

(뒷면)

(앞면)

발간등록번호

11-1543000-000758-01

미생물을 활용한 고부가가치 저염 장류제품 개발

농림축산식품부

미생물을 활용한 고부가가치  
저염 장류제품 개발

(Development of High Value-added  
Low-Salt Soy Products for  
microorganism(Sam Sam-Soy  
Products Project))

순창군장류사업소

농림축산식품부

주 의  
(편집순서 8)

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미생물을 활용한 고부가가치 저염 장류제품 개발” 과제(세부과제 “Pilot plant 적용 Test, 품질특성분석” 협동과제 “발효미생물 분리동정, 발효미생물 균주관리보존 시스템 구축” “전통장류로부터 곰팡이, 세균 그리고 효모의 총체적인 분리 및 발효미생물의 최적배양시스템 구축” “산업적 적용 및 시제품 생산”)의 보고서로 제출합니다.

2014년 10 월 28 일

주관연구기관명 : 순창군장류사업소

주관연구책임자 : 정 도 연

세부연구책임자 : 정 도 연(세부1)

협동연구기관명 : (사)한국미생물보존센터

협동연구책임자 : 박 정 민(협동1)

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 백 상 호(협동2)

협동연구기관명 : (농)순창장류(주)

협동연구책임자 : 김 중 필(협동3)

# 요 약 문

## I. 제 목

미생물을 활용한 고부가가치 저염 장류 제품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 기술적 측면

저염 장류 생산은 장류 숙성동안 알코올 생산 효모 균주의 도입, 젖산균의 도입, 항균 물질을 함유하는 향신료의 첨가 등이 있으나 된장, 간장, 고추장의 고유 향을 유지하면서 저염 상태에서 부패균에 대해 강한 항균 특성 (*B. subtilis*의 bacitracin, surfactin, iturins 그리고 *B. licheniformis*의 lichenysin, lichenicidin 등은 이와 같은 펩타이드계 저분자 물질)을 지닌 장류 발효균(*B. subtilis*, *Aspergillus oryzae*)의 사용이 가장 좋은 선택 중에 하나로 여겨지고 있다.

사전연구에 의하면, 표준 균주들과 전통 장류에서 분리한 *B. cereus* 12종을 대상으로 한 증식 억제 효과에서, 저해 정도에 차이는 있었으나 12 종 모두 장류 우수 발효 균주로 선발한 *Bacillus* SCK 121057의 항균 물질에 의해 저해를 받았음. 이러한 점을 고려할 때 장류 발효균으로 SCK 121057과 같은 *B. cereus* 저해균의 사용은 HACCP 시스템의 도입이 어려운 장류 업체에서 오염문제를 해결할 수 있고 저염시 문제되는 *B. cereus*의 이상 증식도 억제할 수 있는 효과적 대안으로 여겨지고 있다.

SCK 121057 균을 장류 주요 발효 균주들로 분리한 다른 *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 각 6종을 대상으로 저해 효과를 확인한 결과 *B. licheniformis*에 대해서는 전혀 증식 저해를 보이지 않았으며, *B. subtilis*들에 대해서는 모두 증식이 억제되었다. 이 항균 물질은 또한 효모인 *Candida albicans*를 제외하고 aflatoxin과 ochratoxin을 생산하는 *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* 곰팡이들에 대해 항진균 특성을 나타내 매우 효율적인 균주제어수단이 될 수 있음을 강력히 시사하고 있다.

전통 장류 발효 시 mycotoxins의 생성은 위생상 중요한 문제이고 이들 독소들은 간암이나 신장 독성을 유발할 수 있기 때문에 항진균 효과를 가진 이 균의 사용은 숙성과정에서 위생 발효를 위해 가치가 있을 것으로 예상/ 또한 이 항균 물질은 병원성 세균으로서 저염 시 부패에 관여하는 *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus*에 대한 저해 능력이 있었고 특히 식중독과 염증 반응에 중요한 병원성 균인 *S. aureus*의 5 균주 증식을 확실히 억제하였음. 이와 함께 전북 순창 인근 지역에서 전통 제조 방식으로 생산한 메주의 균총 분포에 대한 pyrosequencing을 최근에 수행하였고 그 결과 배양원으로 벼짚을 사용한 메주의 균총 분포를 보면 된장과 간장 숙성 시 저염도의 상태에서 부패를 일으키는 균들(*Enterococcus durans*, *Staphylococcus warneri*, *Citrobacter freundii*)이 높은 빈도로 존재하고 있음. 따라서 강력한 항균 특성을 지닌 발효 균주를 선택적으로 접종했을 시 저염으로 제조한 된장의 경우라도 숙성기간 동안발효 균주가 우점종이

될 것이므로 이들 부패균들은 성장하지 못할 것으로 기대되어지고 있다.

결과적으로 부패를 야기하는 균들에 대해 강력한 항균 특성을 가진 무독성 발효 균주들을 지역의 장류로부터 분리한 기술과 경험을 가지고 있으나, 전국적인 장류 시료에서의 부패균들에 대해 넓은 항균 스펙트럼을 지닌 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Aspergillus* 균주들을 다수 분리를 통한 보다 우수한 균주의 개발을 실시할 필요가 있다. 또한 항균 특성뿐만 아니라 향미성분이 우수한 균주 및 이와 관련된 생태학적인 특성에 관한 연구도 본 연구에서 지향하는 저염화 장류제품을 개발하는데 있어서 필수적인 요소이다.

전통 고염 고추장의 세균군 microflora의 분포 패턴 분석 결과/ 전통형과 공장형 고추장 12개 시료에서 분리하여 동정된 세균군의 분포 결과를 보면 각각의 시료는 염농도가 11~9%를 함유한 시료로서 모든 시료에서 3속 19종이 동정되었으며 *B. velezensis*가 모든 전통형 시료에서 확인되었고 *B. subtilis* subsp. *subtilis*는 모든 공장형 시료에서 확인할 수 있었다. *B. acidovorans*, *B. benzoborans*, *B. cereus*, *B. cohnii*, *B. megaterium*, *B. safensis*, *S. sp*은 각 고추장 시료 한가지에서만 발견되었는데 분포율이 매우 낮아 고추장의 주요 미생물인지 확인할 수 없었다. 또한 전통형 고추장과 공장형 고추장을 비교한 선행연구에서는, 전통형 고추장에서 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *B. licheniformis*가 주요 균주로 동정되었고 그 외 *Pasteurella* 속이 높은 분포율을 보였으며 공장형 고추장에서는 *B. licheniformis*가 숙성 말기 76% 이상을 나타내었다는 Lee 등의 보고와 순창 전통 고추장 총 29종의 고추장 표본 중 *B. licheniformis*가 주요 미생물이라는 Jin 등의 보고와 상이하였으며 전통형과 공장형 고추장의 발효숙성 시기별 *Bacillus* 속의 분포율을 보고한 한 연구에서 숙성 12개월 후에 *B. subtilis* 46%를 차지하는 전통형 고추장과 *B. licheniformis*가 40% 이상을 보이는 공장형 고추장의 보고와도 상이하였다. DNA 염기서열 분석을 통하여 동정한 결과 *B. velezensis*가 고추장내에서 주요 균주라 할 수 있음. 이러한 결과를 통해 전통장류의 발효에 관여하는 미생물의 생태는 매우 지역에 따라 상이하며 제조방식에 따라서도 각기 다르다는 것을 알수 있었다. 따라서 표준화된 제조방법을 확립하고 이를 통해 저염화 및 향기성분이 우수한 표준장류를 제조하기 위해서는 최종적으로 우수 균주의 선별이 반드시 이루어져야 할 것으로 보여진다.

## 2. 산업적, 사회적 측면

한식의 건강기능성과 장류의 생리기능성이 알려지면서 고기능성 장류 제품이 개발되고 있다. 국내에서도 고염도 식품의 유해성이 알려지면서 염도가 높은 장류 제품의 소비가 제한되고 있다. 전통장류는 메주를 주원료로 사용하고 발효 숙성의 제조 특성 때문에 전통 장류 특유의 향미가 강하고 품질 편차가 커서 국내 시장 확대 및 세계화에 큰 장애가 되고 있다. 따라서, 장류의 저염화 및 그에 따른 향미 보전을 위한 기술개발이 필요할 것으로 보여진다.

고추장 · 된장의 국제식품규격(CODEX, 2009.7) 등록에 따른 세계화식품 육성 : 전통식품의 산업화 · 현대화 촉진 및 글로벌화하여 세계 명품으로 육성시키고자 하는 정부시책에 부합 ⇒ 전통 식품 산업 규모 확대 : ('06)7.4조원 → ('12)10조원되고 있으며, 전통장류는 보존성을 높이기 위하여 통상적으로 높은 농도의 소금을 함유하고 있어 건강에 관심이 많은 소비자들이 기피하는 현상(고혈압 등 성인병의 원인)이 두드러지게 나타나고 있다.

저염 장류제품의 제조 시 필연적으로 발생하는 보존성 문제를 해결하기 위해 다양한 물리적, 화학적 방법들이 연구되어 졌으며, 이중 산업현장에서 적용되고 있는 기술로는 물리적 방법으

로 저온살균 방법(공장산고추장에서 활용)이 있고, 화학적 방법으로 95% 주정처리 및 겨자·고추냉이 첨가 등의 방법(순창장류연구소 특허보유)이 현실화 되어 있다.

하지만 이러한 방법들은 전통장류제품에 염도를 저하시키는데 일부 효과적이거나 맛과 향미의 저하가 필연적으로 수반되어 왔다. 한편, 일본의 경우, 저염화 방법에 미생물관리와 화학적 방법, 물리적 방법을 동시에 전통장류제조공정에 포함시킴으로써 맛과 향미를 향상시키면서도 저염화시키는 기술을 보유하고 있다.

순창전통고추장민속마을 전통된장에 대한 모니터링 조사결과 '08년도에는 평균 14.14%(장류연구사업소-4098호), '09년도에는 평균 14.51%(장류연구사업소-3429호), '10년에는 평균 16.7%(장류식품사업소-917)로 염도가 상승하는 경향을 보였으며, 전체적으로 소금함량이 증가하였다. 순창전통고추장민속마을 전통고추장에 대한 모니터링조사결과, '01년 8.76%, '06년 7.3%, '09년 8.38%(장류연구사업소-1067), '10년 7.08%(장류식품사업소-1144)로 염도가 7%~8% 범위에 포함되었다. 순창전통고추장민속마을 전통간장에 대한 모니터링조사결과, 숙성기간 1년 미만간장의 경우 21.6%, 1년 이상~3년 미만 22.7%, 3년 이상 24.6%로 숙성기간이 길수록 염도가 높아졌다. 공장산 간장의 식염 함량은 평균  $16.5 \pm 2.9\%$ 로 전통간장에 비해 매우 낮았으며, 이러한 이유는 곱팡이 단일발효에 의한 간장생산과 최종제품에 대한 조미공정이 들어가기 때문으로 판단된다.

세계보건기구(WHO)가 권장하는 하루 적정 소금 섭취량은 5 g 이며, 반면 짜고 자극적인 음식을 선호하는 한국 성인의 하루 평균 소금 섭취량은 13.5 g 으로 한국 성인의 소금 섭취량은 세계보건기구 권장량의 3배에 가까운 것으로 알려져 있으며, 한식세계화와 관련 한식당의 맛을 좌우하는 우리나라 고유 전통발효식품을 한식세계화 개념에 맞게 세계인의 입맛에 맞게 변형, 발전시키기 위해서는 전통발효식품의 저염화가 무엇보다 선행되어야 할 것이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. Pilot plant 적용 Test, 품질특성분석

##### 가. 우수균주를 이용한 장류 적용

- (1) 유해균의 억제능이 우수한 발효미생물 메주 적용
- (2) 저염 장류 적용 테스트
- (3) 품질 및 미생물학적 특성 분석

##### 나. 저염 및 고염 장류의 미생물 균집 분석

##### 다. 최종제품에서 컨트롤한 저염 된장 제조

- (1) 천연물을 이용한 저염 된장 제조
- (2) 관내 음식업주 대상으로 한 선호도 조사
- (3) 즉석 저염 된장국 시제품 생산

#### 2. 발효미생물 분리 동정, 발효미생물 균주관리보존시스템 구축

##### 가. 저염 관련 미생물에 대한 총균수 분석 및 동정 분석을 통한 microflora 확인

저염화를 위하여 저염 및 고염 된장, 간장 및 고추장의 다양한 염도조건에서(된장 및 간장; 4.8%, 8.4%, 12%, 15.6%, 19.2%, 고추장; 3%, 6%, 10%, 15%, 20%) 자연 발효기간 중 변화하는 총균수 패턴과 분리 미생물의 16S rRNA sequencing, 18S rRNA sequencing 분석 및 cellular fatty acid 분석에 의한 미생물 동정을 통한 미생물의 패턴을 분석함으로써 장류의 최저 염도를 확인하였다.

나. 저염 장류 및 저염화 미생물의 PCR-RAPD 패턴 비교 분석에 의한 유전체 정보 분석  
저염 장류와 고염 장류의 미생물 microflora 패턴 분석에 의한 염도별 존재하는 발효 미생물 유전체 정보 확인하였다.

##### 다. 저염 및 고염으로 제조된 전통 장류의 향기 성분 분석

다양한 염도 조건의 된장, 간장 및 고추장이 발효기간 중에 변화하는 발효 패턴을 주 발효미생물과 향기분석을 통하여 최적 발효 조건을 확립하였다.

##### 라. 각 세부 및 협동기관에 미생물 정보제공

각 세부과제 분리 미생물의 16S rRNA sequencing 및 18S rRNA sequencing 분석에 의한 미생물 동정을 통해 분리된 연구정보 및 미생물을 각 세부과제에 제공하였다.

##### 마. 균주관리 및 균주특성에 대한 산업적 균주관리보존시스템 구축

각 과제별 분리 미생물의 장기적이고 안정적인 보존 방법을 통해 균주관리를 수행하며, 균주 특성에 관한 정보를 확인하여 관리하도록 하였다.

#### 3. 전통장류로부터 곰팡이, 세균 그리고 효모의 총체적인 분리 및 발효미생물의 최적배양시스템 구축

##### 가. 저염장류 생산에 투입 가능한 산업용 곰팡이, 세균 분리

- (1) 전국 수집 장류 샘플들로부터 저염 발효에 필수적인 부패 억제 항진균 및 항세균 특성을

가지는 *Bacillus subtilis*/*B. licheniformis*, *Lactobacillus*, *Aspergillus oryzae*/*Rhizopus* sp.를 40종 이상 분리

(가) 저염 장류의 부패형성 산막 효모의 증식을 억제하는 11종의 산업용 *Bacillus* 발효 균주의 분리

(나) 저염 장류의 부패에 관여하는 *Staphylococcus* 속의 증식을 억제하는 10종의 *Bacillus* 균주의 분리

(다) 저염장류 부패에 관여하는 *Staphylococcus* 속의 증식을 억제하는 13종의 *Weissella* 균주의 분리

(라) 발효 장류에 사용할 수 있는 11종의 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* 분리

(2) 저염 된장 고추장의 제조 시 주로 존재하는 부패 세균, 효모 및 곰팡이의 분리 및 동정

(가) Pyrosequencing 후 선택 배지에서 배양 및 16 S rRNA, 18S rRNA, ITS1-ITS4영역에 대한 염기 서열로 부패균의 동정(세균, 효모 및 aflatoxin 생산 곰팡이)

(3) 전통 장류와 메주로부터 이들 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 주요 발효 *Bacillus* 및 유산균의 분리 및 동정과 실증 실험으로 검증

(가) 부패균에 대해 길항력을 지닌 *Bacillus* 속 균주 20종과 상업용으로 사용 가능한 5종의 선발(상업용 용도의 균주는, 주로 *Bacillus subtilis* 균주로서 *Bacillus cereus* group이 가지는 독소 무생산, glutamate 고생산 균주, biogenic amine 무생산 및 탁월한 분해능력 균주, *Bacillus cereus* group에 대해 강한 길항력을 가진 균주, 부패균에 대해 강한 길항력을 가진 균주, 빠르게 증식하는 균주, 발효 균주들 사이의 증식에 최소한의 영향을 미치는 균주로 공장 규모의 장류 생산에 즉시 사용할 수 있는 균주임)

(나) 부패균에 대해 길항력을 지닌 *Leuconostoc*, *Weissella* 속 균주 20 종의 분리와 상업용 균주 5종의 선발

(다) 된장 및 고추장 발효용으로 aflatoxin 무생산, protease, amylase 고생산, 빠른 증식 속도, 계대 배양 시 안정된 효소 활성을 유지하는 *Aspergillus oryzae* 균주를 20 균주의 분리. 표준 상업용 균주로 사용하는 충무발효의 *Aspergillus oryzae* 균주 보다 효소활성과 안전성에서 최소한 동등하거나 더 좋은 능력을 지닌 *Aspergillus oryzae* 5균주 이상 선발

(라) 10-20 kg 단위로 제조하는 실증 실험

나. 전통장류로부터 발효 효모 균집분석 및 그로부터 분리된 알코올 발효 및 향미 증진 우수 균주의 분리와 저염화 장류로의 적용

(1) 전통장류 발효기간 별 향미분석 및 발효효모 균집분석

(가) 전통 방식으로 제조된 장류의 발효기간 별 이화학적 특성 및 향미성분 분석

(나) 전통 방식으로 제조된 장류의 발효기간 별 발효효모 균집분석

(2) 전통 장류 유래 고 알코올 생성 및 향미 증진능을 가지는 효모 균주 분리

(가) 전통 장류 유래 알코올 또는 향미 생성 우수효모의 선발

(나) 선발된 우수균주의 분자생물학적 동정, 형태학적 특성 분석 및 최적 성장조건

(3) 신규 고 알코올 생성 효모의 알코올 생성 최적화 조건 검토 및 관련 유전자 획득

(가) 선발된 고 알코올 생성 효모 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 발효 최적조건

(나) *T. delbrueckii* JBCC 623 유래 알코올 관련 유전자의 클로닝과 염기서열 결정

(4) 장류 유래 효모 균주별 특성 비교 분석 및 장류 발효 적합성 평가

- (5) 저염 장류 제조를 위한 선발된 고 알코올 및 향미증진 효모 스타터의 적용
  - (가) 선발된 효모 스타터가 저염 장류의 이화학적 특성에 미치는 영향
  - (나) 선발된 효모 스타터가 저염 장류의 미생물학적 특성에 미치는 영향

다. 발효미생물(세균, 곰팡이, 효모) 최적배양시스템 구축

- (1) 통계적 처리방법을 이용한 발효미생물의 저가 산업용 생산배지 개발
  - (가) 기본 생산배지의 생성물 확인과 비교
    - ① 건조균체량 (D.C.W) 생산량 비교
    - ② protease activity 비교
    - ③ sucrose 함량 분석
    - ④ spore counting 실시
  - (나) OFAT 방법을 이용한 영양원의 선별
  - (다) Plackett-Burman Design을 이용한 중요 영양원 선정
  - (라) Full Factorial Design을 이용한 영양원 간의 상호작용 확인
  - (마) Response surface methodology를 이용한 최적 배지 농도 확립
- (2) 발효미생물 균체의 액상·고상 배양을 위한 최적 발효조건 확립
  - (가) 발효조 배양공정 확립
  - (나) 발효조의 온도, 교반속도, pH, 공기유속조건의 발효조건 확립
  - (다) 최적배지를 이용한 반복회분배양 적용

#### 4. 산업적 적용 및 시제품 생산

주관기관에서 장류제조 시 효모 생성을 억제시켜주는 것으로 밝혀진 균주를 분리한다. 이를 이용하여 메주와 된장, 간장 그리고 고추장을 제조한 후 그 메주와 된장, 간장, 고추장의 품질 특성을 분석하여 순창장류(주)에서 사용하고 있는 균주와 비교한다.

장류시장의 동향 및 소비 트렌드 조사를 통해 장류 구매 시 소비자들이 중요시 하는 속성 및 구매형태 조사와 설문지 작성의 근거자료로써 활용할 수 있는 장류 관련 소비정보를 획득하기 위해 장류구매경험이 있는 소비자들을 조사하였다.

소비자 니즈 분석을 통해 저염 장류제품에 대한 수요존재와 증거가 있을 것으로 예상되므로 이를 제품명과 홍보에 이용하였다. 장류 원산지로 순창의 지역브랜드 가치에 대해 소비자조사를 통해 알아봄으로서 브랜드 활용가능성이 어느 정도인지 가늠해보고, 품질분석과 관능평가를 통해 나온 결과로 시제품을 제작한다.



## IV. 연구개발결과

### 1. Pilot plant 적용 Test, 품질특성분석

우수균주(*B.licheniformis* BAD8)를 이용하여 복발효 메주를 만들고 품질특성을 분석하였다. 메주의 발효 8일째 총질소 함량이 5.39~5.75%의 함량을 나타내었으며, 총유리아미노산, 아미노산성 질소, 프로티아제 활성이 기존에 사용하던 메주에 비해 높았으며, 바이오제닉 아민 함량은 낮고 또한 이 메주를 이용한 간장 맛이 관능검사 순위법에서 제일 높게 보여주어 균주를 참여기업에 적용하도록 하였다.

우수균주를 이용하여 된장과 간장을 염농도에 따라 제조한 결과 효모1종, 유산균1종, 세균1종을 최종 균주로 선발하였다. 본 균주를 활용하여 저염 된장 및 간장을 pilot scale로 제조하여 품질 및 미생물학적 특성을 살펴본 결과 일반 된장과는 차이가 크지 않았다. 또한 식중독 미생물은 검출되지 않았으며, 저염으로 제조한 된장 및 간장을 관능평가 한 결과 풍미 및 전체적인 기호도에서 양호한 판정을 받아 참여기업에게 기술이전 및 시생산을 실시하도록 하였다.

우수균주를 이용하여 저염 고추장을 제조한 결과 품질특성상 염도에 따라 큰 차이는 나지 않았으며, 풍미와 관능평가면에서도 고염장류보다도 양호한 판정을 얻었다.

항균력이 강하고 향미성분이 뛰어난 균주를 혼합스타터로 사용함으로써 장류의 저염화로 야기될 수 있는 맛성분의 변화와 부패미생물의 생육을 방지하여 장류의 저염화가 가능할 수 있게 되었다.

또한 추가연구로 기업체에 바로 적용할 수 있는 최종제품에서 컨트롤 할 수 있는 저염 된장 및 즉석 된장국을 제조하였다. 저염 된장은 작두콩, 고추씨분말 등을 일정한 비율로 된장에 배합하여 관내 음식업주를 대상으로 선호도를 조사한 결과 80%이상의 높은 만족도와 추후 구입 의사를 밝혔다. 또한 즉석 된장국은 기개발된 된장을 이용하여 컵에 물만 부어 식음할 수 있는 즉석 된장국을 개발하여 전통발효식품의 현대화 및 편리화로 경쟁력을 확보할 수 있도록 하였다.

### 2. 발효미생물 분리동정, 발효미생물 균주관리보존시스템 구축

가. 저염 관련 미생물에 대한 총균수 분석 및 동정 분석을 통한 microflora 확인

전통 된장에서는 저염인 4.8%, 8.4%의 총 균수와 균총의 pattern과 12%, 15.6%, 19.2%의 총 균수와 균총의 pattern이 비슷했다. 호기성 세균과 호염성 세균의 경우에는 모든 염도와 전 숙성기간에 7-11 log CFU/g의 높은 수준으로 분리되었다. 호기성 세균과 호염성 세균의 균총은 발효 초기에 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus amyloliquefaciens*가 많은 비중을 차지하고, 발효 후기에 *Bacillus subtilis*가 우점종이 된 반면에, 12%, 15.6%, 19.2% 염도 된장에서는 발효 초기부터 *Bacillus subtilis*가 된장 발효에 큰 관여하였다. 유산균의 총 균수를 보았을 때 4.8%, 8.4% 된장은 숙성 초기까지 유산균이 보였고, 12%, 15.6%, 19.2% 염도 된장에서는 control에서만 유산균의 총 균수가 측정되었다. 곰팡이의 확인된 총 균수를 보면, 저염 된장인 4.8%, 8.4% 된장 시료는 비슷한 총 균수 pattern을 보였는데, 비교적 꾸준히 약 2 log CFU/g 곰팡이가 분리되었고 숙성 12개월에서는 저염 된장에서 곰팡이가 분리되지 않았다.

간장 발효의 경우에는 총 균수의 pattern이 4.8%, 8.4%, 12%, 15.6% 간장에서 거의 유사한 총 균수 분포를 보였고, 19.2% 간장은 약간 다른 미생물 총 균수 분포를 보여주었다. 호기성 세균과 호염성 세균의 경우에는 된장과 마찬가지로 모든 염도와 전 숙성 기간 동안 7-11 log CFU/g의 수준으로 분리 미생물의 큰 비중을 차지하였다. 간장의 호기성 세균과 호염성 세균

은 염도별로 매우 다양하게 나타났다. 유산균이나 곰팡이의 미생물 총 균수 pattern은 모든 염도의 간장 시료에서 유사하게 나타났다. 효모는 된장, 간장에서 모두 숙성이 시작되기 전 control 중에서도 4.8% 염도에서만 약 2 log CFU/g의 낮은 수준의 분포를 보였으며, 그 외의 다른 시료에서는 분리되지 않았고, 전 숙성기간에서도 효모는 발견되지 않았다.

고추장의 경우, 호기성 세균과 호염성 세균은 된장, 간장과 마찬가지로 큰 변화 없이 많은 수준으로 분리되었다. 호염성 세균의 경우, 모든 염도에서 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis*가 큰 비중으로 차지하였다. 유산균은 숙성기간 동안 어떠한 경향성 없이 증감하였다. 고추장 유산균의 우점종을 보면, 모든 염도의 고추장에서 담금 직후인 Control에서는 동일하게 *Lactobacillus brevis*이 우점종이었으며, 숙성 1개월 이후에 모든 염도의 시료에서 균주가 분리가 되었던 유산균을 동정해 보았을 때, *Lactobacillus fructivorans*가 가장 많이 확인되었다. 효모 또한 유산균과 마찬가지로 총균수에 대한 편차가 심했다. 곰팡이는 가장 염도가 낮은 3% 고추장에서만 숙성 3개월까지 곰팡이가 분리되었으며, 나머지 6%, 10%, 15%, 20% 염도 고추장에서는 숙성 1개월부터 곰팡이가 분리되지 않았다.

#### 나. 저염 고추장 미생물의 PCR-RAPD 패턴 비교 분석에 의한 유전체 정보 분석

숙성이 되면서 고추장의 전체 미생물 군집이 염도의 영향을 얼마나 받는지 보기 위하여, 같은 숙성 기간 내 염도 별 고추장 시료 각각에 대해 전체 DNA를 추출하여 random primer를 통한 RAPD-PCR 증폭을 수행한 후, DNA 단편 양상에 대해 Fingerprinting II Informatix software를 이용하여 UPGMA dendrogram을 나타내어 비교하였다. 숙성 직후, 1개월, 2개월인 숙성 초기에는 3%, 6% 염도 고추장이 가까운 유연관계로 한 그룹으로 구분되고, 10%, 15%, 20% 염도 고추장이 또 다른 그룹으로 구분되었다. 고추장의 초기 발효 미생물 군집과 상관성이 있을 것으로 보이며, 숙성 3개월에는 숙성 4개월에는 모든 염도의 시료가 상대적으로 높은 유사도 값을 가졌다. 숙성 5개월에는 염도의 차이가 클수록 유사도가 낮아지는 경향을 보였다. 숙성 후기인 10개월에는 다시 3%, 6% 염도 고추장이 가까운 유연관계로 한 그룹으로 구분되고, 10%, 15%, 20% 염도 고추장이 또 다른 그룹으로 구분되었다. UPGMA dendrogram에서 10%, 15%, 20% 염도 고추장끼리는 아주 가까운 유연관계를 가지는 반면에, 염의 첨가량이 적은 3%와 6% 염도 고추장의 두 시료의 미생물 군집끼리 가까운 유연관계를 가졌다. 염도가 낮은 3%와 6% 염도 고추장에서는 미생물의 생육을 저해하는 염의 양이 적었기 때문에, 숙성이 될수록 식품을 부패시키는 미생물의 생장이 일어난 것으로 사료되며, 부패 미생물의 DNA 단편이 고염 고추장과는 먼 유연관계를 나타내는 역할을 한 것으로 판단된다.

#### 다. 저염 및 고염으로 제조된 전통 장류의 향기 성분 분석

된장의 주요 향기성분은 저염 시료에서 aldehydes, alcohols, acids가 발효 초기부터 발효 3개월까지 많이 확인되었고, 발효가 진행됨에 따라 시료들 간의 격차는 점차 감소하였다. 또한, 저염 시료에서 발효 6개월부터 다양한 pyrazine이 형성되었다. 간장의 향기성분은 된장과 마찬가지로 저염화 시료에서 발효초기부터 발효 3개월까지 aldehydes, alcohols, acids가 높은 수준으로 확인되었다. 향미뿐만 아니라, 앞서 보았던 형태학적 특징과 미생물학적 특징을 고려하여, 일반적인 전통 장류보다 염도가 낮은 12% 장류가 일반적인 15-20% 염도의 전통 장류의 특성과 크게 다르지 않는 것으로 보아, 염도 12%까지 낮춘 저염 장류는 된장 및 간장의 장기간 발효에 문제가 없을 것으로 생각된다. 고추장의 향기성분은 alcohol류의 ethanol, ester류의 ethyl

acetate와 3-methyl-1-butyl acetate, ketone류의 3-hydroxy-2-butanone, acid류의 acetic acid가 주요한 성분으로 확인되었다. Ethanol은 10%와 15%에서 많이 검출되었고, ethyl acetate는 3%, 6%, 10% 염도 고추장에서 상대적으로 높게 나타났으며, 반대로 발효유의 중요한 향기성분인 3-hydroxy-2-butanone은 염도가 높아질수록 높은 비율로 검출되었다. 3-Methyl-1-butyl acetate와 acetic acid는 저염 고추장에서 매우 높은 수치로 검출되었다. 일반적인 고추장의 미생물 패턴을 함께 고려하였을 때, 고추장은 10%까지 염도를 낮출 수 있을 것으로 사료된다.

#### 라. 균주관리 및 균주특성에 대한 산업적 균주관리보존시스템 구축

각 과제별 분리된 미생물의 동결건조 및 초저온 동결보존을 통하여 미생물의 안전한 보존을 수행하였으며, 발효기간 중에 분리된 미생물의 동정 결과를 균주 관리시스템에 등록하여 균주 정보를 공유할 수 있도록 구축하였다.

### 3. 전통장류로부터 곰팡이, 세균 그리고 효모의 총체적인 분리 및 발효미생물의 최적배양시스템 구축

#### 가. 저염 장류 생산에 투입 가능한 산업용 곰팡이, 세균 분리

(1) 저염 장류 생산에서 부패 병원성 증식 억제 능력을 가지는 항균 *Bacillus* 균주를 분리하고, 이들 균주들 중 저염 장류 생산에 안전성 확보와 풍미를 유지하기 위해 biogenic amines 분해 특성, protease 및 amylase 고생산, glutamate 고생산 특성을 지니는 균주의 분리했으며, 저염 장류 생산에 biogenic amine, aflatoxin을 생산하지 않으며 protease 및 amylase를 고생산하는 *Aspergillus oryzae*를 분리했다. 그 결과 전통 장류로부터 저염 장류 생산 시 문제되는 부패 유해 균주에 대해 항균 특성을 지닌 *Bacillus licheniformis* 25 종(국제 특허 출원균주 1종 포함)분리 및 aflatoxin 비생산, 고 protease 및 고 amylase 생산, biogenic amine을 생산하지 않는 *Aspergillus oryzae* 9종을 분리했음.

(2) 저염 장류의 부패형성 산막 효모의 증식을 억제하는 11종의 산업용 *Bacillus* 발효 균주의 분리. 저염 장류에서 부패형성 산막 효모의 순수 분리와 부패억제 *Bacillus* 균의 동정 및 paper disc assay에 의한 억제능 관찰했음. 8% 저염 장류에서 형성된 산막효모의 분리 및 동정한 결과 *Pichia kudriavzevii* 또는 *Candida xyloperoci*로 밝혀졌음. 이 산막 효모의 생성을 억제하는 우수 발효 *Bacillus* 균들을 동정한 결과 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. methylotrophicus*로 밝혀졌음.

(3) 저염 장류의 부패에 관여하는 부패세균의 증식을 pyrosequencing을 통해 분석하였고, 이 세균들을 억제하는 10종의 *Bacillus* 균주를 분리. 저염 장류에서 부패를 유발하는 세균을 순수 분리하고 동정한 결과 *Staphylococcus saprophyticus*와 *S. warneri*로 동정되었음. 8% 저염 장류에 냄새를 유발하는 이 병원성 세균들을 대상으로 발효균인 *Bacillus* 균을 사용 paper disc assay에 의한 억제능을 관찰했음.

(4) 저염 장류 부패에 관여하는 *Staphylococcus* 속의 증식을 억제하는 13종의 *Weissella* 균주의 분리한 결과 *Weissella cibaria*, *W. confusa*, *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되었음. 장류에서 다수의 저산생성 유산균인 *Weissella*, *Leuconostoc*을 분리하고 이 균들의 biogenic amine 생성량 및 분해능, glutamic acid 생성량을 관찰하여 13종을 최종 분리. 장류에서 유산균인 *Weissella*, *Leuconostoc* 균주를 사용, paper disc를 통한 *Staphylococcus* 속 균주의 억제능을 관찰.

(5) 발효 장류에 사용할 수 있는 11종의 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* 분리. Aflatoxin 생성능, Protease 및 amylase 생산, 증식 속도의 비교에 의한 균주를 선발 했음. Coconut milk 배지에 의한 aflatoxin 유무 검출, amylase, protease 생산 유도 배지를 사용하여 halo 관찰. 비교를 위해 표준 균주로 상용화된 충무발효 균주를 사용하여 비교했음.

(6) 전통 장류로부터 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 주요 발효 *Bacillus* 분리 및 동정을 위해 선발 균주들의 유해균 억제능과 amylase, protease 활성 및 glutamate 생성능에 대한 분석결과와 biogenic amine 분해율,  $\gamma$ -PGA와 발효취 분석에서 상대적으로 우수한 최종 균주 *Bacillus subtilis* 11종, *Bacillus amyloliquefaciens* 1종, *Bacillus methylotrophicus* 8종으로 총 20종을 분리 선발하였음.

(7) 전통 장류와 메주로부터 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 유산균을 분리하고 동정했음. 이를 위해 BCP가 첨가된 MRS agar배지에서 colony 주위가 노란색으로 변하며, dextran 생성 배지에서 Dextran을 생성하는 lactic acid bacteria를 1차적으로 선발하였음. 선발된 균주들을 다시 Enterococcosel agar배지에 계대 배양하여 colony 주위가 검게 변하는 균주들을 제거하여 최종적으로 *Enterococcus*가 제거된 110개의 lactic acid bacteria를 선발하였음. 선발된 균주들 중 다종의 부패균에 길항작용을 가지는 균주 20개 균주를 선발하였고, 이들 20개 균주는 11 종의 부패균에 각각 다른 길항 능력을 나타냈으며, 저염 장류에서 분리한 *Enterococcus lactis*에 대해서는 선발된 20개 균주 모두 길항 능력을 보이지 않았음. HPLC를 이용한 biogenic amine 분해 균주 선발했고 분석 결과 균주에 따라 biogenic amines의 분해율은 차이가 있었으며, 한 균주에서 biogenic amine에 따른 분해율 또한 차이가 있었음. Tyramine은 최소 28%, 최대 50%를 분해하는 균주가 있었으며, Histamine은 최소 26%, 최대 65%를 분해하는 균주가 있었음. 전자현미경을 통해 형태학적 관찰 결과 전형적인 구균의 형태를 보였으며, 16S rRNA 염기서열을 통한 동정 결과 20개의 선발된 균주들 중 *Leuconostoc mesenteroides* 12개 균주로 가장 많았으며, *Weissella cibaria*가 7개의 균주, *Weissella confusa* 1개 균주로 동정되었음.

(8) 전통 장류와 메주로부터 저염 장류 제조에 상업적 용도로 사용할 수 있는 곰팡이 분리 및 동정했음. 총 92종의 시료로부터 154종의 곰팡이 균주를 분리했음. *Aspergillus oryzae* 균주를 분리하기 위해 형태학적으로 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속에 속하는 균주를 구별하기 위해 현미경 관찰을 통해 *Aspergillus*속과 *Penicillium* 속을 구별했음. Coconut 배지를 이용하여 aflatoxin 생성 여부를 확인했음. coconut 배지에서 aflatoxin을 생성하는 균주는 UV로 조사한 경우 *Aspergillus flavus*와 같이 aflatoxin에 의해 형광을 나타내기 때문에 형광의 발색여부로 aflatoxin 생성 여부를 확인했음. 그 결과 *Aspergillus*속에 속하면서 Aflatoxin을 생성하지 않는 *Aspergillus oryzae* 30종을 최종 분리하였음. 고체 배지 조건에서 분리 균주에 대한 Protease 및 Amylase 활성은 SCIM3 균주의 경우 분리한 균주 중 가장 높은 Protease 활성 능력을 가졌으며 Reference균주를 비롯한 타 균주에 비해 차이 폭이 컸음. 반면 Amylase 활성 능력은 Reference균주가 가장 우수했으며 SCIM19, SCIM20, SCIM21 균주가 Reference 균주보다 낮지만 전반적으로 분리 균주 중 가장 우수한 Amylase 활성 능력을 보였음. 전반적으로 Protease 활성 능력과 Amylase 활성 능력 모두에서 우수한 균주는 나타나지 않았지만 SCIM3, SCIM29 균주의 경우 전반적으로 모두 우수한 편에 속하였음. 액체 배지 조건에서 Amylase 활성 측정 결과 SCIM12 균주가 가장 높은 Amylase 활성을 가진 것으로 나타났고 또한 고체배지 상에서 전반적으로 활성이 높았던 SCIM29 균주도 우수한 활성을 가졌음. 선발 균주의 유전학적

동정을 위해 18S rRNA와 28S rRNA의 부분 서열을 포함하는 ITS 영역의 유전자 염기서열을 동정하였고 선발된 균주의 염기서열 분석결과 *Aspergillus oryzae*와 99% 일치한 것으로 나타났다.

나. 전통장류로부터 발효 효모 균집분석 및 그로부터 분리된 알코올 발효 및 향미 증진 우수 균주의 분리와 저염화 장류로의 적용

전통 장류의 전반적인 발효기간 동안 효모 미생물 균집과 향미 성분의 변화를 살펴보았다. 발효기간 동안 효모의 생균수는  $4.56 \times 10^3$ 에서  $9.06 \times 10^5$ 으로 지속적으로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 *Candida*, *Pichia* 및 *Rhodotorula* 균주가 전반적인 발효기간 동안 우점화 되어 있다는 것을 알 수 있었다. 반면 *Debaryomyces*, *Microbotryum*, *Tetrapisispora*, *Torulasporea*, *Wickerhamomyces*, *Zygosaccharomyces* 효모는 열세종으로 검출되었다. 또한 장류의 발효기간 동안 수행된 향미분석 결과, 장류의 초기단계에는 상대적으로 높은 함량의 alcohol류를 포함하였고, 발효가 진행됨에 따라서 점점 휘발성 acid류의 함량이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 더욱이 본 연구에서는 이러한 장류의 발효기간 동안 분리된 효모 균주로부터, 높은 함량의 알코올을 생성하는 *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623 균주와 높은 함량의 3-methyl-1-butanol을 생성하는 *Pichia guilliermondii* JBCC 848 효모 균주를 분리하였다. 장류의 각기 다른 발효 단계로부터 선발된 이 두 효모는 최종적으로 장류의 저염화로 발생될 수 있는 미생물학적 및 이화학적 변화를 조절하기 위한 스타터 균주로서 적용하였다. 즉, 다른 농도의 염을 함유하는 장류는 선발된 효모 균주의 단일 균주 또는 혼합균주 형태로 접종함으로써 발효한 후 염농도 및 스타터 종류별로 발효된 장류의 이화학적 및 미생물학적 변화의 차이를 살펴보았다. 그 결과, 효모 스타터를 적용한 모든 장류에서 염 농도의 저하로 인한 부패균인 *Staphylococcus* 및 *Enterococcus* sp. 균주를 저해 할 수 있었다. 더욱이 두가지 선발 효모를 단일 균주로 접종한 저염 발효 장류와 비교하여 혼합 균주로 접종한 발효 장류의 경우, 고염 발효 장류와 가장 유사한 향미 성분을 함유하는 것으로 나타나왔다. 즉, 본 연구로부터 분리된 고 알코올 생성 효모 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주와 향미 증진능 효모 *P. guilliermondii* JBCC 848 균주의 혼합 스타터를 사용함으로써 장류를 저염화로 인해 야기되는 향미 변화와 부패 미생물의 생육을 저해할 수 있다는 것을 확인하였다.

다. 발효미생물 균체 대량생산 scale-up 배양 공정에 대비한 저가의 산업용 복합 생산 배지 개발/ 발효미생물 균체의 액상·고상 배양을 위한 최적 발효조 확립

미생물의 산업적 생산을 위해서 생산 배지의 최적화 및 배양 조건의 확립은 필수적이다. 본 연구에서는 다양한 통계적 방법을 이용하여 반응 최적 조건을 결정하며, 대량 생산을 위해 실험실 규모의 발효조에서 발효 조건을 확립하였다. 그 결과, *Bacillus licheniformis* SCK 121057의 균체량과 protease를 위한 최적배지 조성은 Galactose 17.26 g/L, Yeast extract 27.76 g/L,  $K_2HPO_4$  2 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4 g/L,  $Na_2CO_3$  0.25 g/L,  $CaCl_2$  0.01 g/L 로 선정되었다. 또한 최적생산배지를 이용하여 발효조에서 최적발효조건 선정실험 결과, 배양온도, 교반속도, 공기유속과 pH는 각각 42 °C, 200 rpm, 2 vvm, pH 8로 선정되었다. 이 때의 균체량과 protease는 7.24 g/L와 240.06 U/mL로 확인하였다. *B. licheniformis* BaDB 8 균주는 균체량과 protease의 최대 생산을 위한 생산배지 최적화 실험 결과, 최적배지 조성은 glucose 19.85 g/L, soybean meal 10 g/L,  $K_2HPO_4$  1.55 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4 g/L,  $Na_2CO_3$  0.05 g/L,  $CaCl_2$  0.01 g/L 으로

설정할 수 있었다. 또한 *Zygosaccharomyces bailii* KCCM 101021 균주가 에탄올을 최대한 생산하기 위한 생산배지 최적화 실험을 진행하였다. 그 결과 최적 배지의 조성은 glucose:fructose(4:1) 102.87 g/L, yeast extract 10.63 g/L, Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> 1.66 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.06g/L일 때 에탄올을 24.92g/L 생산하는 것을 확인 할 수 있었다. *Z. rouxii* KCCM 100971의 최적 배지 성분은 glucose 158; yeast extract 13.6 g/L MgSO<sub>4</sub> 2.04 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g/L 로 확인 되었고, 에탄올이 54.26 g/L생산 되었고, 발효조건은 29℃, pH 5 and 200 rpm로 확인했다. 마지막으로 본 연구는 *B. licheniformis* SCK 121057와 *Z. rouxii* KCCM를 반복회분 배양을 해본 결과, 장기간 발효 하여도 안정하다는 결론을 얻을 수 있었다.

#### 4. 산업적 적용 및 시제품 생산

우수한 균주를 선정하여 선정된 균주(*Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus licheniformis* SCKB11)와 기존에 사용하고 있는 균주(충무발효 종균 + *Bacillus licheniformis* SCC125037) 선정된 균주와 기존에 사용하고 있는 균주를 혼합한 균주((충무발효 종균 + *Bacillus licheniformis* SCC125037 ) + (*Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus licheniformis* SCK B11))를 된장과 간장을 저염과 고염으로 제조한 후 그 된장, 간장의 품질특성과 관능평가를 통해 분석하였다. 분석해본 결과 선정된 균주를 이용하여 제조한 저염 된장과 선정된 균주와 기존사용하고 있는 균주를 혼합한 균주로 제조한 저염 간장이 가장 우수한 특성을 보여 시제품으로 제작하였다.

고추장 제국에 사용된 곰팡이 균주는 충무발효(주)의 종균과 세균은 *Bacillus licheniformis* SRCM100027(대조구)과 1세부기관에서 제공 받은 *Bacillus subtilis* SCKB1307을 사용하여 4%, 8%, 12% 고추장을 제조하였다. 제조한 후 품질분석과 관능평가를 한 결과 4% 저염 고추장 중에서 대조구와 *Bacillus subtilis* SCKB1307을 사용한 균주가 가장 우수한 특성을 보여 고추장 시제품을 제작하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. Pilot plant 적용 Test, 품질특성분석

#### 가. 기술적 측면

- (1) 저염 장류 제조기술 확보
- (2) 저염 장류 관련 미생물 공급 가능
- (3) 천연소재를 활용한 저염 된장 개발 기술 확보
- (4) 발굴한 우수균주를 활용한 장류 제조공정 및 지표 확립

#### 나. 경제적 측면

- (1) 우수 균주를 활용한 장류의 홈쇼핑 판매를 통한 매출 확보
- (2) 참여기업 매출 증대

#### 다. 성과

- (1) 기술이전 및 사업화 7건  
(저염된장, 저염간장, 메주, 무염청국장, 단기숙성간장, 시래기즉석된장국, 저염고추장)
- (2) 교육 지도 12건
- (3) 정책활용 2건
  - 전통식품 개념 재정립 및 품목별 표준 규격 개정
  - 정책건의 : 가공식품 나트륨 저감화 가이드라인 설정
- (4) 특허 7건 출원, 1건 등록
- (5) 학회 발표

### 2. 발효미생물 분리동정, 발효미생물 균주관리보존시스템 구축

가. 전통 발효 식품의 저염화와 관련된 발효 미생물의 Microflora를 확인함으로써 전통 식품의 과학적 기반을 마련 할 수 있는 기반을 제공함.

나. 전통 발효 식품의 microflora중 장류의 저염화 시 전통 식품의 상품성 및 보존성을 증진 시킬 수 있을 것으로 예상 되는 microflora를 제시함.

다. 전통 발효 식품으로부터 분리된 우수한 발효 미생물의 활용을 통하여 전통 장류의 품질 안정성을 유지 할 수 있도록 함.

### 3. 전통장류로부터 곰팡이, 세균 그리고 효모의 총체적인 분리 및 발효미생물의 최적배양시스템 구축

본 연구결과 관련 특허 8건, SCI 논문 6건, 국내 비SCI 논문 4편의 게재, 3건의 유전자원 등록 및 22건의 학술발표를 추진하였음.

### 4. 산업적 적용 및 시제품 생산

연구개발을 통해 저염 제품 선호라는 소비 트렌드에 발 맞추기 위한 장류업계의 다양한 노

력을 하고 있으나. 이는 일부 대규모기업이나 일본의 기술개발에 의한 것이며 전통, 한식 장류를 제조하는 중소기업체에 적용하기에는 기술적, 자본적 한계를 가질 수밖에 없다.

저염 장류제품을 중소기업체에 적용하기 위한 가장 유효한 방법은 이상발효 미생물을 억제할 수 있는 우수 종균을 보급하거나 기술과 인력이 부족한 제조업체에게는 메주나 된장, 간장을 공급하는 방법을 고려할 수 있을 것이다.

본 연구 과제를 통해 이러한 한계를 극복할 수 있는 메주나 된장, 간장, 고추장 제품을 제조하여 시제품을 만들어 상품화 시켜 중소기업체에 공급함으로써 변화하는 시장 환경에 대응할 수 있도록 했다.



# SUMMARY

## I. Title of Research

Development of High Value-added Low-Salt Soy Products for microorganism  
(Sam Sam-Soy Products Project)

## II. The purpose and necessity for research and development

As health functionality Korean foods and physiologic effect of pastes become renowned, high-functionality paste products are developed. Also in Korea, the consumption of high-salt soybean products is limited as people realize the harm of high-salted foods.

The main ingredient of traditional soybean products is *meju*. Their unique smell and wide variation in quality due to the distinctive fermentation aged production are obstacles for the expansion of domestic market and globalization. Therefore, efforts to make low-salted soybean products while maintaining their flavor are needed.

The *World Health Organization* (WHO) suggests to limit daily intake of salt to 5 g, while average Korean adult's intake of salt is 13.5 g which is near three times of the suggestion. The problem here is, unlike Western people who intake most of sodium from processed food, Koreans take the half of salt from traditional diet like kimchi and soybean products. Korea Food & Drug Administration states *kimchi*(25%), soybean products (22%), and salt (20%) as the major sources of salt intake and warned that 'Without traditional diet halved current sodium contents, the risk of the occurrence of high-blood pressure and stomach cancer cannot be lowered.' Moreover, recently, Korea Food & Drug Administration decided to legislate for nutrition sign of pastes and leads the revision of related laws collecting opinions of soybean products association and consumer's association. This is to mark the amount of salt on soybean products which containing a lot of salt. Korea Food & Drug Administration is running campaign for limiting salt intake. Major food businesses including *ourhome* entered to research for lowering salt contents and join the campaign.

Referring findings of a research group at St. George Univ. London, UK, BBC reported that 'Children eat salty tend to drink more soda containing sugar and more likely to become obese children.' In this report, the researcher emphasized that 'to eradicate child obesity which is one of the serious social problems, parents should figure out how to reduce salt content of child's meal and food businesses also should consider the way to reduce salt content of their products.'

Traditional fermentation food determine the flavor of a Korean restaurant's most of dishes. Lowering the salt content of the traditional fermentation food should be preceded than any other for the globalization for Korean food. A report shows Koreans are the heaviest

consumer of salt. This is due to *kmchi*, salted food, and soybean products which are main dishes of every day meals. Many adult disease and chronic disease increase by high salt intake and lowering of salt in Korean food is required.

Consumers concerning health avoid traditional pastes because of high salt contents to increase their preservability. The high salt content is regarded as one of major factors brings high blood pressure and other adult disease. For preservability, which is an inevitable issue for lower sodium soybean products, many physical, chemical methods have been studied. Among these methods, for physical method, low temperature pasteurization is used for factory-made *gochujang*. For chemical method, 95% distillery process and addition of mustard and horseradish is used currently. However, these methods are only partially effective for the lowering salt of traditional soybean products and lowered taste or flavor is accompanies. That is, whole new approach is needed to lower salt content and improve the quality of traditional soybean products by controlling spoilage microorganism now. In this study, the overall separation of mold, bacteria, and yeast from traditional soybean products was performed and from this, systemized microorganism database related to traditional soybean products was built with separation identification.

Additionally, not only for the finding of these microorganisms but also for the establishment of optimized condition for fermenter operation for mass production of the new superb microorganism body was sought. The goal of this study were to 1) obtain the new superb microorganism body, 2) apply them to ready-operational Pilot plant in *sunchang* and obtain high quality, low salt, enhanced flavor *meju* (*doenjang* and *gochujang*), 3) produce the processed food using this *meju* and examine the characteristics of each product., and 4) apply to industry.

### III. The result of Research and Development

#### 1. Application Pilot Plant Test and Quality Characteristics

Two-step fermentation *meju* was produced with superb stain (*B.licheniformis* BAD8) and quality characteristic was analyzed. The total nitrogen content at the 8th day of the fermentation of *meju* was 5.39–5.75%, and activity of total free amino acid, amino acid nitrogen, protease activity was higher than existing *meju*. Biogenic amine content was low and the taste of soy sauce using this *meju* scored the highest with a sensory test. Therefore the stain was chosen to be applied to participated company.

Yeast 1, lactobacillus 1, and bacteria 1 were selected as final strains by the result of soybean products with each salt concentration. Low-salt *doenjang* and soy sauce pilot produced with these strain. However, quality and microorganism characteristics were indifferent with typical *doenjang*. Food pathogens was not found and scored fine in sensory test so technique transfer and pilot production were carried out.

Low-salted *gochujang* with superb strain showed negligible difference with salt concentration and scored higher than high-salted *gochujang* for overall taste and flavor. Therefore, by using the strain with stronger antibacterial activity and flavor ingredient as a mixed starter, the change of flavor ingredient and the growth of spoilage microorganism could be prevented, and lowering of salt content of paste was achievable.

Additionally, low-salted *doenjang* and instant *doenjang* soup was produced which are directly applicable to industry by performing additional research. The low-salted *doenjang* was made by mixing horse bean, chili seed powder in a certain proportion. The survey result from restaurants owners within near area showed satisfaction over 80% and intension of purchase. And the instant *doenjang* soup using the *doenjang* developed could be cooked simply by pouring hot water into a cup which was intended to secure competitiveness traditional fermentation food by modernization and facilitation.

#### 2. Identification and isolation of food fermented microorganisms and establish of their control and preservation system

The fermented food in Korea is one of major korean food, and a traditional *jang* of the fermented food is the most important for seasoning. However, high salinity of a traditional *jang* is an issue for reason of health. So, identifying the lowest salinity of a traditional *jang*, changes in microflora, flavor and physicochemical properties with five different salt concentrations during fermentation periods were analyzed.

In the case of *doenjang*, the viable cell numbers of aerobic bacteria and halophile bacteria showed a steady increase from all sample during fermentation period. The major bacterial species in low-salted *doenjang* sample were *Bacillus licheniformis* and *B. amyloliquefaciens*. The viable cells numbers of fungi were identified at small amount in all

samples. The main Volatile Flavor compounds were aldehydes, alcohols and acids in low salt samples from control to 3 month of fermentation periods. Various pyrazines were detected in low-salted *doenjang* as fermentation continues.

In the case of *ganjang*, the viable cell numbers of aerobic and halophilic bacteria showed no noticeable changes. The major bacterial species were *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, and *B. subtilis* like *doenjang* sample. As fermentation continues, various species of bacteria were identified. Lactic acid bacteria was detected only in control (0 month), and yeast was identified only in 4.8% salted *ganjang*. The viable cells numbers of fungi were identified at small amount in all samples like *doenjang*. In like manner *doenjang*, the main Volatile Flavor compounds were aldehydes, alcohols, and acids in low salt samples from control to 3 month of fermentation periods.

In the case of *gochujang*, the viable cell numbers of aerobic and halophile bacteria did not show noticeable changes during fermentation. The major bacterial species were identified *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* regardless of Salinity of *gochujang*. But the isolated bacteria in 3%, 6% salted *gochujang* were identified as more diversity of species. The viable cell numbers of lactic acid bacteria was showed much higher spreads during fermentation. The viable cell numbers of yeast was showed much higher spreads like lactic acid bacteria during fermentation. The viable cells numbers of fungi were identified at small amount in all samples like *doenjang* and *ganjang*. The main Volatile Flavor compounds were 3-Methyl-1-butyl acetate of ester group and acetic acid of acid group in low-salted *gochujang*. However, 3-hydroxy-2-butanone in ketone group was detected as main aroma in 10 and 15% salted *gochujang*.

### **3. The overall isolation of fungi, bacteria and yeast strains from traditional soy products, and the construction of optimal culture system of microorganisms**

#### **A. Isolation of industrial fungi and bacteria for the production of low-salted soybean products**

In order to inhibit the growth of pathogens and degrade biogenic amines during the fermentation of soybean products, an isolate with antimicrobial activity against pathogens and biogenic amine-degrading property was obtained from 83 traditionally fermented soybean products. The morphological and biochemical tests and the phylogenetic relationship among 16S rRNA gene sequences indicated that the isolates were most closely related to *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* or *B. amyloliquefaciens*. The cell-free supernatant of two day cultures was active against several pathogens including *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytosis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. PCR analysis was conducted to determine relatedness to antimicrobial lantibiotics and biosurfactants produced by *Bacillus* spp., but showed negative for the genes encoding surfactin, lichenysin, and lichenicidine. Electron microscopic observation indicated that the antimicrobial agent seemed to attack the membrane of the pathogens, leaving the ghost or shrunken cells. The strains were found

to reduce biogenic amines including histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine by 27 to 92% in the cooked soybean containing 5.3% of biogenic amine over 10 days of fermentation time. The use of selected strain would be a potential control measure in manufacturing traditionally fermented soybean products that are difficult to control pathogens and biogenic amine levels.

Soybean pastes with 8% (w/w) salinity were prepared instead of soybean paste with 14% (w/w) salinity to meet the growing demands of Korean's low sodium diet. After aging, white films had appeared on the surface of all low-salted soybean pastes (8% (w/w) salinity) unlike high-salted soybean pastes (14% (w/w) salinity). All of eight microbes isolated from the surface film were identified as *Pichia kudriavzevii*. Eleven *Bacillus* strains with good characteristics of fermentation were isolated from traditionally fermented soybean pastes in order to preserve their unique flavors and aromas after aging, and as a result of analyzing the biochemical characteristics and 16S rRNA sequences, those were identified as *B. subtilis*, *B. licheniformis*, and *B. methylotrophicus*. All of the *Bacillus* isolates had antagonistic activities against 8 isolates of the film-forming yeasts and harbored the genes for synthesis of antimicrobial surfactants including lichenysin and/ or surfactin.

*Leuconostoc* spp. and *Weissella* spp. were isolated from traditionally fermented soybean products in order to select the lactic acid bacteria for the reduction of biogenic amines and harmful bacteria. Both of them were identified by the 16S rRNA sequence analyses and additional biochemical tests. The strains were found to reduce biogenic amines including histamine and tyramine by 25.92 to 64.61% when it grew in minimal synthetic media containing 0.1% (w/v) histamine and 0.1% tyramine at 30°C for 48 h. The strains also had broad inhibition spectra against pathogens. Considering their properties, they could be used as industrially applicable starters for soybean fermentation.

B. Analysis of yeast community during overall fermentation of traditional soy sauce, the isolation of high alcohol-producing and flavor-enhancing yeast strains and their application for salt-reduced soy sauce development

The yeast microbial communities and flavor profiles were monitored during traditional soy-sauce fermentation. During the fermentation, the numbers of yeast were consistently increased from  $4.56 \times 10^3$  to  $9.06 \times 10^5$  cfu/mL. Particularly, *Candida*, *Pichia* and *Rhodotorula* sp. were predominately found throughout the fermentation with *Debaryomyces*, *Microbotryum*, *Tetrapisispora*, *Torulasporea*, *Wickerhamomyces*, *Zygosaccharomyces* sp. as minor strains. In case of flavor profiles, soy-sauce at initial fermentation stage showed high contents of volatile alcohols and then volatile acids constantly increased as the time course. In addition, two salt-tolerant yeast strains producing high ethanol and 3-methyl-1-butanol, *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623 and *Pichia guilliermondii* JBCC 848, were isolated at different stages during the spontaneous fermentation of Korean soy sauce, respectively, and then finally applied in order to control the microbial and flavor

changes occurring in the reduced salt process. Namely, soy sauce with a different salt concentration was fermented by inoculating a single or mixed cultures of yeast strains, in which the selected two yeasts were used; then, their physicochemical and microbial differences were examined. Overall, the application of yeast starter cultures resulted in a growth inhibiting effect on putrefactive bacteria, in which *Staphylococcus* and *Enterococcus* sp. were considerably decreased despite the low-salt concentration. Moreover, of the three starter cultures tested, the mixed culture of *T. delbrueckii* JBCC 623 and *P. guilliermondii* JBCC 848 was most promising, as a flavor analysis revealed that its application allows them to achieve a balance of more complex and richer flavors with the identical flavor profile pattern obtained from the soy sauce fermented with a high-salt concentration.

C. Development of a low cost production medium for industrial scale mass production of microorganisms/ Establish best fermenter for liquid, solid fermentation culture of microorganisms

Optimization of the production medium and culture conditions is essential for the industrial production of a microorganism. This study determined the optimal reaction conditions using statistical methods and established optimal fermentation conditions for mass production in a laboratory scale fermenter. The production medium composition for the D.C.W and protease activity of *Bacillus licheniformis* SCK 121057 was found to be (g/L); Galactose 17.26 g/L, Yeast extract 27.76 g/L,  $K_2HPO_4$  2 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4 g/L,  $Na_2CO_3$  0.25 g/L,  $CaCl_2$  0.01 g/L. Furthermore, when using the optimized medium in the fermenter, the best fermentation conditions were determined to be temperature 42°C, stirring speed 200 rpm, air flow rate 2 vvm and pH 8. Under these conditions, D.C.W and protease activity achieved 7.24 g/L and 240.06 U/mL, respectively. Production medium optimization resulted for the maximum D.C.W and protease of *B. licheniformis* BaDB 8 as glucose 19.85 g/L, soybean meal 10 g/L,  $K_2HPO_4$  1.55 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4 g/L,  $Na_2CO_3$  0.05 g/L,  $CaCl_2$  0.01 g/L. In addition, experiments were conducted to optimize the production medium for maximum production of ethanol by *Zygosaccharomyces bailii* KCCM 101021 and *Z. rouxii* KCCM 100971. Ethanol of *Z. bailii* KCCM 101021 produced 24.92 g/L, when the optimization medium composition determine glucose:fructose(4:1) 102.87 g/L, yeast extract 10.63 g/L,  $Na_2NO_3$  1.66 g/L,  $KH_2PO_4$  2.0 g/L and  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.06 g/L, ethanol produced 24.92 g/L. Ethanol of *Z. rouxii* KCCM 100971 produced 24.92 g/L, when the optimization medium composition determine glucose 158 g/L yeast extract 13.6 g/L  $MgSO_4$  2.04 g/L,  $KH_2PO_4$  1.5 g/L,  $CaCl_2$  0.2 g/L. The fermentation conditions for *Z. rouxii* KCCM 100971 were 29°C, pH 5 and 200 rpm. *B. licheniformis* SCK 121057 and *Z. rouxii* KCCM 100971 remained stable for a long time during repeated batch fermentation.

#### 4. Industrial Application and Production of Prototype

High blood pressure and belongs to the world-class Koreans, compared to a lot of the recommended intake to 4,831 mg / day salt in take(WHO recommended dose : 2000 mg /

day(2011)). In Korean, excessive sodium intake leads to adults diseases such as high blood pressure. To reduce this, it strives to reduce the salt intake of Korea government. Although the consumer and government demands for low-salt formula, traditional food is a situation that still produces more than 14% of high-salt products. For this reason, we want to investigate the possibility of manufacturing as a low-salt foods to traditional foods in this task.

Selection of superior strains to inhibit spoilage microorganism fermentation the final selected strains(*Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus licheniformis* SCK B11) and strains that use conventional(Choongmu fermentation + *Bacillus licheniformis* SCC125037), a mixture strains((Choongmu fermentation + *Bacillus licheniformis* SCC125037 ) + (*Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus licheniformis* SCK B11)) prepared by low-salt Sauce and high-salt Sauce then were analyzed by the quality characteristics and sensory evaluation. The results showed the best properties were commercialized a low-salt Doenjang (manufactured by selected strains) and low-salt Soy sauce(prepared by mixing the strain). *Kochujang* was prepared using a strain of the *choongmu* fermentation + *Bacillus licheniformis* SRCM100027, *Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307, *choongmu* fermentation + *Bacillus licheniformis* SRCM100027 + *Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307(Salt of 4%, 8%, 12%). The results showed the best properties were commercialized a low-salt *Kochujang*(prepared by mixing the strain).

## C O N T E N T S

### **Application Pilot Plant Test and Quality Characteristics**

Chapter 1. Overview of Research .....	30
Chapter 2. Current Status of Research .....	31
Chapter 3. Results and Discussion .....	32
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	104
Chapter 5. Application of Research .....	105
Chapter 6. References .....	108

### **Identification and isolation of food fermented microorganisms and establish of their control and preservation system**

Chapter 1. Overview of Research .....	114
Chapter 2. Current Status of Research .....	116
Chapter 3. Results and Discussion .....	117
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	207
Chapter 5. Application of Research .....	209
Chapter 6. References .....	210

### **The overall isolation of fungi, bacteria and yeast strains from traditional soy products, and the construction of optimal culture system of microorganisms**

Chapter 1. Overview of Research .....	214
Chapter 2. Current Status of Research .....	216
Chapter 3. Results and Discussion .....	218
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	539
Chapter 5. Application of Research .....	541



Chapter 6. Information of Foreign Science and Technology .....	545
Chapter 7. References .....	548

### **Industrial Application and Production of Prototype**

Chapter 1. Overview of Research .....	562
Chapter 2. Current Status of Research .....	564
Chapter 3. Results and Discussion .....	565
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	631
Chapter 5. Application of Research .....	632
Chapter 6. References .....	634

## 목 차

### Pilot plant 적용 Test, 품질특성분석

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	30
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	31
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	32
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	104
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	105
제 6 장 참고문헌 .....	108

### 발효미생물 분리동정, 발효미생물 균주관리보존시스템 구축

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	114
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	116
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	117
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	207
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	209
제 6 장 참고문헌 .....	210

### 전통장류로부터 곰팡이, 세균 그리고 효모의 총체적인 분리 및 발효미생물의 최적배양시스템 구축

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	214
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	216
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	218
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	539
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	541
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	545
제 7 장 참고문헌 .....	548

## 산업적 적용 및 시제품 생산

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	562
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	564
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	565
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	631
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	632
제 6 장 참고문헌 .....	634



## 제1세부 : Pilot plant 적용 Test, 품질특성분석

주관연구기관명 : 순창군장류사업소

주관연구책임자 : 정 도 연

세부연구책임자 : 정 도 연(세부1)



# 제1장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발의 목적

삼삼한 전통장류의 맛을 국민에게 제공하기 위해 발효미생물을 제어하여 장류의 기본인 메주를 제조하고, 이를 이용하여 저염 된장, 간장, 고추장을 제조하여 제품의 품질특성을 분석함으로써 저염화 장류 생산기술을 정립하고자 하였다.

## 2절 연구개발의 필요성

한식의 건강기능성과 장류의 생리기능성이 알려지면서 고부가 기능성 장류 제품이 개발되고 있지만, 최근 고염도 식품의 유해성이 알려지면서 염도가 높은 장류 제품의 소비가 제한되고 있는 실정이다. 특히 임상 테스트를 통해 다양한 기능성이 있음에도 불구하고 건강 기능성 식품으로 인정받지 못하고 있는 것이 현실이다.

세계보건기구(WHO)가 권장하는 하루 적정 소금 섭취량은 5 g이며, 반면 짜고 자극적인 음식을 선호하는 한국 성인의 하루 평균 소금 섭취량은 13.5 g으로 한국 성인의 소금 섭취량은 세계보건기구 권장량의 3배에 가깝다.

문제는 소금 섭취량의 대부분을 가공식품에서 얻는 서구 사람들과 달리 한국인들은 김치류와 장류 등 전통식단에서 소금을 절반 가까이 섭취한다는 것이며, 식품의약품안전처는 나트륨 섭취의 주요 급원을 김치류(25%), 장류(22%), 소금(20%) 순으로 명시하고 ‘전통식단에서 소금 사용을 현재의 절반으로 줄이지 않는 이상 고혈압·위암 발병 위험률을 줄일 수 없다’고 경고하였다. 또한 최근 식약처는 올해 우선 장류에 대한 영양표시를 법제화하기로 하고 장류협회, 소비자 단체 등의 의견을 수렴해 관련 법안 개정애 나서고 있다. 이는 염분이 많은 장류에 나트륨량 등을 표시할 수 있도록 하는 것이다. 그리고 식약처는 나트륨 줄이기 운동을 실시하고 있으며, 아워홈 등 식품업계에서도 저염화를 위한 연구에 돌입하여 나트륨 줄이기 운동에 발 빠르게 참여하고 있다.

보통 ‘음식을 짜게 먹는 어린이가 당분이 함유된 청량음료 등을 더 많이 마시는 경향이 있고, 그 결과 비만아동이 될 확률이 높다’는 영국 런던 세인트조지 대학 연구진의 조사결과를 인용 BBC에서도 ‘염분이 많이 함유된 음식을 먹은 어린이는 비만이 될 가능성이 크다’고 보도했으며, 이 보도에서 연구진은 ‘심각한 사회 문제인 아동 비만을 퇴치하기 위해 부모는 자녀의 음식에서 염분함량을 줄여야 하고 식품업계도 제품의 염분함량을 줄일 수 있는 방안을 강구해야 한다’고 강조했다.

한식세계화와 관련 한식당의 맛을 좌우하는 우리나라 고유 전통발효식품을 한식세계화 컨셉에 맞게 세계인의 입맛에 맞게 변형, 발전시키기 위해서는 전통발효식품의 저염화가 무엇보다 선행되어야 하는 현실이다.

본 연구는 신규의 미생물을 개발하고 이를 현장에 적용하기위한 고도의 기술을 개발함으로써, 현재 기술의 가장 큰 단점인 공장장류와 달리 KS 및 전통식품품질인증 규격 규정에 위배되는 관계로 물리적 처리가 어려운 점과 기타 기 개발된 천연보존제인 겨자와 고추냉이, 주정의 전통장류에 적용하기 어려운 한계를 극복할 수 있도록 하였다.

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내 연구 현황

국내 저염 장류에 대한 연구는 천연물을 이용하여 제조한 장류, 에탄올을 첨가하여 만든 장류, 겹장으로 만든 장류 등이 연구되어 왔다. 천연물을 이용하여 만든 저염 장류에 관한 연구는 5편으로 천연물 중 마늘, 유백피, 양파, 감초, 겨자 등을 첨가하여 만든 된장과, 매실의 당추출액과 발효식초를 첨가한 저염 고추장이 연구되었다. 또한 에탄올을 이용하여 저염 장류를 제조한 연구는 2건 등이 보고되었으며, 감마선 조사를 통해 저염 된장의 특성 변화를 살펴 본 연구는 2건등이 보고되었다.

한편 펩타이드성 향균 물질로, 그람 양성균의 생육을 효과적으로 억제시키는 nisin을 생성하는 유산균을 이용하여 저염 장류를 제조한 연구(2002)가 보고되기도 했으나 완성된 저염 된장의 만족할 만한 풍미와 품질을 전제로 하고 있어서 미생물의 역할이나 우량 균주의 역할이 중요해졌다. 본 연구에서는 우수균주를 활용하여 복발효 형태의 메주를 생산하고 전통에 가까운 향미와 맛을 낼 수 있게 이 메주를 활용하여 저염 장류의 원재료로 사용하고자 하였다. 또한 염도를 낮추어 제조한 장류의 발효기간에 따른 이화학적 및 미생물학적 특성 변화를 조사하였다.

### 2절 국외 연구 현황

국외 연구현황을 살펴보면 우리나라와 마찬가지로 장류를 식생활의 기본으로 하고 있는 일본에 국한 되어 있다. 일본의 경우, 저염화 방법에 미생물관리와 화학적 방법, 물리적 방법을 동시에 전통장류제조공정에 포함시킴으로써 맛과 향미를 향상시키면서도 저염화 시키는 기술로 일본의 일부 된장 제품의 경우 저염화된 제품이 생산 판매되고 있으나 한국의 경우 이에 대한 기술적 연구가 되어 있지 않은 실정이고, 장류관련 세부기술 분야의 경우 국외대비 60% 수준에 머물러 있는 현실이다.

일본 된장제품에 대한 자체 모니터링조사(2010년) 결과 염도가 6.4%에서 14.95%까지 다양한 제품들을 생산하고 있으며, 소금량을 된장제품에 표시하여 소비자가 다양한 염도의 된장제품을 구입할 수 있도록 선택권을 부여하고 있으며, 공장산 간장의 식염 함량은 평균  $16.5 \pm 2.9\%$ 로 전통간장에 비해 매우 낮았으며, 이러한 이유는 곰팡이 단일발효에 의한 간장생산과 최종제품에 대한 조미공정이 들어가기 때문으로 판단된다.

한편, 장류에 함유되는 염 농도를 낮추기 위한 연구로써, 몇몇 연구들에서는 장류에 포함되는 염을 sugars, polypols 또는 ethanol과 같은 염과 동등한 삼투압성 성분들로 대체하고자 한 연구(Chiou, 1999; Chiou et al., 1999). 최근 수행된 일부 연구로부터 발효 식품유래 토착 발효 미생물을 스타터 균주로 적용함으로써 염 함량을 낮춘 Chinese fermented fish 또는 dry fermented sausage를 제조할 수 있었으며, 이러한 결과는 fermented fish 및 fermented sausage와 같은 식품의 발효시 염 함량을 낮춤에 따라 발생할 수 있는 이화학적 및 미생물학적 특성을 극복하기 위한 수단으로써 토착 미생물의 적용은 매우 효과적일 수 있다는 것을 나타낸다(Corral et al., 2014; Zeng et al., 2013). 그러나 현재까지 저염 장류의 제조를 위하여 토착성 발효미생물을 접목한 경우는 전무하다.



# 제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 1절 Pilot plant 적용 Test, 품질특성분석

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 재료

##### (1)원재료

순창에서 생산되고 있는 대두와 백미를 사용하여 본 실험의 재료로 이용하였으며, 천일염은 신안에서 생산되고 있는 제품을 이용하였다.

##### (2)균주

본 실험에 사용된 균주는 제2협동에서 전통장류로부터 분리하여 (재)발효미생물산업진흥원에 보관중인 균주를 분양받아 사용하였다. 사용한 균주의 목록은 아래 표와 같다.

표1. 본 실험에 이용한 균주목록

		균 주 명
	메주	<i>B. licheniformis</i> (BAD8, BAD23, BAD24)
세균	된장 및 간장	<i>B. licheniformis</i> (SCK B11 <sup>1</sup> *SCCB1231 <sup>2</sup> , SCSB1228 <sup>2</sup> , SRCM100027 <sup>3</sup> )
	고추장	<i>B. subtilis</i> (SCKB1307 <sup>1</sup> )
곰팡이	<i>Aspegillus oryzae</i> (SKM 07 <sup>4</sup> , SCAB08 <sup>5</sup> , SCAB09 <sup>5</sup> ), 충무발효 곰팡이 <sup>3</sup>	
유산균	<i>Weissella cibaria</i> (SCKB2301 <sup>2</sup> , SCCB2311 <sup>2</sup> )	
효모	<i>Torulaspora microellipsoides</i> 623 <sup>6</sup> , <i>Pichia kudriavzevii</i> (SCYK22, SCYK01 <sup>2</sup> )	

<sup>1</sup> : 부패미생물 항균력 강한 균주, <sup>2</sup> : 산막 억제력이 강한 균주, <sup>3</sup> : 참여기업 생산 시 사용균주 <sup>4</sup> : 전분 및 단백질에 효소활성이 뛰어난 균주, <sup>5</sup> : 곰팡이 무독소 균주, <sup>6</sup> : 향미성분이 풍부하고 알콜생성능이 뛰어난 균주

#### 나. 장류 제조방법

##### (1) 복발효 메주 생산

###### (가) 바실러스속 균주를 이용한 콩알메주(청국장) 제조

콩을 3회 세척한 후 콩과 물을 1 : 3비율로 15시간 침지 한 다음 물을 빼고 121℃에서 30분 동안 Autoclave를 이용하여 콩을 증자하였다. 증자된 콩은 70℃로 냉각 한 후 *B. licheniformis* 3종(BAD8, BAD23, BAD24)을 콩 무게의 1%를(흡광도 0.3) 접종하였다. 균을 접종한 증자된 콩은 40℃에서 각각 0일, 2일, 3일, 12일 발효하여 분석에 사용하였다.

###### (나) 콩알메주(청국장)를 이용한 간장 제조

발효시간에 따른 콩알메주와 20% 소금물을 1 : 1.5의 비율로 혼합한 후 40℃ 항온기에서 2주일 발효 한 후 간장을 분리 하여 분석에 사용하였다.

#### (다) 복발효 메주 제조

콩을 3회 세척한 후 콩과 물을 1 : 3비율로 15시간 침지 한 다음 물을 빼고 120℃에서 10분 동안 NK증자기를 이용하여 콩을 삶았다. 삶은 콩은 컨베이어벨트를 이용하여 이동된 후 약 70℃ 증자 콩에 각각의 *B. licheniformis* 3종(BAD8, BAD23, BAD24)과 *Aspergillus oryzae* SKO1102 및 효모를 각각 콩 무게의 0.05%(흡광도 1.0)와 0.1% 및 0.3% 접종하여 성형하였다. 성형한 메주는 60℃ 건조기에서 24시간 건조 한 후 30℃ 발효실에서 8일간 발효하였다.

#### (2) 복발효 메주를 이용한 저염 장류(된장, 간장) 생산

##### (가) 바실러스 속 및 아스퍼질러스 속 균주를 이용한 콩알메주 제조

콩을 3회 세척한 후 콩과 물을 1 : 3비율로 15시간 침지 한 다음 물을 빼고 121℃에서 30분 동안 Autoclave를 이용하여 콩을 증자하였다. 증자콩은 70℃로 냉각한 후 *B.licheniformis* 3종을 콩 무게의 0.05%를(흡광도 0.5) 접종하였고 *Aspergillus oryzae* 3종(흡광도2.0)을 접종하여 30℃에서 4일간 발효한 후 60℃에서 24시간 동안 건조하여 콩알메주를 수득하였다.

##### (나) 콩알메주를 이용한 저염 장류 제조

된장 및 간장의 제조는 염수(23%, 16%)를 제조하여 메주 : 염수의 비율이 1:3가 되게 메주에 부어주었다. 이때 염수에 효모 및 유산균을 메주양의 1%가 되게 접종하였다. 이를 플라스틱 통에서 4주간 침지 후 된장과 간장으로 분리한 후 3주간 숙성하였다.

##### (다) 참여기업 적용 가능한 사각메주 제조 및 장류생산(3협동 공동 진행)

콩을 3회 세척한 후 콩과 물을 1 : 3비율로 15시간 침지 한 다음 물을 빼고 115℃에서 10분 동안 NK증자기를 이용하여 콩을 삶았다. 삶은 콩은 컨베이어벨트를 이용하여 이동된 후 약 70℃ 증자 콩에 각각의 *B. licheniformis* 2종(SCK B11, SRCM100027)과 *Aspergillus oryzae* 2종 (SKM 07 : koji로 제조, 충무발효)을 각각 콩 무게의 0.05% (흡광도 0.6)와 0.1% 접종하여 성형하였다. 성형한 메주는 60℃ 건조기에서 24시간 건조 한 후 30℃ 발효실에서 발효하였다. 된장 및 간장의 제조는 염수(25%, 16%)를 제조하여 메주 : 염수의 비율이 1 : 2가 되게 메주에 부어주었다. 이때 염수에 효모를 메주양의 1%가 되게 접종하였다. 이를 플라스틱 통에서 약4주간 침지 후 된장과 간장으로 분리한 후 2주간 숙성하였다.

#### (3) 우수균주를 활용한 저염 고추장 생산

##### (가) 백미와 대두를 이용한 메주 생산

백미와 대두를 증자한 후 백미에는 *Aspergillus oryzae* 2종 (SKM 07 : koji로 제조, 충무발효), 대두에는 *B. licheniformis* SRCM100027, *B. subtilis* SCKB1307을 접종하여 각각 메주로 제조하였다.

##### (나) 저염 고추장 제조(3협동 공동 진행)

고추장 제조는 제3협동인 순창장류(주)의 제조방법 및 배합비에 따라 제조하였으며, 이에 염도만 다르게 하여 고추장을 제조하였다. 상기 제조한 메주에 천일염, 고춧가루 등을 일정한 배합비에 따라 혼합한 후 최적 온도인 25 ~ 30℃에 보관하여 8주간 숙성시켰다.

#### 다. 실험방법

##### 1. 수분

수분함량은 적외선수분측정기(Kett, Japan)를 이용하여 측정하였다.

## 2. pH 및 적정산도

시료 5 g 을 10배 희석하여 pH meter(Mettler Toledo CH/MPC227, Switzerland)로 측정하였고 적정산도는 0.1N-NaOH를 가하여 pH 8.3이 될 때 까지 적정하고 , 이때 소비된 양을 mL 수로 표시하였다.

## 3. 아미노태질소

아미노태질소 함량은 Formol 적정법에 준하여 실시하였다. 즉 시료 2 g을 취하여 증류수 100 mL를 가하고 1시간 동안 교반한 후 0.1 N-NaOH용액으로 pH8.4까지 적정하였다. 여기에 중성 포르말린 용액 20 mL를 가하고 다시 0.1 N-NaOH용액으로 pH8.4가 되도록 적정하였다.

## 4. 총질소

총질소 함량은 시료 1 g을 분해 장치(Foss Digester 2020)로 분해시키고 켈텍 장치(Foss Kjeltex System 2400)를 이용하여 증류 한 후 적정하여 0.1 N-HCl의 mL수를 총질소로 환산하여 양을 구하였다.

## 5. 효소역가측정

조효소액 추출은 시료 10 g에 증류수 90 ml를 가하여 30℃, 150 rpm shaking incubator에서 1시간 shaking 하여 효소액을 추출하였다. α-amylase 활성도는 효소액 1 ml에 pH5.2 Buffer(0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O+0.1 M citric acid) 2ml와 1%전분 용액 2 ml를 첨가하여 40℃ 항온수조에서 반응 시킨 후 반응액을 여과한 후 여액 1 ml를 취해 1 N 초산 10 ml로 반응을 정지시키고 0.005% 요오드 용액 10 ml를 넣어 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 측정값을 (Blank-시료) × 1000 × 80 / (100-수분)으로 계산하여 unit로 표시하였다.

Protease 활성도는 효소액 0.5 ml에 McIlvaine buffer(0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O + 0.1 M citric acid, pH6.0) 1 ml와 기질로 2.0% milk casein 1.5 ml를 시험관에 넣고 38℃ 항온수조에서 1시간 반응 후 0.4 M trichloro acetic acid(TCA) 3 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 38℃ 항온수조에서 30분간 정치하였다. 이 반응액을 여과한 후 여액 1 ml를 취하여 다른 시험관으로 옮겨 0.4M Sodium carbonate 5 ml와 2배 희석한 Phenol reagent 1 ml를 넣고 항온수조 38℃에서 30분간 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 측정값을{[(시료 - Blank) / 검량선의 기울기]×(80/(100 - 수분))} × 2 로 계산하여 unit로 표시하였다. 이 반응 조건하에 1 분간 tyrosine 1 μg을 유리하는 효소량을 1 unit로 하였다.

## 6. 유기산 및 유리당

유기산과 유리당의 분석은 시료 5 g에 증류수 45 ml를 가하여 1시간동안 균질화 시킨 후 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter와 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge(MeOH 2 ml, Water 2 ml로 활성화)에 통과 시킨 후 표 2와 3의 분석조건으로 HPLC로 분석하였다.

표 2. 유기산 HPLC 분석조건

Instrument	Agilent
Detector	DAD 210 nm
Column	Aminex column HPX-87H(300×7.8 mm)
Temperature	60°C
Injection volume	20 $\mu\text{l}$
Flow rate	0.6 ml/min
Mobile phase	0.01 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

표 3. 유리당 HPLC 분석조건

Instrument	Shiseido SI 2
Detector	RI-detector
Column	Ashipak NH2P-504E (4.6 mm × 250 mm)
Temperature	35°C
Injection volume	20 $\mu\text{l}$
Flow rate	1.0 ml/min
Mobile phase	Acetonitrile/Water 75 : 25(v:v)

## 7. 유리아미노산

유리아미노산은 시료 2 g을 취하여 3차 증류수 30 ml넣고 교반한 후 50 ml로 정용한수 초음파를 이용하여 20분간 추출한후 원심분리(3000 rpm, 10 분)한 다음 상등액 2 ml에 5% TCA 2 ml를 넣은 후 원심분리(10,000 rpm, 10 분)한 후 상등액을 취하여 0.02 N-HCL로 희석한 후 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter에 통과시킨 후 표 4의 분석조건으로 아미노산분석기로 분석하였다

표 4. 유리아미노산 분석기 분석조건

Instrument	Amino acid analysis (Hitachi L-8900)
Detector	UV/Vis (440 nm-570 nm)
Column	Hitachi 4.6×60 mm (speration) Hitachi 4.6×40 mm (Ammonia filtering)
Buffer flow rate	0.40 ml/min
Ninhydrin flow rate	0.35 ml/min
Temperature	50℃
Injection volume	20 $\mu$ l
Mobile phase	Buffer set (PH-SET KANTO)

#### 8. 미생물학적 특성분석

세균수, 진균수(곰팡이, 효모)는 시료 10 g을 멸균한 식염수에 넣어 교반한 후 희석해서 Petrifilm™ aerobic count , yeast and mold count(3M, USA)를 이용하여 측정하였다.

식중독 미생물 분석은 식품공전법에 준하여 실험을 실시하였다.

#### 9. 관능검사

순창장류연구소 및 발효미생물관리센터, 순창장류 직원을 대상으로, 관능검사의 목적과 시료에 대하여 설명한 후 발효 숙성 된 된장을 접시에 담아 관능요원들에서 제공하였다. 측정항목으로는 색, 맛(짠맛, 감칠맛), 향 및 전체적기호도를 9점 채점법으로 평가하였다. 기호도는 아주 좋다가 9점, 보통 이다가 5점, 아주 나쁘다가 1점으로 평가하였고 특성은 강도에 따라 강하면 9점, 중간이면 9점, 약하면 1점으로 평가하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 복발효 메주 생산

#### (1) 바실러스속 균주를 이용한 콩알메주(청국장) 제조

##### (가) 수분

콩알메주의 수분함량은 발효초기 58.72%로 발효기간이 증가함에 따라 증가하여 발효 7일에 60.39 ~ 64.14%로 평균 62.59%를 보여주었다.(그림 1.)

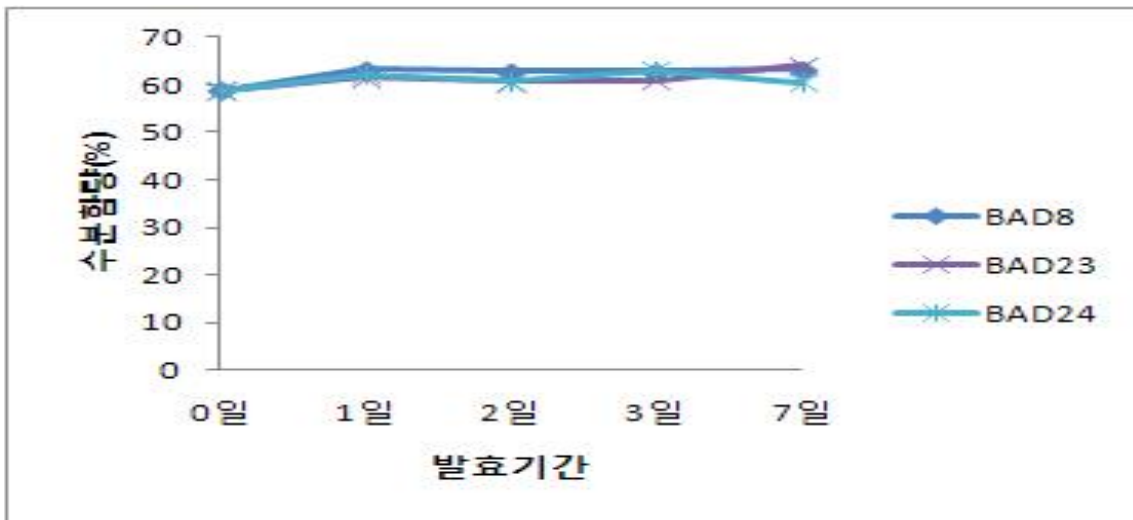


그림 1. 발효기간에 따른 콩알메주의 수분함량 변화

##### (나) pH

pH는 발효초기 5.5에서 발효기간이 진행됨에 따라 발효 7일 후 7.7 ~ 7.8 로 평균 7.8 로 증가하였고, 처리구간에 차이를 보이지 않았다.

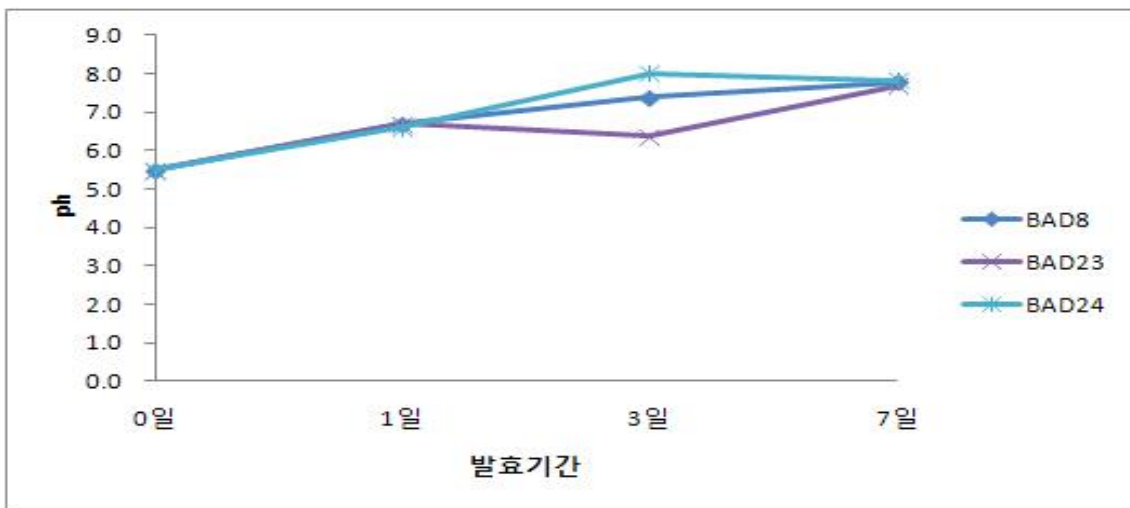


그림 2. 발효기간에 따른 콩알메주의 pH 변화

(다) 아미노산성 질소

아미노산성 질소함량은 protease의 작용에 의하여 단백질이 아미노산의 형태로 분해되는 정도를 나타낸 것으로 장류 발효식품의 품질 지표로 사용되고 있다. 그림3은 3종의 균주를 이용하여 콩알메주 발효 시 아미노산성 질소 함량의 변화를 나타낸 것으로 발효 초기 아미노산성 질소 함량은 104.83 mg%로 발효 1일 때 124.39 ~ 186.55로 평균 165.33, 발효 2일 346.85 ~ 547.82 mg%로 평균 423.08 mg%로 발효 1일 보다 2.56배 증가하였으며, 발효 3일 418.88 ~ 697.83 mg%로 평균 534.52 mg%로 나타났으며 발효 7일 772.31 ~ 1053.92 mg%로 평균 966.98 mg%로 나타났다. BAD8균주를 이용한 처리구가 772.31 mg%로 가장 작은 값을 보여주었으며, BAD23 균주를 접종한 처리구 보다 302.40 mg% 작은 값을 보여주었다.

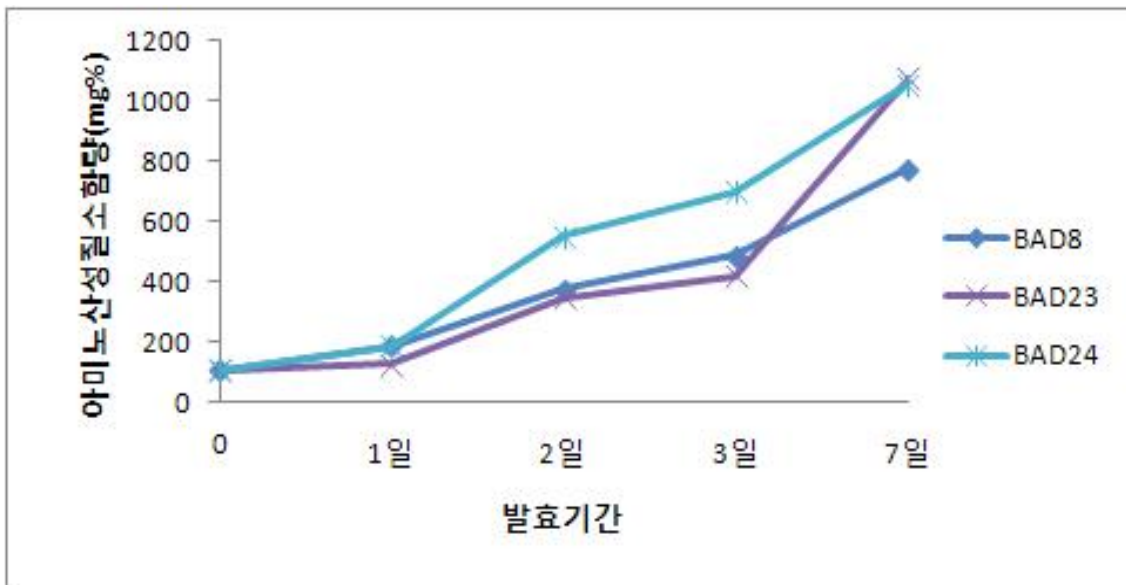


그림 3. 발효기간에 따른 콩알메주의 아미노산성 질소 함량 변화

(라) 암모니아태 질소

암모니아태 질소는 단백질 분해과정에서 deamination에 의하여 생성되며 암모니아아성 질소가 식품 내에 과량으로 축적되면 부패취로 작용하므로 일반적으로 장류 제품의 변패 또는 이상발효의 지표로 사용된다. 균주를 달리한 콩알 메주의 발효시간에 따른 암모니아태 질소 함량 변화는 그림 4와 같다. 발효 초기 암모니아태 질소 함량은 0.18 mgN/g으로 발효기간이 증가함에 따라 증가하였으며, 발효 2일에 급격히 증가하여 평균 1.4 mgN/g을 보여주었고 발효 3일에 평균 1.75 mgN/g, 발효 7일에 평균 2.54 mgN/g을 보였다. 발효 7일 BAD24을 접종한 처리구는 3.05 mgN/g로 가장 높은 값을 보여주었으며, SCG1210을 이용한 균주는 1.89 mgN/g으로 가장 낮은 값을 보여주어 약 BAD24을 접종한 처리구와 비교하였을 때 약 0.6배 이상의 차이를 보여주었다.

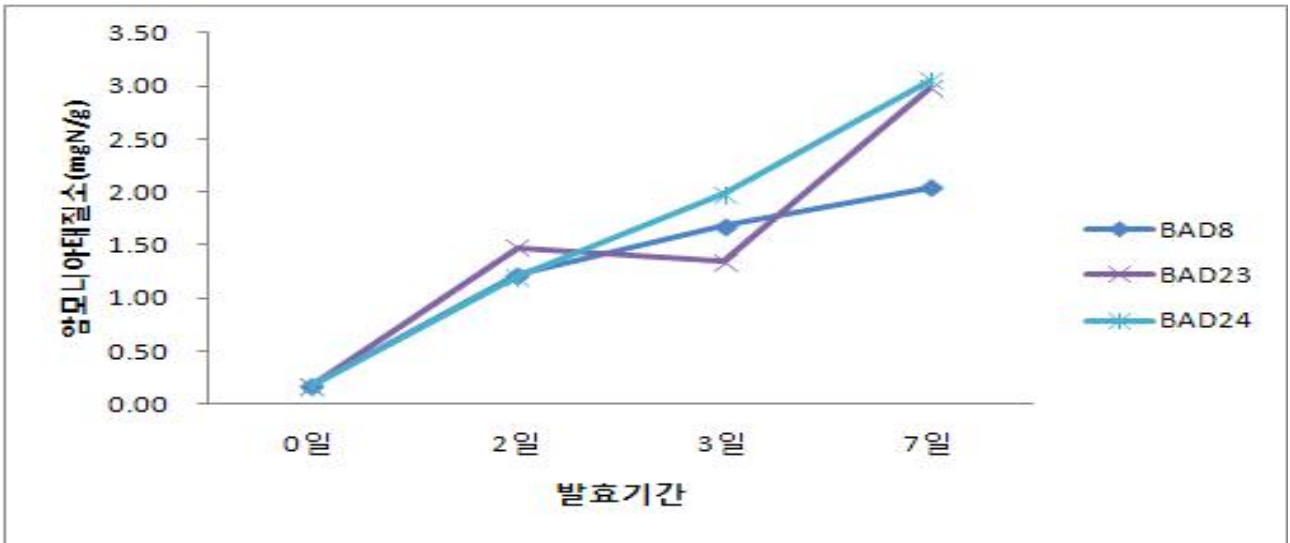


그림 4. 발효기간에 따른 콩알메주의 암모니아태 질소 함량 변화

(마) 프로테아제 활성도

각각의 발효균주를 이용하여 발효 시간에 따른 콩알메주를 이용하여 발효시간에 따른 protease 활성을 확인 한 결과 확인 한 결과를 표4에 나타내었다. Protease 활성은 처리구와 발효시간에 따라 큰 차이를 보이지 않았다.

표 4. 각각의 발효 균주를 이용하여 발효시킨 청국장 시료의 Protease 활성 확인

균주번호	발효시간	Protease 활성 (mm)
BAD8	24 hr	11
	48 hr	13
	72 hr	12
BAD23	24 hr	12
	48 hr	11
	72 hr	10
BAD24	24 hr	12
	48 hr	12
	72 hr	12

(바) 바이오제닉 아민

바이오제닉 아민은 구조상 지방족 방향족 헤테로 고리 구조 등을 가진 형태로 되어 있고 인체 및 동물 체내에서 중추신경의 신경 전달 물질 또는 직간접적 혈관계 조절에 관여하는 필수 성분의 하나이며 다양한 종류의 식품에서 과량 섭취 시 식중독 증상을 유발 시키고 일부 바이오제닉 아민은 N-nitrosamine과 같은 강력한 발암물질로 전환 될 수 있는 잠재성을 갖고 있어



식품 유해 물질로 주목해야 할 물질이다. 특히 바이오제닉 아민은 단백질을 함유한 식품이 부패하거나 발효식품의 발효, 숙성과정 중 생성되는 물질로 단백질 함량이 높은 콩을 주원료로 하여 발효시키는 장류의 경우 바이오제닉 아민의 위험에 쉽게 노출 될 수 있어 지속적인 모니터링 감사 및 관리가 필요하다. 본 연구 결과 균주의 종류에 따른 콩알 메주의 바이오제닉 아민 중 장류에서 가장 많이 검출되고 알러지를 일으키는 histamine을 분석한 결과 표 5와 같이 발효 7일 후 BAD24을 접종한 처리구에서 27.9ppm을 보여 주었고 나머지 처리구에서는 검출되지 않았다.(아미노산성질소는 772.31 ~ 1053.92 mg%로 충분히 발효 되었다고 사료된다)

표 5. 균주에 따른 콩알메주의 바이오제닉 아민 함량

발효기간	구 분	바이오제닉 아민(ppm)	
		histamine	tyramine
발효0일	증자콩	0.0	18.1
	BAD8	0.0	0.0
발효7일	BAD23	0.0	0.0
	BAD24	27.9	16.8

(사) 약한취 *Bacillus* 균과 강한 취의 *Bacillus*균 선별

콩알메주를 7일 발효 한 후 냄새를 맡아본 결과 약한 취를 내는 것은 BAD8 처리구로 나타났고, 강한 취를 내는 것은 BAD23, BAD24처리구로 나타났다.

표 6. 약한 취 *Bacillus* 균과 강한 취의 *Bacillus* 균 선별

냄새	균주 번호
약한 취	BAD8
강한 취	BAD23
	BAD24

(2) 콩알메주의 발효시간에 따른 간장의 성분 분석

(가) pH 및 적정산도

콩알메주의 발효시간에 따른 간장의 pH와 적정산도는 그림 5와 6과 같다. 발효 0일 간장의 pH는 5.87에서 콩알메주를 2일 발효하여 만든 간장은 평균 6.28, 3일 발효하여 만든 간장 6.64, 12일 발효하여 만든 간장은 평균 7.32로 나타났다. 이는 전통 간장의 pH는 4.37 ~ 5.93을 나타냈다고 보고 한 결과와 식품공전의 간장의 일반 성분에 해당하는 pH 4.0 ~ 6.8 규격과는 다른 경향을 보여주었다. 보통 장류의 pH는 발효과정에서 생성되는 유기산에 의한 것으로 숙성기간이 길어짐에 따라 유기산의 함량이 증가되며 pH가 낮아지는 것으로 볼 수 있는데(박 등,

1997), 본 연구 결과는 콩알메주 발효 0일 간장 5.87에서 메주의 발효기간이 증가함에 따라 콩알메주 발효 12일 간장 pH 7.13으로 증가하여 다른 경향을 나타내었다. 그 이유는 유리용기에 콩을 넣고 증자한 후 무균상태에서 *Bacillus*속 균주를 넣고 발효하여 발효조건 별 환경에 따라 많이 차이가 나기 때문으로 생각된다. 적정산도는 콩알메주 발효 0일로 만든 간장은 3.69 mL(0.1 N-NaOH 소비량/5mL간장)로 나타났고 콩알메주의 발효기간이 증가할 수록 간장의 적정산도는 감소하여 발효 12일된 콩알메주로 만든 간장의 적정산도는 1.71을 보여주었다. 발효기간이 증가 할 수록 적정산도는 감소하여 적정산도와 pH는 반대의 경향을 보여 주었다.

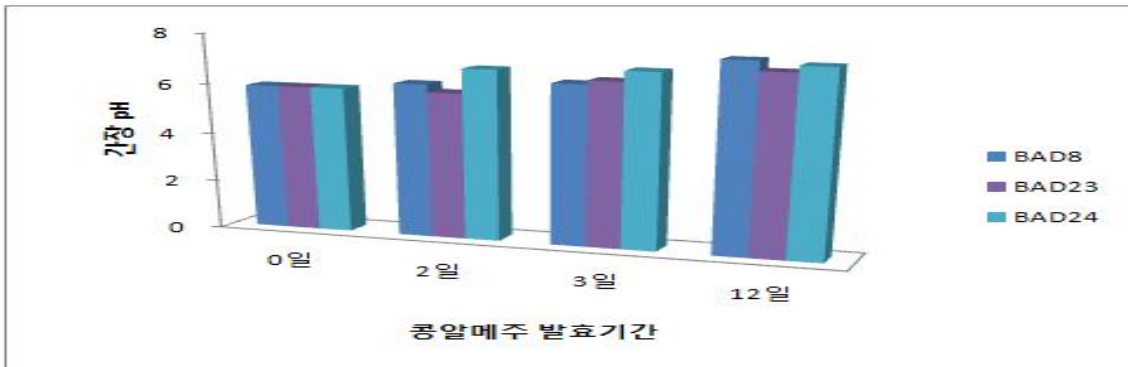


그림 5. 콩알메주의 발효기간에 따른 간장 pH.

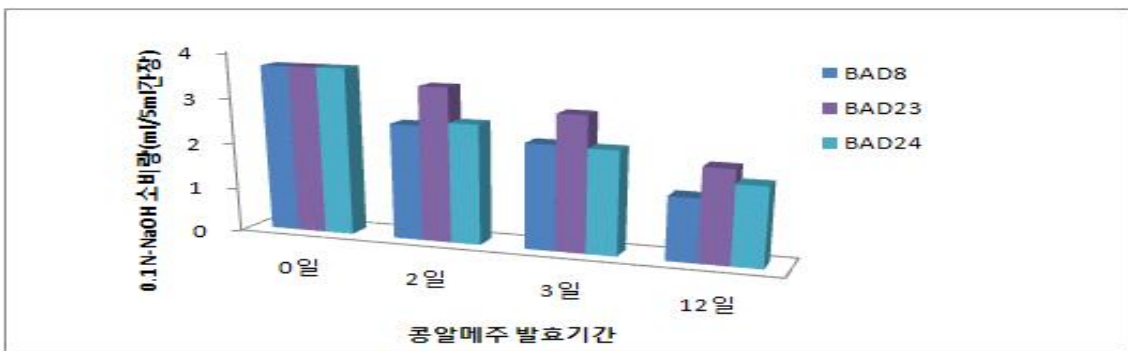


그림 6. 콩알메주의 발효기간에 따른 간장 적정산도.

(나) 총질소

간장의 질소성분은 간장의 품질에 가장 크게 영향을 미치는 제 1인자로(박, 1995) 총질소 성분은 유리아미노산, peptide, 암모니아태 질소 등으로 구성되어 있다. 이 중 총질소는 간장의 맛을 좌우함은 물론 간장의 수율에 관여한다. 따라서 총질소나 아미노태 질소의 함량이 높아야 고급 간장으로 평가된다.(이, 1986) 콩알메주의 발효기간에 따른 간장의 총질소 함량은 그림 7과 같다. 발효 0일된 콩알메주로 만든 간장의 총질소는 0.1%, 발효 3일된 콩알메주로 만든 간장의 총질소는 0.92%로 급격히 증가하여 발효 12일된 콩알메주로 만든 간장의 총질소는 1.05%로 증가하였다. 처리구간에 큰 차이는 보이지 않았다. 식품공전 기준 규격인 0.7% 이상으로 간장의 범위에 들었다.

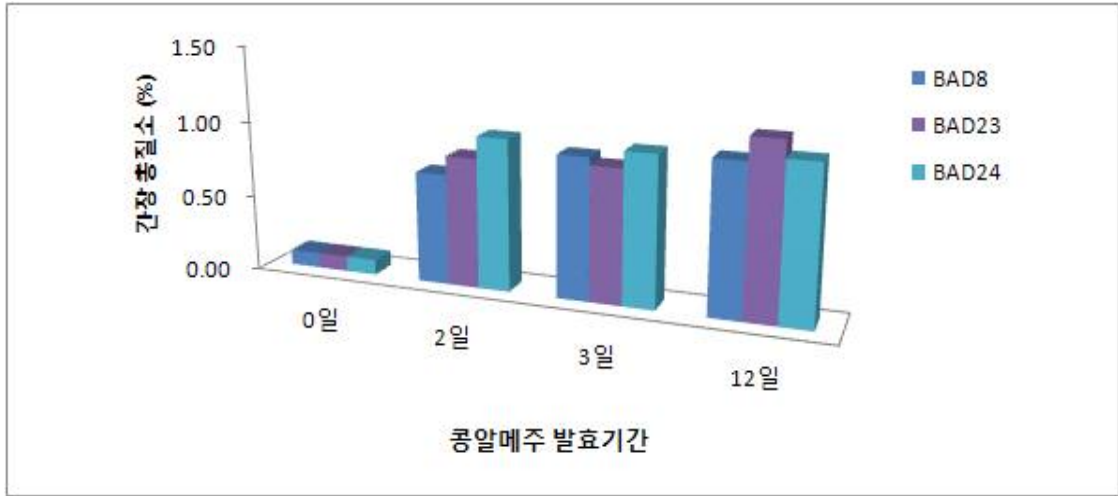


그림 7. 콩알메주의 발효기간에 따른 간장 총질소 함량

(다) 암모니아태 질소

암모니아태 질소는 단백질 분해과정에서 deamination에 의하여 생성되며 암모니아아성 질소가 식품 내에 과량으로 축적되면 부패취로 작용하므로 일반적으로 장류 제품의 변패 또는 이상발효의 지표로 사용된다. 균주를 달리한 콩알 메주의 발효시간에 따른 암모니아태 질소 함량 변화는 그림 8과 같다. 발효 초기 암모니아 태질소 함량은 0.04 mgN/g으로 콩알메주의 발효기간이 증가함에 따라 증가하였으며, 2일 발효한 콩알메주를 이용하여 제조한 간장에서 급격히 증가하여 평균 0.89 mgN/g을 보여주었고 12일간 발효한 콩알메주를 이용하여 제조한 간장에서는 평균 1.37 mgN/g을 보였다.

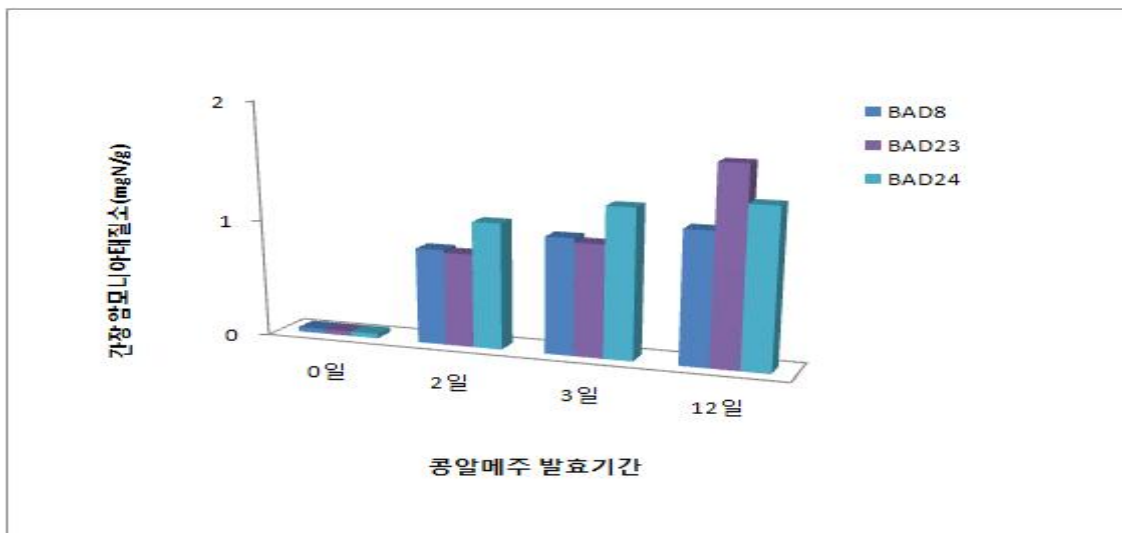


그림 8. 콩알메주의 발효기간에 따른 간장 암모니아태 질소 함량.

(라) 아미노산성 질소

아미노산성 질소는 발효식품의 숙성도를 판단하는 성분으로 메주의 제조와 간장 제조 과정에서 단백질이 효소작용으로 가수분해 되어 맛을 내는 아미노산을 생성하게 된다. *Bacillus*속 세균을 이용한 콩알메주의 발효시간에 따른 아미노산성 질소의 함량은 그림 9와 같다. 발효 초기 8.82 mg%로 나타났으며 2일 발효한 콩알메주를 이용하여 만든 간장은 306.74 ~ 468.02 mg%로 나타나 균주에 따라 아미노산성 질소 함량이 다르게 나타남을 알 수 있었고, 평균 373.38 mg%를 나타내었다. 콩알메주의 발효기간이 증가 할 수 록 균주에 따라 아미노산성 질소 함량은 다소 증가 하여 발효 3일된 콩알메주를 이용하여 제조한 간장의 아미노산성 질소 함량은 416.87 mg%, 발효12일된 콩알메주를 이용하여 제조한 간장의 아미노산성 질소 함량은 453.30 mg%를 보여 주었다.

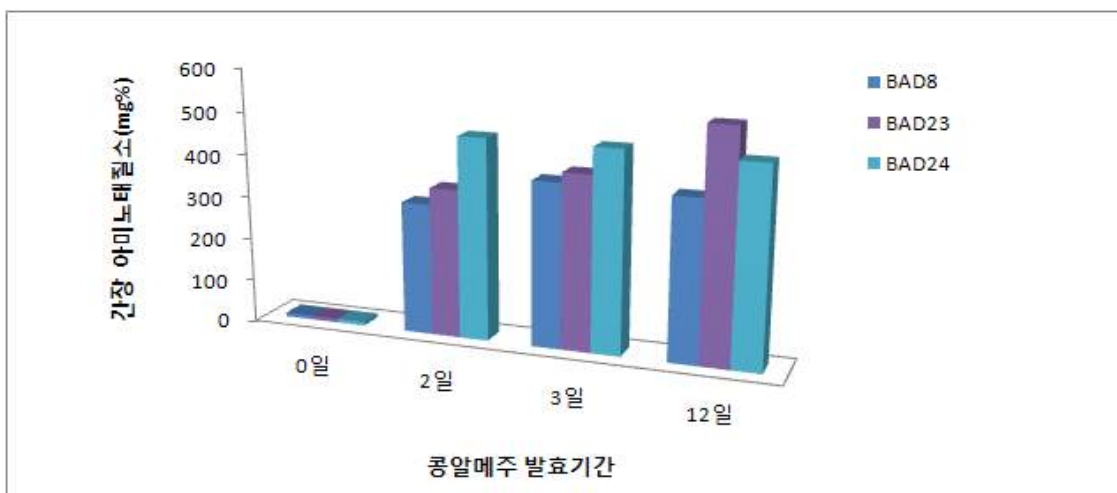


그림 9. 콩알메주의 발효기간에 따른 간장 아미노산성 질소.

(마) 갈색도

간장의 색은 maillard 반응의 산물인 melanoidin 물질에 의한 것으로, 메주 중에 형성된 색소가 침지기간 중 간장으로 용출되거나 간장 내 carbonyl화합물과 amino acid, peptide, protein 등의 amino 화합물을 기질로 하는 maillard 반응을 통해 간장의 색이 형성된다. (김, 1995) 간장의 갈색도를 420nm에서 흡광도를 측정하여 분석한 결과 그림 10과 같다.

발효 0일된 콩알메주로 만든 간장의 갈색도는 0.24로 콩알메주의 숙성기간이 증가함에 따라 갈색도는 증가하여 발효 12일된 콩알메주로 만든 간장의 갈색도는 4.16로 초기 갈색도에 비해 17.35배 이상 증가하였다. 간장의 적당한 갈변은 간장의 색과 향기를 좋게 하여 품질을 향상시키나 지나친 갈변은 영양성분을 감소시키고 맛이나 향기에 나쁜 영향을 끼쳐 간장의 품질을 저하시키는 요인이 되며, 반대로 너무 연한 경우에도 간장의 색에 대한 보편적인 기대에 어긋남으로 바람직하게 여겨지지 않는다.

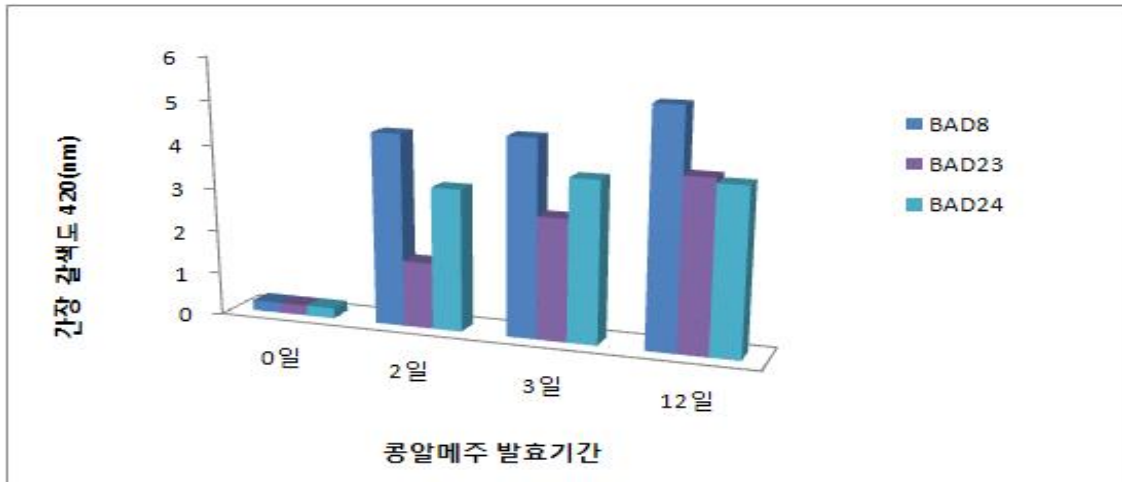


그림 10. 콩알메주의 발효기간에 따른 간장 갈색도.

(바) 바이오제닉 아민 함량

바이오제닉 아민 함량은 균주에 따라 상이한 함량을 보여 주었으며, *B. licheniformis* BAD23의 경우 콩알 메주 제조 시 발효기간이 증가 할수록 tyramine의 함량이 증가하는 경향을 보여 주었다. 이것은 NaCl은 tyrosine decarboxylase활성을 증가시키는 반면 histidine decarboxylase활성을 억제한다(Dischinger, J., M. Josten, C. Szekat, H.Sahl, and G. Bierbaum. 2009.)는 결과와 같은 결과를 보여주었다. 한편 2011년 민속마을에서 21개 수거한 간장의 바이오제닉 아민을 모니터링 결과 histamine은 343.5 ppm tyramine 437.7ppm으로 나타났다. 따라서 간장의 바이오제닉 아민의 생성량을 감소시키기 위해서는 균주 관리가 필요하리라 생각한다.

표 7. 균주 및 콩알메주 발효기간에 따른 간장의 바이오제닉 아민 함량 변화.

시료		바이오제닉 아민(ppm)	
		histamine	tyramine
A*	증자콩	0.0	0.0
	BAD8	0.0	0.0
B	BAD23	0.0	42.0
	BAD24	0.0	0.0
	BAD8	0.0	0.0
C	BAD23	28.4	50.4
	BAD24	0.0	0.0
	BAD8	0.0	0.0
D	BAD23	0.0	223.0
	BAD24	0.0	0.0

A\*: 증자콩을 만든 간장

B : *Bacillus*속 균주를 사용하여 2일 발효하여 제조한 콩알메주로 만든 간장

C : *Bacillus*속 균주를 사용하여 3일 발효하여 제조한 콩알메주로 만든 간장

D : *Bacillus*속 균주를 사용하여 12일 발효하여 제조한 콩알메주로 만든 간장

(사) 관능평가

업체 직원들과 센터직원들을 대상으로 3일 발효시킨 콩알메주를 이용하여 제조한 간장을 가지고 관능평가(순위법)를 실시한 결과 BAD8을 처리한 실험구가 가장 좋은 기호도를 보여주었다.(표 미제시)

(3) 곰팡이 선정

(가) Protease와 α-amylase 활성도 측정

황국균은 protease의 활성도가 높은 *Aspergillus oryzae* SCO1102 선정하였다.

표 8. *Aspergillus oryzae*에 따른 protease 및 α-amylase 활성도 측정.

(Unit : mm)

Strain	Protease activity	α-amylase activity
충무발효	1.76	2.1
SKO1101	2.17	2.5
SCO1102	2.22	2.3
SCO1103	2.16	2.7
SCO1104	2.00	2.4
SCO1105	2.12	1.9

(4) 복발효 메주 제조

(가) 수분함량 변화

메주 발효기간에 따른 수분함량 변화는 그림 11과 같다. 증자콩의 수분함량은 59.27%로 발효기간이 증가 할 수 록 수분함량은 감소하여 발효 8일째 32.60 ~ 35.91%를 나타내었다.

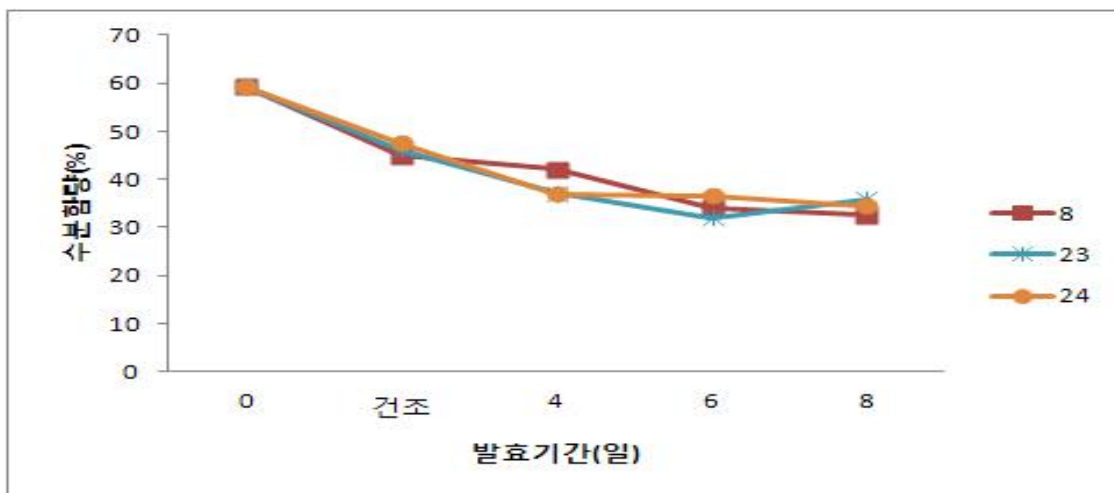


그림 11. 메주 발효 기간에 따른 수분함량 변화.

(나) pH 및 적정산도 변화

대두를 삶아 성형한 초기에는 pH가 6.45이었다가 건조 24시간 후 5.30 ~ 5.88로 감소하였다. 그 이후 조금씩 증가하여 발효 8일째에는 초기 pH 보다 다소 낮은 pH를 보인다. 발효 시간이 경과하면서 pH가 증가하는 것은 미생물의 생육으로 분비되는 효소에 의하여 대두단백질의 분해물 및 암모니아성 질소화합물의 생성에 기인한 것이다. 각 균주별로 유사한 pH 변화 패턴을 보였다. 적정산도는 pH와 반대 경향을 보여 주었다.

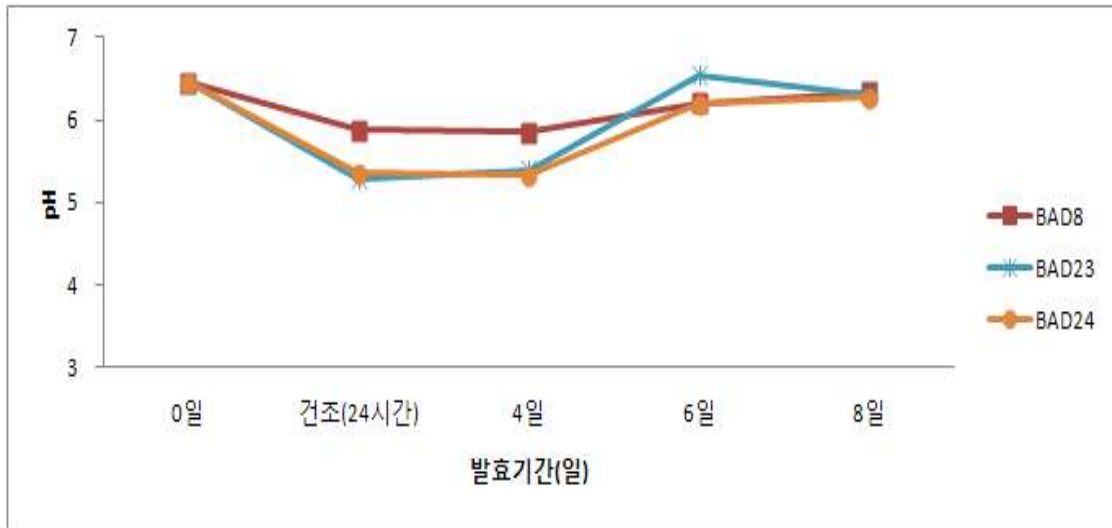


그림 12. 메주 발효기간에 따른 pH 변화.

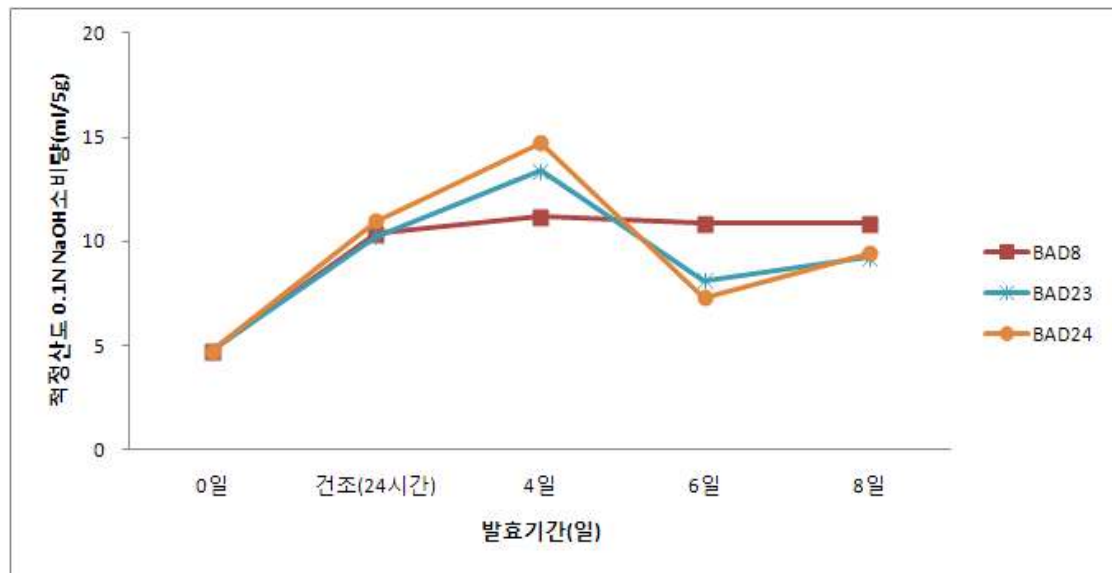


그림 13. 메주 발효기간에 따른 적정산도 변화.

(다) 총질소 변화

총질소의 경우 수분감소에 따라 증가되는 경향으로 초기 3.83%였던 것이 발효 8일 5.39 ~ 5.75%의 함량을 보였다.

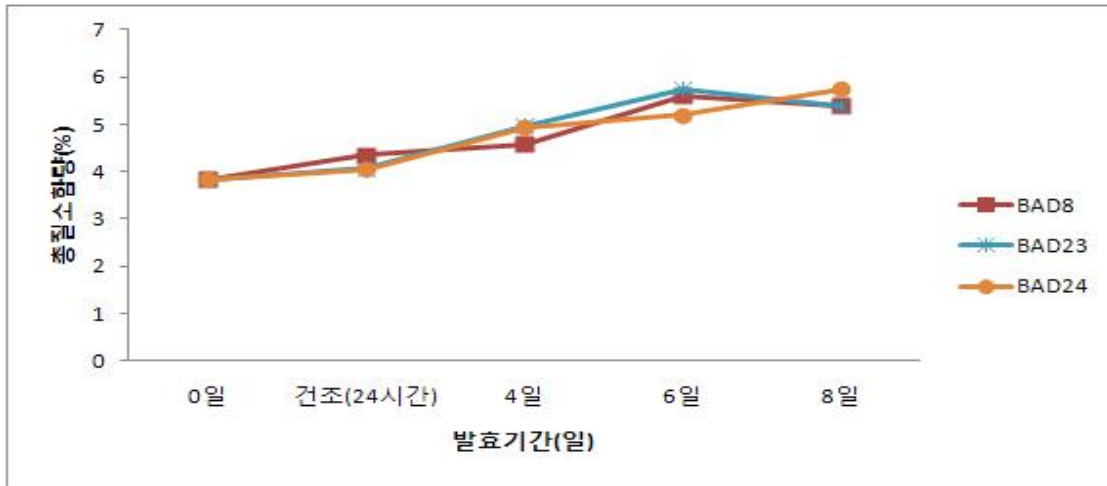


그림 14. 메주 발효기간에 따른 총질소 변화.

(라) 아미노산성 질소 변화

아미노산성 질소 변화는 시험구간에 큰 차이를 보여주지는 않았다. 성형직후 126.13 mg%이 었다가 발효시간이 경과하면서 증가하여 발효 8일째 261 ~ 310 mg%를 보여주었다. BAD23 균주를 사용한 메주는 발효 6일에 290.96 mg%의 최대값을 보여주었으며 그 이후 약간 감소하였다.

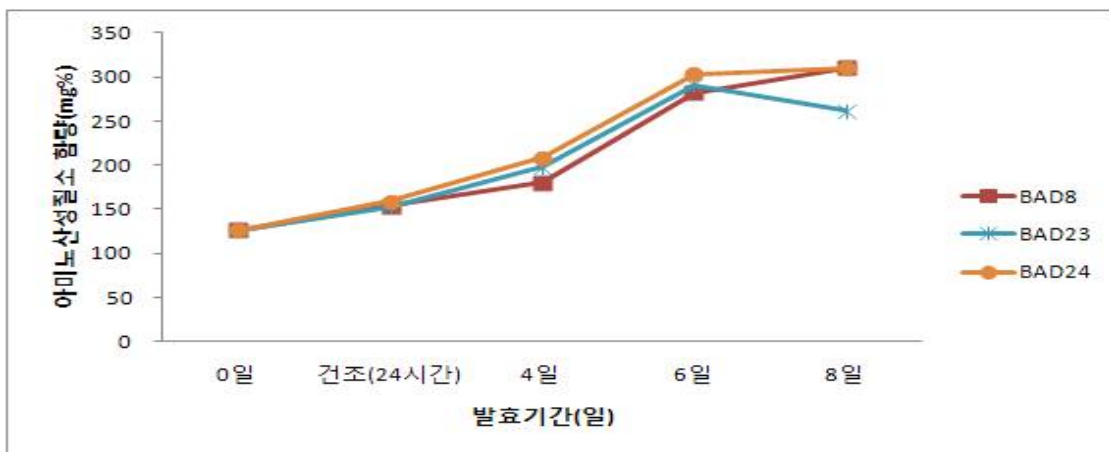


그림 15. 메주 발효기간에 따른 아미노산성 질소 변화.



(마) 암모니아태 질소 변화

암모니아태 질소함량은 초기 0.29 mgN/g이던 것이 발효가 진행됨에 따라 증가하여 발효 8일 3.08 ~ 7.00 mgN/g을 나타내어 사용하는 균주 마다 다른 경향을 보여주어, BAD24균주를 이용한 메주는 BAD8 균주를 이용한 메주(3.08)보다 2배(7.00) 높은 값을 나타내었다.

표 9. 메주 발효기간에 따른 암모니아태 질소 변화.

(Unit : mgN/g)

균주	발효기간(일)		
	0	4	8
BAD8	0.29	0.67	3.08
BAD23	0.29	1.31	6.62
BAD24	0.29	1.03	7.00

(바) 메주의 유리아미노산 함량

메주나 이를 원료로 하여 만든 장류의 유리 아미노산은 직접적으로 발효과정 중 관여 미생물들이 분비하는 Protease에 의하여 대두 단백질이 Peptide로 분해되고 이것을 다시 각종 Peptidase가 작용하여 최종 아미노산으로 분해하는 것으로 알려져 있는데 메주 발효 8일째 유리 아미노산 분석 결과는 표 10에서 보는바와 같다.

균주별 메주에서 확인된 유리 아미노산은 Glutamic acid 등 32종으로 검출되었다.

메주 발효 0일의 유리 아미노산은 검출되지 않았고(데이터 미제시) 발효 8일된 유리 아미노산은 그 함유량으로 볼 때 Glutamic acid가 균주별 평균 15.50%로 가장 많았으며 그 다음으로 Lys(평균 8.39%)> Leu(평균 8.13%)> Ala(평균6.51%)> Phe(평균 6.41%)> NH3(평균 5.84%)> Orn(평균 4.90%)> Val(평균 3.95%)> Asp(평균3.76%)> Ile(평균 3.70%)순으로 보여주었으며, 이상 10종의 아미노산이 70%이상으로 나타났다.

메주 중의 총 유리 아미노산 함량은 균주별로 보면 BAD8번을 이용한 메주는 27,201 ppm, BAD23번을 이용한 메주 16,443 ppm, BAD24번을 이용한 메주는 17,901ppm을 보여 주어 BAD8번을 이용한 메주의 유리아미노산 함량이 가장 높았다. 구수한 맛을 내는 Aspartic acid와 Glutamic acid의 함량은 BAD8을 처리한 메주는 4962.05 ppm, BAD23을 처리한 메주 3368.71 ppm, BAD 24번 3413.53 ppm을 보여주었으며, 단맛을 내는 Serin, Alanine, Proline의 함량은 BAD8을 처리한 메주는 3,724.64 ppm, BAD23을 처리한 메주 1,827.99 ppm, BAD 24번 1885.02 ppm을 보여주었다.

표 10. 메주 유리아미노산 함량(발효 8일)

(unit : ppm(%))

유리 아미노산	BAD8	BAD23	BAD24
p-Ser	260.45(0.96)	183.37(1.12)	261.17(1.46)
Tau	-(0.00)	-(0.00)	-(0.00)
PEA	-(0.00)	-(0.00)	16.81(0.09)
Urea	485.89 (1.79)	18.99 (0.12)	207.02(1.16)
Asp	1,360.58(5.00)	560.44(3.41)	515.49(2.88)
Thr	823.50(3.03)	399.00(2.43)	380.35(2.12)
Ser	1,084.10(3.99)	477.14(2.90)	422.00(2.36)
Glu	3,601.47(13.24)	2,808.27(17.08)	2,898.04(16.19)
Sar	115.71(0.43)	72.59(0.44 )	33.12(0.19)
a-AAA	508.68(1.87)	740.26(4.50)	814.52(4.55)
Gly	688.33(2.53)	262.45(1.60)	252.13(1.41)
Ala	1,776.57(6.53)	1,118.34(6.80)	1,112.63(6.22)
Cit	1,403.01(5.16)	555.59(3.38)	777.27(4.34)
a-ABA	149.93(0.55)	27.00(0.16)	62.04(0.35)
Val	1,178.75(4.33)	635.95(3.87)	653.37(3.65)
Cys	533.65(1.96)	464.61(2.83)	496.37(2.77)
Met	424.24(1.56)	301.29(1.83)	352.29(1.97)
Cysthi	51.36(0.19)	58.53(0.36)	65.13(0.36)
Ile	1,090.07(4.01)	603.40(3.67)	611.36(3.42)
Leu	2,160.51(7.94)	1,329.32(8.08)	1,499.70(8.38)
Tyr	600.00(2.21)	120.55(0.73)	156.20(0.87)
Phe	1,635.74(6.01)	1,057.82(6.43)	1,219.84(6.81)
b-Ala	122.32(0.45)	192.55(1.17)	180.60(1.01)
b-AiBA	239.92(0.88)	122.91(0.75)	159.27(0.89)
g-ABA	281.69(1.04)	255.19(1.55)	267.00(1.49)
EOH <sub>2</sub> NH	120.94(0.44)	126.73(0.77)	166.21(0.93)
NH <sub>3</sub>	1,291.73(4.75)	982.58(5.98)	1,219.43(6.81)
Hylys	-(0.00)	-(0.00)	-(0.00)
Orn	1,013.85(3.73)	1,029.11(6.26)	845.67(4.72)
Lys	2,202.52(8.10)	1,418.64(8.63)	1,514.91(8.46)
1Mehis	-(0.00)	-(0.00)	-(0.00)
His	609.12(2.24)	266.09(1.62)	279.78(1.56)
3Mehis	-(0.00)	-(0.00)	-(0.00)
Ans	173.48(0.64)	-(0.00)	104.55(0.58)
Car	-(0.00)	-(0.00)	-(0.00)
Arg	349.01(1.28)	22.47(0.14)	6.75(0.04)
Hypro	-(0.00)	-(0.00)	-(0.00)
Pro	863.97(3.18)	232.51(1.41)	350.39(1.96)
Total	27,201.11(100.00)	16,443.69(100.00)	17,901.39(100.00)

(사) 메주 발효기간에 따른 바이오제닉 아민 변화

메주 발효에 따른 바이오제닉 아민 중 histamine과 tyramine의 함량을 조사한 결과 발효 0일, 즉 증자콩의 경우 histamine은 0ppm, tyramine은 56.01 ppm을 나타내었고, 발효8일째에는 histamine은 모든 처리구에서 검출되지 않았으며 tyramine은 BAD8번 균주를 처리한 메주에서 133.91 ppm, BAD23번 균주를 처리한 메주에서 231.95 ppm, BAD24번 균주를 처리한 메주에서 336.57 ppm을 나타내었으며, BAD8번 처리한 메주는 BAD24번 처리한 메주보다 2.5 배 적은 값을 보여주었다.

표 11. 메주 발효기간에 따른 바이오제닉 아민 변화.

(unit : ppm)

발효기간	구 분	histamine	tyramine
발효 0일	증자콩	-	56.01
	BAD8	-	133.91
발효 8일	BAD23	-	231.95
	BAD24	-	336.57

(아) 메주 발효기간에 따른 유기산 변화

각각의 균주의 메주 발효과정 중 유기산 함량은 다음 표와 같다. 콩을 증자 한 후의 유기산은 총 3종이 검출되었으며, 이들의 함량은 358.1ppm으로 나타났다. 발효가 진행됨에 따라 유기산은 총 6종이 검출되었으며 점차 함량이 높아져 발효 8일차 총 유기산 함량은 BAD08번의 경우 1069.16ppm, BAD 23번은 4224.11ppm, BAD 24번은 1083.5ppm이 검출되었다. 함량별로는 발효 전기간에 걸쳐 lactic acid가 많이 검출되었으며 중에서도 3113.17ppm으로 BAD23번이 가장 높았다. oxalic acid, citric acid, succinic acid, lactic acid는 발효가 진행됨에 따라 공통적으로 함량이 증가하였고, BAD23번을 제외한 나머지 균주의 메주에서는 formic acid, acetic acid는 발효가 진행됨에 따라 함량이 감소하는 것으로 나타났다.

표 12. 메주 발효기간에 따른 유기산 변화.

(unit : ppm)

	발효 과정	oxalic acid	citric acid	malic acid	succinic acid	lactic acid	formic acid	acetic acid	Total organic acid
BAD8	0일	-	183.92	-	-	159.90	-	14.28	358.1
	건조	0.37	221.06	-	-	297.47	4.60	61.85	585.35
	4일	0.41	254.54	-	-	368.83	4.61	28.51	656.49
	8일	4.88	486.84	-	96.73	369.46	-	116.13	1069.16
Strain BAD23	0일	-	183.92	-	-	159.90	-	14.28	358.1
	건조	0.34	184.36	-	-	211.62	14.34	33.34	444
	4일	2.89	406.93	-	-	383.90	16.73	148.15	955.71
	8일	3.99	768.99	-	36.30	3113.17	131.14	174.51	4224.11
BAD24	0일	-	183.92	-	-	159.90	-	14.28	358.1
	건조	0.34	203.47	-	-	284.60	6.69	29.75	524.85
	4일	10.45	446.33	-	-	343.16	-	104.30	893.79
	8일	3.63	451.02	-	67.59	673.27	-	64.17	1256.05

(자) 메주 발효기간에 따른 protease 활성도 변화

메주 발효기간에 따른 protease 활성도를 측정한 결과 발효시간이 증가 할수록 증가하여 발효 0일째 4.155 unit를 나타내었던 것이 발효 8일째 BAD8번 균주를 처리한 메주 43.23 unit, BAD 23번 균주를 처리한 메주 30.76 unit, BAD24번 균주를 처리한 메주 28.75 unit를 나타내었으며, BAD8번을 처리한 메주가 가장 높은 활성을 보여 주었다.

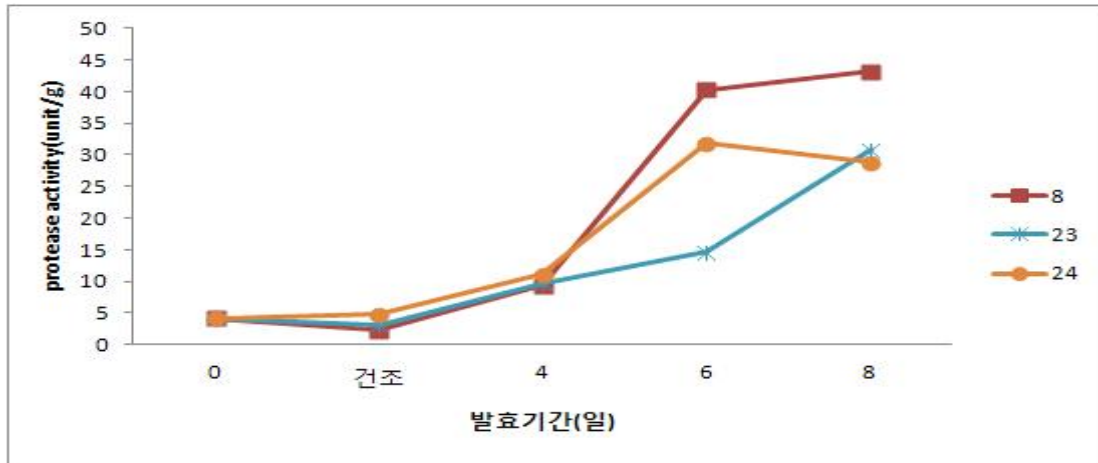


그림 16. 메주 발효기간에 따른 protease 활성도 변화.

(카)  $\alpha$ -amylase 활성도 변화

메주 발효기간에 따른  $\alpha$ -amylase 활성도를 측정한 결과 발효 0일째 29.27 unit를 보여주었으며, 발효 4일째 307.19 ~ 373.33 unit를 보여주어 평균 330.00 unit를 보여주어 발효기간 중 최대값을 보여주었으며 이후 서서히 감소하여 발효 8일째 215.40 ~ 249.51 unit(평균 251.02 unit)를 나타내었다.

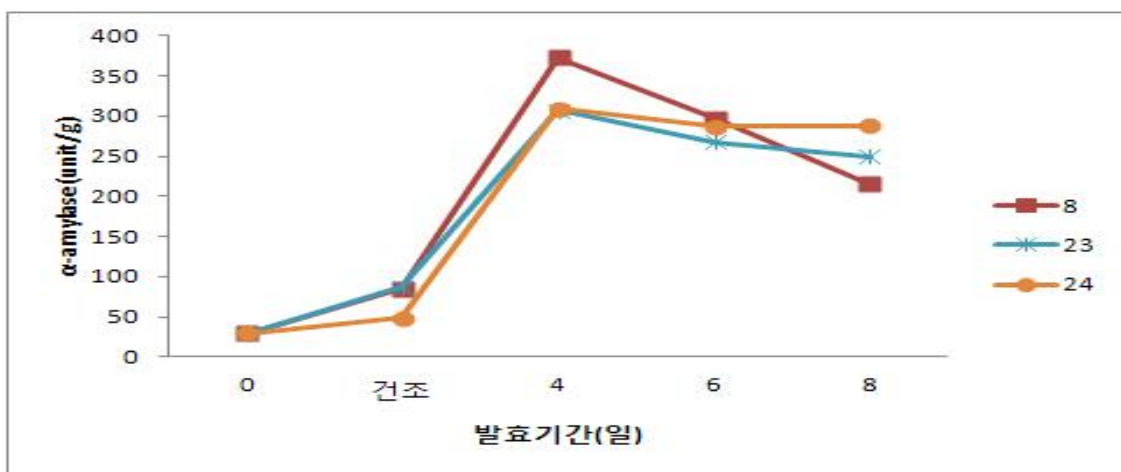


그림 17. 메주 발효기간에 따른  $\alpha$ -amylase 활성도 변화.

(타) 일반세균수 변화

*B. licheniformis* 균주를 이용하여 복 발효 한 메주의 발효기간별 미생물 수를 측정한 결과를 표 13에 나타내었다. 각각의 균주를 이용하여 복 발효시킨 메주의 발효기간별 일반 세균 수는 초기  $1.3 \times 10^6 \sim 2.3 \times 10^7$  로 발효가 진행됨에 따라 점차 증가하는( $2.7 \times 10^9 \sim 4.8 \times 10^9$  CFU/g) 것으로 나타났다.

표 13. 메주 발효기간에 따른 일반세균수 변화.

(unit: CFU/g)

균주	발효기간(일)				
	0	건조	4	6	8
BAD8	$1.3 \times 10^6$	$3.0 \times 10^7$	$1.2 \times 10^9$	$5.5 \times 10^8$	$2.8 \times 10^9$
BAD23	$3.0 \times 10^6$	$3.5 \times 10^8$	$1.3 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$	$2.7 \times 10^9$
BAD24	$2.3 \times 10^7$	$3.6 \times 10^7$	$1.2 \times 10^9$	$1.1 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$

(파) 젖산균수 변화

메주 발효 기간에 따른 젖산균의 변화를 조사한 결과 발효 0일 즉 증자 콩에서는 젖산균이 나타나지 않다가 건조 24시간 후  $1.3 \times 10^7 \sim 3.3 \times 10^7$ 으로 증가하여 메주 제조 시 따로 접종 하지 않았지만 콩의 증자와 메주 발효 과정 중에 성장한 것으로 생각되며 발효가 진행됨에 따라 점차적으로 증가하여 발효 8일째  $4.2 \times 10^8 \sim 4.23 \times 10^9$ 로 증가하였다.

표 14. 메주 발효기간에 따른 젖산균수 변화.

(Unit : CFU/g)

균주	발효기간(일)		
	0	4	8
BAD8	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^9$	$4.2 \times 10^8$
BAD23	$1.5 \times 10^6$	$1.3 \times 10^9$	$2.93 \times 10^9$
BAD24	$3.1 \times 10^6$	$1.8 \times 10^9$	$4.23 \times 10^9$

제2협동으로부터 분양 받은 세균, 곰팡이, 효모를 이용하여 복발효 메주를 만들어 이화학 분석 및 미생물학적 분석을 하였다.

복발효 메주의 수분함량은 초기 59.27%로 발효기간이 증가 할 수 록 감소하여 발효8일째 32.60 ~ 35.91%를 나타내었다. pH는 초기 6.45 이었다가 건조 24시간 후 5.30 ~ 5.88로 감소하였다. 그 이후 조금씩 증가하여 발효 8일째에는 초기 pH 보다 다소 낮은 pH를 보인다. 적정 산도는 pH와 반대 경향을 나타내었다. 총질소의 경우 수분감소에 따라 증가되는 경향으로 초기 3.83%였던 것이 발효 8일 5.39 ~ 5.75%의 함량을 보였다.

아미노산성질소 변화는 초기 126.13 mg%이었다가 발효시간이 경과하면서 증가하여 발효 8일째 261 ~ 310 mg%를 나타내었다. 암모니아태질소 함량은 초기 0.29 mgN/g이던 것이 발효가 진행됨에 따라 증가하여 발효 8일 3.08 ~ 7.00 mgN/g을 나타내었다.

발효8일된 유리 아미노산은 그 함유량으로 볼 때 Glutamic acid가 균주별 평균 15.50%로 가장 많았으며 그 다음으로 Lys(평균 8.39%)>Leu(평균 8.13%)>Ala(평균6.51%)>Phe(평균 6.41%)>NH<sub>3</sub>(평균 5.84%)>Orn(평균 4.90%)>Val(평균 3.95%)>Asp(평균3.76%)>Ile(평균 3.70%) 순으로 보여주었으며, 이상 10종의 아미노산이 70%이상으로 나타났다. 메주 중의 총 유리 아미노산 함량은 균주별로 보면 BAD8번을 이용한 메주는 27,201 ppm, BAD23번을 이용한 메주 16,443 ppm, BAD24번을 이용한 메주는 17,901 ppm을 보여 주어 BAD8번을 이용한 메주의 유리 아미노산 함량이 가장 높았다. 구수한 맛을 내는 Aspartic acid와 Glutamic acid의 함량은 BAD8을 처리한 메주는 4962.05 ppm, BAD23을 처리한 메주 3368.71 ppm, BAD 24번 3413.53ppm을 보여주었으며, 단맛을 내는 Serin, Alanine, Proline의 함량은 BAD8을 처리한 메주는 3,724.64 ppm, BAD23을 처리한 메주 1,827.99 ppm, BAD 24번 1885.02 ppm을 보여주었다.

메주 발효에 따른 바이오제닉 아민 중 Histamine과 Tyramine의 함량을 조사한 결과 발효 0일 Histamine은 0 ppm, Tyramine은 56.01 ppm을 나타내었고, 발효8일째에는 BAD8번 균주를 처리한 메주 133.91 ppm, BAD23번 균주를 처리한 메주 231.95 ppm, BAD24번 균주를 처리한 메주 336.57 ppm을 나타내어 BAD8번을 이용한 균주가 가장 낮은 값을 나타내었다.

프로테아제 활성도는 효0일 째 4.155 unit를 나타내었던 것이 발효 8일째 BAD8번 균주를 처리한 메주 43.23 unit, BAD 23번 균주를 처리한 메주 30.76 unit, BAD24번 균주를 처리한 메주 28.75 unit를 나타내었으며, BAD8번을 처리한 메주가 가장 높은 활성을 나타내었으며, 아밀라아제 활성도는 발효 0일째 29.27 unit를 보여주었으며, 발효 4일째 307.19 ~ 373.33 unit를 보여주어 평균330.00 unit를 보여주어 발효기간 중 최대 값을 보여주었으며 이후 서서히 감소하여 발효 8일째 215.40 ~ 249.51 unit(평균 251.02 unit)를 나타내었다.

미생물 수를 측정 한 결과 일반 세균 수는 초기  $1.3 \times 10^6 \sim 2.3 \times 10^7$  로 발효가 진행됨에 따라 점차 증가하는 ( $2.7 \times 10^9 \sim 4.8 \times 10^9$  CFU/g) 것으로 나타났고 젖산균의 경우 메주 제조 시 따로 접종 하지 않았지만 콩의 증자와 메주 발효 과정 중에 성장한 것으로 생각되며 발효가 진행됨에 따라 점차적으로 증가하여 발효 8일째  $4.2 \times 10^8 \sim 4.23 \times 10^9$ 로 증가하였다.

BAD8번을 이용한 균주가 총유리아미노산, 아미노산성 질소, 프로테아제활성 높고 바이오제닉 아민 함량이 낮았으며 또 BAD8번 균주를 이용한 간장 맛이 관능검사 결과 순위법에서 제일 높게 보여주어 BAD8번 균주를 (주) 순창장류에 사용하도록 하였다.

나. 복발효 메주를 이용한 저염 장류(된장, 간장) 생산

(1) 바실러스 속 및 아스퍼질러스 속 균주를 이용한 콩알메주 제조

(가) 균주 선정 조건

제2협동에서 1차년도 분리한 균주 중 장류 발효 유해 부패균으로 가장 문제시 되는 *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*를 대상으로 항균 spectrum이 넓고 우수했던 *B.licheniformis* SCK B11균주를 활용하였다.

또한 *Aspergillus*는 직접적인 유해균 억제에 관여하지 않지만 같은 flavi group의 *Aspergillus flavus*가 생산하는 1급 발암물질인 aflatoxin을 생산하지 않아야 하며 발효과정에 중요한 protease 및 amylase의 생산 능력이 높아야 하므로 분리한 균주 중 효소활성이 가장 높은 균주 SKM 07을 선택하여 실험에 이용하였다.

표15. 유해균에 대한 분리균주의 억제활성

균주 효소 활성 유해		균주 억제환 직경 (cm)													
Proteas e	Amylas e	<i>B.cereus</i> KACC 10004	<i>B.cereus</i> KACC 11240	<i>B.cereus</i> KACC 13764	<i>B.cereus</i> KACC 13766	<i>B.cereus</i> KACC 13752	<i>B.cereus</i> KACC 10097	<i>S.aureus</i> KACC 1621	<i>S.aureus</i> KACC 1916	<i>S.aureus</i> KACC 1927	<i>S.aureus</i> KACC 3881	<i>M. Luteus</i> KACC 13377	<i>E.coli</i> KACC 13821	<i>P aerugino sa</i> KACC10 259	
SCK B11	0.92	0.84	1.44	1.48	1.38	1.93	1.91	1.83	1.12	1.43	1.88	1.12	2.1	1.1	2.0

표16. 분리균주의 유해물질 생성 유무 및 효소활성

균주	Identification	Aflatoxin 생성 유무	Biogenic amine 생성유무	Protease 활성	Amylase 활성
SKM 07	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	2.5	3.5

(나) 콩알메주의 수분 및 protease activity

메주의 수분은 7.85~7.98%의 범위를 나타내었으며, 메주의 protease activity는 110 ~ 147 unit로 2번 메주가 가장 높은 함량을 나타내었다.

이는 발효특성이 우수한 균주를 2가지씩 복발효하여 대두의 단백질 분해력이 더 높아진 것으로 사료되어진다.



표 17. 콩알메주의 수분 및 프로티아제 활성

	수분(%)	Protease activity(unit)
1*	7.85	110
2	7.98	141
3	7.92	117

1 : 균주 *B.licheniformis* SCK B11, *Aspegillus oryzae* SKM 07

2 : 균주 *B. licheniformis* SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SCAB08, SCAB09

3 : 균주 *B.licheniformis* SCK B11, SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07

## (2) 콩알메주를 이용한 저염 장류의 성분분석

### (가) 된장

#### ① 수분

된장의 수분 함량은 그림 18과 같다.

8%, 14% 된장 모두 숙성 기간에 따라 감소하는 경향을 보여주었다. 3번 처리구가 14일에 8%, 14% 된장 모두 높아지는 경향을 보이긴 했지만 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 8%된장이 14% 된장에 비해 수분이 높게 나타난 이유는 장 분리 시 동일한 시간동안 체에 올려 염수를 분리하였으나 8%의 낮은 염수 염도에 따른 비중의 영향이거나 미생물의 초기 활발한 생육으로 인해 메주의 조직이 연화된 것으로 판단되어진다.

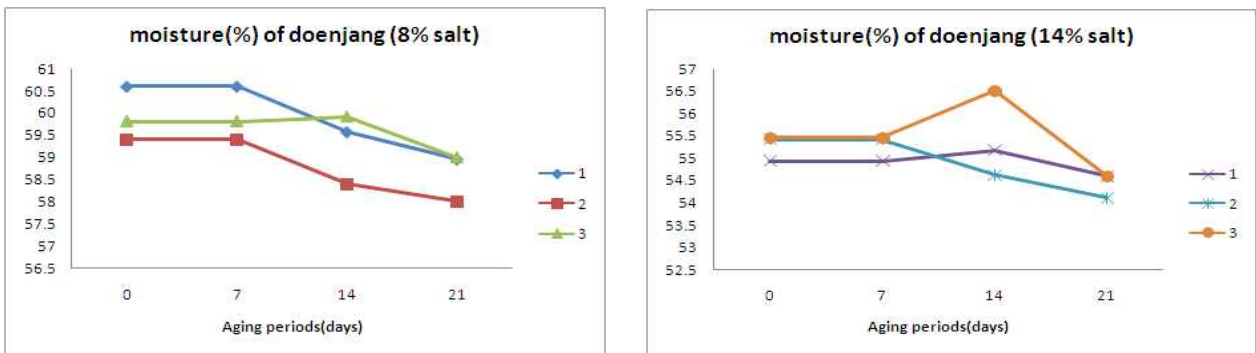


그림 18. 8%된장과 14%된장의 숙성기간에 따른 수분변화

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SCAB08, SCAB09, *Pichia kudriavzevii* SCYK22, SCYK01 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623

② pH 및 적정산도

pH 및 적정산도의 변화는 그림 19와 같다.

pH의 변화는 처리구간 차이는 크지 않았으며, 8% 된장이 14% 된장에 비해 pH가 낮은 경향을 나타내었으며, 적정산도는 pH 감소와 부합하는 경향을 보여주었다. 된장의 pH는 발효 중 지속적으로 감소하고 염 함량이 낮아 젖산균 등이 생육하여 유기산이 다량 생산된 것으로 판단되어진다.

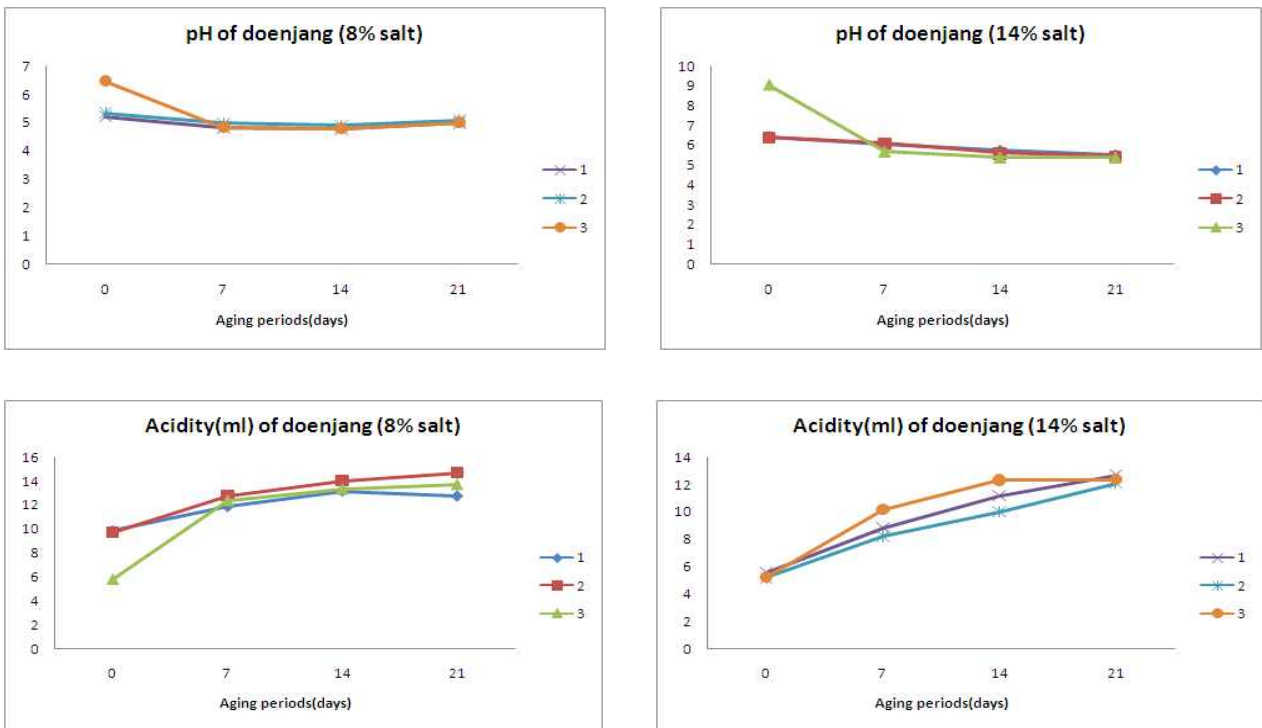


그림19. 8%된장과 14%된장의 숙성기간에 따른 pH 및 적정산도의 변화

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulasporea microellipsoides* 623, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SCAB08, SCAB09, *Pichia kudriavzevii* SCYK22, SCYK01 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulasporea microellipsoides* 623

③ 아미노산성 질소

아미노산성 질소 함량의 변화는 처리구간에 차이를 보여 주었으며, 숙성기간이 지날수록 증가하는 경향을 보여주었다. 8%된장이 발효 21일째 393.60 ~ 544.09 mg%의 함량을 나타내었고, 14%된장은 21일 짜 372.01 ~ 466.26 mg% 의 함량을 나타내었다. 염 농도가 낮은 된장에서 높은 아미노산성 질소 함량을 보인 것은 프로티아제 등 단백질 분해에 관여하는 효소의 활성이 높았기 때문이다.

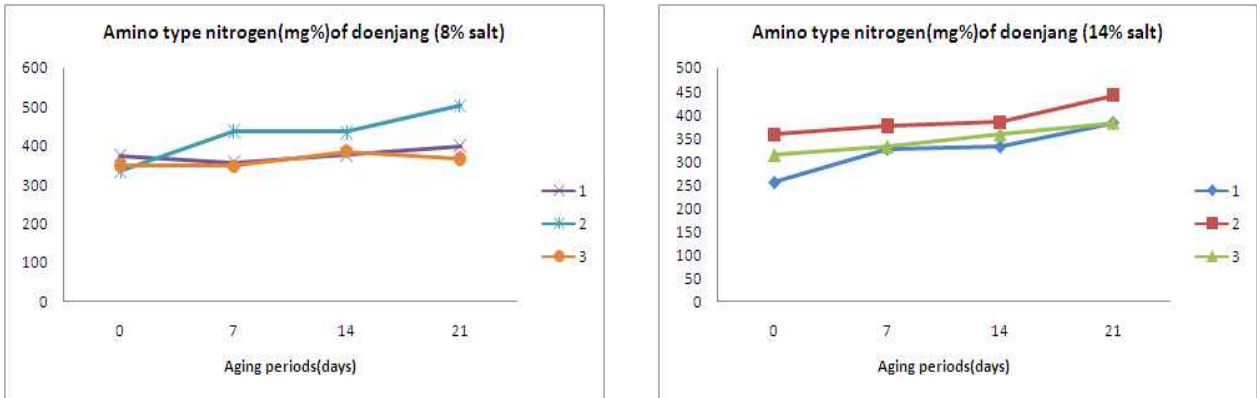


그림20. 8%된장과 14%된장의 숙성기간에 따른 아미노산성 질소 함량 변화

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SCAB08, SCAB09, *Pichia kudriavzevii* SCYK22,SCYK01 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623

(나) 간장

① 총질소

간장의 총질소의 변화는 처리구간 및 염도별 차이를 보여주었다. 처음 초기 1.2 ~ 1.7%의 함량을 나타내다가 숙성기간이 지날수록 감소하는 경향을 나타내었다. 총질소는 간장의 맛 및 간장의 품질에 크게 영향을 미치는 인자로 14%간장이 20% 간장에 비해 더 높은 함량을 나타내었으며, 처리구중 2번 처리구가 높은 함량을 나타내었다. 이는 메주에서 protease activity가 높은 결과와 상응하는 결과값을 보여주었다.

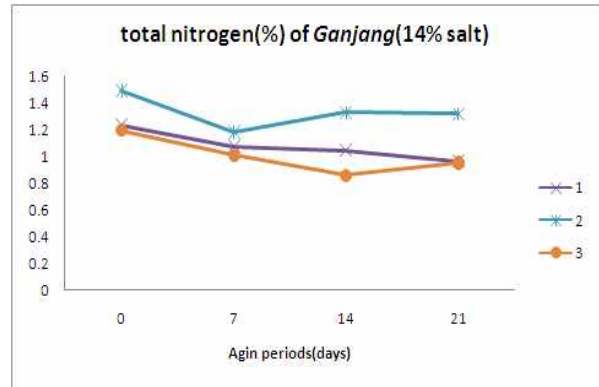
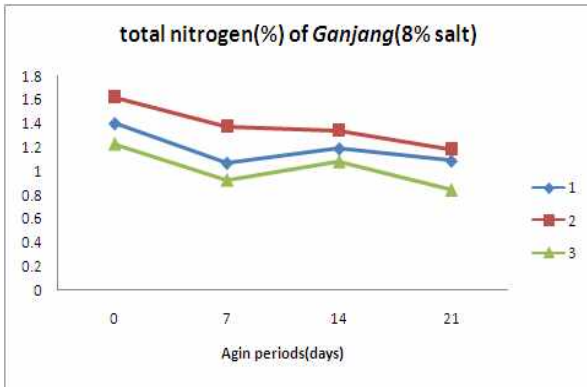


그림21. 14% 간장과 20% 간장의 숙성기간에 따른 총질소 변화

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SCAB08, SCAB09, *Pichia kudriavzevii* SCYK22, SCYK01 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623

② pH 및 적정산도

간장의 pH는 숙성기간에 따라 감소하다가 14일 이후에 다시 높아지는 경향을 보였다. 14% 간장과 20%간장의 pH는 14%간장이 4.9 ~ 5.4를 나타낸 반면 20%간장의 pH는 6.5 ~ 7.8의 범위를 나타내었다. 이것은 낮은 염농도에서 젖산균 등이 생육하여 젖산을 생성하고 초산 등 유기산을 생성하여 pH를 낮추는 것으로 사료된다.

적정산도는 숙성기간에 따라 증가하다가 감소하는 경향을 보여 pH와는 반대의 경향을 나타내었다.

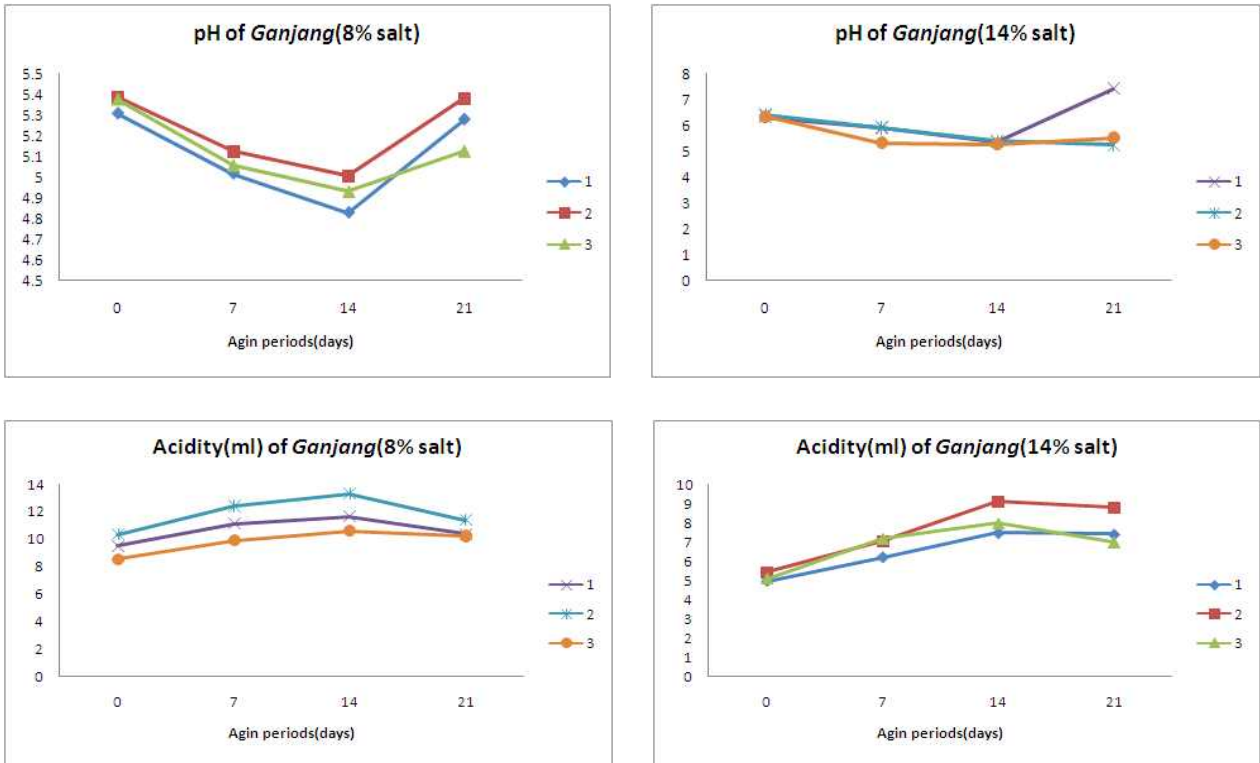


그림22. 14%간장과 20%간장의 숙성기간에 따른 pH 및 적정산도의 변화

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulasporea microellipsoides* 623, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SCAB08, SCAB09, *Pichia kudriavzevii* SCYK22, SCYK01 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulasporea microellipsoides* 623

③ 아미노산성 질소

간장의 아미노산성 질소함량의 변화는 된장의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

염도가 낮은 간장이 높은 간장에 비하여 아미노산성 질소 함량이 높은 결과를 보였으며, 처리구중 2번 처리구가 21일째 440.15, 517.17 mg%의 값을 보여 가장 높은 값을 나타내었다.

이는 2번 처리구 메주 제조 시 접종 균이 다른 처리구에 비해 다양했으며, 이 균들이 단백질 분해에 관여하여 효소활성을 높였기 때문이라고 사료된다.

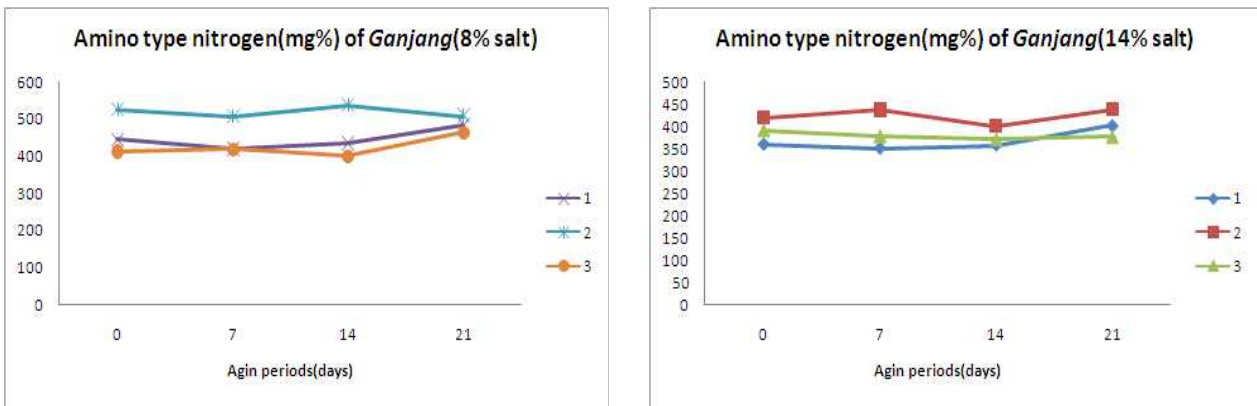


그림23. 14%간장과 20%간장의 숙성기간에 따른 아미노산성 질소 함량의 변화

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SCAB08, SCAB09, *Pichia kudriavzevii* SCYK22, SCYK01 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623

(다) 된장 및 간장의 미생물학적 특성

메주, 된장, 간장의 미생물 분석 결과는 표 18과 같다.

모든 처리구에서 식중독 미생물은 검출되지 않았으며, 세균수는 0일에는  $10^9 \sim 10^{10}$  CFU/g을 보이다가 숙성 21일째는  $10^{11} \sim 10^{13}$  CFU/g으로 증가하는 경향을 보였다. 보통 된장의  $10^5 \sim 10^6$  CFU/g보다는 많은 세균양이지만 이는 메주 제조 시  $10^6$  CFU/g 이상의 선발균을 접종 한 이유와 일반 상온 28°C 이상의 숙성온도로 인하여 다량의 세균이 증식한 것으로 사료된다.

그러나 8%와 14% 염도의 차이에는 유의적인 차이는 보이지 않았다.

진균수는 초기  $10^4 \sim 10^5$  CFU/g을 보이다가 점차 증가하여 21일째에  $10^5 \sim 10^7$  CFU/g의 분포를 보였다. 염 농도 가 낮은 장류에서 진균수가 약간 높은 수치를 나타내었다.

표18. 된장과 간장의 미생물학적 특성

unit : log10 CFU/g

		세균수		진균수		<i>Salmonella</i> spp.	<i>E.coli</i> O157	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Cl.pefri gense</i>	<i>Vibrio</i>		
		0일	21일	0일	21일								
메주	1	10.35		4.23		ND	ND	ND	ND	ND	ND		
	2	10.25		4.12		ND	ND	ND	ND	ND	ND		
	3	10.06		3.52		ND	ND	ND	ND	ND	ND		
된장	8%	1	10.52	13.24	5.25	6.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		2	11.23	14.23	5.45	6.24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	14%	3	10.59	12.63	6.25	7.36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		1	10.23	12.23	4.52	5.45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	간장	14%	2	11.24	13.45	4.34	5.41	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			3	11.32	13.55	4.24	5.42	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20%		1	9.98	11.11	5.35	6.43	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		2	11.02	13.55	5.45	6.21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	3	1	9.87	11.10	5.62	6.87	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		1	9.94	11.45	4.33	5.45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	3	10.78	12.55	5.00	6.21	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
	3	10.53	12.62	4.32	5.45	ND	ND	ND	ND	ND	ND		

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SCAB08, SCAB09, *Pichia kudriavzevii* SCYK22, SCYK01 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspota microellipsoides* 623

(라) 저염 장류의 관능평가

저염 장류(된장, 간장)의 관능평가를 실시 한 결과는 아래 표19, 20과 같다.

된장은 1번 처리구가 색과 향 면에서 각각 4.17, 3.69를 나타내었으며, 짠맛은 특성강도에 따라 측정된 결과 된장은 1번 처리구에서 간장은 3번 처리구가 가장 낮은 값을 나타내었다. 전체적인 기호도면에서 된장, 간장 모두 1번 처리구에서 각각 4.20, 4.08로 가장 높은 선호도를 나타내었다.

기타의견으로는 된장의 2번 처리구는 쿼퀴한 맛이 나고, 3번 처리구는 청국장 향이 강하다는 평가를 보였다. 이는 메주에 사용하는 미생물의 차이로 2번 처리구에 복합적인 균의 조합이 서로 조화롭지 못했다는 결론을 가져왔다고 사료된다.

표19. 8% 염도의 된장

Sensory characteristics	1	2	3
Color	8.17±0.57 <sup>a1)</sup>	3.20±0.74 <sup>b</sup>	5.84±0.64 <sup>a</sup>
Flavor	5.69±0.63 <sup>a</sup>	3.35±0.77 <sup>b</sup>	5.54±0.66 <sup>a</sup>
Salt taste	3.68±0.75 <sup>b</sup>	5.46±0.66 <sup>a</sup>	5.69±0.63 <sup>a</sup>
Overall preference	8.20±0.73 <sup>a</sup>	3.46±0.78 <sup>b</sup>	7.08±0.38 <sup>a</sup>

표20. 14% 염도의 간장

Sensory characteristics	1	2	3
Color	8.94±0.56 <sup>a1)</sup>	8.02±0.32 <sup>a</sup>	5.04±0.66 <sup>b</sup>
Flavor	8.02±0.75 <sup>a</sup>	5.70±0.45 <sup>a</sup>	5.00±0.77 <sup>b</sup>
Salt taste	5.40±0.24 <sup>a</sup>	5.46±0.52 <sup>a</sup>	3.76±0.62 <sup>b</sup>
Overall preference	8.08±0.38 <sup>a</sup>	5.56±0.75 <sup>b</sup>	5.98±0.23 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Mean±standard deviation (n=16)

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulasporea microellipsoides* 623, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SCAB08, SCAB09, *Pichia kudriavzevii* SCYK22, SCYK01 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCCB1231, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulasporea microellipsoides* 623



다양한 균주(2협동 분양균주)를 이용하여 낱알메주를 제조한 결과 2번 처리구가 가장 높은 단백질분해력을 보여주었다. 된장에서는 수분, pH, 적정산도, 아미노산성 질소 함량에서 염농도에 따른 차이를 보였으며, 8% 염농도의 된장이 pH는 낮고 아미노산성 질소 함량이 높은 결과를 보여주었다.

간장에서는 총질소, pH, 적정산도, 아미노산성 질소 함량에서 염농도에 따른 차이를 보였으며 14%의 간장이 pH는 낮고 아미노산성 질소, 총질소 함량이 높은 결과를 보여주었다.

식중독 미생물은 된장, 간장 모두 검출되지 않았으며, 세균은 숙성 기간이 지날수록 많은 세균수를 나타냈으며, 진균은 숙성 초기에 비하여 숙성 21일째에 1 log 정도가 증가되었다.

관능평가를 실시한 결과 1번 처리구가 가장 높은 선호도를 보여주었으며, 2번과 3번 처리구는 1번에 비하여 낮은 점수를 획득하였다.

부패 지표로 쓰이는 식중독 미생물은 8%나 14% 염농도에서 모두 검출이 되지 않아 8% 된장 및 14% 간장의 제조가 가능하며, 8%된장과 14% 된장이 고염 된장이나 간장에 비하여 낮은 pH를 나타냈지만 이는 관능 시 관능요인들이 느낄 수 있을 만큼의 신맛은 아니었다. 또한 보통 장을 담는 시기가 봄과 겨울에 이루어지는 것을 미루어 볼 때 숙성이 28℃ 이상에서 이루어진 점을 고려한다면 pH 및 산도의 차이는 시기 변화를 적절히 맞춘다면 8% 저염 된장 및 14% 저염간장의 적용이 가능할 것이라고 판단되어진다. 또한 저염 장류의 AN 및 총질소 함량으로 미루어 볼 때 2주 ~ 3주 정도의 숙성기간에 충분히 소화흡수가 가능한 아미노산으로 가수분해 되었을 것으로 판단되어 숙성기간은 2주~4주가 적당하다고 판단되어진다.

균주 처리구 중 2번 처리구는 총질소, 아미노산성 질소 함량이 다른 처리구에 비해 높게 나타났지만 다양한 특성을 가지는 균주의 부조합으로 인해 관능면에서는 좋지 않은 결론을 보여주었다. 따라서 관능적인 특성면에서 뛰어나고 총질소나, 아미노산성 질소 함량에서 크게 차이가 나지 않는 1번 처리구의 균주 조합을 (주)순창장류에 보급하여 시제품 생산에 적용할 예정이다.

### (3) 사각메주 및 저염 장류 생산(참여기업 적용, 제3협동 공동 진행)

#### (가) 사각메주의 이화학적 특성

사각메주를 제조하여 분석한 결과 메주의 수분은 39.1 ~ 40.5%의 함량을 나타내었다.

pH는 처리구간 큰 차이를 보이지 않았으며, 적정산도는 이와 부합하는 결과를 보여주었다.

단백질 분해 활성은 74.2 ~ 116.8 unit/g으로 2번 처리구가 가장 높은 활성을 나타내었다. 아미노산성 질소 함량은 처리구간 큰 차이를 보이지 않았지만 1번 대조구의 값이 455.1 mg%로 가장 높은 값을 나타내었다. 일반적으로 아미노산성 질소 함량은 단백질 분해력의 결과와 비례하는 것으로 알고 있었으나 본 실험에서는 상이한 결과를 보였다.

표 21. 균주별 사각메주의 품질특성

구분	수분 (%)	pH	Protease activity (unit/g)	적정산도 (ml)	아미노산성 질소 (mg%)
1	40.3	6.3	80.2	21.3	455.1
2	40.5	6.3	116.8	21.2	454.6
3	39.1	6.5	74.2	17.9	430.6

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효), 대조구, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11,, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspora microellipsoides* 623 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulaspora microellipsoides* 623

(나) 사각메주의 미생물학적 특성

사각메주의 미생물학적 특성을 분석한 결과 식중독 미생물 6종은 3 처리구 모두 검출되지 않았다. 세균수는  $10^{10} \sim 10^{11}$ CFU/g의 분포를 보였고, 대두에서 발견되지 않았던 대장균군에서  $10^1$ CFU/g 정도의 수치를 보였다. 이는 본 보고서에는 데이터를 실지 않았지만 작업장 환경의 위생의 오염 문제로 swap test를 실시한 결과 밝혀졌으며, 이는 작업장의 위생수준을 철저히 할 경우 문제가 없을 것으로 사료된다. 진균수는 처리구별 차이를 보이지 않아  $10^4$  CFU/g의 수치를 나타내었다. 또한 장류에서 문제시 되고 있는 식중독균인 바실러스 세레우스는  $10^1 \sim 10^3$ CFU/g의 범위를 나타내었지만 식약처 허용기준인  $10^4$ CFU/g 범위 안의 결과로 나타났다.

표22. 사각메주의 미생물학적 특성

Unit : log10 CFU/g										
구분	세균수	<i>E.coli</i>	진균수	<i>B. cereus</i>	<i>Salmorella</i> spp.	<i>E.coli</i> O157	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Cl. perfringens</i>	<i>Vibrio</i>
증자량	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	10.09	0.10	4.68	1.48	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	11.26	1.08	4.48	3.70	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	10.27	0.88	4.12	1.48	ND	ND	ND	ND	ND	ND

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효), 대조구, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11,, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspora microellipsoides* 623 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulaspora microellipsoides* 623

(다) 사각메주 염수 침지 후 염수의 품질특성

사각메주는 4주간 침지하여 장 분리를 실시하도록 하였고 4주간 침지 후 염수의 품질특성을 분석한 결과는 아래 표23 과 같다.

염수의 당도는 침지 중 아미노산성 질소와 마찬가지로 숙성도를 가늠할 수 있는 지표로서 쓰이고 있다. 염수의 당도를 측정한 결과 8%는 23.0 ~ 23.8 brix로 14% 염수 27.7~28.0 brix 에 비하여 낮은 수치를 나타내었다. 이는 미생물이 빠르게 생육하여 당을 소비한 것으로 판단되어 지며 이것은 8%염수가 숙성이 더 빠르게 진행되는 것을 알 수 있었다.

염수의 염도는 8%와 14%에서 각각 14.1 ~ 15.0%와 20.6 ~ 21.4%의 범위를 나타내었다. pH 는 8%처리구가 14% 처리구에 비해 낮은 pH를 나타내었다. 이는 효모를 첨가 했음에도 불구하고 숙성온도가 높은 점을 미루어 볼 때 효모의 알콜 생성력이 미생물의 생육저하에 도달하기 전에 젖산균이 급속히 성장하여 산을 생성한 것과 유리당의 빠른 소실로 인해 효모의 알콜 생성능이 충분히 이루어지지 못한 것으로 판단되어진다. 산도는 pH 결과와 부합하는 결과를 보여줬으며, TN 및 무의 함량은 8% 처리구가 14% 처리구에 비하여 더 높은 수치를 나타내었다. 이는 lab scale test의 결과와 부합되는 결과였다.

표23 사각메주의 염수 품질특성

구분	처리구	당도 (brix)	염도 (%)	pH	TN (%)	산도 (ml)	아미노산성 질소(mg%)
8%	1	23.0	14.9	4.7	0.8	16.3	340
	2	23.2	14.1	4.6	0.8	18.3	392
	3	23.8	15.0	4.7	0.9	16.6	336
14%	1	28.0	21.4	5.5	0.7	9.6	276
	2	27.9	20.6	5.3	0.7	10.2	229
	3	27.7	20.8	5.8	0.7	8.5	230

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효),대조구, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11,, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulasporea microellipsoides* 623 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulasporea microellipsoides* 623

## (라) 된장과 간장의 품질특성

메주는 각각의 염수에 침지 후 4주 후에 된장과 간장으로 분리하였고 이를 숙성하면서 0일, 6일, 12일에 걸쳐 샘플링하여 품질특성을 살펴보았다. 된장과 간장의 제조는 제3협동과 공동으로 진행하였으며, 분석 결과에 전문성을 두기 위하여 이화학적 분석 및 미생물학적 분석 등을 나누어 연구하였다.

### ① 일반성분 변화

된장과 간장의 품질특성을 살펴본 결과 된장의 수분은 숙성기간에 따라 일정하게 유지되었지만 8% 처리구가 14% 처리구에 비하여 3 ~ 4% 높게 측정되었다. 또한 이와 부합되는 결과로 염도의 값이 목표 염도인 8%보다 9 ~ 10%로 높게 측정되었다. 이는 목표수분함량에 비해 높게 측정된 실제 수분 함량의 영향으로 판단되며, 8% 된장은 염도의 비중에 따른 메주의 수분 침투력이 다르기 때문이라도 판단된다. 된장의 pH는 처리구간 큰 차이를 보이지 않았으며, 숙성기간에 따라 감소하다가 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 아미노산성 질소의 변화는 처리구간의 큰 차이는 아니지만 8% 처리구가 14% 처리구에 비하여 더 높은 함량을 나타내었다.

염수침지 단계에서 8% 처리구와 14% 처리구간 분석항목 대부분에서 확연한 편차를 보인 반면에 된장 숙성단계에서는 증감속도 둔화와 함께 처리구간 또는 처리구별 대조구/실험구 간 차이가 줄어든 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 구분항목인 염도를 제외하면 산도 이외에 처리구 간 분석항목 편차가 확연하게 나타나지 않았다.

간장의 경우 마찬가지로 pH나 적정산도를 제외하고 염도나 당도 등 처리구간 큰 차이를 보이지 않았으며 아미노산성 질소와 TN값은 8% 처리구가 높게 나타났다. 그중 처리구 중 8% 2번 처리구의 값이 가장 높게 나타났다.(제3협동 결과 참고)

### ② 유기산 변화

유기산의 변화는 표24 와 같다.

유기산으로는 oxalic acid, citric acid, succinic acid, lactic acid, formic acid, acetic acid 6종에 대하여 분석하였고 6종 모두 검출되었다. 메주에서는 증자콩에서 검출되지 않았던 succinic acid, lactic acid, formic acid, acetic acid가 검출되었으며, 장류에서 다량 검출되는 lactic acid의 함량은 1번 메주에서 12.94%로 가장 높게 나타났다.

유기산 함량은 7일차까지는 증가하다가 14일 째에는 다시 낮아지는 경향을 보였다. 된장에서는 1번 처리구가 7일차 가장 높은 lactic acid 함량을 나타내었으며, acetic acid 함량은 8% 된장이 14% 된장보다 대체적으로 높게 나타났다. acetic acid는 장류의 주 휘발성 유기산으로 젖산 함량이 높은 코지를 사용한 장류에서 많이 생성된다는 보고와 일치하는 경향으로 8% 된장이 14% 된장에 비해 유기산 함량이 높은 점으로 pH의 변화와 부합되는 결과이다.

간장 역시 lactic acid와 acetic acid함량이 가장 높게 나타났으며, 8%된장이 14%된장에 비해 유기산 함량이 더 높게 나타나는 결과를 나타내었다.

표24. 된장과 간장의 숙성기간에 따른 유기산의 변화

Unit : %

		숙성 일수	oxalic acid	citric acid	succinic acid	lactic acid	formic acid	acetic acid	합계
증자콩			0.10	6.67	-	-	0.52	-	7.29
		1*	0.10	2.62	-	12.94	7.07	-	22.73
메주		2	0.09	1.26	0.21	10.38	8.87	1.49	22.3
		3	0.15	1.84	-	10.59	6.51	1.94	21.03
		0	0.10	0.20	-	12.13	1.18	2.66	16.27
1		6	0.08	0.68	0.14	14.02	0.14	1.79	16.85
		12	0.08	1.39	0.20	9.25	0.06	0.95	11.93
된장 (8%)		0	0.10	0.31	-	9.71	0.43	3.39	13.94
		2	0.08	1.23	0.17	11.00	0.31	1.15	13.94
		12	0.04	0.61	0.24	9.03	0.22	1.19	11.33
		0	0.16	0.62	0.10	8.28	2.20	1.44	12.8
3		6	0.11	2.01	0.17	10.17	0.17	1.12	13.75
		12	0.04	0.43	0.18	10.68	0.10	1.35	12.78
		0	0.16	0.64	0.24	5.24	1.11	1.19	8.58
1		6	0.11	1.13	0.20	8.64	0.16	0.98	11.22
		12	0.04	0.39	0.20	6.81	0.05	0.63	8.12
된장 (14%)		0	0.10	0.65	0.18	4.08	0.37	3.10	8.48
		2	0.06	2.01	0.24	5.18	0.39	0.63	8.51
		12	0.02	0.94	0.22	3.01	0.15	0.36	4.7
		0	0.12	0.57	-	11.25	2.99	4.26	19.19
3		6	0.11	1.99	0.17	8.46	0.12	0.96	11.81
		12	0.05	1.04	0.20	6.93	0.03	0.69	8.94
		0	0.03	-	-	15.86	0.78	4.23	20.9
1		6	0.01	0.54	0.17	15.92	0.08	2.04	18.76
		12	0.04	0.38	0.19	15.97	0.03	1.72	18.33
간장 (14%)		0	0.04	0.24	-	12.83	0.41	6.13	3.27
		2	0.02	0.72	0.29	14.37	0.29	1.74	17.43
		12	0.03	0.43	0.24	13.61	0.20	1.86	16.37
		0	0.05	0.73	-	12.62	3.52	3.57	20.49
3		6	0.05	1.51	0.22	13.24	0.14	1.41	16.57
		12	0.04	1.44	0.19	13.21		1.32	16.2
		0	0.05	0.37	0.26	6.52	1.78	2.02	11
1		6	0.03	0.90	0.27	8.23	0.09	0.89	10.41
		12	0.04	1.32	0.23	9.70		0.89	12.18
간장 (20%)		0	0.08	0.56	0.28	5.52	1.84	2.29	10.57
		2	0.02	1.36	0.37	6.62	0.27	0.69	9.33
		12	0.02	0.89	0.28	8.12	0.03	0.66	10
		0	0.09	0.72	0.27	5.03	1.69	1.02	8.82
3		6	0.05	1.70	0.28	6.30	0.04	0.68	9.05
		12	0.03	1.64	0.28	5.41	0.18	1.32	8.86

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11., SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspora microellipsoides* 623 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulaspora microellipsoides* 623

### ③ 유리당 변화

된장과 간장의 숙성기간 중 유리당의 변화는 표25 와 같다.

유리당은 증자된 콩에서 총 유리당이 23.24%를 나타내다가 점차 감소하는 경향을 보여주었다. 또한 증자된 콩에서 검출되지 않았던 maltose는 발효가 진행되면서 생기기도 하였다. 각각의 메주에서 fructose, glucose, sucrose, maltose 가 검출되었으며, 이들은 된장이나 간장 숙성 중 점차 소실되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 메주가 소금물에 침지 중 어느 정도의 소실이 이루어진 것으로 보인다.

또한 대두에서 유리되는 당으로 sucrose가 있는데 이는 초기 증자된 콩에서 20.72%의 함량이 검출되었으나 된장이나 간장의 숙성기간이 경과함에 따라 0.01~3.57% 감소하여 소실되었고 반면에 fructose와 glucose의 함량은 소량 증가하였다. sucrose 함량이 숙성 중 감소 원인은 미생물의 작용으로 인하여 sucrose로부터 fructose와 glucose로 유리된 것으로 사료된다.

처리구별로 유리당 함량은 차이를 보이지 않았으나 염농도 별로는 총 유리당 함량이 염도가 낮은 장류에서 더 낮다는 것을 확인할 수 있었다. 저염 처리구에서는 미생물이 보다 빠르게 생육하여 당을 빠르게 소비하여 잔당의 함량이 낮아진 것으로 사료된다.

따라서 저염 장류 제조 시 효모의 알콜 발효를 위해 쌀 코지 제조 등 적당한 비율의 보당 작업이 필요할 것으로 보여진다.

표25. 된장과 간장의 숙성기간에 따른 유리당의 변화

Unit : %

		숙성 일수	fructose	glucose	sucrose	maltose	합계
증자콩			1.15	1.37	20.72	-	23.24
	1*		4.00	4.18	2.34	1.66	12.18
메주		2	2.28	6.34	2.35	1.65	12.62
		3	1.97	3.68	1.53	0.05	7.23
		0	1.84	0.74	1.12	1.06	4.76
1		6		1.23	3.71	0.52	5.46
		12		1.25		1.73	2.98
된장(8%)		0	2.07	1.35	0.73	0.04	4.19
	2	6		1.82		0.88	2.7
		12		1.19		3.17	4.36
		0	1.67	1.32	1.57	0.95	5.51
3		6	0.82	1.59	3.39	1.31	7.11
		12	0.22	0.79	0.23	2.09	3.33
		0	-	1.87	3.57	1.02	6.46
1		6		3.99	1.67	2.15	7.81
		12		0.38		0.79	1.17
된장(14%)		0	1.21	1.84	0.24	0.99	4.28
	2	6		8.61	2.71	1.28	12.6
		12		0.95		2.40	3.35
		0	1.29	1.66	0.92	0.51	4.38
3		6	1.08	1.63	0.84	1.14	4.69
		12		0.18		2.55	2.73
		0	-	0.32	1.05	0.80	2.17
1		6	0.19	0.79	0.84	1.21	3.03
		12				1.49	1.49
간장(14%)		0	0.05	0.41	1.09	-	1.55
	2	6	0.72	1.39		0.81	2.92
		12				0.53	0.53
		0	-	-	0.29	0.68	0.97
3		6	0.45	0.52		1.92	2.89
		12		0.41			0.41
		0	0.74	1.54	1.17	-	3.45
1		6		2.12	1.04	1.52	4.68
		12		0.03			0.03
간장(20%)		0	0.53	1.49	1.17	2.25	5.44
	2	6	0.47	5.01	3.08	3.02	11.58
		12		0.90		1.05	1.95
		0	0.69	1.45	1.18	-	3.32
3		6		2.33	2.26	1.14	5.73
		12		0.84	0.01	0.79	1.64

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11., SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspora microellipsoides* 623 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulaspora microellipsoides* 623

#### ④ 유리아미노산

유리 아미노산은 직접적으로 발효과정 중 관여 미생물들이 분비하는 Protease에 의하여 대두 단백질이 Peptide로 분해되고 이것을 다시 각종 Peptidase가 작용하여 최종 아미노산으로 분해하는 것으로 알려져 있는데 유리 아미노산 분석 결과는 표 26에서 보는바와 같다.

증자콩, 메주, 된장, 간장에서 확인된 유리아미노산은 29종이 검출되었다.

유리아미노산 중 그 함유량으로 볼 때 대표적인 감칠맛(umami)성분으로 알려져 있는 glutamic acid가 가장 많았다. 이와 같이 감칠맛을 내는 Aspartic acid와 glutamic acid는 처리구 중 8% 간장의 3번 처리구가 가장 높은 값을 보여주었다. 염도별 처리구별로 유리아미노산의 함량은 차이가 없었으며, 쓴맛 아미노산 (valine, methionine, leucine, phenylalanine, arginine) 및 단맛(Serin, Alanine, Proline) 역시 8% 간장의 3번 처리구가 높은 것으로 나타났다. 이는 8% 간장 3번 처리구가 다양한 맛을 내는 것으로 나타났다.



표 26. 증자콩, 메주, 된장, 간장의 유리아미노산

Unit : %

Amino acids	증 자 콩	메주			8%된장			14% 된장			8% 간장			14% 간장		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Phosphoethanol amine	-	0.14	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	0.48	1.61	1.02	-	-	-	-	0.02	-	-	-	-	-	0.26	-	-
<b>Aspartic Acid</b>	<b>1.29</b>	<b>1.33</b>	<b>0.62</b>	<b>0.07</b>	<b>0.59</b>	<b>0.77</b>	<b>1.15</b>	<b>0.84</b>	<b>0.65</b>	<b>0.96</b>	<b>0.75</b>	<b>0.90</b>	<b>1.69</b>	<b>0.99</b>	<b>0.76</b>	<b>0.80</b>
Threonine	0.75	0.70	0.40	0.05	0.26	0.42	0.43	0.70	0.65	0.51	0.26	0.45	0.39	0.77	0.74	0.53
<b>Serine</b>	<b>1.27</b>	<b>1.07</b>	<b>0.54</b>	<b>0.06</b>	<b>0.70</b>	<b>0.88</b>	<b>0.88</b>	<b>0.99</b>	<b>0.93</b>	<b>0.86</b>	<b>0.80</b>	<b>1.05</b>	<b>1.05</b>	<b>1.07</b>	<b>1.03</b>	<b>0.82</b>
<b>Glutamic Acid</b>	<b>4.49</b>	<b>4.18</b>	<b>3.69</b>	<b>0.44</b>	<b>4.15</b>	<b>4.01</b>	<b>4.03</b>	<b>3.84</b>	<b>3.63</b>	<b>3.84</b>	<b>4.81</b>	<b>5.00</b>	<b>5.50</b>	<b>4.32</b>	<b>2.89</b>	<b>3.40</b>
Sarcosine	0.21	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Aminoadipic Acid	0.33	0.34	0.32	-	0.30	0.24	0.21	0.26	0.22	0.24	0.39	0.36	0.36	0.29	0.27	0.23
<b>Proline</b>	-	<b>0.72</b>	<b>0.33</b>	-	<b>0.54</b>	<b>0.61</b>	<b>0.58</b>	<b>0.55</b>	<b>0.56</b>	<b>0.52</b>	<b>0.65</b>	<b>0.78</b>	<b>0.85</b>	<b>0.61</b>	<b>0.65</b>	<b>0.42</b>
Glycine	0.49	0.46	0.24	0.11	0.53	0.56	0.57	0.50	0.44	0.52	0.57	0.65	0.79	0.58	0.49	0.43
<b>Alanine</b>	<b>1.48</b>	<b>1.37</b>	<b>0.98</b>	<b>0.25</b>	<b>1.48</b>	<b>1.24</b>	<b>1.15</b>	<b>0.95</b>	<b>0.91</b>	<b>1.05</b>	<b>1.72</b>	<b>1.65</b>	<b>1.69</b>	<b>1.13</b>	<b>1.06</b>	<b>0.85</b>
Citrulline	0.66	1.09	0.93	0.01	0.70	0.91	1.17	0.99	0.64	1.10	0.69	0.90	1.39	0.90	0.53	0.78
a-Aminobutyric Acid	0.23	0.34	-	-	3.19	0.62	0.54	0.05	0.03	0.32	0.84	0.87	1.09	0.06	0.06	0.04
Valine	1.56	1.41	1.15	0.09	1.18	1.20	1.10	1.06	1.04	1.04	1.24	1.41	1.44	1.10	1.10	0.88
Cystine	0.13	0.12	0.09	0.28	0.15	0.17	0.17	0.20	0.20	0.16	0.12	0.20	0.20	0.17	0.19	0.12
Methionine	0.52	0.49	0.38	0.03	0.48	0.52	0.39	0.45	0.47	0.42	0.45	0.55	0.52	0.41	0.44	0.34
Cystionine	0.09	0.08	0.08	-	0.09	0.09	0.05	0.09	0.10	0.07	0.07	0.10	0.10	0.09	0.10	0.07
Leucine	2.58	2.15	1.46	0.06	1.95	2.10	1.87	1.88	1.88	1.82	2.10	2.44	2.36	1.79	1.85	1.37
Tyrosine	1.06	0.83	0.49	-	0.57	0.93	0.94	1.02	1.00	0.69	0.55	0.99	0.85	0.81	0.85	0.62
Phenylalanine	1.88	1.58	1.14	0.07	1.48	1.57	1.47	1.53	1.48	1.43	1.40	1.60	1.54	1.20	1.22	0.93
b-Alanine	0.52	0.41	0.37	0.03	0.19	0.22	0.14	0.24	0.25	0.23	0.13	0.83	0.04	0.04	0.21	0.10
b-Aminoisobut yric Acid	1.38	0.91	0.24	-	0.36	0.47	0.33	0.46	0.53	0.45	0.22	0.49	0.23	0.21	0.46	0.21
r-Aminobutyric Acid	0.31	0.46	0.34	0.20	0.19	0.20	0.15	0.14	0.13	0.18	0.21	0.23	0.20	0.17	0.13	0.14
Ethanol amine	0.18	0.14	0.10	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03
Ammonia	3.90	4.78	3.20	0.28	2.30	1.79	2.54	2.15	1.52	2.31	2.86	2.41	3.76	2.83	1.91	2.12
Ornithin	0.47	0.76	0.23	-	0.99	0.63	0.41	0.45	0.25	0.43	1.18	0.90	0.58	0.68	0.25	0.32
Lysine	2.80	2.80	1.60	0.06	1.80	1.92	1.82	1.82	1.74	1.80	2.07	2.30	2.41	1.95	1.82	1.46
Histidine	0.53	0.55	0.38	0.07	-	-	0.09	0.30	0.31	0.27	-	-	-	0.28	0.21	0.20
Arginine	2.43	1.35	0.28	1.31	0.34	0.77	0.57	0.72	1.32	0.61	0.35	0.86	0.76	0.55	1.41	0.59
<b>Totals</b>	<b>32.00</b>	<b>32.33</b>	<b>20.72</b>	<b>3.50</b>	<b>24.55</b>	<b>22.88</b>	<b>22.80</b>	<b>22.22</b>	<b>20.89</b>	<b>21.90</b>	<b>24.47</b>	<b>27.96</b>	<b>29.82</b>	<b>23.30</b>	<b>20.65</b>	<b>17.82</b>

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11., SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspora microellipsoides* 623 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulaspora microellipsoides* 623

(마) 미생물학적 특성

① 식중독 미생물 분석

된장 및 간장의 식중독 미생물을 분석한 결과 모든 처리구에서 검출되지 않았다. 아래 7개의 식중독 미생물에 대해서는 염농도 및 처리구간의 차이는 보이지 않았다.

표27. 된장과 간장의 식중독 미생물

구분	염농도	처리구	E.coli	Salmonella spp.	E.coli O157	Listeria monocytogenes	S.aureus	Cl. perfringense	Vibrio
된장	8%	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	14%	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
간장	8%	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	14%	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11., SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspora microellipsoides* 623 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulaspora microellipsoides* 623

② 세균수의 변화

된장 및 간장의 세균수의 변화는 그림24 ~ 25 와 같다.

숙성 0일 8%된장은  $10^{10}$  CFU/g을 나타내었고 14%된장은  $10^{11}$  CFU/g을 나타내다가 숙성기간이 증가 할수록  $10^{14}$  CFU/g을 나타내다가 8%, 14% 된장 모두 숙성 14일 쯤에는 일정한 수준을 보여주었다.

간장은 숙성 0일부터 7일까지  $10^{11} \sim 10^{12}$  CFU/g을 나타내다가 14일 쯤에는  $10^{12} \sim 10^{13}$  CFU/g으로 증가하는 경향을 나타내었다.

처리구간, 염도 별 차이는 크지 않았으며, 일반 된장의  $10^5 \sim 10^6$  CFU/g에 비해 높게 나타난 것은 숙성 초기 30℃의 온도에서 진행되어 미생물의 작용이 활발히 진행되어 균체량의 차이가 있었을 것으로 사료된다.

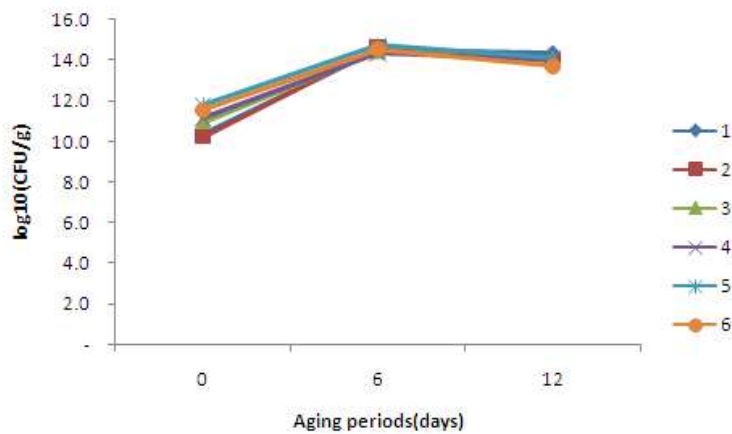


그림24. 된장의 세균의 변화

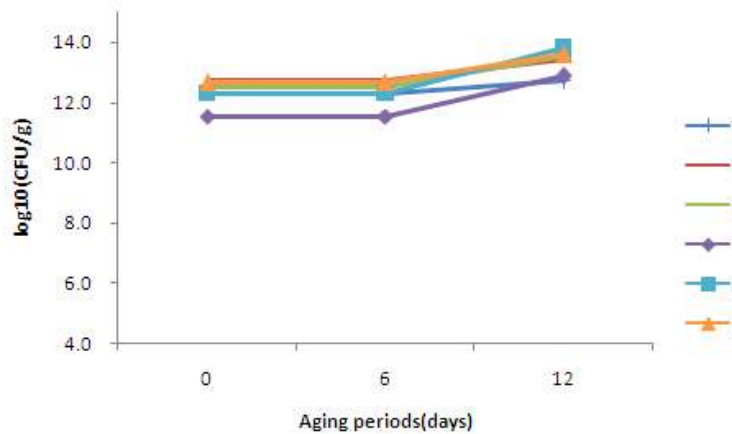


그림25. 간장의 세균의 변화

1,4 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효)대조구, 2,5 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11., SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulasporea microellipsoides* 623 3,6 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulasporea microellipsoides* 623

1,2,3: 8% 염농도, 4,5,6 : 14% 염농도

③ 진균수의 변화

된장과 간장의 진균수는 8%, 14% 염도 처리구간에  $10^1$  CFU/g 정도의 차이를 보였으며, 8% 된장이나 간장이 14% 된장이나 간장에 비하여  $10^1$  CFU/g의 더 많은 균수를 나타내었다.

숙성 초기부터 6일까지는 증가하다가 12일에는 약간 감소하는 경향을 나타내었으며, 균주 처리구간에는 차이는 보이지 않았다. 이 결과는 효모 및 곰팡이 등의 진균수를 측정했기 때문으로 추후 효모 및 곰팡이의 각각의 데이터는 제시되어야 할 것이다.

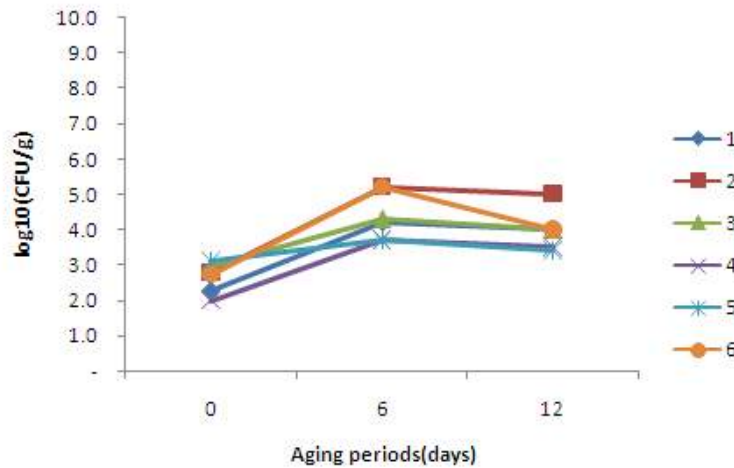


그림26. 된장의 진균수의 변화

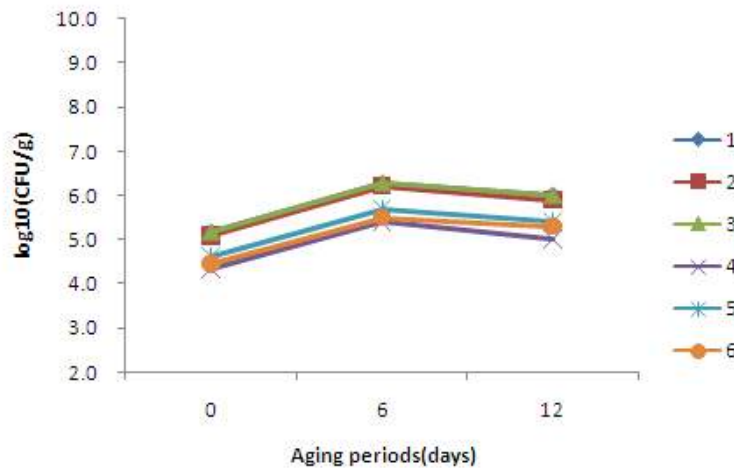


그림27. 간장의 진균수의 변화

1,4 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효)대조구, 2,5 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11,, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulasporea microellipsoides* 623 3,6 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulasporea microellipsoides* 623  
1,2,3: 8% 염농도, 4,5,6 : 14% 염농도

④ 바실러스 세레우스의 변화

바실러스 세레우스 변화는 다음 그림28 ~ 29와 같다.

숙성 0일째에  $10^1 \sim 10^6$ CFU/g의 범위를 보이다가 숙성 6일째에 다시 줄어들어 숙성 12일 째에는 거의 발견이 되지 않는 처리구도 보였다.

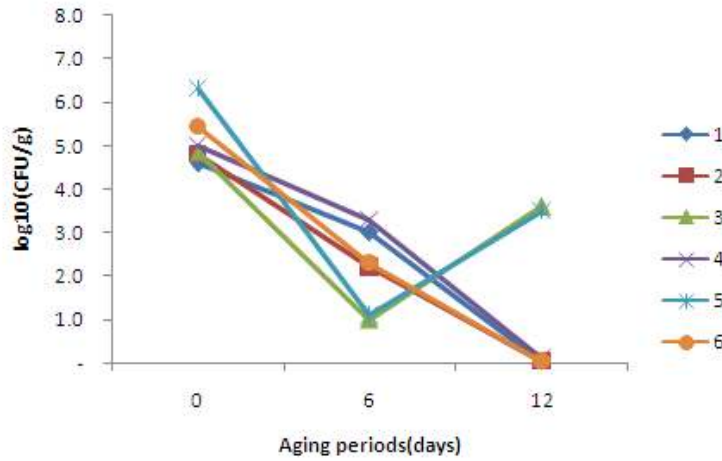


그림28. 된장의 바실러스 세레우스의 변화

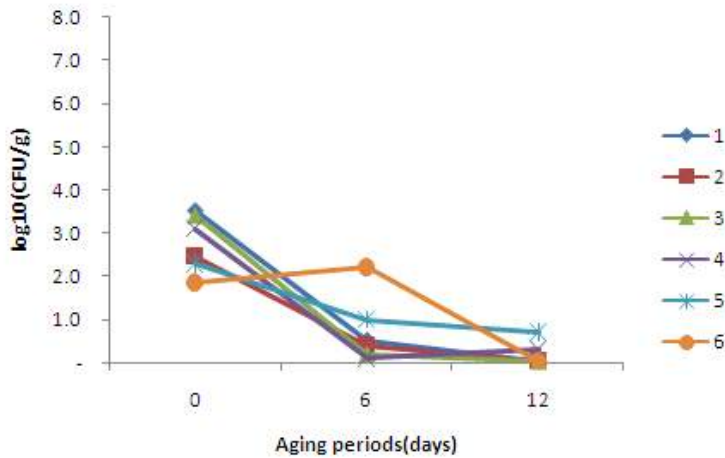


그림29. 간장의 바실러스 세레우스의 변화

1,4 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효)대조구, 2,5 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11,, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspora microellipsoides* 623 3,6 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulaspora microellipsoides* 623

1,2,3: 8% 염농도, 4,5,6 : 14% 염농도

(바) 관능적 특성

① 된장

순창장류연구소 및 발효미생물관리센터, (주)순창장류 연구원을 대상으로 된장의 관능평가를 실시한 결과는 아래와 같다.

8% 된장은 처리구 중 2번 처리구가 색에서  $8.30 \pm 0.82$ 로 높은 점수를 획득하여 유의적인 차이를 나타냈으며, 전반적인 기호도에서도 2번 처리구가  $6.40 \pm 1.70$  으로 점수가 가장 좋았다. 감칠맛 역시 처리구 중 2번 처리구가 높은 점수를 나타내었으며, 신맛은 1번>3번>2번 처리구 순으로 신맛의 강도가 나타났다.

14% 된장에서는 짠맛의 강도가 7.09 ~ 7.63으로 8% 된장보다는 높은 결과를 보여주었다. 8%된장에서와 마찬가지로 14%된장에서도 2번 처리구가 감칠맛과 전체적인 기호도면에서 각각  $5.72 \pm 1.42$ ,  $5.90 \pm 1.04$ 의 결과를 보였다.

위 결과로 미루어 볼 때 처리구 중 8% 2번 처리구가 가장 높은 선호도를 보여줘 참여기업에 2번 처리구의 균주의 적용이 가능할 것이라 판단되어진다.

표28. 8% 된장의 관능평가 결과

관능특성	1	2	3
색	$5.00 \pm 1.82^{a1)}$	$8.30 \pm 0.82^b$	$6.00 \pm 1.33^a$
신맛	$6.00 \pm 1.88^a$	$4.50 \pm 2.17^a$	$5.80 \pm 1.31^a$
짠맛	$4.80 \pm 1.87^a$	$5.50 \pm 2.41^a$	$5.60 \pm 2.41^a$
쓴맛	$4.10 \pm 2.55^a$	$4.10 \pm 2.72^a$	$4.20 \pm 2.53^a$
감칠맛	$5.30 \pm 1.57^a$	$6.20 \pm 1.62^a$	$5.60 \pm 2.01^a$
전반적 기호도	$5.90 \pm 1.45^a$	$6.40 \pm 1.70^a$	$5.70 \pm 2.00^a$

표29. 14% 된장의 관능평가 결과

관능특성	1	2	3
색	$6.27 \pm 1.61^a$	$6.36 \pm 1.80^a$	$6.63 \pm 1.62^a$
신맛	$5.36 \pm 1.96^a$	$5.63 \pm 1.74^a$	$6.00 \pm 1.48^a$
짠맛	$7.09 \pm 1.30^a$	$7.63 \pm 0.92^a$	$7.27 \pm 1.55^a$
쓴맛	$6.09 \pm 2.42^a$	$5.09 \pm 2.02^a$	$5.72 \pm 2.00^a$
감칠맛	$5.09 \pm 2.07^a$	$5.72 \pm 1.42^a$	$5.18 \pm 1.60^a$
전반적 기호도	$5.54 \pm 2.54^a$	$5.90 \pm 1.04^a$	$5.45 \pm 1.75^a$

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11,, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspora microellipsoides* 623 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulaspora microellipsoides* 623

② 간장

간장의 관능평가를 실시한 결과 8% 간장은 전체적인 기호도가 6.50±1.35 으로 3번 처리구가 가장 높은 결과를 나타냈다. 감칠맛 역시 5.40 ± 2.80으로 가장 높은 값을 보여주었다. 짠맛에 있어 5.30 ~ 6.40의 결과로 8%나 14% 처리구간 큰 차이를 보이진 않았다.

14% 간장에서는 전반적인 기호도가 6.30 ± 1,64으로 2번 처리구가 가장 높았으며, 감칠맛에서도 다른 처리구에 비하여 높은 결과를 나타내었다. 이로 미루어보아 장류의 관능적 특징을 살펴볼 때 감칠맛은 장류 중 선호도 평가에 있어 가장 중요한 인자로 보여진다.

표30. 8% 간장의 관능평가 결과

관능특성	1	2	3
색	6.60±1.51 <sup>ab</sup>	5.50±1.96 <sup>a</sup>	7.10±1.10 <sup>b</sup>
향	5.40±1.90 <sup>a</sup>	6.00±1.70 <sup>a</sup>	6.00±1.25 <sup>a</sup>
짠맛	6.00±1.63 <sup>a</sup>	6.00±2.00 <sup>a</sup>	5.60±1.84 <sup>a</sup>
감칠맛	4.80±2.44 <sup>a</sup>	4.90±2.77 <sup>a</sup>	5.40±2.80 <sup>a</sup>
전반적 기호도	6.10±1.60 <sup>a</sup>	5.20±1,14 <sup>a</sup>	6.50±1.35 <sup>a</sup>

표31. 14% 간장의 관능평가 결과

관능특성	1	2	3
색	6.10±1.20 <sup>a</sup>	5.30±1.77 <sup>a</sup>	5.90±1.37 <sup>a</sup>
향	5.90±2.33 <sup>a</sup>	6.30±2.00 <sup>a</sup>	5.60±2.01 <sup>a</sup>
짠맛	5.50±1.18 <sup>a</sup>	5.30±0.95 <sup>a</sup>	6.40±1.58 <sup>a</sup>
감칠맛	3.80±2.35 <sup>a</sup>	5.10±2.81 <sup>a</sup>	4.10±2.64 <sup>a</sup>
전반적 기호도	5.90±1.60 <sup>a</sup>	6.30±1,64 <sup>a</sup>	5.60±1.90 <sup>a</sup>

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11,, SCSB1228, *Aspegillus oryzae* SKM 07, *Torulaspora microellipsoides* 623 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK B11, SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Torulaspora microellipsoides* 623

라. 우수균주를 이용한 저염 고추장 생산

(1) 바실러스 속 균주를 이용한 콩알메주 제조

(가) 균주 선정 조건

부패미생물에 대한 항균력이 뛰어나고 식약처 식품 사용에 허용된 균주 *B.subtilis*를 2협동에서 분리하여 보관중인 균주 10종을 활용하였다.

표32. 유해균에 대한 분리균주의 억제활성

균주 번호	Identification	유해균 억제능(억제능=halo크기/ paper disc(6mm))							
		<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. antracis</i>	<i>S.sapro phyticus</i>	<i>S. waneri</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
SCCB1304	<i>B. subtilis</i>	1.48	1.18	1.35	1.00	1.00	1.00	1.15	1.17
SCKB1307	<i>B. subtilis</i>	1.18	1.17	1.25	1.28	1.18	1.00	1.32	1.22
SCSB1311	<i>B. subtilis</i>	1.40	1.28	1.20	1.15	1.15	1.25	1.15	1.23
SCKB1314	<i>B. subtilis</i>	1.28	1.20	1.23	1.18	1.15	1.12	1.10	1.20
SCCB1316	<i>B. subtilis</i>	1.50	1.70	1.70	1.77	1.80	1.57	1.42	1.32
SCKB1318	<i>B. subtilis</i>	1.40	1.40	1.45	1.60	1.75	1.58	1.42	1.48
SCKB1319	<i>B. subtilis</i>	1.37	1.38	1.42	1.72	1.80	1.47	1.15	1.12
SCKB1321	<i>B. subtilis</i>	1.27	1.43	1.37	1.80	1.33	1.25	1.17	1.20
SCKB1322	<i>B. subtilis</i>	1.32	1.33	1.35	1.80	1.30	1.30	1.27	1.25
SCKB1323	<i>B. subtilis</i>	1.40	1.23	1.27	1.37	1.30	1.20	1.15	1.45
SCKB1324	<i>B. subtilis</i>	1.33	1.27	1.25	1.17	1.17	1.00	1.33	1.20
SCKB1336	<i>B. subtilis</i>	1.40	1.40	1.45	1.60	1.75	1.58	1.42	1.48

(나) 콩알메주의 항균력 및 효소활성 측정

상기 균주 10주를 이용하여 콩알메주를 제조한 다음 콩알메주의 부패균에 대한 항균력을 측정한 결과 균주별 *B.subtilis* SCKB1307과 SCKB1319가 가장 높은 항균력을 보여 고추장 제조 관련 실험에 이용하였다. 또한 곰팡이는 2차년도에 활용했던 *Aspergillus flavus*가 생산하는 1급 발암물질인 aflatoxin을 생산하지 않고, protease 및 amylase 효소활성이 가장 높은 균주 *Aspergillus oryzae* SKM 07을 사용하였다.





그림 33. 우수균주로 제조한 콩알메주의 항균활성 결과 사진

A: *S.aureus*, B: *B.cereus*

\* 1-12: *B.subtilis*, 1: SCCB1304, 2: **SCKB1307**, 3: SCSB1311, 4: SCKB1321, 5: **SCKB1314**, 6: SCCB1316, 7: **SCKB1319**, 8: SCKB1322, 9: SCKB1324, 10: SCKB1323

## (2) 균주 적용을 통한 저염 고추장 제조(균주 선별)

세균 3종과 곰팡이 2종을 이용하여 염도별 고추장을 제조하여 품질특성을 분석하였다. 염도는 최종제품이 4, 8, 12%가 되게 제조하여 28 일동안 숙성시키면서 품질의 특성 변화를 살펴 보았다.

### (가) 수분

고추장의 수분함량은 다음 그림 30과 같다. 고추장의 수분함량은 고추장에 존재하는 유리당, 아미노산, 유기산 등이 분해산물과 소금의 양이 복합적으로 작용하여 형성된다. 36.91~45.49%의 함량을 나타내었다. 4% 함량의 고추장이 12% 고추장의 수분 함량에 비해 다소 높은 함량을 나타내었지만 큰 차이는 아니었다.

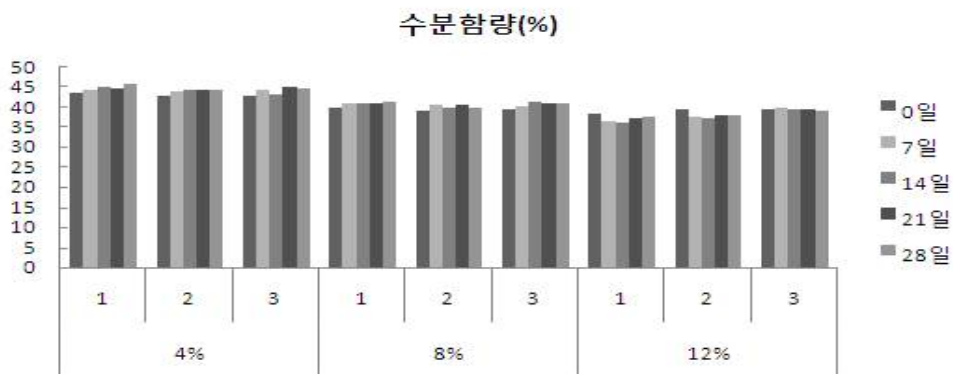


그림 30. 염도별 고추장의 숙성기간에 따른 수분 변화

1 : 균주 *B.licheniformis* SCK125037, 충무균주, 2: *B.subtilis* SCKB1307, *Asp.oryzae* SKM07, 3: *B.subtilis* SCKB1319, *Asp.oryzae* SKM07

(나) pH

고추장의 pH 변화는 다음 그림 31과 같다. pH의 변화는 숙성 초기 5.21~5.41의 분포를 보이다가 숙성 28일에는 점차 낮아져 4.87 ~ 5.07의 분포를 보였다. 4%와 8% 염도의 고추장이 12% 염도의 고추장에 비해 pH가 다소 낮은 경향이 있었지만 강하속도는 염도의 차이에 따라 크게 나타나지 않았다.

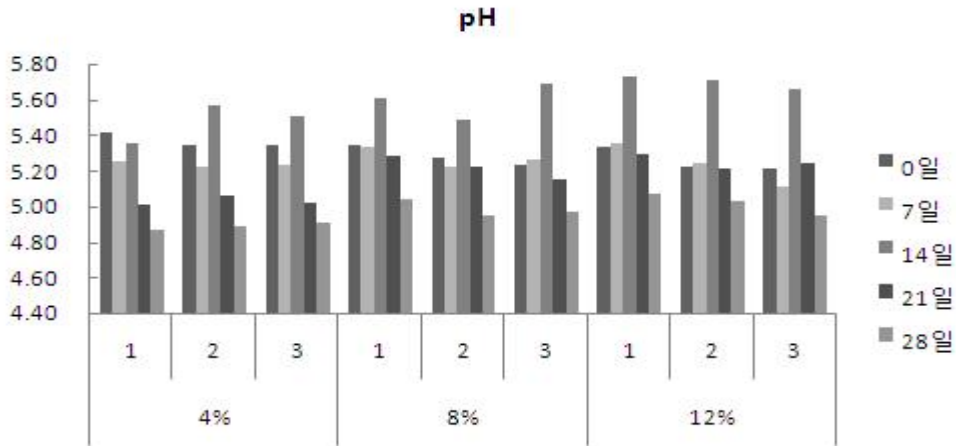


그림 31. 염도별 고추장의 숙성기간에 따른 pH 변화

1 : 균주 *B.licheniformis* SCK125037, 충무균주, 2: *B.subtilis* SCKB1307, *Asp.oryzae* SKM07, 3: *B.subtilis* SCKB1319, *Asp.oryzae* SKM07

(다) 적정산도

고추장의 적정산도의 변화는 다음 그림 32와 같다. 염도가 낮아질수록 산도가 높아지는 경향을 보였지만 4%염도의 고추장에서 대조구로 사용한 균주인 1번 처리구에 비해 2번 3번 처리구가 산도가 낮은 결과를 나타내었다. 염 첨가량이 낮아지면 산을 생성하는 미생물의 활동이 활발하여 산 생성이 촉진되지만 2번, 3번 처리구에 사용한 균주의 유해균 작용 및 기타 기능들이 산도를 낮추는 데 기여했을 것으로 사료된다.

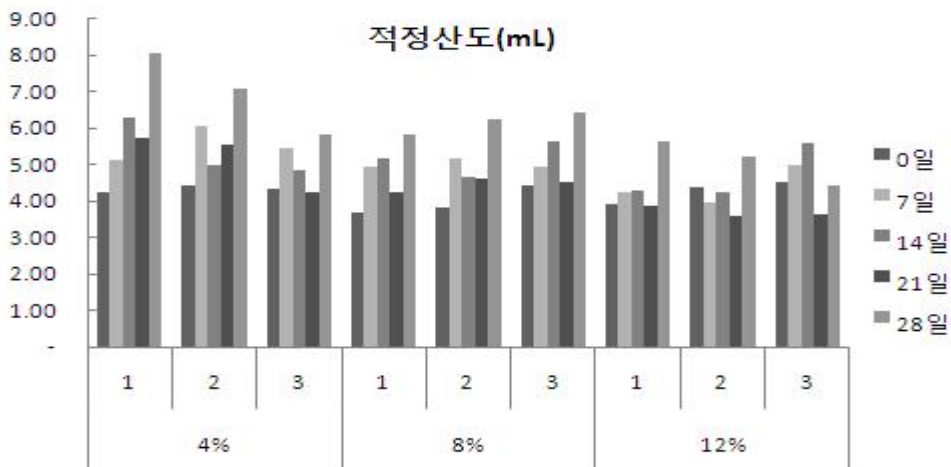


그림 32. 염도별 고추장의 숙성기간에 따른 수분 변화

1 : 균주 *B.licheniformis* SCK125037, 충무균주, 2: *B.subtilis* SCKB1307, *Asp.oryzae* SKM07, 3: *B.subtilis* SCKB1319, *Asp.oryzae* SKM07

(라) 아미노산성 질소

고추장 제조에 사용되는 콩은 단백질 분해효소의 작용으로 각종 펩타이드나 아미노산으로 분해된다, 이로 인해 고추장이 숙성되면서 아민산성 질소나 유리아미노산의 함량은 증가하는 경향을 보이는데 이들 아미노산이 고추장의 감칠맛과 고추장의 품질을 평가하는 지표로 사용될 수 있음이 보고되고 있다. 염도별 고추장의 아미노산성 질소함량을 확인한 결과는 그림 4와 같다. 염도 4%와 8%의 고추장은 숙성기간 21일째 아미노산성 질소함량이 가장 높은 결과를 보였으며, 염의 첨가수준이 낮을수록 아미노산성 질소의 함량이 높아지는 경향을 보였다. 고추장 발효 중 단백질 분해에 관여하는 효소는 염에 민감한 성질을 갖는 것으로 발효 속도에 염의 농도가 영향을 미친다는 결과(JY Oh 등 2002)를 볼 때 유해균의 증식을 억제하는 중균을 사용하여 메주를 제조하고 이를 이용하여 저염 으로 장류를 만들어 숙성기간을 단축할 수 있을 것으로 판단된다.

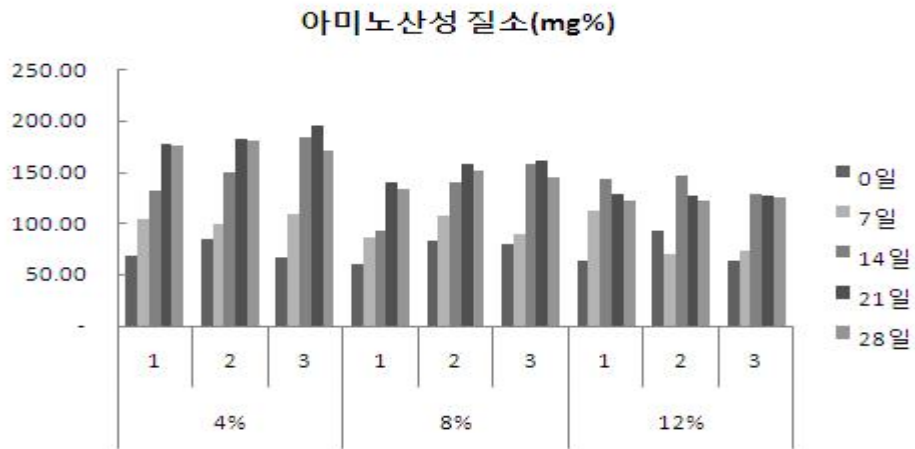


그림 33. 염도별 고추장의 숙성기간에 따른 아미노산성 질소 함량 변화

1 : 균주 *B.licheniformis* SCK125037, 충무균주, 2: *B.subtilis* SCKB1307, *Asp.oryzae* SKM07, 3: *B.subtilis* SCKB1319, *Asp.oryzae* SKM07

(마) 미생물학적 특성

고추장의 미생물 분석 결과는 표 33과 같다.

세균수는 0 일에는  $10^7 \sim 10^8$  CFU/g을 보이다가 숙성 28 일째는  $10^8 \sim 10^9$ CFU/g으로 증가하는 경향을 보였다. 진균수는 초기  $10^3 \sim 10^4$  CFU/g을 보이다가 점차 증가하여 28 일째에  $10^4 \sim 10^5$  CFU/g의 분포를 보였다. 염도별로 유의적인 차이는 보이지 않았고 2번 처리구가 다른 두 처리구에 비해 약간 낮은 세균수와 진균수를 나타내었다. 바실러스 세레우스는 4%염도, 1번 처리구에서만 검출되었으며, 그를 제외한 식중독균은 검출되지 않았다.

표33. 고추장의 미생물학적 특성

unit : log<sub>10</sub> CFU/g

염도	처리구	세균수		진균수		<i>B.cereus</i>	<i>Salmonel</i> <i>la.</i> spp.	<i>E.coli</i> O157	<i>Listeria</i> monocyt ogenes	<i>S.aureus</i>	<i>Cl.pefrig</i> <i>ense</i>
		0일	28일	0일	28일						
4%	1	7.32	9.96	4.10	5.25	0.52	ND	ND	ND	ND	ND
	2	7.42	9.52	4.09	5.10	-	ND	ND	ND	ND	ND
	3	7.45	9.64	4.12	5.26	-	ND	ND	ND	ND	ND
8%	1	7.26	9.54	4.00	5.41	-	ND	ND	ND	ND	ND
	2	7.27	8.57	4.12	5.21	-	ND	ND	ND	ND	ND
	3	7.33	9.72	4.11	5.33	-	ND	ND	ND	ND	ND
12%	1	8.26	9.62	4.23	5.10	-	ND	ND	ND	ND	ND
	2	7.23	9.44	3.92	4.92	-	ND	ND	ND	ND	ND
	3	7.42	9.12	4.10	5.00	-	ND	ND	ND	ND	ND

1 : 균주 *B.licheniformis* SCK125037, 충무균주, 2: *B.subtilis* SCKB1307, *Asp.oryzae* SKM07, 3: *B.subtilis* SCKB1319, *Asp.oryzae* SKM07

(바) 관능평가

고추장의 관능평가는 4% 염도와 12% 염도의 고추장의 평가를 실시 한 결과는 아래 표 34, 35와 같다. 4%, 12%염도의 고추장에서 2번 처리구가 전체적인 기호도 면에서 유의적으로 좋은 결과를 보였고, 특히 맛 부분에서 가장 높은 선호도를 나타내었다. 또한 12% 염도의 고추장은 높은 염도 때문인지 4% 염도의 고추장에 비해 전반적으로 낮은 판정을 받았다.

고추장에 2번 균주와 3번 균주를 사용하여 제조한 것은 평가 상 바람직하고 우수한 것으로 사료되며, 3협동에서 사용하고 있는 균주를 이용했을 때보다 더 높은 선호도를 얻었다.

표34. 4% 염도의 고추장

Sensory characteristics	1	2	3
Color	6.47±1.59 <sup>b1)</sup>	7.93±1.52 <sup>a</sup>	6.40±1.72 <sup>b</sup>
Flavor	6.13±1.92	6.13±2.32	6.07±1.66
Taste	6.80±1.26 <sup>b</sup>	8.13±1.30 <sup>a</sup>	5.20±1.71 <sup>c</sup>
Overall preference	6.40±1.59 <sup>b</sup>	8.07±2.05 <sup>a</sup>	6.13±1.30 <sup>b</sup>

표35. 12% 염도의 고추장

Sensory characteristics	1	2	3
Color	6.46±0.76 <sup>a1)</sup>	7.00±1.24 <sup>a</sup>	6.38±2.66 <sup>a</sup>
Flavor	5.85±1.32 <sup>a</sup>	5.54±1.26 <sup>a</sup>	6.38±1.82 <sup>a</sup>
Taste	5.62±1.75 <sup>b</sup>	6.92±0.73 <sup>a</sup>	5.77±0.42 <sup>ab</sup>
Overall preference	5.92±0.42 <sup>ab</sup>	6.62±1.75 <sup>a</sup>	5.54±1.85 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Mean±standard deviation (n=18)

1 : 균주 *B.licheniformis* SCK125037, 충무균주, 2: *B.subtilis* SCKB1307, *Asp.oryzae* SKM07, 3: *B.subtilis* SCKB1319, *Asp.oryzae* SKM07

다양한 균주를 이용하여 염도별 고추장을 제조하여 숙성 중 품질특성을 살펴보았다. 수분함량은 처리구별로 큰 차이를 나타내지 않았으며, pH의 변화는 숙성 되면서 점차 낮아지는 경향을 나타내었으며, 염도가 낮을수록 pH가 다소 낮은 경향이 있었지만 강하속도는 염도의 차이에 따라 크게 나타나지는 않았다. 적정산도의 변화는 염도가 낮아질수록 산도가 높아지는 경향을 보였지만 4%염도의 고추장에서 대조구로 사용한 균주인 1번 처리구에 비해 2번 3번 처리구가 산도가 낮은 결과를 나타내었다. 염도 4%와 8%의 고추장은 숙성기간 21일째 아미노산성 질소함량이 가장 높은 결과를 보였으며, 염의 첨가수준이 낮을수록 아미노산성 질소의 함량이 높아지는 경향을 보였다. 미생물학적 특성은 세균수가 0일에는  $10^7 \sim 10^8$  CFU/g을 보이다가 숙성 28일째는  $10^8 \sim 10^9$ CFU/g으로 증가하는 경향을 보였다. 진균수는 초기  $10^3 \sim 10^4$  CFU/g을 보이다가 점차 증가하여 28일째에  $10^4 \sim 10^5$  CFU/g의 분포를 보였다. 염도별로 유의적인 차이는 보이지 않았고 2번 처리구가 다른 두 처리구에 비해 약간 낮은 세균수와 진균수를 나타내었다. 관능적 특성은 염도 4%와 12% 고추장의 관능평가를 한 결과 2번 처리구가 가장 좋은 판정을 받았다. 따라서 2번 균주는 고추장 제조에 이용함이 바람직하며 시험생산에 비교균주로서 이용될 것이다.

### (3) 균주 적용을 통한 저염 고추장 pilot scale 적용(제3협동 공동 진행)

위 실험에서 선정된 우수 균주를 이용하여 참여기업인 제3협동의 고추장 제조 매뉴얼에 따라 4%, 8%, 12% 염도의 고추장을 제조하였다. 균주는 제3협동이 이용하고 있는 균주(*B.licheniformis* SCK125037, 충무균주)와 선별된 균주(*B.subtilis* SCKB1307, *Aspergillus oryzae* SKM07)과 이 두 균주를 혼합하여 3처리구로 제조하였다. 이는 각각의 용기에 담아 56일간 숙성하면서 품질 및 미생물학적 특성을 살펴보았다. 고추장의 제조는 참여기업의 공장에서 공동으로 진행하였으며, 분석 결과에 전문성을 두기 위하여 이화학적 분석 및 미생물학적 분석 등을 나누어 연구하였다.

#### (가) 일반성분

고추장의 수분함량의 변화는 숙성 56일까지 41.2 ~ 46.7%의 함량을 나타내었으며, 염도는 제조공정 마지막 단계인 주정 및 물엿 첨가의 이유로 2% 정도 높게 측정되었다. pH의 변화는 숙성이 진행되면서 4.8 ~ 5.0으로 거의 일정한 수준을 보여주었지만 4% 염도, 대조구 균주로 제조한 처리구에서 pH가 4.7로 낮아지는 경향을 나타내었다. 적정산도의 변화는 pH의 변화와 부합되는 결과를 나타내었으며, 4% 염도, 대조구 균주로 제조한 처리구에서 가장 높은 산도 값을 나타내었다. 고추장의 구수한 맛 성분으로 중요시되는 아미노태 질소 함량의 변화는 4% 염도의 고추장이 높은 결과를 나타내었는데 처리구중 4% 염도, 대조구 균주로 처리한 균주의 아미노산성 질소 함량이 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그 다음으로 4% 염도 대조구와 우수 균주를 혼합하여 제조한 처리구가 높은 값을 보여주었다. 숙성 중 색도(L-value)의 변화를 측정된 결과는 처리구간에 큰 차이는 없었으며, 숙성 7일째 거의 모든 처리구에서 높아졌다가 낮아지고 28일째 다시 높아지는 경향을 나타내었다. 수치는 L값이 27~32 정도의 범위를 나타내어 이기영 등(1997)의 연구결과와 일치하는 결과를 보여주었다.(제3협동 결과 참고)

#### (나) 유기산

고추장의 향기와 맛 성분으로 작용하는 유기산의 변화는 표 36과 같다. oxalic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid, formic acid, acetic acid가 분석되었으며, 숙성기간이 지남에 따라 유기산의 함량이 증가하는 결과를 나타내었다. 타 연구결과에 비추어 보면 숙성 중기 lactic acid의 함량이 증가하는 것으로 보고되고 있으나 본 연구결과에서는 4% 염도의 고추장에서 1번 처리구를 제외한 모든 고추장의 lactic acid의 함량이 일정한 결과를 보여주었다. 또한 유기산 함량에 있어 고추장의 염도는 크게 작용하지 않은 것으로 나타났다. 주요 유기산으로는 citric acid와 malic acid의 함량이 가장 높은 결과를 나타내었다. citric acid는 주로 원료에서 유래되는 데 전분질 원료에서 기인한 것으로 사료되며, 숙성 되면서 증가하는 경향은 추후 풍미에 깊이 관여하는 것으로 생각된다. 유기산 성분이나 함량이 타 연구결과와 다른 이유는 전분질 원료 및 균주에 따라 차이가 심하다고 판단되었다.

표36. 염도별 고추장의 숙성기간에 따른 유기산의 변화

Unit : %

염도 (%)	처리 구	숙성일수 (일)	Oxalic acid	Citric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	합계
4	1	0	0.00	0.55	0.18	0.07	0.01	0.13	0.09	1.04
		28	-	0.61	0.00	0.09	0.25	0.09	0.08	1.12
		56	0.00	0.60	0.00	0.10	0.28	0.05	0.10	1.13
	2	0	-	0.62	0.19	0.07	0.02	0.12	0.06	1.08
		28	-	0.57	0.26	0.07	0.02	0.10	0.05	1.07
		56	-	0.60	0.34	0.08	0.02	0.11	0.05	1.20
	3	0	0.00	0.55	0.18	0.05	0.02	0.10	0.06	0.96
		28	0.00	0.62	0.29	0.06	0.02	0.11	0.08	1.19
		56	0.00	0.61	0.34	0.06	0.02	0.11	0.06	1.21
8	1	0	0.00	0.58	0.19	0.07	0.01	0.10	0.03	0.98
		28	-	0.58	0.25	0.06	0.02	0.09	0.03	1.02
		56	-	0.60	0.31	0.07	0.02	0.10	0.09	1.18
	2	0	-	0.57	0.18	0.07	0.02	0.10	0.04	0.97
		28	-	0.62	0.27	0.08	0.02	0.10	0.07	1.17
		56	-	0.62	0.32	0.07	0.02	0.10	0.08	1.21
	3	0	0.00	0.53	0.17	0.05	0.02	0.10	0.09	0.95
		28	5.40	0.60	0.26	0.05	0.02	0.11	0.08	6.52
		56	0.00	0.63	0.32	0.05	0.02	0.11	0.07	1.22
12	1	0	-	0.58	0.31	0.05	0.01	0.05	0.08	1.08
		28	-	0.60	0.26	0.06	0.02	0.09	0.05	1.08
		56	-	0.60	0.31	0.06	0.02	0.09	0.06	1.14
	2	0	-	0.57	0.18	0.07	0.02	0.10	0.04	0.97
		28	-	0.62	0.27	0.08	0.02	0.10	0.07	1.17
		56	-	0.62	0.32	0.07	0.02	0.10	0.08	1.21
	3	0	0.00	0.57	0.19	0.04	0.02	0.08	0.08	1.00
		28	0.00	0.60	0.25	0.05	0.02	0.08	0.03	1.03
		56	0.00	0.66	0.32	0.05	0.02	0.09	0.07	1.22

1 : 균주 *Bacillus licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *Bacillus subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07 3 : 균주 *Bacillus licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Bacillus subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07

(다) 유리당

전분질 분해 산물로서 고추장의 단맛을 내거나 발효 미생물의 기질로 이용되는 유리당 함량의 변화는 표 37과 같다. 모든 처리구에서 주요 유리당으로는 glucose가 대부분이었고 그 다음으로는 fructose, maltose 이었고 sucrose는 소량 검출되었다. 고추장의 유리당은 glucose, fructose, maltose라고 보고(신동화 등(1996))되고 있으며, 숙성 중 glucose와 fructose 함량이 전체 유리당의 82 ~ 100%를 차지한다고 보고되었다(오훈일 등 (1997)). 또한 초기에 비해 저장 중 sucrose 함량은 감소한 경향을 보였는데 이는 단당류의 형태로 효소에 의해 가수분해

되어 glucose와 fructose으로 분해된 것으로 사료된다. 총 유리당 함량으로 미루어 볼 때 유기산의 결과와 비슷하게 고추장의 염도는 크게 작용하지 않았으나, 염도가 높은 고추장에서 glucose의 함량이 전반적으로 염도가 낮은 고추장에 비해 높게 나타났다. Fructose의 함량은 2번째로 높게 나타난 유리당으로 고추 원료나 균주의 glucose 영향일 것으로 판단된다.

표37. 염도별 고추장의 숙성기간에 따른 유리당의 변화

Unit : %

염도(%)	처리구	숙성일수 (일)	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	합계	
4	1	0	2.10	7.46	0.02	2.76	12.34	
		28	1.62	17.02	-	0.10	18.75	
		56	1.73	19.00	-	0.03	20.77	
	2	0	4.16	8.48	0.03	2.17	14.84	
		28	1.64	17.13	0.06	0.02	18.86	
		56	1.26	19.95	-	0.01	21.23	
		3	0	1.90	9.98	0.05	0.40	12.32
			28	1.62	20.18	-	0.04	21.83
			56	1.18	20.84	-	0.01	22.03
8	1	0	3.58	14.30	0.01	2.88	20.77	
		28	5.75	14.23	-	0.05	20.03	
		56	6.56	15.72	-	0.04	22.32	
	2	0	4.47	6.74	0.01	1.70	12.93	
		28	5.86	15.16	0.04	0.01	21.07	
		56	5.75	18.13	0.08	0.02	23.98	
		3	0	4.19	8.30	0.01	0.17	12.66
			28	6.61	17.35	0.04	0.04	24.04
			56	5.84	18.41	0.05	-	24.30
12	1	0	3.15	27.19	-	1.17	31.51	
		28	4.73	30.08	-	0.07	34.89	
		56	4.68	18.55	0.01	0.05	23.28	
	2	0	3.95	21.98	-	0.82	26.76	
		28	4.76	20.77	0.00	0.14	25.67	
		56	4.67	12.27	0.02	0.05	17.01	
		3	0	4.48	24.11	-	0.03	28.62
			28	4.68	21.87	0.01	0.04	26.61
			56	4.77	21.30	0.02	0.09	26.18

1 : 균주 *Bacillus licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *Bacillus subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07 3 : 균주 *Bacillus licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Bacillus subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07



(라) 유리아미노산

고추장의 맛 성분으로 중요시하는 유리아미노산의 변화는 표 38과 같다. 숙성일수가 늘어감에 따라 유리아미노산의 함량도 늘어가는 결과를 보였다. 고추장의 주된 아미노산으로는 glutamic acid, Lysine, Alanine, phenylalanine, Aspartic acid가 많이 검출되었으며, 고추장 염도에 따라서 4% 염도의 고추장이 8%, 12% 염도의 고추장에 비해 유리아미노산의 함량이 높은 결과를 보여주었다. 이는 아미노태 질소 함량의 결과와 부합되는 결과를 보여주었다. 감칠맛을 나타내는 aspartic acid와 glutamic acid는 4%의 염도로 제조한 1번 처리구 고추장이 가장 높은 함량을 나타내었지만 쓴맛을 나타내는 valine의 함량 역시 가장 높은 값을 보여주었다. 또한 단맛을 나타내는 lysine, alanine 역시 4%의 염도로 제조한 1번 처리구 고추장이 가장 높은 함량을 나타내었고 4%의 염도로 제조한 2번 처리구 고추장이 두 번째로 총 유리아미노산 함량이 높은 것을 확인할 수 있었다.

