

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001015-01

복합종균과 마늘을 이용한 인지능력
개선과 안전성이 확보된 장류제조

(Development of fermented soy products ameliorating
cognitive function and with improved microbial safety
by using multiple starters and garlic)

경 상 대 학 교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “복합종균과 마늘을 이용한 인지능력 개선과 안전성이 확보된 장류제조” 과제
제의 보고서로 제출합니다.

2015년 09월 일

주관연구기관명 : 경상대학교
주관연구책임자 : 김 정 환
세부연구책임자 : 김 정 환
연 구 원 : 조 민 정
연 구 원 : 정 선 주
연 구 원 : 이 재 용
연 구 원 : 허 경
연 구 원 : 박 지 영
참 여 기 업 명 : 몽고식품
기 업 책 임 자 : 이 창 권
위탁연구기관명 : 경남과학기술대학교
위탁기관책임자 : 조 계 만
협동연구기관명 : 남해마늘연구소
협동연구책임자 : 신 정 혜
협동연구기관명 : 경북대학교
협동연구책임자 : 김 정 상

요 약 문

I. 제 목

복합중균과 마늘을 이용한 인지능력 개선과 안전성이 확보된 장류제조

II. 연구성과 목표 대비 실적

1. 연구기반 지표는 목표 이상을 달성함. SCI 논문과 비 SCI 논문 목표는 각각 5 편과 6 편이나 달성은 9 편과 5 편임. 학술대회 발표실적 37건 달성

2. 사업화 지표들 중 특허 출원과 등록 목표는 각각 3건과 1건이나 달성은 각각 2건과 0건임. 기술이전과 제품화는 각각 1건과 2건이 목표이나 달성은 현재 없음.

III. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

가. 장류제품의 식중독균 오염 위험성을 현저히 낮추는 동시에 장류의 기능성 개선 효과를 부여하는 복합중균 개발

나. 장류들의 기능성 대사체들, BAs, 향기성분들 분석을 통해 장류 품질 평가와 개선 정도 평가에 필요한 분석 자료들 확보.

다. 기능성 소재인 마늘을 첨가한 고품질 청국장, 된장, 간장 제조와 이들의 품질, 기능성이 일반 장류들 보다 우수함을 입증함으로써 마늘과 장류의 관심제고와 소비 촉진 유도

라. 인지능력 개선이나 신경 보호효과를 지닌 전통장류들의 개발을 통해 고령화시대에 대응하고 관련 식품산업 발전에 기여.

2. 연구개발의 필요성

가. 장류의 소비 촉진과 세계화를 위해서는 장류의 안전성 확보가 시급함. 유해균 증식을 억제하는 중균 개발을 통해 안전한 장류 생산이 요구됨.

나. 기능성과 기호성이 향상된 장류 제조를 통해 기존 장류들과 품질에서 차별화를 이루어야 소비 촉진과 세계화를 달성할 수 있음.

다. 소비자 선호 기호성을 지닌 장류제품들을 얻기 위해서는 기존 장류들의 대사체, 향기성분들의 종류와 양에 대한 정확한 자료들이 요구됨.

라. 고시형 건강기능식품소재원료인 마늘과 전통장류의 시장 확대 및 고급화를 위해서는 마늘 첨가 고품질 장류제품 개발이 필요함.

마. 고령화 시대에 필요한 혈행 개선효과와 인지능력 개선 효과를 지닌 기능성 식품들의 개발이 요구됨. 소비자들의 신뢰를 얻기 위해서는 객관적이고 과학적인 방법들에 의한 효능 검증이 필요함.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용

가. 중균으로 접종할 경우 장류에서 독소생성 유해곰팡이와 *B. cereus* 증식은 억제하나 혈전 용해역가는 증가시키고 BA 생성은 줄이나 장류 풍미는 개선하는 효과를 주는 *Bacillus*, 곰팡이, 효모로 구성된 복합중균 개발.

나. 마늘과 복합중균을 사용한 청국장, 된장, 제조공정 개발. 마늘 첨가비율과 전처리 방법이 품질에 미치는 영향 검증. 식염 농도 및 발효균주에 따른 품질 특성조사. Pilot 규모 (100 kg) 생산 된장의 저장 및 포장 방법에 따른 품질 조사.

다. 흑마늘 추출액과 생간장을 혼합한 간장 제조. 흑마늘추출액 첨가농도, 적정염도 결정과 제조조건 설정.

라. 마늘과 다른 소재들이 지닌 인지능력 개선 효과를 세포주, 동물실험을 통해 검증하고 이들 소재를 함유한 장류에 대해서도 검증함.

2. 연구 범위

가. Bacilli들중 바람직한 특성들 (항균력, 혈전용해능, 우수한 관능성, 비 BA 생산)을 지닌 균주 탐색 및 곰팡이 효모와 공동배양 가능성 조사.

나. 복합종균 조합 결정 및 복합종균을 접종한 장류 제조 후 특성 조사를 통한 효능 검증.

다. 마늘 첨가 장류들의 품질 특성 조사를 통한 최적 제조 공정 설정.

라. 장류들의 대사체, 향기성분 분석과 장류의 품질 평가에 유용한 화합물 선정.

마. 발아 마늘의 항산화, 신경보호 및 인지능력 개선 효과 검증 및 최적 발아 시기 결정.

바. 마늘 혹은 발아 마늘함유 청국장과 된장의 세포보호와 인지기능 개선 효능 검증.

V. 연구개발결과

가. 혈전용해능 또는 항균력 우수 bacilli 균주들 다수 확보 및 특성 조사. 곰팡이, 효모와 공동배양을 통해 복합종균 기반 기술 확보.

나. *Bacillus* 2종 곰팡이 효모 각 1종으로 구성된 복합종균 조합 최종 결정. 장류 제조에 사용하여 효능 검증 완료. *Bacillus* 균주 조합별 효능 비교.

다. 장류의 기능성 대사체들과 향기성분들 분석을 통해 장류 품질 평가와 개선에 필요한 자료 확보.

라. 마늘첨가 장류 제조를 위한 최적 공정 개발과 제조한 장류의 품질 특성들 조사 완료. 마늘 10%, 식염농도 10%로 pilot 규모 (100 kg) 된장 제조 및 품질 특성들 조사하여 종균, 마늘과 식염 첨가량 등 적합성 확인함.

마. 흑마늘추출액을 첨가한 간장 제조 공정을 개발하고 흑마늘추출액 첨가비율에 따른 품질들을 조사한 결과 5% 이상 첨가할 경우 기능적 차이를 보였다.

바. 마늘의 최적 발아시간은 5일이고 발아마늘을 첨가한 청국장의 항산화, 신경보호 및 인지능력 개선 효과는 청국장이나 마늘첨가 청국장보다 우수함을 확인.

사. 발아 마늘을 첨가한 된장의 항산화, 신경보호 효과는 된장, 마늘 첨가 된장과 큰 차이가 없었다. 숙성된장의 항산화능은 증가했고 숙성된장을 투여한 생쥐의 인지능력 개선 효과는 된장보다 컸다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 성과

가. 특허출원 2 건, 등록은 아직없음. 2 건 출원준비 중.

나. SCI(E) 논문 9 건 게재, 학진등재지 5 건 게재. 2 건 심사중 5 건 작성 중

다. 인력양성 실적: 박사 1 인, 석사 2 인 배출, 다수 대학원생 지원

라. 학술대회발표: 37 건

2. 활용계획

가. 복합종균 및 마늘 첨가 장류제조 기술들은 관심을 보이는 산업체에 기술이전 하여 산업화를 시도할 것이다.

나. 본 연구의 결과들은 마늘 및 다른 소재를 활용한 기능성 식품 혹은 소재 생산 후속연구에 활용될 것이다.

다. 본 연구 결과들과 방법은 유용균 선발, 장류품질, 기능성 소재 효능검사, 기능성 식품개발 등 분야에서 대학원생, 연구원, 식품업체 종사자들의 교육과 실습에 활용할 것이다.

SUMMARY

I. Title

Development of fermented soy products ameliorating cognitive function and with improved microbial safety by using multiple starters and garlic

II. Research Goals and Achievements

1. The goals for SCI and non-SCI papers were 5 and 6, respectively, and the papers published were 9 and 5, respectively. More papers were published, and the goals fully achieved. Currently, 2 papers are under review process and 5 papers are in the preparation. Total 37 presentations on the results were done at various domestic and international academic meetings.

2. The goals for patent submission and registration were 3 and 1, respectively. At present, 2 patents were submitted for review, and no patent was registered. Currently, 2 patents are in the preparation for submission. The goals for technology transfer and commercialization were 1 and 2, respectively, but no achievements so far.

III. Objectives and Necessity

1. Objectives

(1) Development of multiple starters which greatly reduce the danger of contamination of fermented soy products by toxinogenic microorganisms and improve the functionality of products at the same time.

(2) Obtaining analysis data on important metabolites, biogenic amines, and flavor compounds of fermented soy products, which are necessary for the evaluation of the quality of fermented soy products and the degree of quality improvements.

(3) Increasing interests on garlic and fermented soy products and encouraging consumption of garlic and fermented soy products through production of high-quality fermented soy products using garlic, an functional raw materia, and proving that the quality and functionality are better than regular fermented soy products.

(4) Contributing to the growth of food industry through development of Korean traditional fermented soy products with enhanced bioactive function such as cognitive function and neuroprotective effect, which are demanded by aged people.

2. Necessity

(1). Ensuring microbial safety of fermented soy products is prerequisite for the encouraging consumption and globalization of fermented soy products.

(2). Fermented soy products with enhanced functionality and palatability, distinct from ordinary products, are suitable for encouraging consumption and globalization of fermented soy products.

(3). For the production of fermented soy products for which consumers prefer, data on the types and amounts of metabolites and flavor compounds of fermented soy foods.

(4). For the wide utilization of garlic with excellent functionality and officially certified for

its efficacy by KFDA, development of fermented soy products containing garlic is necessary.

(5). Increased needs for bioactive traditional foods with increasing aged population. To get consumers credit for such products, confirmation of the properties are necessary by using scientific and objective methods.

IV. Contents and Scope

1. Contents

(1). Development of multiple starters consisting of *Bacillus*, fungus and yeast, which prevent the growth of toxinogenic fungi and *B. cereus*, increase the fibrinolytic activity, reduce the amount of BA and improve the flavor of fermented soy products when applied.

(2). Development of production processes for cheonggukjang, doenjang using garlic and multiple starters. Studies were done on the optimum garlic contents, the effect of pretreatments of garlic on the quality of products, the optimum salinity for the products, and the effects of different microorganisms on the quality of products. Doenjang was prepared in pilot scale (100 kg) and the effects of storage conditions and packaging methods.

(3) Ganjang was prepared from black garlic extract and raw ganjang. Studies were done on the optimum contents of black garlic extracts, the optimum salinity, and optimum production procedures.

(4). The effect of garlic and other materials to improve the cognitive ability is evaluated by cell culture and animal model tests. The effect of fermented soy products containing the materials is also evaluated.

2, Scope

1) Screening of bacilli with desirable properties(antimicrobial activity, fibrinolytic activity, good organoleptic properties, non-BA producer) and investigation of cocultivation with fungus and yeast.

2) Establishment of multiple starters and evaluation of multiple starters by evaluation of fermented soy products produced by multiple starters.

3) Establishment of optimum production processes through evaluation of quality properties of fermented soybean products containing garlic.

4). Analyses of metabolites and flavor compounds of fermented soybean products and selection of compounds used for quality markers.

5). The antioxidative and neuroprotective activities, and effect of sprouted garlic on cognitive function were evaluated and the optimum sprouting period of garlic was determined as well.

6) Development and evaluation of neuroprotective effect and cognitive improvement of cheonggukjang/doenjang containing sprouted garlic or garlic.

V. Major Results

1) Selection of bacilli with good fibrinolytic or antimicrobial activities and investigation on their properties. Establishment of techniques necessary for cocultivation of *Bacillus* with fungus and yeast.

2) Final selection of 2 *Bacillus*, a fungus, and a yeast for multiple starters. Evaluation of

the effectiveness through production of fermented soy products using the starters. Comparison of *Bacillus* strains for the effectiveness.

3) Obtainin data necessary for the quality evaluation and improvement of fermented soy products through analyses of metabolite and flavor compounds of fermented soy products.

4) Establishment of production processes for fermented soy products containnng garlic and evaluation of the quality of products. Pilot scale Doenjang (100 kg) was prepared with 10% garlic and 10% salinity and the properties of product was satisfactory, indicating the optimum selection for starters, garlic content, and salinity.

5) Established for the production of soy sauce with black garlic extract. The biofunction of soy sauce was significantly improved when black garlic extract was added more than 5%.

6) The optimum sprouting period of garlic was 5 days in terms of antioxidant activity and neuroprotective effect. Cheonggukjang (CGJ) prepared by fermenting cooked soybean and sprouted garlic showed superior antioxidant and neuroprotective activities and improved cognitive function, compared to normal CGJ and garlic-containing CGJ.

7) Doenjang (DJ) prepared by fermenting cooked soybean with sprouted garlic did not show significant differences in antioxidant and neuroprotective activities from normal DJ and garlic-containing DJ. However, the antioxidant activity of aged doenjang was significantly superior to non-aged normal DJ while mice fed aged doenjang showed improved cognitive function compared to mice fed normal DJ .

VI. Achievements and Future Plans

1. Achievements

(1). Patents: 2 submission. no registration.

(2) Papers: 9 SCI(E) papers published; 5 KCI papers published.
2 papers under review and 5 are in the preparation.

(3) Graduate students education

1 Ph. D. student and 2 master degree student (2015, Feb) graduated.

Also supported some other graduate students.

(4) Presentations at acedemic meeting: total 37 times.

2. Future Applications

(1). Developed multiple starters, methods for the production of high-quality fermented soy products containing garlic, for screening and evaluation of cognitive function-promoting effect, and other know-hows will be transferred to industry for commercialization.

(2) Results obtained from this work will be used for the following researches for the production of functional foods or ingredients utilizing garlic and other materials

(3) Results obtained from this work will be used for the education and training for graduate students, researchers, and workers at a food company in the area of screening useful microorganisms, quality of fermented soy foods, evaluation methods of functionality of materials, and functional foods production.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of research project	1
1. Object	1
2. Necessity	1
Chapter 2. Current trends in research	6
Chapter 3. Methods & Results	11
1-1. Multiple starter development for highly functional and safe soybean fermented food products manufacture.	11
1-2. Establish mass production of soybean fermented food product	59
1-3. Functional metabolites and flavor compounds analysis of soybean fermented food	72
2. Quality characterization of garlic added soybean fermented food and production process development	196
3. Memory improvement and dementia efficacy evaluation	260
Chapter 4. Accomplishments and expected contribution	302
1. Yearly plan and achievements	302
2. The contribution of the technology in the related field	303
Chapter 5. Applications of research result	304
1. Research and developments outputs	304
2. patents	307
3. Achievements application plans	311
Chapter 6. Overseas scientific information collected during the study	313
1. Trends research	313
2. patents	314
Chapter 7. Research facilities and equipment status	316
Chapter 8. Laboratory safety management implementation performance	317
Chapter 9. References	319
Appendix Report on the analysis of patents, papers, and products (market)	324

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구 개발의 목적, 필요성 및 범위	1
1. 연구 개발의 목적	1
2. 연구 개발의 필요성	1
3. 연구 개발의 범위	2
4. 연구 성과 목표 대비 실적	5
제 2 장 국내외 기술개발 현황	6
제 1 절 국내 기술개발 현황	6
1. 장류의 안전성 개선 연구	6
2. 장류의 기능성 개선 연구	8
제 2 절 국외 기술개발 현황	9
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	11
제 1-1 절 고기능성, 안전한 장류 제조용 복합 종균 개발 (주관기관, 경상대)	11
1-1. 연구수행 방법(주관기관, 1차 년도)	11
가. 청국장 시료들로부터 혈전용해능 우수 bacilli 선발	11
나. <i>B. amyloliquefaciens</i> CB1 배양 특성 및 혈전용해능 조사	12
다. Biogenic amine (BA) 생산균주 탐색	13
라. 항(진)균 bacilli 탐색	14
1-2. 연구수행 방법(주관기관, 2차 년도)	14
가. 혈전용해능, 항균력 우수 Bacilli 균주 분리	14
나. 복합 종균의 생육조사	15
다. 탈지대두 기질을 사용한 복합종균의 저장방법별 특성 확인	16
라. 분리 균주를 사용한 장류 발효	16
1-3. 연구수행 방법(주관기관, 3차 년도)	17
가. 복합종균을 이용한 된장제조	17
나. 복합종균을 접종하여 제조 한 된장에서의 <i>Bacillus cereus</i> 균주의 저해 효과	18
다. 선발균주의 탄소원과 질소원 첨가에 따른 항균활성과 생육촉진	19
라. <i>Bacillus subtilis</i> HK176의 혈전용해 효소 정제	19
2-1. 연구수행 결과(주관기관, 1차 년도)	20
가. 청국장 시료들로부터 혈전용해능 우수 bacilli 선발	20
나. <i>B. amyloliquefaciens</i> CB1 배양 특성 및 혈전용해능 조사	21
다. Biogenic amine (BA) 생산균주 탐색	26
라. 항(진)균 bacilli 탐색	29
2-2. 연구수행 결과(주관기관, 2차 년도)	30
가. 혈전용해능, 항균력 우수 Bacilli 균주 분리	30
나. 복합 종균의 생육조사	34
다. 탈지대두 기질을 사용한 복합종균의 저장방법별 특성 확인	35
라. 복합종균을 사용한 장류 발효	37
2-3. 연구수행 결과(주관기관, 3차 년도)	45

가. 복합중균을 이용한 된장제조	45
나. 복합중균을 접종하여 제조 한 된장에서의 <i>Bacillus cereus</i> 균주의 저해 효과	49
다. 선발균주의 탄소원과 질소원 첨가에 따른 항균활성과 생육촉진	53
라. <i>Bacillus subtilis</i> HK176의 혈전용해 효소 정제	54
제 1-2 절 장류 대량생산 체제 구축 (참여기업, 몽고식품(주))	59
1-1. 연구수행 방법(참여기업, 1차 년도)	59
가. 기존 장류 제품의 이화학적 특성 및 성분 분석	59
1-2. 연구수행 방법(참여기업, 2차 년도)	59
가. 대용량 마늘된장의 이화학적 특성 및 기능성 대사체(isoflavone) 분석	59
나. 된장의 생물생성아민 (Biogenic amine, BA) 분석	60
1-3. 연구수행 방법(참여기업, 3차 년도)	61
가. 콩알메주간장 제조	61
나. 쌀 코오지 및 쌀된장의 제조	61
2-1. 연구수행 결과(참여기업, 1차 년도)	62
가. 기존 장류 제품의 이화학적 특성 및 성분 분석	62
2-2. 연구수행 결과(참여기업, 2차 년도)	63
가. 대용량 마늘된장 발효중 이화학적 특성	63
나. 대용량 마늘된장 발효중 isoflavone 함량 분석	64
다. 기존 청국장 및 된장의 BA 함량	66
라. 마늘 된장의 BA 함량	67
2-3. 연구수행 결과(참여기업, 3차 년도)	69
가. 콩알메주간장 제조	69
나. 쌀 코오지 및 쌀된장의 제조	70
다. 콩알메주 간장의 경제성 분석	71
제 1-3 절 장류의 기능성 대사체 및 향기성분분석 ((위탁과제, 경남과기대)	72
1-1. 연구수행 방법(위탁과제, 1차 년도)	72
가. 장류의 이화학적 특성 및 기능성 대사체 (isoflavone과 향기성분) 분석	72
나. 청국장의 기능성 대사체 (isoflavone) 함량 분석	73
다. 간장 숙성 중 BA (histamine과 tyramine) 분석	74
라. 장류 발효 우수 효모 균주 선발	75
1-2. 연구수행 방법(위탁과제, 2차 년도)	76
가. 된장의 이화학적 특성 및 기능성 대사체 (isoflavone) 분석	76
나. 된장의 향기성분 분석	77
다. 된장 및 간장의 메타게놈 효모 다양성 분석	77
1-3. 연구수행 방법(위탁과제, 3차 년도)	78
가. 대용량 마늘 된장의 기능성 대사체(isoflavone과 향기성분) 분석	78
나. 몽고 모로미 베이스 흑마늘 엑기스 첨가 간장의 특성 분석	79
다. 콩알 메주 베이스 흑마늘 엑기스 첨가 간장의 특성 분석	80
2-1. 연구수행 결과(위탁과제, 1차 년도)	81
가. 장류의 이화학적 특성 및 기능성 대사체 (isoflavone과 향기성분) 분석	81
나. 청국장의 기능성 대사체(isoflavone) 함량 분석	95
다. 간장 숙성 중 BA (histamine과 tyramine) 분석	102
라. 장류 발효 우수 효모 균주 선발	105
2-2. 연구수행 결과(위탁과제, 2차 년도)	109
가. 마늘 첨가 된장 (1차 예비 실험)	109
나. 생마늘 첨가 된장의 특성	123
다. 소금 농도를 달리하여 제조한 마늘된장	136
라. 전처리 방식을 달리한 마늘을 첨가한 마늘된장	139

마. 공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장	151
바. 된장 및 간장의 메타게놈 효모 다양성 분석	157
2-3. 연구수행 결과(위탁과제, 3차 년도)	159
가. 대용량 마늘된장의 특성 및 기능성 대사체 분포	159
나. 몽고 모로미 베이스 흑마늘-간장의 이화학적 특성 및 기능성 대사체분석	168
다. 콩알 메주 베이스 흑마늘 엑기스 첨가별 간장의 특성 및 기능성 대사체 분석	176
라. 콩알 메주 베이스 소금 농도별 흑마늘 엑기스 간장의 특성 및 기능성 대사체 분석	184
마. 콩알 메주 베이스 공시균주 및 선발 균주별 흑마늘 엑기스 간장의 특성 및 기능성 대사체 분석	190
제 2 절 마늘 첨가 장류의 품질특성 규명 및 생산공정 개발 (협동과제 I)	196
1-1. 연구수행 방법(협동과제 I, 남해마늘연구소, 1차 년도)	196
가. 청국장 시료의 제조	196
나. 마늘 첨가 청국장 발효 특성조사	197
1-2. 연구수행 방법(협동과제 I, 2차 년도)	199
가. 된장 시료 제조	199
나. 마늘 첨가 된장 발효 특성조사	201
1-3. 연구수행 방법(협동과제 I, 3차 년도)	203
가. 흑마늘 첨가 간장의 제조	203
나. 흑마늘 첨가 간장 발효 특성조사	205
2-1. 연구수행 결과(협동과제 I, 1차 년도)	206
가. 마늘 청국장의 제조조건 확인 및 품질특성	206
2-2. 연구수행 결과(협동과제 I, 2차 년도)	222
가. 마늘 첨가 된장의 제조조건 확인 및 품질특성	222
2-3. 연구수행 결과(협동과제 I, 3차 년도)	246
가. 흑마늘 첨가 간장의 제조조건 설정 및 이화학적 특성 분석	246
제 3 절 기억력 개선·치매 예방 효능 평가 (협동과제 II, 경북대)	260
1-1. 연구수행 방법(협동과제 II, 1차 년도)	260
가. 마늘새싹 추출물의 제조	260
나. 마늘함유 된장 및 추출물 제조	261
다. 균주별 청국장 추출물의 제조	261
라. 된장 및 간장의 제조 및 에탄올 추출물 제조	261
마. 항산화활성평가	261
바. 발아마늘의 항산화 및 신경보호 효과	263
사. 시료의 기억 및 학습 개선 효과	263
1-2. 연구수행 방법(협동과제 II, 2차 년도)	264
가. 발아마늘첨가 장류의 기능성 평가	264
1-3. 연구수행 방법(협동과제 II, 3차 년도)	268
가. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 동물계에서 항산화 활성 및 인지 기능개선 평가	268
2-1. 연구수행 결과(협동과제 II, 1차 년도)	269
가. 산지별 마늘 새싹 추출물의 항산화 활성	269
2-2. 연구수행 결과(협동과제 II, 2차 년도)	277
가. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 항산화 및 신경보호 활성	277
2-3. 연구수행 결과(협동과제 II, 3차 년도)	291
가. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 생쥐에서 항산화 활성 및 인지 기능개선 평가	291
나. 마늘 함량별 된장의 항산화 및 신경보호 활성	293

다. 된장의 숙성과정중 항산화 활성 변화	296
라. 일반된장과 숙성된장의 인지기능개선 효과	297
마. 흑마늘 함유 간장의 항산화 활성	298
바. 흑마늘 함유 간장섭취가 마우스 인지기능 및 해마 조직에 미치는 영향	298
사. 흑마늘 함유 간장섭취가 마우스 혈중 AST 및 ALT 효소활성에 미치는 영향	300
아. 흑마늘 함유 간장섭취가 마우스 혈중 FRAP 및 BDNF 농도에 미치는 영향	301
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도	302
제 1 절 연도별 연구개발 목표의 달성도	302
제 2 절 관련분야의 기술발전에의 기여도	303
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	304
제 1 절 연구개발 성과	304
제 2 절 특허	307
제 3 절 성과 활용 계획	311
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	313
제 1 절 연구동향	313
제 2 절 특허	314
제 7 장 연구시설·장비 현황	316
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적	317
제 9 장 참고문헌	319
별첨 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서	324

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구 개발의 목적, 필요성 및 범위

1. 연구 개발의 목적

국내산 콩을 활용한 장류 (청국장, 된장, 간장) 제품들의 기능성 (인지능력 개선, 치매예방, 혈행개선) 제고와 품질 고급화, 그리고 독소생성 유해균들로 부터의 안전성을 확보함으로써 소비자들의 건강 유지에 도움을 주고 장류제품들의 소비 촉진과 수출 증진 및 이를 통한 콩 자급률 향상과 장류산업 활성화를 도모하며 궁극적으로 장류의 글로벌화에 최종 목표가 있음.

장류제품들의 소비촉진과 세계화를 위해서는 기능성과 안전성 측면에서 개선이 필수적이며 여기에는 기능성 강화와 안전성 개선이 핵심임. 본 연구과제는 장류제품의 기능성과 안전성 개선을 위해 발효과정에서 효과적으로 장류 제품들에 기능성을 부여하고 또 안전성도 확보하게 해주는 균주들을 3-4 종 혼합한 복합종균들을 콩에 접종, 발효를 수행하여 기억력 개선 및 혈행 개선 효능이 있는 동시에 독소 생성균인 *Bacillus cereus*와 곰팡이 증식이 억제되며 동시에 biogenic amine 생성은 최소인 안전한 장류 제품들을 제조하는 기술을 개발하고자 함.

2. 연구 개발의 필요성

2011년 기준, 장류규모는 9800억 정도이며, 출하액 기준 장류별 비중은 간장 28.8%, 고추장 30.9%, 된장 15.7%으로 알려져 있음. 간장의 출하액 점유율은 전년 대비 3.1%, 출하액은 2.6%가 감소하였음. 특히, 양조간장은 출하액 점유율과 증가율 모두 큰 폭의 감소세를 보이고 있음. 고추장의 경우 전년 대비 출하액 점유율이 1.3% 감소하였으나 출하액은 3.4% 증가하였으며, 특히 조미고추장은 전년대비 482%가 증가하여 큰 폭의 변화가 있었음. 된장은 출하액은 전년 대비 12.4% 증가한 것으로 나타났으나, 출하액 점유율은 전년과 유사한 수준을 유지하고 있음. 출하액을 기준으로 한 장류 시장의 연평균 성장률은 3.3%로 전체 식품군 평균 성장률 9.9%보다 낮은 수준을 보이고 있음. 이와 같이 성장률이 낮은 것은 장류 시장이 성숙기에 접어들었기 때문이라는 견해도 있으나, 장류의 기능성에 대한 지속적인 연구와 소비자들의 전통 장류의 과학적 우수성에 대한 이해도를 높인다면, 추가적인 성장잠재력이 큰 품목으로 판단된다. 예를 들어, 소비자들의 체중조절에 대한 관심이 증가되면서 장류와 같은 소스류에 속하는 저지방 마요네즈 시장은 2005년 이후 100% 이상 증가해왔다. 따라서, 전통장류 시장도 노령화시대를 맞이하여 소비자의 니즈를 정확히 파악하고, 과학적 우수성에 대한 적절한 홍보가 이뤄진다면 새로운 도약의 시기를 맞이할 수 있을 것이다.

장류의 소비확대를 방해하는 요인들로는 aflatoxin 생성 곰팡이나 독소생성 *Bacillus cereus*의 오염 위험성, 품질의 불균일성, 청소년들의 입맛에 맞지 않는 풍미 등이 있다. 이중 유해균 오염 문제는 지속적으로 제기되고 있다. 화학보존제나 식염, 알콜 등의 첨가는 부작용으로 인한 문제가 크기에 식용에 안전하면서 효과적으로 유해미생물을 억제하는 방법들 개발이 요구된다. 바람직한 방안은 유해균 증식을 억제하면서 식품의 품질은 향상시키는 균들을 찾아서 종균으로 활용하는 것이다. 장류에 존재하는 bacilli 중에는 항균물질을 생성하는 종류들이 있고 이들 중 종균으로 적합한 균주들을 찾아서 종균으로 개발하는 노력이 필요하다.

다양한 유해균들을 억제하는 동시에 장류에 바람직한 변화를 주기 위해서는 한 종류의 균만으로는 충분하지 않고 3-4종으로 이루어진 복합종균이 바람직하다. 전통적으로 장류발효에 관여해 온 *Bacillus* 들을 포함해서 효소역가가 우수한 곰팡이 그리고 바람직한 풍미를 부여하는 효모로 구성된 복합종균의 개발이 요구된다.

유해균 억제능과 함께 고려된 것이 혈전용해능으로 이는 일부 *Bacillus* 균주들이 분비하는 protease들에 기인한다. 본 연구에서는 마늘의 인지능력 개선 효과와 함께 종균이 부여하는 혈전용해능도 장류 제조와 발효중 크게 증강시킴으로써 복합기능성을 지닌 우수한 장류제품을 제조하는데 목적이 있다.

마늘은 다양한 생리활성물질들을 지닌 우수한 소재이다. 마늘의 이용도를 높이는 동시에 다양한 장류 제품 개발을 위해서는 마늘의 건강기능성 (인지능력 개선 등)을 확인하는 연구와 함께 마늘을 첨가한 된장, 간장 등의 장류 제조가 바람직하다. 단순한 마늘 첨가에서 벗어나 특정 기능성 향상을 위한 최적 마늘 첨가조건 결정과 해당 제품의 특성들을 상세히 연구하는 노력이 필요하다.

기능성 장류제품들을 언더라도 기호적 특성이 부족하면 소비자의 선택을 받지 못하여서 장류의 관능성 향상도 중요하다. 장류의 대사체, 향기성분 분석은 관능성 평가와 개선을 위한 자료로 중요하다. 관능성을 향상시키는 균주들 선정과 제조방법 개선과 함께 장류의 관능평가와 분석을 통한 확인이 필요하다.

3. 연구 개발의 범위

가. 1차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
(제1세부) 복합 종균 개발과 기존 제품의 이화학적 특징 및 기능성 대사체 분석	복합 종균 개발 (주관)	100	<ul style="list-style-type: none"> • 혈전용해능 우수, 향(진)균 우수 <i>Bacillus</i>들 선발 • 선발균주들 중 biogenic amine 저 생산 균주 선발 • 선발된 <i>Bacillus</i> 균주들 조합별로 콩에 접종하여 기능성 (혈전용해능, 향균능, biogenic amine 저생산) 향상 정도 확인 • 곰팡이 효모 종균들 확보 및 특성 비교 • 복합종균 조합 결정
	장류의 향기성분 분석 (참여기업)	100	<ul style="list-style-type: none"> • 콩고식품(주) 및 제래 장류의 향기성분 비교·분석
	장류의 기능성 대사체 및 생물생성아민 (BA) 분석 (위탁)	100	<ul style="list-style-type: none"> • 장류의 12 isoflavone 및 histamine과 tyramine 분석
(제1협동) 마늘 첨가 장류의 품질특성 규명 및 생산공정 개발	마늘 청국장 제조를 위한 발효 균주 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> • 기존 청국장으로부터 분리한 발효균주 9종의 농도별 마늘 첨가량에 따른 청국장 제조 적합도 판정 • 마늘 내성 청국장 발효균주 3종 선정 • 1차 선별된 균주 3종을 각각 접종하여 10% 마늘이 첨가된 청국장의 품질특성을 분석함 • 1차 선발 균주들을 대상으로 서로 교차 혼합 및 3종 전체를 혼합한 4군의 복합 균주를 이용하여 마늘이 10% 첨가된 청국장 제조시 품질특성을 시험함
	마늘 청국장 제조를 위한 마늘의 전처리 조건 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> • 생마늘, 발아마늘, 발효마늘로 마늘을 전처리 한 후 청국장 제조에 이용하여 발효시간별 시료의 품질특성 및 생리활성을 분석함
	마늘 청국장 제조를 위한 발효조건 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> • 마늘 청국장 제조를 위한 마늘의 첨가 비율, 열처리 시간, 청국장 발효 시간을 최적화하기 위해 중심합성계획법에 따라 시료를 제조하고, 반응표면 분석을 실시함
(제2협동) 기능성소재함유 콩발효 제품의 기억력개선 및 항치매 활성 평가	시료의 in vitro 및 세포모델계 신경세포 보호효과 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> • 마늘, 콩 발효식품(장류)부터 추출물 제조 및 각 추출물의 in vitro에서 항산화 활성 측정 (ORAC, FRAP, ABTS, DPPH 방법 등) • 추출물의 세포모델계 신경세포보호효과 평가

나. 2 차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
(제1세부) 고기능성, 안전한 장류 제조용 복합종균 개발 및 복합종균을 이용한 마늘된장 대량생산 체계 구축 및 기능성 대사체 분석	<ul style="list-style-type: none"> 복합 종균의 장류 발효 중 생육조사 종균의 안정적인 보관법 개발 (주관) 	100	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 증진, 항균능 보유 <i>Bacillus</i> 균주 및 효모 들간 공동 배양에 적합한 균주 조합들 조사 및 조합 균주들 결정 탈지대두를 매질로 균주를 보관하면서 균주 생존율 및 활력 조사. 원료별 생육 및 활성 조사
	복합 종균에 의한 장류 기능성 및 안전성 개선 정도 평가 (주관)	100	<ul style="list-style-type: none"> 장류 발효시 바실러스와 효모 복합종균 사용 및 발효 특성 및 효능 조사
	마늘 된장 대량생산 체계 구축 및 이화학적 특성 조사 (참여기업)	100	<ul style="list-style-type: none"> 효율적인 마늘과 탈지대두 등의 배합법 확립 선발 균주들을 이용한 상업적 규모의 된장 제조
	마늘 된장의 향기성분, 기능성 대사체 및 미생물 분석 (위탁)	100	<ul style="list-style-type: none"> 마늘첨가 된장의 12 isoflavone 함량과 항산화 활성 분석 기존 된장의 histamine과 tyramine 분석 된장/간장의 효모 다양성 분석을 완료하여 향기 성분과 효모 균종과 상관분석 마늘 첨가 된장의 향기성분 분석
(제1협동) 마늘 첨가 장류의 품질특성 규명 및 생산공정 개발	마늘 된장 제조를 위한 마늘의 첨가량 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> 농도별 생마늘을 첨가하여 된장을 제조한 후 발효시간별 품질특성을 분석
	저염 마늘 된장 제조를 위한 식염농도 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> 마늘의 첨가량 최적화 결과에 기초하여 설정된 마늘 첨가량을 기준으로 식염 농도를 달리한 마늘 된장제조, 발효시간별 시료 품질특성을 분석
	마늘 된장 제조를 위한 마늘의 전처리 조건 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> 마늘의 첨가량, 식염농도 설정 결과에 기초하여 마늘의 첨가 형태를 달리하여 마늘 된장을 제조한 후 품질특성 인자를 분석
	마늘 된장의 저장특성 및 발효 균주 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> 설정된 마늘 첨가량, 식염농도 및 첨가 형태에 따라 마늘을 제조하고, 선발된 발효균주와 공시 균주로 각각 된장을 제조한 후 품질특성을 비교 선발 균주를 이용하여 대량으로 발효한 마늘 된장 제조 후 발효시간별 시료의 품질특성 및 생리활성을 분석 포장 용기에 따른 마늘 된장의 발효시간별 색도 변화 분석
(제2협동) 기능성소재 함유 콩발효제품의 기억력개선 및 항치매 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 시료의 세포모델계 알츠하이머 예방활성 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> 해마세포(HT22 cell 및 primary cell)에 amyloid β를 처리하여 손상을 유발하여 이에대한 보호효과 조사: MTT, DAPI 염색, DCFDA 및 DHE 형광염색을 이용한 ROS 생성억제능 평가 마우스 간암세포(hepalc7, BPrcl 등), 해마의 1차 세포 및 해마 유래 세포주 HT22에서 항산화 효소계(HP-1, NQO1, γGCS 등) 및 항산화효소계 발현을 주도하는 전산촉진인자 Nrf2의 핵내 이동 정도 평가

3차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
(제1세부) 고기능성, 안전한 장류 제조용 복합종균 개발 및 복합종균을 이용한 마늘된장 대량생산 체계 구축 및 기능성 대사체 분석	<ul style="list-style-type: none"> 최적 복합종균 조합 결정, 균주 생육 촉진방법 연구 (주관) 	90	<ul style="list-style-type: none"> 복합종균 조합들 결정 복합종균 발효시 균주들의 생육촉진 방법 연구
	<ul style="list-style-type: none"> 복합 종균 접종에 의한 장류 기능성 및 안전성 평가 (주관) 	100	<ul style="list-style-type: none"> 4종으로 구성된 복합종균을 접종한 된장 제조와 숙성을 통해서 <i>B. cereus</i> 저해능과 우수한 혈전 용해능을 확인,
	<ul style="list-style-type: none"> 상업적 규모의 마늘 간장 제조, 시제품화 여부, 제품 경제성 분석 (참여기업) 	90	<ul style="list-style-type: none"> 선발 <i>Bacillus</i> 균주를 이용한 상업적 규모의 콩알메주와 곰팡이를 이용한 쌀코지 제조 1협동의 흑마늘 간장 제조 최적비율에 따라 간장의 대량생산 체계 구축 마늘 간장의 이화학적 특징/일반성분 분석
	<ul style="list-style-type: none"> 마늘된장 기능성 대사체 및 BA 분석, 마늘 간장 향기성분 및 BA 분석 (위탁) 	100	<ul style="list-style-type: none"> 마늘 첨가량별 (증자마늘, 생마늘), 염농도별, 전처리 마늘별 및 상용균주와 본 선발균주로 제조한 마늘된장에 대한 발효 및 숙성 기간 중 기능성대사체 분석과 BA 함량 분석
		100	<ul style="list-style-type: none"> GC-MS 이용 마늘 간장의 향기성분 분석 HPLC를 이용한 마늘 간장의 BA (histamine 과 tyramine 중심) 분석
(제1협동) 마늘 첨가 장류의 품질특성 규명 및 생산공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> 흑마늘 추출액이 혼합된 저염 간장의 발효 중 특성 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 흑마늘 추출액과, 모로미와 콩알메주를 각각 이용한 간장 발효 기간별 이화학적 분석 및 미생물상 변화 분석 흑마늘 추출액과, 염도를 달리한 간장발효 기간별 이화학적 분석 및 미생물상 변화 분석 발효균주를 달리한 흑마늘 추출액 첨가 간장의 발효 기간별 이화학적 분석 및 미생물상 변화분석 반응표면 분석법을 이용한 흑마늘 추출액 첨가 간장 제조를 위한 흑마늘 추출액 첨가농도 및 혼합비율 설정
	<ul style="list-style-type: none"> 저염 흑마늘 간장의 품질 및 이화학적 특성 확인 	100	<ul style="list-style-type: none"> 저염 흑마늘 간장 제조를 위한 흑마늘 추출액의 적정농도 및 혼합비율 설정 및 생산공정 확립
(제2협동) 기능성소재 함유 콩발효제품의 기억력개선 및 항치매 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 동물모델계 기억력 개선 및 알츠하이머 예방 효능 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> 시료로서 발아마늘, 발아마늘함유 청국장 및 된장을 대상으로 동물모델계 인지기능증진 효과 조사 ICR mouse에 scopolamine 처리하여 기억력을 저해한 상태에서 시료의 인지능력 개선효과 조사 : passive avoidance test, Y-maze test, water maze test 방법으로 원료 또는 장류시료의 행동 및 인지기능 개선효능 측정 알츠하이머 예방 및 기억력 개선 작용 메카니즘 규명: 시료에 의한 해마 및 대뇌피질의 항산화효소계 (Nrf2 의존성 항산화효소) 발현 변화 조사 (Western blot, IHC 등)

4. 연구 성과 목표 대비 실적

성과목표	0사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용		기타 (타 연구용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용용	홍보 전서	
			SCI						비 SCI								
최종목표	3	1	1	2						5	6		3		3	3	
연구기간 내 달성실적	2	0	0	0						9	5	37	0	3	0	1	2
달성율(%)	67	0	0	0						180	83		0		0	33	

연구성과들에 관한 상세한 기술은 제 5장 연구개발 성과 및 성과활용계획에서 상세히 설명되어 있습니다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

* 국내.외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내.외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

제 1 절 국내 기술개발 현황

1. 장류의 안전성 개선 연구

가. 유해균 증식 억제 연구

전통장류의 소비확대를 저해하는 요인들은 여러 가지가 있지만 장류의 안전성에 대한 의구심도 중요한 원인중 하나이다. 메주와 된장의 아플라톡신 (aflatoxin), ochratoxin과 같은 곰팡이 독소 (mycotoxin) 생성균 오염 위험성은 수십년전 부터 제기되어 오는 문제이다. 그 결과 상당한 연구들이 계속되어 오고 있다.

1969년 이래 한국식품과학회지에 24편, 한국식품위생안전성학회지에는 3편의 연구논문이 발표되었는데 주제들은 대두 발효식품 중의 aflatoxin 유무, 한국식품 중 aflatoxin 검출, 미생물을 이용한 aflatoxin의 저감 방법, 장에서 쫄의 aflatoxin 제거 효과, 장에서 발효기간별 aflatoxin 함량변화, 길항 미생물에 의한 aflatoxin 제어, aflatoxin에 대한 *Bacillus* 대두 발효추출액의 항돌연변이 효과, 식품 중의 aflatoxin 노출량 평가 등이다 (조 등, 2007). 생산시설의 현대화와 오염방지 노력을 통해서 어느정도 독소생성 곰팡이 오염을 줄일수는 있지만 발효식품 제조의 특성상 완전한 예방은 매우 힘들며 이에 따라 독소생성 곰팡이 증식을 억제할 수 있는 미생물의 접종 혹은 선택적으로 독소생성곰팡이 증식만 억제하는 천연물 첨가가 바람직한 방안으로 여겨지고 있고 이 분야 연구들은 앞으로도 계속 진행되어야 한다.

장류에서 또 다른 문제점으로 지적되는 것은 독소 생성균인 *Bacillus cereus*의 지속적인 오염이다. *B. cereus*는 토양, 식물 상재균으로 모든 전통장류에서 검출되고 있다. 구토형과 설사형 두 종류의 독소를 생성하며 여러 독소생성 유전자들에 대한 연구들이 진행되고 있다 (Ehling-Schulz 등 2006). 독소유전자를 지닌 *B. cereus* 오염균을 각종 식품들로부터 신속히 검출하는 방법들과 오염된 식품에서 *B. cereus* 증식을 효과적으로 제어하는 방안들도 함께 연구되고 있다.

식품에서 독소생성 곰팡이와 *B. cereus* 증식을 효과적으로 억제할 수 있는 방법들의 개발 필요성이 크다. 현재는 식염농도를 높이고 식용알콜을 첨가하여 유해미생물 오염을 줄이고 있지만 지나치게 높은 소금농도는 고혈압을 유발하는 부작용이 있어 최근에는 오히려 저염 장류들이 선호되고 있다. 알콜 첨가도 문제가 될 수 있다. 특히 힐랄장류와 같이 알콜 첨가가 허용되지 않거나 자연적으로 생성된 알콜 농도도 제한하는 제품들에는 사용 불가하다. 장류 제조 공정에서 외부 미생물 오염이 쉽게 일어날 수 있고 특히 규모가 작은 영세업체의 경우 제대로 된 시설을 갖추지 못해 오염문제는 더 심각하다. 이런 점들을 고려할 때 사용이 간편하면서 유해균 증식은 효과적으로 억제할 수 있는 방법들의 개발이 요구된다.

미생물들간의 길항작용을 이용해서 식품중 유해균 증식 억제에 관한 연구들은 꾸준히 이루어져 오고있다. 아플라톡신 오염을 예방하기 위해서 독소생성 곰팡이를 억제하는 미생물들을 찾아서 활용하는 것이 좋은 예이다 (조 등, 2007). 여러 발효식품들로부터 항세균, 항진균 물질들을 분리하는 *Bacillus*, *Lactobacillus* 같은 세균들을 분리하고 이들이 분리하는 항균물질을 정제하여 특성을 구명하고 해당 균주나 항균물질을 식품보존에 응용하려는 연구들이 수행되고

있다. 많은 bacilli들은 박테리오신 (bacteriocin)이나 lipopeptide같은 다양한 항(진)균물질들을 생산하며 생산균들 중 식용에 안전한 *Bacillus subtilis* 그룹 균주들을 선발하고 이들의 항(진)균물질을 식품에서 유해균 증식 억제에 이용하는 연구들이 국내외에서 진행되고 있다.

본 연구팀은 1-2 차년도에 전국 각지에서 구입한 청국장, 간장, 메주들로부터 항균력을 지닌 bacilli들을 분리하고 동정한 결과 항균력이 우수한 균주들은 주로 *Bacillus amyloliquefaciens* 들이고 일부 *B. subtilis*들도 있음을 확인하였다. 이중 하나인 *B. amyloliquefaciens* EMD17은 *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Listeria monocytogenes* 등 병원성 세균들과 ochratoxin (OTA)을 생성하는 *Penicillium* 속 곰팡이 증식을 강력히 억제하였다. 이외에 여러 식물병 유발 곰팡이들도 억제하였으며 이들은 *Alternaria alternate* KACC40019 (잎마름병 유발균), *Botrytis cinerea* KACC40573 (회색곰팡이병), *Rhizoctonia solani* AG-3 KACC40136 (흑점병, 및 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC41068 (부패병) 등이다. 이 결과는 앞으로 EMD17 균주가 타 연구자들이 분리한 다른 bacilli 균주들과 함께 식품들과 농작물에서 유해균 증식억제 목적의 종균으로 사용될 수 있음을 보여준다.

B. amyloliquefaciens EMD17과 MJ1-4들은 본 연구 결과 bacteriocin이 아닌 surfactin같은 lipopeptide 계열 물질들을 생산하는 것이 밝혀졌다. EMD17 genome에는 surfactin 유전자와 그 외 다양한 lipopeptide 유전자들이 존재하며 이들의 실제 생성 여부도 Mass Spectrometry로 확인되었다. 이들 항균물질들을 식품보존제로 활용하기 위해서는 현재 진행되는 유전자 분리, 항균물질 동정을 넘어서 해당 항균물질 유전자들의 발현과 유전자 변형을 통한 특성과 수율 개선 대사공학기법을 적용한 최적 생산균주 개발이 요구된다. 국내에서는 *Bacillus* 항균물질들의 특성 개량이나 대량생산 연구들이 수행되지 않아서 앞으로 연구가 요망된다.

B. subtilis EMD4 균주는 발효중인 간장에서 분리된 균으로 *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Listeria monocytogenes*를 포함한 몇몇 세균들을 저해하였다. EMD4의 항균물질은 정제 결과 3.5 kDa 크기의 박테리오신으로 밝혀졌으며 기존에 보고된 *B. subtilis* 균주들의 박테리오신들과 (Kindoli 등, 2012)는 다른 저해 spectrum을 지녔다. 다양한 항균 박테리오신들이 *Bacillus* 들에 의해 분비되는 것이 확인되었고 lipopeptide들과 함께 사용할 경우 항균력과 저해 spectrum을 늘릴수 있을 것으로 예상된다.

본 연구에서 분리한 bacilli들의 항균력을 활용한 종균개발이 후속 연구로 구체화 될 필요가 있다. 특히 *B. amyloliquefaciens* EMD17의 경우 된장에 종균으로 접종할 경우 고 농도로 오염시킨 *B. cereus* 증식을 강력히 억제하였다. EMD17의 강력한 *B. cereus* 억제 기작을 보다 상세히 조사하여 향후 장류제조에 EMD17을 적용한다면 길항미생물을 이용한 유해균 제어분야에서 중요한 성과가 될 것으로 예상된다.

나. 유해균 검출 및 생육특성 연구

장류를 포함한 김치 등 발효식품에서 유해균 존재를 신속, 정확히 검출하는 방법 개발 연구도 활발히 이루어지고 있다. 선택배지를 사용한 전통적인 방법과 함께 PCR 같은 분자생물학적 기술을 이용한 방법이 최근 널리 적용되고 있다. 최근에는 특정 식품에서 여러 유해균 존재 여부를 빠른 시간내 검출 가능한 질량분석기 (Mass Spectrometry)를 이용한 방법도 보고되고 있다. 신기술들의 출현 결과 이전보다 신속, 정확하게 유해균 존재 여부 판정과 균 동정이 가능해졌다. 유해균 신속 검출은 식중독사고를 사전에 예방할 수 있을 뿐 아니라 발효식품들의 원료, 제조설비, 제조공정, 저장 및 수송에 따른 유해균 오염의 위험 정도를 평가할 수 있게 해주어서 전반적인 품질 및 위생관리에 중요하다. 장류를 오염시키는 유해균들과 무해한 잡균들을 신속히 동정하고 이들의 역할을 연구하는 노력은 장기적 관점에서 장류 품질 제고에 필요하다.

2. 장류의 기능성 개선 연구

장류의 주된 원료가 되는 콩은 영양이 풍부한 작물이지만 발효를 통해서 기능성을 더 증진시키는 연구들이 수행되고 있다. Glyceolin과 equol이 잘 알려진 기능성 물질들이다. Glyceollin은 콩이 여러 스트레스를 받았을 때 생성된다고 알려져 있고 항균능과 함께 항암과 같은 효능을 지닌 기능성물질이다 (Lee 등, 2010). Glyceollin 생성을 유도하는 elicitor들 중 하나가 곰팡이 증식이다. *Aspergillus oryzae*나 *Rhizopus oryzae*와 같은 식용 곰팡이를 콩에 증식시키면 glyceollin 생성이 크게 촉진된다. 본 연구에서는 복합종균의 하나로 *Rhizopus oryzae*를 콩에 접종시켰기 때문에 glyceollin 생성이 일어났을 가능성이 있다, 그러나 조사는 수행하지 못했다. 후속연구가 이루어진다면 복합종균의 사용시 장점이 추가될 것이고 아울러 장류 고품질화에 도움이 될 것이다.

Equol은 항암효과로 인해 주목받는 물질이다. Daidzein을 전구체로 생성되며 생성에는 장내미생물들의 역할이 중요한 것으로 보고되었다 (Setchell and Clerici, 2010). 사람에 따라 식이로 섭취한 콩에서 equol을 생성할 수 있는 사람 그렇지 못한 사람들로 구별이 되고 이는 장내균총들과 밀접한 연관이 있는 것으로 밝혀졌다. 연구들을 통해 다양한 미생물들이 전구체로부터 equol을 생성하는 것이 밝혀졌으나 장류와 관련해서 equol 생성 여부를 확인한 연구는 없다. 앞으로 장류 제조용 종균에 equol 생성능을 지닌 균주를 찾아서 포함시키는 방안도 고려될 수 있을 것이다.

본 연구 수행결과는 종균 접종을 통해 장류 제품들의 혈전용해 활성을 크게 개선할 수 있음을 증명하였다. 혈전용해능은 *Bacillus*들이 분비하는 일군의 proteases에 기인하며 대표적으로 나토키나제가 알려져 있다 (Sumi 등, 1987). *Bacillus*가 분비하는 혈전용해효소들은 혈전치료제인 urokinase, streptokinase, t-PA들처럼 혈관계질환 예방 및 치료효과가 어느 정도 인정되어서 기능성식품으로 국내에서 시판되고 있다. 본 연구에서 청국장, 된장 제조 후 숙성과정을 통해서 종균을 접종한 시료들의 혈전용해활성이 그렇지 않은 시료들보다 높게 유지되는 것을 확인하였다. 이는 종균이 지닌 장점들중 하나이다. 향후 과제는 장류의 혈전용해활성을 어느 정도로 높일 수 있는지는 점이다. 여기에는 우수한 종균 선발과 접종 후 생육 촉진을 통해서 활성을 높이고 오래 유지하는 방안들에 대한 연구들이 필요하다, 또한 발효가 완료된 장류의 효과를 확인하기 위한 동물실험도 필요하다. 혈전용해활성이 기존 균주들보다 크게 향상된 균주들을 발효식품들을 포함한 자연환경에서 탐색하는 노력과 우수균주의 유전자를 확보한 다음 error-prone PCR이나 site-directed mutagenesis 방법을 적용해 변이주들을 얻는 노력도 필요하다.

장류업체들은 제조공정 개선을 통해 새로운 컨셉의 제품들을 출시하는 노력을 기울이고 있다. 대표적인 예로 쌈표간장에서 출시한 연두를 들 수 있다. 종균의 주의깊은 선택과 사용을 통해 콩의 단백질 분해 정도를 조절하고 여기에 여러 채소류 추출물들을 첨가하여 여러 요리에 소스로 사용 가능한 제품이다. 전통장류의 풍미에 가거부감을 갖는 청소년들에게는 서구식 소스와 같은 느낌을 주어 사용에 거부감이 적을것으로 생각된다. 이와같은 제품의 개발을 위해서는 소비자들이 선호하는 맛의 정확한 정의가 필요하고 그와 같은 맛을 부여하는 중요 화합물들을 정확히 파악하는 것이 필수적이다.

제3세대 자연조미료 시장 성장세

현재 2세대 조미료라고 불리는 간장 및 된장 등의 시장규모는 2011년 4,300억원을 정점으로 내리막을 걷고 있는 반면, 3세대 조미료라고 불리는 자연조미료 시장은 2012년 238억원, 2013년 400억원, 지난해 450억원을 형성한 데 이어 올해는 500억원까지 커질 것으로 내다보고 있다. 이에 마늘 등을 활용한 3세대 조미료인 자연조미료 개발이 필요할 것으로 판단된다. 본 연

구팀에서 수행한 장류들의 향기성분 분석과 대사체 분석 연구와 결과들은 소비자들이 선호하는 맛과 성분들을 정확히 파악하여 장류뿐 아니라 자연조미료 개발을 위해서도 필수적인 연구이다. 장류들의 향기성분과 대사체들 중에서 기능적으로 기호적으로 바람직한 성분들을 먼저 확인하고 다음 해당성분들이 많이 생성될 수 있도록 균주를 선발하고 제조 공정을 조정하는 연구들이 수행되어야 한다. 마늘이나 기타 기능성 소재를 첨가하여 장류의 기능성을 향상시키는 연구에서는 특히 소재들의 첨가가 장류의 향기성분이나 대사체들의 생성에 어떤 영향을 미치는 지에 대한 상세한 연구도 필요하다.

노년층 인구가 급증하고 그로인한 노인성 질환이 증가하는 현실을 볼 때 인지능력 개선과 같은 기능성을 지닌 식품이나 의약품 개발은 중요성이 매우 크다. 일상적으로 섭취하는 장류와 같은 식품을 통해서 치매예방에 도움이 된다면 매우 바람직 할 것이다. 본 연구결과 확인된 마늘과 같은 기능성 (치매예방이나 기억력 증진, 혈전용해, 기타 기능성) 소재의 경우 후속 시험을 통해 효능 평가 및 안전성 평가를 수행하여 건강기능식품 소재로 개발할 필요성이 크다. 특히, 마늘의 경우, 2014년 고시형 건강기능식품원료로 등재되었으며 (혈중콜레스테롤 저감효과), 따라서 이를 첨가한 장류를 개발하는 것은 시의 적절한 시도로 판단된다. 본 연구에서 마늘보다 발아시킨 마늘이 항산화 및 신경세포보호활성이 우수함을 증명하였으며, 나아가 발아마늘을 첨가한 청국장이 일반 청국장에 비하여 항산화활성, 신경세포보호 활성, 인지능력개선 효과면에서 우수한 것을 확인할 수 있었다.

식품섭취에 의한 AD를 포함한 치매예방 연구는 거의 없으므로, 본 연구의 성공적 수행은 노화 조절법의 새로운 조명 및 제시가 가능하여 노령화 문제 해결에 기여하리라 생각된다. 나아가 치매예방 및 항노화 기능성 식품 개발을 위한 연구들과 기능성이 검증된 활성 소재의 개발을 촉진할 것으로 판단된다.

제 2 절 국외 기술개발 현황

최근까지 식품중 기능성 물질의 분리 및 특성규명은 대부분 식품 관련저널 J. Agricultural and Food Chemistry (ACS, USA)나 암 관련 학회 International J. Cancer) 등에 보고되었으며 대부분 경우 분자수준에서 신호전달기전이나 생리적작용 규명, 대규모 cohort를 통해 기능성 식품 섭취에 따른 질병 역학 조사가 이루어졌음.

외국의 경우 종합적으로 판단할 때 aflatoxin, *Bacillus cereus* enterotoxins (BC 장독소), Biogenic amine 등 안전성에 관한 기초 분야의 연구는 매우 높은 기술 수준을 갖고 있다. 즉 독소생성균주들에 대해 genomics, proteomics 및 metabolomics 기법들을 적용해 독소생성 기작들에 대한 집중적인 연구들이 이루어지고 있고 해당 결과들은 저널을 통해서 발표되고 있다.

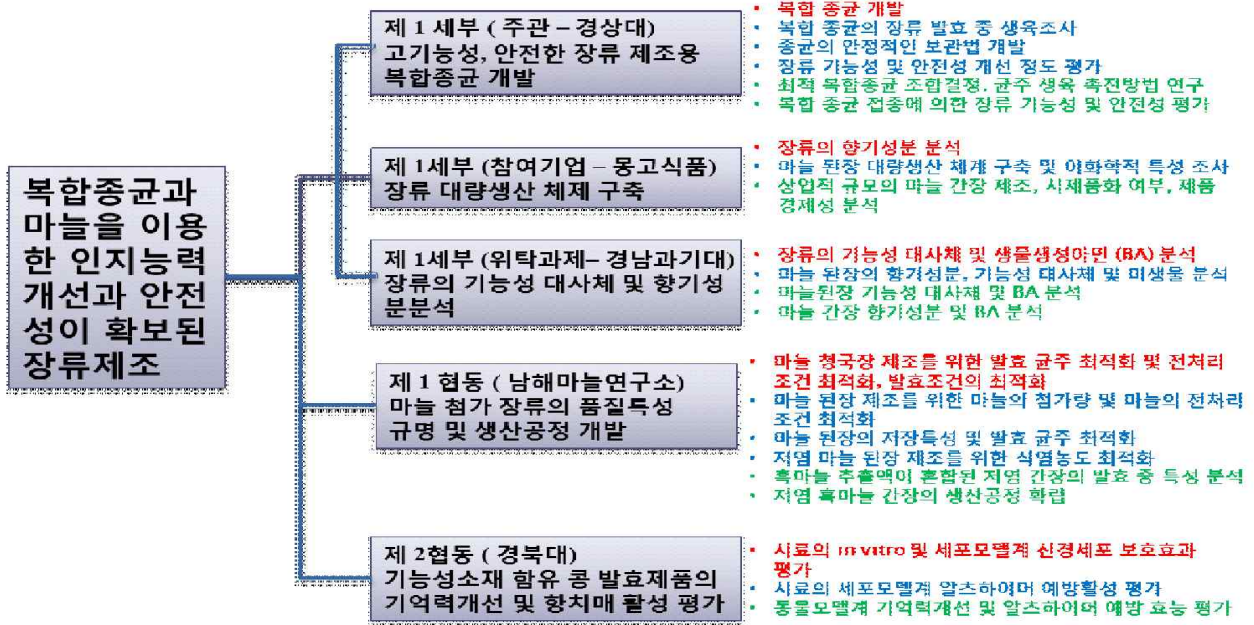
그러나 발효장류는 한국과 일본, 중국 등 아시아 국가에서 소비되고 있어 장류를 대상으로 한 연구는 미국과 유럽에서는 수행되고 있지 않다. 장류 발효와 발효미생물 연구는 주로 한국과 일본에서 수행되었으나 최근 중국도 관심을 갖고 기능성 식품분야 연구를 시작하고 있다. - 분석기술에 있어서는 aflatoxin의 경우 단일 클론 항체를 이용한 ELISA법과 정제 kit개발 B. cereus toxin 검출을 위한 항체 개발 *in vivo* 또는 배양세포에서 분석법들이 개발되어 왔음.

발효식품의 안전성 중 최근 문제로 대두되고 있는 Biogenic amine의 경우 NCBI에 현재까지 보고된 논문은 약 280,000편으로 tyramine에 관한 것이 약 7,500편 histamine이 약 75,000편으로 tyramine 보다 약 10배 더 많음. 주제도 분석방법, 세포에서 기능 등 전 분야에 걸쳐 있으나 대부분 의학적인 연구들이 주를 이루고 있음.

콩발효식품의 건강기능성과 관련해서는 국내에서 주로 연구가 활발하게 이뤄지고 있으며, 된장의 항암효과, 항산화 및 항염증활성, 항비만 효과 등이 보고되었다. 최근 연구에 의하면 (Lee et al, 2012; Cha et al., 2014), 된장보충식이 UCP-1, PPAR-gamma2 등 유전자 발현을 조절함으로써 복부비만을 줄일 수 있음이 보고되었음. 또한 된장을 섭취시킨 쥐는 체중과 지방조직 무게가 유의적으로 감소했는데, 이와 함께 항산화효소인 heme oxygenase-1, p40(phox), TNF-alpha, macrophage chemoattractant protein-1, TGF-beta1의 발현이 감소되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 된장발효 및 숙성중 생리활성물질의 추가적으로 생성되었음을 시사한다. 콩에 존재하는 이소플라본과 사포닌은 대부분 배당체 형태로 존재하고, 따라서 생체이용률이 낮은데, 된장을 제조하는 과정에서 비배당체 (aglycones)으로 분해되면 세포내 흡수율이 증가되면서 여러 가지 생리활성이 증가될 가능성이 크다 (Nam et al., 2015). 또한 장류를 제조할 때 사용되는 균주들의 세포벽에는 베타 글루칸 등 다양한 면역증강물질이 들어 있어, 저하된 면역기능을 회복하는데 도움을 줄 수 있는 것으로 보고되었다 (Jung et al., 2015). 또한, 프로바이오틱을 사용한 혼합배양(Bacillus subtilis-SKm, and Lactococcus lactis-GAm 함유)을 거쳐 제조된 된장을 섭취시킨 경우, 대장암 발생율을 감소시키는 것이 확인되었으며, apoptosis 관련 유전자를 조절하는 것으로 보고되었다. 본인들의 연구에서도 된장의 항산화 및 신경보호 효과를 확인할 수 있었으며, 특히 마늘을 첨가하여 제조한 청국장인 경우, 항산화 활성뿐 만 아니라 동물모델계 인지기능을 현저하게 개선하는 것을 확인하였다 (논문투고중). 전통발효식품에 함유된 기능성성분으로 이소플라본, 사포닌이외에 항암성분으로 thioproline, methylthioproline이 보고되었다 (Kim et al., 2014).

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

각 세부과제들간의 업무 분담과 3년간 수행한 주요 연구내용들을 아래와 같이 정리하였다.



제 1-1 절 고기능성, 안전한 장류 제조용 복합 종균 개발

1-1. 연구수행 방법 (주관기관, 경상대 1차년도)

가. 청국장 시료들로부터 혈전용해능 우수 bacilli 선발

(1) 청국장 시료 수집 및 bacilli 분리

전국 각지에서 제조된 청국장들 (Table 1)을 구입하여 bacilli들을 분리하였다. 청국장 5 g을 0.1% 펩톤수 45 ml와 섞은 후 Stomacher를 사용 균질화하고 균질액은 10 배씩 희석하였다. 희석액 100 µl를 LB 한천배지에 도말하여 16 시간 37°C에서 배양한 후 다양한 형태의 2,000 균락을 선발하였다. LB 배지 1 ml에 접종하여 진탕 배양한 배양액에 glycerol을 30% (v/v) 첨가한 후 냉동 (-70°C) 보관하면서 이후 실험에 사용하였다.

Table 1. Commercial cheonggukjang products used for the screening of bacilli.

제품명	제조사	원산지	label
찌개 청국장	엄마랑 메주마을	충북청원	CB
재래청국장	순창 향적원	진북순창	JB
은자골청국장	동인식품	경상북도	KM
웰빙청국장	묘성윤가네	전라남도	JN
생청국장	야생콩된장	경상남도	KN
외가집청국장	외가집	충남부여군	CN
무쇠숯청국장	광터식품	강원도원주	KW
황토방청국장	콩밭	경기도화성	KG

(2) 혈전용해능 우수 bacilli 균주 탐색

LB 배지에서 12 시간 이상 진탕 배양한 배양액을 이쑤시개를 사용하여 2% casein LB 한천 배지에 spot하고 37°C에서 8 시간 배양하였다. Casein 분해능이 우수한 158 개를 선발하여 이들의 혈전용해능을 fibrin plate 방법 (Jeong 등, 2007)으로 조사하였다. 7 ml PBS에 0.5% fibrinogen (Sigma, USA)을 녹인 용액을 동량의 2% agarose 용액과 섞은 후 plate에 부어 굳힌 후 모세관을 이용하여 well을 만들었다. 균 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 0.45 µm syringe filter로 여과한 여액을 시료로 사용하였다. 시료 10 µl를 well에 접종하여 37°C 12 시간 배양 후 생성된 분해환 크기를 측정하였다. 대조구로 사용된 plasmin (Sigma, USA)의 농도별 면적과 비교하여 시료의 혈전용해능을 plasmin 단위로 계산하였다.

