

## 해조류 첨가가 쌀코지 제조와 효소활성에 미치는 영향

전준영 · 이미향<sup>1</sup> · 정인학<sup>1</sup> · 정민정 · 김병목\*

한국식품연구원, <sup>1</sup>강릉원주대학교 해양식품공학과

### Effects of Seaweeds on Rice Koji Production and Enzyme Activity

Joon-Young Jun, Mi-Hyang Lee<sup>1</sup>, In-Hak Jeong<sup>1</sup>, Min-Jeong Jung and Byoung-Mok Kim\*

Division of Strategic Food Research, Korea Food Research Institute, Gangneung 25440, Korea

<sup>1</sup>Department of Marine Food Science and Technology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

This study investigated the effects of selected seaweeds on rice koji preparation (rice inoculated with *Aspergillus luchuensis*) and enzyme activity. Four types of rice koji were prepared using one of three seaweeds (0.5% laver, 0.5% kelp and 0.5% green laver) or a control for 72 h. The changes in the moisture content, water activity, pH, total mold cell count, amylase and protease activities were measured. During preparation, there was no significant difference in the moisture content among the four kojis, whereas the pH in the kojis made with either laver or green laver decreased rapidly compared with the control ( $P < 0.05$ ). This seemed to result from the seaweeds promoting the growth of mold cells. In terms of the activities of both amylase and protease, the koji with laver was superior. Subsequently, the amylase and protease activities of the koji made with laver were evaluated at various pHs (3 to 9), temperatures (15-55 °C) and NaCl concentrations (0-10%). The activities of both enzymes decreased notably at pH 9 and the protease activity decreased at temperatures above 45 °C. Although the activities of both enzymes decreased at greater than 2.5% NaCl, activity was present at 10% NaCl.

Key words: Rice koji, *Aspergillus luchuensis*, Seaweed, Enzyme activity, NaCl

### 서론

해조류는 육상의 일반 야채류와 마찬가지로 단백질, 지질, 탄수화물 등 일반 영양성분을 함유하고 있는 것은 물론, 육상 야채류에 비하면 다양한 종류의 미네랄을 풍부하게 함유하고 있다(Mok et al., 2005). 해조류는 비타민 및 미네랄 중 마그네슘, 칼슘, 요오드, 철 등의 함량이 높고 그 중에서도 미역, 다시마, 파래 등에 함유되어 있는 다당류는 항암, 항종양 및 면역 활성화와 고혈압 예방 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Kim and Lyu, 2010). 해조류의 국내 산업적 이용현황을 살펴보면 전통적으로 식용하여 왔던 건재제품과 염장품이 주류를 이루고 있으며, 일부는 식품 첨가물의 원료로 이용되고 있으나, 대부분 미비하게 가공되고 있는 실정이다(Lim, 2008; Park et al., 2007).

코지(koji)는 쌀, 콩 등에 유용 미생물을 접종 배양한 효소제(또는 발효제)로 전분 혹은 단백질을 가수분해할 수 있는 것을 말한다. 술 제조에는 쌀이, 간장제조에는 콩이 주로 이용되고 있으며, 전분질 분해용으로서의 입국은 백국을 주로 사용하고 있다

(Kim et al., 2012). 백국균이라 불리는 *Aspergillus luchuensis* (syn. *A. kawachii*)는 *Aspergillus niger*의 변이균으로 내산성 amylase, maltase의 활성이 강력하고, *A. oryzae*에 비해 유기산 생성력이 높아 pH를 낮추는 특징이 있어 술과 음료 등의 제조에 이용된다(Kim et al., 2013). 코지는 곰팡이에 의하여 생성된 amylase와 protease를 함유하고 있어 원료 중의 전분과 단백질을 발효성 당과 아미노산으로 전환하는 역할을 한다(So and Lee, 2010).

코지와 관련된 연구로는 쌀품종을 달리한 입국의 제조 및 막걸리의 품질특성(Kwon et al., 2013), 현미코지를 이용한 쌀된장의 특성(Lee et al., 2011), 비지코지 첨가에 따른 양조간장의 발효 중 이화학적 특성 평가(Song and Lee, 2013), 버섯균 현미코지를 이용한 약주 제조특성(Kim et al., 2015b), 코지를 이용한 seed mash의 이화학적 특성(Lee et al., 2005), *Aspergillus* 속 곰팡이를 이용한 액체종국 제조 및 밀누룩의 품질특성(Choi et al., 2011), soybean koji와 rice koji를 첨가하여 발효한 도루묵 액젓의 상온 저장 중 이화학적 품질변화(Jun et al., 2016),

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0369>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 51(4) 369-375, August 2018

Received 14 May 2018; Revised 7 June 2018; Accepted 19 June 2018

\*Corresponding author: Tel: +82. 33. 643. 8042 Fax: +82. 33. 643. 8039

E-mail address: bmkim@kfri.re.kr

*Aspergillus kawachii* 코지를 이용한 홍게 어간장의 제조 및 품질변화(Kim et al., 2015a) 등 다양한 발효식품 제조분야에 대한 응용연구가 활발히 이루어지고 있으나, 코지를 개량하거나 개량된 코지의 적용분야 평가를 위한 효소특성에 관한 연구는 미흡하다. 앞서 기술한 바와 같이 다양한 영양성분을 함유하고 있는 해조류를 접목하여 코지를 제조하는 것은 코지를 사용하는 응용(발효)제품의 영양학적 가치를 높일 수 있는 방법이며, 좋은 코지 개량방법이 될 수 있다.