표38. 염도별 고추장의 숙성기간에 따른 유리아미노산의 변화

Amino acids	4%						8%						12%														
	1		2		3		1		2		3		1		2		3										
	0	28	56	0	28	56	0	28	56	0	28	56	0	28	56	0	28	56	0	28	56	0	28	56			
1 Tau	8.03	25.00	31.40	7.57	18.56	26.06	8.27	15.94	20.37	7.51	13.39	18.85	7.39	14.68	17.58	7.54	10.42	12.64	7.88	8.70	9.98	7.26	8.75	9.68	7.27	7.65	9.40
2 Asp	<b>32.29</b>	<b>71.89</b>	<b>87.46</b>	<b>30.56</b>	<b>56.31</b>	<b>71.69</b>	<b>36.41</b>	<b>58.33</b>	<b>65.10</b>	<b>29.88</b>	<b>42.84</b>	<b>51.30</b>	<b>29.88</b>	<b>49.60</b>	<b>54.87</b>	<b>32.75</b>	<b>46.47</b>	<b>52.61</b>	<b>32.67</b>	<b>38.27</b>	<b>44.85</b>	<b>30.85</b>	<b>37.07</b>	<b>43.94</b>	<b>30.83</b>	<b>36.94</b>	<b>47.00</b>
3 Thr	8.19	16.23	17.42	8.45	18.62	21.43	9.85	19.81	20.08	8.42	11.73	14.85	7.50	16.64	16.84	9.36	15.63	16.88	8.64	10.43	12.14	8.09	11.26	13.01	7.62	10.07	13.06
4 Ser	11.03	23.98	24.98	10.36	22.37	26.58	11.95	24.46	24.57	9.84	15.19	18.71	9.96	18.86	19.58	10.81	18.05	21.12	10.51	13.47	15.68	9.62	13.07	15.57	9.51	12.73	16.53
5 Glu	<b>9.16</b>	<b>89.14</b>	<b>91.22</b>	<b>18.52</b>	<b>2.07</b>	<b>85.99</b>	<b>21.83</b>	<b>55.10</b>	<b>67.60</b>	<b>15.73</b>	<b>41.59</b>	<b>51.95</b>	<b>17.29</b>	<b>43.12</b>	<b>63.86</b>	<b>18.52</b>	<b>6.90</b>	<b>58.74</b>	<b>14.72</b>	<b>33.14</b>	<b>45.27</b>	<b>14.83</b>	<b>32.26</b>	<b>45.69</b>	<b>13.66</b>	<b>27.58</b>	<b>49.61</b>
6 Pro	-	16.59	19.88	-	8.34	8.53	0.67	9.50	10.79	-	0.22	5.17	-	2.50	7.63	-	6.09	11.12	-	0.73	-	-	1.44	-	-	-	3.42
7 Gly	2.70	15.36	18.09	2.42	9.11	11.19	2.94	10.75	11.99	2.15	5.42	6.79	2.22	7.32	8.54	2.40	7.05	9.35	1.88	3.72	5.10	1.83	3.76	5.09	1.95	4.01	6.72
8 Ala	<b>17.62</b>	<b>38.32</b>	<b>41.72</b>	<b>17.12</b>	<b>27.80</b>	<b>31.20</b>	<b>19.34</b>	<b>29.99</b>	<b>30.96</b>	<b>16.18</b>	<b>21.82</b>	<b>24.59</b>	<b>16.50</b>	<b>25.73</b>	<b>27.24</b>	<b>17.32</b>	<b>25.20</b>	<b>27.70</b>	<b>16.23</b>	<b>20.10</b>	<b>22.95</b>	<b>15.76</b>	<b>19.74</b>	<b>22.36</b>	<b>16.12</b>	<b>19.49</b>	<b>24.00</b>
9 Cit	-	8.14	9.91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	0.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 a-ABA	-	5.62	5.00	-	5.10	10.10	-	10.36	5.01	-	-	9.97	-	-	7.94	-	10.39	5.46	-	5.39	11.82	-	4.88	5.62	-	9.94	6.21
11 Val	7.08	21.43	22.82	6.75	14.80	17.49	7.54	16.11	17.00	5.57	10.26	2.17	6.46	12.49	13.64	6.58	12.10	14.17	6.42	8.94	10.46	6.26	8.78	10.17	6.05	8.27	10.94
12 Cys	2.90	20.93	21.01	12.95	18.66	13.49	14.25	20.59	13.74	13.30	17.33	16.88	13.55	17.71	18.53	12.10	19.42	19.12	13.39	17.10	17.29	12.82	17.20	17.86	12.70	15.66	18.17
13 Met	0.86	9.37	8.95	1.04	7.08	6.94	2.66	9.76	6.80	0.64	3.54	3.66	0.88	3.87	5.16	0.60	6.27	6.43	0.64	2.66	2.95	0.64	2.62	2.92	0.53	1.87	3.42
15 Ile	3.75	18.39	19.49	3.53	14.38	17.82	4.20	18.72	18.25	3.10	7.47	9.37	3.29	9.29	12.13	3.48	12.08	14.20	3.04	5.78	6.85	2.96	5.47	6.95	3.04	5.40	7.96
16 Leu	7.15	31.31	34.26	7.25	24.29	29.52	7.71	28.65	29.38	5.86	12.79	16.94	6.26	17.13	20.95	6.33	19.30	23.30	5.62	10.46	12.46	5.51	9.61	12.48	5.51	9.08	14.40
17 Tyr	1.32	16.30	18.01	5.02	15.11	16.62	6.35	19.65	18.33	4.38	8.49	11.48	1.43	11.94	13.41	4.97	13.71	15.36	4.01	8.88	9.38	1.34	6.81	8.81	6.38	8.00	12.15
18 Phe	<b>12.41</b>	<b>24.67</b>	<b>25.56</b>	<b>11.83</b>	<b>23.34</b>	<b>23.90</b>	<b>13.55</b>	<b>25.61</b>	<b>25.75</b>	<b>11.14</b>	<b>15.82</b>	<b>17.87</b>	<b>10.63</b>	<b>20.03</b>	<b>20.69</b>	<b>12.10</b>	<b>18.72</b>	<b>21.22</b>	<b>11.74</b>	<b>14.16</b>	<b>15.79</b>	<b>9.14</b>	<b>14.15</b>	<b>16.34</b>	<b>10.07</b>	<b>14.16</b>	<b>17.79</b>
19 b-Ala	17.69	13.61	25.32	18.23	29.00	30.13	17.48	26.63	26.10	17.40	15.97	17.65	17.47	26.25	25.03	16.69	24.59	26.60	18.68	17.57	22.14	18.42	19.71	18.99	17.28	17.02	18.65
20 b-AiBA	-	3.15	5.53	-	5.21	2.54	-	2.89	1.44	-	-	-	-	4.59	2.06	-	2.90	2.87	-	-	1.25	-	0.55	-	-	-	-
21 g-ABA	30.06	32.25	30.21	28.20	31.67	31.35	33.83	34.92	31.52	29.11	30.14	30.66	28.09	33.56	31.19	32.35	34.13	47.82	30.94	31.95	33.41	28.80	29.22	30.65	30.96	31.15	34.70
22 EOHNH2	-	5.08	4.76	0.75	4.62	4.58	2.16	5.03	4.21	-	3.78	3.87	-	4.56	4.61	0.68	4.22	4.19	-	3.09	3.68	-	2.67	3.57	-	1.89	3.81
23 NH3	7.28	16.42	18.68	7.41	11.43	13.30	8.12	11.22	12.15	6.77	9.63	11.36	7.28	10.39	11.43	8.05	10.41	11.30	6.93	8.62	9.69	6.53	7.95	9.38	8.28	9.18	10.26
24 Orn	1.80	29.80	26.23	0.89	2.04	1.50	2.43	2.05	1.97	1.55	2.02	1.49	2.09	2.75	1.58	2.65	3.23	1.29	2.04	1.97	1.77	1.73	1.99	1.83	1.80	1.99	2.78
25 Lys	<b>18.05</b>	<b>54.95</b>	<b>55.02</b>	<b>17.59</b>	<b>44.74</b>	<b>48.82</b>	<b>21.70</b>	<b>49.04</b>	<b>47.29</b>	<b>13.67</b>	<b>32.96</b>	<b>38.08</b>	<b>15.10</b>	<b>39.76</b>	<b>42.67</b>	<b>16.33</b>	<b>39.73</b>	<b>43.49</b>	<b>11.28</b>	<b>26.82</b>	<b>33.06</b>	<b>11.13</b>	<b>26.02</b>	<b>32.55</b>	<b>14.53</b>	<b>27.32</b>	<b>37.37</b>
26 His	1.30	8.29	7.14	2.43	6.49	6.24	3.24	6.98	6.34	1.09	4.53	5.10	1.13	5.67	6.13	2.30	5.57	6.47	1.50	3.66	4.73	0.79	3.31	4.79	2.33	3.76	5.52
27 Arg	-	7.09	7.56	-	20.90	31.14	-	26.46	33.10	8.26	28.74	36.04	-	17.71	26.83	-	14.20	23.74	11.25	24.45	31.74	7.95	22.20	31.48	18.78	31.74	45.19
합계	220.	627.	682.	218	515.	593.	256.	546.	555.	211.	355.	435.	204.	416.	482.	223.	431.	501.	220.	319.	385.	202.	309.	371.	225.	314.	419.
	66	99	38	.90	80	97	46	01	31	63	66	03	40	13	38	93	65	00	02	29	18	25	04	17	20	89	05

1 : 균주 *Bacillus licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *Bacillus subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07 3 : 균주 *Bacillus licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *Bacillus subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07

(마) 미생물학적 특성

고추장의 미생물학적 특성은 표 39에 나타냈다. 미생물학적 특성 중 바실러스 세레우스를 제외한 식중독 미생물을 분석한 결과 모든 처리구에서 검출되지 않았다. 세균수는  $10^6 \sim 10^7$  CFU/g을 나타냈으며, 8% 염도 3번 처리구와 12% 염도 2번 처리구를 제외하고 모든 처리구에서 숙성기간이 지남에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 진균수는  $10^3 \sim 10^4$  CFU/g의 범위를 나타내었다. 처리구간 염도별 차이는 크지 않게 나타났다. 장류에서 가장 많이 발생하는 바실러스 세레우스 식중독균을 분석한 결과 3번 처리구를 제외한 모든 처리구에서  $10^1$  CFU/g의 균수를 나타냈다. 2번 처리구에 사용되었던 균주 모두 바실러스 세레우스 증식 억제에 효과가 있는 균주지만 장류로 제조 시 101 CFU/g 정도가 검출되었다. 하지만 이를 혼합하여 사용한 3번 처리구에서는 바실러스 세레우스 균이 검출되지 않아 두 균주가 혼합하여 발효했을 때의 항균효과가 높아진 것으로 판단된다.

표39. 고추장의 미생물학적 특성

unit : log10 CFU/g

염도	처리 구	숙성 일수	세균수	진균수	<i>B.cereus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E.coli</i> O157	<i>Listeria</i> monocyto genes	<i>S.aureus</i>	<i>Cl.petrifige nse</i>
4%	1	0	6.48	3.90	0.48	ND	ND	ND	ND	ND
		28	7.00	3.02	0.70	ND	ND	ND	ND	ND
		56	7.74	3.00	0.65	ND	ND	ND	ND	ND
	2	0	6.18	4.26	0.40	ND	ND	ND	ND	ND
		28	7.11	3.78	0.54	ND	ND	ND	ND	ND
		56	7.34	3.00	0.54	ND	ND	ND	ND	ND
	3	0	6.40	4.60	-	ND	ND	ND	ND	ND
		28	7.27	3.90		ND	ND	ND	ND	ND
		56	7.29	4.45		ND	ND	ND	ND	ND
8%	1	0	6.54	3.95	0.54	ND	ND	ND	ND	ND
		28	7.13	3.00	0.93	ND	ND	ND	ND	ND
		56	7.40	3.00	0.85	ND	ND	ND	ND	ND
	2	0	6.00	4.53	1.37	ND	ND	ND	ND	ND
		28	7.40	3.90	0.74	ND	ND	ND	ND	ND
		56	7.49	3.30	0.65	ND	ND	ND	ND	ND
	3	0	6.65	4.51	0.60	ND	ND	ND	ND	ND
		28	7.45	4.26	-	ND	ND	ND	ND	ND
		56	6.85	3.48	-	ND	ND	ND	ND	ND
12%	1	0	6.48	3.20	0.85	ND	ND	ND	ND	ND
		28	7.08	3.52	0.40	ND	ND	ND	ND	ND
		56	7.18	3.60	-	ND	ND	ND	ND	ND
	2	0	6.30	4.56	0.98	ND	ND	ND	ND	ND
		28	7.33	3.00	0.54	ND	ND	ND	ND	ND
		56	6.60	3.00	0.40	ND	ND	ND	ND	ND
	3	0	6.88	4.40	-	ND	ND	ND	ND	ND
		28	7.66	3.30	-	ND	ND	ND	ND	ND
		56	7.98	3.00	-	ND	ND	ND	ND	ND

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *B. subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *B. subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07

(바) 관능평가

염도별 고추장의 관능평가를 한 결과는 표40와 표41에 나타내었다. 4% 염도의 고추장에서 색, 맛 전체적인 기호도에서 3번 처리구가 다른 처리구에 비해 좋았으며, 유의적인 차이는 아니었으나 좋은 판정을 받았다. 이에 반해 12% 염도의 고추장에서는 2번 처리구가 좋은 판정을 받았으며, 점수는 4% 고추장보다도 낮은 점수를 획득하였다. 이는 높은 염도로 판정단의 선호도를 저해한 것으로 보인다. 이상으로 미루어 보아 우수균주를 이용하여 고추장을 제조한 결과 단독으로 균주를 이용한 것보다도 혼합하여 복발효를 진행했을 때 선호도가 더 높아지는 경향을 보였으며 염도를 4%로 하여 제조하였을 경우도 대조구로 제조한 1번 처리구보다도 더 높은 판정을 얻는 결과를 보여주었다.

표40. 4% 염도의 고추장

Sensory characteristics	1	2	3
Color	6.44±1.38 <sup>a1)</sup>	6.44±1.46 <sup>a</sup>	6.56±1.54 <sup>a</sup>
Flavor	6.83±1.04 <sup>a</sup>	6.00±1.28 <sup>a</sup>	5.83±1.20 <sup>ab</sup>
Taste	6.33±1.60 <sup>a</sup>	5.77±1.59 <sup>ab</sup>	6.39±0.98 <sup>a</sup>
Overall preference	6.22±1.26 <sup>ab</sup>	5.83±1.50 <sup>ab</sup>	6.78±0.94 <sup>a</sup>

표41. 12% 염도의 고추장

Sensory characteristics	1	2	3
Color	6.06±1.51 <sup>a1)</sup>	6.94±1.05 <sup>a</sup>	6.56±1.34 <sup>a</sup>
Flavor	5.44±1.42 <sup>a</sup>	5.89±1.32 <sup>a</sup>	5.66±1.78 <sup>a</sup>
Taste	4.33±1.61 <sup>a</sup>	4.72±1.74 <sup>a</sup>	4.78±1.52 <sup>a</sup>
Overall preference	4.44±1.54 <sup>b</sup>	5.17±1.42 <sup>ab</sup>	5.11±1.60 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Mean±standard deviation (n=18)

1 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* (충무발효) 대조구, 2 : 균주 *B. subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07 3 : 균주 *B. licheniformis* SCK125037, *Aspegillus oryzae* SKM 07, 충무발효, *B. subtilis* SCKB1307, *Aspegillus oryzae* SKM 07

## 2절 저염, 고염 종류의 세균군집구조 분석

저염(8%염도)과 고염(14%염도)으로 제조된 된장과 간장의 세균군집구조를 분석하기 위하여 (주)천연연구소(Chunlab, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 샘플은 기 실험에 이용하였던 된장과 간장의 샘플을 숙성 전, 후로 나눠 시료로 이용하였고, 된장의 원재료인 메주도 시료로 이용하였다.

된장과 간장의 숙수준의 세균군집구조를 살펴 본 결과(그림 34) 된장은 *Bacillus*속이 우점종을 이루었으며, 간장은 *Tetragenococcus*속이 우점종을 이루었다. 된장은 염도별로 큰 차이는 보이지 않았으며, 숙성전과 비교하여 약간의 변화들이 보이긴 했지만 여전히 발효에 영향을 주는 것은 *Bacillus*속이 영향을 미친 것으로 보인다. 이에 반해 간장은 내염성세균인 *Tetragenococcus*속이 우점종을 이루었는데 이는 된장과 간장을 분리할 때 염수에 해당하는 간장에 염수로부터 유래하여 생존하는 *Tetragenococcus*속이 우점종이 된 것으로 보여진다.

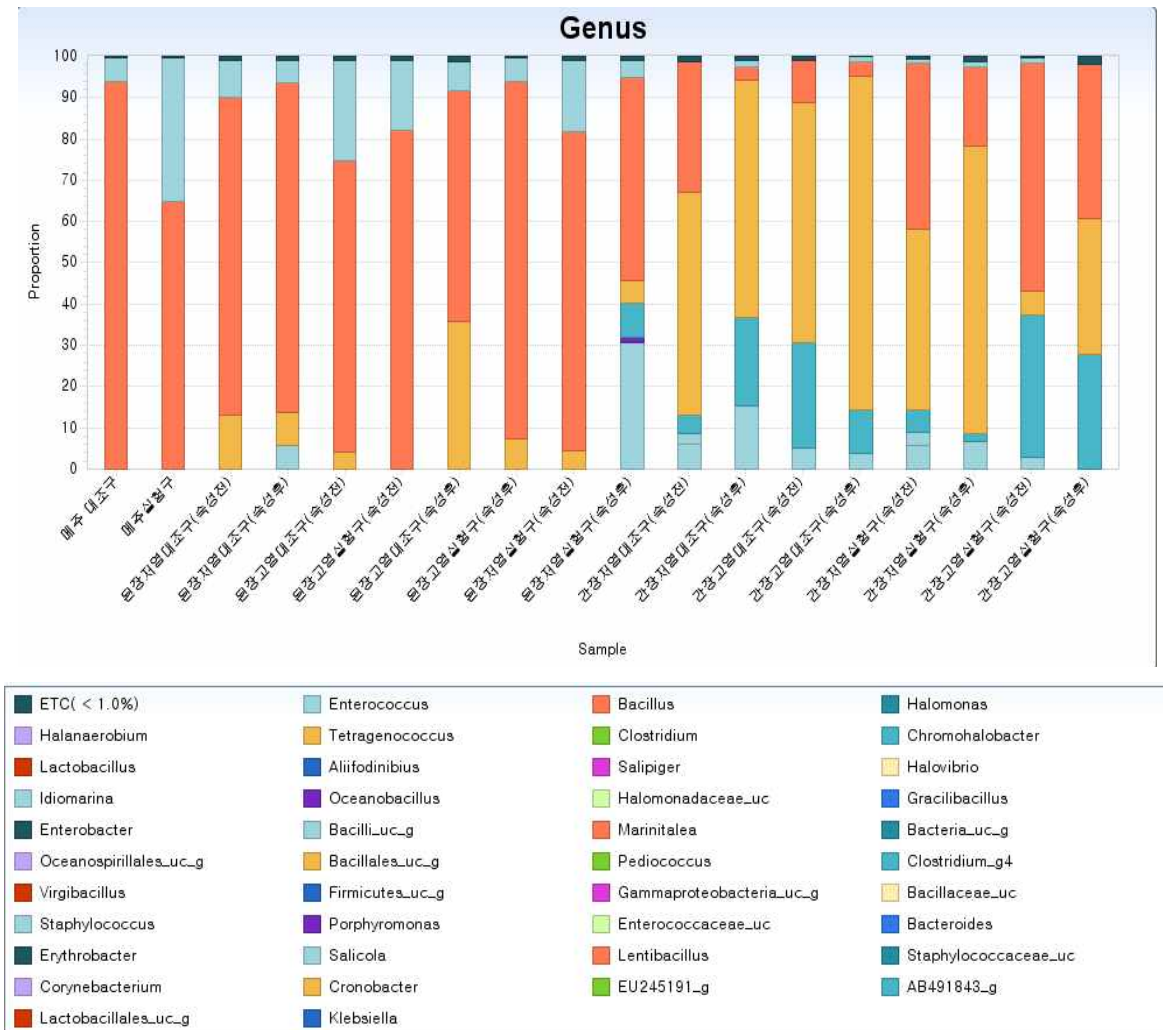


그림34. 메주 및 염도별 된장, 간장에서 속(genus)수준의 세균군집구조

EzTaxon extended database (4)를 이용하여 BLASTN 탐색 실행결과로 찾은 상위 다섯개의 hits을 대상으로 pair-wise alignment (20)를 실행한 뒤 얻은 similarity를 기준으로 분류학적 동정을 수행하였다. 3% 서열 불일치도를 기준으로 CD-HIT program (17)을 이용하여 시료 내에 존재하는 종의 수인 operational taxonomic unit (OTU) 수를 구하였다. 통계분석은 MOTHUR program (27)을 사용해서 rarefaction curve, abundance-based coverage estimator (ACE) index, Chao1 richness index, Shannon 및 Simpson diversity indices들과 Good's coverage index (6)를 구하였다(표42, 43).

표42. 염도별 된장의 숙성 전·후별 분류학적 동정

Sample	Valid reads	OTUs	Ace	Chao1	NP Shannon	Shannon	Simpson	Goods Lib. Coverage
된장저염대조구 (숙성 전)	1939	26	33.34	29.50	1.46	1.44	0.39	1.00
된장저염대조구 (숙성 후)	15458	139	175.06	167.96	2.66	2.65	0.12	1.00
된장고염대조구 (숙성 전)	3226	35	49.65	42.20	1.54	1.52	0.36	1.00
된장고염대조구 (숙성 후)	9951	119	145.87	54.77	2.64	2.63	0.13	1.00
된장저염실험구 (숙성 전)	8361	86	99.13	92.32	1.83	1.82	0.30	1.00
된장저염실험구 (숙성 후)	12481	189	256.14	268.57	3.25	3.23	0.07	1.00
된장고염실험구 (숙성 전)	3882	38	50.78	51.00	0.92	0.90	0.62	1.00
된장고염실험구 (숙성 후)	10022	103	133.07	128.38	1.84	1.83	0.30	1.00

표 43. 염도별 간장의 숙성 전·후별 분류학적 동정

Sample	Valid reads	OTUs	Ace	Chao1	NP Shannon	Shannon	Simpson	Goods Lib. Coverage
간장저염대조구 (숙성전)	1782	35	43.20	41.00	1.95	1.92	0.22	0.99
간장저염대조구 (숙성후)	3737	62	70.31	75.20	2.71	2.69	0.10	1.00
간장고염대조구 (숙성전)	1678	37	45.10	41.00	2.38	2.36	0.14	1.00
간장고염대조구 (숙성후)	994	20	21.42	20.17	1.40	1.38	0.46	1.00
간장저염실험구 (숙성전)	11347	139	192.58	229.08	3.02	3.00	0.07	1.00
간장저염실험구 (숙성후)	1673	45	53.62	51.11	2.25	2.22	0.20	0.99
간장고염실험구 (숙성전)	10501	109	140.27	157.00	2.44	2.43	0.14	1.00
간장고염실험구 (숙성후)	11683	142	175.56	208.60	3.09	3.08	0.07	1.00

된장과 간장의 종수준의 군집구조를 살펴보았다.(그림 35, 36) 된장에서 염도가 높은 처리구는 숙성전이나 숙성 후에 *Bacillus arius*가 71에서 75%로 높아진 분포를 보였으며, 저염 된장에서는 *Bacillus arius*(67%)에서 숙성 후 43%로 변화를 보였다. 저염 된장에서 변화를 보이면서 *Staphylococcus equorum*(20%)가 새롭게 등장하였다. 이 균은 높은 염도의 식품에서 주로 발견되는 균으로 젓갈이나 스위스 치즈에서 많이 분리되고 있으며, 새우젓갈의 스타터로 이용(정두원, 2014)되고 있다. 또한 *Chromohalobacter japonicus*(5%)도 확인되었다. 이 역시 염도가 높은 식품에서 많이 발견되는 것으로 알려져 있다.

간장에서는 염도가 높은 처리구에서 *Bacillus arius*(48%)에서 숙성 후 33%로 떨어지고 *Tetragenococcus halophilus*가 33%로 증가되었다. 염도가 낮은 처리구 역시 *Tetragenococcus halophilus*가 우점종(69%)을 이루었다.

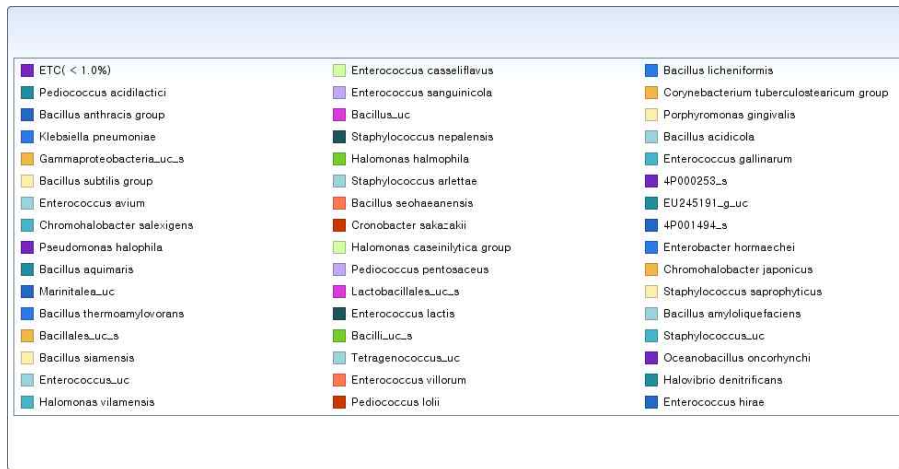
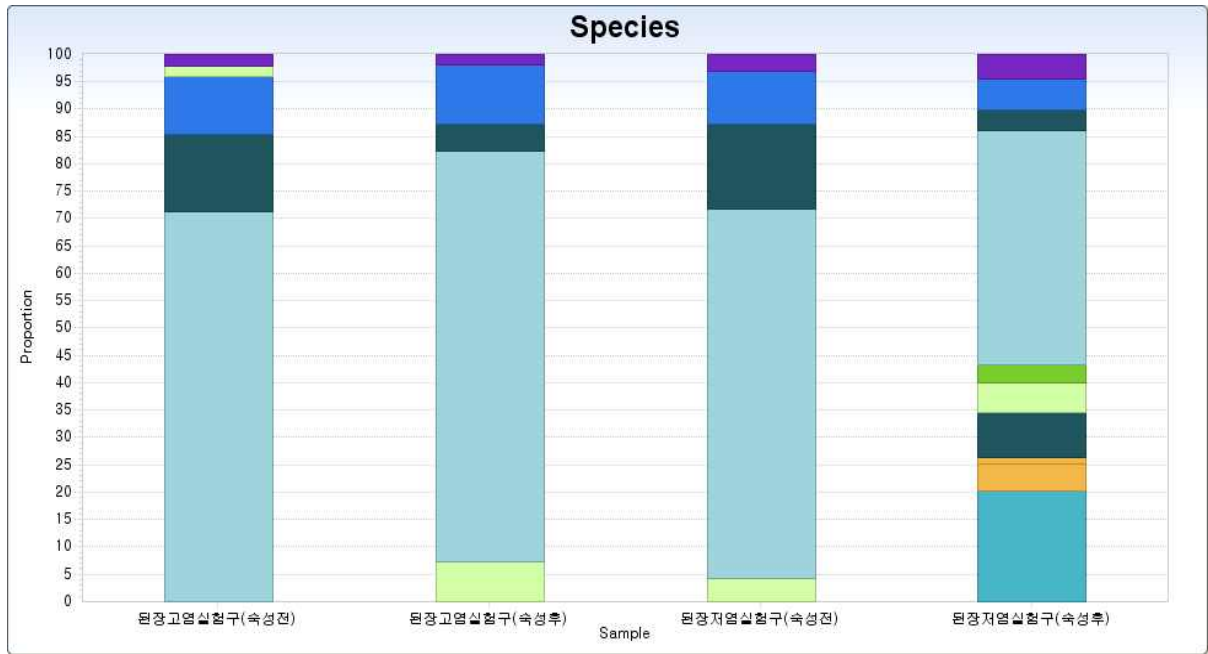


그림35. 염도별 된장에서 종수준의 세균군집구조(Taxonomic composition)



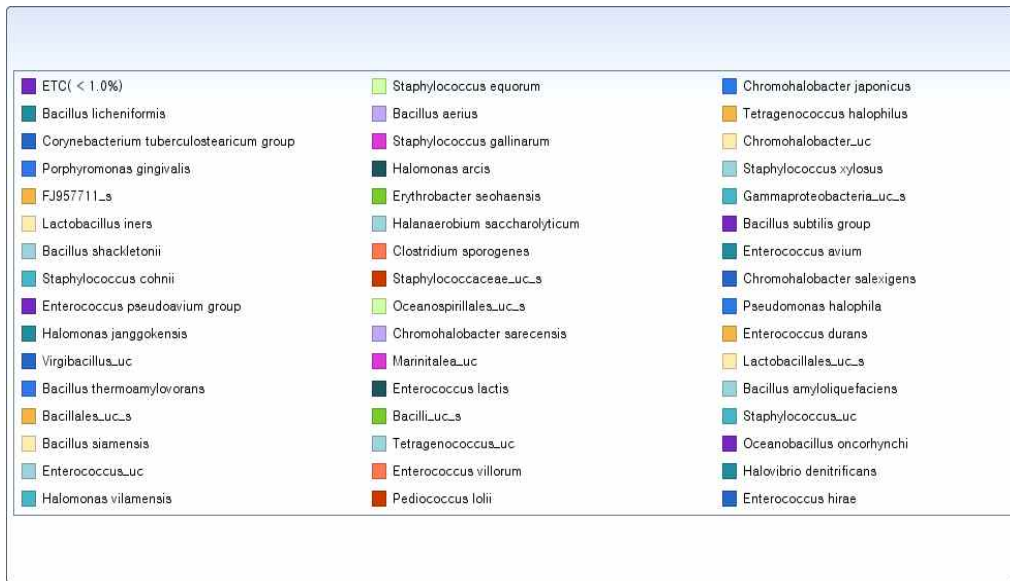
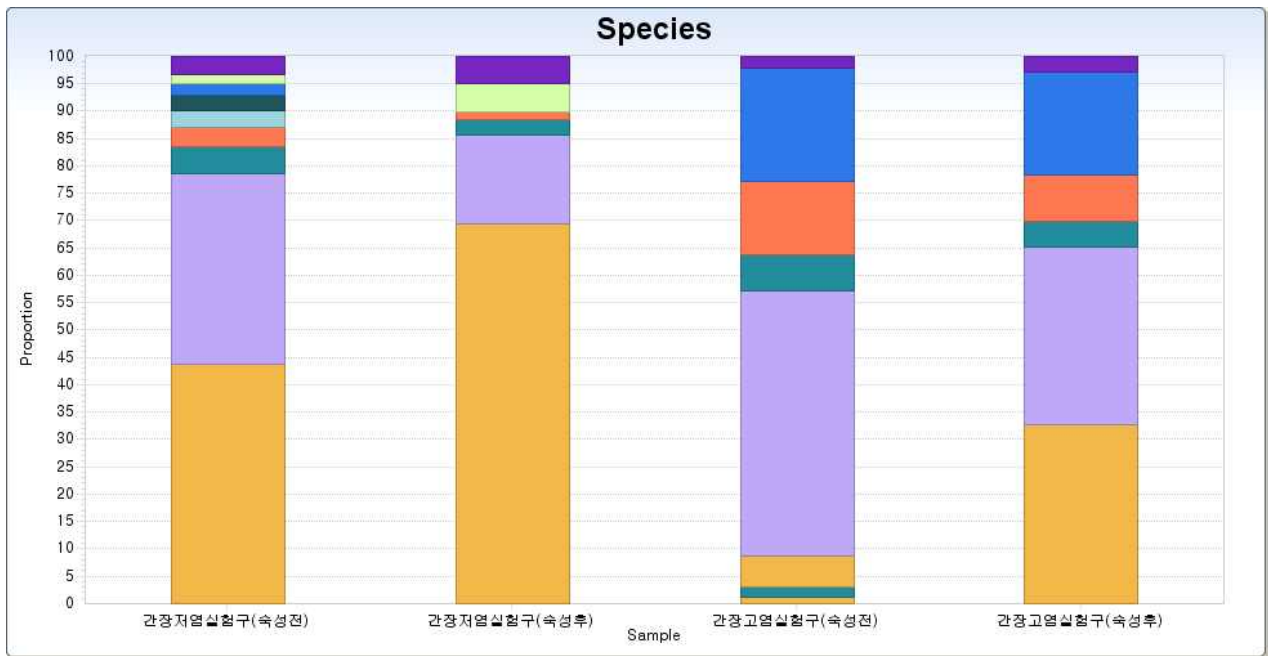


그림36. 염도별 간장에서 종수준의 세균 군집구조(Texonomic composition)

염도별 장류의 세균 군집 다양성을 비교하기 위해 Unifac service를 이용하여Phyrogenic tree를 작성하였다(그림37, 38). 된장은 고염 실험구와 저염 대조구가 유사성을 보였고, 고염 대조구는 중간위치에 존재했다. 간장의 경우 저염 실험구와 고염 대조구는 유사성을 보였으며, 저염 대조구가 중간위치에 존재했다.

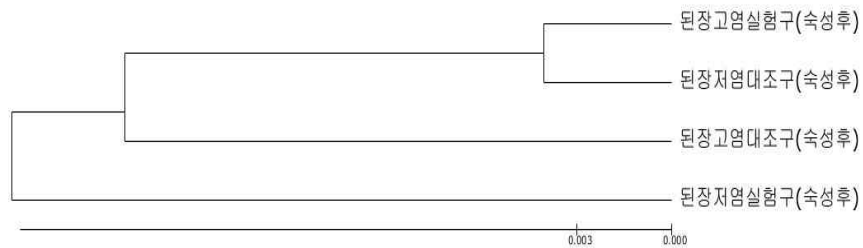


그림 37. 숙성 후 염도별 된장의 군집구조 유사성 분석

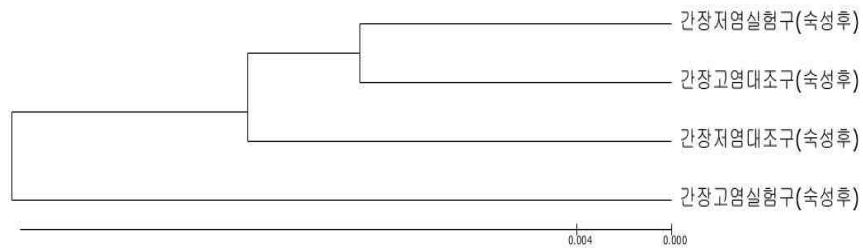


그림 38. 숙성 후 염도별 간장의 군집구조 유사성 분석

장류를 저염으로 제조하였을 경우 새로운 균종이 발견되기도 했지만 *Bacillus*를 스타터로 사용하고 *Bacillus*의 군집빈도가 새로운 균종에 비해 상대적으로 높았기 때문에 이상 발효는 진해되지 않았으며, 향미나 관능면에서 특이한 이상이 발견되지 않았다. 이는 *Bacillus*가 낸 향균물질의 역할이 컸을 것으로 사료된다.

### 3절 최종 제품 컨트롤(저염 된장 제조)

#### 1. 천연물을 이용한 저염된장 제조

##### 가. 재료 및 조사방법

###### (1) 재료

된장 및 간장 분리 후 1개월 숙성을 마친 제품을 (주)순창장류에서 구입하였다.  
작두콩, 완두콩, 고추씨는 국내산으로 인터넷에서 구입하여 사용하였다.

###### (2) 방법

###### (가) 증자 작두콩, 완두콩 분말 이용한 된장 제조 : A

3회 세척한 후 콩과 물을 1 : 3비율로 15시간 침지 한 다음 물을 빼고 121℃에서 30분 동안 Autoclave를 이용하여 콩을 증자하였다. 증자한 콩을 60℃에서 24시간 동안 건조하여 분말을 수득하였다.

된장, 간장, 정수, 작두콩, 완두콩 분말 및 고추씨를 일정량 혼합하여 4주간 상온에서 숙성하였다.

###### (나) 작두콩, 완두콩 koji를 이용한 된장 제조 : B

작두콩 및 완두콩을 3회 세척한 후 콩과 물을 1 : 3비율로 15시간 침지 한 다음 물을 빼고 121℃에서 30분 동안 Autoclave를 이용하여 콩을 증자하였다.

증자콩은 70℃로 냉각 한 후 *Aspergillus oryzae* SKM07(흡광도2.0)을 접종하여 30℃에서 4일간 발효한 후 60℃에서 24시간 동안 건조하여 koji를 수득하였다.

된장, 간장, 정수, 작두콩, 완두콩 koji 및 고추씨를 일정량 혼합하여 4주간 상온에서 숙성하였다.

###### (3) 실험방법

###### (가) 일반성분(수분, pH, 산도, 염도, A.N)

상기 (복발효 메주를 이용한 저염 장류(된장, 간장) 생산)의 방법과 동일한 방법으로 진행되었다.

###### (나) 미생물학적 특성

식품공전방법에 준하여 실험하였다.

###### (4) 결과

###### (가) 된장의 배합비

###### ① koji를 이용한 된장 제조

표44. 저염 된장 A 의 배합비

원재료명	함량
된장	62.8%
작두콩 분말*	5.0%
완두콩 분말	8.8%
고추씨	2.0%
조선간장	15.1%
정제수	6.3%
합 계	100.0%

\*수분함량 :작두콩 분말(7.4%), 완두콩 분말(6.1%)

② 분말을 이용한 된장 제조

표45. 저염 된장 B의 배합비

원재료명	함량
된장	70.4%
작두콩 koji*	5.3%
완두콩 koji	7.0%
고추씨	1.4%
조선간장	10.6%
정제수	5.3%
합 계	100.0%

\*수분함량 :작두콩 koji(7.4%), 완두콩 koji(7.5%)

(나) 저염 된장의 이화학적 특징

된장의 이화학적인 특징을 분석한 결과 수분은 57.56, 56.54%로 일반 된장(55.94%)에 비해 약간 높은 편이었으며, 염도는 8.0, 8.4%의 함량을 나타내었다.

pH는 일반 된장(5.39)보다 낮은 편으로 된장 혼합 후 1개월간 숙성과정에서 pH 가 낮아지는 것으로 판단된다. 적정산도는 pH와 부합되는 결과로 B된장이 더 높은 것을 알 수 있었다.

아미노산성 질소는 B된장이 A된장에 비해 759.94 mg% 로 높은 함량을 나타내었다. 이는 혼합에 사용하는 koji의 작용으로 미생물이 단백질 분해력에 관여하는 효소활성을 높인 것으로 사료된다.

표46. 저염 된장의 이화학적 특성

항목	A	B
수분(%)	57.56±0.88	56.54±0.23
염도(%)	8.4±0.1	8.0±0.5
pH	5.0±0.43	4.9±0.12
산도(ml)	17.83±0.14	18.23±0.11
아미노산성 질소(mg%)	627.81±1.52	759.94±2.10

(다) 저염 된장의 유기산, 유리당

저염 된장의 유기산 유리당을 분석한 결과는 표 47 ~ 48 와 같다.

총 유기산 함량은 A 된장에 비해 B된장이 더 높은 함량을 보여주었으며, 이는 pH 및 적정산도와의 결과에 부합하였다. 유기산 중 Lactic acid가 각각 6.32, 5.97%로 가장 높게 검출되었다.

유리당의 함량은 B된장이 A된장에 비해 월등히 높게 나타났다. 이는 koji로 제조된 콩의 당 성분이 미생물에 의해 glucose나 maltose로 유리되어 나타난 결과라고 사료된다.

표47. 된장의 유기산 함량

구분	Unit : %							합계
	Oxalic acid	Citric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	
A	0.02	1.10	0.22	0.20	6.32	-	1.21	9.07
B	0.01	1.01	0.06	0.25	5.97	0.13	1.81	9.24

A : 증자 작두콩, 완두콩 분말 이용한 된장, B : 작두콩, 완두콩 koji를 이용한 된장

표48. 된장의 유리당 함량

구분	Unit : %				합계
	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	
A	0.31	2.84	-	0.13	3.28
B	-	24.3	-	3.27	27.57

A : 증자 작두콩, 완두콩 분말 이용한 된장, B : 작두콩, 완두콩 koji를 이용한 된장

(라) 저염 된장의 미생물학적 특성

된장의 미생물학적 특성을 살펴본 결과 B.C를 제외한 식중독 미생물은 검출되지 않았으며, 바실러스 세레우스는  $10^3$  logCFU/g의 결과를 보였으나 이는 장류 식약처 기준치인  $10^4$  logCFU/g이하의 결과로서 기준치 허용범위를 벗어나지 않았다.

또한 세균수는  $10^{13}$  logCFU/g를 나타내었고 A된장에 비해 B된장이 더 높은 수치를 나타내었다.

표 49. 저염 된장의 미생물학적 특성

Unit : log <sub>10</sub> CFU/g									
구분	세균수	<i>E.coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E.coli</i> O157	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Cl. perfringens</i>	<i>Vibrio</i>
A	13.3	ND	3.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	13.9	ND	3.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND

A : 증자 작두콩, 완두콩 분말 이용한 된장, B : 작두콩, 완두콩 koji를 이용한 된장

## 2. 관내음식점주 조사

### 가. 조사개요

#### (1) 조사목적

시판 유통 중인 된장 및 전통된장의 높은 염도의 기호성 저하 및 성인병 유발 등의 문제점을 보완하고자 개발 중인 저염 된장을 일반 음식점주 등 소비자 조사를 통해 저염장류 개발의 방향성을 제시하고자 함

#### (2) 조사방법

순창 관내 음식점 방문 후 상담 및 소비자조사  
된장 2제품 및 설문지 배부

#### (3) 조사시기

2013년 7월 8일 ~ 7월 19일

#### (4) 관능평가

순창 관내 음식점 업주를 대상으로 관능검사의 목적과 시료에 대하여 설명한 후 된장을 제공하였다. 측정항목으로는 색, 향, 짠맛 및 전체적기호도를 10점 채점법으로 평가하였다. 기호도는 아주 좋다가 10점, 보통 이다가 5점, 아주 나쁘다가 1점으로 평가하였고 특성은 강도에 따라 강하면 10점, 중간이면 5점, 약하면 1점으로 평가하였다.

#### (5) 결과처리

조사 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science) 통계 프로그램을 활용하여 분석하였다. 두 된장의 관능적 차이분석은 독립표본 t-검증(independent sample t-tst)을 이용하였다.

## 나. 소비자 조사 결과

### (1) 소비자 조사 연령대

순창군 관내 음식점 업주를 대상으로 실시한 결과 조사에 참여한 연령대는 40 ~ 50대가 주를 이룬 것으로 나타났으며, 된장을 주로 선호하는 연령대는 40대 이상으로 나타났다.

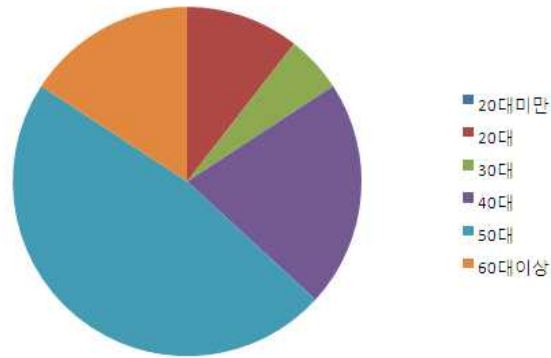


그림39. 소비자 조사에 참여한 연령

### (2) 제품의 만족도

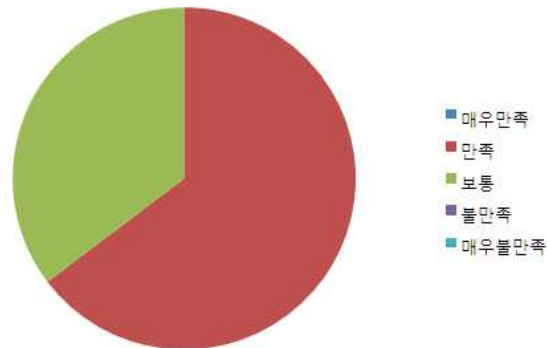


그림40. 제품에 대한 만족도 조사

두 가지 제품에 대한 만족도 조사를 실시한 경우 만족이 64.7%의 비율로 나타났다. 제품에 대하여 만족하다는 의견이 주를 이루어 시장에 상품을 내놓을 경우 단가 조정 및 시장 유통 가능성만 고려한다면 충분히 구매율도 높아질 것이라고 사료된다.

### (3) 맛 평가

된장의 맛을 평가한 결과는 표50과 같다.

색깔, 냄새, 짠맛, 전반적 기호도를 측정한 결과 색깔, 냄새, 전반적 기호도 면에서 A된장이  $8.29 \pm 0.9$ ,  $87.70 \pm 1.8$ ,  $28.29 \pm 1.15$ 를 획득하여 B된장에 비하여 높은 선호도를 보여주었다. 짠맛은 A된장이 B된장에 비해 짜다는 결과를 보여주었으며, 특성강도가 각각 7.29, 6.00점을 획득하여 보통보다는 조금 더 짠맛으로 확인되었다. B된장은 koji를 이용하여 제조한 이유로 색이 더 진하며, 청국장 향이 강하여 선호도가 낮게 나타난 것으로 사료된다.

표 50. 저염 된장의 맛 평가 분석

	색깔	냄새, 향	짠맛	전반적기호도
A	8.29±0.98	7.70±1.82	7.29±1.68	8.29±1.15
B	6.76±1.60	6.70±1.72	6.00±1.69	5.88±2.05
Sig.*	0.020	0.838	0.666	0.003

A : 증자 작두콩, 완두콩 분말 이용한 된장, B : 작두콩, 완두콩 koji를 이용한 된장  
 \*sig.≤0.05일 때 유의적 차이가 있음.

### 3. 즉석 저염된장국 시제품 생산

식생활의 간편화를 추구하는 경향이 증대되고 있으며, 짧은 시간과 적은 노력으로 조리해 내는 음식에 대한 기호도가 증가하고 있다. 기 개발된 저염 된장을 이용하여 된장의 섭취 증대 및 저염 된장의 홍보를 위해 패스트푸드와 접목을 하여 즉석 된장국 생산을 하고자 하였다. 순창군이 보유하고 있는 특허 기술인 즉석된장국 제조방법(10-0761425000)에 따라 된장국을 제조하였으며, 이에 순창산 시래기를 첨가하여 구수하고 시원한 맛을 가미시켰다.

된장의 첨가비율은 장류연구소 및 발효미생물산업진흥원 연구원들의 관능평가로 결정되었으며(데이터 미제시), 된장국을 개발하여 각종 전시회 및 박람회, 지역축제에 홍보할 것이다.



그림 41. 저염된장을 이용한 시래기 즉석된장국의 시제품 디자인



## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 세부과제에서는 연구 과제에서 분리 후 보관중인 균주를 활용하여 메주, 된장, 간장, 고추장을 제조하였다. 메주의 주요 종균으로는 분리된 세균 및 곰팡이를 집중하여 대량생산이 가능한 사각메주를 제조하였다. 또한 된장 및 간장은 상기 개발된 메주를 주원료로 장류의 염도를 각각 된장 8%, 간장 14%로 제조하여 연구를 진행하였다.

이후 염도별, 숙성별 발생하는 미생물학적, 이화학적 특성을 조사하였으며, 이를 통해 제조한 된장에 다양한 소재를 첨가하여 저염 된장을 생산하여 관능평가를 실시하였다. 유리아미노산 중 장류의 깊은 맛과 관련 있는 Aspartic acid와 Glutamic acid는 저염 장류에서 수치가 높았으며, 총 유리아미노산도 높게 나타났다. 식중독 미생물은 검출되지 않았으며, 된장에서 바실러스 세레우스는 염도에 상관없이 감소되다가 일부 샘플에서 다시 증가하는 경향을 보였으며, 간장에서는 모두 감소하는 경향을 보였다. 관능평가 결과 8%e 된장과 14% 간장은 높은 점수를 획득하여 장류로서의 가능성을 확인 할 수 있었다. 염도별 미생물을 분석한 결과 다양한 경향을 보였으며, *Halophilic bacteria*가 염도 증가별로 높게 성장하였고, *Normal yeast*는 초기에만 검출되었으며, *Normal lactobacilli*는 염도 증가별 감소하는 경향을 보였다. 숙성과정 중 색상 변화도 염도별 차이가 나는 것을 확인하였다. 염도별 Protease activity의 경우는 숙성 기간별 증가, 감소를 반복하는 경향을 보였다.

또한 고추장 역시 상기 분리한 균주를 활용하여 저염으로 제조하고 연구를 진행하였다. 염도가 낮은 고추장에서 유리아미노산의 함량이 전체적으로 높게 나타났으며, 식중독 미생물은 검출되지 않았다. 바실러스 세레우스는 염도에 상관없이 10마리 이하로 검출되었으나, 우수균주와 기존의 균주를 혼합하여 제조한 처리구에서는 전혀 검출되지 않았다.

이런 제조기술들을 이용하여 참여기업에 기술을 이전하여 제조하도록 하였으며, 그 결과 균주를 활용한 사각메주, 무염청국장 등의 시제품을 생산하여 약 1억원의 매출을 창출하였으며, 추후 추가 매출을 기대하고 있다. 또한 순창군이 보유하고 있는 특허기술인 즉석 된장국 조리 등을 이용하여 저염 즉석 된장국도 개발하여 시장의 요구에 부응할 수 있도록 할 것이다.

발효미생물을 이용한 저염장류제품 생산은 본 과제를 통하여 충분한 가능성이 있는 것으로 결과가 나왔으며, 더욱이 소비자의 강한 니즈로 인해 향후 시장은 지속적으로 저염을 지향할 것으로 예상된다.

저염을 지향하더라도 소비자는 인위적인 첨가제나 원재료의 변화를 요구하지는 않을 것이며, 더욱더 품질과 전통에 대한 가치를 추구할 것이다. 따라서 이를 제어할 수 있는 효과적인 발효미생물의 발굴과 이용에 대한 가치는 커질 수밖에 없다.

추후 연구결과에 따른 기술적 성과는 논문 및 특허로 도출 할 예정이며, 경제적 산업적으로 2015년에는 1000억 시장 달성, 참여기업 매출 20억 등의 우수한 결과가 도출 될 것이라고 기대해본다. 이렇게 전통장류산업을 효과적으로 성장시켜 한식세계화 육성 전략에 기여 할 수 있을 것이라고 보여진다.

## 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절 연구개발 성과



<저염종균 적용 특화메주>



<무염 청국장>



<삼삼한 한식된장>



<순창간장>

- (1) 우수균주를 적용한 장류개발(사업화 및 기술이전)
  - 단기숙성간장 (궁중음식본가)
  - 사각메주, 저염된장, 저염간장, 무염청국장(순창장류-제3협동)
  - 무염청국장 홈쇼핑 런칭으로 1억원 단기 매출 성과
  - 저염 고추장 생산
  - 즉석 시래기 된장국 시생산
- (2) 교육 지도 12건
  - 장류 기술지도 4건
    - 장류제조방법 설명
    - 기술지도 : 외부환경에 따른 메주침지방법, 간장 염도 조절방법 등
  - 특화사례발표 1건
  - 기타 : 7건
- (3) 정책활용 2건
  - 전통식품 개념 재정립 및 품목별 표준 규격 개정
  - 정책건의 : 가공식품 나트륨 저감화 가이드라인 설정

(4) 특허 출원(7건), 등록(1건)

○ 출원

- 장류의 유해 미생물에 대한 항균활성 및 바이오제닉 아민 분해 활성이 있는 바실러스 리케니포미스 SCK B11 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 순창군발효미생물관리센터, 발명인 : 정도연, 김용상, 엄태봉 특허출원번호 : 10-2012-0079232(2012.07.20).
- 바이오제닉 아민 분해활성이 있는 바실러스 속 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 순창군발효미생물관리센터 발명인 : 김용상, 조성호, 정도연, 엄태봉. 특허출원번호 : 10-2013-0096325(2013.08.14).
- 전통장류 유래 알코올을 고생산하는 효모 균주 및 이의 용도. 출원인: 재단법인 순창군발효미생물관리센터. 발명인: 백상호, 정도연, 송영란. 특허출원번호: 10-2013-0123327 (2013.10.16)
- 전통장류 유래 효모 균주를 이용한 저염 간장의 제조방법. 출원인: 재단법인 순창군발효미생물관리센터. 발명인: 백상호, 정도연, 송영란. 특허출원번호: 10-2013-0123330 (2013.10.16)
- 전통장류에서 분리한 산막 형성 효모 증식 억제력을 가지는 바실러스 리케니포미스 SCDB34 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 발효미생물산업진흥원. 발명인 : 엄태봉, 김용상, 류명선, 전세봄, 정도연, 조승화. 특허출원번호 : 10-2014-0011046(2014.01.29)
- 바이오제닉 아민 분해 활성 및 유해 미생물에 대한 항균활성이 있는 페디오코커스 펜토사세우스 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 발효미생물산업진흥원. 발명인 : 김용상, 오현화, 엄태봉, 정도연 특허출원번호 : 10-2014-0128798(2014.09.26)
- 바실러스 리케니포미스 균주의 균체 생산성 또는 프로테아제 생산성 증가용 배지 조성물 및 이를 이용한 배양 방법. 출원인 : 재단법인 발효미생물산업진흥원 발명인 : 정용섭, 임소연, 이유리, 정도연. 특허출원번호 : 10-201-0143387(2014.10.22)

○ 등록

- 장류의 유해 미생물에 대한 항균활성 및 바이오제닉 아민 분해 활성이 있는 바실러스 리케니포미스 SCK B11 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 순창군발효미생물관리센터, 발명인 : 정도연, 김용상, 엄태봉 특허등록번호 : 10-1379230(2014.03.24)

(5) 학술대회 등 발표

- 백상호, 정도연. 미생물을 활용한 고부가가치 저염 장류제품 개발 2012 한국식품영양과학회. Lecture (2012.11.02)
- 조승화, 정수지, 정도연, 신미진. 전통장류로부터 분리한 균주를 활용한 복발효 메주의 품질 특성. 2012 한국식품영양과학회 국제학술대회, Poster (2012.11.01)
- 정도연, 신동화. Microbes&Function of Fermented Soybean Products 2013 한국미생물생명공학회. Lecture (2013.07.04)
- 정도연. 미생물을 활용한 고부가가치 저염 장류제품 개발 2013 장류국제포럼. Lecture (2013.10.31)
- 조승화, 정수지, 정도연, 오병현, 송예지, 조유빈. Changes in Physicochemical Properties of Low Salt Doenjang Using Selective Starters. 2013 한국식품영양과학회 국제학술대회, Poster (2013.11.15)

- 정도연. 미생물을 활용한 고부가가치 저염 장류제품 개발 2014 고부가가치식품 우수기술발표회. Lecture (2014.05.15)
- 조승화, 정도연, 송예지, 조유빈. 김형희. 저염 고추장의 숙성 중 이화학적 특성변화. 2014 한국식품영양과학회 국제학술대회, Poster (2014.10.29)

(6) 홍보실적

- 신문, 방송, 저널 등
  - 삼삼프로젝트 관련 장류 저염화 홍보 (3건)
  - 우수 발효미생물 관련 홍보(2건)
  - 명품간장 및 저염 간장 홍보(6건)

## 2절 성과활용 계획

(1) 실용화 산업화 계획

- 지속적인 우수발효미생물의 장류 적용에 따른 기술이전
- 공정기술지도

(2) 교육, 지도, 홍보 등 기술 확산 계획

- 저염 장류 제조 기술 등 발효미생물의 우수성 홍보
- 학술대회 홍보
- 장류 기업체 및 농민을 대상으로 장류 제조 기술지도 확산

(3) 특허, 논문, 품종 등 지식재산권 확보계획 등

- 특허 등록
- 논문 1편(비SCI)

(4) 전통장류산업을 효과적으로 성장시켜 한식세계화 육성 전략에 기여할 수 있음

## 제6장 참고문헌

1. Dischinger, J., M. Josten, C. Szekat, H.Sahl, and G. Bierbaum(2009)
2. Kim DH. Food chemistry : Maillard reaction. Tamgudang, Seoul, 403-416(1995)
3. Kim YA. Effective Components on the Sensory Characteristics of Commercial Soy-sauce and Ordinary Korean Soy-sauce. The Research Report of Miwon Research Institute of Korean Food & Dietary Culture. 6, 245-267(1995)
4. Lee TS. Studies on the brewing of traditional soy sauce which differs the fermented soybeans germ. Seoul Womens University, A Collection Thesis, 14, 455(1886)
5. Park OJ. Studies on the nitrogen and flavor components in trandional korean soy sauce by two difference fermentation jars. MS thesis, Younsei university. Seoul, Korea(1995)
6. Park HK, Sohn KH andd Park OJ. Analysis of significant Factors in the Flavor of Traditional Korean Soy sauce(D): Korean J. Dietary Culture 12, No. 1(1997)
7. 조용운 등. 간장 제조 시 염농도 차이에 따른 물성 변화. 산업과학기술연구소보. (6); 333-338(1999)
8. 최광수 등. *Bacillus subtilis* var. *globigii*와 *Scopulariopsis brevicaulis* 접종 메주로 단기숙성 저염 생간장의 젖산 및 알콜발효. 한국농화학회지. 41(6); 405-109(1998)
9. 이주연등. 저염 된장 발효 중 이화학적 특성 변화, 산업식품공학회지, 14(2), 153-158(2010)
10. 목철균 등. 저염 된장 숙성 중 미생물과 효소활성의 변화. 산업식품공학회지. 9(2); 112-117(2005)
11. 이학태 등. 작두콩 첨가 된장과 일반 된장의 생리활성 특성 비교. J. Fd Hyg. safety. 24(1); 94-101(2009)
12. 이정옥 등. Nisin 생성 유산균을 이용한 저염 된장의 제조. 한국식품영양과학회지 31(1); 75-80(2002)
13. 장문익 등. 작두콩 청국장 첨가 고추장의 항산화 tyrosinase 저해 및 암세포 증식 억제 효과. 한국식품과학회지 45(2); 221-226(2013)

14. 박병준 등. 감마선 조사와 저염함량으로 제조한 된장의 미생물 및 품질특성변화. 한국식품과학회지 18(6);644-654(2002)
15. 하봉정. 매실의 당추출액과 발효식초를 첨가한 저염 고추장소스의 품질특성. 경상대학교 (2014)
16. 임성일 등. 감초, 겨자 및 키토산을 첨가한 저염 된장의 발효 특성. 한국식품과학회지 42(3) 323-328(2010)
17. 고준영 등. 감시럽 고추장의 품질특성. The Korean Journal of Culinary Research. 19(1) 139-150(2013)
18. 한덕희. 염농도에 따른 간장과 된장의 미생물 생육과 향미 및 이화학적 특성의 변화. 단국대학교 (2013)
20. 오지영 등. 양고추냉이 분말을 첨가한 저염 고추장의 숙성 중 미생물과 효소 활성의 변화. 한국식품과학회지. 37(3)463-467 (2005)
21. 오지영 등. 천연 보존제를 첨가한 저염 고추장의 숙성 중 이화학적 성분 변화. 한국식품과학회지 34(5) 835-841 (2002)
22. 이필분. 시판을 목적으로 제조한 저염 된장의 이화학적 특성과 전통발효 된장의 향산화성 분석. 경남과학기술대학교. (2014)
23. Chun, J., J.H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim, and Y.W. Lim. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. sys. Evol. Microbiol.* 57, 2259-2261(2007)
24. Myers, E.W. and W. Miller. Optimal alignments in linear space. *Comput. Appl. Biosci.:CABIOS* 4, 11-17(1988)
25. Li, W. and A. Godzik. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658-1659(2006)
26. Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. hartmann, E.B. Hallister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl B. Stres, G.G. Thallinger. D.J. van Horn, and C.F. Weber. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541(2009)

27. Good, I.J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237-264(1953)
28. DW Jeong, HR Kim, JH Lee. Genetic diversity of *Staphylococcus equorum* isolates from Saeu-jeotgal evaluated by multilocus sequence typing. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106(4) 795-808(2014)
29. YS Kim, DY Jeong, YT Hwang, TB Uhm. Bacterial Community Profiling during the Manufacturing Process of Traditional Soybean Paste by Pyrosequencing Method. *The Korea Journal of Microbiology*.47(3) 275-280(2011)





**제1협동 : 발효미생물 분리동정, 발효미생물  
균주관리보존시스템 구축**

주관연구기관명 : (사)한국미생물보존센터

주관연구책임자 : 박 정 민



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발의 목적

전통 발효식품의 유용 미생물에 관한 원천기술의 개발로서 전통 발효 식품의 저염화를 할 수 있도록 저염화 관련 미생물의 유전자 분석에 의한 미생물 동정 및 Microflora map에 관한 연구를 수행하고, 전통발효 식품의 저염화 미생물을 장기적으로 안전하게 보존함으로써 전통 발효 식품의 효율적 유지 관리를 목표로 하며, 각기 보존된 유용 발효미생물의 효율적인 이용을 위하여 적절한 분양 시스템의 구축 및 발효미생물자원의 영구적인 보존을 위한 정보관리 시스템의 개발을 목표로 함.

## 2절 연구개발의 필요성

우리나라 고유의 전통 발효 식품인 고추장·된장·간장과 함께 한국인의 식생활에서 빠질 수 없는 중요한 조미식품이다. 대표적인 우리나라의 발효식품 중 고추장은 주원료로서 고춧가루와 전분질로 찹쌀이나 맵쌀, 발효에 관여하는 koji, 소금 등을 혼합하여 만든 독특한 맛을 가지면서도 기호성이 높은 우리나라의 고유한 복합 조미료이다(Kim & Choi., 2003).

장류에 입맛이 길들여져 있는 우리 민족은 입맛에 맞게 식품을 만들기 위해서 이 장류들이 빼 놓을 수 없는 매우 중요한 조미 재료가 된다. 보통 고추장에는 적정량의 식염이 첨가된다. 우리 민족이 평균적으로 섭취하는 식염의 약 73%는 장류에 의한 것이라고 한다(Lim & Song., 2010). 식염의 역할은 고추장에 짠 맛을 부여하여 복합조미료로써 역할을 할 수 있게 한다. 또한, 고추장을 오랫동안 보관하기 위해 식염을 첨가하여 미생물의 번식을 억제한다. 장류는 그 중요도가 높은 만큼, 섭취 횟수 또한 많을 수밖에 없다. 그러므로 다량 첨가된 식염에 의해, 섭취 횟수가 늘어날수록 더 많은 식염을 섭취하게 된다. 식염의 주요한 성분인 나트륨을 다량 섭취하게 되면 건강상의 문제를 일으킬 수 있기 때문에 세계보건기구(WHO)에서 나트륨의 일일 최대 권고량을 2,000mg으로 권고하고 있다. 그러나 이에 비해, 장류를 즐겨 먹는 우리 민족의 국민 1인 1일 평균나트륨 섭취량은 최대 권장량의 2.5-3배 정도를 육박한다(Lee et al., 2007). 나트륨을 과잉 섭취하게 되면 각종 질병을 유발할 수 있는데, 고혈압이나 심장질환, 혈관질환, 위암 등이 이로 인해 유발될 수 있는 질병이라고 알려져 있다(Na et al., 1997).

일반적인 전통 장류는 제조되는 지역이나 그 방법에 따라 염도의 차이가 크다. 전통식품의 CODEX 규격화 기술지원 자료에 따르면, 총 13점의 전통 고추장 염도를 분석한 결과 약 7-9% 까지 다양한 염도를 나타냈다고 한다(Park et al., 2001). 또한, 총 28점의 순창 고추장민속마을의 전통 고추장 제품의 염도는 약 5-10% 까지 나타난다고 보고된 바도 있으며(Kim et al., 2006), 전라북도 지방의 전통 고추장 15점의 성분을 분석한 결과에 의하면, 최저 4.15%에서 최고 12.0% 까지 편차가 매우 크다는 것을 보여주었다(Cho et al., 1981). 첨가되는 재료에 따라서 전통 고추장의 염도가 달라질 수 있는데, 앞서 말한 바와 같이 질병에 대한 위험을 낮추기 위해 장류의 맛과 보존성은 유지하면서도 염도를 최대한 낮추는 방안이 필요하다. 뿐만 아니라, 본 연구를 통해 장류의 최저 염농도를 확인함으로써 장류의 염도 첨가량에 대한 기준을 제공하고자 한다.

### 3절 연구개발의 범위

된장과 간장은 본 연구소에서 직접 제조한 메주를 이용하여 제조하였으며, 고추장은 순창장 분가전통식품에서 제조한 고추장을 구입하여 사용하였다. 다양한 염도로 천일염을 첨가하였으며, 된장과 간장의 염도는 4.8%, 8.4%, 12%, 15.6%, 19.2%로 제조하였고, 고추장은 3%, 6%, 10%, 15%, 20%로 제조되었다. 염도가 다른 장류를 각각 항아리에서 발효시면서, 숙성기간 별로 시료를 채취하여 시료로 이용하였다. 미생물 분석에서는 호기성 세균과 호염성 세균, 유산균, 효모, 곰팡이를 분리하였고, 분리 미생물의 16S rRNA sequencing, 18S rRNA sequencing 분석 및 cellular fatty acid 분석에 의한 미생물 동정을 통한 미생물의 패턴을 분석하였으며, PCR-RAPD 패턴 비교 분석을 통해 염도별 존재하는 발효 미생물 유전체 정보를 확인하였다.

각 시료의 향미성분을 분석하여 주 발효 미생물과 비교를 통해 최적 발효 조건을 확립하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

식염의 주요한 성분인 나트륨을 다량 섭취하게 되면 건강상의 문제를 일으킬 수 있기 때문에 현재 국내에서는 장류의 염도를 낮추기 위한 저염 장류의 개발이 요구되고 있다. 따라서, 전통 장류의 식염 첨가량을 줄이면서도 맛과 물성과 같은 품질적인 특성이 변하지 않는 한계점에 대한 연구가 필요하다. 국내 연구에서는 저염 장류에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 장류 제조 시 첨가되는 식염의 양을 낮추면서도 일반적인 식염의 양이 첨가된 장류와 제품의 품질적인 특성이 다르지 않게 향균물질을 첨가하는 연구가 많이 보고되어 있다.

된장과 간장의 저염화 연구가 활발히 진행되고 있는데, 소비자의 기호에 맞게 전통식 방법을 혼용하여 변형시키려는 노력과 여러 가지 부재료를 첨가하여 그 기능성을 향상시키는 연구가 활발히 진행되고 있다. 된장과 간장의 식염 첨가량에 대한 연구를 보면 약 12.0% 이상의 소금을 첨가하여 이상 발효와 부패를 방지하고 제조 후 저장성을 부여한다고 보고된 바가 있다 (Mok et al., 2005). 이와 마찬가지로, 고추장 또한 저염화 시키려는 연구가 많이 진행되고 있다. 감초, 겨자 및 키토산을 첨가하여 염도를 낮춘 고추장의 특성 변화에 대해 연구된 바가 있으며 (Lim & Song., 2010), 키토산을 첨가하여 제조된 저식염 기능성 고추장의 특성 변화가 보고된 것도 있다 (Na et al., 1997). 또한 저식염 고추장의 저장성을 높이기 위하여 향균성 부원료를 첨가하는 연구에 대해서도 보고되었다 (Han & Kim., 2008).

본 연구에서는 향균물질을 첨가하지 않고 오로지 식염 첨가량을 달리하여, 고추장의 품질적인 특징 중 중요한 요소 중 하나인 향미의 차이가 어떻게 나타나는지는 연구하였다. 고추장의 숙성 과정 중 향기성분의 특성에 대해 보고된 바는 있지만 (Choi et al., 1997 ; Kim & Oh., 1993), 식염의 양을 달리하여 염도에 따른 고추장의 향미 변화를 연구된 바는 없다. 고추장의 주원료 중의 하나는 식염으로, 식염이 얼마나 첨가되느냐에 따라 고추장의 맛과 향미, 색 등의 특성 차이가 나타날 것으로 사료된다. 각 염도별 특성의 차이를 살펴보고, 장류에 첨가될 수 있는 최저 염농도를 확인해 보고자 한다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1. 연구개발의 목표 및 내용











전통 발효 식품의 저염화에 기여하기 위해 저염화 관련 미생물의 동정을 통한 Microflora map 연구 및 전통 장류 미생물의 적절한 분양 시스템의 구축 및 정보관리 시스템의 개발.

#### 2. 시료 준비

##### 가. 저염 된장과 고염 된장 제조방법

메주를 물로 세척 한 후 햇볕에 2-3일 말린다(저염 된장 및 고염 된장에 사용한 메주는 순장발효미생물센터에서 제조된 메주를 사용하였음). 간수를 뺀 천일염을 녹여 여과한 뒤 하루 방치한다(된장과 간장 만들 경우 : 메주무게의 3.5배). 입이 넓은 항아리를 짚불로 소독한 후 메주를 쌓아 하룻밤 재운 소금물을 붓는다(입이 크고 유약을 바르지 않은 20L 항아리). 침강 후 2-3일이 지나면 숯과 말린 홍고추를 띄운다. 바람이 잘 통하고 벌이 잘 들어가며 벌레가 들어가지 않게 30일 숙성 시킨 후 간장과 된장을 분리한다. 분리된 된장을 다시 항아리입구까지 꼭꼭 눌러 넣고 숙성시킨다. 분리된 간장은 달여서 사용한다(Table 1).

**Table 1.** Changes of *meju* according to the salt concentration in fermentation period.

소금물의 농도	4.8% ( 60% 저염)	8.4% ( 30% 저염)	12% ( control)	15.6% ( 30% 고염)	19.2% ( 60% 고염)
메주 7개 기준	720g/15L	1260g/15L	1800g/15L	2340g/15L	2880g/15L
소금물의 농도	4.8% ( 60% 저염)	8.4% ( 30% 저염)	12% ( control)	15.6% ( 30% 고염)	19.2% ( 60% 고염)
메주 숙성 초기 (2012.05.11)					
메주 숙성 한달 (2012.06.04)					

### 나. 저염 고추장 제조방법

우리나라의 대표적인 재래식 고추장 제조 지역인 순창 지방의 고추장을 구입하여 사용하였다(순창장본가전통식품에서 식염이 첨가되지 않은 고추장 사용하였음). 순창장본가전통식품의 재래식 고추장을 제조방법은 찹쌀 28.1%을 물 30.3%에 넣고 가마솥에 끓인 후, 나머지 재료인 고춧가루 28.1%, 메주가루 7.9%, 엿기름 5.6%의 비율로 배합하여 제조하고, 원재료는 모두 국산을 사용하여 제조되며, 소금은 첨가하지 않는다. 이렇게 제조된 고추장을 구매하여 고추장의 염도를 달리하기 위해 직접 식염을 첨가하였다. 신안군에서 제조한 갯벌천일염으로 염도에 맞게 천일염을 첨가하여 고추장을 염도별로 제조하였다. 식염을 첨가하지 않은 고추장(control)의 염도는 3%였고, control에 0.6kg의 천일염을 첨가하여 6%염도의 고추장을 제조하였고, control에 1.4kg의 천일염을 첨가하여 10% 염도를 가지는 고추장을 제조하였다. 또한, 2.4kg 천일염을 첨가하여 15% 고추장을, 3.4kg을 첨가하여 20% 고추장을 제조하였으며, 각 염도별로 제조된 5가지 염도의 고추장을 숙성 기간별로 채취하여 고추장 미생물 균총을 분석하는데 사용하였다.

### 3. 시료의 형태학적 변화 확인

저염과 고염 된장은 숙성 2개월, 4개월, 6개월, 9개월, 12개월에 sampling을 하여 총균수 측정 및 유전자 분석과 지방산 분석을 통해 미생물 패턴 분석을 하였고, 저염과 고염 간장은 숙성 3개월, 6개월, 9개월, 12개월에 각각 sampling을 하여 총균수 측정 및 유전자 분석과 지방산 분석을 통해 미생물 패턴 분석을 실시하였다. 또한 저염과 고염 고추장은 숙성 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 10개월에 각각 sampling하여 총균수 측정 및 미생물 패턴 분석을 진행하였다. 숙성이 되면서 저염과 고염 장류의 외관이 변화되는 양상을 **Table 2**에 첨부하였다.

된장을 먼저 보면, 숙성 기간 별로 봤을 때, 초기 숙성의 된장의 표면이 산막으로 추정되는 하얀 물질이 덮여 있었다. 1개월 차에는 된장 12%에서 다른 염도에 비해 표면의 하얀 물질이 가장 적게 덮였고, 2~4개월 차에서는 반대로 12%의 염도에 하얀 물질이 표면에 가장 많이 덮였다. 그리고 숙성 시간이 지나면서 숙성 6개월 이후부터는 위에 덮인 물질이 더 이상 생기지 않았다. 된장의 염도 별 전 숙성기간의 내부 색을 보았을 때, 염도가 높아질수록 된장 내부의 색이 진했으며, 수분기가 적어 푸석푸석한 느낌이 들었다. 반대로, 염도가 낮을수록 된장 내부가 밝은 색이었으며, 촉촉하게 수분이 남아 있었다.



간장을 보면, 숙성 기간별로 봤을 때, 된장과 마찬가지로 산막으로 추정되는 표면에 떠 있는 하얀 물질이 4개월 차까지 계속 존재 했으며, 숙성 2개월 차에 최고점으로 많은 양이 표면을 하얗게 덮었다. 간장의 표면의 모양은 숙성 기간별로 다른 경향을 보였다. 1개월 차에는 12%, 15%에서 가장 많이 덮였고, 2~4개월 차에서는 4%, 19%가 가장 많이 표면이 덮였다. 숙성 1개월 차에 하얀 물질이 표면에 가장 적게 덮였던 된장과는 반대되는 pattern이었다. 하지만 된장과 같은 pattern으로 숙성 6개월 이후부터는 표면의 하얀 물질이 더 이상 생기지 않았다. 염도별로 보았을 때, 가장 저염으로 갈수록 숙성이 되면서 더 걸쭉해 졌고, 고염으로 갈수록 점도가 묽었다. 4.8% 저염 간장의 경우 많이 걸쭉하였고, 8.4% 간장의 경우 일반적인 간장보다 걸쭉하였기 때문에 일반적인 액상형태의 간장으로 사용하기에 선호되지는 않을 것으로 생각된다. 또한, 고염으로 갈수록 색은 훨씬 더 진해져서 19%의 색이 가장 검게 보였다.

고추장의 외관을 보면, 숙성 기간 별로 보았을 때, 담금 후 일주일(control) 된 고추장 중 다른 염도의 고추장들은 색이 붉고 표면에 윤기가 있는 반면에 3% 저염 고추장에서는 표면에 복슬

복슬한 물질이 생겼다. 이 물질은 된장과 간장과 마찬가지로 산막으로 추정된다. 담금 후 일주일 밖에 되지 않았음에도 불구하고 3% 저염 고추장에서는 이미 미생물이 많이 증식한 것으로 생각된다. 숙성 1개월에 3% 저염 고추장에서는 담금 일주일 후에 생겼던 복슬복슬한 물질 이외에도 표면에 하얀 물질이 고추장 표면의 중앙까지 생겼고 색상도 처음보다 많이 붉었다. 6% 저염 고추장은 담금 후 일주일 된 3% 저염 고추장처럼 표면에 불투명한 물질이 덮였으며 3% 저염 고추장과 같이 붉어졌다. 10% 고추장의 표면의 테두리에 적은 양의 하얀 물질이 생겼지만 3% 고추장에 비할 수 없을 만큼 적은 양이었다. 15%와 20% 고추장은 Control과 비교해서 색이 약간 어두워졌을 뿐, 큰 변화는 보이지 않았다. 숙성 2개월에는 모든 염도의 고추장이 표면이 약간씩 붉어졌다. 그 중에서도 저염인 3% 고추장이 가장 붉었으며, 그 다음으로 6% 고추장이 붉었다. 나머지 10%, 15%, 20% 고추장의 붉기는 큰 차이가 느껴지지 않았다. 상대적으로 염도가 낮은 3%, 6%, 10% 염도 고추장의 표면에는 표면에 하얀 물질이 군데군데 덮였으며, 저염인 3% 고추장에서는 시큼한 초고추장 냄새가 느껴졌다. 숙성이 지나면서 저염 고추장은 오염 혹은 이상발효가 진행되는 것으로 보였다. 특히 숙성 3개월 부터 3% 저염 고추장에서는 초파리 유충이 생겼고, 6% 저염 고추장에도 또한 적은 양의 초파리 유충이 생겼다. 3% 저염 고추장은 붉으면서도 심각할 정도로 시큼한 향이 났으며, 다른 염도의 고추장에도 생긴 하얀막 이외에도 표면에 끈적한 점액 물질이 생겼다. 6% 저염 고추장도 다른 고염 고추장에 비해 붉기가 붉어졌으며, 점액 물질과 함께 미생물 성장에 의한 것으로 생각되는 가스가 생성되어 표면에 구멍을 형성했다. 숙성 4개월이 되면서 저염인 3%와 6% 염도 고추장은 마치 초고추장과 같은 성상을 띄었다. 냄새도 시큼하고 내부 또한 매우 묽어서 sampling 시에 흐르듯이 떨어졌다. 보다 염이 덜 첨가된 3% 염도 고추장이 6% 염도 고추장보다 심각했다. 10% 염도 고추장은 숙성 1개월의 저염 고추장처럼 중앙까지 표면에 하얀 물질이 덮였다. 고염인 15%와 20% 염도 고추장은 표면에 점액 물질이 생성되었지만, 내부를 살펴보았을 때에는 전혀 점액물질이 발견되지 않았으며, 일반적인 고추장과 같이 고른 붉은색과 적당한 물성을 가진 고추장이었다. 숙성 5개월에는 20% 염도 고추장을 제외하고 모두 표면에 하얀 물질이 덮였다는 사실만 제외하고 숙성 4개월과 비교하여 큰 차이가 없었다. 그러나 오랜 숙성시간이 지난 후 숙성 10개월이 된 고추장을 보았을 때, 저염인 3%와 6% 염도 고추장은 표면에 물이 형성되면서 고추장의 분리 현상이 일어났다는 것을 확인할 수 있었으며, 염도가 높을수록 분리 현상도 일어나지 않았고 표면에 생긴 하얀 물질의 양도 더 적었다는 사실을 확인하였다. 종합적으로, 고추장이 숙성되는 형태만 보았을 때 저염 고추장인 3%, 6% 염도 고추장은 초고추장과 같이 시큼한 향을 내면서 오염 또는 이상발효를 보이는 것으로 보이며, 10%, 15%, 20% 염도 고추장은 일반적인 고추장과 비슷한 형상을 보이는 것으로 생각된다. 또한, 10개월의 숙성기간을 거친 고추장에서 저염인 3%, 6% 염도 고추장은 분리 현상을 일으켰으며, 분리현상이 일어난 고추장은 식품으로 사용하기에 선호되지 않을 것으로 생각된다.



**Table 2.** Fermentation according to the salt concentration

소금물의 농도	4.8% (60% 저염)	8.4% (30% 저염)	12% (control)	15.6% (30% 고염)	19.2% (60% 고염)
된장 숙성 초기 (2012.06.18.)					
숙성 1개월 (2013.07.12.)					
숙성 2개월 (2013.08.27.)					
숙성 4개월 (2013.10.22.)					
숙성 6개월 (2013.12.10.)					
숙성 9개월 (2013.03.22.)					
숙성 12개월 (2013.06.26.)					
간장 숙성 초기 (2012.06.18)					
숙성 1개월 (2013.07.12.)					
숙성 2개월 (2013.08.27.)					

숙성 4개월 (2013.10.22.)					
숙성 6개월 (2013.12.10.)					
숙성 9개월 (2013.03.22.)					
숙성 12개월 (2013.06.26.)					

고추장 염도	3%	6%	10%	15%	20%
담금 후 일주일 (2013.03.22.)					
숙성 1개월 (2013.04.22.)					
숙성 2개월 (2013.05.21.)					
숙성 3개월 (2013.06.17)					
숙성 4개월 (2013.7.23.)					
숙성 5개월 (2013.08.19.)					
숙성 10개월 (2014.01.06.)					

### 3. 미생물 및 일반성분 변화에 관한 연구

#### 가. 실험방법

##### (1)저염 장류와 고염 장류 미생물수 측정

호기성 세균수의 측정은 시료 10 g을 멸균 생리 식염수에 넣어 전체 부피를 100 ml(간장의 경우, 시료 10 mL를 멸균 생리 식염수 90 mL에 넣음)로 맞춘 후, 2 시간 균질화하여 시료액을 만든다. 시료액을 상온에 5 분간 방치한 후 상등액 1 ml를 취해 9 ml 멸균수에  $10^1 \sim 10^{10}$ 까지 연속적으로 희석한 다음  $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$ 의 희석액 1 ml를 Nutrien Agar(beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 15 g, distilled water 1.0 L)배지를 사용하여 30°C에서 2일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다. 호염성 세균수의 측정은 희석액 1 ml를 HM agar(KCl 2.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.36 g, NaBr 0.23 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.06 g, FeCl<sub>3</sub> 0.06 g, Peptone 5.0 g, Yeast extract 10.0 g, Dextrose 1 g, agar 24.0 g, NaCl 100 g, distilled water 1.0 L) 배지를 사용하여 30°C에서 4일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다. 효모 균 수의 측정은 희석액 1 ml를 Yeast Mold agar + 20 µg/ml chloramphenicol(yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, dextrose 10 g, agar 20 g, distilled water 1.0 L, chloramphenicol 1 ml)배지를 사용하여 25°C에서 4일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다. 유산균 수의 측정은 희석액 1 ml를 MRS agar(beef extract 15.5 g, pancreatic digest of casein 7.5 g, proteose peptone No.3 12.5 g, dextrose 32.5 g, sodium chloride 7.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g, tween 80 2 g, agar 15 g, distilled water 1.0 L) 배지에 anaerobic system gas pak(BBL, Becton Dickinson)을 이용하여 혐기 조건을 만든 후 37°C에서 3일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다. 곰팡이 균수의 측정은 희석액 1 ml를 Potato Dextrose Agar + 20 µg/ml chloramphenicol(potato extract 200 g, glucose 20 g, agar 15 g, distilled water 1.0 L, chloramphenicol 1 ml)배지를 사용하여 25°C에서 4 일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다. 분리하고자 하는 미생물의 사용된 분리배지와 온도, 배양 조건은 아래 **Table 3.**과 같다. 평판배지 상에 나타난 집락을 각각의 종류에 따라 계수한 후 선별 배지를 통해 배양 분리된 미생물은 호기성 세균, 호염성 세균의 경우 colony의 색과 형상을 관찰하여 각각 분리하였고, 효모와 유산균의 경우 colony의 형상과 현미경으로 검경하여 분리하였다. 1차 분류를 통하여 3 번의 계대 배양 후 KCCM 번호를 부여하였으며 순수 분리된 균주는 동결 건조 보관하였다.

저염 장류와 고염 장류 미생물의 microflora 패턴 분석을 하기 위한 총균수를 측정한 결과를 **Table 4~8**에 나타내었다. 염도별로 나누어, 숙성 기간에 따른 총균수를 나타내었다. **Table 4**은 된장, 간장, 고추장에서 분리한 Normal Bacteria(BN)의 총균수를 나타내었으며, **Table 5**은 Halophilic Bacteria(BH)의 총균수를 나타내었고, **Table 6**은 Normal Yeast(YN), **Table 7**은 Normal Lactobacilli(LN), **Table 8**은 Normal Fungi(FN)를 나타내었다.

**Table 3.** Medium and temperature and condition for isolation of microorganisms.

Microbe	Medium	Temp.(°C) <sup>1)</sup>	Con <sup>2)</sup>
BN	Nutrient Agar	30	aerobe
BH	HM Agar(10% NaCl)	30	aerobe
YN	YM Agar + 20 µg/ml Chloramphenicol	25	aerobe
LN	MRS Agar	37	anaerobe
FN	PDA+ 20µg/ml Chloramphenicol	25	aerobe

<sup>1)</sup> Temperature for isolation of microorganisms .

<sup>2)</sup> Condition for isolation of microorganisms.

BN : Normal Bacteria, BH: Halophilic Bacteria, YN : Normal Yeast, LN : Normal Lactobacilli, FN : Normal Fungi

**Table 4.** Viable cell numbers of the fermentation food at ripening period. (Normal Bacteria)

Sample	Viable Cell of Normal Bacteria (log CFU <sub>1</sub> / g)						
	Control	숙성 2개월	숙성 4개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월	
된장	4.8%	7.08 ±0.10	8.00 ±0.04	7.30 ±0.07	9.36±0.01	9.08±0.02	9.82±0.09
	8.4%	7.14 ±0.02	8.04 ±0.06	7.29 ±0.07	9.13±0.04	9.15±0.06	9.09±0.09
	12.0%	7.51 ±0.03	8.35 ±0.02	7.74 ±0.05	9.51±0.03	9.01±0.01	9.29±0.17
	15.6%	7.32 ±0.02	8.11 ±0.01	7.30 ±0.05	9.17±0.04	9.24±0.04	9.72±0.02
	19.2%	7.07 ±0.03	7.66 ±0.05	7.16 ±0.01	8.80±0.09	7.98±0.01	7.54±0.16
Sample	Control	숙성 3개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월		
간장	4.8%	7.42±0.03	7.41±0.03	8.69±0.02	9.08±0.04	8.84±0.11	
	8.4%	7.43±0.02	7.41±0.05	8.62±0.06	9.15±0.06	9.90±0.08	
	12.0%	7.48±0.03	7.43±0.02	8.96±0.05	9.01±0.13	10.00±0.03	
	15.6%	7.34±0.02	7.4±0.02	8.67±0.07	9.24±0.08	9.52±0.04	
	19.2%	7.05±0.01	6.86±0.08	8.49±0.05	7.98±0.05	7.81±0.60	

Sample		Viable Cell of Normal Bacteria (log CFU/ g)						
		Control	숙성 1개월	숙성 2개월	숙성 3개월	숙성 4개월	숙성 5개월	숙성10개 월
고추 장	3 %	7.35±0.05	7.22±0.04	7.26±0.11	7.22±0.04	7.03±0.03	6.52±0.12	6.20±0.11
	6 %	7.31±0.07	7.38±0.11	7.50±0.06	7.45±0.05	7.11±0.06	6.40±0.18	6.47±0.09
	10 %	7.31±0.02	7.28±0.14	7.32±0.15	7.39±0.05	7.28±0.08	7.32±0.10	7.48±0.02
	15 %	7.22±0.04	7.08±0.04	7.63±0.05	7.32±0.09	7.29±0.05	7.10±0.05	7.43±0.10
	20 %	7.23±0.11	7.05±0.18	7.49±0.06	7.50±0.03	7.22±0.20	7.36±0.07	7.55±0.02

1) CFU : Colony Foaming Unit

**Table 5.** Viable cell numbers of the fermentation food at ripening period. (Halophilic Bacteria)

Sample		Viable Cell of Halophilic Bacteria (log CFU/ g)					
		Control	숙성 2개월	숙성 4개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월
된장	4.8%	6.58±0.38	7.90±0.05	7.09±0.01	7.95±0.02	9.31±0.03	9.51±0.07
	8.4%	6.93±0.10	8.22±0.09	7.20±0.05	7.82±0.02	9.32±0.20	9.20±0.02
	12.0%	7.47±0.02	8.00±0.02	7.39±0.01	6.14±0.02	10.07±0.09	9.44±0.07
	15.6%	7.21±0.18	7.91±0.03	7.28±0.08	5.89±0.04	9.16±0.03	9.67±0.08
	19.2%	7.07±0.33	7.64±0.05	7.03±0.05	5.83±0.03	8.85±0.22	9.69±0.02
Sample		Control	숙성 3개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월	
간장	4.8%	6.97±0.52	7.24±0.02	8.29±0.04	9.74±0.09	9.08±0.24	
	8.4%	7.43±0.18	7.38±0.12	7.68±0.11	9.21±0.12	11.45±0.12	
	12.0%	6.6±0.38	7.44±0.03	8.94±0.04	8.99±0.04	11.51±0.06	
	15.6%	7.58±0.02	7.41±0.02	8.77±0.04	9.18±0.02	9.71±0.07	
	19.2%	7.25±0.19	7.07±0.06	5.93±0.06	8.88±0.14	9.48±0.09	

Sample		Viable Cell of Halophilic Bacteria (log CFU/ g)						
		Control	숙성 1개월	숙성 2개월	숙성 3개월	숙성 4개월	숙성 5개월	숙성10개 월
고추 장	3 %	7.31±0.09	7.14±0.04	7.32±0.06	7.26±0.06	6.95±0.06	6.57±0.10	6.17±0.07
	6 %	7.13±0.06	7.20±0.03	7.38±0.05	7.46±0.03	6.87±0.13	6.33±0.32	6.27±0.06
	10 %	7.19±0.08	7.19±0.05	7.30±0.02	7.28±0.04	7.22±0.04	7.20±0.04	7.38±0.04
	15 %	6.98±0.05	7.15±0.08	7.56±0.07	7.21±0.06	7.17±0.08	7.04±0.06	7.39±0.09
	20 %	7.02±0.03	6.99±0.08	7.33±0.07	7.36±0.06	7.12±0.03	7.19±0.02	7.49±0.06

**Table 6.** Viable cell numbers of the fermentation food at ripening period. (Normal Yeast)

Sample		Viable Cell of Normal Yeast (log CFU/ g)					
		Control	숙성 2개월	숙성 4개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월
된장	4.8%	2.87±0.23	N.D. <sup>2)</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	8.4%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	12.0%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15.6%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	19.2%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sample	Control	숙성 3개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월		
간장	4.8%	2.76±0.14	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	8.4%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	12.0%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15.6%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	19.2%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Sample		Viable Cell of Normal Yeast (log CFU/ g)						
		Control	숙성 1개월	숙성 2개월	숙성 3개월	숙성 4개월	숙성 5개월	숙성10개 월
고추 장	3 %	4.32±0.09	6.16±0.01	5.58±0.07	4.28±0.05	N.D.	N.D.	N.D.
	6 %	4.31±0.05	6.62±0.62	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	10 %	4.30±0.04	5.93±0.04	7.70±0.03	5.85±0.04	4.92±0.05	5.22±0.02	4.86±0.29
	15 %	4.33±0.08	5.93±0.03	4.47±0.40	N.D.	3.40±0.07	3.49±0.01	5.70±0.02
	20 %	4.22±0.03	3.11±0.02	N.D.	3.81±0.05	N.D.	N.D.	N.D.

**Table 7.** Viable cell numbers of the fermentation food at ripening period. (Normal Lactobacilli)

Sample		Viable Cell of Normal Lactobacilli (log CFU/ g)					
		Control	숙성 2개월	숙성 4개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월
된장	4.8%	7.76±0.06	2.84±0.22	2.83±0.05	N.D.	N.D.	N.D.
	8.4%	7.60±0.05	3.11±0.04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	12.0%	7.25±0.08	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15.6%	6.75±0.06	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	19.2%	6.36±0.09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Sample		Viable Cell of Normal Lactobacilli (log CFU/ g)				
		Control	숙성 3개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월
간장	4.8%	7.91±0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	8.4%	7.9±0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	12.0%	7.25±0.15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15.6%	7.15±0.07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	19.2%	5.68±0.08	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Sample		Viable Cell of Normal Lactobacilli (log CFU/ g)						
		Control	숙성 1개월	숙성 2개월	숙성 3개월	숙성 4개월	숙성 5개월	숙성 10개월
고추장	3 %	3.58±0.07	8.30±0.02	8.11±0.02	8.18±0.03	7.68±0.03	7.60±0.07	5.36±0.05
	6 %	3.54±0.03	6.98±0.01	10.06±0.01	8.04±0.02	3.75±0.15	N.D.	5.27±0.06
	10 %	3.41±0.13	2.19±0.26	2.33±0.17	5.18±0.05	N.D.	N.D.	N.D.
	15 %	3.54±0.08	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.71±0.11	N.D.
	20 %	3.31±0.24	N.D.	N.D.	4.13±0.06	N.D.	3.14±0.14	N.D.

**Table 8.** Viable cell numbers of the fermentation food at ripening period. (Normal Fungi)

Sample		Viable Cell of Normal Fungi (log CFU/ g)						
		Control	숙성 2개월	숙성 4개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월	
된장	4.8%	3.41 ±0.41	2.43 ±0.13	N.D.	2.75±0.06	2.45±0.10	N.D.	
	8.4%	3.72 ±0.03	N.D.	2.74 ±0.14	3.48±0.01	3.30±0.01	N.D.	
	12.0%	3.25 ±0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	15.6%	2.65 ±0.08	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.91±0.09	
	19.2%	3.05 ±0.08	2.62±0.11	N.D.	N.D.	N.D.	3.35±0.05	
Sample	Control	숙성 3개월	숙성 6개월	숙성 9개월	숙성 12개월			
간장	4.8%	3.64±0.02	3.59±0.07	N.D.	N.D.	N.D.		
	8.4%	4.03±0.02	2.84±0.18	N.D.	N.D.	N.D.		
	12.0%	3.41±0.09	2.33±0.31	N.D.	N.D.	N.D.		
	15.6%	2.34±0.24	2.43±0.15	N.D.	N.D.	N.D.		
	19.2%	2.64±0.46	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		
Sample	Control	숙성 1개월	숙성 2개월	숙성 3개월	숙성 4개월	숙성 5개월	숙성 10개월	
고추장	3 %	2.96±0.18	5.93±0.03	3.64±0.03	4.03±0.03	N.D.	N.D.	N.D.
	6 %	3.37±0.11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	10 %	2.88±0.17	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15 %	3.20±0.05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	20 %	2.56±0.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

(2) 저염 종류 및 고염 종류 미생물의 DNA sequence 분석에 의한 균주 동정

최근 발전한 분자생물학적 방법 중에서 널리 사용되고 있는 미생물 동정 방법 중 하나인 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 통하여 종류에서 분리된 미생물의 DNA 염기서열 분석을 수행하였다. PCR은 Bio-Rad사의 Mycycler Thermal Cycler System을 사용하였다. 우선적으로 염기서열을 분석하기 위한 세균 및 유산균, 곰팡이, 효모의 genomic DNA를 추출하였다. 각 미생물의 해당 평판 배지에 1~3일간 배양하여 미량의 colony를 50mM EDTA buffer에 넣고 현탁 시켜준 후, 50mg/ml lysozyme(Sigma)을 넣어 37°C에서 하룻밤 반응시켰다. 그 후 Wizard genomic DNA purification kit(Promega)를 사용하여 DNA를 추출한 후 이를 DNA 증폭에 사용하였다. 분리된 genomic DNA를 증폭하기 위해 사용한 primer는 세균과 유산균, 효모, 곰팡이가 각각 달랐다. 세균과 유산균은 16S rDNA sequence에 사용하는 27F와 1492R primer를 사용하였고, 효모는 18S rDNA sequence에 사용하는 NS 1과 NS 8



primer를 사용하였다. 곰팡이는 ITS-5.8S rDNA sequence에 사용하는 ITS1과 ITS4 primer를 사용하였다. 이 때 primer의 농도는 20 pmol이었고 template DNA 농도는 20~80ng이었다. PCR 반응물의 조성은 세균 및 유산균, 곰팡이, 효모 모두 같은 농도로 사용하였으며, 그 조성은 20mM x 10 reaction buffer, 2.5mM dNTP Mixture, Taq polymerase (Cosmogenetech)를 사용하였으며 최종 반응물의 부피는 50 $\mu$ l였다. PCR 반응 조건은 **Table 9.**에 나타내었다. 증폭된 PCR 반응 산물은 0.5 $\mu$ g/ml Ethidium bromide를 첨가 한 0.8% agarose gel에서 전기영동을 하여 DNA를 확인하였다. PCR product가 확인된 후 Wizard SV Gel abd PCR clean-up system(Promega)을 사용하여 PCR product를 정제한 후 DNA 염기서열을 분석하였다.

**Table 9.** Condition of PCR

Temperature (°C)	Time	Number of Cycle
75	10 min	1
95	30 sec	40
60	1 min	
72	45 sec	
72	10 min	1
10	$\infty$	

(3) 저염 장류 및 고염 장류 미생물의 Cellular fatty acid compisition 분석에 의한 균주 동정

분리 균주의 Cellular Fatty Acid composition은 된장과 간장의 숙성 6, 9, 12개월 미생물과 고추장 전 숙성기간의 세균, 유산균, 효모 동정하기 위해 사용하였으며, 위의 DNA seqence 방법의 대안으로 진행하였다. Cellular Fatty Acid composition 분석은 균체 내의 Cellular Fatty Acid의 양을 분석함으로써 Software 내에 보관되어 있는 미생물의 Cellular Fatty Acid composition과 비교함으로써 그 함유량이 가장 비슷한 균주를 나타내주는 동정 방법이다. 균체 내의 Cellular Fatty Acid를 추출하는 방법은 이렇다. 배양한 약 40 mg의 cell을 Teflon\_lined Screw cap tube에 옮긴 후, 50% methanol에 15% NaOH를 첨가한 용액 1 ml을 넣고 100°C에서 30분간 가열하여 가수분해 해 준 후, 실온에서 식힌다. 여기에 methanolic-HCl 2 ml (6.0 N HCl 325 ml과 methanol 275 ml 혼합용액)을 첨가하여 80°C에서 10분간 가열하여 메틸화 시켜 주고, 이를 급냉 한 후 1.25 ml의 hexane/methyl-tert-butylether(1:1: v/v)을 넣고 10분간 잘 섞어 Cellular Fatty Acid를 추출해 낸다. 실온에 정치한 후 반응액이 2개의 층으로 분리되면 하등액만을 제거하고 3 ml의 dilute NaOH(10.8 g NaOH/900 ml D.W)를 첨가하여 10분간 잘 섞어 washing 단계를 거친 후 실온에 정치하여 상등액의 2/3정도를 screw-capped tube에 보관하였다.

이 추출한 시료에 존재하는 Cellular Fatty Acid의 함유량을 분석하였다. 준비된 시료의 분석에

는 Agilent technologies 6890 Gas chromatography가 이용되었으며 separation column은 A30 m X 0.320 mm X 0.25  $\mu$ m Crosslinked Methyl siloxane column (HP-1)을 사용하였다 분석된 profile 은 Sherlock MIS Software 를 이용 하였으며 standard calibration 용액과의 비교에 의해 peak의 동정, retention time, peak의 면적, 면적 비율을 구하였다.

#### (4) 고추장 미생물의 Total DNA 분리와 RAPD-PCR 분석

염도와 숙성기간이 다른 고추장 시료로부터 전체 DNA를 추출하기 위해, 고추장 시료 1 g을 2.7 ml의 완충용액(100mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA pH 8.0, 1.5M NaCl, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB))에 넣고 현탁시켰다. 단백질을 분해하기 위해 proteinase K(20 mg/ml)를 27  $\mu$ l 넣어 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 6% SDS를 1 ml 첨가하여 65°C에서 2시간 반응시켰다. 6,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 동일 부피의 chloroform:isoamylalcohol(24:1, v:v)을 넣고 잘 섞어준 후, 동일 조건으로 원심분리 하였다. 수용액 층을 chloroform:isoamylalcohol로 두 번 더 추출한 후, 상층액 만을 취해서 0.6배 양의 isopropanol를 혼합한 후에 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 침전된 DNA를 70% ethanol로 세척하여 정제된 DNA를 분리한 후, -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

RAPD 분석을 위해 MyCycler Thermal Cycler system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하였으며, Cosmogenetech사에서 시판되는 random primer인 A-01(5'-CAGGCCCTTC-3')을 사용하여 PCR 증폭하였다. PCR 반응물은 20 pmol primer, template DNA, 20mM x 10 reaction buffer, 2.5 mM dNTP Mixture, Taq polymerase (Cosmogenetech Co.)를 사용하였으며 최종 반응물의 부피는 50 $\mu$ l 으로 하였다. 이 때, template DNA 농도는 300-400  $\mu$ g/mL로 희석하여 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 2분간 initial denaturation한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 36°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분 동안 extension을 40회 반복하였다. 마지막 extension은 72°C에서 5분간 진행한 후 증폭 반응을 완료하였다. PCR 반응 산물은 0.5 $\mu$ g/ml Ethidium bromide를 첨가 한 0.8% agarose gel에서 전기영동을 하였고, UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였으며, 화상 장치(Gel Doc XR, Bio-Rad Co., USA)를 이용하여 사진 촬영하였다. Fingerprinting II Informatix software(Bio-Rad Co., USA)의 분석 프로그램을 사용하여 1kb marker를 통해 측정된 DNA 단편의 분자량을 normalization한 후, 각 시료에서 나타난 DNA 단편들의 상관관계를 분석하여 unweighted pair group method of average linkage(UPGMA) dendrogram을 통해 숙성 기간에 따라 고추장 시료를 clustering 하여 유집 분석하였다.

#### 나. 실험 결과

##### (1) 저염 종류와 고염 종류 microflora 분석

저염 종류와 고염 종류에서 숙성 기간 동안 sampling 한 각 시료에서 분리한 미생물 수를 **Table 10(된장)**, **Table 11(간장)**, **Table 12(고추장)**에 나타내었다. 각각 분리한 호기성 세균, 혐기성 세균, 효모, 유산균, 곰팡이의 분리, 보관 균종은 총 1350주며, 순수 분리된 균주는

동결 건조 보관하였고, DNA 염기 서열과 지방산 분석을 통하여 동정하였다.

된장의 염도 별로 숙성 기간 동안 측정된 미생물 총 균수에 대한 graph를 Fig. 1~5에 나타내었으며, 임의로 선정한 균주의 동정한 결과에 따른 시료 별 우점 종에 대해 함께 설명하고자 한다.

우선, 가장 저염인 4.8% 된장의 숙성 기간 동안 총 균수 변이를 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 호기성 세균의 총 균수 분포의 경우 숙성 초기인 숙성 4개월까지는 염 농도 별로 큰 변화 없이 7.03-8.00 log CFU/g의 수준으로 나타났다. 그러나 숙성 6개월에 총 균수가 약 9 log CFU/g 정도로 많은 수준 증가하였고, 그 수준은 꾸준히 유지되어 숙성 12개월에는 9.82 log CFU/g까지 상승하였다. 분리한 호기성 세균의 우점종을 살펴보면, control에서는 *Bacillus amyloliquefaciens*가 60%정도로 가장 높은 비율을 차지하고 있었으며, 숙성 2개월 차에는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 *Bacillus licheniformis*가 높은 비율을 차지하였고, 숙성 4개월에는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 *Bacillus subtilis*가 우점종을 차지하고 있었다. 숙성 6개월에는 *Bacillus agaradherens*, *Bacillus licheniformis* 그리고 *Paenibacillus macerans*의 다양한 종이 분리 되었다. 숙성 9개월에는 *Paenibacillus macerans*가 약 60% 정도로 가장 많은 비율을 차지하고 있었다. 마지막 숙성 12개월에는 *B. subtilis*와 *Paenibacillus macerans*가 높은 비율을 차지하였다. 가장 염도가 낮은 4.8% 된장에서 분리한 호기성 세균은 *Bacillus amyloliquefaciens*가 초기에 많은 비율을 차지하고, 발효가 진행되면서 다양한 균종이 생겼다가 후기 발효가 진행되면서 *Paenibacillus macerans*와 *Bacillus subtilis*로 균종이 단순화 되는 것으로 보인다. 호염성 세균의 총 균수 분포는 control부터 숙성 12개월까지 총 균수가 6.58-9.51 log CFU/g의 수준에서 꾸준히 증가하는 경향을 보였다. 숙성 6개월에서 호기성 세균이 더 높은 수준으로 증가하였지만, 전 숙성기간에서 비교적 비슷한 수준으로 총 균수가 측정되었다. 분리한 호염성 세균의 우점종을 살펴보면, 숙성 2개월에 *Bacillus licheniformis*가 40% 정도로 높은 비율을 차지하고 있고, 숙성 4개월에는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 *Bacillus licheniformis*가 각각 40% 정도로 우점종을 차지하고 있다. 숙성 초기 호기성 미생물에서 *Bacillus licheniformis*가 높은 비율로 분리된 것과 동일한 결과였다. 이 결과로 보면, 4.8% 된장의 숙성에는 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus amyloliquefaciens*가 초기 발효에 많은 영향을 끼치는 것으로 생각된다. *Virgibacillus pantothenicus*가 숙성 6개월에 높은 비율로 분리 되었으며, 숙성 9개월에는 *Oerskovia turbata*가 새롭게 우점종으로 확인되었다. 마지막 숙성 12개월에는 다시 *Virgibacillus pantothenicus*가 높은 비율을 차지하였다. 효모는 4.8%인 저염 된장 중에서도 숙성이 시작되기 전인 control에서만 2.87 log CFU/g의 낮은 수준의 분포를 보였으며, 숙성이 아주 짧게 진행된 숙성 2개월 차에서도 분리되지 않았다. 또한, 다른 염도의 시료에서는 전 숙성기간에 걸쳐 전혀 효모가 발견되지 않았다. 효모는 된장 숙성 시 2 log CFU/g 이하의 아주 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 사료된다. 4.8% 된장의 control에서 분리되었던 효모는 동정 결과 모두 *Pichia guilliermondii*였다. 된장 시료에서 효모가 낮은 수준으로 분리되는 것으로 보아, 효모는 된장 발효에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 생각된다. 유산균의 총 균수 분포를 보면 숙성기간이 지난 시료일수록 유산균은 검출되지 않았다. 4.8% 저염 된장의 경우 숙성 4개월까지 유산균이 분리되었다. 숙성 4개월 이후에는 그 수준이 효모와 마찬가지로 2 log CFU/g 이하의 아주 낮은 수준으로 존재하거나 아예 존재하지 않는 것으로 생각된다. 이 때 분리된 균주는 control에서는 *Pediococcus pentosaceus*와 *Pediococcus acidilactici*가 각각 40%정도의 높은 비율로 우점종을 차지하고 있다. 숙성 2개월

과 4개월에는 *Enterococcus faecium*가 계속적으로 높은 비율을 차지하고 있다. 곰팡이 총 균수 분포는 수치에 대한 편차가 컸다. 4.8% 저염 된장의 경우 숙성 9개월까지는 2.43-3.41 log CFU/g으로 전반적으로 낮은 수준에서 비교적 꾸준히 곰팡이가 분리 되었지만, 숙성 12개월에서는 곰팡이가 분리되지 않았다. 4.8% 된장의 숙성 2개월 시료에서 분리한 모든 곰팡이가 대표 발효 균주인 *Aspergillus oryzae*였고, 숙성 6개월에는 모든 균주가 *Scopulariopsis brevicaulis*였다. 빗자루곰팡이라고도 불리는 이 균종은 우리나라의 대표적인 발효식품인 메주의 우점종으로 알려져 있다. 4.8% 저염 된장의 경우 초기 발효는 *Aspergillus oryzae*에 의해 진행된다 발효가 진행되면서 *Scopulariopsis brevicaulis*로 균종이 변화되면서 된장 발효에 많은 영향을 주는 것으로 생각된다.

두 번째로, 그 다음 저염으로 분류되는 8.4% 염도의 숙성기간의 총 균수 변이 측정 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 호기성 세균의 총 균수 분포의 경우 4.8% 된장의 호기성 세균의 총 균수 분포와 거의 유사한 경향을 보였다. 분리한 호기성 세균의 우점종을 살펴보면, control에서는 4.8% 염도의 된장과 동일하게 *Bacillus amyloliquefaciens*가 가장 높은 비율을 차지했다. 숙성 2개월 차에는 *Bacillus amyloliquefaciens*가 높은 비율을 차지하였고, 숙성 4개월에는 *Bacillus licheniformis*가 우점종을 차지하고 있었다. 숙성 6개월에는 *Paenibacillus larvae*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans*, *Virgibacillus pantothenicus* 등 다양한 종이 높은 비율을 차지하였고, 4.8% 된장의 숙성 6개월에 다양한 종이 나타났다는 결과와 동일했다. 숙성 9개월에도 4.8% 된장과 동일하게 *Paenibacillus macerans*가 약 60% 정도로 가장 큰 비율을 차지하고 있었다. 마지막 숙성 12개월에는 *Bacillus subtilis*가 큰 비율을 가졌다. 8.4% 염도의 된장은 4.8% 염도에서 분리된 호기성 세균의 균종과 거의 유사한 경향을 보였다. 호염성 세균의 총 균수 분포도 4.8% 된장의 호염성 세균의 총 균수 분포와 약간의 수치만 다를 뿐 거의 유사한 경향을 보였고, 동정 결과에서는 숙성 2개월에 *Bacillus amyloliquefaciens*가 가장 높은 비율을 차지하였고, 숙성 4개월에는 *Bacillus licheniformis*가 약 60% 정도로 우점종을 차지했다. 4.8% 된장의 숙성과 같이 저염 된장의 초기 발효에는 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus amyloliquefaciens*가 많은 영향을 끼치는 것으로 판단된다. 숙성 6개월에는 *Bacillus subtilis*가 우점종을 차지하였고 숙성 9개월에는 *Bacillus licheniformis*와 *Paenibacillus macerans*가 우세한 비율로 분리되었으며, 숙성 12개월에는 *Staphylococcus cohnii*와 *Bacillus amyloliquefaciens*가 큰 비율을 차지하고 있었다. 호염성 세균의 우점종을 보았을 때, 8.4% 염도 된장의 숙성 후기에는 4.8% 염도 된장과 비슷하게 *Paenibacillus macerans*와 *Bacillus subtilis*가 많이 발견되었다. 효모는 전 숙성기간동안 분리되지 않았다 그 수준이 2 log CFU/g 이하로 낮은 수준 존재하거나 존재하지 않는 것으로 생각되며, 효모는 된장의 발효에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다. 유산균의 총 균수 분포를 보면 4.8% 염도 된장의 경우와 비슷하게 숙성기간이 지날수록 유산균이 발견되지 않았다. 그러나 분리된 숙성기간에는 약간의 차이가 있었는데, 4.8% 저염 된장의 경우 숙성 4개월까지 유산균이 분리된 반면에, 8.4% 염도 된장의 경우에는 숙성 2개월까지만 유산균이 분리되었다. 이후의 숙성 기간 동안에는 유산균이 2 log CFU/g 이하의 아주 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 판단된다. 이 때 분리된 균주는 control과 숙성 2개월 모두 *Pediococcus acidilactici*가 각각 80%, 60% 정도의 높은 비율로 우점종을 차지했다. 곰팡이 총 균수 분포는 4.8% 염도 된장과 마찬가지로 수치가 일괄적이지 않았다. 4.8% 염도 된장과 마찬가지로 숙성 9개월까지는 2.74-3.72 log CFU/g으로 전반적으로 낮은 수준에서 비교적 꾸준히 곰팡이가 분리 되었지만, 숙성 12개월에서는 곰팡이

가 분리되지 않았다. 8.4% 된장의 숙성 4개월에 분리된 균주의 우점종은 *Eurotium rubrum*였고, 숙성 6개월에 분리한 균주는 *Aspergillus versicolor*가 가장 높은 비율을 차지하고 있었다.

세 번째로, 12% 염도의 숙성기간 동안 총 균수 변이를 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 호기성 세균의 총 균수 분포의 경우, 저염 된장인 4.8, 8.4% 된장의 호기성 세균의 총 균수 수준이 거의 유사하였다. 분리한 호기성 세균의 우점종을 보면, control에서는 *Bacillus subtilis*가 가장 높은 비율을 차지하였고, 숙성 2개월에도 동일하게 *Bacillus subtilis*가 우점종이었다. 숙성 4개월에는 저염 된장과 마찬가지로 *Bacillus licheniformis*가 우점종을 차지하였다. 숙성 6개월에는 *Paenibacillus macerans*와 *Virgibacillus pantothenicus*가 가장 높은 비율을 차지하였고, 숙성 9개월에는 저염 된장과 동일하게 *Paenibacillus macerans*가 80% 정도로 가장 높은 비율을 차지하였다. 숙성 12개월에는 *Staphylococcus lentus*, *Paenibacillus larvae*, *Virgibacillus pantothenicus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus* 등 다양한 균종이 분리되었다. 저염 된장에서는 발효가 후기로 진행되면서 *Bacillus subtilis*가 우점종으로 바뀐 반면에, 12% 염도에서는 발효 초기부터 된장 발효에 큰 관여하고 있었다. 발효 후기에 *Paenibacillus macerans*가 관여하는 것은 저염 된장의 결과와 같았다. 호염성 세균의 총 균수 분포에는 저염 된장의 총 균수 분포와는 다른 경향을 보이고 있다. 저염 인 4.8%, 8.4% 염도 된장은 control부터 숙성 12개월까지 총 균수의 큰 변동 없이 6.58-9.51 log CFU/g의 수준에서 꾸준히 증가하는 경향을 보인 반면에, 12% 염도 된장의 경우 숙성 기간에 걸쳐 총 균수의 증가에 많은 변동을 보였다. 12% 염도 된장에서 호기성 세균이 숙성 6개월에 총 균수가 급격히 증가한 경향을 보였다면, 호염성 세균의 총 균수는 큰 수준으로 감소하여 control에서의 총 균수인 7.47 log CFU/g 수준보다 더 낮은 6.14 log CFU/g의 수준을 나타내었다. 그리고 그 후 숙성 9개월 차에 약 10.07 log CFU/g까지 총 균수가 큰 폭으로 증가하였으며, 숙성 12개월 차에도 그 수준을 유지하였다. 분리한 호염성 세균의 동정 결과를 보면, control에서는 *Staphylococcus nepalensis*가 약 80%로 높은 비율을 차지하였고, 숙성 2개월에 *Bacillus licheniformis*가 가장 높은 비율을 차지하고 있고, 숙성 4개월에도 마찬가지로 *Bacillus licheniformis*와 함께 *Bacillus amyloliquefaciens*가 우점종을 차지하였다. 저염 된장의 숙성과 같이 12% 된장의 초기 발효에는 호기성 세균에서 분리된 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*가 많은 영향을 끼치는 것으로 사료된다. 숙성 6개월에는 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus atrophaeus*가 우점종을 차지하였으며, 숙성 9개월에는 *Bacillus atrophaeus*와 *Paenibacillus macerans*, 숙성 12개월에는 *Bacillus licheniformis*가 높은 비율을 차지하였다. 숙성 후기에는 저염 된장과 동일하게 *Paenibacillus macerans*와 *Bacillus subtilis*가 높은 비율로 분리되었다. 효모는 전 숙성기간 동안 분리되지 않았으며, 8.4% 염도의 된장과 마찬가지로 2 log CFU/g 이하의 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 사료된다. 유산균의 총 균수 분포를 보면 12% 염도 된장에서는 오직 control에서만 유산균의 총 균수가 측정되었다. 12% 염도 된장은 유산균이 거의 성장할 수 없는 환경인 것으로 사료되며, 여기에서도 유산균은 된장 발효에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. Control에서 분리된 균주 중 *Pediococcus acidilactici*가 80% 정도의 높은 비율로 우점종을 차지하였다. 저염 된장의 초기 숙성 시료에서 높은 비중으로 발견되는 균종과 동일했다. 곰팡이 총 균수 분포는 control에서만 약 2 log CFU/g 정도의 전반적으로 낮은 수준으로 나타났다. 분리된 곰팡이는 대표 발효균주인 *Aspergillus oryzae*였으며, 80% 정도의 높은 비율로 우점종을 나타내었다.

네 번째, 15.6% 염도의 숙성기간 동안 총 균수 변이를 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

전통 된장의 일반적인 염도는 15-20%로, 15.6% 염도 된장은 일반적인 전통 된장의 염도 조건으로 제조되었다. 일반적인 전통 된장의 염도에서 분리한 호기성 세균의 총 균수 분포의 경우, 앞의 세 염도에서 나타난 호기성 세균의 총 균수 변이와 비슷하게 숙성 초기에는 큰 변화 없이 약 7-8 log CFU/g 수준을 나타내다가 숙성 6개월에 총 균수가 9.19 log CFU/g까지 비교적 큰 폭 상승하였다. 분리된 호기성 세균의 우점종을 살펴보면, 숙성 2개월에 12% 된장과 동일하게 *Bacillus subtilis*가 높은 비율을 차지하였고, 숙성 4개월에는 *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Bacillus subtilis*가 다양하게 나타났다. 숙성 6개월에도 숙성 12% 된장과 마찬가지로 *Paenibacillus macerans*가 높은 비율을 차지하였다. 숙성 9개월에는 *Bacillus atrophaeus*가 약 60% 정도로 가장 높은 비율을 차지하였다. 마지막 숙성 12개월에는 앞의 염도들과 마찬가지로 *Bacillus subtilis*가 된장의 숙성 후기에 비중있게 분리되었다. 호염성 세균의 총 균수 분포는 12% 된장 시료와 비슷한 경향을 보였다. 저염 된장에서는 숙성 6개월에 호염성 세균의 총 균수가 꾸준히 증가되는 경향을 보였지만, 15.6% 된장 시료에서는 12% 된장 시료와 마찬가지로 오히려 총 균수가 큰 수준으로 감소하여 control에서의 총 균수보다 더 낮은 5.89 log CFU/g의 값을 나타내었다. 숙성 9개월에 9.16 log CFU/g까지 총 균수가 큰 폭으로 증가하였으며, 숙성 12개월에도 그 수준을 유지하였다. 분리한 호염성 세균의 동정 결과를 보면, 숙성 2개월에는 *Staphylococcus cohnii*가 높은 비율을 차지하였으며 숙성 4개월에는 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*가 우점종을 차지하고 있다. 앞서 본 다른 염도의 된장들과 마찬가지로 초기 발효에는 호기성 세균에서 높은 비율로 분리된 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*가 큰 영향을 끼치는 것으로 사료된다. 숙성 6개월에는 *Bacillus atrophaeus*가 우점종을 차지하였으며, 숙성 9개월에는 *Bacillus subtilis*가 가장 높은 비중을 차지하였고, 숙성 12개월에는 *Bacillus amyloliquefaciens*가 큰 비율을 차지하였다. 저염 된장에서는 발효 후기에 *Bacillus subtilis*가 우점종이 된 반면에, 12% 된장의 세균에 대한 우점종 분포 pattern과 마찬가지로 12, 15.6% 염도 된장에서는 발효 초기부터 *Bacillus subtilis*가 된장 발효에 큰 관여하고 있는 것으로 사료된다. 효모는 12% 염도 된장과 마찬가지로 전혀 분리되지 않았다. 효모는 15.6% 염도 된장에서도 2 CFU/g 이하의 아주 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 생각되며, 15.6% 된장의 숙성에도 관여를 하지 않는 것으로 판단된다. 유산균의 총 균수 분포를 보면 12% 염도 된장에서와 마찬가지로 오직 control에서만 분리되었다. 유산균은 15.6% 된장에서도 발효에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. Control에서 분리된 유산균 중 *Enterococcus durans*가 가장 높은 비율로 우점종을 차지하였다. 곰팡이의 총 균수 분포는 다른 염도의 된장과 마찬가지로 약 2 log CFU/g으로 전반적으로 낮은 수준에서 나타나고 있다. 12%의 된장과 마찬가지로 control에서 곰팡이가 분리되기는 했지만, 15.6% 염도 된장에서는 숙성 12개월에 다시 control에서와 비슷한 수준인 2.91 log CFU/g로 분리되었다. 분리되지 않는 기간 동안은 곰팡이가 2 log CFU/g 이하의 아주 낮은 수준으로 존재하고 있었을 것으로 사료된다. 분리된 균주는 12% 된장과 마찬가지로 *Aspergillus oryzae*가 가장 높은 분리 빈도수를 차지하였다.

다섯 번째, 19.2% 된장의 숙성기간 동안 총 균수 변이를 측정된 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 19.2% 된장도 15.6% 염도의 된장과 마찬가지로 전통 된장의 일반적인 염도에 속한다. 호기성 세균의 총 균수 분포의 경우 숙성 초기인 숙성 4개월까지는 다른 염도의 시료들과 마찬가지로 큰 변화 없이 7.07-7.66 log CFU/g의 수준으로 나타났다. 나머지 염도의 다른 된장 시료들은 숙성 후기에 총 균수 수준이 증가한 반면에, 숙성 기간이 오래 될수록 고염 된장인

19.6% 된장은 총 균수가 약간 감소하는 경향을 보였다. 그러나 모든 염도에서 호기성 세균은 7-9 log CFU/g로 된장 분리 미생물의 큰 비중을 차지하며 전 숙성기간동안 큰 변동 없이 총 균수 분포를 유지하였다. 그 수준이 전 숙성기간 동안 크게 증감하지 않는 것으로 보아, 된장 발효에는 호기성 세균이 많은 역할을 하고 있는 것으로 생각된다. 분리된 호기성 세균의 우점종을 살펴보면, control에서는 12% 된장과 마찬가지로 *Bacillus subtilis*가 가장 높은 비율을 차지하였고, 숙성 2개월에 *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*가 다양하게 높은 분리 빈도수를 차지하고 있다. 숙성 4개월에는 *B. licheniformis*가 높은 비율로 나타났다. 숙성 6개월에는 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Virgibacillus pantothenicus* 등의 다양한 종이 존재하였다. 숙성 9개월에는 *Bacillus subtilis*가 약 60% 정도로 가장 많은 비율을 차지하고 있었다. 마지막 숙성 12개월에는 *Virgibacillus pantothenicus*가 19.2% 된장의 숙성 후기에 비중 있게 관여를 하고 있었다. 저염인 4.8%, 8.4%의 숙성 기간 별 우점종에 대해 살펴보면 저염 된장의 발효 초기에는 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus amyloliquefaciens*가 많은 비중을 차지하였고, 발효 후기에 *Bacillus subtilis*가 우점종이 된 반면에, 12, 15.6, 19.2% 염도에서는 발효 초기부터 *Bacillus subtilis*가 된장 발효에 큰 관여를 하고 있었다. 호기성 미생물의 우점종을 특징으로, 4.8%, 8.4% 된장이 비슷한 pattern을 보이고, 12%, 15.6%, 19.2% 된장이 비슷한 pattern을 보인다는 것을 알 수 있었다. 호염성 세균의 총 균수 분포 역시 12%, 15.6%, 19.2% 된장 시료의 분포와 비슷한 경향을 보인다. 저염 된장에서 숙성 6개월 차에 총 균수가 꾸준히 증가되는 경향을 보였지만, 19.2% 된장 시료에서는 12%, 15.6% 된장 시료와 마찬가지로 숙성 6개월 차에는 오히려 호염성 세균의 총 균수가 큰 수준으로 감소하여 control에서의 총 균수의 수준인 7.07 log CFU/g보다 더 낮은 5.83 log CFU/g의 수준으로 감소하였다. 그리고 숙성 9개월 차에 약 9 log CFU/g 정도까지 총 균수가 큰 폭으로 증가하였으며, 숙성 12개월 차에도 그 수준을 유지하였다. 분리한 호염성 세균의 동정 결과를 보면 control에서는 12% 된장과 마찬가지로 *Staphylococcus nepalensis*가 높은 분리 빈도수를 차지하고 있었고, 숙성 2개월에 *Bacillus licheniformis*가 가장 높은 비율을 차지하고 있고, 숙성 4개월에도 마찬가지로 *Bacillus licheniformis*가 우점종을 차지하고 있다. 숙성 6개월에는 *Bacillus subtilis*가 우점종을 차지하였으며, 숙성 9개월에는 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis*가 높은 분리 빈도수를 나타낸다. 마지막 숙성 12개월에는 *Paenibacillus macerans*가 큰 비율을 차지하고 있었다. 분리된 호염성 세균의 pattern은 호기성 세균의 pattern과 거의 유사하였다. 저염 된장의 발효 초기에는 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus amyloliquefaciens*가 많은 비중을 차지하였고 발효 후기에 *Bacillus subtilis*가 우점종이 된 반면에, 12%, 15.6%, 19.2% 염도 된장에서는 발효 초기부터 *Bacillus subtilis*가 된장 발효에 큰 관여하고 있었다. 효모는 8.4%, 12%, 15.6% 염도 된장과 마찬가지로 분리 확인되지 않았고, 아주 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않아 19.2% 염도 된장의 숙성에 큰 관여를 하지 않는 것으로 보인다. 유산균의 총 균수 분포를 보면 12%, 15.6% 염도 된장에서와 마찬가지로 오직 control에서만 유산균의 총 균수가 측정되었다. 19.2% 된장에서도 유산균은 발효에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 추측된다. 유산균의 분리 pattern에서 보아도 12%, 15.6%, 19.2% 된장은 비슷한 미생물 성장 환경을 지니고 있는 것으로 생각된다. Control에서 분리된 유산균은 *Enterococcus faecalis*가 가장 높은 비율로 나타난다. 곰팡이의 총 균수 분포는 다른 염도의 된장과 마찬가지로 전반적으로 낮은 수준에서 나타나고 있다. 12%의 된장과 마찬가지로 control에서 곰팡이가 분리된 것은 같았지만, 19.2% 염

도 된장에서는 숙성 2개월과 숙성 12개월에도 곰팡이가 control의 3.05 log CFU/g와 비슷한 수준인 2.62 log CFU/g와 3.62 log CFU/g 의 총 균수 분포로 분리되었다. 15.6% 된장과 마찬가지로 분리되지 않는 기간 동안은 곰팡이가 2 log CFU/g 이하의 아주 낮은 수준으로 존재하고 있었던 것으로 생각된다. 숙성 2개월에 분리된 균주는 *Penicillium chermesinum*와 *Eurotium amstelodami*가 높은 분리 빈도수를 차지하고 있다. 곰팡이 총 균수 분포를 보았을 때 저염 된장인 4.8%, 8.4% 된장 시료에서 비교적 꾸준히 약 2 log CFU/g 곰팡이가 분리 되었고 숙성 12개월에서는 저염 된장에서 곰팡이가 분리되지 않는 비슷한 총 균수 분포를 보였으며, 더 염도가 높은 12%는 control에서만 약 2 log CFU/g 정도 곰팡이 총 균수가 측정되고 15.6%, 19.2%의 된장 또한 control에서 12% 된장과 비슷하게 총 균수가 측정 되면서 숙성 중기에는 공통적으로 곰팡이 분리되지 않는 비슷한 총 균수 변이를 보여주었다. 여기에서도 12%, 15.6%, 19.2% 된장은 비슷한 미생물 성장 환경을 지니고 있는 것으로 생각된다.

간장의 염도 별로 숙성 기간 동안 측정된 미생물 총 균수에 대한 graph를 Fig. 6~10에 나타내었으며, 임의로 선정한 균주의 동정 결과에 따라 시료 별 우점종에 대해 함께 설명하고자 한다.

우선, 가장 저염인 4.8% 간장의 숙성 기간 동안 총 균수 변이를 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 호기성 세균의 총 균수 분포의 경우, 숙성 6개월에 비교적 급격하게 총 균수가 증가한 된장 시료와는 다르게 전 숙성기간에 걸쳐 큰 변화 없이 꾸준히 증가하고 있다. 그러나 호기성 세균의 총 균수 수준은 대략 7-9 log CFU/g의 수준으로 같은 염도의 된장 시료와 비슷하였고, 전 숙성기간을 비교하여도 총 균수의 큰 차이는 없었다. 호기성 세균의 우점종을 살펴보면, control에서는 *Bacillus amyloliquefaciens*가 높은 분리 빈도수를 보였으며, 숙성 3개월에는 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*가 높은 빈도로 확인되었다. 숙성 6개월에는 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus macerans*의 다양한 종이 분리되었다. 4.8% 된장의 숙성 6개월 숙성 시료와 동일하게 다양한 균주가 분리된 것으로 보아, 숙성 6개월에는 4.8%의 저염 장류에 다양한 균종이 공생하는 것으로 사료된다. 숙성 9개월은 *Bacillus subtilis*가 우점종이었고, 숙성 12개월에서도 동일했다. 저염 된장과 마찬가지로, 4.8% 간장에서 분리한 호기성 세균은 *Bacillus amyloliquefaciens*가 초기에 많은 비율을 차지하고, 발효가 진행되면서 다양한 균종이 생겼다가 후기 발효가 진행되면서 발효에 *Bacillus subtilis*가 비중있게 관여하는 것으로 보인다. 호염성 세균의 총 균수 분포도 호기성 세균과 유사한 경향을 나타내었다. 대략 7-9 log CFU/g의 수준으로 호기성 세균의 총 균수 변이와 같이 꾸준한 증가 경향을 보였다. 분리한 호염성 세균의 우점종을 살펴보면, control에서는 *Staphylococcus nepalensis*와 *Bacillus amyloliquefaciens*가 높은 비율을 차지하고 있으며, 숙성 3개월에는 호기성 세균과 마찬가지로 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*가 높은 빈도로 분리되었다. 숙성 6개월에는 *Virgibacillus pantothenicus*가 60% 의 높은 수준으로 분리되었고, 숙성 9개월과 숙성 12개월은 호기성 세균과 같은 경향으로 *Bacillus subtilis*가 우점종이었다. 전체적인 호염성 세균의 우점되는 균종은 호기성 세균과 거의 유사하게 나타났다. 효모는 된장 시료의 총 균수 분포와 거의 유사했다. 염도 4.8%의 저염 간장에서는 control에서만 2.26 log CFU/g의 낮은 수준의 분포를 보였으며, 그 외의 다른 시료에서는 전혀 분리되지 않았다. 효모는 된장 숙성 때와 마찬가지로, 간장 시료에서도 2 log CFU/g 이하의 아주 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 사료되며, 간장 발효에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 생각된다.



다. 염도 4.8% 간장의 control에서 분리되었던 효모는 동정 결과 모두 *Pichia guilliermondii*였다. 4.8% 된장 control에서 분리된 균주와 동일한 종이였다. 유산균의 총 균수 분포를 보면 저염 된장에서는 숙성 4개월 시료까지 유산균이 분리된 반면에, 간장 시료의 경우 모든 염도의 간장시료에서 유일하게 control에서만 유산균이 분리되었다. 효모와 마찬가지로 2 log CFU/g 이하의 아주 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 생각된다. 4.8% 간장의 control에서 분리된 종은 *Pediococcus pentosaceus*가 80%의 높은 분리 빈도수를 차지하고 있었다. 4.8% 된장 control에서 분리된 우점종과 같은 결과였다. 곰팡이 총 균수 분포는 고염 간장인 19.6%를 제외한 모든 염도의 간장시료에서 숙성 3개월까지 2.34-4.03 log CFU/g의 낮은 수준으로 확인할 수 있었으며, 숙성 6개월이 지난 후에는 곰팡이가 분리되지 않았다. 가장 저염인 4.8% 간장은 3.64-3.59 log CFU/g의 총 균수를 나타냈으며, control에서 분리된 모든 균주는 4.8% 된장 control에서 분리한 균주와 동일한 *Aspergillus oryzae*로 동정되었고, 숙성 3개월 차에는 모든 균주가 *Aspergillus ochraceus*로 동정되었다..

두 번째로, 그 다음 저염으로 분류되는 8.4% 간장에 대한 숙성기간별 총 균수 변이를 측정 한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 호기성 세균의 총 균수 분포의 경우 4.8% 간장의 호기성 세균의 총 균수 분포와 유사하게 약 7-10 log CFU/g까지 꾸준한 증가를 보였다. 분리한 호기성 세균의 우점종을 살펴보면, control에서는 4.8% 간장과 동일하게 *Bacillus amyloliquefaciens*가 60%의 비교적 높은 분리 빈도수를 보였으며, 숙성 3개월에는 *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*가 높은 빈도로 발견되었다. 숙성 6개월에는 *Paenibacillus macerans*가 우점종으로 나타났다. 숙성 9개월은 *Bacillus atrophaeus*와 *Bacillus subtilis*가 우점종이었고, 숙성 12개월에서는 *Paenibacillus macerans*와 *Bacillus subtilis*가 높은 분리 빈도수를 차지했다. 8.4% 염도의 간장은 4.8% 간장에서 분리된 호기성 세균뿐만 아니라, 저염 된장인 4.8%, 8.4% 된장의 균총과 유사한 경향을 보였다. 호기성 세균은 *Bacillus amyloliquefaciens*가 초기에 많은 비율을 차지하고, 발효가 진행되면서 다양한 균총이 생겼으며, 후기 발효가 진행되면서 후기 발효에는 *Paenibacillus macerans*와 *Bacillus subtilis*가 관여하는 것으로 보인다. 호염성 세균의 총 균수 분포도 4.8% 간장의 호염성 세균의 총 균수 분포와 유사한 경향을 보이면서 6.6-11.51 log CFU/g까지 꾸준한 증가를 보였다. 분리된 균주의 동정 결과를 보면 control에서는 *Bacillus atrophaeus*가 가장 높은 비율을 차지하였고, 숙성 3개월에는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 *Bacillus licheniformis*가 우점종을 차지하였다. 염도 4.8%와 8.4% 된장과 4.8% 간장과 마찬가지로 8.4% 간장의 발효 초기에는 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus amyloliquefaciens*가 발효에 비중있는 역할을 하는 것으로 생각된다. 숙성 6개월에는 4.8% 간장과 같이 *Virgibacillus pantothenicus*가 높은 수준으로 분리되었고, 숙성 12개월에는 *Bacillus amyloliquefaciens*가 높은 분리 빈도수를 차지하였다. 효모는 8.4% 된장과 마찬가지로 전 숙성기간동안 분리되지 않았다. 그 수준이 2 log CFU/g 이하의 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 생각되며, 효모는 8.4% 염도 간장의 발효에도 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 판단된다. 앞서 말한 바와 같이 유산균은 모든 염도 간장 시료의 control에서만 분리었다. 효모와 마찬가지로 2 log CFU/g 이하의 아주 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 생각되며, 간장 발효에도 유산균은 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 보인다. 8.4% 간장의 control에서 분리된 유산균은 4.8% 간장과 같이 *Pediococcus pentosaceus*였고, 60%의 높은 분리 빈도수를 차지하였다. 곰팡이 총 균수 분포는 4.8% 간장과 비슷하게 나타났다. 숙성 3개월까지 2.84-4.03 log CFU/g의 낮은 수준으로 확인할 수 있었으

며, 숙성 6개월이 지난 후에는 곰팡이가 분리되지 않았다. 8.4% 간장 control에서 분리된 모든 균주는 4.8% 간장 control에서 분리된 균주와 동일한 *Aspergillus oryzae*로 동정되었다. 저염 종류의 control에는 된장과 간장 모두 *Aspergillus oryzae*가 높은 비율을 차지한다는 것을 확인하였다.

세 번째, 12% 간장 숙성기간의 총 균수 변이를 측정된 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 호기성 세균의 총 균수 분포의 경우 저염 간장인 4.8, 8.4% 간장의 호기성 세균의 총 균수 분포와 유사하게 약 7-10 log CFU/g까지 꾸준한 증가를 보였다. 분리한 호기성 세균의 우점종을 살펴보면, control에서는 *Bacillus subtilis*가 60%로 높은 비율을 차지하였고, 숙성 3개월에도 동일하게 *Bacillus subtilis*가 우점종이었다. 숙성 6개월에는 저염 간장과 마찬가지로 *Bacillus atrophaeus*가 우점종을 차지하고 있었다. 숙성 9개월에는 저염 된장과 동일하게 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus atrophaeus*가 높은 비율로 분리되었다. 마지막 숙성 12개월에는 *Paenibacillus macerans*이 비중있게 검출되었다. 12% 간장의 숙성 기간에 따른 호기성 세균의 균총은 12% 된장에서 분리된 호기성 미생물 균총과 비슷한 경향으로 나타났다. 저염인 4.8, 8.4% 종류의 숙성 초기에는 된장과 간장이 동일하게 *Bacillus amyloliquefaciens*가 많은 비율을 차지하고, 숙성 후기에는 *Paenibacillus macerans*와 *Bacillus subtilis*가 관여하는 공통된 경향성을 보여주었다. 12% 염도에서는 된장과 간장 동일하게 숙성 초기부터 후기까지 전 숙성 과정에 걸쳐 *Bacillus subtilis*와 *Paenibacillus macerans*가 된장 발효에 큰 관여하고 있는 것으로 보였다. 호염성 세균의 총 균수 분포는 저염 간장의 호기성 세균의 총 균수 분포와 같이 꾸준히 증가하는 경향을 보여준다. 4.8%, 8.4%, 12% 간장 모두 호염성 세균의 총 균수에서 꾸준한 증가만 있을 뿐 큰 변동은 없었다. 분리한 호염성 세균의 동정 결과를 보면, 숙성 3개월에 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus nepalensis*의 다양한 종이 분리되었고, 숙성 6개월에는 저염 간장과 동일하게 *Virgibacillus pantothenicus*가 분리되었으며, 더불어 *Staphylococcus cohnii*도 높은 비중으로 분리되었다. 숙성 9개월에는 *Bacillus subtilis*가 60%로 우점종을 차지하였으며, 숙성 12개월에는 *Paenibacillus larvae pulvifaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus validus*의 다양한 균총들이 확인되었다. 앞서 말한 바와 같이 효모는 전 숙성기간동안 분리되지 않았으며, 아주 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 추측된다. 유산균의 총 균수 분포를 보면 저염 간장의 유산균 총 균수 분포와 같이 control에서만 유산균의 총 균수가 측정되었다. 유산균은 간장의 발효에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 추측된다. Control에서 분리된 유산균은 저염 간장에서 분리된 종과는 다른 종인 *Weissella paramesenteroides*가 60%의 높은 비율로 우점종을 차지하였다. 그러나 숙성이 시작함과 동시에 7 log CFU/g의 수준이었던 유산균 수가 숙성 3개월부터는 전혀 분리되지 않는 것으로 보아 유산균은 12% 간장의 발효에도 큰 영향을 미치지 않는 것으로 추측된다. 곰팡이 총 균수 분포는 저염 간장과 마찬가지로 control과 숙성 3개월에서 약 2 log CFU/g 정도의 전반적으로 낮은 수준으로 분리되었다. 분리된 곰팡이를 동정한 결과, control에서는 대표 발효 균주인 *Aspergillus oryzae*가 우점종으로 나타났고, 숙성 3개월에는 *Aspergillus versicolor*가 80%의 비율로 높은 분리 빈도수를 차지하였다.

네 번째, 15.6% 염도의 숙성 기간의 총 균수 변이를 측정된 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 전통 간장의 일반적인 염도는 전통 된장과 동일하게 15-20%로 제조된다. 일반적인 전통 간장의 염도 조건으로 제조한 간장 경우, 호기성 세균의 총 균수 분포는 앞의 세 염도에서 나타난 호

기성 세균의 총 균수 변이와 유사하게 약 7-10 log CFU/g 수준까지 꾸준한 증가를 보였다. 분리된 호기성 세균의 우점종을 살펴보면, control에서는 *Bacillus amyloliquefaciens*가 높은 비율을 차지하였고, 숙성 6개월에도 숙성 12% 간장과 마찬가지로 *Bacillus atrophaeus*가 우점종을 차지하였다. 숙성 9개월에는 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus cohnii*, *Bacillus atrophaeus*, *Paenibacillus macerans*의 다양한 종이 분리되었다. 마지막 숙성 12개월에는 *Paenibacillus larvae*가 된장의 숙성 후기에 비중있게 관여하였다. 앞서 말한 4.8%, 8.4%, 12% 염도 간장과 마찬가지로 호염성 세균의 경우 총 균수에서 꾸준한 증가만 있을 뿐 큰 변동은 없었다. 분리한 호염성 세균의 동정 결과를 보면 control에서 *Staphylococcus nepalensis*가 60%로 높은 분리 빈도수를 차지하였다. 숙성 3개월에는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*가 높은 비율을 차지하였으며, 숙성 6개월에는 12% 간장과 마찬가지로 *Staphylococcus cohnii*가 높은 총 균수 수준을 보였다. 숙성 9개월에는 *Paenibacillus macerans*가 간장의 발효 후기에 비중있는 영향을 미쳤으며, 숙성 12개월에는 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus macerans*, *Virgibacillus pantothenicus*의 다양한 종이 분리되었다. 된장에서는 저염인 4.8%, 8.4%시료와 염도가 더 높은 12%, 15.6% 시료의 호기성 세균 균총 분포가 다른 경향으로 나타난 반면에, 간장에서는 염도 시료별로 균총에 특징적인 차이가 없이 다양한 종이 생육하는 것으로 확인되었다. 그러나 된장의 발효에서와 마찬가지로 *Paenibacillus macerans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*는 대부분의 시료에서 큰 비중으로 분리되면서, 간장의 숙성을 위해 큰 역할을 하는 균종일 것으로 판단되었다. 효모는 앞서 말한 4.8%, 8.4%, 12% 염도 간장과 마찬가지로 전혀 분리되지 않았고, 2 log CFU/g 이하의 낮은 수준으로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 생각되며, 15.6% 간장의 숙성에서도 효모는 큰 역할을 하지 않는 것으로 보인다. 유산균의 총 균수 분포를 보면 앞선 4.8%, 8.4%, 12% 염도 간장에서와 마찬가지로 control에서만 유산균이 분리 확인되었다. 15.6% 간장에서도 유산균은 발효에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 추측된다. Control에서 분리된 균주 중 *Enterococcus faecium*가 비중있게 확인되었다. 곰팡이의 총 균수 분포는 4.8%, 8.4%, 12% 염도 간장의 총 균수와 비슷한 경향으로 control과 숙성 3개월에 약 2 log CFU/g 정도의 전반적으로 낮은 수준으로 분리되었다. 12% 간장의 분리 균주와 마찬가지로, 분리된 곰팡이는 control에서 대표 발효 균주인 *Aspergillus oryzae*가 우점종이었고, 숙성 3개월에는 *Aspergillus versicolor*가 높은 비율로 분리되었다.

다섯 번째, 19.2% 간장의 숙성 기간 동안 총 균수 변이를 측정된 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 된장의 일반적인 염도와 동일하게, 간장이 일반적으로 제조되는 염도는 15-20%이다. 19.2% 염도의 간장도 15.6% 간장과 마찬가지로 전통 장류의 일반적인 염도에 속한다. 19.2% 염도 간장의 호기성 세균 총 균수 분포에 대해 살펴보면, 나머지 염도의 다른 된장 시료들은 꾸준히 총 균수 수준이 7-10 log CFU/g까지 높아지는 반면에, 고염 된장인 19.6% 간장은 숙성 6개월부터 총 균수가 감소하는 경향을 보였고 마지막 숙성 12개월에는 control에서의 총 균수인 7.05 log CFU/g와 비슷한 7.81 log CFU/g의 수준을 보였다. 그러나 모든 염도에서 호기성 세균수는 7-10 log CFU/g의 높은 수준으로 유지하였고, 간장에서 분리된 미생물 중에서 큰 비중을 차지하였다. 그 수준이 전 숙성기간 동안 큰 폭으로 증감하지 않는 것으로 보아, 된장 발효 때와 마찬가지로 간장 발효에는 호기성 세균이 많은 역할을 하고 있는 것으로 생각된다. 분리된 호기성 세균의 우점종을 살펴보면, control에서는 *Bacillus licheniformis*가 가장 높은 비율을 차지하였고, 숙성 3개월에 *Staphylococcus nepalensis*가 많은 빈도로 분리되었다. 숙성

6개월에는 12%, 15.6% 간장과 더불어 *Bacillus atrophaeus*가 60%의 높은 비율로 나타났다. 숙성 9개월에는 control에서의 우점종과 같이 *Bacillus licheniformis*가 높은 분리 빈도수를 나타냈다. 숙성 12개월에는 *Virgibacillus pantothenicus*와 *Paenibacillus macerans*가 많은 비율을 차지하였다. 된장에서는 호기성 세균의 균총이 4.8%, 8.4% 된장이 비슷한 pattern을 보이고, 12%, 15.6, 19.2% 된장이 비슷한 pattern을 보였던 반면에, 간장의 경우에는 각 숙성 기간 별로 특정한 종이 우점하기보다는 다양한 종이 비슷한 수준으로 분리 되었다. 호염성 세균의 총 균수 분포는 19.2% 된장의 호염성 세균 총 균수 분포와 비슷한 경향을 보였다. 꾸준히 7-9 log CFU/g까지 높은 총 균수를 나타내다가 숙성 6개월에 큰 수준으로 감소하여 control에서의 총 균수의 수준보다 더 낮은 5.93 log CFU/g의 수준을 나타내었다. 그리고 그 후 숙성 9개월에 8.88 log CFU/g까지 총 균수 분포가 큰 폭으로 증가하였으며, 숙성 12개월에도 그 수준을 유지하였다. 숙성 6개월에 총 균수에 큰 감소가 있었지만 최저치의 총 균수의 수준은 5 log CFU/g보다 높은 수준이었으며, 간장 분리 미생물 중에서도 큰 비중을 차지하고 있는 것으로 보아 간장 발효에는 된장 발효와 마찬가지로 호기성 세균과 호염성 세균이 많은 역할을 하고 있는 것으로 사료된다. 분리한 호염성 세균의 동정 결과를 보면, 숙성 3개월에는 *Staphylococcus nepalensis*가 높은 분리 빈도수를 차지하였고, 숙성 6개월에는 *Staphylococcus cohnii*와 *Virgibacillus pantothenicus*가 우점종을 차지하였다. 숙성 9개월에는 12%, 15.6% 간장과 마찬가지로 *Paenibacillus macerans*가 간장의 발효 후기에 영향을 미쳤으며, 15.6% 간장의 숙성 12개월에서 다양한 종이 분리된 것처럼 19.2% 간장의 숙성 12개월에도 *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus macerans*, *Staphylococcus cohnii*, *Paenibacillus larvae*의 다양한 종이 분리 되었다. 앞서 말한 바와 같이, 된장에서는 저염인 4.8%, 8.4% 된장과 12, 15.6% 된장의 호기성 세균 균총의 분포가 다른 경향으로 나타난 반면에, 간장에서는 숙성기간별 다양한 종이 간장 발효에 기여하고 있었다. 특히, 그 중에서도 *Paenibacillus macerans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* 3종이 된장과 함께 전통 장류의 숙성에서 큰 역할을 하는 균종인 것으로 판단된다. 효모는 8.4%, 12%, 15.6% 염도 간장과 마찬가지로 분리 확인되지 않았고, 아주 낮은 수준으로 존재하거나 전혀 존재하지 않는 것으로 사료되어 된장과 마찬가지로 19.2% 염도 간장의 숙성에 큰 관여를 하지 않는 것으로 판단된다. 또한, 모든 염도의 간장 시료 중에서 유일하게 4.8% 간장의 control에서만 2 log CFU/g 의 낮은 수준으로 효모가 분리된 것으로 보아, 전 숙성기간에 걸쳐 효모는 분석된 모든 염도의 간장 숙성에서 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 유산균의 총 균수 분포를 보면, 모든 염도의 시료 중에서도 control에서만 총 균수가 측정되었다. 그러므로 19.2% 간장에서도 유산균은 발효에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되며, control에서 분리된 유산균은 15.6% 간장과 동일하게 *Enterococcus faecalis*가 가장 높은 비율로 확인되었다. 곰팡이의 총 균수 분포는 숙성 3개월까지 곰팡이가 확인되었던 다른 염도의 간장과는 다르게 19.2% 간장은 오직 control에서만 분리되었다. Control에서 분리된 균주는 *Aspergillus oryzae*가 우점종이었으며, 모든 염도별 간장 시료의 초기에는 동일하게 *Aspergillus oryzae*가 가장 높은 비율로 확인되었다.

마지막으로 전통 고추장의 염도 별로 숙성 기간 동안 측정된 미생물 총 균수에 대한 graph를 Fig. 11~15에 나타내었으며, 임의로 선정하여 분리한 균주의 동정한 결과에 따른 시료 별 우점 종에 대해 함께 설명하고자 한다. 전통 고추장은 염도가 아닌 분리한 균종끼리 나누어 숙성 기간에 따른 미생물 총 균수와 균총의 변화추이를 살펴보았다.

우선, 호기성 세균의 숙성기간 동안 총 균수 변화추이를 보았을 때, 숙성 4개월까지는 모든 염도에서 큰 변화 없이 생균수가 7-7.5 log CFU/g의 수준으로 나타났다. 그러나 숙성 5개월이 되면서 10%, 15%, 20% 염도의 고추장은 7-7.5 log CFU/g 수준을 계속 유지하는 반면에, 저염 고추장인 3%와 6% 염도의 고추장은 점차적으로 감소해 각각 6.52, 6.40 log CFU/g까지 감소하였고 숙성 10개월에는 3% 고추장에서 6.20 log CFU/g의 총 균수를 나타내며 많은 수준 감소하였다. 숙성 기간 동안 비슷한 수준에서 총 균수가 증감하던 다른 염도들과는 다르게, 3% 염도 고추장은 호기성 세균의 총 균수 변화 폭이 가장 컸고 숙성 3개월이 지난 후 꾸준히 생균수 감소 추세를 보여주었다. 6% 염도 고추장은 숙성 5개월에 6.40 log CFU/g까지 감소하였다가 숙성 10개월에는 비슷한 수준인 6.47 log CFU/g로 나타났다. 호기성 세균의 우점종에 대해 살펴보면, 가장 염도가 낮은 3% 고추장에서는 담금 직후인 Control에서 *Peaenibacillus macerans*가 우점종을 차지하였고, 숙성 1개월, 숙성 2개월에는 *Bacillus licheniformis*가 우점종을 차지하였으며, 숙성 3개월에는 *Bacillus licheniformis*와 더불어 *Bacillus amyloliquefaciens*가 많이 분리되었다. 숙성이 후기로 진행되면서 숙성 4개월, 숙성 5개월, 숙성 10개월에는 *Bacillus subtilis*가 3% 염도의 고추장을 우점하였다. 6% 염도 고추장에서는 control과 숙성 1개월까지 *Bacillus subtilis*가 우점종을 이루었고, 숙성 2개월에는 *Bacillus pumilus*가 우점하였으며, 숙성 3개월에 *Bacillus licheniformis*가 높은 비율로 확인되면서 숙성 5개월까지 비중있게 분리되었다. 그러나 숙성 3개월까지는 *Bacillus licheniformis*의 한 균주가 우점한 반면에, 숙성 4개월과 숙성 5개월에는 *Bacillus licheniformis* 이외에 *Bacillus subtilis*가 함께 높은 비율로 분리되었으며, 이 뿐만 아니라 *Bacillus megaterium*와 *Bacillus atrophaeus* 등 다양한 종이 분리되었다. *Bacillus atrophaeus*는 *Bacillus subtilis*와 함께 숙성 후기인 10개월까지 6% 고추장 시료에 우점을 이루었다. 여러 가지 다양한 종이 확인된 염도가 낮은 3%, 6% 고추장과는 다르게 10% 염도 고추장은 두 가지 종인 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis*가 숙성기간 내내 우점종이었다. 숙성 1개월에는 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis*가 우점종이었지만, 숙성 2개월에는 *Bacillus licheniformis*, 숙성 3개월에는 *Bacillus subtilis*가 각각 우점종이었고 숙성이 진행되면서 숙성 4개월, 5개월에는 다시 두 균주가 유사한 비율로 우점하였다. 숙성 10개월에는 *Bacillus subtilis*가 가장 많이 확인되었다. 15% 염도 고추장 또한 10% 염도 고추장과 마찬가지로 두 가지 종인 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis*가 숙성기간 내내 우점종으로 분리되었다. 그러나 15% 염도 고추장은 초기 숙성 3개월까지 *Bacillus subtilis*만 우점종으로 확인되었으며, 숙성 4개월부터는 10%염도 고추장과 마찬가지로 두 균주가 비슷한 비율로 우점종으로 확인되었다. 20% 염도 고추장 또한 10%, 15% 염도 고추장과 마찬가지로 주로 두 가지 종인 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis*가 숙성기간 내내 우점종이었다. 숙성 3개월까지는 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*가 번갈아가며 우점종으로 확인되었고, 숙성 5개월에 *Virgibacillus pantothenicus*가 우점을 이룬 것을 제외하고는 10%, 15% 염도 고추장과 숙성 기간 별 우점을 이루는 균주가 동일했다. 호기성 세균에서 확인된 우점종에서 모든 염도의 고추장은 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis*가 큰 비중을 차지한 것으로 보아, 이 두 종은 모든 염도의 고추장 발효에 비중있게 관여하는 것으로 생각된다. 그러나 염도가 낮은 3% 염도 고추장은 control이나 숙성 3개월에 이 두 균종 이외에 *Peaenibacillus macerans*이나 *Bacillus amyloliquefaciens*가 우점을 이루기도 하고, 6% 염도 고추장 또한 숙성 2개월에 *Bacillus pumilus*가 우점종을 이루었고 숙성 후기가 진행되는 숙성 4개월과 숙성 5개월에는 다양한 균주가 확인되었다. 낮은 염도의 고추장과는 다르게, 10%, 15%, 20% 염도의 3가지 고추

장은 호기성 세균의 우점종 경향에서 비슷한 형태를 보이는데, 주로 *Bacillus licheniformis* 또는(혹은 같이) *Bacillus subtilis*가 모든 숙성 기간 동안 유사하게 고추장 호기성 세균의 우점종을 이루었다.

호염성 세균의 생균수 변화 추이는 호기성 세균의 생균수 변화 추이와 비슷했다. 숙성 3개월까지는 모든 염도에서 큰 변화 없이 생균수 7-7.5 log CFU/g 수준을 유지하였다. 그러나 숙성 4개월부터 저염 고추장인 3%와 6% 염도는 점차적으로 총균수가 감소하였다. 10%, 15%, 20% 염도 고추장은 약간의 생균수 변화가 있긴 하지만 7-7.5 log CFU/g의 생균수 수준을 숙성 10개월까지도 계속 유지하는 반면에, 저염인 3%와 6% 고추장은 숙성 4개월부터 생균수가 점차적으로 감소되기 시작하여 3% 고추장은 숙성 4개월에 6.95 log CFU/g, 숙성 5개월에는 6.57 log CFU/g, 숙성 10개월에는 6.17 log CFU/g까지 감소하였으며, 6% 고추장은 숙성 4개월에 6.87 log CFU/g, 숙성 5개월에 6.33 log CFU/g, 숙성 10개월에는 6.27 log CFU/g까지 감소하여 초기 고추장 담금 시기에 7 log CFU/g 수준과 비교하여 비교적 많은 생균수 감소량을 보였다. 호염성 세균의 우점종에 대해 살펴보면, 3% 염도 고추장의 control에서는 호기성 세균에서 확인된 것과는 다르게 *Bacillus subtilis*가 우점을 이루고 있으며, 숙성 1개월에는 *Bacillus subtilis* 이외에도 *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans* 등의 균주가 우점을 이루고 있다. 숙성 2개월부터 3개월까지는 다시 *Bacillus subtilis*가 가장 많이 동정되었으며, 숙성 4개월에는 *Bacillus subtilis* 이외에도 *Virgibacillus pantothenicus*가 함께 우점을 이루었고, 이 균종은 숙성 5개월까지 많은 비중으로 확인되었다. 숙성 10개월이 되어서도 *Bacillus subtilis*는 분리되었고, 그 이외에도 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus larvae* 등의 다양한 종이 확인되었다. 6% 염도 고추장은 control에서는 *Bacillus atrophaeus*가 우점을 이루었지만, 숙성 1개월부터 *Bacillus subtilis*가 *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus larvae*와 함께 분리되기 시작하여, 숙성 2개월부터는 숙성 후기인 10개월까지 계속 *Bacillus subtilis*가 6% 염도 고추장 호염성 세균의 우점종을 차지하였다. 10% 염도 고추장의 Control에서 *Bacillus subtilis*가 우점종을 차지하였고, 숙성 1개월에는 *Paenibacillus macerans*가 우점종이었다. 숙성 2개월에는 *Bacillus subtilis*가 *Bacillus licheniformis* 와 함께 숙성에 큰 비중을 차지하였으며, 숙성 3개월부터는 6% 염도 고추장과 마찬가지로 *Bacillus subtilis*가 마지막까지 우점종이었다. 15% 염도 고추장은 10% 염도 고추장과 마찬가지로 control에서 *Bacillus subtilis*가 우점종을 차지하였고, 숙성 1개월에는 10% 염도 고추장과 같이 *Paenibacillus macerans*가 많은 부분 차지하고 있었지만, 이외에도 *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus pumilus*, *Oceanobacillus* 속 등 다양하게 확인되었다. 그리고 숙성 2개월이 지난 후에는 숙성 5개월차를 제외하고 6%, 10% 염도 고추장과 같이 *Bacillus subtilis*가 숙성 후기까지 우점종을 차지하였다. 20% 염도 고추장도 초기의 control에서 *Bacillus atrophaeus*와 *Bacillus pumilus*가 우점종이었지만, 숙성 1개월부터는 계속 *Bacillus subtilis*가 20% 염도 고추장의 발효에 큰 비중을 차지하고 있다. 그러나 *Bacillus subtilis*와 더불어 숙성 2개월에는 *Bacillus licheniformis*, 숙성 5개월에는 *Bacillus atrophaeus*가 함께 많은 수준으로 분리되었다. 호기성 세균과 마찬가지로, 호염성 세균의 우점종을 살펴보면 *Bacillus subtilis*가 모든 염도에서 전 숙성기간동안 가장 큰 비중으로 확인된다. 그러나 호기성 세균에서는 *Bacillus licheniformis*도 함께 고추장 시료에서 많이 분리된 반면에, 호염성 세균에서는 3%의 숙성 1개월차와 10%, 20% 숙성 2개월 차를 제외하고는 *Bacillus licheniformis*가 많이 분리된 시료가 없다. 고추장에서 분리되는 *Bacillus licheniformis*는 염도가 높은 곳에서는 생장이 어려운 듯 하며, 대신 호기

성 세균의 분리 시 거의 분리되지 않았던 *Peaenibacillus* 속이 많은 부분에서 우점종으로 많이 확인되었다. 3%와 6%, 10%, 15% 염도 고추장의 숙성 1개월차에 *Peaenibacillus* 속이 모두 확인되었으며, 이는 20% 염도 고추장을 제외한 4가지 염도 고추장의 초기 숙성에 *Peaenibacillus* 속이 많은 기여를 하는 것으로 생각된다. 그리고 3% 염도 고추장은 숙성 후기인 4개월부터 *Bacillus subtilis* 이외의 다양한 균종들이 우점을 하는 반면에, 6%, 10%, 15%, 20% 염도 고추장은 숙성 2개월부터 주로 *Bacillus subtilis*가 숙성에 거의 대부분 관여를 하였다. 이로 보아, 3% 염도 고추장은 숙성이 지날수록 다양한 종들이 생육할 수 있는 조건이 형성되는 것으로 보이며, 이외의 다른 염도 고추장은 *Bacillus subtilis*가 우점을 이루고 고추장을 발효하는 것으로 생각된다.

유산균의 생균수는 담금 직후에는 5가지의 모든 염도 고추장에서 약 3 log CFU/g의 중반대의 비슷한 유산균 수를 나타내었다. 그러나 숙성 1개월에 각 염도별로 다른 생균수를 나타냈다. 저염인 3%와 6% 고추장에서는 급격한 유산균 수의 증가를 보여주어 Control의 생균수와 대비하여 약 2 배 정도인 각각 8.30 log CFU/g와 6.98 log CFU/g였고, 10% 염도 고추장은 Control 보다 감소한 수치인 2.33 log CFU/g이었다. 그리고 염도가 높은 15%, 20% 고추장은 유산균이 분리되지 않았다. 숙성이 지나면서 고추장의 유산균 생균수는 편차가 심하게 나타났다. 가장 저염인 3% 고추장에서는 숙성 1개월 차에 증가된 유산균의 생균수가 숙성 3개월부터 꾸준히 감소는 경향을 보여주는 하지만 다른 염도의 고추장에서는 유산균의 생균수가 어떠한 경향성 없이 편차가 심하였다. 6% 고추장에서는 숙성 4, 5개월에 생균수가 급격히 감소되었다가 숙성 10개월에 다시 5.27 log CFU/g의 수치로 증가하여 큰 편차를 보여주었다. 보다 고염인 10% 염도 고추장에서는 숙성 1개월과 숙성 2개월에는 생균수가 감소되었다가 숙성 3개월에는 증가되고, 숙성 4개월부터는 분리가 되지 않았고, 고염인 15%, 20% 염도 고추장은 숙성 1개월부터 유산균이 분리되지 않았다가 숙성 3개월과 5개월에 분리되는 등 큰 편차를 보여주었다. 저염인 3%, 6% 염도의 고추장은 유산균 생균수에 편차는 있지만, 비교적 꾸준히 유산균이 확인되었다는 점이 다른 고염의 고추장과는 달랐다. 시료 자체의 pH가 심하게 낮아졌던 3%와 6% 염도 고추장에서는 유산균이 꾸준히 분리된 것으로 보아 pH에 생육이 가능한 유산균이 분리된 것으로 생각된다. 유산균은 염도가 높을수록 성장하기 힘든 것으로 생각된다. 유산균의 생균수에 큰 편차는 고추장 시료를 채취할 때 발생한 것으로 생각된다. 유산균을 분리할 때, 분리된 유산균은 모두 절대혐기적인 조건에서 배양되었으며, 이 사실에 근거하여 보았을 때 고추장의 표면을 sampling 하느냐 혹은 조금 더 깊은 곳을 sampling 하느냐에 따라 유산균이 분리되는 양이 달라지는 것으로 보인다. 분리되었던 유산균의 우점종을 확인해보면, 우선, 3% 염도 고추장에서는 *Lactobacillus brevis*와 함께 *Lactobacillus suebicus*가 우점종으로 확인되었으며, 숙성 1개월에는 새로운 종인 *Lactobacillus fructivorans*와 *Lactobacillus suebicus*가 가장 많이 분리되었다. 숙성 2개월에는 숙성 1개월에서 많이 분리되었던 *Lactobacillus fructivorans*뿐만 아니라 *Pediococcus acidilactici*도 함께 많이 분리되었고, 숙성 3개월부터 마지막 숙성 10개월까지는 계속 *Lactobacillus fructivorans*가 우점종이었다. 6% 염도 고추장의 유산균을 보면, 3% 염도 고추장과 유산균의 우점종 경향이 거의 비슷했다. 우선, control에서는 *Lactobacillus brevis*가 유일한 지배균이었으며, 숙성 1개월에는 3%와 동일하게 *Lactobacillus fructivorans*와 *Lactobacillus suebicus*가 가장 많이 분리되었다. 숙성 2개월부터는 유산균이 분리 되지 않았던 숙성 5개월을 제외하고 *Lactobacillus fructivorans*가 마지막 숙성 10개월까지 우점종으로 확인되었다. 3% 염도 고추장과 마찬가지로 6% 염도 고추장도 숙성

1개월부터 *Lactobacillus fructivorans*가 고추장 숙성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 10% 염도 고추장은 3%, 6% 저염 고추장들과 마찬가지로 control에서는 *Lactobacillus brevis*가 유일하게 우점종을 차지하고 있었으며, 숙성 1개월에는 *Pediococcus pentosaceus*, 숙성 2개월과 3개월에는 저염 고추장들과 마찬가지로 *Lactobacillus fructivorans*가 가장 많이 분리되었다. 숙성 4개월부터는 10% 염도 고추장에서 유산균이 분리되지 않았다. 15% 염도 고추장은 더 저염인 3%, 6%, 10% 염도 고추장들과 마찬가지로 control에서 *Lactobacillus brevis*가 많이 분리되었으며, 더불어 *Lactobacillus parabuchneri*도 많이 분리되었다. 그리고 유산균이 분리되지 않다가 숙성 5개월에 다시 유산균이 분리되었는데 *Lactobacillus fructivorans*가 우점종으로 나타났다. 20% 염도 고추장도 control에는 *Lactobacillus brevis*가 우점종으로 확인되었으며, 숙성 되면서 유산균이 분리되지 않았다가 숙성 3개월과 숙성 5개월에 유산균이 다시 분리되었는데 그 우점종은 다른 염도 고추장의 숙성 후기에서 우점종으로 분리된 균주와 마찬가지로 *Lactobacillus fructivorans*로 확인되었다. 즉, 고추장에서 분리된 유산균의 우점종은 모든 염도의 고추장에서 담금 직후인 control에서는 동일하게 *Lactobacillus brevis*이 우점종이었다. 그런데 3% 염도 고추장에서는 *Lactobacillus brevis*와 더불어 *Lactobacillus suebicus*도 비슷한 비율로 많이 분리되었고, 숙성 15% 염도 고추장에서는 *Lactobacillus brevis*와 함께 *Lactobacillus parabuchneri*도 많이 분리되었다. 나머지 염도인 6%, 10%, 20% 염도 고추장은 *Lactobacillus brevis*만이 우점종으로 확인되었다. 숙성 1개월부터 꾸준히 균주가 분리된 시료는 3%, 6% 염도 고추장이다. 이 두 염도의 고추장에서는 숙성 1개월부터 *Lactobacillus fructivorans*가 계속적으로 많이 분리되었으며, 이 균종은 저염 고추장의 후기 숙성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 10% 염도 고추장은 숙성 3개월까지만 유산균이 분리되었고, 숙성 1개월에는 *Pediococcus pentosaceus*이 우점종이었지만, 숙성 2개월부터 숙성 3개월까지는 저염 고추장과 마찬가지로 *Lactobacillus fructivorans*가 계속 우점종으로 확인되었다. 염도가 높은 15%, 20% 염도 고추장은 숙성 1개월부터 유산균이 분리되지 않다가 각각 숙성 5개월과 숙성 3개월, 숙성 5개월에 다시 미생물이 분리되었는데, 이 이유는 고추장의 유산균이 염도가 높을수록 성장하기 힘든 것으로 사료되며, 분리되었던 유산균을 동정해 본 결과 3%, 6%, 10% 염도 고추장의 후기 숙성에서 많이 분리되었던 균주와 마찬가지로 *Lactobacillus fructivorans*가 우점종이었다. 고추장의 염도에 의한 영향을 배제한다면, 고추장의 숙성이 지날수록 숙성 후기에 분리되는 균주는 *Lactobacillus fructivorans*가 비중이 가장 큰 것으로 보인다.

곰팡이는 다른 균종들과 마찬가지로 담금 직후의 5가지 모든 염도에서 생균수가 확인되었다. 그 수치는 2-3 log CFU/g 정도의 낮은 수준으로 나타났다. 그러나 숙성이 지나면서 가장 염도가 낮은 3% 고추장에서만 숙성 3개월까지 곰팡이가 분리되었으며, 나머지 6%, 10%, 15%, 20% 염도 고추장에서는 숙성 1개월부터 곰팡이가 분리되지 않았다. 곰팡이는 생장은 pH의 저하에 의해서도 억제될 뿐만 아니라, 염도가 약간 높아도 쉽게 번식이 억제되는 것으로 보인다. 곰팡이의 우점종을 보면, 담금 직후인 Control에서 우점종으로 *Lichtherinia ramsoa*가 공통적으로 확인되었다. 3%염도 고추장의 우점종을 보면, Control에서는 앞서 말한 바와 같이 *Lichtherinia ramsoa*가 유일하게 많이 분리되었으며, 숙성 1개월에는 효모양진균(酵母樣眞菌)에 속하는 *Candida albicans*가 우점종이었다. 숙성 2개월부터 숙성 3개월까지는 *Penicillium chrysogen*가 우점종으로 확인되었으며, 숙성 후기가 지나면서 곰팡이는 분리되지 않았다. 6% 염도 고추장은 control에서만 곰팡이가 분리되었으며, 그 우점종으로는 3% 염도 고추장과 마찬가지로 *Lichtherinia ramsoa*와 함께 *Mucor racemosus*가 확인되었다. 10% 염도 고추장도



control에서만 유일하게 곰팡이가 분리되었는데, *Lichtherinia ramsoa* 이외에도 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida periphelosum*, *Rhizopus microsporus* 등 다양한 균종이 확인되었다. 15% 염도 고추장도 10% 염도 고추장과 마찬가지로 다양한 균종이 확인되었는데, 모든 염도의 control에서 우점종으로 확인되는 *Lichtherinia ramsoa*와 10% 염도 고추장의 control에서 확인되었던 *Aspergillus* 속과 *Candida* 속이 동일하게 확인되었지만 그 종은 달랐다. *Aspergillus ochraceus*, *Candida periphelosum*, *Rhizomucor pustlus*, *Lichtherinia ramsoa*, *Zymomonas mobilis*이 다양하게 확인되었다. 20% 염도 고추장에서는 3% 염도 고추장과 마찬가지로 *Lichtherinia ramsoa*가 단일하게 우점종으로 분리되었다. 결론적으로, 담금 직후인 Control에서는 모든 염도에서 공통적으로 *Lichtherinia ramsoa*가 확인되었으며, 염도마다 다른 균종이 더 확인되기도 하였다. 3%와 20% 염도 고추장에서는 유일하게 *Lichtherinia ramsoa*가 우점종으로 확인되었지만, 6% 염도 고추장에서는 *Lichtherinia ramsoa* 이외에도 *Mucor racemosus*가 확인되었다. 10%와 15% 염도 고추장은 *Lichtherinia ramsoa* 이외에 다양한 종들이 확인되었는데, 10% 염도 고추장의 경우에는 *Aspergillus* 속과 *Candida periphelosum*, *Rhizomucor pustlus* 등의 다양한 종이 확인되었고, 15% 염도 고추장의 경우에는 *Aspergillus ochraceus*, *Candida periphelosum*, *Rhizomucor pustlus*, *Zymomonas mobilis* 등 다양하게 확인되었다. 숙성 1개월이 지난 후에는 3% 염도 이외의 고추장에서는 균주가 전혀 확인되지 않았으며, 유일하게 3% 염도 고추장에서만 숙성이 지나면서 숙성 1개월에는 *Candida albicans*와 숙성 2개월, 3개월에는 *Penicillium chrysogen*가 각각 분리되었고, 숙성 4개월부터는 균주가 분리되지 않았다. 즉, 염도가 가장 낮은 3% 염도 고추장에서만 숙성 3개월까지 곰팡이가 분리되었고, 나머지 염도인 6%, 10%, 15%, 20% 염도 고추장은 오직 control에서만 균주가 분리되었다. 곰팡이는 염도에 매우 민감한 것으로 보이며, 고추장의 발효에는 거의 관여를 하지 않는 것으로 생각된다.

효모 또한 유산균과 마찬가지로 담금 직후의 5가지 모든 염도에서 비슷한 생균수를 나타내었다. 담금 직후, 모든 염도의 고추장 시료에서 약 4.3 log CFU/g의 생균수를 나타내었지만, 숙성이 지나면서 염도별로 생균수의 변화 양상은 다르게 나타났다. 염도가 가장 낮은 3%와 6% 고추장은 숙성 1개월에서는 비슷한 수치인 6 log CFU/g 정도까지 생균수가 증가하였다. 3% 염도 고추장은 숙성 2개월과 숙성 3개월에 각각 5 log CFU/g과 4 log CFU/g의 수치로 효모가 분리되었고, 그 이후에는 효모가 확인되지 않았다. 6% 염도 고추장에서는 숙성 1개월까지만 6 log CFU/g 로 효모가 분리되었지만, 그 이후에는 효모가 확인되지 않았다. 이는 낮은 염도의 고추장에서 pH가 급격하게 저하되면서 pH가 4 이하로 내려갔을 때, 효모가 생육하기 어려운 것으로 생각된다. 10%와 15% 염도의 고추장에서는 숙성 1개월에 두 가지 시료 모두 약 5 log CFU/g 정도의 생균수를 보여주었으며, 15% 염도 고추장의 숙성 3개월 차에 효모가 분리되지 않은 점을 제외하고는 두 가지 염도의 시료에서 모두 숙성 10개월까지 꾸준히 효모가 분리되었다. 저염인 3%, 6% 고추장과 고염인 20% 고추장에서보다, 10%와 15%의 염도의 고추장에서 고추장 분리 효모는 더욱 오랜 숙성기간동안 성장할 수 있는 것으로 생각된다. 염도 별로 숙성기간동안 나타난 생균수의 수치에는 어떠한 경향성 없이 편차가 심했다. 효모는 호기적인 조건에서 배양되었으며, 유산균과 마찬가지로 sampling을 어느 정도 깊이에서 하느냐에 따라 그 편차가 심해지는 것으로 생각된다. 염도가 가장 높은 20% 고추장은 다른 염도와는 다르게 숙성 1개월부터 생균수가 3 log CFU/g 정도까지 감소하였으며, 다른 염도의 고추장과 마찬가지로 생균수에 대해 편차가 있기는 했지만 숙성 4개월부터 완전히 효모는 분리되지

않았다. 고추장 효모는 염도가 너무 낮으면 숙성 기간이 지나면서 pH의 저하에 민감하여 효모가 성장하기 어려운 것으로 생각되며, 염도가 너무 높아도 식염의 미생물 번식 억제 효과에 의해 성장하기 어려워지는 것으로 보인다. 우점종을 보면, 모든 염도에서 숙성기간 동안 다양한 균종이 확인되었다. 염도 별로 분리된 효모 별로 어떠한 유의성이 보이지 않았다. 3% 염도 고추장에서는 담금 직후인 control에서 다양한 종이 분리되었다. 분리된 균주는 대부분 *Candida* 속이었으며, *Candida famata*, *Candida parapsilosis*, *Candida valida*, *Candida zeylanoides* 등 다양한 종이었으며 이외에도 *Cryptococcus terreus* 가 분리되었다. 숙성 1개월이 지나면서 control에서 분리되었던 *Candida valida* 뿐 아니라, *Candida diversa*, *Kluyveromyces lodderii* 가 확인되었으며, 숙성 2개월에는 *Kluyveromyces marxianus*, 숙성 3개월에는 3% 숙성 초기에 분리되었던 *Candida valida*가 우점종이었다. 6% 염도 고추장은 control에서 3% 염도 고추장에서도 우점종이었던 *Candida valida* 가 우점종이었으며, 숙성 1개월에는 *Saccharomyces cerevisiae*가 가장 많이 분리되었다. 3%와 6% 염도 고추장은 시간이 지나면서 각각 숙성 4개월, 숙성 2개월 부터는 pH 감소와 함께 균주가 분리되지 않았다. 10% 염도 고추장에서는 숙성 초기에 6%와 같은 우점종을 보였다. Control에서 *Candida valida* 가 우점종이었으며, 숙성 1개월과 숙성 2개월에는 *Saccharomyces cerevisiae*가 가장 많이 분리되었다. 숙성 3개월에는 3% 염도 고추장의 control에서 많이 분리되었던 *Candida famata*가 우점종이었으며, 숙성 4개월에는 다시 *Saccharomyces cerevisiae*가 가장 많이 분리되었다. 숙성 5개월에는 *Saccharomyces cerevisiae* 이외에도 *Candida famata*, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces lodderii*, *Rhodotorula rubra* 등 다양한 종이 분리되었다. 숙성 10개월에는 다시 *Saccharomyces cerevisiae*이 많이 분리되었다. 15% 염도 고추장은 3%, 6%, 10% 염도 고추장과 마찬가지로 control에서는 *Candida valida* 이 많이 분리되었고, 이 외에 *Candida fragariorum*이 많이 분리되었다. 숙성이 지나면서 숙성 1개월에는 *Candida famata*이 우점종이었고, 숙성 2개월에는 *Candida famata* 이외의 *Candida polymorpha*, *Candida utilis*, *Candida zeylanoides*, *Rhodotorula rubra* 다양한 종이 확인되었다. 숙성 3개월에는 효모가 분리되지 않았는데, pH의 감소 또는 높은 염도에 의한 영향으로 생각되며, 숙성 4개월에는 높은 염도에서도 생육이 가능한 *Saccharomyces cerevisiae*가 다시 우점종을 나타내었으며, 숙성 5개월에는 *Candida versatilis*, 숙성 10개월에도 호염성 효모인 *Candida halophila*가 우점종을 나타내었다. 숙성이 지나면서 높은 염도에서 생육이 불가능한 효모는 생육하지 못하는 것으로 보인다. 20% 염도 고추장에서는 다른 염도들과 마찬가지로 control에서는 *Candida valida*이 우점종이었으며, 숙성 1개월이 지나면서 저염인 3% 염도 고추장과 같이 *Kluyveromyces lodderii*이 가장 많이 분리되었으며, 숙성 2개월에는 분리되지 않았다가 숙성 3개월에는 *Saccharomyces cerevisiae*가 우점종이었다. 가장 염도가 높은 20%염도 고추장에서는 숙성초기인 control과 숙성 1개월, 숙성이 조금 지난 후인 숙성 3개월에서만 균주가 분리되었다. 숙성 후기가 되면서 염도가 너무 높아서 효모의 생장이 어려워지는 것으로 생각된다. 전체적으로 모든 시료를 보았을 때, 모든 염도에서 *Candida* 속과 *Saccharomyces cerevisiae*가 고추장의 발효기간 동안 가장 많이 고추장의 발효에 관여하는 것으로 확인된다. 모든 염도에서 담금 직후인 control에서 동일하게 *Candida valida*이 우점종이었다. 3% 염도 고추장에서는 숙성 기간 동안 *Candida* 속이 주로 발효에 관여를 하였고, 이외에도 *Cryptococcus terreus*, *Kluyveromyces lodderii*이 우점종으로 확인되었다. 5가지 염도 중 유일하게 *Saccharomyces cerevisiae*가 우점종으로 확인되지 않았다. 6% 염도 고추장에서는 *Candida valida*와 *Saccharomyces cerevisiae*가 숙성 초기에 고추장

발효에 관여하였으며, 이후에는 효모가 분리되지 않았다. 10% 고추장도 숙성 초기에는 *Candida valida*와 *Saccharomyces cerevisiae*가 우점종으로 확인되었고, 숙성이 지나면서 *Candida valida* 이외의 다양한 *Candida* 속과 *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces lodderii*, *Rhodotorula rubra* 등 다양한 종이 확인되었다. 15% 염도 고추장에도 *Candida valida*와 *Saccharomyces cerevisiae* 이외에도 10% 염도 고추장의 숙성 5개월에서 확인되었던 *Rhodotorula rubra*가 숙성 중기인 숙성 2개월에 확인되었다. 20% 염도 고추장에서도 다른 염도와 마찬가지로 *Candida valida*와 *Saccharomyces cerevisiae*이 우점종으로 확인되었고, 3%, 10% 염도 고추장에서 우점종으로 확인되었던 *Kluyveromyces lodderii*이 숙성 1개월에 우점종으로 확인되었다. 효모는 모든 염도에서 숙성기간 동안 다양한 균종이 확인되었으며, 염도 별로 분리된 효모 별로 어떠한 유의성이 보이지 않았다.

**Table 10.** Isolation of microorganisms from the ripening *doenjang*.

Type	Sample		Number of isolates					Total
			BN	BH	YN	LN	FN	
control	된장	4.8%	5	5	5	5	5	25
		8.4%	5	5	- <sup>1)</sup>	5	5	20
		12%	5	5	-	5	5	20
		15.2%	5	5	-	5	5	20
		19.2%	5	5	-	5	5	20
숙성 2개월	된장	4.8%	5	5	-	5	5	20
		8.4%	5	5	-	5	-	15
		12%	5	5	-	-	-	10
		15.2%	5	5	-	-	-	10
		19.2%	5	5	-	-	5	15
숙성 4개월	된장	4.8%	5	5	-	5	-	15
		8.4%	5	5	-	-	5	15
		12%	5	5	-	-	-	10
		15.2%	5	5	-	-	-	10
		19.2%	5	5	-	-	-	10
숙성 6개월	된장	4.8%	5	5	-	-	5	15
		8.4%	5	5	-	-	5	15
		12%	5	5	-	-	-	10
		15.2%	5	5	-	-	-	10
		19.2%	5	5	-	-	-	10
숙성 9개월	된장	4.8%	5	5	-	-	5	15
		8.4%	5	5	-	-	5	15
		12%	5	5	-	-	-	10
		15.2%	5	5	-	-	-	10
		19.2%	5	5	-	-	-	10
숙성 12개월	된장	4.8%	5	5	-	-	-	10
		8.4%	5	5	-	-	-	10
		12%	5	5	-	-	-	10
		15.2%	5	5	-	-	5	15
		19.2%	5	5	-	-	5	15
Total			150	150	5	40	70	415

1)Not detected

BN : Normal Bacteria, BH: Halophilic Bacteria, YN : Normal Yeast, LN : Normal Lactobacilli, FN: Normal Fungi

**Table 11.** Isolation of microorganisms from the ripening *ganjang*.

Type	Sample		Number of isolates					Total
			BN	BH	YN	LN	FN	
control	간장	4.8%	5	5	5	5	5	25
		8.4%	5	5	-	5	5	20
		12%	5	5	-	5	5	20
		15.2%	5	5	-	5	5	20
		19.2%	5	5	-	5	5	20
숙성 3개월	간장	4.8%	5	5	-	-	5	15
		8.4%	5	5	-	-	5	15
		12%	5	5	-	-	5	15
		15.2%	5	5	-	-	5	15
		19.2%	5	5	-	-	-	10
숙성 6개월	간장	4.8%	5	5	-	-	-	10
		8.4%	5	5	-	-	-	10
		12%	5	5	-	-	-	10
		15.2%	5	5	-	-	-	10
		19.2%	5	5	-	-	-	10
숙성 9개월	간장	4.8%	5	5	-	-	-	10
		8.4%	5	5	-	-	-	10
		12%	5	5	-	-	-	10
		15.2%	5	5	-	-	-	10
		19.2%	5	5	-	-	-	10
숙성 12개월	간장	4.8%	5	5	-	-	-	10
		8.4%	5	5	-	-	-	10
		12%	5	5	-	-	-	10
		15.2%	5	5	-	-	-	10
		19.2%	5	5	-	-	-	10
Total			125	125	5	25	45	325

**Table 12.** Isolation of microorganisms from the ripening *gochujang*.

Type	Sample	Number of isolates					Total
		BN	BH	YN	LN	FN	
control	3%	5	5	5	5	5	25
	6%	5	5	5	5	5	25
	10%	5	5	5	5	5	25
	15%	5	5	5	5	5	25
	20%	5	5	5	5	5	25
숙성 1개월	3%	5	5	5	5	5	25
	6%	5	5	5	5	-	20
	10%	5	5	5	5	-	20
	15%	5	5	5	-	-	15
	20%	5	5	5	-	-	15
숙성 2개월	3%	5	5	5	5	5	25
	6%	5	5	-	5	-	15
	10%	5	5	5	5	-	20
	15%	5	5	5	-	-	15
	20%	5	5	-	-	-	10
숙성 3개월	3%	5	5	5	5	5	25
	6%	5	5	-	5	-	15
	10%	5	5	5	5	-	20
	15%	5	5	-	-	-	10
	20%	5	5	5	5	-	20
숙성 4개월	3%	5	5	-	5	-	15
	6%	5	5	-	5	-	15
	10%	5	5	5	-	-	15
	15%	5	5	5	-	-	15
	20%	5	5	-	-	-	10
숙성 5개월	3%	5	5	-	5	-	15
	6%	5	5	-	-	-	10
	10%	5	5	5	-	-	15
	15%	5	5	5	5	-	20
	20%	5	5	-	5	-	15
숙성 10개월	3%	5	5	-	5	-	15
	6%	5	5	-	5	-	15
	10%	5	5	5	-	-	15
	15%	5	5	5	-	-	15
	20%	5	5	-	-	-	10
Total		175	175	110	110	40	610

Fig. 1 Viable cell numbers graph of *doenjang* at 4.8% salt condition.

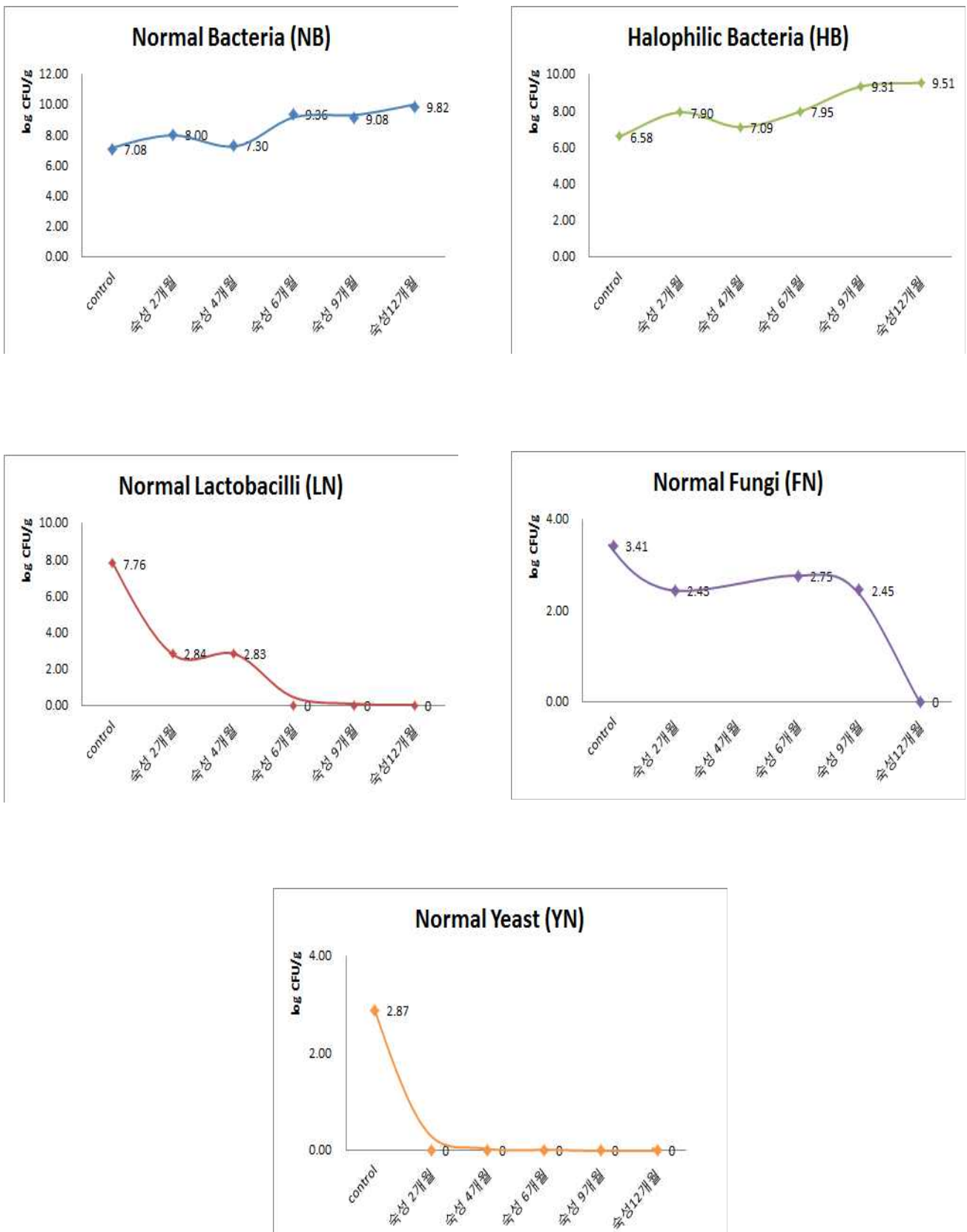


Fig. 2 Viable cell numbers graph of *doenjang* at 8.4% salt condition.

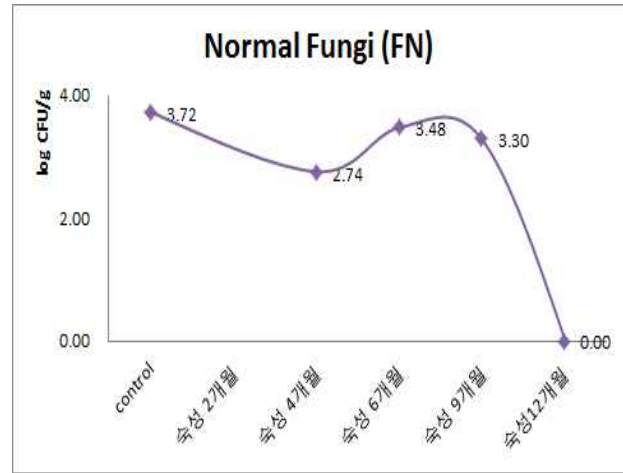
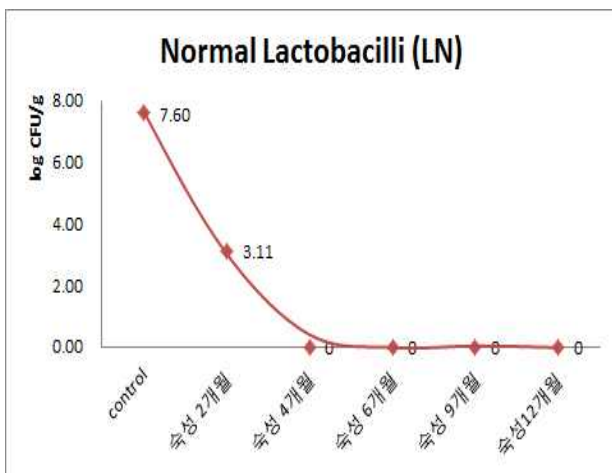
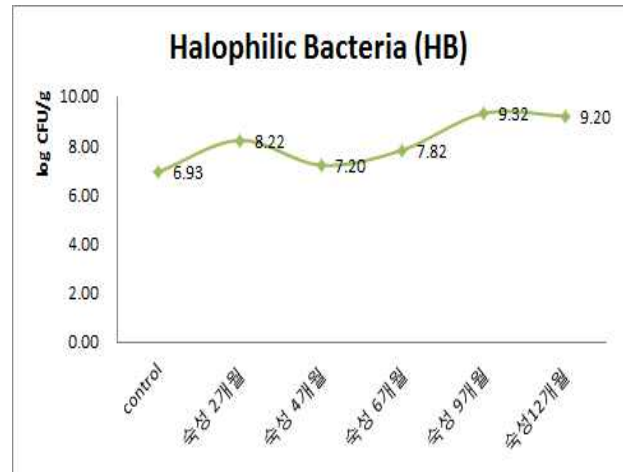
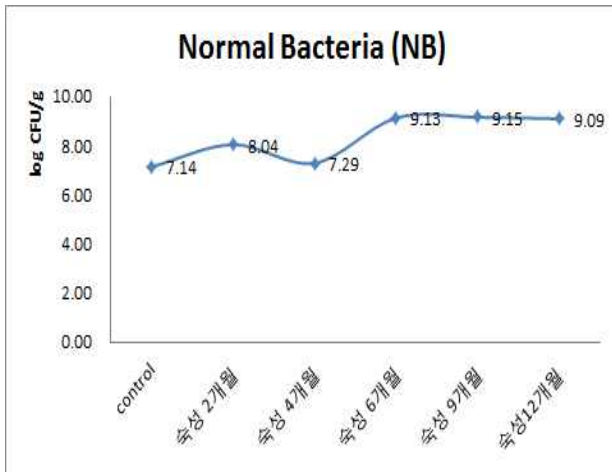


Fig. 3 Viable cell numbers graph of *doenjang* at 12% salt condition.

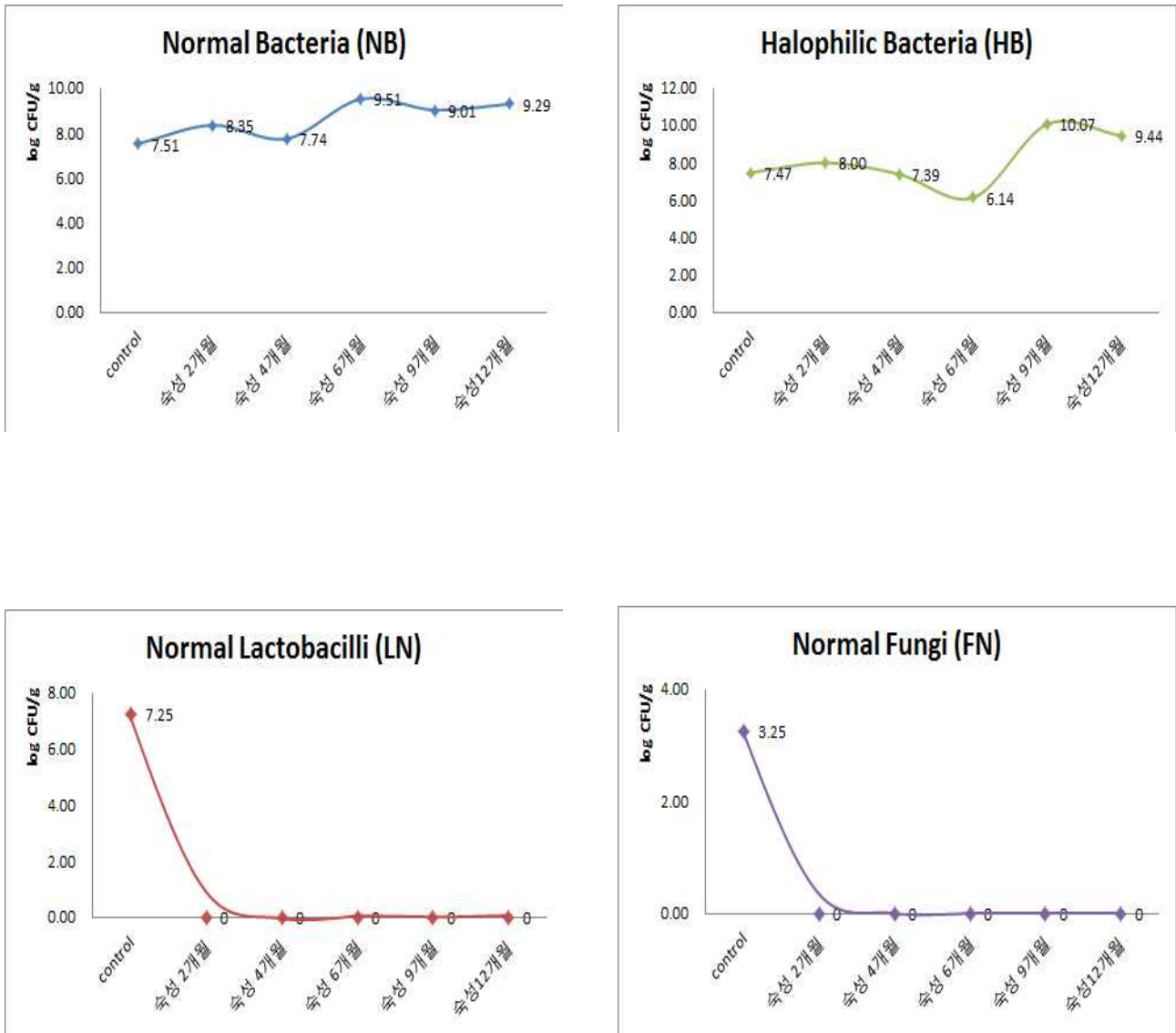




Fig. 4 Viable cell numbers graph of *doenjang* at 15.6% salt condition.

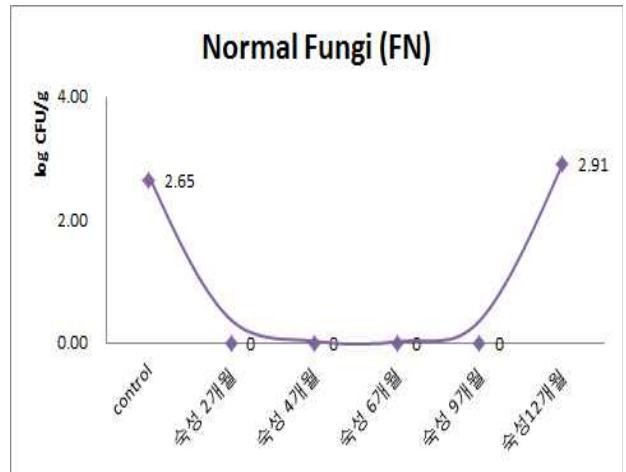
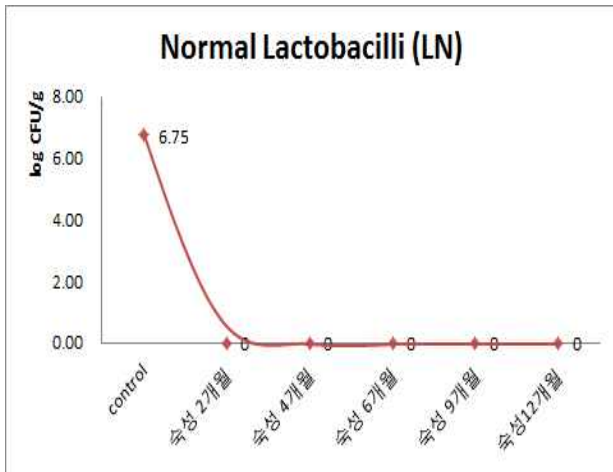
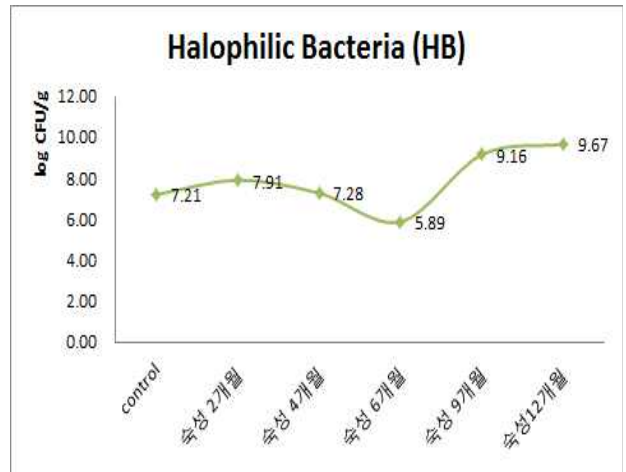
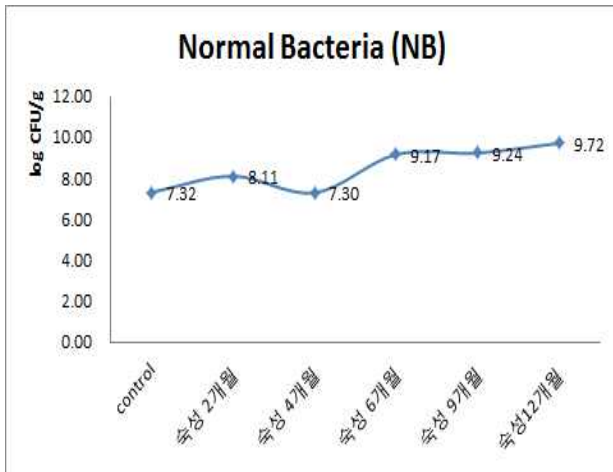


Fig. 5 Viable cell numbers graph of *doenjang* at 19.2% salt condition.

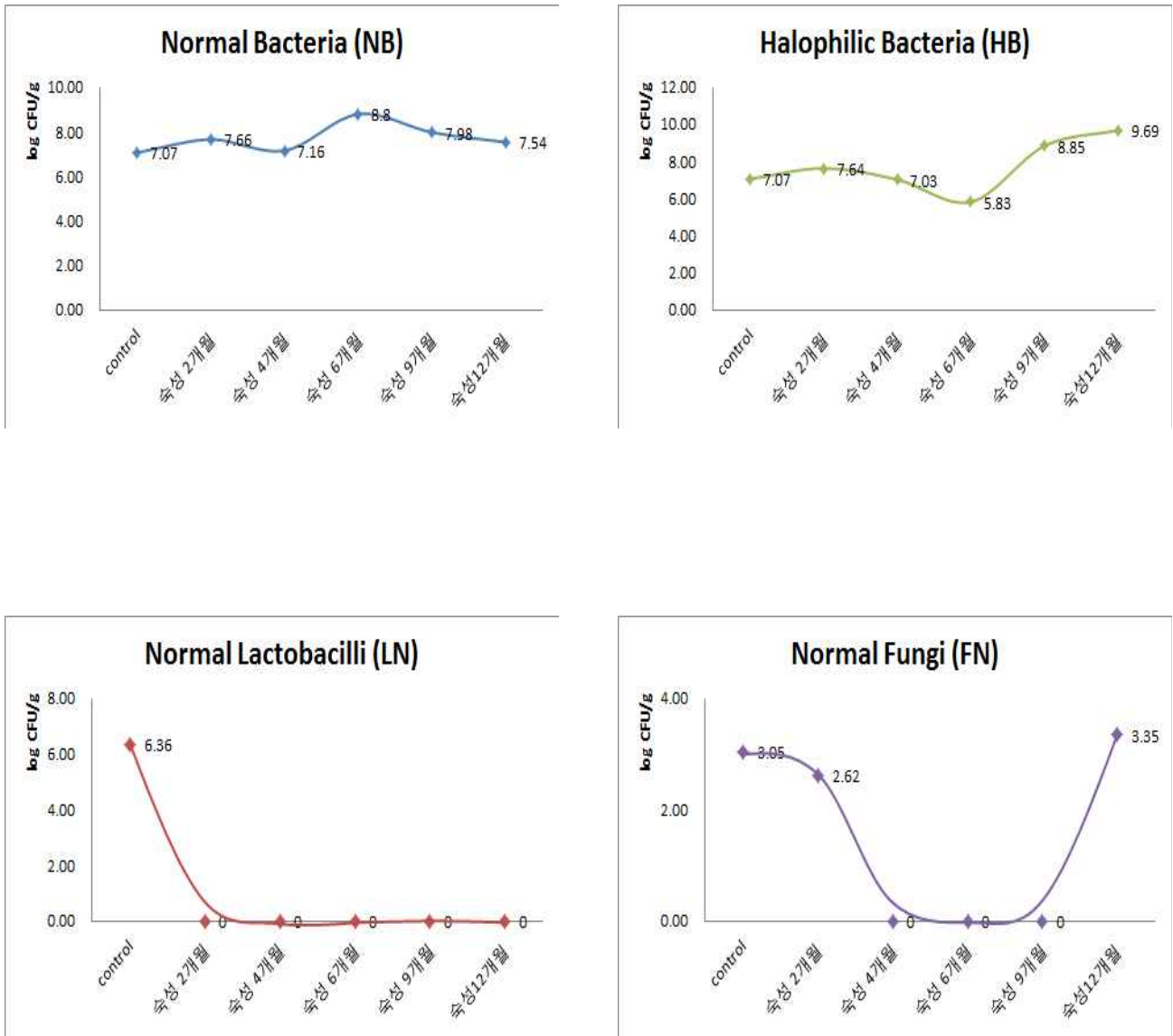


Fig. 6 Viable cell numbers graph of *ganjang* at 4.8% salt condition.

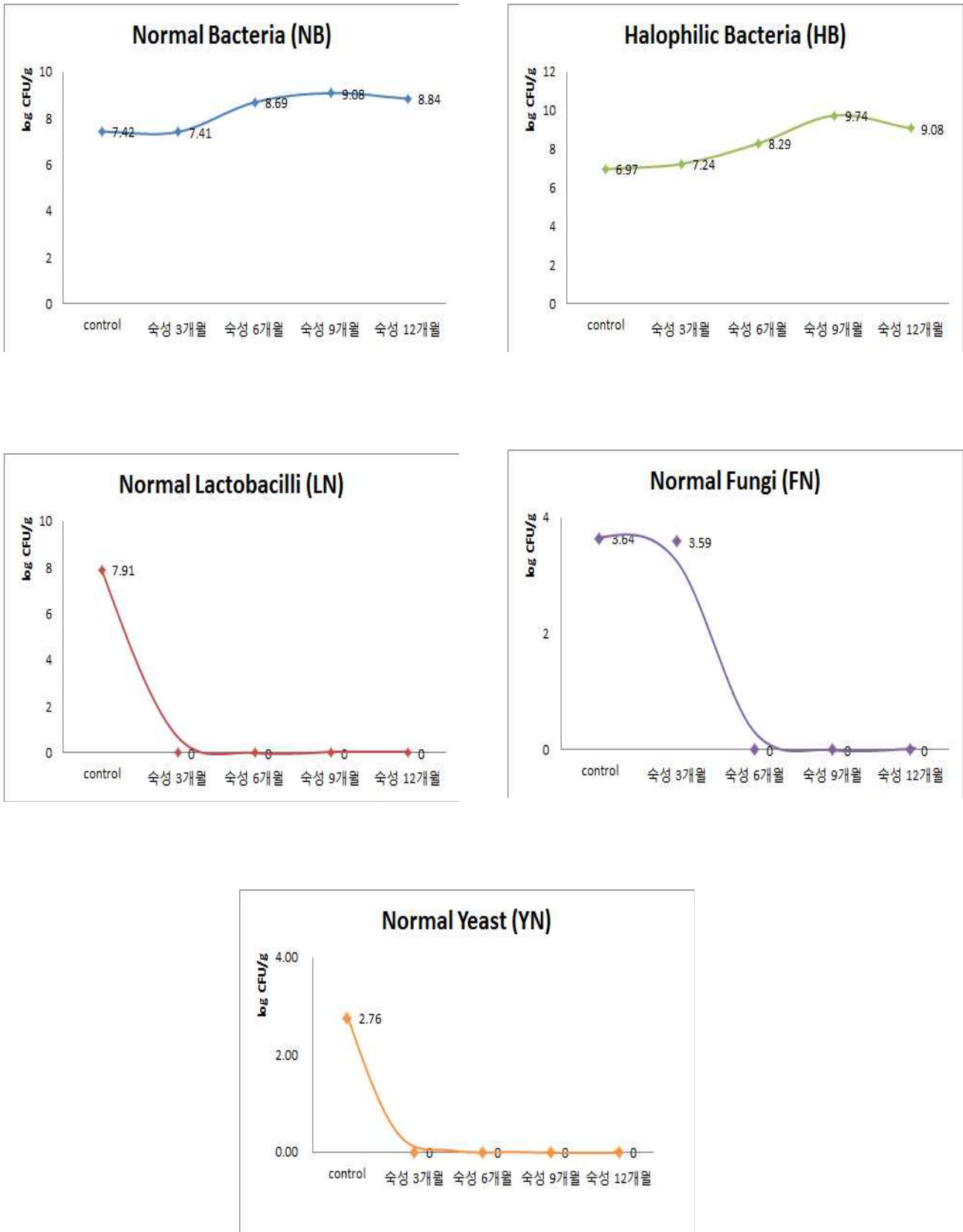


Fig. 7 Viable cell numbers graph of *ganjang* at 8.4% salt condition.

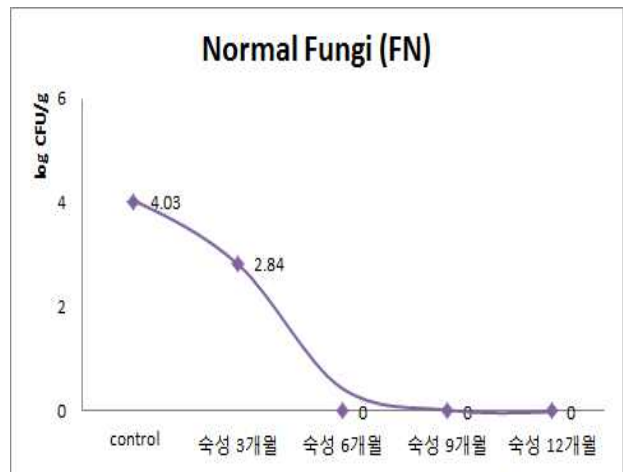
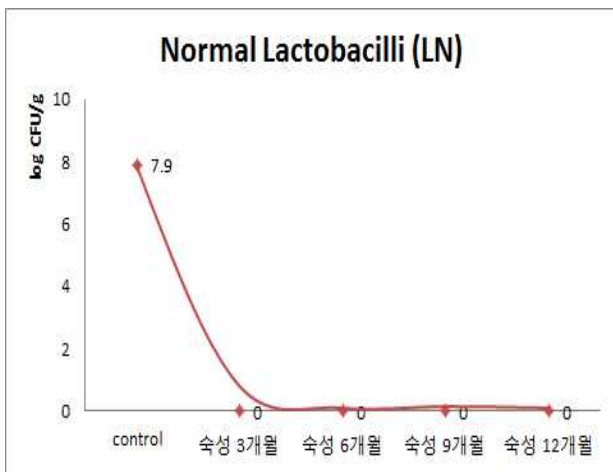
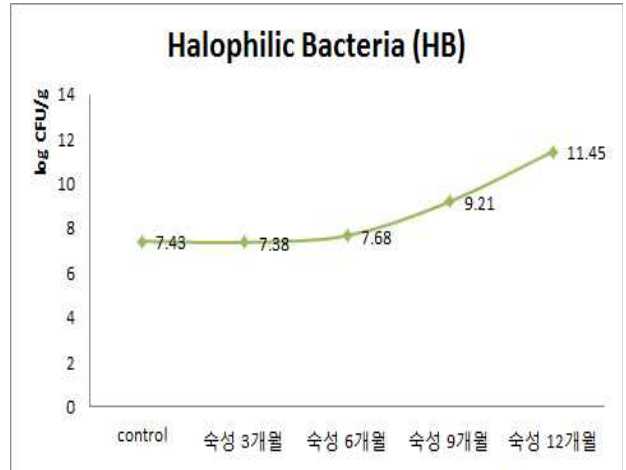
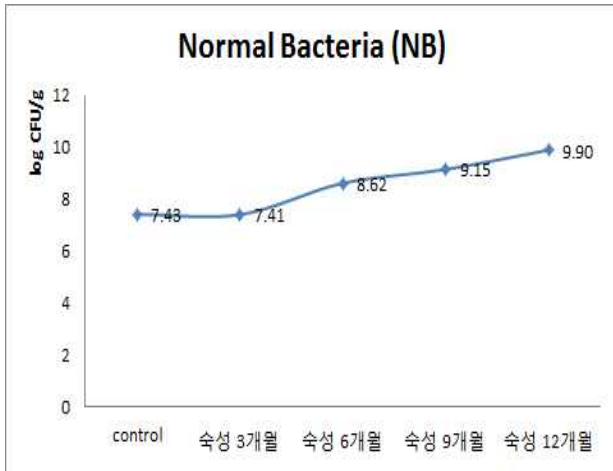


Fig. 8 Viable cell numbers graph of *ganjang* at 12% salt condition.

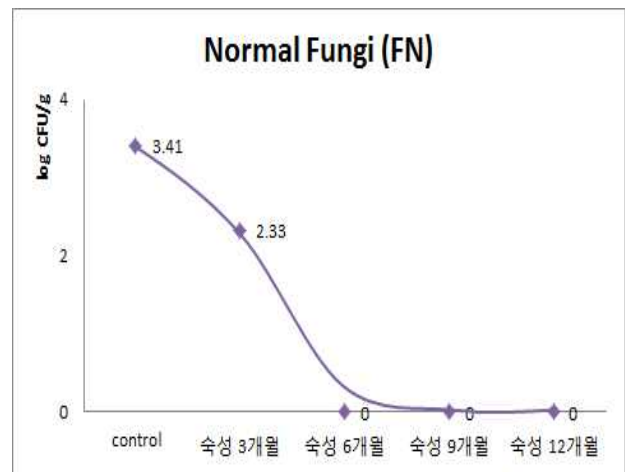
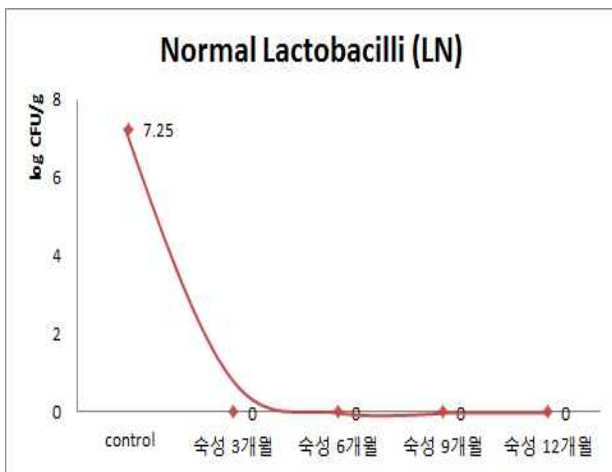
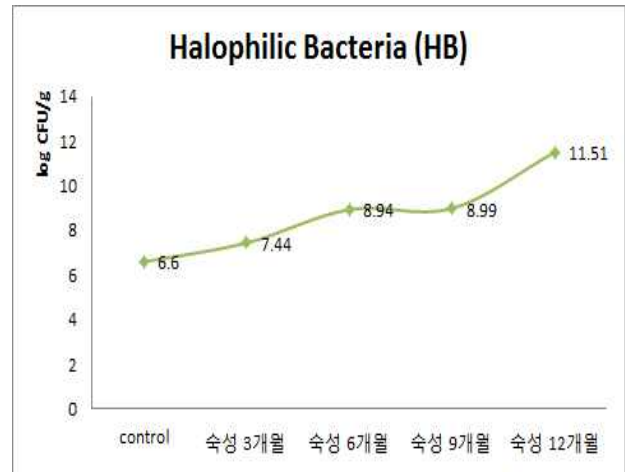
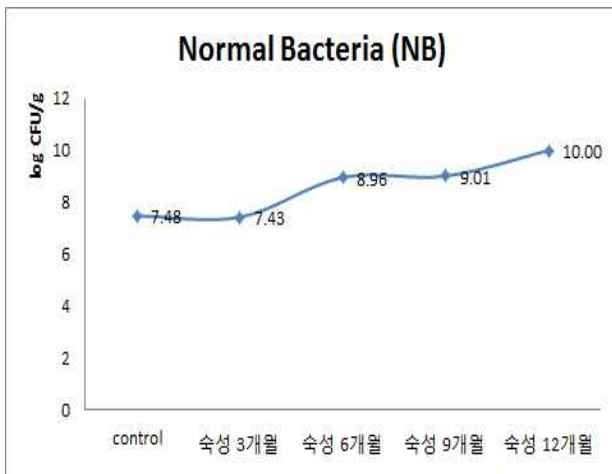


Fig. 9 Viable cell numbers graph of *ganjang* at 15.6% salt condition.

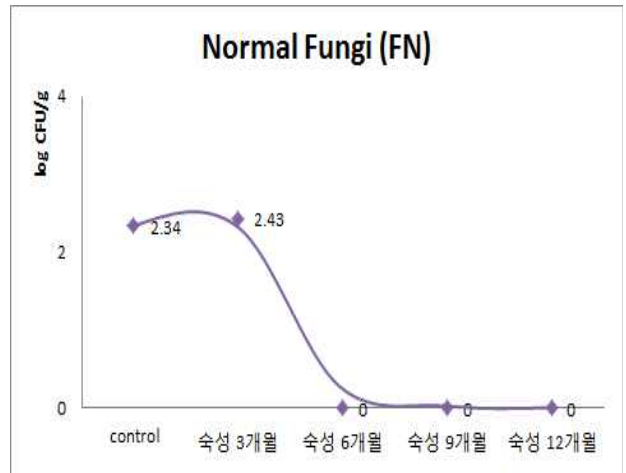
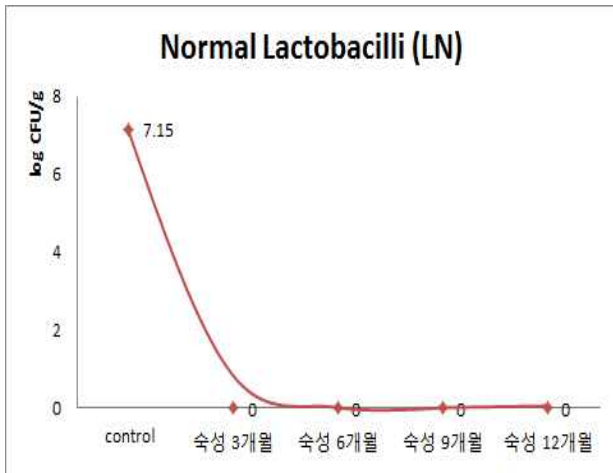
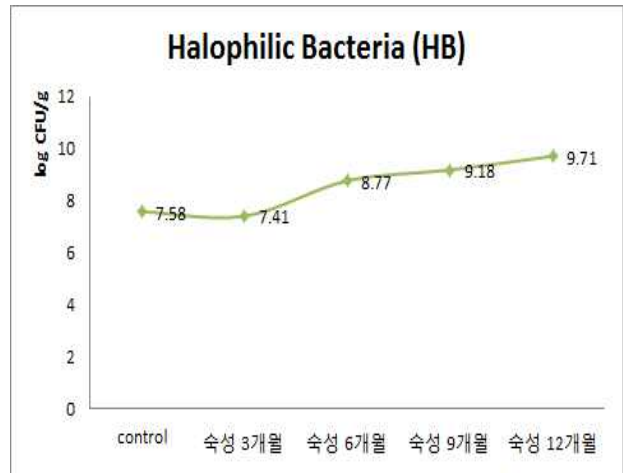
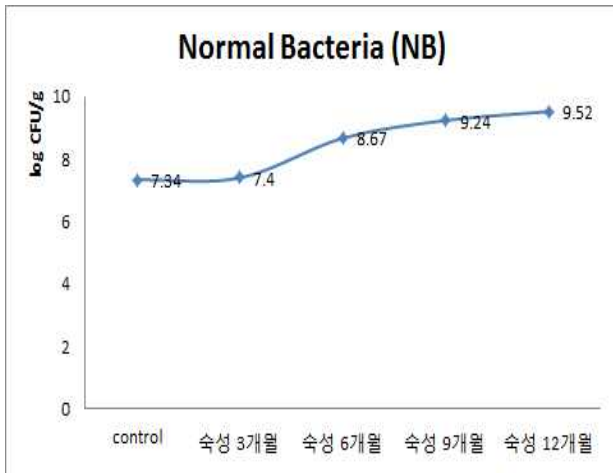


Fig. 10 Viable cell numbers graph of *ganjang* at 19.2% salt condition.

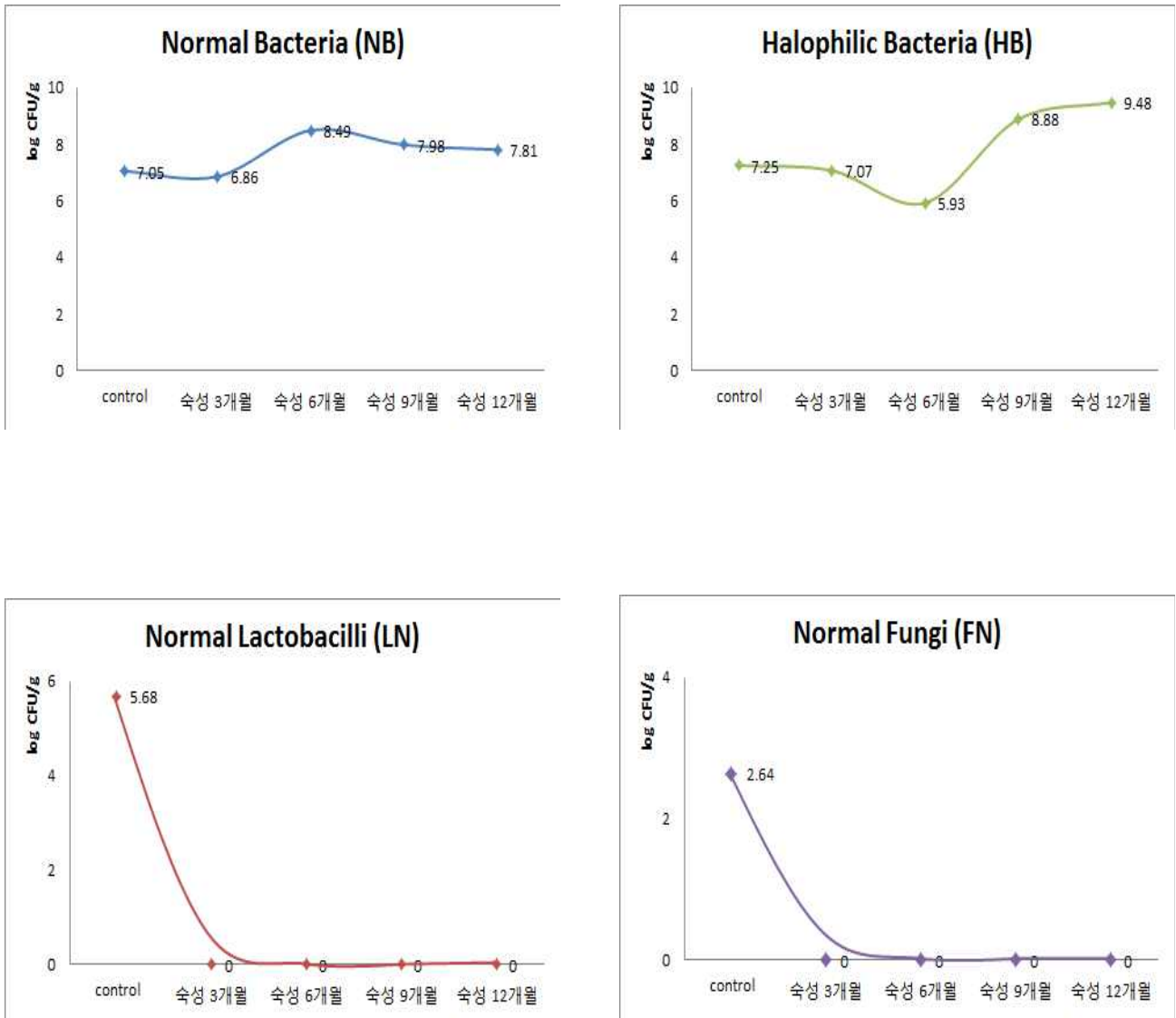


Fig. 11 Viable cell numbers graph of *gochujang* at 3% salt condition.

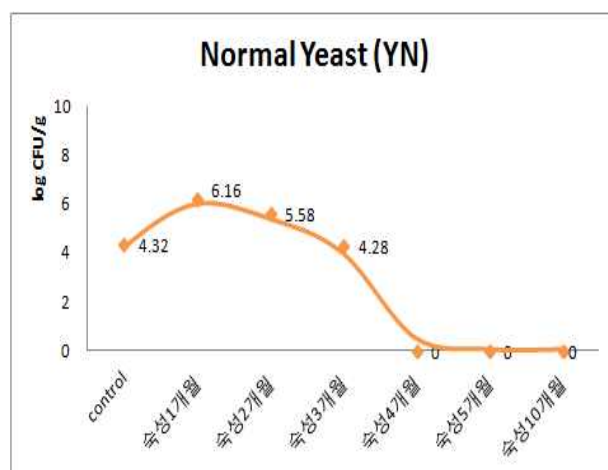
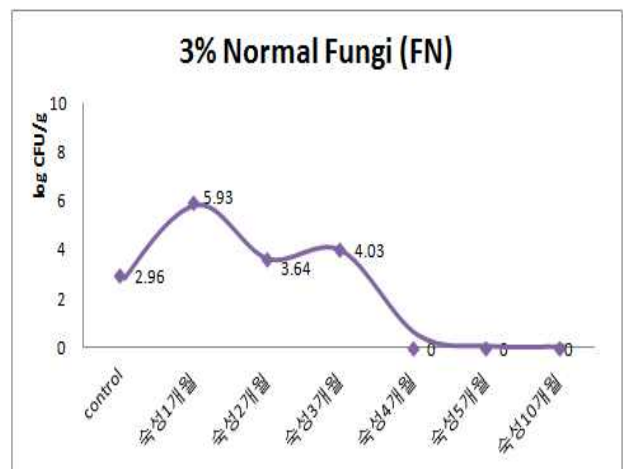
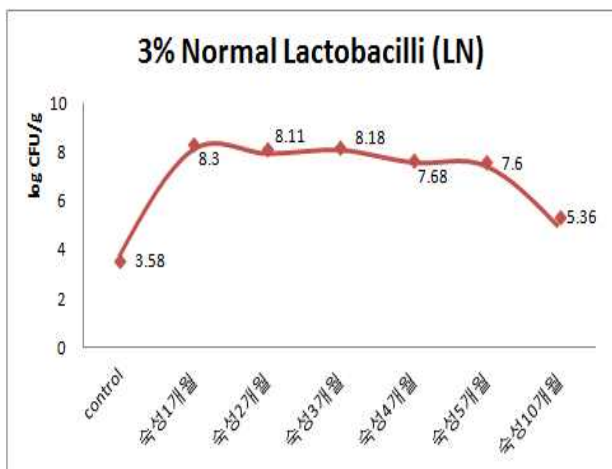
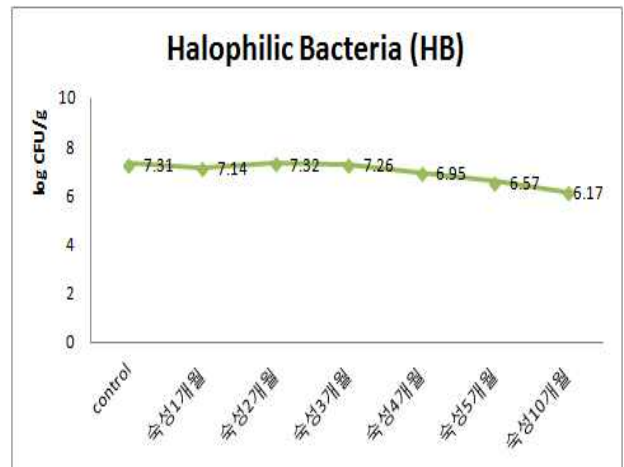
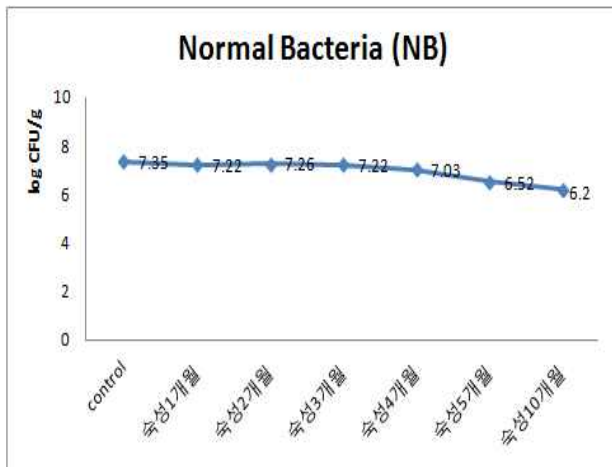




Fig. 12 Viable cell numbers graph of *gochujang* at 6% salt condition.

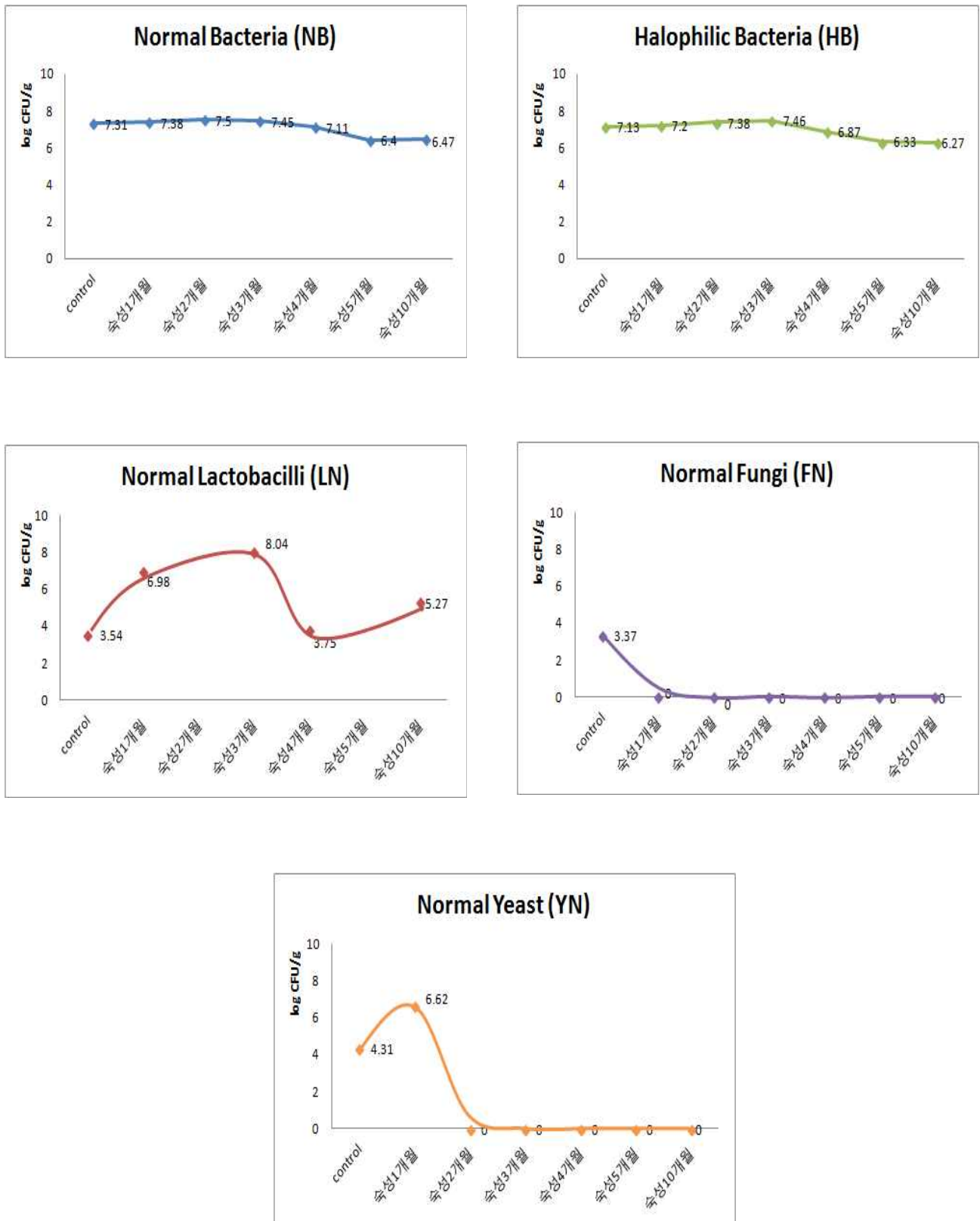


Fig. 13 Viable cell numbers graph of *gochujang* at 10% salt condition.

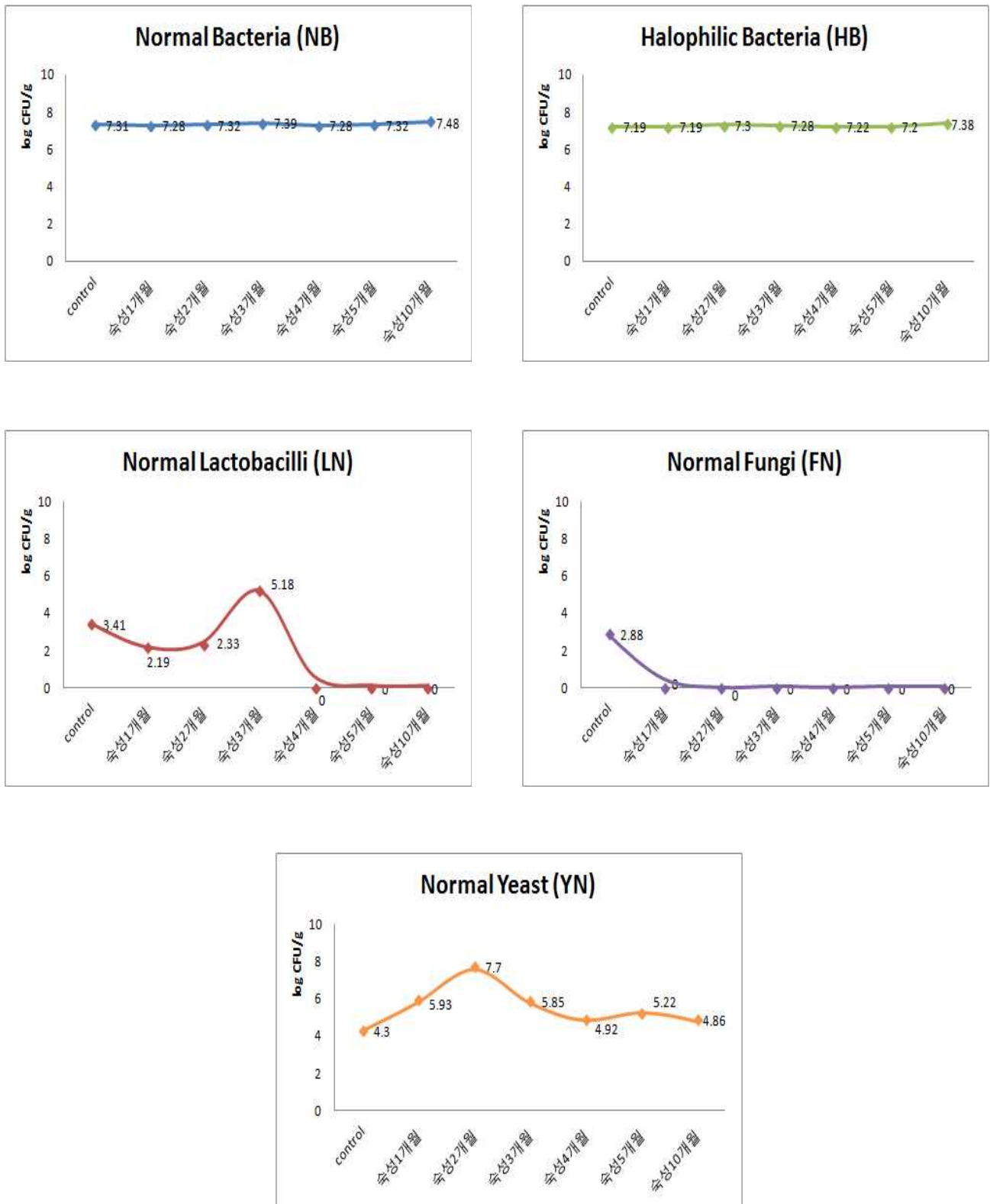


Fig. 14 Viable cell numbers graph of *gochujang* at 15% salt condition.

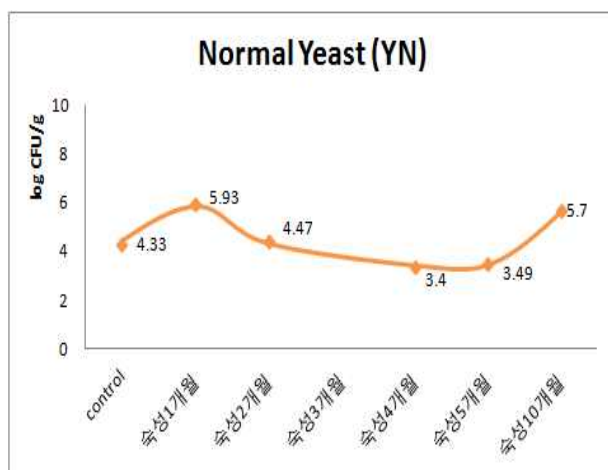
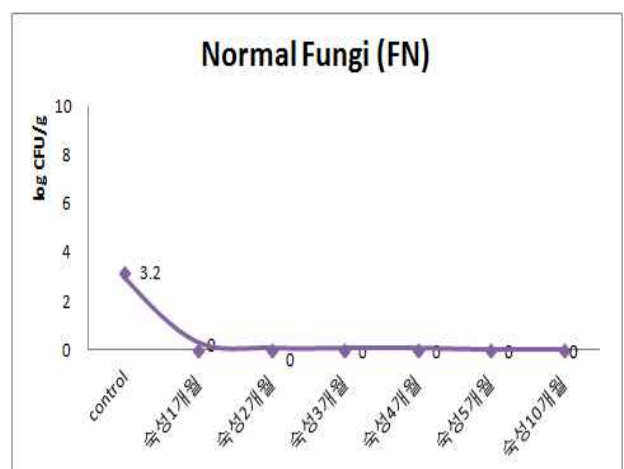
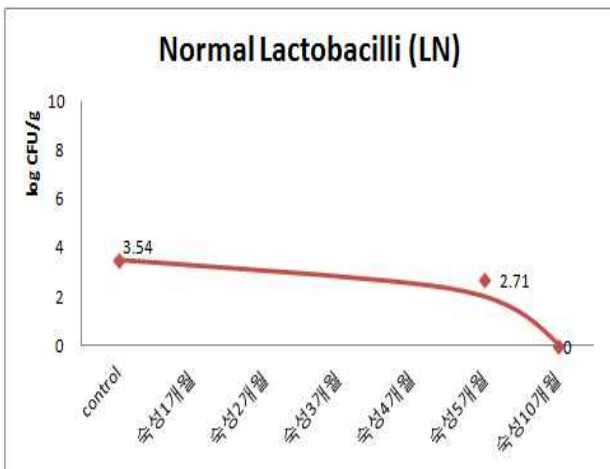
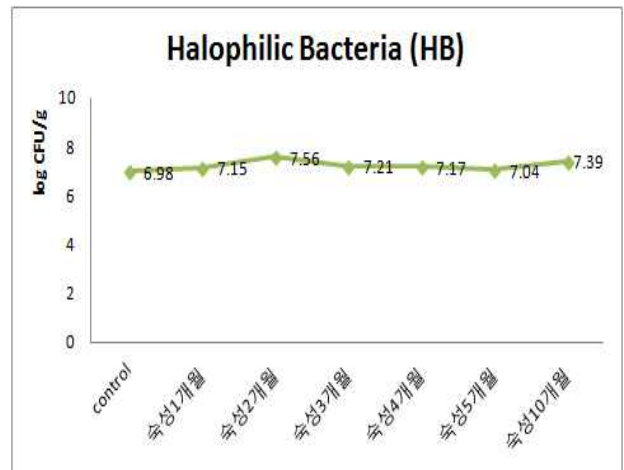
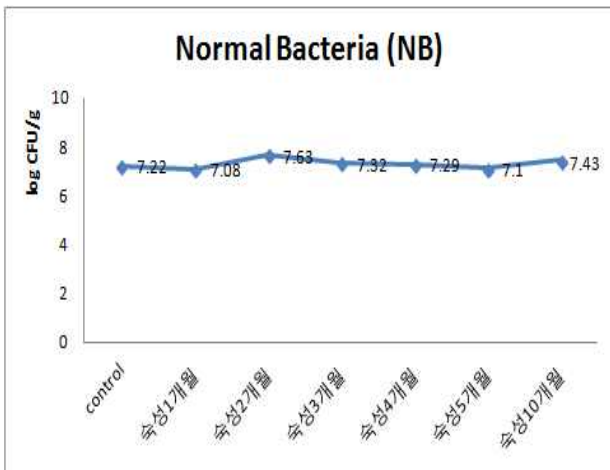
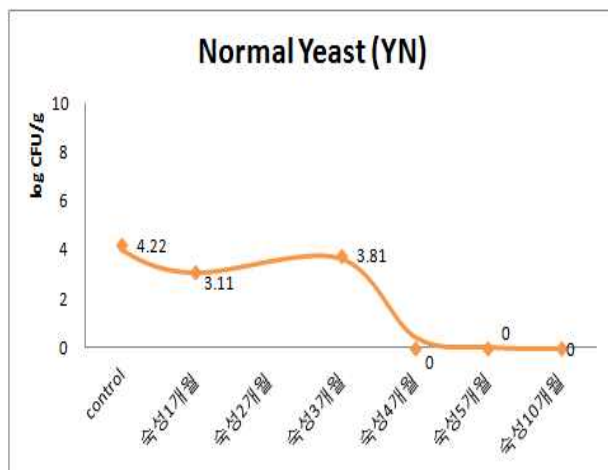
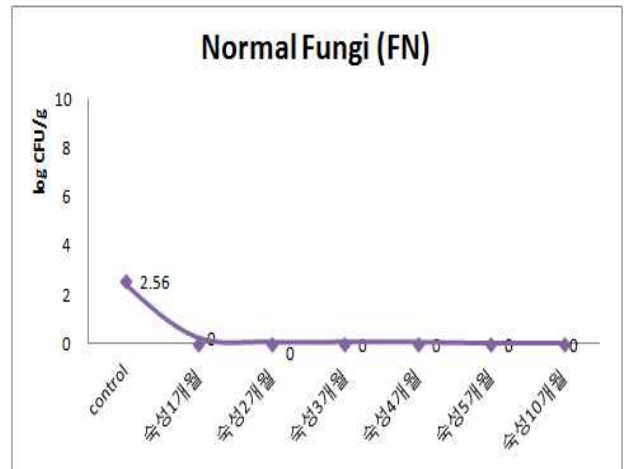
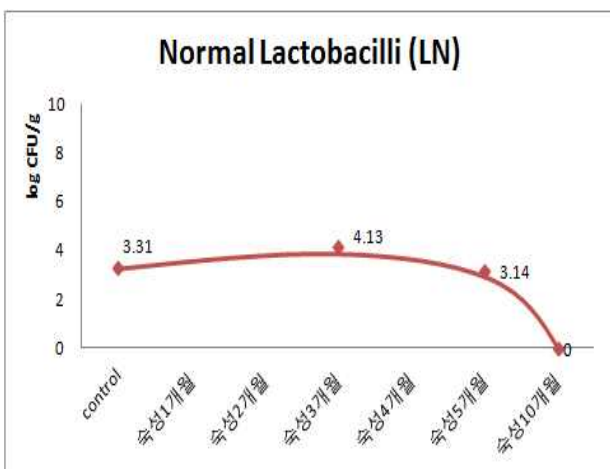
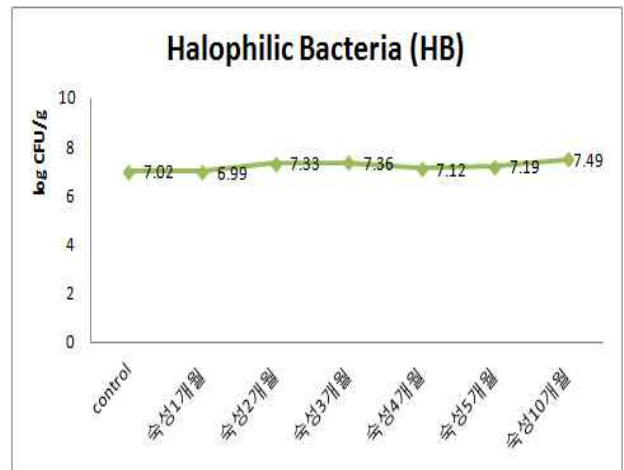
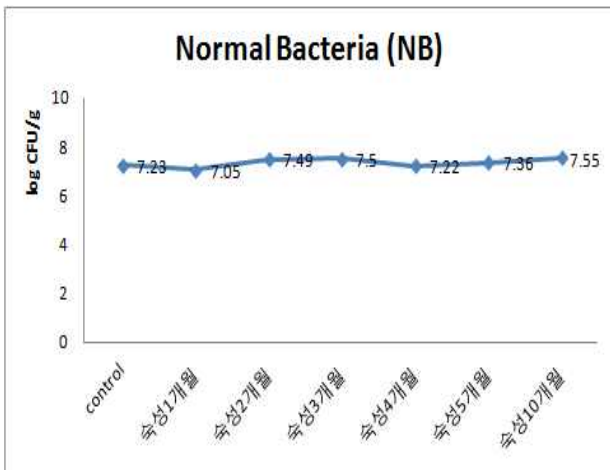


Fig. 15 Viable cell numbers graph of *gochujang* at 20% salt condition.