(3) Bacilli 균주 동정

균주들의 일차 동정은 API 50CH Kit (bioMérieux Clinical Diagnostis)을 사용하였고, 정확한 동정을 위해 16S rRNA와 *recA* 유전자 염기서열을 비교하였다. 16S rRNA 유전자 증폭을 위한 primer는 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하였다. *recA* 유전자 증폭을 위해서 *recA*-F(5'-TGAGTGATCGTCAGGCAGCCTTAG-3')와 *recA*-R (5'-CYTBRGATAAGARTACCAWGMACCGC-3')을 사용하였다. PCR은 94°C 5 분, 30 cycles (94°C 30 초, 55°C 30 초, 72°C 2 분) 수행 및 72°C에서 4 분 신장하였다. 염기서열은 BLAST program을 사용해서 알려진 bacilli 서열들과 비교하였다.

나. *B. amyloliquefaciens* CB1 배양 특성 및 혈전용해능 조사

(1) *B. amyloliquefaciens* CB1 배양 시간과 배지에 따른 혈전용해능

B. amyloliquefaciens CB1을 LB 배지에서 96 시간 배양하였다. 12 시간마다 배양액의 생육 정도 (OD₆₀₀)를 측정하고, 혈전용해 역가는 fibrin plate법으로 측정하였다. SDS-PAGE와 fibrin zymography는 12% acylamide gel을 사용하였다. *B. amyloliquefaciens* CB1의 배지에 따른 생육 차이를 알기 위해 brain heart infusion (BHI, MB cell, Korea), LB (Difco, USA), nutrient broth (NB, Difco, USA), tryptic soy broth (TSB, Difco, USA) 배지에 접종하여 120 시간 배양하면서 12 시간 마다 배양액을 회수하여 OD₆₀₀ 값과 혈전용해 역가를 측정하였다.

(2) Two-Dimensional Gel Electrophoresis와 이미지 분석

단백질 시료 (5 µg)를 rehydration solution (8 M Urea, 50 mM dithiothreitol (w/v), 2% CHAPS, 0.2% Bio-Lyte 3-10 buffer (0.2 ampholytes, BioRad, USA)과 혼합한 다음 re-swelling tray에 고르게 분주하였다. pH 3-10의 pH gradient (IPG) strips (7 cm, BioRad)를 올려놓고 20°C에서 16 시간 rehydration을 실시하였다. Strip을 focusing tray에 옮긴 후 IEF-Cell을 사용하여 20,000 volt/h까지 전기를 걸어 단백질 pI에 의한 분리를 실시하였다. Iso-electric focusing 후에는 12% acrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 염색된 단백질 spot들을 gel에서 잘라내어 MALDI-TOF-MS 실시후 Voyager Biospectrometry Workstation (PE Biosystems, USA)을 사용하여 Mass spectrum을 분석하였다. Spectra 분석은 Data Explorer software (PE Biosystems)와 Mascot mass searching 프로그램 (<http://www.matrixscience.com>)을 사용하고 NCBIInr, MSDB, SwissProt database를 사용하여 동정하였다.

(3) 혈전용해효소 유전자 (*aprECB1*) cloning

B. amyloliquefaciens CB1 chromosomal DNA로부터 *aprECB1* 유전자를 증폭하였다. Primer는 CH51-F (5'-AGGATCCCAAGAGAGCGATTGCGGCTGTGTAC-3')와 CH51-R(5'-AGAATTCTTCAGAGGG AGCCACCC GTCGATCA-3)을 사용하였다 (Kim 등, 2009). 증폭된 1.5 kb DNA를 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector인 pHY300PLK에 넣고 재조합 plasmid를 *E.*

coli DH5a와 *B. subtilis* WB600에 electroporation 방법으로 도입하였다. 재조합 균주들을 배지 별로 120 시간 배양하면서 흡광도와 혈전용해능을 측정하였다.

(4) AprECB1 부분정제

B. subtilis WB600 형질전환체를 LB 배지에서 60 시간 배양한 배양액을 원심분리 (6,000 X g, 45 분)하였다. Filter로 여과한 상등액을 80% ammonium sulfate 침전하여 침전물을 40 ml buffer A에 녹였다. 4°C, 16 시간 투석 후 동결건조하고 30 ml buffer A에 녹여서 Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) column을 통과시켰다. (NH₄)₂SO₄ (1000, 800, 600, 400, 200, 0 mM)을 buffer A에 녹여 용출 buffer로 사용하였고, 각 분획은 10 ml 씩 회수하였다. 다음 DEAE-Sephadex A-50 (Amersham Pharmacia Biotech) column을 통과시켰다. NaCl을 함유한 buffer를 0-1000 mM 농도범위에서 200 mM씩 순차적으로 올려주면서 50 ml씩 흘려주었다. 분획들은 동결건조 후 소량의 buffer A에 녹여 사용했다.

(5) AprECB1 특성 조사

AprECB1의 pH와 온도 안정성을 조사하였다. Glycine-HCl buffer (pH 2.0), sodium acetate buffer (pH 3.0-6.0), Tris-HCl (pH 7.0-9.0), glycine-NaOH buffer (pH 10.0)를 사용하였다. 시료 5 µg을 buffer에 2 시간 둔 후 잔존 역가를 fibrin plate 법으로 확인하였다. 온도 안정성 조사는 시료를 sodium acetate buffer (pH 6.0)에서 37-65°C에서 30 분 둔 다음 잔존 역가를 측정하였다. 5 mM 금속이온 (KCl, MgCl₂, CaCl₂, CuSO₄, MnCl₂, ZnCl₂) 또는 1 mM 저해제 (PMSF, EDTA, EGTA, SDS, cantharidic acid, pepstatin A, bestatin hydrochloride, E64)를 각각 함유한 sodium acetate buffer (pH 6.0)에 시료를 40°C에서 30 분 둔 다음 잔존 역가를 조사하였다. Amidolytic 역가 측정은 10 mM 기질 50 µl, AprECB1 (1 µg), 50 mM sodium acetate buffer (pH 6.0) 430 µl을 섞어 총 500 µl로 하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. Sodium acetate buffer (pH 3.0) 500 µl를 첨가하여 반응을 정지 시키고 원심분리한 후, 410 nm 흡광도를 측정하였다. Amidolytic 역가는 흡광도 값과 p-nitroanilide의 molar 흡광수치 (8,800 M⁻¹ cm⁻¹)로부터 계산하였다.

(6) Fibrinogen 분해 패턴 조사

Fibrinogen 200 µg을 AprECB1 (25 ng), 40 mM Tris-HCl (pH 7.0) 200 µl와 섞은 후 37°C에서 12 시간 배양하면서 매 시간마다 fibrinogen 20 µg을 취한 후 5 x SDS sample buffer (12.5% 0.5 M Tris-HCl (pH 6.0), 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue)와 섞어 5분간 끓인 후 12% acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 후 Gel은 coomassie blue로 염색하였다.

다. Biogenic amine (BA) 생산균주 탐색

(1) Decarboxylase medium 이용 탐색

Decarboxylase medium을 이용한 BA 생산 *Bacillus* 균주 탐색은 Chang 등 (2012)의 방법을 변형하여 실시하였다. Plate method은 0.1% precursor amino acid를 함유한 LB 배지에서 24 시간 배양한 후 LB-GL agar (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride, 1.5% agar, 0.25% glycerol, 0.006% bromocresol purple, pH 5.0)배지에 각각 0.1%되게 ornithine (LB-CLO agar), histidine (LB-CLH agar), tyrosine (LB-CLT) 또는 lysine (LB-CLL)을 첨가한 배지에 10 µl씩을 spot 한 후, 37°C에서 15-24 시간 배양하며 관찰하였다.

(2) Decarboxylase 유전자 검출

Biogenic amines (histamine, tyramine) 생성에 관여하는 *hdc* (histidine decarboxylase)와 *tdc* (tyrosine decarboxylase) 유전자 검출을 위한 PCR을 수행하였다. 사용한 primer는 Table 2와 같다. PCR은 95°C 5 분; 95°C 45 초, 48°C 45 초, 72°C 1 분 15초를 32 cycles 실시

하고, 72°C 5 분 최종 신장하였다. 증폭물의 염기서열 결정 후 BLAST program을 사용해서 염기서열을 비교하였다.

Table 2. Primers used for the PCR.

Name	Sequence	Target	Product (bp)	Reference
HDC3-F	GATGGTATTGTTTCKTATGA	<i>hdc</i>	435	Coton and Coton (2005)
HDC4-R	CCAAACACCAGCATCTTC	<i>hdc</i>	435	Coton and Coton (2005)
TD2-F	ACATAGTCAACCATRTTGAA	<i>tyrdc</i>	1133	Coton and Coton (2005)
TD5-R	CAAATGGAAGAAGAAGTAGG	<i>tyrdc</i>	1133	Coton and Coton (2005)

(3) Amine 분석

균주들을 0.5% precursor amino acid를 함유한 LB와 TSB에 접종하여 37°C 24 시간 진탕배양한 후 원심분리 (4000× g, 20 분)한 후 dansyl chloride로 유도체를 얻은 후 분석하였다. 유도체 분석을 위한 HPLC 분석은 Agilent 110 series를 사용하였고 칼럼으로는 YMC-Pack ODS-AM C₁₈ (4.6 mm×250 mm)를 사용하였다. 유속은 1 ml/min으로 칼럼온도는 40°C를 유지시켰다. 이동상으로 70% acetonitrile을 사용하고 UV detector를 이용하여 254 nm에서 측정하였다.

라. 향(진)균 bacilli 탐색

(1) 향균, 향진균 bacilli 탐색

한천배지에 향균능을 조사할 bacilli들을 2-3 µl spot한 후 그 위에 *B. cereus* 10⁷ cells을 top agar와 섞은 후 도말하거나 혹은 indicator를 도말한 배지에 well을 만들고 well에 bacilli 배양상등액 20-50 µl 투여 후 배양하면서 저해환을 관찰하였다.

향진균 bacilli 탐색을 위해서는 PDA (potatp dextrose agar) top agar에 곰팡이 포자 (1×10⁵/ml)를 섞은 다음 LB 한천배지에 도포하였다. 균은 후 pasteur pipet을 사용하여 well을 만들고 향진균력 조사 대상인 세균 배양액 8 µl를 옮긴 후 25°C에서 5-7일 배양하면서 곰팡이 증식 억제를 관찰하였다. 곰팡이를 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 5-7 일간 배양 후 멸균된 나무젓가락을 사용하여 포자를 긁어 모아 소량의 멸균수가 든 tube에 모은 후 깔데기와 거즈로 여과하여 포자를 얻었다. 포자액 10 µl를 Haemocytometer에 분주하여 현미경으로 관찰하여 포자수를 측정하였다.

(2) 향(진)균 spectrum 작성

Bacilli들의 향(진)균 spectrum 작성을 위해 곰팡이, 그램 양성 및 음성균들을 배양하였다. 향(진)균능 확인은 agar well diffusion 방법, agar overlay 방법, 및 paper disc 방법들을 사용하였다. 한천배지에 indicator를 첨가한 top agar 10 ml를 중층해 균한 다음 well을 만들고 Bacilli 배양 상등액을 0.45 µm filter로 여과한 후 pH를 6.8로 조정하여 50 µl를 well에 첨가하고 24 시간 배양 후 저해환을 조사하였다. 저해환 크기를 측정한 다음 well 크기를 뺀 후 2로 나누어 얻은 숫자가 0.5 mm 이하는 +, 2-4 mm는 ++, 4 mm 이상은 +++로 표시하였다.

1-2. 연구수행 방법 (주관기관, 경상대 2차년도)

가. 혈전용해능, 향균력 우수 Bacilli 균주 분리

(1) 분리 균주 동정

전통방식으로 제조된 된장, 청국장, 메주에서 분리한 균주들 중 향균력이 우수한 EMD4 균주 동정을 위해 16S rRNA 유전자와 *recA* 유전자 염기서열을 조사하였다. 16S rRNA 유전자 증폭을 위한 primer로 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACC

T GTTACGACTT-3')을 사용하였고 *recA* 유전자 증폭을 위해서 *recA*-F (5'-TGAGTGATC GTCAGGCAGCCTTAG-3')와 *recA*-R (5'-CYTBRGATAAGAR TACCA WGMACCGC-3')을 사용하였다 (Heo 등 2013). 결정된 염기서열은 BLAST program을 사용해서 다른 bacilli 서열들과 비교하였는데 RAPD-PCR 방법도 함께 사용하였다 (Kwon 등 2009)

(2) NaCl에 대한 내성과 혈전용해능 측정

분리균주들의 NaCl 내성 정도를 조사하기 위해서 NaCl 농도를 3, 6, 9, 12, 15, 18%로 달리 한 LB 배지에 접종하여 37°C 진탕배양하며 OD₆₀₀ 값을 측정하였다. 혈전용해능은 fibrin plate 방법으로 측정하였다.

(3) SDS-PAGE와 Fibrin zymography

분리균주들을 각각 LB, NB, TSB 및 BHI 배지에 1% (w/v) 접종하고 37°C에서 96 시간 진탕배양하였다. 시간대별로 배양액을 취하여 원심분리하여 배양상등액을 얻었다. 배양상등액 시료들에 대해 SDS-PAGE와 fibrin zymography를 실시하였다 (Jo 등 2011).

(4) 항균 spectrum

여러 그램 양성 및 음성균들에 대한 저해능 확인을 위해 agar well diffusion 방법을 사용하였다. Bacilli 배양 상등액 50 µl를 well에 첨가하고 37°C 24 시간 후 저해환을 관찰하였다. 저해환 크기를 측정할 때 well 크기를 뺀 후 2로 나누어 얻은 숫자로 표시하였다. 0.5 mm 이하는 +, 2-4 mm는 ++, 4 mm 이상은 +++로 표시하였다 (Lee와 Kim 2012).

(5) *B. subtilis* EMD4가 생산하는 박테리오신의 효소, pH, 열 처리에 따른 특성

EMD4 박테리오신의 효소 처리에 따른 안정성 조사를 위해 상등액을 pH 6.8로 맞춘 후, trypsin, proteinase K, pepsin, protease로 처리하였다. pH 안정성은 상등액을 pH 3, -11로 조정 한 buffer에 2 시간 둔 다음 잔존 항균력을 agar well diffusion 방법으로 측정하였다. 열처리 안정성은 상등액을 pH 6.8로 맞춘 후, 50, 60, 70, 80°C에서 15 분, 그리고 100°C에서 10 분간 둔 후 잔존 항균력을 측정하였다.

(6) *B. subtilis* EMD4 균주가 생산하는 박테리오신 정제 및 특성 조사

EMD4 박테리오신 정제는 Q-Sepharose, Sephadex G-50, Phenyl Sepharose 6 fast Flow resin을 차례대로 사용하여 수행하였다. 2 번째 Sephadex G-50 column을 통과한 활성 분획들을 모아 동결건조한 후 20 mM Tris-HCl에 현탁한 다음 16% Tricine-SDS-PAGE 사용하여 시료를 분석하였다 (Kindoli 등 2012).

나. 복합 종균의 생육조사

(1) 바실러스, 효모, 곰팡이들의 공동배양 확인

바실러스, 효모, 곰팡이 공동배양에 적합한 조합들을 찾기위하여, 바실러스 (*B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. amyloliquefaciens* EMD17), 효모 (SY11, SY14, SY15, SY79, SY80, SY133), 곰팡이 (*R. oryzae*) 균주들을 전 배양 후 YM broth에 1% (v/v) 접종하여 30°C 배양기에서 48 시간 배양하며 표면도말법 (spread plate method)을 이용하여 생균수를 측정하였다.

(2) 효모 SY80 동정

1차년도 간장에서 분리한 SY80의 동정을 위해 API 20C AUX kit (biomérieux Clinical Diagnostis)을 사용하고, 또 ITS1-5.8S-ITS2와 D1/D2 domains (28S rRNA) 부위 염기서열을 조사하였다. 유전자 증폭용 primer로 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')와 26S-1 (5'-GGTGAGTTGTTACACTCC-3')을 사용하였다. PCR은 94°C, 5 분, 35 cycles (94°C 30

초, 54°C 1 분, 72°C 4 분) 그리고 72°C에서 10 분간 신장하였다. BLAST program을 사용해서 결정된 염기서열을 알려진 효모들의 서열들과 비교하였다.

다. 탈지대두 기질을 사용한 복합종균의 저장방법별 특성 확인

B. amyloliquefaciens MJ1-4, *B. amyloliquefaciens* EMD17, *Pichia farinosa* SY80, *Rhizopus oryzae*들의 저장방법별 생존율과 활력유지 확인을 위하여 탈지대두 5% (w/v)를 기질로 사용하여 적정온도에서 48 시간 배양 후 4°C, 20°C, -20°C 온도에서 저장하며 생균수, 혈전용해능, 항(진)균력을 측정하였다. 생균수는 표면도말법, 혈전용해능은 fibrin plate법을 이용하였다. 항(진)균력 측정을 위해서는 LB 혹은 PDA top agar 에 indicator (*B. cereus*, *Penicillium* sp.(OTA 생산균주))를 첨가하여 LB agar 배지 위에 부어 굳힌 후, well을 만들고 well에 bacilli 배양상등액 50 µl 투여 후 배양하면서 저해환을 관찰하였다.

라. 분리 균주를 사용한 장류 발효

(1) 청국장 제조 및 발효 중 특성 변화

함양농협에서 구입한 국내산 콩 (2012년산)과 *B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* EMD4를 사용하여 청국장을 제조하였다. 인위적으로 *B. cereus* 균주를 접종하여 실험하였다. 대조구로는 공시균주인 *B. subtilis* (natto) KACC 16450 균주를 사용하여 비교하였다. 대두를 수세하여 실온에서 16 시간 침지한 후, 121°C에서 50 분간 증자한 후 50°C로 냉각시킨 다음 증자된 콩에 균주를 각각 2% (v/w) 접종하여 골고루 혼합한 다음 37°C에서 48 시간 발효시켰다. 발효중 6-12 시간 마다 시료를 채취하여 pH, 생균수, 혈전용해능, 항산화능, 효소활성을 측정하였다. 청국장을 동결건조하여 얻은 분말에 80% EtOH를 첨가하여 60°C에서 2 시간 추출한 시료를 사용하여 DPPH, ABTs radical scavenging activity, FRAP assay 측정법을 사용하여 항산화능을 측정하였다 (Cho 등, 2014). Protease 활성은 청국장 분말에 증류수를 첨가 4 시간 추출한 조효소액을 사용하여 산성, 중성, 염기성 protease 활성을 측정하였다.

(2) 메주 제조 및 발효 중 품질특성 변화

함양농협에서 구입한 국산콩 (2012년산)에 복합 종균 (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *R. oryzae*, *Pichia farinosa* SY80)을 접종한 후 파쇄하여 골고루 혼합한 후, 15x10x20 cm 크기로 성형 (MJ1 메주)하였다. 3 일간 자연건조하여 온도 25°C, 습도 80% 배양기에서 메주를 1차 발효시킨 후, 실외 (12, 1월)에서 2차 발효를 행하였다. 대조구 메주로는 *B. subtilis* (natto) KACC 16450와 *A. oryzae* KCCM 60166 균주를 사용한 메주(MJ2 메주)와 벗짚을 사용하여 전통적인 방법으로 제조한 메주 (MJ3 메주)를 사용하여 비교하였다. 저장중 7 일 간격으로 메주의 pH, 생균수, 혈전용해능, 아미노태 질소, 효소활성을 측정하였다. pH는 pH meter로 측정하고, 적정산도는 0.1N NaOH로 pH 8.3을 종말점으로 하여 적정한 후 젖산 함량으로 환산하였다. 생균수는 단계적으로 10 배씩 희석한 희석액을 배지에 도말하고 16 시간 배양하여 측정하였다. 혈전용해 역가는 fibrin plate법을 변형하여 측정하였다. 정제된 혈전용해제인 plasmin (1 mU)을 사용하여 동일한 fibrin palate상에서 형성된 plasmin 투명한 면적을 100% 혈전용해 활성으로 표시하고, 다른 시료(5 ul)의 용해 활성을 plasmin에 대한 활성 값 (%)으로 표시하였다. 아미노태 질소는 formol 적정법으로 측정하였다. 시료 5 g에 증류수 100 ml를 가한 후, 37°C 수조에서 1 시간 교반하였다. 원심분리한 후 얻은 상등액에 0.1 N NaOH를 가하여 pH 8.4로 적정하였다. 적정한 상등액 10 ml과 중성 formalin 10 ml, 증류수 10 ml를 혼합 한 후 10 분 정치한 후 다시 0.1 N NaOH를 가하여 pH 8.4가 되도록 적정하였다.

$$\text{Amino-type nitrogen (mg\%)} = \frac{(V1 - V0) \times F \times 0.0014 \times D}{\times 100}$$

V1: 본시험 적정소비량 (mL) V0: 공시험 적정소비량 (mL) F: 0.1 N-NaOH용액 역가
 D: 희석배수 S: 시료 채취량 (g) 0.0014: 0.1 N-NaOH 용액 1 mL에 상당하는 질소량 (g)

동결건조한 분말에 증류수를 첨가하여 4 시간 추출한 조효소액을 사용하여 α -, β -amylase와 산성, 중성, 염기성 protease 활성을 보고한 방법에 준해 측정하였다 (Cho 등 2014).

(3) 된장 제조 및 발효 중 품질특성 변화

함양농협에서 구입한 국산콩 (2012년산)을 세척하고 12 시간 수침한 콩을 121°C에서 50 분 증자 후 냉각하였다. 냉각된 콩 600 g에 복합 중균 (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *R. oryzae*, *Pichia farinosa* SY80)을 접종하여 25-37°C에서 45 시간 배양하여 콩알메주를 제조하였다. 콩알메주에 삶은 콩 (600 g)을 가하고 정제염 (한주소금)으로 소금물을 만들어 함께 섞어 소금 농도 12% (w/w)인 된장 (*Doenjang* A1)을 제조하였다. 대조구로는 *B. subtilis* KACC 16750 (Natto 균주)와 *A. oryzae* KCCM 60166 균주를 사용한 콩알메주로 제조한 된장 (*Doenjang* A2)과 벧짚을 사용한 콩알메주로 제조한 된장 (*Doenjang* A3)을 제조하여 비교하였다. 된장들은 20°C에서 70 일간 숙성시켰다. Fig. 1에 전반적인 된장 제조공정을 나타내었다. 숙성 중 일정 간격으로 된장을 채취하여 pH, 산도, 혈전용해능, 조단백질, 조지방, 수분함량, 아미노태질소, 환원당 함량을 측정하였다. 조단백질은 Kjeldahl법, 조지방 분석은 Soxhlet 추출법, 수분은 적외선수분측정, 아미노태질소는 Formol 적정법으로 환원당 함량은 Miller 방법으로 측정하였다 (Cho 등, 2014-2).

된장의 관능평가를 숙성이 완료된 된장들에 대해 실시하였다. 패널은 12 명 (남 6, 여 6, 평균 연령 26.6 세)으로 구성되었다. 된장 (40 g)을 물 400 ml와 섞은 후 10 분간 끓인 후 식힌 된장을 20 ml 종이컵에 담아 제공하였다. 3 숫자의 기호로 각 시료들을 표식하였다. 입을 행구기 위한 물이 제공되었고 시료는 9점법으로 평가되었다 (1점 매우 나쁨, 9점 매우 좋음). 결과는 평균값 \pm 표준편차 (SD)로 표기하고 통계처리는 ANOVA (version 9.2; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) 법과 Duncan's multiple range tests를 사용하였다.

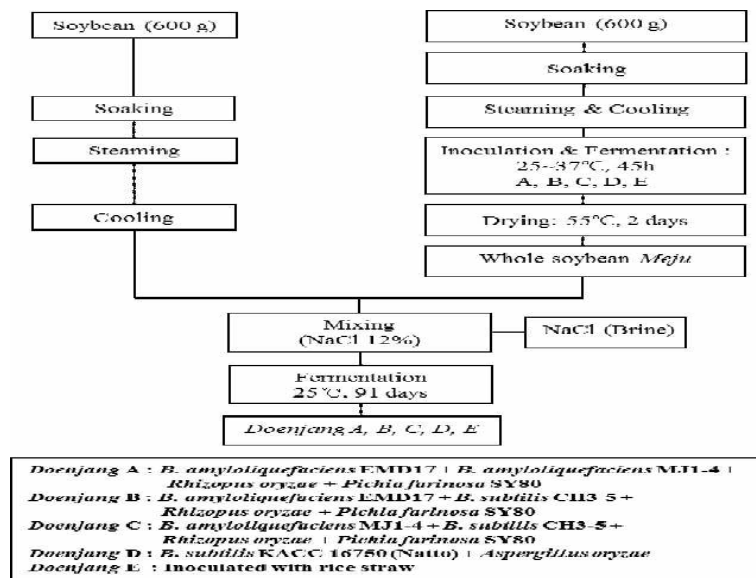


Fig. 1. Flowchart of preparation method of *Doenjang*.

1-3. 연구수행 방법 (주관기관, 경상대 3차 년도)

가. 복합중균을 이용한 된장제조

(1) 된장 제조

함양농협에서 구입한 국내산 콩 (2013년산) 600 g을 세척 후, 18 시간 수침한 후 121°C에서 50 분 증자하였다. 콩 200 g에는 *Bacillus* 균주들을 조합을 달리하여 접종하여(10^5 CFU/g) 37°C에서 45 시간 발효하였다. 200 g에는 곰팡이 포자를 10^6 spore/g 접종하여 25°C에서 45 시간 발효하였다. 나머지 200 g에는 효모를 10^5 CFU/g 접종하여 30°C에서 45 시간 발효하였다. 발효가 끝난 콩들을 조합별로 달리 혼합하여 55°C에서 48 시간 건조하였다. 건조 후 콩알메주에 새로 증자한 콩을 동일한 양 첨가하였다 (Fig. 1). 물과 소금을 혼합하여 소금 농도 12% (w/w)되는 된장을 제조하고 25°C에서 91일간 숙성하였다. *Bacillus*들은 *B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. subtilis* CH3-5, *B. subtilis* KACC16750 (Natto)이며, 곰팡이는 *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, 효모는 *Pichia farinosa* SY80 들을 사용하였다. 각 된장별로 접종된 균주들은 아래와 같다. 된장A (EMD17, MJ1-4, SY80, *R. oryzae*), 된장B (EMD17, CH3-5, SY80, *R. oryzae*), 된장C (MJ1-4, CH3-5, SY80, *R. oryzae*), 된장D (*B. subtilis* KACC16750, *A. oryzae*), 그리고 된장 E (벧짚 사용). 된장 D는 잘 알려진 공시균주들을 E는 종균대신 벧짚을 첨가한 대조구들이다. 모든 종균들은 대수기 후기에서 정상기 초기의 균들을 접종하였다.

(2) 된장 발효중 품질 변화

Bacillus 생균수는 LB 평판배지에 도말한 후, 37°C에서 1-2 일 후 나타나는 균락 숫자를 효모는 chloramphenicol (10 µg/mL)이 첨가된 YM 평판배지에서 30°C 2 일 배양 후 균락수에 희석배수를 곱하여 구하였다. 된장 시료의 pH와 적정산도는 앞과 동일한 방법으로 구하였다. 수분함량은 적외선수분측정기 (MX-50, AND, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 된장의 아미노태질소는 Formol 법을 이용하여 측정하였고 protease 활성과 혈전용해 역가도 앞에서 설명한 방법으로 측정하였다.

나. 복합종균을 접종하여 제조 한 된장에서의 *Bacillus cereus* 균주의 저해 효과

(1) 된장 제조

콩알메주를 이용한 된장 제조는 앞과 동일하다. 18 시간 수침한 콩 (2013년산, 함양농협 구매) 300 g을 121°C에서 50 분간 증자하여 식힌 후, 100 g 씩 각각 *Bacillus* 균주들, 곰팡이 효모를 접종하여 발효시켰다. *Bacillus*는 *B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, 그리고 *B. subtilis* CH3-5 중에서 1 혹은 2 균주 (각 균주 0.5%, 합 1%)를 5 log CFU/g 접종하여 37°C에서 45 시간 발효시켰다. 곰팡이는 *Rhizopus oryzae* 혹은 *Aspergillus oryzae*를 1% 6 log CFU/g 접종하여 25°C에서 48 시간 두어 포자 증식을 유도한 후 45 시간 더 발효시켰다. 효모는 *Pichia farinosa* SY80 균주를 1%, 5 log CFU/g 접종하여 30°C에서 45 시간 발효시켰다. 발효 후 콩을 시료별로 섞은 후 55°C에서 48 시간 건조시켜 콩알메주를 얻었다. 콩알메주에 증자 후 냉각한 콩과 물, 소금을 넣어 최종 염도 12%인 된장들을 제조하였다. 된장 시료들을 정리하면 다음과 같다. 된장A (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80), 된장B (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80), 된장C (*B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80)된장D (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *Aspergillus oryzae*), 된장E (벧짚 사용).

된장에 미리 배양한 *Bacillus cereus*를 4 log CFU/g과 7 log CFU/g로 첨가량을 달리한, 인위적으로 오염시킨 된장들을 얻었다. *B. cereus*를 4 log CFU/g 접종한 된장들을 A, B, C, D, E로 명명했고 7 log CFU/g 접종한 된장들은 A', B', C', D', E'로 명명하였다. 오염 된장들은 25°C에서 70일간 숙성하면서 7일 간격으로 *B. cereus* 생균수 변화와 품질 변화를 조사하였다.

(2) 발효중 된장 품질 변화

된장 시료의 총 *Bacillus* 생균수와 효모수를 구한 방법들은 앞서 설명한 것과 같다. *B.*

cereus 균수 측정은 선택배지인 MYP (mannitol-egg york-polymixin B)를 이용하였다. MYP 평판배지에 도말하여 37°C에서 배양 후 혼탁한 환을 보이는 분홍색 집락을 계수하고 여기에 희석배수를 곱하여 *B. cereus* 균수를 측정하였다. 발효중 된장의 pH와 산도, 아미노태 질소를 앞과 동일한 방법들로 측정하였다.

다. 선발균주의 탄소원과 질소원 첨가에 따른 항균활성과 생육촉진

생육배지에 탄소원 혹은 질소원을 첨가하여 균주 생육과 항균활성을 촉진할 수 있는지 알기 위하여 탄소원으로 glucose, galactose, maltose, sucrose, fructose를 질소원으로 malt extract, peptone, soytone, tryptone, urea, yeast extract를 배지에 첨가하였다. Nutrient broth에 탄소원과 질소원을 1% (w/v) 첨가하고 *B. amyloliquefaciens* EMD17을 1% (v/v) 접종한 후 37°C에서, 96 시간 배양하였다. 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 시간에 배양액을 회수하여 분광광도계를 사용하여 600 nm 값을 측정하였다. 배양상등액의 항균활성은 agar well diffusion 방법을 사용하고 이때 *B. cereus* ATCC1457를 indicator로 사용하였다.

라. *Bacillus subtilis* HK176의 혈전용해 효소 정제

(1) pET176 제조.

B. subtilis HK176의 total DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다. Primer로 51F (5'-AGGATCCCAAGAGAGCGATTGCGGCTGTGTAC -3', *Bam*HI site underlined)와 51R (5'-AGAATTCTTCAGAGGGAG CCACCCGTCGATCA-3', *Eco*RI site underlined)을 사용하였다 (Kim 등, 2009). 분비신호를 제거한 *aprE176* 유전자 증폭을 위한 primer는 petF (5'-AGAGGATCCGATGGCAGGGA AATCA-3', *Bam*HI site underlined)와 petR (5'-AGAC TCGAGCTGAGC TGCCGCCTG-3', *Xho*I site underlined)을 사용하였다 (Jeong 등, 2015). PCR은 94°C 5 분, 30 cycle (94°C 30 초, 60°C 30 초, 72°C 1 분)을 실시하였다. 증폭된 *aprE176*와 분비신호가 결합된 *aprE176*를 각각 pET26b(+) (5.36 kb, Km^r)에 삽입하였다. *E. coli* DH5α와 *E. coli* BL21(DE3) competent cell에 재조합 plasmid를 electroporation 방법으로 도입하였다. 형질전환체들로부터 plasmid를 얻어 확인 후 대장균에서 *aprE176* 발현을 유도하였다. 유전자 발현 정도는 SDS-PAGE와 혈전용해 역가를 측정하여 판정하였다. 혈전용해효소 역가는 plasmin unit/mg로 나타내었다.

(2) AprE176 정제

재조합 plasmid를 지닌 *E. coli* BL21(DE3)를 500 ml LB broth (kanamycin, 30 µg/ml)에 접종하여 37°C에서 OD₆₀₀ 0.8까지 배양하였다. *aprE176* 발현유도를 위해 IPTG를 1 mM 첨가하고 20°C에서 15 시간 더 배양하였다. 회수한 세포를 20 mM sodium phosphate buffer (0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4)에 현탁한 후 초음파파쇄기를 사용하여 세포를 파괴하였다. 파쇄물을 4°C에서 12,000 × g 10 분간 원심분리하여 상등액과 cell pellet을 얻었다. 상등액을 이용하여 AprE176과 M179 (변이효소)를 Ni-NTA column (GE health, Uppsala, Sweden)을 사용 정제하였다.

(3) 정제 효소 특성 조사

정제 효소 1 µg씩을 buffer (pH 3-12)에서 37°C 2 시간 둔 다음 잔존 역가를 fibrin plate 방법으로 측정하였다. 효소의 최적반응 온도 조사를 위해 37°C-60°C (pH 8.0)에서 30 분간 둔 다음 잔존 역가를 fibrin plate 방법으로 조사하였다. 또 효소를 45°C에서 (pH 8.0) 시간을 달리 하여 둔 다음 잔존 역가를 조사하였다. 금속들 (5 mM)과 저해제들 (1 mM)이 효소 역가에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 조건에서 30 분 (40°C, pH 8.0)둔 후 잔존 역가를 조사하였다.

(4) Error-Prone PCR

AprE176 혈전용해능 개선을 목적으로 *aprE176* 유전자를 지닌 pET176을 대상으로

error-prone PCR을 Cadwell과 Joyce 방법에 (1994) 준해 실시하였다. 반응액 (100 μ l)은 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 0.2 mM dATP와 dGTP, 1mM dCTP와 dTTP, pET176 (10 ng), 0.5 mM MnCl₂, *Taq* polymerase (Takara, 5 units)들로 구성되었다. Primer는 petF와 petR을 각각 0.5 μ M 사용하였다. 30 cycle (94°C 1 분, 60°C 30초, 72°C 1분) 후 증폭된 DNA를 *Bam*HI과 *Xho*I으로 절단 후 pET26b(+)와 결합시키고 electroporation 방법으로 *E. coli* BL21(DE3)에 도입시켰다. Kanamycin (30 μ g/ml)과 skim milk (2%, w/v) 함유 LB 배지에서 48 시간 배양 후 균락들중 skim milk 분해환 크기가 대조 구보다 큰 것들을 선발하고 이들의 plasmid를 얻어 염기서열을 조사하였다.

(5) Fibrinogen 가수분해

정제한 AprE176과 M179의 Fibrinogen (1 mg, bovine, MP biochemicals, Illkirch, France) 가수분해 패턴을 조사하였다. 20 mM Tris-HCl (pH 8.0, 37°C) 1 ml에 녹인 fibrinogen에 정제 효소 (50 ng)를 첨가하고 37°C 배양하면서 시간대별로 시료를 취한 후 5 \times SDS sample buffer와 섞어 5분간 끓였다. 12% acrylamide gel을 사용해서 SDS-PAGE를 수행하고 전기영동 후 gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250을 사용하여 염색하였다.

(6) AprE176과 M179 Kinetics

정제한 AprE176과 M179의 amidolytic 역가를 기질들을 사용하여 측정하였다: N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide (Sigma, S7388), N-Benzoyl-Phe-Val-Arg p-nitroanilide hydrochloride (Sigma, B7632), N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg p-nitroanilide hydrochloride (Sigma, B2133), N-(p-tosyl)-Gly-Pro-Lys 4-nitroanilide acetate salt (Sigma, T6140). 각 인공기질을 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 녹인 후 (10 mM) 50 μ l을 효소 10 μ l (1 μ g), Tris-HCl (pH 8.0) 440 μ l와 섞어서 37°C에서 10 분간 반응 후 citrate-NaOH (pH 3.0) 500 μ l를 첨가하여 반응을 종료시키고 바로 얼음에 두었다. 원심분리 (12,000 \times g 5 분) 후 상등액을 얻어 OD₄₁₀를 측정하고 흡광도 값으로부터 기질 가수분해 정도를 구하였다. p-nitroanilide의 molar extinction coefficient는 8,800 M⁻¹cm⁻¹. AprE176와 M179의 V_{max}, K_m 값은 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide를 기질로 사용하고 농도는 0.01-0.9 mM 달리하여 반응시킨 후 방출되는 p-nitroaniline 함량을 측정하여 구하였다. kcat 값은 다음 식으로부터 구하였다. kcat=V_{max}/(enzyme).

(7) 단백질 구조 예측

AprE176과 M179 구조 예측을 위해 SWISS-MODEL Workspace를 사용하였고 Subtilisin Nat (PDB ID: 4DWW)를 template structure로 하였다. PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.5.0.4, Schrödinger, LLC., NY, USA)을 사용하여 예측 구조를 비교하고 images로 얻었다.

2-1. 연구결과 (주관기관, 경상대 1차 년도)

가. 청국장 시료들로부터 혈전용해능 우수 bacilli 선발

혈전용해능이 우수한 CB1, CB67, JB6 균주들을 선발하여 기 보유 균주들 (CH86-1, HK176, CH3-5)과 비교하였다 (Fig. 2). CB1과 CB67은 기존 균주들 보다 혈전용해능이 우수하고 특히 CB1이 가장 우수하였다. 선발된 균주들의 동정을 위해 실시한 API kit (CH50) 결과들과 16S rRNA 유전자 및 *recA* 유전자 염기서열 결과들 (data not shown)들을 종합하면 3 균주 모두 *B. amyloliquefaciens*로 동정되었다. 따라서 CB1, CB67, JB6를 각각 *B. amyloliquefaciens* CB1, *B. amyloliquefaciens* CB67, 그리고 *B. amyloliquefaciens* JB6로 명명하였다. *B. amyloliquefaciens* CB1에 대해서는 보다 자세한 연구를 수행하였다.

나. *B. amyloliquefaciens* CB1 배양 특성 및 혈전용해능 조사

(1) *B. amyloliquefaciens* CB1 배양 시간, 배지종류에 따른 혈전용해능

B. amyloliquefaciens CB1의 배양 시간에 따른 혈전용해능 변화를 조사하였다. 기존 균주들과 비교를 위해 LB 배지에 각각 접종하여 96 시간 37°C 배양하였다. 5 균주들의 생육정도는 비슷했고 배양 60 시간에 가장 높은 혈전용해능을 보였다 (Fig. 3). 60 시간대 배양상등액들의 SDS-PAGE와 fibrin zymography를 실시하였다 (Fig. 4). 29 kDa과 42 kDa band가 뚜렷하고 그 외 band intensity가 약한 minor band들이 여러개 관찰되었다.

배지 종류에 따른 CB1 생육 확인을 위하여 37°C에서 120 시간 배양하였다. *B. amyloliquefaciens* CB1은 생육이 NB 배지에서 가장 느려서 48 시간에 흡광도 1.4에 도달한 반면 다른 배지들에서는 동 시간대에 1.7에 도달했다 (data not shown). 혈전용해능은 배양 60 시간에 가장 높고 BHI 배지에서 가장 높게 나타난 반면 NB 배지에서는 24 시간 이후 거의 역가가 검출되지 않아 배지에 따른 혈전용해능 차이가 매우 큰 것을 알 수 있다. 이는 추후 혈전용해효소 생산을 고려할 때 배지를 포함한 배양조건을 신중히 고려해야 함을 보여준다.

B. amyloliquefaciens CB1을 BHI 배지에서 배양하면서 시간대별로 SDS-PAGE와 fibrin zymography를 실시하였다 (Fig. 5). SDS-PAGE gel에서 21, 28, 37 kDa band 증감이 관찰되었고 21, 28 kDa band는 60 시간대에 최대를 나타내고 (Fig. 5 lane 3) 108 시간대에 줄어든 반면, 37 kDa band는 84 시간에는 거의 관찰되지 않았다. Zymography 역시 SDS-PAGE와 비슷한 경향을 나타내었다. Fibrin zymogram에서 fibrinolytic activity를 fibrin gel 위쪽의 투명한 halo 크기로 판단할 수 있는데, 60 시간의 halo 크기가 최대이고 108 시간에는 거의 관찰되지 않았다.

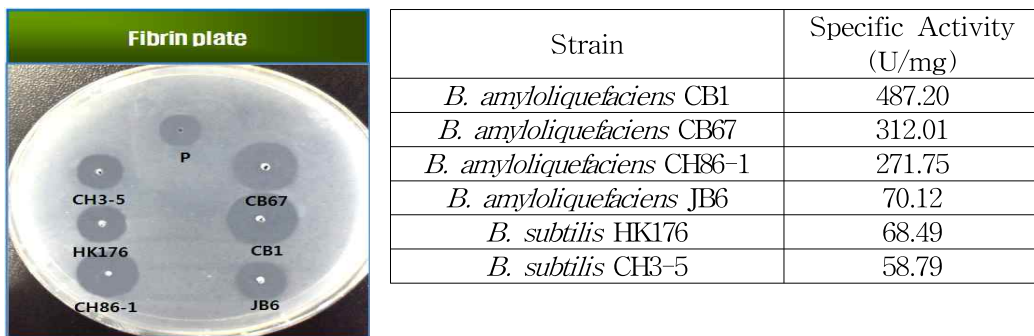


Fig. 2. Fibrinolytic activities of isolated strains.

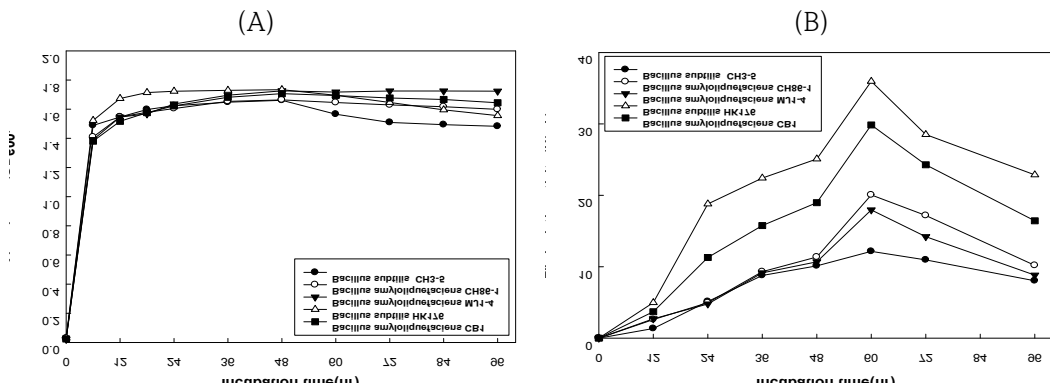


Fig. 3. Growth (A) and fibrinolytic activities (B) of 5 *Bacillus* strains.

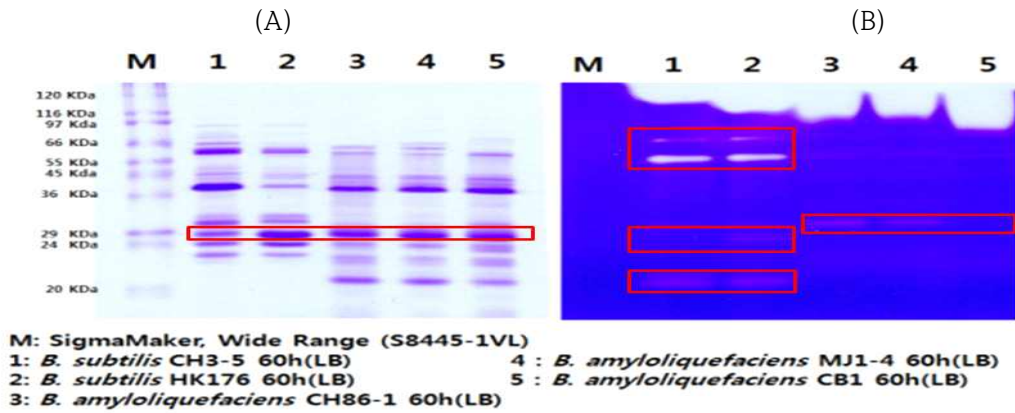


Fig. 4. SDS-PAGE (A) and fibrin zymography (B) of *Bacillus* strains.

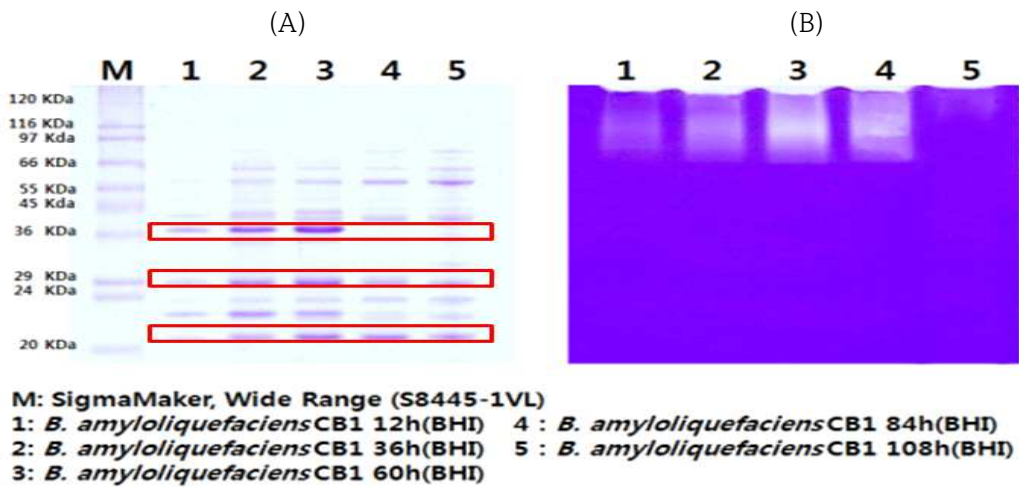


Fig. 5. SDS-PAGE and fibrin zymographys of *B. amyloliquefaciens* CB1 on BHI during 108 h incubation.

(2) Two-Dimensional Gel Electrophoresis와 MALDI-TOF Mass Spectrometry
 BHI 배지에서 60 시간 배양한 배양상등액을 2D-gel로 분석한 결과 gel에서 8 spot을 확인하였다. MALDE-TOF-MS 분석을 통해 8 spot 중 37 kDa은 extracellular neutral protease [NprE], 28 kDa은 serine alkaline protease [AprE], 21 kDa은 Gamma-glutamyltransferase [Ggt]로 3 개 spot이 각각 동정되었다 (Fig. 6).

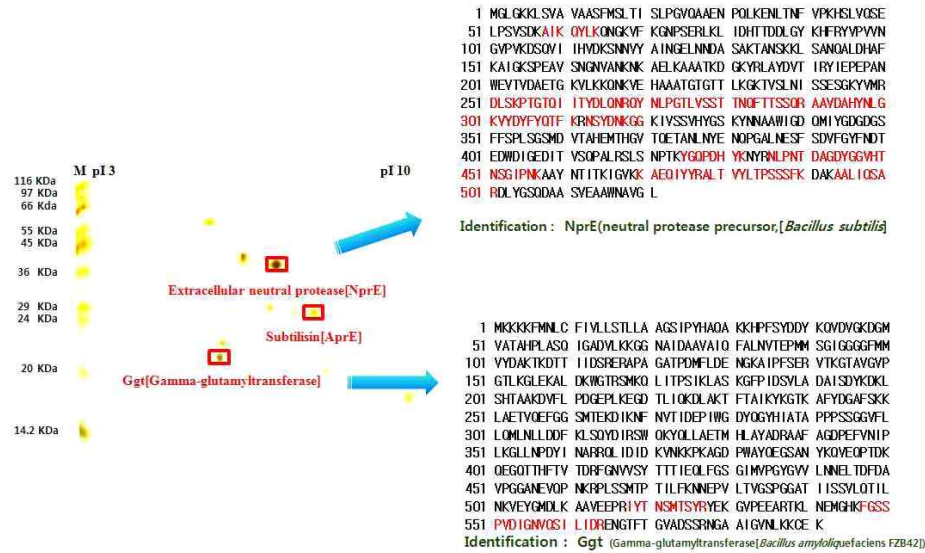


Fig. 6. 2-D gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometric analysis of fibrinolytic enzyme.

(3) *aprECB1* 유전자 cloning

B. amyloliquefaciens CB1 *aprECB1* 유전자를 PCR로 증폭한 1.5 kb DNA 조각을 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector pHY300PLK에 cloning하여 재조합 plasmid pHYCB1 (6.4 kb, Ap^r, Tc^r)를 얻었다. *E. coli* DH5α에 도입시킨 후 *aprECB1* 염기서열을 결정하였다 (Fig. 7). 염기서열에서 유추한 아미노산 서열을 이미 보고된 *Bacillus*들이 분비하는 혈전용해효소 단백질들의 아미노산 서열들과 비교한 결과 기존 효소들과 매우 비슷함을 확인하였다 (Fig. 8).



Fig. 7. Nucleotide sequence of *aprECB1*. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of AprECB1 are shown. Tentative promoter sequences (-35 and -10) and RBS are underlined. A possible transcription terminator is also underlined. The end of pre (▼) and pro sequence (▽) are marked. The first amino acid of proenzyme and mature enzyme are marked in bold characters.

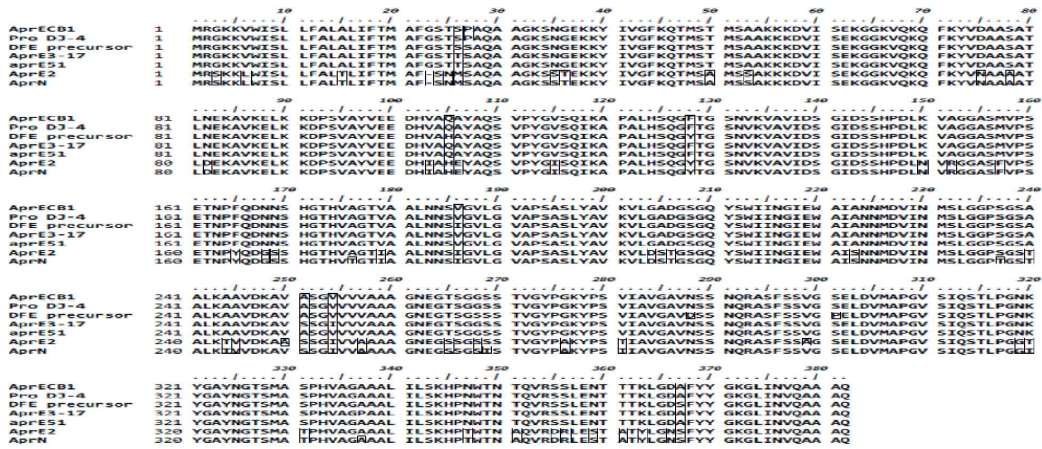


Fig. 8. Alignment of amino acid sequences of AprECB1 and homologous enzymes. Amino acid sequence of AprECB1 was aligned with homologous enzyme. *Bacillus* sp. DJ-4 (pro-subtilisin, AAT45900.1), *B. amyloliquefaciens* DSM7 (AprEofDFE precursor, AAZ66858.1), *B. amyloliquefaciens* CH3-17 (AprE3-17, ACU32756.1), *B. amyloliquefaciens* CH51 (AprE51, ACA34903.1), *B. subtilis* CH3-5 (AprE2, ABJ98765.1), and *B. subtilis* LSSE-22 (AprN of nattokinase, AEV91244.1)

(4) *B. subtilis*에서 *aprECB1* 유전자 발현

pHYCB1을 지닌 *B. subtilis* WB600를 배지를 달리하여 120 시간 배양하면서 생육과 혈전용해능을 조사하였다 (Fig. 9). NB 배지에서 생육이 느리고 BHI 배지에서는 72 시간 이후에 OD 값이 조금 증가하였다. 혈전용해능은 대체로 24 시간 이후 정상기에 접어들면서 급격히 증가하였고, 108 시간 후에는 NB 배지를 제외한 다른 배지들에서는 비슷하였다. SDS-PAGE와 fibrin zymography 결과도 혈전용해능 결과와 상응하는 패턴을 확인할 수 있었다. 혈전용해능을 보이는 주요 단백질이 28 kDa 단백질을 확인할 수 있었다 (Fig. 10).

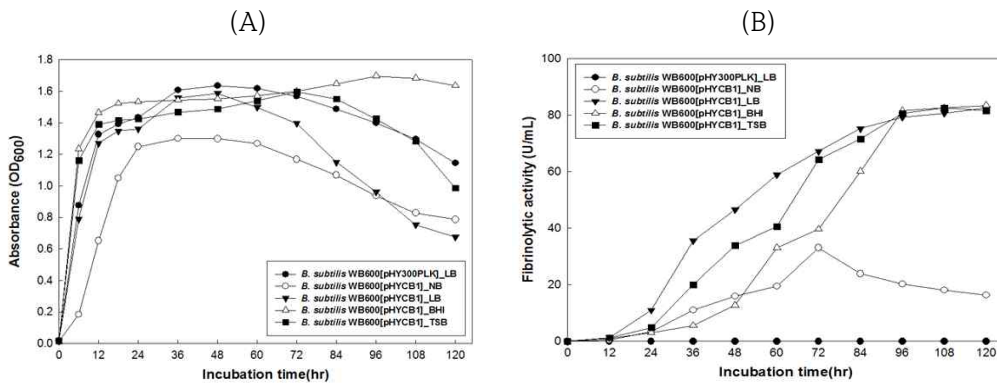


Fig. 9. Growth (A) and fibrinolytic activities (B) of *B. subtilis* WB600 [pHYCB1] in different media.

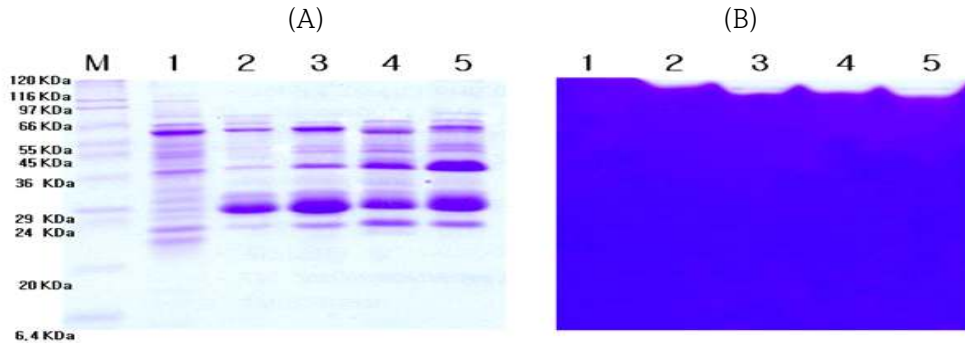


Fig. 10. SDS-PAGE and fibrin zymography of *B. subtilis* WB600 [pHYCB1].
 M: sigmaMaker, Wide Range (S8445-1VL), 1: *B. subtilis* WB600 [pHY300PLK] 72 h (LB)
 2: *B. subtilis* WB600 [pHYCB1] 72 h (NB) 3: *B. subtilis* WB600 [pHYCB1] 72 h (LB)
 4: *B. subtilis* WB600 [pHYCB1] 72 h (BHI) 5: *B. subtilis* WB600 [pHYCB1] 72 h (TSB)

(5) AprECB1 부분정제

AprECB1 정제를 위하여 Phenyl-Sepharose, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography를 실시하고 혈전용해역가를 지닌 분획들을 회수하여 투석 및 동결 건조한 후 SDS-PAGE와 fibrin zymography를 실시하였다 (Fig. 11). 정제가 진행될수록 28 kDa band가 선명해지는 것을 확인할 수 있다. Table 3는 정제결과를 정리한 정제표이다. 최종 정제 후 역가는 배양상등액에 비해 9 배 증가하였고 효소 회수율은 1.63%이다.

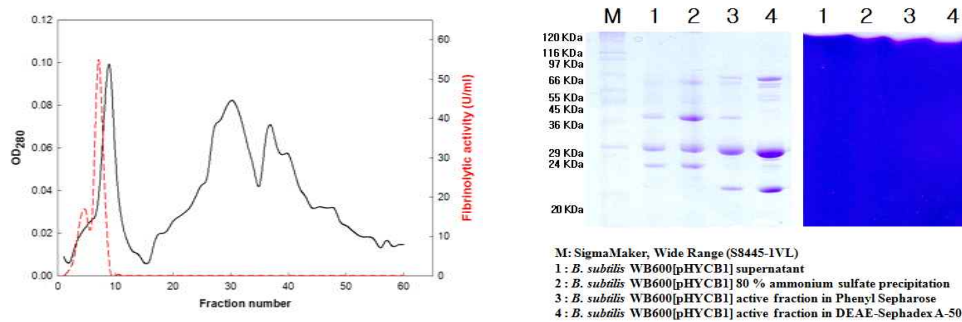


Fig. 11. Purification of AprECB1. (A) Elution profile of AprECB1 through a DEAE-Sephadex A-50 column. A line indicates the OD280 value of each fraction (1 ml) and a dotted line indicates fibrinolytic activity. (B) SDS-PAGE (left) and fibrin zymography (right).

Table 3. Purification table of AprECB1.

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Fold (x-fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	28,120.11	159.73	176.05	1.00	100.00
80% Ammonium sulfate precipitation	20,315.90	41.63	487.98	2.77	72.25
Phenyl-Sepharose	4,831.52	4.94	978.04	5.56	17.18
DEAE-Sephadex A-50	459.31	0.29	1,583.84	9.00	1.63

(6) AprECB1 효소 특성

부분정제한 AprECB1의 pH와 온도 안정성을 조사한 결과 pH 6.0에서 가장 높은 역가를 보였고, 6.0 이상에서는 역가가 감소하였다 (Fig. 12). pH 3 이하에서는 역가가 검출되지 않았

다. pH 6.0에서 반응 최적온도는 40°C이고 45°C에서 역가는 40°C 역가의 68.6%로 감소하고 55°C 이상 온도에서는 완전히 역가가 상실되었다. 결과에서 AprECB1은 중온균 효소의 열 안정성을 지님을 알 수 있다.

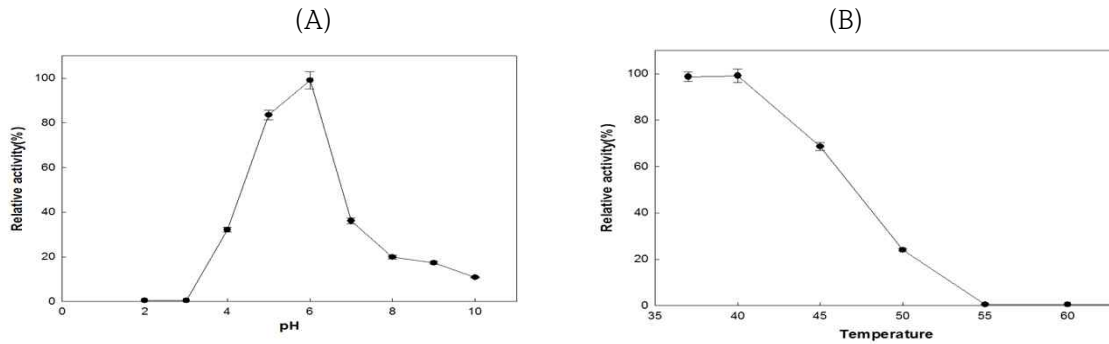


Fig. 12. Effects of pH (A) and temperature (B) on the fibrinolytic activity of AprECB1.

AprECB1 역가는 Ca^{2+} 에 의해 증가하나 K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 은 저해하였다 (Table 4). 특히, Zn^{2+} 과 Cu^{2+} 에 의해 74.08%, 96.17% 저해되었다. Serine protease inhibitor인 PMSF에 의해 역가는 완전히 저해되었고 EDTA, EGTA, SDS에 의해서도 저해되었다. 이상 결과들에서 AprECB1은 serine protease 중 metalloprotease로 추정된다.

AprECB1의 기질특이성에 관해 조사하였다 (Table 5). 여러 인공기질들중 chymotrypsin 선호 기질로 알려진 *N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA*과 가장 특이적으로 반응하였다.

AprECB1의 fibrinogen 가수분해능을 조사하였다 (Fig. 13). Fibrinogen의 A α chain은 30 분에, B β chain은 1 시간 이내 분해하였다. 하지만 γ -chain은 12 시간이 지나도 분해하지 못하였다.

다. Biogenic amine (BA) 생산균주 탐색

(1) Decarboxylase 배지 이용 탐색

Decarboxylase 배지를 이용하여 분리균주들중 BA 생산 균주를 탐색하였다. Chang 등 (2012)의 방법을 변형하여 plate method와 broth method를 실시하였다. 각 배지에 첨가된 bromocresol purple 색이 노란색에서 보라색으로 변하는 정도가 glycerol만 있을 때보다 glycerol과 함께 precursor amino acid를 첨가한 배지에서 더 진한 보라색이 관찰되었을 때 양성으로 판정한다. 그러나 positive control인 *B. subtilis* ATCC6051A, *B. subtilis* ATCC9372, *B. licheniformis* ATCC 14580들도 큰 차이를 보이지 않거나 위음성이 나타났다. 이 방법은 *Bacillus*들의 glycerol 이용 정도에 따라 구별되는 방법이어서 배양조건에 따른 실험적 오차가 커서 정확한 결과를 얻기가 힘들었다.

Table 4. Effect of metal ions and inhibitors on the activity of AprECB1.

Metal ions(5 mM)/inhibitors (1 mM)	Activity (%)
None	100
KCl	98.29±2.57
MgCl	90.18±3.84
CaCl ₂	118.15±3.12
CuSO ₄	3.83±0.14
MnCl ₂	93.32±2.43
ZnCl ₂	25.92±1.17
PMSF	0
EDTA	3.35±0.07
EGTA	3.49±0.07
SDS	5.31±0.18
Cantharidic acid	90.18±3.84
Pepstastin A	98.29±2.55
bestatin hydrochloride	85.65±3.63
E-64	41.78±1.34

Table 5. Amidolytic activity of AprECB1.

Synthetic protease substrate (10mM)	Substrate hydrolysis (mM/min/mg)
<i>N</i> -Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> NA ^a	14.49
<i>N</i> -Benzoyl-Phe-Val-Arg- <i>p</i> NAhydrochloride	0.93
<i>N</i> -Benzoyl-Pro-Phe-Arg- <i>p</i> NAhydrochloride	0.12
<i>N</i> -(<i>p</i> -tosyl)-Gly-Pro-Lys4-NAacetatesalt	0.39

^a*p*NA : *p*-nitroanilide.

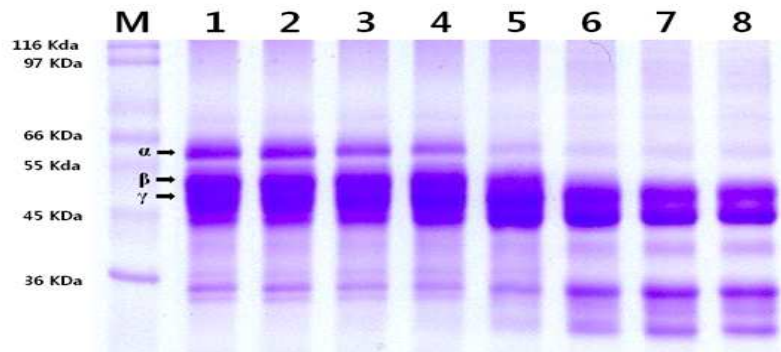


Fig. 13. Fibrinogen hydrolysis by AprECB1.

Fibrinogen (200 μ g) was hydrolyzed by AprECB1 (25 ng) in 200 μ l of 40 mM Tris-HCl, pH 7.0 (buffer A) at 37°C. 1, control (no enzyme); 2, 0 min; 3, 5 min; 4, 10 min; 5, 30 min; 6, 1 h; 7, 2 h; 8, 4 h; M, protein size Marker (wide range, Sigma, S8445-IVL).