이에 본 연구에서는 대표적 식용 해조류인 김(*Pyropia yezoensis*), 다시마(*Saccharina japonica*), 파래(*Enteromorpha* sp.) 각각을 쌀코지 제조시 첨가하여 제조과정 중 amylase 및 protease 활성변화를 조사하였고, 효소활성이 가장 우수하다 판단된 해조류 첨가 코지로부터 얻어진 조효소액의 pH, 온도, NaCl 농도에 따른 amylase 및 protease 활성 변화를 시험하였다. 본 연구 결과는 새로운 형태의 효소제를 개발하거나 이것을 응용하기 위한 기초 자료로 활용 될 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 종균

쌀은 2016년 그해 재배된 것을 강릉시 사천농협으로부터 구입하여 사용하였다. 종균으로 사용된 *Aspergillus luchuensis*는 포자 분말로 된 것을 (주)충무발효(Ulsan, Republic of Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 김과 다시마는 건조된 상태로 강릉시 중앙시장에서 구입하였고, 코지제조에 사용하기전 가정용 블랜더로 분쇄 후 40 mesh체에 내려 사용하였다. 파래는 온라인몰을 통하여 분말로 된 것을 구입하여 사용하였다.

### 쌀코지 제조

쌀코지는 Jun et al. (2016)의 방법을 응용하여 제조하였다. 즉, 원료미(1 kg)를 충분히 수세하고 16시간 동안 실온에서 침지 불림하였고, 40분동안 물 빼기 후 3종의 해조류 분말 각각을 불리기전 쌀 중량 대비 0.5% (w/w)가 되도록 첨가하고 골고루 섞어주었다. 대조구는 해조류를 첨가하지 않은 것을 말한다. 해조류 첨가 후 고압멸균기 105℃에서 40분간 증기로 익혀 고두밥을 만들었고, UV살균처리된 클린벤치에 만들어진 고두밥을 넓게 펼쳐 실온이 될 때까지 식혔으며, 여기에 원료 쌀 무게 대비 0.2%에 해당하는 종균 *A. luchuensis* 포자 분말을 3회로 나누어 골고루 접종하였다. 접종된 쌀은 발효기를 사용하여 일정한 상대습도(85%)와 온도(30℃)를 유지하여 72시간동안 배양하여 제조하였다.

### 시료의 수집 및 조효소액 추출

72시간동안 12시간 간격으로 시료 100 g 가량을 수집하였고, 수집된 시료는 수분, 수분활성도, pH 및 곰팡이 수 측정과 효소 활성 평가를 위한 조효소 추출에 사용되었다. 조효소 추출방법

은 다음과 같다. 시료 20 g과 탈이온수 100 mL를 혼합한 뒤 약 1분간 균질하였고, 30℃ 항온수조에서 30분간 진탕 처리하였다. 이후 원심분리(10,000 g, 4℃, 10분)하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

### 수분함량 및 수분활성도

수분함량은 상압가열건조법(AOAC, 2005)으로 측정하였다. 수분활성도 측정을 위해, 시료는 수집 후 즉시 일회용 측정용기에 5 g을 칭량하여 커버를 닫고 20℃에서 약 1시간가량 정지시켰고, 수분활성도 측정기(HP23-AW-A, Rotronic, Switzerland)를 사용하여 수분활성도를 측정하였다.

### pH 및 곰팡이 수

pH 측정을 위해, 시료 5 g과 탈이온수 45 mL를 혼합한 후 약 1분간 균질하였고, 원심분리(7,000 g, 15분)하여 얻은 상등액을 pH meter (CH/Seven Easy-s20K, Mettler Toledo, Switzerland)로 측정하였다. 곰팡이 수는 표준평판법(Park and Oh, 1995)으로 측정하였다. 시료 20 g과 멸균된 희석수 0.1% peptone water 180 mL를 멸균시료백에 담고 균질(260 rpm, 5분)하였고, 균질된 시료액을 동일한 희석수를 사용하여 십진법으로 적절하게 희석하였다. 희석된 시료액 1 mL는 potato dextrose agar (Difco; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)에 도말하였고, 28℃에서 72시간 배양한 뒤 생성된 colony 수(15-150)를 계수하여 log CFU/g으로 나타내었다.

### Amylase 활성

코지 시료내 amylase 활성은 Bechman et al. (2012)이 제안한 3,5-dinitrosalicylic acid 법을 약간 변형하여 측정하였다. 0.1 M acetate buffer (pH 5.0)에 1% soluble starch를 용해시켜 준비한 기질액 1 mL와 분리된 조효소액 1 mL를 혼합하고 55℃ 항온수조에서 15분간 진탕 반응시켰다. 반응이 끝난 후 즉시 반응액 0.5 mL를 취하였고, 여기에 96 mM 3,5-dinitrosalicylic acid 0.5 mL를 가하여 95℃ 수조에서 5분간 발색시켰다. 그 후 4 mL의 탈이온수를 가한 뒤 실온에서 약 15분간 식혔고, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 maltose의 양은 0.2% maltose를 표준용액으로 사용하여 적절하게 희석한 뒤 위와 동일하게 발색반응 시험을 진행하였고, 측정된 흡광도 값을 이용하여 standard curve를 작성한 후 시료 값을 대입하여 계산하였다. Amylase 활성은 1 g의 코지가 분당 1 mg의 maltose를 생성하는 것을 1 unit (U)으로 나타내었다.

