

발간등록번호

11-1543000-000825-01

벼짚 미생물 제어기술을 활용한
위생적 전통장류제품 개발

(Development of Traditional Jangryu Products Using Rice Straw
Based Natural Microflora)

농업회사법인순창장류주식회사

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “벗짚미생물 제어기술을 활용한 위생적 전통장류제품개발” 과제(세부과제 “벗짚 유래 Starter culture를 이용한 청국장, 된장 및 간장 생산공정확립 및 시제품 생산” 협동과제 “벗짚 유래 *B. cereus* free starter culture의 개발 및 scale up” “위해미생물 및 제품품질특성분석과 개발된 *B. cereus* free starter의 장기보존”)의 보고서로 제출합니다.

2015 년 1 월 17 일

주관연구기관명 : 농업회사법인순창장류(주)

주관연구책임자 : 김 중 필

세부연구책임자 : 김 중 필(세부1)

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 김 광 표(협동1)

협동연구기관명 : (재)발효미생물산업진흥원

협동연구책임자 : 정 도 연(협동2)

요 약 문

I. 제 목

벧짚미생물 제어기술을 활용한 위생적 전통장류제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

현재 전통장류의 경우 환경이 아열대 기후로 변화되면서 다양한 위험성(Aflatoxin, *Bacillus cereus*, Biogenic amine, 식중독 미생물 등)에 노출되어 있으며, 자체적 종균이 없이 발효하는 경우 위험성이 높아지며, 이러한 위험에 처하지 않으려 외부에서 종균을 구입하여 사용하고 있다.

*B. cereus*는 설사 또는 구토증상을 야기하는 병원성 세균으로, 식품 유래 감염 원인균 중 1~20%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 유럽에서는 다양한 식품에서 *B. cereus*를 10^{4-5} CFU/g 으로 제한하고 있고, 국내 식품위생법 식품의 기준 및 규격 전문의 장류 미생물 기준규격의 경우 장류식품에서 유해미생물인 *B. cereus*를 10^4 CFU/g 이하로 제한하고 있다. 그~에도 불구하고 국내에서 유통되는 전통장류 제품에서 *B. cereus* 균주가 일부 제품에서 10^5 CFU/g 정도 또는 그 이상의 경우도 발견되고 있으며, 한국인의 식탁의 필수로 차지하고 있는 전통 장류를 위생적으로 접근하기 위해서 뿐만이 아니라 국제화 시대에 우리나라 전통 발효식품을 수출하기 위해서는 미생물관리가 필수적이다. *B. cereus*는 자연계에 매우 널리 분포되어 있고, 또한 다양한 항균제에 저항성을 보이는 포자를 형성하므로 식품에서의 제어에 어려움이 있다.

전통장류에서 미생물과 함께 된장의 안전성과 관련해 주목을 받는 물질이 Biogenic amine이다. Biogenic amine은 구조상 지방족, 방향족, 헤테로고리구조 등을 가진 형태로 되어 있고, 인체 및 동물 체내에서 중추신경의 신경 전달물질 또는 직·간접적 혈관계 조절에 관여하는 필수 성분의 하나이며, 다양한 종류의 식품에서 과량섭취 시 식중독 증상을 유발시키고 일부 Biogenic amine은 N-nitrosamine과 같은 강력한 발암물질로 전환될 수 있는 잠재성을 갖고 있어 식품의 유해 물질로 주목해야 할 물질이다. 특히 Biogenic amine은 단백질을 함유한 식품이 부패하거나 발효식품의 발효, 숙성 과정 중 생성되는 물질로 단백질 함량이 높은 콩을 주원료로 하여 발효시키는 된장의 경우, Biogenic amine의 위험에 쉽게 노출될 수 있어 지속적인 모니터링 검사 및 관리가 필요하다.

Bacteriophage(phage)는 특정 세균만을 감염·사멸시키는 지구상에서 가장 많이 존재하는 self-replicating unit(10^{31} phage)으로 건강한 성인은 하루에 10^7 - 10^9 정도의 phage를 섭취하는 것으로 추정되고, 또한 10^{13-14} 정도의 미생물을 gut microflora로써 가지고 있음에 비추어 phage는 한 성인에서 10^{13} 에서 10^{15} 까지 존재할 것으로 추정된다. Bacteriophage는 항생제에 비해 높은 특이성을 가지고 특정 숙주 세균에만 영향을 끼치고 숙주이외의 미생물에는 영향을 끼치지

않으며, 자연계에 무한히 존재하여 새로운 product를 찾는 것이 용이하고, 교차내성이 적으며, 다른 어떤 antimicrobial agent도 가지지 못한 증식성을 보유하고 있다. Bacteriophage 연구는 항생제의 발견이후 현재까지, 가장 간단한 구조를 가지는 self-replicating unit이라는 점 때문에, 기초과학의 연구에 필수 요소였고 그 결과로 gene의 발견, gene regulation의 연구, central dogma의 확립 등의 연구 성과를 만들어 낸다. 최근 지구상에 존재하는 bacteria보다 10배수 정도가 더 많이 존재하는 것으로 추정되는 bacteriophage는 기초과학의 중요한 소재로써 뿐만이 아니라 다양한 유전자원의 확보, 그리고 유해균(병원균과 부패균)의 조절(detection, diagnostics, typing, control)등 다양한 활용 방안을 모색하고 있다.

국내 전통발효식품들은 단일 균주 또는 몇 가지 균주를 starter로 사용하는 대용량 생산 제품과는 구별되는 앞으로 계승 발전시켜야 할 독특한 특성을 보유하고 있고, 이러한 특성은 주로 발효에 이용되는 미생물에서 기인한다. 박테리오파지는 특정 세균만을 숙주로 살아가는 obligate parasite로 숙주가 아닌 다른 유용균주에는 영향을 끼치지 않는 높은 수준의 숙주 특이성을 가지고 식품에서 유해균을 매우 효과적으로 제어할 수 있음이 보고되고 있다. 이에 미국 FDA는 *Listeria monocytogenes*를 제어하는 박테리오파지를 “GRAS”로써 식품에서 이용할 수 있도록 승인하였다.

한편으로 장류식품을 포함한 전통발효식품은 발효 및 숙성 과정에서 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus licheniformis*를 포함하는 유용세균의 지속적인 활성이 요구된다. 높은 숙주 특이성을 가지고 유해균의 효과적인 제어가 가능한 박테리오파지의 특성은 다른 어떤 항 미생물제제도 가지지 못하는 박테리오파지만의 특징으로 전통발효식품에서 특정 유해균의 제어에 매우 유용할 것이다.

본 연구에서는 전통장류의 주원료라 할 수 있는 메주와 청국장 발효에 이용되는 벗짚미생물을 활용함에 있어 박테리오파지로 위해미생물을 제어하고자 하였으며, 벗짚에 있는 다양한 미생물을 자체로 배양하고 계대배양이나 세대가 지나더라도 일정한 균총을 유지할 수 있는 배양액을 제조함으로써 전통장의 맛을 내고 제조일정에 따라 발효정도가 큰 편차를 포이지 않는 일정한 메주를 제조할 수 있는 방법을 찾으며, *B. cereus* 제어를 비롯하여 병원성미생물의 생육을 관찰하고 biogenic amine과 같이 신종 위해물질을 모니터링 함으로서 장류에 이용 가능성을 확인하고자 하였다. 또한, 품질기준에 있어 전통메주를 연구한 문헌과 경험, 연구를 토대로 전통장류의 맛을 과학적으로 재현하고자 하였다.

2. 산업적, 사회적 측면

장류 출하액은 2010년 9천 1백억 원에서 2011년 9천 8백억 원으로 성장하여 1조원 시장을 형성하였다(식품의약품안전처, 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 자가 소비성 장류의 상품화가 촉진될 것으로 보이며, 특히 이와 관련된 편의성 제품의 소비촉진이 가속화 될 것으로 예상된다. 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 개량식의 시장점유율이 높다. 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.

전통메주의 제조과정 중에는 자연 상태에서 유래된 수십 종의 사상균과 세균들이 복합적으로 작용하므로 제품의 표준화가 어렵고, 완제품인 된장과 간장이 되기까지 제조기간도 약 6~12개월이 소요되는 등 도시화 되어가는 우리 생활방식에 비추보면 장을 담는다는 것이 어려워지는 것이 현실이다. 재래식 메주의 제조는 대두를 증자 한 후 볏짚과 공기 중의 미생물을 자연적으로 접종되게 하여 1~2개월 발효시키는 과정에서 대두의 단백질 및 당류 성분이 별도의 가공 처리 없이 분해시키는 공정으로 생성된 아미노산, 당 및 유기산 등의 성분손상이 적으며 숙성 후에 분리된 된장도 전량 이용할 수 있어 원료의 이용률이 높은 특징을 가지고 있다. 품질이 균일하고 위생적인 제품을 만들기 위해서나 전통제품 고유의 특징을 계승하기 위해 미생물 이용방법에 대해 제고함으로서 제품에 경쟁력을 부여하고 또한 제품의 다양화를 도모할 수 있다. 장류 제조 시에 일본에서 수입하는 *Aspergillus oryzae*가 활용이 되나 국산 메주에는 이외에도 여러 종류의 amylase, protease를 내는 미생물이 존재하는데 이러한 미생물 중 특징적인 미생물을 분리하여 종균으로 활용하거나 다양한 메주발효균 자체를 배양하여 사용한다면 제품의 고유 풍미를 증진시키고 품질을 향상시킬 수 있다. 대량생산시스템으로 생산되는 공장장류의 경우, 사용하는 발효균을 자체적으로 분리 동정하거나 종균 외부에서 구입하여 단일균 또는 단일균 발효 알메주를 혼합하여 사용함으로써 품질균일화 문제를 해결하고 있다. 그러나 많은 소비자는 여전히 전통장류에 대한 기호를 나타내고 있어 일부 전통장류를 매입하여 혼합함으로써 공장산 장류의 관능적 문제점을 보완하고 있다. 이렇듯 전통장류와 공장산 장류의 품질차이는 여전히 존재하고는 있으나 전통장류의 경우, 앞에서 언급하였듯이 품질표준화가 되지 않기 때문에 대량생산한다거나 소비자에게 신뢰를 줄 수 있는 관능을 가지기 어렵다는 문제점을 내포하고 있다.

본 연구에서는 이러한 현상을 극복하고자 볏짚 자체에 있는 다양한 미생물을 자체로 배양하고 계대배양이나 세대가 지나더라도 일정한 균 총을 유지할 수 있는 배양액을 제조함으로써 전통장의 맛을 내고 제조일정에 따라 발효정도가 큰 편차를 포이지 않는 일정한 메주를 제조할 수 있는 방법을 찾으며, 품질기준 또한 전통메주를 연구한 문헌과 경험을 토대로 전통장류의 맛을 과학적으로 재현하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 볏짚 유래 Starter culture를 이용한 청국장, 된장 및 간장 발효·숙성 공정 확립 및 시제품 생산, 상품화

- 가. RiBS1 적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 발효공정 확립
 - (1) RiBS1 적용 청국장 발효공정 확립
 - (2) RiBS1 적용 메주 발효공정 확립
 - (3) RiBS1 메주 이용 된장 및 간장 숙성 연구
- 나. ORiBS1 적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구
 - (1) ORiBS1 적용 청국장 품질 변화 연구
 - (2) ORiBS1 적용 메주 품질 변화 연구
 - (3) ORiBS1 메주 이용 된장 및 간장 숙성 연구
- 다. 개발 제품 상품화 추진
 - (1) RiBS1 적용 청국장, 된장 및 간장 묘사분석 및 기호도 조사
 - (2) RiBS1과 ORiBS1 적용 청국장 관능특성 비교 분석
 - (3) 소비자 조사 및 상품화 방안 마련

2. 볏짚 유래 *B. cereus* free starter culture의 개발 및 scale up

- 가. 볏짚 유래 *B. cereus* free starter culture(RiBS1)의 scale up 기술개발
- 나. 순창 지역의 유기농볶짚 유래 *B. cereus* free starter culture(ORiBS1)의 개발
- 다. ORiBS1의 scale up 기술 개발
- 라. 새로운 특성을 가지는 *B. cereus* specific 박테리오파지의 분리 및 특성분석
- 마. RiBS 이용 생산 제품의 microflora 분석

3. 위해미생물 및 품질분석과 개발된 *B. cereus* free starter의 장기보존 기술 개발

- 가. 개발된 starter 및 제품(메주, 청국장)의 품질분석 및 관능분석
 - (1) RiBS1 starter의 위해미생물 분석
 - (2) RiBS1 메주 및 청국장 이화학분석 및 미생물 분석
 - (3) RiBS1 메주 및 청국장 관능분석
- 나. 개발된 starter 및 제품(메주, 청국장, 된장, 간장)의 품질분석 및 관능분석
 - (1) RiBS1 된장 및 간장 이화학분석 및 미생물 분석
 - (2) RiBS1 된장 및 간장 관능분석
 - (3) ORiBS1 메주, 청국장, 된장, 간장 이화학분석 및 미생물 분석
 - (4) ORiBS1 메주, 청국장, 된장, 간장 관능분석
- 다. RiBS starter 장기보존기술 개발

IV. 연구개발결과

1. 볏짚 유래 Starter culture를 이용한 청국장, 된장 및 간장 발효·숙성 공정확립 및 시제품 생산, 상품화

가. RiBS1 적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 발효공정 확립

(1) RiBS1 적용 청국장 발효공정 확립

*B. cereus*만이 특이적으로 제거된 볏짚 유래 starter culture인 RiBS1을 이용하여 청국장의 제조한 후 기존 청국장 단발효와 발효패턴 비교 분석을 통하여 발효조건을 확립하였다. 풍미와 위생성이 동시에 요구되는 청국장의 제조를 위해 개발된 starter culture의 발효온도 및 접종량을 달리하여 차이가 있는지 알아보았다. 기존 청국장의 발효 온도는 40℃로 *Bacillus*속이 가장 잘 자랄 수 있는 환경이며, 여기에 50℃로 온도 변화를 주어 고온에서 생육 가능한 균들만 자랄 수 있도록 환경 조건을 제시하였고, 기존의 양인 0.1%에서 1%로 10배 변화를 주었을 때 관능적인 면에서 긍정적인 변화를 미칠 것으로 예상하여 조건을 동시에 진행하였다. 또한, 개발 starter culture와 본사에서 기존의 사용하고 있는 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 혼합하여 불확실한 면을 보완하도록 하여 대조군을 포함한 총 9가지 조건으로 실험을 하였다. 실험 결과, 온도 별로 유의적 차이가 있었으며, 접종량은 차이를 보이지 않았다. 특히 발효온도 40℃보다 50℃로 발효한 청국장에서 관능적으로 양호한 판정을 얻었으며, 제2협동의 관능평가를 통해 선정한 발효온도 50℃, 발효시간 48hr, RiBS1만을 0.1% 접종한 청국장과 발효온도 50℃, 발효시간 24hr, RiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 혼합하여 0.1% 접종한 청국장을 시제품으로 제작하여 묘사분석 및 기호도 조사를 실시하였다.

(2) RiBS1 적용 메주 발효공정 확립

개발 starter culture인 RiBS1을 콩에 적용했을 때 접종량 및 접종온도가 발효기간에 따라 어떠한 특성이 나타나는지 알아보려고 기존 본사 접종량인 0.05%를 기준으로 2배, 3배 증가한 0.1%, 0.15%로 접종량을 다르게 하였으며 기본 본사 접종온도인 60℃를 기준으로 상하로 두어 50℃, 60℃, 70℃로 실시한 결과, 전체적으로 접종량 별로 큰 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 접종온도는 기존 본사 대조군과 70℃로 접종한 RiBS1, 그리고 50℃로 접종한 RiBS1과 60℃로 접종한 RiBS1이 비슷한 경향을 보였다. 이의 결과에서 RiBS1의 접종온도별 차이가 있음을 알아내어 이와 더불어 RiBS1에 *Aspergillus oryzae*를 혼합 하여 접종온도를 다르게 함으로써 발효기간 별 차이가 있는지 알아보았다. 실험 결과 기존 본사 대조군과 비슷한 발효 패턴을 보이면서, 메주의 후 발효가 일어나지 않는 범위의 높은 protease활성과 아미노태 질소 함량이 높은 60℃의 접종온도를 선정하여 사각메주에 적용하였다.

메주는 본사의 기존 병형복발효 방법인 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027과 *Aspergillus oryzae*를 사용하고, 실험군은 RiBS1만 접종한 메주(R), RiBS1과 *Aspergillus oryzae*를 접종한 메주(RA), RiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 및 *Aspergillus oryzae*를 접종한 메주(RBA)를 제조하여 실험했으며, 균의 접종온도는 앞의 실험에서 선정된 60℃로 하였다.

(3) RiBS1 메주 이용 된장 및 간장 숙성 연구

RiBS1을 적용한 메주를 25% 염수에 침지한 후 된장과 간장을 제조하고 숙성하여 품질특성을 살펴보았으며 된장의 경우 가장 큰 유의적 차이를 보이는 분석항목은 아미노태질소함량으로 RiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 및 *Aspergillus oryzae*를 접종한 메주(RBA)를 이용한 된장이 474.6 mg%로 가장 높게 나타났으며 이는 기존 된장보다 높은 결과를 보였다. 또한 간장의 경우도 RBA가 기존 간장과 비슷한 결과를 보였으며, 최종 숙성 기간에서 기존과 Brix, 아미노태질소 함량 및 총질소 함량이 높은 결과를 나타내었다.

나. ORiBS1 적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구

(1) ORiBS1 적용 청국장 품질 변화 연구

*B. cereus*만이 특이적으로 제거된 유기농 벵짚 유래 starter culture인 ORiBS1을 이용하여 RiBS1청국장과 마찬가지로 기존 본사 대조군을 포함한 총 9가지 조건으로 실험을 하였으며, 실험 결과 발효온도별 뚜렷한 차이를 나타내었다. 특히 발효온도 50℃로 발효한 청국장에서 장류 품질의 중요한 척도인 Protease activity, pH 및 아미노태 질소 함량에서 높은 결과를 보였으며 관능적으로도 양호한 판정을 얻었다. 제2협동의 관능평가를 통해 선정된 발효온도 50℃, 발효시간 48hr, ORiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 혼합하여 0.1% 접종한 청국장과 발효온도 50℃, 발효시간 48hr, ORiBS1만을 1% 접종한 청국장을 제작하여 RiBS1 청국장과 관능 분석 차이를 비교하였다.

(2) ORiBS1 적용 메주 품질 변화 연구

메주는 본사의 기존 병형복발효 방법인 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027과 *Aspergillus oryzae*를 사용하고, 실험군은 ORiBS1만 접종한 메주(OR), ORiBS1과 *Aspergillus oryzae*를 접종한 메주(ORA), ORiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 및 *Aspergillus oryzae*를 접종한 메주(ORBA)를 제조하여 실험했으며, 균의 접종온도는 RiBS1 메주 연구에서 선정된 60℃로 동일하게 하였다.

(3) ORiBS1 메주 이용 된장 및 간장 숙성 연구

ORiBS1을 적용한 메주를 25% 염수에 침지한 후 된장과 간장을 제조하고 숙성하여 품질특성을 살펴보았으며 ORiBS1만 접종한 메주를 이용한 된장, 간장을 제외하고 비슷한 경향을 나타내었다.

다. 개발 제품 상품화 추진

(1) RiBS1 적용 청국장, 된장 및 간장 묘사분석 및 기호도 조사

제2협동에서 자체 관능평가 후 가장 선호도가 좋았던 RiBS1적용 청국장 2종과 기존 본사 청국장, 전국적으로 시판 중인 청국장 7종에 대해 묘사분석을 이용하여 각각의 관능적 특성을 분석하고 20대-50대 소비자를 대상으로 소비자 조사를 실시하여 청국장의 관능적 기호 유도 인자를 분석하였으며 아울러 청국장의 반복 섭취 후 기호도 변화를 관찰하였다. 전체적으로 RiBS1적용 청국장의 경우 관능적 특성이 약하게 표현되었으며, 또한 소비자 기호도가 다른 시료들에 비해 두드러지는 특성이 나타나지 않았으나 반복적으로 소비자 조사를 진행한 결과 기

간에 따라 RiBS1적용 청국장에 대한 기호도가 눈에 띄게 증가한 것으로 나타나 긍정적인 평가를 얻었다.

된장, 간장도 마찬가지로 묘사분석 및 기호도 조사를 실시한 결과 RiBS1적용 된장, 간장은 전국적으로 시판 중인 재래식 된장과 관능특성에서 유의적인 차이가 있음을 나타내었으며 전반적인 기호도도 양호했음을 알 수 있었다. 특히 RiBS1만을 적용한 된장, 간장 보다 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 및 *Aspergillus oryzae*를 함께 적용한 된장, 간장에서 긍정적인 결과를 얻을 수 있었다.

(2) RiBS1과 ORiBS1적용 청국장 관능특성 비교 분석

제2협동에서 자체 관능평가 후 가장 선호도가 좋았던 RiBS1 적용 청국장 2종과 ORiBS1 적용 청국장 2종의 관능특성 차이를 비교하기 위한 묘사분석 및 기호도 조사를 실시하였다. 실험 결과 ‘진한 정도’, ‘탁한 정도’, ‘쓴맛’, ‘전반 맛 강도’, ‘팍콩/콩 비린 향미’, ‘걸쭉한 정도’에서 통계적으로 유의한 차이가 있음을 보였으며 전반 기호도는 $OR > R+B > R > OR+B$ 순으로 나타났다.

(3) 소비자 조사 및 상품화 방안 마련

소비자 트렌드와 개발제품의 상품화 가능성을 알아보기 위해 청국장에 관한 설문조사를 실시하였으며, 기술개발 청국장 및 된장, 간장을 상품화하기 위한 판매 전략을 수립하고 라벨 제작 및 품목제조보고서 신고를 완료하였다.

2. 벗짚 유래 *B. cereus* free starter culture의 개발 및 scale up

가. RiBS1 연구관련 결과

- (1) 다양한 양(0.1, 0.5, 1.0L)의 콩갈은물(GB)배지에 RiBS1을 다양한 농도(0.1, 1.0% inoculum)로 처리한 후 배양한 결과 총균수와 미생물 군집(DGGE)이 서로 유사함을 확인
- (2) RiBS1을 이용한 메주의 microflora 분석결과 모든 샘플들에서 *B. aerius*와 *B. licheniformis*가 주요한 세균이 었고, 발효기간에 의한 차이도 미미하였음
- (3) RiBS1을 이용한 된장의 microflora 분석 결과 모든 샘플에서 *Bacillus*가 주요세균이었고 특히 RiBS1를 첨가한 처리군들에서 많은 종류의 세균이 검출됨
- (4) RiBS1을 이용한 간장의 microflora 분석 결과 대부분의 처리군들에서 *Tetragenococcus halophilus*가 주요균으로 확인되었고, 숙성기간에 따른 군집 변화가 있었으나, 일정한 패턴을 보이지는 않음

나. ORiBS1 연구관련 결과

- (1) 유기농 벗짚 유래 ORiBS1을 개발하고, ORiBS1이 *B. cereus*-free임을 확인
- (2) Passage에 따른 ORiBS1의 microflora 분석 결과, P3부터 microflora가 안정화됨을 확인
- (3) 다양한 양(0.1, 0.5, 1.0L)의 콩갈은물(GB)배지에 ORiBS1을 다양한 농도(0.1, 1.0% inoculum)로 처리한 후 배양한 결과 총균수와 미생물 군집(DGGE)이 서로 유사함을 확인
- (4) ORiBS1을 이용한 메주의 microflora 분석결과 모든 샘플들에서 발효초기 *Pediococcus* 또는

*E. coli*가 많은 비중을 차지하였으나 발효 후기로 갈수록, *Enterococcus*가 주요 세균으로 분석됨.
(5) ORiBS1을 이용한 된장의 microflora 분석 결과 발효 초기 세균군들은 샘플들별로 차이를 보였으나, 발효 후 반기에는 모든 샘플에서 *Tetragenococcus halophilus*이 주요 세균으로 분석됨
(6) ORiBS1을 이용한 간장의 microflora 분석 결과 대부분의 처리군들에서 발효후기 *Tetragenococcus halophilus* 또는 *E. coli*가 주요세균으로 분석됨

다. *B. cereus*를 사멸시키는 박테리오파지의 분리 및 특성분석

3. 위해미생물 및 제품품질특성분석과 개발된 *B. cereus* free starter의 장기보존 기술 개발

RiBS1의 starter culture의 분석 결과, *B. cereus* 포함한 *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Stap. aureus*, *Cl. perfringenes* 항목 모두에서 음성의 결과를 보였다.

RiBS1의 starter로 제조한 콩알메주의 유리당 함량 중 fructose는 접종 온도가 60℃ 일 때 시간이 지날수록 증가하는 경향을 보였고, glucose와 maltose는 전반적으로 발효가 진행 될수록 증가하는 경향을 보였다. 반면, sucrose는 발효 초기에 생산이 되었다가 발효가 진행될수록 감소하는 경향을 보였다. RiBS1의 starter로 제조한 청국장장의 유리당 중 fructose의 경우 전반적으로 발효초기에 생성되었다가 발효시간이 경과할수록 줄어드는 경향을 보였고, glucose는 배양 온도가 50℃인 실험구들은 발효시간이 경과할수록 급격하게 증가하는 경향을 보였다. Maltose는 전반적으로 발효 48시간까지 증가하다 그 이후에 감소하는 경향이였다. RiBS1의 starter로 제조한 사각메주의 fructose는 전체적으로 발효일수가 증가할수록 감소하는 경향을 보였고, glucose는 발효 초기에 증가하다 발효9일 이후에 급격하게 감소하는 경향을 보였다. Sucrose와 maltose는 발효 중 증가하는 경향을 보였다.

RiBS1의 starter로 제조한 콩알메주의 유기산 중 citric acid와 succinic acid는 발효기간이 경과할수록 증가하는 경향을 나타냈다. 반면 acetic acid는 발효시간이 경과함에 따라 감소하는 결과를 나타내었다.

RiBS1의 starter로 제조한 청국장 중의 발효온도가 50℃ 이며 RiBS1을 0.1% 접종한 실험구에서는 유리아미노산 중 taurine이 다른 실험구에 비해 2배 이상 높은 결과 값을 보였고, 사각메주의 경우 모든 실험구에서 taurine의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다.

β -amylase 활성은 콩알메주와 청국장장의 경우 발효시간이 경과할수록 증가하는 경향을 나타내었다. 청국장장의 경우 가장 높은 수치를 보인 실험구의 β -amylase 활성은 $1,881 \times 10^4$ unit으로 콩알메주 및 사각메주에 비해서 높은 β -amylase 활성을 보였다.

청국장 36개 실험구에 대하여 16명의 패널을 대상으로 관능검사를 실시한 결과는 sample 2인 발효온도 50℃, 24h 0.1% R+B와 sample 4인 발효온도 50℃, 48h 0.1% R의 실험구에서 가장 높은 기호도를 나타내었다.

RiBS1의 starter로 제조한 콩알메주 및 사각메주의 청국장 실험구의 위해미생물을 분석한 결과 모두 음성의 결과를 나타내었다. 바이오제닉 아민의 경우, histamine은 모든 실험구에서 검출이 되었다. 청국장은 대조구의 39.96 mg/L에 비해 실험구에서 15.42 mg/L가 검출되어 낮은 수치를 나타내었다. 사각메주의 경우, 대조구에 비해 RiBS1만을 이용한 실험구에서는 낮은 수치를 보였지만 RiBS1과 *A. oryzae*를 혼합한 실험구에서 가장 높게 나타났다. Tyramine은 사

각메주 RA, RBA 실험구와 청국장 발효 24h 대조구에서 미량 검출되었다. Cadaverine은 모든 실험구에서 검출되지 않았다.

콩알메주 및 사각메주, 청국장 실험구의 총아플라톡신을 분석한 결과 모두 불검출의 결과를 나타내었다.

RIBS1 starter를 이용하여 개발한 된장의 각 실험구별 숙성 완료인 18주차의 유리당 함량은 maltose는 0~557 mg/L, glucose는 0~111 mg/L로 검출되었고, fructose는 904~2,553 mg/L로 유리당 중 가장 많은 함량을 보였다.

RIBS1 starter를 이용하여 개발한 간장의 유리당 함량 중 maltose와 fructose의 경우 숙성 초기에 각각 333~667 mg/L, 2,453~4521 mg/L로 높은 함량을 나타내었지만, 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였다. Glucose는 숙성 18주차에 R 실험구와 RA에서 각각 14.7 mg/L, 73.8 mg/L 검출되었다.

된장의 유기산 중 citric acid의 경우 RA 실험구의 숙성 완료일에 가장 높은 3,044 mg/L가 검출되었다. 이는 대조구인 BA 실험구의 1,336 mg/L의 2배 이상에 해당하는 수치이다. Succinic acid는 숙성 완료일에 213~400 mg/L로 초기 값보다 낮은 값을 나타내었다. Lactic acid는 숙성 완료일에 11,745~15,766 mg/L로 검출된 유기산의 함량 중 가장 높은 값을 나타내었다. Acetic acid는 숙성 완료일에 증가하는 경향을 나타내었지만 숙성 초기의 873~1,590 mg/L보다 낮은 858~1,145 mg/L 값을 나타내었다.

간장의 유기산은 전반적으로 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였다. Citric acid의 숙성 완료일 함량은 637~1,556 mg/L로 숙성이 진행될수록 급격하게 감소하였다. Succinic acid는 숙성 완료일에 134~325 mg/L의 함량을 나타냈으며, lactic acid는 10,356~14,410 mg/L로 된장과 유사하게 검출된 유기산중 가장 높은 값을 나타내었다. Acetic acid는 RA와 RBA 실험구의 경우 485 mg/L, 950 mg/L 값을 나타내었다.

RIBS1 starter를 이용하여 개발한 된장의 β -amylase 활성은 대조구와 R 실험구는 숙성 초기에 비해 숙성 완료일에 증가된 경향을 보였고, RB와 RBA 실험구는 숙성 완료일에 숙성 초기보다 다소 낮은 761 unit, 563 unit 이었다. 간장의 β -amylase 활성은 숙성 완료일 RB 실험구에서 827 unit으로 R 실험구 302 unit보다 약 2.7배 높은 값을 나타내었다. β -amylase 활성은 된장과 간장에서 모두 RB 실험구가 가장 높은 수치를 나타내었다.

RIBS1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 바이오제닉아민 분석결과 된장의 histamine은 349.8~469.0 mg/L, 간장의 hitamine은 284.3~309.9 mg/L가 검출되었고, Tyramine의 경우 된장은 188.2~204.8 mg/L, 간장은 149.0~156.3 mg/L가 검출되었다.

병원성미생물을 분석한 결과는 된장의 경우 *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Stap. aureus*, *Cl. perfringenes* 등의 병원성미생물은 모두 음성의 결과를 나타내었고, R 실험구를 제외한 대조구, RA, RBA 실험구에는 *B. cereus*가 검출되었지만 식약처 장류 기준인 10^4 이하의 값으로 검출되었다. 간장의 경우 *B. cereus*를 포함한 모든 병원성미생물은 검출 되지 않았다.

RIBS1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 총아플라톡신을 분석한 결과 모든 실험구에서 0.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 또는 불검출로 분석되었다.

ORIBS starter의 병원성미생물을 분석한 결과 RIBS1과 동일하게 모든 병원성미생물 항목에서 음성의 결과를 나타내었다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 β -amylase 활성은 OR 실험구 462 unit, ORA 실험구 541 unit, ORBA 숙성 완료일에는 611 unit으로 분석되었다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 숙성 12주차의 바이오제닉아민을 분석한 결과 histamine은 ORA 실험구에서 4.0 mg/L로 검출된 것을 제외하고는 대조구, OR, ORBA 실험구에서는 검출되지 않았다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 병원성미생물을 분석한 결과 모든 실험구 및 병원성미생물에서 불검출 및 음성의 결과를 나타내었다.

메주의 총아플라톡신을 분석한 결과는 대조구의 경우 불검출로 분석되었고, OR 실험구는 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ORA 실험구는 0.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ORBA 실험구는 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 함량 결과를 나타내었다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 유리당 함량을 분석한 결과 maltose의 경우, 발효 72시간 경과 후 40°C 0.1% OR+B 실험구에서 5,158 mg/L로 가장 높은 함량을 나타내었고, 이는 발효 72시간 경과 후 50°C 0.1% OR+B 실험구인 307 mg/L에 비해 약 16배 이상 높은 함량이었다. Fructose와 glucose는 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 보였다.

ORIBS starter로 제조한 청국장의 유기산 중 lactic acid의 경우 접종온도가 40°C 처리구는 발효시간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였고, 50°C 처리구는 발효시간이 경과할수록 감소하는 경향을 보였다. Succinic acid는 접종온도가 50°C 경우, 발효 48시간 경과하였을 때 265~532 mg/L, 72시간 경과 후에는 594~914 mg/L로 증가하였다. 40°C의 경우 발효 24시간과 발효 72시간의 함량이 유사하였다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 바이오제닉아민 중 histamine의 경우 50°C OR+B 0.5% 실험구에서는 42.1 mg/L, 50°C OR 1% 실험구에서는 21.2 mg/L의 함량이 검출되었다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 병원성미생물을 분석한 결과 모든 실험구 및 병원성미생물에서 불검출 및 음성의 결과를 나타내었다. 청국장의 총아플라톡신을 분석한 불검출과 0.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 수치를 나타내었다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장의 전체적인 유리당 함량은 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였다. Maltose는 숙성 10주차의 OR 실험구에서 가장 높은 436 mg/L, 대조구와 ORBA 실험구의 값은 각각 108 mg/L 와 111 mg/L가 검출되었다. Glucose의 경우 ORA 실험구에서 1,477 mg/L, fructose의 경우 OR 과 ORA 실험구에서 7630 mg/L 와 7366 mg/L가 각각 검출되었다.

간장의 유리당 함량은 된장의 함량과 유사하게 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였다. 된장의 lactic acid는 숙성이 진행될수록 증가하는 경향을 보였으며 대조구 11,788 mg/L, OR 10,872 mg/L, ORA 8,490 mg/L, 9,495 mg/L로 검출되었다. Acetic acid의 경우 ORA 실험구에서 1,433 mg/L 로 가장 높은 값을 나타내었다. 반면 Succinic acid는 모든 실험구에서 검출되지 않았다.

간장의 lactic acid의 경우 대조구를 제외한 실험구에서 숙성이 진행될수록 증가하는 경향을 보였으며 ORA 실험구에서 11,840 mg/L로 가장 높은 함량을 나타내었다. Succinic acid는 된장과 다르게 대조구의 숙성 완료일과 ORA 실험구의 숙성완료일에 검출되었으며, 각각 936 mg/L, 3787 mg/L가 검출되었다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장의 β -amylase 활성은 숙성 10주차의 대조구는 421 unit으로 가장 높았고 다른 실험구는 340~382 unit의 분포로 유사하였다. 간장은 OR 실험구에서 396 unit으로 다른 실험구에 비해 다소 높은 값을 나타내었다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장의 바이오제닉 아민은 된장의 OR 실험구에서

histamine이 0.6 mg/L가 검출된 것을 제외하고, 된장 및 간장의 histamine은 모두 불검출 되었다.

병원성미생물 분석 결과, 된장과 간장의 각 실험구에서 *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Stap. aureus*, *Cl. perfringenes* 모두 음성의 결과를 나타내었다. 반면 *B. cereus*의 경우 된장의 OR 실험구와 ORA 실험구에서 각각 4.2×10^4 , 3.1×10^4 CFU/mL 수준으로 검출되었고, 간장은 ORA 실험구에서 3.2×10^2 CFU/mL 수준으로 검출되었다.

ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 총아플라톡신을 분석한 결과 모든 실험구에서 0.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 과 불검출로 분석되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 벗짚 유래 Starter culture를 이용한 청국장, 된장 및 간장 발효·숙성 공정확립 및 시제품 생산, 상품화

가. 기술적 측면

- (1) 박테리오파지를 이용한 유해세균이 제거된 청국장 제조기술 확보
- (2) RiBS를 적용한 장류 제조공정 확립

나. 성과

- (1) 사업화 4건 (RiBS1청국장, ORiBS1청국장, 된장, 간장)
- (2) 기술이전 2건
- (3) 특허출원
-박테리오파지를 이용한 유해세균이 제거된 전통 발효식품용 스타터 컬처를 이용한 청국장의 제조방법, 특허출원번호 : 10-2013-0136014
- (4) 교육·지도활용 3건
- (5) 홍보 실적 7건
- (6) 기타; 기업부설연구소 인증 및 인력채용(2명)

2. 벗짚 유래 *Bacillus cereus* free starter culture의 개발 및 scale up

가. 논문 출판

-Nadeeka Bandara 외 3인. 2014. 단일박테리오파지를 이용한 벗짚유래 *Bacillus cereus* free 스타터컬처의 개발. Korean J Food Sci Technol. 46(1):1-6 (비SCI)

나. 유전자원 등록

-JBP901 whole genome sequence : GenBank Accession Number : KJ676859)

다. 특허등록

-박테리오파지를 이용한 유해세균이 제거된 전통 발효식품용 스타터 컬처의 제조 방법. 특허 등록번호 : 10-1443141

3. 위해미생물 및 제품품질특성분석과 개발된 *B. cereus* free starter의 장기보존 기술 개발

가. 논문 투고

*Bacillus cereus*가 선택적으로 제거된 벗짚유래 스타터를 이용한 청국장의 제조 및 품질특성 (한국식품위생안전성학회)

나. 학술발표

Characteristics of *cheonggukjang* using rice straw based natural microflora controled *Bacillus cereus*. (미생물생명공학회)

SUMMARY

I. Title of Research

Development of Hygienic Traditional Sauces Using Control of Straw Microbes

II. The purpose and necessity for research and development

1. Technological Aspect

Currently, traditional sauces became exposed to various risks (Aflatoxin, *Bacillus cereus*, Biogenic amine, food poisoning microorganisms, etc.) as the environment changes to subtropical climate. And, fermentation without its own seed culture increases risks and, to avoid such risks, seed culture is purchased from the outside.

B. cereus is pathogenic bacteria that cause diarrhea or vomiting, and known to account for 1 to 20% of foodborne pathogen infection. For that reason, in Europe, *B. cereus* in various food products is restricted to be no more than 10^{4-5} CFU/g, and, Food Sanitation Law of South Korea restricts the harmful microbe *B. cereus* to 10^4 CFU/g in sauces. Nevertheless, some of traditional sauces sold in South Korea have been found to contain 10^5 CFU/g or more of *B. cereus*, and microbes must be regulated for both hygienic approach to traditional sauces, which are essential for Korean dishes, and exporting Korean traditional fermented foods to other countries. *B. cereus* is extensively distributed in the nature and forms spores that are resistant against various antimicrobial agents, which explains why it is difficult to control it in food.

In traditional sauces, as another substance related to safety of *Doenjang*, biogenic amine is receiving attention. Biogenic amine has aliphatic, aromatic, and heterocycle structures, and is an essential component that is involved with neurotransmitter of the central nerve or direct and indirect blood vessel system regulation of human and animal bodies. Excessive intake of it from different types of food can cause food poisoning and some biogenic amines have the potential of being converted to strong carcinogens like N-nitrosamine. Particularly, *Doenjang*, which is made by fermenting beans that have high content of protein, must be constantly monitored and managed because biogenic amine is generated during decomposition or fermentation of food that contain protein.

Bacteriophage (phage) is the most prevalent self-replicating unit (10^{31} phage) on earth that infects and kills only certain germs. It is estimated that healthy adults ingest about 10^7-10^9 phage per day, and have 10^{13-14} microbes as gut microflora, which leads to the assumption that between 10^{13} and 10^{15} phage exist in an adult. Bacteriophage has high

specificity in comparison to antibiotic and influences only certain host bacteria and no other microbes. It is abundant in the natural world and, therefore, it is easy to find a new product. Also, it has low cross-tolerance and is more proliferative than any other antimicrobial agent. Bacteriophage research has been essential in basic science since antibiotic was discovered, because it has the simplest structure as a self-replicating unit. As a result, it led to discovery of genes, research of gene regulation, and establishment of central dogma. Estimated to be about as 10 times more prevalent as the number of bacteria present on earth, bacteriophage is being actively research not only as important material for basic science but also for securing diverse genetic resources and detecting, diagnosing, typing, and controlling harmful bacteria (pathogenic and putrefactive bacteria).

Korean traditional fermented foods have unique characteristics that are distinguished from mass-produced products that use single or several strains as a starter, and these characteristics are mainly derived from microbes that are used for fermentation. Bacteriophage is an obligate parasite that lives only on certain bacteria as a host and has a high level of host specificity that does not affect useful strains. It is reported to effectively control harmful bacteria in food. Therefore, US FDA approved of bacteriophage that controls *Listeria monocytogenes* as “GRAS” to be used for food.

Meanwhile, traditional fermented food including sauces require continuous activity of useful bacteria such as *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* during fermentation. The high host specificity and effective control of harmful bacteria is unique to bacteriophage and can be very useful for controlling specific harmful bacteria in traditional fermented food.

In this study, bacteriophage was used for controlling harmful microbes when using straw microbes for fermenting *Meju* and *Cheonggukjang*, which are main ingredients of traditional sauces. Various microbes found in straw were cultured and culture medium that can maintain a steady colony even after subculture or in different generations was made, to produce the taste of traditional sauces and make *meju* that does not vary too widely in levels of fermentation. And, growth and development of pathogenic microbes as well as control of *B. cereus* was observed, and new harmful substances like biogenic amine were monitored to study the possibility of using it for making sauces. Also, in terms of quality standards, the author attempted to recreate the taste of traditional sauces in a scientific manner based on literature on traditional *Meju*, and relevant experience and study.

2. Industrial and Social Aspects

Sales of traditional sauces grew from 910 billion KRW in 2010 to 980 billion KRW in 2011, amounting to almost trillion KRW as a market (Ministry of Food and Drug Safety, 2010, 2011). In terms of sales, *doenjang* grew 12%, from 138 billion KRW in 2010 to 155 billion KRW in 2011; *Cheonggukjang* by 33%, from 24 billion KRW to 32 billion KRW; and

mixed sauces by 30% from 124 billion KRW to 162 billion. Notably, among soy sauce products, while the sales of fermented, acid decomposition, and enzyme decomposition soy sauces either stagnated or decreased, the sale of Korean traditional soy sauce rapidly increased from 7.5 billion KRW to 13 billion KRW.

Furthermore, following the change of eating and development of restaurant culture, convenience-oriented sauces like mixed soy sauce or mixed sauces grew in sales. As shown in various reports on the sauce market, it is expected that self-consumption sauce products like *Doengjang* and soy sauce will be more commercialized, like *Gochujang*, which has been already fully commercialized, as well as other relevant convenience products. Traditionally, *Doenjang* used to be made and consumed at home, but now, it is made and sold by sauce manufacturers. Most *Doenjang* and soy sauce products in the market are mainly based on beans and wheat, and popular products are made by using enzymes from koji, for which the seed culture is inoculated and cultured artificially, and salt water is added before fermentation. However, as the nutritional values and functional features of traditional sauces became more widely known, more consumers became interested in traditional sauces and production method of them.

During the making of traditional, various mold fungus and bacteria generated from the natural state interact in a complex way, and, therefore, it is difficult to standardize the products. Furthermore, traditional sauces take between six and twelve months until completed. Traditional method of making *Meju* causes little damage to amino acid, sugar, and organic acids, because protein and sugar of the soybeans is decomposed during one or two months of fermentation after the soybeans are cooked and then exposed to microbes in straws and the air. And, *Doenjang*, which is separated after fermentation, can be also entirely used. Research on use of microbes can reinforce competitiveness and diversity of products, and help produce consistent and hygienic products. Although *Aspergillus oryzae* is imported from Japan for making traditional sauces, in Korean *Meju*, there are many microbes that produce different types of amylase and protease, and separating and using characteristic microbes for seed culture and culturing various *Meju* zymogens can improve the taste and quality. Mass-produced traditional sauces solve the problem of quality consistency by isolating and identifying relevant zymogens or purchasing the seed culture and mixing single strain or *Meju* fermented from single strain. However, many consumers still prefer traditional sauces and, therefore, manufacturers include traditional sauces in their products that are made in factories. Although there is still difference in quality between traditional sauces and mass-produced sauces, as mentioned earlier, traditional sauces have not been standardized, and, therefore, difficult to mass-produce or be trusted by consumers in terms of quality consistency.

In this study, to improve these issues, various microbes found in straw were cultured

and culture medium that can maintain a steady colony even after subculture or in different generations was made, to produce the taste of traditional sauces and make *meju* that does not vary too widely in levels of fermentation. Also, in terms of quality standards, the author attempted to recreate the taste of traditional sauces in a scientific manner based on literature on traditional *meju*, and relevant experience.

III. The result of Research and Development

1. Production of Prototype and Commercialization of Fermentation and Production Method of Cheonggukjang, Doenjang, and Soy Sauce Using Straw-Derived Starter Culture

A. Establishing Fermentation Process of Cheonggukjang, Doenjang, and Soy Sauce by Applying RiBS1

(1) Establishing Fermentation Process of *Cheonggukjang* by Applying RiBS1

Cheonggukjang was made by using RiBS1, a starter culture derived from straw from which only *B. cereus* was specifically removed, and then, the fermentation conditions were established based on comparison with single-step fermentation and fermentation pattern of conventional *Cheonggukjang*. Fermentation temperature and seed volume of the starter culture, which was developed to make *Cheonggukjang* that satisfies both savor and hygiene, was varied to examine the difference. The fermentation temperature of conventional *Cheonggukjang* is 40°C, which is ideal for growth of *Bacillus*, and the temperature was changed to 50°C so that only bacteria that can survive in high temperature could grow. The volume was changed from the conventional 0.1% to 1%, 10-fold increase, as it was expected to have a positive effect on the sensory aspect. Also, the proposed starter culture and the company's conventional *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 were mixed to reduce uncertainty and the test was carried out under nine conditions including the control group. The result showed that there was significant difference between different temperature settings but there was no difference in seed volume. Particularly, cheonggukjang that was fermented at 50°C had more positive result in sensory test than that fermented at 40°C, and, *Cheonggukjang*(R) inoculated at 0.1% with only RiBS1, fermented at 50°C, the temperature selected based on the second cooperative sensory test, for 48 hours, and *Cheonggukjang* (R+B) inoculated at 0.1% with mixture of RiBS1 and *Bacillus licheniformis* SRCM0100027, fermented at 50°C for 24hr were made as prototypes for descriptive analysis and preference survey.

(2) Establishing Fermentation Process of *Meju* by Applying RiBS1

In order to examine seed volume and inoculation temperature according to fermentation period, when the developed starter culture RiBS1 was applied to soybeans, based on the company's standard seed volume 0.05%, seed volume was increased by twice and three times, 0.1%, 0.15%, and, based on the company's standard inoculation 60°C, the temperature was varied to 50°C, 60°C, and 70°C. The result showed that there is no significant difference according to the seed volume, and, as for inoculation temperature, the company's standard control group and RiBS1 inoculated at 70°C, and RiBS1 inoculated at 50°C and that inoculated at 60°C were similar. As difference in inoculation temperature of RiBS1 was

found to have an effect, RiBS1 was mixed with *Aspergillus oryzae* to examine difference according to fermentation period, by changing inoculation temperature. The result showed that the fermentation pattern was similar to the company's standard control group, and high protease activity that does not cause after-fermentation of *Meju* and inoculation temperature with high amino nitrogen content, 60°C, was selected and applied to square *Meju*.

For *Meju*, the company's standard fermentation method, *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 and *Aspergillus oryzae*, was used, and, for the experimental group, *Meju*(R) for which only RiBS1 was inoculated, *Meju*(RA) for which RiBS1 and *Aspergillus oryzae*, and *Meju*(RBA) for which RiBS1, *Bacillus licheniformis* SRCM0100027, and *Aspergillus oryzae* was inoculated, were made for test, with the inoculation temperature set at 60°C.

(3) Study on Fermentation of *Doenjang* and *Soy Sauce* Using RiBS1 *Meju*

RiBS1-applied *Meju* was soaked in 25% salt water and *Doenjang* and *Soy sauce* was made and fermented before examining quality characteristics. In *Doenjang*, the most significant difference was found in amino nitrogen content, which was the highest, 474.6 mg%, *Meju*(RBA) for which RiBS1, *Bacillus licheniformis* SRCM0100027, and *Aspergillus oryzae*, and the content was higher than conventional *Doenjang*. Also, in *Soy sauce*, RBA was similar to conventional *Soy sauce*, and, in the final fermentation period, brix, amino nitrogen content, and total nitrogen was high.

B. Study on Quality Change of *Meju*, *Doenjang*, and *Soy Sauce* after Application of ORiBS1

(1) Quality Change of ORiBS1-Applied *Cheonggukjang*

By using ORiBS1, a starter culture derived from organic straw from which only *B. cereus* was specifically removed, like with RiBS1 *Cheonggukjang*, the test was carried out under nine conditions including the company's standard control group, and the result showed clear difference between different fermentation temperatures. Particularly, in *Cheonggukjang* fermented at 50°C, the protease activity, pH, and amino nitrogen content, which are important parameters of quality of traditional sauces, was high, and the sensory test result was positive as well. *Cheonggukjang* inoculated at 0.1% with mixture of ORiBS1 and *Bacillus licheniformis* SRCM0100027, fermented at 50°C, the temperature selected based on the second cooperative sensory test, for 48 hours, and *Cheonggukjang* (OR) inoculated at 0.1% with only ORiBS1, fermented at 50°C for 24hr were made as prototypes and used for sensory analysis comparison with RiBS1 *Cheonggukjang*.

(2) Quality Change of ORiBS1-Applied *Meju*

For *Meju*, the company's standard fermentation method, *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 and *Aspergillus oryzae*, was used, and, for the experimental group,

meju(OR) for which only ORiBS1 was inoculated, *Meju*(ORA) for which ORiBS1 and *Aspergillus oryzae*, and *Meju*(ORBA) for which ORiBS1, *Bacillus licheniformis* SRCM0100027, and *Aspergillus oryzae* was inoculated, were made for test, with the inoculation temperature set at 60°C as in the RiBS1 *Meju* study.

(3) Study on Fermentation of *Doenjang* and *Soy Sauce* Using ORiBS1 *Meju*

ORiBS1-applied *Meju* was soaked in 25% salt water and *Doenjang* and *Soy sauce* was made and fermented before examining quality characteristics. They showed similar results except the *Doenjang* and *soy sauce* for which only ORiBS1 was inoculated.

C. Commercialization of the Developed Products

(1) Descriptive Analysis and Preference regarding RiBS1-Applied *Cheonggukjang*, *Doenjang*, and *Soy Sauce*

Sensory characteristics were analyzed by using descriptive analysis regarding two types of RiBS1-applied *Cheonggukjang*, which were most preferred in the second cooperative sensory test, the company's *Cheonggukjang* product, and seven *Cheonggukjang* products that are available in South Korea, and a survey was conducted with consumers in their 20s to 50s to analyze sensory preference inducing factors of *Cheonggukjang*, and observe change of preference after repeated intake of *Cheonggukjang*. Overall, RiBS1-applied *Cheonggukjang* showed weak sensory characteristics and, although consumer preference was not stronger than other samples, repeated consumer survey led to positive feedback with remarkably increasing preference of RiBS1-applied *Cheonggukjang*.

Also, in descriptive analysis and preference survey, significant difference in sensory characteristics was found between RiBS1-applied *Doenjang* and *Soy sauce* and traditional products available in the market, and the overall preference was positive. Particularly, more positive result was obtained in *Doenjang* and *Soy sauce* to which both *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 and *Aspergillus oryzae* were applied rather than only RiBS1.

(2) Comparison of Sensory Characteristics between RiBS1- and ORiBS1-Applied *Cheonggukjang*

Descriptive analysis and preference survey was conducted in order to compare sensory characteristics of two types of RiBS1-applied *Cheonggukjang* and two types of ORiBS1-applied *Cheonggukjang*, which showed highest preference in the second cooperative sensory test.

The test result showed statistically significant difference in 'strength,' muddiness,' 'bitterness,' 'overall strength of taste,' 'fishy taste of soybean,' and 'thickness,' with the overall preference strongest OR > R+B > R > OR+B in the order.

(3) Commercialization of the Developed Products

To examine consumer trend and possibility of commercializing the developed products, a survey was conducted regarding *Cheonggukjang* and product label and manufacturing items reports were completed and submitted to commercialize the developed *Cheonggukjang*, *Doenjang*, and *Soy sauce*.

2. Develop a Rice Straw-derived *Bacillus cereus*-free Starter Culture and scale up

Rice straw is well-known niche for collections of microorganisms which is the source for traditionally fermented soybean foods in Korea. However, it contains harmful microorganisms including *Bacillus cereus* together with beneficial microorganisms. In this study, we developed two *Bacillus cereus* free starter cultures (RiBS1 and ORiBS1) and optimized the condition for large scale preparation of RiBS. In addition, microflora of fermented foods (Meju, Doenjang and Ganjang) manufactured using RiBS were analyzed. First of all, microflora of RiBS1 and ORiBS1 were different. Secondly, microflora in the starter culture, Meju, Doenjang and Ganjang were significantly different each other. Thirdly, although RiBS-treated Jangryu tend to contain more diverse microflora, it was difficult to specify microflora in the RiBS-treated samples compare to the control (with *B. licheniformis* and *Aspergillus oryzae*). In conclusion, experimental data showing different microflora in different RiBS cultures and successful production of RiBS-added Jangryu products suggest that development of rice-straw-derived-*B. cereus*-free-starter-culture is a promising strategy to produce safe Jangryu product with qualities of Korean tradition.

3. Analysis of Harmful Microbes and Product Quality Characteristics and Development of Technology for Long-Term Preservation of *B. cereus* free starter

Analysis of starter culture for RiBS1 showed negative results for all of *salmonella spp.*, *E. coli*, *stap. aureus*, *Cl. perfringenes* as well as *B. cereus*.

In free sugar content of bean *meju* made with the RiBS1 starter, fructose increased over time at inoculation temperature of 60°C, while glucose and maltose increased overall as fermentation progressed. However, sucrose was produced in the early fermentation stage, but decreased as fermentation progressed. In free sugar content of *cheonggukjang* made with the RiBS1 starter, fructose was produced in the early fermentation stage and decreased as fermentation progressed, while glucose in experimental groups cultured at 50°C rapidly increased as fermentation progressed. Overall, maltose increased until 48 hours of fermentation and then decreased. Fructose in square *meju* made with the RiBS1 starter decreased as fermentation progressed, while glucose increased in the early fermentation stage and rapidly decreased after 9 days of fermentation. Sucrose and maltose tended to increase during fermentation.

In organic acid in bean *meju* made with the RiBS1 starter, citric acid and succinic acid

increased as fermentation progressed. However, acetic acid decreased as fermentation progressed.

In the experimental group in which *cheonggukjang* made with the RIBS1 starter was fermented at 50°C and RIBS1 was inoculated at 0.1%, taurine was as twice high as in other experimental groups, and, as for square *meju*, in all experimental groups, taurine content was the highest.

β -amylase activity in bean *meju* and *cheonggukjang* increased as fermentation progressed. As for *cheonggukjang*, in an experimental group, the highest β -amylase activity was $1,881 \times 10^4$ unit, which was higher than bean and square *meju*.

A sensory test was conducted with 16 people regarding 36 *cheonggukjang* experimental groups, and the most preferred groups were Sample 2 (50°C, 24h 0.1% R+B) and Sample 4 (50°C, 48h 0.1% R).

Negative result was found in all harmful microbes of *cheonggukjang* experimental groups of bean and square *meju* made with the RIBS1 starter. As for biogenic amine, histamine was found in all experimental groups. *Cheonggukjang* experimental group contained 15.42mg/L, lower than the control group, 39.96 mg/L. As for square *meju*, in comparison to the control group, the experimental group for which only RIBS1 was used showed a low content, but it was the highest in the experimental group for which RIBS1 and *A. oryzae* was mixed. A small amount of tyramine was found in the square *meju* RA and RBA groups and the 24h fermentation control group of *cheonggukjang*. Cadaverine was not found in any experimental group.

Aflatoxin was not detected in all of the experimental groups of bean and square *meju* and *cheonggukjang*.

Of free sugars of *doenjang* developed by using the RIBS1 starter, in the 18th week, 0~557mg/L of maltose and 0~111 mg/L of glucose was detected, and fructose showed the highest content among free sugars, 904~2,553 mg/L.

Of free sugars of soy sauce developed by using the RIBS1 starter, although maltose and fructose contents were high, 333~667 mg/L and 2,453~4521 mg/L, respectively, during the early fermentations stage, they declined as fermentation progressed. In the 18th week of fermentation, 14.7 mg/L and 73.8 mg/L of glucose was detected in the R and RA groups, respectively.

Of organic acids of *doenjang*, the highest content of citric acid, 3,044 mg/L, was detected on the day of complete fermentation of the RA group. This was as twice high as that of the control group, BA, 1,336 mg/L. The succinic acid content was lower on the day of complete fermentation, 213~400mg/L, than the initial content. Lactic acid was the highest among detected organic acids, 11,745~15,766 mg/L, on the day of complete fermentation. Acetic acid increased on the day of complete fermentation, but was low, 858~1,145 mg/L, in comparison to the early fermentation, 873~1,590 mg/L.

Organic acids of soy sauce decreased overall as fermentation progressed. Citric acid content rapidly decreased, to 637~1,556 mg/L, on the day of complete fermentation.

Succinic acid content on the day of complete fermentation was 134~325mg/L, and lactic acid 10,356~14,410 mg/L, the highest among organic acids detected similarly to *doenjang*. Acetic acid contents, in RA and RBA experimental groups, were 485 mg/L and 950 mg/L. In the control and R experimental group, β -amylase activity of *doenjang* developed by using RIBS1 starter increased on the day of complete fermentation in comparison to the early fermentation stage, and, in RB and RBA experimental group, it was slightly lower on the day of complete fermentation than the early fermentation stage, with 761unit and 563unit, respectively. In the RB experimental group, β -amylase activity in soy sauce was 827unit, on the day of complete fermentation, about 2.7 times higher than the R experimental group, 302 unit. The RB experimental group showed the highest β -amylase activity in both *doenjang* and soy sauce.

In analysis of biogenic amine of *doenjang* and soy sauce developed by using RIBS1 starter, 349.8~469.0 mg/L of histamine was detected in *doenjang* and 284.3~309.9 mg/L in soy sauce, and , as for tyramine, 188.2~204.8 mg/L was detected in *doenjang* and 149.0~156.3 mg/L in soy sauce.

In pathogenic microbe analysis, in *doenjang*, negative results were found in pathogenic microbes like *salmonella spp.*, *E. coli*, *stap. aureus*, and *Cl. perfringenes*, and, *B. cereus* was found in the control group, and the RA, RBA experimental groups, except the R experimental group, but was below the standard of MFDS, 10^4 . In soy sauce, none of the pathogenic microbes was detected.

In *doenjang* and soy sauce developed by using the RIBS1 starter, no aflatoxin was found or detected in any of the experimental groups.

Analysis of pathogenic microbes of the ORIBS starter showed, like in RIBS1, negative results in all of the pathogenic microbes.

In *meju* developed by using the ORIBS starter, β -amylase activity was 462 units in the OR experimental group, 541 units in the ORA group, and 611 units on the day of complete fermentation of ORBA.

In biogenic amine analysis during the 12th week of fermentation of *meju* developed by using ORIBS starter, 4.0 mg/L of hitamine was detected in the ORA experimental group and none was detected in the control, OR, and ORBA groups.

In analysis of pathogenic microbes in *meju* developed by using the ORIBS starter, no pathogenic microbe was found or detected in all of the experimental groups.

In analysis of aflatoxin of *meju*, none was detected in the control group, while 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was detected in the OR experimental group, 0.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the ORA, and 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the ORBA.

In free sugars analysis of *cheonggukjang* developed by using the ORIBS starter, maltose content was the highest after 72 hours of fermentation, in the 40°C0.1% OR+B experimental group, with 5,158mg/L, which was more than 16 times higher than 50°C0.1% OR+B, 307mg/L, after 72 hours of fermentation.

Of organic acids of *cheonggukjang* developed by using the ORIBS starter, lactic acid

increased in the experimental group inoculated at 40°C as fermentation progressed, and decreased in the group inoculated at 50°C. Succinic acid content, at inoculation temperature of 50°C, after 48 hours of fermentation, was 265~532 mg/L, and increased to 594~914 mg/L after 72 hours of fermentation. At 40°C, the contents were similar between the 24 hours and 72 hours of fermentation.

Of biogenic amine of *cheonggukjang* developed by using the ORIBS starter, histamine content in the 50°C OR+B 0.5% experimental group was 42.1 mg/L, and in the 50°C OR 1% group 21.2 mg/L.

In analysis of pathogenic microbes of *cheonggukjang* developed by using the ORIBS starter, negative result was found in all of the pathogenic microbes. In analysis of aflatoxin of *cheonggukjang*, none or 0.0 µg/kg was found.

The overall free sugars content in doenjang developed by using the ORIBS starter decreased as fermentation progressed. Maltose content was the highest, 436 mg/L, in the OR experimental group during the 10th week of fermentation, and 108mg/L and 111mg/L in the control and ORBA experimental group respectively. Glucose content was 1,477mg/L in the ORA experimental group, and fructose content in the OR and ORA experimental groups 7630mg/L and 7366mg/L, respectively.

Free sugars content in soy sauce, similar to that of *doenjang*, decreased as fermentation progressed.

Lactic acid content in doenjang increased as fermentation progressed, and was 11,788 mg/L in the control group, 10,872 mg/L in the OR, 8,490mg/L in the ORA, and 9,495 mg/L. Acetic acid content was the highest in the ORA experimental group, 1,433 mg/L. However, succinic acid was not found in any experimental group.

Lactic acid content of soy sauce in experimental groups, except the control group, increased as fermentation progressed, and was the highest in the ORA experimental group, 11,840mg/L. Succinic acid, unlike doenjang, was detected in the control group and ORA experimental group, on the date of complete fermentation, 936mg/L and 3787mg/L, respectively.

In *doenjang* developed by using the ORIBS starter, β-amylase activity was the highest in the control group after 10 weeks of fermentation, 421 unit, and similar in other experimental groups, around 340~382 units. And, in soy sauce, the content was higher in the OR experimental group, 396 unit, than other experimental groups.

Of biogenic amine of *doenjang* developed by using the ORIBS starter, except 0.6 mg/L of histamine in the OR experimental group, no histamine was found in doenjang and soy sauce.

In analysis of pathogenic microbes, in experimental groups of both doenjang and soy sauce, negative results were found in *salmonella spp.*, *E. coli*, *stap. aureus*, and *Cl. perfringenes*. However, as for *B. cereus*, in the doenjang OR and ORA experimental groups, 4.2×10^4 and 3.1×10^4 CFU/mL were detected respectively, and, in the soy sauce ORA experimental group, 3.2×10^2 CFU/mL.

In analysis of aflatoxin in doenjang and soy sauce developed by using the ORIBS starter, none was detected in any of the experimental group.

CONTENTS

Production of Prototype and Commercialization of Fermentation and Production Method of Cheonggukjang, Doenjang, and Soy Sauce Using Straw-Derived Starter Culture

Chapter 1. Overview of Research	31
Chapter 2. Current Status of Research	33
Chapter 3. Results and Discussion	34
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives	152
Chapter 5. Application of Research	153
Chapter 6. References	155

Develop a Rice Straw-derived Bacillus cereus-free Starter Culture and scale up

Chapter 1. Overview of Research	161
Chapter 2. Current Status of Research	166
Chapter 3. Results and Discussion	169
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives	191
Chapter 5. Application of Research	192

Analysis of Harmful Microbes and Product Quality Characteristics and Development of Technology for Long-Term Preservation of *B. cereus* free starter

Chapter 1. Overview of Research	195
Chapter 2. Current Status of Research	202
Chapter 3. Results and Discussion	204
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives	258
Chapter 5. Application of Research	259
Chapter 6. References	260

목 차

벗짚 유래 Starter culture를 이용한 청국장, 된장 및 간장 발효·숙성 공정확립 및 시제품 생산, 상품화

제 1 장 연구개발과제의 개요	31
제 2 장 국내외 기술개발 현황	33
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	34
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	152
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	153
제 6 장 참고문헌	155

벗짚 유래 *B. cereus* free starter culture의 개발 및 scale up

제 1 장 연구개발과제의 개요	161
제 2 장 국내외 기술개발 현황	166
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	169
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	191
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	192

위해미생물 및 제품품질특성분석과 개발된 *B. cereus* free starter의 장기보존 기술 개발

제 1 장 연구개발과제의 개요	195
제 2 장 국내외 기술개발 현황	202
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	204
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	258
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	259
제 6 장 참고문헌	260

**제1세부 : 벗짚 유래 Starter culture를 이용한 청국장,
된장 및 간장 생산공정확립 및 시제품 생산**

주관연구기관명 : 농업회사법인순창장류(주)

주관연구책임자 : 김 중 필

세부연구책임자 : 김 중 필(세부1)

제1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 목적

*Bacillus cereus*만이 특이적으로 제거된 벗짚 유래 starter culture를 제공 받아 청국장 및 메주를 제조하고 기존 제품과 개발 제품과의 발효패턴을 비교하여 분석하고, 장류의 기본인 메주를 활용하여 된장, 간장을 제조하여 숙성연구를 통해 제품의 품질특성을 비교분석함으로써 위생적인 장류 발효공정기술을 정립하고자 하였으며, 제품의 묘사분석 및 소비자 기호도 조사를 실시함으로써 판매 전략을 수립하고 마케팅 판매소구점을 확보하고자 하였다.

2절 연구개발의 필요성

최근 들어 전통식품에 대한 새로운 인식과 관심이 되살아남에 따라 전통 발효식품에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 콩은 단백질과 지방질이 풍부하고 isoflavone, saponin, phytic acid, oligosaccharides 등 만성질환 및 성인병에 효과가 있는 기능성 성분이 많이 함유되어 있어 발효식품에 있어서 콩의 이용에 대한 관심이 높아지고 있다. 대표적인 한국 고유의 콩 발효식품인 청국장, 된장, 간장 등 우리나라의 전통 장류는 생산량 기준 국민다소비 식품에 속하며, 국민다소비 식품순위로는 1위 밀가루, 2위 설탕을 비롯하여 고추장 31위, 된장 46위, 쌈장(혼합장) 50위 등 100대 국민다소비 식품 중 장류식품이 차지하는 비중이 높음을 알 수 있다. 또한 장류식품 총 연간 생산량이 604,442톤에 이르며, 국내 출하액이 836,849,803천원에 이르는 등 큰 비중을 차지하고 있다. 산업적인 측면에서 장류 식품 전체의 시장 점유율은 조미식품 품목 중 30% 이상이며, 항암활성, 고혈압 예방 등 그 기능성이 알려진 뒤 꾸준히 증가하는 추세에 있다(Mah, 2012). 이렇듯 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.

Table 1. 생산량 기준 국민 다소비 식품

순위	식품 품목명	생산량(T)	국내 출하액(천원)	수출액(\$)
28	혼합간장	155,794	150,827,743	4,181,005
31	고추장	149,174	293,603,160	14,237,967
46	된장	81,331	98,633,324	2,741,676
50	쌈장(혼합장)	74,207	123,914,443	2,719,559
52	양조간장	65,831	99,108,753	3,014,656
57	산분해간장	60,222	32,873,257	110,778
96	한식된장	17,883	37,889,123	1,466,465
총계		604,442	836,849,803	28,472,106

자료 : 한국식품공업협회(2010)

전통메주의 제조는 대두를 증자 한 후 벧짚과 공기 중의 미생물을 자연적으로 접종되게 하여 1~2개월 발효시키는 과정에서 대두의 단백질 및 당류 성분이 별도의 가공 처리 없이 분해시키는 공정으로 생성된 아미노산, 당 및 유기산 등의 성분손상이 적으며 숙성 후에 분리된 된장도 전량 이용할 수 있어 원료의 이용률이 높은 특징을 가지고 있다. 그러나 장의 메주 제조 과정 중에는 자연 상태에서 유래된 수십 종의 사상균과 세균들이 복합적으로 작용하므로 제품의 표준화가 어렵고, 완제품인 된장과 간장이 되기까지 제조기간도 약 6~12개월이 소요되고 대량생산 판매하기에는 위생적 문제가 걸림돌로 작용하고 있다. 대량생산시스템으로 생산되는 공장 장류의 경우, 사용하는 발효균을 자체적으로 분리 동정하거나 종균 외부에서 구입하여 단일균 또는 단일균 발효 알메주를 혼합하여 사용함으로써 품질균일화 문제를 해결하고 있다.

그러나 많은 소비자는 여전히 전통장류에 대한 기호를 나타내고 있어 일부 전통장류를 매입하여 혼합함으로써 공장산 장류의 관능적 문제점을 보완하고 있다. 이렇듯 전통장류와 공장산 장류의 품질차이는 여전히 존재하고는 있으나 전통장류의 경우, 앞에서 언급하였듯이 품질표준화가 되지 않기 때문에 대량생산한다거나 소비자에게 신뢰를 줄 수 있는 관능을 가지기 어렵다는 문제점을 내포하고 있다.

본 연구에서는 이러한 현상을 극복하고자 벧짚 자체에 있는 다양한 미생물을 자체로 배양하고 계대배양이나 세대가 지나더라도 일정한 균 총을 유지할 수 있는 배양액을 제조함으로써 전통장의 맛을 내고 제조일정에 따라 발효정도가 큰 편차를 포이지 않는 일정한 메주를 제조할 수 있는 방법을 찾으며, 품질기준 또한 전통메주를 연구한 문헌과 경험을 토대로 전통장류의 맛을 과학적으로 재현하고자 하였다.

제2장 국내외 기술개발 현황

장류는 자연에서 유래한 수십 종의 곰팡이와 세균이 복합적으로 서식하며, 발효 및 숙성 과정에서 이들의 대사 작용에 의하여 특유의 맛과 향을 내므로 미생물과 이들의 대사산물에 의한 오염 및 식중독 등 식품 안전 측면에서는 위험성을 안고 있다. 현재 장류에 관한 연구는 다소 미진한 편이며, 장류식품의 발효관련 미생물의 기능성 및 발효공정에 관한 연구가 대부분으로 특히 위해미생물과 관련된 안정성에 대한 연구와 인식은 미진한 상태이다(Mah, 2012). 이에 따라 최근 식약청은 장류식품에서 유해 미생물인 *Bacillus cereus*의 정량 기준을 도입해 미생물 관리를 실시하고 있으나 제품에서 *Bacillus cereus*가 해당 기준을 초과하는지에 대한 정보 및 *Bacillus cereus* 이외 기타 다른 유해 미생물의 오염도에 관한 정보는 미흡한 실정으로 이에 대한 연구가 필요하다(Sun et al., 2008; Rho et al., 2008).

또한 장류에서 분리한 유해 미생물들을 제어할 수 있는 발효 균주의 개발에 관한 선행연구는 이루어진 상태이나 이를 이용하여 전통장류 제품을 개발하는 연구는 거의 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 볏짚 유래 *Bacillus cereus* free starter culture(Rice straw Based Starter, RiBS1)를 이용한 청국장, 메주, 된장 및 간장 시제품을 개발하여 현재 전통장류에서 가장 큰 문제로 대두되고 있는 *Bacillus cereus* 및 유해세균을 특이적으로 제어하면서 구수한 맛과 향이 증진되어 기호도가 향상된 장류제품을 제조하는 데 있다.

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 RiBS1 적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 발효공정 확립

1. 재료 및 방법

가. 재료

(1) 원재료

순창에서 생산되고 있는 대두(백태)를 사용하여 본 실험의 재료로 이용하였으며, 천일염은 신안에서 생산되고 있는 제품을 이용하였다.

(2) 균주

본 실험에서 사용된 균주는 본사에서 사용하고 있는 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027와 충무발효(주) 곰팡이를 사용하였으며, 제1협동인 전북대학교에서 *Bacillus cereus*만이 특이적으로 제거된 벗짚 유래 starter culture인 RiBS1균주를 받아 실험에 이용하였다.

나. 장류 제조방법

(1) 접종량에 따른 청국장 제조 방법

선별한 대두를 5회 세척 하여 물에 6시간 침지한 후 30분 동안 탈수를 하여 autoclave에서 121℃에서 20분 동안 증자하였다. 증자된 대두는 별도의 성형과정 없이 사각소쿠리에 6kg씩 담아 RiBS1을 증자 전 대두 무게의 0.05%, 0.1%, 0.15%로 접종농도를 다르게 하여 각각 접종하였고, 대조군은 순창장류에서 기존 사용하고 있는 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027을 증자 전 대두 무게의 0.1% 접종하였다. 대조군 및 실험군의 접종온도는 60℃로 동일하게 하였고, 발효온도는 40℃, 발효습도는 80%로 72시간동안 배양하였다.

(2) 접종온도에 따른 청국장 제조 방법

선별한 대두를 5회 세척 하여 물에 6시간 침지한 후 30분 동안 탈수를 하여 autoclave에서 121℃에서 20분 동안 증자하였다. 증자된 대두는 별도의 성형과정 없이 사각소쿠리에 6kg씩 담아 50℃, 60℃, 70℃로 접종농도를 다르게 하여 RiBS1을 증자 전 대두 무게의 0.15%로 동일하게 접종하였다. 대조군으로 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 실험군과 동일하여 접종하였으며 발효온도 30℃, 발효습도 80%로 72시간동안 배양하였다.

(3) 청국장 제조 방법

대두를 선별 후 세척 하여 물에 6시간 동안 수침시킨 후 30분 동안 탈수하였다. 121℃에서 20분 동안 증자하여 RiBS1을 증자 전 대두 무게의 0.1%와 1%를 각각 접종하였고, RiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM100027을 각각 0.05%, 0.5% 혼합하여 접종하였고, 발효온도는 40

℃와 50℃로 하였다. 대조군으로 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027을 증자 전 대두 무게의 0.1% 접종하였고 발효온도는 기존 40℃로 하였다. 대조군 및 실험군의 접종온도는 최종선정 온도인 60℃로 동일하게 하였고, 발효습도는 80%로 72시간동안 배양하였다. RiBS1청국장 제조에 이용한 대조군 및 실험군 목록은 Table 2 와 같다.

Table 2. RiBS1청국장 제조에 이용한 대조군 및 실험군 목록

	발효온도 (℃)	접종량 (%)	균주	접종온도 (℃)
대조군	40	0.1	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027	60
실험군1	40	0.1	RiBS1	60
실험군2	40	0.1	RiBS(0.05%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027(0.05%)	60
실험군3	40	1	RiBS1	60
실험군4	40	1	RiBS(0.5%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027(0.5%)	60
실험군5	50	0.1	RiBS1	60
실험군6	50	0.1	RiBS(0.05%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027(0.05%)	60
실험군7	50	1	RiBS1	60
실험군8	50	1	RiBS(0.5%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027(0.5%)	60

(4) 접종온도에 따른 알메주 제조 방법

선별한 대두를 5회 세척 하여 물에 6시간 침지한 후 30분 동안 탈수를 하여 autoclave에서 121℃에서 20분 동안 증자하였다. 증자된 대두는 별도의 성형과정 없이 사각소쿠리에 6kg씩 담아 50℃, 60℃, 70℃로 접종농도를 다르게 하여 RiBS1을 증자 전 대두 무게의 0.05% 접종하고 곰팡이는 증자 전 대두 무게의 0.1%씩 각각 접종하여 total volume을 0.15%로 맞추었다. 대조군으로 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027와 곰팡이를 실험군과 동일하여 접종하였으며, 기존 접종온도 60℃로 하였고, 발효온도 30℃, 발효습도 80%로 72시간동안 배양하였다.

(5) 사각메주 제조 방법

선별한 대두를 3회 세척한 후 대두와 물을 1 : 3비율로 15시간 침지한 후 2시간 동안 탈수를

하여 NK증자기에서 115℃에서 10분 동안 증자하였다. 삶은 대두는 컨베이어벨트를 이용하여 이동된 후 최종선정 접종온도인 60℃로 동일하게 하여 RiBS1 및 혼합한 균(RiBS+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027)을 증자 전 대두 무게의 0.05% 접종시키고, 곰팡이는 증자 전 대두 무게의 0.1%씩 각각 접종하여 total volume을 0.15%로 맞추었다. 대조균으로 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027와 곰팡이를 실험균과 동일하여 접종하여 성형하였다. 만들어진 사각메주는 24시간 동안 60℃의 건조실에 보관되어진 후 발효온도 30℃, 발효습도 80% 발효실로 옮겨 15일 간 발효하였다. RiBS1메주 제조에 이용한 대조균 및 실험균 목록은 Table 3과 같다.

Table 3. RiBS1메주 제조에 이용한 대조균 및 실험균 목록

균주명 (접종량)	
대조균 (이하 BA)	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027 (0.05%) Aspergillus oryzae (0.1%)
실험균1 (이하 R)	RiBS1 (0.15%)
실험균2 (이하 RA)	RiBS1 (0.05%) Aspergillus oryzae (0.1%)
실험균3 (이하 RBA)	RiBS1 (0.05%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027 (0.05%) Aspergillus oryzae (0.05%)

(6) 메주 염수 침지 및 된장, 간장 제조 방법

된장 및 간장의 제조는 염수(25%)를 제조하여 메주 : 염수의 비율이 1 : 2가 되게 메주에 부여하였다. 약 7주 정도 침지 후 된장과 간장으로 분리하여 12주간 숙성하였다.

다. 실험방법

(1) 수분측정

수분함량은 시료를 채취하여 믹서기로 마쇄 후 적외선 수분측정기(Kett, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(2) pH 및 적정산도 측정

시료를 채취하여 믹서기로 마쇄 후 무게 5g을 취하고 증류수를 가하여 50mL로 맞춘 후 이

를 충분히 혼합한 후 pH meter(Mettler Toledo GmbH, Switzerland)기를 이용하여 측정하였고, 적정산도는 0.1N-NaOH를 가하여 pH 8.4가 될 때 까지 적정하였다.

$$\text{적정산도(\%)} = \frac{0.1\text{N-NaOH적정량} \times 0.009(\text{젓산}) \times F \times \text{희석배수} \times 100}{\text{시료량(g)}}$$

(3) Protease활성 측정

Protease 활성도의 측정은 Anson의 방법을 변형하여 측정하였다(Yu, 1984). 시료 10 g을 취하고 증류수를 가하여 100 mL로 정용한 후 30 °C에서 150 rpm으로 1시간 진탕하여 추출한 여과액을 조효소액으로 하였으며, 효소액 0.5 mL, mcIlivine씨 완충액 1 mL, 2% milk casein 0.5 mL를 첨가한 후 38°C에서 1시간 반응시킨 다음, 0.4 M trichloro acetic acid (TCA) 3 mL를 가하고 38 °C에서 20분간 방치하여 반응을 중지시켰다. 반응중지액을 여과하여 얻은 여액 1 mL에 0.4 M Na₂CO₃ 5 mL와 2배 희석한 Folin phenol 시약 1 mL를 가하여 반응시켜 38 °C 항온수조에서 30분간 발색시킨 후 660 nm에서의 흡광도(U-5100, Hitachi, Japan)를 측정하였다. 표준곡선은 L-tyrosine용액을 사용하였으며, 이때 효소활성은 1분 동안 생성되는 1 μg의 tyrosine의 양을 1 unit으로 하였다.

(4) 아미노태 질소(amino-type nitrogen) 측정

아미노태 질소는 Formol법으로 측정하였다(Shin, 1996). 시료 1g을 비커에 취하고 증류수 50mL를 가하고 240초 동안 진탕 혼합하여 충분히 용해한 다음 0.1N-NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4로 한다. 여기에 중성 formalin 20mL를 가하고 20초 동안 진탕 혼합한 뒤 다시 0.1N-NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화·적정하였다.

$$\text{아미노태질소(mg\%)} = \frac{0.1\text{N-NaOH적정량} \times 1.401 \times F \times \text{희석배수} \times 100}{\text{시료량(g)}}$$

(5) 당도 측정

시료 0.5ml를 취한 후 당도계(ATAGO, PAL-1)를 이용하여 측정하였다.

(6) 염도 측정

시료 10g에 증류수 90ml를 가하여 1분 동안 교반 후 염도계(ATAGO, TM-30D)로 측정하였다.

(11) 총질소 측정

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

(12) L값 측정

색차계(MINOLTA, CR-400)를 이용하여 측정하였다.

(13) 청국장 점질물 함량 측정

청국장에 4배의 증류수를 첨가하여 30분 간 진탕하고 여과 후 원심분리(10,000×g, 15min)하여 상등 액을 건조하여 그 함량을 측정하였다(Youn et al., 2001).

2. 연구 결과

가. RiBS1 접종량에 따른 청국장 특성 연구

개발 starter culture인 RiBS1이 접종량을 달리하였을 때 발효기간에 따라 어떠한 특성이 나타나는지 알아보려고 하였다. 증자한 대두에 기존 본 사 *Bacillus licheniformis* SRCM010002의 접종량인 0.05%를 기준으로 2배, 3배 증가한 0.1%, 0.15%로 접종량을 다르게 하였으며, 실험결과는 Table 4, Table 5, Table 6 그리고 Table 7에 나타내었다. 0.05%는 메주발효 시 *Bacillus*속의 접종량이며, 0.1%는 청국장 발효, 0.15%는 메주발효 시 황국균과 *Bacillus*속 사용량에 해당한다.

대조군과 실험군 모두 수분함량은 감소하였으며 pH 및 protease activity(PA), 아미노태 질소(AN)함량은 증가하는 경향을 보였고, 적정산도는 발효48시간에서 0.05%와 0.1% 접종한 실험군을 제외하고 약간 증가하였으나 큰 차이는 없었다. 0.15% 접종한 실험군의 PA와 AN함량이 높음이 관찰되었으나 전체적으로 접종농도별로 큰 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 4. 대조군 균을 이용하여 제조한 청국장 특성

대조군	분석항목				
	수분함량(%)	Protease activity (unit/g)	pH	적정산도 (%)	Amino-type nitrogen (mg%)
발효 24시간	57.8	37.0	6.8	1.0	275.2
발효 48시간	49.6	67.8	7.6	0.8	587.2
발효 72시간	37.0	110.5	7.6	1.0	906.2

* *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 0.05%

Table 5. RiBS1를 0.05% 접종하여 제조한 청국장 특성

실험군 1	분석항목				
	수분함량(%)	Protease activity (unit/g)	pH	적정산도 (%)	Amino-type nitrogen (mg%)
발효 24시간	58.0	34.6	6.8	1.0	263.0
발효 48시간	48.9	113.8	7.4	0.9	671.2
발효 72시간	33.6	122.3	7.4	1.0	928.0

* RiBS1 0.05%

Table 6. RiBS1를 0.1% 접종하여 제조한 청국장 특성

실험군 2	분석항목				
	수분함량(%)	Protease activity (unit/g)	pH	적정산도 (%)	Amino-type nitrogen (mg%)
발효 24시간	56.6	46.8	6.8	1.1	269.6
발효 48시간	43.8	122.5	7.3	1.0	673.9
발효 72시간	27.6	122.3	7.4	1.1	885.1

* RiBS1 0.1%

Table 7. RiBS1를 0.15% 접종하여 제조한 청국장 특성

실험군 3	분석항목				
	수분함량(%)	Protease activity (unit/g)	pH	적정산도 (%)	Amino-type nitrogen (mg%)
발효 24시간	56.8	68.4	6.7	1.2	285.6
발효 48시간	44.4	137.1	7.3	1.1	750.5
발효 72시간	26.0	139.8	7.3	1.2	960.1

* RiBS1 0.15%

나. RiBS1 접종온도에 따른 청국장 특성 연구

초기 접종온도는 다양한 균 총을 형성하고 있는 RiBS1에서 각 균의 생멸과 활성시기를 조절할 수 있는 조건으로 청국장 발효의 특성을 결정짓는 주요한 인자이다. 그러므로 본 실험에서는 현재 실 공정에서 진행되고 있는 기본 조건과 RiBS1의 접종온도가 발효에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 접종온도는 순창장류의 기본 접종온도인 60℃를 기준으로 상하로 두어 50℃, 60℃, 70℃로 실시하였으며, 실험결과는 Table 8와 Table 9 그리고 Table 10과 Table 11에 나타내었다. 발효시간이 경과할수록 수분함량은 감소하였으며, pH는 약간 감소하였다가 증가하는 경향을 보였고, PA와 AN은 증가하였으며, 적정산도는 약간 증가하다가 감소하는 경향을 보였다. 특히적으로 대조군과 70℃로 접종한 실험군, 그리고 50℃로 접종한 실험군과 60℃로 접종한 실험군이 비슷한 경향을 보였다.

(1) 수분함량

수분함량은 대조군을 제외한 접종온도 별 실험군이 72시간에서 29.9%까지 급격히 감소하였는데 이는 72시간에서 걸 부분뿐만 아니라 안까지 대부분 건조된 상태를 보이므로 나타난 결과로 보여지며, 또한 48시간에는 약간 증가하였는데 이는 내부 자체의 습도로 인해 수분함량이 증가한 것으로 보여진다.

(2) Protease activity

Protease activity(PA)의 경우 모든 조건에서 발효 기간이 경과함에 따라 증가하였고, 특히 50℃접종 실험군과 60℃접종 실험군의 PA함량이 125.6 unit/g의 함량을 나타내었고, 대조군과 70℃접종 실험군은 각각 84.9 unit/g, 67.7 unit/g을 나타냈다.

(3) pH

pH는 발효 48시간이 되었을 때 각 실험군의 차이가 최대 0.6 까지 낮지만 72시간에는 실험군의 평균값이 비슷하게 나왔음을 확인 할 수 있다. 또한 발효초기에 약간 감소하였다가 증가함을 볼 수가 있는데, 이는 발효초기에 젖산균이 증식하여 감소하는 경향을 보인 것으로 추정되고 pH가 다시 증가한 경향은 발효과정을 거치면서 단백질이 분해되어 질소화합물의 양이 증가함에 따라 변한 것으로 추정된다.

(4) 적정산도

적정산도 함량은 접종온도별로 최소 0.1% 에서 최대 0.4% 까지 증가하다가 발효가 진행됨에 따라 최소 0.4% 에서 최대 0.8% 까지 감소하였는데, 이는 상대적으로 48시간이 경과한 후 후 발효가 진행됨에 따라 암모니아 생성이 많아지는 것으로 추정된다.

(5) 아미노태 질소(amino-type nitrogen)

실험군 별 아미노태 질소 함량의 경우 전체적으로 증가하는 경향을 보였는데, 대조적으로 PA함량이 가장 높았던 50℃접종 실험군과 60℃접종 실험군이 가장 낮게 나타남을 보였다. 이

는 Eom 등(2009)이 아미노태 질소 함량이 단백질분해 효소의 활성화에 의하여 결정된다고 보고한 결과와는 다른 결과를 나타내었다.

Table 8. 대조군 균을 이용하여 기존 접종온도로 접종한 청국장 특성

대조군	분석항목				
	수분함량(%)	Protease activity (unit/g)	pH	적정산도 (%)	Amino-type nitrogen (mg%)
발효 24시간	56.0	0	6.8	0.8	110.7
발효 48시간	55.1	51.5	6.9	1.0	428.6
발효 72시간	51.0	84.9	7.6	0.6	737.3

* *Bacillus licheniformis* SRCM0100027접종온도 60℃

Table 9. 50℃로 접종한 RiBS1의 청국장 특성

RiBS1 50℃	분석항목				
	수분함량(%)	Protease activity (unit/g)	pH	적정산도 (%)	Amino-type nitrogen (mg%)
발효 24시간	53.8	0.1	6.6	1.0	101.7
발효 48시간	55.0	42.9	6.5	1.2	361.5
발효 72시간	29.9	125.6	7.6	0.4	349.3

Table 10. 60℃로 접종한 RiBS1의 청국장 특성

RiBS1 60℃	분석항목				
	수분함량(%)	Protease activity (unit/g)	pH	적정산도 (%)	Amino-type nitrogen (mg%)
발효 24시간	54.3	1.3	6.8	0.6	125.6
발효 48시간	53.4	82.4	6.9	1.0	443.5
발효 72시간	37.8	125.6	7.7	0.5	579.7

Table 11. 70℃로 접종한 RiBS1의 청국장 특성

RiBS1 70℃	분석항목				
	수분함량(%)	Protease activity (unit/g)	pH	적정산도 (%)	Amino-type nitrogen (mg%)
발효 24시간	55.9	0	6.8	0.8	171.9
발효 48시간	57.5	49.6	7.1	0.9	561.5
발효 72시간	49.7	67.7	7.6	0.5	830.7

다. RiBS1을 이용한 청국장 발효 연구

청국장은 대두를 원료로 하여 *Bacillus*속 세균으로 단기간 발효시킨 우리나라의 대표적인 전통식품으로 영양가가 높고, 고혈압 방지 및 지질대사 개선효과, 함암성, 항산화성, 혈전 용해능 등과 같은 기능성을 가진 것으로 알려지면서 건강식품으로 관심이 높아지고 있다(Choi et al, 2010). 그러나 전통청국장은 각 지방 또는 가정마다 제조 방법이 일정하지 않아 품질이 균일하지 못하며, 볏짚을 이용하였을 때 토양에 분포하고 있는 *B. cereus*의 위험에 노출되어 있다. 볏짚을 사용한 위생문제를 개선하기 위해 종균으로 사용할 우수 균주에 대한 연구가 수행되고 있으며, 종균의 사용에 따라 위생적인 청국장을 생산할 수 있으나 풍미를 재현하기에는 부족한 실정이다. 우리나라 청국장에 관한 연구는 전통 청국장에서부터 발효균을 분리하는 연구와 청국장 유래 미생물의 기능적 특성에 관한 연구, 전통청국장의 모니터링 등에 관한 연구가 주를 이룬다. 특히, *Bacillus*속 위주의 단발효 연구가 대부분으로 전통발효방법인 볏짚을 이용하여 제조한 연구는 Kim 등(1982)의 연구 이외에는 찾아보기 힘든 실정이다. 아마도 이러한 전통청국장 제조에 관한 연구가 다양하게 존재하지 않는 이유는 관능적 특성의 일관성과 내적품질요소를 고려한 표준화가 어렵기 때문일 것이다. 본 연구가 볏짚을 이용하여 배양되었고 세대별 균총이 일정하게 유지되는 RiBS1에 관심을 가지는 이유도 여기에 있다.

따라서 풍미와 위생성이 동시에 요구되는 청국장의 제조를 위해 개발된 starter culture의 발효온도 및 접종량을 달리하여 차이가 있는지 알아보았다. 기존 청국장의 발효 온도는 40℃로 *Bacillus*속이 가장 잘 자랄 수 있는 환경이며, 여기에 50℃로 온도 변화를 주어 고온에서 생육 가능한 균들만 자랄 수 있도록 환경 조건을 제시하였고, 기존의 양인 0.1%에서 1%로 10배 변화를 주었을 때 관능적인 면에서 긍정적인 변화를 미칠 것으로 예상하여 조건을 동시에 진행하였다. 또한, 개발 starter culture와 본사에서 사용하고 있는 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 혼합하여 불확실한 면을 보완하도록 하여 대조균을 포함한 총 9가지 조건으로 실험을 하였다(Figure 1). 실험 결과, 발효온도에 따라 발효양상이 다른 것을 확인할 수 있었지만 접종량에 대해서는 점질물의 생성 및 물성 등의 발효형태의 차이는 보이지 않았다.

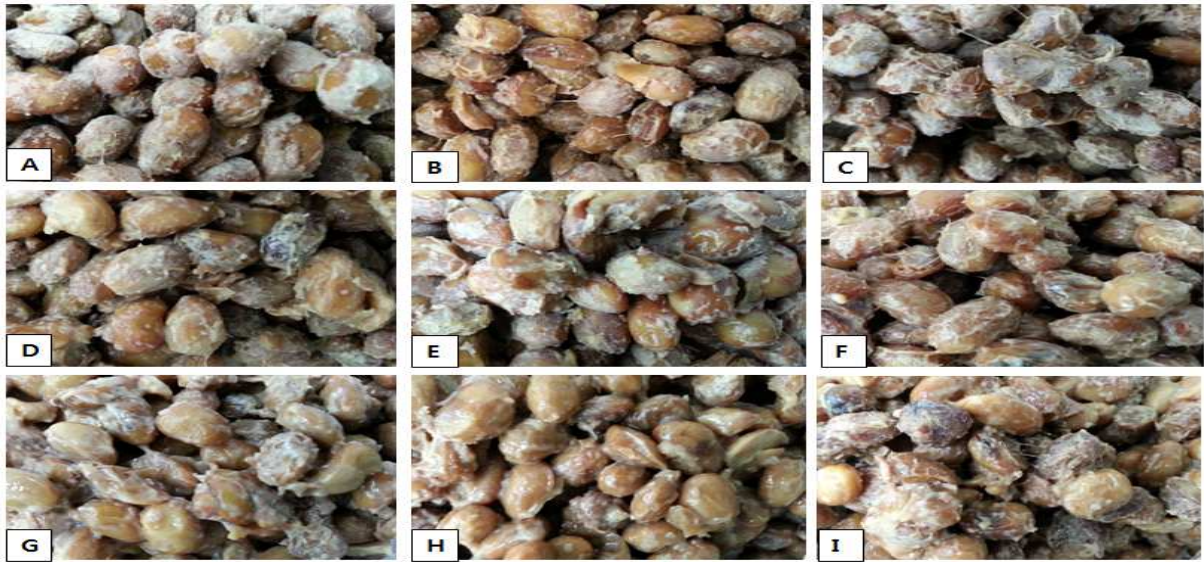


Figure 1. RiBS1 청국장 발효48시간 사진

- * A: 대조구(*Bacillus licheniformis* SRCM0100027 0.1%, 40℃)
- * B: RiBS1(이하 'R') 0.1%, 40℃
- * C: RiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027(이하 "RB") 0.1%, 40℃
- * D: RiBS1 1%, 40℃
- * E: RiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027 1%, 40℃
- * F: RiBS1 0.1%, 50℃
- * G: RiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027 0.1%, 50℃
- * H: RiBS1 1%, 50℃
- * I : RiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027 1%, 50℃

(1) 수분함량

청국장 발효 중 수분함량 변화를 측정한 결과는 Figure 2와 같다. 발효 초기에는 비슷하게 유지 되다가 발효 48시간 이후로 온도 별로 차이가 나기 시작하여 발효 72시간에 유의적으로 감소하는 경향을 보였는데 이는 발효 중 수분 증발로 인한 건조가 이루어졌기 때문이라고 생각된다. 또한 전반적으로 50 ℃의 발효 조건에서 수분 감소량이 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었으며 이는 Ko 등(2012)이 보고한 국내 시판청국장의 수분함량의 분석결과와 유사한 결과를 보였다. 한편 처리구마다 약간의 차이를 보이는 것은 건조가 빠르게 일어나는 겉면의 샘플 채취 여부로 판단되어진다.