(2) Decarboxylase 유전자 검출

Histamine을 생성하는 histidine decarboxylase (*hdc*) 유전자, tyramine을 생성하는 tyrosine decarboxylase (*tdc*) 유전자 존재여부를 PCR 방법으로 확인하였다. *hdc* 유전자 검출을 위해 HDC3/HDC4 primer set을 사용했을 때 증폭산물은 435 bp이며, *tdc* 유전자 검출을 위해 TD5/TD2 primer set을 사용했을 때의 증폭산물은 1,134 bp라고 보고되었다. *hdc* 유전자를 지

닌 균주로 분양받은 *B. licheniformis* A7 (충북대 식품공학과)과 *tdc* 유전자를 지녀서 분양받은 *Paenibacillus tyraminigenes* sp. nov. H3029 (KCTC 10694BP^T)의 전기영동 결과를 나타내었다 (Fig. 14). *hdc*와 *tdc* 으로 추정되는 밴드들을 잘라 DNA 추출 후 염기서열을 결정한 결과 *hdc*는 확인되지 않았다. 그러나 *B. licheniformis* A7와 *P. tyraminigenes* H3029의 *tdc* 유전자 추정 밴드들의 염기서열은 일치했고 염기서열 분석 결과 *tdc* 유전자로 최종 확인되었다.

PCR을 이용한 biogenic amine 생성 유전자를 지닌 균주 검출은 특이성과 민감성이 뛰어나 단시간에 균주 확인이 가능하지만 primer design이 잘못될 경우 비특이적 증폭에 의한 false positive 위험이 있다. 정확한 실험 결과를 위해서는 primer design과 최적 PCR 조건 등을 더 연구할 필요가 있다. 또한 유전자가 검출되어도 해당 BA 생성 여부는 HPLC 등의 방법으로 확인해야만 한다. 유전자는 존재하지만 변이로 인해 실제 아민이 생성되지 않을 수 있기 때문이다.



Fig. 14. PCR products of decarboxylase genes amplified with specific primers from selected microorganisms. M, 1 kb ladder marker; 1, *B. licheniformis* A7; 2, negative control (no primer); 3, *P. tyraminigenes* H3029 4, negative control (no primer). Arrows indicate the histidine decarboxylase (*hdc*) gene (A) and tyrosine decarboxylase (*tdc*) gene (B)

(3) Amine 분석

균주들의 BA 생성 여부 확인을 위해 HPLC 분석을 실시하였다. 유도체화한 표준물질 (putrescine, cadaverine, histamine, tyramine)들을 농도별로 분석하였다 (Fig. 15). 표준물질들의 경우 농도 의존적으로 peak가 검출되었다. Positive control로 사용한 *P. tyraminigenes* sp. nov. H3029 (KCTC 10694BP^T)에서는 높은 함량의 tyramine이 검출되었으나 다른 positive control인 *B. subtilis* ATCC6051A, *B. subtilis* ATCC9372, *B. licheniformis* ATCC14580과 다른 분리 균주들에서는 peak를 관찰할 수 없었다. 저농도로 BA를 생산하는 균주들을 검출하기 위해서는 시료 준비와 HPLC 분석 조건들을 보다 세밀하게 조정할 필요성이 있고 장류에 따라서도 분석 조건을 달리할 필요성이 있을 것으로 생각된다.

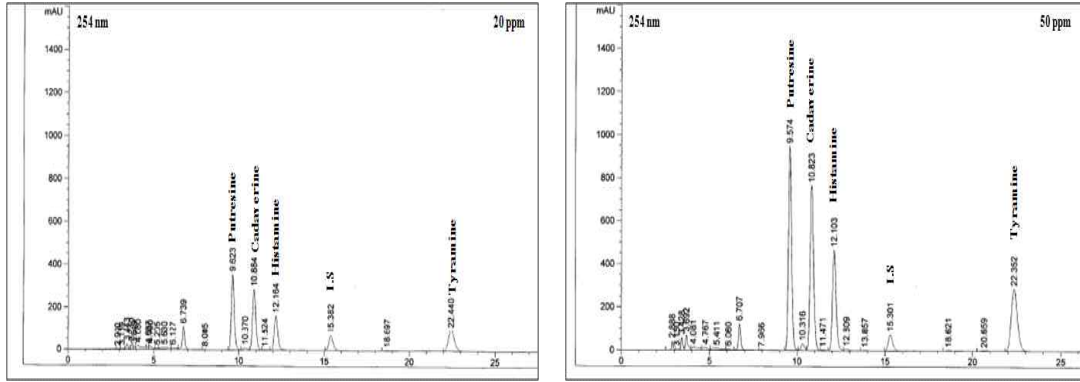


Fig. 15. HPLC analysis of biogenic amines standard.

라. 항(진)균 bacilli 탐색

경남과기대에서 청국장으로 부터 분리된 *Bacillus* sp. 135, CSY191, CSY33, HCD2, EMD17 균주들의 항(진)균력을 측정하였다. 135, HCD2, EMD17 균주들에 대해서 항균력을 측정하였다 (Table 6). 대조구로는 항균물질 생산이 확인된 *B. subtilis* W42 (Kindoli 등, 2012)를 사용하였다. 실험 결과, 135와 EMD17이 우수한 항균력을 지녔다. CSY191, CSY33, 135 3 균주에 대해 항진균력을 조사하였고 대조구로는 항진균력이 우수한 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4 (Lee and Kim, 2012)를 사용하였다 (Table 7). CSY33과 135의 항진균력이 우수하게 나타났다. 특히 135 균주는 항균력과 항진균력이 모두 우수하여서 다른 특성들이 양호할 경우 장류 제조용 종균으로 활용 가능성이 클 것이다.

Table 6. Inhibitory spectrum of some *Bacillus* strains isolated from *Cheonggukjang*.

Indicator strains	Control	Isolated strains		
	W42	135	HCD2	EMD17
<i>Bacillus cereus</i>	+++	+++	-	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	+++	+++	-	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	+++	+++	-	+++
<i>Streptococcus thermophilus</i> KFRI193	+++	+++	-	+++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC9135	++	-	-	-
<i>B. circulans</i> ATCC4513	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> ATCC33679	+++	-	-	+++
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	-	-	-	-

Table 7. Antifungal activity spectrum of *Bacillus* sp. against a variety of fungi.

Strain	Isolated strains			
	MJ1-4	CSY191	CSY33	135
<i>Penicillium</i> spp., OTA producer	+++	-	++	+++
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	++	+	-	+++
<i>Penicillium roqueforti</i>	+++	-	+++	+++
<i>Aspergillus sojae</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+++	++	+++	+++

2-2. 연구결과 (주관기관, 경상대 2차 년도)

가. 혈전용해능, 항균력 우수 균주 분리

(1) 분리 균주 동정

된장과 메주에서 분리한 균들 중 전형적인 바실러스 형태를 보이는 균락들을 선별하였다. 그램 염색 결과 양성 간균이며, API 50CHB kit 사용 결과 *Bacillus* 속들로 판명되었다. 이들의 16S rRNA 유전자, *recA* 유전자 염기서열들 (Table 8)과 RAPD-PCR 결과를 나타내었다 (Fig. 16). 동정 결과 EMD4, EMD17, HCD2 균주는 각각 *B. subtilis* EMD4, *B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* HCD2로 동정되었다.

Table 8. 16S rRNA gene and *recA* gene sequencing results.

	16s rRNA	% identity
EMD4	<i>Bacillus subtilis</i>	99
	<i>Bacillus</i> sp.	99
EMD17	<i>Bacillus subtilis</i>	100
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100
HCD2	<i>Bacillus subtilis</i>	100
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100
<i>recA</i> gene		
EMD4	<i>Bacillus subtilis</i>	100
EMD17	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99
	<i>Bacillus subtilis</i>	85
HCD2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99

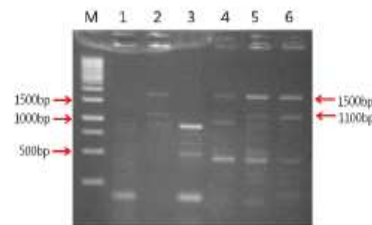


Fig. 16. RAPD-PCR

1, *B. subtilis* W42; 2, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4; 3, *B. licheniformis* ATCC 21416; 4, *Bacillus* sp. 135; 5, *B. amyloliquefaciens* EMD17; 6, *B. amyloliquefaciens* HCD2.

(2) 분리균주들의 생육 특성

분리균주들을 LB, TSB, BHI, NB broth에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 4 균주 모두 LB, TSB, BHI 배지에서는 증식 속도가 빨라서 12-18 시간에 정상기에 진입한 반면 NB 배지에서는 증식 속도가 현저히 느렸다. 식염이 이들의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과, *B. subtilis* W42는 식염농도 12%까지는 느리지만 증식하였다 (data not shown). *B. amyloliquefaciens* EMD17, MJ1-4 그리고 HCD2는 9% 까지는 증식하나 12% 이상에서는 증식하지 못했다. 저염 종류의 식염농도가 통상 12% 부근인 점을 고려할 때 이들 균주들은 식염농도 10% 미만의 저염 종류에서는 생육에 문제가 없음을 알 수 있다 (이 등 2014).

(3) 분리균주들의 혈전용해활성

분리균주들의 혈전용해능을 측정한 결과 *B. amyloliquefaciens* HCD2가 다른 3 균주들 보다 월등히 높았고 특히 HCD2를 BHI 배지에서 배양할 경우 36 시간에 174.5±27.32 mu/μl로 가장 높았다 (data not shown). *B. amyloliquefaciens* EMD17이 다음으로 혈전 용해능이 우수하였고 TSB 배지에서 30 시간에 61.63±7.96 mU/μl을 나타내었다. *B. subtilis* W42의 혈전용해능이 가장 낮았다. 이상 결과들로부터 혈전용해능은 균주에 따른 특성이며, 동일 균주도 배지와 배양 조건에 따라서 큰 차이를 보이는 것을 확인하였다.

(4) SDS-PAGE 및 fibrin zymography

분리균주들의 배양상등액을 시료로 fibrin zymography를 수행하였다 (Fig. 17). Fibrin zymography는 SDS-PAGE로는 알 수 없는 미량 존재하는 단백질들도 활성을 지닌 경우 검출되는 매우 민감한 방법이다 (이 등, 2014). *B. amyloliquefaciens* EMD17 배양상등액의 fibrin zymogram을 보면 배양 시간이 경과할수록 저분자량의 활성 band (a band, 24 kDa)가 나타나

지만 배지에 따라 가장 활성이 뚜렷한 시간대는 차이가 있다. 가장 혈전용해활성이 높았던 *B. amyloliquefaciens* HCD2의 경우 fibrin zymogram에서도 활성이 높게 나타났다.

(5) 항균 spectrum

B. subtilis EMD4 항균능 확인을 위해 agar well diffusion 방법을 사용하였다. 저해 정도는 저해환 크기를 측정하여 다음 well 크기를 뺀 후 2로 나누어 얻은 숫자로 비교하였다. 0.5 mm 이하는 +, 2-4 mm는 ++, 4 mm 이상은 +++로 표시하고, 그 결과는 Table 9에 나타내었다. EMD4 균주는 *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *S. thermophilus* 균주에 대한 항균력이 우수한 것으로 조사되었다.

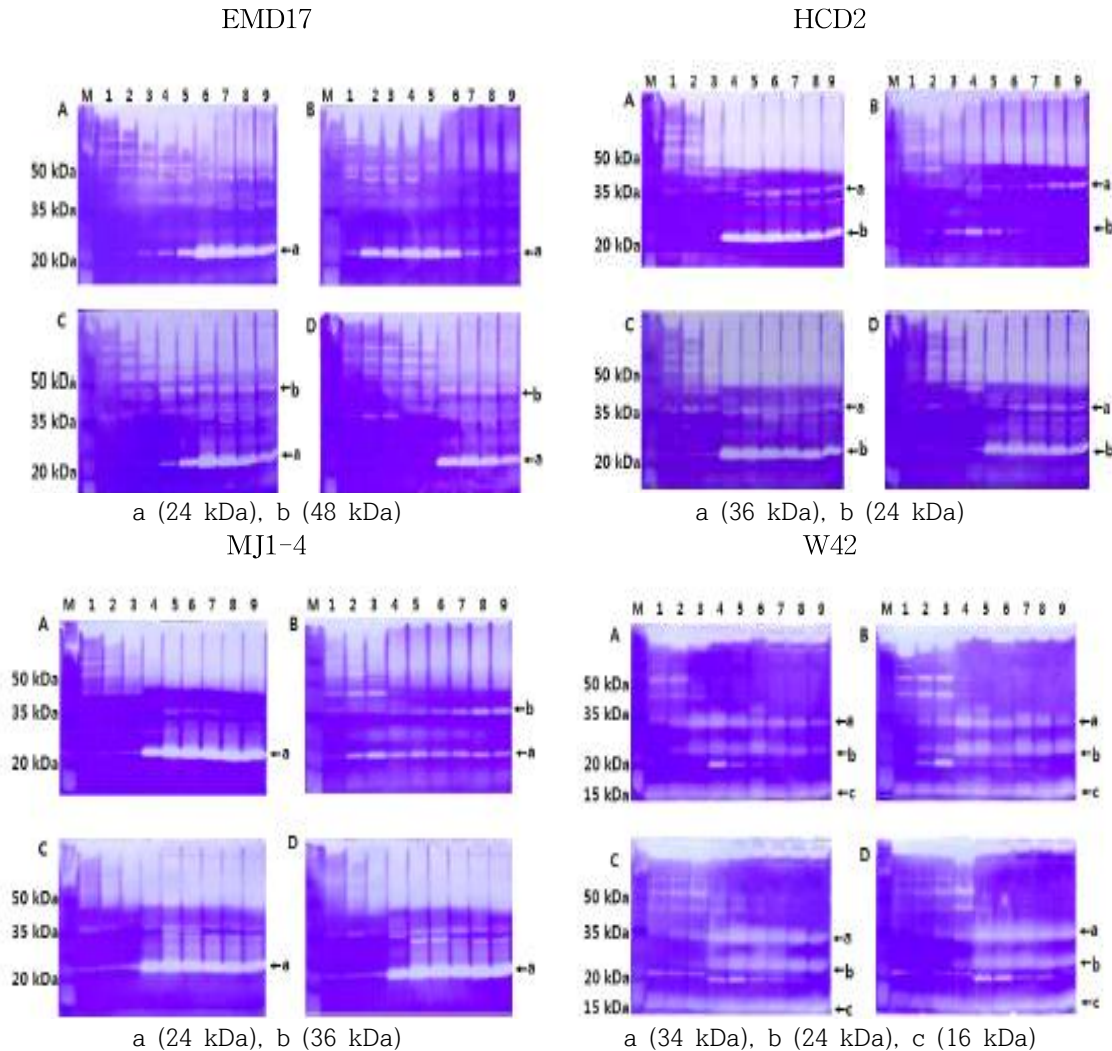


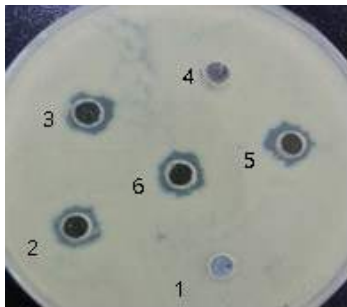
Fig. 17. Fibrinolytic activity changes of *Bacillus* strains during growth on different media. 1, 12 h; 2, 18 h; 3, 24 h; 4, 30 h; 5, 36 h; 6, 48 h; 7, 60 h; 8, 72 h; 9, 96 h.

Table 9. Inhibitory spectrum of *Bacillus* strains

Indicator strains	EMD4	W42	H27
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	+++	+++	++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21415	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 33679	+++	+++	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	+++	++
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19953	-	++	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 4797	-	+	+
<i>Lactobacillus caesei</i> ssp. <i>casei</i> ATCC 4646	-	+	+
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 9135	-	++	++
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	-	+++	++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> NRRL B-14009	+	+	++
<i>Streptococcus thermophilus</i> KFRI 193	++	+++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i> ATCC 25923	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> V519	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium TA98	-	-	-

(6) *B. subtilis* EMD4가 분비하는 박테리오신의 효소, pH, 열 처리 안정성

EMD4 배양상등액을 효소, pH, 열 처리한 후 agar well diffusion 방법을 사용해 잔존 항균력을 측정하였다. EMD4의 항균력은 protease, protease K 처리에 의해 거의 사라졌으며 (Fig. 18), pH 3-9에서는 항균력을 유지하였다. 50-80°C에서 15 분간 처리에는 항균력을 유지하나 90°C 15 분 처리에 의해 50%로 감소하고, 100°C에서 10 분간 처리에 의해 항균력은 거의 다 사라졌다. 이상 결과들로 볼 때 EMD4가 만드는 항균물질은 단백질인 박테리오신이고 상당한 수준의 열 저항성을 지니고 있어서 식품 보존제로 가능성이 있을 것으로 생각된다.



1. EMD4 supernatant treated with protease
2. EMD4 supernatant treated with pepsin
3. EMD4 supernatant treated with trypsin
4. EMD4 supernatant treated with proteinase K
5. EMD4 supernatant (pH 6.8)
6. EMD4 supernatant without any treatment

Fig. 18. Effect of enzyme treatments on Bac EMD4

(7) *B. subtilis* EMD4 박테리오신 정제 및 특성 조사

LB, NB, BHI, TSB 배지에서 *B. subtilis* EMD4의 항균 활성 변화를 agar well diffusion 방법으로 조사한 결과 (Fig. 19), TSB와 BHI 배지에서의 항균력 (320 AU/ml)이 LB, NB 배지보다 우수하였다. Gel filtration chromatography로 얻은 각 fraction에 대해 OD₂₈₀ 값을 구하고 항균 활성은 agar well diffusion 방법으로 측정하였다. 2번째 Sephadex G-50 column을 통과한 항균 활성 분획들을 모아 Tricine SDS-PAGE를 사용하여 시료를 분석한 결과 약 3.5-6.5 kDa band (Fig. 20)들이 관찰되었다. 박테리오신 정제는 Q-Sepharose, Sephadex G-50, Phenyl Sepharose 6 fast Flow resins을 순서대로 사용하여 수행하였다 (Fig. 21). 정제된 BacEMD4를 얻었고 SDS-PAGE 실시후 PVDF membrane에 옮겨 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. Asp Thr-Ile-(Pro,Lys)-X-Ala-Ala-X-Leu-Val-Asp(Ile)-Gly-Pro (Ala)-Ile-Pro-Leu-Val 이 확인되었다. X는 불분명한 위치이고 괄호안은 다른 가능성이 있는 아미노산을

나타낸다. 아미노산 서열들의 비교와 PCR을 통해 BacEMD4는 subtilisin A와 동일한 박테리 오신이라 추정되었다.

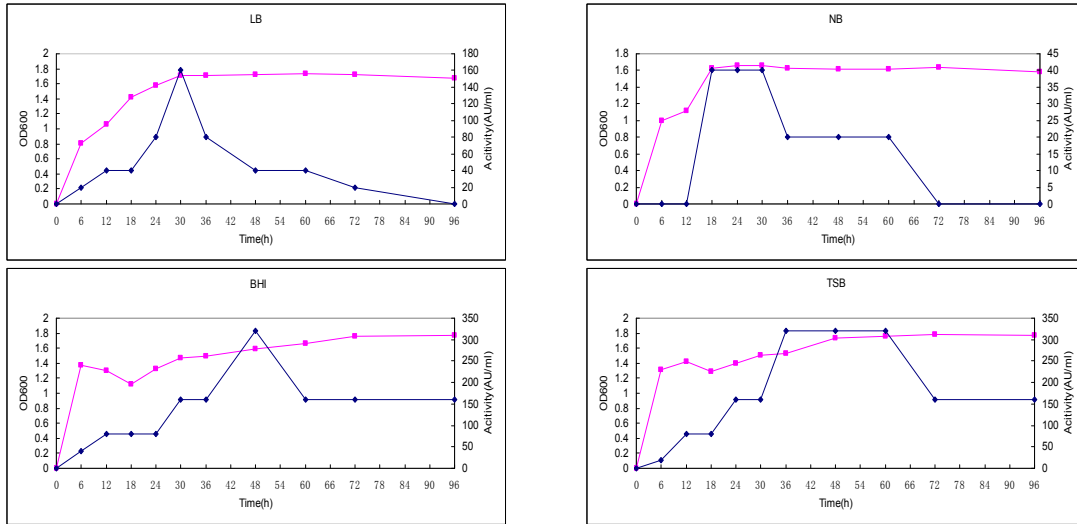


Fig. 19. Absorbances and bacteriocin activities of *B. subtilis* EMD4 grown in different media. —■—, absorbance(OD₆₀₀); —◆—, bacteriocin activity (AU/mL).

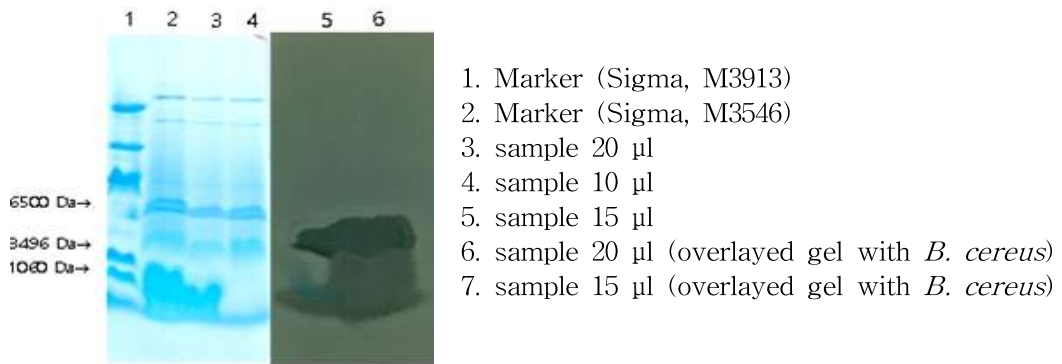


Fig. 20. Tricine SDS-PAGE for partially purified Bac EMD4 and detection of active band.

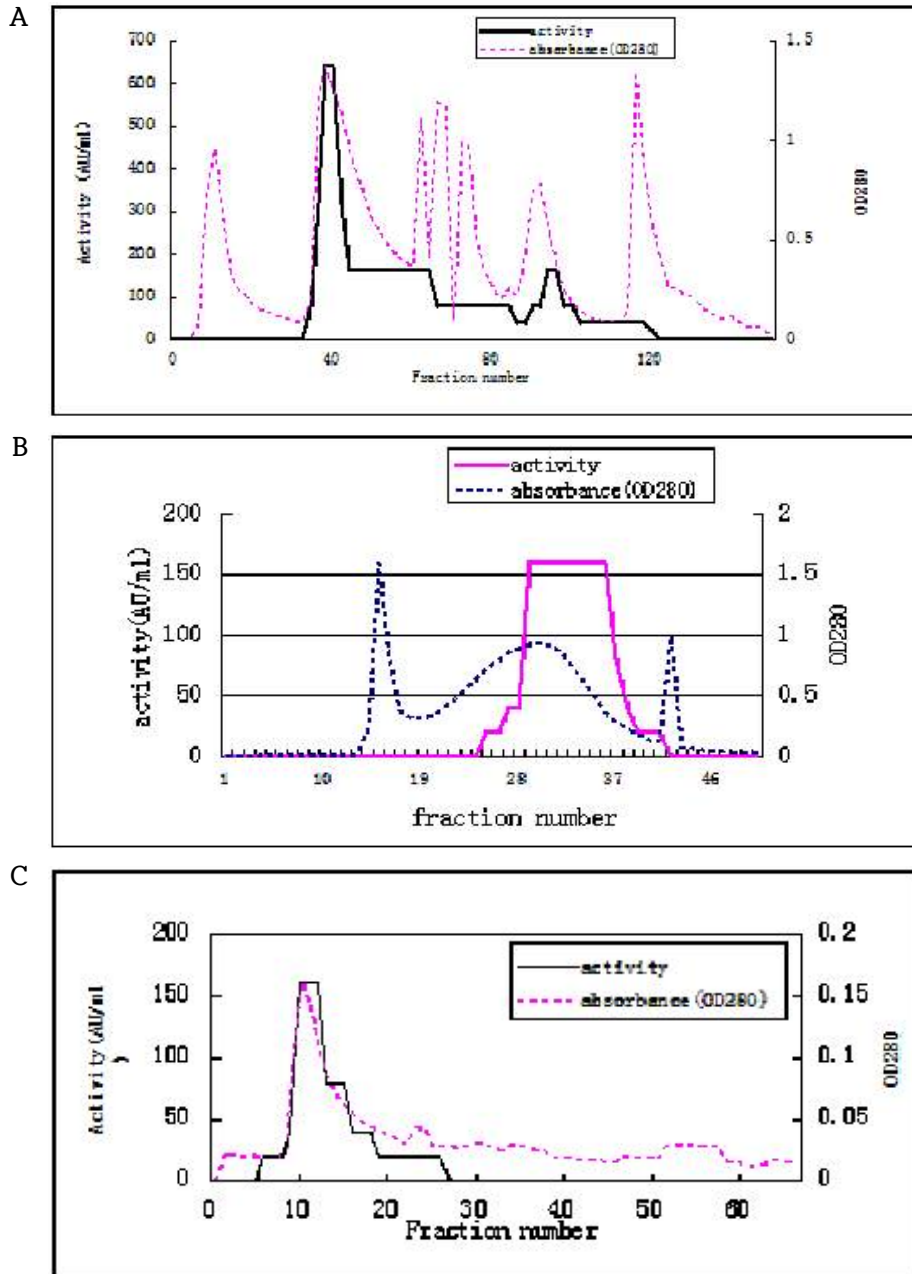


Fig. 21. Elution profiles of Bac EMD4 from Q-Sepharose (A), Sephadex G-50 (B), and Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow resin (C).

나. 복합 종균의 공동배양 특성

(1) 바실러스, 효모, 곰팡이들 공동배양 확인

혈전용해능, 항균력 우수 *Bacillus* 균주들을 cross streaking하여 생육억제 여부를 확인한 결과, *Bacillus* 들간의 생육저해는 나타나지 않았다. 독소생성 곰팡이들을 억제하는 능력이 우수한 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 혈전용해능과 항균력이 우수한 *B. amyloliquefaciens* EMD17를 복합 종균으로 결정하였다. MJ1-4와 EMD17를 1차년도에 분리한 효모들과 cross streaking하여 저해 여부를 확인하여 저해되지 않는 효모 SY11, SY14, SY15, SY79, SY80, SY133들과 또 누룩에서 분리한 *R. oryzae*를 YM 배지에서 30°C에서 48 시간 배양한 결과는

Fig. 22에 나타내었다. 효모 SY11, SY14 균주에 의해서 *Bacillus* 생육이 저해되는 것으로 나타났다. 결과들을 종합하여 *Bacillus* 2 종 (*B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. amyloliquefaceins* EMD17), 효모 1 종 (SY80), 곰팡이 1 종 (*Rhizopus oryzae*) 총 4 종을 복합종균으로 결정하고 이후 실험들에 사용하였다.

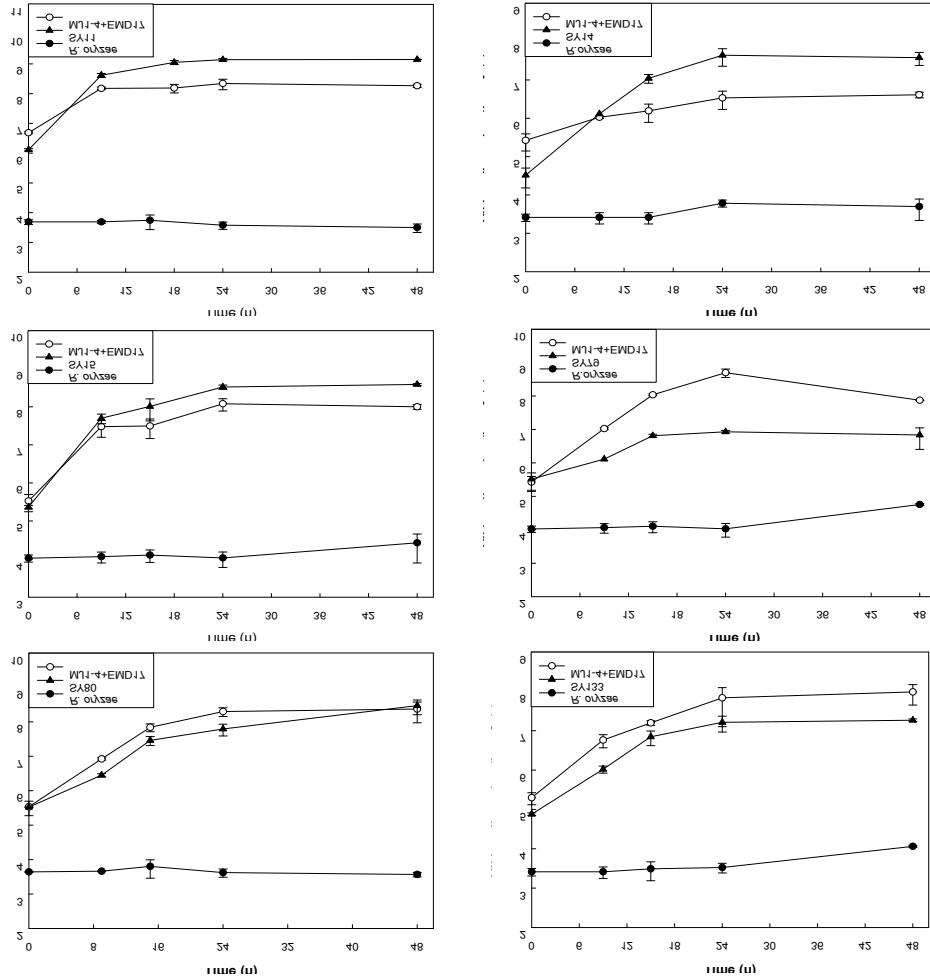


Fig. 22. Changes in the viable cells of multiple starters.

(2) 선발된 효모 SY80 균주 동정

1차년도 간장에서 분리한 SY80 균주의 동정을 위해 API 20C AUX kit (biomérieux Clinical Diagnostis)을 사용하고, 추가로 ITS1-5.8S-ITS2 와 D1/D2 domains (28S rRNA) 부위 염기서열을 조사하였다. API kit으로는 동정이 되지 않았으나 ITS1-5.8S-ITS2 domains 염기서열 분석 결과 *Pichia farinosa*와 97% 일치 그리고 D1/D2 domains 염기서열은 *Pichia farinosa*와 99% 일치하였다. 이상 결과에서 SY80은 *Pichia farinosa*로 동정되었다.

다. 선발된 복합종균의 탈지대두 기질에서의 증식과 저장성 확인

복합종균을 구성하는 *Bacillus*, 효모, 곰팡이의 탈지대두에서의 생육정도를 확인하였다. 각 균주를 ddH₂O, 탈지대두 2.5% (w/v), 탈지대두 5% (w/v), 그리고 LB 또는 YM broth에 접종한 후 적정온도에서 48 시간 배양하면서 생균수를 측정하였다 (Fig. 23). *Bacillus*들은 LB broth와 탈지대두 배지에서 비슷한 수준의 생균수로 생육하였다. *B. amyloliquefacine* MJ1-4는 탈지대두 2.5%보다 5%에서 더 생균수가 많았다. 효모와 곰팡이도 YM broth와 탈지대두 첨가 배지에서 잘 생육하였고 배지간 차이는 관찰되지 않았다. 이상 결과에서 탈지대두 5% 배지는 복합

중균 증식을 위한 배지로 적합한 것으로 판단된다. 복합중균을 탈지대두 (5%, w/v) 배지에 접종하여 48 시간 배양 후 -20, 4, 20°C에서 28 일간 저장하면서 생균수, 혈전용해능, 항(진)균력을 측정하였다. 각 온도에서 저장 기간 증가에 따라 생균수는 점차 감소하였고, 특히 4°C보다 -20, 20°C 저장 시 더 감소하였다 (Fig. 24). 각 온도에서 저장한 배양액의 혈전용해능, 항(진)균력을 측정한 결과 (Fig. 25) 혈전용해능과 항(진)균력은 -20, 4, 20°C에서 28 일간 저장한 배양액 모두 활성이 검출되었다. 결과적으로 복합중균은 탈지대두 (5%)를 매질로 균주를 배양한 후 4°C에서 저장하는 것이 가장 안정적으로 보관 가능한 것으로 조사되었다.

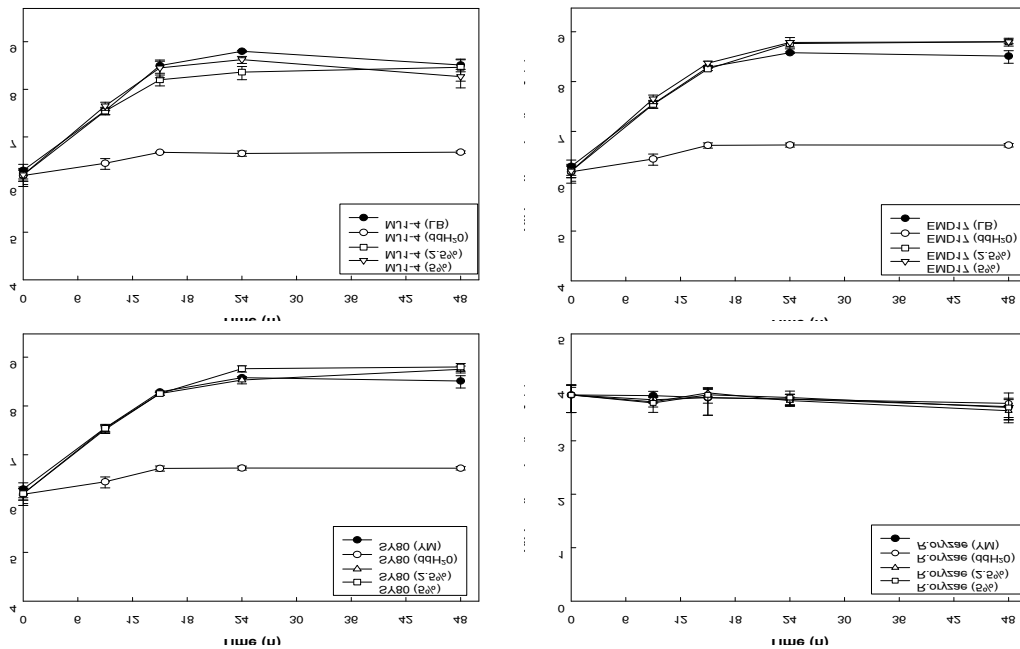


Fig. 23. Changes in the viable cells of multiple starters

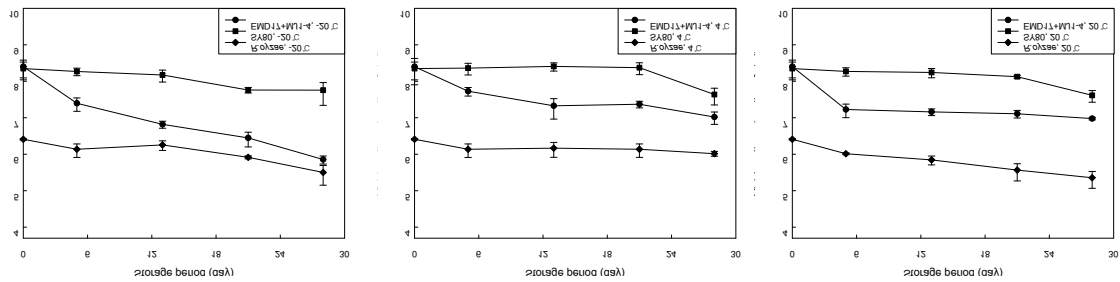


Fig. 24. Changes in the viable cells of multiple starters during storage

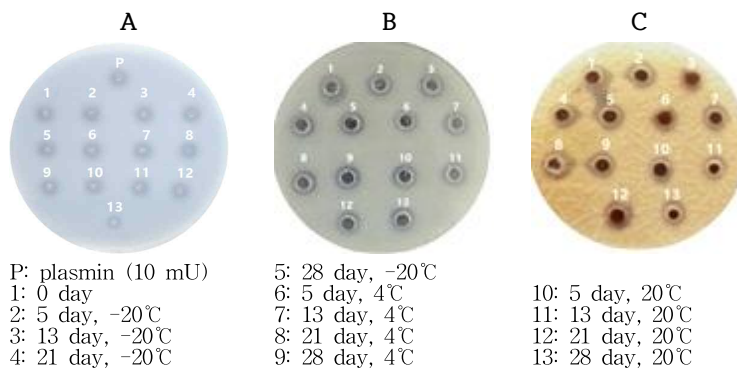


Fig. 25. Changes in the fibrinolytic and antibacterial activities of multiple starters during storage. A, fibrinolytic activity; B, Antibacterial activity; C, Antifungal activity

라. 복합종균을 사용한 장류 발효

(1) 청국장 발효 중 특성 변화

선발된 종균들을 접종하여 제조한 청국장을 37°C 48 시간 발효하면서 6-12 시간 간격으로 채취한 시료와 발효 후 4°C에서 저장하면서 2, 5, 10 일 간격으로 채취한 시료들의 pH, 생균수, 혈전용해능, 항산화능, 효소활성을 측정하였다. pH 측정 결과는 Fig. 26에 나타내었다. *B. amyloliquefaciens* EMD17과 *B. subtilis* EMD4를 단독 또는 혼합한 시료와 *B. cereus*를 혼합한 시료 모두에서 발효 초기 12-18 시간까지 pH가 약간 감소한 다음 발효 48 시간까지 계속해서 pH는 증가하였다. 이후 4°C 저장 기간에는 비슷하게 유지되었다. 생균수 측정 결과는 Fig. 27에 나타내었다. 모든 청국장에서 *Bacillus*들이 발효 48 시간 동안 잘 생육하였고, 저장기간에도 높은 생균수를 유지하였다. *B. cereus*를 인위적으로 오염시킨 청국장에서는 *B. subtilis* EMD4 균주를 접종한 청국장에서는 발효 12시간까지 *B. cereus*가 증가하다가 점차 감소하였으며, *B. subtilis* (natto)를 접종한 청 국장은 *B. cereus* 균수가 크게 감소하지 않았다. 반면, *B. amyloliquefaciens* EMD17 접종 청국장과 *B. amyloliquefaciens* EMD4와 EMD17 혼합 균주를 접종한 청국장에서는 발효 6 시간 이후 *B. cereus*는 전혀 검출되지 않았다. 이 결과는 선발된 종균을 접종 사용한 청국장은 *B. cereus* 오염에서 안전함을 보여준다.

혈전용해능 측정 결과는 Fig. 28에 나타내었다. 모든 청국장에서 발효 48 시간까지 증가하였고 저장 중에는 저장 5 일 (168 h)까지 증가하다가 그 후로 감소하였다. 발효 48 시간 혈전용해능은 *B. amyloliquefaciens* EMD17를 접종한 청국장과 *B. amyloliquefaciens* EMD17과 EMD4 복합균주를 접종한 청국장들이 가장 높았다.

청국장의 항산화 활성 측정 결과는 Table 10-12 및 Fig. 29에 나타내었다. EMD17 균주를 접종한 청국장이 모든 항산화 활성 측정 결과 저장 5 일에 (168 h) 가장 높은 역가를 보였다. EMD4를 접종한 청국장은 발효 36 시간과 저장 2 일에 (96 h) 가장 높은 역가를 보였다. 혼합균주를 사용하여 제조한 청국장은 발효 24 h, 36 h에 높은 역가를 보였다.

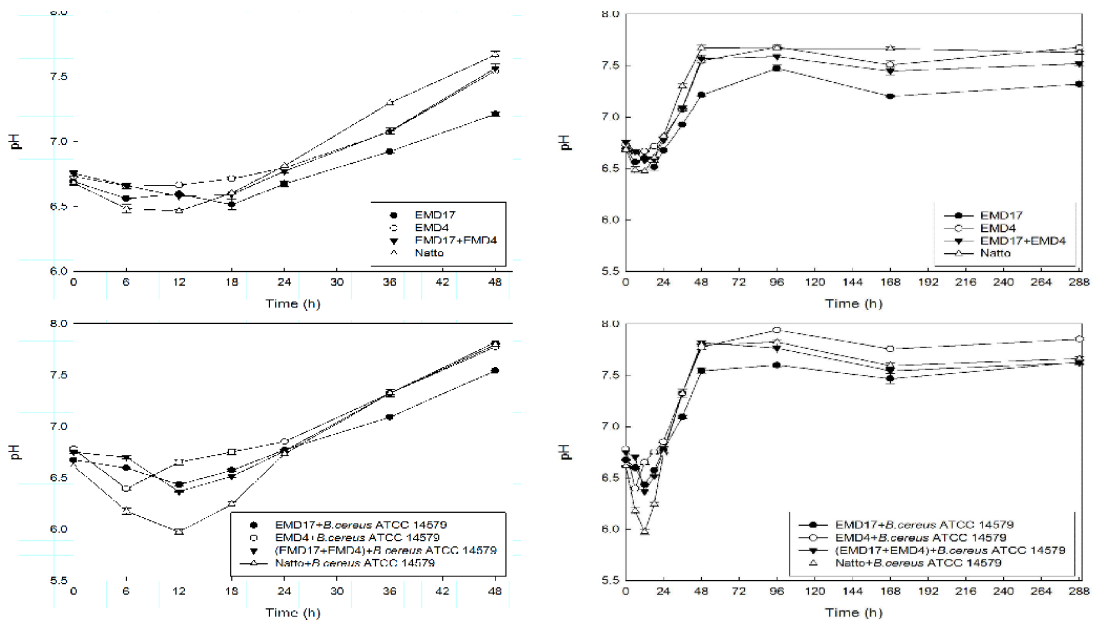


Fig. 26. Change in pH of *Cheonggukjang*.

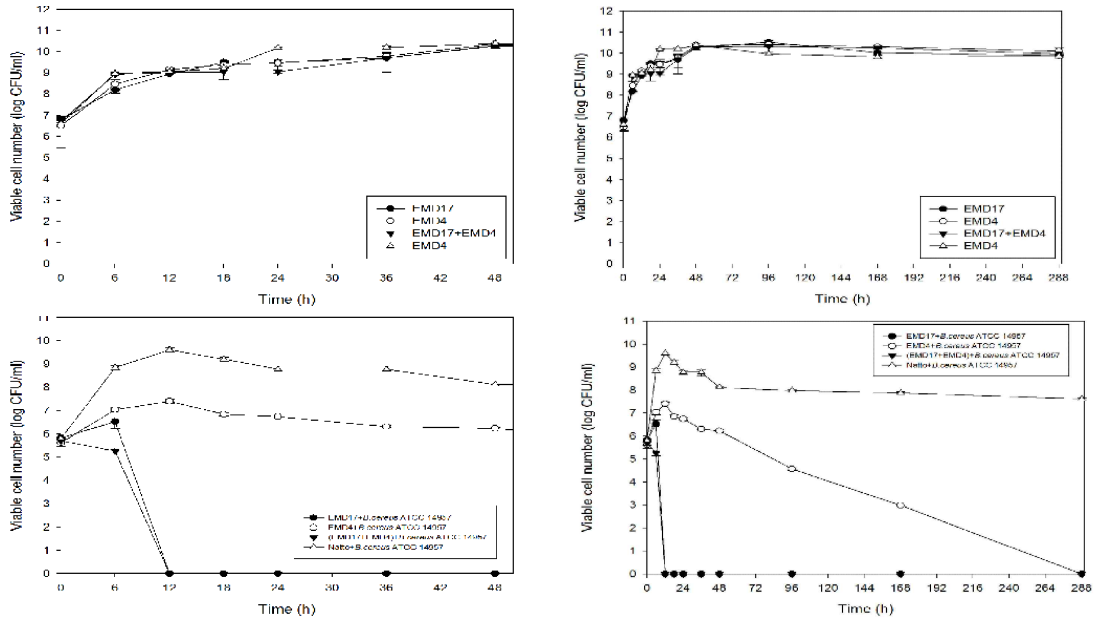


Fig. 27. Changes in the viable cell number of *Cheonggukjang*.

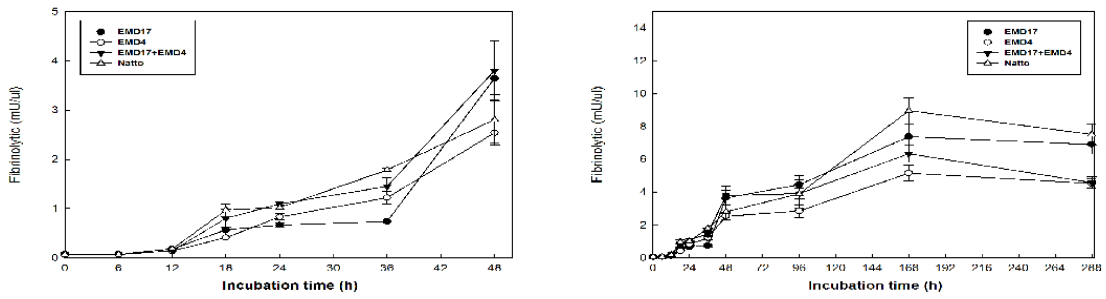


Fig. 28. Change in the fibrinolytic activity of *Cheonggukjang*.

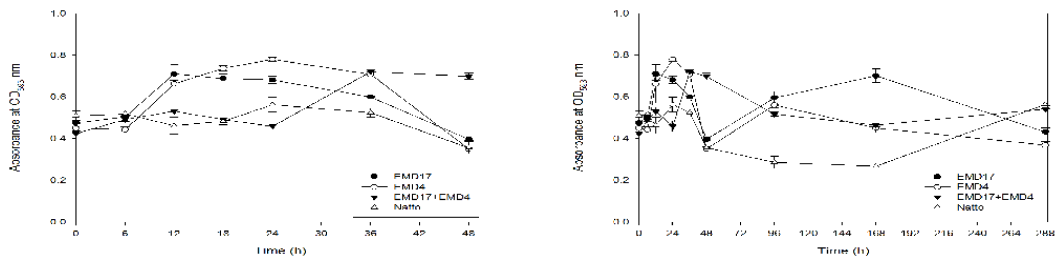


Fig. 29. Changes in the FRAP assay of *Cheonggukjang*

Table 10. Changes in total phenolic compounds of *Cheonggukjang*

Time (h)	Total phenolics content [mg/g GAE]			
	EMD17	EMD4	EMD17+EMD4	Natto
0	0.206±0.001	0.368±0.019	0.202±0.017	0.425±0.013
6	0.261±0.015	0.216±0.010	0.241±0.006	0.372±0.008
12	0.374±0.015	0.262±0.006	0.408±0.004	0.343±0.020
18	0.380±0.019	0.232±0.011	0.460±0.020	0.424±0.020
2	0.383±0.006	0.212±0.013	0.475±0.010	0.480±0.015
36	0.314±0.034	0.411±0.014	0.458±0.011	0.322±0.010
48	0.148±0.015	0.123±0.009	0.382±0.022	0.315±0.020
96	0.333±0.020	0.251±0.010	0.252±0.019	0.332±0.020
168	0.396±0.002	0.229±0.010	0.220±0.015	0.297±0.006
288	0.166±0.013	0.165±0.001	0.280±0.001	0.462±0.009

Table 11. Changes in the DPPH assay of *Cheonggukjang*

Time (h)	DPPH radical scavenging activity (%)			
	EMD17	EMD4	EMD17+EMD4	Natto
0	65.03±0.44	66.70±0.78	54.99±3.99	61.06±1.19
6	62.60±2.26	61.25±0.92	61.61±1.80	63.24±5.25
12	79.93±1.22	67.86±1.13	82.44±1.67	65.43±1.41
18	80.39±1.25	61.18±2.25	84.79±1.82	66.01±0.89
2	82.51±1.19	54.27±1.77	85.53±1.33	66.44±0.81
36	71.39±2.32	71.02±0.69	76.08±0.70	63.64±0.55
48	60.34±1.55	49.61±1.62	72.48±1.96	73.93±3.07
96	77.42±0.89	70.01±1.82	55.39±2.25	64.44±0.37
168	82.37±1.54	50.30±2.90	51.18±1.40	65.79±1.77
288	60.08±4.62	44.63±1.25	55.43±1.66	59.19±0.97

Table 12. Changes in the ABTs assay of *Cheonggukjang*

Time (h)	ABTs radical scavenging activity (%)			
	EMD17	EMD4	EMD17+EMD4	Natto
0	72.62±0.14	75.16±0.29	70.27±0.60	78.62±0.52
6	74.83±0.30	74.21±0.29	72.33±0.38	80.31±0.58
12	82.47±0.68	80.79±0.51	77.09±0.25	84.63±0.50
18	79.92±0.22	76.27±1.69	81.75±0.74	86.26±0.36
2	78.53±0.29	64.70±0.90	84.77±0.68	87.24±0.33
36	75.17±0.36	80.31±0.58	81.17±0.30	88.90±0.58
48	71.66±1.02	70.65±1.20	83.96±1.53	86.84±0.30
96	80.79±0.98	83.09±0.79	72.14±1.34	84.20±0.30
168	86.98±0.22	69.69±0.36	69.21±0.36	84.20±0.22
288	73.82±0.58	65.56±0.29	73.01±0.36	93.13±0.42

청국장의 protease (산성, 중성, 염기성) 활성을 측정한 결과 중성 protease 역가가 산성, 염기성 protease 활성보다 전체적으로 더 높게 나타났다. 중성 protease 역가에서 EMD17 균주를 사용하여 제조한 청국장이 가장 높은 활성을 보였다 (Fig. 30).

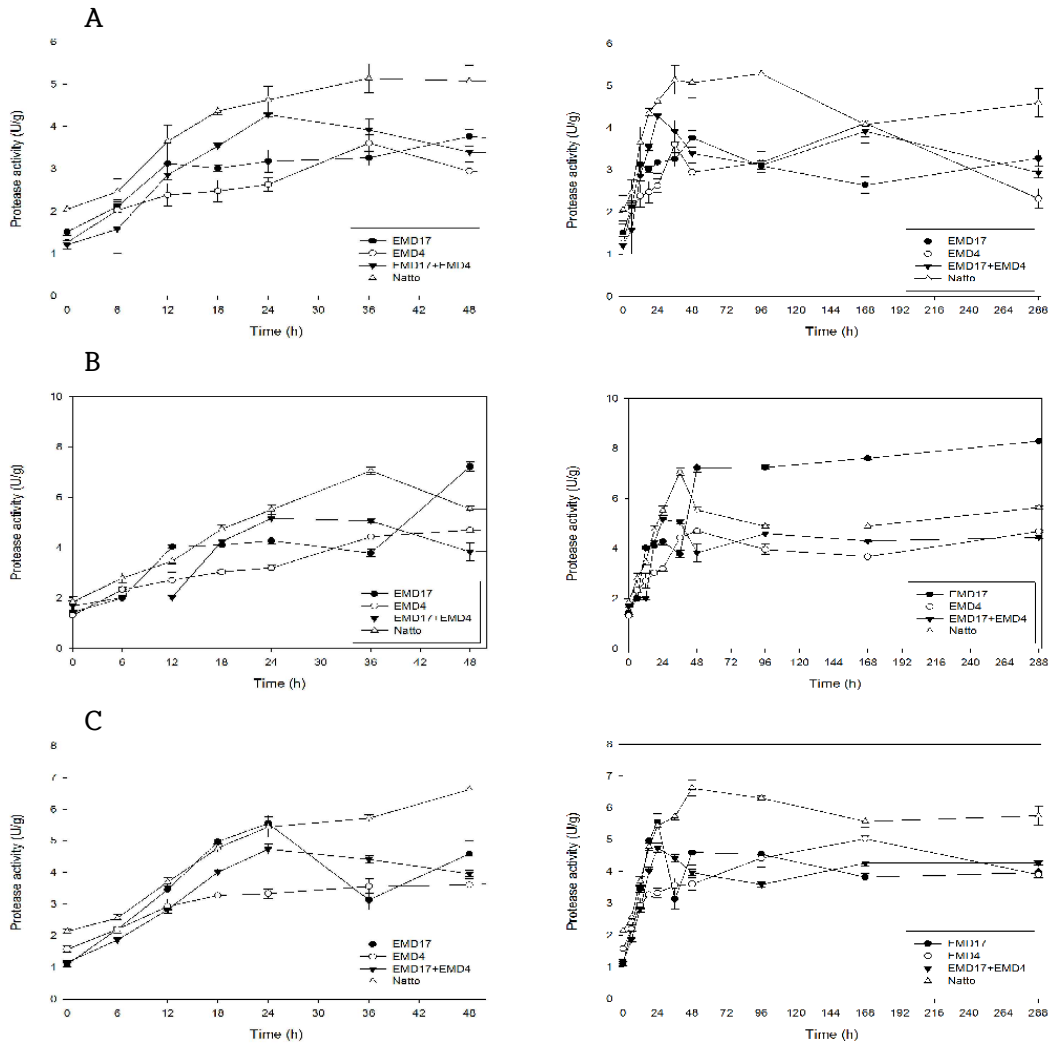


Fig. 30. Changes in the proteases activities of *Cheonggukjang*.
 A, acid protease; B, neutral proteases; C, alkaline proteases.

(2) 메주 발효 중 품질특성 변화

제조한 메주를 7일 간격으로 시료를 채취하여 pH, 산도, 생균수, 혈전용해능, 아미노태 질소, protease 활성, BAs을 측정하였다. pH와 적정산도 측정결과는 Fig. 31에 나타내었다. pH가 감소할수록 적정산도는 증가하는 경향을 보이고 발효 초기 pH는 감소하였다가 다시 증가하였다.

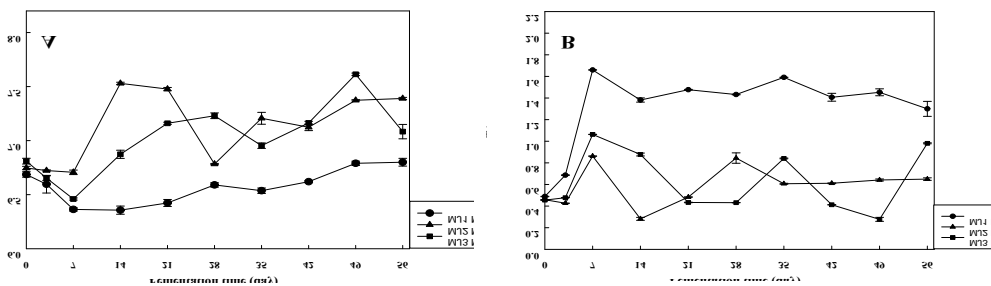


Fig. 31. Change in pH(A) and TA(B) of *Meju*

각 시료의 생균수 측정 결과는 Fig. 32에 나타내었다. 생균수는 발효 7 일까지 급격하게 증가하다가 일정하게 유지되거나 감소하였다. *B. cereus* 선택배지를 사용하여 외부로 부터의 오염여부를 조사하였으나 세 종류 메주 발효 기간 동안 검출되지 않았다. 하지만 MJ2와 MJ3 *Meju*들의

경우 접종한 균주 이외의 잡균들이 고체배지 상에서 검출되었다. 이로 볼 때 복합종균을 사용한 MJ1 *Meju*의 경우 잡균 오염방지에도 우수한 효능을 지녀서 메주의 위생에 도움이 될 것으로 생각된다 (Fig. 33).

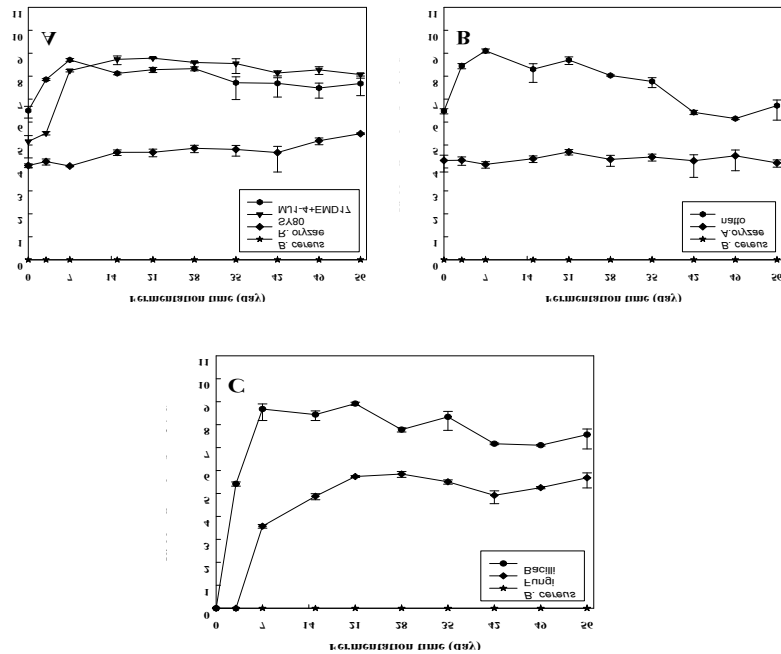


Fig. 32. Change in viable cell number of *Meju*.
A, MJ1 *Meju*; B, MJ2 *Meju*; C, MJ3 *Meju*

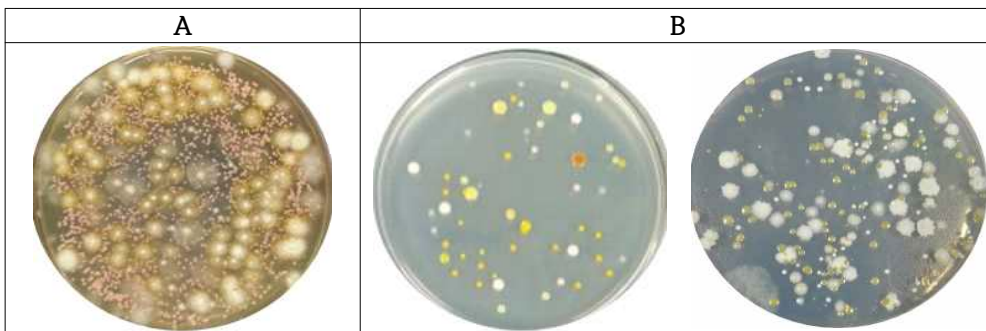


Fig. 33. Screening of Microorganism of *Meju*.
A, MJ2 *Meju*; B, MJ3 *Meju*

각 시료의 아미노태 질소 측정 결과는 Fig. 34에 나타내었다. 메주 제조 이후 발효가 진행되는 동안 모든 시료에서 아미노태 질소 함량이 증가하였고 MJ2 *Meju*의 경우 발효 21일에 급격히 증가한 후 이후 감소하였다.

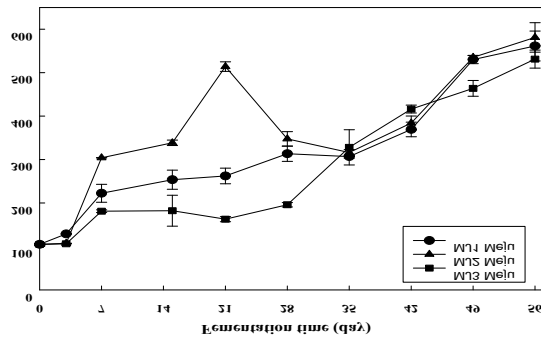


Fig. 34. Change in Amino type nitrogen content of *Meju*.

메주의 혈전용해능을 측정하여 비교하였다 (Table 13). MJ1 메주의 혈전용해능이 가장 높았고 다음으로 MJ2, MJ3 메주 순이었다. 모든 메주들에서 발효 21일 까지 증가하다가 이후 서서히 감소하였다. 벵짚을 접종한 MJ3에 비해 중균을 접종한 MJ1과 MJ2가 유의적으로 높은 점과 나토균주를 접종한 MJ2 보다도 MJ1의 역가가 높은 점은 주목할만 하며 복합중균의 기능적 우수성을 보여준다.

Table 13. Change in fibrinolytic activity of *Meju*.

Time (day)	Fibrin plate (%)		
	Plasmin (1 mU) = 100.0		
	MJ1	MJ2	MJ3
0	ND ¹	ND	ND
3	ND	ND	ND
7	194.5±19.8	196.7±5.9	110.6±13.8
15	243.0±16.0	181.1±8.8	238.2±20.2
21	343.8±12.1	330.7±18.1	269.3±10.8
28	325.8±18.0	253.3±5.2	221.5±15.0
35	319.9±11.6	238.8±18.0	231.3±15.3
42	302.6±13.2	205.8±23.5	215.0±14.6
49	280.2±11.0	238.2±20.2	209.0±24.7
56	285.6±17.3	265.8±16.3	221.5±15.0

¹ND=not detected.

각 시료의 amylase, protease 활성 측정 결과 (Fig. 35, 36)를 나타내었다. α-, β-amylase 활성은 대체로 발효 초기 증가하다가 이후 감소하거나 약간 증가하였다. MJ2 *Meju*의 경우, MJ1, MJ3 *Meju*에 비해 활성도가 낮은 경향을 나타내었다. Protease 활성은 중성 protease 활성이 산성, 염기성 protease 활성보다 약간 더 높게 측정되었으며, MJ3 *Meju*는 MJ1, MJ2 *Meju*에 비해 활성이 낮은 경향을 보였다.

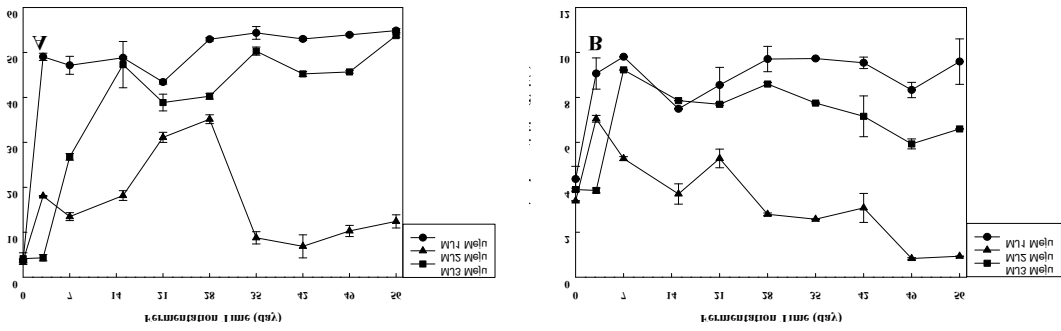


Fig. 35. Changes in the amylase activities of *Meju*.
A, α -amylase; B, β -amylase.

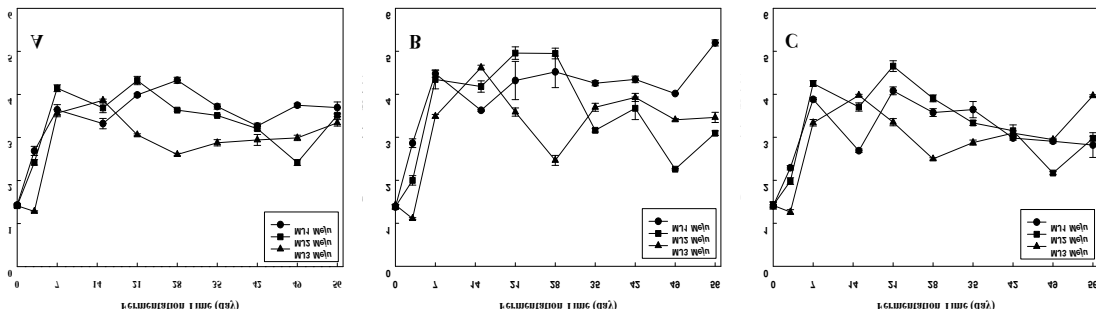


Fig. 36. Changes in the protease activities of *Meju*.
A, acid protease; B, neutral protease; C, alkaline protease.

각 시료의 BAs 측정 (참여기업인 몽고식품에서 수행) 결과는 Table 14에 나타내었다. Histamine, tyramine 분석 결과 EU와 Codex의 histamine 기준치인 200 ppm을 초과하여 검출된 시료는 없었으며, 복합종균을 사용하여 제조한 MJ1 *Meju*에서는 histamine, tyramine 모두 검출되지 않았다. 반면, MJ2 *Meju* 28일째 시료에서 histamine이 가장 높게 검출되었고, MJ3 *Meju*에서는 56 일째 시료에서 tyramine이 검출되었다. 이 결과 역시 복합종균을 접종한 메주의 안전성이 우수한 것을 보여준다.

Table 14. Changes in Biogenic amines of *Meju* (ppm)

Time (day)	MJ1 <i>Meju</i>		MJ2 <i>Meju</i>		MJ3 <i>Meju</i>	
	His	Tyr	His	Tyr	His	Tyr
0	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	97.7	ND	ND	ND
21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	ND	ND	145.5	ND	ND	ND
35	ND	ND	ND	ND	ND	ND
42	ND	ND	ND	ND	ND	ND
49	ND	ND	ND	ND	ND	ND
56	ND	ND	ND	ND	ND	10.9

¹⁾ ND = Not Detected

(3) 된장 발효 중 품질특성 변화

제조한 된장을 2 주 간격으로 시료를 채취하여 pH, 산도, 수분함량, 조단백질, 조지방, 아미

노태 질소, 혈전용해능을 측정하였다. 된장 숙성기간에 따른 pH 및 산도의 변화를 측정한 결과 초기 pH 6.4에서 발효 70일에는 A1, A2, A3 된장의 pH가 6.0, 5.9, 5.8로 감소하였다 (Fig. 37) 적정산도는 초기값 0.6에서 증가하여 1.1, 1.1, 1.3으로 증가하였다.