### Protease 활성

Protease 활성은 o-phthalaldehyde 법(Shakerian et al., 2014)을 응용하여 측정하였다. 0.21 M sodium phosphate buffer (pH 8.2)에 용해시킨 0.5% casein 용액 1 mL와 분리된 조효소액 1 mL를 혼합하고 35℃ 항온수조에서 30분간 진탕 반응시켰다. 반응정지를 위해 0.75% trichloroacetic acid 4 mL를 첨가하였

고, 원심분리(7,000 g, 10분)하여 상정액을 얻었다. 상정액 200 µL에 *o*-phthalaldehyde reagent 3 mL를 가하고 약 30초간 혼합함과 동시 정확히 1분 30초 뒤 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 아미노산량은 0.05% serine을 표준물질로 standard curve를 작성하여 계산하였다. Protease 활성은 1 g의 코지가 분당 serine 1 µg을 유리하는 것을 1 U으로 나타내었다. *O*-phthalaldehyde reagent는 *o*-phthalaldehyde 80 mg을 methanol에 용해시킨 뒤 20% SDS 5 mL, 100 mM sodium tetraborate decahydrate 50 mL, 2-mercaptoethanol 300 µL를 순차적으로 가한다음 탈이온수를 사용하여 100 mL로 정용하여 준비하였다. 이 시약은 측정당일 제조하여 사용하였다.

### pH, 온도 및 NaCl 농도가 amylase와 protease 활성에 미치는 영향

효소활성에 영향을 미치는 요인은 다양하지만, 코지의 산업적 적용범위 고려시 가장 크게 영향을 미칠 것으로 예상되는 pH, 온도 및 NaCl 농도를 요인으로 결정하였다. 각 요인의 구간은 pH 3, 5, 7, 9, 온도 15, 25, 35, 45, 55°C, NaCl 농도 0, 2.5, 5, 7.5, 10%로 설정하였다. pH의 조절을 위해 다음의 완충용액들을 제조하여 반응액으로 사용하였다. pH 3, 0.1 M glycine-HCl buffer; pH 5, 0.1 M acetate buffer; pH 7, 0.1 M potassium phosphate buffer; pH 9, 0.1 M tris-HCl buffer. NaCl의 농도는 반응액의 최종농도 기준으로 NaCl을 첨가하여 조절하였다. pH와 온도에 따른 효소활성 변화를 측정하기위해 반응시간(1시간)과 NaCl 농도(0%)를 고정하였고, NaCl 농도에 따른 효소활성 변화를 측정하기위해 반응시간(1시간)과 반응온도(35°C)를 고정하였다. 나머지 조건은 앞서 언급한 amylase와 protease 활성 측정 방법과 동일하다.

### 통계분석

모든 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었고, 평균값들 사이 유의적 차이는 IBM SPSS statistics program (Version 23;

IBM Co., Amork, NY, USA)을 사용하여 one-way ANOVA 방법에 따라 유의수준 95%에서 Tukey's test에 의해 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 수분함량 및 수분활성도

해조류 첨가농도 결정을 위한 예비실험결과, 0.1-1% 첨가 농도 별(72시간 배양) 각 코지로부터 분리된 조효소의 amylase와 protease 활성은 김, 다시마, 파래 모두 0.5% 첨가시 가장 높게 나타났다(data not shown). 이 결과를 바탕으로 본 연구에서는 각 해조류 첨가농도를 0.5%로 동일하게 설정하였고, 종균 접종 후 배양하는 동안 각 코지의 수분함량 및 수분활성도에 대한 경시적인 변화를 Table 1로 나타내었다. 배양시간이 경과함에 따라 수분함량 및 수분활성도는 모든 구에서 수직적으로 감소되었고, 수분함량의 경우 다시마 첨가구가, 수분활성도의 경우 파래 첨가구가 각각 다른 구들에 비해 빠르게 감소되는 것처럼 보였다. 하지만, 수분함량에서 배양 72시간동안 대조구와 모든 시험구사이 통계학적 유의성은 없었다(P<0.05). 수분활성도는 종균의 증식 및 균사체의 형성에 영향을 미치는 주요 인자로 *Aspergillus* 속의 경우 수분활성도 0.65가 균사체 형성의 한계선으로 보고된 바 있으며(Stevenson et al., 2015), 72시간 경과 후 모든 구의 수분함량은 22.1-27.1%, 수분활성도는 0.78-0.84 범위에 있었다.

### pH 및 곰팡이 수

일본의 큐슈 남부지역에서 shochu 생산시 사용되는 *A. kawachii*의 경우 쌀을 당화하는 과정에서 다량의 유기산을 생성하여 pH를 산성화(약 pH 3.0)하는데 기여하는 것으로 알려져 있으며, 이 가운데 citric acid가 대부분을 차지한다(Mikami et al., 1987; Nagamine et al., 2003). Kim et al. (2013)이 보고한 쌀코지 당화액내 유기산 결과에서는 *A. oryzae*를 접종한 경우 citric acid, malic acid, lactic acid (dominant) 등이 생성되었

Table 1. Changes in the moisture content and water activity of the rice kojis with different seaweeds during solid-state fermentation