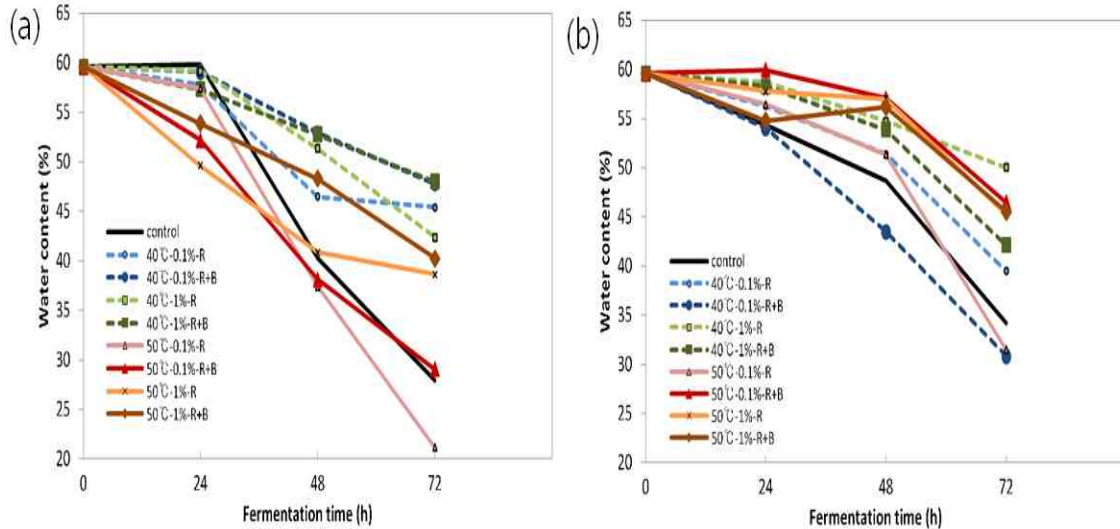


Figure 2. 발효기간에 따른 청국장 수분 함량 변화, (a)1차, (b)2차

(2) Protease activity

Protease는 콩 단백질을 분해하여 감칠맛 성분인 아미노산과 polypeptide 등을 생성하므로 청국장의 맛을 결정짓는 인자 중의 하나이다(Lee et al., 2013). 청국장의 protease활성을 조사한 결과, 실험군은 발효기간에 따라 증가하였으나, 조건에 따라 대조군과 상당한 차이를 나타내었다 (Figure 3). 대조군은 발효 24 시간 만에 평균 61.6 unit/g을 나타낸 이후 점차 증가하여 발효 72시간에는 평균 143.1 unit/g을 나타내었다. 반면 이 기간에 40 °C의 실험군은 67.2 unit/g으로 50%가량 낮은 활성을 보였고, 50°C의 실험군은 38.1 unit/g으로 가장 낮은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 Kim 등(1982)이 벧짚을 이용하여 제조한 청국장의 발효과정 중 protease 활성 변화에서 40 °C에서 발효시킨 청국장이 50 °C보다 다소 높은 활성을 보인다고 보고한 결과와 유사하였다. 또한 균주를 달리한 청국장의 발효48시간 쯤 protease 활성이 90.97-117.19 unit이라 보고한 Baek 등(2008)의 결과 보다 다소 낮은 활성을 나타내었다. 본 결과에서와 같이 대부분의 측정항목들은 발효온도별로 차이가 있으나 점종량별 로는 확연한 차이가 보이지 않았음을 확인할 수 있었다.

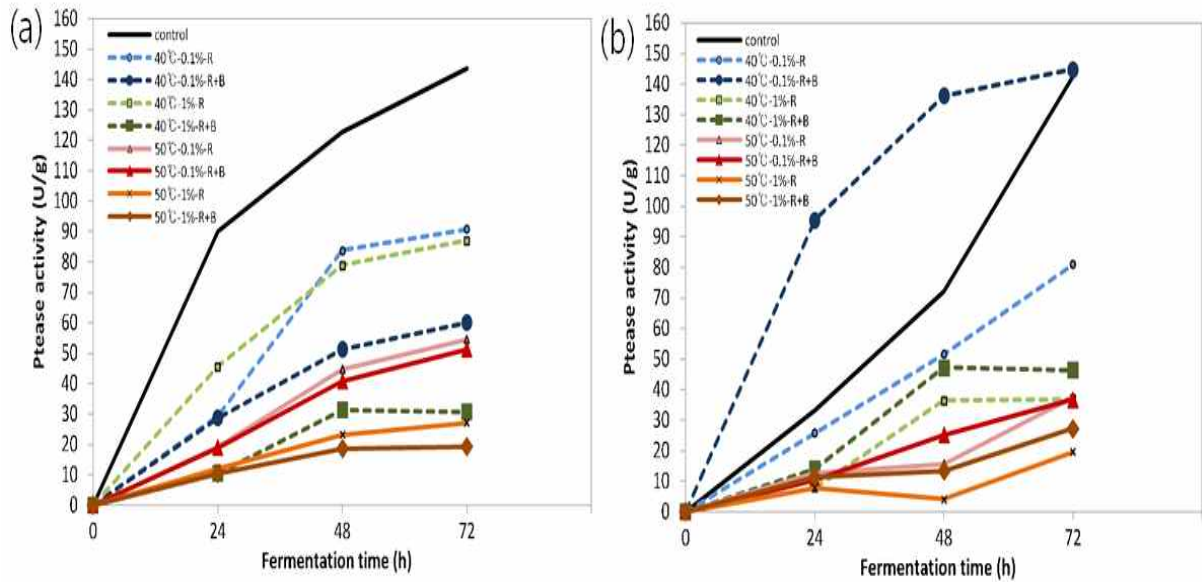


Figure 3. 발효기간에 따른 청국장 protease activity 변화, (a)1차, (b)2차

(3) pH

발효시간에 따른 pH의 변화를 관찰한 결과, 발효 24시간에는 중성 영역을 나타내다가 발효 시간이 경과함에 따라 알칼리 영역으로 전환됨을 알 수 있었다(Figure 4). 40°C 실험군의 경우 pH 6.2-7.8, 50°C 실험군의 경우 pH 6.5-7.9의 범위를 나타내어 발효에 따른 큰 차이를 보이지 않았지만 대조군 pH 6.2-7.5의 범위보다 약간 높은 결과를 나타내었다. 이는 발효온도가 높을수록 청국장이 알칼리 영역으로 전환되었다는 연구결과(Lee et al., 2013)와 유사하며, Kim 등(1982)이 40°C와 50°C에서 각각 48시간 발효시켰을 때 50°C에서 발효시킨 청국장 시료가 다소 높은 pH를 나타냈다는 결과와 유사하였다. 또한 Sung 등(1984)은 36±1°C로 발효시킨 청국장의 pH가 6.6-8.0의 중성 및 알칼리 영역의 pH를 보인다고 보고하여 40°C로 발효시킨 본 실험 결과보다 약간 높은 결과를 보였으며 50°C로 발효시킨 본 실험결과와 유사하였다. 한편 Youn 등(2002)은 증자한 대두에 *Bacillus*속 균주를 접종했을 때 발효초기에는 pH 6.13-6.21를 유지하다가 발효 후기에는 pH 8을 넘었다고 보고 하였다. 청국장의 pH가 알칼리로 전환되는 것은 콩 단백질이 아미노산으로 분해되고, 탈 아미노화로 암모니아가 생성되기 때문인 것으로 알려져 있다(Ann, 2011).

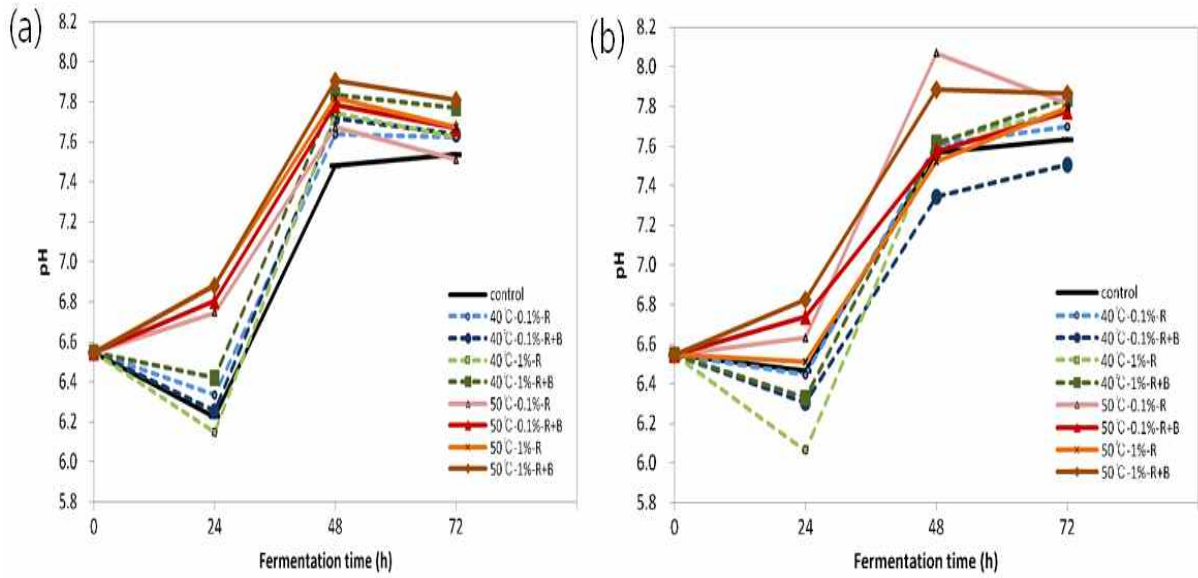


Figure 4. 발효기간에 따른 청국장 pH 변화, (a)1차, (b)2차

(4) 적정산도

적정산도는 Figure 5와 같이 40°C 실험군의 경우 대조군과 비슷한 경향을 보였는데, 발효24시간에 0.9-1.4%로 급속히 증가하다가 48시간에 0.4-0.9%로 약 45% 감소하였고, 이후로 큰 변화는 없었다. 50°C 실험군은 이보다 낮은 결과를 나타내었는데, 발효24시간에 0.6-0.8%로 약간 증가하다가 48시간에 0.2-0.6%로 감소하였고 이후로 큰 변화는 보이지 않았다. 실험군 모두 발효시간이 경과함에 따라 서서히 감소하는 경향을 보였으며, 이같이 발효가 진행될수록 알칼리성을 나타낸 것은 Joo(1971)와 Seo 등(1983)의 보고에서와 같이 단백질이 아미노산으로 분해되고 탈 아미노화로 암모니아가 생성되어서 pH는 높아지고 산도가 낮아지는 것으로 보인다.

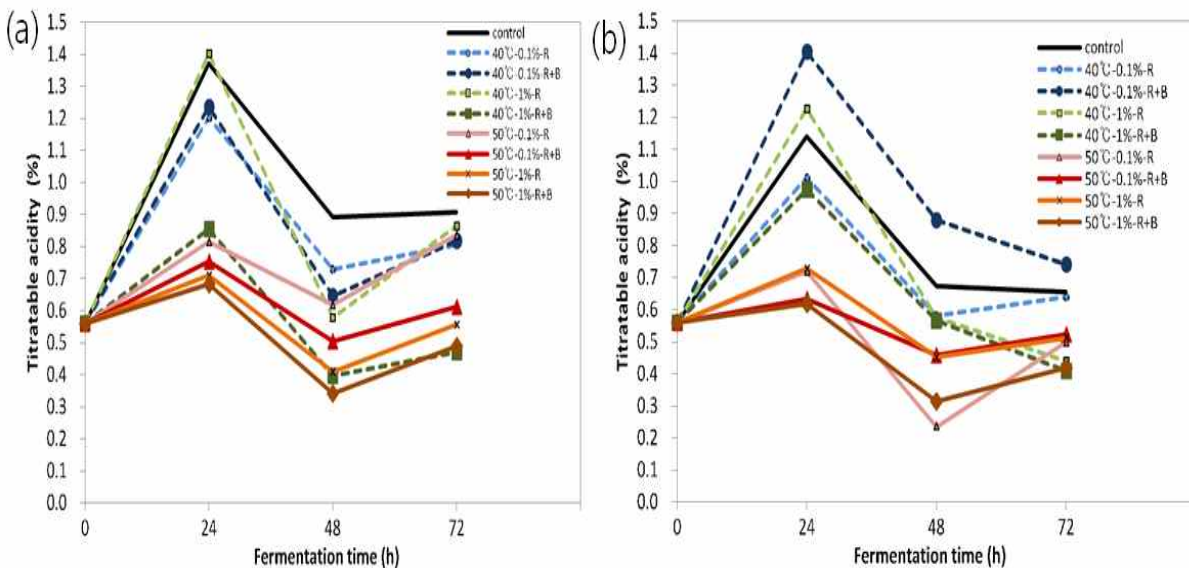


Figure 5. 발효기간에 따른 청국장 적정산도 함량 변화, (a)1차, (b)2차

(5) 아미노태 질소(amino-type nitrogen)

장류 발효의 품질 지표로서 중요한 역할을 하는 아미노태 질소는 콩 단백질이 분해되어 생성되는 물질로서 청국장의 구수한 맛의 척도로 여겨지며, 이를 측정한 결과는 Figure 6과 같다. 증자 직후 92.0 mg%였으나 발효가 진행됨에 따라 40℃, 50℃의 실험군은 발효48시간 만에 각각 386.7-590.2 mg%, 355.4-494.0 mg%를 나타내었고, 72시간에 각각 484.8-728.2 mg%, 420.8-763.2 mg%의 아미노태 질소 함량을 보여주었다. 48시간까지는 40℃가 50℃보다 아미노태 질소 함량이 더 높게 나타났으며, 이는 발효시간 경과에 따라 아미노태 질소 함량이 증가하고 발효온도 40℃가 45℃보다 더 높게 나타났다고 보고한 Hwang(2010)의 결과와 거의 비슷한 경향을 보여주었다. 또한 Kim 등(1982)이 보고한 결과에서 72시간 경에 40℃에서 발효한 경우 345.2 mg%, 50℃에서 발효한 경우 278.6 mg%보다 높은 결과를 나타냈으며 50℃에서 발효시킨 청국장이 40℃에서 발효시킨 청국장보다 아미노태 질소 함량이 다소 떨어진 결과를 나타내었는데 이는 청국장의 발효균주인 *Bacillus*속의 활성이 온도에 의한 영향이 있었던 관계라 여겨진다고 하였다. 본 연구결과는 국내 시판청국장의 아미노태 질소함량(Ko, 2012)과 유사하였으며, 두 차례에 해당하는 실험결과의 차이는 발효시의 조건들의 차이인 것으로 생각되어지며, 같은 발효조건 안에서는 아미노태 질소 생성패턴은 유사한 것으로 보여 진다.

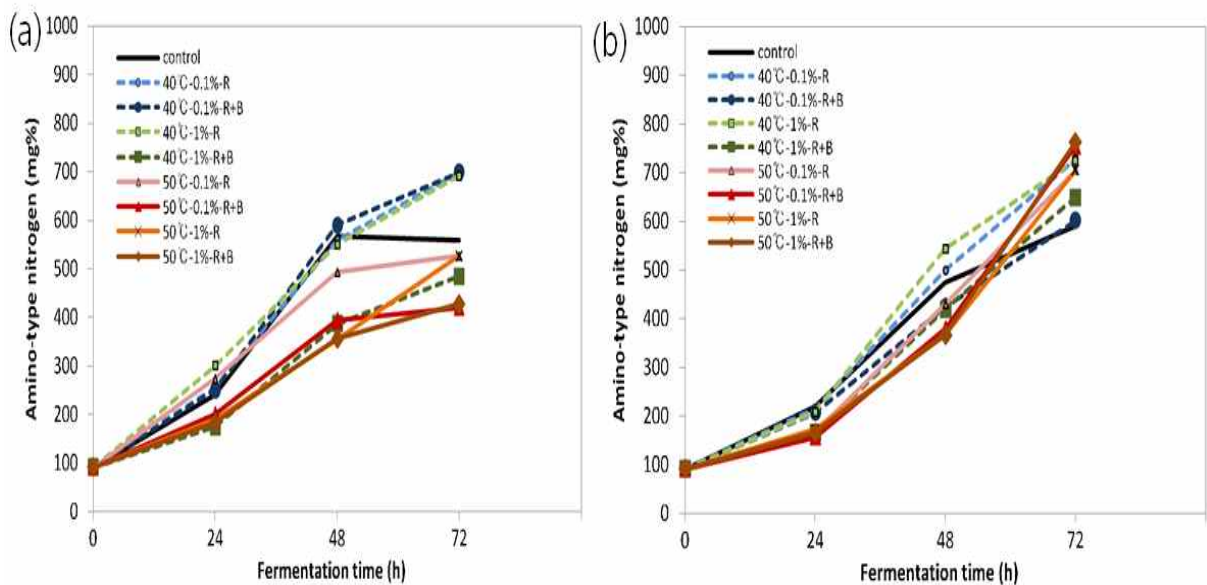


Figure 6. 발효기간에 따른 청국장 아미노태 질소 함량 변화, (a)1차, (b)2차

(6) 청국장 점질물 함량 측정

청국장 발효 시 나타나는 생리활성 기능은 *Bacillus*속 균주의 발효대사산물인 점질물에 의한 것으로 추정되어진다. 청국장 점질물은 글루탐산이 한 줄로 약 5,000개가 연결된 폴리펩타이드와 과당으로 구성된 프락탄이라는 성분으로 구성되어 있다(Kameda Y et al., 1974). 청국장 점질물의 여러 가지 기능성에 관한 연구가 다양하게 진행되었으며, 특히 Youn 등(2001)이 연구한 *B. cereus*등과 같이 제품에 부정적 영향을 미칠 수 있는 미생물의 생육억제 효과에 대한

연구가 본 과제와 관련하여 주목할 만하다. 이 연구에서 *Bacillus*속 미생물이 생성하는 점질물의 종류에 따라 *B. cereus*의 항균력이 대조군에 비해 70~20% 저감화할 수 있다는 결과를 제시하고 있다. 이는 비록 *B. cereus*를 제거한 RiBS1을 사용하더라도 공정 상 오염으로부터 일정 정도의 안전성을 부여할 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구에서 이러한 가능성을 가지는 청국장 점질물의 생성량이 균의 종류와 발효온도, 접종량이 어떠한 변화를 가지는지 알아보고자 하였다.

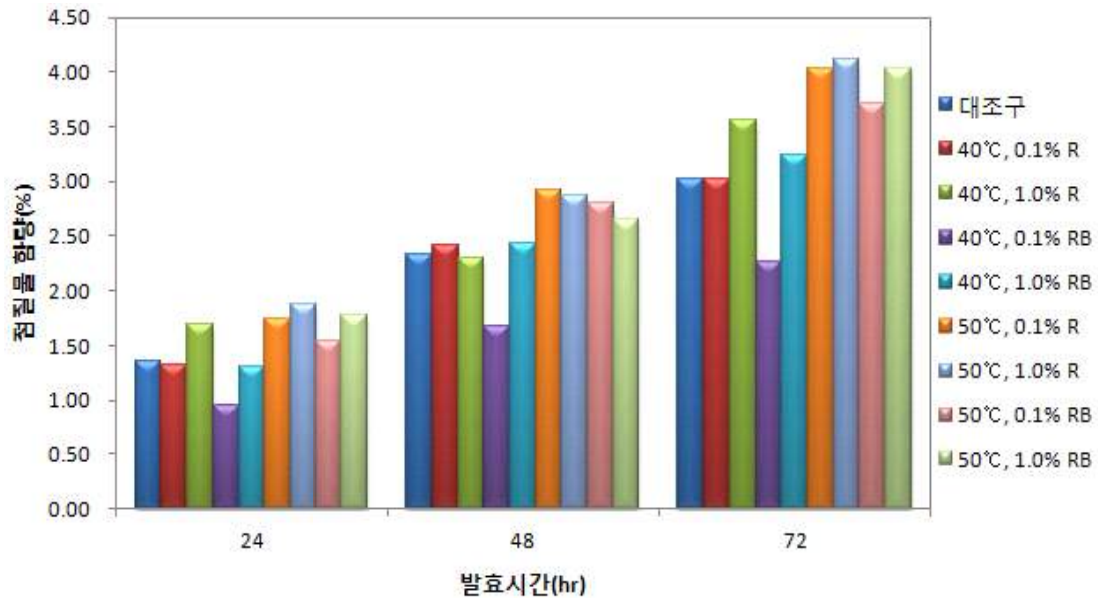


Figure 7. 발효기간에 따른 청국장 점질물 함량 변화, 2차 청국장

청국장 점질물의 접종량과 균의 종류에 따라 유의적 차이를 보이지는 않았으며, 발효기간과 온도에 의해 차이를 보이는 것으로 나타났다(Figure 7). 발효기간이 경과할수록 점질물의 양은 증가하였으며, 50°C 발효온도가 40°C 발효 시 보다 비교적 높은 함량은 나타났다. 이런 결과는 청국장 점질물 생성이 단백질 분해효소 활성과 등가적 관계가 있는 것은 아니고 전분분해효소 활성 등 다른 요인이 함께 작용함을 알 수 있다.

(7) 결과 고찰

RiBS1로 제조한 청국장은 전체적으로 온도 조건에 영향을 미친다는 결과를 확인 할 수 있었으며, 접종량은 10배 수준에서 발효 72시간을 기준으로 고려했을 때 발효 품질 특성에 큰 영향을 주지 않았다. 0.1%에서 1%로 접종량을 증가 시킬 때 산업적 적용 시에는 배지제조 문제 및 생산 단가와 제2협동에서 실시한 관능평가 등 여러 가지를 고려하였을 때 1%보다는 0.1% 접종량이 적합하다고 판단된다. 발효온도는 관능평가결과 50°C에서 발효하고 24시간이 경과한 0.1% RB와 48시간 경과 0.1% R에서의 선호도가 높았다. 이는 다양한 미생물이 존재하는 RiBS1의 경우 40°C에서 발효할 경우 청국장 발효에 풍미를 부여하는 발효균 이외 균의 활성이 비교적 쉽게 나타날 수 있고, 50°C는 *Bacillus*속의 활성이 비교적 높게 나타날 수 있는 환경조건이 되기 때문인 것으로 판단된다.

이에 따라 청국장 시제품은 발효온도는 50°C로 설정하고, 관능평가 결과에 따라 순한 맛의

24시간 0.1% RB와 조금 더 구수한 맛과 향을 부여하는 48시간 0.1% R을 제조하여 소비자 조사 등 상품화에 활용하기로 하였다.

라. RiBS1과 *Aspergillus oryzae* 혼합 시 접종온도에 따른 알메주 특성 연구

앞선 실험결과에서 RiBS1의 접종온도별 차이가 있음을 알아보았다. 이와 더불어 RiBS1에 *Aspergillus oryzae*를 혼합 하여 접종온도를 다르게 함으로써 발효기간 별 차이가 있는지 알아보았다. 본사에서는 사각메주를 제조하여 장을 담그는데, 이는 산업적 적용으로 규모가 커지기에 접종온도별 실험에는 어려운 부분이 있다. 그래서 대부분의 장류 생산업체에서도 사용하는 알메주를 제조하여 2~3일 만에 발효가 가능하도록 함으로써 접종온도별 차이를 알아보았으며, 개발 starter culture의 최적 접종온도를 선정하였다.

앞의 실험결과에서 대조군과 70°C접종 RiBS1, 그리고 50°C접종 RiBS1과 60°C접종 RiBS1이 비슷한 경향을 보였던 반면에, *Aspergillus oryzae*를 첨가한 알메주 실험결과에서는 대조군과 50°C접종 RiBS1+*Aspergillus oryzae*, 그리고 60°C접종 RiBS1+*Aspergillus oryzae*와 70°C접종 RiBS1+*Aspergillus oryzae*가 비슷한 경향을 나타내었다.

(1) 수분함량

접종온도별 알메주의 수분함량은 발효24시간까지는 실험군 간의 차이가 없다가 발효 48시간에서는 0.1~2.0%, 발효 72시간에서는 0.6~6.6% 까지 차이를 보였다(Figure 8). 이는 48시간 이후부터는 콩알메주의 표면이 건조됨에 따라 생기는 문제로 추정된다.

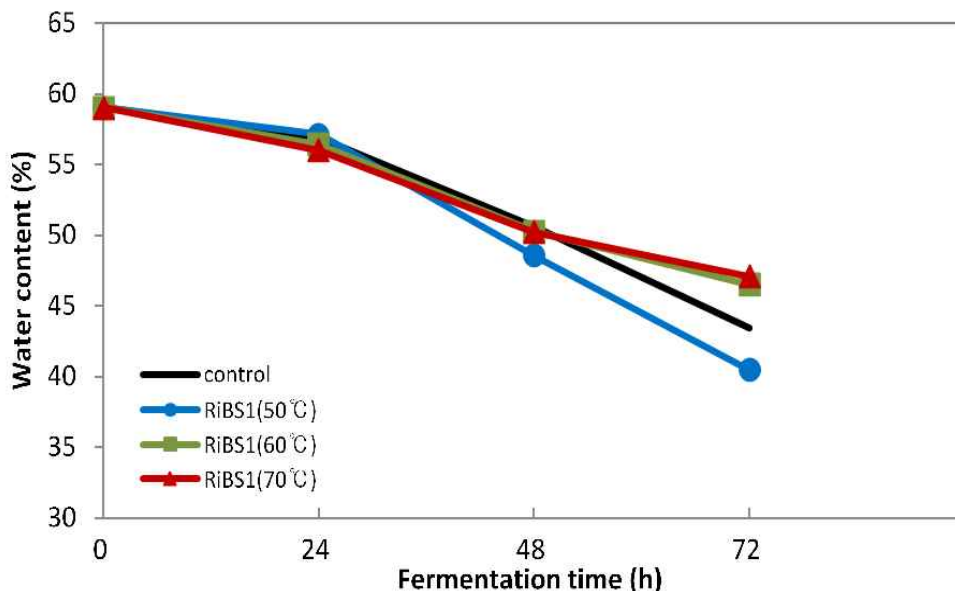


Figure 8. 접종온도에 따른 알메주 수분함량 변화

(2) Protease activity

RiBS1과 *Aspergillus oryzae*를 혼합하여 접종온도 별 제조한 알메주의 protease의 활성을

Figure 9에 나타내었다. 발효시간이 경과함에 따라 증가하였는데, 대조구와 60℃, 70℃에서 접종한 알메주는 발효시간이 경과함에 따라 큰 차이가 없었으나 50℃에서 접종한 알메주는 이들보다 낮은 수준을 유지하다가 72시간에서 38.1 unit/g 으로 다른 실험구들과 비슷한 활성을 보였다.

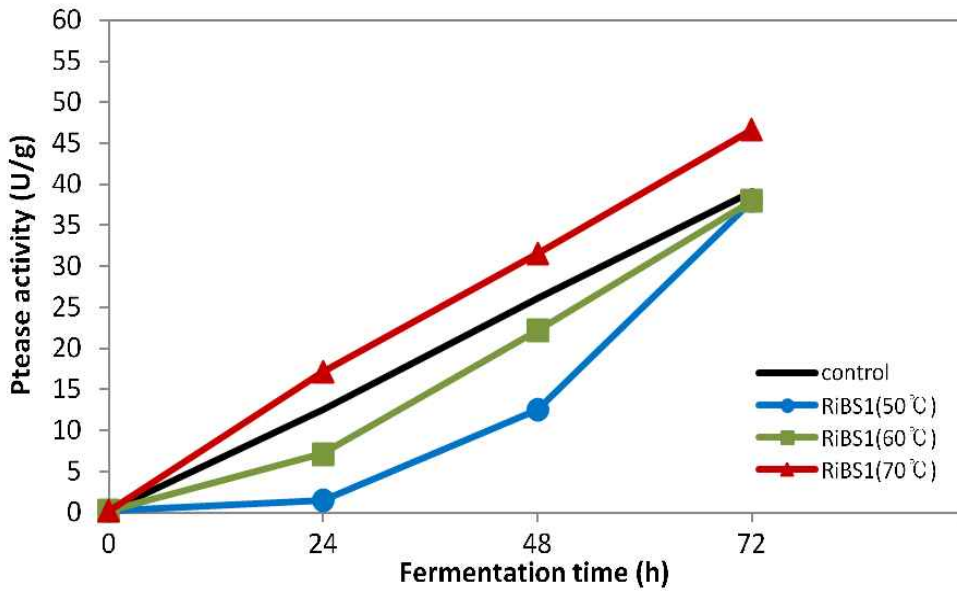


Figure 9. 접종온도에 따른 알메주 protease activity 변화

(3) pH

발효 중 pH 변화는 Figure 10과 같다. 발효 24시간 pH는 6.62~6.97 범위에서 발효48시간에 pH 7.98~8.13으로 급격히 증가 후, 발효72시간에 pH 7.87~8.15로 50℃에서 접종한 알메주를 제외한 나머지는 약간 감소하는 범위를 나타내었다. 본 실험결과와 Kim 등(1997)의 *Bacillus*속 균주를 이용한 알메주의 발효 48시간 pH 7.98~8.68의 범위와 비슷한 결과를 나타내었다.

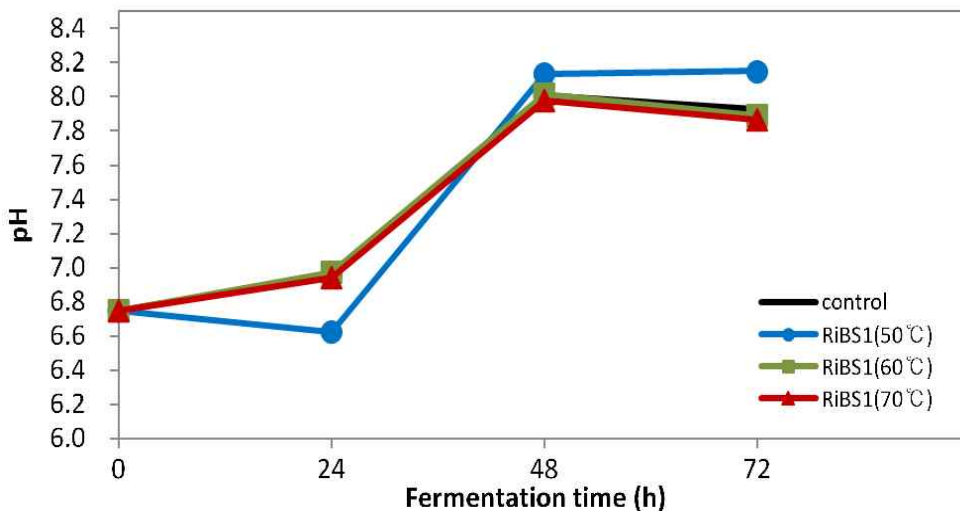


Figure 10. 접종온도에 따른 알메주 pH 변화

(4) 적정산도

알메주의 발효 중 적정산도의 변화를 측정된 결과, Figure 11과 같이 대조군과 60℃, 70℃에서 접종한 알메주는 발효24시간 0.6~0.7%에서 발효 48시간 0.2~0.3%로 급격히 감소 후, 발효 72시간에 0.4~0.6%로 증가하는 유사한 패턴을 보인 반면, 50℃로 접종한 알메주의 적정산도 변화는 발효24시간에서 0.9%로 그 외 대조군 및 실험군에 비해 최대 0.3% 증가하였고 발효48시간 이후부터는 가장 낮은 산도 함량을 나타내었다.

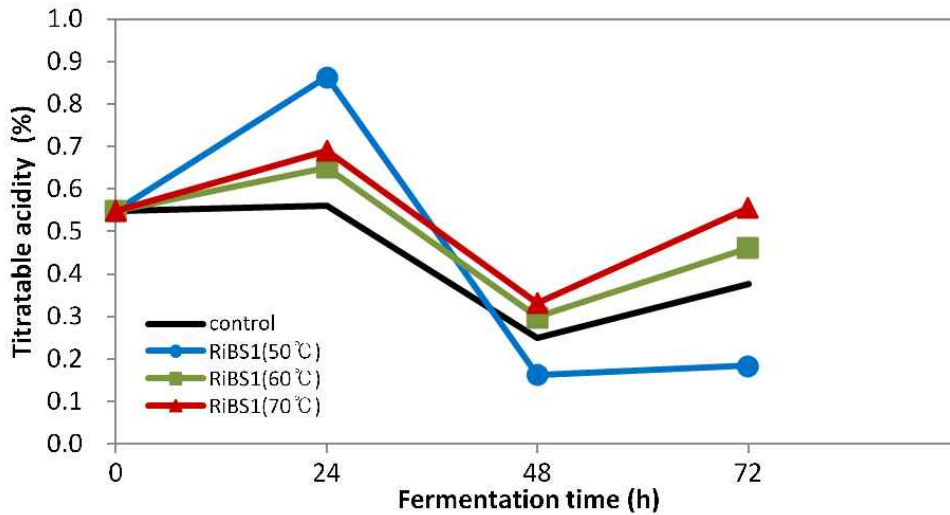


Figure 11. 접종온도에 따른 알메주 적정산도 함량 변화

(5) 아미노태 질소(amino-type nitrogen)

접종온도별 알메주의 아미노태 질소함량 변화를 측정된 결과는 발효24시간에 269.3~302.1 mg%, 발효48시간에 443.1~609.4 mg%로 증가하였고, 발효 72시간에 472.8~742.8 mg%로 최대 270 mg%까지 차이가 났다(Figure 12). 50℃에서 접종한 알메주의 protease활성이 가장 낮았던 결과와 마찬가지로 아미노태 질소 함량도 가장 낮은 결과를 나타내었다.

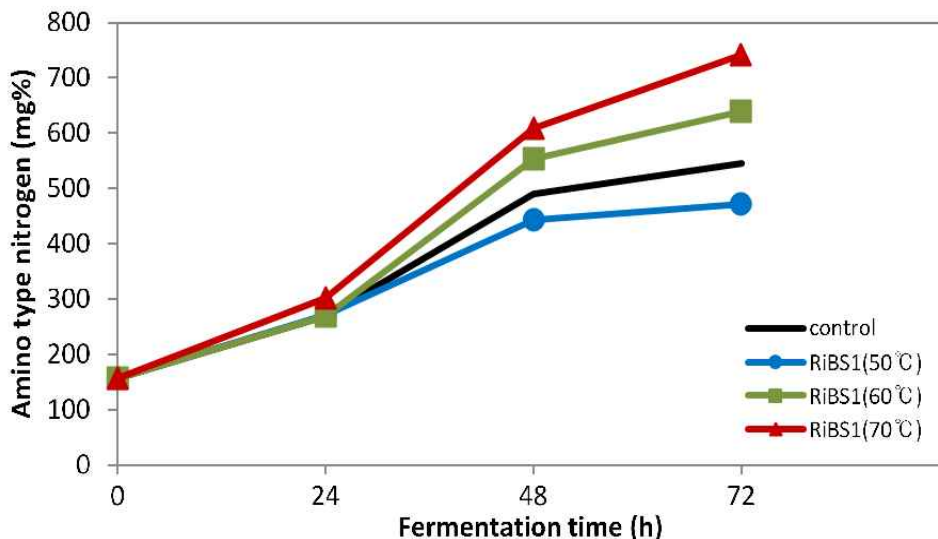


Figure 12. 접종온도에 따른 알메주 아미노태 질소 함량 변화

(6) 결과고찰

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 생육적온인 *Aspergillus oryzae*의 경우 고온접종 시 포자 형태로 접종이 되더라도 온도에 의한 쇼크로 발아율이 떨어질 수 있으므로 접종 시 증자공의 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 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 않는 기 때문에 내부 발효균에는 영향이 그다지 크지 않을 것으로 판단된다.

본 실험을 통해서도 개발 starter culture의 접종온도는 메주 발효에 영향을 미치는 요소로 확인되었으며, 효소활성과 분해산물의 함량 등에 영향을 주는 것으로 생각되어지고 바람직한 메주의 발효를 위해서는 적당한 접종온도의 선정이 필요하다. 하지만 본사에서 생산되는 제품과의 급격한 품질변화는 기존 제품의 균일성을 깨뜨릴 우려가 있다고 판단되어지며, 따라서 본 실험 결과 대조군과 비슷한 발효 패턴을 보이면서, 메주의 후 발효가 일어나지 않는 범위의 높은 protease활성과 아미노태 질소 함량이 높은 60℃의 접종온도로 메주 제조에 이용할 경우 균일성을 보존하면서 더욱 빠른 숙성도와 함께 장류 고유의 맛을 낼 수 있을 것으로 생각된다.

마. 사각메주 발효 연구

맛과 기능성을 향상시키는 된장과 간장을 개발하기 위한 가장 중요한 과정인 사각메주를 제조함으로써 발효 과정 특징을 살펴보았다. 대조군은 본 사의 기존 병형복발효 방법인 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027과 충무발효(주) 종균을 사용하고, 실험군은 RiBS1만 접종한 메주, RiBS1과 충무발효(주) 종균을 접종한 메주(RA), RiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 및 충무발효(주) 종균을 접종한 메주(RBA)를 제조하여 실험했으며, 균의 접종온도는 앞의 실험에서 선정된 60℃로 하였다.

메주의 품질기준은 된장 숙성 중 품질에 가장 많은 영향을 미치는 수분과 protease activity(PA), pH, 적정산도, amino type nitrogen(AN)등을 발효기간별로 분석하였다. 결과 값은 각 실험군 별 5개의 메주를 채취하여 상하 값을 제외한 3개의 평균값으로 하였다. 또한 발효 종말점은 대조구의 PA가 70 unit/g 에 도달한 때로 하였는데, 이는 본 사 메주품질기준에 따른 것으로 한식 사각메주 특성 상 70 unit/g 정도로 메주가 발효하더라도 침지 시 염수침투기간 중 메주의 후 발효가 일어나고 과도한 발효로 포자형성이 많아지면 관능특성 저하를 가져올 수 있기 때문이다(Figure 13). 이와 관련 하여 일본에서 대두를 이용한 적 된장 제조 시 코지의 발효는 균사를 형성하는 정도의 약국(弱麴)으로 제조해 곰팡이가 과도하게 발효하지 않도록 한다(정동효, 2006).

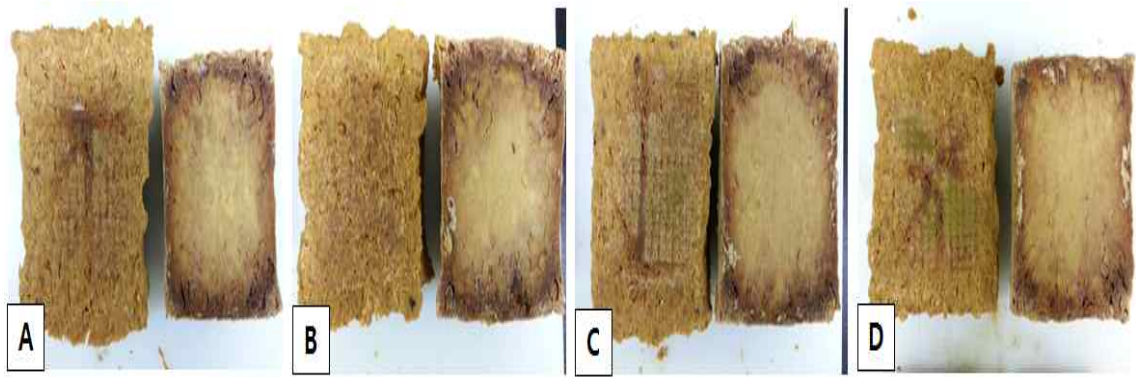


Figure 13. starter culture에 따른 사각메주 발효 완료 사진

- * A: 대조구 (*Bacillus licheniformis* SRCM0100027+*Aspergillus oryzae*)
- * B: RiBS1(이하 'R')
- * C: RiBS1+*Aspergillus oryzae*(이하 'RA')
- * D: RiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027+*Aspergillus oryzae*(이하 'RBA')

(1) 수분함량

starter culture에 따른 사각메주 수분함량은 모든 조건에서 발효초기 59.6% 범위에서 발효3일에는 41.5~46.9%로 급격히 감소하였고, 이후부터는 완만한 감소를 보여 발효15일에는 29.4~37.3%를 나타내어 실험군별 유의적 차이는 없었다(Figure 14).

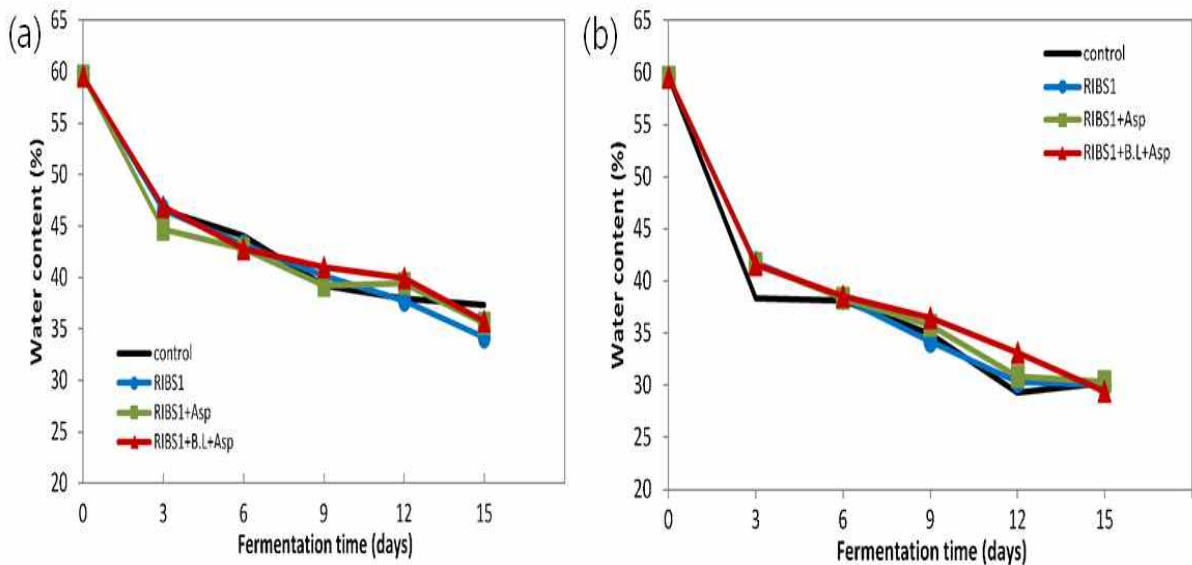


Figure 14. starter culture에 따른 사각메주 수분함량 변화, (a)1차, (b)2차

(2) Protease activity

사각메주 protease활성 변화를 측정한 결과는 Figure 15에 나타내었다. 전반적으로 PA활성은 증가하는 경향을 보였고, 특히 RBA메주가 발효초기에는 커다란 변화가 없었으나 발효12일

이후로 증가하면서 발효15일에는 평균 66.3 unit/g으로 가장 높은 효소 활성을 나타내었다.

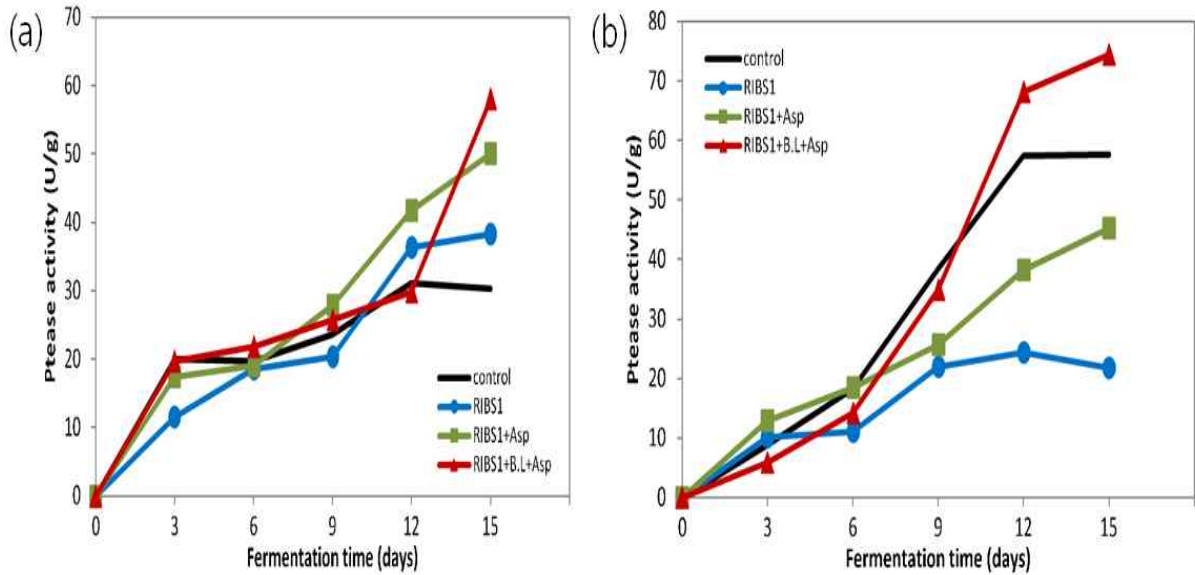


Figure 15. starter culture에 따른 사각메주 protease activity 변화, (a)1차, (b)2차

(3) pH

발효기간에 따른 pH 변화는 대조군과 RiBS1메주는 서서히 증가하는 경향을 나타내었지만, 발효기간이 경과함에 따라 RiBS1메주, RA메주 및 RBA메주 즉, RiBS1을 사용하여 제조한 메주의 pH는 전반적으로 *Bacillus*속을 사용하여 제조한 대조군에 비해 낮은 범위를 나타내었다 (Figure 16). 이는 대조군에서 사용한 *Bacillus*에 의하여 생성된 암모니아 가스를 포함한 단백질 발효물의 영향으로 판단된다. 한편 발효 기간 중 pH가 감소하는 경향을 보이는 것은 수분 증발 및 표면 균열이 지연됨에 따라 메주 내부에 혐기적 조건이 형성되고 그 결과 이러한 조건에 적합한 유기산 생성에 의한 결과로 해석할 수 있다.

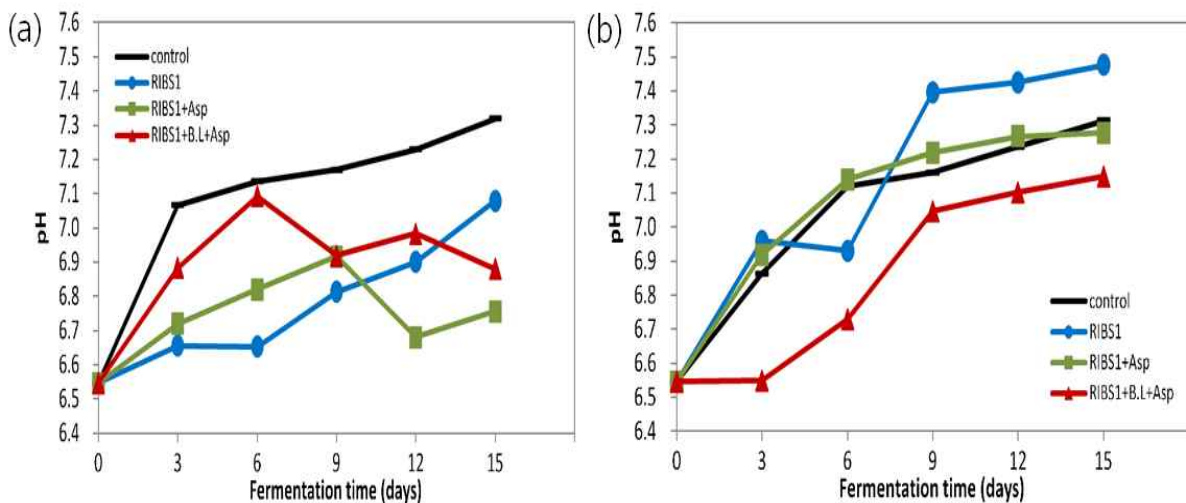


Figure 16. starter culture에 따른 사각메주 pH 변화, (a)1차, (b)2차

(4) 적정산도

적정산도 함량의 경우 발효 기간이 경과함에 따라 RBA메주는 증가하였고, 이를 제외한 대조군 및 실험군은 서서히 증가하다가 발효12일 이후로 큰 변화가 없는 결과를 나타내었다(Figure 17). 또한 대체적으로 실험군의 적정산도는 대조군에 비해 높은 함량을 나타내거나 비슷한 함량을 보였으며, 평균적으로 발효15일에 RBA메주의 적정산도함량이 1.20%로 가장 높았다. Kim 등 (2011)은 메주 발효 12일째에 0.20~0.25%로 보고한 결과보다 약 5배 많은 함량 이었는데, 이는 전통메주로 실험한 결과로 본사에서 제조하는 개량메주와의 차이로 나타나는 결과로 생각된다.

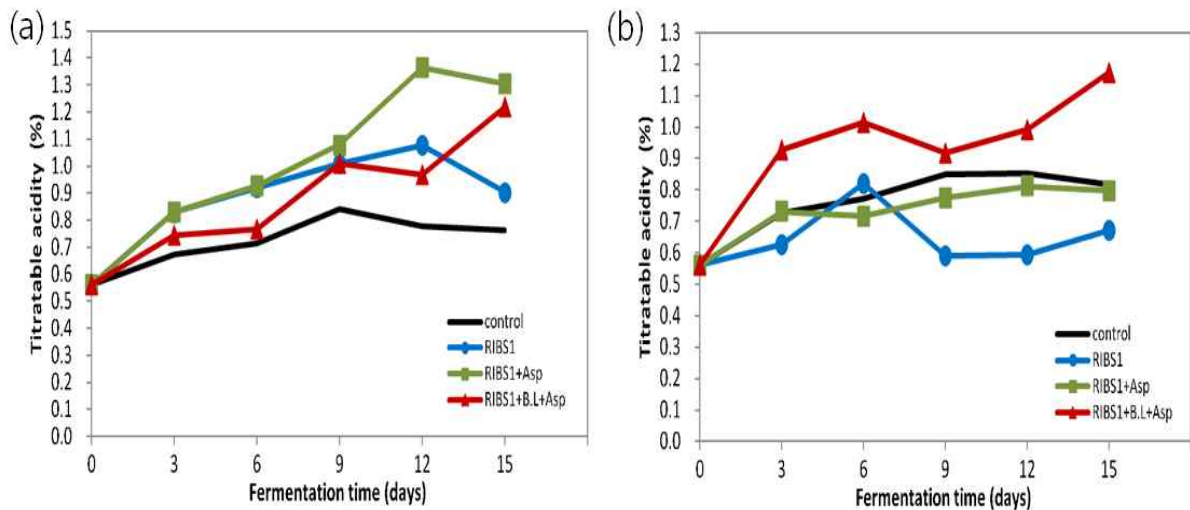


Figure 17. starter culture에 따른 사각메주 적정산도 변화, (a)1차, (b)2차

(5) 아미노태 질소(amino-type nitrogen)

사각메주의 발효 중 아미노태 질소 함량의 변화는 Figure 18과 같다. 발효기간이 경과함에 따라 모든 조건에서 아미노태 질소 함량은 꾸준히 증가하였으며, RBA메주의 경우 발효15일에 563.2 mg%를 나타내어서 가장 높은 결과를 나타냈다. 다음으로는 대조군이 498.2 mg%으로 나타났으며, RA메주는 478.2 mg%, 마지막으로 RiBS1메주의 경우 424.6 mg%으로 가장 낮은 함량을 보였지만 큰 차이는 없었다.

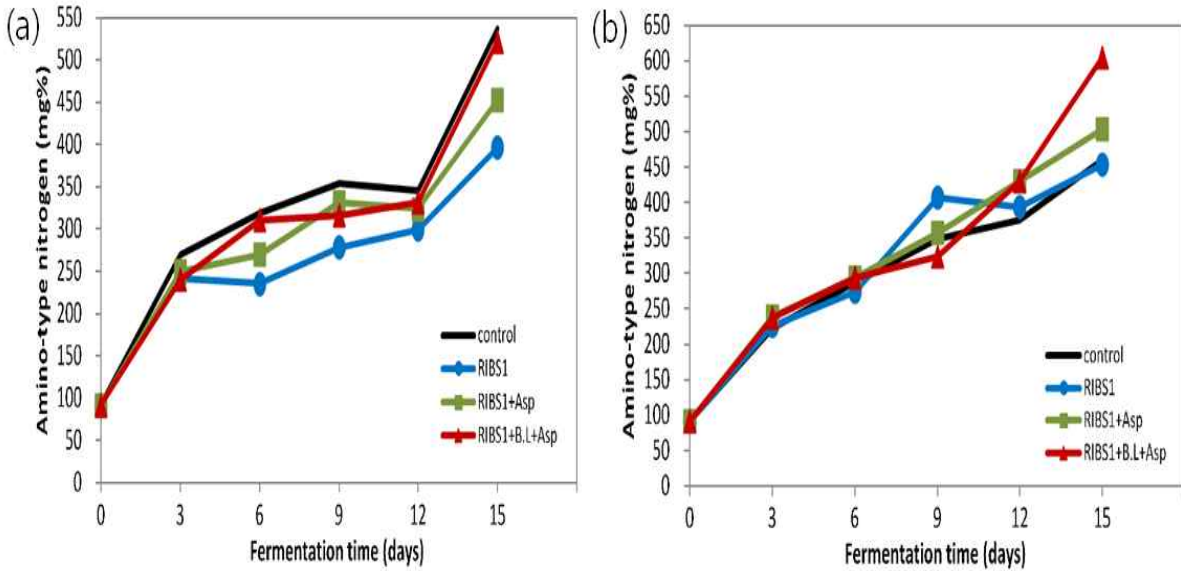


Figure 18. starter culture에 따른 사각메주 아미노태 질소 함량 변화, (a)1차, (b)2차

(6) 결과 고찰

RA, RBA 메주가 대조군과 가장 비슷한 특성을 보였으며, 특히 RBA가 가장 비슷하였다.

바. 메주의 염수침지 중 품질변화

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 담금 비율, 천일염의 종류, 침지온도에 영향을 받는다. 일반적으로 메주가 작고 표면적이 넓을수록 메주발효균의 증식이 왕성하여 유리아미노산의 함량이 증가할 것으로 생각하지만, Lee 등(2009)이 연구한 결과에 따르면 메주크기가 클수록 비휘발성 유기산 함량이 증가하고 이와 비례관계로 유리아미노산의 함량이 증가한다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 대조군과 RiBS1만 접종한 메주(R), RiBS1과 충무발효(주) 종균을 접종한 메주(RA), RiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 및 충무발효(주) 종균을 접종한 메주(RBA)를 침지하고 이에 대한 품질변화 특성을 알아보려고 하였다. 메주와 염수비율은 1대 2로 하였으며, 침지기간은 약 7주 정도로 대조군의 침지액 TN값이 0.7% 이상이었을 때 장 가르기를 실시하였고, 각각의 실험군은 0일부터 49일까지 7일마다 침지액을 채취하여 Brix, 염도, pH, 적정산도 함량, 아미노태 질소 함량(AN), 총 질소 함량(TN)의 변화

를 분석하였다(Figure 19).

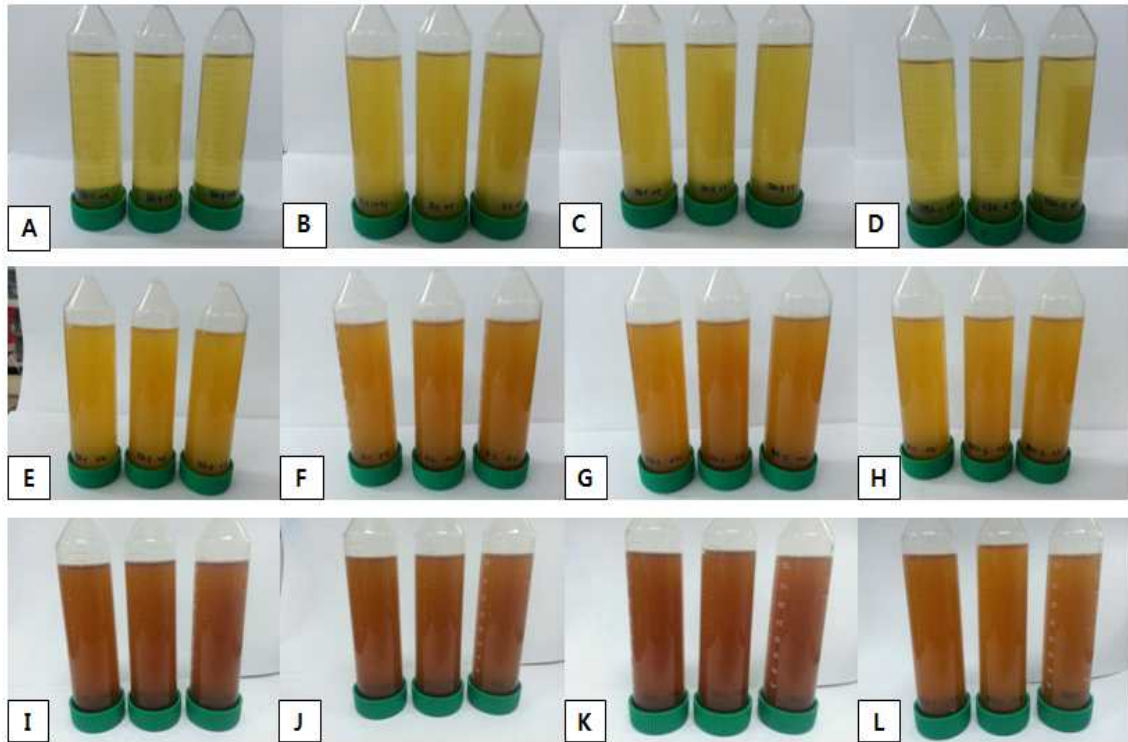


Figure 19. starter culture에 따른 침지액 기간별 변화

- A: 대조구(침지7일) B: RiBS1(침지7일) C: RiBS1+*Aspergillus oryzae*(침지7일)
 D: RiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027+*Aspergillus oryzae*(침지7일)
 E: 대조구(침지21일) F: RiBS1(침지21일) G: RiBS1+*Aspergillus oryzae*(침지21일)
 H: RiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027+*Aspergillus oryzae*(침지21일)
 I: 대조구(침지49일) J: RiBS1(침지49일) K: RiBS1+*Aspergillus oryzae*(침지49일)
 L: RiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027+*Aspergillus oryzae*(침지49일)

(1) Brix

Brix는 염분농도를 제외한 값이 메주로부터 유래한 성분의 용출과 분해에 기인하는 것으로 침지 중 숙성정도를 가늠할 수 있는 척도가 된다. 침지기간 중 brix 변화를 Figure 20에 나타냈다. 초기에는 25.1 brix로 실험군 별 큰 차이가 없다가 21일 경과 후부터 눈으로도 색의 식별이 가능해졌으며, 이후부터 침지종료일 까지 RA메주 침지액이 29.2 brix로 가장 높은 결과를 나타내었다. 또한 21일 경과 후 침지종료일 까지 대조군이 28.0 brix로 가장 낮은 결과를 보였다.

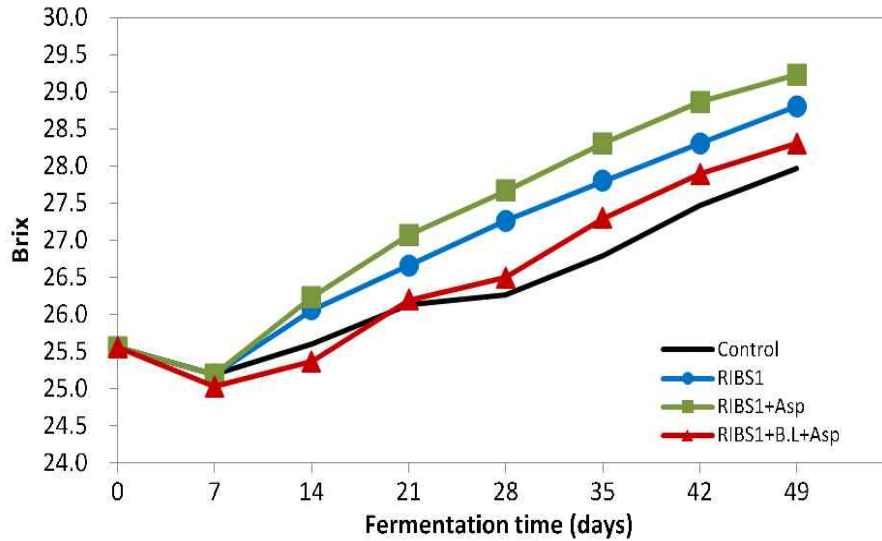


Figure 20. starter culture에 따른 침지액 brix 변화

(2) 염도

처리구별 침지기간 중 염도변화를 관찰한 결과 초기 23%에서 침지종료일에 21%로 감소하였으며 실험군 간 유의적 차이는 보이지 않았다(Figure 21). 실험결과로 보아 침지 시작 7일 만에 메주내부수분과 염수 간에 염도 평형을 이뤄 염수의 염도가 급격하게 감소하였으나 이후에는 증가와 감소를 반복적으로 보였다. 발효초기 염수침투는 메주내부의 발효균의 증식을 억제하는 효과를 보여준다. 특히 곰팡이의 경우 염에 노출될 경우 그 개체수가 급격히 감소하고, 비교적 *Bacillus*속과 유산균의 개체 수는 유지되거나 증가하는 것으로 알려졌다(Mok et al., 2005).

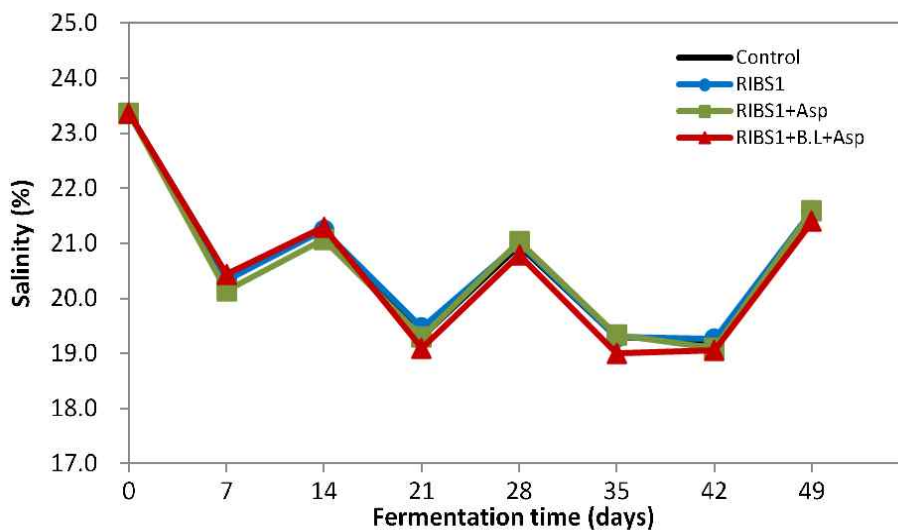


Figure 21. starter culture에 따른 침지액 염도 변화

(3) pH

염수 침지 중 pH의 성분변화는 Figure 22에 나타내었다. 침지기간 중 pH는 전반적으로 감소하는 경향을 보였다. 염수침지 7일까지 대조군과 실험군의 편차는 구분할 수 없었으나 14일에는 대조군의 침지액이 pH 6.3으로 가장 높게 나타났으며, RiBS1메주 침지액은 pH 5.8, RA 메주 침지액과 RBA메주 침지액의 pH는 5.0~5.1로 가장 낮은 pH 감소를 보였다. 그러나 이후 감소가 둔화 되었으며, pH 4.8~5.0 로 큰 변화 없이 비슷한 결과를 나타내었다.

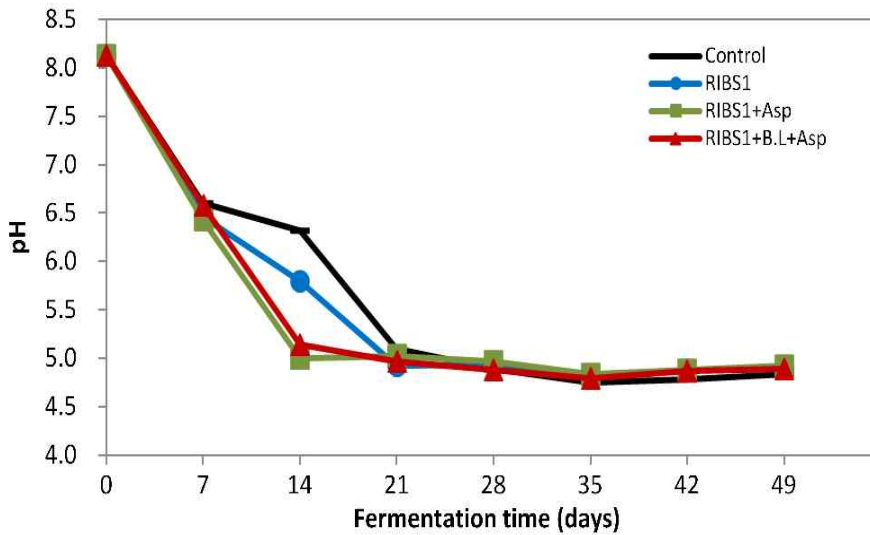
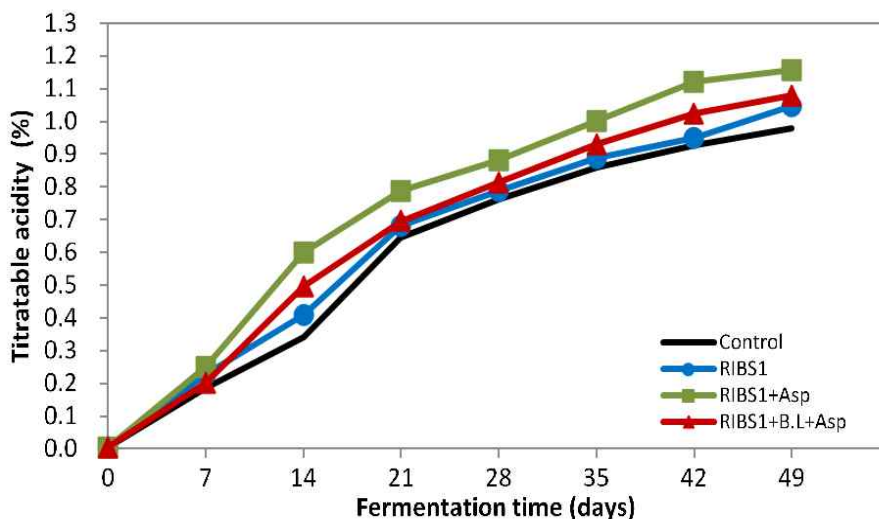


Figure 22. starter culture에 따른 침지액 pH 변화

(4) 적정산도

적정산도는 Figure 23과 같이 침지기간에 따라 증가하여 pH 감소와 부합하는 경향을 보였다. 실험군별 적정산도는 침지종료일에 RA메주침지액이 1.2 %로 가장 높았으며, RBA메주 침지액은 1.1%, R메주 침지액은 1.0%으로 대조군보다 약간 높았으나 큰 차이는 없었다.



<Figure 23. starter culture에 따른 침지액 적정산도 함량 변화>

(5) 아미노태 질소(amino-type nitrogen)

침지기간 중 아미노태 질소 함량 변화는 Figure 24와 같이 침지기간에 따라서 지속적으로 증가하였으며 침지종료일에 RA메주 침지액이 327.7 mg%으로 가장 높은 함량을 보였다. 다른 실험군의 침지종료일 아미노태 질소 함량은 275.6~283.0 mg%으로 비슷한 결과를 나타냈다.

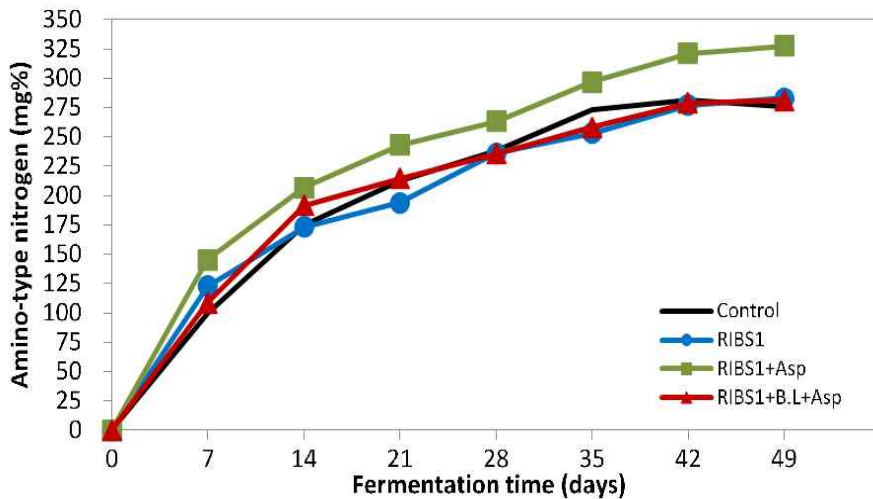


Figure 24. starter culture에 따른 침지액 아미노태 질소 함량 변화

(6) 총 질소(TN)

메주의 염수침지 종말점은 일반적으로 총 질소 함량을 기준으로 정한다. 한식간장의 총 질소 기준은 0.7 %N으로, 장 가르기 후 간장 숙성 중 메주침전물의 분해가 진행된다 하더라도 급격하게 증가하지는 않으므로 이상으로 측정되었을 시 침지를 종료한다. 침지기간 중 침지액의 총 질소는 모든 실험군에서 지속적으로 증가하였다(Figure 25). 침지종료일차에 대조군 및 R메주 침지액, RBA메주 침지액은 0.7 %N의 TN 함량을 보였으나, RA메주 침지액은 0.8 %N으로 가장 높은 함량을 나타내었다.

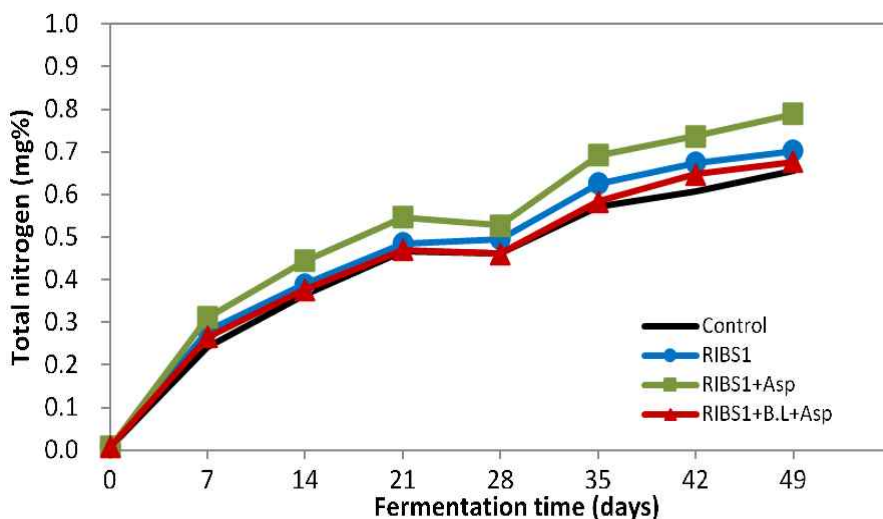


Figure 25. starter culture에 따른 침지액 아미노태 질소 함량 변화

(7) 결과 고찰

메주발효 후 된장과 간장을 제조하기 위해 대조군과 R메주, RA메주 및 RBA메주를 침지한 결과 큰 변화는 없었으며, 이 중 RA메주가 대조군과 다른 실험군에 비해 용출 속도가 빠른 것으로 판단된다. 염수침지 종료 후 대조군과 실험군은 장 가르기를 실시하여, 된장과 간장으로 분리하여 숙성변화를 연구 하였다.

사. RiBS1 적용 메주 활용 된장 및 간장 숙성 연구

된장, 간장은 청국장과 함께 콩을 주원료로 하여 발효, 숙성시킨 우리나라의 대표적인 대두 발효식품이다. 이들은 단백질과 아미노산 함량이 높을 뿐만 아니라 저장성이 뛰어나며, 그 특유의 맛과 향을 지니고 있어 우리 조상들의 식생활에 널리 애용되어 왔다. 된장의 숙성과정 중 맛, 향, 색 등의 품질을 결정짓는 데에는 여러 가지 요인이 있으나 크게 원료, 제조방법, 메주나 이에 적용되는 균주 등으로 나눌 수 있다. 좋은 원료와 제조방법이 된장, 간장 품질에 많은 영향을 끼치기는 하지만, 된장, 간장은 숙성 과정 중 미생물의 작용에 따라 그 맛과 향 등이 결정되므로 작용하는 미생물이 가장 중요하다고 할 수 있다(Kim et al., 2006).

따라서 본 연구에서는 RiBS1과 된장 및 간장(Figure 26, Figure 28) 숙성에 관여하는 여러 미생물들이 복합적으로 작용함으로써 숙성과정 중에 어떠한 품질특성을 나타내는지 살펴보았다.

(1) 된장

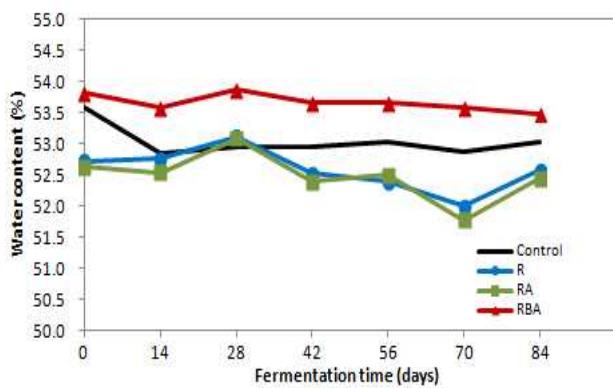


Figure 26. 숙성완료된 RiBS1적용 메주 활용 된장 (숙성84일)

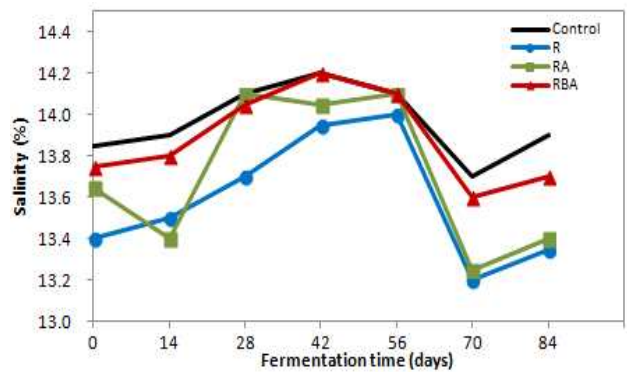
된장 숙성기간 중 수분함량을 Figure 27A에 제시하였다. 숙성초기 52.6~53.8%에서 숙성말기 52.5~53.5%로 비교적 일정하게 유지되었으며, 큰 유의적 차이는 보이지 않았다. 염도는 숙성 초기와 숙성말기에서 13.4~13.9%으로 유지하였으나 숙성기간 내내 변동이 컸음을 알 수 있다(Figure 27B). 이는 숙성기간 동안 된장 샘플링의 문제로 판단되어지며 된장 상부에 미생물 오염을 막기 위하여 옷소금을 뿌리는데, 샘플 채취 시 옷소금과 같이 채취를 함으로써 염의 변동이 심했을 것으로 생각된다. pH 변화는 R, RA, RBA가 pH 5.1~5.2로 숙성 기간별 유의적 차이는 보이지 않았다(Figure 27C). 이에 반해 대조군은 pH 5.3~5.4로 실험군에 비해 약간 높은 pH를 보였고, 적정산도 함량은 대조군과 실험군 모두 숙성기간이 경과할수록 약간 증가함

을 보였으나 처리구간 변화는 크지 않았다(Figure 27D). 된장에서 아미노태 질소 함량은 된장의 고유한 맛인 구수한 맛 성분과도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 여러 장류 식품에 있어서 그 숙성도를 판단하는 지표로 사용된다. 이렇게 된장 특유의 맛을 내는데 중요한 역할을 하는 아미노태 질소 함량의 변화를 살펴보면 Figure 27E와 같다. 숙성기간이 경과함에 따라 아미노태 질소 함량 또한 유의적인 차이로 증가함을 보였다. 특히 RBA의 경우 숙성종료일에 474.6 mg%로 가장 높게 나타났으며 이는 기존 된장 432.7 mg%보다 높은 결과를 보였으며, 다음으로는 RA로 412.2 mg%이었으며, R은 384.3 mg%로 가장 낮은 결과를 나타냈다. L값은 RiBS1만 접종한 메주를 이용한 된장인 R이 숙성종료일에 49.7로 가장 밝은 색을 띄었으며, RBA가 45.2로 가장 낮게 측정되었다(Figure 27F). 하지만 본 연구결과는 Park 등(2000)이 보고한 시판 전통 된장의 평균 L값인 37.4 보다 높은 수준 이었다.

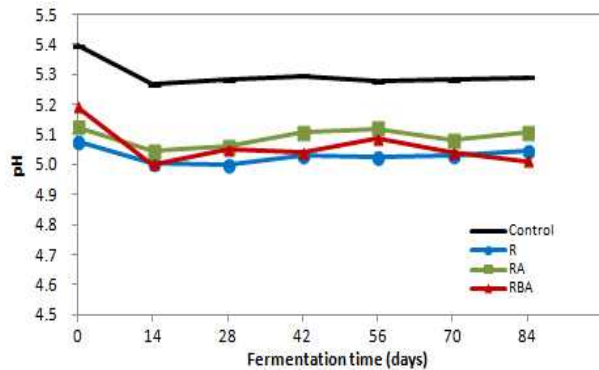
(A)



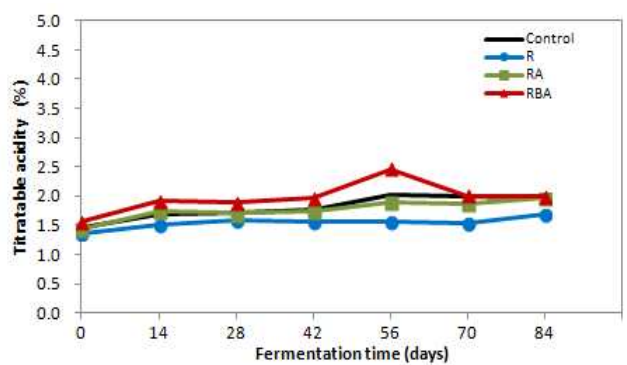
(B)



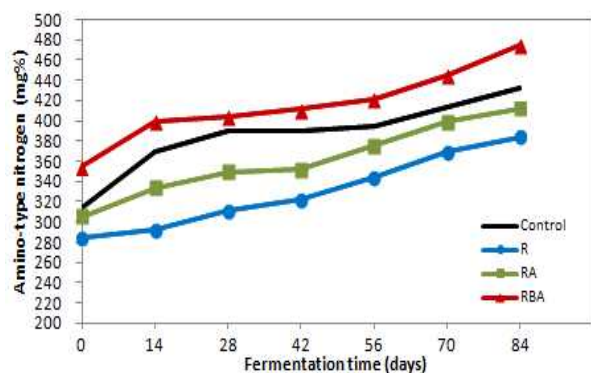
(C)



(D)



(E)



(F)

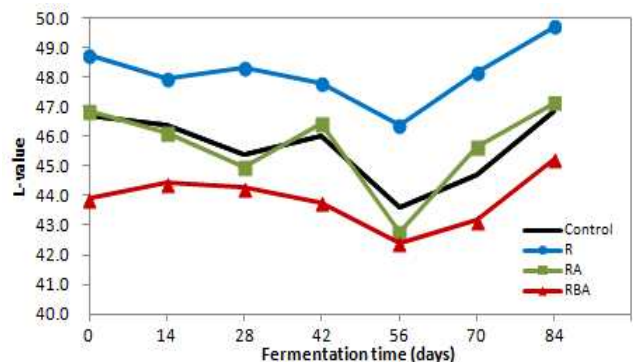


Figure 27. 숙성기간에 따른 RiBS1적용 메주 활용 된장의 품질 변화

(2) 간장



Figure 28. 숙성완료된 RiBS1적용 메주 활용 간장 (숙성84일)

간장 숙성기간 중 Brix변화는 숙성기간이 경과함에 따라 비슷한 함량을 유지하다가 숙성종료일에 약간 감소되는 경향을 보였다(Figure 29A). 숙성종료일에 대조군과 가장 비슷한 Brix를 보인 실험군은 RBA로 30.0 brix를 나타냈으며 R은 27.9 brix로 가장 낮은 결과를 나타내었고 RA는 29.2 brix를 나타내었다. 염도는 Figure 29B에 제시하였다. 처리구별 유의적 차이는 보이지 않았으나 모든 처리구가 숙성42일까지 약간 증가함을 보이다가 숙성56일에 약간 감소한 후 숙성70일 이후에는 급격히 감소되는 경향을 보였다. 숙성기간별 간장의 pH를 측정한 결과는 Figure 29C와 같다. 실험군 모두 pH 4.9~5.1 분포로 나타났고 Chang(1966)이 보고한 pH 4.5~5.7 수치의 범위 안에 포함되었으며, 이 결과는 식품공전의 간장의 일반성분에 해당하는 pH 4.0~6.8 규격에 적합하였다. 보통 장류의 pH는 발효과정에서 생성되는 유기산에 의한 것으로 숙성기간이 길어짐에 따라 유기산의 함량이 증가되며 pH가 낮아지는 것으로 볼 수 있는데 (Park et al., 1997), 본 연구 결과는 모든 실험군이 비슷하게 유지되어 Park 등(1997)의 결과와 다른 경향을 나타내었다. 적정산도는 숙성기간이 경과함에 따라 약간 감소되는 경향을 나타냈으며, 특히 R이 숙성종료일에 0.7%로 가장 낮게 측정되었다(Figure 29D). 산도의 증가는 미생물에 의한 젖산발효 과정에서 젖산의 생성과 여러 가지 향미에 관계되는 유기산의 생성량이 증가하며, 숙성기간 중 수분증발, 그리고 농축과정 중의 유기산 농도의 증가에 의한 것으로 생각된다. 그러나 Lee 등(1997)은 적정산도는 pH와는 상대적인 경향을 보인다고 하였으나 본 연구에서는 비슷한 경향을 보였다. 아미노태 질소 함량은 숙성종료일에 대조군이 445.8 mg%로 가장 높은 함량을 보였으며, RBA가 422.3 mg%, RA가 404.7 mg%를 나타냈고 R이 331.8 mg%로 대조군보다 약 26% 낮은 결과를 나타냈다(Figure 29E). 총 질소 함량은 숙성기간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였으며 숙성종료일에 대조군과 RBA가 0.8~0.9 %N으

로 가장 높았으며, RA는 0.7 %N, R은 0.6 %N으로 한식간장의 총 질소 기준은 0.7 %N보다 낮았다(Figure 29F).

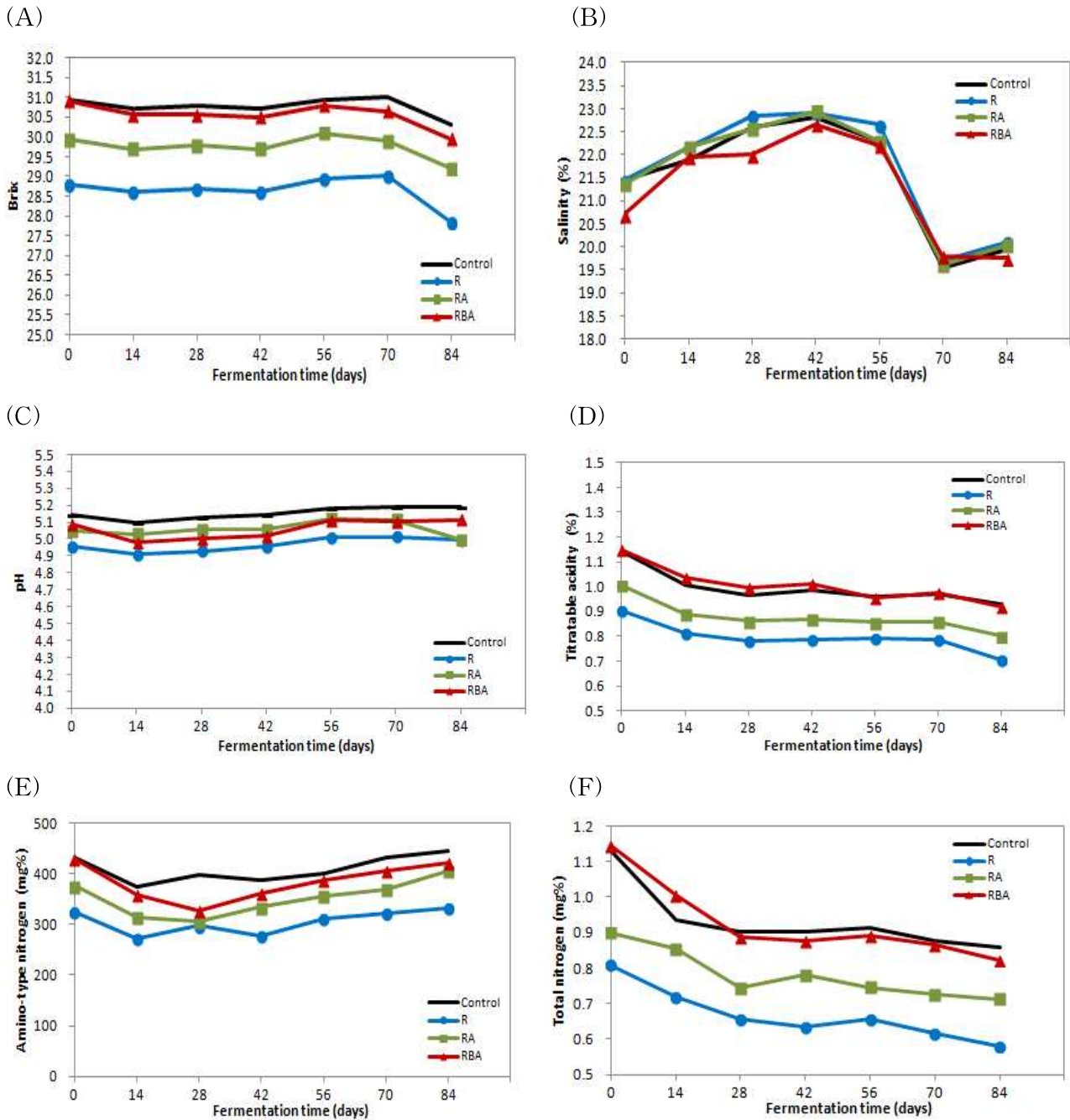


Figure 29. 숙성기간에 따른 RiBS1적용 메주 활용 간장의 품질 변화

(3) 결과 고찰

된장의 경우 가장 큰 유의적 차이를 보이는 분석항목은 아미노태질소함량으로 RBA 된장이 474.6 mg%로 가장 높게 나타났으며 이는 기존 된장보다 높은 결과를 보였다. 또한 간장의 경우도 RBA 간장이 기존 간장과 비슷한 결과를 보였으며, 최종 숙성 기간에서 기존과 Brix, 아미노태 질소 함량 및 총 질소 함량이 높은 결과를 나타내었다. 이 결과를 토대로 차년도 묘사 분석을 통해 각각의 관능적 특성을 도출하고 소비자 기호도 평가를 실시하여 상품화 가능성을 알아보고자 한다.

2절 ORiBS1 적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구

1. 재료 및 방법

가. 재료

(1) 원재료

순창에서 생산되고 있는 대두(백태)를 사용하여 본 실험의 재료로 이용하였으며, 천일염은 신안에서 생산되고 있는 제품을 이용하였다.

(2) 균주

본 실험에서 사용된 균주는 본사에서 사용하고 있는 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 와 충무발효(주) 곰팡이를 사용하였으며, 제1협동인 전북대학교에서 *Bacillus cereus*만이 특이적으로 제거된 유기농 벧짚 유래 starter culture인 ORiBS1균주를 받아 실험에 이용하였다.

나. 장류 제조방법

(1) 청국장 제조 방법

상기 (1절 RiBS1적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 청국장 제조 방법과 동일하게 제조하였으며, 균주는 RiBS1대신 ORiBS1을 적용하였다. ORiBS1청국장 제조에 이용한 대조군 및 실험군 목록은 Table 12와 같다.

Table 12. ORiBS1 청국장 제조에 이용한 대조군 및 실험군 목록

	발효온도 (°C)	접종량 (%)	균주	접종온도 (°C)
대조군	40	0.1	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027	60
실험군1	40	0.1	ORiBS1	60
실험군2	40	0.1	ORiBS1(0.05%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027(0.05%)	60
실험군3	40	1	ORiBS1	60
실험군4	40	1	ORiBS1(0.5%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027(0.5%)	60
실험군5	50	0.1	ORiBS1	60
실험군6	50	0.1	ORiBS1(0.05%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027(0.05%)	60
실험군7	50	1	ORiBS1	60
실험군8	50	1	ORiBS1(0.5%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027(0.5%)	60

(2) 사각메주 제조 방법

상기 (1절 RiBS1 적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 사각메주 제조 방법과 동일하게 제조하였으며, 균주는 RiBS1대신 ORiBS1을 적용하였다. ORiBS1메주 제조에 이용한 대조군 및 실험군의 목록은 Table 13과 같다.

Table 13. ORiBS1메주 제조에 이용한 대조군 및 실험군 목록

균주명 (접종량)	
대조군 (이하 BA)	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027 (0.05%) <i>Aspergillus oryzae</i> (0.1%)
실험군1 (이하 OR)	ORiBS1 (0.15%)
실험군2 (이하 ORA)	ORiBS1 (0.05%) <i>Aspergillus oryzae</i> (0.1%)
실험군3 (이하 ORBA)	ORiBS1 (0.05%) <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027 (0.05%) <i>Aspergillus oryzae</i> (0.05%)

(3) 메주 염수 침지 및 된장, 간장 제조 방법

된장 및 간장의 제조는 염수(25%)를 제조하여 메주 : 염수의 비율이 1 : 2가 되게 메주에 부여하였다. 약 4주 정도 침지 후 된장과 간장으로 분리하여 10주간 숙성하였다.

다. 실험방법

(1) 수분측정

상기 (1절 RiBS1적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 방법과 동일하게 진행되었다.

(2) pH 및 적정산도 측정

상기 (1절 RiBS1적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 방법과 동일하게 진행되었다.

(3) Protease활성 측정

상기 (1절 RiBS1적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 방법과 동일하게 진행되었다.

(4) 아미노태 질소(amino-type nitrogen) 측정

상기 (1절 RiBS1적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 방법과 동일하게 진행되었다.

(5) Brix 측정

상기 (1절 RiBS1적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 방법과 동일하게 진행되었다.

(6) 염도 측정

상기 (1절 RiBS1적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 방법과 동일하게 진행되었다.

(11) 총질소 측정

상기 (1절 RiBS1적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 방법과 동일하게 진행되었다.

(12) L값 측정

상기 (1절 RiBS1적용 청국장, 메주, 된장 및 간장 품질변화 연구)의 방법과 동일하게 진행되었다.

2. 연구결과

가. ORiBS1적용 청국장 품질 변화 연구

제1협동인 전북대학교에서 *B.cereus*만이 특이적으로 제거된 유기농 벗짚 유래 starter culture인 ORiBS1균주를 받아 1차년도와 동일하게 기존 분사 대조군을 포함한 총 9가지 조건으로 청국장을 제조하였다(Figure 30).



Figure 30. ORiBS1 청국장 발효48시간 사진

- * A: 대조구(*Bacillus licheniformis* SRCM0100027 0.1%, 40°C)
- * B: ORiBS1(이하 O'R') 0.1%, 40°C
- * C: ORiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027(이하 "ORB') 0.1%, 40°C
- * D: ORiBS1 1%, 40°C
- * E: ORiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027 1%, 40°C
- * F: ORiBS1 0.1%, 50°C
- * G: ORiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027 0.1%, 50°C
- * H: ORiBS1 1%, 50°C
- * I : ORiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027 1%, 50°C

(1) 수분함량

기존 사용하고 있는 대조군과 ORiBS1을 적용하여 조건을 달리한 실험군의 수분함량을 나타낸 결과를 Figure 31에 나타냈다. 각 조건별 초기수분함량은 59.6%으로 발효48시간까지는 51.7~56.9%로 유의적 차이 없이 감소되어지다가 이후부터는 24.4~48.0%로 급격히 감소하였다. 발효온도별로 수분함량 감소의 차이는 크게 나타나지 않았다.