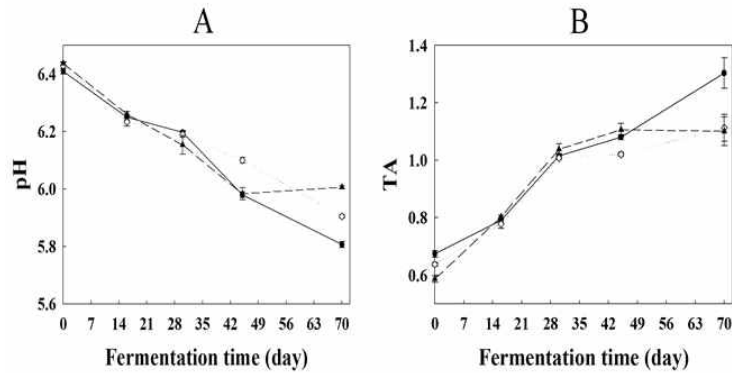


Fig. 37. Changes in pH (A) and titratable acidity (B) of *Doenjang* during fermentation. --▲--, *Doenjang* A1; ...◇..., *Doenjang* A2; -●-, *Doenjang* A3.

된장의 수분함량, 조단백, 조지방, 아미노태질소, 환원당 함량을 분석하였다 (Table 15). 수분 함량은 초기 58.2-58.9%에서 70 일에 55.6-56.0%로 시간이 경과할수록 조금씩 감소하였는데, 이는 숙성 과정에서 수분의 자연증발로 인한 것으로 추측된다. 조단백질과 조지방은 발효가 진행될수록 시료간의 수치가 비슷하였다. 조단백질은 평균 14.3%로 발효기간이 경과하여도 크게 변하지 않았다. 조지방 함량은 발효초기보다 발효가 진행될수록 조금 증가하는 경향을 나타내었다. 아미노태질소 함량은 발효기간이 경과할수록 증가하였다. 발효 70일째 아미노태질소 함량은 된장 A2 (707.8±6.9 mg%)가 가장 높고 A3 (656.1±3.2 mg%)와 A1 (513.3±8.1 mg%) 순이었다. 예상외로 A1이 가장 낮았지만 발효초기와 종료시 함량 증가율로 나타내었을 때는 A1 (3.15), A3 (2.68), A2 (2.57)로 나타났다. 대조구 A2에 사용한 균주들이 단백질분해능이 우수한 균주들이어서 초기 아미노태 질소함량이 높게 나온 것으로 추정된다. 환원당 함량은 발효 30일 까지 증가하다가 이후로는 서서히 감소하였다. 30일째는 A1 (11.49%) 그리고 70일에는 A2 된장 (7.58%)이 가장 높았다. 환원당 함량 변화는 된장의 amylase 활성과 관련이 있다.

Table 15. Changes in chemical components of *Doenjang* during fermentation.

<i>Doenjang</i>	Fermentation period (day)	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Amino nitrogen (mg%)	Reducing sugar (%)
A1	0	58.9±0.8	14.2±0.6	9.8±0.4	163.3±8.1	1.30±0.0
	16	58.1±0.2	14.4±0.3	11.5±1.0	259.0±7.0	4.33±0.0
	30	57.3±0.2	14.3±0.6	12.9±1.0	424.7±8.1	11.49±0.0
	45	55.8±0.9	14.7±0.5	12.5±0.8	479.7±9.0	6.99±0.1
	70	55.9±1.1	14.6±0.4	12.0±0.3	513.3±8.1	6.98±0.4
A2	0	58.7±0.9	14.3±0.6	9.9±0.2	275.3±4.0	1.42±0.0
	16	58.3±0.7	14.3±0.4	12.6±1.2	408.3±4.0	4.22±0.1
	30	57.0±0.5	14.5±0.4	12.8±0.7	664.5±7.1	7.87±0.0
	45	55.6±0.4	14.7±0.2	12.6±0.1	690.7±8.1	7.64±0.1
	70	55.6±1.2	14.6±0.4	12.2±0.1	707.8±6.9	7.58±0.8
A3	0	58.2±0.2	14.3±0.3	9.9±1.5	245.9±5.7	1.37±0.0
	16	58.1±0.7	14.3±0.8	12.2±0.1	338.3±4.0	3.32±0.0
	30	57.8±0.3	14.2±0.4	12.4±0.6	526.4±7.4	7.36±0.2
	45	56.3±0.6	14.7±0.4	12.4±0.8	636.5±7.1	5.67±0.2
	70	56.0±1.1	14.6±0.6	11.9±0.2	656.1±3.2	5.50±0.7

된장의 혈전용해능을 측정하여 비교하였다 (Table 16). 혈전용해제인 plasmin을 동시에 사용하여 생성된 투명환을 100%로 하여 비교하였다. 발효기간이 경과될수록 혈전용해 활성이 증가하였다. 된장 A1에서 발효 중 가장 높은 수치를 나타내었다. A1 된장은 발효 70일에 초기보다 1.9 배 증가하였고, A2 된장은 1.3 배, A3 된장은 1.2 배 증가하였다. 이 결과는 종균들을 접종하여 제조한 장류의 기능성 (혈전용해능)은 그렇지 못한 제품들 보다 크게 개선 할 수 있음을 보여준다.

이상의 결과들을 종합하면 복합종균을 접종하여 제조한 장류는 유해균에 대한 안전성이 개선되고 혈전용해능도 개선됨을 보여서 적극 제품생산에 활용할 필요성을 보여준다.

Table 16. Changes in fibrinolytic activity of *Doenjang* during fermentation.

Fermentation period (day)	Fibrin plate (%) (Plasmin 1 mU = 100.0)		
	<i>Doenjang</i> A1	<i>Doenjang</i> A2	<i>Doenjang</i> A3
0	164.0±20.1	136.0±18.3	100.0±6.3
16	285.0±21.2	169.0±4.1	121.0±3.5
30	297.0±16.2	172.0±8.2	124.0±7.0
45	320.0±5.6	181.0±4.2	120.0±5.2
70	312.0±5.6	175.0±4.2	122.0±1.7

(4) 된장 관능평가

발효 완료 후 된장들에 대해 관능평가를 실시하였다 (Table 17). 된장 A1은 A2, A3보다 풍미에서 우수하였고 이는 사용된 두 *Bacillus* 균주들이 좋은 풍미를 주기 때문이라 생각된다. 애초 균주를 선발할 때 청국장 제조시 좋은 풍미를 주는 균주들을 선발하였기 때문이다. 된장 A2는 맛에서 우수하였고 전체적인 기호도도 가장 높았다. 그러나 된장시료들 간 유의적 차이는 관찰되지 않았다. 복합종균을 접종한 된장의 기호도를 높일수 있는 방안에 관해 심도있는 연구가 추후 필요하다.

Table 17. Sensory evaluation of *Doenjang* samples.

<i>Doenjang</i>	Sensory attribute			
	Color	Flavor	Taster	Overall acceptance
A1	6.58±0.90 ^{ab1)}	7.17±1.40 ^a	5.25±1.06 ^a	5.33±1.37 ^a
A2	6.92±1.00 ^a	6.17±1.59 ^{ab}	5.75±1.96 ^a	5.92±1.83 ^a
A3	6.42±1.31 ^a	5.92±1.38 ^b	5.08±1.62 ^a	5.25±1.29 ^a

¹⁾ Values are mean ± SD ($n=12$); Values in the same column with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

2-3. 연구결과(주관기관, 경상대 3차 년도)

가. 복합종균을 이용한 된장제조

(1) 된장 발효중 생균수 변화

복합균주들 조합을 달리하여 제조한 된장을 총 91일간 25°C에서 발효 하면서 1 주 간격으로 시료를 취하여 *Bacillus*와 효모 생균수를 측정하였다 (Fig. 38). *Bacillus* 균수는 된장 제조 직후 된장 C가 10 log CFU/g 으로 가장 높았고 벗짚만 첨가하여 발효시킨 된장 E가 8 log CFU/g로 가장 낮았다. 발효가 진행됨에 따라 혼합 종균을 접종한 된장 A, B, C의 *Bacillus* 생

균수는 9 log CFU/g 수준에서 비슷하게 유지되며 종료되었지만, 단일 *Bacillus* 균주를 접종한 된장 D는 9 log CFU/g 수준으로 시작하여 7 log CFU/g까지 생균수가 감소하였다. 벻짚을 접종하여 제조한 된장 E는 된장 제조 직후 생균수와 비슷한 수준의 균수가 발효기간 내내 유지되었다. 효모는 된장 제조 직후에 된장 A가 6 log CFU/g 수준으로 가장 높게 나타났고, 된장 B는 5 log CFU/g, 된장 C는 4 log CFU/g 수준으로 나타났으며 된장 E에서는 나타나지 않았다. 그러나 발효가 진행됨에 따라 효모 균수가 증가하였고, 발효 28일 이후부터 6-7 log CFU/g 수준으로 유지되었다. 특히 된장 E는 제조 직후 효모가 확인되지 않았지만 발효 7일 이후부터 검출되었고 6 log CFU/g 까지 증가하였다. 된장 D는 콩알메주를 제조할 때 효모를 접종하지 않았으며, 발효가 종료 될 때까지 효모가 검출되지 않았다. 이상 결과들을 볼 때, 선별한 *Bacillus* 균주들과 곰팡이, 효모를 접종하여 된장을 제조 하였을 때 균들 간의 저해 없이 생육하면서 발효가 진행 될 수 있음을 확인하였다.

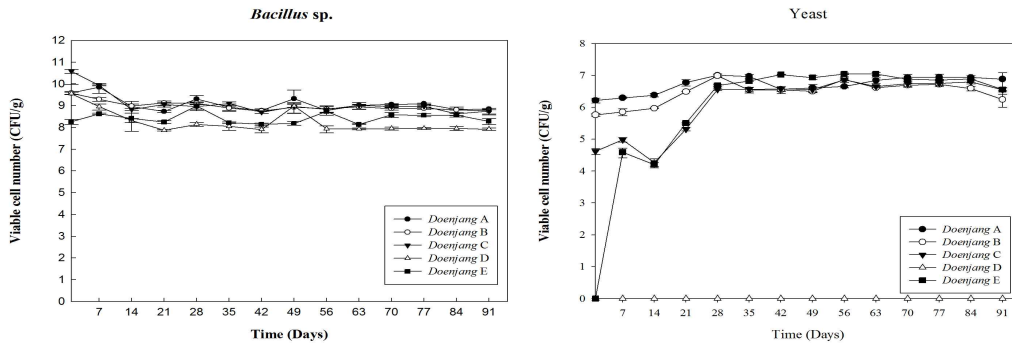


Fig. 38. Changes in viable cell numbers of bacilli and yeasts of *Doenjang* during fermentation.

(2) 수분함량, pH, 산도 변화

발효기간 중 된장의 수분함량 (Fig. 39)과 pH, TA (Fig. 40)를 측정하였다. 수분함량은 초기 56-62%에서 발효가 진행됨에 따라 서서히 감소하여 종료 시에는 53-57%까지 감소하였다. pH는 발효 초기 6.1-6.3을 나타내다 발효가 진행됨에 따라 발효 42 일 까지 5.6-5.9 까지 감소하였다. 이후 천천히 감소하거나 큰 변화 없이 유지되어 종료시에는 pH 5.6-5.7를 나타내었다. TA는 pH와 반대로 pH가 감소함에 따라 증가하여 발효 초기 0.3-0.6을 나타내다가 발효 종료 시에는 0.8-1.2로 증가하였다. 된장은 발효 기간 중 pH는 감소하고 TA는 증가하는 경향을 보인다고 보고되고 있어 다른 된장들과 비슷한 경향을 보였다. 된장 발효 기간 중 미생물 대사과정에서 생성되는 acetic acid, lactic acid 등과 같은 유기산 생성이 pH 감소와 TA 증가에 영향을 미친다고 보고된 바 있다.

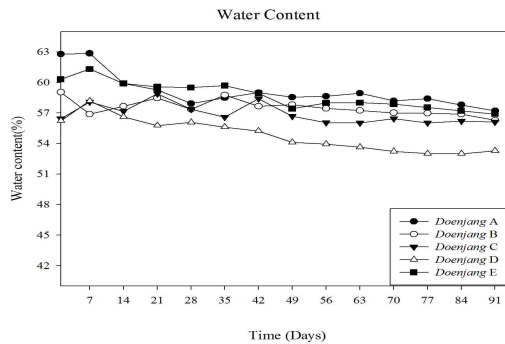


Fig. 39. Change in moisture content of *Doenjang* during fermentation.

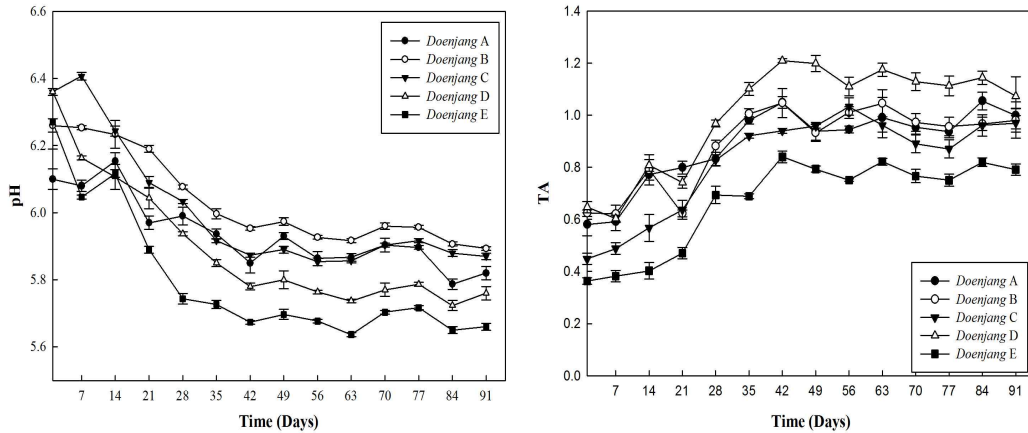


Fig. 40. Changes in pH and TA of *Doenjang* during fermentation.

(3) 아미노태질소 변화

된장 발효 중 아미노태질소를 Formol법으로 측정하였다 (Fig. 41). 된장 제조 직후 아미노태질소는 114.89 ± 27.10 – 193.88 ± 8.48 mg%로 나타났으며, 된장 C가 가장 높고 된장 E가 가장 낮았다. 발효가 진행됨에 따라 발효 14일 까지 아미노태질소는 급격히 증가하다가 이후 서서히 증가하였다. *Bacillus 2* 균주와 *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80를 접종한 된장 A, B, C가 발효초기부터 종료시까지 된장 D와 E보다 높아서 단백질 분해가 활발함을 보여준다. 벧짚을 이용한 된장 E는 다른 된장들보다 현저히 낮은 수치를 보였다. 발효 종료 후 된장의 최종 아미노태질소를 보면 된장 A 429.33 ± 16.16 mg%, B 429.33 ± 8.08 mg%, C 392.00 ± 14.00 mg%, D 370.14 ± 16.23 mg% 그리고 E 198.28 ± 7.98 mg%로 된장 A, B, C는 E에 비해 약 2 배 이상 높게 나타났다. 아미노태질소는 된장 숙성 정도나 품질 평가에 사용되는 중요한 척도이다. 발효 중 된장의 단백질은 미생물이 지닌 효소들에 의해 분해되어 아미노산들을 만들고 이들에 의해 된장 특유의 구수한맛이 나온다고 보고되었다. 아미노태질소 함량은 미생물들의 생육이나 효소 생성능에 따라서 차이를 보이고 함량이 높을수록 좋게 평가받고 있다. 이상 결과들을 고려할 때, *Bacillus 2* 균주와 *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80를 복합중균으로 접종하여 된장을 제조하면 전통적인 방식으로 얻은 된장보다 고품질의 제품을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

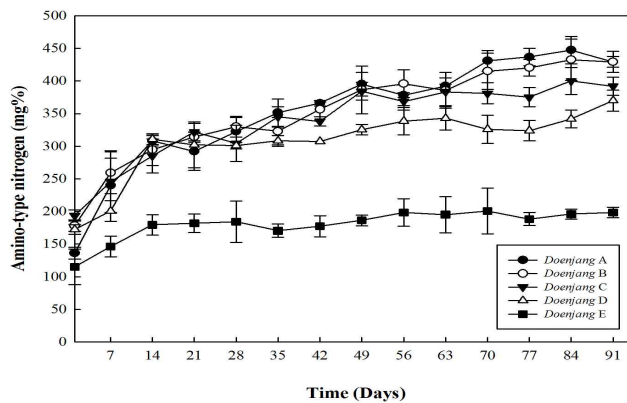


Fig. 41. Change in amino-type nitrogen of *Doenjang* during fermentation.

(4) Protease 활성

된장 발효 기간 중 산성, 중성, 염기성 Protease 활성들을 측정하였다 (Fig. 42). 발효가 진행됨에 따라 protease 활성이 점차 증가하다가 비슷하게 유지되는 등 모든 된장의 산성, 중성, 염기성 protease 활성의 변화 경향에는 큰 차이를 보이지 않았다. 된장 제조 직후 산성 Protease

는 2.45 ± 0.10 – 4.57 ± 0.03 U/g으로 된장 D가 가장 높고 된장 E가 가장 낮게 나왔으며, 발효 종료 시에는 4.62 ± 0.10 – 6.03 ± 0.05 U/g으로 된장 B가 가장 높고, 된장 E가 가장 낮게 측정되었다. 중성 protease는 된장 제조 직후 1.91 ± 0.26 – 4.29 ± 0.13 U/g으로 된장 D가 가장 높고 된장 E가 가장 낮게 측정되었으며, 발효 종료 시에는 5.06 ± 0.05 – 6.66 ± 0.15 U/g으로 된장 D가 가장 높고 된장 E가 가장 낮게 측정되었다. 염기성 protease는 된장 제조 직후 2.01 ± 0.35 – 4.64 ± 0.06 U/g으로 된장 A가 가장 높고 된장 E가 가장 낮게 측정되었으며, 발효 종료 시에는 3.72 ± 0.08 – 6.42 ± 0.12 U/g으로 제조 직후와 마찬가지로 된장 A가 가장 높고, 된장 E가 가장 낮았다. 중성 protease 활성이 가장 높게 나왔고, 복합균주를 사용하여 제조한 된장 A, B, C가 된장 E에 비해서 높은 활성을 보였다. 된장의 단백질이 protease들에 의해서 분해되면서 생성 되는 아미노산들은 된장의 맛을 부여하는 중요한 요소로 작용하여서 된장 A, B, C가 된장 E 보다 더욱 풍성한 맛을 지닐 것으로 사료된다.

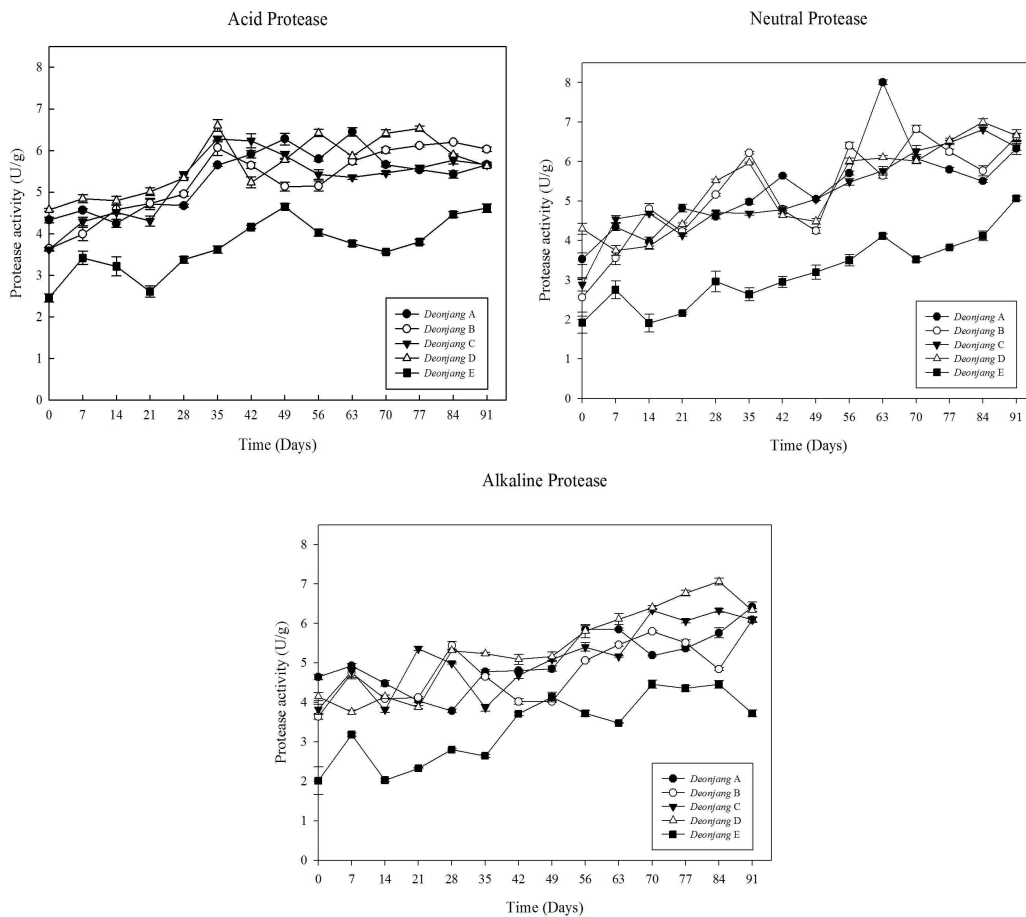


Fig. 42. Changes in proteases activities of *Doenjang* during fermentation.

(5) 혈전용해 역가 측정

된장 발효 중 혈전용해 활성을 fibrin plate method를 이용하여 측정하였다 (Fig. 43). 된장 E를 제외한 모든 된장이 발효가 진행됨에 따라 혈전용해능이 증가하다 점점 감소하는 경향을 보였고, 된장 E는 제조 직후부터 발효 종료때 까지 혈전용해능이 검출되지 않았다. 된장 D는 발효 14일에 가장 높은 혈전용해능 (1.56 ± 0.14 U/ml)을 보였으며 발효 종료 시까지 다른 된장들보다 높은 역가를 유지하였는데 이는 된장 D에 접종된 *B. subtilis* 균주가 혈전용해능이 우수한 나토균주이기 때문이다. 나머지 된장들 중에서는 된장 B가 발효 28일에 가장 높은 혈전용해능 (0.96 ± 0.16 U/ml)을 보였고 이 후부터 점점 감소하였다. 된장 C는 발효 14일에 가장 높은 혈전용해능 (0.52 ± 0.08 U/ml)을 보였고, 된장 A는 발효 35일에 가장 높은 혈전용해능 (0.46 ± 0.04 U/ml)을 보였다. *B. subtilis* CH 3-5와 *B. amyloliquefaciens* EMD17 균주는 혈전용

해능이 높은 것으로 보고된 바 있어서 아마도 *B. subtilis* CH 3-5로 인해서 된장 B가 된장 D를 제외한 다른 된장들보다 혈전용해능이 높은 것으로 추측된다. 같은 맥락으로 된장 A가 된장 E를 제외한 나머지 된장들 보다 낮은 혈전용해능을 보이는 것으로 생각된다.

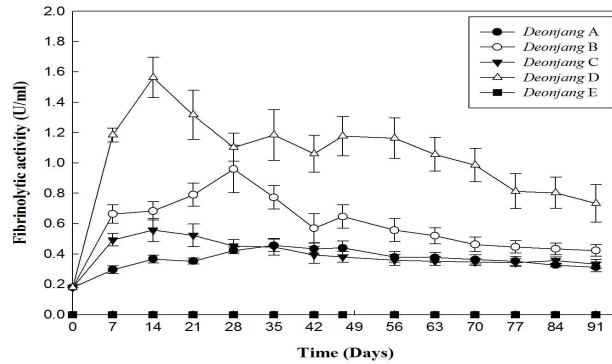


Fig. 43. Change in fibrinolytic activity of *Doenjang* during fermentation.

나. 복합종균을 접종하여 제조 한 된장에서 *Bacillus cereus* 균주의 저해 효과

(1) 생균수 변화

인위적으로 *B. cereus* 균주를 오염시킨 된장 시료들을 70 일 동안 숙성하는 동안 1 주 간격으로 시료를 채취하여 *Bacillus*와 효모 생균수 변화를 측정하였다 (Fig. 44). *Bacillus* 총균수 (중균+ *B. cereus*)는 된장 제조 직후 모든 된장들에서 8 log CFU/g으로 측정되었으며, 숙성이 진행됨에 따라 서서히 증가하였다. 모든 된장이 21 일부터 56 일 까지 9 log CFU/g로 증가하였고 숙성 종료 때는 8 log CFU/g으로 된장 제조 직후의 균수까지 감소하였다. 효모의 생균수는 된장 제조 직후 모든 된장에서 4-5 log CFU/g으로 측정되었고 숙성이 진행됨에 따라 6 log CFU/g 까지 서서히 증가하며 숙성 종료 시 5 log CFU/g 까지 감소하였다. 생균수 측정 결과 *B. cereus*를 두가지 수준으로 오염시켜 된장을 제조 하였을 때에도 총 *Bacillus*와 효모 균수에는 영향을 미치지 않음을 확인 할 수 있었다.

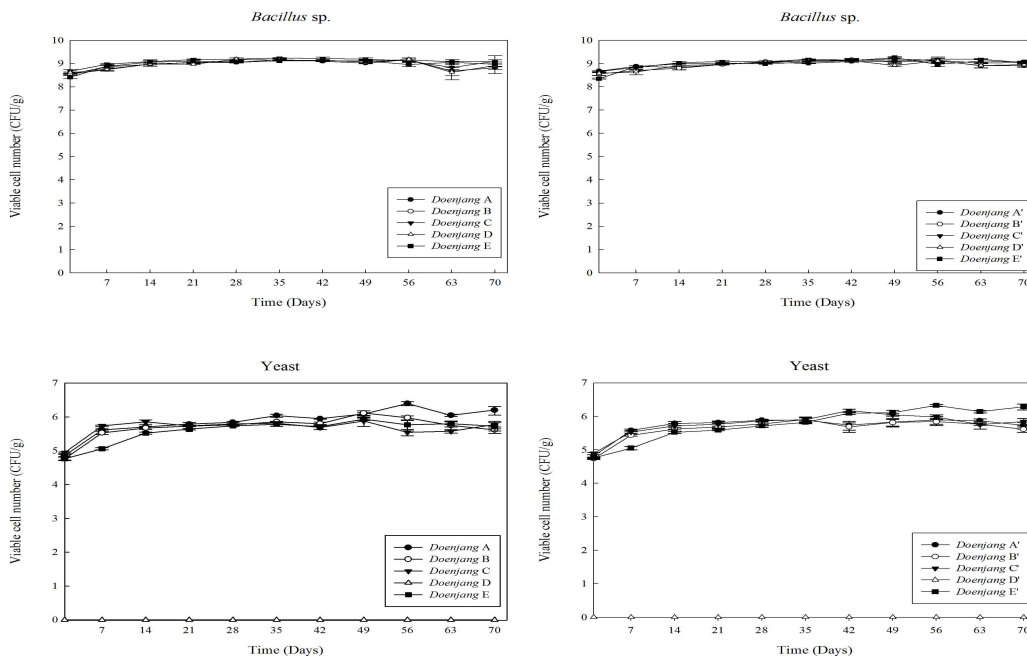


Fig. 44. Changes in the numbers of total bacilli and yeasts of *Doenjang* artificially contaminated with *B. cereus* during fermentation.

(2) *B. cereus* 생균수 변화

된장 A, B, C, D에서 *B. cereus*는 된장 제조 직후에는 접종량과 동일한 4 log CFU/g 으로 검출되었다 (Fig. 45). 반면 된장 E에서는 5 log CFU/g으로 검출되었다. 된장 E는 볏짚을 이용하였기 때문에 볏짚에 존재하던 *B. cereus*들 때문에 다른 된장들보다 높게 나온 것으로 추정된다. 숙성이 진행됨에 따라 된장마다 *B. cereus* 균수에서 차이를 보였다. 된장 E는 발효 초기 5 log CFU/g 가 숙성이 종료 될 때 까지 비슷하게 유지되면서 5 log CFU/g 균수로 숙성이 종료되었다. *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 *B. subtilis* CH3-5를 접종한 된장 C의 경우 *B. cereus*는 제조 직후부터 숙성 21일까지 5 log CFU/g 로 증가하다가 이 후 서서히 감소하다 종료 시에 3 log CFU/g까지 감소하였다. *B. amyloliquefaciens* EMD17과 MJ1-4를 접종한 된장 A에서는 숙성이 진행되면서 *B. cereus* 균수가 서서히 감소하여 종료시에는 3 log CFU/g 까지 감소하였다. *B. amyloliquefaciens* EMD17과 *B. subtilis* CH3-5를 접종한 된장 B는 숙성이 진행됨에 따라 *B. cereus*가 크게 감소하였다. 4 log CFU/g으로 시작한 생균수가 숙성 21일에 1 log CFU/g 까지 감소하였고 그 이후부터 숙성 종료까지 비슷한 수준으로 유지되었다. 된장 D의 경우 *B. cereus*가 숙성 7일째에 4 log CFU/g로 검출되었으나 14일 이후로는 검출되지 않았다. 된장 D는 *B. amyloliquefaciens* EMD17만 단독 접종한 된장으로 *Bacillus 2* 균주를 접종한 된장 A, B, C와 차이를 보였다. 된장 A와 B 또한 EMD17 균주가 포함된 혼합 균주를 사용하였지만, 그 효과는 다르게 나타났다. 된장 A와 B는 인공적으로 *B. cereus*를 접종하였지만 숙성 종료 시까지 식품의약품안전처에서 고시한 4 log CFU/g 이하로 *B. cereus* 균수를 저해하고 생육을 억제하였다. 된장 D는 발효 14일차 이후에는 *B. cereus*가 검출되지 않아 *B. cereus* 생육 억제 효과가 *B. amyloliquefaciens* EMD17를 단독으로 사용하는 것이 타 균주와 혼합 사용하는 것 보다 더 우수함을 보여준다.

*B. cereus*를 인위적으로 7 log CFU/g 접종하여 제조한 된장들 (A', B', C', D', E')에서 발효중 *B. cereus* 균수는 4 log CFU/g 접종 된장보다 적게 감소하였다. 된장 E'는 제조 직후 8 log CFU/g로 검출된 이후 숙성 14일에 5 log CFU/g까지 감소하다가 숙성 21일 이후 비슷한 수준으로 숙성이 종료 될 때까지 유지되었다. 이는 볏짚으로 제조된 된장 E에 *B. cereus* 균수를 저해 하는 균주와 함께 발효되면서 된장 E와 마찬가지로 숙성 종료 때 5 log CFU/g까지 감소한 것으로 추측된다. 된장 C'는 제조 직후 7 log CFU/g으로 시작하여 숙성 21일까지 비슷한 수준을 유지하다가 그 이후부터 감소하기 시작하여 숙성 42일에 4 log CFU/g 까지 감소하고 숙성이 종료 될 때까지 이 수준을 유지하였다. 된장 A'는 제조 직후 7 log CFU/g으로 시작해서 숙성 7일차에 5 log CFU/g으로 급격하게 감소한 후 비슷한 수준으로 숙성 49일까지 유지 되었으며, 그 이후부터 조금 더 감소하여 숙성 종료 시 4 log CFU/g까지 감소하였다. 된장 B'는 7 log CFU/g로 시작하여 숙성 7일에 5 log CFU/g 까지 급격하게 감소하였으며 비슷한 수준으로 숙성 35일 까지 유지되는 것을 확인하였다. 숙성 42일에 3 log CFU/g까지 감소하였으며 숙성 종료 시 까지 비슷한 수준으로 유지되었다. 된장 D'는 제조 직후 7 log CFU/g으로 시작하여 숙성 7일까지 유지 되다가 그 이후로는 *B. cereus*가 검출 되지 않았다. 이 결과는 *B. cereus*를 4 log CFU/g으로 인위적으로 접종한 된장과 같은 결과로서 1000 배나 더 많은 *B. cereus* 세포를 인위적으로 접종하였을 때도 *B. amyloliquefaciens* EMD17의 저해효과가 뛰어난 것을 알 수 있다.

현재 식품의약품안전처에서 고시한 우리나라 전통 장류의 *B. cereus* 허용 균수는 4 log CFU/g 이하이다. 본 연구에서 *Bacillus 2* 균주를 혼합 접종한 모든 된장이 숙성이 종료 되었을 때 허용 균수와 비슷한 수준이거나 더 낮은 것을 확인하였다. 특히 *B. amyloliquefaciens* EMD17을 단독으로 접종한 된장 D와 D'에서 현저한 *B. cereus* 생육 억제 효과를 확인하였다. *B. amyloliquefaciens* EMD17 단독으로 혹은 다른 *Bacillus* 균주와 함께 종균으로 사용하여 된장을 제조한다면 *B. cereus*에 의한 오염 억제에 큰 효과를 볼 수 있을 것으로 사료된다.

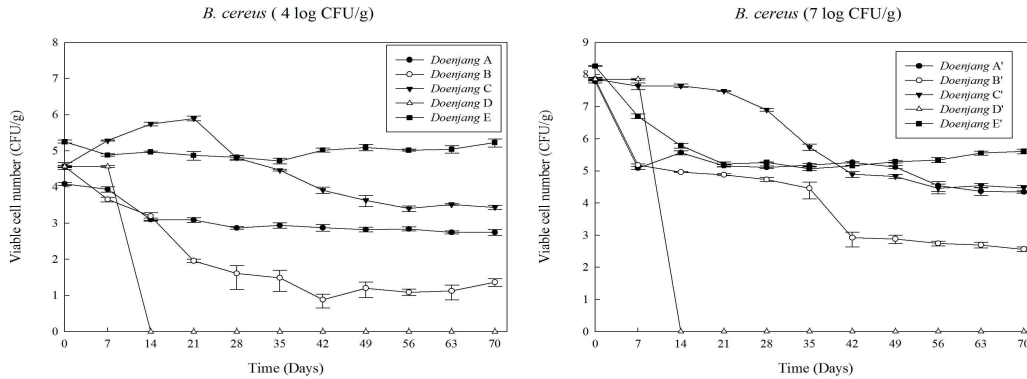


Fig. 45. Changes in the number of *B. cereus* of *Doenjang* artificially contaminated with *B. cereus* during fermentation.

(2) pH 및 TA 변화

숙성 중 된장들의 pH와 TA 변화를 측정하였다 (Fig. 46). 된장들 (A, B, C, D, E)은 제조 직후 pH 6.59-6.77를 나타내었다. 된장 D가 가장 낮았고 C가 가장 높았다. 이후 발효 7일 까지 pH 6.35-6.58로 조금 감소하더니 7일에서 14일 사이 5.27-5.70으로 급격하게 감소하였다. 14일 이후에는 서서히 감소하거나 비슷한 수준을 유지하면서 종료시에는 pH 5.11-5.33을 나타내었다. 된장 A', B', C', D', E'의 pH 변화 또한 제조 직후에 pH 6.47±0.01-6.78±0.01으로 시작하여 발효 14일에 5.16±0.01-6.02±0.02까지 급격히 감소하였고, 그 이후로는 비슷한 수준으로 유지되거나 조금 감소하면서 발효 종료시에는 pH 4.99-5.87을 나타내었다. *B. cereus* 균주를 인위적으로 접종하여 제조한 된장들의 전체적인 pH 변화는 숙성이 진행됨에 따라 pH가 감소하다가 일정한 수준으로 유지되었으며 된장 A, B, C, D, E 와 된장 A', B', C', D', E' 가 이런 경향에서 크게 다르지 않았고, 일반적인 된장 발효에서 나타나는 pH 변화 경향과도 다르지 않았다. 된장 D와 D' pH 값은 다른 된장들에 비해 높았고 이는 아마도 단일 *Bacillus* 균주를 접종한 D와 D' 된장의 유기산 함량이 혼합균주를 접종한 타 된장들보다 적었기 때문이라 추정된다.

앞서 연구한 복합균주 조합을 달리한 된장들의 pH와 비교할 때 *B. cereus* 접종 된장들이 낮게 측정되었는데 이 역시 *B. cereus*가 생육하면서 생성하는 유기산 때문으로 추정된다.

된장 A, B, C, D, E의 TA는 제조 직후 0.33±0.01-0.42±0.01에서 시작하여 발효 7일에 0.41±0.01-0.49±0.01로 증가하다가 발효 14일에 0.94±0.02-1.19±0.01로 급격히 증가하였다. 14일 이후엔 서서히 증가하거나 비슷한 수준을 유지하면서 발효를 종료하였다. 된장 A', B', C', D', E' 또한 같은 경향을 보였다. 제조 직후 0.36±0.01-0.50±0.01으로 나타났으며, 발효 7일에 0.45±0.01-0.57±0.01로 증가하고 14일에 0.86±0.01-1.09±0.01으로 급격히 증가하였다. 14일 이후엔 조금씩 증가하거나 비슷한 수준을 유지하며 종료하였다. 이상 결과들은 된장 시료들의 pH 변화와 상반되는 경향을 보이며 일반적인 된장 발효 중 나타나는 pH와 TA 변화와 같은 경향을 보였다.

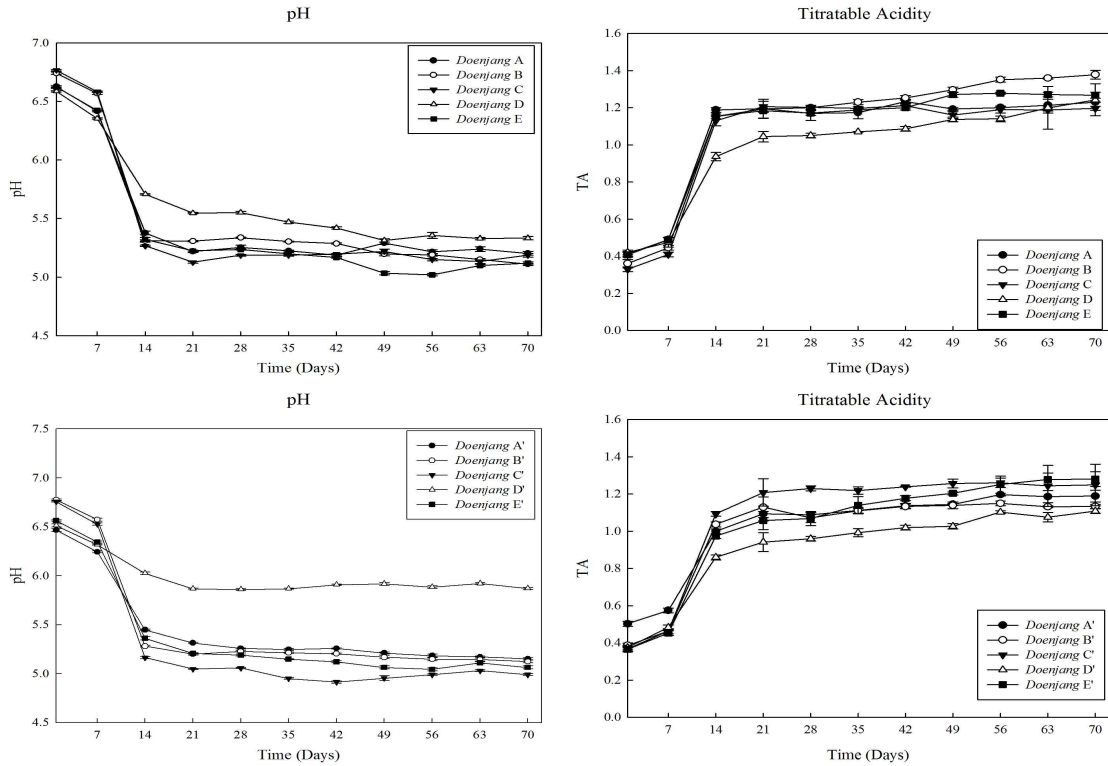


Fig. 46. Changes in pH and TA of *Doenjang* artificially contaminated with *B. cereus* during fermentation.

(3) 아미노태 질소

*B. cereus*를 인위적으로 접종하고, 70일 간 숙성하면서 된장들의 아미노태 질소를 측정하였다 (Fig. 47). 된장 A, B, C, D, E의 경우 제조 직후 145.83 ± 7.89 – 223.31 ± 7.89 로 나타났으며, 된장 B가 가장 높게 그리고 된장 E가 가장 낮게 측정되었다. 숙성이 진행됨에 따라 아미노태 질소도 증가하였는데 숙성 14일 까지 244.66 ± 13.59 – 449.25 ± 7.94 빠르게 증가하다가 그 이후부터 서서히 증가하는 경향을 보였다. 특히, 된장 D는 숙성 14일 까지 다른 된장에 비해 급격하게 증가하였으며, 된장 E보다 약 1.8 배 높게 측정되었다. 숙성이 종료 될 때 된장 D가 가장 높았고 된장 E가 가장 낮았다. 된장 A', B', C', D', E'의 경우 제조 직후 116.67 ± 8.08 – 195.96 ± 7.89 로 된장 B'가 가장 높고 된장 E' 가장 낮았으며 발효가 진행됨에 따라 서서히 증가하였다. 된장 D와 마찬가지로 된장 D'도 숙성 14일에 457.33 ± 8.08 로 급격하게 증가하였으며 가장 낮은 된장 E' (221.15 ± 7.82) 보다 약 2배 높게 나타났다. 된장 A', B', C', E'는 숙성 14일 이후 숙성 종료까지 조금씩 증가하였고, 된장 D'는 비슷한 수준으로 유지되면서 301.57 ± 23.68 – 448 ± 6.20 으로 숙성이 종료되었다.

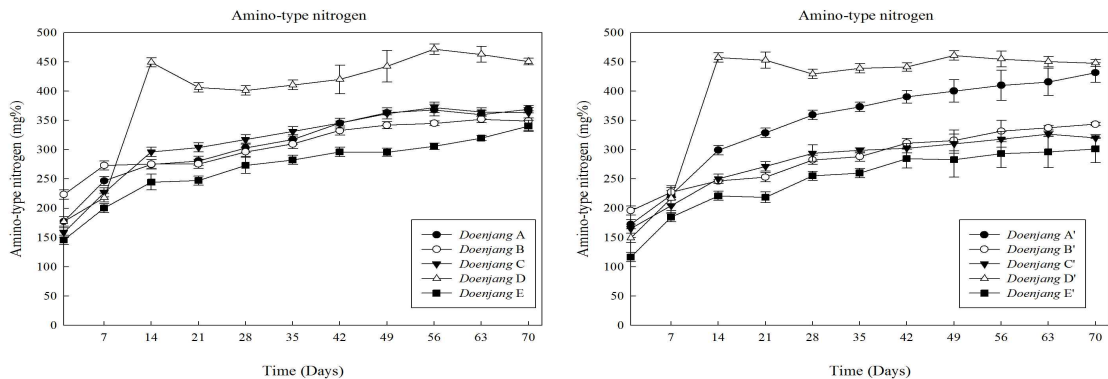


Fig. 47. Changes in the amino-type nitrogen of during fermentation of *Doenjang* artificially contaminated with *B. cereus* during fermentation.

다. 선발균주의 탄소원과 질소원의 첨가에 따른 항균활성과 생육촉진

(1) 탄소원 첨가에 따른 생육과 항균활성

NB broth와 탄소원을 각각 1% (v/v) 첨가한 NB broth에 선발균주인 *B. amyloliquefaciens* EMD17을 접종하여 항균활성과 생육촉진을 측정하였으며, 결과를 Fig 48.에 나타내었다. EMD17 생육은 탄소원을 첨가하지 않은 NB broth에서 흡광도 (OD₆₀₀) 값이 배양 48 시간에 최대값인 1.5에 도달하였으나, 탄소원을 첨가한 배지에서는 galactose와 maltose를 제외한 glucose, sucrose, fructose에서 배양 12 시간에 1.5에 도달하였다. 또한 12 시간 이후 모든 탄소원에서 1.6 까지 생육됨을 확인하였다. 이는 탄소원을 첨가하지 않은 NB broth에 배양할 때보다 탄소원을 첨가하였을 때 생육 정상기에 도달이 빨랐으며, 정상기가 더 높게 나타났다.

항균활성의 경우 탄소원을 첨가하지 않은 NB broth에서 배양 48, 60 시간에 최대 항균활성 160 AU/ml이 측정되었으며, glucose와 galactose, maltose를 첨가한 NB broth에서 배양 48 시간에 항균활성이 360 AU/ml 측정되었다. Fructose를 제외한 나머지 탄소원을 첨가한 NB broth에서 첨가하지 않은 NB broth보다 EMD17이 높은 항균활성을 보였다. Maltose와 glucose galactose를 첨가할 경우 생육 촉진과 함께 항균활성도 증가됨을 알 수 있다. 또한 탄소원을 첨가하지 않은 NB broth에서 배양 60 시간 이후 항균활성이 감소하는 반면, 탄소원을 첨가한 경우 배양 96 시간 까지 항균활성이 유지되었다. 탄소원 첨가로 인해 EMD17 균주의 정상기 유지 시간이 향상되었으며, 이로 인하여 최대 항균활성을 보이는 시간 증가로 추측되어진다. Sucrose의 경우 생육 촉진에는 기여하지만 항균활성 증가에는 영향력이 적어 galactose와 glucose에 비해 경제적으로 효율이 낮다고 생각된다. 탄소원 첨가로 인한 생육 촉진 및 항균활성의 증가는 된장 발효시 안전성을 개선하는 효과가 있다. 따라서 장류 제조 시 경제적인 측면을 고려한 적절한 탄소원 공급은 장류의 안전성 개선 효과가 있을 것으로 생각된다.

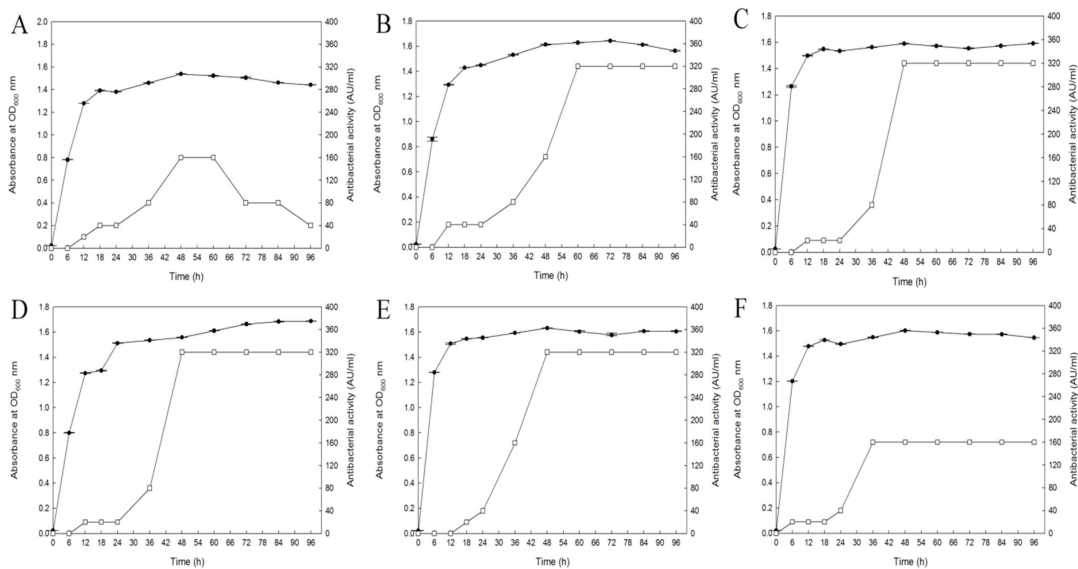


Fig. 48. Effect of alternative carbon sources on the growth and antibacterial activity of *B. amyloliquefaciens* EMD17. -●-, absorbance (OD₆₀₀);-○-, antimicrobial activity(AU/ml). NB broth (A), NB broth with 1% maltose (B), NB broth with 1% glucose (C), NB broth with 1% galactose (D), NB broth with 1% sucrose (E), and NB broth with 1% fructose (F).

(2) 질소원 첨가에 따른 생육과 항균활성

질소원 첨가로 인한 *B. amyloliquefaciens* EMD17의 항균활성 변화를 측정하였다 (Table 18). 무기질소인 Potassium nitrate, Sodium nitrate, Ammonium nitrate, Ammonium chloride, Ammonium sulfate를 첨가한 NB broth에서는 항균력이 모두 1 AU/ml로 측정되었으며, 유기질소인 malt extract, soytone, yeast extract를 첨가한 배지에서는 160 AU/ml로 측정되었다. 이는 NB broth에서 EMD17 항균활성과 동일하여 결과적으로 이들 질소원 첨가는 항균력에 미치는 영향이 없음을 확인하였다.

Table 18. Effect of alternative nitrogen sources on the antibacterial activity by EMD17

Nitrogen sources	
Organic nitrogen sources	Activity (AU/ml)
Malt extract	160
Peptone	40
Soytone	160
Tryptone	80
Urea	0
Yeast extract	160
Inorganic nitrogen sources	
Potassium nitrate	1
Sodium nitrate	1
Ammonium nitrate	1
Ammonium chloride	1
Ammonium sulfate	1

라 *Bacillus subtilis* HK176의 혈전용해 효소 정제

전년도 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* HK176는 뛰어난 혈전용해능을 지니고 있다. HK176 total DNA에서 혈전용해효소 유전자 *aprE176*를 클로닝하였다. *aprE176* 유전자를 대장균 발현벡터인 pET26b(+)에 넣은 후 *E. coli* BL21(DE3)에 도입시켰다. IPTG를 첨가하여 유전자 발현을 유도한 후 생성된 AprE176 효소를 정제하여 효소특성을 조사하였다. *aprE176* 유전자에 대해 error-prone PCR을 수행하여 혈전용해능이 개선된 변이주들을 얻었다. 염기서열 분석과 변이효소 정제를 통한 특성조사를 수행하였고 변이주들중 열 안정성이 개선된 변이주에 대해 분자구조 모델분석을 통해 열 안정성 개선 이유를 조사하였다. 혈전용해능 우수 *Bacillus* 확보와 이들 효소의 특성 조사, 유전자 확보 및 개량연구를 통해서 장기적으로 우수 종균들 개발을 통해 고품질 발효장류 제조에 기여할 것이다.

(1) *B. subtilis* HK176 분리 동정

HK176 동정을 위하여 700 bp *recA* 유전자와 1,300 bp 16S rRNA 유전자를 증폭하여 염기서열을 결정하고 BLAST로 분석한 결과 *B. subtilis* (99% identity) 또는 *B. tequilensis* (99% identity)로 동정되었다. S30 primer를 이용한 RAPD-PCR 결과는 *B. subtilis* 균주들의 profil과 일치하여 최종적으로 HK176을 *B. subtilis*로 동정하였다.

(2) Cloning of *aprE176*.

PCR로 1.5 kb *aprE176* 조각을 얻어 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector인 pHY300PLK에 클로닝하였다. *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단한 후 pHY300PLK와 연결시켜 pHY176 (6.43 kb)을 얻었

다. 1.5 kb 염기서열은 Genbank에 등록 (KJ572414) 하였다. *aprE176* 유전자는 382개 아미노산들로 구성된 단백질을 지정하며 30 개 아미노산인 분비신호, 77개 아미노산들인 propeptide를 지닌다 (Fig. 49). 가공이 완료된 활성형 효소는 275 개 아미노산으로 구성되어서 분자량이 27 kDa 크기이며 SDS-PAGE에서 동일한 크기의 band가 관찰되었다. Ribosome-binding site (RBS)와 promoter 서열 (-35, -10)들이 ORF 위쪽에 존재한다. *aprE176* 염기서열은 *B. amyloliquefaciens* CH51 (EU414203), *B. amyloliquefaciens* MJ5-41 (JF739176), *B. subtilis* JZ06 (EU386607), *B. subtilis* D-2 (JQ730856) 등에 존재하는 혈전용해효소 유전자들과 99% 수준의 동일성을 보였다.

염기서열로부터 얻은 AprE176 아미노산 서열을 다른 효소들의 아미노산 서열과 정렬한 결과 (Fig. 50) AprE176은 *B. licheniformis* CH3-17의 AprE3-17과 99.7%, *B. amyloliquefaciens* CH51의 AprE51와 99.5%, *B. amyloliquefaciens* LFB112의 peptidase S8 및 *B. amyloliquefaciens* DC-4의 subtilisin DFE와 99.2%, *Bacillus* sp. DJ-4의 subtilisin DJ-4와 99%, *B. subtilis* subtilisin과 98.2%, 그리고 *B. subtilis* nattokinase와 97.9% 일치하였다. *aprE176* 염기서열은 *B. amyloliquefaciens*와 *B. subtilis*의 유전자 서열들과 비슷하고 염기서열에서 추정된 아미노산 서열은 *B. licheniformis*의 AprE3-17과 가장 비슷하였다. 활성형 효소들의 아미노산 정렬 결과 AprE176은 *B. subtilis* nattokinase와 일치하였다. Preproenzyme 전체 아미노산 서열을 비교하면 nattokinase와 5-6 개 아미노산들이 불일치하나 대부분은 분비신호를 구성하는 아미노산들이다. AprE176은 AprE51, AprE3-17, peptidase S8, subtilisin DJ-4, subtilisin DFE들과 아미노산 1개만 달랐다. *E. coli* BL21(DE3)에서 효소 대량생산을 위한 목적으로 분비신호가 결여된 *proaprE176* 유전자를 증폭하고 증폭된 1.1 kb 조각을 pET26b(+)에 클로닝하여 pET176을 얻었다. 벡터에 존재하는 *pelB* 분비신호에 의해 AprE176은 대장균의 periplasm으로 이동하며 전사는 T7 promoter에 의해 일어난다.

(3) AprE176 정제

대장균에서 AprE176 대량 생산을 유도한 뒤 세포를 회수하여 파쇄하고 상등액과 cell pellet을 얻었다. 효소역가를 조사한 결과 상등액과 pellet에서 검출되었지만 상등액에서 더 높은 역가가 검출되어 상등액을 시료로 하여 효소정제를 시도하였다. Ni-NTA column에 상등액을 통과시킨 후 imidazole 농도를 달리하여 얻은 용출액들을 대상으로 SDS-PAGE를 실시한 결과 27 kDa 크기의 단일 band가 확인되어 정제가 성공적으로 이루어졌다. 정제된 AprE176의 specific activity는 216.8 ± 5.4 plasmin unit/mg protein 이다. 한편 M179 정제도 동일한 방법으로 진행되었다.

GCTTCTAGACATCTGCAGGTGAGCGGATGCCAAGAGAGCGATTTGGGGCTGTGTACAATACCTCATGTCCTTCCATGCGTGTCTTTTTCGATTA 90
 AAATTTAAATATTTGGGGTTCCTATTAAACCGAAAGAGAGATGATATACCTAAATAGAAATAAAACAACCTGAAAAAAATTTGGGTCTACTA 180
 -35
 M R 2
 270
 AAATATTTCCACTACTATCAAAITAACTCCAGAGAAATATCTGTCTATTGGTTATTTCTGCAAATGAAAAAAGAGTGCATTAAGAGTGTAG
 -10 +1 RBS
 G K K V W I S L L F A L A L I F T M A F G S T T S A Q A ▼ A G 32
 AGGCAAAAAGGTATGGATCAAGTATTGCTGTTTGGCTTATAGGTATACTTACGATGAGCGTTGGGAGCAGCACTTTGCCAAGGCTGCAGG 350
 K S N G E K K V I V G F K Q T M S T M S A A K K K D V I S E 132
 GAATCAAAACGGGAAAGAAATATAITGTGGGATTAAAGCAGCAATGAGCAGCATGAGGGGGCCGCAAGAAAAAGATGTCTTTCTGA 450
 K G G K V Q K Q F K V V D A A S A T L N E K A V K E L K K D 92
 AAAAGGGGAAAGTCCAAAAGCAATTCAAATATGTAGAGCGACTTCAGCTACATTAAAAGAAAAAGCTGTAAGAGCTGAAAAAGA 540
 P S V A V V E E D H V A Q A V V A Q S V P V G V S Q I K A P A 122
 CCTAGGGTGGCTTGGTGAAGAAGTCCAGTTCAGCAGGGCTAGCGCAGTCCGTCCTTAAAGGGTATCAGAGATTAAGGGCCCTGC 630
 L H S Q G F T G S N V K V A V I D S G I D S S H P D L K V A 152
 TCTGCCTCTCAAGGCTTCAGCGGATCAATGTTAAAGTGGGTATTCAGCAGGGTATGGATTCCTTCATCTCGATTTAAAGGTAGC 720
 G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L 182
 AGGGAGGACGAGTGGTTCCTTCTCAAGCAAAATGCTTTCAGCAGCAAACTCTCAGGAACTCAAGTTGGCGGTACAGTGGCGGTCT 810
 H N S V G V L G V A P S A S L V A V K V L G A D G S G D V S 212
 TAAATACCTCAGTGGTGTATTAGGCTTGGCGCAAGCGCATCTCTTACCGTGAATAAAGTCTCGGCGCTGACGGTTCGGCCAGTACAG 900
 W I I N G I E W A I A N N M D V I N M S L G G P S G S A A L 242
 CTGGATCATTAAGGAAITGAGTGGCGATGGCAAAATAITGGAGGTATTAACAATGAGGCTGGGCGAGCTCTGGTCTGCGCGGTT 990
 K A A V D K A V S S G I V V A A A G N E G T S G G S S T V 272
 AAAGGGGCGTGGCAAGCGCTTTCTTCCGCGTGTAGTGGTGGCGAGCGGTAAGAGGCACTTCCGGGCGTCAAGGAGT 1050
 G V P G K V P S V I A V G A V N S S N D R A S F S S V G S F 302
 GGCTTCTGGTAAATACCTTCTGTCTTGGCTAGGGCTGTAAACAGCAGCAACCAACAGGATCTTCTCAAGCGTGGTCTGTA 1170
 L D V M A P G V S I Q S T L P G N K V G A V N G T S M A S P 332
 GCTTGAATCTTGGCAGGGGCTCTTCTCAAGCAAGCGCTTCTGAGAAACAAGTACGGCGGTACAAATGGTACGTCATGGCATCTCC 1260
 H V A G A A L I L S K H P N W N T Q V R S S L E N T 362
 GCAAGTTCGGGAGCGGCTGCTTGAATCTCTTCAAGCAGCAGTGGCAAAACTCAAGTCCGACAGCTTTAGAACAACAGCATC 1350
 K L G D A F V V G K G L I N V Q A A A Q + 382
 AAAACTTGTGATGCTTCTACTACGGAAAGGGCTGATCAAGTACAGGCGCGCTCAGTAAAACATAAAAAACCAGCGCTGGGATC 1440
 GGCGCGCGGTTTTTTTATTTTCTCTCCCGCATGTTCAATCCGCTCCATGATCGAAGGGTGGTCCCTCTGAAGAAATTCCTGTTA 1530
 TAAAAAAGGATCAATTTGAAGTCTCTCC 1560

Fig. 49. Nucleotide sequence of *aprE176*. Deduced amino acid sequence is shown above the nucleotide sequence. Putative -35 and -10 promoter sequences are underlined. The RBS and transcription terminator are also underlined. The end of pre (▼) and pro sequence (▽) are marked.

	Pre	Pro	Mature						
AprE176	MRGKKVWISL	LFALALIFTM	AFGSTTSQA	AGKSNGEKKY	IVGFKQTMST	MSAAKKKDVI	SEKGGKVQKQ	FKYVDAASAT	80
AprE51	MRGKKVWISL	LFALALIFTM	AFGSTTSQA	AGKSNGEKKY	IVGFKQTMST	MSAAKKKDVI	SEKGGKVQKQ	FKYVDAASAT	80
AprE3-17	MRGKKVWISL	LFALALIFTM	AFGSTTSQA	AGKSNGEKKY	IVGFKQTMST	MSAAKKKDVI	SEKGGKVQKQ	FKYVDAASAT	80
peptidase S8	MRGKKVWISL	LFALALIFTM	AFGSTTSQA	AGKSNGEKKY	IVGFKQTMST	MSAAKKKDVI	SEKGGKVQKQ	FKYVDAASAT	80
subtilisin DJ-4	MRGKKVWISL	LFALALIFTM	AFGSTSPAAQ	AGKSNGEKKY	IVGFKQTMST	MSAAKKKDVI	SEKGGKVQKQ	FKYVDAASAT	80
subtilisin	MRGKKVWISL	LFALALIFTM	AFGSTSPAAQ	AGKSNGEKKY	IVGFKQTMST	MSAAKKKDVI	SEKGGKVQKQ	FKYVDAASAT	80
nattokinase	MRGKKVWISL	LFALALIFTM	AFGSTSPAAQ	AGKSNGEKKY	IVGFKQTMST	MSAAXKKDVI	SEKGGKVQKQ	FKYVDAASAT	80
subtilisin DFE	MRGKKVWISL	LFALALIFTM	AFGSTSPAAQ	AGKSNGEKKY	IVGFKQTMST	MSAAKKKDVI	SEKGGKVQKQ	FKYVDAASAT	80
AprE176	LNEKAVKELK	KDPSVAYVEE	DHYAQAYAQS	VPGYVGSQIKA	PALHSQGGFTG	SNVKVAVIDS	GIDSSHPDLK	VAGGASMVPS	160
AprE51	LNEKAVKELK	KDPSVAYVEE	DHYAQAYAQS	VPGYVGSQIKA	PALHSQGGFTG	SNVKVAVIDS	GIDSSHPDLK	VAGGASMVPS	160
AprE3-17	LNEKAVKELK	KDPSVAYVEE	DHYAQAYAQS	VPGYVGSQIKA	PALHSQGGFTG	SNVKVAVIDS	GIDSSHPDLK	VAGGASMVPS	160
peptidase S8	LNEKAVKELK	KDPSVAYVEE	DHYAQAYAQS	VPGYVGSQIKA	PALHSQGGFTG	SNVKVAVIDS	GIDSSHPDLK	VAGGASMVPS	160
subtilisin DJ-4	LNEKAVKELK	KDPSVAYVEE	DHYAQAYAQS	VPGYVGSQIKA	PALHSQGGFTG	SNVKVAVIDS	GIDSSHPDLK	VAGGASMVPS	160
subtilisin	LNEKAVKELK	KDPSVAYVEE	DHYAQAYAQS	VPGYVGSQIKA	PALHSQGGFTG	SNVKVAVIDS	GIDSSHPDLK	VAGGASMVPS	160
nattokinase	LNEKAVKELK	KDPSVAYVEE	DHYAQAYAQS	VPGYVGSQIKA	PALHSQGGFTG	SNVKVAVIDS	GIDSSHPDLK	VAGGASMVPS	160
subtilisin DFE	LNEKAVKELK	KDPSVAYVEE	DHYAQAYAQS	VPGYVGSQIKA	PALHSQGGFTG	SNVKVAVIDS	GIDSSHPDLK	VAGGASMVPS	160
AprE176	ETNPFQDNNS	HGTHVAGTVA	ALNNSVGLG	VAPSASLYAV	KVLGADGSGQ	YSWIIINGIEW	AIANNMVDIN	MSLGGPSSGA	240
AprE51	ETNPFQDNNS	HGTHVAGTVA	ALNNSVGLG	VAPSASLYAV	KVLGADGSGQ	YSWIIINGIEW	AIANNMVDIN	MSLGGPSSGA	240
AprE3-17	ETNPFQDNNS	HGTHVAGTVA	ALNNSVGLG	VAPSASLYAV	KVLGADGSGQ	YSWIIINGIEW	AIANNMVDIN	MSLGGPSSGA	240
peptidase S8	ETNPFQDNNS	HGTHVAGTVA	ALNNSVGLG	VAPSASLYAV	KVLGADGSGQ	YSWIIINGIEW	AIANNMVDIN	MSLGGPSSGA	240
subtilisin DJ-4	ETNPFQDNNS	HGTHVAGTVA	ALNNSVGLG	VAPSASLYAV	KVLGADGSGQ	YSWIIINGIEW	AIANNMVDIN	MSLGGPSSGA	240
subtilisin	ETNPFQDNNS	HGTHVAGTVA	ALNNSVGLG	VAPSASLYAV	KVLGADGSGQ	YSWIIINGIEW	AIANNMVDIN	MSLGGPSSGA	240
nattokinase	ETNPFQDNNS	HGTHVAGTVA	ALNNSVGLG	VAPSASLYAV	KVLGADGSGQ	YSWIIINGIEW	AIANNMVDIN	MSLGGPSSGA	240
subtilisin DFE	ETNPFQDNNS	HGTHVAGTVA	ALNNSVGLG	VAPSASLYAV	KVLGADGSGQ	YSWIIINGIEW	AIANNMVDIN	MSLGGPSSGA	240
AprE176	ALKAAVDKAV	ASGIVVVAAA	GNEGTSGGSS	TVGYPGKYPS	VIAGVAVNSS	NQRASFSSVG	SELDVMAPGV	SIQSTLPGNK	320
AprE51	ALKAAVDKAV	ASGIVVVAAA	GNEGTSGGSS	TVGYPGKYPS	VIAGVAVNSS	NQRASFSSVG	SELDVMAPGV	SIQSTLPGNK	320
AprE3-17	ALKAAVDKAV	ASGIVVVAAA	GNEGTSGGSS	TVGYPGKYPS	VIAGVAVNSS	NQRASFSSVG	SELDVMAPGV	SIQSTLPGNK	320
peptidase S8	ALKAAVDKAV	ASGIVVVAAA	GNEGTSGGSS	TVGYPGKYPS	VIAGVAVNSS	NQRASFSSVG	SELDVMAPGV	SIQSTLPGNK	320
subtilisin DJ-4	ALKAAVDKAV	ASGIVVVAAA	GNEGTSGGSS	TVGYPGKYPS	VIAGVAVNSS	NQRASFSSVG	SELDVMAPGV	SIQSTLPGNK	320
subtilisin	ALKAAVDKAV	ASGIVVVAAA	GNEGTSGGSS	TVGYPGKYPS	VIAGVAVNSS	NQRASFSSVG	SELDVMAPGV	SIQSTLPGNK	320
nattokinase	ALKAAVDKAV	ASGIVVVAAA	GNEGTSGGSS	TVGYPGKYPS	VIAGVAVNSS	NQRASFSSVG	SELDVMAPGV	SIQSTLPGNK	320
subtilisin DFE	ALKAAVDKAV	ASGIVVVAAA	GNEGTSGGSS	TVGYPGKYPS	VIAGVAVNSS	NQRASFSSVG	SELDVMAPGV	SIQSTLPGNK	320
AprE176	YGAYNGTMSA	SPHVAGAAAL	ILSKHPNWTN	TQVRSSELT	TTKLGDAFY	GKGLINVQAA	AQ	382	
AprE51	YGAYNGTMSA	SPHVAGAAAL	ILSKHPNWTN	TQVRSSELT	TTKLGDAFY	GKGLINVQAA	AQ	382	
AprE3-17	YGAYNGTMSA	SPHVAGAAAL	ILSKHPNWTN	TQVRSSELT	TTKLGDAFY	GKGLINVQAA	AQ	382	
peptidase S8	YGAYNGTMSA	SPHVAGAAAL	ILSKHPNWTN	TQVRSSELT	TTKLGDAFY	GKGLINVQAA	AQ	382	
subtilisin DJ-4	YGAYNGTMSA	SPHVAGAAAL	ILSKHPNWTN	TQVRSSELT	TTKLGDAFY	GKGLINVQAA	AQ	382	
subtilisin	YGAYNGTMSA	SPHVAGAAAL	ILSKHPNWTN	TQVRSSELT	TTKLGDAFY	GKGLINVQAA	AQ	382	
nattokinase	YGAYNGTMSA	SPHVAGAAAL	ILSKHPNWTN	TQVRSSELT	TTKLGDAFY	GKGLINVQAA	AQ	382	
subtilisin DFE	YGAYNGTMSA	SPHVAGAAAL	ILSKHPNWTN	TQVRSSELT	TTKLGDAFY	GKGLINVQAA	AQ	382	

Fig. 50. Alignment of amino acid sequence of AprE176 with homologous enzymes. AprE51 (*B. amyloliquefaciens* CH51, ACA34903), AprE3-17 (*B. licheniformis* CH3-17, ACU32756), peptidase S8 (*B. amyloliquefaciens* LFB112, YP_008949402), subtilisin DJ-4 (*Bacillus* sp. DJ-4, AAT45900), subtilisin (*B. subtilis*, AAC63365), nattokinase (*B. subtilis*, AHZ12721) and subtilisin DFE (*B. amyloliquefaciens* DC-4, AAZ66858). Amino acid different from those of other proteins is marked as a box.