Incubation time (h)	Control		Laver <i>Pyropia yezoensis</i>		Kelp <i>Saccharina japonica</i>		Green laver <i>Enteromorpha sp.</i>	
	Moisture (%)	Water activity	Moisture (%)	Water activity	Moisture (%)	Water activity	Moisture (%)	Water activity
0	43.6±6.9 <sup>A * ns †</sup>	0.98±0.01 <sup>A ns</sup>	49.5±3.6 <sup>A</sup>	0.98±0.01 <sup>A</sup>	43.2±9.5 <sup>A</sup>	0.96±0.01 <sup>A</sup>	39.1±3.6 <sup>A</sup>	0.99±0.01 <sup>A</sup>
12	40.3±7.5 <sup>AB ns</sup>	0.95±0.03 <sup>AB ns</sup>	46.4±6.6 <sup>AB</sup>	0.98±0.01 <sup>A</sup>	42.0±2.6 <sup>A</sup>	0.97±0.01 <sup>A</sup>	32.4±5.8 <sup>AB</sup>	0.99±0.01 <sup>A</sup>
24	31.3±4.3 <sup>ABC ns</sup>	0.89±0.02 <sup>ABC a ‡</sup>	40.0±6.0 <sup>ABC</sup>	0.91±0.02 <sup>B a</sup>	32.3±2.8 <sup>AB</sup>	0.90±0.02 <sup>AB a</sup>	31.4±6.2 <sup>AB</sup>	0.84±0.01 <sup>B b</sup>
36	29.3±1.1 <sup>ABC ns</sup>	0.88±0.05 <sup>ABC ns</sup>	36.0±9.6 <sup>ABC</sup>	0.87±0.03 <sup>BC</sup>	24.7±9.5 <sup>B</sup>	0.90±0.05 <sup>AB</sup>	28.1±3.4 <sup>AB</sup>	0.83±0.01 <sup>B</sup>
48	27.4±6.8 <sup>BC ns</sup>	0.85±0.08 <sup>BC ns</sup>	31.7±4.5 <sup>BC</sup>	0.84±0.01 <sup>CD</sup>	24.8±6.7 <sup>B</sup>	0.88±0.03 <sup>B</sup>	28.3±6.0 <sup>AB</sup>	0.79±0.02 <sup>C</sup>
60	26.0±1.3 <sup>BC ns</sup>	0.81±0.01 <sup>C bc</sup>	29.1±3.2 <sup>C</sup>	0.83±0.01 <sup>CD ab</sup>	23.7±2.6 <sup>B</sup>	0.86±0.02 <sup>B a</sup>	26.3±3.7 <sup>AB</sup>	0.79±0.01 <sup>C c</sup>
72	25.7±3.6 <sup>C ns</sup>	0.81±0.01 <sup>C ab</sup>	27.1±5.5 <sup>C</sup>	0.82±0.02 <sup>D ab</sup>	22.1±2.1 <sup>B</sup>	0.84±0.03 <sup>B a</sup>	24.2±5.5 <sup>B</sup>	0.78±0.01 <sup>C b</sup>

\*The different capital letters indicate significantly different values in the vertical column (P<0.05). †No significant difference in the horizontal column (P<0.05). ‡The different small letters indicate significantly different values in the horizontal column (P<0.05). Data expressed as the mean±SD in triplicate.

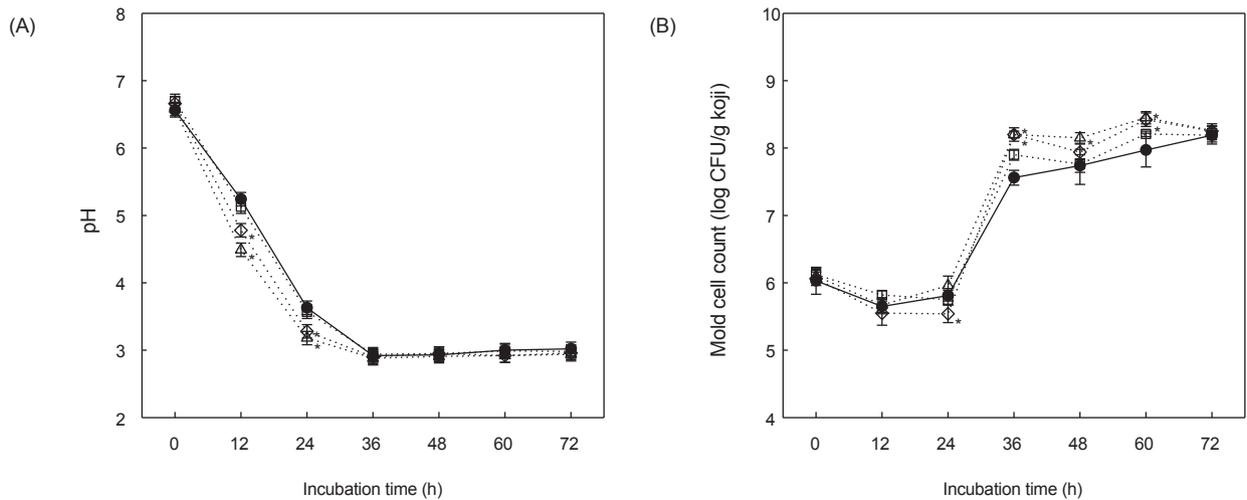


Fig. 1. Changes in the pH and mold cell count of the rice koji with different seaweeds during solid-state fermentation. Symbols indicate: ●, control (without seaweed); △, Laver *Pyropia yezoensis*; □, Kelp *Saccharina japonica*; ◇, Green laver *Enteromorpha* sp. \*Significant difference at  $P < 0.05$  versus the control (ANOVA). Data expressed as the mean  $\pm$  SD in triplicate.

고, *A. kawachii*를 접종한 경우 다량의 citric acid, succinic acid와 소량의 oxalic acid가 생성되었다. 총 생성량은 후자의 균주 접종시 훨씬 높았고, 이것은 pH 감소에 영향을 미쳤다.