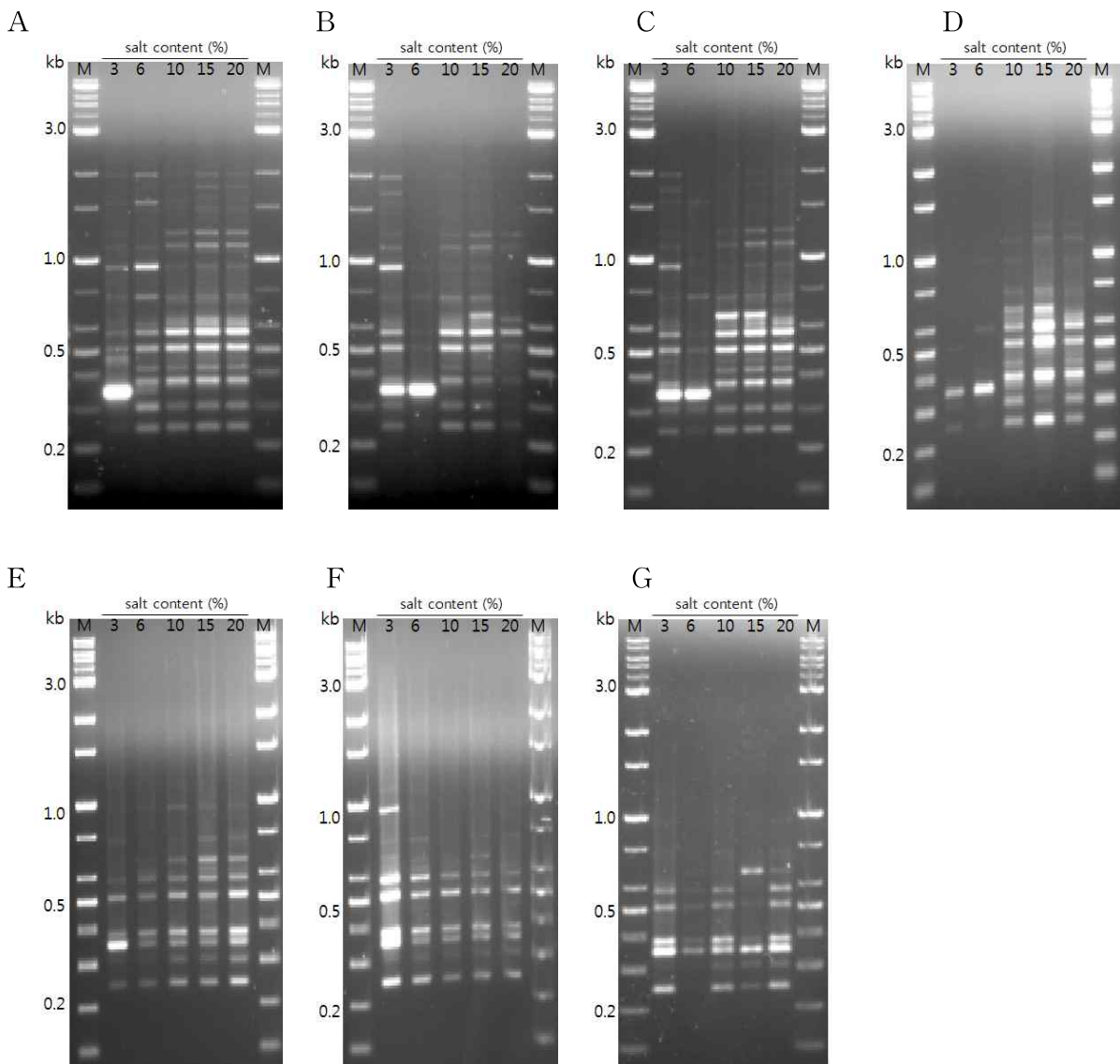


## (2) 고추장 미생물의 Total DNA 분리와 RAPD-PCR 분석

동일한 숙성 기간에 고추장의 염도에 따라 달라지는 메타지놈의 차이를 쉽게 비교하기 위하여, 숙성 기간별로 나누어 RAPD-PCR을 진행하였다. PCR 과정을 통하여 증폭된 DNA 단편의 크기는 0.2kb와 3.0kb 사이에서 나타났고, 시료마다 단편의 수는 4개부터 16개까지 다양하게 확인되었으며, 숙성 기간에 따라 염도별로 다른 단편 양상을 보여주었다(Fig. 16). RAPD 방법을 이용하여 얻어진 DNA 단편 양상에 대해 Fingerprinting II Informatix software를 이용하여 UPGMA dendrogram을 나타내어, 같은 숙성 기간 내 염도 별 고추장 시료의 유전체에 대한 유사도를 확인하였다(Fig. 17). 우선, 숙성 직후의 염도별 고추장 시료에서 10%, 15%, 20%는 서로 96.4-98.7%의 높은 유사도를 보였다. 반면에, 3%와 6% 염도 고추장은 각각 10% 염도 고추장과 유사도가 77.4%, 53.6%에 불과했으며, 이 두 시료의 유사도 또한 65.5%로 낮게 나타났다. 숙성 1개월에 10% 염도 고추장은 15% 염도 고추장과 94.8%의 높은 유사도를 보였고, 20% 염도 고추장과는 78.3%로 비교적 낮은 유사도를 나타내었지만 한 그룹으로 유집 되었다. 반면에, 3%와 6% 염도 고추장은 서로 88.2%의 유사도를 보이며 가까운 유연관계를 나타내었지만, 28.7-45.7%의 유사도를 보이면서 나머지 염도 고추장 시료와는 상당히 먼 유연관계를 가졌다. 숙성 2개월에도 비슷하게 10%, 15%, 20% 염도 고추장은 88.5-97.1%의 높은 유사도를 나타냈지만, 3%와 6% 염도 고추장은 93.1%의 유사도를 보이면서 10% 이상의 고추장 시료와는 50% 이하의 낮은 유사도 가졌다. 숙성 초기에 3%, 6% 염도 고추장이 가까운 유연관계로 한 그룹으로 구분되고, 10%, 15%, 20% 염도 고추장이 또 다른 그룹으로 구분된 것은 고추장의 초기 발효 미생물 군집과 상관이 있을 것으로 보이며, 염도별로 제조 시 첨가된 천일염에 존재하는 미생물과도 관련이 있을 것으로 보인다. 숙성 3개월에는 3% 염도 고추장이 10%, 15%, 20% 염도 고추장과 79.3-86.7%로 높은 유사도를 보이고, 숙성 4개월에는 6% 염도 고추장 역시 다른 염도들과 80% 이상의 상대적으로 높은 유사도 값을 가지며 5가지의 모든 시료끼리 가까운 유연관계를 나타내었다. 이를 보았을 때, 고추장 숙성 3개월, 4개월에는 5가지의 모든 염도의 시료에서 비슷한 발효 미생물 군집이 자라나는 것으로 사료된다. 숙성 5개월에는 시료마다 그룹으로 구분되지 않고 염도의 차이가 클수록 유사도가 낮아지는 경향을 보였는데, 염도가 가장 높은 20% 염도 고추장을 기준으로 15% 염도 고추장과는 93.8%, 10% 염도 고추장과 92.1%, 6% 염도 고추장과 83.1%, 3% 염도 고추장과는 69.1%의 유사도를 나타내었다. 이때부터 염도의 차이가 미생물 군집 형성에 직접적인 영향을 주는 것으로 추측된다. 발효가 많이 된 숙성 10개월에는 다시 숙성 초기와 마찬가지로 두 그룹으로 나뉘어 10%, 15%, 20% 염도 고추장이 83.8-91.6%의 높은 유사도를 나타내었고, 3%와 6% 염도 고추장은 10% 이상의 고추장 시료들과 38.1-66.9%으로 숙성 기간 중 가장 낮은 유사도 가지면서 두 시료의 유사도 또한 65.3%로 낮게 나타났다. 숙성 후기에 3%와 6% 염도 고추장이 다른 시료들과는 먼 유연관계를 보여주었는데, 이는 재래식 고추장의 평균적인 염도보다 높은 10%, 15%, 20% 염도 고추장은 상대적으로 서로 유사한 미생물 군집이 생장하고, 염도가 낮은 3%와 6% 염도 고추장은 일반적인 고추장에서와는 다른 미생물이 군집을 이루는 것으로 판명된다. 염도가 낮기 때문에 부패 미생물의 생장이 용이했을 것으로 추측된다.

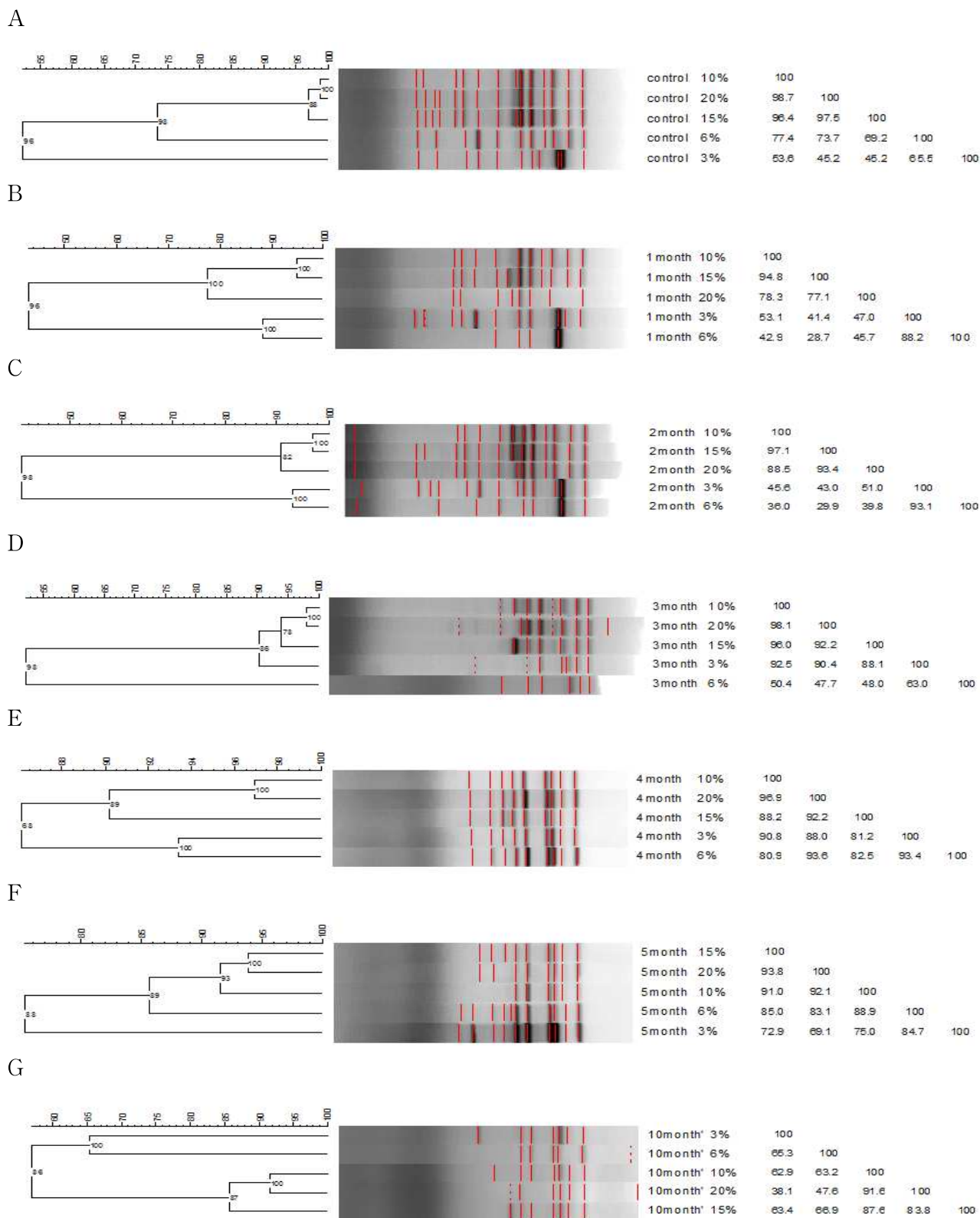
전 숙성기간을 통해 3%와 6%는 나머지 염도 고추장과는 다른 증폭된 DNA 단편 양상을 보여주었으며, UPGMA dendrogram에서 10%, 15%, 20% 염도 고추장끼리는 아주 가까운 유연관계를 가지는 반면에, 3%와 6% 염도 고추장은 먼 유연관계를 보인다. 제조되는 염도에 큰 편차가

있지만 평균적으로 제조되는 고추장은 7% 이상의 염도를 가지는 연구를 근거로 하여, 이보다 높은 염도를 가지며 대부분의 숙성 기간에 한 그룹으로 clustering 되었던 10%, 15%, 20% 염도 고추장은 정상적인 발효 미생물 군집이 존재하는 것으로 보인다. 그러나 3%와 6% 염도 고추장은 일반적인 재래식 고추장의 전체 미생물 군집과 다른 양상을 가지는 것으로 사료된다. 그러므로 3%와 6% 염도 고추장은 고추장 발효와는 관계없는 미생물 군집이 성장하는 것으로 추측되며, 정상적인 미생물 발효를 통해 고추장을 숙성시키기 위한 최저 식염 농도는 10%가 가장 적합하다는 결론을 얻었다.



**Fig. 16** RAPD profiles showing polymorphism amplified DNA isolated in *gochujang* during fermentation.

(A) 0 month, (B) 1 month, (C) 2 month, (D) 3 month, (E) 4 month, (F) 5 month, (G) 10 month of fermentation time. Lane M; DNA size marker.



**Fig. 17** The result of cluster analysis of DNA isolated in *gochujang* during fermentation based on RAPD pattern.

(A) 0 month, (B) 1 month, (C) 2 month, (D) 3 month, (E) 4 month, (F) 5 month, (G) 10 month of fermentation time.

#### 4. 이화학적 특성 및 향미 변화에 대한 연구

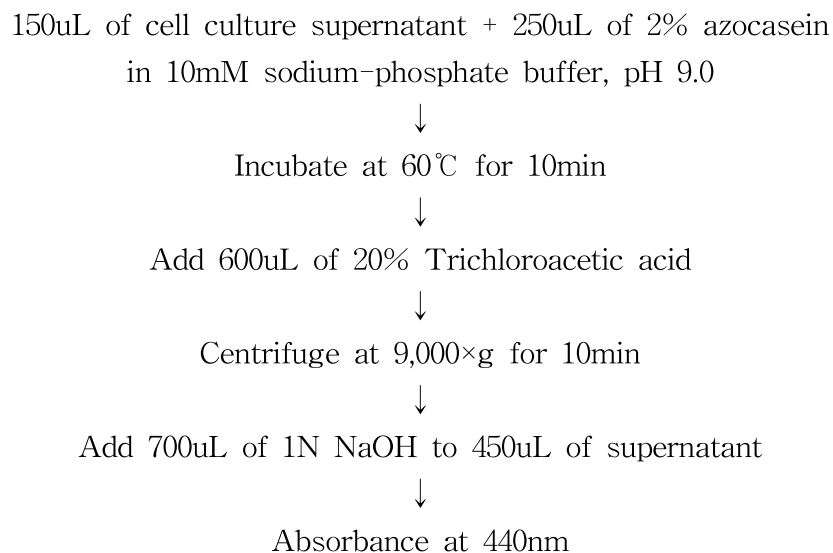
##### 가. 실험 방법

###### (1) 환원당 측정

간장, 된장의 환원당 함량은 dinitrosalicylic acid(DNS)법으로 측정하였다. 각 시료의 간장과 된장을 20배로 희석하여 F1004.filter paper를 이용해 filtering 해주었다. 그 후 각 시료는 1.5 mL vial tube에 0.5 mL씩 각각 담아주고 Preparation(Dinitrosalicylic acid 0.5 g, NaOH 8.0 g, Rochell Salt(potassium sodium tartarate) 150 g, D.W 500 mL)을 1mL씩 가해준 뒤, Water bath(80℃)에서 10 min동안 반응시켜 주었다. 반응 후 각 tube들은 흐르는 냉각수에 cooling 시켜준 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

###### (2) Protease 활성 측정

단백질 분해효소의 활성은 Beynon과 Bond에 의한 azocasein법을 변형하여 사용하였다. 단백질 분해효소 활성 측정을 위한 기질로는 azocasein(Sigma 사, St. Louos, USA)을 사용하였다. Azocasein 2g을 10mM sodium phosphate buffer(pH 7.2) 200mL에 현탁한 후 azocasein 기질 용액 250uL를 60℃에서 5분간 예열시킨 후 조효소액 150uL를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시켜 azo기를 유리시켰다. 여기에 20% trichloro acetic acid 600uL를 가하여 잔존활성을 실험시키고 반응되지 않은 azocasein은 침전시켜 9000xg에서 10분간 원심분리 후 제거하고 상등액 450uL에 1N NaOH 700uL를 혼합하여 440nm에서 흡광도를 측정하였다.(Fig. 18) 이때 효소 활성도 1unit은 10분간 반응에 의하여 유리되는 azo기에 의해 440nm에서의 흡광도를 0.001증가시키는 양으로 정하였다.



**Fig. 18** Measurement of protease activity using azocasein



### (3) 된장과 간장의 향미 성분 분석

향기성분 분석은 Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method를 사용해 GC-MS(Agilent 6890N, Agilent 5973 network mass selective detector, MSD. Agilent Co, Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다. SPME Fiber는 50/30 $\mu$ m DVB/Carbpxen<sup>TM</sup>/PDMS Stable Flex<sup>TM</sup> for Manual Holder gray를 사용하였다. column은 DB-5ms(60m length $\times$ 0.25mm I.D $\times$ 0.25  $\mu$ m film thickness: J&W Scientific, Folsom, CA, USA)을 이용하였다. Carrier gas는 헬륨을 1.0mL/min씩 흘려보냈으며, Ionization voltage은 70eV m/z의 범위는 33~350, Injector temp 200 $^{\circ}$ C, Detector temp 250 $^{\circ}$ C와 같은 조건으로 하였다. 20ml SPME vial에 시료 간장 3ml과 된장 3g을 각각 넣어 준 뒤 Water bath를 이용해 40 $^{\circ}$ C의 온도에서 30min 동안 equilibrium 시켜 준 뒤, equilibrium state의 vial에 SPME를 1cm찔러주어 30min 동안 adsorption 시켜주었다. adsorption 된 SPME를 GC-MS injector에 3.5cm찔러주어 10min동안 desorption 시켜주었다. Oven temp setting은 40 $^{\circ}$ C에서 5min 유지하며 200 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min의 속도로 온도를 올려주었 으며, 200 $^{\circ}$ C에서 20min동안 유지 해주었다.

### (4) 고추장의 향미 성분 분석

향기성분 분석은 전통 된장과 간장의 향기성분 분석과 마찬가지로 Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method를 사용하였으나 GC-MS는 다른 기종을 사용하였다. 이외의 시료의 전처리 과정이나 기계의 분석 조건은 유사한 조건으로 시행하였고, 이 때 사용한 Gas chromatography의 분석 조건을 **Table 13.**에 나타내었다. SPME method에 의해 포집되어 분리된 향기 물질의 단일 성분들에 대한 피크에 대해 질량 스펙트럼의 패턴 및 크기를 측정하여 정성·정량 분석하기 위해 탈착되어 분리된 향기 물질들을 Gas Chromatography-mass spectrometry(GC/MS)로 재차 분석하였고, 이 때 사용한 GC-MS는 GC(Agilent 7890A GC, Agilent, Palo Alto, CA, USA)에 detector인 MSD (Agilent 5975C, Agilent Co, Palo Alto, CA, USA)가 직접 연결된 mass spectrometer를 사용하였으며, 이 때, GC-MS의 분석 조건을 **Table 14.**에 나타내었다. GC/MS에 의해 결정된 분자량과 분자이온에 따라 질량 스펙트럼으로 분리된 향기성분의 Total ionization chromatogram(TIC)의 피크 성분은 mass spectrum library(NIST05a)와 GC/MSD에서 확인된 Retention Indices(RI)에 근거하여 분석하였으며, 이를 통해 스펙트럼에 나타난 피크에 따른 향기성분을 동정하였다.

**Table 13.** Operating condition of gas chromatography in SPME method

Parameters	Conditions
Instrument	GC-MSD, Agilent 7890A
Column	CPWax-52CB fused silica capillary column (50m X 0.32 $\mu$ m)
Oven temp.	40 $^{\circ}$ C (5min) $\rightarrow$ (5 $^{\circ}$ C $\uparrow$ /min) $\rightarrow$ 200 $^{\circ}$ C (20min)
injector temp.	200 $^{\circ}$ C
Detector temp.	250 $^{\circ}$ C
Carrier gas	He, 1.0mL/min
Split ratio	splitless mode

**Table 14.** Operating condition of gas chromatography and mass spectrometry.

Parameters	Conditions
Instrument	GC chromatograph, Agilent 7890A
Detector	Agilent 5975C
injector temp.	200 $^{\circ}$ C
Detector temp.	250 $^{\circ}$ C
Electron voltage	70 eV
Mass range	33-350 m/z
flow rate	He, 1.0mL/min
Split ratio	splitless mode
Library	mass spectrum library(NIST05a)

## 나. 실험 결과

### (1) 환원당 측정

간장의 환원당 함량은 **Table. 15**과 **Fig. 19**에 나타냈으며, 된장의 환원당 함량은 **Table. 16**와 **Fig. 20**에 각각 나타냈다.

간장의 환원당 값에 경우 발효기간 2개월까지 15%와 19% 염농도의 경우 0.208~0.290ABS 값으로 4%, 8%, 12% 염농도 0.011~0.043ABS값의 비해 많은 양의 환원당이 증가 되는 경향을 나타냈으며, 이후 6개월까지 15%와 19%의 환원당 값이 급격히 감소되기 시작했으며, 발효 6개월이 지났을 때는 그 값의 양이 처음 3개월간의 발효과정에 비해 많은 차이를 보이지 않았다. 오히려 발효 4개월 이후부터는 4%염농도 간장의 환원당의 양이 높게 나타나는 결과를 보였다. 환원당의 증가는 미생물이 분비하는 amylase가 전분질을 당류로 전환시키는 것과 관련되고, 감소는 생성된 당분이 미생물의 영양원이나 알콜 발효 및 유기산 발효의 기질로 이용되었기 때문으로 보인다. 발효 2개월까지 4%, 8%, 12%의 경우 활발한 미생물의 생육 및 알콜 발효, 유기산 발효로 인해 환원당의 값이 변화가 없어 보이며, 15%, 19%의 경우 amylase의 의한 전분질 분해에는 큰 영향을 끼치지 않지만 높은 고염성으로 인해 환원당을 이용함에 있어 영향을 준 것으로 보인다. 하지만 4개월 이상의 지속적인 발효과정이 진행됨에 따라 전체적인 환원당의 수치가 염농도의 관계없이 비슷하게 나타나게 되는 것을 확인할 수 있었다. 4%의 경우 발효 8개월 때에 환원당의 값에 수치가 가장 높게 나타났는데, 낮은 염도의 의해 기존의 미생물외에 다른 추가적인 미생물의 생육에 의한 amylase 생성 또는 실험 중 나타난 오차에 의한 결과 값으로 보인다. 발효기간에 따른 전체적인 미생물의 분포변화에 관한 추가적으로 연구가 필요할 것으로 보인다.

된장의 환원당 값에 경우 발효기간 4개월까지는 전체적으로 환원당의 값이 증가되는 경향을 보였으며, 이중 19%가 가장 높은 수치를 4%가 가장 낮은 수치를 나타냈다. 19%, 15%, 12%, 8%, 4% 염농도 순으로 각각 0.484, 0.401, 0.216, 0.121, 0.073ABS 값을 나타내었다. 4개월 이후부터는 환원당의 수치에 변화가 거의 없어 보였으며, 발효 8개월 때에는 가장 높은 수치를 나타냈던 19%와 15%의 값이 감소된 값을 보여주었다. 된장 발효 시 간장과 마찬가지로 전분질 원료의 분해에 의해 환원당이 생성되는데 생성속도가 미생물에 의해 이용되는 속도보다 높으면 총 함량이 증가하게 된다. 이는 높은 염농도에 따라 환원당의 수치가 높게 나타나는 것으로 보아 염농도가 전분질분해에는 크게 영향을 주지 않지만, 환원당을 이용하는 미생물의 소비과정에는 영향을 주는 것으로 보인다. 또한 지속되는 발효과정 후에는 높은 수치의 염농도에서도 전분질 원료가 소진되는 경향을 보이는 것으로 나타났다. 이는 간장의 환원당 값과의 수치 비교에도 비슷한 결과를 나타냈다.

**Table 15.** Reducing sugar content of *ganjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month).

	Fermentation period (month)											
	1		2		3		4		6		8	
4%	0.020	± 0.000	0.037	± 0.002	0.056	± 0.008	0.100	± 0.002	0.067	± 0.001	0.155	± 0.010
8%	0.011	± 0.001	0.018	± 0.002	0.042	± 0.009	0.027	± 0.003	0.009	± 0.003	0.102	± 0.001
12%	0.048	± 0.007	0.043	± 0.005	0.027	± 0.002	0.021	± 0.004	0.010	± 0.000	0.087	± 0.003
15%	0.208	± 0.010	0.245	± 0.005	0.214	± 0.007	0.117	± 0.003	0.059	± 0.005	0.088	± 0.002
19%	0.254	± 0.003	0.290	± 0.002	0.205	± 0.009	0.074	± 0.004	0.020	± 0.001	0.078	± 0.003

**Table 16.** Reducing sugar content of *deonjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month).

	Fermentation period (month)											
	1		2		3		4		6		8	
4%	0.041	± 0.016	0.050	± 0.006	0.082	± 0.004	0.073	± 0.005	0.078	± 0.004	0.077	± 0.001
8%	0.057	± 0.002	0.067	± 0.014	0.091	± 0.003	0.121	± 0.003	0.098	± 0.006	0.103	± 0.004
12%	0.144	± 0.010	0.153	± 0.005	0.184	± 0.004	0.216	± 0.014	0.161	± 0.012	0.187	± 0.003
15%	0.180	± 0.002	0.215	± 0.016	0.298	± 0.008	0.401	± 0.017	0.460	± 0.011	0.348	± 0.003
19%	0.186	± 0.008	0.284	± 0.010	0.383	± 0.006	0.484	± 0.001	0.510	± 0.005	0.415	± 0.003

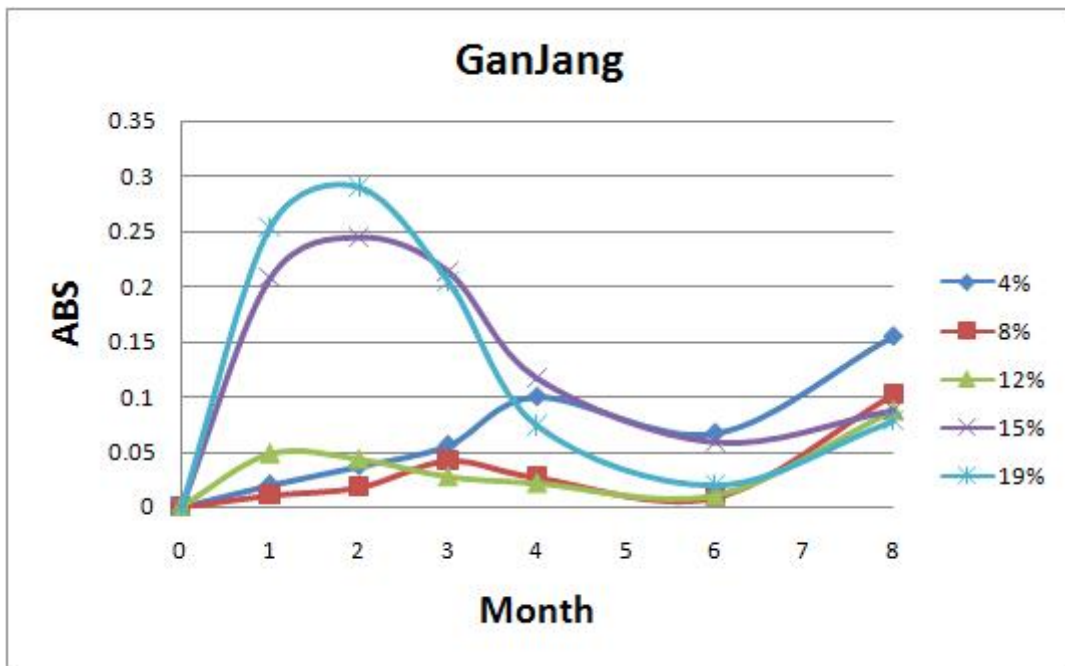


Fig. 19 Reducing sugar content of *ganjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month).

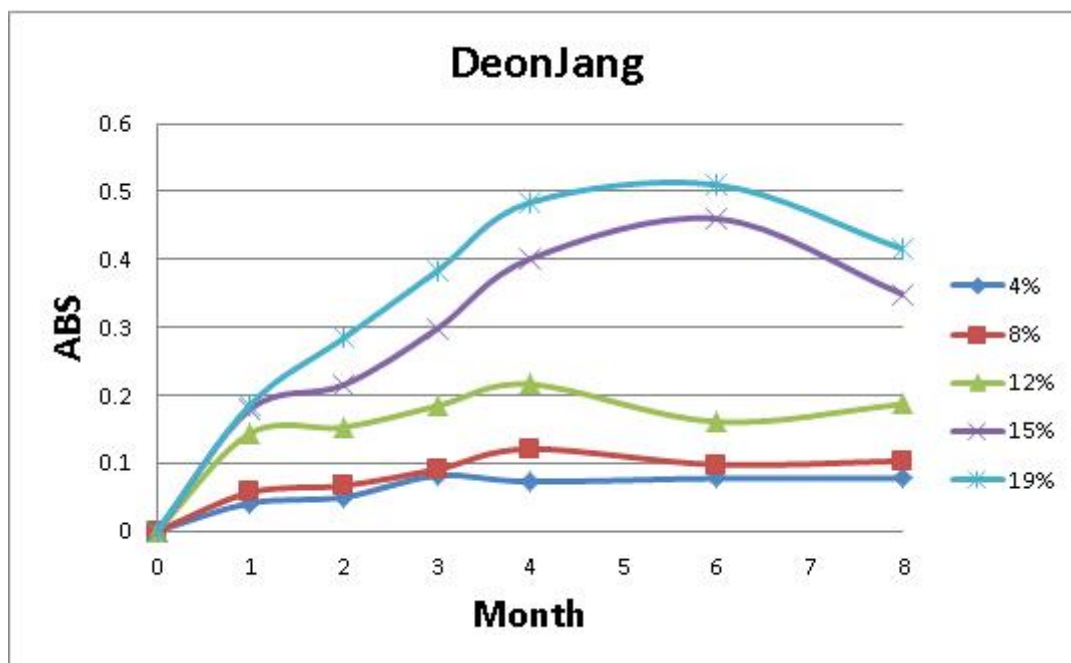


Fig. 20 Reducing sugar content of *deonjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month).

## (2) Protease 활성 측정

간장의 protease 활성 측정은 **Table. 17**과 **Fig. 21**에 나타냈으며, 된장의 protease 활성 측정은 **Table. 18**와 **Fig. 22**에 각각 나타냈다.

간장과 된장 각각 전체적으로 발효기간 6개월까지 protease 활성이 증가되는 것으로 나타났으며, 염농도가 높을수록 수치가 낮게 나타났다. 발효 6개월일 때 간장의 경우 각각 4%: 0.254, 8%: 0.195, 12%: 0.186, 15%: 0.179, 19%: 0.144 값을 보였으며, 된장의 경우는 각각 4%: 0.226, 8%: 0.168, 12%: 0.175, 15%: 0.146, 19%: 0.133 값을 나타냈다. 된장과 간장의 두 경우 모두 4개월 때에 활성 값이 감소되었지만, 이는 각 시료 내에 균들의 생육 분포에 따른 protease 활성 변화 또는 가용성 단백질이나 peptide단위의 단백질을 미생물의 영양원으로 이용되어 감소되어진 것으로 보인다. 이후 간장과 된장의 활성도가 다시 증가되어지게 되는데, 앞서 언급한바와 같이 이는 발효가 진행됨에 따라 균들의 생육 분포에 변화에 따르거나, 가용성 단백질이나 peptide가 아미노산으로 가수분해 과정이 진행됨에 따라 protease 활성도가 증가한 것으로 사료된다. 이는 추가적으로 발효 기간 내에 유기산의 함량에 대한 추가적인 연구가 필요해 보인다. 간장의 경우에는 발효 6개월일 때가 가장 큰 protease 활성도를 나타냈으며, 된장의 경우에는 6개월 이후에도 4%를 제외한 나머지 시료가 protease 활성도가 증가됨을 볼 수 있었다. 이 결과 값을 통해 염농도가 protease 활성도의 영향을 주는 것을 볼 수 있었으며, 이는 염농도가 높을수록 미생물들의 생육을 억제해 protease 활성을 감소시키는 것으로 사료된다.

**Table 17.** Protease activity of *ganjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month).

	Fermentation period (month)											
	1		2		3		4		6		8	
4%	0.078	± 0.004	0.161	± 0.011	0.197	± 0.006	0.174	± 0.010	0.254	± 0.008	0.174	± 0.010
8%	0.072	± 0.004	0.154	± 0.004	0.198	± 0.005	0.131	± 0.002	0.195	± 0.018	0.131	± 0.002
12%	0.075	± 0.002	0.157	± 0.004	0.190	± 0.016	0.109	± 0.008	0.186	± 0.013	0.102	± 0.008
15%	0.059	± 0.007	0.137	± 0.001	0.157	± 0.004	0.068	± 0.008	0.179	± 0.004	0.089	± 0.008
19%	0.057	± 0.007	0.130	± 0.003	0.137	± 0.004	0.042	± 0.010	0.144	± 0.016	0.042	± 0.010

**Table 18.** Protease activity of *doenjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month).

	Fermentation period (month)											
	1		2		3		4		6		8	
4%	0.103	± 0.010	0.160	± 0.012	0.197	± 0.012	0.177	± 0.021	0.226	± 0.011	0.182	± 0.005
8%	0.095	± 0.013	0.145	± 0.012	0.170	± 0.009	0.152	± 0.025	0.168	± 0.009	0.208	± 0.007
12%	0.094	± 0.001	0.145	± 0.012	0.143	± 0.005	0.137	± 0.005	0.175	± 0.002	0.210	± 0.010
15%	0.069	± 0.005	0.127	± 0.016	0.145	± 0.018	0.109	± 0.014	0.146	± 0.004	0.227	± 0.005
19%	0.047	± 0.009	0.116	± 0.016	0.143	± 0.017	0.080	± 0.014	0.133	± 0.006	0.194	± 0.017

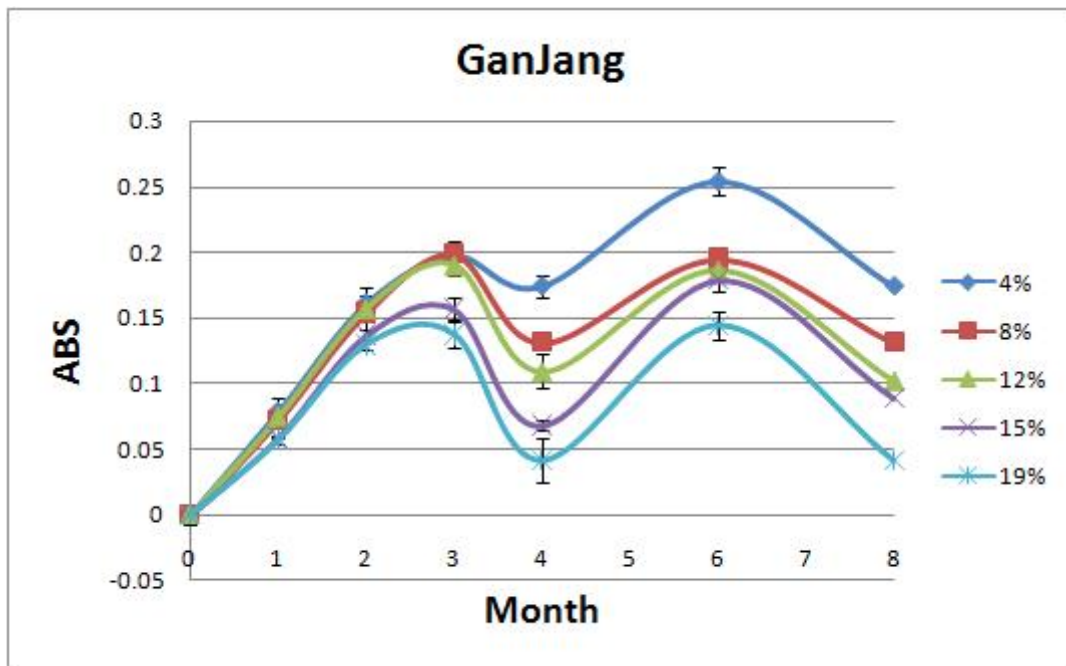


Fig. 21 Protease activity of *ganjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month).

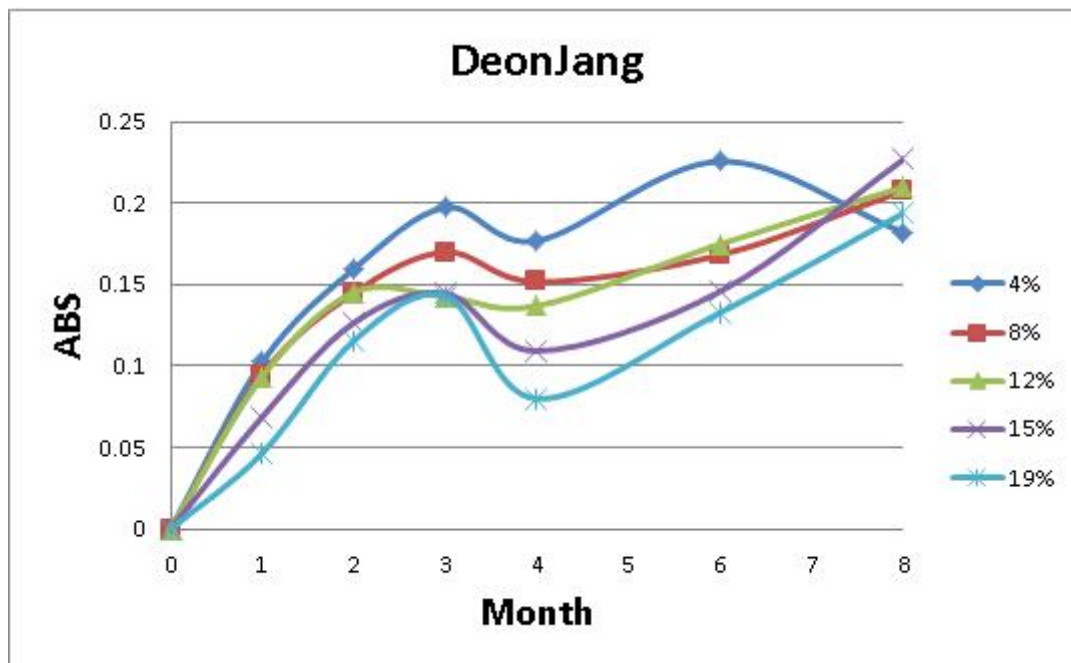


Fig. 22 Protease activity of *doenjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month).



### (3) 된장과 간장의 향미 성분 분석

간장과 된장의 주요 향기화합물들은 기존에 연구되어진 문헌들을 참고하여 **Table. 19**를 통해 나타내었으며, 본 실험은 이를 중심으로 각각의 시료들의 발효기간 중에 따른 향미 성분의 변화량 값을 SPME를 이용한 GC-MS통해 비교 분석하였다.

간장의 4%, 8%, 12%, 15%, 19% 염도 향미 성분 분석은 **Table 20, 21, 22, 23, 24**를 통해 각각 나타내었다. acetic acid의 발효기간 중 변화량을 살펴보게 되면(**Fig. 23**) 처음 발효기간 3개월 동안에는 저염성의 시료 일수록 더 많은 acetic acid를 생산하였으며, 이는 염의 의한 미생물의 생리활성저하 또는 초산발효가 아닌 젖산발효가 진행됨에 따라 나타난 수치적인 차이로 보인다. 하지만 3개월 이상의 발효가 진행됨에 따라 다른 시료들의 acetic acid 생산량이 늘어나게 되었고, 4개월 이후부터는 4% 간장이 가장 낮은 생산량을 보였다. 향미 성분 내 acetic acid는 소량 또는 희석 됐을 때에 단과일향과 과일배향을 내는 화합물로서 많은 양을 생산 시에는 오히려 풍미저하를 가져올 수 있다. 저염성 4% 간장 시료는 acetic acid외에도 benzaldehyde와 phenethyl alcohol에서 초기의 다른 시료들에 비해 월등히 많은 생산량을 보여 주었다(**Fig 24, 25**). benzaldehyde는 crush bitter almond향을 띄며, 간장에 기호도에 있어 긍정적인 측면을 보이는 생산물이다. 특히 phenethyl alcohol의 경우에는 hydrocarbon odor를 내는 화합물로서 대장균등의 세균세포 표면에 작용하여 DNA복제의 초기 단계를 특이적으로 저해하며, 장미유 등에 함유되어 있는 향료성분중 하나이다. 이 화합물은 4% 시료 외에서는 생성되어지지 않았는데 이는 다른 시료의 경우에는 높은 염의 의해 다른 외부 균들의 생육을 억제할 수 있지만, 그렇지 못한 4%시료내 미생물들이 상대적으로 생육하기위해 생산한 것으로 보여진다. 그 외에도 3-octanol의 수치가 높게 나타났는데, 3-octanol은 대두 특유의 풋내를 내는 흙냄새 화합물로서 대두의 발효과정이 늦어 질 경우에 많이 발생한다.

반면 Pyrazin group의 경우에는 고염성의 시료 내에서 생산량이 높게 나타났는데, dimethyl pyrazine과 trimethyl pyrazine은 된장과 간장내에서 특유의 향에 크게 기여하는 화합물로 알려져 있는데, 저염성 간장의 경우에는 이 화합물의 양이 현저히 차이 나는 것을 볼 수 있으며 (**Fig 26, 27**), 그 외에 1-octen-3-ol와 2-hydroxy benzoic acid에 경우에는 염농도와 관계없이 생산되는 것을 확인 할 수 있다. 1-octen-3-ol의 화합물은 버섯향을 2-hydroxy benzoic acid의 화합물에서는 달콤한 과일향을 띄게 된다.(**Fig. 28, Fig. 29**) 전체적으로 발효초기에는 19%의 고염성 간장이 가장 많은 향미성분들을 생산하는 것으로 보였지만 발효기간이 길어짐에 따라 전체적으로 pyrazine류를 제외한 화합물에서 비슷한 양의 생산량을 나타내는 것을 볼 수 있었다.

다음으로 4%, 8%, 12%, 15%, 19%의 된장의 향미분석은 **Table 25, 26, 27, 28, 29**에 나타내었다. 된장은 간장에 비해 전체적으로 더 많은 양의 향미 화합물이 생성되었으며, 간장과 마찬가지로 염농도에 따른 화합물 생산의 차이를 보여주고 있다. 먼저 acetic acid를 살펴보게 되면, 앞서 내용과 같이 3개월 까지 전체적으로 acetic acid의 양이 증가되었으며, 이중 4% 된장의 값이 가장 크게 나타났다. 이후 발효기간이 지남에 따라 (**Fig. 30**) 전체적으로 비슷한 양의 acetic acid를 생산하는 것을 볼 수 있었다. 이 수치 또한 염에 의한 균의 생리활성저하 또는 초산발효보다 젖산발효가 더 진행됨에 따라 나타난 수치적 차이로 보인다. Pyrazin group의 경우 또한 마찬가지로 고염성의 시료 내에서 생산량이 높게 나타났는데, dimethyl pyrazine과 tetramethyl pyrazine이 염의 농도가 높을수록 높게 나타났고, trimethyl pyrazine의 경우에는

반응초기를 제외하고는 많은 양의 차이를 보이지는 않았다.(Fig. 31, 32, 33) 이는 간장과 비교에 보았을 때에도 다른 결과의 수치를 볼 수 있었는데, 간장의 경우 tetramethyl pyrazine의 경우는 오히려 저염성의 시료내에서 높은 수치를 보여주었고, 남은 2가지 종류에 pyrazine내에서 큰 차이가 나는 반면, 된장에 경우에는는 전체적으로 pyrazine의 양이 더 많은 수치를 보였으며, 이중 trimethyl pyrazine에 경우가 저염성 된장과 크게 차이나지 않는 값을 보여주었다. 된장의 발효가 진행됨에 따라 간장에 비해 pyrazine류가 많이 생성되는 것을 볼 수 있었으며, 간장과 마찬가지로 pyrazine이 생성됨에 있어 염의 농도가 pyrazine의 생성함에 있어 영향을 주는 것으로 보여진다. 그 외에 benzaldehyde와 phenethyl alcohol, 2-pentyl-furan의 경우에는는 간장과 마찬가지로 저염성의 된장의 값이 높게 나타났고, 간장과 마찬가지로 1-octen-3-ol과 2-hydroxy benzoic acid에 경우에는 염농도와 관계없이 생산되는 것을 확인 할 수 있다. 1-octen-3-ol의 화합물은 버섯향을 2-hydroxy benzoic acid의 화합물에서는 달콤한 과일향을 띄게 된다.

**Table 19.** Main aroma compounds of *ganjang* and *doenjang*.

RI	Compound	Flavor
600	acetic acid	sweet-fruity taste
650	3-methyl butanal	malt
806	2,3-butanediol	sweet fruit
892	dimethyl pyrazine	nut, peanut butterm
960	benzaldehyde	amound, burnt sugar
974	dimethyl trisulfide	onion
983	1-octen-3-ol	mushroom
993	2-pentyl-furan	green bean, butter
996	3-octanol	earth
1004	trimethyl pyrazine	nutty
1043	benzeneacetaldehyde	pungent
1060	Phenethyl alcohol	hydrocarbon odor
1095	tetramethyl pyrazine	pungent
1270	2-hydroxy-benzoic acid	pungent

**Table 20.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *ganjang* of 4% salinity concentration.

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	65630377	51413835	22806888	0	0	2320763
2	650	methyl butanal	0	14483691	29478983	0	11657838	9657505
3	806	2,3-butanediol	6671147	3933919	1949359	0	0	0
4	892	dimethyl pyrazine	0	0	0	0	0	0
5	960	benzaldehyde	16649292	303904051	184094610	0	96191019	35645310
6	974	dimethyl trisulfide	0	0	21659475	8537639	31131435	21115084
7	983	1-octen-3-ol	45230497	84473853	68926960	40324969	43186996	69516245
8	993	2-pentyl-furan	6333749	12839366	25728124	9806898	13625881	24638228
9	996	3-octanol	13804150	18947943	29113387	24957186	24557441	17477028
10	1004	trimethyl pyrazine	0	0	0	0	0	0
11	1043	benzeneacetaldehyde	3067175	4978506	5097179	0	0	0
12	1060	tetramethyl pyrazine	85630377	51413835	22806888	4333260	0	2320763
13	1095	phenethyl alcohol	4084156	454515738	153268927	18013901	43034699	55278911
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	4142684	17352920	12392992	9409923	2342268	1290439

**Table 21.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *ganjang* of 8% salinity concentration.

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	55457294	12678723	0	4733260	0	0
2	650	methyl butanal	15686207	12368489	0	0	0	0
3	806	2,3-butanediol	4073864	812640	0	0	0	0
4	892	dimethyl pyrazine	0	0	0	0	0	0
5	960	benzaldehyde	6436318	37608155	141986393	13611553	68839662	47524210
6	974	dimethyl trisulfide	0	0	0	6035118	0	0
7	983	1-octen-3-ol	17868300	21213691	47791325	43130086	36134673	105953661
8	993	2-pentyl-furan	6972296	4237090	21802123	34504611	5255048	30843541
9	996	3-octanol	0	0	0	0	0	4806330
10	1004	trimethyl pyrazine	2209911	0	0	0	0	0
11	1043	benzeneacetaldehyde	2912157	2496701	0	0	0	0
12	1060	tetramethyl pyrazine	65457294	12678723	0	4733260	0	0
13	1095	phenethyl alcohol	0	27708967	18696056	12798241	8277951	20458583
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	4218129	12405361	14559466	16880764	7255826	4241383

**Table 22.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *ganjang* of 12% salinity concentration

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	46426682	15805154	5609627	27360751	0	9986400
2	650	methyl butanal	17082514	25465101	0	0	3913184	1775382
3	806	2,3-butanediol	2197743	2804637	0	0	0	0
4	892	dimethyl pyrazine	2935483	25465101	415140620	63622455	83634744	46217451
5	960	benzaldehyde	5887850	14256224	91805383	27494832	41118343	24534981
6	974	dimethyl trisulfide	0	11208877	0	0	0	0
7	983	1-octen-3-ol	13748295	21145424	50681402	49250752	33687777	45370085
8	993	2-pentyl-furan	4768944	8870417	23604414	50886481	0	17728277
9	996	3-octanol	0	0	0	0	0	0
10	1004	trimethyl pyrazine	0	0	16996078	15943498	9250987	0
11	1043	benzeneacetaldehyde	3261431	8944568.5	4371070	0	0	0
12	1060	tetramethyl pyrazine	46426682	25805154	60962517	12014100	0	0
13	1095	phenethyl alcohol	0	0	16135023	9727742	0	8550185
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	4779255	17394256	31747592	46233318	9253669	3341530

**Table 23.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *ganjang* of 15% salinity concentration

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	9967357	27101656	0	13511260	0	0
2	650	methyl butanal	56544807	43050733	35617121	47508041	14157262	33286085
3	806	2,3-butanediol	2733444	1697415	0	0	0	0
4	892	dimethyl pyrazine	67499542	48207378	457754205	187514308	69177321	13824339
5	960	benzaldehyde	17572401	25216513	23304094	17116002	36183559	31546379
6	974	dimethyl trisulfide	0	0	0	0	0	15083753
7	983	1-octen-3-ol	15231832	36891522	50812716	43437260	30427973	84086322
8	993	2-pentyl-furan	0	0	0	0	0	0
9	996	3-octanol	0	0	0	0	0	0
10	1004	trimethyl pyrazine	8175462	7145413	14589354	61729888	33189329	34348851
11	1043	benzeneacetaldehyde	9206672	6932340	2193897	1340390	0	767040
12	1060	tetramethyl pyrazine	34967357	27101656	50321020	10345020	0	0
13	1095	phenethyl alcohol	0	9585584	18411373	74333352	56306027	47639609
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	8258612	31254562	62152136	73110550	6854420	9259723

**Table 24.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *ganjang* of 19% salinity concentration

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	26532607	19469372	760814	0	5733260	46340800
2	650	methyl butanal	87367817	88685010	57330177	18051216	28799000	28490063
3	806	2,3-butanediol	5111248	4800959	2864973	0	0	0
4	892	dimethyl pyrazine	39313349	52212960	665770261	708904102	742897648	568001614
5	960	benzaldehyde	24901866	43898513	119908274	33756890	94404101	40883383
6	974	dimethyl trisulfide	0	0	0	0	0	7923501
7	983	1-octen-3-ol	22581136	49170711	83581650	54975714	37084596	120837197
8	993	2-pentyl-furan	0	0	0	0	3014564	77275676
9	996	3-octanol	0	0	0	0	0	0
10	1004	trimethyl pyrazine	14506117	14590952	136015933	167088284	183646474	101750760
11	1043	benzeneacetaldehyde	14190985	8133795	1181203	0	0	0
12	1060	tetramethyl pyrazine	26532607	19469372	76081424	22040410	0	53411080
13	1095	phenethyl alcohol	0	9997495	57713023	56718560	31208873	84617760
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	8672288	28089214	86931289	146917272	21875645	22353698

**Table 25.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *doenjang* of 4% salinity concentration.

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	66521332	26873875	529515118	28016509	49260139	16046398
2	650	methyl butanal	35344337	41926965	152067812	17307943	74756799	21874602
3	806	2,3-butanediol	1413447	7015734	0	0	4931419	0
4	892	dimethyl pyrazine	0	0	0	0	879287	3642782
5	960	benzaldehyde	10353678	168361361	147910893	46386437	145580325	16895392
6	974	dimethyl trisulfide	0	0	0	0	8968671	2410381
7	983	1-octen-3-ol	87050155	89831777	60279733	53097864	74632608	41260071
8	993	2-pentyl-furan	7854780	23580461	18212845	17498253	25700750	13882700
9	996	3-octanol	10998785	7368275	0	2913901	4885202	3251962
10	1004	trimethyl pyrazine	0	0	0	0	13660701	6759886
11	1043	benzeneacetaldehyde	4517966	5551376	14929231	6226656	8903852.5	5470806
12	1060	tetramethyl pyrazine	6062549	7623265.5	11544501	5275380	11062246	5688437
13	1095	phenethyl alcohol	3795318	4772257	3215173	5997563	0	0
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	4279588	5528681	0	55479789	3090709	0



**Table 26.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *doenjang* of 8% salinity concentration.

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	115533227	125347592	445029469	94916487	31589768	26059691
2	650	methyl butanal	65034294	31472103	44989456	32295897	37173136	7423653
3	806	2,3-butanediol	7298335	4294607	10179306	0	3967638	0
4	892	dimethyl pyrazine	2298335	3294607	3179306	0	2967638	0
5	960	benzaldehyde	12214271	21239531	29780836	10429670	27910392	5610533
6	974	dimethyl trisulfide	0	0	0	0	1745321	0
7	983	1-octen-3-ol	26374283	29346826	38670258	30138394	22186957	10029292
8	993	2-pentyl-furan	7996036.5	18790928	20212100	33924424	22900273	11190364
9	996	3-octanol	0	5162106.5	10324213	0	0	0
10	1004	trimethyl pyrazine	0	0	0	12530964	12160464	6085365
11	1043	benzeneacetaldehyde	5125946	6000163	19164726	5689241	8275673	4187447
12	1060	tetramethyl pyrazine	9424649.5	11126484	13790572	17621390	14763033	5707541
13	1095	phenethyl alcohol	0	0	0	0	0	0
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	3345349	5481017	0	32296356	0	0

**Table 27.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *doenjang* of 12% salinity concentration.

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	46365574	44477981	344689651	223118836	200872296	126304452
2	650	methyl butanal	45162103	26234503	0	38695834	32738466	7635056.5
3	806	2,3-butanediol	2612521	0	7082714.5	0	0	3103523
4	892	dimethyl pyrazine	2612521	1510171	6082714.5	4071213	3221142	3103523
5	960	benzaldehyde	17798319	15636788	12127625	3610951.5	25347040	8410648
6	974	dimethyl trisulfide	0	0	0	0	0	0
7	983	1-octen-3-ol	19580568	18455102	21433675	11984349	27139887	16095718
8	993	2-pentyl-furan	8352869	12517407	19308711	27523967	25073968	12036391
9	996	3-octanol	0	0	0	0	0	0
10	1004	trimethyl pyrazine	0	0	8996078	15943498	9250987	6524313
11	1043	benzeneacetaldehyde	3949936	8939813	23670458	7140718.5	15068509	7551738
12	1060	tetramethyl pyrazine	6736551	7956783	10409893	3540498	8300912	6121195
13	1095	phenethyl alcohol	0	0	0	0	0	0
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	3643689	6171573	0	26572637	0	0

**Table 28.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *doenjang* of 15% salinity concentration.

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	0	44381685	124340163	74262902	45052676	48864625
2	650	methyl butanal	57492171	41260225	0	53557806	47766570	11060970
3	806	2,3-butanediol	0	0	6690588	0	4459776	0
4	892	dimethyl pyrazine	4127523	6214520	6690588	5412774	4459776	2142154
5	960	benzaldehyde	29301416	29198136	36313380	11686553	41181390	0
6	974	dimethyl trisulfide	0	0	0	0	8048790	0
7	983	1-octen-3-ol	18846812	16189857	24903144	33687655	30579932	6901932
8	993	2-pentyl-furan	5934521	11585583	6731640	8251413	17611110	4414360
9	996	3-octanol	0	0	0	0	0	0
10	1004	trimethyl pyrazine	3811051	4996834.5	10307483	12383672	12493938	7074456
11	1043	benzeneacetaldehyde	5645767	12337488	30075500	14976878	22847126	2620049
12	1060	tetramethyl pyrazine	14556165	14505412	18284457	11354133	13192676	2591336
13	1095	phenethyl alcohol	0	0	0	0	0	0
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	3150340	6849686	0	22587388	0	0

**Table 29.** Identified main aroma compounds by Head-space SPME(Solid Phase Micro Extraction) method in *doenjang* of 19% salinity concentration.

	RI	compound	Fermentation period (month)					
			1	2	3	4	6	8
1	600	acetic acid	68725259	52381044	37940796	39395758	42693178	47675087
2	650	methyl butanal	68725259	52381044	37940796	39395758	42693178	47675087
3	806	2,3-butanediol	0	0	8769812	0	7135232	5328871
4	892	dimethyl pyrazine	5412304	7456210	8769812	9764201	7135232	5328871
5	960	benzaldehyde	23608158	34566593	17405661	13018786	28579917	19490752
6	974	dimethyl trisulfide	0	0	0	0	4339852	2991503
7	983	1-octen-3-ol	25258452	27044150	28133992	43744944	43743204	35122334
8	993	2-pentyl-furan	5727164	12192598	4304424	0	11986333	9326311
9	996	3-octanol	0	0	0	0	0	0
10	1004	trimethyl pyrazine	8470853	9246424.5	15511954	15615732	19468378	4427327
11	1043	benzeneacetaldehyde	3818567	14893626	34481740	14574315	23351644	19844574
12	1060	tetramethyl pyrazine	26991352	32059026	28545774	36433833	28266632	23505692
13	1095	phenethyl alcohol	0	0	0	0	0	0
14	1270	2-hydroxy-benzoic acid	2973978	5963500	0	18919140	0	0

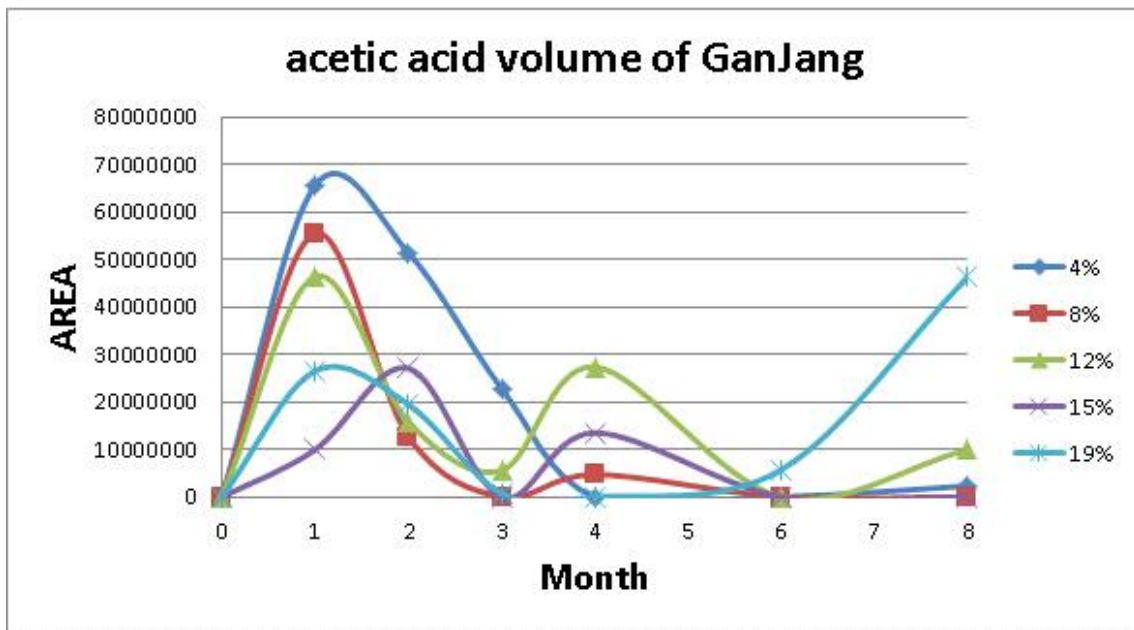


Fig. 23 Acetic acid volume of *ganjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS

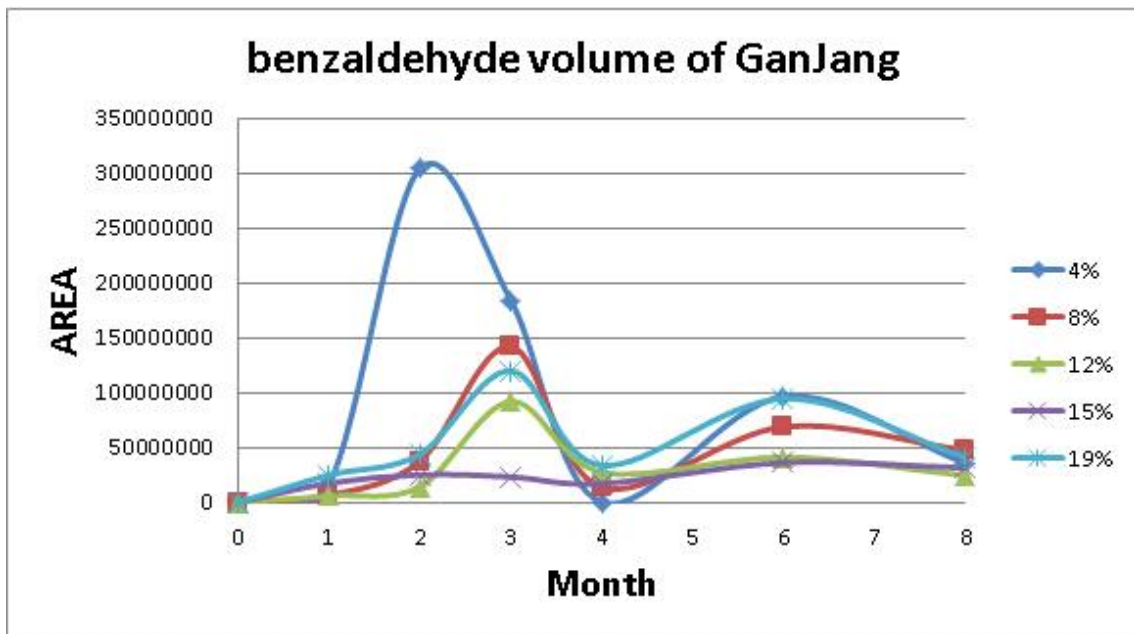


Fig. 24 Benzaldehyde volume of *ganjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.

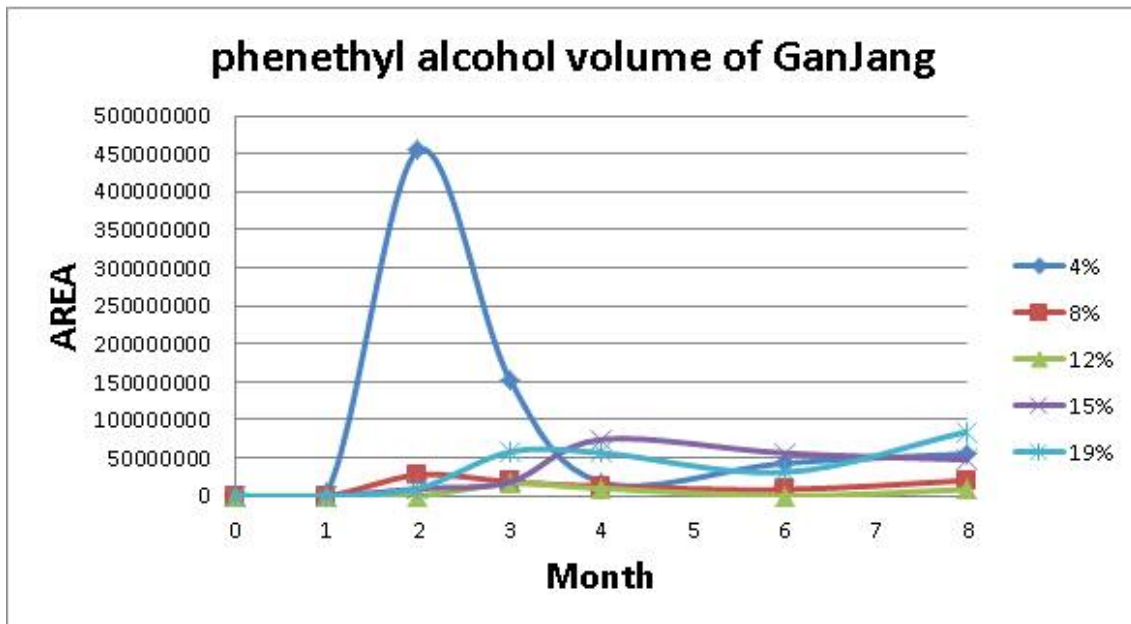


Fig. 25 Phenethyl alcohol volume of *ganjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.

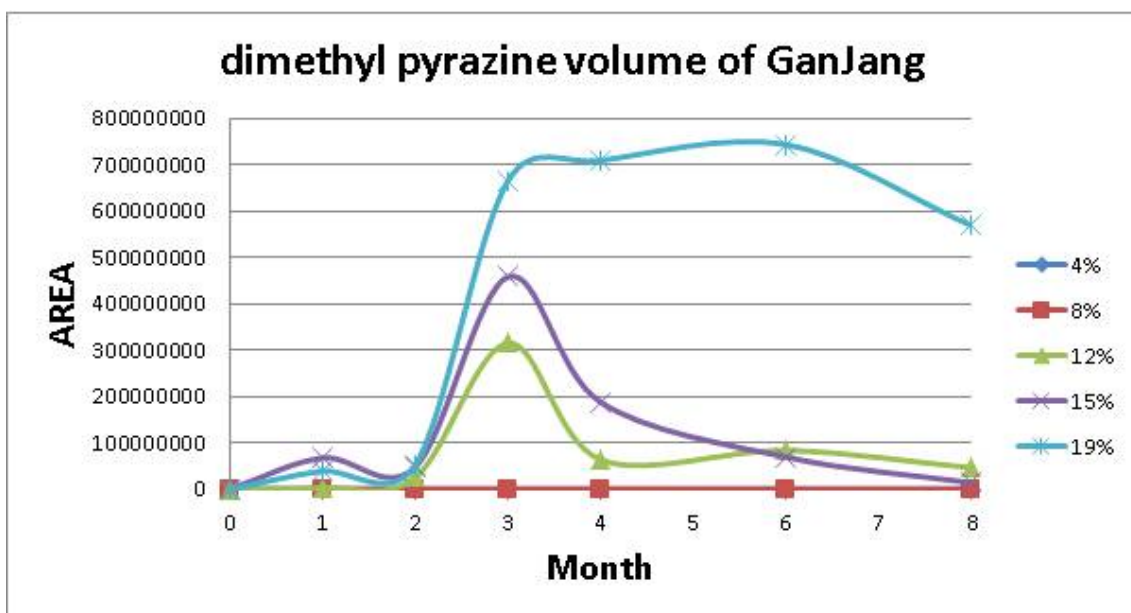


Fig. 26 Dimethyl pyrazine volume of *ganjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentations period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.

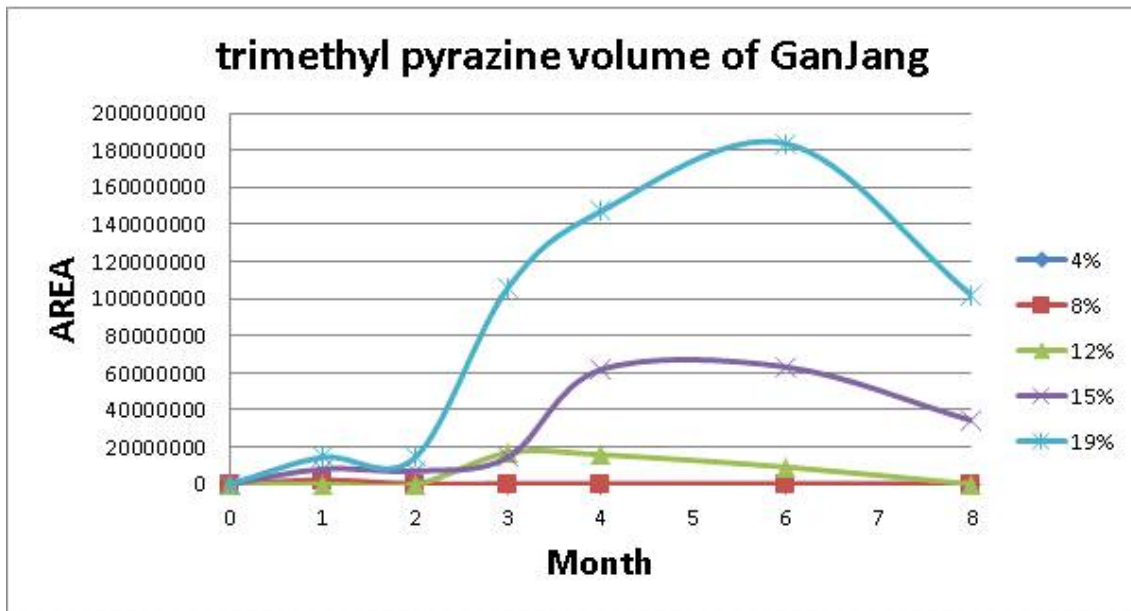


Fig. 27 Trimethyl pyrazine volume of *ganjang* with the addition of different concentrations of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.

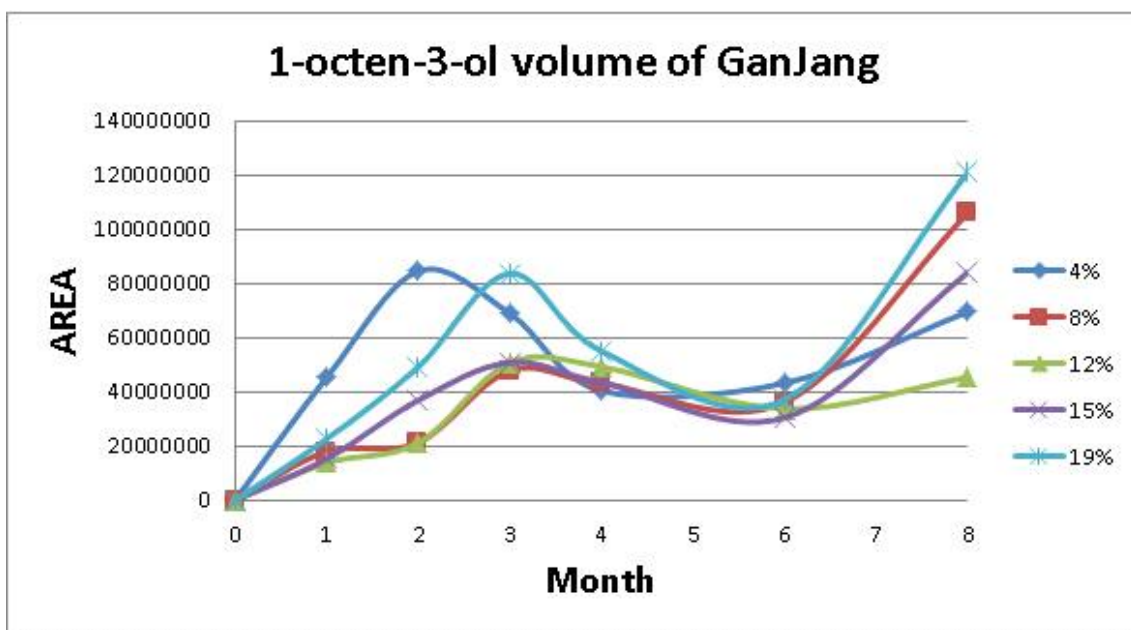


Fig. 28 1-Octen-3-ol volume of *ganjang* with the addition of different concentration of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.

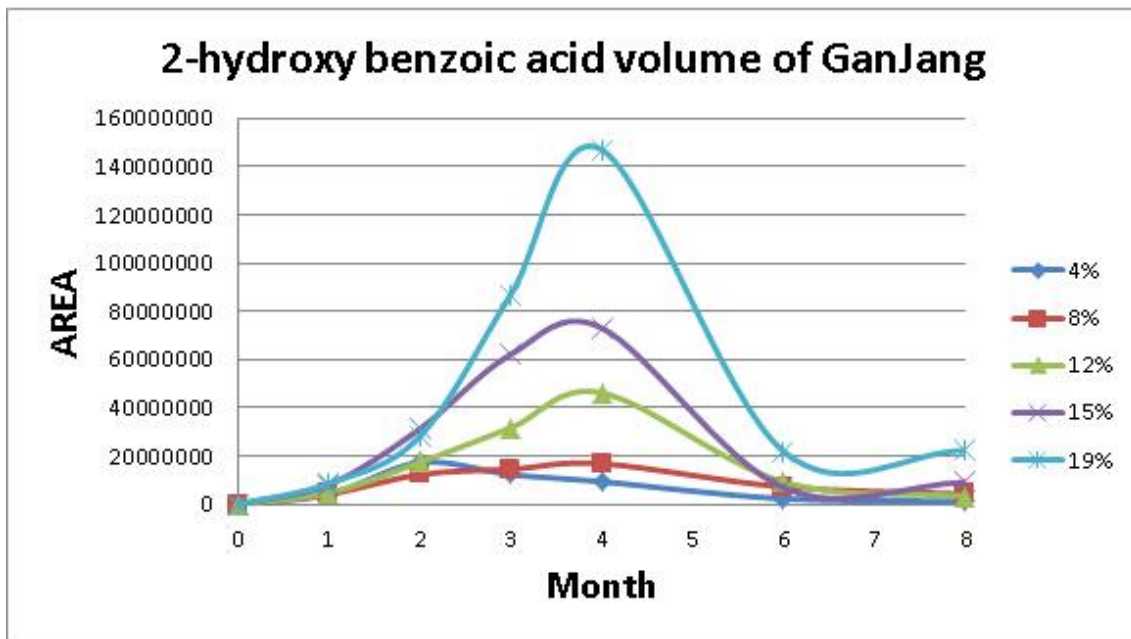


Fig. 29 2-Hydroxy benzoic acid volume of *ganjang* with the addition of different concentration of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.

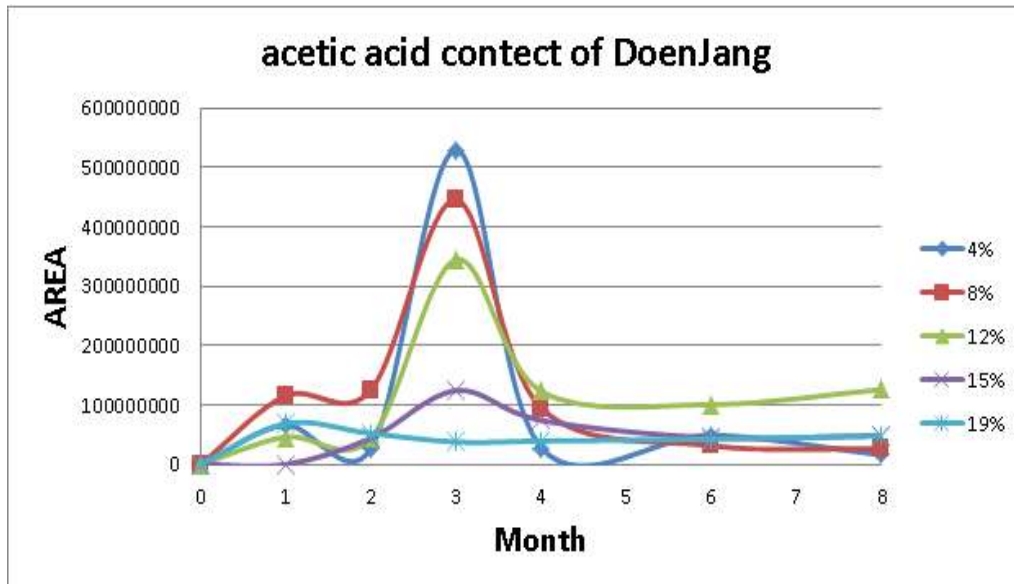


Fig. 30 Acetic acid volume of *doenjang* with the addition of different concentration of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.



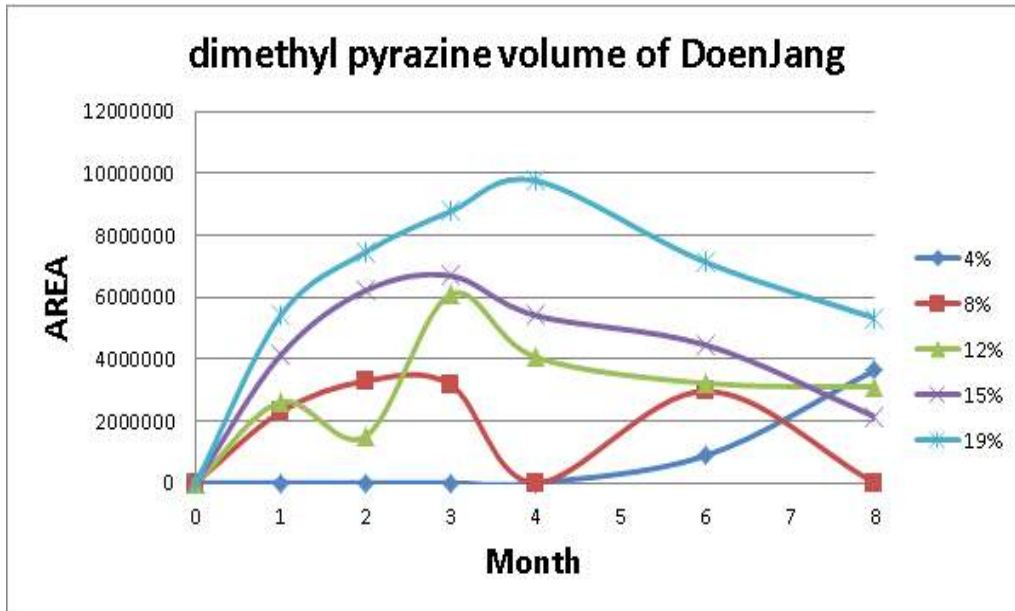


Fig. 31 Dimethyl pyrazine volume of *doenjang* with the addition of different concentration of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.

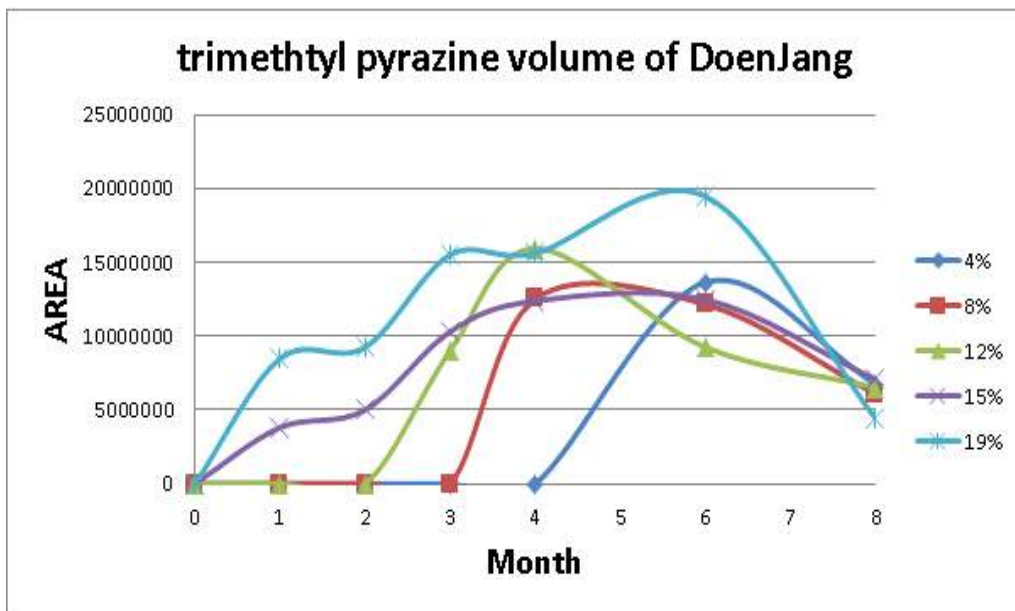
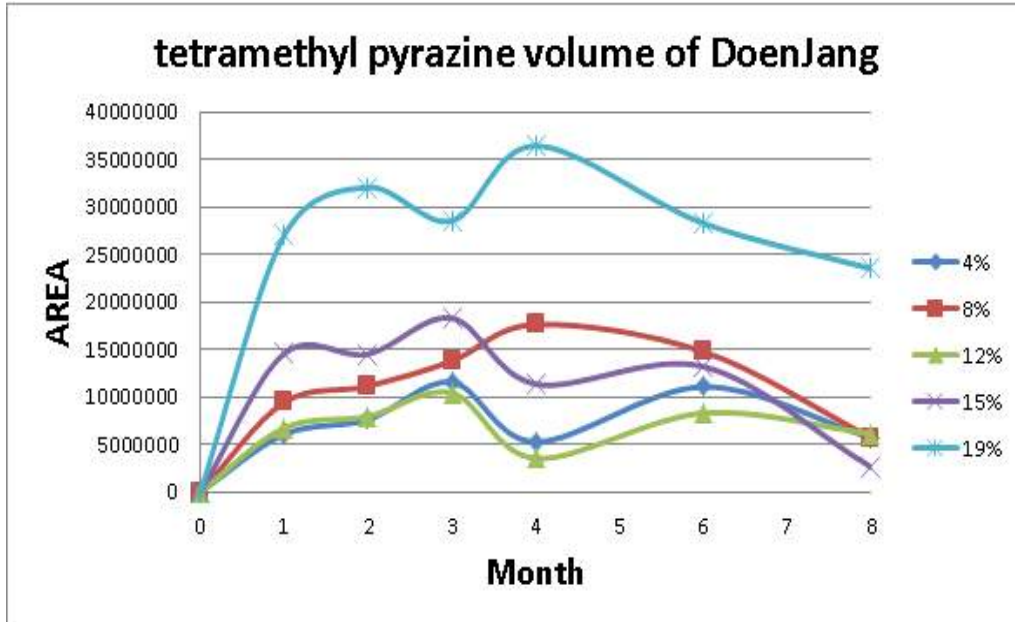


Fig. 32 Trimethyl pyrazine volume of *doenjang* with the addition of different concentration of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.



**Fig. 33** Trimethyl pyrazine volume of *doenjang* with the addition of different concentration of salinity sample(4%, 8%, 12%, 15%, 19%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 6 and 8 month) by GC-MS.

#### (4) 고추장의 향미 성분 분석

염도를 다르게 하여 제조한 재래식 고추장의 숙성과정 중 발생하는 휘발성향기성분을 GC와 GC-MS로 분석하여 동정한 결과를 **Table 30~34**에 나타내었다. 각각 염도별로 나누어 3%, 6%, 10%, 15%, 20% 염도 고추장에 대해 나타냈으며, 담금 직후인 Control부터 숙성이 완료된 10개월까지의 숙성 기간별로 검출된 휘발성 향기 성분을 동정하였다.

재래식으로 제조된 저염 및 고염 고추장의 숙성 과정 중 alcohol류가 12종, aldehyde류가 5종, ester류가 26종, ketone류가 6종, furan류가 3종, pyrazine류가 1종, acid류가 3종, Sulfur-containing compound류가 1종, alkane류가 5종, alkene류가 5종, 기타 3종 등 총 70종의 휘발성 향기성분이 동정되었다. 계수적인 측면으로 보았을 때, ester류의 종류가 가장 많고, 그 다음이 alcohol류, ketone류, aldehyde류의 순서로 나타났다.

고추장의 주요한 향기성분 중 하나인 alcohol 화합물은 발효를 통해 제조되는 주류나 고추장의 향기물질에서 중요한 성분 중 하나이다. alcohol 화합물의 향기성분 중에서는 모든 염도의 고추장에서 ethanol이 가장 높은 면적비율을 가진다. Ethanol은 효모의 대사산물로, 당을 분해하면서 생성되는 향기물질이다. 이는 고추장의 고소한 향이 나는데 기여한다. 염도에 따라 ethanol의 생성량을 비교하여 **Fig. 34**에 나타내었다. 3% 염도 고추장은 담금 직후부터 숙성 4개월까지 10% 중반 대를 유지하고 있지만, 숙성 후기인 숙성 5개월에는 그 수치가 급격히 감소하여 0.85%를 나타냈다. 숙성 10개월에는 2.6%로 약간 증가하였다. 6% 염도 고추장도 숙성 초기인 숙성 1개월까지 11% 정도를 유지하고 있지만, 이후 숙성 기간부터는 10% 미만으로 그 수치가 많이 하락하였으며 숙성 10개월에는 3% 염도와 비슷한 수치인 2.98%를 나타내었다. 10% 염도 고추장은 3%, 6% 염도 고추장과 비교하여 높은 수준의 ethanol이 검출되었다. 담금 직후에는

13% 정도로 저염 고추장과 비슷한 수준이었지만, 숙성 1개월, 3개월, 4개월에 20% 이상의 수준으로 검출되었다. 15% 염도 고추장도 10%염도 고추장과 마찬가지로 숙성 중기인 숙성 3개월, 4개월에 높은 수준의 ethanol이 검출되었고, 그 수준은 28%에 육박했다. 20%염도 고추장은 10%, 15% 염도 고추장보다 적은양의 ethanol이 검출되었으며, 담금 직후부터 숙성 2개월까지는 오히려 3% 염도 고추장보다 더 낮은 수준으로 검출되었다. ethanol의 검출량으로 보았을 때, 10%와 15% 염도 고추장의 숙성 중기에 상대적으로 높은 수준의 ethanol이 검출되었으며, 이는 10%와 15%에서 발효에 관여하는 효모가 가장 많이 증식하여 고추장의 향미에 영향을 주는 것으로 생각된다. Ethanol과 더불어 2-methyl-1-propanol과 3-methyl-1-butanol 또한 고추장의 고소한 향미에 기여를 하는 성분이다. 2-Methyl-1-propanol은 3%, 6% 염도 고추장에서 0~1%의 미비한 수준으로 검출되었다. 반면, 10%, 15% 염도 고추장에서는 거의 모든 숙성기간 1~2% 정도의 수준으로 검출되었으며, 숙성 3개월, 4개월에 최고 수준을 나타냈다. 20% 염도 고추장은 1% 이하의 수준을 보였지만, 숙성 5개월에도 성분이 검출되었다. 3-Methyl-1-butanol 또한 3%, 6% 염도 고추장에서는 숙성 기간 동안 수치가 점차적으로 감소하여 숙성 10개월에는 1% 정도의 수준으로 검출되었다. 반면, 10%, 15% 염도 고추장은 숙성 중기인 3개월, 4개월에 최고 수준을 찍으면서 숙성 10개월에는 각각 4.18%, 7.05%를 나타내었다. 20% 염도 고추장도 숙성기간 내내 성분이 검출되면서 숙성 마지막에는 4.9%로 10%염도 고추장과 비슷한 수준으로 확인되었다. 고추장 원료인 대두의 비린내에 관여하는 향기성분인 1-pentanol과 1-hexanol도 검출되었다. 1-pentanol은 발효 초기에는 높은 생산량을 보이고 있으나 이후 숙성 4개월부터 생산량이 현저히 줄어들었다. 그러나 3%염도 고추장은 숙성 10개월에 다시 1.69%의 높은 수준으로 성분이 검출되었다. 1-hexanol은 오히려 염도가 높을수록 더 높은 수준으로 검출되었다. 3%, 6% 염도 고추장에서는 1%이하의 수준으로 검출된 반면에, 10%, 15% 염도 고추장에서는 숙성이 지나면서 1% 이상의 수준을 보였고, 20%염도 고추장에서는 2%정도의 수준을 보였다.

Aldehyde류는 대부분의 시료에서 숙성 초기에는 검출되지 않았으며 숙성 3개월부터 검출되기 시작하였다. 검출된 양은 다른 성분들에 비해 상대적으로 적은 양이었다. Aldehyde류 중 benzaldehyde는 crush bitter almond 향을 내며 식품에 인공적으로 첨가할 시 좋은 향미를 낼 수 있다. 또한, 메주와 된장에서 검출되는 주요 향기 성분이다. 다른 염도의 고추장에서는 숙성 3개월 이후부터 검출되어 0.5% 이하의 수준으로 나타난 반면에, 20% 염도 고추장에서는 숙성 1개월부터 1% 이상의 수준으로 검출되어 숙성 5개월에 최고수치인 2.52%로 상대적으로 많은 양 확인되었다.

과일향을 내는 ester류는 분석된 70종의 향기성분 중 총 26가지로 가장 많은 성분이 확인되었다. Ester류는 alcohol보다 휘발성이 강하기 때문에 고추장의 향미에서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 연구된 고추장 향기성분에서도 ethanol과 함께 주요한 고추장 향기성분으로 보고되고 있다. ester류 중 과일향과 감귤류의 주요한 향기 성분인 ethyl acetate에 대한 숙성기간동안의 생성량을 Fig. 35에 나타내었다. 모든 염도의 고추장에서 담금 직후에 20-40%를 육박하며 가장 큰 비율로 검출되었다. 특히 3%와 6%, 10% 염도 고추장은 대부분의 숙성기간동안 20-30% 수준을 나타내며 고추장 향기의 주성분으로 확인되었다. 15%와 20% 염도 고추장은 숙성 3개월부터 10% 내외의 상대적으로 적은 양 검출되었다. 더불어 3%와 6% 염도 고추장에서는 바나나의 주요한 성분인 3-methyl-1-butyl acetate가 ester류 중 두 번째로 큰 비율로 검출되었다(Fig. 36). 숙성 1개월부터 증가하여 숙성 10개월까지 10-20% 수준으로 나

타났다. 반면에 10% 염도 고추장은 숙성 10개월에 19%의 수준을 보였으며, 이전 숙성기간동안은 0-3% 정도의 상대적으로 적은 양이 검출되었다. 또한, 15%와 20% 염도 고추장도 전 숙성기간동안 검출되지 않거나 2% 이하로 검출된 것으로 보아 10%, 15%, 20% 염도 고추장의 향미에 3-methyl-1-butyl acetate는 큰 기여를 하지 않는 것으로 생각된다. 감미성 과실향의 ethyl hexanoate와 파인애플향의 ethyl octanoate는 개량식 고추장과 재래식 고추장에서 검출된 성분이다. 그러나 그 면적비율은 낮았으며, 본 연구에서도 3%, 6% 염도 고추장에서는 1% 이하의 낮은 면적비율로 나타나거나 검출되지 않았지만, 감미성 과실향의 ethyl hexanoate가 10%, 15%, 20% 염도 고추장에서는 숙성 3개월부터 2-5% 정도의 상대적으로 높은 비율로 확인되었다. 또한 벌꿀향의 2-phenylethyl acetate는 모든 염도에서 담금 직후에 많은 양 검출되었으며 이후에는 0.5% 이하의 낮은 면적비율로 나타났다. 담금직후에 검출된 2-phenylethyl acetate는 염도가 높아질수록 높은 면적비율을 나타내는 경향이었으며, 15% 염도 고추장에서 가장 높은 14%의 면적비율을 가졌다. 숙성 초기와 후기에 각각 2-phenylethyl acetate와 ethyl hexanoate의 면적비율이 높았던 10%, 15%, 20% 염도 고추장이 3%와 6%의 고추장보다 감미도가 높을 것으로 생각된다.

미생물의 중간 대사물질이며 미숙취와 같은 자극취를 내는 ketone류는 대부분의 연구된 고추장 향기분석과 마찬가지로 낮은 면적비율로 확인되었다. 숙성 초기에는 검출되지 않은 성분이 더 많았으며, 숙성 후기에 비교적 높은 빈도로 ketone류의 향기성분이 검출되었고 검출된 향기성분의 수는 염도가 높을수록 많았다. 미생물 생균수 측정 부분에서 염도가 낮을수록 호기성 미생물이 감소한다는 것을 확인하였는데, 이로 인해 미생물이 대사하며 생성되는 ketone 물질이 적어지는 것으로 생각된다. 이 경향은 미생물의 중요한 대사 물질이면서 발효유의 주요한 휘발성 향기물질인 3-hydroxy-2-butanone(Acetoin)에서 극단적으로 확인된다. 염도가 다른 고추장에서 이 성분의 숙성기간동안 생성량을 Fig. 37에 나타내었다. 3%와 6% 염도 고추장에서는 숙성 1개월부터 분리되지 않았지만, 10% 염도 고추장에서는 숙성 2개월에 3% 이상의 수준으로 검출되었으며, 15%와 20% 염도 고추장에서는 숙성 1개월과 2개월에 10% 이상의 수준으로 검출되었다.

Furan류는 vinyl furan 및 2-pentyl furan, furfural이 비교적 낮은 면적비율로 확인되었으며, 숙성 초기보다는 숙성 후기에 높은 빈도수로 검출되었다. 공시된 고추장 향기성분에서는 당류가 산화할 시 생성되는 2-pentyl furan와 furfural이 낮은 비율로 나타났으며, 본 실험에서는 고추장의 염도가 높을수록 검출된 수치가 높았다.

Pyrazine류 중에서는 tetramethyl pyrazine이 전 숙성기간동안 검출되었다. 이 향기성분은 benzoaldehyde와 함께 청국장의 쿵쿵한 냄새에 관여하는 성분으로 본 실험의 고추장에서도 두 성분이 함께 고추장의 쿵쿵한 냄새에 관여하는 것으로 생각된다. 위의 benzoaldehyde와 같이 고추장의 염도가 높아질수록 tetramethyl pyrazine의 면적비율도 증가하는 경향이었다.

Acid류는 통상적으로 식품의 pH를 낮추는데 기여하는 성분이다. Acid류 중에서 미생물의 산화발효의 생성물인 acetic acid는 저염 고추장인 3%와 6% 염도 고추장에서 숙성이 될수록 눈에 띄게 증가하는 경향을 보였다. 이에 대한 그래프를 Fig. 38에 나타내었다. 3%와 6% 염도 고추장에서는 숙성 5개월까지 면적비율이 커져서 최고 검출 수치인 각각 19.45%, 25.91%로 큰 면적비율을 나타냈다. 반면에, 10%, 15%, 20% 염도 고추장에서는 10% 이하의 면적비율을 보여 주면서 대부분의 숙성기간에 1% 정도의 낮은 면적비율로 나타났다. 염도가 높은 고추장에서는 미생물의 생리활성저하에 의해 초산발효가 상대적으로 적게 일어나는 것으로 보인다. acetic

acid는 식초에 다량으로 포함된 향기성분으로써, 적은 양 존재할 때 단과일향을 내는 화합물이지만, 그 양이 많을 경우 오히려 본연의 고추장 맛을 저하시킬 수 있다. 공시된 고추장의 향미 성분을 보면 acetic acid가 검출되기는 하지만 낮은 면적비율로 검출되며, 많은 acetic acid가 생성된 3%와 6% 염도 고추장은 본연의 고추장 향미보다는 식초와 같이 신 맛이 강할 것으로 생각된다. 또 다른 미생물의 산화 생성물인 3-methylbutanoic acid도 검출되었는데, acetic acid와는 대조적으로 염도가 높은 고추장일수록 더 많은 수준으로 검출되었다. 그러나 면적비율은 최고 수준인 20% 염도 고추장에서도 5% 미만으로 검출되었으며, acetic acid 만큼 신 맛에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

마늘, 부추, 파 등에서 매운 향을 내는 함황 화합물인 diallyl disulfide는 발효 기간에 따라서는 큰 차이를 보이지 않지만, 염 농도가 높을수록 면적비율이 커졌다. 염의 농도가 높을수록 매운 향의 정도는 더 강할 것으로 생각된다.

이외에 Alkane류에서 hexamethyl cyclotrisiloxane, decamethyl cyclopentasiloxane 등 5종이 낮은 면적비율로 검출되었다. 대부분의 성분이 숙성 3개월부터 검출되었다. Alkene류 또한 3,3-thiobis-1-propene과 3,7-dimethyl-1,3,7-octatriene 등 5종의 성분이 낮은 면적비율로 검출되었다. 일반적인 재래식 고추장의 향기성분에서도 Alkane류와 Alkene류는 적은 면적비율로 검출되며, 고추장의 향기성분에 많은 영향을 주지 않는 것으로 보인다.

또한 기타 성분으로 toluene과 p-xylene, styrene이 검출되었다. 풀 향이나 benzene향을 가진 toluene은 숙성기간에 따라 비교적 높은 비율로 검출되었다. 3% 고추장에서는 다른 고추장에 비해 낮은 면적비율을 보였으며, 6%, 10, 20% 고추장에서는 중간 정도의 비슷한 수준으로 나타났고, 15% 염도 고추장에서 10% 이상의 최고 면적비율을 나타내었다.

본 연구에서 검출된 총 70가지의 향기성분 중 alcohol류의 ethanol, ester류의 ethyl acetate과 3-methyl-1-butyl acetate, ketone류의 3-hydroxy-2-butanone, acid류의 acetic acid 등이 숙성 기간동안 10-40%까지 높은 면적비율을 차지하며 고추장의 향미에 많은 기여를 하는 것으로 보였다. 이 중 3-hydroxy-2-butanone은 3%와 6% 염도 고추장에서는 담금 직후에만 소량 검출되어 이후에는 검출되지 않았다. 또한, acetic acid는 상대적으로 3%와 6% 염도 고추장에서만 다량으로 검출되어 일반적인 고추장의 향미보다 신 맛이 강할 것으로 보인다. 따라서, 고추장의 미생물 균총과 휘발성 향미에 영향을 미치지 않는 한도 내에서는 10% 염도까지 낮출 수 있을 것으로 생각된다.

**Table 30.** Volatile compounds identified from *gochujang* (3%)

(unit: peak area %)

No.	Compounds name	fermentation period (month)						
		0	1	2	3	4	5	10
<b>Alcohols</b>								
3	ethanol	13.73	16.12	14.08	17.68	14.66	0.85	2.60
10	2-methyl-1-propanol	1.19	1.04	0.73	0.51	-	-	-
21	3-methyl-1-butanol	7.78	8.09	6.02	-	2.80	3.76	1.64
22	1-pentanol	8.04	8.39	-	4.06	2.85	-	1.69
31	2-heptanol	-	-	-	0.17	0.14	0.16	0.12
36	1-hexanol	0.53	-	-	0.90	0.51	0.51	0.36
37	3-ethoxy-1-propanol	0.27	-	-	-	0.11	-	-
49	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	0.41	-	0.52	0.66	1.11	1.24	1.85
57	2-furanmethanol	-	-	-	0.09	0.20	0.39	0.48
61	4-trimethyl-3-cyclohexene -1-methanol	-	-	-	-	0.16	-	0.17
67	benzyl alcohol	0.37	0.56	0.62	0.35	0.45	0.90	0.56
68	phenylethyl alcohol	3.16	0.98	1.21	0.19	0.80	1.45	0.86
<b>Aldehydes</b>								
39	nonanal	-	-	-	-	-	-	-
48	benzaldehyde	-	-	-	0.11	0.22	0.47	0.19
51	5-methyl-2-furancarboxaldehyde	-	-	-	-	-	-	-
55	2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.16	0.14	0.17	0.11
56	2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadiene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.14	0.21	0.33	0.28
<b>Esters</b>								
2	ethyl Acetate	38.23	36.66	23.08	32.76	21.03	8.25	24.57
4	2-methylpropyl acetate	0.43	1.47	0.95	0.79	0.95	0.92	0.99
7	ethyl-2-methyl butanoate	-	-	-	0.98	0.45	0.48	0.78
8	ethyl-3-methyl butanoate	-	-	-	0.83	0.44	0.67	1.15
11	3-methyl-1-butyl acetate	3.70	15.80	24.22	7.13	16.42	9.23	11.54
16	ethyl-2-butenolate	-	-	-	-	-	-	0.07
17	heptyl acetate	-	-	-	-	0.11	-	0.10
18	pentyl acetate	-	-	-	-	0.22	-	0.17
19	ethyl hexanoate	0.76	2.17	2.35	1.98	0.73	0.43	2.35
20	ethyl propanoate	0.43	0.68	-	-	-	-	-
24	hexyl acetate	-	-	0.50	0.23	0.63	0.37	0.59
32	ethyl heptanoate	-	-	-	0.13	0.24	0.24	0.21
35	ethyl-2-hydroxyl propanoate	-	-	1.77	-	2.22	4.07	5.08
38	ethyl decanoate	-	-	-	0.24	0.15	0.21	0.55
40	ethyl octanoate	0.41	0.50	0.44	0.36	0.58	0.65	0.72
46	ethyl tridecanoate	-	-	-	-	0.14	-	0.15
47	ethyl nonanoate	-	-	-	0.27	0.33	0.20	0.06
50	2-methyl propanoate	0.32	0.48	0.46	0.40	-	0.33	0.17
52	ethyl tetradecanoate	-	-	-	-	0.11	0.19	0.06
60	diethyl butanedioate	-	-	-	-	0.11	0.17	-
62	phenylmethyl acetate	-	-	0.34	-	0.17	0.25	0.19
63	methyl-2-hydroxyl benzoate	0.62	0.69	0.61	0.41	0.44	0.99	0.64
64	ethyl benzeneacetate	-	-	-	-	0.14	0.28	0.10
65	2-phenylethyl acetate	5.72	0.54	0.56	-	0.29	-	0.64
66	ethyl dodecanoate	-	-	-	-	-	0.30	0.42
70	ethyl hexadecanoate	-	-	-	-	0.25	0.66	0.18
<b>Ketones</b>								
5	1-(2-furanyl)-ethanone	-	-	-	-	-	0.11	0.11
29	3-hydroxy-2-butanone	0.40	-	-	-	-	-	-
30	3-hepten-2-one	-	-	-	-	-	-	0.07
34	6-methyl-5-hepten-2-one	-	-	-	0.17	-	-	-
53	6-methyl-3,5-heptadiene-2-one	-	-	-	-	-	0.14	0.14
69	2-acetyl-4,4-dimethyl-cyclopent -2-enone	0.22	-	-	-	-	-	-

<b>Furans</b>									
9	vinyl furan	-	-	-	-	-	-	-	0.17
23	2-pentyl furan	-	-	-	1.15	1.14	-	-	1.40
43	furfural	-	-	-	-	-	-	-	0.05
<b>Pyrazines</b>									
44	tetramethyl pyrazine	0.63	0.79	0.83	0.60	0.78	2.23	0.58	
<b>Acids</b>									
41	acetic acid	0.86	4.87	6.37	4.80	11.48	19.45	15.83	
58	3-methylbutanoic acid	-	-	-	1.29	1.02	1.95	1.04	
59	3-methyl pentanoic acid	0.62	-	1.53	-	-	-	-	
<b>Sulfur-containing compounds</b>									
45	diallyl disulphide	0.64	1.63	1.68	1.67	1.74	-	1.76	
<b>Alkanes</b>									
1	hexamethyl cyclotrisiloxane	-	-	-	1.87	-	1.55	0.07	
14	decamethyl cyclopentasiloxane	0.45	-	-	0.19	0.38	0.53	0.06	
28	tridecane	-	-	-	-	0.15	0.19	0.09	
33	2-methyl tridecane	-	-	-	-	0.18	0.39	0.17	
42	dodecamethyl pentasiloxane	-	-	-	-	-	0.25	-	
<b>Alkenes</b>									
13	3,3'-thiobis-1-propene	-	-	0.47	1.18	0.86	0.43	1.58	
15	1-methyl-4-(1-methylethylidene) cyclohexene	-	-	-	-	-	0.27	-	
25	3,7-dimethyl-1,3,7-octatriene	0.33	0.78	0.85	0.86	0.76	0.75	0.66	
27	3,7,7-trimethyl-hept-2-ene	-	-	-	-	-	-	-	
54	neopentylidenecyclohexane	-	-	-	0.18	0.25	0.27	0.27	
<b>Others</b>									
6	toluene	0.45	0.71	-	2.07	0.96	0.79	2.52	
12	p-xylene	-	-	-	0.52	0.74	0.32	0.70	
26	styrene	2.65	2.31	0.67	0.69	0.96	1.13	1.62	

**Table 31.** Volatile compounds identified from *gochujang* (6%)

(unit: peak area %)

No.	Compounds name	fermentation period (month)						
		0	1	2	3	4	5	10
<b>Alcohols</b>								
3	ethanol	11.83	11.16	6.46	6.25	8.59	4.15	2.98
10	2-methyl-1-propanol	1.11	0.62	-	0.19	-	-	-
21	3-methyl-1-butanol	-	2.97	0.56	0.58	-	0.95	0.62
22	1-pentanol	5.66	-	-	0.59	0.59	-	-
31	2-heptanol	-	-	-	0.26	-	0.08	0.06
36	1-hexanol	0.36	0.43	0.47	0.39	0.24	0.30	0.28
37	3-ethoxy-1-propanol	-	-	-	-	-	-	-
49	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	0.37	-	0.45	0.54	1.14	1.45	1.56
57	2-furanmethanol	0.46	-	-	-	0.15	0.22	0.24
61	4-trimethyl-3-cyclohexene -1-methanol	-	-	-	-	0.18	0.30	0.18
67	benzyl alcohol	0.32	-	-	0.11	0.32	0.53	0.41
68	phenylethyl alcohol	2.30	-	-	-	0.25	0.44	0.42
<b>Aldehydes</b>								
39	nonanal	-	-	-	-	-	-	-
48	benzaldehyde	-	-	-	-	0.16	0.58	0.27
51	5-methyl-2-furancarboxaldehyde	-	-	-	-	-	0.12	0.14
55	2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.09	0.13	0.15	0.11
56	2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadiene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.07	0.17	0.31	0.24
<b>Esters</b>								
2	ethyl Acetate	47.96	24.41	14.09	19.46	23.29	9.94	24.80
4	2-methylpropyl acetate	-	1.50	1.35	1.87	2.28	1.42	0.88

7	ethyl-2-methyl butanoate	-	-	-	-	-	0.24	0.18
8	ethyl-3-methyl butanoate	-	-	-	0.17	0.09	0.21	0.35
11	3-methyl-1-butyl acetate	1.45	26.34	22.78	25.25	23.00	12.89	17.30
16	ethyl-2-butenolate	-	-	-	-	-	-	-
17	heptyl acetate	-	-	-	0.34	0.20	0.25	0.17
18	pentyl acetate	-	-	0.55	0.41	0.32	-	0.39
19	ethyl hexanoate	-	1.19	-	1.46	1.27	0.68	0.95
20	ethyl propanoate	0.42	-	-	-	-	-	-
24	hexyl acetate	-	0.58	1.28	2.01	1.72	1.24	1.67
32	ethyl heptanoate	-	-	-	0.12	0.08	0.16	0.09
35	ethyl-2-hydroxyl propanoate	-	-	-	-	1.12	2.00	2.38
38	ethyl decanoate	-	-	-	0.15	0.14	0.22	0.20
40	ethyl octanoate	0.25	-	-	0.21	0.36	0.45	0.35
46	ethyl tridecanoate	-	-	-	-	-	0.17	0.05
47	ethyl nonanoate	-	-	-	0.11	0.15	0.18	0.08
50	2-methyl propanoate	-	-	-	0.15	0.04	0.30	0.14
52	ethyl tetradecanoate	-	-	-	-	-	0.08	0.06
60	diethyl butanedioate	-	-	-	-	0.12	0.13	-
62	phenylmethyl acetate	-	0.65	2.16	0.73	1.02	1.39	0.94
63	methyl-2-hydroxyl benzoate	0.45	0.47	-	0.24	0.25	0.83	0.59
64	ethyl benzeneacetate	-	-	-	-	-	0.12	-
65	2-phenylethyl acetate	5.47	-	-	-	-	-	0.33
66	ethyl dodecanoate	-	-	-	-	-	-	0.26
70	ethyl hexadecanoate	-	-	-	-	0.08	0.23	0.10
<b>Ketones</b>								
5	1-(2-furanyl)-ethanone	-	-	-	-	-	0.16	0.18
29	3-hydroxy-2-butanone	0.32	-	-	-	-	-	-
30	3-hepten-2-one	-	-	-	-	0.23	0.16	-
34	6-methyl-5-hepten-2-one	-	-	-	-	-	-	-
53	6-methyl-3,5-heptadiene-2-one	-	-	-	-	-	0.11	-
69	2-acetyl-4,4-dimethyl-cyclopent-2-enone	-	-	-	-	-	-	-
<b>Furans</b>								
9	vinyl furan	-	-	-	-	-	-	0.11
23	2-pentyl furan	0.30	-	1.17	1.45	0.39	1.21	1.23
43	furfural	-	-	-	-	0.49	1.52	2.14
<b>Pyrazines</b>								
44	tetramethyl pyrazine	0.49	0.49	0.49	0.35	0.58	1.96	0.59
<b>Acids</b>								
41	acetic acid	1.10	9.08	16.55	13.87	20.82	25.91	20.11
58	3-methylbutanoic acid	0.58	-	-	0.69	0.89	1.44	0.87
59	3-methyl pentanoic acid	-	1.11	1.42	-	0.77	-	-
<b>Sulfur-containing compounds</b>								
45	diallyl disulphide	0.48	1.07	1.18	1.15	1.11	-	1.49
<b>Alkanes</b>								
1	hexamethyl cyclotrisiloxane	-	-	-	1.00	0.08	1.17	0.06
14	decamethyl cyclopentasiloxane	-	-	-	0.17	0.40	0.48	0.65
28	tridecane	-	-	-	-	0.17	0.44	0.32
33	2-methyl tridecane	-	-	-	-	-	0.21	0.11
42	dodecamethyl pentasiloxane	-	-	-	-	-	-	-
<b>Alkenes</b>								
13	3,3'-thiobis-1-propene	-	-	0.44	0.51	0.56	0.38	1.59
15	1-methyl-4-(1-methylethylidene)cyclohexene	-	-	-	-	-	-	0.05
25	3,7-dimethyl-1,3,7-octatriene	0.23	0.51	0.69	0.68	0.50	0.64	1.20
27	3,7,7-trimethyl-hept-2-ene	-	-	-	-	-	-	-
54	neopentylidenecyclohexane	-	-	-	0.07	0.15	0.15	-
<b>Others</b>								
6	toluene	-	0.64	0.98	2.05	0.82	1.00	4.21
12	p-xylene	-	-	0.33	0.21	0.53	0.23	0.60
26	styrene	0.62	1.04	-	0.58	1.02	0.97	1.70



**Table 32.** Volatile compounds identified from *gochujang* (10%)

(unit: peak area %)

No.	Compounds name	fermentation period (month)						
		0	1	2	3	4	5	10
<b>Alcohols</b>								
3	ethanol	13.87	20.67	11.22	22.71	26.71	15.65	1.98
10	2-methyl-1-propanol	1.13	1.88	1.02	1.77	1.54	0.51	-
21	3-methyl-1-butanol	-	-	5.23	7.52	7.79	4.95	4.18
22	1-pentanol	7.43	6.38	-	-	7.80	-	-
31	2-heptanol	-	-	-	0.13	0.38	-	0.40
36	1-hexanol	-	0.64	0.40	1.01	0.69	0.13	0.74
37	3-ethoxy-1-propanol	-	-	-	-	-	-	-
49	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	0.65	-	-	0.47	0.87	-	1.82
57	2-furanmethanol	2.62	-	-	-	0.16	0.11	0.48
61	4-trimethyl-3-cyclohexene -1-methanol	-	-	-	-	0.29	0.20	0.74
67	benzyl alcohol	0.44	-	0.30	0.22	0.60	0.43	1.06
68	phenylethyl alcohol	3.81	0.67	3.15	0.18	1.06	2.98	0.81
<b>Aldehydes</b>								
39	nonanal	-	-	-	0.36	-	-	0.05
48	benzaldehyde	-	-	-	0.15	0.34	-	0.53
51	5-methyl-2-furancarboxaldehyde	-	-	-	-	-	-	-
55	2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.15	0.16	0.06	0.18
56	2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadiene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.14	0.24	0.10	0.41
<b>Esters</b>								
2	ethyl Acetate	37.44	3.82	32.60	33.31	25.13	33.53	19.44
4	2-methylpropyl acetate	-	-	-	1.02	0.50	0.22	1.30
7	ethyl-2-methyl butanoate	-	-	-	1.31	0.93	0.17	1.41
8	ethyl-3-methyl butanoate	-	-	-	0.95	0.85	0.14	1.66
11	3-methyl-1-butyl acetate	1.16	-	1.15	1.32	3.38	0.69	19.74
16	ethyl-2-butenate	-	-	-	-	0.73	0.20	1.10
17	heptyl acetate	-	-	-	-	-	-	-
18	pentyl acetate	-	-	-	-	-	-	0.09
19	ethyl hexanoate	-	-	0.74	2.40	2.65	1.13	4.63
20	ethyl propanoate	0.52	-	0.57	-	-	-	-
24	hexyl acetate	-	-	-	-	-	-	0.45
32	ethyl heptanoate	-	-	-	0.22	0.35	0.15	0.38
35	ethyl-2-hydroxyl propanoate	-	-	-	-	-	-	0.04
38	ethyl decanoate	-	-	-	0.10	0.18	0.15	0.16
40	ethyl octanoate	-	-	-	0.50	1.00	0.49	0.75
46	ethyl tridecanoate	-	-	-	-	0.16	0.21	-
47	ethyl nonanoate	-	-	-	0.14	0.31	0.12	0.19
50	2-methyl propanoate	0.62	-	-	0.20	0.16	0.12	0.39
52	ethyl tetradecanoate	-	-	-	-	-	0.12	0.16
60	diethyl butanedioate	-	-	-	-	0.16	0.10	0.13
62	phenylmethyl acetate	-	-	-	-	-	-	0.83
63	methyl-2-hydroxyl benzoate	0.53	0.38	0.23	0.30	0.32	0.33	0.86
64	ethyl benzeneacetate	-	-	-	-	0.16	0.14	0.21
65	2-phenylethyl acetate	7.68	-	-	-	-	-	0.22
66	ethyl dodecanoate	-	-	-	-	-	0.11	0.33
70	ethyl hexadecanoate	-	-	-	-	0.15	0.30	0.38
<b>Ketones</b>								
5	1-(2-furanyl)-ethanone	-	-	-	-	-	-	0.15
29	3-hydroxy-2-butanone	0.43	0.50	3.61	-	-	0.11	-
30	3-hepten-2-one	-	-	-	-	-	-	-
34	6-methyl-5-hepten-2-one	-	-	-	0.27	0.25	-	0.27
53	6-methyl-3,5-heptadiene-2-one	-	-	-	-	-	-	-
69	2-acetyl-4,4-dimethyl-cyclopent -2-enone	-	-	-	-	-	-	-

<b>Furans</b>									
9	vinyl furan	-	-	-	-	-	-	-	0.27
23	2-pentyl furan	0.40	1.11	-	-	0.81	0.34	1.78	
43	furfural	0.67	-	-	0.21	0.54	-	-	
<b>Pyrazines</b>									
44	tetramethyl pyrazine	0.64	0.69	0.62	0.69	1.20	0.62	1.75	
<b>Acids</b>									
41	acetic acid	3.28	1.86	1.02	0.84	1.58	1.30	6.01	
58	3-methylbutanoic acid	1.36	-	0.45	0.68	0.75	0.50	1.43	
59	3-methyl pentanoic acid	0.67	0.82	-	-	-	-	-	
<b>Sulfur-containing compounds</b>									
45	diallyl disulphide	0.79	1.14	0.56	1.91	1.70	0.44	2.07	
<b>Alkanes</b>									
1	hexamethyl cyclotrisiloxane	-	-	-	-	-	0.37	0.05	
14	decamethyl cyclopentasiloxane	0.50	-	-	0.15	0.46	0.29	0.11	
28	tridecane	-	-	-	-	-	-	-	
33	2-methyl tridecane	-	-	-	-	0.13	0.17	0.15	
42	dodecamethyl pentasiloxane	-	-	-	-	-	0.06	0.04	
<b>Alkenes</b>									
13	3,3'-thiobis-1-propene	-	-	0.28	0.79	1.04	0.21	2.61	
15	1-methyl-4-(1-methylethylidene) cyclohexene	-	-	-	-	-	0.10	0.11	
25	3,7-dimethyl-1,3,7-octatriene	0.40	1.06	0.33	0.92	0.75	0.29	0.96	
27	3,7,7-trimethyl-hept-2-ene	-	-	-	-	0.14	-	0.17	
54	neopentylidenecyclohexane	-	-	-	-	0.39	-	-	
<b>Others</b>									
6	toluene	-	0.49	-	2.72	1.43	0.21	4.14	
12	p-xylene	-	-	-	0.46	0.73	-	0.69	
26	styrene	0.90	1.27	1.21	1.43	1.62	0.84	2.63	

**Table 33.** Volatile compounds identified from *Kochujang* (15%)

(unit: peak area %)

No.	Compounds name	fermentation period (month)						
		0	1	2	3	4	5	10
<b>Alcohols</b>								
3	ethanol	17.51	10.08	12.46	28.05	28.24	10.33	8.03
10	2-methyl-1-propanol	0.88	-	0.82	2.60	2.56	0.52	0.04
21	3-methyl-1-butanol	9.61	5.77	4.05	12.77	10.93	4.18	7.05
22	1-pentanol	-	6.68	-	-	12.27	-	0.20
31	2-heptanol	-	-	-	-	-	0.07	-
36	1-hexanol	0.42	2.55	0.27	1.61	1.35	0.13	1.24
37	3-ethoxy-1-propanol	0.60	-	-	-	-	-	0.12
49	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	0.56	0.63	-	0.74	1.16	-	1.08
57	2-furanmethanol	0.33	-	-	-	0.22	0.08	0.52
61	4-trimethyl-3-cyclohexene -1-methanol	-	-	-	-	0.25	0.22	0.39
67	benzyl alcohol	0.38	1.12	0.30	0.28	0.74	0.33	1.18
68	phenylethyl alcohol	2.16	1.44	2.57	0.22	2.11	2.72	1.78
<b>Aldehydes</b>								
39	nonanal	-	-	-	0.42	-	-	0.07
48	benzaldehyde	-	-	-	0.20	0.36	-	0.12
51	5-methyl-2-furancarboxaldehyde	-	-	-	-	-	-	0.37
55	2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.23	0.22	-	0.18
56	2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadiene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.16	0.26	0.08	0.36
<b>Esters</b>								
2	ethyl Acetate	23.87	10.16	37.33	8.39	5.33	29.03	8.32

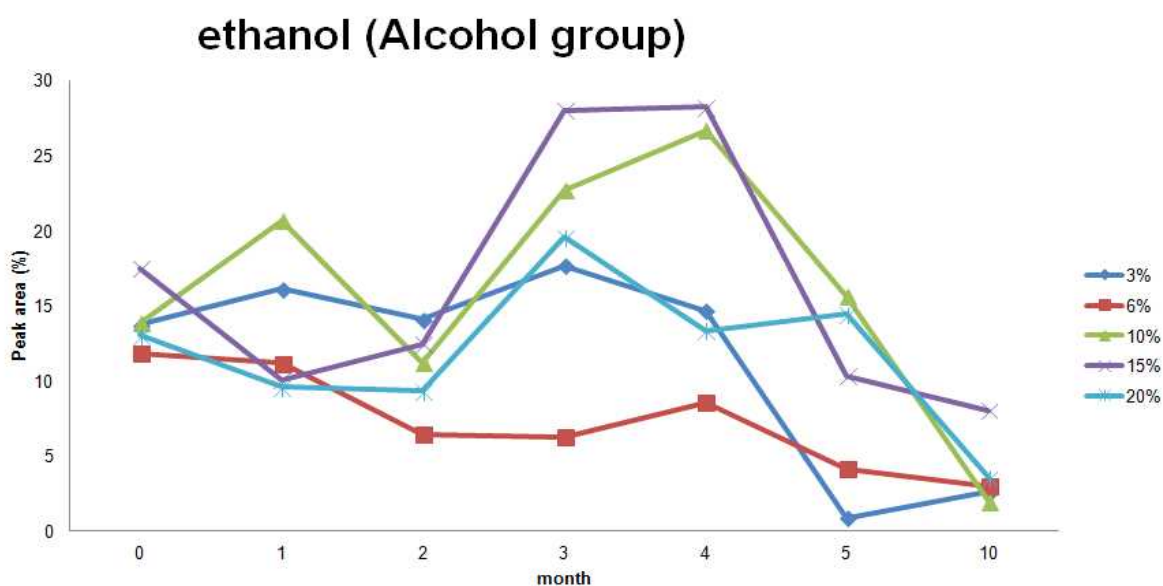
4	2-methylpropyl acetate	-	-	-	-	-	-	0.28
7	ethyl-2-methyl butanoate	-	-	-	-	1.36	0.12	1.49
8	ethyl-3-methyl butanoate	-	-	-	0.91	1.10	0.11	2.65
11	3-methyl-1-butyl acetate	2.72	-	0.59	1.07	2.12	0.26	1.43
16	ethyl-2-butenolate	-	-	-	-	0.54	-	0.63
17	heptyl acetate	-	-	-	-	-	-	-
18	pentyl acetate	-	-	-	-	-	-	-
19	ethyl hexanoate	-	-	-	3.40	5.40	0.77	5.89
20	ethyl propanoate	0.50	-	-	-	-	-	-
24	hexyl acetate	-	-	-	-	-	-	-
32	ethyl heptanoate	-	-	-	0.19	0.40	0.12	0.45
35	ethyl-2-hydroxyl propanoate	-	-	-	-	-	-	-
38	ethyl decanoate	-	-	-	-	0.17	0.13	0.17
40	ethyl octanoate	0.55	-	-	0.58	1.06	0.33	1.06
46	ethyl tridecanoate	-	-	-	-	0.52	0.15	0.39
47	ethyl nonanoate	-	-	-	0.17	0.62	0.08	1.72
50	2-methyl propanoate	0.31	1.39	-	0.38	0.24	0.10	0.32
52	ethyl tetradecanoate	-	-	-	-	-	0.07	0.14
60	diethyl butanedioate	-	-	-	-	0.26	0.10	0.21
62	phenylmethyl acetate	0.51	-	-	-	-	-	0.06
63	methyl-2-hydroxyl benzoate	0.49	1.10	0.27	0.41	0.34	0.26	0.92
64	ethyl benzeneacetate	-	-	-	-	0.16	0.09	0.20
65	2-phenylethyl acetate	14.79	-	-	-	0.13	0.08	0.10
66	ethyl dodecanoate	-	-	-	-	-	0.08	0.45
70	ethyl hexadecanoate	-	-	-	-	0.17	0.18	0.37
<b>Ketones</b>								
5	1-(2-furanyl)-ethanone	-	-	-	-	0.07	-	0.17
29	3-hydroxy-2-butanone	0.52	18.40	0.61	-	-	0.32	-
30	3-hepten-2-one	-	-	-	-	-	-	-
34	6-methyl-5-hepten-2-one	-	-	-	0.34	0.31	-	0.27
53	6-methyl-3,5-heptadiene-2-one	-	-	-	-	-	-	0.26
69	2-acetyl-4,4-dimethyl-cyclopent-2-enone	0.18	-	-	-	-	0.19	-
<b>Furans</b>								
9	vinyl furan	-	-	-	-	-	-	0.49
23	2-pentyl furan	0.45	2.57	0.64	1.05	0.82	0.31	1.98
43	furfural	-	-	-	0.32	0.49	-	0.10
<b>Pyrazines</b>								
44	tetramethyl pyrazine	0.61	2.57	0.57	1.00	1.76	0.90	0.98
<b>Acids</b>								
41	acetic acid	4.17	1.50	1.42	0.69	0.72	1.17	2.21
58	3-methylbutanoic acid	-	2.77	-	1.26	1.32	0.48	2.10
59	3-methyl pentanoic acid	0.66	4.18	0.53	0.59	1.71	0.50	-
<b>Sulfur-containing compounds</b>								
45	diallyl disulphide	0.67	3.50	0.63	2.86	2.12	-	2.29
<b>Alkanes</b>								
1	hexamethyl cyclotrisiloxane	-	-	-	1.21	-	0.54	1.21
14	decamethyl cyclopentasiloxane	-	-	-	0.48	0.56	0.26	0.20
28	tridecane	-	-	-	-	-	-	-
33	2-methyl tridecane	-	-	-	0.28	0.17	0.16	0.29
42	dodecamethyl pentasiloxane	-	-	-	-	-	0.10	0.10
<b>Alkenes</b>								
13	3,3'-thiobis-1-propene	-	1.24	-	1.43	1.10	0.15	3.24
15	1-methyl-4-(1-methylethylidene)cyclohexene	-	-	-	-	-	0.09	0.38
25	3,7-dimethyl-1,3,7-octatriene	0.29	1.42	0.33	-	0.95	0.25	1.50
27	3,7,7-trimethyl-hept-2-ene	-	-	-	-	0.27	-	0.35
54	neopentylidenecyclohexane	-	-	-	0.19	0.41	0.21	0.55
<b>Others</b>								
6	toluene	-	5.46	0.52	9.40	4.80	0.46	18.04
12	p-xylene	-	-	-	0.81	1.06	-	0.99

**Table 34.** Volatile compounds identified from *Kochujang* (20%)

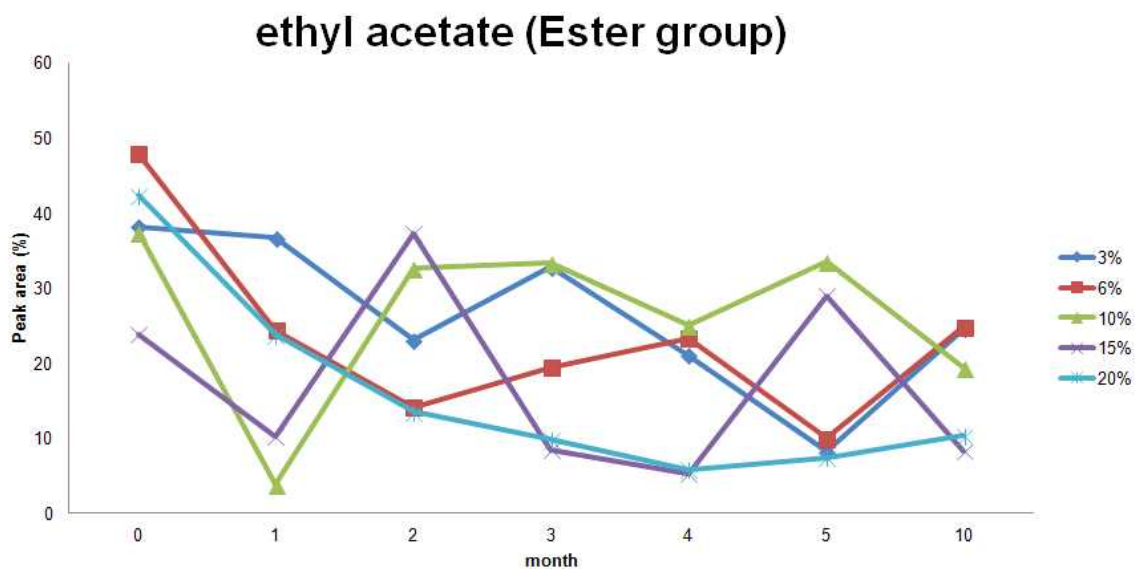
(unit: peak area %)

No.	Compounds name	fermentation period (month)						
		0	1	2	3	4	5	10
<b>Alchols</b>								
3	ethanol	13.06	9.60	9.33	19.61	13.37	14.45	3.57
10	2-methyl-1-propanol	0.71	-	0.74	-	-	0.98	-
21	3-methyl-1-butanol	4.91	2.80	4.77	3.09	2.78	3.36	4.90
22	1-pentanol	4.71	-	-	-	2.74	-	-
31	2-heptanol	-	-	-	-	-	0.17	0.40
36	1-hexanol	0.18	2.61	2.26	1.10	1.89	1.60	2.66
37	3-ethoxy-1-propanol	-	-	-	-	-	-	-
49	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	0.23	0.54	0.99	1.04	2.10	1.71	3.18
57	2-furanmethanol	-	-	-	-	0.23	0.39	0.60
61	4-trimethyl-3-cyclohexene -1-methanol	-	-	-	-	1.02	0.94	1.66
67	benzyl alcohol	0.41	1.44	-	0.56	1.14	1.12	1.45
68	phenylethyl alcohol	4.22	-	-	-	0.39	1.21	0.98
<b>Aldehydes</b>								
39	nonanal	-	-	-	1.37	0.61	0.61	0.15
48	benzaldehyde	-	1.12	1.13	0.78	1.47	2.52	0.86
51	5-methyl-2-furancarboxaldehyde	-	-	-	-	0.36	0.44	0.43
55	2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.43	0.59	0.15	0.36
56	2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadiene -1-carboxaldehyde	-	-	-	0.48	0.56	0.43	0.60
<b>Esters</b>								
2	ethyl Acetate	42.37	23.78	13.59	9.82	5.83	7.42	10.30
4	2-methylpropyl acetate	-	-	-	-	-	0.21	-
7	ethyl-2-methyl butanoate	-	-	-	1.63	1.42	0.66	1.05
8	ethyl-3-methyl butanoate	-	-	-	0.89	0.96	0.66	1.87
11	3-methyl-1-butyl acetate	1.54	-	2.61	0.46	1.24	0.55	1.12
16	ethyl-2-butenolate	-	-	-	-	-	-	0.39
17	heptyl acetate	-	-	-	-	-	-	-
18	pentyl acetate	-	-	-	-	-	-	-
19	ethyl hexanoate	0.29	-	-	4.89	6.23	1.92	4.89
20	ethyl propanoate	0.45	-	-	-	-	-	-
24	hexyl acetate	-	-	-	-	-	-	-
32	ethyl heptanoate	-	-	-	-	-	0.27	0.34
35	ethyl-2-hydroxyl propanoate	-	-	-	-	-	0.16	-
38	ethyl decanoate	-	-	-	-	-	0.54	0.11
40	ethyl octanoate	0.27	-	-	0.64	0.89	0.69	0.88
46	ethyl tridecanoate	-	-	-	-	-	-	0.21
47	ethyl nonanoate	-	-	-	-	-	-	0.19
50	2-methyl propanoate	0.35	1.65	-	0.70	0.82	0.82	0.83
52	ethyl tetradecanoate	-	-	-	-	-	-	0.13
60	diethyl butanedioate	-	-	-	-	0.45	0.53	0.35
62	phenylmethyl acetate	0.41	-	-	-	-	-	0.06
63	methyl-2-hydroxyl benzoate	0.30	1.11	0.95	0.56	0.65	1.01	1.41
64	ethyl benzeneacetate	-	-	-	-	-	0.22	0.16
65	2-phenylethyl acetate	10.78	-	-	-	-	-	-
66	ethyl dodecanoate	-	-	-	-	-	-	-
70	ethyl hexadecanoate	-	-	-	-	-	0.18	0.26
<b>Ketones</b>								
5	1-(2-furanyl)-ethanone	-	-	-	-	0.42	0.45	0.42
29	3-hydroxy-2-butanone	-	14.24	12.51	-	-	1.22	0.10
30	3-hepten-2-one	-	-	-	-	0.91	0.82	0.37
34	6-methyl-5-hepten-2-one	-	-	-	0.89	1.09	1.27	0.62
53	6-methyl-3,5-heptadiene-2-one	-	-	-	-	-	0.54	0.46
69	2-acetyl-4,4-dimethyl-cyclopent	-	-	-	-	-	-	-

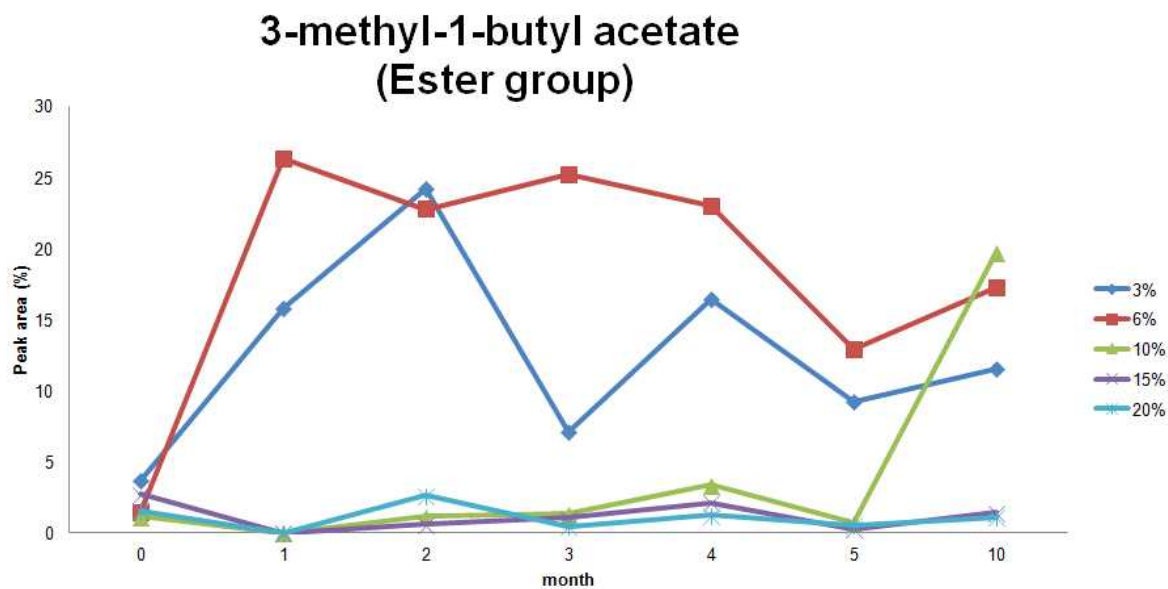
		-2-enone						
<b>Furans</b>								
9	vinyl furan	-	-	-	-	-	-	0.54
23	2-pentyl furan	-	2.79	2.57	-	2.31	2.28	3.91
43	furfural	-	-	-	-	2.80	2.39	1.55
<b>Pyrazines</b>								
44	tetramethyl pyrazine	0.56	2.46	2.37	2.62	3.14	2.50	3.36
<b>Acids</b>								
41	acetic acid	2.61	1.78	2.07	-	3.33	2.36	2.44
58	3-methylbutanoic acid	-	4.59	1.63	2.28	4.18	3.27	4.15
59	3-methyl pentanoic acid	-	-	-	-	3.75	-	3.20
<b>Sulfur-containing compounds</b>								
45	diallyl disulphide	0.33	3.66	3.14	4.58	4.39	1.60	4.51
<b>Alkanes</b>								
1	hexamethyl cyclotrisiloxane	-	-	1.17	-	-	0.81	0.11
14	decamethyl cyclopentasiloxane	1.16	-	-	0.88	1.19	1.09	0.23
28	tridecane	-	-	-	-	-	-	-
33	2-methyl tridecane	-	-	-	-	0.38	1.22	0.41
42	dodecamethyl pentasiloxane	0.32	-	-	-	-	0.12	-
<b>Alkenes</b>								
13	3,3'-thiobis-1-propene	-	1.28	1.37	1.58	2.75	1.18	4.17
15	1-methyl-4-(1-methylethylidene) cyclohexene	-	-	-	-	0.64	0.61	0.75
25	3,7-dimethyl-1,3,7-octatriene	-	1.42	1.17	1.72	2.52	1.20	2.02
27	3,7,7-trimethyl-hept-2-ene	-	-	-	-	0.33	0.30	0.43
54	neopentylidenecyclohexane	0.18	-	-	-	0.25	0.27	-
<b>Others</b>								
6	toluene	-	1.77	1.58	5.61	4.28	1.44	5.78
12	p-xylene	-	1.12	1.12	0.74	2.13	1.12	1.88
26	styrene	0.34	2.69	2.57	1.37	1.51	2.12	2.84



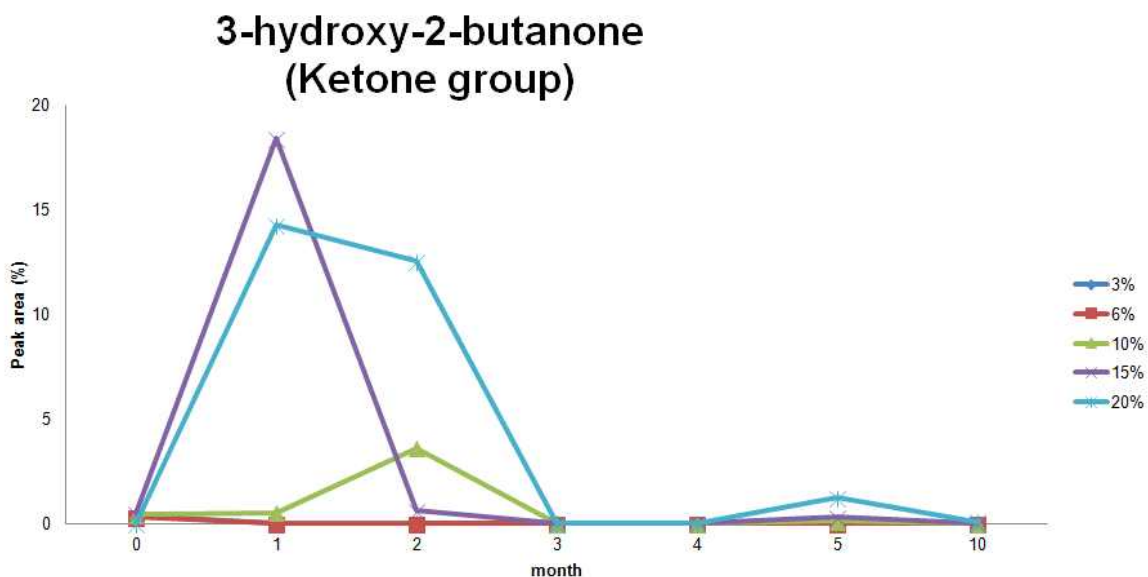
**Fig. 34** Ethanol volume of *gochujang* with the addition of different concentration of salinity sample(3%, 6%, 10%, 15%, 20%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 5 and 10 month) by GC-MS.



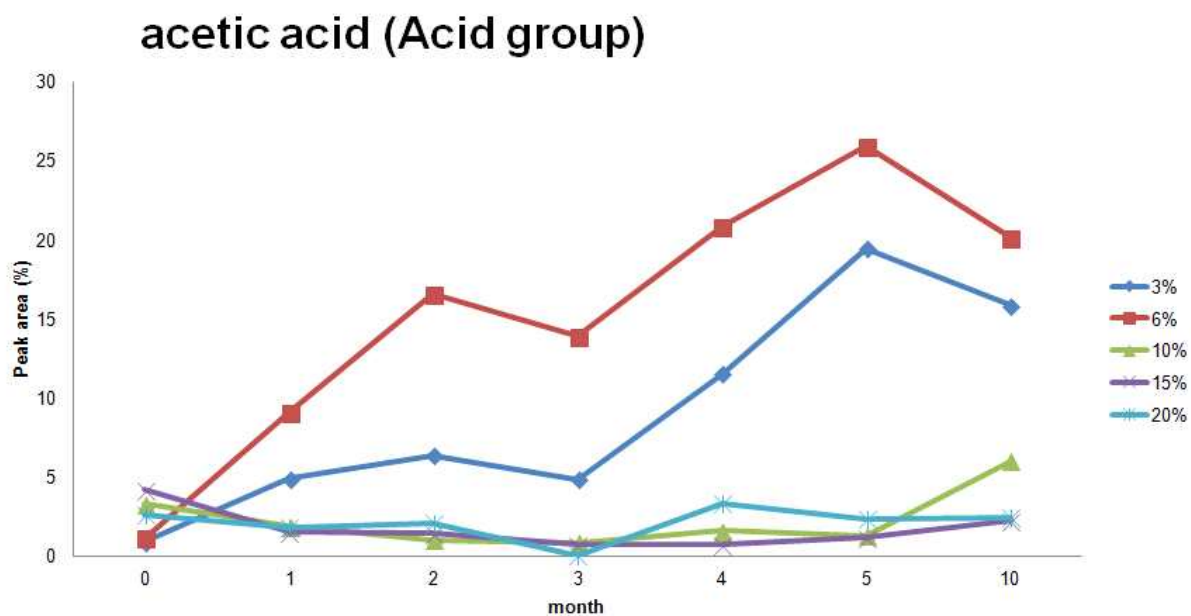
**Fig. 35** Ethyl acetate volume of *gochujang* with the addition of different concentration of salinity sample(3%, 6%, 10%, 15%, 20%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 5 and 10 month) by GC-MS.



**Fig. 36** 3-Methyl-1-butyl acetate volume of *gochujang* with the addition of different concentration of salinity sample(3%, 6%, 10%, 15%, 20%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 5 and 10 month) by GC-MS.



**Fig. 37** 3-Hydroxy-2-butanone volume of *gochujang* with the addition of different concentration of salinity sample(3%, 6%, 10%, 15%, 20%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 5 and 10 month) by GC-MS



**Fig. 38** Acetic acid volume of *gochujang* with the addition of different concentration of salinity sample(3%, 6%, 10%, 15%, 20%) for the fermentation period(1, 2, 3, 4, 5 and 10 month) by GC-MS

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구개발의 목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	발효미생물 분리동 정, 발효미생물 균 주관리보존시스템 구축	저염 관련 미생물에 대한 Sequencing 분석 및 동정	100	• 저염 장류 와 고염 장류의 미생물 microflora 패턴 분석에 의한 발효 미생물의 정보 확인
		제2세부와 제3세부에 미생물 정 보제공	100	• 제1세부 및 제2세부과제 분리 미생 물의 16S rRNA sequencing 및 18S rRNA sequencing분석에 의한 미생 물 동정
		균주관리 및 균주특성에 대한 산업적 균주관리보존시스템 구축	100	• 제1세부 및 제2세부과제 분리 미생 물자원의 장기보존을 위한 시스템 구축
2차 년도 (2013)	발효미생물 분리동 정, 발효미생물 균 주관리보존시스템 구축	저염 관련 미생물에 대한 Sequencing 분석 및 동정	100	• 전통 장류의 저염화를 위하여 저염 및 고염 된장 및 간장의 자연 발효 기간중에 변화하는 미생물의 패턴을 분석함으로써 된장의 최저 염도를 확인 함. • 다양한 염도 조건의 된장 및 간장이 발효기간 중에 변화하는 발효 패턴 을 주 발효미생물과 향기분석을 통 하여 최적 발효 조건을 확립 함.
		제2세부와 제3세부에 미생물 정 보제공	100	• 본 실험을 통하여 분리된 연구정보 및 미생물을 각 세부과제에 제공함. • 각 세부과제 분리 미생물의 16S rRNA sequencing 및 18S rRNA sequencing분석에 의한 미생물 동정
		균주관리 및 균주특성에 대한 산업적 균주관리보존시스템 구축	100	• 각 과제별 분리미생물의 장기적이고 안정적인 보존을 위하여 동결건조 및 초저온 보존을 병행하는 방법으 로 미생물의 안전 보존을 수행함. • 균주특성에 관한 정보를 균주관리시 스템에 등록하여 균주정보를 관리함.
3차 년도 (2014)	저염화 미생물 관 리 및 유전체 정 보 분석에 의한 정 보제공	저염 장류 관련 미생물의 유전 체 분석 및 균주보존시스템 구 축	100	• 각 과제별 분리미생물의 장기적이고 안정적인 보존을 위하여 동결건조 및 초저온 보존을 병행하는 방법으 로 미생물의 안전 보존을 수행함. • 균주특성에 관한 정보를 균주관리시 스템에 등록하여 균주정보를 관리함
		저염 관련 미생물 의 장기 보존 및 저염화미생물의 다양한 활용 을 위하여 산업적 균주관리시스 템 구축	100	• 저염화 장류의 제조를 위하여 다양 한 염도의 장류 발효최적화 조건 연 구 • 연구 결과물의 다양한 활용을 위하 여 산업적 균주관리시스템에 등록하 여 산업적인 이용을 위한 기반 구축 • 장류의 저염화에 따라서 장류의 발 효에 관여 하는 미생물의 차이를 과 학적으로 규명 함.

### 2. 연구관련 논문게재



게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.( No.)	국내외 구분	SCI구 분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	<i>Oceanobacillus gochujangensis</i> sp. nov., isolated from <i>gochujang</i> a traditional korean fermented food.	장서정	배동훈	김유진, 이설희, 박영서, 박정민	Journal of microbiology	52(12)	국내	SCIE
2014	염도를 달리한 전통 고추장의 숙성 과정 중 미생물 및 휘발성 향기성분 의 분석	변옥희	배동훈	박정민, 박영서	Food engineering progress	18(4)	국내	-
impres sed	염농도에 따른 간장 내 미생물 생육 과 향미의 변화	한덕희	배동훈	박정민	Food engineering progress	impres sed	국내	-
impres sed	염농도에 따른 된장의 숙성과정 중 미생물과 향미의 변화에 관한 연구	한덕희	배동훈	박정민	Food engineering progress	impres sed	국내	-

### 3. 관련분야의 기술발전예의 기여도

현재 연구된 바에 의하면, 항균성 물질을 첨가하여 염도를 낮춘 저염화 장류가 대부분이다. 항균성 물질의 미생물 생장을 막는 효과가 제시되어 있을 뿐, 어느 정도로 염 농도가 장류의 최저 염 첨가량이 될 수 있는지 기준점은 공시된 바가 없다. 비록, 건강을 위해 저염으로 제조되었다 하더라도 식품으로서의 가치를 갖기 위해서는 맛과 형태와 같은 특성이 양호해야 한다. 본 연구를 통해 저염화 장류의 발효기간에 따른 미생물학적 특징과 향미 성분의 변화를 조사함으로써 전통 장류 제조 시 첨가 가능한 최저 염 농도의 기준점을 확립하였고, 이를 통해 염도를 최소화한 전통 장류의 품질개선을 이룰 수 있다.

전통 발효 식품의 저염화와 관련된 발효 미생물 분석을 통해 Microflora를 확인함으로써 전통 식품의 과학적 기반을 마련 할 수 있는 기반을 제공할 수 있고, 전통 발효 식품의 microflora 중 장류의 저염화 시 전통 식품의 상품성 및 보존성을 증진 시킬 수 있을 것으로 예상 되는 microflora를 제시하였으며, 전통 발효 식품으로부터 분리된 우수한 발효 미생물의 활용을 통하여 전통 장류의 품질 안정성을 유지 할 수 있는 기반을 마련하였다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

고추장이 저염으로 제조되었다 하더라도 식품으로서 장류의 기호성을 충족시키기 위해서는 양호한 풍미와 품질이 전제되기 때문에, 본 연구를 통해 염도를 낮추어 제조한 고추장의 발효 기간에 따른 향미 성분의 변화를 조사함으로써 향미 성분이 변하지 않는 한도 내에서 고추장 제조 시 활용 가능한 최저 염도를 확인하였다.

또한, 전통 발효 식품의 저염화와 관련된 발효 미생물 분석을 통해 Microflora를 확인함으로써 전통 식품의 과학적 기반을 마련 할 수 있는 기반을 제공할 수 있으며, 전통 발효 식품의 microflora 중 장류의 저염화 시 전통 식품의 상품성 및 보존성을 증진 시킬 수 있을 것으로 예상 되는 microflora를 제시하였으며, 전통 발효 식품으로부터 분리된 우수한 발효 미생물의 활용을 통하여 전통 장류의 품질 안정성을 유지 할 수 있는 기반으로 활용 가능하다.

각 과제별 분리된 미생물의 동결건조 및 초저온 동결보존을 통하여 미생물의 안전한 보존을 수행하면서 저염화 관련 미생물의 효소적 활성도 측정 및 생리적 특성에 관한 균주정보를 구축하였다. 이를 통해 균주 특성과 함께 동정 결과를 균주관리시스템에 등록하여 균주정보를 공유할 수 있다.

## 제 6 장 참고문헌

1. 박완수, 최신양, 김명호, 임성일, 이호준, 박기재, 배상철, 김미란, 정은영, 김태균, 김영아, 배수익. 2001. 장류 등 전통식품 Codex 규격화 기술지원. 농림부. 연구사업보고서.
2. 이연경, 손숙미, 이중정, 이해진, 신은경, 박민정. 2007. 대국민 나트륨 섭취 감소방안 연구. 경북대학교 건강증진사업지원단. 연구사업 보고서.
3. Cho HO, Kim JG, Lee HJ, Kang JH and Lee TS. 1981. Brewing method and composition of traditional Kochuzang (Red pepper paste) in Junrabook-do area. J. Korean Agricultural Chemical Society. 24: 21-28.
4. Choi JY, Lee TS and Park SO. 1997. Changes of volatile flavor compounds in improved *Kochujang* prepared with soybean *Koji* during fermentation. Korean J. Food sci. Technol.
5. Han SM and Kim DH. 2008. Effect of combined use of anti-microbial materials on storage of low salted Kochujang. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 51: 281-287.
6. Kim DH and Choi HJ. 2003. Physicochemical properties of Kochujang prepared by *Bacillus* sp. *Koji*. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 1174-1181.
7. Kim JW, Kim YS, Jeong PH, Kim HE and Shin DH. 2006. Physicochemical characteristics of traditional fermented soybean products manufactured in folk villages of Sunchang region. J. Fd Hyg. Safety. 21: 223-230.
8. Kim YS and Oh HI. 1993. Volatile flavor components of traditional and commercial Kochujang. Korean J. Food sci. Technol. 25: 494-501.
9. Lim SI and Song SM. 2010. Changes in characteristics of low-salted *Kochujang* with Licorice (*Glycyrrhiza glabra*), Mustard (*Brassica juncea*), and Chitosan during fermentation. J Korean. Soc. Food Sci. Nutr. 39: 560-566.
10. Mok C, Song K, Lee JY, Park YS, Lim S. 2005. Changes in microorganisms and enzyme activity of soybean paste (doenjang) during fermentation. Food Eng. Prog. 9: 112-117.
11. Na SE, Seo KS, Choi JH, Song GS and Choi DS. 1997. Preparation of Low salt and functional Kochujang containing Chitosan. Korean J. Food & Nutr. 10: 193-200.



제2협동 : 전통장류로부터 곰팡이, 세균 그리고 효모의  
총체적인 분리 및 발효미생물의 최적배양시스템 구축

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 백 상 호

연 구 원 : 엄 태 봉

연 구 원 : 정 용 섭



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절 서론

김치, 장류, 젓갈 등의 발효식품이 발달한 식문화 습관 때문에 한국인은 식사를 통해 세계적으로 가장 높은 수준의 소금량인 하루 평균 11.6 g을 섭취하며 이는 세계 보건 기구(WHO) 권장량(하루 5 g)의 2.3배에 이른다(KFDA, 2013). 소금의 과다 섭취는 심혈관 질환, 위암, 신장결석, 골다공증 등과 관련되어있기 때문에 이의 섭취량을 줄이려는 노력이 범국가적으로 진행되고 있다. 2011년 국민건강영양조사에 따르면 소금 섭취의 주요 급원은 김치 25%, 장류 22%, 소금 20%로 김치와 장류를 통해 전체 섭취 소금량의 47%에 해당하는 것으로 나타나, 식품의약품안전처에서는 장류 100 g 당 sodium함량을 0.4 g 더 줄여주도록 장류업체에 권고하였다(KFDA, 2011). 그러나 단백질 및 지방이 풍부한 콩을 저염 상태로 발효하는 경우에는 높은 소금 농도에서 증식이 억제되던 유해균의 농도가 빠르게 증가하기 때문에, 이들 균의 억제를 위해 sorbate 같은 방부제, 알코올, 지방산(Lee *et al*, 1985), 또는 항균 활성을 가진 천연 향신료들의 첨가(Oh *et. al.*, 2002; Kim, 2005; Lim and Song, 2010)가 고려되었다. 그러나 이러한 처리는 전통 장류의 고유한 풍미를 감소시키는 문제점을 가지기 때문에, 저염 장류 발효 시 산막을 형성하고 장류를 부패시키는 균들에 대해 길항적으로 작용하는 유익 발효균들을 장류 제품에서 찾을 필요가 있었다. 장류에 형성된 산막은 산소 공급을 차단하여 발효균들의 증식 환경 변화에 의한 미생물 군집 변화를 일으키며, 산막 형성균의 세포 자가 분해로 인한 부패균들의 증식을 유발한다. 또한 높은 염도 때문에 증식을 못하고 있던 유해 세균들은 길항균이 존재하지 않는 경우 급격한 증식으로 장류의 부패를 일으키고 기회적 감염이나 식중독을 유발할 수 있다. 전통 장류에서 *Aspergillus* 속과 함께 발효에 주 역할을 하는 *Bacillus* 속은 장류 발효에 관여하는 수많은 미생물 군집 간 경쟁에서 항상 우점을 차지하고 있고 특히 *Bacillus* 일부균주들은 자기방어를 위해 항생물질과 계면활성제를 분비하여 항세균 및 항진균 작용을 하는 것으로 보고되었다(Tagg *et. al.*, 1976). 본 연구는 저염 된장 제조 동안 증식하는 부패균들을 2차년도에 이어 분리 동정하고, 이들 부패균에 대해 길항 억제능을 가진 *Bacillus*, 유산균, 곰팡이 균들을 분리함으로써 위생적인 산업용 저염 장류를 제조하려는데 목적을 두고 있다.

더욱이, 발효 식품을 제조하는 과정 중에 단순한 염 함량의 저하는 유해 미생물의 증식 뿐만 아니라 최종 식품의 텍스처와 향미 성분과 같은 관능적 특성의 변화를 유발하여 최종적으로 품질 저하를 일으키는 것으로 보고되었다(Feng *et al.*, 2014; Liem *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2005). 유사한 문제점은 또한 상업적으로 제조되는 장류에서도 종종 나타날 수 있는데, 이는 *Aspergillus* 속의 곰팡이와 *Bacillus* 속의 세균을 스타터 균주로 사용하여 제조되는 상업적 장류는 전통장류에 의한 방법과 비교하여 상대적으로 적은시간이 소요되며 또한 위생적인 측면에서 장점을 가질 수 있으나, 장류 발효에 있어서 또 다른 중요 미생물인 효모의 역할이 무시되면서 특히 전통 장류와 비교하여 부족한 향미를 나타내게 된다(Lock, 2007; Luh, 1995). 장류의 풍미 형성은 발효 효모와 밀접하게 관련되어 있으며, 특히 volatile high alcohols, esters, furanones, pyrazines과 같은 휘발성 향미성분들은 장류의 발효 과정동안 생성되는 다양한 당류와 아미노산들이 효모에 의하여 대사됨으로써 생성되어 질 수 있고 이러한 성분들은 결과적으로 최종적인 장류의 향미를 형성하게 된다(Van Der Sluis *et al.*, 2001; Belitz *et al.*, 2009). 이에 따라서 몇몇 연구들은 비교적 짧은 시간동안 특징적인 장류의 향미를 증진하거나 촉진할

수 있는 특이 효모를 찾기 위하여 시도하였으나(Van Der Sluis et al., 2001; Suezawa et al., 2006; Kim et al., 1996), 현재까지 일본형 장류 유래의 효모에 대한 연구들이 일부 수행되었을 뿐 국내 유래의 장류의 발효를 위한 우수 효모를 분리한 예는 전무하다. 한편, Chiou 등의 연구로부터 상대적으로 낮은 알코올 농도에도 불구하고 대부분의 부패 미생물들은 성장하지 못하였으며, 특히 NaCl과 ethanol을 조합하였을 때 부패 미생물들을 효과적으로 저해할 수 있었다는 것이 확인되었다(Chiou, 1999; Chiou et al., 1999). 그러나 저염 장류의 제조시 발생될 수 있는 부패 미생물을 저해하기 위하여 인위적으로 ethanol을 첨가하는 것은 소비자에게 나쁜 인상을 초래하며 더욱이 최종적인 발효 장류의 관능적 특성을 변화시킬 수 있기 때문에, 저염화를 위해 인위적인 화합물의 첨가가 아닌 다른 대안이 요구된다. 장류 발효에 있어서 효모 균주들은 장류의 향미성분 발생과 밀접한 관련성이 있고, 특히 휘발성 고급알코올류 뿐만 아니라 ethanol 성분은 효모 균주에 의하여 생성되기 때문에 본 연구에서는 고 알코올 및 향미 성분을 생성하는 효모를 전통 장류로부터 분리하고자 하였고 최종적으로 분리된 우수 균주를 적용함으로써 저염 발효 장류를 제조하고자 하였다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내 연구 현황

김치, 장류, 젓갈 등의 발효식품이 발달한 식문화 습관 때문에 한국인은 식사를 통해 세계적으로 가장 높은 수준의 소금량인 하루 평균 11.6 g을 섭취하며 이는 세계 보건 기구(WHO) 권장량(하루 5 g)의 2.3배에 이른다(KFDA, 2013). 소금의 과다 섭취는 심혈관 질환, 위암, 신장결석, 골다공증 등과 관련되어있기 때문에 이의 섭취량을 줄이려는 노력이 범국가적으로 진행되고 있다. 2011년 국민건강영양조사에 따르면 소금 섭취의 주요 급원은 김치 25%, 장류 22%, 소금 20%로 김치와 장류를 통해 전체 섭취 소금량의 47%에 해당하는 것으로 나타나, 식품의약품안전처에서는 장류 100 g 당 sodium함량을 0.4 g 더 줄여주도록 장류업체에 권고하였다(KFDA, 2011). 그러나 단백질 및 지방이 풍부한 콩을 저염 상태로 발효하는 경우에는 높은 소금 농도에서 증식이 억제되던 유해균의 농도가 빠르게 증가하기 때문에, 이들 균의 억제를 위해 sorbate 같은 방부제, 알코올, 지방산(Lee and Kim, 1985), 또는 항균 활성을 가진 천연 향신료들의 첨가(Oh et. al., 2002; Kim, 2005; Lim and Song, 2010)가 고려되었다. 그러나 이러한 처리는 전통 장류의 고유한 풍미를 감소시키는 문제점을 가지기 때문에, 저염 장류 발효 시 산막을 형성하고 장류를 부패시키는 균들에 대해 길항적으로 작용하는 유익 발효균들을 장류 제품에서 찾을 필요가 있었다. 장류에 형성된 산막은 산소 공급을 차단하여 발효균들의 증식 환경 변화에 의한 미생물 군집 변화를 일으키며, 산막 형성균의 세포 자가 분해로 인한 부패균들의 증식을 유발한다. 또한 높은 염도 때문에 증식을 못하고 있던 유해 세균들은 길항균이 존재하지 않는 경우 급격한 증식으로 장류의 부패를 일으키고 기회적 감염이나 식중독을 유발할 수 있다. 전통 장류에서 *Aspergillus* 속과 함께 발효에 주 역할을 하는 *Bacillus* 속은 장류 발효에 관여하는 수많은 미생물 군집 간 경쟁에서 항상 우점을 차지하고 있고 특히 *Bacillus* 일부 균주들은 자기방어를 위해 항생물질과 계면활성제를 분비하여 항세균 및 항진균 작용을 하는 것으로 보고되었다(Tagg et. al., 1976).

2007년 식품의약품안전처는 주요 발효 식품을 대상으로 biogenic amine 함량을 조사하였고, 그 결과 한국인의 biogenic amines 섭취량 대부분은 전통 장류, 김치, 젓갈로부터 기인되며 이들 식품에서 높은 함량은 인체에 해로운 수준임을 보고하였다(Cho et al., 2006). Biogenic amine에 관해 한국식품과학회지에 발표한 총 8편 중 시판 재래식 된장 중에 biogenic amines 함량의 조사, 국내 유통 발효식품 중 biogenic amines 함량, 청국장 중 biogenic amines 함량 및 생성원인 등 biogenic amines 연구가 있다. 국내에서는 전통 장류에서 분리한 *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*들이 histamine, tyramine, putrescine, cadaverine을 분해하는 것으로 알려졌지만(Kim et al., 2012, Kim et al., 2012), 유산균에 의한 biogenic amines 분해 연구는 아직 보고된 바 없다. Aflatoxin에 관한 연구로는 장류식품 연구로는 대두 발효 식품 중에 aflatoxin유무 검색, 국내식품 중 aflatoxin 검출, 대두식품 중 aflatoxin 검색 등이 있다.

### 2절 국외 연구 현황

발효식품의 안전성 중 최근 문제로 대두되고 있는 Biogenic amine의 경우 NCBI에 현재까지 보고된 논문은 약 280,000편으로 분석 방법, 세포에서 기능 등 전 분야에 걸쳐있으며 대부분이

의학적인 연구들이다. 유럽의 경우에도 주 발효 식품인 포도주, 치즈, 소시지 등에서 biogenic amine 함량이 높게 나타나 2011년 유럽 연합은 발효식품의 biogenic amine 저감화를 위한 project를 진행했으며(BIAMFOOD #211441, 2008), 2013년 FAO/WHO 합동 전문가회의에서는 어류 내 histamine 허용 한도를 200mg/kg 이내로 권고하였다(FAO/WHO, 2013). 소시지, 포도주, 치즈 등의 발효 식품에서 발견되는 유산균인 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*들은 biogenic amines 생산에 주 역할을 하는 것으로 보고되었으며(Coton et al., 2010) Biogenic amine을 분해하는 유산균으로 *L. plantarum*(Capozzi et al., 2012; Callejón et al., 2014)과 *Pediococcus acidilactici*(Callejón et al., 2014)가 분리되었다.

한편, 장류에 함유되는 염 농도를 낮추기 위한 연구로써, 몇몇 연구들에서는 장류에 포함되는 염을 sugars, polyols 또는 ethanol과 같은 염과 동등한 삼투압성 성분들로 대체하고자 하였다(Chiou, 1999; Chiou et al., 1999). 결과적으로 이러한 삼투압성 대체제의 사용은 부패 미생물의 생육을 효과적으로 저해할 수 있는 것으로 나타났으며 특히 NaCl을 일부 ethanol로 대체하였을 때 가장 효과적으로 부패 미생물을 저해시킬 수 있는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 단순한 화합물의 첨가는 장류의 발효에 포함되는 효모와 일부 세균과 같은 유익한 미생물의 성장도 억제할 수 있으며, 특히 식품의 관능적 특성을 저하시키고 소비자에게 좋지 않은 인상을 준다는 문제점을 수반한다(Baba et al., 1983). 최근 수행된 일부 연구로부터 발효 식품유래 토착 발효 미생물을 스타터 균주로 적용함으로써 염 함량을 낮춘 Chinese fermented fish 또는 dry fermented sausage를 제조할 수 있었으며, 이러한 결과는 fermented fish 및 fermented sausage와 같은 식품의 발효시 염 함량을 낮춤에 따라 발생할 수 있는 이화학적 및 미생물학적 특성을 극복하기 위한 수단으로써 토착 미생물의 적용은 매우 효과적일 수 있다는 것을 나타낸다(Corral et al., 2014; Zeng et al., 2013). 그러나 현재까지 저염 장류의 제조를 위한 우수한 토착성 발효 미생물의 분리 및 적용에 대한 연구는 전무하다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 1절 저염장류 생산에 투입 가능한 산업용 곰팡이, 세균 분리

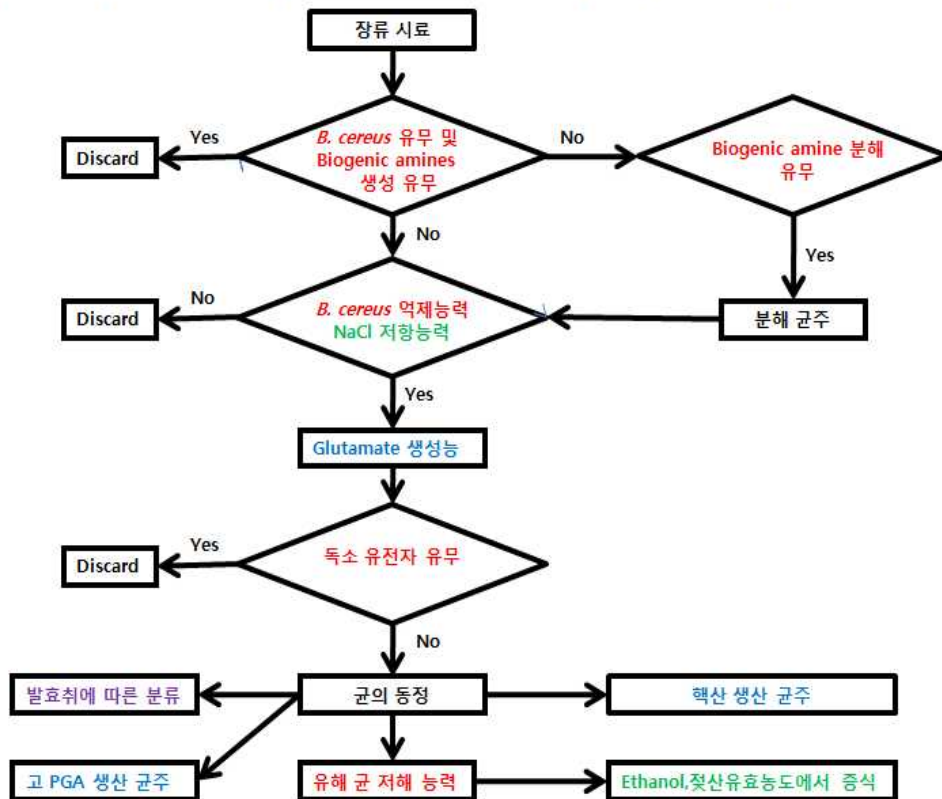
### 1. 연구개발 목표

- (1) 저염 장류인 간장, 고추장, 된장 제조시 부패에 관여하는 세균 균집 규명 및 부패 세균, 효모 및 곰팡이의 분리 및 동정
- (2) 전통 장류로부터 유해균에 길항능력이 우수한 장류 우수 발효 균주들의 선발
- (3) 선발한 장류 우수 발효 균주들을 이용한 실증 제조

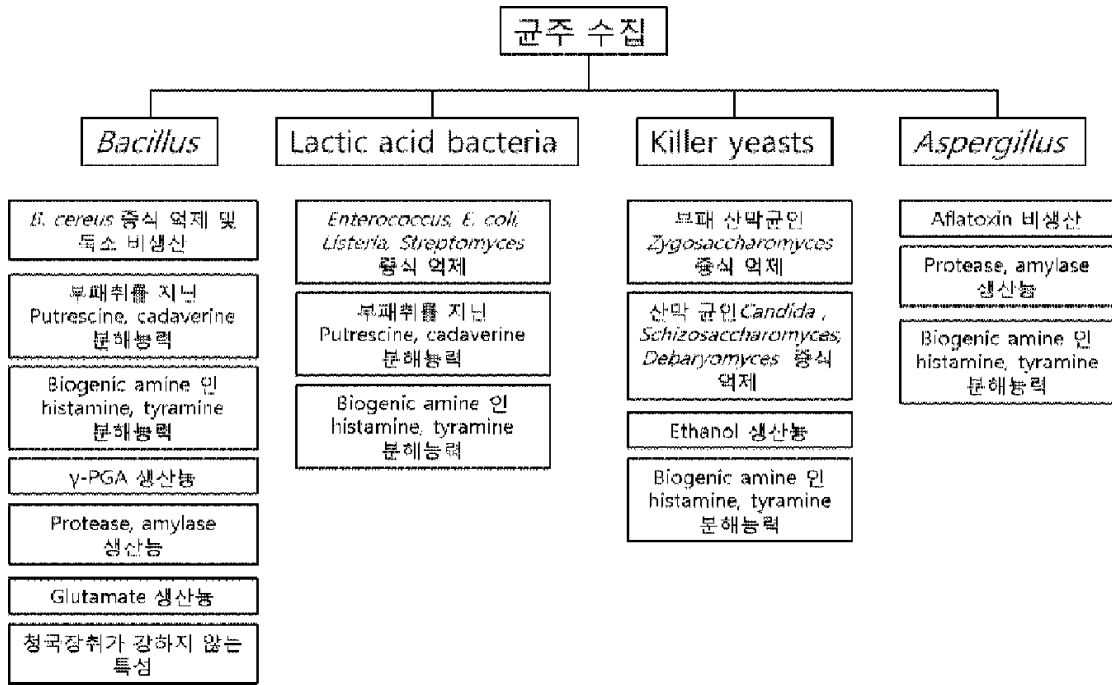
### 2. 연구 접근 방법

- (1) 연차별 균주 분리 Flow Chart
- (가) 1차년도

저염화 장류 제조를 위한 *Bacillus* 우수 균주 선발 방법의 흐름도



(나) 2차년도



(다) 3차년도



### 3. 연구 수행 결과

#### 가. 연구 수행 방법

##### (1) 저염 장류 제조 시 생기는 문제점 확인 및 부패 원인 균 규명

##### (가) 저염 장류의 제조 시 생기는 문제점 확인 및 부패균 분리, 동정

###### ① 저염 장류의 제조

된장 제조를 위해 메주용 콩(순창 산) 20 kg을 수세 침지하여 121°C에서 30분 증자하고 냉각하였다. 전통 장류로 부터 분리한 *A. oryzae* SKM7 포자와 *B. licheniformis* SCK B11 배양액을 각각 0.1%와 0.05%(v/w) 농도로 증자한 콩에 동시에 접종하여 30°C에서 48시간 발효시켰고, 이를 60°C에서 24시간 건조하여 낱알 메주를 제조하였다. 접종균 조제를 위해 *A. oryzae* SKM7는 Potato Dextrose Agar(PDA)에서 28°C에서 14일 배양 후, 10 ml 0.01% Triton X-100를 사용하여 포자를 수집하고 여과 및 원심분리를 한 뒤 사용하였다. *B. licheniformis* SCKB11는 37°C에서 18시간 동안 Nutrient broth(NB)에 배양(~2-10 x 10<sup>8</sup>cfu/ml)한 후 접종하였다. 각 2 kg 단위의 낱알 메주에 소금 염수를 6 L 첨가하여 30°C에서 90일 침지 발효 후 염수를 제거하고 된장을 분리했으며, 이때 저염 된장은 8%(w/w), 일반 된장은 14%(w/w)의 소금을 함유한 것으로 측정되었다.

###### ② 저염 장류 제조시 생기는 부패 세균들의 동정

###### ㉞ Pyrosequencing을 통한 저염 장류의 부패균 군집 비교

저염 장류의 부패 세균들을 동정하기 위해 pyrosequencing을 하였다. 산막을 포함하는 8% 저염 장류 시료에서 glass bead beater에서 토양 용 Fast DNA SPIN Kit(MP Bio Laboratories, USA)로 genomic DNA를 추출하였다. 14% 정상 장류 시료는 8% 저염 장류와 같은 방법으로 genomic DNA를 추출하였다. 정제한 genomic DNA를 template로 하여 adaptor와 barcode가 포함된 세균 16S rRNA의 unidirectional 용 fusion universal primer를 사용했다. Fusion primer로 Bacterial Forward 27F, 5'-CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC- TCA G-A C-G AGT TT GAT CMT GGC TCA G-3', Reverse 518R, 5'-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC- TCA G-T CGT CAT -AC -WT TAC CGC GGC TGC TGG-3'을 이용하였고, PCR은 94°C 5분; 94°C 30초, 60°C 45초, 72°C 1분 30초로 10 cycle; 94°C 30초, 55°C 45초, 72°C 1분 30초로 20 cycle의 조건에서 수행하였다. 정제한 PCR 산물은 GS Junior Titanium system(Roche, Germany) 염기서열분석기를 이용하여 pyrosequencing을 진행하였으며 pyrosequencing에 필요한 방법과 반응들은 제조회사(Roche)의 manual에 따라 (주)천랩(Chunlab, Inc, Korea)에서 수행하였다. Barcode sorting에 따라 분리된 각 서열들에서, barcode 서열, primer 및 linker를 뺀 뒤 나머지 서열의 길이가 300 bp 이하인 것들은 분석에서 제외했고, Hidden Markov Model(HMMER 3.0; <http://hmmer.janelia.org/>)과 BLASTN search를 통해 16S rRNA가 아닌 서열들과 chimera 염기 서열제거도 함께 수행하였다. 분류학적 동정은 EzTaxon extended database를 이용하여 BLASTN 탐색 실행결과로 찾은

상위 다섯 개의 hits을 대상으로 pair-wise alignment를 실행하여 얻은 similarity를 기준으로 수행하였다. 3% 서열 불일치도를 기준으로 CD-HIT program 을 이용하여 시료 내에 존재하는 종의 수인 operational taxonomic unit(OTU) 수를 구하였다.

#### ㉔ 산막 형성 저염 장류에서 주로 발견된 세균, 산막 형성 효모의 분리 및 동정

산막 미생물을 분리하기 위해 4종의 저염 된장에서 각각 산막을 분리하여 증류수로 희석하고 이를 효모 및 곰팡이 분리용 3M Petrifilm(3M, St. Paul, USA)에 접종한 뒤 27°C에서 48시간 배양하고 이를 새 PDA에서 다시 분리 배양하여 서로 다른 집락을 얻었다. 이 집락들을 위상차 현미경에서 400배로 확인 하여 미생물의 크기로 세균과 효모로 나누어 동정을 하였다. 특징적으로 세균으로 추정된 배양 집락에서는 악취가 난 반면 효모로 추정한 집락은 알코올 냄새가 났다. 이 세균을 형성된 집락들을 PDA에 접종하여 배양하였으며, gDNA를 추출한 다음 16S rRNA 유전자의 염기 서열을 분석하였다.

세균은 16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 동정을 위해 universal primer로서 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭 후, 동정에 중요한 가변 염기 영역(Chakravorty et al., 2007)을 포함하는 1,443 bp를 BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하여 해독하였다. 염기 서열들을 이용해서 BLASTN search (Zhang et al., 2000)와 Ribosomal Database Project(version 11)의 SeqMatch program에서 서열 일치도가 높은 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 얻었고, 이들 염기 서열간의 상호비교를 위해 CLUSTAL W(Thompson *et al.*,1994)를 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기 서열들을 정렬하고 chromatogram의 시각적 관찰과 수작업으로 gap이 최소화되도록 보정한 후 Tamura-Nei model에 기초한 Maximum Likelihood 방법(Tamura and Nei, 1993)을 사용하여 작성하였다. 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계적 신뢰도를 산출하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며, 계통분석과 bootstrap 분석은 MEGA program(Tamura et al., 2011)를 사용하였다.

한편, 위상차 현미경과 전자현미경에서 확인된 효모균의 동정을 위해 효모용 genomic DNA(gDNA) prep kit(Solgent, Daejeon, Korea)를 사용 gDNA를 추출하고, 이를 주형 DNA로 하여 PCR을 수행하였다. Universal primer로서 ITS1F(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')와 ITS4R(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 ITS 영역을 증폭하였으며, PCR은 95°C 2분 처리, 95°C 20초, 50°C 40초, 72°C 1분 반응을 30회 반복, 72°C에서 5분 반응 후 종결하였다. 반응산물은 1.5% agarose 겔에서 전기영동을 하여 확인하였고 PCR purification kit(Qiagen)에서 정제한 뒤, MacroGen(Seoul, Korea)에 염기 서열을 의뢰하였다. 해독한 476-723 bp 크기의 염기 서열들을 대상으로 BLASTN search(Zhang et al., 2000)를 수행하여 가장 가까운 근연 관계를 추정하여 동정하였다.

#### (나) 부패취가 나는 전통장류를 통한 장류의 부패 원인 규명 및 유해균 분리, 동정

##### ① 전통장류의 pyrosequencing 분석을 통한 부패균 군집 비교

저염의 장류에서 부패균의 군집의 차이를 확인하기 위하여 pyrosequencing 분석을 진행하였다. 전국적으로 전통 장류 120개를 수집하여 간장, 된장, 고추장, 청국장 각각 향취가 좋은 것

부패취가 나는 것으로 선별하여 총 13개의 장류를 시료로 사용하였다. 시료의 세균군집구조를 분석하기 위하여 Power Soil extraction Kit(MO Bio, USA)를 사용하여 gDNA를 추출하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭을 위해 16S universal primers인 27F(5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 518R(5'-WTTACCGCGGCTGCTGG-3')을 이용하였으며, PCR반응은 94°C(3분); 35주의 94°C(15초), 55°C(45초), 72°C(1분)의 온도 조건에서 수행하였다. AMPure beads (Beckman coulter)를 이용하여 PCR산물을 정제하였고, Library는 GGS FLX plus library prep guide를 따라 PCR products를 이용하여 준비하였다. 상기에 열거한 pyrosequencing에 요구되는 모든 반응은 염기서열 분석기 제조사인 454 Life Science(Banford, USA)의 방법에 따라 Macrogen 사(Korea)에서 실시하였으며, Genome Sequencer FLX software(Roche)를 사용하여 서열의 길이가 300 bp 이하인 것들은 분석에서 제외했고, Hidden Markov Model(HMMER 3.0; <http://hmmer.janelia.org/>)과 BLAST search를 통해 chimera 염기 서열과 16S rRNA가 아닌 서열들도 제거하였다. EzTaxon extended database(Chun et al., 2007)를 이용하여 BLASTN 탐색 실행결과 찾은 상위 다섯 개의 hits를 대상으로 pair-wise alignment(Myers and Miller, 1988)를 실행한 뒤 얻은 similarity를 기준으로 분류학적 동정을 수행하였다. CD-HIT-OUT software를 이용하여 시료 내에 존재하는 종의 수인 operational taxonomic unit(OUT) 수를 구하였다. 통계 분석은 MOTHUR program (Schloss et al., 2009)을 사용하여 rarefaction curve, abundance-based coverage estimator(ACE) index, Chaol richness index, Shannon 및 Simpson diversity indices들과 Good's coverage index (Good, 1953)를 구하였다.

## ② 저염 장류에서 증식하는 *Enterococcus* 균주의 분리

전국적으로 수집한 장류(된장, 간장, 청국장, 고추장) 샘플에서 부패한 샘플을 골라 pyrosequencing을 수행하였고, 그 결과 부패한 저염 장류에서 식품 유해균주인 *Enterococcus* 속이 나왔다. 부패한 저염 장류에서 증식하는 *Enterococcus* 균주의 분리 및 동정은 다음과 같다.

## ㉠ Enterococcosel agar 배지를 이용한 colony 선별

부패한 저염 장류 샘플을 각 0.1g씩 NB 배지 1 ml에 현탁하고 각각을 연속희석 시킨 후 200  $\mu$ l를 Enterococcosel Agar(BBL, USA) 배지(Pancreatic Digest of Casein 17.0%, Peptic Digest of Animal Tissue 3.0%, Yeast Extract 5.0%, Oxgall 10.0%, Sodium Chloride 5.0%, Esculin 1.0%, Ferric Ammonium Citrate 0.5%, Sodium Azide 0.25%, Sodium Citrate 1.0%, Agar 13.5%)에 도말하고 37°C에서 호기조건으로 24시간 동안 배양 후 암갈색 또는 흑색복합체를 형성하는 colony를 선별하였다. 이 배지의 원리는 장구균과 그룹D 연쇄상 구균은 다당체 esculin을 esculetin과 포도당으로 분해하는데, esculetin은 철염, 구연산철암모늄과 반응하여 암갈색(dark brown) 또는 흑색복합체를 형성한다(Fig. 1). Oxgall은 장구균이외에 그람양성 세균을 억제하는데 이용되었고, Sodium azide는 그람음성 미생물을 억제하는데 이용되었다.

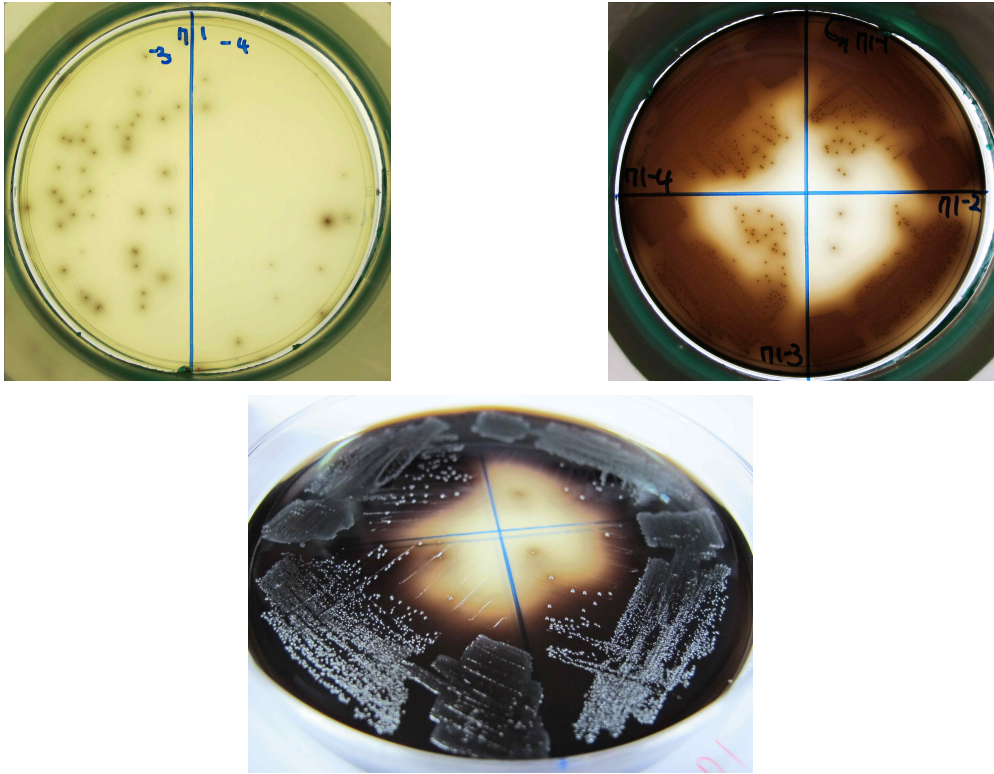


Fig. 1. Selection of *Enterococcus* genus using Enterococcosel Agar.

#### ⊕ 균주 동정

16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 균 동정을 위해 universal primer로서 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭 후, 동정에 중요한 가변 염기 영역(Chakravorty et al., 2007)을 포함하는 1,443 bp를 BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하여 해독하였다. 염기 서열들을 이용해서 BLASTN search(Zhang et al., 2000)와 Ribosomal Database Project(version 11)의 SeqMatch program에서 서열 일치도가 높은 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 얻었고, 이들 염기 서열간의 상호비교를 위해 CLUSTAL W(Thompson et al., 1994)를 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기 서열들을 정렬하고 chromatogram의 시각적 관찰과 수작업으로 gap이 최소화되도록 보정한 후 Tamura-Nei model에 기초한 Maximum Likelihood 방법(Tamura and Nei, 1993)을 사용하여 작성하였다. 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계적 신뢰도를 산출하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며, 계통분석과 bootstrap 분석은 MEGA program(Tamura et al., 2011)를 사용하였다.

#### (2) 전통 장류로부터 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 주요 발효 *Bacillus* 분리 및 동정

##### (가) 저염화 장류 제조를 위한 *Bacillus* 우수 균주 선발 및 *Bacillus* 항균활성 확인

전통 방법에 따라 제조한 83종의 된장 고추장, 청국장들에서 저염화 장류 제조를 위한



*Bacillus* 우수균주 분리 및 동정은 다음과 같다.

### ① 균주 선발 및 배양

전통 방법에 따라 제조한 83종의 된장 고추장, 청국장들을 구입 후 5 g을 취해 0.3 mM 인산 완충액(pH 7.2)으로 희석하였다. Nutrient Agar(NA)와 *B. cereus* 선택 배지(chromogenic polymyxin B-methoprim agar(CPMA)) 표면에 희석된 균액을 각각 200  $\mu$ l씩 도포하고 30°C에서 24시간 배양 후, NA에서 자란 집락수에 비해 CPMA에서 자란 집락수의 비율이 낮았던 장류들을 선발하였다. NA에서 배양한 이 선발 장류의 집락들을 toothpick으로 찍어 미리 만들어 둔 NA와 CPMA 배지의 같은 위치에 각각 접종하여 24시간 후 CPMA에 자라지 않은 균들만을 수집하였다. 수집한 균들을 대상으로 PCR에 의해 *B. cereus* 독소 유전자 유무를 검사한 뒤, 선발한 균들을 NB배지에 37°C, 78시간 배양하고 16,000×g에서 3분간 원심분리 후 상층액을 모아 -20°C에 보관하였다.

### ② *Bacillus cereus* 및 유해균에 대한 길항능력 확인

표준 균주인 *B. cereus* KACC 11240(ATCC 14579)과 본 실험실에서 분리한 *B. cereus* JBE 0001(GenBank accession no. FJ 982655), JBE 0002(FJ 982656), JBE 0004(FJ 982654), JBE 0005(FJ 982657), JBE 0006(FJ 982658) JBE 0008(FJ 982659), JBE 0011(FJ 982661)을 NB에서 37°C, 21시간 배양 후 100  $\mu$ l를 각 NA 표면에 끌고루 spreading하고 배지 중앙에 4 mm paper disc(3M)를 올려놓았다. 냉동 보관했던 원심분리 상층액을 녹여 paper disc 중앙에 20  $\mu$ l를 분주하고 21시간 37°C로 배양 뒤 투명한 크기를 측정하여 8 종의 *B. cereus* 모두에 대해 길항능력을 가진 종들을 분리하였다. 또한, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* 배양은 NB 배지, *B. cereus* 검출 배지는 CPMA, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* 배양은 각각 *Lactobacilli* MRS broth(MRS), trypticase soy broth(TSB), *Listeria* Oxford broth(LOB), *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*는 potato dextrose broth(PDB), *Candida albicans*는 yeast extract broth(YEB)를 사용하였다. 사용한 장류 유해 균주들은 생명자원센터(KCTC)와 한국농업미생물자원센(KACC)로부터 분양을 받았다. 배양온도로 *A. ochraceus*는 25°C, *L. brivis* 28°C, *Aspergillus* 및 *C. albicans*는 30°C, 나머지 균들은 37°C에서 배양하였다.

### ③ 선발 균주 동정

생화학적 동정을 위해 균을 새로운 NA 배지에 접종하고 37°C에서 18시간 배양하였다. 형성된 집락은 NA 배양액에 희석 후 46종 건조 배지 및 생화학 반응물로 구성된 BCL ID card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, USA)에 주입하였고, 15분 간격으로 결과들이 VITEK 2 Compact software(bioMérieux Vitek)에 통합적으로 저장 분석된 뒤 14시간 후 동정이 완료되었다.

16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 균 동정을 위해 universal primer로서 518F(5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3')와 800R(5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')을 이용, 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭 후, 동정에 중요한 50~900 bp 염기 서열을 포함하는 1,443 bp를 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하

여 해독하였다. 이 염기 서열은 NCBI database로부터 BLASTN program(Zhang et al., 2000)과 Ribosomal Database Project(RDP)의 Seqmatch program(version 3)을 사용하여 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 얻은 다음 염기 서열들 간의 상호 비교를 위해 CLUSTALW 프로그램(Thompson et al., 1994)을 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 시각적 관찰과 수작업으로 gap이 최소화되도록 보정한 후 Kimura's two-parameter method(Kimura, 1980)와 maximum parsimony method (Fitch, 1971)를 사용하여 작성하였다. 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 산출하기 위해 Bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며 계통 분석과 bootstrap 분석은 PAUP(version 4.0b)을 사용하였다(Swofford, 1998). 곰팡이 동정을 위한 DNA 추출을 위해 PDA 배지에 멸균 셀로판지를 깔고 균을 접종한 뒤 25°C 에서 5~7일 간 incubation 시킨 후 셀로판지 위층의 균사체를 분리하였다. 균사체를 -80°C 에 1시간 정치한 뒤 액체 질소 하에서 분말형태로 만들고 0.5 ml를 취하여 EP tube에 옮겼다. 500 µl lysis buffer를 첨가한 뒤 68°C 에서 10분 동안 incubation 후 16,000 × g에서 7분 동안 원심분리 하였다. 원심 상층액에 600 µl의 isopropanol 를 첨가한 뒤 원심분리하여 상층액을 제거하고 600 µl의 70% Et-OH로 세척하였다. PCR을 위한 universal primer로 ITS1(forward primer; 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4(reverse primer; 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3,)를 사용하였으며 반응조건은 95°C, 5 분, 35 cycles(95°C, 30 초; 55°C, 1 분; 72°C, 1 분), 72°C, 6 분이였다.

#### ④ *Bacillus cereus* 독소유전자 및 *Bacillus* 항균물질 유전자 유무 확인

*B. cereus*의 설사독소유전자(*nheABC*, *hblACD*, *cytK*), 구토 독소 cereulide 합성 효소 유전자(*cesA* 및 *cesB*), 설사독소 발현 전사조절 유전자 *plcR-papR*, 호흡독소인 certhrax를 갖는지 확인하기 위하여 PCR을 실시하였다. 이들 독소 검출용 primer 서열들은 Table 1과 같으며, PCR 조건은 94°C에서 2분간 초기 변성 후, 94°C 1분간 변성, 56°C 1분간 결합, 72°C 1분간 증폭 과정을 30회 반복하고 72°C에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다. 항균물질 유전자 유무를 확인하기 위해 *B. licheniformis*의 Lichenysin 합성 효소 유전자인 *lchAA*, *lchAB*, *lchAC*와 lantibiotic 수식 효소 유전자인 *licM1*, *licM2*, *B. subtilis*의 surfactin 합성효소 유전자 *srf4A*, *srfAB*, *srfAC*를 선택하여 PCR을 수행하였다. primer 서열들은 Table 1과 같고, PCR 조건은 94°C에서 2분간 초기 변성 후, 94°C 1분간 변성, 56°C 1분간 결합, 72°C 1분간 증폭과정을 30회 반복하고 72°C에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다.

Table 1. The PCR primers used in this study.

Primer pair	Sequence	Target sequence (GenBank accession no)	Size (bp)
nheAF nheAR	ATATGCGCAAAATGTAATTGCTCCA TGCCTTCTTCAACATTTGTTTGAATTT	Non-hemolytic enterotoxin, <i>nheA</i> (AY835995)	935
nheBF nheBR	ACTTATGGCAGTATTTGCAGCAGGA TGCAACGCTGTAATTGCAGTATCAA	Non-hemolytic enterotoxin, <i>nheB</i> (AY835995)	972
nheCF nheCR	GACCAGCAGGATTTCCAGATGTAAT CCACGCCTTCATGTAATTTTTCTGT	Non-hemolytic enterotoxin, <i>nheC</i> (AY835995)	930
hblAF hblAR	ACCAGTAGCGACTTTTGCAAGTGAA TTTTGAGCTGCATTCTCAATATGCC	Hemolytic enterotoxin, <i>hblA</i> (AY822584)	909
hblCF hblCR	ATCAATACTCTCGCAACACCAATCG ATGTGCTCGTTGCTCTGCTGTTAAT	Hemolytic enterotoxin, <i>hblC</i> (AY822584)	957
hblDF hblDR	GACTGAAGACAGCATTGGCTCAAAC CGATGTCTTTTCGAAATGAATTCTGC	Hemolytic enterotoxin, <i>hblD</i> (AY822584)	1,059
cytKF cytKR	CCGCTGTTTTTGCTAGTAGTGCTGT ACGTCTTTTACGTTGTTTCCAACCC	Cytotoxin K, <i>cytK</i> (DQ019311)	901
plcRF plcRR	CRGGYGCRGTATACCCAAGT TGAAATACCCCATGYCATYG	Phospholipase C regulatory protein, <i>plcRpapR</i> (DQ153391)	888
cesAF cesAR	GTTGGCGTGTTATGTGATCG GGTGAAACAGCTTCTCTCTGC	Cereulide synthetase A, <i>cesA</i> (AB248763)	662
ctxF ctxR	TGCTAAAGGAGGAAGGAACCGT AGCCCCATGTACCCCTTCTGGA	Certrax, <i>ctx</i> (AAEK01000004)	1,000
lchAF lchAR	ACGGCCGATCAGGAGCTTTC TCTCAGCGCCTTCTGATCTGC	Lichenysin synthetase, <i>lchAA</i> (AJ005061)	557
lchBF lchBR	TTTGACCCGGAGCTCGTTGA CTGAGGGCGGAAAGCAGGAT	Lichenysin synthetase, <i>lchAB</i> (AJ005061)	706
lchCF lchCR	CATGTATACGGCCGACGGA CTGAAGGCCGGAGATGGCTT	Lichenysin synthetase, <i>lchAC</i> (AJ005061)	1,173
lanM1F lanM1R	TCGCTGACCACCGAGGAAAA CGCTTTCTGCATGGTCCAG	Lantibiotic modification enzyme1, <i>licM1</i> (NC006270)	571
lanM2F lanM2R	CGACAGCGCACTACGCCTCT TCCCGCATGCTGCAGAAAAT	Lantibiotic modification enzyme2, <i>licM2</i> (NC006270)	776
srfAF srfAR	CGGTGTGTCATGGCGGATTT TCGAAAGCGGACGGTTCAAA	Surfactin synthetase A, <i>srfAA</i> (NC000964)	1,025
srfBF srfBR	CGGTGTGTCATGGCGGATTT TCGAAAGCGGACGGTTCAAA	Surfactin synthetase AB, <i>srfAB</i> (NC000964)	696
srfCF srfCR	TTCACTGTCCGAGGCGGAAA ACCGGCAGATAGGCTGCTCC	Surfactin synthetase AC, <i>srfAC</i> (NC000964)	933

⑤ 전자 현미경 관찰을 통한 *B. cereus* 에 대한 선발된 SCK B11 균주의 항균 작용

37°C에서 21시간 배양한 *B. cereus* KACC 11240(ATCC 14579) 배양액 1 ml에 동일 조건에서 배양한 SCK B11배양액을 직경 0.2  $\mu$ m filter(Satorius, Germany)로 여과한 여과액 2 ml을

넣고 37°C에서 8시간 더 배양시켰다. 배양액을 16,000 × g에서 3분간 원심 분리 후 상층액을 제거하고 9% NaCl로 2번 pellet을 세척한 뒤 2.5% glutaraldehyde 1차 고정, 1% osmium tetroxide 2차 고정, ethanol 탈수과정을 거쳤다. 100% ethanol에 탈수된 균을 cover glass 위에 떨어뜨린 뒤 80°C에서 12시간 건조시키고, ion sputter로 20분간 osmium을 코팅시켜 전계방사형 주사전자현미경(SUPRA 40VP, Carl Zeiss, Germany)에서 관찰하였다.

## ⑥ 선발된 SCK B11 균주의 biogenic amine 합성 및 시간별 분해

전통 장류 발효 시 높은 tyrosine과 histamine의 농도를 최소화하기 위해 biogenic amine 선택 배지와 HPLC를 이용, SCK B11의 biogenic amine 생산 여부를 조사했다. Amino acid decarboxylase를 분비하는 미생물은 선택배지에 첨가된 아미노산을 염기로 전환하며, 이 때 변화된 pH 때문에 cresol red는 적자색으로 바뀐다. 최근 전통 소시지에서 분리한 일부 *Staphylococcus*와 *Bacillus* 속들이 biogenic amines을 생산하는 것이 발견되었다(Bermudez et al., 2012). 선발 균주 SCK B11의 biogenic amines 분해 능력을 관찰하기 위해 HPLC를 수행하였다. 또한 시간별 biogenic amines의 분해률을 보기 위하여 2, 4, 6, 8, 10일 동안 배양하여 HPLC를 수행하였다. 증기 멸균한 삶은 콩가루 0.3 g에 각각 16 mg의 histamine, tyramine, putrescine, cadaverine을 녹인 0.8 ml NB 배지를 첨가하고 SCK B11 배양액 0.2 ml를 접종하였다. 대조균은 각 biogenic amines이 없는 NB를 대신 첨가하였다. 47°C에서 시간 별로 배양한 후 10,000xg에서 10분 간 원심 분리하여 얻은 0.1 ml 상층액과 80 μl 아세톤 용해 1% dansyl chloride, 50 μl 포화 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 μl 내부 표준 용액을 섞어 45°C에서 1시간 유도체화 시켰다. 유도체화한 시료용액에 50 μl 10% proline을 넣어 여분의 dansyl chloride를 제거한 뒤 0.5 ml ether를 넣고 3분 뒤 분리된 상층액만을 모아 증발 후 0.1 ml acetonitrile에 녹였다. HPLC 분석으로 역상컬럼은 C18(Capcell pak, 4.6 mmx 150 mm, 5 μm), 이동상은 H<sub>2</sub>O에 녹인 0.1% formic acid(A)와 acetonitrile에 녹인 0.1% formic acid(B), 농도 경사는 0~10 분, A:B=45:55; 11~15분, A:B=35:65; 16~25분, A:B=20:80; 26~30분, A:B=10:90, 30분 유속은 1 ml/min이었으며 10 μl 시료를 주입하였다.

## (나) 산막 효모에 대해 길항 능력을 가지는 우수 발효 *Bacillus* 선발

### ① 우수 발효 *Bacillus* 선발

산막효모와 부패균을 억제하기 위해서 (1) 장류에서 안전하게 사용하는 주 발효균으로 *Bacillus* 및 유산균일 것 (2) 이들 부패균에 효과적인 길항능력을 가질 것 (3) 장류의 맛과 풍미를 유지하는 균이 요구된다. 이들 중 *Bacillus* 균은 장류 발효에 가장 중요한 균이기 때문에 이 균을 중심으로 저염 부패균의 억제능을 조사했다. 우수 발효 균주로서 부패균의 억제능력을 가질 수 있는 *Bacillus* 분리 전략은 Fig. 2와 같다. 이에 대한 실험방법은 이전의 실험 방법을 따랐다.

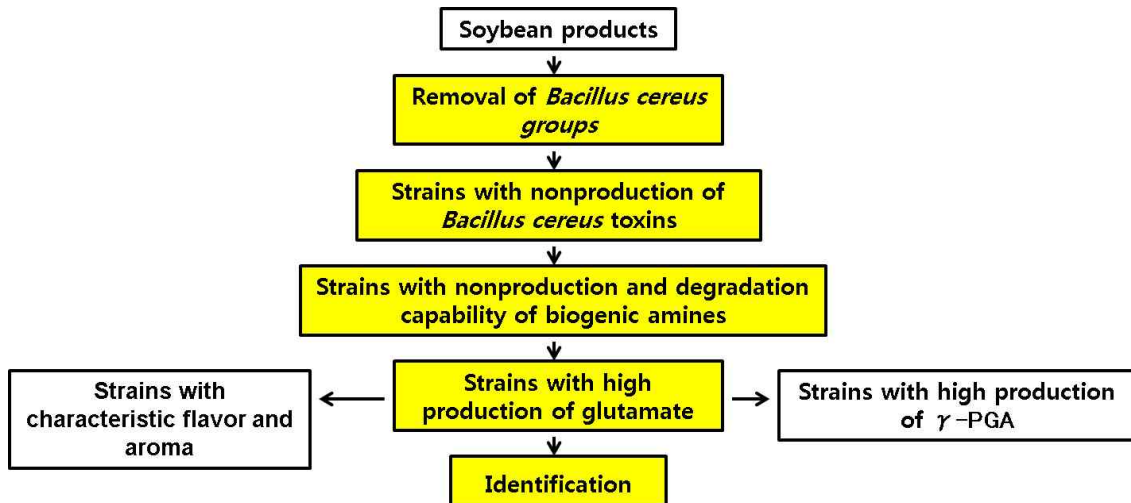


Fig. 2. Strategy for the isolation of industrial *Bacillus* strains.

## ② 선발된 우수 발효 *Bacillus* 균주들의 부패균 *Bacillus anthracis* / *B. cereus* 및 산막 효모에 대한 길항능력

산막 형성 저염 장류에서 분리한 *Bacillus anthracis*와 *B. cereus*는 NB 배지에 37°C에서 18시간 진탕 배양하였고, 산막 효모는 PDB배지에서 28°C, 48시간 진탕배양 후 각각 배양액 200  $\mu$ l를 CPMA배지 표면과 PDA배지에 spreading 하여 도말된 배지에 6 mm paper disc (ADVANTEC, Japan)를 올리고, NB 배지에서 37°C, 48시간 진탕 배양한 선별된 균주 배양액을 16,000 $\times$ g, 10분간 원심분리 하여 상등액을 취해 paper disc 중앙에 20  $\mu$ l를 분주하였다. CPMA배지는 37°C, 18시간 배양하였고, PDA배지는 28°C에서 48시간 배양한 후 투명환 크기를 측정하였다.

## ③ 선발된 우수 발효 *Bacillus* 균주들의 항생물질 유무 확인

산막효모의 증식을 억제하는 물질이 일부 *B. licheniformis*가 생산하는 펩타이드성 항균제인 lichenicidin이나 계면활성제인 lichenysin 또는 *B. subtilis*가 생산하는 surfactin인지 확인하기 위하여 항진균, 항세균 단백질의 합성 유전자에 대한 PCR을 수행하였다. 항균물질 유전자 유무를 확인하기 위해 *B. licheniformis*의 lichenysin 합성 효소 유전자인 *lchAA*, *lchAB*, *lchAC*와 lantibiotic 수식 효소 유전자인 *licM1*, *licM2*, *B. subtilis*의 surfactin 합성효소 유전자 *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*를 선택하여 PCR을 수행하였다. primer 서열들은 Table 2와 같고, PCR 조건은 94°C에서 2분간 초기 변성 후, 94°C 1분간 변성, 56°C 1분간 결합, 72°C 1분간 증폭과정을 30회 반복하고 72°C에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다.

Table 2. The PCR primers used in this study.

Primer pair	Sequence	Target gene (GenBank accession no)	Size (bp)
IchAF IchAR	ACGGCCGATCAGGAGCTTTC TCTCAGCGCCTTCGATCTGC	Lichenysin synthetase, <i>IchAA</i> (AJ005061)	557
IchBF IchBR	TTTGACCCGGAGCTCGTTGA CTGAGGGCCGGAAAGCAGGAT	Lichenysin synthetase, <i>IchAB</i> (AJ005061)	706
IchCF IchCR	CATGTATACGGGCCGACGGA CTGAAGGCCGGAGATGGCTT	Lichenysin synthetase, <i>IchAC</i> (AJ005061)	1176
IanM1F IanM1R	TGGCTGACCACCGAGGAAAA CGCTTCTGCATGGTCCCAG	Lantibiotic modification enzyme1, <i>IicM1</i> (NC006270)	571
IanM2F IanM2R	CGACAGCGCACTACGCCTCT TCCCGCATGCTGCAGAAAAT	Lantibiotic modification enzyme2, <i>IicM2</i> (NC006270)	776
srfAF srfAR	GAGCGGCAGCGGATTAATG GGCCTTCAAAATCGCCTGCT	Surfactin synthetase AA, <i>srfAA</i> (NC000964)	1,026
srfBF srfBR	CGGTGTGTCATGGCGGATTT TGGAAAGCGGACGGTTCAA	Surfactin synthetase AB, <i>srfAB</i> (NC000964)	696
srfCF srfCR	TTCACTGTCCGAGGGCGGAAA ACCGGCAGATAGGCTGCTCC	Surfactin synthetase AC, <i>srfAC</i> (NC000964)	932

(다) 저염 장류 제조시 유해균에 대한 길항 능력이 우수한 발효 *Bacillus* 선발

전통 방법에 따라 제조한 된장, 고추장, 청국장, 간장의 장류시료에서 저염 장류 제조 시 사용할 수 있는 산업적으로 유용한 우수 발효 *Bacillus* 균주 분리 및 동정은 다음과 같다.

① 특이적 colony 선별 및 *Bacillus cereus* 제거

전국적으로 수집한 112개의 장류(된장, 간장, 청국장, 고추장) 시료에서 각 시료 0.1 g을 NB 배지 1 ml에 현탁하고 각각을 연속희석 시킨 후 200  $\mu$ l를 NA 배지에 도말하고 37°C에서 18h 동안 배양한 후 특이적 colony를 선별하였다. 선별된 colony의 *B. cereus* 균주 및 biogenic amine을 생성하는 균주를 제거하기 위해 미리 만들어둔 NA, CPMA, biogenic amine 생성확인 배지(BaPA)의 같은 위치에 tooth pick으로 각각 접종하여 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 CPMA에서 푸른색을 띄지 않으며, BaPA 배지에서 보라색을 띄지 않는 균을 선발하였다. BaPA 배지는 Chang(2012)의 방법을 이용하였다(Fig. 3).

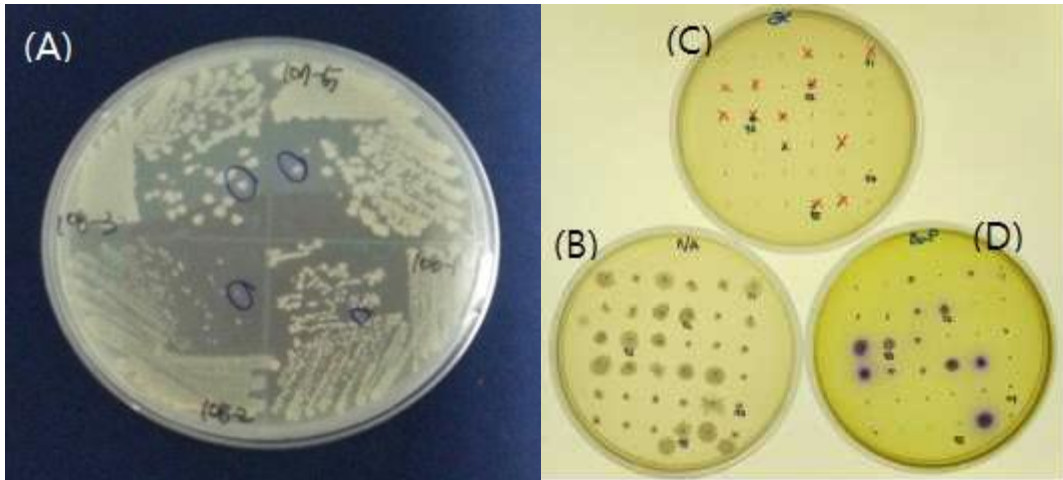


Fig. 3. (A) Isolation of single colony, (B) NA, (C) CPMA, (D) BaPA.

## ② 유해균에 대한 길항균주 선발

유해균에 대한 길항균주 선발을 위해 식품유해균인 *Bacillus cereus*(KACC 10077, KACC 12672), *Escherichia coli*(KACC 13821), *Listeria monocytogenes*(KACC 104764), *Pseudomonas aeruginosa*(KACC 10259), *Enterococcus faecalis*(KACC 11304)는 각각 NB 배지에 37°C에서 18시간, *Staphylococcus aureus*(KACC 10778), *Staphylococcus saprophyticus*(KF476041), *Staphylococcus wagneri*(KF476044)는 각각 LB(Luria-Bertani) broth 배지에 37°C에서 18시간 배양하고 *Pichia kudriavzevii*(KF277144)는 PDB배지에서 27°C, 48시간 진탕배양하였다. 배양액 200  $\mu$ l를 배지 표면에 spreading 하여 도말된 배지에 6 mm paper disc를 올리고, NB 배지에서 37°C, 48시간 진탕배양한 선별된 균주 배양액을 16000  $\times$  g, 10분간 원심분리 하여 상등액을 취해 paper disc 중앙에 20  $\mu$ l를 분주하였다. 이를 37°C, 18시간 배양한 후 투명한 크기를 측정하였다(Fig. 4).

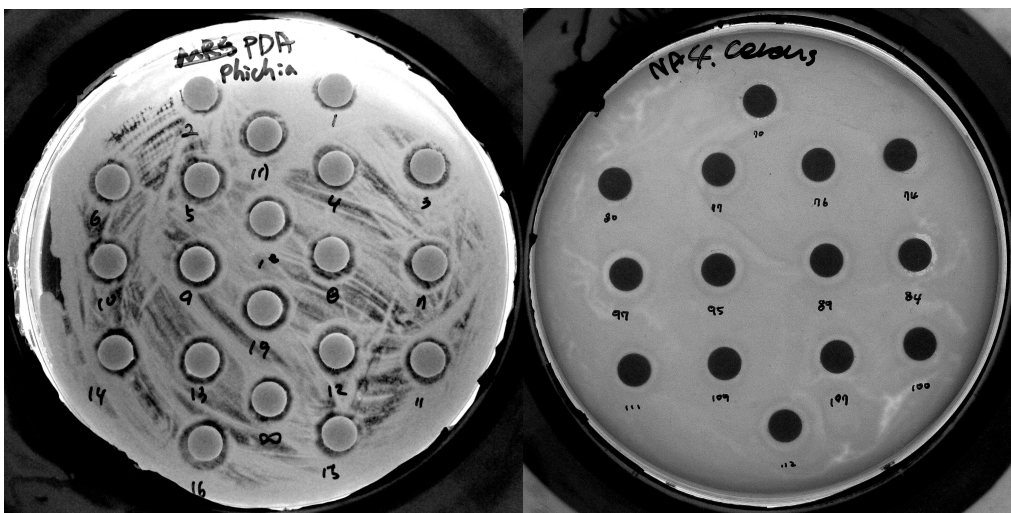


Fig. 4. Growth inhibition of putrefactive bacteria by antagonistic *Bacillus* strains isolated from soybean products.

### ③ Amylase 및 protease 활성 측정 및 glutamate 정량분석

#### ㉞ Amylase 및 protease 활성 측정

분리된 균주를 amylase 및 protease 활성 측정 배지에 tooth pick을 이용하여 접종 후 37 °C에서 18시간 배양 후 확인되는 투명환과 균체의 단축 및 장축을 측정하고 평균을 내어 비교하였다(Fig. 5).

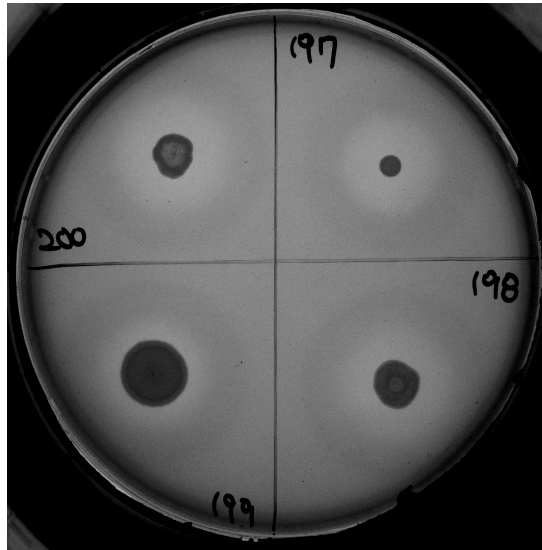


Fig. 5. Protease activity of *Bacillus* strains.

#### ㉟ Glutamate 정량분석

선발된 균의 산업적 이용을 위한 연구의 일환으로 glutamate 고생산능을 보유한 균주를 선발하고자 glutamate 생성능을 측정하였다. 측정방법은 Glutamate Assay Kit(Catalog #K629-100; 100 reactions; Store kit at -20°C)를 사용하여 kit 상에 protocol을 참조하여 진행하였으며, 상술하면 다음과 같다. 원료대두는 선별하여 이물질 제거 후 수세하여 물에 침지해서 불리고, 불린 콩 1 g 당 9 ml 증류수를 넣어 100°C 끓는 물에서 1시간 중탕하여 콩물배지(1:9=콩:물)를 조제하였고, 이를 121°C에서 15분간 살균하여 사용하였다. 선발된 균주는 NB배지에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 콩물배지에 1% 접종하여 37°C, 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 16000×g, 10분간 원심분리하여 상등액 50  $\mu$ l를 취해 96 well plate에 분주하였으며, glutamate 표준용액을 농도별 희석하여 50  $\mu$ l씩 분주하였다. 각각의 well에 reaction buffer mix(Assay Buffer 90  $\mu$ l, Glutamate developer 8  $\mu$ l, Glutamate enzyme mix 2 $\mu$ l) 100  $\mu$ l를 분주한 뒤 37°C, 30분 동안 빛을 차단하며 반응시켰다. 반응산물을 450nm Microplate reader에서 흡광도를 측정하고, 표준곡선에 비례하여 sample의 glutamate 생성능을 정량분석하였다(Fig. 6).



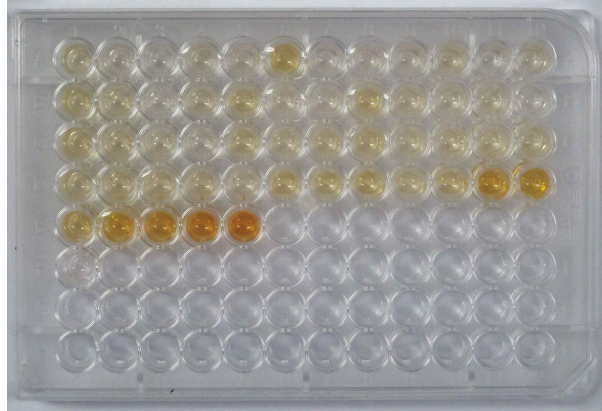


Fig. 6. Glutamate activity using of Glutamate assay kit.

#### ④ HPLC를 이용한 biogenic amines 분해율 확인

##### ㉞ 균주의 배양

Biogenic amines 분해 능력을 확인하기 위하여 탄소 및 질소원으로 0.1% biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine & cadaverine 각각 0.025%)을 함유한 최소합성배지 (Dipotassium Phosphate 0.7%, Monopotassium Phosphate 0.2%, Sodium Citrate 0.05%, Magnesium Sulfate 0.01%, Ammonium Sulfate 0.1%, Final pH 7.0±0.2)에 접종한 후 37℃, 48 시간 배양하였다.

##### ㉟ HPLC 분석을 위한 유도체화 및 HPLC 분석조건

배양액을 16000×g, 10분간 원심 분리하여 상등액 100 μl를 시료용액으로 사용하였으며, 대조구로는 균을 접종하지 않은 최소배지를 사용하였다. Dansyl chloride를 이용한 유도체화 방법은 일본위생시험법(PSJ, 2005)의 일부를 변형하여 사용하였다. 즉, 100 μl 상등액에 100 μl 아세톤에 용해된 1% dansyl chloride, 50 μl 포화 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 μl 내부 표준물질 0.001% 1,7-aminoheptane을 섞어 45℃ 암소에서 1 시간 유도체화 시켰다. 이 용액에 50 μl 10% proline 용액을 넣어 과잉의 dansyl chloride를 제거한 뒤, 0.5 ml diethyl ether를 넣고 잘 섞어 3 분 후 분리된 상등액 만을 모아 diethyl ether 용매를 증발시켰다. 이를 200μl acetonitrile에 녹여 HPLC 분석에 사용하였다. HPLC는 역상 컬럼으로 C18 Capcell pack(Shiseido, Japan; 4.6 mm x 150 mm, 5 μm), 이동상은 0.1% formic acid가 용해된 H<sub>2</sub>O(A)와 0.1% formic acid가 용해된 acetonitrile(B)을 사용하였고 농도 경사는 0-10 분, A:B=45:55; 10-15 분, A:B=35:65, 15-25 분, A:B=20:80; 25-30 분 A:B=10:90, 유속은 분당 1 ml이었으며 10 μl 시료를 주입하였다. 시료 농도(Cs) 계산은 다음과 같았다(Smělá et al., 2003).

$$Cs = RFs \times \frac{Cis \times As}{Ais}$$

RFs (각 tyramine, histamine의 response factor) = (Ais/Ass) x (Css/Cis)

Ass, 정량 표준 곡선에서 tyramine 또는 histamine의 피크 면적;

Css, 정량 표준 곡선에서 tyramine 또는 histamine 농도;

Ais, 내부 표준물질 피크 면적; As, 시료 피크 면적; Cis, 내부 표준물질 농도.

### ⑤ $\gamma$ -polyglutamate 생산능 및 발효취 확인

$\gamma$ -polyglutamate 생산능 및 발효취 확인을 위해 알이 고른 헛콩을 원료로 콩 분량의 3배의 물로 실온에서 12시간 정도 불린다. 불린 콩을 각각 10 g( $\pm$ 0.05g)씩 Tube에 담아 121°C, 15분 동안 콩을 찢 후 37°C, 18시간 배양한 균 1 ml을 접종하여 37°C, 48시간 발효시킨 후 콩의 표면에 생긴  $\gamma$ -polyglutamate의 늘어나는 정도(cm)를 측정하여  $\gamma$ -polyglutamate의 생산능을 확인하였고 발효취는 실험자가 직접 냄새를 맡은 뒤 냄새 및 냄새의 강도를 측정하였다(Fig. 7).



Fig. 7. (A), (B)Experimental procedure and (C) After fermentation.

### ⑥ 선발 균주 동정

16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 균 동정을 위해 universal primer로서 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭 후, 동정에 중요한 가변 염기 영역(Chakravorty *et al.*, 2007)을 포함하는 1,443 bp를 BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하여 해독하였다. 염기 서열들을 이용해서 BLASTN search (Zhang *et al.*, 2000)와 Ribosomal Database Project(version 11)의 SeqMatch program에서 서열 일치도가 높은 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 얻었고, 이들 염기 서열간의 상호비교를 위해 CLUSTAL W(Thompson *et al.*, 1994)를 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기 서열들을 정렬하고 chromatogram의 시각적 관찰과 수작업으로 gap이 최소화되도록 보정한 후 Tamura-Nei model에 기초한 Maximum Likelihood 방법 (Tamura and Nei, 1993)을 사용하여 작성하였다. 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계적 신뢰도를 산출하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며, 계통분석과 bootstrap 분석은 MEGA program(Tamura *et al.*, 2011)를 사용하였다.

### (3) 전통 장류로부터 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 유산균 분리 및 동정

#### (가) 산막 형성 효모의 증식 억제력이 있는 유산균 선발

##### ① 선발된 유산균 균주의 산막 효모에 대한 길항능력

산막 형성 저염 장류에서 분리한 산막 효모 균주들을 PDB 배지에서 28°C, 48시간 진탕배양 후 각각 배양액 200  $\mu$ l를 PDA배지에 spreading 하여 도말된 배지에 6 mm paper disc

(ADVANTEC. Japan)를 올리고, MRS broth배지에서 30℃, 48시간 진탕배양한 선별된 균주 배양액을 16000×g, 10분간 원심분리 하여 상등액을 취해 paper disc 증양에 20 μl를 분주하였다. PDA배지는 28℃에서 48시간 배양한 후 투명한 크기를 측정하였다.

(나) 전통 장류, 메주로부터 유해균에 강한 길항 작용을 가지는 *Leuconostoc*, *Weissella* 속 선발

① 우수 유산균 선발

상품성 있는 저염 장류 제조를 위하여 (1) 장류의 향미와 풍미를 높여줄 *Leuconostoc*, *Weissella* 속일 것, (2) *B. cereus* 및 저염 장류 제조 시 주로 존재하는 부패균에 대해 효과적인 길항능력을 가지는 균이 요구된다.

㉞ *Leuconostoc* 및 *Weissella* 균주 분리

유산균을 분리하기 위하여 전통 장류와 메주 시료를 구매하였다. 각 시료를 각각 희석하여 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe) agar(BD, USA) 배지에 200 μl를 도말하여 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양 후 생성되는 상이한 균 집락을 선발하여 유산균 선별 배지(0.006% Broom Creasol Purpls(BCP)를 첨가한 MRS agar에 tooth pick으로 접종하여 30℃에서 48시간 배양하였다. 유산균 선별 배지에 첨가한 BCP는 pH indicator로써 pH 5.2이하일 때는 노란색으로, pH 6.8 이상일 때는 보라색으로 색이 변한다. 이에 유산균 선별 배지에서 유산균이 성장하며 낮아지는 pH에 의해 colony 주위가 노란색으로 변한 colony를 선발하였다. 또한 *Leuconostoc* 속과 *Weissella* 속 균주를 선발하기 위해 dextran 생성 배지에 tooth pick으로 접종하여 30℃에서 48시간 배양 후 점성을 가지는 식용 다당류로서 exopolysaccharide(EPS)라 불리는 dextran을 생성하는 colony를 선발하였다(Fig. 8).

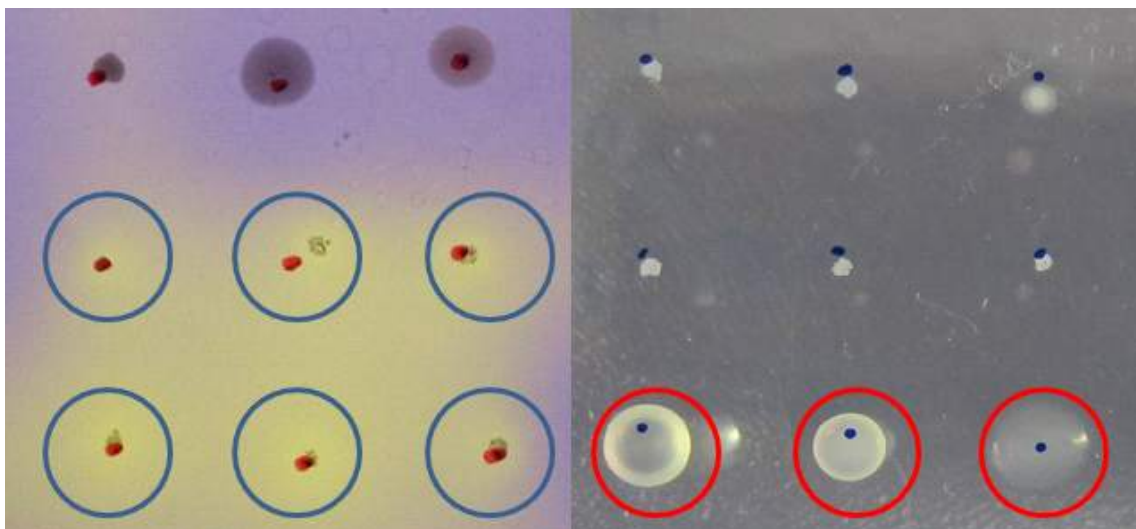


Fig. 8. Blue circle is to isolate lactic acid bacteria producing lactic acid and red circle is to isolate lactic acid bacteria producing dextran.

### ⊕ *Enterococcus* 제거

*Enterococcus*는 lactic acid bacteria의 한 속으로 드물게 아급성 심내막염이나 요로 감염, 감염성 식중독을 일으키며 부패한 장류에서 주로 존재하는 부패균의 중 하나이다. 이로 인해 선별된 lactic acid bacteria 중 *Enterococcus*가 있는지 확인하기 위하여 *Enterococcus* 선별배지인 Enterococcosel™ agar(BBL, USA) 배지와 PCR assay법을 수행하였다. *Enterococcus*와 그룹D 연쇄상 구균이 다당체 esculin을 esculetin과 포도당으로 분해하는 과정에서 esculetin이 배지 내 철염, 구연산 철암모늄과 반응하여 암갈색 또는 흑색 복합체를 형성하는 점을 이용한 Enterococcosel agar 배지에 37°C에서 호기조건으로 24시간 동안 배양 후 암갈색 또는 흑색복합체를 형성하는 colony를 제거하였다(Fig. 9). PCR assay는 Ke et al.(1999)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, *Enterococcus* specific primer는 *tuf* gene을 이용하여 설계한 것으로 각각 Ent1(5'-TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G-3')과 Ent2(5'-AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC-3')이며, PCR 반응은 95°C, 3분 열 변성, 35 cycles(95°C; 30초, 55°C; 30초, 72°C; 1분), 72°C, 7분간 final extension 온도조건으로 수행하였다(Fig. 10).

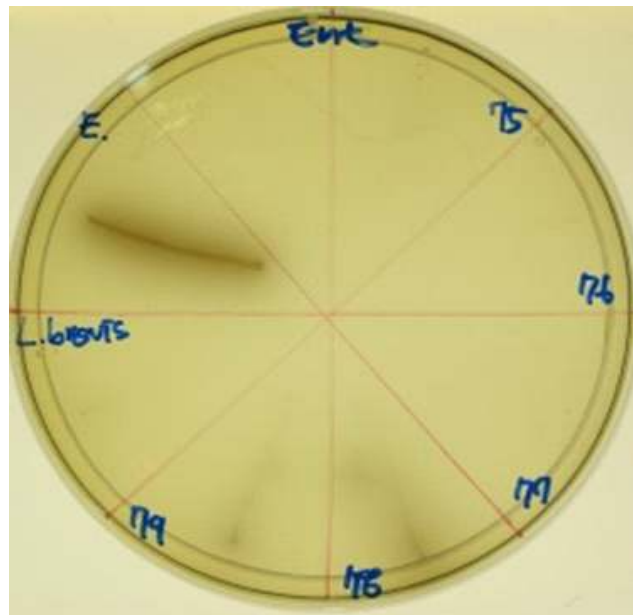


Fig. 9. *Enterococcus* colony's color changed to black in the *Enterococcus* selective medium. *Enterococcus* and *L. brevis* was type strain(*E. faecalis* KACC 11304), *L. brevis*(KACC11433).

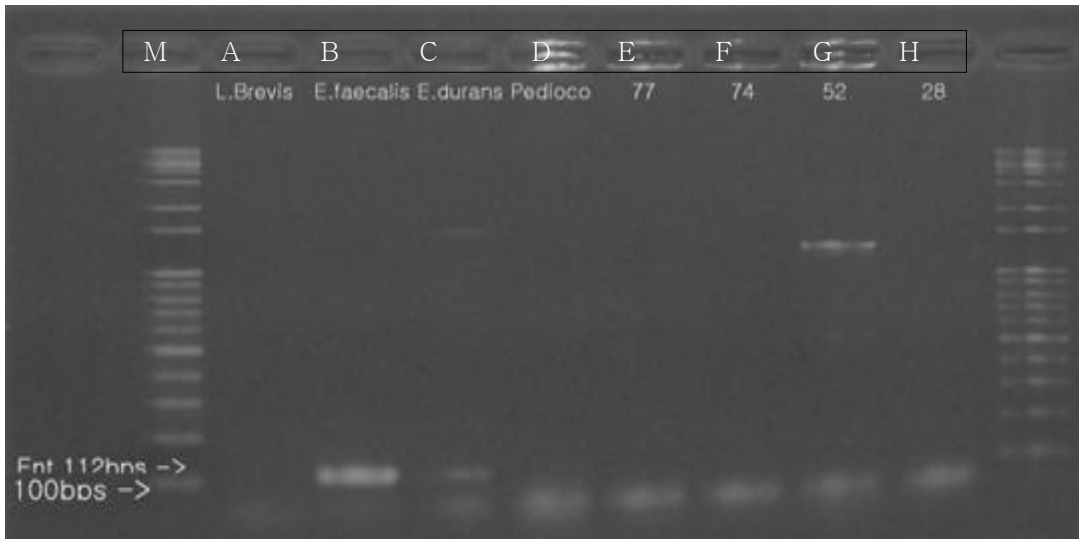


Fig. 10. PCR assay for identification of non *Enterococcus* and *Enterococcus* type strains. PCR products were gel electrophoresed. Lane: M, 100bps DNA ladder; A, *Lactobacillus brevis* KACC 11433; B, *Enterococcus faecalis* KACC 11304; C, *Enterococcus durans*; E-H, the strain isolated from soybean products.

#### ⊕ *Bacillus cereus* 및 부패균에 대한 우수 발효 균주들의 길항능력

보다 안전한 저염 장류를 제조하기 위해 선발한 lactic acid bacteria의 저염 장류 제조 시 주로 존재하는 부패균인 *B. cereus*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *E. lactis*에 대한 길항능력을 조사하였다. 이를 위해 *B. cereus*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*는 NB 배지에 37°C에서 200rpm으로 18시간 진탕 배양하였고, *E. lactis*는 MRS broth 배지에 30°C에서 200rpm으로 24시간 진탕 배양하였다. *B. cereus*는 CPMA 배지, *E. lactis*는 MRS agar 배지, 나머지 부패균은 NA 배지에 각각의 배양액 200  $\mu$ l씩을 분주하여 도말하고 그 위에 6mm paper disc를 올렸다. MRS broth 배지에서 30°C, 200rpm으로 48시간 진탕배양한 선발된 유산균 배양액을 16000 $\times$ g에서 10분 원심분리하여 상층액 20 $\mu$ l를 취해 paper disc에 분주하고 37°C에서 18시간 배양한 후 paper disc 주위로 생긴 halo의 크기를 측정하였다(Fig. 11).

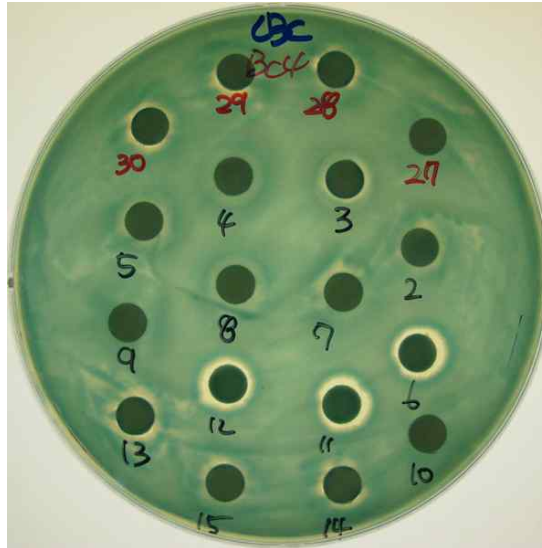


Fig. 11. Inhibition of growth of putrefactive bacteria(*B. cereus* KACC10097).

#### ㊦ HPLC를 이용한 biogenic amine 분해 균주 선발

선발된 20개의 lactic acid bacteria의 biogenic amine 분해 능력을 확인하기 위해 선발 균주들을 0.2% biogenic amines(Tyramine, Histamine 각 0.1%)가 첨가된 MRS broth 배지(final pH 5.3±0.2)에 접종하여 30℃에서 200rpm으로 48시간 진탕 배양하였다. 배양액을 16000 × g에서 10분간 원심분리한 후 상등액 100 μl를 시료 용액으로 사용하였으며, 대조구로 균을 접종하지 않은 0.2% biogenic amine이 첨가된 MRS broth 배지를 사용하였다. 유도체화 방법은 Dansyl chloride를 이용하는 일본위생시험법(PSJ, 2005)의 일부를 변형하여 사용하였다. 즉, 상등액 100 μl에 100 μl 아세톤에 용해된 1% dansyl chloride, 50 μl 포화 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 μl 내부 표준물질 1,7-aminoheptane을 섞어 45℃ 암소에서 1시간 유도체화 시켰다. 이 용액에 50 μl 10% proline 용액을 넣어 과잉의 dansyl chloride를 제거한 뒤, 0.5 ml diethyl ether를 넣고 1분 동안 잘 섞은 후 분리된 상등액만을 모아 50℃에서 incubation 하며 diethyl ether 용매를 증발시켰다. 이를 200 μl acetonitrile에 녹여 HPLC 분석에 사용하였다. HPLC는 역상 컬럼으로 C18 Capcell pack(Shiseido, Japan; 4.6 mm x 150 mm, 5 μm), 이동상은 0.1% formic acid가 용해된 H<sub>2</sub>O(A)와 0.1% formic acid가 용해된 acetonitrile(B)을 사용하였고 농도 경사는 0-10 분, A:B=45:55; 10-15 분, A:B=35:65, 15-25 분, A:B=20:80; 25-30 분 A:B=10:90, 유속은 분당 1 ml이었으며 10 μl 시료를 주입하였다. 시료 농도(C<sub>s</sub>) 계산은 다음과 같았다(Smělá et al., 2003).

$$C_s = RF_s \times \frac{C_{is} \times A_s}{A_{is}}$$

RFs (각 tyramine, histamine의 response factor) = (A<sub>is</sub>/A<sub>ss</sub>) × (C<sub>ss</sub>/C<sub>is</sub>)

A<sub>ss</sub>, 정량 표준 곡선에서 tyramine 또는 histamine의 피크 면적;

C<sub>ss</sub>, 정량 표준 곡선에서 tyramine 또는 histamine 농도;

A<sub>is</sub>, 내부 표준물질 피크 면적; A<sub>s</sub>, 시료 피크 면적; C<sub>is</sub>, 내부 표준물질 농도.

## ㉔ 선발 균주의 동정

선발된 20개의 균주의 형태학적 관찰을 위하여 균주들을 MRS broth 배지에서 30℃에서 200rpm으로 48시간 진탕 배양한 후 16000×g에서 3분간 원심 분리 하여 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 균체에 0.9% NaCl로 2번 pellet을 세척한 뒤 2.5% glutaraldehyde로 1차 고정, 1% osmium tetroxide로 2차 고정, ethanol로 탈수를 시켰다. 100% ethanol에 탈수된 균을 cover glass위에 떨어뜨린 뒤 80℃에서 12시간 건조 시키고, ion sputter로 20분간 osmium을 코팅시켜 전계방사형 주사전자현미경(SUPRA 40VP, Carl Zeiss, Germany)에서 관찰하였다.

또한, 선발된 20개의 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 균 동정을 위하여 universal primer로 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭한 후, Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems Inc., USA)를 이용하여 염기서열을 해독하였다. 이 염기서열들을 이용하여 BLASTN search(Zang et al., 2000)와 Ribosomal Database Project(version 11)의 SeqMatch program에서 서열 일치도가 높은 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 얻었고, 이들 염기 서열간의 사호비교를 위해 CLUSTAL W(Tompson et al., 1994)를 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 chromatogram의 시각적인 관찰과 수작업으로 gap이 최소화되도록 보정한 후 Tamura-Nei model에 기초한 Maximum Likelihood방법(Tamura and Nei, 1993)을 사용하여 작성하였다. 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 산출하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 실행 하였으며, 계통 분석과 bootstrap 분석은 MEGA program(Tamura et al., 2011)를 사용하였다.

## (4) 전통 장류와 메주로부터 저염 장류 제조에 상업적 용도로 사용할 수 있는 곰팡이 분리 및 동정

### (가) 저염 장류 제조시 사용할 수 있는 biogenic amine 및 aflatoxin 비생산 곰팡이 균주의 선발

저염 장류 발효에서 가장 중요한 요인은 부패 유해균의 증식 억제와 biogenic amines 감소와 같은 식품 안전성의 확립과 전통 장류의 풍미를 유지하는 일이다. 장류발효에 가장 중요하게 관여하는 진균류로서 *Aspergillus*는 직접적인 유해균 억제에 관여하지 않지만 같은 flavi group의 *Aspergillus flavus*가 생산하는 1급 발암물질인 aflatoxin을 생산하지 않아야하며 발효과정에 중요한 protease 및 amylase의 생산 능력이 높아야한다.

#### ① 시료 채취

균주 분리를 위해 시료 1 g 또는 1ml을 취해 멸균된 증류수로 희석한 다음 연속 희석한 다음 효모 및 곰팡이 분리용 3M petrifilm에 분주 하여 28℃, 48시간 배양하여 푸른색 균사체가 보이는 부분을 긁어 PDA 배지에 streaking하여 곰팡이를 선발한다.

#### ② Aflatoxin 생산 유무

Aflatoxin 생산 유무를 확인하기 위하여 5% coconut powder가 들어간 코코넛 배지에 선발된 곰팡이 균주를 접종하여 28℃에서 72시간 배양한 다음 UV로 형광유무를 확인하였다. Coconut

은 C12-C14의 지방산을 많이 함유하여 가수분해시 C16-C18보다 더 높은 농도의 glycerol을 생성하고 이것이 배지 상에서의 높은 aflatoxin을 유도한다. 생성된 aflatoxin은 365nm의 자외선을 흡수하여 녹색 및 노란색의 형광을 생성한다(Davis et al., 1987). Control 균주로 C사에서 상업적으로 판매하는 *Aspergillus oryzae* 균주와 농업유전자원센터(KACC)에서 분양받은 *Aspergillus flavus*(KACC 41809) 균주를 이용하였다.

### ③ 고체 배지 조건에서 protease 및 amylase 활성 측정

Protease 효소 활성 검사를 위해 skim milk 2%(w/v)를 첨가한 PDA 배지를 이용하였다. 시험 균주를 배지에 접종하고 30°C에서 72시간 배양한 다음 형성되는 투명환 크기를 측정하였고 균주의 균사체 크기로 나누어 상대적인 활성 값을 측정하였다.

고체 배양 상에서 amylase 효소 활성 검사를 위해 starch 2%(w/v)를 첨가한 PDA배지를 이용하여 시험 균주를 배지에 접종하고 30°C에서 72시간 배양한 다음 아이오딘-아이오딘화칼륨 용액을 이용하여 배지를 염색한 후 구별되는 투명환 크기를 측정하였고 균주의 균사체 크기로 나누어 상대적인 활성 값을 측정하였다.

### ④ HPLC를 이용한 biogenic amines 분해율 확인

선발한 곰팡이 균주의 biogenic amines 분해율을 확인하기 위하여 삶은 콩가루 0.3g 각 16mg의 histamine, tyramine, putrescine 그리고 cadaverin을 첨가한 0.8 ml PDB배지를 첨가하고 활성화 시킨 균주 배양액 0.2 ml를 접종하였다. 대조군으로 균주를 접종하지 않은 PDB배지를 사용하였다. 47°C에서 72시간 배양 한 후 10,000×g에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액 0.1 ml과 아세톤 용해 1% dansyl chloride 80  $\mu$ l, 포화 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50  $\mu$ l, 내부 표준 용액 50  $\mu$ l를 섞어 45°C 1시간 유도체화 시켰다. 유도체화한 시료 용액에 10% proline 50  $\mu$ l를 넣어 여분의 dansyl chloride를 제거한 뒤 ether 0.5 ml를 넣고 완전히 섞어주어었다. 5분 동안 실온에 방치하여 시료 용액층과 완전히 분리된 상층액 ether층만을 모으고 ether를 완전히 증발 시킨 후 acetonitrile 0.1 ml에 녹여 최종 시료로 사용하였다. HPLC는 역상 컬럼으로 C18 Capcell pack(Shiseido, Japan; 4.6 mm x 150 mm, 5  $\mu$ m), 이동상은 0.1% formic acid가 용해된 H<sub>2</sub>O(A)와 0.1% formic acid가 용해된 acetonitrile(B)을 사용하였고 농도 경사는 0-10 분, A:B=45:55; 10-15 분, A:B=35:65, 15-25 분, A:B=20:80; 25-30 분 A:B=10:90, 유속은 분당 1 ml이었으며 10  $\mu$ l 시료를 주입하였다. 시료 주입 후 표준물질(histamine, tyramine, putrescine, cadaverin)의 머무름 시간을 확인하고, 같은 머무름 시간에 있는 시료의 면적 값을 비교하여 biogenic amine 분해율(시료 peak 면적 값/ 대조군 peak 면적 값 × 100)을 측정한다.

## (나) 저염 종류에서 사용할 수 있는 biogenic amine 분해 및 aflatoxin 비생산 곰팡이 선발

### ① 시료 채취

균주 분리를 위해 시료 1 g 또는 1 ml을 취해 멸균된 증류수로 희석한 다음 연속 희석한 다음 효모 및 곰팡이 분리용 3M petrifilm에 분주 하여 28°C, 48시간 배양하여 푸른색 균사체가 보이는 부분을 긁어 PDA에 streaking하여 곰팡이를 선발한다.



## ② Aflatoxin 생산 유무

Aflatoxin 생산 유무를 확인하기 위하여 5% coconut powder가 들어간 코코넛 배지에 선발된 곰팡이 균주를 접종하여 28°C에서 72시간 배양한 다음 UV로 형광유무를 확인하였다. Coconut은 C12-C14의 지방산을 많이 함유하여 가수분해시 C16-C18보다 더 높은 농도의 glycerol을 생성하고 이것이 배지 상에서의 높은 aflatoxin을 유도한다. 생성된 aflatoxin은 365nm의 자외선을 흡수하여 녹색 및 노란색의 형광을 생성한다(Davis et al., 1987). Control 균주로 C사에서 상업적으로 판매하는 *Aspergillus oryzae* 균주와 농업유전자원센터(KACC)에서 분양받은 *Aspergillus flavus*(KACC 41809) 균주를 이용하였다.

## ③ 고체 배지 조건에서 Protease 및 Amylase 활성 측정

Protease 효소 활성 검사를 위해 skim milk 2%(w/v)를 첨가한 PDA배지를 이용하였다. 시험 균주를 배지에 접종하고 30°C에서 72시간 배양한 다음 형성되는 투명한 크기를 측정하였고 균주의 균사체 크기로 나누어 상대적인 활성 값을 측정하였다.

고체 배양 상에서 amylase 효소 활성 검사를 위해 starch 2%(w/v)를 첨가한 PDA배지를 이용하여 시험 균주를 배지에 접종하고 30°C에서 72시간 배양한 다음 아이오딘-아이오딘화칼륨 용액을 이용하여 배지를 염색한 후 구별되는 투명한 크기를 측정하였고 균주의 균사체 크기로 나누어 상대적인 활성 값을 측정하였다.

## ④ HPLC를 이용한 biogenic amines 분해율 확인

선발한 곰팡이 균주의 biogenic amines 분해율을 확인하기 위하여 삶은 콩가루 0.3 g 각 16 mg의 histamine, tyramine, putrescine 그리고 cadaverin을 첨가한 0.8 ml PDB 배지를 첨가하고 활성화 시킨 균주 배양액 0.2 ml를 접종하였다. 대조군으로 균주를 접종하지 않은 PDB 배지를 사용하였다. 47°C에서 72시간 배양 한 후 10,000×g에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액 0.1 ml과 아세톤 용해 1% dansyl chloride 80  $\mu$ l, 포화 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50  $\mu$ l, 내부 표준 용액 50  $\mu$ l를 섞어 45°C 1시간 유도체화 시켰다. 유도체화한 시료 용액에 10% proline 50 $\mu$ l를 넣어 여분의 dansyl chloride를 제거한 뒤 ether 0.5 ml를 넣고 완전히 섞어주었다. 5분 동안 실온에 방치하여 시료 용액층과 완전히 분리된 상층액 ether 층만을 모으고 ether를 완전히 증발 시킨 후 acetonitrile 0.1 ml에 녹여 최종 시료로 사용하였다. HPLC는 역상 컬럼으로 C18 Capcell pack(Shiseido, Japan; 4.6 mm x 150 mm, 5  $\mu$ m), 이동상은 0.1% formic acid가 용해된 H<sub>2</sub>O(A)와 0.1% formic acid가 용해된 acetonitrile(B)을 사용하였고 농도 경사는 0-10 분, A:B=45:55; 10-15 분, A:B=35:65, 15-25 분, A:B=20:80; 25-30 분 A:B=10:90, 유속은 분당 1 ml이었으며 10  $\mu$ l 시료를 주입하였다. 시료 주입 후 표준물질(histamine, tyramine, putrescine, cadaverin)의 머무름 시간을 확인하고, 같은 머무름 시간에 있는 시료의 면적 값을 비교하여 biogenic amine 분해율(시료 peak 면적 값/ 대조군 peak 면적 값 × 100)을 측정한다.

### (다) 상업용 곰팡이 균주보다 protease, amylase 활성이 높은 *Aspergillus oryzae* 선발

#### ① 시료 채취

다양한 시료로부터 곰팡이 균주를 분리하고자 하였다. 전통발효식품인 된장, 청국장, 고추장 등의 장류와 전통발효식품의 스타터로 쓰이는 누룩을 시료로 이용하였다. 시료는 전국 각지에

서 유통되고 있는 상업용 식품 및 스타터와 가내 수공업으로 제조한 식품 및 스타터를 이용하였다.

## ② 곰팡이 균주 분리

균주 분리를 위해 시료 1 g 또는 1 ml을 취해 펩톤액(0.1% Peptone + 0.85% NaCl)으로 희석한 다음 연속 희석한 다음 선택 배지에 도말 하여 1차 선별 하였다. 이를 위해 선택배지로써 Bacteria 계열에 광범위한 항균활성을 가지는 Chloramphenicol 0.005%를 첨가한 PDA을 사용하였다. 시료를 도말한 배지는 30℃에서 72시간 배양하며 배양 중 균사체를 형성하는 콜로니를 선택하여 Chloramphenicol을 첨가 하지 않은 PDA 배지에 계대 배양하여 순수 분리하였다. Control 균주로 C사에서 상업적으로 판매하는 *Aspergillus oryzae* 균주와 농업유전자원센터(KACC)에서 분양받은 *Aspergillus flavus*(KACC 41809) 균주를 이용하였다.

## ③ *Aspergillus oryzae* 균주 분리

분리된 곰팡이 균주 가운데 상업적으로 이용 할 수 있는 *Aspergillus oryzae*를 분리하기 위하여 형태학적 특성을 통해 1차적으로 *Aspergillus oryzae* 및 *Aspergillus flavus*를 분리하고 2차로 분별 배지를 이용하여 aflatoxin을 생성하는 균주를 제거하여 *Aspergillus oryzae*를 최종 분리하였다. 형태학적 특성은 PDA배지에서 순수 배양한 균주의 균사체 성장 특성이 *Aspergillus*속과 동일한 특성을 가지고 있는지를 확인하였고 현미경을 통해 포자낭 및 포자경을 확인하였다. *Aspergillus oryzae* 와 *Aspergillus flavus*를 구별하기 위하여 코코넛배지(Coconut powder 5%, Agar 1.5%)를 이용하였다. *Aspergillus*속에 속하는 균주를 백금을 이용하여 코코넛 배지에 접종한 뒤 30℃에서 72시간 배양한 다음 UV illuminator로 배지를 조사하였다. aflatoxin을 생산하는 경우 365nm의 파장에서 형광색을 나타내게 된다. 형광색을 나타내는 균주를 제거하여 aflatoxin을 생성하지 않는 *Aspergillus oryzae* 균주를 최종 선별하였다.

## ④ 고체 배지 조건에서 Protease 및 Amylase 활성 측정

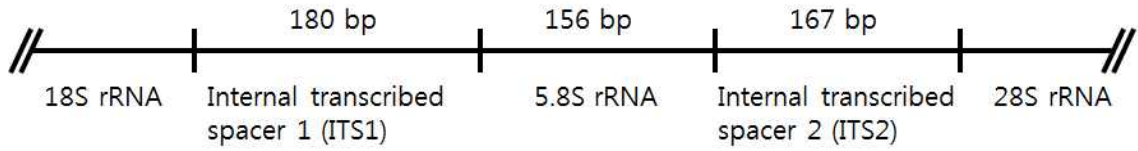
Protease 효소 활성 검사를 위해 skim milk 2%(w/v)를 첨가한 PDA 배지를 이용하였다. 시험 균주를 배지에 접종하고 30℃에서 72시간 배양한 다음 형성되는 투명한 크기를 측정하였고 균주의 균사체 크기로 나누어 상대적인 활성 값을 측정하였다.

고체 배양 상에서 amylase 효소 활성 검사를 위해 starch 2%(w/v)를 첨가한 PDA배지를 이용하여 시험 균주를 배지에 접종하고 30℃에서 72시간 배양한 다음 아이오딘-아이오딘화칼륨 용액을 이용하여 배지를 염색한 후 구별되는 투명한 크기를 측정하였고 균주의 균사체 크기로 나누어 상대적인 활성 값을 측정하였다.

## ⑤ 액체 배지 조건에서 amylase 활성 측정

또한 액상 배양 상에서 amylase 효소 활성 검사를 위해 DNS method를 이용하여 환원당을 측정하였다. PDB 배지에 균주를 접종하고 48시간 배양 후 상등액 200 $\mu$ l을 분리하여 2% starch를 첨가한 증류수 200 $\mu$ l를 혼합 시킨 뒤 55℃에서 한 시간 동안 반응시킨 뒤 DNS solution 400 $\mu$ l를 혼합한 후 90℃에서 10분 동안 중탕 가열한 뒤 4℃에서 10분간 식힌 다음 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

㉔ 선발 균주의 유전학적 동정



18S rRNA 및 23S rRNA 영역을 포함한 ITS영역의 유전자의 염기 서열에 의한 동정을 위해 universal primer로 ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') primer와 LR3(5'-GGT CCG TGT TTC AAG AC-3')를 사용하였다. 해당 영역의 유전자를 증폭하고, 이 PCR산물을 정제한 후 염기 서열을 해독하였다. 이 염기 서열을 이용하여 BLASTN search를 통해 서열 일치도가 높은 표준 균주의 유전자 염기서열을 얻었고, 염기 서열간의 상호 비교를 위해 CLUSTAL W를 사용했다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 chromatogram의 비교와 수작업으로 공백 부분을 최소화되게 보정한 후 Tamura-Nei 모델에 기초한 Maximum Likelihood 방법을 사용하여 작성하였다. 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계적 신뢰도를 산출하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며, 계통 분석과 bootstrap 분석은 MEGA6 program을 사용하였다.