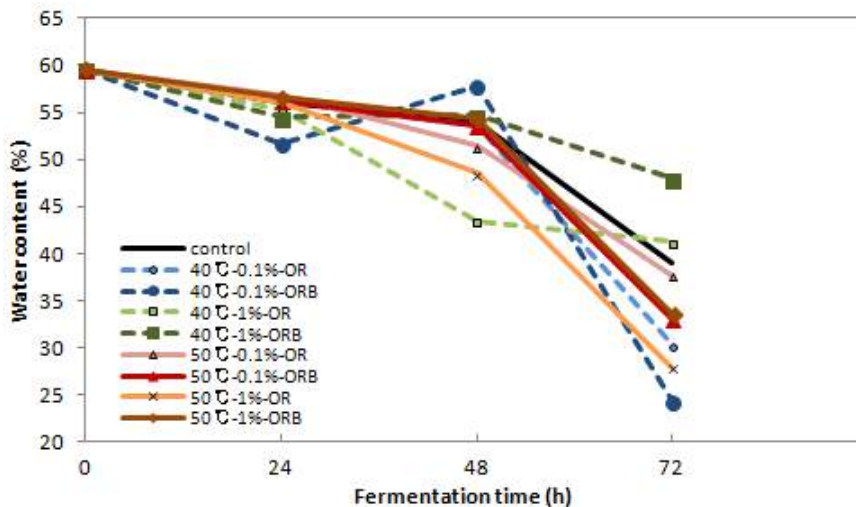


Figure 31. 발효기간에 따른 ORiBS1청국장의 수분함량 변화

(2) Protease activity

대두에 함유된 당이나 지방, 단백질의 이용에 관한 것이 영양학적으로나 관능적으로 중요하기 때문에 다양하게 발효에 이용되는 미생물에 관한 연구가 수행되고 있다. 결국, 발효미생물이 배출하는 amylase나 protease, lipase와 같은 효소와 기타 정미성분 등이 장류의 관능과 기능성 물질 생성에 결정적인 영향을 미치며, 이중에서도 주요한 요소로 평가받고 있는 protease 활성 변화를 살펴보면 발효온도별 유의적 차이가 크게 나타났음을 알 수 있다(Figure 32). 50°C로 발효한 청국장은 발효기간이 경과함에 따라 대조군의 protease활성보다는 낮은 수치이지만 점차적으로 증가함을 보여 발효72시간에는 27.4~34.6 unit/g을 나타낸 반면 40°C로 발효한 청국장은 발효기간이 경과함에도 0.0~10.9 unit/g으로 거의 변화를 보이지 않았다. 이는 40°C로 발효한 RiBS1청국장이 50°C로 발효한 RiBS1청국장보다 protease활성이 높았던 결과와 대

조적인 경향을 보였다.

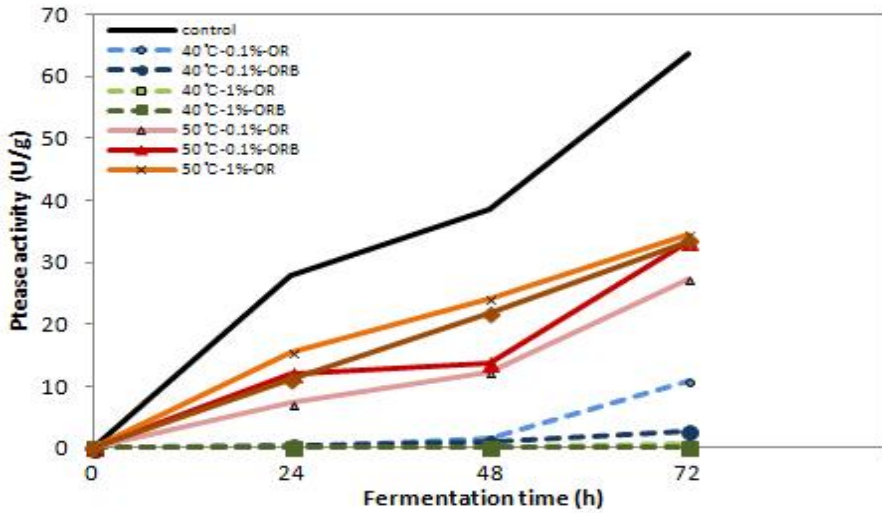


Figure 32. 발효기간에 따른 ORiBS1청국장의 protease activity 변화

(3) pH 및 적정산도

청국장은 균주에 의해 대두가 분해되면서 아미노산, 암모니아가 연차적으로 생성되면서 염기성 pH를 띤다. 이렇듯 청국장의 발효진행 상태를 확인하기 위하여 청국장의 pH 및 산도함량을 측정된 결과는 Figure 33과 같다. 특히 40°C 발효한 청국장과 50°C 발효한 청국장의 pH 변화가 발효 24시간 이후로 뚜렷하게 나타났으며, 발효되지 않은 콩의 pH는 약산성인 pH 6.5 이었으나 40°C 발효한 청국장의 pH는 발효 24시간에 5.1~5.3으로 감소되었으며 이후로 큰 변화 없이 유지 되었다. 반면 50°C로 발효한 청국장의 pH는 발효 24시간에 pH 7.2~7.5로 크게 증가하였으며 이후로도 증가 후 발효 72시간에 약간 감소하는 경향을 보였으나 이는 대조군의 pH 결과보다 높은 수치였다. 적정산도는 pH 결과와 상반되었으며, pH가 낮은 40°C로 발효한 청국장의 산도함량이 발효 72시간에서 1.6~2.0%로 50°C로 발효한 청국장보다 높았음을 알 수 있었다.

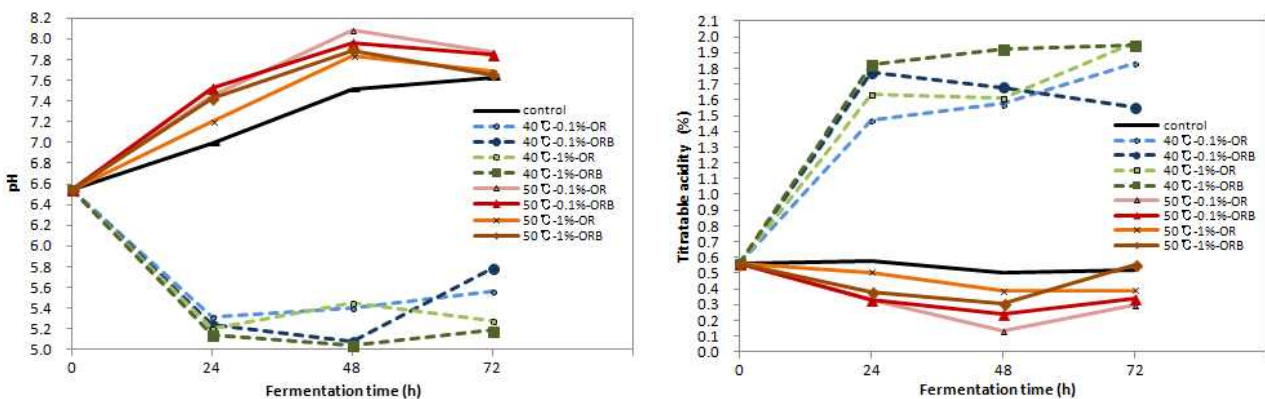


Figure 33. 발효기간에 따른 ORiBS1청국장의 pH 및 적정산도함량 변화

(4) 아미노태 질소(amino-type nitrogen)

청국장의 숙성도 평가의 지표로써 이용되는 아미노태 질소 함량의 분석한 결과를 Figure 34

에 나타내었다. protease활성 결과와 마찬가지로 50℃로 발효한 청국장의 아미노태 질소 함량이 40℃로 발효한 청국장보다 24시간 이후로 지속적으로 높은 결과를 보였다.

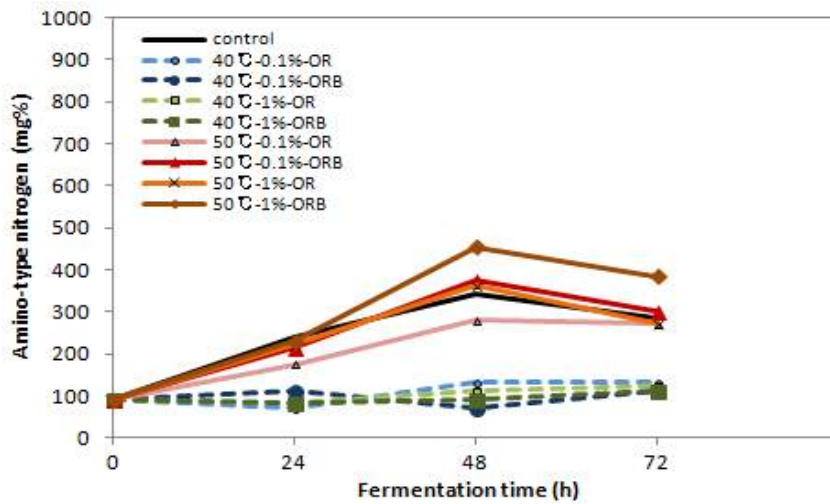


Figure 34. 발효기간에 따른 ORiBS1청국장의 아미노태 질소 함량 변화

(5) 결과 고찰

1차년도 RiBS1청국장도 발효온도별 뚜렷한 차이를 나타내었지만 2차년도 ORiBS1청국장은 그보다 커다란 차이를 나타내었다. 품질특성 뿐만 아니라 외관형태에서도 차이를 많이 보였는데 40℃에서 발효시킨 ORiBS1청국장은 발효 48시간이 되어서도 청국장의 느낌보다는 점액성분이 많은 콩으로 보였다. RiBS1의 경우에도 품질특성에서 차이는 나타내었지만 외관에서는 큰 차이를 발견하지 못했던 점과 비교해보면 흥미로운 결과였다. 결국 이런 결과는 발효온도 50℃로 발효한 청국장에서 장류 품질의 중요한 척도인 Protease activity, pH 및 아미노태질소 함량에서 높은 결과를 보였으며 관능적으로도 양호한 판정을 얻었다. 제2협동의 관능평가를 통해 선정된 발효온도 50℃, 발효시간 48hr, ORiBS1와 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 혼합하여 0.1% 접종한 청국장과 발효온도 50℃, 발효시간 48hr, ORiBS1만을 1% 접종한 청국장을 시제품으로 제작하여 RiBS1 청국장과 관능 분석 차이를 비교하였다.

나. ORiBS1 적용 메주 품질 변화 연구

RiBS1과 ORiBS1의 된장, 간장 숙성 비교연구를 위한 가장 기본이 되는 사각메주를 제조하기 위해 제1협동인 전북대학교에서 *Bacillus cereus*만이 특이적으로 제거된 유기농 벵짚 유래 starter culture인 ORiBS1균주를 받아 1차년도 RiBS1과 동일하게 기존 본사 대조균을 포함한 총 4가지 조건으로 메주를 제조하였다. 즉, 본사의 기존 병형복발효 방법인 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027과 *Aspergillus oryzae*(충무발효(주) 종균)를 사용하고, 실험균은 ORiBS1만 접종한 메주(OR), ORiBS1과 *Aspergillus oryzae*(충무발효(주) 종균)를 접종한 메주(ORA), ORiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027 및 *Aspergillus oryzae*(충무발효(주) 종균)를 접종한 메주(ORBA)를 제조하여 실험했으며, 균의 접종온도는 1차년도 메주 연구에서

선정된 60℃로 동일하게 하였다. 이와 마찬가지로 메주의 품질기준 또한 된장 숙성 중 품질에 가장 많은 영향을 미치는 수분과 protease activity(PA), pH, 적정산도, amino type nitrogen(AN)등을 발효기간별로 분석하였으며, 결과 값은 각 실험군 별 5개의 메주를 채취하여 상하 값을 제외한 3개의 평균값으로 하였다. 발효 종말점 또한 모든 처리구의 PA가 70 unit/g이상에 도달한 때 로 하였다(Figure 35).

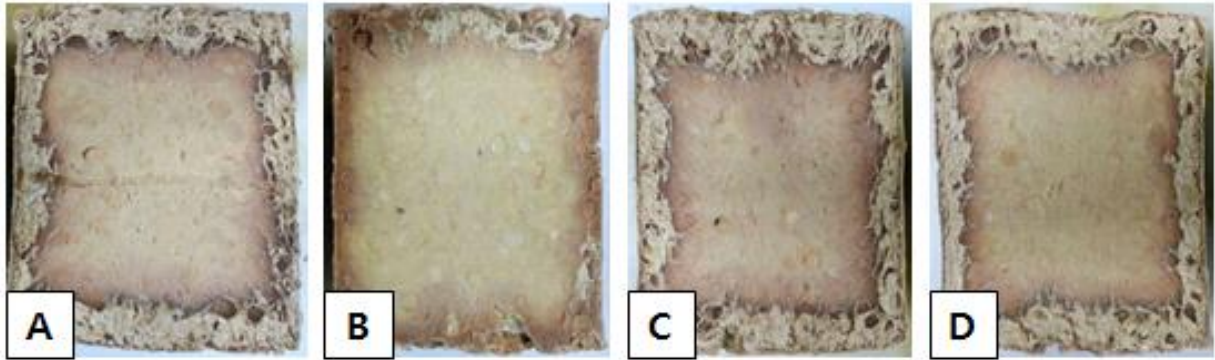


Figure 35. starter culture에 따른 ORiBS1사각메주 발효 완료 사진

- * A: 대조구 (*Bacillus licheniformis* SRCM0100027+*Aspergillus oryzae*)
- * B: ORiBS1(이하 'OR')
- * C: ORiBS1+*Aspergillus oryzae*(이하 'ORA')
- * D: ORiBS1+*Bacillus licheniformis* SRCM0100027+*Aspergillus oryzae*(이하 'ORBA')

(1) 수분함량

모든 실험군 및 대조군이 발효 초기 59.6% 범위에서 발효기간이 경과될수록 완만하게 감소 되었으며, 발효12일에는 평균 약 41%로 실험군별 유의적 차이를 보이지 않았다(Figure 36).

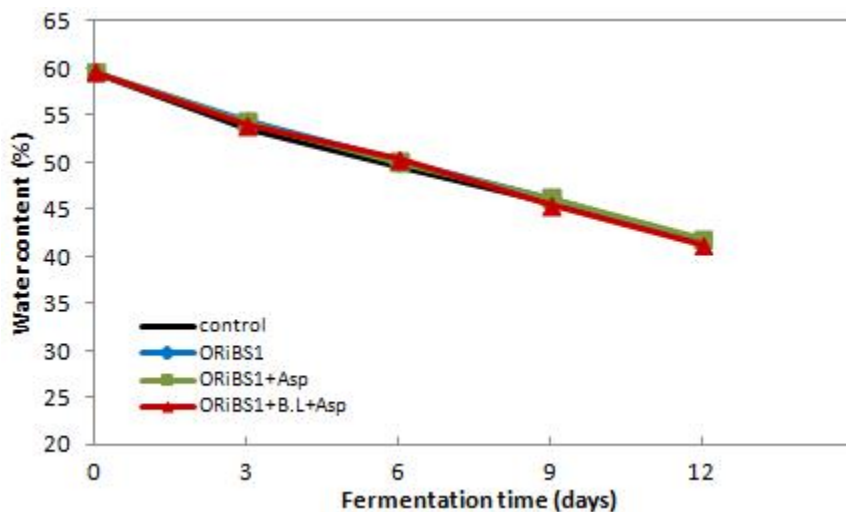


Figure 36. starter culture에 따른 ORiBS1사각메주 수분함량 변화

(2) Protease activity

메주의 중요한 품질기준인 PA는 발효12일이 경과되었을 때 ORiBS1만을 적용한 메주를 제외하고 자체 품질기준인 100 unit/g을 초과하였다(Figure 37). ORA, ORBA메주 및 대조군은 발효가 완료되는 시점까지 각각 122.0 unit/g, 120.3 unit/g, 128.6 unit/g으로 나타나 유의적 차이는 보이지 않았으며, 반면 OR메주는 77.0 unit/g으로 가장 낮은 활성을 보였다. 보통 곰팡이류의 생육 적정 온도가 30°C인 점을 감안하면 *Aspergillus*는 ORiBS1와 함께 접종하였을 때 메주자체의 수분활성도가 발효12일이 되었을 때 세균이나 기타 균류보다는 곰팡이류의 생육이 활성 되는 것으로 판단되어진다.

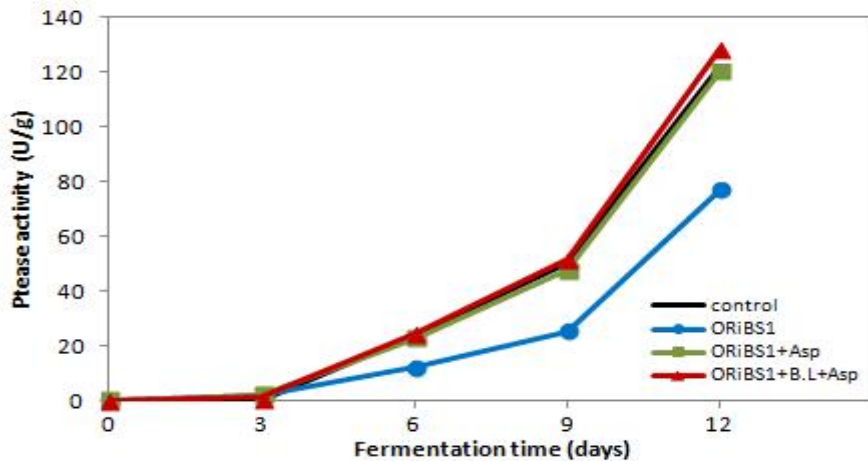


Figure 37. starter culture에 따른 ORiBS1사각메주 protease activity 변화

(3) pH 및 적정산도

발효기간에 따른 pH는 Figure 38에 제시하였다. OR메주의 pH는 5.3으로 발효3일차 이후로 유지되는 경향을 보였으며, ORA는 발효3일차에 pH 5.4로 낮아졌다가 발효기간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하여 발효완료일에는 실험군 중 가장 높은 pH 6.1을 나타내었다. 또한 ORBA메주는 발효3일차에 pH 5.0으로 급격히 감소하다가 발효완료일에는 pH 5.7을 나타내어 대조군과 거의 비슷한 경향을 보였다. 적정산도는 이와 반대로 ORBA메주와 대조군이 가장 높은 함량을 보였으며, ORA메주는 발효9일차까지 3.0%으로 증가하다가 발효완료일에 2.3%으로 감소하였다. OR은 발효기간이 지날수록 산도함량 또한 증가하였으며 발효완료일에는 2.3%를 나타내었다.

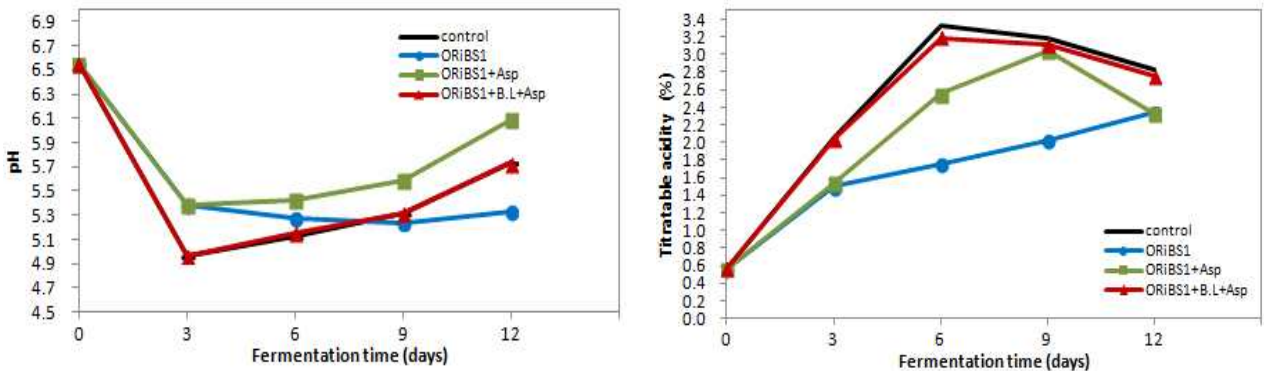


Figure 38. starter culture에 따른 ORiBS1사각메주 pH 및 적정산도함량 변화

(4) 아미노태 질소(amino-type nitrogen)

일반적으로 아미노태 질소 함량은 PA활성 증가에 따라 증가하였다가 유리된 아미노산이 암모니아 등으로 분해되며 메주의 pH를 높이고 AN을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2011). 이러한 현상은 본 실험의 결과를 통해서도 얻을 수 있었다. PA와 마찬가지로 ORA, ORBA메주 및 대조군은 발효가 완료되는 시점까지 지속적으로 증가하여 각각 462.5 mg%, 411.2 mg%, 488.1 mg%으로 나타나 유의적 차이는 보이지 않았으며, 반면 OR메주는 280.5 mg%으로 가장 낮게 측정되었고 이는 다른 처리구와 비교했을 때 약 38% 낮은 함량 이었다 (Figure 39).

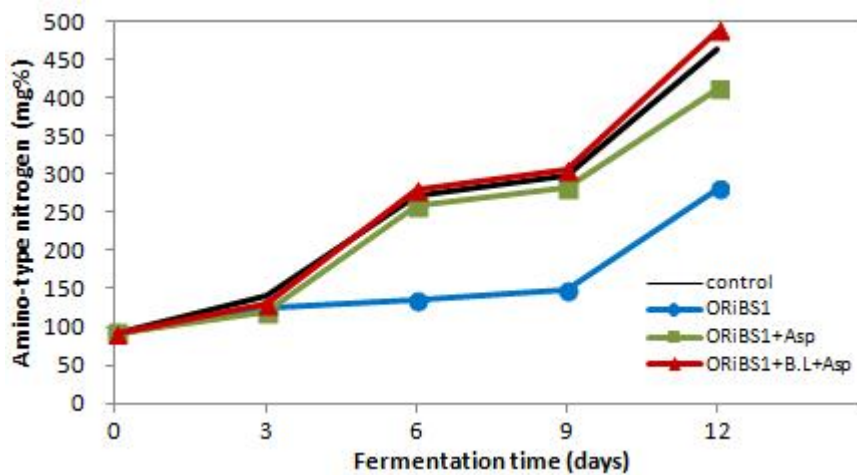


Figure 39. starter culture에 따른 ORiBS1사각메주 아미노태 질소 함량 변화

(5) 결과 고찰

OR메주를 제외한 ORA, ORBA메주가 대조군과 가장 비슷한 특성을 보였으며, 특히 ORBA가 가장 비슷하였다.

다. ORiBS1메주의 염수침지 중 품질변화

장류 자체에서 품질은 발효미생물에 의한 차이가 가장 클 것이나 제조공정 상에서는 성형여부와 바로 염수침지공정이 해당할 것이다. 염수비율은 간장으로 유리되는 유용성분의 양을 좌우한다. Choi 등(2000)이 연구한 결과에 따르면, 콩 사용량에 대비한 간장의 양은 1대 1일 때 23.3%, 1대 1.5 85.9%, 1대 2 145.7%, 1대 2.5 197.4%로 증가하며 이와 비례하여 콩의 무게 대비 용출되는 TN의 총량도 6.9%, 21.4%, 33.7%, 33.2%로 증가한다고 보고하였다. 또한 소금은 된장과 간장의 맛에 직접적으로 관여할 뿐만 아니라 다양한 미생물의 생육을 억제하기도 한다. Chang 등(2010)은 천일염과 정제염을 이용하여 된장의 품질특성을 연구하였는데 천일염을 사용한 된장이 정제염을 사용한 된장보다 같은 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 기

본적인 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 ORiBS1만 접종한 메주(OR), ORiBS1과 충무발효(주) 종균을 접종한 메주(ORA), ORiBS1과 *Bacillus licheniformis* SCC125037 및 충무발효(주) 종균을 접종한 메주(ORBA)를 침지하고 이에 대해 품질변화 특성을 알아보려고 하였다. 메주와 염수비율은 1차년도와 동일하게 1대 2로 하였으며, 침지기간은 약 4주 정도로 하였고, 이는 ORiBS1메주의 고형분이 염수로 용출되는 시간이 빠르게 나타났기 때문이며, 각각의 실험군은 0일부터 28일까지 7일마다 침지액을 채취하여 Brix, 염도, pH, 적정산도 함량, 아미노태 질소 함량(AN), 총 질소 함량(TN)의 변화를 분석하였다(Figure 40).

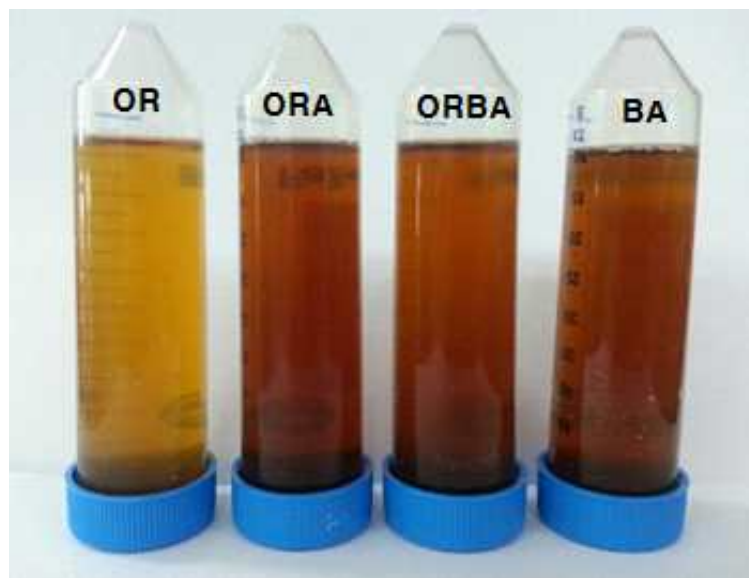


Figure 40. 침지완료된 ORiBS1적용 메주 활용 침지액 (침지28일)

(1) Brix

침지 중 숙성 정도를 가늠할 수 있는 척도인 Brix의 변화는 Figure 41에 제시하였다. 침지기간이 경과함에 따라 메주로부터 유래한 성분이 용출·분해되어 증가하는 경향을 보였으며, 특히 ORA와 ORBA는 대조군보다 높은 30.3 brix, 29.2 brix를 나타내었다. 반면 OR은 시간이 지날수록 증가하는 경향을 보였으나, 다른 실험군에 비해 27.1 brix로 낮게 측정되었다.

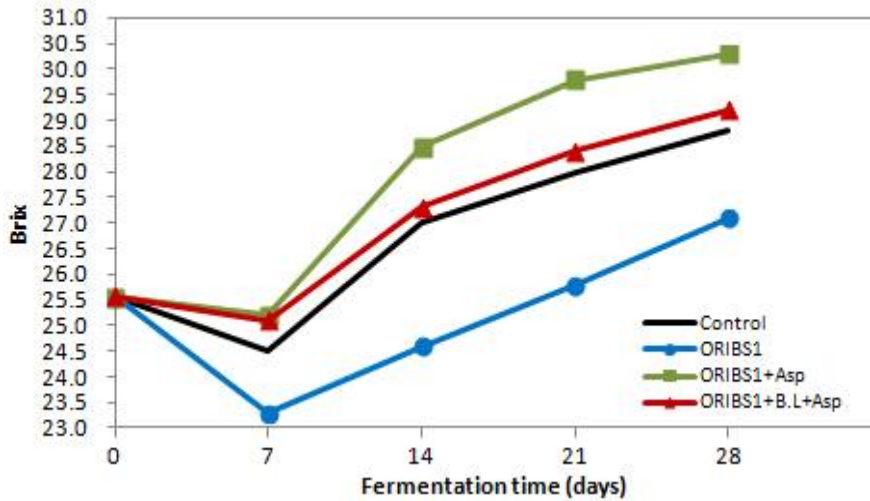


Figure 41. starter culture에 따른 ORiBS1침지액의 brix 변화

(2) 염도

침지기간 중 염도변화를 관찰한 결과 모든 실험군에서 유의적 차이를 나타내지 않았다 (Figure 42). 실험결과로 보아 침지 시작 7일 만에 메주 내부 수분과 염수간 염도 평형을 이뤄 염수의 염도가 급격하게 감소하였으나 이후에는 평균 14%로 큰 변화를 보이지 않았다.

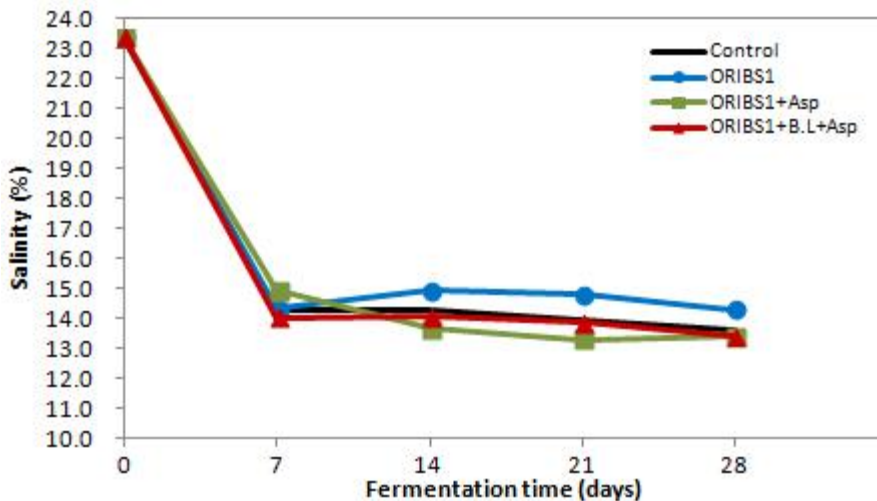


Figure 42. starter culture에 따른 ORiBS1침지액의 염도 변화

(3) pH 및 적정산도

염수 침지 중 pH는 침지7일만에 급격히 감소하여 이후로 큰 변화를 보이지 않았다(Figure 43). OR의 경우 침지종료일에는 pH 5.4로 다른 실험군에 비해 약간 낮게 나타났으며, ORA는 pH 5.9, ORBA는 pH 6.0으로 대조군의 pH보다는 약간 낮으나 큰 유의적 차이는 없었다. 적정산도는 침지기간이 경과할수록 pH가 감소함에 따라 증가하였으며, 침지완료일에 OR은 1.0%, ORA는 1.2%, ORA는 1.0%로 대조군보다 약간 높았으나 유의적 차이는 없었다.

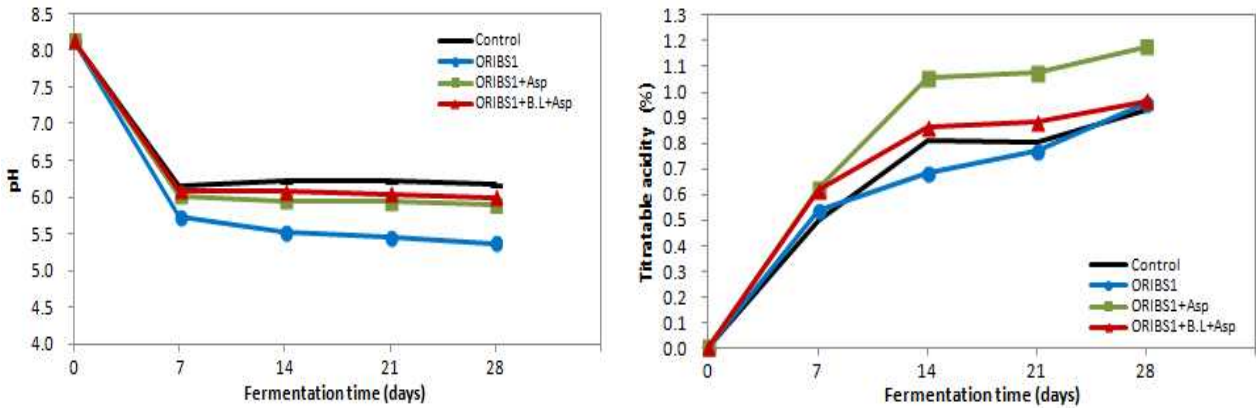


Figure 43. starter culture에 따른 ORiBS1침지액의 pH 및 적정산도 함량 변화

(4) 아미노태 질소(amino-type nitrogen)

침지기간 중 아미노태 질소 함량 변화는 Figure 44와 같이 침지기간이 경과할수록 지속적으로 증가하여 brix와 부합하는 경향을 보였다. 침지완료일에 ORA는 684.4 mg%로 가장 높은 함량을 나타냈으며 ORB는 617.2 mg%로 대조군과 비슷한 함량을 보였으며, 반면 OR은 brix결과와 마찬가지로 328.1 mg%로 가장 낮은 함량을 나타내었다.

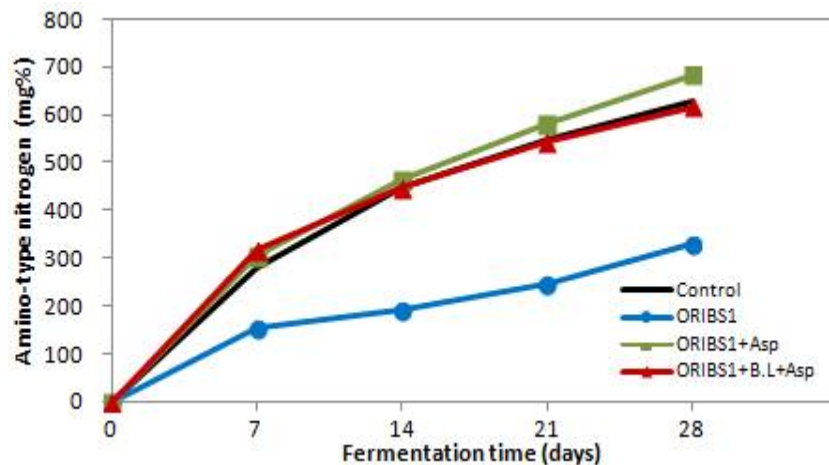


Figure 44. starter culture에 따른 ORiBS1침지액의 아미노태 질소 함량 변화

(5) 총 질소(TN)

침지액의 총 질소 변화는 Figure 45와 같다. 이는 위의 아미노태 질소 함량결과 유사한 결과를 보였으며, 모든 처리구가 침지완료일에 0.7 %N 이상 이였으나, OR을 제외한 ORA, ORBA, 대조군은 침지 14일 만에 급격히 증가하여 0.9 %N 이상을 나타내었다. 이 결과 또한 메주에서 protease활성과 아미노태 질소 함량이 높은 결과와 상응하는 결과 값을 보여준다.

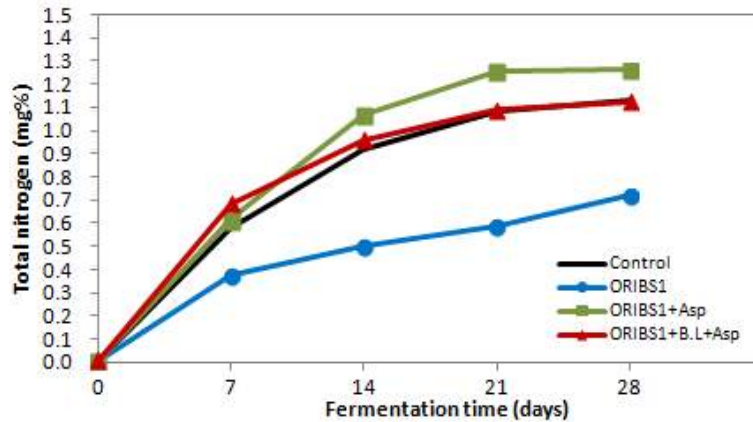


Figure 45. starter culture에 따른 ORiBS1침지액의 총 질소 함량 변화

(6) 결과 고찰

ORiBS1만 접종한 메주를 이용한 된장, 간장을 제외하고 비슷한 경향을 나타내었다. 이는 메주 제조 시 *Aspergillus oryzae*접종의 영향으로 메주의 protease활성과 아미노태 질소 함량이 높을수록 침지액의 brix, 총 질소 함량은 증가했음을 알 수 있으며, 이들 성분은 비례적인 관계로 해석될 수 있고 간장의 brix 및 총 질소 함량에도 영향을 미칠 것으로 판단되어진다.

라. ORiBS1 메주 이용 된장 및 간장 숙성 연구

염수침지가 완료된 대조군과 실험군은 장 분리를 실시하였고, 된장과 간장(Figure 46, Figure 48)으로 분리하여 숙성변화를 관찰하였다. 0일부터 70일 동안 14일 간격으로 샘플을 채취하여 된장의 경우 수분함량, 염도, pH, 적정산도, AN, L값의 변화를 분석하였고, 간장은 Brix, 염도, pH, 적정산도, AN, TN을 분석하여 품질 특성을 살펴보았다.

(1) 된장



Figure 46. 숙성완료된 ORiBS1적용 메주 활용 된장 (숙성70일)

숙성기간 중 된장의 수분함량은 Figure 47A에 나타내었다. 초기 수분이 가장 낮았던 OR된장의 경우 숙성완료일에 57.1%로 다른 실험군에 비해 낮은 함량이었으나 이는 큰 유의적 차이를 나타내지는 않으며, 모든 실험군이 숙성기간이 경과함에 따라 거의 일정하게 유지되는 경향을 보였다. 염도도 처리구별 큰 유의적 차이는 보이지 않았으며, 숙성완료일에 OR된장 10.3%, ORA된장 10.2%, ORBA된장 10.7%으로 대조군과 비슷한 결과를 나타내었다(Figure 47B). 된장 숙성기간별 pH 측정결과는 기간이 지나감에 따라 pH가 감소되었다가 증가하는 것으로 나타났(Figure 47C). 특히 ORA, ORBA된장 및 대조군이 OR된장보다 pH저하 폭이 큰 것을 알 수 있었다. 숙성초기 pH 5.9에서 숙성42일까지 각각 pH 5.0~5.2로 감소되다가 이후 약간 증가하여 숙성완료일에는 pH 5.4를 나타내었다. 숙성기간 중 pH가 낮아지는 일반적인 원인이 숙성 중 미생물의 작용으로 lactic acid, acetic acid, oxalic acid 등의 유기산이 생성되기 때문이며, 본 실험 같은 변화는 *Aspergillus oryzae*첨가 여부로 생각되어지며, *Aspergillus*속이 생성해내는 여러 가지 효소들 뿐 만아니라 유기산들의 생성으로 인해 된장의 pH에 영향을 주는 것으로 판단되어 진다. 적정산도는 pH 결과와 반대로 모든 실험군이 숙성기간이 경과함에 따라 증가하다가 감소하는 경향을 보였다(Figure 47D). 아미노태 질소 함량 변화에 대한 결과는 실험군 모두 초기보다 숙성기간이 길어짐에 따라 아미노태 질소가 증가되는 결과를 보이는 것으로 분석되었다(Figure 47E). OR된장의 경우 숙성초기 390.1 mg%로 다른 실험군에 비해 가장 낮은 함량이었으나 숙성될수록 증가 속도가 빨라져 숙성완료일에는 800.6 mg%으로 10주 만에 약 50%함량이 증가되었음을 알 수 있었다. ORA된장의 아미노태 질소는 914.7 mg%으로 가장 높은 함량을 보였으며, 대조군 873.6 mg%보다 높은 결과를 보였다. 또한 ORBA는 855.8 mg%함량을 나타내었다. 된장의 L값은 제품의 기호도에 큰 영향을 미치는 중요한 품질 관리 항목으로 숙성기간 중 L값 변화 결과는 기간이 지남에 따라 약간 감소하는 경향을 보였으며, 특히 숙성완료일 OR된장의 L값은 39.9로 ORA, ORBA된장보다 낮은 결과를 보였다(Figure 47F).

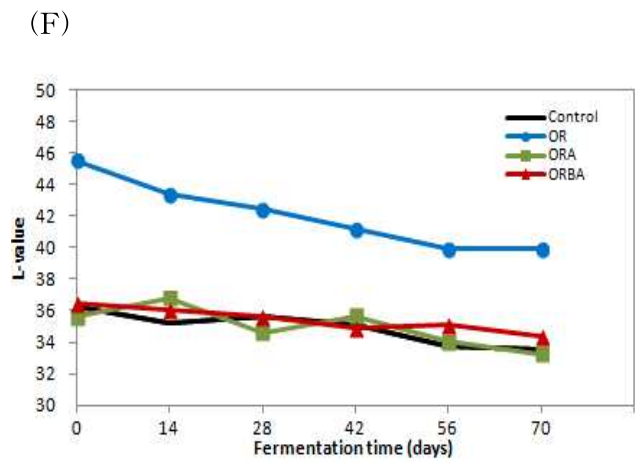
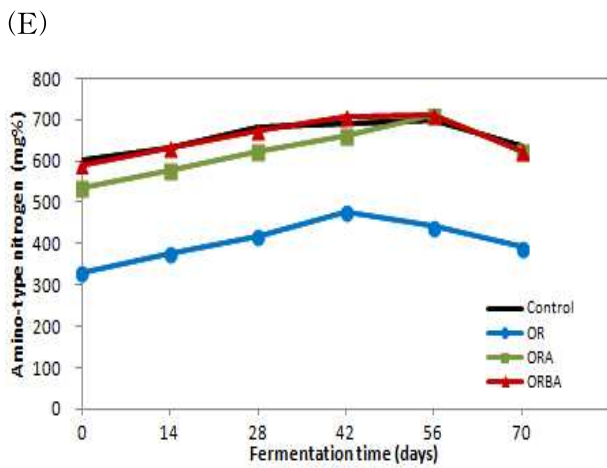
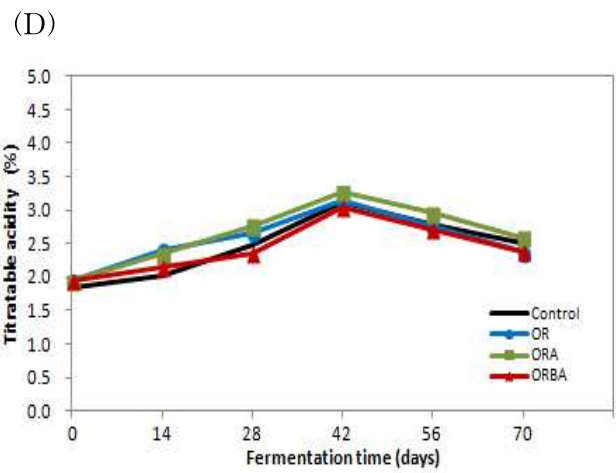
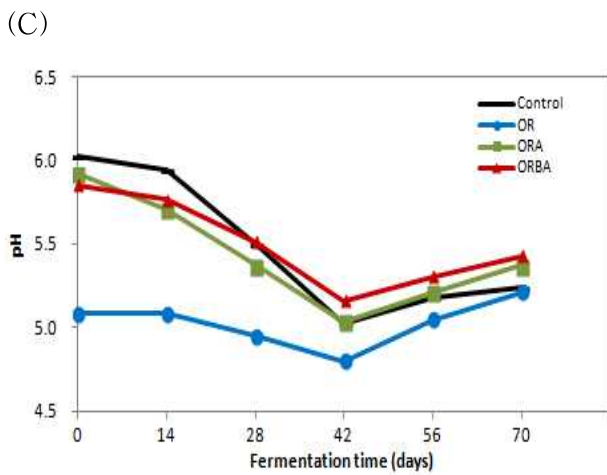
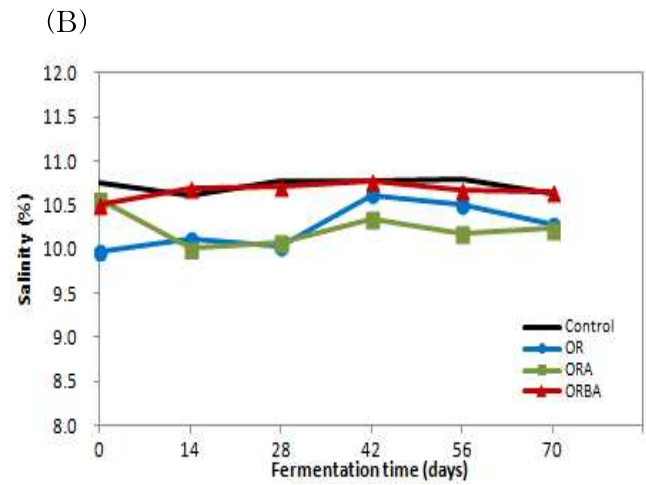
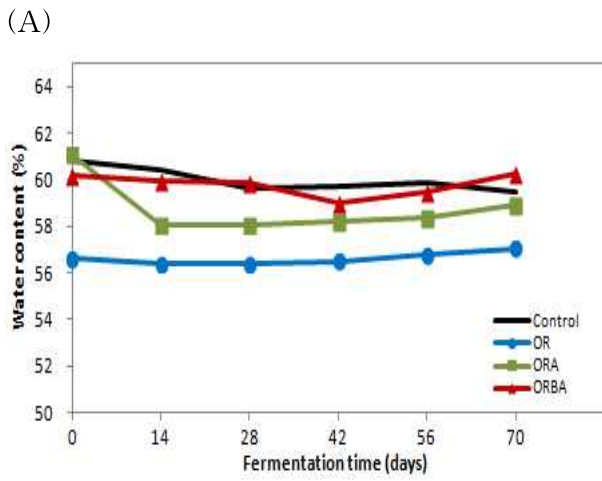


Figure 47. 숙성기간에 따른 ORiBS1적용 메주 활용 된장의 품질 변화

(2) 간장



Figure 48. 숙성완료된 ORiBS1적용 메주 활용 간장 (숙성70일)

간장의 brix 변화를 측정된 결과는 Figure 49A와 같다. 숙성기간이 경과함에 따라 brix 함량은 변하지 않았으며, 숙성완료일에 OR, ORA, ORBA간장 모두 평균 27.5 brix로 대조군과 비슷한 함량을 나타내었다. 또한 염도의 결과도 마찬가지로 모든 실험군에서 약 14%로 일정 수준을 유지하며 큰 변화를 보이지 않았다(Figure 49B). 숙성기간 동안 간장의 pH를 측정된 결과 실험군 모두 숙성초기 평균 pH 5.7에서 70일간 숙성 후 평균 pH 5.2로 나타났으며, 숙성기간에 따른 pH 변화는 뚜렷하지 않았다(Figure 49C). 박테리오파지를 메주에 접종시켜 이를 활용하여 제조한 간장에 대한 보고는 현재까지 전무하며, 미장 혼합 비율에 따른 간장의 pH를 조사한 Jeong 등(2014)의 결과와 비교하면 간장의 2주간 발효 후 평균 pH 6.01 보다는 낮은 결과를 나타내었다. 적정산도는 숙성기간에 따라 큰 변화는 없었으며, 이것은 숙성기간이 길어짐에 따라 간장의 적정산도가 증가하였다는 Chae(2000), Kwon 등(2003)의 보고와는 다른 결과를 나타내었다(Figure 49D). 숙성기간별 ORiBS1간장의 아미노태 질소는 Figure 49E에 제시하였다. 아미노태 질소는 protease activity가 높고, 대두의 양이 많을수록 저분자 peptide와 아미노산이 다량으로 생성됨에 따라 생성되는 것으로 간장의 숙성 정도와 보존기간 품질의 지표가 된다(Kwon et al., 2010). 아미노태 질소 함량이 높은 간장이 성분 및 관능적 특성에서 좋은 것으로 평가되고 있으며(Kim, 2004) 본 실험에서 기간에 따른 아미노태 질소 변화에서 ORA, ORBA간장은 숙성초기 평균 563.7 mg%에서 숙성완료일에 평균 625.4 mg%를 나타내어 대조군과 비슷한 경향을 보인 반면 OR은 숙성초기 331.0 mg%에서 숙성완료 391.8 mg%을 나타내어 ORA간장과 ORBA간장에 비해 약 37%가량 낮은 함량을 보였다. 간장의 맛을 좌우함은 물론 간장의 수율에 관여하는 총 질소 함량의 변화를 측정된 결과는 Figure 49F와 같으며 숙성기간이 경과함에 따라 ORA간장과 ORBA간장은 대조군과 비슷한 함량인 1.2 %N을 유지하였으며, 반면 OR간장은 숙성초기에서 숙성이 완료되는 시점까지 0.8 %N의 함량을 보여 한식간장의 총 질소 기준인 0.7 %N보다는 높았지만 ORA, ORBA간장에 비해 낮은 함량을 나타내었다.

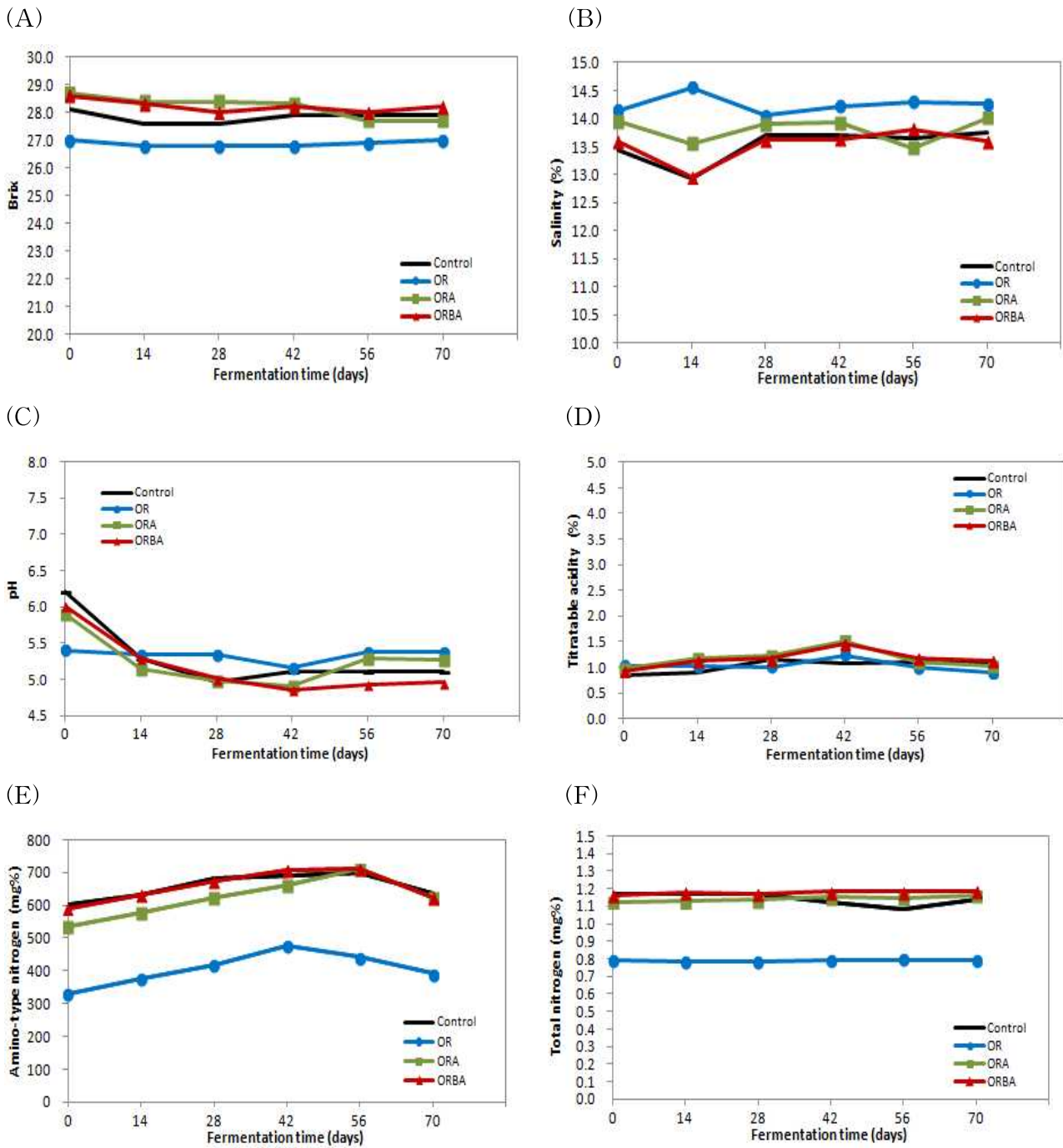


Figure 49. 숙성기간에 따른 ORiBS1적용 메주 활용 간장의 품질 변화

(3) 결과 고찰

ORA, ORBA 된장과 간장은 *Bacillus*속을 집중한 대조군과 비슷한 경향을 보였고, 큰 유의적 차이를 보이지 않았다. OR간장은 다른 실험군에 비해 관능적 특성에서 감칠맛의 척도가 되는 아미노태 질소 및 총 질소 함량이 낮았고, 반면 OR된장의 경우 아미노태 질소 함량이 숙성 초기에는 다른 실험군에 비해 현저히 낮았으나 숙성기간이 경과함에 따라 증가 속도가 빠르게 나타났으며, 숙성기간을 연장한다면 더 높은 함량을 나타낼 것으로 판단되어진다.

3절 개발 제품 상품화 추진

1. RiBS1 적용 청국장, 된장 및 간장 묘사분석 및 기호도 조사

*B. cereus*만이 특이적으로 제거된 벧짚 유래 Starter culture인 RiBS1을 이용하여 제조한 청국장, 된장 및 간장의 정확한 관능적 특성을 도출·분석하기 위해 이화여자대학교에 의뢰하여 수행하였다. 패널은 장류 관련 전문적인 묘사분석 훈련 과정을 거친 40~50대 주부 11명(43~57세)을 대상으로 묘사분석을 하였으며, 기호도 조사는 20대 65명의 여대생을 인터넷 홍보를 통하여 모집한 후 다양한 패널 모집을 위해 모집 시 청국장 섭취 경험 유무와 무관한 소비자를 모집하여 본 실험을 수행하였다.

가. 청국장

(1) 관능적 특성 분석(묘사분석)

(가) 시료

제2협동에서 자체 관능평가 후 가장 선호도가 좋았던 RiBS1적용 청국장 2종(발효온도 50℃, 발효시간 48hr, RiBS1와 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 혼합하여 0.1% 접종한 청국장, 이하 **R+B** / 발효온도 50℃, 발효시간 24hr, RiBS1 0.1% 접종한 청국장, 이하 **R**)과 기존 본사 청국장(소금 무첨가 100% 순창콩 청국장, 이하 **무염**), 벧짚을 이용하여 제조한 전통 청국장 2종(칠갑산 청국장, 이하 **칠갑산** / 유모레 청국장, 이하 **유모레**), 전국에 시판되고 있는 5종의 청국장을 생산 지역을 고려하여 경상도, 충청도, 강원도, 전라도 지역의 청국장(송다 청국장, 이하 **송다** / 산사의 참맛, 이하 **산사** / **한살림** / 담양 청국장, 이하 **담양** / 김인순 찌개 청국장, 이하 **김인순**)을 선정하여 본 실험을 수행하였다. 시료에 대한 기본적인 정보는 Table 14와 같다.

Table 14. 청국장 10종 시료

이름	지역	제품명	성분
R	전라도 (순창)	R	RiBS1 48hr-0.1%-R (50℃)
R+B		R+B	RiBS1 24hr-0.1%-RB (50℃)
무염		소금 무첨가 100% 순창콩 청국장	대두(국산)100%
칠갑산	충청도	칠갑산 우리콩 청국장	대두(국산)95%, 천일염(국산)3%, 고춧가루(국산)2%
유모레	전라도	유모레 청국장	콩(국산)98%, 천일염(국산)2%
송다	경상도	송다 청국장	콩(대두)98%, 천일염2%
산사	경상도	산사의 참맛	콩(국산)95%, 2회 죽염(국산)5%
한살림	강원도	한살림	콩100%(국산)
담양	전라도	담양 청국장	대두(수입산)96%, 정제염(국산)4%
김인순	전라도	김인순 찌개 청국장	발효대두96%(국산), 식염3%

(나) 실험 결과

① 청국장 10종의 관능적 특성

청국장 10종의 관능적 특성강도를 강·중·약으로 나누어 정리한 내용은 다음과 같다.

전반 맛 강도가 강한 시료는 담양 > 한 살림 > R > 유모례 > 김인순 > 송다 > 무염/산사 > 칠갑산 > R+B 순으로 나타났다(Table 15). R시료는 많은 특성에서 중간 강도의 점수를 취했으며, 강한 강도의 특성은 인공조미료 향이고 약한 강도의 특성은 군덕내, 텃텃한/뚝은 정도, 걸쭉한 정도 등이 발현되었다. R+B시료는 R의 특성과 유사하였으며, 이에 덧붙여 익힌 콩 향미, 인공조미료 향미, 구수한 향미 걸쭉한 정도 등 청국장에서 발현되는 일반적 특성들 또한 약한 강도로 평가되었다. 김인순시료는 단맛, 감칠맛, 인공조미료 향미 특성이 강하게 발현된 반면 메주 향, 익힌 콩 향미, 쓴맛, 걸쭉한 정도 특성은 약하게 발현되었고 담양시료는 청국장에서 발현되는 일반적 특성들이 강하게 나타나고 군덕내, 쓴맛, 이미/이취, 텃텃한/뚝은 정도, 걸쭉한 정도 특성 등은 약하게 나타났다. 무염시료는 거의 모든 특성에서 약한 강도를 보였고 단맛 특성에서 강한 강도가 나타나고 시큼한 향, 감칠맛, 이미/이취 특성은 중간 강도로 발현되었다. 산사시료는 단맛 특성을 제외하고 거의 모든 특성이 중간 강도와 약한 강도로 발현되었고 송다시료는 청국장에서 일반적으로 발현되는 특성인 메주 향/향미, 익힌 콩 향, 간장 향/향미 등이 강하게 나타나고 더불어 이미/이취, 텃텃한/뚝은 정도 특성 또한 강하게 나타나는 것이 특징 이었다. 유모례시료는 단맛, 쓴맛, 짠내, 메주 향/향미, 멸치 향미, 간장 향미, 시큼한 향, 이미/이취 등의 특성에서 강한 강도로 나타나는 반면 구수한 향미, 걸쭉한 정도 특성에서 약한 강도로 나타남. 이 외의 익힌 콩 향/향미, 구수한향, 인공조미료 향/향미 특성은 중간 강도로 발현되었다. 칠갑산시료는 진한정도, 탁한 정도, 짠내, 메주 향/향미, 멸치 향/향미, 인공조미료 향, 몽그러지는 정도, 걸쭉한 정도 특성에서 강한 강도가 나타나고, 쓴맛, 이미/이취, 텃텃한/뚝은 정도 특성 또한 강한 강도를 가졌으며 반면에 일반적으로 청국장에서 발현되는 감칠맛, 익힌 콩 향/향미, 구수한 향미 특성에서는 약한 강도로 나타났다. 이 외의 특성은 중간 강도를 가졌다. 마지막으로, 한살림시료는 쓴맛, 짠내, 메주 향/향미, 익힌 콩 향/향미, 구수한 향/향미, 인공조미료 향, 간장 향미, 몽그러지는 정도 특성에서 강한 강도로 나타나고, 시큼한 향, 이미/이취 특성에서 약한 강도로 나타남. 이 외의 단맛, 감칠맛, 걸쭉한 정도 특성은 중간 강도로 발현되었다.

전반 맛 강도가 상대적으로 높은 시료는 담양시료로 나타났으며, 담양 시료의 특징은 단내, 단맛, 익힌 콩 향미, 구수한 향/향미, 인공조미료 향미 특성이 다른 시료들에 비해 강하게 나타나고 쓴맛 특성은 약하게 나타났다.

Table 15. 청국장 10종 시료의 평균값과 표준편차

샘플	진한정도	탁한정도	단내	짙내	시큼한향	발효향	메주향	익힌콩향
P-value	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.019*	0.075	0.000***	0.000***
R	4.7±1.49 ^b	5.64±1.78 ^{abc}	5.24±2.14 ^{bc}	5.15±2.37 ^{abc}	4.03±2.48	5.64±2.33	5.97±1.85 ^{bc}	5.18±1.67 ^{abc}
R+B	5.79±1.39 ^c	6.03±1.67 ^{bcd}	4.76±1.9 ^{bc}	4.88±2.1 ^{abc}	3.55±2.21	5.21±2.48 ^a	5.94±1.75 ^{bc}	5.06±1.87 ^{abc}
김인순	5.12±1.62 ^b	5.24±1.68 ^{ab}	5.09±2.01 ^{bc}	5.15±1.84 ^{abc}	4.42±2.53	6.12±2.5	5.64±2 ^{ab}	5.12±2.21 ^{abc}
담양	6.88±1.56 ^d	6.94±1.75 ^{def}	5.76±2.22 ^c	5.15±2.14 ^{abc}	4.03±2.34	5.39±2.37	6.18±1.79 ^{bcd}	5.97±1.69 ^c
무염	2.91±1.49 ^a	5±2.26 ^a	4.09±1.93 ^a	4.27±2.04 ^a	3.88±2.69	5.88±2.37	4.91±2.08 ^a	4.73±2.1 ^{ab}
산사	4.73±1.35 ^{bc}	5.15±1.86 ^{ab}	4.67±1.78 ^{bc}	4.3±1.79 ^{ab}	3.45±2.12	5.24±2.39	5.39±2.03 ^{ab}	4.48±1.97 ^a
송다	8.39±1.78 ^e	7.82±1.86 ^f	4.91±2.74 ^{bc}	5.79±2.19 ^c	4.21±2.36	5.67±2.43	6.97±1.96 ^{cd}	5.48±2.03 ^{abc}
유모레	7±1.09 ^d	6.52±1.4 ^{cde}	5.06±1.9 ^{bc}	5.48±1.97 ^c	4.36±2.45	5.24±2.48	6.45±2.21 ^{bcd}	5.21±2.13 ^{abc}
칠갑산	9.64±1.52 ^f	8.58±1.73 ^g	4.58±2.02 ^{bc}	5.55±2.08 ^c	3.79±2.36	5.45±2.49	6.79±1.82 ^{cd}	4.97±1.98 ^{abc}
한살림	6.55±1.42 ^d	7.18±1.78 ^{ef}	5.18±2.07 ^{bc}	5.42±2.03 ^{bc}	3.76±2.21	5.76±2.63	7.15±1.94 ^d	5.64±2.13 ^{bc}
합계	6.17±2.36	6.41±2.11	4.93±2.1	5.12±2.09	3.95±2.37	5.56±2.43	6.14±2.04	5.18±2

샘플	구수한향	꽃콩/콩비린내	멸치향	군덕내	간장향	인공조미료향	단맛	짙맛
P-value	0.000***	0.244	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.253
R	5±2.22 ^{bc}	2.55±2.29	4.33±2.87 ^{ab}	3.7±2.16 ^{ab}	4.33±2.06 ^{abc}	4.36±2.25 ^{ab}	4.52±2.35	7.61±1.92
R+B	4.82±1.98 ^{abc}	2.64±2.22	4.03±2.92 ^{ab}	3.73±2.25 ^{ab}	4.18±2.04 ^{abc}	4.12±2.26 ^{ab}	4.15±2.45	7.06±1.35
김인순	4.55±2.09 ^{abc}	2.85±2.43	3.79±3.27 ^{ab}	3.85±2.5 ^{ab}	4.06±2.19 ^{abc}	3.76±2.45 ^{ab}	5.09±2.08	7.61±1.56
담양	5.67±2.09 ^c	2.55±2.24	5.21±3.66 ^b	3.76±2.29 ^{ab}	4.24±2.15 ^{abc}	4.79±2.63 ^b	4.88±2.41	8.03±1.83
무염	3.7±2.05 ^a	2.7±2.1	2.97±2.54 ^a	3.36±2.43 ^a	3.15±1.91 ^a	3.33±2.38 ^a	4.76±2.36	7.48±1.99
산사	4.45±1.89 ^{abc}	2.45±2.2	3.58±3.31 ^{ab}	3.52±2.12 ^a	3.64±2.03 ^{ab}	3.64±2.33 ^{ab}	4.73±2.08	7.52±1.81
송다	4.85±2.54 ^{abc}	2.82±2.17	5.18±3.5 ^b	4.88±2.76 ^b	5.15±2.64 ^c	4.7±2.59 ^b	3.91±2.39	7.36±2.01
유모레	4.55±2.31 ^{abc}	2.61±2.14	4.42±3.03 ^{ab}	4.18±2.38 ^{ab}	4.7±2.05 ^{bc}	3.97±2.28 ^{ab}	4.61±1.98	7.39±2.02
칠갑산	4.39±2.3 ^{ab}	2.36±1.92 ^a	5.36±3.77 ^b	4.33±2.31 ^{ab}	5.03±2.34 ^c	4.36±2.13 ^{ab}	3.82±2.39	7.3±1.9
한살림	5.33±2.01 ^{bc}	2.55±2.36	4.73±3.23 ^{ab}	4.06±2.49 ^{ab}	4.79±2.7 ^{bc}	4.3±2.39 ^{ab}	4.36±2.26	7.67±1.96
합계	4.73±2.19	2.61±2.18	4.36±3.27	3.94±2.38	4.33±2.27	4.13±2.38	4.48±2.28	7.5±1.84

샘플	신맛	쓴맛	감칠맛	전반맛강도	발효향미	메주향미	익힌콩향미	구수한향미
P-value	0.109	0.000***	0.000***	0.002**	0.590	0.000***	0.023*	0.000***
R	3.79±1.95	3.61±1.9 ^{abc}	6.55±2.49 ^{ab}	8.27±1.51 ^{ab}	5.09±2.05	5.85±1.82 ^{ab}	5.64±1.92	5.18±2.49 ^{ab}
R+B	3.7±2.23	3.94±1.89 ^{abc}	5.79±2.29 ^{ab}	7.48±1.42 ^a	4.94±2.42	5.88±1.71 ^{ab}	5.39±2.18	4.61±2.22 ^{ab}
김인순	3.73±2.07	3.36±2.1 ^{ab}	6.85±2.31 ^b	8.06±1.22 ^{ab}	5.33±2.37	5.85±1.99 ^{ab}	5.36±1.92	5±2.62 ^{ab}
담양	3.58±1.87	3.42±1.89 ^{ab}	6.79±2.12 ^b	8.85±1.7 ^b	5.3±2.42	6.18±1.91 ^{ab}	6.06±1.98	5.82±2.44 ^b
무염	3.85±2.25	3±2.15 ^a	6.39±1.85 ^{ab}	7.94±1.64 ^{ab}	5.24±2.91	5.15±2 ^a	5.3±2.2	4.33±2.57 ^a
산사	3.76±2.06	3.61±2.03 ^{abc}	6.21±2.61 ^{ab}	7.94±1.77 ^{ab}	4.88±2.19	5.64±2.16 ^{ab}	5.39±1.95	5.06±2.29 ^{ab}
송다	3.88±2.5	4.52±2.18 ^{bc}	5.91±2.57 ^{ab}	8.03±1.81 ^{ab}	5.15±2.31	6.64±1.64 ^b	5.64±2.16	5.06±2.83 ^{ab}
유모레	4.55±2.18	4.24±2.41 ^{bc}	6.61±2.45 ^{ab}	8.15±1.86 ^{ab}	5.33±2.71	6.45±2.27 ^b	5.7±2.27	4.79±2.18 ^{ab}
칠갑산	3.94±2.21	4.64±1.85 ^c	5.36±2.49 ^a	7.91±1.74 ^{ab}	5±2.46	6.64±2.07 ^b	5.24±2.29	4.79±2.46 ^{ab}
한살림	3.85±2.14	4.3±2.08 ^{bc}	6.12±2.43 ^{ab}	8.36±1.82 ^{ab}	5.33±2.42	6.76±2.09 ^b	5.91±2.16	5.45±2.2 ^{ab}
합계	3.86±2.14	3.86±2.09	6.26±2.38	8.1±1.67	5.16±2.41	6.1±2.01	5.56±2.09	5.01±2.44

샘플	꽃콩/콩비린향미	멸치향미	간장향미	인공조미료향미	이미/이취	텃텃한/뚱은정도	몽그러지는정도	겉쭉한정도
P-value	0.103	0.000***	0.000***	0.000***0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.006**
R	2.7±2.42	5.85±3.41	4.88±3	6±2.88	3.3±2.1	4.64±2.26	7.24±1.48 ^{bc}	6.24±1.82 ^a
R+B	2.33±2.16	5.21±2.87	4.64±2.64	5.42±2.81	3.21±2.27	5.06±2.21	8.48±1.44 ^d	6.52±1.99 ^a
김인순	2.61±2.45	5.7±3.07	4.79±2.66	6.42±2.61	3.36±2.5	4.79±2.53	8.06±1.68 ^{cd}	5.97±1.81 ^a
담양	2.39±2.19	6.03±3.26	5.36±2.62	6.48±3.05	3.15±1.87	4.52±2.46	7.27±1.91 ^{bc}	6.36±1.95 ^a
무염	2.82±2.43	4.76±2.88	4±2.35	5.12±2.45	3.3±2.33	4.3±1.9	6.03±1.4 ^a	6.21±2.01 ^a
산사	2.52±2.18	5.27±3.22	4.45±2.37	5.45±2.64	2.91±2.05	4.58±2.21	7.3±1.45 ^{bc}	5.88±1.95 ^a
송다	2.76±2.32	6.21±3.66	5.27±2.93	5.67±2.84	3.82±2.13	5.58±2.41	7.03±1.65 ^b	6.58±1.99 ^a
유모레	2.88±2.7	5.55±3.14	5.45±2.71	5.88±2.76	3.76±2.05	4.82±2.31	8.06±1.66 ^{cd}	6.03±2.11 ^a
칠갑산	2.85±2.69	5.79±3.57	5.36±2.8	5.15±2.72	3.82±2.14	5.52±2.43	8.09±1.31 ^{cd}	9.82±12.39 ^b
한살림	2.7±2.49	5.97±3.18	5.18±2.51	5.76±2.8	3.21±2.12	4.94±2.28	7.94±1.52 ^{cd}	7.06±1.97 ^a
합계	2.65±2.38	5.63±3.22	4.94±2.67	5.74±2.76	3.38±2.15	4.87±2.31	7.55±1.68	6.67±4.42

* 최대평균값은 빨간색, 최소평균값은 파란색으로 표시

* P***<0.001 P**<0.01 P*<0.05

② 청국장 10종의 관능적 특성에 대한 시각적 도표화

주성분 분석(PCA)을 실시하여 청국장 10종의 관능적 특성을 시각적으로 요약하고 도표화하여 Figure 50에 나타내었다.

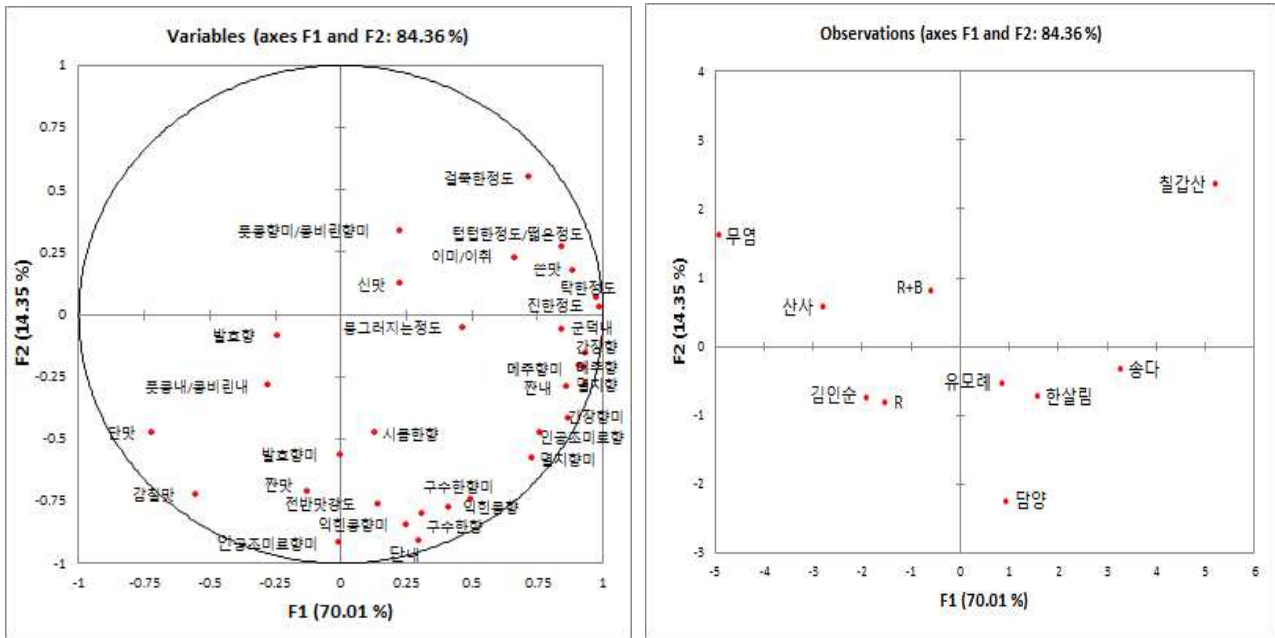


Figure 50. 청국장 10종의 주성분분석(PCA) 결과

R시료의 특징은 풋콩 내/콩 비린내가 강하게 나타남을 알 수 있고 **R+B**시료는 풋콩향미/콩 비린 향미가 두드러지게 나타났다. 김인순시료는 발효 향/향미, 인공조미료 향미, 단맛, 짠맛, 감칠맛 특성이 두드러졌으며 담양시료의 특징은 구수한향, 단내, 인공조미료 향미, 익힌 콩 향미, 전반 맛 강도, 짠맛, 감칠맛이 강하다. 기존 본사 제품인 무염시료는 전반적으로 대부분의 관능적 특성들이 다른 시료들에 비해 약하게 나타나는 것이 특징이였며 산사시료 또한 대부분의 관능적 특성들이 다른 시료들에 비해 약하게 나타나는 것이 특징이였다. 송다시료는 간장향, 멸치 향, 군덕내, 짠내, 메주 향/메주향미가 강하게 나타나는 것이 특징이였고, 유모레시료는 시큼한 향, 짠내, 군덕내, 이미/이취, 간장향미, 멸치향미, 신맛이 강한 것이 특징이였다. 칠갑산시료의 특징은 진한정도, 탁한 정도, 간장 향, 군덕내, 쓴맛, 걸쭉한 정도, 텁텁한 정도/뽀은 정도 특성이 강하게 나타났으며 마지막으로, 한살림시료의 특징은 몽그러지는 정도, 메주 향/향미, 멸치 향/향미, 간장향미가 강한 것으로 분석되었다.

(2) 소비자 기호도 조사

(가) 시료

제2협동에서 자체 관능평가 후 가장 선호도가 좋았던 RiBS1적용 청국장 2종(발효온도 50℃, 발효시간 48hr, RiBS1와 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 혼합하여 0.1% 접종한 청국장, 이하 **R+B** / 발효온도 50℃, 발효시간 24hr, RiBS1 0.1% 접종한 청국장, 이하 **R**)과 기존 본사 청국장(소금 무첨가 100% 순창콩 청국장, 이하 **무염**), 볶짚을 이용하여 제조한 전통 청국장 2종(칠갑산 청국장, 이하 **칠갑산** / 유모레 청국장, 이하 **유모레**), 이전에 시행되었던 청국장

관능적 특성 분석 결과를 토대로 거의 모든 관능적 특성 항목에서 눈에 띄는 특징이 없게 평가된 산사의 참맛(이하 **산사**), 구수한향, 단내, 인공조미료 향미, 익힌 콩 향미, 전반 맛 강도, 짠맛, 감칠맛이 강하게 평가된 담양 청국장(이하 **담양**)을 선정하여 본 실험을 수행하였다. 시료에 대한 기본적인 정보는 Table 16과 같다.

Table 16. 청국장 10종 시료

이름	지역	제품명	성분
R	전라도 (순창)	R	RiBS1 48hr-0.1%-R (50℃)
R+B		R+B	RiBS1 24hr-0.1%-RB (50℃)
무염		소금 무첨가 100% 순창콩 청국장	대두(국산)100%
칠갑산	충청도	칠갑산 우리콩 청국장	대두(국산)95%, 천일염(국산)3%, 고춧가루(국산)2%
유모레	전라도	유모레 청국장	콩(국산)98%, 천일염(국산)2%
산사	경상도	산사의 참맛	콩(국산)95%, 2회 죽염(국산)5%
담양	전라도	담양 청국장	대두(수입산)96%, 정제염(국산)4%

(나) 실험 결과

① 청국장 10종에 대한 기호도 분석

청국장 7종에 대한 기호도를 조사한 결과는 Table 17에 나타내었다. 전반기호도가 가장 높은 시료는 담양으로 나타났고 전반기호도가 가장 낮은 시료는 유모레로 나타났다. 냄새/향기호도, 맛/향미기호도, 식감/질감/입안감촉기호도가 높으면 전반기호도가 높고, 이 항목들의 점수가 낮으면 전반기호도가 낮게 나타났다. 반면 외관 기호도는 전반기호도에 큰 영향을 주지 않은 것으로 분석되었다.

청국장 7종에 대한 시료별 전반기호도는 칠갑산>R+B>무염>R>유모레 순으로 평가되었고, 외관 기호도는 칠갑산>유모레>R>R+B>무염 순으로 평가, 냄새/향기호도는 칠갑산>R+B>R>무염>유모레 순으로 평가, 맛/향미 기호도는 R+B>무염>R>칠갑산>유모레 순으로 평가되었고, 마지막으로 식감/질감/입안감촉 기호도는 무염>칠갑산>R+B>R>유모레 순으로 평가되었다. 더불어, RiBS1을 적용한 개발 제품인 두 시료 중에서 R청국장 보다 R+B청국장의 기호도가 크게 나타났다.

Table 17. 청국장 7종에 대한 기호도 평균 및 표준편차

시료명	전반기호도	외관기호도	냄새/향기호도	맛/향미기호도	식감/질감/ 입안감촉 기호도
R	4.4±1.52 ^b	5.12±1.22 ^b	4.95±1.4 ^b	4.35±1.63 ^{ab}	5.06±1.37 ^{ab}
R+B	4.54±1.73 ^{bc}	5.09±1.38 ^b	5.17±1.67 ^{bc}	4.54±1.85 ^b	5.12±1.64 ^{ab}
담양	5.69±1.51 ^d	5.58±1.29 ^b	5.62±1.35 ^c	5.78±1.64 ^c	5.97±1.5 ^c
무염	4.49±1.85 ^{bc}	4.31±1.7 ^a	4.86±1.63 ^b	4.48±1.97 ^b	5.4±1.46 ^b
산사	5.11±1.65 ^{cd}	5.08±1.52 ^b	5.22±1.56 ^{bc}	5.18±1.77 ^c	5.63±1.32 ^{bc}
유모레	3.75±1.67 ^a	5.23±1.24 ^b	4.22±1.52 ^a	3.71±1.77 ^a	4.68±1.49 ^a
칠갑산	4.58±1.94 ^{bc}	6.12±1.48 ^c	5.29±1.54 ^{bc}	4.2±1.98 ^{ab}	5.35±1.6 ^b
합계	4.65±1.78	5.22±1.49	5.05±1.57	4.61±1.9	5.32±1.53

* 최대값은 파란색, 최소값은 빨간색으로 표시

② 좋았던 시료와 싫었던 시료 분석

청국장 7종의 시료를 평가한 후, 가장 좋았던 시료와 가장 싫었던 시료 각각 2 종씩 고른 결과를 합산하여 Table 18에 정리하였다. 가장 좋았던 시료는 담양 > 산사 > 칠갑산 > R+B > R = 무염 > 유모레 순으로 나타났고, 가장 싫었던 시료는 유모레 > R = 무염 > 칠갑산 > R+B > 산사 > 담양 순으로 나타났다. 가장 좋았던 시료인 담양은 28.5%로 다른 시료에 비해 높은 비율로 선정되었고, 가장 싫었던 시료인 유모레 또한 25.4%의 높은 비율로 선정되었다.

Table 18. 가장 좋았던 시료와 가장 싫었던 시료

	가장 좋았던 시료		가장 싫었던 시료	
	빈도	%	빈도	%
R	91	10.0	168	18.5
R+B	112	12.3	112	12.3
담양	259	28.5	42	4.6
무염	91	10.0	168	18.5
산사	168	18.5	56	6.2
유모레	35	3.8	231	25.4
칠갑산	154	16.9	133	14.6
합계	910	100.0	910	100.0

③ 청국장 7종의 시료별 CATA 선호인자와 비선호인자 분석

청국장 7종 시료의 좋은 점과 싫은 점을 카이제곱검정을 통해 CATA항목에 대한 시료별 유의성 검정을 실시하였으며, 다양한 항목 중 20%이상의 소비자가 응답한 결과만을 모아 Table 19에 정리하였다.

R시료의 선호인자로 ‘부담이 없다’, ‘구수한 맛’, ‘순한 맛’, ‘씹히는 질감’이 높게 나타났고, 비

선호인자로는 ‘뭉은 농도’, ‘개성이 없다’, ‘무슨 맛인지 모르겠다’, ‘단조로운 맛’, ‘이상한 맛/냄새’가 높게 나타났다. R+B시료의 선호인자로 ‘부담이 없다’, ‘순한 맛’, ‘담백한 맛’가 높게 나타났고, 비선호인자로는 ‘뭉은 농도’, ‘무슨 맛인지 모르겠다’, ‘개성이 없다’, ‘짠맛이 약함’, ‘좋은 점이 없다’ 항목이 높게 나타났다. 담양시료의 선호인자로 ‘부담이 없다’, ‘구수한 맛’, ‘순한 맛’, ‘씹히는 질감’, ‘담백한 맛’, ‘토속적이다’, ‘자연적인 맛이다’, ‘외관’, ‘친숙하다’는 항목이 높게 나타났고, 비선호인자로는 ‘뭉은 농도’, ‘개성이 없다’, ‘단조로운 맛’이 나타났다. 무염시료의 선호인자로 ‘순한 맛’, ‘부담이 없다’, ‘건강에 좋을 것 같다’, ‘담백한 맛’ 항목이 높게 나타났고, 비선호인자는 ‘뭉은 농도’, ‘무슨 맛인지 모르겠다’, ‘외관’, ‘다시 먹고 싶지 않다’, ‘단조로운 맛’, ‘개성이 없다’ 항목이 높게 나타났다. 산사시료의 선호인자는 ‘순한 맛’, ‘부담이 없다’, ‘담백한 맛’, ‘구수한 맛’, ‘뭉은 농도’ 항목이 높게 나타났고, 비선호인자는 ‘뭉은 농도’, ‘단조로운 맛’, ‘개성이 없다’, ‘좋은 점이 없다’ 항목이 높게 나타났다. 유모레시료의 선호인자는 ‘씹히는 질감’, ‘외관’ 항목이 높게 나타났고 비선호인자는 ‘이상한 맛/냄새’, ‘췌내’, ‘다시 먹고 싶지 않다’, ‘굳덕내/구린내’, ‘시큼한 맛’, ‘무슨 맛인지 모르겠다’, ‘좋은 점이 없다’, ‘뭉은 농도’, ‘속이 불편해진다’ 항목이 높게 나타났다. 칠갑산시료의 선호인자는 ‘외관’, ‘토속적이다’, ‘구수한 맛’, ‘깊고 진한풍미’, ‘발효된 맛/냄새’, ‘씹히는 질감’, ‘부담이 없다’ 항목이 나타났고 비선호인자에는 ‘이상한 맛/냄새’, ‘다시 먹고 싶지 않다’, ‘짠맛이 약함’, ‘단조로운 맛’ 항목이 높게 나타났다.

각 시료에 대한 선호인자와 비선호인자 분석을 총합한 결과, ‘부담이 없다’, ‘순한 맛’, ‘구수한 맛’, ‘담백한 맛’ 등의 특성이 청국장에 대한 소비자의 선호도에 긍정적 영향을 끼치는 것으로 분석되어지며 반면, ‘뭉은 농도’, ‘개성이 없다’, ‘단조로운 맛’, ‘이상한 맛/냄새’ 등의 특성은 선호도에 부정적 영향을 끼치는 것으로 분석되었다.

Table 19. 각 시료에 대한 선호인자와 비선호인자(%)

(a) 선호인자(Like)

시료	외관	구수한맛	순한맛	깊고 진한풍미	담백한맛	발효된맛/냄새	씹히는 질감
P-value	0.023*	0.006**	0.000***	0.003**	0.049*	0.011*	0.362
R	12(18.46)	15(23.08)	15(23.08)	4(6.15)	11(16.92)	2(3.08)	13(20)
R+B	7(10.77)	8(12.31)	21(32.31)	1(1.54)	17(26.15)	2(3.08)	12(18.46)
담양	13(20)	25(38.46)	21(32.31)	7(10.77)	19(29.23)	7(10.77)	21(32.31)
무염	9(13.85)	9(13.85)	24(36.92)	2(3.08)	15(23.08)	4(6.15)	11(16.92)
산사	9(13.85)	15(23.08)	32(49.23)	4(6.15)	17(26.15)	6(9.23)	11(16.92)
유모레	13(20)	11(16.92)	7(10.77)	5(7.69)	5(7.69)	8(12.31)	14(21.54)
칠갑산	22(33.85)	17(26.15)	10(15.38)	13(20)	12(18.46)	13(20)	13(20)

시료	뭉은농도	친숙하다	부담이 없다	토속적이다	자연적인 맛이다	건강에 좋을 것 같다	좋은점이 없다
P-value	0.115	0.239	0.001**	0.003**	0.349	0.666	0.002**
R	7(10.77)	5(7.69)	19(29.23)	12(18.46)	9(13.85)	11(16.92)	10(15.38)
R+B	11(16.92)	4(6.15)	22(33.85)	8(12.31)	11(16.92)	9(13.85)	14(21.54)
담양	9(13.85)	13(20)	28(43.08)	18(27.69)	16(24.62)	12(18.46)	2(3.08)
무염	11(16.92)	6(9.23)	20(30.77)	6(9.23)	12(18.46)	16(24.62)	13(20)
산사	13(20)	8(12.31)	28(43.08)	6(9.23)	9(13.85)	12(18.46)	5(7.69)
유모레	4(6.15)	7(10.77)	9(13.85)	10(15.38)	6(9.23)	8(12.31)	17(26.15)
칠갑산	4(6.15)	9(13.85)	13(20)	20(30.77)	9(13.85)	12(18.46)	7(10.77)

* P***<0.001 P**<0.01 P*<0.05

(b) 비선호인자(Dislike)

시료	외관	짤맛이 약함	시큼한맛	단조로운맛	씼내	군텃내/구린내	이상한맛/냄새
P-value	0.001**	0.469	0.009**	0.761	0.000***	0.005**	0.000***
R	8(12.31)	12(18.46)	6(9.23)	15(23.08)	10(15.38)	12(18.46)	15(23.08)
R+B	9(13.85)	15(23.08)	11(16.92)	12(18.46)	4(6.15)	3(4.62)	9(13.85)
담양	5(7.69)	8(12.31)	6(9.23)	14(21.54)	5(7.69)	4(6.15)	5(7.69)
무염	19(29.23)	8(12.31)	10(15.38)	15(23.08)	10(15.38)	9(13.85)	12(18.46)
산사	10(15.38)	10(15.38)	4(6.15)	18(27.69)	4(6.15)	8(12.31)	6(9.23)
유모레	3(4.62)	10(15.38)	17(26.15)	10(15.38)	21(32.31)	17(26.15)	28(43.08)
칠갑산	5(7.69)	15(23.08)	5(7.69)	15(23.08)	8(12.31)	13(20)	17(26.15)

시료	뭉은농도	개성이 없다	무슨 맛인지 모르겠다	속이 불편해진다	다시 먹고 싶지 않다
P-value	0.364	0.071	0.040**	0.009**	0.000***
R	18(27.69)	17(26.15)	16(24.62)	4(6.15)	10(15.38)
R+B	23(35.38)	16(24.62)	19(29.23)	6(9.23)	6(9.23)
담양	19(29.23)	15(23.08)	6(9.23)	2(3.08)	1(1.54)
무염	22(33.85)	14(21.54)	19(29.23)	10(15.38)	18(27.69)
산사	19(29.23)	16(24.62)	10(15.38)	4(6.15)	7(10.77)
유모레	15(23.08)	4(6.15)	17(26.15)	14(21.54)	18(27.69)
칠갑산	12(18.46)	11(16.92)	12(18.46)	9(13.85)	15(23.08)

* P***<0.001 P**<0.01 P*<0.05

(3) 청국장 7종의 관능적 특성과 소비자기호도의 관련성

모사분석결과 도출된 청국장의 관능적 특성과 실제 소비자조사에서 도출된 시료별 기호도와 의 연관성을 분석하고자 그 관련성을 시각적으로 요약하고 도표화하기 위해 Generalized Procrustes analysis(GPA)를 활용하였다(Figure 51).

전반기호도, 외관기호도, 냄새/향기호도, 맛/향미 기호도는 담양, 산사, R/칠갑산/R+B/무염, 유모레 순으로 높게 평가되었다. 거의 모든 기호도가 가장 높게 평가된 담양시료는 감칠맛, 단맛, 단내, 인공조미료 향/향미, 익힌 콩 향/향미, 전반 맛 강도, 구수한향 특성이 강하게 발현되었으며, 전반기호도가 가장 낮게 평가된 유모레시료는 이미/이취, 시큼한 향이 강하게 발현되어 이러한 특성이 기호도 부정적 영향을 준다고 판단되어진다. 외관기호도가 높게 평가된 칠갑산시료는 진한 정도, 탁한 정도, 메주 향/향미, 짠내, 군덕내, 멸치향/향미, 간장 향/향미, 텁텁한 정도/뽀은 정도, 걸쭉한 정도, 뭉그러지는 정도가 강하게 발현되었고, 외관기호도가 가장 낮게 평가된 무염시료는 이미/이취, 군덕내 등의 부정적인 향이 낮게 평가되었으나 일반적으로 청국장에서 느껴지는 메주 향/향미, 간장 향/향미, 익힌 콩 향/향미 등 또한 낮게 평가되었다. 산사, R, R+B시료는 위에서 언급한 시료들에 비해 두드러지는 특성이 나타나지 않았다.

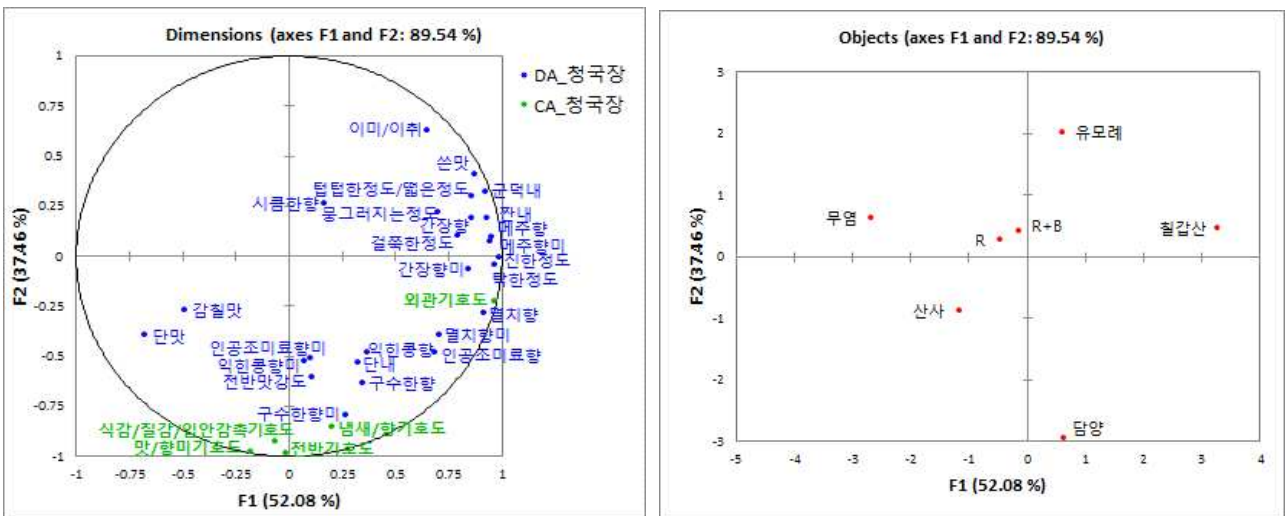


Figure 51. 청국장 7종의 소비자 기호도와 관련된 관능적 특성에 대한 Generalized Procrustes analysis(GPA) 결과

이를 통해 R청국장과 R+B청국장은 일반적인 청국장에 비해 특성이 약하고 기호도 또한 약하다는 것을 알 수 있었으며, 이와 같은 결과는 전통 청국장의 맛이 길들여지지 않은 현대인들의 식습관을 배재 할 수 없어 소비자가 반복적으로 섭취하였을 때 청국장의 기호도 변화를 알아보고자 8주간에 걸쳐 반복섭취 실험을 진행하였다.

(4) 청국장 시료의 반복 섭취 시 소비자 기호도 변화 분석

(가) 실험방법

맛 방향이 다양한 청국장을 소비자가 반복적으로 섭취하였을 때 각각의 청국장에 대한 소비자 기호도 변화를 분석하고자 하였다. 실험은 전체 7종의 청국장에 대한 기호도 조사를 4주씩

즉 실험을 시작하는 시점인 0주차, 4주차, 8주차 총 3회에 걸쳐 진행하였고 또한 7종 중 4종을 선택하여 반복적인 섭취를 진행한 반복실험으로 실험을 시작하는 시점에서부터 매주 1회씩 총 3회에 걸쳐 실시하였다. 구체적인 실험 설계는 Figure 52와 같다.