본 연구에서 나타난 pH와 곰팡이 수의 경시적인 변화는 Fig. 1로 나타내었다. 초기 pH는 해조 첨가 유무 및 종류에 관계없이 유사한 수준(pH 6.6-6.7)으로 나타났고, 모든 구에서 동일하게 배양 36시간째 최저 pH(2.8 부근)에 도달하였다. 하지만, 배양 12시간과 24시간째 결과에서 김과 파래 첨가구가 대조구와 다시마 첨가구에 비해 유의적으로 낮게 나타나( $P < 0.05$ ) 이 시간대에서 빠른 pH 감소를 보였다. 증자된 쌀에 종균을 약 0.2% (w/w)가량 접종시 초기 곰팡이 수는 약 6 log CFU/g (wet basis)으로 나타났고, 모든 구에서 약 24시간동안 초기균수가 유지되는 유도기가 관찰되었다. 이후 배양 36시간째 곰팡이 수는 모든 구에서 급격하게 증가하였고, 대조구에서 약 7.6 log CFU/g로 나타난 것에 비해 김과 파래 첨가구의 곰팡이 수는 유의적인 차이를 보이며 약 8.2 log CFU/g까지 증가하였다( $P < 0.05$ ). pH의 감소는 배양 12시간전부터 일어난 것으로 예상된 반면, 곰팡이 수는 이 시간대에서 유도기를 가졌는데, 이것은 곰팡이의 life cycle을 생각하면 잘 해석된다. 균사체를 형성하는 곰팡이의 경우 일반적인 세균과 달리 균사체, 분생자병 형성을 거쳐 포자를 생성한 후에 퍼져서 증식하기 때문에 유도기가 있는 것처럼 보이며, 퍼진 포자의 발아가 일어난 이후 급격한 증식이 나타나고, 곰팡이유래 효소의 경우 대부분 균사체에서 생성되므로(Madigan and Martinko, 2006), 김과 파래첨가시 단축된 pH의 감소는 이 두 해조의 첨가가 곰팡이 자실체의 생성 및 유기산을 생성하는데 긍정적인 영향을 미친 결과로 예상된다.

#### Amylase 및 protease 활성

코지제조를 위해 소요되는 배양시간은 원료의 종류, 소화정도, 종균의 종류, 접종농도 및 배양조건 등 다양한 요인에 의해 달라질 수 있으며, 응용하고자 하는 사용 목적에 따라 효소활성이 최대가 되는 지점에 맞춰 그 기간을 정하게 된다. 종균의 종류는 다르지만 Bechman et al. (2012)의 보고에 따르면, 증자된 쌀에 *A. oryzae*를 접종한 경우 배양 약 58시간이 변곡점으로  $\alpha$ -amylase의 활성이 감소하였다. 이들의 결과를 기준으로 배양시간 최대를 72시간으로 정하였으나, 본 연구에서 나타난 amylase 활성은 실제 배양 72시간까지 지속적으로 증가하였다(Fig. 2A). Amylase 활성은 해조류 첨가 유무에 따라 배양 36시간에서부터 유의적인 차이를 보였고, 해조류 첨가구 모두 대조구에 비해 높게 나타났다( $P < 0.05$ ). 특히, 김과 파래 첨가구의 경우 배양 36시간부터 72시간까지 대조구와 현저한 차이를 유지하였고( $P < 0.05$ ), 최대 amylase 활성 평균값은 코지 1g당 김 첨가구 1,740 U, 파래 첨가구 1,733 U, 다시마 첨가구 1,586 U, 대조구 1,378 U 순으로 각각 나타났다.

Amylase 활성은 배양 72시간동안 지속적인 증가를 보인데 반해, protease 활성은 대조구를 포함한 모든 시험구에서 배양 36시간을 중심으로 활성이 유지되거나 감소된 것으로 나타났다(Fig. 2B). 해조류 첨가 유무에 따라 김과 파래 첨가구의 경우 배양 24시간에서부터 대조구와 유의적인 차이를 나타내었고, 특히 김 첨가구의 경우 배양 36시간째 가장 높은 활성을 나타내었다( $P < 0.05$ ). 쌀품종에 따라 다르지만 일반적인 도정을 거친 쌀에는 건조중량 기준 약 7%미만의 단백질과 90%이상의 탄수화물이 존재하는데(Choi, 2010), 본 실험에서 protease의 활성이 amylase 활성에 비해 상대적으로 낮은 것은 기질로 사용된 쌀이 가진 영양성분 비율의 차이에서 기인된 결과로 예상되었다. *Aspergillus* 속으로부터 다양한 효소들이 분리되어 상업적으로