(4) AprE176 특성 조사

AprE176을 pH 7-10 buffer에서 2 시간 두면 역가를 80% 이상 유지하지만 pH 6 이하에서는 신속히 활성이 상실되었다 (Fig. 51). 효소 반응 최적 pH는 8.0로 확인되었다. pH 8.0에서 효소활성의 최적온도는 40°C이고 50°C에서는 역가가 신속히 감소하고 55°C 이상에서는 완전히 불활성화되었다. AprE176의 반응 최적 pH와 온도는 *B. subtilis* natto B-12의 nattokinase와

비슷한 수준이나 *B. amyloliquefaciens* DC-4의 효소 (pH 9.0, 48°C)나 *Bacillus* sp. CK11-4의 효소 (pH 10.5, 70°C)들 보다는 낮다. 저해제들의 영향을 조사한 결과 AprE176는 1 mM PMSF에 의해 완전히 역가를 상실하며 EDTA와 EGTA에 의해서도 불활성화되어서 AprE176은 세린계 protease인 동시에 metalloprotease임을 알 수 있었다. Ca^{2+} 은 첨가 시 AprE176 역가를 17% 증가시키지만 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 은 각각 7, 7, 43% 감소시켰다. 금속이온들에 대한 반응은 혈전용해효소마다 다소 차이가 있다.

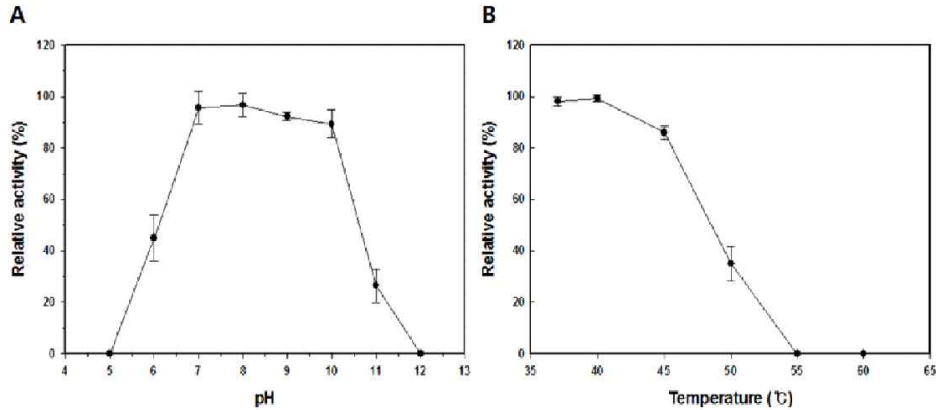


Fig. 51. Effect of pH and temperature on the activity of AprE176. (A) Residual fibrinolytic activities were measured after 2 h at different pH. (B) Residual fibrinolytic activities were measured after 30 min in Tris-buffer (pH 8.0) at different temperature.

(5) Error-Prone PCR

혈전용해능이 개선된 변이주를 얻을 목적으로 *aprE176* 유전자에 대해 error-prone PCR을 실시하였다. *E. coli* BL21(DE3) 형질전환체 (550 colonies)들을 일차로 skim milk 배지에 접종하여 탐색하였고 일차에서 선발된 균락들은 이차로 fibrin plate에 접종하여 혈전용해능이 증가한 변이주들을 탐색하였다. Fibrin 분해능이 증가한 변이주 3개 (M57, M111, M179) 그리고 반대로 활성이 크게 감소한 1개 변이주 (M11)를 선발하여 이들의 염기서열 변화를 조사하였다. M11, M57, M111, M179에서 아미노산 치환은 각각 V84A/K213M, K213N, G157S, A176T로 확인되었다. 각 변이주들의 효소를 앞과 동일하게 *E. coli* BL21 (DE3) 균주에서 생산한 후 정제하였다. 정제한 M11, M57, M111, M179 변이주들의 specific activity는 각각 10.9 ± 1.6 , 277.1 ± 15.7 , 300.4 ± 21.2 , 479.8 ± 12.2 plasmin unit/mg protein으로 나타났다. M179의 혈전용해능이 가장 높았고 wild-type인 AprE176과 비교시 2.2 배 높았다. M111은 1.4 배 그리고 M57은 1.3 배 높았다. M11은 84번과 213번 아미노산들의 치환이 일어났고 아마도 이들의 동시치환은 정확한 기작은 알수 없지만 효소활성을 거의 소멸시키는 결과를 나타내는 것으로 추정된다.

(6) Hydrolysis of Fibrinogen by AprE176 and M179.

Fibrinogen은 fibrin 전구체로서 disulfide 결합으로 연결된 3 쌍의 polypeptide 들 (A α , B β , and γ)로 이루어져 있다. AprE176와 M179 둘 다 A α 사슬을 신속히 분해하여 30 초 이내에 분해되었다 (Fig. 52). A α 사슬 다음으로 B β 사슬 분해가 일어났고 이는 AprE176가 강력한 α -fibrinogenase 활성과 보통의 β -fibrinogenase 역가를 지님을 보여준다. 이상의 분해 패턴은 *B. subtilis* CH3-5의 AprE2나 *B. subtilis* TP-6의 TPase 효소들과 비슷하다. M179는 A α 와 B β 사슬들을 20 분 이내에 완전히 분해하였고 이 결과는 M179의 β -fibrinogenase 역가가 더 높음을 가리킨다. 두 효소 공히 20 분 내에 γ -chain을 분해하지 못했다.

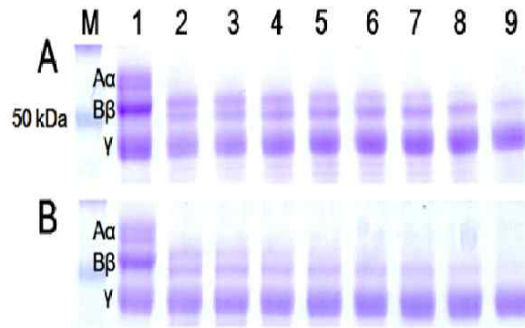


Fig. 52. Hydrolysis of fibrinogen by AprE176 (A) and M179 (B). Lane M, size marker (DokDo-MARK, ELPIS-Biotech. Inc., Daejeon, Korea.); 1, no enzyme treatment; 2, 30 s; 3, 1 min; 4, 2 min; 5, 3 min; 6, 4 min; 7, 5 min; 8, 10 min; 9, 20 min. A 12% acrylamide gel was used.

(7) AprE176와 M179의 Kinetics.

AprE176과 M179을 4 종류의 기질을 대상으로 amidolytic activity를 측정한 결과 N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA이 분해되었다. 해당 기질은 subtilisin과 chymotrypsin의 선호기질이기도 하다. AprE176과 M179는 다른 기질들은 분해하지 못했고 이 결과에서 AprE176이 subtilisin과 유사한 세린계 효소임을 알수 있다. AprE176과 M179의 amidolytic activity는 28.63 ± 0.20 , 39.84 ± 0.04 mM/min/mg protein으로 M179가 AprE176 보다 1.39 배 높았다. N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA의 분해속도로부터 AprE176의 K_m 과 K_{cat} 값을 구한 결과 각각 0.453 ± 0.036 과 122.851 ± 7.863 이었다. 한편 M179의 값들은 0.537 ± 0.027 과 151.429 ± 1.541 로 나타났다. M179의 경우 혈전용해능과 K_{cat} 값은 높았지만 기질에 대한 친화도 (K_m)는 AprE176보다 떨어졌다. 그 결과 M179의 catalytic efficiency (k_{cat}/K_m)는 $282.961 \text{ S}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 로서 AprE176의 $281.715 \text{ S}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 와 차이가 없었다.

(8) M179의 열안정성

M179는 AprE176 보다 열안정성이 더 우수하다. 45°C 에서 150 분 경과 후 AprE176은 역가의 50%만 유지되지만 M179는 67% 유지된다 (Fig. 53). 5 시간 둘 경우 M179는 36% AprE176은 11% 역가만 남았다. M179의 향상된 열안정성을 설명하기 위한 목적으로 분자모델링을 실시하였고 기준이 된 모델은 알려진 nattokinase 구조 (4DWW)를 이용하였다. Nattokinase와 AprE176은 아미노산 서열에서 76% identity를 지니고 있어 상동성에 기초한 모델을 SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>)를 사용하여 구하였다. 모델링 결과를 보면 M179의 향상된 열안정성은 A176T 변이때문으로 추정된다. AprE176 모델구조를 보면 calcium ion 반경 3.0 Å 이내에 3 개 아미노산들 (Gly169, Tyr171, Val174)이 위치한다 (Fig. 54). M179는 Thr176의 수산기가 calcium ion과 가까우나 (2.9 Å) AprE176의 Ala176는 그렇지 못하다. *Bacillus* 혈전용해효소들은 Ca A와 Ca B 2 개의 calcium 결합 site를 지니고 있다. M179의 Thr176는 Ca B site에 위치한 것으로 보이며 calcium ion과의 강화된 결합을 통해서 AprE176 보다 열 안정성을 높인 것으로 추정된다.

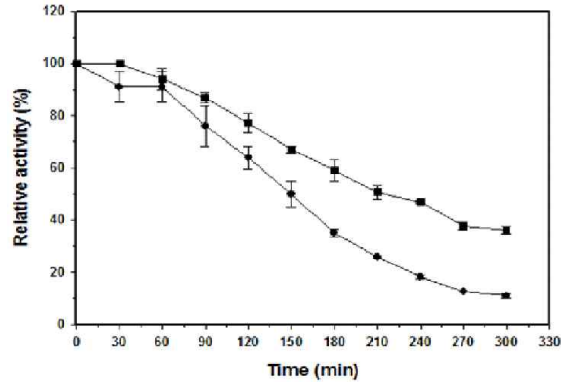


Fig. 53. Temperature stability of AprE176 and M179. Thermal stability was determined at 45°C in Tris-HCl buffer (pH 8.0) for various times. AprE176, -●-; M179, -■-.

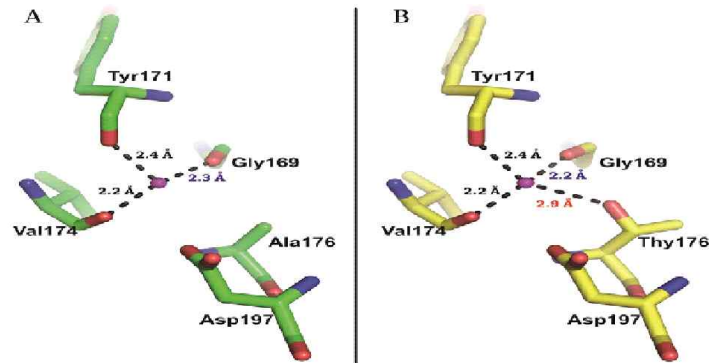


Fig. 54. Predicted structures of calcium binding pocket. (A) AprE176, (B) M179. The purple ball indicates a calcium ion.

제 1-2 절 장류 대량생산 체제 구축 (참여기업, 몽고식품(주))

1-1. 연구수행 방법 (1차 년도)

가. 기존 장류 제품의 이화학적 특성 및 성분 분석

참여기업(몽고식품(주))에서 자사 및 타사 간장 (청정원, 샘표식품), 된장(청정원, 사조, 해찬들) 제품들의 특성을 조사하였다. 간장은 총질소, Brix, 순추출물, 비중, pH, 염도, 색도를 측정했으며, 된장은 총질소, pH, 염도, 아미노태질소, 수분, 산도를 측정하였다. 청정원, 해찬들, 사조, 몽고식품에서 제조한 된장들에 대해서 향, 콩입자, 입자의 부드러움, 색상, 끓인 후 색상, 맛에 대하여 관능적 특성을 조사하였다.

1-2. 연구수행 방법(2차 년도)

가. 대용량 마늘된장의 이화학적 특성 및 기능성 대사체(isoflavone) 분석

(1) 대용량 마늘된장 제조방법

밀 koji는 *Rhizopus oryzae* 균주를 사용하여 제조하였으며, 대두 코지 (청국장) 발효는 *B. amyloliquifaciens* MJ1-4 및 EMD17 균주를 접종하여 제조하였다. 대용량 발효는 마늘된장 최종 제조조건인 마늘 및 소금 10% 기준으로 100 kg 제조하였다. 제조일 기준으로 총 20 일 발효하였으며 5 일 간격으로 시료를 채취하여 실험에 사용하였으며, 발효가 종료된 된장은 포장용기에 충전하여 시제품을 제작하였다 (Fig. 55).

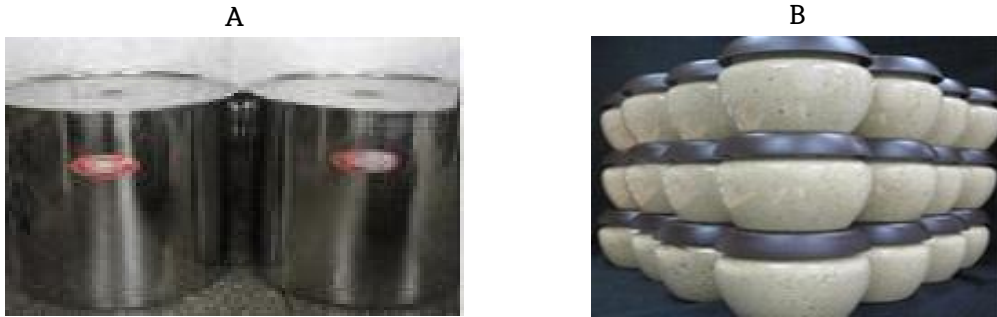


Fig. 55. Photography of bulk garlic *Doenjang* processing (A) and final products (B).

(2) 대용량 마늘된장의 이화학적 특성

된장 5 g에 증류수 45 ml를 첨가하여 균질화한 후 pH meter (model 3510, Jenway, UK) 사용하여 pH를 측정하였다. 산도는 0.1 N-NaOH 용액으로 pH 8.3±0.1까지 중화시키는데 소요된 ml 수를 구하여 젖산 (lactic acid)양으로 환산 및 표기하였다. 염도는 된장 10 g에 증류수 40 ml를 첨가하여 균질화한 후 원심분리 하여 얻은 상등액을 염도계로 측정하였다. 생균수 측정을 위해 시료를 단계별 로 희석한 후 chloramphenicol 함유 YPDA 배지를 사용하여 호모 수를 측정하였고 TSA 배지를 사용하여 bacilli 수를 측정하였다.

(3) 대용량 마늘된장의 isoflavone 함량 분석

동결건조 한 된장 분말 1 g에 50% 메탄올 10 ml를 가하여 상온에서 12시간 교반(160 rpm)한 후 0.45 µm PTPE syringe filter로 여과하여 isoflavone 분석에 사용하였다. Isoflavone 분석은 HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Co, Forest Hill, Vic, Australia)로 수행하였다. 분석 column은 Lichrophore 100 RP C₁₈ column (4.6×250 mm, 5 µm, Merck, Germany)을 사용하였고 이동상 용매는 0.2% glacial acetic acid in water (solution A)와 0.2% acetonitrile in glacial acetic acid (solution B)로 분석하였다. 이동상 조건은 A 용매 기준으로 0 min-100%, 15 min-90%, 25 min-80%, 35 min-75%, 45 min-65% 및 50 min-65%로 유지하였다. 시료는 20 µL를 주입하였으며, 이동상 속도는 30°C에서 1 ml/min으로 유지하였다. 검출기는 diode array detector (DAD)를 사용하여 UV 254 nm 에서 검출하였다. 각 실험은 3회 반복하여 평균 값으로 나타내었다.

나. 된장의 생물생성아민 (Biogenic amine, BA) 분석

BA 분석에 사용한 균주들은 0.5% precursor amino acid를 함유한 LB와 tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 37°C 24시간 진탕배양한 후 원심분리 (4000×g, 20 min)한 후 dansyl chloride로 유도체화하여 분석하였다. Dansyl chloride를 이용한 유도체화는 표준용액 및 시험 용액 각각 1 mL을 내부표준용액 (I.S., 1,7-diaminoheptane) 100 µL 가한 후 포화 탄산나트륨 용액 0.5 mL, 1% dansyl chloride 1 mL을 가하여 혼합한 후 45°C에서 1시간 유도체화 하였다. 유도체화 후 10% proline 용액 0.5 mL, 에테르 5 mL를 가하여 3분간 진탕하고 상층액을 취하

여 질소 농축한 뒤 아세토니트릴 1 mL를 가한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였다. 유도체 분석을 위한 HPLC 분석은 Agilent 110 series를 사용하였고 칼럼으로는 YMC-Pack ODS-AM C₁₈(4.6 mm x 250mm)를 사용하였다. 유속은 1 mL/min으로 칼럼온도는 40°C를 유지시켰다. 이동상으로 70% acetonitrile을 사용하고 UV detector를 이용하여 254 nm에서 측정하였다.

1-3. 연구수행 방법 (3차 년도)

가. 콩알메주간장 제조

(1) 콩알메주간장 발효·숙성

콩알메주 4 kg에 23% 염수 12 L를 혼합하여 담금한 후 30°C에서 60일간 발효·숙성시킨다. 원활한 발효·숙성을 위해 1회/3-4의 간격으로 교반을 실시하고 발효물의 발효·숙성 상태를 확인하기 위해 10일 간격으로 시료를 채취 한 후 자연 여과하여 분석하였다.

(2) 콩알메주간장 발효물 및 콩알메주 국간장 시제품의 이화학적 분석

모든 분석은 식품공전에서 제시하는 분석법에 따라 분석하였다. 총질소 함량은 세미 마이크로 킬달법으로 분석하였으며, 염도는 시료 4 g를 취하여 500 mL 용량 플라스크에 넣고 증류수로 500 mL로 맞추고 잘 혼합한 후 그 용액 10 mL를 취하여 2% 크롬산칼륨(K₂CrO₄)을 2-3 방울 첨가한 후 0.02 N 질산은(AgNO₃)액으로 적정하여 염도를 산출하였다. pH는 pH 미터로, Brix는 당도계를 이용하여 분석하였으며 색도는 장류 색차계를 이용하여 분석하였다. 순추출물은 Brix 값에서 염도를 뺀 값을 사용하였다. 콩알메주간장 발효물은 여과포를 이용하여 자연 여과한 후 그 여과액을 콩알메주간장원액으로 사용하여 분석하였다.

나. 쌀 코오지 및 쌀된장의 제조

(1) 쌀 코오지 제조

쌀을 5 시간 동안 물에 침지하여 5 시간 물빼기를 한 후 120°C에서 30분간 증자한 후 (주)충무발효에서 구입한 *Aspergillus oryzae*를 0.167% 접종하여 제곡상자에 담은 후 30°C에서 42-44 시간 배양하였다.

(2) 쌀된장의 제조

쌀로만 된장을 제조 시 쌀이 함유하고 있는 총질소 함량이 적어 된장 특유의 구수한 맛과 감칠맛이 떨어지는 단점을 보충하기 위해 대두를 5시간 침지하여 2시간 동안 물빼기를 한 후 120°C에서 30분간 증자하여 쌀 코오지와 정제소금을 첨가하여 된장 발효물을 담금하였다. 쌀 코오지, 증자대두, 정제소금을 각각 29.5%, 20.0%, 9%로 혼합하여 30°C에서 21일간 발효·숙성하였다.

(3) 쌀된장의 이화학적 분석

모든 분석은 식품공전에서 제시하는 분석법에 따라 분석하였다. 총질소 함량은 세미 마이크로 킬달법으로 분석하였으며, 아미노산 질소는 Formol 적정법에 의해 분석하였다. 염도는 시료 4 g를 취하여 500 mL 용량 플라스크에 넣고 증류수로 500 mL로 맞추고 잘 혼합한 후 그 용액 10 mL를 취하여 2% 크롬산칼륨(K₂CrO₄)을 2-3방울을 첨가한 후 0.02 N 질산은(AgNO₃)액으로 적정하여 염도를 산출하였다. Protease 역가는 카제인을 기질로 하여 된장 발효물을 반응시킨 다음 분해되는 아미노산을 folin 시액으로 발색한 흡광도와 일정량의 기준 아미노산(L-Tyrosine)을 folin시액으로 발색한 흡광도와 비교하여 농도로서 분석하였다. 산도는 산도 I (pH 7.0로 중화하는데 필요한 0.1 N NaOH ml)과 산도 II (pH 8.2로 중화하는데 필요한 0.1 N NaOH

ml)를 합한 값으로 pH 미터로 측정하였으며, pH는 pH 미터로, 수분 함량은 수분 측정기를 이용하여 분석하였다.

2-1. 연구결과 (참여기업, 1차 년도)

가. 기존 장류 제품의 이화학적 특성 및 성분 분석

1) 몽고식품(주) 및 타사 간장제품 특성

몽고식품(주) 및 타사의 간장제품들의 특성을 Table 19에 나타내었다. 총질소, Brix, 순추출물, 비중, 염도는 샘표식품 제품에서 가장 높게 나타났으며, 색도는 몽고식품(주) 제품에서 가장 높게 나타났다.

2) 몽고식품(주) 및 타사 된장제품 특성

몽고식품(주) 및 타사 된장제품의 특성을 Table 20에 나타내었다. 총질소, 염도, 아미노태질소, 수분, 산도II 는 해찬들 제품에서 높게 나타났다.

3) 몽고식품(주) 및 타사 된장제품 관능적 특성

몽고식품(주) 및 타사의 된장제품의 관능적 특성을 Table 21에 나타내었다. 몽고식품 된장의 향이 타사 제품들 보다 강하였고 끓인 후 색상 역시 타사 된장들 보다 진하였다. 맛은 재래식의 약간 새콤한 맛을 나타내었다. 제품들 마다 원료 배합비율이 차이가 있고 제조방법도 차이가 있어 결과적으로 관능적 특성 차이를 보이는 것으로 생각되며 앞으로 소비자들의 평가를 통해서 선호도가 높은 제품들의 제조 공정 개선이 필요한 것으로 보인다.

Table 19. Properties of Ganjang in the market..

제 품		총질소	Brix	순추출물	비중	pH	염도	색도
청정원	햇살담은 진간장	0.94	33.40	17.92	1.148	4.85	15.48	3
	햇살담은 양조간장	1.61	39.00	23.40	1.164	4.91	15.60	7
샘표식품	양조간장 701	1.76	46.40	29.73	1.196	4.76	16.67	3
	양조간장 501	1.59	39.80	23.25	1.169	4.89	16.55	11
	진간장 금 F3	1.33	36.20	19.71	1.164	4.93	16.49	3
몽고식품	메주간장	1.17	38.69	23.09	1.182	4.58	15.60	7
	송표프라임 간장	0.94	36.42	21.02	1.171	4.75	15.40	15
	진플러스 간장	1.02	28.26	12.46	1.149	5.02	15.80	15

Table 20. Properties of Doenjang

제 품		총질소	pH	염도	아미노태 질소	수분	산도 I	산도 II
청정원	재래식 안심생된장	1.98	4.95	9.94	481.32	50.70	14.27	12.26
사조	발아콩 메주된장	2.09	4.97	10.91	278.88	48.71	16.73	10.13
해찬들	재래식 콩된장	2.46	5.03	12.44	456.12	53.53	13.69	11.37
몽고 식품	콩된장	2.04	5.41	11.52	313.88	47.75	9.23	8.09
	메주된장	2.09	5.47	11.28	304.92	46.48	9.07	7.21

Table 21. Sensory properties of Doenjang

평가항목	청정원* (D사)	해찬들* (C사)	사조* (S사)	몽고* (M사)
향	향이 약함	적절한 된장 향	향이 약함 신내가 남	향이 강함
콩입자	콩입자 있음	콩입자 있음	콩입자 없음	콩입자 있음
입자의 부드러움	조금 거침	부드러움	수분이 많고 거침	수분 적으나 부드러움
색상	노란 콩색	노란 콩색	색이 진함	노란 콩색
끓인 후 색상	옅음	적절	구물이 탁함	약간 진함
맛	순한 맛	부드러움	미소 맛이 강함	재래식의 약간 새콤함

* 청정원; 재래식 안심 생된장, 해찬들; 재래식된장, 사조; 발아콩 메주된장, 몽고; 콩된장

2-2. 연구결과 (참여기업, 2차 년도)

가. 대용량 마늘된장 발효 중 이화학적 특성

발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화는 Table 22와 같다. pH는 발효 전 (0 d) 5.97 이나 발효 중기 (20 d)에는 5.87로 약간 감소하였다. 산도 및 염도는 최종적으로 각각 1.17 및 11.2%를 나타내었다. 한편 효모수는 발효 전 5.52에서 중기에 6.72 log cfu/g로 약간 증가한 반면, 바실러스는 발효전 10.34에서 발효중기에 9.37 log cfu/g로 약 10배 감소하였다.

Table 22. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of during bulk *garlic doenjang* fermentations¹⁾

Fermentation time (d)	Contents ²⁾				
	pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers log cfu/g	
				<i>Yeast</i>	<i>Bacillus</i>
0	5.97	0.51	6.6	5.52	10.34
5	5.87	0.76	9.0	6.09	9.81
10	5.98	1.03	10.6	6.60	9.76
15	5.95	1.02	10.0	6.51	9.43
20	5.87	1.17	11.2	6.72	9.37

¹⁾Bulk *garlic doenjang* were fermented at room temperature for 20 day

²⁾All values are means of determination in three independent experiments.

나. 대용량 마늘된장 발효 중 isoflavone 함량 분석

대용량 마늘된장의 HPLC 크로마토그램, isoflavone 비율 및 함량 변화는 Fig. 56, 57 및 Table 23와 같다. 총 11종의 isoflavone 유도체가 공통적으로 검출되었으며, 발효 중 공통적으로 acetylglycosides 형태인 acetyldaidzin은 검출되지 않았다 (Fig. 56). 발효 0 및 5일의 주요 유도체로는 glycosides daidzin, glycitin 및 genistin 이었으며 (Fig. 56 A and B), 발효 10일부터 20일의 주요 유도체는 비배당체들인 daidzein, glycitein 및 genistein 이었다(Fig. 56C-E). 이상 결과로 볼 때 된장 발효중 종균의 β -glucosidase 역가에 의해 배당체들이 비배당체들로 전환됨과 이로 인해 isoflavone들의 소화흡수율이 증가함을 알 수 있다.

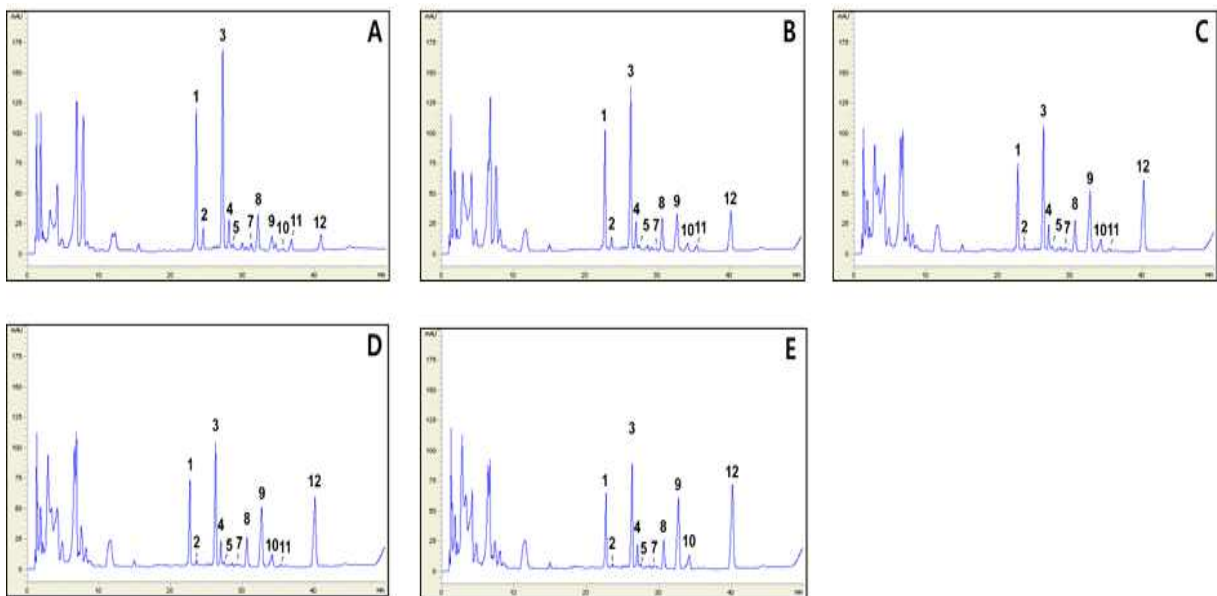


Fig. 56. Typical HPLC chromatogram of isoflavones. A; HPLC chromatogram of isoflavone extracts in bulk *garlic doenjang* at 0 day (A), 5 day (B), 10 day (C), 15 day (D), and 20 day (E). 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, acetylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, glycitein; 11, acetylgenistin; and 12, genistein.

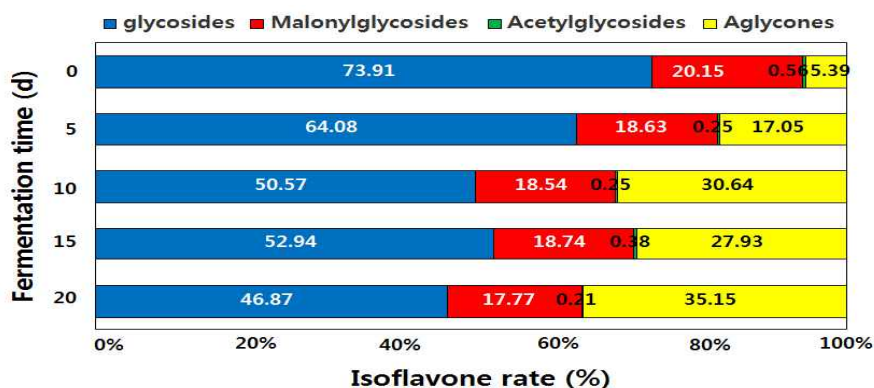


Fig. 57. Changes of isoflavone glycosides, malonylglycosides, acetylglycosides and aglycones contents during bulk *garlic doenjang* fermentations.

Table 23. Changes of isoflavone contents of bulk *garlic doenjang* during fermentations¹⁾

Contents ²⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Fermentation time (day)				
	0	5	10	15	20
Glycosides					
Daidzin	206.75	179.12	135.20	153.34	127.73
Glycitin	73.94	56.30	30.44	50.43	34.13
Genistin	252.71	203.31	154.72	157.09	134.72
Total	533.40	438.72	320.36	360.86	296.58
Malonylglycosides					
Daidzin	51.44	42.45	37.72	41.05	35.09
Glycitin	17.95	18.64	17.01	22.90	18.60
Genistin	76.02	66.45	62.72	63.79	58.77
Total	145.41	127.54	117.44	127.74	112.45
Acetylglycosides					
Daidzin	nd ³⁾	nd	nd	nd	nd
Glycitin	2.70	1.13	1.05	1.75	1.35
Genistin	1.35	0.56	0.53	0.87	nd
Total	4.04	1.69	1.58	2.62	1.35
Aglycones					
Daidzein	20.06	55.69	90.36	86.47	101.08
Glycitein	4.58	18.41	29.10	31.51	33.65
Genistein	14.24	42.64	74.60	72.40	87.69
Total	38.88	116.75	194.07	190.38	222.41
Total isoflavones	721.73	684.70	633.46	681.60	632.80

¹⁾ *Daemang* soy yogurt were fermented at 35°C for 60 h.

²⁾ All values are presented as the mean \pm SD of determinations in three independent experiments

³⁾ nd: not detected.

발효 전 배당체들 함량은 533.40 $\mu\text{g/g}$ 이고 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하여 발효 20 일에는 296.58 $\mu\text{g/g}$ 로 감소하였다 (Table 23). 이와는 반대로 비배당체들은 발효 전에는 38.88 $\mu\text{g/g}$ 이나 발효 20 일에는 222.41 $\mu\text{g/g}$ 으로 크게 증가하였다. Acetylglycosides인 acetylgenistin은 큰 변화는 없었고 발효 20일에는 검출되지 않았다(Table 23). 한편 isoflavone 유도체의 변화율은 발효 전 배당체 형태가 73.91% 이나 발효 20 일에는 46.87%로 감소하였고 비배당체들은 발효 전 5.39%의 낮은 비율에서 발효 20 일에는 35.15%로 증가하였다 (Fig. 57).

다. 기존 청국장 및 된장의 BA 함량

(1) 기존 판매되는 청국장의 BA 함량

시판 중인 10 종 청국장에 함유된 histamine, tyramine 및 총질소 함량을 조사한 결과는 Table 24와 같다. 시판 청국장 (A~J)들의 histamine 함유량 (mg/kg)은 각각 1044, 1018, 138, 231, 92, 145, 74, 90, 332 및 44 로 나타났다. 최소 44 mg/kg에서 최대 1044 mg/kg 수준이었고 tyramine (mg/kg)은 각각 1762, 2065, 48, 15, 258, 313, 35, 29, 544 및 84로 최소 15 mg/kg에서 최대 2065 mg/kg 수준이었다. 한편 총질소 함량은 각각 18.99%, 19.27%, 16.99%, 19.05%, 37.61%, 19.43%, 17.51%, 19.68%, 16.7% 및 10.56%으로 sample J가 가장 낮았고 (10.56%) E가 가장 높았다 (37.61%).

Table 24. Comparison of histamine, tyramine, and total nitrogen contents of commercial cheonggukjang

No.	Samples	Contents		
		Histamine (mg/kg)	Tyramine (mg/kg)	Total nitrogen (%)
1	A	1044	1762	18.99
2	B	1018	2065	19.27
3	C	138	48	16.99
4	D	231	15	19.05
5	E	92	258	37.61
6	F	145	313	19.43
7	G	74	35	17.51
8	H	90	29	19.68
9	I	332	544	16.7
10	J	44	84	10.56

(2) 기존 판매되는 된장의 BA 함량

시판 중인 19 종 된장에 함유된 histamine, tyramine, 및 총질소 함량을 조사한 결과 (Table 25) histamine은 각각 0, 8, 872, 23, 38, 77, 5, 107, 121, 24, 251, 818, 101, 997, 423, 412, 940, 146 및 11 mg/kg 함유되어 있었다. 최소 0 mg/kg에서 최대 997 mg/kg 수준이었다. 한편 tyramine은 각각 69, 129, 2051, 63, 24, 19, 68, 134, 115, 22, 454, 1633, 134, 461, 436, 780, 1822, 29 및 37 mg/kg으로 최소 19 mg/kg에서 최대 2051 mg/kg 수준 이다. 총질소 함량은 각각 13.48, 12.49, 13.09, 13.51, 10.04, 11.83, 11.49, 12.3, 11.1, 11.6, 11.2, 16, 13.3, 16.3, 15.8, 13.4, 14.7, 18.6 및 11.5%로 E가 최소 (10.04%)이고 R (18.6%)이 최고 수준이었다.

Table 25. Comparison of histamine, tyramine, and total nitrogen contents of commercial doenjang

No.	Samples	Contents		
		Histamine (mg/kg)	Tyramine (mg/kg)	Total nitrogen (%)
1	A	0	69	13.48
2	B	8	129	12.49
3	C	872	2051	13.09
4	D	23	63	13.51
5	E	38	24	10.04
6	F	77	19	11.83
7	G	5	68	11.49
8	H	107	134	12.3
9	I	121	115	11.1
10	J	24	22	11.6
11	K	251	454	11.2
12	L	818	1633	16
13	M	101	134	13.3
14	N	997	461	16.3
15	O	423	436	15.8
16	P	412	780	13.4
17	Q	940	1832	14.7
18	R	146	29	18.6
19	S	11	37	11.5

라. 마늘 된장의 BA 함량

(1) 마늘 첨가 된장의 총질소 (TN), 아미노태질소 (AN) 및 생물생성아민 (BA) 함량
 위탁기관과 제1협동과 함께 제조한, 마늘 첨가량을 달리하여 얻은 된장 시료들의 총질소 (TN), 아미노태질소 (AN) 그리고 생물생성아민 (BA) 함량을 측정하였다. 발효 0 주와 6 주에 측정된 결과를 Table 26에 나타내었다. 0 주째 TN 함량은 마늘 첨가 0%, 5%, 10%, 15%, 20% 및 30% 순으로 각각 1.94%, 1.87%, 1.90%, 1.80%, 1.65% 및 1.64%이고 발효 6 주째에는 1.92%, 1.85%, 1.80%, 1.78%, 1.65% 및 1.73% 였다. 마늘첨가량 0-15%일 때 TN은 0 주에 비해 6 주째 0.02% 감소하는 경향을 보였으며 20%, 30% 첨가 시에는 동일하거나 약 0.1% 정도 증가하였다. 마늘 첨가량에 따른 AN 함량 변화는 0 주째 마늘 첨가량 0%, 5%, 10%, 15%, 20% 및 30% 순으로 각각 382.16 mg/kg, 282.80 mg/kg, 306.32 mg/kg, 245.00 mg/kg, 269.36 mg/kg 및 254.80 mg/kg 이고 발효 6 주째 각각 518.56 mg/kg, 469.56 mg/kg, 539.00 mg/kg, 471.52 mg/kg, 442.96 mg/kg 및 408.24 mg/kg 이다. 마늘첨가량 0%-30%에서 AN은 0 주에 비해 6 주째 최소 153.44 mg/kg에서 최대 232.52 mg/kg 증가하였다. 한편 BA는 검출되지 않았다. 이는 실험실 규모에서 위생적으로 장류를 담금하고 발효한 결과로 추정되었다.

Table 26. Comparison of total nitrogen, amino nitrogen, and biogenic amine contents of different garlic concentrations *doenjang*

the amount of garlic added (%)	0 week			6 week		
	TN (%)	AN (mg/kg)	B.A (mg/kg)	TN (%)	AN (mg/kg)	B.A (mg/kg)
0	1.94	328.16	0	1.92	518.56	0
5	1.87	282.80	0	1.85	469.56	0
10	1.90	306.32	0	1.80	539.00	0
15	1.80	245.00	0	1.78	471.52	0
20	1.65	269.36	0	1.65	442.96	0
30	1.64	254.80	0	1.73	408.24	0

TN: total nitrogen, AN: amino nitrogen, B.A: biogenic amine (histamine/tyramine)

(2) 염 농도별 마늘 첨가 된장

위탁기관과 제1협동과 함께 제조한, 소금농도를 달리하여 제조한 마늘 첨가 된장 시료들의 TN, AN, BA 함량을 측정하였다 (Table 27). 염 농도별 마늘 첨가 된장의 TN 함량은 0 주째 염 첨가량 6%, 8%, 10%, 및 12% 순으로 각각 1.67%, 1.65%, 1.61% 및 1.53% 이나 발효 6 주째 각각 1.67%, 1.63%, 1.63% 및 1.56% 이었다. 한편 AN는 0 주째 223.16 mg/kg, 189.56 mg/kg, 175.00 mg/kg 및 147.00 mg/kg 이나 6 주째에는 306.64 mg/kg, 242.48 mg/kg, 259.28 mg/kg 및 208.04 mg/kg 이었다. 결과로 보면 AN은 0 주에 비해 6 주째 최소 52.92 mg/kg에서 최대 83.48 mg/kg 증가하여 발효에 의해 저분자량의 질소화합물이 증가하였음을 보여준다. 한편 BA는 검출되지 않았다.

Table 27. Comparison of total nitrogen, amino nitrogen, and biogenic amine contents of different salt concentrations garlic *doenjang*

the amount of salt added (%)	0 week			6 week		
	TN (%)	AN (mg/kg)	B.A (mg/kg)	TN (%)	AN (mg/kg)	BA (mg/kg)
6	1.67	223.16	0	1.67	306.64	0
8	1.65	189.56	0	1.63	242.48	0
10	1.61	175.00	0	1.63	259.28	0
12	1.53	147.00	0	1.56	208.04	0

TN: total nitrogen, AN: amino nitrogen, B.A: biogenic amine (histamine/tyramine)

(3) 마늘 형태별 첨가 된장

위탁기관과 제1협동과 함께 제조한, 마늘의 형태를 달리하여 첨가 제조한 된장 시료들의 TN, AN, BA 함량을 측정하였다 (Table 28). TN의 함량은 0 주째에 control, fresh garlic, steamed garlic, fermented garlic, sprouted garlic 첨가된장 순으로 각각 1.68%, 1.58%, 1.57%, 1.66% 및 1.57%이었으며 6 주째는 1.72%, 1.64%, 1.69%, 1.58% 및 1.55%이었다. AN 함량은 0 주째 동일 시료순으로 각각 168.56 mg/kg, 155.68 mg/kg, 183.40 mg/kg, 167.16 mg/kg, 164.08 mg/kg 이고 6 주째에는 246.68 mg/kg, 242.76 mg/kg, 259.00 mg/kg, 255.64 mg/kg, 255.93 mg/kg 이었다. 마늘 첨가 형태에 따라 AN는 최소 75.6 mg/kg 에서 최대 91.84 mg/kg 증가하였다. 한편 BA는 검출되지 않았다.

Table 28. Comparison of total nitrogen, amino nitrogen, and biogenic amine contents of pre-treatment different garlic *doenjang*

garlic differently pre-treated	0 week			6 week		
	TN (%)	AN (mg/kg)	B.A (mg/kg)	TN (%)	AN (mg/kg)	B.A (mg/kg)
Control	1.68	168.56	0	1.72	246.68	0
Fresh garlic	1.58	155.68	0	1.64	242.76	0
Steamed garlic	1.57	183.40	0	1.69	259.00	0
Fermented garlic	1.66	167.16	0	1.58	255.64	0
Sprouted garlic	1.57	164.08	0	1.55	255.92	0

TN: total nitrogen, AN: amino nitrogen, B.A: biogenic amine (histamine/tyramine)

2-3. 연구결과 (참여기업, 3차 년도)

가. 콩알메주간장 제조

(1) 콩알메주간장 발효물의 이화학적 특성

콩알메주에 염수를 첨가하여 30℃에서 60일간 발효·숙성시키며 10일 간격으로 발효물을 채취하여 발효·숙성 중 발효물의 변화를 이화학적으로 분석하였다. 그 결과 Table 29에서 보여주는 것과 같이 간장의 경제적 지표가 되는 총질소의 함량이 10일째 1.44%에서 60일째 1.53%에 도달하였다. 단, 탈지대두와 소맥을 사용하여 제조하는 공장식 간장의 발효물과는 달리 발효·숙성 기간에 따른 현격한 총질소 함량의 증가는 보이지 않았다. 따라서 콩알메주를 사용한 발효·숙성 기간은 경제성을 고려하였을 때 60일 정도가 적정한 것으로 판단되어진다.

Table 29. *Meju* fermented soy bean sauce of physicochemical characteristics

days	Total Nitrogen (%)	Brix	Pure extract (w/v, %)	Specific gravity	pH	Salinity (%NaCl)	Chromaticity
10	1.44	42.12	22.51	1.186	5.25	19.61	23
20	1.48	42.26	22.65	1.182	5.32	19.61	23
30	1.47	42.42	22.83	1.185	5.22	19.59	23
40	1.49	42.53	22.91	1.185	5.24	19.62	23
50	1.49	42.61	23.08	1.185	5.22	19.53	23
60	1.53	42.63	23.10	1.186	5.19	19.53	23

(2) 콩알메주간장 시제품 제조

탈지대두와 소맥을 혼합하여 제조되는 일반적인 공장식 간장과 달리 소맥을 사용하지 않고 콩을 원료로 하여 제조하는 콩알간장의 경우 콩 특유의 향으로 인해 주로 국 요리 및 나물무침에 사용되는 국간장으로 사용되어진다. 따라서 본 연구에서 얻어진 콩알메주간장 원액을 사용하여 국간장을 제조하고자 Table 30와 같은 배합비로 시제품을 제조하였다.

Table 30. *Meju* Korean style soy sauce prototype of Mixed percentage

Material	Mixed percentage(%)	
Meju soybean sauce stock solution	58.85	Meju soybean sauce stock solution of total nitrogen content 1.53%, salinity 19.53% standard
High fructose corn syrup	7.00	
Ethyl alcohol	3.00	
Purified salt	5.51	
Purified water	25.64	
Total	100.00	

콩알메주 국간장 시제품의 이화학적 특성을 분석한 결과 총질소 함량은 0.91%였으며 염도는 17.07%였다. 국간장의 경우 요리의 색에 영향을 주지 않는 옅은 색과 높은 염도를 갖는 특성이 있음을 고려하였을 때 상기 Table 30의 배합비로 신규 콩알메주 국간장을 제품화한다면 유용할 것으로 판단되어진다.

Table 31. *Meju* Korean style soy sauce prototype of physicochemical characteristics

Total Nitrogen(%)	Brix	Pure extract (w/v, %)	Specific gravity	pH	Salinity (%NaCl)	Chromaticity
0.91	31.29	14.12	1.154	5.15	17.07	19

(3) 콩알메주 국간장의 관능검사

본 연구에서 개발된 콩알메주 국간장과 몽고 양조국에 대해 맛, 향, 색도에 관해 몽고식품 장류기술연구소 직원을 대상으로 관능검사를 실시하였다. 그 결과 색도는 커다란 차이가 없었으나 맛과 향의 경우 두 제품간에 차이를 보이는 것으로 나타났다. 두 제품 간의 선호도는 개인의 주관적인 차이로 우열을 가릴 수 없었으나 맛과 향이 기존 국간장과 다른 특징을 갖고 있다는 점에서 신제품으로서의 개발이 가능할 것으로 판단되어진다는 의견을 얻을 수 있었다.

나. 쌀 코오지 및 쌀된장의 제조

(1) 쌀 코오지의 효소 역가

본 연구에서 제조된 쌀 코오지의 protease 역가는 315.47 IU/g 수분은 25.04%였다. 공장식 된장의 제조 시 소맥분 코오지의 protease의 역가가 500-800 IU/g이라는 점을 고려하면 쌀 코오지의 경우 효소역가가 소맥분 코오지보다 낮은 것으로 나타났다. 이는 쌀 코오지 제조 시 발효열이 소맥분 코오지보다 높아 벌어지는 현상으로 사료되어지며 쌀 코오지 제조 시 통풍설비의 보강 및 교반을 통한 발효열의 제어로 쌀 코오지의 역가를 높일 필요성이 있다.

(2) 쌀된장의 제조 및 그 특성

최근 젊은 소비층에서의 된장의 소비가 감소하는 추세를 보이고 있다. 이는 국내에서 된장의 소비가 된장찌개에 주로 이용되고 있다는 점과 된장찌개의 경우 주로 저녁식사에 이용되고 있다는 소비경향에 있는 것으로 사료된다. 예를 들면 일본의 된장국(미소시루)은 모든 식사에 다양하게 이용되고 있다. 이러한 차이는 한국식 된장의 경우 그 맛이 진해 아침 및 점심식사 보다는 저녁에 편중된다는 단점이 있다. 따라서 된장의 소비를 늘릴 수 있는 제품을 개발하기 위해 쌀과 콩을 적절히 혼합하여 된장의 진한 맛과 냄새를 줄인 쌀된장을 제조하였다. 쌀 코오지와 증자한 콩, 소금을 적절히 혼합하여 30℃에서 21일간 발효·숙성하여 쌀된장을 제조한 후

그 이화학적 특성을 기존의 콩된장과 비교·분석하였다 (Table 32). 그 결과 총질소 및 아미노태 질소 함량은 각각 0.56%, 307.72 mg%로 콩고 콩된장의 2.42%, 416.64 mg%보다 현저히 감소하였다. 이러한 사실은 쌀된장의 경우 쌀이 갖고 있는 단백질 함량이 적어 일어나는 현상으로 사료된다. 이러한 영양적 차이와는 달리 관능검사 결과, 맛과 향의 경우는 기존 된장보다 부드럽고 향이 적어 된장국으로서의 개발이 가능한 것으로 판단되어졌다.

Table 32. Comparison of physicochemical characteristics of rice soybean paste(*doenjang*) and Monggo-Soybeen paste(*doenjang*)

	Total Nitrogen (%)	pH	Salinity (%NaCl)	Amino nitrogen (mg%)	Water content (%)	Acidity I	Acidity II
rice soybean paste (<i>doenjang</i>)	0.56	5.54	9.54	307.72	48.43	7.08	6.76
Monggo-Soybeen paste (<i>doenjang</i>)	2.42	5.06	9.85	416.64	45.29	13.32	8.97

다. 콩알메주 간장의 경제성 분석

(1) 발효간장원액, 주정, 액상과당, 정제소금으로 만든 간장의 재료비를 계산하면 (용기, 인건비, 감가상각비 등을 제외) 다음과 같다.

- 탈지대두와 소맥을 사용한 일반간장: 773 원/L
- 콩알메주간장: 1,328 원/L
- 콩알메주간장 + 흑마늘농축액 (0.5%): 1,574 원/L

이상에서 보듯이 흑마늘을 첨가하지 않고 발효간장원액에 따른 가격을 생각하였을 때도 773 원 : 1,328 원으로 산업체에서 사용하는 소맥과 탈지대두에 비해서 콩알메주간장의 비용이 1.72 배로 큰 차이가 있는 것을 알수 있다. 이는 국내산 콩값이 탈지대두보다 현저히 비싸기 때문이다. 탈지대두+소맥은 664 원/kg 이지만 국산콩은 3,500 원/kg이다.

흑마늘 농축액을 0.5% 첨가할 경우 비용은 더 증가하여 1,574 원/L에 달하여 2 배의 값 차이가 발생한다.

본 연구를 통해서 기능성의 차이를 나타내기 위한 흑마늘 추출액의 최소 첨가량은 5%로서 이 경우 추가적인 비용 상승이 불가피하다.

(2) 또한 비용 계산에서 추가되어야 할 부분은 복합종균의 대두 접종을 위한 전 배양과 본 배양에 소요되는 경비로 배지와 배양 관련 비용이 발생한다.

- Bacillus, 곰팡이, 효모 각각의 전 배양과 본 배양에 필요한 배지 비용
- Bacillus, 곰팡이, 효모 각각의 전 배양과 본 배양을 책임질 전담 인력

Bacillus 배양을 위한 목적으로 실험실에서 사용되는 LB broth (1 liter 배지당tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g)를 1 L 제조할 경우 배지의 비용은 대략 2,000 원 정도이다. 곰팡이

이나 효모 배양에 사용되는 PDA 배지는 약 6,000 원/L 그리고 YPD (yeast extract, peptone, dextrose)는 약 8,000 원/L 이다.

만약 이들 배지를 장류 접종을 위한 본 배양에 사용한다면 (100 L) 그 비용이 상당할 것이다. 따라서 산업화를 위해서는 종균 배양을 위한 값싼 배지 개발이 필수적이다. 밀 당화액이나 탈지대두박과 같은 농산물, 부산물들을 이용하여 종균을 대량 배양하는 연구가 필요하다. 특히 복합종균의 성공적인 적용을 위해서는 접종을 위한 전 배양과 본 배양에서 4 종류의 균 수들이 일정 수 이상 되어야 하고 이를 지원하는 값싼 배지 확인이 필요하다.

결론적으로 마늘 첨가 국산콩 장류의 생산비용은 현 제품들의 최소 2-3 배로 예상되어 소비자들의 선택을 받기 위해서는 마늘첨가 국산콩 장류의 기능적 우수성이 추가 연구를 통해서 더 강화되고 홍보도 되어야 한다. 동시에 제품의 관능적 특성도 더 개선되어야 할 것이다. 참여기업에서는 추가연구와 시장동향 파악을 통해서 개발된 기술들을 활용한 제품들의 상품화를 위한 구체적인 계획들을 수립할 것이다. 제품의 출시 전후로 참여기업이 보유하고 있는 마케팅 및 영업전략을 최대한 활용하여 신제품의 시장 안착을 위한 다양한 방법들이 강구될 것이다.

제 1-3 절 장류의 기능성 대사체 및 향기성분분석 (위탁과제, 경남과기대)

1-1. 연구수행 방법 (1차 년도)

가. 장류의 이화학적 특성 및 기능성 대사체 (isoflavone과 향기성분) 분석

(1) 장류의 수집 및 이화학적 특성

채래 된장과 간장은 약 6개월 이상 숙성된 것을 함양과 하동의 가정집에서 수집하였고 몽고 된장과 간장은 약 3개월 숙성된 것을 몽고식품으로부터 제공받아 사용하였다. pH는 된장 (10 g) 및 간장 (10 ml)에 증류수 40 ml을 첨가하고 혼합한 후 pH meter (model 3510, Jenway, UK)로 측정하였다. 산도는 시료를 0.1 N-NaOH 용액으로 pH 8.3까지 중화시키는데 소요된 부피 (ml)를 구한 후 젖산 (lactic acid)의 양으로 환산하여 표기하였다.

(2) 장류의 총 phenolics 및 isoflavone 함량

Isoflavone 추출은 Cho 등 (2011)의 방법에 준하였다. 냉동 건조한 된장 분말 10 g에 50% 메탄올 100 ml을 가하여 25°C에서 12 시간 교반 (160 rpm)한 후 일부는 0.45 µm Minipore PVDF filter로 여과하여 총 phenolics와 isoflavone 분석에 사용하였고 나머지는 Whatman No. 42 여과지로 여과한 후 진공 건조하여 -40°C에 보관하였으며, 분석 전 0.5 mg/ml 되게 50% 메탄올에 녹여 항산화 활성을 측정하였다. 간장은 6,000 rpm에서 30 분 원심분리한 후 상등액을 0.45 µm Minipore PVDF filter로 여과 후 총 phenolics와 isoflavone 분석, 항산화 활성 검정에 사용하였다.

총 phenolics는 Cho 등 (2011)의 방법에 준하여 분석하였다. 희석한 여과액 500 µl에 250 µl 2 N Folin-Ciocalteu 시약을 첨가하여 혼합하고 3 분간 상온에 방치 후 25% sodium carbonate (Na₂CO₃) 500 µl를 첨가, 상온에 1 시간 둔 후 흡광도 (750 nm)를 측정하였다. 표준검량곡선은 gallic acid를 이용하여 작성하였고 모든 시료는 3 반복 분석하였다.

(3) 장류의 향기성분 분포

실험에 사용된 간장 및 된장 샘플은 자동흡탈착 장치를 이용하여 향기성분을 포집하여 Gas

Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS)를 이용하여 향기성분을 동정하였다. 간장 샘플은 30 mL, 된장 샘플은 30 g 사용하고 각 실험은 3 반복 하였다.

(4) 장류의 항산화 활성

DPPH 라디칼 소거활성은 Blois (1952) 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 1.5×10^{-4} mM 용액 0.8 mL과 0.5 mg/mL 농도의 추출물 (된장) 혹은 40 배 희석한 여과액 (간장) 0.2 mL을 가하고 10 초간 vortex로 균질화시키고 실온에서 30 분 방치한 후 흡광도 (525 nm)를 측정하였다. 음성 대조구는 시료 대신 에탄올 0.2 mL를 사용하였으며, DPPH 라디칼 소거활성은 실험구와 음성 대조구의 흡광도를 구하여 백분율(%)로 표시하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 7 mM ABTs 용액과 2.45 mM potassium persulfate을 1:1 (v/v)로 섞어 실온의 암실에서 12–16 시간 반응시켜 ABTs 라디칼 ($ABTs^{+ \cdot}$)을 생성시켰다. ABTs는 732 nm에서 흡광도가 0.7 ± 0.02 가 되도록 에탄올로 희석, 사용하였다. 에탄올로 희석된 ABTs 용액 0.9 mL과 추출물 0.1 mL [0.01 mg/mL 농도의 추출물 (된장) 혹은 50 배 희석한 여과액 (간장)]을 섞고, 정확히 3 분 후 흡광도 (730 nm)를 측정하였다. 음성 대조구로 에탄올 0.1 mL를 사용하였고, ABTs 라디칼 소거활성은 실험구와 음성 대조구의 흡광도를 구하여 백분율(%)로 표시하였다 (Choi 등, 2012). Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) 분석은 (Choi 등, 2012)의 방법을 응용하여 추출물의 항산화력을 측정하였다. 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6)와 40 mM HCl로 용해시킨 10 mM TPTZ 용액 그리고 20 mM $FeCl_3$ 용액을 사용하였다. 미리 제조된 sodium acetate buffer, TPTZ 용액 및 $FeCl_3$ 용액을 10:1:1 (v/v/v) 비율로 혼합하여 37°C 15 분간 반응시켜 FRAP 시약을 준비하였다. FRAP 시약 1.5 mL를 추출물 50 μ L [0.25 mg/mL 농도의 추출물(된장) 혹은 50 배 희석한 여과액(간장)]에 혼합하여 섞고, 37°C 15 분 반응시키고 흡광도 (593 nm)를 측정하였다. 음성 대조구로는 에탄올 50 μ L를 사용하였고 FRAP 활성은 흡광도 값으로 표시하였다.

나. 청국장 발효 중 isoflavone 함량 분석

(1) 국산콩 품종별 청국장 발효 중 isoflavone 함량 변화

(가) 국산콩 품종 및 균주

국산콩 (새단백콩, 대원콩, 대풍콩, 늘찬콩, 태광콩, 황금콩, 선유콩 및 대망콩)은 2011년 11월 경상남도 밀양에서 수확된 것을 농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물부에서 얻었으며 청국장 발효 균주는 참여기업인 몽고식품(주)와 공동으로 기존에 특허 등록을 완료한 균주 *B. subtilis* CSY191을 사용하였다.

(나) 청국장 제조 및 발효 중 생균수와 β -glucosidase 활성 변화

국산콩 8 품종 (200 g)을 세척하고 20°C에서 12 시간 3 배 양의 물에 불리고 121°C에서 30 분 증자하였다. 증자 후 37°C에서 1시간 두어 냉각된 콩에 CSY191 (9.56 log cfu/ml)을 2.5% (w/w) 접종하고 37, 48 시간 발효하였고 0, 12, 24 및 48 시간에 시료를 채취하였다. 생균수는 청국장 시료 1 g을 0.85% NaCl 9 ml와 섞고 현탁액 (0.1 ml)을 TSA 배지에 도말하여 도말 배지는 37°C 24 시간 배양하여 콜로니를 계수하였다. β -glucosidase 활성 조사를 위해 청국장 (1.0 g)을 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 20 mL와 섞고 4°C, 6000 \times g에서 30 분 원심분리한 후 상등액을 0.45 μ m filter로 여과하여 조효소를 제조하였다. 조효소의 β -glucosidase 활성은 *p*-NPG를 사용하여 측정하였다. 조효소 (250 μ l)은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 5 mM *p*-NPG의 250 μ l을 가하여 37°C 30 분 반응한 후 500 μ l의 0.2 M glycine–NaOH (pH 10.5)를 가하여 효소반응을 정지시키고 방출된 *p*-nitrophenol의 양은 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 unit는 *p*-NPG 1 μ mole를 유리하는 효소 양으로 정의하였다.

(다) 국산콩 품종별 및 발효 중 총 phenolics 및 isoflavone 함량 변화

Isoflavone 추출과 분석 및 총 phenolics 분석은 상기 기술한 방법대로 수행하였다.

(라) 국산콩 품종별 및 발효 중 항산화 활성 변화

DPPH 라디칼 소거활성, ABTs 라디칼 소거활성 및 FRAP 분석은 상기 기술한 방법에 준하

여 수행하였다.

(2) 마늘 내성 및 청국장 발효가공 적성이 우수한 *Bacillus* sp. 균주 선발

(가) 마늘 내성균 및 청국장 발효 가공 적성 균주 선발

시판 된장들을 수집하여 희석 후 TSA 배지에 도말하여 37°C, 48 h 배양 후 형태학적으로 다른 76 종의 *Bacillus* sp.를 분리하였다. 5% (w/w) 다진 마늘을 청국장 제조시 첨가하여 청국장 발효 72 시간에 균 성장정도, 마늘 냄새와 청국장의 악취도를 측정하여 일차적으로 31 균주를 선정하였다. 31 균주와 경상대학교 (주관기관)와 본 실험실에서 보유하고 있던 기존 31 균주를 합한 총 62 균주에 대해서 마늘 청국장 제조 후 균 성장정도, 마늘 냄새와 청국장의 악취도를 측정하였고 새로 선발된 31 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 균주를 동정하였다

(나) 선발 균주의 청국장 발효 특성 확인

국산콩 (200 g)을 세척, 물에 담금, 증자한 후 냉각된 콩에 균주 EMD17, HCD02 및 MJ1-4 (9.56 log cfu/ml)을 2.5% (w/w) 접종하여 37°C에서 72 시간 발효하고 0, 12, 24, 48 및 72 시간에 시료를 채취하였다. 생균수 및 β -glucosidase 활성은 상기 기술한대로 측정하였다.

(3) 최종 선정균주를 이용한 단독 및 혼합 청국장 발효 중 isoflavone 함량 변화

(가) 청국장 준비

협동기관인 (재) 남해마늘연구소에서 균주 단독/혼합배양 및 발효기간별로 제조된 청국장 (마늘 10% 첨가)을 제공받아 실험에 사용하였다.

(나) 생균수와 β -glucosidase 활성 변화

생균수와 β -glucosidase 활성은 상기 기술한 바와 같이 동일하게 수행하였다.

(다) 발효 중 총 phenolics 및 isoflavone 함량 변화

Isoflavone 추출과 분석 및 총 phenolics 분석은 상기 기술한 방법대로 수행하였다.

(4) 마늘 첨가 형태 (생, 발아 및 발효 마늘)를 달리한 청국장 발효 중 isoflavone 함량 변화

(가) 청국장 준비

협동기관인 (재) 남해마늘연구소에서 마늘 무 첨가, 생마늘 첨가, 발아마늘 첨가 및 발효마늘 첨가하여 제조된 청국장 시료들을 제공받아 실험에 사용하였다.

(나) 생균수와 β -glucosidase 활성 변화

생균수와 β -glucosidase 활성은 상기 기술한대로 측정하였다.

(다) 발효 중 총 phenolics 및 isoflavone 함량 변화

Isoflavone 추출과 분석 및 총 phenolics 분석은 상기 기술한 방법대로 수행하였다.

다. 간장 숙성 중 BA (histamine과 tyramine) 분석

(1) 몽고 간장 숙성 중 BA (histamine과 tyramine) 함량 변화

(가) 몽고식품(주) 간장의 시료 채취 및 이화학적 특성 분석

참여기업인 몽고식품(주)의 간장 시료는 담금 30 일째부터 시료를 채취하여 약 200 일 동안 6 차례 시료를 확보하였다. 몽고 간장 숙성 중 생균수는 10 단 희석 후 TSA 배지에 도말하여 계수하였고 총질소 (TN), pH, 염도 및 아미노태질소 (AN)는 장류분석법에 준해 분석하였다.

(나) 몽고식품(주) 간장의 BA (histamine과 tyramine) 함량

BA은 일본 장류 시험법 분석 중 BA 분석법을 일부 변형하여 HPLC를 이용하여 분석하였다.