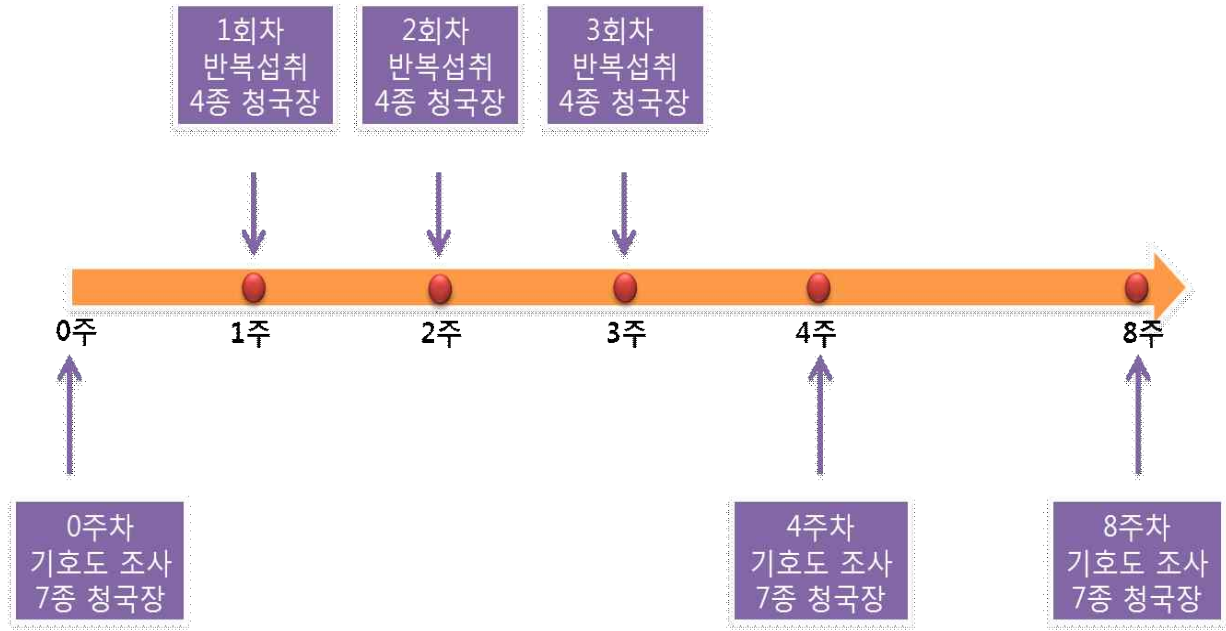


Figure 52. 소비자 기호도 조사 및 반복 섭취 실험 디자인

(나) 실험결과

① 7종 청국장의 소비자 기호도 변화

7종 청국장에 대해 기간을 두고 반복적으로 소비자 조사를 진행한 결과 소비자 조사 기간에 따라 청국장 시료에 대한 기호도가 유의적으로 변화 된 것으로 나타났다(Figure 53). 아울러 청국장의 종류에 따라 기호도 변화 추이가 달라짐을 알 수 있었다. 즉 R, R+B, 담양, 무염 시료의 경우 청국장 시료를 맛 본 기간이 늘어날수록 이들 시료에 대한 기호도는 증가하였다. 특히 R과 R+B청국장의 경우 초기 소비자 기호도는 4,5위로 하위권이었으나 최종 소비자 기호도 조사에서는 각각 2, 3위를 보여 소비자의 기호도가 눈에 띄게 증가한 것으로 나타났다. 반면 칠갑산 시료는 소비자가 이 시료에 노출 될수록 기호도가 감소하는 것으로 조사되었고 유모레의 경우 기호도는 변동이 없는 것으로 나타났다.

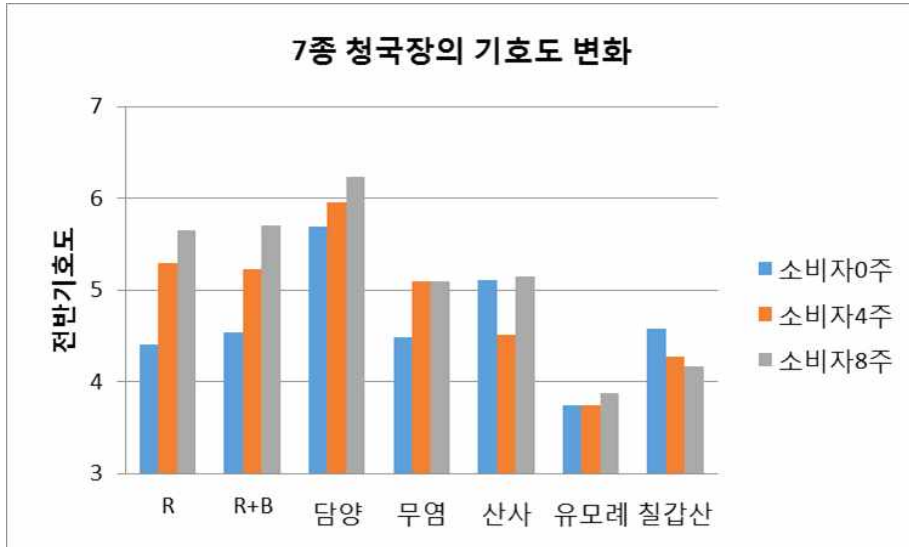


Figure 53. 노출기간에 따른 7종 청국장의 기호도 변화

② 4종 청국장의 반복 섭취시 기호도 변화

7종의 청국장에 대해 0주차 소비자 조사 기호도를 실시한 직후 3주간 4종의 청국장에 대한 반복섭취 실험을 실시하였고 그 기호도 변화는 Figure 54와 같다. 전반적으로 0주차 소비자 기호도 조사에 비해 4종 반복섭취 실험 때에는 청국장과 더불어 밥, 김치가 함께 제공되어 기호도 점수가 증가하였다. 칠갑산 시료의 경우 반복섭취가 진행될수록 기호도가 유의적으로 감소되었으나 나머지 R, 담양, 산사 시료의 경우 반복섭취 기간 내에서의 기호도 변화는 크지 않은 것으로 나타났다. 따라서 매주 진행된 반복섭취 실험보다는 0주차, 4주차, 8주차에 진행된 소비자 기호도 조사에서 각 시료에 대한 기호도가 더 큰 폭으로 변화된 것을 알 수 있었다.

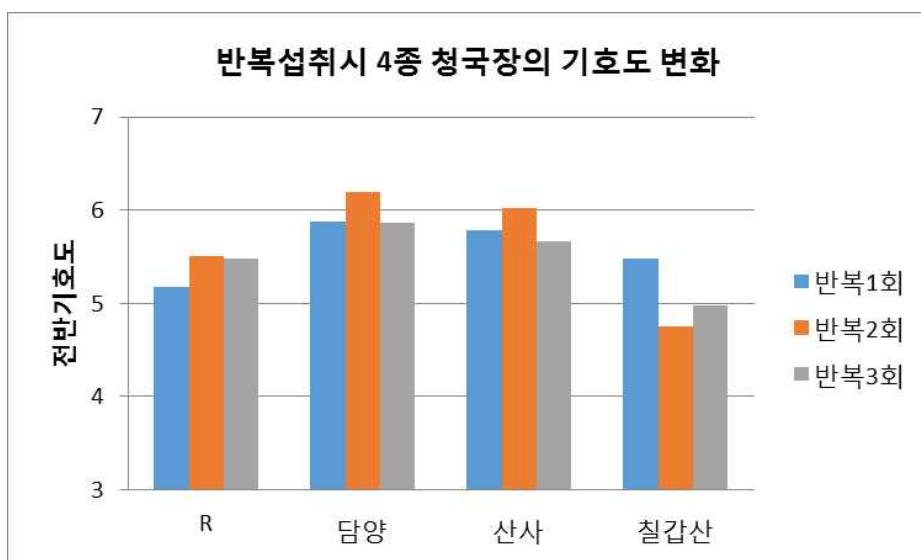


Figure 54. 4종 청국장의 반복섭취 시 기호도 변화

(5) 결론

위 결과와 같이 청국장은 섭취 횟수에 따라 소비자 기호도가 급격히 변화하는 것으로 분석되어진다. 청국장의 경우 발효식품이기 때문에 맛에 대한 학습효과가 있을 것으로 사료되며 초기 기호도보다 반복적으로 노출되었을 때 기호도의 변화를 분석하는 것이 청국장의 소비자 기호도를 이해함에 있어서 중요할 것으로 판단되어진다.

결론적으로 유모레, 칠갑산에 있는 이미, 이취는 점점 갈수록 부정적인 영향을 미치고, R과 R+B에 있는 약한 특성들은 점점 갈수록 긍정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 어떠한 성분이 반복섭취 할수록 긍정적인 영향을 미치는지는 추후에 연구를 통해 밝히는 것도 좋을 것이라 생각되어진다. 또한 7종의 청국장 중에서 R과 R+B가 가장 큰 반복섭취 기호도 변화를 보여줌으로써 장기간에 봤을 때 긍정적인 평가를 얻을 것으로 예상되어진다.

나. 된장

(1) 관능적 특성 분석(표사분석)

(가) 시료

된장의 시료는 Starter Culture(RiBS1), *Aspergillus oryzae*(A.O), *Bacillus sp.*(B.L)의 처리 여부에 따라 4종으로 구분되어진다. 즉 RiBS1만 적용한 메주를 활용하여 제조한 된장(이하 **R**), RiBS1와 *Aspergillus oryzae*를 적용한 메주를 활용하여 제조한 된장(이하 **RA**), RiBS1와 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 적용한 메주를 활용하여 제조한 된장(이하 **RBA**) 및 기존 분사 된장인(이하 **BA**)이며, 시판 된장으로 전국적으로 판매되고 있는 제품들중에 소맥분이 들어가지 않고 재래식으로 생산된 된장 6종(해찬들 100% 국산된장, 이하 **해찬들** / 맥 된장, 이하 **맥** / 계룡산 궁골된장, 이하 **궁골** / 대도 진 전통재래식된장, 이하 **대도진** / 들미골 산촌된장, 이하 **산촌** / 순창문옥레 우리콩된장, 이하 **우리콩**)을 선정하였다(Table 20).

Table 20. 10종 된장 시료 제품명 및 성분

이름	제품명	성분
R	-	RiBS1
RA	-	RiBS1+A.O
RBA	-	RiBS1+B.L+A.O
BA	-	B.L+A.O
해찬들	100% 국산된장	대두(국산), 정제수, 천일염, 국산콩가루, 중국, 쌀발효증류주
맥		콩(국산) 96%, 천일염(국산) 4%
궁골	계룡산 궁골된장	콩 75%, 소금 25%
대도진	대도 진 전통재래식된장	콩(국산) 97%, 천일염(국산, 신안군) 3%
산촌	들미골 산촌된장	콩(국산, 양구군)
우리콩	순창문옥레 우리콩된장	대두(국산) 88%, 천일염(국산), 정수

(나) 실험 결과

① 된장 10종의 관능적 특성

BA는 발효향에서 가장 높은 강도 점수를 보였고, 짠내, 메주향, 군덕내, 간장향, 짠맛에서도 강한 강도를 나타내었다(Table 21). 반면에 고추향미에서는 가장 약한 강도를 보였으며 몽그러지는 정도와 색이 진한 정도, 윤기 정도에서도 다소 낮은 강도 점수를 보였다. **R**은 짠내, 시큼한향, 군덕내 특성과 거친 정도, 입자 크기 정도에서 가장 강한 강도를 나타내었다. 또한 전반 맛 강도에서도 다소 높은 강도 점수를 보였고 발효향, 메주향, 간장향 특성에서도 높은 강도 점수를 보였다. 반면에 색이 진한 정도, 윤기 정도와 같은 외관 특성에서는 가장 약한 강도를 보였으며, 단내, 고추향미, 텁텁한 정도/뽀은 정도, 몽그러지는 정도에서도 낮은 강도 점수를 보였다. **RA**는 짠내, 발효향, 메주향 특성 그리고 거친 정도, 입자 크기 정도가 다소 강하게 나타난 반면에 고추향, 텁텁한 정도/뽀은 정도, 몽그러지는 정도와 같은 특성에서는 가장 약한 강도를 보였으며 단내, 고추향미, 색이 진한 정도, 윤기 정도와 같은 특성에서도 낮은 강도 점수를 보였다. **RBA**는 짠내, 메주향 특성과 거친 정도, 입자 크기 정도에서 높은 강도 점수를 나타냈으나 단내, 고추향, 고추향미, 텁텁한 정도/뽀은 정도, 몽그러지는 정도에서 낮은 강도 점수를 나타냈으며 색이 진한 정도, 윤기 정도에서도 낮은 강도를 보였다. 그 외의 관능적 특성들은 10종 된장의 중간 정도의 강도를 발현하는 것으로 평가된다. 궁골은 메주향, 간장향, 텁텁한 정도/뽀은 정도, 색이 진한 정도에서 가장 높은 강도 점수를 보였으며, 특히 전반 맛 강도에서 10종 된장 중 가장 강하게 평되었다. 또한 짠내, 발효향, 군덕내, 짠맛, 몽그러지는 정도, 윤기 정도에서도 높은 강도를 보인 반면에 질감 특성 중 거친 정도와 입자 크기 정도와 같은 외관 특성에서는 다소 낮은 강도 점수를 보였으며 나머지 특성들은 중간 정도의 강도로 평가되었다. 대도진은 고추향, 고추향미, 텁텁한 정도/뽀은 정도에서 다른 된장 시료들에 비해 강한 강도를 나타냈으나 짠내, 시큼한향, 발효향, 메주향, 간장향, 짠맛, 거친 정도와 전반 맛 강도 낮은 강도 점수로 평가되었다. 맥은 단내, 윤기 정도 특성에서 가장 높은 강도로 평가되었으며 텁텁한 정도/뽀은 정도, 몽그러지는 정도에서도 높은 강도를 보인 반면에 짠내, 시큼한향, 발효향, 메주향, 군덕내, 거친 정도와 같은 특성에서는 다소 약한 강도로 평가되었다. 그 외의 특성들에서는 10종 된장 시료의 중간 정도로 나타났다. 산촌은 짠맛에서 10종 된장 시료 중 가장 강한 강도를 나타냈으며 메주향, 고추향미, 윤기 정도, 그리고 전반 맛 강도에서도 다소 높은 강도 점수를 보인 반면 입자 크기 정도는 낮은 강도로 평가되었으며 그 외 특성은 모두 중간 정도의 강도로 평가되었다. 우리콩은 단내, 간장향, 텁텁한 정도/뽀은 정도, 색이 진한 정도와 전반 맛 강도에서 높은 강도 점수를 나타내었고 고추향미는 약한 강도로 평가되었으며 그 외의 특성들은 10종 된장 시료의 중간 정도로 나타났다. 해찬들은 단내, 몽그러지는 정도, 윤기 정도에서 다소 높은 강도 점수를 보였으나 짠내, 시큼한향, 발효향, 메주향, 군덕내, 짠맛과 같은 특성에서 10종 된장 중 가장 약한 강도를 보였으며 전반 맛 강도 또한 가장 낮은 강도 점수를 보였다.

Table 21. 10종 된장 시료별 관능적 특성 평균값 ± 표준편차

system	sample	단내***	짠내***	시큼한향***	발효향*	매주향***	익힌콩향 ^{NS}	구수한향 ^{NS}	
	BA	3.55±1.76 ^e	7.77±2.43 ^{ab}	4.8±2.2 ^{ab}	5.63±2.65 ^a	5.87±1.83 ^{ab}	3.3±1.86	3.53±2.06	
	R	3.67±1.97 ^e	8.13±2.13 ^a	5.63±2.48 ^a	5.23±1.89 ^{ab}	5.9±1.69 ^{ab}	3.33±1.86	3.6±2.19	
	RA	3.63±1.75 ^e	7.63±2.08 ^{ab}	4.3±2.04 ^{bcd}	5.13±1.98 ^{ab}	5.83±1.95 ^{ab}	3.53±2.18	3.63±2.11	
	RBA	3.97±1.67 ^{de}	7.6±2.3 ^{ab}	4.63±2.08 ^b	4.93±2.38 ^b	5.77±2.05 ^{ab}	3.6±1.94	3.67±2.06	
	궁골	4.67±2.12 ^c	7.17±2.04 ^b	4.77±2.14 ^{ab}	5.1±2.23 ^{ab}	6.03±1.97 ^a	3.43±1.76	3.97±1.5	
	대도진	4.5±1.59 ^{cd}	5.43±1.98 ^{cd}	3.5±2.06 ^{de}	4.1±2.33 ^{cd}	4.3±1.75 ^c	3.3±1.82	3.5±2.08	
	맥	5.77±1.83 ^a	5.7±2.25 ^{cd}	3.63±1.69 ^{cde}	4.13±1.89 ^{cd}	4.7±1.62 ^c	3.63±1.71	4.27±1.29	
	산촌	4.97±2.16 ^{bc}	6.97±2.24 ^b	4.2±2.2 ^{bcd}	4.72±2.14 ^{bc}	5.97±1.52	3.87±1.81	4.27±1.78	
	우리콩	5.57±1.91 ^{ab}	6.17±2.04 ^c	4.47±2.32 ^{bc}	4.87±2.32 ^b	5.4±1.73 ^b	3.7±1.66	4.43±2.05	
	해찬들	5.63±1.69 ^{ab}	5.33±1.88 ^d	3.33±2.07 ^e	3.77±2.16 ^d	4.23±1.68 ^c	3.53±1.96	3.83±1.72	
	합계	4.6±2.01	6.79±2.33	4.33±2.21	4.76±2.24	5.4±1.89	3.52±1.84	3.87±1.9	
생된장	sample	꽃콩내 /콩비린내 ^{NS}	균덕내**	간장향*	인공조미료향 ^{NS}	고추향***	단맛 ^{NS}	짠맛**	
		BA	2.47±1.66	6±3.2 ^{ab}	5.93±2.77 ^{ab}	2.47±1.59	1±1.17 ^{cd}	4.07±2.26	9.17±2.1 ^{ab}
		R	2.43±1.68	6.37±2.99 ^a	6.03±2.65 ^{ab}	2.37±1.69	1.1±1.16 ^{cd}	3.6±2.37	9.27±1.98 ^{ab}
		RA	2.2±1.45	5.63±2.9 ^{abc}	5.6±2.43 ^{bc}	2.37±1.3	0.8±0.76 ^d	3.83±2.64	9±2.05 ^{ab}
		RBA	2.03±1.4	5.37±2.75 ^{bcd}	5.47±2.22 ^{bc}	2.57±1.55	0.93±1.11 ^{cd}	4.07±2.45	8.9±2.23 ^b
		궁골	1.67±1.47	5.57±3.44 ^{abc}	6.3±2.42 ^a	2.67±1.35	1.33±0.99 ^{bcd}	4.23±2.86	9.7±2.07 ^{ab}
		대도진	1.97±1.54	4.63±3.26 ^{de}	4.3±2.2 ^e	2.67±1.79	3.67±2.8 ^a	4.57±2	8.1±2.22 ^c
		맥	1.73±1.46	3.9±2.83 ^{ef}	5.23±1.85 ^{cd}	2.53±1.46	1.47±1.28 ^{bc}	5.33±2.48	8.97±1.97 ^{ab}
		산촌	1.6±1.38	4.83±3.22 ^{cd}	5.73±1.84 ^{abc}	2.67±1.3	1.7±1.39 ^b	4.5±2.9	9.77±2.46 ^a
		우리콩	1.67±1.47	4.57±3.16 ^{de}	5.93±2.2 ^{ab}	2.63±1.33	1.4±1.04 ^{bc}	4.63±2.81	9.3±1.62 ^{ab}
	해찬들	1.7±1.49	3.23±2.39 ^f	4.8±1.92 ^{de}	2.83±1.42	1.37±1.56 ^{bcd}	5.27±2.02	7.6±2.33 ^c	
	합계	1.95±1.51	5.01±3.12	5.53±2.31	2.58±1.47	1.48±1.61	4.41±2.52	8.98±2.18	

Table 21. 10종 된장 시료별 관능적 특성 평균값 ± 표준편차 (cont'd)

system	sample	신맛 ^{NS}	쓴맛 ^{NS}	감칠맛 ^{NS}	발효향미 ^{NS}	메주향미 ^{NS}	익힌콩향미 ^{NS}	구수한향미 ^{NS}
	BA	3.1±1.54	4.4±2.57	4.1±2.31	4.6±2.34	5.83±2.04	3.8±1.94	3.5±2.15
	R	3.47±1.48	4.4±2.66	3.6±1.96	4.83±2.32	5.6±1.73	3.87±1.68	3.27±2.32
	RA	3.33±1.85	4.17±2.56	4±2.12	4.57±2.32	5.73±1.91	3.93±2.05	3.33±2.12
	RBA	3.5±1.61	4.5±2.65	4.23±2.33	4.6±2.33	5.73±2	3.87±2.08	3.53±2.24
	궁골	3.63±1.73	4.9±2.55	4.37±2.81	4.73±2.57	6.3±1.66	3.43±1.72	3.8±1.88
	대도진	3.27±1.57	4.87±2.89	4.43±2.42	4.73±2.46	5.03±2.01	3.33±1.81	3.17±2.29
	맥	3.23±1.61	4.53±2.39	5.77±2.53	4.5±2.56	5.87±2.06	3.83±1.68	4.13±1.81
	산촌	3.8±2.28	4.53±2.43	4.57±2.46	4.8±2.5	6.13±1.59	3.43±1.94	3.63±1.92
	우리콩	3.83±1.76	4.83±2.53	4.87±2.57	4.7±2.32	5.67±1.94	3.47±1.8	3.87±2.01
	해찬들	3.5±1.8	4.47±2.47	4.57±2.37	4.47±2.36	5.1±1.95	3.33±1.81	3.6±2.14
	합계	3.47±1.73	4.56±2.55	4.45±2.43	4.65±2.38	5.7±1.91	3.63±1.84	3.58±2.08
생된장	sample	꽃콩향미 /콩비린향미 ^{NS}	간장향미 ^{NS}	인공조미료향미 ^{NS}	고추향미 ^{***}	이미/이취 ^{NS}	전반맛강도*	떫떫한정도 /뽀은정도 ^{***}
	BA	2.17±1.78	5.93±2.38	3.23±1.98	1.2±1.16 ^c	2.63±1.54	8.9±1.67 ^{bcd}	4.57±2.45 ^{ab}
	R	2.13±1.72	5.7±2.29	3.2±1.65	1.17±1.23 ^c	2.33±1.45	9±1.44 ^{abcd}	4.33±2.37 ^b
	RA	2.17±1.8	5.7±2.26	3.43±1.98	1.3±1.29 ^e	2.53±1.7	8.63±1.69 ^{cd}	4.13±2.08 ^b
	RBA	2±1.62	5.63±2.37	3.67±2.02	1.17±1.15 ^c	2.6±1.67	8.83±1.72 ^{bcd}	4.33±2.09 ^b
	궁골	1.6±1.4	6.57±2.18	3.7±1.9	2.1±1.97 ^b	2.9±1.95	9.57±1.65 ^a	5.17±3.08 ^a
	대도진	2.1±1.54	4.7±2.1	3.33±1.92	4.23±2.64 ^a	3.8±1.73	8.33±1.54 ^{de}	4.8±2.48 ^{ab}
	맥	1.5±1.25	6.3±2	4.3±2.14	2.07±1.98 ^b	2.73±1.91	8.77±1.74 ^{cd}	4.9±2.86 ^{ab}
	산촌	1.7±1.51	5.97±1.92	3.7±1.92	3.9±2.3 ^a	3.2±2.2	9.47±2.03 ^{ab}	4.6±2.71 ^{ab}
	우리콩	1.73±1.53	6.03±2.22	3.83±2.39	1.77±1.76 ^{bc}	2.63±1.88	9.07±1.74 ^{abc}	4.77±3.14 ^{ab}
해찬들	1.67±1.37	5.33±2.12	3.63±1.75	2.27±2.38 ^b	2.83±1.97	7.93±1.74 ^e	4.17±2.52 ^b	
합계	1.88±1.56	5.79±2.21	3.6±1.97	2.12±2.12	2.82±1.83	8.85±1.74	4.58±2.58	

Table 21. 10종 된장 시료별 관능적 특성 평균값 ± 표준편차 (cont'd)

system	sample	몽그러지는정도 (입안녹는정도)***	거친정도***	입자크기정도***	색이진한정도***	윤기정도***		
생된장	BA	5.47±2.06 ^e	7.8±2.19 ^b	7.7±1.8 ^{ab}	5.87±1.63 ^e	4.97±1.81 ^e		
	R	5.5±3.04 ^e	8.8±2.12 ^a	8.4±2.18 ^a	5±1.62 ^f	4.17±1.9 ^f		
	RA	5.1±2.81 ^e	8.57±2.21 ^a	7.87±2.22 ^{ab}	5.2±1.4 ^f	4.37±1.77 ^f		
	RBA	5.83±2.47 ^e	8.2±2.14 ^{ab}	7.27±2.02 ^b	6±1.39 ^e	4.9±1.75 ^e		
	궁골	9.07±1.98 ^{ab}	4.2±1.92 ^d	3.97±2.01 ^d	10.17±1.26 ^a	8.13±1.66 ^{abc}		
	대도진	8.8±2.34 ^{abc}	4.13±2.1 ^d	5.03±2.17 ^c	6.97±1.3 ^d	7.6±1 ^c		
	맥	8.3±2.12 ^{bcd}	4.47±1.68 ^d	5.53±2.47 ^c	9.93±1.41 ^a	8.63±1.71 ^a		
	산촌	7.9±1.49 ^{cd}	5.43±2.18 ^c	4.77±2.03 ^{cd}	7.97±1.43 ^c	8.03±1.25 ^{bc}		
	우리콩	7.6±1.94 ^d	5.23±1.91 ^c	5.2±2.36 ^c	9.4±1.16 ^b	6.8±1.3 ^d		
	해찬들	9.63±2.33 ^a	3.13±1.59 ^e	3±1.55 ^e	7.63±1.27 ^c	8.3±1.09 ^{ab}		
	합계	7.32±2.78	6±2.83	5.87±2.7	7.41±2.29	6.59±2.29		

최대평균값은 붉은색, 최소평균값은 푸른색으로 표기함.

Duncan사후분석 a>b>c>d>e>f

NS(Not Significant)

② 된장 10종의 주성분분석(PCA)

10종 된장의 관능적 특성을 시각적으로 요약하기 위해 주성분분석을 실시한 결과 주성분 1(F1)과 주성분2(F2)가 총 분산의 약 88.05%를 설명하는 것으로 나타났다(Figure 55). 총 분산의 75.07%를 설명한 제 1주성분은 양의 방향으로 메주향, 시금한향, 발효향, 짠내, 군덕내, 익힌콩향미, 거친 정도, 입자 크기 정도, 풋콩내/콩비린내, 풋콩향미/콩비린향미 등이 강하게 발현되었으며 R, RA, RBA, BA 된장 시료가 이러한 특성이 강한 것으로 나타났다. 평균 강도 점수를 살펴보았을 때 R, RA, RBA, BA 된장 시료는 짠내, 시금한향, 발효향, 메주향이 유의적으로 강한 강도 점수로 나타났음을 알 수 있었다. 그러나 익힌콩향미, 풋콩향미 등은 강도 점수가 조금 높기는 하나 유의적 차이는 보이지 않았다. 음의 방향으로 감칠맛, 쓴맛, 단내, 단맛, 인공조미료향, 윤기 정도 등이 강하게 부하되었으며 맥, 우리콩, 산촌 된장 시료가 이러한 특성이 강한 것으로 나타났다. 그러나 이러한 특성들은 단내 특성을 제외하고는 유의적인 강도를 나타내지 않았다. 12.98%의 설명력을 가진 제 2주성분은 양의 방향으로 구수한향미, 간장향, 간장향미, 짠맛, 메주향미, 텁텁한 정도/뽀은 정도 등이 강하게 부하되었으며 궁골 된장 시료가 이러한 특성이 강한 것으로 나타났다. 평균 분석표에서도 궁골 시료가 간장향과 텁텁한 정도/뽀은 정도에서 최고 강도 점수를 나타냈지만 나머지 특성들은 유의적 강도 차이를 보이지 않았다. 음의 방향으로 이미/이취, 고추향 등이 강하게 부하되었으며 해찬들, 대도진 된장 시료가 이러한 특성이 강하게 나타났다. 평균 분석표를 살펴본 결과 PCA와 같이 고추향미가 강하게 나타났고, 대도진은 고추향이 강하게 나타남. 그러나 이미/이취는 유의적 차이를 보이지 않았다.

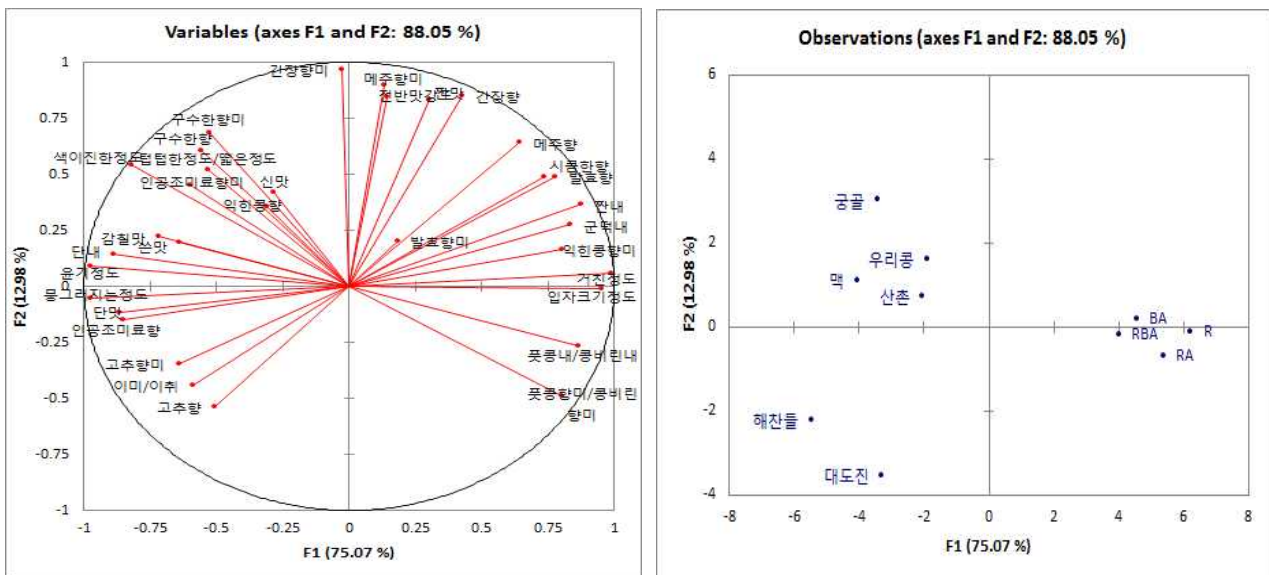


Figure 55. 된장 10종의 주성분분석 (PCA; Principal Component Analysis)

(2) 소비자 기호도 조사

(가) 시료

된장의 시료는 Table 22와 같으며, 시료 제시 방법은 된장국으로, 부재료를 최소화하여 된장 외에 다른 맛 성분들이 많이 관여하지 않도록 하였다. 즉 된장 시료의 맛 성분이 다른 맛 성분 에 의해 방해받지 않도록 육수 외에 다른 부재료는 넣지 않았다.

Table 22. 된장 6종 시료 제품명 및 성분

이름	제품명	성분
R	-	RiBS1
RA	-	RiBS1+A.O
RBA	-	RiBS1+B.L+A.O
BA	-	B.L+A.O
궁골	계룡산 궁골된장	콩 75%, 소금 25%
해찬들	100% 국산된장	대두(국산), 정제수, 천일염, 국산콩가루, 종국, 쌀발효증류주

(나) 실험 결과

① 6종 된장국의 기호도 분석

BA는 유의적 차이가 있는 5가지 기호도 항목(전반기호도, 외관기호도, 냄새/향기호도, 맛/향미기호도, 식감/질감기호도) 모두에서 가장 높은 점수로 평가되었다. 반대로 **R**은 외관기호도를 제외한 모든 항목에서 가장 낮은 점수로 평가되어 **BA**와 상반되는 기호도를 형성하였다. **R**은 전반기호도, 외관기호도, 냄새/향기호도, 맛/향미기호도가 다소 높은 점수로 평가되었으나 식감/질감 기호도는 6종 된장국의 중간 정도로 평가되었다. **RBA**도 **RA**와 마찬가지로 식감/질감 항목에서 6종 된장국의 중간 정도의 기호도를 형성하였고, 다른 기호도 항목에서는 꽤 높은 점수를 나타내었다. 궁골은 외관 기호도에서 가장 낮은 기호 점수로 평가되었으며, 해찬들은 외관, 식감/질감 항목에서 낮은 기호도를 보였으며 전반기호도에서도 낮은 점수의 기호도를 보였다(Table 23).

Table 23. 6종 된장국 시료의 기호도 항목별 평균값 ± 표준편차

system	sample	전반기호도***	외관기호도***	냄새/향기호도*	맛/향미기호도**	식감/질감기호도*
	BA	5.43±1.35 ^a	5.88±0.99 ^a	5.2±1.51 ^a	5.35±1.53 ^a	5.61±1.31 ^a
	R	4.14±1.61 ^d	4.92±1.66 ^b	4.1±1.58 ^b	4.02±1.66 ^b	4.75±1.59 ^b
	RA	5.22±1.45 ^{ab}	5.63±1.47 ^a	4.98±1.61 ^a	5.14±1.56 ^a	5.18±1.58 ^{ab}
된장국	RBA	5.08±1.57 ^{abc}	5.67±1.28 ^a	4.98±1.53 ^a	5.02±1.73 ^a	5.27±1.56 ^{ab}
	궁골	4.61±2 ^{cd}	3.76±1.64 ^c	4.82±1.67 ^{ab}	4.73±1.8 ^a	5±1.81 ^b
	해찬들	4.51±1.67 ^{bcd}	4.2±1.66 ^c	4.61±1.65 ^a	4.71±1.78 ^a	4.73±1.58 ^{ab}
	합계	4.83±1.67	5.01±1.66	4.78±1.62	4.83±1.72	5.09±1.6

최대평균값은 붉은색, 최소평균값은 푸른색으로 표기함.

Duncan사후분석 a>b>c>d

② 좋았던 시료와 싫었던 시료 분석

6종 된장국 중 가장 좋았던 시료 두 종류와 가장 싫었던 시료 두 종류를 설문하여 모두 합산한 결과 가장 좋았던 시료로 시료 BA가 제일 많이 선택되어 소비자 기호도 평가 결과와 상응하였으며, 가장 싫었던 시료로는 궁골이 가장 많이 선택되었다. 소비자 기호도 평가에서 가장 낮은 점수를 보였던 R은 궁골과 미미한 차이를 보이며 싫었던 시료로 선택되었다(Table 24).

Table 24. 6종 된장국의 ‘가장 좋았던 시료’/‘가장 싫었던 시료’ 선택 빈도 및 백분율

가장 좋았던 시료			가장 싫었던 시료		
된장 시료	빈도	백분율(%)	된장 시료	빈도	백분율(%)
BA	28	27.45	BA	6	5.88
R	6	5.88	R	26	25.49
RA	19	18.63	RA	12	11.76
RBA	15	14.71	RBA	9	8.82
궁골	16	15.69	궁골	27	26.47
해찬들	18	17.65	해찬들	22	21.57
합계	102	100	합계	102	100

③ 6종 된장의 시료별 CATA 선호인자와 비선호인자 분석

BA는 ‘외관’, ‘씹히는질감’, ‘뭉은농도’와 같은 관능적 항목과 ‘친숙하다’와 같은 감정적 항목에서 가장 높은 빈도로 긍정적 평가를 받았으며, 부정적인 기호 유도 인자로는 ‘부담스럽다’, ‘가공식품같다’ 항목에서 가장 많이 선택되었지만 다른 시료와 유의적으로 차이를 보이지는 않았다(Table 25). R은 긍정적 기호 유도 인자 중 ‘부담없다’가 높은 빈도로 선택되었으나 대부분의 긍정적 요인들은 가장 낮은 빈도로 선택되었고, ‘좋은 점이 없다’고 응답한 소비자들도 가

장 많은 것으로 나타났다. 반대로 ‘시큼한맛’, ‘이상한맛/냄새’, ‘부패한 것 같다’, ‘향미의부조화’, ‘씼내’, ‘굳덕내/구린내’ 등의 부정적 기호 유도 인자에서 가장 많이 선택되며 BA와 상반되는 결과를 보였다. RA는 ‘순한맛’, ‘뭉은농도’, ‘건강에 좋을 것 같다’와 같은 긍정적 기호 유도 인자에서 가장 많이 선택된 반면 ‘단조로운맛’, ‘개성이없다’와 같은 부정적 기호 유도 인자에서도 가장 많이 선택되었다. RBA는 긍정적 기호 유도 인자 중 ‘담백한맛’이 가장 많이 선택되었으나 다른 시료와 유의적 차이를 가지지는 않으며, 나머지 인자들은 6종 된장국의 중간 정도로 평가되었고, 부정적 기호 유도 인자 중에서는 ‘입안잔여감’, ‘촌스럽다’와 같은 항목이 가장 많이 선택되었으나 마찬가지로 유의적이지 않았다. 궁골은 ‘감칠맛’, ‘구수한맛’, ‘깊고 진한 풍미’, ‘발효된맛’, ‘메주맛/냄새’ 등과 같은 긍정적 기호 유도 인자에서 가장 높은 빈도를 나타낸 반면 ‘외관’, ‘짠맛이 강함’, ‘강한맛’, ‘자극적이다’와 같은 부정적인 기호 유도 인자도 많이 가지고 있는 것으로 평가되었다. 해찬들은 ‘겉쪽한 농도’, ‘짠맛’과 같은 특성이 긍정적 기호 유도 인자로 나타났으나 빈도 자체는 크지 않게 나타나지 않았다. 그러나 ‘겉쪽한 농도’는 해찬들의 부정적 기호를 형성하는 인자로써도 높은 빈도를 보였다. 또한 15% 이상의 소비자들이 ‘조미료맛’, ‘부담스럽다’와 같은 특성이 해찬들에 대한 부정적 기호를 형성한다고 평가하였다.

Table 25. 6종 된장의 관능적, 감정적 특성 빈도 및 백분율(Liking)

CATA	sample	외관**	짠맛	감칠맛	구수한맛	순한맛**	깊고진한풍미** *	담백한맛	
긍정적 요인 (Like)	BA	빈도	16	6	13	19	9	5	10
		백분율(%)	31.37	11.76	25.49	37.25	17.65	9.8	19.61
	R	빈도	12	2	9	9	7	1	10
		백분율(%)	23.53	3.92	17.65	17.65	13.73	1.96	19.61
	RA	빈도	17	5	13	15	14	7	11
		백분율(%)	33.33	9.8	25.49	29.41	27.45	13.73	21.57
	RBA	빈도	15	6	11	17	10	9	13
		백분율(%)	29.41	11.76	21.57	33.33	19.61	17.65	25.49
	궁골	빈도	5	5	15	21	2	18	3
		백분율(%)	9.8	9.8	29.41	41.18	3.92	35.29	5.88
	해찬들	빈도	4	8	11	16	2	14	6
		백분율(%)	7.84	15.69	21.57	31.37	3.92	27.45	11.76
		sample	맛의풍부함	발효된맛	메주맛/냄새	씹히는질감*	겉쪽한농도*	뭉은농도*	친숙하다***
	BA	빈도	7	9	13	14	2	9	21
백분율(%)		13.73	17.65	25.49	27.45	3.92	17.65	41.18	
R	빈도	1	7	6	7	2	8	5	
	백분율(%)	1.96	13.73	11.76	13.73	3.92	15.69	9.8	
RA	빈도	5	11	12	9	5	9	11	
	백분율(%)	9.8	21.57	23.53	17.65	9.8	17.65	21.57	
RBA	빈도	7	14	16	8	0	6	6	
	백분율(%)	13.73	27.45	31.37	15.69	0	11.76	11.76	
궁골	빈도	10	15	19	3	5	0	7	
	백분율(%)	19.61	29.41	37.25	5.88	9.8	0	13.73	
해찬들	빈도	6	14	14	3	9	4	8	
	백분율(%)	11.76	27.45	27.45	5.88	17.65	7.84	15.69	

최대빈도값은 붉은색, 최소빈도값은 푸른색으로 표기함.

‘외관’= 0.003, ‘순한맛’=0.003, ‘깊고 진한 풍미’=0.000, ‘씹히는 질감’=0.00, ‘겉쪽한 농도’=0.014, ‘뭉은 농도’=0.039, ‘친숙하다’=0.000

NS(Not Significant)

Table 25. 6종 된장의 관능적, 감정적 특성 빈도 및 백분율(Liking)

CATA	sample	부담이없다*	토속적이다**	자연적인 맛이다*	건강에 좋을것같다	집에서 만든것같다	좋은점이없다	
긍정적 요인 (Like)	BA	빈도	11	20	15	9	14	6
		백분율(%)	21.57	39.22	29.41	17.65	27.45	11.76
	R	빈도	14	13	4	4	5	12
		백분율(%)	27.45	25.49	7.84	7.84	9.8	23.53
	RA	빈도	13	14	11	12	12	8
		백분율(%)	25.49	27.45	21.57	23.53	23.53	15.69
	RBA	빈도	11	22	13	3	15	5
		백분율(%)	21.57	43.14	25.49	5.88	29.41	9.8
	궁골	빈도	2	32	17	8	17	8
		백분율(%)	3.92	62.75	33.33	15.69	33.33	15.69
	해찬들	빈도	6	23	8	6	10	10
		백분율(%)	11.76	45.1	15.69	11.76	19.61	19.61

최대빈도값은 붉은색, 최소빈도값은 푸른색으로 표기함.

‘부담이 없다’=0.018, ‘토속적이다’=0.002, ‘자연적인 맛이다’=0.025

NS(Not Significant)

Table 25. 6종 된장의 관능적, 감정적 특성 빈도 및 백분율(Disliking)

CATA	sample	외관***	짠맛이강함***	시큼한맛***	조미료맛	강한맛**	단조로운맛*	향미의부조화	선내	
부정적 요인 (Dislike)	BA	빈도	2	25	16	2	1	5	3	3
		백분율(%)	3.92	49.02	31.37	3.92	1.96	9.8	5.88	5.88
	R	빈도	9	11	34	6	4	1	11	11
		백분율(%)	17.65	21.57	66.67	11.76	7.84	1.96	21.57	21.57
	RA	빈도	2	19	17	4	5	8	6	4
		백분율(%)	3.92	37.25	33.33	7.84	9.8	15.69	11.76	7.84
	RBA	빈도	4	23	20	5	7	2	9	4
		백분율(%)	7.84	45.1	39.22	9.8	13.73	3.92	17.65	7.84
	궁골	빈도	26	35	9	1	13	1	7	4
		백분율(%)	50.98	68.63	17.65	1.96	25.49	1.96	13.73	7.84
	해찬들	빈도	19	23	9	8	9	3	8	5
		백분율(%)	37.25	45.1	17.65	15.69	17.65	5.88	15.69	9.8
		sample	균덕내/구린내	발효된맛/냄새	이상한맛/냄새**	입안잔여감	겉쪽한농도**	새롭다	익숙하다	
	BA	빈도	11	9	1	7	0	4	8	
		백분율(%)	21.57	17.65	1.96	13.73	0	7.84	15.69	
	R	빈도	15	12	15	5	1	7	4	
		백분율(%)	29.41	23.53	29.41	9.8	1.96	13.73	7.84	
	RA	빈도	14	5	5	10	1	8	5	
백분율(%)		27.45	9.8	9.8	19.61	1.96	15.69	9.8		
RBA	빈도	12	9	9	10	1	5	4		
	백분율(%)	23.53	17.65	17.65	19.61	1.96	9.8	7.84		
궁골	빈도	13	7	9	9	3	4	5		
	백분율(%)	25.49	13.73	17.65	17.65	5.88	7.84	9.8		
해찬들	빈도	12	6	12	11	8	4	5		
	백분율(%)	23.53	11.76	23.53	21.57	15.69	7.84	9.8		

최대빈도값은 붉은색, 최소빈도값은 푸른색으로 표기함.

'외관'=0.000, '짠맛이 강함'=0.000, '시큼한맛'=0.000, '강한맛'=0.009, '단조로운맛'=0.035, '이상한맛/냄새'=0.004, '겉쪽한 농도'=0.002

NS(Not Significant)

Table 25. 6종 된장의 관능적, 감정적 특성 빈도 및 백분율(Disliking)

CATA	sample	자극적이다	부담스럽다	개성이없다	촌스럽다	부패한것같다*	가공식품같다	다시 먹고싶지않다	
부정적 요인 (Dislike)	BA	빈도	7	9	5	4	4	9	1
		백분율(%)	13.73	17.65	9.8	7.84	7.84	17.65	1.96
	R	빈도	7	8	3	6	10	9	8
		백분율(%)	13.73	15.69	5.88	11.76	19.61	17.65	15.69
	RA	빈도	7	7	8	3	2	7	4
		백분율(%)	13.73	13.73	15.69	5.88	3.92	13.73	7.84
	RBA	빈도	6	4	4	8	4	7	5
		백분율(%)	11.76	7.84	7.84	15.69	7.84	13.73	9.8
	궁골	빈도	13	8	0	8	2	1	7
		백분율(%)	25.49	15.69	0	15.69	3.92	1.96	13.73
	해찬들	빈도	7	9	7	3	3	7	7
		백분율(%)	13.73	17.65	13.73	5.88	5.88	13.73	13.73

최대빈도값은 붉은색, 최소빈도값은 푸른색으로 표기함.

*'부패한 것 같다'=0.039

NS(Not Significant)

(3) 6종 된장의 묘사분석 데이터와 소비자 기호도 평가를 이용한 기호 유도 인자 분석

6종 된장에 대해 전문적인 패널들이 평가한 관능적 특성들이 소비자들의 기호도에 영향을 미치는지를 알아보기 위해 묘사분석 데이터와 소비자 기호도 평가 결과를 이용하여 MFA를 실시하였다(Figure 56).

MFA 결과, 제 1주성분의 양의 방향으로는 발효향, 풋콩향미, 메주향, 메주향미, 짠맛, 짠내 등이 강하게 부하되었고, 이러한 특성은 **BA, RA, RBA**에서 강하게 나타났다. 즉, 이러한 관능적 특성들이 된장 BA, RA, RBA의 높은 기호도를 유도한 것으로 판단되어진다. 제 1주성분의 음의 방향으로는 고추향, 신맛, 쓴맛, 단맛, 구수한향, 뭉그러지는 정도 등의 관능적 특성들이 강하게 부하되어 있으며, 이러한 특성들은 된장 시료에 대한 소비자의 기호도 형성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 해찬들, 궁골에서 강하게 나타남을 알 수 있다. 실제로 해찬들과 궁골의 평균 기호도는 6종 된장 중에서 중하위로 나타났다. 소비자 기호도 평가에서 가장 낮은 점수를 보인 **R**은 제 2주성분의 음의 방향에 강하게 나타나며 발효향미, 시큼한향, 군덕내 등이 강하게 부하되었으며, R의 이러한 특성들이 기호도 형성에 부정적으로 관여하는 것으로 보인다.

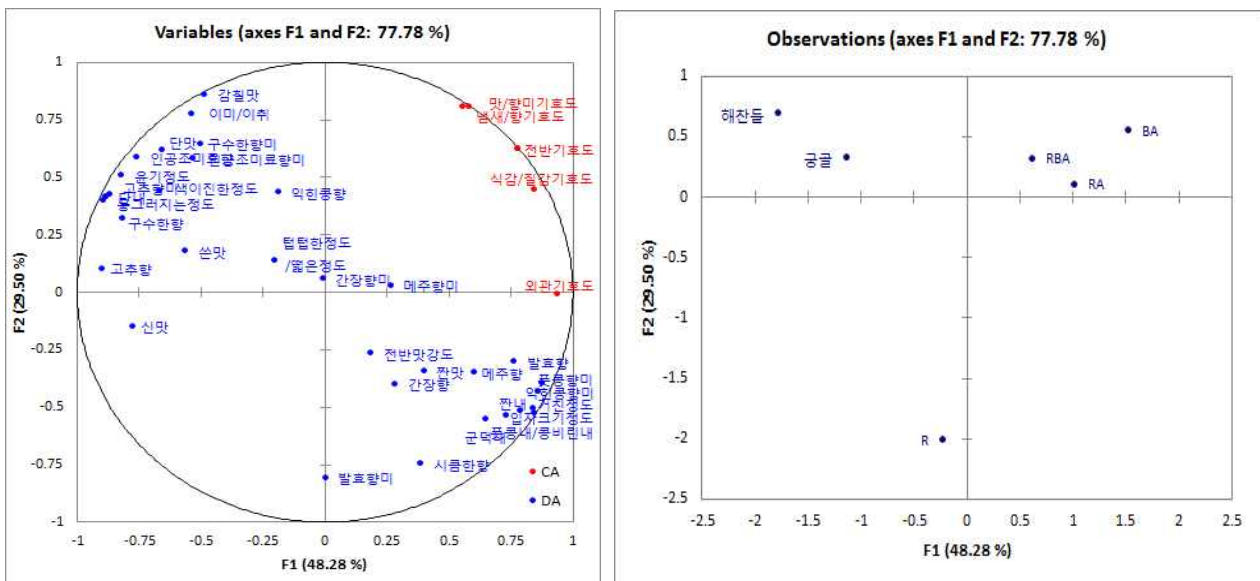


Figure 56. 6종 된장의 MFA(Multi Factor Analysis)

(4) 결론

가장 좋았던 시료로 본사 기존 된장인 BA가 제일 많이 선택되었으나 그 다음으로 RA와 RBA가 각각 18.63%, 14.71%로 선택되었음을 확인 할 수 있었고 특히 RBA의 경우 가장 싫었던 시료로 BA다음으로 가장 낮은 선택을 받았다. 따라서 품질분석에서 높은 아미노태 질소 함량을 보인 RBA된장이 RA와 R보다 상품화로서의 가능성이 크다고 판단되어지며, 이를 최종 제품으로 선정하여 시제품으로 제작하였다.

다. 간장

(1) 관능적 특성 분석(표사분석)

(가) 시료

간장의 시료는 Starter Culture(RiBS1), *Aspergillus oryzae*(A.O), *Bacillus sp.*(B.L)의 처리 여부에 따라 4종으로 구분되어진다. 즉 RiBS1만 적용한 메주를 활용하여 제조한 간장(이하 **R**), RiBS1와 *Aspergillus oryzae*를 적용한 메주를 활용하여 제조한 간장(이하 **RA**), RiBS1와 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 적용한 메주를 활용하여 제조한 간장(이하 **RBA**) 및 기존 본사 간장인(이하 **BA**)이며, 시판 간장으로 전국적으로 판매되고 있는 제품들중에 소맥분이 들어가지 않고 재래식으로 생산된 간장 4종(맥꾸름 조선맥간장, 이하 **맥** / 순창문옥례 우리콩간장, 이하 **문옥례** / 샘표 맑은간장, 이하 **샘표** / 한살림 전통간장, 이하 **한살림**)을 선정하였다(Table 26).

Table 26. 8종 간장 시료 제품명 및 성분

이름	제품명	성분
R	-	RiBS1
RA	-	RiBS1+A.O
RBA	-	RiBS1+B.L+A.O
BA	-	B.L+A.O
맥	맥꾸름 조선맥간장	메주 96%, 천일염 4%
문옥례	순창문옥례 우리콩간장	한식메주 26%, 정수, 천일염
샘표	샘표 맑은간장	메주 29.1%, 정제수, 천일염, 주정
한살림	한살림 전통간장	메주콩 15%, 천일염 15%, 정제수 70%

(나) 실험 결과

① 8종 간장의 관능적 특성

BA는 액젓향, 짠내 특성에서 다른 시료에 비해 높은 강도 점수를 나타내었으나 짠맛 특성에서는 가장 낮은 강도로 평가되었다(Table 27). **R**은 액젓향과 액젓향미 특성에서 가장 높은 강도 점수를 나타냈으며, 메주향 특성에서는 가장 낮은 점수를 나타내었다. 또한 진한 정도, 탁한 정도와 같은 외관 특성에서 모두 유의적으로 약한 강도를 보였다. **RA**는 메주향, 그리고 진한 정도, 탁한 정도와 같은 외관 특성에서 모두 약한 강도 점수를 보인 반면 다른 관능적 특성들은 8종 간장들의 중간 정도의 강도를 나타내었다. **RBA**는 액젓향 특성에서 강한 강도를 보인 반면 짠맛 특성에서 약한 강도를 보였으며 전반 맛 강도에서도 가장 낮은 강도 점수로 평가되었다. 맥은 메주향, 단맛, 감칠맛 특성이 유의적으로 높은 강도로 나타났으며, 진한 정도, 탁한 정도에서도 높은 강도 점수를 보이고 나머지 관능적 특성들은 다른 시료와 유의적으로 차이가 나지 않거나 중간 정도의 강도 점수를 나타냈다. 문옥례는 모든 관능적 특성에서 평균값 근처

의 강도 즉, 8종 간장의 중간 정도의 강도로 평가되었다. 설탕은 진한 정도, 탁한 정도에서 강한 강도로 평가되었으며, 단맛 특성 또한 가장 높은 강도 점수를 보인 반면, 메주향 특성에서는 약한 강도로 평가되었으며, 액젓향, 군덕내, 액젓향미에서 가장 낮은 강도 점수를 나타내었다. 한살림은 군덕내와 짠맛 특성, 그리고 전반 맛 강도에서 가장 높은 강도 점수로 평가되었고, 액젓향과 쓴맛에서도 높은 강도 점수를 보였다. 하지만 단맛과 감칠맛 특성에서는 가장 낮은 강도 점수로 평가되었다.

Table 27. 8종 간장 시료별 관능적 특성 평균값 ± 표준편차

system	sample	진한정도***	탁한정도***	매주향***	풋콩내 ^{NS}	볶은콩내 ^{NS}	액젓향***	짠내 ^{NS}
	BA	6.27±1.86 ^d	5.79±1.95 ^{cd}	7.36±1.37 ^{bc}	5.21±2.32	5.18±2.27	7.58±1.84 ^a	7.91±1.84
	R	5.61±1.62 ^d	5.45±1.54 ^d	6.7±2.31 ^c	5.55±2.41	5.06±2.45	7.61±1.85 ^a	7.24±2.17
	RA	5.94±1.68 ^d	5.09±1.86 ^d	6.88±1.98 ^c	5.21±2.21	5.18±2.43	7±1.6 ^{ab}	7.67±1.58
	RBA	7.27±1.74 ^c	6.55±1.82 ^c	7.3±1.79 ^{bc}	5.21±2.3	5.45±2.41	7.52±1.72 ^a	7.91±1.77
생간장	맥	11.67±1.51 ^a	10.06±2.75 ^a	8.94±2.47 ^a	5.06±2.98	5.55±2.2	6.45±2.32 ^{bc}	7.82±2.27
	문옥레	8.18±1.67 ^b	8±2.86 ^b	7.94±2 ^b	5.88±2.55	5.03±2.52	7.03±2.48 ^{ab}	7.42±1.94
	샘표	11.85±1.56 ^a	10±2.67 ^a	6.79±2.43 ^c	4.91±2.96	5.55±2.76	5.69±2.56 ^c	7.39±2.62
	한살림	7.55±2.03 ^{bc}	8.24±1.95 ^b	7.3±2.56 ^{bc}	5.24±2.59	4.61±2.63	7.24±2.5 ^{ab}	7.45±2
	합계	8.04±2.85	7.4±2.87	7.4±2.23	5.28±2.54	5.2±2.45	7.02±2.2	7.6±2.03

최대평균값은 붉은색, 최소평균값은 푸른색으로 표기함.

Duncan사후분석 a>b>c>d

NS(Not Significant)

Table 27. 8종 간장 시료별 관능적 특성 평균값 ± 표준편차 (cont'd)

system	sample	신내 ^{NS}	균덕내*	발효향 ^{NS}	메주향미 ^{NS}	꽃콩향미 ^{NS}	액젓향미 ^{***}	짬맛 ^{***}
	BA	6.18±2.98	6.3±2.3 ^{abc}	5.24±2.05	6.88±1.98	5.15±2.75	7.21±1.93 ^{ab}	9.45±1.87 ^c
	R	6.36±3.38	7.03±2.71 ^{ab}	5.36±2.22	6.82±2.21	5.36±2.58	7.42±1.58 ^a	9.73±1.99 ^{bc}
	RA	5.94±2.5	6.48±2.37 ^{abc}	5.27±2.1	6.88±2.1	5.3±2.52	7.03±1.7 ^{abc}	10.39±1.84 ^b
	RBA	6.03±2.74	6.3±2.4 ^{abc}	5.09±2.14	7.06±1.85	5.42±2.49	7.24±1.6 ^{ab}	9.48±1.81 ^c
	맥	5.42±3.04	6.12±3 ^{bc}	5.3±2.51	7.27±2.07	4.82±2.64	6.45±2.41 ^{bcd}	9.73±2.07 ^{bc}
	문옥례	5.45±3.32	7.18±2.26 ^{ab}	4.82±2.24	7.15±1.97	5.33±2.79	6.33±2.07 ^{cd}	9.61±1.71 ^{bc}
	샘표	5.7±3.68	5.52±3.09 ^c	5.09±2.32	6.3±2.27	4.7±2.86	5.67±2.29 ^d	9.67±2.16 ^{bc}
	한살림	5.24±3.5	7.55±2.6 ^a	5.21±2.69	6.24±2.15	4.94±2.44	7.33±1.81 ^a	11.33±2.01 ^a
	합계	5.79±3.15	6.56±2.65	5.17±2.27	6.83±2.08	5.13±2.61	6.84±2.01	9.92±2
생간장	sample	단맛	신맛 ^{NS}	쓴맛 ^{NS}	감칠맛 ^{***}	텃텃한맛 ^{NS}	전반 맛 강도 ^{***}	
	BA	5.21±2.12 ^{ab}	4.76±2.96	5.15±2.59	6.58±2.41 ^{bc}	5.48±2.8	9.94±1.8 ^{bc}	
	R	4.97±1.86 ^{ab}	5.21±3.09	5.21±2.92	6.36±2.46 ^{bc}	6±2.98	10.15±1.77 ^{bc}	
	RA	4.88±1.8 ^b	4.91±2.71	5.3±2.68	6.33±2.31 ^{bc}	5.48±3.09	10.45±1.84 ^{bc}	
	RBA	5.45±2.05 ^{ab}	5.15±2.87	4.88±2.09	6.97±2.51 ^{ab}	5.45±2.73	9.64±1.8 ^c	
	맥	5.73±1.74 ^a	4.61±2.75	4.58±2.48	7.45±2.11 ^a	5.52±2.75	10.21±2.48 ^{bc}	
	문옥례	4.82±1.94 ^b	4.48±2.87	4.61±2.38	5.79±2.32 ^c	5.55±2.67	9.94±1.73 ^{bc}	
	샘표	5.76±1 ^{***.87^a}	4.3±3.06	4.52±3.04	7.09±2.51 ^{ab}	5.85±3.08	10.55±2.11 ^b	
	한살림	4.06±2.28 ^c	4.36±3.13	5.88±3.33	4.85±2.39 ^d	6.18±3.14	11.61±1.77 ^a	
	합계	5.11±2.01	4.72±2.91	5.02±2.71	6.43±2.47	5.69±2.88	10.31±1.98	

Duncan사후분석 a>b>c>d

NS(Not Significant)

② 8종 간장의 주성분분석(PCA)

8종 간장의 관능적 특성을 시각적으로 요약하기 위해 주성분분석을 실시한 결과를 Figure 57에 제시하였다. 제 1주성분은 양의 방향으로 메주향, 진한 정도, 탁한 정도가 강하게 부하되었으며 맥, 설탕이 이러한 특성이 강한 것으로 나타났다. 평균 분석을 살펴본 결과 맥 간장 시료는 탁한 정도와 메주향 특성에서 설탕 시료는 진한 정도에서 가장 강한 강도로 평가되었다. 반면, 음의 방향으로는 풋콩향미, 액젓향, 액젓향미, 신맛 등이 강하게 부하되었으며 **R, RA, BA**가 이러한 특성이 강한 것으로 나타났다. 평균 분석에서도 R, RA, BA 시료는 액젓향, 액젓향미에서 다른 간장 시료에 비해 높은 강도 점수를 보였다. 그러나 신맛, 풋콩향미 등에서는 높은 점수를 보이기는 하나 유의적 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 제 2주성분은 양의 방향으로 감칠맛, 단맛, 볶은콩내, 메주향미 등이 강하게 부하되었으며, 이러한 특성이 뚜렷하게 나타난 시료는 없으나 맥이 단맛, 감칠맛에서 유의적으로 높은 강도를 보였다. 볶은콩내, 메주향미 특성에서도 맥이 높은 강도 점수를 보였지만 시료 간 유의적 차이를 나타내지는 않았다. 음의 방향으로는 군덕내, 짠맛, 텁텁한맛 등이 강하게 부하되었으며 한살림이 이러한 특성이 강한 것으로 분석되었다. 평균 분석에서도 마찬가지로 한살림이 이 세 가지 특성에서 가장 강하게 나타남을 확인하였다.

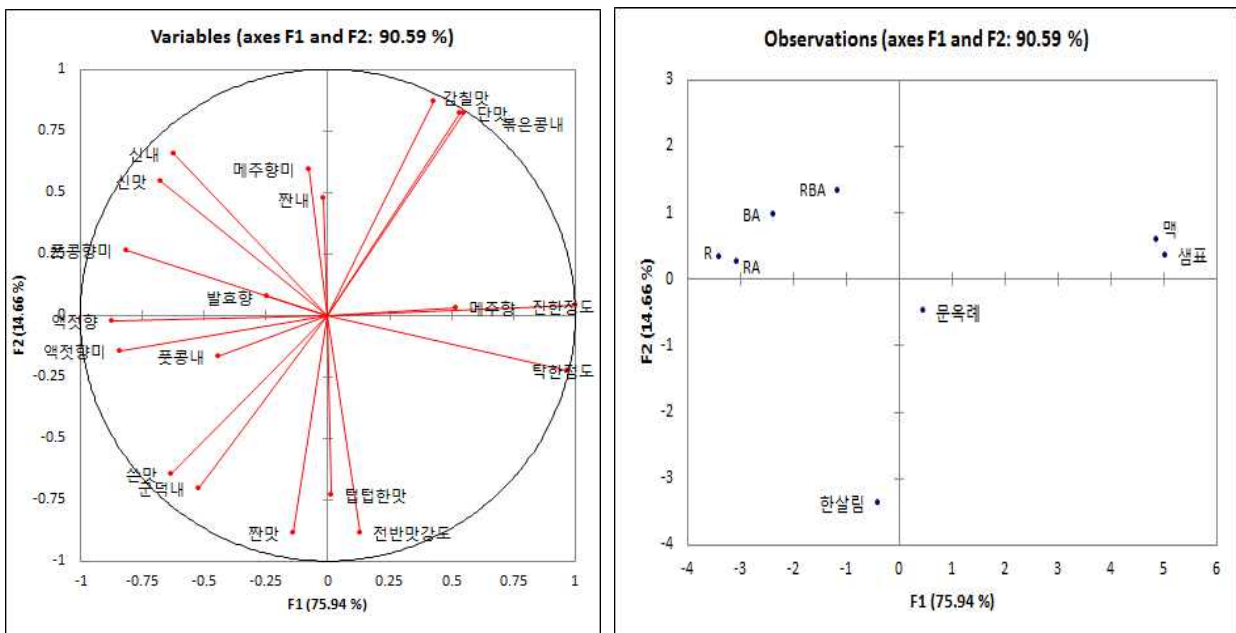


Figure 57. 8종 간장의 주성분분석 (PCA; Principal Component Analysis)

(2) 소비자 기호도 조사

(가) 시료

간장의 시료는 Table 28과 같으며, 시료 제시 방법은 미역국으로, 부재료를 최소화하여 간장 외에 다른 맛 성분들이 많이 관여하지 않도록 하였다. 미역국의 염도는 간장향과 간장향미가 확실히 발현되도록 기존 국의 일반적인 염도(0.4~0.5%)보다 높게 설정하였다.

Table 28. 6종 간장 시료 제품명 및 성분

샘플	제품명	성분
R	-	RiBS1
RA	-	RiBS1+A.O
RBA	-	RiBS1+B.L+A.O
BA	-	B.L+A.O
샘표	샘표 맑은간장	메주 29.1%, 정제수, 천일염, 주정
한살림	한살림 전통간장	메주콩 15%, 천일염 15%, 정제수 70%

(나) 실험 결과

① 6종 미역국의 기호도 분석

BA는 외관과 냄새/향 기호도에서 높은 점수로 나타났으며 R은 외관 기호도를 제외한 냄새/향, 맛/향미, 식감/질감 기호도에서 모두 가장 낮은 점수로 평가되었고 전반기호도 또한 가장 낮게 평가되었다. RA는 외관 기호도에서 다소 높은 점수를 보였으나 나머지 기호도 항목에서는 6종 시료의 중간 정도로 평가되었고 RBA는 시료 R과 상반되는 결과로써 전반기호도를 포함한 5가지 기호도 항목에서 가장 높은 점수를 나타내었다. 샘표는 모든 기호도 항목에서 중간 정도로 평가되었고 한살림은 냄새/향, 맛/향미, 식감/질감 기호도에서 다소 높은 점수로 평가되었으며, 외관과 전반적인 기호도는 6종 간장의 중간 정도로 나타났다(Table 29).

Table 29. 6종 미역국 시료의 기호도 항목별 평균값 ± 표준편차

system	sample	전반기호도***	외관기호도*	냄새/향기호도***	맛/향미기호도***	식감/질감기호도**
	BA	5.04±1.63 ^b	5.58±1.3 ^a	5.73±1.28 ^a	5.08±1.56 ^{ab}	5.34±1.49 ^{ab}
	R	4.13±1.59 ^c	5.27±1.31 ^{ab}	4.2±1.63 ^c	4.04±1.54 ^c	4.76±1.59 ^c
	RA	4.83±1.55 ^b	5.46±1.45 ^{ab}	5.38±1.43 ^{ab}	4.8±1.51 ^b	5.28±1.3 ^{ab}
미역국	RBA	5.54±1.29 ^a	5.66±1.2 ^a	5.82±1.25 ^a	5.46±1.29 ^a	5.72±1.28 ^a
	샘표	4.94±1.6 ^b	5.04±1.45 ^b	5.28±1.45 ^b	4.9±1.61 ^b	5.1±1.6 ^{bc}
	한살림	5.03±1.51 ^b	5.03±1.49 ^b	5.54±1.23 ^{ab}	5.13±1.48 ^{ab}	5.45±1.45 ^{ab}
	합계	4.92±1.58	5.34±1.38	5.32±1.48	4.9±1.56	5.27±1.48

② 좋았던 시료와 싫었던 시료 분석

가장 좋았던 시료를 작성하는 설문 결과 시료 BA가 가장 높은 빈도로 나타났으며 소비자 기호도 평가에서 가장 높은 점수로 평가되었던 RBA는 소비자의 19.7%만이 가장 좋았던 시료로 선택하였다(Table 30). 가장 싫었던 시료로는 소비자의 46.5%가 시료 R을 선택함으로써 소비자 기호도 평가의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

Table 30. 6종 미역국의 ‘가장 좋았던 시료’/‘가장 싫었던 시료’ 선택 빈도 및 백분율

가장 좋았던 시료			가장 싫었던 시료		
간장 시료	빈도	백분율(%)	간장 시료	빈도	백분율(%)
BA	19	26.8	BA	6	8.5
R	3	4.2	R	33	46.5
RA	8	11.3	RA	10	14.1
RBA	14	19.7	RBA	5	7
샘표	11	15.5	샘표	10	14.1
한살림	16	22.5	한살림	7	9.9
합계	71	100	합계	71	100

③ 6종 된장의 시료별 CATA 선호인자와 비선호인자 분석

BA는 긍정적 기호 유도 인자 중 ‘국물의 깊은맛’이 가장 높은 빈도로 선택되었다. ‘간장향/맛’ 기호 인자에서도 최고 빈도로 선택되었지만 시료 간 유의적 차이를 보이지는 않았다. 반면에 부정적 기호 유도 인자에서는 ‘너무 짜다’, ‘조미료맛’, ‘기름기가 많다’, ‘인공적이다’와 같은 관능적, 감정적 특성에서 가장 높은 빈도로 평가되었다. **R**은 ‘색상’ 인자에서 다른 시료에 비해 긍정적으로 평가된 빈도가 높았지만 유의적 차이는 없었다. 반면에 ‘좋은 점이 없다’ 항목에서도 가장 높은 빈도로 평가되었으며, 부정적 기호 유도 인자 중에서는 ‘발효향/맛’, ‘비린향/맛’, ‘너무 진한 냄새와 맛’, ‘이상한 냄새와 맛’, ‘썩썩한 냄새와 맛’, ‘기분이 나빠진다’, ‘다시 먹고 싶지 않다’, ‘부담스럽다’ 항목에서 가장 높은 빈도로 평가되었다. 이러한 부정적 인자들이 시료 **R**에 대한 소비자들의 매우 낮은 기호도를 유도한 것으로 판단되어진다. **RA**는 모든 긍정적 유도 인자에서 6종 간장의 중간 정도의 빈도로 평가되었고 부정적 기호 유도 인자에서는 ‘부담스럽다’는 평가가 **R**과 함께 최고 빈도로 선택되었다. ‘자극적이다’는 평가도 가장 많이 받았으나 시료 간 유의적 차이는 없었다. **RBA**는 ‘국물의 순한맛’, ‘목넘김의 부드러움’, ‘친숙하다’, ‘깔끔하다’와 같은 긍정적 기호 유도 인자가 6종 간장 중에서 가장 높게 나타났다. 또한 시료 간 유의적 차이를 보이지는 않지만 ‘감칠맛’, ‘구수한향/맛’, ‘조화로운향/맛’, ‘만족스럽다’에서도 가장 높은 빈도를 나타내며 **R**과 상반되는 결과를 보였다. 즉, 이러한 관능적 또는 감정적 기호 유도 인자들이 **RBA**에 대한 소비자들의 높은 기호도로 반영된 것으로 여겨진다. 그러나 ‘너무 순한 냄새와 맛’, ‘맛이 단조롭다’와 같은 부정적 기호 유도 인자가 가장 높은 빈도로 선택되었다. 샘표는 긍정적 기호 유도 인자 ‘건강에 좋을 것 같다’에서 최고 빈도를 나타냈지만 시료 간 유의적 차이는 보이지 않았다. 반면에 ‘색상’ 인자에서는 부정적인 평가가 6종 간장 중에서 가장 많이 나타났다. 한살림은 ‘미역향/맛’, ‘친숙하다’와 같은 긍정적 기호 유도 인자에서 가장 높은 빈도를 보였으나 나머지 항목에서는 6종 간장의 중간 정도의 빈도를 보였다. 부정적 기호 유도 인자에서도 6종 간장의 중간 정도의 빈도를 나타냈으며 이러한 결과로 소비자 기호도 평가에서도 6종 간장의 중간 정도에 위치하였다(Table 31, Table 32).

Table 31. 6종 간장의 관능적, 감정적 특성 빈도 및 백분율(Liking)

CATA	sample	색상 ^{NS}	감칠맛 ^{NS}	미역향/맛 ^{NS}	간장향/맛 ^{NS}	구수한 향/맛 ^{NS}	조화로운 향/맛 ^{NS}	국물의 깊은맛*	국물의 순한맛**	
긍정적 요인 (Like)	BA	빈도	14	11	18	13	12	11	12	20
		백분율(%)	19.72	15.49	25.35	18.31	16.90	15.49	16.90	28.17
	R	빈도	21	6	9	6	3	7	2	11
		백분율(%)	29.58	8.45	12.68	8.45	4.23	9.86	2.82	15.49
	RA	빈도	18	13	18	10	8	7	8	16
		백분율(%)	25.35	18.31	25.35	14.08	11.27	9.86	11.27	22.54
	RBA	빈도	19	17	17	11	13	14	3	29
		백분율(%)	26.76	23.94	23.94	15.49	18.31	19.72	4.23	40.85
	샘표	빈도	13	10	18	6	7	10	9	17
		백분율(%)	18.31	14.08	25.35	8.45	9.86	14.08	12.68	23.94
	한살림	빈도	16	14	23	12	10	9	9	13
		백분율(%)	22.54	19.72	32.39	16.90	14.08	12.68	12.68	18.31
		sample	목넘김의 부드러움*	친숙하다*	만족스럽다 ^{NS}	깔끔하다**	건강에 좋은 것 같다 ^{NS}	부담스럽지 않다**	좋은 점이 없다**	
	BA	빈도	28	21	12	20	2	17	9	
백분율(%)		39.44	29.58	16.90	28.17	2.82	23.94	12.68		
R	빈도	15	9	3	7	9	11	24		
	백분율(%)	21.13	12.68	4.23	9.86	12.68	15.49	33.80		
RA	빈도	23	15	7	14	5	18	12		
	백분율(%)	32.39	21.13	9.86	19.72	7.04	25.35	16.90		
RBA	빈도	36	24	10	27	7	32	8		
	백분율(%)	50.70	33.80	14.08	38.03	9.86	45.07	11.27		
샘표	빈도	25	15	8	18	11	22	14		
	백분율(%)	35.21	21.13	11.27	25.35	15.49	30.99	19.72		
한살림	빈도	28	24	9	14	4	16	12		
	백분율(%)	39.44	33.80	12.68	19.72	5.63	22.54	16.90		

최대빈도값은 붉은색, 최소빈도값은 푸른색으로 표기함.

*국물의 깊은맛'=0.040, *국물의 순한맛'=0.009, *목넘김의 부드러움'=0.013, '친숙하다'=0.020, *깔끔하다'=0.003, *부담스럽지 않다'=0.003, *좋은 점이 없다'=0.009

NS(Not Significant)

Table 32. 6종 간장의 관능적, 감정적 특성 빈도 및 백분율(Disliking)

CATA	sample	색상***	너무 짜다**	조미료맛 ^{NS}	기름기가 많다 ^{NS}	발효향/맛***	간장향/맛 ^{NS}	비린향/맛**	
부정적 요인 (Dislike)	BA	빈도	7	37	14	16	5	18	9
		백분율(%)	9.86	52.11	19.72	22.54	7.04	25.35	12.68
	R	빈도	9	24	10	11	19	28	19
		백분율(%)	12.68	33.80	14.08	15.49	26.76	39.44	26.76
	RA	빈도	5	34	12	13	5	24	9
		백분율(%)	7.04	47.89	16.90	18.31	7.04	33.80	12.68
	RBA	빈도	8	13	11	9	4	19	3
		백분율(%)	11.27	18.31	15.49	12.68	5.63	26.76	4.23
	샘표	빈도	23	24	12	8	3	23	8
		백분율(%)	32.39	33.80	16.90	11.27	4.23	32.39	11.27
	한살림	빈도	21	29	10	11	1	23	7
		백분율(%)	29.58	40.85	14.08	15.49	1.41	32.39	9.86
		sample	너무 진한 냄새와 맛**	너무 순한 냄새와 맛*	이상한 냄새와 맛**	풍부하지 않은 냄새와 맛 ^{NS}	쿵쿵한 냄새와 맛***	텃텃하다 ^{NS}	
	BA	빈도	4	3	6	19	9	7	
	백분율(%)	5.63	4.23	8.45	26.76	12.68	9.86		
R	빈도	10	3	16	15	28	14		
	백분율(%)	14.08	4.23	22.54	21.13	39.44	19.72		
RA	빈도	2	4	7	17	8	12		
	백분율(%)	2.82	5.63	9.86	23.94	11.27	16.90		
RBA	빈도	0	11	2	27	3	9		
	백분율(%)	0.00	15.49	2.82	38.03	4.23	12.68		
샘표	빈도	7	11	4	16	6	8		
	백분율(%)	9.86	15.49	5.63	22.54	8.45	11.27		
한살림	빈도	9	5	4	20	6	10		
	백분율(%)	12.68	7.04	5.63	28.17	8.45	14.08		

최대빈도값은 붉은색, 최소빈도값은 푸른색으로 표기함.

'색상'=0.000, *'너무 짜다' 유의확률=0.001, *'발효향/맛'=0.000, '비린 향/맛'=0.003, *'너무 진한 냄새와 맛'=0.007, *'너무 순한 냄새와 맛'=0.024, '이상한 냄새와 맛'=0.001,

'쿵쿵한 냄새와 맛'=0.000

NS(Not Significant)

Table 32. 6종 간장의 관능적, 감정적 특성 빈도 및 백분율(Disliking) (cont'd)

CATA	sample	기분이 나빠진다***	인공적이다 ^{NS}	자극적이다 ^{NS}	맛이 단조롭다***	무슨 맛인지 모르겠다 ^{NS}	다시 먹고 싶지 않다***	부담스럽다*	
부정적 요인 (Dislike)	BA	빈도	4	17	8	18	8	12	5
		백분율(%)	5.63	23.94	11.27	25.35	11.27	16.90	7.04
	R	빈도	17	13	8	12	13	27	12
		백분율(%)	23.94	18.31	11.27	16.90	18.31	38.03	16.90
	RA	빈도	2	13	12	14	6	18	12
		백분율(%)	2.82	18.31	16.90	19.72	8.45	25.35	16.90
	RBA	빈도	0	12	4	33	6	5	1
		백분율(%)	0.00	16.90	5.63	46.48	8.45	7.04	1.41
	샘표	빈도	3	12	8	30	13	15	11
		백분율(%)	4.23	16.90	11.27	42.25	18.31	21.13	15.49
	한살림	빈도	1	14	11	17	6	6	11
		백분율(%)	1.41	19.72	15.49	23.94	8.45	8.45	15.49

최대빈도값은 붉은색, 최소빈도값은 푸른색으로 표기함.

*기분이 나빠진다'=0.000, '맛이 단조롭다'=0.000, '다시 먹고 싶지 않다'=0.000, *부담스럽다'=0.017

NS(Not Significant)

(3) 6종 간장의 묘사분석 데이터와 소비자 기호도 평가를 이용한 기호 유도 인자 분석

6종 간장에 대해 전문적인 패널들이 평가한 관능적 특성들이 소비자들의 기호도에 영향을 미치는지를 알아보기 위해 묘사분석 데이터와 소비자 기호도 평가 결과를 이용하여 MFA를 실시하였다(Figure 58).

MFA 결과, 제 1주성분인 외관기호도를 제외한 전반기호도, 냄새/향기호도, 맛/향미기호도, 색감/질감기호도는 양의 방향에 집중되어 나타났다. 따라서 제 1주성분의 양의 방향으로 강하게 부하된 짠내, 감칠맛, 메주향, 단맛과 같은 특성들이 이와 같은 기호도 항목에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보인다. 이러한 관능적 특성들이 강한 시료 RBA와 BA는 실제 소비자 기호도 평가에서도 다른 간장 시료들에 비해 높은 점수를 보였다. 반면, 제 1주성분의 음의 방향으로 발효향, 군덕내, 짠맛 등의 관능적 특성이 강하게 부하되어 있으며, 소비자 기호도에 부정적인 영향을 미쳤으며, 이러한 특성이 비교적 강하게 나타나는 한살림 간장은 소비자 기호도 평가에서도 6종 간장 중에서 낮은 점수를 보였다.

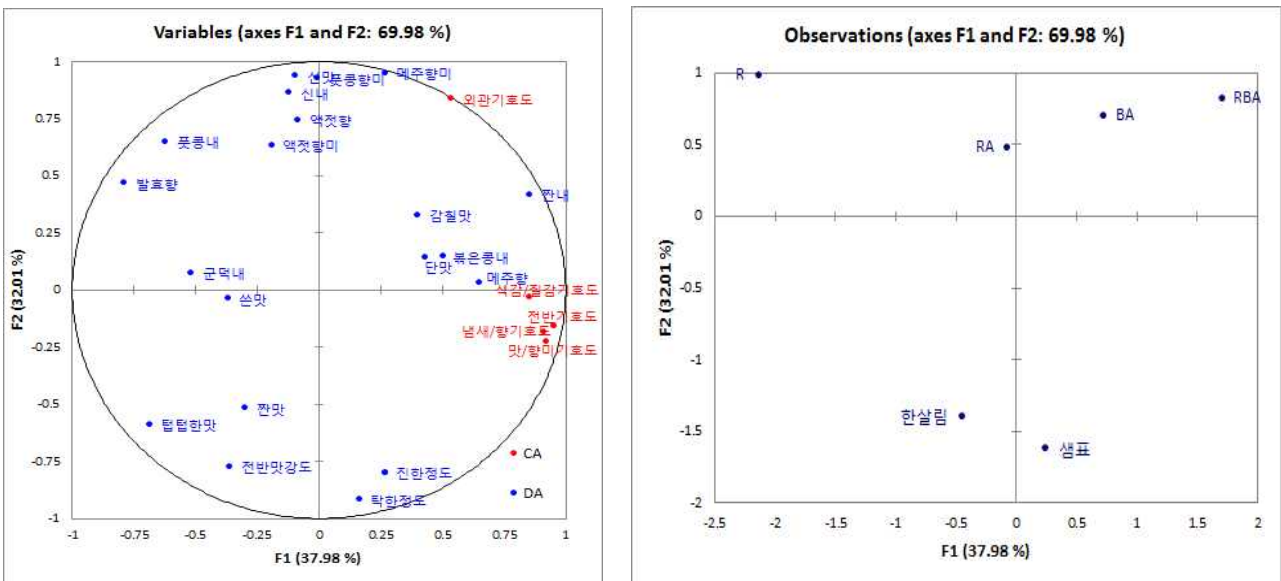


Figure 58. 6종 간장의 MFA(Multi Factor Analysis)

(4) 결론

된장과 마찬가지로 가장 좋았던 시료로 본사 기존 된장인 BA가 제일 많이 선택되었으나 그 다음으로 RBA가 19.7%로 높은 선택을 받았음을 확인 하였고, 특히 비선택도 비율 또한 7%로 가장 낮음을 알 수 있었다. 품질분석 결과 또한 RBA가 본사 기존 간장과 가장 비슷한 결과를 보였고, 최종 숙성 기간에서 Brix, 아미노태 질소 함량 및 총 질소 함량이 높은 결과를 나타내었기에 RBA간장이 RA, R보다 상품화로서의 가능성이 크다고 판단되어지며 이를 최종 제품으로 선정하여 시제품으로 제작하였다.

2. RiBS1과 ORiBS1적용 청국장 관능특성 비교 분석

*B. cereus*만이 특이적으로 제거된 볏짚 유래 Starter culture인 RiBS1을 이용하여 제조한 청국장과 유기농 볏짚 유래 Starter culture인 ORiBS1으로 제조한 청국장의 관능적 특성 및 기호도 조사 비교를 위해 이화여자대학교에 의뢰하여 수행하였다. 패널은 장류 관련 전문적인 묘사분석 훈련 과정을 거친 40~50대 주부 10명을 대상으로 묘사분석을 하였으며, 기호도 조사는 다양한 범위의 소비자를 대상으로 조사하기 위하여 20대 여학생 23명, 20대 남학생 24명, 그리고 40~50대 주부 49명 총 96명의 패널을 모집하여 본 실험을 수행하였다.

가. 시료

묘사분석 및 소비자 기호도 조사에 사용된 시료는 Table 33과 같다. 제2협동에서 자체 관능평가 후 가장 선호도가 좋았던 RiBS1적용 청국장 2종(발효온도 50℃, 발효시간 48hr, RiBS1와 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 혼합하여 0.1% 접종한 청국장, 이하 **R+B** / 발효온도 50℃, 발효시간 24hr, RiBS1 0.1% 접종한 청국장, 이하 **R**)과 ORiBS1적용 청국장 2종(발효온도 50℃, 발효시간 48hr, ORiBS1와 *Bacillus licheniformis* SRCM0100027를 혼합하여 0.1% 접종한 청국장, 이하 **OR+B** / 발효온도 50℃, 발효시간 48hr, ORiBS1 1% 접종한 청국장, 이하 **OR**)을 선정하여 본 실험을 수행하였다.

Table 33. 청국장 4종 시료

이름	성분
R	RiBS1 48hr-0.1%-R (50℃)
R+B	RiBS1 24hr-0.1%-RB (50℃)
OR	ORiBS1 48hr-0.1%-ORB (50℃)
OR+B	ORiBS1 48hr-1%-OR (50℃)

나. 실험 결과

(1) 청국장 4종의 관능적 특성

청국장 4종에 대한 관능적 특성 강도 점수의 평균값과 표준편차는 Table 34에 제시하였다. 청국장 시료별 관능적 특성 강도를 강·중·약으로 나누어 정리한 내용은 다음과 같다.

청국장 4종 시료 중 전반 맛 강도가 강한 것은 **OR+B** > **OR** > **R+B** > **R** 순으로 나타났다. 전반 맛 강도 점수가 가장 높게 부여된 **OR+B**는 외관과 질감 특성이 강한 강도로 나타나고, 전반적으로 맛과 향미가 강한 특징을 지니고 있으며, ‘쓴맛’은 강하게 도출되었고 ‘푹콩/콩 비린 향미’특성 강도는 약하게 나타났다. 전반 맛 강도 점수가 두 번째로 강하게 부여된 **OR**은 일반적으로 청국장에서 도출되는 맛과 향미 특성이 나타나지만, 그 강도가 OR+B에 비해 약하게 도출되었다. 그러나 OR+B에 비해 ‘푹콩/콩 비린향미’가 강하게 도출되는 것이 특징이었다. 전반 맛 강도 점수가 약하게 부여된 **R+B**시료는 거의 모든 특성 항목이 다른 시료에 비해 약한

강도로 나타내었다. 즉, 전반적으로 청국장에서 도출될 수 있는 향/향미, 맛 특성이 발현되지 않은 것을 알 수 있으며 ‘겉쪽한 정도’가 약하게 발현되었고, ‘풋콩/콩 비린 향미’ 또한 약한 강도로 발현된 것이 특징이다. 마지막으로 전반 맛 강도가 가장 낮게 평가된 R시료는 대부분의 맛과 향미 특성이 다른 시료들에 비해 약하게 도출되었고, R+B시료의 특징과 유사한 것이 특징 이었다.

Table 34. 청국장 4종 시료의 평균값과 표준편차

샘플	진한 정도	탁한 정도	단내	짠내	시큼한 향	발효 향	매주 향	익힌 콩 향
P-value	0.000***	0.000***	0.427	0.078	0.609	0.346	0.156	0.573
R	5.5±1.6 ^a	5.88±1.74 ^a	4.5±1.5	3.65±1.66	3.25±1.78	5.23±1.44	5.93±1.35	5.43±1.26
OR	6.9±2.02 ^b	6.98±1.93 ^b	4.23±1.31	3.9±1.53	3.05±1.28	5.33±1.47	6.13±1.52	5.63±1.41
R+B	7.3±2.14 ^b	6.73±2.5 ^b	4.08±1.85	3.73±1.83	3.05±1.47	5.05±1.85	6.23±1.58	5.38±1.6
OR+B	8.2±1.44 ^c	8.05±1.48 ^c	4.3±1.45	4.25±1.66	3.25±1.43	5.5±1.66	6.55±1.41	5.7±1.45
합계	6.98±2.05	6.91±2.08	4.28±1.53	3.88±1.67	3.15±1.49	5.28±1.61	6.21±1.47	5.53±1.43

샘플	구수한향	풋콩/콩 비린내	멸치 향	군덕내	간장 향	인공조미료 향	단맛	짠맛
P-value	0.348	0.392	0.975	0.992	0.144	0.176	0.263	0.286
R	5.28±1.72	2.2±1.09	4.13±1.67	3.33±1.59	4.28±1.43	3.05±1.28	2.68±1.1	2.78±1.19
OR	5.38±1.79	2.33±1.19	4.13±1.99	3.38±1.64	4.2±1.79	3.2±1.31	2.5±1.09	3±1.18
R+B	5.1±1.89	2.1±1.01	4.1±2	3.33±1.46	4.38±1.86	3.05±1.52	2.33±1.02	2.6±1.03
OR+B	5.55±1.96	2.08±1.27	4.2±1.83	3.38±1.61	4.73±2.21	3.43±1.65	2.3±1.07	2.9±1.15
합계	5.33±1.84	2.18±1.14	4.14±1.86	3.35±1.56	4.39±1.84	3.18±1.44	2.45±1.07	2.82±1.14

샘플	신맛	쓴맛	감칠맛	전반 맛 강도	발효향미	매주향미	익힌 콩 향미	구수한 향미
P-value	0.602	0.005**	0.241	0.022*	0.262	0.065	0.917	0.279
R	2.6±1.22	3.25±1.55 ^a	4.08±1.86	5.08±1.97 ^a	5.03±1.58	5.28±1.34	5.15±1.31	4.93±1.79
OR	2.3±1.29	4.1±2.37 ^b	4.13±1.84	5.58±2.18 ^a	4.95±1.72	5.75±1.75	5.33±1.35	4.7±1.49
R+B	2.43±1.22	3.88±2.29 ^b	3.63±1.72	5.1±2.27 ^a	4.6±1.74	5.75±2.02	5.23±1.82	4.55±1.97
OR+B	2.53±1.43	4.28±2.14 ^b	3.98±1.83	5.7±2.31 ^b	5.15±1.78	6.03±1.9	5.3±1.56	5±1.77
합계	2.46±1.28	3.88±2.13	3.95±1.81	5.36±2.19	4.93±1.7	5.7±1.78	5.25±1.51	4.79±1.76

샘플	팏콩/콩 비린 향미	멸치향미	간장향미	인공조미료향미	이미/이취	텃텃한/뚝은 정도	몽그러지는 정 도	겉쭉한 정도
P-value	0.011**	0.933	0.743	0.249	0.907	0.112	0.127	0.001**
R	2.25±1.48 ^a	3.53±1.89	3.15±1.39	3.43±1.53	2.65±2.33	4.63±1.97	7.73±1.75	5.83±2.06 ^a
OR	2.95±2.28 ^b	3.6±1.87	3.3±1.49	3.38±1.78	2.55±2.06	5.28±2.24	8.03±1.49	6.28±1.87 ^a
R+B	2.3±1.8 ^a	3.53±2.15	3.03±1.72	2.9±1.43	2.7±2.32	5.13±2.53	8.33±2.26	5.8±2.27 ^a
OR+B	2.25±1.77 ^a	3.65±2.12	3.23±1.64	3.2±1.73	2.7±2.26	5.28±2.3	8.45±2.31	6.9±1.97 ^b
합계	2.44±1.86	3.58±1.99	3.18±1.55	3.23±1.62	2.65±2.22	5.08±2.26	8.13±1.99	6.2±2.08

* 최대평균값은 빨간색, 최소평균값은 파란색으로 표시

* P***<0.001 P**<0.01 P*<0.05

* Duncan검정 a<b<c (통계적 유의한 항목만 사후검정을 실시)

(2) 청국장 4종의 소비자 기호도 조사

(가) 청국장 4종에 대한 기호도 분석

각 시료별 기호도에 대한 집단별 평균분석 결과를 Table 35에 나타내었다. 전반 기호도가 높은 순은 OR > R+B > R > OR+B 으로 나타났다. 외관 기호도는 R+B > OR > R > OR+B 순으로 평가, 냄새/향 기호도의 경우 OR > R+B > R > OR+B 순으로 평가, 맛/향미 기호도의 경우 OR > R+B > R > OR > B 순으로 평가, 마지막으로 식감/질감/입안감촉 기호도는 R+B > OR > R > OR > B 순으로 평가되었다. 전반기호도가 높게 평가된 시료 OR과 R+B를 비교해보면 **OR**시료는 냄새/향기호도, 맛/향미기호도가 높게 평가되었고, **R+B**시료는 외관기호도와 식감/질감/입안감촉기호도가 높게 평가된 것을 알 수 있었다.

식감/질감/입안감촉 기호도는 시료별 유의적 차이를 보이지 않는 것으로 보아, 전반 기호도에 평가에 큰 영향을 주지 않는 것으로 해석되며, 전반 기호도가 가장 강하게 평가된 OR시료는 냄새/향 기호도, 맛/향미 기호도 또한 높게 평가된 반면, 전반 기호도가 가장 낮게 평가된 OR+B시료는 모든 기호도 특성 항목이 낮게 평가되었다.

Table 35. 청국장 4종에 대한 기호도 특성 항목별 유의확률과 기호도 평균 및 표준편차

시료명	전반기호도	외관기호도	냄새/향기호도	맛/향미기호도	식감/질감/ 입안감촉 기호도
P-value	0.001**	0.000***	0.000***	0.001**	0.09
R	5.1±1.59 ^b	5.44±1.33 ^a	5.28±1.46 ^a	5.09±1.65 ^b	5.6±1.4 ^{ab}
OR	5.57±1.62 ^b	5.89±1.3 ^b	5.95±1.41 ^b	5.6±1.63 ^c	5.67±1.52 ^{ab}
R+B	5.3±1.78 ^b	6.09±1.34 ^b	5.86±1.48 ^b	5.24±1.8 ^{bc}	5.85±1.44 ^b
OR+B	4.63±1.71 ^a	5.17±1.53 ^a	4.98±1.52 ^a	4.58±1.67 ^a	5.31±1.6 ^a
합계	5.15±1.71	5.65±1.42	5.52±1.52	5.13±1.72	5.61±1.5

* 최대값은 파란색, 최소값은 빨간색으로 표시

* P***<0.001 P**<0.01 P*<0.05

* Duncan검정 a<b<c (통계적 유의한 항목만 사후검정을 실시)

(나) 좋았던 시료와 싫었던 시료 분석

청국장 4종의 시료를 평가한 후, 가장 좋았던 시료와 가장 싫었던 시료를 각각 1종씩 고른 결과를 합산하여 Table 36에 나타내었다. 가장 좋았던 시료는 OR > R+B > R > OR+B 순으로 나타났고, 가장 싫었던 시료는 OR+B > R > OR > R+B 순으로 나타났다. 가장 좋았던 시료인 OR은 34.4%로 다른 시료에 비해 높은 비율로 선정되었고, 가장 싫었던 시료 결과에서는 46.9%의 절반 가까이 되는 소비자들이 가장 싫었던 시료로 OR+B를 선정하였다. 이에 반해 R 시료와 R+B시료에 대한 기호도 점수는 큰 차이를 나타내지 않음을 알 수 있었다.