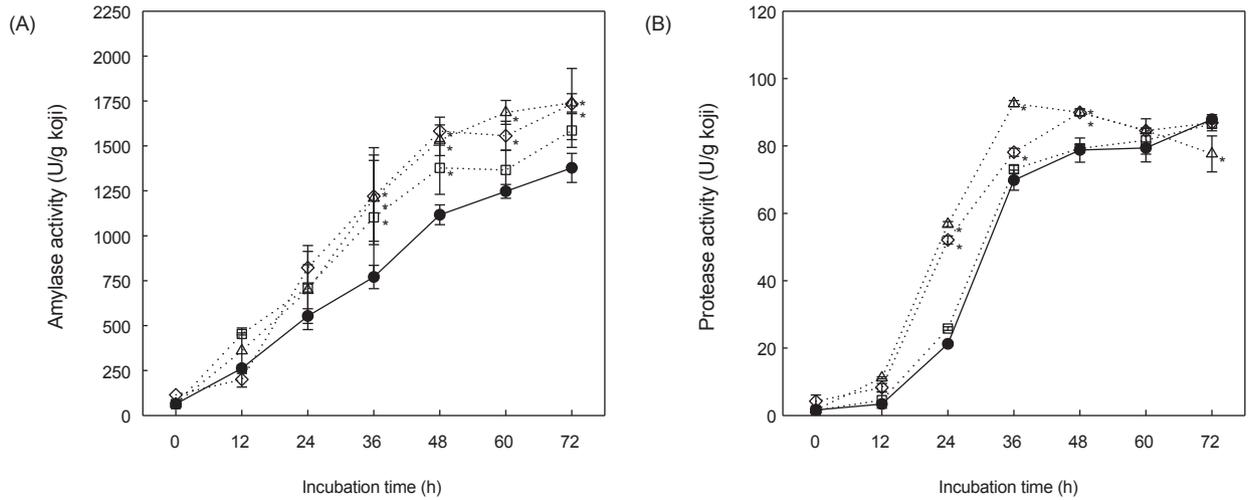


Fig. 2. Changes in the amylase and protease activities of the rice kojis with different seaweeds during solid-state fermentation. Symbols indicate: ●, control (without seaweed); △, Laver *Pyropia yezoensis*; □, Kelp *Saccharina japonica*; ◇, Green laver *Enteromorpha* sp. One unit of amylase activity was defined as the one milligram of maltose released from 1% soluble starch per a minute. One unit of protease activity was defined as the one microgram of leucine released from 0.5% casein per a minute. \*Significant difference at P<0.05 versus the control (ANOVA). Data expressed as the mean±SD in triplicate.

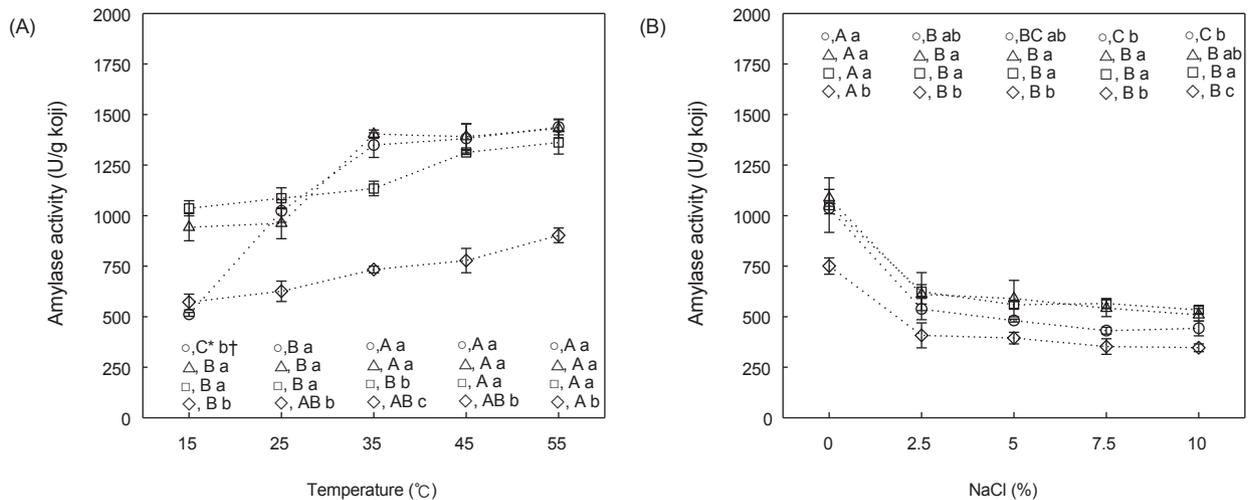


Fig. 3. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the amylase activity of the rice koji with 0.5% Laver *Pyropia yezoensis*. Symbols indicate: ○, pH 3; △, pH 5; □, pH 7; ◇, pH 9. One unit of amylase activity was defined as the one milligram of maltose released from 1% soluble starch per a minute. \*The different capital letters indicate significantly different values in the horizontal column (P<0.05). †The different small letters indicate significantly different values in the vertical column (P<0.05). Data expressed as the mean±SD in triplicate.

이용되고 있으며, 이 가운데 일부 산성화 발효환경에서 산내성을 가지는  $\alpha$ -amylase 및 protease 등이 분리된 바 있다(Mikami et al., 1987; Siala et al., 2009). 본 연구결과에서 protease 활성은 초기 pH가 감소함에 따라 활성은 증가하여 어느정도 산내성을 가지는 것으로 예상되었지만, 배양 36시간 이후 활성이 감소함에 따라 과도한 산생성이 protease 활성을 저해할 수 있다는 점이 시사되었다.

현재까지 결과를 종합하면, 코지 제조과정에서 김 첨가는 대조구 및 다시마 첨가구에 비해 pH 감소시간을 단축시켰고, 코지내 곰팡이 수 및 효소활성 증가에 보다 긍정적인 영향을 주었다. 이것은 김 첨가 방법이 코지를 개량하는 좋은 방법이 될 수 있다는 것을 보여주는 것이며, 배양시간은 protease 활성 감소 시간대를 고려하여 48시간 이내로 배양하는 것이 적절한 것으로 사료된다.