나. 연구 수행 결과

(1) 저염 장류 제조 시 생기는 문제점 확인 및 부패 원인 균 규명

(가) 저염 장류의 제조 시 생기는 문제점 확인 및 부패균 분리, 동정

① 저염 장류의 특성

㉕ 산막(Film) 형성

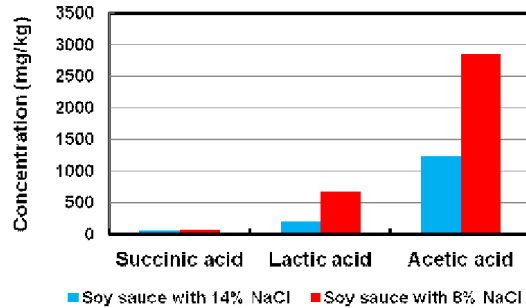
발효 후 8% 저염 된장은 14% 염 농도를 지닌 된장과 달리 희고 두꺼운 산막을 형성했다 (Fig. 12). 이러한 특성은 다른 종류의 저염 간장에서도 동일한 현상이었다. 따라서 이 산막 형성 균은 보다 저염의 환경에서 증식 속도가 증가하는 특성을 가진 것으로 보인다.



Fig. 12. Film formation on the surface of products.

㉔ 산도의 증가

발효 후 저염 장류는 정상 장류에 비해 더 낮은 산도를 나타냈으며 특히 초산의 증가가 가장 많았고 증가 비율로는 젖산이 가장 높았다.



Processing	Concentration of organic acid (mg/1kg)		
	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid
Soy sauce with 14% NaCl	66.3	220.5	1237.7
Soy sauce with 8% NaCl	86.1	679.8	2863.7

\*Personal communication with Cho et al. (Sunchang Research Center for Fermentation Microbes, 2013)

㉕ 바람직하지 않은 냄새의 생성

3달의 발효 후 8% 저염 된장은 14% 염 된장에 비해 부패 냄새가 났다.

㉖ 저염 장류 제조 시 생기는 부패 세균 및 산막 형성 효모 동정

발효 후 14% 염 농도의 된장 시료들은 된장 고유의 향미를 가지며 산막이 나타나지 않았으나, 8% 염을 함유한 4종의 된장에서는 부패 냄새와 함께 표면에 흰 산막을 형성하였다. 저염 시 증식이 증가한 산막 형성균과 부패균을 확인하기 위해 이들 균을 분리한 다음 세균은 16S rRNA 유전자 염기서열 분석과 pyrosequencing, 곰팡이 및 효모는 18S rRNA, ITS 영역, 28S rRNA의 염기 서열을 분석하였다.

㉗ Pyrosequencing을 통한 저염 장류의 부패균 군집 비교

특정적으로 14% 정상 장류에서 *Virgibacillus* 속이 가장 높은 군집 순위를 보였는데 낱알 메주 시 사용한 염수에서 기인한 것으로 보인다. 14% 장류와의 세균 군집을 비교했을 때 8% 장류에서는 *Staphylococcus*속이 20% 이상으로 증가하였고 속 수준에서는 *Bacillus*와 *Virgibacillus*를 이어 3번 째 군집 순위를 나타냈다(Fig. 13).

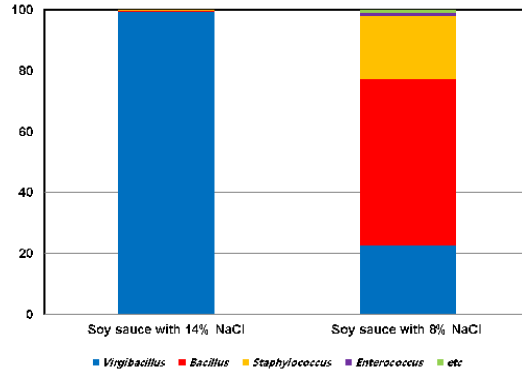


Fig. 13. Differences between bacteria community of soybean sauces with 8% and 14% salinity after three months of aging.

Pyrosequencing에 의한 세균 군집실험에서 14% 장류에서는 보이지 않았지만 8% 장류에서만 관찰된 세균 군집을 순위대로 표시한 결과가 Table 3에 나타나있다.

Table 3. Taxon exclusive analysis. Species that were only presented in the soy sauce submerged with 8% sodium chloride were compared with those in the normal soy sauce salted with 14%(w/v) sodium chloride.

Species	Soy sauce with 8% NaCl	Soy sauce with 14% NaCl
<i>Staphylococcus warneri</i>	1058	0
<i>Bacillus mojavensis</i>	649	0
<i>Bacillus atrophaeus</i>	268	0
<i>Bacillus tequilensis</i>	195	0
<i>Enterococcus durans</i>	90	0
<i>Staphylococcus_uc</i>	63	0
<i>Bacillus aerius</i>	60	0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	41	0
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	16	0
<i>Enterococcus lactis</i>	15	0
<i>Staphylococcaceae_uc_s</i>	14	0
<i>Enterobacter cowanii</i>	10	0

저염 일 때 가장 극적으로 증가된 세균은 *Staphylococcus*였다. *Staphylococcus*는 31속이 알려져 있는 토양 유래 세균으로 대부분 무해하지만 저염 장류에서 가장 많이 발견된 *S. warneri*의 경우 인체 면역 기능이 떨어지면 요도감염, 유산, 수막염 등을 일으킬 수 있는 기회 감염성 균이기 때문에 저염 장류 제조 시 이 균의 증식 억제가 필요하다.

㊤ 산막 형성 저염 장류에서 주로 존재하는 세균, 산막 형성 효모의 분리 및 동정

3M Petrifilm(3M, St. Paul, USA)에서 새 PDA로 다시 분리 배양 하여 얻은 20개의 집락에서 위상차 현미경에서 400배로 확인한 결과 7종은 세균 크기였고, 나머지 13종이 효모의 크기를 보였다. 7종의 세균을 16S rRNA 염기서열로 동정한 결과 6종은 *Staphylococcus saprophyticus*와 1종은 *S. warnei*로 동정되었다(Fig. 14). *S. saprophyticus*와 *S. warnei*는 모두 기회감염성 세균으로 요도나 방광에 감염되어 염증을 일으킬 수 있다. 이러한 점에서 저염 장류를 제조하는 경우 *Staphylococcus*와 같은 병원성 균의 증식 문제를 고려해야만 한다.

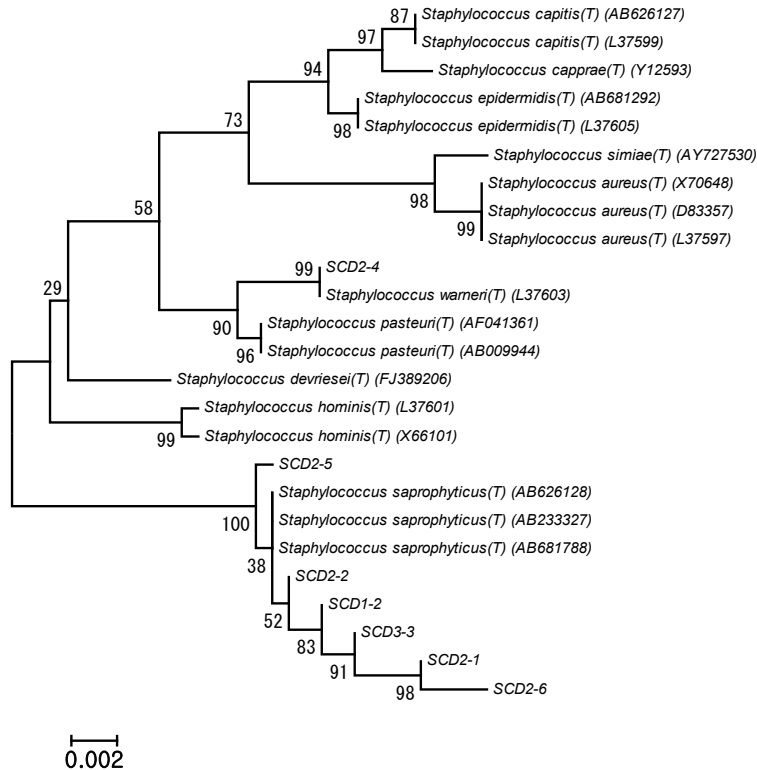


Fig. 14. Molecular phylogenetic analysis of putrifactive bacteria found in fermented soybean pastes with low salinity(8%) by Maximum Likelihood method.

장류발효동안 독소 생산 때문에 장류제품에  $10^4$  CFU/g 이하(식약청 식품공전)로 규제를 받고 있는 *Bacillus cereus* group은 *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*가 포함되며 장내에서 식중독 증상을 일으킨다. 저염 발효 시 이들 *Bacillus cereus* group은 과잉 증식의 가능성을 가지며, 식중독의 1차 원인균으로 작용할 수 있으므로 CPMA 배지를 이용 8% 저염 장류에서 증식한 이들 균 10종을 분리하였다. 16S rRNA 유전자 서열 분석 후 *Bacillus cereus* group 표준 균주를 대상으로 phylogenetic tree를 만들어 동정한 결과 저염 장류에 주로 존재하는 이들 균들은 7종이 *B. anthracis*, 3종은 *B. cereus*로 분류되었다(Fig. 15).

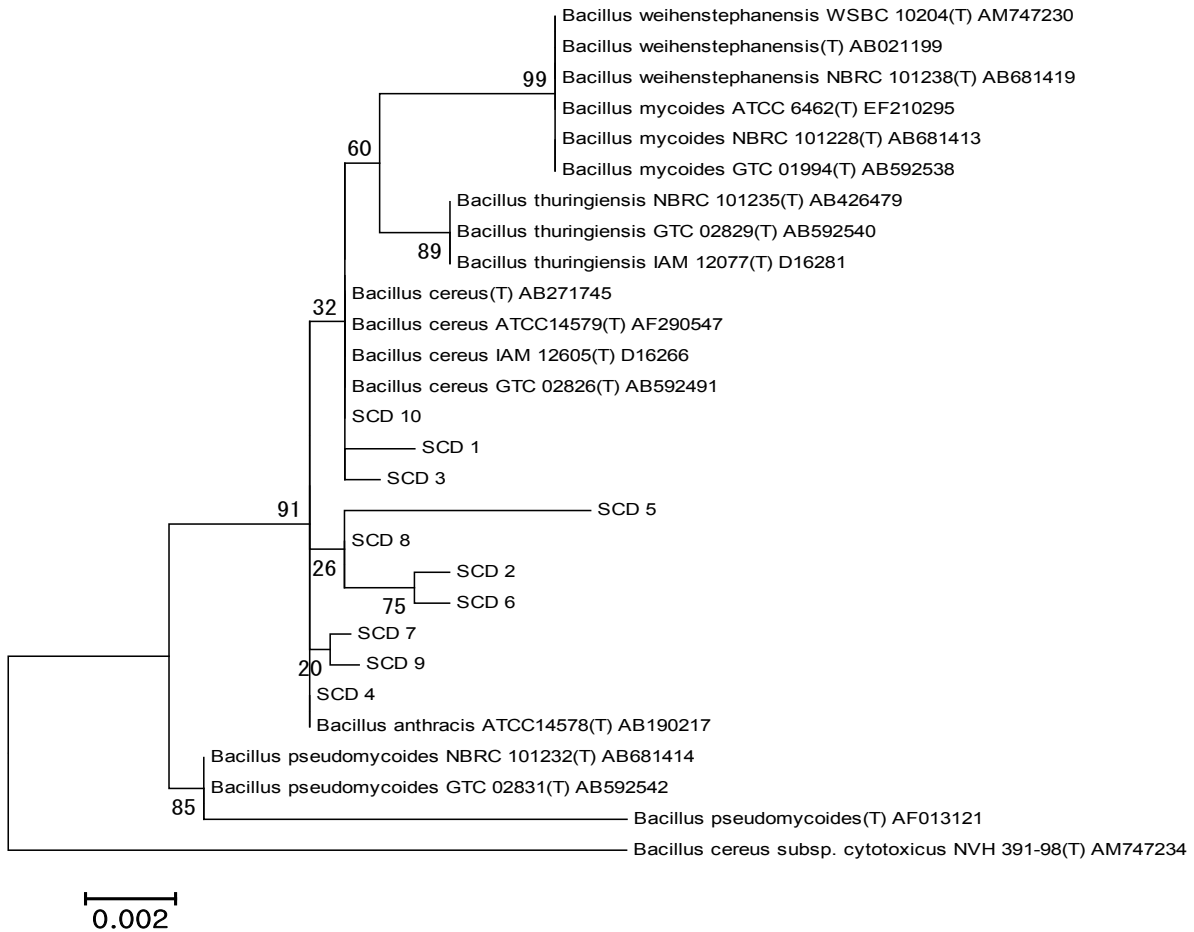


Fig. 15. Molecular Phylogenetic analysis of strains isolated from low-salted soybean pastes by Maximum Likelihood method based on 16S rRNA gene sequences.

위상차 현미경과 전자현미경에서 확인된 13개의 효모균(Fig.16 및 17)의 염기서열들을 대상으로 BLASTN search(Zhang et al., 2000)를 수행하여 가장 가까운 근연 관계를 추정된 결과 산막의 주 미생물들은 *Pichia* 또는 *Candida* 속 효모로 동정되었다(Fig. 18). 위한 표준 균주의 ITS 영역과 비교하기 위해 phylogenetic tree를 만든 뒤 동정된 모든 효모는 *Pichia kudriavzevii*(*Candida krusei*, *Issatchenkia orientalis*) 또는 *Candida xylopsoci*로 동정되었다(Fig. 19). 두 효모 표준 균주(type strain)의 ITS 1-4 영역의 염기 서열과 비교했을 때 100% 일치하였다. 포도주에서 산막형성 효모로는 *Candida boidinii*, *C. intermedia*, *C. pseudointermedia*, *C. pseudolambica*, *C. tropicalis*, *Issatchenkia occidentalis*, *I. orientalis*, *Pichia anomala*, *P. fluxuum*, *P. fermentati*, *P. galeiformis*, *P. membranifaciens*, *Brettanomyces* 속이 보고(Vollekova et al., 1996)되고 있고, 이들 중 *P. galeiformis*와 *P. membraniformis*는 가장 자주 발견되었다(Stratford, 2006).

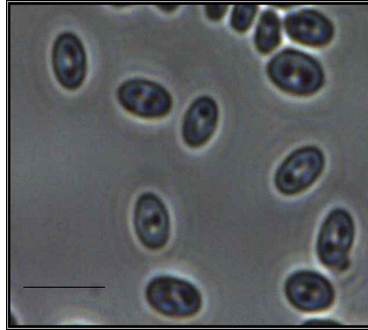


Fig. 16. A photo of film-forming yeasts taken by a light microscope. Bar scale is equivalent to 10  $\mu\text{m}$ .

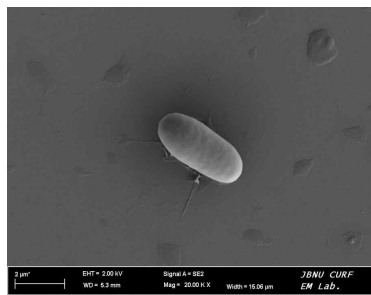


Fig. 17. Scanning electron micrographs of film-forming yeast. Bar length is 2  $\mu\text{m}$ .

BLASTN search: alignment statistics for match with partial 18S ribosomal RNA sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8 S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and partial 28S ribosomal RNA sequence of *Pichia kudriavzevii* (JX681126, FJ697171, FJ515204, EF198013, EF198000, JX174414, HQ122942, AB369918, and AY939808) and *Candida xylopsoci* (NR077074 and FM178339)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
894 bits(484)	0.0	484(483)/484(100%)	0/484(0%)	Plus/Plus

```

CLUSTAL W (1.1.1) multiple sequence alignment

11 AGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAAAAACACCTA
12 AGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAAAAACACCTA
13 AGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAAAAACACCTA
06 AGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAAACAACACCTA
07 AGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAAACAACACCTA
08 AGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAAACAACACCTA
09 AGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAAACAACACCTA
10 AGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAAACAACACCTA
24 AGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAAACAACACCTA
*****

```

Fig. 18. Comparison of nucleotide sequences of ITS regions between film-forming yeasts isolated from soybean paste with 8% salinity.



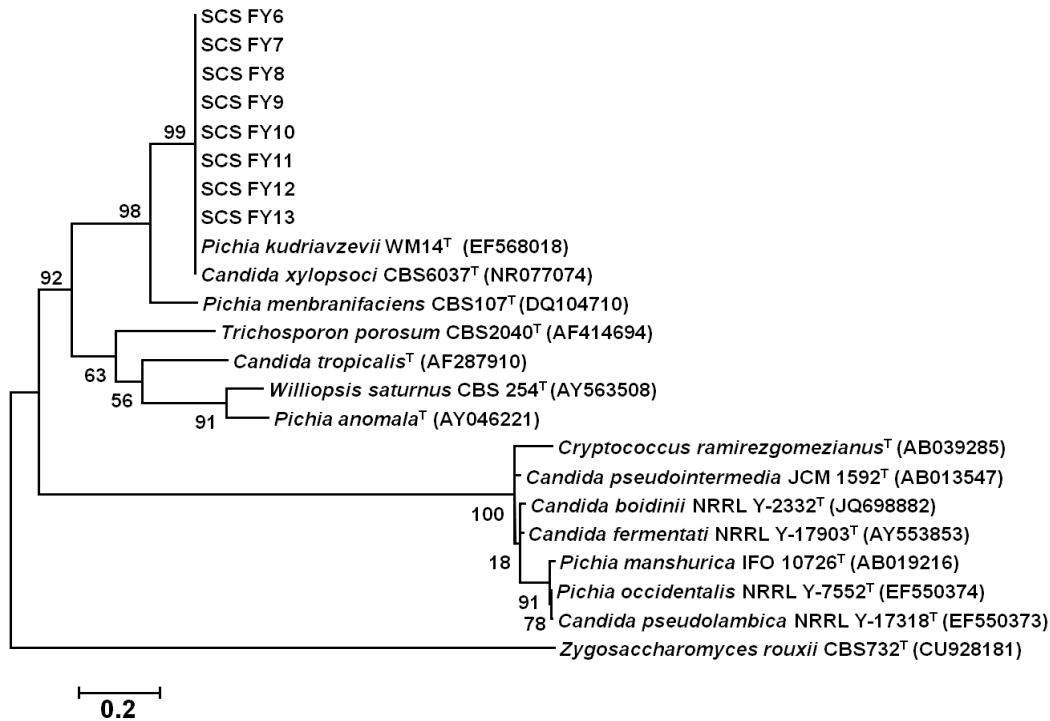


Fig. 19. Molecular phylogenetic analysis of film-forming yeasts found in fermented soybean sauces with low contents(8%) of sodium salt by Maximum Likelihood method.

(나) 저염 장류 제조 시 주로 존재하는 부패균 분리 및 동정

① 전통장류의 pyrosequencing 분석을 통한 부패균 군집 비교

Pyrosequencing 분석 결과 정상 장류 6종 중 5종이 *Bacillus*가 우점종이었고, 고추장 한 시료만 *Lactobacillus* 다음으로 *Bacillus*가 2번째 우점종이었다. *Bacillus* 이외에 다른 균주들만으로는 염 농도와 상관없이 정상적인 발효 숙성을 유지하지 못했다. 이는 메주로 제조하는 장류(고추장, 된장) 발효 숙성에 핵심적인 역할은 *Bacillus*균이 한다는 것을 보여준다. 위와 같은 결과로 장류부패의 원인은 메주 발효 시 항생 물질의 분비가 적거나 없는 *Bacillus* 이거나 항생 물질을 내는 다른 균주들 때문에 우점을 점하지 못하게 되는 *Bacillus*로 예상 할 수 있다. 저염의 장류가 부패하지 않기 위해서는 저염에서도 단백질 가수분해능이 뛰어나 콩 단백질의 분해를 잘하며 증식 속도가 빠르고, 항생물질(lichenycin, lichenicidine, surfactin 등)을 분비하여 발효 능력이 탁월한 *Bacillus* sp.가 우점종이거나 다른 부패균들의 증식이 어렵게 콩 발효 시작 후 빠르게 pH 저하(pH 4.5 내외)와 항생물질 생산을 유도하는 lactic acid bacteria가 *Bacillus*가 우점종이 되게끔 도와줄 수 있어야 한다. 본 실험에서는 *Bacillus*가 우점종이지 못했던 부패취가 나는 저염 장류 시료에서 부패취를 유발할 수 있는 배양되는 부패균을 분리, 동정하였다.

㉞ 전통 된장의 pyrosequencing 분석

Table 4. Bacterial diversity indices of the four different doenjang samples.

Sample	Reads	OTU	chao	chao_lci	chao_hci	ace	ace_lci
13_doenjang	3621	22	22	22	0	22.347101	22.026868
96_doenjang	3408	48	48	48	0	48.209096	48.013438
112_doenjang	5565	29	35	29.927818	67.800718	31.124392	29.350409
118_doenjang	7881	36	39.333333	36.503451	58.06988	38.842813	36.576481
Sample	ace_hci	shannon	shannon_lci	shannon_hci	simpson	simpson_lci	simpson_hci
13_doenjang	26.484115	1.033266	0.989597	1.076936	0.541327	0.523455	0.559199
96_doenjang	51.253568	1.938213	1.885353	1.991073	0.280065	0.266024	0.294106
112_doenjang	41.879348	1.331451	1.293661	1.369241	0.444488	0.43057	0.458406
118_doenjang	50.018817	1.411962	1.378913	1.445012	0.430435	0.418677	0.442194

Table 5. Comparison of Bacterial Community in doenjang using 16S rRNA Gene-Based pyrosequencing.

된장	good-12%	good-22%	bad-10%	bad-4%
Bacterial species	No.13	No.96	No.112	No.118
<i>Bacillus subtilis</i>	71.42	49.09	7.22	3.56
<i>Bacillus licheniformis</i>	16.96	14.06	0.52	1.79
<i>Bacillus sp. 37LGy-1</i>	3.51	10.83	1.02	5.85
<i>Bacillus sp. TCCC11054</i>	3.45	1.17	0.14	0.09
<i>Thermoactinomycessanguinis</i>	0.83	2.73	0.13	0.05
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	0.17	6.48	15.99	63.24
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides</i>	0.03	0.29	2.75	0
<i>Enterococcus faecium</i>	0	3.99	64.15	0.02
<i>Halomonassp. JS46</i>	0	0	0.22	15.57
<i>Bacillus cereus</i>	0	2.82	0	0
ETC.	3.63	8.54	7.86	9.83

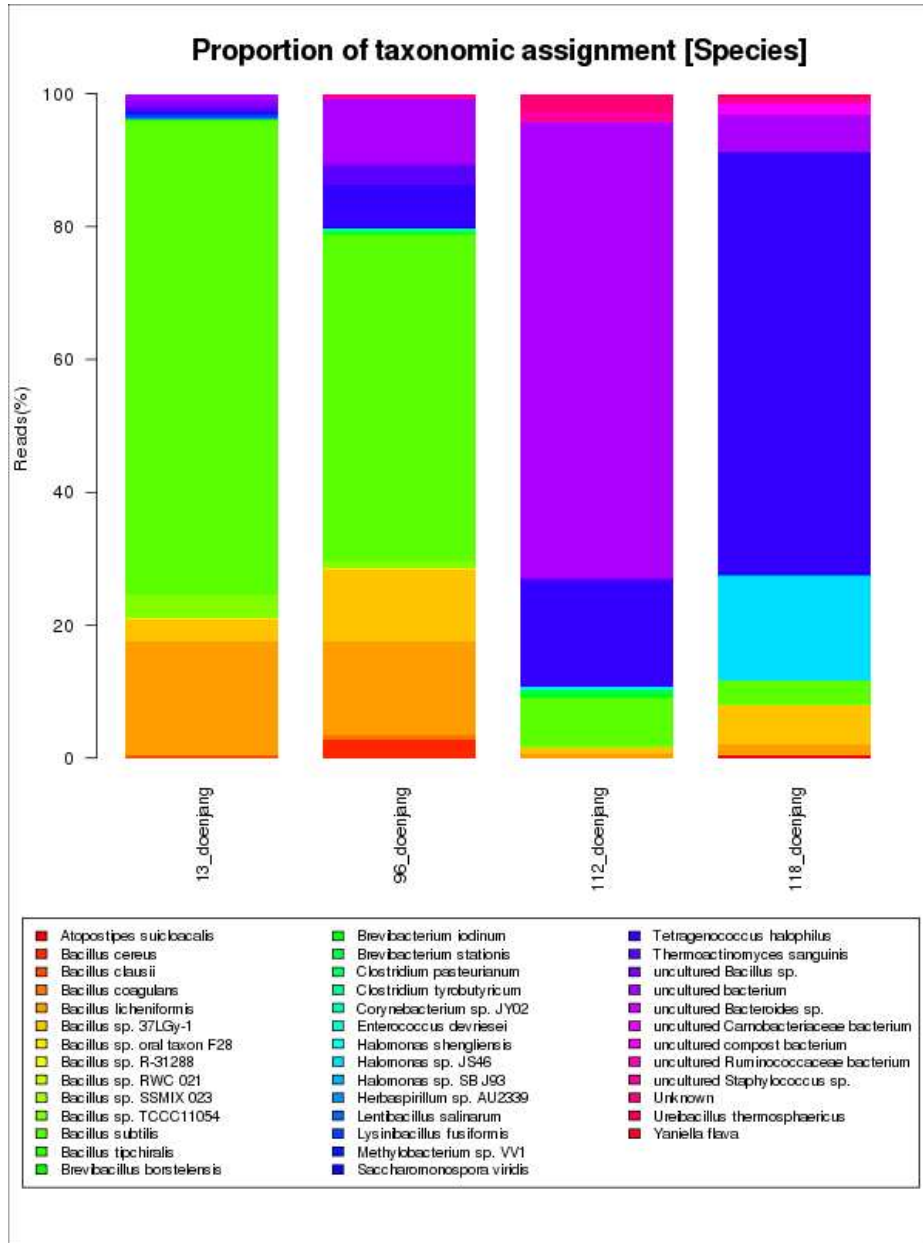


Fig. 20. Species-level abundance for comparing bacterial communities in doenjang.

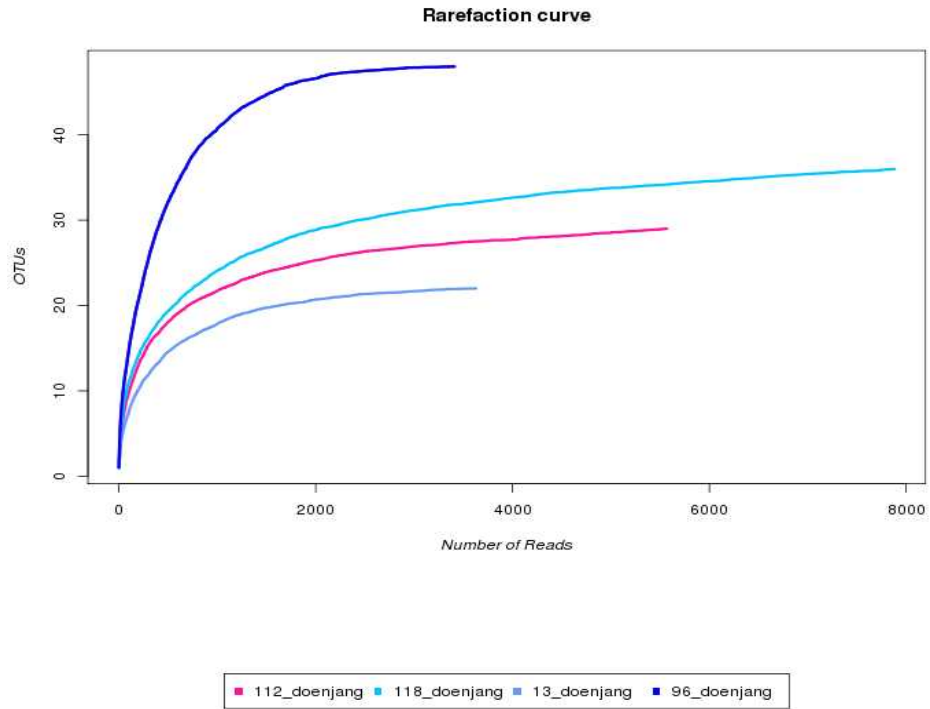


Fig. 21. Rarefaction curves of OTUs defined for the four different doenjang samples.

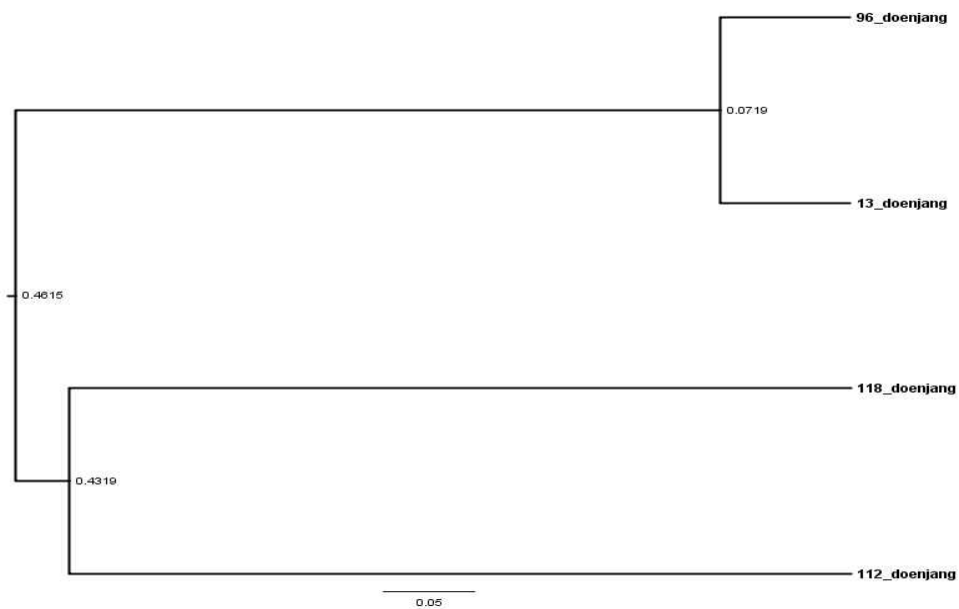


Fig. 22. Clustering analysis for the four samples using the UniFrac service after pyrosequencing. The scale indicates the distance between clusters in UniFrac units.

㊦ 전통 간장의 pyrosequencing 분석

Table 6. Bacterial diversity indices of the three different soy sauce samples.

Sample	Reads	OTU	chao	chao_lci	chao_hci	ace	ace_lci
7_soy sauce	4155	42	42	42	42	42	42
11_soy sauce	2810	30	30.333333	30.018627	35.964957	30.47619	30.059931
50_soy sauce	8398	18	21	18.39133	40.998494	21.648352	18.683516
Sample	ace_hci	shannon	shannon_lci	shannon_hci	simpson	simpson_lci	simpson_hci
7_soy sauce	42	1.779901	1.7331	1.826701	0.290317	0.281073	0.29956
11_soy sauce	33.783653	1.67797	1.63237	1.723569	0.266811	0.256908	0.276715
50_soy sauce	37.473533	0.311857	0.288674	0.335041	0.89171	0.882627	0.900792

Table 7. Comparison of Bacterial Community in soy sauce using 16S rRNA Gene-Based pyrosequencing.

간장	good-16%	bad-28%	bad-16%
<i>Bacterial species</i>	No.7	No.11	No.50
<i>Brevibacteriumiodinum</i>	39.74	0.18	0.23
<i>Kocuriapalastris</i>	35.48	0	0.12
<i>Tetragenococcusshalophilus</i>	6.62	19.79	94.38
<i>Marinilactibacilluspsychrotolerans</i>	3.08	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	1.42	0.04	0.54
<i>Lentibacillussalinarum</i>	0	64.77	0
<i>Chromohalobactercanadensis</i>	0	5.48	0.01
ETC.	13.67	9.75	4.73

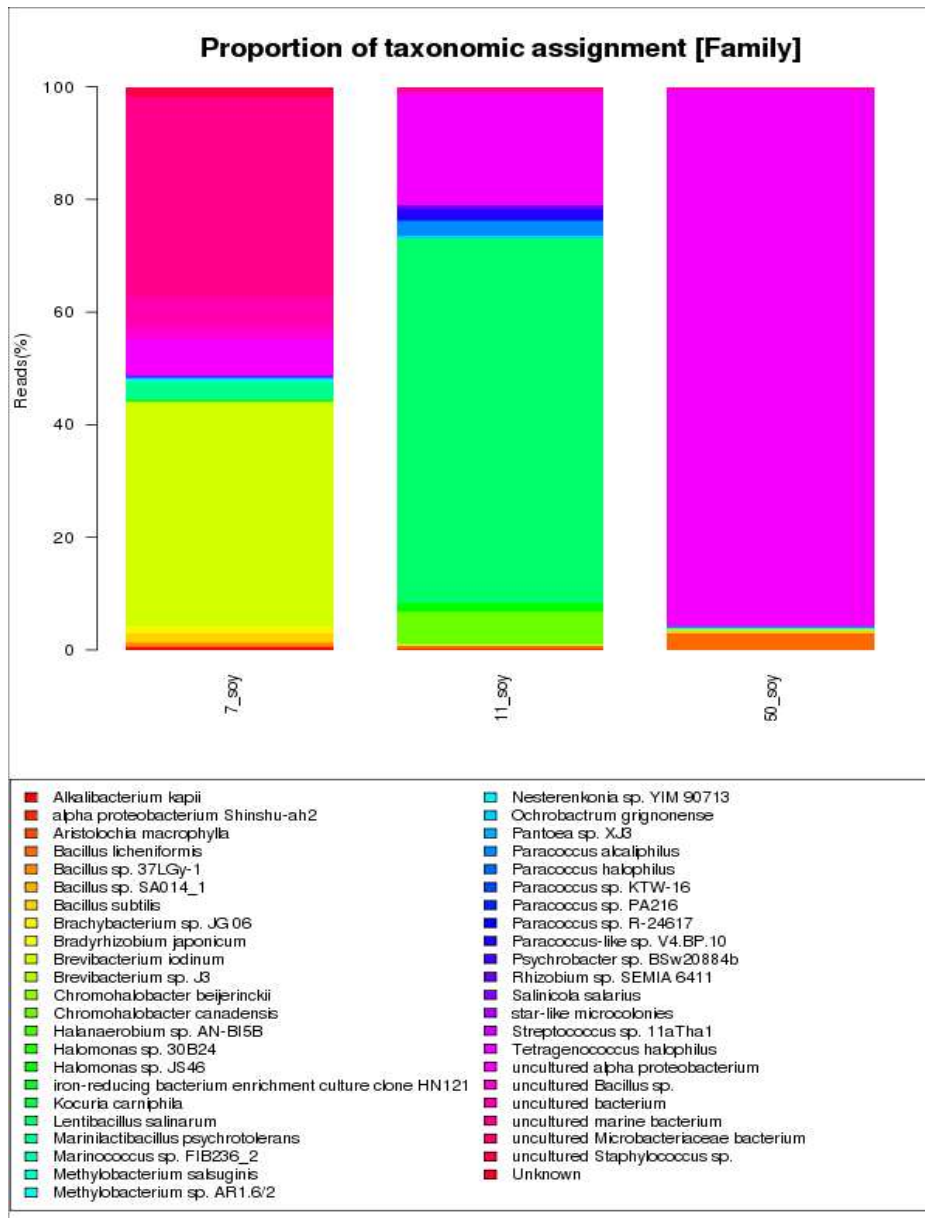


Fig. 23. Species-level abundance for comparing bacterial communities in soy sauce.

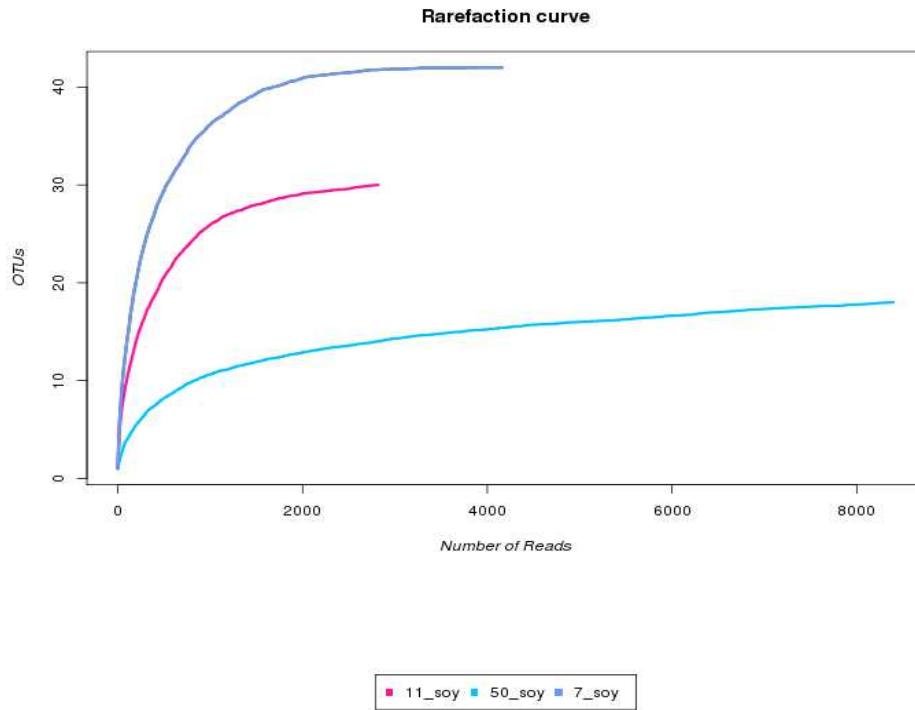


Fig. 24. Rarefaction curves of OTUs defined for the three different soy sauce samples.



Fig. 25. Clustering analysis for the three samples using the UniFrac service after pyrosequencing. The scale indicates the distance between clusters in UniFrac units.

㊤ 전통 고추장의 pyrosequencing 분석

Table 8. Bacterial diversity indices of the four different doenjang samples.

Sample	Reads	OTU	chao	chao_lci	chao_hci	ace	ace_lci
8_red pepper paste	4568	25	25	25	0	25.275267	25.01917
47_red pepper paste	8560	7	7	7	7	7	7
119_rred pepper paste	11841	23	23	23	23	23	23
Sample	ace_hci	shannon	shannon_lci	shannon_hci	simpson	simpson_lci	simpson_hci
8_red pepper paste	28.952659	1.262538	1.226215	1.29886	0.414505	0.401221	0.42779
47_red pepper paste	7	0.522855	0.502333	0.543377	0.746426	0.734969	0.757883
119_red pepper paste	23	0.823346	0.799082	0.847611	0.651175	0.6407	0.66165

Table 9. Comparison of Bacterial Community in red pepper paste using 16S rRNA Gene-Based pyrosequencing.

고추장	bad-8%	good-8%	bad-4%
<i>Bacterial species</i>	No.8	No.47	No.119
<i>Bacillus subtilis</i>	0.74	85.72	3.62
<i>Bacillus licheniformis</i>	0.09	10.25	0.31
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	3.27	0.10
<i>Solanumlycopersicum</i>	2.16	0.44	79.79
<i>Thermoactinomycessanguinis</i>	60.00	0	0
<i>Geobacillusstearothermophilus</i>	17.58	0	0
<i>Aneurinibacillusthermoaerophilus</i>	0	0	11.31
<i>Enterococcusfaecium</i>	15.06	0	0.03
ETC.	3.61	0.32	4.84



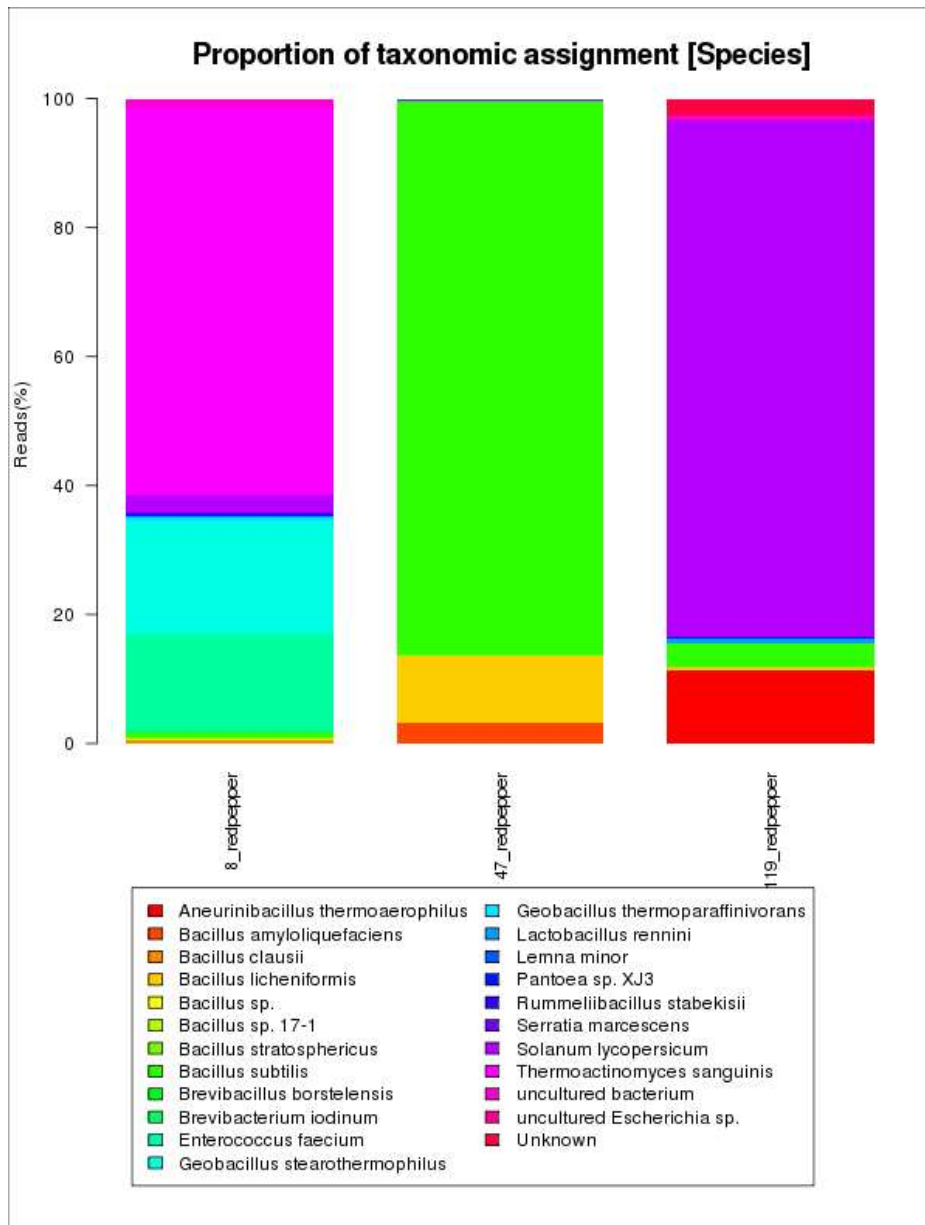


Fig. 26. Species-level abundance for comparing bacterial communities in red pepper paste.

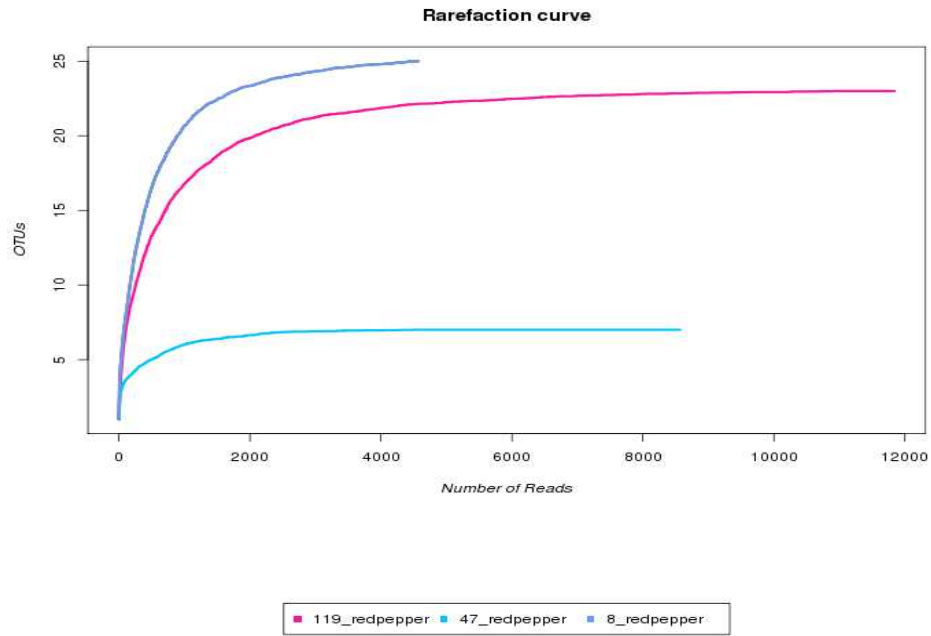


Fig. 27. Rarefaction curves of OTUs defined for the three different red pepper paste samples.



Fig. 28. Clustering analysis for the three samples using the UniFrac service after pyrosequencing. The scale indicates the distance between clusters in UniFrac units.

㉔ 전통 청국장 pyrosequencing 분석

Table 10. Bacterial diversity indices of the four different cheonggukjang samples.

Sample	Reads	OTU	chao	chao_lci	chao_hci	ace	ace_lci
22_cheonggukjang	5760	20	20	20	20	20	20
57_cheonggukjang	11137	12	12	12	12	12	12
71_cheonggukjang	11335	20	20	20	20	20	20
Sample	ace_hci	shannon	shannon_lci	shannon_hci	simpson	simpson_lci	simpson_hci
22_cheonggukjang	20	1.985078	1.95737	2.012787	0.198487	0.19237	0.204605
57_cheonggukjang	12	0.425683	0.405278	0.446087	0.832083	0.822782	0.841385
71_cheonggukjang	20	1.624677	1.602964	1.646389	0.286501	0.280937	0.292065

Table 11. Comparison of Bacterial Community in cheonggukjang using 16S rRNA Gene-Based Pyrosequencing.

청국장	good-2%	good-2%	bad-4%
<i>Bacterial species</i>	No.22	No.57	No.71
<i>Bacillus subtilis</i>	32.85	3.48	42.74
<i>Brevibacillusborstelensis</i>	24.55	0.20	2.16
<i>Enterococcusdurans</i>	14.41	91.08	11.94
<i>Bacillus licheniformis</i>	5.36	0.20	3.0
<i>Enterococcusgallinarum</i>	4.83	3.30	0.17
<i>Weissellaparamesenteroides ATCC 33313</i>	3.92	0	0
<i>Lactobacillussakei</i>	2.88	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	2.73	0.03	2.72
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.40	0	0
<i>Enterococcusmalodoratus</i>	0	0	29.36
ETC.	6.08	1.71	7.91

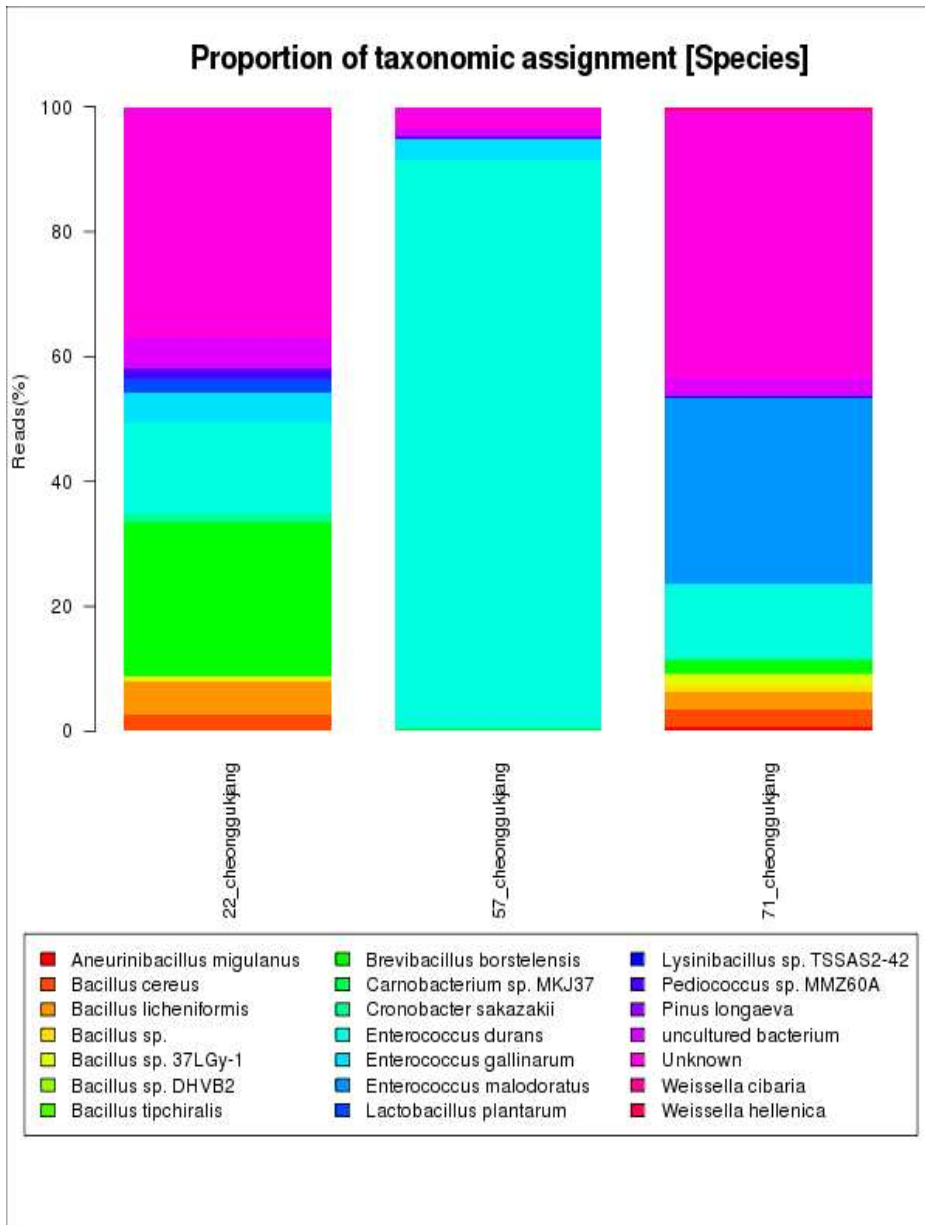


Fig. 29. Species-level abundance for comparing bacterial communities in cheonggukjang.

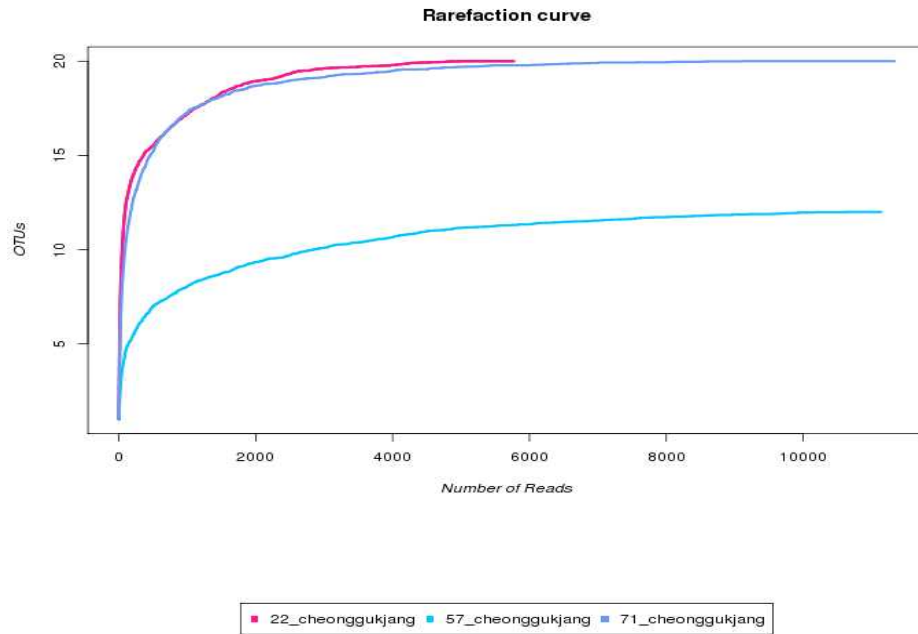


Fig. 30. Rarefaction curves of OTUs defined for the three different cheonggukjang samples.

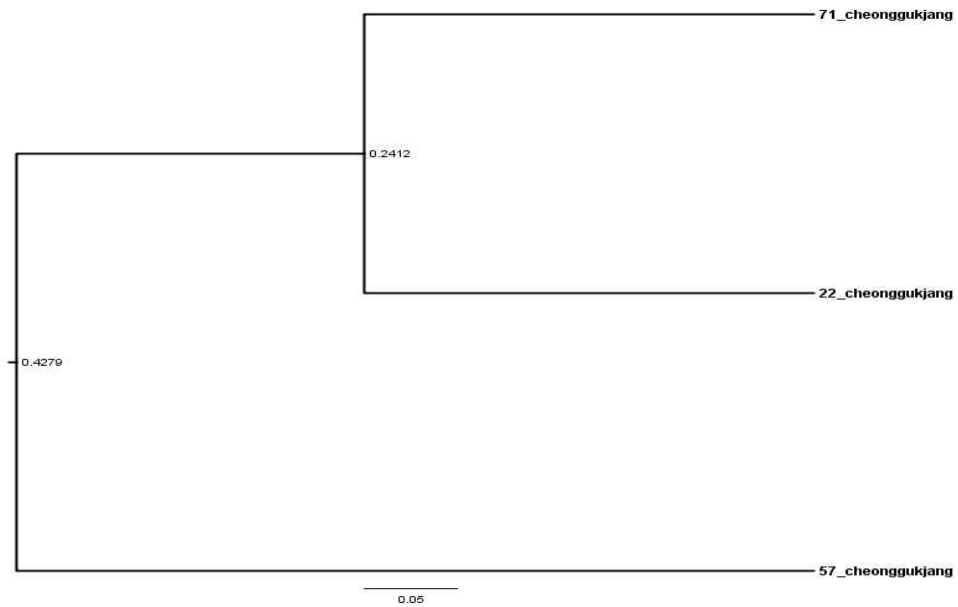
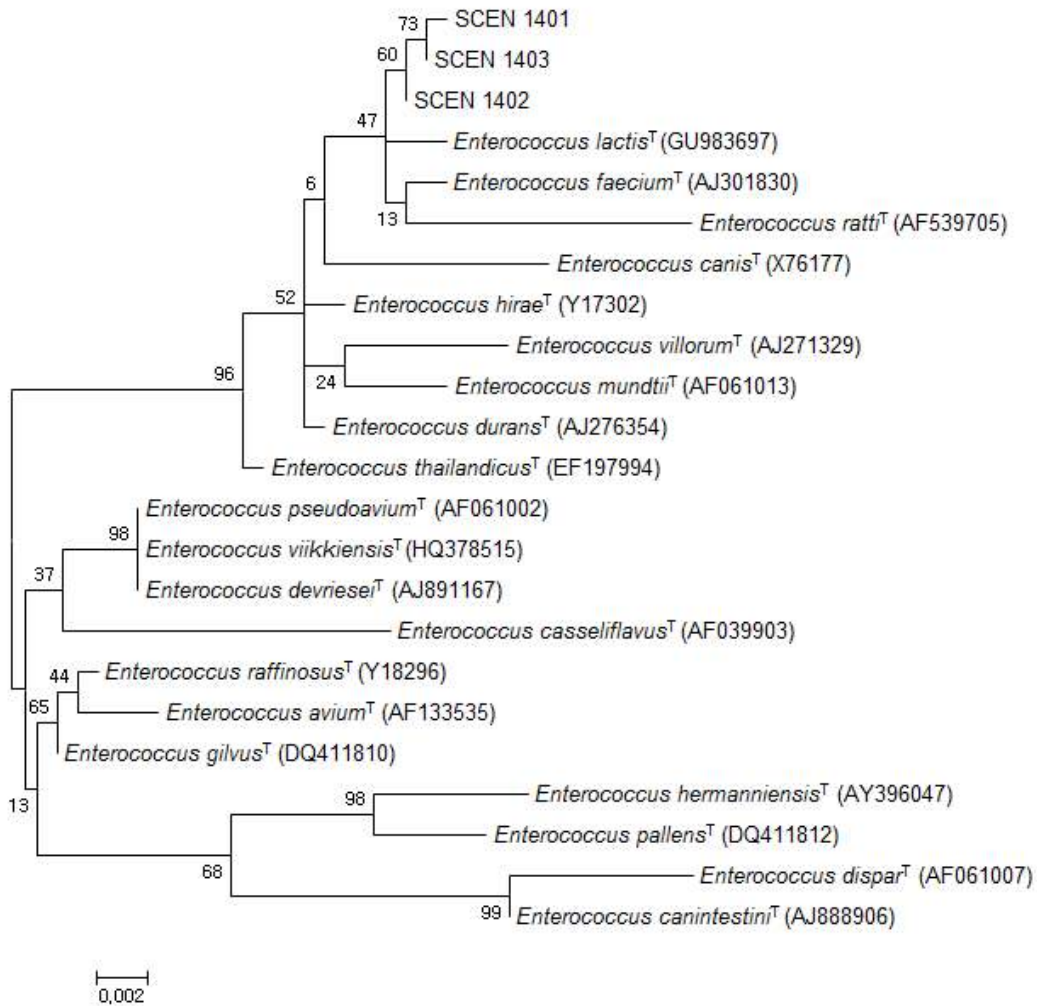


Fig. 31. Clustering analysis for the three samples using the UniFrac service after pyrosequencing. The scale indicates the distance between clusters in UniFrac units.

② *Enterococcus lactis*에 대한 계통도



(2) 전통 장류로부터 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 주요 발효 *Bacillus* 분리 및 동정

(가) 저염화 장류 제조를 위한 *Bacillus* 우수 균주 선발(1차년도)

① 유해균 억제 특성 균주 선발

장류 발효 유해 부패균으로 가장 문제시 되는 *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*를 대상으로 항균특성이 높은 균들을 전통 장류로부터 분리하였고 그 결과는 다음 Table 12와 같았다.

Table 12. Selected fermentation strains showing antibacterial activities against some putrefactive and pathogenic bacteria.

균주	효소 활성		유해 균주 억제환 직경 (cm)												
	Protease	Amylase	<i>B. cereus</i> KACC 10004	<i>B. cereus</i> KACC 11240	<i>B. cereus</i> KACC 13764	<i>B. cereus</i> KACC 13766	<i>B. cereus</i> KACC 13752	<i>B. cereus</i> KACC 10097	<i>S. aureus</i> KACC 1621	<i>S. aureus</i> KACC 1916	<i>S. aureus</i> KACC 1927	<i>S. aureus</i> KACC 3881	<i>M. Luteus</i> KACC 13377	<i>E. coli</i> KACC 13821	<i>P. aeruginosa</i> KACC102 59
SCS A01	0.51	0.37	1.35	1.66	1.41	0.69	1.19	1.59	1.47	1.26	1.18	1.34	0.56	-	-
SCD A02	0.61	0.56	1.29	1.51	1.35	0.73	1.27	1.3	1.48	1.09	1.25	1.37	0.6	-	-
SCD A03	0.56	0.58	1.31	1.31	1.35	-	1.29	1.24	1.51	1.17	1.24	1.4	-	-	-
SCD A04	0.46	0.56	0.99	1.55	1.16	-	0.89	1.15	1.25	1.12	1.17	1.31	-	-	0.74
SCK A05	0.31	0.82	1.19	1.53	1.29	-	1.16	1.32	1.23	1.15	1.19	1.28	-	-	-
SCK A06	0.63	0.52	1.32	1.51	1.3	-	1.25	1.25	1.39	1.18	1.22	1.38	-	-	0.59
SCK A07	0.59	0.47	1.48	1.61	1.46	0.72	1.42	1.39	1.42	1.26	1.28	1.4	-	-	-
SCK A08	0.64	0.36	1.2	1.72	1.28	-	1.14	1.37	1.43	1.16	1.28	1.41	0.57	-	-
SCD A09	0.33	0.39	1.41	1.88	1.61	0.89	1.46	1.75	1.35	1.23	1.23	1.25	0.66	-	0.67
SCD A10	0.38	0.48	1.21	1.44	1.27	-	1.14	1.17	1.38	1.23	1.29	1.41	-	-	0.6
SCS A11	0.63	0.51	1.47	1.63	1.58	-	1.46	1.37	1.4	1.25	1.33	1.42	-	0.63	0.61
SCK A12	0.49	0.49	1.51	1.79	1.59	0.93	1.42	1.61	1.4	1.27	1.31	1.39	-	-	-
SCK A13	0.47	0.23	1.57	1.79	1.59	0.84	1.48	1.57	1.48	1.24	1.31	1.38	-	-	-
SCC A14	0.98	0.63	1.36	1.62	1.39	0.85	1.38	1.35	1.32	1.21	1.27	1.24	0.58	-	0.74
SCS A15	0.67	0.38	1.13	1.44	1.48	-	1.1	1.08	1.32	1.09	1.17	1.4	-	-	-
SCS A17	0.63	0.37	1.1	1.4	1.1	-	1.08	1.04	1.15	0.94	1.2	1.28	-	-	-
SCD A18	0.64	0.34	1.42	1.72	1.68	-	1.23	1.37	1.33	1.16	1.34	1.3	-	0.68	0.57
SCD A19	0.51	0.45	1.44	1.69	1.78	0.79	1.35	1.33	1.44	1.3	1.39	1.46	-	-	-
SCK A20	0.7	0.62	1.46	1.7	1.71	0.96	1.43	1.43	1.59	1.32	1.43	1.67	-	-	-
SCK A23	0.36	0.52	1.43	1.73	1.61	0.77	1.25	1.34	1.37	1.19	1.22	1.23	-	-	-
SCD A24	0.74	0.61	1.39	1.64	1.51	0.73	1.29	1.21	1.26	1.16	1.26	1.31	-	-	-
SCD A25	0.59	0.41	1.36	1.5	1.44	-	1.31	1.1	1.38	1.29	1.36	1.34	-	-	0.56
SCK A26	0.53	0.45	1.43	1.81	1.72	-	1.5	1.39	1.5	1.35	1.35	1.35	0.98	-	0.57
SCK B11	0.92	0.84	1.44	1.48	1.38	1.93	1.91	1.83	1.12	1.43	1.88	1.12	2.1	1.1	2.0

항균 및 발효 특성이 좋은 분리균들 중에서도 유해균들에 대해 가장 항균 spectrum이 넓고 우수했던 SCK B11 균주를 대상으로 그 특성을 자세히 조사한 결과는 다음과 같았다.

## ② SCK B11의 동정 및 특성

NA 배지에서 배양 후 형태는 백색의 집락 주위로 반투명의 광택 환을 형성하였다. 균은 1,500 x 배율의 광학 현미경 하에서 관찰하였을 때 움직임이 매우 활발했고 Gram 염색에서 양성을 나타냈다. 50,000 x 배율로 확대한 주사전자현미경으로 관찰 결과 균의 형태는 간균으로 0.8~0.9  $\mu\text{m}$  x 2.0~3.0  $\mu\text{m}$ 의 크기를 보였으며 편모들을 가진 것이 확인되었다(Fig. 32).

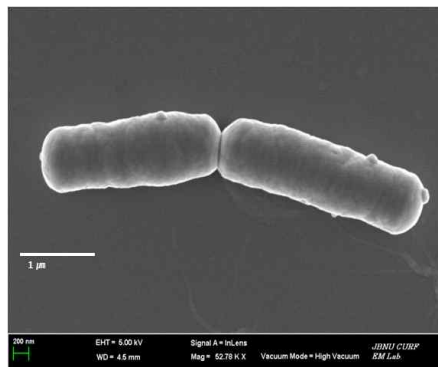


Fig. 32. Field emission scanning electron micrograph of the strain SCK B11. Bar, 1  $\mu\text{m}$ .

BCL card를 이용하여 46 종류의 생화학적 검사 결과를 Vitec 2 Compact Software에서 분석한 결과 96%의 확률로 *B. licheniformis*로 분류되었다(Table 13), RDP에 등록된 모든 *Bacillus* 표준 균주들만을 사용하여 계통도를 분석한 결과 SCK B11은 *B. licheniformis* ATCC 14589과 가장 가까운 근연 관계로 16S rDNA 유전자 서열 상동성은 99.93%(1,399 bp/1,400 bp)를 보였다(Fig. 33). 따라서 생화학 분석과 계통학적 분류를 고려하여 SCK B11을 *B. licheniformis*로 동정하였다.



Table 13. Biochemical characterization for the identification of the strain SCK B11.

Test	Reaction	Test	Reaction
β-Xylosidase	(+)	Phenylalanine arylamidase	+
L-Lysine arylamidase	-	L-Proline arylamidase	-
L-Aspartate arylamidase	-	β-Galactosidase	+
D-Mannose	+	L-Pyrrolydonyl arylamidase	+
D-Melezitose	-	α-Galactosidase	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+	Alanine arylamidase	-
Palatinose	+	Tyrosine arylamidase	+
L-Rhamnose	-	β-N-Acetyl-glucosaminidase	-
β-Glucosidase	+	Ala-Phe-Pro arylamidase	-
β-Mannosidase	-	Cyclodextrin	+
Phosphorylcholine esterase	-	D-Galactose	-
Pyruvate	-	Glycogen	-
α-Glucosidase	+	Myoinositol	+
D-Tagatose	+	Methyl-α-D-glucopyranose	+
D-Trehalose	+	Ellman	+
Inulin	-	Methyl-D-xylosidase	-
D-Glucose	+	α-Mannosidase	-
D-Ribose	+	Maltotriose	+
Putrescine assimilation	-	Glycine arylamidase	+
Growth in 6.5% NaCl	+	D-Mannitol	+
Kanamycin resistance	-	Esculin hydrolase	+
Oleandomycin resistance	+	Tetrazolium red	-
Leucine arylamidase	+	Polymyxin B resistance	+

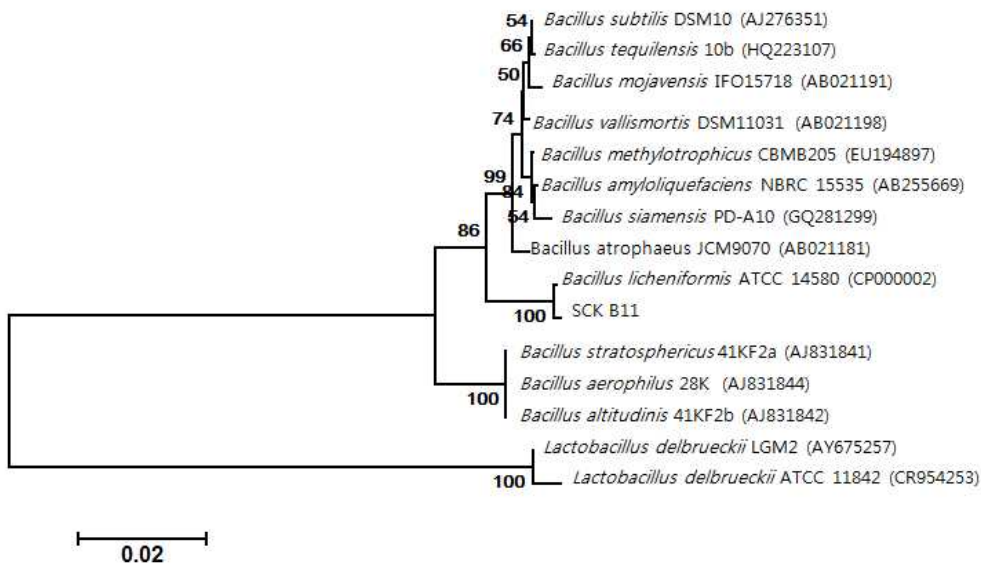


Fig. 33. Phylogenetic tree constructed from a comparative analysis of 16S rRNA gene sequences showing the relationships of SCK B11 with other related type strains. The tree was made using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with a Kimura two-parameter distance matrix (Kimura, 1980) and pairwise deletion. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). Bar, 0.02 substitutions per 1 nucleotide position.

### ③ SCK B11의 *B. cereus* 독소 유전자 및 항생물질 유전자 유무 확인

SCK B11 균주가 독소 유전자를 함유하는지 확인하기 위해 *B. cereus* 독소들인 NheABC, HblACD, CytK, cereulide, certhrax와 단백질 독소 발현조절인자인 plcR-papR의 유전자들을 대상으로 PCR을 수행한 결과 이들 유전자의 어느 것도 발견되지 않았다(Fig. 34A).

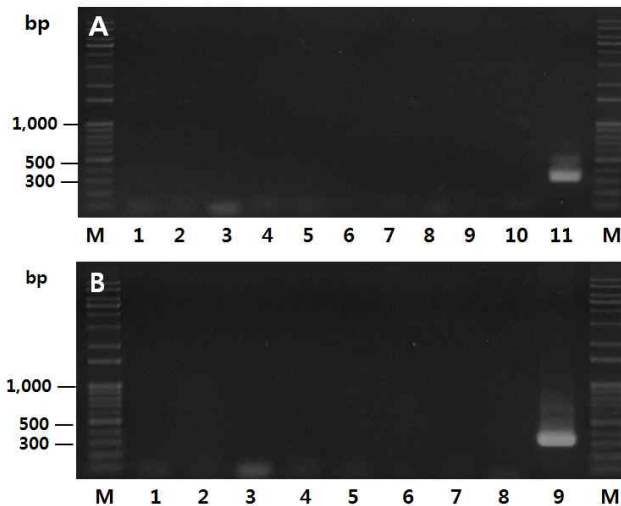


Fig. 34. Gel electrophoresis of PCR products for the detection of *Bacillus cereus* toxins(A) and *B. licheniformis* antibiotics and surfactants(B). A: 1, nheA 2, nheB 3, nheC 4, hblA 5, hblC 6, hblD 7, cytK 8, plcR-papR 9, cesA 10, crx 11, 16S rRNA gene. (B): 1. lchAA 2, lchAB 3. lchAC 4, licM1 5, licM2 6. srfAA 7, srfAB 8, srfAC 9, 16S rRNA gene(508F & 800R primers).

### ④ SCK B11의 항균 작용

SCK B11의 병원성 세균 및 곰팡이에 대한 항균 효과는 Table 14에 요약되어 있다. 증식 억제에 차이는 있었으나 SCK B11은 실험에 사용한 *B. cereus* 6종 모두의 증식을 억제하였다. 하지만 장류 유익 발효 균주들인 *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 각 2종에 대해서는 전혀 증식 저해를 나타내지 않았다. 한편 고추장의 우수발효 균주로 선발한 *B. licheniformis* SCK 121057이 6종의 *B. subtilis*에 대해 모두 증식 억제능을 가졌다(Kim et al., 2010)는 최근 보고와는 대조를 보였다. 따라서 SCK B11 균주는 좋은 발효 특성을 가진 다른 *B. subtilis* 균들과 함께 고추장을 발효하는 것이 가능할 것으로 판단되었다. SCK B11은 효모인 *Candida albicans*를 제외하고 곰팡이들에 대해 항진균 특성을 나타냈고, aflatoxin B, G, M을 생산하는 *A. flavus* 및 *A. parasiticus*, ochratoxin A 생산균인 *A. ochraceus*에 대해서도 효과적(투명환 직경 5~6 mm)인 증식 저해를 보였다. 전통 장류 발효 시 mycotoxins의 생성여부는 식품 안전상 중요하며 이들 독소들은 간암이나 신장 독성을 유발할 수 있기 때문에 항진균 효과를 가진 이 균의 사용은 숙성과정에서 위생 발효를 위해 가치가 있을 것으로 예상된다. 또한 SCK B11은 병원성 또는 기회 감염성 세균들인 *E. coli*, *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*에 대한 저해능력(투명환 직경 5~12 mm)이 있었고 특히 식중독과 염증 반응에 관여하는 병원성 균인 *S. aureus*에 대해서는 사용한 5 균주 모두에 대해 증식 억제 효과를 보였다. SCK B11이 분비하는 항균 물질이 일부 *B. licheniformis*가 생산하는 펩타이드성 항균제인 lichenicidin이나 계면활

성제인 lichenysin 또는 *B. subtilis*가 생산하는 surfactin인지 확인하기 위하여 이들 합성 유전자에 대한 PCR을 수행하였다. 그러나 SCK B11은 lichenysin 합성효소 유전자(*lchAA*, *lchAB*, *lchAC*), lichenicidin 합성을 위한 lantibiotic 수식효소유전자(*licM1*, *licM2*)와 surfactin 합성효소유전자(*srfAA*, *srfAC*, *srfAD*)를 함유하고 있지 않아(Fig. 34B) 앞으로 이 항균 물질의 특성은 규명해야 할 필요가 있다. 전통 장류 발효에 다양한 항 유해균 스펙트럼을 가진 SCK B11의 사용은, HACCP 시스템의 도입이 어려운 장류 업체에서 유해균들의 오염 문제를 해결할 수 있는 효과적 대안이 될 수 있을 것이다. 이러한 항균 특성으로부터 SCK B11는 장류 발효 이외에 동물 사료, 의료, 공중위생 분야에서 사용 가능성을 고려해 볼 수 있으며, 특히 methicillin 저항 균주(MRSA)를 포함하는 *S. aureus*균들에 대해서는 항균물질로서 사용 가능성을 조사할 필요가 있다.

Table 14. Antimicrobial activities of the strain SCK B11 against bacteria and fungi.

Test strain	Antimicrobial Activity <sup>a</sup>	Culture condition <sup>b,c</sup>
<i>Aspergillus ochraceus</i> KACC 41859	+	PDA, 30°C
<i>Aspergillus fumigatus</i> KACC 41186	+	PDA, 30°C
<i>Aspergillus flavus</i> KACC 41403	+	PDA, 30°C
<i>Aspergillus parasiticus</i> KACC 40074	+	PDA, 30°C
<i>Bacillus cereus</i> KACC 10004(ATCC 27348)	++	NA, 37°C
<i>Bacillus cereus</i> KACC 10097(ATCC 11778)	+++	NA, 37°C
<i>Bacillus cereus</i> KACC 11240(ATCC 14579)	++	NA, 37°C
<i>Bacillus cereus</i> KACC 13752	+++	NA, 37°C
<i>Bacillus cereus</i> KACC 13764	++	NA, 37°C
<i>Bacillus cereus</i> KACC 13766	+++	NA, 37°C
<i>Bacillus licheniformis</i> KACC 121034	-	NA, 37°C
<i>Bacillus licheniformis</i> KACC 121035	-	NA, 37°C
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 10112	-	NA, 37°C
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1023	-	NA, 37°C
<i>Candida albicans</i> KACC 30062	-	YEA, 30°C
<i>Enterococcus faecalis</i> KACC 11304	+++	TSA, 37°C
<i>Escherichia coli</i> KACC 13821	+	NA, 37°C
<i>Lactobacillus brevis</i> KACC 11433	-	MRS, 28°C
<i>Listeria monocytogenes</i> KACC 10764	+	LOA, 37°C
<i>Micrococcus luteus</i> KACC 13377	+++	NA, 37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC 10259	+++	NA, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> KACC 10778	++	NA, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	+	NA, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	++	NA, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927	+++	NA, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 3881	+	NA, 37°C

<sup>a</sup>+++ , halo size >10 mm; ++, 7-9 mm; +, 5-6 mm; -, not detected.

<sup>b</sup>PDA, Potato dextrose agar; NA, Nutrient agar; YEA, Yeast extract agar; TSA, Trypticase soy agar; MRS, *Lactobacilli* MRS agar; LOA, *Listeria*Oxfordagar.

<sup>c</sup>The bacteria and fungi were grown on agar plates for 18-21 h and 4 days, respectively.

항균 작용은 SCK B11의 배양 후 무균 상층액 100 $\mu$ l를 취해 200 $\mu$ l의 유해균 배양액에 넣고 20시간 37 $^{\circ}$ C 추가 배양 후 전계방사형 주사전자현미경에서 확인하였다(Fig. 35). Fig. 35의 A, C, E, G, I, K는 SCK B11의 무균 상층액을 첨가하지 않은 유해균들로 표면이 깨끗한 간균과 구균 형태를 보였다. 그러나 무균 상층액을 첨가한 후에는 세포막이 부풀어오른 형태(D), 막이 터져 내용물이 흘러나오거나(D, J, L), 세포막 껍질만 있는 형태(B, F, H)들이 관찰되었다. 전체적으로 SCK B11로 처리한 유해균 표면은 비처리군에 비해 세포막 표면이 거칠며 부분적으로 녹아있는 형태를 나타냈고 균의 크기도 변화되어 있었다. 따라서 SCK B11의 항균 성분은 막 구조나 막 대사에 영향을 주어 막 투과조절 능력의 상실이나 세포막 합성 저해를 일으키는 것 같다.

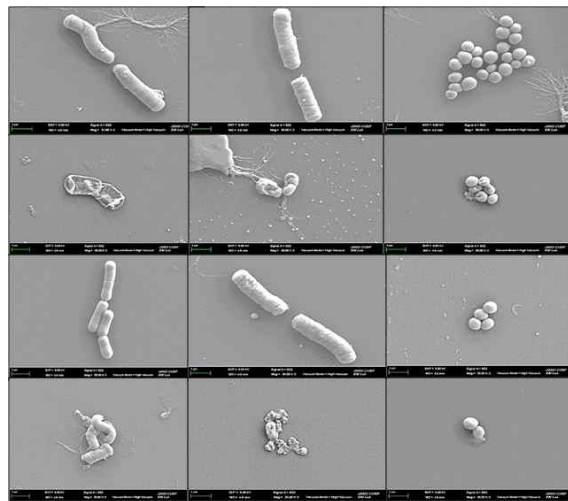


Fig. 35. Electron microscopic analysis of pathogens incubated with culture filtrate, which was filtered with 0.22  $\mu$ m microfilter, of the strain SCK B11. The cultured cells(200  $\mu$ l) were incubated with the culture filtrate(100  $\mu$ l) of the strain SCK B11 for 20 h. The figures of intact and treated cells show *B. cereus* KACC 11240(A and B), *L. monocytogenes* KACC 10764(C and D), *E. coli* KACC 13821(E and F), *P. aeruginosa* KACC 1025(G and H), *E. faecalis* KACC 11304(I and J), and *S. aureus* KCTC 1621(K and L), respectively.

#### ⑤ SCK B11의 biogenic amines 합성 및 시간별 분해

Biogenic amine 선택배지에서 SCK B11는 biogenic amine 합성 시 보라색으로 변하는 색의 변화는 없었으며, 배양액의 HPLC 분석에서도 amines들은 생성되지 않았다. 발효 숙성 동안 여러 미생물들로 오염되는 전통 장류의 특성을 고려해 볼 때 전통 장류에 적용할 수 있는 가장 효율적인 균주 선발 전략은 항균 특성과 biogenic amines을 생산하지 않으면서 biogenic amines을 분해하는 균을 찾는 방법이다. 미생물이 분비하는 monoamine oxidase와 diamine oxidase에 의해 다수의 미생물들이 biogenic amines이 분해하는 것으로 보고되어 있다(Naila et al., 2010). Biogenic amines분해 여부를 확인하기 위하여, 탄소원 및 질소원으로 2% histamine, tyramine, putrescine, cadaverine 만을 사용한 최소합성배지에서 SCK B11 균을 배양했을 때 잘 증식하였다. 또한 HPLC 분석 결과, 삶은 콩 g당 각 53 mg의 histamine, tyramine, putrescine, cadaverine 을 첨가한 배지에서 2일 후 SCK B11은 이들 amine을 각각

53%, 45%, 62%, 70%, 10일 후에는 72%, 66%, 75%, 79%를 분해하였다(Fig. 36). 전통적인 청국장 제조는 삶은 콩에 벧짚을 넣고 47°C, 2일 동안 발효과정을 거친다는 점을 고려할 때 특히 발효 2일 안에 약 50%의 biogenic amines을 제거하는 SCK B11를 접종하는 경우 벧짚 내 다른 미생물들에 의해 생성된 biogenic amines을 효율적으로 제거할 것으로 보인다.

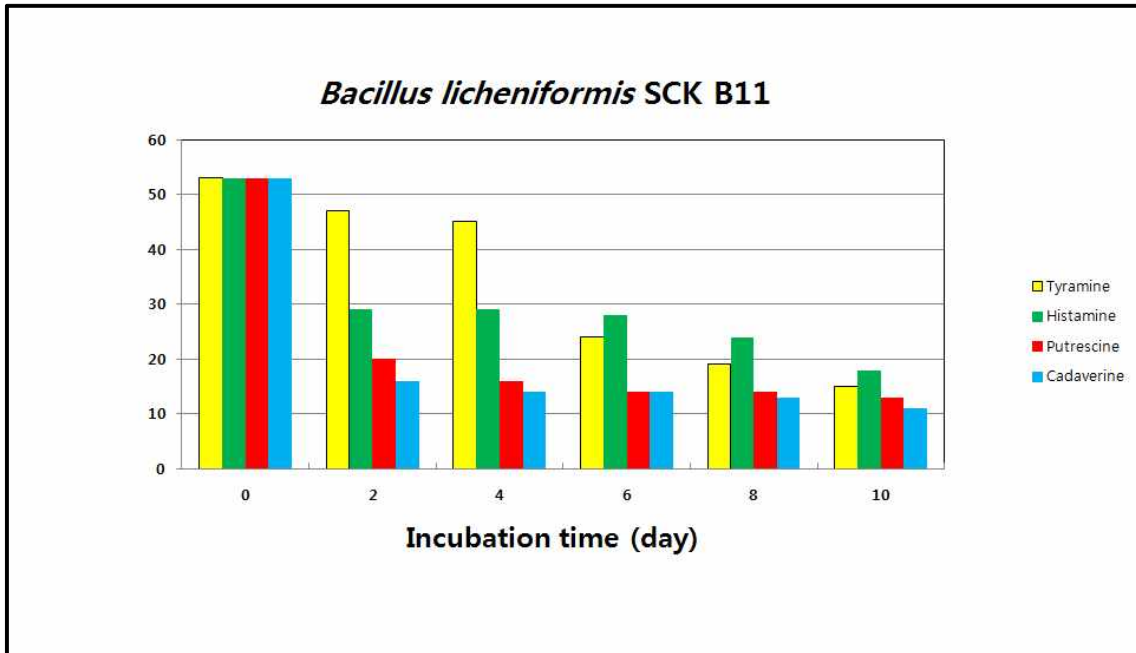


Fig. 36. Changes in the concentrations of biogenic amines added during fermentation of cooked soybean inoculated with the strain SCK B11.

(나) 산막 효모에 대해 길항 능력을 가지는 우수 발효 *Bacillus* 선발

① 우수 발효 *Bacillus* 선발

이 분리 방법에 의해 28종의 장류 시료로부터 11종의 우수발효 능력을 지닌 *Bacillus* 균주들을 분리 했다(Table 15). 우수 선발 균주의 동정 결과 *Bacillus subtilis* 1 종, *B. methylotropicus* 1 종, *B. licheniformis* 9 종으로 *B. licheniformis*가 가장 많았다(Fig. 37).

Table 15. General characteristics of strains selected for the growth inhibition of film-forming yeasts among *Bacillus* strains isolated from soybean pastes.

Strain	Putrescine digestion (%)	Tyramine digestion (%)	<i>B. cereus</i> inhibition	Glutamate (mg/g)	<i>B. cereus</i> toxin genes	Protease activity	Amylase activity
SCKB 17	64	99	(++)	0.959	none	(+++)	(+++)
SCKB 18	56	95	(++)	1.278	none	(++++)	(+++)
SCDB 19	68	92	(++)	0.959	none	(++++)	(+++)
SCCB 32	88	94	(+++)	4.474	none	(+++)	(+++)
SCKB 33	78	92	(++)	3.835	none	(+++)	(+++)
SCDB 34	83	91	(+++)	3.825	none	(++++)	(+++)
SCDB 35	83	88	(++)	3.211	none	(++++)	(+++)
SCDB 36	84	91	(++)	2.237	none	(++++)	(+++)
SCCB 37	98	90	(+++)	3.196	none	(+++)	(+++)
SCSB 38	90	87	(++)	3.225	none	(++)	(+++)
SCSB 39	94	91	(+)	4.793	none	(++++)	(+++)

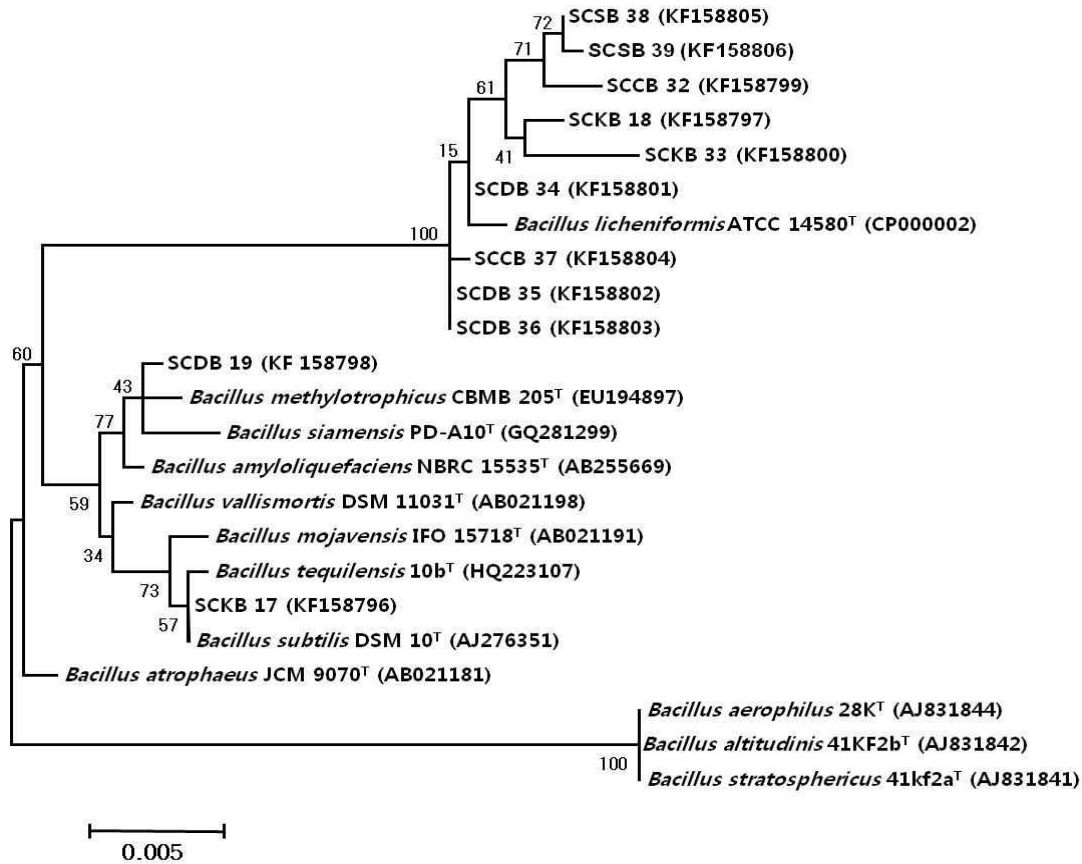


Fig. 37. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method.

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The tree with the highest log likelihood(-2672.0916) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood(MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 23 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 1428 positions in the final data set. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5.



㉔ 선발된 우수 발효 *Bacillus* 균주들의 부패균 *Bacillus anthracis*/*B. cereus*에 대한 길항 능력

부패 및 독소 생산 *Bacillus*에 대해 길항능력을 지닌 *Bacillus* 균주로 안전한 장류를 생산하기 위해, 저염 장류에서 증식한 유해 균주인 *Bacillus anthracis*와 *B. cereus*를 대상으로 이들 발효균의 저해능을 조사하였다(Fig. 38). 길항능력을 지닌 11 종류의 균주는 부패균인 *Bacillus anthracis*와 *B. cereus*에 대해 strain에 따라 다른 저해능력을 보였다(Table 16).

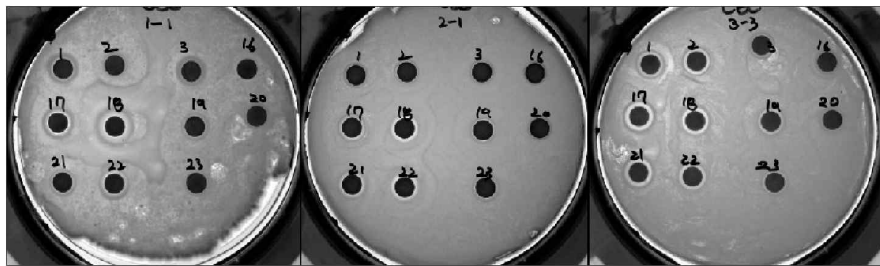


Fig. 38. Inhibition of growth of putrefactive *Bacillus* strains, SCD Pt11(A), SCD Pt21(B), and SCD Pt33(C), in the presence of supernatants of antagonistic *Bacillus* strains with the paper disc assay. Putrefactive cells( $\sim 10^7$ ) were spread on Nutrient broth agar plates. Twenty microliters of cell-free supernatant of cultured *Bacillus* strains were pipetted onto filter paper discs and then grown at 37°C for 24 hours. Clear circles around the discs indicate sensitivity towards the putrefactive *Bacillus* strains.

Table 16. Growth inhibition of putrefactive *Bacillus* species by antagonistic *Bacillus* strains isolated from soybean products.

Putrefactive strain	Relative inhibition zone <sup>a</sup> by antagonistic <i>Bacillus</i> strain										
	SCKB 17	SCKB 18	SCDB 19	SCKB 32	SCKB 33	SCDB 34	SCDB 35	SCDB 36	SCSB 37	SCSB 38	SCSB 39
SCD Pt11		1.00	1.17	1.00			1.17	1.00	1.17	1.17	1.08
SCD Pt12	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
SCD Pt14	1.00	1.17	1.17					1.00		1.17	1.08
SCD Pt15	1.00	1.08	1.08	1.00	1.17			1.08	1.08		1.08
SCD Pt21	1.17	1.17	1.08	1.08				1.08		1.17	1.08
SCD Pt22			1.00	1.08				1.00	1.17		1.08
SCD Pt23	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
SCD Pt24	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.08	1.17	1.17	1.17
SCD Pt31	1.08	1.17	1.17	1.17	1.00	1.17	1.17	1.08	1.00	1.08	1.08
SCD Pt32			1.17	1.00			1.17	1.00	1.17		1.00
SCD Pt33			1.17	1.08				1.17	1.00		1.08
SCD Pt34	1.08	1.08	1.08	1.00	1.00		1.17	1.08	1.08	1.08	1.08
SCD Pt35	1.08	1.08	1.17	1.17	1.17			1.17	1.17	1.08	1.08
SCD Pt36	1.00	1.17	1.00	1.00	1.08	1.17	1.17	1.00	1.00	1.00	1.00
SCD Pt39	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.08	1.00	1.17	1.00	1.00	1.00

즉 *B. licheniformis* SCDB 34는 14종의 부패균들 중 11종에 대해 증식 억제능력을 가진 반면 SCDB 36균주는 부패균 3종에만 증식 억제력을 보였다. 분리한 균들 중 SCKB 33, SCDB 34, SCDB 35, SCSB 38, SCSB 39는 다종의 부패균들 대해 억제능을 보였기 때문에, 단독 또는 혼합 형태로 접종하는 경우 부패균들에 의한 다중오염 가능성을 줄일 것으로 예상되었다.

### ⊕ 선발된 *Bacillus* 균주의 산막 효모 증식 억제능력

분리한 *Bacillus* 균주들의 산막효모에 대한 증식 억제능을 확인하기 위해 paper disc assay에 의한 halo크기를 관찰하였다(Table 17). Paper disc assay에서 산막효모인 *Pichia kudriavzevii*에 대해 halo를 형성하는 *Bacillus* 균주들이 발견되었다(Fig. 39). 이 실험은 길항균주를 배양한 다음 세포를 제거한 배양 상등액만을 paper disc에 주입(20 $\mu$ l)했기 때문에 이들 효모에 대한 억제 물질은 균이 세포외로 분비하는 저해물질인 것으로 추정되었다. 이 저해 물질이 그 결과 *B. subtilis*, *B. licheniformis* 균주들은 항진균 특성을 지니는 lichenicin, surfactin을 함유하는 유전자들을 가지고 있었으며(Table 18), Paper disc assay와 더불어 이 유전자 함유여부를 측정하는 multiple PCR방법의 개발로 항진균 균주 선발 방법의 단순화를 시도할 필요가 있다.

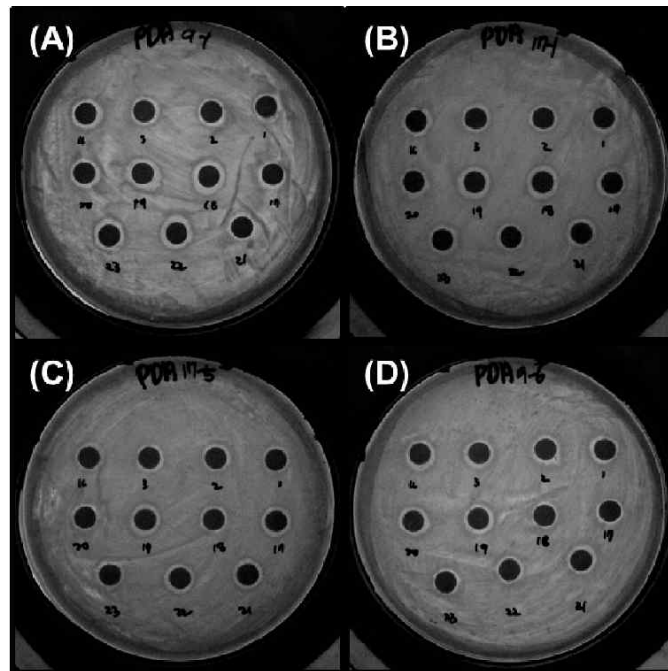


Fig. 39. Inhibition of growth of film-forming yeasts, SCS FY6(A), SCS FY10(B), SCS FY11(C), and SCS FY12(D), in the presence of supernatants of antagonistic *Bacillus* strains with the paper disc assay. Yeast cells( $\sim 10^7$ ) were spread on potato dextrose agar plates. Twenty microliters of cell-free supernatant of cultured *Bacillus* strains were pipetted onto filter paper discs and then grown at 30 $^{\circ}$ C for 24 hours. Clear circles around the discs indicate sensitivity towards the film-forming yeasts.

Table 17. Growth inhibition of film-forming yeasts by antagonistic *Bacillus* strains isolated from soybean products.

Film yeast	Relative inhibition zone <sup>a</sup> by antagonistic <i>Bacillus</i> strain										
	SCKB 17	SCKB 18	SCDB 19	SCCB 32	SCKB 33	SCDB 34	SCDB 35	SCDB 36	SCCB 37	SCSB 38	SCSB 39
SCS FY6	1.27	1.23	1.3	1.42	1.28	1.55	1.62	1.42	1.42	1.52	1.52
SCS FY7	1.18	1.23	1.25	1.35	1.45	1.18	1.37	1.33	1.28	1.28	1.28
SCS FY8	1.35	1.27	1.4	1.35	1.22	1.2	1.38	1.48	1.38	1.3	1.3
SCS FY9	1.17	1.2	1.33	1.22	1.22	1.33	1.33	1.4	1.13	1.27	1.27
SCS FY10	1.25	1.28	1.27	1.4	1.35	1.55	1.6	1.38	1.4	1.3	1.3
SCS FY11	1.25	1.35	1.25	1.4	1.52	1.37	1.5	1.4	1.47	1.52	1.52
SCS FY12	1.27	1.25	1.22	1.23	1.35	1.4	1.45	1.33	1.25	1.32	1.32
SCS FY13	1.25	1.35	1.2	1.25	1.22	1.5	1.3	1.38	1.17	1.35	1.35

<sup>a</sup>Average halo diameter/paper disc diameter

Table 18. Presence of corresponding genes in the antagonistic *Bacillus* strains against yeasts.

Strain	Gene							
	<i>lanM1</i>	<i>lanM2</i>	<i>lchAA</i>	<i>lchAB</i>	<i>lchAC</i>	<i>srfA</i>	<i>srfB</i>	<i>srfC</i>
<i>Bacillus subtilis</i> SCKB 17	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i> SCKB 18	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Bacillus methylotrophicus</i> SCDB 19	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> SCCB 32	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i> SCKB 33	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> SCDB 34	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> SCDB 35	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> SCDB 36	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> SCCB 37	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> SCSB 38	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> SCSB 39	+	+	+	+	+	-	-	-

(다) 저염 장류 제조시 유해균에 대한 길항능력이 우수한 발효 *Bacillus* 선발

선발된 균주의 유해균 억제능과 amylase, protease 활성 및 glutamate 생성능에 대한 분석결과와 biogenic amine 분해율,  $\gamma$ -PGA와 발효취에 대해 분석하였고, 이들 중 상대적으로 우수한 최종 균주 *Bacillus subtilis* 11종, *Bacillus amyloliquefaciens* 1종, *Bacillus methylotrophicus* 8종으로 총 20종을 분리 선발하였다.

① 선발 균주의 유해균 억제능

균주번호	Identification	<i>B. cereus</i> KACC 10077	<i>B. cereus</i> KACC 12672	<i>E. coli</i> KACC 13821	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> KACC 104764	<i>P.</i> <i>kudriavzevii</i> KF277144
SCDB1439	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1.85 *	1.65	1.86	1.15	1.36
SCKB1443	<i>Bacillus subtilis</i>	1.93	1.8	1.8	1.96	1.4
SCKB1444	<i>Bacillus subtilis</i>	1.76	1.85	1.75	-	1.2
SCKB1449	<i>Bacillus subtilis</i>	1.95	1.95	1.74	-	1.19
SCKB1450	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.7	1.81	1.62	1.23	1.37
SCKB1452	<i>Bacillus subtilis</i>	1.7	1.86	1.51	1.48	1.33
SCKB1455	<i>Bacillus subtilis</i>	1.36	1.5	1.66	1.39	1.22
SCKB1456	<i>Bacillus subtilis</i>	1.46	1.74	1.63	-	1.26
SCKB1458	<i>Bacillus subtilis</i>	1.45	1.29	1.59	1.41	1.27
SCKB1460	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.76	1.57	1.64	-	1.35
SCSB1461	<i>Bacillus subtilis</i>	1.49	1.61	1.53	1.22	1.24
SCSB1465	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.55	1.92	1.57	1.11	1.17
SCDB1469	<i>Bacillus subtilis</i>	1.92	1.4	1.57	1.37	1.28
SCDB1470	<i>Bacillus subtilis</i>	1.89	1.73	1.68	1.39	1.23
SCDB1473	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.5	2.05	1.61	-	1.24
SCDB1474	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.76	1.76	1.83	-	1.2
SCDB1476	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.99	2.06	1.62	-	1.26
SCKB1478	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.78	1.58	1.72	-	1.12
SCKB1481	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.64	1.92	1.6	-	1.18
SCDB1483	<i>Bacillus subtilis</i>	1.4	1.78	1.65	-	1.4

\*halo diameter/paper diameter

균주번호	Identification	<i>S. aureus</i> KACC 10778	<i>S. saprophyticus</i> (KF476041)	<i>S. waneri</i> (KF476044)	<i>P. aeruginosa</i> KACC 10259	<i>E. faecalis</i> KACC 11304
SCDB1439	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1.21 *	2.02	1.6	1.57	-
SCKB1443	<i>Bacillus subtilis</i>	1.37	2.06	2.01	1.81	-
SCKB1444	<i>Bacillus subtilis</i>	1.21	1.89	1.92	1.6	-
SCKB1449	<i>Bacillus subtilis</i>	1.21	2.01	2.06	1.65	-
SCKB1450	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.12	2.03	2.37	1.36	-
SCKB1452	<i>Bacillus subtilis</i>	1.41	1.85	1.88	1.74	-
SCKB1455	<i>Bacillus subtilis</i>	1.26	2.13	2.03	1.61	-
SCKB1456	<i>Bacillus subtilis</i>	1.28	1.87	1.56	1.57	-
SCKB1458	<i>Bacillus subtilis</i>	1.41	1.77	1.93	1.75	-
SCKB1460	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.3	1.96	1.97	1.76	-
SCSB1461	<i>Bacillus subtilis</i>	-	2.02	2.03	1.6	-
SCSB1465	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.35	1.91	1.99	1.7	-
SCDB1469	<i>Bacillus subtilis</i>	1.26	2.01	2.01	1.87	-
SCDB1470	<i>Bacillus subtilis</i>	-	1.89	1.93	1.63	1.29
SCDB1473	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.32	1.93	1.95	1.53	-
SCDB1474	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.15	1.94	1.89	1.84	-
SCDB1476	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.24	2.08	2.07	1.74	-
SCKB1478	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.39	2.13	2.06	1.62	-
SCKB1481	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.44	1.94	2.02	1.64	-
SCDB1483	<i>Bacillus subtilis</i>	1.14	2.06	2.09	1.43	-

\* halo diameter/paper diameter

② 선발균주의 amylase, protease 활성측정 결과 및 glutamate 생성능

균주번호	Identification	Amylase 활성 (halo diameter/colony diameter)	Protease 활성 (halo diameter/colony diameter)	glutamate (g/l 콩물배지)
SCDB1439	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2.125	1.82	0.636
SCKB1443	<i>Bacillus subtilis</i>	2.34	1.895	0.423
SCKB1444	<i>Bacillus subtilis</i>	4.79	3.225	0.987
SCKB1449	<i>Bacillus subtilis</i>	-	2.915	0.888
SCKB1450	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.91	2.595	0.176
SCKB1452	<i>Bacillus subtilis</i>	1.48	2.14	0.391
SCKB1455	<i>Bacillus subtilis</i>	2.83	2.9	1.106
SCKB1456	<i>Bacillus subtilis</i>	4.37	2.31	0.701
SCKB1458	<i>Bacillus subtilis</i>	2.575	2.925	0.925
SCKB1460	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.965	1.48	1.118
SCSB1461	<i>Bacillus subtilis</i>	1.92	1.36	0.649
SCSB1465	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.19	1.735	0.531
SCDB1469	<i>Bacillus subtilis</i>	1.78	2.16	0.789
SCDB1470	<i>Bacillus subtilis</i>	1.295	1.6	1.427
SCDB1473	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.505	1.445	0.958
SCDB1474	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.31	3.79	0.609
SCDB1476	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.53	1.54	0.462
SCKB1478	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	-	1.59	0.4
SCKB1481	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1.2	1.39	0.327

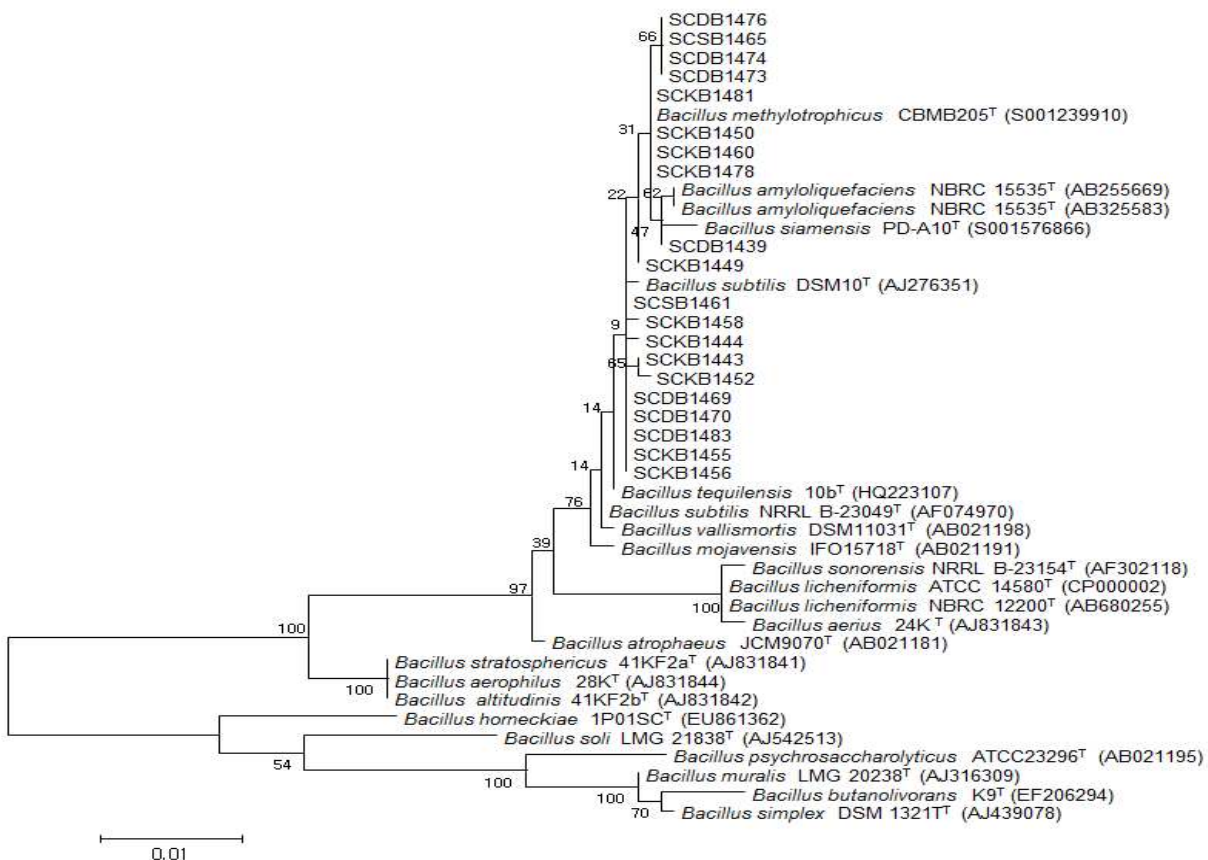
③ 선발균주의 biogenic amine 분해율

균주번호	Identification	Biogenic amine degradation ratio (%)			
		histamine	tyramine	putrescine	cadaverine
SCDB1439	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7	7	9	10
SCKB1443	<i>Bacillus subtilis</i>	8	9	4	4
SCKB1444	<i>Bacillus subtilis</i>	3	8	1	6
SCKB1449	<i>Bacillus subtilis</i>	14	16	13	14
SCKB1450	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	3	4	2	6
SCKB1452	<i>Bacillus subtilis</i>	3	4	4	6
SCKB1455	<i>Bacillus subtilis</i>	18	17	14	17
SCKB1456	<i>Bacillus subtilis</i>	1	8	-	8
SCKB1458	<i>Bacillus subtilis</i>	5	5	4	7
SCKB1460	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	17	17	18	21
SCSB1461	<i>Bacillus subtilis</i>	3	45	35	6
SCSB1465	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	7	3	5	4
SCDB1469	<i>Bacillus subtilis</i>	12	12	10	12
SCDB1470	<i>Bacillus subtilis</i>	16	34	37	15
SCDB1473	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	-	12	-	3
SCDB1474	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	9	12	11	13
SCDB1476	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	9	19	8	16
SCKB1478	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	2	64	40	15
SCKB1481	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	11	13	13	17
SCDB1483	<i>Bacillus subtilis</i>	11	10	9	7

④  $\gamma$ -polyglutamate 생산능 및 발효취 결과

균주번호	Identification	$\gamma$ -PGA(cm)	발효취
SCDB1439	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	++(구수함)
SCKB1443	<i>Bacillus subtilis</i>	5	+++ (구수함)
SCKB1444	<i>Bacillus subtilis</i>	13	+(구수함)
SCKB1449	<i>Bacillus subtilis</i>	3	+++ (구수함, 암모니아)
SCKB1450	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	10	++ (구수함)
SCKB1452	<i>Bacillus subtilis</i>	8	++ (구수함)
SCKB1455	<i>Bacillus subtilis</i>	20	++ (상큼함)
SCKB1456	<i>Bacillus subtilis</i>	30	++ (구수함)
SCKB1458	<i>Bacillus subtilis</i>	5	+(상큼함)
SCKB1460	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	5	+(시큼함)
SCSB1461	<i>Bacillus subtilis</i>	0	++ (상큼함)
SCSB1465	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	0	+(구수함)
SCDB1469	<i>Bacillus subtilis</i>	3	+++ (구수함)
SCDB1470	<i>Bacillus subtilis</i>	1	++ (구수함)
SCDB1473	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	20	++ (구수함)
SCDB1474	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	25	++ (구수함, 시큼함)
SCDB1476	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	20	++ (구수함, 시큼함)
SCKB1478	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	5	+++ (구수함)
SCKB1481	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	10	+++ (구수함)
SCDB1483	<i>Bacillus subtilis</i>	15	++ (구수함, 시큼함)

⑤ *Bacillus* 속에 대한 계통도



(3) 전통 장류와 메주로부터 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 유산균 분리 및 동정

(가) 산막 형성 효모의 증식 억제력이 있는 유산균 선발

① 선발된 유산균 균주의 산막 효모에 대한 길항능력

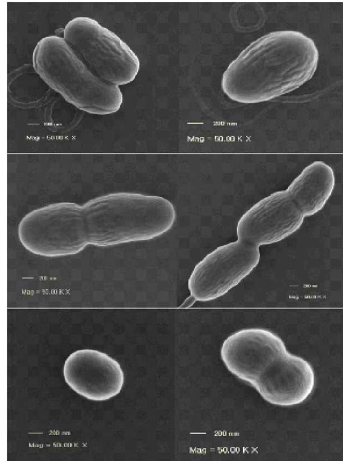


Fig. 40. Scanning electron micrographs of lactic acid bacteria strains with biogenic amines-degrading activities. (A) *Weissella cibaria* SCK B2301, (B) *Weissella confusa* SCC B2311, (C) *Leuconostoc mesenteroides* SCS B2219. Bar, 10 $\mu$ m.

전통 장류에서 분리했던 유산균인 *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Leuconostoc mesenteroides* 균주들의 전자 현미경 사진은 Fig. 40과 같았고 이들 유산균은 산막효모의 증식을 효과적으로 억제함을 보여주었다(Fig. 41 및 Table 19).

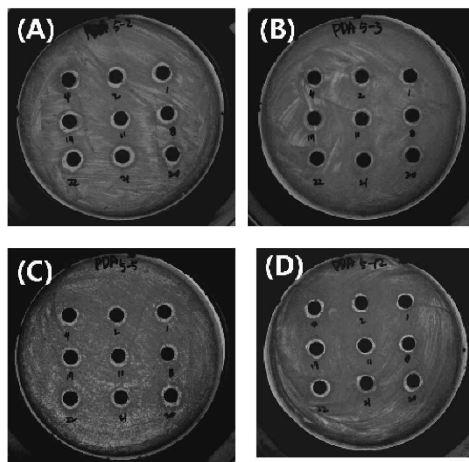


Fig. 41. Inhibition of growth of film-forming yeasts, SCS FY6(A), SCS FY7(B), SCS FY8(C), and SCS FY9(D), in the presence of supernatants of antagonistic *Weissella* and *Leuconostoc* strains with the paper disc assay. Yeast cells( $\sim 10^7$ ) were spread on potato dextrose agar plates. Twenty microliters of cell-free supernatant of cultured *Weissella* / *Leuconostoc* strains were pipetted onto filter paper discs and then grown at 30 $^{\circ}$ C for 24



hours. Clear circles around the discs indicate sensitivity towards the film-forming yeasts.

Table 19. Growth inhibition of film-forming yeasts by antagonistic *Weissella*, *Leuconostoc* strains isolated from soybean products.

Film yeast	Relative size of halo diameter (average diameter of halo/diameter of disc(6 mm))									
	Antagonistic strain against film-forming yeasts									
	<i>Weissella cibaria</i> SCKB 2301	<i>Weissella cibaria</i> SCKB 2302	<i>Weissella cibaria</i> SCDB 2304	<i>Weissella cibaria</i> SCKB 2303	<i>Weissella confusa</i> SCCB 2311	<i>Weissella confusa</i> SCDB 2316	<i>Weissella confusa</i> SCKB 2318	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SCSB 2219	<i>Weissella confusa</i> SCSB 2320	
SCS FY6	1.35	1.45	1.37	1.35	1.3	1.28	1.33	1.27	1.25	
SCS FY7	1.38	1.45	1.25	1.23	1.37	1.45	1.33	1.5	1.47	
SCS FY8	1.43	1.38	1.43	1.37	1.47	1.28	1.37	1.3	1.37	
SCS FY9	1.25	1.47	1.72	1.33	1.53	1.65	1.33	1.4	1.38	

(나) 전통 장류, 메주로부터 유해균에 강한 길항 작용을 가지는 *Leuconostoc*, *Weissella* 속 선발

① *Leuconostoc* 및 *Weissella* 균주 분리 및 *Enterococcus* 제거

BCP가 첨가된 MRS agar배지에서 colony 주위가 노란색으로 변하며, dextran 생성 배지에서 Dextran을 생성하는 lactic acid bacteria를 1차적으로 선발하였다. 선발된 균주들을 다시 Enterococcosel agar배지에 계대 배양하여 colony 주위가 검게 변하는 균주들을 제거하여 최종적으로 *Enterococcus*가 제거된 110개의 lactic acid bacteria를 선발하였다.

② *Bacillus cereus* 및 부패균에 대한 우수 발효 균주들의 길항능력

총 110개의 선발된 균주들 중 다종의 부패균에 길항작용을 가지는 균주 20개 균주를 선발하였고, 이들 20개 균주는 11 종의 부패균에 각각 다른 길항 능력을 나타냈으며, 저염 장류에서 분리한 *Enterococcus lactis*에 대해서는 선발된 20개 균주 모두 길항 능력을 보이지 않았다. 이는 선발된 유산균의 항균물질에 의한 길항 능력보다는 낮은 pH 때문에 길항능력을 보인 것으로 예상된다(Table 20).

Table 20. Growth inhibition of putrefactive bacteria by lactic acid bacteria strain isolated from soybean products.

Strain no.	Identification	Relative size of inhibition zone <sup>a</sup> by lactic acid bacteria strain					
		<i>B.cereus</i> KACC10004	<i>B.cereus</i> KACC13066	<i>B.cereus</i> KACC11240	<i>B.cereus</i> KACC10097	<i>B.cereus</i> KACC13064	<i>B.cereus</i> KACC13752
SCWL01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.55±0.01	1.56±0.04	-	1.55±0.06	1.41±0.04	-
SCWL02	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.53±0.04	1.56±0.06	-	-	1.42±0.05	-
SCWL03	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.56±0.06	1.36±0.16	1.52±0.20	-	1.51±0.08	1.67±0.01
SCWL04	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.63±0.07	1.56±0.12	1.52±0.04	-	1.36±0.05	1.49±0.04
SCWL05	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.58±0.04	1.53±0.02	1.51±0.12	1.50±0.03	1.48±0.01	1.51±0.04
SCWL06	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.53±0.15	1.58±0.02	1.57±0.01	1.52±0.07	1.45±0.10	1.43±0.06
SCWL07	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.55±0.09	1.55±0.04	1.61±0.08	1.56±0.09	1.37±0.02	1.39±0.01
SCWL08	<i>Weissella confusa</i>	1.39±0.03	1.32±0.04	-	-	1.45±0.02	1.37±0.05
SCWL09	<i>Weissella cibaria</i>	1.64±0.02	1.51±0.01	-	1.59±0.07	1.40±0.01	1.47±0.04
SCWL10	<i>Weissella cibaria</i>	1.63±0.02	1.57±0.06	-	1.41±0.03	1.18±0.02	-
SCWL11	<i>Weissella cibaria</i>	1.45±0.03	1.55±0.03	-	1.52±0.01	1.36±0.07	1.40±0.07
SCWL12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.30±0.00	1.52±0.10	-	1.53±0.03	1.34±0.01	1.31±0.04
SCWL13	<i>Weissella cibaria</i>	1.40±0.00	1.40±0.02	-	-	1.40±0.14	1.30±0.01
SCWL14	<i>Weissella cibaria</i>	1.55±0.13	-	1.70±0.01	-	1.38±0.01	-
SCWL15	<i>Weissella cibaria</i>	1.56±0.01	1.50±0.00	1.60±0.05	1.60±0.07	-	-
SCWL16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.57±0.04	1.40±0.03	1.41±0.04	1.67±0.07	1.49±0.12	1.45±0.01
SCWL17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.53±0.02	1.65±0.03	-	-	1.31±0.06	1.60±0.03
SCWL18	<i>Weissellacibaria</i>	1.50±0.15	1.46±0.09	-	-	1.31±0.03	1.49±0.04
SCWL19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.47±0.04	1.64±0.10	-	-	1.54±0.01	1.65±0.05
SCWL20	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.67±0.02	1.58±0.01	-	-	1.46±0.03	1.56±0.08
Strain no.	Identification	Relative size of inhibition zone <sup>a</sup> by lactic acid bacteria strain					
		<i>M.luteus</i> KACC13399	<i>P.aeruginosa</i> KACC10261	<i>S.aureus</i> KACC10780	<i>E. lactis</i>	<i>L.monocytogenes</i> KACC10766	<i>E.coli</i> KACC13823
SCWL01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2.31±0.03	1.65±0.14	1.88±0.08	-	1.75±0.04	1.82±0.09
SCWL02	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2.07±0.08	1.64±0.11	1.60±0.00	-	1.84±0.04	1.84±0.04
SCWL03	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.68±0.03	1.62±0.10	1.87±0.01	-	1.86±0.02	1.79±0.03

SCWL 04	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.69±0.13	1.59±0.05	1.69±0.11	-	1.76±0.04	1.71±0.02
SCWL 05	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.96±0.03	1.59±0.03	1.81±0.06	-	1.81±0.10	1.89±0.02
SCWL 06	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.86±0.21	1.70±0.17	1.66±0.11	-	1.72±0.03	1.84±0.10
SCWL 07	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.65±0.05	1.73±0.21	1.58±0.06	-	1.65±0.07	1.78±0.06
SCWL 08	<i>Weissella confusa</i>	1.82±0.02	1.62±0.10	1.50±0.00	-	1.76±0.04	1.83±0.09
SCWL 09	<i>Weissella cibaria</i>	2.17±0.16	1.66±0.09	2.27±0.16	-	1.77±0.05	1.86±0.07
SCWL 10	<i>Weissella cibaria</i>	1.71±0.05	1.52±0.07	1.70±0.06	-	1.82±0.00	1.93±0.03
SCWL 11	<i>Weissella cibaria</i>	1.75±0.23	1.60±0.10	1.72±0.09	-	1.90±0.03	-
SCWL 12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.83±0.11	1.51±0.11	1.55±0.12	-	1.82±0.03	1.86±0.03
SCWL 13	<i>Weissella cibaria</i>	2.14±0.14	1.50±0.00	1.51±0.11	-	1.75±0.06	1.84±0.04
SCWL 14	<i>Weissella cibaria</i>	1.79±0.07	1.66±0.07	1.77±0.00	-	1.76±0.02	1.90±0.06
SCWL 15	<i>Weissella cibaria</i>	2.02±0.15	1.59±0.24	2.01±0.15	-	1.84±0.02	1.96±0.00
SCWL 16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.70±0.08	1.63±0.02	1.98±0.14	-	1.81±0.01	1.93±0.01
SCWL 17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.90±0.08	1.82±0.06	1.69±0.09	-	1.74±0.05	1.92±0.05
SCWL 18	<i>Weissellacibaria</i>	1.53±0.12	1.70±0.07	1.73±0.11	-	1.93±0.01	2.03±0.01
SCWL 19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.83±0.12	1.74±0.04	1.90±0.00	-	1.93±0.03	1.89±0.05
SCWL 20	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.75±0.29	1.67±0.04	1.74±0.27	-	1.91±0.10	1.89±0.05

<sup>a</sup> average diameter of halo/ diameter of disc(6mm) ± SD

### ③ HPLC를 이용한 biogenic amine 분해 균주 선발

분석 결과 균주에 따라 biogenic amines의 분해율은 차이가 있었으며, 한 균주에서 biogenic amine에 따른 분해율 또한 차이가 있었다. Tyramine은 최소 28%, 최대 50%를 분해하는 균주가 있었으며, Histamine은 최소 26%, 최대 65%를 분해하는 균주가 있었다(Table 21).

Table 21. Degradation of biogenic amines by the isolated lactic acid bacteria strain.

Strain no.	Identification	Biogenic amine degradation(%)	
		Tyramine	Histamine
SCWL 01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	30.17	50.04
SCWL 02	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	28.19	54.16
SCWL 03	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	37.01	57.17
SCWL 04	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	30.99	28.69
SCWL 05	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	50.30	25.92
SCWL 06	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	32.26	47.18
SCWL 07	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	31.22	28.23
SCWL 08	<i>Weissella confusa</i>	37.10	36.83
SCWL 09	<i>Weissella cibaria</i>	38.64	57.55
SCWL 10	<i>Weissella cibaria</i>	37.56	61.25
SCWL 11	<i>Weissella cibaria</i>	32.14	58.31
SCWL 12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	35.81	58.76
SCWL 13	<i>Weissella cibaria</i>	36.55	62.62
SCWL 14	<i>Weissella cibaria</i>	35.12	62.18
SCWL 15	<i>Weissella cibaria</i>	33.53	58.11
SCWL 16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	37.54	42.03
SCWL 17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	42.45	28.43
SCWL 18	<i>Weissella cibaria</i>	35.16	55.08
SCWL 19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	29.38	57.67
SCWL 20	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	38.43	64.61

#### ④ 선발균주 형태학적 관찰 및 동정

전자현미경을 통해 형태학적 관찰 결과 전형적인 구균의 형태를 보였으며(Fig. 42), 16S rRNA 염기서열을 통한 동정 결과 20개의 선발된 균주들 중 *Leuconostoc mesenteroides* 12개 균주로 가장 많았으며, *Weissella cibaria*가 7개의 균주, *Weissella confusa* 1개 균주로 동정되었다(Fig. 43).



Fig. 42. Field emission scanning electron micrograph of SCWL 08(right), SCWL 10(middle), SCWL 20(left).

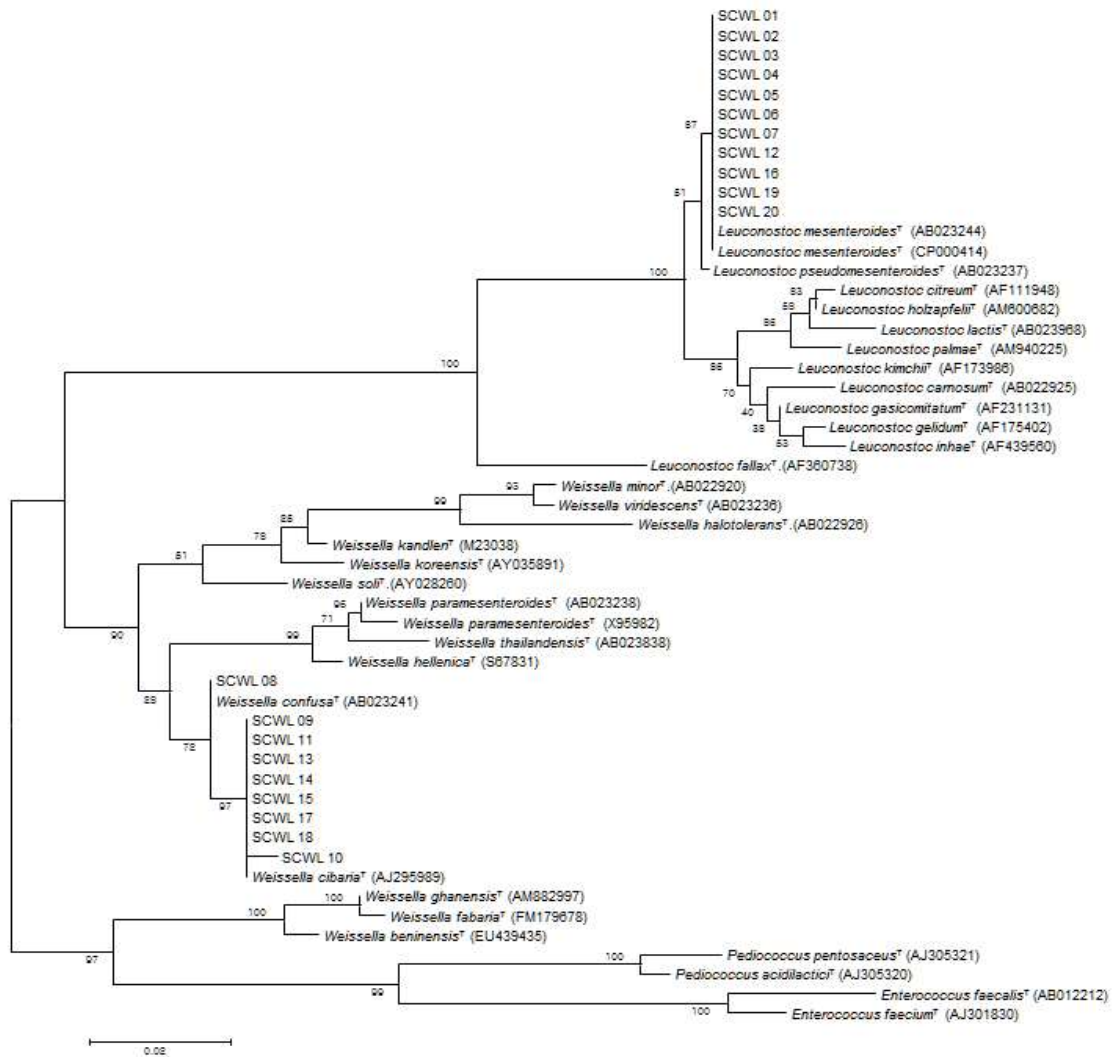


Fig. 43. Molecular phylogenetic analysis of strains isolated from soybean product by Maximum Likelihood method based on 16S rRNA gene sequence.

(4) 전통 장류와 메주로부터 저염 장류 제조에 상업적 용도로 사용할 수 있는 곰팡이 분리 및 동정

(가) 저염 장류 제조 시 사용할 수 있는 Biogenic amine 및 aflatoxin 비생산 곰팡이 균주의 선발

#### ① Biogenic amine 및 aflatoxin 비생산 곰팡이 균주의 선발

전통 장류로부터 유해균 증식 억제와 biogenic amine 감소, aflatoxin 비생산, protease 및 amylase 고생산의 선발 목표에 따라 균주들을 선발하였다. 이 균들의 선발을 위해 우리나라 대부분 장류회사에서 구입해 사용하는 충무발효의 *Aspergillus oryzae*를 비교 균주로 사용하였다. 그 결과는 다음과 같았다(Table 22).

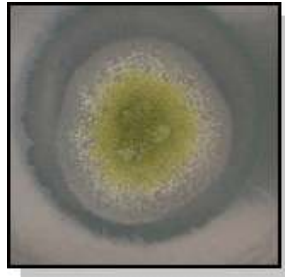
Table 22. Selection of *A. oryzae* strains that do not produce aflatoxin and biogenic amines.

균주	Identification	Aflatoxin 생성 유무	Biogenic amine 생성유무	Protease 활성	Amylase 활성
SSM 01	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	2	3.5
SDM 02	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	2.22	3
SDM 03	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	1.16	2.7
SDM 04	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	1	2.5
SDM 05	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	1.5	3.6
SKM 06	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	2	2.4
SKM 07	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	2.5	3.5
SDM 08	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	2.5	2
SSM 09	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	2.4	3
Chun gMu	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	1.76	2.1

\*Protease & amylase 활성: 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C에서 4 일 배양시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값.

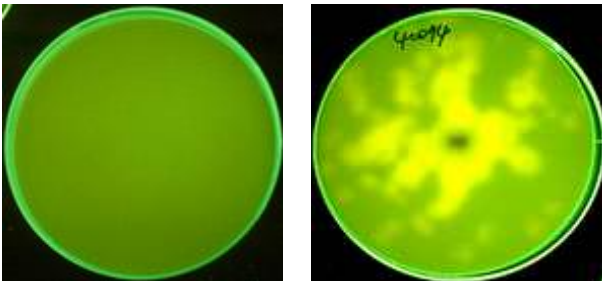
㉞ 선발 균주에 대한 상세정보

1. 균주 번호 : SSM01
2. 분리 날짜 및 시료 생산지 : 2012. 6. 1~ 강원도 양양
3. 균주 명 : *Aspergillus oryzae*



4. 형태 :  
-형태적 특징 : 연한 녹색을 띄며, 포자(spore)는 비교적 크나 잘 날리는 특징이 있다.

5. CEA에서의 aflatoxin 생성 여부 확인 (UV에 조사)



(CEA(coconut extract agar)에서 4~5day 25°C 배양)

- contol: (우) *A. parasiticus* 배양한 배지  
(좌) 무균 배지

6. sequencing & BLAST Search in NCBI - Sequencing by macrogen

```

AACGTTTTTATATTTAAAAGAGGGGTTTTCCCACCCCCTTTTACAAAGATTTTCATCCCCCAGAGAAGAAGTT
ATATTTGTTTTTGCCTCCCCGGCCCGCCTGGGGGATACACAAAAGGGGGAGAAAACCCCCCTCCCCTC
CCCCGAGGAAATGGCGGGGGGGGGCGGCGGCTCTGGGGGCCCTTTCCCCCCCCAAAAGGGGAG
GGGCACCCCAACAACCGCCCCCTTCTTTGGGGAAGCAAGGGAGCCTTGGGATAGGCCTTGCCCC
CCCGGAATACCCGGGGGGCGCCATTTGCTTTTTAAAGGACCCCGTTCATTCCAGGAGTTTTTTGCCAT
TCCCCACCCCGTTAACCGCATTTCGTTGCTTTTTTTAATGGAGGCCGGAACCCCAACACTTCCCATT
GTTGAGAAGTTTTAAACTGGAGTGCGATAACAATCCAATTTCGACTCCCAACCAGATCAGAAAGATNC
CGGGGTTTCCGGCGGCCCGCGGCAGAGCCCCCGGGGCCCGGAAGGCGGGCCGGCGGAAGCAAA
NTAAGGAACCGAAAANCCGGGGGGAGGTGGGGCNGNNGGANCN CNNNCNNTNNGTNNTGCCCTT
TCTTTTAGGGGGACTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTCTAGCGAGCCACCTCCCACC
CGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCG
GGCCCGCGCCCGCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCA
ATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
CTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCG
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTGTCGCC
TCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCT
TTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCG
    
```

GATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAGGCCGGGAGGAGATCATTACCGAGTGTAG  
 GGTTCTAGCGAGCCCAACCTCCCACGTGGTTTACGGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCGCCATTCA  
 GGGCGCGGGGGGCTCTAACCGGGGCGCCGCGGAGACCCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAAGTC  
 TGAGGTGGATTGGTATCGCAATCAGTTTAAACTTTTCAACAATGGGATCTCTTGGGTTTCCGGCCATCC  
 ATTAACAAAACGCAGGCGGAAGTGCGGATAAACTAGGTGGTGAAATTGCAAAAATTCCGTGAAAATCAT  
 CGAAGTTCTTTTCAAACGCAACATTGGCGCCCCCGGGTTATTTCCGGGGGGGGGCAAGGCCCTGTT  
 CCAAAGCGGTCATTTGCTTCCAATCAGACCAGGGCGTGGGGGGTGGTTTTGGGGGGGGTCCCCCCC  
 CTTCCCCGGGGGGGGGGACGGGGGGCCAAAAAAGACAGCGGGGCCGGGCACCCGTTTTCTA  
 TTTTCTTCGGAAGAAAAAAGGGGGGGCTTTTTTTTTCTCCCCCTCCTTTTTTTTTAAACCCCCCGG  
 GCCCGGGCGGCCGTTTTGGGCCGAAAAAATAAATTTTATTTTTCTTTTTTTCCCGCAGGGGGT  
 TAAACACACCCCCTCGGAAAAAATAAAGGGGTGTGGGAAAGATATAACACACCCCCCTT

*Aspergillus oryzae* strain NSK internal transcribed spacer 1,  
 partial sequence

Score = 1271 bits (688), Expect = 0.0  
 Identities = 847/915 (93%), Gaps = 49/915 (5%)  
 Strand=Plus/Plus

7. protease & amylase activity

- protease activity

	<b>충무발효균주</b>	<b>SSM 01</b>
활성 (상대값)	1.76	2.0

- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

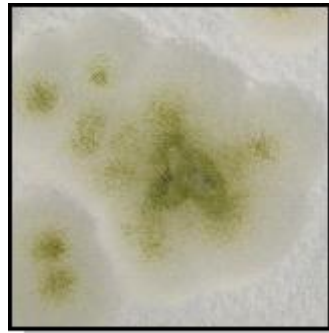
- amylase activity

	<b>충무발효균주</b>	<b>SKO 1101</b>
활성 (상대값)	2.1	2.5

- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

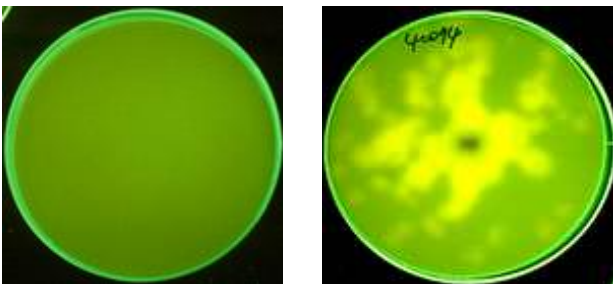


1. 균주 번호 : SDM02
2. 분리 날짜 및 시료 생산지 : 2012. 6. 1~ 강원도 정선
3. 균주 명 : *Aspergillus oryzae*
4. 형태 :



-형태적 특징 : 연한 녹색을 띄며, 포자(spore)는 비교적 크나 잘 날리는 특징이 있다.

5. CEA에서의 aflatoxin 생성 여부 확인 (UV에 조사)



(CEA(coconut extract agar)에서 4~5day 25°C 배양)

- contol: (우) *A. parasiticus* 배양한 배지
- (좌) 무균 배지

-tip; CEA배지에서 aflatoxin생성 균주(*A. parasiticus*, *A. flavus* 등.)를 배양 후 UV를 조사하게 되면 가운데 그림 사진과 같이 형광을 띄게 된다.

6. sequencing & BLAST Search in NCBI- Sequencing by macrogen

```

CTTTTTTTTTTTTTTCCCCCAAACCTTAAAATTTCTAAGGGGGTTATCCCGGGCCCTTTTTTCCCCGGGTT
TTTTACCGCCGGCGCGCAACATAGAGCGAGGACATCCGACACGGGTTTACTGGAGCTTAGTTGCGCC
GGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGC
CTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGC
AATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGA
TTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGA
GATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTC
GTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCCGC
CGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAAT
GATCCTTCCGCAGGTTACCCTACGGAAGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCC
CACCGGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCACCC
GGCCCCCCCCGGAGACCCCGAAATCTGTCTGATCTAGTGGAAGTCTGAAGTTGATTGTTATCGCAATCAG
TTTAAACTTTCAACAATGGGATCTCTTGGGTTCCGGCATCGATGAAAGAACGCAGCGAAAATGCGAATA
ACTAGGTGTGAAATTGCAGAAATCCGTGAAATCATCGAGTTCTTTTGAACGCAAATTGGCCCCCGG
GGTATTCCGGGGGGGGCATGCCTGTTCCAAGCGTTCCTTTGCCGCCACAAACCAGGGGTTGGGGTGG

```

TTTGCGCCCCCTCCCTCCCCCCCCGGGGGGGGGAACGGGCCCCCAAAGGGACACCGGCCGGCCCC  
 CCGTTCCAAAATCCCCGGGCGGAAGGGGGGGCTTTTTTTCCCCCGCTCTTGTTGAGGCCCGGGCC  
 CGGGGCTTTGGCCAAAAACCAAATTTTAGTTTTTTTTCCCCAGGGTAAACACCCCGGAAACAAGGGG  
 GGGGGGAAAAACCCCTTAAATTTTAAGCTTAGAGTTTAGGGGGGGGGGAAGGAAAAAAA

*Aspergillus oryzae* strain SV/09-09 18S ribosomal RNA gene

Score = 1009 bits (546), Expect = 0.0  
 Identities = 575/588 (98%), Gaps = 5/588 (1%)  
 Strand=Plus/Minus

7. protease & amylase activity

- protease activity

	충무발효 균주	SDM 02
활성 (상대값)	1.76	2.22

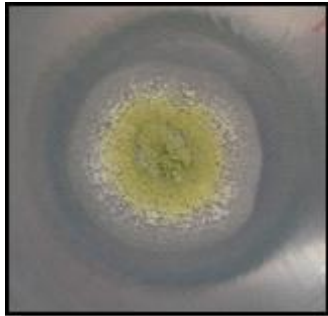
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

- amylase activity

	충무발효 균주	SDM 02
활성 (상대값)	2.1	3.3

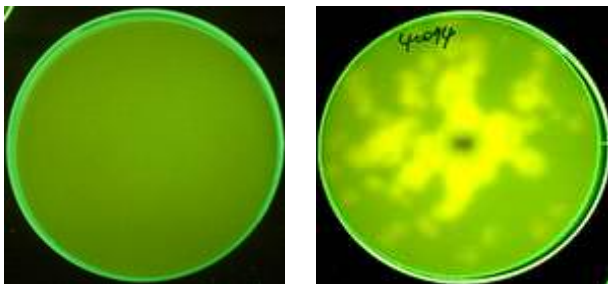
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

1. 균주 번호 : **SDM03**
2. 분리 날짜 및 시료 생산지 : 2012. 6. 1~ 전북 완주
3. 균주 명 : *Aspergillus oryzae*
4. 형태 :



-형태적 특징 : 연한 녹색을 띄며, 포자(spore)는 매우 미세하기 때문에 잘 날리는 특징이 있다.

5. CEA에서의 aflatoxin 생성 여부 확인(UV에 조사)



(CEA(coconut extract agar)에서 4~5day 25°C 배양)

- contol: (우) *A. parasiticus* 배양한 배지  
(좌) 무균 배지

6. sequencing & BLAST Search in NCBI - Sequencing by macrogen

```

TTTTTTTTTTCTTTCTCCTCTTTCTCCTCTTTTTTTGGTTGTTTGTACCTTTTCCACTGTTCTACTGA
GAGAAAAAAAAAAATTTTTTTTCGCCCGCCGGGCGGCGCCCCAAAAAGGAGAAAACAAACACCCAC
CCCGGCCAGAGGTGGGGGGGGGGGGGGTGGTGGGGCGGCTTTCCCCCGGGGGGGGAGGGGGCG
CAACCCCCCCCCCTGGAGGAAGAAACTGTAGAACGGCATCCCCGGAATACCCGGGGCCA
ATGCTTTAAAGAATTTGTTATTCACGAATTTGCAATTCACACTAGTTATCGCACTCCGTGCTTTTTTAATA
GACGCGGAACCCAGAGCTCCAGTGTGAAAGTTTTAAGTGAGTGCATAACAATCAACTCGGACTTCACCA
GATCAGATAGATTCGTGGTTTCCGGCGCGCCCGGNTAGAGCCCCGGCGNCCTGAANGGCGGCCCGC
CGAAGCAACTAAGGTACCGTAAACAACGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTTCGGTAA
TGATTTTTCTAGAAAGGGGGTCTGGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGATACATAGCGAGCCAACCTC
CCCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGC
CCCGGGACCGCACCCGCCGGAGACACCGCCAACCTCTGTCTGATCTACTGAAATATGAGATGATTATATC
GCAATCAGTTAAAACTTTCAGCAATGGATCTCTTGTTCCGGGATCGATCACCAACACACCAAGGTGCG
ATAAGTACTGTGAATTACACAATTAATCGAATCATTAGTCTTTGAACGCACTTTGCGCCCTCTGGTATTC
CGGGGTCCATGCCTGTACCAACATATTTGTTGCCATCGTTTTAGGTGTGTGTGATGCGTCGACGTCC
CATCTCCGGAGATCACAGGCACTTCATGCTGTCTCCGGAGCGCGTCCGATCGTCGATGATAGCCCGCT
TTGTCCATGAATGTCGGGCCCGCCAGCGCTTAACGAACGCTAATCACTCTTTTCCAGGTTGACCTCGC

```

AACGAGCCCGACACTCCGTAAAGATCCTTCCTATGTACCCCTTAAAGAAGATCATTACGAGTGTAGGGTT  
 CTAGCGAGCCAACCTCCCACCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCGCCATTCAGGCCGC  
 GGGGGCTCTAGCCGGCCCCCGGAGAACACAACCTGTTCGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCC  
 ACTCAGTTAAAACCTTTCACAATGGATCTCTTGTTCCGCGTCCATAAAGAAGCAGCGGAGTGCGATAACT  
 AGTGTGAATTGCAAAATTCGTGAATCACGAGTCTTTGACGCAATCGCCCCGGGTATTGGGGGGCATG  
 CCTATCCAGCTTCTTGCTCCATAAGCAGGGTTGTGTGGTTGGGGCGCCCTCCTCTCGGGGGGGGAACG  
 CCCAAAAGCCCCCCCCCCCCCTCCATCCCGGGGGAGGGGGGTTTTCCCCCTTTTAAGCCCGCCCG  
 GCTTGCCAAAAAATTTTTTTTTTCCAGTAAACCCCGAACAGGAAGGATACCCCTAAATAACTAGGGGG  
 GGAGGAAAAAAAAAAAAACCC

*Aspergillus oryzae* strain NSK internal transcribed spacer 1,  
 partial sequence

Score = 893 bits (483), Expect = 0.0  
 Identities = 958/1181 (81%), Gaps = 77/1181 (7%)  
 Strand=Plus/Plus

7. protease & amylase activity

- protease activity

	<u>충무발효균주</u>	<u>SDM 03</u>
활성 (상대값)	1.76	1.16

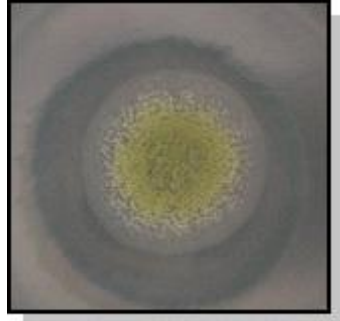
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C  
 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

- amylase activity

	<u>충무발효균주</u>	<u>SDM 03</u>
활성 (상대값)	2.1	2.7

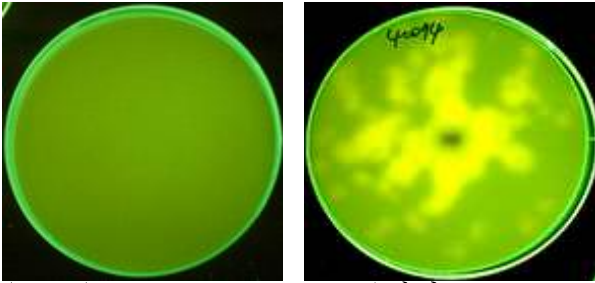
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C  
 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

1. 균주 번호 : SDM04
2. 분리 날짜 및 시료 생산지 : 2012. 6. 1~ 강원도 정선
3. 균주 명 : *Aspergillus oryzae*
4. 형태 :



-형태적 특징 : 연한 녹색을 띄며, 포자(spore)는 매우 미세하기 때문에 잘 날리는 특징이 있다.

5. CEA에서의 aflatoxin 생성 여부 확인(UV에 조사)



(CEA(coconut extract agar)에서 4~5day 25°C 배양)

- contol: (우) *A. parasiticus* 배양한 배지  
(좌) 무균 배지

6. sequencing & BLAST Search in NCBI - Sequencing by macrogen

```

TTTTTTTTTTTTCTTTCCCCCCCCCTCCCGTTTTATTTGGGGGGTTTCCTTCTCTTTCAAAGTTATTAA
GGGAAAAGAAGTATTTTTTTTTGGGCCAAGCGCGGGCGGGTTTTAAAAAGGGGGACACAACCCCCCTA
CCCCGGAATAGGGGCCGTTGGGGGTGGTGGTGGGGTCTGTCCCCCCCCGGGGGGGAGGGCGC
CGGCCACCGCACCCCGCCTCAGGAGGCAATGAGGGTTGAATGGCCCTGCCCCCGGAATACCC
CGGGGGCGCCATGTGCGTTCAAAGAACTCGCTGATTCATCGAATTTATGCAATTCACCACTAGTTATCG
CACTTCGCTGCTTTTTTTAATCGAGGCCGGAACCCACAGATCCCATTGTTGAAAGTGTTAATCTGAAT
GCGATACCAATCAACTTCAGACTTCCACTAGATCAGACAGATTTCGTGTTTTTCGGCGGGCCCCGGCTGA
GAGCCCCCGCGGCCCTGAATGCGGGCCCGCGAAGCAACCTAAGGTACCGTAAACANCGGTGGGAG
GTNNGGCTCGCTAGGAACNTACTCGGTAATGATTTTTCGTTTTGGGGGGGATGCGGAAGGATCATT
ACCGAGTGTAGGGTATCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGG
GCCCGCCATTCATGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGGAGACACCACGAAC
TCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTG
GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCAT
CGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG
CCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAG
CGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCG

```

CTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG  
 CATATCAAAGACCGGGAAGAAAATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCGTG  
 GTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCAGGGCCGCCGGGGGGCTCTCAGCCCGGC  
 CCCGCCGGAGACACACGAACTCTTGTCTGATCTAGCTGAAAGTCTGAAATTGGATTGTTATCGCAATCA  
 GATTAAACTTTTCAACAATGGGATCTCTTTGGGTTCCCGCCATCGATTGAAAAACGCAGCGAAAATGC  
 GAATAAACTAGGTGGGGAAATTGCAATAAATTCCGTGGAATCATCGAAGTTCTTTTGAAACGCACCCTT  
 GCGCCCCCGGGTATTTCGGGGGGTGAATGCCCTGTTCCCAGCCCTTCATTTGCCTCCCCATCA  
 AGCCAGGGGGTGGGTGGTTGTTTTGGGGGGGGGCCCTCCCCCCCCCGGGGGGGGGGAAAAGGG  
 CCCCCAAAAGGCCAGCGGGCCAGACCCGCGGTCCGAATCCCCGGGGGGGAGATGGGGGGGC  
 CTTTTTTTTCTCCCCGCATTTTTGAAGAACGCCCCCGGTTCCCCGGGGTTTGAGCCCCGGGAAATC  
 CCAAAGTTTTCTGTTTTCCCCTTGGTTTTCAACTTGAAGTAAAACTCCCTCGGGAAATACAGGGGGGGA  
 AAGGGGAATTTACACCCCCCCTTAAAAACTTAAAAACGTGGGGGGGGAAAAGGGGGGGGGGGGGG  
 AAGGGGAAAAAAAAGAAAAAAGAAAAAACCAGGGAAAAA

*Aspergillus oryzae* strain YI-A7 18S ribosomal RNA gene, partial  
 sequence

Score = 1040 bits (563), Expect = 0.0  
 Identities = 567/569 (99%), Gaps = 0/569 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

7. protease & amylase activity

- protease activity

	충무발효균주	SDM 04
활성 (상대값)	1.76	1

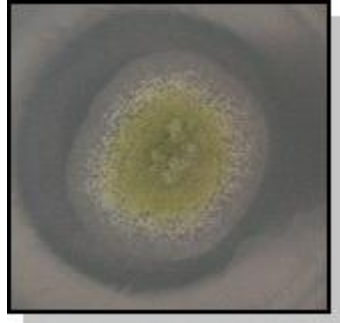
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30℃에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

- amylase activity

	충무발효균주	SDM 04
활성 (상대값)	2.1	2.5

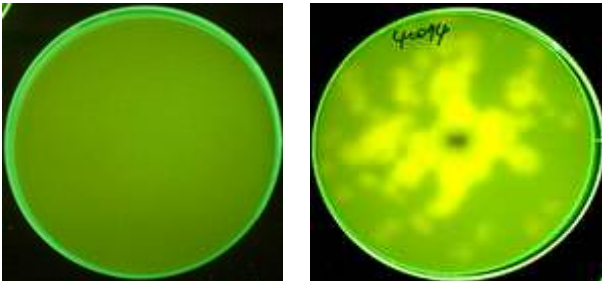
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30℃에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

1. 균주 번호 : SDM05
2. 분리 날짜 및 시료 생산지 : 2012. 6. 1~ 전북 완주
3. 균주 명 : *Aspergillus oryzae*
4. 형태 :



-형태적 특징 : 연한 녹색을 띄며, 포자(spore)는 매우 미세하기 때문에 잘 날리는 특징이 있다.

5. CEA에서의 aflatoxin 생성 여부 확인(UV에 조사)



(CEA(coconut extract agar)에서 4~5day 25°C 배양)

- contol: (우) *A. parasiticus* 배양한 배지  
(좌) 무균 배지

6. sequencing & BLAST Search in NCBI - Sequencing by Macrogen

```

TTTTTTTTTTTTTTTTCTTCCCCCGCGCAAACACTGTATATATTAGGGGTATATCCTCCCCCTCTTTCAA
GGGTTTCAAGCGGAGAAAGAAAATTTTTGTTTTTCGCTTAAGCCCGGCTGGGGTTTTCAAAGGGGGGG
CACAAACCCCCCACCTCCCGGAATAGGAGCGGGTGCGGGCGTGCCCTTGGGGGGCCTTTCCCCC
CGGAGAGGGGGCGGCCCCGCCACCACACACCCCCCTGCCCTAGGGGGGCAATGAGGTTGGTAAAGG
CATGCCCCCGGAATAACCCGGGGCCGCGAATTGCGTTCAAAGAACTTGCTGATTTACGAATTTTTG
CAACTCCACACCTAGTTATCCGCAATTTGTTGCTTTTTTNNATCGATGCCGGAACCCACAGCTCCCAT
TGTTGAAAGTTGTTAACCTGANTGCGATACCAATCAACCTCAGACTTCCANCAGATCAGACAGATTCGTG
GTTTCGGGCGGGGCGGGCTAGAGCCCCGGCGGCCCTGAAGGGCGGCCCGCCGAAGCAACTAAGG
TACCGTAAACCACGGTGGGAGGTNGGCNCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATTTTTCTAGGA
GGGGGGCATCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTCTAGCGAGCCACCTCCCACCCGTGTTTA
CTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGC
GCCCGCCGGAGACACCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTA
AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGT
GAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCA
TGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTTCGTTCCTCCCTCTCCGG
GGGGACGGGCCCAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACC

```

CGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGG  
 TAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCTAAAACCGGGAGGAAGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTT  
 AGCGAGCCCAACCTCCCACCGTGGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTGAGGGCC  
 GCCGGGGGCTCTCAGCCGGGGCCCGCCGGAGACCCACGAACTCTTGTCTGATCTAGGTGAAAGTCTT  
 GAGGTTGGATTGGTTATCGCAATCAGTTTTAAACTTTTCAACACATGGGATCTCTGTGGGTTCCGGGCA  
 TCGATTAACAAAAACGCAGCGAAAATGCGAATAAACTAGGTGGTGAATTGCAAAAAATTCCGTGAAATCA  
 TCGAGGTCTTTTCAAACGCACATTTGCGCCCCCGGGGTTATTTCCGGGGGGGGCCATGGCCTGTTCC  
 CAAGCCTTCATTTGCCTCCCAGCAAGCCAGGGGTTTGTGTTGTTTTGGGGGTCGGGCCTCCCCCTCCC  
 CCGGGGGGGGGGAAAAGGGCCCCCAACAAAAGGCAAACGGGCCAAAACCCCGCCTTTCCAAATCCC  
 CCCGAACGAAAAAAGGGGGGGGCTTTTTGTTTCCCCCGCCTTCTTTTAAAGCCCCCGGCCCCCGG  
 GGTTTAGGGCCCGGAAGAAAACAAAATAATAAATTCCCCTGGTTCCCCCGTGAAGTAAAACCCCTCG  
 GGAATACAGGGGGGTGGAGGAGGATTACACCCCCCTTAAACAATTTAAACACTGTTTGTTTTTTAAA  
 GGGGGAAAAGGGGGGGGAAGGAAAGAGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
 TGGTCCCCCCCCCCCCCCCC  
 CCCCCCTCCCC

*Aspergillus oryzae* strain 096515 18S ribosomal RNA gene, partial  
 sequence

Score = 1022 bits (553), Expect = 0.0  
 Identities = 563/567 (99%), Gaps = 4/567 (1%)  
 Strand=Plus/Plus

7. protease & amylase activity

- protease activity

	<b>충무발효균주</b>	<b>SDM 05</b>
활성 (상대값)	1.76	1.5

- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C  
 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

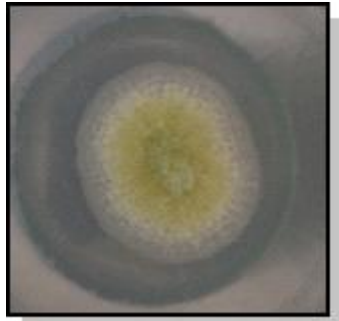
- amylase activity

	<b>충무발효균주</b>	<b>SDM 05</b>
활성 (상대값)	2.1	3.6

- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C  
 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

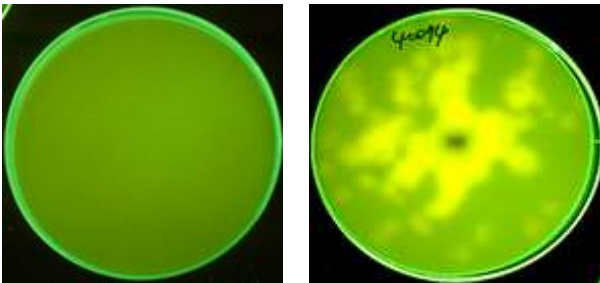


1. 균주 번호 : **SKM06**
2. 분리 날짜 및 시료 생산지 : 2012. 6. 1~ 경기도 안성
3. 균주 명 : *Aspergillus oryzae*
4. 형태 :



-형태적 특징 : 연한 녹색을 띄며, 포자(spore)는 매우 미세하기 때문에 잘 날리는 특징이 있다.

5. CEA에서의 aflatoxin 생성 여부 확인(UV에 조사)



(CEA(coconut extract agar)에서 4~5day 25°C 배양)

- contol: (우) *A. parasiticus* 배양한 배지  
(좌) 무균 배지

6. sequencing & BLAST Search in NCBI - Sequencing by Macrogen

```

ATTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTCTTCCCCAAAAAAAACACGTTTAAATAAAATGTGGGGAGTCTCCCT
CCCCCCCCTTTTTTAGGGGTTTTTTTTTTTCGGAAGAAAAAAGAAAAAAAATTTTTTTTTCTTTGCCCAA
ACCCGGGGGGGGGGGGGGGGGTTTTAAAAAAAAGGGGGGGGGACAAAACGCCCCCCCTTTTCTCCCCG
GGAAAAAAAAGGCCGGGGGGGGGCCCGGCTTTTTTTTTGGGGGGCCTTTTTCCCCCCCCCGGAAGG
GGGGGGGGGGGGGCCCAAAAACCCCAACCCCTTTTTTTAGGGGGGAAAATAACGCTTTGGAAAAGG
CCTTGCCCCCCCCGAAAAACCCCGGGGGGCCAATTTGCGTTTTCAAAGAACTCGGTTGATTTACC
GAAATTTTTGCAATTTCCCACCTAGTTATTCGCACTTCCGCTGCGTTTTTTTTATTTCGAGGCCGGGAACC
CCAAGAGATCCCATTGGTGAAAAGTTTTAAACTGAATGGGATAAAAATTAATTCAGAATTTCACTAGATT
AGAAAGATTTGTGGGTTTTTCGGGGGGGGGGGGGGGAGAGGGCCCGGCGGCCCTGAAAGGCGGGCCCG
CCGAAGCAATTAAGGTACAGTAAACAAGGTGGGAGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTTGTAAT
GATTTTTTTGTA AAAAGGGGACTGCGGAAGGATCATTACCGAGGTAGGGTATCTAGCGAGCCAACCATC
CCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCGGGGGCTCTCAG
CCCCGGGCCCGCGCCCGGAGACACCACGA ACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTA
TCGCAATCAGTTAAA ACTTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGTTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTAT
TCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGT

```

CCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGG  
GGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGA  
CCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAGCAGGAGGAAGATCATTACCGAG  
TGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACCTCCACCGGGGTTTACTGTACCTTAAGTTGCTTCGGCGGGCCC  
GCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCGGGGCCCGCCGGAGACACACGAAATCTGTCTGTATCTA  
GCTGAAAGTCTGGAGGTTGGATTGTTATCGCACCTCACATTCAAACCTTTTCTACACATGGGGGTCTCTT  
TGGGGTCCCGGGCATCGAATGAAAAAACGCAGGCGAAAATGCGAATAAACTAGGTGGTCAAATTTGC  
AAAAATTTTCGATGAAAATCCATCGAAGTTCTTTTGAACGCAAACCTTTGGCCCCCCCCGGGGTTTATT  
TCCGGGGGGGGCCCAAGGCCCTTCTCAAAGCCTTTATTTTGCCCCCCCCAAAAAAGAAGGGGTTT  
TTGGTTGGTTTCTTTGGGGGGGGGGGCCCCCCCCCCCTCCCCGGGGGGGGGGGGGAAAAAAGCGGG  
CCCCCAAAAAAAAACCCCCGGCCACCCCCCCCCGGCCCCCTAATTATCCCCCGGCGGTGAAAG  
GGGGGGGGTGGTGTGTTTGGTTCCCCCCCCCTCCCCTTTTATTTAAAAAACCCCCCGCCCCCATTGG  
GTTTGC GCGTGGAAGAAAGATTAATAAAAAATATAAAATCTTTTCTTCTGTTTTTCTCCCCTCCCC  
GGGAAAATCAAAAACCTCTCGGGGAGAAAAAGAAGGGGGGGGGGGGGAAGAAAAAAGAAATCAGC  
GCCCCCCCCCTTTTATAAATATTTTATAAAGACACGAAAAGAAGGGGGGGGGGAAAAAAAAGGG  
GGAGAAAAAAGAAGAAAGGAGAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGGG  
CCCCCCCCCGGCCGGGGGGGGCGGGTTTTGGGGGG

*Aspergillus oryzae* isolate F5-03 18S ribosomal RNA gene, partial  
sequence

Score = 1044 bits (565), Expect = 0.0  
Identities = 579/585 (99%), Gaps = 3/585 (1%)  
Strand=Plus/Plus

7. protease & amylase activity

- protease activity

	충무발효균주	SKM 06
활성 (상대값)	1.76	2

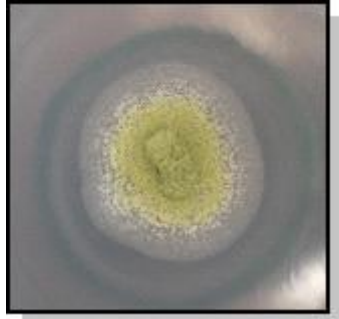
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30℃에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명환 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

- amylase activity

	충무발효균주	SKM 06
활성 (상대값)	2.1	2.4

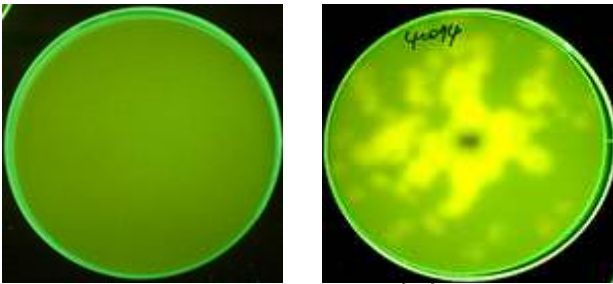
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30℃에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명환 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

1. 균주 번호 : **SKM07**
2. 분리 날짜 및 시료 생산지 : 2012. 6. 1~ 전북 순창
3. 균주 명 : *Aspergillus orysae*
4. 형태 :



-형태적 특징 : 연한 녹색을 띄며, 포자(spore)는 매우 미세하기 때문에 잘 날리는 특징이 있다.

5. CEA에서의 aflatoxin 생성 여부 확인(UV에 조사)



(CEA(coconut extract agar)에서 4~5day 25°C 배양)

-contol: (우) *A. parasiticus* 배양한 배지  
(좌) 무균 배지

6. sequencing & BLAST Search in NCBI- Sequencing by Macrogen

```

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCCCCCACCAAAACCTTTATTTAAAGGGGTTTCCCCACCCCTTTTCCCAG
GTTACCACCAGGGAAGAAAAGATTTTGGTTTCTGCCAAGGGCCCGCGGGTCTTCAAAAAGGGGGACA
AACGCCCCCTCTCCCCGGGAATGGACCGGGTGTGGCGGTGCTTGGGGCCCCGTCCCCCCCCGAAAG
GGGGGCGCCCCCCCCCCCCACCCCCCCCCCTGCTCAGGAGCAAATGCCCTGGAACGGCCTGCCCTCC
CGGAATACCCGGGGGCCGATTGGCTTAAAGAGACACGCTGTTTCAACGATTTTTTGAATTCCCACC
TAGTGATCCGCATTCCGTTGCTTTTTTAAATCGAGGCGGACACCCACAGCTTCCATGTTGAAAGTTTAAA
CTGANTGCGACACAATTCAACTCGGACTCCACAGAATCAGANAGATTTCGTGTTNTTCGGCGGCGCGCC
GGTCAGAGCCCCCGGGGCCCTGAANGGCGGNCNGCNGAAGCAANTNAGGTACCGTAAACANNNGTG
GGGGTNGGGCNGNTNGGANCCNNNCNNTNGGTANTGCCCTTTCCTGGGGGGGGGATGCGGAAGGAT
CATTACCGAGTGTAGGGTTTCTAGCGAGCCACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGC
GGGCCCGCCATTTCATGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCACGA
ACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCT
TGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATC
ATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGC
TGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGC

```

AGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGG  
CGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA  
AGCATATCAAAAACCGGAAGAAGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCGT  
GGTTTACTGTACCTTAAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTAGGGCCCGCGGGGGCTCTCACCGGGCC  
GCCGCCGGAGACCCACGAACTCTGGTCTGATCTAGTTGAAAGTCTGAAGTTGGATTGGTATCGCAATCA  
GTTTAAAACTTTTCAACAATGGGAATCTCTTTGGGTTTCCGGCCATCGCATTAAAAAACGCCAGCGAA  
AAGTGCGAATAAACTAGGTGGTGAAATTGCAAAAAATTCCGTGGAATCATCCAAGGTCTTTTGAAACG  
CCACATTGGGGCCCCCGGGGTTATTTCCGGGGGGGGCCATGCCCTGTTCCCAAACCTTCATTTGG  
CTTCCCATGCAGGACAAGGGGTTTGGTGGTTGGTTTGGGGGGGCGGGCCCCCCCCCTCCCCCGGGG  
GGGGGGGGAAAAGGGCCCCCAAAAAGGCCACCGGGCCCGGACCCCGCGCTTCTAAATTTCC  
CCCCGGGGGGAAAAGGGGGGGGGGCTTTTTGTGTTCCCCCCCCGCTTTTTTTTTGTTAAAGGGCCCCG  
CGGGACACGCGGGGCGTTTTTGCCCGCGAAAAAAGACCCAAAATAAATTAATAAATTTCTTTGTTCTC  
CCCGTGGGTGTTAAACACACCTCCCCGCAATAACCCAAGGGGTTGAAGAAGAGGATAAATAACCCCC  
CCGCCTTTTAAAACTTTTTAAAAACCTTTTTCGGGTTTTTTTTTTGCCCCGGGGGGGAGGGGGGGGA  
GAAAAAAGAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAATTTCTTTTATTTTTCCCCCTCTT  
TA

*Aspergillus oryzae* strain YI-A6 18S ribosomal RNA gene, partial  
sequence

Score = 1037 bits (561), Expect = 0.0  
Identities = 572/577 (99%), Gaps = 2/577 (0%)  
Strand=Plus/Plus

7. protease & amylase activity

- protease activity

	충무발효균주	SKM 07
활성 (상대값)	1.76	2.5

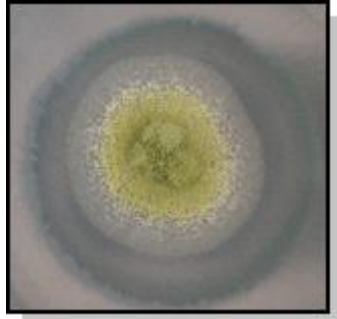
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

- amylase activity

	충무발효균주	SKM 07
활성 (상대값)	2.1	3.5

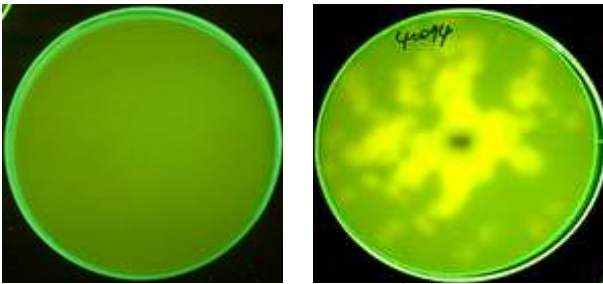
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

1. 균주 번호 : SDM08
2. 분리 날짜 및 시료 생산지 : 2012. 6. 1~ 강원도 정선
3. 균주 명 : *Aspergillus oryzae*
4. 형태 :



-형태적 특징 : 연한 녹색을 띄며, 포자(spore)는 매우 미세하기 때문에 잘 날리는 특징이 있다.

5. CEA에서의 aflatoxin 생성 여부 확인(UV에 조사)



(CEA(coconut extract agar)에서 4~5day 25°C 배양)

- contol: (우) *A. parasiticus* 배양한 배지  
(좌) 무균 배지

6. sequencing & BLAST Search in NCBI - Sequencing by macrogen

```

TTTTTTTTTTTTTTTTTCTTCTCTCCTCCNCCCCCTCGTGTTTTTTGTGGGTTTGTCTCCCCCTTTTCC
TGGTTTTTTCCCGGGCGGGCCGTTTTTTTTTTCTTGGGTGCCCCCGGCCCTCGGGCTGCTCCCGCGGGG
GTGGCCCGCCCCCCCCCTCCCGGGTTTGGGGCCCGGTGGGGGCGGGGGGTTTGGGGCGGCGGTCC
CCCCCGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCCGCCCCCCCCCCCCCTCTGGGGGGGGTGCTGCTTGGT
TGGGCCCGCCCCCCCCGGCCTTCCCCGGGGCCCCGGTGGGTTTTATGGGCCCGTGTTTTCCCGGAG
TTTNTGCCTTTCCTCCCCTCGTTTTCGCCCTTCCGGTGCTTTTTTTNTTCGGGCCCGGGCCCCCCCCC
TCCCTTTGTTAATGGTGTGGTCTGGGTGCGCTGCCCTTCCCTTCGGCTTTTTCGCGGTTCTGNTGGCT
TCTGGTTCTCGGGCGGCCGCGGTTAGGGCCCCCGCGGCCNTGAAGGCGGGCCNGCNGNNGCNNN
TNNGTNCCGGTNNNCCGGGGTGGGGTGGGGCNCGNTNGGANCCNNNCNNTNNGTNNNTGCCCTCT
CCCCGTGGAGCGCATCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCACCTCCCACCCGT
GTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCATTATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGC
CCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAActCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCA
GTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAG
TGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTGTCGCCCTCTC
CGGGGGGACGGGCCCAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGT

```

CACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGAT  
 CAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATTTCATAAACCGGGAAGAAGATCATTACCGAGTGTAGGGTT  
 CCTAGCGAGCCCAACCTCCACCGTGGTTTACGGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCGCCATTACAGGGC  
 CGCGGGGGGCTCTAACCGGGGCGCCGCGGAGACCCCGAAATCTGTCTGATCTAGTGAAAGTCTGAG  
 GTTGATTGGTATCGCAATCAGTTTAAACTTTTCAACAATGGGATCTCTTGGGTTCCGGCATCGATTTAA  
 AAAACGCAGCGAAAGTGCGAATAAACTAGGTGGTGAATTGCAAAAAATTCCGGTGAATCATCGAAGG  
 TCTTTTGAACGCAAATTGGGGCCCCCGGGGTATTTCCGGGGGGGGCATGGCCTGTTCCAAAACCTTC  
 ATTTGCTTCCCATTCAAAAAGGGGTTGGTGGTGGTTTGGGGGGGGGGCCCCCCCCCTCCCCGGGGG  
 GGGGGAAAAGGGCCCCCAAAAAGACCAACCGGCCCGACCACCCCGTTCCAAATTCTTCCCCGGGG  
 GGAAAGTGGGGGGGGTTTTTTTTTCCCCCCCCCTTCTTTTTTAAACCCCGCCCCGCGGCTTTTTTG  
 GCCGAAAAACGAAAATTTAAATTTTCTTTTTTCCCCGGGAGAAAAAACTTCTCTGAAAACCAGAG  
 GTTGGGGGGGAATTAACACCCCCTTTAAACTTAAAAGCTAAGGGATTTTTTTTCGGGGGGGGGGGG  
 GAGAAGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGTTTAATTTTTTT

*Aspergillus oryzae* strain 096515 18S ribosomal RNA gene, partial  
 sequence

Identities = 564/566 (99%), Gaps = 2/566 (0%)

Strand=Plus/Plus

7. protease & amylase activity

- protease activity

	<u>충무발효균주</u>	<u>SDM 08</u>
활성 (상대값)	1.76	2.5

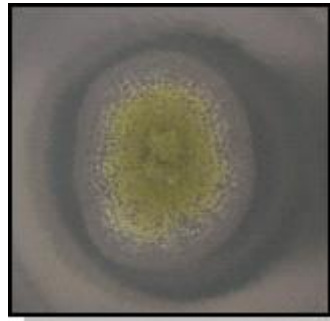
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C  
 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

- amylase activity

	<u>충무발효균주</u>	<u>SDM 08</u>
활성 (상대값)	2.1	2.0

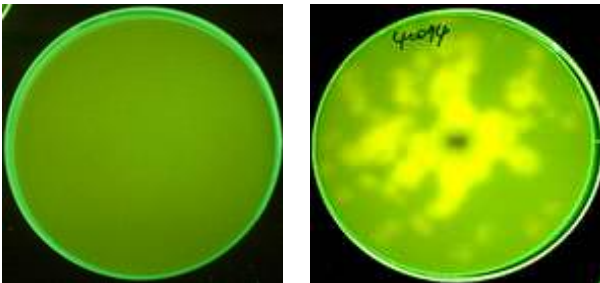
- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C  
 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

1. 균주 번호 : SSM09
2. 분리 날짜 및 시료 생산지 : 2012. 6. 1~ 전북 무주
3. 균주 명 : *Aspergillus oryzae*
4. 형태 :



-형태적 특징 : 연한 녹색을 띄며, 포자(spore)는 매우 미세하기 때문에 잘 날리는 특징이 있다.

5. CEA에서의 aflatoxin 생성 여부 확인(UV에 조사)



(CEA(coconut extract agar)에서 4~5day 25°C 배양)

- contol: (우) *A. parasiticus* 배양한 배지  
(좌) 무균 배지

6. sequencing & BLAST Search in NCBI - Sequencing by Macrogen

```

TTTTTTTTTCCCTCCCCCCCCCCCCCTTTTTATTATAGGGGGTATTTCTTCCCTCTTCAAATTT
TTCCACGAGAAAGAAATAATTAATTTTTTTGGCGAAAGGCCGGCCGGGGCTTATCAAAGGGGGGAA
AACAAAGCGCCCTCCTCCCCGGGATAAGAGGCCGGTGTGGGGGGTGTTCGTGGGGGCCCTCTTCC
CCCCGGGAGGGGGGAAGGACGCCCCGAACCGACCCACCCCTGGCCGACGGGCGCAAAGAAGGGC
TGGTAAAGGCCAGCCCCCGAATTACCGGGGGGCCCATGTGCGTTCAAAGACTTCGTTGATTT
CACGAATTTTTTCCATCTCCCAACTCGTGATCCGCACTCTCGTTGCTTTNTTAATCCGAGGCCGGCACCC
AAGAGCTCCCTTTGTGAAAGTTTAAACTGATTGCGATACTCAACTTCGGCCTTCACAAGATCAGACA
GATTCGTGTTTTCCGCGCGCGGGCCGGGTGAGAGCCCCGGCGGCCCTGAAGGCGGGCCCGCCGAAG
CAACTAAGGTACCGTAAACANCGGTGGGAGGTNGGGCNCGCTAGGAACCCTACTCGGTANNGANTT
TTCCTGTTGGGGGTATGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGAGATCTAGCGAGCCAACCTCCCCC
GTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGG
GCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAAT
CAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACT
AGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGG
GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCGCCCTC
TCCGGGGGGGACGGGCCCAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTT

```

GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGG  
 ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCTAAAGCGGGAGGAAGATCATTACCGAGTGTAGGG  
 TTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCGGGGTTTACTGTACCTTAGGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTC  
 ATGGCCGCGGGGGGCTCTCAGCCGGGGCCCGCCGGAACCAAACTCTGTCCGGATCTAGCTG  
 AAAGTTCTGAGGTTGAATTGTTGTCGCACCTCAGCTTCAAACCTATTTCTTCAAAGGGAGGCTCTCTGT  
 GGGTTCCCGGGCTTCCAATTAAGAAACGCAAGCGGAAAATGGCGAATTAATAAGGTGGTGGAAATT  
 TGAAAAAACTTTCCGATGAAAACCCAATCCAATTTTTTTTTTAAAAAACGGCAATCTTCGGCCCCCCCCTT  
 GGGATTTTTCTTGCGGGGGGCGGGGTCCCAAGGCCTTCAAATCGGAAGGCCCTTTCCTTTCCCCC  
 CCCCCTCGACCAGAGGGGGTGGGGGGTGGGTTGGTGGTGGCCCCCTTCCTTCCCCCCTCCCCCCC  
 CCCACCTGTGCGGGCCGAGAGAAGAAGGAAAAAACCCACCCGGCCACCCCCACACCCGAAA  
 AACCCCTCCCCCCCAAACCCATTCTCCGGGGTGAGGCATTTTATTTGTTTTCTCCGGCGGCTCG  
 CTTTTGTGGGGTAGGGGGTCCCCTTGTGTGTTCTTTTTCCCCTCTCCCCCCCCTCGGGGGGAG  
 GATAGGAGGGGAAAGAGGCGCCCCAGCGGGCTCCTTCTTTGGTGGTTACCCAGGCGATGTGTGA  
 TGAAAAATAAGAAACCCCTCTTCTAATTAATAAAAAATAAAAAAAATTTTTGTTTTTTTTCCCGCGGGT  
 GGTATAATTTCTCCTCCGCCCCCTTTCTTTGGGGAAAAAGCCTTTTAGAAAAAACGCCCTGCGAA  
 AAACCCCGGGGGTGTTAAAAGGGGGGGGGGGGAGATGGGGGTAAAAAGAGAAGAAAAATAAGTA  
 CGACAACCCCCACCAAAAATTTTTTTATAAAAAAAATTTTTTTAAAAAAGATATGTTTGAAAAAAA  
 AAATGGGGTGGGGGGGGGGGGAAAAA

*Aspergillus oryzae* strain YI-A7 18S ribosomal RNA gene, partial  
 sequence

Score = 1027 bits (556), Expect = 0.0  
 Identities = 575/583 (99%), Gaps = 6/583 (1%)  
 Strand=Plus/Plus

7. protease & amylase activity

- protease activity

	<u>충무발효균주</u>	<u>SSM 09</u>
활성 (상대값)	1.76	2.4

- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C  
 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미

- amylase activity

	<u>충무발효균주</u>	<u>SSM 09</u>
활성 (상대값)	2.1	3.0

- Protease & amylase 활성 상대 값은 균을 starch 및 skim milk 함유 배지에 접종하고 30°C  
 에서 4 day incubation 시킨 후 생성되는 투명한 지름을 균 colony 지름으로 나눈 값을 의미



(나) 저염 장류에서 사용할 수 있는 biogenic amine 분해 및 aflatoxin 비생산 곰팡이 선발

① 우수 발효 곰팡이 선발

Table 23. Degradation of biogenic amines by the *Aspergillus* isolates. Degradation was determined after 10 day fermentation of cooked soybean containing 5.3% of each biogenic amine.

Strain	Identification	Aflatoxin Production	Biogenic amine production	Protease activity	Amylase activity	Degraded biogenic amines (%)			
						Histamine	Putrescine	Cadaverine	tyramine
SDAB 01	<i>Aspergillus oryzae</i>			+++	+	19			69
SCAB 02	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	+++	++	—	—	—	68
SCAB 03	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	+++	++	26	—	—	85
SDAB 04	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	+++	+++	—	—	—	10
SCAB 05	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	+++	+++	10	—	—	75
SDAB 06	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	+++	++	28	—	—	83
SDAB 07	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	+++	+++	26	—	—	77
SCAB 08	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	+++	++	25	—	10	81
SCAB 09	<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	+++	++	—	—	22	60

(다) 상업용 곰팡이 균주보다 protease, amylase 활성이 높은 *Aspergillus oryzae* 선발

① 시료 채취

총 92종의 시료를 확보하였으며 확보한 시료는 Table에 간략히 나타내었다(Table 24).

Table 24. Collection of samples according to region.

시료 종류	지역	수량
누룩	전라	11
	경상	2
	경기	2
장류	경상	20
	전라	18
	충청	15
	강원	10
	경기	9
	제주	2
	미상	3
종합		92

### ② 곰팡이 균주의 분리

총 92종의 시료로부터 154종의 곰팡이 균주를 분리하였다. 15개의 누룩으로부터 111개의 균주를 분리한 것에 비해 76개의 장류로부터 43개의 균주를 분리하였으며 시료의 종류별 분리된 균주는 Table에 나타내었다(Table 25).

Table 25. Isolation of strains of each samples.

종류	시료 수	분리 균주수
가내 수공업 누룩	9	67
상업용 누룩	6	44
상업용 된장	30	17
상업용 고추장	14	3
상업용 막장 및 청국장	21	22
상업용 간장	12	0
미상	1	1
종합	92	154

수집된 시료 중 장류에 비해 전통주의 스타터로 쓰이는 누룩이 장류보다 더 많은 수의 다양한 균주가 분리되었으며 장류에서는 막장과 청국장에서 많은 수의 균주가 분리된 것에 비해 간장과 고추장에서는 거의 분리되지 않았다.

### ③ *Aspergillus oryzae* 균주 분리

배지 상에서 형태적으로 *Aspergillus*속에 속한 균주를 분리하기 위해 Fig. 44와 같은 형태상의 특징을 보이는 곰팡이 균주를 분리하였다.

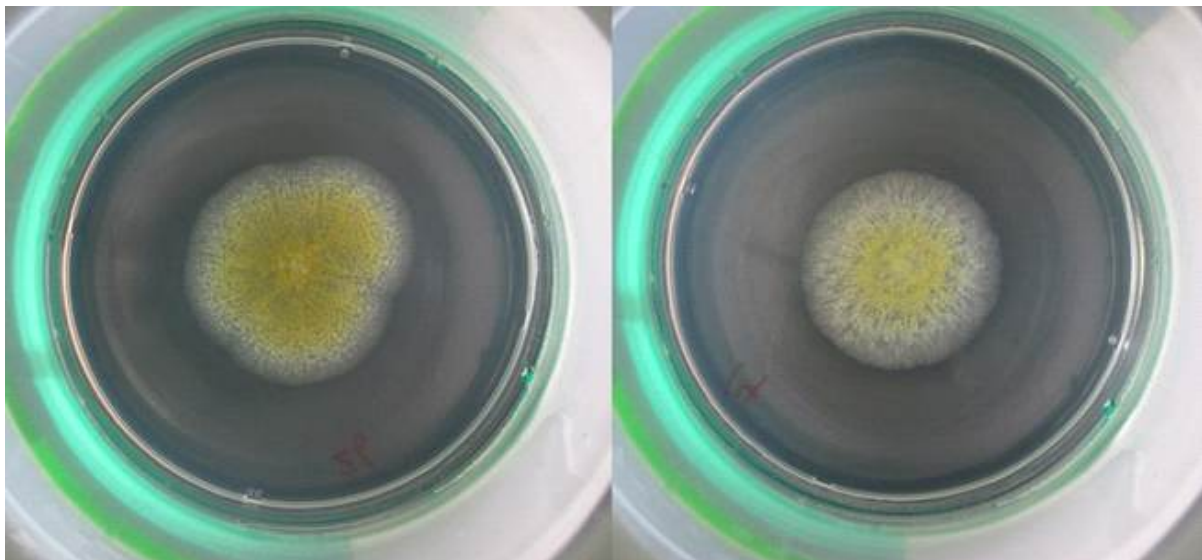


Fig. 44. Cultures for screening of *Aspergillus* genus on potato dextrose agar medium.

또한 배지 상에서 형태학적으로 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속에 속하는 균주를 구별하기

위해 현미경 관찰을 통해 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속을 구별을 실시하였다. Coconut 배지를 이용하여 aflatoxin 생성 여부를 확인하였다. coconut 배지에서 aflatoxin을 생성하는 균주는 UV로 조사한 경우 *Aspergillus flavus*와 같이 aflatoxin에 의해 형광을 나타내기 때문에 형광의 발색여부로 aflatoxin 생성 여부를 확인하였다(Fig 45).

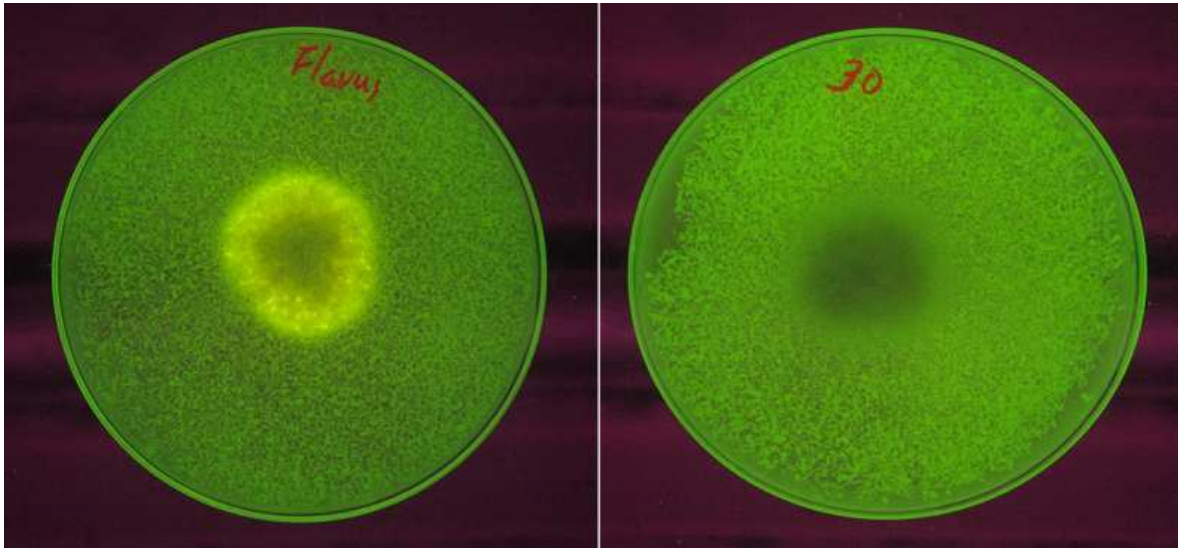


Fig. 45. To distinguish between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*, culture on coconut agar medium and distinguished *A. flavus*(Left) and *A. oryzae*(Right) under long-wave UV light(365nm).

형태적으로 *Aspergillus*속에 속하면서 aflatoxin을 생성하지 않는 *Aspergillus oryzae* 30종을 최종 분리하였다(Table 26).

Table 26. Lists of selected strains from traditional soybean products and traditional wine starter *Nuruk*.

No.	지역명	학명	시료
SCIM1	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM2	광주 광역	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM3	경북 상주	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM4	강원도 정선	<i>Aspergillus oryzae</i>	된장
SCIM5	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM6	광주 광역	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM7	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM8	광주 광역	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM9	경북 상주	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM10	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM11	전북 전주	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM12	경남 진주	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM13	경남 진주	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM14	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM15	경기 안성	<i>Aspergillus oryzae</i>	청국장
SCIM16	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM17	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM18	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM19	경남 김해	<i>Aspergillus oryzae</i>	된장
SCIM20	경북 고령	<i>Aspergillus oryzae</i>	된장
SCIM21	경북 고령	<i>Aspergillus oryzae</i>	된장
SCIM23	전북 전주	<i>Aspergillus oryzae</i>	미상
SCIM24	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM25	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM26	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM27	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM28	경북 경산	<i>Aspergillus oryzae</i>	고추장
SCIM29	전북 순창	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM30	경기 화성	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩
SCIM31	경기 화성	<i>Aspergillus oryzae</i>	누룩

#### ④ 고체 배지 조건에서 protease 및 amylase 활성 측정

고체 배지 조건에서 분리 균주에 대한 Protease 및 Amylase 활성은 Figure로 나타내었다 (Fig. 46). 활성 비교를 위해 *Aspergillus niger* SCIM22 균주와 C사에서 판매하는 상업용 *Aspergillus oryzae* 균주를 사용하였다. Figure에 나타난 것 같이 고체배지 조건에서는 protease 활성이 reference 균주보다 우수한 균주는 많았으며 특히 SCIM3 균주의 경우 분리한 균주 중 가장 높은 protease 활성 능력을 가졌으며 reference균주를 비롯한 타 균주에 비해 차이폭이 컸다. 반면 amylase 활성 능력은 reference균주가 가장 우수했으며 SCIM19, SCIM20, SCIM21 균주가 reference 균주보다 낮지만 전반적으로 분리 균주 중 가장 우수한 amylase 활성 능력을 보였다. 전반적으로 protease 활성 능력과 amylase 활성 능력 모두에서 우수한 균주는 나타나지 않았지만 SCIM3, SCIM29 균주의 경우 전반적으로 모두 우수한 편에 속하였다.

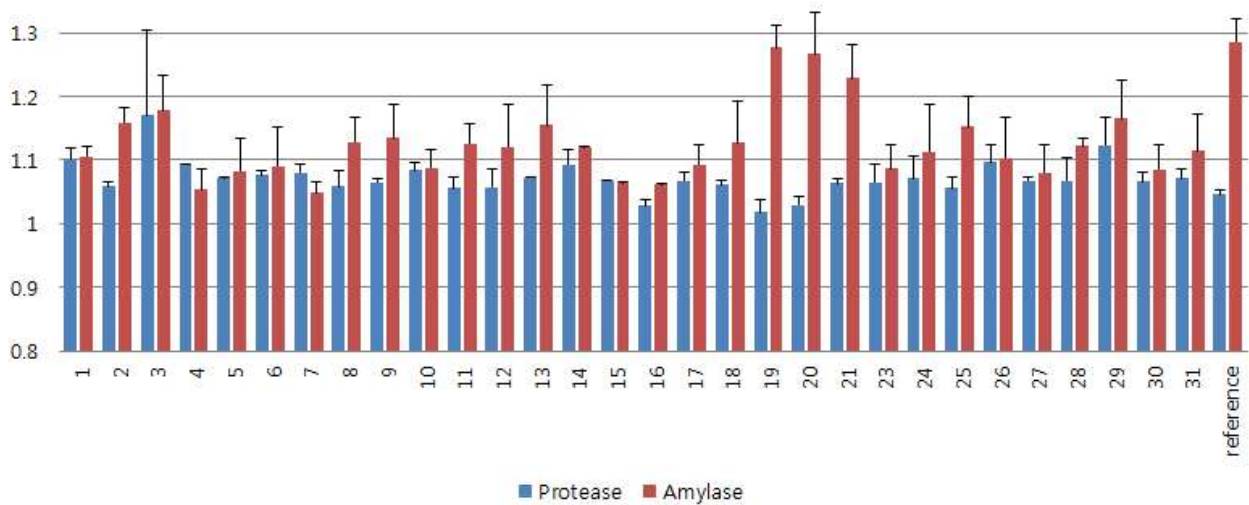


Fig. 46. The enzyme activity value based on diameter of clear zone on the 1% skim milk agar medium(blue) and 1% starch agar medium(red). The values were calculated the diameter of clear zone/ the diameter of colony size. Commercial strain(reference) and *A. niger*(22) are used as control.

#### ⑤ 액체 배지 조건에서 Amylase 활성 측정

액체 배지 조건에서 분리 균주에 대한 Amylase 활성은 DNS 측정법을 이용하여 환원당을 측정하였으며 측정된 값은 figure로 나타내었다(Fig. 47). 활성 비교를 위한 reference 균으로 C사에서 판매하는 상업용 균주를 사용하였다.

측정은 4회 반복하여 측정하였으며 측정 결과 SCIM12 균주가 가장 높은 amylase 활성을 가진 것으로 나타났다. 또한 고체배지 상에서 전반적으로 활성이 높았던 SCIM29 균주도 우수한 활성을 가졌다.

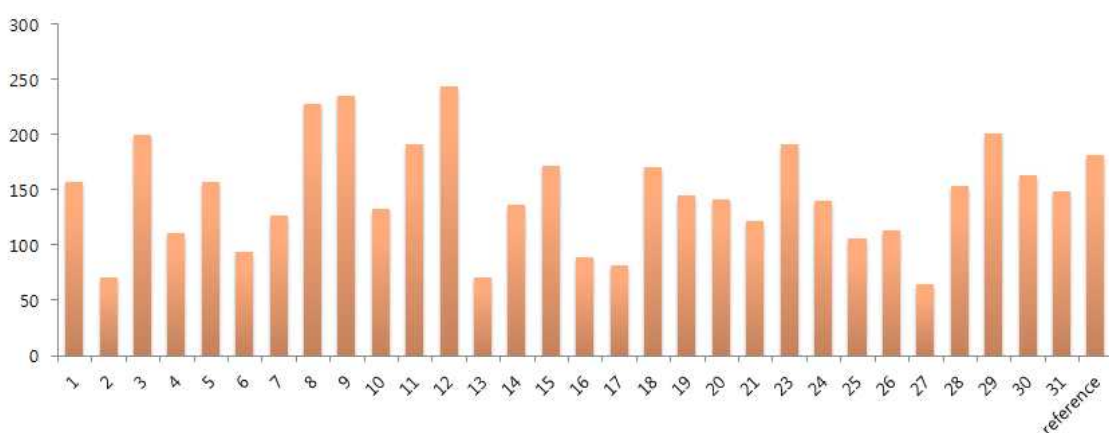


Fig. 47. Reducing sugar assay using DNS method. This assay can measure  $\alpha$ -amylase activity of isolated strains on MRS broth. Commercial strain(reference) and *A. niger* (22) are used as control.

⑥ 선발 균주의 유전학적 동정

선발 균주의 유전학적 동정을 위해 18S rRNA와 28S rRNA의 부분 서열을 포함하는 ITS 영역의 유전자 염기서열을 동정하였다. 선발된 균주의 염기서열 분석결과 *Aspergillus oryzae*와 99% 일치한 것으로 나타났다. 그러나 또한 *Aspergillus flavus*와 99% 일치하는데 이러한 이유는 *A. oryzae*와 *A. flavus* 모두 유전적으로 동일하기 때문이다. 분리된 균주에 대한 계통도 작성은 figure로 나타내었다(Fig 48).

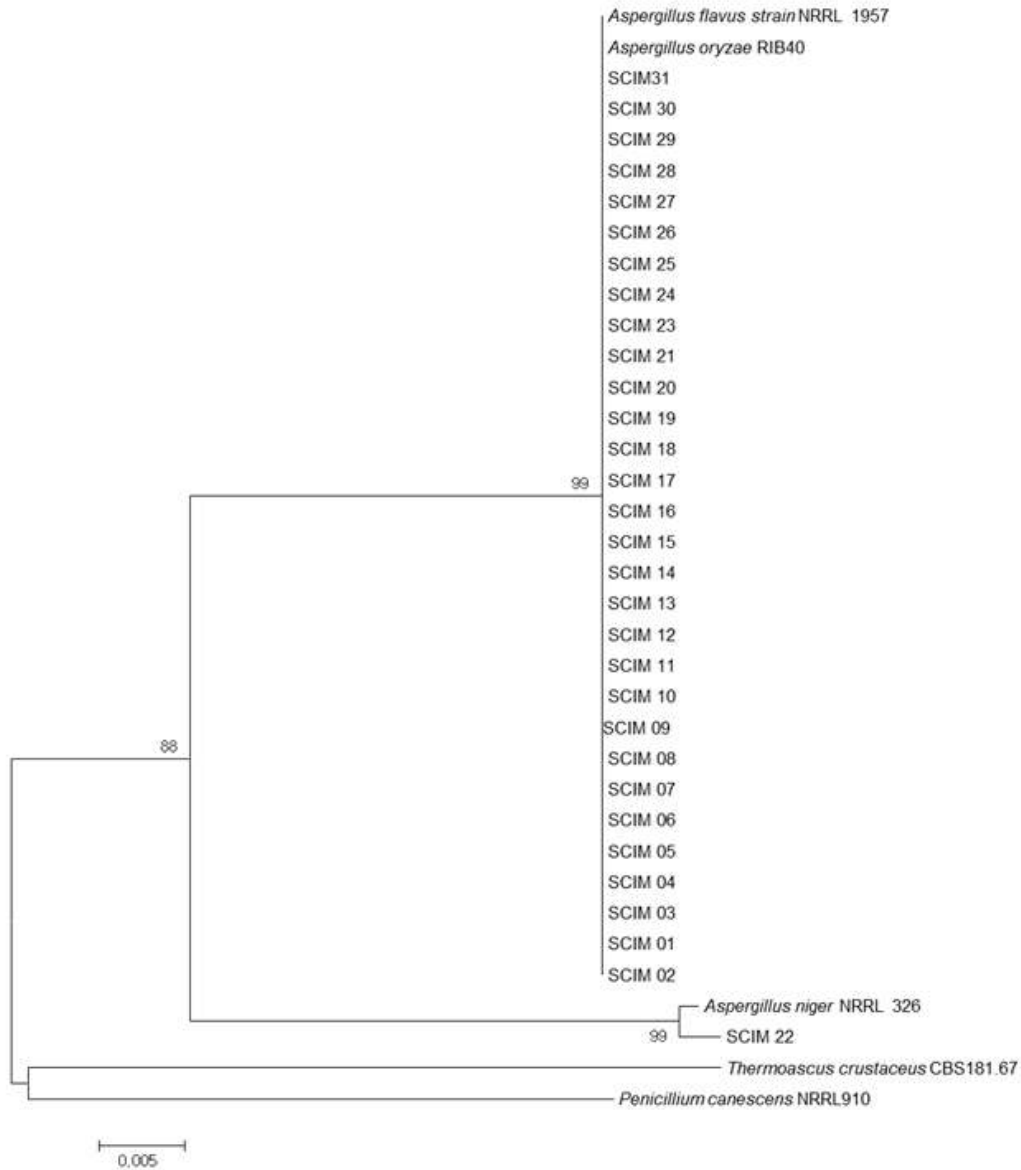


Fig. 48. Phylogenetic tree constructed from comparative analysis of ITS region gene sequences showing the relationships of selected strains with other type strains. Bootstrap values(percentage from 1,000 replicates) are indicated at the nodes. The scale bar indicates the nucleotide change per site.

#### 다. 수행 연구 결론

(1) Pyrosequencing을 통해 저염 장류의 부패에 관여하는 부패 세균군집을 비교하였으며, 부패를 유발하는 세균 및 산막을 형성하는 효모를 순수 분리하고 동정한 결과 *Staphylococcus saprophyticus* 와 *S.warneri*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida xylopsoci*로 동정되었으며, 이외에도 *Bacillus antracis*, *B. cereus*, *Enterococcus lactis*를 분리, 동정하였다.

(2) 저염 장류에 상업적으로 바로 사용 가능한 우수 발효 *Bacillus* SCK B11을 분리 및 동정한 결과 *Bacillus licheniformis*로 분류되었고, 이 균주는 biogenic amine을 분해할 수 있는 능력을 가지고 있으며, 유해균 13종에 대해 우수한 길항 능력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

(3) 분리한 산막 형성 효모 *Pichia kudriavzevii*와 *Candida xylopsoci*와 부패 유발 세균 *S. saprophyticus*와 *S. warneri*, *Bacillus antracis*, *B. cereus*를 억제하는 우수 발효 *Bacillus* 11종을 분리 및 동정한 결과 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. methylotrophicus*로 분류 되었다.

(4) 저염 장류에 주로 존재하는 유해균에 대하여 강한 길항 능력을 가지는 우수 발효 *Bacillus* 균주 20종은 분리 및 동정하였다. 동정결과 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. methylotrophicus*로 밝혀졌으며, 이 균주들은 biogenic amine 분해능력이 있음을 확인하였다.

(5) 산막 형성 효모 *P. kudriavzevii*와 *Candidia xylopsoci*의 증식을 억제하는 유산균을 분리 및 동정하였더니 *Weisella cibaria*, *W. confusa*, *Leuconostoc mesenteroides*로 분류 되었다. 또한 저염 장류에 주로 존재하는 유해균 11종에 대한 강한 길항 능력을 가지는 유산균을 분리한 결과 *W. cibaria*, *W. confusa*, *L. mesenteroides*로 동정되었으며 이들 균주는 비교적 높은 biogenic amine 분해능력을 가진다.

(6) 저염 장류 제조에 국내에서 상업적으로 이용되고 있는 균주보다 protease, amylase 활성이 우수한 *Aspergillus oryzae* 49종을 선별하였다. 이들 균주는 aflatoxin 비생산 및 biogenic amine 분해 능력도 가지고 있음을 확인하였다.

## 2절 전통장류로부터 발효 효모 균집분석 및 그로부터 분리된 알코올 발효 및 향미 증진 우수 균주의 분리와 저염화 장류로의 적용

### 1. 연구개발 목표

- 전통장류 발효기간 별 이화학적 특성, 향미성분 및 발효효모 균집 분석
- 전통장류로부터 분리된 효모 균주를 대상으로 고 알코올 생성 및 향미 증진 우수효모 선발
- 알코올 발효 우수 효모의 알코올 생성 최적화 조건 검토 및 관련 유전자 획득
- 장류 유래 효모 균주별 특성 비교 분석 및 장류 발효 적합성 평가
- 저염 장류 제조를 위한 고 알코올 생성 및 향미 증진 우수효모 복합 스타터의 적용

### 2. 연구 수행 방법

#### 가. 전통장류 발효기간 별 향미분석 및 발효효모 균집분석

##### (1) 전통 방식으로 제조된 장류의 발효기간별 수집

본 연구에서 사용한 장류는 전북 순창 지역에서 메주 및 씨간장을 사용하여 전통적으로 제조되는 장류를 발효기간별로 수집하여 시료로 사용하였다. 메주부터 장을 담근 후 1일(SF<sub>1</sub>), 10일(SF<sub>10</sub>), 20일(SF<sub>20</sub>), 30일(SF<sub>30</sub>), 40일(SF<sub>40</sub>), 50일(SF<sub>50</sub>, 장분리), 60일(SF<sub>60</sub>) 및 70일(SF<sub>70</sub>, 열처리)로 10일마다 수집하여 분석에 사용하였다.

##### (2) 장류의 발효기간 별 이화학적 특성 및 향미성분 분석

###### (가) 장류의 발효기간 별 이화학적 특성 분석

전통장류의 제조 및 숙성 단계별로 pH, 총산도, 고형분 함량, 환원당, 아미노산, 염 및 알코올 함량을 분석하였다. pH는 제조된 장류를 10,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 상등액을 Orion model 710 pH meter(Orion model 710, Thermo, Beverly, MA, USA)로 측정하였으며, 산도 측정은 상등액 10 mL에 혼합지시약(bromothymol blue 0.2 g, neutral red 0.1 g, absolute ethanol 300 mL) 2-3방울을 가한 뒤 0.1N NaOH로 담록색이 나타날 때까지 적정 시키는데 소요되는 mL수를 산도로 표시하여 계산하였다. 고형분 함량은 hand refractometer(PAL-a; 0-85 Brix, Atago, Tokyo, Japan)로 측정하여 °Brix로 표기하였고, 환원당 함량은 시료 상등액을 가지고 DNS(dinitrosalicylic acid)법으로 측정하였다(Miller, 1959). 아미노산은 시료 10 mL을 취해 formal titration method(Simpson et al., 1998)로 분석하였으며, 염 농도는 시료를 5배 희석하여 hand digital salinity refractometer(model PAL-03S, Atago Co., LTD, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 알코올 함량 측정은 상등액 5 mL와 GC분석을 위한 내부표준물질로 10%(v/v) isopropyl alcohol 5 mL를 첨가하여 혼합한 후 그 액을 증류하여 GC-FID로 하기에 표기된 조건하에서 분석하였다(Table 29).



### (나) 장류의 발효기간 별 향미성분 분석

전통장류의 제조 및 숙성 단계별로 수집된 장류의 향기 성분 포집을 위하여 headspace법에 따라 built-in automated Purge & Trap Sampler JTD-505III(Japan Analytical Industry, Tokyo, Japan)을 사용하였다(Ikem, 2010). 즉, 시료 5 g을 시료병(55 mm OD x 120 mm)에 취하여 질소로 purging하면서 Table 27과 같은 조건하에서 향기성분을 추출한 뒤 휘발성 향기 성분의 상대적인 함량 차이를 비교하기 위하여 Table 28과 같은 조건에서 GC/MS QP 2010 plus(Shimadzu, Kyoto, Japan)와 DB-624 column(3.0×0.251×1.40 mm) (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)을 이용하여 분석하였으며, 향기 성분의 동정은 GC-MS에 내장된 Wiley library의 mass spectrum과 비교하여 확인하였다. 이때 2-methyl-3-heptanone은 정량분석을 위한 internal standard로 사용하였다.

Table 27. Analysis condition of Purge & Trap Sampler for volatile flavor compounds sampling of fermented soy sauce.

Item	Condition
Instrument	Purge & Trap Sampler(JTD-505III)
Desorption temperature	280°C
Desorption time	30 min
Desorption gas flow rate	50 mL/min
Cold-trap for sample trapping	-40°C
For pyrolysis	280°C
Transfer-line temperature	280°C
Needle heater	280°C
Cold-trap heater	200°C
Head press	86 MPa
Column flow	1.0 mL/min
Split ratio	1/100

Table 28. Condition of GC-MS analysis for volatile flavor compounds in fermented soy sauce.

Item	Condition
Instrument	GC-MS
Column	DB-624 column (3.0×0.251×1.40 mm)
Oven temp.	0-30 min(at 40°C for 3min hold, 10°C/min up to 260°C, at 260°C for 5 min hold)
Mass scan	30 - 600 mass scan
Ion source	200°C
Transfer line	250°C
EM voltage	70eV

### (3) 장류의 발효기간 별 발효효모 균집 분석

#### (가) Culture-dependent 방법을 통한 장류 효모 균집 분석

##### ① 선택배지를 이용한 장류유래 효모의 분리 및 생균수 측정

수집된 숙성과정별 전통발효 장류로부터 효모균주의 분리 및 배양을 위해, 수집된 장류는 멸균된 0.1%(w/v) peptone water에 십진법으로 희석하여 25 units/mL의 penicillin-streptomycin(Sigma) 항생제가 포함된 YM 고체배지(Difco, USA)에 0.1 mL을 도말하였다. 효모는 29°C에서 48시간 동안 배양함으로써 분리되었고, 그 생균수는 yeast strain log cfu/mL로써 표현하였다.

##### ② Culture-dependent(cultivation-based analysis) 방법을 통한 장류 효모 균집 분석

상기의 선택배지를 사용하여 분리된 효모 균주는 동일한 조건에서 YM broth와 YM agar배지에 3번 이상 계대배양 한 후 장류 유래 분리효모로 사용하였으며, 균주 동정을 위하여 제1협동기관인 한국미생물보존센터(KCCM; Seoul, Korea)으로 균주를 제공하여 NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3')과 NS8(5'-TCCGCAGGTTTCACCTA CGGA-3') primer set를 사용한 18S rRNA sequencing 분석을 수행한 결과를 획득하였다.

#### (나) Culture-independent(PCR-DGGE) 방법을 통한 장류 효모 균집 분석

##### ① Total genomic DNA의 추출

수집된 장류로부터 genomic DNA를 분리하기 위하여 Mills 등(2002)의 방법을 인용한 glass beads 방법을 사용하였다. 먼저 장류 2 mL을 12,000g에서 20분간 원심분리(GYROZEN, 1580MGR, Daejeon, Korea) 한 후 침전물을 4°C의 cold water로 2번 세척하였다. 0.5 mm 직경의 glass beads 400 mg와 4°C의 0.8%(w/v) NaCl solution이 혼합한 후 screw-cap으로 pellet을 옮겨담은 후 다시 12,000g에서 20분간 원심분리 한 cell/bead pellet은 400 µL의 breaking

buffer[2% Triton X-100, 1% sodium dodecyl sulphate, 100 mM NaCl, 10 mM Tris(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0)]에 재부유 되었고, 400  $\mu$ L의 P/C/I(phenol:chloroform:isoamyl alcohol = 25:24:1, v/v) (Sigma, Milan, Italy)을 섞어 주었다. Homogenization은 bead beater instrument (Fast Prep 24, Bio 101, Vista, CA)를 사용하여 30초 동안 4번 수행하였다. 12,000g에서 20분간 원심분리한 상등액을 eppendorf tube에 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 DNA를 침전시킨 뒤 15분간 15,000 rpm으로 원심분리하였다. 획득된 pellet은 70% ethanol로 세척하고 건조시킨 후 증류수로 용해시켜서  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

## ② Polymerase Chain Reaction(PCR)

장류로부터 분리하여 얻은 DNA 시료는 26S rRNA 유전자(약 250 bp)를 증폭하기 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. PCR반응은 GC 클램프(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG-3')가 붙어있는 NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')과 LS2(5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3')프라이머 세트를 사용하여 Mycycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler(Bio-Rad, Hercules, California, USA)로 수행하였다. 반응 조건은 pre-denaturation 단계  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 7분, denaturation 단계  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 60초, annealing 단계  $53^{\circ}\text{C}$ 에서 45초,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 60초간 extension을 35회 반복하였고 마지막 extension은  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 시행하였다. 증폭된 PCR product는 1×TBE buffer 상에서 1.5%(w/v) agarose gel을 100 volt로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV광으로 관찰하였다(Tanaka et al., 2012).

## ③ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)

상기의 PCR product에 대하여 Dcode<sup>TM</sup> system(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)을 이용한 DGGE 분석을 실시하였다. Denature gradient는 30-60% 농도변화를 갖는 8%(w/v) 폴리아크릴아마이드 겔(acrylamide: bisacrylamide 37.5:1)을 사용하였고, 제조된 겔을 1×TAE(20 mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 mM EDTA[pH 8.0]) running buffer가 첨가된 Dcode<sup>TM</sup> system 상에서  $60^{\circ}\text{C}$ , 125V의 조건하에서 5시간 동안 전기영동을 하였다. 전기영동이 완료된 겔은 ethidium bromide solution(0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 20분 동안 염색하였으며, DNA 밴드는 ChemiDoc XRS Imaging System(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 UV광으로 관찰 및 촬영하였다.

## ④ DGGE 겔의 DNA 밴드 분석

폴리아크릴아마이드 겔에서 분리된 DNA 밴드들을 절단하여 TE buffer(10 mM Tris/1 mM EDTA, pH 8.0)에 넣어 DNA가 확산되어 나오도록 하였다. 이를 GC 클램프가 없는 동일한 프라이머 세트 NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')과 LS2(5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3')를 사용하여 PCR 반응으로 DNA를 증폭시켰다. PCR 반응에 의해 증폭된 산물을 2% 아가로스 겔 전기영동을 한 후 이를 QIAEX II agarose gel extraction kit(Qiagen Valencia, CA, USA)를 사용하여 회수하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열은 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST, Altschul et al., 1997)과 Ribosomal Database Project II tool(RDP, Cole et al., 2003)에 등록되어 있는 database를 사용하여 검색하였으며, 높은 유사성을 가지는 염기서열을 기초로하여 group별로 정리 한 후 Clustal W(EBI, UK)를 이용한 multiple alignment를 통해 sequence data들을 비교하였다(Thompson et al., 1994).

## 나. 전통 장류 유래 효모 분리 및 고 알코올 생성 및 향미증진능을 가진 유용균주 탐색

### (1) 전통 방식으로 제조된 전통 장류로부터 효모의 분리

전북 순창군의 장류업체 4곳으로부터 수집된 메주 및 2곳으로부터 전통적인 방식으로 제조된 장류를 발효기간별로 수집하여 효모 분리용 시료로 사용하였다. 효모의 분리를 위하여 장류 시료는 멸균된 peptone water를 사용하여 십진법으로 희석한 후 penicillin-streptomycin 항생제가 포함된 YM 고체배지에 0.1 mL을 도말하여 29°C에서 48시간 배양하였다. 분리된 균주는 동일한 조건에서 YM broth와 YM agar배지에 3번 이상 계대배양 한 후 장류 유래의 분리효모로 사용하였다. 결과적으로 발효기간별로 수집된 장류로부터 약 1,200점의 효모를 분리하였으며, 또한 제1협동으로 균주를 제공하였다.

또한, 본 연구기관에서 수집된 전통장류 시료로부터 새로 분리된 효모균주와 함께 제1협동기관인 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 분양받은 장류 유래의 효모균 100주를 함께 유용균주 탐색을 위한 균주로서 사용하였다. 균주보관을 위해 YM broth에 접종하여 24~48시간 29°C, 180 rpm에서 배양한 후 20% glycerol 농도로 -80°C deep freezer에 liquid stock으로 냉동보관하여 사용하였다.

### (2) 전통 장류 유래 알코올 및 향미 생성능 우수 균주 스크리닝

#### (가) 전통 장류 유래 알코올 생성능 우수 균주 선별

상기와 같이 본 연구팀에서 총 4가지의 전통 메주 및 2가지의 전통 장류로부터 약 1,200점의 효모 균주를 분리하였으며, 제1협동으로부터 분양받은 100주의 효모와 함께 알코올 생성능 우수 균주를 선별하기 위한 시험을 위한 대상으로 사용하였다. 각 균주를 기질로 30%(w/v)의 glucose가 함유된 YM 액체배지에 2%(v/v) 비율로 접종하여 29°C, 180 rpm에서 2일 동안 배양함으로써 균주를 성장시킨 후, 동일한 온도에서 정치배양을 2일 동안 추가적으로 수행함으로써 알코올 발효를 유도하였다. 알코올 분석을 위한 전처리로서, 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액을 수집하고 얻어진 상등액에 internal standard로서 isopropanol을 5%(v/v) 농도가 되도록 첨가시킨 후(Cassada et al., 2000) 증류하였다(AOAC, 2005). 증류하여 얻어진 액은 0.45 µm membrane filter로 여과하여 최종적으로 GC-FID(HP 6890 series; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)의 분석시료로 하였다. GC 분석을 위해 J&W DB-5 capillary column(3.0×0.25 mm; 0.25 µm) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)을 사용하였으며 그 분석조건은 Table 29와 같다. 정량 분석을 위한 표준물질로서 ethanol과 isopropanol은 필요한 농도구배별로 수행한 후 비교를 위하여 사용되었으며, 각각 1.707 min과 1.842 min의 retention time을 보였다.

Table 29. Condition of GC-FID analysis for alcohol analysis.

Item	Condition
Instrument	GC-FID(HP 6890, Agilent)
Column	J&W DB-5 capillary column(3.0×0.25 mm; 0.25 μm)
Detector temp.	250°C
Injection temp.	240°C
Carrier gas	He
Flow rate	1.3 mL/min
Oven temp.	an initial hold (70°C, 2 min), raised from 70 to 135°C (20°C/min) and then raised from 150 to 200°C (50°C/min)
Split ratio	50:1

본 연구로부터 전통장류로부터 분리된 효모 균주들 중에서 가장 높은 알코올 생성능을 보이며 선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623과 표준 균주인 *Z. rouxii* KCCM 12066, *Z. rouxii* KCCM 55054 및 *S. cerevisiae* KACC 30008는 기질로 10, 20, 30%(w/v)의 glucose가 각각 함유된 YM 액체배지에 2%(v/v) 비율로 접종하여 29°C, 180 rpm에서 2일 동안 배양한 후, 동일한 온도에서 정지배양을 2일 동안 추가적으로 수행 하였다. 배양액으로부터 원심분리(8,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액을 수집하고 internal standard로서 isopropanol을 5%(v/v) 농도가 되도록 첨가시킨 후 증류하여 얻어진 액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 Table 29의 조건으로 GC-FID분석하였다.

이때 실험에 사용된 고 알코올 생성 효모의 대조균주로 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 12066과 *Z. rouxii* KCCM 55054과 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양받은 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30008을 사용하였다.

#### (나) 전통 장류 유래 향미 생성능 우수 균주 선발

##### ① 4-ethylguaiacol 및 vanillin 생성능

장류 유래의 효모균주를 대상으로 향미성분 생성능 우수 균주를 선별하기 위한 스크리닝 방법을 확립하였다. 즉, ferulic acid를 기질로 장류의 주요 향미성분인 4-ethylguaiacol 또는 vanillin로 전환할 수 있는 효소활성을 지닌 효모균주를 TLC 및 GC-FID 분석을 이용하여 분석가능한 방법을 정립하였다(Fig. 49 및 Table 30). 분양 또는 분리된 각각의 효모 균주를 YM broth에 1%(v/v) 접종한 후 29°C, 180 rpm에서 3일간 배양 시킨 후 8,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 가라앉은 균체를 회수하였다. 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 2번 세척하여 배지성분을 제거한 후, 얻어진 균체는 동일한 버퍼에 현탁시켜 0.5 μm beads와 함께 3분 동안 (30 sec, 6 times) 처리하여 균체를 파괴하였다. 8,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 효모 균주의 cell-free extract로 하였다. 목적하는 향미성분인 4-ethylguaiacol 및 vanillin 생성능을 확인하기 위하여 5 mM의 ferulic acid, 6 mg/mL NADH가 함유된 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 조효소액을 첨가한 뒤 37°C에서 6시간 동안 효소반응을 실시하였

다. 최종적으로 메탄올을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 TLC 및 GC-FID 분석을 위한 시료로서 사용하였다. 반응액으로부터의 ferulic acid, 4-ethylguaiacol, vanillin 성분 확인을 위한 TLC 분석과 GC 분석 방법은 다음과 같다. TLC 분석은 silica gel TLC 판(Merck, TLC aluminium sheet, silica gel 60F<sub>254</sub>)을 하단 2.5 cm, 상단 2.5 cm 전개길이 12 cm, 용매사이 간격 0.8 cm로 하였고, 각 표준물질 2  $\mu$ L(25 mM)와 분석샘플을 20  $\mu$ L씩 점적하여 benzene/dioxane/acetic acid(85:15:1, v/v/v)를 이동상으로 전개시킨 후, 건조시 나타나는 yellow color spot을 통해 확인하였음(Fig. 49). 또한 본 시료의 GC-FID 분석조건은 하기의 Table 30과 같다.



Fig. 49. TLC chromatogram of standard compounds, ferulic acid(FA), 4-ethylguaiacol(4-EG), vanillin(V) and vanillic acid(VA), for the screening of flavor producing yeast strains.

Table 30. GC-FID condition for volatile flavor compounds.

Item	Condition
Instrument	GC-FID(HP 6890, Agilent)
Column	J&W DB-5 capillary column(3.0×0.25 mm; 0.25 μm)
Carrier gas	He
Flow rate	0.9 mL/min
Oven temp.	hold at 40°C for 1 min, raised to 150°C at 5°C/min, raised to 250°C at 13°C/min, and then hold at 250°C for 15 min
Injection temp.	230°C
FID temp.	250°C
Injection volume	1 μL

② 장류 향미 생성능 우수 균주로써 고 3-methyl butanol 생성효모의 선발

장류 유래의 효모균주를 대상으로 향미성분 생성능 우수 균주를 선별하기 위한 스크리닝 방법을 확립하였다. 즉, 각 균주는 기질로 30%(w/v)의 glucose가 함유된 YM 액체배지에 전 배양된 균주를 2%(v/v) 비율로 접종하여 29°C, 180 rpm에서 2일 동안 배양한 후, 동일한 온도에서 정지배양을 2일 동안 추가적으로 발효 후 배양 상등액을 가지고 스트리닝 하였다. 1차 스크리닝 방법으로써 실험자의 관능적 분석을 기초로 일부의 효모 균주를 선정하였다. 2차 스크리닝 방법으로써 고급알코올로 카라멜향을 나타내는 것으로 알려진 2-methyl butanol 또는 3-methyl butanol을 향미생성 지표물질로하여 GC 분석을 수행하였다. 배양액의 전처리에는 purge and trap analyzer(JDT-505II)을 사용하여 시료 5 mL을 질소로 purging하면서 향기성분을 추출하여(Table 27), Table 28과 같은 조건에서 GC-MS를 이용하여 분석하였다. 향기 성분의 동정은 GC-MS에 내장된 Wiley library의 mass spectrum과 비교하여 확인하였다.

(다) 알코올 고생산 및 향미증진능 효모의 16S rRNA sequencing 분석을 이용한 분자생물학적 동정

선발된 고 알코올 생성 및 고 향미성분 생성능 효모균주의 26S rDNA 염기서열 분석을 위해 먼저 YM agar 배지에 분리균주를 접종하여 29°C에서 48시간 동안 배양하여 자란 콜로니로부터 total genomic DNA를 획득하였다. 이를 template로 universal primer set NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')과 NL4(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')를 사용하여 PCR 수행한 product를 가지고 sequencing 분석을 수행하였다(Mills et al., 2002). 얻어진 염기서열은 NCBI의 Blast에 등록되어 있는 database를 사용하여 검색하였으며, 높은 유사성을 가지는 염기서열을 기초로하여 Clustal W를 이용한 multiple alignment를 통해 sequence data들을 비교하였다.

(라) 알코올 고생산 및 향미증진능 효모의 API kit을 이용한 생화학적 동정

효모균주의 생화학적 특성 분석을 위하여 API 20C AUX kit(BioMerieux, France)을 이용하여 제조회사의 시험방법에 따라 시험하였으며, 동정결과는 apiweb program

(<http://apiweb.biomerieux.com>, Biomerieux)을 이용하여 확인하였다.

#### (마) 알코올 고생산 및 향미증진능 효모의 전자현미경(FE-SEM)을 이용한 형태학적 특성 분석

선발된 알코올 고생산 효모 JBCC 623과 향미증진능 효모 JBCC 848의 형태학적 특성을 분석하기 위하여 그 세포 형태를 광학현미경 분석 및 전자현미경(SEM, scanning electron microscopy) 분석을 통해 살펴보았다. SEM 관찰용 균체 시료의 전처리는 각각의 효모를 0.25%의 penicillin-streptomycin solution을 첨가한 YM broth에 24-48시간 동안 배양시킨 균체액을 가지고 다음과 같이 실시하였다. 즉, 균주 배양액을 4°C에서 원심분리 하여 균체를 회수한 다음 2.5% glutaraldehyde(sigma)를 사용하여 30분 동안 1차 고정시킨 후, 10,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 균체를 회수하고 0.9%(w/v) NaCl 용액으로 3-5회 반복하여 세척하였다. 1%(w/v) osmium tetroxide(sigma)를 사용하여 20분간 2차 고정한 후, 0.9%(w/v) NaCl을 사용하여 3-5회 반복 세척하였다. 회수된 균체는 2% uranyl acetate(EMS, w/v)를 첨가하여 30분 동안 염색 후, 회수하고 25, 50, 70, 90, 100% ethanol(v/v)을 순서대로 첨가하여 탈수시켰으며 탈수가 끝난 혼합액을 slide glass에 분주하여 건조하였다. slide glass 위에 건조된 시료는 Ion sputter를 이용하여 20분 동안 gold coating 한 후, FE-SEM(SUPRA 40VP)을 통해 상을 관찰하였다.

#### (바) 선발된 고 알코올 생성 및 향미 증진능 우수 효모의 최적 성장조건 검토

고 알코올 생성 효모 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주와 향미 우수 효모 *P. guilliermondii* JBCC 848 균주의 성장에 있어서 pH, 배양온도, 당농도, 염농도 및 알코올 농도가 미치는 영향을 살펴보려고 하였다. 이때 glucose 10 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 5 g/L의 YM 액체 배지에 180 rpm 조건하에서 29°C에서 각각 12, 24, 48시간 동안 배양하는 것을 기본 조건으로 하였다. 먼저 두 균주의 성장에 있어서 pH가 미치는 영향을 살펴보기 위해 초기 pH를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12로 조성한 YM 액체배지에 각각 접종한 후 180 rpm, 29°C에서 배양하면서 12, 24, 48시간 쯤 OD<sub>600</sub> 값을 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 배양온도가 두 균주의 성장에 미치는 영향은 YM 액체배지에 효모를 각각 접종한 후 180 rpm 조건하에서 각각 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45°C에서 배양하면서 12, 24, 48시간 쯤 OD<sub>600</sub> 값을 측정하여 확인하였다. 또한, 당, 염 및 알코올 농도가 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 선발된 두 효모 균주는 glucose를 사용하여 초기 당농도를 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50%(w/v)로 조성한 YM 액체배지, NaCl를 사용하여 초기 염농도를 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0%(w/v)로 조성한 YM 액체배지, ethanol를 사용하여 초기 알코올 농도를 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0%(v/v)로 조성한 YM 액체배지에 각각 접종한 후 180 rpm, 29°C에서 배양하면서 12, 24, 48시간 쯤 OD<sub>600</sub> 값을 측정하였다.



## 다. 신규 고 알코올 생성 효모의 알코올 생성을 위한 최적 발효조건 검토 및 관련 유전자 획득

### (1) 선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 발효 최적조건 검토

#### (가) 탄소원의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성에 있어서 탄소원 종류가 미치는 영향을 살펴 보았다. glucose 10 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 5 g/L의 YM 액체 배지에 16시간 전배양한 균주를 상기에 기술된 YM 기본 액체 배지 조성에서 탄소원으로 glucose 또는 fructose, galactose, mannose, ribose, xylose를 25%(w/v)의 비율로 각각 첨가하여 확인하였다. 즉, 기질로 25%(w/v)의 각각의 탄소원이 함유된 YM 액체배지에 균주를 2%(v/v) 비율로 접종하여 29°C, 180 rpm에서 2일 동안 배양함으로써 균주를 성장시킨 후, 동일한 온도에서 정치배양을 2일 동안 추가적으로 수행함으로써 알코올 발효를 유도하였다. 배양액의 전처리는 원심분리(8,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액을 수집하고 얻어진 상등액에 internal standard로서 isopropanol을 5%(v/v) 농도가 되도록 첨가시킨 후 증류하여 얻어진 액을 0.45 µm membrane filter로 여과하여 GC-FID로 분석하였다(Table 29).

#### (나) 탄소원 농도의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성을 위한 탄소원 농도의 영향을 살펴보았다. 상기에 기술된 YM 기본 액체 배지 조성에서 탄소원인 glucose의 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50%(w/v)의 비율로 각각 조제하여 확인하였다. 즉, 기질로 0-50%(w/v)의 glucose가 함유된 YM 액체배지에 균주를 2%(v/v) 비율로 접종하여 29°C, 180 rpm에서 2일 동안 배양함으로써 균주를 성장시킨 후, 동일한 온도에서 정치배양을 2일 동안 추가적으로 수행함으로써 알코올 발효 후 생성된 알코올 농도를 GC-FID로 분석하였다(Table 29).

#### (다) 염농도의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성을 위한 NaCl(sodium chloride)의 영향을 살펴 보았다. YM 기본 액체 배지 조성에서 탄소원인 glucose의 농도를 25%(w/v)의 비율로 고정한 후 0, 2.5, 5.0, 10, 15, 20, 25, 30%(w/v)의 비율로 NaCl을 첨가하여 제조한 후 확인하였다. 즉, 0-30%(w/v)의 salt가 함유된 YM 액체배지에 균주를 2%(v/v) 비율로 접종한 후 29°C, 180 rpm에서 2일 동안, 동일한 온도에서 정치배양을 2일 동안 추가적으로 발효한 후 생성된 알코올 농도를 GC-FID로 분석하였다(Table 29).

#### (라) 초기 pH의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성을 위한 배양액의 초기 pH의 영향을 살펴보았다. glucose의 농도를 25%(w/v)의 비율로 고정한 YM 배양액의 초기 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10의 비율로 각각 조정 한 후 확인하였다. 즉, pH 3.0-10.0으로 조정된 YM 액체배지에 균주를 2%(v/v) 비율로 접종한 후 29°C, 180 rpm에서 2일 동안, 동일한 온도에서 정치배양을 2일 동안 추가적으로 발효한 후 생성된 알코올 농도를 GC-FID로 분석하였다(Table 29).

#### (마) 배양 온도의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성을 위한 배양 온도의 영향을 살펴보았다. glucose의 농도를 25%(w/v)의 비율로 고정된 YM 액체배지에 균주를 2%(v/v) 비율로 접종한 후 각각 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37°C의 다른 온도에서 180 rpm으로 2일 동안 배양함으로써 균주를 성장시킨 뒤 동일한 온도에서 정치배양을 2일 동안 추가적으로 수행함으로써 알코올 발효 후 생성된 알코올 농도를 GC-FID로 분석하였다(Table 29).

#### (바) 배양 시간의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성을 위한 배양 시간의 영향을 살펴보았다. glucose의 농도를 25%(w/v)의 비율로 고정된 YM 액체배지에 균주를 2%(v/v) 비율로 접종하여 29°C의 온도에서 180 rpm으로 2일 동안 배양함으로써 균주를 성장시킨 후, 동일한 온도에서 정치배양을 0, 12, 24, 48, 72, 76, 120, 144시간 동안 각각의 다른 시간으로 추가적으로 수행함으로써 알코올 발효 후 생성된 알코올 농도를 GC-FID로 분석하였다(Table 29).

### (2) 장류배지 조건하에서 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성능 확인

#### (가) 메주 및 청국장 배지에서 *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 생성

전통장류로부터 분리된 효모균주 중 가장 뛰어난 알코올 생성능을 보이면서 최종 선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 장류 적용 적합성을 시험하기 위해 메주 및 청국장 배지에서 본 균주의 알코올 생성능을 조사하였다. 곱게 분쇄된 메주 및 청국장 분말 시료는 주관기관으로부터 제공받았으며 이를 사용한 배양액의 조성은 메주 분말 또는 청국장 분말을 5, 10, 15, 20%(w/v)의 농도를 함유하게 조절하였다. 또한 알코올 발효를 위한 기질로써 25%(w/v)의 glucose를 첨가하여 사용하였다. 전배양된 균주를 2%(v/v) 비율로 접종하여 29°C, 180 rpm에서 2일 동안 배양함으로써 균주를 성장시킨 후, 동일한 온도에서 정치배양을 2일 동안 추가적으로 수행함으로써 알코올 발효를 유도하였다. 알코올 농도 측정을 위해 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액을 수집하고 얻어진 상등액의 증류액을 GC-FID로 분석하였다(Table 29).

#### (나) *T. delbrueckii* JBCC 623을 이용한 콩, 찹쌀 및 멥쌀 코지 발효

선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 장류 적용 적합성을 시험하기 위해 koji분말을 콩, 찹쌀 및 멥쌀로 제조하여 각각 lab-scale의 장류 발효에 적용하였다. 콩, 찹쌀, 멥쌀을 사용하여 각각 제조된 코지 분말은 주관기관으로부터 제공받았으며 이를 사용한 발효액의 조성은 Fig. 50과 같이 조절하였다. 먼저, 각각 코지 분말의 당함량을 DNS법을 사용하여 조사한 결과 콩 코지는 약 1.6%의 당농도를, 찹쌀 코지와 멥쌀코지는 약 7.1%의 당농도를 함유하고 있었다. 본 연의 코지를 사용한 시험구와 glucose를 첨가함으로써 당농도를 25%(w/v)가 되도록 조절된 처리구를 준비하였다. 당을 첨가하거나 무첨가한 코지 분말은 14%(w/v)의 salt 함량을 조절하여 무균 조작된 염수를 1:4(w:v)의 비율로 혼합된 후 OD값 1.0의 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주를 접종하지 않은 구와 2%(v/v) 또는 5%(v/v)의 농도로 접종하여 30°C에서 7일 동안 정치 배양함으로써 코지발효 하였다. 코지 발효된 각각의 시료를 가지고 상기에 서술된 바와 같이 효모 생균수, final pH, 총산도, 환원당 함량 및 생성된 알코올 함량을 측정하였다.

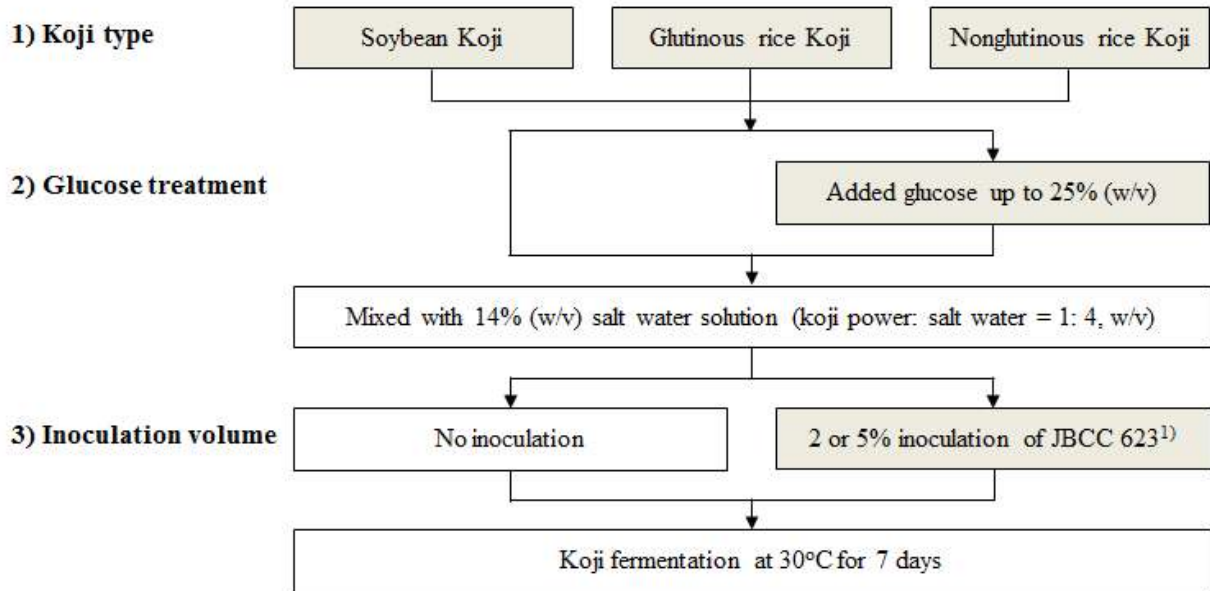


Fig. 50. Procedure of koji fermentation by <sup>1)</sup>*Torulaspora delbrueckii* JBCC 623 isolated from tradition soy-sauce.

### (3) *T. delbrueckii* JBCC 623 유래 알코올 관련 유전자의 클로닝과 염기서열 결정

#### (가) 효모 균주

장류 유래 고알코올 생성능 균주로 선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623와 표준 균주로서 *T. delbrueckii* ATCC 10662, *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30008를 함께 사용하였다.

#### (나) *T. delbrueckii* JBCC 623 유래 alcohol dehydrogenase 유전자 증폭

*T. delbrueckii* JBCC 623으로부터 alcohol dehydrogenase ADH1을 encoding하는 유전자는 Taq-DNA polymerase(GeneAll, Seoul, Korea)와 primer ADH1-F(5'-atg tct atc cca gaa act caa aaa gg-3')과 ADH1-R(5'-tta ttt aga agt gtc aac aac g-3')을 사용하여 PCR 증폭하였다. 이때 사용된 primer세트는 계놈 분석된 표준균주 *S. cerevisiae* S288c로부터 alcohol dehydrogenase ADH 1 유전자 서열(GenBank accession no. NM\_001183340.1)과 *T. delbrueckii* CBS 1146로부터의 hypothetical protein TDEL0D05050 유전자 서열(GenBank accession XM\_003681252.1)로부터 디자인 하였으며 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 합성하였다. PCR 증폭은 95°C에서 1분간 변성반응(denaturation), 54°C에서 1분간 결합반응(annealing), 72°C에서 2분간 연장반응(extention)과정을 30회 반복하여 수행하였다. PCR산물은 ethidium bromide(sigma)가 포함된 2.0% agarose gel에서 100V로 30분간 전기영동하여 확인한 후 MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit(iNtRON Biotechnology)를 사용하여 정제하였다. 또한 표준 균주로서 *T. delbrueckii* ATCC 10662, *S. cerevisiae* KACC 30008균주로부터 동일한 방법으로 각각의 PCR산물을 획득하였다.

#### (다) TA 클로닝과 유전자 서열분석

획득된 유전자 단편은 TA 클로닝을 수행하기 위해 T4 DNA ligase에 의하여 분절된 후 T&A cloning vector(RBC Bioscience Cloning System, Taiwan)로 삽입하였고, 획득된 재조합 플라스미드 pTA-TdelADH-1는 CH<sub>3</sub>COONa 방법으로 제조된 *E. coli* JM109 competent cells로 형질 전환 하였다. 최종적으로 positive transformants로부터 Plasmid Miniprep Kit (AxyPrep™)를 사용하여 재조합 플라스미드를 정제한 후 primers M13-F(5'-GTT TTC CCA GTC ATG AC-3')와 M13-R(5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3')로 서열분석 하였다. 유전자 서열분석은 ABI PRISM Kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)과 ABI 3730xl DNA Analyzer(Applied Biosystems)를 사용하여 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 수행하였다. Protein translation, theoretical Mw, PI는 ExPASy 웹사이트(<http://www.expasy.org>)를 사용하여 예측되었고, sequence prediction은 NCBI 웹사이트(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 뉴클레오타이드와 단백질 데이터베이스로부터 검색되고, sequence similarity search는 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)를 사용하여 수행하였다. Phylogenetic tree는 DDBJ로부터의 ClustalW(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)에 의해 homologous proteins과 함께 *T. delbrueckii* JBCC 623 유래 alcohol dehydrogenase ADH1의 multiple sequence alignment로 제작하였다.

### 라. 장류 유래 효모 균주별 특성 비교 분석 및 장류발효 적합성 평가

#### (1) 장류 유래 10종의 발효효모 별 특성 비교 분석

##### (가) 26S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통수 작성

전통 장류의 발효기간 별 효모 균집분석과 알코올 및 향미 균주 스크리닝 결과를 바탕으로 다른 10 종의 대표 균주를 선발하였으며, 이를 대상으로 각각의 효모 균주의 26S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통수 작성하였다. 이를 위해 universal primer인 NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')과 NL4(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')를 사용하여 PCR 반응을 수행하였고, 이때 염기서열분석은 ABI PRISM 3730 DNA Analyzer로 결정하였다. 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)에 의해 GenBank database들과 서열을 비교하였으며 phylogenetic tree는 CLUSTALW program을 사용하여 균주간의 상동성을 NJ법(Neighbor-Joining)으로 나타내었다.

##### (나) PCR-RFLP 패턴 분석

장류 유래 10종의 발효효모의 ITS1, ITS4지역을 포함한 5.8s rRNA 제한효소 처리에 따른 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism) 분석을 위하여 각 균주의 5.8s rRNA region을 증폭하여 제한효소 처리 후 패턴분석을 수행하였다. 먼저, PCR은 Esteve-Zarzoso 등 (1999)에서 사용한 primer ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 Primer ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하였고, 95°C에서 5분간 1회 반응 후, 95°C에서 60초-53°C에서 45초-72°C에서 60초간 반응을 1 cycle로 30회 반복하고 최종적으로 72°C에서 7분간 1회 반응 함으로써 종결하였다. 획득된 PCR product는 정제하여 제한효소

*cfbI*, *HaeIII*, *HinA*으로 37°C에서 1시간 반응시킨 후 2% agarose gel에서 전기 영동하여 ethidium bromide로 염색 후 Molecular Imager(Gel Doc XR+ and Chemi Doc XRS+Systems, Bio-rad)를 이용함으로써 RFLP 패턴을 검출하였다.

#### (다) 주사현미경(SEM)을 이용한 형태학적 특성 분석

장류 유래 10종의 발효효모의 형태학적 특성을 관찰하기 위하여 전자주사현미경(SEM, SN-3000 Hitachi, Japan)으로 분석하였다. 시료의 전처리 과정은 1차로 균체를 고정하기 위한 과정으로 2.5% glutaraldehyde로 균체를 현탁하여 실온에서 30분간 반응 시킨 후 1,000 rpm에서 5분간의 원심분리로 상등액을 제거하고 0.9% NaCl로 3회 세척하였다. 2차 고정은 1% osmium tetroxide로 실온에서 20분 반응 후 1차 고정과 같은 방법으로 원심분리와 세척과정을 수행하였다. 고정 과정을 마친 균체는 농도별 ethanol(25, 50, 70, 90, 100%)로 각 5분간 탈수하고 100% ethanol은 2회 반복 처리하였다. 탈수가 끝난 균체는 cover glass에 고정 및 건조한 다음 gold로 코팅하여 SEM분석을 실시하였다.

#### (라) 탄소대사 패턴 분석

장류 유래 10종의 발효효모의 탄소대사 패턴을 조사하기 위해 API 20C AUX(bioMerieux)를 사용하였다. 분석은 프로토콜에 따라 균체배양액을 사용하였으며 29°C에서 48~72시간 동안 배양하여 균체의 성장여부를 확인하였다. 또한 api web(<https://apiweb.biomerieux.com>)의 database에서 동정 결과를 확인하였다.

#### (마) 효소활성능 검토

장류 유래 10종의 발효효모의 효소활성능 검토를 위해 API ZYM reactions system (bioMérieux)를 이용하여 프로토콜에 따라 시험하였다. 각각의 균체배양액을 사용하여 스트립에 분주한 후 29°C에서 48~72시간 동안 배양함으로써 균체의 효소활성능을 확인하였다.

#### (바) 생리학적 특성 및 환경 내성 검토

장류 유래 10종의 발효효모의 포도당으로부터 산 생성여부, extracellular amylase, protease 및 lipase 활성, 여러 탄소원과 질소원에 대한 소비능, cycloheximide 및 acetic acid 저항성, 다양한 배양온도, pH, 당농도, 염농도, 아황산 및 알코올 농도에서의 성장능과 같은 생리학적 특성 및 환경 내성을 살펴보았다. glucose로부터 산 생성 여부는 5%(w/v) glucose, 0.5%(w/v) calcium carbonate, 0.05%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) agar를 함유하는 Custer's chalk medium를 사용하여 확인하였다. amylase 활성 및 protease 활성은 각각 1%(w/v) soluble starch 또는 1%(w/v) skim milk가 포함된 고체배지를 사용하였으며, lipase 활성은 lipase reagent(Difco)를 포함하는 spirit blue agar에 point inoculation하여 배양한 후 효모의 콜로니 주변에 형성된 clear zone을 측정함으로써 평가하였다(Buzzini and Martii, 2002). 다양한 탄소원 및 질소원에 대한 대사능을 확인하기 위하여, 탄소원으로 1%(w/v) glucose와 1%(w/v) ammonium sulfate를 함유하는 Yeast Nitrogen Base agar(Difco) 배지를 기본으로 사용하였다. arbutin, sucrose, ribose, melibiose, soluble starch, inulin, mannitol, methanol, ethanol의 탄소원은 glucose 대신 첨가하거나 nitrate, nitrite, L-tyrosine, cadaverine dihydrochloride, L-lysine, imidazole, creatine, creatinine의 질소원은 ammonium sulfate 대신 첨가하여 사용하

였다. 효모 균주들의 cycloheximide 저항성은 0.01 또는 0.1%(w/v) cycloheximide를 첨가한 YM 액체배지를 사용하였으며, acetic acid에 대한 저항성은 1%(v/v) acetic acid를 첨가한 YM 액체배지를 사용하여 살펴보았다. 또한 pH에 대한 영향을 살펴보기 위하여 1N NaOH 및 1N HCl을 사용하여 초기 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12로 조정한 YM 액체배지를 사용하였고, 또한 배양온도의 영향을 살펴보기 위하여 YM 액체배지에 접종한 균주들은 각각 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45°C의 각각의 온도에서 배양하였다. 또한 1, 10, 20, 30, 40, 50%(w/v)의 glucose 농도별, 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0%(w/v) NaCl 농도별, 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 ppm(w/v) K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 농도별, 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0(v/v)의 ethanol을 농도별로 각각 첨가한 YM 액체배지에 효모를 접종한 후, 29°C, 180rpm에서 48-72시간 동안 배양한 후 살펴보았다.

## (2) 장류 유래 효모 균주별 장류 발효 적합성 평가

장류 유래 10종의 발효효모의 장류 발효 적합성을 평가하기 위한 방법으로써, 장류와 유사한 배양액을 제조하여 각각의 효모를 접종하여 발효한 후 염 농도, 환원당 함량, 고형분 함량, 총 산도, 최종 pH 및 향미성분과 같은 이화학적 분석을 수행하였다. 장류 유사 배지로 이배농도의 tryptic soy broth(Difco)에 NaCl을 사용하여 염농도를 17%(w/v)로 조정하고 glucose를 사용하여 당농도를 20%(w/v)로 조정하여 사용하였다. 각각의 효모균주는 YM 액체배지에서 전배양하여 멸균수로 2회 세척한 후, fresh cell의 농도를 5-6 log cfu/mL로 조절하여 접종하였다. 발효는 30°C에서 14일 동안 수행하였다. 발효 후 최종 pH는 Orion model 710 pH meter(Thermo)를 사용하여 측정하였으며, 총 산도 측정을 위해 0.1N NaOH 적정법을 사용하였다. 염 농도는 PAL-03S digital salinity refractometer(Atago), 고형분 함량은 PAL-α refractometer(Atago)를 사용하여 측정하였고, 환원당 함량은 DNS(dinitrosalicylic acid)법으로 측정하였다(Miller, 1959). 휘발성 향미분석은 builted-in automated Purge & Trap Sampler JTD-505III(Japan Analytical Industry)를 사용하여 향기 성분 포집한 후(Table 27), DB-624 column(Agilent Technologies)를 사용한 GC/MS QP 2010 plus(Shimadzu)로 Table 28의 조건 하에서 분석하였다.

## 마. 저염장류 제조를 위한 선발된 고 알코올 및 향미증진 효모의 적용

### (1) 선발 균주를 스타터로 사용한 염 농도별(8, 11, 14 % w/v) 장류의 제조

본 연구에서는 저염의 장류를 발효하는데 있어서 전통장류 유래 선발된 알코올 생성능 우수 균주 *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623와 향미증진능 우수 균주 *Pichia guilliermondii* JBCC 848의 적용가능성을 시험하고자 하였다. 장류 발효에 있어서 염의 농도는 8, 11, 14%(w/v)로 각각 조정하였고, 이때 기본 발효로써 효모를 접종하지 않은 무처리구 및 대조균주로 장류의 주요 향미효모로 알려진 *Zagosccharomyces rouxii* 균주를 함께 사용하였으며, 그 접종 방법은 단일 또는 혼합균주 형태로 처리하였다(Table 31). 시험을 위해 사용된 koji 분말은 주관기관으로부터 제공받았으며 8, 11, 14%(w/v)의 salt 함량으로 각각 조절된 무균처리된 염수와 1:4(w:v)의 비율로 혼합된 후 OD값 1.0의 *T. delbrueckii* JBCC 623, *P. guilliermondii* JBCC 848, *Z. rouxii* KCCM 12066 균주를 2%(v/v)로 단일 접종하거나 혼합 균주의 경우 각각의 균주를 1%(v/v)씩 접종하였다. 또한 효모 균주를 접종하지 않은 무접종구와 함께 30°C에서 14일

동안 정치 배양함으로써 코지발효 하였다.

Table 31. Single ant mixed treatments of yeast starter for soy-sauce fermentation with 8, 11, or 14% salt content.

Media	8% salt	11% salt	14% salt
Control	No inoculation	No inoculation	No inoculation
	ZR1 <sup>1)</sup>	ZR1	ZR1
Single culture	TD623 <sup>2)</sup>	TD623	TD623
	PG848 <sup>3)</sup>	PG848	PG848
	ZR1 + PG848	ZR1 + PG848	ZR1 + PG848
Mixed-culture	TD623 + PG848	TD623 + PG848	TD623 + PG848

<sup>1)</sup>ZR1, *Zagoccharomyces rouxii* KCCM 12066 as a positive strain

<sup>2)</sup>TD623, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623 isolated in this study

<sup>3)</sup>PG848, *Pichia guilliermondii* JBCC 848 isolated in this study

## (2) 미생물 생균수 측정

다른 농도의 염을 함유하도록 하여 발효된 장류 시료의 곰팡이, 효모, 젖산균에 대한 생균수는 평판배양법으로 측정하였다. 곰팡이의 생균수 측정은 PDA(Difco, USA) 배지, 효모수의 측정은 세균의 배양을 억제하기 위한 penicillin-streptomycin solution을 포함하는 YM agar (Difco, USA), 총균은 plate count agar(Difco, USA) 배지를 사용하였고, 1%(w/v) pepton solution을 사용하여 십진법으로 희석한 샘플을 100 µL 도말(spread) 하였다. 곰팡이는 25°C에서 3-5일간 배양하고 효모는 29°C에서 48시간 배양하였으며, 일반 세균을 위한 plate는 37°C에서 36시간 배양 한 후 30-300개의 집락(colony)을 형성한 plate의 colony 수를 측정하였다. 생균수는 log cfu(colony forming unit)/mL으로 표현하였다.