Table 36. 가장 좋았던 시료와 가장 싫었던 시료

	가장 좋았던 시료		가장 싫었던 시료	
	빈도	%	빈도	%
R	92	24	80	20.8
OR	132	34.4	68	17.7
R+B	100	26	56	14.6
OR+B	60	15.6	180	46.9
합계	384	100	384	100

(다) 청국장 4종의 시료별 CATA 선호인자와 비선호인자 분석

R시료에서 ‘메주 맛/냄새’가 선호인자로 작용되고, ‘시큼한 맛’ 항목이 비선호인자로 나타나 다른 시료와 구분되는 특징은 보였다. 가장 좋았던 시료로 선정된 OR시료의 경우 시료 간 유의적 차이를 보였던 ‘구수한 맛’에서 소비자의 49%가 응답하였으며 가장 높은 빈도를 나타내었다. 더불어 유의적 차이를 나타내진 않았지만 ‘순한 맛’과 ‘담백한 맛’ 항목에서도 높은 빈도를 차지하며 선호인자로 선택되었다. R+B시료는 OR시료와 비슷한 경향을 보였으며, OR시료와 비교하였을 때 선호인자에서 ‘발효된 맛/냄새’, ‘겉쫀한 농도’, ‘집에서 만든 것 같다’ 항목이 보다 더 높은 빈도로 나타났고, 비선호인자에서는 OR시료에 비해 ‘시큼한 맛’의 빈도가 높게 나타났다. 마지막으로 소비자들이 가장 싫었던 시료로 선택한 OR+B의 경우, ‘감칠맛’, ‘향미의 조화로움’, ‘발효된 맛/냄새’, ‘메주 맛/냄새’, ‘겉쫀한 농도’, ‘친숙하다’, ‘집에서 만든 것 같다’ 항목에서 4가지 시료 중 가장 낮은 빈도로 나타났으며, 비선호 인자로 ‘향미의 조화로움’, ‘균덕내/구린내’, ‘이상한 맛/냄새’, ‘무슨맛인지 모르겠다’ 항목에서 높은 빈도로 나타났다(Table 37, Table 38).

위의 결과를 종합해 보면, 소비자는 4종 청국장의 기호인자에 대하여 ‘외관’, ‘구수한 맛’, ‘순한 맛’, ‘담백한 맛’, ‘발효된 맛/냄새’, ‘쫀히는 질감’, ‘부담이 없다’, ‘토속적이다’, ‘자연적인 맛이 다’, ‘건강에 좋을 것 같다’, ‘집에서 만든 것 같다’ 등의 항목을 선호인자로 고려하였고, ‘짠맛이 약함’, ‘단조로운 맛’, ‘향미의 부조화로움’, ‘균덕내/구린내’, ‘뭉은 농도’, ‘개성이 없다’, ‘무슨맛인지 모르겠다’ 항목을 비선호인자로 고려하는 것을 알 수 있었다.

그러나 청국장 4종 시료에 대해 선호인자와 비선호인자를 분석한 결과 중에서 통계적 유의성을 띄는 항목은 제한적이다. 선호인자의 경우 ‘외관’, ‘감칠맛’, ‘구수한 맛’, ‘겉쫀한 농도’, ‘집에서 만든 것 같다’ 항목에서 시료별 유의적 차이가 나타나고, 비선호인자의 경우 ‘단조로운 맛’, ‘향미의 부조화로움’, ‘뭉은 농도’, ‘무슨맛인지 모르겠다’ 항목에서 유의적 차이를 나타내었다.

Table 37. 청국장 4종에 대한 선호인자(Like) 빈도(%)

시료	외관	감칠맛	구수한 맛	순한 맛	담백한 맛	향미의 조 화로우	발효된 맛/냄새	메주 맛/냄새	씹히는 질 감	겉쭉한 농 도
P-value	0.011*	0.015*	0.000***	0.289	0.292	0.079	0.123	0.430	0.406	0.012*
R	18(18.8)	15(15.6)	36(37.5)	41(42.7)	35(36.5)	13(13.5)	20(20.8)	19(19.8)	33(34.4)	6(6.3)
OR	23(24.0)	16(16.7)	47(49.0)	46(47.9)	41(42.7)	16(16.7)	20(20.8)	18(18.8)	25(26.0)	12(12.5)
R+B	33(34.4)	11(11.5)	34(35.4)	34(35.4)	35(36.5)	15(15.6)	24(25.0)	15(15.6)	30(31.3)	19(19.8)
OR+B	17(17.7)	4(4.2)	20(20.8)	39(40.6)	28(29.2)	5(5.2)	12(12.5)	11(11.5)	31(32.3)	4(4.2)

시료	친숙하다	부담이 없다	토속적이다	자연적인 맛이다	건강에 좋을 것 같다	집에서 만든 것 같다
P-value	0.314	0.209	0.268	0.655	0.359	0.008***
R	18(18.8)	45(46.9)	25(26.0)	31(32.3)	36(37.5)	14(14.6)
OR	19(19.8)	51(53.1)	25(26.0)	34(35.4)	39(40.6)	17(17.7)
R+B	19(19.8)	37(38.5)	29(29.9)	30(31.3)	40(41.7)	21(21.9)
OR+B	11(11.5)	41(42.7)	18(18.8)	27(28.1)	30(31.3)	7(7.3)

* P***<0.001 P**<0.01 P*<0.05

* 15%이상의 소비자가 응답한 결과는 빨간색으로 표시

Table 38. 청국장 4종에 대한 비선호인자(Dislike) 빈도(%)

시료	짠맛이 약함	시큼한 맛	단조로운 맛	향미의 부 조화로움	굳덕내 /구린내	이상한 맛/ 냄새	물은 농도	개성이 없다	무슨맛인지 모르겠다
P-value	0.713	0.223	0.036*	0.000***	0.297	0.218	0.019*	0.404	0.000***
R	25(26.0)	15(15.6)	25(26.0)	14(14.6)	12(12.5)	13(13.5)	39(40.6)	35(36.5)	14(14.6)
OR	31(32.3)	8(8.3)	31(32.3)	11(11.5)	12(12.5)	7(7.3)	26(27.1)	34(35.4)	7(7.3)
R+B	28(29.2)	14(14.6)	30(31.3)	4(4.2)	12(12.5)	7(7.3)	28(29.2)	27(28.1)	16(16.7)
OR+B	29(30.2)	11(11.5)	39(40.6)	26(27.1)	21(21.9)	16(16.7)	41(42.7)	34(35.4)	27(28.1)

* P***<0.001 P**<0.01 P*<0.05

* 15%이상의 소비자가 응답한 결과는 빨간색으로 표시

(라) 청국장 4종에 대해 소비자가 인지하는 특성과 기호도 관련성

청국장 섭취 후 소비자가 인지하는 청국장 시료별 특성과 기호도 관련성을 확인하기 위해 Correspondence Analysis(CA)를 실시하여 그 관련성을 시각적으로 도표화하였다(Figure 59).

그 결과 제1성분 음의방향에 선호인자(L_특성)가 위치하고 양의방향으로 비선호인자(DL_특성)가 위치하여 음의방향에 위치한 시료인 R+B와 OR은 소비자 기호도가 높게 평가 되었고 양의방향에 위치한 시료인 R과 OR+B는 소비자 기호도가 낮게 평가되었음을 알 수 있었다. **R+B**의 기호도에 영향을 준 CATA항목은 ‘L_겉쪽한 농도’, ‘L_외관’, ‘L_집에서 만든 것 같다’로 나타났으며, 다른 시료에 비해 외관과 질감이 긍정적 기호도 형성에 영향을 준 것으로 분석되었다. **OR**의 경우 ‘L_구수한 맛’, ‘L_감칠맛’항목이 긍정적 기호도 형성에 영향을 준 것으로 나타났다. L_특성 항목과 DL_특성 항목 분포의 가운데에 위치한 **R**시료는 전반적으로 청국장 향미가 약한 시료로 ‘DL_단조로운 맛’, ‘DL_뭉은 농도’, ‘DL_외관’ 인자들이 기호도 형성에 영향을 준 것으로 나타났다. 마지막 **OR+B**시료의 경우 도표에서 비선호인자(DL_특성)이 편중되어 있는 것을 볼 수 있으며, 기호도에 부정적인 영향을 준 인자로 ‘DL_다시 먹고 싶지 않다’, ‘DL_무슨맛인지 모르겠다’, ‘DL_단조로운 맛’, ‘DL_좋은 점이 없다’, ‘DL_뭉은 농도’, ‘DL_썩내’, ‘DL_외관’, ‘DL_향미의 부조화로움’이 도출되었다.

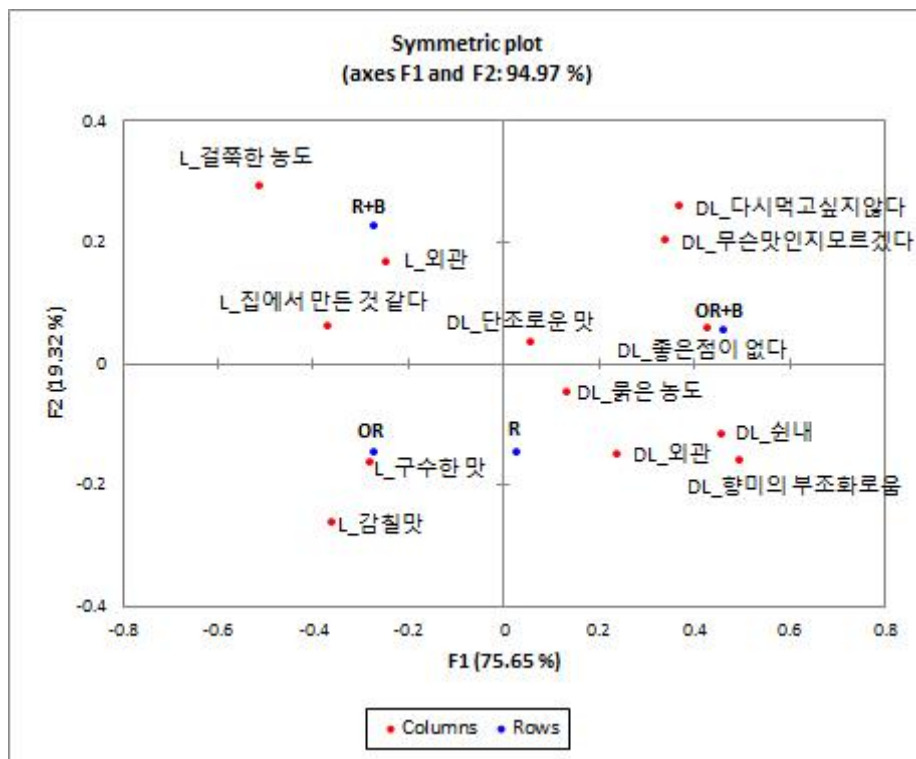


Figure 59. 청국장 4종 시료에 대해 소비자가 인지하는 특성과 기호도 관련성에 대한 Correspondence Analysis(CA)결과

(마) 결론

시료별 선호인자와 비선호인자에 차이를 보이는 것으로 보아, 청국장 4종 시료의 전반적인 기호인자가 뚜렷하게 구분되어 나타나는 것으로 해석되어지며, 소비자는 R+B와 OR시료를 선호하고 ‘겉쪽한 농도’, ‘집에서 만든 것 같다’, ‘구수한 맛’, ‘감칠맛’ 등의 항목이 청국장에 대한

긍정적 기호도를 형성하는 반면, ‘단조로운 맛’, ‘푹은 농도’, ‘쉰내’, ‘향미의 부조화로움’ 등의 항목은 부정적 기호도를 형성하였다. 결과적으로 RiBS1의 약한 특성을 *Bacillus*속이 보완하여 시너지효과를 내어 긍정적인 맛을 형성함으로써 기호도를 향상시켰으며 ORiBS1의 경우 특유의 구수한 맛을 형성해내는 반면 *Bacillus*속과의 작용은 부정적인 기호도를 형성하였다.

3. 소비자 조사 및 상품화 방안 마련

가. 개발 제품 소비 트렌드 조사

청국장은 비교적 겨울에 즐기는 식품으로 알려져 있다. 특유의 향과 맛으로 선호가 극명하게 갈리기도 하고, 특히 최근 젊은 소비자 계층은 이에 대한 거부감이 있는 것이 사실이다. 본사에서 학교급식 등에 공급하는 청국장 제품 또한 이러한 트렌드를 반영하듯이 비교적 순한 맛의 청국장이 제조되고 있는 실정이다. 이러한 소비자 트렌드와 개발제품의 상품화 가능성을 알아보기 위해 방문객 등을 상대로 설문조사를 실시하였다. 이와 관련된 설문조사지 내용은 Figure 60과 같다.

청국장 제품 소비자 설문조사서

조 사 배 경

본 설문은 본 사 청국장 생산/판매와 관련하여 소비자 의견을 수렴하고자 실시하오니
설문에 응해 주시면 감사하겠습니다.
Tel, 063-653-9592 Fax, 063-653-9597

1. 귀하의 연령대는?
 20대 이하 30대 40대 50대 60대 이상
2. 귀하의 성별은?
 여성 남성
3. 함께 거주하는 가족의 수는?
 2인 이하 3 ~ 4인 4인 이상
4. 1년에 몇 번 정도 청국장을 드시나요?
 먹지 않는다. 1 ~ 10회
 10 ~ 20회 20회 이상
5. 특별히 즐겨먹는 계절이 있으신가요?
 4계절 내내 즐긴다. 봄 여름
 가을 겨울 먹지 않는다.
6. 청국장은 어떻게 조달하시나요?
 지인(부모님, 이웃 등)을 통해 대형마트에서 구매 전통시장
 온라인 구매 직접발표 소형 슈퍼 기타
7. 어떤 청국장을 선호하시나요?
 청국장 고유의 냄새와 맛이 진한 것 냄새는 별로 없지만 맛은 진한 청국장 맛
 냄새도 없고 맛도 부드러운 청국장 청국장을 좋아하지 않음
8. 유해균을 제거하고 벗질 추출물을 이용하여 만든 청국장에 대한 생각은 어떠신가요?
 그래도 청국장은 벗질을 이용해서 만들어야 제 맛이 날 것이다
 기술이 발전했으므로 기존에 먹던 청국장과 같은 맛이 난다면 더 안전할 것이다
 일반 청국장 발효균을 사용한다 하더라도 괜찮다
 기타의견()
9. 청국장을 100g 단위로 밀봉포장해서 5, 10, 20개 단위로 포장한 청국장이 있다면
구매할 의향은 있으신가요?(100g 단위로 개별포장하여 냉동실에 보관하고 하나씩
꺼내 먹을 수 있음)
 있다 없다 가격을 고려하여 결정 기타

설문에 응해 주셔서 감사드립니다. 여러분이 주시는 의견은 본 사 청국장 개발의 귀중한 자료로 활용하겠습니다. 감사합니다.

Figure 60. 청국장 제품 소비자 설문조사서

설문은 기본적 프로파일과 섭취 및 구매, 조달 형태, 선호 청국장과 기술개발 제품의 구매의향에 대해 조사하였다(Figure 61). 설문조사에 참여한 인원은 100명으로 성별로 여성이 56%, 남성이 44% 였으며, 연령대는 30대 이하 26%, 30대 42%, 40대 20%, 50대 12% 이었다. 함께 거주하는 가족수는 2인 이하 16%, 3 ~ 4인 66%, 4인 이상 18%로 핵가족화 추세가 유지되고 있음을 알 수 있었다. 선호하는 계절은 겨울 56%로 가장 많았고 비교적 4계절 내내 즐기는 소비자도 34%가량으로 높은 비율을 나타냈다. 가을과 봄, 먹지 않는다고 응답한 조사대상자는 10.4%였다.

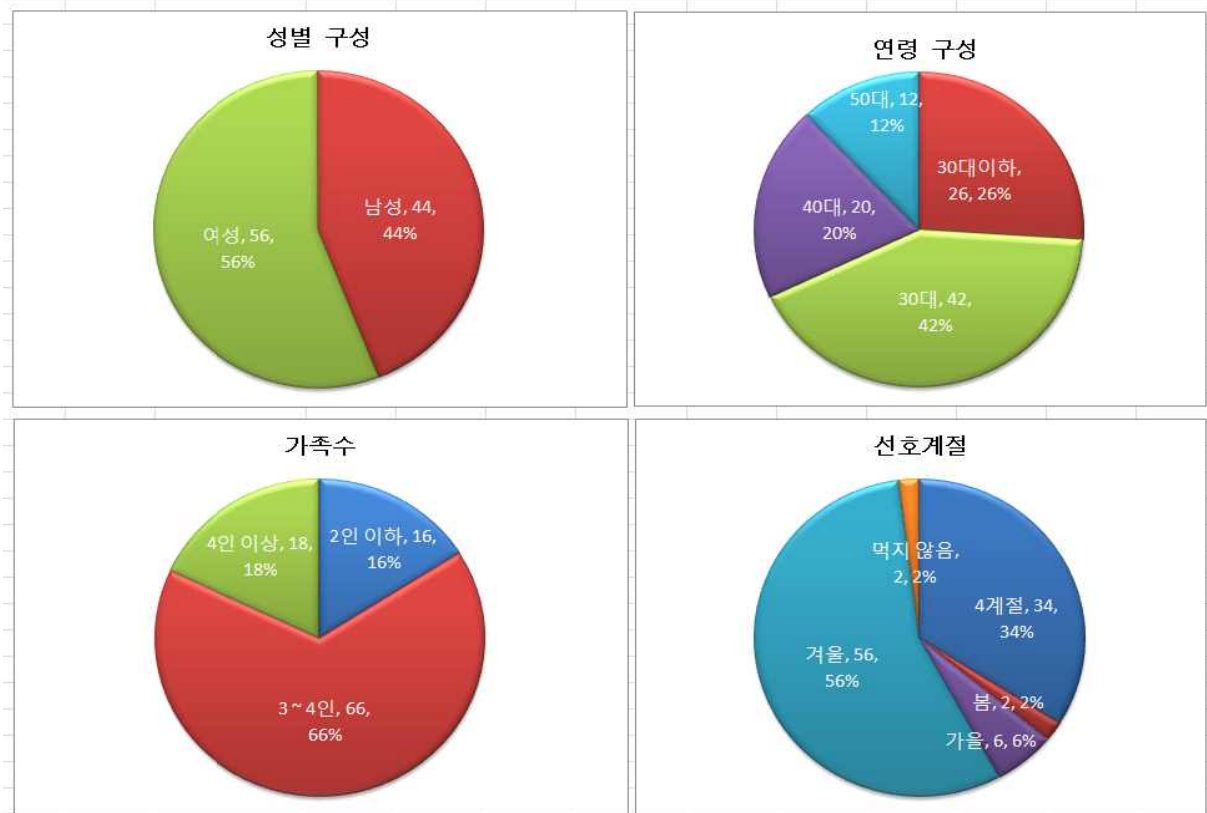


Figure 61. RiBS1을 이용한 청국장 제품개발 관련 소비자조사 프로파일링

청국장은 1회 2인 기준으로 약 100g 정도 사용된다. 기존 청국장의 염도는 냉장유통 시 3% 정도를 유지하며, 유통기한은 약 3개월가량이 일반적이거나 장류를 비롯하여 식품의 저염화 트렌드로 인해 염도는 낮아지고 소량화, 냉동상태의 제품이 개발되고 있다. RiBS1을 이용하여 개발한 청국장은 이러한 소비트렌드를 반영하고자 하였다.

제품개발은 100~150g 포장단위를 최소로 5~20개를 1set로 구성하는 방안을 고려하고 있다. 이를 위해 소비자가 연간 소비하는 청국장의 양을 대략적으로나마 추정하고자 청국장 사용빈도를 조사하였다(Figure 62). 청국장 사용빈도는 전체적으로 연간 20회 이상과 11~20회가 각각 30%, 1 ~ 10회가 38%로 조사되었으며, 청국장을 먹지 않는다고 응답한 소비자는 2%로 나타났다. 성별로 남자가 여자보다 먹는 횟수가 많았으며, 연령대로는 20회 이상의 경우 50대, 40대,

30대 이하와 30대 순으로 연령대가 높을수록 자주 먹는다는 것을 알 수 있었다. 연간 11회, 즉 월 1회 이상 먹는 것으로 기대되는 연령대도 이와 유사하였다. 이해보아, 2 ~ 4인 가족 기준으로 100g 단위 청국장은 5개를 1set로 구성하는 것이 소비와 판매에 효과적일 것으로 판단된다.

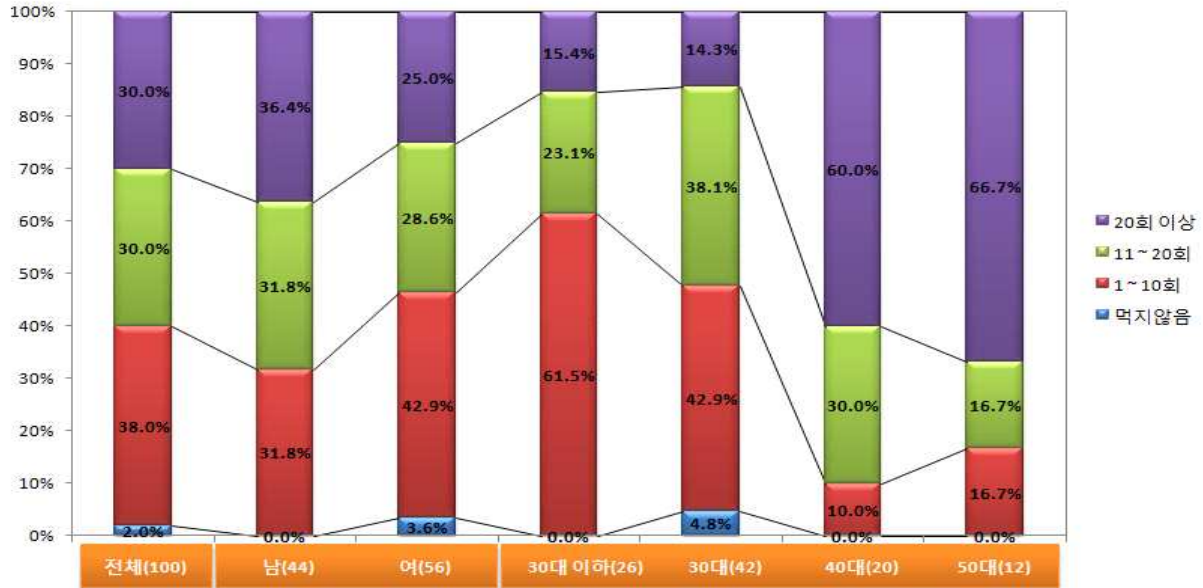


Figure 62. 성별/연령대별 청국장 사용빈도(연간)

기술개발제품의 향후 시장전망성과 유통채널을 고려하기 위하여 소비자의 청국장 조달방법에 대해 조사하였다(Figure 63). 아직까지 다른 식품류와는 달리 대형마트나 슈퍼, 온라인 등 일반적 유통채널이 아닌 지인을 통해 조달하거나 직접제조하여 먹는 비율이 전체적으로 50% 이상을 유지하였다. 남자의 경우 40% 정도, 여자의 경우 53% 정도가 이와 같은 방법을 통해 청국장을 획득하는 것으로 나타났으며, 고무적인 것은 사용빈도가 높은 40대(80%)와 50대(50%)에 확인하다. 이는 아직 청국장 시장이 시장에 정착하지 못했고 향후 청국장 시장확대 전망이 밝음을 의미하기도 한다. 그러나 이러한 양상은 기존 유통되고 있는 청국장의 맛의 일관성과 더불어 전통적으로 집이나 아는 사람을 통해 맛있는 청국장을 얻는 편이 사는 것보다 현재까지는 유효하다는 것으로 이에 발맞춘 제품개발이 지속적으로 진행되어야 할 것이다.

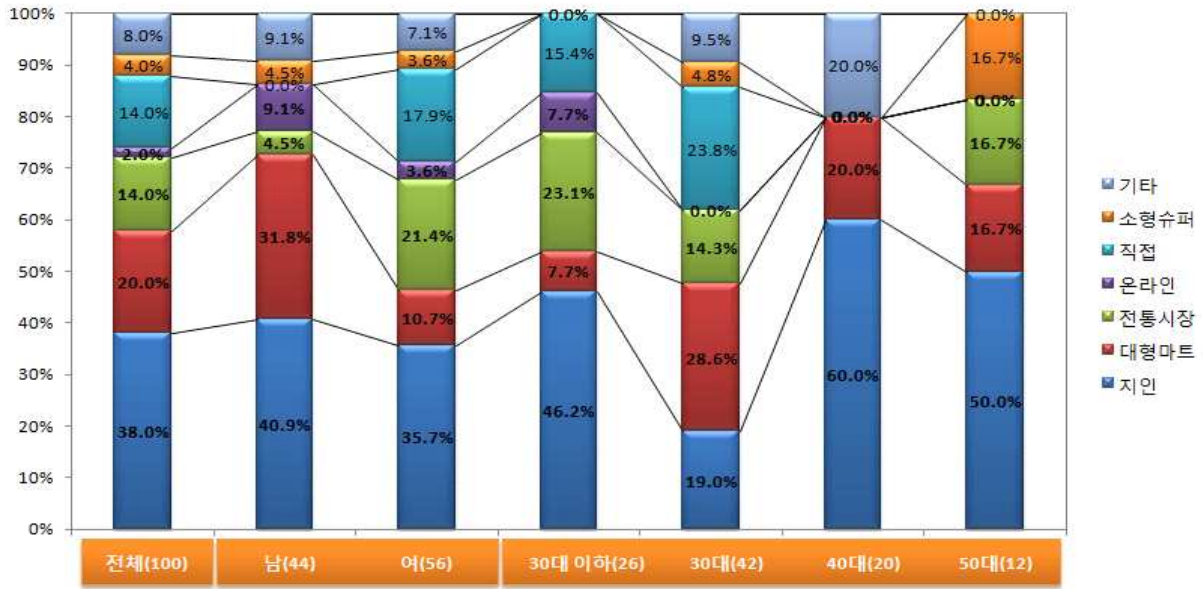


Figure 63. 성별/연령대별 청국장 조달방법

본 연구과제에서는 이런 트렌드를 반영하여 순한 맛의 청국장과 구수한 맛이 더한 청국장을 개발하고 일정한 품질을 유지할 수 있도록 하고자 하였으며, 이러한 것이 실제 소비자 조사에서도 나타나는지 알아보기 위하여 청국장에 대한 소비자 기호도를 조사하였다. 그 결과 소비자의 청국장에 대한 기호도 조사에서 진한 맛과 냄새에 대한 개선이 있어야 함을 알 수 있었다(Figure 64). 전체적으로 고유의 진한 맛과 냄새를 선호하는 비중은 24%, 냄새는 없고 부드러운 맛이여야 한다는 의견이 42%, 냄새와 맛이 모두 부드러워야 한다는 답변인 30%로 조사되었다. 결국, 청국장의 소비트렌드는 기존의 맛과 향의 강함이 개선되어지는 방향으로 나갈 것으로 예상되며, 이러한 현상은 연령대별 기호도 조사에 일정부분 반영되어 있다. 본 과제를 통한 연구개발이 벗짚미생물제어 기술로 전통의 맛을 복원하는 것도 있지만 이러한 소비트렌드도 일정부분 반영되어 저야 할 것으로 여겨진다. 이는 발효균의 변화로도 추구할 수 있지만, 고온에서 발효라든지 발효시간의 조절 등 기술적 문제로 해결할 수 있으며, 전통적인 청국장 맛과 향이 단발효 위주로 흘러가야 한다는 것을 의미하지는 않는다.

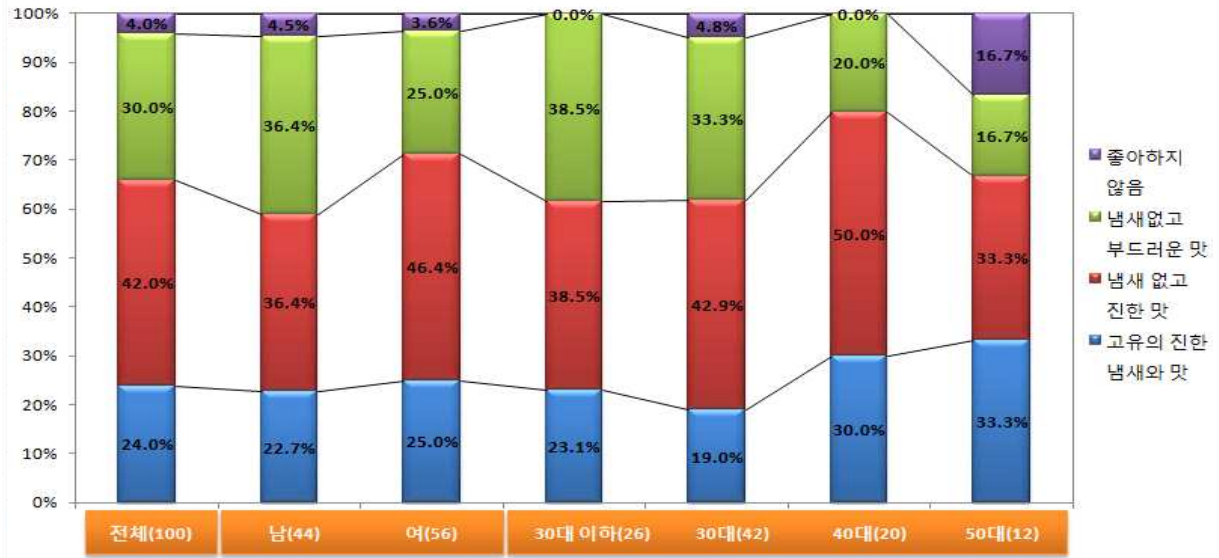


Figure 64. 성별/연령대별 청국장 기호도

과연 그러면 소비자가 여전히 빗짚을 이용하여 제조하는 청국장에 대한 생각은 어떻게 소비자 감성에 영향을 줄 수 있을 것인지에 대해 알아볼 필요성이 있어 이와 관련하여 청국장 발효방법에 대한 선호도를 조사하였다(Figure 65).

안정성을 확보하고 과학적 기술도입을 통한 빗짚미생물 사용은 소비자에게 좋은 반응을 보일 것으로 조사되었다. 전체적으로 60%가 빗짚미생물 제어기수를 이용하여 제조한 청국장 제조에 대해 좋은 반응을 보였으며, 22%는 기존 전통적 발효방법, 18%는 일반청국장 발효균을 사용해도 무방하다고 응답하였다. 남자보다는 여자가 선호하였으며, 연령대 별로는 청국장 소비도가 낮은 30대 이하의 경우가 61%로 기존 빗짚이용 청국장을 선호하였고 50대는 33.3%로 나타났다. 가정에서 직접 조리해 참여하고 이용빈도가 비교적 높은 30대와 40대가 빗짚미생물 제어기술로 발효한 청국장에 대한 선호도가 높음을 알 수 있었다.

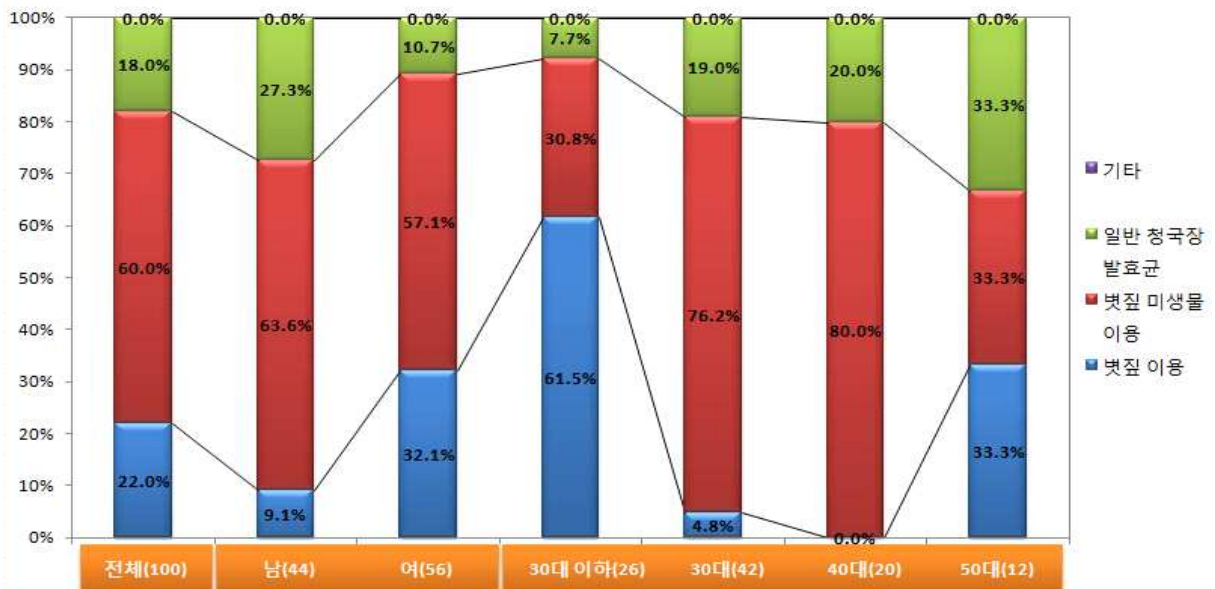


Figure 65. 성별/연령대별 청국장 발효방법 선호도

현재 판매되고 있는 청국장의 판매단위는 최소 500g이며, 보통 1kg 단위로 판매된다. 하지만 일반적으로 가정에서 소비되는 청국장의 양은 2인 가족일 경우 1회 100g, 4인 가족일 경우 200g 정도로 최소 단위의 청국장을 사더라도 포장을 개봉하고 사용할 양만큼 덜어내고 다시 포장하여 냉장고에 저장하여야 한다. 제조회사에서 청국장을 포장할 때는 최대한 공기를 빼고 염을 첨가하고 판매되기 전까지 냉동상태로 유지시킨다. 하지만 소비자가 사용한 뒤에는 공기가 혼입되고 되고 냉장상태로 보관할 우려도 있다. 이럴 경우, 이미 개봉이 된 청국장의 냄새를 효과적으로 막을 수가 없어 냉장고에 이취가 생길 수 있고, 자칫 잘못 보관하였을 때는 곰팡이가 생성 될 수 있다.

이러한 소비패턴을 감안하여 100g 단위로 진공밀봉 포장할 경우 사용량이 개별 포장 단위로 사용되어질 수 있으며, 보관상으로도 개선된 효과를 가질 것으로 판단되었다. 따라서 이와 같은 포장방법에 대해 소비자의 의견을 알아보고 제품개발에 반영하고자 하였다.

그 결과 100g 단위 개별 밀봉포장에 대한 소비자 호응도는 높았다(Figure 66). 전체적으로 72%가 이렇게 포장할 경우 구매할 의향이 있다고 답하였으며, 26%는 가격이 적당하다면 구매할 수 있다는 의견을 보였다. 특히, 청국장 소비가 많은 높은 연령대로 갈수록 이런 편의성에 대해 호응도가 높은 것으로 나타나, 소량 진공포장 방법은 개발 청국장 제품의 판매 마케팅 요소 중 주요한 요소로 작용할 수 있을 것으로 판단되었다.

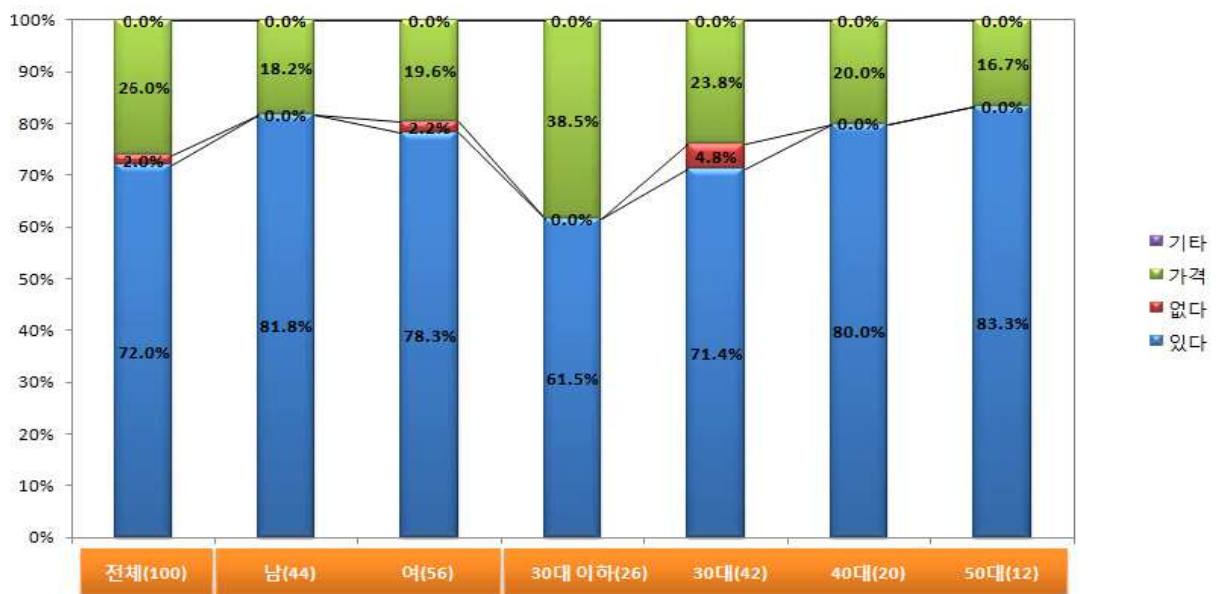


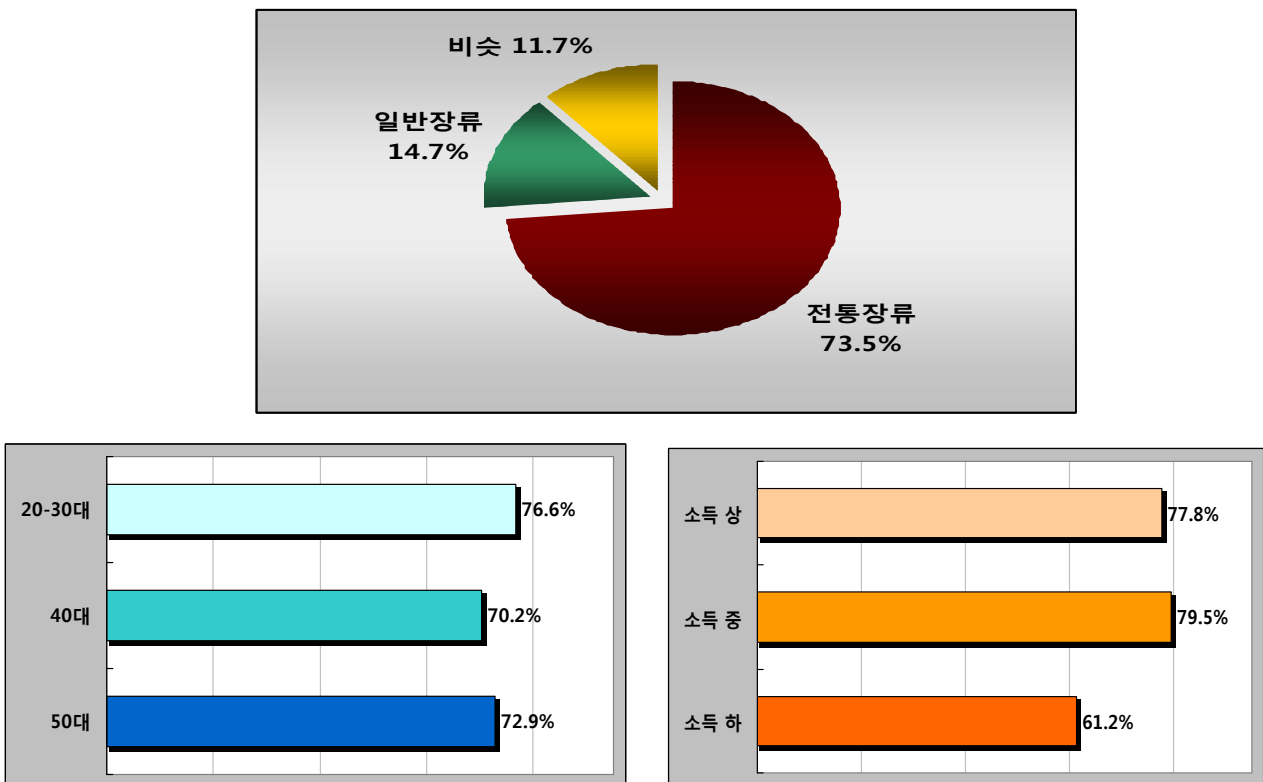
Figure 66. 성별/연령대별 100g 단위 진공 소포장 청국장 구매 의향

설문조사 결과를 요약하자면, 벧짚미생물 제어기술을 이용하여 제조한 청국장에 대한 소비자 호응은 좋았으며, 포장 단위도 핵가족화를 고려하여 소량화 하는 방향으로 제품개발이 이뤄져야 한다는 것을 알 수 있었다. 또한, 벧짚미생물을 활용하더라도 소비자의 기호도가 청국장 고유의 냄새가 많이 나지 않고 조금 더 부드러운 것을 원하는 방향으로 흐름을 알 수 있었다. 현재까지 청국장 시장은 잠재시장이 상당히 존재함을 알 수 있었고, 소비가 많은 30대 이상의 소비층을 공략할 필요성이 있음을 알 수 있었다.

따라서 제품개발 시 벗짚미생물제어기술을 이용하여 위생적 장류제품을 생산하되 공정 기술적 방법을 통해 소비트렌드를 맞춰가는 방향으로 기술개발이 이뤄져야 할 것으로 판단된다. 이런 기술적 결과를 성공시키기 위해서는 다양한 홍보/마케팅 방법이 필요할 것이다. 최근 국가정책적으로 전통발효식품에 대한 홍보강화가 이뤄지고 있다는 점은 고무적이다. 벗짚을 이용하여 제조하는 장류가 표준화와 위생적인 문제를 내포하고 있다고 피하기보다는 과학기술을 이용하여 극복하는 방법이 무엇인지 어떻게 노력해야 하는지 본 과제를 통해 규명하고 다양한 매체를 통해 홍보를 강화해야 할 것이다.

나. 사업화 추진 전략

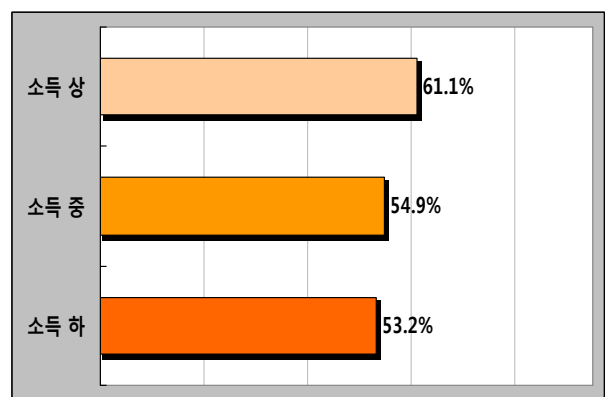
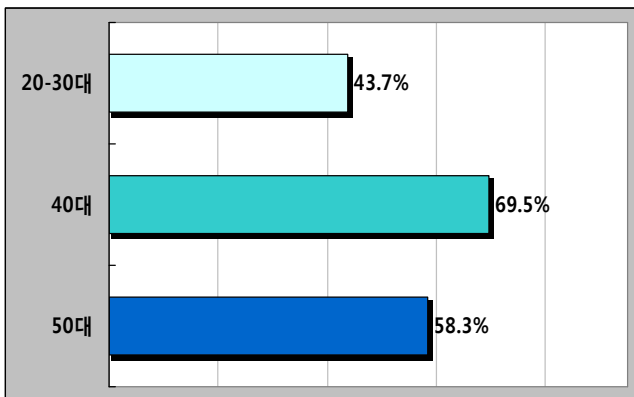
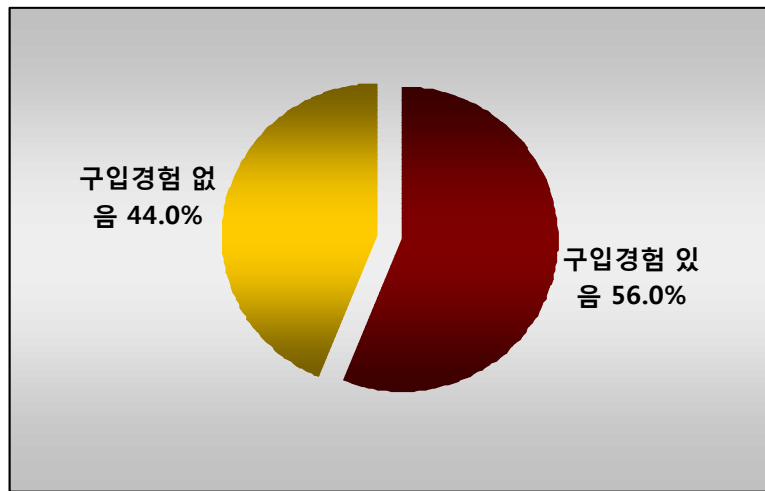
전통장류에 대한 소비자의 구매 및 소비행태를 파악하기 위해 2009년도 소비자시민모임의 조사결과를 참고하여 전통장류에 대한 의식을 간접적으로 파악할 수 있었다. 먼저 전통장류의 사용패턴을 알아보기 위해 전통장류 선호도 조사를 실시한 결과 일반장류와 전통장류 중에서 소비자 선호도는 전통장류가 73.5%로 매우 높게 나타났다(Figure 67). 또한 연령대에 상관없이 대다수의 소비자가 전통장류는 좋다는 인식이 형성되어 있음을 알 수 있고, 소득이 높을수록 전통장류를 선호하는 것으로 나타났다. 연령별로 보면 큰 차이 없이 고르게 전통장류를 선호하고 있었으며 특히 20-30대 소비자들이 76.6%를 선호하는 것으로 나타났다. 이는 전통에 대한 인식이 40대, 50대에 비해 20-30대 소비자들에게 더 크게 작용하고 있음을 알 수 있다.



자료 : 소비자시민모임(2009)

Figure 67. 일반장류와 전통장류의 선호도 및 연령별, 소득별 전통장류 선호도 비율

전통장류를 구입한 경험이 있는지에 대한 질문에 응답자의 56.0%가 구입 경험이 있는 것으로 나타났다(Figure 68). 또한 전통장류 선호도 조사 결과와는 다르게 40대 소비자들이 전통장류 구입율이 69.5%로 높았으며, 선호도가 높았던 20-30대 소비자들은 전통장류 구입율이 43.7%로 40대, 50대에 비해 구입율이 저조한 것으로 보였다. 또한 근소한 차이로 소득이 높을수록 전통장류 구입 경험률이 높은 것으로 나타났다.



자료 : 소비자시민모임(2009)

Figure 68. 전통장류 구입경험 및 연령별 및 소득별 전통장류 구입율

또한 향후 전통장류 소비가 어떻게 변화할 것인지에 대한 질문에 응답자의 87.7%가 전통장류의 소비자 늘어날 것이라고 응답함으로써 긍정적인 결과를 보였으며, 연령이 높을수록 향후 전통장류 소비자 늘어날 것이라고 응답하였다(Table 39). 전통장류의 소비가 늘어날 것이라고 응답한 이유로 입맛의 고급화로 최상의 품질과 제품을 선호하기 때문에(35.0%)로 가장 높게 나타났으며 웰빙으로 인해 건강과 영양을 생각해서(30.8%), 원산지의 신뢰도가 높아서(18.3%), 방부제 또는 농약으로부터 안전(15.4%) 순으로 나타났다. 반면 전통장류 소비가 늘어나지 않을 것이라고 응답한 소비자는 전체 12.3%였으며, 이러한 이유로 홍보가 잘 이루어지지 않아 모르기 때문에(44.1%), 가격이 비싸서(41.2%), 포장단위 용량이 마음에 들지 않아서(8.8%), 유통의 불편함(5.9%)의 순으로 나타났다.

Table 39. 전통장류의 소비 증감 예상 및 이유

	전체 (277)	연 령			소 득		
		20-30대 (86)	40대 (105)	50대 (84)	소득 하 (86)	소득 중 (105)	소득 상 (84)
늘어날 것이다	87.7	80.2	89.5	92.9	89.2	86.0	88.6
늘어나지 않을 것이다	12.3	19.8	10.5	7.1	10.8	14.0	11.4

소비 증감 여부	소비 증가할 것(87.7%)	소비 증가하지 않을 것(12.3%)
이 유	입맛의 고급화(35.0%)	홍보 부족으로 알지 못함(44.1%)
	웰빙 건강(30.8%)	가격이 비싸서(41.2%)
	원산지 신뢰도(18.3%)	포장단위 불만 용량(8.8%)
	방부제, 농약 안전(15.4%)	유통 불편(5.9%)

자료 : 소비자시민모임(2009)

설문조사결과를 토대로 소비자들은 일반장류보다 전통장류를 선호하면서도 전통장류 사용이 미흡하나 대체로 전통장류 시장의 증가를 예상하고 있었는데, 이는 ‘입맛의 고급화’와 ‘웰빙 건강’의 이유를 들고 있어서 고급성과 건강에 좋은 제품이라는 인식은 되어 있는 상태였음을 알 수 있었다. 하지만 홍보가 부족하고 가격이 비싸서 소비 증가에 애로사항이 있을 것으로 보는 소비자도 소수 있음으로써 전통장류에 대한 홍보마케팅이 중요한 요인이 될 것으로 판단되어 진다. 이를 토대로 상품화를 위한 판매 전략을 수립하고 본 제품의 유통채널은 어떻게 구성하는 것이 판매에 효과적인 것인지에 대해 조사하였다.

전체 된장시장에서 지역브랜드 및 가격경쟁력을 기반으로 한 중소기업체 제품이 많이 유통되고 있는 실정이다. 업무용 시장도 품질(맛)을 중시하는 트렌드로 ‘맛, 입소문’이 좋은 된장을 우선적으로 선택하고 있는 실정이다. 대부분의 식당거래처는 관습적으로 ‘합동짜개된장’을 사용(30%)하고 있으나 품질 불균일, 공급량 통제, 현금위주거래 등의 고객 불만이 내재되어 있어 이를 보완하고자하는 전략이 필요한 실정이다. 본 연구를 통해 개발된 된장과 컨셉이 비슷한 제품과의 비교를 통하여 포지셔닝을 수립하고자 3C(Competition, Consumer, Company)분석을 실시하였다(Figure 69).

구분	현황 및 특이사항
경쟁사 동향 (COMPETITON)	<ul style="list-style-type: none"> ○ CJ 업무용 된장 <ul style="list-style-type: none"> - 재래식된장 14kg지함 - 구수한집된장 14kg지함 ○ 합동찌개된장 <ul style="list-style-type: none"> - 연매출액 : 약 30억 (08년 기준) - 문제점 : 품질(맛) 불안정, 식당거래처 수요가 높은 관계로 현금위주 거래 - 소비자판매가 : 38,000~40,000원
소비자 동향 (CONSUMER)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식당에서는 된장찌개 조리시 당연히 합동찌개된장을 쓰는 것으로 생각 ○ 사용형태 : 합동찌개된장과 재래식된장(대상, 해찬들)을 1 : 1 로 혼합하여 사용하는 경향 <ul style="list-style-type: none"> - 가정에서 담든 집된장 개념으로 합동찌개된장을 사용 ○ 전국 한식점업 : 272,174개 (전체 366,034개 업소 중 74.3% 차지)
자사 현황 (COMPANY)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 당사 업무용 된장현황 <ul style="list-style-type: none"> - 순창한식된장 : 14kg지함 및 bulk - 개발 제품 : bulk 판매에 집중

Figure 69. 3'C(Competition, Consumer, Company)분석

이러한 현황을 통해 당사 기존 한식된장의 자기잠식을 최소화하기 위해 찌개전용된장으로 포지셔닝 방향을 설정하고 관외 및 관내장류제조업체에 bulk 단위로 판매에 집중함으로써 품질, 가격경쟁력, 안정된 공급을 기반으로 업무용 매출이 증대할 것으로 여겨진다. 또한 관외/관내장류제조업체 및 소비자에게 *B. cereus*가 특이적으로 제어된 벗짚유래미생물을 이용한 메주를 공급함으로써 전통의 맛과 품질관리를 요구하는 구매자의 의향을 충족시킬 수 있을 것으로 여겨진다. 이처럼 다양한 소비자의 욕구를 충족하고 경쟁력을 키워나갈 수 있도록 STP(Segmentation, Targeting, Positioning)전략을 수립하였다(Figure 70).

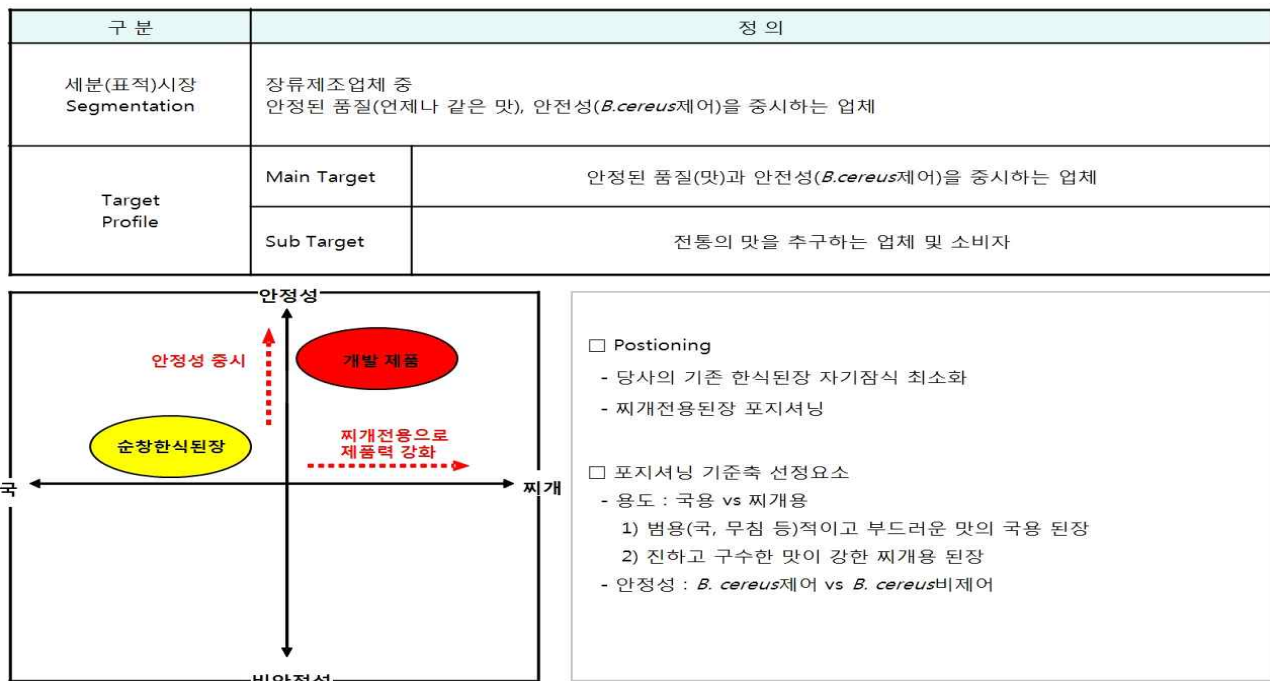


Figure 70. STP(Segmentation, Targeting, Positioning)전략 수립

장류제조업체 중 안정된 품질(언제나 같은 맛)과 장류오염지표인 *B. cereus* 등 위해미생물 제어를 중요시하는 업체를 대상을 세분(표적)시장으로 선택하고 이와 관련하여 전통의 맛을 추구하는 업체를 타겟으로 정하였다. 당사 순창한식된장의 자기잠식을 최소화하기 위하여 부드러운 맛의 국용 된장이 아닌 진하고 구수한 맛이 강한 찌개전용된장으로 포지셔닝 방향을 설정하였고 여기에 안정성 요소가 향상됨으로써 위생적인 전통장류를 제조하는 업체의 의향을 충족시킬 것으로 여겨진다.

STP전략을 토대로 브랜드 컨셉을 제시하였다(Figure 71). 브랜드가 가지는 가치속성을 함축적으로 표현한 brand essence는 ‘구수한 전통의 맛’으로 선정하고 브랜드가 소비자와 시켜야 할 약속인 brand promise는 1) 벗짚 유래 미생물 *B. cereus* 제어(위생적 제조), 2) 전통의 맛 추구, 3) 국내산 원재료만을 사용, 4) 철저한 품질관리로 정하였으며 브랜드의 독창성을 나타내는 brand personality는 ‘Hygienic-위생적인, 안전한’, ‘Traditional -전통적인, 구수한’ 제품의 이미지를 생성·유지해야 할 것이다. 또한 ‘순창’이라는 명칭은 브랜드로서 전통과 기술, 원산지 등의 이미지를 앞세워 기술한 요소들을 대부분 함축시키고 있기 때문에 최종적으로 브랜드네임은 ‘구수한순창콩’으로 결정하였다.

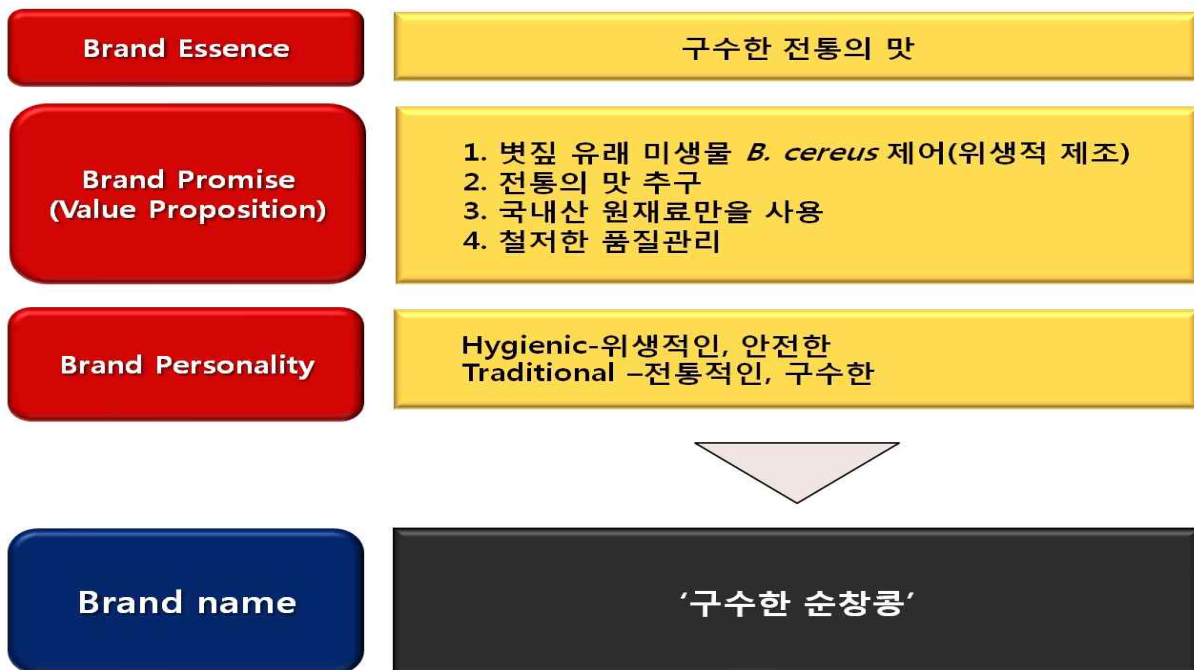


Figure 71. 브랜드 컨셉 제안

구수한 순창콩 브랜드 컨셉 요소를 바탕으로 상품화를 위한 제품 전략을 수립하였다(Figure 72). 구수한 순창콩 된장은 주요 대상이 B2B 고객이므로 bulk 판매를 집중으로 하고 도매가는 kg당 5,000원으로 제시하였다.

1. 제품명 : 구수한 순창콩 된장
2. CBP(Core benefit proposal)
 - 집에서 담근 것 같이 진하고 구수한 된장찌개 전용 된장

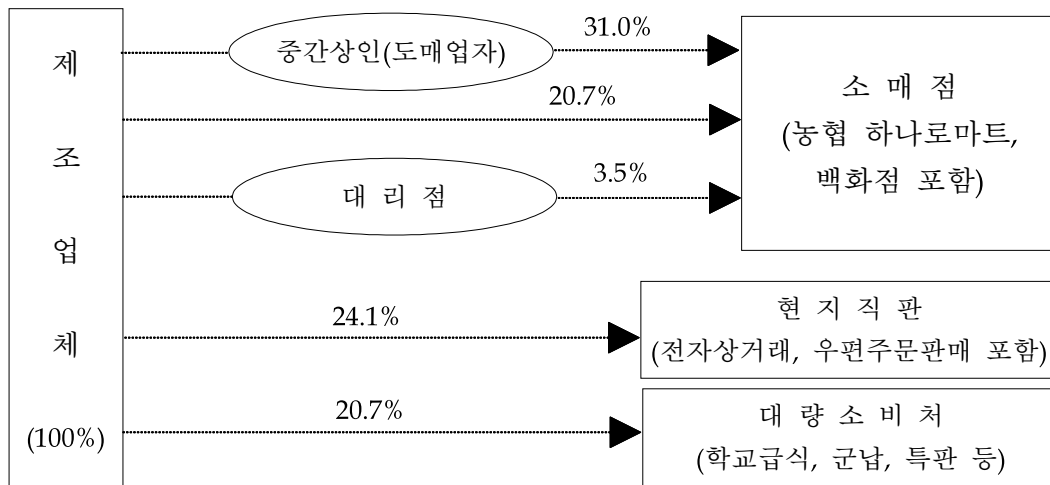
Target	Main /sub target 명기	
Concept Statement	<ul style="list-style-type: none"> • 된장찌개를 메뉴로 하는 거래처에서 집에서 만든 진하고 구수한 • 안정된 품질과 안전성을 중요시하는 장류제조업체 • 위해미생물이 제어된 안전한 전통된장 	
USP	안심하고 먹을 수 있는 진하고 구수한 된장찌개 전용 된장	
용도 & TPO	된장찌개용	
Attribute		Benefit(additional)
<ul style="list-style-type: none"> • 위해미생물 제어 • 매주맛이 강함 • 안정적인 품질 		<ul style="list-style-type: none"> • 안전한 먹거리/안심 • 집에서 담근 것 같은 구수하고 진한 된장맛 • 언제 만들어도 같은 맛
제품설계	규격 & 포장형태	bulk
	PRICE	도매가 : 5,000원/kg

Figure 72. 상품화를 위한 제품 전략

전통장류의 유통체계는 일반식품과 많은 부분에서 다를 수밖에 없으며, 종류에 따라서는 차이가 난다. 이는 특히 1개 업체의 상품생산량이 소량이며, 일반 업체에서 생산하는 장류에 비해 3~4배 정도 가격의 차이가 나기 때문에 더욱 심하게 나타나고 있다. 전통장류의 유통체계가 일반식품의 그것과 많은 부분에서 차이가 나는 근본적인 이유는 다음과 같다고 할 수 있다. 첫째, 대부분의 업체가 영세한 규모를 유지하고 있어 대량생산이 불가능하고 그에 따라 물류비가 많이 소요되기 때문이다. 둘째, 사용하는 주원료가 국산이기 때문에 주로 수입농산물을 사용하는 일반식품과는 생산비에서부터 차이가 발생해 일반유통체계를 이용한 판매에는 한계가 있기 때문이다. 셋째, 전문 인력의 부족으로 전문적인 마케팅이 불가능해 현지판매와 우편판매 등 비교적 판매에 유리한 유통체계를 선호하게 되기 때문이다. 그럼에도 불구하고 전통장류 생산업체의 경우 전체생산량은 증가하고 있다. 이는 전체 장류시장의 확대, 즉 공장 공급량의 전반적인 증가에 기인한 것으로 여겨진다.

전통장류의 유통경로는 첫째, 제조업체 → 중간상인(도매업자나 대리점) → 소매점(34.5%), 둘째, 제조업체 → 백화점이나 할인점(20.7%), 셋째, 직거래: 직판, 직납 혹은 우편판매(44.8%)의 세 가지로 분류가 가능하다(Figure 73). 전통장류는 생산자가 최종소비자에게 직접 공급하는 비중이 높은 편이다. Kang 등(2000)의 연구에 의하면 도매업자나 소매업자를 거치지 않고 현지판매와 우편주문판매 및 특판 등을 통해 소비자에게 직접 공급하는 유통경로를 주로 이용하는 비율이 44.8%에 달했다. 이밖에 중간상인(도매업자) 또는 직접 소매점에 공급하는 경우가 51.7%로 나타났으며, 직영대리점을 통한 유통은 3.5%로 조사되었다. 직영대리점을 통한 유통비율이 낮은 것은 이를 운영하기 위해 필요한 비용이 영세한 전통장류 생산업체에게는 큰 부담으로 작용하고 있기 때문이라고 할 수 있다. 대부분의 업체가 전문 인력의 부족으로 새로운 판로확보에 어려움을 겪는 것으로 나타났다. 이러한 이유로 대부분의

업체는 우편주문 판매(전자상거래 포함)를 1순위 판매방법으로 취하고 있으며, 현지방문 판매 고객 등에 대한 판매도 매우 선호하는 것으로 보여 진다.



자료: 전통가공식품 생산·유통의 문제와 개선방안, 한국식품유통학회, 2000

Figure 73. 전통장류의 주요 유통경로

전통장류 업체와 소비자들의 희망 유통경로를 살펴보면 최근 이계임 등(2006)의 연구에서 전통장류 생산업체들은 도농교류, 농촌관광과 연계한 현장판매확대와 친환경매장 등의 입점 확대를 가장 선호하고 있으며(각각 20.0%), 다음으로 대형할인매장 판매확대 17.5%, 급식공급 확대 15.0%로 나타났다(Figure 74). 온라인 판매를 확대하고자 하는 의사도 10.0%로서 높았다. 이밖에 전통식품 공동판매장 개설, 농협판매장 및 백화점 판매 확대 등을 감안하고 있었다.

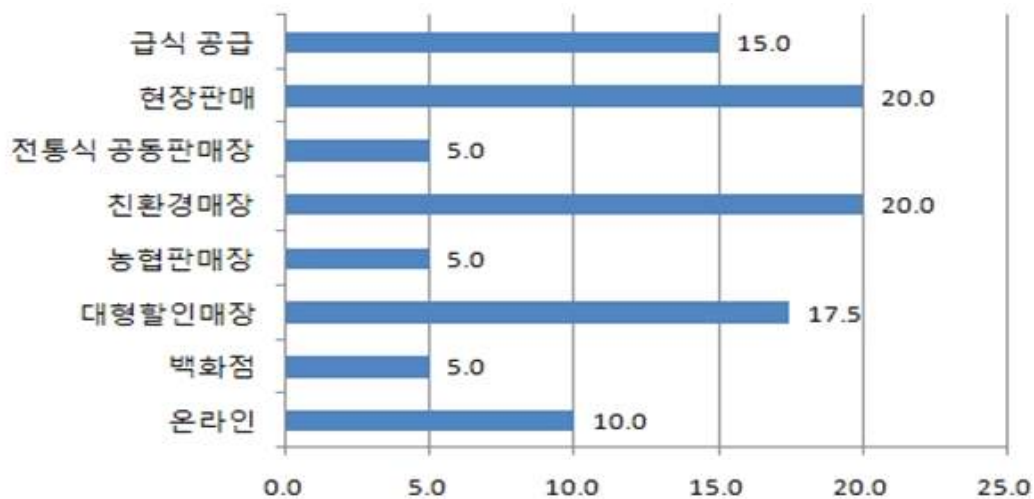


Figure 74. 전통장류 생산업체들의 유통경로 선호도(%)

이와 대조적으로 소비자들은 재래식 된장의 판매처별 선호도 조사에서 농협 하나로마트·클럽을 가장 선호하였으며, 다음으로 백화점, 대형할인매장과 친환경 유통업체를 꼽았다(Figure 75). 현장판매의 선호도도 높게 나타났다. 상대적으로 통신판매와 홈쇼핑, 재래시장 및 인근 슈

퍼마켓은 선호도가 낮았다.

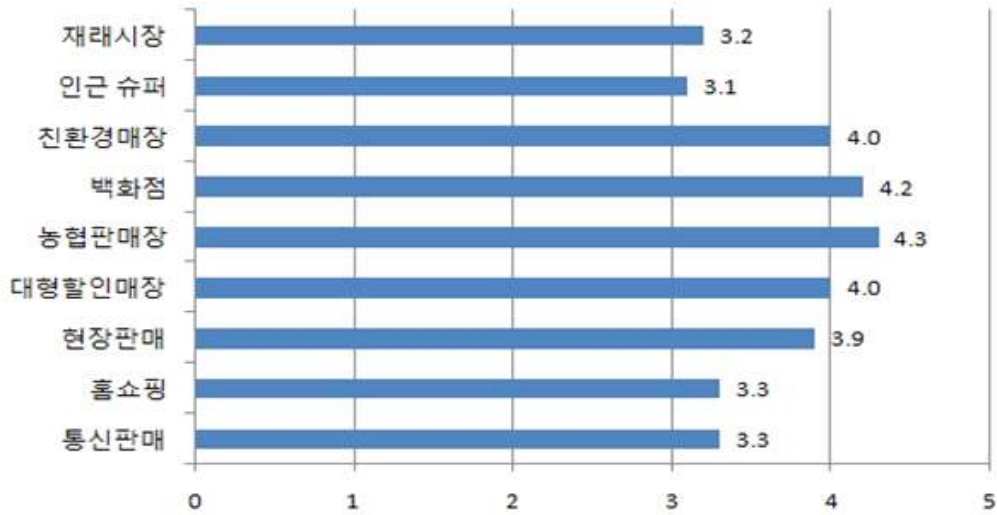


Figure 75. 소비자들의 전통식품 판매처별 선호도(5점 척도)

위와 같은 조사를 바탕으로 당사에서는 과제수행에 따른 벗짚 미생물 제어기술을 활용한 위생적 전통장류제품화가 완료되는 시점에 맞춰 안정적이고 성공적인 시장 정책을 위한 마케팅 활동을 전개할 예정이다(Table 40). 시장 진입 및 매출신장을 위해서는 경쟁사 대비 획기적으로 차별화된 품질이 반드시 이루어져야 하며 본사의 대표적인 제품인 메주 및 된장, 간장, 청국장 등의 국내시장 지위향상을 위해 제품 포트폴리오를 체계적으로 작성 실행해 나감으로써 사업화 매출 목표에 도달할 수 있도록 제품의 시장정착을 도모코자 한다(Table 41).

Table 40. 사업화 추진 계획

년도	구분	추진내용	비고
2015 ~2017	환경분석	<ul style="list-style-type: none"> • 거시적 환경분석, 고객 needs분석 • 판매 추이 분석 • 발효관련 기술 추이 분석(국내외 박람회 및 학회 참석, 특허출원 및 등록 현황분석) 	
	마케팅조사	<ul style="list-style-type: none"> • 자료 수집 및 해석 • 소비자 전문 패널 조사 	
	상품전략 수립	<ul style="list-style-type: none"> • 상품기획 및 가격전략(경쟁, 고객만족, 가격유지, 적정이익의 원칙) • 유통전략 수립(유통 유형 ; 도소매업종별 전략 및 케터링 유통업체) 	
	유통촉진 전략	<ul style="list-style-type: none"> • 홍보 : 영양교사 견학 유도를 통한 매출확대 • 대리점 확대 : 전국의 대리점 확보를 통한 매출확대 추진 	

Table 41. 사업화 계획(3개년도)

(단위 : 억원)

구 분		사 업 화 년 도		
		2015년	2016년	2017년
사업목표		4.6억매출	5.1억매출	5.6억매출
사업화 품목		한식메주 된장 간장 청국장	한식메주 된장 간장 청국장	한식메주 된장 간장 청국장
판매계획	국내매출 (억원)	4.6	5.1	5.6
	수출(만불)	-	-	-
	계	4.6	5.1	5.6

또한, 최근 급속한 인터넷 및 미디어매체의 확대와 한류의 품을 타고 한국의 식문화가 실시간으로 확대 전파되고 있는 실정이므로 식품브랜드의 홈쇼핑 등의 미디어 노출을 통해 당사 브랜드 인지도 향상 및 제품 영업망을 구축하고 있다. 이에 당사에서는 위생·안정적 제품화를 위해 (사)장류기술연구회 등의 전문 기술자 및 기타 국책과제 관련 장류전문가를 활용한 네트워크를 확충할 예정이며, 당사 장류 제품의 매출 극대화를 위한 새로운 포트폴리오를 작성하고 차별화된 고부가가치 제품의 출시를 위한 기초연구단계에서부터 제품 포트폴리오를 진단하고 제품경쟁력 확보를 위한 차별화요인을 발굴하여 제품을 출시함으로써 국내 최대의 발효전문기업으로써의 기업 가치를 실현할 계획이다.

다. 시제품 디자인 및 마켓테스트

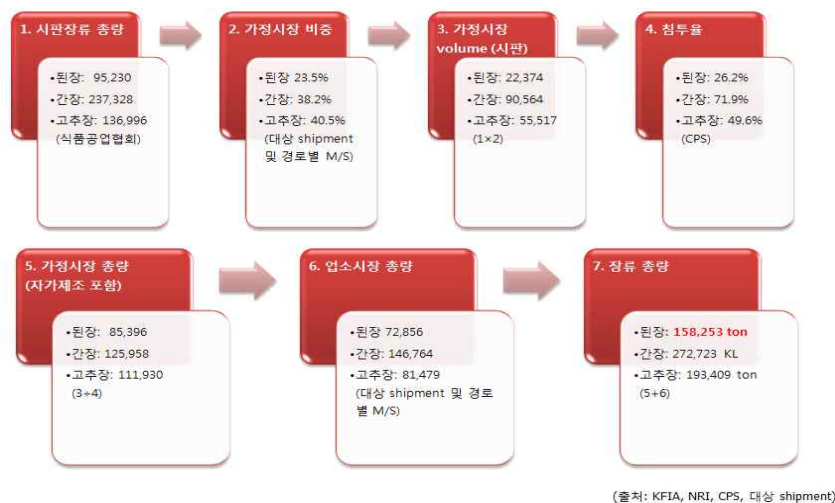


Figure 76. 장류의 가정시장 침투율

현재 장류의 가정 침투율은 된장이 26.2%, 간장이 71.9%, 고추장이 49.6%로 향후 고령화에 따른 시판장류의 가정 침투율은 지속적으로 증가할 것으로 예상되고 있다(Figure 76). 된장의

경우 10년 이내에 40%가 시판 된장으로 전환 될 가능성이 크며, 40%의 시판 된장으로서의 전환과정 중 34%는 전통된장 구입의사를 보임으로서 전통된장의 시장은 점점커질 것으로 보인다.

소비자 니즈 분석과 판매 전략을 고려해 봤을 때, 전통장류제품에 대한 소비자의 긍정적 인식이 높았음을 알 수 있었으며, 한국의 장, 세계를 유혹하다(KBS, 2013) 프로그램을 통하여 벗짚과 우리 생활과의 연관성 및 전통장류의 표준화 연구에 대하여 알릴 수 있는 계기를 마련하였다(Figure 77).



Figure 77. 전통장류 표준화 연구관련 홍보, KBS 2013. 9. 22

국내시장의 환경변화로 개발완료 전 양산 및 판매를 위한 모든 시스템 구축이 필요한 실정이며, 이를 토대로 청국장 라인을 개발 완료 후 즉시 양산이 가능하도록 시스템을 개선하였다. 즉 본사(제1세부)의 RiBS1 및 ORiBS1 청국장의 일반분석, 제2협동의 관능평가와 성분분석, 소비자 기호도 조사를 종합적으로 분석하고 평가하여 R+B청국장, OR청국장 시제품을 제조하였다. 포장단위는 100~150g로 신규도입한 성형기로 제조하였으며, 시제품 제작에 활용한 청국장 성형기 사진은 Figure 78에 나타내었다.



Figure 78. 소포장용 청국장 성형기 도입사진

또한, 구수한 순창콩 브랜드 컨셉을 도입하여 청국장 제품명은 '구수한 순창콩 청국장'과 '더 구수한 순창콩 청국장'으로 결정하였고, 된장 및 간장 제품명은 '구수한 순창콩 된장'과 '구수한 순창콩 간장'으로 하였다. 이와 관련한 홍보 및 시제품 판매를 위하여 품목제조보고서 신고를 완료하였으며, 이와 관련한 기술개발 시제품의 상품화와 홍보에 활용하기 위하여 라벨과 카달로그를 제작하였다. 라벨디자인은 Figure 79에, 카달로그 디자인은 Figure 80에 제시하였다.



Figure 79. 기존 청국장 제품(좌)과 기술개발 제품 라벨 디자인(중간, 우)



Figure 80. RiBS1을 이용한 시제품 홍보용 카달로그 디자인

또한 본 사(제1세부)의 RiBS1 적용 된장, 간장의 일반분석, 제2협동의 관능평가 및 소비자 기호도 조사 분석을 종합적으로 분석하고 평가하여 RiBS1+B. licheniformis SRCM0100027+Aspergillus oryzae를 접종한 메주를 활용하여 제조한 된장 및 간장(RBA) 시제품을 제조하였고, 이와 관련한 홍보 및 시제품 판매를 위하여 품목제조보고서 신고를 완료하였으며 라벨 시안을 제작하였다 (Figure 81).



Figure 81. RiBS1적용 된장 및 간장 제품 라벨 디자인

앞서 전통장류제품 유통채널 분석을 통해 조사한 결과에서 나타났듯이 개발 전통장류제품의 판매채널은 B2B를 제외한 소매시장에서 백화점, 산지직판장과 현장판매, 온라인 쇼핑몰이 주요 대상이 될 것으로 예상된다. 이에 따라 일차적으로 본 사 온라인 쇼핑몰을 통해 개발제품의 소비자노출과 홍보를 실시하고자 하였다(Figure 82).



Figure 82. 온라인 쇼핑몰을 통한 소비자 노출 및 시제품 실사

또한, 전국 유일의 메주 HACCP 인증 시설과 전통장류의 자동화를 추구하는 당사 시설에 대한 인지도를 활용하여 견학, 방문객 대상으로 내부에 설치된 직판장을 통한 청국장, 된장 및 간장 홍보 판매를 실시하고자 한다(Figure 83).



Figure 83. 본 사 내부 직판장 사진

홈쇼핑 시장도 개발제품의 주요 수요처가 될 것으로 예상하여, 신규 업체를 발굴하여 벗짚 유래 미생물을 적용한 메주를 런칭 하였고 이를 통해 약 2억 원의 매출을 예상하고 있으며, 높은 소비자 호응으로 인하여 지속적인 거래관계가 유지될 것으로 보인다(Figure 84, 현대홈쇼핑).

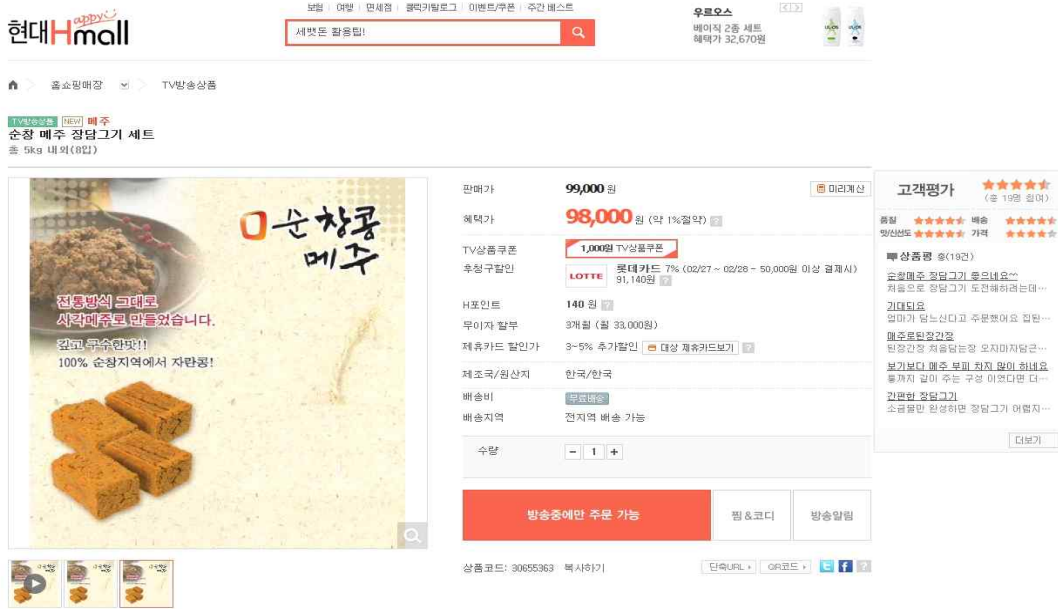


Figure 84. 벗짚 유래미생물 적용 메주 홈쇼핑 런칭

4. 위생적인 공정 관리 방안 및 관련기술의 산업화

당사는 한식메주에 대한 HACCP 지정(2012년)을 받아 Figure 85의 공정을 통해 위생적인 제품을 생산하고 있으며, 현재 위생적인 공정관리를 통해 한식메주 완제품에서 *B. cereus*는 검출되지 않고 있으나 전통장류의 특성 상 장기간 숙성 중 일부 *B. cereus*의 생육이 이루어지는 것으로 파악된다(≒10²생육).

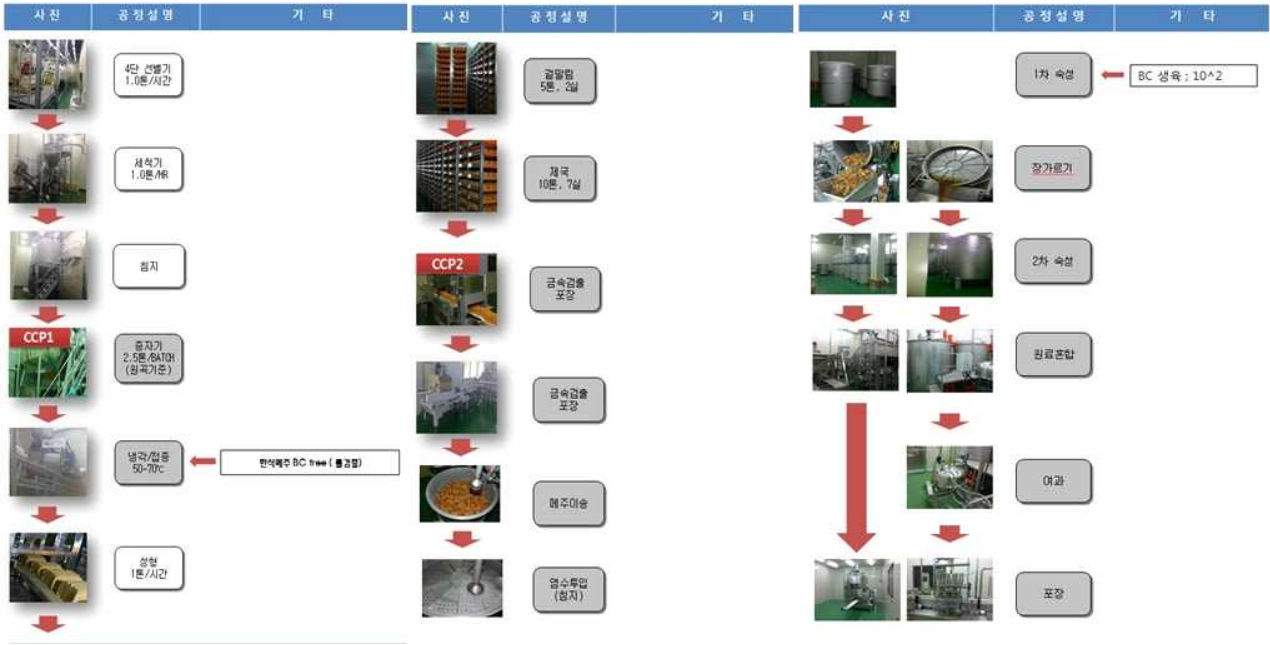
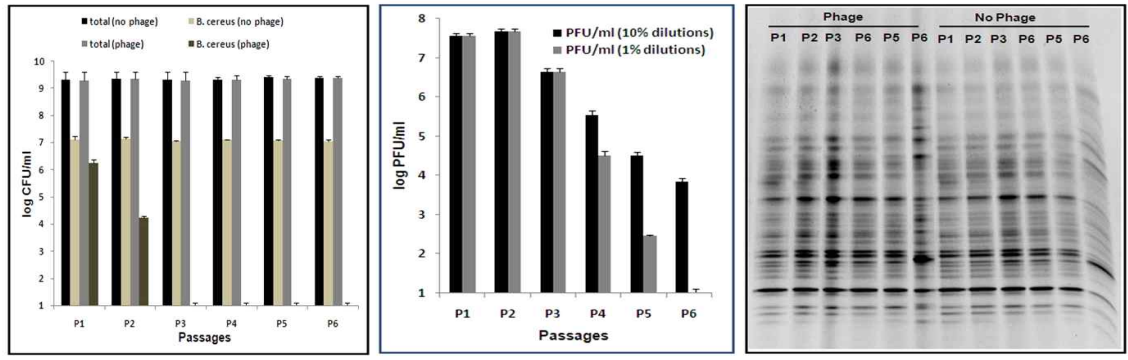


Figure 85. 본사 제품 생산 공정(한식메주 HACCP지정 및 장류제품 HACCP 지정 진행 중)

본 과제에서 사용한 박테리오파지는 P6이후 한식된장 및 한식간장에서 자연 감소되어 검출되지 않으며, 집중한 박테리오파지는 검출되지 않으나 생육 중 생성하는 대사물질에 대한 검토는 추후 진행되어야 할 것으로 보인다(Figure 86). 또한 벗짚 미생물을 이용한 starter culture를 적용한 메주 제품을 소규모전통장류업체에 공급함으로써 전통장류업체의 위생적인 제품 생산이 가능할 것으로 보여 진다. 또한 개발된 starter culture의 경우 복합균주를 이용하여 숙성 중 변이 또는 배양 중 우점종의 변화 등이 발생할 수 있는 기술적인 애로점이 있으나, 추후 연구를 통해 제품 표준화 및 일관적인 전통장류의 관능유지가 가능할 것으로 보인다. 앞으로 지역 및 벗짚의 채집시기에 따른 균주의 다양성에 기인한 제품의 품질특성에 대한 연구가 진행될 경우, 전통장류의 지역 생산성(local product)에서 벗어나 한 지역에서 다양한 지역 색의 전통장류의 생산이 가능할 것으로 보여 진다.