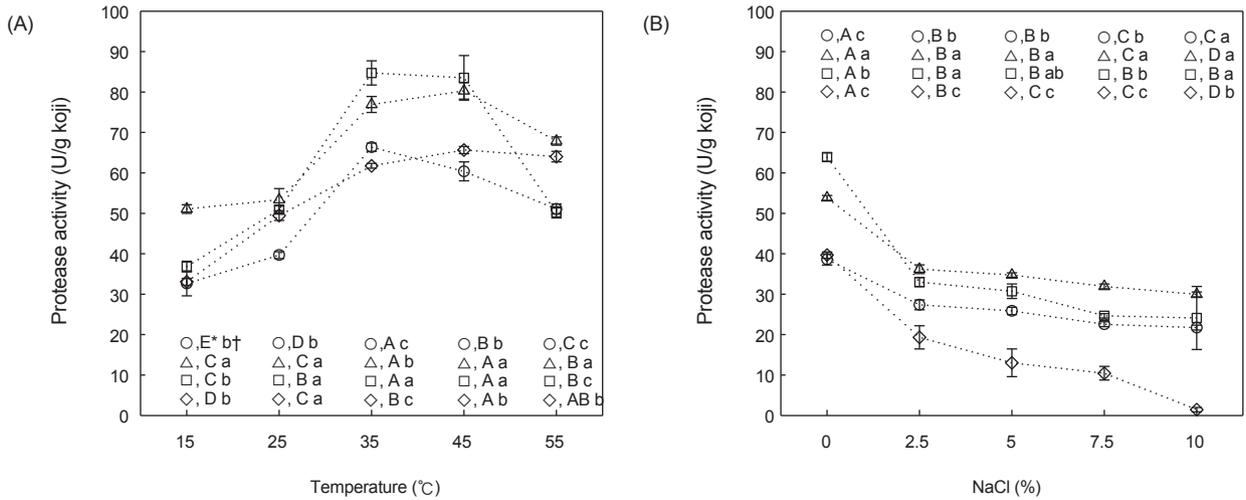


Fig. 4. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the protease activity of the rice koji with 0.5% Laver *Pyropia yezoensis*. Symbols indicate: ○, pH 3; △, pH 5; □, pH 7; ◇, pH 9. One unit of protease activity was defined as the one microgram of leucine released from 0.5% casein per a minute. \*The different capital letters indicate significantly different values in the horizontal column (P<0.05). †The different small letters indicate significantly different values in the vertical column (P<0.05). Data expressed as the mean±SD in triplicate.

**pH, 온도 및 NaCl 농도가 amylase 활성에 미치는 영향**

pH, 온도 및 NaCl 농도가 코지의 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 앞선 결과에서 가장 효소활성이 높았던 것으로 나타난 0.5% 김 첨가, 배양 48시간 조건에서 코지를 제조하였고, 조효소 분리 후 다양한 pH, 온도 및 NaCl 농도에서 amylase 활성변화를 측정하였다(Fig. 3). 그 결과, pH 3-9, 온도 15-55 °C 반응조건에서 나타난 amylase 활성은 온도보다 pH에 더 큰 영향을 받는 것처럼 보였고, 주어진 모든 pH 조건에서 온도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 경향을 보였다. pH 9에서 amylase 활성은 모든 온도조건에서 다른 pH에 비해 활성이 크게 낮았다. 각 온도 별 amylase 활성을 살펴보면, 15 °C에서는 pH 5와 7의 반응구가 pH 3과 9에서 보다 유의적으로 높았고, 25 °C, 45 °C, 55 °C에서는 pH 3, 5, 7사이 유의적인 차이가 없었다(P<0.05). NaCl 농도 0-10%범위에서 amylase 활성은 모든 pH 조건에서 NaCl 농도 2.5%부터 크게 감소하였고, 이 감소된 활성은 NaCl 농도 10%까지 그대로 유지되었다. 다시 말하면, amylase 활성은 특정 pH 영역에서 NaCl의 농도에 의해 더 큰 영향을 받았다고 보다 전반적으로 일정하게 감소하였고, pH 9의 경우 주어진 모든 NaCl 농도에서 pH 5와 7의 반응구 보다 유의적으로 낮은 활성을 나타내었다(P<0.05).

**pH, 온도 및 NaCl 농도가 protease 활성에 미치는 영향**

동일한 pH 및 온도조건에서 protease 활성은 amylase 활성과 다른 양상을 보였다(Fig. 4). Amylase 활성은 온도가 증가함에

따라 증가하였던 반면, protease 활성은 pH 9를 제외한 다른 pH 반응구에서 35-45 °C 사이 최대활성을 나타내었고, 이 구간을 중심으로 온도가 낮거나 높을 경우 활성은 감소하였다. 온도 별 protease 활성을 살펴보면, 15 °C에서는 pH 5의 반응구가 pH 3, 7, 9에 비해 유의적으로 높았고, 25 °C에서는 pH 3의 반응구가 pH 5, 7, 9에 비해 유의적으로 낮았다(P<0.05). 35 °C와 45 °C에서는 pH 5와 7의 반응구가 pH 3과 9보다 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05). NaCl 농도에 따른 protease 활성은 pH 9의 반응구를 제외하고 amylase 활성과 유사하게 나타났다. pH 9의 경우 NaCl 농도가 증가함에 따라 감소하였다.

결론적으로, amylase 및 protease 활성을 기준으로 발효식품에 쌀코지를 적용할 경우 pH 9 이상을 요구하는 환경에서는 효과적인 효소 활성을 기대하기 어려우며, 특히, 단백질 분해 목적일 경우 35 °C 부근의 발효환경이 요구된다. 또한, 염을 첨가하는 경우에는 염 첨가 전에 코지를 첨가해야 효소활성을 극대화할 수 있을 것으로 예상된다. 흥미롭게도 식염 첨가에 의해 쌀코지의 amylase 및 protease 활성은 감소하였지만, 10%가량의 고농도 NaCl 환경에서도 두 효소활성이 일정수준 유지되어 식염을 첨가하는 다양한 발효식품에 적용 가능성이 확인되었다.