## (3) PCR-DGGE 방법을 통한 제조된 염 농도별 장류의 세균 및 효모 다양성 분석

### (가) Total genomic DNA의 추출

각각의 장류 시료로부터 genomic DNA를 분리하기 위하여 Mills et al. (2002)의 방법을 인 용한 glass beads 방법을 사용하였다. 먼저 장류 2 mL을 12,000g에서 20분간 원심분리 (GYROZEN, 1580MGR, Daejeon, Korea) 한 후 침전물은 0.5 mm 직경의 glass beads 400 mg 와 400 µL의 breaking buffer[2% Triton X-100, 1% sodium dodecyl sulphate, 100 mM NaCl, 10 mM Tris(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0)]에 재부유 되었고, 400 µL의 P/C/I(phenol:chloroform:isoamyl alcohol = 25:24:1, v/v)을 섞어 주었다. 30초 동안 3번 수행하 여 homogenization 한 후 12,000g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 70% ethanol로 세척하고 건조시킨 후 증류수로 용해시켜서 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

## (나) Polymerase Chain Reaction(PCR)

세균 분석을 위한 16S rRNA 유전자와 진균류 분석을 위한 26S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 장류 시료로부터 분리하여 얻은 DNA 시료를 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 먼저 16S rRNA 유전자 증폭은 GC 클램프(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3')가 붙어있는 357F(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')과 517R(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')프라이머 세트를 사용하였다. PCR 반응은 pre-denaturation 단계 95°C에서 7분, denaturation 단계 95°C에서 30초, annealing 단계 40초, 72°C에서 60초간 extension을 35회 반복하였는데 이때 annealing 온도는 65°C에서 10회, 60°C에서 10회, 55°C에서 마지막 15회로 하였고 마지막 extension은 72°C에서 7분간 시행하였다. 진균류의 26S rRNA 유전자 증폭은 GC 클램프(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG-3')가 붙어있는 NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')과 LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3')프라이머 세트를 사용하였다. PCR 반응 조건은 pre-denaturation 단계 95°C에서 7분, denaturation 단계 95°C에서 60초, annealing 단계 53°C에서 45초, 72°C에서 60초간 extension을 35회 반복하였고 마지막 extension은 72°C에서 7분간 시행하였다. 증폭된 PCR product는 1×TBE buffer 상에서 2.0%(w/v) agarose gel을 100 volt로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 관찰하였다.



#### (다) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)

상기의 PCR product에 대하여 DGGE 분석은 30-60% 농도변화를 갖는 8%(w/v) 폴리아크릴아마이드 겔(acrylamide: bisacrylamide 37.5:1)을 사용하여 60°C, 125V의 조건하에서 5.5시간 동안 전기영동을 함으로써 수행하였다. 전기영동이 완료된 겔을 ethidium bromide solution(0.5 µg/mL)로 20분 동안 염색을 시킨 후 UV광으로 관찰 및 촬영하였다. 검출된 밴드들을 각각 절단하여 TE buffer(10 mM Tris/1 mM EDTA, pH 8.0)에 넣어 DNA가 확산되어 나오도록 한 후, 이를 GC 클램프가 없는 동일한 프라이머 세트 357F와 517R 또는 NL1과 LS2를 사용하여 PCR 반응으로 DNA를 증폭시켰다. PCR 반응에 의해 증폭된 산물을 2% 아가로스 겔 전기영동을 한 후 이를 QIAEX II agarose gel extraction kit(Qiagen Valencia, CA, USA)를 사용하여 회수한 후 DNA 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열은 NCBI의 Blast의 database를 사용하여 검색하였으며, 높은 유사성을 가지는 염기서열을 기초로하여 group별로 정리 한 후 Clustal W를 이용한 multiple alignment를 통해 sequence data들을 비교하였다.

#### (4) pH 및 총산도 측정

pH는 제조된 장류를 10,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 상등액을 Orion model 710 pH meter(Thermo, Beverly, MA, USA)로 측정하였으며, 산도 측정은 0.1N NaOH 적정법으로 측정하였다.

#### (5) 당도 및 환원당 함량 측정

당도는 원심분리한 상등액 200µL를 취하여 디지털 굴절당도계(Refractometer PLA ATAGO, Tokyo, Japan)로 측정하여 °Brix로 나타내었다. 환원당 함량은 DNS법으로 측정하였다(Miller, 1959).

#### (6) 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 시료 상등액 5 mL와 GC분석을 위한 내부표준물질로 10%(v/v) isopropyl alcohol 5 mL를 첨가하여 혼합한 후 그 액을 증류하여 GC-FID로 분석하였다(Table 29).

#### (7) 휘발성 향미 성분 분석

수집된 전통장류의 제조 및 숙성 단계별로 수집된 장류를 purge and trap analyzer (JDT-505II)을 사용하여 향기 성분 포집한 후(Table 27), GC-MS를 이용하여 분석하였으며(Table 28), 향기 성분의 동정은 GC-MS에 내장된 Wiley library의 mass spectrum과 비교하여 확인하였다.

#### 바. 통계분석

통계분석은 SPSS Ver. 16.0 package program(SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 각 시험군의 평균과 표준편차를 산출하고 Duncan의 다중범위분석법을 이용하여 각 시험구간의 유의차를  $p < 0.05$  유의수준에서 검증하였다. 또한 주성분분석(Principal component analysis, PCA)을 수행한 후 PC1과 PC2의 PCA bi-plots은 각각의 장류 샘플들의 차이점과 유사성을 증명하였다. 또한, 수집된 발효기간별 장류의 향미분석 및 군주별로 제조된 발효장류의 이화학적 특성 결과를 활용하여 계층적 군집분석(Hierarchical cluster analysis, HCA)을 실시하였다.

### 3. 연구 수행 결과

#### 가. 전통장류 발효기간 별 향미성분 분석 및 발효효모 균집 분석

##### (1) 전통발효장류의 숙성과정별 이화학적 특성 및 향미성분의 변화

###### (가) 전통장류 발효기간 별 이화학적 특성의 변화

전북 순창 지역에서 메주 및 씨간장을 사용하여 전통적으로 제조되는 장류를 발효기간별로 수집하여 시료로 사용하였다. 샘플은 장을 담근 후 1일(SF<sub>1</sub>), 10일(SF<sub>10</sub>), 20일(SF<sub>20</sub>), 30일(SF<sub>30</sub>), 40일(SF<sub>40</sub>), 50일(SF<sub>50</sub>, 장분리), 60일(SF<sub>60</sub>) 및 70일(SF<sub>70</sub>, 열처리)로 10일마다 수집하여 pH, 총산도, pH, 총산도, 고형분 함량, 환원당, 아미노산, 염 및 알코올 함량을 분석한 결과는 Fig. 51과 같다. 발효 초기 pH는 약 5.5수준 이었으나, 발효가 진행될수록 점차 감소되어 40일째 4.8에 도달하였으며, 장분리 후 어느정도 일정한 수준을 유지하였다(Fig. 51A). 총산도에 있어서, 그 수준은 발효가 진행되는 전반적인 기간 동안 그 수준이 꾸준히 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 51A). 장류의 환원당 함량은 발효 20일째까지 급격히 증가하여 4.74% 수준을 나타냈고, 그 뒤 일정한 수준을 보이다가, 장분리 후 약간 감소되는 경향을 나타냈다(Fig. 51B). 또한 장류의 고형분 함량도 발효 20일째까지 유의적으로 증가하며 34.9°Brix를 나타내었고, 그 뒤 발효 70일째까지 어느정도 그 수준이 유지됨을 나타냈다(Fig. 51B). 장류의 총 아미노산 함량의 경우, 그 수준이 발효 전반적으로 꾸준히 증가하면서 초기 0.25% 수준에서 1.22% 수준까지 증가되었다(Fig. 51C). 장류의 알코올 함량은 발효 초기 2.25%까지 급격하게 증가되었지만, 그 뒤 유의적으로 감소되며 발효 60일째 1.27%로 감소된 후, 특히 열처리 후에는 0.5% 이하로 감소되었다(Fig. 51C). 장류의 발효초기 염농도는 약 22.7% 였으며, 발효 기간동안 증가되면서 발효 70일째에는 26.5%로 나타났다(Fig. 51D).

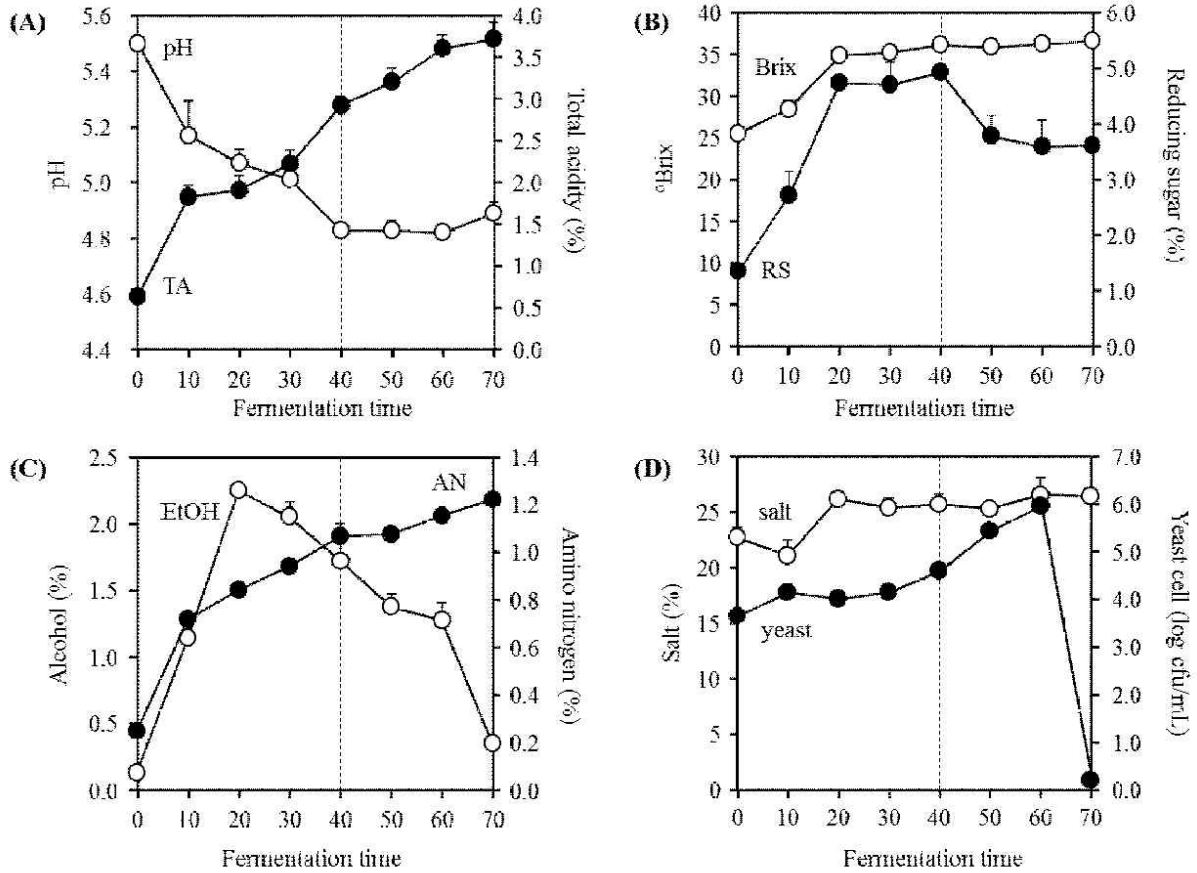


Fig. 51. Changes of the yeast counts and physicochemical characteristics during the manufacturing process; (A), pH and total acidity(%); (B), reducing sugar(%) and total soluble solid contents(°Brix); (C), alcohol and amino nitrogen contents(%), and (D) number(log cfu mL<sup>-1</sup>) of total yeast and salt content(%).

#### (나) 전통장류 발효기간 별 향미성분의 변화

장류의 발효 과정 동안 휘발성 향미성분의 변화를 purge and trap으로 추출한 후 GC-MS로 분석하여 살펴보았다(Table 32). 총 70일간의 발효기간 동안 purge and trap system 추출에 의해 확인된 향기 물질은 alcohol류가 12종, aldehyde류 7종, acid류가 11종, ester류 4종, furan(none)류 3종, hydrocarbon류 6종, ketone류 7종, phenol류 2종, pyrazine류 5종, pyrrole류 2종, sulfur compound 3종 그리고 기타물질이 2종으로 총 62 성분이 동정되어, alcohol류가 가장 다양하게 포함되어있는 것으로 나타났다. 총 휘발성 화합물의 농도는 발효 초기(SF<sub>1</sub>) 가장 낮은 함량을 나타냈으며, 발효 20일째(SF<sub>20</sub>) 가장 높은 함량을 나타낸 후 발효 70일째까지는 유사한 수준을 나타냈다. 전반적인 발효기간 동안 acid류, alcohol류, pyrazine류, ketone류는 가장 큰 부분을 나타내는 그룹이었다. 더 자세히는, alcohols류는 발효 20일째까지 급격하게 증가되었고 그 뒤에 감소되는 경향을 나타냈다(Fig. 52). 일반적으로 장류의 알코올 발효는 비교적 초기의 엽발효 단계에서 일어난다고 보고되어있으며, 발효 초기에 검출된 alcohol류는 발효가 지속되면서 사라지는 것으로 알려져있다(van der Sluis et al., 2001; Gao et al., 2010). 본 연구에서, 발효기간 별 장류의 alcohols 성분은 2 또는 3-methyl-1-butanol(malty note), 2-methyl-1-propanol(sweet pear/nutty note)과 같은 화합물이 가장 큰 부분을 차지하고 있었

으며, 이들은 기존의 다양한 장류제품의 유의적으로 풍미를 증진시키는 화합물로 알려져 있는 성분이다(Feng et al., 2014). 또한 butanol, ethanol, 2-methyl-1-propanol, propanol은 발효 초기 빠르게 증가되었으나, 발효 후기에는 더 이상 검출되지 않았다. 한편 aldehyde류의 상대적인 농도는 발효기간 동안 증가하면서, 발효 70일째 7배 이상 증가되었다. 특히, benzaldehyde, 2-methylbutanal은 장류에서 가장 높은 농도로 함유되어 있는 aldehyde 화합물이었고, 이들은 장류의 발효기간 동안 아미노산 분해와 미생물적 전환을 통하여 증가되는 화합물로 알려져 있다(Belitz et al., 2009). 2,3-butanedione, 2-butanone, 3-hydroxy-2-butanone, 2-propanone을 포함하는 ketone류는 발효초기(SF<sub>1</sub>) 장류의 총 휘발성 화합물의 약 52.1%를 포함하고 있었으나, 발효 50일 이후 총 휘발성 화합물의 2%이하로 감소되었다. 장류 발효에 있어서 aldehyde류와 ketone류의 전반적인 변화는 malty향과 caramel향에 기여하는 것으로 알려져 있다(Gao et al., 2010). ketone류와 대조적으로, 대부분의 acidic 화합물은 발효 초기에는 거의 검출되지 않았으나 발효가 수행됨에 따라서 유의적으로 증가하였다. 발효 70일째 장류는 총 휘발성 화합물 농도의 약 69.2%를 차지하는 것으로 나타났으며, 이는 상기의 장류의 총산도와 일치되는 결과이다(Fig. 51A). acid류 화합물 중에서 2 또는 3-methylbutanoic acid, 2-methylpropanoic acid는 주요한 acid류로 나타났으며, 더욱이 발효기간 동안 증가되는 경향을 나타냈다. 반면에, acetic acid는 일정하지 않게 증가되었다. 이러한 화합물은 발효된 장류에 있어서 가장 중요한 풍미증진 화합물로 고려된다. Pyrazine류는 또한 장류의 중요한 휘발성 화합물의 한 종류이다. 본 연구에서 2,5-dimethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazine, 2,3,5,6-tetramethylpyrazine을 포함하는 pyrazine류는 발효 초기 장류의 총 휘발성 성분의 16.3%를 차지하였으며, 발효가 진행됨에 따라 유의적으로 증가하다가 발효 후기에는 일정한 수준을 나타냈다. 그러나 열처리 후 인 마지막 70일째 약 절반 수준의 pyrazine은 제거되었다. 한편, 장류의 전반적인 발효기간 동안 오직 4가지의 ester류 화합물이 검출되었다. 이는 다른 연구들로부터 보고된 결과와 비교하여 상대적으로 적은 수 일지라도, fruity향을 증진시키는 ethyl acetate가 장류의 ester 그룹의 주요 화합물이라는 점에서 일치한다(Feng et al., 2014; Gao et al., 2010). 특히, ethyl acetate는 마지막 70일째 총 화합물의 4.51%를 차지하였으며, 이는 이 ethyl acetate 화합물이 발효된 장류의 향미에 기여하는 중요한 화합물 중 하나임을 나타내는 결과이다. 그 외, furan(none)류, sulfur compound류, phenol류, hydrocarbon류는 발효 중반까지 증가된 후 유의적인 수준을 유지하거나 또는 점차 감소되는 경향을 나타내었다(Table 32).

더욱이, 발효기간에 따른 장류 시료에 함유된 휘발성 화합물의 분명한 차이점은 PCA 분석(total variance 67.75%: PC1, 36.4% 및 PC2, 25.2%)을 통하여 나타냈다(Fig. 53). PC1은 대부분의 alcohol류 및 모든 ketone류와 강력한 positive인 상관관계를 보인 반면, 대부분의 acid류, furan(none)류, pyrazine류, phenol류, hydrocarbon류와 강력하게 negative한 상관관계를 보였다. 더해서 PC2 loading은 대부분의 alcohol류, ester류, phenol류, pyrazine류와 positive한 관계를 나타낸 반면 대부분의 acids류와 negative한 상관관계를 나타냈다. 이러한 원리를 기본으로 발효 초기의 장류 샘플은 상대적으로 높은 ketone류 및 alcohol류 농도로 인하여 강력하게 positive한 PC1 지역에 위치하고 있었으며, 그 뒤 발효 단계에 따른 샘플들은 acid류, furan(none)류, phenol류, pyrazine류, hydrocarbon류의 성분들의 증가로 인하여 negative PC1 지역에 위치하였다. 특히, 30일부터 60일째 사이의 발효 중·후반의 샘플들은 하나의 cluster를 구성하며 가장 유사한 휘발성 성분들을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 더해서, 발효 중·후반 장류 샘플들과 마지막 70일째 샘플의 PC2에 따른 분명한 차이를 관찰할 수 있었으며, 이들은

구분되는 각자의 cluster를 형성하였다.

Table 32. Change aspect of major flavor compounds at each fermentation stage of traditional soy-sauce by GC-MS analysis.

Compounds	Area%							
	SF <sub>1</sub>	SF <sub>10</sub>	SF <sub>20</sub>	SF <sub>30</sub>	SF <sub>40</sub>	SF <sub>50</sub>	SF <sub>60</sub>	SF <sub>70</sub>
<i>Alcohols</i>								
1-Butanol	2.86	0.49	0.22	nd	nd	nd	nd	nd
2-Butanol	0.08	0.03	0.18	nd	nd	nd	nd	nd
Ethyl alcohol	9.75	1.88	13.49	nd	nd	nd	nd	nd
Isoamylalcohol	5.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Methoxybenzyl alcohol	nd	nd	0.16	0.79	nd	nd	0.22	nd
2-Methyl-1-butanol	0.47	nd	0.92	nd	0.23	0.77	nd	0.01
3-Methyl-1-butanol (Isoamyl alcohol)	2.22	0.18	2.82	2.30	1.88	2.11	3.02	0.33
2-Methyl-1-propanol (Isobutanol)	2.82	0.28	1.78	0.18	0.75	nd	nd	nd
1-Octen-3-ol (3-Hydroxy-1-octene)	0.19	nd	0.12	0.21	nd	0.12	0.07	nd
Phenethyl alcohol (Benzeneethanol)	0.27	0.18	nd	0.40	nd	nd	0.09	0.11
1-Phenyl-1-propanol	0.14	0.10	0.13	0.52	nd	nd	0.08	nd
1-Propanol	0.41	0.06	0.34	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Aldehydes</i>								
Ethyl aldehyde (Acetaldehyde)	0.16	0.05	0.41	nd	nd	nd	nd	nd
2-Methylbutanal	nd	nd	0.11	0.22	nd	0.22	0.35	0.45
3-Methylbutanal (Isovaleraldehyde)	0.12	0.21	0.89	0.63	nd	0.69	1.04	0.93
Phenylmethanal (Benzaldehyde)	0.92	0.35	0.50	0.80	1.41	0.58	0.61	0.40
<i>Carboxylic acids</i>								
Butanoic acid (n-Butyric acid)	nd	0.71	0.12	nd	nd	0.30	0.35	0.44
Ethyllic acid (Vinegar acid)	0.69	3.96	nd	nd	0.78	0.31	0.42	1.60
2-Methylbutanoic acid (Active valeric acid)	nd	9.84	5.33	9.29	8.17	12.93	10.31	15.74
3-Methylbutanoic acid (iso-valeric acid)	nd	3.34	4.99	11.97	10.01	11.66	12.19	16.23
4-Methylpentanoic acid (4-Methylvaleric acid)	nd	0.53	0.10	0.22	0.69	0.24	0.43	0.50
2-Methylpropanoic acid (Isobutyric acid)	nd	8.91	3.63	2.75	2.37	3.96	4.30	7.20
<i>Esters</i>								
Ethyl acetate (Acetic acid ethyl ester)	0.32	0.25	0.94	1.01	nd	0.46	0.50	nd
<i>Furans</i>								
2-Hexanoylfuran (2-Furyl n-pentyl ketone)	0.15	0.05	0.58	nd	nd	0.62	0.73	0.18
<i>Ketones</i>								
Diacetyl (2,3-Butanedione)	3.99	1.96	1.73	0.84	nd	nd	0.25	0.14
3-Hydroxy-2-butanone (Acetoin, 2,3-Butanolone)	2.86	5.87	0.33	nd	nd	nd	nd	nd

2-Propanone (Acetone)	1.48	0.20	0.95	0.77	nd	0.26	2.33	0.16
<i>Phenols</i>								
2-Ethylphenol (o-Ethylphenol)	0.05	nd	nd	nd	0.36	nd	nd	0.46
4-Ethylphenol (p-Ethylphenol)	nd	nd	0.49	nd	0.00	nd	0.32	nd
2-Methoxyphenol (Guaiacol, o-Methoxyphenol)	0.06	0.02	nd	nd	nd	nd	0.08	nd
<i>Pyrazines</i>								
2,3-Dimethyl-pyrazine	nd	0.09	nd	0.34	nd	0.17	0.21	nd
2,5-Dimethyl-pyrazine	3.03	1.14	1.55	3.04	2.60	2.87	2.29	1.10
(2,3,5,6-)Tetramethylpyrazine	0.90	1.04	2.66	3.53	3.64	2.14	2.16	0.99
(2,3,5-)Trimethylpyrazine	1.61	0.88	2.51	2.70	1.77	2.36	1.98	0.69
<i>Sulfur-containing compounds</i>								
4-Hydroxybenzenesulfonic acid	0.12	0.16	0.11	0.32	1.14	0.23	0.13	0.17

<sup>1)</sup> Values were expressed as 2-methyl-3-heptanone equivalent ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) by GC-MS QP 2010 plus (Shimadzu) with automated Purge & Trap Sampler JTD-505III (Japan Analytical Industry) and given as average ( $n=3$ ); nd, not detected.

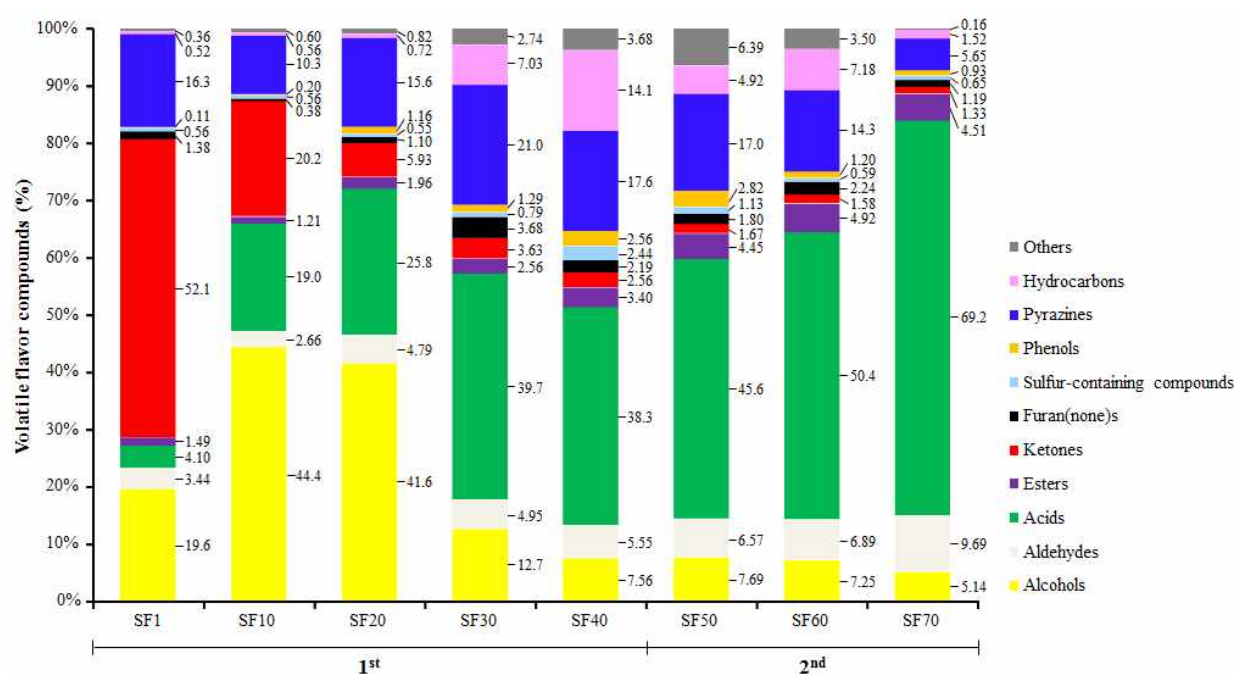
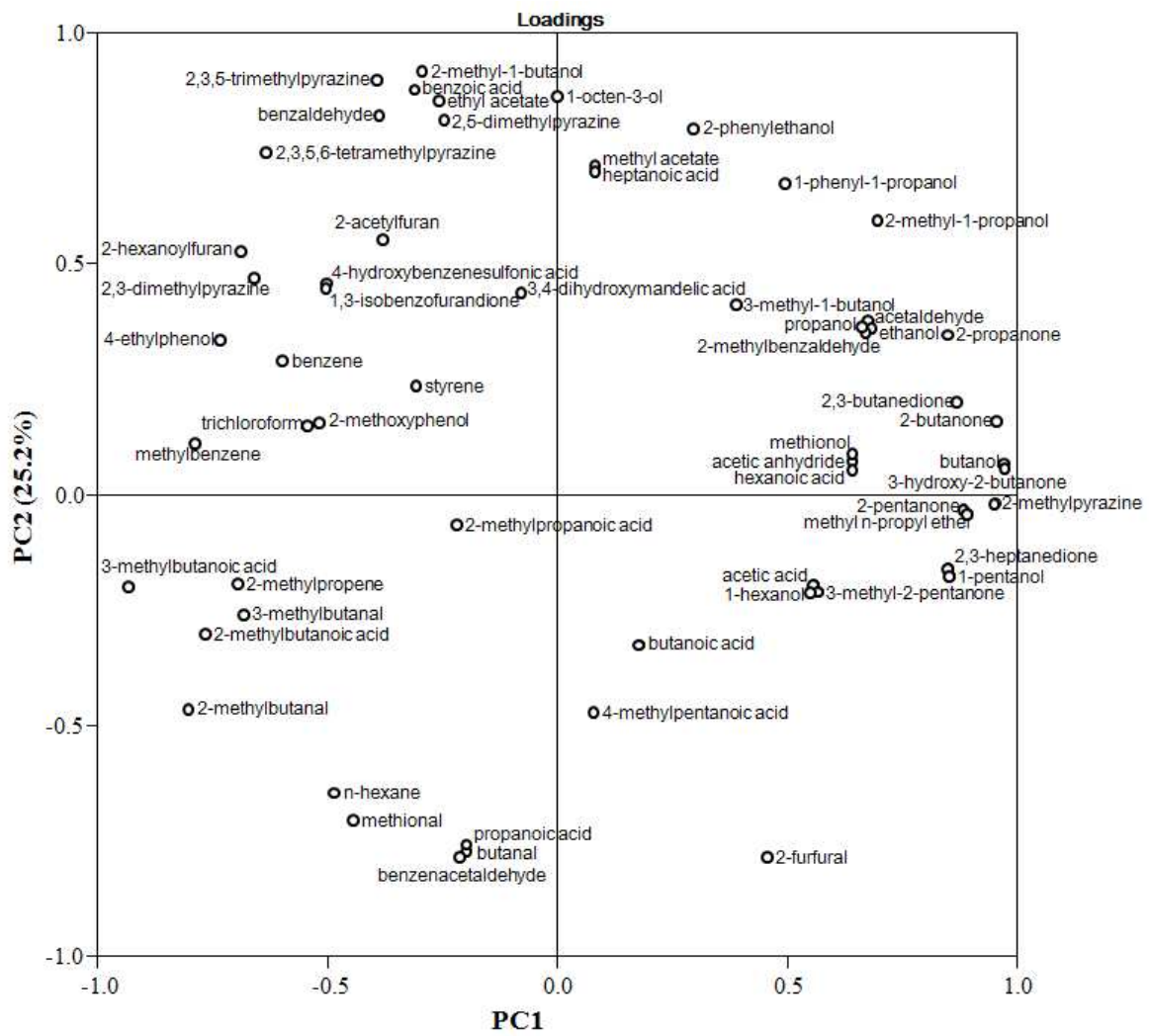


Fig. 52. Volatile flavor profiling during spontaneous fermentation process of soy-sauce based on GC-MS analysis.

(A)



(B)

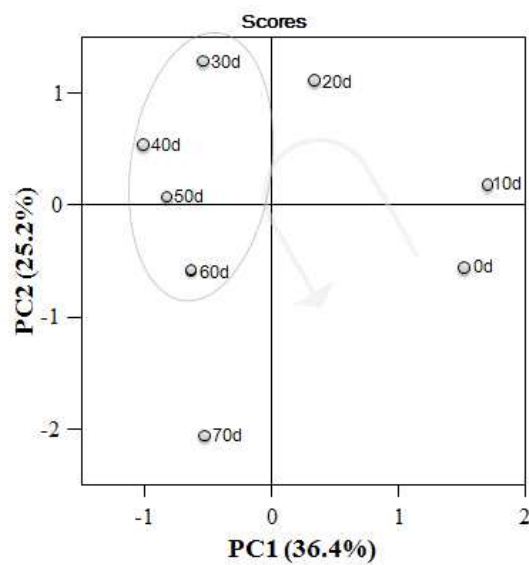


Fig. 53. Principal component bi-plot performed on volatile flavor compounds at different stages of soy sauce fermentation.

## (2) 전통발효장류의 숙성과정별 장류의 효모 다양성 분석

### (가) 수집된 전통발효장류의 숙성과정별 효모 생균수의 변화

전북 순창지역의 업체로부터 제조기간 동안 일정한 간격으로 수집된 장류의 효모 생균수의 변화를 penicillin-streptomycin 항생제가 포함된 YM 평판배지에서 연속희석법을 사용하여 조사하였다. 그 결과, 발효가 시작한 시점에서 효모의 생균수는  $4.56 \times 10^3$  cfu/mL이었고, 발효 시작 후 30일째 까지 그 수준은  $1.40 \times 10^4$  cfu/mL로 큰 변화가 없었다(Fig. 51D). 그러나 장류의 전반적인 발효기간 동안 효모의 수는 꾸준히 증가되는 경향을 나타냈으며, 특히 30일 이후로 그 증가 수준은 높아져 40일째에는  $4.03 \times 10^4$  cfu/mL, 50일째  $2.73 \times 10^5$  cfu/mL, 60일째  $9.06 \times 10^5$  cfu/mL로 증가했다. 그러나 최종적인 열처리로 인해 효모의 생균수는 급격하게 감소하였다.

### (나) Culture-dependent 방법을 사용한 전통발효장류의 숙성과정별 장류의 효모 다양성 분석

전통 장류의 발효 과정 동안 효모의 다양성 변화를 평판배양법으로 분석하여 살펴보았다. 전반적인 발효 기간 동안 효모 선택배지를 사용하여 자란 콜로니를 대상으로 총 336 균주(각 발효 단계별 약 50균주)에 대하여 16S rDNA sequencing 분석을 수행한 결과는 Fig. 54와 같다. 전반적인 발효기간 동안 수집된 전통 장류로부터 분리된 효모는 *Candida* sp.(43.2%), *Debaryomyces* sp.(0.3%), *Microbotryum* sp.(0.3%), *Pichia* sp.(18.5%), *Rodoptorula* sp.(34.2%), *Tetrapisispora* sp.(0.3%), *Torulaspora* sp.(0.3%), *Wickerhamomyces* sp.(0.9%)으로 총 8 속으로 분류될 수 있다. 이러한 균주들에서, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. orthopsilosis*, *P. guilliermondii*, *P. sorbitophila*, *R. glutinis*, *R. mucilaginosa*를 포함하는 *Candida*, *Pichia*, *Rodoptorula* 속은 전반적인 발효기간 동안의 장류에서 우점화되어 있었고, 반면 *D. hancenii*, *T. delbrueckii*, *M. violaceum*, *T. blattae*, *W. anomalus*와 같은 균주들은 특이적으로 마이너하게 검출되었다. 더욱 자세히는, *Debaryomyces*, *Torulaspora* 두가지 속은 오직 발효 초기에만 검출되었고, 반면 우점종인 *Candida*, *Pichia*, *Rodoptorula* 속은 전반적인 발효기간 동안 꾸준히 검출되었다. 특히, 발효 초기에 38.7% 비율을 보였던 *C. parapsilosis*는 발효 중반까지 꾸준히 높은 수준을 유지하였으나, 장분리 후 점차적으로 감소되는 경향을 보였다. 반면 *C. lusitaniae*는 오직 발효 말기에만 검출되었으며, *C. orthopsilosis*는 발효 중반까지 비특이적으로 검출되었다. 또 다른 주요 균주인 *P. guilliermondii*는 발효 시작하는 시점에 가장 높은 비율을 차지하고 있었으나, 그 후 발효가 지속됨에 따라서 발효 중반까지 적은 비율로 감소하였다. 그러나 장분리 후 다시 증가하여 마지막 70일째에는 70.6%를 차지하는 것으로 나타났다. 한편, 발효 중반에 나타난 *P. sorbitophila*는 장분리 직전 28%를 차지하였으나, 장분리 후 더 이상 검출되지 않았다. *Rodoptorula* 속의 경우, *R. mucilaginosa*는 발효가 진행됨에 따라서 48.0% 수준까지 꾸준히 증가되다가 발효 말기에는 11.8%로 검출되었다. 더해서, *M. violaceum*, *T. blattae*, *W. anomalus*는 특이적으로 마이너하게 검출되었다.



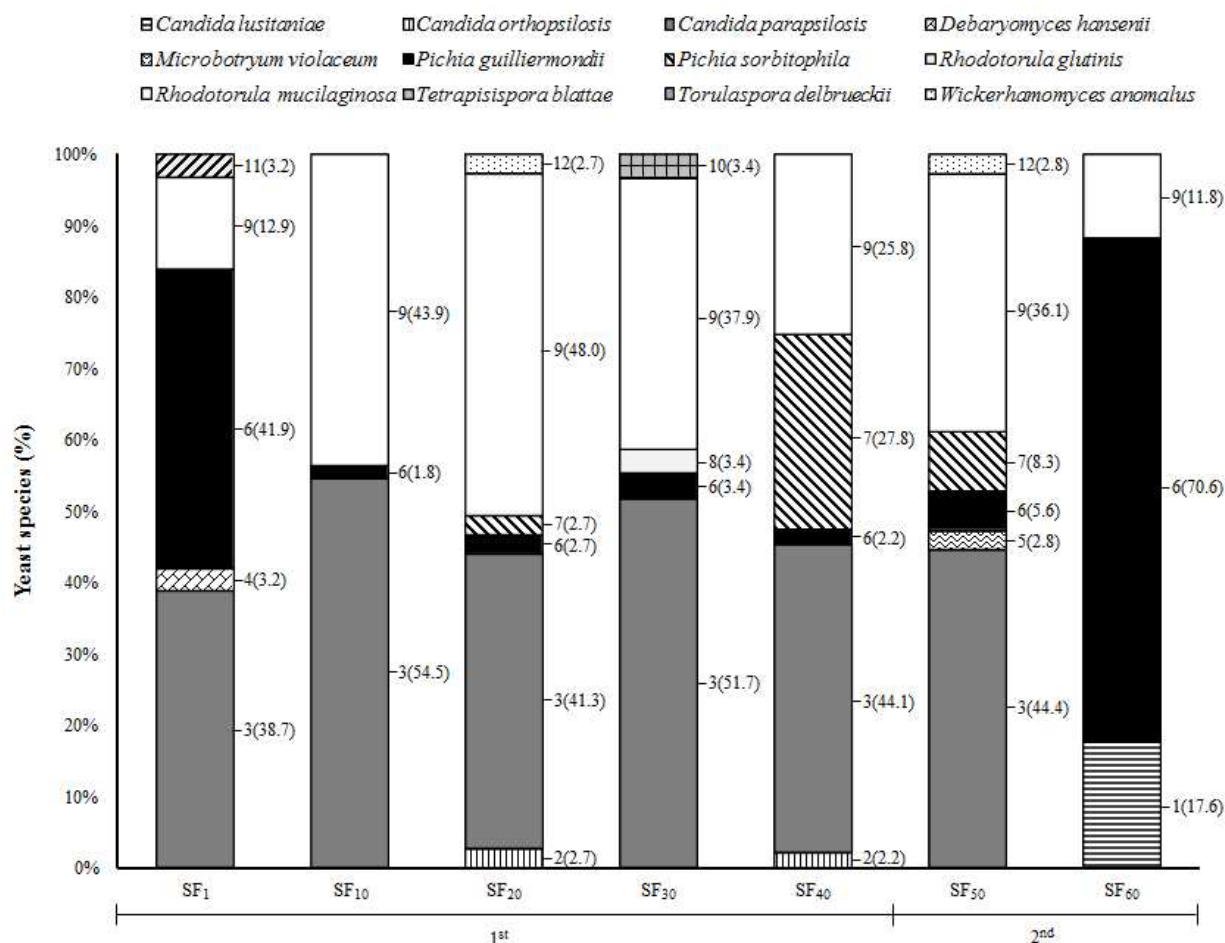


Fig. 54. Distribution of yeast species throughout overall soy-sauce fermentation based on culture-dependent analysis. 1, *Candida lusitanae*; 2, *Candida orthopsilosis*; 3, *Candida parapsilosis*; 4, *Debaryomyces hansenii*; 5, *Microbotryum violaceum*; 6, *Pichia guilliermondii*; 7, *Pichia sorbitophila*; 8, *Rhodotorula glutinis*; 9, *Rhodotorula mucilaginosa*; 10, *Tetrapisispora blattae*; 11, *Torulaspora delbrueckii*; 12, *Wickerhamomyces anomalus*.

#### (다) Culture-independent 방법을 사용한 전통발효장류의 숙성과정별 장류의 효모 다양성 분석

전통 장류의 발효 과정 동안 효모의 다양성 변화를 culture-independent 방법 중 하나인 PCR-DGGE 방법으로 분석하여 살펴보았다. 전반적인 발효기간 동안 일정한 간격으로 수집된 장류 시료로부터 DNA를 추출한 후 26S rRNA 유전자에 대한 eukaryotic universal primer인 (gc)NL1과 LS2 primer를 사용한 PCR 반응하였으며, 증폭된 약 250bp의 PCR 산물을 30-60%의 변성제가 들어 있는 폴리아크릴아마이드 젤을 이용하여 분석하였다. 그 결과 검출된 각 band로부터의 정제된 PCR product에 대해서는 염기서열의 확인을 통해 진균류를 동정함으로써 장류 발효 기간 동안의 효모의 다양성을 조사하였으며, 그 결과 Fig 55와 같이, 수집된 전통 장류로부터 총 16개의 밴드를 확인할 수 있었다. 결과적으로, *Candida*(bands 3, 4, 8 및 11), *Debaryomyces*(band 1), *Pichia*(bands 2, 6 및 7), *Rhodotorula*(bands 5 및 10), *Zygosaccharomyces*(밴드 9) spp. 효모가 전반적인 발효과정 동안 검출되었고 그 수준은 발효 시간에 따라 차이가 있었다. 검출된 대부분의 band들은 전반적인 발효기간 동안 나타났으나, *D. hansenii*(band 1), *C. albicans*(band 3), *Zygosaccharomyces* sp.(band 9), *Rhodotorula* sp.(band 10) 및 *C. versatilis*(band 11)는 오직 발효 40일째(SF<sub>40</sub>)까지만 검출된 후 장을 분리함에 따라 더 이상 검출되지 않았다. 이러한 결과는 장류의 제조과정 동안 수행되는 장분리 과정에 의하여 장류에 존재하는 발효효모의 군총이 상당히 변화한다는 것을 확인할 수 있는 결과이다. 더욱이, *Candida*, *Pichia* 및 *Rhodotorula* spp.에 상응하는 균주들이 전반적인 발효기간 동안 가장 풍부하게 존재하였으며, 이러한 결과는 상기의 culture-dependent한 방법에 의하여 확인된 효모 다양성 결과와 일치하는 것으로 이러한 효모 균주들이 장류의 발효 동안 우점하게 존재한다는 것을 나타내는 결과이다. 그 중에서도, *P. sorbitophila*, *C. temnochilae*, *R. mucilaginosa* 및 *P. guilliermondii* 균주는 모든 발효 단계의 장류 샘플에서 검출되었고, *P. sorbitophila* 및 *R. mucilaginosa* 균주의 경우 발효 중반까지는 약한 강도의 밴드로 나타났으나 발효 후기에는 우점화되는 경향을 보였다. 한편, 발효 초기에 우점하게 존재했던 *P. guilliermondii* 균주의 경우 발효가 진행됨에 따라서 점차적으로 감소되는 경향을 보였으나 장분리 후 다시 주요 균주로 검출되었다. 반면, *C. temnochilae* 균주는 전반적인 발효기간 동안 미미하게 검출되었다. 더해서, *D. hansenii* 균주의 경우 오직 장분리 전까지만 검출되었고, *Zygosaccharomyces* sp. 균주 역시 이와 유사하게 발효 초기에 풍부하게 존재하였으나 점차 감소되는 경향을 보였다. 또한 장류의 발효기간 동안 *Aspergillus* and *Penicillium* spp.의 2종의 곰팡이가 검출되었으나, 장분리 후에 급격하게 사라지는 것으로 나타났다.

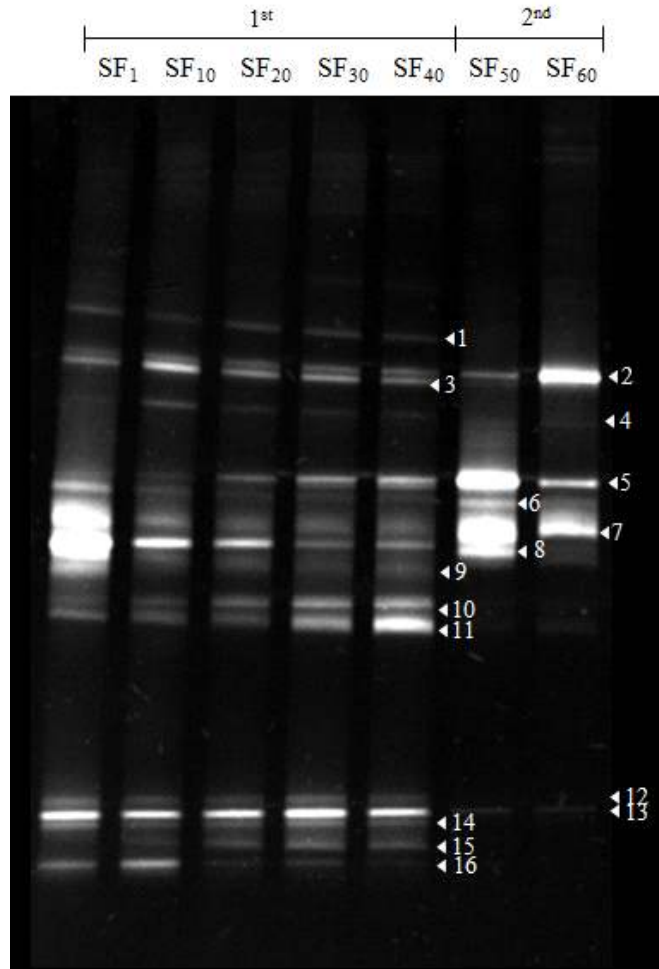


Fig. 55. Distribution of yeast species throughout overall soy-sauce fermentation based on PCR-DGGE profiles representing 26S rRNA gene fragments. The closest relatives of the fragments sequenced are as follows: 1, *Debaryomyces hansenii*; 2, *Pichia sorbitophila*; 3, *Candida albicans*; 4, *Candida temnochilae*; 5, *Rodoptorula mucilaginosae*; 6, *Pichia triangularis*; 7, *Pichia guilliermondii*; 8, *Candida* sp.; 9, *Zygosaccharomyces* sp.; 10, *Rodoptorula* sp.; 11, *Candida versatilis*; 12, *Penicillium islandicum*; 13, *Aspergillus* sp.; 14, *Penicillium aurantiogriseum*; 15, *Aspergillus* sp.; 16, *Aspergillus flavus*.

나. 전통장류 유래 효모 분리 및 고 알코올 생성능/향미 증진능 우수균주 선발

(1) 전통 방식으로 제조된 전통 장류로부터 효모의 분리

전통 장류로부터 효모 균주를 분리하기 위해 전북 순창 지역의 몇몇 대표적인 장류업체를 선정하여 장류제조를 의뢰하였고, 결과적으로 장류업체 4곳으로부터 4종류의 메주와 2곳의 업체로부터 전통적인 방식으로 제조되는 2종류의 장류를 발효기간별로 수집하여 효모 분리용 시료로 사용하였다. 메주 제조는 2-4월경에 실시하였으며, 제조된 메주를 이용하여 장담그기는 4월경에 실시하였다. 장 담금 기간은 약 5개월 또는 2개월이었으며, 발효 과정 중 주기적으로 수집된 발효 장류로부터 효모 균주를 획득하였다. 그 결과 총 1,296 strains(숙성과정별 장류 유래 분리된 No.401-No.1696 효모균주)을 분리·확보하였으며, 제 1협동기관으로 전달하여 동정 및 보존 작업을 수행하도록 하였다.

(2) 전통 장류 유래 고 알코올 및 향미성분 생성 효모균주의 스크리닝법 확립

장류유래 고 알코올 및 향미성분 생성능을 보유하는 효모균주의 스크리닝법을 확립하기 위하여 먼저, 배양조건에 따른 스크리닝법을 비교하였다. 향미성분을 생성하는 효모의 특성에 대한 이전 연구들로부터 내당성(포도당 25% 이상), 내염성(염분 8% 이상), 내알코올성(알코올 8% 이상), 내열성(온도 37°C 이상) 등 스트레스적인 배양조건하에서 성장하는 효모 균주들이 4-EG(4-ethylguaiacol)과 4-EP(4-ethylphenol) 등의 향미성분들을 고생산하는 경향이 있었다는 보고에 따라, 장류유래의 효모균주 44점을 대상으로 내당성(30 및 45%), 내염성(10 및 18%), 내알코올성(8 및 15%), 내열성(30 및 37°C)을 검토하였다. 그 결과, 장류유래 효모균주 대부분이 스트레스에 대한 내성을 지닌다는 것을 알 수 있었으며(Table 33), 따라서 이러한 배지조성 및 배양조건을 달리함으로써 목적하는 고 알코올 생성 및 향미성분 생성 효모를 선별하는 것은 어려운 것으로 사료되어진다.

Table 33. The degree of growth on stress condition of yeast strains isolated from fermented soy sauce.

Strains		Glucose		NaCl		EtOH		High temp.	
KCCM	No.	30%	45%	10%	18%	8%	15%	30°C	37°C
11313	Cand1	++ <sup>1)</sup>	++	++	+	++	++	++	-
50095	Cand2	++	++	++	-	++	++	++	-
12066	Zygo1	++	++	++	-	++	++	++	-
50054	Zygo2	++	++	-	-	++	++	++	-
100019	1	++	++	++	-	++	++	++	+
100025	2	++	-	++	-	++	++	++	+
100026	3	++	++	++	-	++	++	++	+
100028	4	++	++	++	-	++	++		+
100041	5	++	++	++	-	+	+		-
100042	6	++	++	++	-	+	+		-
100043	7	++	++	++	+	++	++	++	-
100052	8	++	++	-	-	++	++	++	-

100053	9	++	++	++	-	++	++	++	-
100054	10	++	++	++	-	++	++	++	-
100418	11	++	++	++	++	++	++	++	+
100419	12	++	++	++	++	++	++	++	+
100495	13	++	++	++	++	++	++	++	+
100496	14	++	++	++	++	++	++	++	+
100497	15	++	++	+	-	++	++	++	+
100498	16	++	++	++	++	++	++	++	++
100499	17	++	++	++	++	++	++	++	++
100500	18	++	++	++	++	++	-	++	+
100501	19	++	++	-	-	++	++	++	+
100502	20	++	++	+	-	++	++	++	+
100968	21	++	++	++	-	++	+	++	-
100969	22	++	++	++	-	++	++	++	-
100970	23	++	++	+	-	++	++	++	-
100971	24	++	++	++	-	++	++	++	-
100972	25	++	++	++	+	++	++	++	-
100973	26	++	++	++	-	++	++	++	-
100974	27	++	++	++	++	++	++	++	-
100975	28	++	++	++	+	++	++	++	-
100976	29	++	++	++	+	++	++	++	-
100977	30	++	++	++	++	++	++	++	-
101019	31	++	++	++	-	++	++	++	-
101020	32	++	++	-	-	++	++	++	-
101021	33	++	++	-	-	++	++	++	-
101022	34	++	++	++	-	++	++	++	-
101023	35	++	++	-	-	++	++	++	-
101024	36	++	++	++	-	++	++	++	-
101025	37	++	++	-	-	++	++	++	-
101026	38	++	++	++	-	++	++	++	-
101027	39	++	++	-	-	++	++	++	-
101028	40	++	++	++	-	++	++	++	-

<sup>1)</sup>-; no grown strains, +; slowly-grwon strains, ++; well-grown strains within 3 days.

### (3) 분양받은 장류유래 효모균주의 알코올 생성능 및 향미성분 생성능 유/무 비교

제 1협동으로부터 제공받은 장류 유래 효모 100주를 대상으로 알코올 생성능 및 향미성분 생성능 유/무 양상을 분석하고자 하였다. 장류 유래 효모균주의 알코올 생성능 분석을 위해 알코올 대사 기질인 포도당을 충분히 공급해주기 위하여 30%(w/v)의 glucose를 함유하는 YM broth 배지에서 각 효모를 배양 후, 생성된 알코올을 분석한 결과 총 18 균주(KCCM No.101061, 101062, 101066, 101067, 101068, 100059, 100060, 100062, 100072, 100077, 100079, 100091, 100092, 100093, 100096, 100139, 100145, 100365)에서 10% 이상의 알코올이 생성되어짐

을 확인할 수 있었다.

한편, 제 1협동으로부터 제공받은 동일한 장류 유래 효모 100주를 대상으로 향미성분 생성능 분석을 수행하였다. 이때 목표 생성 지표물질인 4-ethylguaiacol 및 vanillin의 생성능을 확인하기 위하여 5 mM의 ferulic acid, 6 mg/mL NADH가 함유된 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 조효소액을 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 반응을 실시한 후 TLC 및 GC-FID로 분석한 결과, 3가지 균주(KCCM No.100497, 100501, 100502)에서 공여한 기질인 ferulic acid로부터 4-ethylguaiacol를 생성할 수 있었으며, 반면 KCCM No. 100419, 101024, 101025 균주의 경우 공여된 기질인 ferulic acid로부터 vanillin을 생성함을 확인하였다(Table 34).

Table 34. Production capacities of alcohol and flavor compound of 100 yeast strains isolated from fermented soy products(제1협동 분양 균주).

Strains No.	Characterization		Strains No.	Characterization		Strains No.	Characterization		Strains No.	Characterization	
	EtOH %	FA to V		EtOH %	FA to V		EtOH %	FA to V		EtOH %	FA to V
100019	+ <sup>1)</sup>	- <sup>2)</sup>	100973	++	-	100059	+++	-	100363	+	-
100025	+	-	100974	+	-	100060	+++	-	100364	+	-
100026	+	-	100975	+	-	100061	++	-	100365	+++	-
100028	+	-	100976	+	-	100062	+++	-	100366	++	-
100041	+	-	100977	+	-	100072	+++	-	100367	++	-
100042	+	-	101019	++	-	100077	+++	-	100368	+	-
100043	+	-	101020	+	-	100078	++	-	100369	+	-
100052	+	-	101021	++	-	100079	+++	-	100410	+	-
100053	+	-	101022	++	-	100090	+	-	100411	+	-
100054	+	-	101023	++	-	100091	+++	-	100412	+	-
100418	+	-	101024	++	V	100092	+++	-	100413	+	-
100419	-	V	101025	+	V	100093	+++	-	100414	+	-
100495	-	-	101026	++	-	100096	+++	-	100415	+	-
100496	-	-	101027	+	-	100097	++	-	100416	-	-
100497	+	EG	101028	++	-	100098	++	-	100417	+	-
100498	+	-	101059	+	-	100137	++	-	100503	+	-
100499	+	-	101060	++	-	100138	++	-	100504	+	-
100500	+	-	101061	+++	-	100139	+++	-	100530	-	-
100501	+	EG	101062	+++	-	100144	++	-	100531	+	-
100502	-	EG	101063	++	-	100145	+++	-	100532	+	-
100968	++	-	101064	++	-	100146	++	-	100533	+	-
100969	+	-	101065	++	-	100147	++	-	100534	-	-
100970	+	-	101066	+++	-	100360	+	-	100535	+	-
100971	++	-	101067	+++	-	100361	+	-	100536	+	-
100972	+	-	101068	+++	-	100362	+	-	100537	+	-

<sup>1)</sup>-, under 1%(v/v) alcohol production; +, 1~5%(v/v) alcohol production; ++, 5~10%(v/v) alcohol production; +++, above 10%(v/v) alcohol production.

<sup>2)</sup>-, no conversion from ferulic acid(FA) to 4-ethylguaiacol(EG) or vanillin(V); V, conversion from ferulic acid to vanillin; EG, conversion from ferulic acid to 4-ethylguaiacol.

#### (4) 전통장류로부터 분리된 효모 균주를 대상으로 알코올 고생성 균주의 선발

현재, 콩 발효제품 저염화시 발생하는 부패 미생물을 제어한 수단으로써 알코올 성분을 첨가하는 방법이 주로 시도되고 있는데, 대부분의 병원성 및 부패 미생물이 알코올에 대한 내성을 나타내지 않기 때문에 이러한 방법이 매우 효과적인 수단이 될 수 있음을 시사하고 있다 (Chiou, 1999; Chiou et al., 1999). 그러나 이러한 방법은 알코올의 첨가라는 인위적인 수단에 의존함으로써 전통식품의 이미지와 고유의 풍미를 저하시키는 문제점이 수반된다. 따라서 전통장류의 저염화를 위해서는 부패 미생물의 제어뿐만 아니라 전통식품 고유의 향미를 보완시켜 줄 방법을 모색해야만 한다. 따라서 본 연구에서는 장류의 저염화를 위하여 인위적인 수단이 아닌 자연적으로 발효 동안 생성되는 알코올 수준을 높임으로써 향균력을 부여하여 부패미생물을 억제하고, 동시에 장류의 저염화로 인한 향미성분 감소를 보완하기 위한 수단으로써 장류의 중요한 향미성분을 생성할 수 있는 능력을 지닌 효모 균주를 분리하고자 하였다.

본 연구로부터 분리된 효모 총 1296 균주를 대상으로 알코올 또는 향미성분을 고생성하는 우수 효모를 분리하기 위한 연구를 수행하였다. 먼저 각 균주의 알코올 생성능을 확인하기 위해 기질인 30%(w/v)의 glucose를 함유하는 YM broth 배지에서 배양 후 생성된 알코올 함량을 분석한 결과, 총 86주(JBCC strains No. 407, 437, 452, 457, 488, 509, 511, 513, 515, 517-522, 524, 525, 528, 530, 531, 533, 535, 548-552, 590, 595, 597, 623, 726, 728, 730, 737, 740, 742, 743, 744, 745, 748, 749, 750, 758, 782, 785, 790, 796, 797, 802-806, 818, 830, 841, 854, 913, 914, 915, 918, 922, 923, 925-928, 930, 931, 932, 934, 936, 937, 938, 939, 944-946, 948, 962, 972, 974, 988, 1044, 1054, 1439)의 균주로부터 10% 이상의 알코올을 생산했음을 확인하였다. 반면 총 181 균주는  $5\% \leq$ 알코올 생성능 $<10\%$ 을 나타냈으며, 총 456 균주는  $1\% \leq$ 알코올 생성능 $<5\%$ , 총 573 균주는 1% 미만의 알코올 생성능을 나타냈다. 한편 10% 이상의 알코올을 생성할 수 있는 균주의 대부분이 메주 또는 장류 발효의 초기단계에서 분리되었다는 점을 고려할 때, 이는 장류의 발효과정에서 알코올 발효가 주로 초기단계에서 수행된다는 점과 크게 관련성이 있는 것으로 보인다. 더해서, 스크리닝 대상인 총 1,296주의 효모 중에서, 동정이 된 545 균주를 대상으로 효모의 종류와 알코올 생성 수준에 따른 패턴을 Fig. 56에 표현하였다.

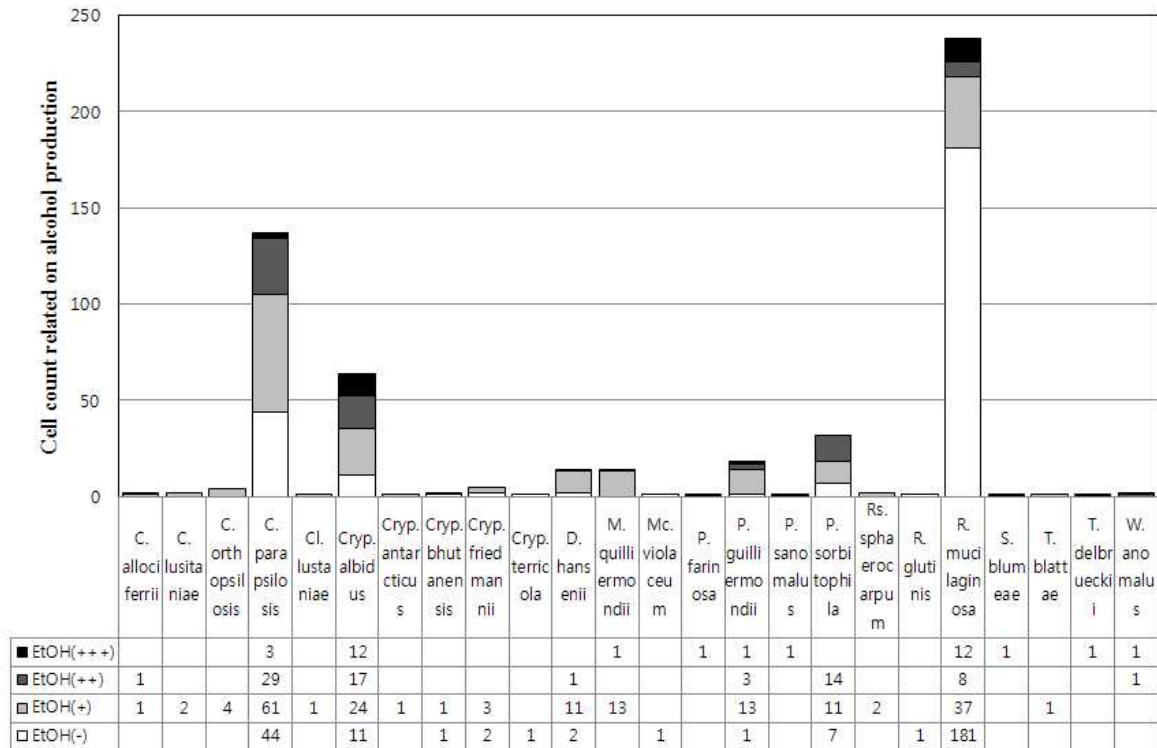


Fig. 56. Patterns of alcohol production by yeast strains isolated from traditional soy-sauce in this study.

<sup>a)</sup> -, under 1%(v/v) alcohol production; +, 1~5%(v/v) alcohol production; ++, 5~10%(v/v) alcohol production; +++, above 10%(v/v) alcohol production.

더욱이 전통장류 유래 효모 중 JBCC strain No. 623균주는 약 14.1±2.83%의 가장 높은 알코올을 생산하였고, 따라서 JBCC 623 균주는 알코올 고생성 효모로 최종 선발되었다(Fig. 57). 특히, 이러한 JBCC 623 균주로부터의 생성 정도는 표준 균주인 *S. cerevisiae* 및 *Z. rouxii* 균주로부터 생성된 알코올 수준보다 유의적으로 높았다(Fig. 58). 즉, 선발된 JBCC 623균주와 표준 균주인 *Z. rouxii* KCCM 12066, *Z. rouxii* KCCM 55054 및 *S. cerevisiae* KACC 30008를 기질로 10, 20, 30%(w/v)의 glucose가 함유된 YM 액체배지에 각각 배양한 후 생성된 알코올 함량을 측정된 결과, 모든 처리구에서 JBCC 623균주에 의해 생성된 알코올 수준이 유의적으로 높았다. 특히 30%의 glucose가 포함된 배지에서 JBCC 623 균주는 14.8%(v/v)의 알코올을 생성하는 반면, *Z. rouxii* KCCM 12066는 10.8%, *Z. rouxii* KCCM 55054는 12.8%, *S. cerevisiae* KACC 30008 균주는 11.8%의 알코올을 생성하였다.



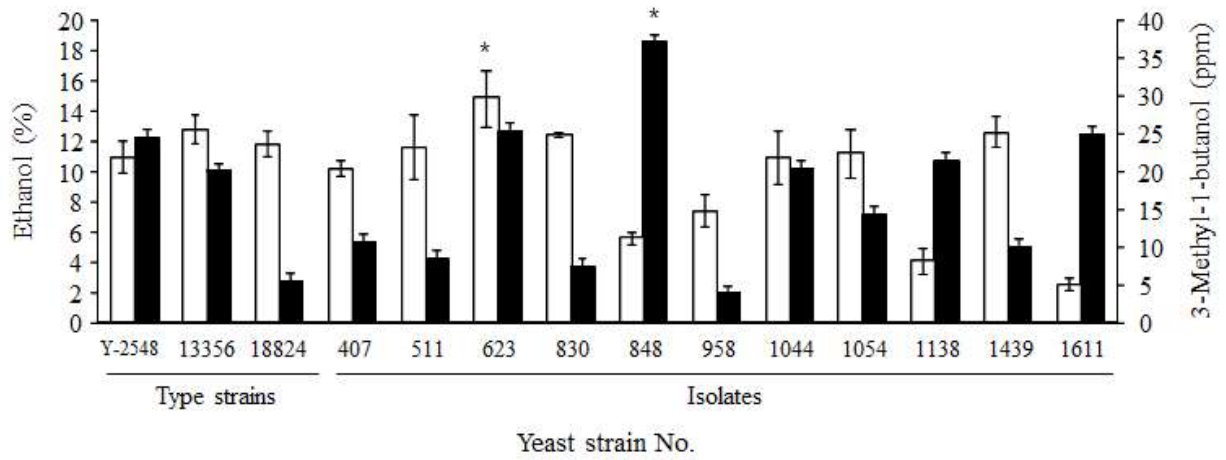
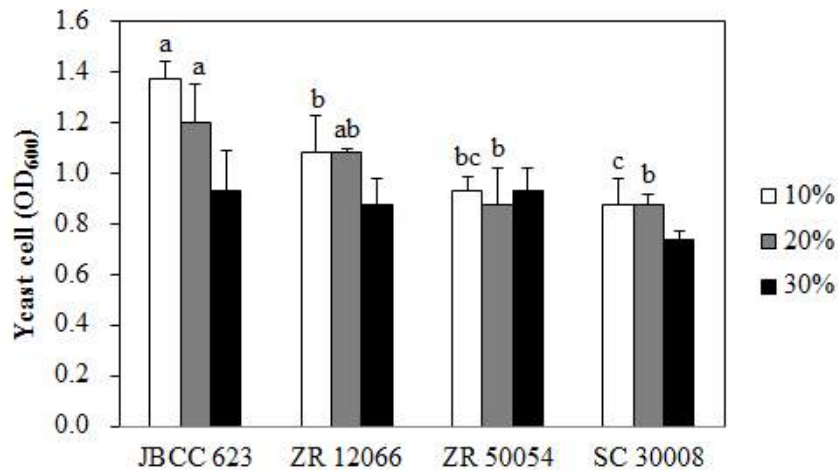


Fig. 57. Ethanol(white bar) and 3-methyl-1-butanol(black bar) productions by yeast strains isolated from traditional soy sauce in comparison with reference strains of *Z. rouxii* NRRL Y-2548, *Z. rouxii* ATCC 13356 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824.

(A)



(B)

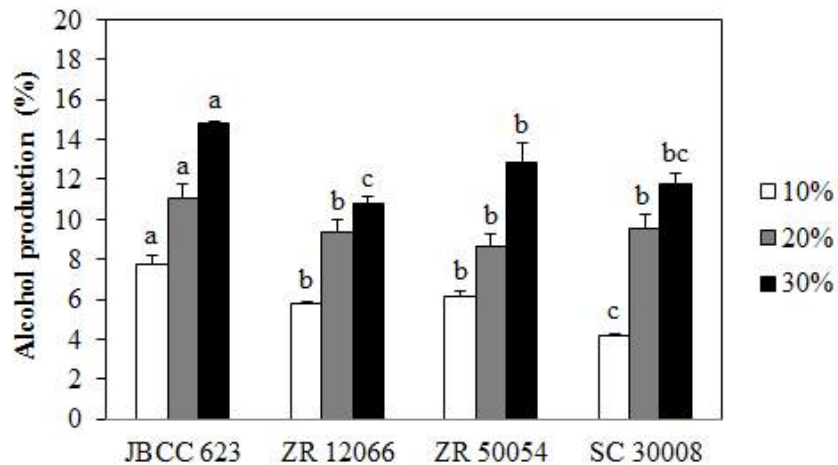


Fig. 58. Cell growth(A) and alcohol production(B) of a selected JBCC 623 strain as a high-alcohol producing yeast according to glucose concentration from 10, 20 and 30%(w/v).

\*623, a JBCC 623 strain isolated in this study; ZR 12066, *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 12066 as a control strain; ZR 50054, *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 55054 as a control strain; SC 30008, *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30008 as a control strain.

\*Different small letters indicate significant differences of values between four different inoculum types under same concentrations of glucose(p<0.05).

#### (5) 전통장류로부터 분리된 효모 균주를 대상으로 향미성분 고생성 균주의 선발

장류에 있어서 염(salt)은 미생물에 대한 식품 부패를 예방할 뿐만 아니라 식품의 발효를 조절하고 결국 텍스처와 향미 등에 영향을 미친다. 따라서 콩발효 제품의 저염화시 식품의 발효 양상이 변함에 따라서 장류 고유의 맛과 향미가 감소되며, 결과적으로 식품의 품질 저하를 야기할 수 있다. 한편 장류의 특징적인 향미는 사용되는 재료, 적용되는 발효 방법 및 발효에 관

여하는 미생물에 의하여 크게 영향을 받으며, 특히 효모는 향미성분을 생성하는 주요 미생물이다. 따라서 저염화된 장류에서 발생할 수 있는 향미 저하를 해결하기 위한 수단으로써 본 연구에서는 장류의 향미에 유의적으로 기여하는 향미 성분을 고생성할 수 있는 균주를 전통장류 유래의 토착 효모로부터 선발하고자 하였다.

#### (가) 4-ethylguaiacol 및 vanillin 생성능

장류 효모 균주를 대상으로 향미성분 지표물질인 4-ethylguaiacol 및 vanillin의 생성 여부를 검토하기 위하여 5mM ferulic acid와 6 mg/mL NADH를 함유한 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 각각의 효모배양액으로 제조한 조효소액을 첨가한 뒤 37°C에서 6시간 동안 반응 하였다. 그 결과, 321균주(JBCC No. 403-406, 410, 412, 413, 416, 417, 420-429, 434, 437, 441-455, 457-469, 472-480, 482-488, 490-494, 495-523, 526-529, 531, 532, 534, 536-539, 551-553, 558, 563, 570, 572-576, 580, 581, 583, 589, 598, 605, 609, 611, 614, 657, 658, 661-663, 666, 667, 686-690, 708-711, 714, 715, 727, 746, 755, 759-762, 771, 775, 784, 790, 793, 815, 818, 827, 835, 845, 848, 849, 858-903, 933, 940-942, 949-951, 953, 955, 977, 980, 984-987, 989, 991, 993-995, 997-999, 1002-1004, 1006, 1009, 1011, 1014, 1017, 1020, 1022-1027, 1029, 1031-1034, 1039, 1042, 1094-1097, 1099-1106, 1110-1123, 1125-1127, 1129-1134, 1137-1164)는 ferulic acid를 기질로 4-ethylguaiacol을 생성할 수 있음을 확인하였다. 특히 Fig. 59에 나타낸 것처럼, JBCC No. 500 균주는 ferulic acid로부터 vanillin을 생성할 수 있었으며, JBCC No. 1141, 1142, 1143, 1152, 1153균주 또한 vanillin을 생성할 수 있는 것으로 나타났다. 또한 균주들의 전환능은 GC-FID 분석을 통해서도 확인하였다. 즉 효모의 조효소액 대신 멸균수를 처리한 대조구와 달리, 기 확인된(Table 34) KCCM 100419(No. 12)균주와 JBCC 500균주의 반응액으로부터 기질인 ferulic acid 뿐만 아니라 최종 향미 지표성분인 vanillin의 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 60).

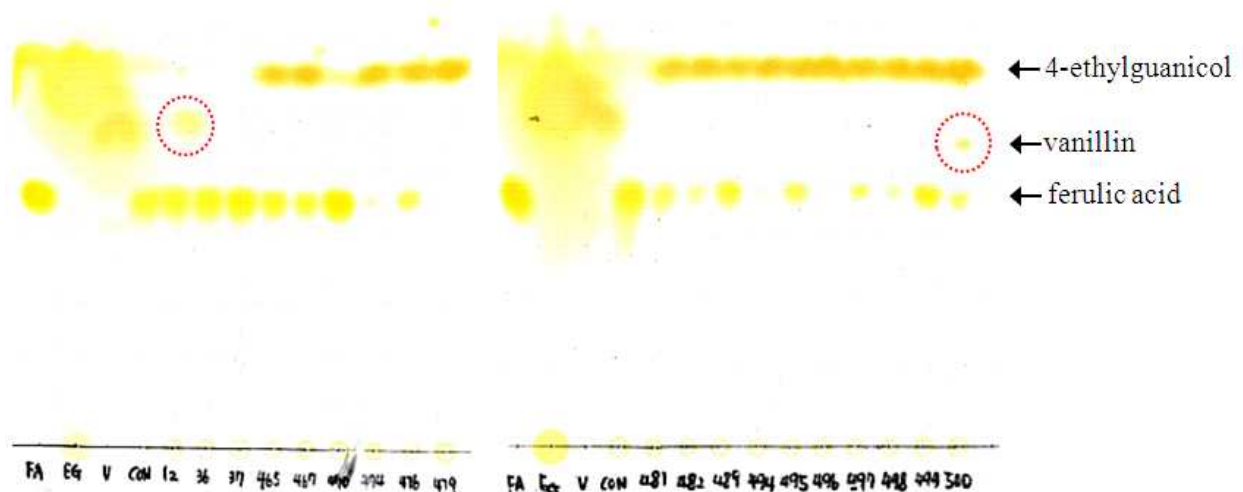


Fig. 59. TLC-chromatogram on conversion abilities from ferulic acid to 4-ethylguaiacol and vanillin of yeast strains isolated from traditional fermented soy sauce.

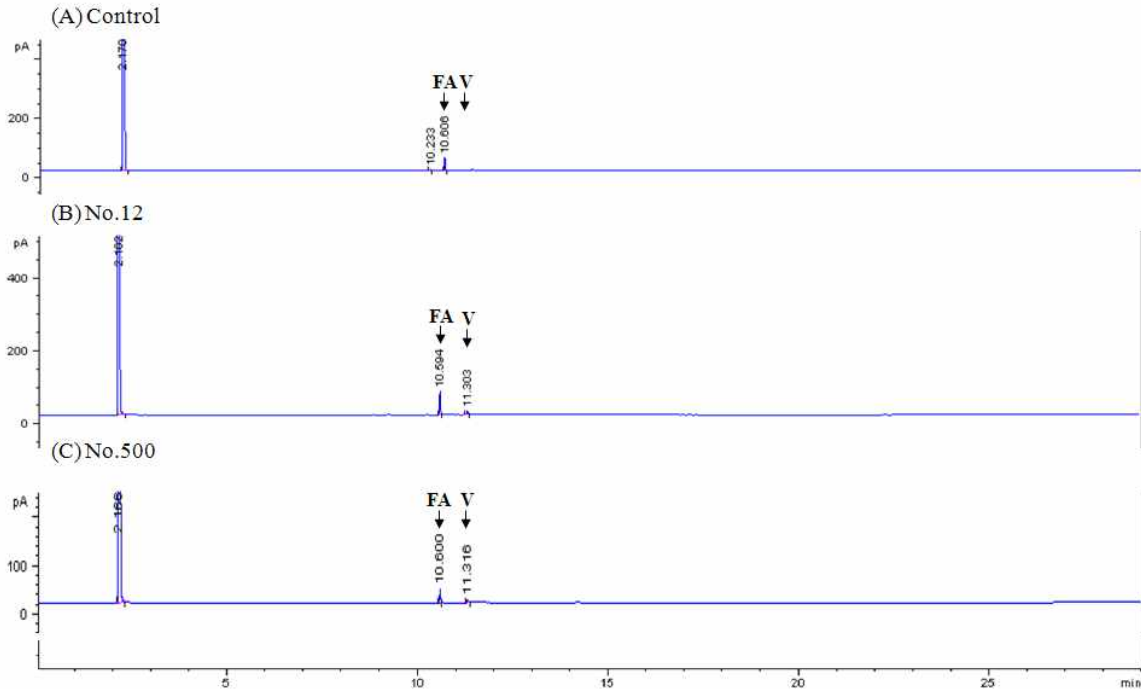


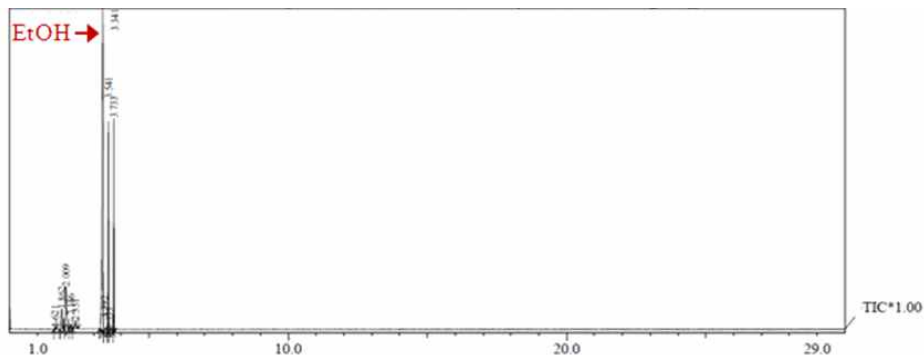
Fig. 60. GC-FID chromatogram on conversion abilities from ferulic acid to vanillin of yeast KCCM 100419(No. 12) and JBCC 500(No.500) strains isolated from traditional fermented soy sauce.

#### (나) 장류 향미 생성능 우수 균주로써 고 3-methyl butanol 생성 효모의 선발

$\alpha$ -keto acids로부터 형성되는 고급알코올인 3-methyl butanol(isoamyl alcohol)는 장류의 대표적인 향미 성분이다(Feng et al., 2014; van der Sluis et al., 2001). 따라서 본 연구에서는 3-methyl butanol(또는 2-methyl butanol)을 향미생성 지표물질로 선택하였고, 분리된 효모를 대상으로 3-methyl butanol(또는 2-methyl butanol) 생성능을 확인함으로써 우수한 향미증진능 효모를 선발하고자 하였다. 이를 위하여 각각의 분리 효모 균주를 30%(w/v)의 glucose를 함유하는 YM broth에서 29°C, 180 rpm에서 2일간 배양한 후 혐기적 알코올 생산을 위하여 29°C에서 추가적으로 2일간 배양하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였다. 먼저 1차 스크리닝 방법으로 실험자의 관능적 분석을 이용하여 약 200균주의 상등액을 선발하였으며, 그때의 기준은 caramel, sweet fruit, floral odour를 좋은 향미, acrid, solvent, faint odour를 좋지않은 향미로 고려하였다. 또한 선발된 200균주의 상등액으로부터 향미생성 지표물질인 고급알코올(3-methyl butanol 또는 2-methyl butanol)의 유/무를 GC-MS를 통해 분석하였다. 그 결과, JBCC 848 균주의 상등액으로부터 37.1±5.15 ppm으로 가장 높은 3-methyl butanol 수준을 확인하였으며(Fig. 57), 따라서 저염화 장류제품의 제조시 향미성분을 보완하기 위한 향미 증진 효모로써 JBCC 848 균주를 최종 선발하였다. JBCC 505균주와 같이 일부 효모들의 배양 상등액의 주요한 휘발성 성분은 에탄올(RT: 3.4 min)이었던 것과 달리 JBCC 848균주의 배양액은 목표하는 향미생성 지표물질인 3-methyl-1-butanol(RT: 9.790 min)과 2-methyl-1-butanol(RT: 9.805 min)이 주된 산물로 함유되어 있음을 확인하였다(Fig. 61). 더욱이 알코올 고생산 균주로 선발된 JBCC-623 균주의 경우도 비교적 높은 양의 3-methyl-1-butanol를 생성하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 57). 결과적으로 알코올 고생산 효모 JBCC 623와 3-methyl-1-butanol 고생산

효모 JBCC 848 균주를 저염화 장류의 제조를 위한 후보 균주로 최종 선발하였다.

(A)



(B)

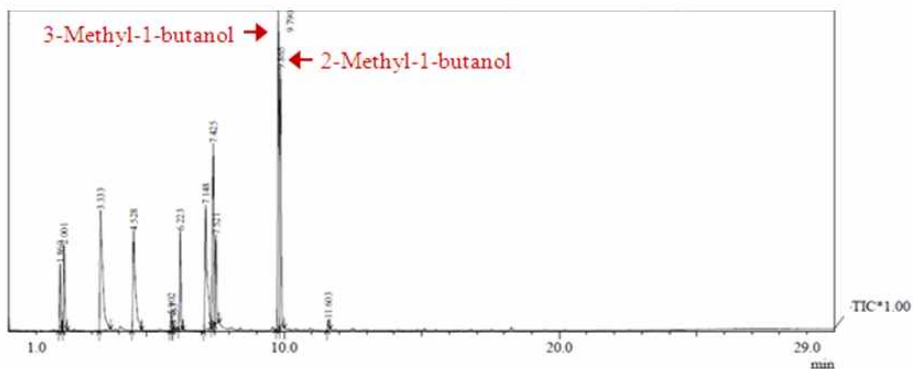


Fig. 61. GC-MS chromatogram on production abilities of 3-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-butanol by yeast strains, JBCC 505(A) and JBCC 848(B), isolated from traditional fermented soy sauce.

#### (6) 선발된 알코올 고생성 및 향미 증진능 우수 효모의 동정 및 특성 분석

장류로부터 알코올과 3-methyl-1-butanol를 고생산하며 우수균주로 선발한 JBCC 623과 JBCC 848효모에 대해 26S rRNA 서열 분석을 통한 동정을 실시하였다. 그 결과, JBCC 623 균주는 *Torulasporea delbrueckii*(JF920157)와 99%의 상동성이 가장 높았으며(Fig. 62), JBCC 848은 *Pichia guilliermondii*(EF490689)와 99%의 가장 높은 상동성을 보였다(Fig. 63). 본 연구에서는 또한 두 균주에 대한 생화학적 동정을 API kit을 이용하여 실시하였다(Table 35). 그 결과, JBCC 848균주는 전형적인 특징으로 inositol과 D-lactose(bovine origin)를 이용하지 못하는 것으로 나타나면서 26S rRNA sequence analysis 결과와 일치되게 *Candida guilliermondii*(84.3%)로 동정되었다. 반면 JBCC 623 균주의 경우 L-arabinose, adonitol, N-acetyl-glucosamine, D-cellobiose를 이용하지 못하고 xylitol, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, D-maltose를 variable하게 이용하는 것을 확인할 수 있었으나, API kit으로 동정될 수 있는 균종에 속해있지 않다. 따라서 최종적으로 선발된 JBCC 623 및 JBCC 848균주를 각각 *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623와 *Pichia guilliermondii* JBCC 848로 최종 명명하였다. 오늘날까지 *T. delbrueckii* 균주는 과일, 와인, 제빵 제품 등으로부터 분리되었으며, 최근에는 *T.*

*delbrueckii* 효모가 높은 알코올 및 적절한 ester 생산성을 가지는 내삼투압성 효모로 알려지면서 와인 산업에 있어서 큰 관심을 받고 있다(Aidoo et al., 2006; Renault et al., 2009). 한편, 내삼투압성 효모 *P. guilliermondii*는 이전 연구에서 장류 moromi 발효 동안 분리된 바 있으며, 또한 *P. guilliermondii*는 와인 발효 동안 향미 성분을 고 생산할 수 있다는 결과가 보고된 바 있다(Schirmer-Michel et al., 2010). 더해서, 선발된 효모의 형태학적 특성을 FE-SEM(SUPRA 40VP)을 통해 관찰한 결과, Fig. 64에 보이는 것처럼 *T. delbrueckii* JBCC 623의 세포형태는 평균 3.4  $\mu\text{m}$ 의 구형이었으며 *P. guilliermondii* JBCC 848의 세포형태는 평균 3.2  $\mu\text{m}$ 의 타원형으로 두 균주 모두 다극출아에 의해 생육하는 것을 확인 할 수 있었다.

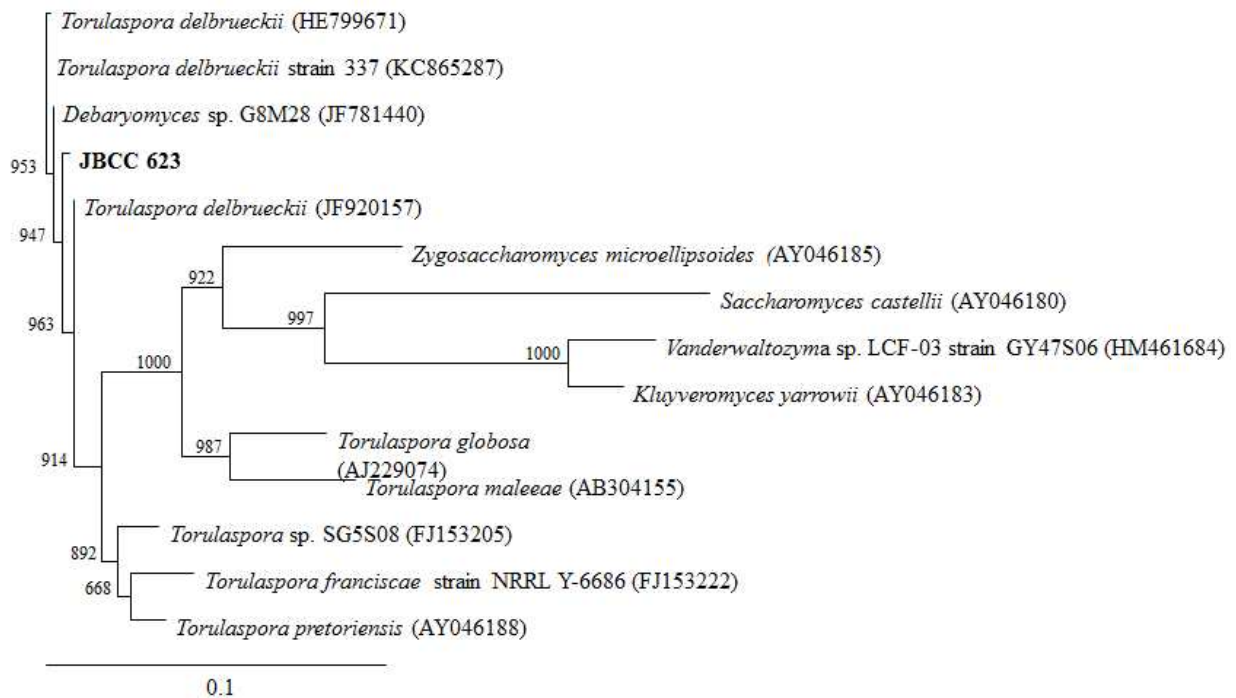


Fig. 62. Phylogenetic tree of a JBCC 623 strain selected as high alcohol-producing yeast among isolates from traditional soy-sauce.

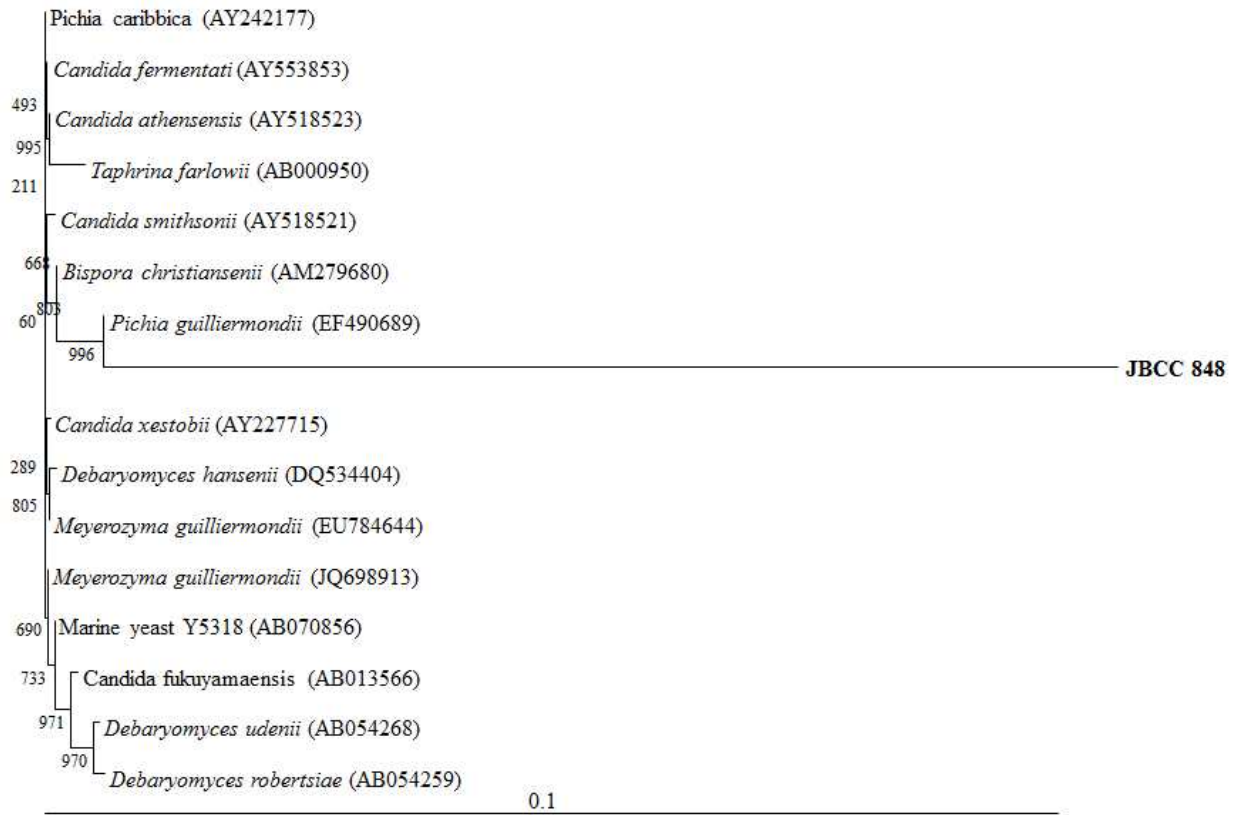


Fig. 63. Phylogenetic tree of a JBCC 848 strain selected as high flavor-producing yeast among isolates from traditional soy-sauce.

Table 35. Biochemical analysis using API kit of *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623 and *Pichia guilliermondii* JBCC 848 strains selected as a high ethanol or 3-methyl-1-butanol producing yeast strain, respectively.

No.	Tests	Active ingredients	JBCC 623	JBCC 848
1	GLU <sup>2)</sup>	D-Glucose	+ <sup>3)</sup>	+
2	GLY	Glycerol	+	+
3	2KG	Calcium 2-keto-gluconate	+	+
4	ARA	L-Arabinose	-	+
5	XYL	D-Xylose	+	+
6	ADO	Adonitol	-	+
7	XLT	Xylitol	v	+
8	GAL	D-Galactose	+	+
9	INO	Inositol	w	-
10	SOR	D-Sorbitol	+	+
11	MDG	Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	v	+
12	NAG	N-Acetyl-glucosamine	-	+
13	CEL	D-celiobiose	-	+
14	LAC	D-Lactose(bovine origin)	w	-
15	MAL	D-maltose	v	+
16	SAC	D-saccharose(sucrose)	+	+
17	TRE	D-trehalose	+	+
18	MLZ	D-melezitose	+	+
19	RAF	D-raffinose	w	+

<sup>1)</sup>JBCC 623, a JBCC 623 strain; JBCC 848, a JBCC 848 strain isolated in this study.

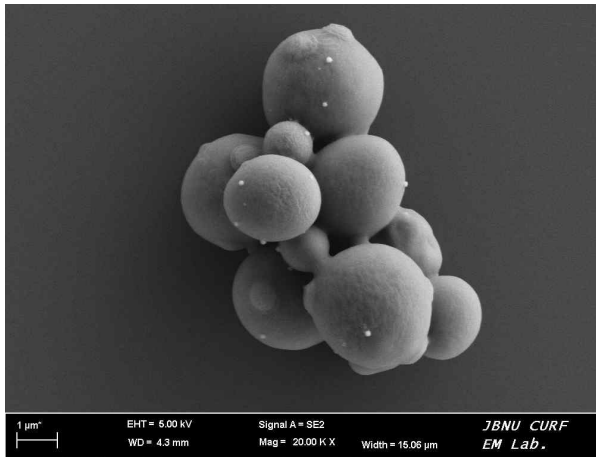
<sup>2)</sup>GLU, D-glucose; GLY, glycerol; 2KG, calcium 2-keto-gluconate; ARA, L-arabinose; XYL, D-xylose; ADO, adonitol; XLT, xylitol; GAL, D-galactose; INO, inositol; SOR, D-sorbitol; MDG, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside; NAG, N-acetyl-glucosamine; CEL, D-celiobiose; LAC, D-lactose(bovine origin); MAL, D-maltose; SAC, D-saccharose(sucrose); TRE, D-trehalose; MLZ, D-melezitose; RAF, D-raffinose.

<sup>3)</sup>+, positive activity; w, weakly positive activity; v, variable activity; -, negative activity.

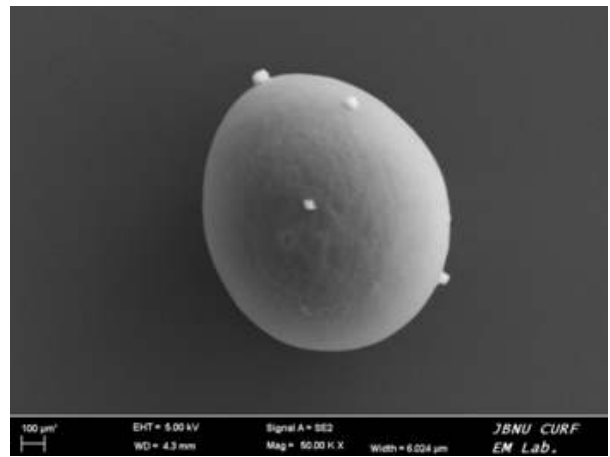


(A)

× 20.00

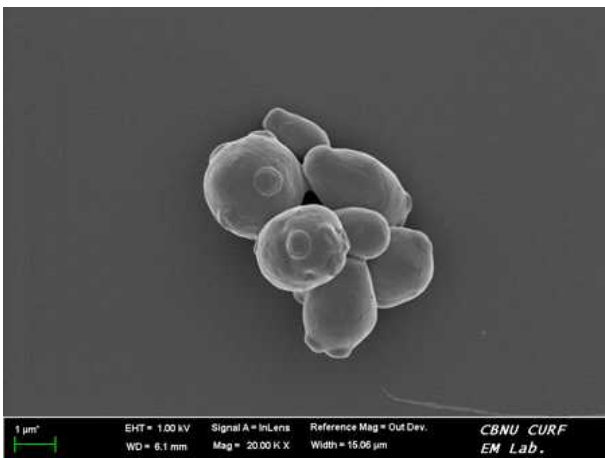


× 50.00



(B)

× 20.00



× 50.00

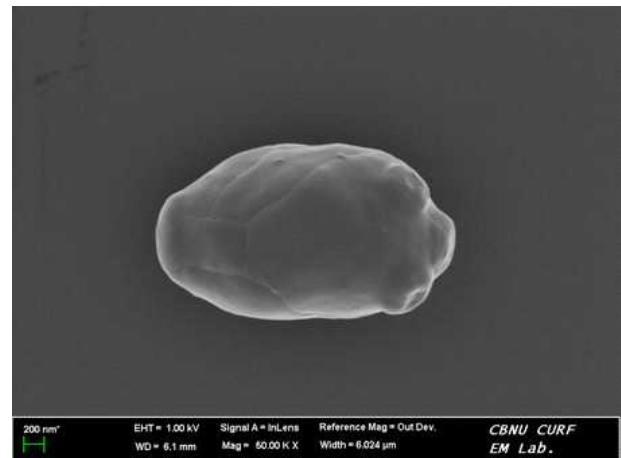


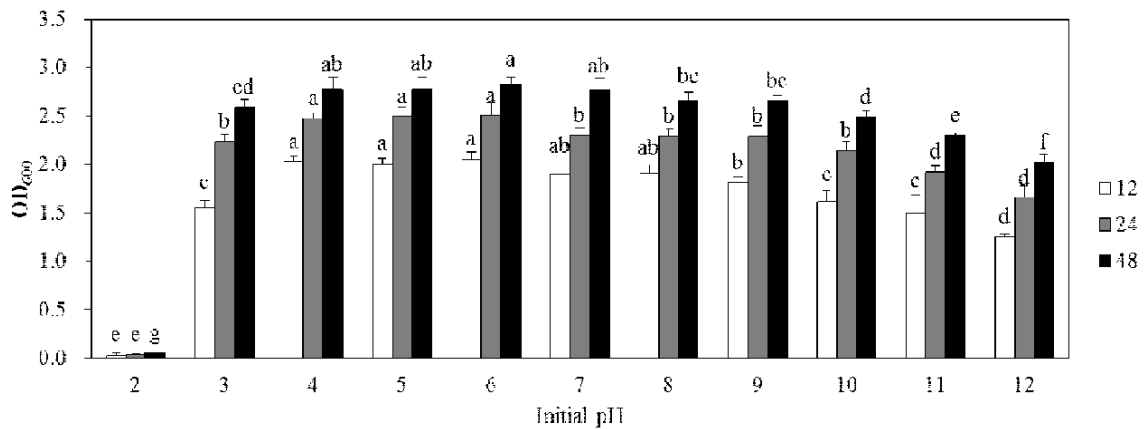
Fig. 64. SEM images(EHT=3.00 kV, Signal A=SE2, Mag=20.00 KX) of *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623(A) and *Pichia guilliermondii* JBCC 848(B) strains selected as a high ethanol or 3-methyl-1-butanol producing yeast, respectively.

(7) 선발된 알코올 고생성 및 향미 증진능 우수 효모의 최적 성장 조건 검토

(가) 선발된 두 효모의 생육에 있어서 초기 pH가 미치는 영향

선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주와 *P. guilliermondii* JBCC 848 균주의 생육에 있어서 초기 pH가 미치는 영향을 살펴보기 위해 각각 pH를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12로 조정된 배양액에 접종하여 29°C, 180 rpm 조건하에서 12, 24, 48 시간동안 배양한 후 OD<sub>600</sub>을 측정하였다(Fig. 65). 그 결과, *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 경우 배양 48시간 쯤 pH 6.0에서 유의적으로 가장 높은 수준을 나타냈으며, 반면 pH 2.0에서는 거의 생육하지 못하였다. 반면 *P. guilliermondii* JBCC 848 효모의 경우 pH 4.0-10.0의 넓은 범위에서 잘 생육할 수 있었으며, pH 2.0에서도 어느 정도 생육하였다.

(A)



(B)

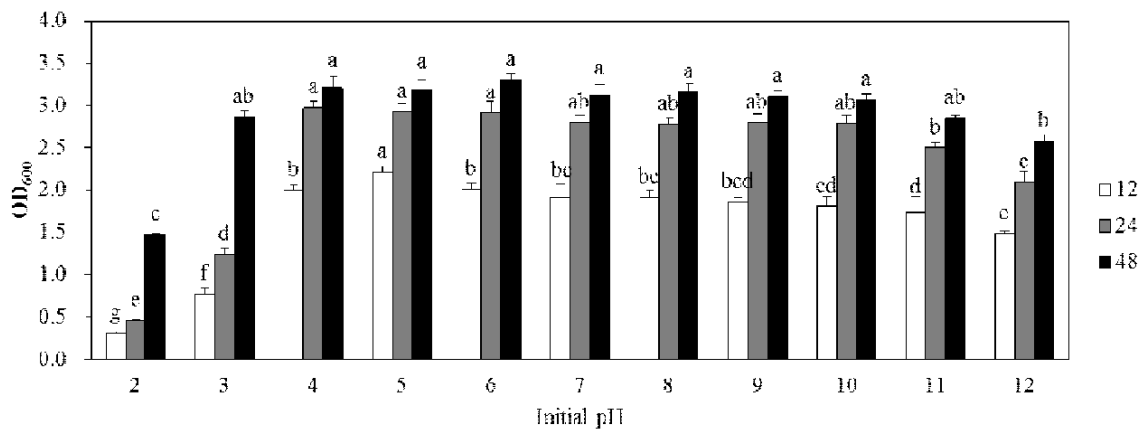
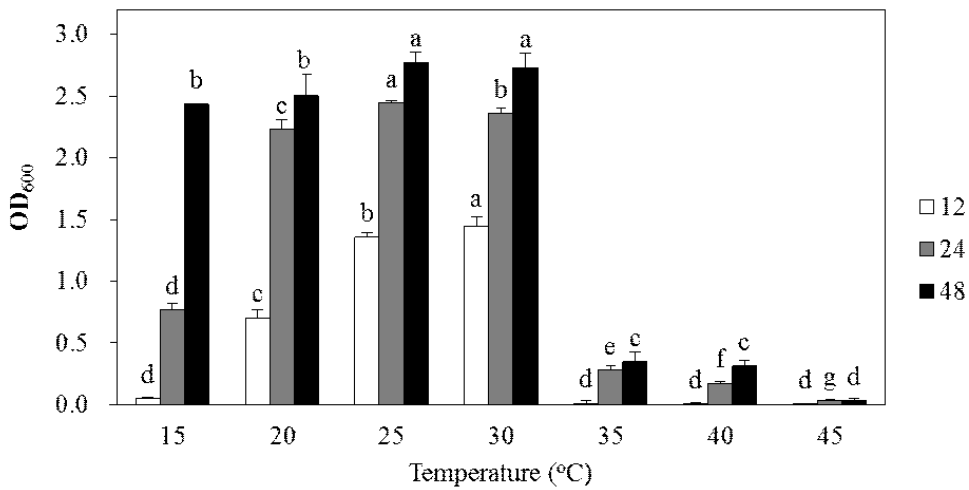


Fig. 65. Effect of initial pH on cell growth of *T. delbrueckii* JBCC 623(A) and *P. guilliermondii* JBCC 848(B) selected as a high ethanol or 3-methyl-1-butanol producing yeast strain, respectively.

(나) 선발된 두 효모의 생육에 있어서 배양 온도가 미치는 영향

선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623과 *P. guilliermondii* JBCC 848 효모의 생육에 있어서 배양 온도가 미치는 영향을 살펴보기 위하여 YM 기본 배양액에 접종하여 180 rpm 조건하에서 12, 24, 48 시간동안 배양한 후 OD<sub>600</sub>을 측정하였고, 이때 배양 온도는 각각 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45°C로 하였다(Fig. 66). 그 결과, 배양 48시간 쯤 OD<sub>600</sub> 값은 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 경우 25-30°C의 온도 범위에서 유의적으로 가장 높은 수준을 나타냈으며, 더욱이 15°C의 낮은 온도에서도 어느 정도 생육할 수 있었다. 한편 35-45°C에서는 거의 생육하지 않았다. 반면 *P. guilliermondii* JBCC 848 효모의 경우 10-35°C의 상대적으로 넓은 범위에서 잘 생육하였으며, 15°C 또는 40°C에서도 어느 정도 생육하였다. 그러나 45°C에서는 거의 생육하지 않았다.

(A)



(B)

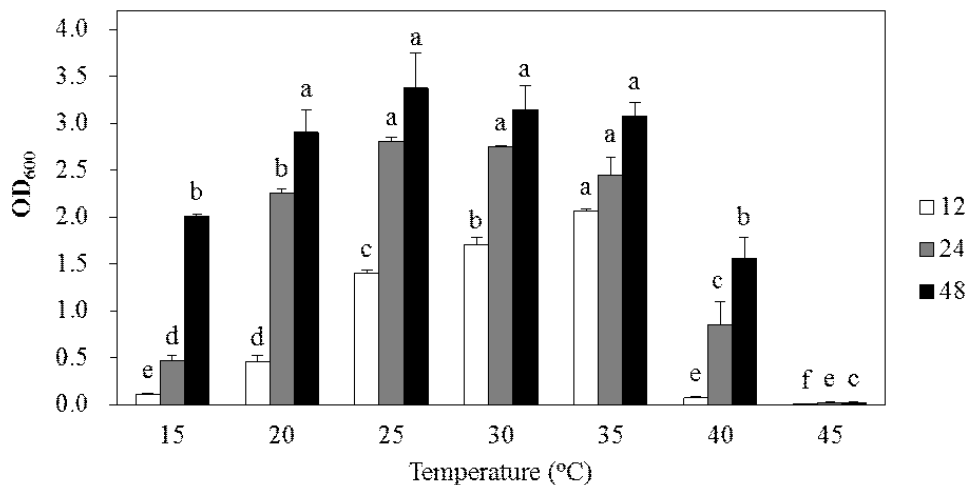
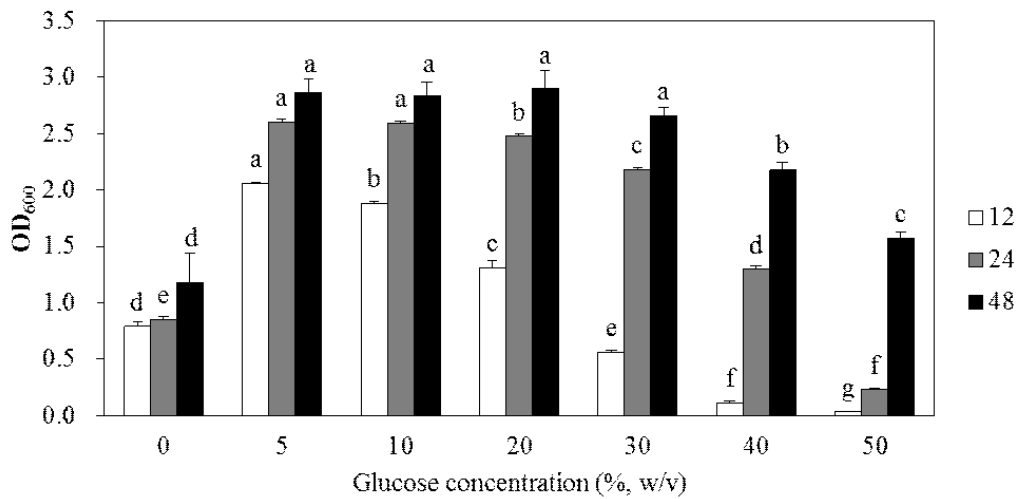


Fig. 66. Effect of culture temperature of *T. delbrueckii* JBCC 623(A) and *P. guilliermondii* JBCC 848(B) selected as a high ethanol or 3-methyl-1-butanol producing yeast strain, respectively.

(다) 선발된 두 효모의 생육에 있어서 당 농도가 미치는 영향

선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623과 *P. guilliermondii* JBCC 848 효모의 생육에 있어서 당 농도가 미치는 영향을 살펴보기 위하여 포도당 농도를 각각 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50%(w/v)로 조정된 배양액에 접종하여 29°C, 180 rpm 조건하에서 12, 24, 48 시간동안 배양한 후 OD<sub>600</sub>을 측정하였다(Fig. 67). 그 결과, 배양 48시간 쯤 OD<sub>600</sub> 값은 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 경우 5-30%(w/v)의 상대적으로 넓은 당 농도에서 유의적으로 가장 높은 수준을 나타냈으며, 50%의 높은 당 농도에서도 성장하였다. 반면 *P. guilliermondii* JBCC 848 효모의 경우 10%의 당농도에서 유의적으로 가장 높은 수준의 OD<sub>600</sub> 값을 나타냈으나, 50%의 당 농도에서는 거의 성장하지 못했다.

(A)



(B)

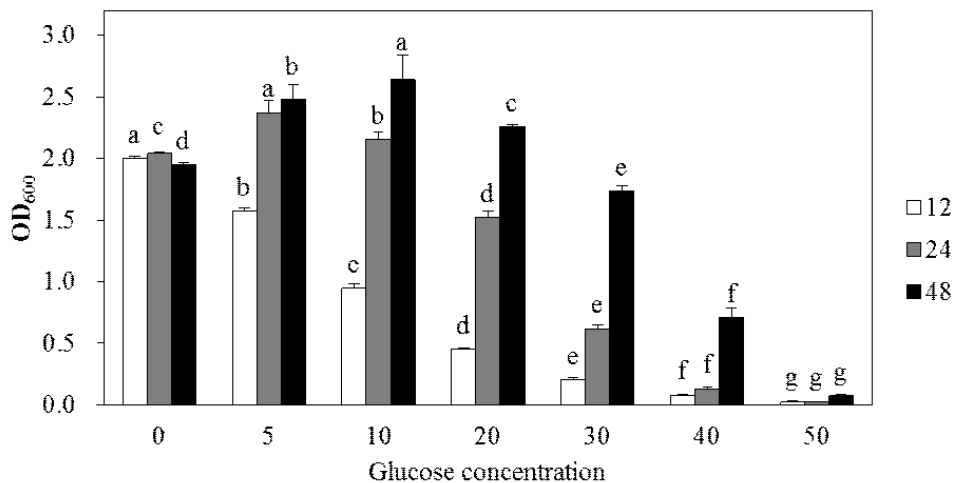
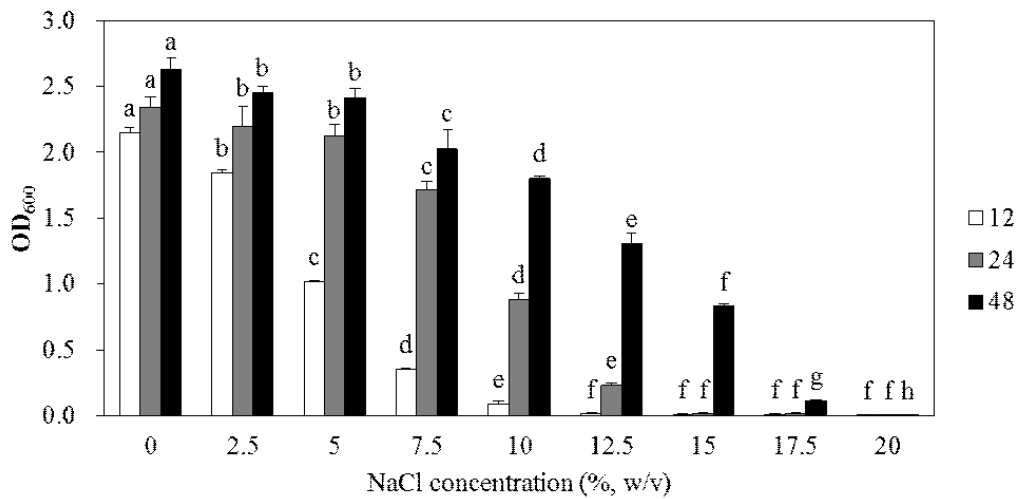


Fig. 67. Effect of glucose concentration on cell growth of *T. delbrueckii* JBCC 623(A) and *P. guilliermondii* JBCC 848(B) selected as a high ethanol or 3-methyl-1-butanol producing yeast strain, respectively.

(라) 선발된 두 효모의 생육에 있어서 염 농도가 미치는 영향

선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623과 *P. guilliermondii* JBCC 848 효모의 생육에 있어서 염 농도가 미치는 영향을 살펴보기 위하여 염 농도를 각각 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0%(w/v)로 조정된 배양액에 접종하여 29°C, 180 rpm 조건하에서 12, 24, 48 시간동안 배양한 후 OD<sub>600</sub>을 측정하였다(Fig. 68). 그 결과, 두 균주 모두 염을 첨가하지 않았을 때 유의적으로 가장 잘 생육하였으며, 염 농도가 증가함에 따라서 그 수준이 감소하는 경향을 보였다. 더욱이, 두 균주 모두 15.0%이상의 염농도에서는 염을 첨가하지 않은 처리구와 비교하여 OD<sub>600</sub> 값이 50% 이하로 떨어지는 것이 관찰되었으며, 특히 17.5%(w/v) 이상에서는 거의 성장하지 않는 것으로 나타났다.

(A)



(B)

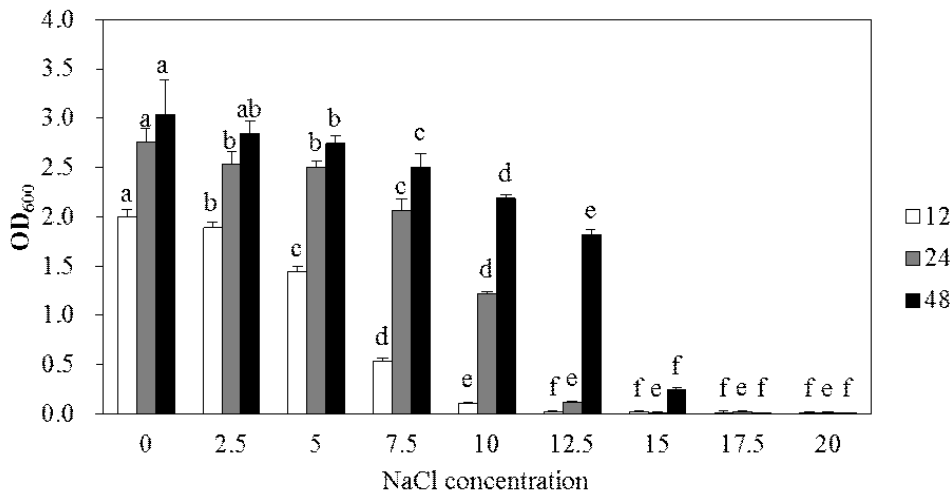
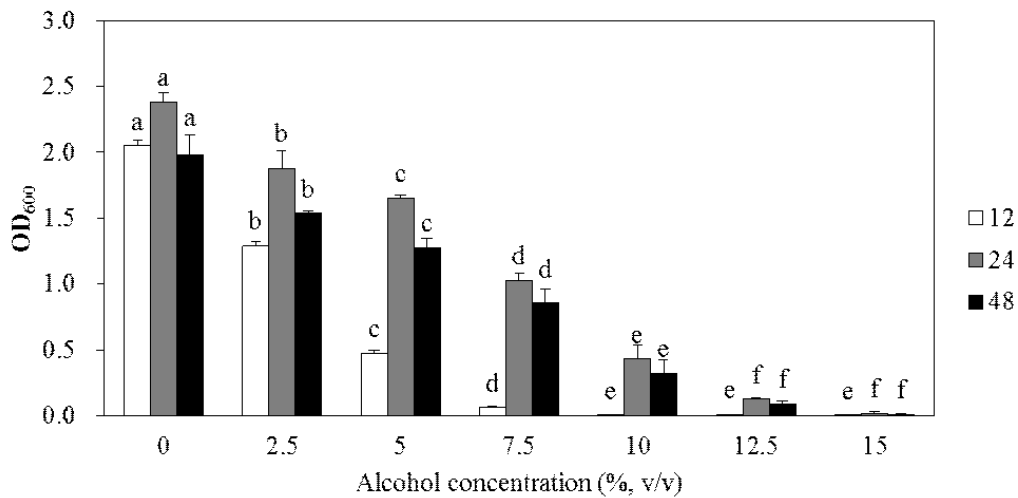


Fig. 68. Effect of sodium chloride concentration on cell growth of *T. delbrueckii* JBCC 623(A) and *P. guilliermondii* JBCC 848(B) selected as a high ethanol or 3-methyl-1-butanol producing yeast strain, respectively.

(마) 선발된 두 효모의 생육에 있어서 알코올 농도가 미치는 영향

선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623과 *P. guilliermondii* JBCC 848 효모의 생육에 있어서 알코올 농도가 미치는 영향을 살펴보기 위하여 알코올 농도를 각각 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0%(w/v)로 조정된 배양액에 접종하여 29°C, 180 rpm 조건하에서 12, 24, 48 시간동안 배양한 후 OD<sub>600</sub>을 측정하였다(Fig. 69). 그 결과, 두 균주 모두 알코올을 첨가하지 않았을 때 OD<sub>600</sub> 값이 유의적으로 가장 높았으며, 알코올 농도가 증가함에 따라서 그 수준이 감소되는 경향을 나타냈다. *P. guilliermondii* JBCC 848 효모의 경우 5%이상의 알코올 농도에서는 알코올을 첨가하지 않은 처리구와 비교하여 그 수준이 50% 이하로 낮았으며, 특히 알코올 농도 7.5% 그 이상에서는 거의 생육하지 못했다. 반면 *T. delbrueckii* JBCC 623의 경우 알코올 농도 7.5%에서 무처리구와 비교하여 절반 이하의 수준이었으나, 알코올 농도 10%까지도 생육 가능한 것으로 나타났다. 그러나 알코올 15.0% 이상의 농도에서는 거의 생육하지 못했다.

(A)



(B)

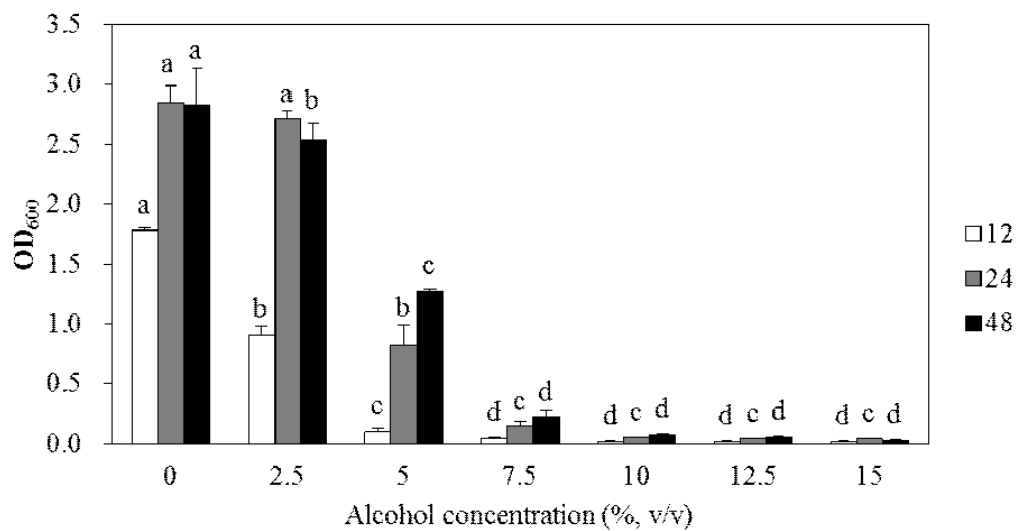


Fig. 69. Effect of alcohol concentration on cell growth of *T. delbrueckii* JBCC 623(A) and *P. guilliermondii* JBCC 848(B) selected as a high ethanol or 3-methyl-1-butanol producing yeast strain, respectively.

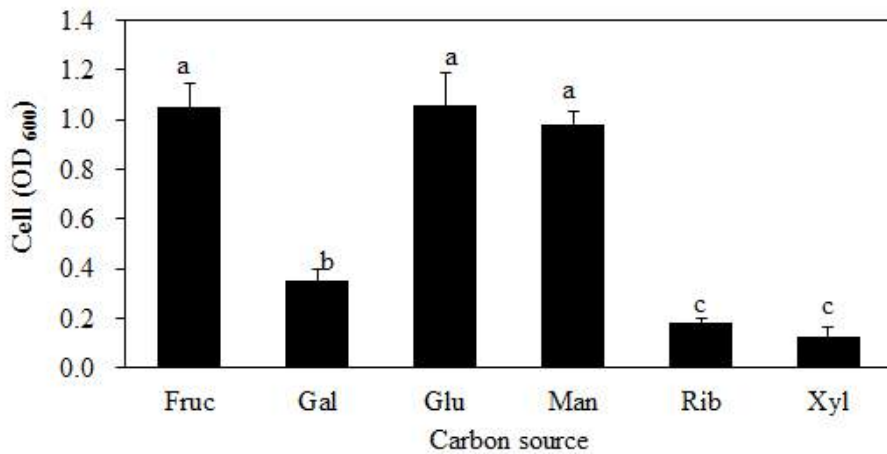
다. *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성을 위한 최적발효 조건 검토 및 관련 유전자 획득

(1) 선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 발효 최적조건

(가) *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 발효에 있어서 탄소원의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성을 위한 탄소원의 영향을 살펴보기 위하여 탄소원으로 fructose, galactose, glucose, mannose, ribose 또는 xylose를 20%(w/v)의 비율로 첨가된 배양액에서 효모의 성장 정도와 알코올 생성량을 비교 분석하였다. 그 결과, *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 균체 성장 정도는 Fig. 70(A)과 같이 fructose, glucose 및 mannose를 탄소원으로 하였을 때 각각 OD<sub>600</sub> 값 1.04±0.10, 1.06±0.21, 0.98±0.05 수준으로 유의적으로 가장 높았다. 또한 알코올 생성 수준도 유사한 경향을 나타내며, glucose와 mannose를 탄소원으로 하였을 때 각각 8.27±0.43%(v/v)와 8.23±1.14%(v/v)로 유의적으로 가장 높았다 (Fig. 70B).

(A)



(B)

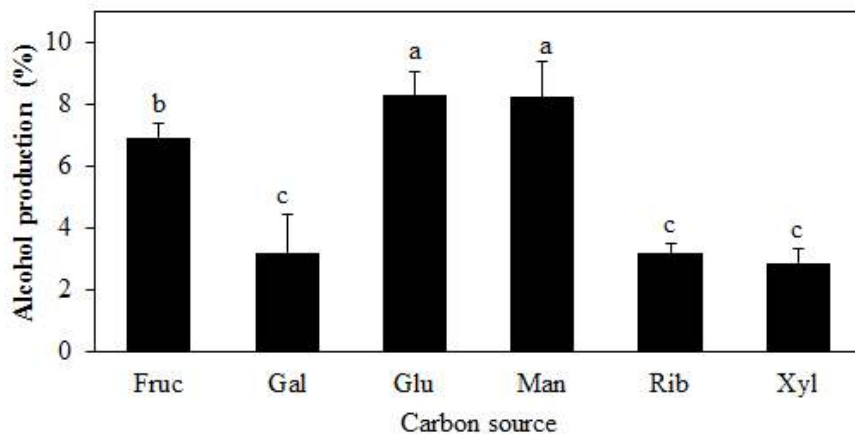
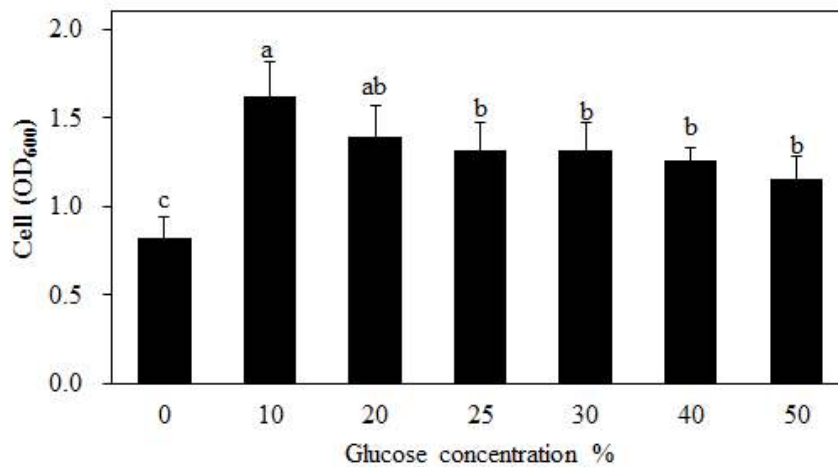


Fig. 70. Effects of carbon source on cell growth(A) and alcohol production(B) of *T. delbrueckii* JBCC 623.

(나) *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 발효에 있어서 glucose 농도의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성을 위하여 최적의 탄소원으로 선정된 glucose의 농도에 따른 영향을 살펴보고자 하였다. 즉, glucose의 농도를 0, 10, 20, 30, 40 또는 50%(w/v)의 비율로 첨가된 배양액에서 효모의 성장 정도와 알코올 생성량을 비교 분석한 결과, *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 균체 성장 정도는 Fig. 71(A)와 같이 10%의 glucose 농도에서 OD<sub>600</sub> 값 1.62±0.28 수준으로 유의적으로 가장 높았다. 더욱이 50%의 glucose 농도에도 OD<sub>600</sub> 값 1.39±0.46 수준을 나타냈는데, 이는 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주가 높은 당 농도 하에서도 잘 성장할 수 있음을 알려주는 결과이다. 또한 Fig. 71(B)와 같이 glucose를 다양한 농도로 조정하였을 때 알코올 생성량은 30%의 glucose 농도에서 9.91±1.88%(v/v)로 유의적으로 가장 높았으며, 25%와 20%의 glucose 농도에서는 각각 8.03±0.27%와 8.03±1.12%의 수준을 나타냈다.

(A)



(B)

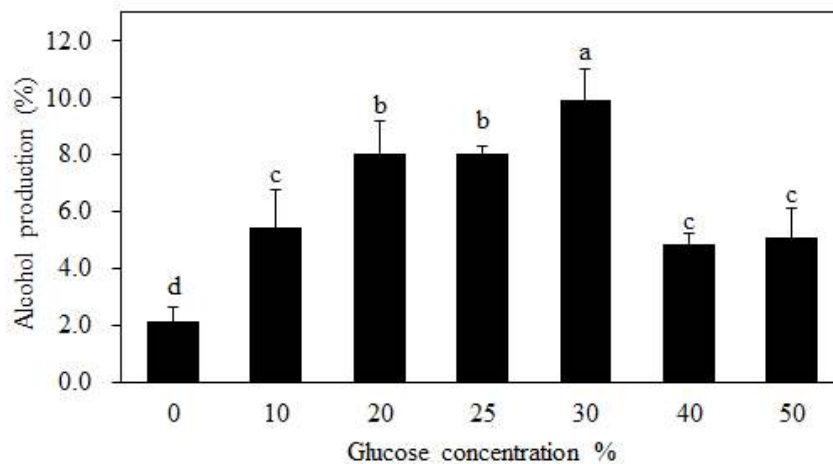


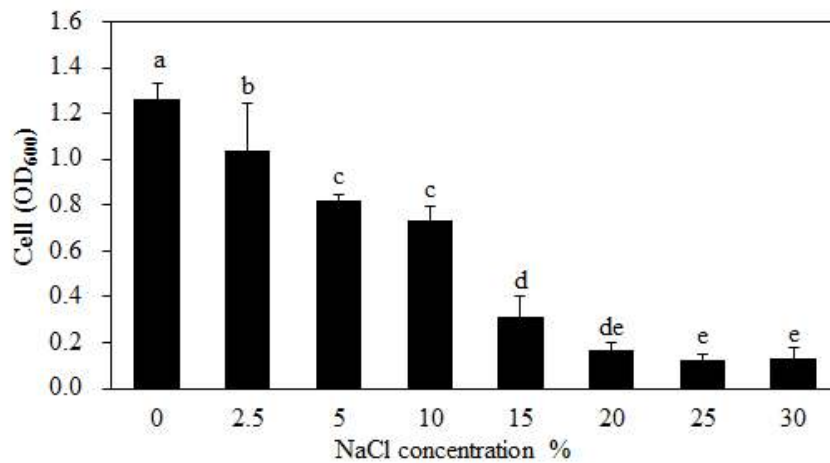
Fig. 71. Effects of glucose concentration on cell growth(A) and alcohol production(B) of *T. delbrueckii* JBCC 623.



(다) *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 발효에 있어서 salt 농도의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성에 있어서 salt의 농도에 대한 영향을 살펴보기 위하여 배양액의 NaCl 농도를 0, 2.5, 5.0, 10, 15, 20, 25 또는 30%(w/v)의 비율로 첨가하여 효모의 성장 정도와 알코올 생성량을 확인하였다. 그 결과, Fig. 72(A)와 같이 염을 첨가하지 않은 조건에서 OD<sub>600</sub> 값은 1.26±0.07으로 가장 높았으며, 10%의 NaCl 농도 하에서는 0.73±0.07로 측정되었다. 그러나 염의 농도가 증가함에 따라서 균체의 생육 수준은 감소하였으며, 특히 NaCl 15% 농도에서는 0.31±0.09, 30% 농도에서는 0.13±0.04로 측정되었다. 그러나 감소되는 균체 성장에도 불구하고 본 균주의 알코올생성량은 상대적으로 영향을 덜 받았다(Fig. 72B). 비록 염 농도의 증가에 따라 알코올 생성량도 감소하였으나, 염을 첨가하지 않은 조건에서 알코올 생성량은 11.91±0.19%(v/v) 수준인 반면 10%의 NaCl 농도 하에서도 9.21±2.44% 수준을 생성하였다. 또한 20% NaCl 조건에서는 6.27±1.46, 30%에서는 2.31±1.98의 수준을 나타냈다.

(A)



(B)

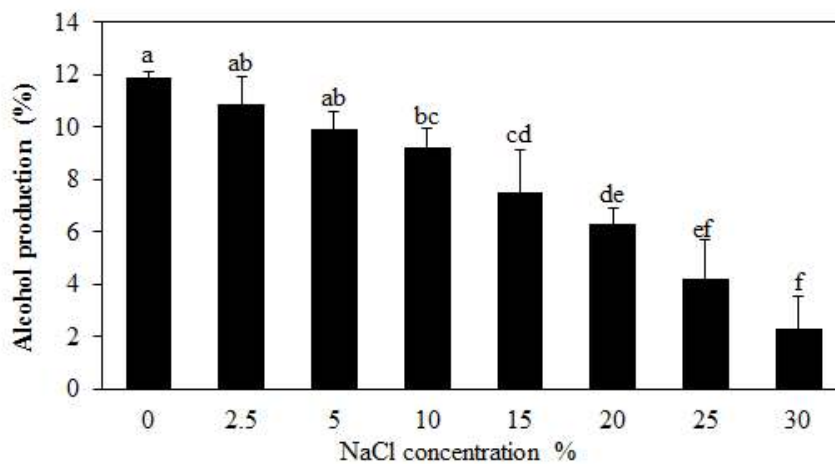
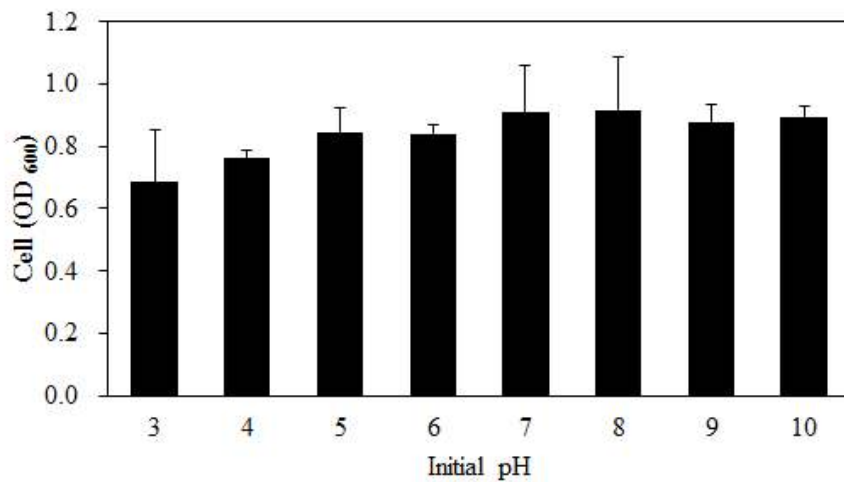


Fig. 72. Effects of salt concentration on cell growth(A) and alcohol production(B) of *T. delbrueckii* JBCC 623.

(라) *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 발효에 있어서 초기 pH의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성에 있어서 배양액의 초기 pH에 따른 영향을 살펴보기 위하여, 배양액의 초기 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10로 각각 조정 한 배양액에서 효모의 성장 정도와 알코올 생성량을 확인 하였다. 그 결과, Fig. 73(A)와 같이 pH 5.0-10.0까지의 범위에서 OD<sub>600</sub> 값은 최소 0.84±0.03에서 최대 0.92±0.17로 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주는 상대적으로 넓은 pH 범위에서 잘 생육할 수 있는 것으로 나타났다. 또한 pH 3.0에서도 OD<sub>600</sub> 값 0.68±0.17 수준을 보였다. 또한 초기 pH에 따른 알코올 생성량을 살펴본 결과(Fig. 73B), pH 5.0에서 9.56±1.03%로 유의적으로 가장 높았으며 pH 4.0에서도 6.42±0.52% 수준을 나타냈다. 반면 pH 3.0에서는 2.92±1.36%의 수준을 나타냈다.

(A)



(B)

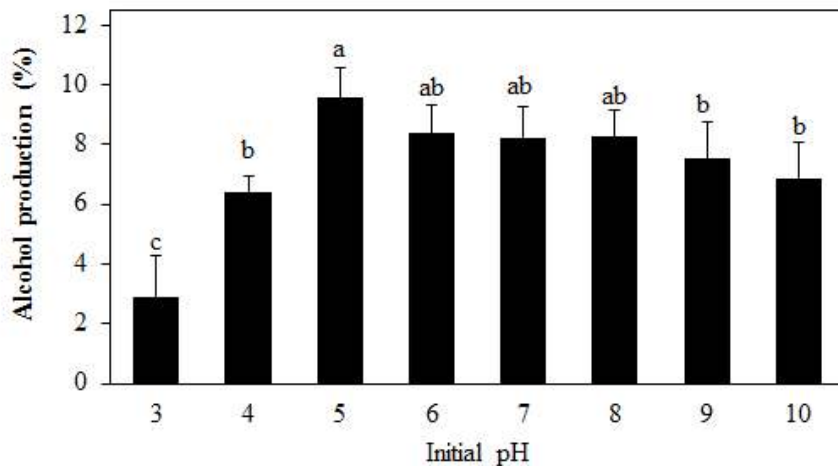
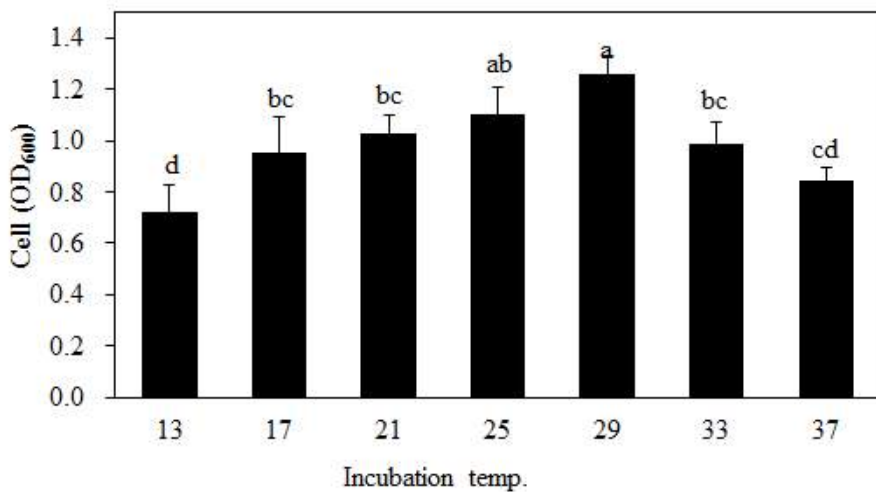


Fig. 73. Effects of initial pH on cell growth(A) and alcohol production(B) of *T. delbrueckii* JBCC 623.

(마) *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올발효에 있어서 배양 온도의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성에 있어서 배양 온도에 따른 영향을 살펴보기 위해, 13, 17, 21, 25, 29, 33 또는 37°C의 다른 온도에서 배양한 후 효모의 성장 정도와 알코올 생성량을 확인하였다. 그 결과, Fig. 74(A)와 같이 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 OD<sub>600</sub> 값은 29°C의 온도에서 1.26±0.07 수준으로 유의적으로 가장 높았다. 또한 발효 온도에 따른 알코올 생성량에 있어서, 25°C에서 12.24±1.91%으로 유의적으로 가장 높았으며 29°C에서는 11.91±0.19%의 알코올이 생성되었다(Fig. 74B). 반면 그 이상으로 온도가 높아졌을 경우 33°C에서 4.00±1.02%, 37°C에서 1.62±0.86%으로 생성량은 매우 감소되었으며, 13°C에서는 2.31±1.35% 수준을 보였다. 따라서 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성을 위해 20-30°C 수준의 온도에서 발효하는 것이 적합한 것으로 보인다.

(A)



(B)

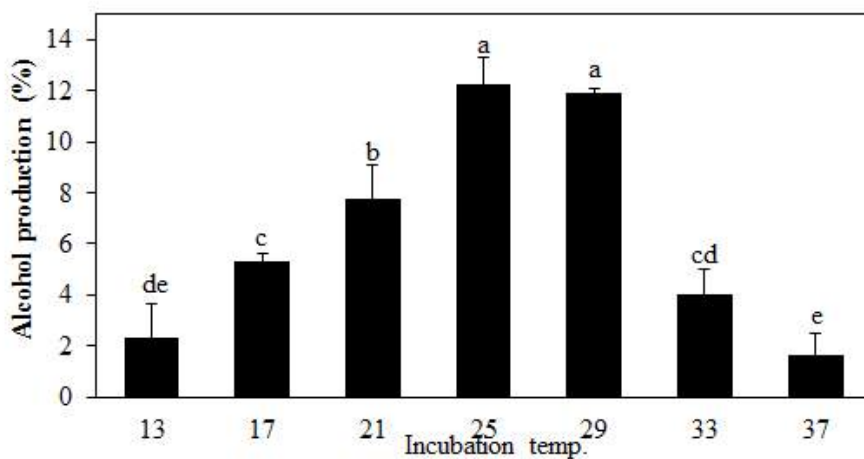
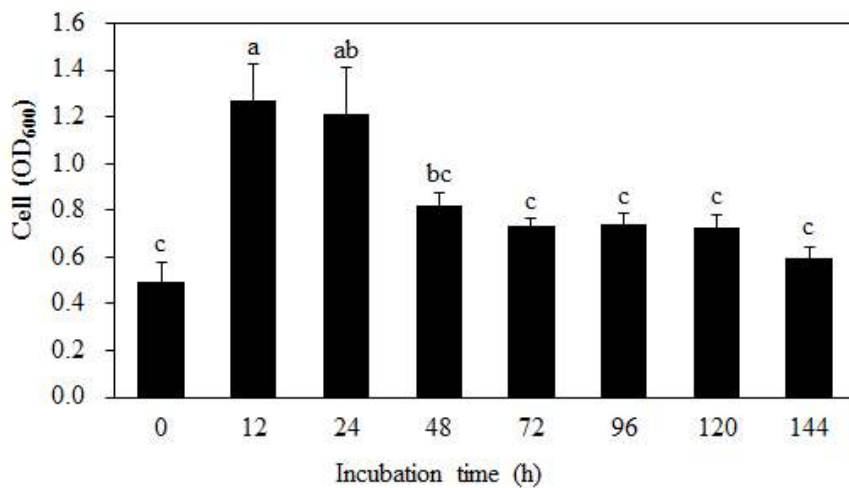


Fig. 74. Effects of culture temperature on cell growth(A) and alcohol production(B) of *T. delbrueckii* JBCC 623.

(바) *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 발효에 있어서 배양 시간의 영향

*T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 알코올 생성에 있어서 배양 시간에 따른 영향을 살펴보기 위해, 29°C의 고정된 온도에서 180 rpm으로 2일 동안 배양함으로써 균주를 성장시킨 후, 동일한 온도에서 0, 12, 24, 48, 72, 76, 120 또는 144시간 동안 정지 배양하여 효모의 성장 정도와 알코올 생성량을 비교하였다. 그 결과, Fig. 75(A)와 같이 OD<sub>600</sub> 값은 12-24시간 배양하였을 때 1.26±0.04에서 1.21±0.47 수준으로 유의적으로 가장 높았으며, 그 이후 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 시간에 따른 알코올 생성량은 Fig. 75(B)와 같이 72-96시간 배양하였을 때 11.05±1.53%에서 11.50±1.27%으로 유의적으로 가장 높았으며, 그 후 알코올 수준은 다시 감소되는 경향을 나타냈다.

(A)



(B)

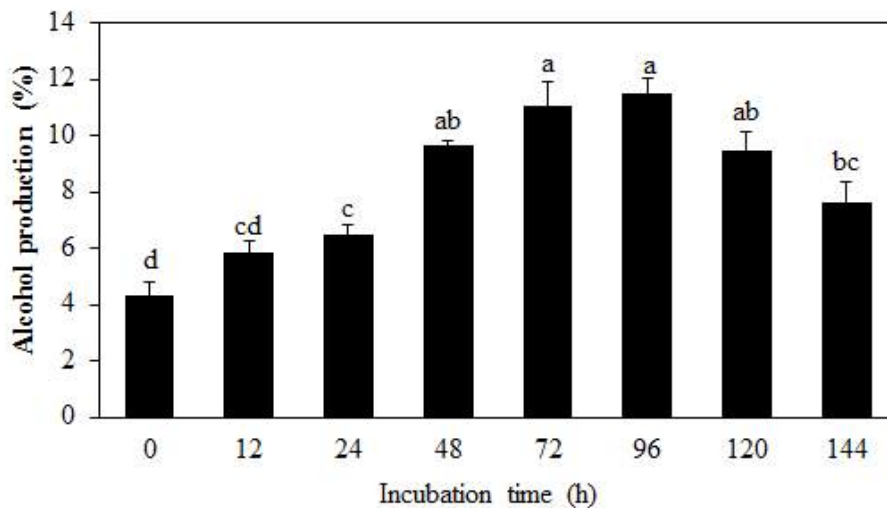


Fig. 75. Effects of culture time on cell growth(A) and alcohol production(B) of *T. delbrueckii* JBCC 623.

(2) *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 장류 배지 조건하에서 알코올 생성능 확인

(가) 메주 및 청국장 배지에서 *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 생성능

고 알코올 생성 효모로 선발된 *T. delbrueckii* JBCC 623 효모의 장류 적용 적합성을 시험하기 위해 먼저 메주 및 청국장 배지에서 알코올 생성능을 조사하였다. 메주 또는 청국장 분말을 5, 10, 15 또는 20%(w/v)의 농도로 함유한 각각의 배지에 25%(w/v)의 glucose를 첨가하여 발효 한 결과는 Fig. 76과 같다. 결과적으로 25%로 당농도를 고정시킨 상태에서 *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 생성 수준은 메주 또는 청국장 분말의 첨가율이 증가됨에 따라 증가하였다. 특히 20% 메주 배양액에서 JBCC 623 효모는  $6.62 \pm 1.14\%$ 의 알코올을 생성하였고, 20% 청국장 배양액에서는  $7.61 \pm 0.59\%$ 를 생성하였다.

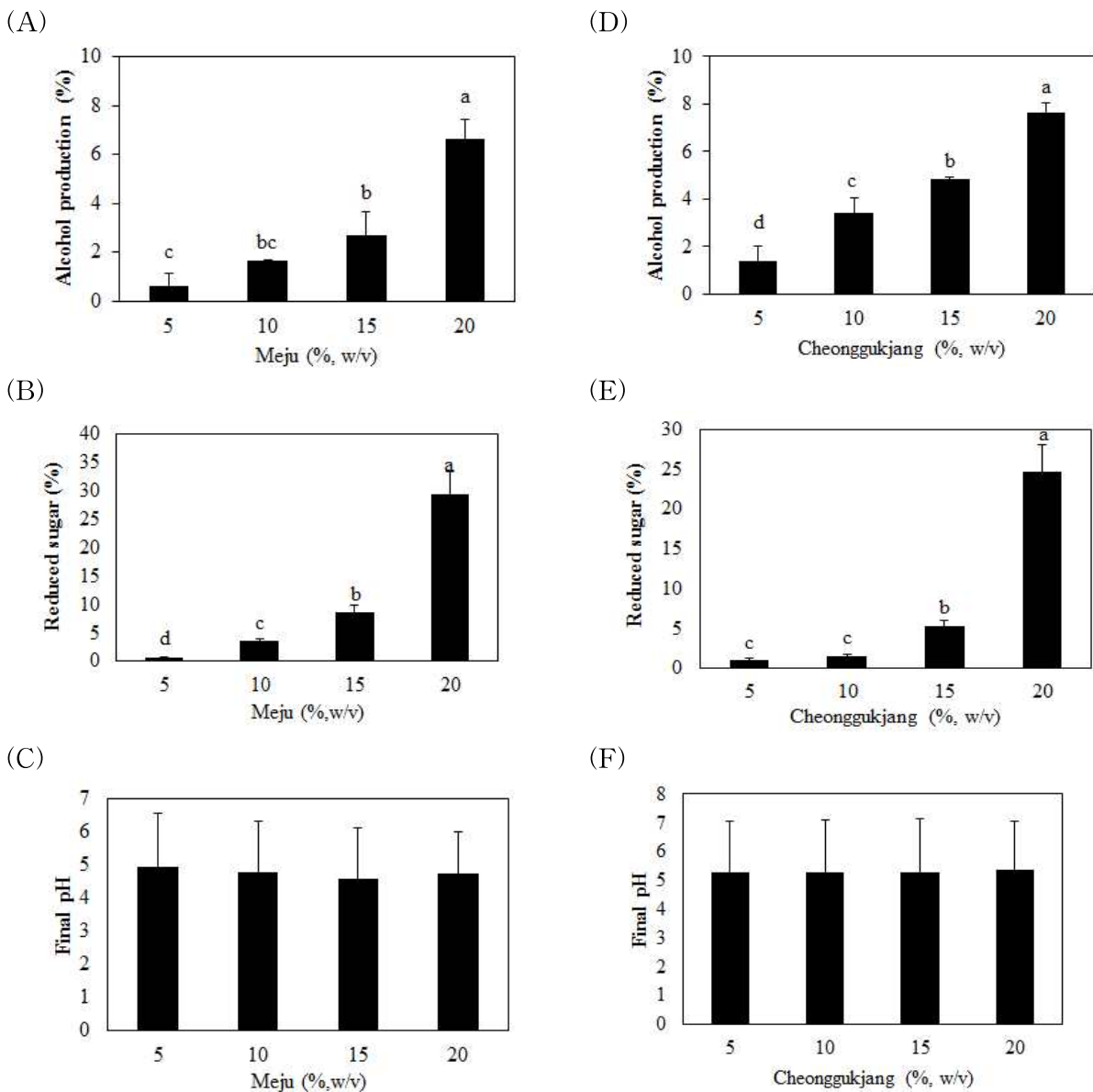


Fig. 76. The contents of produced alcohol(A, D) and final reducing sugar(B, E) and final pH(C, F) by inoculums of *T. delbrueckii* JBCC 623 strain in 5, 10, 15 and 20%(w/v) meju and chunggukjang medium added 25%(w/v) of glucose.

(나) 다른 코지를 사용한 발효 조건하에서 *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올 생성능

고 알코올 생성 효모인 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주의 장류 적용 적합성을 시험하기 위하여 Fig. 50과 같이 콩, 찹쌀 또는 멍쌀로 각각 제조된 koji를 사용하여 코지 발효를 수행한 후 효모의 생균수, 최종 pH, 총산도, 환원당량 및 알코올 생성량을 측정하였다(Table 36). 그 결과, JBCC 623 균주를 접종하지 않은 모든 처리구에서는 YM 고체 배지상에서 효모 균주가 검출되지 않은 반면 JBCC 623 균주를 2%(v/v) 또는 5% 접종한 모든 처리구에서 효모가 검출되었으나 균주의 접종 비율은 효모의 생균수에 큰 영향을 미치지 않았다. 특히 어느정도 당 함량을 보이던 멍쌀과 찹쌀 코지 발효에 있어서는 당의 첨가가 효모의 생육에 유의적이지는 않았으나 당 함량이 상대적으로 낮았던 콩 코지 발효에 있어서는 당을 첨가했을 때 효모의 생균수가 증가하였다. 그러나 환원당량을 제외하고는 최종 pH, 총산도 및 알코올 생성량은 당 첨가에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 결과적으로 *T. delbrueckii* JBCC 623의 알코올생성량은 찹쌀 코지에 당을 첨가하지 않고 2% 또는 5% 접종한 처리구에서 4.9±1.7%와 4.6±1.0% 수준으로 가장 높은 결과를 나타냈으나, 찹쌀과 멍쌀의 경우 관능적으로 막걸리 발효취를 형성하였다(data not shown). 반면 콩 코지 발효에 있어서 JBCC 623 균주를 접종하지 않은 처리구와 비교하여 처리한 군에서 알코올 생성량이 최대 3.2배 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

Table 36. Yeast count, final pH, total acidity and the contents of reducing sugar and alcohol after koji fermentation with a *T. delbrueckii* JBCC 623 strain.

	Yeast (log cfu/mL)	Final pH	Total acidity(%)	Alcohol production(%)	Reducing sugar(%)
(A) Koji with soybean					
Soy-N-0	ND	6.0±0.1	3.0±0.1	0.6±0.2	1.3±0.0
Soy-N-2	2.7±0.3	5.3±0.0	3.2±0.5	1.5±0.5	2.9±0.0
Soy-N-5	4.0±0.0	5.5±0.0	4.0±0.6	1.6±0.2	2.8±0.0
Soy-G-0	ND	5.7±0.0	2.8±0.0	0.5±0.0	13.0±0.0
Soy-G-2	5.5±0.1	5.3±0.1	4.2±0.2	1.4±0.3	13.2±0.0
Soy-G-5	6.6±0.8	5.4±0.1	4.2±0.4	1.4±0.4	12.9±0.0
(B) Koji with glutinous rice					
Glu-N-0	ND	4.7±0.0	1.2±0.0	1.5±0.5	9.0±0.0
Glu-N-2	6.2±0.5	4.3±0.1	1.2±0.3	4.9±1.7	5.1±0.0
Glu-N-5	6.1±0.3	4.0±0.1	1.4±0.2	4.6±1.0	5.1±0.0
Glu-G-0	ND	4.6±0.2	1.1±0.0	1.3±0.4	7.1±0.0
Glu-G-2	5.5±0.5	4.2±0.1	1.2±0.1	2.6±0.4	12.0±0.0
Glu-G-5	5.3±0.7	4.2±0.0	1.1±0.0	2.4±0.7	11.7±0.0
(C) Koji with nonglutinous rice					
Nong-N-0	ND	4.5±0.3	1.1±0.1	1.9±0.2	9.2±0.0
Nong-N-2	5.3±0.1	4.4±0.0	1.0±0.0	2.6±1.0	5.0±0.0
Nong-N-5	5.8±0.2	4.4±0.0	1.1±0.0	3.9±0.7	5.0±0.0
Nong-G-0	ND	4.1±0.0	1.1±0.0	1.6±0.3	7.5±0.0
Nong-G-2	5.2±0.3	4.2±0.1	1.0±0.0	1.5±0.6	12.4±0.0
Nong-G-5	5.5±0.2	4.2±0.1	1.0±0.1	1.9±0.7	11.8±0.0

### (3) *T. delbrueckii* JBCC 623 유래 알코올 생성 관련 유전자의 클로닝과 염기서열 결정

#### (가) *T. delbrueckii* JBCC 623 유래 ADH1 유전자 증폭을 위한 프라이머 제작

alcohol dehydrogenase(ADH; EC 1.1.1.1)는 알코올을 생성하고 소비하는 것을 촉매하는 특이 효소로 세포질(cytoplasm) 또는 미토콘드리아(mitochondria)에 위치한다. 현재까지 *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia stipitis*, *Candida utilis*와 같은 효모로부터의 ADH 효소의 유전자와 단백질은 서열분석 및 특징화되었다(Park et al., 2006). 그러나 *Torulaspora delbrueckii* 효모 균주로부터의 ADH 효소에 대한 연구는 전무하다. 따라서, 본 연구로부터 장류 유래 고 알코올 생성 효모로 분리된 *T. delbrueckii* JBCC 623의 ADH1 유전자를 분리하고 서열을 분석하고자 하였다. 먼저, *T. delbrueckii* JBCC 623으로부터 alcohol dehydrogenase ADH1을 encoding하는 유전자를 증폭하기 위해 *T. delbrueckii* CBS 1146의 genomic database(Project data type: RefSeq Genome sequencing)로부터 3가지의 hypothetical protein TDEL0G02530, TDEL0C04550 및 TDEL0B03570의 유전자(각각 GenBank accession no. XM\_003682783.1, XM\_003680507.1 및 XM\_003679649.1)과 *S. cerevisiae* S288c의 alcohol dehydrogenase ADH 1 유전자 서열(GenBank accession no. NM\_001183340.1)을 후보로 선택하였다. 최종적으로 *S. cerevisiae* S288c의 alcohol dehydrogenase ADH1와 *T. delbrueckii* CBS 1146의 hypothetical protein TDEL0D05050 유전자를 primer 설계를 위해 사용하였다. 그 결과, 제작된 ADH1-F와 ADH1-R primer를 사용하여 수행된 PCR 반응을 통해 유의적인 밴드를 성공적으로 증폭함으로써, 약 1,100 bp의 유전자 단편을 획득하였다(Fig. 77).

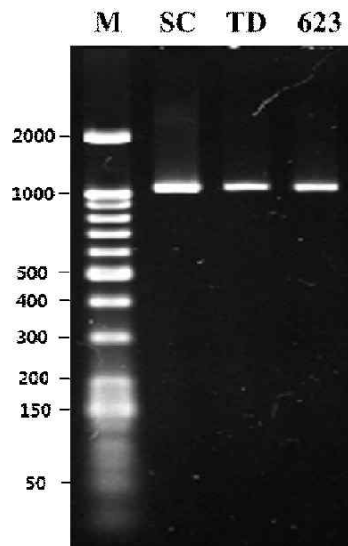


Fig. 77. Profiles of the DNA fragment of alcohol dehydrogenase amplified by PCR in agarose gel electrophoresis. M, 25/100 bp mixed DNA ladder(Bioneer); SC, *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30008 as a type strain; TD, *Torulaspora delbrueckii* ATCC 10662 as a type strain; 623, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623 isolated in this study.

#### (나) *T. delbrueckii* JBCC 623 유래 ADH1 유전자 및 단백질 서열 결정

PCR 반응을 통해 상기에 획득된 유전자 단편을 가지고 TA cloning을 통한 유전자 서열분석 결과 *T. delbrueckii* JBCC 623 유래 ADH1 유전자는 1,047 bp의 길이로 확인되었다(Fig. 78). 즉, TdelADH1 유전자는 348 아미노산을 encoding하는 하나의 open reading frame(ORF)로써 예측된 분자량(predicted molecular mass)은 36.85 kDa, 등전점(isoelectric point)은 6.25으로 결정되었다. 한편, 표준균주로 사용된 *T. delbrueckii* ATCC 10662 유래 ADH1 유전자는 1,047 bp로 348 아미노산을 encoding하는 하나의 open reading frame(ORF)로써 이 예측된 분자량은 36.93 kDa, 등전점은 6.24로 나타났다. 또 다른 표준균주 *S. cerevisiae* KACC 30008 유래 ADH1 유전자는 1,047 bp로 348 아미노산을 encoding하는 하나의 open reading frame(ORF)로써 예측된 분자량은 36.85 kDa, 등전점은 6.21로 확인되었다. 더욱이, deduced amino acids sequence에 대한 BLAST 검색 결과, *T. delbrueckii* JBCC 623의 ADH1는 *T. delbrueckii* CBS 1146로부터의 hypothetical protein TDEL0D05050 유전자 서열(GenBank accession no. XM\_003681252)과 99%로 가장 높은 유사성을 보이는 것으로 나타났다. 반면 *S. cerevisiae* S288c의 alcohol dehydrogenase ADH1 유전자 서열(GenBank accession no. NM\_001183340.1)과는 84%, *Saccharomyces pastorianus*의 alcohol dehydrogenase 2(ADH2) 유전자 서열(GenBank accession no. AY217001.1)과는 82%의 유사성을 보였다. 더해서, 효모 유래 ADH1의 metal binding region과 cofactor binding domain의 GXGXXG fingerprint 패턴을 고려해볼 때(Park et al., 2006), deduced amino acids 서열 구조분석 비교는 *T. delbrueckii* JBCC 623의 ADH1이 하나의 zinc-binding consensus(GHEGAGVVVALGSNVK, Box I)와 하나의 NAD(P)<sup>+</sup> binding motif(GACGGLG, Box II)를 가진다는 것을 알 수 있었다(Fig. 78). 일반적으로 NAD(P)<sup>+</sup>를 요구하는 ADH superfamily는 (1) zinc-dependent long chain ADHs(약 350 residues/subunit), (2) zinc-independent short chain ADHs 및 (3) iron-activated ADHs의 3가지의 그룹으로 크게 분류될 수 있다(Park et al., 2006). 본 연구에서의 염기 및 아미노산 서열 분석 결과는 *T. delbrueckii* JBCC 623 ADH1는 아마도 아연 이온과 NAD(P)<sup>+</sup>에 의존적인 ADH superfamily Group 1에 속할 것이라는 것을 제안한다. NCBI database로부터 가장 관련 있는 서열과 함께한 *T. delbrueckii* JBCC 623 ADH1의 전반적인 348 아미노산의 multiple alignment와 그 phylogenetic tree는 Fig. 79에 나타났다.



```

TD ATCC 10662 (ADH1) -----ATGTCATATCCAGAAACTCAAAGAGTGTATCTTTTACGAGAACACCGTACTTTGGAATACAAAGATATCCAGTTCCAAAGCCAGCTC
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) ATGTCGCTCCAACTATCCAGAAACCCAAAAGGTGTATCTTTTACGAGAACACCGTACTTTGGAATACAAAGATATCCAGTTCCAAAGCCAGCTC
TD JBCC-623 (ADH1) -----ATGTCATATCCAGAAACTCAAAGAGTGTATCTTTTACGAGAACACCGTACTTTGGAATACAAAGATATCCAGTTCCAAAGCCAGCTC
SC (ADH1) -----ATGTCATATCCAGAAACTCAAAGAGTGTATCTTTTACGAGAACACCGTAAAGTTGGAATACAAAGATATCCAGTTCCAAAGCCAGCTC
*****
TD ATCC 10662 (ADH1) CAAATGAGCTTTTGATTAACGTCAGTACTCTGGTGTGTTGTCACACCGATTTCACACGCTGGAAGGTTGACTGGCCATTGCCAGTTAAGCTACCTTTAGT
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) CAAATGAGCTTTTGATTAACGTCAGTACTCTGGTGTGTTGTCACACCGATTTCACACGCTGGAAGGTTGACTGGCCATTGCCAGTTAAGCTACCTTTAGT
TD JBCC-623 (ADH1) CAAATGAGCTTTTGATTAACGTCAGTACTCTGGTGTGTTGTCACACCGATTTCACACGCTGGAAGGTTGACTGGCCATTGCCAGTTAAGCTACCTTTAGT
SC (ADH1) CAA-CGAATTGTTGATCAACGTTAAATACTCTGGTGTGTTGTCACACTGACTTCACGCTTGGCAGGTTGACTGGCCATTGCCAGTTAAGCTACCTTTAGT
*** ** * *****
TD ATCC 10662 (ADH1) CGGTGGTCACGAAGTGTCTGGTGTGTTGTCGCTCTAGGTTCTAACGTTAAGAAGTGGAGGTTGACTACGCCGGTATCAAATGGTTGAACGGTTGT
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) CGGTGGTCACGAAGTGTCTGGTGTGTTGTCGCTCTAGGTTCTAACGTTAAGAAGTGGAGGTTGACTACGCCGGTATCAAATGGTTGAACGGTTGT
TD JBCC-623 (ADH1) CGGTGGTCACGAAGTGTCTGGTGTGTTGTCGCTCTAGGTTCTAACGTTAAGAAGTGGAGGTTGACTACGCCGGTATCAAATGGTTGAACGGTTGT
SC (ADH1) CGGTGGTCACGAAGTGTCCGCTGCTGCTGATGCGCATGGTGAAGGTTAAGGCTGGAAGATCGGTGACTACGCCGGTATCAAATGGTTGAACGGTTGT
*****
TD ATCC 10662 (ADH1) TGTATGCTTTGTAAGATTGTAATTGGGTAAACGAATCCAACCTGCCACAAGTACTGCTGCTGTTACACCCAGCAGCGTTCTTTCCAAACAATACGCTA
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) TGTATGCTTTGTAAGATTGTAATTGGGTAAACGAATCCAACCTGCCACAAGTACTGCTGCTGTTACACCCAGCAGCGTTCTTTCCAAACAATACGCTA
TD JBCC-623 (ADH1) TGTATGCTTTGTAAGATTGTAATTGGGTAAACGAATCCAACCTGCCACAAGTACTGCTGCTGTTACACCCAGCAGCGTTCTTTCCAAACAATACGCTA
SC (ADH1) TGTATGCTTTGTAAGATTGTAATTGGGTAAACGAATCCAACCTGCCACAAGTACTGCTGCTGTTACACCCAGCAGCGTTCTTTCCAAACAATACGCTA
*****
TD ATCC 10662 (ADH1) CCACATGATGCTGTTCAAGCTGCCAAGATCTCCAGGTACCGATTGGCTGAAGTTGCTCCAGTTCTATGCTGGTCTCACTGTTTACAAGGCTTTGAA
TD CBS 114 (TDEL0D05050) CCACATGATGCTGTTCAAGCTGCCAAGATCTCCAGGTACCGATTGGCTGAAGTTGCTCCAGTTCTATGCTGGTCTCACTGTTTACAAGGCTTTGAA
TD JBCC-623 (ADH1) CCAGCTGATGCTGTTCAAGCTGCCAAGATCTCCAGGTACCGATTGGCTGAAGTTGCTCCAGTTCTATGCTGGTATCACTGTTTACAAGGCTTTGAA
SC (ADH1) CCAGCTGACGCTGTTCAAGCCGCTCACATTCCTCAAGSTACCGACTTGGCCCAAGTCCGCCCACTCTGTTGCTGGTATCACCGCTACAAGGCTTTGAA
*****
TD ATCC 10662 (ADH1) GTCCTGCTGAGTTGGAAGCCGGTCAATGGTGTGCCATTTCCGGTCTTGTGGTGTCTAGGTTCTCTAGCTGTCGAATACGCTAAGGCTATGGGTTACAGA
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) GTCCTGCTGAGTTGGAAGCCGGTCAATGGTGTGCCATTTCCGGTCTTGTGGTGTCTAGGTTCTCTAGCTGTCGAATACGCTAAGGCTATGGGTTACAGA
TD JBCC-623 (ADH1) GTCCTGCTGAGTTGGAAGCCGGTCAATGGTGTGCCATTTCCGGTCTTGTGGTGTCTAGGTTCTCTAGCTGTCGAATACGCTAAGGCTATGGGTTACAGA
SC (ADH1) GTCCTGCTGAGTTGATGGCCGGTCACTGGGTTACTGCTATCCGGTGTCTAGGTTCTTGGCTGTTCAATACGCCAAGGCTATGGGTTACAGA
*****
TD ATCC 10662 (ADH1) GTCITGGGTATTGACGGTGGTGACGAAAAGGCTAAGATGTTCAAGGAATGGGTTGGTGAATACTTCATTGATTTACCAAGTGTAAAGACATCATTGGCG
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) GTCITGGGTATTGACGGTGGTGACGAAAAGGCTAAGATGTTCAAGGAATGGGTTGGTGAATACTTCATTGATTTACCAAGTGTAAAGACATCATTGGCG
TD JBCC-623 (ADH1) GTCITGGGTATTGACGGTGGTGACGAAAAGGCTAAGATGTTCAAGGAATGGGTTGGTGAATACTTCATTGATTTACCAAGTGTAAAGACATCATTGGCG
SC (ADH1) GTCITGGGTATTGACGGTGGTGAAGSTAAAGGAAGATTTATCAGATCCATCGGTGGTGAAGTCTTCATTGACTTCACTAAGGAAAAGGACATTTGTCGGTG
*****
TD ATCC 10662 (ADH1) AAGTCGTCAGGCTACCAACGGTGGTCCCGGTTGTCATCAACGTCCTGTCGTCGGAAGTCCCACTCTCTGCTCCACTCGTTACGCCAGAGCCAAACGG
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) AAGTCGTCAGGCTACCAACGGTGGTCCCGGTTGTCATCAACGTCCTGTCGTCGGAAGTCCCACTCTCTGCTCCACTCGTTACGCCAGAGCCAAACGG
TD JBCC-623 (ADH1) AAGTCGTCAGGCTACCAACGGTGGTCCCGGTTGTCATCAACGTCCTGTCGTCGGAAGTCCCACTCTCTGCTCCACTCGTTACGCCAGAGCCAAACGG
SC (ADH1) CTGTTCTAAAGCCACTGACGGTGGTCTACGGTGTCTATCAACGTTCCGTTCCGGAAGCCGCTATTGAAGCTTCAACAGATACGTTAGAGCTAACGG
** * *****
TD ATCC 10662 (ADH1) TACCCTGCTGTTGGTCTGCTTACCAGCCGGTCTACTGTAAGTCCGAAGTCTTCAACCAGTCTGCAAGTCCATCAAATCGTGGTCTTACGTCGGT
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) TACCCTGCTGTTGGTCTGCTTACCAGCCGGTCTACTGTAAGTCCGAAGTCTTCAACCAGTCTGCAAGTCCATCAAATCGTGGTCTTACGTCGGT
TD JBCC-623 (ADH1) TACCCTGCTGTTGGTCTGCTTACCAGCCGGTCTACTGTAAGTCCGAAGTCTTCAACCAGTCTGCAAGTCCATCAAATCGTGGTCTTACGTCGGT
SC (ADH1) TACCACCGTTTTGGTCTGGTATGCCAGCTGGTCCAAAGTGTGTTCTGATGCTTCAACCAAGTCTGCAAGTCCATCTATATTGGTCTTACGTCGGT
**** * *****
TD ATCC 10662 (ADH1) AACAGAGCTGACACCAGAGAAGCTTTGGACTTCTTCAACAGAGGTTTGGTCAAGGCCCAATCAAGGTTGTCGGTCTAACCCTTTGGCTGAAATCTATG
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) AACAGAGCTGACACCAGAGAAGCTTTGGACTTCTTCAACAGAGGTTTGGTCAAGGCCCAATCAAGGTTGTCGGTCTAACCCTTTGGCTGAAATCTATG
TD JBCC-623 (ADH1) AACAGAGCTGACACCAGAGAAGCTTTGGACTTCTTCAACAGAGGTTTGGTCAAGGCCCAATCAAGGTTGTCGGTCTAACCCTTTGGCTGAAATCTATG
SC (ADH1) AACAGAGCTGACACCAGAGAAGCTTTGGACTTCTTCAACAGAGGTTTGGTCAAGGTTGTCGGTCTAACCCTTTGGCTGAAATCTATG
*****
TD ATCC 10662 (ADH1) ATAAGATGATCAAGGGCCAAATCTTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCAAATAA
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) ATAAGATGATCAAGGGCCAAATCTTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCAAATAA
TD JBCC-623 (ADH1) ATAAGATGATCAAGGGCCAAATCTTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCAAATAA
SC (ADH1) AAAAGATGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCAAATAA
* *****

```

Fig. 78. Nucleotide sequences of alcohol dehydrogenase ADH1 from *Torulaspora delbrueckii* JBCC-623, alcohol dehydrogenase ADH 1 of *Saccharomyces cerevisiae* S288c(GenBank accession no. NM\_001183340.1), alcohol dehydrogenase ADH 1 of *Torulaspora delbrueckii* ATCC 10662, hypothetical protein TDEL0D05050 of *Torulaspora delbrueckii* CBS 1146(GenBank accession XM\_003681252.1).

(A)

```

TD ATCC 10662 (ADH1)      ---MSIPETQKGVI FYENNGTLEYK DIPVVKPAPNEL LINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLPVKLPVLSHEGAGV
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) MSAPTIPETQKGVI FYENNGTLEYK DIPVVKPAPNEL LINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLPVKLPVLSHEGAGV
TD JBCC-623 (ADH1)      ---MSIPETQKGVI FYENNGTLEYK DIPVVKPAPNEL LINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLPVKLPVLSHEGAGV
SC (ADH1)                :*****:*.*****.*****:*****

TD ATCC 10662 (ADH1)      VVALGSNVKNWKVGDYAGIKWLNCCMSCECELGNESNCPQADLSGYTHDGSFQQYATDAVQAAKISPGTDLA
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) VVALGSNVKNWKVGDYAGIKWLNCCMSCECELGNESNCPQADLSGYTHDGSFQQYATDAVQAAKISPGTDLA
TD JBCC-623 (ADH1)      VVALGSNVKNWKVGDYAGIKWLNCCMSCECELGNESNCPQADLSGYTHDGSFQQYATDAVQAAKISPGTDLA
SC (ADH1)                VVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNCSMACEYCELGNESNCPHADLSGYTHDGSFQQYATDAVQAAPQGTDLA
                          *..:*.***.***:*****.***:*** *****:*****:*****:*. *****

TD ATCC 10662 (ADH1)      EVAPVLCAGLTVYKALKSAELEAGQWVAISGACGGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGDEKAKMFKELGGGEYFIDF
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) EVAPVLCAGLTVYKALKSAELEAGQWVAISGACGGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGDEKAKMFKELGGGEYFIDF
TD JBCC-623 (ADH1)      EVAPVLCAGLTVYKALKSAELEAGQWVAISGACGGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGDEKAKMFKELGGGEYFIDF
SC (ADH1)                QVAPILCAGITVYKALKSANLMAGHWVAISGAAGGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGEGKEELFRSIGGEVFIDF
                          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:* * *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* * *:*:*:*:* * *

TD ATCC 10662 (ADH1)      TKCKDII GEVVKATNGGAHGVINVSVEAAISASTRYARANGTVVLVGLPAGAYCKSEVFNQVVKSIKIVGSYVG
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) TKCKDII GEVVKATNGGAHGVINVSVEAAISASTRYARANGTVVLVGLPAGAYCKSEVFNQVVKSIKIVGSYVG
TD JBCC-623 (ADH1)      TKCKDII GEVVKATNGGAHGVINVSVEAAISASTRYARANGTVVLVGLPAGAYCKSEVFNQVVKSIKIVGSYVG
SC (ADH1)                TKEKDIVGAVLKATDGGAGHGVINVSVEAAIEASTRYVRANGTTVLVGM PAGAKCCSDVFNQVVKSIIVGSYVG
                          ** *:*:* *:*:*:*****:*****.*****.*****.***** * *:*:*:*:*:*:*:*

TD ATCC 10662 (ADH1)      NRADTREALDFFNRGLVKAPIKVVGLSTLPEIYDKMIKQIFGRYVVDTSK
TD CBS 1146 (TDEL0D05050) NRADTREALDFFNRGLVKAPIKVVGLSTLPEIYDKMIKQIFGRYVVDTSK
TD JBCC-623 (ADH1)      NRADTREALDFFNRGLVKAPIKVVGLSTLPEIYDKMIKQIFGRYVVDTSK
SC (ADH1)                NRADTREALDFFNRGLVKAPIKVVGLSTLPEIYDKMIKQIFGRYVVDTSK
                          ***** *****:*****:*****:*****.***** *

```

(B)

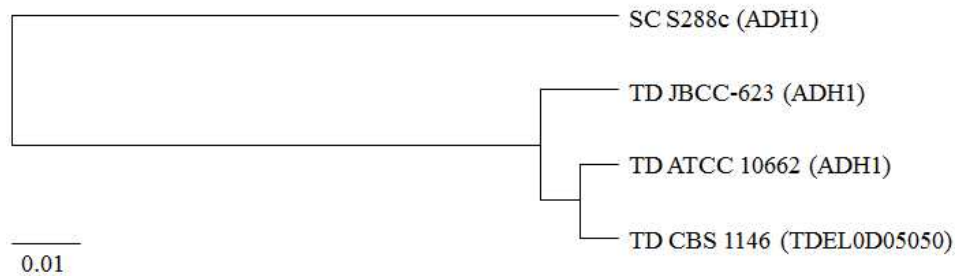


Fig. 79. Deduced amino acid sequence alignment(A) and phylogenetic tree(B) of alcohol dehydrogenase ADH1 from *Torulaspora delbrueckii* JBCC-623, alcohol dehydrogenase ADH 1 of *Saccharomyces cerevisiae* S288c, alcohol dehydrogenase ADH 1 of *Torulaspora delbrueckii* ATCC 10662, hypothetical protein TDEL0D05050 of *Torulaspora delbrueckii* CBS 1146. Box I, zinc-binding consensus; Box II, NAD(P)<sup>+</sup>-binding moiety.

## 라. 장류 유래 효모 균주별 특성 비교분석 및 장류 발효 적합성 평가

상기에 수행된 전통 장류의 발효기간 별 효모 균집분석과 알코올 및 향미 균주 스크리닝 결과를 바탕으로 다른 9 종의 대표 균주 No. 49, 429, 541, 623, 841, 848, 1138, 1148, 1186를 선발하였으며, 또한 기존에 장류에서 대표적인 향미 효모로 알려진 *Candida versatilis*의 경우 본 연구에서도 PCR-DGGE 방법을 통하여 검출되었으나, 배양법에 의하여 분리되지 않아 제1협동기관으로부터 *Candida versatilis* KCCM 11312 균주를 분양받아 사용하였다. 총 10가지 종의 장류 관련 효모 균주를 대상으로 각각의 효모 균주의 분자생물학적, 형태학적 및 생리학적 특성을 살펴보고 최종적으로 장류 발효 적합성 평가를 수행함으로써, 장류 유래 효모 균주별의 특성을 이해하고 장류에 적용하기 위한 정보를 제공하고자 하였다.

### (1) 장류 유래 효모 균주 10종의 특성 분석

#### (가) 장류 유래 효모 균주 10종의 분자생물학적 동정을 통한 계통수

universal primer인 NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')과 NL4(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')를 사용한 전통장류 유래 효모 10 균주의 26S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 통한 계통도를 작성하였다. 이때 염기서열분석은 ABI PRISM 3730 DNA Analyzer로 결정하였고, 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)에 의해 GenBank database들과 서열을 비교하였으며 Phylogenetic tree는 CLUSTALW program을 사용하여 균주간의 상동성을 NJ법(Neighbor-Joining)으로 나타내었다. 그 결과, *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49, *Cryptococcus albidus* JBCC 429, *Debaryomyces hansenii* JBCC 541, *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623, *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841, *Pichia guilliermondii* JBCC 848, *Rhodotula mucilaginosa* JBCC 1138, *Candida parapsilosis* JBCC 1146, *Pichia farinosa* JBCC 1186 및 *Candida versatilis* KCCM 11312 균주에 대하여 작성된 계통수는 Fig. 80과 같다.

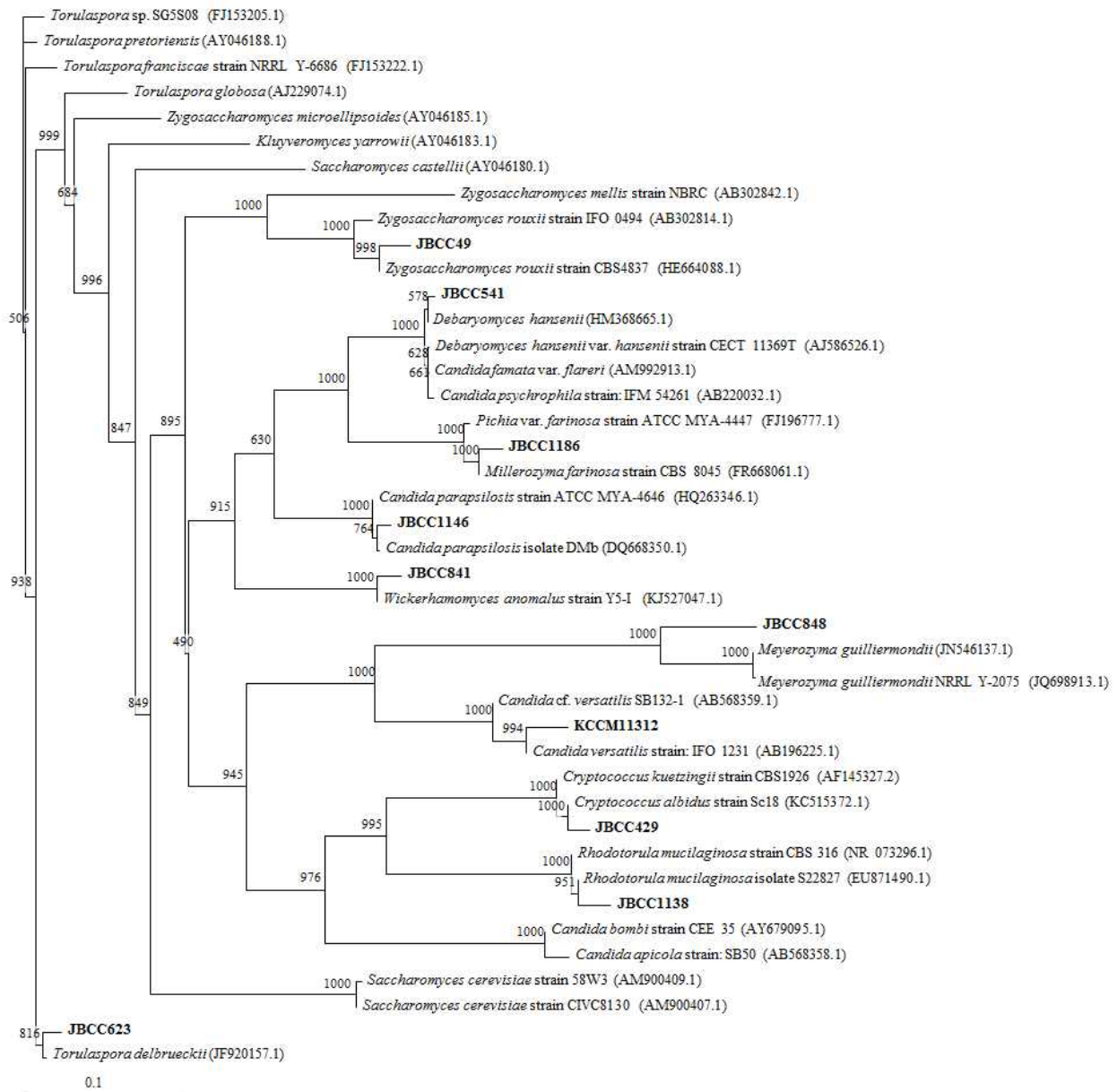


Fig. 80. Phylogenetic tree of ten different yeast strains related to the fermentation of traditional soy-sauce. JBCC49, *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49; JBCC429, *Cryptococcus albidus* JBCC 429; JBCC541, *Debaryomyces hansenii* JBCC 541; JBCC623, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623; JBCC841, *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841; JBCC848, *Pichia guilliermondii* JBCC 848; JBCC1138, *Rhodotorula mucilaginosa* JBCC 1138; JBCC1146, *Candida parapsilosis* JBCC 1146; JBCC1186, *Pichia farinosa* JBCC 1186; and KCCM11312, *Candida versatilis* KCCM 11312.

#### (나) ITS1, ITS4지역을 포함한 5.8s rRNA 제한효소 처리에 따른 RFLP 분석

PCR 기법은 균주의 빠른 동정과 관련하여 아주 유용한 방법 중 하나로서 ITS 영역과 5.8S 영역 사이에서의 차이를 효모의 종간 구별에 응용함으로써 빠른 시간 내에 균주를 동정할 수 있는 방법으로(Choi et al., 2011), 발효기간별 장류로부터 분리된 10종의 효모 균주로부터 universal primer인 ITS1과 ITS4를 사용하여 PCR을 실시하였다. 그 결과, 약 750 bp(*Z. rouxii* JBCC 49), 630 bp(*Cryp. albidus* JBCC 429), 650 bp(*D. hansenii* JBCC 541), 800 bp(*T. delbrueckii* JBCC 623), 650 bp(*W. anomalus* JBCC 841), 625 bp(*P. guilliermondii* JBCC 848), 640bp(*R. mucilaginosa* JBCC 1138), 550 bp(*C. parapsilosis* JBCC 1146), 690 bp(*P. farinosa* JBCC 1186) 또는 460 bp(*C. versatilis* KCCM 11312)의 단일 band 산물을 확인하였다(Fig. 81A 및 Table 37). 또한 각 효모 균주에 대한 PCR 산물은 제한효소 절편 길이 다형현상(RFLP)을 위한 제한효소인 *CfoI*, *HaeIII* 또는 *HinI*으로 처리한 후 그 패턴을 살펴보았다. 즉, RFLP의 경우 특정의 제한효소로 처리하였을 때 유전자의 염기서열에 따라 서로 다른 길이의 독특한 절단조각이 생성되며 이는 종간 다양성을 의미하는 것으로(Choi et al., 2011), 효모 10종의 균주의 경우 다음과 같은 패턴 차이를 보였다(Fig. 81B-D 및 Table 37). *CfoI*, *HaeIII* 또는 *HinI*으로 처리 후 *Z. rouxii* JBCC 49 균주의 경우 290+200+170+90 bp, 400+220 bp 또는 335+240+150 bp의 위치에서 band를 보였고, *Cryp. albidus* JBCC 429는 각각 330+300 bp, 500+70+60 bp 또는 350+160+120 bp를 나타내었다. 또한 *D. hansenii* JBCC 541균주에 대한 *CfoI*, *HaeIII*, *HinI*에 의한 패턴은 각각 300+300+50 bp, 420+150+90 bp, 325+325 bp이며, *T. delbrueckii* JBCC 623 균주는 320+320+60 bp, 800 bp, 410+390 bp, *W. anomalus* JBCC 841는 620+30 bp, 650 bp, 325+325 bp, *P. guilliermondii* JBCC 848는 300+265+60 bp, 400+115+90 bp, 320+300 bp, *R. mucilaginosa* JBCC 1138는 320+240 bp, 425+215 bp, 340+225 bp였다. 더해서, *C. parapsilosis* JBCC 1146 균주는 *CfoI*, *HaeIII*, *HinI*에 의해 295+255 bp, 440+110 bp, 280+270 bp로 각각 나타났으며, *P. sorbitophila* JBCC 1186 균주는 각각 330+330+30 bp, 450+200+40 bp, 360+230 bp의 패턴을 보였으며, *C. versatilis* KCCM 11312 균주의 경우 260+200 bp, 460 bp, 250+210 bp로 각각 나타났다. 결과적으로 10종의 효모는 분류학상 서로 동일하지 않은 균주에 속하는 것을 알 수 있었다. 대부분의 균주들은 기존에 연구들에서 분석되어진 각각의 패턴들과 유사한 결과를 나타내었으나, *Z. rouxii* JBCC 49, *T. delbrueckii* JBCC 623 및 *C. versatilis* KCCM 11312 균주의 경우 *CfoI* 패턴의 차이점을 보였으며, 더욱이 *P. sorbitophila* 균주의 경우 PCR-RFLP 패턴 분석이 수행된 연구는 전무했다(Guillamón et al., 1998; Esteve-Zarzoso et al., 1999; de Llanos Frutos et al., 2004; Pham et al., 2011).

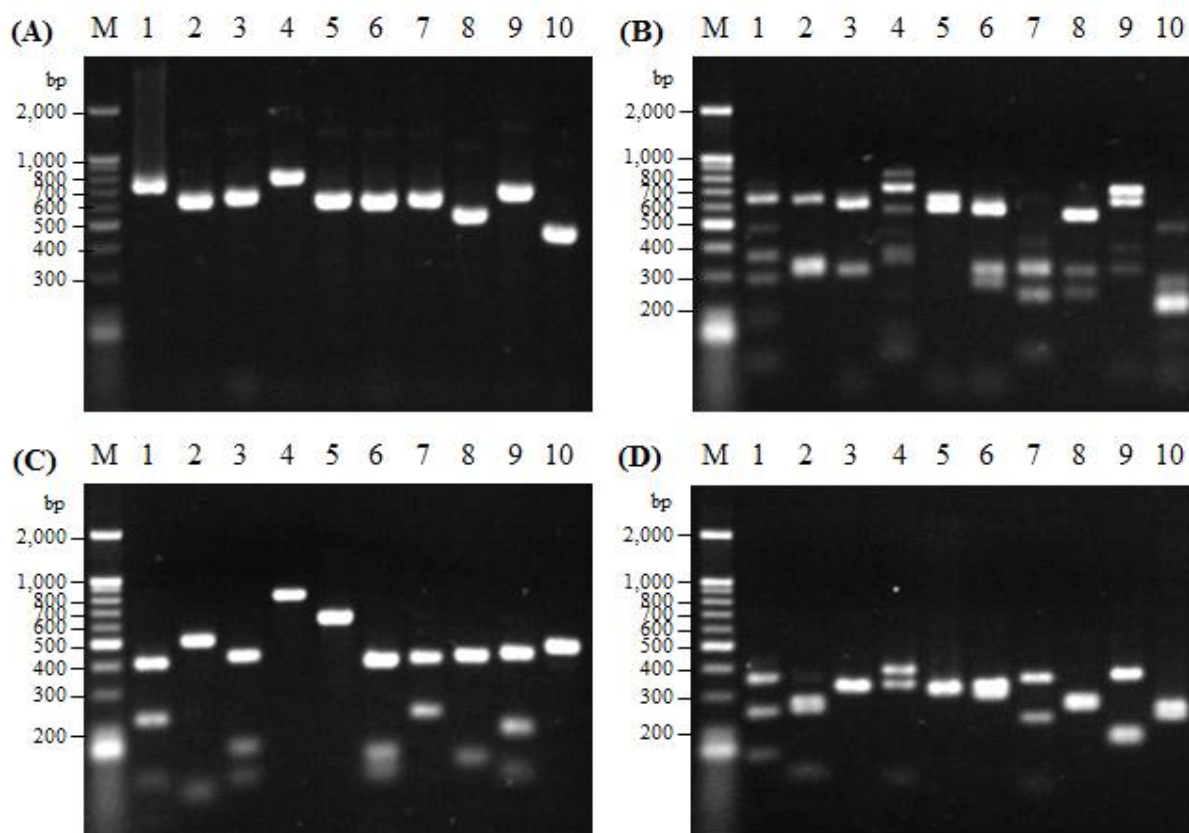


Fig. 81. PCR-amplified products(a) and the RFLP patterns by the digestion of the 5.8s rRNA gene with restriction endonucleases *Cfo* I(b), *Hae* III(c) and *Hinf* I(d) of ten different yeast strains related to the fermentation of traditional soy-sauce. Lanes M. Molecular weight marker(25/100 bp ladder): 1, DNA from yeast isolate *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49; 2, *Cryptococcus albidus* JBCC 429; 3, *Debaryomyces hansenii* JBCC 541; 4, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623; 5, *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841; 6, *Pichia guilliermondii* JBCC 848; 7, *Rhodotorula mucilaginosa* JBCC 1138; 8, *Candida parapsilosis* JBCC 1146; 9, *Pichia farinosa* JBCC 1186; and 10, *Candida versatilis* KCCM 11312.

Table 37. Size in bp of the PCR products and the restriction fragments of ten different yeast strains related to the fermentation of traditional soy-sauce.

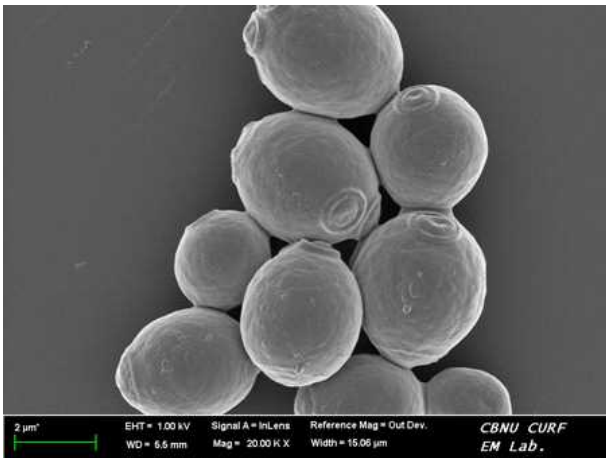
Isolated strains	Amplicon size(bp)	Restriction fragments(bp)		
		<i>Cfo</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I
<i>Z. rouxii</i> JBCC 49	750	290+200+170+90	400+220	335+240+150
<i>Cryp. albidus</i> JBCC 429	630	330+300	500+70+60	350+160+120
<i>D. hansenii</i> JBCC 541	650	300+300+50	420+150+90	325+325
<i>T. delbrueckii</i> JBCC 623	800	320+320+60	800	410+390
<i>W. anomalus</i> JBCC 841	650	620+30	650	325+325

<i>P. guilliermondii</i> JBCC 848	625	300+265+60	400+115+90	320+300
<i>R. mucilaginosa</i> JBCC 1138	640	320+240	425+215	340+225
<i>C. parapsilosis</i> JBCC 1146	550	295+255	440+110	280+270
<i>P. sorbitophila</i> JBCC 1186	690	330+330+30	450+200+40	360+230
<i>C. versatilis</i> KCCM 11312	460	260+200	460	250+210

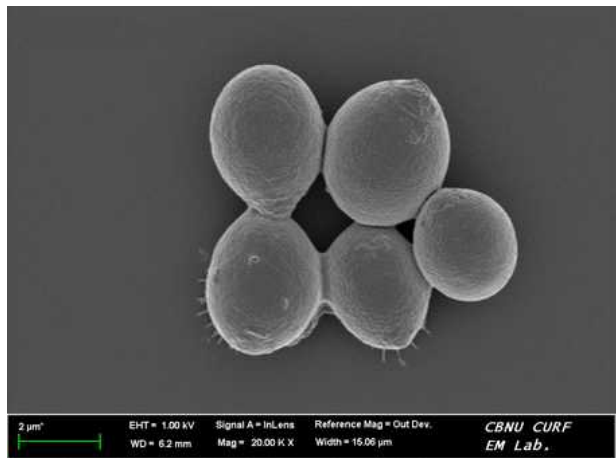
(다) 주사현미경(SEM)을 이용한 형태학적 특성 분석

발효기간별 장류로부터 분리된 10종의 효모의 모양, 크기 및 특징을 전자주사현미경(SEM, SN-3000 Hitachi)으로 확인하였다. 즉, *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49, *Cryptococcus albidus* JBCC 429, *Debaryomyces hansenii* JBCC 541, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623, *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841, *Pichia guilliermondii* JBCC 848, *Rhodotorula mucilaginosa* JBCC 1138, *Candida parapsilosis* JBCC 1146, *Pichia farinosa* JBCC 1186, *Candida versatilis* KCCM 11312 효모의 세포 크기는 평균 2-4  $\mu\text{m}$ 의 구형 또는 난형이었으며 표면에 출아흔이 관찰되어 출아법에 의해 생육하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 82).

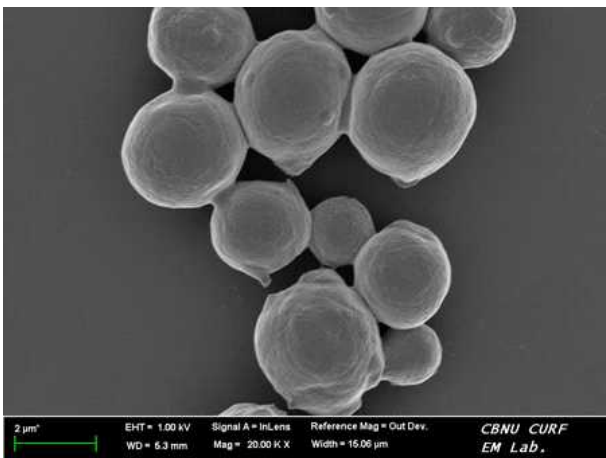
(A) *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49



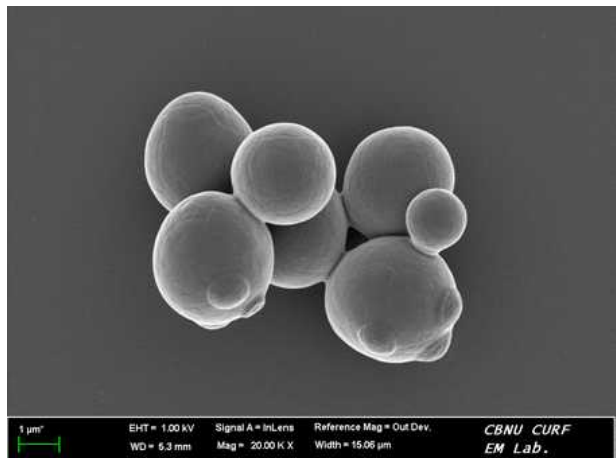
(B) *Cryptococcus albidus* JBCC 429



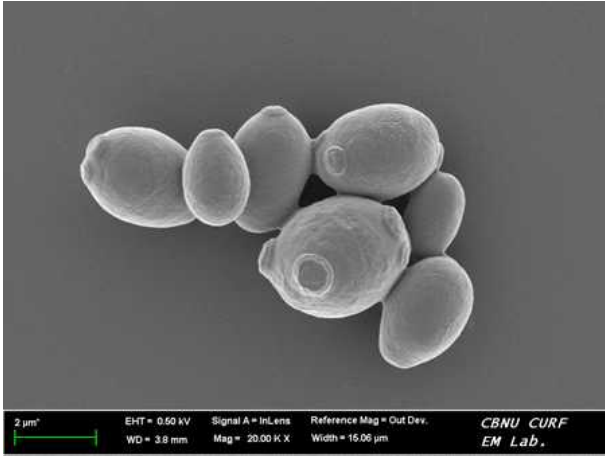
(C) *Debaryomyces hansenii* JBCC 541



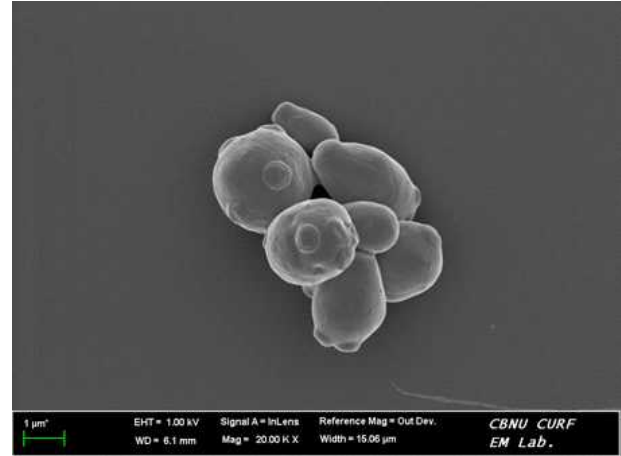
(D) *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623



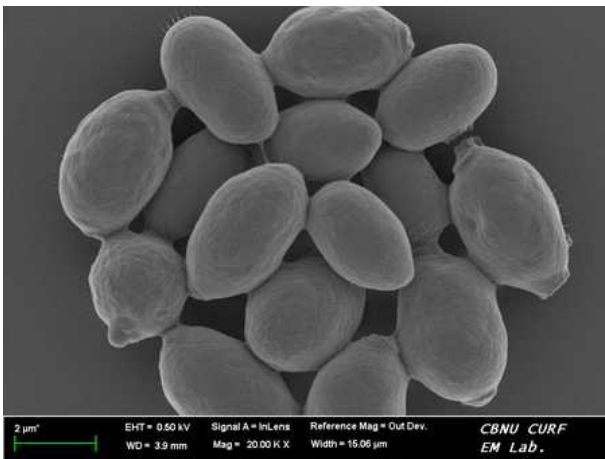
(E) *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841



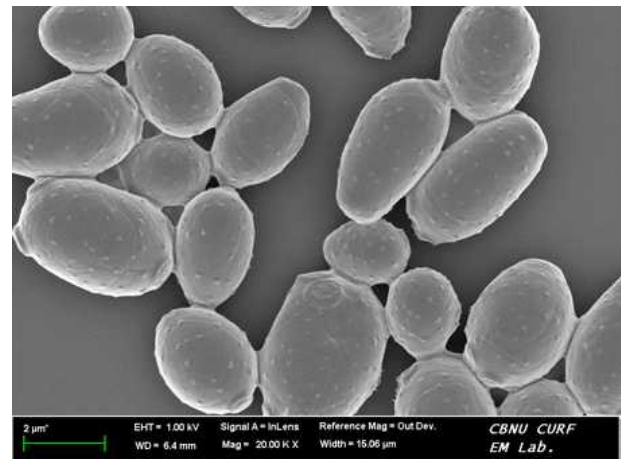
(F) *Pichia guilliermondii* JBCC 848



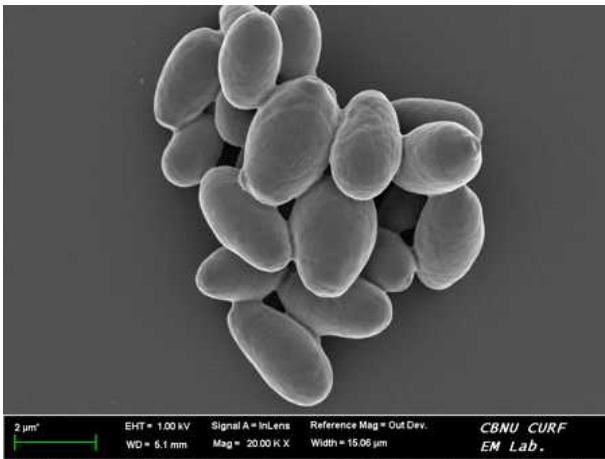
(G) *Rhodotorula mucilaginosa* JBCC 1138



(H) *Candida parapsilosis* JBCC 1146



(I) *Pichia farinosa* JBCC 1186



(J) *Candida versatilis* KCCM 11312

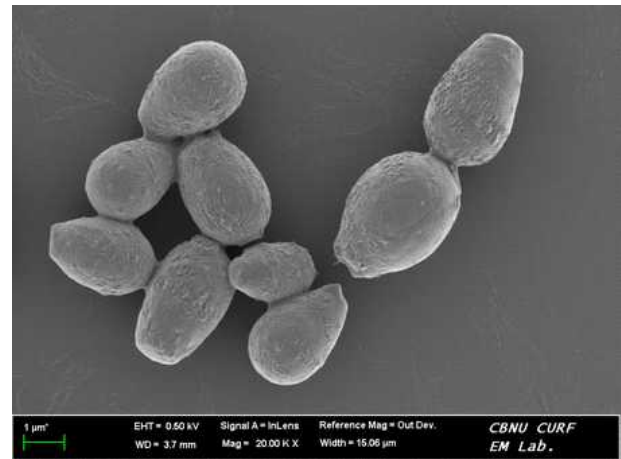


Fig. 82. SEM images (EHT=3.00 kV, Signal A=SE2, Mag=20.00 KX) of ten different yeast strains related to the fermentation of traditional soy-sauce. (A) *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49, (B) *Cryptococcus albidus* JBCC 429, (C) *Debaryomyces hansenii* JBCC 541, (D) *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623, (E) *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841, (F) *Pichia guilliermondii* JBCC 848, (G) *Rhodotorula mucilaginosa* JBCC 1138, (H) *Candida parapsilosis* JBCC 1146, (I) *Pichia farinosa* JBCC 1186, and (J) *Candida versatilis* KCCM 11312.



#### (라) 발효기간별 장류로부터 분리된 효모 10종의 탄소대사패턴

발효기간별 장류로부터 분리된 10종의 효모의 생화학적 특성으로 API 20C AUX(bioMerieux)를 이용하여 각기 다른 19가지의 당에 대한 탄소대사 패턴을 조사하였다. 분석은 프로토콜에 따라 균체배양액을 사용하였으며 29°C에서 48~72시간 동안 배양한 후 균체의 성장여부를 확인하였다. 그 결과 Table 38와 같이, 모든 균주는 glucose, glycerol 및 D-saccharose(sucrose)를 대사할 수 있는 반면 그 외의 당 종류에 대해서는 서로 다른 패턴을 보였다. *Z. rouxii* JBCC 49 균주의 경우 D-glucose, glycerol, D-xylose, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, D-celiobiose, D-maltose, D-saccharose(sucrose)를 대사하였고, calcium 2-keto-gluconate, L-arabinose, adonitol, D-lactose(bovine origin), D-melezitose, D-raffinose를 약하게 대사하는 반면 N-acetyl-glucosamine, D-trehalose는 대사하지 못했으며, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside를 대사하는 능력에는 변화성있는 결과를 보였다. *Cry. albidus* JBCC 429 균주의 경우, D-glucose, glycerol, calcium 2-keto-gluconate, L-arabinose, D-xylose, inositol, D-sorbitol, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, D-celiobiose, D-maltose, D-saccharose(sucrose), D-trehalose, D-melezitose, D-raffinose를 대사할 수 있었으며, *D. hansenii* JBCC 541는 D-glucose, glycerol, calcium 2-keto-gluconate, adonitol, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, D-celiobiose, D-lactose(bovine origin), D-maltose, D-saccharose(sucrose), D-trehalose, D-melezitose를 대사하는 것으로 나타났으며, L-arabinose, D-xylose에 대해서는 variable한 결과를 보였다. *T. delbrueckii* JBCC 623 균주는 D-glucose, glycerol, calcium 2-keto-gluconate, D-xylose, D-galactose, inositol, D-sorbitol, D-lactose(bovine origin), D-saccharose(sucrose), D-trehalose, D-melezitose, D-raffinose의 12가지 당을 대사하였으며, *W. anomalus* JBCC 841 균주는 D-glucose, glycerol, D-xylose, xylitol, D-sorbitol, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, D-celiobiose, D-maltose, D-saccharose(sucrose), D-trehalose, D-melezitose로 11가지 당을 대사하였다. *P. guilliermondii* JBCC 848 균주는 inositol과 D-lactose(bovine origin)를 제외한 모든 17가지의 당을 대사하면서 가장 다양한 탄소이용능을 보였으며, *R. mucilaginosa* JBCC 1138는 D-glucose, glycerol, L-arabinose, D-xylose, adonitol, xylitol, D-galactose, D-sorbitol, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, D-maltose, D-saccharose(sucrose), D-trehalose, D-melezitose, D-raffinose의 당을 이용할 수 있었다. *C. parapsilosis* JBCC 1146 균주는 inositol, D-lactose(bovine origin), D-raffinose의 3가지 당을 제외한 모든 당을 대사하였으며, *P. farinosa* JBCC 1186 균주의 경우 calcium 2-keto-gluconate, L-arabinose, adonitol, inositol, D-lactose(bovine origin), D-raffinose의 6가지 당은 대사하지 못하였다. 마지막으로, *C. versatilis* KCCM 11312 균주는 adonitol, D-galactose, inositol, D-melezitose, D-raffinose를 대사하지 못하였다. 특히 이러한 당 소비 패턴에서 JBCC 848 균주의 경우 전형적인 *P. guilliermondii* 균주와 동일한 당 대사능을 보였으나, JBCC 429 균주는 전형적인 *Cryp. albidus* 균주와 달리 glycerol을 약하게나마 대사하였으며 JBCC 1138 균주의 경우는 전형적인 *R. mucilaginosa*와 달리 methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside를 대사할 수 있는 특징적인 차이를 보였다. 또한 JBCC 1146 균주는 전형적인 *C. parapsilosis* 균주와 달리 xylitol과 D-celiobiose를 약하게나마 대사할 수 있는 차이를 나타냈다. 그러나 API 분석 결과를 이용한 그 외의 균주의 전형적인 균주에 대한 정보는 아직 이용할 수 없다.

Table 38. Biochemical analysis using API 20C AUX Clinical Yeast System(BioMerieux) of ten different yeast strains related to the fermentation of traditional soy-sauce.

No.	Active ingredients	ZR <sup>1)</sup>	CA	DH	TD	WA	PG	RM	CP	PF	CV
1	D-Glucose	+ <sup>2)</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Glycerol	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Calcium 2-keto-gluconate	w	+	+	+	-	+	-	+	-	+
4	L-Arabinose	w	+	v	-	-	+	+	w	-	w
5	D-Xylose	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+
6	Adonitol	w	-	+	-	-	+	+	+	-	-
7	Xylitol	+	-	+	v	w	+	w	w	+	v
8	D-Galactose	+	-	+	+	-	+	+	+	v	-
9	Inositol	+	+	w	w	-	-	-	-	-	-
10	D-Sorbitol	+	+	w	+	+	+	+	+	w	w
11	Methyl- $\alpha$ -D-glucofuranose	v	+	+	v	+	+	+	+	+	+
12	N-Acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-	+	-	+	v	+
13	D-Celiobiose	+	+	w	-	w	+	-	w	w	+
14	D-Lactose(bovine origin)	w	-	w	w	-	-	-	-	-	w
15	D-Maltose	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+
16	D-Saccharose(sucrose)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	D-Trehalose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	D-Melezitose	w	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19	D-Raffinose	w	+	-	w	-	+	+	-	-	-

<sup>1)</sup>ZR, *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49; CA, *Cryptococcus albidus* JBCC 429; DH, *Debaryomyces hansenii* JBCC 541; TD, *Torulaspota delbrueckii* JBCC 623; WA, *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841; PG, *Pichia guilliermondii* JBCC 848; RM, *Rhodotorula mucilaginosa* JBCC 1138; CP, *Candida parapsilosis* JBCC 1146; PF, *Pichia farinosa* JBCC 1186; and CV, *Candida versatilis* KCCM 11312.

<sup>2)</sup>+, positive; w, weakly positive; v, variable activities; -, negative activities.

(마) 발효기간별 장류로부터 분리된 효모 10종의 효소활성능 검토

발효기간별 장류로부터 분리된 10종의 효모의 효소활성을 검토하기 위해 API ZYM reactions system(bioMérieux)를 이용하여 19가지의 효소활성능 유/무를 조사하였다. 그 결과 Table 39와 같이, 모든 10종의 효모 균주는 약하게 또는 강하게 alkaline phosphatase, C<sub>4</sub>에 대한 esterase, C<sub>8</sub>에 대한 esterase lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase의 활성을 나타냈다. 반면, trypsin, α-chymotrypsin, β-glucuronidase, α-mannosidase에 대한 활성은 모든 균주에서 약하거나 또는 나타나지 않았다. C<sub>14</sub>에 대한 lipase 활성은 *P. guilliermondii* JBCC 848과 *R. mucilaginosa* JBCC 1138 균주를 제외한 모든 균주에서 활성을 나타냈으며, β-galactosidase의 경우는 *C. versatilis* KCCM 11312 균주를 제외하고 모든 균주에서 활성을 보였다. *Cryp. albidus* JBCC 429, *D. hansenii* JBCC 541, *R. mucilaginosa* JBCC 1138, *C. parapsilosis* JBCC 1146, *P. farinosa* JBCC 1186 균주는 α-galactosidase 활성을 보유했고, *Z. rouxii* JBCC 49, *Cryp. albidus* JBCC 429, *R. mucilaginosa* JBCC 1138 균주만이 약한 N-acetyl-β-glucosaminidase 활성을 보였다. 더해서, α-fucosidase 활성은 오직 *D. hansenii* JBCC 541와 *P. guilliermondii* JBCC 848 균주에서 나타났다. 한편, α-glucosidase 활성은 *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623, *Pichia farinosa* JBCC 1186, *Candida versatilis* KCCM 11312 균주를 제외한 모든 균주에서 나타났으며, β-glucosidase 활성의 경우 *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49, *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623, *Candida parapsilosis* JBCC 1146를 제외한 모든 균주에서 나타났다.

Table 39. Hydrolytic enzyme activities of ten different yeast strains related to the fermentation of traditional soy-sauce grown on YM medium as determined by the API ZYM reactions system(bioMérieux).

Enzymes assayed for	ZR <sup>1)</sup>	CA	DH	TD	WA	PG	RM	CP	PF	CV
Alkaline phosphatase	w <sup>2)</sup>	+	+	w	+	+	+	+	+	+
Esterase (C4)	w	+	+	w	+	+	+	+	+	+
Esterase Lipase (C8)	w	+	w	w	+	+	+	w	+	+
Lipase (C14)	w	w	w	w	+	-	-	w	w	w
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	w	+	+	+	+	+	+	+	w	+
Crystine arylamidase	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trypsin	w	-	w	-	-	-	w	-	-	-
α-Chymotrypsin	-	-	w	w	-	-	w	-	-	-
Acid phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Galactosidase	-	w	+	-	-	-	w	+	w	-
β-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
β-Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-
α-Glucosidase	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
β-Glucosidase	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
N-Acetyl-β-glucosaminidase	w	w	-	-	-	-	w	-	-	-

$\alpha$ -Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Fucosidase	-	-	w	-	-	+	-	-	-	-

<sup>1)</sup>ZR, *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49; CA, *Cryptococcus albidus* JBCC 429; DH, *Debaryomyces hansenii* JBCC 541; TD, *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623; WA, *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841; PG, *Pichia guilliermondii* JBCC 848; RM, *Rhodotorula mucilaginosa* JBCC 1138; CP, *Candida parapsilosis* JBCC 1146; PF, *Pichia farinosa* JBCC 1186; and CV, *Candida versatilis* KCCM 11312.

<sup>2)</sup>+, positive; w, weakly positive; -, negative activities within the strains.

#### (바) 발효기간별 장류로부터 분리된 효모 10종의 생리학적 특성 및 환경 내성 검토

발효기간별 장류로부터 분리된 10종의 효모의 포도당으로부터 산 생성여부, extracellular amylase, protease 및 lipase 활성, 여러 탄소원과 질소원에 대한 소비능, cycloheximide 및 acetic acid 저항성 및 다양한 배양온도, 초기 pH, 당 농도, 염 농도, 아황산 농도와 알코올 농도에서의 성장능에 대한 생리학적 특성을 살펴본 결과는 Table 40와 같다. 결과적으로, *D. hansenii* JBCC 541, *R. mucilaginosa* JBCC 1138, *C. versatilis* KCCM 11312 균주를 제외한 모든 균주는 glucose로부터 산을 생성할 수 있었고 특히 *W. anomalus* JBCC 841과 *P. farinosa* JBCC 1186 균주는 그 생성 수준이 가장 높았다. 일반적으로 대부분의 효모 균주들은 amylase 활성이 약하거나 존재하지 않는 것으로 알려져 있으나, 장류 유래 10종의 효모 중에서 *Z. rouxii* JBCC 49, *D. hansenii* JBCC 541, *P. guilliermondii* JBCC 848 균주는 약하지만 amylase 활성을 보였다. 더욱이 모든 10종의 효모들은 protease와 lipase 활성을 보였으며, 특히 *R. mucilaginosa* JBCC 1138, *C. parapsilosis* JBCC 1146 균주에서 가장 높은 protease 활성이 확인되었고 *R. mucilaginosa* JBCC 1138 균주는 또한 가장 높은 lipase 활성을 보였다. 또한 10종의 다른 효모들을 대상으로 glucose를 arbutin, sucrose, ribose, melibiose, soluble starch, inulin, mannitol, methanol 또는 ethanol의 탄소원으로 대체한 후 그 이용능을 살펴본 결과, *C. versatilis* KCCM 11312를 제외한 모든 균주들은 시험된 모든 탄소원을 이용하여 성장할 수 있는 것으로 나타났다. *C. versatilis* KCCM 11312 균주는 melibiose, soluble starch, ethanol를 탄소원으로 성장하지 못했다. 더해서 ammonium sulfate 외 nitrate, nitrite, L-tyrosine, cadaverine dihydrochloride, L-lysne, imidazole, creatine, creatinine의 질소원에 대한 소비능을 살펴본 결과, 모든 균주는 ammonium sulfate 및 L-tyrosine, cadaverine dihydrochloride, L-lysne, creatinine을 소비하여 성장할 수 있는 반면 nitrite 존재하에서는 모든 균주가 성장하지 못하였다. 특히 nitrate와 creatine에 대하여 오직 *Z. rouxii* JBCC 49 균주만이 생육하지 못하는 것으로 확인되었다. 한편, 10 균주 중에서 오직 *P. guilliermondii* JBCC 848와 *R. mucilaginosa* JBCC 1138 균주만이 0.01%(w/v) 농도의 chcloheximide 저항성을 보였으며, 특히 *P. guilliermondii* JBCC 848 균주는 0.1% 농도의 chcloheximide에도 저항성을 나타냈다. 그러나 모든 균주는 1%(v/v) acetic acid 농도에서는 성장하지 못하는 것으로 나타났다. 효모 균주들의 성장 가능한 온도 범위를 확인하기 위해 각각 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 또는 45°C의 온도에서 배양함으로써 그 성장 정도를 살펴본 결과, *Z. rouxii* JBCC 49와 *C. versatilis* KCCM 11312 균주를 제외한 모든 8종의 균주들은 10°C의 낮은 온도에서도 잘 성장할 수 있는 것으로 나타났으며, *D. hansenii* JBCC 541, *T. delbrueckii* JBCC 623, *R. mucilaginosa* JBCC 1138, *C. versatilis* KCCM 11312 균주들은 40°C 이상의 온도에서는 성장하지 못했다. 반면 *W.*

*anomalus* JBCC 841, *P. guilliermondii* JBCC 848, *C. parapsilosis* JBCC 1146, *P. farinosa* JBCC 1186 균주는 40°C 온도에서도 성장하였으나 45°C 이상의 온도에서는 어떠한 균주도 성장하지 못했다. 또한 배양액의 초기 pH를 각각 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 12로 조절한 후 효모 균주들의 성장 정도를 살펴본 결과, *D. hansenii* JBCC 541 균주만을 제외한 모든 9균주들은 pH 3-12 범위에서 성장 할 수 있었고 *D. hansenii* JBCC 541 균주의 경우 pH 12 조건하에서는 성장하지 않았다. 효모들의 성장에 있어서 당농도의 영향을 살펴보기 위해 배양액에 glucose 농도를 각각 1, 10, 20, 30, 40 또는 50%(w/v)의 농도로 첨가하여 배양한 결과, *P. guilliermondii* JBCC 848를 제외한 모든 9 균주들은 1-50% 당 농도에서도 잘 성장 할 수 있었던 반면 *P. guilliermondii* JBCC 848 균주의 경우 40% 당 농도에서 그 성장 수준이 급격히 감소하였으며 더욱이 50%의 당 농도하에서는 성장하지 못하는 것으로 나타났다. 마찬가지로 효모균주들의 생육에 있어서 염 농도가 미치는 영향을 살펴보기 위해 각각 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5 또는 20.0%(w/v)의 NaCl을 첨가하여 배양한 결과, 모든 10종의 균주들은 NaCl 0-15.0% 농도 범위에서 성장할 수 있었으나, *P. guilliermondii* JBCC 848 균주는 17.5%의 염 농도하에서 성장하지 못하였으며 더욱이 20.0% 염 농도하에서는 오직 *D. hansenii* JBCC 541, *C. parapsilosis* JBCC 1146, *P. farinosa* JBCC 1186 세 균주만이 성장 하였다. 한편 모든 효모 균주들은 2,000 ppm(w/v) 수준의 아황산 조건에서도 내성을 나타내면서 잘 생육할 수 있었다. 마지막으로 알코올 농도가 효모들의 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위해 각각 ethanol을 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 또는 15.0%(v/v)로 첨가한 배지를 사용하여 배양하였다. 그 결과, 모든 효모 균주들은 5% 이하의 에탄올 농도에서 잘 성장 할 수 있었으나 *C. versatilis* KCCM 11312 균주의 경우 에탄올 농도 7.5% 이상에서는 성장할 수 없는 것으로 나타났으며 *Cryp. albidus* JBCC 429, *D. hansenii* JBCC 541, *C. parapsilosis* JBCC 1146 균주들도 10% 이상의 에탄올 농도에서 성장하지 못하였다. 한편 본 연구에서 고 알코올 생성능 효모로 선발된 *D. hansenii* JBCC 541만이 유일하게 12.5%와 15% 수준의 에탄올 농도에서도 어느정도 성장하는 것을 관찰하였다.

Table 40. Biochemical and physiological characteristics of ten different yeast strains related to the fermentation of traditional soy-sauce.

	ZR <sup>1)</sup>	CA	DH	TD	WA	PG	RM	CP	PF	CV
Acid production from glucose <sup>1)</sup>	+ <sup>5)</sup>	++	-	+	+++	+	-	++	+++	-
Amylolytic activity <sup>3)</sup>	w	-	w	-	-	+	-	-	-	-
Proteolytic activity <sup>3)</sup>	++	w	+	+	+	++	+++	+++	w	+
Lipolytic activity <sup>3)</sup>	+	+	++	+	++	++	+++	++	+	v
Carbon source assimilation <sup>4)</sup>										
glucose(basic)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
arbutin	+	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++	+
sucrose	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ribose	+	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++	+
melibiose	w	+	++	+	+++	+++	+	++	+++	-
soluble starch	w	+	+	w	++	+	+	+	++	-
inulin	w	++	++	++	++	+++	+	+	+++	w
mannitol	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
methanol	w	+	+	w	+	+	+	+	+	-
ethanol	+	++	++	+	+++	++	++	++	+++	-
Nitrogen compounds assimilation <sup>4)</sup>										
ammonium sulfate(basic)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
nitrate	-	+++	w	w	+++	w	+++	+++	w	++
nitrite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-tyrosine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
cadaverine dihydrochloride	+++	++	+++	w	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L-lysine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
imidazole	-	-	w	-	-	-	-	w	-	-
creatine	-	+	w	+	++	++	+	+	++	+
creatinine	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cycloheximide resistance at 0.01%(w/v)	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	+
at 0.1%	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	+
Tolerance of 1%(v/v) acetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 10°C	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+
15-30°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
35°C	+++	+++	+	+	+++	+++	+	+++	+++	+
40°C	-	-	-	-	++	++	-	+	++	-
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 3	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pH 4-8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pH 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pH 12	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++
Growth at 1-30%(w/v) glucose	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

40%	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
50%	+++	+++	+++	++	+++	-	+++	+++	+++	+++
Growth at 0-10%(w/v) NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12.5%	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
15.0%	++	+	+++	++	++	+	++	++	+++	++
17.5%	+	+	++	+	+	-	+	+	++	+
20.0%	-	-	++	-	-	-	-	+	++	-
Growth at 0-2,000 ppm(w/v) K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Growth at 0-5%(v/v) ethanol	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5.0%	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
7.5%	+++	++	+	+++	+++	+	+++	++	+++	-
10.0%	+	-	-	+++	++	+	++	-	++	-
12.5%	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
15.0%	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup>ZR, *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49; CA, *Cryptococcus albidus* JBCC 429; DH, *Debaryomyces hansenii* JBCC 541; TD, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623; WA, *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841; PG, *Pichia guilliermondii* JBCC 848; RM, *Rhodotorula mucilaginosa* JBCC 1138; CP, *Candida parapsilosis* JBCC 1146; PF, *Pichia farinosa* JBCC 1186; and CV, *Candida versatilis* KCCM 11312.

<sup>2)</sup>Acid production from glucose was assessed in Custer's chalk medium containing 5%(w/v) glucose, 0.5%(w/v) calcium carbonate, 0.05%(w/v) yeast extract and 2%(w/v) agar.

<sup>3)</sup>Amylase and protease activities were assessed by point inoculation of strains onto agar plate containing 1%(w/v) soluble starch and skim milk, respectively (Buzzini and Martii, 2002), and lipolytic activity was assessed using spirit blue agar with lipase reagent (Difco) examining clear zones surrounding yeast growth after incubation at 29°C for 2-4 days according to manufacture's protocols.

<sup>4)</sup>Carbon source assimilation was tested under 1%(w/v) carbon source, 0.5%(w/v) ammonium sulfate as a nitrogen source, 2.0% agar in Yeast Nitrogen Base without amino acids and ammonium sulfate (17 g/L), and nitrogen compounds assimilation was tested under 5 g/L(w/v) nitrogen source, 10 g/L(w/v) glucose as a carbon source, 2.0% agar in yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (18 g/L).

<sup>5)</sup>+++ , strongly positive; ++ , moderately positive; + , slowly positive; w , weakly positive; v , variable positive; - , negative activities within the strains.

## (2) 발효기간별 장류로부터 분리된 효모 10종의 장류 적합성 평가

장류의 발효과정에 있어서, 내염성 효모 균주들은 특히 다양한 향미성분들을 생성하기 때문에 중요하다. 따라서 장류의 염 발효에 관여하는 효모 균주들은 최종적인 발효 장류의 품질에 크게 영향을 미치나, 제어하기 힘든 면 때문에 현재까지 장류유래 효모균집 뿐만 아니라 각각의 효모들이 장류와 관련된 향미 생성에 미치는 영향에 대한 연구는 일본에서 몇몇의 연구만 수행되었을 뿐 국내에서는 그 연구가 미미한 실정이다(van der Sluis et al., 2001). 특히 본 연구에서는 한국 전통 장류의 발효 과정동안 다양하고 풍부한 효모 균주가 존재한다는 것을 확인했으며, 그 중 몇몇 균주는 연구되어진 일본형 장류로부터도 보고된바 없다. 이는 한국 장류의 독특한 제조 방법 때문일 것이며, 더욱이 메주를 제조하기 위한 수단으로써 자연 발효를 하는 과정에서의 환경적 차이 등이 영향을 끼쳤을 것이다. 따라서 발효 장류에 있어서 다양한 효모들의 존재는 다른 특성과 특이적인 효과를 부여할 것이다. 본 연구에서는 발효기간별 장류로부터 분리된 10종의 효모의 장류 적합성을 평가하기 위한 방법으로, 장류와 유사한 발효 조건하에서 균주를 발효한 후 생성된 휘발성 향미성분을 purge and trap으로 추출한 후 GC-MS를 통해 살펴보았다. 이때 장류 유사 배지는 17%(w/v) NaCl과 20%(w/v)의 당을 함유하는 이 배농도의 tryptic soy broth(Difco)를 사용하였으며, 각각의 효모는 cell 농도를 5-6 log cfu/mL로 조절하여 접종하였다. 발효는 30°C에서 총 14일 동안 수행되었으며, 그 뒤 최종 pH, 총 산도, 환원당 함량 및 휘발성 향미 성분의 생성 정도를 확인하였고 그 결과를 Table 41에 표기하였다. 결과적으로 다른 종의 효모들은 휘발성 향미 성분들의 생성에 있어서 유의적으로 다른 역할을 수행한다는 것을 알 수 있었다. 즉, alcohol류 생성에 있어서 *Cryp. albidus*와 *R. mucilaginosa* 균주를 제외한 대부분의 균주들은 유의적인 생성능을 보였다. 그 중에서도 *T. delbrueckii* 및 *W. anomalus* 균주는 가장 높은 수준의 고급 알코올류를 생성하였고, 특히 *T. delbrueckii*는 가장 많은양의 3-methylbutanol을 생성한 반면 *W. anomalus* 균주는 다양한 휘발성 알코올 성분들을 높은 수준 생성하였다. 또한 *P. guilliermondii*와 *C. parapsilosis* 균주도 유의적인 수준의 3-methylbutanol을 생성하였으며, *D. hansenii*, *P. sorbitophila* 균주는 유의적인 양의 2-methylpropanol을 생성하였다. ethanol 뿐만 아니라 3-methylbutanol, 2-methylpropanol 및 phenylethanol과 같은 고급 알코올류는 발효 장류에 있어서 매우 중요한 성분으로 알려져 있는바, 일부 효모들의 이러한 생성능력은 향후 장류의 제조를 조절하기 위한 수단으로써 활용될 수 있을 것이다(Gao et al., 2010; Feng et al., 2014). 또한 장류의 발효에 있어서, benzaldehyde, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methylpropanal과 같은 aldehyde류는 특히 이에 상응하는 alcohols류 또는 acids류로 전환 될 수 있기 때문에 발효 장류의 중요한 향미 성분이다(Belitz et al., 2009). Table 41에 나타난 것과 같이, *D. hansenii*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *C. versatilis*와 같은 일부 효모들은 발효 후 aldehyde류를 유의적으로 증가시켰다. 더욱이 ester류 생성에 있어서 *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *P. sorbitophila*, *C. versatilis* 균주들은 유의적인 생성 능력을 보였고, 특히 *W. anomalus* 균주는 ethyl acetate와 같은 ester류 생성에 있어서 월등한 생성 능력을 나타냈다. 발효 후 ketone류 생성에 있어서 *Z. rouxii*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *C. versatilis* 균주들은 유의적인 생성 수준을 나타냈다. 반면에 *Cryp. albidus*, *R. mucilaginosa*는 전반적인 향미성분들의 생성 수준이 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로, 본 연구에서는 향미 생성에 있어서 효모 균주에 따른 분명한 차이를 확인하였다. 장류 발효에 관여하는 효모는 다양한 속과 종을 가진다는 점을 고려할 때, 이러한 효모 균주들의 다른 발효 능력과 그들의 coexistence는 결과적으로 발효된 장



류의 품질에 영향을 미칠 것이다.

Table 41. Analysis of the volatile flavor compounds in the single fermentation performed with ten different yeast strains related to the fermentation of traditional soy-sauce.

	Cont <sup>2)</sup>	ZR	CA	DH	TD	WA	PG	RM	CP	PF	CV
Salt content(%)	33.7 <sup>a</sup>	28.5 <sup>d</sup>	32.9 <sup>b</sup>	33.1 <sup>b</sup>	31.8 <sup>c</sup>	32.6 <sup>b</sup>	34.0 <sup>a</sup>	34.0 <sup>a</sup>	33.1 <sup>b</sup>	26.4 <sup>e</sup>	26.0 <sup>e</sup>
Reducing sugar content (g/L as glucose)	200 <sup>a</sup>	74.3 <sup>g</sup>	151.2 <sup>b</sup>	131.8 <sup>de</sup>	116.7 <sup>f</sup>	127 <sup>c</sup>	142.1 <sup>c</sup>	143.4 <sup>c</sup>	135.8 <sup>d</sup>	44.3 <sup>h</sup>	34.6 <sup>i</sup>
Sugar solid content(Brix)	31.6 <sup>a</sup>	27.2 <sup>g</sup>	31.4 <sup>ab</sup>	30.5 <sup>d</sup>	29.6 <sup>f</sup>	30.1 <sup>e</sup>	31.0 <sup>c</sup>	31.2 <sup>bc</sup>	30.5 <sup>d</sup>	25.5 <sup>h</sup>	25.0 <sup>i</sup>
Titrateable acidity(g/L as lactic acid)	3.73 <sup>d</sup>	5.39 <sup>abc</sup>	4.54 <sup>bcd</sup>	4.11 <sup>cd</sup>	5.17 <sup>abc</sup>	5.67 <sup>ab</sup>	3.71 <sup>d</sup>	3.9 <sup>d</sup>	4.3 <sup>cd</sup>	3.23 <sup>d</sup>	6.29 <sup>a</sup>
Final pH	5.4 <sup>a</sup>	5.0 <sup>ef</sup>	5.2 <sup>c</sup>	5.3 <sup>b</sup>	5.1 <sup>d</sup>	4.9 <sup>f</sup>	5.4 <sup>a</sup>	5.4 <sup>a</sup>	5.3 <sup>b</sup>	5.0 <sup>e</sup>	4.8 <sup>g</sup>
Contents of volatile flavor compounds <sup>3)</sup>											
<i>Alcohols</i>											
n-Butanol	0.33 <sup>b</sup>	0.74 <sup>b</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.94 <sup>b</sup>	2.54 <sup>a</sup>	2.95 <sup>a</sup>	0.36 <sup>b</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.59 <sup>b</sup>	1.16 <sup>b</sup>	2.81 <sup>a</sup>
3-Ethyl-3-heptanol	0.20 <sup>b</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.24 <sup>b</sup>	0.4 <sup>b</sup>	0.46 <sup>b</sup>	1.41 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.39 <sup>b</sup>
2-Ethylhexanol	0.19 <sup>d</sup>	0.35 <sup>bcd</sup>	0.19 <sup>d</sup>	0.37 <sup>bcd</sup>	0.51 <sup>bc</sup>	1.21 <sup>a</sup>	0.20 <sup>d</sup>	0.20 <sup>d</sup>	0.27 <sup>cd</sup>	0.28 <sup>cd</sup>	0.59 <sup>b</sup>
3-Ethyl-3-pentanol	0.06 <sup>b</sup>	0.19 <sup>ab</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.22 <sup>ab</sup>	0.21 <sup>ab</sup>	0.33a	0.08 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.12 <sup>ab</sup>	0.14 <sup>ab</sup>	0.26 <sup>ab</sup>
3-Heptanol	0.02	0.06	nd	0.17	0.10	0.37	0.09	nd	0.06	0.14	0.14
Isobutanol	0.00 <sup>e</sup>	2.08 <sup>cde</sup>	0.17 <sup>e</sup>	5.30 <sup>bc</sup>	2.23 <sup>cde</sup>	6.18 <sup>b</sup>	0.49 <sup>de</sup>	0.12 <sup>e</sup>	2.28 <sup>cde</sup>	3.76 <sup>bcd</sup>	19.32 <sup>a</sup>
2-Methyl-1-butanol	0.17 <sup>c</sup>	nd	1.04 <sup>c</sup>	4.92 <sup>bc</sup>	nd	25.9a	0.62 <sup>c</sup>	0.40c	7.04 <sup>b</sup>	4.35 <sup>bc</sup>	nd
3-Methyl-1-butanol	0.09 <sup>e</sup>	63.1 <sup>b</sup>	4.98 <sup>e</sup>	1.34 <sup>e</sup>	98.4 <sup>a</sup>	58.1 <sup>b</sup>	26.4 <sup>c</sup>	5.09 <sup>e</sup>	15.4 <sup>d</sup>	0.07 <sup>e</sup>	2.55 <sup>e</sup>
2-Methyl-2-propanol	1.27b	1.85 <sup>b</sup>	1.31 <sup>b</sup>	1.56 <sup>b</sup>	1.59 <sup>b</sup>	3.90 <sup>a</sup>	1.39 <sup>b</sup>	1.39 <sup>b</sup>	1.43 <sup>b</sup>	1.24 <sup>b</sup>	2.02 <sup>ab</sup>
1-Pentanol	0.34c	0.70 <sup>bc</sup>	0.34 <sup>c</sup>	0.88 <sup>bc</sup>	0.93 <sup>bc</sup>	2.53 <sup>a</sup>	0.32c	0.36 <sup>c</sup>	0.51 <sup>c</sup>	0.72 <sup>bc</sup>	1.48 <sup>b</sup>
2-Phenylethanol	nd	0.45 <sup>a</sup>	0.15 <sup>bc</sup>	0.17 <sup>bc</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.31 <sup>b</sup>
<i>Esters</i>											
Ethyl acetate	0.93 <sup>b</sup>	0.83 <sup>b</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>	8.95 <sup>b</sup>	89.6 <sup>a</sup>	nd	0.69 <sup>b</sup>	0.39 <sup>b</sup>	17.9 <sup>b</sup>	13.04 <sup>b</sup>
Ethyl pentadecanoate	nd	0.07	nd	nd	0.05	nd	nd	nd	nd	0.04	nd
Formic acid, hexyl ester	0.09 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.30 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.18 <sup>b</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.42 <sup>b</sup>
Hexanoic acid, ethyl ester	nd	nd	nd	nd	0.21 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Isobutyl acetate	nd	nd	nd	nd	nd	2.05 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
2-Methyl butyl acetate	nd	nd	nd	nd	nd	1.10 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
3-Methyl butyl acetate	nd	nd	nd	nd	0.14 <sup>ab</sup>	4.96 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	0.11 <sup>ab</sup>	0.29 <sup>ab</sup>
2-Phenethyl acetate	nd	nd	nd	nd	0.23 <sup>b</sup>	1.41 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
2-Propenoic acid, 2-ethylhexyl ester	nd	nd	0.32 <sup>b</sup>	nd	0.22 <sup>b</sup>	3.44 <sup>a</sup>	0.05 <sup>bc</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.11 <sup>bc</sup>	0.29 <sup>b</sup>
n-Propyl acetate	nd	nd	nd	nd	nd	2.96 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Aldehydes</i>											
Benzaldehyde	0.14	0.58	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.45
n-Butanal	0.47 <sup>b</sup>	0.63 <sup>ab</sup>	0.41 <sup>b</sup>	1.37 <sup>a</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.59 <sup>b</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.12 <sup>b</sup>	0.64 <sup>ab</sup>
n-Decanal	0.13 <sup>de</sup>	0.19 <sup>bcd</sup>	0.14 <sup>cde</sup>	0.28 <sup>bc</sup>	0.27 <sup>bcd</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.11 <sup>e</sup>	0.12 <sup>de</sup>	0.12 <sup>e</sup>	0.13 <sup>de</sup>	0.32 <sup>b</sup>
2-Ethylhexanal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.08
n-Heptanal	0.09 <sup>bc</sup>	0.09 <sup>bc</sup>	0.12 <sup>abc</sup>	0.06 <sup>bc</sup>	nd	0.17 <sup>ab</sup>	0.06 <sup>bc</sup>	0.12 <sup>abc</sup>	0.10 <sup>bc</sup>	nd	0.26 <sup>a</sup>
2-Methylbutanal	0.13 <sup>ab</sup>	nd	nd	0.20 <sup>ab</sup>	0.12 <sup>ab</sup>	0.31 <sup>a</sup>	nd	nd	0.12 <sup>ab</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>

3-Methylbutanal	0.43 <sup>c</sup>	0.34 <sup>cd</sup>	0.15 <sup>d</sup>	0.51 <sup>bc</sup>	0.55 <sup>bc</sup>	1.55 <sup>a</sup>	0.18 <sup>d</sup>	0.14 <sup>d</sup>	0.21 <sup>d</sup>	0.34 <sup>cd</sup>	0.69 <sup>b</sup>
2-Methyl-2-propenal	0.08 <sup>b</sup>	nd	0.03 <sup>b</sup>	0.31 <sup>ab</sup>	0.46 <sup>a</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.06 <sup>b</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>	nd	nd
n-Octanal	0.19 <sup>cd</sup>	0.33 <sup>bc</sup>	0.21 <sup>cd</sup>	0.24 <sup>cd</sup>	0.28 <sup>bcd</sup>	0.91 <sup>a</sup>	0.20 <sup>cd</sup>	0.20 <sup>cd</sup>	0.23 <sup>cd</sup>	0.09 <sup>d</sup>	0.44 <sup>b</sup>
<b>Ketones</b>											
2-Butanone	1.19 <sup>cde</sup>	2.10 <sup>abc</sup>	1.22 <sup>cde</sup>	0.75 <sup>de</sup>	2.54 <sup>ab</sup>	0.07 <sup>e</sup>	1.49 <sup>bcd</sup>	1.20 <sup>cde</sup>	1.81 <sup>bcd</sup>	1.01 <sup>cde</sup>	3.04 <sup>a</sup>
2,3-Butanedione	0.05 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	0.22 <sup>ab</sup>	nd	nd	nd	nd	0.39 <sup>a</sup>	0.22 <sup>ab</sup>
1-(2,4-Dimethyl-3-furanyl)-ethanone	0.87 <sup>b</sup>	1.59 <sup>ab</sup>	0.86 <sup>b</sup>	1.35 <sup>ab</sup>	1.52 <sup>ab</sup>	4.31 <sup>a</sup>	0.79 <sup>b</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.83 <sup>b</sup>	0.80 <sup>b</sup>	2.03 <sup>b</sup>
2,2-Dimethyl-3-pentanone	0.13 <sup>cd</sup>	0.29 <sup>bc</sup>	0.14 <sup>cd</sup>	0.20 <sup>cd</sup>	0.27 <sup>bcd</sup>	0.73 <sup>a</sup>	0.13 <sup>cd</sup>	0.15 <sup>cd</sup>	0.15 <sup>cd</sup>	0.06 <sup>d</sup>	0.43 <sup>b</sup>
5-ethyl-4-methyl-3-Heptanone	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.06	nd
2-Heptanone	0.41 <sup>c</sup>	0.85 <sup>bc</sup>	0.43 <sup>c</sup>	0.64 <sup>bc</sup>	0.79 <sup>bc</sup>	2.52 <sup>a</sup>	0.43 <sup>c</sup>	0.46 <sup>c</sup>	0.50 <sup>c</sup>	0.46 <sup>c</sup>	1.12 <sup>b</sup>
3-Heptanone	2.45 <sup>c</sup>	5.38 <sup>bc</sup>	2.54 <sup>c</sup>	3.91 <sup>bc</sup>	5.03 <sup>bc</sup>	15.9 <sup>a</sup>	2.45 <sup>c</sup>	2.73 <sup>c</sup>	3.02 <sup>c</sup>	3.06 <sup>c</sup>	6.94 <sup>b</sup>
2-Hexanone	1.22 <sup>c</sup>	2.86 <sup>bc</sup>	1.31 <sup>c</sup>	2.04 <sup>bc</sup>	2.09 <sup>bc</sup>	8.26 <sup>a</sup>	1.28 <sup>c</sup>	1.48 <sup>c</sup>	1.63 <sup>c</sup>	1.58 <sup>c</sup>	3.83 <sup>b</sup>
3-Hexanone	0.68 <sup>c</sup>	1.41 <sup>c</sup>	0.77 <sup>c</sup>	1.26 <sup>c</sup>	1.65 <sup>bc</sup>	4.20 <sup>a</sup>	0.75 <sup>c</sup>	0.79 <sup>c</sup>	0.98 <sup>c</sup>	1.36 <sup>c</sup>	2.69 <sup>b</sup>
1,3-Isobenzofurandione	0.13 <sup>a</sup>	nd	0.12 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.09 <sup>ab</sup>	nd	nd	0.13 <sup>a</sup>	0.08 <sup>ab</sup>	nd	0.11 <sup>a</sup>
4-Methyl-2-heptanone	0.08 <sup>b</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.09 <sup>ab</sup>	nd	nd	0.12 <sup>ab</sup>	nd	0.11 <sup>ab</sup>	0.10 <sup>ab</sup>	0.00 <sup>b</sup>
4-Methyl-3-penten-2-one	1.05 <sup>c</sup>	2.47 <sup>bc</sup>	1.21 <sup>c</sup>	1.74 <sup>c</sup>	2.48 <sup>bc</sup>	7.03 <sup>a</sup>	1.24 <sup>c</sup>	1.45 <sup>c</sup>	1.56 <sup>c</sup>	1.35 <sup>c</sup>	3.58 <sup>b</sup>
2-Methyl-1-propene	0.07 <sup>ab</sup>	nd	0.05 <sup>ab</sup>	0.12 <sup>ab</sup>	nd	0.50 <sup>a</sup>	0.13 <sup>ab</sup>	nd	0.10 <sup>ab</sup>	nd	nd
2-Nonanone	0.09 <sup>b</sup>	0.12 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.13 <sup>b</sup>	0.17 <sup>b</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.09 <sup>b</sup>	nd	0.09 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.15 <sup>b</sup>
3-Nonanone	0.09 <sup>c</sup>	0.17 <sup>c</sup>	0.10 <sup>c</sup>	0.16 <sup>c</sup>	0.20 <sup>c</sup>	0.63 <sup>a</sup>	0.12 <sup>c</sup>	0.10 <sup>c</sup>	0.13 <sup>c</sup>	0.12 <sup>c</sup>	0.45 <sup>b</sup>
5-Nonanone	0.44 <sup>c</sup>	0.98 <sup>bc</sup>	0.51 <sup>c</sup>	0.77 <sup>bc</sup>	0.97 <sup>bc</sup>	2.61 <sup>a</sup>	0.48 <sup>c</sup>	0.48 <sup>c</sup>	0.56 <sup>c</sup>	0.56 <sup>c</sup>	1.33 <sup>b</sup>
2-Octanone	0.42 <sup>c</sup>	0.72 <sup>bc</sup>	0.47 <sup>c</sup>	0.65 <sup>bc</sup>	0.81 <sup>bc</sup>	2.57 <sup>a</sup>	0.46 <sup>c</sup>	0.49 <sup>c</sup>	0.57 <sup>c</sup>	0.45 <sup>c</sup>	1.12 <sup>b</sup>
3-Octanone	0.97 <sup>c</sup>	1.60 <sup>bc</sup>	0.88 <sup>c</sup>	1.29 <sup>c</sup>	1.65 <sup>bc</sup>	5.00 <sup>a</sup>	0.86 <sup>c</sup>	0.92 <sup>c</sup>	1.07 <sup>c</sup>	0.86 <sup>c</sup>	2.29 <sup>b</sup>
4-Octanone	0.31 <sup>b</sup>	0.88 <sup>b</sup>	0.39 <sup>b</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.49 <sup>b</sup>	2.29 <sup>a</sup>	0.42 <sup>b</sup>	0.40 <sup>b</sup>	0.55 <sup>b</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.73 <sup>b</sup>
2-Pentanone	0.39 <sup>c</sup>	0.71 <sup>bc</sup>	0.40 <sup>c</sup>	0.57 <sup>c</sup>	0.70 <sup>bc</sup>	2.90 <sup>a</sup>	0.39 <sup>c</sup>	0.45 <sup>c</sup>	0.43 <sup>c</sup>	0.39 <sup>c</sup>	1.26 <sup>b</sup>
3-Pentanone	1.21 <sup>c</sup>	2.47 <sup>bc</sup>	1.15 <sup>c</sup>	1.81 <sup>c</sup>	2.16 <sup>bc</sup>	7.76 <sup>a</sup>	1.17 <sup>c</sup>	1.32 <sup>c</sup>	1.33 <sup>c</sup>	1.91 <sup>c</sup>	3.59 <sup>b</sup>
1-phenyl-Ethanone	1.21 <sup>bc</sup>	2.08 <sup>bc</sup>	1.01 <sup>bc</sup>	1.75 <sup>bc</sup>	2.00 <sup>bc</sup>	6.04 <sup>a</sup>	0.91 <sup>c</sup>	1.15 <sup>bc</sup>	1.06 <sup>bc</sup>	1.17 <sup>bc</sup>	2.53 <sup>b</sup>
2-Propanone	0.60 <sup>ab</sup>	0.80 <sup>ab</sup>	0.54 <sup>ab</sup>	0.51 <sup>ab</sup>	0.31 <sup>b</sup>	1.11 <sup>a</sup>	0.78 <sup>ab</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.42 <sup>b</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.46 <sup>b</sup>
<b>Pyrazines</b>											
2,5-Dimethylpyrazine	nd	0.08	0.03	0.07	0.07	0.12	0.10	0.09	0.11	0.09	nd
2-Methylpyrazine	0.06 <sup>a</sup>	nd	nd	0.05 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pyrazine	0.07 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	0.05 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Others</b>											
Benzene(phenol)	0.31 <sup>c</sup>	0.55 <sup>c</sup>	0.38 <sup>c</sup>	0.44 <sup>c</sup>	1.02 <sup>b</sup>	1.85 <sup>a</sup>	0.55 <sup>c</sup>	0.33 <sup>c</sup>	0.58 <sup>c</sup>	0.22 <sup>c</sup>	0.52 <sup>c</sup>
Benzoic acid	0.18 <sup>a</sup>	nd	0.10 <sup>ab</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	0.03 <sup>bc</sup>	nd	nd
Phenol	0.24 <sup>bc</sup>	0.33 <sup>bc</sup>	0.22 <sup>bc</sup>	0.41 <sup>bc</sup>	0.42 <sup>bc</sup>	1.01 <sup>a</sup>	0.17 <sup>c</sup>	0.22 <sup>bc</sup>	0.21 <sup>bc</sup>	0.22 <sup>bc</sup>	0.47 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>The fermentation potential of the yeast strains was evaluated in micro-fermentation trials, which were carried out at 29°C in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 150mL sterile tryptic soy broth with the initial concentrations of 170 g/L(w/v) NaCl and 200 g/L(w/v) sugar.

<sup>2)</sup>ZR, *Zygosaccharomyces rouxii* JBCC 49; CA, *Cryptococcus albidus* JBCC 429; DH, *Debaryomyces hansenii* JBCC 541; TD, *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623; WA, *Wickerhamomyces anomalus* JBCC 841; PG, *Pichia guilliermondii* JBCC 848; TM, *Rhodotorula mucilaginosa* JBCC 1138; CP, *Candida parapsilosis* JBCC 1146; PS, *Pichia sorbitophila* JBCC 1186; CV *Candida versatilis* KCCM11312.

<sup>3)</sup>Relative content to peak areas of internal standard(10 ppm of 2-methyl-3-heptanone in methanol) by GC-MS QP 2010 plus(Shimadzu) with automated Purge & Trap Sampler JTD-505III(Japan Analytical Industry); nd, not detected.

## 마. 다른 농도의 염 농도를 함유한 장류의 발효 및 저염 장류 발효에 선발된 우수 균주의 적용

### (1) 선발된 우수 균주를 적용한 다른 염농도로 제조된 장류의 생균수

본 연구에서는 저염 장류를 발효하는데 있어서 전통장류로부터 선발된 알코올 생성능 우수 균주 *T. delbrueckii* JBCC 623과 향미증진능 우수 균주 *P. guillierondii* JBCC 848의 적용가능성을 시험하고자 하였다. 장류 발효에 있어서 염의 농도는 8, 11 및 14%(w/v)로 조정하였고, 이때 효모를 접종하지 않은 대조구와 장류의 주요 향미효모로 알려진 *Z. rouxii* 균주를 표준 균주로 사용하여 비교하였고, 접종 방법은 Table 31과 같이 단일 또는 혼합균주 형태로 처리하였다. 먼저 곰팡이, 효모, 일반 세균의 선택배지를 이용한 plating법에 의한 미생물의 균수의 변화 양상을 살펴본 결과는 Table 42에서 44와 같다. 먼저 곰팡이의 경우 발효가 진행될수록 초기  $7.19 \pm 0.29 \log \text{ cfu/mL}$ 에서  $4.70 \sim 5.77 \log \text{ cfu/mL}$  수준으로 현저히 감소하였으며, 또한 배양액의 염 농도가 높을수록 그 수준이 감소했다(Table 42). 특히 JBCC 623 효모와 JBCC 848 효모를 단일 또는 혼합 접종한 모든 8% 발효 처리구에서 대조구와 비교하여 곰팡이의 생균수가 유의적으로 낮았다. 한편 Table 43와 같이 효모의 생균수를 살펴본 결과, 대조구의 경우 14일간의 발효 기간 동안 꾸준히  $3.0 \log \text{ cfu/mL}$  이하로 검출되었다. 그러나 3가지의 효모 균주를 접종하였을 때, 표준 균주인 ZR1 효모의 처리구를 제외하고는 발효 중반인 7일째 효모의 수가 급격히 증가되었다. 특히 효모의 생균수는 8% 농도의 저염과 비교하여 염 농도가 높을수록 그 수준이 높았다. 한편, 일반 세균의 생균수는 발효 초기  $9.51 \log \text{ cfu/mL}$ 의 수준이 발효 중반에 약간 감소되는 경향을 보였으나, 8% 농도의 저염 처리구에서만  $9.48 \log \text{ cfu/mL}$  수준으로 고염 처리구와 비교하여 유의적으로 높았다(Table 44). 그러나 효모 균주를 접종한 처리구에서는 약  $9.0 \log \text{ cfu/mL}$  전후로 약간 감소하였다. 결과적으로, 일반세균의 총균수는 발효기간에 따라 감소되는 경향을 보였으나 8% 농도의 저염 처리구에서 유의적으로 가장 높았고, 곰팡이 생균수 또한 발효기간에 감소되는 경향을 보였으나 8% 농도의 저염 처리구에서 유의적으로 가장 높았다. 반면 염 농도와 무관하게 모든 대조구에서 발효기간 동안 효모의 생균수는  $\log 3$  이하로 미미하게 검출되었으나, 효모를 스타터로 접종한 모든 처리구에서는 효모의 생균수가 유의적으로 높았다. 반면 bacteria와 fungi의 수준은 대조구와 비교하여 유사하거나 낮은 수준을 나타내었다.