- 10⁷ pfu/g BCP8-2 이용
- *B. cereus* 불검출
- 파지처리/비처리 총균수 변화
- 박테리오파지 불검출
- 파지 처리군/비처리군 균총 변화
- 균총의 안정화

Figure 86. 개발 starter culture의 BC불검출 및 균총 안정화

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	RiBS1이용 청국장, 메주 발효공정 확립	◦ RiBS1이용 메주 발효공정 확립	120	-1협동에서 개발한 starter culture인 RiBS1 이용 메주 발효연구 (Lab scale) -메주발효 시 사용되었던 <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> SRCM0100027에 의한 병행복발효 방법과 기술개발 starter culture의 제품생산 시 발효 패턴 비교 분석 -메주 시생산을 위한 발효조건 확립
		◦ RiBS1이용 청국장 발효공정 확립	120	-개발 starter culture 이용 청국장 발효 (Lab scale) -기존 청국장 발효와 기술개발 starter culture 제품과 발효패턴비교 분석 -청국장 시생산을 위한 발효조건 확립
2차 년도 (2014)	숙성 공정 확립 및 시제품 생산, 상품화	◦ 된장, 간장 숙성 연구	100	-RiBS1 메주 이용 된장, 간장 숙성 연구 • 3회, 300kg/회
		◦ 메주 발효 연구 및 된장, 간장 숙성 연구	100	-RiBS2이용 메주 발효연구 • 3회, 300kg/회 -RiBS2이용 메주 된장, 간장 숙성 연구
		◦ 청국장 발효 연구	100	-RiBS2 이용 청국장 발효 조건확립 -RiBS2 이용 청국장 시제품 생산 • 5회, 300kg/회
		◦ 품질변화 확인 및 feedback	100	-된장, 간장 숙성 시 품질변화 확인 후 메주제조공정 및 참여기관 feedback
		◦ 개발 제품 상품화 추진	120	-상품화를 위한 라벨 및 상품디자인, 마켓테스트 -청국장, 된장, 간장 묘사분석 -청국장, 된장 소비자 기호도 조사 -소비자 기호도 조사 연계 RiBS1과 ORiBS1 이용 청국장 관능특성 비교 분석 -네이밍 및 상품화 전략 수립 • 소비자 기호도조사, 묘사분석, 관능평가, 설문 등을 통한 판매 전략 수립 및 마케팅 소구점 확보

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절 연구개발 성과

1. RiBS1적용 장류제품 개발(사업화)

- 구수한 순창콩 청국장
- 구수한 순창콩 된장
- 구수한 순창콩 간장
- 더 구수한 순창콩 청국장



<구수한 순창콩 청국장>



<구수한 순창콩 된장>



<구수한 순창콩 간장>



<더 구수한 순창콩 청국장>

2. 기술이전

- 유해 미생물이 제거된 starter culture를 이용한 청국장 제조 기술 (2014.11.06)
- 상업화를 위한 Starter culture의 안정적인 균주 배양방법 (2014.11.06)

3. 특허 출원

- 박테리오파지를 이용한 유해세균이 제거된 전통 발효식품용 스타터 컬처를 이용한 청국장의 제조방법. 출원인 : 농업회사법인 순창장류 주식회사, (재)발효미생물산업진흥원 발명인 : 김중필, 오병현, 송예지, 조유빈, 이은실. 특허출원번호 : 10-2013-0136014 (2013.11.11)

4. 교육·지도활용

- 기술지도 : 메주 침지 시 염수제조방법에 관한 기술지도(2013.05.03)
- 기술지도 : 전통 청국장의 제조시 품질 불균열 문제 해결방법에 관한 기술지도(2013.07.19)

-기술지도 : 전통장류 제조방법 기술지도(2013.11.06)

5. 홍보실적(신문, 방송, 저널 등)

-벚짚미생물 관련 홍보(6건)

-전통식품 및 벚짚장류제품 관련 홍보(1건)

6. 기타

-기업부설연구소 인증(2013.07.26)

-인력채용(2명)

2절 성과활용 계획

1. 교육, 지도, 홍보 등 기술지도 확산 계획

- 위생적 전통장류 제조 기술 및 RiBS적용 장류제품의 우수성 홍보

- 장류 기업체 및 농민을 대상으로 장류 제조 기술지도 확산

2. 지식재산권 확보계획

- 특허 등록 및 출원

제6장 참고문헌

1. Ann YG (2011) Changes in components and peptides during fermentation of *cheonggukjang*, Korean J. Food Nutr., 24: 124-131
2. Baek LM., Park LY, Park KS, Lee SH (2008) Effect of starter cultures on the fermentative characteristics of Cheonggukjang. Korean J Food Sci Technol 40, 400-405
3. Chae SH (2000) Color characteristics and antioxidizing ability of Korean traditional soy sauce prepared from different conditions. Ph D Thesis, Yonsei University, Seoul, Korea
4. Chang CH. Free-sugars in ordinary Korean soy sauce. J. Korean Agric. Chem. Soc. 7:35-37(1966)
5. Chang M, Kim IC, Chang HC (2010) Effect of solar Salt on the quality characteristics of Doenjang, J Korean Soc Food Sci Nutr. 39(1), 11-124
6. Choi EJ, Lee JS, Chang HB, Lee MS, Jang HD, Kwon YI (2010) Changes in the functionality of cheonggukjang during fermentation supplemented with *Angelica gigas*, *Rehmanniae Radix*, and Red ginseng. Korean. J. Microbiol. Biotechnol. 38(4), 467 - 474
7. Choi KS, Choi JD, Chung CH, Kwon KI (2000) Effects of mashing proportion of soybean to salt brine on Kanjang(soy sauce) quality, Korean J. Food Sci. Technol. 32(1), 174-180
8. Eom SM, Jung BY, Oh HI (2009) Changes in chemical components of Cheonggukjang prepared with germinated soybeans during fermentation. J. Appl. Biol. Chem. 52(3), 133-141
9. Hwang JH (2010) The fermentative characteristics of Cheonggukjang prepared by starter culture of *Bacillus* spp. with fibrinolytic activity. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 39, 1832 - 1838
10. Jeong SJ, Shin MJ, Jeong SY, Yang HJ and DY Jeong (2014) Characteristic Analysis and Production of Short-Ripened Korean Traditional Soy Sauce Added with Rice Bran. J Korean Soc Food Sci Nutr 43(4), 550-556
11. Joo HK (1971) Studies on the Manufacturing of Chungkukjang, Korea J Food sci. Technol. Vol. 3, No. 1

12. Kameda Y et al. (1974) Anti-tumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311, *Chem. Pharm. Bull*, 22, 938-944
13. Kang CY, Kim H, Song JH (2000) Improvement of Production and Distribution in Korean Traditional Food, Korean Food Marketing Association, 17(4), 223-244
14. Kim DH, Lim DW, Bai S and Chun SB (1997) Fermentation characteristics of whole soybean Meju model system inoculated with 4 *Bacillus* strains, *Koeran J. Food Sci. Technol.* 29(5), 1006-1015
15. Kim JG (2004) Changes of components affecting organoleptic quality during the ripening of Korean traditional soy sauce—amino nitrogen, amino acids, and color. *Korean J Env Hlth*, 30, 22-28
16. Kim JH, Choi JS, Lee CH, Kim SY and Lee SK (2006), Quality properties of soybean pastes made from Meju with *Mold* producing protease isolated from traditional Meju. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49(1), 7-14
17. Kim JW, Doo HS, Kwon TH, Kim YS and Shin DH (2011) Quality characteristics of Doenjang Meju fermented with *Aspergillus* species and *Bacillus subtilis* during fermentation. *Korean J Food Preserv.* 18(3), 397-406
18. Kim KJ, Ryu MK, Kim SS (1982), Chungkook-jang koji fermentation with rice straw, *Koeran J. Food Sci. Technol.* 10(4), 301-308
19. Ko YJ, Son YH, Kim EH, Seol HG, Lee GR, Kim DH and Ryu CH (2012) Quality properties of commercial Chungkukjang in Korea. *Journal of Agriculture & Life Science.* 46(1)
20. Kwon OJ, Kim MA, Kim TW, Kim DG, Son DH, Choi UK, Lee SH (2010) Changes in the quality characteristics of soy sauce made with salts obtained from deep ocean water. *Korean J Food Preserv.* 17, 820-825
21. Kwon SH, Choi JH, Ko YR, Shon MY, Park SK (2003) Changes in free sugars, organic acids and fatty acid composition of Kanjang prepared with different cooking conditions of whole black bean. *Korean J Food Preser.* 10, 333-338
22. Lee JG, Kwon KI, Chounh MG, Kwon OJ, Choi JY and Im MH (2009) Quality analysis

on the size and the preparation method of Meju for the preparation of Korean traditional soy sauce (Kanjang), J, Appl. Biol. Chem. 52(4), 205-21

23. Lee KY, Kim HS, Lee HG, Han O and Chang HJ (1997) Studies on the prediction of the shelf-life of kochujang through the physicochemical and sensory analysis during storage. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 26, 588-594
24. Lee NR, Lee SM, Go TH, Jeong SY, Hong CO, Kim KK, Park HC, Lee SM, Kim YG and Son HJ (2013) Fermentation characteristics of *chungkookjang* prepared using different soybean. J. of Environ. Sci. Inter. 22 : 723-732
25. Lee NR, Park SB, Lee SM, Go TH, Hwang DY, Kim DS, Jeong SY, Son HJ (2013) Characteristics of White Soybean Chungkookjang Fermented by *Bacillus subtilis* D7, Journal of Life Science Vol. 23. No. 4. 529-536
26. Mah JH (2012) Reduction of food-borne pathogenic bacteria in traditional fermented food , Korea University
27. Ministry of Food and Drug Safety, Production of food and food additives 2010, 2011
28. Mok CK, Song KT, Lee JY, Park YS, Lim SB (2005), Changes in microorganisms and enzyme activity of low salt soybean paste (Doenjang) during fermentation. 9(2), 112-117
29. Park HK, Sohn KH and Park OJ (1997) Analysis of significant factors in the flavor of traditional Korean Soy sauce(I): Korean J. Dietary Culture 12, No. 1
30. Park SK, Seo KI, Choi SH, Moon JS and Lee YH (2000) Quality assessment of commercial Doenjang prepared by traditional method. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29, 211-217
31. Rho J.D, Choi SY, Lee SJ (2008) Quality characteristics of soybean pastes (Doenjang) prepared using different types of microorganisms and mixing ratios. Korean J. Food Cookery Sci. 24(2), 243-240
32. Shin DH, Kim DH, Choi U, Lim DK, Lim MS (1996) Studies on the physicochemical characteristic of traditional kochujang. Korean J Food Sci Technol 28, 157-161
33. Suh JS, Ryu MK, Hur YH (1983) Effect of bacillus strains on the Chungkookjang processing, Korea J Food sci. Technol. Vol 15, No. 4 383-391

34. Sun JK, Baek JH (2008) The consuming tendency analysis of soybean paste market in Korea. Korean J. Food Marketing Association. 25(3), 25-52
35. Sung NJ, Ji YA and Chung SY (1984) Changes in nitrogenous compounds of soybean during Chungkookjang koji fermentation. J Korean Soc Food Nutr 13, 275-284
36. Sung NK, Ji YA, Chung SY(1984) Changes in nitrogenous compounds of soybean during Chungkookjang koji fermentation. Korean J. Food Nutr., 13(3) 275-284
37. Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH (2001) Antimicrobial activities of viscous substance from Chongkukjang fermented with different bacillus spry. Korea J. Fd HYg. Safety 16(3), 188-193
38. Yu J.H, (1984) Experiments in food science and engineering, Department of food engineering. Yonsei university (Ed.), Tamgudang, Seoul, Vol. 2, p. 476-478
39. Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM and Byun MW (2002) Quality characteristics of the Chungkookjang fermented by the mixed culture of Bacillus natto and B. licheniformis. J Korean Soc Food Sci Nutr 31, 204-210
40. 이계임, 김민정(2006) 전통식품에 대한 소비자 평가와 시장 활성화방안, 한국농촌경제연구원
41. 정동호 (2006) 콩발효식품

제1협동 : 벗짚 유래 *B. cereus* free starter culture의
개발 및 scale up

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 김 광 표

제1장 연구개발과제의 개요

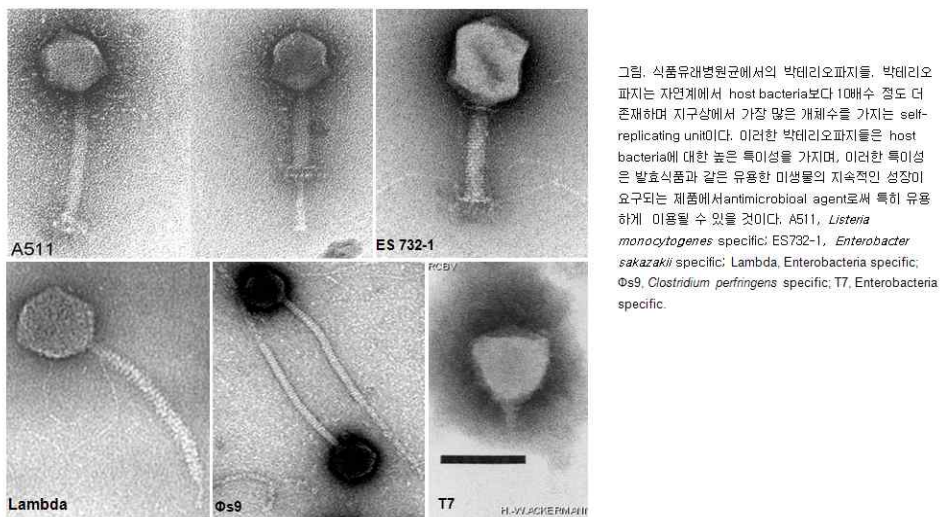
1절 연구개발의 목적

- 전통장류의 고유한 특성은 벧짚 유래 유용미생물의 다양성에 기인하지만 필연적으로 *Bacillus cereus* 오염의 문제를 수반함
- 이를 극복하기 위해 본 연구에서는 (i) *B. cereus*만이 특이적으로 제거된 벧짚 유래 starter culture를 개발하고 대량생산기술을 확립하며, (ii) 이를 이용하여 청국장, 메주, 된장 및 간장 제품을 생산하고 이들의 특성을 분석하며 이를 바탕으로 (iii) 위생적 전통장류제품의 개발 및 상품화를 목표로 함

2절 연구개발의 필요성

1. 박테리오파지의 특성 및 유용성

가. Bacteriophage: 새로운 paradigm의 antimicrobial agents



<그림 1. 세균별 bacteriophage의 형태>

- Bacteriophage(phage)는 특정 세균만을 감염·사멸시키는 지구상에서 가장 많이 존재하는 self-replicating unit(10^{31} phage)으로 건강한 성인은 하루에 10^7 - 10^9 정도의 phage를 섭취하는 것으로 추정되고, 또한 10^{13-14} 정도의 미생물을 gut microflora로써 가지고 있음에 비추어 phage는 한 성인에서 10^{13} 에서 10^{15} 까지 존재할 것으로 추정됨

- Bacteriophage는 항생제에 비해 높은 특이성을 가지고 특정 숙주 세균에만 영향을 끼치고 숙주이외의 미생물에는 영향을 끼치지 않으며, 자연계에 무한히 존재하여 새로운 product를 찾는 것이 용이하고, 교차내성이 적으며, 다른 어떤 antimicrobial agent도 가지지 못한 증식성을 보유하고 있음
- Bacteriophage 연구는 항생제의 발견이후 현재까지, 가장 간단한 구조를 가지는 self-replicating unit이라는 점 때문에, 기초과학의 연구에 필수요소였고 그 결과로 gene의 발견, gene regulation의 연구, central dogma의 확립 등의 연구 성과를 만들어 냄
- 최근 지구상에 존재하는 bacteria보다 10배수 정도가 더 많이 존재하는 것으로 추정되는 bacteriophage는 기초과학의 중요한 소재로써 뿐만이 아니라 다양한 유전자원의 확보, 그리고 유해균(병원균과 부패균)의 조절(detection, diagnostics, typing, control)등 다양한 활용 방안을 모색하고 있음
- 더 나아가 또한 항생제에 저항성을 가지는 병원균과 달리, phage에 저항성을 보이는 병원균은 종종 그 병원성 자체도 감소함이 확인되었으며, 이는 저항성과 관련된 심각성이 항생제에 비해 상대적으로 낮음을 의미함(<표 10>)

<표10. Bacteriophage의 특성>

특성	항생제(antibiotics)	박테리오파지
특이성(specificity)	Low	High to extremely high
부작용(side effects)	High	Very low (if any)
증식성(Multiplicity)	No	Yes
교차내성(Cross resistance)	Yes	No ~ (Yes)
병원성과의 관계	Not associated with virulence	Often confer less virulent phenotype

- 최근의 연구들이 보여주는 phage의 안전성 (Carlton et al., 2005)과 병원균 조절에서의 효율성으로 FDA는 anti-*Listeria* phage에 GRAS (Generally Regarded As Safe) status를 부여했고 (FDA GRAS Notice No. GRN 000198; FDA, 2006) antibiotic - resistant bacteria에 대한 치료에도 phage를 이용하려는 노력들이 진행되고 있음(그림)



<그림 2. FDA에 의해 GRAS를 부여 받고 현재 이용되고 있는 *L. monocytogenes* phage P100의 전자현미경사진과 판매제품>

- 참고로 다음은 각국에서 식품에 허가된 박테리오파지(BCP8-2 및 BCP901과 같은 SPO1 group에 속하는 파지임)를 정리한 것임

<표1. 국가별 bacteriophage 식품허가 사항>

일시	국가 및 기관	허가사항(식품 관련)
2012년 9월	Food Standards Australia and New Zealand	Processing aid로 허가
2012년 3월	European Food Safety Authority (EFSA)	P100가 안전함을 확인
2011년 3월	USDA	Processing aid로 허가
2011년 1월	Dutch CBG	<i>Salmonella</i> phage의 field test를 허가하고, temporary use exemption을 부여
2010년 9월	Health Canada	Processing aid로 허가
2006년 10월	US FDA	P100에 GRAS 부여

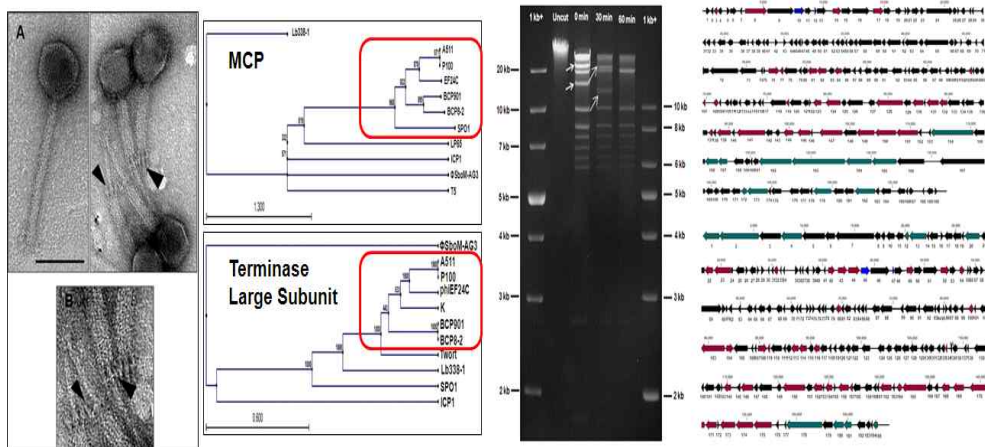
나. 전통 장류의 유해균 제어에서 박테리오파지의 유용성

- 국내 전통발효식품들은 단일 균주 또는 몇 가지 균주를 starter로 사용하는 대용량 생산 제품과는 구별되는 앞으로 계승 발전시켜야 할 독특한 특성을 보유하고 있고, 이러한 특성은 주로 발효에 이용되는 미생물에서 기인함
- 위에서 언급한 바와 같이 국내 전통발효식품의 미생물들은 주로 벧짚에서 유래되고 있으나, 문제는 이러한 벧짚들이 (거의) 모두 *Bacillus cereus*에 오염이 되어 있음
- 박테리오파지는 특정 세균만을 숙주로 살아가는 obligate parasite로 숙주가 아닌 다른 유용균주에는 영향을 끼치지 않는 높은 수준의 숙주 특이성을 가지고 식품에서 유해균을 매우 효과적으로 제어할 수 있음이 보고되고 있음
- 이에 미국 FDA는 *Listeria monocytogenes*를 제어하는 박테리오파지를 “GRAS”로써 식품에서 이용할 수 있도록 승인했음
- 한편으로 장류식품을 포함한 전통발효식품은 발효 및 숙성 과정에서 *B. subtilis* 및 *B. licheniformis*를 포함하는 유용세균의 지속적인 활성이 요구됨
- 높은 숙주 특이성을 가지고 유해균의 효과적인 제어가 가능한 박테리오파지의 특성은 다른 어떤 항미생물제제도 가지지 못하는 박테리오파지만의 특징으로 전통발효식품에서 특정 유해

균의 제어에 매우 유용할 것임

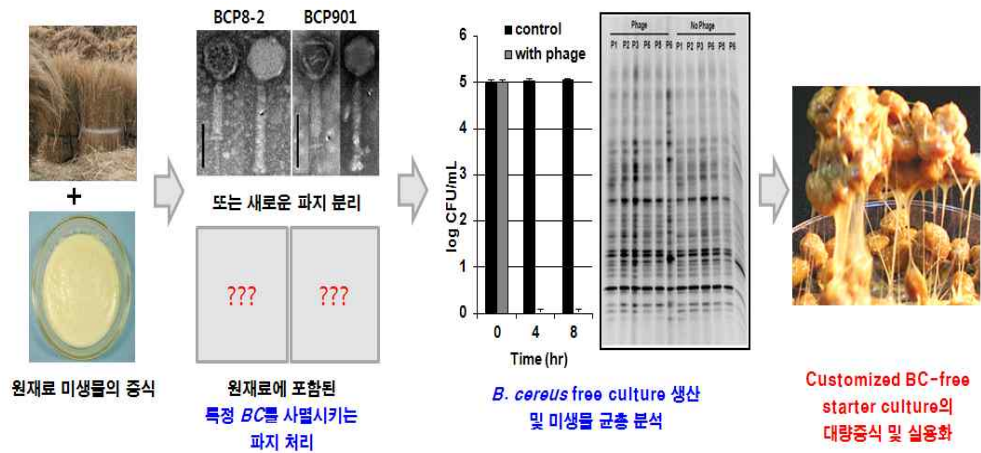
2. 박테리오파지를 이용한 starter culture 개발의 선행연구

- 벧짚은 많은 전통 장류의 발효에서 기본이 되는 미생물을 제공하고 있으나 모든 벧짚들은 *B. cereus*에 오염되어 있음
- 박테리오파지는 이러한 다양한 미생물군에서 특정 세균만을 특이적으로 사멸시키는 것이 가능하므로 본 연구제안서에서의 기본 아이디어는 벧짚에서 *B. cereus*만이 제거된 starter culture를 개발하는 것임



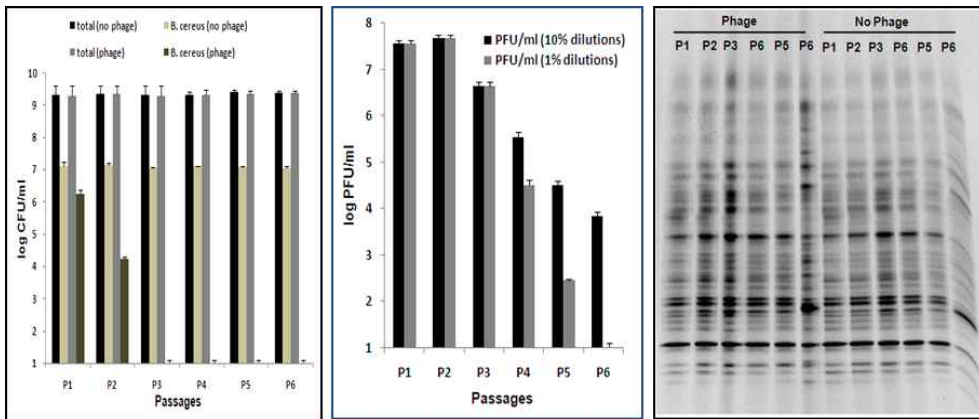
<그림 3. ARPC 과제 수행시 분리된 박테리오파지 및 이의 특성분석>

- 본 연구진은 지난 4년간 ARPC와 지역선도클러스터 연구개발지원사업을 수행하며 BCP8-2와 BCP901을 분리하고 이들의 유해균 제어 능력 등의 효능을 분석해 왔음
- 이를 기반으로 2011년과 2012년도에 SCI 저널인 Research in Microbiology와 Food Microbiology에 논문을 publish함
- 또한 선행연구를 통하여 본 연구자는 *B. cereus*가 오염되어 있는 벧짚으로부터 *B. cereus*가 제거된 culture를 성공적으로 생산하였음



<그림 4. *B.cereus free culture* 생산 방법의 모식도>

- 아래의 그림은 벧짚에 박테리오파지를 처리하지 않을 경우 *B. cereus*의 수가 10^7 CFU/ml에 이르나 파지 처리 culture의 경우 *B. cereus*가 검출되지 않음을 확인할 수 있음
- 더 나아가 이렇게 준비된 파지가 처리된 culture는 총균수에는 차이가 없었으며, 관능적으로도 파지 미처리균과 차이가 없었음
- 또한 6번의 passage를 지나는 동안 미생물 균총의 변화가 없는 것을 확인할 수 있었음.



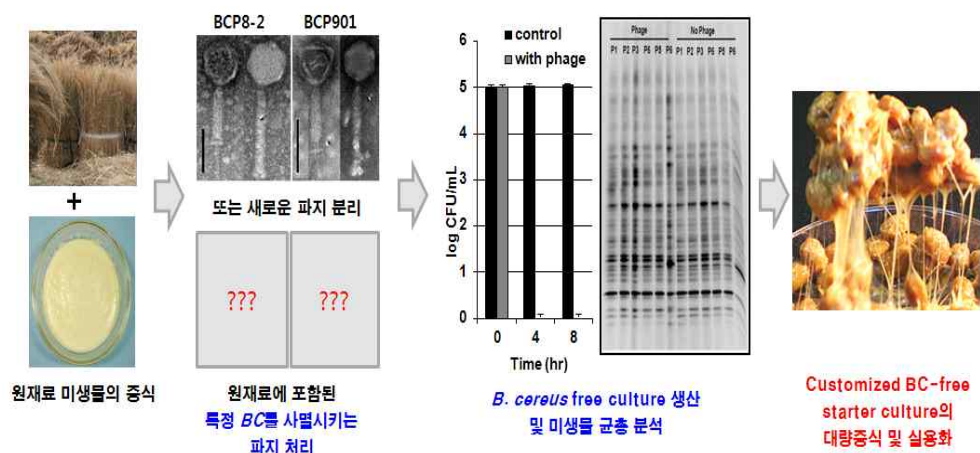
<그림 5. RiBS1의 개발 및 계대 증가에 따른 미생물 균총 변화>

- 이러한 선행연구의 결과물들을 바탕으로 본 과제에서는 전국에서 수집된 벧짚 유래 *B. cereus free starter culture*를 개발하고 이를 이용 다양한 전통장류제품 개발 및 상업화하고자 함

제2장 국내외 기술개발 현황

1절 국내 연구 현황

- 본 연구과제와 직접적으로 연관이 있는 식품에서 박테리오파지를 이용한 *S. aureus*의 제어에 대한 연구는 아직 없는 것으로 알고 있고, 이와 관련하여 몇몇 연구자들이 *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Cronobacter sakazakii* 등을 제어하기 위한 연구를 진행하고 있음
- *S. aureus* 제어를 위한 국내의 연구는 길항미생물 또는 길항미생물이 생산하는 박테리오신 등을 이용하거나 다양한 화학물질 및 물리적인 방법 등을 이용하는 방법 등이 진행되고 있음
- 국내 제품생산 및 시장의 관점에서, 박테리오파지를 이용하여 *S. aureus* 뿐만이 아니라 다른 유해균을 식품에서 제어하는 제품은 우리나라에는 아직 시판되지 않고 있음. 이에 대한 주요한 이유는 우리나라에서 이에 대한 연구가 시작하는 단계에 불과하여 제품을 만들 만한 수준에 도달하지 못했기 때문임.
- 본 연구진은 식품에서 박테리오파지를 이용하여 *Bacillus cereus*를 제어하기 위해 지난 4년간 ARPC와 지역선도클러스터 연구개발지원사업을 수행하며 BCP8-2와 BCP901을 분리하고 이들의 유해균 제어 능력 등의 효능을 분석해 왔음
- 이러한 연구를 통하여 본 연구진은 다양한 식품에서 *B. cereus*를 사멸시키는 박테리오파지를 분리하고 특성을 분석하였으며, 식품에 박테리오파지를 직접 처리하여 유해균을 제어할 수 있음을 확인하였고, 더 나아가 오염되어 있는 볏짚으로부터 *B. cereus*가 제거된 culture를 성공적으로 생산하였고 현재 이를 산업적으로 적용하는 연구를 iPET으로부터 지원을 받아 진행하고 있음(그림)



<그림. *B.cereus free culture* 생산 방법의 모식도>

- 이를 기반으로 2011년과 2012년도에 SCI 저널인 *Research in Microbiology*와 *Food Microbiology*에 논문을 publish하였고, “박테리오파지를 유효성분으로 함유하는 유해세균 제어용 조성물 및 이를 이용하여 유해세균을 제어하는 방법”과 “박테리오파지를 이용한 유해세균이 제거된 전통 발효식품용 스타터 컬처의 제조 방법” 등의 특허를 출원하였음

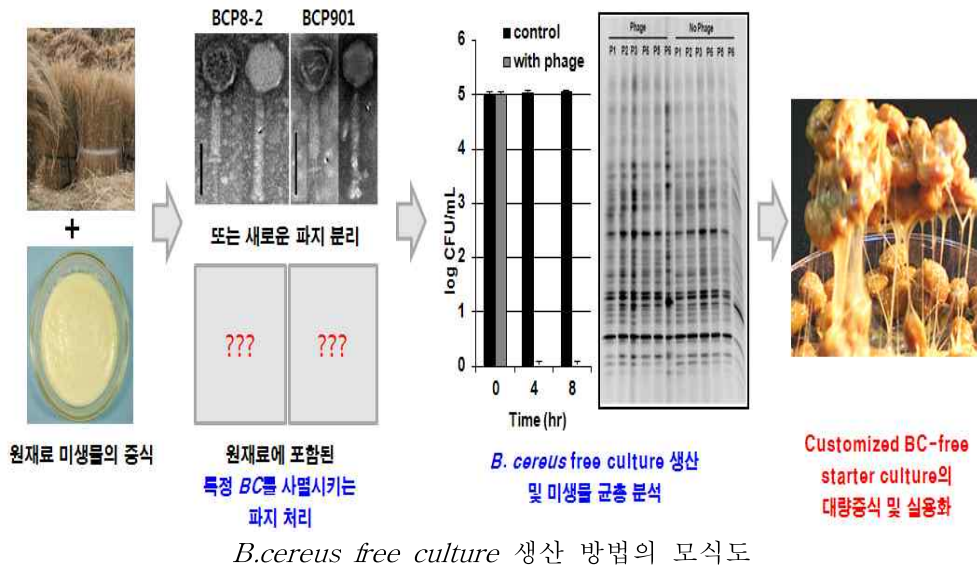
2절 국외 연구 현황

- Bacteriophage 활용에 대한 관심과 연구 부활
효과적인 세균 제어제인 항생제 개발과 사용으로 한동안 bacteriophage를 이용한 세균 감염 치료 (phage therapy)에 대한 연구가 거의 잊혀지고 있었으나, 최근 들어 전 세계적으로 폭발적으로 늘고 있는 항생제 내성균에 대한 해결책으로 phage therapy (biocontrol)와 endolysin (lysin therapy)에 대한 관심이 고조되어 연구 project와 발표 논문이 매년 증가하고 있음
- Bacteriophage 이용의 안전성 공인 (미국 FDA)
전 세계적으로 의학과 농업, 식품안전 등 다 방면에 걸친 연구가 진행되고 있다. 특히 2006년 8월에는 미국과 네덜란드의 venture 기업 2곳이 축산물에 도포하여 *Listeria*를 제거할 수 있는 bacteriophage를 개발하여 미국 FDA 허가를 받을 정도로 안전성이 검증되고 실용화가 진전되고 있음. (Federal Register of August 18, 2006, FDA announced that it had approved the use of a bacteriophage preparation made from six individually purified phages to be used on Ready To Eat meat and poultry products as an antimicrobial agent against *Listeria monocytogenes*)
- Bacteriophage를 이용한 다양한 application
아직 국제적인 공인이 되지 않았으나 옛 Soviet Georgia에서 기존 항생제에 의해 치료가 안 되는 병원균에 대한 phage therapy가 이용되었음. 이에 대한 기초연구로 mouse의 혈액에서 오랫동안 circulation되는 λ phage mutant를 screening 하고 분석한 연구가 발표되었음 (Merril et al., 1996). 또한, bacteriophage를 이용하여 *E. coli* O157:H7이나 *Salmonella*와 같이 가축에서 유래하는 식중독균의 가축오염을 감소시키려는 실험이 다수 보고되고 있음 (Atterbury et al., 2007; Raya et. al. 2006). 최근에는 *E. coli* bacteriophage와 Quantum Dot의 nanocomplex를 이용한 *E. coli*의 rapid detection system이 개발되었다 (Edgar et al., 2006).
- 박테리오파지를 이용한 *S. aureus* 제어 연구에서는 pubmed search를 통해 (“*S. aureus*”, “bacteriophage”, “food”의 search 단어 이용) 144개의 논문을 확인했는데 이중 식품에 박테리오파지 자체를 처리한 연구는 4개 정도에 불과했고, 그 외 *S. aureus* 감염 치료를 위한 phage therapy 및 endolysin을 이용한 *S. aureus* 제어 관련 논문들이 확인되었음

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
위생적 전통장류제품 생산을 위한 순창지역 벗짚 유래 starter culture의 개발	US, EU	20	20	50	<ul style="list-style-type: none"> - 국내의 경우 파지를 이용한 유해균의 제어연구는 몇몇 연구자들이 진행하고 있으나 <i>Bacillus cereus</i>에 대한 연구는 매우 미미한 실정임 - 연구신청팀은 ARPC의 지원을 받아 <i>B. cereus</i>에 특이한 파지를 분리한 경험을 보유하고 있음

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 연구재료 및 연구방법



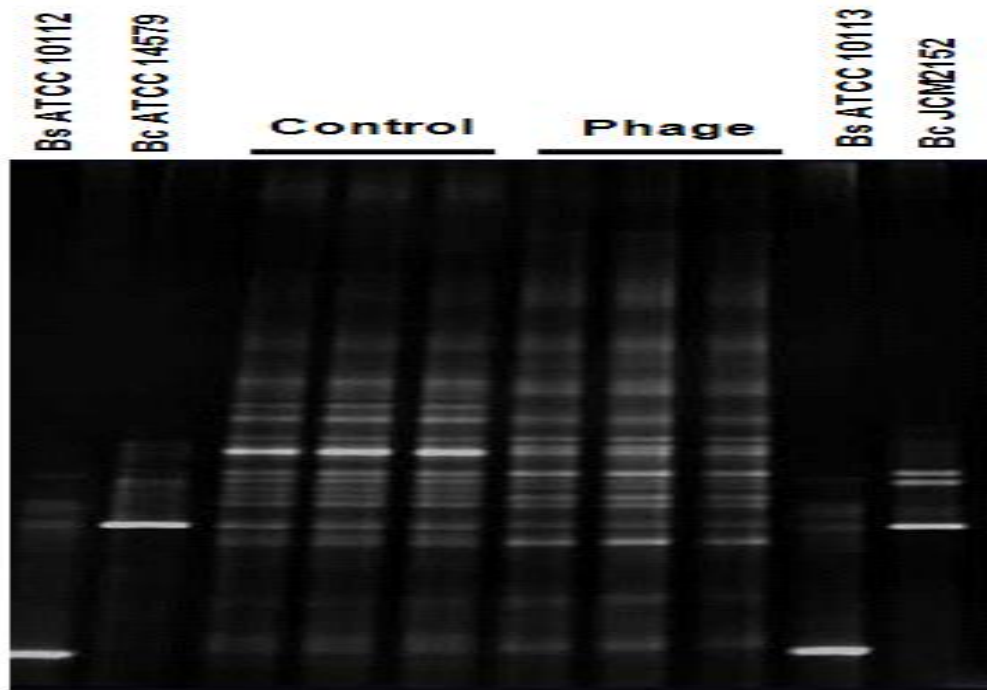
○ 전통장류는 주로 벗짚에 의한 토양미생물을 이용해 발효가 진행되므로 벗짚미생물을 분리해 starter culture를 만들 수 있지만 *B. cereus*균의 오염이 수반되므로 *B. cereus*만 특이적으로 제거된 벗짚유래 starter culture 만들어 전통장류의 발효에 이용할 수 있음

가. 벗짚 유래 *B. cereus* free starter culture(Rice straw Based Starter, RiBS1)의 대량 생산 기술 개발

- 다양한 농도의 콩 같은 물(GB)을 이용하여 벗짚 미생물의 증식 (0.5-1.0 L)
- Beadbeater 및 Ultraclean Soil DNA Isolation kit를 이용한 total genomic DNA의 순수분리
- 16s rDNA sequence의 증폭을 위한 PCR
 - 프라이머(338f - CGCCCGCCGCGCCGGCGGGCGGGGCGGGGGC
ACGGGGGACTCCTACGGGGAGGCAGCAG and
518r-ATTACCGCGGCTGCTGG)
 - 94도 5분, 30 cycles (94도 1분, 52도 1분, 72도, 1분), final extension 72도, 10분
- 다양한 배지에서 증식한 미생물을 대상으로 DGGE(denatured gradient gel electrophoresis) 분석을 통한 미생물군(microflora) 분석
 - 20-60% gradient
 - 8시간 또는 16시간 프로토콜 이용

- Ethidium bromide staining

○ TSA를 이용한 호기성 총균수의 측정



나. 순창 지역의 벧짚 유래 *B. cereus* free starter culture (RiBS2, RiBS3)의 개발

○ 순창에서 20여 개 이상의 다양한 유기농 벧짚 샘플 수집

○ *B. cereus* free starter culture 생산을 위한 다양한 박테리오파지의 최적 combination과 최소 처리 농도의 선정(P1 단계)

- 위에서 정리된 최적 배지를 이용하여 벧짚 미생물군을 37도에서 10시간 증식

- 벤치에서 3분간 정치하여 벧짚이 가라앉도록 한 후 상등액을 취함

- 여기에 먼저 4종류의 박테리오파지(1-1, 8-2, 901 및 22-1)을 각각 10^9 pfu/ml로 접종한 후 37도에서 8-10시간 배양

- MYP와 *B. cereus* selective agar를 이용하여 *B. cereus*를 counting

- TSA를 이용하여 total aerobic bacteria counting

- *B. cereus* free starter culture가 가능한 벧짚 샘플들을 대상으로 위의 방식을 이용하여 2종류의 박테리오파지(BCP8-2와 BCP901)로도 *B. cereus* free starter culture의 생산이 가능한지를 확인

- *B. cereus* free starter culture가 가능한 벧짚 샘플들을 대상으로 위의 방식을 이용하여 1종류의 박테리오파지(BCP8-2 또는 BCP901)만으로도 *B. cereus* free starter culture의 생산이 가능성 확인

- 2 종류 또는 1 종류의 박테리오파지를 이용한 *B. cereus* free starter culture의 생산이 가능한 combination을 이용하여 10^7 , 10^8 및 10^9 pfu/ml의 다양한 박테리오파지의 농도를 접종하여 최소 박테리오파지의 농도를 확인

- P1 sample의 분석
 - 위의 방법을 통해 성공적으로 준비된 *B. cereus* free starter culture(P1 단계)를 이용하여 청국을 제조(37-42도, 48-72시간 배양)
 - P1 sample을 이용하여 위의 방법으로 DGGE 분석
 - 이 때 박테리오파지를 처리하지 않은 샘플을 control로 이용하여 비교 대조
- *B. cereus* free starter culture의 계대 배양 기술 개발(P2 이후 단계)

(Microflora에 영향이 적은 최대 희석 배수의 선정)

 - 위에서 준비된 *B. cereus* free starter culture를 이용하여 위에서 결정된 배지에 계대 배양
 - 이 때 10배(10% inoculum) 및 100배(1%) 희석배수를 이용하여 접종 후 8시간에서 10시간 배양
 - 세대의 경과에 따른 미생물군의 변화를 DGGE를 통해 모니터링하고 최적 계대배양 희석배수를 결정
- P1과 이후 passage의 microflora의 변화 모니터링
 - Beadbeater 및 Ultraclean Soil DNA Isolation kit를 이용한 total genomic DNA의 순수분리
 - 16s rDNA sequence의 증폭을 위한 PCR
 - 프라이머(338f - CGCCCGCCGCGCCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGGAGGCAGCAG and 518r-ATTACCGCGGCTGCTGG)
 - 94도 5분, 30 cycles (94도 1분, 52도 1분, 72도, 1분), final extension 72도, 10분
 - Pyrosequencing 분석을 통한 미생물군(microflora) 분석
- P6를 이용한 청국장장의 제조 및 이의 특성분석
 - P6 1 ml를 10-100g의 삶은 콩에 접종 후 37-42℃도에서 발효
 - 약식 관능평가
 - *B. cereus*와 유효 박테리오파지 counting

다. RiBS 이용 메주, 간장 및 된장 제품의 미생물 군집 분석

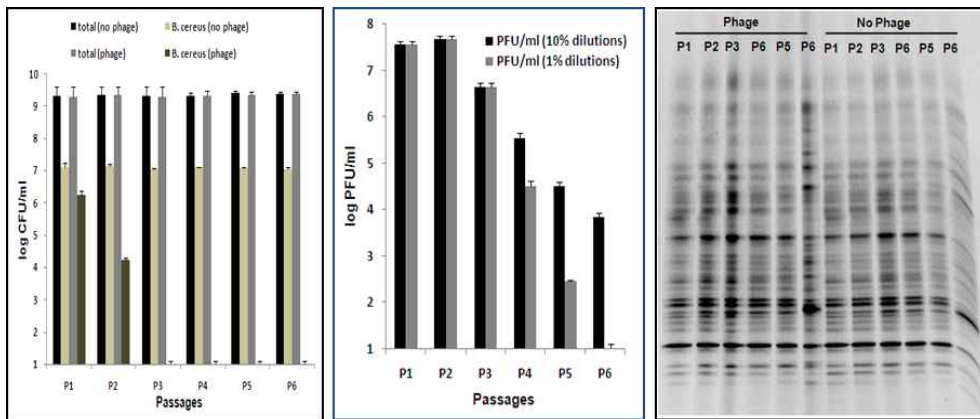
- 생산된 메주, 간장 및 된장의 제품의 발효 전·후 샘플 수거
- 위에서 설명된 방법대로 총 DNA를 분리
- 16s rRNA sequenced based DGGE analysis
- Pyrosequencing 분석

라. *Bacillus cereus* 박테리오파지의 분리 및 특성분석

- 볏짚과 논흙에서 *B. cereus*를 사멸시키는 박테리오파지의 분리
- 분리된 박테리오파지의 특성분석(TEM, adsorption study, Inhibition of *B. cereus* in Liquid culture 등)
- 액체 배지에서 *B. cereus*의 증식 저해능 확인

- Inhibition of *B. cereus* in Liquid culture 실험은 Overnight 한 균을 1% inoculum으로 TA broth에 접종한 후 약 3시간 후 균이 10^7 - 10^8 CFU/ml 정도 도달할 때 파지를 다양한 MOI로 접종하여 균의 성장을 측정함
- Adsorption study는 일정한 균수에 도달한 균을 매 분마다 MOI=0,0001로 파지를 접종한 후 원심분리하고 supernatant를 취해 PFU counting을 하여 free phage를 측정함

2. 실험내용 및 결과



RiBS1의 개발 및 계대 증가에 따른 미생물 균총 변화

- 위의 그림은 벧짚에 박테리오파지를 처리하지 않을 경우 *B. cereus*의 수가 10^7 CFU/ml에 이르나 파지 처리 culture의 경우 *B. cereus*가 검출되지 않음을 확인할 수 있음
- 더 나아가 이렇게 준비된 파지가 처리된 culture는 총균수에는 차이가 없었으며, 관능적으로도 파지 미처리균과 차이가 없었음
- 또한 6번의 passage를 지나는 동안 미생물 균총의 변화가 없는 것을 확인할 수 있었음
- 이러한 선행연구의 결과물들을 바탕으로 본 과제에서는 전국에서 수집된 벧짚 유래 *B.cereus* free starter culture를 개발하고 이를 이용 다양한 전통장류제품 개발 및 상업화하고자 함

가. RiBS1 실험결과

(1) 순창지역 벧짚 유래 RiBS1의 대량생산 및 순창장류회사에 공급

- 배양 volume과 inocula에 따른 RiBS1 P6의 total bacterial counts 및 *B. cereus* counts
 - RiBS1을 이용한 다양한 장류 식품의 개발을 위해서는 대량생산 시 품질특성유지가 중요
 - RiBS1 starter culture의 대량생산 시 특성분석을 위해 다양한 volume과 0.1% 또는 1%

inoculum 조건을 이용하여 P6를 생산

- RiBS1 P5를 이용해 생산된 RiBS1 P6의 경우 전체적으로 $5-10 \times 10^9$ CFU/ml 정도의 total CFU count를 나타내었음(그림 1)
- 10 ml, 100 ml 및 1,000 ml의 조건에서 차이점을 발견할 수 없었으나, 500 ml의 경우 상대적으로 낮은 total CFU counts를 나타냄(그림 1)
- 0.1%와 1.0% inoculum을 달리 배양한 결과는 서로 차이가 없음을 확인
- 이러한 결과들을 통해 배양 volume과 inoculum은 total bacterial count에 영향이 없음을 확인

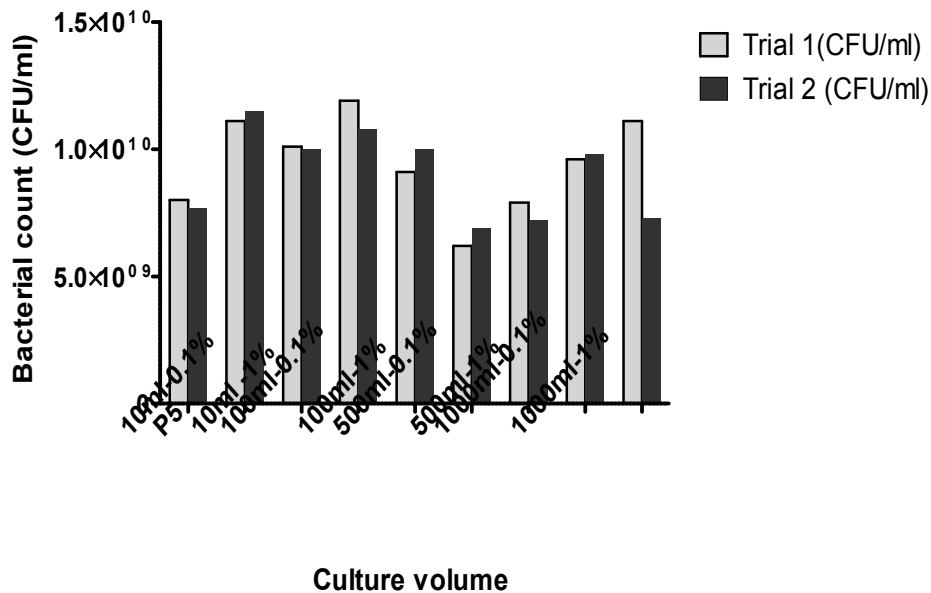


그림 1. 다양한 volume과 inocula에 따른 RiBS1 culture의 total bacterial counts

- 다양한 volume 및 inoculum으로 증식된 RiBS1 P6의 경우, 모든 샘플에서 *B. cereus*는 검출되지 않았음(detection limit, 10^1 CFU/ml) (표 1)

표 1. 다양한 volume에서 증식한 RiBS1 P6의 *B. cereus* counts

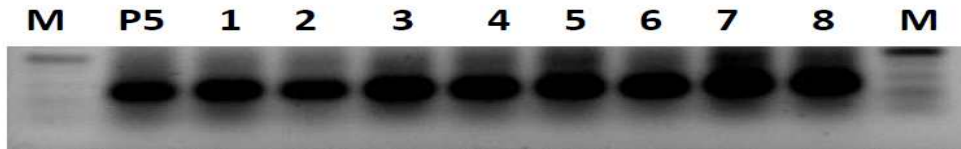
	Trial 1(CFU/ml)	Trail 2 (CFU/ml)
10ml	0	0
100ml	0	0
500ml	0	0
1000ml	0	0

○ 배양 volume과 inocula에 따른 RiBS1 P6의 microflora 분석

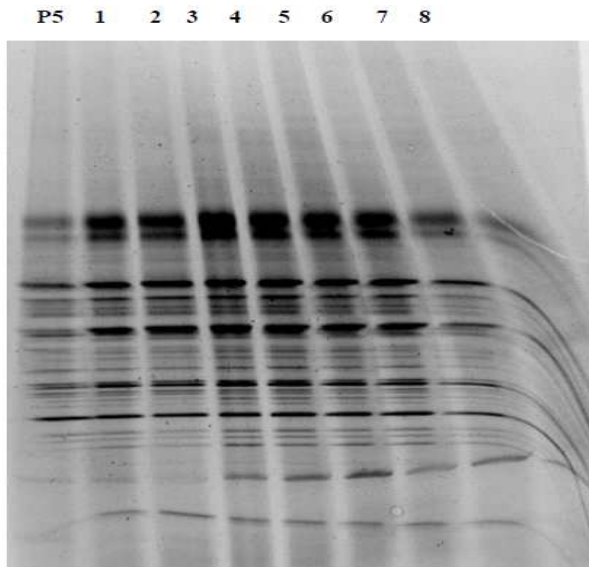
- 다양한 배양 volume과 inocula에서 생산된 RiBS1 P6의 microflora를 16S rDNA sequence를 기반으로 한 DGGE를 이용하여 분석
- Gradient gel은 10-60%로 제작하였고, 60도에서 11시간 분리 후, ethidium bromide를 이용 염색함

- 독립적으로 준비된 샘플들로부터 추출된 DNA로부터 MoBio Soil DNA isolation kit를 이용하여 total DNA를 추출하였고, 이를 이용하여 16S rRNA의 sequence amplification(그림 2A)

(A)



(B)



(C)

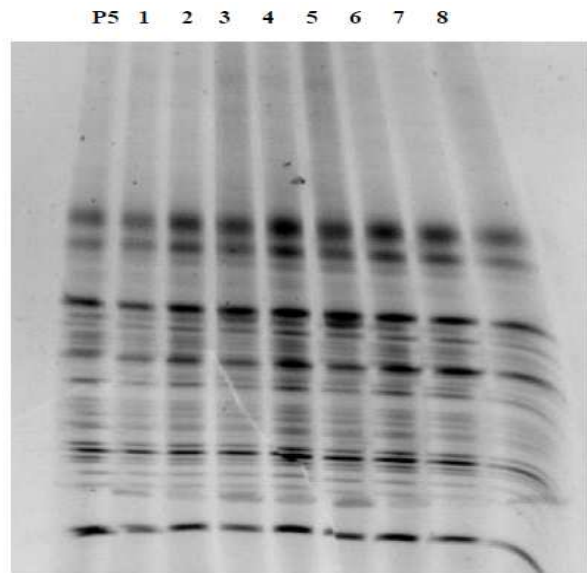


그림 2. (A) 시료로부터 추출된 DNA를 이용한 16S rDNA sequence의 amplification. (B)와 (C) (A)에서 준비된 샘플의 banding pattern 분석을 위해 PCR product를 10-60% gradient gel에서 DGGE를 이용하여 분석. 1, 10 ml total volume (0.1% inoculum); 2, 10 ml (1%); 3, 100 ml (0.1%); 4, 100 ml (1%); 5, 500 ml (0.1%); 6, 500 ml (1%); 7, 1000ml (0.1%); 8, 1000ml (1%)

- 16S rDNA를 기반으로 한 DGGE 분석 결과, volume에 상관없이 일정한 DGGE banding pattern을 확인할 수 있었음(그림 2B, 2C)
- 또한 inoculum에 의한 microflora의 변화도 없음을 확인할 수 있었음(그림 2B, 2C)
- 이러한 결과들은 RiBS1 P6의 대량생산에 따른 starter culture의 microflora가 일정하게 유지됨을 확인한 것으로 starter culture를 이용한 장류제품의 품질 특성 유지가 가능함을 암시하고 있음

○ 준비된 RiBS1 culture를 순창 장류에 공급

- 위의 분석을 통해 RiBS1의 특성이 배양 volume과 inoculum 조건에 영향이 없음을 확인함
- 이에 따라 순창 장류에서 필요한 RiBS1를 필요한 양만큼 생산하여 제공함

(2) RiBS1을 이용한 메주, 된장, 간장의 발효 중 미생물 군집분석

○ DGGE를 이용한 RiBS1 메주의 발효 중 미생물 군집분석(그림 3)

- (RiBS1 "R"), (*B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae* "BA"), (RiBS1 + *Asp. oryzae* "RA"), (RiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae* "RBA")
- 15일 동안 발효
- 3일(F3), 9일(F9), 및 15일차(F15) 메주들을 샘플링
- 16S rDNA sequence를 기반으로 한 DGGE 분석을 위해 16S rDNA PCR amplification(그림 3A)
- PCR product의 Gel extraction 후 DGGE 분석
- 다양한 미생물 처리에 관계없이 매우 유사한 banding pattern을 보임

(A)

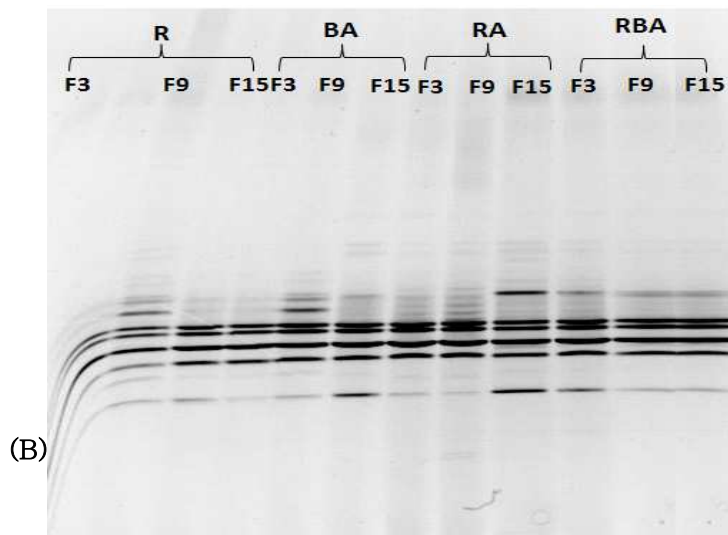
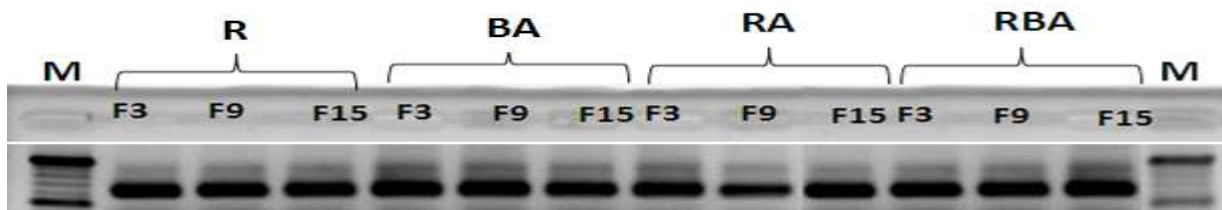


그림 3. DGGE를 이용한 RiBS1 메주의 발효 중 미생물 군집분석. (A) 16S rDNA PCR amplification. (B) 16S rDNA sequence를 기반으로 한 DGGE 분석. R, RiBS1 첨가; BA, *B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae*; RA, RiBS1 + *Asp. oryzae*; RBA, RiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae*. 3일(F3), 9일(F9), 및 15일차(F15) 메주 샘플

○ Pyrosequencing을 이용한 RiBS1 starter culture의 미생물 군집분석

- 먼저 RiBS1 P3와 P6 샘플들의 microflora는 *Enterobacter* spp.가 가장 많은 부분을 차지하였고, 이후 *Escherichia* spp. 등이 그 뒤를 따랐음(그림 4)
- *B. cereus*는 검출되지 않음
- 이에 반해 유익한 균으로 사료되는 *Bacillus* spp. 역시 검출되지 않았음

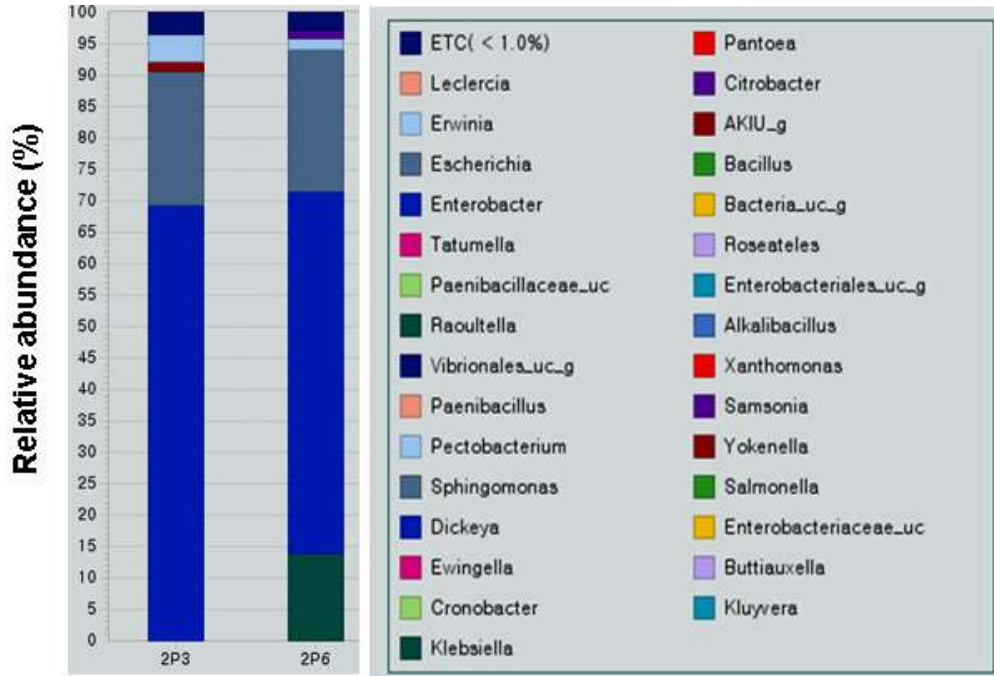


그림 4. RiBS1 starter culture의 미생물 군집분석

○ Pyrosequencing을 이용한 RiBS1 메주의 발효 중 미생물 군집분석

- 그림 6에서와 같이 준비된 PCR product를 pyrosequencing을 통하여 분석
- 모든 샘플들에서 *Bacillus* spp.가 전체 read 가운데 95% 이상을 차지함
- 이러한 결과는 RiBS1 자체의 미생물 군집분석(그림 4)에서의 결과와 비교하면 매우 놀라운 결과임
- 즉, 비록 RiBS1을 구성하는 미생물에 *Bacillus*의 조성이 매우 낮더라도 메주의 발효 조건하에서 대부분의 그램 음성균이 제거되고 *Bacillus*가 주발효균으로 성장함을 보여주는 결과임
- *Bacillus* spp. 중 *B. aerius*가 전체 read의 70-75%를 차지하고 있었으며 *B. licheniformis*가 그 뒤를 따랐음
- *B. licheniformis*를 첨가한 샘플에서는 *B. sonorensis*가 발견되지 않은데 반해, 넣지 않은 샘플들(R 처리군과 RA 처리군)에서는 *B. sonorensis*가 발견되었고, 특히 15일차에서 발견된 경우가 많았음
- *B. sonorensis* 외의 결과들은 모든 처리군에서 매우 비슷함을 확인함
- 이러한 결과들은 세균의 분포가 처리군에 상관없이 매우 유사함을 보여주고 있으며, 곰팡이의 분포를 확인하는 것이 필요할 것으로 사료됨

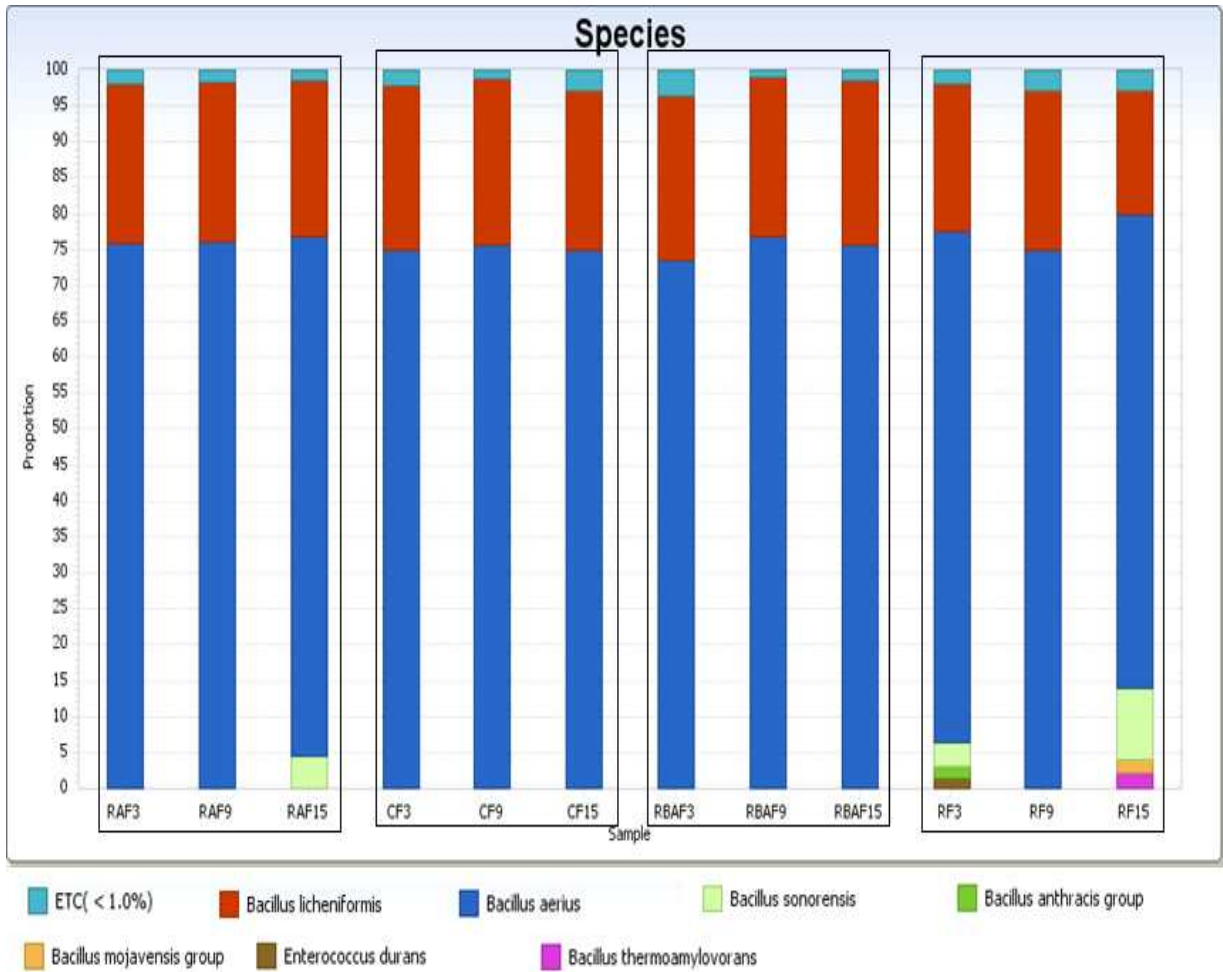


그림 5. Pyrosequencing을 이용한 RiBS1 메주의 발효 중 미생물 군집분석. R only, RiBS1 첨가; C only, *B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae*; RA, RiBS1 + *Asp. oryzae*; RBA, RiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae*. 3일(F3), 9일(F9), 및 15일차(F15) 메주 샘플

- 재미있는 점은 *B. licheniformis*와 *Asp. oryzae* 만을 첨가한 Control에서도 *B. aerius*가 가장 높은 빈도로 발견되었다는 점임
- 이에 대한 설명으로는 *B. aerius*와 *B. licheniformis*의 16S rDNA sequence가 서로 매우 유사하기 때문인 것으로 사료됨(그림 6)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus aerius strain BAB-2524 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2784	2784	100%	0.0	100%	KC443101.1
Bacillus licheniformis strain BAB-1836 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2758	2758	99%	0.0	99%	KF535152.1
Bacillus aerius strain RGS230 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2745	2745	99%	0.0	99%	KC469617.1
Bacillus licheniformis strain Pb-WC09001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2745	2745	99%	0.0	99%	HM006901.1
Bacillus licheniformis strain ACQ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2745	2745	98%	0.0	99%	DQ228996.1
Bacillus licheniformis strain SB 3131 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2743	2743	98%	0.0	99%	GU191917.1
Bacillus licheniformis strain BCRC 12820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2743	2743	98%	0.0	99%	EF423608.1
Bacillus licheniformis 9945A, complete genome	2741	19131	98%	0.0	99%	CP005865.1
Bacillus licheniformis strain MS5-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2741	2741	98%	0.0	99%	EU718480.1
Bacillus sp. DM-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2741	2741	98%	0.0	99%	DQ539520.1
Bacillus licheniformis strain Mo1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2741	2741	98%	0.0	99%	AF372616.1
Bacillus licheniformis strain BAB-1833 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2739	2739	98%	0.0	100%	KF535150.1
Bacillus licheniformis strain BAB-1826 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2739	2739	98%	0.0	100%	KF535148.1

그림 6. *B. aerius* 16S rRNA sequence를 이용한 blast search 결과

○ Pyrosequencing을 이용한 RiBS1 된장발효 중 미생물 군집분석

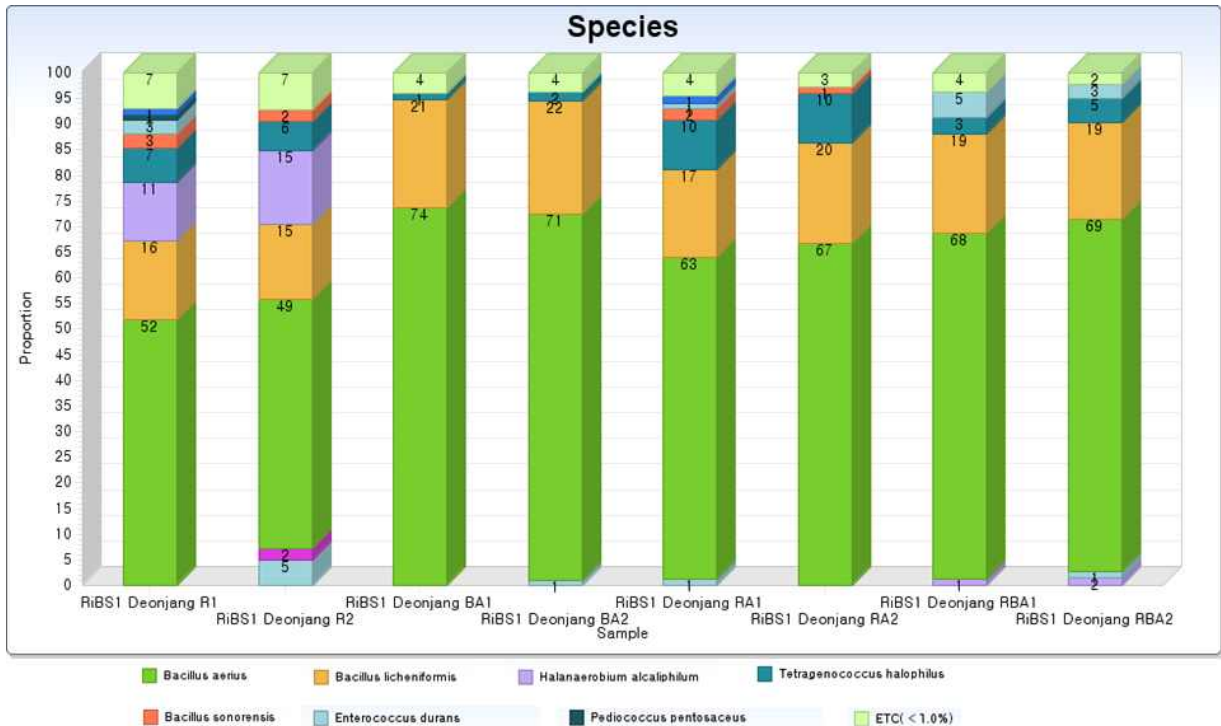


그림 7. Pyrosequencing을 이용한 RiBS1 된장 발효 중 미생물 군집분석 R, RiBS1 첨가; BA, *B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae*; RA, RiBS1 + *Asp. oryzae*; RBA, RiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae*). 샘플이름 끝에 1은 0주차 2는 12주차 샘플

- RiBS1을 이용한 된장에서 약 70여종 이상의 미생물들이 분석됨
- RiBS1을 이용한 된장 샘플에서는 주 발효균이 *B. aerius*, *B. licheniformis*, *Halanaerobium alcaliphilum*, *Tetragenococcus halophilus*균으로 분석되었고 발효초기와 발효후기의 미생물군집에 큰 변화는 없었음(그림7)
- R처리군에서 발효초기와는 다르게 발효후기에서는 *B. thermoamylovorans* 5%와 *E. coli*

group이 2%로 나옴(그림7)

- BA 처리군과 RA 처리군의 발효초기와 발효후기는 별 차이가 없었음(그림7)
- 다른 처리군과는 다르게 RBA 처리군에서는 발효초기와 발효후기에 *B. subtilis* group 2%이 발견됨(그림8)
- RiBS1만 첨가한 처리군에서 분석된 미생물의 종류가 가장 많았음(그림7)

○ Pyrosequencing을 이용한 RiBS1 간장발효 중 미생물 군집분석

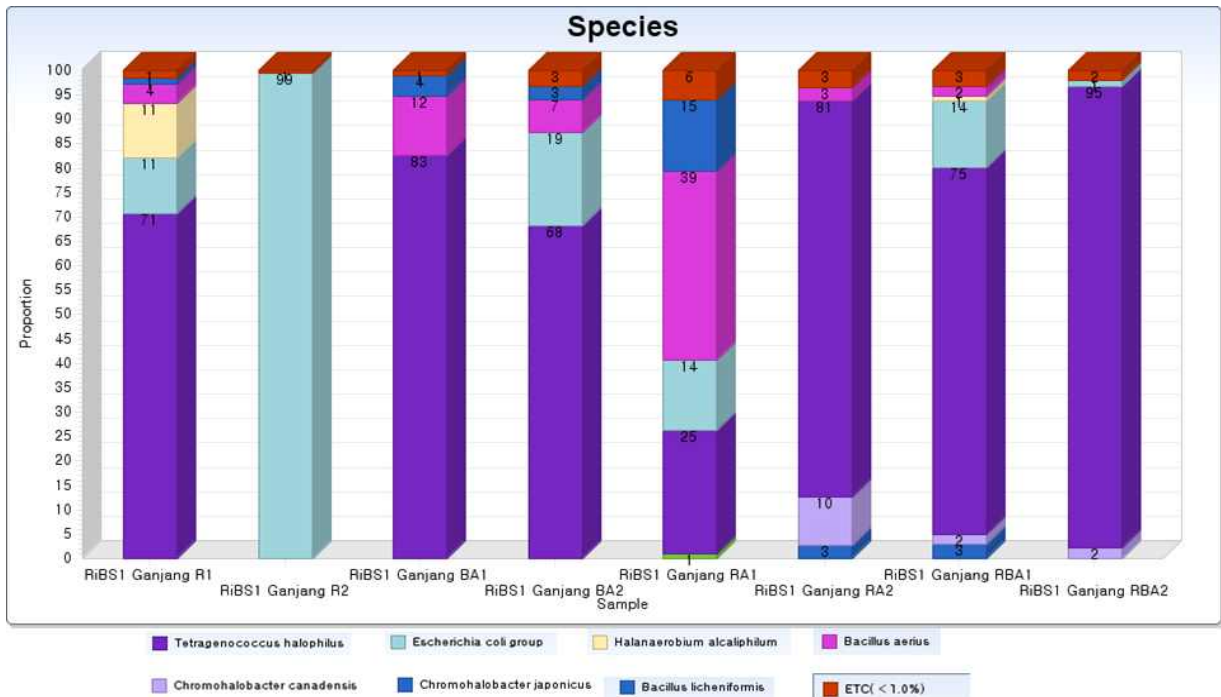


그림 8. Pyrosequencing을 이용한 RiBS1 간장 발효 중 미생물 군집분석 R, RiBS1 첨가; BA, *B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae*; RA, RiBS1 + *Asp. oryzae*; RBA, RiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae*). 1은 0주차 2는 12주차 샘플

- RiBS1을 이용한 간장 샘플에서는 주 발효균으로 *Tetragenococcus halophilus*, *E. coli* group, *Halanaerobium alcaliphilum*, *B. aerius*로 발견되었고 발효가 진행됨에 따라 미생물 군집의 변화는 있었지만 일정한 패턴을 보이지는 않았음(그림8)
- R처리군에서 발효후기에 주 발효균으로 *E. coli* group이 차지함(그림8)
- BA처리군에서는 발효가 진행됨에 따라 주 발효균인 *Tetragenococcus halophilus*가 소폭 감소하였고 *E. coli* group이 19% 증가함(그림8)
- RA처리군에서는 발효초기에 주 발효균이 *B. aerius*, *Tetragenococcus halophilus*, *B. licheniformis*, *E. coli* group였는데 발효후기에는 주 발효균으로 *Tetragenococcus halophilus*균이 차지하였고 *Chromohalobacter canadensis* 10%, *Chromohalobacter japonicus* 3%가 분석됨. (그림8)
- 전체적으로 RiBS1을 이용한 간장 샘플에서는 BA처리군을 제외한 나머지 처리군에서 ETC%(1% 미만의 균들)가 발효가 진행됨에 따라 비율이 감소하므로 미생물 군집이

단순화되었다는 것을 나타냄(그림8)

나. ORiBS1 실험결과

(1) 유기농 볏짚을 이용한 ORiBS1의 개발 및 특성분석

○ 유기농 볏짚을 이용한 ORiBS1의 개발(그림 9)

- 순창 지역 유기농 볏짚 수집
- 볏짚 10g과 5% ground bean broth (GBB)와 함께 섞고, 박테리오파지 BCP8-2(10^7 PFU/ml)을 매 2시간마다 넣고 총 10시간 배양(P1)
- P2에서 P6를 만들기 위해 1% inoculum을 GBB에 넣고 10시간 배양
- 각 passage마다 total bacterial counts와 *B. cereus* counts를 확인
- 전체적으로 박테리오파지 처리군과 미처리군에서 total bacterial counts는 10^9 CFU/ml 수준을 유지했으며 처리군과 미처리군 사이에 차이는 없었음
- *B. cereus* counts는 미처리군의 경우 10^6 CFU/ml 이상으로 존재하였으나, 박테리오파지 처리군의 경우 P2에서 “not detectable”(10¹ CFU/ml) 수준으로 감소
- *B. cereus*의 경우 passage가 지남에 따라 지속적으로 발견되지 않음

○ ORiBS1의 passage에 따른 microflora의 분석(그림 10)

- ORiBS1를 P1에서 P6까지 생산
- 16S rDNA sequence를 기반으로 한 microflora를 DGGE를 통해 분석
- 박테리오파지를 처리군과 비처리군들은 passage에 관계없이 매우 유사한 banding pattern을 보임
- 박테리오파지 처리군과 비처리군에서 모두 P4에서부터 microflora가 안정화 됨을 확인할 수 있었음

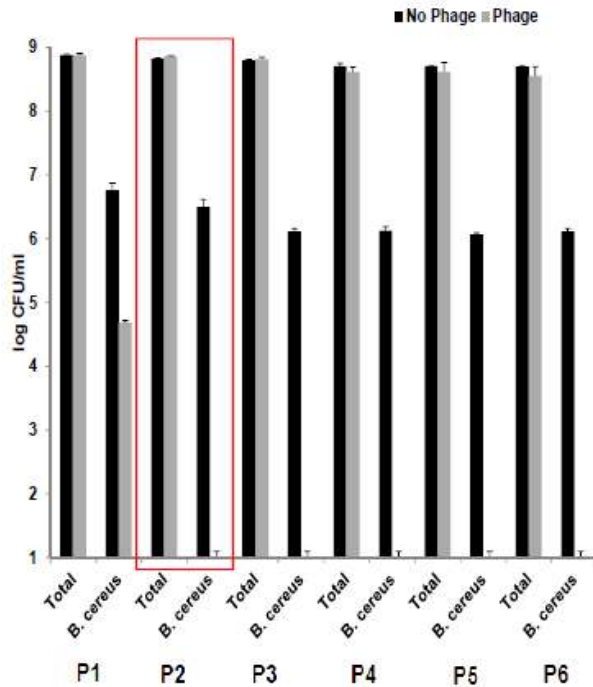


그림 9. 박테리오파지 BCP8-2를 이용한 유기농 볏짚 유래 *B. cereus* free starter culture (ORiBS1)의 개발

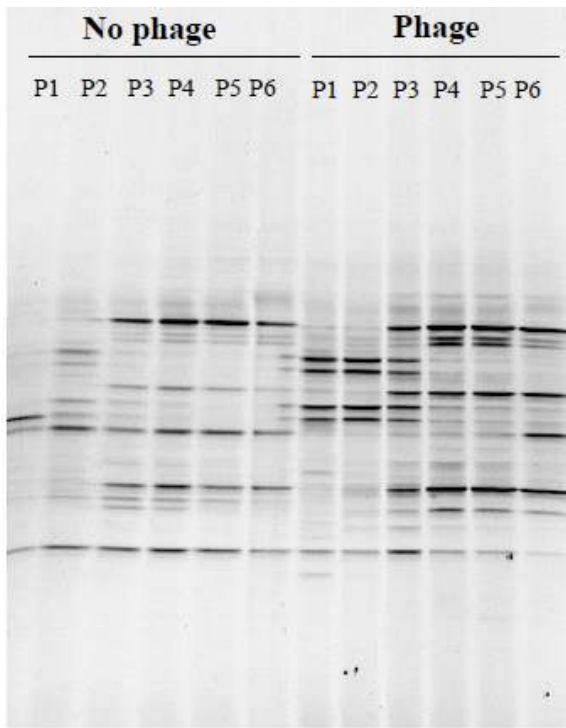


그림 10. ORiBS1의 passage에 따른 microflora의 DGGE 분석

(2) 순창지역 볏짚 유래 ORiBS1의 대량생산 및 순창장류회사에 공급

- 배양 volume과 inocula에 따른 ORiBS1 P6의 total bacterial counts 및 *B. cereus* counts
 - RiBS1과 마찬가지로 ORiBS1을 이용한 다양한 장류 식품의 개발을 위해서는 대량생산 시 품질특성유지가 중요
 - RiBS1 starter culture과 같은 조건으로 ORiBS1 starter culture의 대량생산 시 특성분석

- 을 위해 다양한 volume과 0.1% 또는 1% inoculum 조건을 이용하여 P6를 생산
- ORiBS1 P5를 이용해 생산된 ORiBS1 P6의 경우 평균 4.6×10^7 CFU/ml 정도의 total CFU count를 나타내었음(그림 11)
- RiBS1의 경우(약 10^9)와는 다르게 ORiBS1의 total bacterial count가 10^7 으로 상대적으로 적게 나옴(그림 11)
- 다양한 volume과 inocula에 따른 total bacterial count의 큰 변화는 없었음
- 이러한 결과들을 통해 ORiBS1도 RiBS1과 마찬가지로 배양 volume과 inoculum은 total bacterial count에 영향이 없음을 확인

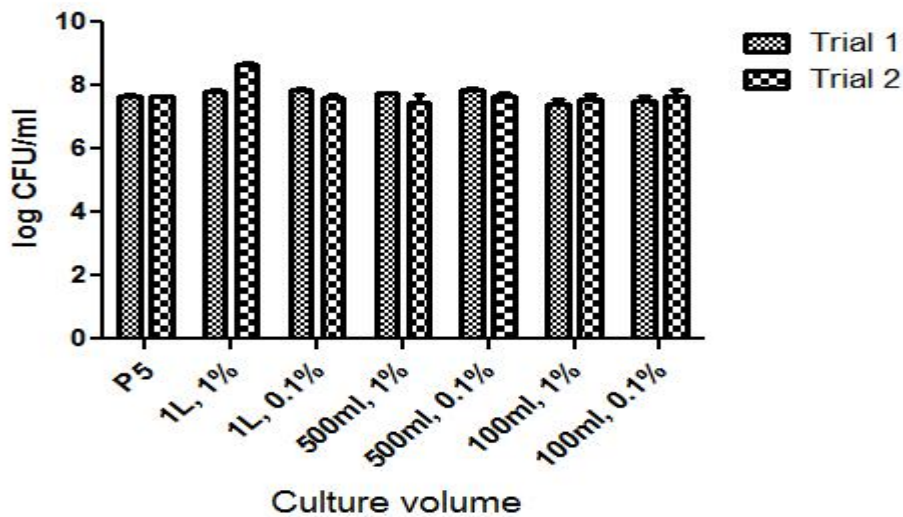


그림 11. 다양한 volume과 inocula에 따른 ORiBS1 starter culture의 total bacterial counts

- 다양한 volume 및 inoculum으로 증식된 ORiBS1 P5의 경우, 모든 샘플에서 *B. cereus*는 검출되지 않았음(detection limit, 10^1 CFU/ml) (표 2)

표 2. 다양한 volume에서 증식한 ORiBS1 P5의 *B. cereus* counts

	Trial 1(CFU/ml)	Trial 2 (CFU/ml)
10ml	0	0
100ml	0	0
500ml	0	0
1000ml	0	0

○ ORiBS1 P6를 이용한 청국장 제조(그림 12)

- ORiBS1 P6 0.1% 및 1.0%를 이용하여 청국장 제조(50도에서 24, 48, 72시간 배양)
- 50도의 배양조건에서 시간이 지남에 따라 exopolysaccharide의 양이 증가함을 육안으로 확인 할 수 있었음



그림 12. ORiBS1 P6 1%를 이용한 청국장 제조. (A) 24시간, 50도; (B) 48시간, 50도; (C) 72시간, 50도.

(3) ORiBS1을 이용한 메주, 된장, 간장 제품의 미생물 군집 분석

○ ORiBS1을 이용한 메주 제품의 미생물 군집 분석

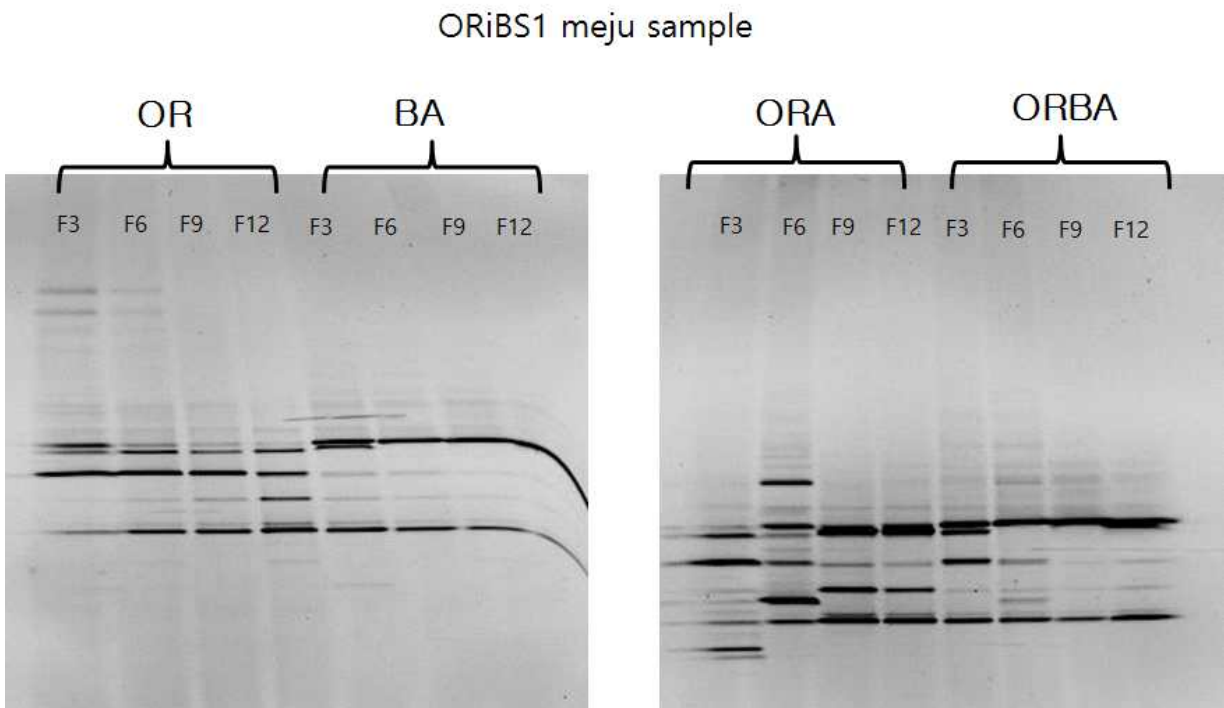


그림 13. OR only, add ORiBS1; BA, *B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae*; ORA, ORiBS1 + *Asp. oryzae*; ORBA, ORiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae*. 3day(F3), 6day(F6), 9day(F9) and 12day(F12)

○ DGGE를 이용한 ORiBS1 메주의 발효 중 미생물 군집분석

- (ORiBS1 "OR"), (*B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae* "BA"), (ORiBS1 + *Asp. oryzae* "ORA"), (ORiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae* "ORBA")
- 12일 동안 발효
- 3일(F3), 6일(F6), 9일(F9) 및 12일차(F12) 메주들을 샘플링

- ORiBS1을 이용하여 만든 메주에서도 발효초기와 발효말기에 관계없이 DGGE에서 비슷한 banding pattern을 보여줌(그림13)
- 메주는 된장, 간장과 달리 발효기간이 상대적으로 짧으므로 발효초기와 발효후기의 banding pattern이 비슷하게 나온 것으로 사료됨

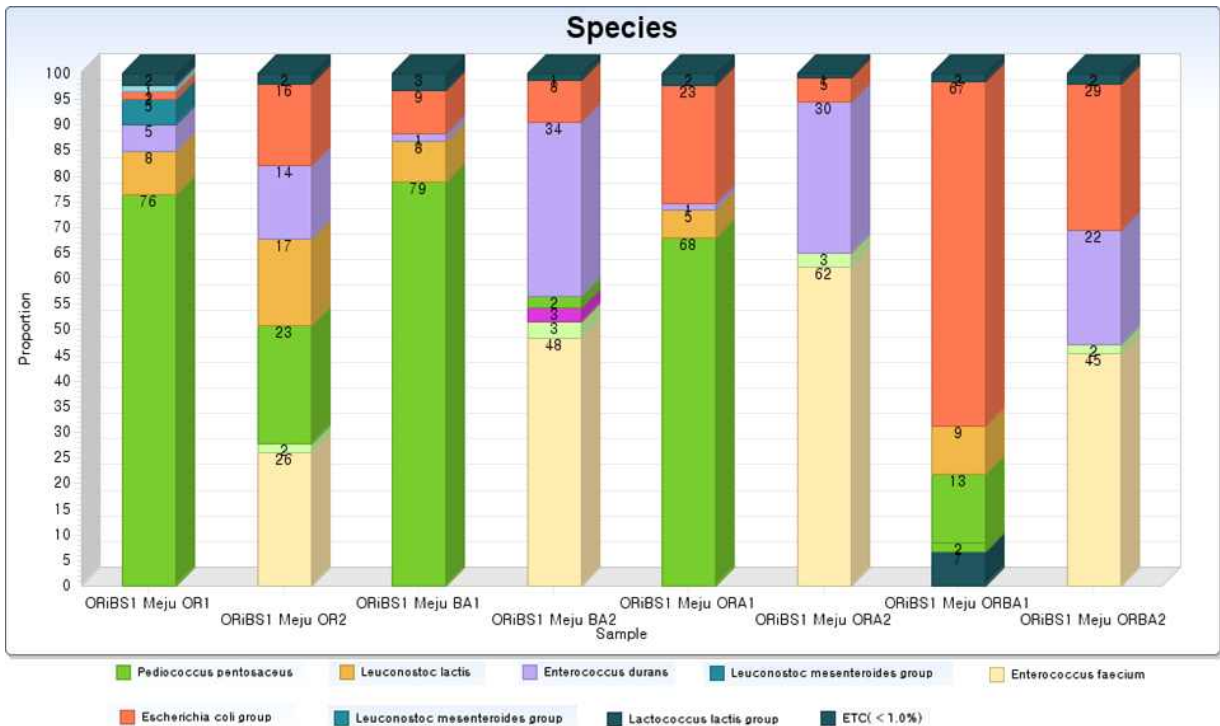


그림 14. Pyrosequencing을 이용한 ORiBS1 메주 발효 중 미생물 군집분석 OR, add ORiBS1; BA, *B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae*; ORA, ORiBS1 + *Asp. oryzae*; ORBA, ORiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae*). 1은 3일차 2는 12일차 샘플

- ORiBS1을 이용한 메주 샘플에서는 발효초기의 주 발효균이 *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc lactis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* group으로 분석됨
- 발효초기의 메주 샘플에서는 주 발효균이 *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc lactis*, *E. coli* group으로 나왔고 발효후기의 메주 샘플에서는 주 발효균이 *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* group으로 나왔음(그림14)
- ORiBS1만 처리한 발효초기의 샘플에서만 *Leuconostoc mesenteroides* group이 분석되었고 발효가 진행됨에 따라 초기의 주 발효균인 *Pediococcus pentosaceus* 비율이 감소하였고 다른 주 발효균인 *Leuconostoc lactis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* group이 소폭 증가함(그림14)
- BA처리군에서는 발효가 진행됨에 따라 초기의 주 발효균인 *Pediococcus pentosaceus*가 감소하였고 발효후기에는 *Enterococcus* 속이 주 발효균으로 증가함(그림14)
- ORA처리군에서도 BA처리군과 비슷한 미생물 군집분석을 나타냄(그림14)

- ORBA처리군에서는 발효가 진행됨에 따라 초기의 주 발효균이 *E. coli* group이 감소하였고 Enterococcus 속이 주 발효균으로 증가하였음(그림14)
- ORiBS1을 이용한 메주 샘플들 중 ORBA처리군의 발효후기에서만 *Lactococcus lactis* group이 발견됨(그림14)

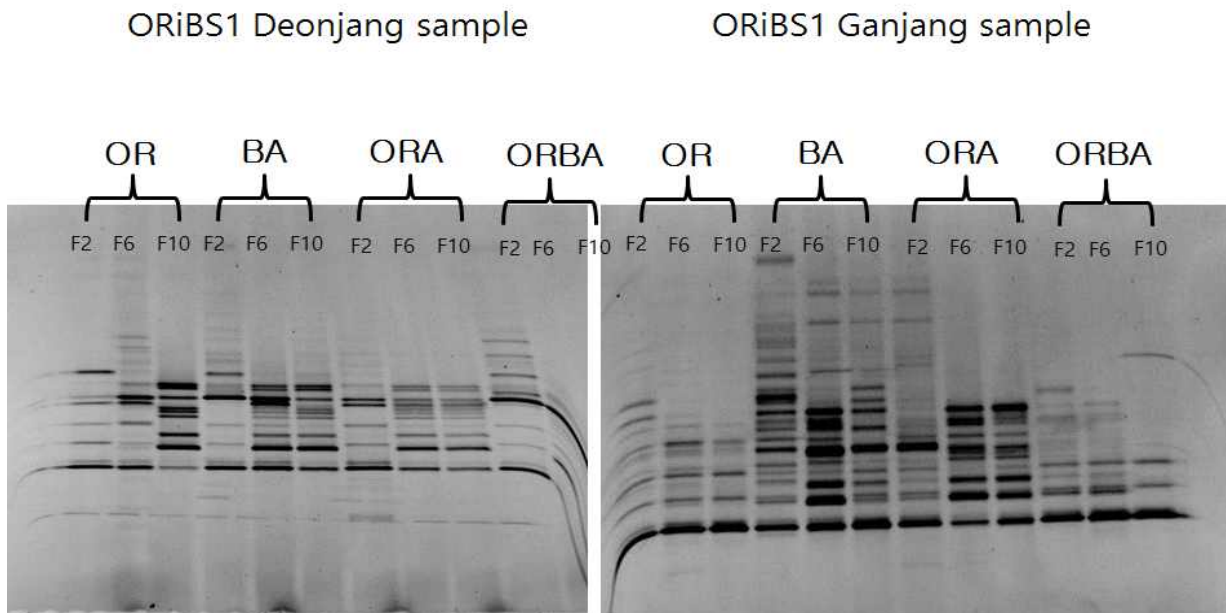


그림 15. OR, add ORiBS1; BA, *B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae*; ORA, ORiBS1 + *Asp. oryzae*; ORBA, ORiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae*. 2week(F2), 6week(F6) and 10week(F10)

- ORiBS1을 이용한 된장, 간장 제품의 DGGE 분석 결과, ORiBS1을 첨가하지 않은 BA 처리군의 경우 ORiBS1을 첨가한 다른 처리군과 다르게 더 다양한 banding pattern을 볼 수 있음(그림15)

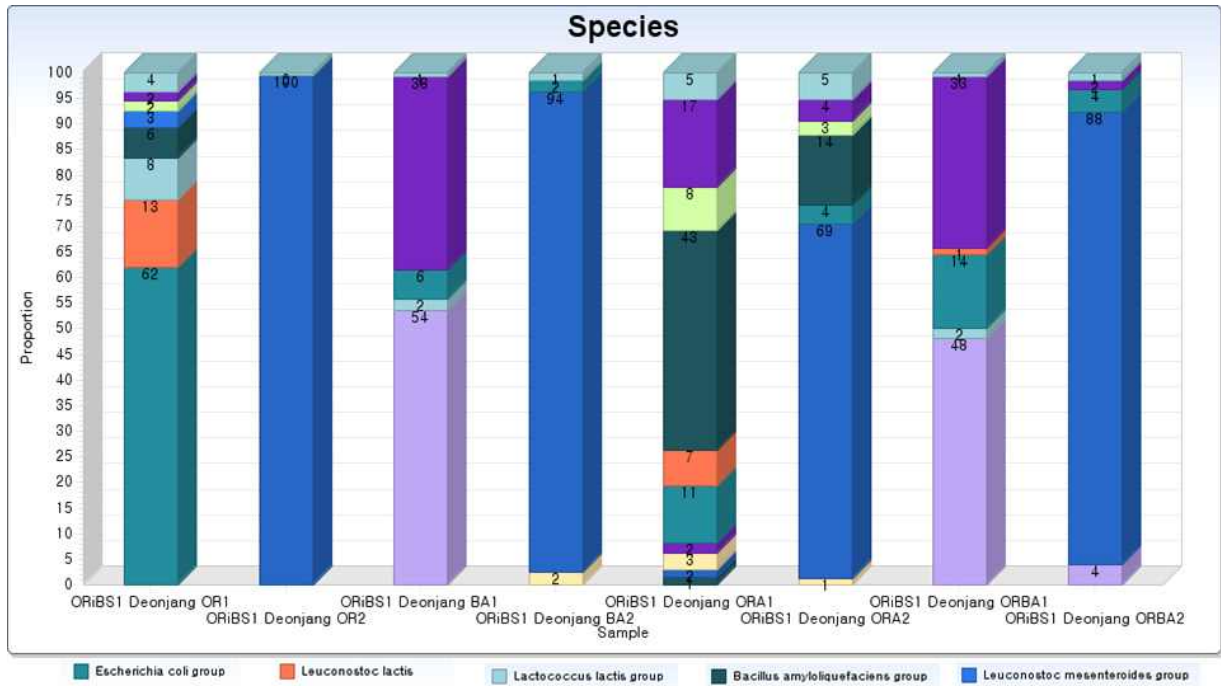


그림 16. Pyrosequencing을 이용한 ORiBS1 된장 발효 중 미생물 군집분석 OR, add ORiBS1; BA, *B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae*; ORA, ORiBS1 + *Asp. oryzae*; ORBA, ORiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae*). 1은 0주차 2는 10주차 샘플

- ORiBS1을 이용한 된장 샘플에서는 주 발효균이 *E. coli group*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis group*, *Bacillus amyloliquefaciens group*, *Tetragenococcus halophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*으로 분석되었고 발효가 진행됨에 따라 미생물 군집이 단순화되는 것을 볼 수 있음(그림16)
- ORiBS1만 첨가한 샘플에서는 발효가 진행됨에 따라 초기의 주 발효균인 *E. coli group*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis group*, *Bacillus amyloliquefaciens group*이 감소하고 발효후기에는 *Tetragenococcus halophilus*균만 분석됨(그림16)
- BA처리균에서는 발효가 진행됨에 따라 초기의 주 발효균인 *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* 중 *Enterococcus faecium*가 감소하고 *Enterococcus durans*이 발효후기의 주 발효균으로 존재함(그림16)
- ORA처리균은 OR처리균과 비슷한 미생물군집 분석을 보이나 *Bacillus amyloliquefaciens group*의 군집비율이 좀 더 높게 나옴(그림16)
- ORBA처리균도 BA처리균과 비슷한 미생물 군집분석을 나타냄(그림16)

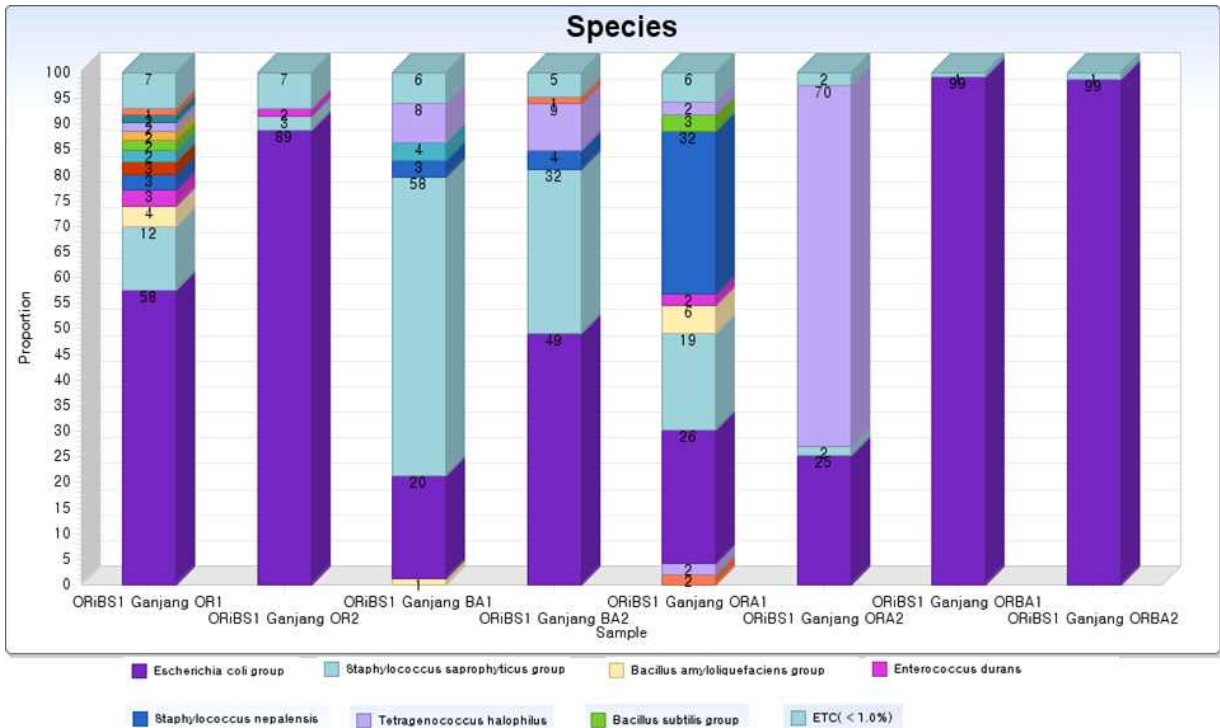


그림 17. Pyrosequencing을 이용한 ORiBS1 간장 발효 중 미생물 군집분석 OR, add ORiBS1; BA, *B. licheniformis* + *Aspergillus oryzae*; ORA, ORiBS1 + *Asp. oryzae*; ORBA, ORiBS1 + *B. licheniformis* + *Asp. oryzae*). 1은 0주차 2는 10주차 샘플