**사 사**

이 논문은 한국식품연구원 주요사업(E0156404-02)의 지원으로 수행된 연구이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

**References**

AOAC. 2005. AOAC official methods of analysis, 18th ed.

- AOAC International publishing, Gaithersburg, MD, U.S.A.
- Bechman A, Phillips RD and Chen J. 2012. Changes in selected physical property and enzyme activity of rice and barley koji during fermentation and storage. *J Food Sci* 77, M318-M322. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02691.x>.
- Choi I. 2010. Physicochemical properties of rice cultivars with different amylose contents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39, 1313-1319. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.9.1313>.
- Choi JS, Jung ST, Kim JY, Choi JH, Choi HS and Yeo SH. 2011. Quality characteristics of wheat nuruk and optimum condition of liquid starters for *Aspergillus* sp. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39, 357-363.
- Jun JY, Lim YS, Lee MH, Kim BM and Jeong IH. 2016. Changes in the physicochemical quality of sailfin sandfish *Arctoscopus japonicus* sauces fermented with soybean koji or rice koji during storage at room temperature. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 101-108. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0101>.
- Kim BM, Lim JH, Jung JH, Jung MJ, Kim DS, Lee KP, Jun JY and Jeong IH. 2015a. Quality changes and processing of fermented red snow crab *Chionoecetes japonicus* sauce using *Aspergillus kawachii* koji. *Korean J Fish Aquat Sci* 48, 644-654. <http://doi.org/10.5657/KFAS.2015.0644>.
- Kim JS, Lee JH, Chang YE, Kim GC and Kim KM. 2013. The quality characteristics of rice mash by mixing ratios of rice and rice koji. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42, 2035-2041. <http://doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.12.2035>.
- Kim JH, Kwon YH, Lee AR, Kim HR and Ahn BH. 2012. Manufacture of koji using fungi isolation from nuruk and identification of koji molds. *Kor J Mycol* 40, 187-190. <http://doi.org/10.4489/KJM.2012.40.4.187>.
- Kim MJ, Kim YH, Kim DW, Park HS and Kim MK. 2015b. Brewing and quality characteristics of rice-wine using *Ba-sidionmycetes* rice koji. *J Agric Life Sci* 46, 24-32.
- Kim HS and Lyu ES. 2010. Optimization of sulgidduk with green laver powder using a response surface methodology. *Korean J Food Cook Sci* 26, 54-61.
- Kwon YH, Lee AR, Kim HR, Kim JH and Ahn BH. 2013. Quality properties of makgeolli brewed with various rice and koji. *Korean J Food Sci Technol* 45, 70-76. <http://doi.org/10.9721/KJFST.2013.45.1.70>.
- Lee MK, Park JK and Lee SK. 2005. The physicochemical properties of seed mash prepared with koji. *Korean J Food Sci Technol* 37, 199-205.
- Lee SE, Suh HJ and Hwang JH. 2011. Characteristics of rice doenjang prepared with brown rice koji. *Korean J Food Preserv* 18, 859-868. <http://dx.doi.org/10.11002/kjfp.2011.18.6.859>.
- Lim EJ. 2008. Quality characteristics of cookies with added *Enteromorpha intestinalis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 21, 300-305.
- Medigan MT and Martinko JM. 2006. Brock biology of microorganisms, 11th edn. Pearson Education Inc, NJ, U.S.A., 470-471.
- Mikami S, Iwano K, Shinoki S and Shimada T. 1987. Purification and some properties of acid-stable  $\alpha$ -amylases from shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *Agric Biol Chem* 51, 2495-2501. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.51.2495>.
- Mok JS, Park HY and Kim JH. 2005. Trace metal contents and safety evaluation of major edible seaweeds from Korean coast. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34, 1464-1470.
- Nagamine K, Murashima K, Kato T, Shimoi H and Ito K. 2003. Mode of  $\alpha$ -amylase production by the shochu koji mold *Aspergillus kawachii*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 2194-2202. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2194>.
- Park JM and Oh HI. 1995. Changes in microflora and enzyme activities of traditional kochujang meju during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 27, 56-62.
- Park YK, Kang SG, Jung ST, Kim DH, Kim SJ, Pak JI, Kim CH, Rhim JW and Kim JM. 2007. Development of value-added products using seaweeds. *J Mar Biosci Biotechnol* 2, 133-141.
- Siala R, Sellami-Kamoun A, Hajji M, Abid I, Gharsallah N and Nasri M. 2009. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II: purification and characterization. *Afr J Biotechnol* 8, 4582-4589.
- So MH and Lee YS. 2010. Effects of culture conditions of rhizopus sp. ZB9 on the production of protease during preparation of rice koji. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 23, 399-404.
- Song YC and Lee SP. 2013. Evaluation in physicochemical properties of soy sauce fortified with soymilk residue (okara koji). *Korean J Food Preserv* 20, 818-826. <http://doi.org/10.11002/kjfp.2013.20.6.818>.
- Shakerian M, Razavi SH, Khodaiyan F, Zial SA, Yarmand MS and Moayedi A. 2014. Effect of different levels of fat and inulin on the microbial growth and metabolites in probiotic yogurt containing nonviable. *Int J Food Sci Technol* 49, 261-268. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12315>.
- Stevenson A, Cray JA, Williams JP, Santos R, Sahay R, Neuenkirchen N et al. 2015. Is there a common water-activity limit for the three domains of life? *ISME J* 9, 1333-1351. <http://doi.org/10.1038/ismej.2014.219>.