Table 42. Enumeration of fungi during soy sauce fermentation with different salt contents of 8, 11 and 14%, and the effects by autochthonous starter cultures, as determined by plating.

Sample <sup>1)</sup>	Salt(%)	Fungi (log cfu/mL)		
		0 day	7 days	14 days
Control	8%	7.19±0.29	<sup>A</sup> 7.18±0.02 <sup>a2)</sup>	5.77±0.15 <sup>a</sup>
	11%	7.19±0.30	<sup>A</sup> 7.12±0.03 <sup>ab</sup>	5.71±0.09 <sup>a</sup>
	14%	7.19±0.31	<sup>B</sup> 6.96±0.08 <sup>abc</sup>	5.65±0.11 <sup>ab</sup>
ZR1	8%	7.19±0.32	6.90±0.22 <sup>abc</sup>	<sup>B</sup> 5.07±0.14 <sup>cdef</sup>
	11%	7.19±0.33	6.88±0.11 <sup>abc</sup>	<sup>A</sup> 5.45±0.22 <sup>abcd</sup>
	14%	7.19±0.34	6.86±0.08 <sup>abc</sup>	<sup>AB</sup> 5.14±0.17 <sup>bcdef</sup>
TD623	8%	7.19±0.35	<sup>A</sup> 6.76±0.07 <sup>bcd</sup>	<sup>B</sup> 4.89±0.38 <sup>ef</sup>
	11%	7.19±0.36	<sup>A</sup> 6.70±0.10 <sup>cd</sup>	<sup>A</sup> 5.45±0.10 <sup>abcd</sup>
	14%	7.19±0.37	<sup>B</sup> 6.44±0.08 <sup>de</sup>	<sup>A</sup> 5.56±0.08 <sup>abc</sup>
PG848	8%	7.19±0.29	<sup>A</sup> 5.95±0.15 <sup>g</sup>	<sup>B</sup> 4.78±0.45 <sup>f</sup>
	11%	7.19±0.29	<sup>A</sup> 6.16±0.17 <sup>efg</sup>	<sup>AB</sup> 5.33±0.17 <sup>abcde</sup>
	14%	7.19±0.29	<sup>B</sup> 5.43±0.36 <sup>h</sup>	<sup>A</sup> 5.75±0.20 <sup>a</sup>
ZR1+PG848	8%	7.19±0.29	<sup>A</sup> 6.39±0.14 <sup>def</sup>	5.58±0.39 <sup>abc</sup>
	11%	7.19±0.29	<sup>A</sup> 6.20±0.09 <sup>efg</sup>	5.54±0.28 <sup>abc</sup>
	14%	7.19±0.29	<sup>B</sup> 5.37±0.60 <sup>h</sup>	5.13±0.14 <sup>bcdef</sup>
TD623+PG848	8%	7.19±0.29	<sup>A</sup> 6.03±0.27 <sup>fg</sup>	4.70±0.49 <sup>f</sup>
	11%	7.19±0.29	<sup>A</sup> 6.23±0.13 <sup>efg</sup>	5.48±0.12 <sup>abcd</sup>
	14%	7.19±0.29	<sup>B</sup> 5.20±0.10 <sup>h</sup>	4.98±0.55 <sup>def</sup>

<sup>1)</sup>ZR1, *Zagoccharomyces rouxii* KCCM 12066 as a positive strain; TD623, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623 isolated in this study; PG848, *Pichia guilliermondii* JBCC 848 isolated in this study.

<sup>2)</sup>Different capital and small letters indicate significant differences of values in the same column between three samples with three different salt concentrations and between eighteen samples with different salt concentrations and inoculum types (p < 0.05).

Table 43. Enumeration of yeasts during soy sauce fermentation with different salt contents of 8, 11 and 14%, and the effects by autochthonous starter cultures, as determined by plating.

Sample <sup>1)</sup>	Salt(%)	Yeast (log cfu/mL)		
		0 day	7 days	14 days
Control	8%	< log 3.0	< log 3.0	< log 3.0
	11%	< log 3.0	< log 3.0	< log 3.0
	14%	< log 3.0	< log 3.0	< log 3.0
ZR1	8%	< log 3.0	< log 3.0	5.74±0.46 <sup>d</sup>
	11%	< log 3.0	< log 3.0	5.74±0.33 <sup>d</sup>
	14%	< log 3.0	< log 3.0	5.81±0.28 <sup>cd</sup>
TD623	8%	< log 3.0	<sup>B</sup> 5.05±0.17 <sup>d2)</sup>	5.73±0.30 <sup>d</sup>
	11%	< log 3.0	<sup>AB</sup> 5.35±0.13 <sup>c</sup>	5.75±0.13 <sup>d</sup>
	14%	< log 3.0	<sup>A</sup> 5.50±0.22 <sup>c</sup>	5.94±0.23 <sup>bcd</sup>
PG848	8%	< log 3.0	<sup>B</sup> 6.42±0.07 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 6.48±0.26 <sup>bc</sup>
	11%	< log 3.0	<sup>B</sup> 6.41±0.10 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 6.55±0.10 <sup>b</sup>
	14%	< log 3.0	<sup>A</sup> 7.16±0.40 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 7.70±0.15 <sup>a</sup>
ZR1+PG848	8%	< log 3.0	6.52±0.16 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 7.60±0.53 <sup>a</sup>
	11%	< log 3.0	6.33±0.09 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 6.41±0.32 <sup>bcd</sup>
	14%	< log 3.0	6.50±0.16 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 5.80±0.39 <sup>cd</sup>
TD623+PG848	8%	< log 3.0	<sup>B</sup> 6.49±0.10 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 6.02±0.73 <sup>bcd</sup>
	11%	< log 3.0	<sup>B</sup> 6.40±0.01 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 6.57±0.26 <sup>b</sup>
	14%	< log 3.0	<sup>A</sup> 6.94±0.03 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 7.64±0.45 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>ZR1, *Zagoccharomyces rouxii* KCCM 12066 as a positive strain; TD623, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623 isolated in this study; PG848, *Pichia guilliermondii* JBCC 848 isolated in this study.

<sup>2)</sup>Different capital and small letters indicate significant differences of values in the same column between three samples with three different salt concentrations and between eighteen samples with different salt concentrations and inoculum types (p < 0.05).

Table 44. Enumeration of total bacteria during soy sauce fermentation with different salt contents of 8, 11 and 14%, and the effects by autochthonous starter cultures, as determined by plating.

Sample <sup>1)</sup>	Salt(%)	Total bacteria (log cfu/mL)		
		0 day	7 days	14 days
Control	8%	9.51±0.08	<sup>A</sup> 9.27±0.08 <sup>a2)</sup>	<sup>A</sup> 9.48±0.21 <sup>a</sup>
	11%	9.51±0.08	<sup>A</sup> 9.11±0.13 <sup>ab</sup>	<sup>B</sup> 9.00±0.22 <sup>ab</sup>
	14%	9.51±0.08	<sup>B</sup> 8.79±0.11 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 8.97±0.18 <sup>b</sup>
ZR1	8%	9.51±0.08	9.10±0.03 <sup>ab</sup>	9.04±0.26 <sup>ab</sup>
	11%	9.51±0.08	9.19±0.06 <sup>ab</sup>	9.23±0.46 <sup>ab</sup>
	14%	9.51±0.08	9.07±0.09 <sup>ab</sup>	8.89±0.24 <sup>b</sup>
TD623	8%	9.51±0.08	9.18±0.09 <sup>ab</sup>	9.20±0.28 <sup>ab</sup>
	11%	9.51±0.08	9.19±0.02 <sup>ab</sup>	9.00±0.02 <sup>ab</sup>
	14%	9.51±0.08	9.09±0.06 <sup>ab</sup>	9.29±0.13 <sup>ab</sup>
PG848	8%	9.51±0.08	9.16±0.11 <sup>ab</sup>	8.88±0.15 <sup>b</sup>
	11%	9.51±0.08	9.11±0.10 <sup>ab</sup>	9.05±0.10 <sup>ab</sup>
	14%	9.51±0.08	9.06±0.19 <sup>ab</sup>	9.07±0.37 <sup>ab</sup>
ZR1+PG848	8%	9.51±0.08	8.94±0.47 <sup>ab</sup>	9.30±0.42 <sup>ab</sup>
	11%	9.51±0.08	8.80±0.13 <sup>b</sup>	9.15±0.24 <sup>ab</sup>
	14%	9.51±0.08	8.14±0.54 <sup>c</sup>	9.22±0.37 <sup>ab</sup>
TD623+PG848	8%	9.51±0.08	<sup>A</sup> 8.81±0.43 <sup>b</sup>	8.94±0.21 <sup>b</sup>
	11%	9.51±0.08	<sup>B</sup> 8.01±0.23 <sup>c</sup>	9.00±0.24 <sup>ab</sup>
	14%	9.51±0.08	<sup>B</sup> 7.76±0.10 <sup>c</sup>	9.16±0.45 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>ZR1, *Zagosccharomyces rouxii* KCCM 12066 as a positive strain; TD623, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623 isolated in this study; PG848, *Pichia guilliermondii* JBCC 848 isolated in this study.

<sup>2)</sup>Different capital and small letters indicate significant differences of values in the same column between three samples with three different salt concentrations and between eighteen samples with different salt concentrations and inoculum types (p < 0.05).

(2) 선발된 우수 균주를 적용한 다른 염농도로 제조된 장류의 세균 및 효모의 다양성

염 농도를 8, 11 및 14%(w/v)로 조정된 장류 발효에 있어서 효모를 접종하지 않은 대조구와 본 연구로부터 분리된 고 알코올 생성능 및 향미 증진능을 보이며 선발된 두 균주 *T. delbrueckii* JBCC 623와 *P. guilliermondii* JBCC 848를 스타터로 적용하였다. 이때 장류의 주요 향미효모로 알려진 *Z. rouxii* 균주를 표준 균주를 사용하여 Table 31과 같이 단일 또는 혼합균주 형태로 처리하여 발효 후 세균 및 효모의 다양성을 DGGE 분석을 통해 살펴보았다. 그 결과 Fig. 83과 같이, 고농도의 salt를 함유한 장류에서는 오직 *Bacillus* sp.만이 DGGE 분석을 통해 검출되었다. 반면 8%의 저농도 salt 함량을 포함하는 장류는 발효 동안 고농도 염 농도에서는 나타나지 않았던 *Staphylococcus* sp. 및 *Enterococcus* sp.가 검출되었다. 그러나 저염 장류에서 검출된 이러한 부패 균주는 8% 농도의 저염 장류라 할지라도 *T. delbrueckii* JBCC 623 및 *P. guilliermondii* JBCC 848를 스타터 균주로 접종한 처리구에서는 감소되는 경향을 보이거나 또는 검출되지 않았다.

다른 염농도를 포함하는 장류의 발효 동안 효모 양상을 살펴본 결과는 Fig. 84와 같다. 먼저 8, 11, 14%의 농도를 함유한 무접종 처리구인 모든 발효 장류에 있어서 어떤 효모의 band로 보이는 것은 검출되지 않았고, 초기 코지 분말에 분주되었던 *Aspergillus* sp.만이 검출되었다. 그러나 효모를 단일 또는 혼합 균주 형태로 접종한 처리구에서는 접종된 효모 균주들의 band 패턴을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 처리된 모든 효모 균주들이 다양한 염농도를 포함하는 장류의 발효 조건하에서도 잘 적응하여 생육할 수 있다는 것을 의미한다. 특히 본 연구로부터 분리된 *T. delbrueckii* JBCC 623 및 *P. guilliermondii* JBCC 848 균주의 경우 대조균주로 사용된 *Z. rouxii*와 비교하여 상대적으로 짧은 시간에 더 높은 수준으로 생육할 수 있었다.

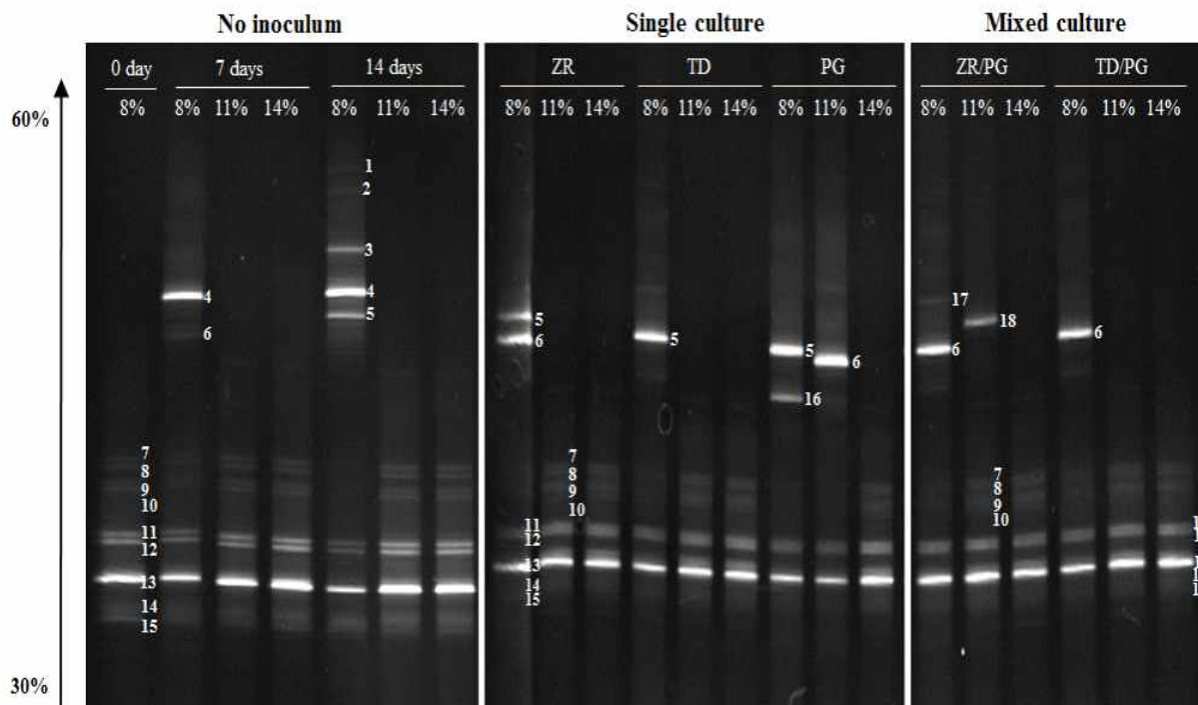


Fig. 83. DGGE fingerprints of bacterial 16S rDNA (B) of fermented soy sauce. As starters, ZR1 (*Zagosccharomyces rouxii* KCCM 12066) as a positive strain), TD623 (*Torulasporea delbrueckii* JBCC 623 isolated in this study), and PG848 (*Pichia guilliermondii* JBCC 848 isolated in this study) were used. Profiles of soy sauce with different salt contents of 8, 11 and 14% obtained at time 0 and after 7 and 14 days are shown, while patterns on single and mixed inoculated soy sauces under 8% salt concentration were obtained at 14 days. The closest relative of the fragments sequenced were as follows: (1) *Staphylococcus epidermidis* (JQ511425), (2) *Staphylococcus epidermidis* (JQ511425), (3) *Staphylococcus xylosus* (KC790245), (4) *Staphylococcus* sp. (EF200000), (5) Uncultured *Enterococcus* sp. (FN554288), (6) *Enterococcus faecium* (HM218167), (7) *Bacillus* sp. (AY462206), (8) *Bacillus vallismortis* (KC565644), (9) Uncultured *Bacillus* sp. (FJ810826), (10) *Bacillus subtilis* (AY176764), (11) *Bacillus amyloliquefaciens* (GU479922), (12) *Bacillus methylotrophicus* (HQ844450), (13) *Bacillus subtilis* (AY176764), (14) *Bacillus amyloliquefaciens* (AB523743), (15) *Bacillus* sp. (AY462206), (16) Uncultured *Staphylococcus* sp. (FJ384491), (17) *Enterococcus faecium* (KC545900), and (18) *Enterococcus* sp. (AJ936944).



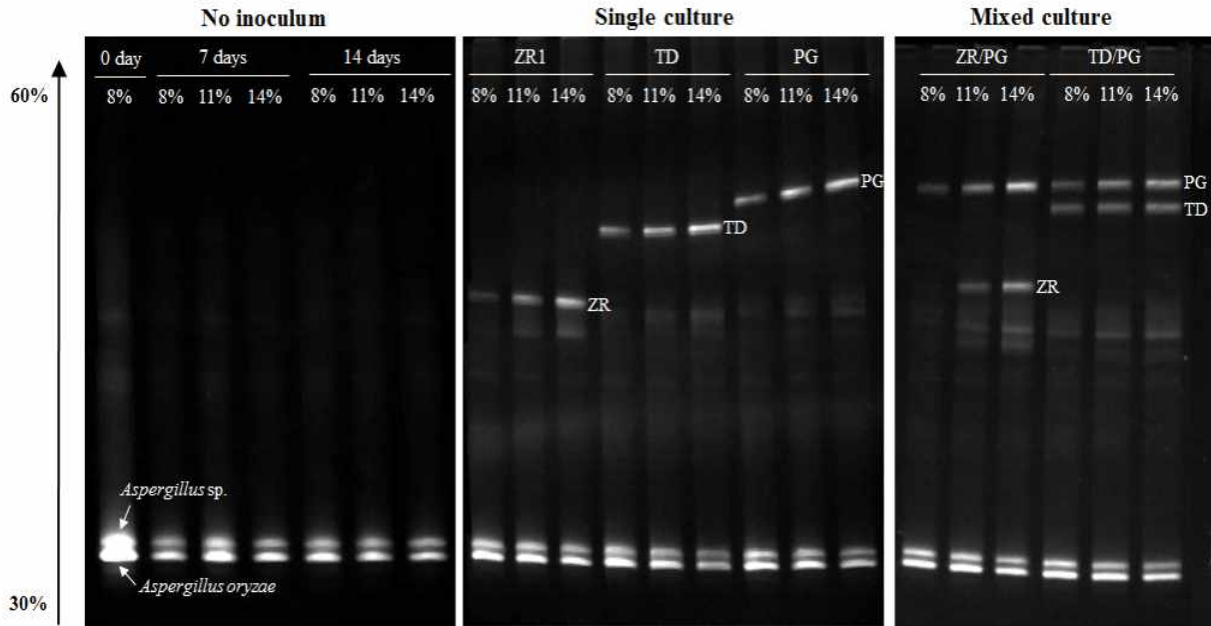


Fig. 84. DGGE fingerprints of eukaryotic 26S rDNA of fermented soy sauce. As starters, ZR1 (*Zagoccharomyces rouxii* KCCM 12066) as a positive strain), TD623 (*Torulaspora delbrueckii* JBCC 623 isolated in this study), and PG848 (*Pichia guilliermondii* JBCC 848 isolated in this study) were used. Profiles of soy sauce with different salt contents of 8, 11 and 14% obtained at time 0 and after 7 and 14 days are shown, while patterns on single and mixed inoculated soy sauces under 8% salt concentration were obtained at 14 days.

### (3) 선발된 우수 균주를 적용한 다른 염농도로 제조된 장류의 이화학적 분석

염 농도를 8, 11, 14%(w/v)로 조정된 장류 발효에 있어서 효모를 접종하지 않은 대조구와 본 연구로부터 고 알코올 생성능 및 향미 증진능 우수 균주로 분리된 *T. delbrueckii* JBCC 623, *P. guilliermondii* JBCC 848 및 장류의 주요 향미효모로 알려진 *Z. rouxii* 균주를 표준 균주를 사용하여 Table 30과 같이 단일 또는 혼합균주 형태로 처리하여 발효 후 최종 pH, 총산도, 당도, 환원당 및 알코올 생성량을 살펴보았다(Table 45). 그 결과, 최종 pH는 모든 처리구에서 5.0이상의 수준이었고, 고농도의 염을 함유한 장류와 비교하여 8% 농도의 염을 함유한 장류에서 총산도는 유의적으로 높았다. 이러한 경향은 효모 처리구에서도 유사하게 나타났다. 그러나 *T. delbrueckii* JBCC 623와 *P. guilliermondii* JBCC 848의 혼합 처리구는 8% 농도의 염 조건에서도 고농도의 염을 함유한 처리구와 유사한 수준을 나타냈다. 한편 알코올 생성량에 있어서, 무처리구의 기본 장류는 약 1.0% 정도가 생성되었고 그 수준은 더 낮은 염 농도를 함유한 장류에서 유의적으로 더 낮았다. 그러나 효모균주를 스타터로 접종한 모든 장류에서 알코올 생성량은 유의적으로 높았으며, 특히 *T. delbrueckii* JBCC 623와 *P. guilliermondii* JBCC 848의 혼합 처리구 또는 *T. delbrueckii* JBCC 623 단일 처리구에서 약 2.5%의 알코올을 생성하면서 유의적으로 가장 높았다. 한편, 일반적으로 부패 미생물은 알코올 2~3%농도에서 그 생육이 저하된다고 알려져 있다.

Table 45. Results of the chemical analysis on the fermented soy-sauce samples with different salt content of 8, 11 and 14%.

	14 days	Final pH	Total acidity (%)	Sugar solid (Brix)	Residual Sugar (%)	Alcohol production (%)
Control	8%	5.2±0.1 <sup>B,h2)</sup>	9.3±0.4 <sup>A,a</sup>	21.9±0.4 <sup>C,d</sup>	6.69±0.1 <sup>C,c</sup>	0.92±0.2 <sup>B,i</sup>
	11%	5.7±0.1 <sup>A,abcd</sup>	8.5±0.2 <sup>B,bc</sup>	24.0±0.1 <sup>B,c</sup>	10.0±1.2 <sup>B,b</sup>	1.29±0.1 <sup>A,hi</sup>
	14%	5.6±0.0 <sup>A,bcde</sup>	8.6±0.1 <sup>B,bc</sup>	26.5±0.3 <sup>A,a</sup>	12.6±1.1 <sup>A,a</sup>	1.36±0.2 <sup>A,gh</sup>
ZR1 <sup>1)</sup>	8%	5.4±0.3 <sup>efg</sup>	9.0±0.5 <sup>ab</sup>	21.2±0.3 <sup>C,d</sup>	7.49±0.9 <sup>B,c</sup>	1.75±0.2 <sup>B,efg</sup>
	11%	5.8±0.1 <sup>ab</sup>	8.8±0.7 <sup>bc</sup>	23.3±0.2 <sup>B,c</sup>	9.26±0.6 <sup>AB,b</sup>	2.28±0.3 <sup>A,abc</sup>
	14%	5.5±0.1 <sup>bcdef</sup>	8.6±0.0 <sup>bc</sup>	25.7±0.3 <sup>A,ab</sup>	9.74±1.2 <sup>A,b</sup>	2.04±0.3 <sup>AB,cde</sup>
TD623 <sup>1)</sup>	8%	5.5±0.1 <sup>cdef</sup>	8.7±0.5 <sup>bc</sup>	21.1±1.0 <sup>C,d</sup>	7.95±0.4 <sup>B,c</sup>	2.46±0.4 <sup>abc</sup>
	11%	5.6±0.1 <sup>bcde</sup>	8.1±0.6 <sup>cd</sup>	23.3±0.5 <sup>B,c</sup>	9.60±0.9 <sup>A,b</sup>	2.55±0.1 <sup>ab</sup>
	14%	5.5±0.2 <sup>defg</sup>	8.4±0.3 <sup>bcd</sup>	25.4±0.4 <sup>A,b</sup>	9.24±0.2 <sup>AB,b</sup>	2.71±0.5 <sup>a</sup>
PG848 <sup>1)</sup>	8%	5.2±0.3 <sup>B,gh</sup>	9.2±0.7 <sup>A,a</sup>	21.4±0.3 <sup>C,d</sup>	7.36±0.6 <sup>B,c</sup>	1.34±0.3 <sup>gh</sup>
	11%	5.7±0.1 <sup>A,abc</sup>	8.1±0.2 <sup>B,cd</sup>	23.4±0.3 <sup>B,c</sup>	9.65±0.5 <sup>A,b</sup>	1.68±0.4 <sup>efg</sup>
	14%	5.6±0.0 <sup>A,bcde</sup>	8.1±0.2 <sup>B,cd</sup>	25.4±0.2 <sup>A,b</sup>	10.2±0.1 <sup>A,b</sup>	1.59±0.1 <sup>fgh</sup>
ZR1 + PG848	8%	5.3±0.0 <sup>C,efg</sup>	9.3±0.2 <sup>A,a</sup>	21.1±0.3 <sup>C,d</sup>	7.93±0.6 <sup>B,c</sup>	1.43±0.3 <sup>B,efg</sup>
	11%	5.8±0.1 <sup>A,a</sup>	7.8±0.4 <sup>C,d</sup>	23.0±0.6 <sup>B,c</sup>	10.2±0.2 <sup>A,b</sup>	2.04±0.1 <sup>A,cde</sup>
	14%	5.6±0.1 <sup>B,bcdef</sup>	8.3±0.5 <sup>B,bcd</sup>	25.4±0.5 <sup>A,b</sup>	10.1±0.8 <sup>A,b</sup>	1.83±0.1 <sup>A,def</sup>
TD623 + PG848	8%	5.4±0.1 <sup>defg</sup>	8.4±0.2 <sup>bcd</sup>	21.3±0.9 <sup>C,d</sup>	7.37±0.3 <sup>B,c</sup>	2.44±0.2 <sup>abc</sup>
	11%	5.6±0.1 <sup>bcde</sup>	8.3±0.5 <sup>bcd</sup>	23.4±1.0 <sup>B,c</sup>	9.49±0.8 <sup>A,b</sup>	2.22±0.1 <sup>bcd</sup>
	14%	5.4±0.1 <sup>defg</sup>	8.5±1.0 <sup>bcd</sup>	25.5±0.6 <sup>A,b</sup>	10.5±0.7 <sup>A,b</sup>	2.35±0.0 <sup>abc</sup>

<sup>1)</sup>ZR1, *Zagoccharomyces rouxii* KCCM 12066 as a positive strain; TD623, *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623 isolated in this study; PG848, *Pichia guilliermondii* JBCC 848 isolated in this study.

<sup>2)</sup>Different capital and small letters indicate significant differences of values in the same column between three samples with three different salt concentrations and between eighteen samples with different salt concentrations and inoculum types ( $p < 0.05$ ).

#### (4) 선발된 우수 균주를 적용한 다른 염농도로 제조된 장류의 향미성분 분석

염의 농도를 8, 11, 14%(w/v)로 조정된 장류 발효에 있어서 효모를 접종하지 않은 대조구와 본 연구로부터 고 알코올 생성 균주 및 향미 우수 균주로 분리된 *T. delbrueckii* JBCC 623, *P. guilliermondii* JBCC 848와 함께 장류의 주요 향미효모로 알려진 *Z. rouxii* 균주를 표준 균주를 사용하여 단일 또는 혼합균주 형태로 처리하여 발효 후 생성된 휘발성 향미성분을 purge and trap으로 추출한 후 GC-MS를 통해 살펴보았다. 장류의 특징적인 향미를 향상시키는 대표적인 휘발성 향미성분을 결과로써 Table 46에 표기하였다. 결과적으로, 모든 처리구에서

2-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-propanol, phenethyl alcohol, 1-propanol, ethyl acetate, acetic acid, 2-methylbutanoic acid, 3-methylbutanoic acid, 2-methylpropanoic acid, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methylpropanal, 2-butanone, heptan-3-one, 3-pentanone, 1-phenyl-ethanone 등의 성분들이 검출되었다. 그러나 14%의 염 농도로 발효된 샘플과 비교하여 8% salt 처리구에서 2-methyl-1-butanol, 2-methyl-2-propanol, 1-propanol, 2-methylbutanoic acid, 3-methylbutanoic acid 및 2-phenethyl acetate과 같은 일부의 alcohol류, acid류, ester류는 유의적으로 감소하였다. 더욱이 butanol, 3-methyl-1-butanol, ethyl propanoate를 포함하는 일부의 화합물들은 8% salt 처리구에서 아예 검출되지 않았다. 반면에 8% salt 처리구에서는 유의적으로 더 높은 수준의 aldehyde류(benzaldehyde, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methylpropanal) 수준을 보였다. 이러한 결과는 salt의 농도가 낮은 조건에서는 장류의 발효 중 이러한 aldehydes류가 생성 되더라도 그 성분들에 상응하는 alcohol류 또는 acid류로 전환하는 대사가 부족하다는 것을 제안한다(Yvon et al., 2001). 그러나 다양한 휘발성 화합물은 8% salt 조건하에도 불구하고 분리된 효모 균주를 적용 사용했을 때 유의적으로 증가하였다. 특히 *T. delbrueckii* JBCC 623와 *P. guillierondii* JBCC 848의 혼합 처리구는 14% 농도의 염을 사용하여 제조된 기본 장류와 가장 유사한 수준을 나타내는 것을 알 수 있었다. 반면에 이미 타 논문에서 mixed culture로서 가능성을 제시했던 *Z. rouxii*과 *P. guillierondii* JBCC 848의 혼합배양 처리구에서는 대부분의 화합물이 검출되지 못한 결과를 나타냈다(Wah et al., 2013). 더욱이 8%의 낮은 염농도 조건하에서 다섯가지의 다른 효모 스타터를 처리하여 발효된 장류의 physicochemical properties에 따른 차이를 PCA bi-plots을 통해 확인하였다(Fig. 85). 즉, *T. delbrueckii* JBCC 623 또는 *Z. rouxii*의 단일 처리구는 유의적으로 증가된 ethanol, 일부의 alcohol류, ketone류의 수준과 함께 하나의 클러스터를 형성하면서 positive PC1 지역에 위치하였다. 반면 *P. guillierondii* JBCC 848의 단일 처리구 또는 *Z. rouxii*과 *P. guillierondii* JBCC 848의 혼합배양 처리구는 완전하게 negative PC1 지역에 위치하였는데, 이는 butanol, 2-methyl-2-propanol, ethyl acetate, 2-methylpropanal, octanal, octanone과 같은 화합물들의 생성 수준이 negative하게 작용하였기 때문이다. 반면 이러한 *P. guillierondii* JBCC 848의 단일 또는 혼합 처리구는 PC2에 의하여 분리 될 수 있었다. 그러나 *T. delbrueckii* JBCC 623와 *P. guillierondii* JBCC 848의 혼합 처리구는 PC1과 PC2 둘다에 positive한 결과를 나타내면서, 결과적으로 11%~14%의 고 농도의 염을 함유하는 대조구와 유사한 이화학적 특성을 가지면서 같은 cluster를 형성하였다.

즉, 본 연구에서는 전통적으로 제조되는 장류의 발효과정 별 효모의 천이양상과 향미성분의 변화양상을 살펴보고, 장류의 저염화를 목적으로 전통장류로부터 고 알코올 및 향미를 생성하는 우수 효모 *Torulaspora delbrueckii* JBCC 623과 *Pichia guilliermondii* JBCC 848 균주를 분리하였다. 특히 분리된 효모 균주를 starter로 처리하여 장류의 저염화를 시험한 결과 두 균주를 mixed culture로서 적용하였을 때 가장 효과적으로 알코올을 생성하고 부패균을 억제하며 고염 장류와 가장 유사한 수준으로 향미성분 증강에 기여한 다는 것을 알 수 있었다.

Table 46. Major flavor compounds of fermented soy-sauce with different salt content of 8, 11 and 14% by GC-MS analysis.

No	Flavor compounds	RT <sup>3)</sup>	Relative peak area <sup>1)</sup>							
			No-inoculum			Single-culture <sup>2)</sup>				
			8%	11%	14%	ZR1	TD623	PG848	ZR +PG	TD +PG
			8%	8%	8%	8%	8%	8%		
<b><i>Alcohols</i></b>										
1	n-Butanol	4.44	ND <sup>f4)</sup>	1.63 <sup>c</sup>	1.00 <sup>d</sup>	2.64 <sup>a</sup>	1.73 <sup>bc</sup>	0.58 <sup>e</sup>	ND <sup>f</sup>	1.88 <sup>b</sup>
2	2-Methyl-1-butanol	9.74	0.20 <sup>f</sup>	0.23 <sup>f</sup>	1.00 <sup>e</sup>	2.34 <sup>b</sup>	1.93 <sup>c</sup>	4.31 <sup>a</sup>	4.39 <sup>a</sup>	1.41 <sup>d</sup>
3	3-Methyl-1-butanol	9.67	ND <sup>g</sup>	0.50 <sup>f</sup>	1.00 <sup>de</sup>	0.98 <sup>e</sup>	1.45 <sup>c</sup>	2.13 <sup>b</sup>	3.41 <sup>a</sup>	1.15 <sup>d</sup>
4	2-Methyl-1-propanol	7.07	1.50 <sup>d</sup>	2.35 <sup>b</sup>	1.00 <sup>e</sup>	1.91 <sup>c</sup>	2.60 <sup>a</sup>	0.57 <sup>f</sup>	ND <sup>g</sup>	2.52 <sup>ab</sup>
5	2-Methyl-2-propanol	4.44	0.62 <sup>d</sup>	1.16 <sup>ab</sup>	1.00 <sup>b</sup>	1.08 <sup>ab</sup>	0.82 <sup>c</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	1.25 <sup>a</sup>
6	Phenethyl alcohol	18.2	0.51 <sup>g</sup>	4.45 <sup>a</sup>	1.00 <sup>e</sup>	0.71 <sup>f</sup>	0.60 <sup>fg</sup>	2.75 <sup>b</sup>	1.89 <sup>c</sup>	1.37 <sup>d</sup>
7	1-Pentanol	10.4	ND <sup>f</sup>	1.25 <sup>bc</sup>	1.00 <sup>d</sup>	1.56 <sup>a</sup>	1.36 <sup>b</sup>	0.41 <sup>e</sup>	1.13 <sup>cd</sup>	0.99 <sup>d</sup>
8	1-Propanol	5.46	0.75 <sup>c</sup>	1.55 <sup>a</sup>	1.00 <sup>b</sup>	0.41 <sup>e</sup>	0.51 <sup>de</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	0.62 <sup>d</sup>
<b><i>Esters</i></b>										
9	Ethyl acetate	6.14	0.86 <sup>c</sup>	1.14 <sup>b</sup>	1.00 <sup>bc</sup>	0.69 <sup>d</sup>	1.48 <sup>a</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	1.02 <sup>b</sup>
10	Ethyl propanoate	8.55	ND <sup>e</sup>	0.89 <sup>d</sup>	1.00 <sup>cd</sup>	1.31 <sup>a</sup>	1.10 <sup>bc</sup>	ND <sup>e</sup>	1.20 <sup>ab</sup>	0.93 <sup>d</sup>
11	2-Phenethyl acetate	20.1	ND <sup>f</sup>	0.32 <sup>e</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.54 <sup>d</sup>	0.71 <sup>bc</sup>	ND <sup>f</sup>	0.65 <sup>c</sup>	0.77 <sup>b</sup>
<b><i>Acids</i></b>										
12	Acetic acid	7.50	1.05 <sup>de</sup>	1.20 <sup>cd</sup>	1.00 <sup>e</sup>	1.97 <sup>a</sup>	1.38 <sup>bc</sup>	0.82 <sup>f</sup>	1.40 <sup>b</sup>	1.28 <sup>bc</sup>
13	2-Methylbutanoic acid	12.9	0.36 <sup>f</sup>	0.77 <sup>e</sup>	1.00 <sup>d</sup>	1.70 <sup>b</sup>	1.98 <sup>a</sup>	0.76 <sup>e</sup>	1.23 <sup>c</sup>	1.42 <sup>c</sup>
14	3-Methylbutanoic acid	12.7	0.55 <sup>c</sup>	0.98 <sup>b</sup>	1.00 <sup>b</sup>	1.34 <sup>a</sup>	0.89 <sup>b</sup>	0.45 <sup>c</sup>	1.01 <sup>b</sup>	0.86 <sup>b</sup>
15	2-Methylpropanoic acid	10.9	0.21 <sup>d</sup>	1.05 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.51 <sup>c</sup>	0.72 <sup>b</sup>	0.05 <sup>e</sup>	0.54 <sup>c</sup>	0.67 <sup>b</sup>
<b><i>Aldehydes</i></b>										
16	Benzaldehyde	15.0	3.20 <sup>a</sup>	ND <sup>f</sup>	1.00 <sup>d</sup>	2.29 <sup>b</sup>	2.06 <sup>b</sup>	0.73 <sup>e</sup>	0.20 <sup>f</sup>	1.28 <sup>c</sup>
17	Butyraldehyde	5.83	ND <sup>d</sup>	2.00 <sup>a</sup>	1.00 <sup>b</sup>	2.03 <sup>a</sup>	1.83 <sup>a</sup>	0.74 <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	1.16 <sup>b</sup>
18	2-Methylbutanal	7.55	3.79 <sup>a</sup>	1.70 <sup>d</sup>	1.00 <sup>e</sup>	2.63 <sup>c</sup>	3.12 <sup>b</sup>	1.15 <sup>e</sup>	ND <sup>f</sup>	1.12 <sup>e</sup>
19	3-Methylbutanal	7.36	3.39 <sup>a</sup>	1.61 <sup>d</sup>	1.00 <sup>e</sup>	2.53 <sup>b</sup>	2.26 <sup>c</sup>	1.10 <sup>e</sup>	0.15 <sup>f</sup>	1.00 <sup>e</sup>
20	2-Methylpropanal	4.95	1.88 <sup>a</sup>	1.66 <sup>b</sup>	1.00 <sup>d</sup>	1.29 <sup>c</sup>	1.06 <sup>d</sup>	0.92 <sup>d</sup>	ND <sup>e</sup>	0.90 <sup>d</sup>
21	2-Methyl-2-propenal	5.24	ND <sup>e</sup>	1.58 <sup>a</sup>	1.00 <sup>d</sup>	1.30 <sup>b</sup>	1.15 <sup>c</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	1.06 <sup>cd</sup>
22	n-Octanal	15.3	1.37 <sup>b</sup>	1.54 <sup>b</sup>	1.00 <sup>c</sup>	1.86 <sup>a</sup>	1.77 <sup>a</sup>	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>	0.87 <sup>c</sup>
<b><i>Ketones</i></b>										
23	2-Butanone	5.88	0.97 <sup>c</sup>	1.18 <sup>b</sup>	1.00 <sup>bc</sup>	1.59 <sup>a</sup>	1.63 <sup>a</sup>	0.62 <sup>d</sup>	ND <sup>e</sup>	1.09 <sup>bc</sup>
24	2,3-Dimethylhexane	12.3	0.89 <sup>c</sup>	1.46 <sup>b</sup>	1.00 <sup>c</sup>	1.92 <sup>a</sup>	2.10 <sup>a</sup>	0.17 <sup>d</sup>	1.33 <sup>b</sup>	1.42 <sup>b</sup>

25	Ethyl propyl ketone	10.6	0.96 <sup>c</sup>	1.65 <sup>b</sup>	1.00 <sup>c</sup>	1.77 <sup>b</sup>	2.00 <sup>a</sup>	0.70 <sup>d</sup>	ND <sup>e</sup>	1.11 <sup>c</sup>
26	Heptan-2-one	13.0	0.90 <sup>d</sup>	1.55 <sup>b</sup>	1.00 <sup>d</sup>	1.74 <sup>a</sup>	1.37 <sup>c</sup>	0.63 <sup>e</sup>	ND <sup>f</sup>	0.99 <sup>d</sup>
27	Heptan-3-one	12.9	1.20 <sup>b</sup>	1.52 <sup>a</sup>	1.00 <sup>c</sup>	1.62 <sup>a</sup>	1.61 <sup>a</sup>	0.66 <sup>d</sup>	0.17 <sup>e</sup>	0.98 <sup>c</sup>
28	2-Octanone	15.1	0.85 <sup>e</sup>	1.59 <sup>c</sup>	1.00 <sup>d</sup>	1.97 <sup>a</sup>	1.83 <sup>b</sup>	0.69 <sup>f</sup>	ND <sup>g</sup>	1.04 <sup>d</sup>
29	3-Octanone	13.7	ND <sup>e</sup>	2.78 <sup>a</sup>	1.00 <sup>d</sup>	1.54 <sup>b</sup>	1.48 <sup>b</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	1.17 <sup>c</sup>
30	3-Pentanone	8.47	0.66 <sup>e</sup>	1.67 <sup>b</sup>	1.00 <sup>d</sup>	1.94 <sup>a</sup>	1.75 <sup>b</sup>	0.61 <sup>e</sup>	0.20 <sup>f</sup>	1.18 <sup>c</sup>
31	1-Phenyl-ethanone	17.1	3.09 <sup>a</sup>	1.55 <sup>c</sup>	1.00 <sup>d</sup>	2.84 <sup>a</sup>	2.31 <sup>b</sup>	0.60 <sup>e</sup>	0.55 <sup>e</sup>	1.68 <sup>c</sup>
<b><i>Other</i></b>										
32	Phenol	16.3	2.46 <sup>a</sup>	ND <sup>d</sup>	1.00 <sup>c</sup>	1.40 <sup>b</sup>	1.03 <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>	0.99 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>The increment values are calculated by volatile flavor compounds in other samples divided by volatile flavor compounds in a non-inoculated soy sauce sample fermented with 14% (w/v) salt and expressed as a ratio; ND: no detection.

<sup>2)</sup>ZR1, *Zagoccharomyces rouxii* KCCM 12066 as a positive strain; TD623, *Torulasporea delbrueckii* JBCC 623 isolated in this study; PG848, *Pichia guilliermondii* JBCC 848 isolated in this study; ZR, TD, PG, ZR/PG and TD/PG represent inoculum samples with salt contents of 8%.

<sup>3)</sup>RT: retention time.

<sup>4)</sup>Different small letters indicate significant differences of values in the same row between eight samples with different salt concentrations and inoculum types ( $p < 0.05$ ).



#### 4. 수행 연구 결론

먼저, 전통 장류의 전반적인 발효기간 동안 효모 미생물 군집과 향미 성분의 변화를 살펴보았다. 발효기간 동안 효모의 생균수는  $4.56 \times 10^3$ 에서  $9.06 \times 10^5$ 으로 지속적으로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 *Candida*, *Pichia* 및 *Rhodotorula* 균주가 전반적인 발효기간 동안 우점화 되어 있다는 것을 알 수 있었다. 반면 *Debaryomyces*, *Microbotryum*, *Tetrapisispora*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces*, *Zygosaccharomyces* 효모는 열세종으로 검출되었다. 또한 장류의 발효기간 동안 수행된 향미분석 결과, 장류의 초기단계에는 상대적으로 높은 함량의 alcohol류를 포함하였고, 발효가 진행됨에 따라서 점점 휘발성 acid류의 함량이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 더욱이 본 연구에서는 이러한 장류의 발효기간 동안 분리된 효모 균주로부터, 높은 함량의 알코올을 생성하는 *Torulaspota delbrueckii* JBCC 623 균주와 높은 함량의 3-methyl-1-butanol을 생성하는 *Pichia guilliermondii* JBCC 848 효모 균주를 분리하였다. 장류의 각기 다른 발효 단계로부터 선발된 이 두 효모는 최종적으로 장류의 저염화로 발생될 수 있는 미생물학적 및 이화학적 변화를 조절하기 위한 스타터 균주으로써 적용하였다. 즉, 다른 농도의 염을 함유하는 장류는 선발된 효모 균주의 단일 균주 또는 혼합균주 형태로 접종함으로써 발효한 후 염농도 및 스타터 종류별로 발효된 장류의 이화학적 및 미생물학적 변화의 차이를 살펴보았다. 그 결과, 효모 스타터를 적용한 모든 장류에서 염 농도의 저하로 인한 부패균인 *Staphylococcus* 및 *Enterococcus* sp. 균주를 저해 할 수 있었다. 더욱이 두 가지 선발 효모를 단일 균주로 접종한 저염 발효 장류와 비교하여 혼합 균주로 접종한 발효 장류의 경우, 고염 발효 장류와 가장 유사한 향미 성분을 함유하는 것으로 나타나났다. 즉, 본 연구로부터 분리된 고 알코올 생성 효모 *T. delbrueckii* JBCC 623 균주와 향미 증진능 효모 *P. guilliermondii* JBCC 848 균주의 혼합 스타터를 사용함으로써 장류를 저염화로 인해 야기되는 향미 변화와 부패 미생물의 생육을 저해할 수 있다는 것을 확인하였다.

### 3절 발효미생물 균체 대량생산 scale-up 배양 공정에 대비한 저가의 산업용 복합 생산 배지 개발/ 발효미생물 균체의 액상·고상 배양을 위한 최적 발효조 확립

#### 1. 연구개발 목표

- 우수 균주로 선발된 미생물을 대량 생산하기 위해 통계적 실험법을 이용하여 산업용 저가 배지를 개발
- 미생물의 액상, 고상 배양을 위한 최적의 발효조건을 확립

#### 2. 연구 수행 방법

가. *Candida lactis* KCCM 101019, *Zygosaccharomyces bailii* KCCM 101021, *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 100971의 통계적 방법을 이용한 배지 최적화

(1) 스펀지 마개와 실리콘 마개를 사용한 미생물 성장곡선

(가) 스펀지 마개에서의 *C. lactis* KCCM 101019 성장곡선

생산배지를 최적화함에 앞서 성장배지에서 *C. lactis* KCCM 101019의 성장곡선을 확인하였다 (Fig. 86). 성장배지인 YM broth에서 180 rpm, 29°C의 조건으로 36시간 동안 배양한 결과 미생물의 성장이 활발한 시기인 15시간째를 생산배지 접종을 위한 성장시간으로 정하였다. 성장배지에서 15시간 배양한 균을 생산배지에 접종하여 실험을 진행하였다.

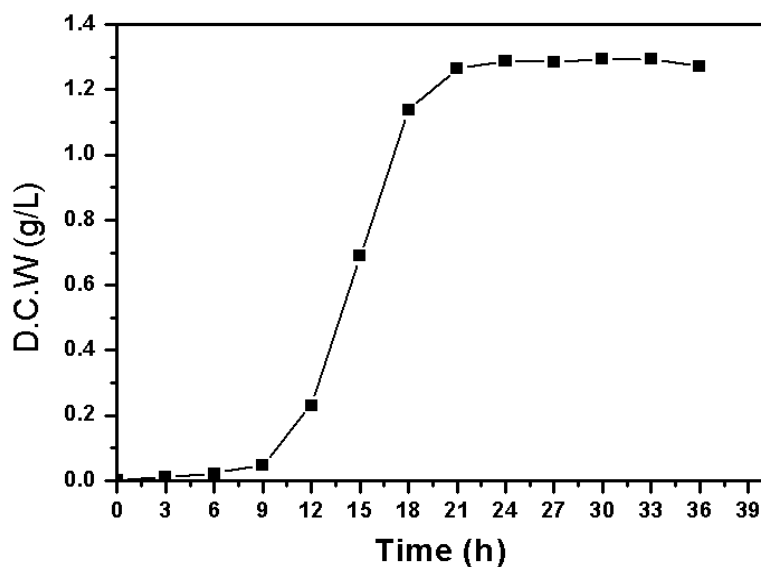


Fig. 86. Growth curve at YM broth using sponge stoppers.



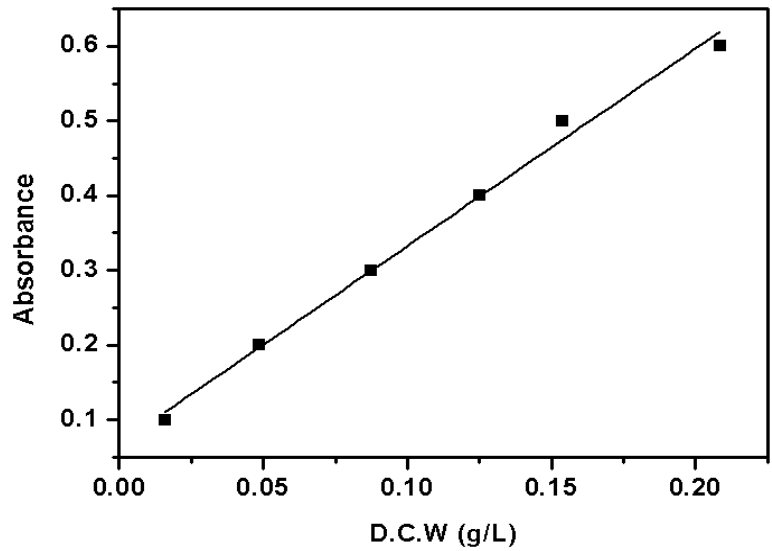


Fig. 87. Standard curve for dry cell weight ( $\lambda$ ; 660nm) using sponge stoppers.

$$Y = aX + b$$

Parameter	Value	R	N	P
a	2.64247	0.99342	6	<0.001
b	0.06832			

(나) 실리콘 마개에서의 *C. lactis* KCCM 101019 성장곡선

생산배지를 최적화함에 앞서 성장배지에서 *C. lactis* KCCM 101019의 성장곡선을 확인하였다 (Fig. 88). 성장배지인 YM broth에서 180 rpm, 29°C의 조건으로 27시간 동안 배양한 결과 미생물의 성장이 활발한 시기인 15시간째를 생산배지 접종을 위한 성장시간으로 정하였다. 성장배지에서 15시간 배양한 균을 생산배지에 접종하여 실험을 진행하였다.

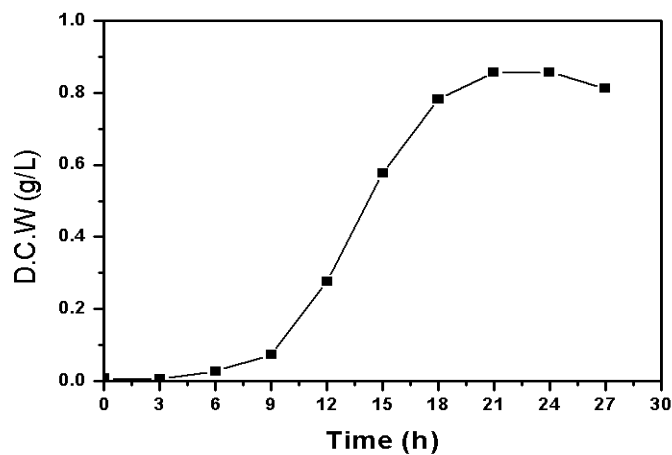


Fig. 88. Growth curve at YM broth using sili stoppers.

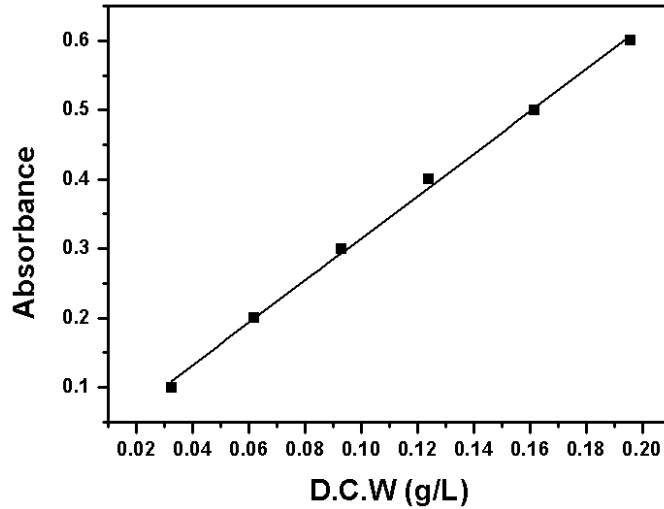


Fig. 89. Standard curve for dry cell weight ( $\lambda$ ; 660nm) using sili stoppers.  
 $Y = aX + b$

Parameter	Value	R	N	P
a	3.04612	0.99819	6	<0.001
b	0.01057			

(다) 스펀지 마개에서의 *Z. bailii* KCCM 101021 성장곡선

생산배지를 최적화함에 앞서 성장배지에서 *Z. bailii* KCCM 101021의 성장곡선을 확인하였다 (Fig. 90). 성장배지인 YM broth에서 180 rpm, 29°C의 조건으로 54시간 동안 배양한 결과 미생물의 성장이 활발한 시기인 24시간째를 생산배지 접종을 위한 성장시간으로 정하였다. 성장배지에서 24시간 배양한 균을 생산배지에 접종하여 실험을 진행하였다.

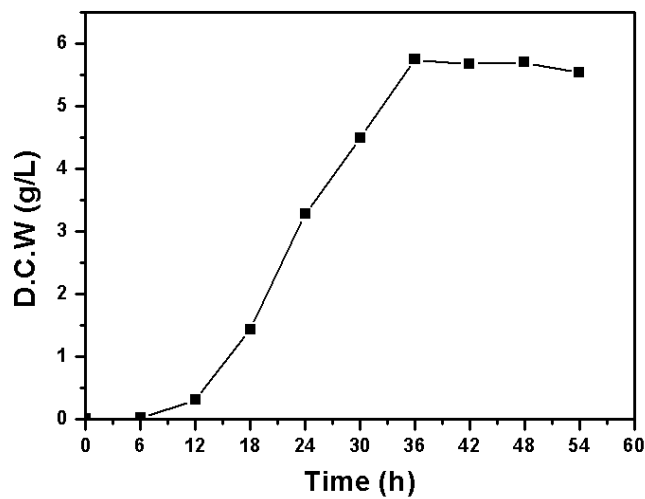


Fig. 90. Growth curve at YM broth using sponge stoppers.

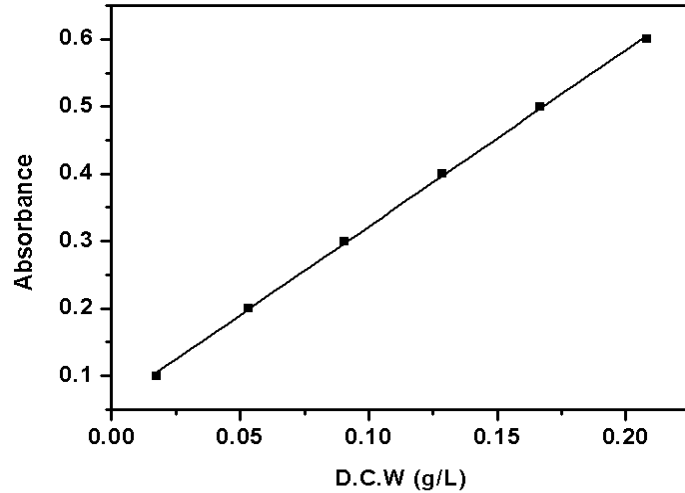


Fig. 91. Standard curve for dry cell weight ( $\lambda$ ; 660nm) using sponge stoppers.  
 $Y = aX + b$

Parameter	Value	R	N	P
a	2.62707	0.99942	6	<0.001
b	0.05895			

(라) 실리콘 마개에서의 *Z. bailii* KCCM 101021 성장곡선

생산배지를 최적화함에 앞서 성장배지에서 *Z. bailii* KCCM 101021의 성장곡선을 확인하였다 (Fig. 92). 성장배지인 YM broth에서 180 rpm, 29°C의 조건으로 54시간 동안 배양한 결과 미생물의 성장이 활발한 시기인 24시간째를 생산배지 접종을 위한 성장시간으로 정하였다. 성장배지에서 24시간 배양한 균을 생산배지에 접종하여 실험을 진행하였다.

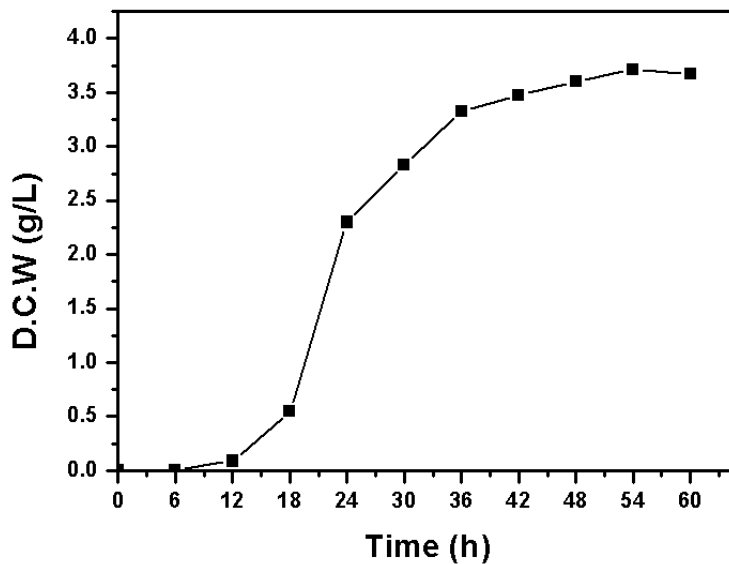


Fig. 92. Growth curve at YM broth using sili stoppers.

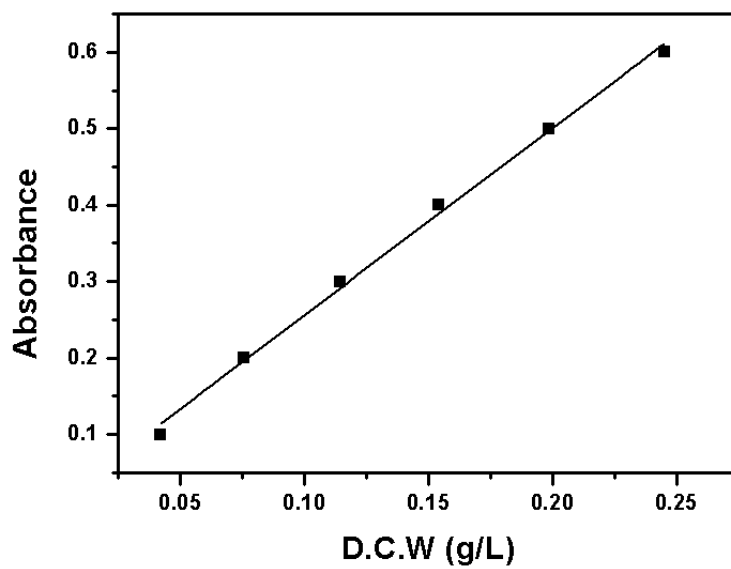


Fig. 93. Standard curve for dry cell weight ( $\lambda$ ; 660nm) using sili stoppers.  
 $Y = aX + b$

Parameter	Value	R	N	P
a	2.44821	0.99686	6	<0.001
b	0.01144			

(마) 성장배지에서 *Z. rouxii* KCCM 100971의 성장곡선

생산배지를 최적화함에 앞서 성장배지에서 *Z. rouxii* KCCM 100971의 성장곡선을 확인하였다 (Fig. 94). 성장배지인 YM broth에서 180 rpm, 29°C의 조건으로 60시간 동안 배양한 결과 미생물의 성장이 활발한 시기인 36시간째를 생산배지 접종을 위한 성장시간으로 정하였다. 성장배지에서 36시간 배양한 균을 생산배지에 접종하여 실험을 진행하였다.

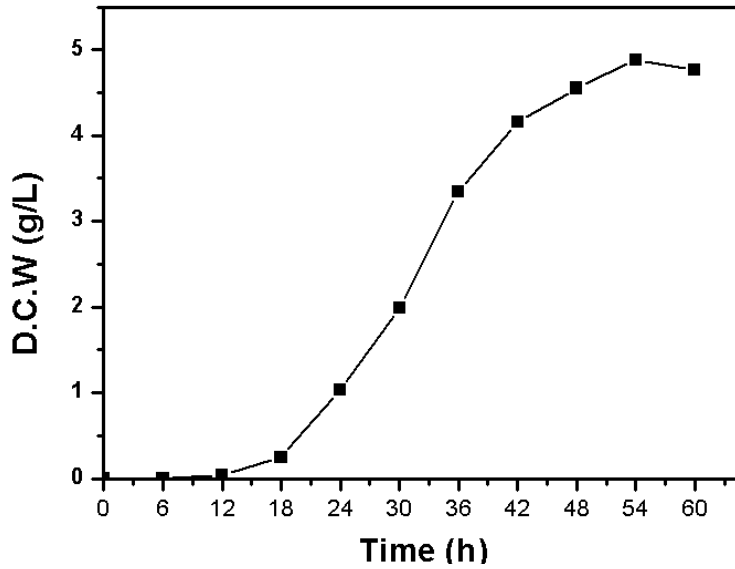


Fig. 94. growth curve at YM broth.

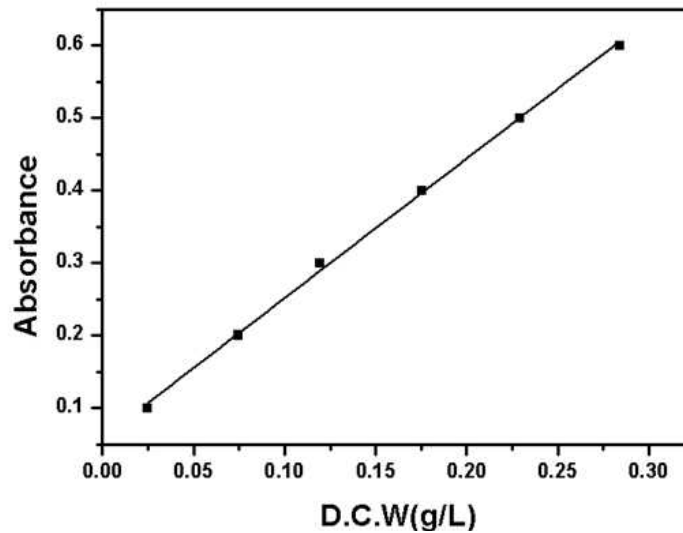


Fig. 95. Standard curve for dry cell weight ( $\lambda$ ; 660nm),  $Y = aX + b$ .

Parameter	Value	R	N	P
a	1.92481	0.9987	6	<0.0001
b	0.05884			

(2) 성장배지에서 스펀지 마개와 실리콘 마개의 에탄올함량과 D.C.W 측정

성장 배지인 YM broth에서 180 rpm, 29°C 조건으로 3균주의 에탄올의 함량(Fig. 96)과 D.C.W(Fig. 97)를 측정해 보았다. 3균주의 샘플을 취해 에탄올 함량을 분석한 결과 스펀지 마개를 사용한 *C. lactis* KCCM 101019의 에탄올 함량은 10.7g/L 로 3균주 중 가장 많은 에탄올의 양이 나타났으며, D.C.W는 0.87g/L이 나왔다. *Z. bailii* KCCM 101021의 에탄올 양은 1.6g/L, D.C.W는 4.0g/L, *Z. rouxii* KCCM 100971의 에탄올 양은 0.59g/L로 나왔고, D.C.W는 4.75g/L로 나왔다. 실리콘 마개를 사용했을 때 *C. lactis* KCCM 101019의 에탄올 함량은 3.2g/L로 스펀지 마개의 결과와 비슷하게 3균주 중 가장 많은 에탄올의 양이 나왔으며, D.C.W는 0.77g/L이 나왔다. *Z. bailii* KCCM 101021의 에탄올 양은 0.18g/L, D.C.W는 3.95g/L, *Z. rouxii* KCCM 100971의 에탄올 양은 0.68g/L, D.C.W 는 3.23g/L 나타났다.

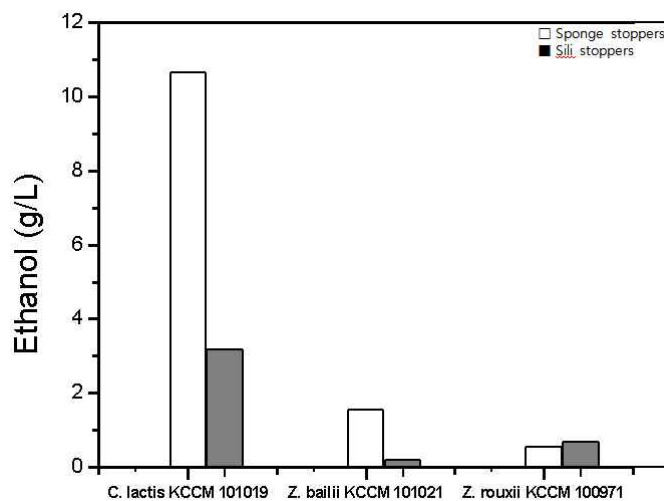


Fig. 96. Effect of sponge stoppers and sili stopper on ethanol production of yeasts.

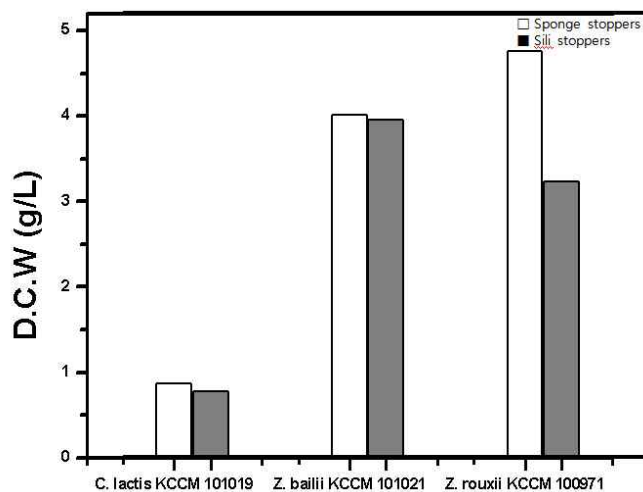


Fig. 97. Effect of sponge stoppers and sili stopper a dry cell weight of yeasts.

### (3) 스펀지 마개와 실리콘 마개를 이용한 생산곡선

#### (가) 스펀지 마개와 실리콘 마개를 이용한 *C. lactis* KCCM 101019의 생산곡선

생산배지에서 *C. lactis* KCCM 101019를 스펀지 마개와 실리콘 마개를 사용하여 180 rpm, 29°C 조건에서 생산 곡선을 확인하였다(Fig. 98). 생산배지에서 27시간 키워본 결과, 스펀지 마개를 사용 했을 때 21시간에 정지기의 모습이 나타났고, 에탄올 함량은 11.88g/L 으로 측정 되었다. 실리콘 마개를 사용 했을 때는 21시간에 정지기가 나타났고, 에탄올의 양은 10.91g/L 로 나왔다. 이 결과에 따라 실리콘 마개를 사용 했을 때, 가장 많은 에탄올의 양이 나오는 시간인 21시간을 분석시간으로 정하였다.

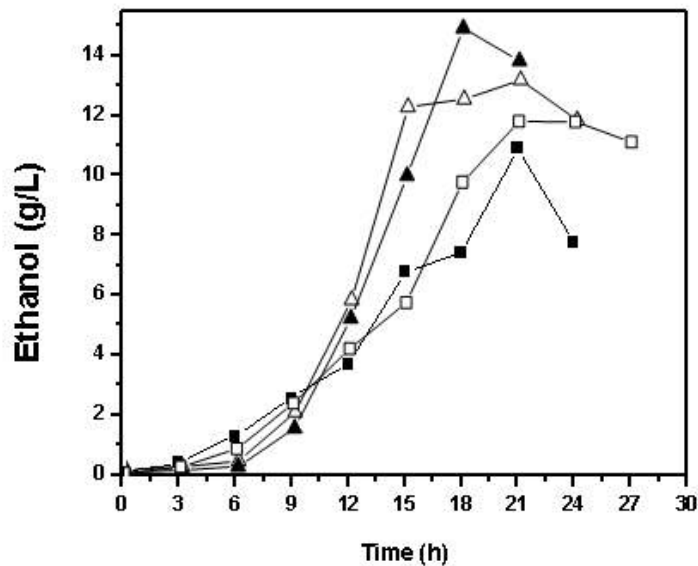


Fig. 98. Ethanol production curve by two strains of yeasts using different stoppers. □; *C. lactis* KCCM 101019 using Sponge stoppers, ■; *C. lactis* KCCM 101019 using Sili stoppers, △; *Z. bailii* KCCM 101021 using Sponge stoppers, ▲; *Z. bailii* KCCM 101021 using Sili stoppers.

#### (나) 스펀지 마개와 실리콘 마개를 이용한 *Z. bailii* KCCM 101021 생산곡선

생산배지에서 *Z. bailii* KCCM 101021를 스펀지 마개와 실리콘 마개를 사용하여 180 rpm, 29°C 조건에서 생산 곡선을 확인하였다(Fig. 98). 생산배지에서 24시간 키워본 결과, 스펀지 마개를 사용 했을 때는 21시간에 정지기의 모습이 나타났고, 에탄올 함량은 13.4g/L 으로 측정 되었다. 실리콘 마개를 사용 했을 때는 18시간에 정지기가 나타났고, 에탄올의 양은 15.0g/L 로 나왔다. 이 결과에 따라 실리콘 마개를 사용 했을 때, 가장 많은 에탄올의 양이 나오는 시간인 18시간을 분석시간으로 정하였다.

(다) *Z. rouxii* KCCM 100971 생산 곡선

생산배지에서 *Z. rouxii* KCCM 100971의 생산 곡선을 확인하였다(Fig. 99). 생산배지에서 180 rpm, 29°C의 조건으로 48시간 동안 배양한 결과 42시간대에 정지기의 모습이 나타났고, 38.4g/L로 가장 많은 에탄올이 생성이 되었다. 가장 많은 에탄올의 함량이 나오는 시간인 42시간을 분석 시간으로 정하였다.

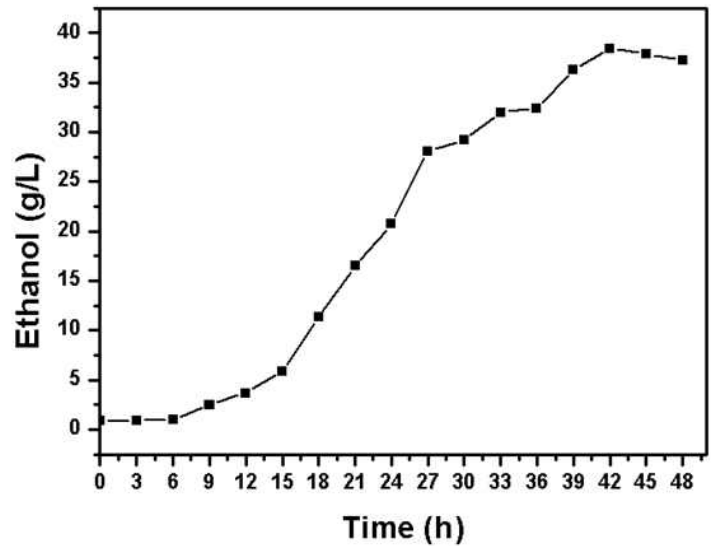


Fig. 99. Ethanol production curve by *Z. rouxii* KCCM 100971 in production medium.

(4) 생산배지에서의 스펀지마개와 실리콘 마개의 에탄올 함량 과 D.C.W의 통계적 비교

(가) *C. lactis* KCCM 101019를 이용한 스펀지마개와 실리콘 마개의 에탄올 함량과 D.C.W의 통계적 비교

생산배지에서 180 rpm, 29°C 조건으로 *C. lactis* KCCM 101019를 스펀지 마개는 24시간 배양하고, 실리콘 마개는 21시간 배양 후, 에탄올 함량(Fig. 100)과 D.C.W(Fig. 101)의 값을 측정하고 통계처리를 하였다. 스펀지 마개 사용 시 에탄올 함량은 11.87g/L로 나왔고, 실리콘 마개 사용 시 11.08g/L로 두 마개의 유의적인 차이는 없었다. D.C.W의 경우 스펀지 마개에서는 1.48g/L, 실리콘 마개에서는 1.46g/L로 D.C.W 또한 각 마개 간 유의적인 차이는 없었다.



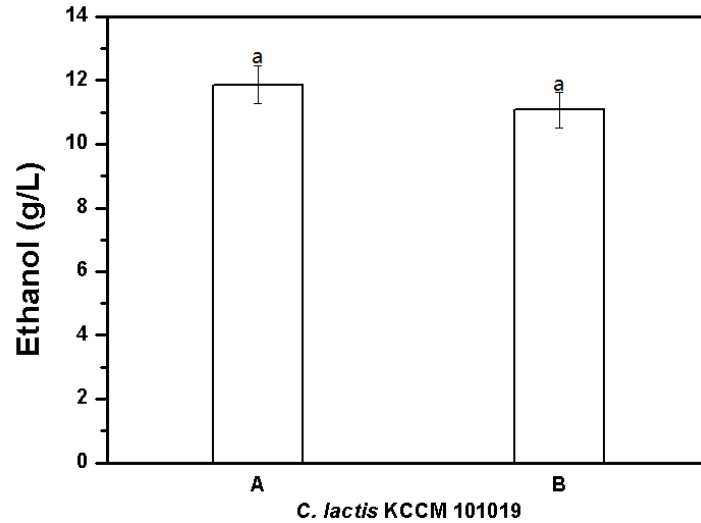


Fig. 100. Comparison of ethanol concentration of *C. lactis* KCCM 101019 using different stoppers. A, sponge stopper; B, sili stopper. Data were expressed as mean±SD(n=3). Different characters were significantly different( $p<0.05$ ).

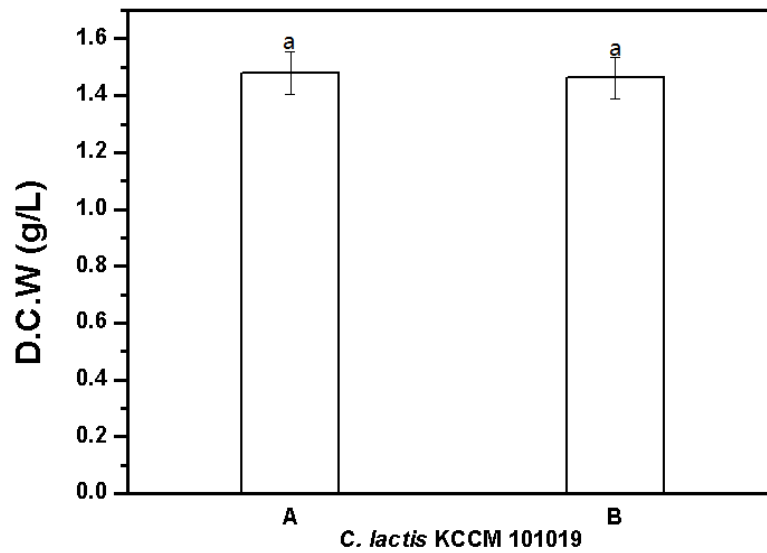


Fig. 101. Comparison of dry cell weight of two strains of *C. lactis* KCCM 101019 using different stoppers. A, sponge stopper; B, sili stopper. Data were expressed as mean±SD (n=3). Different characters were significantly different ( $p<0.05$ ).

(나) *Z. bailii* KCCM 101021를 이용한 스펀지마개와 실리콘 마개의 에탄올 함량 과 D.C.W의 통계적 비교

생산배지에서 180 rpm, 29°C 조건으로 *Z. bailii* KCCM 101021를 스펀지 마개는 21시간 배양하고, 실리콘 마개는 18시간 배양 후, 에탄올 함량(Fig. 102)과 D.C.W(Fig. 103)의 값을 측정하고 통계처리를 하였다. 스펀지 마개 사용 시 에탄올 함량은 13.4g/L로 나왔고, 실리콘 마개 사용 시 15.0g/L로 두 마개의 유의적인 차이가 있었다. D.C.W의 경우 스펀지 마개 사용 시 4.83g/L, 실리콘 마개 사용 시 4.54g/L로 두 마개 간 유의적인 차이는 없었다.

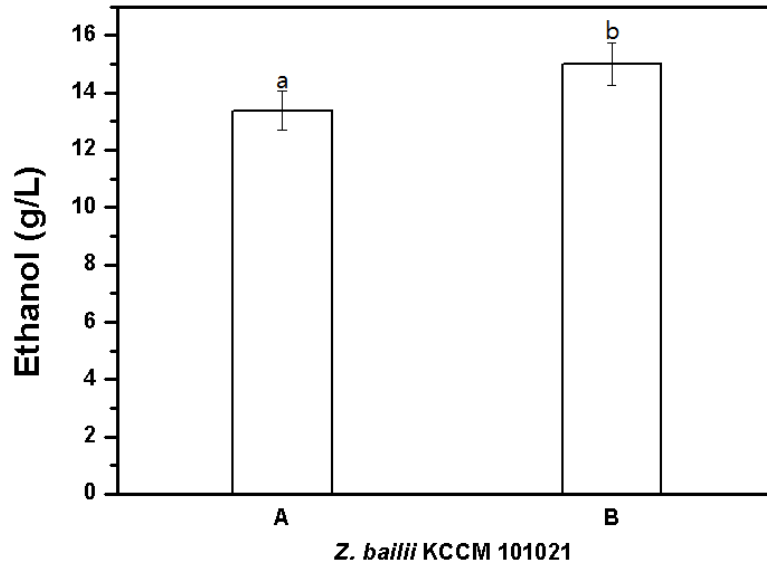


Fig. 102. Comparison of ethanol concentration of *Z. bailii* KCCM 101021 using different stoppers. A, sponge stopper; B, sili stopper. Data were expressed as mean±SD(n=3). Different characters were significantly different( $p < 0.05$ ).

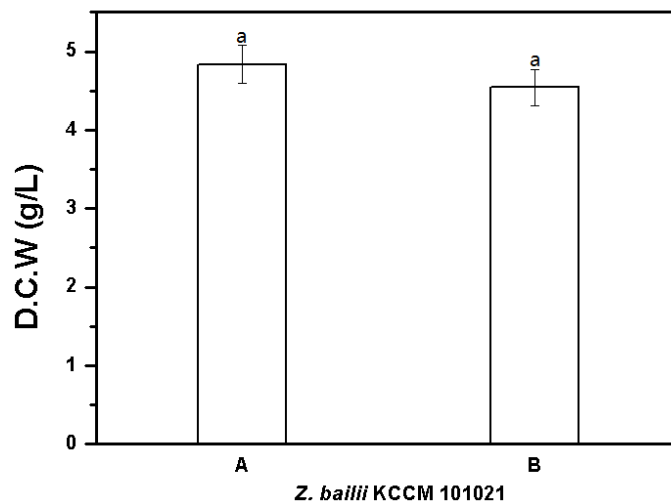


Fig. 103. Comparison of dry cell weight of two strains of *Z. bailii* KCCM 101021 using different stoppers. A, sponge stopper; B, sili stopper. Data were expressed as mean±SD (n=3). Different characters were significantly different( $p < 0.05$ ).

(5) One factor at a time(OFAT) 방법을 이용한 영양원의 선정

(가) *C. lactis* KCCM 101019의 탄소원 선정

기본배지의 성분에서 탄소원인 glucose를 대조구로 malt, starch, fructose, sucrose, maltose, galactose, xylose로 바꾸어 180 rpm, 29°C 조건으로 21시간 배양한 후, D.C.W 와 에탄올 함량을 측정해 보았다(Fig. 104)(Ann, et al., 1997). 가장 많은 에탄올을 보인 탄소원은 fructose(7.72g/L)로 대조구인 glucose(5.99g/L) 보다 약 1.2 배정도 증가량을 보였다. 또한 sucrose(6.32g/L)로 약 1.05배 증가량을 보였다. D.C.W의 경우 sucrose (2.22g/L)가 대조구인 glucose(2.04g/L) 보다 약 1.08배로 나타났고, fructose는 1.92g/L로 측정이 되었다.

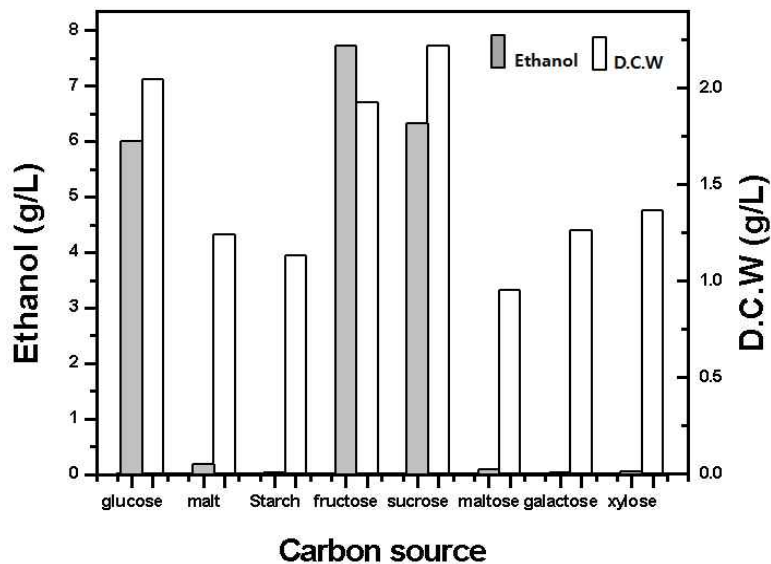


Fig. 104. Effect of various carbon sources on dry cell weight and ethanol concentration using *C. lactis* KCCM 101019.

나. *Zygosaccharomyces bailii* KCCM 101021의 통계적 방법을 이용한 배지최적화

(1) One factor at a time 방법을 이용한 영양원 선별

(가) 탄소원 결과

기본배지의 성분에서 탄소원인 glucose를 대조구로 malt, starch, fructose, sucrose, maltose, galactose, xylose로 바꾸어 180 rpm, 29°C 조건으로 18시간 배양한 후, D.C.W 와 에탄올 함량을 측정해 보았다(Fig. 105)(Ann, et al., 1997). 가장 많은 에탄올을 보인 탄소원은 fructose(9.7g/L)로 대조구인 glucose(8.04g/L) 보다 약 1.2 배정도 증가량을 보였고, sucrose 의 경우는 0.006g/L 값이 측정이 되었다. D.C.W의 경우 대조구인 glucose(3.49g/L)가 가장 많은 양이 측정이 되었고, fructose는 3.12g/L, sucrose 는 1.14g/L이 측정이 되었다.

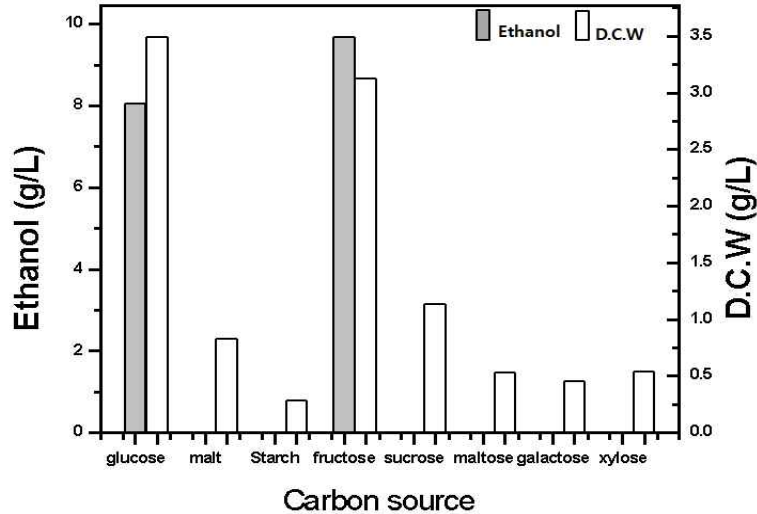


Fig. 105. Effect of various carbon sources on dry cell weight and ethanol concentration using *Z. bailii* KCCM 101021.

#### (나) 질소원 결과

탄소원 못지않게 중요한 배지성분인 질소원은 배양액내에서 세포성장 및 에너지 대사를 위해 이용될 뿐 아니라 다양한 아미노산의 공급원이다. 다양한 질소원의 이용 정도는 세포가 가진 분해 능력에 따라 좌우된다. 대부분의 발효미생물은 무기태나 유기태의 질소를 이용할 수 있고, 유기태 질소는 아미노산, 단백질 또는 요소로 공급된다. 질소는 효소를 포함한 세포 내 단백질, DNA, RNA의 원료로서 세포의 성장에 필수적이며, 배지 중의 질소량에 따라 미생물의 성장이 지배된다. 앞에서 언급했듯이 각종 미생물 배양에 일반적으로 이용되는 질소원은 아미노산류이고 미생물의 성장은 각종 아미노산을 함유한 배지에서 잘 성장 한다. 본 연구에서는 기존 생산배지를 바탕으로 하여 탄소원 조사 실험을 통해 결정한 glucose:fructose(4:1)을 이용하고  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , soymeal,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 메주가루, malt extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , soybean flour 그리고 yeast extract 을 질소원으로 하여 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 및 균체량 생산에 미치는 영향을 확인 하였다(Fig. 106)(Jang et al., 2009). 실험결과, 사용된 질소원에 따라 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 생산량은 0.26 ~ 15.13 g/L 그리고 균체량은 0.09 ~ 3.67 g/L으로 확인 되었다. 가장 많이 생산된 알코올은 yeast extract를 사용했을 때(Fig. 21), 15.13 g/L, 균체량은 3.67 g/L으로 확인 되었다.

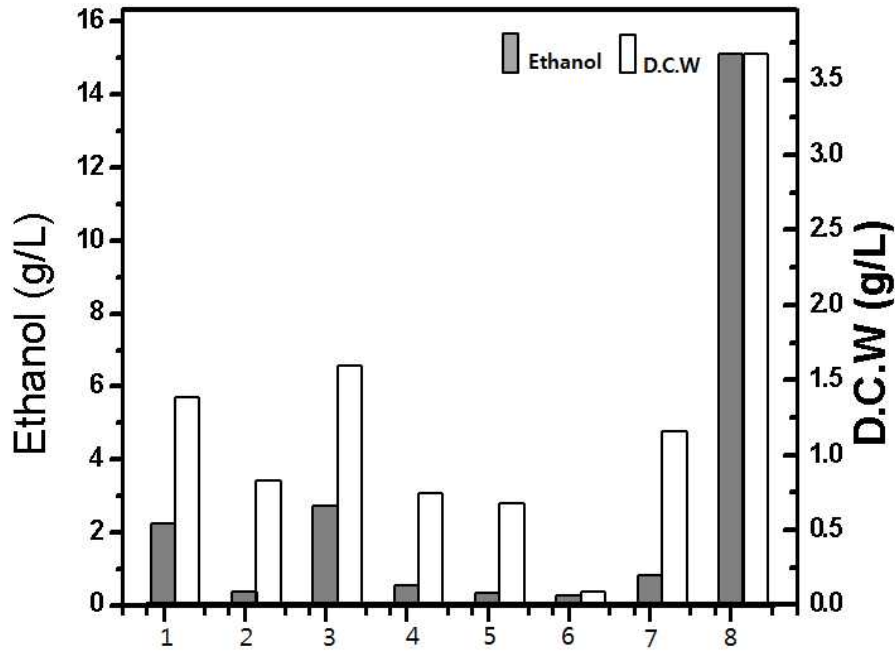


Fig. 106. Effect of various nitrogen sources on dry cell weight and ethanol concentration using *Z. bailii* KCCM 101021.

- |   |  |
|---|--|
| 1. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | 5. malt extract                                    |
| 2. soymeal  | 6. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> |
| 3. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 7. soybean flour                                   |
| 4. 메주가루   | 8. yeast extract                                   |

#### (다) 인원 결과

미생물의 생육에는 탄소원, 질소원 외에 무기질과 비타민 등이 필요하다. 비교적 다량으로 필요한 무기질로서는 Mg, P, S, Ca, Cl 등이 필수원소로 알려져 있으며 이들은 배양액의 pH 및 삼투압 조절, 외부 물질의 흡수 등에 중요한 기능을 한다. 특히, 인은 핵산, 인지질, 조효소의 구성원소 등 미생물 대사와 관련이 깊은 무기질이다. 또한, 인원이 첨가되는 배지의 발효에서 인의 농도는 다른 무기물 성분들보다 훨씬 더 높을 경우가 있다. 하지만 미생물의 증식기에 인의 허용량이 매우 작아서, 대수기가 끝날 때까지 소비되어 없어지는 양이 극히 소량일 때도 있다. 인은 미생물 발효시 pH를 외부에서 조절하지 않을 때 pH의 변화를 최소화 하는 완충제로도 사용된다. 본 연구는 미생물 배지에서 가장 많이 사용된 인원인 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>을 기준으로 하여 MgHPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 그리고 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>을 인원으로 하여 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 및 균체량 생산에 미치는 영향을 확인 하였다(Fig. 108).(Zeng et al., 2010). 실험결과, 사용된 인원에 따라 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 생산량은 14.22~15.51 g/L, 균체량은 3.42 ~ 3.72 g/L의 범위로 관찰이 되었다. 가장 많은 알코올 생산을 보인 성분은 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>으로 15.51 g/L, 그 다음 으로 높은 알코올 생산량을 보인 Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O가 15.26 g/L으로 대조구에 비해 0.2 g/L 알코올이 덜 생산이 되었다. 두 배지의 가격을 비교를 해본 결과, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O가 더 저렴 하기 때문에 인원으로 선정이 되었다. Zeng et al. (2010)은 Ca 이온이 세포막을 안정시켜주고, 세포투과성의 도움을 주는데 이러한

효과는 높은 당에서 미생물의 성장과 대사에 도움을 준다는 것으로 보고 하였다.

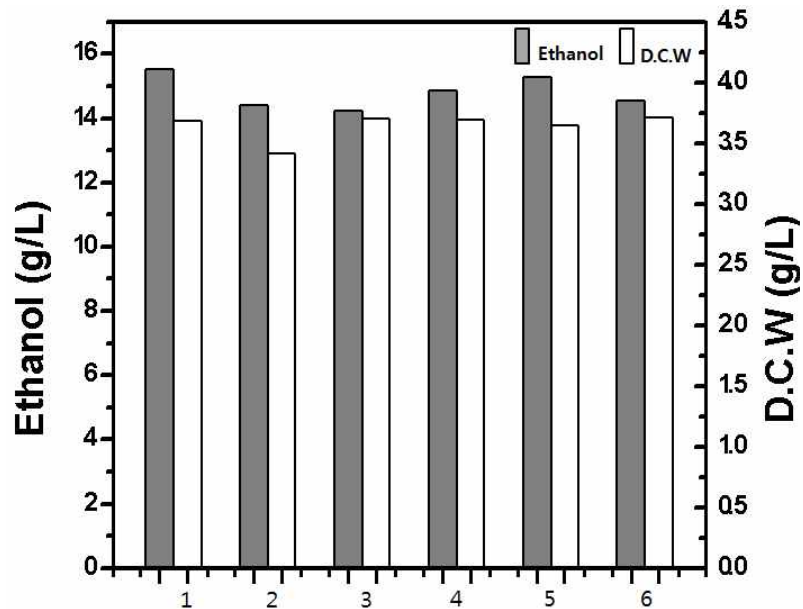


Fig. 107. Effect of various phosphate sources on dry cell weight and ethanol concentration using *Z. bailii* KCCM 101021

- |  |   |
|--|---|
| 1. Control   | 4. NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     |
| 2. MgH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O | 5. Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O |
| 3. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 6. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                    |

#### (라) 무기염 결과

미생물의 생육에는 탄소원, 질소원 외에 무기질과 비타민 등이 필요하다. 비교적 다량으로 필요한 무기질로서는 Mg, P, S, Ca, Cl 등이 필수원소로 알려져 있으며 이들은 배양액의 pH 및 삼투압 조절, 외부 물질의 흡수 등에 중요한 기능을 한다. 특히, Mg은 세포의 주요 양이온, ATP를 포함한 효소 반응의 무기 cofactor, 클로로필의 구성원소가 되고, Ca은 일부 효소의 cofactor, Mg를 대체할 수 가 있다(Moon et al., 2011; Lee et al., 2002; Turhan and Bialka, 2010). 본 연구는 미생물 배지에서 가장 많이 사용된 인원인 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O을 기준으로 하여 KHSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 그리고 CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O을 금속이온으로 하여 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 및 균체량 생산에 미치는 영향을 확인 하였다(Fig. 108). 실험결과, 사용된 금속이온에 따라 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 생산량은 12.04 ~ 15.52 g/L, 균체량은 3.42 ~ 3.97 g/L의 범위로 관찰이 되었다. 가장 많은 알코올 생산을 보인 KHSO<sub>4</sub>은 15.52 g/L, 건조 균체량은 3.42 g/L로 확인이 되었고, 그 다음으로 알코올 생산이 높은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 14.14 g/L, 건조 균체량은 3.87 g/L로 확인 되었다. 가장 많은 알코올을 생산한 KHSO<sub>4</sub>를 선택 하여야 하지만, K<sup>+</sup> 이온은 인원 선정과정에 있어 이미 선정이 되었기에 두 번째로 알코올 생산성이 우수한 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 선정되었다.

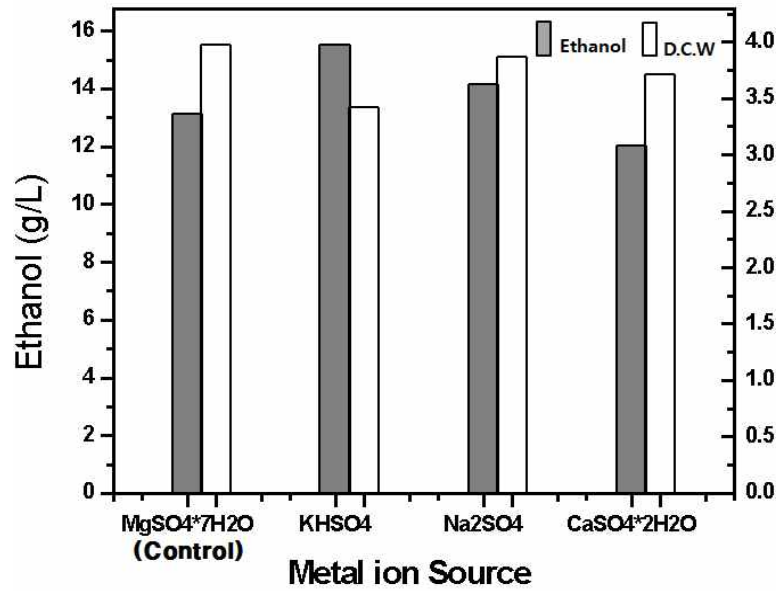


Fig. 108. Effect of various metal ion sources on dry cell weight and ethanol concentration using *Z. bailii* KCCM 101021.

#### (마) 염원 결과

본 연구는 미생물 배지에서 가장 많이 사용된 염원인 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O을 기준으로 하여 NaCl MgCl<sub>2</sub> 그리고 KCl을 금속이온으로 하여 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 및 균체량 생산에 미치는 영향을 확인 하였다(Fig. 109)(Kim et al., 1986; Kwon et al., 2000; Moon et al., 2011; Lee et al., 2002). 실험결과, 사용된 염이온에 따라 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 생산량은 12.91~13.97 g/L, 균체량은 3.72~3.98 g/L의 범위로 관찰이 되었다. 가장 많은 알코올을 생산한 KCl은 알코올 함량이 13.97 g/L, 건조균체량은 3.72 g/L으로 확인 되었고, 두 번째로 많은 알코올을 생산한 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(대조구)는 13.25g/L, 건조 균체량은 3.86 g/L로 확인 되었고, 알코올 생산량 차이는 KCl 과 약 0.7 g/L가 차이가 남을 보였다. 4가지의 염을 통계학적 처리를 해 본 결과, 가장 많은 에탄올을 생성한 KCl 와 두 번째로 에탄올을 많이 생성한 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 는 유의적 차이가 없다는 결과를 확인 하였다. 따라서 두 성분 중 가격이 저렴한 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O이 선정 되었다.

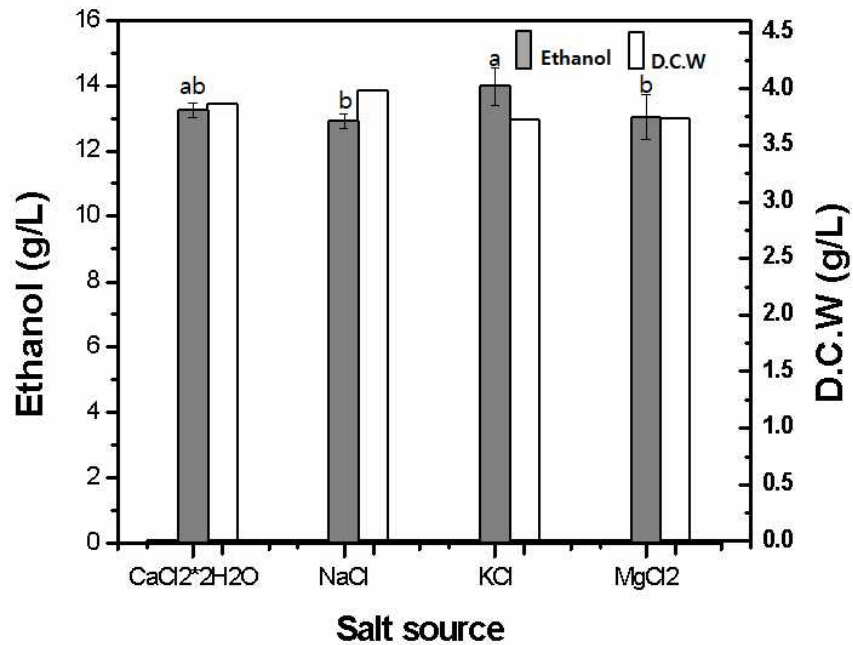


Fig. 109. Effect of various Salt sources on dry cell weight and ethanol concentration using *Z. bailii* KCCM 101021. Data were expressed as meas±SD(n=3). Different characters were significantly different( $p<0.05$ ).

## (2) Plackett-Burman design 결과

5가지 배지성분들 중에서 균체량 생산에 중요한 영향을 미치는 요인들을 선별하기 위하여 Plackett-Burman design을 실시하였다. PBD에 의한 실험은 적은 실험횟수로 중요한 변수만을 선별하는 장점이 있지만, 각 변수들 간의 상호작용에 대한 정보는 얻을 수 없게 된다. 본 실험은 균체량 생산에 가장 많은 영향을 미치는 중요변수를 얻기 위하여 PBD을 실시하였고, 이 결과를 토대로 중요인자를 선별 하였다(Kim and Park, 2011). 농도가 높은 탄소원은 농도조절을 중심 값 에서 20%로 조절하였고, 농도가 낮은 나머지 변수들은 50%로 조정하여 실험한 결과는 Table 48에 제시 하였다. 또한, 각 배지 성분을 낮은 농도에서 높은 농도로 변화를 하였을 때 effect는 Fig. 110-114에 제시하였고, 그에 대한 분석표는 Table 50에 제시하였다. Fig. 25-29.을 순서로 분석을 해보면, glucose:fructose(4:1), yeast extract, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 그리고 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>는 알코올 생산성이 증가하는 긍정적인 영향을 보인 반면, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O는 알코올 생산성이 감소하는 부정적인 영향을 보였다. Fig. 110-114를 통한 pareto plot 결과를 토대로 알코올 생산에 영향을 미치는 변수들의 effect를 확인 하였다(Fig. 115). 실험결과, *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 생산성은 8.12~15.19 g/L, 건조 균체량은 3.17 ~ 4.33 g/L로 확인 되었다. 가장 높은 알코올 생산을 보인 배지는 M2배지로 알코올 생산성은 15.19 g/L로 확인 되었다. 각 배지 성분을 낮은 농도에서 높은 농도로 변화를 하였을 때 effect를 살펴보면(Table 49), glucose:fructose(4:1)가 1.9557로 알코올 생산성에 미치는 효과가 가장 컸고, 그 다음 순으로 yeast extract 0.8655, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3906으로 확인 되었다. 상기 결과를 토대로 Pareto plot(Fig. 116)를 분석해 보면, Glucose:Fructose(4:1)는 54%, yeast extract 24% 그리고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 11% 순서로 알코올 생산에 영향을 미치는 정도가 큰 배지성분임을 확인 하였다.



Table 47 The composition of select production medium for Plackett-Burman design.

Component	Concentration(g/L)	Factor
glucose:fructose(4:1)	30	A
yeast extract	5	B
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	C
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	D
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.06	E

Table 48 High and Low factor of Plackett-Burman design.

	glucose:fructose(4:1)	yeast extract	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
High(+)	36	6	3	1.5	0.09
Low(-)	24	4	1	0.5	0.03

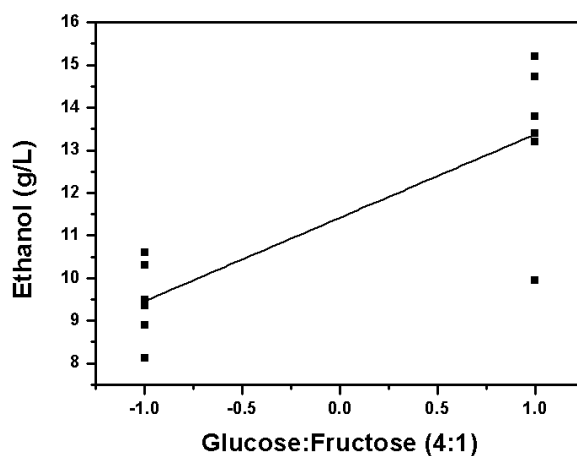


Fig. 110. Plot of observed ethanol concentration versus Glucose:Fructose(4:1) concentration (grams per liter) in a Plackett-Burman study.

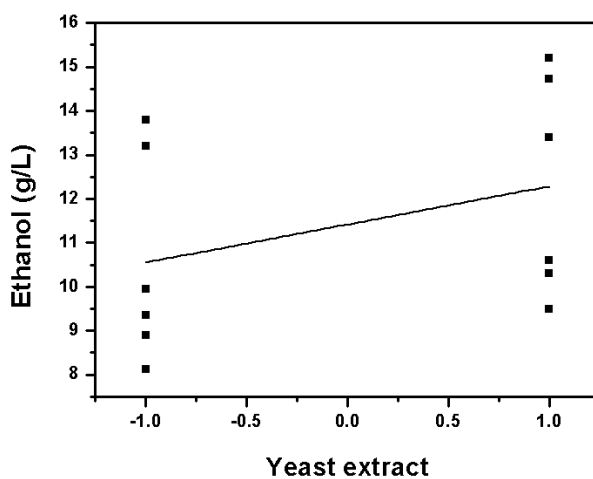


Fig. 111. Plot of observed ethanol concentration versus Yeast extract concentration (grams per liter) in a Plackett-Burman study.

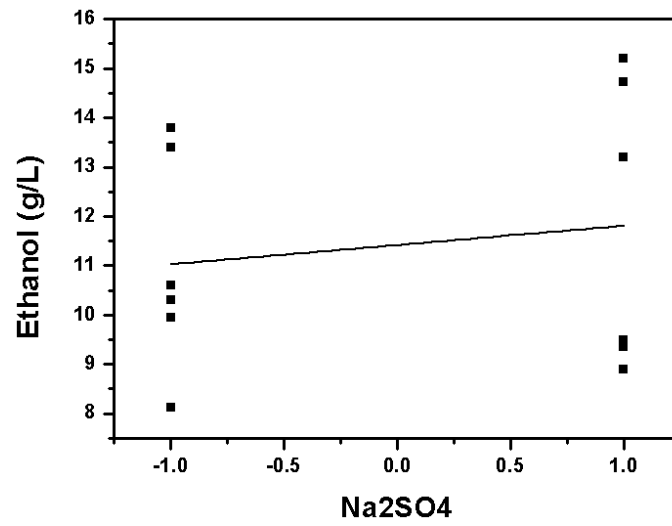


Fig. 112. Plot of observed ethanol concentration versus Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration (grams per liter) in a Plackett-Burman study.

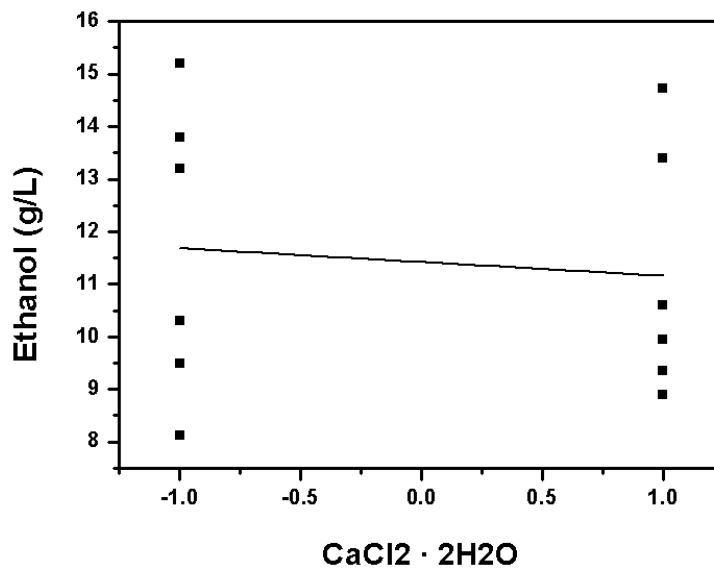


Fig. 113. Plot of observed ethanol concentration versus CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O concentration (grams per liter) in a Plackett-Burman study.

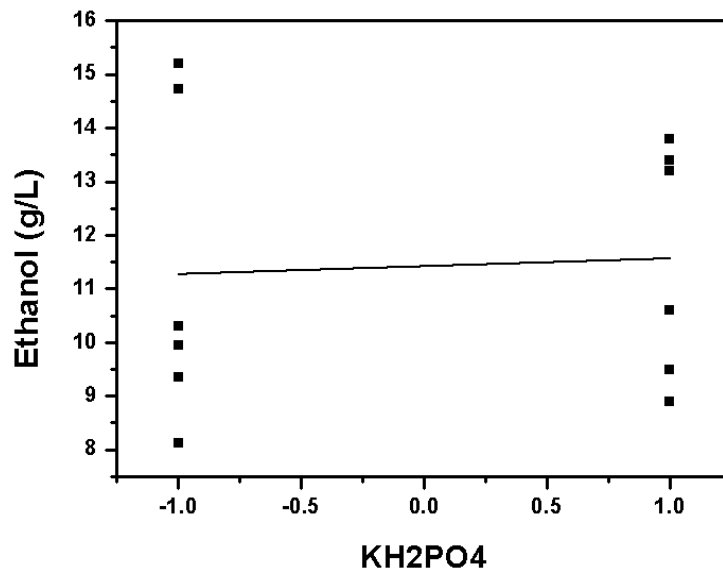


Fig. 114. Plot of observed ethanol concentration versus KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentration (grams per liter) in a Plackett–Burman study.

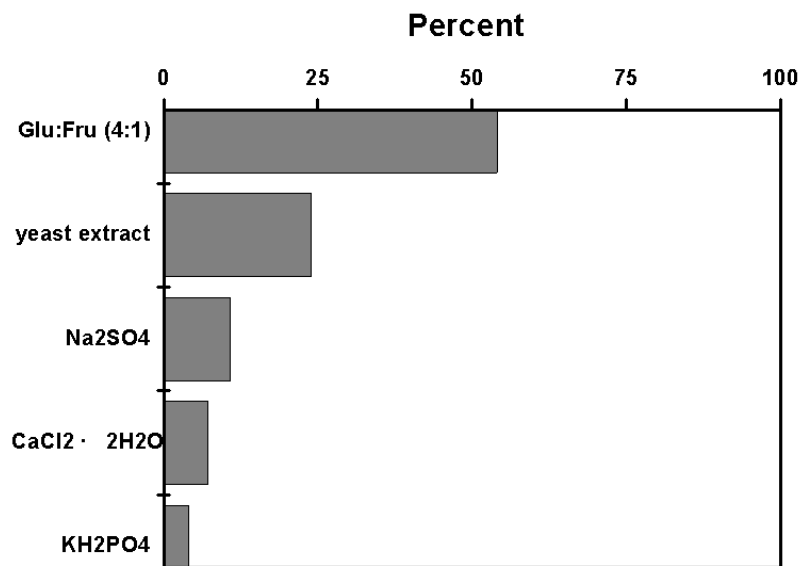


Fig. 115. Pareto plot for Plackett–Burman parameter estimates. (cumulative percent)

Table 49 Parameter estimates and P values for Plackett–Burman study of ethanol fermentation.

Factor	Estimate	P value
glucose:fructose(4:1)	1.9557	0.0033
yeast extract	0.8655	0.2138
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1459	0.6766
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3906	0.6638
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-0.2621	0.9971

Table 50 Plackett-Burman design for five variables(factors).

Trial	Variables					Ethanol (g/L)	D.C.W (g/L)
	glucose:fructose (4:1)	yeast extract	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		
M1	+	-	+	-	-	13.79	3.21
<b>M2</b>	+	+	-	+	-	<b>15.19</b>	<b>4.33</b>
M3	-	+	+	-	+	10.61	3.4
M4	+	-	+	+	-	13.2	3.41
M5	+	+	-	+	+	14.72	4.14
M6	+	+	+	-	+	13.4	4.01
M7	-	+	+	+	-	9.49	3.71
M8	-	-	+	+	+	8.9	3.24
M9	-	-	-	+	+	9.36	3.32
M10	+	-	-	-	+	9.95	3.22
M11	-	+	-	-	-	10.3	3.46
M12	-	-	-	-	-	8.12	3.17

### (3) Response surface method 결과

Plackett-Burman design에서 얻은 Pareto plot의 결과를 토대로 통계적 반응표면분석(response surface method, RSM)을 적용하여 생산배지를 최적화시키기 위하여 3개의 중요한 요인인 glucose:fructose(4:1), yeast extract, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 중심합성계획(Central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 반응표면분석의 목적은 독립변수인 배지성분이 각각의 농도 변화에 따라 종속변수인 알코올 생산성이 어떻게 영향을 받는가를 설명해주는 함수 관계를 구함으로써, 알코올 생산성이 최대가 되는 각 배지성분들의 최적 농도를 찾고자 함이다. 본 실험에서는 Table 51에 제시한 바와 같이 -1(low)과+1(high)으로 농도를 설정하였고, 중심합성계획에 사용된 실험중점은 상기 실험인 PBD을 통해 얻은 배지조합 이용하였다(Douglas, 2005). Table 52에 중심합성계획법에 의해 수행된 배양결과인 각각의 배지 조합에 대한 알코올의 생산성을 제시하였다. 탄소원인 glucose:fructose(4:1)는 23.89 ~ 48.11 g/L, 질소원인 yeast extract는 3.98 ~ 8.02 g/L, 금속 이온인 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 0.24 ~ 2.76 g/L 의 다양한 배지조건에서 실험한 결과, 알코올의 생산성이 7.89~18.83 g/L 범위인 것으로 관찰되었다. 실험결과의 특성을 Table 53의 분산분석표를 통해 살펴보면 p-value는 매우 유의하다는 것을 알 수 있다. 반면에 요인변화량 (CV)의 값은 15.84로 실험의 정확성과 신뢰도가 매우 낮으며, R<sup>2</sup>은 0.7121로 알코올 생산성에 대한 실험값과 모델식이 예측한 값이 거의 일치 하지 않는 다는 결과를 얻었다. 이러한 결과에 따라, 정확한 배지 최적 점을 찾기 위하여 fractional factorial design실험이 진행되었다.

Table 51 Concentration of the respective medium components at each level(central composite design for the response surface method, RSM).

X <sub>n</sub>	Independent variables	Level				
		-a	-1	0	+1	+a
X <sub>1</sub>	Glucose:Fructose(4:1)	23.89	28.8	36	43.2	48.11
X <sub>2</sub>	Yeast extract	3.98	4.8	6	7.2	8.02
X <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.24	0.75	1.5	2.25	2.76

※ a : 1.682

Table 52 Experimental matrix for the central composite design experiment.

Std	glucose : fructose 4:1 (g/L)	Yeast extract (g/L)	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	Ethanol (g/L)	D.C.W (g/L)
1	-1(28.8)	-1(4.8)	-1(0.75)	10.13	3.14
2	+1(43.2)	-1(4.8)	-1(0.75)	16.01	3.72
3	-1(28.8)	+1(7.2)	-1(0.75)	10.04	3.56
4	+1(43.2)	+1(7.2)	-1(0.75)	18.83	4.36
5	-1(28.8)	-1(4.8)	+1(2.25)	9.90	3.36
6	+1(43.2)	-1(4.8)	+1(2.25)	13.70	4.08
7	-1(28.8)	+1(7.2)	+1(2.25)	10.18	3.59
8	+1(43.2)	+1(7.2)	+1(2.25)	17.87	4.76
9	-a(23.89)	0(6)	0(1.5)	7.89	3.31
10	+a(48.11)	0(6)	0(1.5)	15.39	4.04
11	0(36)	-a(3.98)	0(1.5)	10.35	3.44
12	0(36)	+a(8.02)	0(1.5)	10.76	4.11
13	0(36)	0(6)	-a(0.24)	10.01	3.75
14	0(36)	0(6)	+a(2.76)	10.85	3.9
15	0(36)	0(6)	0(1.5)	10.54	4.24
16	0(36)	0(6)	0(1.5)	10.49	3.99
17	0(36)	0(6)	0(1.5)	10.01	4.21

Table 53 Main effects according to trial of response surface method.

Response	1	Ethanol				
<b>ANOVA for Response Surface Linear Model</b>						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	114.90	3	38.30	10.72	0.0008	significant
<i>A-glucose:fruc</i>	110.10	1	110.10	30.81	< 0.0001	
<i>B-yeast extrac</i>	4.52	1	4.52	1.27	0.2809	
<i>C-Na2SO4</i>	0.28	1	0.28	0.078	0.7851	
Residual	46.46	13	3.57			
<i>Lack of Fit</i>	46.29	11	4.21	49.93	0.0198	significant
<i>Pure Error</i>	0.17	2	0.084			
Cor Total	161.36	16				
Std. Dev.	1.89		R-Squared	0.7121		
Mean	11.94		Adj R-Squared	0.6456		
C.V. %	15.84		Pred R-Squared	0.4901		
PRESS	82.27		Adeq Precision	10.415		

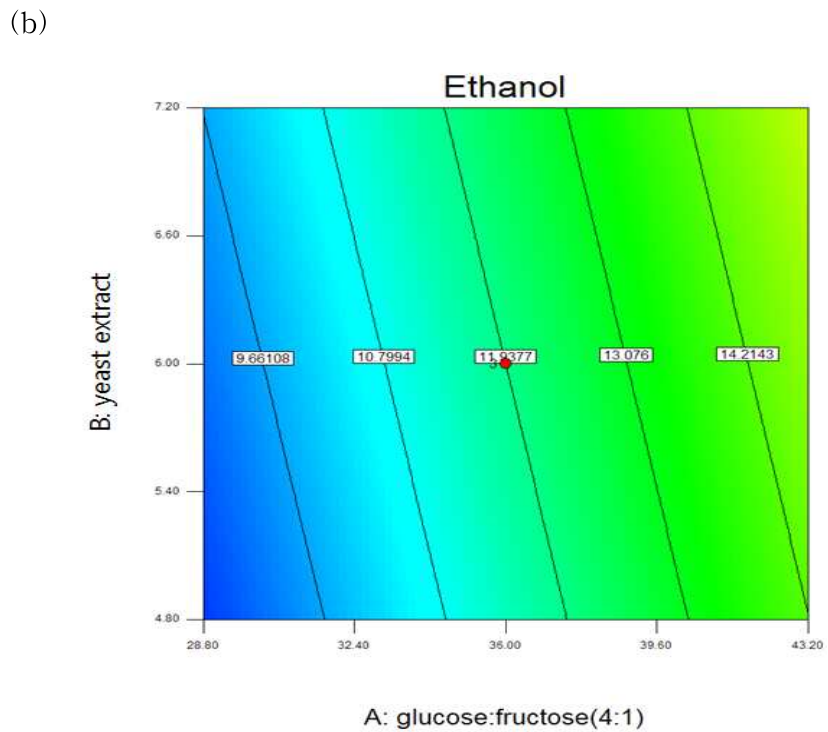
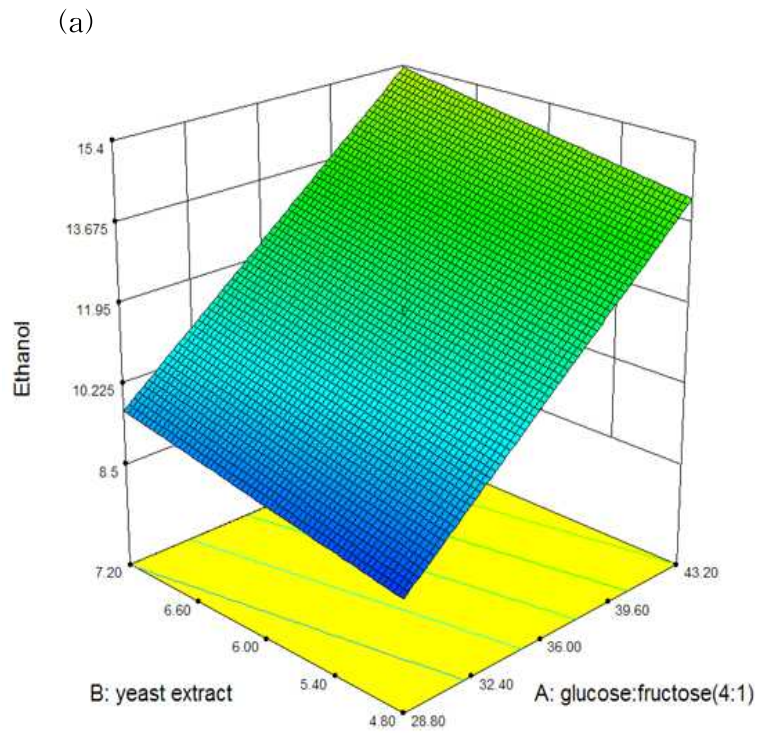


Fig. 116. Effects of glucose:fructose(4:1) and yeast extract on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of glucose:fructose(4:1) and yeast extract.

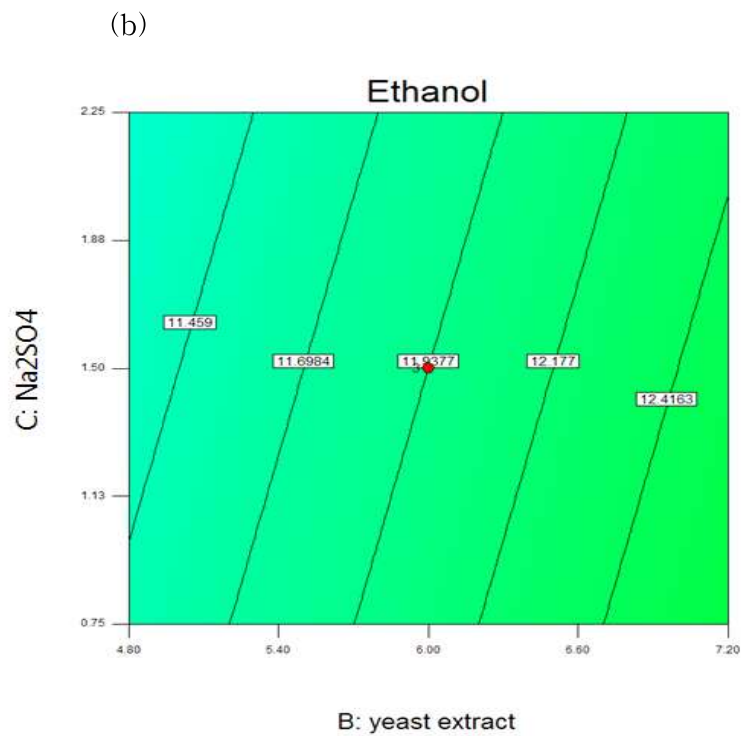
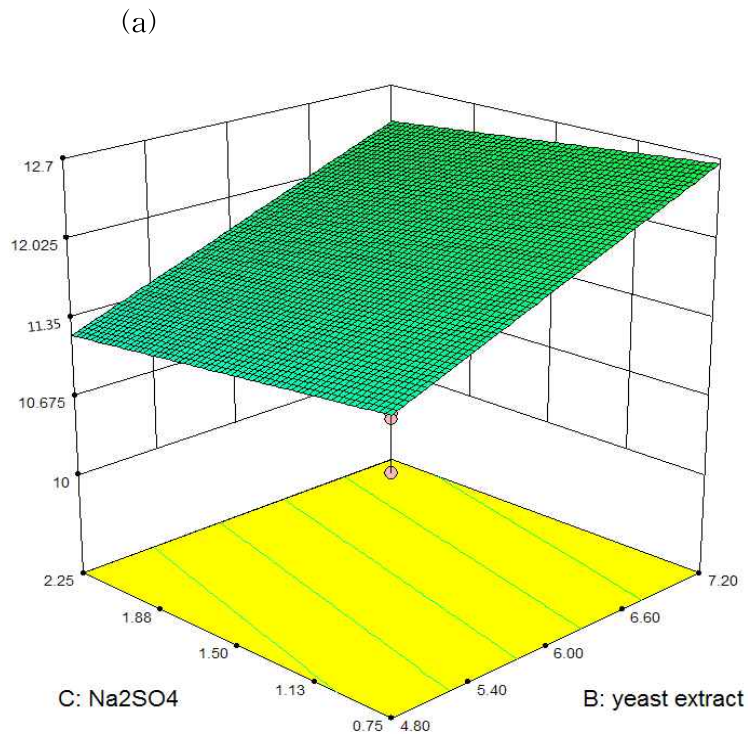
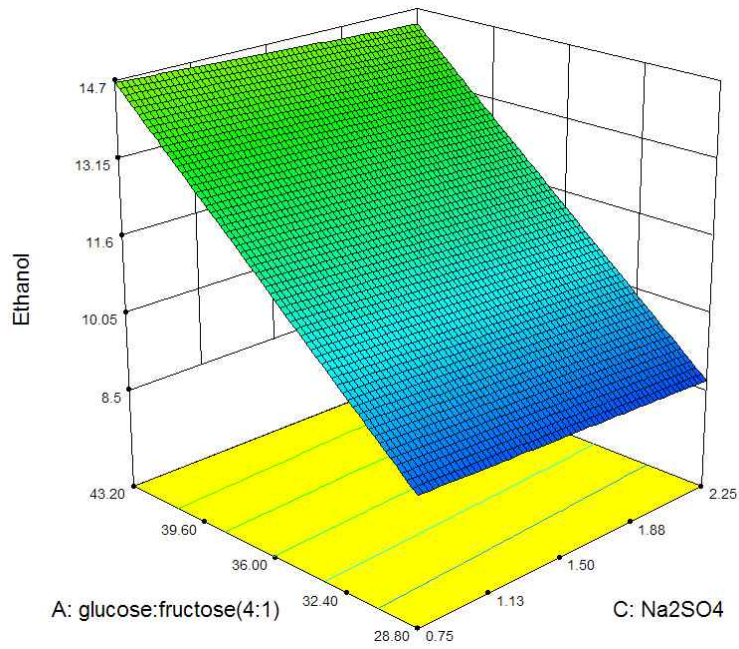


Fig. 117. Effects of yeast extract and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of yeast extract and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



(a)



(b)

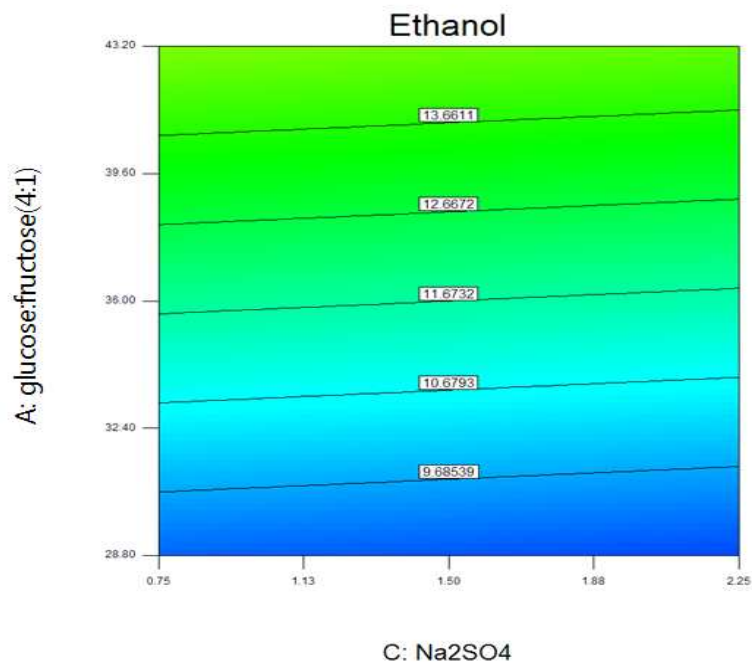


Fig. 118. Effects of glucose:fructose(4:1) and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of glucose:fructose(4:1) and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### (4) FFD 결과

Plackett-Burman desing 실험결과 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 생산에 영향을 미치는 3가지 요인은 glucose:fructose(4:1), yeast extract, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 으로 확인이 되었고, 이를 바탕으로 +1(High level), -1(Low level)을 center point를 중심으로 ±설정 후(Table 54) 총 10종류의 배지조건(Table 55)에서 알코올 생산성을 확인 하였다. 그 결과, 가장 적은 알코올을 생산한 배지는 7번 배지로 glucose:fructose (4:1)가 low level, yeast extract 와 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 high level 으로 알코올 함량은 11.99 g/L로 확인이 되었다. 반면에 가장 많은 알코올을 생산한 배지는 8번 배지로, 알코올 함량은 20.40 g/L 으로 확인이 되었는데, 이때의 배지성분의 농도를 확인해보면 glucose:fructose(4:1), yeast extract, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 high level으로 나타났는데, 이전 연구인 Plackett-Burman design에서의 pareto plot의 결과를 보면 glucose:fructose(4:1), yeast extract, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 알코올 생산에 긍정적인 효과를 보인 것으로 확인이 되었는데, 이는 PBD 과 FFD 결과는 같다는 것을 확인을 하였다. 결과를 토대로 fractional factorial model에 적용시켜 통계적으로 분석한 결과인 분산표석표(Analysis of variance, ANOVA)는 Table 56에 제시하였다. 이 결과를 보면, R<sup>2</sup>은 0.9603 으로 모델의 예상 값과 실제 알코올 값이 거의 일치함을 확인 하였다. 또한 통계적으로 유의한(p<0.05) 배지성분은 glucose:fructose(4:1)으로 p-value는 0.0245 으로 확인 하였다. 3가지 요인들의 배지의 농도를 낮은 농도에서 높은 농도로 변화 하였을 경우에 대한 효과의 결과는 Table 57에 나타내었고, 알코올의 이차다항식은 다음과 같다.

$$\text{Ethanol} = 15.33 + 2.51 * A + 0.87 * B - 0.19 * C + 0.58 * A * B + 0.55 * A * C + 0.18 * B * C$$

(A :glucose:fructose (4:1), B : yeast extract, C : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

이 식에서 각 항의 계수는 Design expert pro S/W version 7.1.6의 다중 회귀분석에 의한 결과이다(Douglas, 2005). 이 결과에 따른 알코올 생산에 긍정적인 효과를 보이는 배지 성분은 glucose:fructose(4:1)로 그 값은 5.02, yeast extract는 1.73으로 나타났고, 부정적인 효과의 배지 성분은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 그 값은 -0.38 으로 나타났다. 또한 3가지 요인들의 각각의 농도 변화에 따른 알코올 생산에 미치는 영향은 Fig. 118에 제시하였다. Fig. 119의 (a)는 glucose:fructose (4:1)와 yeast extract농도가 증가함에 따라 알코올 함량이 증가하는 것을 확인 하였고, (b)는 yeast extract와 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 증가함에 따라 알코올 함량이 증가하는 것을 확인 하였고, (C)는 yeast extract가 낮고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 감소함에 따라 알코올 함량이 증가하는 것을 확인 하였다.

Table 54 Levels of each medium component for 3-factor fractional factorial design(FFD).

	glucose:fructose(4:1)	yeast extract	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
+1	36	6	1.5
0	30	5	1
-1	24	4	0.5

Table 55 Experimental matrix for 3-factor fractional factorial design and Ethanol production of *Z. bailii* KCCM 101021.

	glucose:fructose (4:1)	yeast extract	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	D.C.W (g/L)	Ethanol (g/L)
1	-1	-1	-1	3.47	12.89
2	+1	-1	-1	3.94	16.78
3	-1	+1	-1	3.79	14.24
4	+1	+1	-1	4.51	18.18
5	-1	-1	+1	3.66	12.18
6	+1	-1	+1	4.03	16.01
7	-1	+1	+1	3.77	11.99
<b>8</b>	<b>+1</b>	<b>+1</b>	<b>+1</b>	<b>4.51</b>	<b>20.40</b>
9	0	0	0	4.00	16.80
10	0	0	0	4.13	16.84

Table 56 Analysis of variance for the factors of the fractional factorial design.

Response 1 Ethanol					
ANOVA for selected factorial model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	62.01	6	10.34	8.07	0.1143 not significant
A-glucose:fru	50.32	1	50.32	39.30	0.0245
B-yeast extra	6.02	1	6.02	4.70	0.1624
C-Na2SO4	0.28	1	0.28	0.22	0.6844
AB	2.69	1	2.69	2.10	0.2845
AC	2.44	1	2.44	1.90	0.3016
BC	0.26	1	0.26	0.20	0.6958
Curvature	3.53	1	3.53	2.76	0.2386 not significant
Residual	2.56	2	1.28		
Lack of Fit	2.56	1	2.56	4234.29	0.0098 significant
Pure Error	6.046E-004	1	6.046E-004		
Cor Total	68.10	9			
Std. Dev.	1.13		R-Squared	0.9603	
Mean	15.63		Adj R-Squared	0.8414	
C.V. %	7.24		Pred R-Squared	-1.5375	
PRESS	163.85		Adeq Precision	8.119	

Table 57 Main effect of medium components in fractional factorial design experiments.

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
M A-glucose:fructose(4:1)	5.02	50.32	73.89
M B-yeast extract	1.73	6.02	8.84
M C-Na2SO4	-0.38	0.28	0.42
M AB	1.16	2.69	3.94
M AC	1.10	2.44	3.58
M BC	0.36	0.26	0.38

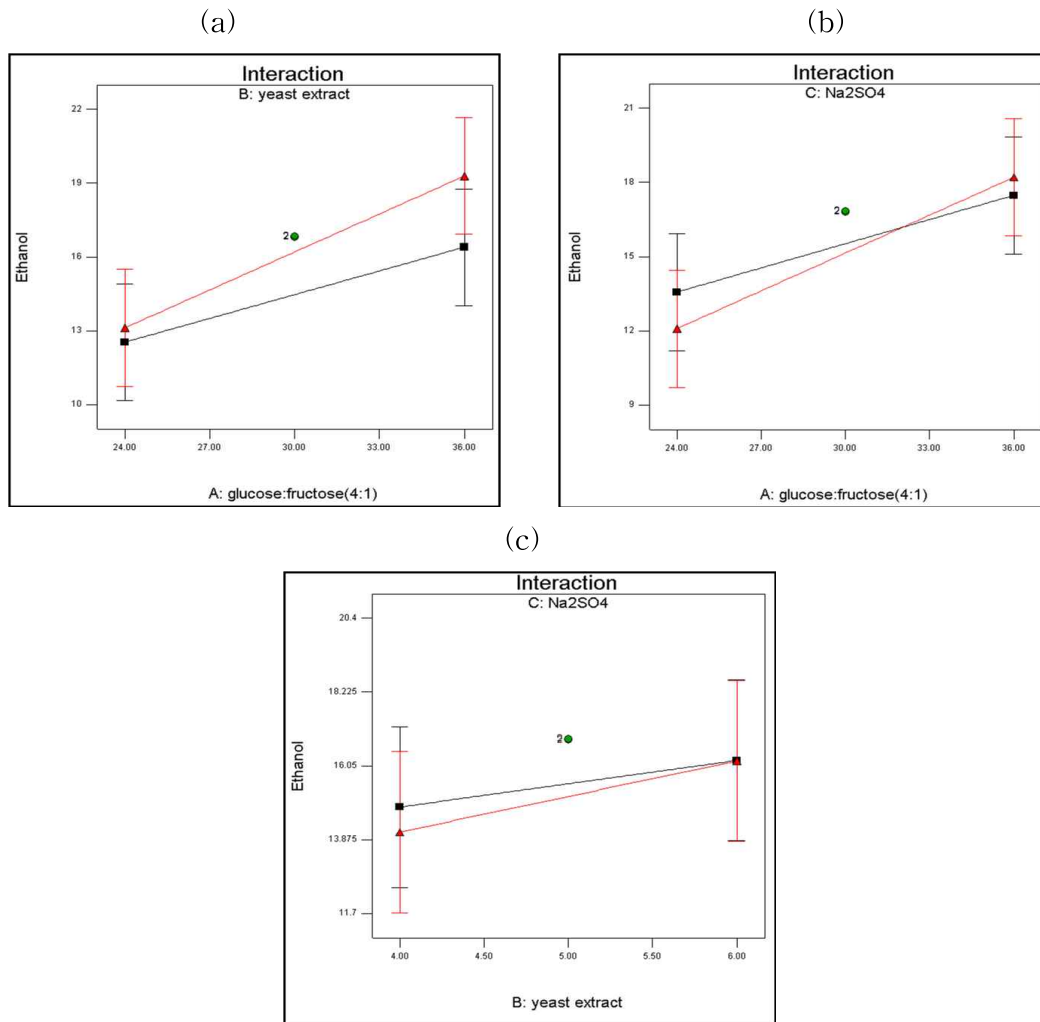


Fig. 119. Two-factor interaction obtained from fractional factorial design experiments (●; design point, ■; low level, ▲; high level).

- (a) glucose:fructose(4:1)-yeast extract
- (b) glucose:fructose(4:1)-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- (c) yeast extract-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### (5) SAM결과

FFD에서 얻은 1차모델식을 근거로 하여 배지 성분의 최적 농도에 접근하기 위해 단계별 축차실험(sequential experiments)을 수행 하였다. PBD에서 선별된 세 가지 배지성분인 glucose:fructose(4:1), yeast extract, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도를 일정하게 변화시켜 알코올 생산을 위한 최적 농도에 접근 하고자 하였다. Table 58에 최급상승법 실험을 수행하기 위한 실험설계표를 나타냈고, FFD 실험에서의 각 성분들의 중점(center point), 중점에서 각 농도간의 차이(origin step), Fractional factorial design에서 얻은 다항식의 계수(main effect), main effect의 1/2(coefficent)을 이용하여 각 요인들의 수준 변화에 따른 축차 실험계획을 Table 59 에 나타 냈다. Table 59에는 각 배지의 농도에 따른 축차 실험과 *Z. bailii* KCCM 101021의 알코올 생 산량을 제시하였다. 이전 연구인 FFD에서의 중심점을 최급상승법의 시작점으로 하여 알코올

생산에 긍정적인 영향을 미치는 glucose:fructose(4:1)는 6.906 g/L, yeast extract는 0.3967 g/L 으로 농도를 증가시켰고, 알코올 생산에 부정적인 영향을 미치는 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도는 0.04358 g/L 씩 감소 시켰다. SAM 실험 결과 (Fig. 120) center point에서 가장 낮은 알코올 함량인 11.76 g/L 으로 확인이 되었고, step 7에서 20.76 g/L로 가장 높게 나타났다. 최대생산성을 보인 step 7를 각 배지성분의 최적농도 부근이라 판단하고 그 농도 범위 내에서 RSM을 수행되었다 (Wang and Wan, 2009).

Table 58 Experimental design for the optimization of D.C.W medium concentration through steepest ascent method(SAM).

	glucose:fructose (4:1)	yeast extract	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
center point	30	5	1
origin step	6	1	0.5
main effect	5.02	1.73	-0.38
coefficient	2.51	0.865	-0.19
r value	6.1033		
slope value	5.7556	1.9835	-0.4357
new step	34.53	1.9835	-0.2179
new step÷5	6.906	0.3967	-0.04358

Table 59 Run table of experimental design for the optimization of ethanol production medium through steepest ascent method(SAM).

No.	glucose:fructose (4:1)	yeast extract	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ethanol (g/L)
center point	30	5	1	11.76
2	36.906	5.3967	0.9565	14.30
3	43.812	5.7934	0.9130	17.11
4	50.718	6.1901	0.8694	18.38
5	57.624	6.5868	0.8259	19.26
6	64.53	6.9835	0.7824	19.88
<b>7</b>	<b>71.436</b>	<b>7.3802</b>	<b>0.7389</b>	<b>20.76</b>
8	78.342	7.7769	0.6954	20.74
9	85.248	8.1736	0.6518	20.69

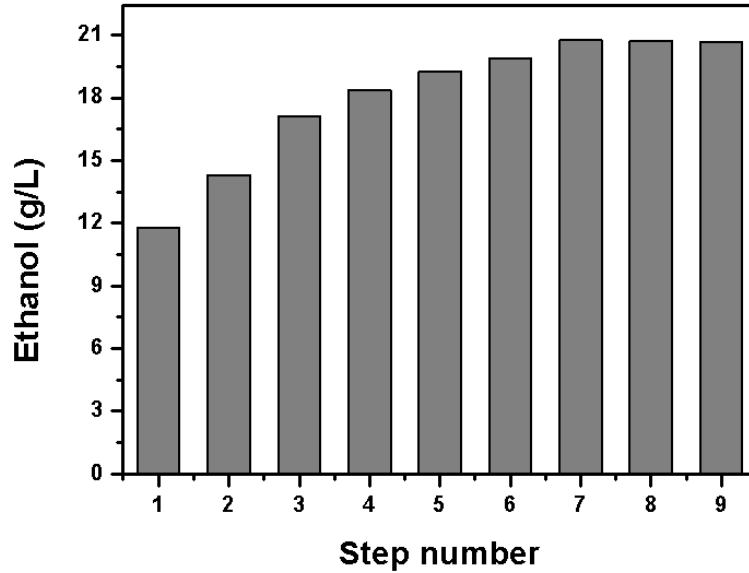


Fig. 120. Result of Ethanol concentration in various medium concentration by Steepest ascent method.

#### (바) Response surface method 결과

이전 연구인 steepest ascent method 연구에서 선별된 배지성분을 이용하여 반응표면분석(response surface method, RSM)을 적용하였다. 생산배지를 최적화시키기 위하여 3개의 중요한 요인인 glucosae:fructose(4:1), yeast extract, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 중심합성계획(Central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. SAM의 결과를 토대로 각 배지의 농도를 -a, -1, 0, 1, +a 다섯 단계로 부호화 하였다(Table 60). Table 51에 중심합성계획법에 의해 수행된 배양결과인 각각의 배지 조합에 대한 알코올생산성 및 균체량 생산성을 제시하였다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 Ethanol으로 회귀분석에 사용되었으며, 회귀분석에 의한 모델 식은 Design Expert pro S/W ver. 7.1.6을 사용하였다. 다양한 배지 조건에서 실험한 결과, Ethanol 생산성이 19.33 ~ 26.14 g/L, D.C.W 생산성은 4.95 ~ 6.54 g/L 범위로 관찰이 되었고, 실험 결과의 특성을 Table 62의 분산분석표를 통해 살펴보면 p-value는 0.0032로 통계적으로 유의하다는 것을 알 수 있다(p<0.05). R-square(결정계수)은 0.9273로서 Ethanol 생산성에 대한 실험값과 모델식이 예측한 값이 거의 일치 한다는 결과를 얻었다. 모수 추정에 의한 2차 회귀식은 다음과 같이 분석되었다.

$$\text{Ethanol} = +24.74 + 1.43*A + 1.78*B + 0.19*C + 0.44*A*B + 0.094*A*C - 0.10*B*C - 0.90*A^2 - 0.98*B^2 - 0.39*C^2$$

Fig. 121-123에 반응 표면도와 contour plot을 이용해서 각 배지 성분들의 농도에 따른 균체량의 생산성을 나타내었다. 그래프 분석결과, 최적 점을 찾지 못하고 본 연구의 결과는 최적점 근처에 머문 형태의 그래프의 결과를 확인 할 수 있었다. 따라서 point prediction을 이용하여 여러 배지 성분 중, 가장 많은 알코올을 생산하는 배지를 찾은 후, 그 배지 농도를 center point 로 지정하여 다시 RSM 연구진행 하였다.

Table 60 Concentration of the respective medium components at each level (central composite design for the response surface method, RSM).

X <sub>n</sub>	Independent variables	Level				
		-a	-1	0	+1	+a
X <sub>1</sub>	Glucose:Fructose(4:1)	47.41	57.15	71.44	85.73	95.47
X <sub>2</sub>	Yeast extract	4.9	5.9	7.38	8.86	9.86
X <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.12	0.37	0.74	1.11	1.36

※ a : 1.682

Table 61 Experimental matrix for the central composite design experiment.

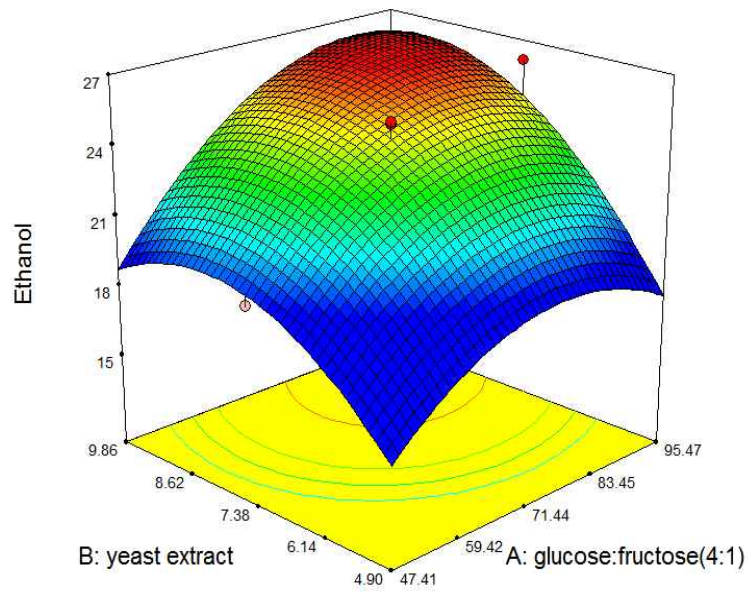
Std	glucose:fructose 4:1(g/L)	yeast extract (g/L)	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	Ethanol (g/L)	D.C.W (g/L)
1	-1(57.15)	-1(5.9)	-1(0.37)	19.47	5.15
2	+1(85.73)	-1(5.9)	-1(0.37)	20.56	5.29
3	-1(57.15)	+1(8.86)	-1(0.37)	22.50	5.77
4	+1(85.73)	+1(8.86)	-1(0.37)	25.07	6.14
5	-1(57.15)	-1(5.9)	+1(1.11)	19.98	5.26
6	+1(85.73)	-1(5.9)	+1(1.11)	21.18	5.37
7	-1(57.15)	+1(8.86)	+1(1.11)	22.34	5.75
8	+1(85.73)	+1(8.86)	+1(1.11)	25.55	5.52
9	-a(47.41)	0(7.38)	0(0.74)	19.33	5.56
10	+a(95.47)	0(7.38)	0(0.74)	26.14	6.11
11	0(71.44)	-a(4.9)	0(0.74)	19.54	4.95
12	0(71.44)	+a(9.86)	0(0.74)	25.47	6.54
13	0(71.44)	0(7.38)	-a(0.12)	23.85	5.39
14	0(71.44)	0(7.38)	+a(1.36)	24.49	5.73
15	0(71.44)	0(7.38)	0(0.74)	24.09	5.95
16	0(71.44)	0(7.38)	0(0.74)	24.92	5.97
17	0(71.44)	0(7.38)	0(0.74)	25.04	6.03

Table 62 Main effects according to trial of response surface method.

Response 1		Ethanol				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	88.63	9	9.85	9.92	0.0032	significant
<i>A-glucose:fruc</i>	27.91	1	27.91	28.12	0.0011	
<i>B-yeast extrac</i>	43.04	1	43.04	43.36	0.0003	
<i>C-Na2SO4</i>	0.47	1	0.47	0.47	0.5144	
AB	1.53	1	1.53	1.54	0.2544	
AC	0.071	1	0.071	0.071	0.7974	
BC	0.083	1	0.083	0.084	0.7808	
A <sup>2</sup>	9.13	1	9.13	9.20	0.0190	
B <sup>2</sup>	10.92	1	10.92	11.00	0.0128	
C <sup>2</sup>	1.76	1	1.76	1.77	0.2251	
Residual	6.95	7	0.99			
<i>Lack of Fit</i>	6.41	5	1.28	4.76	0.1827	not significant
<i>Pure Error</i>	0.54	2	0.27			
Cor Total	95.58	16				
Std. Dev.	1.00		R-Squared	0.9273		
Mean	22.91		Adj R-Squared	0.8338		
C.V. %	4.35		Pred R-Squared	0.4787		
PRESS	49.82		Adeq Precision	9.566		



(a)



(b)

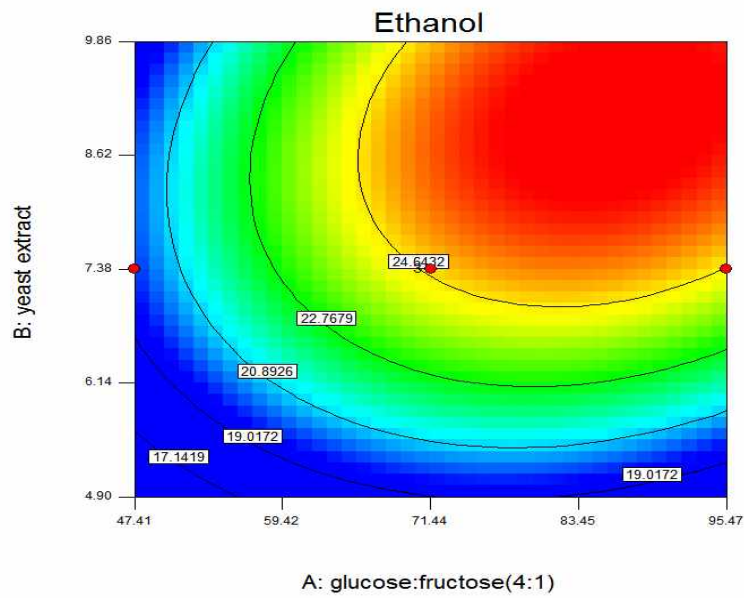


Fig. 121. Effects of glucose:fructose(4:1) and yeast extract on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of glucose:fructose(4:1) and yeast extract.

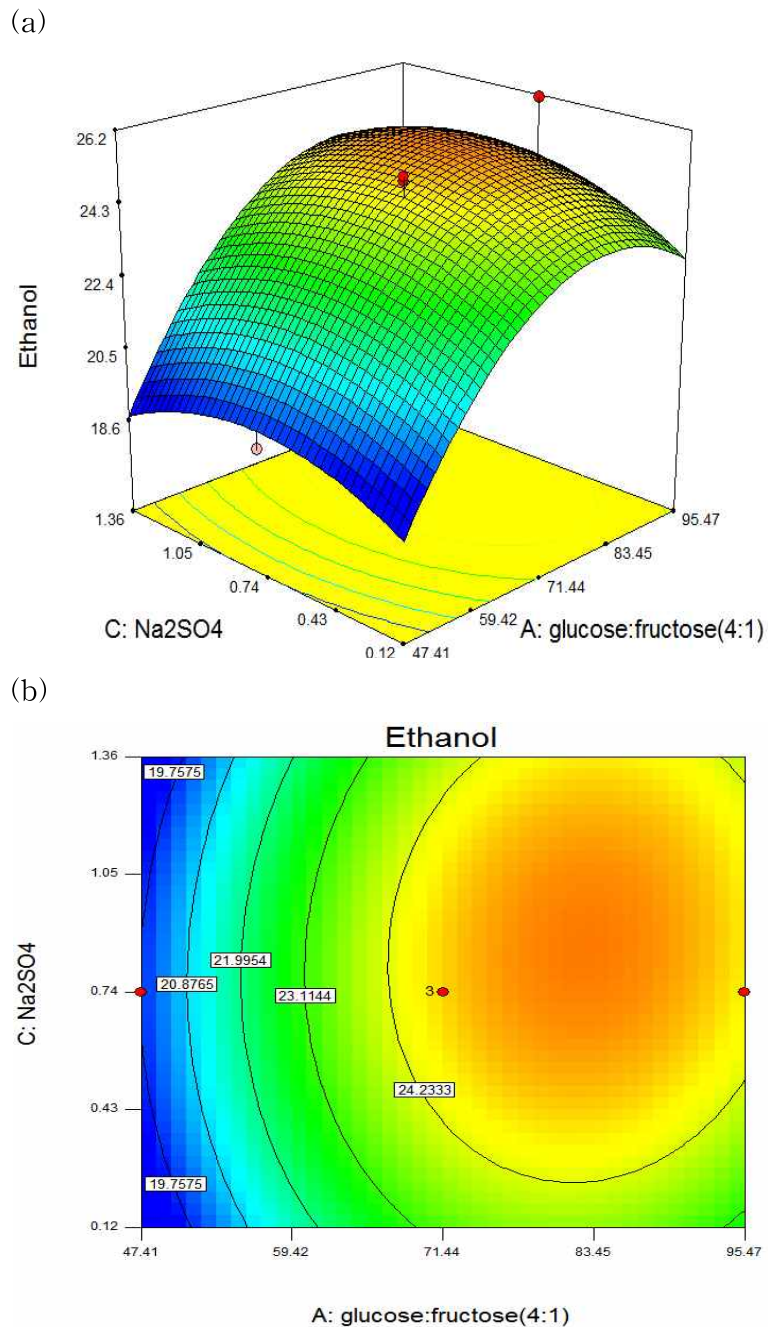
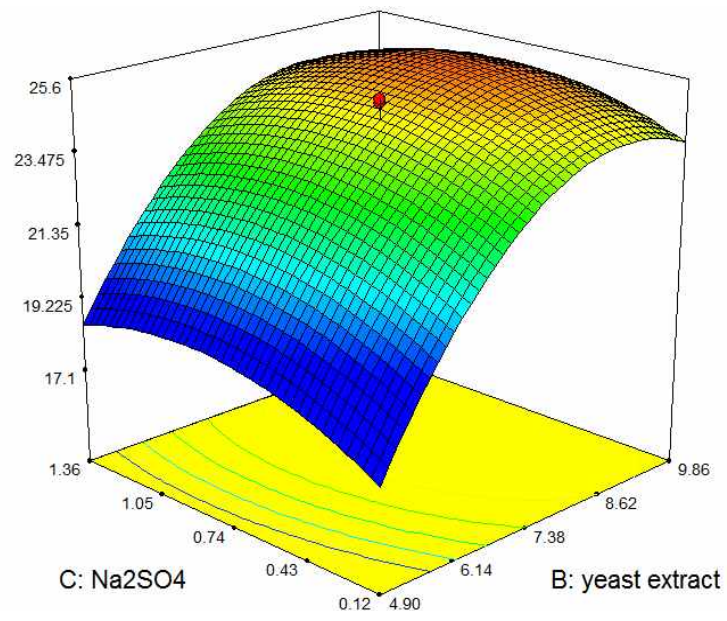


Fig. 122. Effects of glucose:fructose(4:1) and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of glucose:fructose(4:1) and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

(a)



(b)

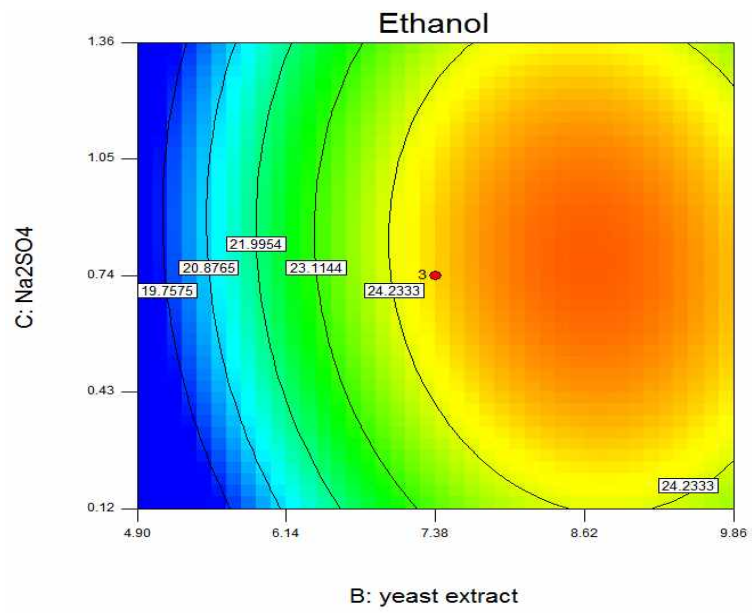


Fig. 123. Effects of yeast extract and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of yeast extract and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## (6) Response surface method 결과

1차 RSM의 분석 결과를 바탕으로 2차 RSM에서 예상되는 결과 (Table 62)를 토대로 예상되는 알코올이 가장 높은 8 번을 중점으로 2차 RSM을 진행하였다.(Table 63) 생산배지를 최적화시키기 위하여 3개의 중요한 요인인 glucosoe:fructose (4:1), yeast extract, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 중심합성계획(Central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 각 배지의 농도를 -a, -1, 0, 1, +a 다섯 단계로 부호화 하였다(Table 64). Table 65에 중심합성계획법에 의해 수행된 배양결과인 각각의 배지 조합에 대한 알코올생산성 및 균체량 생산성을 제시하였다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 Ethanol으로 회귀분석에 사용되었으며, 회귀분석에 의한 모델 식은 Design Expert pro S/W ver. 7.1.6을 사용하였다. 다양한 배지 조건에서 실험한 결과, Ethanol 생산성이 21.01 ~ 28.01 g/L, D.C.W 생산성은 6.86 ~ 8.69 g/L 범위로 관찰이 되었고, 실험 결과의 특성을 Table 66의 분산분석표를 통해 살펴보면 전체 모델의 유의 확률은 <0.0001보다 작으므로 가정된 모형반응이 자료에 적합하다고 할 수 있다. R-square(결정계수)은 0.9944로서 Ethanol 생산성에 대한 실험값과 모델식이 예측한 값이 거의 일치 한다는 결과를 얻었다. 모수 추정에 의한 2차 회귀식은 다음과 같이 분석되었다.

$$\begin{aligned} \text{Ethanol} = & +25.45 +0.70*A +1.99*B +0.61*C -0.029*A*B \\ & +0.11*A*C -0.11*B*C -0.43*A^2 -0.22*B^2 -0.24*C^2 \end{aligned}$$

Fig. 124-126에 반응 표면도와 contour plot을 이용해서 각 배지 성분들의 농도에 따른 알코올의 생산성을 나타내었다. 그래프 분석결과, 최적 점을 찾지 못하고 본 연구의 결과는 최적점 근처에 머문 형태의 그래프의 결과를 확인 할 수 있었다. 따라서 point prediction을 이용하여 여러 배지 성분 중, 가장 많은 알코올을 생산하는 배지를 찾은 후, 그 배지의 농도를 center point로 지정하여 다시 RSM 연구를 진행 하였다.

Table 63 Predicted value of each concentration by RSM.

	glucose:fructose(4:1)	yeast extract	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ethanol(g/L)
1	71.440	7.380	0.739	24.74
2	57.152	5.904	0.370	19.50
3	57.152	5.904	1.109	19.89
4	57.152	8.856	0.370	22.38
5	57.152	8.856	1.109	22.36
6	85.728	8.856	0.370	25.93
7	85.728	5.904	1.109	22.06
<b>8</b>	<b>85.728</b>	<b>8.856</b>	<b>1.109</b>	<b>26.28</b>
9	85.728	5.904	0.370	21.30
10	59.421	6.705	0.564	21.89
11	70.123	6.705	0.730	23.60
12	80.661	7.038	1.070	24.69
13	62.336	6.475	0.417	21.71
14	60.164	7.097	0.807	22.75
15	63.376	8.701	1.039	24.00
16	62.359	7.709	1.041	23.58
17	76.915	7.477	0.593	25.13
18	57.815	7.482	0.507	22.44
19	73.149	6.777	0.735	23.99
20	64.202	8.049	0.539	24.12
21	84.448	7.051	0.973	24.79
22	62.050	6.535	0.516	21.99
23	60.498	7.746	0.496	23.19
24	64.287	7.625	0.508	23.80
25	60.850	8.341	0.594	23.64
26	65.322	6.626	0.874	22.92
27	80.710	6.867	0.859	24.51
28	79.450	7.677	0.711	25.61
29	81.745	6.958	0.643	24.53
30	74.418	6.632	0.584	23.63
31	77.698	8.376	0.753	26.08
32	60.535	7.774	1.040	23.25
33	81.147	7.817	0.592	25.68
34	83.588	6.937	0.773	24.60
35	84.674	8.700	0.403	25.97
36	80.696	6.142	0.806	22.92
37	73.155	7.745	0.822	25.31
38	66.902	8.483	0.520	24.69
39	76.238	7.960	0.733	25.72

Table 64 Concentration of the respective medium components at each level (central composite design for the response surface method, RSM).

X <sub>n</sub>	Independent variables	Level				
		-a	-1	0	+1	+a
X <sub>1</sub>	glucose:fructose(4:1)	56.89	68.58	85.73	102.87	114.56
X <sub>2</sub>	yeast extract	5.88	7.09	8.86	10.63	11.83
X <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.18	0.55	1.11	1.66	2.04

※ a : 1.682

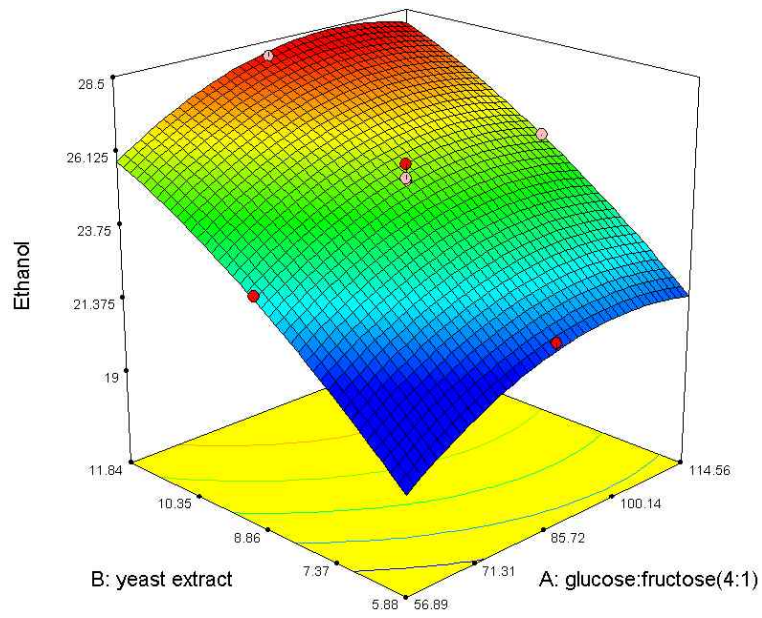
Table 65 Experimental matrix for the central composite design experiment.

Exp No.	Culture condition			Ethanol (g/L)	D.C.W (g/L)
	glucose:fructose(4:1)	yeast extract	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
1	-1(68.58)	-1(7.09)	-1(0.55)	21.01	5.88
2	+1(102.87)	-1(7.09)	-1(0.55)	22.41	5.74
3	-1(68.58)	+1(10.63)	-1(0.55)	25.56	6.82
4	+1(102.87)	+1(10.63)	-1(0.55)	26.60	6.41
5	-1(68.58)	-1(7.09)	+1(1.66)	22.39	5.71
6	+1(102.87)	-1(7.09)	+1(1.66)	24.00	5.91
7	-1(68.58)	+1(10.63)	+1(1.66)	26.25	6.31
8	+1(102.87)	+1(10.63)	+1(1.66)	27.99	6.31
9	-a(56.89)	0(8.86)	0(1.11)	23.16	6.23
10	+a(114.56)	0(8.86)	0(1.11)	25.39	6.38
11	0(85.73)	-a(5.88)	0(1.11)	21.72	5.90
12	0(85.73)	+a(11.83)	0(1.11)	28.01	7.24
13	0(85.73)	0(8.86)	-a(0.18)	23.81	6.52
14	0(85.73)	0(8.86)	+a(2.04)	25.79	5.99
15	0(85.73)	0(8.86)	0(1.11)	25.79	6.15
16	0(85.73)	0(8.86)	0(1.11)	25.23	6.29
17	0(85.73)	0(8.86)	0(1.11)	25.32	6.07

Table 66 Main effects according to trial of response surface method.

Response 1		Ethanol				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	68.38	9	7.60	138.82	< 0.0001	significant
<i>A-glucose.fruc</i>	6.66	1	6.66	121.77	< 0.0001	
<i>B-yeast extrac</i>	54.05	1	54.05	987.51	< 0.0001	
<i>C-Na2SO4</i>	5.14	1	5.14	93.95	< 0.0001	
<i>AB</i>	6.613E-003	1	6.613E-003	0.12	0.7384	
<i>AC</i>	0.10	1	0.10	1.89	0.2115	
<i>BC</i>	0.099	1	0.099	1.81	0.2206	
<i>A<sup>2</sup></i>	2.09	1	2.09	38.12	0.0005	
<i>B<sup>2</sup></i>	0.55	1	0.55	10.12	0.0155	
<i>C<sup>2</sup></i>	0.67	1	0.67	12.32	0.0099	
Residual	0.38	7	0.055			
<i>Lack of Fit</i>	0.20	5	0.040	0.45	0.7975	not significant
<i>Pure Error</i>	0.18	2	0.090			
Cor Total	68.76	16				
Std. Dev.	0.23		R-Squared	0.9944		
Mean	24.73		Adj R-Squared	0.9873		
C.V. %	0.95		Pred R-Squared	0.9711		
PRESS	1.99		Adeq Precision	38.695		

(a)



(b)

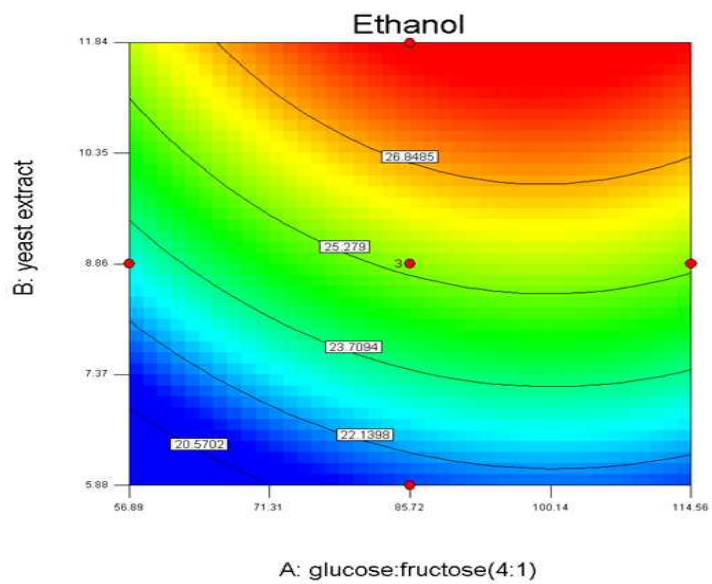


Fig. 124. Effects of glucose:fructose(4:1) and yeast extract on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of glucose:fructose(4:1) and yeast extract.



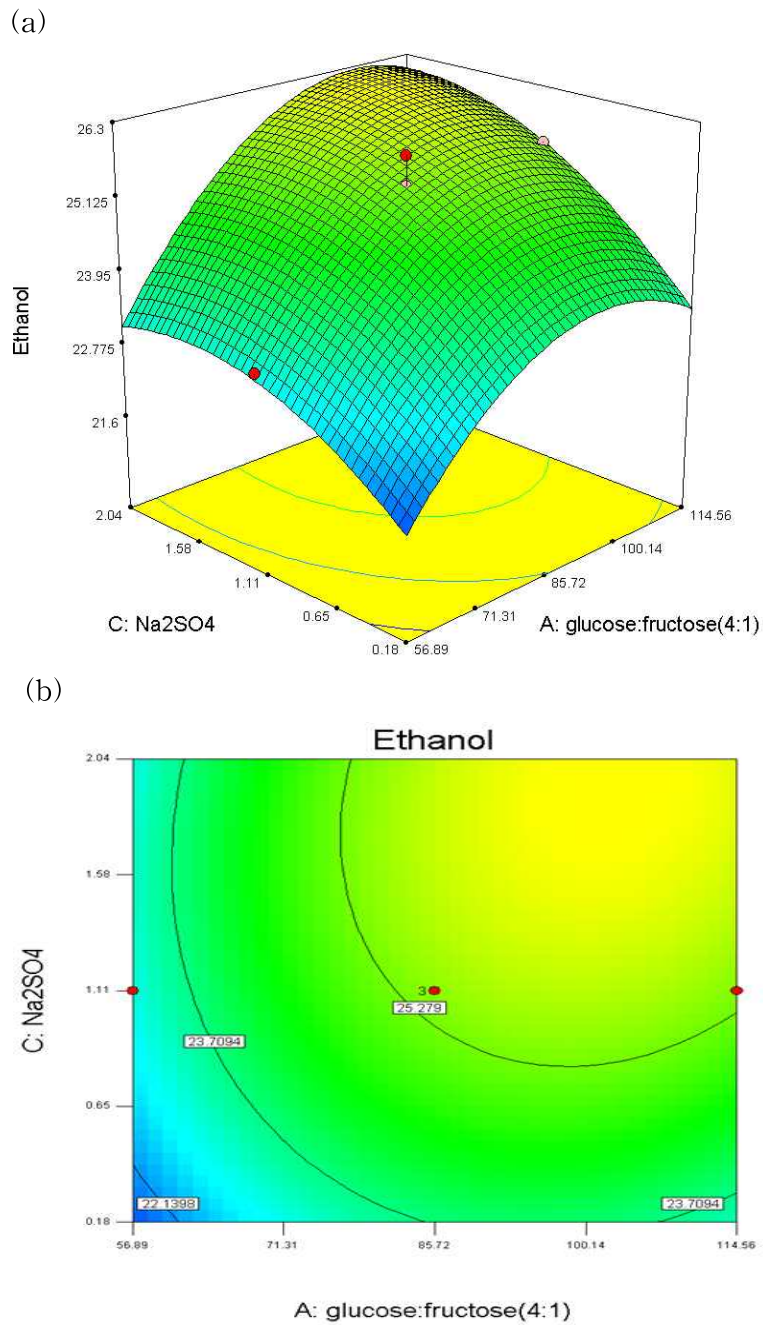
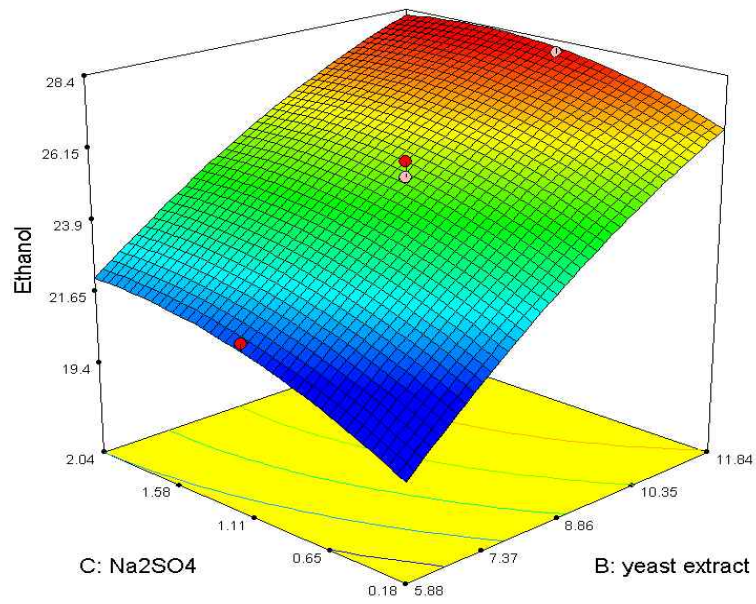


Fig. 125. Effects of glucose:fructose(4:1) and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of glucose:fructose(4:1) and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

(a)



(b)

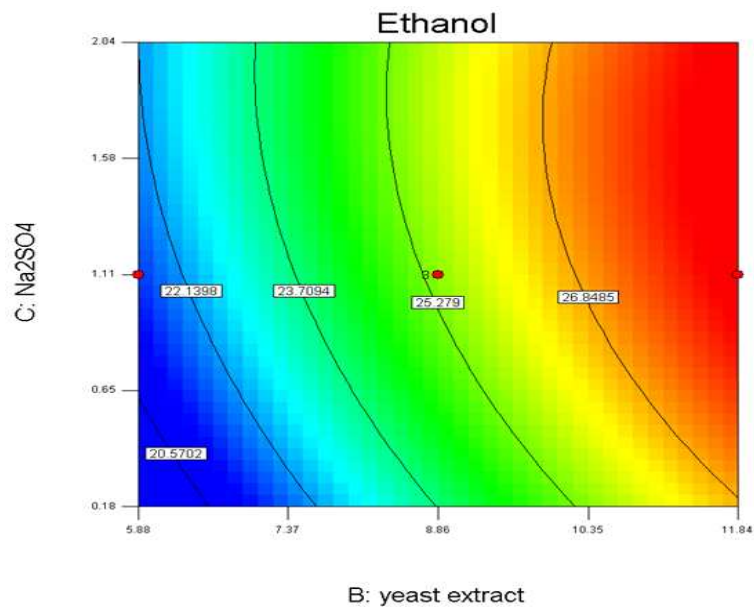


Fig. 126. Effects of yeast extract and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of yeast extract and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## (7) 2차 Response surface method 결과

2차 RSM의 분석 결과를 바탕으로 3차 RSM에서 예상되는 결과 (Table 66)을 토대로 예상되는 알코올이 가장 높은 5 번을 중점으로 2차 RSM을 진행하였다(Table 67). 생산배지를 최적화시키기 위하여 3개의 중요한 요인인 glucosae:fructose(4:1), yeast extract, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 중심합성계획(Central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 각 배지의 농도를 -a, -1, 0, 1, +a 다섯 단계로 부호화 하였다.(Table 68) Table 69에 중심합성계획법에 의해 수행된 배양 결과인 각각의 배지 조합에 대한 알코올생산성 및 균체량 생산성을 제시하였다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 Ethanol으로 회귀분석에 사용되었으며, 회귀분석에 의한 모델 식은 Design Expert pro S/W ver. 7.1.6을 사용하였다. 다양한 배지 조건에서 실험한 결과, Ethanol 생산성이 26.46 ~ 37.04 g/L, D.C.W 생산성은 5.33 ~ 6.70 g/L 범위로 관찰이 되었고, 실험 결과의 특성을 Table 70의 분산분석표를 통해 살펴보면 전체 모델의 유의 확률은 <0.05보다 작으므로 가정된 모형반응이 자료에 적합하다고 할 수 있다. R-square(결정계수)은 0.8869로서 Ethanol 생산성에 대한 실험값과 모델식이 예측한 값이 거의 일치 한다는 결과를 얻었다. 모수 추정에 의한 2차 회귀식은 다음과 같이 분석되었다.

$$\begin{aligned} \text{Ethanol} = & +35.56 +0.38*A +2.43*B +0.48*C +0.34*A*B -0.47*A*C \\ & -0.47*B*C -1.69*A^2 -1.01*B^2 -1.01*C^2 \end{aligned}$$

Fig. 127-129에 반응 표면도와 contour plot을 이용해서 각 배지 성분들의 농도에 따른 알코올의 생산성을 나타내었다. 그래프 분석결과, 최적 점 근처에 다다른 결과를 확인 하였다. 따라서 point prediction을 이용하여 여러 배지 성분 중, 가장 많은 알코올을 생산하는 배지를 찾은 후, 그 배지의 농도를 center point로 지정하여 예측 값과 실험값을 비교 해보는 연구를 진행해야 할 것이다.

Table 67 Predicted value of each concentration by RSM 2.

	glucose:fructose(4:1)	yeast extract	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ethanol (g/L)
1	85.73	8.86	1.11	25.45
2	102.87	7.09	0.55	22.45
3	102.87	10.63	0.55	26.60
4	68.58	7.09	0.55	21.23
<b>5</b>	<b>102.87</b>	<b>10.63</b>	<b>1.66</b>	<b>27.83</b>
6	68.58	10.63	0.55	25.49
7	68.58	10.63	1.66	26.26
8	102.87	7.09	1.66	24.13
9	68.58	7.09	1.66	22.45
10	91.70	8.23	0.57	23.99
11	97.21	9.99	1.20	26.99
12	82.03	8.38	1.25	24.86
13	94.13	10.00	0.93	26.64
14	68.91	8.95	0.86	24.19
15	96.66	7.83	0.88	24.16
16	97.06	9.22	1.01	25.99
17	83.13	7.75	1.28	24.18
18	100.10	9.82	1.45	27.04
19	99.24	9.06	1.38	26.24
20	82.80	10.14	0.74	26.20
21	96.77	7.27	1.15	23.83
22	99.52	10.19	1.28	27.26
23	97.89	7.72	0.94	24.12
24	77.79	7.76	1.65	24.09
25	86.64	9.66	0.93	26.13
26	84.37	10.48	0.71	26.54
27	77.82	8.06	0.89	23.81
28	99.14	7.94	1.62	25.15
29	89.25	8.73	1.04	25.35
30	88.11	8.38	1.52	25.33
31	96.30	9.95	0.89	26.57
32	101.26	7.99	0.67	23.95
33	76.94	8.50	1.45	24.83
34	92.46	7.13	1.26	23.71
35	101.54	7.88	1.40	24.91
36	85.41	10.10	1.54	26.99
37	89.61	10.22	0.95	26.80
38	92.48	7.33	0.83	23.35
39	98.41	10.05	0.58	26.13

Table 68 Concentration of the respective medium components at each level.  
(central composite design for the response surface method, RSM)

X <sub>n</sub>	Independent variables	Level				
		-a	-1	0	+1	+a
X <sub>1</sub>	glucose:fructose(4:1)	68.28	82.30	102.87	123.44	137.46
X <sub>2</sub>	yeast extract	7.05	8.50	10.63	12.76	14.21
X <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.26	0.83	1.66	2.49	3.06

※ a : 1.682

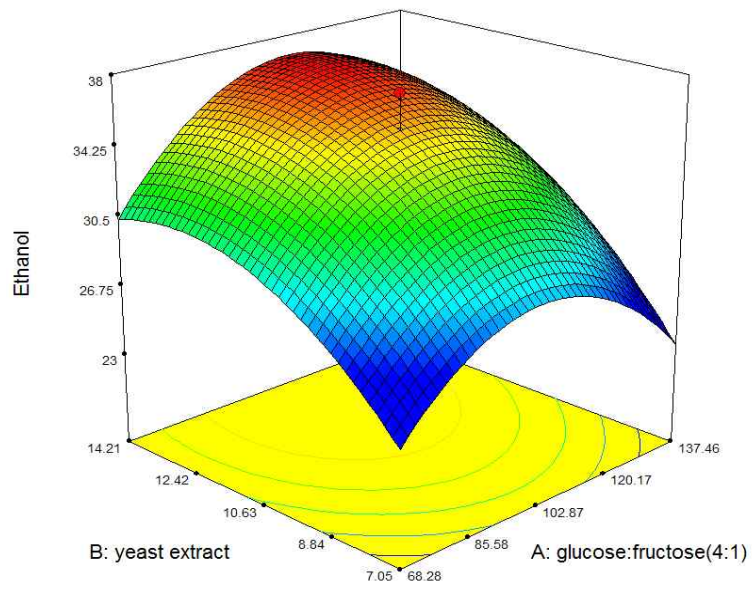
Table 69 Experimental matrix for the central composite design experiment.

Exp No.	Culture condition			Ethanol (g/L)	D.C.W (g/L)
	glucose:fructose(4:1)	yeast extract	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
1	-1(82.30)	-1(8.50)	-1(0.83)	26.46	5.33
2	+1(123.44)	-1(8.50)	-1(0.83)	27.90	5.49
3	-1(82.30)	+1(12.76)	-1(0.83)	32.67	5.95
4	+1(123.44)	+1(12.76)	-1(0.83)	34.64	5.94
5	-1(82.30)	-1(8.50)	+1(2.49)	31.01	5.81
6	+1(123.44)	-1(8.50)	+1(2.49)	29.76	5.61
7	-1(82.30)	+1(12.76)	+1(2.49)	34.53	6.15
8	+1(123.44)	+1(12.76)	+1(2.49)	35.43	5.80
9	-a(68.28)	0(10.63)	0(1.66)	30.55	6.05
10	+a(137.46)	0(10.63)	0(1.66)	31.85	6.01
11	0(102.87)	-a(7.05)	0(1.66)	29.85	5.32
12	0(102.87)	+a(14.21)	0(1.66)	36.38	6.70
13	0(102.87)	0(10.63)	-a(0.26)	33.89	5.52
14	0(102.87)	0(10.63)	+a(3.06)	32.38	5.35
15	0(102.87)	0(10.63)	0(1.66)	34.56	5.78
16	0(102.87)	0(10.63)	0(1.66)	37.04	6.03
17	0(102.87)	0(10.63)	0(1.66)	34.93	5.97

Table 70 Main effects according to trial of response surface method.

Response 1		Ethanol				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	127.41	9	14.16	6.10	0.0131	significant
<i>A-glucose:fruc</i>	2.02	1	2.02	0.87	0.3820	
<i>B-yeast extrac</i>	80.39	1	80.39	34.65	0.0006	
<i>C-Na2SO4</i>	3.11	1	3.11	1.34	0.2847	
AB	0.91	1	0.91	0.39	0.5514	
AC	1.77	1	1.77	0.76	0.4110	
BC	1.77	1	1.77	0.76	0.4115	
A <sup>2</sup>	32.19	1	32.19	13.87	0.0074	
B <sup>2</sup>	11.57	1	11.57	4.99	0.0607	
C <sup>2</sup>	11.43	1	11.43	4.93	0.0619	
Residual	16.24	7	2.32			
<i>Lack of Fit</i>	12.66	5	2.53	1.41	0.4639	not significant
<i>Pure Error</i>	3.58	2	1.79			
Cor Total	143.65	16				
Std. Dev.	1.52		R-Squared	0.8869		
Mean	32.58		Adj R-Squared	0.7416		
C.V. %	4.68		Pred R-Squared	0.2713		
PRESS	104.67		Adeq Precision	7.547		

(a)



(b)

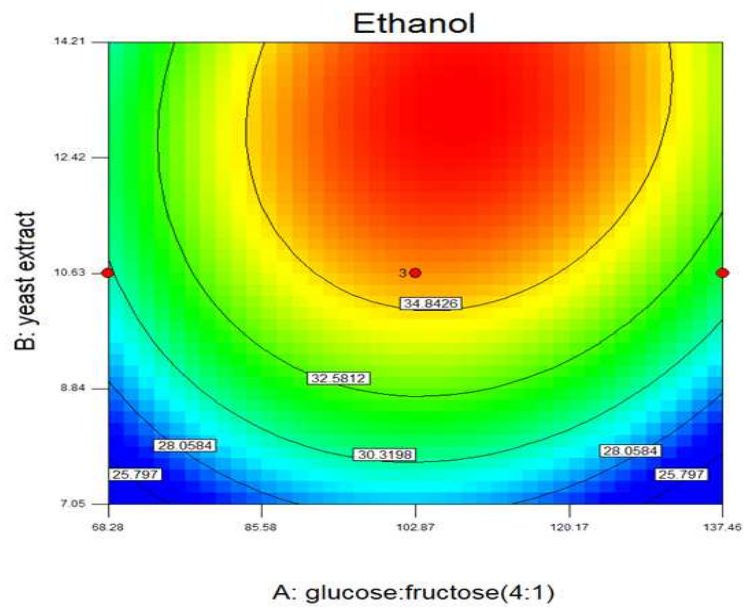
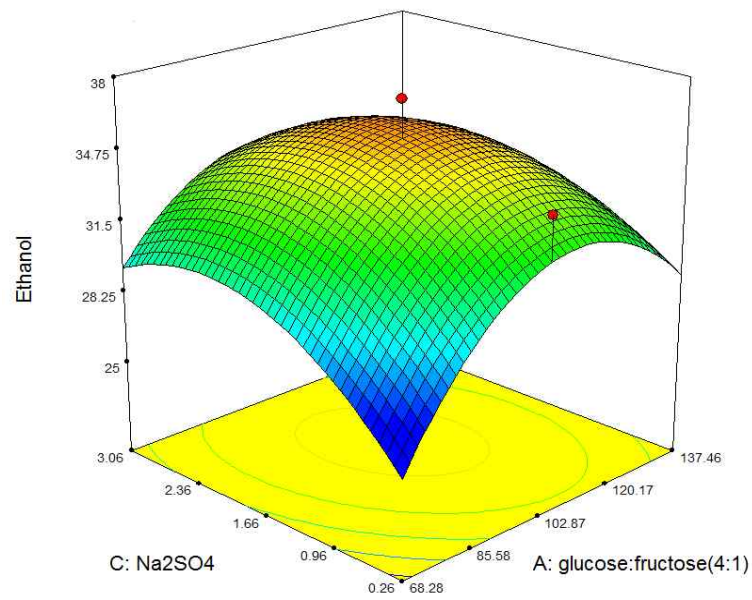


Fig. 127. Effects of glucose:fructose(4:1) and yeast extract on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of glucose:fructose(4:1) and yeast extract.

(a)



(b)

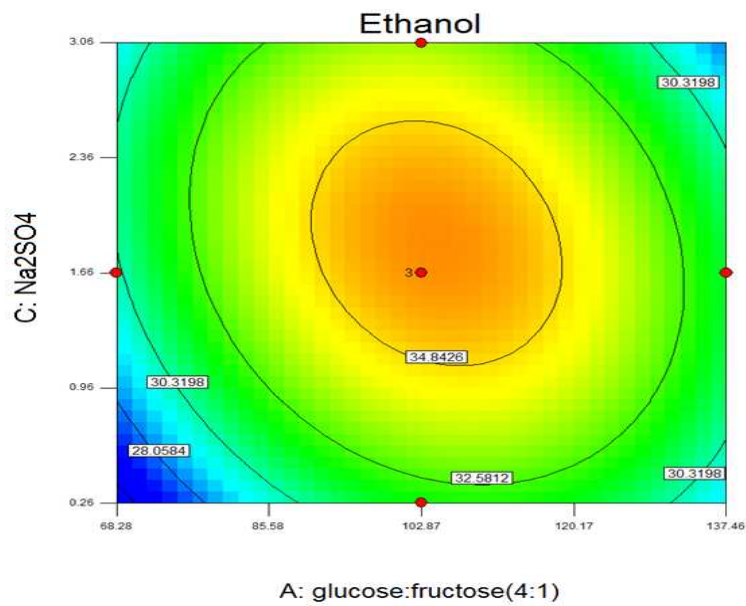
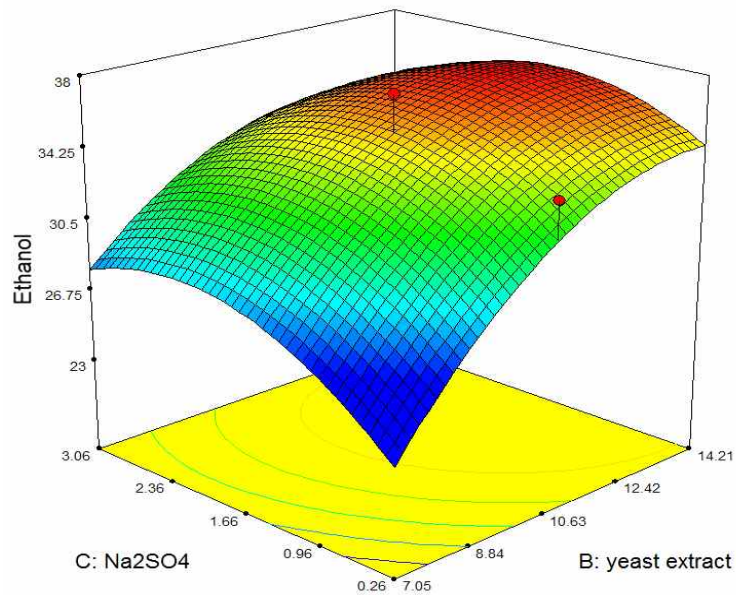


Fig. 128. Effects of glucose:fructose(4:1) and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of glucose:fructose(4:1) and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



(a)



(b)

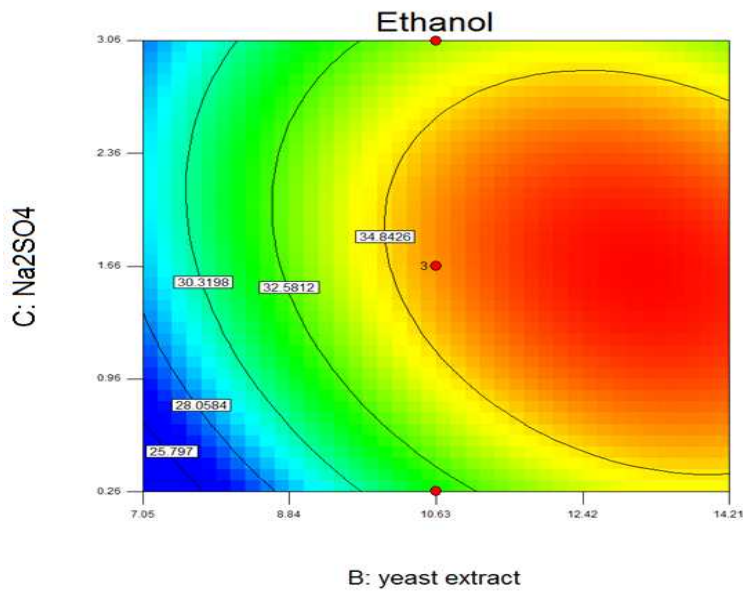


Fig. 129. Effects of yeast extract and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on Ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of yeast extract and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

다. *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 100971의 통계적 방법을 이용한 배지 최적화

(1) One factor at a time 방법을 이용한 영양원 선별

(가) 탄소원 선정 실험

glucose를 기본 탄소원으로 하여 fructose, sucrose, maltose, galactose 그리고 lactose의 영향을 확인하였다(Fig. 130). 탄소원 함량은 100 g/L로 선정 하고 실험에 진행하였다. 실험결과 glucose가 선정되었다.

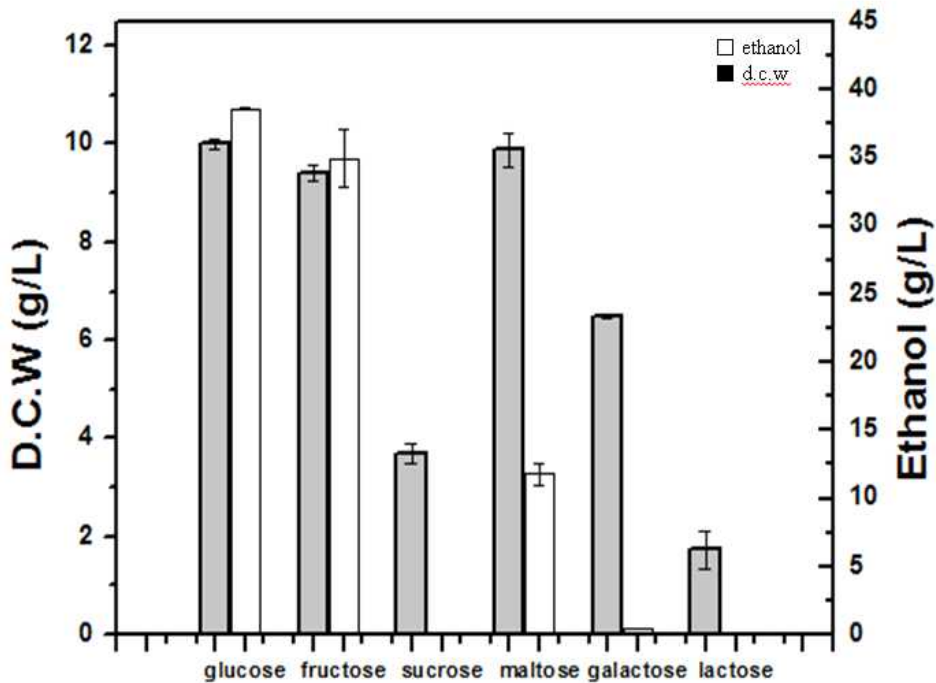


Fig. 130. Effect of carbon source on ethanol production.

(나) 질소원 선정 실험

질소원 선정 실험은 탄소원에서 선정된 glucose를 고정하여, 5 g/L로 농도를 정한 후 실험을 진행하였다(Fig. 131). 질소원은 yeast extract를 대조구로하여 urea, ammonia sulfate, beef extract, peptone, ammonium chloride 그리고 tryptone의 영향을 확인하였다. 실험결과 yeast extract가 선정되었다.

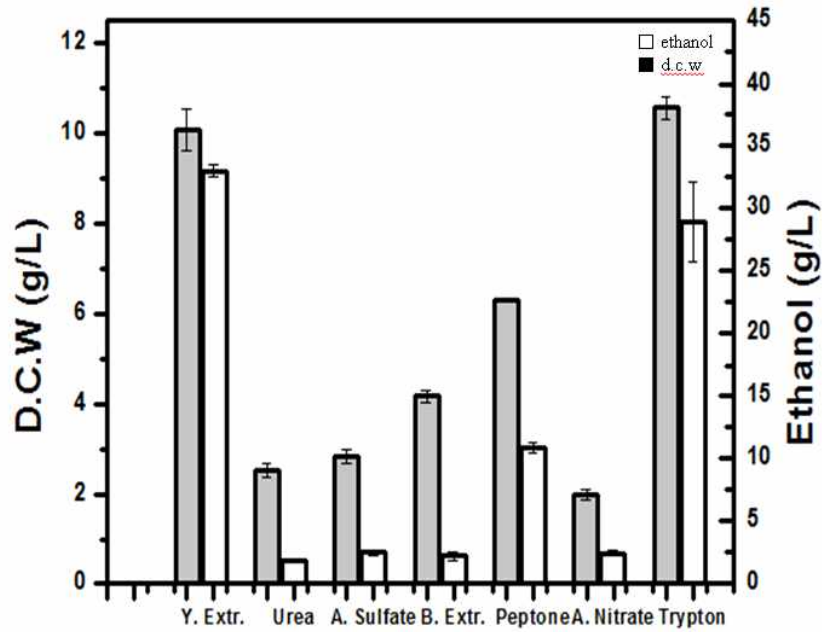


Fig. 131. Effect of nitrogen source on ethanol production.

#### (다) 인원 선정 실험

인원 선정 실험은  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 대조구로 선정하여 1.5 g/L로 농도를 정한 후, 실험을 진행하였다(Fig. 132). potassium phosphate dibasic ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), diammonium hydrogen phosphate( $\text{NH}_4\text{HPO}_4$ )의 영향을 확인 하였다. 실험결과,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 가 선정 되었다.

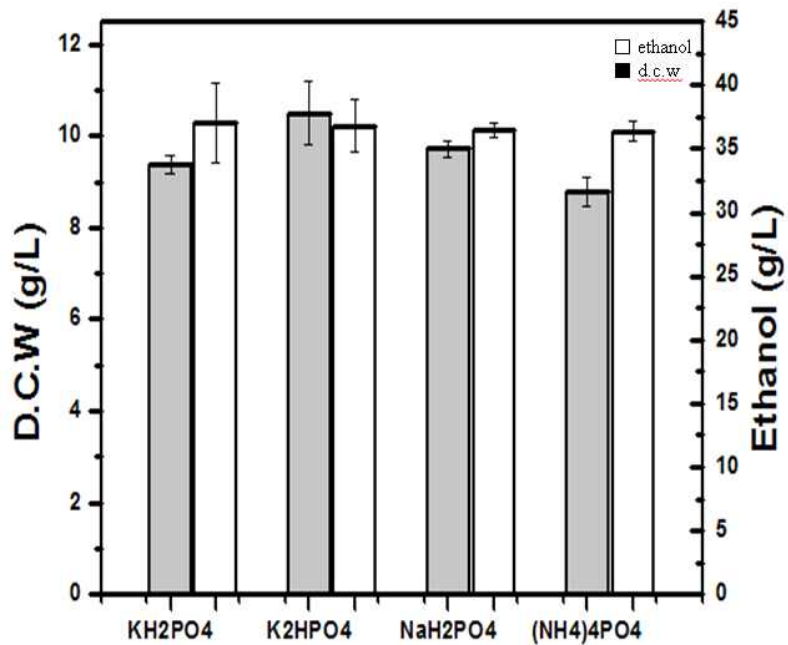


Fig. 132. Effect of phosphate source on ethanol production.

(라) 금속이온 선정 실험

금속이온 선정 실험은  $MgSO_4$ 를 대조구로하여 0.6 g/L로 농도를 정한 후, 실험을 진행하였다 (Fig. 133).  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $KHSO_4$  그리고  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 영향을 확인 하였다. 실험 결과,  $MgSO_4$ 가 선정 되었다.

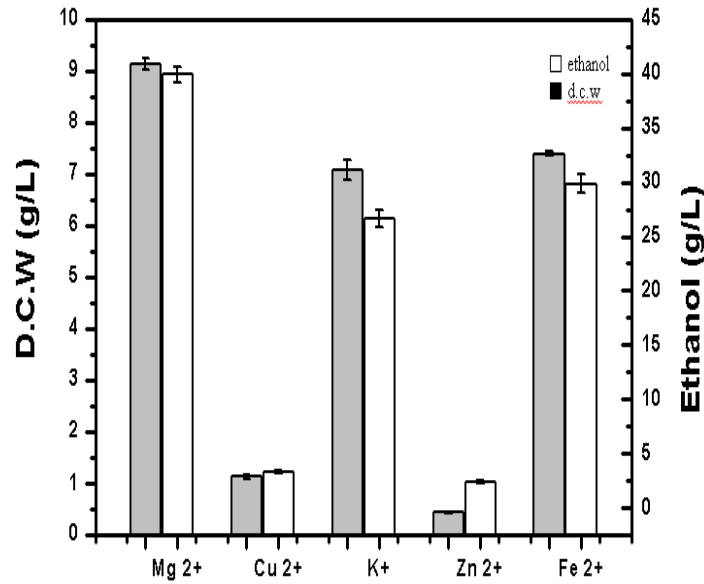


Fig. 133. Effect of metal ions on d.c.w and ethanol production.

(마) 염이온 선정 실험

염이온 선정 실험은  $CaCl_2$ 를 대조구로 하여 0.2 g/L로 농도를 정한 후,  $NaCl$ ,  $KCl$  그리고  $MnCl_2$ 의 영향을 확인 하였다(Fig. 134). 실험 결과,  $CaCl_2$ 가 선정 되었다.

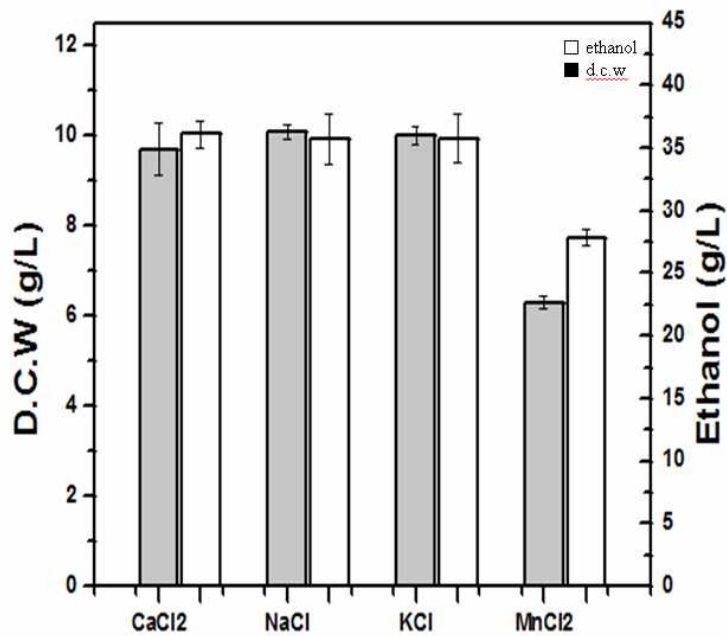


Fig. 134. Effect of metal chlorides on d.c.w and ethanol production.

(2) Plackett-Burman design method에 의한 최대 영향요인 선택

Plackett-Burman design을 통하여 알코올 생산에 미치는 영향 조사를 한 결과(Fig. 135), glucose(78.7%)가 알코올 생산에 가장 많은 영향을 미쳤고, 그 다음으로 MgSO<sub>4</sub>(9.4%)와 yeast extract(8.4%)가 선정이 되었다. 생산에 미치는 영향이 낮은 성분은 CaCl<sub>2</sub>(3.3%), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.3%)로 확인 되었다.

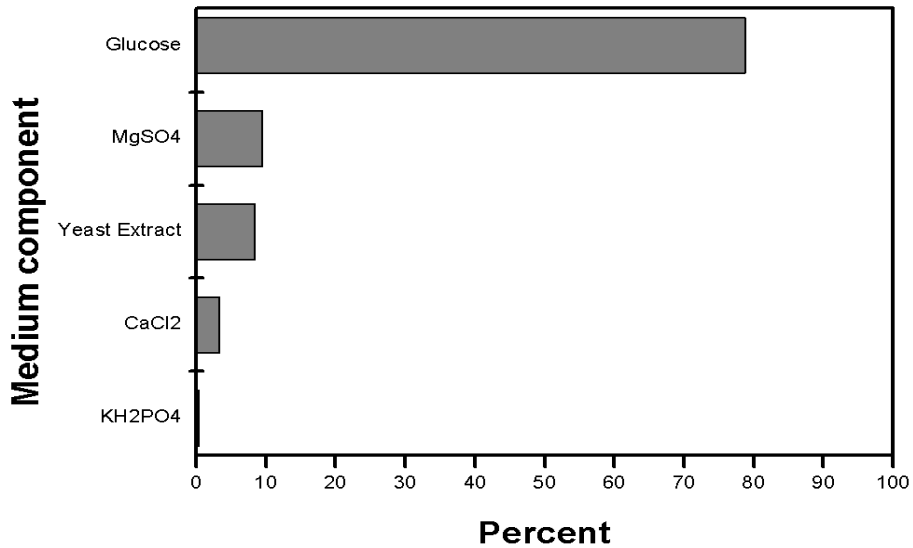


Fig. 135. Pareto plot for Plackett-Burman parameter estimates-cumulative percent.

Table 71 Medium components and their levels used in the Plackett-Burman design.

	glucose	yeast extract	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>
High(g/L)	120	6	2.25	0.9	0.3
Low(g/L)	870	4	0.75	0.3	0.1

Table 72 Plackett–Burman design results.

Trial	Variables					Ethanol (g/L)	D.C.W (g/L)
	A	B	C	D	E		
M1	+	-	+	-	-	42.33	10.15
<b>M2</b>	+	+	-	+	-	37.51	<b>9.35</b>
M3	-	+	+	-	+	<b>30.61</b>	8.90
M4	+	-	+	+	-	39.58	9.22
M5	+	+	-	+	+	42.47	9.85
M6	+	+	+	-	+	41.24	9.87
M7	-	+	+	+	-	28.08	8.64
M8	-	-	+	+	+	20.25	7.17
M9	-	-	-	+	+	29.15	8.81
M10	+	-	-	-	+	39.92	9.14
M11	-	+	-	-	-	26.41	8.41
M12	-	-	-	-	-	26.32	8.84

H (+); high concentration of variable

L (-); low concentration of variable

A. glucose, B. Yeast extract, C.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , D.  $\text{MgSO}_4$ , E.  $\text{CaCl}_2$

Table 73 Analysis of ethanol production shown.

	A	B	C	D	E
$\Sigma(\text{H})$	243.05	206.32	202.09	197.07	203.64
$\Sigma(\text{L})$	160.82	197.55	201.78	206.83	200.23
Difference	82.23	8.77	0.31	-9.76	3.41
Effect	16.45	1.75	0.06	-1.95	0.69
Mean square	676.34	7.67	0.0093	9.52	1.18

**(3) Response surface method (RSM, 반응표면분석법)에 의한 생산배지 최적화**

Design Expert pro S/W version 7 프로그램을 통하여 데이터 분석을 하였고, 이차식은 다음과 같다.

$$Y=52.13 + 6.64X_1 + 3.60 X_2 + 0.59 X_3 + 0.20 X_1X_2 - 0.88 X_1X_3 + 0.57 X_2X_3 - 2.58 X_1^2 - 6.12 X_2^2 - 1.85 X_3^2$$

Y는 ethanol 생산이고, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> 그리고 X<sub>3</sub>, 는 glucose, yeast extract and MgSO<sub>4</sub>의 농도를 나타내었다. ANOVA 분석은 (Table 76)에 제시 하였다. 모델식은 p<0.0422로 통계적으로 유의하다 라고 할 수 있고, R-square는 0.8350로 확인 되었다. 반응표면분석 그래프는 Fig. 136에 제시하였다. 최적 농도는 glucose 158 g/L yeast extract 13.6 g/L MgSO<sub>4</sub> 2.04 g/L로 확인 되었고, 에탄올 생산은 54.26 g/L로 확인 하였다.

Table 74 Concentration of the respective medium components at each level.  
(Central composite design for the response surface method)

X <sub>n</sub>	Independent variables	Level				
		-a	-1	0	+1	+a
X <sub>1</sub>	glucose	99.55	120	150	180	200.45
X <sub>2</sub>	yeast extract	1.91	6	12	18	22.09
X <sub>3</sub>	MgSO <sub>4</sub>	0.29	0.9	1.8	2.7	3.31

Table 75 Experimental and predicted ethanol levels in media with different concentrations of critical components.

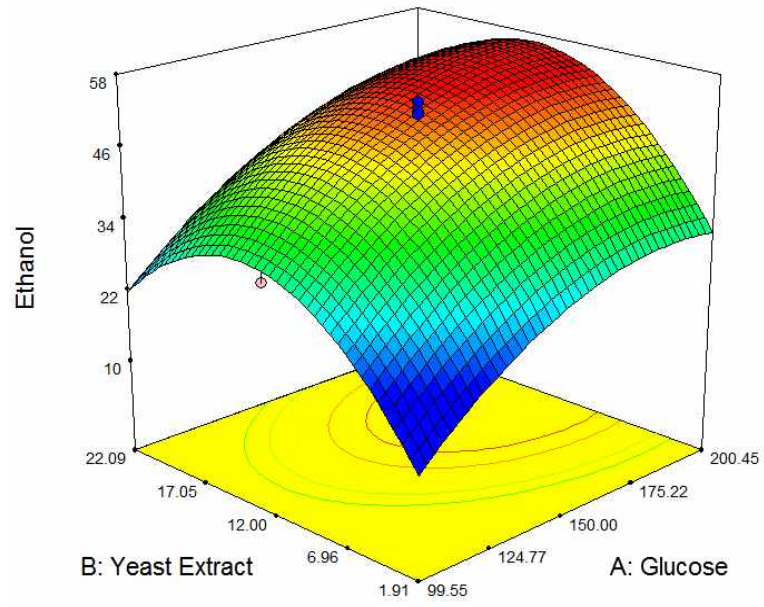
Exp. NO.	glucose (g/L)	yeast extract (g/L)	MgSO <sub>4</sub> (g/L)	Predicted Ethanol (g/L)	Experimental Ethanol (g/L)	D.C.W (g/L)
1	-1(120.00)	-1(6.0)	-1(0.90)	30.65	35.78	9.76
2	+1(180.00)	-1(6.0)	-1(0.90)	45.29	49.6	10.44
3	-1(120.00)	+1(18.00)	-1(0.90)	36.28	34.02	9.57
4	+1(180.00)	+1(18.00)	-1(0.90)	51.74	50.58	9.61
5	-1(120.00)	-1(6.0)	+1(2.70)	32.43	36.31	10.27
6	+1(180.00)	-1(6.0)	+1(2.70)	43.55	48.53	9.76
7	-1(120.00)	+1(18.00)	+1(2.70)	40.37	38.77	9.85
8	+1(180.00)	+1(18.00)	+1(2.70)	52.3	49.89	9.4
9	-a(99.55)	0(12.00)	0(1.80)	33.65	31.9	8.93
10	+a(200.45)	0(12.00)	0(1.80)	55.99	53.9	9.36
11	0(150.00)	-a(1.91)	0(1.80)	28.79	29.21	6.18
12	0(150.00)	+a(22.09)	0(1.80)	40.89	46.62	11.2
13	0(150.00)	0(12.00)	-a(0.29)	45.93	43.64	9.44
14	0(150.00)	0(12.00)	+a(3.31)	47.9	43.6	9.88
15	0(150.00)	0(12.00)	0(1.80)	52.13	53.51	9.72
16	0(150.00)	0(12.00)	0(1.80)	52.13	52.05	9.84
17	0(150.00)	0(12.00)	0(1.80)	52.13	51.49	9.81



Table 76 Main effects according to trial of response surface method (RSM).

Response 1		Ethanol				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1222.54	9	135.84	3.94	0.0422	significant
<i>A-Glucose</i>	602.63	1	602.63	17.47	0.0041	
<i>B-Yeast Extrac</i>	176.80	1	176.80	5.12	0.0580	
<i>C-MgSO4</i>	4.68	1	4.68	0.14	0.7236	
<i>AB</i>	0.34	1	0.34	9.744E-003	0.9241	
<i>AC</i>	6.20	1	6.20	0.18	0.6845	
<i>BC</i>	2.65	1	2.65	0.077	0.7899	
<i>A<sup>2</sup></i>	75.32	1	75.32	2.18	0.1831	
<i>B<sup>2</sup></i>	421.55	1	421.55	12.22	0.0101	
<i>C<sup>2</sup></i>	38.71	1	38.71	1.12	0.3247	
Residual	241.53	7	34.50			
<i>Lack of Fit</i>	239.35	5	47.87	44.01	0.0224	significant
<i>Pure Error</i>	2.18	2	1.09			
Cor Total	1464.07	16				
Std. Dev.	5.87		R-Squared	0.8350		
Mean	43.65		Adj R-Squared	0.6229		
C.V. %	13.46		Pred R-Squared	-0.2468		
PRESS	1825.36		Adeq Precision	6.039		

(a)



(b)

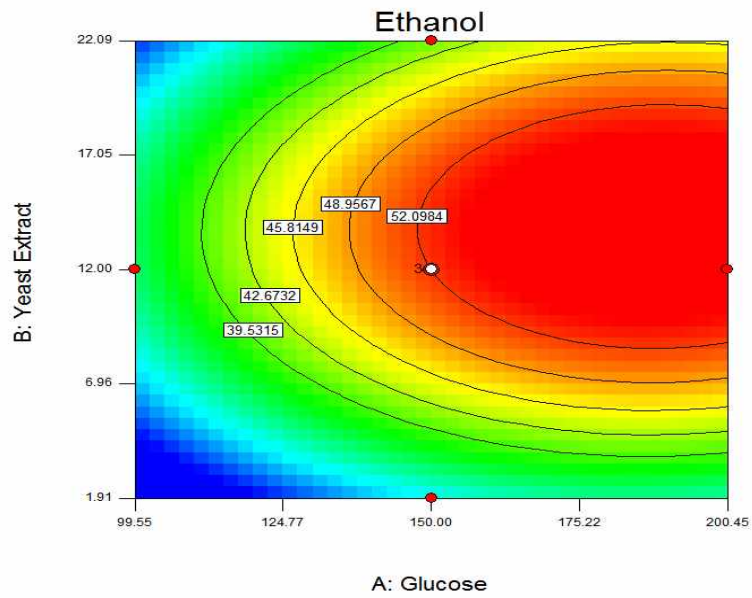
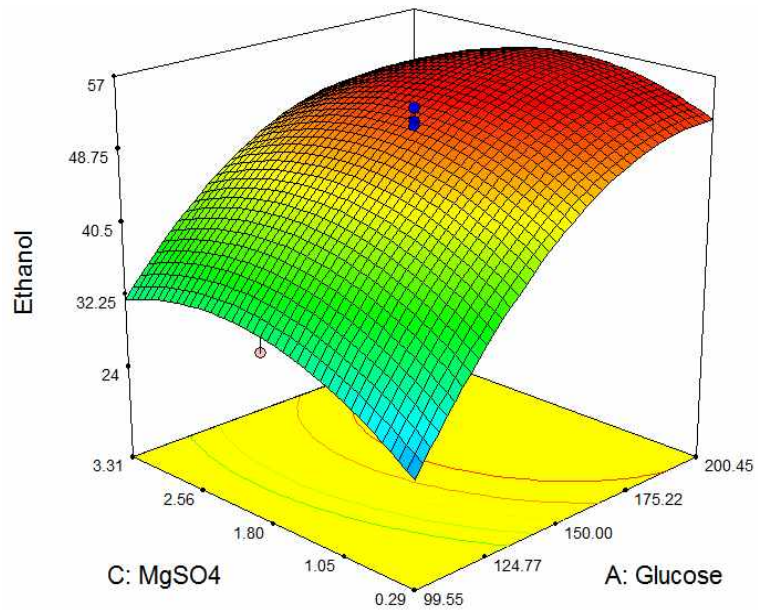


Fig. 136. Effect of glucose and yeast extract on ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of glucose and yeast extract concentration.

(a)



(b)

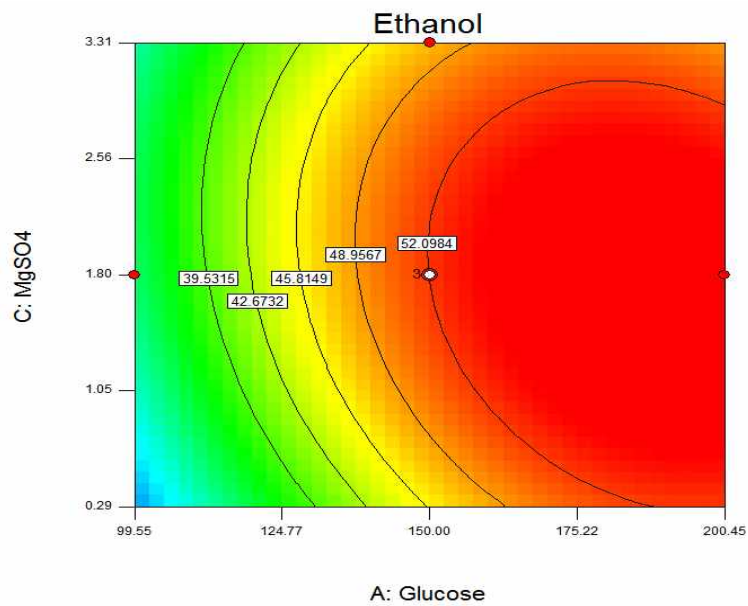
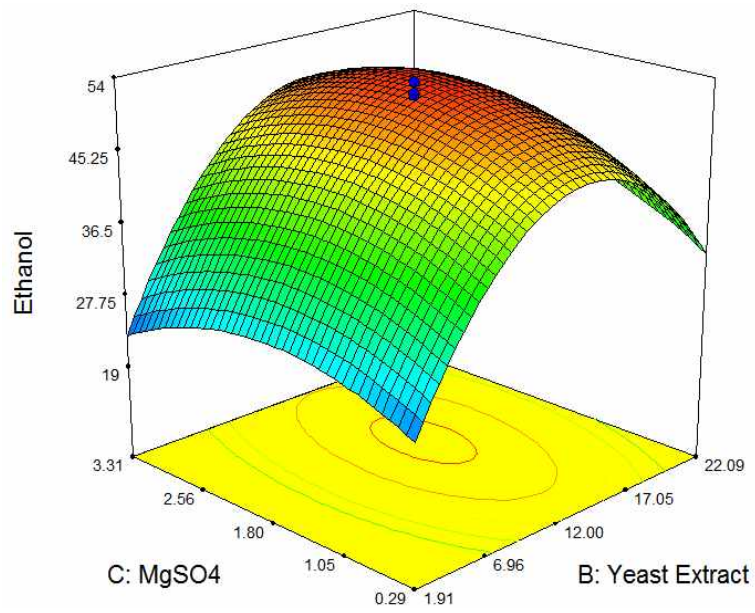


Fig. 137. Effect of glucose and MgSO<sub>4</sub> on ethanol production:(a)3-D response surface and (b) contour plot a safunction of glucose and MgSO<sub>4</sub> concentration.

(a)



(b)

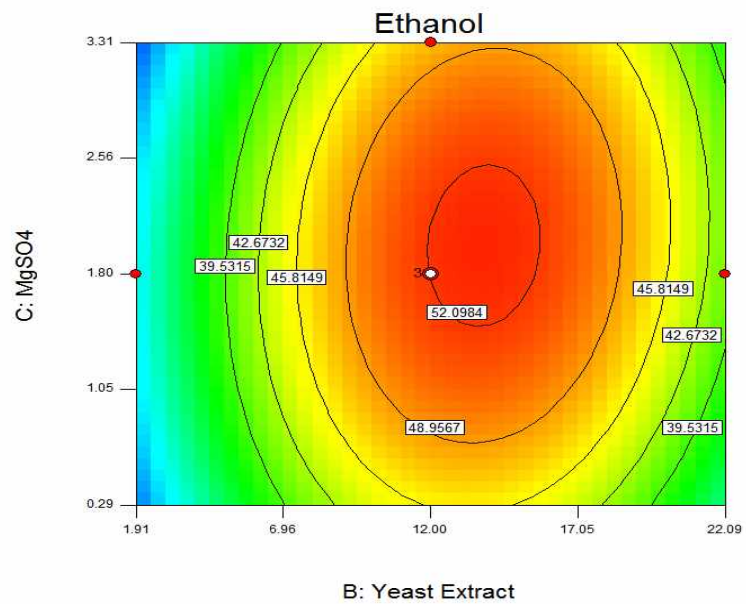


Fig. 138. Effect of yeast extract and MgSO<sub>4</sub> on ethanol production: (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of yeast extract and MgSO<sub>4</sub> concentration.

#### (4) 최적 배지를 이용한 발효조 배양 실험

##### (가) 최적 배지를 이용한 온도 선정 실험

*Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 100971를 서로 다른 온도 27 ~ 32°C 에서 발효한 결과 29°C 에서 가장 높은 알코올 함량 54.9 ± 1.5 g/L 으로 확인 하였다(Fig. 139). 27°C 그리고 32 °C에서 알코올 생산은 19.3, 51.9 g/L로 나타났으며, 각각의 온도에서 남은 당 함량은 27, 29 그리고 32°C 는 54.6, 25.7 그리고 29.7 g/L로 나타났다. 본 실험 결과 온도는 29°C가 선정 되었다.

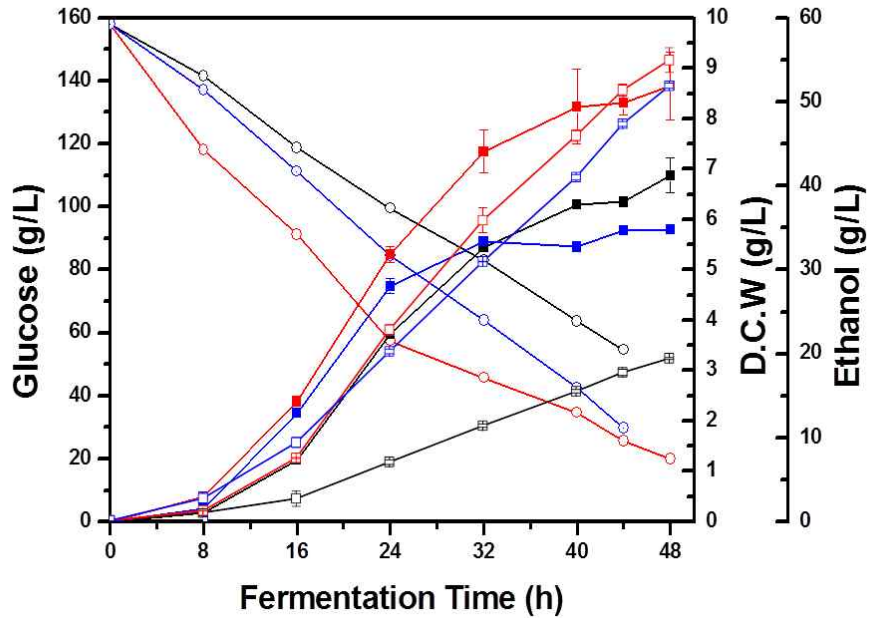


Fig. 139. Effect of temperature on d.c.w, ethanol production and glucose consumption in optimized medium at pH 5 and 180 rpm using *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 100971(□;ethanol at 27°C, □;ethanol at 29°C, □;ethanol at 32°C, ■; d.c.w. at 27°C, ■;d.c.w at 29°C, ■;d.c.w at 32°C, ○;glucose at 27°C, ○;glucose at 29°C, ○;glucose at 32°C).

(나) 최적 배지를 이용한 pH 선정실험

*Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 100971 균주를 서로 다른 pH(5-7)로 변화시켜 실험을 진행하였다(Fig. 140). pH 5에서 가장 높은 에탄올 생산 (54.9 g/L)이 되었고, pH를 조절 하지 않은 배지에 44시간 동안 발효한 결과 52.8 g/L로 확인되었다. pH를 조절 하지 않은 배지는 5.88 - 4.21로 pH가 떨어짐을 보였다. 그리고 pH 6, 7에서는 알코올 생산이 낮았으며, 각각 43.5 와 32.2 g/L로 확인 되었다. 따라서 본 실험 결과에 따라 pH 5가 선정이 되었다.

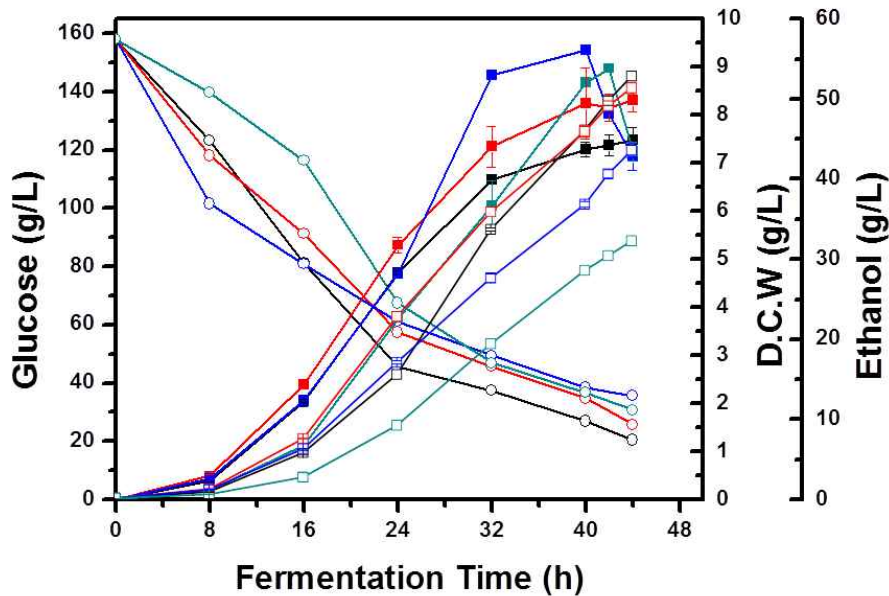


Fig. 140. Effect of pH on d.c.w, ethanol production and glucose consumption in optimized medium at 29°C and 180 rpm using *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 100971(□;ethanol at uncontrolled pH, □;ethanol at pH 5, □;ethanol at pH 6, □;ethanol at pH 7, ■;d.c.w. at uncontrolled pH, ■; d.c.w at pH 5, ■;d.c.w at pH 6, ■;d.c.w at pH 7, ○; glucose at uncontrolled pH, ○; glucose at pH5, ○;glucose at pH6, ○;glucose at pH 7).

(다) 최적 배지를 이용한 교반속도 선정실험

*Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 100971 균주를 서로 다른 교반속도(150-250 rpm)를 선정하여 실험하였다(Fig. 141). 교반속도 200 rpm일 때 65 g/L로 가장 많은 알코올을 생산하였다. 다른 교반속도인 150 rpm과 250 rpm은 각각 42.5, 49.4 g/L로 확인되었다.

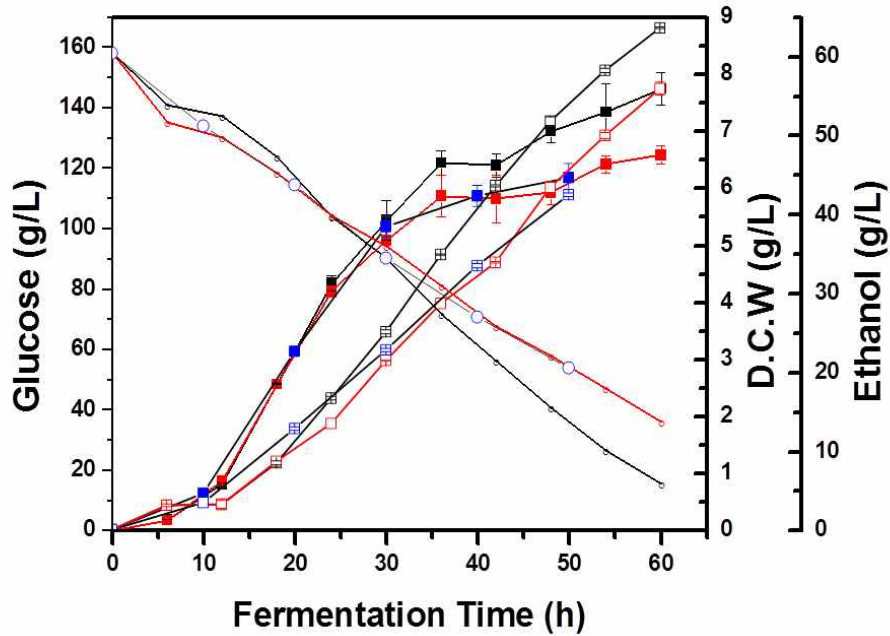


Fig. 141. Effect of agitation speed on d.c.w, ethanol production and glucose consumption in optimized medium at pH 5 and 29°C using *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 100971. (□; ethanol at 150 rpm, □; ethanol at 200 rpm, □; ethanol at 250 rpm, ■; d.c.w. at 150 rpm, ■; d.c.w at 200 rpm, ■; d.c.w at 250 rpm, ○; glucose at 150 rpm, ○; glucose at 200 rpm, ○; glucose at 250 rpm).

(라) 최적배지와 선정된 발효조건을 이용한 확인 실험

발효조를 이용한 발효조건 최적화 실험 결과, 균주의 최적 발효 조건은 29°C, pH 5 그리고 200 rpm 고정하여 알코올 생산과 미생물 성장을 확인 실험하였다(Fig. 142). 실험결과, 장시간 발효를 하여도 안정하다는 결과를 도출하였고, 알코올 생산은 59 g/L로 확인되었다.

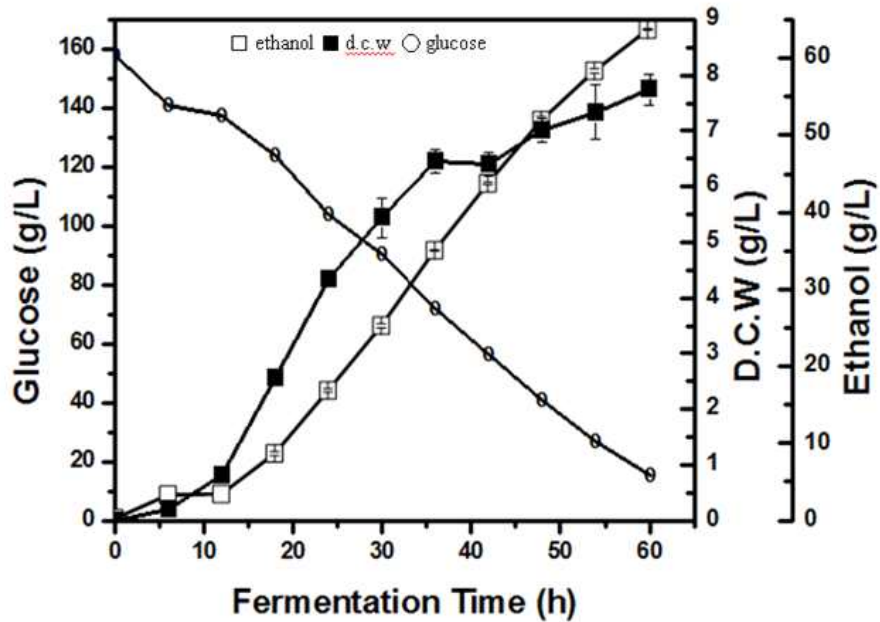


Fig. 142. Ethanol production, d.c.w and glucose consumption in optimized medium under optimized process conditions.



(마) 최적배지와 선정된 발효조건을 이용한 반복회분배양

2.5 L 발효조에서 최적 조건인 29°C, pH 5 and 200 rpm을 고정하여 60시간 발효한 결과 (1cycle), 알코올 함량은 66.7 g/L로 확인 되었고 0.46 g/g 수율을 얻었다(Fig. 143). 2~4 cycle 에서 알코올 생산은 54.6 g/L, 52.2 g/L 그리고 54.2 g/L로 확인되었고 각각 발효 시간은 다음과 같다(110 h, 160 h 그리고 210 h). 따라서 본 실험 결과에 따라 *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 100971 균은 장기간 발효를 하여도 안정하다는 결과를 도출 하였다.

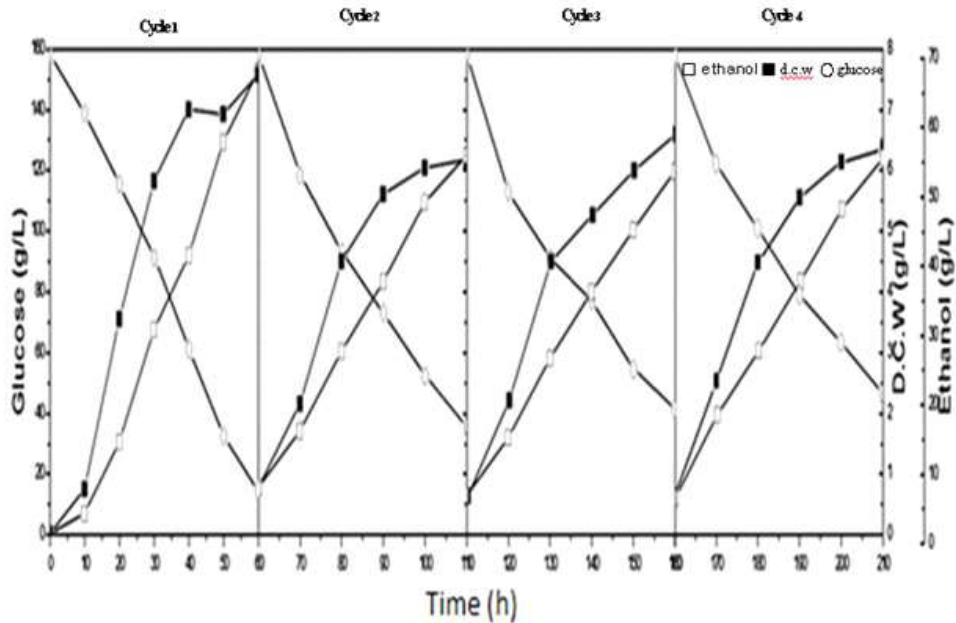


Fig. 143. Repeated-batch fermentation by *Z. rouxii* KCCM 100971 KCCM 100971 using optimized medium and process seconditions.

Table 77 Comparison of ethanol production under different culture conditions of *Zygosaccharomycesrouxii* KCCM 100971.

	Configuration	Ethanol (g/L)	Ethanol productivity(g/L/h)
A	flask	36.9	0.88
B	flask	50.4	1.2
C	batch	66.7	1.11
D	batch	30	0.28

A : Basic medium(This study), B : Optimized medium(This study),

C : Batch fermentation using optimized medium at selected conditions(This study) D : production of polyols and ethanol by osmophilic yeast *Z. rouxii*(Groleau et al., 1995)

## (바) 요약

One factor at a time 실험을 통해 glucose, yeast extract,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ 가 선정이 되었다. Plackett-Burman design을 통해 알코올 생산에 가장 많은 영향을 주는 배지 성분은 glucose, yeast extract,  $\text{MgSO}_4$ 로 확인 되었다. Response surface method방법을 통하여 최적 성분은 glucose 158; yeast extract 13.6 g/L  $\text{MgSO}_4$  2.04 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L 그리고  $\text{CaCl}_2$  0.2 g/L 로 확인 되었고, 에탄올 생산은 54.26 g/L로 확인되었다. 발효조건은 29°C, pH 5 and 200 rpm로 확인 하였고, 반복회분 배양을 해본 결과, 장기간 발효 하여도 안정 하다는 결론을 얻었다.

라. *Bacillus licheniformis* SCK 121057 균주를 이용한 균체량과 protease의 최대 생산을 위한 통계적 배지최적화와 발효조건 확립

### (1) 성장배지에서 미생물의 성장곡선

생산배지를 최적화함에 앞서 성장배지에서 *Bacillus licheniformis* SCK 121057의 성장곡선을 확인하였다(Fig. 144). 성장배지인 tryptic soy broth에서 30°C, 200 rpm의 조건으로 24시간 동안 배양한 결과 미생물의 성장이 활발한 시기인 12시간째를 생산배지 접종을 위한 성장시간으로 정하였다. 성장배지에서 12시간 배양한 균을 생산배지에 접종하여 실험을 진행하였다.

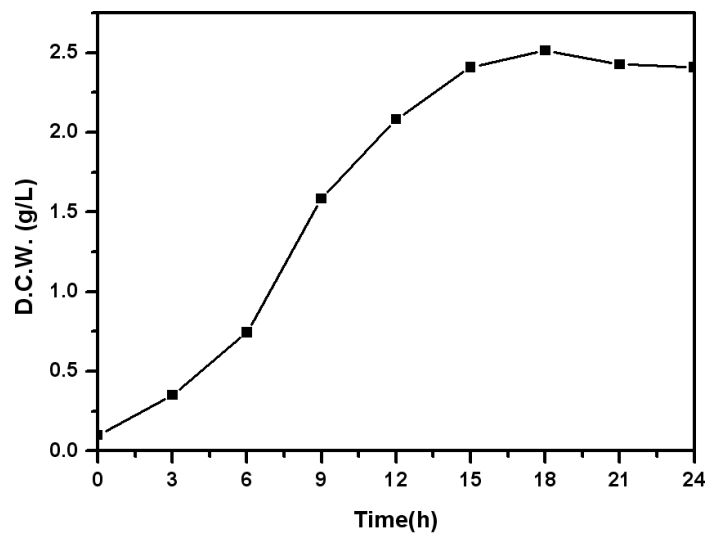


Fig. 144. Growth curve of *Bacillus licheniformis* SCK 121057 at tryptic soy broth, 30°C, 200 rpm.

### (2) *Bacillus cereus*에 대한 항균활성 측정

식중독 균인 *Bacillus cereus*에 대한 *Bacillus licheniformis* SCD121067과 *Bacillus licheniformis* SCK 121057의 항균활성을 확인하기 위해 실험을 진행하였다(Table 78) (Altayar and Sutherland, 2005; Ann et al., 1997; Apetroaie et al., 2005; Bermudez et al., 2012).

Table 78 The effect of two *Bacillus* strain on the inhibition of *Bacillus cereus* growth(A:*Bacillus licheniformis* SCD121067, B: *Bacillus licheniformis* SCK121057, C: Tryptic Soy Broth).

	A	B	C
Diameter(cm)	1.6±0.2	1.9±0.1	-

*Bacillus licheniformis* SCD 121067과 *Bacillus licheniformis* SCK 121057가 각각 지름 1.6 cm 와 1.9 cm의 환을 생성하였고 tryptic soy broth는 환을 생성하지 않았다(Fig. 145). 이 결과를 토 대로 *Bacillus cereus*에 대한 항균 능력은 *Bacillus licheniformis* SCK 121057 균주가 가장 좋 다 는 것을 알 수 있었다.

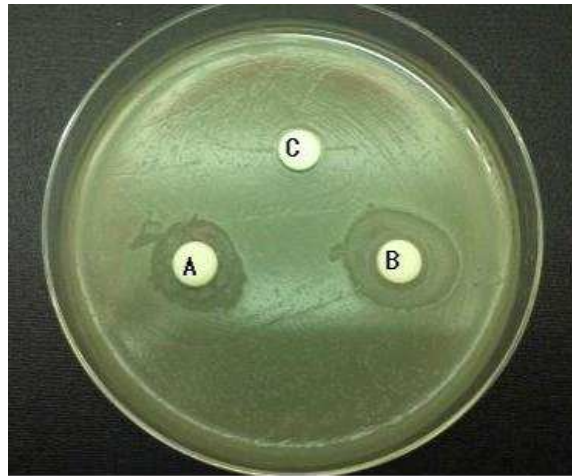


Fig. 145. The effect of two *Bacillus* strain on the inhibition of *Bacillus cereus* growth.

A: *Bacillus licheniformis* SCD121067

B: *Bacillus licheniformis* SCK121057

C: Tryptic soy broth (Control)

### (3) One factor at a time(OFAT) 방법을 이용한 영양원의 선정

#### (가) 탄소원 선정

기본배지의 성분에서 탄소원인 sucrose를 대조구로 glucose, galactose, lactose, fructose, maltose, cellobiose, soluble starch로 바꾸어 30°C, 200rpm의 조건으로 24시간 배양한 후 D.C.W와 protease 활성을 측정해 보았다(Fig. 146).(Park et al., 1986) 가장 높은 D.C.W를 보인 탄소원은 galactose(0.6371 g/L)로 대조구인 sucrose(0.1021 g/L)를 사용했을 때보다 6배의 증가량을 보였다. Soluble starch를 사용한 경우 D.C.W는 0.5569 g/L로 5배의 증가량을 보였다. Protease activity 또한 galactose가 가장 높은 7.53 U/mL을 보였으며 이는 대조구인 sucrose를 사용했을 때의 3.68 U/mL보다 2배 높은 값이다. soluble starch 또한 sucrose보다 1.6배 높은 값인 5.68 U/mL을 보였 으며 fructose의 경우 D.C.W는 sucrose와 비슷한 0.1206 g/L를 보였으나 protease activity은 sucrose를 사용한 경우보다 1.6배 높은 5.92U/mL를 보였다.

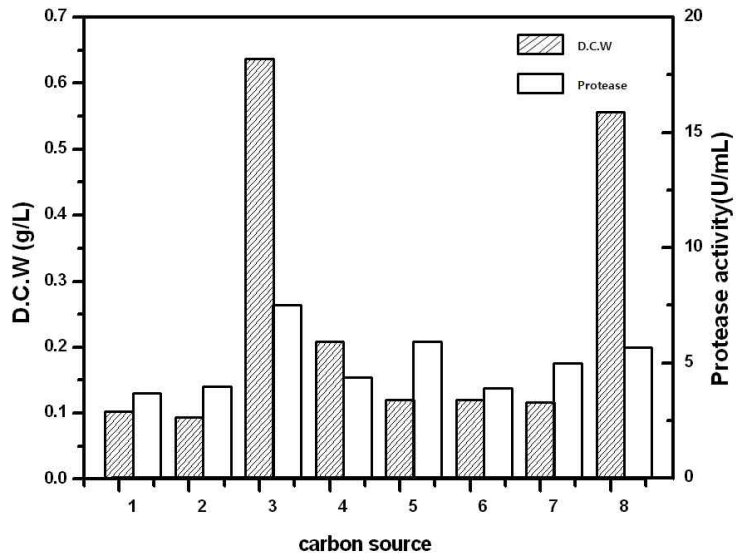


Fig. 146. Effect of various carbon sources on D.C.W and protease activity.

1: sucrose(Control), 2: glucose, 3: galactose, 4: lactose,  
5: fructose, 6: maltose, 7: cellobiose, 8: soluble starch

#### (나) 질소원 선정

탄소원으로 galactose를 선별하고 질소원인 asparagine을 대조구로 yeast extract, beef extract, tryptone, soybean flour, casitone, ammonium chloride( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), ammonium sulfate( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )을 질소원으로 하여  $30^\circ\text{C}$ , 200 rpm의 조건으로 24시간 배양한 후 D.C.W와 protease activity를 측정해 보았다(Fig. 147). 가장 높은 D.C.W를 보인 질소원은 yeast extract로 대조구인 asparagine의 D.C.W인 0.7233 g/L보다 1.3 g/L로 1.8 배 증가하였다. Tryptone의 경우도 대조구보다 D.C.W가 1.7배 증가하는 것을 볼 수 있었다. Protease activity를 측정한 결과 가장 높은 D.C.W를 보인 yeast extract에서 88.5 U/mL로 대조구를 사용한 경우 7.07 U/mL보다 13배 증가하는 것을 볼 수 있었다. Ammonium chloride( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), ammonium sulfate( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 등의 무기질소원을 사용한 경우보다 yeast extract, tryptone, soybean flour 등의 유기질소원을 사용한 경우가 D.C.W와 protease activity가 모두 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다(Birgit et al., 1999).

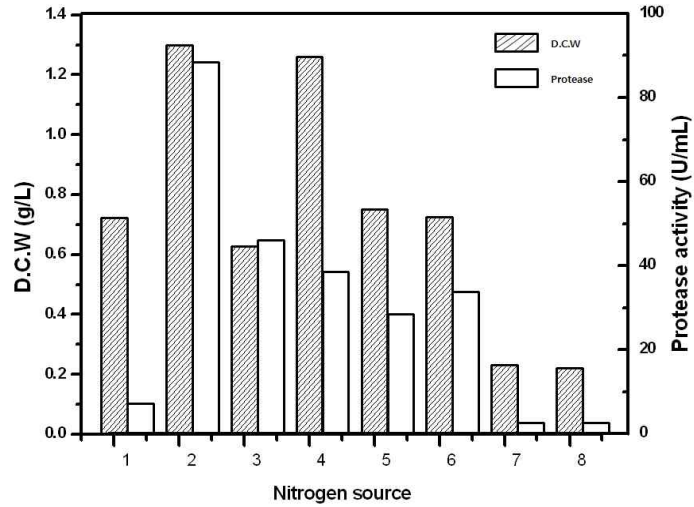


Fig. 147. Effect of various nitrogen sources on D.C.W and protease activity.  
 1:Asparagine(Control), 2:yeast extract, 3:beef extract, 4:tryptone,  
 5:soybean flour, 6:casitone, 7:NH<sub>4</sub>Cl, 8:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### (다) 인원 선정

앞서 수행된 실험에서 선정된 galactose와 yeast extract를 탄소원과 질소원으로 사용하고, 여기에 인원을 바꾸어 배양한 결과를 Fig. 148에 나타내었다. D.C.W는 대조구인 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 사용한 경우의 D.C.W 1.3242 g/L보다 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>에서 1.5492 g/L로 가장 높게 측정되었으며 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 사용한 경우에도 1.4721 g/L로 높게 측정되었다. Protease activity를 측정한 결과 균체량이 가장 낮게 나온 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>에서 가장 높은 99.61 U/mL로 측정되었으며 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 순으로 높게 측정되었다.

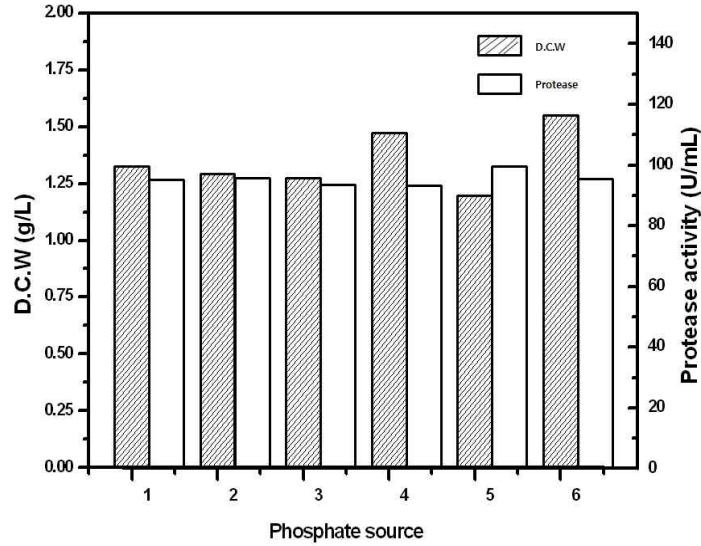


Fig. 148. Effect of various phosphate sources on D.C.W and protease activity.

- 1: Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 2: Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 3: Ammonium phosphate monobasic ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )
- 4: Diammonium hydrogen phosphate ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ )
- 5: Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 6: Potassium phosphate monobasic ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

**(4) Plackett-Burman design에 의한 최대 영향 인자 선정**

Plackett-Burman design에 의한 배지조성과 각 성분의 농도 그리고 그에 따른 Plackett-Burman design을 Table 79, 80, 81에 나타내었다. 농도가 높은 탄소원, 질소원은 농도 조절을 중심 값에서 20 %로 조절하였고, 농도가 낮은 나머지 변수들은 50%로 조절하였다 (Choi et al., 1999). Table 82을 보면 D.C.W에 가장 크게 영향을 주는 인자는 mean square값이 가장 높은 yeast extract(1.4491)이고 그 다음으로 galactose(0.6302)와  $\text{CaCl}_2$ (0.0271)가 다른 인자에 비해 높은 값을 나타내었다.

Table 79 The composition of selected production medium for Plackett-Burman design.

Component	Concentration (g/L)	Factor
Galactose	20	<b>A</b>
Yeast extract	10	<b>B</b>
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	<b>C</b>
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01	<b>D</b>
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	<b>E</b>
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.25	<b>F</b>

Table 80 High and Low factor of Plackett–Burman design(6 component).

	Galactose	Yeast extract	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
<b>High (+)</b>	24	12	3	0.015	0.6	0.375
<b>Low (-)</b>	16	8	1	0.005	0.2	0.125

Table 81 Plackett–Burman design for six variables.

Trial	Variables						D.C.W (g/L)	Protease activity (U/mL)
	A	B	C	D	E	F		
M1	+	+	-	+	+	+	2.38	98.07
M2	-	+	+	-	+	+	1.81	95.76
M3	+	-	+	+	-	+	1.58	86.53
M4	-	+	-	+	+	-	2.08	91.92
M5	-	-	+	-	+	+	1.35	81.92
M6	-	-	-	+	-	+	1.33	84.99
M7	+	-	-	-	+	-	1.8	81.92
M8	+	+	-	-	-	+	2.38	89.61
M9	+	+	+	-	-	-	2.76	91.92
M10	-	+	+	+	-	-	1.87	97.3
M11	+	-	+	+	+	-	1.67	83.45
M12	-	-	-	-	-	-	1.38	78.07

Table 82 Analysis of the D.C.W shown in table 81.

	A	B	C	D	E	F
<b>Σ(H)</b>	12.57	13.28	11.04	10.91	11.09	10.83
<b>Σ(L)</b>	9.82	9.11	11.35	11.48	11.3	11.56
<b>Difference</b>	2.75	4.17	-0.31	-0.57	-0.21	-0.73
<b>Effect</b>	0.4583	0.695	-0.0517	-0.095	-0.035	-0.1217
<b>Mean square</b>	0.6302	1.4491	0.008	0.0271	0.0037	0.0148

#### (5) Fractional factorial design에 의한 상호작용에 의한 생산성 변화 관찰

Plackett–burman design의 결과에 의해 건조균체량(D.C.W)생산에 크게 영향을 주는 세 가지 성분(yeast extract, galactose, CaCl<sub>2</sub>)을 선택하고, 각 성분들의 high, low level에 따른 상호작용에 의한 생산성 변화를 관찰하고자 full factorial design을 수행하였다. 실험에 사용된 각 factor의 농도는 Table 83에 나타내었다(Hong and Shin, 2010; Jang et al., 2009; Jeong et al., 2010).

Table 83 Level of each medium component for 3-factor full factorial design(FFD).