- ORiBS1을 이용한 간장 샘플에서는 주 발효균이 *E. coli* group, *Staphylococcus saprophyticus* group, *Bacillus amyloliquefaciens* group, *Staphylococcus nepalensis*, *Tetragenococcus halophilus*으로 분석되었고 전체적으로 *E. coli* group의 군집비율이 높았음(그림17)
- OR처리군에서는 발효가 진행됨에 따라 주 발효균인 *E. coli* group이 증가하였고 전체적으로 미생물 군집이 단순화됨(그림17)
- BA처리군에서는 발효가 진행됨에 따라 주 발효균인 *E. coli* group은 증가하였고 *Staphylococcus saprophyticus* group은 감소함(그림17)
- ORA처리군에서는 발효가 진행됨에 따라 주 발효균인 *Staphylococcus saprophyticus* group과 *Staphylococcus nepalensis*가 감소하였고 *Tetragenococcus halophilus*균이 증가함(그림17)
- ORBA처리군에서는 발효기간에 관계없이 *E. coli* group이 주 발효균으로 분석됨(그림17)

다. *B. cereus*를 사멸시키는 박테리오파지의 분리

(1) *B. cereus* specific 박테리오파지의 분리

- 다양한 장류 샘플과 순창지역 벚짚 등의 수거
- 다양한 *B. cereus* reference strain들을 이용한 박테리오파지 분리
- 장류 샘플로부터 BCP25의 분리
- 벚짚 샘플들로부터 RS1-1의 분리
- *B. cereus* JCM2152을 propagation strain으로 이용하여 Single plaque isolation과 plate elution 및 filter sterilization 수행

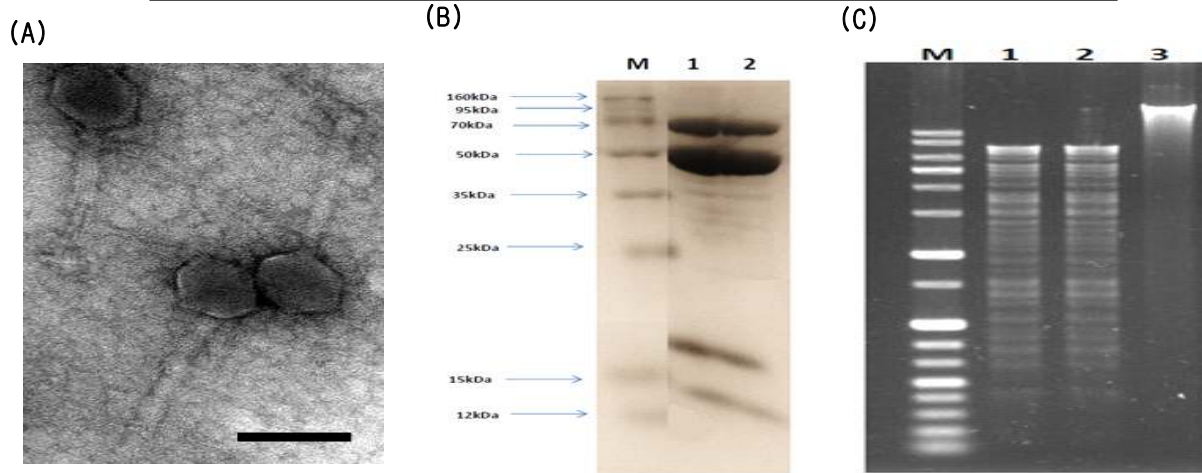
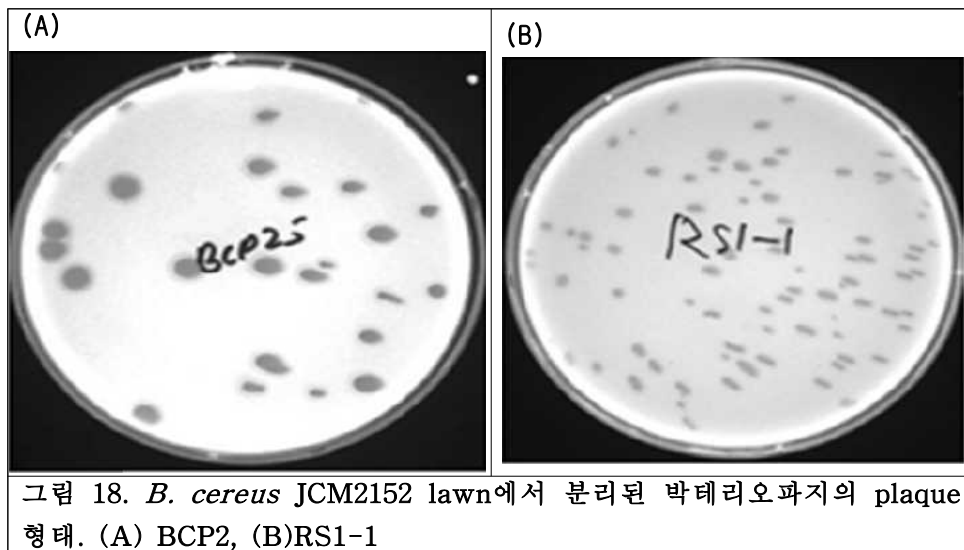


그림 19. BCP25의 TEM(A), SDS PAGE(B) 및 restriction enzyme digestion pattern analysis(C)

(2) 분리된 박테리오파지의 특성분석

- BCP25와 RS1-1의 host range를 분석한 결과 *B. cereus* group spp. (9/12) (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. weihenstephanensis*)를 사멸시킬수 있었음.(표 3)
- *B. cereus* groups spp. 이외에도 *B. megaterium*과 *B. licheniformis*를 사멸시킬수 있음(표 3)
- BCP25의 TEM 분석을 통해 BCP25가 myoviridae에 속함을 확인하였고, SDS PAGE를 통한 구조단백질 분석결과 13, 17, 50, 70 kDa의 주요 구조단백질을 확인하였음

표 3. BCP25와 RS1-1의 host spectrum 분석

Host	Bacteriophages	
	BCP 25	RS1-1
<i>Bacillus cereus</i>	3/5	3/5
<i>Bacillus thuringiensis</i>	4/4	4/4
<i>Bacillus subtilis</i>	0/8	0/8
<i>Bacillus sphaericus</i>	0/1	0/1
<i>Bacillus pumilus</i>	0/1	0/1
<i>Bacillus megaterium</i>	1/1	1/1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1/2	1/2
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	1/1	1/1
<i>Bacillus mycooides</i>	1/2	1/2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0/2	0/2
<i>Listeria monocytogenes</i>	0/1	0/1
<i>Escherichia coli</i>	0/1	0/1
<i>Salmonella typhimurium</i>	0/2	0/1
<i>Cronobacter sakazakii</i>	0/2	0/2

- 벧짚에서 분리한 RS 1-1 phage와 장류로부터 분리한 BCP25 phage의 특성을 분석하기 host 균주인 *B. cereus* JCM2152을 사용하여 Inhibition of *B. cereus* growth in Liquid culture 실험을 진행함.
- RS 1-1과 BCP25의 host 균주인 *B. cereus* JCM2152 균을 TA broth에 접종한 뒤 약 3 시간 후(균이 10^7 에 도달함)에 파지를 다양한 MOI로 접종 후 OD를 측정함

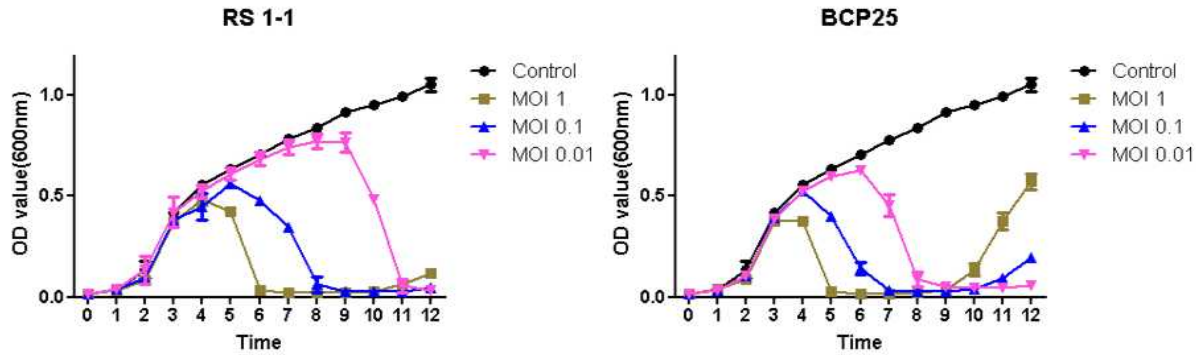


그림 20. RS1-1과 BCP25 파지의 Inhibition of *B. cereus* growth in Liquid culture experiment

- 실험결과에서도 알 수 있듯이 MOI가 높을수록 시간이 지남에 따라 OD값이 급격이 떨어짐(그림21)
- BCP25 파지의 경우 상대적으로 RS1-1 파지보다 더 빠른 cell lysis를 보였음(그림20)
- MOI=0.01에서 상대적으로 빠른 cell lysis 보였던 BCP25 파지에서는 시간이 지남에 따라 균수가 다시 증가하는 것을 볼 수 있지만 RS1-1에서는 보이지 않음(그림20)
- cell lysis가 빠를수록 균의 재성장이 빨리 측정됨

○ RS1-1과 BCP25 파지의 특성분석을 위한 Adsorption study

- 몇 분이 지난 뒤에 파지가 가장 많이 균에 흡착했는지 관찰하는 실험으로 상대적인 값으로 표현이 가능함
- 일정균량에 도달한 균에 파지를 접종한 후 원심분리 후 매 분마다 상층액을 취해 PFU counting 진행하여 free phage의 비율을 측정함

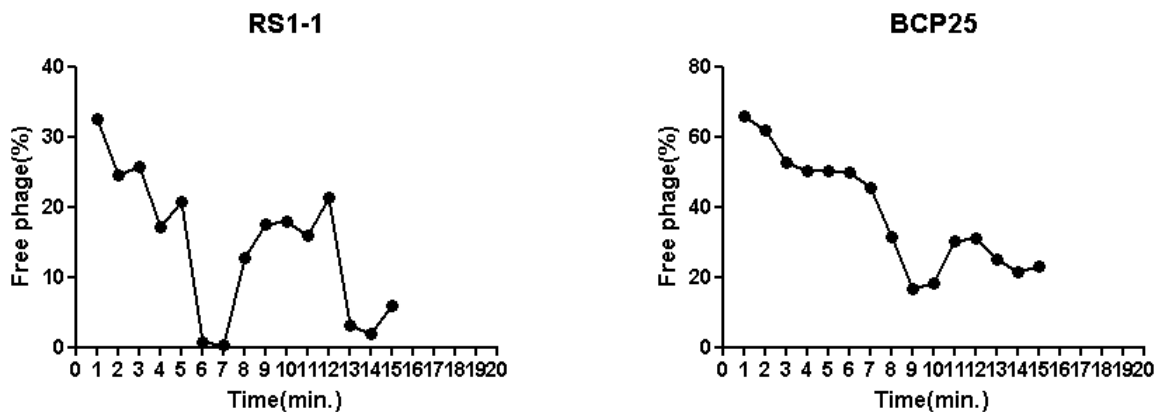


그림 21. RS1-1과 BCP25 파지의 Adsorption study

- RS1-1 파지의 경우 약 6분 후 free phage의 비율이 가장 낮았고, BCP25 파지의 경우 약 9분 후 free phage의 비율이 가장 낮았음(그림21)

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	볍짚 유래 <i>Bacillus cereus</i> free starter culture의 개발 및 scale up	<ul style="list-style-type: none"> 순창 지역 볅짚 유래 RiBS1과 ORiBS1의 개발 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 볍짚 유래 <i>B. cereus</i> free starter culture(Rice straw Based Starter, RiBS1)의 개발 순창 지역의 유기농 볅짚 유래 <i>B. cereus</i> free starter culture (ORiBS1)의 개발
		<ul style="list-style-type: none"> RiBS1의 대량생산 및 순창 장류주식회사에 공급 	100%	-RiBS1의 대량생산과 순창 장류주식회사에 공급
		<ul style="list-style-type: none"> RiBS1 이용 생산 제품의 microflora 분석 	100%	-RiBS1 메주의 발효 중 미생물 균집 분석
		<ul style="list-style-type: none"> 새로운 박테리오파지의 분리 	100%	-새로운 특성을 가지는 <i>B. cereus</i> specific 박테리오파지 2종의 분리
2차 년도 (2014)	볍짚 유래 <i>Bacillus cereus</i> free starter culture의 개발 및 scale up	<ul style="list-style-type: none"> ORiBS1의 대량생산 및 순창 장류주식회사에 공급 	100%	<ul style="list-style-type: none"> ORiBS1의 특성분석 볍짚 유래 ORiBS1의 대량 생산기술 개발
		<ul style="list-style-type: none"> RiBS1과 ORiBS1 이용 생산 제품의 microflora 분석 	100%	<ul style="list-style-type: none"> RiBS1 된장 및 간장의 발효 중 미생물 균집 분석 ORiBS1 메주, 된장 및 간장의 발효 중 미생물 균집 분석
		<ul style="list-style-type: none"> 분리된 박테리오파지의 특성 분석 	100%	-RS1-1과 BCP25 파지의 특성 분석

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절 연구개발 성과

1. 논문

계제연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	단일박테리오파지를 이용한 벧짚유래 <i>Bacillus cereus</i> free 스타터 컬처의 개발	나디카 반다라	김광표	정서진, 정도연	한국식품 과학회지	46(1), 1-6	국내	비SCI

2. 유전자원등록

- JBP901 whole genome sequence (GenBank Accession Number : KJ676859)

3. 특허등록

- 박테리오파지를 이용한 유해세균이 제거된 전통 발효식품용 스타터 컬처의 제조 방법 (특허등록번호 : 10-1443141, 2014.09.16)

2절 성과활용 계획

- 본 연구는 본래 3년 이상을 위한 과제로 기획되었으며, 전국의 벧짚을 대상으로 연구를 진행하고, 이렇게 만들어진 RiBS 및 이를 이용한 제품들의 특성분석이 목표였음
- 과제발표평가위원들은 순창지역 벧짚을 대상으로 2년 연구를 진행해 보고, 전국으로 확대하는 것이 좋겠다는 의견이었음
- 이에 따라, 본 연구의 성공적 수행을 바탕으로 전국의 벧짚을 대상으로 다양한 특성의 RiBS를 또는 ORiBS를 생산하고 이를 이용한 제품들의 개발을 위한 추가연구를 진행할 예정임

**제2협동 : 위해미생물 및 제품품질특성분석과 개발된
B. cereus free starter의 장기보존 기술 개발**

협동연구기관명 : (재)발효미생물산업진흥원

협동연구책임자 : 정 도 연

제1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 목적

B. cereus free starter와 이를 이용하여 제조한 메주, 청국장, 간장 및 된장의 위해미생물 및 제품의 품질특성을 분석하여 제품적용에 적합 여부 판단하고, 개발된 벧짚 유래 *B. cereus* free starter의 장기보존 기술을 개발하고자 함.

2절 연구개발의 필요성

1. 전통장류의 안전관리

- 장류는 한국인의 식탁에 필수적인 부식으로서 위생 안전성 확보는 무엇보다도 중요한 과제임
- 장류에서 미생물에 의한 식품 안전을 좌우 하는 3가지 주요 인자는 *Bacillus cereus* 증식에 의한 장독소, *Aspergillus flavus* 등에 의한 aflatoxin, 발효 미생물들에 의한 biogenic amine이 대표적임
- 그러나 HACCP (Hazard Analysis & Critical Control Point) 인증을 받기 어려운 영세 전통장류 공장들은 시설의 현대화와 제조 공법의 혁신적인 전환 없이는 현실적으로 이러한 요구에 부응할 수 없으며, 현재 전통 장류 제조회사들은 전통방식의 제조 공법을 유지함으로써 제조 특성 상 품질 제어를 위한 위생 기준도 표준화하지 못하고 있음
- 이러한 이유 때문에 풍미는 좋으나 식품 의약품 안전청의 미생물 규격기준에 미치지 못하는 것이 많으며, 품질 균일화가 되지 못해 저장 및 생산 기간에 따라 발효 미생물들의 균주 특성이나 종류가 달라 항상 위생학적인 위험성을 지니고 있음

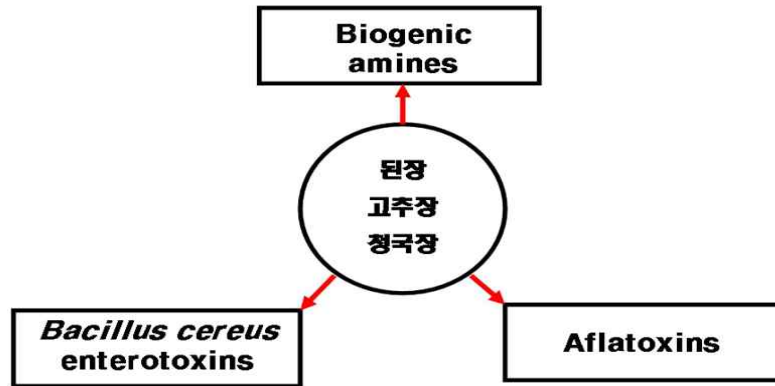


그림 1. 식품안전성에 중요한 영향을 미치는 3인자

- 식품위생법 식품의 기준 및 규격 전문의 장류 미생물 기준규격에 의하면 장류식품에서 유해미생물인 *Bacillus cereus* 균의 경우 10^4 log cfu/g 이하로 제한하고 있음
- 국내에서 유통되는 전통장류 제품에서 *B. cereus* 균주가 일부(거의 대부분) 제품에서 10^5 log cfu/g 정도 또는 그 이상의 경우도 발견되고 있음
 - ⇒ 국제화 시대에 우리나라 전통 발효식품을 수출하려면 국제화에 필요한 미생물관리가 필수적임
- 특히 구토형 독소를 가지는 *B. cereus*가 식품에서 주로 문제가 되며, 노천 또는 개방형 발효조건에서 장류의 주원료인 메주가 발효되기 때문에 토양이나 공기를 통한 오염에 쉽게 노출됨
- 비록 메주자체로는 식품공전 상 규격기준에 해당하지 않으나 *Bacillus*속의 특성 상 염수침지 상태나 된장, 간장 숙성 중에 사멸되지 않거나 성장하여 완제품에 영향을 미칠 수 있으므로 이에 대한 관리가 필요함

표1. *Bacillus cereus* 독소의 특성

	설사형	구도형
감염량	10 ⁵ -10 ⁷ (전체)	10 ⁵ -10 ⁸ (cfu/g)
독소의 생성	인체의 소장	식품에서 생성
독소의 종류	Protein	Cyclic peptide
잠복기	8-16 hr (때때로 24 hr 이상)	0.5-5 hr
발병 기간	12-24 hr (때때로 며칠을 가는 경우도 있음)	6-24 hr
증상	비정상적 통증, 설사 및 어지럼증 동반	어지럼증, 구토 및 불쾌감 (때때로 설사를 동반하기도 함)
원인식품	고기류, 스프류, 채소류, 푸딩/소스류 등	볶음밥 같은 밥 종류, 빵과 면 종류

표2. 식품공전의 장류에 대한 기준 규격

구분	관리항목	관리기준
개별규격	총 질소(w/v%)	0.8 이상(간장에 한하며, 한식간장은 0.7 이상)
	타르색소	검출되어서는 아니된다
	총 아플라톡신(ug/kg)	15 이하(B1, B2, G1 및 G2의 합으로서, 단 B1은 10 ug/kg 이하이어야 하며, 메주에 한함)
	대장균군	음성[혼합장(살균제품)에 한한다]
	보존료 (g/kg 다만, 간장은 g/L)	세부기준 참조
공통규격	이물	금속성 이물로서 쇧가루는 제 10. 7. 1) (5) 금속성이 물시험법에 따라 시험하였을 때 식품중 10.0 mg/kg 이상 검출되어서는 아니되며, 또한 크기가 2.0 mm 이상인 금속성 이물이 검출되어서는 아니된다.
	<i>B. cereus</i>	10 ⁴ log cfu/g (g 당 10,000 이하) 단, 멸균제품은 음성이어야 한다. 메주 제외
	<i>Cl. perfringens</i>	10 ² log cfu/g (g 당 100 이하) 단, 멸균제품은 음성이어야 한다, 메주 제외
	살모넬라, 황색포도상구균, 장염비브리오균, 리스테리아 모노사이토제네스, 대장균 O157:H7, 캄필로박터 제주니, 여시니아 엔테로콜리티카 등	불검출 (단, 살균 또는 멸균처리하였거나 더 이상의 가공, 가열조리를 하지 않고 그대로 섭취하는 가공식품)

○ 아래 표와 같이 장류제품을 수거하여 위해미생물을 모니터링한 결과 *B. cereus*가 주로 검출되었음

표3. 장류 제품 중 위해미생물 분포 및 위해도(식중독균 분포도 조사 및 위해도 평가, 식약청, 2005)

식품명	건수	조사 결과		
		미생물	검출	검출수준
된장	124건	<i>B. cereus</i>	33건(26.6%)	< 10 ~ 1.1×10 ⁸
		<i>S. aureus</i>	1건(0.8%)	2.5×10 ⁵
고추장	78건	<i>B. cereus</i>	19건(24.4%)	< 10 ~ 3.2×10 ⁵
		<i>Cl. perfringens</i>	7건(9.0%)	< 10 ~ 500
춘장	10건	<i>B. cereus</i>	4건(40.0%)	100 ~ 3.2×10 ³
청국장	37건	<i>B. cereus</i>	1건(2.7%)	10,000
		<i>E. coli</i>	3건(8.1%)	< 10 ~ 220
혼합장	88건	<i>B. cereus</i>	25건(28.4%)	< 10 ~ 3.8×10 ⁸
		<i>Cl. perfringens</i>	1건(1.1%)	500

○ 미국 CFSAN, 캐나다 Government of Canada Laboratory Procedure
: 식품 중 10⁶ cfu/g 이상 증식, 생성 enterotoxin 섭취시 위협할 수 있다고 평가

○ 미국 USDA/FSIS Microbiology Lab. Guide Book : 10⁵ cfu/g 이상인 경우 위협할 수 있다고 평가

○ Food Standards Australia, New Zealand(2003) : 설사발생 *B. cereus* 농도를 1.2×10³~10⁸ cfu/g 결정

2. 전통장류의 미생물학적 분석

○ 청국장 19개의 미생물학적 특성을 분석한 결과 살모넬라, 리스테리아, 비브리오, 포도상구균은 검출되지 않았으며, 대장균은 9개 업체에서 검출되었고, *B. cereus*는 15개 업체에서 검출되어 그 범위는 0~log₁₀ 3.98 CFU/g로 평균 log₁₀ 1.03 CFU/g을 나타냄

○ 일반세균수는 log₁₀ 9.25~log₁₀ 11.27 CFU/g로 평균 log₁₀ 10.30 CFU/g을 나타냈다. 청국장 제조시 많이 이용되고 있는 벧짚의 *B. cereus*는 log₁₀ 3.53 CFU/g (3,400 CFU/g)을 나타냄

○ 대략적으로나마 발효미생물 기원에 따른 청국장 발효기간 중 *Bacillus cereus* 변화를 알아보기 위해 실험한 결과, 분리균주를 접종한 청국장에서는 *B. cereus* 가 검출되지 않았으며, 벧짚을 이용하여 제조한 청국장에서는 48 시간대에 4.7×10³ CFU/g이 검출되었음

○ 비록 장류 바실러스 세레우스 기준 규격인 10⁴ CFU/g 이하의 숫자로 검출되었지만 관리가 필요하며, 적절한 균주관리를 통해 장류를 제조하여야 할 것으로 사료됨

표4. 청국장 발효기간에 따른 *Bacillus cereus* 변화(단위: CFU/g)

구 분	0h	24h	48h
세척콩	1.6	-	-
증자콩	ND	-	-
rice straw(벼짚)	1.2×10^2	3.3×10^5	4.7×10^3
<i>B.licheniformis</i> 28	ND	ND	ND
<i>B.licheniformis</i> 48	ND	ND	ND
<i>B.licheniformis</i> 58	ND	ND	ND

○ 종 수준에서 벼짚의 *Bacillus* 군집분포를 보면 *B. siamensis*가 7.2 %(29위), *B. amyloliquefaciens* 1.8 %(65위) 이었으나, 메주에서는 이들의 세균군집비율이 각각 1, 2위로 올라갔고, 숙성 전후 과정을 거치면서 전체 군집의 1~5위까지 모두 *Bacillus*종들(전체군집분포의 92.2 %)이 차지

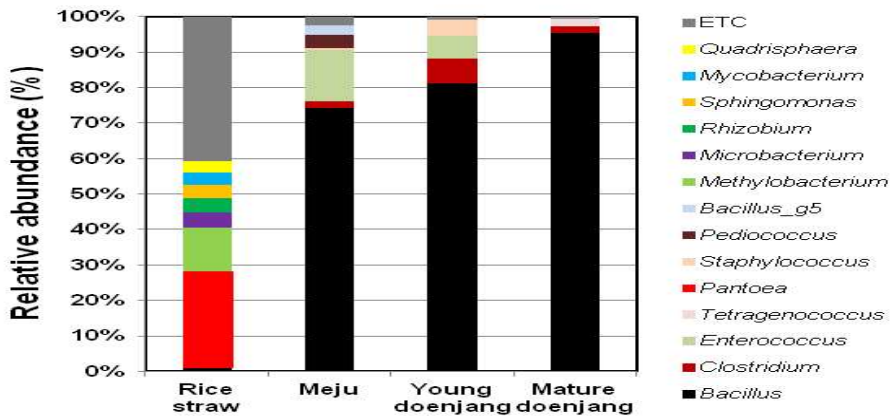


그림 2. 벼짚 및 메주, 된장 숙성 별 세균 분포

○ 이러한 관점에서 보면 전통장류에서 발효의 주 세균은 *Bacillus*종이며 이들은 기본적으로 벼짚으로부터 기원되었다고 추정할 수 있음

○ 따라서 풍미와 위생성이 동시에 요구되는 전통 장류의 제조를 위해서는 벼짚 표면에 이 기능을 가진 *Bacillus* 종들의 군집 분포가 필요할 것으로 예상됨

○ <표4>에서 제시된 자료와 같이 전통장류에서 *B. cereus*의 주 오염원인 벼짚에서부터 위해 미생물을 제어하는 기술이 필요하며, 이는 또한 벼짚과 동일한 starter를 개발하되 starter에는 *B. cereus*가 존재하지 않는 starter를 개발하여 활용한다면 전통방식을 이용한 전통장류의 제조가 가능하리라 판단됨

3. 전통장류의 위해미생물의 제어기술

○ 집단화, 대형화되는 식중독을 예방하기 위해서는 집단급식소의 위생관리 뿐만 아니라 식품 원료의 세척 살균 등 제어를 위한 처리가 중요

○ 전통적으로 가열 살균이 가장 효과적으로 저렴한 방법으로 많이 사용되어 왔으나, 최근 식품 구성성분의 변화를 최소화한 자연적이고 고품질의 식품에 대한 소비자들의 요구에 따라 최근 비가열 살균법이 각광 받고 있음

○ 전통식품에 대한 주변 국가들의 치열한 경쟁으로 국내 발효식품시장이 위협을 당하고 있으나 국내 업체의 영세성, 연구시설의 부재 등으로 경쟁력이 저하되고 있으므로 이에 대한 대책 마련이 필요함

○ 토양, 물 등 환경오염 증가로 우리 농산 식품소재에 세균오염도가 많이 높아지고 있으며, 전통장류의 주원료인 찹쌀, 고춧가루, 콩 등에서 많은 미생물 오염원이 있을 것으로 판단되지만 대부분 가공 중에 사멸하거나 그 수가 급격히 감소되나 *B. cereus*와 같은 포자형성균의 경우 사멸되지 않고 식품의 부패에 관여 식중독을 유발시키는 것으로 보고되고 있음

○ 따라서, 국민 다소비식품중의 하나이자 주변국가와의 치열한 시장경쟁을 벌이고 있는 전통장류 중 고추장과 된장을 중심으로 발효 및 숙성 중 식중독 미생물의 증식양상 및 위해정도를 규명하고 이에 대한 안전성품질기준확보 및 관리방안을 구축하는 것이 매우 필요함

○ 장류에서 위해미생물 제어의 문제점

- 장류에서 위해미생물로 인한 부패 또는 변패를 방지하기 위하여 살균·소독력을 갖는 다양한 화학 또는 천연물질들이 연구되고 있으며, 이를 바탕으로 항균제, 살균제, 소독제, 보존제, 기능성 세제 등의 화학적 제어법을 사용하고 있으나, 장류 성분의 변화 및 파괴를 초래하는 문제점이 있음
- 장류제품에서 위해미생물 제어방법의 한가지인 물리적 살균법(High voltage pulsed electric fields, 방사선조사, 자외선(UV), 초음파, 필터여과, 오존 등) 또한 장류 성분의 변화 및 파괴를 초래하는 문제점이 있음
- 위해미생물 물리적 저해기술 중 하나인 초음파는 열을 발생시키지 않아 영양성분을 유지하며, 저장성을 향상시키는 살균 보조기술로 활용되고 있으나, 장류 원료의 깊은 곳까지 도달 할 수 없는 단점이 있어, 미생물 저감화에 큰 도움은 주지 못함.
- 장류제품에 존재하는 위해미생물을 제어하기 위한 방사선 조사, 알코올 및 방부제 등의 화학 물질의 첨가, pasteurization과 같은 열처리, 마늘, 매실, 허브 등의 첨가, 제조 과정의

HACCP 시스템 도입들이 고려되었지만 빗짚 부착균과 공기 부유균을 발효에 사용하는 전통 장류의 제조 특성, 전통 장류가 가져야 하는 고유 풍미 유지, 영세 사업자들의 경제적 규모 등을 고려한다면 이들 모두 한계를 가지고 있음

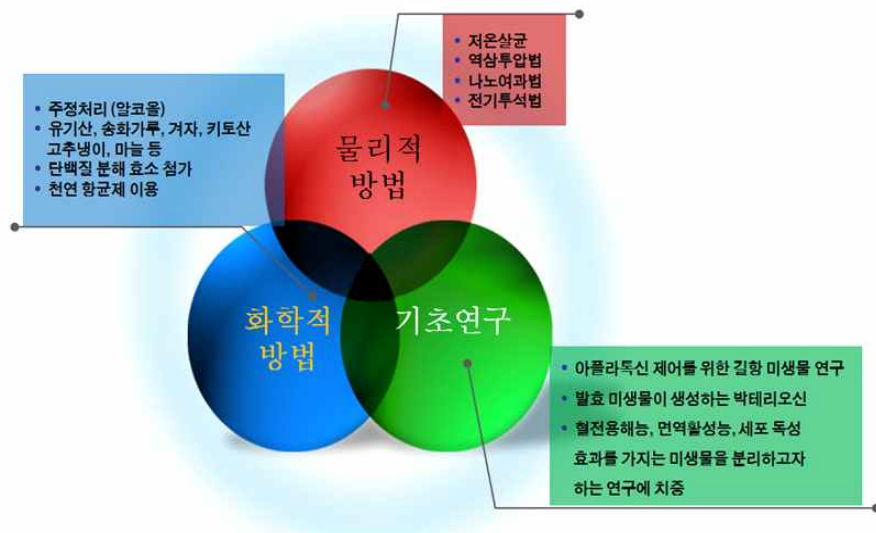


그림 3. 일본의 Soy food 세계화를 위한 미생물제어 및 발굴 연구 전략

○ 전통장류에서의 위해미생물 제어하기 위해 중요한 점은 ①전통 장류의 맛을 유지하면서도 ②위생상의 문제를 해결해야하는 문제가 있는데, 이 두 가지 고려 사항을 동시에 해결하기 위해서는 결국 발효와 숙성동안 이들 유해 미생물들을 제어할 수 있는 발효 균주의 개발이 필요한데, 이러한 선행연구 내용을 아래와 같음

- 발효 장류의 중요 발효균인 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* 등의 일부 균주들은 다양한 종류의 계면활성제나 향생물질을 생산하여 경쟁관계에 있는 주위 균들의 증식을 저해함(Yang and Chang, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007).
- *B. subtilis*의 bacitracin, surfactin, iturins, *B. licheniformis*의 lichenysin, lichenicidine 등은 펩타이드계 저분자 물질로서 항세균 또는 항진균 특성을 가지고 있음(Ryu 등, *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 2007; Jung 등, *J. Life Sci.*, 2009).
- 2010년 장류에서 분리한 한 *Bacillus licheniformis* 균주는 *Bacillus cereus* 뿐 아니라, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* 등과 같은 대장균군, *Staphylococcus aureus*, aflatoxin 생산균인 *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*에 대한 강력한 증식 억제 작용을 보였음(Kim 등, *Kor. J. Microbiol.*, 2010).
- 동물의 장에서 *Bacillus subtilis*와 *B. licheniformis*가 *Clostridium perfringens* 증식을 억제한다는 연구결과를 근거로 할 때, 장류에 존재하는 *B. licheniformis*나 *B. subtilis*도 *C. perfringens*에 길항 미생물로 작용할 수 있다는 가능성을 보여주었음(Alex and Tan, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005).

제2장 국내외 기술개발 현황

우리나라 발효식품은 세계적으로 알려진 자연발효식품이다. 자연발효식품은 원료와 환경에 따른 독특한 미생물에 의해 차별화 된 향과 맛을 내어, 가가호호(家家戶戶) 고유한 장(醬) 맛과 지역에 따른 다양한 종류의 술과 김치를 탄생시켰다. 그러나 산업발전에 따라 가공식품의 생산과 구매가 점차 늘어나면서 대량으로 생산된 발효식품의 품질 향상과 표준화가 요구되었고 효율적 생산을 위한 발효 미생물 중요성이 높아지고 있다.

현재, 세계 바이오 시장이 연간 17%의 성장을 보이는 가운데 국내 발효제품 시장도 2010년 84,000억원으로 10년 만에 10배의 성장을 달성했다(산업연구원, 2011).

이와 더불어 발효식품산업이 급속도로 발전함에 따라 발효를 위한 종균(스타터)의 다양성 연구와 배양기술 개발뿐만 아니라 미생물의 유전자를 조절하는 연구도 현재 이루어지고 있다.

그러나 GMO(genetically modified organism, 유전자재조합생물체)에 대한 안전성 미확보로 인한 소비자 불신으로 새로운 Non-GMO 연구가 시작되었다. 다시 말하면, 미생물들이 서로 경쟁하면서 우점종으로 진화하는 방법을 이용한 개량 연구이다. 대부분의 발효 미생물은 발효식품에서 분리한 후, 다시 식품가공에 종균으로 이용되고 있으나 식품 내 기능성이나 정착능이 낮아 발효식품 가공에서의 실용화는 저조한 실정이다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법은 비교적 생육속도가 빠르고 세대기간이 짧은 미생물에 외부자극(환경 스트레스)을 주어, 수십~수백 세대를 거치면서 새로운 환경에 적응된 개체를 만드는 실험실 진화(laboratory evolution)를 이용하는 것이다.

이 연구에서는 곰팡이, 효모, 그 외 세균의 유전자를 조작하지 않고 목적에 맞게 발효 미생물을 개량할 수 있다(Non-GMO). 이렇게 개량을 거친 미생물은 고온과 저온에서 발효가 가능하며 산(酸)과 알코올에 내성을 가져, 고산도 식초제조와 새로운 유형의 독특한 술을 기대할 수 있을 것이다.

현재까지 진행된 종균 관련 연구는 미생물 공학에 발효공학 기술을 접목하여 발효산물의 품질 고급화와 생산 현대화를 실현하였고, 이로 인해 우리는 오늘날 세계 명주인 일본의 사케, 중국의 마호타이, 유럽의 포도주, 남미의 림, 보드카를 맛볼 수 있게 되었다. 나아가 최근, 네덜란드 연구팀은 종균 개량 대상인 *Lactobacillus lactis* (유산균)가 야생 균주와 비교하여 환경에 적합하도록 진화된 유전자를 가지며 젖산 발효능과 우유에서의 성장능이 우수한 것으로 보고되었다(Bechmann, 2012). 그 외에도 초산 저항성을 갖는 초산균(Sauer, 2003), 알코올 내성을 갖는 효모(Stanley, 2010) 연구 등 우수한 종균을 얻고자 세계 각국에서 끊임없는 노력이 이어지고 있다.

세계 생물자원시장 규모는 2010년에 300억 달러에 이르고 있고, 그 시장규모도 지속적으로 성장하고 있다(국립생물자원관, 2010). 반면 우리나라는 아직 우수한 생물자원 및 종균 개발이 미비한 관계로 매년 고액의 로열티를 해외에 지불하고 있다(한국무역협회, 2009). 이를 고려하여 정부에서도 국정과제 12 '농림축산산업의 신성장 동력화'를 위한 6차 산업화 지원을 통해 중

자·식품·기자재 등 고부가 가치 분야에 대한 집중 투자로 농식품을 최첨단 산업으로 육성하기로 결정한 바 있으며, 농림축산식품부에서는 종자강국 도약을 위한 골든씨드(Golden Seed) 프로젝트를 추진 중에 있다.

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 연구재료 및 방법

1. 개발된 starter의 병원성미생물 분석

가. *B. cereus*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cl. perfringenes* 등

나. 병원성미생물 분석은 식약처 식품공전 미생물시험법에 준하여 실시하고, 최종 동정을 위해 API kit 활용

다. 개발된 모든 culture에 대하여 검증 실시

2. 벗짚 유래 *B. cereus* free starter culture를 이용하여 개발한 제품의 품질특성 분석

가. 개발된 장류의 이화학성분 분석

(1) 유리아미노산

시료 5 g에 3차 증류수 30 mL를 가하여 교반하여 준 뒤 50 mL로 정용한 것을 30분간 진탕시킨 후 원심분리 (3,500 rpm, 20 min)한 후 상등액 2 mL를 취한다. 상등액 2 mL에 5% TCA 2 mL를 가한 후 원심분리(10,000rpm, 10min)하여 얻어진 상등액과 0.02 N HCl을 동량으로 희석한 후 0.22 μ m syringe filter로 여과한 액을 amino acid analysis system (Sykam S-4300, Eresing, Germany)을 이용하여 분석하였다. 컬럼은 cation separation lithium (4.6 x 150 mm)와 cation lithium filter (4.6 \times 100 mm), buffer flow rate는 0.45 mL/min, reagent flow rate는 ninhydrin으로 0.25 mL/min으로 하여 분석하였고, 분석 파장은 440-570 nm 사용하였다.

(2) 유리당과 유기산

시료 5 g에 증류수 45 mL를 가한 후 30분간 진탕시킨 후 원심분리(3,500 rpm, 20 min)하여 상등액을 사용하였다. 상등액을 0.22 μ m membrane filter로 여과시킨 뒤 RI detector 및 UV detector를 장착한 HPLC(Shimadzu, Japan)으로 분석하였다. 분석 조건은 표 1과 같다.

표 1. 유리당/유기산 측정을 위한 HPLC분석 조건

Instrument	HPLC (Shimadzu 20A Series., Japan)	
	Free sugar	Organic acid
Column	Shodex Asahipak NH2P-504E (4.6 mm×250 mm)	ICSep COREGEL-87H3 (7.8mm×300mm)
Mobile phase	Acetonitrile/Water 75:25(v/v)	0.008M H ₂ SO ₄
Flow rate	1.0 mL/min	0.6 mL/min
Injection volume	20 μ L	20 μ L
Detection	RI	UV (λ =210 nm)
Colum temp.	35 $^{\circ}$ C	35 $^{\circ}$ C

나. 개발된 제품의 효소활성분석

(1) β -amylase 활성 분석

(가) 조효소액 조제

시료 5g에 증류수 45 mL를 첨가하고 3시간 진탕한 후 원심분리(10,000 \times g, 10 min)하여 얻은 상등액을 0.22 μ m syringe filter로 여과한 것을 조효소액으로 사용하였다.

(나) β -Amylase 활성도 측정

β -Amylase 활성은 dinitrosalicylic acid(DNS)법에 의하여 측정하였다.. 0.5% soluble starch 용액 1 mL에 조효소액 1 mL를 가하여 반응(30 $^{\circ}$ C, 30분)시킨 뒤, DNS 시약 1 mL를 넣고 끓는 물에서 5분간 반응시킨 후 증류수 10 mL를 넣어 희석한 다음 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-maltose를 이용하여 작성하였고, 효소활성도는 효소액 1 mL에서 1 mg의 maltose를 유리할 때를 1 unit/g으로 하여 시료 1 g당으로 환산하여 표시하였다.

다. 제품의 위해물질 분석

(1) 병원성미생물 분석

Pilot scale 및 large scale로 생산된 최종제품에 대하여 식약처 식품공전 미생물시험법에 의해 *B. cereus*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cl. perfringenes* 등.에 대하여 실시하였다.

(2) 바이오제닉아민

바이오제닉아민 함량 분석은 최종제품에 대하여 실시하였다. 시료 5 g에 0.1 N HCl 45 mL를 가한 후 균질화하고 이것을 원심분리(9,900 RPM, 30 min) 한 후 상등액을 취하여 시험용액으로 사용하였다. 표준용액 및 시험용액 각각 1mL를 마개달린 시험관에 취한 다음 내부표준용액(1,7-diaminoheptane, SIGMA) 100 μ L를 가한 후 포화탄산나트륨용액 0.5 mL와 1% 염화단

실아세톤용액(dansyl chloride, SIGMA) 0.8 mL를 가하여 혼합한 후 마개를 하여 45°C에서 1시간 유도체화시킨다. 유도체화 시킨 표준용액 및 시험용액에 10% 프롤린용액 0.5 mL 및 에테르 5mL를 가하여 약 10분간 50°C 항온수조에서 진탕하고, 상등액을 취하여 다시 50°C 항온수조에서 증발시킨다. 건조된 검체에 아세토니트릴 1mL를 가하여 여과한 것을 표 2의 조건하에 HPLC로 분석하였다.

(3) 곰팡이 독소

곰팡이 독소분석은 공인분석기관에 의뢰하여 실시하였고, 최종제품에 한하여 의뢰하였다.

라. 관능평가

개발한 RIBS 1 청국장의 발효 48h 시료의 기호도 평가를 실시하였다. 청국장의 경우 대조구 및 실험구에 대하여 참여연구원 4명을 대상으로 1차 선별을 거친 후 대조구 2개와 선택된 4개의 실험구만을 가지고 기호도 조사를 실시하였다. 향, 맛, 전반적 기호도에 대해 9점 척도법을 이용하였다. 시료는 청국장 60 g에 동일량 가염한 후 물에 끓인 청국장을 시험체로 하였다. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장은 각 처리구별 시료를 제공한 후 순위법으로 진행하였다. 가장 기호도가 높은 시료를 1순위, 기호도가 낮은 시료를 3순위로 하여 1순위에 5점, 2순위에 3점 3순위에 1점을 부여하였다.

표 2. 바이오제닉아민 HPLC 분석조건

Items	Conditions
HPLC	Agilent 1200 HPLC, USA
Column	Capcell PAK C18 column 250mm × 4.6mm, 5um column
Detector	Agilent G1315D 1260DAD VL
Mobile phase	A : 0.1 % Formic acid in ACN B : 0.1 % Formic acid in H ₂ O
Gradient	A:B = 55 : 45, 0~15 min A:B = 65 : 35, 15~25 min A:B = 80 : 20, 25~30 min A:B = 90 : 10, 30~40 min A:B = 55 : 45, 40 min over
Floe rate	1 mL/ min
Sample injectorvolume	10 ul

마. 개발된 벗짚 유래 *B. cereus* free starter의 장기보존 기술 개발

실험구는 starter 1 mL를 원심분리하여 얻어진 균체를 20% skim milk 1 mL에 혼합하여 동결건조(1), starter 1 mL와 20% skim milk 1mL에 혼합하여 동결건조(2), starter 1 mL를 원심분리하여 얻어진 균체를 20% glycerol 1mL에 혼합하여 -80℃에 보존(3), starter 1 mL와 40% glycerol 1 mL와 혼합하여 -80℃에 보존(4) 방법으로 총 4가지로 설정하였다. 각 보존방법의 안전성을 검증하기 위하여 DGGE 분석법을 진행 하였다.

바. Starter의 안정적 배양 및 유통방법 개발

개발된 starter가 안정적인 품질이 유지 및 재현 될 수 있는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다.

(1) 배지의 수율 비교

제1협동기관에서 starter를 배양할 때 사용하였던 불린 콩 5 g에 증류수 100 mL를 혼합 한 후 스토마커를 이용하여 제조하였던 여액은 콩 부산물이 많이 생성되어 수율이 낮아, 주관기관에서 사용하기에 적합하지 않다는 점이 지적되었다. 이를 개선하기 위하여 액체배지의 수율을 높이고자 하였다. 기존의 스토마커를 이용하여 얻은 액체배지와 같은 양의 콩과 증류수를 착즙하여 얻은 착즙액을 탁도를 비교하여 수율을 측정하였다.

(2) 제조한 배지의 배양 적합성 비교

얻어진 콩 착즙액을 이용하여 ORIBS starter를 배양하여 기존의 액체배지와 유사하게 배양되는지를 알아보려고 하였다. 콩 착즙액의 농도를 스토마커를 이용하여 얻어진 배지의 농도와 동일하게 사용하기 위해서 착즙액을 8% 함유된 희석액을 사용하였고, 8% 첨가 실험구를 포함하여 4%, 12%, 16%, 착즙원액 및 스토마커 여액에 1%의 종균 ORIBS를 접종하였다. 배양조건은 37℃, 150 rpm, 48시간동안 배양하였다.

(3) 고체배지를 이용한 배양

Starter가 액체배지 외에 콩을 분쇄하여 만든 고체 상태에서도 잘 배양되는지 알아보기 위하여 불린 콩을 믹서기로 분쇄한 후 분쇄물 300 g을 살균한 후, 종균 starter를 5% 비율로 접종하여 37℃, 48시간 동안 배양하였다.

(4) 균집분석

비율별로 제조된 액체배지에서 배양된 배양액과 고체배지로 배양된 배양물이 종균 starter의 군집을 유지하는지 알아보았다. 군집분석은 동정전문 서비스업체인 MACROGEN(마크로젠)에 의뢰하여 분석하였다.

2절 개발된 starter를 활용한 장류의 개발 및 분석

1. RIBS 1 starter의 병원성미생물 분석

개발된 starter culture인 RIBS1의 *B. cereus*에 대한 안전성을 확인하기 위하여 *B. cereus*를 포함한 병원성미생물을 분석하였다. 결과는 표 3과 같다. 분석 결과 병원성미생물 항목 모두에서 음성의 결과를 보였다. 따라서 개발된 RIBS1은 *B. cereus*가 제거가 된 것으로 보여지며, 장류 제조 등에 사용하여도 안전한 것으로 판단되어진다.

표 3. RIBS 1의 위해미생물 분석 결과

	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Cl. perfringenes</i>
결과	음성	음성	음성	음성	음성

2. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 메주 및 청국장 품질특성

가. 유리당

(1) 콩알메주

유리당의 종류에 따라 각 접종온도에서는 각기 다른 결과를 나타내었다. Fructose는 접종 온도가 60℃ 일 때 시간이 지날수록 증가하는 경향을 보였고, 70℃인 경우 시간이 지날수록 증가하다가 발효 완료에 가까워질수록 감소하는 경향을 보였다.

Glucose와 maltose는 전반적으로 발효가 진행 될수록 증가하는 경향을 보였으며, glucose는 대조구가 maltose 접종온도가 70℃인 경우에 가장 높은 수치를 나타내었다. Sucrose는 발효 초기에 생산이 되었다가 발효가 진행될수록 감소하는 경향을 보였다.

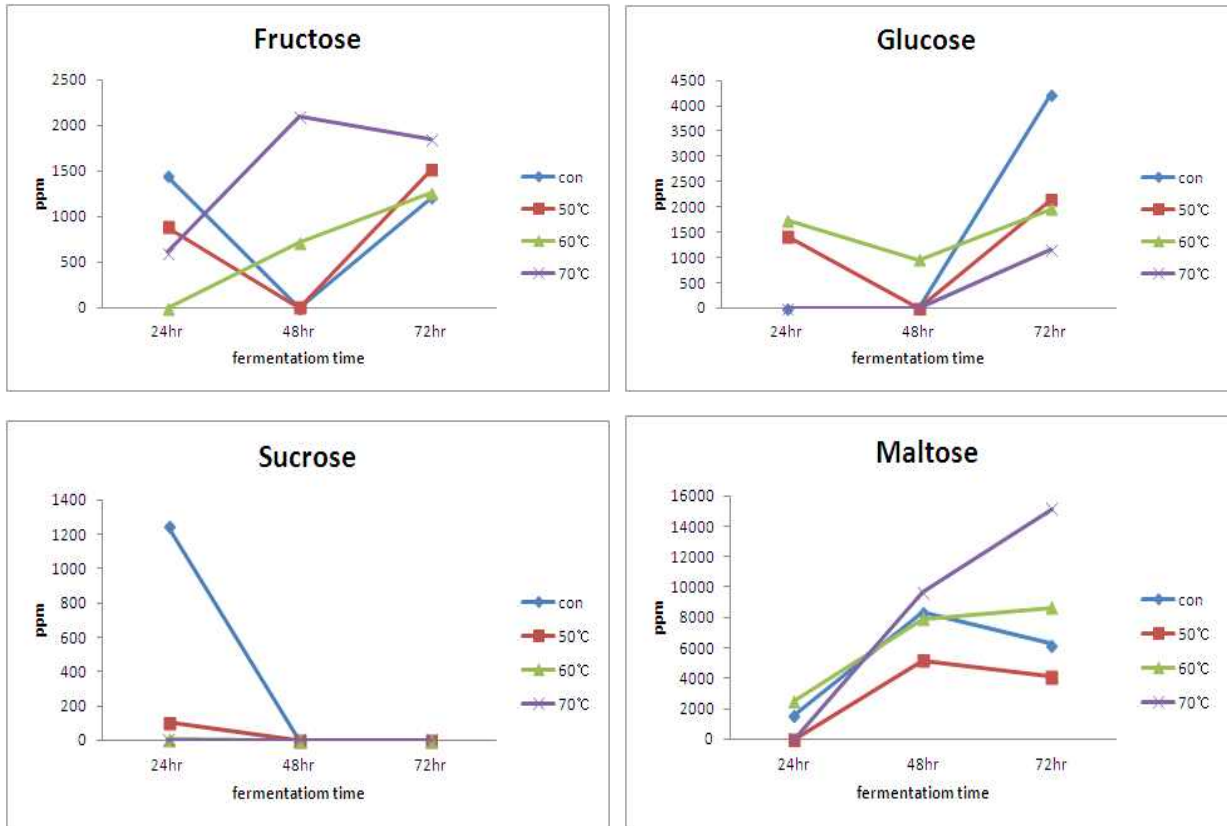


그림 1. 콩알메주 접종 균주의 접종 온도 및 발효기간에 따른 유리당 함량

(2) 청국장

청국장을 제조할 때 접종한 균주 및 발효 온도에 따라 각기 다른 결과를 나타내었다.

Fructose의 경우 전반적으로 발효초기에 생성되었다가 발효시간이 경과할 수 록 줄어드는 경향을 보였고, glucose는 배양 온도에 따라 다른 경향을 보였는데, 배양온도가 50°C 인 실험 구들은 발효시간이 경과할수록 급격하게 증가하는 경향을 보였다.

Maltose는 전반적으로 발효 48시간까지 증가하다 그 이후에 감소하는 경향이었는데 특히 0.1% RIBS 1과 *B.licheniformis*를 혼합하고 50°C에서 배양한 실험구는 발효 초기부터 빠르게 생성되다 발효 24시간이 경과하면서 감소하는 양상을 나타내었다. Sucrose는 접종 균주 별, 배양 온도별로 각기 다른 양상을 보였다.

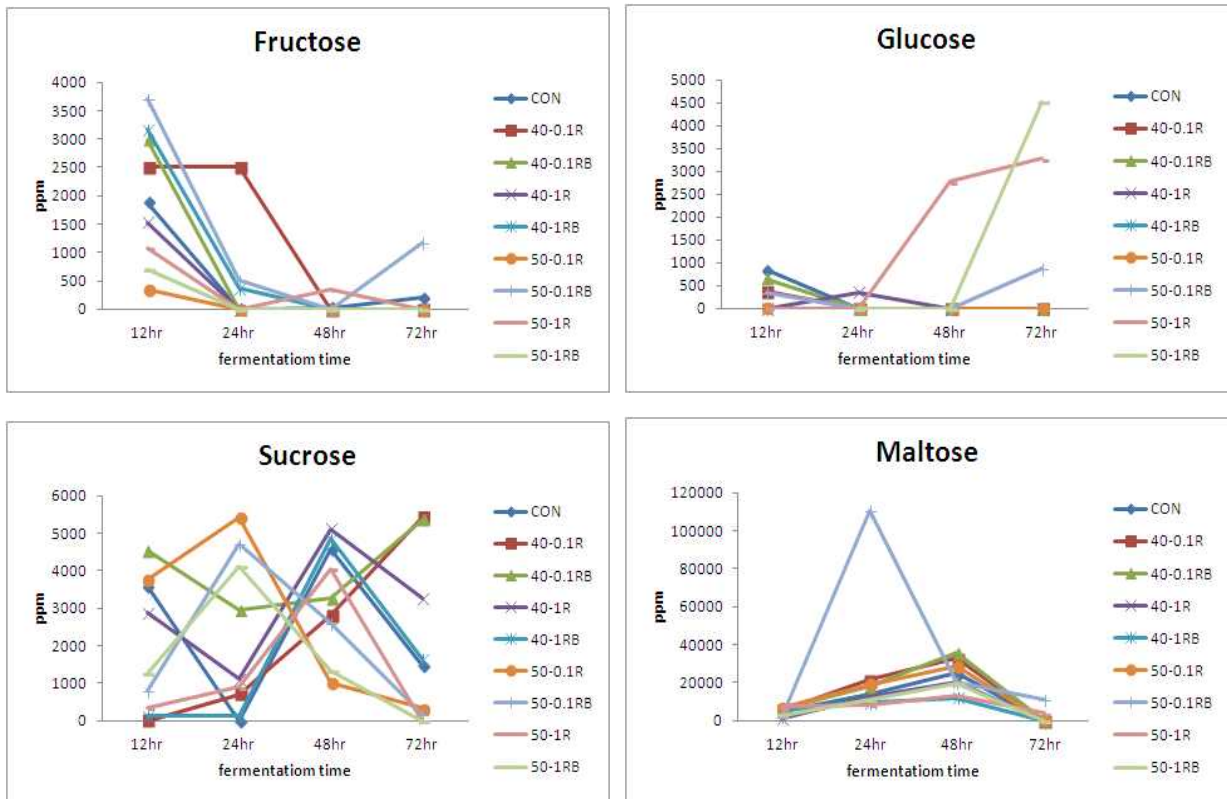


그림 2. 청국장 접종균주 및 발효기간에 따른 유리당 함량

(3) 사각메주

사각메주는 유리당의 종류에 따라 비슷한 경향을 나타내었다. Fructose는 전체적으로 발효일 수가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나, RIBS 1 과 *A.oryzae*를 혼합한 균주는 발효종료일에 가장 높은 함량을 나타내었다. Glucose는 발효 초기에 증가하다 발효9일 이후에 급격하게 감소하는 경향을 보였다. Sucrose는 발효 12일 이후에 급격하게 증가하는 경향을 보이 발효 종료일에도 가장 높은 수치를 유지하였다. Maltose는 대조구를 제외하고 발효일이 경과할수록 함량이 높아는 경향을 나타내었다.

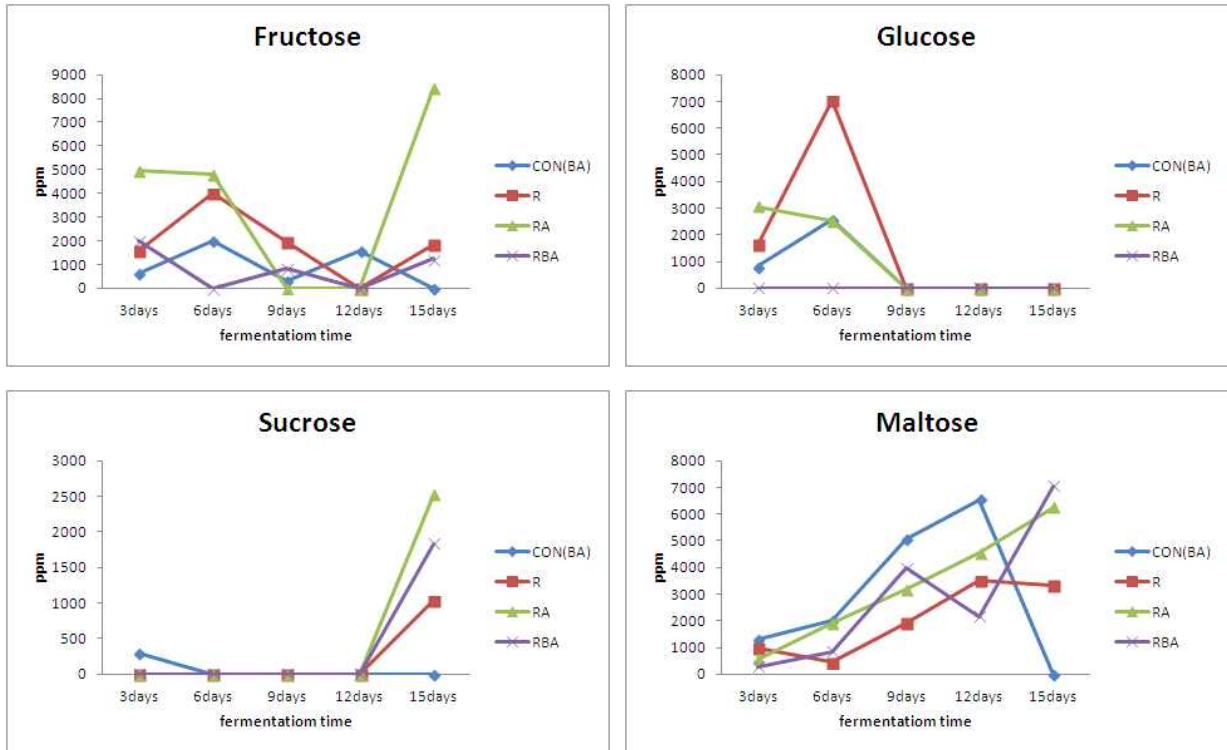


그림 3. 사각메주 접종균주 및 발효기간에 따른 유리당 함량

나. 유기산

(1) 콩알메주

유기산의 종류에 따라 각기 다른 경향을 보였다. Citric acid는 균주 접종 온도가 70℃를 제외하고는 발효기간이 경과할수록 증가하는 경향을 나타냈다. Succinic acid 함량은 모든 실험구에서 발효시간이 경과할수록 증가하였고, acetic acid는 발효시간이 경과함에 따라 감소하는 결과를 나타내었다. 반면 lactic acid는 발효 초기에 증가하였다가 감소한 후 다시 증가하였고, formic acid는 발효 초기부터 중기 까지 증가하였다가 발효 완료시점에 감소하는 경향을 보였다.

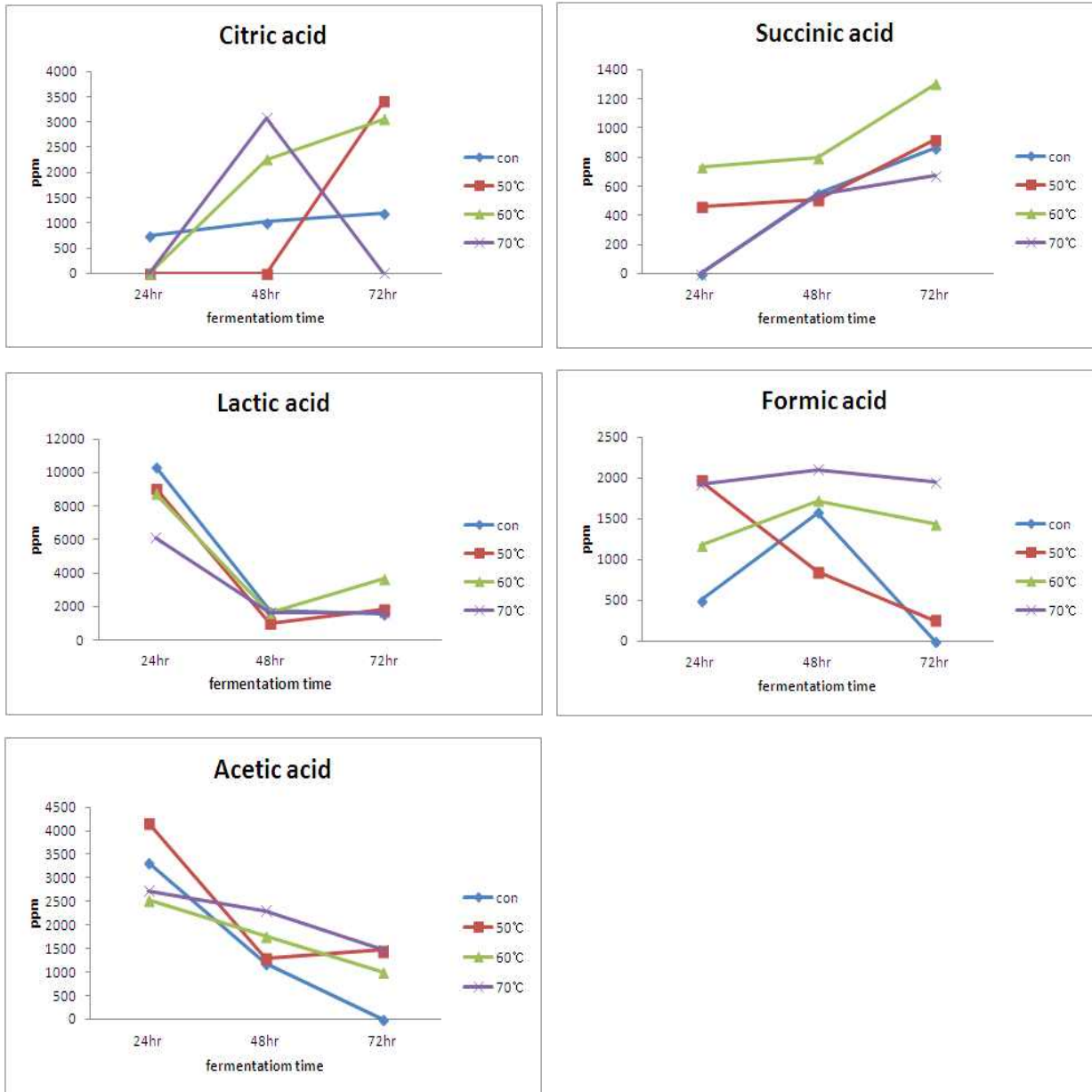


그림 4. 발효기간 및 접종 온도에 따른 유기산 함량

(2) 청국장

청국장의 유기산 함량은 유기산에 따라 다른 경향을 보였다. Oxalic acid는 발효 시간이 경과하면서 감소와 증가를 반복하였고, citric acid의 경우에는 발효 초기에 높은 함량 값을 보였으나 24시간 에 급격히 감소하였다가 48시간 이후에 다시 생성되는 것으로 나타났다.

Succinic acid는 발효온도 50°C 0.1% RIBS 1을 접종한 실험구, 50°C 0.1% RIBS 1와 *B.licheniformis* 혼합 실험구, 발효온도 40°C에서 1% RIBS 1와 *B.licheniformis*를 접종한 실험구는 발효 시간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였고, 50°C 0.1% RIBS 1을 접종한 실험구에서 가장 높은 함량을 나타내었다. Lactic acid는 전반적으로 발효 48시간 까지 증가하다 그 이후에 감소하는 경향을 보였지만, 대조구의 경우에는 발효시간이 경과할수록 증가하는 결과를

보였다. 이 결과는 acetic acid 함량 변화와 유사한 경향이다.

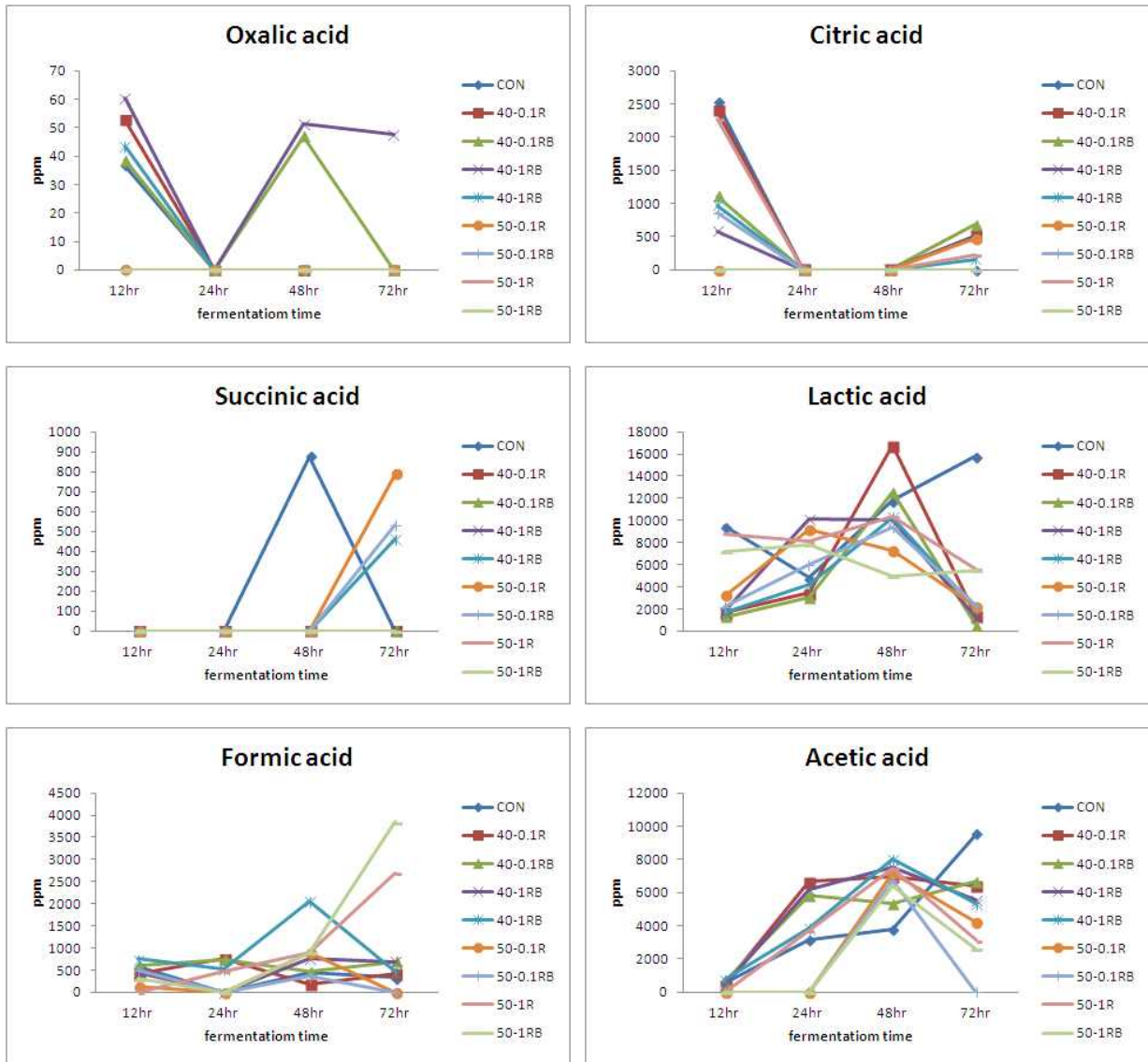


그림 5. 접종균주 및 발효기간에 따른 유기산 함량

(3) 사각메주

사각메주의 유리당의 함량은 malic acid를 제외하고 발효일차가 경과하면서 증가하였다가 감소하는 경향을 보였다. Citric acid는 모든 실험구에서 발효일이 경과하는 동안 검출되지 않았다.

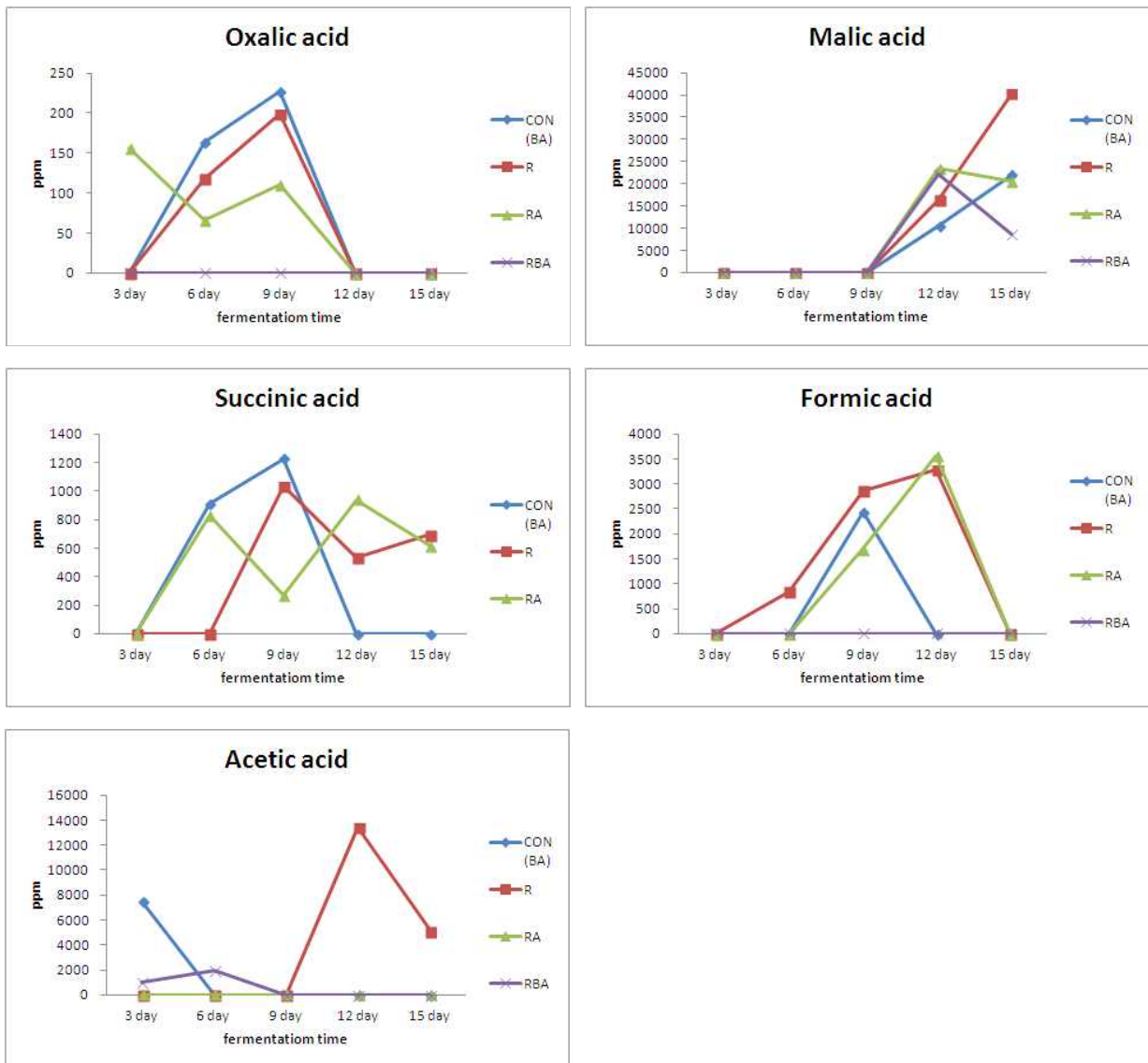


그림 6. 접종균주 및 발효기간에 따른 유기산 함량

다. 유리아미노산

(1) 콩알메주

유리아미노산은 모든 실험구에서 발효 24시간에서 측정된 값보다 발효 완료일인 발효 72시간이 지난 시점에서 최대값을 보였다. 균주 접종 온도간의 차이에서는 50℃인 실험구에서 가장 높은 함량을 나타냈다. 이 값은 다른 실험구에 비하여 2배~3배 이상의 값이었다.

대조구의 경우는 phospho-serine이, 접종온도가 50℃ 일 때는 urea, 60℃ 인 경우는 phospho-serine, 70℃일 때는 glutamic acid가 가장 높은 결과 값을 보였다. 50℃ 일 때를 제외한 실험구에서는 함량 차이는 있지만 실험구 자체의 유리아미노산의 비율은 크게 다르지 않음을 알 수 있었다.

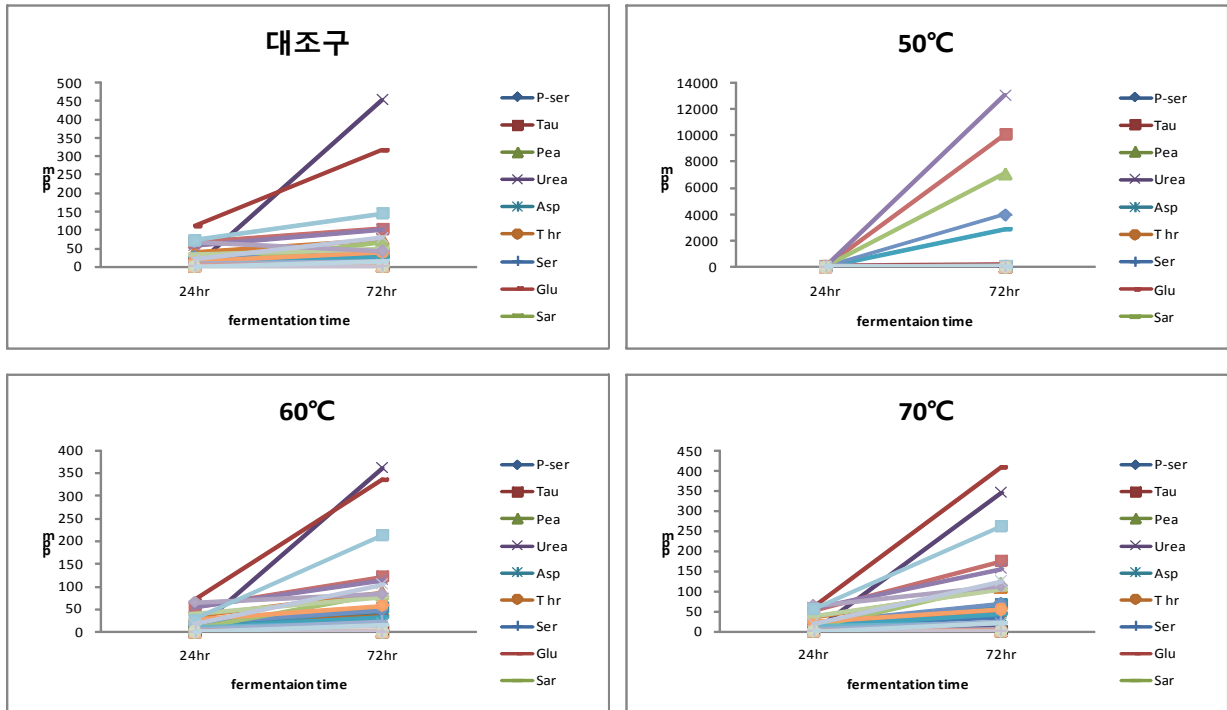


그림 7. 콩알메주의 발효기간에 따른 유리아미노산 함량변화

(2) 청국장

청국장의 경우에는 전체적으로 발효기간이 증가할수록 함량이 증가하는 경향을 보였고, 각 유리아미노산의 비율 또한 비슷한 경향을 보였다. 발효온도가 50°C 이며 RIBS 1을 0.1% 접종한 실험구에서는 taurine이 다른 실험구에 비해 2배 이상 높은 결과 값을 보였다.

반면, 발효온도가 50°C 이며 RIBS 1을 0.1%, *B.licheniformis*를 혼합하여 제조한 실험구에는 taurine함량이 발효기간이 경과함에 따라 증가하였다가 감소하는 결과를 보였다.

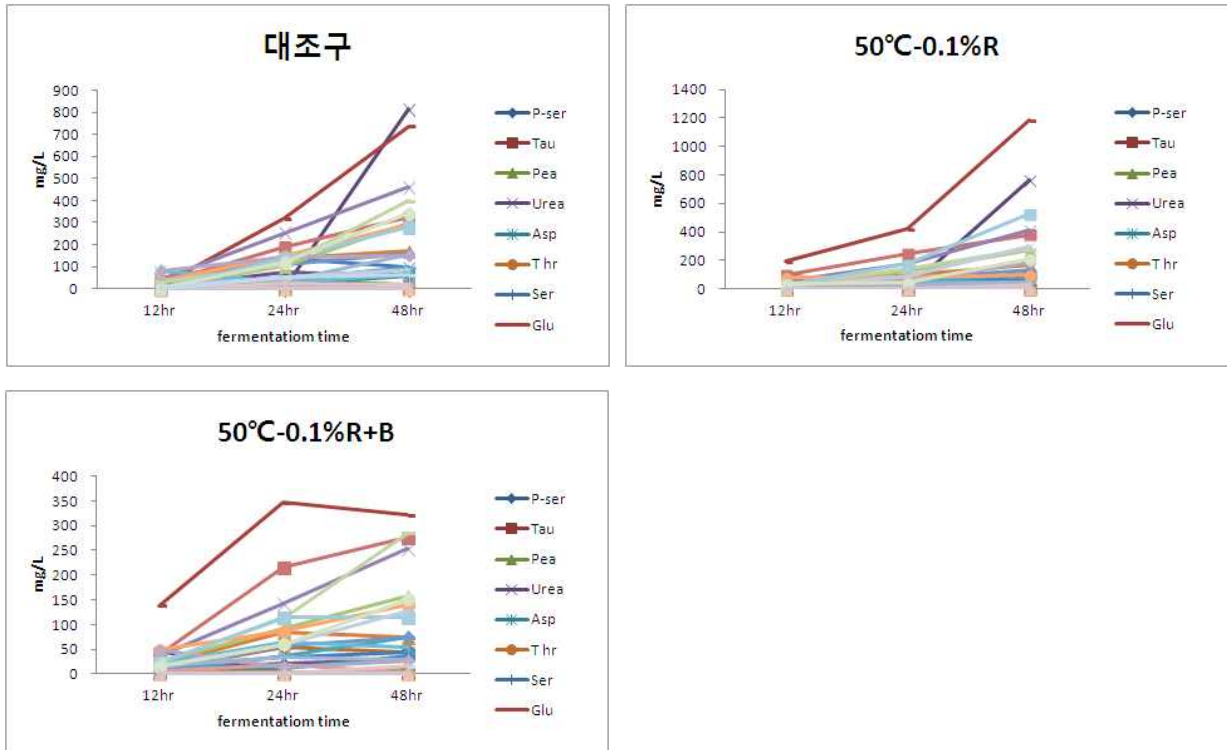


그림 8. 청국장의 발효기간에 따른 유리아미노산 함량변화

(3) 사각메주

사각메주의 유리아미노산 함량 결과는 RIBS 1만 접종한 실험구를 제외하고는 전반적으로 유사한 경향을 보였다 모든 실험구에서 taurine의 함량이 가장 높은 것으로 나타났고, RIBS 1만을 접종한 실험구의 함량이 다른 실험구에 비해 절반 정도의 수준에 그쳤으며, 다른 성분 또한 다른 실험구들에 비하여 증가폭이 적고 함량 또한 적은 결과를 나타내었다.

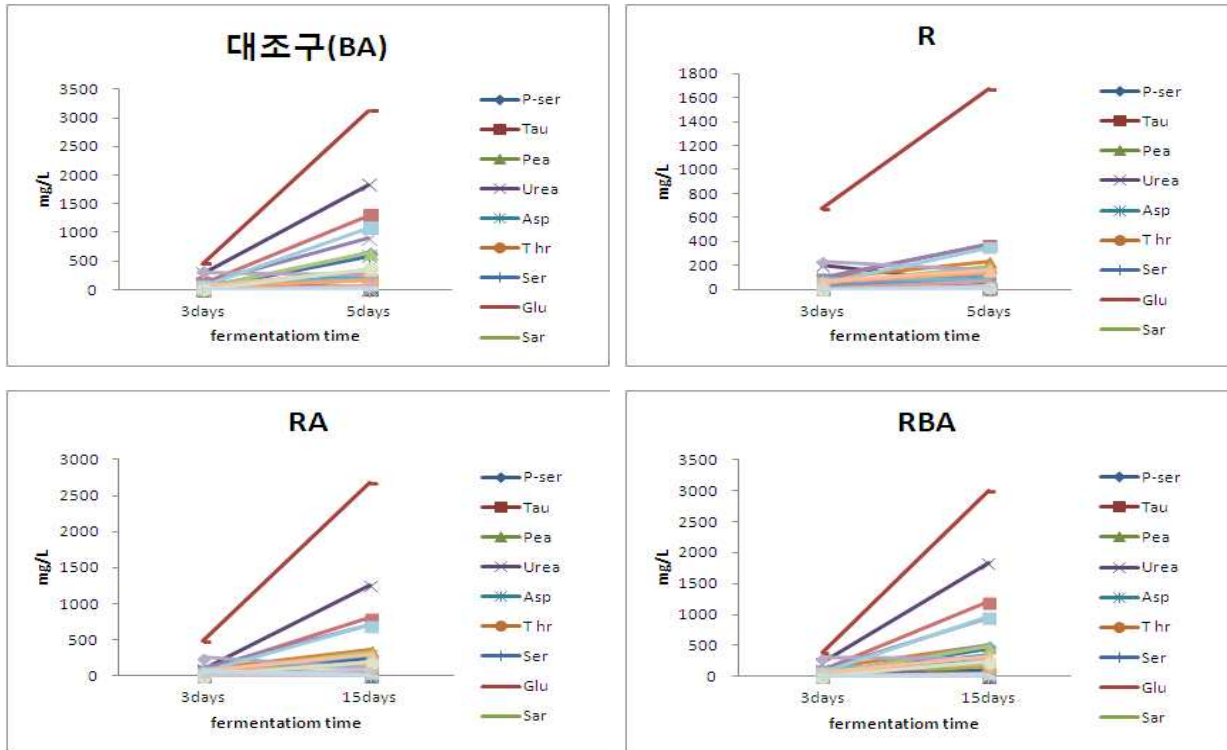


그림 9. 사각메주의 발효일차에 따른 유리아미노산 함량변화

3. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 메주 및 청국장의 β -amylase 활성

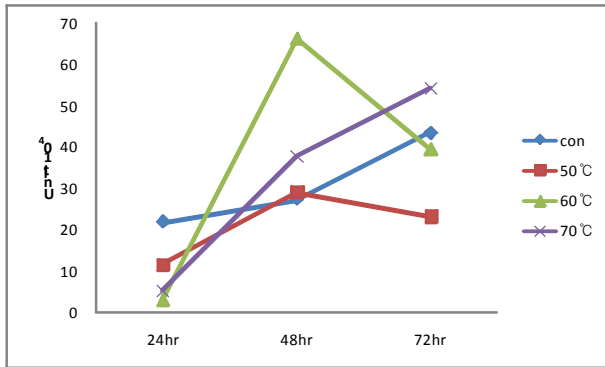
β -amylase 활성은 그림 10과 같다.

콩알메주의 경우 전반적으로 발효시간이 경과할수록 증가하는 경향을 나타내었다. 반면 접종 온도가 60℃인 실험구는 발효 48시간 이후에 감소하는 경향을 보였지만, 발효 종료일에는 초기 농도보다 높은 값을 유지하였다.

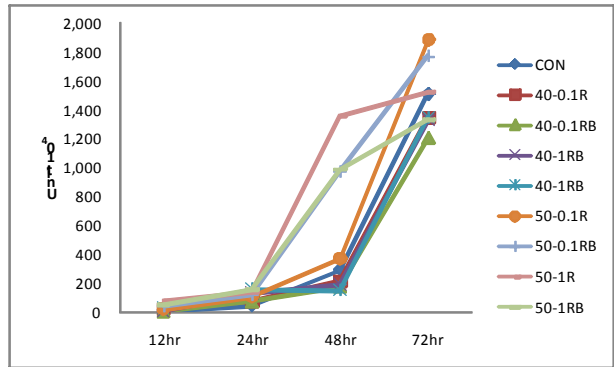
청국장의 경우는 발효시간이 경과할수록 β -amylase 활성이 증가하는 결과를 나타내었다. 청국장의 경우 다른 콩알메주 및 사각메주에 비해서 높은 β -amylase 활성을 보였다. 가장 높은 수치를 보인 실험구는 0.1% RIBS 1을 접종하여 50℃에서 발효시킨 것으로 그 값이 $1,881 \times 10^4$ unit/g으로 실험 종료일을 기준으로 하였을 때, 그 결과 값이 20배에서 100배 까지 차이가 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 전반적으로 발효 온도가 50℃인 경우에 β -amylase 값이 높은 것으로 나타났다.

사각메주의 경우는 접종 균주에 따라 다른 양상을 나타냄을 알 수 있었다. 대조구와 RIBS 1만을 접종한 실험구 에서는 발효 6일차 까지는 증가하다 그 이후에 감소하였지만 9일차부터 다시 증가하는 양상을 보였고, RIBS 1, 와 *A.oryzae*를 접종한 실험구와 RIBS 1, *B.licheniformis*와 *A.oryzae*를 접종한 실험구에서는 발효 초기에 가장 높은 함량을 나타내었다 가 발효 일차가 경과할수록 감소하는 경향을 보였다.

(a)



(b)



(c)

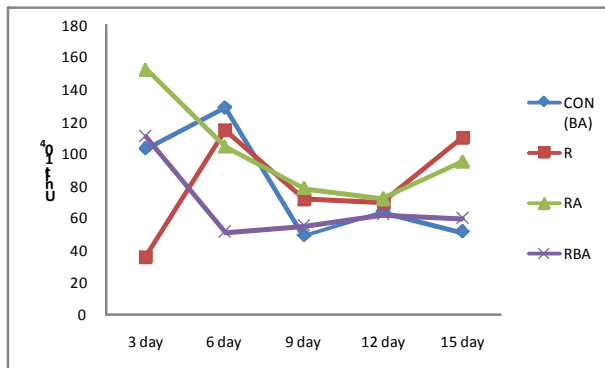


그림 10. β -amylase 활성 (a) : 콩알메주, (b) : 청국장, (c) : 사각메주

4. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 청국장의 관능검사 결과

청국장 36개 실험구에 대하여 참여연구원 4명을 대상으로 1차 선별을 거친 후 걸러진 4개의 실험구만을 가지고 기호도 조사를 실시하였다. 16명의 패널을 대상으로 관능검사를 실시한 결과는 표 4와 같다. 관능검사 결과 sample 2인 발효온도 50°C, 24h 0.1% R+B과 sample 4인 발효온도 50°C, 48h 0.1% R의 실험구에서 가장 높은 기호도를 나타내었고, 이는 대조구인 sample 5와 sample 6의 기호도 값보다도 높은 수치였다. 관능검사 결과를 토대로 최종 샘플로 설정하고, 유리아미노산 및 위해물질 분석에 사용하였다.

표 4. 샘플에 따른 청국장 관능결과

	Smell	Taste	overall taste
Sample 1 50 °C, 24h 0.1% R	4.50± ¹⁾ 2.16 ^a	4.81±2.51 ^{ab}	4.44±2.03 ^{ab}
Sample 2 50 °C, 24h 0.1% R+B	4.75±2.32 ^a	4.75±2.59 ^{ab}	5.06±2.43 ^a
Sample 3 50 °C 24h 1% R+B	4.94±2.97 ^a	3.69±2.09 ^b	4.31±2.15 ^{ab}
Sample 4 50 °C, 48h 0.1% R	4.62±2.66 ^a	5.56±2.13 ^a	5.31±2.41 ^a
Sample 5 50 °C, 24h con	4.75±1.88 ^a	4.50±2.22 ^{ab}	4.63±2.09 ^{ab}
Sample 6 50 °C, 48h con	3.63±2.73 ^a	3.63±2.42 ^b	3.38±2.47 ^b
P value < 0.05			

¹⁾± value is standard deviations

5. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 메주 및 청국장의 위해물질 분석

가. 병원성 미생물

콩알메주 및 사각메주의 발효일차 완료일 실험구와 관능검사를 통해 선정된 청국장 실험구의 위해미생물을 분석한 결과 모두 음성의 결과를 나타내었다.

표 5. 콩알메주의 위해미생물 분석 결과

	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Cl. perfringenes</i>
72h-con.	음성	음성	음성	음성	음성
72h-50°C	음성	음성	음성	음성	음성
72h-60°C	음성	음성	음성	음성	음성
72h-70°C	음성	음성	음성	음성	음성

표 6. 청국장장의 위해미생물 분석 결과

	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Cl. perfringenes</i>
24h-con.	음성	음성	음성	음성	음성
24h-50°C 0.1% R+B	음성	음성	음성	음성	음성
48h-con	음성	음성	음성	음성	음성
48h-50°C 0.1% R	음성	음성	음성	음성	음성

표 7. 사각메주의 위해미생물 분석 결과

	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Cl. perfringenes</i>
대조구 (BA)	음성	음성	음성	음성	음성
R	음성	음성	음성	음성	음성
RA	음성	음성	음성	음성	음성
RBA	음성	음성	음성	음성	음성

나. 바이오제닉아민

콩알메주 및 사각메주의 발효일차 완료일 실험구와 관능검사를 통해 선정된 청국장 실험구의 바이오제닉아민을 분석한 결과는 표 8과 같다.

Histamine은 모든 실험구에서 검출이 되었으며, 콩알메주는 대조구에 비해 실험구에서 약간 높은 값으로 검출이 되었다. 청국장은 대조구에 비해 실험구에서 현저히 낮은 수치를 나타내었

다. 사각메주의 경우, 대조구에 비해 RIBS 1만을 이용한 실험구에서는 낮은 수치를 보였지만 RIBS 1과 *A.oryzae*를 혼합한 실험구에서 가장 높게 나타났으며, RIBS 1과 *B.licheniformis*, *A.oryzae*를 혼합한 실험구에서도 대조구에 비해 높은 수치를 보였다.

RIBS 1과 *A.oryzae*를 혼합한 실험구와 RIBS 1과 *B.licheniformis*, *A.oryzae*를 혼합한 실험구에서는 putresine이 미량 검출되었고, tyramine은 청국장의 발효 24h 대조구에서 미량 검출되었다.

Cadaverine은 모든 실험구에서 검출되지 않았다.

표 8. 바이오제닉아민 분석 결과

(단위 : mg/L)

		Putresine	Cadaverine	Histamine	Tyramine
콩알메주	대조구	ND ¹⁾	ND	35.78	ND
	72h-60℃	ND	ND	40.11	ND
청국장	24h대조구	ND	ND	18.76	0.31
	24h-50℃	ND	ND	5.53	ND
	0.1% R+B	ND	ND	5.53	ND
	48h 대조구	ND	ND	39.96	ND
	48h-50℃ 0.1% B	ND	ND	15.42	ND
사각메주	대조구(BA)	ND	ND	12.13	ND
	R	ND	ND	7.74	ND
	RA	0.15	ND	18.07	ND
	RBA	0.51	ND	15.43	ND

1) Not detect

다. 총아플라톡신

콩알메주 및 사각메주의 발효일차 완료일 실험구와 관능검사를 통해 선정된 청국장 실험구의 총아플라톡신을 분석한 결과 모두 불검출의 결과를 나타내었다.

표 9. 총아플라톡신 분석 결과

	콩알메주		청국장		사각메주		
	72h-60℃	72h-70℃	24h-50℃ 0.1% R+B	48h-50℃ 0.1% B	R	RA	RBA
결과	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출

6. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 품질 분석

가. 유리당

(1) 된장

RIBS 1 starter를 이용하여 제조한 메주를 숙성하여 만들어진 된장의 유리당 함량변화는 그림 11과 같다. *A.oryzae* 및 *B.licheniformis* 로 제조한 대조구(이하 BA)의 유리당 함량의 변화는 maltose의 경우 숙성 10주차에 가장 높은 함량을 나타내다 숙성 완료일은 18주차에 다소 감소하는 경향을 보였다. Glucose는 숙성이 진행 될수록 급격하게 증가하였고, fructose의 경우는 숙성 초기에 가장 높았다가 숙성이 진행될수록 낮아지는 경향을 보였다.

Starter만으로 발효시킨 실험구(이하 R)에서는 maltose는 검출되지 않았으며, glucose와 fructose의 모두 숙성 초기에 높았다가 숙성 중반 낮아졌지만 숙성완료일에는 다시 높아지는 경향을 보였지만 숙성완료의 함량이 숙성초기보다는 낮은 함량이었다. Starter와 *A.oryzae*를 혼합하여 제조한 실험구(이하 RA)는 R 과 마찬가지로 maltose는 검출되지 않았고, glucose는 숙성초기에만 검출되었다. Fructose는 숙성이 진행될수록 함량이 감소하는 것으로 확인되었다. Starter와 *A.oryzae* 및 *B.licheniformis*를 혼합하여 제조한 실험구(이하 RBA)의 maltose와 fructose는 숙성 초기에 많은 양이 검출되었다가 숙성 중반 감소하였다가 숙성 완료일에 다시 증가하는 경향을 보였으며, glucose는 숙성 초기에 생성되었다가 숙성이 진행되면서 검출되지 않았다.

각 실험구별 숙성 완료인 18주차의 함량은 maltose는 0~557mg/L, glucose는 0~111 mg/L, fructose는 904~2,553 mg/L로 유리당 중 가장 많은 함량을 보였다.