(2) 몽고 간장 발효 중 미생물 다양성 조사

(가) 세균 다양성 조사

간장으로부터 미생물 metagenomic DNA 분리는 PowerSoil™ DNA Kit (MOBIOLabs, Carlsbad, USA)을 사용 추출하였다. Metagenomic DNA를 주형으로 하여 16S rDNA (1.5 kb)를 PCR로 증폭하였다. 증폭은 94°C 1 분 변성, 50°C 30 초 풀림, 72°C 1 분 30 초 신장으로 30

cycle 수행되었다. 16S rDNA 증폭을 위해 사용한 primer들은 5'-CGGAGAGTTTGATCCTG G-3'와 5'-TACGGCTACCTTGTACGAC-3'이다. 증폭 후 1% agarose gel에서 1.5 kb 단편을 회수한 후 pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA)에 클로닝 하고 *Escherichia coli* DH5a에 도입하였다. LB 한천배지 (50 µg ampicillin) 상의 균락들로부터 plasmid를 분리 정제하였다. 핵산 염기서열은 PRISM Ready Reacion Dye terminator/primer cycle sequencing kit를 사용하여 결정하였다. 염기서열은 BLAST (NCBI)를 사용하여 database의 균들과 비교하였다.

(나) 효모 다양성 조사

Metagenomic DNA를 주형으로 하여 26S rDNA (0.6 kb)를 PCR로 증폭하였다. 증폭은 94°C 1 분 변성, 52°C 30 초 풀림, 72°C 30 초 신장으로 40 cycle 수행되었다. PCR primer들은 5'-ACCCGCTGAAYTTAAGCATAT-3'와 5'-CTCCTTGGTCGTGTTCAAGACGG-3'이다. 증폭된 0.6 kb 단편은 1% agarose gel에서 회수한 후 pGEM-T Easy에 클로닝 하여 *Escherichia coli* DH5a에 도입하였다. LB 한천배지 (50 µg ampicillin)에서 자란 균락들의 plasmid DNA를 분리 정제하였다. 핵산 염기서열은 앞과 동일하게 결정하였고 26S rDNA 염기서열은 BLAST (NCBI)를 사용하여 database의 효모들과 비교하였다.

라. 장류 발효 우수 효모 균주 선발

(1) 장류로부터 효모 균주 선발 및 동정

(가) 균주 분리

장류 (된장과 간장)로부터 효모 균주들을 순수 분리하였다. 10 g 혹은 10 ml 시료를 100 mL YPD 배지 (클로람페니콜, 1.5 mg/mL)에서 24-48 시간 배양한 후 배양액 1 mL 취하여 $10^6 - 10^9$ 으로 희석하고 이를 클로람페니콜 (1.5 mg/mL)이 함유된 YPD 한천배지에 도말하여 30°C 48-72 시간 배양하여 전형적인 효모 클로니들을 얻은 후 새 YPD 한천배지에 순수 분리하여 30°C에서 48시간 배양하였다.

(나) 균주 동정

분리 균주를 PDB 액체배지 5 ml에 접종하고 48 시간 배양 후 원심분리하여 균체를 얻고 DNAzol kit (Invitrogen사, USA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. Genomic DNA를 주형으로 94°C 1 분 변성, 52°C 30 초 풀림, 72°C 30 초 신장으로 30 cycle로 수행하여 0.6 kb 단편을 증폭하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 회수 및 정제한 후 pGEM-T Easy 에 클로닝 하고 *Escherichia coli* DH5a에 도입하였다. LB 배지 (50 µg ampicillin)에서 16 시간 배양한 후 plasmid DNA를 얻었다. 염기서열 결정과 분석은 상기 기술한 대로 수행하였다.

(2) 선발 효모의 내염성, 내알코올성 및 내당성 확인

(가) 내염성 확인

소금 (NaCl)을 0-15% 첨가한 PDB 액체배지에 균주를 5.0% (v/v) 첨가한 후 25°C에서 48 시간 배양 후 흡광도 (600 nm)를 측정하여 균 생육정도를 결정하였다.

(나) 알코올 내성 확인

0-15% 알코올 첨가 PDB 액체배지에 최종 선발한 6 균주를 각각 5.0% (v/v) 첨가한 후 25°C 48 시간 배양 후 흡광도 (600nm)를 측정하였다.

(다) 당 내성 확인

0, 10, 20 및 30% 설탕을 첨가한 PDB 배지에 균주를 5.0% (v/v) 첨가한 후 37°C에서 48 시간 배양한 후 흡광도 (600nm)를 측정하여 균 생육정도를 결정하였다.

(3) 선발 효모를 이용한 간장 제조 및 이화학적 특성 확인

(가) 콩알 메주 및 간장 제조

국산콩을 앞서 기술한 대로 세척, 물 불림, 증자하였다. 증자한 콩에 복합균주 (EMD17, HCD02 및 MJ1-4, 9.12 log cfu/ml)을 2.5% (w/w) 접종하고 37°C 에서 72 시간 발효하여 생 청국장을 제조한 후 55°C에서 2 일간 건조하여 콩알 메주를 제조하였다. 1.2 liter 유리 발효조

에 제조된 콩알 메주 200 g과 염농도 18%로 조정된 식염 4배 (800 ml)를 첨가하고 밀당화액 배지에서 배양한 효모 균주를 5% 접종하여 간장을 제조한 후 20°C에서 30 일간 발효시킨 후 이화학적 특성과 생균수를 측정하였다.

1-2. 연구수행 방법 (2차 년도)

가. 된장의 이화학적 특성 및 기능성 대사체 (isoflavone) 분석

(1) 발효 균주

1차년도에 선발한 균주를 사용하였다. *Bacillus*는 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, EMD17 및 HCD02 3 종 혹은 2 종을 사용하였고 공시균주로는 *B. natto*를 사용하였다. 한편 진균류는 *Rhizopus oryzae*와 공시균주로 *Aspergillus oryzae*를 사용하였다. 효모는 1차년도 선발한 내염성이 우수한 *Pichia farinosa* SY80를 사용하였다.

(2) 증자마늘첨가 (0, 10, 20%) 된장 제조방법

원료콩은 함양농협 가공사업소, 마늘은 남해마늘연구소에서, 밀 koji는 몽고식품(주)에서 *Asp. oryzae*를 이용하여 만든 것을 각각 제공받아 사용하였다. 마늘은 121°C에서 15 분 증자 처리하였으며, 청국장용 증자콩 3 kg에 MJ1-4, EMD17 및 HCD02 배양액을 각각 2% (v/w) 접종하여 37°C에서 72 h 발효하여 제조하였다. 마늘된장은 총 10 kg 기준으로 제조하였으며 제조한 날을 기준으로 6 주간 발효하였으며 1 주 단위로 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

(3) 마늘 첨가량을 달리한 된장 시료 제조

남해마늘연구소와 공동으로 마늘 첨가량 (0, 5, 10, 15, 20, 30%)을 달리하여 된장을 제조한 후, 6 주간 발효시키고 1 주 간격으로 시료를 채취하여 생시료는 이화학적 특성 분석에 사용하였고 일정량은 동결건조 후 분쇄하여 총 phenolics, isoflavone 분석 및 항산화 활성 분석에 사용하였다.

(4) 소금농도를 달리한 된장 시료 제조

남해마늘연구소와 공동으로 소금농도 (6, 8, 10, 12%)를 달리하여 된장을 제조한 후, 6 주간 발효시키고 1 주 간격으로 시료를 채취하여 생시료는 이화학적 특성 분석에 사용하였고 일정량은 동결건조 후 분쇄하여 총 phenolics, isoflavone 분석 및 항산화 활성 분석에 사용하였다.

(5) 마늘의 첨가방식을 달리한 된장 시료 제조

남해마늘연구소와 공동으로 마늘 첨가방식 (생마늘, 증숙마늘, 발아마늘, 발효마늘)을 달리하여 된장을 제조하였고, 마늘을 첨가하지 않은 된장을 대조군으로 하였다. 된장을 6 주간 발효시키고 1 주 간격으로 시료를 채취하여 생시료는 이화학적 특성 분석에 사용하였고 일정량은 동결건조 후 분쇄하여 총 phenolics, isoflavone 분석 및 항산화 활성 분석에 사용하였다.

(6) 공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장 제조

남해마늘연구소와 공동으로 공시균주 (*B. natto*, *A. oryzae*) 및 선발균주 (*B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. amyloloquefaciens* EMD17, *R. oryzae*)를 달리하여 된장을 제조한 후, 6 주간 발효시키고 1 주 간격으로 시료를 채취하여 생시료는 이화학적 특성 분석에 사용하였고 일정량은 동결건조 후 분쇄하여 총 phenolics, isoflavone 분석 및 항산화 활성 분석에 사용하였다.

(7) 된장의 이화학적 특성

pH 와 산도 측정은 1차년도에 기술한 방법과 동일하게 수행하였다. 염도 측정은 된장 10 g 에 증류수 40 ml을 첨가하여 균질화한 후 원심분리 하여 얻은 상등액을 염도계로 측정하였다.

생균수는 단계별 희석법을 이용하여 효모는 chloramphenicol 함유 YPDA 배지를 사용하였으며, 바실러스는 TSA 배지를 사용하여 검출하였다

(8) 된장의 총 phenolics 및 isoflavone 함량 분석

총 phenolics 및 isoflavone 추출은 1차년도에 기술한 Cho 등 (2011)의 방법에 따라 실시하였다.

Isoflavone 분석은 Cho 등(2011)의 방법에 준하여 HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Co, Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다. 분석 column은 Lichrophore 100 RP C18 column (4.6×250 mm, 5 µm, Merck, Germany)을 사용하였고 이동상 용매는 0.2% glacial acetic acid in water (solution A)와 0.2% acetonitrile in glacial acetic acid (solution B)로 분석하였다. 이동상 조건은 A 용매 기준으로 0 min-100%, 15 min-90%, 25 min-80%, 35 min-75%, 45 min-65% 및 50 min-65%로 유지하였다. 시료는 20 µL를 주입하였으며, 이동상 속도는 30°C에서 1 ml/min으로 유지하였다. 검출기는 diode array detector (DAD)를 사용하여 UV 254 nm에서 검출하였다. 각 실험은 3 회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

나. 된장의 향기성분 분석

(1) 향기성분 추출

모든 샘플은 분석에 앞서 동결건조를 통해 수분을 제거한 후 실험에 사용되었다. 각 샘플의 향기 성분 추출은 Likens & Nikerson의 연속증류추출법 (simultaneous steam distillation and extraction apparatus; SDE)에 따라 수행하였다. 시료 플라스크에 마쇄한 샘플 10 g과 증류수 500 mL를 혼합한 후, 100°C로 유지 시키고, 용매 플라스크에는 Diethyl ether 200 mL를 넣은 후 60°C로 유지하면서 2 시간 동안 휘발성 성분을 포집하였다. 향기성분이 포집된 용매 플라스크에 sodium sulfate anhydrous를 소량 가한 후 4°C 하룻밤 방치하여 탈수시켰다. 탈수된 용매는 Whatman No. 1 여과지를 통해 여과를 거친 후, 질소가스를 이용하여 1 mL 까지 농축한 후 분석에 사용하였다. 내부 표준물질은 pentadecane (C15:0)를 사용하였다 (Fig. 1).

(2) Chromatographic 분석

농축된 휘발성 성분은 Gas chromatography-Mass Spectrometry (GC/MSD; Agilent 7890A & 5975C, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. 향기 성분 분석은 HP-5MS 칼럼 (30 m×0.25 mm i.d.×0.25 µm film thickness)을 사용하였다. 분석조건으로 오븐 온도는 40°C에서 5 분 후 200°C까지 분당 5°C 속도로 승온시켰으며, injector 온도는 220°C로, carrier gas인 helium 유속은 1.0 mL/min, 그리고 split ratio는 1:10이었다. Total ionization chromatogram (TIC)에서 분리된 각 성분은 mass spectrum library (NIST 12)와 참고문헌을 이용하여 동정하였으며, 각 시료의 향기 성분은 피크 면적과 이를 기준으로 하여 전체 피크면적을 100%로 환산하여 각 성분들이 가지는 피크면적을 상대적인 비율(%)로 나타내었다.

다. 된장 및 간장의 메타게놈 효모 다양성 분석

(1) Genomic DNA 분리

된장은 시료 10 g에 pH 7 buffer 100 mL을 가하여 160 rpm에서 3 시간 추출한 후 된장 입자를 제거한 후 추출액 3 mL을 4°C, 13,000 × g에서 5 분 원심분리 하였고, 간장은 시료 3 mL을 4°C, 13,000 × g에서 5 분 원심분리하였다. 모여진 균체는 DNAzol kit (Invitrogen사, USA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다.

(2) 26S rDNA PCR 증폭 및 형질전환

Genomic DNA로 부터 26S rDNA를 증폭하였다. 26S rDNA 단편을 증폭하는데 사용한 PCR (yeast-specific) primer들은 다음과 같다: 5'-ACCCGCTGAAYTTAAGCATAT-3' (3YF/21-mer, forward primer, *Saccharomyces cerevisiae* rRNA)와 5'-CTCCTTGGTCGT

GTTTCAAGACGG-3'(3YR/25-mer, reverse primer) (Cho *et al.*, 2009). rRNA는 meta-genomic DNA를 기질로 그리고 Super-Therm DNA 중합 효소 (JMR, Side Cup, Kent, UK)를 사용하여 증폭하였다. PCR 반응은 (50 μ L) *Taq* polymerase (2.5 unit) 1 μ L, 3YF-3YR (10 pmol) primer 3 μ L, 반응 buffer (15 mM MgCl₂) 5 μ L, 2 mM dNTP 5 μ L, 주형 DNA 5 μ L, 멸균수 28 μ L을 포함하였다. PCR은 94°C 5 분, 30 cycles (94°C 30 초, 50°C 30 초, 72°C 2 분) 수행 그리고 72°C에서 10 분 신장하였다. PCR 반응이 끝난 후 전기 영동하여 26S rRNA 단편을 확인하고 Kit를 사용하여 정제하였다. pGEM-T Easy에 클로닝하여 *Escherichia coli* DH5a에 도입하였다. LB 배지 (50 μ g ampicillin)에서 자란 균락들의 plasmid DNA를 plasmid purification kit (Intron, Suwon, Korea)를 사용하여 분리 정제하였다.

(3) DNA 염기서열 및 상동성 분석

염기서열 결정은 PRISM Ready Reaction Dye terminator/primer cycle sequencing kit (Per-kin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)를 사용하여 수행하였다. 염기서열은 GenBank database의 효모들의 26S rRNA와 비교 분석하였다. 26S rRNA 유사성 값은 DNAMAN analysis system (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)를 사용하여 alignments, evolutionary distance로부터 계산하였다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining method와 distance matrix data를 사용하여 확인하였다.

1-3. 연구수행 방법 (3차 년도)

가. 대용량 마늘 된장의 기능성 대사체 (isoflavone과 향기성분) 분석

(1) 이화학적 특성 및 기능성 대사체 분석

(가) 이화학적 특성

된장의 pH, 산도, 염도 및 생균수 (*Bacillus* 균수 및 효모) 측정은 앞서 기술된 1, 2 차년도 방법과 동일하다.

(나) 총 phenolics 및 isoflavone 함량 분석

총 phenolics 및 isoflavone 추출은 상기 기술한 Cho 등 (2011)의 방법에 따라 실시하였다. Isoflavone 분석은 Cho 등 (2011)의 방법에 준하여 HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Co, Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다.

(다) 유리아미노산 분석

유리아미노산 분석은 된장 분말 0.1 g에 HPLC 등급수 5 ml을 첨가 및 교반한 후 60°C에서 1 시간 가수분해하였다. 그 후 10% salic acid dehydrate 1 ml을 첨가하여 4°C에서 2 h 방치시켜 단백질을 침전시켰다. 그 후 원심분리기 (MF-550, Hanil Science Industrial Co., Ltd, Korea.)를 이용하여 15 분 원심분리하여 상등액만 따로 0.45 μ m 필터로 여과하였다. 여과한 용액은 회전진공농축기 (Eyela, NE1S, Japan.)를 이용하여 60°C에서 건조하였으며 lithium loading buffer 2 mL을 첨가한 후 다시 0.45 μ m 필터로 여과하였다. 전처리 한 시료는 자동 아미노산 분석기 (L-8900, Hitachi, Co., Ltd, Japan.)를 이용하여 분석하였다.

(라) 향기성분 분석

2차년도와 동일한 방법으로 수행하였다.

(2) 효모 다양성 분석

(가) Genomic DNA 분리

된장과 간장 시료들에서 genomic DNA 추출 방법은 2차년도와 동일하다.

(나) 26S rDNA PCR 증폭 및 형질전환

분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 26S rDNA를 증폭하고 대장균에 도입 후 염기서열

을 결정한 과정들은 전년도 기술한 방법들과 동일하다.

(다) DNA 염기서열 및 상동성 분석

염기서열들 결정과 상동성 분석에 사용한 방법들은 2차년도 기술한 방법들과 동일하다.

(3) 항산화 활성

(가) DPPH 라디칼 소거활성: Cho 등 (2013)의 방법에 준하여 측정하였다.

(나) ABTS 라디칼 소거활성: Hwang 등 (2013)의 방법에 준하여 측정하였다.

(다) Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) 분석: Hwang 등 (2013)의 방법에 준하여 측정하였다.

나. 몽고 모로미 베이스 흑마늘 엑기스 첨가 간장의 특성 분석

(1) 간장 제조 및 특성

(가) 재료 및 간장 제조

간장 제조에 사용한 몽고 모로미 간장은 참여 기업인 몽고식품에서 제공 받았으며, 흑마늘 엑기스는 남해마늘연구소에서 제공받아 사용하였다. 두 재료를 준비한 후 Table 33의 비율표를 따라 총 3 L 기준으로 흑마늘 엑기스를 각각 0, 0.5, 1, 2 및 4% 첨가하여 몽고 모로미 간장을 제조하였다. 그 후 제조한 날을 기준으로 총 180 일 동안 발효하였으며 각각 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 및 180 일에 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

(나) 이화학적 특성

pH는 간장 10 g에 증류수 40 ml을 첨가하고 혼합한 후 pH meter (model 3510, Jenway, UK)로 측정하였다. 산도는 시료를 0.1 N-NaOH 용액으로 pH 8.3±0.01까지 중화시키는데 소요된 ml 수로 표기하였다. 염도 측정은 간장 10 g에 증류수 40 ml을 첨가하여 균질화한 후 원심 분리하여 얻은 상등액을 염도계로 측정하였다. 생균수는 단계별 희석법을 이용하여 효모는 chloramphenicol 함유 YPDA 배지를 사용하였으며, 바실러스는 TSA 배지를 사용하여 검출하였다.

Table 33. Mixing ratio of black garlic extract and Monggo moromi for Ganjang

Material	Concentrations of black garlic extract (%)				
	0	0.5	1	2	4
Black garlic extract	0 mL	15 mL	30 mL	60 mL	120 mL
Monggo moromi	3,000 mL	3,000 mL	3,000 mL	3,000 mL	3,000 mL
Total	3,000 mL	3,015 mL	3,330 mL	3,060 mL	3,120 mL

(다) 유리아미노산 분석

유리아미노산 분석은 된장 분말 0.1 g에 HPLC water 5 ml을 첨가 및 교반한 후 60°C에서 1 시간 가수분해하였다. 그 후 10% salic acid dehydrate 1 ml을 첨가하여 4°C에서 2 h 방치시켜 단백질을 침전시켰다. 그 후 원심분리기 (MF-550, Hanil Science Industrial Co., Ltd, Korea.)를 이용하여 15 분 원심분리하여 상등액만 따로 0.45 μm 필터로 여과하였다. 여과한 용액은 회전진공농축기 (Eyela, NE1S, Japan.)를 이용하여 60°C에서 건조하였으며 lithium loading buffer 2 mL을 첨가한 후 다시 0.45 μm 필터로 여과하였다. 전처리 한 시료는 자동 아미노산 분석기 (L-8900, Hitachi, Co., Ltd, Japan.)를 이용하여 분석하였다.

(2) 기능성 대사체 및 항산화 활성

(가) 총 phenolics 및 isoflavone 함량

총 phenolics 함량은 Folin-Denis (1912)법으로 측정하였다. Isoflavone 분석은 Cho 등 (2011)의 방법에 준하여 HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Co, Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다.

(나) 항산화 활성

DPPH 라디칼 소거활성은 Cho 등 (2013)의 방법에 준하여 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 Hwang 등 (2013)의 방법에 준하여 측정하였다. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) 분석의 경우는 Hwang 등 (2013)의 방법에 준하여 측정하였다. OH 라디칼 소거활성은 Min 등 (2008)의 방법에 준하여 측정하였다. 10 mM FeSO₄·7H₂O-EDTA 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM H₂O₂ 0.2 mL, 희석 시료 1.4 mL를 혼합한 뒤 37°C에서 4 시간 반응시켰다. 혼합액에 1% thiobarbituric acid와 2.8% trichloroacetic acid를 각각 1 mL를 가하여 100°C에서 20 분 가열하고 냉각시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구는 시료 대신 PBS 완충액 (NaCl 8.76 g, NaH₂PO₄ 0.11 g, Na₂HPO₄ 0.596 g)을 사용하였다. OH 라디칼 소거활성 시료용액의 첨가구와 무 첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

다. 콩알 메주 베이스 흑마늘 엑기스 첨가 간장의 특성 분석

(1) 간장 제조

(가) 흑마늘 엑기스 첨가별 간장 제조

콩·소맥 코오지와 청국장은 아래 배합표에 의거하여 제조하였다 (Table 34). 증자한 콩에 복합균주 (EMD17 및 MJ1-4, 9.12 log cfu/ml)를 콩 중량대비 2.5% (w/w)를 접종하고 37°C에서 72 시간 발효하여 생청국장을 제조한 후 55°C에서 2 일간 건조하여 콩알 메주를 제조하였다. 5 liter 유리 발효조에 콩알 메주 200 g과 염농도 18%로 조정된 식염 4 배 (800 ml)를 첨가하고 밀당화액 배지에서 배양한 효모 균주를 5% 접종하여 간장을 제조한 후 20°C에서 120 일간 발효시킨 후 이화학적 특성과 생균수를 측정하였다.

Table 34. Composition of Ganjang using whole soybean Meju and Black garlic extracts.

재료	흑마늘 엑기스 첨가 비율(%)				
	0	0.5	1	2	4
콩·소맥 코오지	0.75 kg	0.75 kg	0.75 kg	0.75 kg	0.75 kg
청국장 코지(건조청국장)	0.25kg	0.25 kg	0.25 kg	0.25 kg	0.25 kg
효모	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g
흑마늘 엑기스	0 g	20 g	40 g	80 g	160 g
15% 염수	4000 ml	3980 ml	3960 ml	3920 ml	3840 ml
합계	101	121.5	142	183	265

(나) 소금 농도별 흑마늘 엑기스 간장 제조

앞서 기술한 바와 같이 콩을 세척 및 수침하고 증자처리를 하였다. 증자한 콩에 복합균주 (EMD17 및 MJ1-4, 9.12 log cfu/ml)를 콩 중량대비 2.5% (w/w)를 접종하고 37°C에서 72 시간 발효하여 생청국장을 제조한 후 55°C에서 2 일간 건조하여 콩알 메주를 제조하였다. 5 liter 유리 발효조에 제조된 콩알 메주 200 g과 흑마늘 엑기스를 첨가하여 소금농도를 최종 12.0, 15.0 및 18.0%로 조정하였다 (Table 35). 이 후 밀당화액 배지에서 배양한 효모 균주를 5% 접종하여 간장을 제조한 후 20°C에서 120 일간 발효시킨 후 이화학적 특성과 생균수를 측정하였다.

Table 35. Composition of Ganjang using whole soybean Meju and Black garlic extracts with different NaCl contents

재료	염수 농도(%)		
	12.0	15.0	18.0
콩.소맥 코오지	0.75 kg	0.75 kg	0.75 kg
청국장 코지(건조청국장)	0.25 kg	0.25 kg	0.25 kg
효모	75 g	75 g	75g
흑마늘 엑기스	60 g	60 g	60g
염수	2940	2940 ml	2940 ml
합계	3,076	3,076	3,076

(다) 균주별 흑마늘 엑기스 간장 제조

이전 연구에서 확립된 흑마늘 엑기스 간장은 *Aspergillus oryzae* 및 *Rhizopus oryzae*. 균주를 이용하여 아래의 배합표에 따라 제조한 후 (Table 36) 20℃에서 150 일간의 발효 과정 중 이화학적 특성과 기능성 대사체를 비교 분석하였다.

Table 36. Composition of Ganjang using whole soybean Meju and Black garlic extracts with different fungus.

재료	콩알 메주 제조 균주 종류	
	<i>Asp. oryzae</i>	<i>Rhi. oryzae</i>
콩.소맥 코오지	0.75 kg	0.75 kg
청국장 코지(건조청국장)	0.25 kg	0.25 kg
효모	75 g	75g
흑마늘 엑기스	60 g	60g
12% 염수	2940 ml	2940 ml
합계	3,076	3,076

(2) 이화학적 특성, 유리아미노산, 기능성 대사체 및 항산화 활성

(가) 이화학적 특성: 상기에 기술된 방법에 준하여 수행하였다.

(나) 유리아미노산 분석: 상기에 기술된 방법에 준하여 수행하였다.

(다) 총 phenolics 및 isoflavone 함량과 Isoflavone 분석은 상기 기술한 방법들에 따랐다.

(라) 항산화 활성

DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) 분석 및 OH 라디칼 소거활성은 상기 기술한 방법에 따랐다.

2-1. 연구결과 (1차 년도)

가. 장류의 이화학적 특성 및 기능성 대사체 (isoflavone과 향기성분) 분석

(1) 장류의 수집 및 이화학적 특성

재래 된장의 pH, 산도 및 염도는 각각 5.37 (CD1)과 6.79 (CD2), 0.12 ml과 0.08 ml 및 10.8%와 11.0% 이었고 몽고 된장 (MGD)의 pH, 산도 및 염도는 각각 5.52, 0.17 ml 및 13.6%로 산도와 염도가 재래 된장보다 높았다 (Table 37). 재래 간장의 pH, 산도 및 염도는 각각 6.30 (CK1)과 5.15 (CK2), 0.48 ml과 1.60 ml 및 17.4%와 20.1% 이었고 몽고 간장 (MGK)의 pH, 산도 및 염도는 각각 4.73, 2.46 ml 및 17.9%로 pH와 산도가 숙성기간이 짧음에도 불구하고 재래 간장보다 높았다.

Table 37. Comparison of pH, titratable acidity, and salinity of doenjang and kanjang.

Soybean fermentation foods	Contents ^{a)}		
	pH	Titratable acidity ^{b)} (ml)	Salinity (%, NaCl)
Conventional doenjang 1 (CD1)	5.37	0.12	10.8
Conventional doenjang 2 (CD2)	6.79	0.08	11.0
Mong-go doenjang (MGD)	5.52	0.17	13.6
Conventional kanjang 1 (CK1)	6.30	0.48	17.4
Conventional kannjang 2 (CK2)	5.15	1.60	20.1
Mong-Go kanjang (MGK)	4.73	2.46	17.9

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

^{b)}Ten gram or milliliter were titrated with 0.1N NaOH to pH 8.2±0.1 for titratable acidity

(2) 장류의 총 phenolics, isoflavones 및 향기성분

(가) 총 phenolics 함량

장류의 총 phenolics 함량을 측정한 결과를 Fig. 58에 나타내었다. 된장은 재래식 된장 CD2가 총 phenolics 함량이 가장 높았고, 간장은 재래식 간장인 KD2가 가장 높았다.

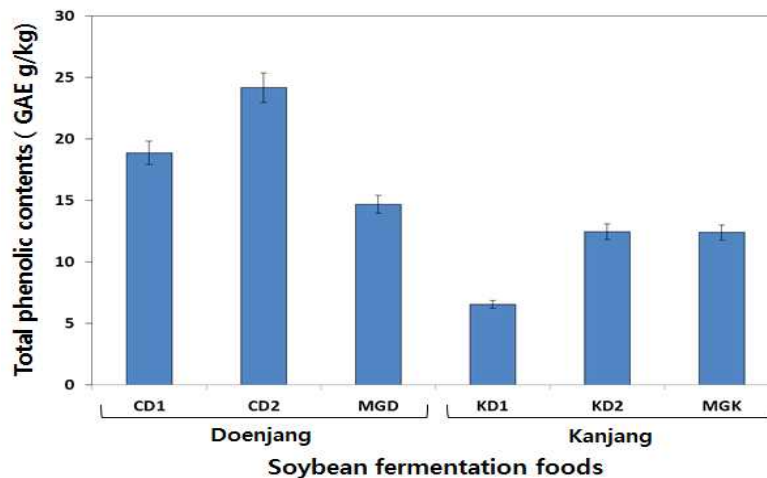


Fig 58. Comparison of total phenolic contents of soybean fermentation foods.

(나) Isoflavone 함량

재래 및 몽고 된장/간장 isoflavone 분석 결과는 Fig. 59 및 Table 38와 같다. 된장에서는 isoflavone이 검출되었으나, 간장에서는 isoflavone이 검출되지 않았다. 재래 된장1 (CD1)에서는 aglycones인 daidzein, glycitein 및 genistein 3 종이 검출되었고 재래 된장2 (CD2)에서는 glycoside 인 daidzin과 aglycones인 daidzein, glycitein 및 genistein 3 종이 검출되었다. 몽고 된장에서는 glycosides 3 종, malonylglycosides 3 종, acetylglycosides 2 종 및 aglycones 3 종 총 11 종이 검출되었다. 총 isoflavone 함량은 몽고 된장이 가장 높았으나, aglycones 함량은 가장 낮게 나타났다. 콩 발효식품의 경우 발효 중 미생물이 생성하는 산이나 β-glucosidase 활성에 의해 배당체 화합물이 비배당체인 aglycones로 전환되고 총 isoflavone 함량은 감소하는 것으로 보고되고 있다(Cho et al., 2009; Cho et al., 2011).

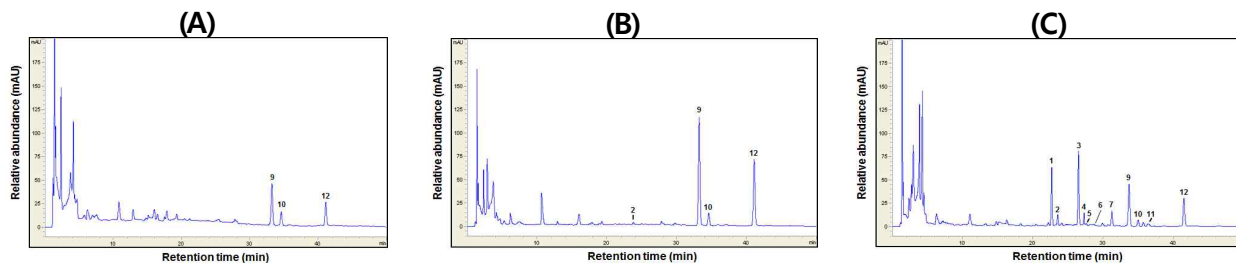


Fig 59. Typical HPLC chromatograms of isoflavones. (A) HPLC chromatogram of isoflavone extract in conventional doenjang 1 (CD1); (B) HPLC chromatogram of isoflavone extract in conventional doenjang 2 (CD2); (C) HPLC chromatogram of isoflavone extract in Mong-Go doenjang 2 (MGD). 1, Daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, glycitein; 11, acetylgenistin; 12, genistein.

Table 38. Comparison of 12 isoflavone contents of doenjang and kanjang.

Isoflavone contents ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	Soybean fermentation foods					
	CD1	CD2	MGD	KD1	KD2	MGK
Glycosides						
Daidzin	nd ^{b)}	tr ^{c)}	184.5	nd	nd	nd
Glycitin	nd	37.5	104.0	nd	nd	nd
Genistin	nd	nd	163.8	nd	nd	nd
Malonylglycosides						
Daidzin	nd	nd	38.9	nd	nd	nd
Glycitin	nd	nd	24.9	nd	nd	nd
Genistin	nd	nd	70.6	nd	nd	nd
Acetylglycosides						
Daidzin	nd	nd	2.9	nd	nd	nd
Glycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Genistin	nd	nd	14.6	nd	nd	nd
Aglycones						
Daidzein	116.2	275.6	108.4	nd	nd	nd
Glycitein	59.5	45.8	25.3	nd	nd	nd
Genistein	42.0	118.7	49.1	nd	nd	nd

^{a)}Data are presented as the mean \pm SD of triplicated determinations.

^{b)}nd, not detected

^{c)}tr, trace < 0.002 $\mu\text{g/g}$

(다) 장류의 향기성분 분포

간장 및 된장 샘플의 크로마토그램을 아래 Fig. 60에 나타내었다. 재래 및 몽고 된장의 휘발성 향기성분 분석 결과는 Tables 39-41과 같다. 재래 된장 1 (CD1)은 80 종의 휘발성 향기성분이 검출되었고 주요 휘발성 향기성분은 2-methylpropanal, acetic acid, ethylester, 3-methyl-butanol 및 2-methyl-butanol 이었고 재래 된장 2 (CD2)는 82 종의 휘발성 향기성분이 검출되었고 주요 성분은 ethanol, 2-methylpropanal, acetic acid, ethylester, 3-methyl-butanol 및 2-methyl-butanol 이다. 한편 몽고 된장 (MGD)에서는 63 종 휘발성 향기성분이 검출되었고 주요 성분은 diethoxy-ethane, pentanoic acid, 3-methyl-4-oxo- 및 3-methyl-butanol 이었다. 재래식 및 공장식 된장 공동으로 검출된 주요 휘발성 향기성분은 3-methyl-butanol 이고, 재래식 된장에서 주요 성분으로 검출된 acetic acid, ethylester는 공장식 된장에서는 소량만 검출되었다.

재래 및 몽고 간장의 휘발성 향기성분 분석 결과는 Tables 42-44와 같다. 재래 간장 1 (CK1)은 65 종

의 휘발성 향기성분이 검출되었고 주요 성분은 ethanol 및 2-propanone 이고 다른 장류보다 향기성분의 종류와 함량이 낮았다. 재래 간장 2 (CK2)는 106 종이 검출되었고 주요 성분은 1,1-diethoxy-ethane, 2-propanone, 2-methyl-propanal, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-butanal, 3-methyl-1-butanol 및 2-methyl-1-butanol 이었다 (Table 8). 한편 몽고 간장 (MGK)에서는 112 종이 검출되었고 주요 성분은 2-methyl-propanal, 1,1,1-triethoxy-ethane, 1,1,1-triethoxy-ethane, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-butanal, 2-methyl-butanal, n-butanol, n-butanol, acetic acid 및 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol 이었다. 재래 간장 2 (CK2) 및 몽고 간장 (MGK) 공통으로 검출된 주요 휘발성 향기성분은 2-methyl-propanal, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-butanal 및 2-methyl-1-butanol 이고 재래 간장 1 (CK1)을 제외하고는 공통으로 확인된 휘발성 향기성분은 3-methyl-butanol 이었다. 그러나 6 종류 장류의 휘발성 향기성분 종류와 함량은 상당한 차이가 있는 것으로 판단되었다. 이는 장류의 제조 방식, 발효 방식, 숙성 방식 및 품종과 장류에 관여하는 미생물이 상이하기 때문에 휘발성 향기성분의 종류와 함량이 차이 나는 것으로 판단되었다.

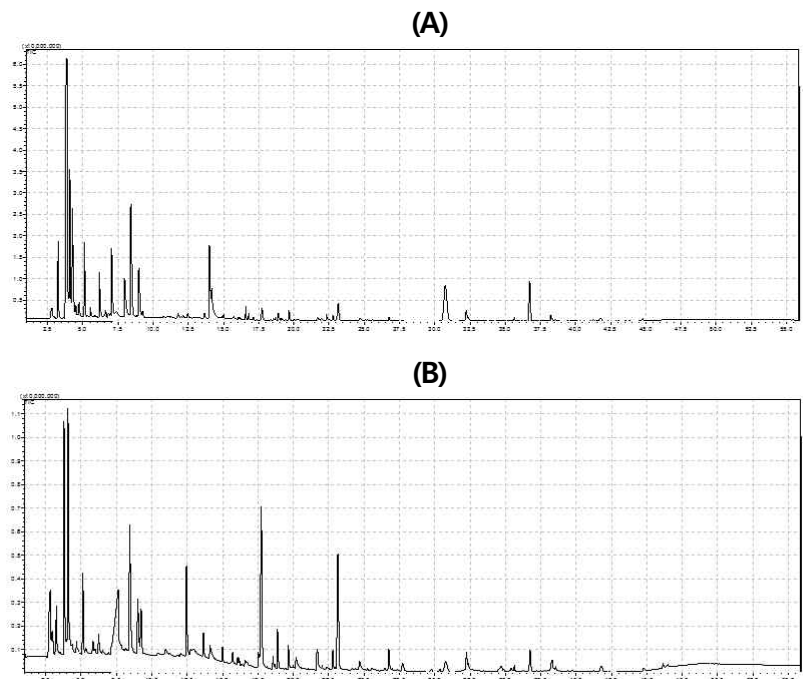


Fig. 60. Typical GC-MS chromatograms of volatile compounds. (A) GC-MS chromatogram of volatile compounds in Mong-Go doenjang (MGD); GC-MS chromatogram of volatile compounds in Mong-Go kanjang (MGK).

Table 39. Distribution of volatile compounds in conventional doenjang 1 (CD1).

No.	Compound	RT ⁽¹⁾	RI ⁽²⁾	Area/10 ⁶
1	Sulfurdioxide	3.03	<500	1.0
2	Acetaldehyde	3.24	<500	68.8
3	Diethoxy-ethane	3.83	<500	331.2
4	2-Propanone	4.06	<500	135.7
5	Pentane	4.19	500	-
6	2-Methyl-butane	4.23	502	51.8
7	Formic acid, 1-methylethyl ester	4.25	503	117.8

8	2-Propanol	4.30	506	15.7
9	2-Pentene	4.36	509	1.3
10	Dimethylsulfide	4.49	516	6.9
11	Aceticacid,methylester	4.73	528	8.2
12	1,3-Pentadiene	4.75	528	0.3
13	2-Methylpropanal	5.12	545	49.7
14	2-Methylpropenal	5.44	559	8.4
15	1-Propanol	5.56	564	4.5
16	2,3-Butanedione	5.85	576	1.4
17	Butanal	5.96	580	0.7
18	3-Buten-2-one	5.97	580	1.0
19	2-Butanone	6.18	588	32.9
20	n-Hexane	6.51	600	1.9
21	2-Methyl-furan	6.61	603	8.5
22	2-Butanol	6.78	607	6.6
23	2-Methyl-1,3-dioxacyclohept-5-ene	6.84	608	2.5
24	3-Methyl-furan	6.95	611	5.3
25	Aceticacid,ethylester	7.05	613	58.3
26	2-Methyl-1-propanol	8.00	634	26.0
27	3-Methyl-butanal	8.42	643	125.1
28	2-Methyl-butanal	8.99	654	60.5
29	Benzene	9.23	658	15.3
30	2-Methyl-2-butenal	9.47	663	3.8
31	Thiophene	9.55	664	0.3
32	Aceticacid,1-methylethylester	9.79	668	0.2
33	2,3-Dihydro-furan	9.95	671	0.1
34	3-Methyl-3-buten-2-one	10.00	672	0.1
35	2-Pentanone	10.75	684	1.9
36	n-Pentanal	11.01	688	1.4
37	1,5-Hexadien-3-ol	11.17	690	0.5
38	3-Pentanone	11.26	692	1.7
39	2-Ethyl-furan	11.77	699	6.2
40	Heptane	11.84	700	-
41	3-Hydroxy-2-butanone	11.98	703	1.4
42	2-Methyl-1,5-heptadiene	12.12	707	3.5
43	2,5-Dimethylfuran	12.14	707	1.6
44	3-Methyl-butanenitrile	12.43	714	3.0
45	2,3-Dihydro-furan	12.74	722	0.1
46	3-Methylpyridazine	13.01	728	0.4
47	Phenol	13.02	728	0.7
48	2-Isobutyl-4,4-dimethyl-1,3-dioxane	13.23	733	0.1
49	3-Ethyl-2-pentene	13.32	735	0.2
50	2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolane	13.52	739	0.2
51	Dimethyldisulfide	13.65	742	5.2
52	3-Methyl-3-buten-1-ol	13.89	748	0.3
53	3-Methyl-1-butanol	14.03	750	26.3
54	2-Methyl-1-butanol	14.17	753	19.7
55	Propanoicacid,2-methyl-,ethylester	14.88	768	0.6
56	Benzene, methyl-	15.00	770	1.0
57	3-Methyl-thiophene	15.13	773	0.2
58	Acetic acid, 2-methylpropyl ester	15.47	780	0.6
59	4,4-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one	15.57	781	0.8
60	Butanoic acid, 3-methyl-, methyl ester	15.59	782	0.5

61	2-Methyl-propanoic acid	15.72	784	3.6
62	2-Hexanone	16.06	791	1.9
63	n-Hexanal	16.07	791	1.5
64	1-Octene	16.18	793	1.7
65	Octane	16.57	800	9.6
66	2-Octene	16.78	807	4.9
67	2,4-Octadiene	17.04	814	0.9
68	4-Octene	17.12	817	2.7
69	3,5-Octadiene	17.34	823	1.0
70	1,3-Octadiene	17.38	825	1.4
71	3-Methyl-butanoicacid	18.59	859	1.5
72	2-Methyl-butanoicacid	18.92	868	1.7
73	1-Butanol,3-methyl-,acetate	19.12	874	0.9
74	1,3,5,7-Cyclooctatetraene	19.67	889	1.3
75	Nonane	20.11	900	-
76	Benzaldehyde	21.72	941	1.9
77	5-Methyl-3-heptanone	22.35	956	4.1
78	(1-Methylethenyl)-benzene	22.55	961	1.0
79	2-Pentyl-furan	22.77	966	2.8
80	Decane	24.30	1000	-
¹ Retention Time (min)				
² Retention Index				

Table 40. Distribution of volatile compounds in conventional doenjang 2 (CD2).

No.	Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Area/10 ⁶
1	Sulfur dioxide	3.06	<500	1.7
2	Acetaldehyde	3.27	<500	12.6
3	Methanol	3.33	<500	3.6
4	Methanethiol	3.47	<500	0.6
5	Ethanol	3.80	<500	160.4
6	Acetonitrile	4.00	<500	6.7
7	2-Propanone	4.07	<500	93.0
8	Pentane	4.19	500	-
9	2-Propanol	4.28	505	46.2
10	Aceticacid,methylester	4.76	528	1.8
11	2-Methyl-propanal	5.14	546	44.8
12	Methanesulfonicanhydride	5.32	553	0.6
13	1-Propanol	5.57	564	2.6
14	2,3-Butanedione	5.86	575	8.5
15	2-Butanone	6.21	588	11.7
16	n-Hexane	6.56	600	1.1
17	2-Methyl-furan	6.64	602	1.5
18	2-Butanol	6.81	606	2.2
19	Aceticacid,ethylester	7.09	613	5.3
20	2-Methyl-1-propanol	8.03	634	27.5
21	3-Methyl-butanal	8.43	642	97.1
22	2-Methyl-butanal	8.99	653	61.1
23	Benzene	9.27	659	4.4
24	2-Pentanone	10.72	683	0.9
25	2,3-Pentanedione	10.90	686	0.8
26	Propanoicacid,2-methyl-,methylester	11.09	689	3.2
27	3-Pentanone	11.26	691	0.3
28	1-Methoxy-3-methyl-butane	11.49	695	1.6

29	2-Ethyl-furan	11.74	699	0.4
30	Heptane	11.84	700	-
31	3-Hydroxy-2-butanone	11.92	702	1.4
32	3-Methyl-1,5-heptadiene	12.11	707	3.0
33	2-Methyl-propane	12.38	713	5.3
34	Propanoicacid	13.06	730	3.8
35	Disulfide,dimethyl	13.64	743	41.5
36	3-Methyl-1-butanol	13.98	750	53.9
37	2-Methyl-1-butanol	14.14	754	28.6
38	Propanoicacid,2-methyl-,ethylester	14.85	769	3.6
39	Benzene, methyl-	15.00	772	0.7
40	2-Nitro-tertiary-butanol	15.44	780	0.3
41	Butanoicacid,3-methyl-,methylester	15.55	782	4.7
42	Butanoicacid,2-methyl-,methylester	15.65	784	3.8
43	n-Hexanal	16.05	792	10.0
44	Octane	16.48	800	-
45	2-Methyl-propanoicacid	16.50	800	63.7
46	2,4-Dimethyl-hexane	16.57	803	1.6
47	2-Octene	16.77	809	0.5
48	Butanoic acid	16.87	812	0.5
49	Propanoicacid,2-hydroxy-,ethylester	17.03	816	1.3
50	4-Octene	17.12	819	0.3
51	2,2-Dimethyl-propane	17.21	822	0.1
52	3-Methyl-butanenitrile	17.29	824	0.4
53	Acetylvaleryl	17.50	830	1.7
54	2,2,4,6,6-Pentamethyl-3,5-heptanedione	17.55	832	0.3
55	4-Methyl-3-hexanone	17.82	839	1.3
56	2-Butenoic acid, ethyl ester	17.95	843	0.2
57	Butanoicacid,3-methyl-,ethylester	18.35	854	33.0
58	1-Propene,3,3'-thiobis-	18.48	858	0.7
59	3-Methyl-butanoicacid	19.32	880	144.5
60	2-Methyl-butanoicacid	19.75	891	151.1
61	Nonane	20.11	900	-
62	Methylallyldisulfide	20.29	905	2.7
63	2,6-Dimethyl-pyrazine	20.34	906	3.1
64	4,4-Dimethyl-2-pentanol	21.10	925	0.4
65	Benzaldehyde	21.64	939	1.7
66	Dimethyltrisulfide	22.02	948	6.2
67	1-Octen-3-ol	22.31	955	5.4
68	2-Octanone	22.44	958	0.8
69	2-Pentyl-furan	22.75	965	1.2
70	Butanoicacid,3-methyl-,2-methylpropylester	23.05	972	1.4
71	Trimethyl-pyrazine	23.23	976	2.7
72	Butanoicacid,3-methylbutylester	23.44	981	0.4
73	dl-Limonene	24.29	1000	0.1
74	Decane	24.30	1000	-
75	Diallyldisulfide	26.08	1046	8.7
76	2-Nonanone	26.32	1052	0.4
77	Tetramethyl-pyrazine	26.55	1058	0.3
78	isopentyl2-methylbutanoate	26.83	1065	1.2
79	Butanoicacid,3-methyl-,3-methylbutylester	26.96	1068	0.5
80	Butanoicacid,2-methyl-,2-methylbutylester	27.08	1071	0.5
81	Undecane	28.30	1100	-

82	Dodecane	32.39	1200	0.6
----	----------	-------	------	-----

¹⁾ Retention Time (min)

²⁾ Retention Index

Table 41. Distribution of volatile compounds in Mong-Go doenjang (MGD).

No.	Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Area/10 ⁶
1	Sulfur dioxide	3.05	<500	2.6
2	Acetaldehyde	3.26	<500	35.7
3	Diethoxy-ethane	4.13	<500	1336.0
4	Pentane	4.19	500	-
5	2-Propanol	4.44	513	13.7
6	Formicacid,ethylester	4.51	516	1.0
7	Aceticacid,methylester	4.78	529	24.4
8	2-Methyl-propanal	5.21	548	10.5
9	3-Cyclopropyl-1-butyne	5.47	559	0.3
10	1-Propanol	5.63	565	22.3
11	2,3-Butanedione	5.90	576	6.4
12	2-Butanone	6.29	590	4.9
13	n-Hexane	6.58	600	0.4
14	Pentanoic acid, 3-methyl-4-oxo-	7.09	613	263.2
15	2-Methyl-1-propanol	8.12	636	10.7
16	2-Butenal	8.33	640	0.8
17	3-Methyl-butanal	8.52	644	33.4
18	2-Methyl-butanal	9.09	655	13.7
19	Benzene	9.30	659	4.6
20	Thiofuran	9.63	665	0.4
21	n-Butanol	10.45	679	1.7
22	2-Pentanone	10.82	685	0.4
23	n-Pentanal	11.07	689	0.8
24	Propanoicacid,2-methyl-,methylester	11.17	690	2.1
25	3-Pentanone	11.33	693	0.5
26	2-Ethyl-furan	11.83	700	1.6
27	Heptane	11.84	700	-
28	3-Hydroxy-2-butanone	12.00	704	1.6
29	Propanoicacid,ethylester	12.48	716	9.5
30	Aceticacid,propylester	12.70	721	0.6
31	Propanoicacid	13.13	731	0.5
32	Dimethyl disulfide	13.71	744	0.7
33	1,1-Diethoxy-ethane	13.85	747	0.8
34	3-Methyl-1-butanol	14.05	752	47.6
35	2-Methyl-1-butanol	14.21	755	30.1
36	Propanoicacid,2-methyl-,ethylester	14.88	769	34.9
37	Butanoic acid, 3-methyl-, methyl ester	15.61	784	1.4
38	2-Methyl-propanoicacid	16.02	791	11.0
39	n-Hexanal	16.11	793	0.7
40	Octane	16.48	800	-
41	Butanoic acid, ethyl ester	16.51	801	3.2
42	Acetic acid, butyl ester	17.02	816	0.1
43	Propanoicacid,2-hydroxy-,ethylester	17.10	819	5.8
44	2-Butenoic acid, ethyl ester	18.02	845	0.2
45	Butanoicacid,3-methyl-,ethylester	18.36	854	22.9
46	3-Methyl-butanoicacid	18.78	866	15.7
47	2-Methyl-butanoicacid	19.15	875	10.5

48	1-Butanol,2-methyl-,acetate	19.26	878	0.9
49	Ethenyl-benzene	19.72	890	0.5
50	Pentanoicacid,ethylester	19.87	894	0.2
51	1,3-Oxathiane	19.98	897	0.3
52	Nonane	20.11	900	-
53	Methylallyldisulfide	20.36	907	0.8
54	2,5-Dimethyl-pyrazine	20.47	909	0.6
55	Ethyltiglate	21.06	924	0.1
56	Pentanoicacid,4-methyl-,ethylester	21.78	942	2.1
57	Benzaldehyde	21.79	942	2.2
58	Dimethyl trisulfide	22.09	950	0.2
59	Hexanoicacid,ethylester	22.85	967	1.8
60	Trimethyl-pyrazine	23.38	980	0.8
61	Decane	24.30	1000	-
62	Diallyldisulfide	26.23	1050	2.2
63	Undecane	28.30	1100	-

¹⁾ Retention Time (min)

²⁾ Retention Index

Table 42. Distribution of volatile compounds in conventional kanjang 1 (CK1).

No.	Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Area/10 ⁶
1	1,3,5-Trioxane	2.96	<500	5.0
2	Sulfur dioxide	3.03	<500	1.8
3	Acetaldehyde	3.25	<500	7.8
4	Methanethiol	3.52	<500	0.5
5	Ethanol	3.79	<500	41.8
6	2-Propenal	3.99	<500	2.2
7	2-Propanone	4.07	<500	44.9
8	Pentane	4.19	500	-
9	Ethylether	4.37	510	0.3
10	Aceticacid,methylester	4.77	529	0.8
11	2-Methyl-propanal	5.12	545	15.0
12	1-Propanol	5.63	567	0.1
13	2,3-Butanedione	5.84	575	2.5
14	Butanal	5.98	580	0.9
15	Cyclobutane	6.18	588	0.1
16	2-Butanone	6.24	590	3.6
17	Hexane	6.52	600	0.7
18	2-Methyl-furan	6.62	603	0.4
19	Aceticacid,ethylester	7.14	615	0.7
20	2-Methyl-1-propanol	8.12	637	0.3
21	3-Methylbutanal	8.40	642	32.1
22	Dihydro-2,5-furandione	8.44	643	30.0
23	2-Methylbutanal	9.01	654	14.1
24	Benzene	9.24	658	11.5
25	n-Butanol	10.46	679	1.0
26	2-Pentanone	10.81	685	0.1
27	2,3-Pentadione	10.92	686	0.2
28	1-Methoxy-2-propanol	10.97	687	3.0
29	2-Methoxyethanol	11.03	688	1.1
30	1-Heptene	11.26	691	0.7
31	2,2-Dimethyl-Hexane	11.27	692	0.1
32	2-Ethyl-furan	11.79	699	0.1

33	n-Heptane	11.85	700	0.4
34	3-Hydroxy-2-butanone	12.08	706	0.6
35	2-Propenoic acid, 2-methyl-, methyl ester	12.47	715	9.4
36	Propanoic acid	12.93	726	4.4
37	Disulfide,dimethyl	13.65	743	3.4
38	3-Methyl-1-butanol	14.12	753	4.1
39	Methyl-benzene	15.00	771	2.2
40	1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)-ethanone	15.29	777	0.2
41	2-Methyl-propanoic acid	15.69	785	1.9
42	n-Hexanal	16.06	792	1.1
43	Octane	16.48	800	-
44	Butanoic acid	16.68	806	2.0
45	Furfural	17.53	832	3.6
46	3-Methyl-butanoicacid	18.57	862	2.5
47	Ethylbenzene	18.69	865	0.9
48	1-Methoxy-2-propylacetate	18.88	870	6.7
49	Dihydro-2(3H)-furanone	19.81	895	0.9
50	Nonane	20.00	900	0.6
51	Methoxy, phenyl-, oxime	20.20	905	3.8
52	Benzaldehyde	21.69	942	6.0
53	Dimethyltrisulfide	22.04	950	0.9
54	1-Octen-3-ol	22.35	957	0.9
55	Octanal	22.79	967	2.4
56	Decane	24.30	1000	-
57	2-Hydroxy-benzaldehyde	24.69	1010	3.1
58	Nonanal	26.76	1063	3.7
59	Undecane	28.30	1100	-
60	Decanal	32.25	1197	4.0
61	Dodacane	32.38	1200	2.5
62	Tridecane	35.63	1300	1.2
63	1-Tridecene	38.00	1389	0.4
64	2,7,10-Trimethyl-dodecane	38.24	1398	1.8
65	Tetradecane	38.30	1400	-

¹⁾ Retention Time (min)

²⁾ Retention Index

Table 43. Distribution of volatile compounds in conventional kanjang 2 (CK2).

No.	Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Area/10 ⁶
1	Sulfur dioxide	3.06	<500	4.6
2	Acetaldehyde	3.27	<500	34.5
3	1,1-Diethoxy-ethane	3.90	<500	454.8
4	Acetonitrile	4.00	<500	12.4
5	2-Propanone	4.10	<500	92.1
6	Pentane	4.19	500	-
7	2-Propanol	4.32	507	8.9
8	Ethylether	4.39	510	21.6
9	Dimethyl sulfide	4.52	517	0.9
10	2-Hydroxy-2-methyl-propanoic acid, ethyl ester	4.75	528	0.9
11	Aceticacid,methylester	4.77	529	10.3
12	2-Methyl-propanal	5.15	546	64.9
13	1-Propanol	5.56	563	10.2
14	2,3-Butanedione	5.88	576	3.1
15	1,1-Dimethyl-cyclopropane	6.00	580	0.7

16	2-Butanone	6.20	587	27.1
17	n-Hexane	6.56	600	13.2
18	2-Butanol	6.82	607	2.3
19	4-Hydroxy-2-butanone	7.07	613	40.4
20	Ammonium acetate	7.50	623	3.1
21	2-Methyl-1-propanol	8.00	634	117.2
22	3-Methyl-butanal	8.45	643	144.8
23	2-Methyl-butanal	9.00	654	80.0
24	Benzene	9.30	659	4.7
25	Cyclohexane	9.43	661	0.1
26	2,3-Dihydro-4-methyl-furan	9.53	663	0.7
27	2-Methyl-propanal	10.14	674	0.1
28	3,3,4-Trimethyl-heptane	10.44	679	0.2
29	n-Butanol	10.49	679	0.6
30	2-Pentanone	10.75	684	0.5
31	2,3-Pentanedione	10.93	686	0.5
32	2-Pentanamine	10.96	687	0.2
33	2-Pentanol	11.14	690	0.1
34	3-Pentanone	11.29	692	0.2
35	n-Heptane	11.84	700	0.2
36	3-Hydroxy-2-butanone	11.95	703	3.4
37	2,5-Dimethyl-furan	12.15	708	1.2
38	Propanoic acid, ethyl ester	12.48	716	0.6
39	Dimethadione	12.72	722	0.4
40	Propanoicacid	13.20	733	0.8
41	2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolane	13.50	740	0.7
42	Disulfide,dimethyl	13.67	743	3.8
43	3-Methyl-1-butanol	14.03	751	197.3
44	2-Methyl-1-butanol	14.16	754	159.8
45	2,3-Dimethyl-pentane	14.92	770	1.6
46	Methyl-benzene	15.01	772	3.8
47	Aceticacid,butylester	15.45	780	0.6
48	2-Methyl-propanoicacid	15.81	787	5.4
49	n-Hexanal	16.01	791	1.8
50	Octane	16.48	800	-
51	2,4-Dimethyl-hexane	16.54	802	0.3
52	4-Methyl-4-penten-2-one	16.79	809	3.6
53	Acetic acid, butyl ester	16.93	814	0.1
54	Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	17.05	817	5.2
55	2,2-Dimethyl-propanoicacid	17.51	830	6.7
56	2-methylpyrazine	17.52	831	0.2
57	4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone	17.96	843	2.7
58	4-Methyl-1-pentanol	18.04	845	0.2
59	2,4-Dimethyl-1-heptene	18.15	848	0.1
60	Butanoicacid,2-methyl-,ethylester	18.34	854	0.3
61	Butanoicacid,3-methyl-,ethylester	18.38	855	0.4
62	3-Methyl-butanoicacid	18.67	863	7.5
63	1-Methoxy-2-propyl acetate	18.93	870	1.3
64	2-Methyl-butanoic acid	19.00	871	4.8
65	1-Butanol,3-methyl-,acetate	19.11	874	1.7
66	1-Butanol,2-methyl-,acetate	19.21	877	1.0
67	3-(Methylthio)-propanal	19.59	887	0.6
68	Heptanal	19.61	887	1.0
69	1,2-Dimethyl-benzene	19.74	891	0.5

70	4-Methyl-2-hexanol	20.00	897	0.4
71	Acetic acid, cyclohexylester	20.01	897	0.9
72	Nonane	20.11	900	-
73	2,6-Dimethyl-pyrazine	20.34	906	0.6
74	3-Acetoxy-1-oxacyclooctane	21.01	923	0.3
75	2-Decanone	21.31	931	0.4
76	Benzaldehyde	21.61	938	2.6
77	2,6-Dimethyl-3-heptanol	21.79	942	15.9
78	Dimethyl trisulfide	22.04	948	1.4
79	Acetic acid, (3-Methoxy-2-butyl) ester	22.25	953	2.1
80	6-Methyl-5-hepten-2-one	22.30	955	1.5
81	1-Octen-3-ol(CAS)Oct-1-en-3-ol	22.42	957	1.9
82	Octanal	22.79	966	1.5
83	1,2,3-Trimethyl-benzene	22.89	968	0.5
84	2-Hexen-1-ol, propanoate, (E)-	22.98	970	0.7
85	3,5-Dimethyl-octane	23.00	971	0.5
86	1,3-Dimethoxy-2,3-dimethylbutane	23.55	983	0.1
87	2,2,4,6,6-Pentamethyl-heptane	24.17	997	0.5
88	Acetic acid, 3-methoxy-2-butyl ester	24.28	1000	2.5
89	Decane	24.30	1000	-
90	Benzeneacetaldehyde	24.32	1001	0.8
91	2-Nonenol	25.16	1023	0.5
92	2,2,6-Trimethyl-decane,	25.62	1035	0.8
93	2,2,3,4,6,6-Hexamethyl-heptane	25.78	1039	1.6
94	2,6-Dimethyl-3-heptanol	26.14	1048	1.1
95	3,3,7-Trimethyl-decane	26.47	1056	0.6
96	n-Nonanal	26.66	1061	5.4
97	2,4,6-Trimethyl-octane	26.92	1067	0.3
98	Undecane	28.30	1100	-
99	trans-2-Undecen-1-ol	30.23	1150	1.1
100	n-Decanal	32.15	1196	8.7
101	Dodecane	32.31	1200	1.1
102	Benzoic acid, 2-hydroxy-, methylester	32.47	1205	0.4
103	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	35.30	1286	0.3
104	1-(Ethenyloxy)-octadecane	35.58	1294	0.5
105	Tridecane	35.80	1300	-
106	Tetradecane	38.17	1400	1.4

¹⁾ Retention Time (min)

²⁾ Retention Index

Table 44. Distribution of volatile compounds in Mong-Go kanjang (MGK).

No.	Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Area/10 ⁶
1	Sulfur dioxide	3.05	<500	4.9
2	Acetaldehyde	3.26	<500	15.9
3	Methanol	3.38	<500	0.6
4	Methanethiol	3.48	<500	0.2
5	Pentane	4.19	500	-
6	Formic acid, ethylester	4.51	516	4.5
7	2-Propanol	4.64	523	8.1
8	2-(1-Methylethoxy)-ethanol	4.79	530	17.4
9	Acetic acid, methyl ester	4.81	531	12.2
10	2-Methyl-propanal	5.23	549	65.5
11	2-Methyl-2-propanal	5.51	561	0.6

12	2-Ethyl-hexanal	5.64	566	0.3
13	1-Propanol	5.87	575	44.3
14	2,3-Butanedione	5.92	577	18.1
15	2-Butanone	6.32	592	43.2
16	n-Hexane	6.56	600	21.2
17	3-Methyl-furan	6.65	602	0.8
18	1,1,1-Triethoxy-ethane	7.21	616	510.7
19	2-Methyl-1-propanol	8.47	643	663.9
20	3-Methyl-butanal	8.58	645	275.3
21	2-Methyl-butanal	9.15	656	175.5
22	n-Butanol	10.48	679	68.4
23	2-Pentanone	10.87	686	6.2
24	2,3-Pentanedione	11.02	688	1.5
25	3-Pentanone	11.37	693	0.9
26	Acetic acid, ethyl ester	11.83	700	0.8
27	Heptane	11.84	700	-
28	Acetic acid	12.20	709	130.5
29	2,5-Dimethyl-furan	12.21	709	0.3
30	3-Hydroxy-2-butanone	12.35	713	10.8
31	Propanoicacid,ethylester	12.52	717	22.0
32	Aceticacid,propylester	12.73	722	2.1
33	2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolane	13.53	740	57.4
34	Disulfide, dimethyl	13.71	744	7.6
35	2-Methyl-2-butenal	13.80	746	2.0
36	2-Hexanol	13.87	748	6.9
37	1,1-Diethoxy-ethane	13.90	749	4.3
38	3-Methyl-1-butanol	14.39	759	685.7
39	2-Methyl-1-butanol	14.46	760	202.7
40	Propanoicacid,2-methyl-,ethylester	14.94	770	37.5
41	Aceticacid,2-methylpropylester	15.52	782	19.0
42	4-Buthoxy-1-butanol	15.74	786	5.8
43	Cyclopentanone	15.77	787	0.8
44	2-Methyl-propanoic acid	16.06	792	7.7
45	n-Hexanal	16.15	794	3.1
46	Propanoicacid,2-oxo-,ethylester	16.39	798	0.9
47	Octane	16.48	800	-
48	Butanoic acid, ethyl ester	16.55	802	4.4
49	2-Hydroxy-propanoic acid, 2-methylpropyl ester	16.77	809	0.2
50	3-Methoxy-pentane	16.84	811	0.2
51	Acetic acid, butyl ester	17.05	817	2.3
52	Propanoicacid,2-hydroxy-,ethylester	17.15	820	80.1
53	Furfural	17.57	832	9.3
54	2-Butenoic acid, ethyl ester	18.04	845	1.6
55	Butanoicacid,2-methyl-,ethylester	18.39	855	38.9
56	Butanoicacid,3-methyl-,ethylester	18.44	856	28.2
57	3-Methyl-butanoicacid	18.80	866	4.4
58	4-Heptanone	18.93	870	1.5
59	1,2-Dimethyl-benzene	19.02	872	1.3
60	2-Methyl-butanoic acid	19.08	874	2.1
61	1-Butanol,3-methyl-,acetate	19.16	876	34.2
62	1-Butanol,2-methyl-,acetate	19.27	879	22.6
63	2-Heptanone	19.48	884	0.4
64	3-(Methylthio)-propanal	19.65	888	3.5
65	Styrene	19.71	890	12.5

66	Pentanoicacid,ethylester	19.88	894	1.0
67	Furan,2,2'-[oxybis(methylene)]bis-	19.98	897	1.8
68	5-Methyl-1-heptene	19.99	897	1.8
69	2,5-Dimethyl-nonane	20.06	899	0.1
70	Nonane	20.11	900	-
71	Aceticacid,pentylester	20.28	904	0.1
72	Propanoicacid,2-methyl-,2-methylpropylester	20.37	907	0.6
73	1,3,3,4-Tetramethyl-2-oxabicyclo[2.2.0]hexane	20.54	911	0.7
74	3-Methyl-4-heptanone	20.72	916	0.2
75	Ethyl tiglate	21.06	924	2.3
76	3-Hydroxy mandelic acid, ethyl ester, di-TMS	21.07	925	2.7
77	8-Oxabicyclo[5.1.0]octane	21.36	932	0.2
78	1,1-Diethoxy-3-methyl-butane	21.54	936	0.2
79	Benzaldehyde	21.73	941	19.0
80	2-Pentanol,propanoate	21.93	946	0.8
81	Dimethyltrisulfide	22.11	950	1.8
82	2-Pentadecyl-1,3-dioxepane	22.21	952	1.6
83	2-Furanmethanol, acetate	22.71	964	0.4
84	Hexanoicacid,ethylester	22.85	967	5.6
85	Propanoic acid, 2-methyl-, pentyl ester	23.37	979	0.6
86	Butanoicacid,3-methylbutylester	23.54	983	0.4
87	2,5,6-Trimethyl-octane	24.16	997	0.3
88	Decane	24.30	1000	-
89	Benzeneacetaldehyde	24.57	1007	6.6
90	Sulfurous acid, butyl nonyl ester	24.83	1014	0.7
91	2-(2-Bromoethyl)cyclohexanone	25.20	1024	0.3
92	4d-methyl hexanoic acid ethyl ester	25.54	1033	0.7
93	3-Methyl-butanoic acid	25.55	1033	0.4
94	1-Phenyl-ethanone	25.65	1035	3.0
95	Heptanoicacid,ethylester	26.67	1061	0.4
96	n-Nonanal	26.93	1067	1.3
97	Butanoicacid,3-methyl-,3-methylbutylester	27.11	1072	0.7
98	Pentanoicacid,2-pentylester	27.29	1076	0.8
99	Undecane	28.30	1100	-
100	Benzoicacid,ethylester	31.21	1171	8.8
101	Ethylcis-4-octenoate	32.07	1191	1.4
102	Octanoicacid,ethylester	32.10	1191	1.3
103	2,2-Dimethyl-cyclohexanol	32.38	1198	1.2
104	n-Dodecane	32.49	1200	1.2
105	Benzo[b]thiophene	32.69	1206	0.2
106	Cyclohexane,isothiocyanato-	33.56	1233	0.3
107	Benzothiazole	33.78	1240	0.8
108	Benzeneacetic acid, ethyl ester	34.17	1252	4.5
109	1,3-bis(1,1-Dimethylethyl)-benzene	34.68	1267	0.3
110	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	35.60	1294	2.7
111	2,3,5-Trimethyl-decane	35.70	1297	0.2
112	Tridecane	35.80	1300	-

¹⁾ Retention Time (min)

²⁾ Retention Index

(3) 장류의 항산화 활성

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성과 FRAP 분석 결과 재래 된장 2 (CD2) 및 재래 간장 2

(CK2)가 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 특히 재래 된장 2의 경우 DPPH 라디칼 소거활성은 89.1%, ABTs 라디칼 소거활성은 63.3% 및 FRAP 활성은 0.92 이었다 (Fig. 61). 재래 된장 2는 총 phenolics 및 isoflavone-aglycones 함량이 가장 높은 것으로 보아 이들이 높은 항산화 활성과 깊은 관련이 있는 것으로 추정되었다. 일반적으로 식물유래 polyphenol성 화합물이 많을수록 항산화 활성이 높은 것으로 보고되어 있고, Cho 등에 따르면 청국장 발효 중 총 phenolics 및 isoflavone-aglycones 함량이 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거활성이 증가한다

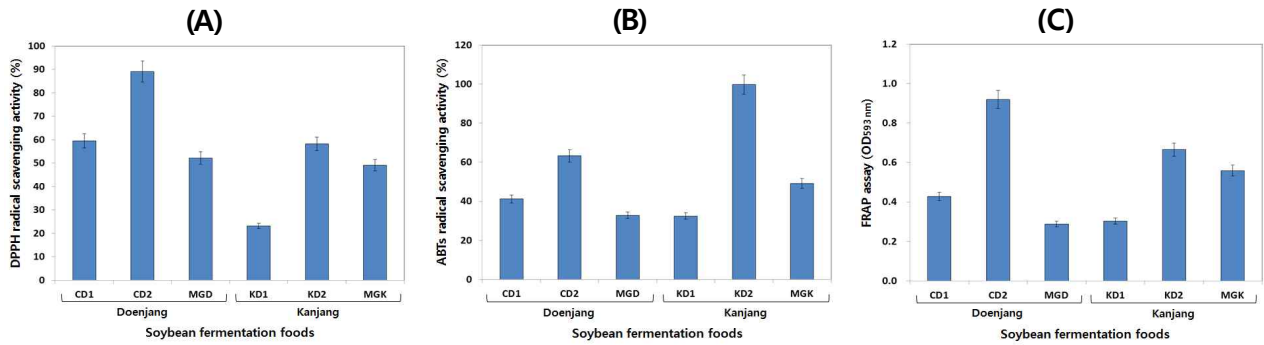


Fig. 61. Comparison of DPPH (A) and ABTs (B) radical scavenging activities and FRAP (C) assay of the different doenjang and kanjang samples.