	Galactose	Yeast extract	CaCl <sub>2</sub>
+1	24	12	0.015
0	20	10	0.01
-1	16	8	0.005

결과를 분석해보면 Table 84에서 galactose와 yeast extract가 high, CaCl<sub>2</sub>가 low level인 4번 조합에서 D.C.W가 1.57 g/L로 가장 높았고 galactose, yeast extract, CaCl<sub>2</sub>가 모두 low level인 1번 조합에서 D.C.W가 1.20 g/L로 가장 낮은 값을 보였다. 이로 보아 CaCl<sub>2</sub>는 균체량에 큰 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 full factorial model에 적용시켜 통계처리를 하였으며 D.C.W의 이차다항식은 다음과 같다.

$$D.C.W = +1.38 + 2.5 \times 10^{-3} * A + 0.17 * B - 2.5 \times 10^{-3} * C + 0.000 * A * B - 2.5 \times 10^{-3} * A * C - 0.015 * B * C$$

(A: galactose, B: yeast extract, C: CaCl<sub>2</sub>)

이 식에서 각 항의 계수는 Design expert pro S/W의 다중 회귀분석에 의한 결과이다. 각 변수들의 effect list는 Table 84에 나타내었다. A(galactose), B(yeast extract), C(CaCl<sub>2</sub>) 요인들의 변화에 따른 D.C.W에 대한 최종 모델식을 통해 각 성분의 effect를 살펴보면 galactose, yeast extract는 positive effect를 보인 반면 CaCl<sub>2</sub>는 negative effect를 보였다.

Table 84 Experimental matrix for 3-factor full factorial design (FFD) and D.C.W of *Bacillus licheniformis* SCK 121057.

	Galactose	Yeast extract	CaCl <sub>2</sub>	D.C.W (g/L)
1	-1	-1	-1	1.20
2	+1	-1	-1	1.21
3	-1	+1	-1	1.56
4	+1	+1	-1	1.57
5	-1	-1	+1	1.23
6	+1	-1	+1	1.23
7	-1	+1	+1	1.53
8	+1	+1	+1	1.53
9	0	0	0	1.36
10	0	0	0	1.39



Table 85 Main effect of D.C.W medium components in full factorial design experiments.

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
A-Galactose	5.000E-003	5.000E-005	0.023
B-Yeast extract	0.33	0.22	98.87
C-CaCl <sub>2</sub>	-5.000E-003	5.000E-005	0.023
AB	0.000	0.000	0.000
AC	-5.000E-003	5.000E-005	0.023
BC	-0.030	1.800E-003	0.82

Protease activity 결과를 분석해 보면 Table 86에서 yeast extract, CaCl<sub>2</sub>가 high, galactose가 low level인 7번 조합에서 가장 높은 값인 133.45 U/mL을 보였고 D.C.W와 마찬가지로 galactose, yeast extract, CaCl<sub>2</sub>가 모두 low level인 1번 조합에서 가장 낮은 121.92 U/mL을 보였다. 이상의 결과를 full factorial model에 적용시켜 통계처리를 하였으며 protease의 이차다항식은 다음과 같다.

$$\text{Protease} = +128.17 + -0.29 * A + 4.14 * B + 0.86 * C - 0.094 * A * B - 0.67 * A * C - 0.48 * B * C$$

A: galactose, B: yeast extract, C: CaCl<sub>2</sub>)

이 식에서 각 항의 계수는 Design expert pro S/W의 다중 회귀분석에 의한 결과이다. 각 변수들의 effect list는 Table 87에 나타내었다. A(galactose), B(yeast extract), C(CaCl<sub>2</sub>) 요인들의 변화에 따른 D.C.W에 대한 최종 모델식을 통해 각 성분의 effect를 살펴보면 yeast extract, CaCl<sub>2</sub>는 positive effect를 보인 반면 galactose는 negative effect를 보였다.

Table 86 Experimental matrix for 3-factor full factorial design(FFD) and Protease of *Bacillus licheniformis* SCK 121057.

	Galactose	Yeast extract	CaCl <sub>2</sub>	Protease (U/mL)
1	-1	-1	-1	121.92
2	+1	-1	-1	123.45
3	-1	+1	-1	131.92
4	+1	+1	-1	131.92
5	-1	-1	+1	126.53
6	+1	-1	+1	124.22
7	-1	+1	+1	133.45
8	+1	+1	+1	131.92
9	0	0	0	128.07
10	0	0	0	127.30

Table 87 Main effect of protease activity medium components in full factorial design experiments.

	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
	Intercept			
M	A-Galactose	-0.58	0.67	0.44
M	B-Yeast extract	8.27	136.87	91.02
M	C-CaCl <sub>2</sub>	1.73	5.97	3.97
M	AB	-0.19	0.070	0.047
M	AC	-1.34	3.60	2.40
M	BC	-0.96	1.85	1.23

(6) Steepest ascent method(SAM, 최급상승법)을 이용한 배지성분의 최적 농도 접근

최급상승법은 각 성분들이 최적점으로 진행될 수 있는 최단거리를 보여줌으로 반응표면 분석법(RSM)이전에 실시하여 좀 더 정확하고 빠르게 배지최적화를 수행할 수 있다. FFD를 통해 선별된 세 가지 배지성분인 galactose, yeast extract, CaCl<sub>2</sub>의 농도를 일정하게 변화시켜 균체 성장을 위한 최적 농도에 접근하고자 하였다. Full factorial design에서의 각 성분들의 중점(center point), 중점에서 각 level간의 실제 차이(origin step), 컴퓨터에서 주어지는 다항식의 계수(main effect), main effect의 1/2(coefficient)를 이용하여 최적점으로 갈 수 있는 최단거리를 구할 수 있었다(Table 88) (Cho et al., 2006).

Table 88 Experimental design for the optimization of D.C.W medium concentration though steepest ascent method(SAM).

	Galactose	Yeast extract	CaCl <sub>2</sub>
center point	20	10	0.01
origin step	4	2	0.005
main effect	0.0005	0.33	-0.0005
coefficient	0.00025	0.165	-0.00025
r value	4.47213875		
slope value	0.006775952	4.472128484	-0.006775952
new step	0.027103809	8.944256967	-3.38798*10 <sup>-5</sup>

Table 89에 요인들의 수준 변화에 따른 축자 실험 계획을 나타내었고, 최대상승법의 시작점은 full factorial design의 중심점으로 하였다. Galactose는 중심점으로 0.0054 g/L씩 농도를 증가시켰고, yeast extract의 경우 1.7889 g/L씩 증가 시켰다. 균체생산에 부정적인 영향을 미치는 CaCl<sub>2</sub>는 0.00006 g/L씩 감소시켜야 하는데 이러한 극소량의 값으로는 균체 성장에 영향을 줄 수 없다고 판단되어 실험에서 제외되었다.

Table 89 Result of run table for the D.C.W and protease activity experiments design for SAM.

No.	Galactose	Yeast extract	D.C.W (g/L)	Protease activity (U/mL)
Center point	20	10	1.36	128.84
1	20.00542076	11.78885139	1.38	136.53
2	20.01084152	13.57770279	1.76	138.84
3	20.01626229	15.36655418	2.15	140.38
4	20.02168305	17.15540557	2.44	142.68
5	20.02710381	18.94425697	3.05	146.53
6	20.03252457	20.73310836	3.66	154.99
7	20.03795219	22.52195976	3.66	156.53
8	20.04337295	24.31081115	3.82	158.84
9	20.04879371	26.09966254	3.68	158.84
10	20.05421448	27.88851394	3.68	164.99

SAM 실험 결과 Fig. 149을 보면 center point에서 가장 낮은 균체량(1.36 g/L)과 protease activity(128.84 U/mL)를 보였다. Step 8에서 가장 높은 3.82 g/L의 균체량을 보였으며, 이는 center point일 때보다 약 3배 정도 증가한 것을 볼 수 있었다. 그리고 yeast extract의 농도가 높아질수록 균체량이 증가하다가 step 8의 농도 이후로는 균체량이 감소하는 것을 볼 수 있었다. Protease activity는 yeast extract의 농도가 높아질수록 계속 증가하는 것을 볼 수 있었고 step 10에서 164.99 U/mL로 가장 높게 측정되었다.

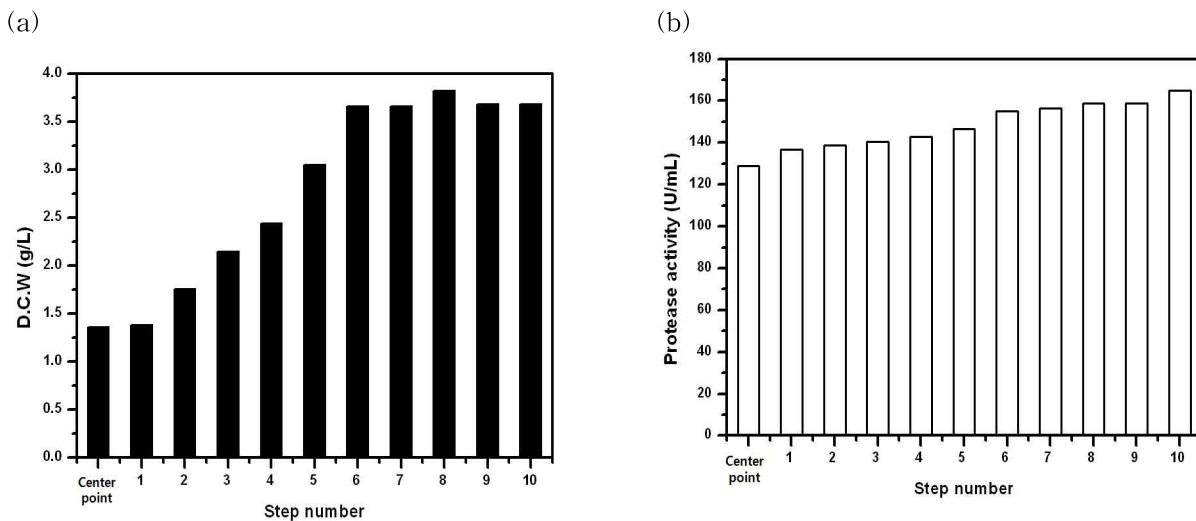


Fig. 149. Result of (a)D.C.W and (b)protease activity in various medium concentration by SAM.

### (7) Response surface method (RSM, 반응표면분석법)에 의한 생산배지 최적화

Plackett-Burman design에 의해 선정된 2가지 인자 galactose, yeast extract를 가지고 배지

성분의 최적 농도 결정을 위해 반응표면 분석법(RSM)을 수행한다. 현재 사용하고 있는 생산배지의 농도를 중심점으로 사용하여 최적화 하고자 하는 세 가지 성분의 농도는  $-a$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $1$ ,  $a$  다섯 단계로 부호화하여 Table 90에 나타내었다. 실험에서 3개의 중점을 사용하였으며,  $a$ 값은 1.414이었다. 총 실험횟수는 3반복을 통하여 33개로 실험구가 수행되었다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수 (Y)는 D.C.W와 Protease로 회귀분석에 사용되었으며, 회귀분석에 의한 모델식의 예측에는 Design Expert pro S/W ver 7.0을 사용하였다(Hong and Shin, 2010; Jang et al., 2009; Jeong et al., 2010).

Table 90 Concentration of the respective medium components at each level(central composite design for the response surface method).

Xn	Independent variables	Level				
		$-a$	$-1$	$0$	$1$	$a$
X <sub>1</sub>	Galactose	14.3718	16.032	20.04	24.048	25.7082
X <sub>2</sub>	Yeast extract	17.4341	19.448	24.31	29.172	31.1859

(가) 건조균체량(D.C.W) 분석

이상의 결과를 통계처리를 하였으며 그 결과 나타난 분산분석표(Analysis of variance, ANOVA), effect list와 각 변수들의 통계값을 Table 91에 나타내었다.

Table 91 Main effects according to trial of response surface method (response 1: D.C.W).

Response 1 D.C.W					
ANOVA for Response Surface Quadratic Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	0.81	5	0.16	10.74	0.0105 significant
A-Galactose	0.085	1	0.085	5.65	0.0635
B-Yeast extrac	0.034	1	0.034	2.27	0.1921
AB	0.051	1	0.051	3.35	0.1267
A <sup>2</sup>	0.19	1	0.19	12.65	0.0163
B <sup>2</sup>	0.59	1	0.59	39.23	0.0015
Residual	0.076	5	0.015		
Lack of Fit	0.074	3	0.025	39.09	0.0250 significant
Pure Error	1.267E-003	2	6.333E-004		
Cor Total	0.89	10			
Std. Dev.	0.12		R-Squared	0.9148	
Mean	3.69		Adj R-Squared	0.8297	
C.V. %	3.33		Pred R-Squared	0.4014	
PRESS	0.53		Adeq Precision	8.158	

전체적인 실험모델의 유의성을 확인해 본 결과 P value가 0.0105로 분석되었다. 그리고 R-square(결정계수)는 0.9148로 분석되었다(Table 91). 모수 추정에 의한 2차 회귀식은 다음과 같이 분석되었다.

$$D.C.W = +4.06 - 0.10 * A + 0.065 * B - 0.11 * A * B - 0.18 * A^2 - 0.32 * B^2$$

(A: Galactose, B: Yeast extract)

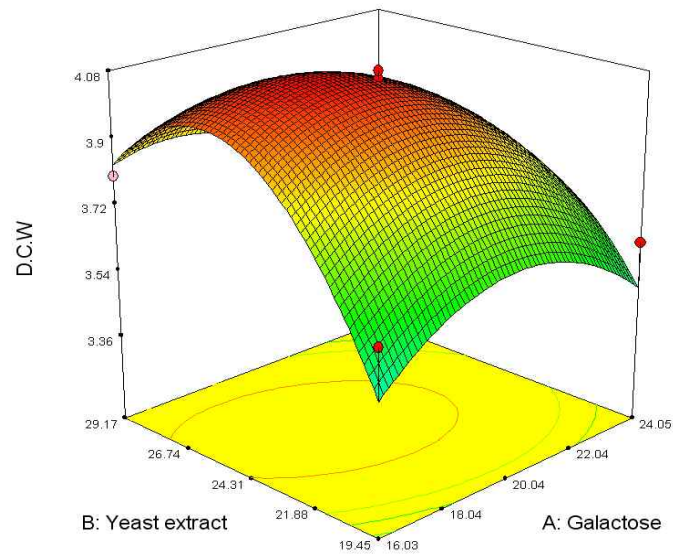
주어진 데이터에 대한 정확한 최적점을 찾기 위한 반응표면분석실험 예상결과와 실험결과를 Table 92에 나타내었다.

Table 92 Predicted value and experimental value of each concentration by RSM.

	Galactose	Yeast extract	Predicted D.C.W (g/L)	D.C.W (g/L)
1	16.03	19.45	3.47	3.61
2	24.05	19.45	3.49	3.62
3	16.03	29.17	3.83	3.80
4	24.05	29.17	3.39	3.36
5	14.37	24.31	3.83	3.78
6	25.71	24.31	3.54	3.50
7	20.04	17.43	3.32	3.15
8	20.04	31.19	3.50	3.57
9	20.04	24.31	4.06	4.03
10	20.04	24.31	4.06	4.06
11	20.04	24.31	4.06	4.08

모수추정에 의한 2차 회귀식을 바탕으로 능선분석을 하였으며 결과를 Fig. 150에 나타내었다. 건조 균체량은 galactose 20.04 g, Yeast extract 24.31 g의 조건일 때 4.08 g/L로 가장 높게 분석되었다.

(a)



(b)

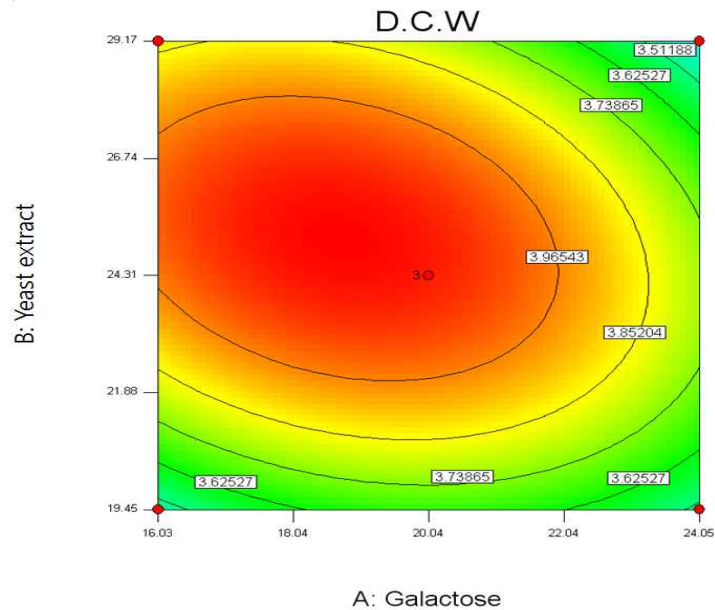


Fig. 150. Effects of Galactose and Yeast extract on D.C.W: (a) 3-D response surface and (b) Contour Plot as Function of the concentration of galactose and yeast extract.

#### (나) Protease activity 분석

이상의 결과를 통계처리를 하였으며 그 결과 나타난 분산분석표(Analysis of variance, ANOVA), effect list와 각 변수들의 통계값을 Table 93에 나타내었다.

Table 93 Main effects according to trial of response surface method.  
(response 2: protease activity)

Response 2		Protease				
ANOVA for Response Surface Linear Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	367.26	2	183.63	20.51	0.0007	significant
A-Galactose	18.26	1	18.26	2.04	0.1911	
B-Yeast extrac	349.00	1	349.00	38.97	0.0002	
Residual	71.64	8	8.95			
Lack of Fit	61.01	6	10.17	1.91	0.3822	not significant
Pure Error	10.63	2	5.31			
Cor Total	438.90	10				
Std. Dev.	2.99		R-Squared	0.8368		
Mean	152.68		Adj R-Squared	0.7960		
C.V. %	1.96		Pred R-Squared	0.6551		
PRESS	151.37		Adeq Precision	11.954		

전체적인 실험모델의 유의성을 확인해 본 결과 P value가 0.007로 분석되었다. 그리고 R-square(결정계수)는 0.8368로 1에 가깝게 분석되었으나 그다지 높은 값은 아니었다. 모수 추정에 의한 2차 회귀식은 다음과 같이 분석되었다.

$$\text{Protease} = +152.68 - 1.51 * A + 6.60 * B \quad (\text{A: Galactose, B: Yeast extract})$$

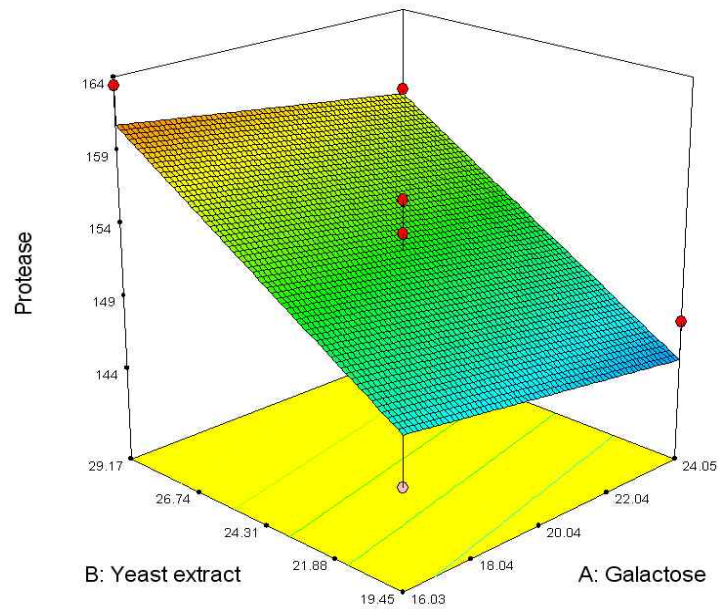
주어진 데이터에 대한 정확한 최적점을 찾기 위한 반응표면분석실험 예상결과와 결과를 Table 94에 나타내었다.

Table 94 Predicted value and experimental value of each concentration by RSM.

	Galactose	Yeast extract	Predicted Protease (U/mL)	Protease (U/mL)
1	16.03	19.45	147.59	144.22
2	24.05	19.45	144.57	147.30
3	16.03	29.17	160.79	163.45
4	24.05	29.17	157.78	158.07
5	14.37	24.31	154.82	157.30
6	25.71	24.31	150.55	150.38
7	20.04	17.43	143.34	141.15
8	20.04	31.19	162.03	157.30
9	20.04	24.31	152.69	155.76
10	20.04	24.31	152.69	151.15
11	20.04	24.31	152.69	153.45

모수추정에 의한 2차 회귀식을 바탕으로 능선분석을 하였으며 결과를 Fig. 151에 나타내었다. Protease activity는 galactose 16.03 g, yeast extract 29.17 g의 조건일 때 163.45 U/mL로 가장 높게 분석되었다.

(a)



(b)

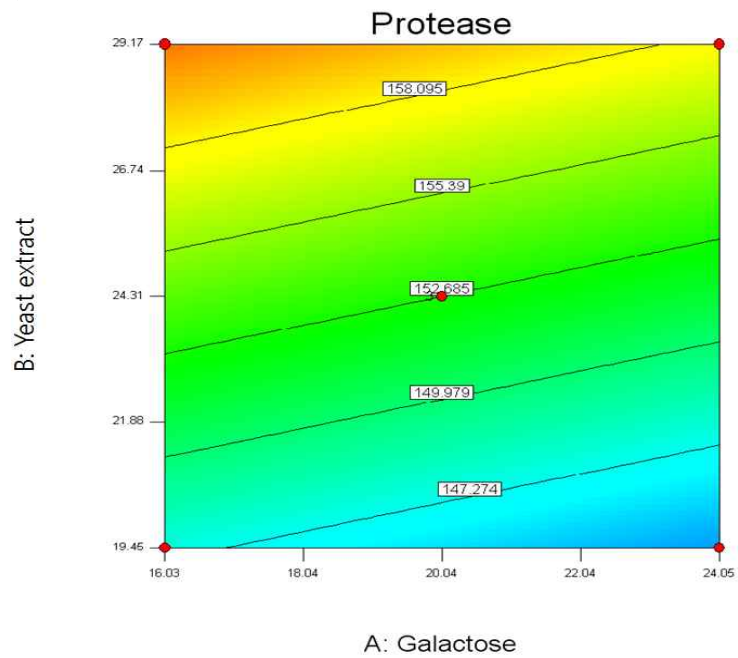


Fig. 151. Effects of galactose and yeast extract on protease activity: (a) 3-D response surface and (b) Contour Plot as Function of the concentration of galactose and yeast extract.



**(8) 수치최적화(Numerical optimization method)를 통한 최적조건 예측과 확립**

최적 생산조건을 예측은 D.C.W, protease activity 각각의 최적 생산 조건의 반응표면을 supercomposing하여 중복되는 범위에서 최적 생산 조건을 예측하였다. 예측된 범위에서 임의 점을 설정한 후 최적 값을 예측하고 실제 실험값과 비교하였다. 소프트웨어는 Design Expert pro S/W ver 7.0을 사용하였다(Design-expert 7.1 User's Guide, Diana et al., 2009; Esben et al., 2009; Felsenstein et al., 1985)

D.C.W은 galactose 20.04 g, yeast extract 16.03 g일 때 4.08 g/L로 최대값을 나타내었다. Protease activity는 galactose 16.03 g, yeast extract 29.17 g일 때 163.45 U/mL로 최대값을 나타내었다. 이 두 가지 반응물의 각각의 최적조건을 수치최적화 방법을 통해 중복되는 범위에서의 최적 생산 조건을 예측하였다.

Galactose와 yeast extract성분의 양은 실험 범위 내에서 결정되도록 하였으며 반응물인 D.C.W와 protease activity는 목표치를 최대로 설정하여 최적치를 수치최적화 분석법에 의해 추정하였다. Galactose 16.032 g/L~24.048 g/L, yeast extract 19.448 g/L~29.172 g/L의 실험 범위 내에서 D.C.W와 protease activity생산의 최적조건은 galactose 17.26 g/L, yeast extract 27.76 g/L이 본 실험 조건하에서의 최적 조건으로 반응표면분석법에 의해 설정되었다. 이 때 D.C.W와 protease activity의 예측값은 3.9782 g/L, 158.425 U/mL로 나타났다.

실제 실험값은 Table 97에서와 같이 예측했던 D.C.W, protease activity와 유사한 값을 나타내었다.

Table 95 The concentration of main factors within optimized medium and experimental value by using response surface methodology.

Response	Galactose	Yeast extract	Experimental value
D.C.W (g/L)	20.04	24.31	4.08
Protease activity (U/mL)	16.03	29.17	163.45

Table 96 Optimal constraint values obtained by a numerical optimization method.

Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Galactose	is in range	16.032	24.048	1	1	3
Yeast extract	is in range	19.448	29.172	1	1	3
D.C.W	maximize	3.15	4.08	1	1	3
Protease	maximize	141.15	163.45	1	1	3
Solutions						
Number	Galactose	Yeast extract	D.C.W	Protease	Desirability	
1	17.26	27.76	3.97821	158.425	0.831	Selected

Table 97 Comparison between predicted and observed values of response variables within the range of the optimum condition.

Responses	Optimum conditions	Predicted value	Experimental value
D.C.W (g/L)	Galactose 17.26 g Yeast extract 27.76 g	3.978	4.002±0.107
Protease activity (U/mL)		158.425	161.274±5.670

(9) 균주를 이용한 균체량과 protease의 최대 생산을 위한 발효조건 확립

(가) 최적 배지를 이용한 온도 선정실험

배양온도는 배양환경과 세포 내가 항상 일치하게 된다. 배양환경의 온도는 곧바로 매우 빠른 시간에 세포 내의 온도와 동일하게 되므로 세포의 반응속도, 대사의 특성, 영양요구와 균체 구성 등에 불가피하게 영향을 준다. 증식속도는 배양온도에 의하여 민감한 반응을 일으킨다. 따라서 최적 배지를 이용하여 *Bacillus licheniformis* SCK 121057 균주의 성장에 적합한 온도 조건을 찾기 위해 다른 물리적인 조건은 동일하게 하고 배양온도를 30, 34, 38과 42°C의 네 가지의 조건에서 실험을 진행하였다. 실험결과를 Fig. 152에 나타내었다.

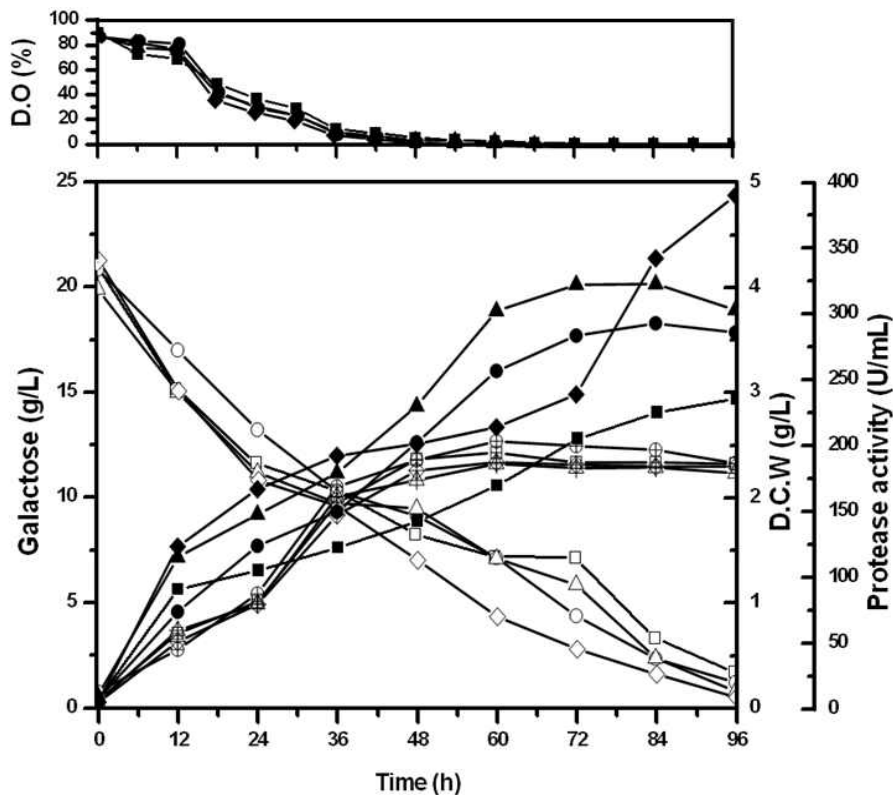


Fig. 152. Effect of various temperatures on D.C.W, protease activity, galactose and D.O in optimum medium at 200 rpm, 1 vvm and pH 7(D.C.W: 30°C(■), 34°C(●), 38°C(▲), 42°C(◆), Protease activity: 30°C(□), 34°C(○), 38°C(△), 42°C(◇), Galactose: 30°C(□), 34°C(○), 38°C(△), 42°C(◇), D.O: 30°C(■), 34°C(●), 38°C(▲), 42°C(◆)).

42℃의 조건에서 균체량은 4.92 g/L로 가장 높았고, protease는 184.22 U/mL로 측정되었다. Galactose는 0.76 g/L까지 떨어지는 것을 확인할 수 있었다 (Table 98). 30℃, 34℃, 38℃와 42℃까지 온도가 높을수록 균체량이 증가하는 것을 볼 수 있었으나 결과에는 포함하지 않았지만 46℃에서의 실험 결과 균체량은 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 균체 성장이 가장 좋은 42℃의 온도를 제외하고 다른 온도에서는 galactose가 모두 소모되지 않는 것을 볼 수 있었다. 균의 성장이 가장 빠르게 일어나고, 배지에 녹아있는 탄소원의 소모가 가장 많이 되었다고 판단되는 42℃의 온도 조건을 균체 성장에 가장 적합한 온도로 선택하였다.

Table 98 Comparison of D.C.W, protease and galactose under different temperature conditions at 200 rpm, 1 vvm and pH 7.

Temperature(℃)	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)	Galactose (g/L)
30	2.94	186.53	1.69
34	3.59	188.26	1.23
38	3.77	179.36	0.96
42	4.92	184.22	0.76

#### (나) 최적 배지를 이용한 교반속도 선정실험

교반은 농도, 온도 그리고 그 외 성질의 기울기(gradient)를 제거함으로써 배지 내의 불균일을 해소시키는 생물 공정에서 가장 중요한 물리적 조건 중 하나이다. 발효를 위한 최적의 환경을 조성하기 위해 생물 반응기는 호기적 배양에서 산소를 포함한 모든 기질에 세포가 쉽게 접근할 수 있게 해야 한다. 단지 영양물질이 풍부한 배지를 발효기에 채우는 것만으로는 불충분하며, 만일 배양액이 잘 혼합되지 못하면 세포가 그들이 필요로 하는 물질을 빠른 속도로 소모하므로 곧 영양물질이 고갈된 지역이 생길 것이다. 만일 교반에 의해 세포물질들이 균일한 상태를 유지하지 못한다면 이러한 문제가 증폭되므로, 배양액으로부터 세포가 침강된 지역에서의 기질 농도는 급하게 영(zero)으로 떨어질 것이다. 세포의 성장이 가장 잘 일어날 수 있는 교반속도를 찾기 위해 온도 선별에서 선택된 42℃의 온도에서 교반속도를 100, 200과 300 rpm의 조건으로 다르게 하여 최적교반속도 선정 실험을 수행하였다. 실험 결과를 Fig. 153에 나타내었다. 200 rpm의 조건에서 균체량은 5.08 g/L로 가장 높았고, protease 또한 229.99 U/mL로 가장 높은 값을 보였다 (Table 99). 그리고 galactose는 1.61 g/L까지 소모되는 것을 볼 수 있었다. 300 rpm의 조건에서는 균체량과 protease는 3.89 g/L와 197.68 U/mL로 200 rpm의 조건일 때보다 낮은 값을 보였다. 교반에 의해 배양액에서의 산소전달을 촉진하는 역할을 하기 때문에 교반속도가 높을수록 미생물이 잘 자랄 것이라고 생각하지만 너무 빠른 교반속도는 전단응력에 민감한 미생물에게는 스트레스를 유발하기 때문에 알맞은 속도를 유지하는 것이 중요하다. 따라서 최적 교반속도 조건으로 200 rpm을 선정 후 공기유속을 선정하는 실험을 진행하였다.

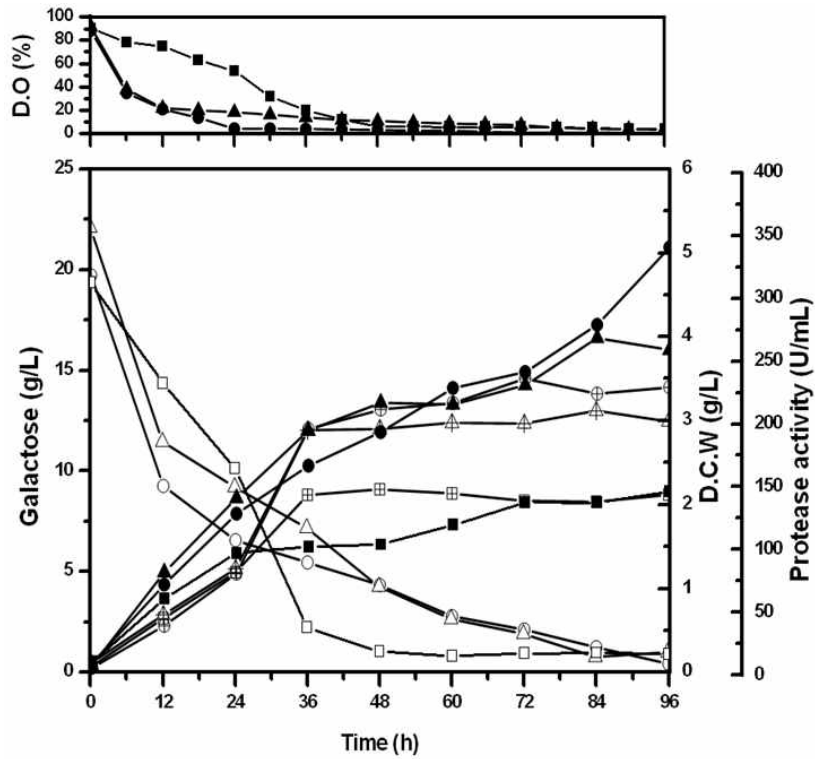


Fig. 153. Effect of various agitation speeds on D.C.W, protease activity, galactose and D.O in optimum medium at 42°C, 1 vvm and pH 7(D.C.W: 100 rpm(■), 200 rpm(●), 300 rpm(▲), Protease activity: 100 rpm(■), 200 rpm(●), 300 rpm(▲), Galactose: 100 rpm(□), 200 rpm(○), 300 rpm(△), D.O: 100 rpm(■), 200 rpm(●), 300 rpm(▲).

Table 99 Comparison of D.C.W, protease and galactose under different agitation speeds conditions at 42°C, 1 vvm and pH 7.

Agitation speed (rpm)	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)	Galactose (g/L)
100	2.15	146.14	2.73
200	5.08	229.99	1.61
300	3.89	197.68	1.54

#### (다) 최적 배지를 이용한 공기유속 선정실험

호기성 배양에서 사용되는 일반적인 발효조에서 산소는 임펠러 아래에 위치한 폭기 장치에 의해 배지로 공급된다. 그리도는 임펠러의 작동에 의해 배양액 전체에 기체가 고르게 분포하게 된다. 배지 내로 공급되는 공기는 산소의 양과 직결되고, 미생물의 생리현상에 지대한 영향을 준다. 이러한 공기 유속이 균체량에 미치는 영향과 적정 공기유속을 선정하기 위해 배양온도와 교반속도를 42°C, 200 rpm으로 고정시킨 후 다음 1, 2와 3 vvm의 조건에서 공기유속을 선정하는 실험을 수행하였다. 실험결과는 Fig. 154에 나타내었다.

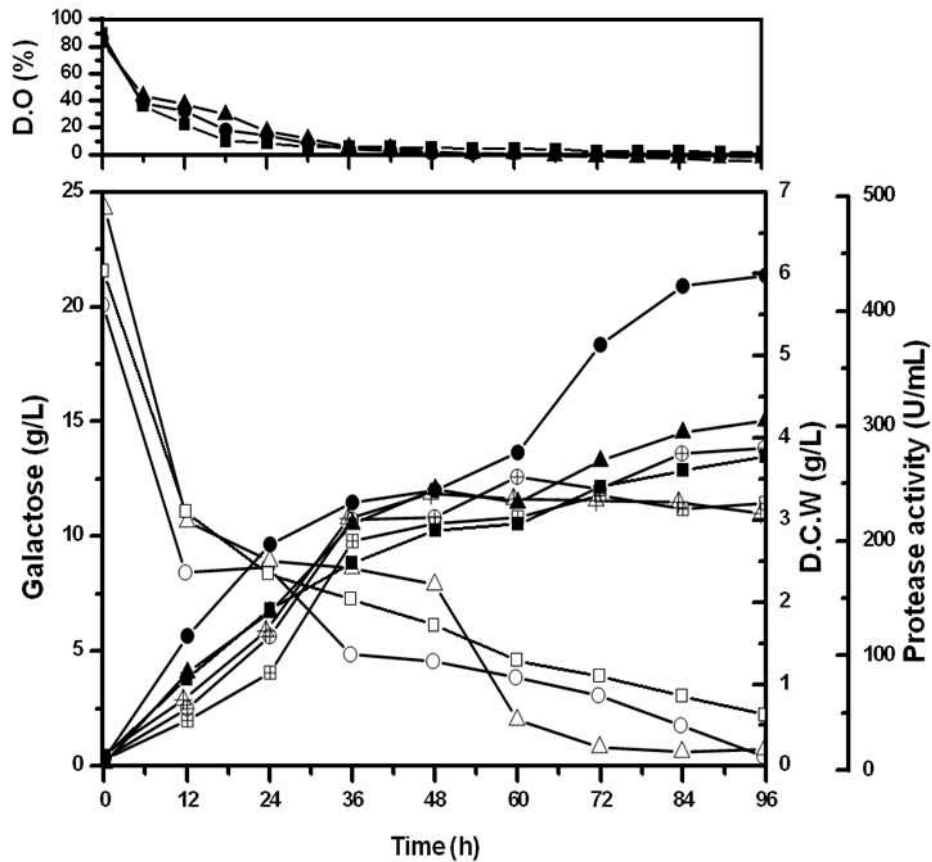


Fig. 154. Effect of various aeration rate on D.C.W, protease activity, galactose and D.O in optimum medium at 42°C, 200 rpm and pH 7(D.C.W: 1 vvm(■), 2 vvm(●), 3 vvm(▲), Protease activity: 1 vvm(□), 2 vvm(○), 3 vvm(△), Galactose: 1 vvm(□), 2 vvm(○), 3 vvm(△), D.O: 1 vvm(■), 2 vvm(●), 3 vvm(▲).

통기량이 높을수록 균체 성장이 높을 거라는 예상과는 달리 3 vvm의 조건에서 균체량과 protease는 4.28 g/L와 218.06 U/mL로 2 vvm의 조건일 때의 균체량과 protease는 5.99 g/L와 277.30 U/mL로 2 vvm의 조건에서 균체량과 protease 모두 가장 높은 값을 보였다 (Table 100). Galactose도 0.94 g/L까지 소모되는 것을 볼 수 있었다. 균체 성장에 가장 긍정적인 영향을 주는 공기유속으로 2 vvm을 선정하였다.

Table 100 Comparison of D.C.W, protease and galactose under different aeration rate conditions at 42°C, 200 rpm and pH 7.

Aeration rate (vvm)	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)	Galactose (g/L)
1	3.78	229.99	2.24
2	5.99	277.30	0.94
3	4.28	218.06	3.3

(라) 최적 배지를 이용한 pH 선정실험

pH값이 세균 성장속도에 미치는 영향은 대칭적이며 배양 pH는 증식속도 이외에 탄소원과 에너지원의 대사에도 상당한 영향을 미친다. *Bacillus* 종의 배양에서 pH값은 세포벽 구성에 영향을 미친다. 원형질막의 선택적 투과성에 의해 세포 내부 pH가 배지 pH에 의하여 크게 영향을 받지 않지만 미생물 대사는 환경의 pH에 의해 쉽게 영향을 받는 것이 분명하다. 중성인 pH 7을 기준으로 배양온도, 교반속도와 공기유속을 42°C, 200 rpm 그리고 2 vvm으로 고정시킨 후 pH 6, 7과 8의 조건에서 pH 선정실험을 수행하였다. 실험 결과를 Fig. 155에 나타내었다.

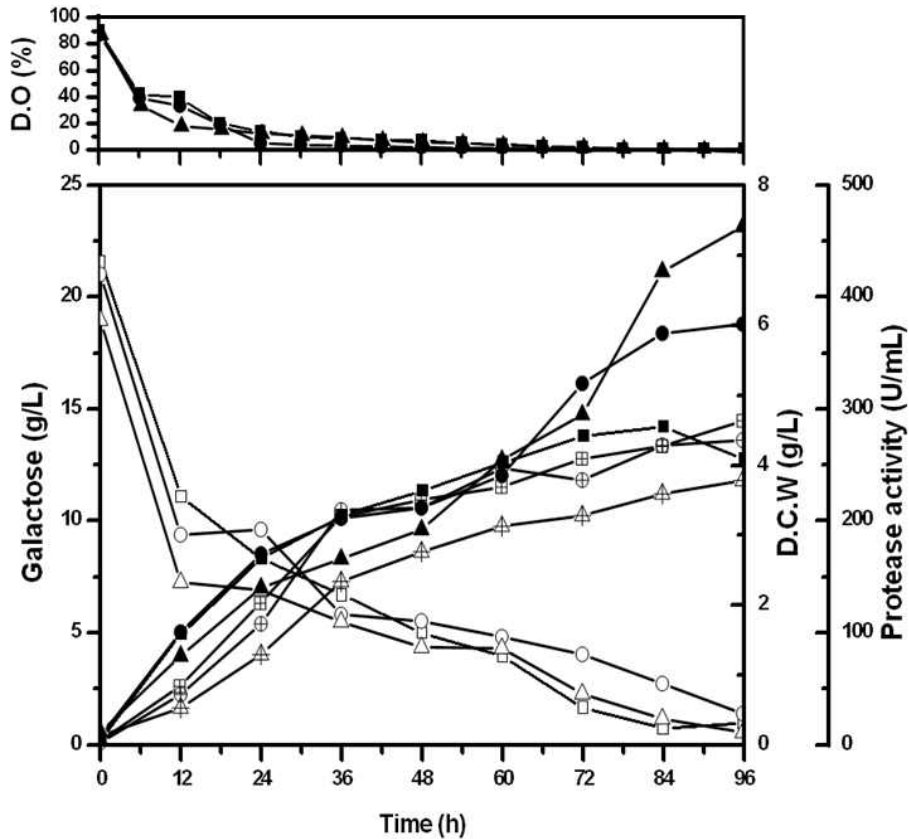


Fig. 155. Effect of various pH on D.C.W, protease activity, galactose and D.O in optimum medium at 42°C, 200 rpm and 2 vvm(D.C.W: pH 6 (■), pH 7 (●), pH 8 (▲), Protease activity: pH 6 (▣), pH 7 (⊙), pH 8 (△), Galactose: pH 6 (□), pH 7 (○), pH 8 (△), D.O: pH 6 (■), pH 7 (●), pH 8 (▲))

pH 8의 조건에서 균체량은 7.37 g/L로 가장 높은 값을 보였고, protease는 230.76 U/mL로 측정되었다(Table 101). Galactose는 0.96 g/L까지 소모되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 최적 pH는 pH 8로 선정되었다.

Table 101 Comparison of D.C.W, protease and galactose under different pH conditions at 42°C, 200 rpm and 2 vvm.

pH	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)	Galactose (g/L)
6	4.09	292.30	1.30
7	5.99	277.30	1.21
8	7.34	230.76	0.96

(마) 최적배지와 선정된 발효조건을 이용한 확인 실험

발효조를 이용한 발효조건 최적화 실험 결과 *Bacillus licheniformis* SCK 121057 균주의 최적 발효 조건은 42°C, 200 rpm, 2 vvm 그리고 pH 8로 선정되었다.

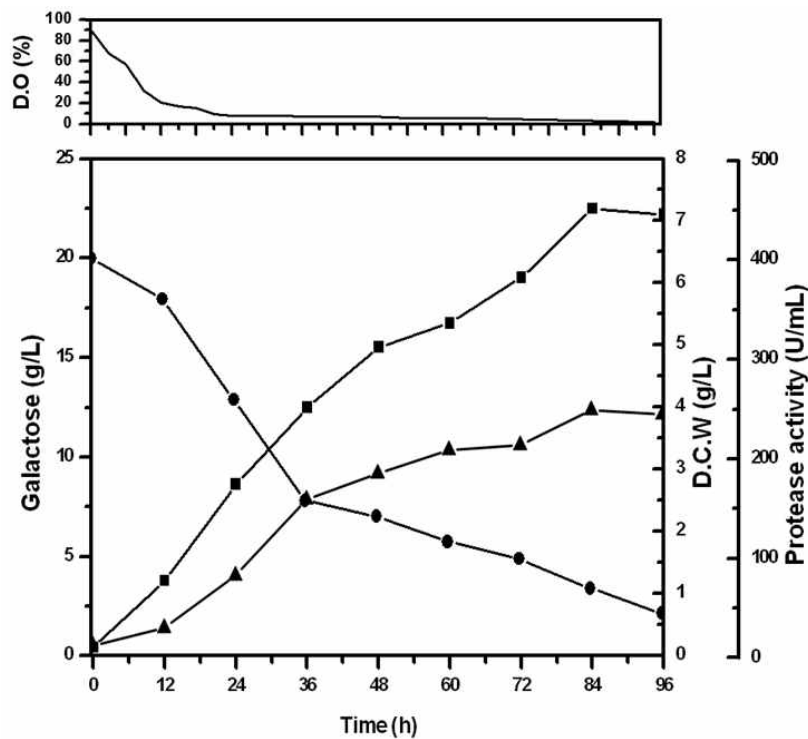


Fig. 156. Time profiles of residual galactose concentration (●), D.C.W (■), protease activity (▲) and DO (-) in batch culture using the optimized medium at 42°C, 200 rpm, 2 vvm, pH 8.

이 조건에서 균체량과 protease는 7.34 g/L와 230.76 U/mL로 최대 균체량과 protease활성을 보였다. 확인 실험을 통하여 균체량의 재현성을 확인하였고, 이때의 균체량 (7.24 g/L)과 protease (240.06 U/mL)는 최적배지를 이용하여 플라스크배양을 하였을 때보다 1.81과 1.49배 증가한 것을 볼 수 있었다. 발효조에서 배양할 경우 플라스크 배양과 다르게 임펠러에 의해 배지 농도가 균일하게 유지되도록 하는 교반 형태를 가지고 있고 또한 마개에 의해 산소의 공급이 제한되는 플라스크 발효와 달리 직접 발효에 필요한 공기를 공급해주기 때문에 이러한 결과가 나타났다고 추측할 수 있을 것이다. 시간에 따른 기질로 사용된 galactose, 균체량, protease와 용존산소량의 변화를 Fig. 156에 나타내었다.

#### (바) 최적배지와 선정된 발효조건을 이용한 반복회분배양

최적생산배지와 최적발효조건을 이용하여 *Bacillus licheniformis* SCK 121057 균주의 반복회분배양 실험을 수행한 결과를 Fig. 157에 나타내었다. 발효 96시간에 균체는 7.87 g/L까지 성장하였다. 이 때의 protease는 258.06 U/mL이었고 남아있는 galactose의 양은 0.7 g/L였다. 반복회분배양을 하기 위해 0.15 L의 배양액을 남긴 후 1.35 L의 새로운 배지를 첨가하였다. 새로운 배지를 첨가한 후 96시간일 때 7.91 g/L의 가장 높은 균체량을 보였다. 이 때의 protease는 226.53 U/mL이었고 남아있는 galactose의 양은 1.37 g/L이었다. 새로운 배지를 첨가한 세 번째, 네 번째도 비슷한 경향을 보였다. 반복회분배양 결과 균체량은 일정수준 유지되는 것으로 보아 장시간 발효를 하여도 균이 안정성이 있다는 것을 알 수 있었고, protease는 조금씩 값이 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 용존산소량 (DO)는 처음 90을 기준으로 발효가 진행될수록 0에 가깝게 떨어지다가 새로운 배지를 첨가하면 다시 용존 산소량이 증가하는 것을 볼 수 있었고 이는 세 번, 네 번 반복 배양을 할 때에 같은 경향을 보였다. 네 번의 반복배양을 수행한 결과, 반복회분배양 방법으로 균체생산을 하더라도 무리가 없는 것으로 판단되었다. 이러한 반복회분배양 실험결과는 스타터 제조 시 회분배양보다 시간적으로나 사람의 노동력에 대해 경제적으로 균체생산이 가능하다는 것을 알 수 있다.

*Bacillus licheniformis* SCK 121057 균주의 배지최적화와 최적 발효조건선정 실험을 통한 각 실험 단계별 균체량, protease와 생산성을 비교하여 Table 102에 나타내었다. 플라스크 배양시에는 성장시간이 24시간이고 발효조 배양시에는 성장시간이 96시간으로 배양시간이 길어짐에 따라 생산성이 플라스크 상태일 때보다는 작지만 기본 생산배지일 때보다 최적 생산배지일 때 생산성이 증가하는 것을 볼 수 있고, 선정된 최적 발효조건상태에서 회분 배양할 때보다 반복회분 배양을 할 때 생산성이 증가하는 것을 볼 수 있었다.



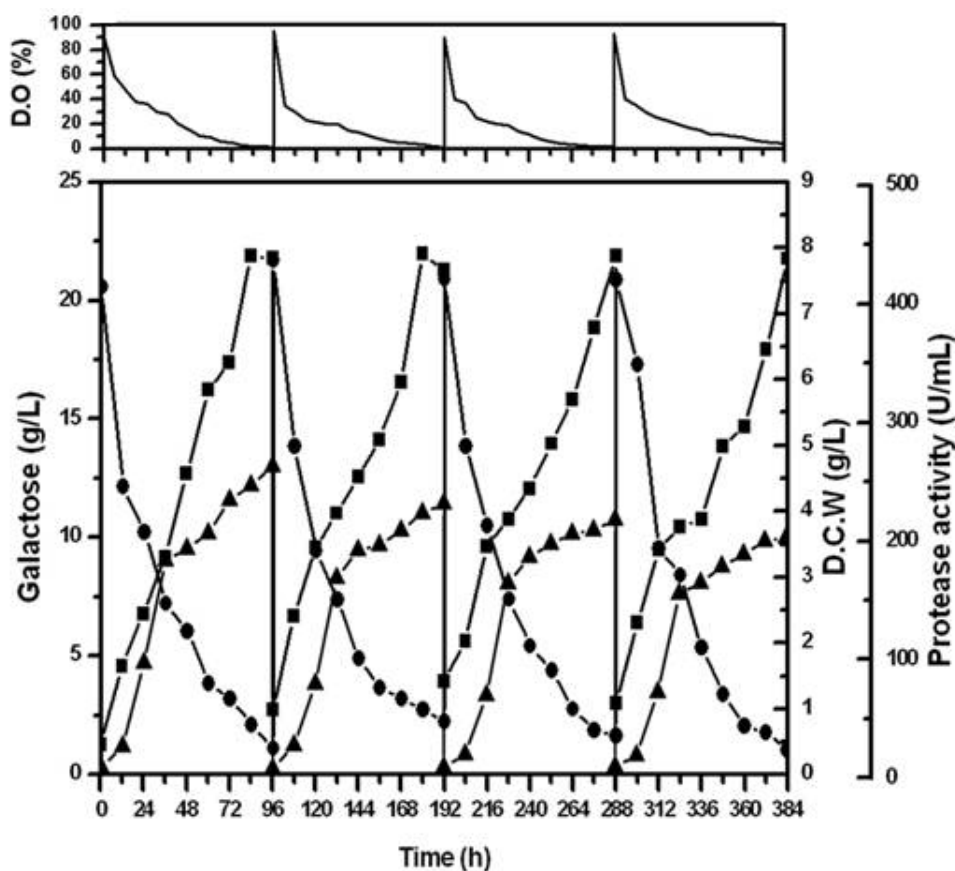


Fig. 157. Time profiles of D.C.W (●), protease activity (▲), galactose (●) and DO (—) during repeated-batch fermentation using the optimized medium at 42°C, 200 rpm, 2 vvm and pH 8.

Table 102 Comparison of D.C.W, protease and D.C.W productivity under each experimental step by *Bacillus licheniformis* SCK 121057.

	Configuration	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)	D.C.W productivity (g/L·h)
A	Flask	0.10	3.68	$4.17 \cdot 10^{-3}$
B	Flask	4.00	161.27	0.16
C	Batch	7.24	240.06	0.086
D	Repeated-batch	7.87*	258.07*	0.093*

A: Basic medium, B: Optimized medium, C: Batch fermentation using the optimized medium at selected conditions, D: Repeated batch fermentation using the optimized medium at selected conditions

\*: the average value each batch fermentation stage

### (9) 요약

통계적 실험 방법을 이용한 생산배지최적화 실험 결과, 최적배지 조성은 Galactose 17.26 g/L, Yeast extract 27.76 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.25 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g/L 이었다. 이 때의 균체량과 protease는 4.00 g/L와 161.27 U/mL로 기본 생산배지에서 배양했을 때보다 각각 40배와 43배 증가하는 것을 볼 수 있었다. 최적생산배지를 이용하여 발효조에서 최적발효조건 선정실험 결과, 배양온도, 교반속도, 공기유속과 pH는 각각 42 °C, 200 rpm, 2 vvm, pH 8로 선정되었다. 이 때의 균체량과 protease는 7.24 g/L와 240.06 U/mL이었고, 최적생산배지와 최적발효조건을 이용하여 반복회분배양 실험을 수행하였을 때 균체량과 protease는 배양을 반복하여도 일정하게 유지된다는 것을 확인하였다.

마. *Bacillus licheniformis* BaDB 8 균주를 이용한 균체량과 protease의 최대 생산을 위한 통계적 배지최적화와 발효조건 확립

#### (1) *Bacillus cereus*에 대한 항균활성 측정

식중독 균인 *Bacillus cereus*에 대한 *Bacillus licheniformis* BaDB 8의 항균활성을 확인하기 위해 실험을 진행하였다(Table 103). (Altayar and Sutherland, 2005, Ann et al., 1997, Aptroaie et al., 2005, Bermudez et al., 2012))

Table 103 Activity of the *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* strain.

(A:Tryptic soy broth (control), B: *Bacillus licheniformis* SCK 121057 (Soonchang), C: *Bacillus licheniformis* SCD 121067 (Soonchang), D: *Bacillus licheniformis* BaDB 8 (goryeong), E: *Bacillus licheniformis* BaDB 23 (Soonchang), F: *Bacillus subtilis* (Busan Univ.), G: *Bacillus subtilis* (Daesang, Co. Ltd))

	A(control)	B	C	D
Diameter(cm)	-	1.7±0.058	1.3±0.058	1.7±0.058
	E	F	G	
Diameter(cm)	1.3±0.058	-	0.9±0.78	

비교 실험을 위해 사용된 균주는 *Bacillus licheniformis* SCK 121057 (Soonchang), *Bacillus licheniformis* SCD 121067 (Soonchang), *Bacillus licheniformis* BaDB 23 (Soonchang), *Bacillus subtilis* (Busan Univ.) 그리고 *Bacillus subtilis* (Daesang, Co. Ltd)를 사용하였고 대조구로는 균을 접종하지 않은 tryptic soy broth이다. 항균활성 실험 결과 *Bacillus licheniformis* SCK 121057 균주와 *Bacillus licheniformis* BaDB 8균주가 1.7 cm로 가장 큰 환을 생성하는 것을 볼 수 있었고, *Bacillus subtilis* (Busan Univ.)의 경우 *Bacillus cereus*를 저해하는 것이 아니라 같이 뿌옇게 자라는 것을 볼 수 있었다(Fig. 158). 이 결과를 토대로 *Bacillus licheniformis* BaDB 8균주가 다른 균주에 비해 우수하다는 것을 볼 수 있었다.

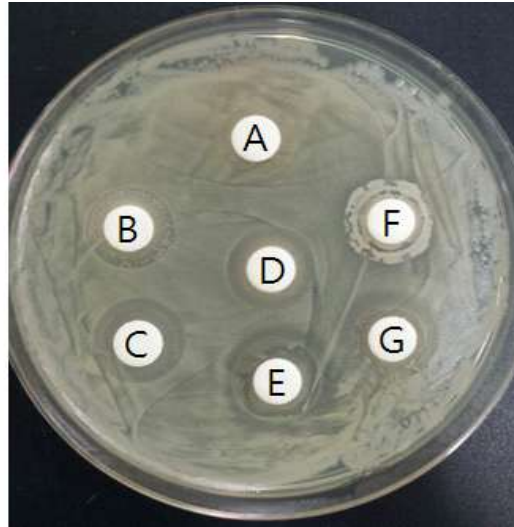


Fig. 158. The effect of six *Bacillus* strain on the inhibition of *B.cereus* growth.

- A: Tryptic soy broth (control)
- B: *Bacillus licheniformis* SCK 121057 (Soonchang)
- C: *Bacillus licheniformis* SCD 121067 (Soonchang)
- D: *Bacillus licheniformis* BaDB 8 (goryeong)
- E: *Bacillus licheniformis* BaDB 23 (Soonchang)
- F: *Bacillus subtilis* (Busan Univ.)
- G: *Bacillus subtilis* (Daesang, Co. Ltd)

(2) *Bacillus licheniformis* BaDB 8의 기본배지에서의 성장곡선

기본배지에서 *Bacillus licheniformis* BaDB 8 성장곡선 실험 결과 24시간에 정지기에 접어들어 일정시간 값을 유지하다가 30시간에 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 159). 이 실험을 통해 기본배지를 기준으로 OFAT 실험을 할 때의 분석시간을 24시간으로 결정할 수 있었다.

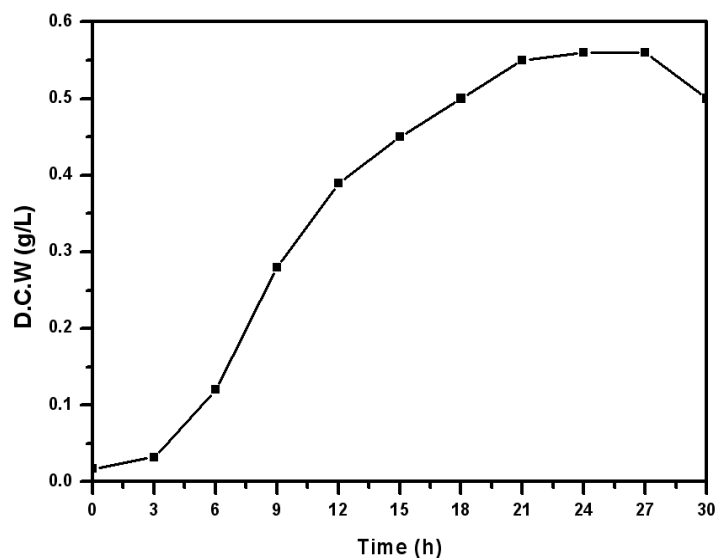


Fig. 159. Growth curve of *Bacillus licheniformis* BaDB 8 at basic production medium, 30°C, 200 rpm.

### (3) One factor at a time(OFAT) 방법을 이용한 영양원의 선별

#### (가) 탄소원 선정

탄소원 선정 실험에는 일반적으로 널리 사용되는 탄소원인 sucrose(control)를 비롯하여 glucose, galactose, lactose, fructose, maltose, cellobiose, soluble starch를 사용하여 실험을 진행하였다(Guinebretiere et al., 2002; Kim et al., 1992; Havelka, 1967; Hong and Shin, 2010; Jang et al., 2009; Jeong et al., 2010). OFAT 실험 결과 Fig. 160을 보면control인 sucrose를 탄소원으로 사용하였을 때 균체량은 0.44 g/L, protease activity는 8.5 U/mL로 측정되었다. Glucose를 탄소원으로 사용하였을 때 균체량은 0.63 g/L, protease activity는 17.51 U/mL로 다른 탄소원들보다 균체량과 protease activity 모두 가장 높게 측정되는 것을 볼 수 있었다. 탄소원으로는 glucose를 선정하게 되었다.

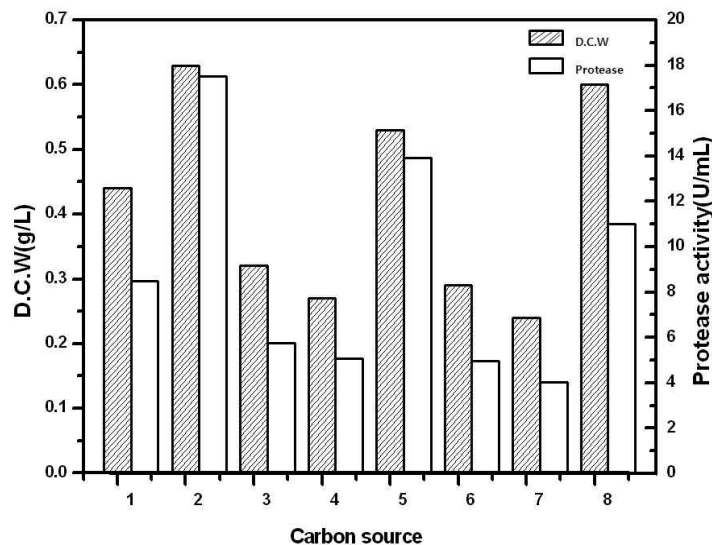


Fig. 160. Effect of various carbon source on dry cell weight (D.C.W) and protease activity; 1. sucrose 2. glucose 3. galactose 4. lactose 5. fructose 6. maltose 7. cellobiose 8. soluble starch.

#### (나) 질소원 선정

질소원 선정 실험에는 이전의 실험을 통해 무기질소원보다는 유기질소원이 미생물의 성장에 긍정적인 영향을 미친다는 결과를 얻었기 때문에 무기질소원은 제외하고 유기질소원인 asparagine, yeast extract, malt extract, peptone, soybean meal, soy peptone, urea, casein을 사용하여 실험을 진행하였다(Jeong et al., 2010; Lee et al., 1997). OFAT 방법을 이용하여 질소원 실험을 한 결과 대조구인 asparagine을 질소원으로 사용하였을 때보다 soybean meal을 사용하였을 때 D.C.W는 2.56 g/L, protease activity는 93.79 U/mL로 5배 증가한 값으로 질소원 중 가장 높게 측정되었다(Fig. 161). 그 다음으로는 yeast extract를 질소원으로 사용하였을 때 D.C.W는 1.2 g/L, protease activity는 39.68 U/mL로 높게 측정되었다. Soy peptone을 사용하였을 때 protease activity는 45.55 U/mL로 높게 측정되었으나 D.C.W는 0.42 g/L로 낮게 측정되었다. 질소원으로는 soybean meal이 선정되었다.

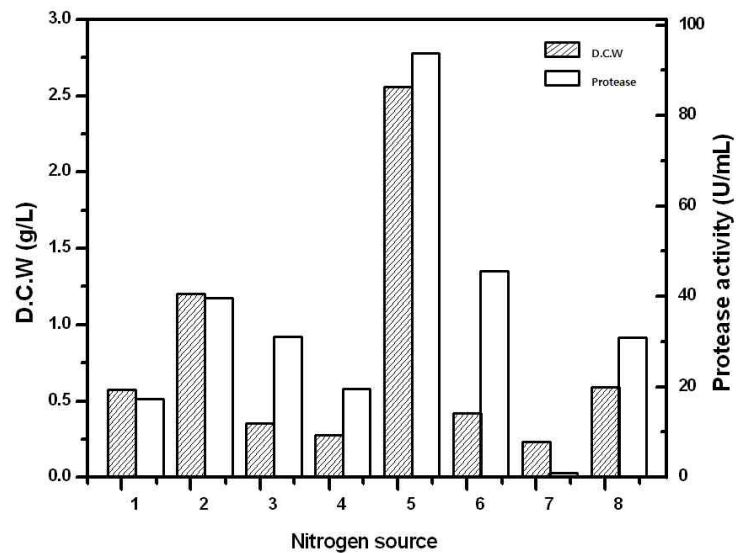


Fig. 161. Effect of various nitrogen source on dry cell weight(D.C.W) and protease activity.

1. asparagine(C) 2. yeast extract 3. malt extract 4. peptone
5. soybean meal 6. soy peptone 7. urea 8. casein

#### (다) 질소원 비교 재실험

이전의 질소원 선정실험에서 선정된 soybean meal이 현재 실험실에 soybean meal의 양은 500 g 정도 있는데 앞으로 통계적 최적화와 발효조건을 선정하는 진행할 때 적어도 10 kg 정도는 보유되어야 한다. 하지만 제조회사에서 이 상품의 생산을 중단하여 더 이상 구할 수 없어 (주)사조 해표에서 생산하는 soybean meal을 제공받아 비교실험을 진행하였다. 실험 결과를 Fig. 162에 나타내었고, (주)사조 해표에서 생산하는 soybean meal (3.16 g/L)을 사용하였을 때 미래자원에서 생산하는 soybean meal (2.43 g/L) 보다 더 높은 균체량을 보였다. Protease 역시 (주)사조 해표에서 생산하는 soy bean meal을 사용하였을 때 89.81 U/mL로 작은 차이이지만 높게 측정되었다. 질소원 선정실험을 했을 때 사용했던 다른 질소원들과 비교했을 때 (Fig. 164)에도 soybean meal이 균체량과 protease 모두 높게 측정되는 것을 볼 수 있었다.

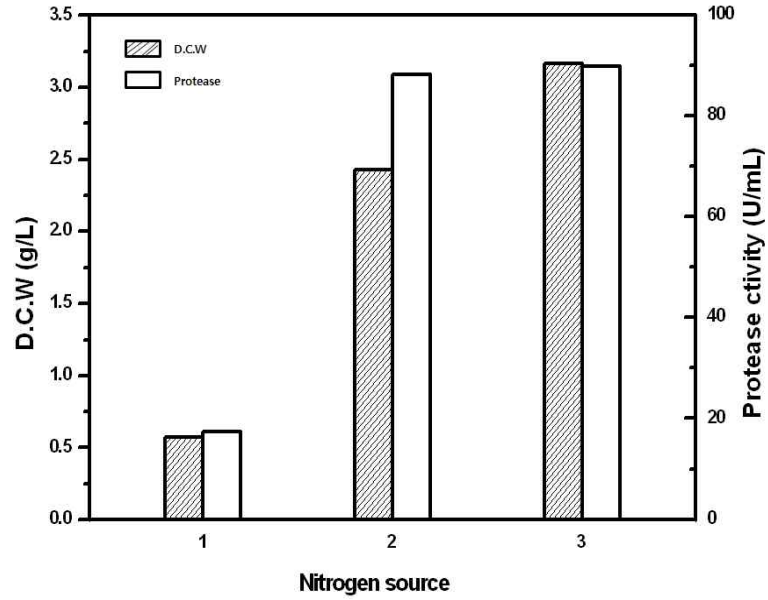


Fig. 162. Effect of various nitrogen source on dry cell weight and protease.  
 1. Asparagine (c), 2. Soybean meal (미래자원)  
 3. Soybean meal (사조 해표)

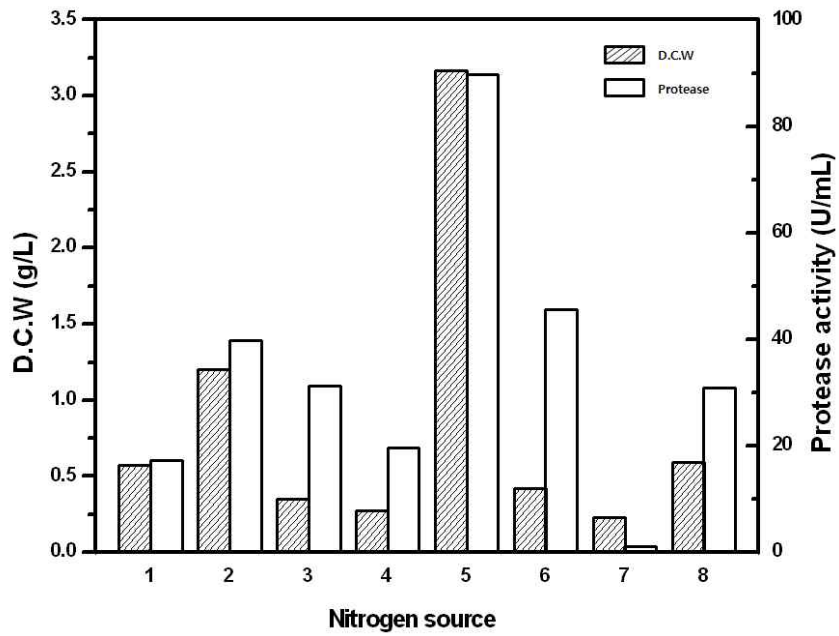


Fig. 163. Effect of various nitrogen source on dry cell weight and protease.  
 1. Asparagine (C) 2. Yeast extract 3. Malt extract 4. Peptone  
 5. Soybean meal 6. Soy peptone 7. Urea 8. Casein

### (라) 인원 선정 실험

Soybean meal 비교 실험 결과 (주)사조 해표에서 생산하는 soybean meal을 새로운 질소원으로 선정한 후 인원 실험을 진행하였다. 결과를 Fig. 164에 나타내었다. 미래자원의 soybean meal을 질소원으로 선정한 후 인원 선정실험을 했을 때와 비슷한 결과를 보였다. 6번 potassium phosphate monobasic ( $K_2HPO_4$ )을 인원으로 사용하였을 때 균체량은 3.84 g/L로 control인 disodium hydrogen phosphate ( $Na_2HPO_4$ )을 사용하였을 때 균체량인 3.44 g/L보다 약 1.1배 높은 값을 보였다. 3번 ammonium phosphate monobasic ( $NH_4H_2PO_4$ )을 인원으로 사용하였을 때에 균체량은 0.53 g/L로 가장 낮은 값을 보였다. 인원은 발효 시 외부에서 pH를 외부에서 조절하지 않을 때 pH변화를 최소화하는 완충제로 사용된다. 인원선정 실험 결과를 전체적으로 보았을 때  $Na^+$ 나  $NH_4^+$ 이온보다  $K^+$ 이온이 건조 균체량의 긍정적인 영향을 미치는 것으로 예상할 수 있었다. 6번  $K_2HPO_4$ 은 1% 수용액의 pH는 8.7에서 9.3으로  $K_2HPO_4$ 를 인원으로 사용하였을 때 균의 성장이 가장 좋았다는 것은 미생물이 알칼리 조건에서 더 잘 성장한다는 것을 알 수 있었다. 또한  $K_2HPO_4$ 는 발효 공업에서 발효 공업에서 발효력의 강화, 풍미 향상을 목적으로 사용하며 미생물의 영양원으로 많이 첨가한다. Protease는 2번 Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ )를 인원으로 사용하였을 때 가장 높은 값인 105.97 U/mL로 측정되었다. 가장 낮은 protease를 나타내는 인원은 균체량도 가장 낮은 값을 보인  $NH_4H_2PO_4$ 로 54.81 U/mL로 측정되었다. 가장 높은 균체량을 나타낸  $K_2HPO_4$ 을 인원으로 사용했을 때에는 83.25 U/mL로 측정되었다. 균체량을 중심으로  $K_2HPO_4$ 을 인원으로 선정하였다.

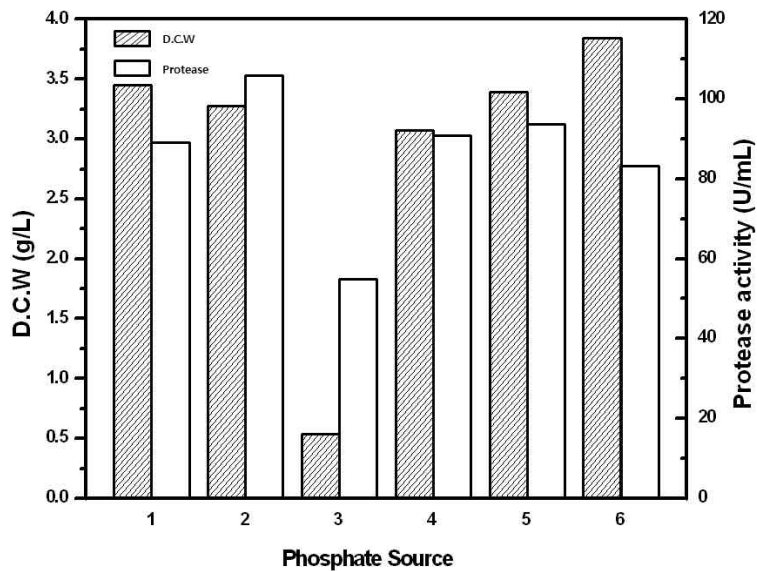


Fig. 164. Effect of various phosphate sources on D.C.W and protease activity.

1.  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (C), 2.  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 3.  $NH_4H_2PO_4$ ,
4.  $(NH_4)_2HPO_4$ , 5.  $KH_2PO_4$ , 6.  $K_2HPO_4$

**(4) Plackett-Burman design method에 의한 최대 영향요인 선택**

Plackett-Burman design에 의한 배지조성과 각 성분의 농도 그리고 그에 따른 Plackett-Burman design을 Table 104, 105, 106에 나타내었다. 농도가 높은 탄소원, 질소원은 농도조절을 중심 값에서 20 %로 조절하였고, 농도가 낮은 나머지 변수들은 50%로 조절하였다.

Table 104 The composition of selected production medium for Plackett-Burman design.

Component	Concentration (g/L)	Factor
Glucose	20	A
soybean meal	10	B
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	C
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4	D
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.25	E
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01	F

Table 105 High and Low factor of Plackett-Burman design (6 component).

	Glucose	soybean meal	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
High (+)	24	12	3	0.6	0.375	0.015
Low (-)	16	8	1	0.2	0.125	0.005



Table 106 Plackett-Burman design for six variables.

Trial	Variables						D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)
	A	B	C	D	E	F		
M1	+	+	-	+	+	+	3.964577	122.6846
M2	-	+	+	-	+	+	2.979904	123.0692
M3	+	-	+	+	-	+	3.627063	110.3769
M4	-	+	-	+	+	-	3.339093	124.6077
M5	-	-	+	-	+	+	3.283357	121.5308
M6	-	-	-	+	-	+	3.639449	104.2231
M7	+	-	-	-	+	-	3.893358	106.1462
M8	+	+	-	-	-	+	3.930516	124.2231
M9	+	+	+	-	-	-	3.639449	129.6077
M10	-	+	+	+	-	-	3.549652	126.9154
M11	+	-	+	+	+	-	3.524880	99.6076
M12	-	-	-	-	-	-	3.676606	109.2231

(가) 건조균체량 (D.C.W) 분석

Plackett-Burman design method를 이용하여 균체량과 protease를 분석한 결과를 Table 107에 나타내었다. 여섯 가지 배지성분 중 균체생산과 protease에 큰 영향을 미치는 성분을 알아보았다. +와 - level의 실험값의 기울기를 구해 분석해 본 결과 (Fig. 167), 균체 생산에 영향을 미치는 %는 glucose(36.98%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(32.21%), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(18.87%)순으로 이 세 가지 성분의 % 합이 약 90%로 세 가지 성분이 균체생산의 주된 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다(Fig. 165). 그리고 glucose는 균체생산에 긍정적인 영향을 미치는 반면, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>는 부정적인 영향을 미쳐서 성분의 적은 양이 들어가야 높은 균체량을 보이는 것을 알 수 있었다. 실험을 하기 전에는 질소원으로 들어가는 soybean meal의 영향이 가장 클 것이라고 생각을 했는데 실험 결과 질소원의 영향은 4.23%로 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다. 대신 탄소원으로 들어가는 glucose의 영향이 36%로 가장 큰 것을 알 수 있었고 질소원보다는 탄소원을 주된 영양원으로 쓴다는 것을 알 수 있었다. 그리고 t-value는 +, -부호에 상관없이 절대값이 크면 영향을 많이 미친다고 볼 수 있는데 glucose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 순으로 2.66, -2.14, -1.09로 기울기가 크고 큰 영향을 미치는 성분의 값이 높은 것을 볼 수 있었다(Table 107). 그리고 통계적으로 유의하다는 것을 증명하기 위해서는 P-value가 0.05보다 작아야 하는데 glucose와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 0.05보다 작은 것을 볼 수 있는데 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>는 0.1568로 0.05보다 큰 값으로 통계적으로 유의하지 않다는 것을 알 수 있었다.

Table 107 Coefficient, P-value and t-value for Plackett-Burman design study of D.C.W.

Factor	Coefficient	P-value	t-value
Glucose	0.1759	0.0130	2.6603
Soybean meal	-0.0201	0.4106	-0.2335
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-0.1533	0.0289	-2.1422
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0201	0.4106	0.2334
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-0.0898	0.1568	-1.0998
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-0.0165	0.4268	-0.19136

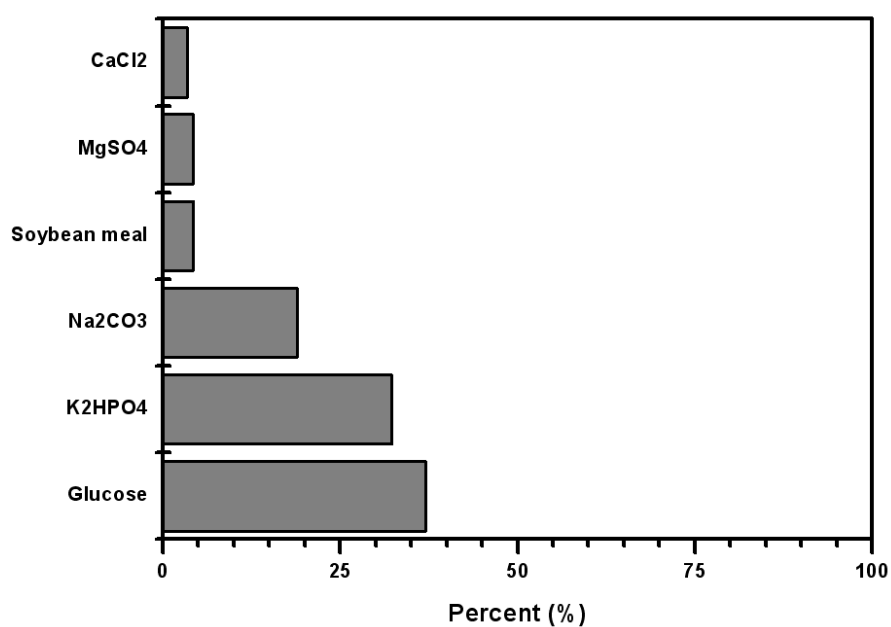


Fig. 165. Pareto plot for Plackett-Burman design parameter estimates for D.C.W.

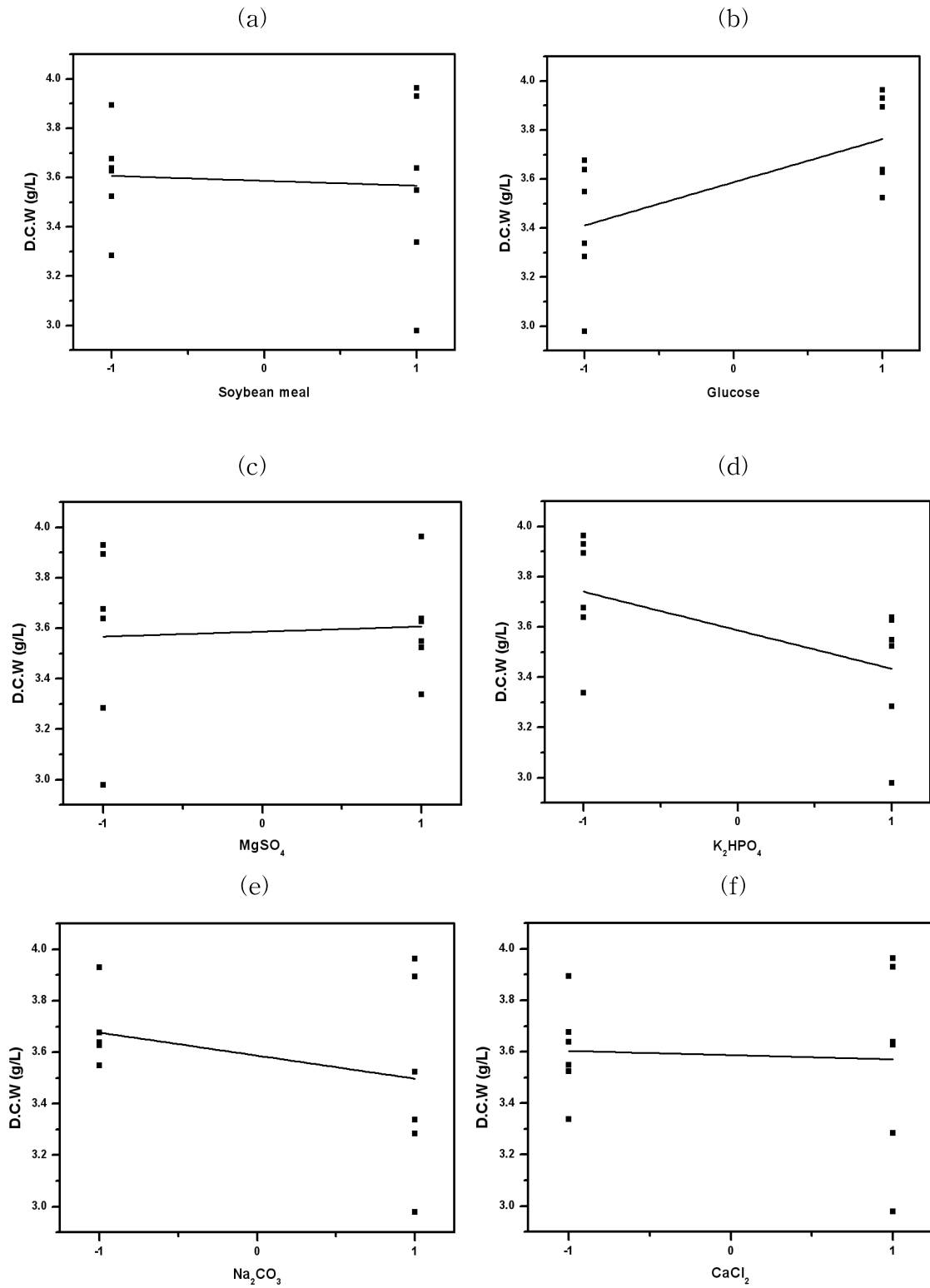


Fig. 166. Plot of observed D.C.W in a Plackett-Burman design study.  
 (a) Glucose, (b) Soybean meal, (c)  $K_2HPO_4$ , (d)  $MgSO_4$ , (e)  $Na_2CO_3$ , (f)  $CaCl_2$

**(나) Protease activity 분석**

protease의 영향을 살펴본 결과 (Fig. 167-168) soybean meal이 55%로 다른 성분에 비해 월등하게 높은 영향을 주었고, 그 다음으로는 MgSO<sub>4</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>가 14.16%와 11.15%의 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 그리고 soybean meal과 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 protease activity에 긍정적인 영향을 미치고, MgSO<sub>4</sub>는 부정적인 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 실험 결과 protease activity는 예상대로 질소원의 영향을 가장 많이 받는다는 것을 알 수 있었다. 그리고 t-value (Table 108)는 soybean meal, MgSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>로 5.17, -0.70, 0.54순으로 높은 것을 볼 수 있었고, 통계적 유의성을 증명하기 위해 P-value를 살펴본 결과 soybean meal만 0.001로 통계적으로 매우 유의하다는 것을 알 수 있었고, MgSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>은 0.2495, 0.2979로 0.05보다 큰 값이므로 통계적으로 유의하지 않다는 것을 알 수 있었다.

Table 108. Coefficient, P-value and t-value for Plackett-Burman design study of protease.

Factor	Coefficient	P-value	t-value
Glucose	-1.4103	0.3277	-0.4615
Soybean meal	8.333	0.0010	5.1741
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6667	0.2979	0.5477
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-2.1154	0.2495	-0.7016
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-0.5769	0.4277	-0.1781
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.8333	0.3963	0.2708

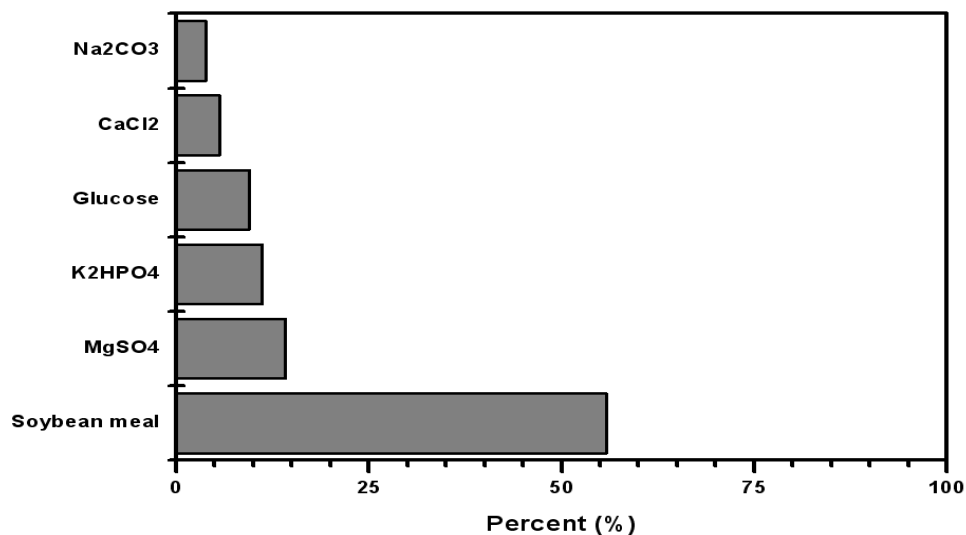


Fig. 167. Pareto plot for Plackett-Burman design parameter estimates for protease.

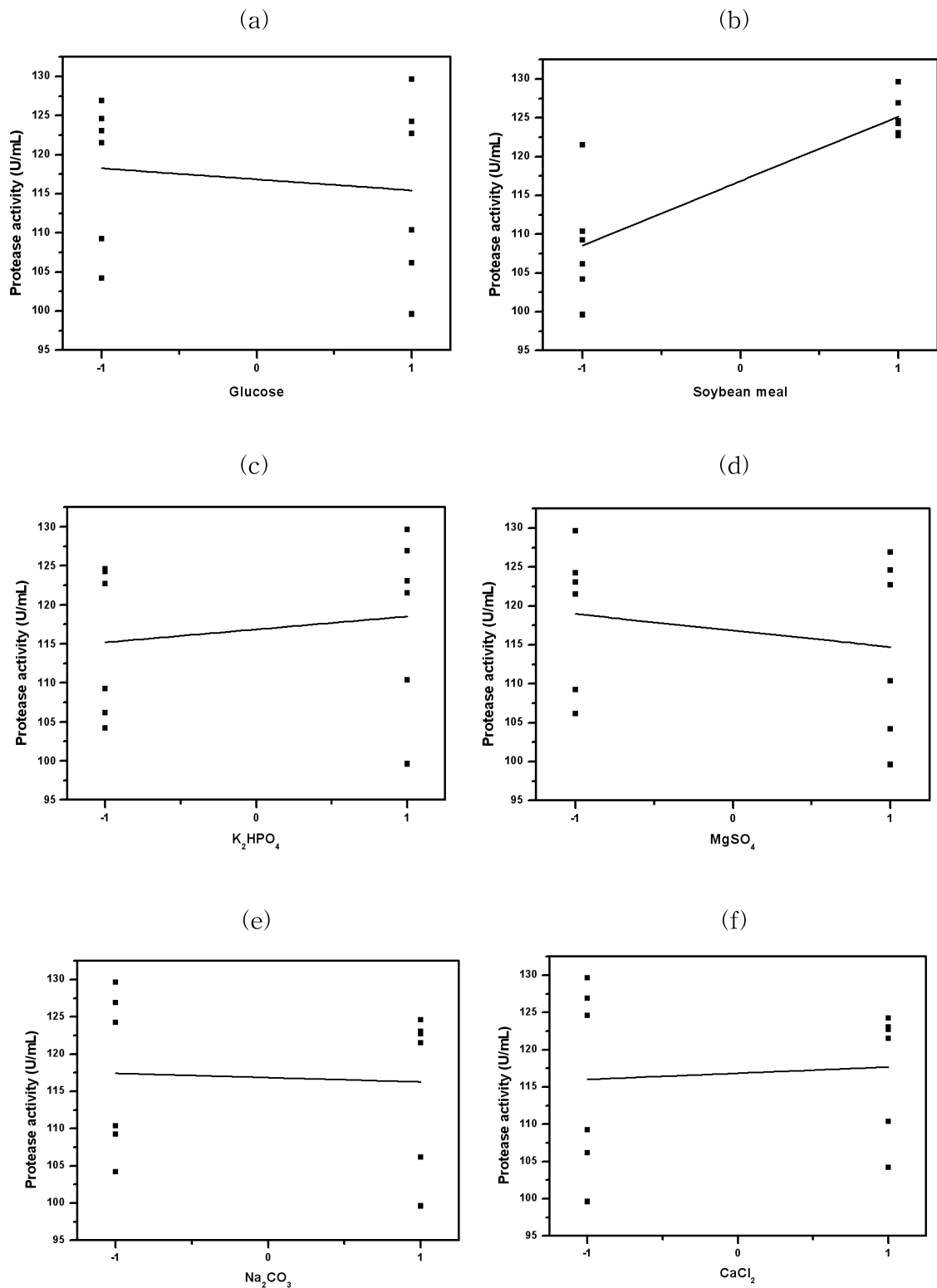


Fig. 168. Plot of observed protease in a Plackett-Burman design study.  
 (a) Glucose, (b) Soybean meal, (c)  $K_2HPO_4$ , (d)  $MgSO_4$ , (e)  $Na_2CO_3$ , (f)  $CaCl_2$

(5) Full factorial design method에 의한 중요 영향 인자간의 상호작용 확인

One factor at a time (OFAT) 실험은 하나의 factor만을 변화시키고 다른 요인들은 고정시킨 상태에서 실험을 수행하였고, Plackett-Burman design에서는 단지 중요한 변수만을 선별하는데 중점을 두고 있기 때문에 요인들 간의 상호작용을 관찰할 수 없었다. Plackett-Burman design의 결과에 의해 균체량에 크게 영향을 주는 세 가지 성분을 이용하여 각 성분들의 high, low level에 따른 상호작용에 의한 생산성 변화를 관찰하고자 full factorial design을 수행하였다. 실험에 사용된 각 factor의 농도와 실험디자인에 따른 균체량과 protease 결과는 Table 109와 110에 나타내었다.

Table 109 Levels of each medium component for 3-factor full factorial design (FFD).

	Glucose	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
+1	24	3	0.375
0	20	2	0.25
-1	16	1	0.125

Table 110 Experimental matrix for 3-factor full factorial design (FFD) of D.C.W and protease of *Bacillus licheniformis* SCK 121057.

	Glucose	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)
1	-1	-1	-1	3.84	131.92
2	+1	-1	-1	4.02	127.56
3	-1	+1	-1	3.49	125.76
4	+1	+1	-1	3.51	128.33
5	-1	-1	+1	3.78	123.71
6	+1	-1	+1	3.71	122.69
7	-1	+1	+1	3.54	125.51
8	+1	+1	+1	3.34	131.92
9	0	0	0	3.69	126.27
10	0	0	0	3.72	125.76

(가) 건조균체량 (D.C.W) 분석

FFD 실험 결과를 분석해보면(Table 110), glucose가 high level이고 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>가 low level인 2번 조합에서 균체량은 4.02 g/L로 가장 높았다. Glucose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>가 모두 high level인 8번 조합에서 균체량은 3.34 g/L로 가장 낮은 값을 보였다. 균체량이 가장 높은 값은 보인 2번 조합에서 glucose는 high level이었는데 전체 FFD 결과를 분석해 본 결과 (Table 111 및 112, Fig. 169) effect 값이 glucose가 -값이 나왔다. 이는 high일 때 균체량은 가장 높게 나왔으나 전체적으로는 glucose가 적게 들어갈수록 균체량이 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 일차방정식은 다음과 같다.

$$D.C.W = +3.66 - 9.289 \times 10^{-3} * A - 0.19 * B - 0.062 * C - 0.038 * A * B - 0.058 * A * C + 0.029 * B * C$$

(A: Glucose, B: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, C: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

Table 111 Main effect of medium components in full factorial design experiments for D.C.W.

	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
	Intercept			
M	A-Glucose	-0.019	6.903E-004	0.19
M	B-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-0.37	0.27	76.97
M	C-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-0.12	0.031	8.74
M	AB	-0.076	0.012	3.27
M	AC	-0.12	0.027	7.49
M	BC	0.059	6.923E-003	1.94

Table 112 ANOVA analysis of full factorial design experiments for D.C.W.

Response 1 D.C.W						
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0.35	6	0.059	145.99	0.0068	significant
A-Glucose	6.903E-004	1	6.903E-004	1.72	0.3201	
B-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.27	1	0.27	683.72	0.0015	
C-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.031	1	0.031	77.67	0.0126	
AB	0.012	1	0.012	29.05	0.0327	
AC	0.027	1	0.027	66.55	0.0147	
BC	6.923E-003	1	6.923E-003	17.24	0.0534	
Curvature	4.177E-003	1	4.177E-003	10.40	0.0842	not significant
Residual	8.033E-004	2	4.016E-004			
Lack of Fit	3.409E-005	1	3.409E-005	0.044	0.8679	not significant
Pure Error	7.692E-004	1	7.692E-004			
Cor Total	0.36	9				
Std. Dev.	0.020		R-Squared	0.9977		
Mean	3.67		Adj R-Squared	0.9909		
C.V. %	0.55		Pred R-Squared	0.9851		
PRESS	5.259E-003		Adeq Precision	38.349		

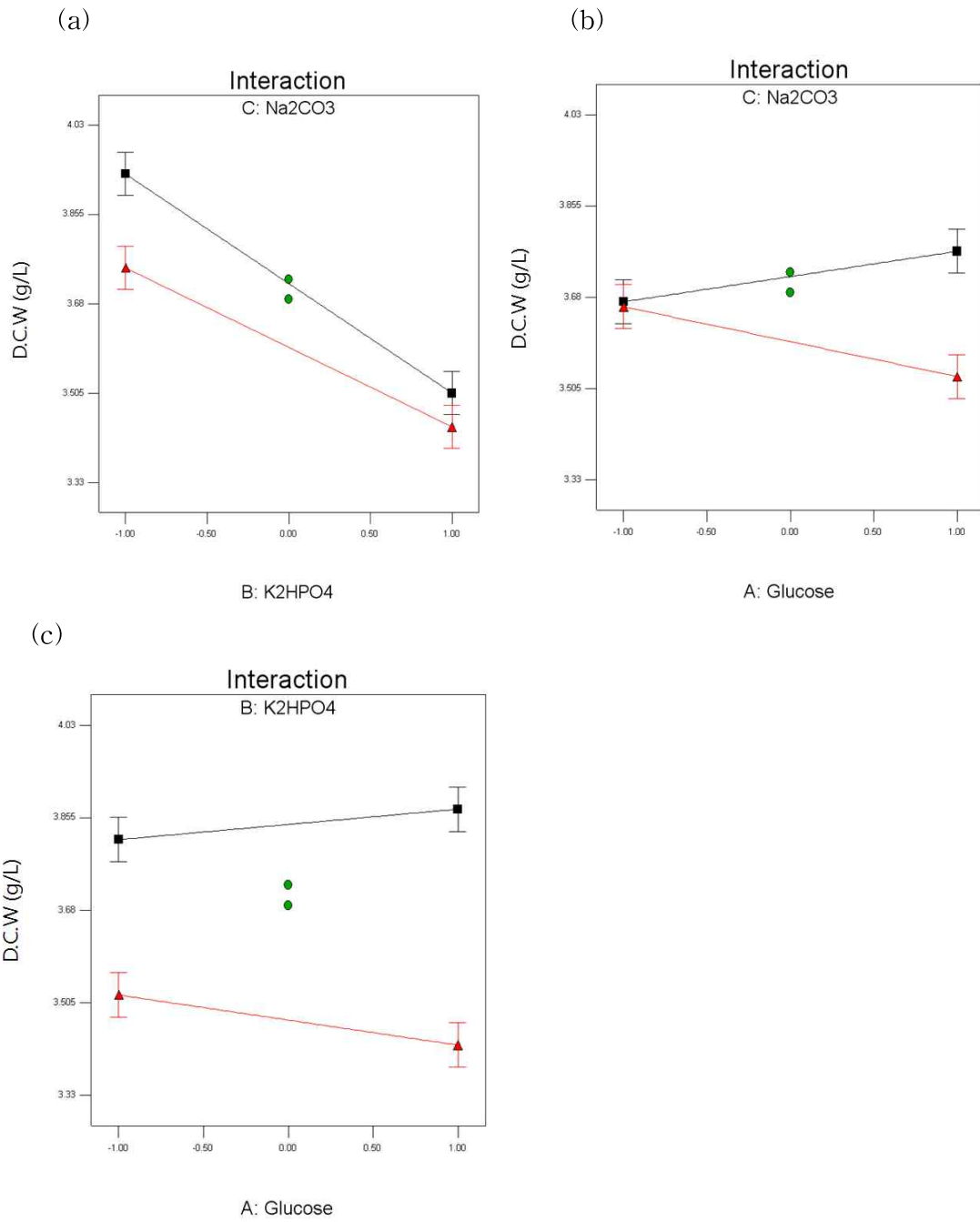


Fig. 169. Two-factor interaction obtained from full factorial design experiments for D.C.W (a) Glucose–K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (b) Glucose–Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (c) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.



(나) Protease activity 분석

Protease 결과를 분석해보면 (Table 110) 모두 low level인 1번 조합과 모두 high level인 8번 조합에서 가장 높은 131.92 U/mL의 값을 나타내었다. 전체적으로 결과 (Table 113, 114, Fig. 170)를 보면 protease는 glucose와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 긍정적인 영향을 주며 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>는 부정적인 영향을 주는 것으로 나타났다. 일차방정식은 다음과 같다.

$$\text{Protease} = +127.17 + 0.45 * A + 0.71 * B - 1.22 * C + 1.79 * A * B + 0.90 * A * C + 2.05 * B * C$$

(A: Glucose, B: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, C: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

Table 113 Main effect of medium components in full factorial design experiments for protease.

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
A-Glucose	0.90	1.61	1.88
B-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.41	3.98	4.65
C-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-2.44	11.87	13.86
AB	3.59	25.77	30.10
AC	1.79	6.44	7.52
BC	4.10	33.66	39.31

Table 114 ANOVA analysis of full factorial design experiments for protease.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	83.33	6	13.89	169.00	0.0059	significant
A-Glucose	1.61	1	1.61	19.60	0.0474	
B-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.98	1	3.98	48.40	0.0200	
C-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	11.87	1	11.87	144.40	0.0069	
AB	25.77	1	25.77	313.60	0.0032	
AC	6.44	1	6.44	78.40	0.0125	
BC	33.66	1	33.66	409.60	0.0024	
Curvature	2.13	1	2.13	25.92	0.0365	significant
Residual	0.16	2	0.082			
Lack of Fit	0.033	1	0.033	0.25	0.7048	not significant
Pure Error	0.13	1	0.13			
Cor Total	85.63	9				
Std. Dev.	0.29		R-Squared	0.9980		
Mean	126.94		Adj R-Squared	0.9921		
C.V. %	0.23		Pred R-Squared	0.9685		
PRESS	2.63		Adeq Precision	36.000		

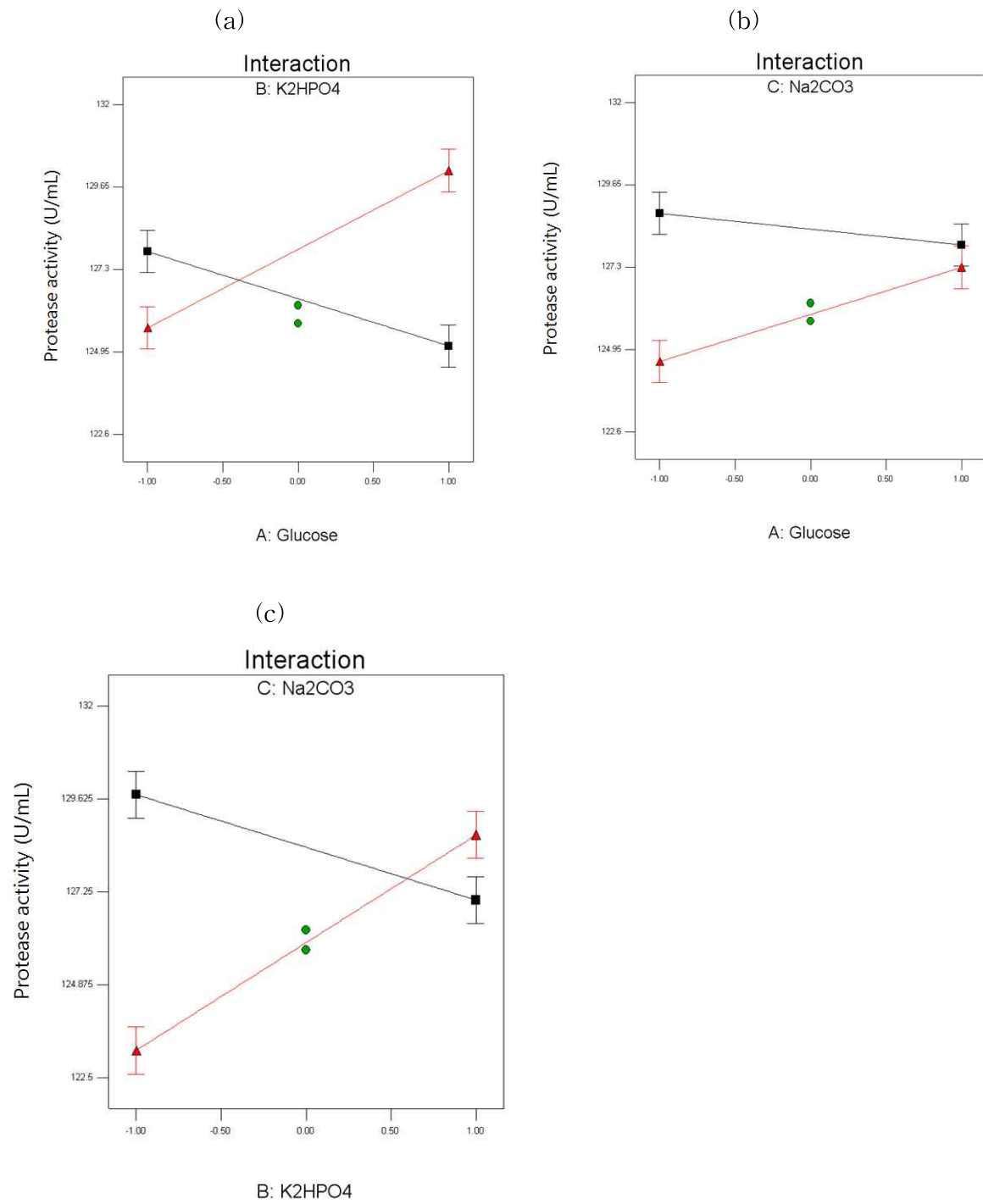


Fig. 170. Two-factor interaction obtained from full factorial design experiments for protease. (a) Glucose–K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (b) Glucose–Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (c) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

**(6) Response surface method(RSM, 반응표면분석법)에 의한 생산배지 최적화**

이전 연구에서 선별된 배지성분의 최적 농도 결정을 위해 반응표면 분석법(RSM)을 수행하였다. 실험 계획법으로는 중심합성계획법 (Central composite design)을 이용하였다. 현재 사용하고 있는 생산배지의 농도를 중심으로 사용하여 glucose와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>의 성분을 최적화 하고자 세 가지 성분의 농도는 -α, -1, 0, 1, +α 다섯 단계로 부호화 하였다 (Table 115). 본 실험에서는 3개의 중점을 사용하였으며, α값은 1.682이었다. 총 실험 횟수는 3반복을 통하여 51개 실험구가 수행되었다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수(Y)는 D.C.W로 회귀분석에 사용되었으며, 회귀분석에 의한 모델식의 예측에는 Design Expert pro S/W ver. 7.1을 사용하였다.(Joo et al., 2012)

Table 115 Concentration of the respective medium components at each level.  
(Central composite design for the response surface method)

Xn	Independent variables	Level				
		-α	-1	0	+1	+α
X1	Glucose	15.87	19.14	23.93	28.72	31.99
X2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.19	0.60	1.21	1.81	2.23
X3	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.01	0.04	0.07	0.11	0.13

**(가) D.C.W 결과 분석**

배지성분의 최적화를 위해 반응표면분석법(RSM)의 실험계획에 따라 실험을 진행하였다. D.C.W 분석 결과 (Table 116), 이상의 결과를 통계처리를 하였으며 그 결과 나타난 분산분석표(Analysis of variance, ANOVA), effect list, coefficient list와 각 변수들의 통계값을 Table 117, 118에 나타내었다. 유의확률(Probability value, P value)값이 가지는 일반적인 의미는 0.05보다 작으면 '통계적으로 유의하다(significant)'라고 하며, 이 값이 0.01보다 작으면 '통계적으로 매우 유의하다(highly significant)'라고 말한다. 여기서 유의하다란 용어는 가정한 모형이 데이터해석에 의미가 있다는 뜻이다. 전체적인 실험 모델의 유의성을 평가해본 결과 0.0072로 0.01보다 작으므로 통계적으로 매우 유의하다는 것을 알 수 있었고 결정계수인 R-square은 가정한 모형이 자료에 얼마나 잘 맞는지를 수량화한 통계량으로 1에 근접할수록 반응모형이 자료에 적합함을 확인하는 수치로 R-square값은 0.9061로 1에 가까우므로 이 반응모형을 신뢰할 수 있음을 알 수 있었다. 가장 높은 D.C.W을 보인 배지 성분 조합은 center point로 설정했던 glucose 23.93 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.21 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.07 g/L일 때 D.C.W는 4.40 g/L로 가장 높게 분석되었다. 3가지 factor 간의 상호작용을 나타낸 3D 그래프와 평면 그래프를 Fig. 171-173에 나타내었다.

Table 116 CCD matrix of two variables with predicted value and experimental value of D.C.W.

Exp No.	Culture condition			D.C.W (g/L)	
	Glucose	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Predicted value	Experimental value
1	19.14	0.60	0.04	4.01	4.09
2	28.72	0.60	0.04	3.73	3.61
3	19.14	1.81	0.04	4.25	4.20
4	28.72	1.81	0.04	4.21	4.22
5	19.14	0.60	0.11	4.13	4.09
6	28.72	0.60	0.11	4.10	4.12
7	19.14	1.81	0.11	4.06	4.11
8	28.72	1.81	0.11	4.25	4.11
9	15.87	1.21	0.07	4.29	4.23
10	31.99	1.21	0.07	4.19	4.26
11	23.93	0.19	0.07	3.77	3.75
12	23.93	2.23	0.07	4.12	4.17
13	23.93	1.21	0.01	3.97	3.93
14	23.93	1.21	0.13	4.19	4.26
15	23.93	1.21	0.07	4.37	4.34
16	23.93	1.21	0.07	4.37	4.37
17	23.93	1.21	0.07	4.37	4.40

Table 117 Main effects according to trial of response surface method.

Response 1		D.C.W				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0.62	9	0.069	7.51	0.0072	significant
A-Glucose	0.011	1	0.011	1.16	0.3177	
B-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15	1	0.15	15.99	0.0052	
C-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.056	1	0.056	6.02	0.0438	
AB	0.028	1	0.028	3.08	0.1229	
AC	0.031	1	0.031	3.35	0.1100	
BC	0.063	1	0.063	6.78	0.0352	
A <sup>2</sup>	0.024	1	0.024	2.62	0.1496	
B <sup>2</sup>	0.25	1	0.25	27.04	0.0013	
C <sup>2</sup>	0.11	1	0.11	11.93	0.0106	
Residual	0.065	7	9.242E-003			
Lack of Fit	0.063	5	0.013	13.05	0.0727	not significant
Pure Error	1.924E-003	2	9.620E-004			
Cor Total	0.69	16				
Std. Dev.	0.096		R-Squared	0.9061		
Mean	4.13		Adj R-Squared	0.7855		
C.V. %	2.33		Pred R-Squared	0.2237		
PRESS	0.54		Adeq Precision	9.497		

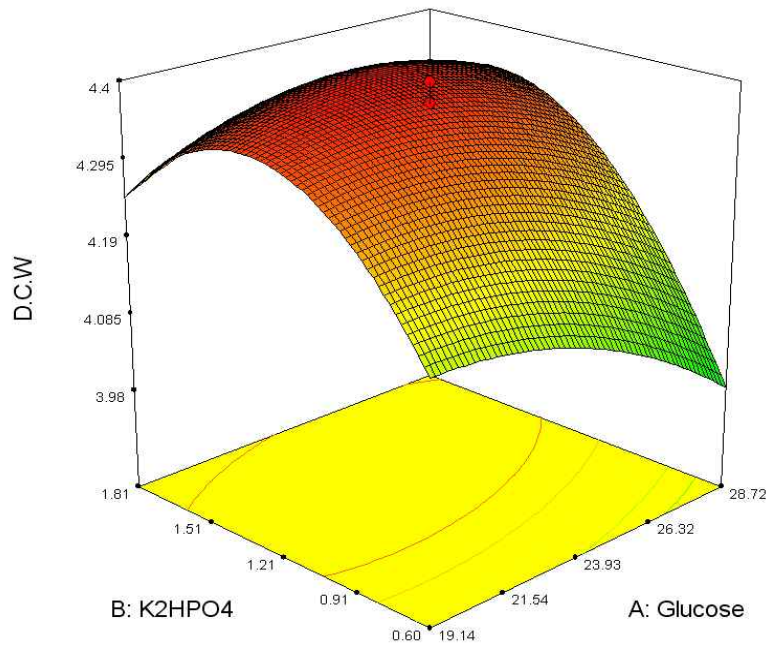
Table 118 Coefficient according to trial of response surface method.

Factor	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Intercept	4.37	1	0.055	4.24	4.50	
A-Glucose	-0.028	1	0.026	-0.089	0.034	1.00
B-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.10	1	0.026	0.042	0.17	1.00
C-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.064	1	0.026	2.336E-003	0.13	1.00
AB	0.060	1	0.034	-0.021	0.14	1.00
AC	0.062	1	0.034	-0.018	0.14	1.00
BC	-0.089	1	0.034	-0.17	-8.137E-003	1.00
A <sup>2</sup>	-0.046	1	0.029	-0.11	0.021	1.16
B <sup>2</sup>	-0.15	1	0.029	-0.22	-0.081	1.16
C <sup>2</sup>	-0.099	1	0.029	-0.17	-0.031	1.16

\*이차 다항식

$$D.C.W = +4.37 - 0.028 * A + 0.10 * B + 0.064 * C + 0.060 * A * B + 0.062 * A * C - 0.089 * B * C - 0.046 * A^2 - 0.15 * B^2 - 0.099 * C^2 \quad (A: \text{Glucose}, B: \text{K}_2\text{HPO}_4, C: \text{Na}_2\text{CO}_3)$$

(a)



(b)

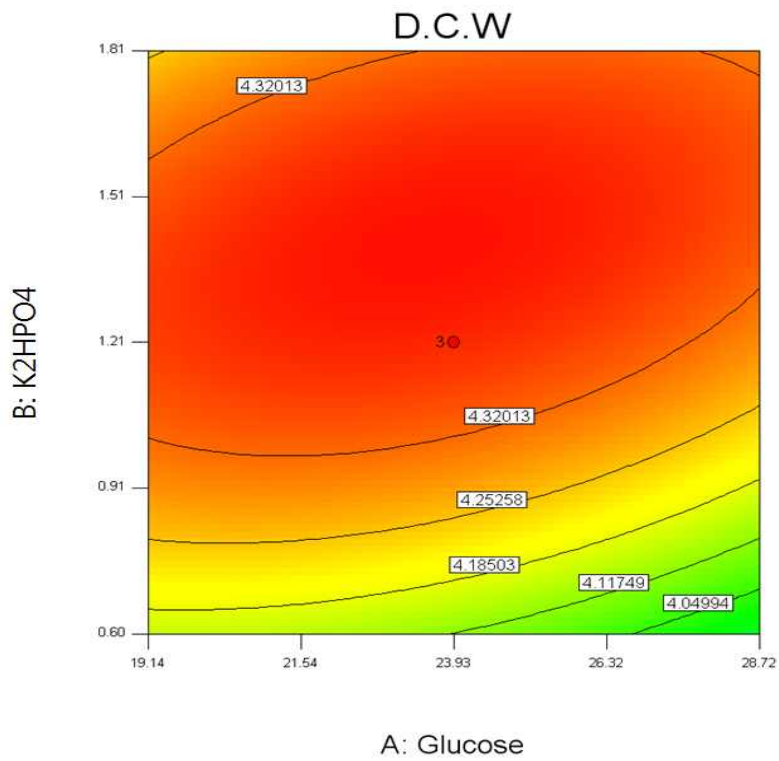
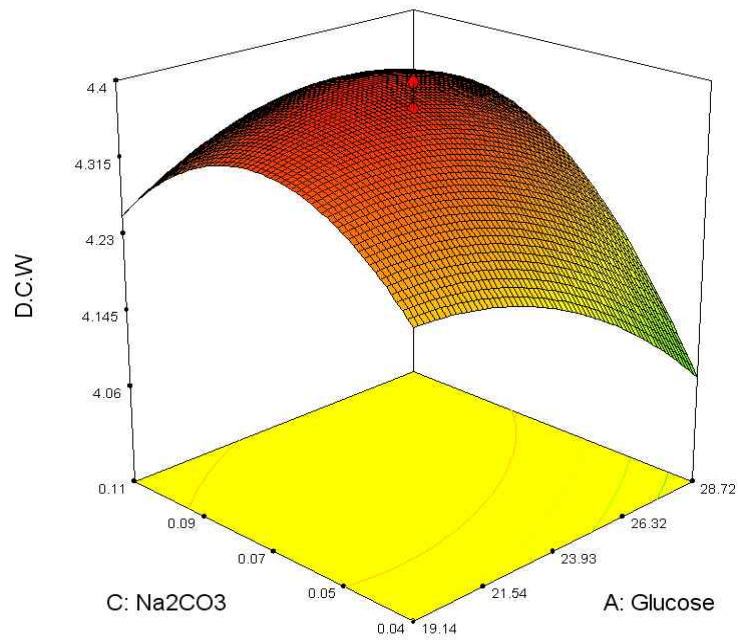


Fig. 171. D.C.W represent as (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of Glucose and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

(a)



(b)

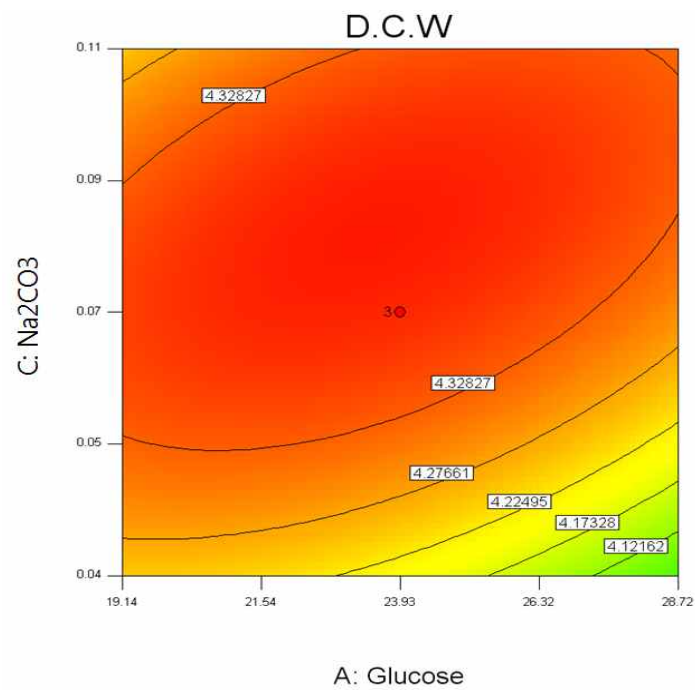
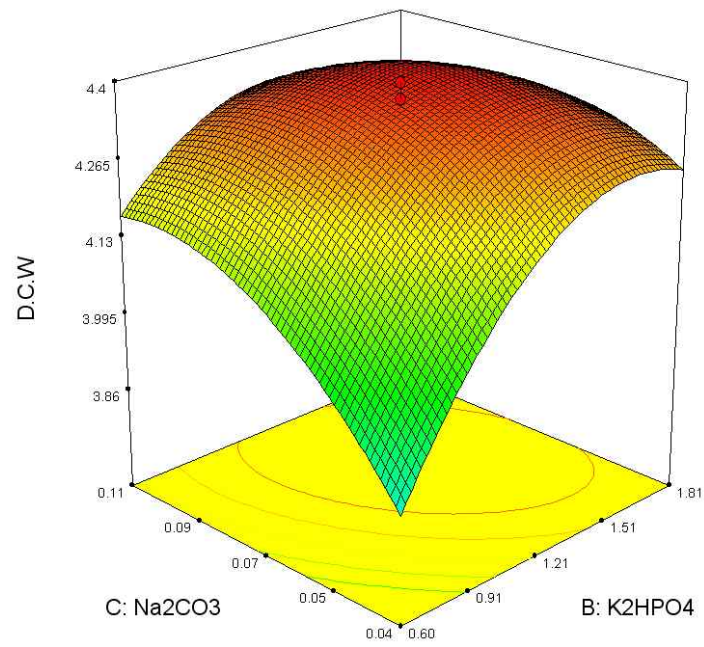


Fig. 172. D.C.W represent as (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of Glucose and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

(a)



(b)

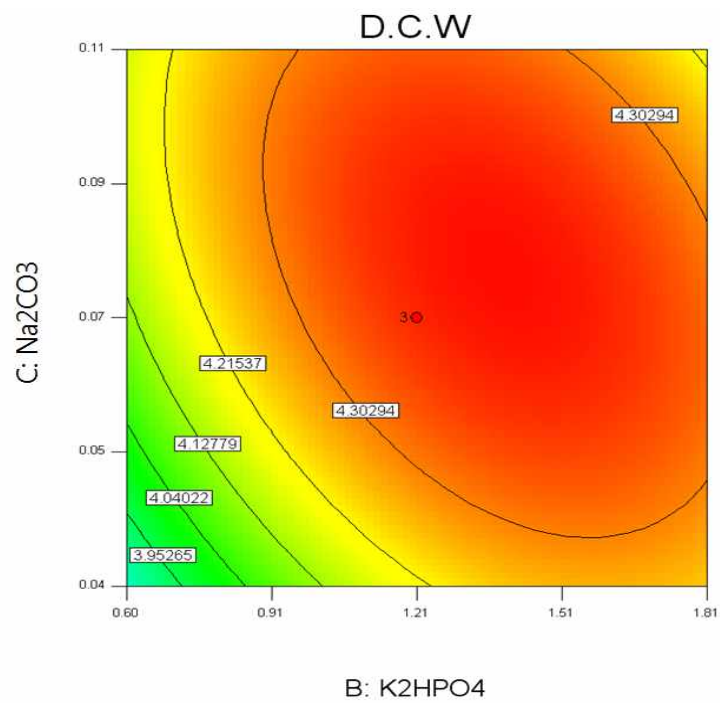


Fig. 173. D.C.W represent as (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.



**(나) Protease activity 분석**

Protease activity 분석 결과(Table 119) 이상의 결과를 통계처리 하였으며 그 결과 나타난 분산분석표(Analysis of variance, ANOVA), effect list, coefficient list와 각 변수들의 통계값을 Table 120, 121에 나타내었다. 전체적인 실험 모델의 p-value는 0.1356로 통계적으로 유의하지 않다고 분석되었고 결정계수인 R-square값은 0.7519로 적어도 0.8 이상이 되어야 통계적으로 반응 모형을 신뢰할 수 있다고 보는데 이 값 또한 신뢰할 수 없다고 분석되었다. 통계적 방법을 이용하여 실험할 때 D.C.W를 중심으로 D.C.W를 높이기 위한 실험을 진행하고 있기 때문에 이와 같은 결과가 나왔다고 생각한다. 3가지 factor 간의 상호작용을 나타낸 3D 그래프와 평면 그래프를 Fig. 174-176에 나타내었다.

Table 119 CCD matrix of two variables with predicted value and experimental value of protease.

Exp No.	Culture condition			Protease (U/mL)	
	Glucose	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Predicted value	Experimental value
1	19.14	0.60	0.04	136.18	136.92
2	28.72	0.60	0.04	131.70	129.99
3	19.14	1.81	0.04	140.63	138.84
4	28.72	1.81	0.04	132.52	134.22
5	19.14	0.60	0.11	132.29	130.76
6	28.72	0.60	0.11	135.83	138.07
7	19.14	1.81	0.11	135.84	137.30
8	28.72	1.81	0.11	135.40	134.99
9	15.87	1.21	0.07	136.05	137.30
10	31.99	1.21	0.07	131.41	129.99
11	23.93	0.19	0.07	134.29	134.61
12	23.93	2.23	0.07	137.79	137.30
13	23.93	1.21	0.01	135.89	136.53
14	23.93	1.21	0.13	135.37	134.61
15	23.93	1.21	0.07	136.26	137.30
16	23.93	1.21	0.07	136.26	136.92
17	23.93	1.21	0.07	136.26	134.61

Table 120 Main effects according to trial of response surface method for protease activity.

Response 2 Protease					
ANOVA for Response Surface Quadratic Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	92.15	9	10.24	2.36	0.1356 not significant
A-Glucose	25.96	1	25.96	5.98	0.0445
B-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.65	1	14.65	3.37	0.1089
C-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.32	1	0.32	0.073	0.7949
AB	6.68	1	6.68	1.54	0.2550
AC	34.19	1	34.19	7.87	0.0263
BC	0.91	1	0.91	0.21	0.6617
A <sup>2</sup>	9.03	1	9.03	2.08	0.1925
B <sup>2</sup>	0.071	1	0.071	0.016	0.9021
C <sup>2</sup>	0.52	1	0.52	0.12	0.7391
Residual	30.41	7	4.34		
Lack of Fit	26.16	5	5.23	2.47	0.3131 not significant
Pure Error	4.24	2	2.12		
Cor Total	122.55	16			
Std. Dev.	2.08		R-Squared	0.7519	
Mean	135.31		Adj R-Squared	0.4329	
C.V. %	1.54		Pred R-Squared	-0.9287	
PRESS	236.37		Adeq Precision	6.028	

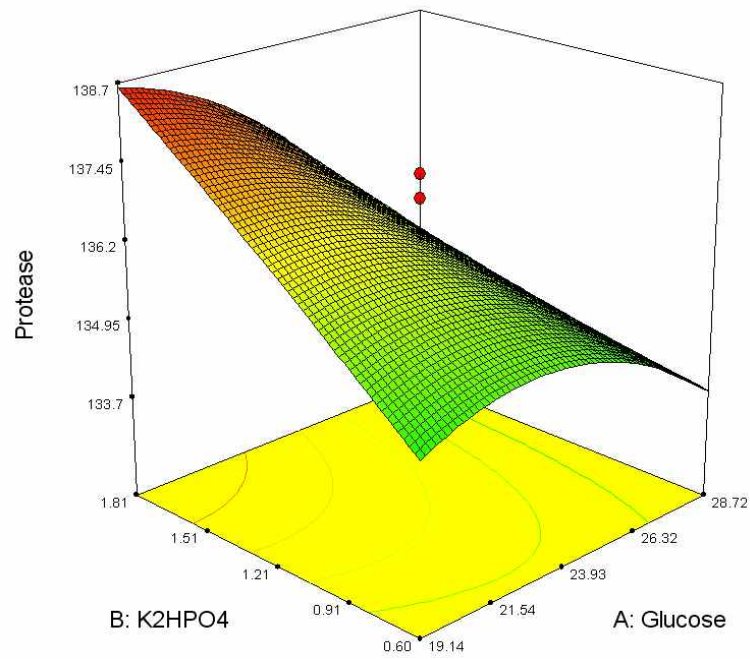
Table 121 Coefficient according to trial of response surface method for protease activity.

Factor	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Intercept	136.26	1	1.20	133.42	139.10	
A-Glucose	-1.38	1	0.56	-2.71	-0.045	1.00
B-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.04	1	0.56	-0.30	2.37	1.00
C-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-0.15	1	0.56	-1.49	1.18	1.00
AB	-0.91	1	0.74	-2.66	0.83	1.00
AC	2.07	1	0.74	0.32	3.81	1.00
BC	-0.34	1	0.74	-2.08	1.41	1.00
A <sup>2</sup>	-0.90	1	0.62	-2.36	0.57	1.16
B <sup>2</sup>	-0.079	1	0.62	-1.55	1.39	1.16
C <sup>2</sup>	-0.22	1	0.62	-1.68	1.25	1.16

\*이차다항식

$$\text{Protease} = +136.26 - 1.38 * A + 1.04 * B - 0.15 * C - 0.91 * A * B + 2.07 * A * C - 0.34 * B * C - 0.90 * A^2 - 0.079 * B^2 - 0.22 * C^2 \text{ (A: Glucose, B: K}_2\text{HPO}_4\text{, C: Na}_2\text{CO}_3\text{)}$$

(a)



(b)

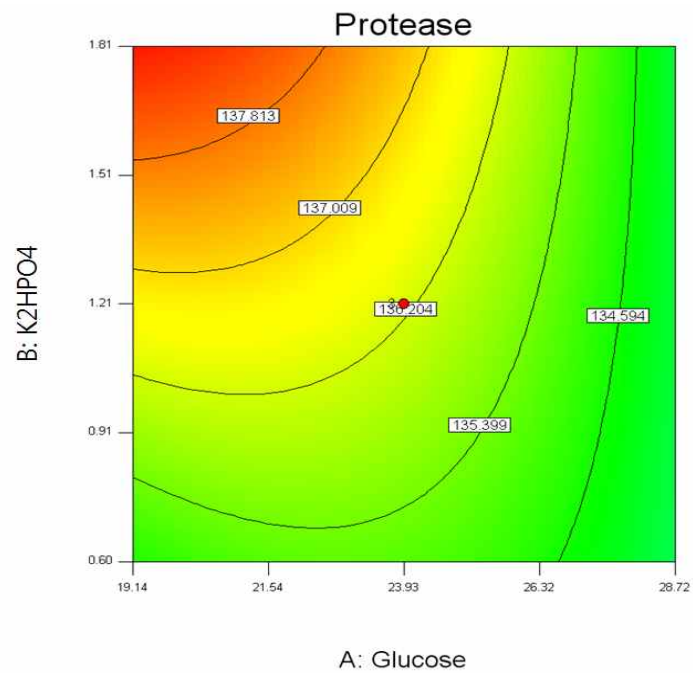
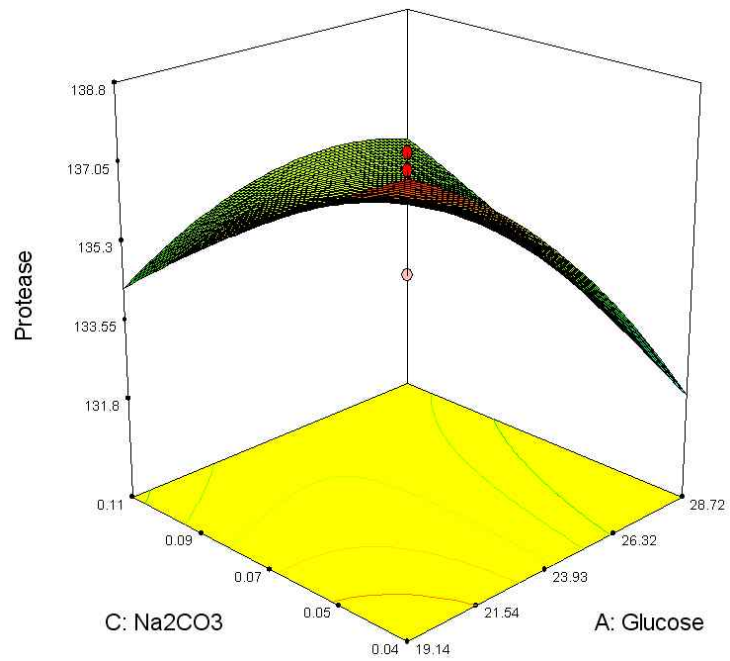


Fig. 174. Protease represent as (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of Glucose and  $K_2HPO_4$ .

(a)



(b)

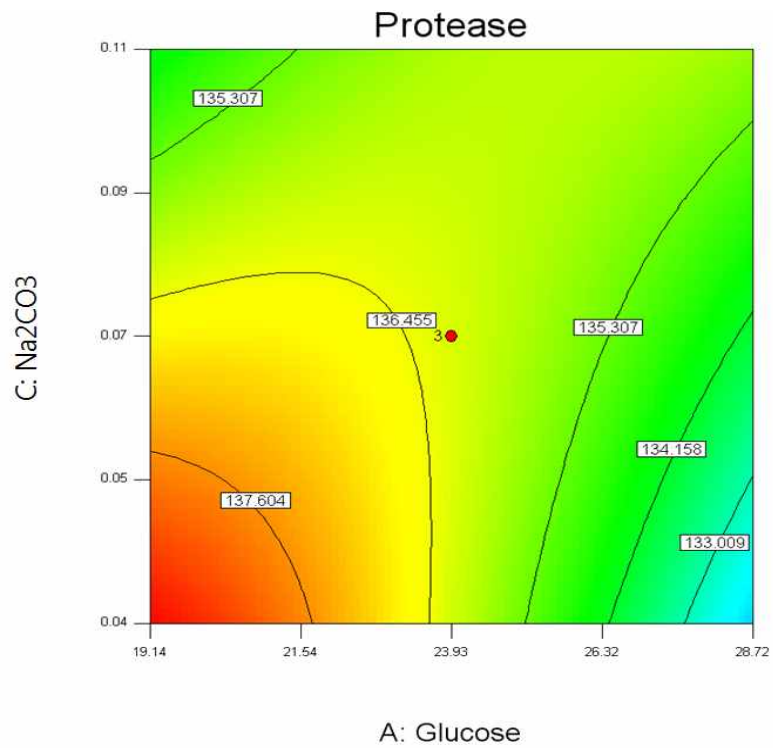
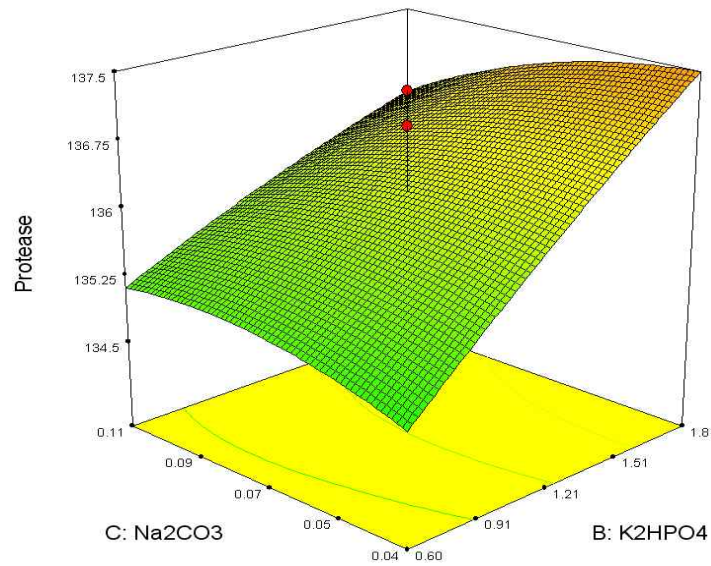


Fig. 175. Protease represent as (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of Glucose and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

(a)



(b)

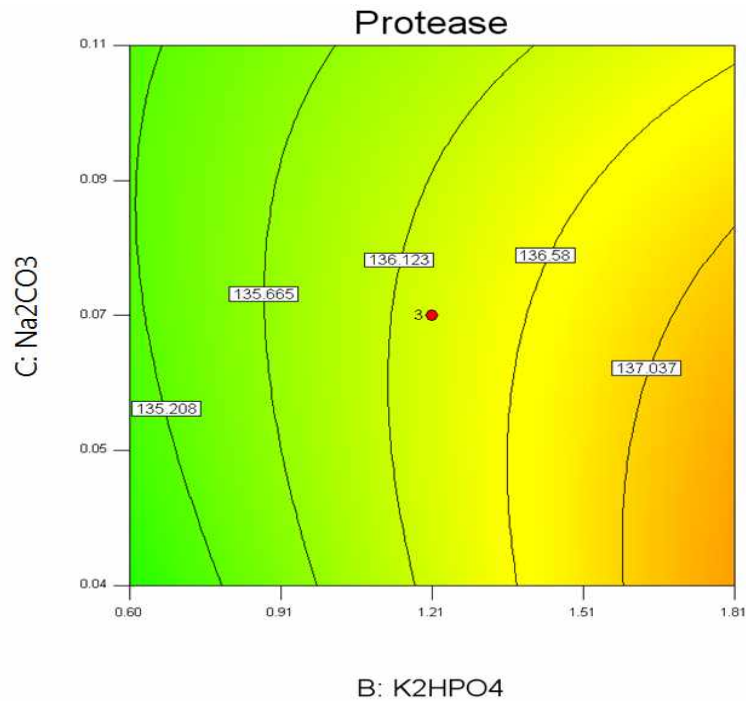


Fig. 176. Protease represent as (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

실험 디자인에서 center point로 설정한 glucose 23.93 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.21 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.07 g/L일 때 가장 높은 D.C.W를 보였으나 이는 정확한 최적점이 아니므로 point prediction을 통해 프로그램에서 예측해주는 예측값을 나타낸 Table 122의 26번 조합인 glucose 24.78 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.57 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.07 g/L 일 때 가장 높은 D.C.W값을 예측하고 있기 때문에 확인 실험을 진행하였다. 그리고 39번의 조합일 때도 D.C.W 예측값이 4.37로 26번 조합과 같은 값을 나타내지만 이 표는 소수점 두 번째 자리까지 나타낸 값으로 26번 조합일 때 예측값은 4.3749

이고 39번 일 때는 4.3733으로 소수점 세 번째 자리에서 반올림했을 때에는 같은 값이지만 실제로 넷째자리까지 보았을 때 26번 조합일 때 더 높은 예측값을 나타내기 때문에 26번 조합을 선정하여 확인실험을 진행하였다.

Table 122 Predicted value of each concentration by RSM.

	Glucose	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)
1	19.14	1.81	0.11	4.06	135.80
2	26.80	1.73	0.10	4.29	136.01
3	19.14	1.81	0.04	4.23	140.96
4	26.80	0.69	0.04	3.87	133.28
5	26.80	0.69	0.10	4.18	135.67
6	19.14	0.60	0.11	4.15	132.62
7	23.93	1.21	0.07	4.37	136.26
8	26.80	1.73	0.04	4.25	134.63
9	19.14	0.60	0.04	3.97	136.39
10	27.76	0.94	0.038	3.99	132.73
11	21.43	0.81	0.05	4.18	136.20
12	25.91	0.92	0.06	4.19	134.85
13	23.21	1.30	0.05	4.33	136.84
14	25.50	1.07	0.04	4.12	134.73
15	27.79	0.76	0.08	4.16	134.77
16	21.29	1.36	0.10	4.32	135.82
17	19.87	1.08	0.10	4.31	134.86
18	21.72	1.23	0.04	4.28	137.53
19	22.78	0.85	0.10	4.28	135.23
20	25.67	1.30	0.04	4.25	135.17
21	23.55	1.19	0.01	4.35	135.94
22	20.27	1.43	0.04	4.29	138.96
23	23.78	0.90	0.05	4.17	135.69
24	23.72	1.29	0.04	4.24	136.55
25	28.44	1.18	0.08	4.31	134.40
26	24.78	1.57	0.07	4.37	136.48
27	27.37	1.18	0.09	4.35	135.53
28	25.15	0.87	0.06	4.18	135.13
29	25.26	1.64	0.05	4.31	136.11
30	19.37	1.31	0.07	4.36	137.33
31	27.62	0.72	0.08	4.13	134.63
32	19.98	0.86	0.09	4.28	134.56
33	27.36	0.82	0.05	4.06	133.71
34	24.11	0.70	0.07	4.16	135.29
35	19.68	1.35	0.08	4.36	136.88
36	23.33	0.73	0.07	4.18	135.47
37	26.43	1.03	0.09	4.33	135.65
38	26.07	0.70	0.06	4.06	134.48
39	27.08	1.34	0.09	4.37	135.55

**(7) Supercomposing method를 통한 배지 성분 최적화**

반응물인 건조균체량 (D.C.W)과 protease의 최대생산을 위한 배지성분의 최적 조건을 확립하기 위해 supercomposing method를 사용하였다. 모든 배지성분의 반응표면을 이용하여 중복되는 범위 내에서 최적 생산 조건을 예측하였다. 세 가지 배지성분 glucose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>는 실험 범위 내 (is in range)에서 결정되도록 하였으며 반응물인 D.C.W와 protease activity는 목표치를 최대(maximize)로 설정하여 예측하였다(Table 124). 반응물의 바람직함(desirability) d, 0 ≤ d ≤ 1을 정의하여 d를 최대로 하는 최적조건을 선정하여 예측값과 실제 실험값을 비교하여 최적조건에서의 재현성을 확인하였다. 프로그램은 Design Expert pro S/W ver. 7.1을 사용하였다(Joo et al., 2012).

Table 123 Optimal constraint values obtained by a supercomposing method.

Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Glucose	is in range	19.14	28.72	1	1	3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	is in range	0.605	1.815	1	1	3
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	is in range	0.035	0.105	1	1	3
D.C.W	maximize	3.61055	4.39808	1	1	3
Protease	maximize	129.992	138.838	1	1	3

Table 124 Predicted values for the maximum response by response surface method.

Response	Maximum conditions(g/L)			Predicted value
	Glucose	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
D.C.W (g/L)	24.78	1.57	0.07	4.37
Protease(U/mL)	19.14	1.81	0.04	140.96

Point prediction을 한 결과 (Table 125), 배지 성분의 조성은 glucose 24.78 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.57 g/L와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.07 일 때 균체량은 4.37 g/L로 가장 높은 값으로 예측되었다. 그리고 배지 성분의 조성이 glucose 19.14 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.81 g/L와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.04 일 때 protease는 140.96 U/mL로 가장 높은 값으로 예측되었다. Supercomposing method를 사용하여 두 가지 반응물이 동시에 최대값을 나타내는 배지성분의 조성을 예측한 값을 Table 126에 나타내었다. Supercomposing한 결과, glucose 19.85 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.55 g/L와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 g/L일 때 균체량과 protease는 4.34 g/L와 138.84 U/mL로 각각 최대값을 나타내는 것을 예측할 수 있었다. Desirability value가 1에 가까울수록 바람직하다는 것을 알 수 있는데 이 실험에서는 0.959로 매우 높게 분석 되었다.

Table 125 Selected value for the maximum response by supercomposing method.

Solutions							
Number	Glucose	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	D.C.W	Protease	Desirability	
1	19.85	1.55	0.05	4.3351	138.838	0.959	Selected
2	19.84	1.54	0.05	4.33507	138.838	0.959	
3	19.84	1.56	0.05	4.335	138.838	0.959	
4	19.72	1.56	0.05	4.33468	138.839	0.959	

이 배지 성분의 조성대로 배지를 제조하여 예측값과 실제 실험값이 재현성이 있는지 확인 실험한 결과를 Table 126에 나타내었다.

Table 126 Comparison between predicted and observed values of response variables within the range of the optimized medium by using response surface methodology and supercomposing method.

Statistical experiment al design	Optimized medium			Response			
	Glucose (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (g/L)	Predicted value		Experimental value	
				D.C.W (g/L)	Protease (g/L)	D.C.W (g/L)	Protease (g/L)
RSM	24.78	1.57	0.07	4.37	136.26	4.33±0.05	131.92±10.06
	19.14	1.81	0.04	4.25	140.96	4.22±0.06	134.99±2.66
Super composing	19.85	1.55	0.05	4.34	138.84	4.24±0.02	133.20±5.46

실험결과, 균체량은 4.24 g/L이고 protease는 133.20 U/mL로 측정되었다(Table 126). 신뢰구간을 95%로 했을 때 예측값과 실제 실험값의 %는 균체량과와 protease 각각 97.70%, 95.94%로 나타나 재현성이 확인되었다. 통계적 실험 계획법을 이용하여 배지 성분의 최적화한 결과, *Bacillus licheniformis* BaDB 8 균주의 최적배지 조성은 Table 127에 나타내었다.



Table 127 Composition of optimum medium determined by statistical experimental design.

Component	Concentration (g/L)
Glucose	19.85
soybean meal	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.55
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.05
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01

### (8) 요약

우선 one factor at a time method (OFAT) 방법을 이용하여 탄소원, 질소원 그리고 인원을 glucose, soybean meal 그리고 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 로 각각 선정하였고, Plackett-Burman design method (P-B design)을 통해 *Bacillus licheniformis* BaDB 8 균주의 균체량 증가에 중요한 요인인 glucose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 그리고 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 찾을 수 있었다.

또한 full factorial design method (FFD) 실험을 통해 생산배지 성분 중 균체량 증가에 중요한 요인 세 가지가 모두 과량 첨가되면 균체 생산성이 저해됨을 알 수 있었다.

Response surface method (RSM)을 적용하여 각 배지 성분의 농도를 최적화시키기 위해, 3개의 중요 요인인 glucose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 그리고 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>에 대한 중심합성계획 (Central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 균체량 최대 생산 최적 배지 조성은 glucose 24.78 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.57 g/L 그리고 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.07 g/L인 것으로 측정하였고 최적배지에서의 균체량과 protease는 각각 4.37 U/mL과 136.48 U/mL이었다.

배지의 큰 소모 없이 균체량과 protease가 동시에 최대값을 나타내는 최적성분의 농도를 찾기 위해 supercomposing method를 이용하여 실험한 결과 glucose 19.85 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.55 g/L와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 g/L일 때 균체량과 protease는 4.34 g/L와 138.84 U/mL로 각각 최대값을 나타내는 것을 알 수 있었다.

*Bacillus licheniformis* BaDB 8균주의 균체량과 protease의 최대 생산을 위해 통계적 실험 방법을 이용하여 생산배지 최적화 실험 결과, 최적배지 조성은 glucose 19.85 g/L, soybean meal 10 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.55 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g/L 이었다.

### (9) 균주를 이용한 균체량과 protease의 최대 생산을 위한 발효조건 확립

#### (가) 최적 배지를 이용한 온도 선정실험

배양온도는 배양환경과 세포 내가 항상 일치하게 된다. 배양환경의 온도는 곧바로 매우 빠른 시간에 세포 내의 온도와 동일하게 되므로 세포의 반응속도, 대사의 특성, 영양요구와 균체 구성 등에 불가피하게 영향을 준다. 증식속도는 배양온도에 의하여 민감한 반응을 일으킨다. 따라서 최적 배지를 이용하여 *Bacillus licheniformis* BaDB 8 균주의 성장에 적합한 온도 조건을 찾기 위해 다

른 물리적인 조건은 동일하게 하고 배양온도를 30, 34, 38과 42°C의 네 가지의 조건에서 실험을 진행하였다. 실험결과를 Fig. 177에 나타내었다.

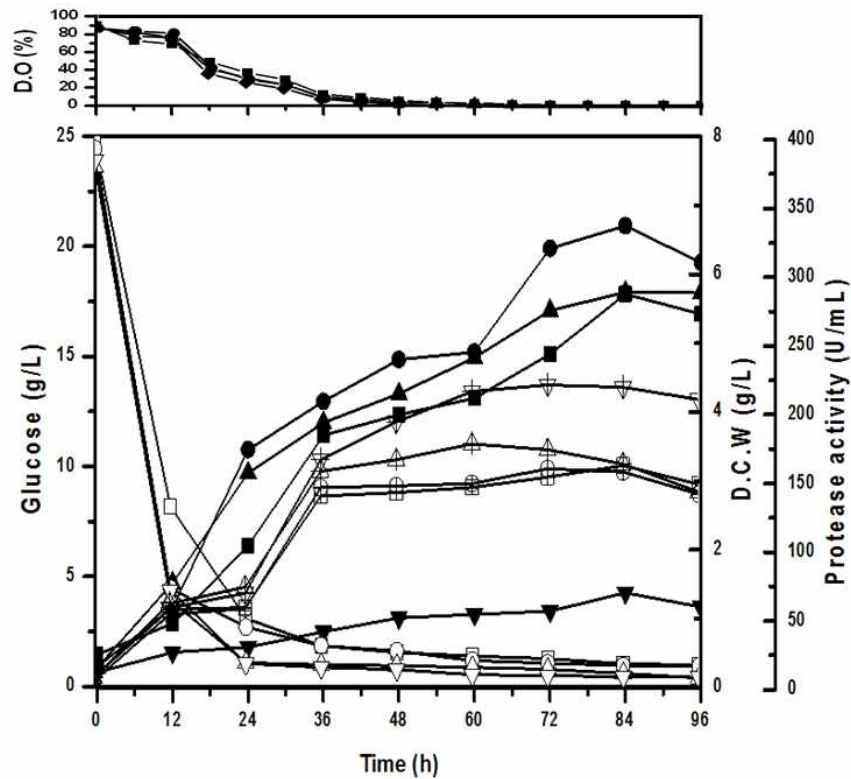


Fig. 177. Effect of various temperatures on D.C.W, protease activity, glucose and D.O in optimum medium at 200 rpm, 1 vvm and pH 7 (D.C.W: 30°C(■), 34°C(●), 38°C(▲), 42°C(◆), Protease activity: 30°C(■), 34°C(●), 38°C(▲), 42°C(◆), Glucose: 30°C(□), 34°C(○), 38°C(△), 42°C(◇), D.O: 30°C(■), 34°C(●), 38°C(▲), 42°C(◆))

34°C의 조건에서 균체량은 6.70 g/L로 가장 높았고, protease는 158.84 U/mL로 측정되었다. glucose는 0.92 g/L까지 떨어지는 것을 확인할 수 있었다 (Table 128). 34°C보다 높은 온도인 38°C와 42°C의 온도에서는 균체량이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 protease의 활성은 온도가 높을수록 활성이 증가하는 경향을 보였고, 균체량이 가장 작은 42°C에서 219 U/mL로 가장 높은 활성을 보였다. 그리고 탄소원인 glucose는 발효가 끝남에 따라 1 g/L이하로 모두 소모되는 것을 볼 수 있었다.

Table 128 Comparison of D.C.W, protease and glucose under different temperature conditions at 200 rpm, 1 vvm and pH 7.

Temperature (°C)	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)	Glucose (g/L)
30	5.71	161.14	0.98
34	6.70	158.84	0.92
38	5.74	176.92	0.39
42	1.16	219.61	0.42

(나) 최적 배지를 이용한 교반속도 선정실험

교반은 농도, 온도 그리고 그 외 성질의 기울기(gradient)를 제거함으로써 배지 내의 불균일을 해소시키는 생물 공정에서 가장 중요한 물리적 조건 중 하나이다. 발효를 위한 최적의 환경을 조성하기 위해 생물 반응기는 호기적 배양에서 산소를 포함한 모든 기질에 세포가 쉽게 접근할 수 있게 해야 한다. 단지 영양물질이 풍부한 배지를 발효기에 채우는 것만으로는 불충분하며, 만일 배양액이 잘 혼합되지 못하면 세포가 그들이 필요로 하는 물질을 빠른 속도로 소모하므로 곧 영양물질이 고갈된 지역이 생길 것이다. 만일 교반에 의해 세포물질들이 균일한 상태를 유지하지 못한다면 이러한 문제가 증폭되므로, 배양액으로부터 세포가 침강된 지역에서의 기질 농도는 급하게 영(zero)으로 떨어질 것이다. 세포의 성장이 가장 잘 일어날 수 있는 교반속도를 찾기 위해 온도 선별에서 선택된 34°C의 온도에서 교반속도를 100, 200과 300 rpm의 조건으로 다르게 하여 최적교반속도 선정 실험을 수행하였다. 실험 결과를 Fig. 178에 나타내었다. 300 rpm의 조건에서 균체량은 7.39 g/L로 가장 높았고, protease는 203.07 U/mL의 활성을 보였다 (Table 129). 그리고 glucose는 0.28 g/L까지 소모되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 최적 교반속도 조건으로 300 rpm을 선정 후 공기유속을 선정하는 실험을 진행하였다.

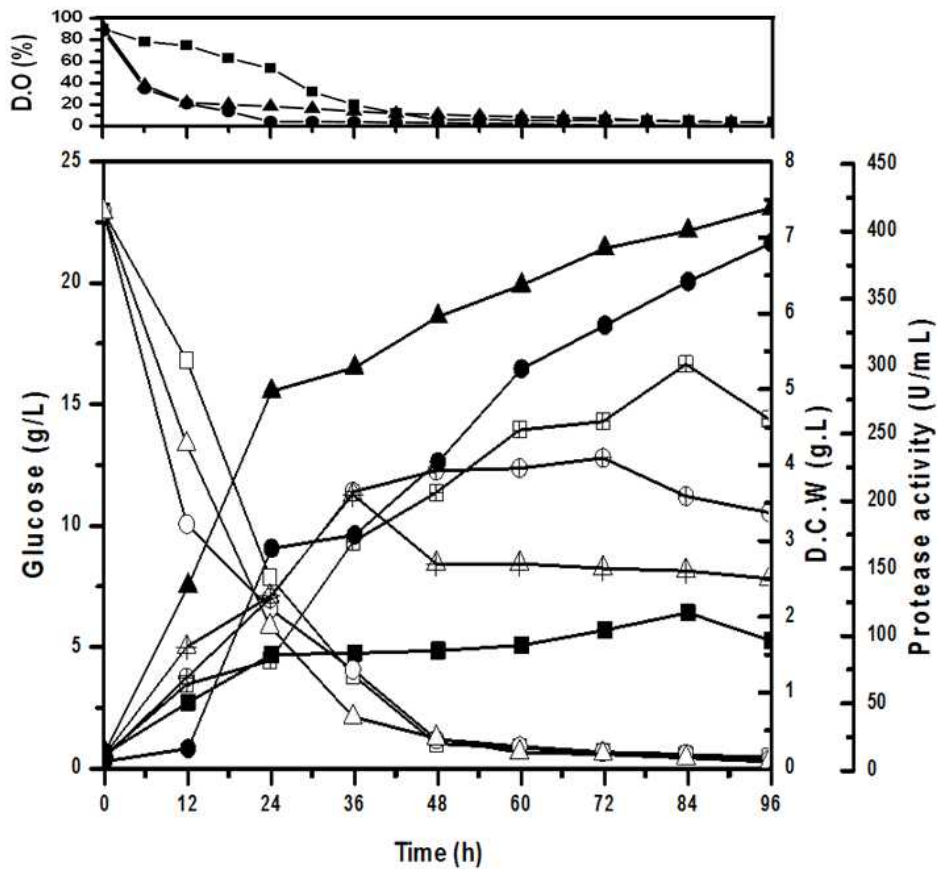


Fig. 178. Effect of various agitation speeds on D.C.W, protease activity, glucose and D.O in optimum medium at 34°C, 1 vvm and pH 7(D.C.W: 100 rpm(■), 200 rpm(●), 300 rpm(▲), Protease activity: 100 rpm(□), 200 rpm(○), 300 rpm(△), Glucose: 100 rpm(□), 200 rpm(○), 300 rpm(△), D.O: 100 rpm(■), 200 rpm(●), 300 rpm(▲)).

Table 129 Comparison of D.C.W, protease and glucose under different agitation speeds conditions at 34°C, 1 vvm and pH 7.

Agitation speed(rpm)	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)	Galactose (g/L)
100	1.68	299.61	0.47
200	6.93	230.38	0.35
300	7.39	203.07	0.28

(다) 최적 배지를 이용한 공기유속 선정실험

호기성 배양에서 사용되는 일반적인 발효조에서 산소는 임펠러 아래에 위치한 폭기 장치에 의해 배지로 공급된다. 그리도는 임펠러의 작동에 의해 배양액 전체에 기체가 고르게 분포하게 된다. 배지 내로 공급되는 공기는 산소의 양과 직결되고, 미생물의 생리현상에 지대한 영향을 준다. 이러한 공기 유속이 균체량에 미치는 영향과 적정 공기유속을 선정하기 위해 배양온도와 교반속도를 34°C, 300 rpm으로 고정시킨 후 다음 1, 2와 3 vvm의 조건에서 공기유속을 선정하는 실험을 수행하였다. 실험결과는 Fig. 179에 나타내었다. 통기량이 높을수록 균체 성장이 높을 거라는 예상과 같이 공기유속이 높을수록 균체량이 높아지는 것을 볼 수 있었고, 3 vvm의 조건에서 균체량과 protease는 10.47 g/L와 178.45 U/mL로 균체량이 가장 높은 값을 보였다 (Table 130). glucose도 0.78 g/L까지 소모되는 것을 볼 수 있었다. 균체 성장에 가장 긍정적인 영향을 주는 공기유속으로 3 vvm을 선정하였다.

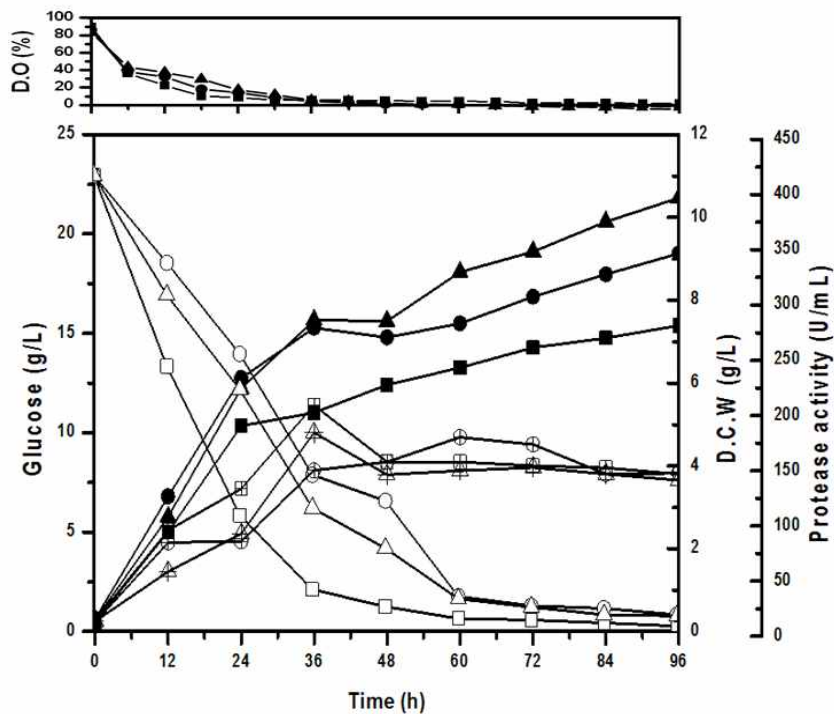


Fig. 179. Effect of various aeration rate on D.C.W, protease activity, glucose and D.O in optimum medium at 34°C, 300 rpm and pH 7 (D.C.W: 1 vvm(■), 2 vvm(●), 3 vvm(▲), Protease activity: 1 vvm(□), 2 vvm(○), 3 vvm(◇), Glucose: 1 vvm(□), 2 vvm(○), 3 vvm(△), D.O: 1 vvm(■), 2 vvm(●), 3 vvm(▲).

Table 130 Comparison of D.C.W, protease and glucose under different aeration rate conditions at 34°C, 300 rpm and pH 7.

Aeration rate (vvm)	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)	glucose (g/L)
1	7.39	203.07	0.28
2	9.13	174.22	0.84
3	10.47	178.45	0.78

(라) 최적 배지를 이용한 pH 선정실험

pH값이 세균 성장속도에 미치는 영향은 대칭적이며 배양 pH는 증식속도 이외에 탄소원과 에너지원의 대사에도 상당한 영향을 미친다. *Bacillus* 종의 배양에서 pH값은 세포벽 구성에 영향을 미친다. 원형질막의 선택적 투과성에 의해 세포 내부 pH가 배지 pH에 의하여 크게 영향을 받지 않지만 미생물 대사는 환경의 pH에 의해 쉽게 영향을 받는 것이 분명하다. 중성인 pH 7을 기준으로 배양온도, 교반속도와 공기유속을 34°C, 300 rpm 그리고 3 vvm으로 고정시킨 후 pH 6, 7과 8의 조건에서 pH 선정실험을 수행하였다. 실험 결과를 Fig. 180에 나타내었다.

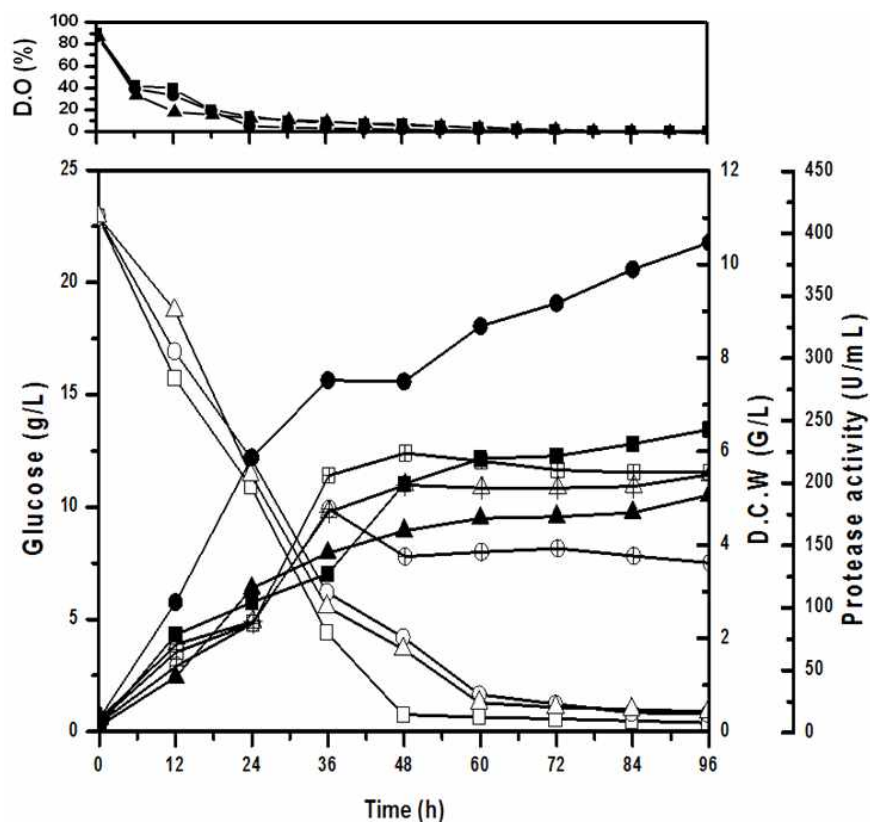


Fig. 180. Effect of various pH on D.C.W, protease activity, glucose and D.O in optimum medium at 34°C, 300 rpm and 3 vvm (D.C.W: pH 6 (■), pH 7 (●), pH 8 (▲), Protease activity: pH 6 (□), pH 7 (○), pH 8 (△), Glucose: pH 6 (□), pH 7 (○), pH 8 (△), D.O: pH 6 (■), pH 7 (●), pH 8 (▲))

pH 7의 조건에서 균체량은 10.47 g/L로 가장 높은 값을 보였고, protease는 178.45U/mL로 측정되었다(Table 131). Galactose는 0.78 g/L까지 소모되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 최적 pH는 pH 7로 선정되었다.

Table 131 Comparison of D.C.W, protease and glucose under different pH conditions at 34°C, 300 rpm and 3 vvm.

pH	D.C.W (g/L)	Protease (U/mL)	Glucose (g/L)
6	6.47	223.07	0.40
7	10.47	178.45	0.78
8	5.06	206.15	0.88

(마) 최적배지와 선정된 발효조건을 이용한 확인 실험

발효조를 이용한 발효조건 최적화 실험 결과 *Bacillus licheniformis* BaDB 8 균주의 최적 발효 조건은 34°C, 300 rpm, 3 vvm 그리고 pH 7로 선정되었다 (Fig. 181).

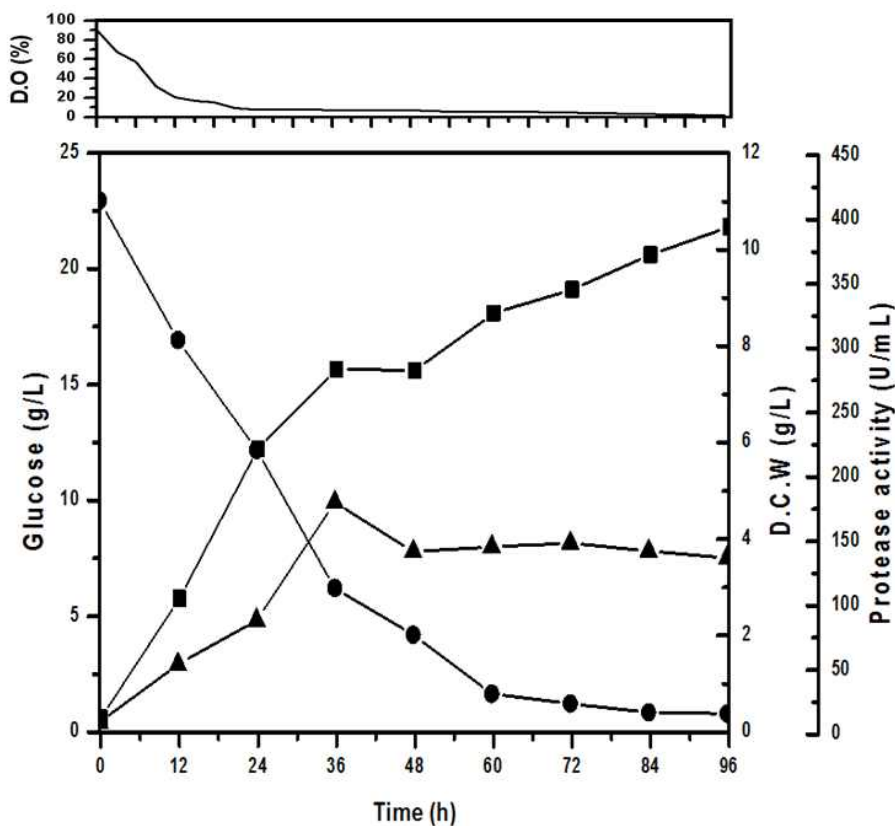


Fig. 181. Time profiles of residual glucose concentration (●), D.C.W (■), protease activity (▲) and DO (-) in batch culture using the optimized medium at 34°C, 300 rpm, 3 vvm, pH 7.

이 조건에서 균체량과 protease는 10.47 g/L와 178.45 U/mL로 최대 균체량과 protease활성을 보였다. 확인 실험을 통하여 균체량의 재현성을 확인하였고, 이때의 균체량 (10.47 g/L)과 protease (178.45 U/mL)는 최적배지를 이용하여 플라스크배양을 하였을 때보다 2.5과 1.3배 증가한 것을 볼 수 있었다. 발효조에서 배양할 경우 플라스크 배양과 다르게 임펠러에 의해 배지 농도가 균일하게 유지되도록 하는 교반 형태를 가지고 있고 또한 마개에 의해 산소의 공급이 제한되는 플라스크 발효와 달리 직접 발효에 필요한 공기를 공급해주기 때문에 이러한 결과가 나타났다고 추측할 수 있을 것이다.

#### 마. *Aspergillus oryzae* SKM 07의 통계적 방법을 이용한 배지 최적화와 발효조건 확립

##### (1) 접종량에 따른 미생물 성장곡선

곰팡이는 물과 유기물이 풍부한 성장조건에서는 영양균사가 발아되고, 효소를 이용해 유기물을 분해하여 영양분을 섭취한다. 영양분을 바탕으로 기생균사가 성장하고 물체 표면에 균사체가 서로 교차하는 균락을 형성하게 된다. 성장한 곰팡이들은 포자주머니와 분생포자들을 생성한다. 하지만 불리한 성장조건에서는 기생균사를 성장시키기보다 포자를 더 많이 형성하여 환경에 적응한다. 이러한 현상은 본 실험에서 확인 할 수 있다. 초반 영양균사가 성장 할 때는 protease의 증가가 뚜렷하게 보이지만 포자가 본격적으로 생산하기 시작하는 4~5일에는 protease 생산량이 줄어든 것을 확인 할 수 있다. 때문에 앞으로의 실험에서는 protease는 4일 째 측정하며, 포자는 7일 째 측정하는 것으로 설정한다.

접종량을 다르게 해줬을 때도 모두 비슷한 양상을 보이고 있는 것으로 확인되었다. 그 중에서도  $1.0 \times 10^6$ /ml과  $1.0 \times 10^7$ /ml을 접종하고 7일 째가 되었을 때 포자의 수가 거의 비슷한 것을 확인 할 수 있다(Fig. 182). 결과가 비슷할 경우 초기 접종량이 적은 것이 보다 효율적이기 때문에  $1.0 \times 10^6$ /ml을 초기 접종량으로 선정하고 앞으로의 실험을 진행한다.

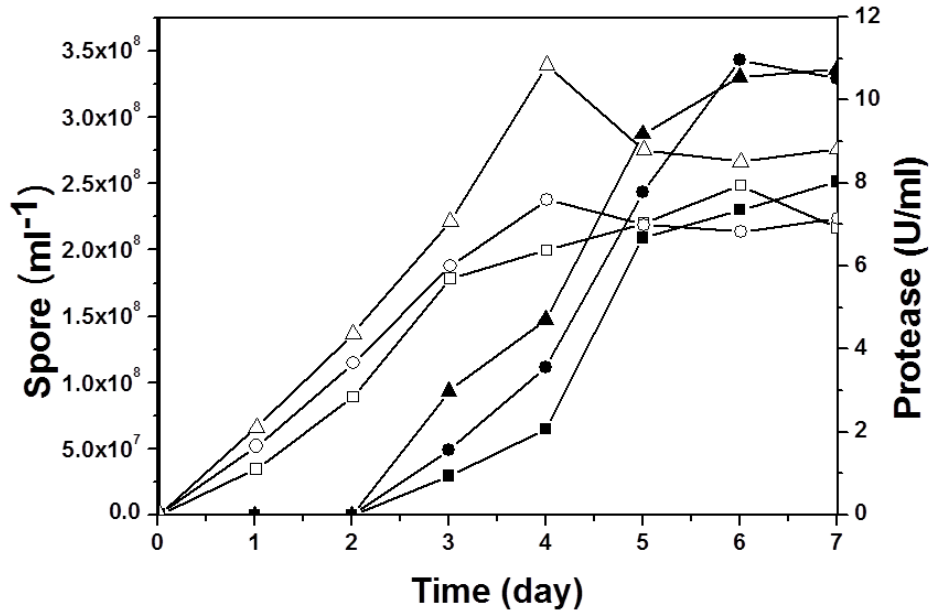


Fig. 182. Spore and Protease growth curve of *Aspergillus oryzae* SKM07 according to initial inoculum size.

spore:  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ (■),  $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ (●),  $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ (▲)

protease:  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ (□),  $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ (○),  $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ (△)

## (2) 기질 비교 실험

곡물마다 가지고 있는 특성과 영양성분이 다르기 때문에 실험에 영향을 미칠 것으로 판단하고 포자 생산성이 우수한 곡물을 선정하기 위해서 기질 비교 실험을 진행하였다. 백미를 포함한 찹쌀, 현미, 밀, 보리쌀, 콩, 귀리를 실험한 결과 콩에서 spore ( $4.36 \times 10^8$  spore/mL)와 protease (9.97 U/mL)가 가장 많이 생산된 것을 볼 수 있었다. 하지만 콩 가격이 백미의 가격이 저렴한 것을 감안해 보았을 때, 백미가 보다 효율적으로 spore ( $3.29 \times 10^8$  spore/mL)와 protease (7.59 U/mL)를 생산할 수 있다(Fig. 183). 콩이 spore와 protease의 생산량이 많은 이유는 백미보다 높은 단백질 함량에 따른 것으로 판단된다.



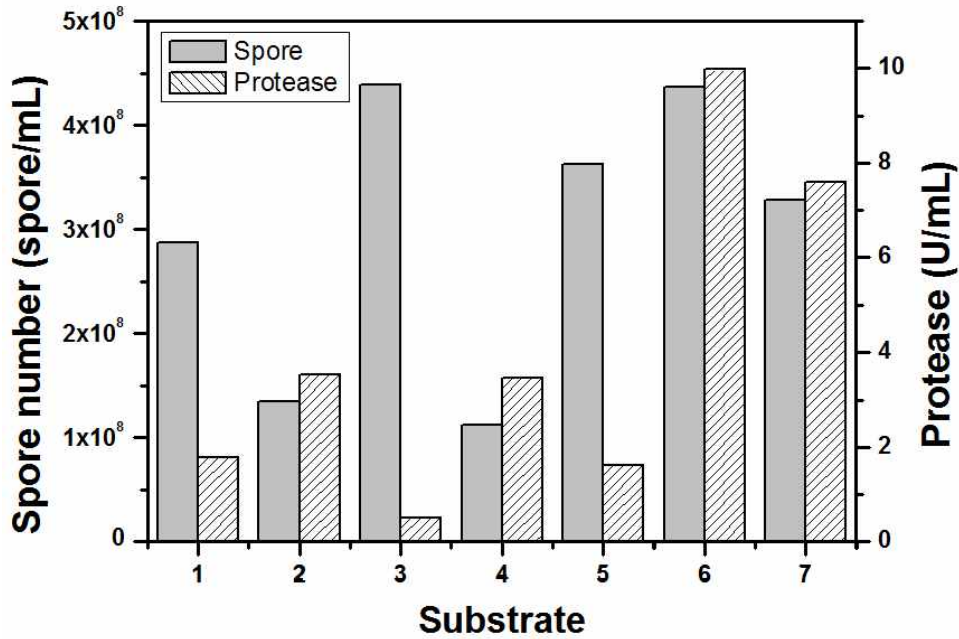


Fig. 183. Effect of substrate for spore number and protease activity of *A. oryzae* SKM07.

- |               |                   |
|---------------|-------------------|
| 1. Brown Rice | 2. Glutinous Rice |
| 3. Wheat      | 4. Barley         |
| 5. Oat        | 6. Soybean        |
| 7. Rice       |                   |

### (3) 영양원 비교 실험

#### (가) 질소원 비교 실험

기질로 선택된 쌀은 탄소원이 주된 영양원이다. 때문에 추가적인 탄소원이 필요치 않을 것으로 판단하여 탄소원 비교 실험은 생략하고 질소원 비교 실험을 진행하였다. 질소원은 세포성장 및 에너지 대사를 위해 이용될 뿐 아니라 다양한 아미노산의 공급원이다. 다양한 질소원의 이용 정도는 세포가 가진 분해 능력에 따라 좌우된다. 대부분의 발효미생물은 무기태나 유기태의 질소를 이용할 수 있고, 유기태 질소는 아미노산, 단백질 또는 요소로 공급된다. 질소는 효소를 포함한 세포 내 단백질, DNA, RNA의 원료로서 세포의 성장에 필수적이며, 배지 중의 질소량에 따라 미생물의 성장이 지배된다. 앞서 언급했듯이 각종 미생물 배양에 일반적으로 이용되는 질소원은 아미노산류 이고 미생물의 성장은 각종 아미노산을 함유한 배지에서 잘 성장 한다 (Jang et al., 2009). 본 연구에서는 콩에서 spore와 protease가 가장 많이 생산된 것을 감안하여 soybean meal과 rice bran을 포함하며  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , peptone, urea, casein 그리고 cornsteep liquor을 질소원으로 사용하여 *A. oryzae* SKM 07의 spore와 protease의 생산량에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 184). 사용된 질소원에 따라 spore 생산량은  $1.45 \sim 4.43 \times 10^8$  spores/mL 그리고 protease는 4.27~12.61 U/mL 로 확인되었다. 가장 많이 생산된 spore는 rice bran을 사용했을 때  $4.45 \times 10^8$  spore/mL으로 확인되었다.

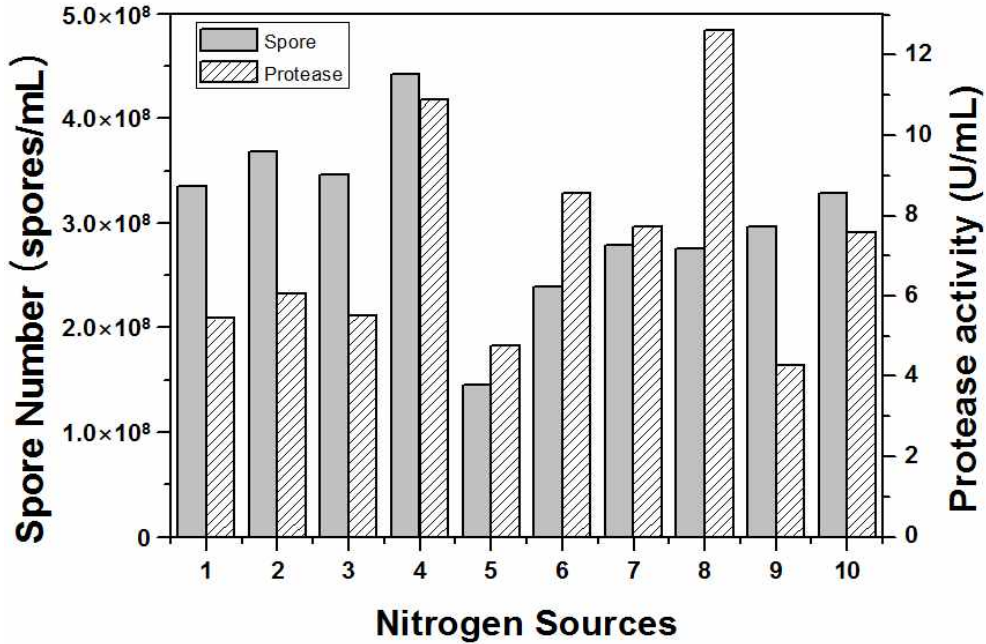


Fig. 184. Effect of nitrogen sources for spore number and protease activity of *A. oryzae* SKM07.

- |                                    |                      |
|------------------------------------|----------------------|
| 1. Yeast extract                   | 2. Soybean meal      |
| 3. Cornsteep liquor                | 4. Rice bran         |
| 5. Casein                          | 6. Urea              |
| 7. Peptone                         | 8. NaNO <sub>3</sub> |
| 9. NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 10. Control          |

#### (나) 인원 비교 실험

미생물의 생육에는 탄소원, 질소원 외에 무기질과 비타민 등이 필요하다. 특히, 인은 핵산, 인지질, 조효소의 구성원소 등 미생물 대사와 관련이 깊은 무기질이다. 또한, 인원이 첨가되는 배지의 발효에서 인의 농도는 다른 무기물 성분들보다 훨씬 더 높을 경우가 있다. 하지만 미생물의 증식기에 인의 허용량이 매우 작아서, 대수기가 끝날 때까지 소비되어 없어지는 양이 극히 소량일 때도 있다. 인은 미생물 발효시 pH를 외부에서 조절하지 않을 때 pH의 변화를 최소화하는 완충제로도 사용된다(Zeng et al., 2010). 본 연구는 미생물 배지에서 가장 많이 사용된 인원인 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 그리고 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>을 인원으로 실험을 진행하였다. 실험결과, 사용된 인원에 따라 *A. oryzae* SKM 07의 포자 생산량은 2.61~6.19×10<sup>8</sup> spores/mL, protease는 1.87~10.36 U/mL의 범위로 관찰되었다(Fig. 185). 가장 많은 포자 생산을 보인 성분은 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>로 6.19×10<sup>8</sup> spores/mL을 생산한 것을 확인 할 수 있었다.

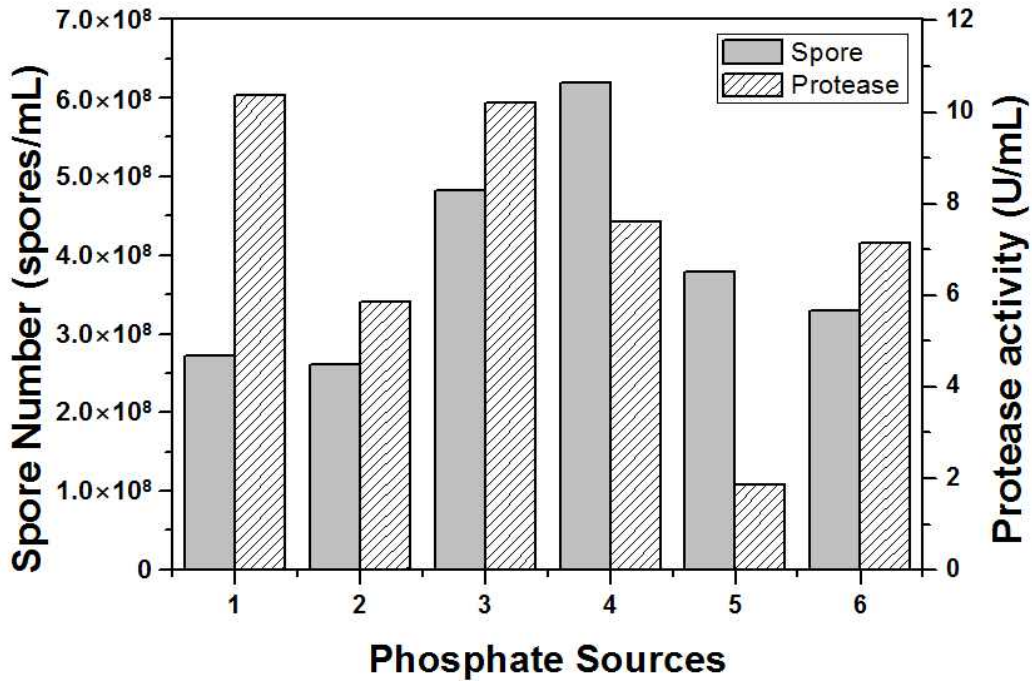


Fig. 185. Effect of phosphate sources for spore number and protease activity of *A. oryzae* SKM07.

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| 1. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>               | 2. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| 3. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |
| 5. NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 6. Control                          |

#### (다) 무기염 비교 실험

미생물은 생육에 필요한 여러 종류의 무기염류를 요구하는데 무기염류는 세포의 성분, 대사과정 중의 조효소, 세포 내 삼투압 조절에 필요하며 배지의 완충작용으로도 중요한 역할을 한다. 비교적 다량으로 필요한 무기질로서는 Mg, P, S, Ca, Cl 등이 필수원소로 알려져 있다. Ca는 아포의 내영성에 중요한 역할을 하며, 유기산을 중화하는 작용을 한다. 또한 효소를 활성화하는 인자이기도 하다. Mg는 라이보솜, 세포막, 핵산 등을 안정화하고 인산 전이효소의 cofactor로 작용한다(강옥주 et al., 2011) 연구에서는 CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>와 MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 실험을 진행하였다(Fengyu and Yingbo, 2007). 실험결과, 사용된 무기염에 따라 *A. oryzae* SKM 07의 포자 생산량은 3.24~4.88×10<sup>8</sup> spores/mL, protease는 5.59~8.53 U/mL의 범위로 관찰되었다. (Fig. 186) 가장 많은 포자 생산을 보인 성분은 CaCO<sub>3</sub>로 4.88×10<sup>8</sup> spores/mL을 생산한 것을 확인 할 수 있었다.

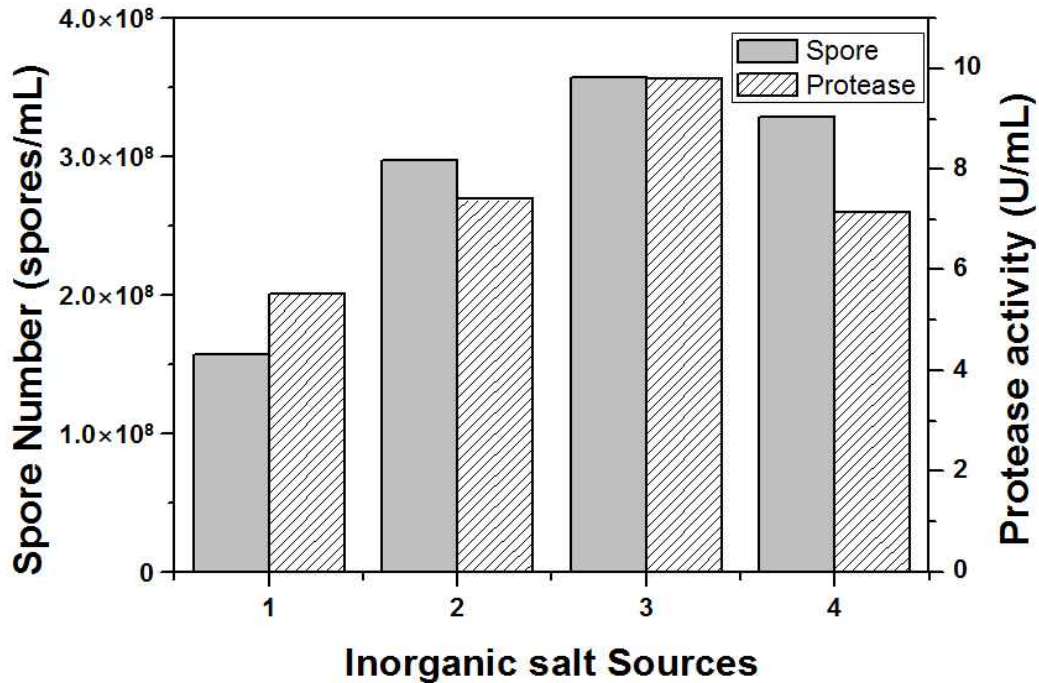


Fig. 186. Effect of inorganic salts for spore number and protease activity of *A. oryzae* SKM07.

- |                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| 1. CaCl <sub>2</sub> | 2. MgSO <sub>4</sub> |
| 3. CaCO <sub>3</sub> | 4. Control           |

## (2) Plackett-Burman design method에 의한 최대 영향요인 선택

Plackett-Burman design method에 의한 실험은 적은 실험횟수로 중요한 변수만을 선별하는 장점이 있지만, 각 변수들 간의 상호작용에 대한 정보는 얻을 수 없게 된다. 본 실험은 포자 생산에 가장 많은 영향을 미치는 중요변수를 얻기 위하여 PBD를 실시하였고, 이 결과를 토대로 중요인자를 선별 하였다(Kim and Park, 2011). 본 연구에서는 PBD에 의한 배지조성과 각 성분의 농도에 대한 실험설계(Table 132)에 따라 실험한 결과 포자수 생산이 가장 높은 배지 성분은 M8배지로 포자수는  $7.20 \times 10^8$  로 나타났다(Table 133). 첨가하는 영양원의 양이 많지 않아 농도 조절은 50%로 정하였다. 결과를 분석해보면 rice, rice bran, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 그리고 온도는 포자 생산에 긍정적인 보이는 반면, CaCO<sub>3</sub>와 moisture는 부정적인 영향을 보였다(Fig. 187). 이를 토대로 pareto plot을 분석해 보면, rice 40.96%, CaCO<sub>3</sub> 17.96%, rice bran 15.81% 그리고 moisture 14.01% 순서로 포자 생산에 영향을 미치는 저도가 큰 배지 성분임을 확인하였다(Fig. 188). rice의 경우 우월한 수준으로 큰 영향을 미치지만 다른 3가지 요소는 비슷한 수준이기 때문에 총 4가지 요소를 선정하고 변수들 간의 상호작용을 알아보기 위해 full factorial design method를 진행한다.

Table 132 High and Low factor of Plackett–Burman design (6 component).

	Rice(g)	Rice bran(g)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	CaCO <sub>3</sub> (g)	Temp. (°C)	Moisture (%)
<b>Factor</b>	A	B	C	D	E	F
<b>High (+)</b>	12	0.15	0.15	0.15	35	50
<b>0</b>	10	0.1	0.1	0.1	30	40
<b>Low (-)</b>	8	0.05	0.05	0.05	25	30

Table 133 Plackett–Burman design for six variables.

Trial	Variables						Spore Number (spores/mL)	Protease activity (U/mL)
	A	B	C	D	E	F		
M1	+	+	-	+	+	+	5.43×10 <sup>8</sup>	8.45
M2	-	+	+	-	+	+	3.67×10 <sup>8</sup>	3.73
M3	+	-	+	+	-	+	3.84×10 <sup>8</sup>	10.67
M4	-	+	-	+	+	-	4.09×10 <sup>8</sup>	7.91
M5	-	-	+	-	+	+	5.23×10 <sup>8</sup>	3.71
M6	-	-	-	+	-	+	2.95×10 <sup>8</sup>	12.07
M7	+	-	-	-	+	-	6.10×10 <sup>8</sup>	6.97
M8	+	+	-	-	-	+	<b>7.20×10<sup>8</sup></b>	<b>9.62</b>
M9	+	+	+	-	-	-	7.01×10 <sup>8</sup>	6.40
M10	-	+	+	+	-	-	5.07×10 <sup>8</sup>	9.22
M11	+	-	+	+	+	-	6.38×10 <sup>8</sup>	8.93
M12	-	-	-	-	-	-	3.56×10 <sup>8</sup>	7.00

Table 134 Coefficient, P-value and t-value for Plackett–Burman design study of spores.

Factor	Coefficient	P-value	t-value
Rice	9.50×10 <sup>7</sup>	0.5644	0.0663
Rice bran	3.67×10 <sup>7</sup>	0.3946	-0.8896
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.56×10 <sup>7</sup>	0.3404	-1.0010
CaCO <sub>3</sub>	-4.17×10 <sup>7</sup>	0.4080	0.8637
Temperature	1.06×10 <sup>7</sup>	0.3282	-1.0279
Moisture	-3.25×10 <sup>7</sup>	0.3835	0.9114

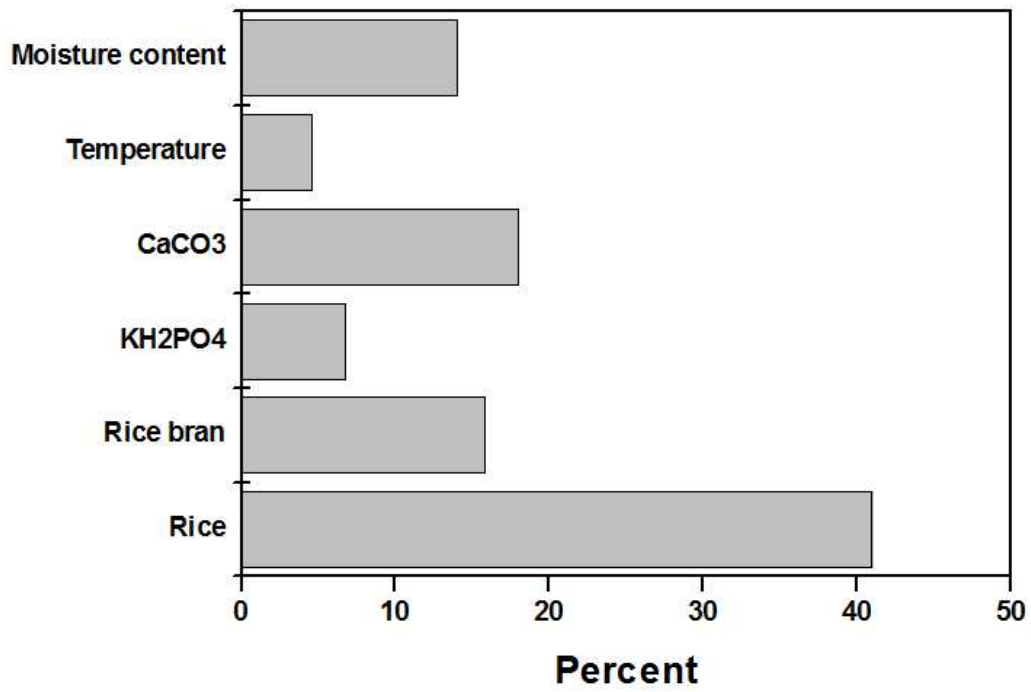


Fig. 187. Pareto plot for Plackett-Burman design parameter estimates for spores numbers.

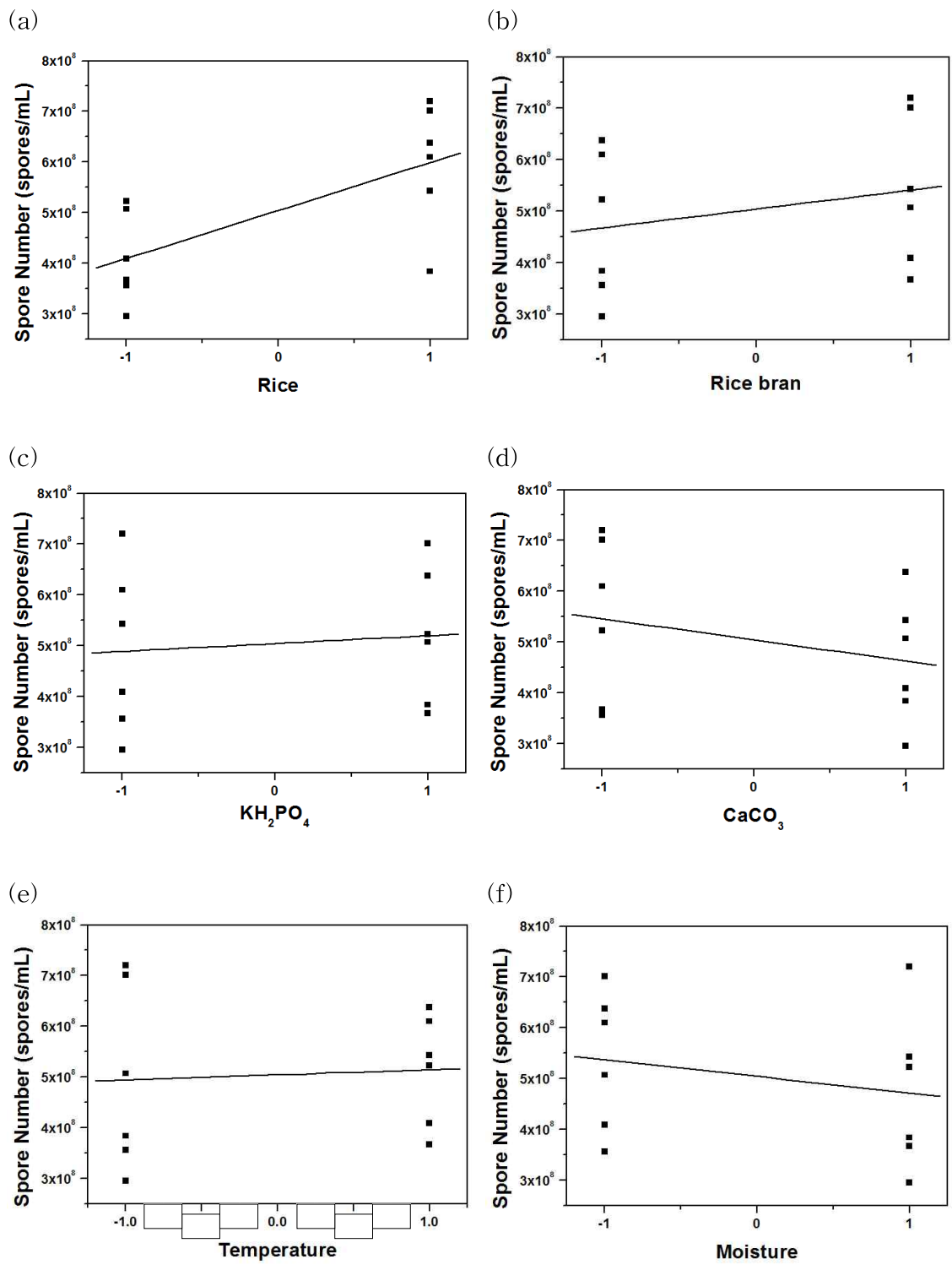


Fig. 188. Plot of observed spore in a Plackett-Burman design study.  
 (a) Rice, (b) Rice bran, (c)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (d)  $\text{CaCO}_3$ , (e) Temperature, (f) Moisture.

### (3) Full factorial design method에 의한 중요 영향 인자간의 상호작용 확인

Plackett-Burman design(PBD)과 *A.oryzae* SKM 07의 포자수 생산에 영향을 미치는 4가지 요인은 rice, CaCO<sub>3</sub>, rice bran 그리고 moisture로 확인되었다. 하지만 PBD의 경우 요소들 간의 상호작용을 확인 할 수 없으므로 Full factorial design(FFD) 실험을 진행하였다. PBD 결과를 바탕으로 high level과 low level을 설정한 후(Table 135) 총 16가지 배지조건을 Table 136에 나타내었다.

Table 135 Composition of selected production medium for full factorial design study.

Component	High (+)	Low (-)	Factor
Rice	12g	8g	A
CaCO <sub>3</sub>	0.15g	0.05g	B
Rice bran	0.15g	0.05g	C
Moisture content	50%	30%	D

그 결과, 가장 많은 포자수를 생산한 배지는 7M 배지로 포자수가  $6.00 \times 10^8$  spores/mL로 확인되었다. ANOVA 분석을 한 결과, rice, CaCO<sub>3</sub> 그리고 rice bran의 농도는 증가 시킬수록 포자수 생산성이 증가하였고, moisture는 낮아질수록 포자수가 증가함을 확인하였다. 또한 4가지 요인들의 각각의 농도 변화에 따른 생균수 생산에 미치는 영향은 Fig. 189에 제시하였다. 모델식 역시 회석배수를 제외하면 다음과 같이 나타낼 수 있다. 이 식에 각 항의 계수는 Design expert 7 pro S/W의 다중 회귀분석에 의한 결과이다. 각 변수들의 effect list는 Table 137에 나타내었다.

$$\begin{aligned} \text{Spore} = & 4.28 \times 10^8 + 0.35 \times 10^8 * A + 0.13 \times 10^8 * B + 0.055 \times 10^8 * C - 0.24 \times 10^8 * D \\ & - 0.029 \times 10^8 * A * B - 0.039 \times 10^8 * A * C - 0.22 \times 10^8 * A * D + 0.22 \times 10^8 * B * C \\ & - 0.26 \times 10^8 * B * D - 0.50 \times 10^8 * C * D \end{aligned}$$



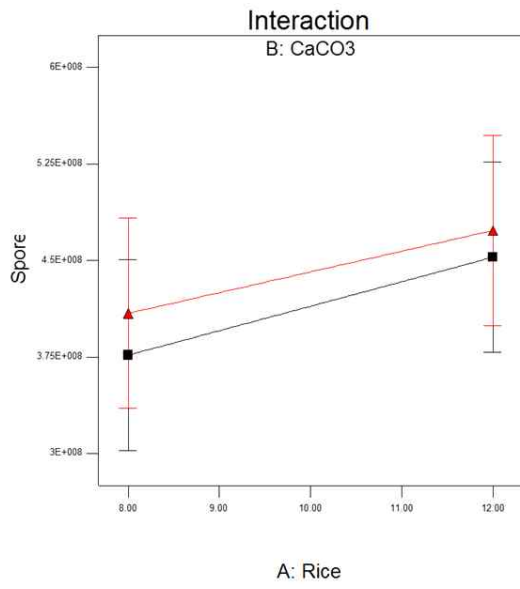
Table 136 Experimental matrix for 4-factor full factorial design and product.

Trial	Variable				Spore yield ( $\times 10^8$ )	Protease
	Rice	CaCO <sub>3</sub>	Rice bran	Moisture content		
M1	-	-	-	-	3.03	8.312
M2	+	-	-	-	4.86	11.080
M3	-	+	-	-	3.40	11.271
M4	+	+	-	-	4.58	17.141
M5	-	-	+	-	3.38	9.720
M6	+	-	+	-	5.23	11.462
M7	-	+	+	-	6.00	10.245
M8	+	+	+	-	5.70	12.726
M9	-	-	-	+	5.23	7.000
M10	+	-	-	+	4.12	10.555
M11	-	+	-	+	3.68	8.217
M12	+	+	-	+	4.89	10.650
M13	-	-	+	+	3.42	7.382
M14	+	-	+	+	3.90	9.219
M15	-	+	+	+	3.28	8.241
M16	+	+	+	+	3.76	9.982

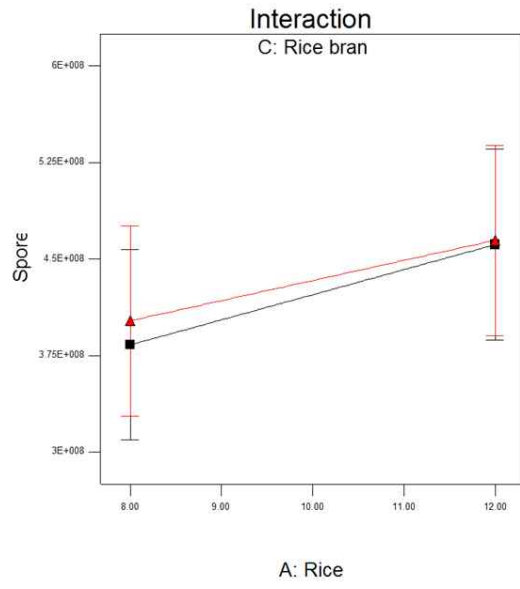
Table 137 Main effect of medium components in full factorial design experiments.

	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
	Intercept			
M	A-Rice	7.021E+007	1.972E+016	14.89
M	B-CaCO <sub>3</sub>	2.667E+007	2.844E+015	2.15
M	C-Rice bran	1.104E+007	4.877E+014	0.37
M	D-Moisture	-4.896E+007	9.588E+015	7.24
M	AB	-5.833E+006	1.361E+014	0.10
M	AC	-7.708E+006	2.377E+014	0.18
M	AD	-4.354E+007	7.584E+015	5.73
M	BC	4.375E+007	7.656E+015	5.78
M	BD	-5.292E+007	1.120E+016	8.46
M	CD	-9.979E+007	3.983E+016	30.08

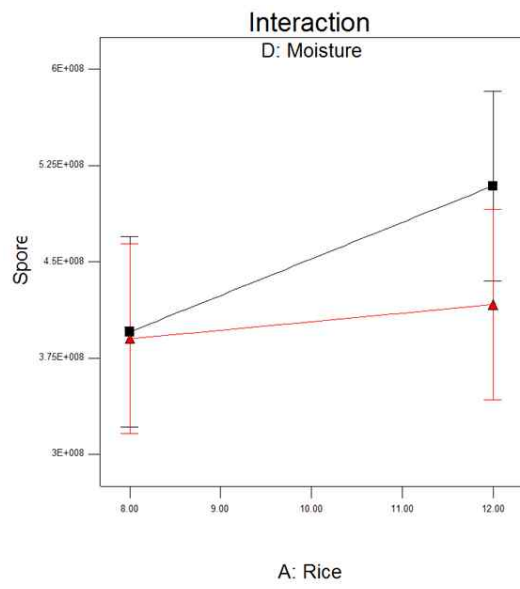
(a)



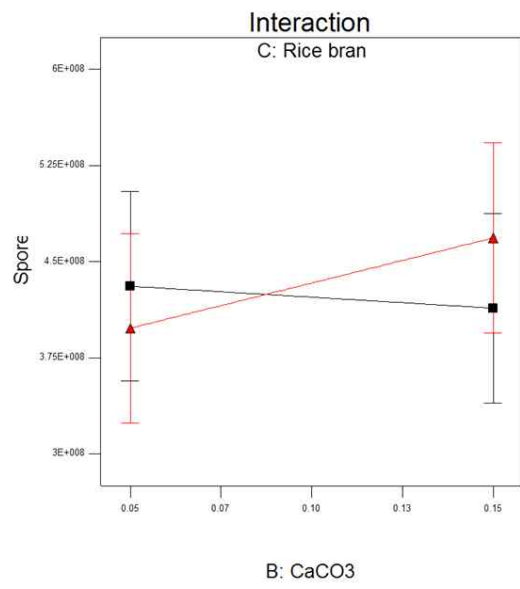
(b)



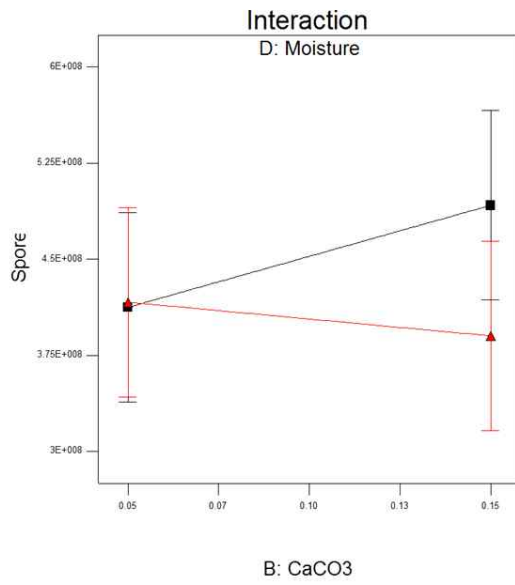
(c)



(d)



(e)



(f)

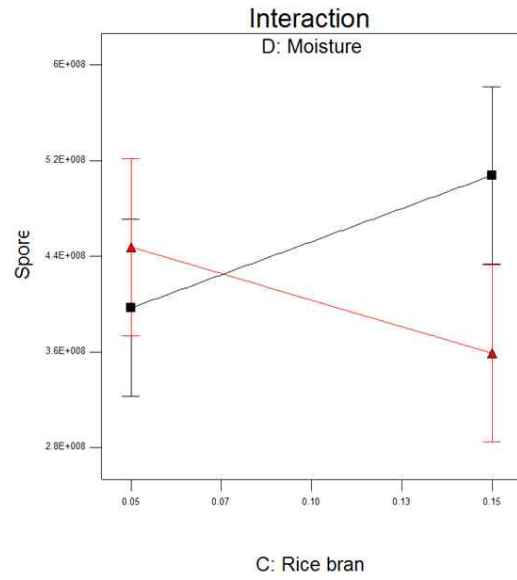


Fig. 189. Two-factor interaction obtained from full factorial design experiments.

(■; low level, ▲; high level)

(a) Rice-CaCO<sub>3</sub>, (b) Rice-Rice bran, (c) Rice-Moisture,

(d) CaCO<sub>3</sub>-Rice bran, (e) CaCO<sub>3</sub>-Moisture, (f) Rice bran-Moisture

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011)	전통장류로부터 곰팡이, 세균 그리고 효모의 총체적인 분리 및 발효미생물의 최적배양시스템 구축	저염 발효에 필수적인 <b>부패 억제 항진균 및 항세균</b> 특성을 가지는 <i>Bacillus subtilis</i> / <i>B. licheniformis</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> / <i>Rhizopus</i> sp.를 20종 이상 분리	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전통 장류로부터 저염 장류 생산 시 문제되는 부패 유해 균주에 대해 항균 특성을 지닌 <i>Bacillus licheniformis</i> 25 종(국제 특허 출원균주 1종 포함)분리</li> <li>• aflatoxin 비생산, 고 protease 및 고 amylase 생산, biogenic amine을 생산하지 않는 <i>Aspergillus oryzae</i> 9종의 분리</li> </ul>
		저염화장류개발을 위한 전통장류로부터 <b>발효효모</b> 균집분석/ 알코올발효우수 균주 분리법의 확립/향미우수균주 분리법의 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 숙성과정별로 수집된 전통발효장류 (메주, 간장)로부터 효모 700주 분리</li> <li>• 숙성과정별 전통발효장류(간장)의 향미성분 변화양상 검토</li> <li>• 우수 균주 선발을 위한 알코올, 휘발성 페놀 등 향미성분 추출방법, rapid yeast screening, TLC, GC 분석 방법의 확립</li> <li>• Culture collection: 장류유래 효모균주의 알코올 생성능 및 향미성분 생성능 유무 검토함으로써 고 알코올 생성능을 보이는 균주 18주와 4-EG를 생성하는 효모균주 3주와 vanillin을 생성하는 효모균주 3종을 선발함</li> <li>• 숙성과정별 전통발효장류(메주, 간장)으로부터 분리된 효모 200주를 대상으로 알코올생성능 시험을 통해 고 알코올 생성능을 보이는 효모균주 24주를 선발함</li> <li>• 숙성과정별 전통발효장류(메주, 간장)으로부터 분리된 효모 200주를 대상으로 4-EG를 생성하는 효모 126주와 vanillin을 생성하는 효모균주 1종, 2-methyl butanol 및 3-methyl butanol을 생성하는 효모균주 1종을 선발함</li> </ul>
		발효미생물 균체 대량생산 scale-up 배양공정에 대비한 저가의 산업용 복합 생산배지 개발/ 발효미생물 균체의 액상·고상 배양을 위한 <b>최적 발효조 확립</b>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효미생물 균체의 산업적 대량생산을 위한 저가의 최적 생산배지 개발(성분, 농도, 배양조건 등 최적화)</li> <li>• 최적의 용존산소공급량 결정 및 이를 통한 scale-up 자료 확보(효모, 세균)</li> <li>• Plackett-Burman design 분석과 Response surface method에 의한배지 최적화 및 고체 배양 조건 확립(곰팡이)</li> </ul>
2차 년도 (2012)	전통장류로부터 곰팡이, 세균 그리고 효모의 총체적인 분리 및 발효미생물의 최적배양시스템 구축	전국 수집 장류 샘플들로부터 저염 발효에 필수적인 <b>부패 억제 항진균 및 항세균</b> 특성을 가지는 <i>Bacillus subtilis</i> / <i>B. licheniformis</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> / <i>Rhizopus</i> sp.를 40종 이상 분리	120	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 저염 장류의 부패형성 산막 효모의 증식을 억제하는 11종의 산업용 <i>Bacillus</i> 발효 균주의 분리</li> <li>• 저염 장류의 부패에 관여하는 <i>Staphylococcus</i> 속의 증식을 억제하는 10종의 <i>Bacillus</i> 균주의 분리</li> <li>• 저염장류 부패에 관여하는 <i>Staphylococcus</i> 속의 증식을 억제하는 13종의 <i>Weissella</i> 균주의 분리</li> <li>• 발효 장류에 사용할 수 있는 11종의 <i>Aspergillus</i>, <i>Rhizopus</i>, <i>Mucor</i> 분리</li> </ul>
		• 전통장류 제조용 <b>우수효모</b> 선발/ 고알코올생성 및 향미성분 활성의 분석	120	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 장류의 숙성과정별 수집 완료</li> <li>• 숙성과정별로 수집된 효모균주의 균집분석을 통한 발효과정별 효모 천이상태 변화양상 검토 <ul style="list-style-type: none"> <li>- PCR-DGGE 기법을 통한 숙성과정별 발효장류의 효모 균집분석(unculture-based techniques)</li> <li>- 효모 선택배지 기법을 통한 숙성과정 별 발효</li> </ul> </li> </ul>

				<p>장류의 효모 균집분석(culture-based techniques)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효장류의 숙성과정별 향미성분 변화와 효모 천이상태와의 상관관계 분석</li> <li>• 장류 분리 효모로부터의 우수 균주 선발: 숙성과정별 장류로부터 효모균집 약 1,200점 분리 완료 및 분리된 약 1,200점 효모를 대상으로 고알코올생성능 및 고 향미성분 생성능 분석 및 고 알코올생성 효모 선발</li> <li>• 선발된 우수 효모균주의 코지 장류 적용가능성 검토</li> <li>• 염농도 8, 11, 14%로 조정된 장류발효에 있어서 부패 균주 및 이화학적 변화 검토</li> </ul>
		2차년도 저염 된장·간장 우수 발효미생물 균체 대량생산 scale-up 배양공정에 대비한 저가의 산업용 복합 생산배지 개발/ 발효미생물 균체의 액상·고상 배양을 위한 <b>최적 발효조 확립</b>	120	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효미생물 균체의 산업적 대량생산을 위한 저가의 최적 생산배지 개발(성분, 농도, 배양조건 등 최적화)</li> <li>• 최적의 용존산소공급량 결정 및 이를 통한 scale-up 자료 확보(효모, 세균)</li> <li>• Plackett-Burman design 분석과 Response surface method에 의한배지 최적화 및 고체 배양 조건 확립(곰팡이)</li> </ul>
3차년도 (2013)	전통장류로부터 곰팡이, 세균 그리고 효모의 총체적인 분리 및 발효미생물의 최적배양시스템 구축	저염 된장 고추장의 제조 시 주로 존재하는 부패 세균, 효모 및 곰팡이의 분리 및 동정/ 전통 장류와 메주로부터 이들 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 주요 발효 <i>Bacillus</i> 및 유산균의 분리 및 동정과 실증 실험으로 검증	120	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 저염 부패 장류의 pyrosequencing을 통한 세균 균집 비교</li> <li>• 저염 부패 장류로부터 부패 세균 분리 및 동정</li> <li>• 전통 장류로부터 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 주요 발효 <i>Bacillus</i>(Amylase 활성, Protease 활성, glutamate 고생산, biogenic amine 비생산 및 고분해능) 및 20종 분리 및 동정</li> <li>• 전통 장류로부터 부패균에 대해 강한 길항 작용을 가지는 주요 발효 <i>Leuconostoc</i> / <i>Weissella</i>(biogenic amine 비생산 및 고분해능) 분리 및 동정</li> <li>• 전통 장류로부터 상업적으로 사용 가능한 <i>Aspergillus oryzae</i>(Amylase 활성, Protease 활성, Aflatoxin 비생성) 20종 분리 및 동정</li> </ul>
		고알코올생성 및 향미성분 관련 유전자 칩 및 특성/유전자의 발현/ 효소의 정제 및 특성/ 신규분리균주의 발효/ 최적조건의 검토/ 장류 발효에의 적용을 위한 <b>균주의 제공</b>	120	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 장류의 발효과정에 관여하는 효모균집의 종/속별 생육특성, 대사특성 및 효소역가 시험</li> <li>• 장류의 발효효모 별 장류발효 적합성 검토 및 균주별 비교분석(염도별, 장류 포함된 배지에서의 성장)</li> <li>• 분리 신규의 우수효모의 최적생육조건의 검토</li> <li>• 우수 효모를 저염화된 장류에 적용함으로써 저염 장류 제조시의 부패억제능, 향미 증진능 시험 및 통계학적 분석</li> <li>• 우수 효모 유래 고알코올 생성 관련 유전자의 클로닝 및 alcohol dehydrogenase 효소의 Nuclotide 서열확득</li> <li>• 장류의 저염화 및 발효를 위해 선발 및 개량된 신규의 우수효모 제공 및 그 특성에 대한 정보를 제공함</li> </ul>
		2차년도 발굴된 발효미생물 균체 대량생산 scale-up 배양공정에 대비한 저가의 산업용 복합 생산배지 개발/ 발효미생물 균체의 액상·고상 배양을 위한 <b>최적 발효조 확립</b>	120	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효미생물 균체의 산업적 대량생산을 위한 저가의 최적 생산배지 개발(성분, 농도, 배양조건 등 최적화)</li> <li>• Plackett-Burman design 분석과 Response surface method에 의한배지 최적화 및 고체 배양 조건 확립(곰팡이)</li> </ul>

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 1절 연구개발 성과

### 1. 학술분야

본 연구결과 관련 특허 5건, SCI 논문 6건, 국내 비SCI 논문 4편을 게재 또는 게재중에 있으며, 3건의 유전자원 등록을 추진하였음.

#### 가. 논문 게재

- (1) 김용상, 정진오, 조성호, 정도연, 엄태봉. 2012. 전통고추장에서 유해균 억제 및 Biogenic Amines 분해 능력을 가지는 *Bacillus licheniformis* SCK B11의 분리. 미생물학회지 48(2), 163-170 (2012.06) - 비SCI급
- (2) Gwon HJ, Yoshiok H, Song NE, Kim JH, Song YR, Jeong DY, Baik SH. 2012. Optimal production of L-threo-2,3-dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS) on a large scale by diastereoselectivity-enhanced variant of L-threonine aldolase expressed in *Escherichia coli*. Prep. Biochem. Biotechnol. 42(2), 143-154 (2012.03) - SCI급
- (3) 김용상, 조성호, 정도연, 엄태봉. 2012. 전통장류에서 Biogenic Amines 분해 능력을 가지는 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 분리. 미생물학회지 48(3), 220-224 (2012.09) - 비SCI급
- (4) Young-Ran Song, Do-Youn Jeong, Sang-Ho Baik. 2013. Optimal production of exopolysaccharide by *Bacillus licheniformis* KS-17 isolated from kimchi. Food Science and Biotechnology 22(2), 417-423 (2013.04) - SCI급
- (5) Song YR, Jeong DY, Cha YS, Baik SH. 2013. Exopolysaccharide produced by *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from the Korean traditional rice wine, makgeolli. Journal of Microbiology and Biotechnology. 23(5), 681-688 (2013.05) - SCI급
- (6) 전세봄, 류명선, 김용상, 조승화, 정도연, 엄태봉. 2013. 저염 장류에서 증식하는 산막효모에 길항 작용을 갖는 *Bacillus* 균주의 분리, 미생물학회지 49(3), 286-291 (2013.09) - 비SCI급
- (7) Young-Ran Song, Nam-Sik Shin, Sang-Ho Baik. 2014. Physicochemical and functional characteristics of a novel fermented pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves-based beverage using lactic acid bacteria. Food Science and Biotechnology 23(1), 187-194 (2014.02) - SCI급
- (8) Young-Ran Song, Nam-Sik Shin, Sang-Ho Baik. 2014. Physicochemical properties, antioxidant activity and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase of a novel fermented pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves-based vinegar. International Journal of Food Science and Technology 49, 2491-2498 (2014.10) - SCI급
- (9) 오현화, 류명선, 허준, 전세봄, 김용상, 정도연, 엄태봉. Characterization of biogenic amines-reducing *Pediococcus peatosaceus* isolated from traditionally fermented soybean

- products. 한국미생물학회지. Accepted (2014.09) - 비SCI급
- (10) 임소연, Elijah Nyakudya, 이유리, 전계택, 정도연, 정용섭. Optimization of medium composition and repeated-batch cultivation of *Bacillus licheniformis* SCK 12105. Journal of Microbiology and Biotechnology. *In revision* (2014.10) - SCI급

#### 나. 학술발표

- (1) 백상호. Functional evaluation and screening of useful microorganisms from fermented foods. 2012 한국미생물생명공학회 국제학술대회. Lecture (2012.06)
- (2) 김용상, 정도연, 엄태봉. Isolation of biogenic amine degrading microorganisms from traditionally fermented soybean products and their properties. 2012 한국미생물생명공학회 국제학술대회. Lecture (2012.06)
- (3) 백상호. Development of High value-added low salt products for microorganism. 2012 한국식품영양과학회 국제학술대회, Lecture (2012.11)
- (4) 송영란, 정도연, 백상호. Screening of high-alcohol producing yeast from traditional fermented soy-sauce. 2012 한국식품영양과학회 국제학술대회, Poster (2012.11)
- (5) 송영란, 정도연, 백상호. Changes of volatile flavor compounds in traditional soy-sauce during fermentation. 2012 한국식품영양과학회 국제학술대회, Poster (2012.11)
- (6) 류명선, 전세봄, 김용상, 조성호, 정도연, 엄태봉. Isolation and characterization of *Bacillus* species showing antimicrobial activity against putrefactive microbes in fermented soybean products with reduced-sodium salt. 2013 한국미생물학회 국제 학술대회, Poster (2013.05)
- (7) 송영란, 정도연, 백상호. Microbial and biochemical effect of high ethanol producing yeasts on soy-sauce fermentation prepared with different salt concentrations. 2013 한국미생물생명공학회 국제학술대회, Poster (2013.07)
- (8) 송영란, 정도연, 백상호. Changes of yeast biodiversity and volatile flavor during Korean traditional soy-sauce production. 2013 한국미생물생명공학회 국제학술대회, Poster (2013.07)
- (9) 임소연, 정용섭. Optimization of medium and fermentation conditions for biomass and protease of *Bacillus licheniformis* SCK 121057. 2012 International Biotechnology Symposium (IBS), Poster (2012.09)
- (10) 임소연, 정용섭. Enhanced production of biomass and protease by *Bacillus licheniformis* SCK 121057: optimization of medium and fermentation conditions using statistical experimental methods. 2012 식품영양과학회 국제학술대회. Poster (2012.11)
- (11) 임소연, 정용섭. Medium optimization and fermentation for biomass and protease of *Bacillus licheniformis* SCK 121057 by statistical experimental design. 2013 한국생물공학회. Poster (2013.04)
- (12) Elijah NYAKUDYA, 정용섭. Statistical optimization of medium and fermentation conditions for enhanced production of ethanol by osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. 2013 한국생물공학회 국제학술대회. Poster (2013.04)
- (13) 전세봄, 류명선, 김용상, 정도연, 엄태봉. Isolation of *Bacillus* species with antimicrobial

- activity against putrefactive microbes in fermented soybean products with reduced-sodium salt. 2013 한국미생물생명공학회 국제학술대회. Lecture (2013.07)
- (14) 임소연, 정용섭. Statistical Optimization of medium and fermentation conditions for biomass and protease of *Bacillus licheniformis* SCK 121057. 2013 Institute of Food Technologists(IFT), Poster (2013.07)
- (15) 백상호. Isolation and characterization of non-*Saccharomyces* species with high-level GABA from traditional soy-sauce. 2013 한국미생물연합 국제학술대회. Lecture (2013.10)
- (16) 송영란, 정도연, 백상호. Screening of functional yeasts from traditional fermented soy-sauce and its application for development of low-salt fermentation process. 2013 한국미생물연합 국제학술대회. Poster (2013.10)
- (17) 백상호. Indigenous yeasts isolated from traditional fermented soy-sauce can prevent pathogenic bacteria occurred at low-salt fermentation process. 2014 한국미생물학회 국제학술대회. Lecture (2014.05)
- (18) 허준, 전세봄, 류명선, 정도연, 엄태봉. Isolation of *Aspergillus oryzae* strains suitable for the fermentation of soybean products and their properties. 2014 한국미생물학회 국제학술대회. Poster (2014.05)
- (19) 송영란, 백상호. Application of indigenous yeast strains in the control of pathogenic bacteria during low-salt soy sauce fermentation. 2014 European Biotechnology Congress (Journal of Biotechnology). Poster (2014.05)
- (20) 송영란, 정도연, 백상호. Characterization of yeasts involved in the fermentation of Korean traditional soy sauce. 2014 한국미생물생명공학회 국제학술대회. Poster (2014.06)
- (21) 오현화, 전세봄, 류명선, 허준, 정도연, 엄태봉. Possible role of *Bacillus* strains from analyses of bacterial communities by pyrosequencing of low-salted soybean products. 2014 한국식품과학회 국제학술대회. Lecture (2014.08)
- (22) 이유리, Optimization of medium and fermentation condition for mass production of *Bacillus licheniformis* SCK 121057 by statistical experimental design. 2014 한국식품과학회 국제학술대회. Lecture (2014.08)

## 2. 특허출원

- (1) 장류의 유해 미생물에 대한 항균활성 및 바이오제닉 아민 분해 활성이 있는 바실러스 리케니포미스 SCK B11 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 순창군발효미생물관리센터, 발명인 : 정도연, 김용상, 엄태봉 특허출원번호 : 10-2012-0079232(2012.07.20).
- (2) 바이오제닉 아민 분해활성이 있는 바실러스 속 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 순창군발효미생물관리센터 발명인 : 김용상, 조성호, 정도연, 엄태봉. 특허출원번호 : 10-2013-0096325(2013.08.14).
- (3) 전통장류 유래 알코올을 고생산하는 효모 균주 및 이의 용도. 출원인: 재단법인 순창군발효미생물관리센터. 발명인: 백상호, 정도연, 송영란. 특허출원번호: 10-2013-0123327



(2013.10.16)

(4) 전통장류 유래 효모 균주를 이용한 저염 간장의 제조방법. 출원인: 재단법인 순창군발효미생물관리센터. 발명인: 백상호, 정도연, 송영란. 특허출원번호: 10-2013-0123330

(2013.10.16)

(5) 전통장류에서 분리한 산막 형성 효모 증식 억제력을 가지는 바실러스 리케니포미스 SCDB34 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 발효미생물산업진흥원. 발명인 : 엄태봉, 김용상, 류명선, 전세봄, 정도연, 조승화. 특허출원번호 : 10-2014-0011046(2014.01.29)

(6) 바이오제닉 아민 분해 활성 및 유해 미생물에 대한 항균활성이 있는 페디오코커스 펜토사세우스 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 발효미생물산업진흥원. 발명인 : 김용상, 오현화, 엄태봉, 정도연 특허출원번호 : 10-2014-0128798(2014.09.26)

(7) 바실러스 리케니포미스 균주의 균체 생산성 또는 프로테아제 생산성 증가용 배지 조성물 및 이를 이용한 배양 방법. 출원인 : 재단법인 발효미생물산업진흥원 발명인 : 정용섭, 임소연, 이유리, 정도연. 특허출원번호 : 10-201-0143387(2014.10.22)

### 3. 특허등록

(1) 장류의 유해 미생물에 대한 항균활성 및 바이오제닉 아민 분해 활성이 있는 바실러스 리케니포미스 SCK B11 균주 및 이의 용도. 출원인 : 순창군, 재단법인 순창군발효미생물관리센터, 발명인 : 정도연, 김용상, 엄태봉 특허등록번호 : 10-1379230(2014.03.24)

## 2절 성과활용 계획

1. 전통 장류 업체가 표준화된 균주를 사용함으로써 품질의 균일화를 얻을 수 있는 장점이 있음.
2. 저염화 시 전통 장류의 가장 큰 약점인 부패균에 의한 건강 및 위생적인 문제를 해결함으로써 전통 장류 업체의 제품 신뢰도를 높이고 소비자의 건강 위해 요소를 제거하며 해외 시장에 진출할 수 있는 기회가 됨.
4. 또한 본 연구에서 발효식품으로부터 확보된 다양한 활성을 갖는 유용미생물자원은 농업용, 축산용 및 식품용으로 활용이 가능함
5. 본 연구는 발효식품으로부터 유래된 항균활성 기능을 갖는 유용미생물에 최적 발효 조건을 설정하여 보다 효율적이고 경제적인 균체 생산에 활용이 가능함.
6. 대량 생산이 가능한 유용미생물자원은 농업용 비료, 축산용 사료 및 식품용 starter로 활용될 수 있음. 특히 부패균에 대해 강한 항균 특성을 갖고 있어 저염 장류를 생산 할 때 우수한 starter 사용이 가능함.
7. 한국 고유한 맛을 지니고 위생적인 관점에서 검증된 전통 장류를 사용하여 현재 정부가 벌이고 있는 한식 세계화 사업에 일조함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술

### 1절 유해균주 억제 연구

#### 1. 논문

제목	내용	문헌
Cerecidins, Novel Lantibiotics from <i>Bacillus cereus</i> with Potent Antimicrobial Activity	장류 유해균주로서 <i>B. cereus</i> 는 설사독소와 구토독소를 생산하기 때문에 <i>B. subtilis</i> 나 <i>B. licheniformis</i> 에 의한 이 균의 제어가 지금까지 시도 되어왔다. 그러나 이들 유용 발효 균주가 모든 <i>B. cereus</i> 균주를 효과적으로 억제하는 것은 아니다. 이런 점에서 <i>B. cereus</i> 가 유용 발효 균주에 대해 왜 항균저항성을 가지는지를 밝히는 유용한 정보이다.	Jian Wang, Li Zhang, Kunling Teng, Shutao Sun, Zhizeng Sun, Jin Zhong. 2014. Appl Environ Microbiol. 80(8), 2633 - 2643.
Engineering unnatural variants of plantazolicin through codon reprogramming	지금까지 보고된 항생제에 저항성을 가지는 유해균주의 종류가 점점 많아지고 있다. 한계에 도달한 기존 항생제의 항균 능력 때문에, 유용 발효 균주의 항균물질을 이용해 새로운 유해균 억제능력을 갖는 물질 생산의 시도로서 중요한 결과이다.	Caitlin D. Deane, Joel O. Melby, Katie J. Molohon, Aziz R. Susarrey, Douglas A. Mitchell. 2013. ACS Chem Biol. 8(9), 1998 - 2008.
Fermentation of low-salt miso as affected by supplementation with ethanol	염 농도를 낮추기 위한 수단으로써 ethanol 대체제를 농도별로 첨가하여 low-salt miso를 발효한 연구로써, 염농도가 낮아짐으로 증가될 수 있는 미생물이 생육을 에탄올의 첨가로 효과적으로 저해시킬 수 있다는 것을 알려주는 결과이다.	Chiou, R.Y.Y., Ferng, S., Beuchat, L.R., 1999. Int. J. Food Microbiol. 48, 11 - 20.

#### 2. 특허

제목	내용	특허
<i>Bacillus licheniformis</i> chromosome	상업적 유용균인 <i>Bacillus licheniformis</i> SJ1904(ATCC PTA-7992) 전 유전체, vector 서열에서 산업적 중요성을 갖는 모든 유전자에 대한 특허 등록으로 앞으로 유전자 자원이 어떻게 상업화될 수 있는지를 잘 보여주는 특허이다.	(21) 출원번호/일자12516426 (2007.11.29) (71) 출원인Novozymes, Inc. (30) 우선권번호(Priority No.) (51) IPC(Int. Cl.)A01H 5/00 C12P 21/06 C12N 15/82 C12N 5/10 C40B 30/04 C40B 40/06 C07K 14/415 C07H 21/04 C07H 21/02 (52) UPC(U.S. Cl.)800/298435/691435/468435/419506/9506/16530/370536/231536/232536/237536/245

		(*) CPCC07K14/32 (58) Field of Search A01H 5/00 C12P 21/06 C12N 15/82 C12N 5/10 C40B 30/04 C40B 40/06 C07K 14/415 C07H 21/04 C07H 21/02 (86) 국제출원번호(PCT No.) PCT/US2007/024746 (2007.11.29)
--	--	---

## 2절 Biogenic amine 저감화

### 1. 논문

제목	내용	문헌
A partial proteome reference map of the wine lactic acid bacterium <i>Oenococcus oeni</i> ATCC BAA-1163	장류에도 존재하는 <i>Oenococcus oeni</i> 의 proteome 분석을 통해 biogenic amine 대사와 축적에 대한 정보를 제공한 점에서 중요하다.	María de la Luz Mohedano, Pasquale Russo, Vivian de los Ríos, Vittorio Capozzi, Pilar Fernández de Palencia, Giuseppe Spano, Paloma López. 2014. Open Biol. 4(2), 130154. 1-10.

### 2. 특허

제목	내용	특허
Formation of hydrogel in the presence of peroxidase and low concentration of hydrogen peroxide	hydrogen peroxide와 peroxidase의 존재하에서 굳어지는 hydrogel의 특성에 관한 특허로서 biogenic amine oxidase에 의한 biogenic amine의 hydrogen peroxidase의 검출에 유용하게 이용될 수 있다.	(11) 등록번호/일자08691206 (2014.04.08) (65) 공개번호/일자20120177604 (2012.07.12) (21) 출원번호/일자13336783 (2011.12.23) (71) 출원인Motoichi Kurisawa Li Shan Wang Joo Eun Chung Fan Lee Keming Xu Hirohisa Yano (30) 우선권번호(Priority No.) (51) IPC(Int. Cl.)A61K 38/21 A61P 1/16 A61P 35/00 A61K 38/44 (52) UPC(U.S. Cl.)424/857424/854424/944 (*) CPCA61K9/06A61K9/0019A61K38/00A 61K47/02A61K47/36A61K47/42A61L27 /20A61L27/222A61L27/52A61L27/54A6 1L2300/252A61L2400/06C08J3/00C08J3 /075C08J2305/08

### 3절 발효식품의 저염화

#### 1. 논문

제목	내용	문헌
Salt-free miso fermentation using ethanol, sugars, and polyols	salt-free miso를 발효하기 위한 방법으로써 ethanol, sugars, polyols을 염 대신 대체하여 miso를 발효해 봄으로써 proteolytic activities, protein hydrolysis와 함께 곰팡이와 세균의 성장에 미치는 영향을 살펴본 논문으로 소금과 유사한 삼투압성 대체물질로 염 농도를 낮춰보고자 한 결과이다.	Chiou, R.Y.Y, 1999. Food Sci. 64, 918 - 920.
Evaluation of aroma differences between high-salt liquid-state fermentation and low-salt solid-state fermentation soy sauces from China	염농도가 장류의 관능적 특성에 미치는 영향을 이해하기 위한 수단으로 염농도의 차이가 장류의 향미에 미치는 결과를 살펴본 논문으로 고염발효 장류에서는 alcoholic, cooked potato-like, caramel-like 향 성분들이 상대적으로 높은 반면 저염발효 장류에서는 유의적으로 sour, burnt 향미를 내는 성분들이 많아 염농도를 낮출 경우 목적으로 해야하는 향미성분들이 무엇인지를 알게 해주는 결과이다.	Feng, Y., Cai, Y., Su, G., Zhao, H., Wang, C., Zhao, M., 2014. Food Chem. 145, 126 - 134.
Effect of autochthonous starter cultures on microbiological and physico-chemical characteristics of Suan yu, a traditional Chinese low salt fermented fish	발효식품의 저염시 발생하는 변화를 예상하기 위하여 토착미생물을 적용한 논문으로, 혼합형의 토착미생물을 스타터로 접종함으로써 염농도를 낮출 경우 발생하는 부패미생물을 억제하고 pH, 단백질 가수분해율 및 소비자 기호도를 완화할 수 있음으로써 발효식품의 저염화를 이룬 결과이다.	Zeng, X., Xia, W., Jiang, Q., Yang, F., 2013. Food Control 33, 344 - 351.
Effect of fat and salt reduction on the sensory quality of slow fermented sausages inoculated with <i>Debaryomyces hansenii</i> yeast	토착효모를 스타터로 접종함으로써 발효 소시지의 저염/저지방화를 이룬 논문으로써, 결과적으로 토착 효모의 적용은 발효소시지의 지방/염 농도 저하시 일어나는 이화학적/미생물학적 변화를 억제할 뿐만 아니라 제품의 향미, 맛, 소비자 기호도를 향상시키면서, 토착미생물의 사용이 발효식품의 저염화에 효과적임을 알 수 있는 결과이다.	Corral, S., Salvador, A., Belloch, C., Flores, M., 2014. Food Control 45, 1 - 7.

## 제 7 장 참고문헌

1. Abdollahi, A., Buchanan, R.L. (1981) Regulation of aflatoxin biosynthesis: characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. *Journal of Food Science* 46, 143-146.
2. Aidoo, K.E., Rob Nou, M.J., Sarkar, P.K. (2006) Occurrence and function of yeasts in 988 Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Research* 6(1), 30-39.
3. Altayar, M., Sutherland, A.D. (2005) *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J. Appl. Microbiol.* 100, 7-14.
4. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Grapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, 25, 3398-3402.
5. Ann, Y.G., Kim, S.K., Shin, C.S. (1997) Sugar in Kochuzang. *Korea J. Food & Nutr.* 10(4), 446-452.
6. AOAC. (2005) Official Method 920.57: Distillation-hydrometric method for the determination of ethanol contents in red wines. pp. 1.
7. Apetroaie, C., Andersson, M.A., Sproer, C., Tsitko, I., Shaheen, R., Jaaskelainen, E.L., Wijnands, L.M., Heikkila, R., Salkinoinoja-Salonen, M.S. (2005) Cereulide-producing strains of *Bacillus* show diversity. *Arch. Microbiol.* 184, 141-151.
8. Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F. (2011) *Candida galli* strain PGO6: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid. *Curr Microbiol* 62, 990-998.
9. Baba, H., Baba, K., Shimizu, T., Kimura, E. (1983) Studies on the moromi mash of soy sauce (part 4): Fermentation of Exwb-40 as raw material under the condition of low NaCl concentration on the producing soy sauce containing high nitrogen. *J. Jpn. Soy Sauce Res. Inst.* 9, 24-28.
10. Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009) Aroma compounds. In *Food Chemistry*, 4th revised and extended ed.; Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, pp 340-402.
11. Bermudez, R., J.M. Lorenzo, S., Fonseca, I., Franco, Carballo, J. (2012) Strains of *Staphylococcus* and *Bacillus* isolated from traditional sausages as producers of biogenic amines. *Frontiers Microbiol.* 3, 1-6.
12. BIAMFOOD. (2008) Controlling biogenic amines in traditional food fermentations in regional Europe (Project Reference no. 211441), EU's 7th Framework Program for Research, EU.
13. Buzzini, P., Martini, A. (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J. Appl. Microbiol.* 93, 1020-1025.
14. Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I. (2014) Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl.*

Microbiol. Biotechnol. 98, 185–198.

15. Capozzi, V., Russo, P., Ladero, V., Fernández, M., Fiocco, D., Alvarez, M.A., Grieco, F., Spano, G. (2012) Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: toward a potential application in wine. *Front. microbiol.* 3.
16. Cassada, D.A., Zhang, Y., Snow, D.D., Spalding, R.F. (2000) Trace Analysis of ethanol, MTBE, and related oxygenate compounds in water using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 4654–4658.
17. Chancharonpong, C., Hsieh, P.C., Sheu, S.C. (2012) Production of enzyme and growth of *Aspergillus oryzae* S. on soybean koji. *International Journal of Bioscience Biochemistry and Bioinformatics*, 2(4), 228–231.
18. Chang, M., Chang, H.C. (2012) Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp. *International journal of food microbiology*, 153(3), 269–274.
19. Chen, S., Xu, Y. (2010) The influence of yeast strains on the volatile flavour compounds of Chinese rice wine. *J. Inst. Brew.* 116(2), 190–196.
20. Chiou, R.Y.Y. (1999) Salt-free miso fermentation using ethanol, sugars, and polyols. *Food Sci.* 64, 918–920.
21. Chiou, R.Y.Y., Ferng, S., Beuchat, L.R. (1999) Fermentation of low-salt miso as affected by supplementation with ethanol. *Int. J. Food Microbiol.* 48, 11–20.
22. Cho, T.Y., Han, G.H., Bahn, K.N., Son, Y.W., Jang, M.R., Lee, C.H., Kim, S.H., Kim, D.B., Kim, S.B. (2006) Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38, 730–737.
23. Choi, H.S., Hong, Y.A., Choi, Y.J., Park, H.D. (2011) Identification and characterization of wild yeasts isolated from Korean domestic grape varieties. *Korean J. Food Preserv.* 18(4), 604–611.
24. Choi, G.W., Um, H.J., Kim, M., Kim, Y., Kang, H.W., Chung, B.W., Kim, Y.H. (2010) Isolation and characterization of ethanol-producing *Schizosaccharomyces pombe* CHFY0201. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(4), 828–834.
25. Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2259–2261.
26. Chung, M.S., Lee, M.S. (2003) Analysis of volatile compounds in *Elsholtzia splendens* by solid phase microextraction. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 19(1), 79–82.
27. Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., Delvaux, F.R. (2004) Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 602–608.
28. Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. (2003) The Ribosomal Database Project (RDP-II): preview a new autoaligner that allows regular updates and

- the new prokaryotic taxonomy. *Nucl. Acids Res.*, 31, 442-443.
29. Corral, S., Salvador, A., Belloch, C., Flores, M. (2014) Effect of fat and salt reduction on the sensory quality of slow fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast. *Food Contol* 45, 1-7.
  30. Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Coton, E. (2010) Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food microbiol.* 27, 1078-1085.
  31. Davis, N.D., Iyer, S.K., Diener, U.L. (1987) Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and environmental microbiology*, 53(7), 1593-1595.
  32. de Bok, F.A.M., Janssen, P.W.M., Bayjanov, J.R., Sieuwerts, S., Lommen, A., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Molenaar, D. (2011) Volatile Compound fingerprinting of mixed-culture fermentations. *Applied And Envionmental Microbiology*, 17(77), 6233-6239.
  33. de Llanos Frutos, R., Teresa Fernández-Espinar, M., Querol, A. (2004) Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 175-185.
  34. Design-expert 7.1 User's Guide, Multifactor RSM Tutorial-Part 2-Optimization, 7-10.
  35. Di Gioia, D., Sciubba, L., Ruzzi, M., Settic, L., Fava, F. (2009) Production of vanillin from wheat bran hydrolyzates via microbial bioconversion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 1441-1448.
  36. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
  37. Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.85 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329-337.
  38. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization). (2013) Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. Meeting report. Rome, Italy.
  39. Felsenstein, J. (1985) Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
  40. Feng, Y., Cai, Y., Su, G., Zhao, H., Wang, C., Zhao, M. (2014) Evaluation of aroma differences between high-salt liquid-state fermentation and low-salt solid-state fermentation soy sauces from China. *Food Chemistry* 145, 126-134.
  41. Ferencik, M. (1970) Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the flesh of some marinefishes. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 14, 52-60.
  42. Fitch, W.M. (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree trpology. *Syst. Zool.* 20, 406-416.
  43. Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K.M., Ramachandra, S., Ghosh, S., Szakacs, G., Pandey, A. (2003) Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*, *Biochemical Engineering Journal* 15, 107-115.

44. Gao, X.L., Cui, G., Zhao, H.F., Zhao, M.M., Yang, L., Ren, J.Y. (2010) Changes in volatile aroma compounds of traditional Chinese-type soy sauce during moromi fermentation and heat treatment. *Food Sci. Biotechnol.* 19(4), 889–898.
45. Gigras, P., Sahai, V., Gupta, R. (2002) Statistical media optimization and production of ITS  $\alpha$  - amylase from *Aspergillus oryzae* in a bioreactor. *Curr. Microbiol.* 45, 203–208.
46. Good, I.J. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 40(3–4), 237–264.
47. Granum, P.E., Lund, T. (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 223–228.
48. Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387–392.
49. Guinebrière, M.H., Broussolle, V., Nguyen-The, T. (2002) Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3053–3056.
50. Han, K.H., Lee, D.B., Kim, J.H., Kim, M.S., Han, K.Y., Kim, W.S., Park, Y.S., Kim, H.B., Han, D.M. (2003) Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*, *The Journal of Microbiology*, 41(1), 34–40.
51. Hansen, E.H., Moller, B.L., Kock, G.R., Bunner, C.M., Kristensen, C., Jensen, O.R., Okkels, F.T., Olsen, C.E., Motawia, M.S., Hansen, J. (2009) De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Applied and Environmental Microbiology* 75(9), 2765–2774.
52. Havelka, B. (1967) Role of the Hafnia bacteria in the rise of histamine in tuna fish meat. *Cesk. Hyg.* 12, 343–352.
53. Hong, Y.K., Shin, H.Y. (2010) Medium optimization for the protease production by *Bacillus licheniformis* isolated from Cheongkookjang. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 38(4), 385–390.
54. Jang, Y.M., Shin, W.S., Lee, D.H., Kim, S.Y., Park, C.H., Jeong, Y.S., Chun, G.T. (2009) Statistical optimization of production medium for enhanced production of itaconic acid biosynthesized by fungal cells of *Aspergillus terreus*. *KSBB J.* 24, 30–40.
55. Jeong, Y.M., Lee, J.H., Chung, H.J., Chun, G.T., Yun, S.I., Jeong Y.S. (2010) Optimization of medium and fermentation conditions for mass production of *Bacillus licheniformis* SCD121067 by statistical experimental design. *KSBB J.* 25, 539–546.
56. Ji, W.D., Lee, E.J., Kim, J.K. (1992) Volatile flavor components of soybean pastes manufactured with traditional meju and improved meju. *J. Korean Agric. Chem. Soc* 35(4), 248–253.
57. Joo, H.S., Park, D.C., Choi, J.W. (2012) Increased production of an alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52 by chromosomal integration. *J. Agric. sci.* 46(1), 1598–5504.
58. Kawabata, T., Ishizaka, K., Mura, T., Sasaki, T. (1956) Studies on the food poisoning associated with putrefaction of marine products. VII. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 22, 41–47.
59. Ke, D., Picard, F.J., Martineau, F., Ménard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G.



- (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of *enterococci*. Journal of Clinical Microbiology, 37(11), 3497–3503.
60. Kim, D.S., Park, Y.S. (2011) Optimization of air-plasma and oxygen-plasma process for water treatment using central composite design and response surface methodology. J. Environ. Sci. 20(7), 907–917.
  61. Kim, G.E., Kim, M.H., Choi, B.D., Kim, T.S., Lee, J.H. (1992) Flavor compounds of domestic meju and doenjang. J. Korean Soc. Food Nutr. 21(5), 557–565.
  62. Kim, H.J., Lee, J.W., Kim, Y.D. (2011) Antimicrobial activity and antioxidant effect of *Curcuma longaa*, *Curcuma aromatica*, *Curcuma zedoaria*. Korean J Food Preserv. 18(2), 219–225.
  63. Kim, H.Y., Hwang, I.G., Woo, K.S., Kim, K.H., Kim, K.J., Lee, C.K., Lee, J., Jeong, H.S. (2010) Chemical components changes of winter cereal crops with germination. J. Korean Soc. food Sci. Nutr. 39(11), 1700–1704.
  64. Kim, K.H., Bae, J.S., Lee, T.S., (1986) Studies on the quality of kochujang prepared with grain and flour of glutinous rice. J. Appl. Biol. Chem 29(2), 227–236.
  65. Kim, N.Y., Jang, M.K., Lee, S.H. (2010) Verification of antimicrobial activities of various Pine needle extracts against antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J. life sci. 20(4), 589–596.
  66. Kim, S.D., Yoon, S.H., Kang, M.S. Park, N.S. (1986) Softening related changes in cell wall polysaccharides of hot pepper fruit. J. Korean Soc, Food Nutr. 15(2), 165–170.
  67. Kim, Y.S., Cho, S.H., Jeong, D.Y., Uhm, T.B. (2012) Isolation of biogenic amines-degrading strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* from traditionally fermented soybean products. Kor. J. Microbiol. 48, 220–224.
  68. Kim, Y.S., Jeong, J.H., Cho, S.H., Jeong, D.Y., Uhm, T.B. (2012) Antimicrobial and biogenic amine-degrading activity of *Bacillus licheniformis* SCK B11 isolated from traditionally fermented red pepper paste. Kor. J. Microbiol. 48, 163–170.
  69. Kim, Y.S., Kim, M.C., Kwon, S.W., Kim, S.J., Park, I.C., Ka, J.O., Weon, H.Y. (2011) Analysis of bacterial communities in Meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods. J. Microbiol. 49, 340–348.
  70. Kim, Y.S., Yun, S.H., Jeong, D.Y., Hahn, K.S. Uhm, T.B. (2010) Isolation of *Bacillus licheniformis* producing antimicrobial agents against *Bacillus cereus* and its properties. Korean J. Microbiol. 46, 270–277.
  71. Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111–120.
  72. Ko, H.S., Kim, H.S. (2010) Isolation of mutant strains from keratinase producing *Bacillus subtilis* SMMJ-2 and comparison of their enzymatic properties. KSBB J. 25, 429–436.
  73. Ko, M.S., Yang, J.B. (2009) Antimicrobial activities of extracts of *Prunus mume* by sugar. Korean J. Food Preserv. 16, 759–764.