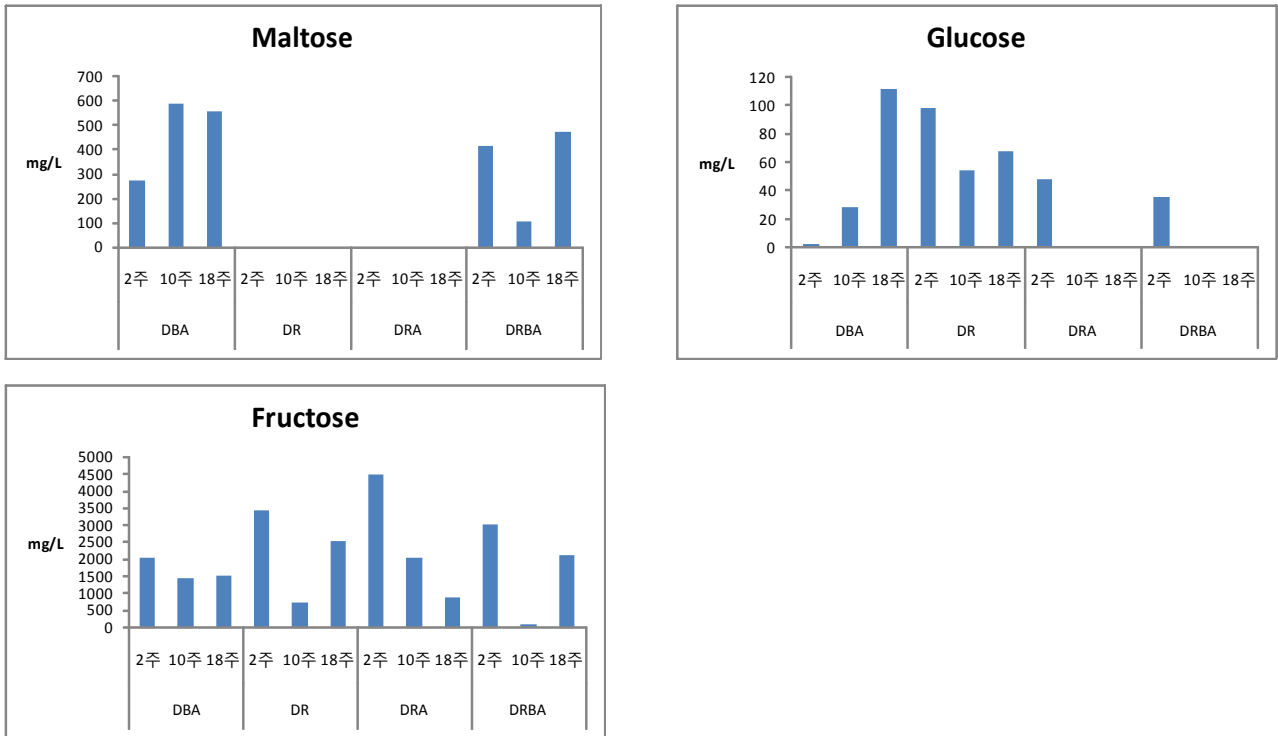


그림 11. RIBS 1 starter로 제조한 된장의 유리당 함량 변화

(2) 간장

RIBS 1 starter를 이용하여 제조한 메주를 숙성하여 만들어진 간장의 유리당 함량변화는 그림12와 같다. Maltose와 fructose의 경우 숙성 초기에 각각 333~667 mg/L, 2,453~4521 mg/L로 높은 함량을 나타내었지만, 숙성이 진행 될수록 감소하는 경향을 보였으며, R 실험구와 RA 실험구는 숙성 완료일차에 검출되지 않았다. Glucose는 숙성 18주차에 R 실험구와 RA에서 각각 14.7 mg/L, 73.8 mg/L 검출되었으며. RA 실험구는 숙성이 진행될수록 증가하였다.

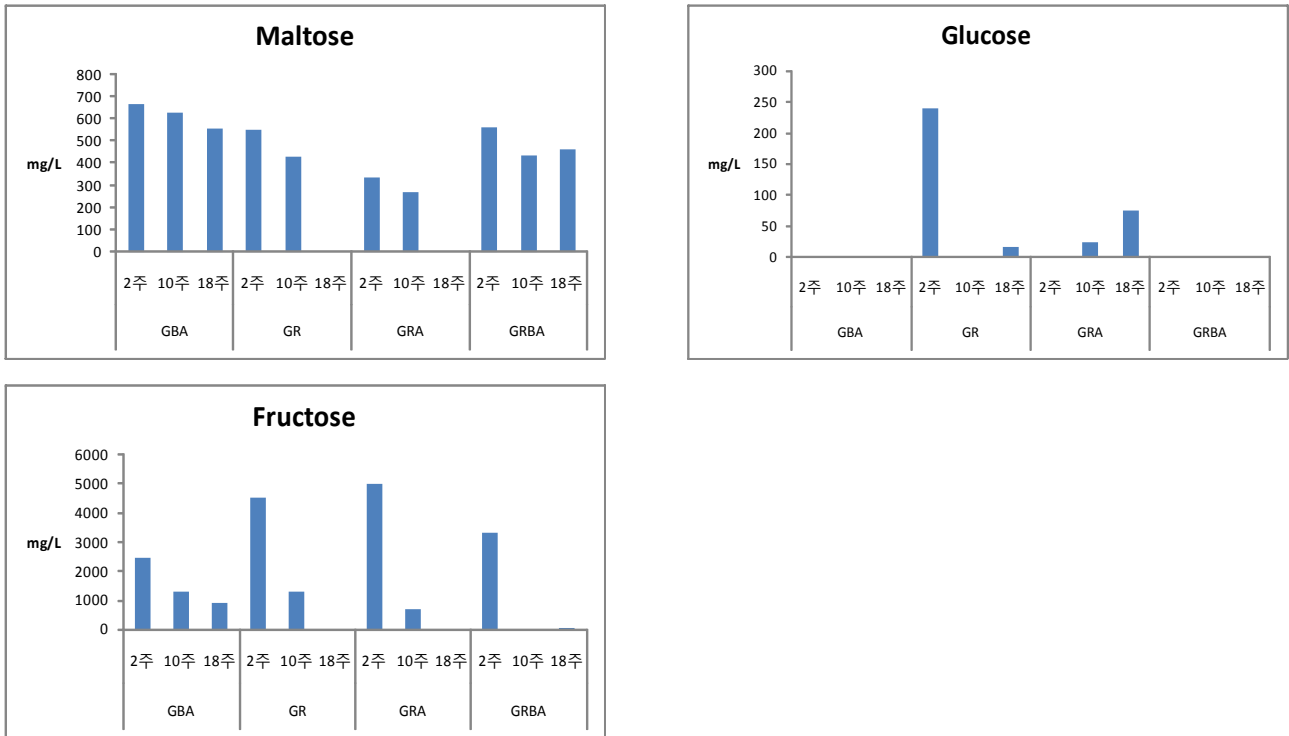


그림 12. RIBS 1 starter로 제조한 간장의 유리당 함량 변화

나. 유기산

(1) 된장

RIBS 1 starter를 이용하여 제조한 메주를 숙성하여 만들어진 된장의 유기산을 측정된 결과는 다음과 같다. Citric acid의 경우 BA 실험구와 RBA 실험구에서 숙성 초기보다 숙성 완료일에 다소 낮아지는 경향을 보였으며, R 실험구와 RA 실험구에서는 숙성이 진행 될수록 증가하는 경향을 보였다. RA 실험구의 숙성 완료일에 가장 높은 3,044 mg/L 가 검출되었다. 이는 대조구인 BA 실험구의 1,336 mg/L의 2배 이상에 해당하는 수치이다. Succinic acid는 전반적으로 숙성 초기에는 258~430 mg/L이 검출되었으나 숙성 완료일에 213~400mg/L로 초기 값보다 낮은 값을 나타내었다. Lactic acid는 RBA 실험구를 제외하고 숙성이 진행 될수록 증가하는 경향을 보였으며 숙성 완료일에 11,745~15,766 mg/L로 검출된 유기산의 함량 중 가장 높은 값을 나타내었다. Acetic acid는 BA 실험구를 제외하고는 숙성 중반 값이 떨어지다가 숙성 완료일에 증가하는 경향을 나타내었지만 숙성 초기의 873~1,590 mg/L보다 낮은 858~1,145 mg/L 값을 나타내었다.

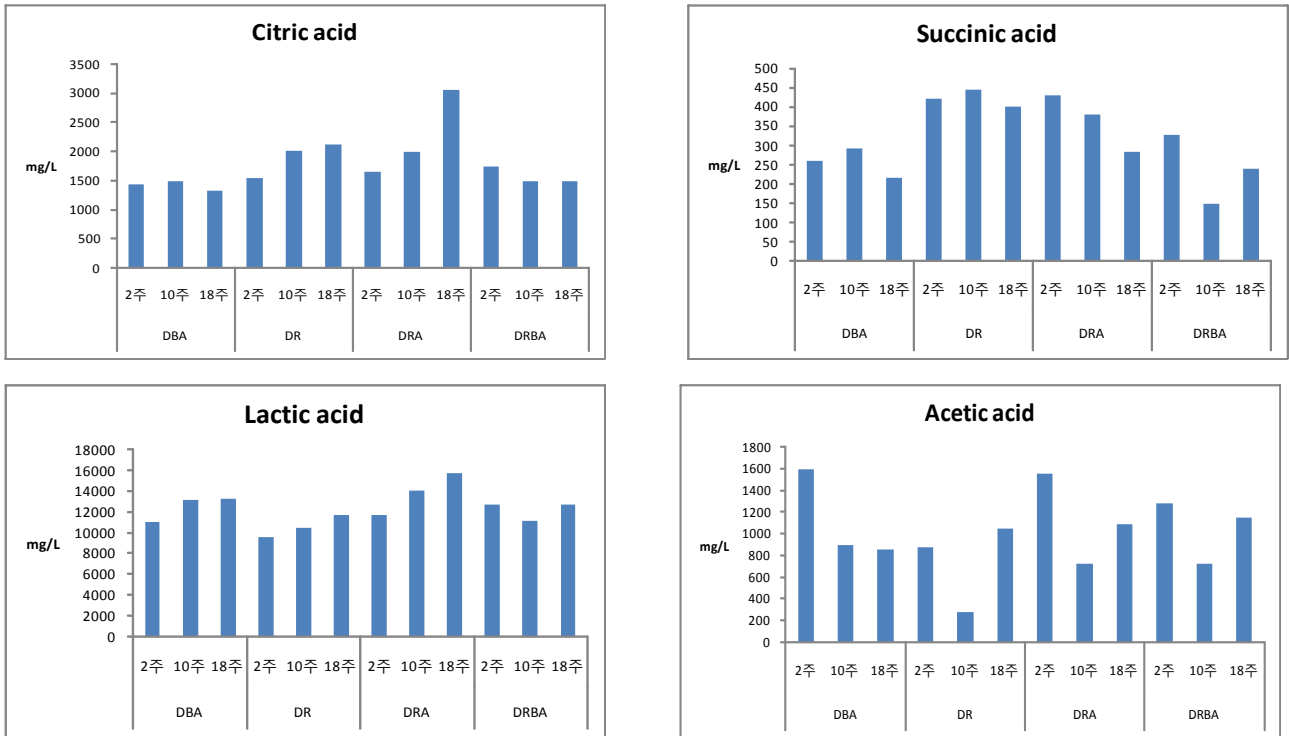


그림 13. RIBS 1 starter로 제조한 된장의 유기산 함량 변화

(2) 간장

간장의 유기산은 전반적으로 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였다.

Citric acid는 숙성 초기에는 대조구인 BA 실험구보다 높은 값을 나타냈으나 숙성이 진행될수록 감소하여 대조구보다 낮은 값을 나타냈다. 숙성 완료일 함량은 637~1,556 mg/L로 숙성이 진행될수록 급격하게 감소하였다. Succinic acid는 숙성 완료일에 134~325mg/L의 함량을 나타냈으며, citric acid와 유사하게 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였다. Lactic acid는 대조구인 BA 와 R 실험구는 숙성이 진행될수록 증가하는 경향을 보였고, RA와 RBA 실험구는 숙성이 진행될수록 낮아지는 경향을 나타내었다. lactic acid는 10,356~14,410 mg/L로 된장과 유사하게 검출된 유기산중 가장 높은 값을 나타내었다 Acetic acid는 숙성이 진행될수록 함량이 낮아지는 경향을 나타내었고, RA와 RBA 실험구의 경우 숙성 중반에 비해 숙성 완료일에 증가하는 경향을 보였지만 초기 값보다는 낮은 485 mg/L, 950 mg/L 값을 나타내었다.

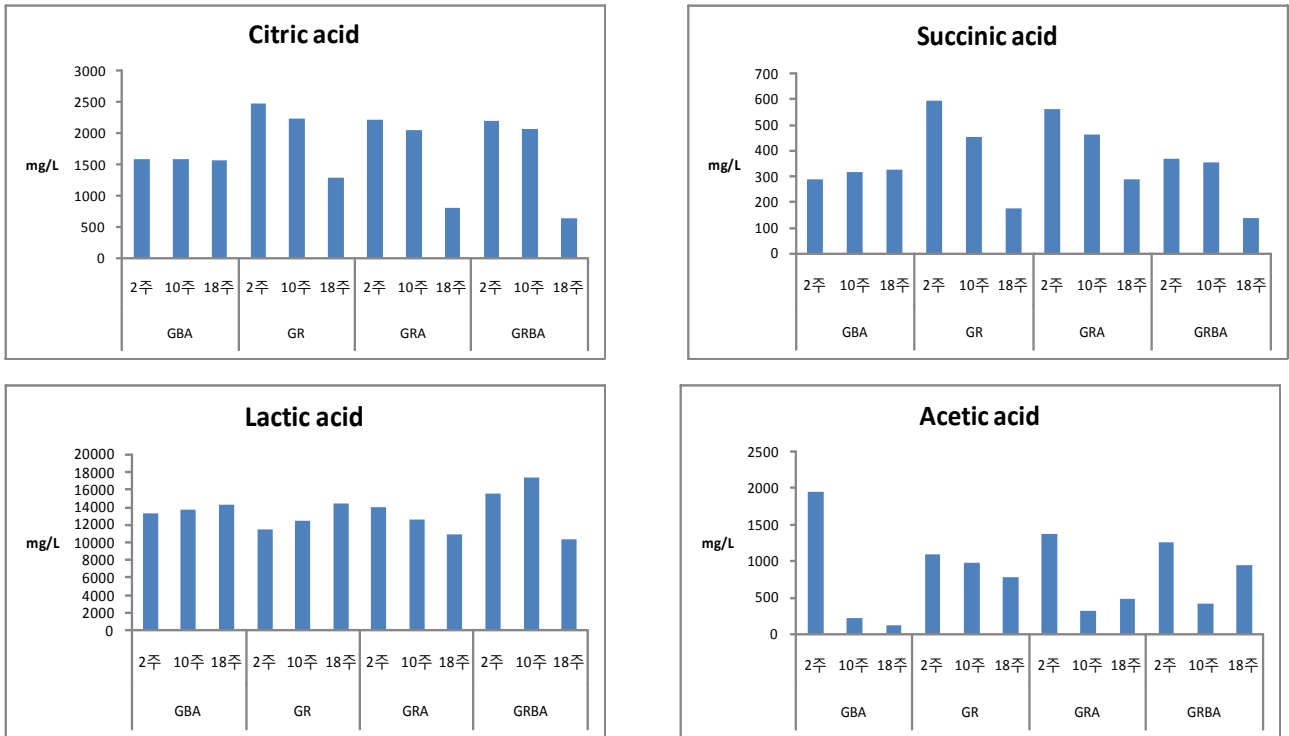


그림 14. RIBS 1 stater로 제조한 간장의 유기산 함량 변화

다. 유리아미노산

(1) 된장

숙성 기간 동안 된장의 유리아미노산의 변화량을 분석하였다.(표 10) 실험구별로 다른 결과를 나타내었다. 대조구의 경우 glutamic acid가 818.84 mg/L, 로 가장 높은 함유량을 나타내었고, R 실험구는 glycine은 1,178.39 mg/L, RA 실험구 역시 glycine이 961.80 mg/L로 가장 높았으며, RBA 실험구는 glutamic acid가 1,130.65 mg/L 으로 가장 높은 값을 나타내었다. Aspartic acid와 alanine, ornitine은 대조구를 제외한 실험구에서 숙성기간이 지날수록 증가하는 경향을 보였다.

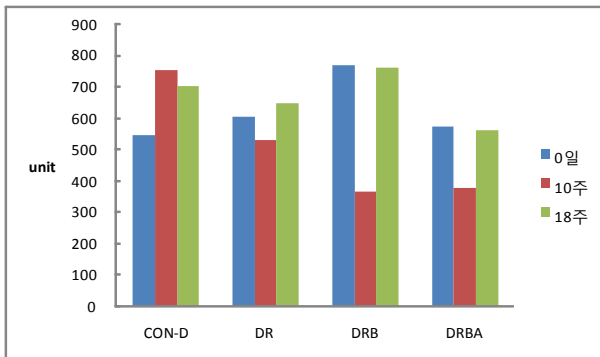
(2) 간장

숙성 기간 동안 간장의 유리아미노산의 경우(표 11) RBA 실험구를 제외한 실험구에서는 glutamic acid가 가장 높은 함량을 나타내었고, RBA 실험구에서는 glycine이 924.78 mg/L로 가장 함유량이 가장 높았다. 된장의 glutamic acid의 함량은 숙성초기보다 숙성 완료일에 증가하였지만 간장의 경우, 숙성초기에 비해 숙성 완료일에는 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 glycine, threonine, alanine에서 유사하게 나타났다. Threonine과 ornitine이 각각 151.91~682.21 mg/L, 159.64~233.69 mg/L로 glutamic acid와 glycine 다음으로 함량이 높게 나타났다.

7. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 β -amylase 활성

RIBS 1 starter를 이용하여 제조한 메주를 숙성하여 만들어진 된장 및 간장의 β -amylase 활성을 측정한 결과는 그림 15와 같다. 된장의 경우 대조구와 R 실험구는 숙성 초기에 비해 숙성 완료일에 증가된 경향을 보였고, RB와 RBA 실험구는 숙성 완료일에 숙성초기보다 다소 낮은 761unit/g, 563unit/g 이었다. 간장의 β -amylase 활성 값은 RB 실험구를 제외하고 숙성 완료일에 숙성 초기보다 낮은 값을 나타내었다. 숙성 완료일 RB 실험구의 β -amylase 활성은 827unit/g으로 R 실험구 302 unit/g보다 약 2.7배 높은 값을 나타내었다. β -amylase 활성은 된장과 간장에서 모두 RB 실험구가 가장 높은 수치를 나타내었다.

(a)



(b)

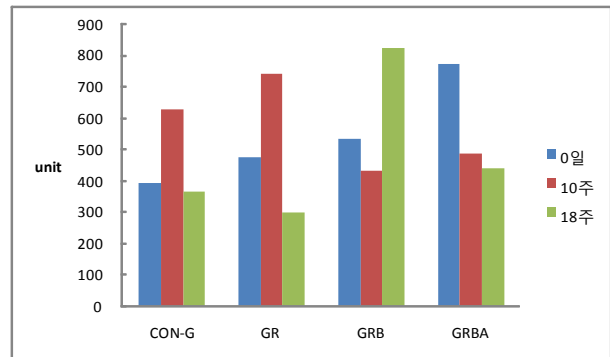


그림 15. RIBS 1 starter로 제조한 된장 및 간장의 β -amylase 함량 변화 (a)된장, (b) 간장

표10. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장의 유리아미노산

(단위 : mg/L)

	Aspartic acid			Threonine			Glutamic acid			Glycine			Alanine		
	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주
BA	4.60	6.54	3.82	401.79	615.80	419.20	814.83	922.84	818.84	30.04	683.42	594.62	8.29	6.30	6.79
R	32.04	35.26	47.83	ND ¹⁾	568.54	876.84	789.71	912.82	1025.96	592.00	538.03	1178.39	46.48	56.04	74.87
RA	1.36	18.31	21.93	45.68	1323.74	864.51	271.84	1191.15	662.59	67.57	840.84	961.80	3.99	8.10	14.07
RBA	0.48	9.45	15.37	650.74	402.69	886.90	792.01	435.23	1130.65	645.10	448.04	1005.78	6.00	11.37	11.79
	Valine			Leucine			Phenylalanine			Ornithine			Lysine		
	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주
BA	81.40	78.73	87.19	35.63	13.54	15.12	61.64	73.65	74.09	212.87	147.67	149.49	59.78	ND	ND
R	77.08	106.21	136.95	ND	20.50	37.03	66.90	99.41	149.09	165.90	205.01	299.78	66.80	ND	ND
RA	154.96	90.72	103.15	109.53	25.74	33.06	89.90	126.03	135.56	99.35	247.78	261.18	107.70	ND	ND
RBA	82.54	112.16	49.26	ND	20.85	26.72	62.64	88.78	128.63	132.55	175.41	285.13	ND	ND	ND

1) ND : Not detect

표11. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 간장의 유리아미노산

(단위 : mg/L)

	Aspartic acid			Threonine			Glutamic acid			Glycine			Alanine		
	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주
BA	8.49	15.33	19.72	741.78	736.24	682.21	1127.12	1086.25	1123.39	981.12	816.12	830.21	7.40	7.72	7.45
R	54.14	39.52	31.21	942.28	494.88	145.31	1172.78	1061.81	1047.41	861.53	854.55	796.84	55.53	39.44	7.85
RA	22.31	26.33	33.92	1744.07	1587.09	833.74	1234.44	1162.07	910.04	1114.78	1019.87	736.17	9.22	8.95	7.79
RBA	13.75	7.52	19.63	1160.23	105.16	151.91	1319.04	1329.88	534.22	1053.19	1121.16	924.78	8.74	9.47	5.00
	Valine			Leucine			Phenylalanine			Ornithine			Lysine		
	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주	2주	10주	18주
BA	94.32	72.80	73.54	13.70	12.51	13.50	59.72	58.06	59.77	157.70	151.64	159.64	ND ¹⁾	ND	ND
R	92.35	80.77	121.19	16.14	15.24	19.38	71.05	67.23	76.68	194.85	186.30	224.72	ND	ND	ND
RA	111.34	97.00	99.11	18.63	19.05	20.85	78.95	80.79	82.03	215.08	218.89	233.69	ND	ND	ND
RBA	115.21	111.85	86.01	17.97	18.24	13.18	75.73	76.32	59.54	206.96	227.70	179.54	ND	ND	ND

8. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 위해물질분석

가. 바이오제닉아민

RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 바이오제닉아민 분석 결과는 다음과 같다. 된장의 histamine은 349.8~469.0 mg/L, 간장의 hitamine은 284.3~309.9 mg/L가 검출되었다. 현재 우리나라의 histamine 안전기준은 마련되어있지 않지만, 미국 식약청(FDA)의 안전기준인 500 mg/L에 미치지 못하는 수준이었다. Tyramine의 경우 된장은 188.2~204.8 mg/L, 간장은 149.0~156.3 mg/L가 검출되었다.

표12. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 바이오제닉아민

(단위 : mg/L)

		Control(BA)	R	RA	RBA
된장	Histamine	394.1	469.0	468.3	349.8
	Tyramine	188.2	204.8	192.0	192.9
간장	Histamine	294.5	309.9	309.6	284.3
	Tyramine	149.0	156.3	150.1	151.3

나. 병원성미생물

RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 병원성미생물 분석한 결과는 표13과 같다. 된장의 경우 R 실험구를 제외한 대조구, RA, RBA 실험구에는 *B.cereus*가 검출되었고, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Stap. aureus*, *Cl. perfringenes* 등의 병원성미생물은 모두 음성의 결과를 나타내었다. *B.cereus*의 경우 검출되었지만 법적 기준인 10^4 이하의 값으로 검출되었다. 된장으로 숙성되기 전의 메주에서는 *B.cereus*가 검출되지 않은 것으로 보아, 극미량 있던 개체 수가 숙성 중에 증가한 것으로 판단되어 진다. 간장의 경우 *B.cereus*를 포함한 모든 병원성미생물은 검출 되지 않았다.

표13. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 병원성미생물

(단위 : CFU/mL)

		<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Cl. perfringenes</i>
된장	대조구 (BA)	1.0×10 ¹	음성	음성	음성	음성
	R	불검출	음성	음성	음성	음성
	RA	8.5×10 ³	음성	음성	음성	음성
	RBA	3.0×10 ¹	음성	음성	음성	음성
간장	대조구 (BA)	불검출	음성	음성	음성	음성
	R	불검출	음성	음성	음성	음성
	RA	불검출	음성	음성	음성	음성
	RBA	불검출	음성	음성	음성	음성

다. 총아플라톡신

RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 총아플라톡신을 분석한 결과 된장의 대조구 및 R 실험구, 간장의 대조구, RA 및 RBA 실험구에서는 0.0 µg/kg, 된장의 RA 및 RBA, 간장의 R 실험구에서는 불검출로 분석되었다.

표14. RIBS 1 starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 총아플라톡신

(단위 : µg/kg)

	Control(BA)	R	RA	RBA
된장	0.0	0.0	불검출	불검출
간장	0.0	불검출	0.0	0.0

9. ORIBS starter의 병원성미생물 분석

개발된 starter culture인 ORIBS의 *B. cereus*에 대한 안전성을 확인하기 위하여 *B. cereus*를 포함한 병원성미생물을 분석하였다. 결과는 표 15와 같다. 분석 결과 병원성미생물 항목 모두에서 음성의 결과를 보였다. 따라서 개발된 ORIBS 역시 *B. cereus*가 제거가 된 것으로 보여지며, 장류 제조 등에 사용하여도 안전한 것으로 판단되어진다.

표 15. ORIBS의 병원성미생물 분석

	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Cl. perfringenes</i>
결과	음성	음성	음성	음성	음성

10. ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 품질 분석

가. 유리당

ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 유리당을 분석한 결과는 다음과 같다. Maltose는 OR 실험구를 제외한 실험구들에서 검출되지 않았으며 OR 실험구의 발효 6일차에서 1,547 mg/L가 검출되었지만, 숙성 완료일에는 검출되지 않았다. Glucose는 전반적으로 발효가 진행되면서 증가하였다. 발효초기에는 ORBA는 검출되지 않았으며 대조구 81 mg/L, OR 실험구 165 mg/L, ORA 실험구 360 mg/L의 함량을 나타내었으나 발효가 완료된 12일차에는 급격히 증가하여 5,515~6,883 mg/L로 검출되었다. Fructose는 실험구에 따라 상이한 결과를 보였다. 대조구의 경우 발효초기 61 mg/L에서 발효 6일차에 급격히 증가하여 26,448 mg/L가 검출되었다가 발효완료 시점에 16,988 mg/L로 감소하였고, OR 실험구는 발효초기 157 mg/L에서 증가하여 28,064 mg/L가 검출되었다. ORA 실험구와 ORBA 실험구는 각각 498 mg/L, 200 mg/L에서 발효 6일차에 27,833 mg/L, 27,060 mg/L로 증가하였다가 발효 완료일에 10,091 mg/L, 11,865mg/L로 50% 정도 감소하였다.

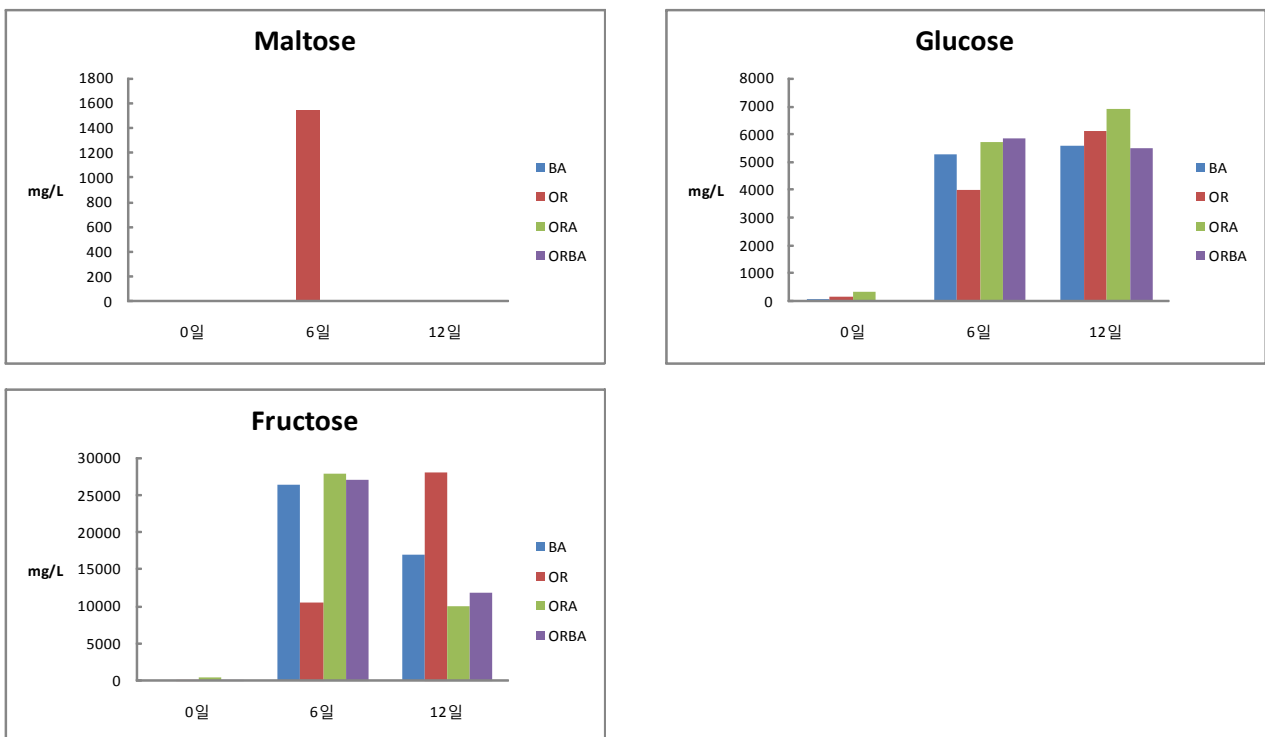


그림 16. ORIBS stater로 제조한 메주의 유리당 함량 변화

나. 유기산

Citric acid는 모든 발효 초기 모든 실험구에서 검출되지 않았다. OR 실험구의 경우 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 보였고, OR 실험구를 제외한 실험구들은 발효 6일차에 증가하였다가 발효 12일차에 감소하여 대조구 4,333 mg/L, ORA 실험구 3,358 mg/L, ORBA 실험구 3,401 mg/L가 검출되었다. Succinic acid는 모든 실험구에서 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 보였으며 발효 12일차에 대조구 13,670 mg/L, OR 실험구 6,201 mg/L, ORA 실험구는 11,668 mg/L, ORBA 실험구는 2,124 mg/L로 실험구중 가장 높은 값을 나타내었다.

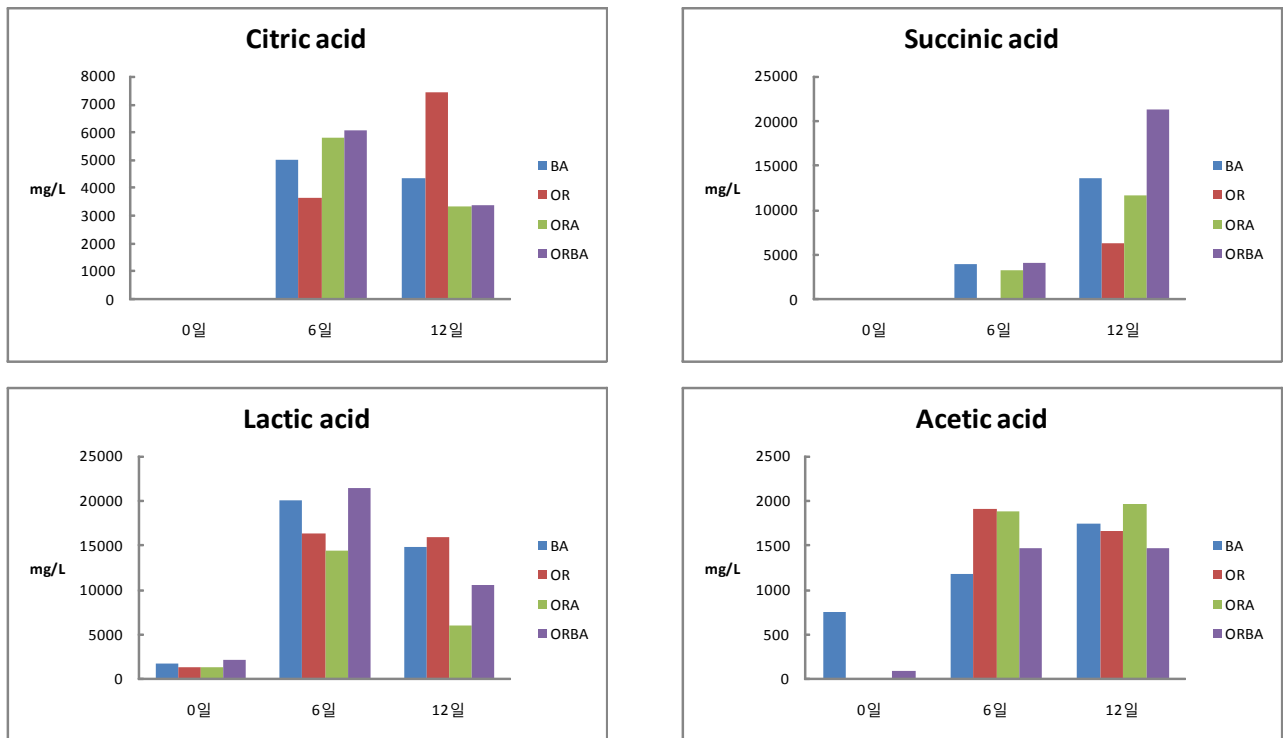


그림 17. ORIBS stater로 제조한 메주의 유기산 함량 변화

Lactic acid는 발효 초기에 1,346~2,187 mg/L 분포를 보이다 발효 6일차에 가장 높은 함량을 보였고, 발효 12일차에는 감소하여 1,475~1,970 mg/L의 값을 나타내었다. Acetic acid는 실험구에 따라 다른 경향을 보였다, 대조구와 ORA 실험구의 경우 발효가 진행될수록 증가하였으며, OR 실험구는 발효 6일차에 급격히 증가하였다가 발효 완료일에 다소 감소하는 경향을 보였고, ORBA 실험구의 경우 발효 6일차에 증가하였다가 발효 12일차에는 유사한 값을 유지하였다.

다. 유리아미노산

메주의 유리아미노산의 결과는 표 16과 같다. 메주의 유리아미노산 중 가장 많은 함량은 threonine으로 발효가 진행될수록 증가하여 267.12~625.15 mg/L가 검출되었다. 반면 glutamic

acid는 발효 초기에 38.93~67.59 mg/L가 검출되었지만 발효 완료일에 14.49~27.87 mg/L 가 검출되어 발효가 진행될수록 감소한 것으로 나타났다. glycine의 경우 발효가 진행될수록 증가하여 발효 12일차에 8.01~15.91 mg/L가 검출되었다. Urea의 함량은 OR 실험구를 제외한 실험구에서 발효가 진행될수록 증가하였고, OR 실험구는 발효 초기에 비해 발효 완료일에 더 낮은 함량을 나타내었다. Alanine은 발효 초기에 가장 높은 값을 보였다.

11. ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 β -amylase 활성

메주의 β -amylase 활성을 분석한 결과는 그림 18과 같다. 대조구의 경우 숙성이 진행될수록 함량이 증가하여 숙성 완료일에는 755 unit/g 이었고, OR 실험구와 ORA실험구는 숙성초기에 각각 941 unit/g, 1,042 unit/g 였으나 숙성 6일차에 급격히 감소하여 숙성 완료일에는 462 unit/g, 541 unit/g을 나타내었다. ORBA 실험구는 숙성이 진행될수록 증가하는 경향을 보였고, 숙성 완료일에는 611 unit/g으로 증가하였다.

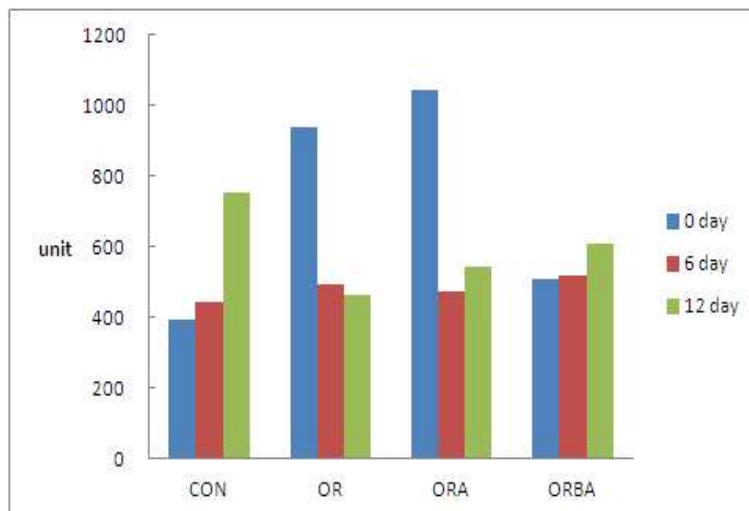


그림 18. ORIBS stater로 제조한 메주의 β -amylase 함량 변화

표16. ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 유리아미노산

(단위 : mg/L)

	Urea			Aspartic acid			Threonine			Glutamic acid			Glycine		
	0일	6일	12일	0일	6일	12일	0일	6일	12일	0일	6일	12일	0일	6일	12일
BA	27.93	ND	38.85	3.23	10.43	7.00	2.46	418.89	625.15	45.05	20.65	27.59	0.30	11.19	14.41
OR	19.85	ND	6.55	4.90	1.2	8.13	3.84	38.69	267.12	67.59	15.69	14.49	0.34	1.97	8.01
ORA	9.38	29.25	40.38	4.96	14.76	26.69	3.44	418.10	693.80	48.43	22.62	27.87	0.38	11.04	15.91
ORBA	23.10	18.86	29.94	4.30	11.93	5.41	2.99	458.29	484.67	38.93	23.63	21.06	0.34	12.14	11.39
	Alanine			Valine			Leucine			Ornithine			Lysine		
	0일	6일	12일	0일	6일	12일	0일	6일	12일	0일	6일	12일	0일	6일	12일
BA	11.38	1.80	7.57	1.56	28.82	26.36	10.71	6.28	11.79	30.88	27.68	39.79	5.91	3.45	9.23
OR	8.68	1.38	2.31	1.64	28.88	27.72	8.90	0.98	6.89	22.90	4.03	0.40	5.20	0.25	2.66
ORA	8.69	2.30	3.79	1.44	27.84	27.18	8.09	6.62	12.96	25.49	27.60	0.44	5.71	3.38	9.66
ORBA	11.64	1.91	5.45	1.34	31.73	20.52	10.09	7.79	9.56	30.93	31.68	31.69	6.51	4.07	7.06

12. ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 위해물질분석

가. 바이오제닉아민

숙성 완료일인 숙성 12차의 시료의 바이오제닉함량을 분석한 결과 histamine은 ORA 실험구에서 4.0 mg/L로 검출된 것을 제외하고는 대조구, OR, ORBA 실험구에서는 검출되지 않았다. 이와 반대로 tyramine은 ORA 실험구에서 검출되지 않았고, 대조구 543mg/L, OR 8.7 mg/L, ORBA 279.6 mg/L로 검출되었다.

표17. ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 바이오제닉아민

(단위 : mg/L)

	Control(BA)	OR	ORA	ORBA
Histamine	ND ¹⁾	ND	4.0	ND
Tyramine	543.5	8.7	ND	279.6

1) ND : Not detect

나. 병원성미생물

ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 병원성미생물을 분석한 결과 모든 실험구 및 병원성미생물에서 불검출 및 음성의 결과를 나타내었다.

표18. ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 병원성미생물

(단위 : CFU/mL)

	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Cl. perfringenes</i>
대조구 (BA)	불검출	음성	음성	음성	음성
OR	불검출	음성	음성	음성	음성
ORA	불검출	음성	음성	음성	음성
ORBA	불검출	음성	음성	음성	음성

다. 총아플라톡신

메주의 숙성 완료일은 12일차의 시료들의 총아플라톡신을 분석한 결과는 표19와 같다. 대조구의 경우 불검출로 분석되었고, OR 실험구는 0.9 µg/kg, ORA 실험구는 0.0 µg/kg, ORBA 실험

험구는 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 함량 결과를 나타내었지만 식약처 장류(메주제외) 기준인 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에는 미치지 못하는 수준이었다.

표19. ORIBS starter를 이용하여 개발한 메주의 총아플라톡신

(단위 : $\mu\text{g}/\text{kg}$)

	Control(BA)	OR	ORA	ORBA
메주	불검출	0.9	0.0	0.1

13. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 품질 분석

가. 유리당

ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 유리당 함량을 분석한 결과는 다음과 같다.

Maltose의 경우 전반적으로 발효가 진행될수록 함량이 증가하는 경향을 보였다. 발효 72시간 경과 후 40°C 0.1% OR+B 실험구에서 5,158mg/L로 가장 높은 함량을 나타내었고, 이는 발효 72시간 경과 후 50°C 0.1% OR+B 실험구인 307mg/L에 비해 약 16배 이상 높은 함량이었다. Fructose 역시 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 보였으며, 이러한 경향은 glucose에서도 유사하였다.

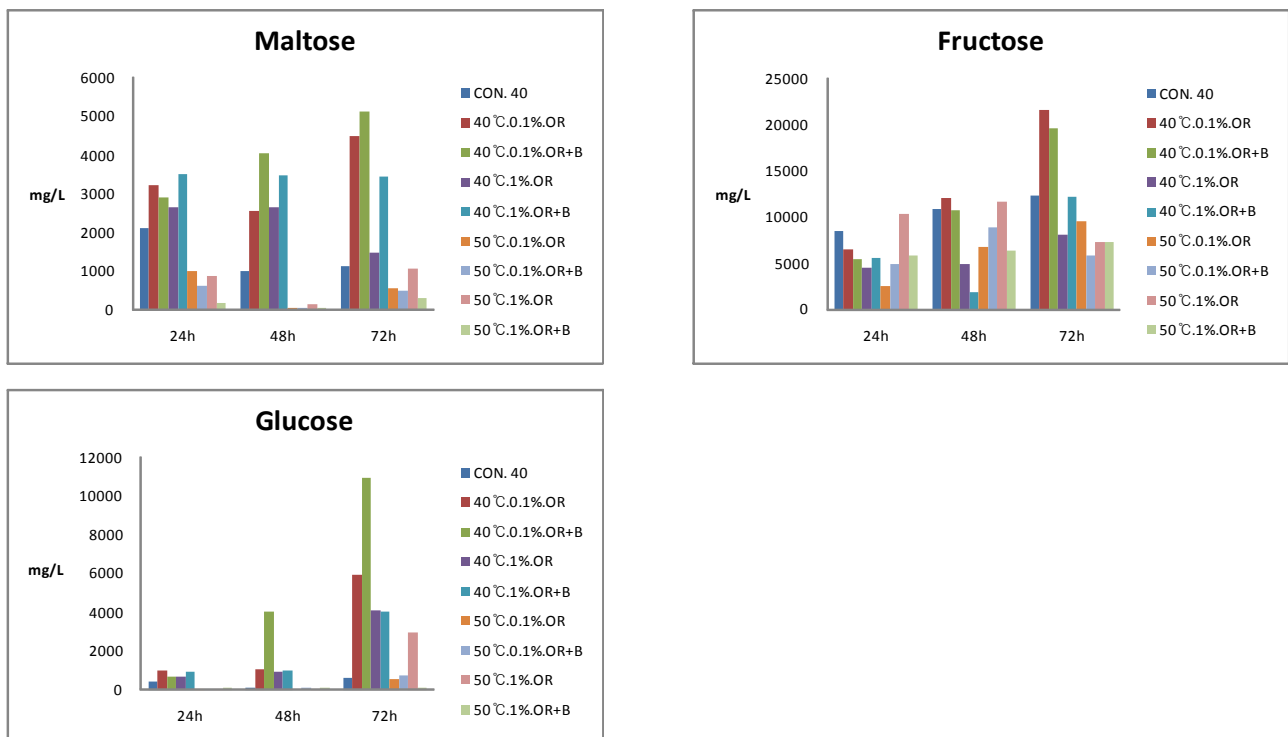


그림 19. ORIBS stater로 제조한 청국장의 유리당 함량 변화

나. 유기산

ORIBS stater로 제조한 청국장의 유기산의 분석결과는 다음과 같다. Citric acid는 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 보였고, 특히 균주의 접종온도가 40℃ 처리구가 8,561~9,800 mg/L로 50℃ 처리구의 247~621 mg/L 함량에 비해 높은 함량을 나타내었다. Lactic acid의 경우 접종온도가 40℃ 처리구는 발효시간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였고, 50℃ 처리구는 발효시간이 경과할수록 감소하는 경향을 보였다.

Succinic acid는 접종온도가 50℃ 경우, 발효 48시간 경과하였을 때 265~532 mg/L로 가장 낮은 함량을 보이다가 72시간 경과 후에는 594~914 mg/L로 증가하였다. 40℃의 경우 발효 24시간 과 발효 72시간의 함량이 유사하였다. Acetic acid의 함량은 접종온도 40℃와 50℃에서 유사한 함량을 나타내었다.

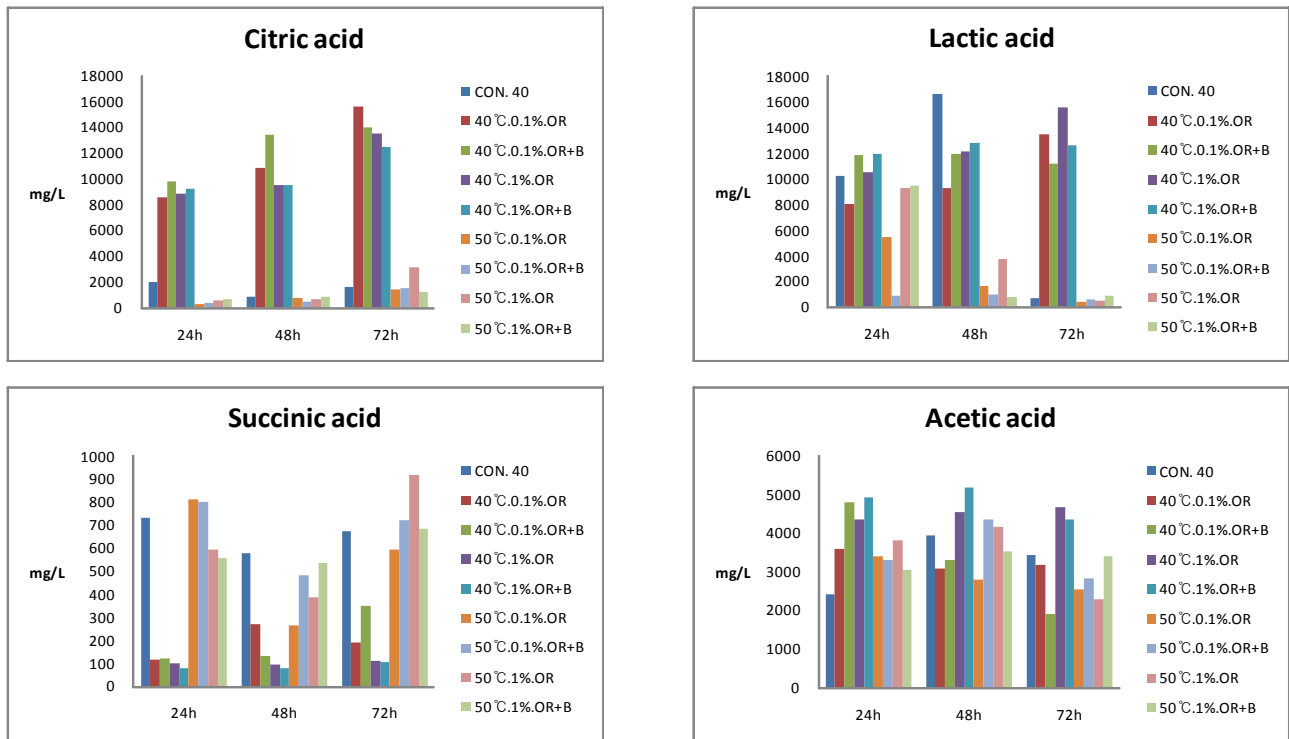


그림 20. ORIBS stater로 제조한 청국장의 유기산 함량 변화

다. 유리아미노산

ORIBS stater로 제조한 청국장의 유리아미노산 결과는 다음과 같다. 유리아미노산 중 가장 많은 함량을 나타낸 것은 glutamic acid로 대조구에서 발효72h에 가장 높은 80.00 mg/L가 검출되었고, 50℃ 0.1% OR+B 실험구와 50℃ 1% OR 실험구에서 각각 72.43 mg/L, 49.42 mg/L가 검출되었다. 대조구의 glutamic acid의 함량은 발효가 진행 될수록 증가하였으나, 두 실험구의 경우 발효 48h에는 증가하였다가 발효72h에 다시 감소하였다. 하지만 두 실험구 모두 발효 48h을 완료 시점으로 결정하였기 때문에 발효 완료일에 가장 높은 함량을 나타낸 것으로 판단

할 수 있다. 이러한 경향은 glycine에서도 동일하게 확인할 수 있었다.

표20. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장용 유리아미노산

(단위 : mg/L)

	Urea			Aspartic acid			Threonine			Glutamic acid			Glycine		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
CON	ND ¹⁾	21.94	19.91	0.58	0.12	0.2	42.74	68.99	76.29	41.12	73.91	80.00	1.79	4.09	4.21
50℃ 0.1% OR+B	1.63	4.62	13.29	0.20	4.14	0.20	2.33	82.50	35.58	46.62	75.31	72.43	2.06	5.80	3.23
50℃ 1% OR	0.23	8.83	9.08	0.06	0.16	0.18	27.62	50.79	20.67	41.70	65.47	49.42	2.41	4.99	2.04
	Alanine			Valine			Leucine			Ornithine			Lysine		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
CON	0.52	0.85	2.31	34.42	32.78	52.24	ND	ND	4.34	0.07	1.05	0.68	2.32	2.19	2.98
50℃ 0.1% OR+B	0.41	0.84	1.48	24.91	40.82	36.24	1.41	4.47	4.87	0.20	8.30	9.28	1.23	3.06	3.50
50℃ 1% OR	0.50	1.18	1.23	23.62	37.06	32.59	0.11	2.68	3.39	3.62	6.24	6.23	0.73	0.99	2.25

1) ND : Not detect

14. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 β -amylase 활성

청국장의 β -amylase 활성은 다음과 같다. β -amylase 활성은 발효시간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였으며, 40°C 1% ORB 실험구와 50°C 0.1% OR, 50°C 1% ORB 실험구는 발효 48시간일 때 가장 높은 활성을 나타내었다.

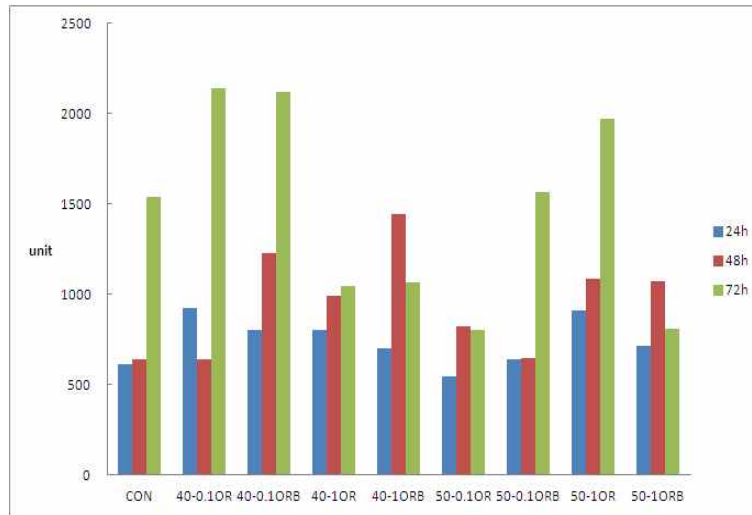


그림 21. ORIBS starter로 제조한 청국장의 β -amylase 함량 변화

15. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 위해물질분석

가. 바이오제닉아민

ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 바이오제닉아민 함량 분석 결과는 표21과 같다. Histamine의 경우 대조구에서는 42.2 mg/L, 50°C OR+ B 0.1% 실험구에서는 42.1 mg/L, 50°C OR 1% 실험구에서는 21.2 mg/L의 함량이 검출 되었다. Tyramine의 경우 대조구에서 239.8mg/L로 실험구인 50°C OR+ B 0.1%의 33.9 mg/L와 50°C OR 1%의 63.4 mg/L의 함량보다 높은 값을 나타내었다.

표21. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 바이오제닉아민

(단위 : mg/L)

	Control	50°C OR+ B 0.5%	50°C OR 1%
Histamine	42.2	42.1	21.2
Tyramine	239.8	33.9	63.4

나. 병원성미생물

ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 병원성미생물을 분석한 결과 모든 실험구 및 병원성미생물에서 불검출 및 음성의 결과를 나타내었다.

표22. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 병원성미생물

(단위 : CFU/mL)

	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Cl. perfringenes</i>
대조구	불검출	음성	음성	음성	음성
50℃ 0.1% OR+B	불검출	음성	음성	음성	음성
50℃ 0.1% OR	불검출	음성	음성	음성	음성

다. 총아플라톡신

청국장의 총아플라톡신을 분석한 결과 대조구와 50℃ 0.1% OR+B 실험구에서는 불검출로 분석되었고, 50℃ 0.1% OR% 실험구는 0.0 µg/kg의 수치를 나타내었다.

표23. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 총아플라톡신

(단위 : µg/kg)

	Control	50℃ 0.1% OR+B	50℃ 0.1% OR%
청국장	불검출	불검출	0.0

16. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 관능검사

ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 관능의 순위법 검사결과 총 9개의 실험구 중 50℃ 0.1% OR+B 와 50℃ 0.1% OR% 실험구가 17점으로 가장 높은 점수로 함께 되었다. 관능검사 결과를 토대로 최종 샘플로 설정하고, 유리아미노산 및 위해물질 분석에 사용하였다.

표24. ORIBS starter를 이용하여 개발한 청국장의 관능검사

	1순위 배점	2순위 배점	3순위 배점	합계
Control	5	6	0	11
40℃ 0.1% OR	5	6	0	11
40℃ 0.1% OR+ B	5	0	2	7
40℃ 1% OR	0	0	2	2
40℃ 1% OR+ B	0	6	1	7
50℃ 0.1% OR	15	0	2	17
50℃ 0.1% OR+ B	10	6	1	17
50℃ 1% OR	0	3	1	4
50℃ 1% OR+ B	0	0	0	0

17. ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장 품질 분석

가. 유리당

(1) 된장

ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장의 유리당의 분석 결과는 다음과 같다. 전체적인 유리당함량은 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였다. Maltose는 숙성 10주차의 OR실험구에서 가장 높은 436 mg/L가 검출되었고 대조구와 ORBA 실험구의 값은 각각 108 mg/L 와 111 mg/L로 유사하였다. 반면 RA 실험구에서는 숙성기간동안 검출되지 않았다. Glucose의 경우 ORA 실험구에서 1477mg/L로 가장 높은 함량을 나타내었다. Fructose의 경우 OR 과 ORA 실험구에서 7630mg/L 와 7366mg/L가 각각 검출되었고, ORBA실험구의 함량은 5811mg/L로 대조구의 5161mg/L 보다 다소 높았다.

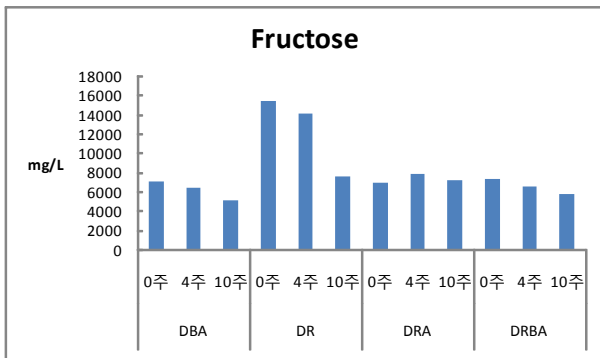
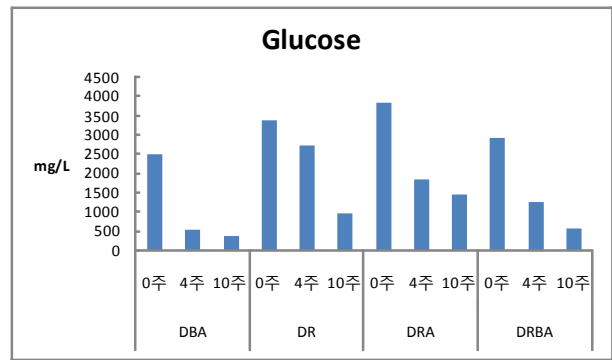
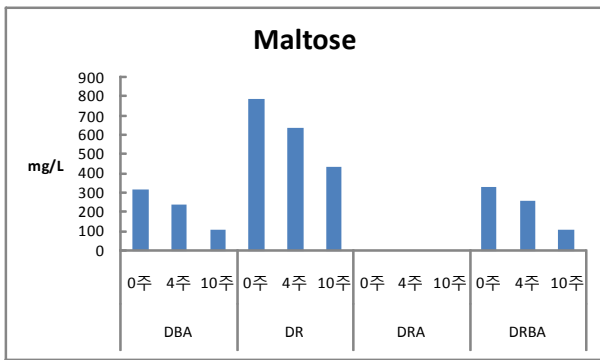


그림 22. ORIBS stater로 제조한 된장의 유리당 함량 변화

(2) 간장

간장의 유리당 함량은 된장의 함량과 유사하게 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였다. Maltose의 함량은 대조구에서 가장 높은 함량을 나타내었다. Glucose의 경우 숙성초기에는 ORA 실험구가 2743 mg/L로 가장 높은 값을 나타내었지만 숙성이 완료된 10주차에는 713mg/L로 OR 실험구에서 가장 높은 값이 검출되었다. Fructose는 OR 실험구에서 7910mg/L로 가장 높은 검출값을 나타내었다.

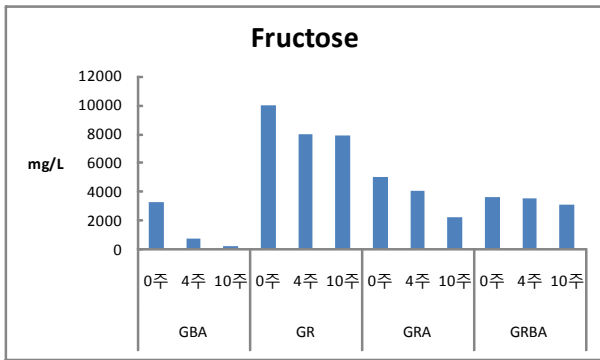
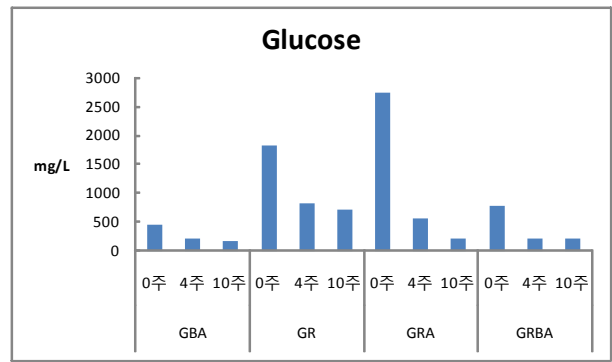
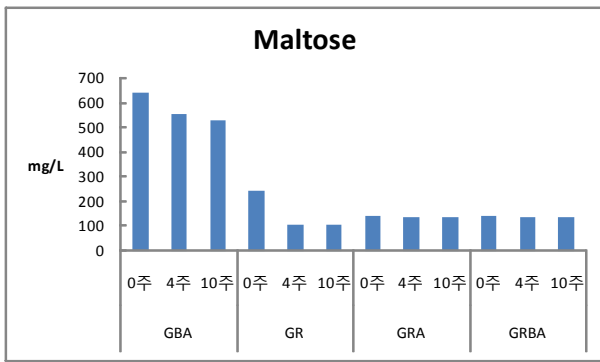


그림 23. ORIBS stater로 제조한 간장의 유리당 함량 변화

나. 유기산

(1) 된장

된장의 유기산 함량은 다음과 같다. Citric acid는 OR 실험구를 제외한 실험구에서 숙성 초기에만 검출되었다가 숙성 4주차 이후에는 검출되지 않았다. Lactic acid는 숙성이 진행될수록 증가하는 경향을 보였으며 대조구 11,788 mg/L, OR 10,872 mg/L, ORA 8,490mg/L, 9,495 mg/L로 검출되었다. Acetic acid의 경우 OR 실험구를 제외한 실험구에서 숙성중반 증가하였다가 숙성 완료일에 감소하는 경향을 보였다. ORA 실험구에서 1,433 mg/L 로 가장 높은 값을 나타내었다. 반면 Succinic acid는 모든 실험구에서 검출되지 않았다.

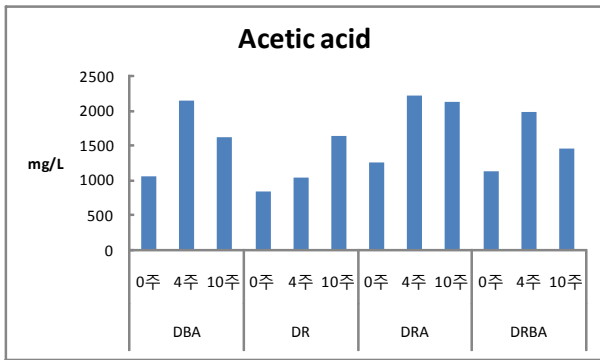
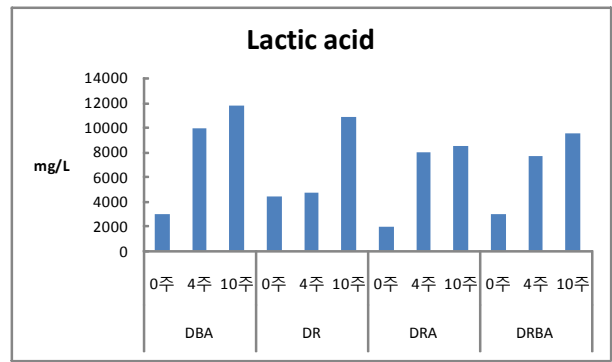
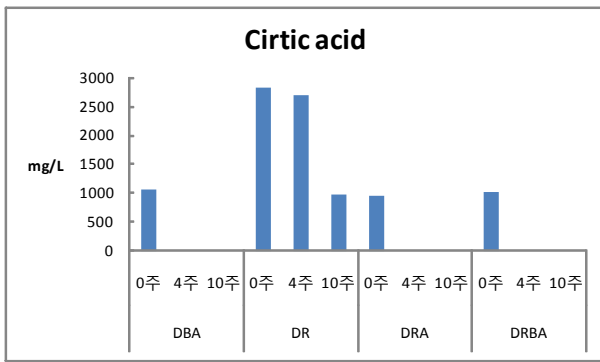


그림 24. ORIBS stater로 제조한 된장의 유기산 함량 변화

(2) 간장

Citric acid의 함량은 된장의 경향과 같이 OR 실험구를 제외하고 숙성 초기에 검출되었다가 숙성 중반부터 검출되지 않았다. OR실험구의 citric acid는 숙성이 진행됨에 따라 증감이 거의 일어나지 않았다. Lactic acid의 경우 대조구를 제외한 실험구에서 숙성이 진행될수록 증가하는 경향을 보였으며 ORA 실험구에서 11,840mg/L로 가장 높은 함량을 나타내었다.

Acetic acid는 OR 실험구를 제외한 실험구에서 숙성 초기에 비해 숙성 완료일에 함량이 높아짐을 확인할 수 있었다. Succinic acid는 된장과 다르게 대조구의 숙성 완료일과 ORA 실험구의 숙성완료일에 검출되었으며, 각각 936mg/L, 3,787mg/L씩 검출되었다.

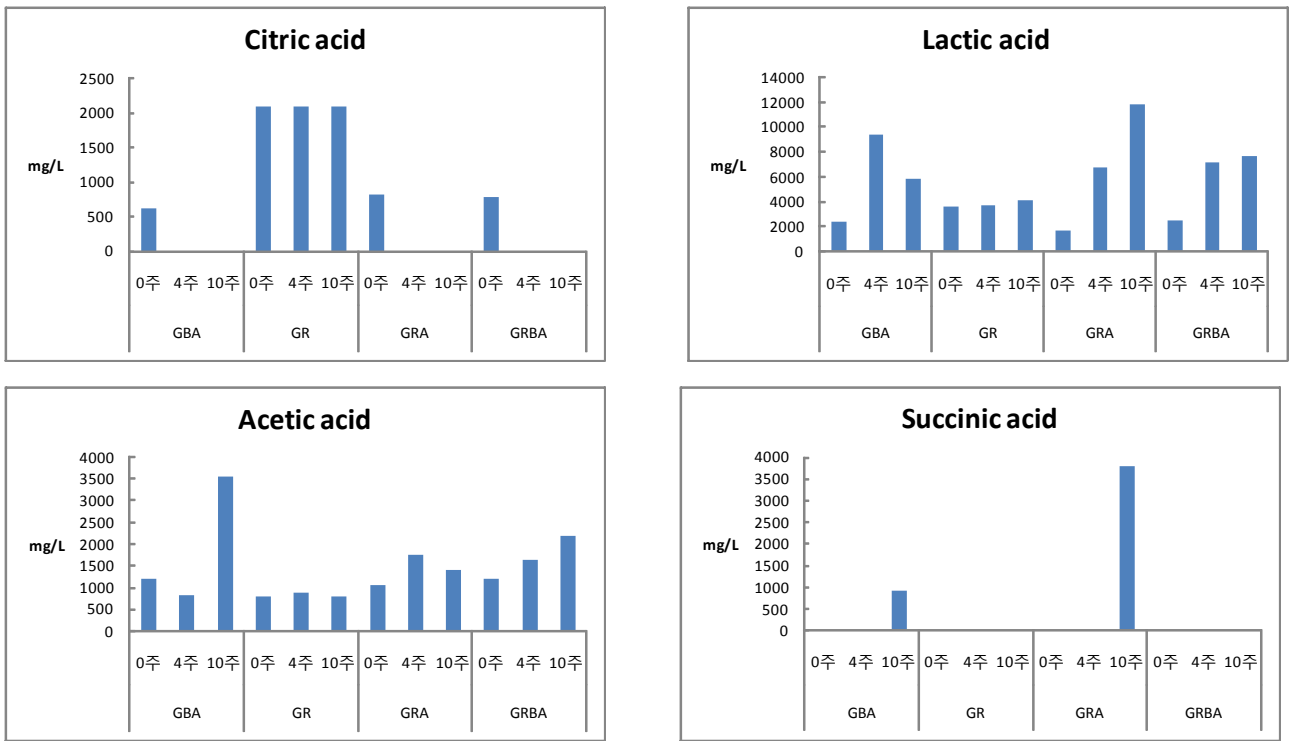


그림 25. ORIBS stater로 제조한 간장의 유기산 함량 변화

다. 유리아미노산

(1) 된장

ORIBS stater로 제조한 된장의 유리아미노산 함량은 표24와 같다. 유리아미노산 중 glutamic acid를 제외한 유리아미노산들에서 전반적으로 숙성 초기보다 숙성 완료일에 높은 함량을 나타내었다. Glutamic acid의 경우 ORA 실험구에서 272.69 mg/L로 가장 높은 값을 나타내었다. Threonine이 811.98~975.35 mg/L가 검출되어 유리아미노산 중 가장 높은 값을 나타내었다. 그 다음으로는 urea, ornitine, aspartic acid, valine이 많은 함량을 나타내었다.

(2) 간장

간장의 유리아미노산 중 가장 많은 함량을 나타낸 것은 threonine으로 126.14~668.35 mg/L가 검출되었다, Glutamic acid는 대조구가 54.58 mg/L로 가장 낮았고, 실험구에서는 132.32~179.48 mg/L로 threonine 다음으로 높은 함량이었다. 간장의 유리아미노산의 함량이 된장의 유리아미노산 함량보다 전반적으로 낮은 값을 나타내었다. 이는 RIBS 1 starter로 제조한 된장, 간장의 결과와는 일치하지 않는 결과이다.

18. ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장 β -amylase 활성

된장 및 간장 β -amylase 활성은 그림 26의 결과와 같다. 된장의 경우 숙성초기에 비해 숙성

완료시점에 β -amylase함량이 감소한 경향을 보였다. 숙성 10주차의 대조구는 421 unit/g으로 가장 높았고 다른 실험구는 340~382 unit/g의 분포로 유사하였다. 간장은 대조구를 제외한 실험구에서 숙성이 진행될수록 β -amylase함량이 감소한 경향을 보였고, OR 실험구에서 396 unit/g으로 다른 실험구에 비해 다소 높은 값을 나타내었다.

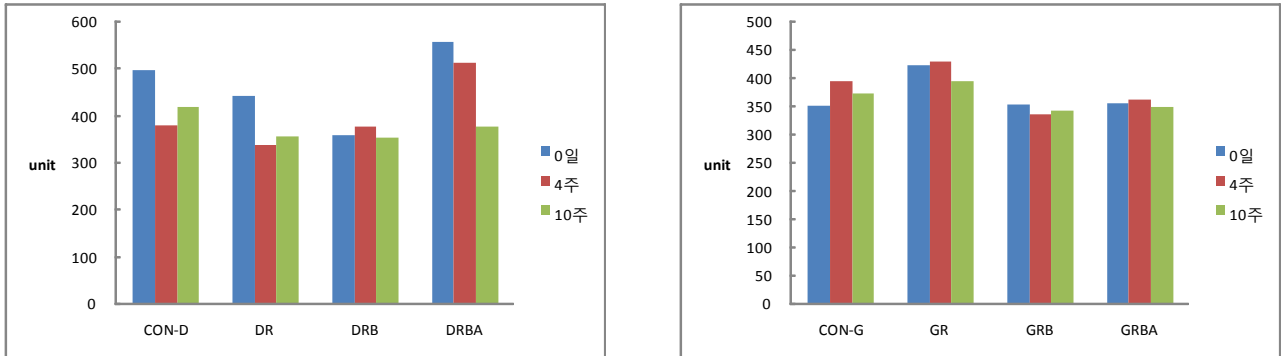


그림 26. ORIBS stater로 제조한 된장 및 간장의 β -amylase 함량 변화

표25. ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장의 유리아미노산

(단위 mg/L)

	Urea			Aspartic acid			Threonine			Glutamic acid			Glycine		
	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주
BA	42.30	55.80	56.75	28.31	33.02	30.50	753.39	967.84	970.63	59.45	40.99	31.23	16.54	22.92	26.91
OR	9.70	97.31	64.46	15.05	23.60	35.23	554.54	899.79	945.47	54.63	46.48	39.16	13.69	21.23	36.90
ORA	49.94	73.81	69.56	7.63	38.38	36.62	1156.20	1139.13	811.98	42.94	285.56	272.69	19.44	27.02	28.20
ORBA	38.21	57.12	13.37	7.81	33.76	34.72	811.98	987.19	975.35	63.94	43.19	31.74	17.57	23.15	23.39
	Alanine			Valine			Leucine			Ornithine			Lysine		
	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주
BA	12.04	15.54	15.77	25.86	60.40	44.37	8.42	13.09	14.25	36.56	41.77	42.93	9.71	11.83	12.24
OR	2.75	4.89	7.67	28.56	82.40	77.27	11.03	14.60	14.83	0.52	43.55	48.13	7.31	10.71	12.52
ORA	4.65	8.94	8.87	18.06	57.69	47.30	13.66	19.24	19.79	39.59	48.39	47.30	10.90	13.95	13.75
ORBA	12.72	16.82	15.93	25.40	21.55	19.45	11.59	14.32	12.99	38.51	42.76	41.96	10.40	12.08	12.09

표26. ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장의 유리아미노산

(단위 : mg/L)

	Urea			Aspartic acid			Threonine			Glutamic acid			Glycine		
	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주
BA	ND	29.52	31.41	8.70	4.18	13.27	ND	394.73	126.14	41.26	14.26	54.58	15.19	14.54	17.60
OR	5.29	6.87	6.61	13.39	18.87	19.93	470.37	480.22	668.35	150.76	153.34	179.48	11.76	11.88	15.73
ORA	12.17	10.13	8.79	7.20	6.77	6.32	668.35	652.18	428.73	179.48	175.49	144.86	15.73	17.17	17.07
ORBA	35.95	36.72	35.59	8.20	8.38	8.24	629.54	656.65	630.41	39.39	22.98	132.32	13.34	18.10	17.78
	Alanine			Valine			Leucine			Ornithine			Lysine		
	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주	2주	4주	10주
BA	9.63	8.19	4.10	13.64	13.78	23.32	6.95	7.26	7.58	30.94	29.70	30.37	7.86	5.54	4.63
OR	1.67	1.73	1.76	19.14	38.69	33.85	9.78	7.10	5.38	2.65	24.29	24.61	5.48	5.99	6.25
ORA	2.70	3.24	1.02	13.36	13.15	26.91	9.87	10.57	8.46	30.87	30.77	29.91	8.07	8.10	7.59
ORBA	7.39	8.83	8.63	35.23	12.69	25.59	26.90	28.31	27.53	29.72	31.05	30.19	7.47	8.01	7.89

19. ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 위해물질분석

가. 바이오제닉아민

ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 바이오제닉아민을 분석한 결과는 표26과 같다. 된장의 OR 실험구에서 histamine이 0.6 mg/L가 검출된 것을 제외하고, 된장 및 간장의 histamine은 모두 불검출 되었다. Tyramine은 모든 실험구에서 검출 되었으며, 된장의 대조구와 ORBA 실험구에서 각각 747.7mg/L, 710.5mg/L로 다소 높은 함량이 검출되었다. 된장의 tyramine 함량이 간장의 함량보다 2배 이상 높은 값을 나타내었다. 우리나라 및 EU, 캐나다 미국의 tyramine 규격 기준은 설정되어있지 않지만 일본의 경우 histamine과 함께 불검출로 기준을 정하고 있다.

표27. ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 바이오제닉아민

(단위:mg/L)

		Control(BA)	OR	ORA	ORBA
된장	Histamine	0	0.6	0	0
	Tyramine	747.7	163.1	210.7	710.5
간장	Histamine	0	0	0	0
	Tyramine	336.5	46.9	57.6	352.1

나. 병원성미생물

ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 병원성미생물을 분석한 결과는 표 27과 같다. 된장과 간장의 각 실험구에서 *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Stap. aureus*, *Cl. perfringenes* 모두 음성의 결과를 나타내었다. 반면 *B. cereus*의 경우 된장의 OR 실험구와 ORA 실험구에서 각각 4.2×10^3 , 3.1×10^3 CFU/mL 수준으로 검출되었고, 이는 식약처 기준인 g당 10000마리 기준에 미치지 못하는 수치였다. 간장의 경우 ORA 실험구에서 3.2×10^2 CFU/mL 수준으로 검출되었다.

표28. ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 병원성미생물 분석

(단위 : CFU/mL)

		<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Cl. perfringenes</i>
된장	대조구 (BA)	불검출	음성	음성	음성	음성
	OR	4.2×10 ³	음성	음성	음성	음성
	ORA	3.1×10 ³	음성	음성	음성	음성
	ORBA	불검출	음성	음성	음성	음성
간장	대조구 (BA)	불검출	음성	음성	음성	음성
	OR	불검출	음성	음성	음성	음성
	ORA	3.2×10 ²	음성	음성	음성	음성
	ORBA	불검출	음성	음성	음성	음성

다. 총아플라톡신

ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 총아플라톡신을 분석한 결과 ORA 처리구의 된장, 간장에서 0.0 µg/kg 로 분석되었고, ORA 실험구를 제외한 모든 실험구에서는 불검출로 분석되었다.

표29. ORIBS starter를 이용하여 개발한 된장 및 간장의 총아플라톡신 분석

(단위 : µg/kg)

	Control(BA)	OR	ORA	ORBA
된장	불검출	불검출	0.0	불검출
간장	불검출	불검출	0.0	불검출

2. 배지의 수율 비교

기존의 방법대로 스토마커를 이용한 액체배지의 탁도를 측정하였다. 5 차례 측정한 탁도의 평균값은 3.35 임을 알 수 있었다. 액체배지의 수율을 높이기 위하여 불린 콩 5 g에 증류수 100 mL를 혼합 한 후 착즙기를 이용하여 착즙하였다. 스토마커를 이용한 액체배지의 탁도값과 유사한 값으로 측정될 수 있게 착즙액을 희석하였고, 약 92배를 희석한 결과 3.33의 수치를 보였다. 이 결과를 보아 스토마커를 이용하여 얻어진 여액보다 착즙한 여액은 약 92배의 수율이 증가 하였다는 것을 확인하였다.

표30. 스토마커를 이용한 콩 액체배지의 탁도

	1차	2차	3차	4차	5차	평균값
탁도	3.24	3.48	3.47	3.30	3.28	3.35

3. 제조한 배지의 배양 적합성 비교

종균 ORIBS의 총균수는 1.3×10^8 CFU/g 이었다. 착즙원액을 이용하여 배양한 실험구를 제외하고는 $10^7 \sim 10^9$ CFU/g으로 전반적으로 배양이 잘 되었다고 판단할 수 있었다.

표31. 배양된 배지의 총균수

(단위 :CFU/g)

	종균 starter	스토마커 여액	착즙원액	4%	8%	12%	16%
총균수	1.3×10^8	4.5×10^8	9.0×10^5	1.2×10^8	2.1×10^8	4.1×10^9	4.8×10^7

4. 균집 구조 분석

액체배지와 고체배지로 배양한 시료들의 미생물군의 차이를 알아보기 위하여 pyrosequencing 방법을 사용하여 균집을 비교분석하였다.

각 실험구 별 유사성을 확인하기 위하여 phylogenetic tree를 작성하였다.(그림 27) 실험구는 크게 두 가지 구조로 나뉘어졌다. 종균 ORIBS(Control 1,2)와 가장 유사한 균집을 가진 실험구

는 고체배양(Solid 1, 2) 실험구였다. 또한, 기존의 배지제조 방법인 스토마커를 이용하여 얻은 액체배지 배양액(st 1,2)은 착즙원액 배양액과 균집이 유사하였다. 반면 착즙액을 희석하여 제조한 배지로 배양한 실험구들은 평균 ORIBS로 배양한 대조구와는 유사성이 떨어지는 것으로 분석되었다. 안정적인 균주 배양을 위해서는 고체 배양 방법이 가장 적합한 것으로 보여진다. 추후 기업에서 고체배양방법으로 증균하여 사용할 경우 평균 ORIBS의 균집변화를 최소화 시킬 수 있는 방법이라고 사료된다.

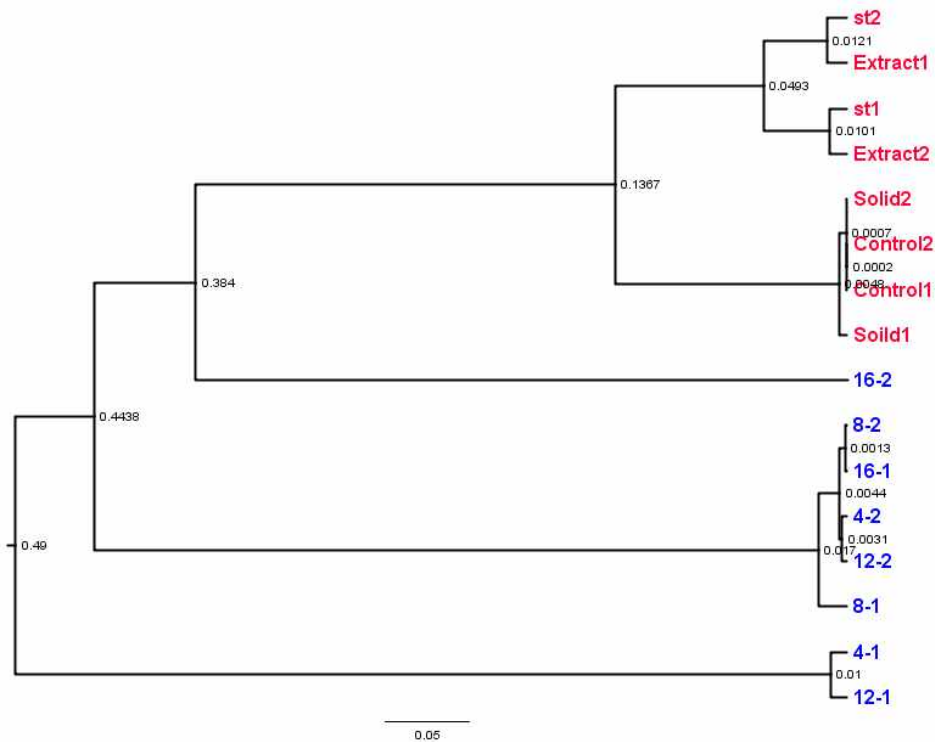


그림 27. 배양물의 균집구조 유사성 분석

Control 1, 2 : 평균 ORIBS, st 1,2 : 스토마커 여액, Extract 1,2 : 착즙원액, Solid 1, 2 : 고체 배양물, 4-1,2 : 착즙액 4% 첨가구, 8-1,2 : 착즙액 8% 첨가구, 12-1,2 : 착즙액 12% 첨가구, 16-1,2 : 착즙액 16% 첨가구

5. 개발 starter culture의 품질지표 및 안정적 보급을 위한 전략 제시

본 과제는 공장식 장류의 단순한 획일적인 품질의 단점과 위생적인 관리의 장점을 복합적으로 적용하여 전통식 장류의 풍미를 가급적 유지한 위생적인 전통장류를 제조하는 사업으로 최종 개발된 2건의 BC free stater culture의 품질지표는 표32와 같다.

표32. BC free starter culture의 품질지표

구분	품질지표
위생	- <i>B. cereus</i> 불검출 -Aflatoxin 불검출
품질	1. BC free starter culture의 보존(바이얼, 앰플) 전후 미생물 균총의 변화 유지 (DGGE분석법)

보존 후에 starter culture를 장류제조에 사용방법은 바이얼이나 앰플을 지정한 증균배지에 전량 접종하여 적절한 배양조건에서 활성화시킨 후에 접종한다. 본 사업에서 개발한 BC free starter culture의 경우 다양한 미생물이 혼합된 복합균주로서 세대를 반복적으로 증균할 경우 균집이 변화될 수 있기 때문에 1회 이상의 계대를 하지 않는다.

또한 BC free starter culture의 안정적인 보급을 위한 장기적인 전략은 첫째, 본 starter culture는 복합균주가 혼합되어 있기 때문에 전통장류의 풍미를 제조시마다 일정하게 유지할 수 있는 미생물 균집의 유지기술에 대한 추가 연구가 필요하며 둘째, 고체 starter를 1회에 다량 제조하여 다년간 사용 연구 및 전통장류의 풍미 개선을 위하여 지속적으로 다양한 벚짚을 활용한 BC free starter culture의 개발 및 상품화 연구 필요할 것이다. 마지막으로 복합균주 starter culture로부터 균주를 순수 분리하여 각각 비율을 결정하는 연구를 통하여 단일 배양 후 일정비율로 혼합하여 사용하는 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 보인다.

4절 연구 결과에 대한 고찰

1. RIBS 1 starter으로 제조한 청국장의 유리당의 함량은 발효 초기에 증가 하였다가 발효가 진행 될수록 감소하는 경향을 보였다. 이는 기존의 연구¹⁾에서의 결과와 유사한 경향이었고, ORIBS starter로 제조한 청국장은 RIBS 1으로 제조한 청국장과는 반대로 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 보였다.
2. RIBS 1 starter으로 제조한 청국장의 유기산 성분 중 lactic acid의 변화 추이는 lactic acid는 발효가 진행 될수록 증가하다 감소하였다는 보고²⁾와 유사하였다. ORIBS starter로 제조한 청국장의 50℃ 처리구에서도 유사한 경향을 보였다.
3. 청국장의 acetic acid는 발효 초기에 증가하다가 48시간 이후에 감소하는 경향을 나타내었는데 이 결과는 자체 분리균주인 *B.subtilis* p01를 이용하여 발효시킨 청국장 연구결과³⁾와 유사하였다.
4. 청국장의 맛은 발효 중에 생성되는 아미노산의 조성 과 관련 있는 것으로 보고되고 있는데 glutamic acid와 aspartic acid가 높으면 구수한 맛이 강해지며, alanine, glycine, lycine의 함량이 높으면 단맛이 강해진다는 연구결과가 있다⁴⁾. 본 실험에서 개발된 두 종류의 청국장은 유리아미노산 조성중 aspartic acid와 glutamic acid의 함량이 alanine, glycine, lycine의 함량보다 월등하게 높은 것으로 보아 구수한 맛이 강한 것으로 판단된다.
5. RIBS 1 starter로 제조한 사각메주의 유기산 함량 변화 추이는 기존의 연구⁵⁾에서의 결과와 유사한 경향이지만, 본 실험의 사각메주 발효일은 15일로 기존의 타 연구에서의 60일 발효보다는 짧은 기간이지만, 함량 변화를 비교하였을 때, 발효 기간 동안 유기산의 함량이 증가와 감소를 반복하는 것으로 짐작할 수 있다.
6. 국내 시판 청국장 102건의 품질 특성에 대한 연구결과에⁶⁾ 따르면, histamine은 최고 755.40 mg/kg, tyramine은 1913.51 mg/kg으로 나타났으며 대부분의 제품에서 histamine과 tyramine이 검출되었다고 보고하였다. 또한 7개의 청국장을 분석한 연구결과에 따르면⁷⁾ histamine 함량이 1.3~54.3 mg/kg, tyramine 함량이 0.7~483.1 mg/kg 으로 검출되었다. 이러한 선행 연구들로 보아, 본 연구에서 개발된 두 건의 청국장의 histamine과 tyramine의 함량은 일반적인 것으로 판단되어진다.
7. 천일염으로 제조한 된장의 발효특성에 대한 연구에서 된장의 유리당 함량의 변화를 보면 발효 초기 유리당의 함량과 발효 30일의 된장을 비교하였을때 전체적으로 그 함량이 증가하였으며, 유리당 함량 중 가장 높게 나타난 것은 glucose라고 보고하였다⁸⁾. 반면 본 연구에서 두 종류의 starter로 개발된 된장은 fructose의 함량이 glucose의 함량보다 월등히 높은 것을 확인할

수 있었다.

8. 된장의 유기산은 맛에 영향을 주며, 적당량은 된장의 보존성에도 관여하는 중요 성분이다⁹⁾. 본 연구에서 두 종류의 starter로 개발된 된장의 유기산 함량 중 가장 많은 함량을 차지하는 성분은 lactic acid였다. 이러한 결과는 가정에서 제조한 전통된장의 유기산 함량 중 lactic acid의 함량이 가장 높았다는 연구결과와 유사하였다¹⁰⁾. 또한 *A.oryzae*, *B.subtilis* 및 *B.natto*를 첨가한 된장에서는 lactic acid의 함량이 아주 많았고, 다음으로 acetic, citric, malic, oxalic acid의 순으로 검출되었다는 보고와 유사하였고, 전통메주를 이용한 경우는 citric,과 acetic acid는 많았으나 lactic acid가 적었다는 보고¹¹⁾와는 상이하였다. 본 실험에서 RIBS 1 starter로 제조한 된장에서는 succinic acid가 검출되었지만 ORIBS starter로 제조한 된장에서는 검출되지 않았다. 이는 전통된장은 곰팡이를 이용하는 중국된장에서 검출되는 succinic, glutamic 및 tataric acid 등이 검출되지 않았다는 보고¹²⁾와 유사하였다.

9. 재래된장의 맛에 대한 기여도는 leucine 과 isolucine 같은 쓴맛 성분이 가장 큰 영향을 미치며, 다음으로 cystine, aspartic acid, glutamic acid와 같은 구수한 맛 성분이 영향을 미친다고 보고되었다¹³⁾. 본 연구에서 제조한 된장에서 glutamic acid의 함량이 가장 높았는데, 이는 전통된장에서 glutamic acid가 aspartic acid 보다 더 많이 존재한다는 결과와 유사하였다¹⁴⁾.

10. 간장의 숙성기간에 따른 유리당의 증가는 당화 효소활성의 증대로 인한 것이고, 알콜발효나 유기산 발효로 이용되면 유리당은 감소한다¹⁵⁾. 본 연구에서의 간장의 유리당 함량이 숙성이 진행될수록 감소한 것으로 보아 유기산 발효가 일어난 것으로 판단할 수 있다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	위해미생물 및 제품품질 특성분석과 개발된 <i>B.cereus</i> free starter cul- ture의 장기보 존 기술 개발	RIBS 1 starter의 위해미생물 분석	100	1협동에서 개발한 벗짚유래 starter culture의 <i>B. cereus</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Cl. perfringenes</i> 의 존재여부를 정성 시험으로 분석
		RIBS 1 메주 및 청국장 미생물 분석	100	1세부기관에서 생생한 메주 및 청국장의 <i>B. cereus</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Cl. perfringenes</i> 의 존재여부를 정성 시험으로 분석
		RIBS 1 메주 및 청국장 이화학 분석	100	1세부기관에서 생생한 메주 및 청국장의 유리당, 유기산, 유리아미노산, β -amylase 효소활성 품질분석 및 바이오제닉 아민, 총아플라톡신 위해물질 분석
		RIBS 1 청국장 관능분석	100	개발된 제품을 일반 패널을 대상으로 기호도 관능분석
2차 년도 (2014)	위해미생물 및 제품품질 특성분석과 개발된 <i>B.cereus</i> free starter culture의 장 기보존 기술 개발	개발된 제품(메주, 청국장, 된장, 간장)의 품질분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - RiBS1 간장 및 된장 미생물 분석 <i>B. cereus</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>E. coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Cl. perfringenes</i> 의 존재여부를 분석 - RiBS1 간장 및 된장 이화학 분석 유리당, 유기산, 유리아미노산, β-amylase 효소활성 품질분석 및 바이오제닉 아민, 총아플라톡신 위해물질 분석 - ORIBS starter의 위해미생물 분석 <i>B. cereus</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>E. coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Cl. perfringenes</i> 의 존재여부를 정성 시험으로 분석 - ORIBS 메주, 청국장, 간장, 된장 <i>B. cereus</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>E. coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Cl. perfringenes</i> - ORIBS 메주, 청국장, 간장, 된장 유리당, 유기산, 유리아미노산, β-amylase 효소활성 품질분석 및 바이오제닉 아민, 총아플라톡신 위해물질 분석 - ORIBS 청국장 관능분석
		재래식 장류 재현성 검토 및 ORIBS starter 보존 기술 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> -스타터 보존법 개발 -안정적 균주 배양 및 유통방법 개발 Culture 제조용 배지 제조방법 연구 고형화를 통한 보존/유통방법 개선연구

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절 학술발표 성과

1. 논문

-*Bacillus cereus*가 선택적으로 제거된 벃짚유래 스타터를 이용한 청국장의 제조 및 품질특성 (한국식품위생안전성 학회)

2. 학술발표

-Characteristics of *cheonggukjang* using rice straw based natural microflora controled *Bacillus cereus*. (미생물생명공학회)

2절 성과 활용 계획

-논문 게재 및 학술발표

제6장 참고문헌

1. 싹튼 콩으로 제조한 청국장 발효기간에 따른 품질변화, 김미향, 강우원, 이난희, 권대준, 권오준, 정연신, 황영현, 최용규, 한국식품과학회지, 39(6), 676, (2007)
2. *Bacillus* sp. CS-17 로 제조한 청국장 발효기간별 품질변화, 정영건, 조영제, 권오진, 지원대, 손동화, 최용규, 차원섭, 권오준, 이은정, 한국농화학회지, 43(1), 6 (2000)
3. 인재평, 이시경 : 유카(*yucca shidigera*)추출물의 첨가가 *Bacillus subtilis* p01을 이용한 청국장의 품질 특성에 미치는 영향, 한국응용생명화학회지, 47(2), 176 (2004)
4. 전통 청국장의 이화학적 특성, 한국농화학회지, 유선미, 최정숙, 박홍주, 41:377-383(1998)
5. 박종면, 이승수, 오훈일 : 재래식 고추장 메주 숙성 중 화학적 특성 변화, 한국식품영양학회지, 8(3), 184 (1995)
6. 국내 시판 청국장의 품질 및 특성 : 고유진, 송용휘, 김은자, 설희경, 이경란, 김동현, 류충호, 농업생명과학연구지, 46(1), 177-187(2012)
7. 국내 유통 발효식품 중 biogenic amines 함량 분석, 한국식품과학회지, 한규홍, 반경녀, 손영욱, 장미란, 이창희, 김소희, 김대병, 김선봉, 조태용, 38:730-737(2006)
8. 천일염으로 제조한 된장의 발효특성, 김설희, 김선재, 김보희, 강성국, 정순택, 한국식품과학회지, 32(6), 1365-1370(2000)
9. 혼합콩으로 제조한 전통된장의 품질특성, 윤원중, 이수원, 문혜경, 문재남, 김봉규, 김분주, 김귀영, 동아시아식생활학회지, 21(3). 375-384(2011)
10. 가정에서 제조된 전통된장의 품질특성, 박석규, 서권일, 손미예, 문주석, 이영환, 한국식품조리과학회지, 16(2),121-127(2000)
11. 된장 숙성중 정미성분의 변화에 관한 연구(1)-유리아미노산과 핵산 관련물질, 김미정, 이해수, 한국조리과학회지, 6:1-8(1990)
12. 재래 및 개량메주와 납두의 배합이 된장 발효에 미치는 영향, 주현규, 오균택, 김동현, 한국농화학회지, 35:286-293(1992)

13. 한국 재래식 된장 맛의 특징, 양성호, 최명락, 김종규, 정영건, 한국영양식량학회지, 21(4),443-448(1992)
14. 전통식 녹차된장과 일부 시판된장의 이화학적 특성, 정복미, 노승배, 한국식품영양과학회지, 33(1), 132-139(2004)
15. 형상이 다른 메주로 제조한 재래식 간장 중의 유리당과 알코올 함량, 서정숙, 이택수, 한국식품영양학회지, 6(2),103-108(1993)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.