나. 청국장의 기능성 대사체 (isoflavone) 함량 분석

(1) 마늘 내성 및 청국장 발효가공 적성이 우수한 *Bacillus* sp. 균주 선발

(가) 마늘 내성균 및 청국장 발효 가공 적성 균주 선발

총 62 균주를 접종하여 마늘 첨가 청국장을 제조한 후 균 성장정도, 마늘 냄새와 청국장의 악취도를 측정하였다. 마늘 첨가 (5%, w/w) 청국장에서 62 균주들의 성장과 악취도를 평가한 결과는 Table 2와 같다. 균 성장도와 악취도를 종합적으로 고려하여 이차적으로 최종 9 균주인 EMD17, HCD02, CSY191, MJ1-4, MJ3-6, MJ5-48, SKE24, CB1 및 CB58을 선정하였다 (Table 45).

Table 45. Screening of *Bacillus* starter for production of cheonggukjang with garlic.

No.	Species	Fresh garlic		Steamed garlic	
		Growth	Bad smell	Growth	Bad smell
1	<i>Bacillus</i> sp. EMD01	+	+	++	+
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EMD03	+	++	+++	+
3	<i>Bacillus</i> sp. EMD06	-	+++	+	++
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EMD07	-	++	+++	+
5	<i>Bacillus</i> sp. EMD08	-	++	+++	+
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EMD11	-	++	+++	+
7	<i>Bacillus</i> sp. EMD12	++	+++	++	++
8	<i>Bacillus</i> sp. EMD16	+	++	+++	+
9	<i>Bacillus</i> sp. EMD17	++	+	+++	+
10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EMD19	-	+++	+++	+
11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EMD21	-	+++	++	+
12	<i>Bacillus subtilis</i> SSD02	-	+++	++	++
13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SSD06	++	+++	++	+
14	<i>Bacillus subtilis</i> SSD07	-	++	+++	+
15	<i>Bacillus</i> sp. SSD08	-	++	+++	+

16	<i>Bacillus</i> sp. SSD10	-	+++	+++	+
17	<i>Bacillus</i> sp. SSD11	-	++	+++	+
18	<i>Bacillus</i> sp. SSD13	-	+++	++	+
19	<i>Bacillus</i> sp. SSD16	-	++	+++	+
20	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SSD17	-	++	+++	+
21	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HCD02	++	++	+++	++
22	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HCD04	++	++	+++	+++
23	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HCD08	++	+++	+++	+
24	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HCD09	-	+++	+++	++
25	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HCD10	-	+++	+++	+
26	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CJW01	++	+++	+++	+
27	<i>Bacillus subtilis</i> CJW05	+	+++	+++	+
28	<i>Bacillus subtilis</i> CJW06	++	++	++	++
29	<i>Bacillus</i> sp. CJW07	+	++	+++	+
30	<i>Bacillus</i> sp. CJW10	-	++	++	+
31	<i>Bacillus</i> sp. CJW12	+	++	++	+
32	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CJW14	+	+++	+++	+
33	<i>Bacillus</i> sp. CJW15	+	++	++	+
34	<i>Bacillus</i> sp. CJW16	-	+++	++	++
1	<i>Bacillus subtilis</i> CSY191	++	++	+++	++
2	<i>Bacillus subtilis</i> CSY388	-	++	++	++
3	<i>Bacillus subtilis</i> CH3-5	+	+++	++	++
4	<i>Bacillus licheniformis</i> CH3-17	+	+++	++	++
5	<i>Bacillus subtilis</i> CH3-25	+	++	++	+
6	<i>Bacillus subtilis</i> CH51	++	+++	+++	++
7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CH86-1	++	+++	++	+
8	<i>Bacillus subtilis</i> CH97	++	+++	+++	+++
9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MJ5-41	+++	++	+++	++
10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MJ1-4	++	++	+++	+
11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MJ3-6	+++	+	+++	+
12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MJ5-48	+++	++	+++	+
13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MJ7-66	+++	+++	++	+++
14	<i>Bacillus subtilis</i> W42	++	+++	+	+++
15	<i>Bacillus subtilis</i> K21	+++	+++	+++	+++
16	<i>Bacillus subtilis</i> SKE12	+++	+++	++	+++
17	<i>Bacillus subtilis</i> H27	+++	+++	++	+++
18	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SG141	+++	+++	++	+++
19	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JY126	++	+++	+	+++
20	<i>Bacillus subtilis</i> HK207	++	+++	+	+++
21	<i>Bacillus subtilis</i> HK176	+++	+++	+++	+++
22	<i>Bacillus subtilis</i> SH356	++	+++	+++	+++
23	<i>Bacillus</i> sp. SKE55	+++	+++	+++	+++
24	<i>Bacillus</i> sp. J55	+++	+++	+++	+++
25	<i>Bacillus</i> sp. K16	+	+++	+	+++
26	<i>Bacillus</i> sp. SKE24	+++	++	++	+
27	<i>Bacillus</i> sp. SKE74	+++	++	+++	+++
28	<i>Bacillus</i> sp. SKE65	+++	+++	+++	+++
29	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CB1	+++	++	+++	+
30	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CB67	+++	++	+++	+
31	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JB6	+++	+++	+++	+
32	<i>Bacillus pumilus</i> HY1	++	+++	+++	++

Growth: -, not growth; +, week growth; ++ good growth; +++ very good growth

Bad smell: +, not bad smell; ++, week bad smell; +++ very bad smell

(나) 선발 균주의 청국장 발효 특성 확인

① 생균수와 β -glucosidase 활성 변화

청국장 발효 중 생균수와 β -glucosidase 활성 변화는 Table 46과 같다. 발효가 진행됨에 따라 생균수는 7.0 log cfu/g 에서 발효 종기 (72 h) 10.0-11.0 log cfu/g 에 도달하였다. β -glucosidase 활성 역시 발효 초기 5.0 Unit/g 에서 발효 48 h 최대 활성을 나타낸 후 발효 종기 (72 h) 약간 감소하여 22 Unit/g 수준을 유지하였다. 특히 균주 MJ1-4의 경우에는 생균수는 두 균주보다 약간 낮으나 β -glucosidase 역가 활성은 높음을 확인할 수 있었다 (Table 46).

Table 46. Change of viable cell numbers and β -glucosidase activity during *cheonggukjang* fermentation by *Bacillus* sp. starters.

Contents ^{a)}	Species	Fermentation (h)				
		0	12	24	48	72
Viable cell numbers (log cfu/g)	HCD02	7.03	8.28	9.01	9.21	11.42
	EMD17	7.37	8.91	9.35	9.74	11.79
	MJ1-4	7.19	8.39	9.07	9.25	10.59
β -glucosidase (Unit/g)	HCD02	5.3	12.0	16.8	24.2	22.6
	EMD17	4.8	11.9	15.6	22.3	22.1
	MJ1-4	5.4	12.4	16.6	24.8	22.0

^{a)}Data are presented as the mean \pm SD of triplicated determinations.

^{b)}One unit of β -glucosidase activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μ M of *p*-NPG.

② Isoflavone 함량

본 실험에 사용한 국산콩인 백태에서는 11 종의 isoflavone 유도체가 확인되었고 발효 종기 (72 h) 11 종의 isoflavone과 새로운 형태의 isoflavone 유도체를 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 증자 과정 중 malonylglycosides가 감소하여 glycosides로 전환되었으며, 발효가 진행됨에 따라 glycosides는 감소하고 비배당체인 aglycones 함량은 증가하였다. 특히 HCD02의 경우 발효 72 시간에 aglycones인 daidzein은 258.4 μ g/g, glycitein은 22.2 μ g/g 및 genistein은 8.6 μ g/g 이었고 (Table 47) 종자에서는 glycosides 및 malonylglycosides가 각각 22.9% 및 68.9%에서 증자 처리 후 각각 75.5% 및 17.9%로 변화하였다. 한편 증자 및 발효 과정 중 5.2% 정도로 낮은 aglycones는 증자 후 6.1%와 발효 종기 32.0%로 증가하였다. Isoflavone 유도체들은 콩 종자, 재배 토양 및 환경, 식품가공(열처리 등) 및 미생물 작용에 그 조성이 달라진다. 특히 미생물의 β -glucosidase에 의해 배당체들이 비배당체 형태로 변화되는 것을 많은 연구자들이 보고하였다.

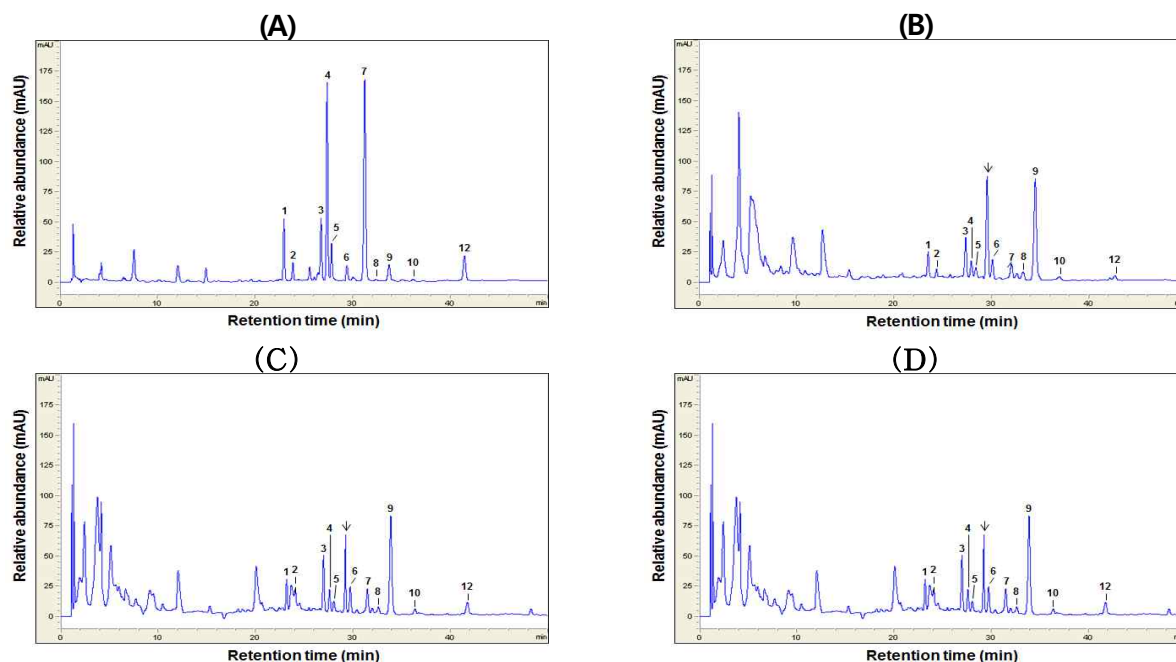


Fig. 62. Typical HPLC chromatograms of isoflavones. (A) HPLC chromatogram of isoflavone extract in soybean seeds; (B) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang (72 h) with HCD02; (C) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang (72 h) with EMD17; (D) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang (72 h) with MJ1-4. 1, Daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, glycitein; 12, genistein. Arrow was indicated the unknown compound.

Table 47. Change of 12 isoflavone contents during *cheonggukjang* fermentation by the different *Bacillus* sp. starter.

Samples	Fermentation time (h)	Isoflavone contents ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)											
		Alycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Aglycones		
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitein	Genistein
Seed	-	159.6	116.0	111.5	455.1	108.6	598.5	45.7	5.3	nd	36.4	11.9	39.7
HCD02	0	447.2	270.9	454.8	103.3	37.8	137.0	tr	8.0	nd	24.4	52.9	16.8
	12	346.5	222.2	388.4	91.5	34.8	125.2	5.8	6.9	nd	78.8	52.9	17.4
	24	250.3	141.6	294.4	85.0	34.3	113.6	36.0	10.2	nd	182.0	51.4	14.2
	48	179.2	151.1	193.6	86.7	79.1	144.5	116.5	11.9	nd	319.8	17.6	31.2
	72	109.4	90.0	93.4	64.4	59.4	86.8	77.5	32.8	nd	258.4	22.2	8.6
EMD17	0	471.7	252.5	512.0	77.7	30.9	108.1	tr	7.9	nd	30.9	65.9	20.3
	12	423.4	225.1	460.9	88.5	31.2	121.5	tr	6.8	nd	57.9	57.3	16.3
	24	271.6	324.9	311.3	93.7	45.4	122.1	42.5	10.9	nd	154.9	49.2	21.0
	48	180.7	349.4	204.8	90.9	78.7	116.7	125.8	51.2	nd	244.4	45.4	41.4
	72	128.5	250.3	126.3	84.2	71.4	219.4	111.4	32.8	nd	216.5	12.1	20.0
MJ1-4	0	469.4	244.9	490.6	96.6	34.6	130.8	tr	9.1	nd	34.6	59.6	20.7
	12	274.0	147.9	323.8	86.2	37.4	116.8	23.7	9.5	nd	159.9	57.5	23.1
	24	291.0	184.4	340.9	93.4	46.7	119.1	43.2	10.1	nd	184.0	43.6	28.5
	48	114.2	91.9	103.3	59.3	56.0	74.4	68.1	23.7	nd	243.9	22.3	15.1
	72	104.9	135.5	98.7	52.5	51.2	77.1	51.8	29.4	nd	190.5	13.8	16.7

^{a)}Data are presented as the mean \pm SD of triplicated determinations.

^{b)}nd, not detected

^{c)}tr, trace < 0.002 $\mu\text{g/g}$

(다) 최종 선정균주를 이용한 단독 및 혼합 청국장 발효 중 isoflavone 함량 변화

① 생균수와 β -glucosidase 활성 변화

청국장 발효 중 생균수와 β -glucosidase 활성 변화는 Table 15와 같다. 발효가 진행됨에 따라 생균수는 초기 7.0 log cfu/g 에서 발효 종기 (72 h) 11.0-12.0 log cfu/g로 증가하며 β -glucosidase 활성도 초기 5.0 Unit/g 에서 발효 종기 (72 h) 22 Unit/g 이상을 나타내었다. 특히 균주 HCD02와 MJ1-4 혼합 접종인 경우 β -glucosidase 역가가 가장 높았다 (Table 48).

Table 48. Change of viable cell numbers and β -glucosidase activity during *cheonggukjang* fermentation with garlic by single and mixed *Bacillus* sp. starter.

Contents ^{a)}	Samples	Fermentation (h)				
		0	12	24	48	72
Viable cell numbers (log cfu/g)	Single culture					
	HCD02	7.02	7.62	8.2	8.9	11.79
	EMD17	7.52	8.24	9.21	9.29	12.09
	MJ1-4	7.11	7.35	8.31	9.08	12.52
	Two mixture culture					
	HCD02+EMD17	7.29	7.46	8.65	9.65	11.63
	HCD02+MJ1-4	7.38	7.67	9.28	9.76	11.91
	EMD17+MJ1-4	7.38	7.61	8.9	9.47	11.96
	Three mixture culture					
	HCD02+EMD17+MJ1-4	7.18	7.43	8.74	9.72	12.14
β -glucosidase (Unit/g)	Single culture					
	HCD02	5.0	11.2	15.4	22.1	22.4
	EMD17	5.1	11.0	15.2	18.2	22.8
	MJ1-4	5.2	11.6	15.7	23.8	23.2
	Two mixture culture					
	HCD02+EMD17	5.2	11.3	15.2	22.4	22.6
	HCD02+MJ1-4	5.4	11.6	16.0	22.7	23.6
	EMD17+MJ1-4	5.4	11.8	15.6	22.6	23.4
	Three mixture culture					
	HCD02+EMD17+MJ1-4	5.3	10.2	15.4	22.4	23.0

^{a)}Data are presented as the mean \pm SD of triplicated determinations.

^{b)}One unit of β -glucosidase activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μ M of *p*-NPG.

② Isoflavone 함량

함양농협가공사업소에서 구입한 국산콩인 백태는 11 종의 isoflavone 유도체가 확인되었고 발효 종기 (72 h) 11 종의 isoflavone과 새로운 형태의 isoflavone 유도체를 확인할 수 있었다 (Fig. 63). 증자 과정 중 malonylglycosides가 감소하여 glycosides로 전환되었으며, 발효가 진행됨에 따라 glycosides는 감소한 반면에 aglycones 함량이 증가하였다. 특히 균주 HCD02+MJ1-4 혼합 배양의 경우 발효 72 시간대 aglycones인 daidzein은 269.8 μ g/g, glycitein은 29.5 μ g/g 및 genistein은 23.0 μ g/g 이었고 (Table 49) 종자에서는 glycosides 및 malonylglycosides가 각각 22.9% 및 68.9%에서 증자 처리 후 각각 78.8% 및 12.5%로 변화하였고 한편 증자 및 발효 과정 중 5.2% 정도로 낮은 aglycones는 증자 후 8.7%와 발효 종기 27.5%로 증가하였다.

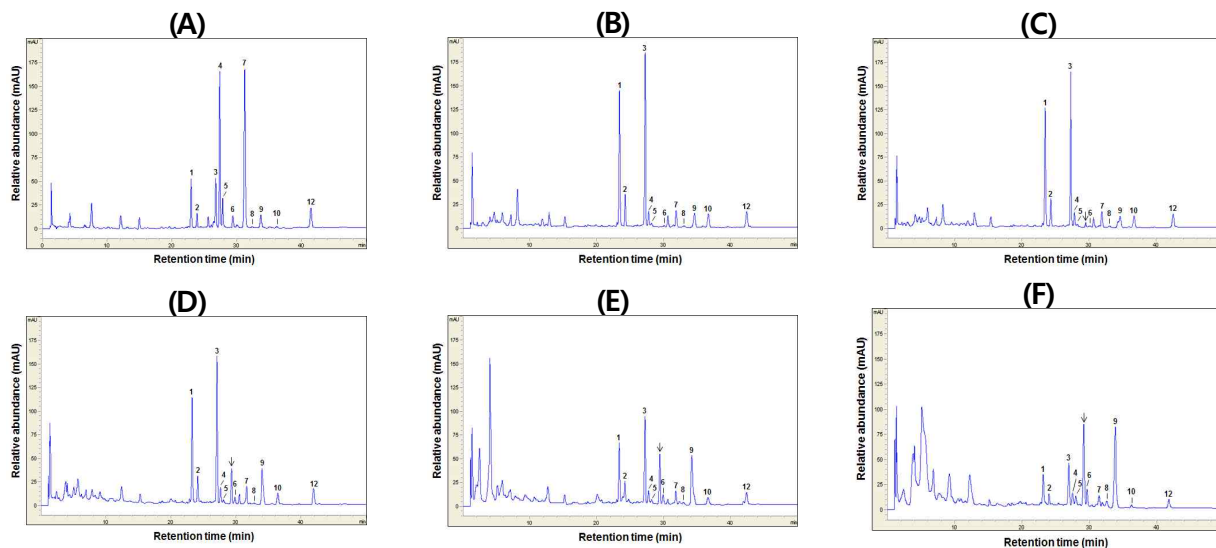


Fig. 63. Typical HPLC chromatograms of isoflavones. (A) HPLC chromatogram of isoflavone extract in soybean seed; (B) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang with tree starter (0 hr); (C) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang with tree starter (12 hr); (D) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang with tree starter (24 hr); (E) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang with tree starter (48 hr); (F) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang with tree starter (72 hr). 1, Daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, malonylgenistin; 8, acetylglycitin; 9, daidzein; 10, glycitein; 12, genistein. Arrow was indicated the unknown compound.

Table 49. Change of 12 isoflavone contents during *cheonggukjang* fermentation with garlic by the single and mixture *Bacillus* sp. starter.

Samples	Fermentation time (h)	Isoflavone contents ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)											
		Alycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Aglycones		
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein
Seed	-	159.6	116.0	111.5	455.1	108.6	598.5	45.7	5.3	nd	36.4	11.9	39.7
Single culture													
HCD02	0	435.4	251.1	444.8	55.4	27.9	76.3	tr	6.9	12.6	39.2	58.6	24.9
	12	418.9	211.0	452.3	48.5	21.4	76.5	nd	5.3	nd	33.6	60.2	24.7
	24	349.3	224.1	364.5	56.3	27.1	76.9	tr	6.3	nd	63.6	48.3	18.2
	48	218.6	313.6	241.3	63.9	47.5	70.6	66.3	16.4	nd	216.2	9.6	26.8
	72	190.0	258.3	175.0	93.4	70.9	117.2	90.4	29.9	nd	251.2	8.3	18.4
EMD17	0	419.5	229.6	460.9	47.0	25.2	68.8	nd	6.4	5.3	42.0	61.4	25.3
	12	414.3	244.8	441.7	52.8	27.2	73.9	nd	7.0	nd	22.0	57.8	16.6
	24	371.4	205.8	364.7	45.8	21.4	67.6	tr	7.0	nd	89.9	48.3	19.1
	48	251.6	457.9	243.3	54.0	38.4	73.1	18.0	17.8	nd	113.4	41.9	17.5
	72	134.9	223.4	136.7	55.0	57.6	60.2	96.4	33.2	nd	205.0	10.8	22.1
MJ1-4	0	450.0	237.0	493.9	51.0	27.5	71.6	nd	9.2	nd	38.8	68.8	24.8
	12	405.4	227.7	428.0	60.0	28.5	83.7	tr	6.7	nd	31.8	57.7	17.7
	24	305.4	187.7	313.6	48.0	28.0	73.2	0.2	6.5	nd	111.3	39.0	19.1
	48	213.9	301.3	228.2	58.7	53.2	64.9	18.0	20.3	nd	250.6	49.3	24.3
	72	152.1	197.8	154.1	59.5	72.8	40.1	87.8	43.9	nd	264.4	16.4	31.1
Two mixture culture													
HCD02 + EMD17	0	422.0	237.3	456.2	53.7	40.4	101.5	tr	11.8	nd	37.9	58.5	28.1
	12	422.5	248.7	438.0	62.2	38.1	93.1	tr	9.9	nd	33.7	56.3	25.0
	24	371.2	230.4	364.2	55.7	25.9	81.3	tr	8.5	nd	69.5	51.4	20.0
	48	162.8	176.2	165.2	62.8	46.1	90.2	67.8	17.0	nd	185.6	23.9	20.8
HCD02 + MJ1-4	72	186.9	256.5	194.4	73.4	58.7	105.4	66.2	23.2	nd	219.1	34.5	28.8
	0	387.6	197.8	403.4	47.3	32.1	78.2	tr	nd	nd	32.0	55.5	22.3
	12	412.9	248.0	411.4	58.0	27.1	83.8	tr	9.0	nd	33.3	55.4	22.3
	24	317.2	259.5	348.1	61.5	37.2	96.8	20.1	12.9	nd	129.1	43.1	25.7
	48	227.9	172.7	241.8	51.1	32.9	85.3	21.4	9.5	nd	170.1	31.8	25.7
72	162.8	204.9	149.2	65.5	65.6	89.4	83.4	30.6	nd	269.8	29.5	23.0	

EMD17 + MJ1-4	0	444.2	267.6	454.4	57.4	33.3	87.3	tr	10.0	nd	49.2	61.1	33.6
	12	388.3	246.2	402.7	53.6	39.3	82.2	tr	9.5	nd	33.0	52.6	25.8
	24	349.0	291.2	360.8	59.9	37.3	97.9	7.7	14.4	nd	106.9	45.9	20.6
	48	166.6	291.3	186.2	73.0	66.6	98.2	87.3	20.0	nd	235.0	27.0	23.3
	72	196.3	216.7	181.2	77.3	75.0	81.4	78.9	34.2	nd	290.3	29.0	31.4
Three mixture culture													
HCD02 + EMD17 +MJ1-4	0	397.4	239.0	423.7	52.2	35.2	82.2	tr	10.1	nd	43.3	56.3	31.1
	12	357.6	222.3	381.3	48.5	36.3	79.0	tr	8.9	nd	33.2	51.1	26.2
	24	327.0	274.9	367.1	62.0	36.1	99.9	19.8	12.2	nd	123.1	44.6	31.3
	48	214.5	230.8	229.4	57.7	39.5	73.5	38.3	11.3	nd	165.6	39.7	25.1
72	181.1	161.6	138.1	69.9	73.4	69.9	92.6	36.7	nd	265.9	16.1	19.1	
^{a)} Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations. ^{b)} nd, not detected ^{c)} tr, trace < 0.002 µg/g													

(다) 마늘 첨가 형태 (생, 발아 및 발효 마늘)에 따른 청국장 발효 중 isoflavone 함량 변화

① 생균수와 β-glucosidase 활성 변화

청국장 발효 중 생균수와 β-glucosidase 활성 변화는 Table 50과 같다. 발효가 진행됨에 따라 생균수는 초기 7.0 log cfu/g에서 발효 중기 (72 h) 9.0-10.0 log cfu/g 증가하며 β-glucosidase 활성도 발효 초기 5.0 Unit/g에서 발효 48 시간에 최대 활성을 나타낸 후 발효 중기 (72 h) 약간 감소하여 22 Unit/g를 나타내었다. 발효 초기 마늘 첨가 시료가 마늘을 첨가하지 않은 대조구보다 β-glucosidase 활성이 낮게 나타났다. 이는 발효 초기 마늘에 의해 β-glucosidase 활성이 저해된 것으로 판단되었다.

Table 50. Changes of viable cell numbers and β-glucosidase activity during *cheonggukjang* fermentation with fresh, germinated, and fermented garlic by mixed starters.

Contents ^{a)}	Samples	Fermentation (h)				
		0	12	24	48	72
Viable cell numbers (log cfu/g)	Control	6.96	8.77	9.14	9.70	10.12
	Fresh garlic	7.01	8.43	8.97	9.85	9.72
	Germinated garlic	6.93	8.52	9.10	9.85	9.87
	Fermented garlic	6.88	8.86	9.15	10.15	9.93
β-glucosidase (Unit/g)	Control	4.8	11.6	15.4	22.4	21.6
	Fresh garlic	5.0	10.8	14.8	22.0	21.6
	Germinated garlic	4.9	10.9	15.0	22.1	21.8
	Fermented garlic	4.9	11.0	15.2	22.2	22.0

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

^{b)}One unit of β-glucosidase activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 µM of *p*-NPG.

② 복합균주를 이용하여 마늘 전처리 형태별 마늘 첨가 청국장에서는 11 종의 isoflavone과 새로운 형태의 isoflavone 유도체를 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 마늘 전처리별 청국장의 isoflavone 함량은 커다란 차이가 없었으며, 대조구보다는 비배당체인 aglycones 형태가 낮음을 확인할 수 있었다 (Table 18). 이는 미생물의 β-glucosidase가 마늘에 의해 저해되어 대조구보다 적은 비배당체가 생성된 것으로 추정되었다.

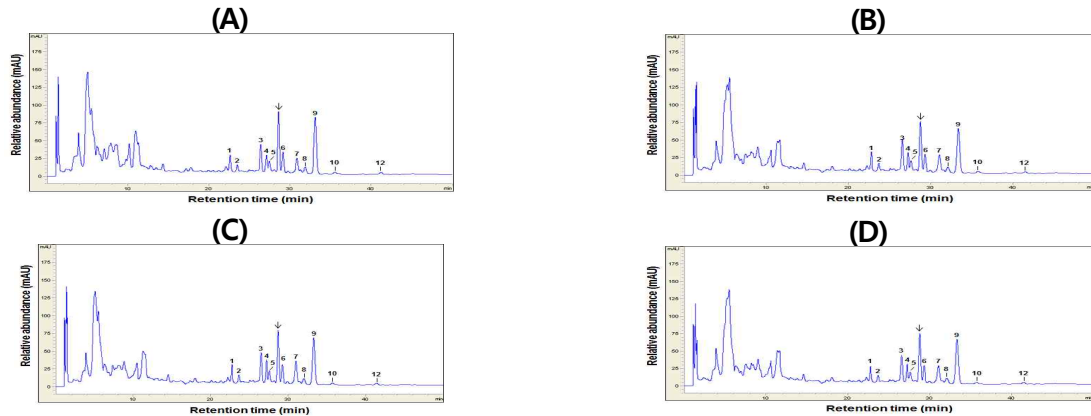


Fig. 64. Typical HPLC chromatograms of isoflavones. (A) HPLC chromatogram of isoflavone extract in soybean seed; (B) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang with tree starter (0 hr); (C) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang with tree starter (12 hr); (D) HPLC chromatogram of isoflavone extract in cheonggukjang with tree starter (24 hr). 1, Daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, malonylgenistin; 8, acetylglycitin; 9, daidzein; 10, glycitein; 12, genistein.

Table 51. Change of 12 isoflavone contents during *cheonggukjang* fermentation by with fresh, germinated, and fermented garlic by the tree mixture starter.

Samples	Fermentation time (h)	Isoflavone contents ^{a)} (µg/g)											
		Alycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Alycones		
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitein	Genistein
Control	0	311.6	242.2	358.7	87.6	45.4	147.2	5.3	9.1	nd ^{b)}	9.1	47.1	6.7
	12	270.2	242.4	313.4	104.1	56.0	166.7	32.7	7.5	nd	68.7	41.6	6.7
	24	172.5	173.2	222.3	104.4	47.1	150.5	53.8	6.8	nd	111.0	32.8	11.7
	48	153.4	169.6	182.9	126.4	89.2	170.3	152.7	24.9	nd	243.3	37.4	14.1
	72	154.4	131.6	152.0	123.2	109.3	150.3	183.6	28.9	nd	284.2	18.0	6.5
Fresh garlic	0	308.6	239.9	345.5	63.9	35.9	119.6	tr ^{c)}	5.6	nd	8.0	52.5	7.0
	12	265.5	216.5	294.3	56.0	31.7	104.0	tr	4.5	nd	46.5	42.9	6.7
	24	268.0	239.8	301.8	66.6	36.9	110.7	17.1	6.1	nd	76.2	48.6	7.4
	48	167.0	194.8	166.9	91.9	68.1	118.8	105.4	14.8	nd	186.9	38.1	11.8
	72	163.0	86.2	143.0	137.1	108.4	188.1	172	30.1	nd	242.2	26.2	4.9
Germinated garlic	0	346.2	289.6	376.3	58.2	34.9	104.8	tr	6.9	nd	8.9	58.3	7.6
	12	298.1	240.9	337.8	66.1	35.7	120.5	tr	5.8	nd	49.8	49.1	8.0
	24	233.4	233.8	255.6	65.0	38.8	108.3	16.6	6.2	nd	80.8	43.2	8.5
	48	182.4	309.7	189.2	90.5	64.1	119.5	97.1	15.4	nd	191.8	43.3	13.1
	72	122.1	103.2	128.8	121.0	85.5	177.5	136.6	20.9	nd	224.1	13.7	5.0
Fermented garlic	0	318.1	236.3	373.3	48.6	32.5	92.6	tr	6.00	nd	7.7	55.9	6.9
	12	268.2	210.5	300.4	49.7	29.6	94.2	tr	5.1	nd	46.0	46.7	6.1
	24	267.4	218.3	282.7	71.2	43.8	109.7	29.2	7.3	nd	110.6	46.3	8.2
	48	189.7	235.8	202.4	105.1	80.3	129.8	139.7	21.3	nd	247.9	46.0	12.0
	72	153.5	189.1	159.4	134.8	106.7	185.9	170.6	29.4	nd	245.7	24.2	5.9

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

^{b)}nd, not detected

^{c)}tr, trace < 0.002 µg/g

다. 간장 숙성 중 BA (histamine과 tyramine) 분석

(1) 콩 간장 숙성 중 BA (histamine과 tyramine) 함량 변화

(가) 콩식품(주) 간장의 이화학적 특성 분석

콩 간장 숙성 중 생균수는 숙성 37 일에 최대균수인 6.4 log cfu/ml을 나타낸 후 그 이후 감소하여 숙성 198 일 3.0 log cfu/ml 이었고 pH는 4.74에서 4.65로 거의 변화가 없었으며 염도 역시 17.5%에서 17.2%로 변화가 없었다. 총질소는 1.40% 유지가 되었고 아미노태질소는

865.9 mg%에서 숙성 37일 714.7 mg%로 감소한 후 숙성 198일 907.9 mg%로 증가하였다 (Table 52).

Table 52. Viable cell numbers, pH, salinity, total nitrogen, and amino nitrogen during Mong-Go kanjang fermentation.

Contents ^{a)}	Fermentation day					
	30	37	56	91	117	198
Viable cell numbers (log cfu/ml)	6.5	6.9	6.4	5.5	4.8	3.0
pH	4.74	4.75	4.90	4.91	4.88	4.65
Salinity(NaCl, %)	17.5	18.3	18.9	18.3	18.1	17.2
Total nitrogen(TN, %)	1.40	1.37	1.45	1.43	1.53	1.43
Amino nitrogen(AN, mg%)	865.9	714.7	830.2	769.3	920.5	907.9

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

(나) 몽고식품(주) 간장의 BA (histamine과 tyramine) 함량 : 몽고 간장 숙성 중 histamine과 tyramine 함량 변화는 Fig. 65과 같다. 숙성 30일에 histamine은 171 mg/kg, tyramine은 389 mg/kg 이다. 발효 37일에 각각 241 mg/kg (histamine)과 1,037 mg/kg (tyramine)으로 급격히 증가한 후 서서히 증가하여 발효 종기에는 각각 468 mg/kg (histamine)과 1,173 mg/kg으로 감소하였다. 발효식품에서 젖산균들이 생성하는 탈탄산효소에 의해 BA이 생성되는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 간장 발효 중 37일부터 주 우점종인 *Tetragenococcus halophilus*가 감소하면서 다른 젖산균들이 나타남으로써 이들의 효소적 분해에 의해 BA가 생성된 것으로 추정된다(Table 53).

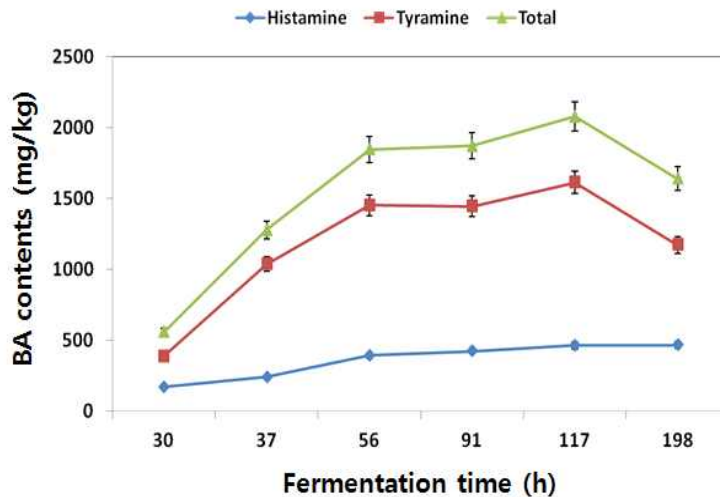


Fig. 65. Change of histamine, tyramine, and total BA contents during Mong-Go kanjang fermentation.

(2) 몽고 간장 발효 중 미생물 다양성 변화

(가) 세균 다양성 변화

간장 발효 30 일부터 198 일까지 세균 변화 양상을 살펴본 결과는 Table 53과 같다. 발효 전 기간 동안 *Tetragenococcus halophilus*가 우점종이나, 발효 30 일 82.5%에서 198 일 32.5%로 감소하였다. 발효 37 일부터는 *Staphylococcus* 및 *Enterobacter* 장구균과 *Weissella* 및 *Lactobacillus*, *Leuconostoc* 등의 다양한 젖산균들이 나타났다 (Table 53).

Table 53. Bacterial distribution and diversity during *kanjang* fermentation by culture-independent methods based on 16S rDNA sequences.

Genus / Species ^{a)}	Clone Number (<i>n</i>)/Percentage (%)					
	Fermentation day					
	30	37	56	91	117	198
<i>Bacillus</i>						
<i>Bacillus subtilis</i>				1/2.5	1/2.5	
<i>Enterobacter</i>						
<i>Enterobacter hormaechei</i>						5/12.5
<i>Enterobacter</i> sp.						4/10.0
<i>Enterococcus</i>						
<i>Enterococcus gallinarum</i>			1/2.5			
<i>Klebsiella</i>						
<i>Klebsiella</i> sp.				1/2.5		
<i>Lactobacillus</i>						
<i>Lactobacillus brevis</i>			1/2.5		1/2.5	
<i>Lactobacillus plantarum</i>		1/2.5	3/7.5	2/5.0	2/5.0	
<i>Lactobacillus</i> sp.					1/2.5	
<i>Leuconstoc</i>						
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>				1/2.5	1/2.5	
<i>Leuconostoc</i> sp.		3/7.5				
<i>Pediococcus</i>						
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		1/2.5	1/2.5	1/2.5	2/5.0	
<i>Staphylococcus</i>						
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1/2.5	3/7.5	1/2.5	7/17.5	6/15.0	7/17.5
<i>Staphylococcus gallinarum</i>			4/10.0	1/2.5	4/10.0	5/12.5
<i>Staphylococcus kloosii</i>			1/2.5			
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>						1/2.5
<i>Staphylococcus sciuri</i>			1/2.5		1/2.5	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>			1/2.5	1/2.5		
<i>Staphylococcus</i> sp.		1/2.5	2/5.0			
<i>Tetragenococcus</i>						
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	33/82.5	29/72.5	22/55.0	21/52.5	15/37.5	13/32.5
<i>Tetragenococcus</i> sp.	6/15.0	1/2.5	1/2.5	3/7.5	2/5.0	5/12.5
<i>Weissella</i>						
<i>Weissella cibaria</i>		1/2.5	1/2.5	1/2.5	3/7.5	
<i>Weissella confusa</i>					1/2.5	
Total	40/100	40/100	40/100	40/100	40/100	40/100

^{a)}When more than one sequence had the same similarity, only the accession number of the first sequence is given.

② 효모 다양성 변화 : 간장 숙성 30 일부터 198 일까지 효모 변화 양상을 살펴본 결과는 Table 54와 같다. 숙성 56 일까지는 *Candida* cf. *lactis-condensi*가 우점종이나, 90 일부터 *Zygosaccharomyces pseudorouxii*가 우점종 이었다. 즉 *Candida* cf. *lactis-condensi* 발효 30 일 75.0%에서 90 일까지 27.5%로 감소하여 그 이후에는 나타나지 않으며, 반면에 *Zygosaccharomyces pseudorouxii*는 발효 30 일 17.5%에서 발효 198 일 55.0%로 증가하였다. 발효 전기간 동안 *Zygosaccharomyces rouxii*가 나타났으며, 발효가 진행됨에 따라 *Candida versatilis*, *Pichia burtonii*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida apicola*, *Candida atlantica*, *Candida etchellsii* 등 다양한 내성효모균이 출현하는 것을 알 수가 있었다 (Table 54).

Table 54. Yeast distribution and diversity during *kanjang* fermentation by culture-independent methods based on 26S rDNA sequences.

Genus / Species ^{a)}	Clone number (n) / Percentage (%)					
	Fermentation day					
	30	37	56	91	117	198
<i>Aspergillus</i>						
<i>Aspergillus oryzae</i>					1/2.5	
<i>Candida</i>						
<i>Candida apicola</i>						8/20.0
<i>Candida atlantica</i>						1/2.5
<i>Candida etchellsii</i>						2/5.0
<i>Candida cf. lactis-condensi</i>	30/75.0	27/67.5	19/47.5	11/27.5		
<i>Candida versatilis</i>			2/5.0			2/5.0
<i>Pichia</i>						
<i>Pichia anomala</i>					2/5.0	
<i>Pichia burtonii</i>				2/5.0		
<i>Pichia guilliermondii</i>					2/5.0	
<i>Saccharomyces</i>						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>					3/7.5	2/5.0
<i>Zygosaccharomyces</i>						
<i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i>	7/17.5	8/20.0	9/22.5	16/40.0	23/57.5	22/55.0
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3/7.5	5/12.5	10/25.0	11/27.5	9/22.5	3/7.5
Total	40/100	40/100	40/100	40/100	40/100	40/100

^{a)}When more than one sequence had the same similarity, only the accession number of the first sequence is given.

라. 장류 발효 우수 효모 균주 선발

(1) 장류로부터 효모 균주 선발 및 동정

(가) 균주 분리 및 동정

26S rDNA 염기서열 결정 결과 *Wickerhamomyces* 속, *Hanseniaspor* 속, *Pichia* 속, *Debaryomyces* 속, *Millerozyma* 속, *Candida* 속, *Endomyces* 속, *Saccharomycopsis* 속, *Rhodotorula* 속, *Cryptococcus* 속 등으로 확인 되었고 *Wickerhamomyces anomalus* 1 종, *Hanseniaspora uvarum* 2 종, *Pichia guilliermondii* 3 종, *Pichia burtonii* 1 종, *Debaryomyces hansenii* 2 종, *Millerozyma farinosa* 2 종, *Candida sorbosivorans* 1 종, *Endomyces fibuliger* 1종, *Candida nodaensis* 1 종, *Saccharomycopsis crataegensis* 1 종, *Pichia farinosa* 1 종, *Rhodotorula mucilaginosa* 1 종, *Candida sp.* 1 종, *Candida apicola* 4 종, *Cryptococcus aureus* 1 종, *Candida mogii* 1 종, 및 *Cryptococcus liquefaciens* 1 종을 최종 확보하였다. 한편 균주 SY80을 제외하고는 99-100%의 염기서열 유사성을 나타내었으며, SY80은 94%로 차후 정확한 균주 동정이 필요할 것으로 판단되었다 (Table 55).

Table 55. Similarity values of 26S rRNA gene sequences retrieved from the various isolated yeasts for production of soybean fermented foods.

Isolates	Sources	Genus	Nearest relative ^{a)}	Accession No.	Similarity (%)
SY9	Kanjang	<i>Wickerhamomyces</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN393988	100
SY10	Kanjang	<i>Hanseniaspor</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i> SYH23-1	EU326137	99
SY11	Kanjang	<i>Pichia</i>	<i>Pichia guilliermondii</i> EQ	EU177574	99
SY12	Kanjang	<i>Hanseniaspor</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i> 13w76	HQ149311	99
SY13	Kanjang	<i>Pichia</i>	<i>Pichia burtonii</i> TY01	FJ972208	100

SY14	Kanjang	<i>Pichia</i>	<i>Pichia guilliermondii</i> EQ	EU177574	99
SY15	Kanjang	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i> 12-1	FJ432605	100
SY23	Kanjang	<i>Millerozyma</i>	<i>Millerozyma farinosa</i>	HE994470	99
SY24	Kanjang	<i>Millerozyma</i>	<i>Millerozyma farinosa</i>	HE994470	99
SY36	Kanjang	<i>Candida</i>	<i>Candida sorbosivorans</i> DMic 113940	JN031573	99
SY45	Doenjang	<i>Endomyces</i>	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
SY78	Doenjang	<i>Candida</i>	<i>Candida nodaensis</i>	AB617915	100
SY79	Doenjang	<i>Saccharomycopsis</i>	<i>Saccharomycopsis crataegensis</i> NRRL Y-5902	EU057555	99
SY80	Kanjang	<i>Pichia</i>	<i>Pichia farinosa</i> UWFP-389	AF335973	94
SY85	Kanjang	<i>Rhodotorula</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HE660061	99
SY101	Kanjang	<i>Candida</i>	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
SY124	Kanjang	<i>Pichia</i>	<i>Pichia guilliermondii</i> 4.2-2	FJ432597	99
SY125	Kanjang	<i>Candida</i>	<i>Candida apicola</i>	U45703	99
SY126	Kanjang	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus aureus</i> HN4.9	EU304246	99
SY127	Kanjang	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i> TJY37	EU250073	99
SY128	Doenjang	<i>Candida</i>	<i>Candida apicola</i> strain P12	JN004197	99
SY129	Doenjang	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i> TJY37	EU250073	99
SY130	Doenjang	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i> TJY37	EU250073	99
SY133	Doenjang	<i>Candida</i>	<i>Candida apicola</i>	U45703	99
SY134	Doenjang	<i>Candida</i>	<i>Candida apicola</i> P12	JN004197	99
SY140	Doenjang	<i>Candida</i>	<i>Candida mogii</i>	U44820	99
SY141	Kanjang	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus liquefaciens</i> UWFP-357	AF335980	99

^{a)}When more than one sequence had the same similarity, only the accession number of the first sequence is given.

(2) 선발 효모의 내염성, 내알코올성 및 내당성 확인

(가) 염 내성 확인

분리 효모 균주들의 내염성 확인 결과는 Table 56과 같다. 염 농도 15%에서는 거의 모든 균의 생육이 1.0 수준이었고, 염 농도 10%에서 *Pichia guilliermondii* SY11, SY14 및 SY124 균주들이 높은 생육을 보였다 (Table 56).

Table 56. Test of microbial growth on various salt concentration.

Isolates	Microbial growth ^{a)} (OD _{600 nm})			
	Salt concentration (%)			
	0	5	10	15
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> SY9	11.48	9.18	1.74	1.50
<i>Hanseniaspora uvarum</i> SY10	5.58	1.45	0.14	0.15
<i>Pichia guilliermondii</i> SY11	13.64	12.47	7.17	0.99
<i>Hanseniaspora uvarum</i> SY12	4.4	1.49	0.24	0.15
<i>Pichia burtonii</i> SY13	12.41	9.31	8.27	0.80
<i>Pichia guilliermondii</i> SY14	11.62	11.35	9.88	1.61
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY15	12.5	10.51	6.89	1.49
<i>Millerozyma farinosa</i> SY23	10.16	8.69	5.79	1.44
<i>Millerozyma farinosa</i> SY24	10.11	8.49	6.08	1.55
<i>Candida sorbosivorans</i> SY36	12.61	10.96	0.65	0.61
<i>Endomyces fibuliger</i> SY45	9.79	0.535	0.50	0.47
<i>Candida nodaensis</i> SY78	11.96	9.01	4.08	0.72
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i> SY79	7.97	7.34	7.07	5.92
<i>Pichia farinosa</i> SY80	9.31	5.95	0.694	0.59
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SY85	11.27	9.35	0.71	0.68
<i>Candida</i> sp. SY101	11.93	9.88	6.82	2.41
<i>Pichia guilliermondii</i> SY124	11.73	12.89	8.82	0.64
<i>Candida apicola</i> SY125	8.7	0.89	0.546	0.52
<i>Cryptococcus aureus</i> SY126	9.47	4.67	3.18	0.53

<i>Debaryomyces hansenii</i> SY127	8.15	9.8	8.59	4.42
<i>Candida apicola</i> SY128	8.93	6.54	0.57	0.46
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY129	8.37	9.93	8.64	4.07
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY130	9.2	10.9	9.79	5.84
<i>Candida apicola</i> SY133	8.9	0.58	0.51	0.46
<i>Candida apicola</i> SY134	8.29	7.51	7.04	0.52
<i>Candida mogii</i> SY140	10.14	8.21	3.07	0.46
<i>Cryptococcus liquefaciens</i> SY141	11.28	9.4	0.60	0.67

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

(나) 알코올 내성 확인

분리 효모 균주들의 알코올 내성 확인 결과는 Table 57와 같다. 알코올 농도 15%에서는 거의 모든 균의 생육이 1.0 수준이었으며, 내염성이 뛰어난 *Pichia guilliermondii* SY11, SY14 및 SY124 균주는 알코올 농도 5%에서 높은 생육도를 보였다 (Table 57).

Table 57. Test of microbial growth on various alcohol concentration.

Isolates	Microbial growth (OD _{600 nm})			
	Alcohol concentration (%)			
	0	5	10	15
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> SY9	10.52	5.46	0.64	0.48
<i>Hanseniaspora uvarum</i> SY10	5.14	0.22	0.15	0.24
<i>Pichia guilliermondii</i> SY11	13.37	8.56	0.85	0.71
<i>Hanseniaspora uvarum</i> SY12	4.54	0.17	0.13	0.07
<i>Pichia burtonii</i> SY13	12.94	10.48	0.86	0.51
<i>Pichia guilliermondii</i> SY14	12.80	5.22	0.54	0.55
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY15	12.62	8.27	0.80	0.66
<i>Millerozyma farinosa</i> SY23	10.13	10.58	0.95	0.27
<i>Millerozyma farinosa</i> SY24	10.63	10.16	0.96	0.32
<i>Candida sorbosivorans</i> SY36	12.94	12.37	0.80	0.76
<i>Endomyces fibuliger</i> SY45	10.39	9.09	6.69	0.43
<i>Candida nodaensis</i> SY78	9.60	0.71	0.58	0.50
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i> SY79	8.64	3.52	0.53	0.45
<i>Pichia farinosa</i> SY80	12.34	11.98	8.06	0.62
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SY85	11.79	0.70	0.62	0.55
<i>Candida sp.</i> SY101	12.49	12.50	8.04	0.54
<i>Pichia guilliermondii</i> SY124	11.38	8.62	0.56	0.36
<i>Candida apicola</i> SY125	8.75	5.94	1.96	0.64
<i>Cryptococcus aureus</i> SY126	8.50	0.29	0.27	0.29
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY127	8.07	0.73	0.42	0.39
<i>Candida apicola</i> SY128	9.45	3.62	0.46	0.28
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY129	7.41	3.44	0.31	0.30
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY130	8.43	0.75	0.33	0.31
<i>Candida apicola</i> SY133	10.01	8.28	0.55	0.51
<i>Candida apicola</i> SY134	8.76	4.17	0.47	0.43
<i>Candida mogii</i> SY140	9.67	0.63	0.51	0.53
<i>Cryptococcus liquefaciens</i> SY141	11.79	1.18	0.71	0.57

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

(다) 당 내성 확인

분리 효모 균주의 내당성 확인 결과는 Table 58와 같다. 당 농도 30%에서 거의 모든 균이

생육 가능하였으며, 내염성이 뛰어난 *Pichia guilliermondii* SY11, SY14 및 SY124 균주들은 당 농도 30%에서도 높은 생육을 보였다 (Table 58).

Table 58. Test of microbial growth on various sugar concentration.

Isolates	Microbial growth (OD _{600 nm})			
	Sugar concentration (%)			
	0	10	20	30
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> SY9	11.04	9.68	7.92	7.43
<i>Hanseniaspora uvarum</i> SY10	4.72	4.75	4.65	4.46
<i>Pichia guilliermondii</i> SY11	13.61	14.06	12.09	12.00
<i>Hanseniaspora uvarum</i> SY12	4.10	4.15	3.93	3.46
<i>Pichia burtonii</i> SY13	12.49	12.90	11.87	11.11
<i>Pichia guilliermondii</i> SY14	11.96	14.29	12.45	9.65
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY15	12.43	11.92	9.82	9.51
<i>Millerozyma farinosa</i> SY23	10.91	10.47	8.52	7.76
<i>Millerozyma farinosa</i> SY24	10.43	9.59	9.56	7.93
<i>Candida sorbosivorans</i> SY36	13.32	13.10	12.23	11.49
<i>Endomyces fibuliger</i> SY45	10.77	11.16	9.84	9.59
<i>Candida nodaensis</i> SY78	9.69	8.58	7.91	7.49
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i> SY79	8.04	8.36	7.50	7.48
<i>Pichia farinosa</i> SY80	11.91	11.65	11.48	10.28
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SY85	11.41	10.18	8.92	8.22
<i>Candida sp.</i> SY101	11.09	10.36	10.54	8.93
<i>Pichia guilliermondii</i> SY124	11.67	10.07	9.31	8.72
<i>Candida apicola</i> SY125	9.81	10.62	9.72	9.62
<i>Cryptococcus aureus</i> SY126	8.47	6.37	5.84	5.51
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY127	8.81	9.06	9.25	8.26
<i>Candida apicola</i> SY128	8.61	10.41	9.51	9.06
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY129	8.76	9.24	9.13	8.01
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY130	8.89	9.22	8.46	7.93
<i>Candida apicola</i> SY133	9.24	12.10	10.14	9.39
<i>Candida apicola</i> SY134	9.27	10.59	9.65	8.66
<i>Candida mogii</i> SY140	10.73	10.28	8.61	7.81
<i>Cryptococcus liquefaciens</i> SY141	12.24	11.36	9.88	9.10

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

(3) 선발 효모를 이용한 간장 제조 및 이화학적 특성 확인

(가) 콩알 메주 및 간장 제조

분리 효모 균주로 제조한 간장의 이화학적 특성과 생균수는 Table 59와 같다. 내염성이 뛰어난 *Pichia guilliermondii* SY11, SY14 및 SY124 균주로 제조된 간장의 경우 pH 7.06-7.11 수준, 산도는 0.6-0.70 ml, 염도는 23% 및 생균수는 2.85-4.12 log cfu/ml 수준이었다 (Table 59).

Table 59. Comparison of pH, acidity, salinity, and viable cell numbers by the various isolated yeasts for fermentation of kanjang.

Isolates	Contents ^{A)}			
	pH	Acidity ^{B)} (ml)	Salinity (%)	Viable cell numbers log cfu/ml
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> SY9	7.24	0.65	23.0	nd
<i>Hanseniaspora uvarum</i> SY10	7.26	0.60	22.9	nd
<i>Pichia guilliermondii</i> SY11	7.06	0.65	22.9	2.85
<i>Hanseniaspora uvarum</i> SY12	7.12	0.60	23.0	nd
<i>Pichia burtonii</i> SY13	7.10	0.70	23.0	nd
<i>Pichia guilliermondii</i> SY14	7.11	0.60	22.9	3.58
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY15	7.10	0.65	23.0	3.82
<i>Millerozyma farinosa</i> SY23	7.10	0.70	23.0	2.30
<i>Millerozyma farinosa</i> SY24	7.10	0.60	23.1	2.48
<i>Candida sorbosivorans</i> SY36	7.18	0.70	23.0	nd
<i>Endomyces fibuliger</i> SY45	7.16	0.70	23.0	nd
<i>Candida nodaensis</i> SY78	7.12	0.70	23.1	nd
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i> SY79	7.13	0.65	23.0	nd
<i>Pichia farinosa</i> SY80	7.17	0.72	23.1	2.62
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SY85	7.17	0.70	23.0	3.30
<i>Candida sp.</i> SY101	7.11	0.70	23.1	3.64
<i>Pichia guilliermondii</i> SY124	7.15	0.70	23.1	4.12
<i>Candida apicola</i> SY125	7.14	0.70	23.1	nd
<i>Cryptococcus aureus</i> SY126	7.09	0.70	23.0	nd
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY127	7.12	0.69	23.1	3.91
<i>Candida apicola</i> SY128	7.15	0.75	23.0	nd
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY129	7.08	0.79	23.0	3.95
<i>Debaryomyces hansenii</i> SY130	7.10	0.72	23.1	3.87
<i>Candida apicola</i> SY133	7.08	0.75	23.1	nd
<i>Candida apicola</i> SY134	7.11	0.70	23.0	nd
<i>Candida mogii</i> SY140	7.08	0.80	23.1	nd
<i>Cryptococcus liquefaciens</i> SY141	7.05	0.70	23.1	2.0

^{a)}Values indicate the mean's of three replications (n=3).

^{b)}Acidity: 10 mL of kanjang was titrated with 0.1 N NaOH to pH 8.2±0.1.

2-2. 연구결과 (2차 년도)

가. 마늘 첨가 된장 (1차 예비 실험)

(1) 마늘 첨가 된장의 이화학적 특성

(가) 마늘 첨가 된장의 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화

발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화는 Table 60과 같다. 마늘 무 첨가 된장과 마늘첨가 된장은 발효 중 pH에는 큰 차이가 없었다. 산도 또한 발효 중기 (8 주) 0.79-0.86%로 큰 차이는 없었으며 염도는 20% 마늘 나)된장에서 14.10%로 가장 높았다. 한편 생균수는 효모의 경우 발효 중기 (8 주)에 5-6 log cfu/g 수준이었고, 바실러스는 8-9 log cfu/g으로 효모보다 비교적 높았다 (Table 60).

(2) 마늘 첨가 된장 총 phenolics, isoflavone, 유리아미노산 및 향기성분 함량 분석

(가) 발효 중 총 phenolics 함량 변화

마늘 첨가 된장의 총 phenolics 함량 변화는 Fig. 66과 같다. 총 phenolics 함량이 가장 높은 것은 마늘을 10% 첨가한 된장으로 발효 중기 (8 주)에 14.49 mg/g 으로 가장 높았고 마늘을 20% 첨가한 된장은 발효 중기 (8 주)에 12.62 mg/g 으로 가장 낮았다. 한편 마늘 무 첨가 일반 된장은 13.40 mg/g 으로 10% 마늘된장과 큰 차이는 없었다.

(나) 발효 중 isoflavone 함량 변화

마늘 첨가 된장의 HPLC 크로마토그램, isoflavone 비율 및 함량 변화를 Table 61과 Fig. 67에 나타내었다. 마늘된장은 공통적으로 9 종의 isoflavone 유도체가 검출되었으며 acetylglycosides인 acetylaidzin, acetylglycitin 및 acetylgenistin은 검출되지 않았다 (Fig. 67). 모든 된장은 발효 중 glycosides 및 malonylglycosides 함량은 줄어들면서 동시에 aglycones 함량은 증가하였다. 마늘 무 첨가 된장의 경우 총 isoflavone 함량이 3646.13 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았고 20% 마늘 된장은 3500.56 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 낮았다. 한편 10% 마늘 된장은 3556.98 $\mu\text{g/g}$ 을 나타내었고 (Table 61). 발효 전 (0 주) glycosides 비율이 67.02% 이지만 발효 중기 (8 주)에는 aglycones이 52.41%를 차지하여 발효가 진행됨에 따라 aglycones 함량이 증가하는 것을 알 수 있었다.

Table 60. Changes of pH, acidity, salinity, and viable cell numbers of garlic *doenjang* during fermentations.¹⁾

Conc. of steamed garlic (%)	Fermentation time (w)	Contents ²⁾				
		pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers log cfu/g	
					<i>Yeast</i>	<i>Bacillus</i>
0	0	6.12	0.24	7.40	6.60	8.52
	1	5.93	0.61	10.40	7.05	10.06
	2	6.13	0.68	10.20	6.62	8.74
	3	5.87	0.69	10.00	7.04	8.98
	4	6.13	0.71	11.20	6.95	8.53
	6	5.90	0.74	12.20	6.76	8.87
	8	5.80	0.79	12.30	6.67	9.04
10	0	6.11	0.32	8.10	6.55	8.72
	1	5.97	0.63	11.40	6.48	9.68
	2	6.08	0.63	11.40	6.54	8.86
	3	5.94	0.63	10.70	6.27	8.99
	4	6.10	0.68	11.70	6.33	8.89
	6	5.82	0.73	12.28	6.35	8.86
	8	5.79	0.85	13.00	6.37	9.01
20	0	6.05	0.33	9.20	6.56	8.73
	1	6.05	0.61	10.60	6.55	9.70
	2	6.14	0.62	12.40	6.23	8.91
	3	5.95	0.64	11.00	6.10	8.83
	4	6.12	0.64	11.50	5.65	8.90
	6	6.05	0.72	12.25	5.53	8.88
	8	6.02	0.86	14.10	5.30	8.99

¹⁾ Garlic *doenjang* were fermented at room temperature for 6 week

²⁾ All values are means of determination in three independent experiments.

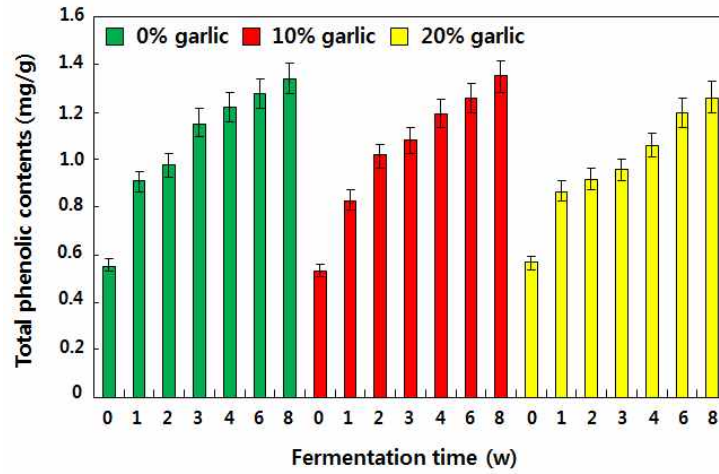


Fig. 66. Changes of total phenolic contents of *garlic doenjang* during fermentations.