74. Kwon, O.J., Choi, U.K., Lee, E.J., Cho, Y.J., Cha, W.S., Son, D.H., Chung, Y.G. (2000) Chemical changes of Meju made with barley bran using fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32(5), 1135-1141.
75. Lee, H.D., Kim, M.H., Lee, C.H. (1992) Relationships between the taste component and sensory preference of Korea red peppers. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24(3), 266-271.
76. Lee, J.S., Yi, S.H., Kwon, S.J., Ahn, C., Yoo, J.Y. (1997) Isolation, identification and cultural conditions of yeasts from traditional meju. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25(5), 435-441.
77. Lee, K.S., Lee, J.C., Lee, J.K., Hwang, E.S., Lee, S.S., Oh, M.J. (2002) Quality of 4-recommended soybean cultivars for Meju and Doenjang. *Korean J Food Preserv.* 9(2), 205-211.
78. Lee, S.W., Shin, S.Y., Yu, T.J. (1985) Effects of the ethanol contents on the preparation of low salt Doenzang. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17, 336-339.
79. Lerke, P.A., Werner, S.B., Taylor, S.L., Guthertz, L.S. (1978) Scombroid poisoning. Report of an outbreak. *West J. Med.* 129, 381-386.
80. Li, K., Frost, J.W. (1998) Synthesis of vanillin from glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 10545-10546.
81. Li, X., Yang, J., Li, X., Gu, W., Huang, J., Zhang, K.Q. (2008) The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by *Enterobacter* sp. Px6-4 isolated from vanilla root. *Process Biochemistry* 43, 1132-1137.
82. Liem, D.G., Miremedi, F., Keast, R.S.J. (2011) Reducing sodium in foods: the effect on flavor. *Nutrients* 3, 694-711.
83. Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2), 744-753.
84. Lim, S.I., Song, S.M. (2010) Fermentation properties of low-salted Doenjang supplemented with licorice, mustard, and chitosan. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42, 323-328.
85. Lindback, T., Fagerlund, A., Rodland, M.S., Granum, P.E. (2004) Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 150, 3959-3967.
86. Lock, S.L. (2007) Flavor characteristics of soy products modified by proteases and alpha-galactosidase. [MSc thesis]. Ames, IA: Iowa State University, 95 pages. Available from: Iowa State Park Library, Ames, IA.
87. Luh, B.S., 1995. Industrial production of soy sauce. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 14, 467 - 471.
88. Mathewa, S., Abraham, E.T., Sudheesh, S. (2007) Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 44, 48-52.
89. Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 31, 426-428.
90. Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, C. (2002) Yeast diversity and persistence in

- botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68(10), 4884-4893.
91. Min, D.L., Lim, S.W., Ahn, J.B., Choi Y.J. (2010) Optimization of ethanol extraction conditions for antioxidants from *Zizyphus jujuba* Mill. leaves using response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42(6), 733-738.
  92. Montgomery, D.C. (2005) *Design and analysis of experiments* 6th edition, p 211-217, JOHN WILEY & SONS, INC, United states of America.
  93. Moon, H.K., Lee, S.W., Moon, J.N., Kim, D.H., Yoon, W.J., Kim, G.Y. (2011) Quality characteristics of various beans in distribution. *J East Asian Soc Dietary Life.* 21(2), 215-221.
  94. Myers, E.W., Miller, W. (1988) Optimal alignments in linear space. *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, 4(1), 11-17.
  95. Nakamura, Y., Kobayashi, F., Ohnaga, M., Sawada, T. (1997) Alcohol fermentation of starch by a genetic recombinant yeast having glucoamylase activity. *Biotechnology and Bioengineering* 53, 21-25.
  96. Neila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., Meerdink, G. (2010) Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *J. Food Sci.* 75, 139-150.
  97. Ngamwongsatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikarn, C., Ohba, M., Assavanig, A., Panbangred, W. (2008) Broad distribution of enterotoxin genes among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 352-356.
  98. Oh, J.Y., Kim, Y.S., Shin, D.H. (2002) Changes in physicochemical characteristics of low-salted Kochujang with natural preservatives during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34, 835-841.
  99. Omura, V., Price, R.J., Olcott, H.S. (1978) Histamine forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. *J. Food Sci.* 43, 1779-1787.
  100. Ooijkaas, L.P., Wilkinson, E.C., Tramper, J., Buitelaar, R.M. (1999) Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minutans* using statistically-based experimental designs, *Biotechnology and Bioengineering* 64(1), 92-100.
  101. Ouhib, Q., Clavel, T., Schmitt, P. (2006) The production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate. *Curr. Microbiol.* 53, 222-226.
  102. Pack, Y.C., Yun, N.R., San, K.Y., Bennett, G.N. (2006) Molecular cloning and characterization of the alcohol dehydrogenase ADH1 gene of *Candida utilis* ATCC 9950. *J. Ind. Microbial. Biotechnol.* 33, 1032-1036.
  103. Park, C.H., Lee, S.K., Shin, B.K. (1986) Effect of wheat flour and glutinous rice on quality of Kochujang. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 29(4), 375-380.
  104. Park, J.M., Lee, S.S., Oh, H.I. (1995) Changes in chemical characteristics of traditional Kochujang Meju during fermentation. *Korean J. Food & Nutrition* 8(3), 184-191.
  105. Park, S.J., Moon, S.W., Lee, J., Kim, E.J., Kang, B.S. (2011) Optimization of roasting condition for coffee beans by response surface methodology. *Korean J. Food Preserv.*

18(2), 178-183.

106. Peng, W.S., Wang, C., Hou, L., Cao, X. (2011) Effect of adding salt-tolerant microorganisms on the flavor of soy-sauce mash. Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE), 2011 International Conference, 7500-7502.
107. Pham, T., Wimalasena, T., Box, W.G., Koivuranta, K., Storgårds, E., Smart, K.A., Gibson, B.R. (2011) Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'wild' yeast contaminants. J. Inst. Brew. 117(4), 556-568.
108. Prüß, B.M., Dietrich, R., Nibler, B., Martlbauer, E., Scherer, S. (1999) The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5436-5442.
109. Ramnani, P., Kumar, S.S., Gupta, R. (2005) Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. Process Biochem. 40, 3352-3359.
110. Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M. (2009) Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. 134, 201-210.
111. Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.
112. Saraphirom, P., Reungsang, A. (2010) Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods. Int. J. Hydrogen Energy. 35, I3435-I3444.
113. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and environmental microbiology, 75(23), 7537-7541.
114. Schoeni, J.L., Wong A.C. (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. J. Food Prot. 68, 636-648.
115. Seo, D.C., Ko, J.A., Gal, S.W., Lee, S.W. (2010) Characterization of *Bacillus licheniformis* KJ-9 isolated from soil. J. Life sci. 20(3), 403-410.
116. Shalaby, A.R. (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research Int. 29, 675-690.
117. Shi, F., Zhu, Y. (2007) Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. Bio Control 52, 845-853.
118. Shin, M.R., Joo, K.J. (1999) Fractionated volatile flavor components of soybean paste by dynamic headspace method. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28(2), 305-311.
119. Simpson, B.K., Nayeri, G., Yaylayan, V., Ashie, I.N.A. (1998) Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. Food Chemistry 61, 131-138.

120. Smělá, D., Pechová, P., Komprdá, T., Klejdus, B., Kubáň, V. (2003) Liquid chromatographic determination of biogenic amines in a meat product during fermentation and long-term storage. *Czech J. Food Sci.* 21, 167–175.
121. Su, N.W., Wang, M.L., Kwok, K.F., Lee, M.H., (2005) Effects of temperature and sodium chloride concentration on the activities of proteases and amylases in soy sauce koji. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1521–1525.
122. Suezawa, Y., Suzuki, M., Mori, H. (2008) Genotyping of a miso and soy sauce fermentation yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*, Based on sequence analysis of the partial 26S ribosomal RNA gene and two internal transcribed spacers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72(9), 2452–2455.
123. Suezawa, Y., Suzuki, M. (2007) Bioconversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol and 4-ethylguaiacol and of 4-vinylguaiacol to 4-ethylguaiacol by halotolerant yeasts belonging to the genus *Candida*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 71(4), 1058–1062.
124. Suezawa, Y., Kimura, I., Inoue, M., Gohda, N., Suzuki, M. (2006) Identification and typing of miso and soy sauce fermentation yeasts, *Candida etchellsiii* and *C. versatili*, based on sequence analyses of the D1D2 domain of the 26S ribosomal RNA gene, and the region of internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2. *Process Biochemistry* 43, 1132–1137.
125. Suezawa, Y., Suzuki, M. (2007) Bioconversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by halotolerant yeasts belonging to the genus *Candida*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(4), 1058–1062.
126. Suezawa, Y., Suzuki, M., Mori, H. (2008) Genotyping of a miso and soy sauce fermentation yeast, *Zygosaccharomyce rouxii*, based on sequence analysis of the partial 26S ribosomal RNA gene and two partial 26S ribosomal RNA gene and two internal transcribed spacer. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(9), 2452–2455.
127. Swofford, D. (1989) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony. Version 3. Illinois Natural History Survey, Champaign.
128. Swofford, D.L. (1998) PAUP. Phylogenetic Analysis using Parsimony. 4.0 ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
129. Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722–756.
130. Tamura, K., Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Bio. Evol.* 10, 512–526.
131. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
132. Tanaka, Y., Watanabe, J., Mogi, Y. (2012) Monitoring of the microbial communities involved in the soy sauce manufacturing process by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* 31, 100–106.

133. Taylor, S.L., Guthertz, L.S., Leatherwood, M., Lieber, E.R. (1979) Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(2), 274-278.
134. Taylor, S.L., Speckhard, M.W. (1983) Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Mar. Fish. Rev.* 45, 35-39.
135. Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H., Huis, I. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73-84.
136. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673-4680.
137. Tiwary, E., Gupta, R. (2010) Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: Biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides. *Bioresour. Technol.* 101, 6103-6110.
138. Turhan, I., Bialka, L.K. (2010) Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 101, 5290-5296.
139. van der Sluis, C., Tramper, J., Wijffels, R.H. (2001) Enhancing and accelerating flavor formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes. *Trends Food Sci. Tech.* 12, 322-327.
140. Vollekova, A., Malik, F., Vollek, V., linczenyiova, K. (1996) Characterization of yeasts isolated from red wine surface film. *Folia Microbiol.* 41, 347-352.
141. Wang, J., Wan, W. (2009) Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy.* 34, 235-244.
142. Wolk, D.M., Johnson, C.H., Rice, E.W., Marshall, M.M., Grahn, K.F., Plummer, C.B., Sterling, C.R. (2000) A spore counting method and cell culture model for chlorine disinfection studies of *Encephalitozoon* syn. *Septata intestinalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4), 1266-1273.
143. Woo, S.M., Woo, J.U., Kim, S.D. (2007) Purification and characterization of the siderophore from *Bacillus licheniformis* K11, a multi-functional plant growth promoting rhizobacterium. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35(2), 128-134.
144. Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2007) Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 1025-1030.
145. Yang, J.Y., Park, K.H., Pek, U.H., Yu, J.H. (1990) Screening and characterization of the high-alcohol producing *Saccharomyces cerevisiae* D1. *Kor. j. Appl. Microbiol. Biotech* 18(5), 511-516.
146. Zeng, X., Xia, W., Jiang, Q., Yang, F. (2013) Effect of autochthonous starter cultures on microbiological and physico-chemical characteristics of Suan yu, a traditional Chinese low salt fermented fish. *Food Control* 33, 344-351.

147. Zeng, Y., Wei, N., Lou, M., Fu, L., Xing, P., Wang, H. (2010) Calcium chloride improve ethanol production in recombinant *Zymomonas mobilis*. Afr. J. Biotechnol. 9(45), 7687-7691.
148. Zhang, Z., Schwarz, S., Wagner, L., Miller, W. (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput. Biol. 7, 203-214.
149. 강옥주, 김영목, 김정목, 조좌형 (2011) 식품미생물학, pp. 154-157 수확사
150. 이계준 (2002) 발효미생물학, pp. 133-138, 라이프사이언스, 서울
151. 정용섭 (2001) 생물공정공학, pp. 165-166, 월드사이언스, 서울
152. 채수규 (2006) 표준 식품분석학, pp. 678-679, 지구문화사, 서울





## 제3협동 : 산업적 적용 및 시제품 생산

협동연구기관명 : (농)순창장류(주)

협동연구책임자 : 김 중 필



# 제1장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발의 목적

부패발효미생물을 저해하는 발효미생물과 장류제품적용에 적합한 발효균을 제공 받아 메주를 제조하고, 이를 이용한 저염 된장·간장을 제조하기 위한 발효·숙성 공정이 현장에 적용 가능하도록 하는 기술적 목표를 이루고 현재 소비 트렌드를 파악하여 시장에 제공할 수 있는 시제품을 만드는 목적으로 한다.

## 2절. 연구개발의 필요성

국내 장류시장은 '09.12월 기준 총 8,900억 시장을 형성하고 있으며, 고추장과 간장의 경우 높은 성장률을 보이고 있어 향후 된장과 쌈장 시장의 성장이 예상 된다.

한국의 전통된장은 가정에서 만들어서 소비되어 왔으나 현재는 산업화가 되어 장류업체에서 제조, 시판되고 있다. 시판되고 있는 대부분의 된장 및 간장은 콩과 밀을 주원료로 사용하며 인위적으로 종균을 접종 배양한 koji 중의 효소를 이용하고 염수를 가한 후 발효시켜 제조하는 개량식이 대부분이다. 그러나 장류가 가진 영양적인 가치뿐만 아니라 최근 장류가 지닌 기능적인 측면이 밝혀짐으로써 전통장류에 대한 인식도가 점차 높아지고 있고 또한 제조방법의 재현에 대한 관심 역시 높아지고 있다. 메주는 장을 만드는 소재로 특히 전통의 경우 약 30 ~ 45일이 소요되며, 본사에서 생산되는 메주 또한 10 ~ 15일 가량이 소요된다. 이를 된장, 간장 제품에 적용하기 위해서는 약 3 ~ 4개월의 기간이 소요되며, 이 기간이 지나서야 비로소 완제품이 생성된다. 된장과 간장은 이러한 메주를 주원료로 하는 우리 고유의 발효식품이고, 소금에서 오는 짠맛, 단백질 가수분해 산물인 아미노산에서 오는 구수한맛, 발효에 의한 향 등이 조화를 이루어 독특한 향미와 색이 생성된 전통식품이다. 된장은 항암효과, 항 돌연변이 효과, 면역기능강화효과, 혈전용해효과, 콜레스테롤 저하 효과, 항산화효과 등 다양한 기능성이 밝혀져 새롭게 큰 관심을 끌고 있는 식품이다. 한국인의 식염 섭취량에 대해서는 지금까지 과잉인 것으로 지적되고 있다. 한국인은 세계적으로 혈압수준이 높은 부류에 속하는데 그 이유는 식염 섭취량과의 관계가 역학적으로 나타내고 있다. 주요국의 1인당 1일 나트륨섭취량을 보면 우리나라는 WHO권장량의 2.6배에 달하는 5,287 mg을 섭취하고 있으며, 일본은 4,213 mg, 영국은 3,600 mg, 미국은 3,375 mg으로 나타났다. 이에 각국은 나트륨섭취 감량 사업을 추진하고 있는데 영국의 경우 94년부터 1일 권장량을 9 g에서 6 g 으로 낮추고, 2003년에는 소금위해평가보고서를 발간하기도 하였다. 현재 식품 중 소금함유량 D/B를 제작 중에 있으며, 이를 활용하여 주요 식품군에 대해 소금 함유 감소를 목표로 사업을 추진하고 있다. 미국의 경우, FDA 등에서 나트륨 과잉섭취에 대한 교육, 홍보 및 식품업체의 소금사용 감소를 유도하고 미국인을 위한 식생활지침에서 1일 권장량을 2,300 mg 미만의 나트륨 섭취를 권고하고 있다. 일본은 Akita Salt Down campaign을 실시해 북해도 및 동부지역을 대상으로 식생활 개선운동을 전개하고 식생활개선지침에서 식염을 1일 10 g 이하로 섭취하도록 권고하며, 지역 보건소에서 주민을 대상으로 한 저염식 조

리, 시식 등 소금 섭취 감량 프로그램을 운영하고 있다. 우리나라 또한 2002년 “한국인을 위한 식생활 목표 및 식생활 지침”을 개정하였고, 가공식품의 나트륨함량 모니터링 및 관련 표시기준을 강화하였다. 근래에는 식품의약품안전처가 영양성분표시 개정을 통해 나트륨함량 표시를 확대하기 위한 정책을 추진 중에 있다. 이처럼 주요국은 여러 가지 방법을 통해 고혈압과 같은 성인질환의 예방을 통해 국민건강을 증진시킨다는 목적으로 나트륨에 대한 소비감소를 유도하고 있는 실정이다. 우리나라의 나트륨 주요급원식품은 김치류(배추김치, 총각김치, 나박김치)가 30%, 국 및 찌개류 18%, 가공식품 중 라면 4.7% 순으로 나타나 우리 전통식생활과 관련이 깊음을 알 수 있었다. 이와 반면에 미국이나 영국은 가공식품이 70%를 차지하고 있어 우리 식생활에 가공식품과 외식 빈도가 증가함에 따라 이와 관련된 식품들로 점차 옮겨갈 것으로 보인다. 결과적으로 장류를 주원료로 하는 국과 찌개류가 김치류 다음의 나트륨 주요 급원으로 나타남에 따라 이에 대한 소비자 인식을 고려할 필요성이 제기된다. 전통·한식 된장의 경우, 별도의 처리 없이 염수(또는 염)만으로 변패를 방지하며 숙성하기 때문에 염도가 14%로 비교적 고염을 유지하고 있는데 이는 소비자 트렌드와는 거리감이 있다. 장류를 생산하는 기업들이 제품의 저염화를 유도하는 이유이기도 하다. 공정개선을 통한 장류의 저염화는 발효·숙성 중 유기산처리를 하거나 유산균 등 미생물을 접종하여 pH를 낮추기도 하고, 발효·숙성 공정은 비교적 고염을 유지하다가 포장 전 혼합공정에서 메주가루나 볶음콩가루, 기타 염도를 낮출 수 있는 재료를 혼합하여 살균 포장함으로써 염도를 낮출 수 있다. 또한, 저염 된장에 관한 연구로 에탄올 첨가, 감마선 조사 및 nisin생성 유산균을 이용하는 시도도 있었다. 공장산 장류제품의 경우 저염화를 위해 염 첨가량을 감소시키거나 부분적으로 NaCl을 대체하여 제품을 생산하기도 하며, 간장의 경우 전기투석을 이용하여 포장 전에 탈염하기도 한다(1). 그러나 이러한 방법들은 제한적이며 맛이 감소되거나 대체제에 의한 이미·이취를 발생시키는 문제점을 일으키기도 한다. 이러한 노력으로 일부 자본과 기술력을 갖춘 기업의 경우 저염 제품을 출시하여 시장에 내놓기도 하였다. 일본 마루코메는 환자식 저염 된장을 출시하였고 기꼬망도 염도를 50% 낮춘 간장을 출시하였다. 우리나라의 샘표나 대상과 같은 기업도 낮은 염도의 제품을 출시하고 소비시장 확대를 모색하고 있다. 하지만, 전통·한식 장류제품을 생산하는 기업의 경우, 기술적으로나 설비가 이러한 저염 장류제품을 생산하기에 부족하고 관능의 변화에 대한 우려로 시도를 꺼려한다. 또한, 저염 시 부패미생물이나 이상발효 미생물의 생육에 의한 품질열화도 많은 문제를 야기하게 될 것이다. 이에 본사는 본 연구 과제를 통해 획득한 부패발효미생물을 저해하는 발효미생물과 장류제품적용에 적합한 발효균을 제공 받아 메주를 제조하고, 이를 이용한 저염 된장·간장 발효·숙성 공정이 현장에 적용 가능하도록 하는 기술적 목표를 이루고 현재 소비트렌드를 파악하여 시장에 제공할 수 있는 시제품을 만들고자 하였다.

## 제2장 국내외 기술개발 현황

장류에 관련된 안전성 측면에 대한 연구는 한국식품과학회에서 발표된 aflatoxin 연구는 1969년 이래 24편, 한국식품위생안전성학회에는 3편이 발표되었으며 이중 장류식품 연구로는 대두 발효 식품 중에 aflatoxin 유무 검색(1969), 한국식품 중 aflatoxin 검출(1977), 대두식품 중 aflatoxin 검색(1985), 미생물을 이용한 aflatoxin의 저감방법(2000), 장에서 슛의 aflatoxin 제거 효과(1989), 장에서 발효기간 별 Aflatoxin 함량 변화(2000), 길항 미생물에 의한 aflatoxin 제어(2000), aflatoxin에 대한 *Bacillus* 대두 발효 추출액의 항돌연변이 효과(2005), 식품 중에 aflatoxin 노출량 평가(2007)등이 있다.

## 제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

메주발효균주의 발효패턴을 분석하고 걸 말림 및 발효공정 중 성분변화를 주어 품질변화를 관찰한다.

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 재료

- (1) 대두 : 본 실험에 사용한 대두는 국내산(전북 순창) 대두를 사용하였다.
- (2) 사용균주

사용균주는 본사에서 사용하고 있는 균주와 발효미생물센터에서 분리 및 선별한 균주를 받아서 사용하였다. 곰팡이 균주는 대조구로는 충무발효(주) 종균을 사용하였으며, 선별된 균주 중에서 저염 된장·간장 제조 중에 효모를 생성을 줄여주는 균주 (*Aspergillus oryzae* SKM07)을 사용하였다. 세균은 *Bacillus licheniformis* SRCM100027(대조구), *Bacillus licheniformis* SCK B11을 사용하였다.

#### 나. 방법

- (1) 선정된 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus licheniformis*로 메주 제조방법

걸 말림 공정은 65℃에서 24시간 진행하였다. Sample 채취방법은 대두 사용량 5 ton 1배치를 기준으로 각 분석일별로 5개를 채취하여 분석항목별 상하 값 각 1개씩을 제외한 3개의 평균값으로 나타냈다. 메주생산 산업적용을 위하여 실제 제조공정을 적용한 관계로 각 배치별 모집단의 수는 6,600개 정도로 다량이며, 발효실 내 위치와 균 접종 오차로 인하여 표본 간 오차가 어느 정도 발생하였으나 발효패턴에 대한 분석은 가능하였다.

메주 발효공정 연구는 기존 생산 공정에서 메주발효균주의 발효패턴을 분석하고 걸 말림 및 발효온도, 증자통의 정도, 성형 시 온도에 변화를 주어 품질변화를 관찰하였다. 발효균의 접종량은 *Aspergillus oryzae*는 0.1% *Bacillus licheniformis*는 0.05%로 고정하였다. 메주의 품질기준은 된장 숙성 중 품질에 가장 많은 영향을 미치는 Protease activity(이하 PA)와 수분을 기준으로 하였으며, 이외 pH, Amino type nitrogen(이하 AN)을 발효기간별로 분석하였으며, 발효최종일에는 *Bacillus cereus*와 총균수를 함께 측정하였다.

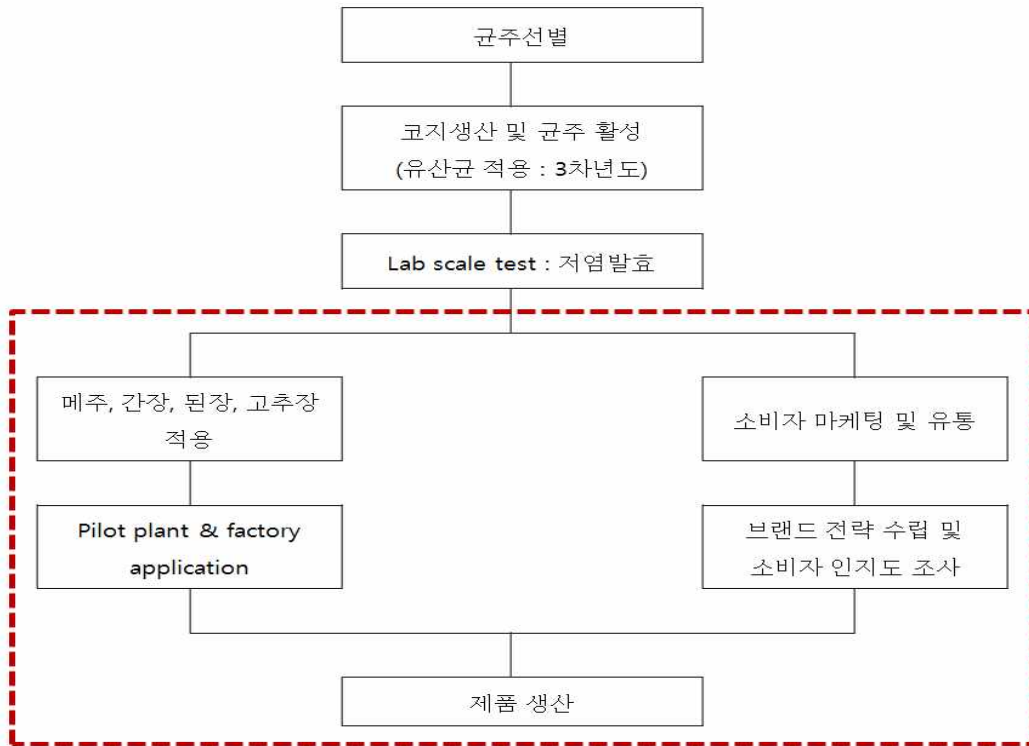


Figure 1. 산업적 시생산을 위한 연구개발도

(2) 제조된 메주를 이용한 염수침지 방법

대조군과 실험군 1, 2가 각각 8%와 14%의 된장과 14%와 20%의 간장이 되도록 염수를 제조하여 침지하였다. 메주와 염수비율은 1:2로 하였으며, 이때 효모(*Torulaspora microellipsoides* 623)를 1%씩 접종하였다. 침지기간은 약 4주 정도로 된장기준 8% 대조구당금액의 TN값이 0.8% 이상이었을 때 장 분리를 실시하였다.

(3) 저염, 고염 된장 간장 숙성

된장 기준 8% 처리구와 14% 처리구별로 된장 간장을 분리하여 된장제조 시 침지액에 담겨져있는 메주들을 잘 뭉쳐지게 파쇄 후 숙성을 시켜주고 간장제조 시에는 침지액을 여과시켜 숙성을 시켜준다. 각각의 처리군은 0일부터 6일까지 12일마다 sampling하여 된장은 발효기간에 따라서 수분함량, 염도, pH, 산도, AN, 색도의 변화를 분석하였고, 간장 또한 발효기간에 따라서 당도, 염도, pH, TN, 산도, AN의 변화를 분석하였다

(4) 선정된 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus licheniformis*로 고추장제조

고추장 제조에 사용된 대두와 쌀과 고춧가루는 순창에서 구입하였으며, 쌀가루는 대호물산(주)에서 생산된 시판품을 사용하였으며, 고추장 제조에 사용된 곰팡이 균주는 충무발효(주)의 종균과 세균은 *Bacillus licheniformis* SRCM100027(대조구)와 발효미생물산업진흥원에서 제공 받은 *Bacillus subtilis* SCKB1307을 사용하였다

(5) 품질분석 실험방법

(가) 수분측정

발효가 끝난 콩알메주 및 메주(시료)를 곰팡이 별로 채취하여 Blender에 마쇄 후 적외선 수분 측정기에서(Kett Engineering) 수분을 측정하였다.

(나) pH측정

발효가 끝난 콩알메주 및 메주(시료)를 Blender에 마쇄 후 무게 5 g을 취하고 증류수를 가하여 50 mL로 한 후 이를 충분히 혼합한 후 pH meter(Mettler Toledo)기를 이용해 측정하였다.

(다) Protease활성 측정

시료 10 g 을 취하고 증류수를 가하여 100 mL 로 한 후 35°C에서 150 rpm으로 1시간 진탕 혼합하여 추출한 여과한 액을 조효소액으로 하여 효소액 0.5 mL, McIlivine씨 완충액 1 mL, 2% Milk Casein 1.5 mL 을 첨가한 후 항온수조(대한 Science) 38°C에 1시간 중탕 반응시킨 후 0.4 M TCA 3 mL을 첨가하여 38°C에 20분간 중탕 반응시켰다. 이를 여과하여 얻은 여액 1 mL과 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 mL, Phenol Reagent 2배 희석한 액을 1 mL 반응시켜 38°C에 30분간 반응시킨 후 660 nm 흡광도를(HITACHI U-5100 UV/VIS) 측정하였다.

효소활성은 조효소액 1 mL 가 1분간에 1 ug 의 tyrosine을 생성하는 효소량을 1 unit 로 하였다.

(라) 아미노태 질소(amino-type nitrogen) 측정

아미노태 질소는 Formol법으로 측정하였다. 시료 2 g 을 비커에 취하고 증류수 100 mL를 가하고 10분 동안 진탕 혼합하여 충분히 용해한 다음 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4로 한다. 여기에 중성 formalin 20 mL 를 가하고 다시 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화·적정하였다.

$$\text{아미노태 질소(\%)} = \frac{(A-B) \times 1.4 \times F \times 100}{\text{시료량(g)}}$$

여기서, A : 0.1N NaOH 용액의 적정량(mL)

B : 0.1N NaOH 용액의 공시험 적정량(mL)

F : 0.1N NaOH 용액의 농도 계수

(마) Glutamate 측정

Glutamate Assay Kit(Bio vision)로 측정하였다.

배양이 끝난 sample을 4500 rpm에서 15분간 원심분리 하여 균체를 제거한 후 상층액 50 uL 를 96well plate에 각각 분주 하였다. reaction Buffer인 assay Buffer 90 uL, Glutamate developer 8 uL, Glutamate enzyme mix 2 uL를 sample이 있는 well에 첨가하였다. standard glutamate well에도 첨가하였다. 이를 37°C에서 30분 동안 배양시킨 후 450 nm Micro reader에서 측정하였다.

Glutamate standard curve를 위해서 1 mM standard Glutamate를 준비하여 96well plate에 1 mM Glutamate 0, 2, 4, 6, 8, 10 uL를 순서대로 첨가하였다. well당 total 부피가 50 uL가 되도록 assay Buffer를 첨가하였다.



(바) 대장균군 정량실험

시료 10 g에 멸균증류수 90 mL을 가하여 100 mL로 맞춘다. 이를 검체액으로 이용하여 1 mL을 채취하여 대장균 균용 페트리필름(3M)에 가한다. 그리고 37°C에서 24 hr 배양한다.

(사) *Bacillus cereus* 검출 실험방법

시료 10 g에 인산염완충용액 90 mL을 가하여 100 mL로 맞춘다. 이를 검체액으로 이용하여 0.25 mL을 채취하여 미리 만들어둔 선택배지(BBC, Oxoid)에 가하여 도말한다. 이때 실험은 4반복을 하여 1 mL로 맞춘다. 그리고 30°C에서 24 hr 배양한다.

## 2. 실험결과 및 고찰

### 1. 산업적 적용을 위한 발효조건 연구 결과

#### 가. 메주발효균의 산업적 적용을 위한 메주발효조건 연구 결과

기본공정 적용 시 발효기간별 품질 변화 분석 결과를 Table 1.에 나타내었다.

기본 공정은 침지 12시간, 겉 말림은 65℃에서 24시간, 발효는 30℃에서 14일 내외로 실시하였다. 기본공정에 대한 품질변화 분석결과 Table 1.과 같다. 성형 시 메주의 수분은 57.2%이며 겉 말림 공정 후 표면 5 mm의 수분 함량은 33.9%로 메주발효에 적합한 상태를 타나냈다. 수분은 발효 1일차(D+2) 49.7%를 시작으로 자체 품질 기준인 35% 내외에 도달하기 까지 약 13일이 걸렸으며, 또 하나의 중요한 품질기준인 PA는 발효 9일차(D+10)에 자체 품질기준 100 unit/g을 초과하였다. 최종적으로 발효 종말점은 증자 및 성형일로부터 13일에 도달하였으며, 이후 변화 관찰을 위해 발효종료는 16일이 경과한 후에 종료하였다. 발효종료 후 메주를 분석한 결과는 수분 30.5%, PA 124.7 unit/g이었으며, 이외 AN 263.7 mg%, pH 7.5, 총균수  $7.9 \times 10^9$ , *Bacillus cereus*(이하 BC)는 검출되지 않았다.

Table 1. 기본공정 적용 시 발효기간별 품질 변화 분석.

공정명	분석일 (day)	분석항목							
		AN mg%	pH	수분함량 %			PA u/g	총균수 (g당)	BC (g당)
원료/세척/침지	대두	-	-	7.5			-	-	-
	세척	-	-	-			-	-	-
	침지 후	-	-	-			-	-	-
겉말림	D-day	-	-	57.2			-	4.1E+03	N.D.
	D+1	-	-	표면 5mm 수분(%) 33.9			-	-	-
메주발효	D+2	110.4	7.0	내측	외측	평균	15.8	-	-
				57.1	37.0	49.7			
	D+4	161.2	7.3	내측	외측	평균	47.5	-	-
				56.3	36.1	48.2			
	D+7	127.9	7.6	내측	외측	평균	40.0	-	-
				54.1	30.2	44.1			
	D+10	244.3	6.9	내측	외측	평균	144.9	-	-
				55.7	34.1	39.7			
D+13	224.5	7.5	내측	외측	평균	108.6	-	-	
			54.4	25.8	36.3				
D+16	263.7	7.5	내측	외측	평균	124.7	7.9E+09	N.D.	
			51.8	25.1	30.5				

발효온도 조정 시 발효기간별 품질변화 분석 결과는 Table 2.와 같다. 보통 곰팡이류의 생육 적정 온도가 30℃인 점을 감안하면 온도변화가 집중한 *Aspergillus*의 생육에 많은 영향을 미칠 것으로 보이지는 않았으나, 온도를 높일 경우 건조속도가 빨라지고 이로 인해 메주자체의 수분활성도가 세균이나 기타 균류보다는 곰팡이류의 생육에 적정하게 유지되는 것으로 판단되었다. 또한, 40℃ 이상으로 발효 온도를 유지시킬 경우 병행 복 발효법을 이용하여 발효하고 있는 제조공

정상 함께 접종한 *Bacillus licheniformis*의 생육이 초기에 지나치게 왕성하게 일어나 제품 품질에 많은 변화를 불러오기 때문에 온도변화에 대한 발효기간별 성분분석 변화관찰은 35°C에서 진행하였다. 성형 시 수분함량은 56.3%, 걸 말림 후 표면수분함량은 33.2%로 기본조건과 동일하게 나타났다. 그러나 발효 1일차 수분함량은 49.4%, AN 110.9 mg%, pH 6.6 유사하였으나, 중요한 품질기준 중의 하나인 PA는 기본조건 보다 2배인 38.2 unit/g 나타났다. 이런 발효패턴은 지속적으로 유지되어 PA는 D+7일, 수분함량은 D+10일에 도달하여 기본조건보다 각각 3일 정도 이르게 발효종말점에 도달하였다. 메주발효는 D+13일에 종료하였으며, 이때, 수분함량은 25.5%로 기본조건보다 3일 빠른 기간임에도 5% 가량 수분이 더 감소되었으며, PA는 137.9 unit/g, pH 6.9, 총균수는  $1.1 \times 10^{10}$ , BC는 검출되지 않았으며 AN은 450.6 mg% 2배가량 증가하였다.

Table 2. 발효온도를 조정 시 발효기간별 품질 변화 분석

공정명	분석일 (Day)	분석항목							
		AN mg%	pH	수분함량 %			PA u/g	총균수 (g당)	B.C. (g당)
원료/세척/침지	대두	-	-	7.5			-	-	-
	세척	-	-	-			-	-	-
	침지후	-	-	-			-	-	-
걸말림	D-day	-	-	56.3			-	9.2E+03	N.D.
	D+1	-	-	표면 5mm 수분(%) 33.2			-	-	-
메주발효	D+2	110.9	6.6	내측	외측	평균	38.2	-	-
				56.5	35.1	49.4			
	D+4	161.2	6.8	내측	외측	평균	96.1	-	-
				56.0	30.0	45.9			
	D+7	155.8	6.7	내측	외측	평균	103.1	-	-
				52.8	24.2	40.1			
	D+10	273.2	7.3	내측	외측	평균	122.1	-	-
				53.9	23.3	34.2			
	D+13	450.6	6.9	내측	외측	평균	137.9	1.1E+10	N.D.
				18.5	22.9	25.5			

대두의 증자 정도는 메주 발효에 많은 영향을 미친다. 증자가 과하였을 경우, 메주 표면에 피막을 형성하고 전체적 조직도 치밀하게 유지되기 때문에 수분감소 속도가 느려지고 내부 수분활성도를 높게 유지하기 때문에 *Aspergillus*속의 생육 속도를 저하시킬 수 있다. 이러한 경우, 전체적으로 발효 속도도 느려지기 때문에 수분함량과 PA는 상당한 발효기간이 지나야 발효종말점에 도달하게 되고 이는 생산비 증가로 이어질 수 있다. 또한, 내부에 이상발효균의 증식이나 같이 접종한 *Bacillus licheniformis*의 생육이 과하게 진행되어 된장 생산 시 색도 저하 및 이취가 발생할 수 있다. 반대로 대두의 정도를 기준보다 낮게 증자하였을 경우, 공정 상 성형이 잘되고 기계장치의 오류가 적어지기 때문에 작업의 편의성은 증대되나 발효미생물의 생육이 저하될 수 있고 또한, 대두발효식품의 주 이용목적인 단백질의 이용성이 떨어지고 된장 숙성을 저하시키고 생공의 질감과 맛 등이 느껴질 수 있다. 그러므로 증자대두의 정도는 관능적 특성뿐 만 아니라 발효미생물의 생육에도 영향을 미치기 때문에 매우 중요한 요소 중의 하나라고 볼 수 있다. 증자공의 정도측정 방법은 간이측정법(증자공을 저울이 날개로 올리고 동전 등 면이 평평한 물체

를 이용하여 눌러 파쇄되는 시기에 표시되는 g수 측정)을 이용하였으며, 이에 따라 기존 공정 상 설정된 증자대두의 경도는 700 이었으며, 본 과제에서는 이보다 100 낮은 600 정도로 증자하여 발효기간에 따른 변화를 분석하였다. 기타 발효조건은 기존 공정과 동일하게 설정하였다. 경도가 700이상 800 가까이 콩의 증자가 이뤄질 경우, 앞서 말한 표면피막형성에 따른 발효기간 증가와 기계장치 오작동 증가로 인해 공정연구가 불가능하기 때문에 본 연구에서는 제외하였다. 성형 시 메주의 수분함량과 걸 말림 후 표면수분함량은 기본조건과 유사하게 측정되었다. 수분함량은 기본조건보다 2일 정도 늦게 발효종말점에 도달하였으며, PA 또한 약간 낮게 유지되는 것을 알 수 있었다. 전체적으로 발효종말점에 기본조건이나 다른 발효조건 보다 상당히 늦게 도달하는 이유는 발효미생물이 증자콩의 영양성분에 대한 이용성이 떨어지기 때문인 것으로 판단된다. *Aspergillus oryzae*는 발효 중 발열을 통해 일부 내부 부피 팽창을 일으키고 균사가 뻗어가는 과정에서 조직을 연화시킨다. 이 두 가지 양상은 결과적으로 메주의 전체적인 표면적을 넓게 함으로써 수분감소속도를 향상시킨다. 이러한 경우, *Aspergillus oryzae* 생육속도는 더욱 증가하게 되고 PA와 수분이 발효종말점에 더욱 빠르게 이르게 하는 효과를 가진다. 앞서 말한 관능적 특성은 차제하고라도 발효패턴이 늦어지는 것은 메주의 산업적 생산을 위해서는 재고해야 할 사항으로 판단된다. 증자 및 성형 후 15일이 경과하여 발효를 종료하였다. 이때 품질기준인 수분함량은 35.7%, PA 94.6 unit/g에 도달하였으며, 이 외 AN 246.0 mg%, pH 7.0, 총균수  $1.3 \times 10^{10}$ , BC는 검출되지 않았다.

발효균 접종 온도(성형 시 온도)를 조절하여 발효기간별 품질변화를 분석한 결과는 Table 3과 같다. 메주발효균 접종 온도는 포자형태로 접종하는 *Aspergillus oryzae*의 생육과 밀접한 관련성이 있다. 일반적으로 *Bacillus*속은 고온에서 생육이 가능하고 발효 시 자체적인 발열에 의해서 60℃ 정도까지 품온을 상승시키기도 한다. 그러나 30℃ 정도가 생육적온이 *Aspergillus oryzae*의 경우 고온접종 시 포자 형태로 접종이 되더라도 온도에 의한 쇼크로 발아율이 떨어질 수 있으므로 접종 시 증자콩의 온도는 *Aspergillus oryzae*의 생육에 상당한 영향을 미칠 수 있다. 또한, 더딘 발아율은 함께 접종한 *Bacillus licheniformis*의 생육을 과도하게 진행시켜 메주 자체 pH를 높이므로 비교적 낮은 pH의 생육환경에서 잘 자라는 곰팡이류의 생육에 나쁜 영향을 미칠 수 있다. *Aspergillus oryzae*의 생육은 앞서 기술한 바와 같이 메주수분감소 및 PA에 영향을 미치므로 이의 관리는 메주품질관리에 있어서 중요한 사항이라고 할 수 있다. 비록 걸 말림 시 실내 온도를 60℃ 이상으로 유지하기는 하나, 건열이기도 하고 이는 단지 잡균 오염방지를 위한 표면수분 증발이 목적일 뿐 메주 내부로 열전달이 쉽게 이뤄지지 않는기 때문에 내부 발효균에는 영향이 그다지 크지 않을 것으로 판단된다. 증자 및 성형 시 수분함량은 56.9%, 걸 말림 후 표면수분함량은 31.2%로 기본조건과 유사한 경향을 보였다. 그러나 발효 2일차 PA를 제외하고 전체적으로 빠른 패턴의 수분감소와 PA증가를 보였는데 이는 기본조건보다 5 ~ 6일나 빠르게 진행되었으며, 생육 관찰결과 *Aspergillus oryzae*의 생육이 급격히 증가함을 알 수 있었다. 또한, 단축된 기간에도 불구하고 기본조건보다 AN, PA가 높음을 알 수 있었다.

Table 3. 발효균 접종 온도(성형 시 온도) 조정 시 발효기간별 품질 변화 분석

공정명	분석일 (day)	분석항목							
		AN mg%	pH	수분함량 %			P-act u/g	총균수 (g당)	BC (g당)
원료/세척/침지	대두	-	-	7.5			-	-	-
	세척	-	-	-			-	-	-
	침지 후	-	-	-			-	-	-
겉말림	D-day	-	-	56.9			-	1.1E+03	N.D
	D+1	-	-	표면 5mm 수분(%) 31.2			-	-	-
메주발효	D+2	135.2	5.9	내측 57.7	외측 45.2	평균 49.3	15.5	-	-
	D+5	193.2	6.2	내측 57.5	외측 37.8	평균 43.8	64.5	-	-
	D+7	430.0	6.5	내측 56.6	외측 33.3	평균 39.4	136.5	-	-
	D+10	402.3	6.7	내측 54.5	외측 28.1	평균 36.3	156.2	5.2E+10	N.D

발효는 자체수분함량기준에 도달한 D+10일에 종료하였으며, 이때 수분함량은 36.3%, PA 156.2 unit/g, AN 402.3 mg%, pH 6.7, 총 균수  $5.2 \times 10^{10}$ , BC는 검출되지 않았다. 비록 *Aspergillus oryzae*의 빠른 생육이 생산 공정의 단축, 높은 AN, PA함량을 나타내고는 있으나, 이러한 급격한 발효는 발효종말점에서 편차가 심하고 보관(냉장 포함), 유통 또는 염수침지 시 침투기간 중에도 대체로 높은 생육이 유지되어 다량의 포자를 생성하여 쓴맛을 낼 수 있다. 대량 생산 공정의 경우 알메주 제국 시 포자를 형성하더라도 추후 대두 증자물을 다량 혼합하여 스타터의 개념으로 사용하기 때문에 이러한 문제점이 노출되기 쉽지 않으나, 한식 또는 전통 메주로 된장을 제조하는 것은 자체가 완제품이 되기 때문에 더더욱 포자 관리에 신경을 써야한다.

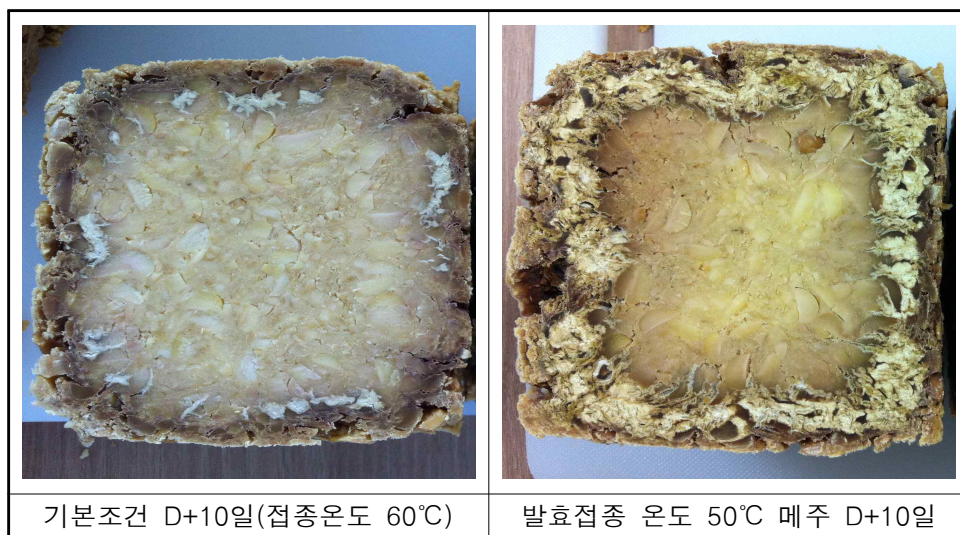


Figure 2. 발효균 접종 후 10일차 메주 단면 사진 비교

종합적으로 분리된 메주발효균을 현장에 적용은 대두침지 12시간, 증자경도 700 유지, 접종온도 50℃ 내외, 발효기간 9~12일의 조건이 적절한 것으로 판단되며, 또한, 현장에서 육안으로 직접 발효정도, 포자생육정도를 관찰하여 정확한 발효 종말점을 찾아내는 것도 중요할 것이다. 이와 더불어 메주발효 중 *Aspergillus oryzae*의 포자 생육을 면밀히 관찰하고, 전통 또는 한식 된장에서 PA 고·저가 된장숙성에 어떤 영향을 미치는지에 대한 지속적인 연구가 필요할 것이다.

#### 나. 선정된 종균을 활용한 저염 된장·간장 적용 연구 결과

사용균주는 본사에서 사용하고 있는 균주와 제2협동기관에서 분리하고 1세부에서 선별한 균주를 받아서 사용하였다. 곰팡이 균주는 대조구로는 충무발효(주) 종균을 사용하였으며, 선별된 균주 중에서 저염 된장·간장 제조 중에 효모를 생성을 줄여주는 균주 (*Aspergillus oryzae* SKM07)을 사용하였다. 세균은 *Bacillus licheniformis* SRCM100027(대조구), *Bacillus licheniformis* SCK B11을 사용하였다.

선별한 대두를 물에 14시간 침지한 후 2시간 동안 탈수를 하여 증자기 내에서 115℃에서 10분동안 증자하였다. 증자콩은 파쇄 하여 각각 1.5 kg씩 10×8×15 cm 정도로 성형하여 사각메주를 제조하였으며 성형 전에 선정된 발효균인 *Aspergillus oryzae* SKM07 0.1%, *Bacillus licheniformis* SCKB11 0.05%(B)를 접종하였다. 대조군으로 충무발효 종균과 *Bacillus licheniformis* SCC125037(A)를 실험군과 동일한 양을 접종하여 사용하였다. 마지막 처리구로는 *Aspergillus oryzae* SKM07와 충무발효를 0.05%, *Bacillus licheniformis* SCKB11와 *Bacillus licheniformis* SCC125037를 0.025% 혼합하여 접종(C)하였다. 발효는 30℃, 상대습도 30%로 설정하였다.

메주의 품질기준은 된장 숙성 중 품질에 가장 많은 영향을 미치는 protease activity(PA)와 pH, amino type nitrogen(AN) 등을 발효기간별로 분석하였다. 분석방법은 각 실험군 별 5개의 메주를 채취하여 상하 값을 제외한 3개의 평균값으로 하였다.

발효종말점은 선정 균(A)의 PA가 100 unit/g에 도달한 때로 하였는데 이는 본사 메주품질기준에 따른 것으로 한식사각메주 특성 상 100 unit/g 정도로 메주가 발효하더라도 침지 시 염수침투기간 중 메주의 후발효가 일어나고 과도한 발효로 포자형성이 많아지면 관능특성 저하를 가져올 수 있기 때문이다. 이와 관련 하여 일본에서 대두를 이용한 적된장 제조 시 코지의 발효는 균사를 형성하는 정도의 약국(弱麴)으로 제조해 곰팡이가 과도하게 발효하지 않도록 한다(정동호 외, 콩발효식품, 2006년).

실험결과 발효기간에 따라 대조군과 실험군 모두 수분함량은 감소하였으며 pH와 PA활성은 증가하는 경향을 보였고, 적정산도는 감소하였다가 증가하는 경향을 보이고 있다. AN함량은 증가 하였다가 감소하는 경향을 보였다.

발효 종료일차 pH의 경우 대조군과 실험군 모두 6.3 ~ 6.5로 큰 편차를 보이지 않았다. 일반적으로 사각메주에서 pH는 초기에 감소하였다가 발효기간이 늘어남에 따라 증가하는 경향을 보이는데 이러한 원인은 초기 유산균 생육에 의해 낮아진 pH가 이후 곰팡이와 세균이 생성하는 단백질분해효소에 의한 단백질의 분해물 및 암모니아성 질소화합물의 생성과 축적으로 여겨진다. 그러나 전통메주발효에서 pH는 5 ~ 8까지 폭넓은 범위를 보이며 이는 원료별, 지역별 환경에 따라 대두의 단백질분해에 따른 혐기성 질소화합물의 생성, 미생물의 증식 및 이에 따른 유기산의 생성이 다르기 때문인 것으로 추정하고 있다(5, 6).

Table 4. 대조구균(A)을 이용하여 제조한 사각메주의 품질특성

대조균	분석항목				
	수분함량(%)	pH	PA(unit/g)	적정산도 (ml/g)	AN(mg%)
발효 05일	47.0	5.9	51.3	21.6	362.7
발효 12일	42.9	6.4	67.1	17.7	592.7
발효 15일	40.3	6.3	80.2	21.3	455.1

\* 충무발효 종균 0.1% + *Bacillus licheniformis* SCC125037 0.05%

Table 5. 선정된 균(B)을 이용하여 제조한 사각메주의 품질특성

실험균 1	분석항목				
	수분%	pH	PA(unit/g)	적정산도 (ml/g)	AN(mg%)
발효 05일	47.8	5.7	11.9	17.6	263.0
발효 12일	43.5	6.0	78.0	18.5	452.3
발효 15일	40.5	6.3	116.8	21.2	454.6

\* *Aspergillus oryzae* SKM07 0.05% + *Bacillus licheniformis* SCK B11 0.025%

Table 6. 선정 균과 대조구균을 혼합(C)하여 제조한 사각메주의 품질특성

실험균 2	분석항목				
	수분%	pH	PA(unit/g)	적정산도 (ml/g)	AN(mg%)
발효 05일	46.7	5.9	67.0	23.6	240.1
발효 12일	42.1	6.4	102.2	17.5	748.8
발효 15일	39.1	6.5	74.2	17.9	430.6

\* (충무발효 종균 0.05% + *Bacillus licheniformis* SCC125037 0.025%) + (*Aspergillus oryzae* SKM07 0.05% + *Bacillus licheniformis* SCK B11 0.025%)

메주발효종말점의 주요한 지표인 PA는 발효기간에 따라 대조균과 실험균 모두 증가하였으며, 실험균1은 발효 15일차에 116.8 unit/g을 나타냈다. 이 기간에 대조균은 80.2 unit/g 으로 30% 가량 낮은 활성을 나타냈으며, 혼합균인 실험균2 또한 74.2 unit/g 으로 실험균1 보다 낮았다. 이는 유 등(6)이 전통식 메주의 PA는 평균적으로 안쪽은 88.9 unit/g, 바깥쪽은 114.4 unit/g 이었다고 보고한 결과와 유사하게 발효되었음을 알 수 있었다.

실험균 별 적정산도는 증감경향이 일정한 패턴을 보이지는 않았다. 이는 김 등(7)의 연구결과와 같이 발효종균별로 적정산도의 경향은 일률적이지 않다는 것을 보여준다. 특히나 사각메주의 경우에는 내부의 혐기적 조건 때문에 유산균이 접종이 되지 않은 상태에서도 자생적으로 자라고 이로 인해 유기산 등의 생성 패턴이 일정하게 나타나지 않음을 보여주는 결과였다.

발효기간별 아미노태 질소함량(AN)은 대조균과 실험균2는 증가하였다가 감소하는 경향을 보였으며, 실험균1은 증가 후 유지되었다. 그러나 발효최종일차 함량은 430~455 mg%로 유사하게

나타났다. 일반적으로 아미노태 질소 함량은 PA 활성 증가에 따라 증가하였다가 유리된 아미노산이 암모니아 등으로 분해되며 메주의 pH를 높이고 AN을 감소시키는 것으로 알려져 있다(7). 그러나 이러한 현상은 비단 높은 PA에서만 나타나는 것은 아니며, 비록 비교적 낮은 PA활성을 보이더라도 발효기간이 증가함에 따라 나타나기도 한다는 것을 본 실험을 통해 알 수 있었다. 이와 같이 대조군과 실험군의 메주발효 중 품질특성 변화를 분석하였으며, 각각의 샘플은 된장 제조를 위하여 염도별로 구분하여 염수에 침지하고 그 변화 관찰하였다.

#### 나. 대조군 및 실험군1, 2 메주의 염수침지 중 품질변화

상품용으로 판매된 된장은 일본식 된장 제조방법을 바탕으로 하고 있기 때문에 한국 된장의 정통성과 맛에 있어 다소 부족한 점이 있다(8). 발효미생물에 의한 차이가 가장 클 것이나 제조공정 상에서는 성형여부와 바로 염수침지공정이 해당할 것이다.

염수 침지 시 주요한 변화는 메주발효에 관여하는 곰팡이와 세균류의 성장을 억제하고 그들이 배출한 효소를 이용하고자 하는 것과 관여하는 미생물 군을 젖산균이나 *Bacillus*속과 같은 호염성 세균과 효모로 전환되는 것이다.

또한, 장 분리를 통해 메주발효 시 배출된 효소의 농도를 낮춤으로서 된장 숙성 중 갈변이나 효소작용 등 생물화학적 반응이 지나치게 일어나는 것을 방지하기 위한 것으로도 보인다. 그러나 메주발효나 침지 중 유리된 유용성분을 간장으로 침출시켜 이용한다는 것 이외에 장 분리 목적을 연구한 자료는 찾아보기 힘들다.

염수침지는 된장과 간장의 품질을 좌우하는 중요한 요소로 메주크기나 담금비율, 천일염의 종류, 침지온도에 영향을 받는다. 일반적으로 메주가 작고 표면적이 넓을수록 메주발효균의 증식이 왕성하여 유리아미노산의 함량이 증가할 것으로 생각하지만, 이 등(9)이 연구한 결과에 따르면 메주크기가 클수록 비휘발성 유기산 함량이 증가하고 이와 비례관계로 유리아미노산의 함량이 증가한다고 보고하였다.

염수비율은 간장으로 유리되는 유용성분을 양을 좌우한다. 최 등(10)이 연구한 결과에 따르면, 콩 사용량에 대비한 간장의 양은 1:1일 때 23.3%, 1:1.5 85.9%, 1:2 145.7%, 1:2.5 197.4로 증가하며 이와 비례하여 콩의 무게 대비 용출되는 TN의 총량도 6.9%, 21.4%, 33.7%, 33.2%로 증가한다고 보고하였다. 이에 따라 관능도 1:1일 경우가 가장 좋았으며 염수비율이 증가할수록 관능도 감소하였다.

소금은 된장과 간장의 맛에 직접적으로 관여할 뿐만 아니라 다양한 미생물의 생육을 억제하기도 한다. 장 등(11)은 천일염과 정제염을 이용하여 된장의 품질특성을 연구하였는데 천일염을 사용한 된장이 정제염을 사용한 된장보다 갈변 진행속도가 느리고 유리아미노산 함량이 높게 검출된다고 보고하였다.

전통된장과 간장의 염도는 침지 중 염수의 염도에 따라 결정된다. 때에 따라 염수와 고체염을 혼합하여 사용하기도 하지만, 일반적으로 염수를 제조하며 이에 따라 된장과 간장의 기본적인 염도가 결정된다. 염수의 염도는 발효된 메주의 미생물 생육에 영향을 주며 이로 인해 간장의 품질기준이 되는 TN과 AN의 용출과 유리에도 영향을 준다. 또한, pH의 감소속도에도 많은 영향을 미친다.

따라서 본 실험에서는 대조군과 실험군 1, 2를 염도에 따라 구분하여 침지하고 이에 대한 품질변화특성을 알아보려고 하였다.

대조군과 실험군 1, 2가 각각 8%와 14%의 된장과 14%와 20%의 간장이 되도록 염수를 제조



하여 침지하였다. 메주와 염수비율은 1:2로 하였으며, 이때 효모(*Torulaspora microellipsoides* 623)를 1%씩 접종하였다. 침지기간은 약 4주 정도로 된장기준 8% 대조구담금액의 TN값이 0.8%이상이었을 때 장분리를 실시하였다.

각각의 처리군은 0일부터 24일까지 6일마다 염수를 채취하여 당도, 염도, pH, TN, 산도, AN의 변화를 분석하였다.(Figure 3)

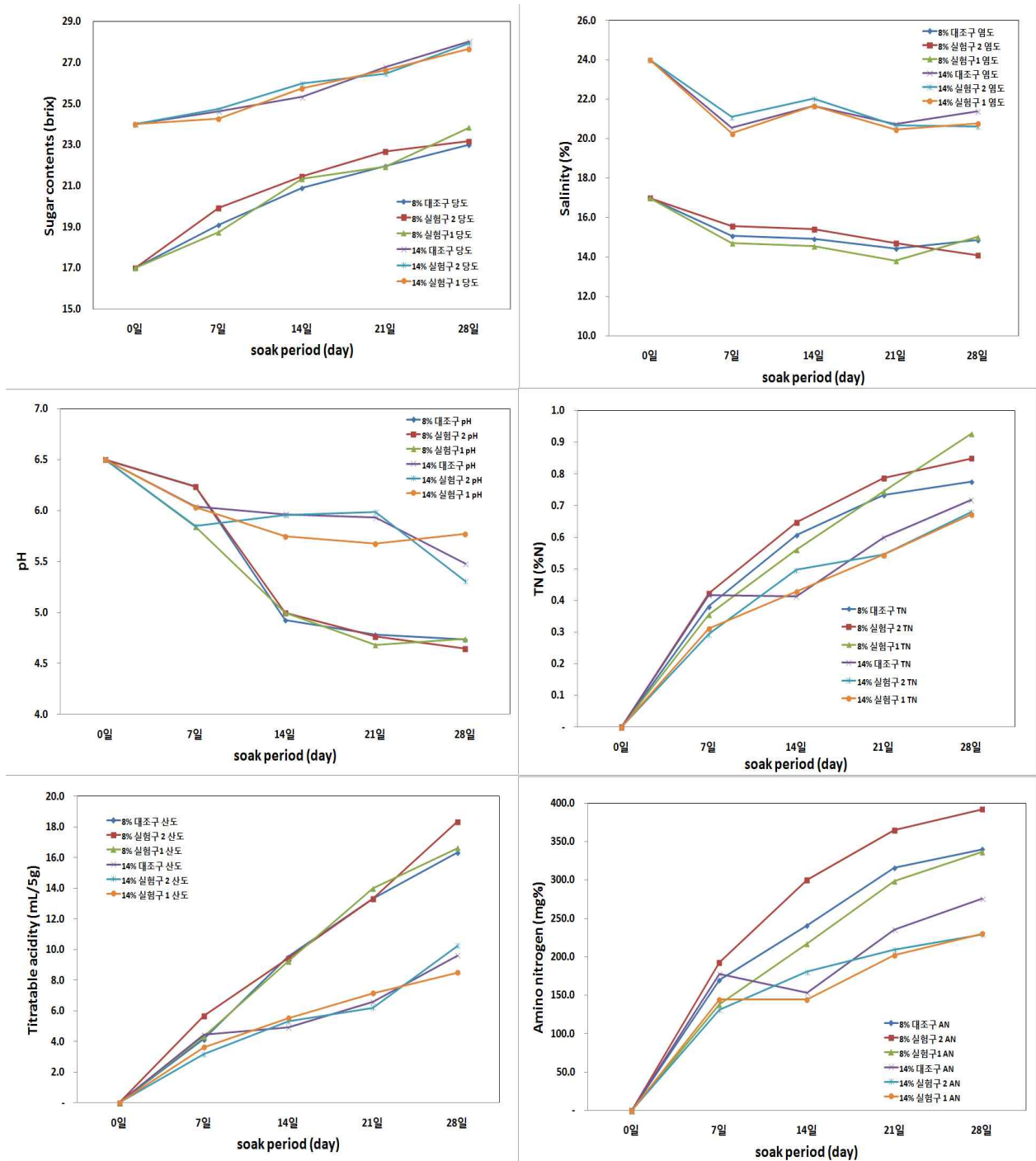


Figure 3. 처리구별 염수침지 중 품질변화 분석 결과

침지기간 중 당도의 변화는 염분농도를 제외한 값이 메주로부터 유래한 성분의 용출과 분해에 기인하는 것으로 침지 중 숙성정도를 가늠할 수 있다.

침지기간 중 당도변화를 측정된 결과 대조군과 실험군 모두 14% 처리구가 높은 값을 보이고 있으나 이는 염수의 염도에 의한 차이에 불과하다. 따라서 종료일과 초기의 당도 차이를 비교해본 결과 저염도인 된장기준 8% 처리구들은 초기에 17 brix 였으며, 침지종료일에는 23 brix로 증가하였다. 반면에 고염도인 된장기준 14% 처리구들은 초기 24 brix에서 침지종료일에는 28 brix 정도 높아진 것을 확인할 수 있었는데 이는 8% 처리구들이 메주 중 성분 용출과 효소 분해가 14%에 비해 1.5배 정도 빠른 것으로 추정할 수 있다. 구분 염도별 대조군과 실험구1, 2와의 차이는 크지 않았다.

처리구별 침지기간 중 염도변화를 관찰한 결과 된장기준 8% 처리구들의 염수의 염도는 초기 17%에서 침지종료일에 14%로 감소하였으며 된장기준 14% 처리구들은 24%에서 20%로 낮아졌다. 실험결과로 보아 침지 시작 6일 만에 메주 내부 수분과 염수간 염도 평형을 이뤄 염수의 염도가 급격하게 감소하였으나 이후에는 큰 변화를 보이지 않았다. 발효초기 염수침투는 메주 내부의 발효균의 증식을 억제하는 효과를 보여준다. 특히 곰팡이의 경우 염에 노출될 경우 그 개체수가 급격히 감소하고, 비교적 바실러스 속과 유산균의 개체수는 유지되거나 증가하는 것으로 알려졌다(12). 이는 염수침지가 메주 주 발효균 중에 하나로 알려진 *Aspergillus*속과 같은 곰팡이의 생육을 억제 또는 감소시킴으로서 메주발효 이후에는 효소와 일부 호염성 세균류와 효모에 의한 숙성이 이뤄진다는 것을 의미한다.

또한, 효모는 에탄올을 생성해 유산균 등의 생육을 억제함으로써 pH 감소를 방지하기도 한다. 비록 효모에 의한 에탄올 생성효과를 검증한 것은 아니나 이 등(13)은 에탄올이 1% 정도 첨가하였을 때 이러한 효과가 나타난다고 보고하였다.

메주의 염수침지 종말점은 일반적으로 총 질소함량을 기준으로 정한다. 한식간장의 총질소 기준은 0.7%N로 장분리 후 간장 숙성 중 메주침전물의 분해가 진행된다 하더라도 급격하게 증가하지는 않으므로 이상으로 측정되었을 시 침지를 종료한다.

처리구별 침지기간 중 염수의 총 질소는 지속적으로 증가하였다. 침지종료일차에 대조군 및 실험군 1, 2 중 된장기준 염 농도 8% 처리구는 0.78~0.93 %N의 TN 함량을 보였으나 14% 처리구는 0.67~0.72 %N로 비교적 낮은 값을 나타냈다. 또한, 된장기준 14% 처리구의 대조군과 실험군의 TN은 0.05 %N으로 편차가 적었으나 된장기준 8% 처리구의 대조군과 실험군은 0.15 %N의 편차를 보였는데 이는 침지 중 발효미생물종류에 따른 생육 정도에 기인한 것으로 판단된다.

침지기간 중 아미노태 질소함량 변화는 Figure 2와 같이 침지기간에 따라서 지속적으로 증가하였으며 된장기준 8% 처리구의 대조군과 실험군 침지액에서 높은 경향을 보였다. 침지종료일에 아미노태질소함량은 된장기준 8% 처리구의 경우 336 ~ 392 mg% 였으며 된장기준 14% 처리구는 229 ~ 276 mg% 로 8% 처리구가 100 mg% 정도 높게 측정되었다.

염수 침지 중 pH는 전반적으로 감소하는 경향을 보였다. 염수침지 6일까지 된장기준 8% 처리구와 14% 처리구의 편차는 구분할 수 없었으나 이후 기간이 경과할수록 된장기준 8% 처리구의 급격한 감소가 나타났다. 침지 12일차에 8% 처리구는 pH 4.9 ~ 5.0까지 하강한 후 감소가 둔화되었으며, 14% 처리구는 8% 처리구에 비해 침지기간 전반에 걸쳐 완만한 감소를 보였다. 침지종료일차 pH는 8% 처리구 pH 4.6~4.7, 14% 처리구는 pH 5.3 ~ 5.8로 측정되었다.

된장기준 8% 처리구의 급격한 pH 감소원인은 여름철 실온(약 30°C 이상) 침지로 효모의 에

탄을 생성량이 미생물 생육저하 농도에 도달하기 전에 급속하게 pH저하 미생물이 성장한 것이 원인으로 판단된다. 반면에 14% 처리구의 경우, 일정부분 생육을 저해한 것으로 보인다. 우리 전통된장과 간장은 고염임에도 봄에 염수침지가 종료된다. 효모에 의한 에탄올 생성으로 숙성에 관여하는 미생물의 생육을 저하시켜 저염 장류를 제조할 수 있다 하더라도 초기 유리된 당에 의한 효모의 이러한 작용이 있기도 전에 미생물이 과도하게 생육한다면 이런 현상은 언제든지 나타날 수 있는 현상이라고 보이며, 이를 보완하기 위해 다양한 방법의 적용연구를 실시해야 할 것으로 판단된다.

이러한 열악한 환경에서 제조한 반면에 본 사 된장 pH 품질기준인 pH 4.8 이상의 범위에서 크게 낮아지지 않았다는 점과 단순 비교할 수는 없지만 이 등(11)이 20℃에서 된장염도별 숙성기간 중 pH 변화를 관찰한 결과 염도 8%가 pH 4.8까지 하강하였다는 연구결과를 비취 볼 때 향후 저염된장제조에 적용할 수 있는 가능성은 충분할 것으로 여겨진다.

적정산도는 침지기간에 따라 증가하여 pH감소와 부합하는 경향을 보였다. 처리구별 적정산도는 된장기준 8% 처리구는 16.3 ~ 18.3 mL/5g의 0.1N-NaOH 소비량을 보였으며, 14% 처리구는 8.5 ~ 10.2 mL/5g의 0.1N-NaOH 소비하여 8%처리구보다 2배 정도 낮은 산도를 나타냈다.

메주발효 후 된장과 간장의 목표염도별로 대조군과 실험군 1, 2를 침지한 결과 된장기준 8% 처리구의 대조군과 실험군의 미생물작용 생육과 품질변화가 큰 것을 알 수 있었다. 여름철 높은 온도로 열악한 환경에서 침지실험을 하여 문제점과 보완점도 도출되었으나 주로 겨울과 봄에 공정이 이뤄지는 전통된장 염도와 같은 14% 처리구가 비교적 안정한 품질 특성을 보였고, 8% 처리구 또한 에탄올이 충분히 생성되었을 것으로 여겨지는 기간부터 변화속도가 급격히 줄어든 것을 본다면 분리한 효모의 저염장류 적용 가능성은 충분히 확인된 것으로 판단된다.

염수침지 종료 후 각 염도처리구별 대조군과 실험군은 장분리를 실시하였고, 된장과 간장으로 분리하여 숙성변화를 관찰하였다.

#### 다. 저염된장·간장 숙성 연구

된장의 원료 중 미생물의 생육에 가장 큰 영향을 미치는 성분은 식염으로, 통상 12% 이상의 소금을 첨가하여 이상발효와 부패를 방지하고 제조 후 저장성을 부여하는 것으로 알려졌다(9). 그러나 이 등(11)은 8%의 저염이라 하더라도 고염보다 숙성기간을 짧게 했을 경우, 관능적 특성이 더 향상되었다고 보고하였다. 따라서 고염일 경우 장기 숙성에 효과적이며 짧은 기간 숙성할 경우에는 저염 된장도 숙성완료 후 살균처리 등 보존성을 확보할 수만 있다면 된장 숙성에 충분히 활용할 수 있다고 판단된다.

그러나 본 실험에서는 이러한 보존성 문제도 발효미생물의 생육을 통해 해결하고자 하였다. 먼저 메주발효단계에서 병원성미생물 등 위생적 문제를 야기하는 미생물 제어 발효균을 접종하고 2차적으로 염수침지 단계에서 보존성을 부여할 수 있는 에탄올 생성 효모를 적용한 것이다.

메주발효는 발효균을 달리하여 대조군과 실험군 1, 2를 구분하였으며, 이들은 된장목표염도 8%와 간장목표염도 14%의 염수와 된장목표염도 14%와 간장목표염도 20%에 도달할 수 있는 염수에 각각 나눠 침지하였다. 따라서 총 실험군은 침지단계에서 6개, 장분리 이후에는 된장숙성샘플 6개(8% 대조군, 8% 실험군 1, 8% 실험군 2, 14% 대조군, 14% 실험군 1, 14% 실험군 2)와 간장숙성샘플 6개(8% 대조군, 8% 실험군 1, 8% 실험군 2, 14% 대조군, 14% 실험군 1,

14% 실험군 2)개가 되었다.

각각의 대조군과 실험군은 0일부터 12일까지 6일 간격으로 된장의 경우 수분함량, 염도, pH, 산도, AN, 색도의 변화를 분석하였고, 간장은 당도, 염도, pH, TN, 산도, AN의 변화를 분석하였다.

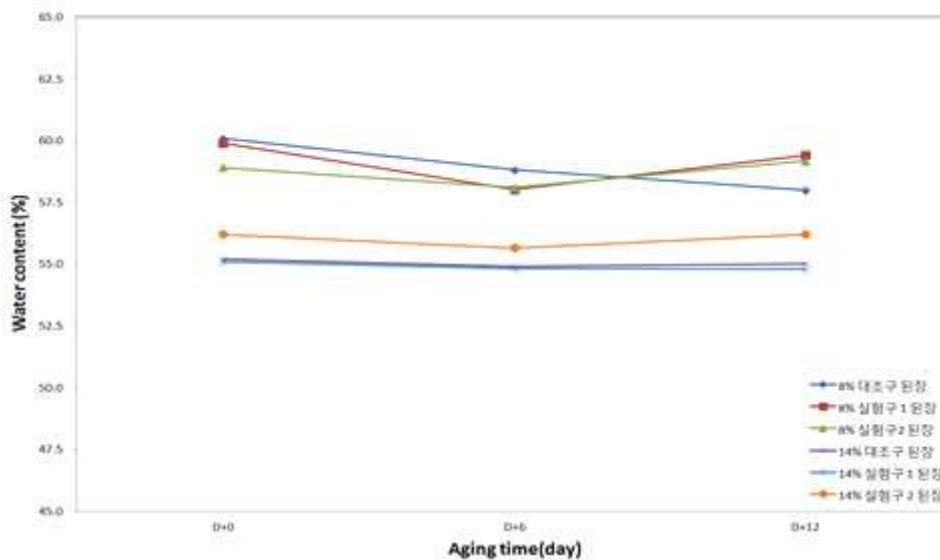


Figure 4. 처리구별 된장숙성 중 수분함량 변화

된장숙성기간 중 수분함량을 Figure 4에 제시하였다. 8% 대조군 및 실험군 1, 2 된장의 수분함량은 숙성기간에 관계없이 58~60%로 비교적 일정하게 유지되었다. 14% 대조군 및 실험군 1, 2는 이보다 낮은 55~56%의 수분함량을 나타냈으며, 8% 처리구와 마찬가지로 숙성기간별 차이는 크지 않았다. 단지 8% 처리구가 14%처리구 보다 3 ~ 4% 높게 측정되었는데 이는 장분리 시 동일한 시간동안(1시간) 채에 올려 침지메주 중 염수를 제거하였으나, 8%처리구의 낮은 염수 염도에 따른 비중의 영향이거나 왕성한 미생물의 생육과 효소작용에 의해 메주가 보다 연화되어 염수침투공간이 많아지고 보수력이 높아져 나타나는 현상으로 판단된다.

숙성기간에 따른 8% 처리구들의 염도는 0일차부터 12일차까지 목표염도 보다 높은 9~10%로 유지되었고, 14% 처리구들은 13 ~ 14%로 측정되었다(Figure 5). 8% 처리구들이 목표염도 보다 높은 염도를 나타낸 이유는 수분함량의 영향 때문이다. 염수침지 시 목표수분함량 설계는 55%로 높은 수분함량은 높은 염도를 가질 수 밖에 없다. 8% 처리구 기준으로 수분함량 5%의 증가는 12.5%의 염수추가 침투효과를 나타내며 장분리 시 염수의 염도가 14%라 가정하면, 실제적으로 약 1.5~2%의 염도 상승효과를 나타낸다.

이러한 문제점을 개선하기 위해서는 장분리 공정 시 염수를 제거하기 위한 침지메주 정치시간을 증가시키는 등의 조치가 필요할 것이다.

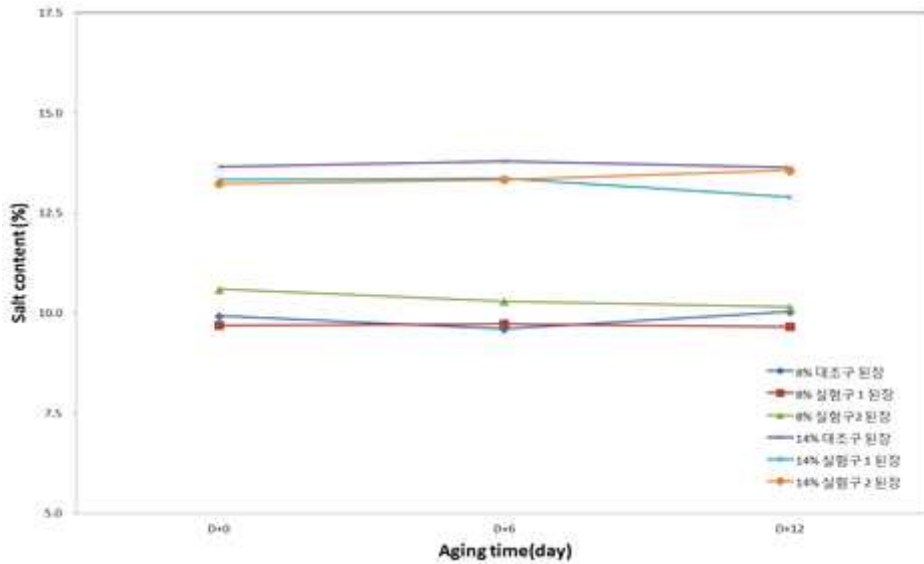


Figure 5. 처리구별 된장숙성 중 염도 변화

된장숙성 중 pH변화는 Figure 6과 같다. 8% 대조구는 0일차에는 pH 4.7 12일차에는 pH 4.8로 약간 증가하였으나, 8% 실험구 1과 실험구 2는 pH 4.7에서 pH4.6, pH 5.1에서 pH 4.7로 각각 감소하였다. 14% 대조구는 숙성초기에는 pH 5.5에서 pH 4.9로 감소되었으나 다시 12일차에는 pH 5.1로 약간 증가하였다. 14% 실험구 1와 실험구 2는 pH 5.4에서 각각 pH 5.2, pH 5.0으로 감소하였다. 그러나 처리구간 변화는 크지 않았으며, 편차는 침지 시에 측정된 pH보다 감소하였음을 알 수 있었다.

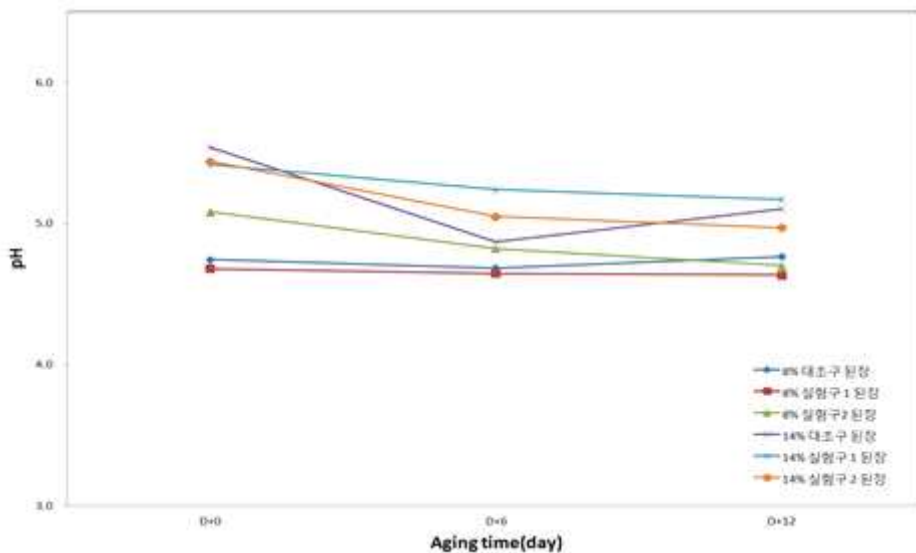


Figure 6. 처리구별 된장숙성 중 pH 변화

처리구별 적정산도(Figure 7)는 숙성기간에 따라 증가하였다. 8% 처리구는 숙성 12일차에 27.0~28.0 0.1 N-NaOH mL/10g을 보였으며, 14% 처리구는 24.8 ~ 25.5 0.1 N-NaOH mL/10g 범위를 나타냈다. 8%의 처리구가 14%의 처리구 보다 3 0.1N-NaOH mL/10g 정도 높게 측정되었다. 침지 중 처리구간 염수의 적정산도 차이는 약 8 0.1N-NaOH mL/10g에 반해 장분리

후 숙성된장에서는 그 격차가 많이 감소하였음을 알 수 있었다.

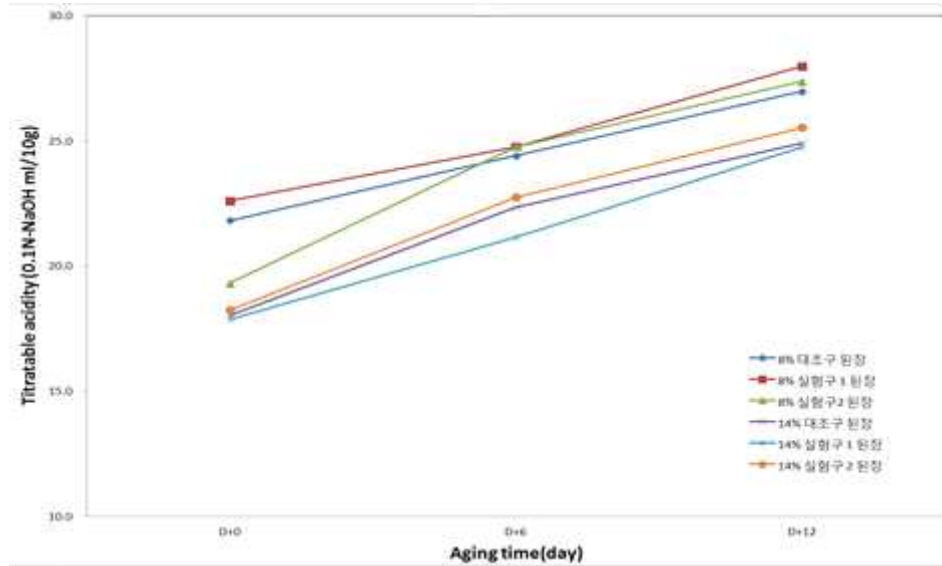


Figure 7. 처리구별 된장숙성 중 적정산도 변화

각 처리구별로 된장숙성 중 아미노태 질소함량 변화를 확인한 결과는 Figure 8와 같다.

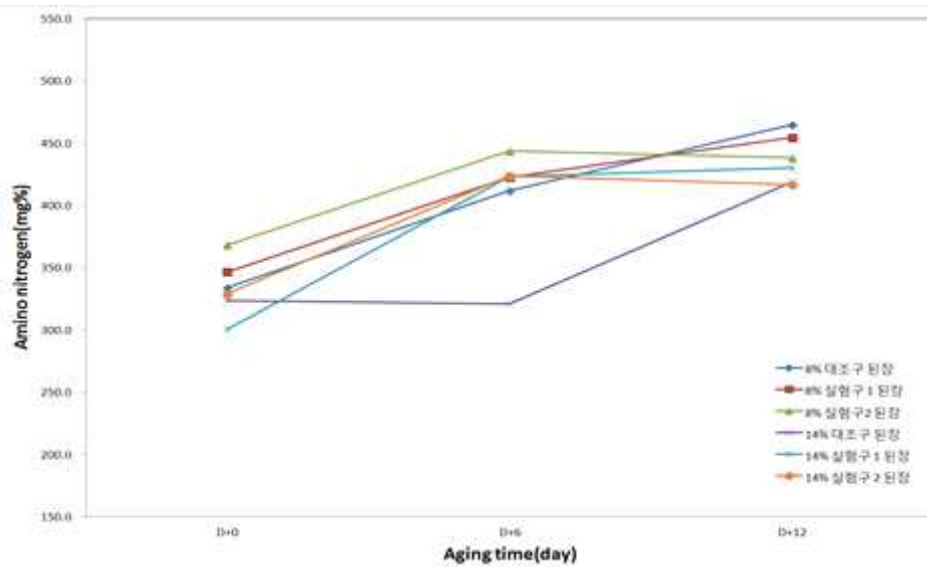


Figure 8. 처리구별 된장숙성 중 AN 변화

8% 처리구와 14% 처리구의 아미노태 질소함량은 숙성 초기에는 300.8~368.3 mg%였으며 12일차에는 416.7~464.9 mg% 로 증가하였다(Figure 8). 숙성 12일차에 8% 대조구와 8% 실험구 1 된장은 460 mg% 정도로 측정되었으며, 14% 대조구와 14% 실험구 2가 420 mg%를 보여 약 40 mg%의 차이를 보였다. 염수침지 단계에서 처리구 간 측정값의 차이가 2배 정도였던 것을 감안하면 장분리 후 된장의 AN값은 처리구별 대조구와 실험구 뿐만 아니라 처리구 간에도 편차가 큰 폭으로 감소하였음을 알 수 있었다.

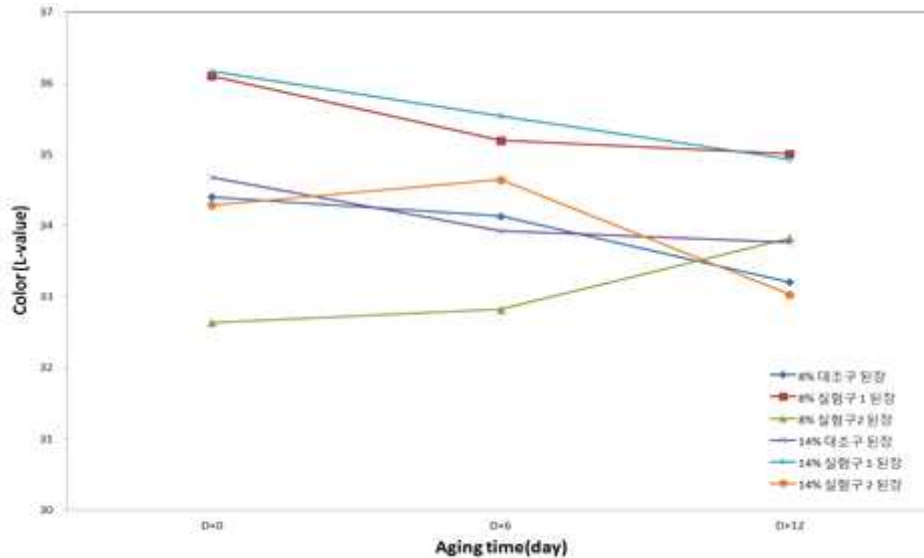


Figure 9. 처리구별 된장숙성 중 색도 변화

된장 숙성기간 중 처리구별 대조구와 실험구의 색도를 측정하였다(Figure 9). 8%, 14% 처리구 처리구 모두 33~36의 L-value를 나타냈다. AN과 마찬가지로 처리구 간 편차는 확인할 수 없었다.

염수침지 단계에서 8% 처리구와 14% 처리구간 분석항목 대부분에서 확연한 편차를 보인 반면에 된장 숙성단계에서는 증감속도 둔화와 함께 처리구간 또는 처리구별 대조구/실험구 간 차이가 줄어든 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 구분항목인 염도를 제외하면 산도 이외에 처리구간 분석항목 편차가 확연하게 나타나지 않았다.

아직 숙성이 종료된 것은 아니나 이런 분석항목들의 편차 감소는 저염의 8% 처리구(실제 염도 10% 정도)가 14% 처리구에 준하는 품질특성을 가질 수 있다는 점을 시사하며, 이에 따라 관능적 특성이 14%와 유사하거나 크게 뒤 떨어지지 않는다면 8% 실험군의 제품화에 긍정적 영향을 미칠 것이다.

장분리 후 분리한 간장은 0일차 6일차 12일차에 기본 품질분석항목인 당도, 염도, pH, TN, 적정산도, AN을 분석하였다.

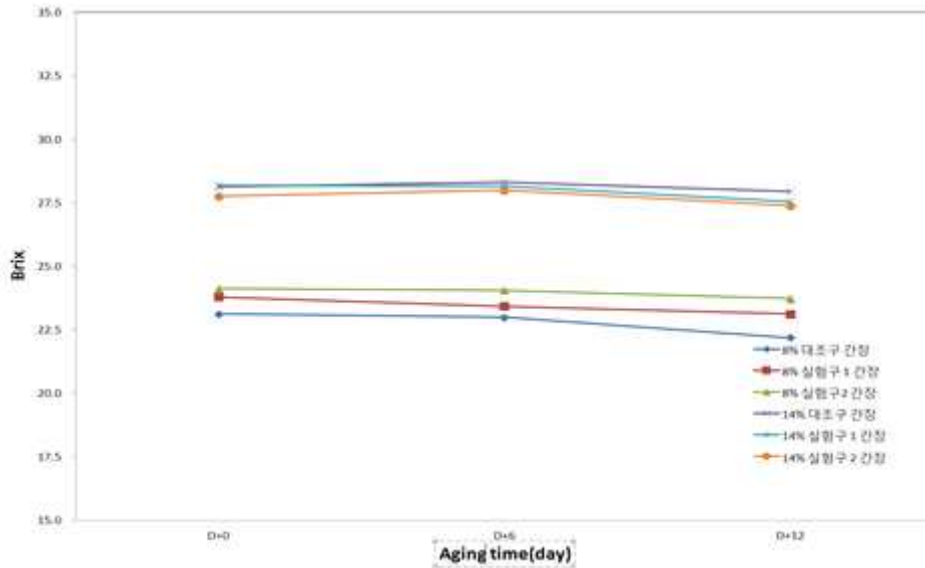


Figure 10. 처리구별 간장숙성 중 Brix 변화

간장숙성 중 당도 변화를 Figure 10에 나타냈다. 염수침지와 마찬가지로 8% 처리구보다 14% 처리구가 높은 당도함량을 나타내고 있다. 8% 처리구는 23brix 정도를, 14% 처리구에서는 28brix를 유지하였다.

염도는 된장과 마찬가지로 숙성기간에 따라 큰 변화를 보이지 않았으며, 8% 처리구들은 14%를 14%처리구들은 20%를 나타냈다(Figure 11). 이 또한 당도 측정값과 같이 침지 종료일과 비슷한 염도를 나타냈다.

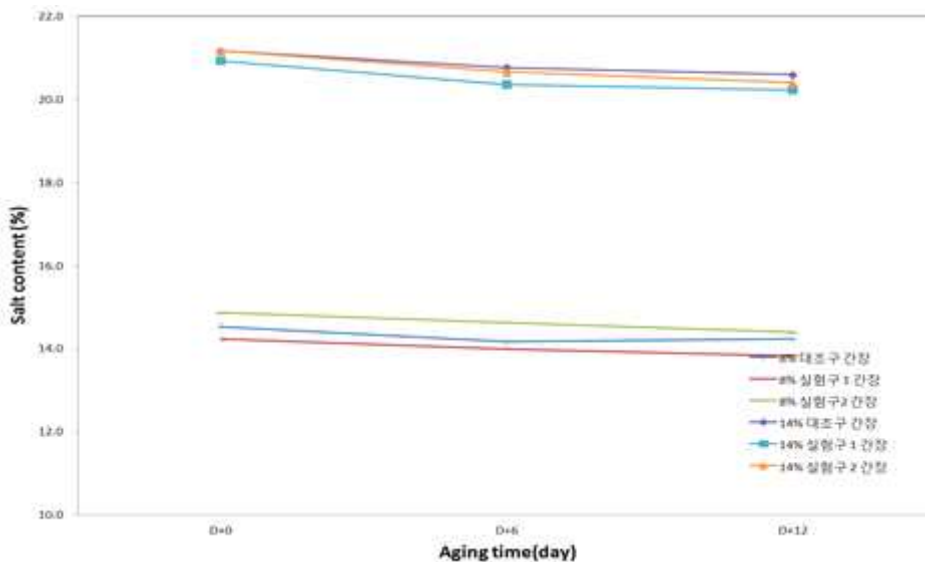


Figure 11. 처리구별 간장숙성 중 염도 변화

처리구별 간장숙성 중 pH의 변화는 Figure 12에 나타냈다. 침지기간 중은 8%처리구와 14% 처리구 모두 pH가 감소하는 경향을 보였으나, 8% 처리구는 pH 4.9~5.1의 범위에서 숙성기간 중 변화를 보이지 않았거나 약간 증가하였다. 반면에 14% 처리구는 초기 pH 5.3 ~ 5.7로 측정



되었으나 12일차에는 pH 4.9 ~ 5.2로 감소되었다. 다른 분석항목들과 마찬가지로 pH 변화도 처리구간 편차가 줄어들었음을 알 수 있었다.

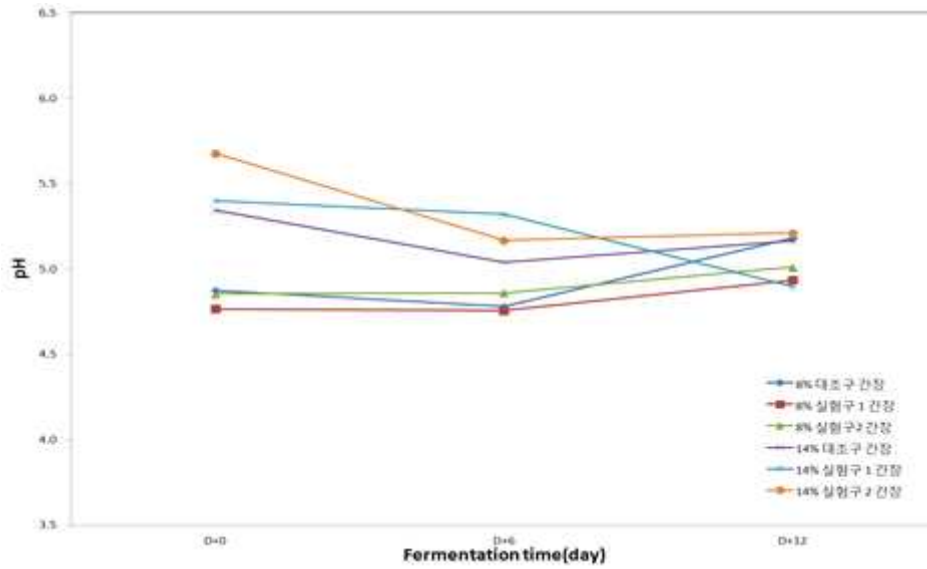


Figure 12. 처리구별 간장숙성 중 pH 변화

침지기간 중 침지액의 TN값은 급격한 증가를 보였다(Figure 13). 그러나 장분리 후 8% 처리구는 0.84~0.96 %N, 14% 처리구는 0.68~0.76 %N의 범위에서 크게 변화를 나타내지 않았다. 침지종료일 염수분석에서와 마찬가지로 여전히 8% 처리구와 14% 처리구는 0.16 %N의 편차를 유지하였다. 이 중 8% 실험구 1과 2가 비교적 높은 TN함량을 나타냈다.

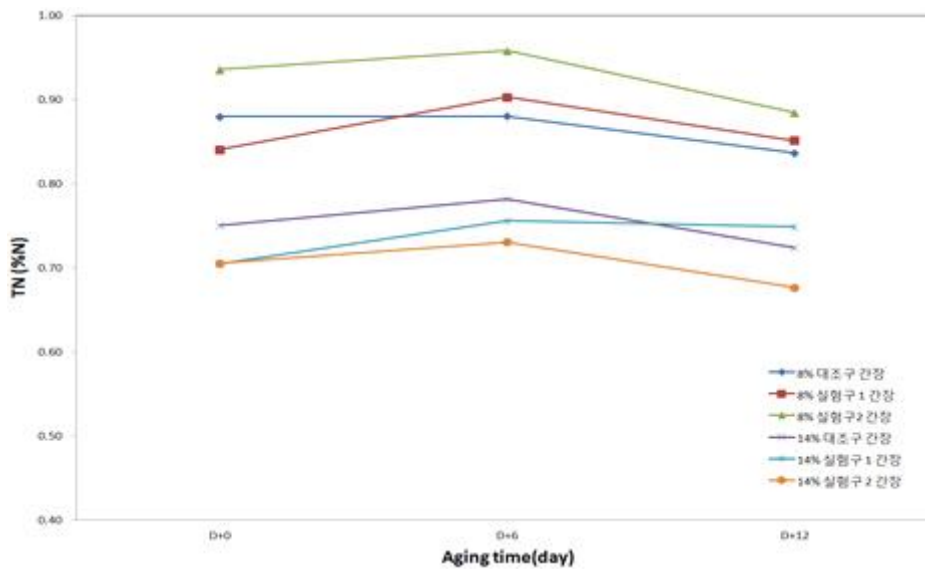


Figure 13. 처리구별 간장숙성 중 TN 변화

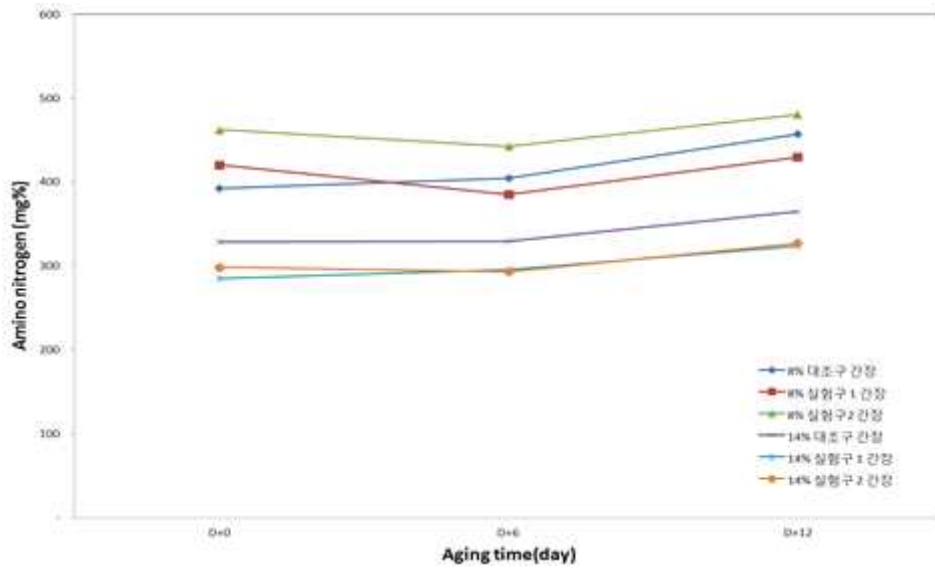


Figure 14. 처리구별 간장숙성 중 AN 변화

간장숙성 중 AN함량 변화는 Figure 14에 제시하였다. 8% 대조구는 393 mg%에서 457 mg%로 증가하였으며, 8% 실험구 1과 실험구 2는 0일차에 420 mg% 와 463 mg% 였으며, 6일차에는 385 mg% 와 443 mg% 로 감소하였다가 12일차에는 430 mg% 와 481 mg% 로 증가하였다. 14% 대조구와 실험구 1, 2는 0일차에 285~329 mg% 에서 12일차에 324~365 mg% 로 증가하여 8% 처리구보다는 낮은 AN함량을 보였다. 된장숙성 중 AN은 8% 처리구와 14% 처리구간의 편차가 감소하였으나 간장에서는 염수침지 시 AN함량 격차가 유지되는 것으로 나타났다. 각각의 처리구중 8% 실험구 2의 AN함량이 481 mg%로 가장 높게 나타났다.

처리구별 간장숙성 중 적정산도의 경우, 8% 처리구는 13.5~15.5 mL/10g의 0.1N-NaOH 소비량을 보였고, 14% 처리구는 9.2~10.2 mL/10g의 0.1N-NaOH 소비량을 보여 침지액에서의 적정산도의 변화처럼 14% 처리구가 8% 처리구보다 1.5배 낮은 값을 나타냈다(Figure 15).

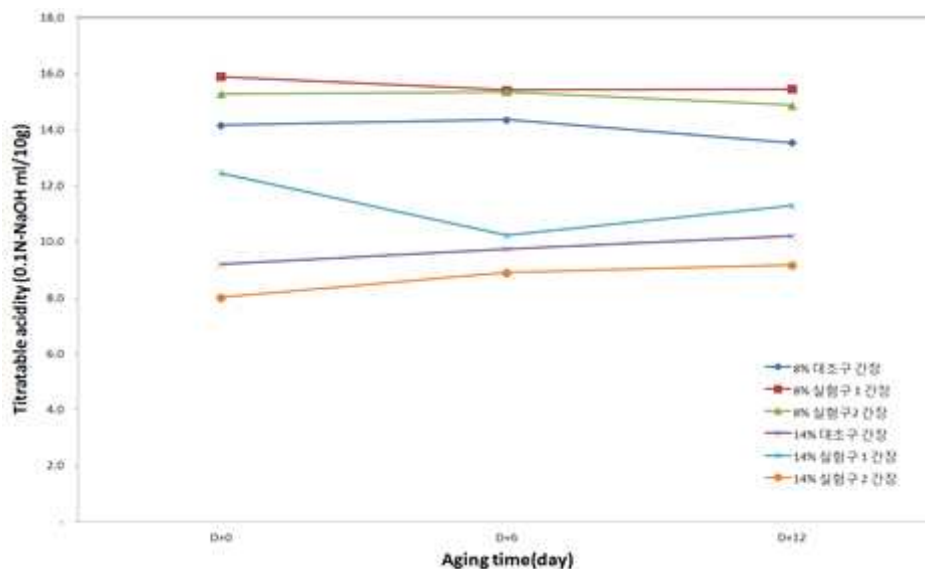


Figure 15. 처리구별 간장숙성 중 적정산도 변화

분리 간장의 숙성 중 품질변화는 된장에서와 달리 침지 중 염수의 품질특성을 유지하거나 연결되어 나타났다. 다만 pH의 경우, 된장과 유사하게 처리구간 편차가 감소하는 경향을 보였으며, 숙성 중 감소가 예상되었으나 그 정도가 크지 않았다.

제품품질에 긍정적인 영향을 미치는 AN과 TN, 염도는 8% 처리구가 높았으나, 적정산도와 pH는 14% 처리구가 보다 나은 결과를 보여 품질분석 차이만으로 우열을 가리기는 힘들었다. 또한, 처리구별 대조군과 실험군 1, 2의 편차도 예상보다 낮게 나타나 실제 관능적 특성이 주요한 요소로 작용할 것으로 판단되었다.

#### 다. 선정된 종균을 활용한 저염 고추장 품질분석 결과

고추장 제조에 사용된 대두와 쌀과 고춧가루는 순창에서 구입하였으며, 쌀가루는 대호물산(주)에서 생산된 시판품을 사용하였으며, 고추장 제국에 사용된 균주는 대조구(충무발효(주) + *Bacillus licheniformis* SRCM100027)와 발효미생물산업진흥원에서 제공 받은 균주 07 (*Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307)와 대조구+07((충무발효(주) + *Bacillus licheniformis* SRCM100027) + (*Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307)) 사용하였다. 그리고 천일염은 코리아솔트에서 판매한 원료로 사용하였다. 고추장의 재료에 사용된 대두, 쌀가루, 천일염의 제조방법은 Figure 15.와 같다.

고추장용메주를 제조하는 방법은 본사에서 사용하고 있는 방법으로 선별한 대두를 물에 14시간 침지한 후 2시간 동안 탈수를 하여 115°C에서 10분 동안 증자한 후 *Bacillus*균주들인 *Bacillus licheniformis* SCC125037와 *Bacillus subtilis* SCKB1307를 0.1%씩 접종하였고, 마지막 처리구는 *Bacillus licheniformis* SCC125037와 *Bacillus subtilis* SCKB1307를 0.05% 혼합하여 접종하였다. 발효온도는 30°C, 상대습도 80%로 설정하였다.

곡자는 선별한 쌀을 물에 14시간 침지한 후 2시간 동안 탈수하여 115°C에서 10분 동안 증자한 후 충무발효 종균 0.1%을 접종하여 제조하였으며, 발효온도는 30°C, 상대습도 80%로 설정하였다.

고추장은 Figure 16.과 같이 본사의 방법에 따라 제조하였으며, 각 처리구별로 염도를 다르게 하여 배합하였다(Table 7). 쌀곡자와 고추장용메주를 24시간 발효시켜 나머지 원료들과 같이 조절하여 혼합한 후 이를 각각 용기에 넣어 최적숙성온도 25 ~ 30°C를 유지하여 8주간 숙성시켰다.



Figure 16. 저염고추장 제조방법

Table 7. 저염고추장 염도별 혼합 비율

(단위:%)

원료	염도별 고추장 제조 (%)		
	4.0%	8.0%	12.0%
쌀가루	20.25	15.25	10.25
곡자	8.00	8.00	8.00
천일염	5.00	10.00	15.00
고추분 (국산)	12.00	12.00	12.00
고추장용메주	5.00	5.00	5.00
종국	0.01	0.01	0.01
물엿	24.00	24.00	24.00
정수	22.74	22.74	22.74
주정	3.00	3.00	3.00
합계	100	100	100

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 숙성기간 중 수분의 변화

숙성기간중의 수분은 Figure 16.에서 보는바와 같이 담금 직후부터 56일까지의 수분함량은 41.2 ~ 46.7%로 거의 일정하였다. 수분함량은 숙성에 관여하는 미생물의 생육과 저장성에 밀접한 관계가 있으며 당사에서 제조한 고추장은 40 ~ 45%로 이보다 수분이 과다한 경우 숙성과정에서 이상발효를 일으킬 위험성이 있을 뿐 아니라 제품의 저장성에도 지장이 있고 너무 과하면 숙성이 잘되지 않는다.

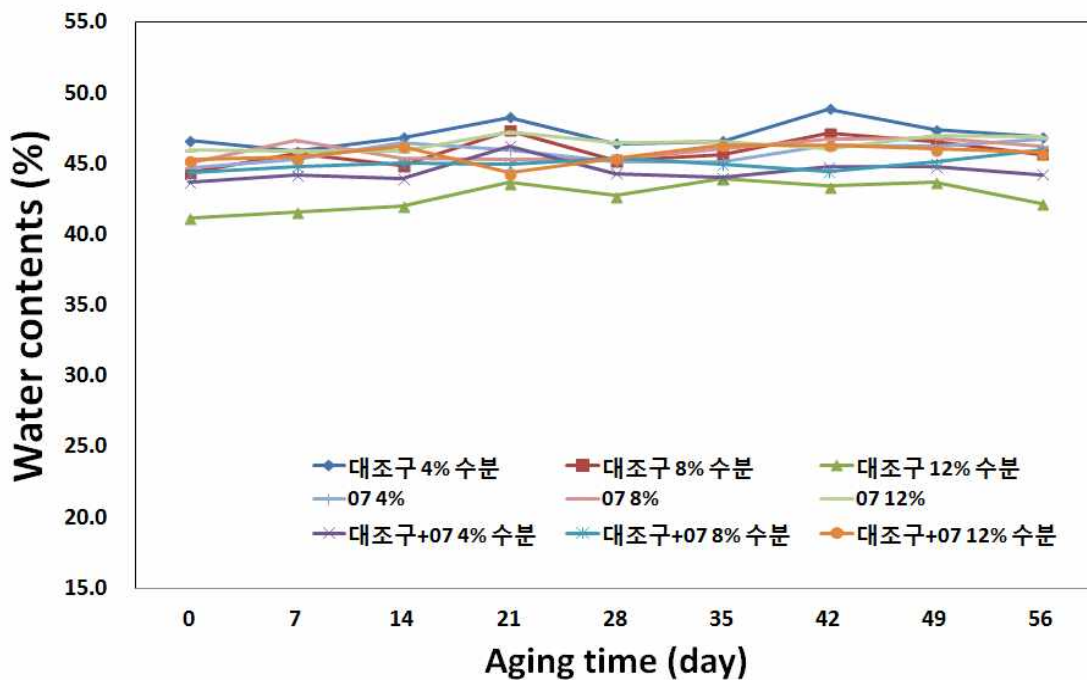


Figure 16. 처리구별 고추장 숙성 중 수분함량 변화

\* 대조구 : 충무발효+ *Bacillus licheniformis* SRCM100027

\* 07 : *Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307

\* 대조구+07 : (충무발효+*Bacillus licheniformis* SRCM100027)+(Aspergillus oryzae SKM07+*Bacillus subtilis* SCKB1307)

### 나. 숙성 기간 중 염도의 변화

고추장의 염도는 고추장의 짠맛과 효소역가에 영향을 주며 고추장의 저장기간에도 영향을 미치는 품질요소중의 하나이다. 고추장에 염도를 4.0 ~ 12.0%로 고추장을 제조하였다. 그러나 숙성기간 중에 분석되는 고추장들은 물엿과 주정이 첨가되지 않아 Figure 17.에서 보는바와 같이 4%처리구들은 염도 6.0%, 8.0% 처리구들은 10.0%, 12.0%처리구들은 14.0% 정도 2% 더 높게 측정되었다. 숙성기간 중에는 각 처리구별 염도의 함량은 일정하게 나타났다.

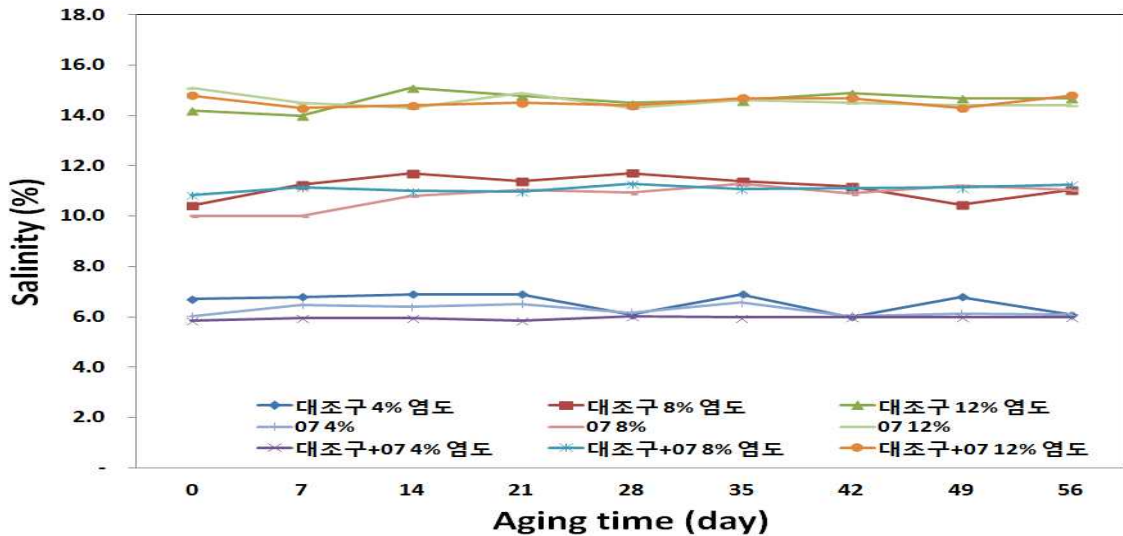


Figure 17. 처리구별 고추장 숙성 중 염도 변화

\* 대조구 : 충무발효+ *Bacillus licheniformis* SRCM100027

\* 07 : *Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307

\* 대조구+07 : (충무발효+*Bacillus licheniformis* SRCM100027)+(Aspergillus oryzae SKM07+*Bacillus subtilis* SCKB1307)

다. 숙성기간 중 pH의 변화

고추장숙성기간 중 pH의 변화를 Figure 18.에 제시하였다. 대부분의 처리구들은 pH값이 4.8 ~ 5.0으로 숙성이 진행되면서 pH가 일정하였다. 하지만 대조구 4.0%처리구는 담금 초기에는 pH 5.1로 높았으나 시간이 지날수록 pH 4.7까지 감소되는 것을 보았다. 숙성과정중의 pH의 저하는 *Aspergillus oryzae*와 고추장 원료중의 유산균의 대사 작용으로 생성된 유기산에 의한 것이다.

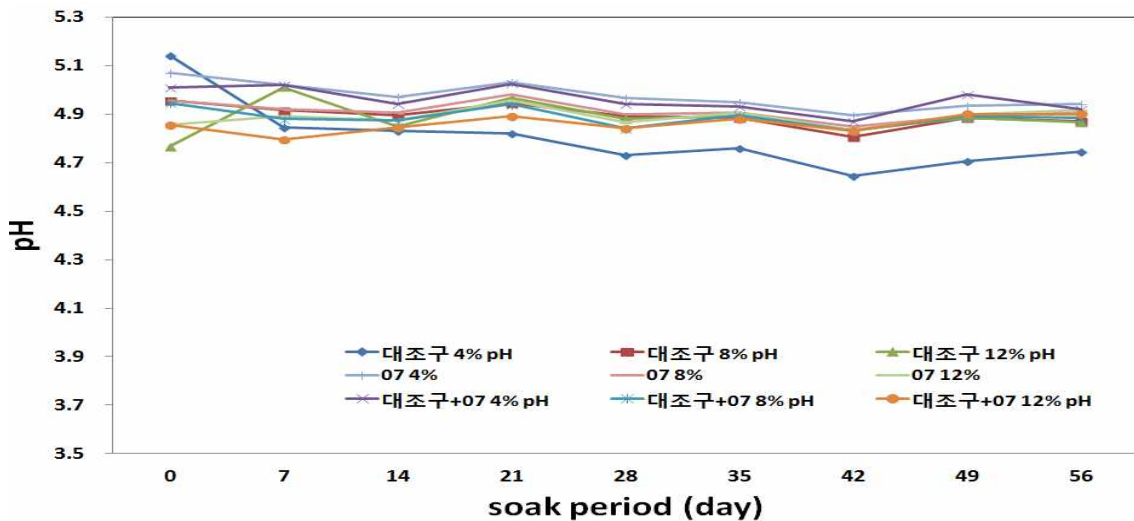


Figure 18. 처리구별 고추장 숙성 중 pH 변화

\* 대조구 : 충무발효+ *Bacillus licheniformis* SRCM100027

\* 07 : *Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307

\* 대조구+07 : (충무발효+*Bacillus licheniformis* SRCM100027)+(Aspergillus oryzae SKM07+*Bacillus subtilis* SCKB1307)

라. 숙성기간 중 적정산도의 변화

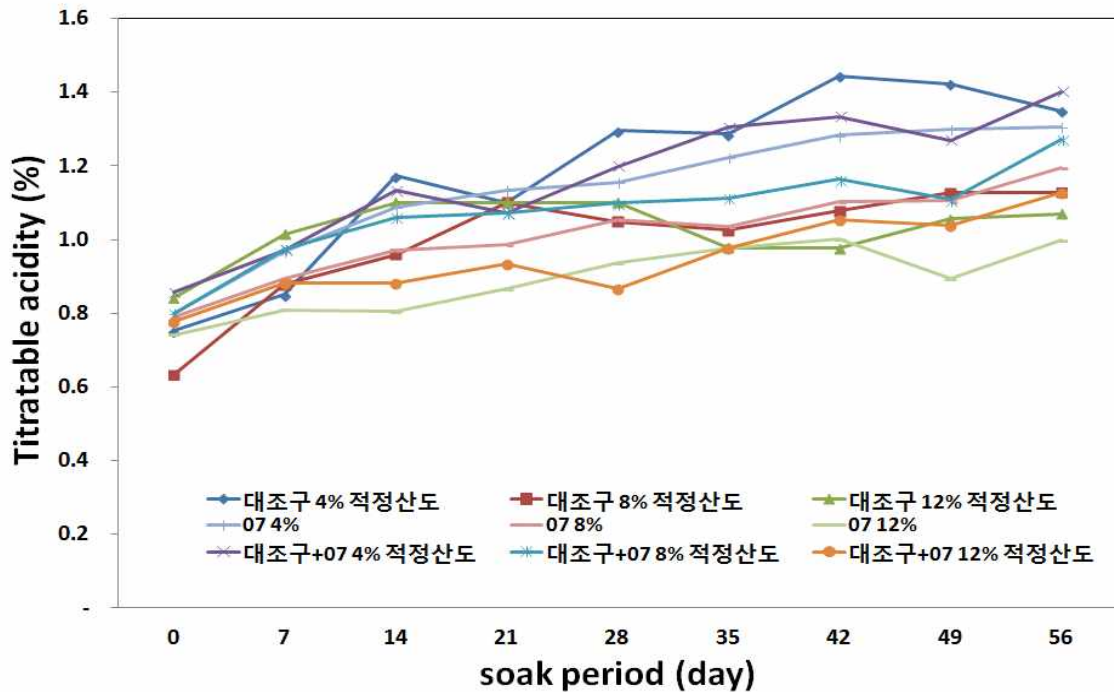


Figure 19. 처리구별 고추장 숙성 중 적정산도 변화

\* 대조구 : 충무발효+ *Bacillus licheniformis* SRCM100027

\* 07 : *Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307

\* 대조구+07 : (충무발효+*Bacillus licheniformis* SRCM100027)+(Aspergillus oryzae SKM07+*Bacillus subtilis* SCKB1307)

처리구별 고추장 숙성기간 중 적정산도의 변화는 Figure 19.에 나타났다. 적정산도는 고추장 숙성기간에 따라 증가하여 pH감소와 부합하는 경향을 보였다. 이는 유기산 축적으로 인한 것으로 숙성기간이 길어질수록 적정산도가 증가했다. 대조구 4%는 값이 제일 낮게 나온 반면에 적정산도값은 대체적으로 높은 값을 나타냈다. 이 등(15)은 고추장 저장 중 이화학적 특성변화를 조사한 연구에서 숙성기간의 경과에 따라 pH는 감소하는 반면 산도는 증가하였다. 이는 고추장의 숙성 중 숙성과 관련된 효소 등의 활성증가와 숙성 관련 미생물의 작용에 의한 것이라 했다.

마. 숙성기간 중 아미노태 질소의 변화

미생물이 생산한 단백질 분해효소에 의해서 아미노태질소가 생성되며, protease가 작용하여 단백질이 아미노산으로 분해되어 숙성이 진행되면서 점차 증가되는 것으로 알려져 있다. 고추장의 품질평가 기준으로 아미노태 질소 함량이 이용된다(16). 숙성 중 아미노태 질소의 변화를 Figure 20.에 나타내었다. 담금 초기에는 대조구+07 4%가 83.4 mg%로 가장 높았고 그다음으로 07 4%가 77.5 mg%로 높았다. 그 이후로도 서서히 증가 하여 숙성종료일에는 대조구 4%가 가장 높은 값인 183.7 mg%를 나타내어 아미노태 질소 함량이 가장 많이 늘어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 염도가 낮을수록 아미노태 질소 함량이 더 높은 값을 나타냈다.

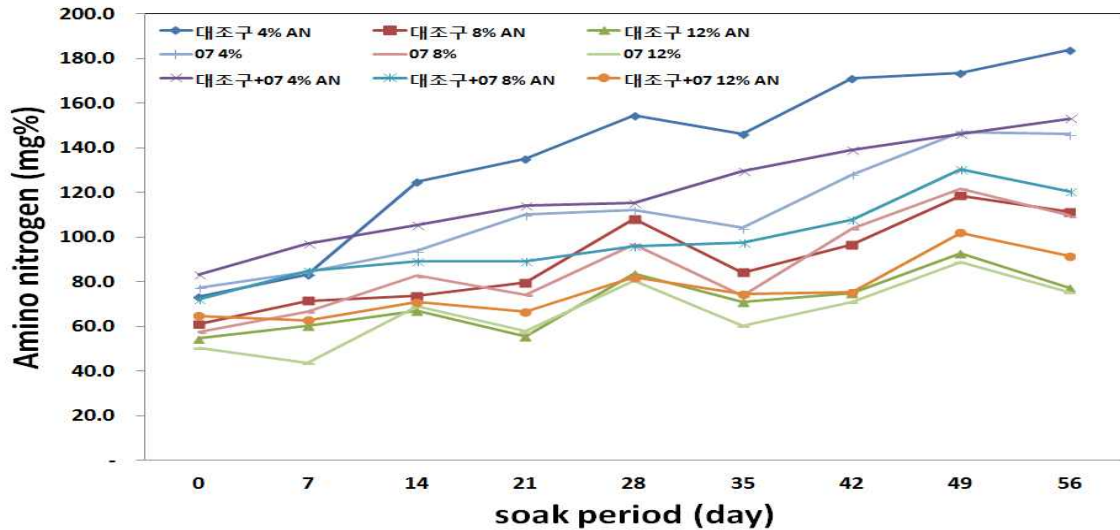


Figure 20. 처리구별 고추장 숙성 중 아미노테질소함량 변화

\* 대조구 : 충무발효+ *Bacillus licheniformis* SRCM100027

\* 07 : *Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307

\* 대조구+07 : (충무발효+*Bacillus licheniformis* SRCM100027)+(Aspergillus oryzae SKM07+*Bacillus subtilis* SCKB1307)

#### 바. 숙성 기간 중 색도 변화

고추장의 외형적 품질기분으로 중요한 인자인 고추장의 색은 제조 과정부터 시작되며 관능적인 영향을 미친다(17). 숙성기간에 따른 각 처리구의 색도 변화는 Figure 21과 같다. 담금 초기에는 각 시료별로 L값이 2 ~ 3정도 차이가 나는 것으로 나타났으나 숙성종료일에는 모든 처리구들의 차이가 나지 않았다. 이등(15)은 고추장의 색상은 고축가루의 첨가량과 숙성온도 및 숙성기간에 따라 달라지나 전통고추장의 경우 숙성기간동안 L값이 27 ~ 32의 범위를 나타낸다 하여 본 연구의 결과와 일치하였다.

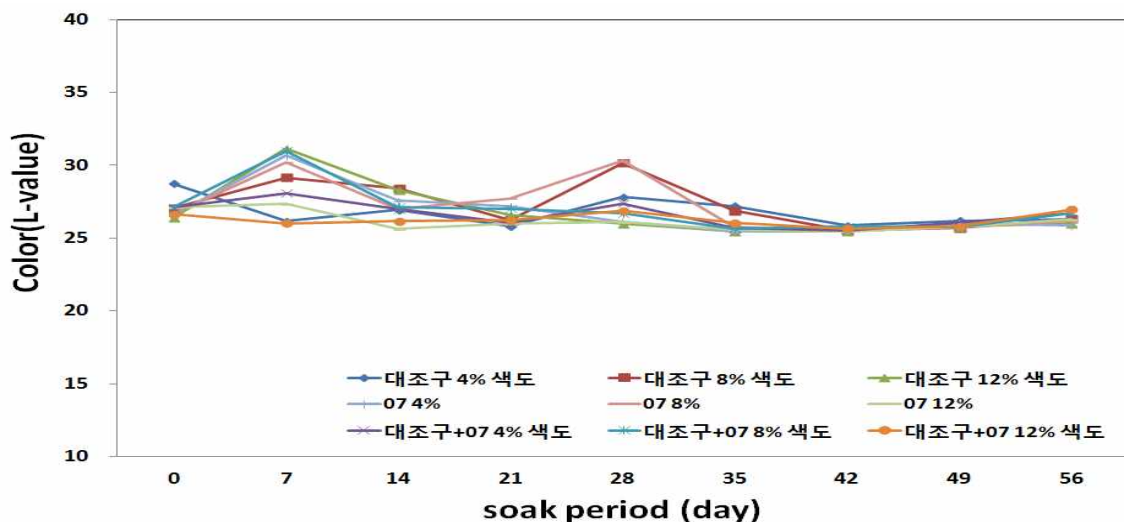


Figure 21. 처리구별 고추장 숙성 중 색도 변화

\* 대조구 : 충무발효+ *Bacillus licheniformis* SRCM100027

\* 07 : *Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus subtilis* SCKB1307

\* 대조구+07 : (충무발효+*Bacillus licheniformis* SRCM100027)+(Aspergillus oryzae SKM07+*Bacillus subtilis* SCKB1307)



## 2. 소비자 조사 및 상품화 방안 마련

### 가. B2B 대상 생산메주에 대한 소비자조사 실시와 판매전략 수립

제조업체의 메주 구매의향 및 니즈를 파악하기 위해 관내 장류제조업체 대상으로 소비자조사를 실시하였다(Table 8). 조사방법은 FGI(Focus Group interview, 표본심층면접법)과 설문조사를 통해 실시하였다.

Table 8. 메주판매 관련 선행조사를 위한 조사방법 및 조사 목적

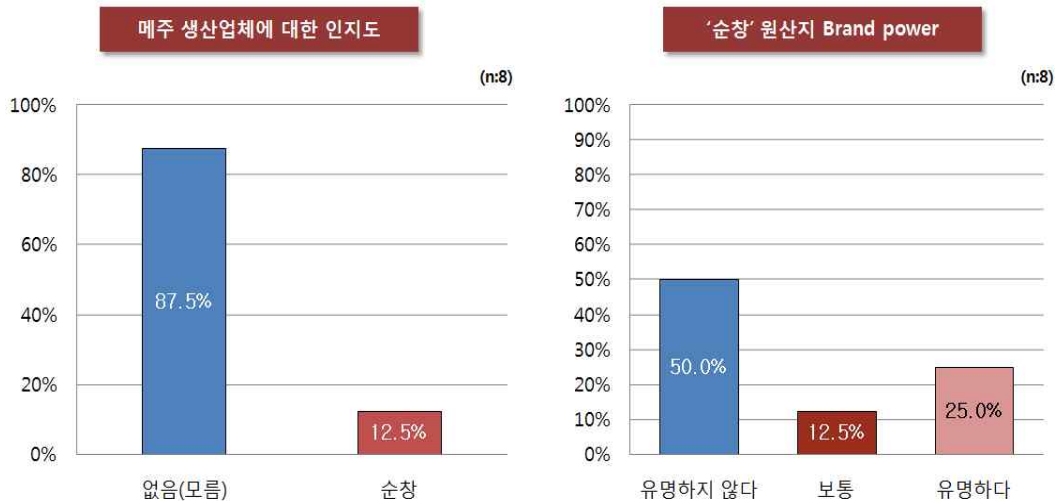
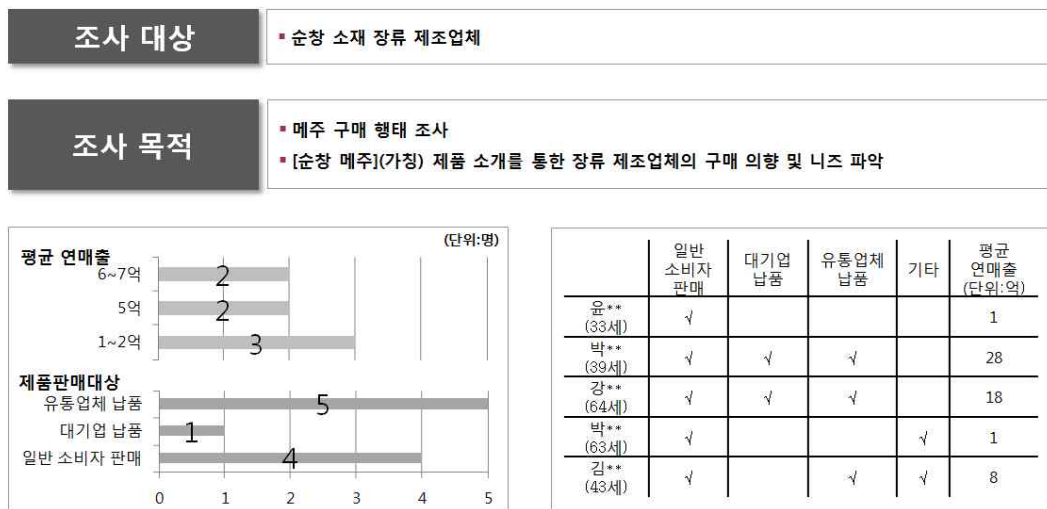


Figure 22. “순창메주”에 대한 원산지 브랜드 파워

‘순창메주’에 대한 원산지 브랜드 파워 조사 결과는 Figure 22과 같다.

선행연구결과 ‘순창’이라는 명칭은 고추장의 경우 소비자가 원산지라고 인식하는 정도 90%를 초과하며, 이와 연계하여 된장, 간장 등 장류제품도 높은 인지도를 가지고 있다. 이를 감안하여

장류제조업체 대상으로 메주의 원산지 인지도를 파악하기 위해 “순창” 역이 메주로도 유명하다고 생각하는가를 조사하였으며, 결과적으로 50%의 인원이 유명하지 않다고 응답하였다. 메주 전문적으로 생산하는 업체나 브랜드에 대한 물음에도 “없음”으로 응답한 경우가 많았다.

이를 통해 볼 때, ‘순창’ 지역이 장류 생산업체/원산지로써는 인지도가 있으나 ‘메주’로서 원산지 브랜드 파워는 상대적으로 약하다는 것을 알 수 있다. 설문조사에 응답한 제조업체의 메주이용방법과 구매/자체생산 여부를 알아보기 위해 조사한 결과는 그림 4와 같다.

현재 메주를 통해 생산 중인 장류제품으로는 된장/간장>고추장/쌈장 순으로 나타났다. 메주 생산 방식은 ‘자체생산’을 통해 공급하는 경우가 87.5%, ‘구입’하여 공급(12.5%)하는 경우보다 월등히 높게 나타났다.

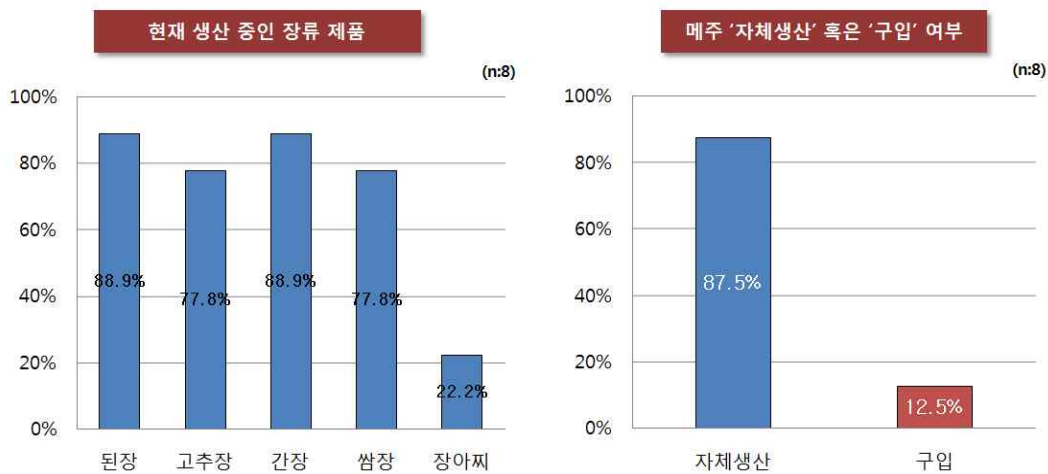


Figure 23. 메주에 대한 구매형태(구매여부)

현재 자체생산을 통해 메주를 제조하는 비율이 높으나 향후 메주 제품의 구매의향에 대해 조사한 결과(Figure 23) ‘구매의향’이 있음이 84.6%로 높게 나타났으며, 그 이유로는 ‘위생(3명)>생산시설 구축에 대한 비용 절감 효과(2명)>생산편의성(2명)>균주 균일화(1명)/균일제품 대량생산(1명)/인력활용 증대효과(1명)’ 순으로 나타났다.

중·소규모 장류제조업체의 경우, 판매망이 협소하고 고정거래처(또는 소비자)나 현지 판매가 주를 이루기 때문에 아직까지 저염 장류제품에 대한 기호도가 떨어지는 것이 사실이다. 또한 저염화로 기존의 고염생산방식을 탈피할 경우, 이상발효 또는 부패 미생물 증식으로 된장을 폐기처분해야 한다는 생각이 강하다.

설문조사결과에서 보듯이 저염 또는 균주활용을 통한 제품균일화 보다는 최근 위생기준 강화로 인한 ‘위생’에 대한 인식이 크고 생산인력의 고령화 및 인력수급 불안정해소를 위해 생산 시설을 보강하고 편의성을 증대하고자 하는 목적이 강한 것으로 판단된다.



Figure 24. 메주에 대한 구매형태(구매의향)

위의 설문조사결과를 토대로 구매의향에 대해 표본심층면접(FGI)을 통해 그 이유에 조사한 결과(Figure 24), '생산 용이성 향상/위생적이기 때문/정부지원 혜택' 등의 답변이 나왔으며, 전반적으로 구매 의향이 높음을 알 수 있었다. 구매의향이 없음에 대한 이유로는 '비전통적/소비자들의 부정적 인식 우려/일자리 감소' 때문이라는 답변이 나다.

Table 9. 메주에 대한 구매형태(구매의향 FGI결과)

<b>향 후 구매 의향 있음</b>	<p>"제조업체 입장에서는 메주를 받아서 장을 만들게 되면 (장을) 생산하는데 간편해져서 좋다"</p> <p>"국내산 재료를 사용하고, 균을 제거한 메주이기 때문에 더 위생적이라서 사용할 것"</p> <p>"순창 지역에서 운영하는 것이기 때문에 정부 지원 받을 수 있어서 더 이익일 듯"</p>
<b>메주 구매 시 우려하는 사항</b>	<p>"메주를 사서 장을 만들면 소비자들이 좋지 않게 생각할 듯"</p> <p>"전통적이지 않다고 소비자들이 생각하면 어떡하나"</p> <p>"메주 공장이 생기면 기존에 각 업체에서 메주 만들던 인력들이 쉬게 된다"</p>

메주 구매 시 평가 기준의 중요도를 알아본 결과, '국내 원재료 사용'(4.38)>'전통의 맛 충족'(4.25)>'HACCP 기준 충족'(3.88)>'신뢰성'(3.75)>'엄격한 품질관리'(3.50) 순으로 나타났다 (Table 9). '발효균 관리'는 2.38점으로 현재 장류 제조업체에 어필하지 못하고 있지만, 균일한 맛과 품질관리를 요구하는 구매자의 의향에 비춰 마케팅 시 소구할 수 있는 중요한 요인이 될 것으로 판단된다.

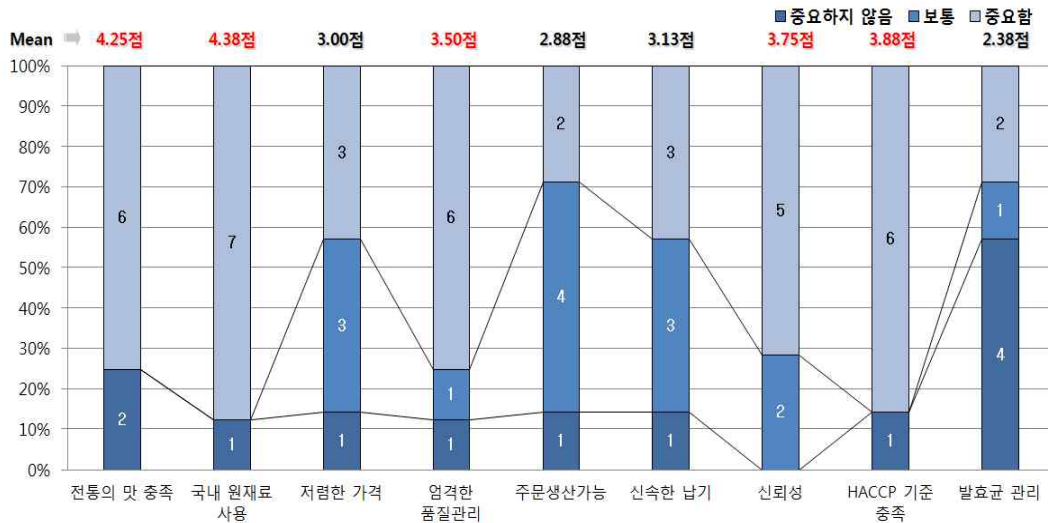


Figure 25. 구매 시 평가 기준 및 중요도

구매의향이 있는 업체가 생각하는 좋은 메주의 조건에 대해 조사하였다(Figure 26). ‘좋은 메주’를 결정하는 요인으로는 ‘발효’, ‘건조’, ‘위생’ 순으로 중요하게 생각하는 것으로 나타났으며, 또한, ‘품질균일’과 ‘균일한 맛’과 같이 메주의 ‘품질안정성’ 역시 중요하게 고려하는 것으로 조사되었다.

메주 구매 시 고려사항으로는 ‘가격이 적당’하고, ‘정부지원에 의해 구매 단가를 낮춰야’하며, ‘전통메주의 문제점인 곰팡이가 과하게 생육되거나 심한 이미·이취가 나지 않아야’하는 것으로 심층면접 시 응답하였다. 또한, ‘전통이라도 냄새가 너무 심하지 않을 것’, ‘약간의 신맛이 가미 되도록 유산균이 적절히 함유되어 있을 것’, ‘곰팡이가 너무 심하지 않을 것’, ‘적절히 숙성되어 빛깔과 맛이 좋을 것’ 등이 좋은 메주의 조건이라고 답변하였다.

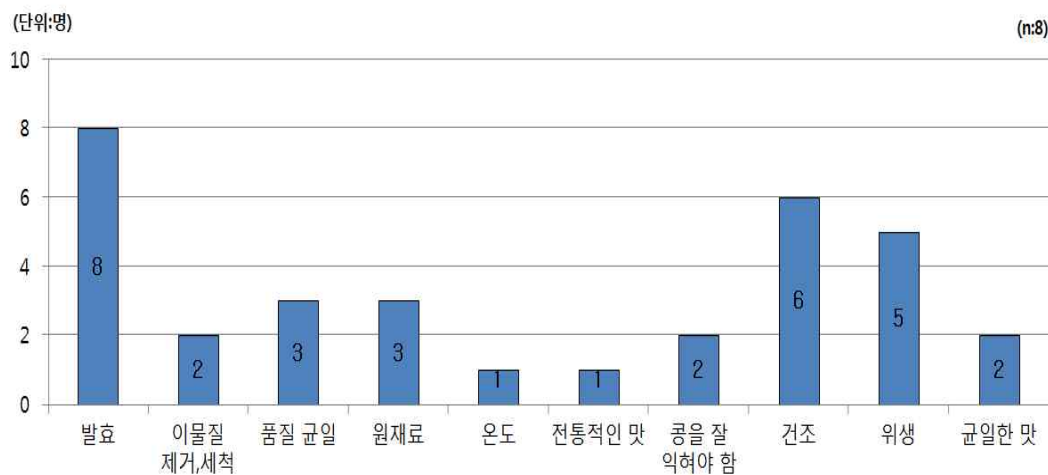


Figure 26. 좋은 메주의 조건에 대한 설문조사 결과

메주판매관련 선행조사결과를 요약하면 다음과 같다

1) 메주 인지도 및 원산지 브랜드 파워 : ‘순창’ 지역이 장류생산업체/원산지로써는 인지도가 있으나 ‘메주제품’으로써의 원산지 브랜드 파워는 상대적으로 약함

2) 업체의 장류제품 생산용 메주의 구매형태 : 향후 메주 제품의 구매의향에 대한 응답으로 ‘구매의향 있음’이 전반적으로 높게 나타났으며, 구매할 의향이 없는 이유로 ‘제조되는 메주는 전통적이지 않기 때문’이라는 답변

3) 니즈분석 : 메주 구매 시 평가 기준의 중요도는 ‘국내산 원재료 사용’>‘전통의 맛 충족’>‘HACCP 기준 충족’>‘신뢰성’>‘엄격한 품질관리’ 순으로 나타났으며, ‘발효균 관리’라는 점은 현재 장류제조업체에게 이필하지 못하고 있지만, 균일한 맛과 품질관리를 요구하는 구매자의 의향에 비춰 마케팅 시 소구 할 수 있는 중요한 요인이 될 것으로 판단

=> 전반적으로 ‘메주제품’에 대해서는 인지도 및 구매의향이 높으나, ‘전통적이지 않다’는 문제점이 지적되고 있으므로 이를 보완/해소하기 위한 판매 전략이 요구되었다.

앞의 메주판매관련 선행조사를 토대로 브랜드 포지셔닝 전략을 수립하고, 판매 시 고려해야 할 가치를 내포하는 브랜드명과 슬로건을 개발하기 위한 조사를 실시하였다. 조사를 위해 제품명은 가칭[순창메주]로 설정하였다.

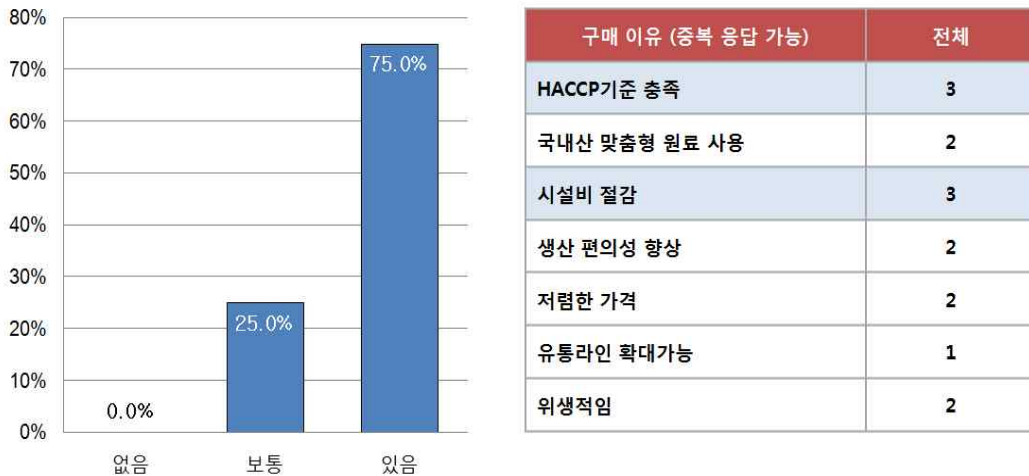


Figure 27. [순창메주](가칭) 구매의향 및 구매이유

[순창메주]에 대한 구매의향 및 구매이유에 대해 조사한 결과(Figure 27), 전체적으로 ‘구매의향 있음’(75.0%)로 매우 높게 나타났으며, 그 이유로는 ‘HACCP 기준 충족’과 ‘시설비 절감’이 구매의 가장 큰 이유로 나타났다. 그 밖에 구매 이유로는 ‘국내산 맞춤형 원료 사용’, ‘생산 편의성 향상’, ‘저렴한 가격’, ‘위생적임’ 등으로 나타났다.

Table 10. [순창메주] 요소별 평가

컨셉 요소	전체
HACCP기준 충족	5
저렴한 가격 / 가격 할인	3
발효균 관리	0
국내산 원재료(순창중심)를 사용	2
균일 품질 제품의 대량 생산(제품 표준화)	2
순창군 보증마크 부착	0

컨셉 요소 외 구매 영향 요인	전체
제품 생산 비용 절감	3
일반 제조 업체보다 위생적	2

[순창메주]에 대한 컨셉 요소를 조사한 결과(Table 10), 'HACCP기준 충족'과 '가격할인'이 가장 어필하는 것으로 나타났으며, 그 외 '국산 원재료 사용'과 '품질균일화' 등에 대한 니즈 역시 많은 편이었다. '발효균 관리'와 '순창군 보증마크 부착'은 장류제조업자들에게 크게 어필하지 못하였으며, 컨셉요소 외에도 '제품 생산 비용 절감', '일반 제조업체보다 위생적' 등의 요소가 구매에 영향을 미칠 것으로 조사되었다.

위의 [순창메주]에 대한 요소별 평가를 기초로 표본 집단 대상 FGI 결과, 이와 유사하게 가장 어필하는 부분으로 'HACCP 기준 충족'이 가장 높게 나타났으며, 그 밖에 '저렴한 가격', '맞춤형 원재료'가 1순위로 지목되었다. 어필하지 못하는 부분으로는 '발효균 관리', '균일한 품질의 대량생산', '저렴한 가격(당연히 갖추어야 할 것. 저렴하지 않으면 구매하지 않음)'인 것으로 나타났다.



Figure 28. 브랜드 컨셉

위 조사결과를 토대로 브랜드 컨셉을 제시하였다. 브랜드가 가지는 가치속성을 함축적으로 표현한 brand essence는 ‘전통장류의 도약을 위한 건강한 파트너’로 브랜드가 소비자와 지켜야 할 약속인 brand promise는 1) HACCP 기준 충족(위생적 제조과정), 2) 철저한 품질관리, 3) 국내산 원재료만을 사용, 4) 전통의 맛과 건강이다. 브랜드의 독창성을 나타내는 brand personality는 ‘Sincerity-정직하고 성실한’, ‘Competence-믿을만한, 전문적인’ 제품의 이미지를 생성·유지해야 할 것이다.

결국, ‘순창’이라는 명칭은 브랜드로서 전통과 기술, 원산지 등의 이미지를 앞세워 앞서 기술한 요소들을 대부분 함축하고 있기 때문에 최종적으로 브랜드네임은 ‘순창 메주’로 결정하였다.

[순창메주] 브랜드 컨셉요소를 바탕으로 제품의 이미지를 함축적으로 표현할 수 있는 브랜드 슬로건을 개발하였다(Figure 29).

[순창메주]는 주요 대상이 B2B 고객이나, B2C 브랜드로의 확장성도 고려하지 않을 수 없다. 그러므로 B2B 고객과 B2C 고객에 모두 어필하는 브랜드 슬로건 개발이 필요하며, 제품 자체가 중간재 성격이지만 [순창메주]를 사용해 장을 만들 경우 그 맛 자체가 달라질 수 있는 차별성 표현도 필요하므로 이를 위해서 ‘전통, 장인 정신’의 이미지를 보완할 필요성이 있었다. 그러나 [순창메주]라는 이름 자체가 ‘장류의 전문성을 인정받은 순창’이라는 것과 메주라는 제품의 카테고리를 직접적으로 표현한다고 볼 수 있다.



Figure 29. 브랜드 슬로건 개발 내용

다수의 브랜드 슬로건 후보를 선별하여 이 중 가장 브랜드 컨셉과 부합하는 슬로건을 선별하였다. 제품에 사용될 브랜드 슬로건은 ‘맑은 콩, 바른 손맛’이었으나 일부를 변형하여 앞뒤 글자수를 맞춰 “맑은 콩, 바른 맛”으로 결정하였다. 이 브랜드 슬로건을 이용하여 각종 디자인과 홍보물, 홈페이지 등에 사용할 예정이다.

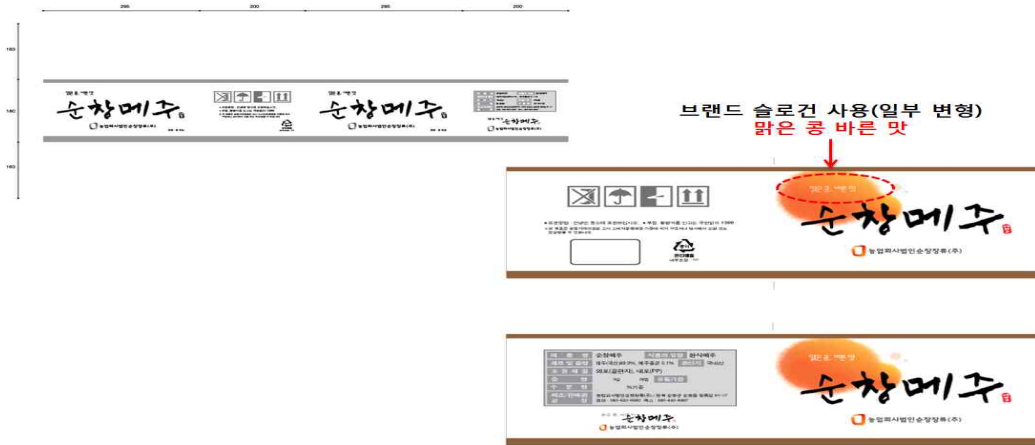


Figure 30. 박스디자인(상) 및 라벨디자인(하)

개발완료 된 브랜드 및 슬로건을 이용하여 B2C용 박스디자인 및 제작을 하였으며(Figure 30), 또한, 생산메주의 속성을 적용하여 브로셔를 제작하였다(Figure 31).

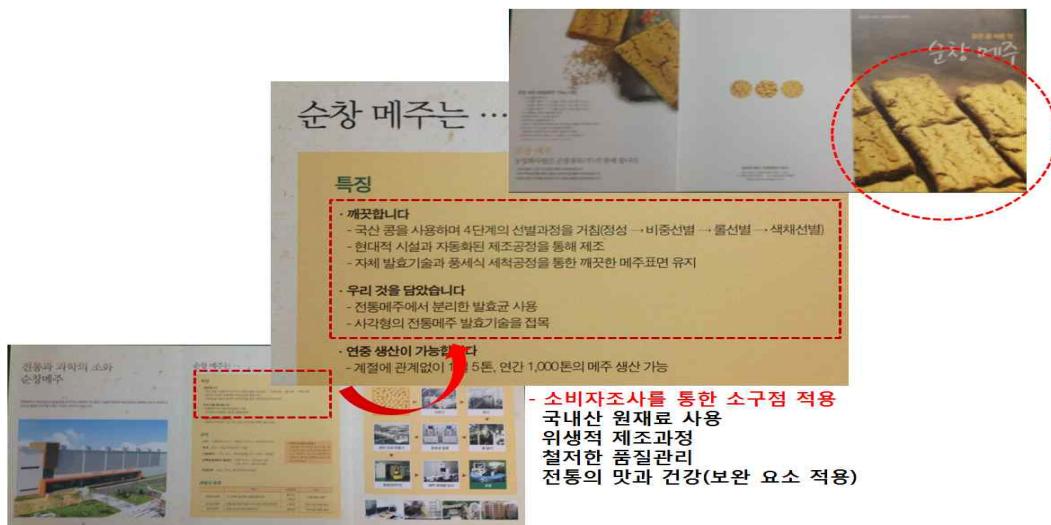


Figure 31. 브로셔 및 소비자조사 내용 적용 문구

생산 메주 시제품은 관내·외 업체와 일반인으로 구분되어 판매되었다. 관외 제조업체는 8,700 원, 관내제조업체는 모니터링을 위한 샘플수거 협조 등 제반사항으로 7,700원에 공급되었으며, 일반소매가는 10,500원 이었다.



Table 11. B2B대상 [순창메주] 생산원가 분석

구분		생산원가(200톤, 단위 천원)			Kg당 원가(원)			점유율
		계	고정비	변동비	계	고정비	변동비	
재료비	원재료비	880,000	-	880,000	4,400.0	-	4,400.0	50.6
	포장재료비	20,000	-	20,000	100.0	-	100.0	1.2
	계	900,000	-	900,000	4,500	-	4,500	51.8
노무비	직접노무비	110,400	110,400	-	552.0	552.0	-	6.4
	간접노무비	102,000	102,000	-	510.0	510.0	-	5.9
	계	212,400	212,400	-	1,062.0	1,062.0	-	12.2
제조경비	유틸리티비	297,768	-	297,768	1,488.8	-	1,488.8	17.1
	일반관리비	194,099	194,099	-	970	970	-	11.2
	계	491,867	194,099	297,768	2,459.3	970.5	1,488.8	28.3
제조원가계		1,604,267	406,499	1,197,768	8,021.3	2,032.5	5,988.8	92.3
판매비	인건비	46,500	46,500	0	232.5	232.5	-	2.7
	관리비	86,800	86,800	-	434.0	434.0	-	5.0
	계	133,300	133,300	-	666.5	666.5	-	7.7
총원가 계		1,737,567	539,799	1,197,768	8,687.8	2,699.0	5,988.8	100.0

- 제품공급 원가 8,700원 -> 관내 메주제조업체 7,700원 공급

사업기간 중 총 520백만원의 메주를 판매하였으며, 이중 관내제조업체는 12곳으로 이중 중복 구매한 업체 수를 제외한 총 9개 장류제조업체에서 본 사 메주로 담은 된장 샘플을 수거하여 모니터링 검사를 실시하였다. 샘플은 메주제공 후 90일 경과 후 채취하였으며, 분석항목은 염도, 수분, pH와 *Bacillus cereus*였다.

Table 12. 자체적으로 제조한 된장제품 품질분석 결과

샘플번호	염도	수분	pH	AN(AV)	B.C
001	14.4	53.1	5.6	434.4	N.D
002	15.4	56.2	5.7	737.9	N.D
003	15.6	56.6	5.8	744.5	41개/ml당
004	14.3	53.5	5.6	450.2	198개/ml당
005	15.7	56.2	5.5	828.1	N.D
006	14.1	56.5	5.7	702.3	13개/ml당
007	14.2	55.7	5.6	779.0	N.D
008	13.5	54.2	5.6	522.5	N.D
009	14.0	54.2	5.5	783.0	N.D
010	14.1	56.4	5.8	757.9	N.D
평균	14.5	55.3	5.7	674.0	-
표준편차	0.8	1.4	0.1	146.8	-

Table 13. 메주공급업체에서 제조한 된장제품 품질분석 결과

업 체 명	염도(%)	수분(%)	pH	AN(mg%)	B.C(1g당)
A	14.7	57.6	5.8	781.3	N.D
B	15.2	53.4	5.4	714.2	N.D
C	12.8	58.6	5.3	569.8	N.D
D	14.3	54.9	5.8	562.0	N.D
E	13.3	55.6	5.4	711.6	보류
F	15.5	51.9	5.9	432.9	N.D
G	15.9	57.3	5.8	602.3	N.D
H	17.0	56.0	6.0	516.0	N.D
I	10.5	62.7	6.0	814.5	N.D
평 균	14.4	56.5	5.7	633.8	-
표준편차	1.9	3.1	0.3	128.2	-

메주를 제공한 업체에서 샘플을 수거하여 품질분석을 하는 이유는 메주의 품질이 어느 정도 균일하다 하더라도 투입하는 염수의 농도나 량, 메주의 량, 숙성기간 등에 따라서 된장 품질이 천차만별로 달라지기 때문이다. 따라서 품질이 모두 균일할 수는 없지만 어느 정도 수준을 유지하기 위해서는 표준화된 제조방법을 제공하여 메주품질 불만족을 일정부분 해소할 수 있으며 궁극적으로 제공한 메주를 이용한 장류제품의 저염화에도 영향을 미칠 것이기 때문이다.

전통 또는 한식된장은 보통 수분 14±2%, 수분 55%이하를 유지하는 것이 보통이다. 전체적으로 수분함량이 기준보다 높게 유지되는 것을 알 수 있는데 이는 본사 제공메주가 각각의 업체 메주보다 수분침투속도가 빨라 장 분리를 기존 방법보다 이른 시일 내에 해야 함을 할 수 있다.

염도는 대부분의 업체가 편차 내에 들어가나 H와 I업체의 경우 너무 높거나 낮는데 이는 본사에서 제공한 메주 수분함량을 적용하지 않고 기존방식 데로만 제조한데 따른 것으로 추정된다. 이러할 경우, 높은 염도를 유지하는 것은 그나마 이상발효에 영향이 적을 수는 있으나 염도가 지나치게 낮으면 품질열화가 발생할 수밖에 없다. 비교적 높은 pH를 유지하는 것도 품질열화의 중요한 변수로 작용할 수 있다.

전통·한식 메주와 된장의 맛을 결정하는 요인은 유리아미노산, Glutamate함량 등 여러 가지가 있을 수 있다. pH 또한 중요한 요인 중에 하나로 일반적으로 전통된장의 경우 pH 5.4±0.3으로 비교적 높은 pH를 나타내지만 그 이하의 pH로도 좋은 품질을 유지하며 적절한 pH의 관리는 저염화에도 메주 중요한 변수이기도 하다. 메주·된장·간장의 숙성 중 유산균은 낮은 pH를 유도함으로써 정균작용과 적당한 산미, 그리고 전통적인 구수한 맛을 복원에 주요한 역할을 할 수 있다고 여겨진다. 저염 장류제품 개발 목적 달성을 위해서는 향후 연구에서 정균작용을 하는 *B. lichemiformis*와 *Aspergillus oryzae*의 연구와 더불어 메주발효 또는 된장·간장 숙성 중 우수발효 유산균 접목에 대한 연구가 필요할 것이다.

결과적으로 평균값은 제조업체에서 담금한 된장과 본사에서 제조한 된장이 유사한 품질분석 수치를 보이거나 업체의 경우 품질분석 편차가 큼을 알 수 있다. 본 연구과제의 목표인 저염 장류제품 생산을 위해서는 1) 본사 생산 장류제품의 저염화와 더불어 메주와 된장이 수요업체에서 제대로 적용되기 위해서는 2) 구매업체를 위한 표준 메뉴얼 또는 현장기술지도가 필요할 것으로 판단된다.

### 나. 장류시장 동향 및 소비 트렌드 조사

장류 출하액은 2010년 9천 1백억 원에서 2011년 9천 8백억 원으로 성장하여 1조원 시장을 형성하였다(식품의약품안전처, 식품 및 식품첨가물 생산실적보고 2010, 2011). 이 중 된장이 2010년 1,380억 원에서 2011년 1,550억 원으로 12%, 청국장 240억 원에서 320억 원으로 33%, 혼합장 1,240억 원에서 1,620억 원으로 30% 성장하여 전체 장류 출하액을 높였다. 이 밖에 특이한 것은 간장 품목 중 양조간장과 산분해간장 효소분해간장의 출하액은 동결이거나 감소한 반면 출하액 비중은 미미하나 한식간장이 75억 원에서 130억 원으로 급성장하였다는 점이다.

또한, 식생활의 편의성과 외식문화의 발달로 혼합간장이나 혼합장과 같은 편의성 장류제품의 매출성장도 관심을 끄는 대목이다. 장류시장 관련 여러 연구보고서에서 나타나듯이 이미 상품화가 완료된 고추장을 제외한 된장이나 간장과 같은 자가소비성 장류의 상품화가 촉진될 것으로 보이며, 특히 이와 관련된 편의성 제품의 소비촉진이 가속화 될 것이다. 또한, 식생활의 고급화와 건강에 대한 관심이 증가하는 소비경향으로 비취 저염과 기능성이 강화된 장류제품의 선호도도 증가할 것으로 예상된다.

이러한 논제를 바탕으로 향후 장류시장 동향 및 소비트렌드에 대해 관련 자료와 통계를 통해 분석해보았다.



Figure 32. 일인당 연간 장류 소비량 추이(KFIA, NRI, 통계청, A社, 2009년)

가정용 시판장류와 업소용 시판장류, 자가 생산장류를 포함한 우리나라 국민 일인당 장류소비량을 Figure 32에 표시하였다.

2009년 기준 국민 일인당 연간 장류소비량은 간장 5.6L iter>고추장 4.0 kg>된장 3.2 kg 순이며 된장은 고추장 대비 82%의 소비량을 보였다. 된장이 국과 찌개에 한정되어 사용되나 간장은 이외에도 무침이나 조림 등 요리전반에 걸쳐 폭넓게 사용되고 있기 때문인 것으로 보인다.

반면에 2002년부터 2009년까지 연평균 성장률은 된장이 4.4%로 고추장 2.5%, 간장 2.0% 보다 상대적으로 높은 성장률을 보이고 있다.

B2B, B2C를 모두 포함하여 시판시장에서 판매되고 있는 장류소비량은 증가하는 경향을 보이고 있다(Figure 33). 간장의 경우 1980년대 후반 급격히 증가 후 지속적으로 완만하게 상승하여 조사기간 동안 연평균 2.6%의 성장률을 보였으며, 고추장과 된장, 쌈장, 추장의 증가속도는 이보다 빠르게 성장하고 있다.

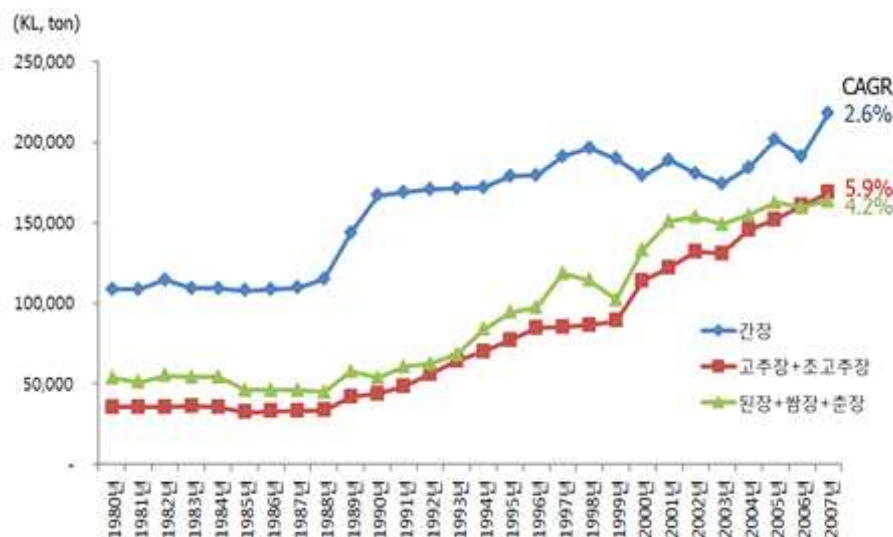


Figure 33. 시판시장에서 장류 소비량 추이(한국장류협동조합, 1980-2007년)

가정시장 장류판매추이를 보면, 간장판매는 1999년부터 2009년까지 연평균 -1.6% 감소가 진행되고 있으며 고추장은 시판장류시장보다 낮은 4.2%의 성장, 된장은 시판시장 보다 다소 높은 4.5%의 성장추이를 나타냈다. 하지만 판매량 비중은 여전히 간장이 53.7%로 가장 높았고 고추장 32.5%, 된장 13.7%를 차지하였다.

종합적으로 판단하였을 때, 간장, 고추장, 된장 중 된장의 일인당 소비 비중은 약 25%인데 반해 유통채널에서의 가정시장 판매 비중이 약 14%이고 성장세도 가장 높으므로 향후 시장 확대 가능성이 전망된다.

된장은 일반적으로 공장형의 양산회사와 프리미엄급 소규모 전통식제조회사 또는 자가제조에 의해 공급된다. 양산회사의 유통채널은 대리점을 통해 소매점과 업소를 거쳐 소비자에게 공급되거나 제조회사가 직접 소매점과 업소에 공급하기도 한다. 양산회사의 경우 소비자 직접 판매가 거의 없으나 프리미엄급 장류를 제조하는 소규모 전통식 장류제조업체의 경우 소비자 직접 판매와 소매점을 통한 판매 두 가지 형태가 주를 이룬다. 자가제조의 경우에는 직접 담거나 지인이나 가족을 통해 조달한다.

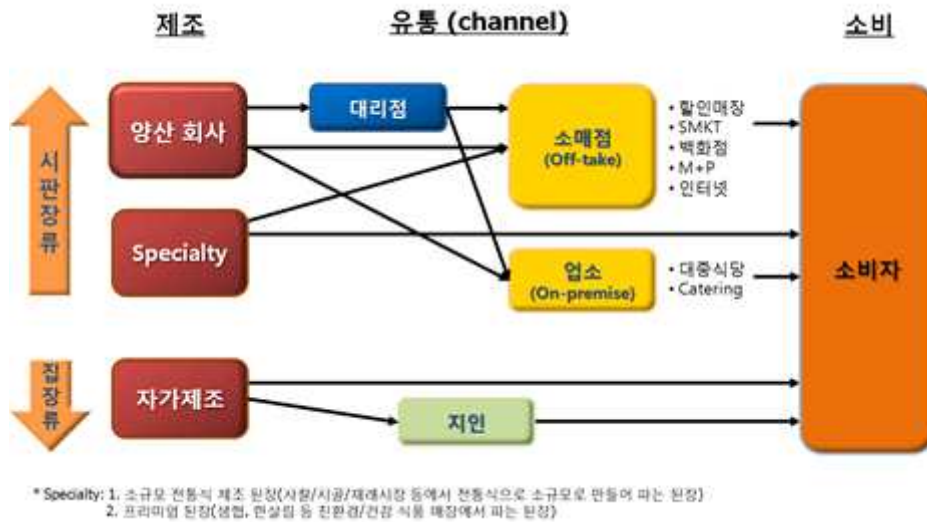


Figure 34. 된장 유통채널 분석

조달방법별 시장이 크기는 Figure 34에 제시하였다.

2009년 된장 전체소비량은 158,253ton으로 추정되며, 이중 가정용(시판구매 + 자가제조)의 비중은 54%, 업소용(시판구매)의 비중은 46%였다. 가정용 된장 중 자가제조 비중은 73.8%(전체 시장대비 39.8%), 시판된장 구매 비중은 26.2%(전체시장 대비 14.2%)로 된장의 경우 여전히 직접 제조하거나 지인을 통해 조달하는 비중이 비교적 높게 나타났다.

결국, 시판시장에 노출되지 않은 된장의 잠재시장은 전체 된장소비량의 40%로 이미 80%가 넘는 시판시장 침투율을 가지는 고추장이나 간장보다 시장성장 가능성이 높게 나타나는 이유이기도 하다.

된장시장의 자가제조 비중이 높은 이유는 여전히 전통된장에 대한 소비자의 니즈가 존재한다는 것을 보여준다.

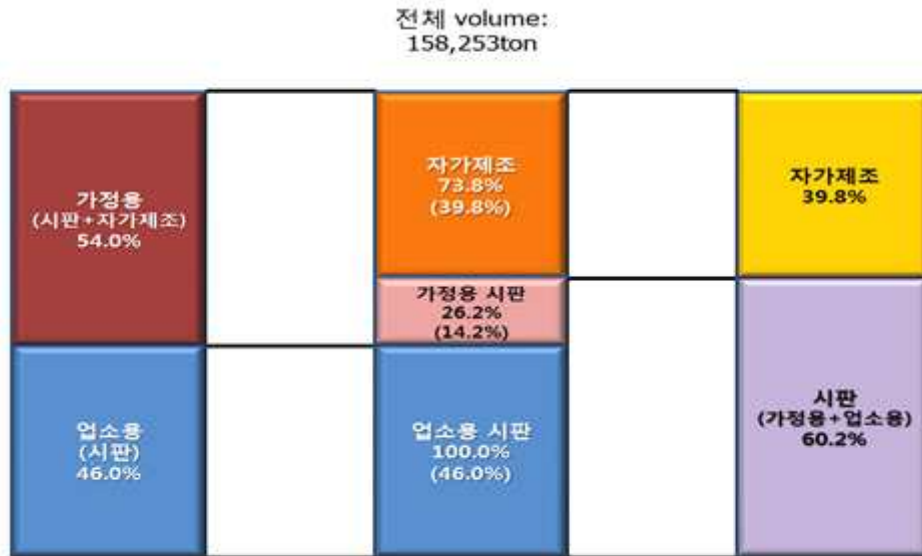


Figure 35. 조달방법별 된장 소비 규모(KFIA, NRI, 통계청, A社, 2009년)

이와 관련하여 실제로 소비자는 자가 제조 된장(집된장)과 시판된장에 대한 차이를 인식하고 있는 것으로 나타났다(Figure 35). ‘차이가 있다’고 인식하는 소비자는 조사대상자 중 87.6%로 이 중 매우 차이를 느끼는 소비자도 27.1%였다. 이러한 이유로 맛의 차이를 느끼는 소비자가 91%(복수 응답), 원료관련 응답자는 28%, 제조방식 차이를 응답한 소비자는 12%로 나타나 관능적 특성에서 자가제조 된장과 시판된장의 차이를 가장 많이 느끼는 것으로 나타났다.

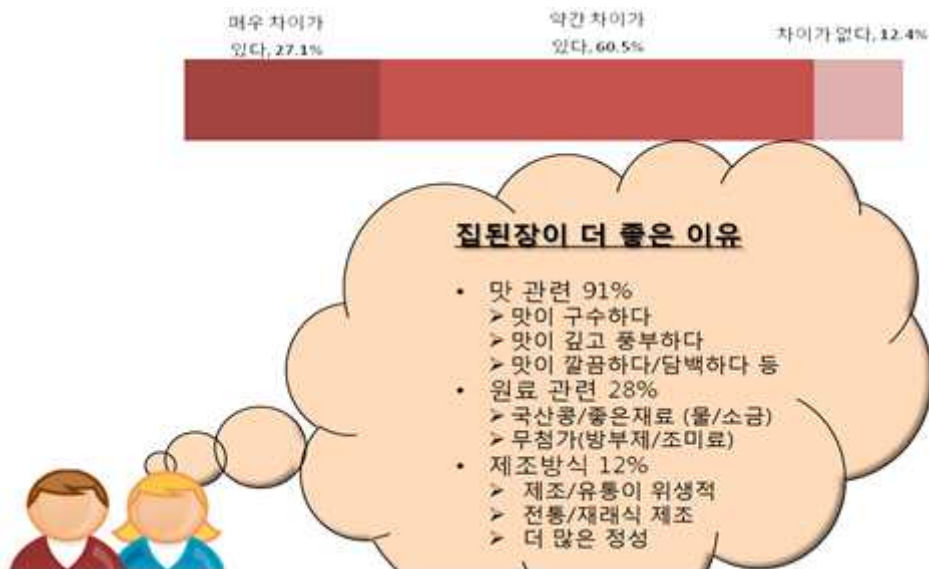


Figure 36. 자가제조 된장(집된장)과 시판된장의 소비자 인식차이(동서리서치, A社, 2010)

이러한 자가 제조 된장과 시판된장의 차이점을 기본속성과 이미지속성, 의인화속성으로 구분하여 비교해 보았을 때, 시판된장은 ‘적당한 짠맛과 물에 잘 풀어진다’는 등의 사용편리성과 젊은 이미지 이외에 모든 영역에서 자가 제조된장에 비해 열세를 나타냈다(Figure 36). 이는 자가 제조 된장이 시판된장에 비해 신뢰성이 높은 것에 기인하는 것으로 판단할 수 있다.

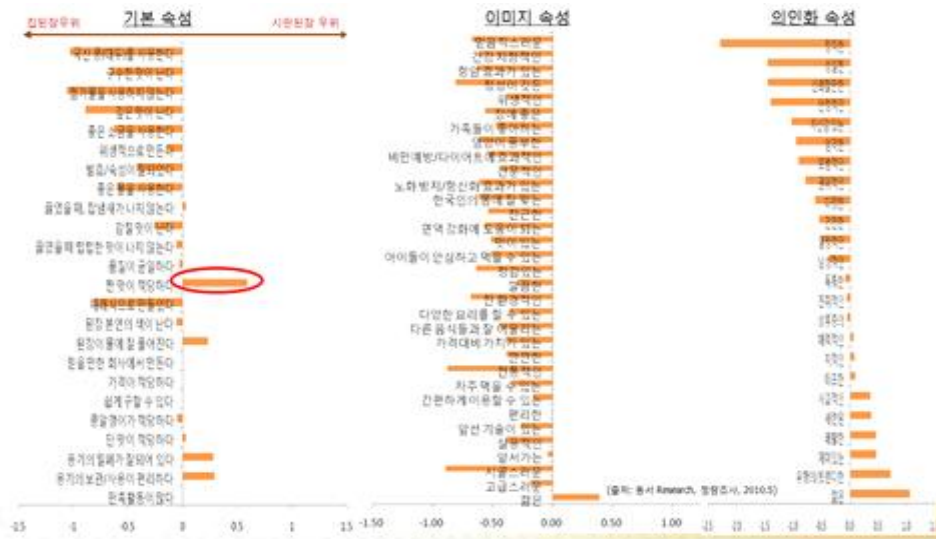


Figure 37. 자가제조 된장(집된장)과 시판된장의 가치속성 비교(동서리서치, A社, 2010)

특이한 점은 기본속성 중 시판된장이 자가제조 된장에 비해 짠맛에 대한 선호도는 다른 요소에 비해 높게 나타나고 있는데, 이는 소비자가 전통된장이나 자가소비 된장의 지나친 짠맛을 문제점으로 인식하고 있는 것으로 판단된다(Figure 37).

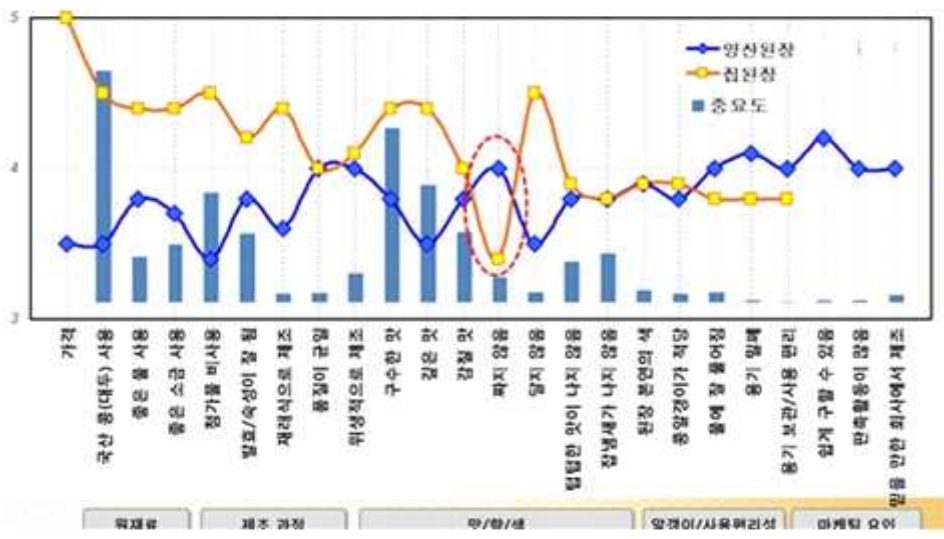


Figure 38. 자가제조 된장(집된장)과 시판된장의 Value curve(동서리서치, A社, 2010)

이러한 결과는 시판된장과 자가 제조 된장(집된장)의 value curve에서도 확연하게 나타난다 (Figure 38). 자가 제조 된장은 사용편리성과 마케팅 요인 이외의 모든 부분에서 시판된장에 비해 높은 값을 나타내며 중요도는 비교적 낮지만 짠맛과 관련된 속성에서 시판된장에 비해 낮게 평가되는 것을 알 수 있다.

장류 중 잠재시장이 비교적 큰 된장의 향후 구매전망은 Figure 39에 나타냈다.

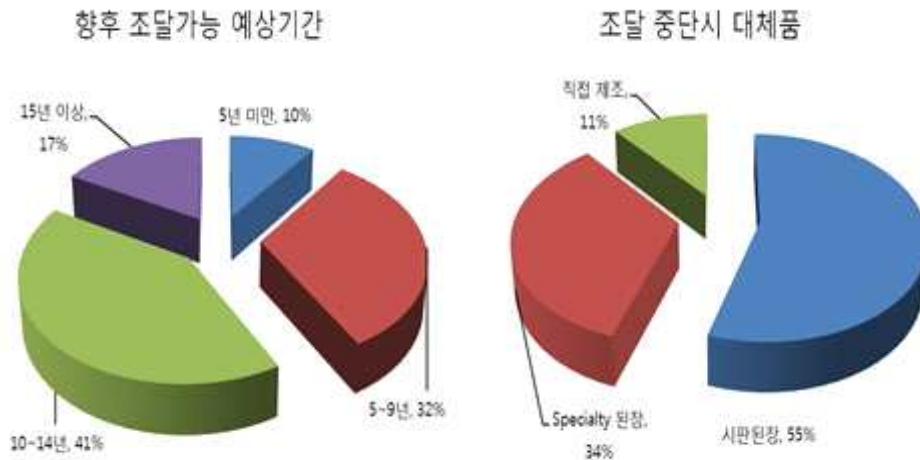


Figure 39. 자가 제조 된장 소비자의 향후 된장 조달 방법 조사(동서리서치, A社, 2010)

된장을 직접제조하거나 지인에게 얻어서 사용하는 자가제조 소비자의 약 40%는 향후 10년 이내에 조달이 끊길 것으로 예상하고 있다. 그 비중을 보면 5년 이내 10%, 5 ~ 9년 32%, 10~14년 41%였으며 15년 이상은 17%로 조사되었다.

조달 중단 시에는 90% 가량이 시판된장이나 프리미엄급 된장을 구매하여 사용하겠다고 응답했으며, 이중 10% 정도만이 직접제조 할 의향이 있는 것으로 조사되었다.

이로 보아 앞서 시장동향조사에서도 분석하였다시피 향후 된장시장은 자가 제조 소비가 감소하고 양산이든 프리미엄이든 시판시장 소비가 증가할 것으로 예상된다.

이러한 소비시장 변화가 예상됨에도 자가 제조 된장 소비자의 상당수가 시판된장으로 소비처를 전환할 수밖에 없는 이유를 살펴볼 필요성이 있다. 따라서 자가 제조된장과 시판된장의 구매/소비 장애 요인이 무엇인지 살펴보았다(Table 14).

시판된장에 비해 원재료와 맛에서 뛰어난 경쟁우위를 보임에도 자가 제조 된장의 조달이 어려운 가장 큰 이유는 제조방법이 어렵고 지인에게서 조달할 경우 불편함이 있다는 것이다. 또한, 많은 양을 오래 보관하고 먹어야 한다는 보관 상 문제점과 지나친 짠맛과 담는 시기에 따라 일정한 맛을 낼 수 없다는 것이다.



Table 14. 된장 조달방법별 구매/소비 장애요인(동서리서치, A社, 2010)

	인식/구매	사용	맛	보관
전통 제조 방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>만들기 어려움</li> <li>매주 냄새</li> <li>안정적/지속적 조달이 어려움</li> <li>얼어먹기 눈치보임</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>육수내기 귀찮다</li> <li>어린이용 별도 조리</li> <li>물에 잘 풀어 지지 않는다</li> <li>얼어날 때 위생 문제 (수저 및 뚜껑)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>너무 짠 맛</li> <li>일정하지 않은 맛</li> <li>퐁퐁한 냄새</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>많은 양을 오래 보관해야 함</li> </ul>
시판 제품	<ul style="list-style-type: none"> <li>신뢰성 (중국산품 /GMO/방부제/합성 조미료 첨가/제조공정에 대한 불신)</li> <li>규격/양/제품명등이 복잡 (업계 표준이 없다)</li> <li>낮은 소비자 관여도</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>조미료 맛</li> <li>단 맛</li> <li>덜 구수하고 길은 맛</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>플라스틱 용기 (환경 호르몬/색깔 배임)</li> <li>뚜껑 및 중간 층이가 비위생적</li> <li>장기 보관시 용기 뒤틀림</li> <li>밀폐 불안 (변질)</li> </ul>

결국 기존의 제조방식과 원재료의 신뢰성을 부여하고 일정한 맛을 유지하며, 저염화를 유도한 전통 한식된장과 간장을 제조할 수 있다면 시판 양산시장으로 전환되는 소비자의 일부 또는 상당수가 이 시장으로 흡수될 수 있다는 것이다.

장류에 대한 이러한 소비 트렌드는 양산회사도 인지하고 있으며, 이 시장을 공략하기 위한 제품을 속속 출시하고 있다. 하지만 현재까지는 발효미생물을 이용한 저염 제품은 없으며, 염의 대체, 살균 등 물리화학적 방법을 사용하고 있는 실정이다.

이러한 시장 환경에 대해 소비자는 어떤 요구를 하는지 설문조사를 통해 니즈를 분석하고 패널들을 대상으로 FGI를 실시하였다.

#### 나. 소비자 니즈 분석 및 FGI

전통된장에 대한 소비자 니즈를 분석하기 위해 설문조사와 FGI를 실시하였다.

FGI는 장류구매경험이 있는 30대와 40대 기혼여성을 연령대별 2그룹으로 나눠 실시하였으며, 조사목적은 장류 구매 시 소비자들이 중요시하는 속성 및 구매형태조사와 설문지 작성의 근거 자료로써 활용할 수 있는 장류 관련 소비정보를 획득하기 위해서이다(Table 15).

Table 15. FGI 조사 개요

	Group 1 (30대 주부)	Group 2 (40대 주부)
조사 대상	* 장류 구매 경험이 있는 30~40대 기혼 여성 2집단(12명)	
조사 목적	* 장류 구매 시 소비자들이 중요시하는 속성 및 구매 형태 조사 * 설문지 작성의 근거 자료로써 활용될 수 있는 장류 관련 정보 획득	
조사 일시	1월 8일 (화) 오후 1시	1월 8일 (화) 오후 4시
참석자 명단	<ul style="list-style-type: none"> <li>송OO (36세, 인천 부평)</li> <li>장OO (36세, 서울 잠원)</li> <li>전OO (31세, 서울 신림)</li> <li>김OO (31세, 서울 미아)</li> <li>허OO (35세, 경기 하남)</li> <li>강OO (34세, 서울 강남)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>안OO (38세, 서울 강북)</li> <li>우OO (40세, 서울 강북)</li> <li>이OO (42세, 서울 강북)</li> <li>김OO (43세, 서울 서초)</li> <li>이OO (41세, 인천 연수)</li> <li>남OO (40세, 서울 강북)</li> </ul>

설문조사는 서울 및 경기도 지역 장류구매 경험이 있는 기혼 여성 305명의 대상으로 실시하였으며, 장류구매 시 소비자들이 중요시하는 속성 및 구매형태조사와 판매전략수립 근거 자료로써 활용하고자 하였다(Table 16).

연령대는 20대 45명, 30대 117명, 40대 99명이었으며 50대 이상은 44명이 참여하였다. 소득은 월 200만원 이하 29명, 200 ~ 400만원 121명, 401~600만원 95명, 이상은 60명이었으며, 직업별로 주부가 194명, 회사원 87명 기타 24명이 설문에 응하였다(Table 16, Figure 40).

Table 16. 설문조사 설계 개요

조사 지역	* 서울 및 경기도																																						
조사 대상	* 장류 구매 경험이 있는 기혼 여성 305명																																						
조사 목적	* 장류 구매 시 소비자들이 중요시하는 속성 및 구매 형태 조사 * 브랜드 포지셔닝 전략 수립의 근거 자료로써 활용할 수 있는 세분시장 프로파일 정보 획득																																						
세부 표본구성	<p>Total : 305명 (기혼 여성 대상)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>연령</th> <th>n</th> <th>소득</th> <th>n</th> <th>직업</th> <th>n</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>20대</td> <td>45</td> <td>200만원 이하</td> <td>29</td> <td>주부</td> <td>194</td> </tr> <tr> <td>30대</td> <td>117</td> <td>201~400만원</td> <td>121</td> <td>회사원</td> <td>87</td> </tr> <tr> <td>40대</td> <td>99</td> <td>401~600만원</td> <td>95</td> <td>자영업/회사원/기타</td> <td>24</td> </tr> <tr> <td>50대</td> <td>44</td> <td>601~800만원</td> <td>60</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>305</td> <td>Total</td> <td>305</td> <td>Total</td> <td>305</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 거주지 별로 강남-동(44명), 강남-서(44명), 강북(43명), 경기도(120명), 기타(45명)로 분류됨</p>			연령	n	소득	n	직업	n	20대	45	200만원 이하	29	주부	194	30대	117	201~400만원	121	회사원	87	40대	99	401~600만원	95	자영업/회사원/기타	24	50대	44	601~800만원	60			Total	305	Total	305	Total	305
연령	n	소득	n	직업	n																																		
20대	45	200만원 이하	29	주부	194																																		
30대	117	201~400만원	121	회사원	87																																		
40대	99	401~600만원	95	자영업/회사원/기타	24																																		
50대	44	601~800만원	60																																				
Total	305	Total	305	Total	305																																		



Figure 40. 응답자 인구통계학적 특성

설문조사 시 응답대상자는 요인추출과 군집분석을 통해 4개의 시장으로 세분화하였다(Table 17). 세분화된 시장은 맛과 품질이 좋은 장을 선호하며, 장류 이용 방식에도 관심이 많은 “고관여 품질 및 편의성 추구 집단(21%)”, 제품 품질보다 가격을 더욱 고려하는 “저관여 가격민감 집단(45%)”, 장의 전통적 제조방식에 관심이 많은 “전통방식 선호 집단(19%)”, 제품의 품질을 고려하며, 제조사 및 브랜드의 신뢰성에 민감한 “품질 및 브랜드 신뢰성 추구 집단(15%)”로 구분되었다.

Table 17. 세분시장 프로파일

<b>[세분시장 1]</b> 고관여 품질 및 편의성 추구 집단 (n=64, 21%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30대(43.8%) 및 40대(37.5%)의 분포가 높으며, 가구 소득에서는 중상/중하소득층(201-600만원: 79.7%) 분포가 타 집단 대비 가장 높게 나타났다.</li> <li>• 직업상으로는 타 집단 대비 전업주부(70.3%) 비율이 가장 높게 나타났다.</li> <li>• 맛과 품질이 좋은 장을 선호하며, 장류 이용 방식에도 관심이 많은 집단</li> </ul>
<b>[세분시장 2]</b> 저관여 가격민감 집단 (n=137, 45%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 타 집단 대비 상대적으로 20대 및 30대의 분포가 크며, 저소득층(200만원 이하: 14.6%)의 분포가 타 집단 대비 가장 크게 나타났다.</li> <li>• 직업상으로는 자영업/전문직/기타(9.5%)의 비율이 타 집단 대비 가장 높게 나타났다.</li> <li>• 제품 품질보다 가격을 더욱 고려하는 저관여 집단</li> </ul>
<b>[세분시장 3]</b> 전통방식 선호 집단 (n=59, 19%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30대(37.3%) 및 40대(39.0%)의 분포가 매우 높으며, 중상소득층(400-600만원: 33.9%)과 고소득층(600만원 이상: 20.3%)의 분포가 매우 높게 나타났다.</li> <li>• 전업주부(64.4%)와 회사원(28.8%)의 비율이 높게 나타났다.</li> <li>• 장의 전통적 제조방식에 관심이 많은 집단</li> </ul>
<b>[세분시장 4]</b> 품질 및 브랜드 신뢰성 추구 집단 (n=45, 15%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 타 집단 대비 상대적으로 30대의 분포가 가장 많으며(53.3%), 중하소득층(201-400만원: 48.9%)의 분포가 가장 크게 나타났다.</li> <li>• 직업상으로는 회사원(40.0%)의 비율이 타 집단 대비 가장 높게 나타났다.</li> <li>• 제품의 품질을 고려하며, 제조사 및 브랜드의 신뢰성에 민감한 집단</li> </ul>

시판된장과 전통된장(자가 제조 및 프리미엄 된장 구매)의 사용 비중을 알아본 결과 시판된

장만 사용(34.4%)하거나 시판된장과 전통된장 모두 사용(57%)하는 비중이 높게 나타났다 (Figure 41). 그러나 전통된장 이용비율은 8.5%로 비교적 낮았으며, 고관여 품질 및 편의성 추구 집단과 전통방식 선호 집단이, 그리고 연령이 높아질수록 사용 비중이 높게 나타났다.

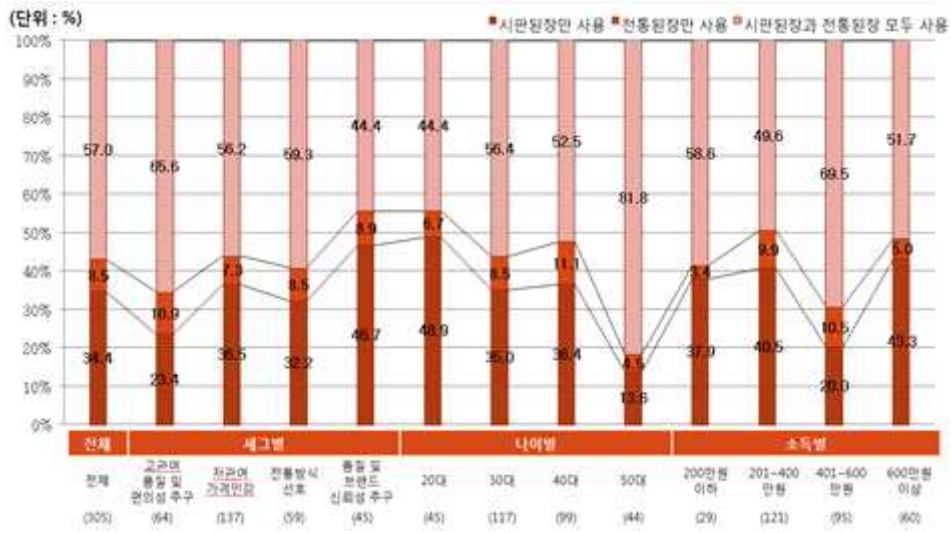


Figure 41. 시장/연령/소득별 사용하는 된장 형태

이 결과는 앞서 분석한 <가. 장류시장 동향 및 트렌드 조사>와 차이가 있는 것으로 보이나, 시판장류와 전통장류 모두를 사용하는 응답 비율도 57%로 높기 때문에 단순히 자가제조 및 프리미엄급 전통장류 구매 사용자의 비중이 낮다고 단정할 수 없다.

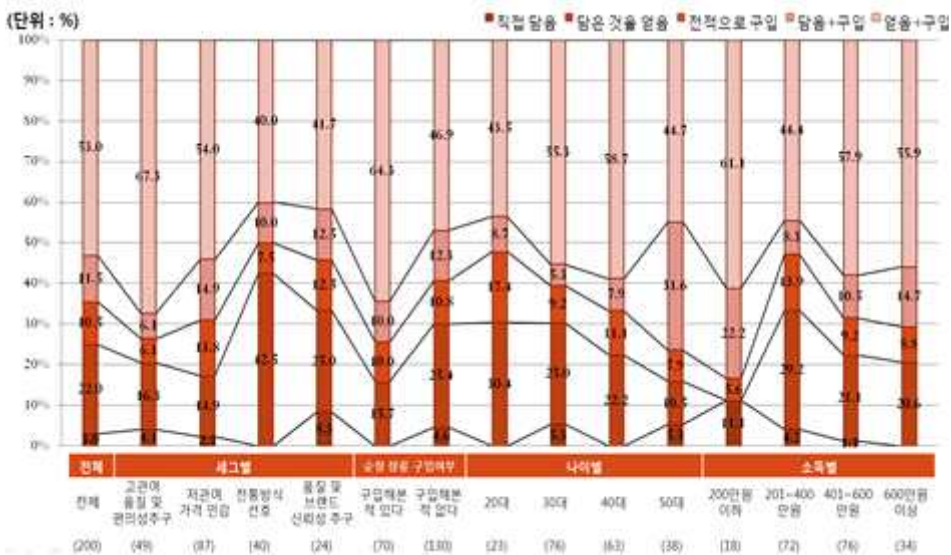


Figure 42. 시장/연령/소득별 전통된장 획득 방법

이에 따라 전통된장만 사용한다고 응답한 사람과 시판된장과 전통된장 모두 사용한다고 응답한 사람을 대상으로 전통장류 획득방법에 대해 조사/분석해 보았다(Figure 42). 자가 제조에 해당하는 직접제조와 지인에게 얻는다는 응답자는 전체의 25%였으며, 전적으로 구입한다는 응

답자는 10.5%에 불과하였다. 직접제조하거나 구입하여 사용하는 사람은 11.5%, 지인에게 얻거나 구입하는 사람은 53.0%로 전통장류를 사용하는 소비자는 자가제조 및 지인에게 얻는 것보다 더불어 구입도 함으로서 혼용 사용하는 비중이 높음을 알 수 있었다.

이와 같이 전통된장소비자의 일부만 전적으로 구입하며(10.5%) 나머지는 혼용사용하거나 직접제조방식으로 조달하는 것으로 나타났다.

결과적으로 <가. 장류시장 동향 및 트렌드 조사>에서 제시한 자가제조(직접제조 또는 지인 조달)의 비중과 유사한 결과를 보인 것으로 판단된다.

향후 된장 소비 예상을 알아본 결과(Figure 43), '현 수준을 유지'하겠다는 반응이 68.2%로 가장 높게 나타났으며 감소(10.8%)보다 증가(23.0%)가 많아 점진적인 소비증가가 나타날 것으로 예상된다. '전통방식 선호'집단과 '고관여 품질 및 편의성 추구'의 경우 현 수준보다 증가할 것 같다는 반응이 각각 30.5%, 28.1%로 다른 집단에 비해 높게 나타났으며, 30대 소비자들의 증가의향이 가장 크게 나타났다.

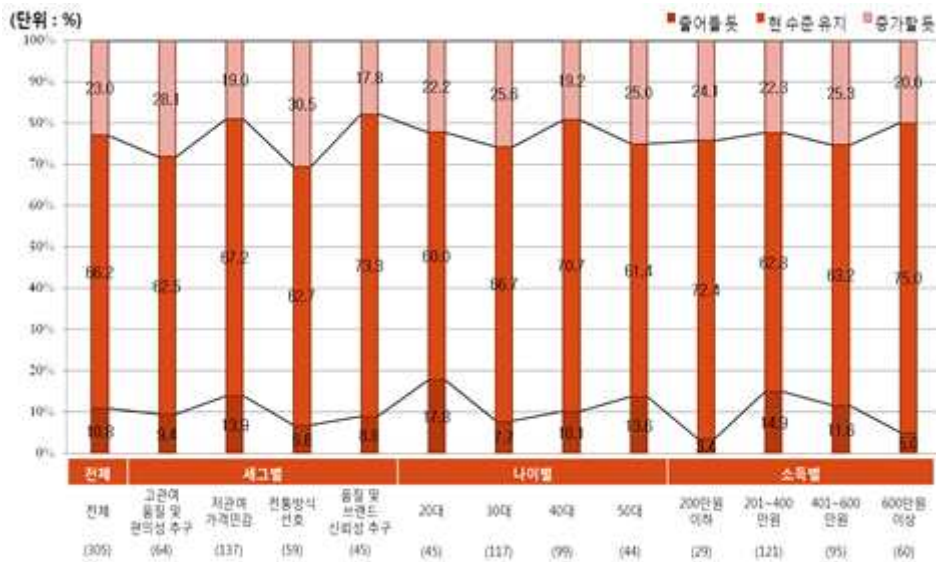


Figure 43. 시장/연령/소득별 향후 된장 소비 예상

전통된장의 구매, 재구매 의향은 Figure 32에 제시하였다. 결과적으로 '(재)구매'하겠다는 반응이 68.2%로 매우 높게 나타났으며, '고관여 품질 및 편의성 추구' 집단이 다른 집단에 비해 의향이 82.8%로 높은 경향을 보였다. 연령별로 30대와 40대가 구입의향이 가장 크며, 소득으로는 중상 이상의 집단에게서 크게 보였다.

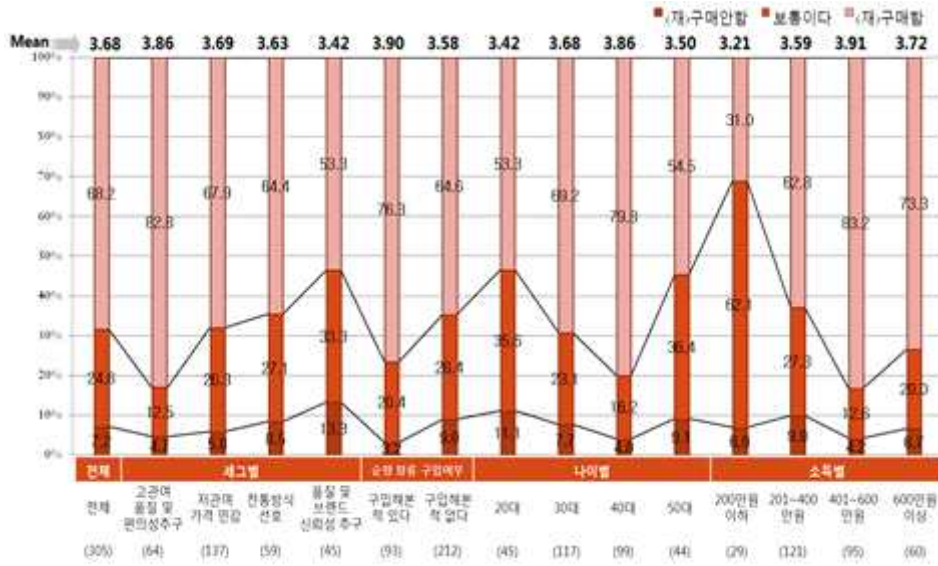


Figure 44. 시장/연령/소득별 향후 전통된장 구매, 재구매 의향

현재 이용하고 있는 된장제품의 만족과 불만족스러운 점을 파악해 개발한 저염된장/간장의 시장진입가능성을 알아보고 판매전략 수립에 활용하고자 하였다.

Table 18는 현재 이용하고 있는 된장의 만족스러운 점에 대한 설문조사 결과이다. 주요 사용 브랜드로는 대상의 ‘청정원 순창’, CJ의 ‘해찬들 태양초’ 그리고 브랜드로 인식된 ‘순창고추장’과 기타 전통장류제품들이었다. 주목할 점은 ‘순창고추장’ 브랜드가 대상의 브랜드와 지역 장류제조업체 브랜드의 혼돈 가능성이 있다는 것이다.

Table 18. 현재 이용 된장의 만족스러운점(단위:%)

	대상 청정원 순창	CJ 해찬들 태양초	순창 고추장 (브랜드로 인식)	기타 전통장류	순창 민속 마을
(응답자 숫자)	(63)	(104)	(94)	(3)	(1)
맛	63.5	65.4	76.6	100.0	100.0
색깔	17.5	19.2	20.2	100.0	-
가격	33.3	25.0	38.3	-	100.0
브랜드 인지도/신뢰도	49.2	45.2	36.2	-	100.0
구매 용이성	36.5	30.8	28.7	33.3	-
재료 원산지 (국산/해외)	15.9	18.3	23.4	33.3	-
제조 과정상의 위생 및 안전성	-	10.6	10.6	33.3	-
제품 이미지	20.6	16.3	22.3	-	-

만족요인으로는 맛>브랜드 인지도/신뢰도>구매 용이성> 가격 등이 주요하게 나타나고, 특이할만한 사항은 만족요인으로 ‘색깔’에 응답 역시 상당수 나왔다는 것이다.

불만족 요인으로는 인공첨가물혼합여부>GMO농산물 사용 여부>유통 및 보관 과정상의 신뢰

성>제조과정상의 위생 및 안정성>재료 원산지 등이 주요하게 나타났다.

Table 19. 현재 이용 된장의 불만족스러운점(단위:%)

(단위 : %)					
	대상 원정원 순장	C 해장동 태영초	순장 고추장 (브랜드로 인식)	기타 순용장류	순장 만족 비율
(응답자 수)	(63)	(104)	(94)	(3)	(1)
가격	15.9	13.5	28.7	-	-
브랜드 인지도/신뢰도	-	-	12.8	-	-
맛	11.1	10.6	21.3	-	-
재료 원산지 (국산/해외)	27.0	18.3	11.7	-	-
제조 과정상의 위생 및 안전성	22.2	24.0	14.9	-	100.0
GMO 농산물 사용 여부	39.7	31.7	37.2	66.7	100.0
안공 첨가물 혼합 여부	55.6	51.0	48.9	33.3	100.0
유동 및 보관과정의 신뢰성	31.7	23.1	22.3	-	-
전통 방식에 의한 제조방식	9.5	-	13.8	33.3	-
용량	9.5	-	11.7	33.3	-
패키지 및 포장형태	14.3	-	-	-	-

만족/불만족 요인과 구매 패턴에 대해 심도있는 고찰을 위해 FGI를 실시하였으며, 이에 대한 결과는 Table 20과 같다. 결과적으로 고추장과 비교하였을 때, 된장의 경우에는 브랜드 충성도가 훨씬 낮게 나타났다.

Table 20. 만족/불만족 요인과 구매 패턴 FGI 결과

	Group 1 (30대 주부)			Group 2 (40대 주부)		
	원장 고추장	1~2 브랜드 구매	다양하게 구매	원장 고추장	1~2 브랜드 구매	다양하게 구매
<b>장류 구매 패턴</b>	1~2 브랜드 구매	-	5명	1~2 브랜드 구매	-	2명
	다양하게 구매	-	1명	다양하게 구매	-	4명
<b>재래 된장 구매 패턴</b>	<p>"재래식 원장만 넣으면 맛도 짜고 찌개를 끓이고 나서 색도 너무 까맣게 되서"</p> <p>"재래식 원장은 특유의 톡톡한 맛이 있어요"</p> <p>"시판원장"만 넣으면 깊은 맛이 부족해서 섞어야 되요"</p> <p>"시판원장"만 넣으면 색은 밝고 끈질인데, 깊은 맛이 부족해서"</p>					

시판원장만 사용하면 색은 보기 좋고 맛을 쉽게 내나 깊은 맛이 부족하다고 인식하며, 전통 된장(재래식 된장)의 경우 맛은 깊으나, 너무 짜고 색이 검어서 불만을 나타냈다. 시판원장과 전통원장을 섞어서 사용하는 경우도 많았다.

요약하자면 시판원장 제품에 대한 주요 불만족 요인으로는 재료에 대한 불안함과 제조 및

유통과정 상에서의 신뢰도가 낮은 것으로 나타나 전통된장의 잠재적 경쟁우위 요소임을 확인할 수 있었다. 그러나 전통된장의 경우 색깔과 맛이 짜다는 불만족 요인을 갖추고 있어 이는 개선해야 할 점으로 판단되었다(Table 21). 따라서 본 과제가 추구하는 발효미생물 이용, 국내산 원재료, 첨가물 미사용 그리고 한식메주를 제조하여 생산하는 저염장류제품은 시장의 니즈를 충분히 반영한 것이라 판단된다.

<Table 21. 만족/불만족 요인 요약>

	만족 요인	불만족 요인
시판 된장	맛 브랜드 인지도 구매 용이성 가격 (색깔)	인공 첨가물 혼합 여부 GMO 농산물 사용 여부 유통 및 보관 과정상의 신뢰성 제조 과정상의 위생 및 안정성 재료 원산지
전통 된장	깊은 맛	색깔 맛 (짜다)

#### 다. 판매전략

소비자 니즈 분석을 통해 저염 장류제품에 대한 수요 존재와 증가가 있을 것으로 예상되므로 이를 제품명과 홍보에 이용하고자 한다. 또한, 장류 원산지로 순창의 지역 브랜드가치에 대해 소비자조사를 통해 알아봄으로서 브랜드 활용가능성이 어느 정도인지 가늠해 보고, 더불어 국내산 원재료와 한식메주제조방식, 첨가물의 미첨가 등으로 전통장류와 유사한 상품군을 형성할 것으로 판단되는 본 제품의 유통채널은 어떻게 구성하는 것이 판매에 효과적인 것인지에 대해서도 조사하였다.

보증브랜드로서 ‘순창’지역의 효과를 알아보하고자 설문 조사자를 대상으로 전통장류 원산지 최초상기도(TOM)를 알아보았다(Figure 33). ‘순창’의 장류 원산지로서의 인지도는 90.8%로 자산적 가치가 매우 높으며, 향후 개발 저염 장류제품에 ‘순창’이라는 지역명이 원산지 브랜드로서 제품의 보증효과를 가져다 줄 것으로 판단된다.





Figure 45. 전통장류 원산지 TOM

‘순창’의 장류 원산지로써의 선호도는 전반적으로 높아 3.77점을 나타냈다(Figure 46). 세분집단별로는 ‘전통방식 선호집단’과 ‘고관여 품질 및 편의성 집단’이 가장 높게 나타났으며, 연령대가 높아질수록 선호도가 높았다.

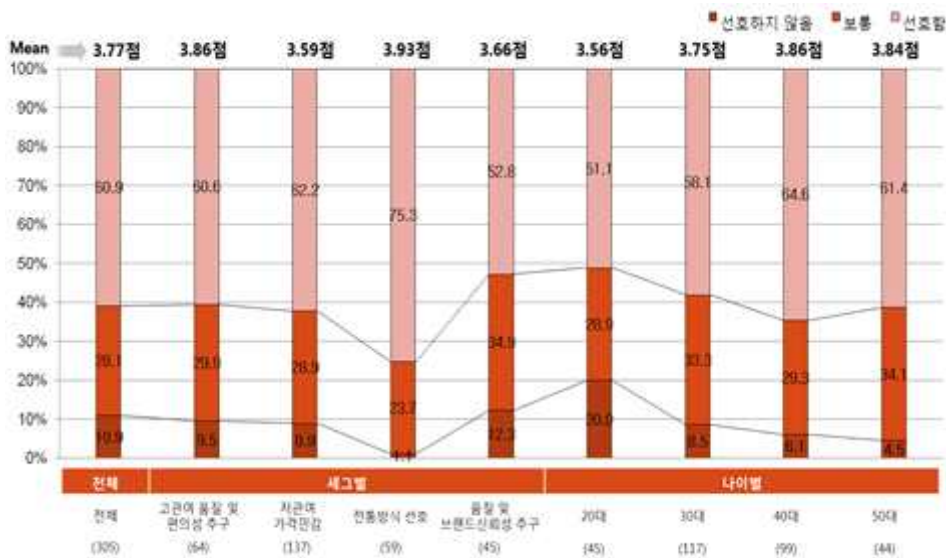


Figure 46. '순창'의 원산지로써 선호도

조사자 중 약 30.5%는 ‘순창’ 장류 브랜드를 구매해본 경험이 있는 것으로 나타났다(Figure 47). 세분시장 별로 살펴보면 ‘고관여 품질 및 편의성 추구집단(39.1%)’이 가장 높았음을 알 수 있었다. ‘전통방식 선호 집단’의 경우, 높은 구매 경험을 가질 것으로 예상하였으나 비교적 낮게 나타났다. 이는 ‘전통방식 선호집단’의 경우, ‘고관여 품질 및 편의성 추구 집단’ 보다 직접제조나 지인을 통한 조달방식의 비중이 높기 때문인 것으로 판단된다.

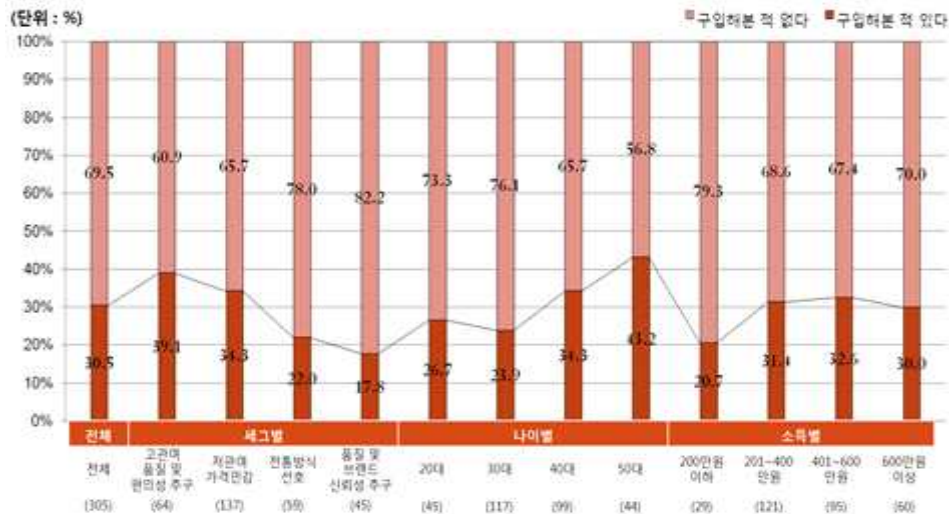


Figure 47. 순창장류 브랜드 구매여부

‘순창’ 장류 브랜드 구매경험이 있는 소비자들의 주요 구매 장소는 백화점(25.8%)>산지직판장(21.5%)>온라인몰(17.2%) 순으로 나타났으며 이는 시판 장류제품이 주로 소매점 비중이 높은 것과 차이를 보였다(Table 22).

Table 22. 순창장류 브랜드 구매장소(단위:%)

구분	전체
(Base)	(93)
백화점	25.8
산지직판장	21.5
온라인 몰	17.2
직거래 매장	11.8
친환경 전문매장	9.7
홈쇼핑	4.3
재래시장	3.2
기타	6.5

소비자 니즈 분석을 통해 저염전통장류 제품의 시장 가능성이 충분한 것을 확인하였으며, 브랜드로 ‘순창’의 보증효과는 소비자에게 큰 신뢰감을 줄 수 있는 것으로 조사되었다. 따라서 이를 활용하여 브랜드명과 판매 전략을 수립할 필요성이 있다.

또한, 개발제품의 주요 공략층은 30, 40대, 소득 중상 또는 중하(201~600만원), 전업주부의 비율이 높은 ‘고관여 품질 및 편의성 추구집단’으로 나타나 이에 대한 고려가 필요하다. 또한, 지역 중소장류제조업체와 기술공유 및 개발제품의 B2B 거래도 중요한 사항으로 판단된다.

소매 시 주요 유통채널은 앞서 결과에서 제시하였듯이 백화점과 산지직판장, 온라인 쇼핑몰을 주요 공략 대상으로 삼아야 할 것이다.

## 라. 저염 고추장 상품화 방안 마련

세계적으로 농 식품시장의 트렌드가 변화하고 있다. 데이터모니터의 '세계 식품시장 동향보고서'에 의하면 2007년 세계 식품시장 메가트렌드로 10대 포인트를 제시하고 있다.

### - 2007년 세계 식품시장 10대 메가 트렌드

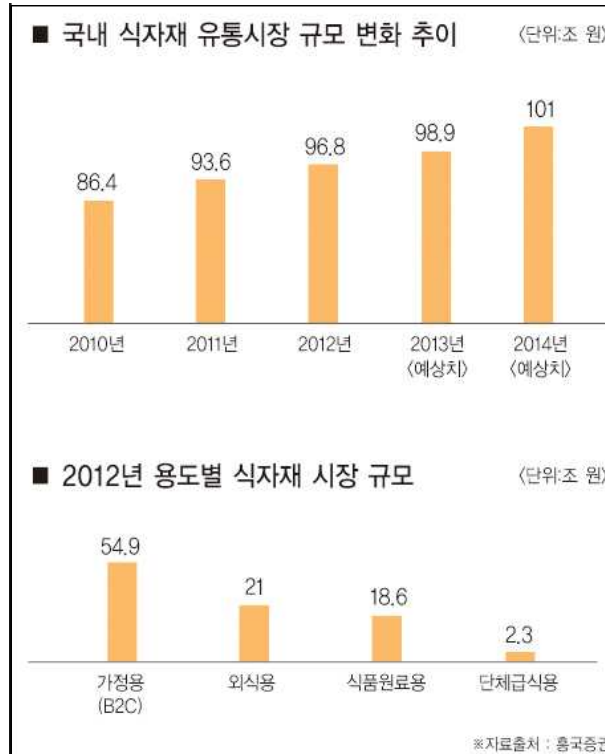
가치 트렌드	식품소비 패턴
① 편리성 추구	소비자들의 조리시간 절약, 간편한 식품 선호
② 건강 중시	식품선택의 기준이 건강, 자연식품, 유기식품 선호
③ 연령초월 현상	젊은 층의 식품구매 증대, 브랜드 인지도, 충성도 증대
④ 성초월 현상	남자들도 건강식품에 대한 관심이 증대
⑤ 생활패턴의 복잡화	단독가구 증가, 노령가구 증가, 소량 구매
⑥ 명품 대중화	사치품 민주화 현상, 프리미엄 브랜드식품 선호
⑦ 개성화	자신만의 취향과 구미에 맞는 브랜드 선호
⑧ 이색상품 선호	새로운 식품을 적극적으로 경험, 이국풍의 농산물 선호
⑨ 편안함 추구	대형소매점 선호
⑩ 공동체 중시	공동체 가치를 공유한 식품 선호, 지산지소 증대

인구구성의 변화 및 소비자의 가치체계 변화로 소비자의 소비패턴의 다변화·양극화가 확대되는 추세이다.

과거에는 적당한 가치를 가지면서 적당한 가격을 갖춘 표준화된 농산물이 주종을 이루었으나, 향후 가치상품과 무가치상품으로 구분되는 제품의 양극화가 이루어 질 것으로 예상된다. 가치가 적은 무가치상품에 대해서는 저렴한 가격을 지불하려는 경향이 점차 증가할 것으로 예상되는 반면 자신의 취향에 맞는 가치가 높은 상품에 대해서는 높은 가격을 기꺼이 지불할 소비자는 점차 증가할 것으로 판단된다.

보다 높은 가격을 얻는 차별화된 가치 있는 농 식품의 수요가 증가할 전망이어서 전통식 종류의 다양한 가치를 제고하는 상품화가 매우 중요하다.

반면 무가치상품도 수요가 증가할 전망인데 이에 대응하기 위해서는 표준화로 생산비, 물류비를 절감하여야 할 것이다.



식품소비의 양극화로 농식품 상품공간에서 소비변화를 보면, 특정 소비자를 위한 차별화된 상품과 표준화된 식자재 식품의 시장이 성장할 전망이다.

기능성 식품, 명품, 디자인이 우수한 차별화된 농산품 분야에서는 소비자의 만족도를 높이도록 다양한 형태의 상품화가 강화되어야 한다. 어떤 경우는 틈새시장이 될 수도 있고, 시장규모가 크게 발전할 수도 있다.

식자재 식품시장도 급성장하고 있다. 식자재 시장은 가격은 낮지만 업무를 간단하게 하면 규모화로 높은 소득을 얻을 수 있다. 이를 위해서는 표준화로 대량생산-대량거래 능력을 확보하여야 한다.

새로운 시장을 창출하고, 매력적인 시장을 확보하기 위해서는 이러한 식품소비 트렌드를 읽고, 그에 적합한 다양한 형태의 상품화, 제품개발을 추구하여야 하고, 적합한 공급능력을 갖추어야 한다.

상품화, 제품개발을 할 때 이런 식품소비의 트렌드를 잘 이해하고, 적어도 한 가지 트렌드, 바람직하다면 몇 가지 트렌드를 아우를 수 있는 제품을 개발하는 것이 성공하는 길일 것이다. 기존의 전통 고추장에 새롭게 안전성을 강화하거나, 품질의 균일화 등 새로운 가치를 부여하는 상품화에서부터 새로운 수요가 창출될 수 있게 된다.

주요 장류의 출하 액 기준으로 2000년 이후의 추이를 본 결과 생산량이 가장 많은 간장제품의 경우, 2005년 1,943억 원을 나타냄으로써 출하 액 기준으로는 주요 장류제품 중 가장 적으며, 평균 6.7%의 낮은 증가율을 나타내고 있다(Figure 22).

반대로 고추장은 2005년 출하 액 기준으로 2,531억 원으로서 가장 높은 수치를 보여주고 있다.

된장제품의 경우 출하액은 2004년까지 가장 낮았으나, 2005년 2,069억 원으로 간장제품을 추월하였으며, 고추장에 이어 2위를 차지하고 있다. 출하액 증가율의 경우 연평균 14.1%로서 가장 높은 증가율을 나타내고 있으며, 급속하게 시장이 커지고 있음을 알 수 있다.

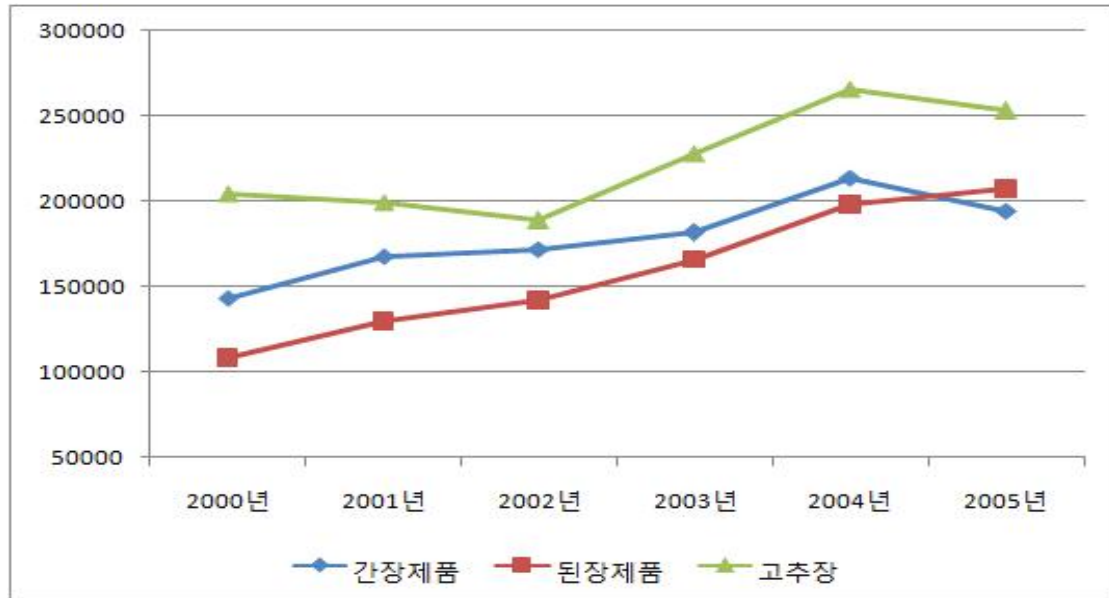


Figure 48. 장류 출하액 현황(2005년도 식품 및 식품첨가물 생산실적, 식약청, 2006)

2005년도 정부지원 농산물가공업체의 운영실태 조사결과를 통해 전통장류 업체의 경영현황을 간접적으로 파악할 수 있다. 조사결과에서 조사대상 전통장류업체는 73개이었다. 이는 2000년 92개 업체에 비해 19개 업체가 줄어든 것으로 전통장류의 매출액이 증가함에 비추어 경쟁력이 약한 영세업체들이 퇴출되었다고 볼 수 있다.

전통장류업체들은 경영상의 최대 애로사항으로 판매부진(28.5%)과 자금부족(25.7%)을 꼽고 있다(Figure 49).

전체 장류시장은 '99년 4,525억 원에서 '09년 7,800억 원으로 크게 성장하였다(Table 6). 그러나 전통장류에 대한 시장규모나 수급동향에 대해서는 공식적인 통계자료가 발표되고 있지 않아 정확히 알 수 없기 때문에 기존 연구자들의 연구결과와 농림부, 농수산물유통공사의 정부지원 농산물 가공업체의 자료를 중심으로 유추할 수밖에 없다.

강창용 외(2000)는 1999년의 경우 정부로부터 자금을 지원받아 전통장류를 생산하고 있는 업체에서 생산하는 생산량을 취합하여 전통장류의 시장을 전체 장류시장의 6.6%로 추정한 바가 있다.

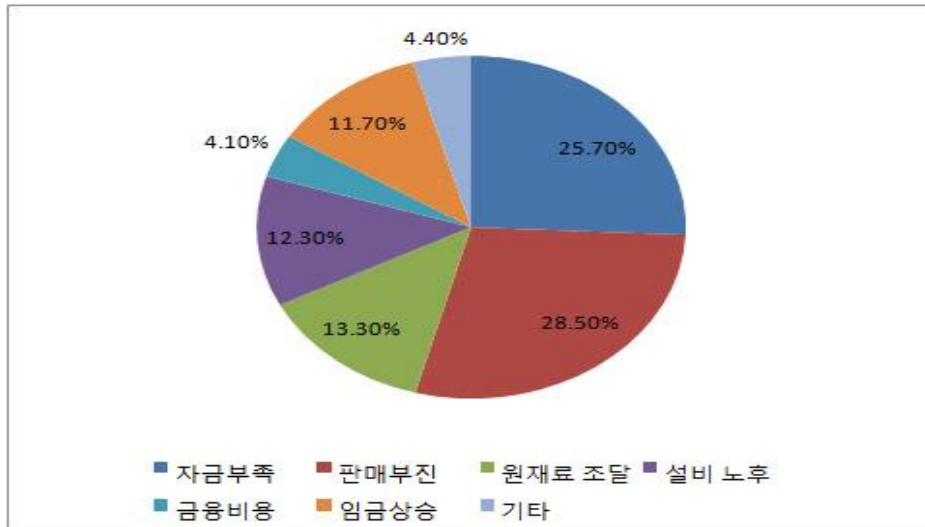


Figure 49. 전통장류업체 경영 애로사항(농림부, 농수산물유통공사,(2008))

당시 정부에서 자금을 지원받아 고추장, 된장, 간장 등 전통장류를 생산하고 있는 업체는 모두 92개 업체로 총 생산액은 약 369억 원이었다. 이 중 수입 콩을 원료로 사용하는 업체와 장류 이외의 품목도 함께 생산하는 업체의 생산액을 제외하고 전통장류의 생산액을 약 300억 원 가량으로 추정하였다.

또한 한국식품연구원 발효식품 팀은 전통장류의 시장규모는 2000년 기준 441억 원으로 전체 장류의 9%를 차지하고 있으며, 매년 15%의 높은 성장세를 보이고 있다고 주장하고 있다. 또한 대부분의 전통장류업체가 영세한 규모로 업체당 평균 매출액이 4억8천만 원, 평균 생산량이 200톤에 불과하며 평균가동률도 47%로 매우 저조한 실정이라고 하였다.

최지현 외(2002) 역시 전통장류의 생산량을 전체 장류의 약 7%에 달하는 것으로 추정하고, 장류시장의 틈새시장을 형성하고 있다고 해석하였다.

농림부, 농수산물유통공사의 「'05 농산물가공업체 운영실태 조사결과」에 의하면, 2005년의 전통장류 매출액은 726억 원으로 2004년 619억 원에 비해 17.4% 증가하고 있다. 따라서 2005년 전체 장류시장 6,544억 원에 대하여 약 11.1%의 비중을 차지하고 있다.

생산량을 기준으로 전통장류 업체의 2005년 생산량은 22,113톤으로 전체 생산량의 4.1%를 차지하고 있다. 생산량 비중에 비해 매출액 비중이 높은 것은 전통장류의 높은 가격에 기인한다고 볼 수 있다.

Table 23. 장류 종류별 시장 현황

(단위: 억 원)

품목	2007	2008	2009
간장	1,672	1,942	2,085
된장	1,170	1,300	1,419
고추장	2,761	2,786	2,900
쌈장	952	1,082	1,396
계	6,555	7,110	7,800

<농 산업 정책지원과 세계화 전략 심포지엄, 2010>

장류제조업체의 분포를 살펴보면, 경기도가 21.4%(237개)로 가장 많은 비중을 차지하고 있으며, 그 다음으로 전북 9.4%(192개), 경남 9.4%(183개) 순으로 나타나고 있다. 이 중 순창군에 72개의 업체가 입지하고 있는 것으로 나타났다(Table 23).

시군구 단위로 살펴보면 235개 시군구 중 233개 지역에 최소한 1개 이상의 장류제조업체가 입지하고 있으며, 순창군에는 72개의 장류업체가 입지하고 있어 시군구 단위에서는 가장 많은 장류업체가 입지하고 있다.

두 번째로 많은 장류제조업체가 입지하고 있는 전남 영광군에는 46개 업체가 입지하고 있어 순창군과 수적 차이가 비교적 크게 나타나고 있다. 경기도 파주시는 세 번째로 많은 장류제조업체(39개)가 입지하고 있으며, 경남 김해시, 충북 음성군이 각각 4위, 5위로 나타나고 있다.

Table 24. 2006년 시도별 장류제조업체 분포 현황

순위	시도	시군	합 계
1	전북	순창군	72
2	전남	영광군	46
3	경기	파주시	39
4	경남	김해시	35
5	충북	음성군	34
6	경기	포천군	30
7	인천	서구	30
8	경기	광주시	29
9	경기	화성시	29
10	서울	송파구	28

순창군 장류제조업체의 특징은 종업원 5인 이하의 영세한 기업이 많다는 것이다. 총 72개의 장류제조업체 중 61개 업체가 종업원 5인 이하의 영세업체이며, 이들 61개 업체는 전통적 방식으로 장류를 제조하는 업체이다(Figure 50).

순창군 장류산업은 통계자료상 음식료품으로 혹은 제조업부문으로 포함되어 있어 정확한 자료를 얻기 힘들다. 구체적으로 나와 있는 자료는 세무서에 신고 되는 정도다. 그러나 이 자료를 이용하는 것은 다소 문제점이 발생한다. 세무자료를 이용할 경우 현금 판매의 경우가 제외될 수 있기 때문이다.

2 006년 순창의 장류산업 총생산량은 약 10만2천 톤대로 2003년 이후 연평균 8% 성장하고 있다. 성장의 주축은 고추장으로서 연평균 11.1%로 생산량이 증가하고 있으며, 혼합장도 성장세가 높다. 된장과 청국장 각각 연평균 1.7%, 2.1%로 생산이 늘어남으로써 고추장이나 혼합장에 비해 성장세가 미미하다.

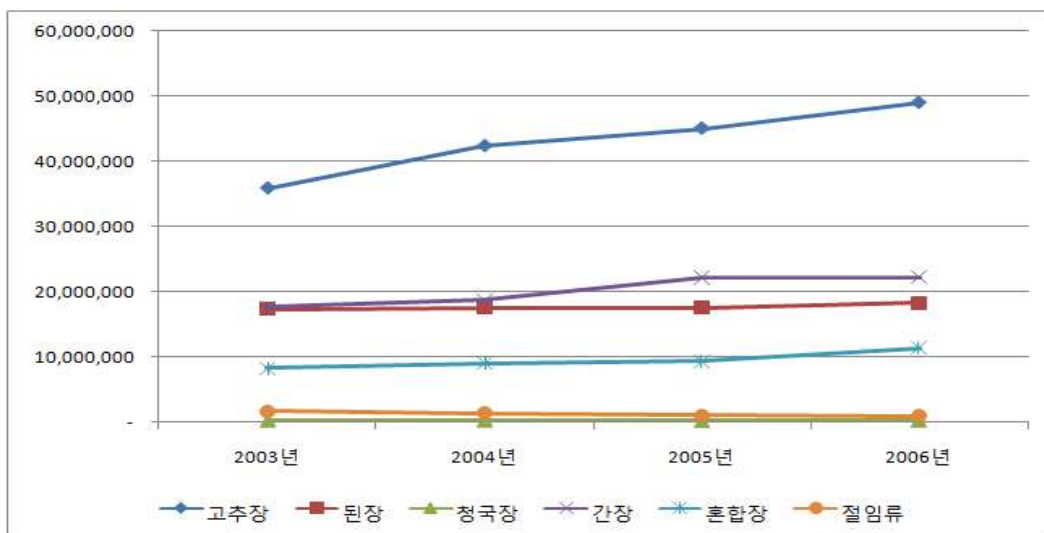


Figure 50. 순창군 장류산업 생산량 추이(2003년~2006년) (단위:kg)

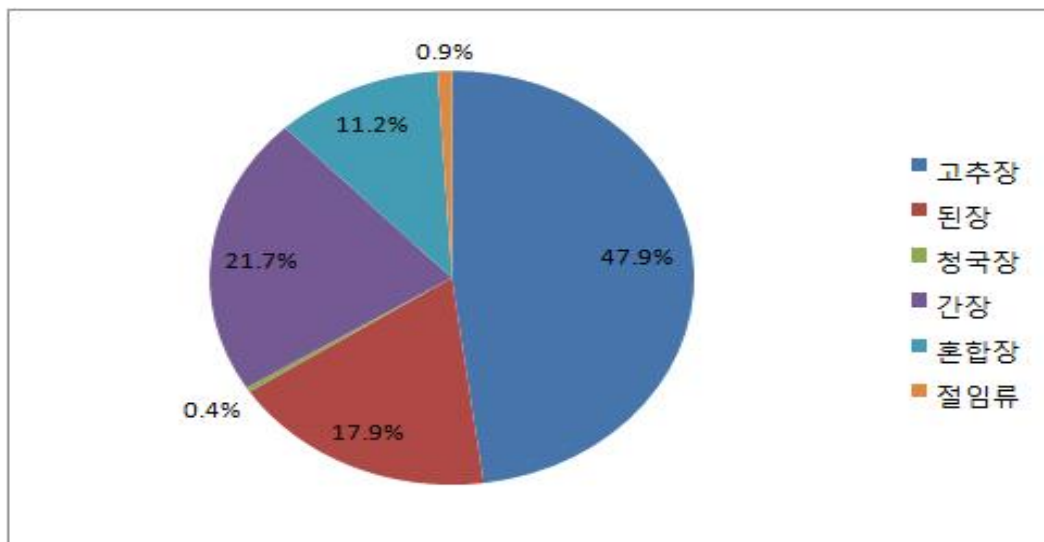


Figure 51. 2006년 순창군의 장류산업 생산량 구조

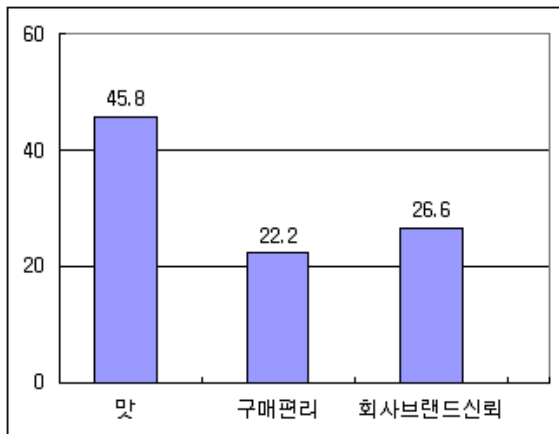


순창군의 장류산업 구조를 생산량으로 보면(Figure 51), 고추장이 47.9%를 차지함으로써 고추장산업이 가장 큰 역할을 함을 보여주고 있다. 다음으로 간장 21.7%, 된장 17.9%의 순이다. 상대적으로 최근 소비가 급증하는 청국장 생산량이 0.4%로서 미미한 비율을 차지하고 있다.

전통 제조 방식의 과학화로 품질의 안정성 및 맛을 개선한 제품으로 집에서 담은 전통고추장의 깊고 구수한 맛을 유지하며 짠 맛, 퉁퉁한 냄새, 일정하지 않은 맛 등 전통고추장의 단점을 개선한 된장을 개발해야한다.

소비자가 주로 구입하는 된장의 종류는 전체 응답자의 61.1%가 식품 제조 회사 된장을 구매하고, 전체의 13.3%만이 전통된장을 구매하는 것으로 나타났다. 식품제조회사의 장류를 구매하는 이유는 맛(45.8%), 브랜드신뢰(26.6%), 구매편리성(22.2%)의 순서로 가장 큰 이유가 되고 있었다. 전통장류를 구매하는 이유는 국산원료를 사용한다고 생각해서(39.7%), 맛이 좋아서(39.7%), 식품 첨가물이 없을 것 같아서(14.9)로 나타났다. (Table 25~26)

Table 25. 식품제조회사의 장류를 구매하는 이유 Table 26. 전통장류를 구매하는 이유



평가내용	순창 전통	일반
색상	3.36	3.31
향	3.47	3.11
콩의 형태	3.51	3.08
구수한 맛	3.66	2.95
짠맛	3.36	3.04
종합평가	3.63	3.15

순창전통장류를 구입해 본 경험이 한번이라도 있는 응답자는 전체의 31.1%였고, 없는 소비자는 68.9%로 나타났다. 구입해 본 순창 전통장류의 종류가 무엇인지를 조사해본 결과(Table 26) 고추장 54.1%, 된장 26.4% 간장 6.4%, 장아찌 13.2%로 나타났다. 순창 전통 장류를 구매한 이유는 대부분이 맛이 좋아서라고 대답하였고 나머지 사람들은 국산원료를 사용한다라는 이유로 구매한다는 사람들이 있었다.

순창 전통 장류와 일반된장을 비교하여 맛을 평가해본 결과 모든 측면에서 순창 전통된장이 일반 식품회사제품보다 우월한 평가를 받고 있었다. 특히 “구수한맛”이 월등한 평가를 받았으며 또한 “콩의 형태”가 매우 선호 되었다.

순창 전통된장은 색상(3.36%), 향(3.47%), 콩의 형태(3.51%), 구수한맛(3.66%) 일반 된장은 색상(3.31%), 향(3.22%), 콩의 형태(3.08%), 구수한맛(2.95%)로 기호도에서 순창 전통 된장이 일반 된장보다는 우위를 보이고 있었다.

Table 27. 순창 전통장류 구매한 장류 종류와 순창전통과 일반된장의 맛 평가

평가내용	순창 전통	일반
색상	3.36	3.31
향	3.47	3.11
콩의 형태	3.51	3.08
구수한 맛	3.66	2.95
짠맛	3.36	3.04
종합평가	3.63	3.15

하지만 순창 전통된장은 짠맛(3.36%) 일반된장은 짠맛(3.04%)로 순창 전통된장이 일반된장보다 높은 짠맛을 가지고 있었다. 종합평가에서 순창 전통된장은 3.63%로 일반 된장은 3.15%로 순창 전통된장이 평가가 높지만 소비자들은 짠맛이 나는 않은 일반 된장을 더 선호하고 있었다.

소비자조사를 통해 볼 때, 현재 일반 된장에 대해 불만족하고 전통된장에 만족하는 층이나, 전통된장에 만족하지만 짠 맛, 일정하지 않은 맛, 킁킁한 냄새 등은 비 선호하는 소비자들을 위해서 전통 된장의 맛의 장점을 계승하고 단점을 보완한 된장을 개발해야하며 또한 국산 원재료를 사용하여 전통 제조 방식을 과학화해야 한다.

전통 제조 방식의 과학화로 품질의 안정성 및 맛을 개선한 제품으로 집에서 담은 전통된장의 깊고 구수한 맛을 유지하며 짠 맛, 킁킁한 냄새, 일정하지 않은 맛 등 전통된장의 단점을 개선한 된장을 개발해야한다.

### 3. 시제품 디자인 및 마켓테스트

시장동향 및 소비자 니즈 분석과 판매방안을 고려해 봤을 때, 저염장류제품에 대한 소비자의 긍정적 인식이 높고 ‘순창’이라는 지역브랜드 또한 장류제품의 신뢰도를 높여줄 것으로 판단되어 제품명에 이를 활용하기로 하였다. 따라서 본 사 브랜드 카테고리 체계에 포함하고 과제 부명을 도입하여 제품명은 ‘순창메주 삼삼한 한식된장’과 ‘순창메주 삼삼한 한식간장’으로 결정하였다.

이를 활용하여 8% 처리군 중 주간기관에서 실시한 관능평가에서 가장 우수한 특성을 보인 실험구 1 된장과 실험구 2 간장의 시제품을 제작하였다. 라벨디자인은 Figure 52에, 제품실사는 Figure 53에 제시하였다.



<Figure 52. 저염 된장/간장 시제품 라벨 디자인>



Figure 53. 저염 된장/간장 시제품 실사

앞서 저염 장류제품 유통채널 분석을 통해 조사한 결과에서 나타났듯이 개발 저염 장류제품의 판매채널은 B2B를 제외한 소매시장에서 백화점, 산지직판장과 온라인 쇼핑몰이 주요 대상이 될 것으로 예상된다.

이에 따라, 일차적으로 본 사 온라인 쇼핑몰을 통해 개발제품의 소비자노출과 홍보를 실시하고자 하였다(Figure 54). 향후 쇼핑몰 활용을 통해 시제품의 소비자 선호도 조사 및 개선방향에 대한 설문조사를 진행하고자 한다.



Figure 54. 저염 된장/간장 시제품 실사

또한, 전국 유일의 메주 HACCP 인증 시설과 전통한식장류의 자동화를 추구하는 본 사 시설에 대한 인지도를 활용하여 견학, 방문객 대상으로 내부에 설치된 직판장을 통한 홍보 판매를 실시하고자 한다.



Figure 55. 본사 메주공장 내부 직판장 사진

백화점 등 프리미엄 시장도 개발제품의 주요 수요처가 될 것으로 예상된다. 기술목표에는 미치지 못하나 이미 당해연도 사업기간 내 기존제품보다 염도를 약 10% 감소한 제품이 백화점 유통업체를 통해 12,000병(420 mL/병) 정도 판매되었으며, 높은 소비자 호응으로 인하여 지속적인 거래관계가 유지될 것으로 보인다.



저염에 관한 소비자 트렌드는 확고한 것으로 보여 진다. 관련 상품은 아니지만 본 사는 홈엔 쇼핑과 염을 첨가하지 않은 무염 청국장 런칭을 시도하였고 중소기업진흥협회로부터 사업 가능성을 인정받아 송출료 등 일부를 지원받기로 하였다.

발효미생물을 이용한 저염 장류제품 생산의 기술적 문제가 완전히 해결된 것은 아니다. 하지만 본 과제에서 나타났듯이 일부 문제를 제외하고 충분한 가능성이 있는 것으로 판단되며, 더욱이 소비자의 강한 니즈로 인해 향후 시장은 지속적으로 저염을 지향할 것으로 예상된다.

저염을 지향하더라도 소비자는 인위적인 첨가제나 원재료의 변화를 요구하지는 않을 것이며, 더욱더 품질과 전통에 대한 가치를 추구할 것이다. 따라서 이를 제어할 수 있는 효과적인 발효미생물의 발굴과 이용에 대한 가치는 커질 수밖에 없다.

정부까지 나서 나트륨 줄이기 운동을 하는 것을 보면 우리의 나트륨 섭취량이 꽤 심각한 수준인 듯하다. 평생의 입맛이 결정되는 시기인 아이들은 특히 주의가 필요하다. 어린아이들은 어른보다 신장이 약하기 때문에 너무 짠 음식에 노출이 되면 건강을 악화시킬 수 있다.

나트륨을 많이 섭취하면 고혈압, 대사증후군, 당뇨병과 같은 성인병에 노출되기 쉽다. 성인병의 연령대가 점점 낮아지고 발병 횟수가 증가하는 것은 나트륨 섭취량과 전혀 무관하지는 않을 것이다.

우리나라 사람들의 평균 나트륨 섭취량은 2008년 45,553 mg에서 2011년 4,831 mg까지 꾸준히 상승하고 있다. 짠 외식과 인스턴트 음식의 증가 등으로 인해 나트륨 섭취는 점점 증가하고 있는 중이다. 특히 아이들의 급식까지도 염도가 높아지고 있어 학교 급식을 중심으로 나트륨 중이기가 시행되고 있다. 이처럼 본 과제를 통해서도 저염 고추장을 출시함으로써 소비자들에게 긍정적인 인식을 주고자 한다.

이를 활용하여 4% 처리구 중에서 주관기관에서 실시한 관능평가를 통해 가장 우수한 특성을 보인 4% 대조구+07 고추장을 시제품을 제작하였다. 라벨디자인과 제품 실사는 Figure 59에 제시하였다.

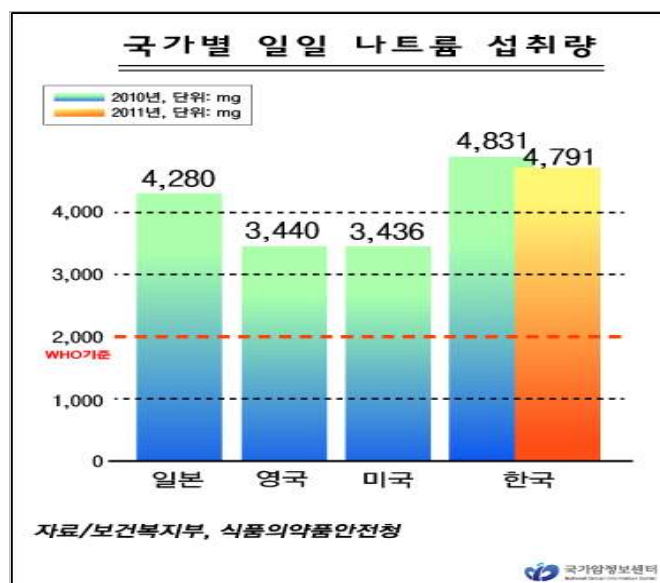


Figure 58. 국가별 일일 나트륨 섭취량

이를 활용하여 4% 저염구 중에서 주관기관에서 실시한 관능평가를 통해 가장 우수한 특성을 보인 4% 대조구+07 고추장을 시제품을 제작하였다. 라벨디자인은 Figure 27에, 제품 실사는 Figure 28에 제시하였다.



Figure 59. 저염 고추장 시제품 실사

수분은 물엿을 첨가하였을 때 약간 떨어졌고 염도역시 6%에서 3.9%로 4% 저염 고추장이 완성되었다. pH와 적정산도, AN값은 변화가 없었고 색도 값은 29에서 25로 약간 감소하였다. 기존 제품들과 비교하였을 때 염도만 낮추어서 저염으로 공장에서 제조하더라도 이상발효가 일어나거나 분석데이터 값이 크게 달라지는 것을 볼 수 없어 저염 고추장 제조 가능성을 확인하였다.

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구개발의 목표는 저염 발효 적용 시 곰팡이나 고초균 등 유익한 균을 저해하지 않는 저염 장류에 적합한 균주 선정 및 조건을 확립하는데 목적을 둔다. 이를 통하여 메주의 품질 변화 및 특성을 확인하고 저염 된장, 저염 간장, 저염 고추장을 제조하여 숙성기간에 따른 품질분석과 그에 따른 시제품을 제작하였다.

저염 장류 적합한 균주는 주관기관인 순창군장류사업소에서 분리, 선별한 기본적으로 된장, 간장, 고추장 제조 시 효모 생성을 억제시켜주는 것으로 밝혀진 곰팡이 균주와 세균 균주를 선별하여 사용하였다.

선정된 균주를 동시에 접종하여 사각 메주로 성형한 후 발효시켜 수분, pH, Protease activity, amino-type nitrogen 함량 등의 품질분석 실험을 통해 특성을 확인하였다.

기존에 사용하고 있는 종균만을 사용하여 제조한 된장, 간장보다는 기존균주와 선정된 균주를 혼합한 균주(충무발효 종균 + *Bacillus licheniformis* SCC125037) + (*Aspergillus oryzae* SKM07 + *Bacillus licheniformis* SCK B11)를 사용하여 제조한 된장, 간장이 상대적으로 저염 장류에 적용하기 좋은 균주로 판단되었다.

고추장 역시 주관기관에서 제공받은 균주를 이용하여 분석해본 결과 기존에 사용하고 있는 종균보다는 기존균주와 제공받은 균주를 혼합한 균주(*Bacillus licheniformis* SCC125037 + *Bacillus subtilis* SCKB1307)를 사용하여 제조한 저염 고추장이 기본데이터와 큰 변화가 없는 제품으로 선정되었다.

한국에서 장류는 없어서는 안 될 중요한 식품이다. 전통장류는 여러 가지 미생물의 작용을 통하여 향미가 우수하고 맛은 깊으나 생산되어지는 과정에서 외부환경에 유출되어 여러 가지 유해한 미생물이 성장하여 위생적인 문제가 야기되어질 수 있으며, 이로 인하여 체계적인 관리가 필요하다고 생각된다.

하지만 개발된 저염 장류를 제조하면서 발생하는 문제점이 전혀 없지는 않을 것이며, 저염 장류를 생산하는 간장과 된장, 고추장의 경우 추가적인 연구를 통하여 전통장류의 풍미와 품질을 유지하면서 위생적 생산을 할 수 있는 조건을 갖추어 나아가야 할 것이다. 슬로우 푸드와 소비자들의 건강의식의 강화에 따른 전통장류 위생성과 안전성을 제시하여 전통장류의 고급화를 이룰 수 있는 연구가 더욱 필요하다고 판단된다.



## 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절 연구개발 성과

#### (1) 시제품 생산 및 매출액 달성

- 사각메주, 저염된장, 저염간장, 저염고추장 시제품 생산
- 무염청국장 흡소핑 런칭으로 1억원 단기 매출 성과

#### (2) 특허 2건 출원

- 혼합균주 발효 및 저온숙성을 이용한 메주의 제조방법. 출원인 : 농업회사법인 순창장류 주식회사, 발명인 : 김종필, 오병현, 송예지. 특허출원번호 : 10-2013-0043630 (2013.04.19).
- 혼합균주발효를 이용한 메주의 제조방법. 출원인 : 농업회사법인 순창장류 주식회사, 발명인 : 김종필, 오병현, 송예지. 특허출원번호 : 10-2013-0043627(2013.04.19).

#### (3) 학술대회 등 발효

- 조유빈, 김형희, 송예지, 문형윤, 정세희, 강금성, 이지윤, 김해미, 조승화, 정은정. 고부가가치 저염 간장의 품질특성의 변화. 2014 한국식품영양과학회 국제학술대회 Poster (2014.10.28)

#### (4) 전시회 성과

- 행사명칭 : 구곡순담 100살 잔치. 주관기관 : 순창군
- 행사명칭 : 2012전주국제발효식품엑스포. 주관기관 : 전라북도, 전주시
- 행사명칭 : 2012광주국제식품전. 주관기관 : 광주광역시
- 행사명칭 : 2013 울산옹기축제. 주관기관 : 순창군장류사업소
- 행사명칭 : 부산국제식품대전. 주관기관 : 순창군장류사업소

#### (5) 타 연구에 활용 및 2단계 연구에 활용

- 연구사업명 : 고부가 식품산업 전문인력 양성사업 (캡스톤사업). 연구제목 : 고부가가치 저염 장류제품 개발

### 2절 성과활용 계획

적용 균주에 따른 저염 장류 제조 방법을 적용하여 전통의 풍미를 유지하면서도 체계적이고 대량 생산이 가능한 제조공정 확립을 통해 전통 저염 장류 유통시장의 확대가 가능할 것으로 판단되며, 저염 장류의 발효에 관여하는 우수균주를 확보하여 전통식품의 염도감소 및 안전성을 확보가 가능하다.

기존 균주와 선정된 균주의 혼합 발효를 통하여 고품질의 메주의 생산과 고추장이 가능하며, 표준화된 균주의 사용으로 고품질의 균일한 메주 생산과 고추장 생산으로 전통장류 제조 시 품질

의 균일화 또한 가능하다고 판단된다.

위생적이고 안전한 메주와 고추장의 제조로 전통장류의 안전성과 위생적 측면에서 소비자의 신뢰도를 높이며, 저염 장류를 통하여 전통에 가까운 맛과 방식을 추구하여 세계적 기준에 맞는 전통장류의 생산에 기여할 수 있다.

## 제6장 참고문헌

1. 석영란, 김영활 (1994), *Bacillus licheniformis* CN-115 균주를 이용한 청국장 제조 과정에 있어서 단백질 및 아미노산의 변화, *한국농화학회지*, 37(2), 65-71
2. 김영구, 차진 (1994), 공장산 고오지 고추장의 이화학적 특성변화 및 품질지표 개발, *한국식품과학회지*, 26(4), 453-458
3. 이기영, 김형석 (1997), 고추장 저장 중 이화학 및 관능적 특성에 의한 유통기간 예측에 대한 연구, *한국식품영양과학회지*, 26(4), 588-594
4. 서병철, 오재명 (2002), 저염식품의 개발 현황과 방향, *대한지역사회영양학회지*, 7(3), 401-404
5. 유진영, 김현규(1998), 순창지역 메주 발효 중 미생물과 효소역가의 변화, *한국식품영양과학회지*, 27(3), 448-454
6. 유진영, 김현규(1998), 전국적으로 수집한 전통식 메주의 특성조사, *한국식품영양과학회지*, 27(2), 529-267
7. 김종욱, 두홍수, 권태호, 김용석, 신동화(2011), *Aspergillus*속과 *Bacillus subtilis*를 이용한 된장메주 발효 중 품질특성, *한국식품저장유통학회지*, 18(3), 397-406
8. 박건영, 황경미, 정근옥, 이규복(2002), 된장 제조방법의 표준화 연구, *한국식품영양과학회지*, 31(2), 345-350
9. 이종구, 권광일, 정명근, 권오준, 최지영, 임무혁(2009), 한국 재래식 간장 제조를 위한 메주의 크기와 제조 방법에 따른 품질특성, *생물화학회지*, 52(4), 205-211
10. 최광수, 최종동, 정현채, 권광일, 임무혁, 김영호, 김우성(2000), 메주의 담금비율이 간장의 품질에 미치는 영향, *한국식품과학회지*, 32(1), 174-180
11. 장미, 김인철, 장해춘(2010), 천일염이 된장의 품질특성에 미치는 영향, *한국식품영양과학회지*, 39(1), 11-124
12. 목철균, 송기태, 이주연, 박영서, 임상빈(2005), 저염 된장 숙성 중 미생물과 효소활성의 변화업식품공학회지, 9(2), 112-117

13. 이순원, 신순영, 유태종(1985), 저염된장 제조 시 에탄올 첨가효과, 한국식품과학회지, 17(5), 336-339
14. 이주연, 목철균(2010), 저염 된장 발효 중 이화학적 특성 변화, 산업식품공학회지, 14(2), 153-158
15. 이기영, 김형석(1997), 고추장 저장 중 이화학 및 관능적 특서에 의한 유통기간 예측에 대한 연구, 한국식품영양과학회지, 26(4), 588-594
16. 신동빈, 박우문(1994), 저장온도에 따른 고추장의 품질변화, 한국식품과학회지, 26(3), 300-304
17. 안영순, 홍영표(2005), 곡류분말 처리가 고추장의 물성학적 특성에 미치는 영향, 한국식품저장유통학회, 12(2), 151-155

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업(미생물을 활용한 고부가가치 저염 장류제품 개발)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업(미생물을 활용한 고부가가치 저염 장류제품 개발)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.