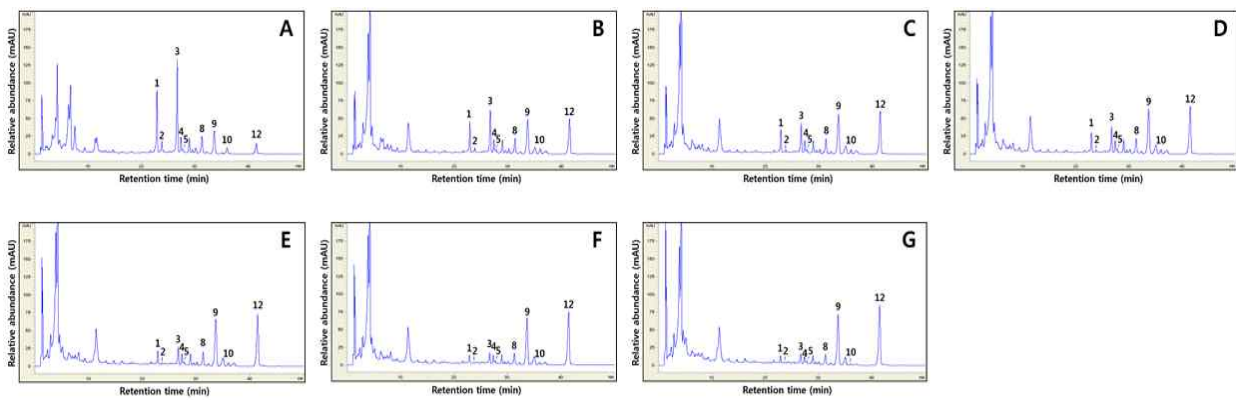


Fig. 67. Typical HPLC chromatogram of isoflavone. 10% garlic doenjang 0 week (A), 1 week (B), 2 week (C), 3 week (D), 4 week (E), 6 week (F), and 8 week (G). 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, glycitein; and 12, genistein.

Table 61. Changes of isoflavone contents of garlic doenjang during fermentations¹⁾

Conc. of garlic (%)	Ferm en-ta tion time (w)	Isoflavone contents ¹⁾ (µg/g)												
		Glycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Aglycones			Totals
		Daidzi n	Glyciti n	Genistin	Daidzi n	Glyciti n	Genistin	Daidzin	Glyciti n	Genisti n	Daidzei n	Glycitei n	Genistein	
0	0	177.88	107.14	196.06	45.16	25.62	69.31	tr	nd	nd	63.78	21.15	19.48	725.58
	1	115.86	58.21	90.93	47.24	26.71	72.29	nd	nd	nd	115.13	18.22	75.47	620.06
	2	74.54	25.54	52.29	35.86	21.01	60.38	nd	nd	nd	120.46	14.24	85.88	490.2
	3	52.54	33.25	36.36	31.75	24.52	53.72	nd	nd	nd	145.13	10.05	107.62	494.94
	4	44.76	29.48	27.96	30.35	20.26	53.90	nd	nd	nd	135.51	10.51	99.32	452.05
	6	42.70	30.42	23.12	28.61	24.80	50.21	nd	nd	nd	140.61	8.21	104.90	453.58
	8	33.22	33.15	11.64	17.05	14.57	38.82	nd	nd	nd	144.67	4.52	112.08	409.72
10	0	168.85	94.82	192.23	42.39	22.31	66.05	nd	nd	nd	56.80	19.53	17.29	680.27
	1	100.60	45.20	88.52	36.01	21.62	58.62	nd	nd	nd	93.08	16.05	59.97	519.67
	2	81.33	29.95	62.33	33.55	20.26	56.13	nd	nd	nd	106.23	14.09	73.30	477.17
	3	74.93	27.80	55.30	33.43	21.74	56.72	nd	nd	nd	120.35	13.81	83.74	487.82
	4	61.87	37.72	42.97	35.03	27.22	57.04	nd	nd	nd	126.28	12.25	89.57	489.95
	6	48.10	31.32	28.66	27.92	24.93	48.21	nd	nd	nd	127.59	9.08	93.67	439.48
	8	49.47	37.61	28.16	26.62	24.71	46.51	nd	nd	nd	137.89	6.12	105.53	462.62
20	0	175.47	103.13	200.63	35.65	23.71	55.32	tr	nd	nd	54.24	21.19	16.41	685.75
	1	121.49	66.36	115.34	30.38	23.02	48.19	tr	nd	nd	86.67	18.51	50.58	560.54
	2	101.54	54.19	87.70	28.61	22.55	45.47	nd	nd	nd	96.98	16.57	61.58	515.19
	3	87.34	46.92	69.82	26.44	21.64	42.89	nd	nd	nd	100.97	14.71	66.42	477.15
	4	61.74	35.10	48.52	24.10	21.26	39.98	nd	nd	nd	106.22	12.39	73.03	422.34
	6	52.74	35.02	41.90	23.32	24.58	38.50	nd	nd	nd	119.39	10.76	84.35	430.56
	8	46.47	33.23	35.02	20.69	25.54	35.83	nd	nd	nd	117.49	8.95	85.83	409.05

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾tr: trace(<0.002 µg/g).

(다) 발효 중 유리아미노산 함량 변화

마늘 첨가 된장의 발효 중 유리아미노산 조성을 Fig. 68 및 Tables 62-64에 나타내었다. 모든 된장에서 총 27 종의 urea 및 1-Methylhistidine을 제외한 일반아미노산 25 종과 필수아미노산 (threonine, methionine, phenylalanine, valine, isoleucine, leucine, 및 lysine) 7 종이 공통적으로 검출되어 총 32 종의 유리아미노산이 검출되었다 (Fig. 68). 마늘을 첨가하지 않은 된장의 발효 후기 (8 주)의 총 유리아미노산 함량은 5534.80 mg/g 으로 가장 높았다. 그 중 proline 은 발효가 진행됨에 따라 증가하여 후기 (8 주)에 312.68 mg/g이었고, glutamic acid는 1308.55 mg/g으로 증가한 후 발효 후기 (8 주)에 1087.48 mg.g으로 감소하였다 (Table 62). 필수아미노산은 isoleucine 및 leucine이 발효가 진행됨에 따라 증가하여 발효 후기에는 각각 350.64 및 445.28 mg/g 이었다. 10% 마늘된장의 총 유리아미노산 함량은 4736.86 mg/g 이었고 발효 과정 중 proline, aspartic acid 및 glutamic acid가 증가하였으며 발효 후기에는 각각 280.72, 473.34 및 1087.48 mg/g 이었다 (Fig. 68 및 Table 63). 20% 마늘된장의 총 유리아미노산 함량은 4503.68 mg/g 이었으며 예외적으로 taurine이 발효 과정 중 검출되지 않았으며, gamma-aminobutyric 함량이 증가하는 경향을 나타내었다 (Table 64).

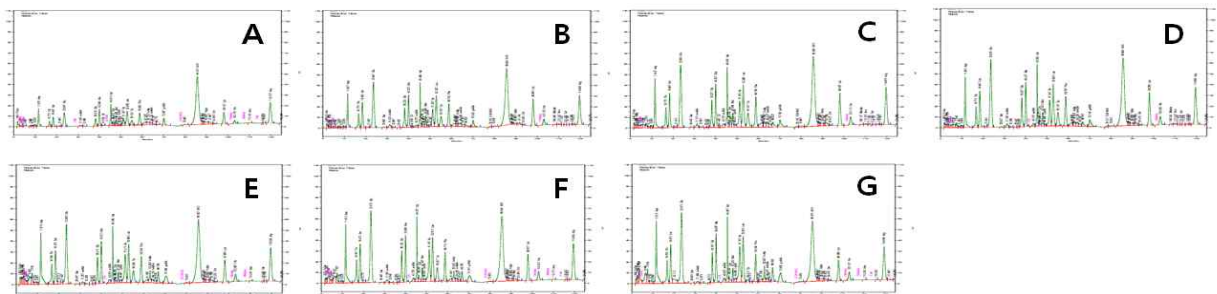


Fig. 68. Typical chromatogram of free amino acid contents. Chromatogram of free amino acids from 10% garlic Doenjang at 0 week (A), 1 week (B), 2 week (C), 3 week (D), 4 week (D), 6 week (E), and 8 week (F).

Table 62. Changes of free amino acid contents of doenjang during fermentations¹⁾

Contents ¹⁾ (mg/g)	Fermentation time (w)						
	0	1	2	3	4	6	8
General amino acids							
Phosphoserine	59.25	52.22	39.54	38.36	30.93	34.13	66.16
Taurine	nd ²⁾	23.28	15.91	22.99	18.62	23.71	47.86
Phosphoethanolamine	nd	nd	23.27	36.26	32.47	nd	nd
Urea	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Proline	53.95	164.80	205.87	272.78	276.83	300.62	312.68
Aspartic acid	101.39	218.28	315.42	391.24	410.30	447.23	440.69
Serine	62.31	162.08	211.70	245.18	267.11	278.52	217.43
Glutamic acid	226.53	732.22	1008.67	1150.63	1296.21	1308.55	1087.48
Sarcosine	nd	28.30	32.92	20.13	51.02	19.40	12.96
Amino adipic acid	27.28	70.15	85.70	67.02	85.79	72.25	48.74
Glycine	35.43	93.77	122.83	135.68	139.49	137.74	126.90
Alanine	78.79	150.61	187.89	223.20	223.96	219.49	217.42
Citrulline	10.85	nd	nd	9.31	nd	nd	nd
α -aminobutyric acid	10.90	31.66	48.81	43.57	53.97	32.83	48.46
Cystine	10.85	36.30	49.41	54.17	57.12	50.26	62.52
Cystathionine	32.04	22.55	34.41	40.23	47.21	107.10	60.53
Tyrosine	94.31	175.52	258.48	284.98	295.29	268.24	298.08
β -alanine	44.76	33.61	38.59	64.61	67.72	61.68	98.84
β -aminoisobutyric acid	44.76	69.98	82.81	80.93	82.23	60.14	85.03
γ -aminobutyric acid	48.76	53.56	62.04	70.38	75.83	62.77	85.49
Aminoethanol	9.40	9.31	10.16	11.33	11.35	7.54	nd
Hydroxyproline	24.25	23.69	24.76	46.14	46.38	41.76	43.53
Ornithine	9.19	7.56	7.99	10.32	7.59	6.53	20.59
1-Methylhistidine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-Methylhistidine	nd	5.24	76.12	3.59	3.78	2.53	nd
Anserine	42.83	105.84	124.85	86.49	92.55	77.66	33.38
Carnosine	nd	7.01	9.92	5.69	5.94	5.14	4.34
Arginine	216.73	316.82	386.12	412.83	437.65	451.60	374.75
Totals	1244.56	2594.36	3464.19	3828.04	4117.34	4077.42	3793.86
Essential amino acids							
Threonine	39.61	109.10	141.76	163.81	172.21	181.02	156.95
Valine	86.14	156.49	197.63	231.58	231.28	234.45	231.44
Methionine	47.74	82.45	108.79	115.43	116.58	107.10	108.93
Isoleucine	76.42	166.07	218.28	281.54	293.43	311.42	350.64
Leucine	147.98	310.65	390.91	443.49	439.08	443.61	445.28
Phenylalanine	158.82	259.80	348.19	373.25	379.41	351.24	352.39
Lysine	113.69	241.07	292.05	289.95	300.95	285.14	222.22
Histidine	32.93	61.53	76.12	92.49	93.09	100.87	91.83
Totals	703.33	1387.16	1773.73	1991.54	2026.03	2014.85	1959.68
Total amino acids	1947.89	3981.52	5237.92	5819.58	6143.37	6092.27	5753.54
Ammonia	53.12	63.65	79.54	88.04	89.57	85.29	79.56

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.²⁾nd: not detected.

Table 63. Changes of free amino acid contents of 10% garlic doenjang during fermentations¹⁾

Contents ¹⁾ (mg/g)	Fermentation time (w)						
	0	1	2	3	4	6	8
General amino acids							
Phosphoserine	53.66	37.81	47.22	45.68	70.83	45.80	47.80
Taurine	nd ²⁾	10.08	23.65	22.96	49.13	35.85	49.94
Phosphoethanolamine	nd	17.11	28.16	28.58	67.67	nd	79.95
Urea	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Proline	46.96	124.50	185.04	195.38	221.11	252.05	280.72
Aspartic acid	103.99	193.12	322.09	321.60	390.35	414.50	473.34
Serine	48.39	127.64	179.03	175.32	174.00	201.71	196.03
Glutamic acid	183.21	594.79	813.69	861.25	781.19	959.62	938.55
Sarcosine	nd	17.79	21.41	19.67	12.47	15.70	5.95
Aminoadipic acid	17.44	53.35	62.29	61.52	41.62	52.33	33.98
Glycine	26.85	69.73	96.07	94.99	84.34	101.28	93.50
Alanine	63.37	125.15	169.90	160.64	153.19	170.39	176.05
Citrulline	6.48	7.15	9.29	nd	nd	nd	nd
α-aminobutyric acid	nd	20.67	62.29	20.15	25.05	30.11	31.88
Cystine	35.09	42.01	60.38	46.21	42.52	76.69	76.31
Cystathionine	12.17	17.47	35.40	20.91	36.99	34.42	53.78
Tyrosine	67.89	137.95	227.59	183.62	163.78	197.38	39.91
β-alanine	33.29	18.17	42.33	36.43	74.61	62.57	88.07
β-aminoisobutyric acid	31.77	69.59	79.88	63.31	55.73	47.49	58.49
Gamma aminobutyric acid	42.78	49.51	64.29	61.02	81.43	65.46	90.16
Aminoethanol	nd	8.50	10.83	8.96	nd	nd	nd
Hydroxyproline	44.01	3.23	42.65	38.99	43.54	44.32	43.58
Ornithine	8.33	3.68	8.32	7.12	5.66	7.99	11.49
1-Methylhistidine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-Methylhistidine	nd	3.94	3.83	4.16	nd	nd	nd
Anserine	26.34	78.97	77.39	83.37	30.30	35.17	18.96
Carnosine	nd	5.04	4.12	4.34	15.14	nd	nd
Arginine	285.64	400.54	508.81	499.11	437.80	479.71	446.92
Totals	1137.66	2237.49	3185.95	3065.29	3058.45	3330.54	3335.36
Essential amino acids							
Threonine	31.74	84.65	126.75	121.70	134.35	147.31	153.42
Valine	77.61	139.46	192.97	180.98	172.57	192.09	191.99
Methionine	35.17	62.79	85.11	73.83	57.61	75.29	75.30
Isoleucine	56.71	125.97	219.40	197.61	240.52	263.68	307.71
Leucine	108.12	235.54	329.11	312.04	282.22	329.17	341.57
Phenylalanine	122.71	214.89	318.87	279.36	243.61	271.89	263.46
Lysine	97.17	209.37	255.62	253.72	169.12	206.34	161.56
Histidine	28.38	48.95	66.28	71.90	64.06	75.95	75.10
Total	557.61	1121.62	1594.11	1491.14	1364.06	1561.72	1570.11
Total amino acids	1695.27	3359.11	4780.06	4556.43	4422.51	4892.26	4905.47
Ammonia	54.86	61.32	78.88	74.44	70.08	73.78	67.10

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

Table 64. Changes of free amino acid contents of 20% garlic doenjang during fermentations¹⁾

Contents ¹⁾ (mg/g)	Fermentation time (w)						
	0	1	2	3	4	6	8
General amino acids							
Phosphoserine	64.11	46.74	55.21	50.61	57.96	nd	49.59
Taurine	nd ²⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Phosphoethanolamine	24.07	19.56	28.03	29.41	39.32	65.18	76.67
Urea	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Proline	52.79	128.81	156.56	168.79	205.06	220.00	233.40
Aspartic acid	137.16	262.79	287.65	306.42	373.38	371.55	460.00
Serine	52.56	118.88	142.83	153.02	182.23	152.02	171.61
Glutamic acid	207.30	610.63	714.18	791.12	877.69	824.13	883.32
Sarcosine	nd	14.98	19.03	17.38	17.15	13.34	6.67
Aminoadipic acid	16.20	43.11	55.54	59.10	56.88	44.13	35.35
Glycine	28.47	62.82	77.90	79.92	88.51	85.39	80.71
Alanine	69.10	130.89	143.73	136.79	157.07	155.40	154.08
Citrulline	20.94	22.06	9.39	nd	nd	nd	nd
a-aminobutyric acid	7.85	23.27	27.40	18.49	22.69	25.02	35.35
Cystine	48.09	60.27	61.62	54.18	57.17	83.48	75.66
Cystathionine	17.10	34.29	21.61	21.33	22.57	36.17	54.82
Tyrosine	69.76	174.76	154.25	169.96	175.60	191.21	173.04
b-alanine	34.29	43.00	34.57	40.51	56.61	78.72	89.21
b-aminoisobutyric acid	28.49	71.83	61.01	66.41	60.39	65.82	47.29
Gamma aminobutyric acid	45.42	68.59	62.21	66.56	73.74	89.38	108.93
Aminoethanol	nd	8.66	8.73	8.69	7.80	nd	nd
Hydroxyproline	44.25	39.53	39.85	41.02	43.11	42.70	42.78
Ornithine	9.44	9.29	9.94	8.02	8.46	7.19	5.70
1-Methylhistidine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-Methylhistidine	nd	3.08	3.15	3.14	2.35	nd	nd
Anserine	29.22	58.82	65.54	64.73	50.00	31.31	17.94
Carnosine	nd	4.58	2.25	4.75	2.88	18.97	nd
Arginine	384.70	563.73	587.65	574.27	624.29	561.58	506.58
Totals	1391.31	2624.97	2829.83	2934.62	3262.91	3162.69	3308.70
Essential amino acids							
Threonine	33.22	80.50	95.56	102.40	121.78	115.11	130.93
Valine	97.24	163.46	180.42	172.15	195.17	198.48	171.90
Methionine	36.84	69.25	60.40	55.93	58.03	47.90	64.20
Isoleucine	63.00	143.42	174.80	181.79	217.48	241.36	250.87
Leucine	109.96	244.79	259.11	265.99	292.06	290.45	271.15
Phenylalanine	130.10	266.39	246.85	267.73	274.55	282.89	231.76
Lysine	102.81	212.55	229.90	227.87	234.79	196.75	154.88
Histidine	31.27	49.30	62.46	58.05	70.42	65.77	60.56
Total	604.44	1229.66	1309.50	1331.91	1464.28	1438.71	1336.25
Total amino acids	1995.75	3854.63	4139.33	4266.53	4727.19	4601.40	4644.95
Ammonia	56.97	66.29	72.89	73.08	75.78	69.95	63.32

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

(4) 발효 중 향기성분 분포

① 마늘 무침가 된장의 향기성분

마늘 무침가 된장 0 주째에는 28 종의 향기성분이 확인되었고 8 주째에는 36 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 8 주에 공통으로 검출된 향기성분은 acetic acid ethyl ester, trichloromethane, 1-ethoxy-2-methyl propane, 1-ethoxy butane, trimethyl hydrazine, 2,4-dimethyl heptane, ethylbenzene, 4-methyl octane, tetradecane 및 heptadecane 10 종의 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 acetic acid ethyl ester와 trichloromethane으로 각각 12.11%와 31.08%를 차지하였고 8 주에는 이 향기성분은 감소하여 각각 5.48% 및 16.38%를 차지하였고 주요 향기성분으로는 trichloromethane을 비롯하여 ethyl benzene이 11.54%, 새로운 생성된 pentanoic acid, 3-methylbutyl ester가 14.39% 였다. 발효 후 향기성분의 종과 다양한 향기성분이 생성된 것은 미생물의 발효 작용에 의한 것으로 판단되었다 (Tables 65, 66).

Table 65. Volatile compounds of doenjang without garlic at 0 week.

No.	Compound	RT (min)	Peak area (×10 ⁶)	Ratio (%)
1	acetic acid ethyl ester	2.58	26.09	12.11
2	trichloromethane	2.63	66.96	31.08
3	1-ethoxy-2-methyl propane	2.98	15.64	7.26

4	2-methoxy butane	3.66	4.97	2.30
5	1-ethoxy butane	4.02	3.04	1.41
6	trimethyl hydrazine	4.22	1.90	0.88
7	1,1-diethoxy ethane	4.43	6.44	2.99
8	2,4-dimethyl heptane	7.01	5.80	2.69
9	ethylbenzene	8.33	12.84	5.96
10	4-methyl octane	8.44	2.61	1.21
11	4-ethyl decane	15.00	4.77	2.21
12	3,7-dimethyl decane	15.17	1.46	0.68
13	acetophenone	15.29	3.15	1.46
14	3,6-dimethyl decane	16.41	2.08	0.96
15	tetradecane	24.77	0.86	0.40
16	1-cyclohexyl ethanone	28.50	1.43	0.66
17	methoxyacetic acid	28.75	1.36	0.63
18	sulfurous acid butyl tetradecyl ester	28.92	2.20	1.02
19	2-amino-2-oxo-acetic acid ethyl ester	29.22	0.85	0.40
20	2-octyl-1-dodecanol	29.42	2.10	0.98
21	hexadecane	29.60	14.41	6.68
22	oxalic acid cyclobutyl pentadecyl ester	29.88	2.00	0.93
23	2-butoxylfonylhexadecane	29.94	2.78	1.29
24	2-hexyl-1-decanol	30.02	1.22	0.57
25	eicosane	30.69	6.72	3.12
26	2-methyl hexadecane	31.01	6.81	3.16
27	heptadecane	31.82	13.04	6.05
28	nonadecane	33.33	1.97	0.91

RT: Retention time

Table 66. Volatile compounds of Doenjang without garlic at 8 week.

No.	Compound	RT (min)	Peak area ($\times 10^6$)	Ratio (%)
1	2-fluoro-2-butene	2.32	13.76	2.29
2	acetic acid ethyl ester	2.58	32.90	5.48
3	trichloromethane	2.63	98.42	16.38
4	1-ethoxy-2-methyl-propane	2.97	43.66	7.27
5	methyl vinyl sulfide	3.18	6.91	1.15
6	1-ethoxy butene	3.65	33.72	5.61
7	propanoic acid ethyl ester	3.99	7.95	1.32
8	methyl vinyl sulfide	4.20	1.27	0.21
9	1,1-diethoxy ethane	4.42	49.84	8.30
10	trimethyl hydrazine	4.74	1.30	0.22
11	hydrazine ethanoate	5.04	3.68	0.61
12	pentanoic acid, 3-methylbutyl ester	5.12	86.45	14.39
13	trimethyl hydrazine	5.63	0.95	0.16
14	2-methyl-2-butanol	6.87	2.05	0.34
15	2,4-dimethyl heptane	7.01	12.50	2.08
16	ethyl benzene	8.32	69.32	11.54
17	4-methyl octane	8.43	5.69	0.95
18	decane	13.11	1.91	0.32
19	1,2-dichloro benzene	14.21	4.78	0.80
20	benzeneacetaldehyde	14.56	5.15	0.86
21	4-ethyl decane	14.94	18.40	3.06
22	undecane	15.17	5.36	0.89
23	5-methyl undecane	16.41	6.85	1.14
24	4-ethyl phenol	18.35	3.28	0.55

25	dodecane	19.33	3.05	0.51
26	2-methoxy benzeneethanol	21.61	36.90	6.14
27	2,6,11-trimethyl dodecane	22.85	3.81	0.63
28	tetradecane	24.77	2.59	0.43
29	5-phenyl-1,2,4-thiadiazol-3-amine	26.55	0.46	0.08
30	2,6-bis phenol	27.79	1.30	0.22
31	diethyl phthalate	29.56	29.83	4.96
32	elemol	30.40	0.67	0.11
33	di-tert-dodecyl disulfide	30.79	0.68	0.11
34	alpha-cadinol	30.99	2.03	0.34
35	heptadecane	31.82	1.80	0.30
36	octadecane	33.94	1.62	0.27

RT: Retention time

② 증자마늘 10% 첨가 마늘된장의 향기성분

증자마늘을 10% 첨가한 마늘된장의 0 주의 향기성분은 33 종이 검출되었고 8 주에는 55 종이 검출되었다. 0 주와 8 주에 공통으로 검출된 향기성분은 9 종으로 acetic acid ethyl ester, trichloromethane, trimethyl hydrazine, 1-ethoxy butane, ethyl benzene, 4-methyl octane, 1,4-dimethyl benzene, tetradecane 및 hexadecane 있었다. 0 주의 주요 향기성분으로는 acetic acid ethyl ester, pentanoic acid 3- methylbutyl ester 및 ethyl benzene으로 각각 15.34%, 15.13% 및 19.32% 차지하였고 8 주의 주요 향기성분은 ethyl benzene만 10.07% 있었고 나머지는 10% 이하를 차지하였다. 0 주의 주요 향기성분인 acetic acid ethyl ester의 경우도 ethyl benzene과 마찬가지로 8 주에는 감소하여 5.29% 였다. 8 주에는 특정한 향기성분은 없었으나 발효 초기보다 향기성분이 다양해졌다. 이런 결과는 미생물의 발효 과정에 의해 다양한 향기성분이 생성된 것으로 판단되었다 (Table 67, 68).

Table 67. Volatile compounds of Doenjang with 10% garlic at 0 week.

No.	Compound	RT (min)	Peak area ($\times 10^6$)	Ratio (%)
1	acetic acid ethyl ester	2.58	42.38	15.34
2	trichloromethane	2.62	16.75	6.06
3	1-ethoxy-2-methyl propane	2.98	18.53	6.71
4	trimethyl hydrazine	3.15	3.38	1.22
5	2-fluoro-2-butene	3.28	2.04	0.74
6	1-ethoxy butane	3.66	5.68	2.06
7	pentanoic acid 3-methylbutyl ester	5.12	41.81	15.13
8	2,3,5-trimethyl hexane	6.77	1.44	0.52
9	methyl vinyl sulfide	7.68	0.52	0.19
10	2,3-dimethyl heptane	8.16	0.94	0.34
11	ethyl benzene	8.32	53.36	19.32
12	4-methyl octane	8.43	7.84	2.84
13	1,3-dimethyl benzene	8.61	2.59	0.94
14	1,1,3-triethoxy propane	11.62	1.13	0.41
15	dodecane	13.11	2.35	0.85
16	2,7,10-trimethyl dodecane	14.76	2.05	0.74
17	4-ethyl decane	15.17	7.49	2.71
18	propylene sulfide	15.23	1.30	0.47
19	1-phenyl ethanone	15.28	3.94	1.42
20	allyl disulfide	15.68	2.39	0.87
21	3,6-dimethyl decane	16.58	4.90	1.77
22	4-methyl undecane	16.78	1.42	0.51
23	tridecane	22.20	4.73	1.71
24	2,4-decadienal	22.62	3.46	1.25
25	tetradecane	24.77	4.56	1.65
26	tridecanol	27.06	1.43	0.52
27	2,6,11-trimethyl-dodecane	28.24	9.13	3.31
28	2-methyl hexacosane	28.48	3.76	1.36
29	methoxyacetic acid, 2-tetradecyl ester	28.92	1.88	0.68
30	hexadecane	29.60	12.39	4.49
31	2-hexy-1-decanol	29.76	1.38	0.50
32	2-naphthalenemethanol	30.91	3.98	1.44
33	1-chloro octadecane	31.00	5.30	1.92

RT: Retention time

Table 68. Volatile compounds of Doenjang with 10% garlic at 8 week.

No.	Compound	RT (min)	Peak area ($\times 10^6$)	Ratio (%)
1	4-methyl-1-penten-3-ol	2.15	38.36	5.04
2	propanoic acid methyl ester	2.19	18.89	2.48
3	methyl vinyl sulfide	2.37	5.03	0.66
4	acetic acid ethyl ester	2.58	40.29	5.29
5	trichloromethane	2.63	59.50	7.82
6	3-methyl butanal	3.00	18.40	2.42
7	trimethyl hydrazine	3.08	4.81	0.63
8	2-methyl-4-hydroxy cyclobutanone	3.14	20.33	2.67
9	2-fluoro-2-butene	3.28	8.99	1.18
10	1-ethoxy butane	3.65	41.00	5.39
11	1,1-diethoxy ethane	4.41	63.23	8.31
12	3-methyl butanol	4.52	5.45	0.72
13	hexamide	5.04	5.48	0.72
14	2,4-dimethyl heptane	7.01	13.75	1.81
15	2-furancarboxaldehyde	7.39	78.81	10.35
16	2,5-dimethyl furan	7.67	2.66	0.35
17	3-methyl butanoic acid methyl ester	8.16	1.15	0.15
18	ethyl benzene	8.32	76.68	10.07
19	4-methyl octane	8.43	6.59	0.87
20	1,4-dimethyl benzene	8.62	1.95	0.26
21	3-propanal	9.90	2.40	0.32
22	2,5-dimethyl pyrazine	10.04	2.06	0.27
23	benzaldehyde	11.76	2.54	0.33
24	2-pentyl furan	12.85	1.51	0.20
25	decane	13.11	2.34	0.31
26	1,2-dichloro benzene	14.21	5.85	0.77
27	benzenacetaldehyde	14.54	38.70	5.08
28	dinonyl trisulfide	14.76	2.51	0.33
29	2,6-dimethyl octane	14.86	2.94	0.39
30	1,2-bisallyl disulfide	15.67	7.50	0.99
31	3,7-dimethyl decane	16.58	2.57	0.34
32	undecane	16.79	1.51	0.20
33	p-dioxanyl hydroperoxide	17.51	2.98	0.39
34	4-ethyl phenol	18.34	16.14	2.12
35	2-hydroxy benzoic acid methyl ester	19.23	0.41	0.05
36	dodecane	19.33	4.62	0.61
37	2-ethyl-1,1-dimethyl hydrazine	19.96	0.79	0.10
38	2-methoxybenzeneethanol	21.61	60.20	7.91
39	diallyl trisulfide	22.21	42.84	5.63
40	2-methoxy-4-vinylphenol	22.56	22.70	2.98

41	2,7,10-trimethyl dodecane	23.29	0.63	0.08
42	dodecanol	23.52	0.43	0.06
43	butoxyethoxyethyl acetate	23.94	3.46	0.45
44	linalyl propionate	24.68	0.36	0.05
45	tetradecane	24.77	3.39	0.45
46	2,4-bis phenol	27.57	1.26	0.17
47	sulfurous acid pentyl undecyl ester	28.34	0.54	0.07
48	hexadecane	29.60	4.73	0.62
49	cubenol	30.40	0.76	0.10
50	muurolol	30.69	2.03	0.27
51	2-hexyl-1-decanol	30.78	0.93	0.12
52	2-propenyl cyclohexane	30.87	1.76	0.23
53	alpha-cardinol	30.99	2.32	0.30
54	heptadecane	31.82	1.82	0.24
55	octadecane	33.94	2.23	0.29

RT: Retention time

③ 증자마늘 20% 첨가 마늘된장의 향기성분

증자마늘을 20% 첨가한 마늘된장의 0 주째 향기성분은 35 종이 검출되었고 8 주째에는 62 종이 검출되었다. 0 주째와 8 주째에 공통으로 검출된 향기성분은 11 종으로 acetic acid ethyl ester, trichloromethane, 1-ethoxyl-2-methyl-propane, trimethyl hydrazine, 1-ethoxy butane, 2,4-dimethyl heptane, ethyl benzene, 4-methyl octane, dodecane, tetradecane 및 hexadecane 있었다. 0 주째 주요 향기성분으로는 acetic acid ethyl ester, trichloromethane, 1-ethoxy-2-methyl-propane, pentanoic acid 3-methylbutyl ester 및 ethyl benzene으로 각각 12.97%, 13.56%, 10.65%, 16.48% 및 9.00% 차지하였고 이들 중 8 주째 acetic acid ethyl ester, trichloromethane 및 1-ethoxyl-2-methyl propane은 감소하여 각각 4.10%, 5.67% 및 6.32% 였고 ethylbenzene은 약간 증가하여 9.75%를 차지하였다. 한편 0 주째 검출되지 않은 3-methylbutyl decanoate가 11.80%로 8 주째는 주요 향기성분이였다. 이런 결과는 미생물의 발효 과정에 의해 다양한 향기성분이 생성된 것으로 판단되었다 (Tables 69,70).

Table 69. Volatile compounds of Doenjang with 20% garlic at 0 week.

No.	Compound	RT (min)	Peak area ($\times 10^6$)	Ratio (%)
1	2-ethoxy propane	2.19	19.76	5.34
2	2-fluoro-2-butene	2.32	19.08	5.15
3	acetic acid ethyl ester	2.43	48.02	12.97
4	trichloromethane	2.62	50.22	13.56
5	1-ethoxy-2-methyl-propane	2.97	39.44	10.65
6	3-methyl hexane	3.28	8.97	2.42
7	1-ethoxy butane	3.65	14.31	3.87
8	propanediamide	3.99	7.86	2.12
9	trimethyl hydrazine	4.74	4.80	1.30
10	hydrazine ethanoate	4.99	1.75	0.47
11	propanoic acid, 3-methylbutyl ester	5.12	61.02	16.48
12	methyl vinyl sulfide	6.44	0.88	0.24
13	2,4-dimethyl heptane	7.01	7.32	1.98
14	ethyl benzene	8.32	33.33	9.00
15	4-methyl octane	8.43	2.88	0.78
16	2-pentyl furan	12.85	0.79	0.21
17	decane	13.11	0.97	0.26
18	4-ethyl decane	14.99	7.11	1.92
19	3,6-dimethyl decane	15.17	1.97	0.53

20	1-phenyl-ethanone	15.28	2.76	0.75
21	3,7-dimethyl decane	16.40	2.46	0.66
22	5-methyl undecane	16.58	0.86	0.23
23	dodecane	19.33	0.88	0.24
24	tetradecane	24.77	0.91	0.24
25	oxalic acid, hexyl octadecyl ester	28.49	0.92	0.25
26	4,5-dichloro acridine	28.54	0.72	0.20
27	sulfurous acid, 2-propyl tridecyl ester	28.62	0.53	0.14
28	methoxyacetic acid, 2-tetradecyl ester	28.92	1.08	0.29
29	hexadecane	29.60	9.78	2.64
30	1-pentacontanol	29.76	2.50	0.68
31	oxalic acid, isobutyl hexadecyl ester	30.19	1.15	0.31
32	sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester	30.62	2.63	0.71
33	2-naphthalenemethanol	30.91	6.62	1.79
34	nonadecane	31.01	5.40	1.46
35	2-hexyl-1-decanol	31.51	0.55	0.15

RT: Retention time

Table 70. Volatile compounds of Doenjang with 20% garlic at 8 week.

No.	Compound	RT (min)	Peak area ($\times 10^6$)	Ratio (%)
1	acetic acid ethyl ester	2.58	34.27	4.10
2	trichloromethane	2.62	47.35	5.67
3	1-ethoxy-2-methyl propane	2.97	52.80	6.32
4	2-methyl butanal	3.14	17.07	2.04
5	2-fluoro-2-butene	3.28	8.85	1.06
6	1-ethoxy-2-butane	3.65	14.95	1.79
7	trimethyl hydrazine	4.27	4.66	0.56
8	acetal	4.42	19.69	2.36
9	2-methyl-2-hexanol	5.04	5.94	0.71
10	3-methylbutyl decanoate	5.12	98.52	11.80
11	2-pentanol	6.87	4.12	0.49
12	2,4-dimethyl heptane	7.01	8.26	0.99
13	fufural	7.39	25.14	3.01
14	3-furaldehyde	7.52	4.58	0.55
15	chlorobenzene	7.79	10.87	1.30
16	dially sulfide	8.22	4.31	0.52
17	ethylbenzene	8.32	81.44	9.75
18	4-methyloctane	8.43	6.21	0.74
19	<i>p</i> -xylene	8.61	3.97	0.48
20	1,3-dimethylbenzene	9.40	14.79	1.77
21	3-propanal	9.90	2.86	0.34
22	2,5-dimethyl pyrazine	10.05	3.45	0.41
23	1,3-dithiane	10.20	3.31	0.40
24	4-ethoxy-1-butanol	12.45	2.22	0.27
25	2-pentylfuran	12.84	2.35	0.28
26	trimethyl pyrazine	13.17	2.63	0.31
27	benzenacetaldehyde	14.54	23.88	2.86
28	4-ethyl decane	14.99	8.09	0.97
29	3-methyl undecane	15.17	3.50	0.42
30	3-methyl butanoic acid	15.22	2.45	0.29
31	allyl disulfide	15.67	23.64	2.83
32	6-ethyl-2methyl octane	16.40	3.91	0.47
33	4-methoxy butanoic acid	16.49	1.73	0.21

34	3,6-dimethyldecane	16.58	1.46	0.18
35	durene	16.82	1.60	0.19
36	1,4-dioxan-2-yl hydroperoxide	17.50	9.41	1.13
37	dodecane	19.33	2.99	0.36
38	dehydrobenzofuran	19.86	1.44	0.17
39	eicosane	21.61	6.26	0.75
40	2-undecane	22.00	1.49	0.18
41	heneicosane	22.14	0.41	0.05
42	allyl trisulfide	22.22	114.72	13.74
43	2-methoxy-4-vinylphenol	22.56	30.85	3.69
44	thymol	22.68	2.57	0.31
45	docosane	22.85	2.70	0.32
46	tetradecane	24.77	0.91	0.11
47	surfynol	25.21	7.18	0.86
48	2,6-bis phenol	27.67	45.52	5.45
49	gamma-cadinene	27.95	1.28	0.15
50	diallyl tetrasulfide	28.34	3.03	0.36
51	2-tridecyl methoxyacetic acid	28.92	0.71	0.08
52	hexadecane	29.60	4.33	0.52
53	2-hexyl-1-decanol	29.67	0.20	0.02
54	muurolol	30.69	2.73	0.33
55	alpha-cadinol	30.99	2.73	0.33
56	heptadecane	31.83	7.12	0.85
57	2-hexyl-1-dodecanol	31.96	3.11	0.37
58	1-pentacontanol	33.84	0.66	0.08
59	octadecane	33.94	1.98	0.24
60	tetradecanoic acid trimethylsilyl ester	35.02	1.11	0.13
61	hexadecanoic acid methyl ester	36.50	5.24	0.63

RT: Retention time

(3) 마늘 첨가 된장의 항산화 활성

(가) 발효 중 항산화 활성 변화

마늘 첨가 된장의 발효 중 항산화 활성을 측정하였다 (Fig. 69). 항산화 활성 역시 총 phenolics 함량과 마찬가지로 모든 된장에서 발효가 진행됨에 따라 증가하였다. 특히 10% 마늘 첨가 된장은 DPPH radical scavenging activity가 발효가 전 (0 주) 19.71%에서 발효 후 8 주에 76.48%로 크게 증가하였다. ABTS 라디칼 소거활성도 모든 된장에서 발효 과정 중 증가하였다. 10% 마늘 된장은 발효 후 8 주에 75.51%로 가장 우수하였다. 한편 FRAP 환원력 역시 라디칼 소거활성과 마찬가지로 10% 마늘 된장이 우수하였다. 이는 총 phenolics 함량, isoflavone의 비례양체 함량 증가에 기인한 것으로 판단되었다. 그러나 마늘 첨가량에 따른 항산화 활성에는 차이가 없었다.

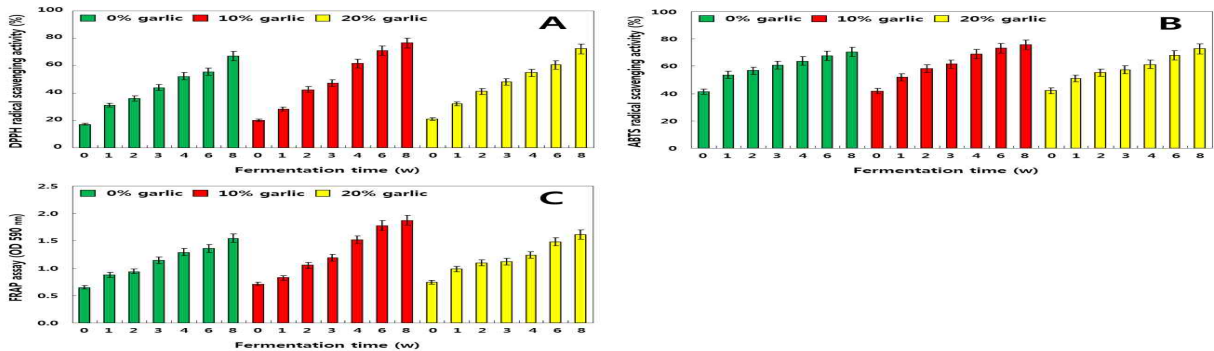


Fig. 69. Changes of antioxidant activities of garlic doenjang during fermentations. A; DPPH radical scavenging activity, B; ABTS radical scavenging activity, and C; FRAP assays.

나. 생마늘 첨가 된장의 특성

(1) 생마늘 첨가 된장의 이화학적 특성

(가) 생마늘 첨가 된장의 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화

발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화를 Table 71에 나타내었다. 마늘 무 첨가 된장과 마늘 첨가된장은 발효 중 pH는 큰 차이는 없었으나, 마늘 첨가 된장이 약간 더 높은 경향을 보였다. 한편 산도는 발효 초기 0.6% 수준에서 발효 중기에 약 1.20% 수준으로 증가하는 경향을 보였다. 염도는 발효 중기 12-13% 수준이고 생균수 중 효모의 경우 마늘 10% 이상 첨가구에서는 발효가 진행됨에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 바실러스는 큰 변화가 없었다. 효모의 경우 마늘에 대한 내생이 약한 것으로 판단되었다.

Table 71. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of garlic doenjang during fermentations¹⁾

Conc. of garlic (%)	Fermentation time (w)	Contents ²⁾				
		pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers log cfu/g	
					<i>Yeast</i>	<i>Bacillus</i>
0	0	6.02	0.59	8.00	7.38	9.89
	1	6.19	1.10	10.40	7.14	8.45
	2	6.28	1.39	12.80	7.06	9.43
	3	6.18	1.08	9.00	6.68	9.95
	4	6.10	1.02	10.60	5.53	8.55
	5	6.08	1.25	10.40	6.34	8.26
	6	6.05	1.43	13.00	7.10	9.42

5	0	5.99	0.60	7.80	7.06	9.07
	1	6.04	1.00	10.60	6.06	8.39
	2	6.00	1.20	11.20	5.56	10.07
	3	5.97	1.10	8.40	5.05	8.61
	4	5.92	1.42	12.60	5.64	8.41
	5	5.94	1.43	11.80	7.01	8.65
	6	5.94	1.28	12.80	7.21	9.10
10	0	0	6.02	0.59	8.00	7.38
	1	1	6.22	0.97	11.80	5.48
	2	2	6.24	1.01	10.20	4.78
	3	3	6.23	1.04	12.00	4.37
	4	4	6.19	1.01	11.40	3.00
	5	5	6.15	1.34	13.20	3.00
	6	6	6.14	1.27	12.60	6.03
15	0	0	5.99	0.60	7.80	7.06
	1	1	6.08	1.05	10.20	4.36
	2	2	6.13	1.14	10.00	5.06
	3	3	6.02	1.02	10.00	3.68
	4	4	5.95	1.07	10.42	4.56
	5	5	5.96	1.40	13.00	5.90
	6	6	5.95	1.21	11.80	6.24
20	0	0	6.02	0.59	8.00	7.38
	1	1	6.26	0.90	11.00	3.94
	2	2	6.27	1.22	12.60	3.18
	3	3	6.27	1.06	12.60	2.25
	4	4	6.20	1.01	12.80	3.78
	5	5	6.23	1.17	12.20	4.93
	6	6	6.17	1.23	12.80	5.38
30	0	0	6.02	0.59	8.00	7.38
	1	1	6.28	0.98	11.00	3.96
	2	2	6.33	1.01	12.40	4.02
	3	3	6.34	1.03	11.60	5.38
	4	4	6.23	0.85	9.20	4.85
	5	5	6.26	1.00	9.60	4.92
	6	6	6.26	1.18	13.00	5.01

¹⁾ *Garlic doenjang* were fermented at room temperature for 6 week.

²⁾ All values are means of determination in three independent experiments.

(2) 마늘 첨가 된장의 총 phenolics, isoflavone 및 향기성분 분석

(가) 발효 중 총 phenolics 함량 변화

마늘 첨가 된장의 총 phenolics 함량 변화는 Fig. 70과 같다. 된장 중 총 phenolics 함량이 가장 높은 것은 마늘 10% 첨가한 된장이다. 모든 마늘 된장들은 발효가 진행됨에 따라 총 phenolics 함량이 증가하였다. 특히 10% 마늘을 첨가한 된장의 경우 발효 전 (0 주) 9.18 mg/g 에서 발효 중기 (6 주)에는 20.48 mg/g으로 2 배 증가하였다.

(나) 발효 중 isoflavone 함량 변화

마늘 첨가 된장의 HPLC 크로마토그램, isoflavone 비율 및 함량 변화는 Fig. 71 및 Table 72와 같다. 마늘된장은 공통적으로 12 종의 isoflavone 유도체가 검출되었다 (Fig. 71). 발효가 진행됨에 따라 aglycone 함량은 동일하게 증가하였고, 총 isoflavone 함량은 마늘 무 첨가 된장이 3854.8 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았다 (Table 72). 20% 마늘 첨가 된장의 경우 2587.70 $\mu\text{g/g}$ 으로 총 isoflavone 함량이 가장 낮았으며, 10% 마늘 첨가 된장은 3135.00 $\mu\text{g/g}$ 으로 함량이 비교적 높았다. 발효 전 (0 주)에는 daidzin, glycitin 및 genistin 함량은 각각 200.08 $\mu\text{g/g}$, 107.98 $\mu\text{g/g}$ 및 207.70 $\mu\text{g/g}$ 이었고 malonylglycosides의 daidzin, glycitin 및 genistin 함량은 각각 20.89 μg

/g, 18.22 $\mu\text{g/g}$ 및 29.25 $\mu\text{g/g}$, acetylglycoside인 daidzin, glycitin 및 genistin은 각각 5.20 $\mu\text{g/g}$, 1.43 $\mu\text{g/g}$ 및 0.72 $\mu\text{g/g}$ 이었다. 발효가 진행됨에 따라 glycosides 및 malonylglycosides 함량이 줄어들면서 aglycones 함량이 증가하였으며 발효 종기 (6 주) daidzein, glycitein 및 genistein 함량은 각각 140.26 $\mu\text{g/g}$, 37.33 $\mu\text{g/g}$, 및 114.76 $\mu\text{g/g}$ 으로 증가하였다. 한편 10% 마늘 첨가 된 장은 발효 전 (0 주) 79.34%의 glycosides 비율이 발효 종기 (6 주)에는 12.80%로 감소하였고 aglycones 비율은 발효전 9.01%에서 발효 종기에 62.92%로 증가하였다.

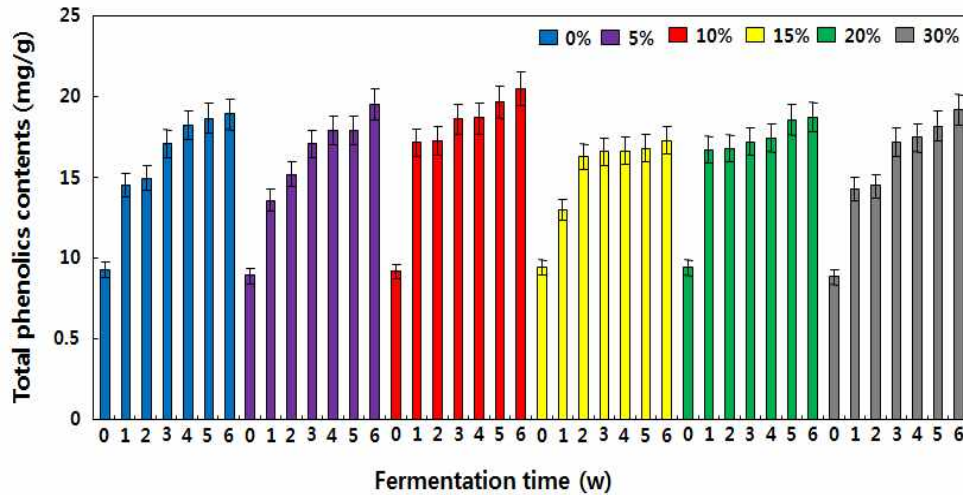


Fig. 70. Changes of total phenolic contents of garlic doenjang during fermentations.

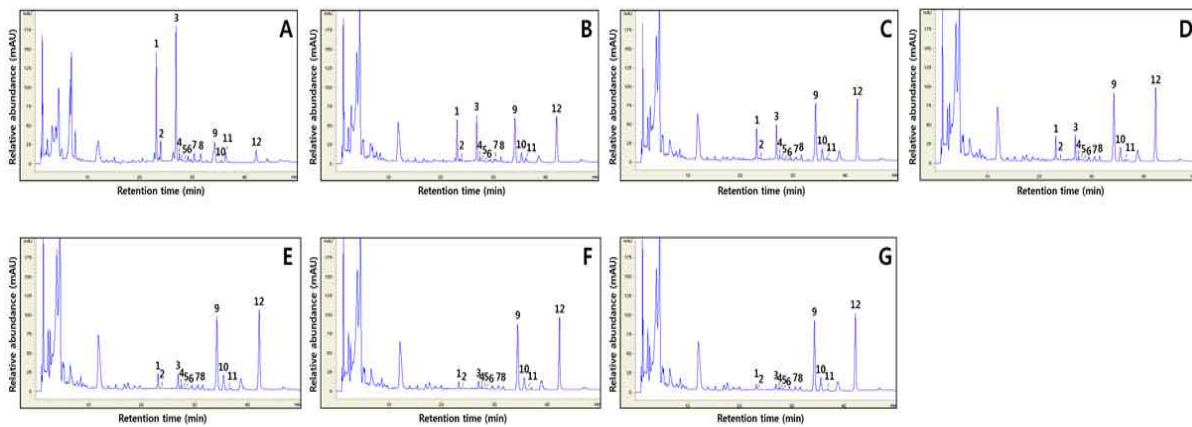


Fig. 71. Typical HPLC chromatogram of isoflavone. A; 10% garlic Doenjang at 0 week (A), 1 week (B), 2 week (C), 3 week (D), 4 week (E), 5 week (F), and 6 week (G). 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, acetylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, glycitein; 11, acetylgenistin; and 12, genistein.

Table 72. Changes of 12 isoflavone contents of garlic doenjang during fermentations¹⁾

Conc. of garlic (%)	Fermentation time (w)	Isoflavone contents ²⁾ (µg/g)												
		Glycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Aglycones			Totals
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	
0	0	196.36	100.19	206.33	22.22	31.47	37.27	nd ³⁾	nd	nd	51.08	7.29	13.72	668.93
	1	133.12	62.89	126.74	33.34	33.27	55.59	15.03	10.92	5.46	143.68	53.65	105.18	778.87
	2	90.07	33.33	71.98	18.40	19.22	33.05	tr ⁴⁾	4.98	nd	127.00	34.48	79.79	516.3
	3	77.92	32.22	56.48	17.90	19.82	34.56	0.84	5.90	nd	153.22	41.22	98.78	538.86
	4	55.76	25.90	32.43	13.78	17.68	29.79	tr	4.82	nd	141.35	36.82	92.92	451.25
	5	45.90	24.58	24.34	13.37	17.45	31.40	tr	4.54	nd	148.77	37.43	99.38	447.16
5	6	41.64	25.24	21.80	12.18	16.50	31.27	tr	4.52	nd	153.05	38.16	103.69	448.05
	0	186.50	93.35	193.28	17.73	15.83	27.98	tr	0.89	0.45	38.44	7.86	22.86	605.17
	1	126.69	38.15	114.44	15.93	14.75	28.32	tr	0.60	0.30	81.35	26.36	63.34	510.23
	2	95.97	26.24	74.88	15.10	14.12	27.68	tr	0.60	0.30	109.46	33.99	86.71	485.05
	3	68.20	13.83	42.55	12.28	11.97	23.65	tr	1.80	0.90	127.74	37.66	104.17	444.75
	4	50.60	19.19	23.66	12.20	11.59	22.96	tr	2.50	1.25	143.05	4.31	114.99	406.3
10	5	43.72	21.25	18.74	12.48	12.56	28.04	3.74	3.19	1.60	139.70	38.44	112.43	435.89
	6	37.46	17.20	12.32	10.01	10.66	20.39	tr	2.25	1.13	140.26	37.33	114.76	403.77
	0	200.08	107.98	207.70	20.89	18.22	29.25	5.20	1.43	0.72	36.70	6.84	15.05	650.06
	1	93.31	29.91	74.38	14.13	15.30	23.35	3.36	0.71	0.35	89.65	28.43	56.91	429.79
	2	79.07	25.06	58.86	14.01	15.13	23.53	4.64	0.58	0.29	114.24	35.35	76.67	447.43
	3	67.36	25.11	44.73	13.85	15.55	23.63	7.63	0.54	0.27	135.26	42.04	92.59	468.56
15	4	47.54	15.71	25.81	9.56	12.28	21.49	1.07	3.61	1.80	140.77	42.40	102.92	424.96
	5	34.16	13.76	11.97	6.33	10.96	17.78	tr	3.20	1.60	124.59	36.12	92.64	353.11
	6	31.07	14.69	8.63	6.02	11.00	17.49	0.35	2.96	1.48	131.46	37.60	98.35	361.1
	0	198.58	100.44	205.82	18.56	16.04	27.50	tr	1.50	0.75	40.77	9.47	26.18	645.61
	1	107.98	27.28	85.04	13.90	13.94	30.78	tr	1.66	0.83	88.87	31.06	72.79	474.13
	2	77.97	16.50	48.51	12.28	11.91	21.76	tr	2.81	1.40	128.08	38.51	106.36	466.09
20	3	47.42	21.97	18.32	11.23	11.98	23.60	0.34	3.18	1.59	130.37	37.47	106.49	413.96
	4	32.47	10.78	7.90	6.56	9.34	18.31	tr	2.23	1.12	131.18	36.19	108.00	364.08
	5	32.55	17.70	6.07	7.23	15.05	16.88	tr	2.42	1.21	139.04	37.91	113.39	389.45
	6	29.12	16.26	2.96	6.27	9.93	15.44	tr	2.20	1.10	130.84	35.55	106.65	356.32
	0	160.16	65.94	166.46	11.29	12.18	22.61	nd	0.75	0.38	40.54	5.12	13.33	498.76
	1	87.13	26.11	59.87	14.25	17.37	23.05	4.54	0.80	0.40	110.83	38.79	74.77	457.91
30	2	54.70	14.81	26.53	8.81	13.10	16.63	tr	3.32	nd	114.95	36.99	84.33	374.17
	3	37.45	25.65	12.87	5.60	11.02	15.22	tr	2.94	nd	120.61	37.08	87.33	355.77
	4	28.82	24.88	5.79	4.39	11.24	14.55	tr	3.11	nd	118.15	39.70	85.44	336.07
	5	21.03	nd ³⁾	tr ⁴⁾	1.30	nd	12.37	nd	2.59	nd	115.74	36.20	81.45	277.68
	6	23.20	nd	1.84	2.22	9.77	12.46	0.46	2.70	nd	118.33	34.71	83.94	289.63
	0	147.55	66.90	117.13	215.14	17.76	20.23	tr	0.45	0.23	48.24	5.39	12.79	651.81
30	1	73.02	23.97	47.47	11.39	14.45	142.47	0.38	4.20	2.10	88.39	30.83	62.09	500.76
	2	37.70	nd	10.98	1.52	nd	13.61	nd	2.11	nd	98.98	32.78	70.32	268
	3	33.41	nd	9.36	4.35	11.18	14.01	tr	2.84	nd	108.41	36.37	78.64	298.57
	4	28.46	nd	6.10	4.16	10.78	13.21	1.61	3.19	nd	126.58	43.46	89.65	327.2
	5	25.36	nd	3.51	3.07	19.82	11.33	nd	3.12	nd	118.94	39.63	82.38	307.16
	6	24.30	nd	1.80	9.49	11.40	10.98	9.35	3.42	nd	131.71	40.59	91.19	334.23

¹⁾Garlic doenjang were fermented at room temperature for 6 week.

²⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

³⁾nd: not detected.

⁴⁾tr: trace(<0.002 µg/g).

(다) 향기성분 분석

① 일반된장 (대조구)의 향기성분 : 일반된장(대조구) 0 주째에는 32 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 37 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Butanal 3-methyl-, Furfural Propanal, 3-(methylthio)-, 2-Furancarboxaldehyde 5-methyl-, Furan 2-pentyl-, Benzeneacetaldehyde, Diallyl disulphide, Phenol 2-methoxy-, Cyclopentasiloxane decamethyl-, Tetradecane, 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal, Cycloheptasiloxane tetradecamethyl-, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid, ethyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester 및 Octadecanoic acid, ethyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Butanal 3-methyl-와 Ethyl 9 cis 11 trans-octadecadienoate 으로 각각 16.707%와 16.83%를 차지하나 6 주에는 전자의 향기성분은 감소하여 12.55% 이고 후자는 검출되지 않았고 9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester는 증가하여 23.35% 였다 (Table 73).

Table 73. Volatile compounds of Doenjang without garlic.

No.	Volatile compounds	RT	Area%	
			0w	6w
1	Propanal, 2-methyl-	1.764		2.68
2	Butanal, 3-methyl-	2.093	16.70	12.55
3	2,2-Dimethyl-1,3-propanediamine	2.508		0.82
4	1-Pentanol	2.571	0.86	
5	Hydrazine, 1,2-dimethyl-	2.954		6.20
6	Pentanoic acid, 2-methyl-	3.172		0.35
7	Hexanal	3.223	0.18	
8	Furfural	3.633	16.31	9.06
9	Butanedioic acid, monopropargyl ester	4.276		0.31
10	2-Oxazolidinone, 3-methyl-	4.310		
11	Propanal, 3-(methylthio)-	4.837	0.53	1.02
12	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	6.024	0.51	0.87
13	Succinic acid, 2-ethylhexyl hexylester	6.244		0.75
14	Succinic acid, 2,4-dimethylpent-3-yl pentyl ester	6.261	0.48	
15	Furan, 2-pentyl-	6.668	0.22	0.38
16	Succinic acid, butyl 2-ethylhexyl ester	6.937		0.12
17	Succinic acid, butyl nonyl ester	6.960	0.13	
18	Benzeneacetaldehyde	7.979	4.68	10.71
19	Cyclopentane, 1-hexyl-3-methyl-	8.631		0.12
20	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	8.631		0.14
21	Diallyl disulphide	8.905	0.17	0.57
22	Phenol, 2-methoxy-	9.160	0.11	0.43
23	Nonanal	9.529		0.21
24	Maltol	9.992		0.14
25	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	10.902	0.42	0.60
26	Furan, 3-phenyl-	12.739	0.08	0.13
27	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	14.124		0.42
28	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	14.656		0.20
29	2-Methoxy-4-vinylphenol	15.197	0.58	1.11
30	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.563	0.82	0.90
31	1,2-Dithiolane	16.538		0.12
32	Tetradecane	17.374	0.11	0.15
33	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	19.525		0.15
34	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.720	0.40	0.94
35	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.969	0.64	0.88
36	Butylated Hydroxytoluene	20.349		0.57
37	Benzoic acid, 2,4-bis[(trimethylsilyloxy]-, trimethylsilyl ester	26.134	0.09	
38	1,3,5,7-Tetraethyl-1-ethylbutoxy siloxycyclotetrasiloxane	26.134		0.25
39	n-Hexadecanoic acid	33.504	3.53	4.37
40	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.265	12.19	
41	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.860	1.64	4.80
42	10,13-Octadecadienoic acid, methylester	36.559	0.11	
43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester	36.931	0.12	
44	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	37.715	16.54	
45	9-Octadecenoic acid, (E)-	37.801		5.61
46	Ethyl 9 cis 11 trans-octadecadienoate	37.984	16.83	
47	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.248	7.13	23.35
48	Octadecanoic acid, ethyl ester	38.740	1.81	0.74
49	Tetrahydrofuran-2-carboxylic acid,dibenzofuran-3-ylamide	42.722	0.16	

5% 마늘첨가 마늘된장의 향기성분 : 5% 마늘첨가 마늘된장 0 주째에는 30 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 30 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Butanal 3-methyl-, Furfural, 1-Propene 3,3'-thiobis-, 2-Furancarboxaldehyde 5-methyl-, Benzeneacetaldehyde, Diallyl disulphide, 2,4-Decadienal (E,E)-, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, Cycloheptasiloxane tetradecamethyl-, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester 및 9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Butanal 3-methyl-와 Furfural으로 각각 27.09%와 16.88%를 차지하나 6 주에는 감소하여 6.14% 및 3.81% 이고 주요 향기성분은 9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester는 증가하여 25.97% 였다 (Table 74).

Table 74. Volatile compounds of Doenjang with 5% garlic.

No.	Volatile compounds	RT	Area%	
			0w	6w
1	Distannoxane, hexabutyl-	1.707		1.24
2	Butanal, 3-methyl-	2.111	27.09	6.14
3	1-Pentanol	2.531		1.17
4	Hexanoic acid, 2-methyl-	2.537	0.30	
5	Thiophene, 3-methyl-	3.046	0.29	
6	Hexanal	3.229	0.35	
7	1-Nonen-3-ol	3.332		0.33
8	Furfural	3.624	16.88	3.81
9	1-Propene, 3,3'-thiobis-	4.400	0.87	0.42
10	Imidazole-4-acetic acid	4.751		0.20
11	Vinyl ethyl sulfoxide	4.860	0.87	
12	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	6.021	2.39	0.45
13	Ethyl hydrogen succinate	6.256		0.17
14	Succinic acid, but-3-yn-2-yl pentyl ester	6.267	0.45	
15	Furan, 2-pentyl-	6.685	0.30	
16	Succinic acid, 2-decyl heptyl este	6.965	0.14	
17	Benzeneacetaldehyde	7.982	9.53	2.72
18	Diallyl disulphide	8.911	1.50	0.63
19	Pyrazine, tetramethyl-	9.157	0.25	
20	Nonanal	9.546	0.18	
21	2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Acetyloxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl acetate	10.501	0.19	
22	1,3,5-Trithiane	10.903		0.24
23	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	10.913	0.79	
24	Octanoic acid, ethyl ester	12.041		0.14
25	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	14.127		0.21
26	Trisulfide, di-2-propenyl	14.862	0.14	
27	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.251	0.76	0.30
28	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.560	0.54	0.13
29	Propanoic acid, 2-chloro-	16.538	0.25	
30	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	19.531	0.14	
31	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.720	0.86	
32	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.971	0.47	0.16
33	n-Hexadecanoic acid	28.435		0.66
34	Hexadecanoic acid, ethyl ester	30.283		9.63
35	Ethyl 13-methyl-tetradecanoate	31.856		0.17
36	n-Hexadecanoic acid	34.194	7.93	1.76
37	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.875	2.01	9.32

38	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	35.530		0.62
39	cis-Vaccenic acid	35.730		1.00
40	Ethyl 9.cis.,11.trans.-octadecadienoate	36.371		15.88
41	Ethyl Oleate	36.543		10.26
42	Octadecanoic acid, ethyl ester	37.252		1.36
43	Octadec-9-enoic acid	37.818	12.35	
44	9-Octadecenoic acid, (E)-	37.836		3.26
45	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.236	7.05	25.97
46	Octadecanoic acid, ethyl ester	38.849		1.67

③ 10% 마늘첨가 마늘된장의 향기성분

10% 마늘첨가 마늘된장 0 주째에는 40 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 42 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Valine, Butanal 3-methyl-, Hydrazine 1,1-dimethyl-, Vinyl ethyl sulfoxide, Borinic acid diethylthio-methylester, 2-Furancarboxaldehyde 5-methyl-, 2-Furancarboxaldehyde 5-methyl-, Furan 2-pentyl-, Benzeneacetaldehyde, Diallyl disulphide, Maltol, 1,3,5-Trithiane, Benzofuran 2-ethenyl-, Benzeneacetaldehyde alpha.-ethyidene-, 2-Propenylthioacetonitrile, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester 및 Octadecanoic acid ethyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Benzeneacetaldehyde와 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester로 각각 16.40%와 16.49%를 차지하나 6 주에는 전자는 감소하여 12.28% 및 후자는 증가하여 19.98% 였다 (Table 75).

Table 75. Volatile compounds of Doenjang with 10% garlic.

No.	Volatile compounds	RT	Area%	
			0w	6w
1	Valine	1.764	2.62	3.28
2	Butanal, 3-methyl-	2.065	7.39	10.96
3	Thiazole, 4,5-dihydro-2-methyl-	2.491		0.14
4	Hydrazine, 1,1-dimethyl-	2.954	7.83	6.36
5	Furfural	3.183	13.86	
6	Isopropyl isothiocyanate	3.401		0.11
7	Furfural	3.618		11.75
8	Threonine	3.859		1.99
9	Nonane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-	4.007	3.44	
10	Butanedioic acid, monopropargyl ester	4.265		0.51
11	Vinyl ethyl sulfoxide	4.823	1.65	0.64
12	Octanoic acid, 2-butyl-	5.192	0.46	
13	Borinic acid, diethylthio-, methylester	5.793	0.57	0.49
14	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	6.018	2.35	1.01
15	Cyclopentane, 1,2,3,4,5-pentamethoxy-, stereoisomer	6.239		1.36
16	Furan, 2-pentyl-	6.654	0.37	0.37
17	1,3-Dioxepane, 2-pentadecyl-	6.937		0.38
18	Succinic acid, 6-ethyloct-3-yl propyl ester	6.943	0.20	
19	1,3-Dioxolane, 4,5-dimethyl-2-pentadecyl-	7.166		0.32
20	Benzeneacetaldehyde	7.978	16.40	12.28
21	2-Octenal, (E)-	8.322	0.12	
22	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	8.682	0.30	
23	Diallyl disulphide	8.894	1.38	3.91
24	Phenol, 2-methoxy-	9.157		0.39
25	2-Vinyl-1,3-dithiane	9.455		0.46
26	Nonanal	9.529	0.25	

27	Maltol	10.004	0.16	0.17
28	3,4-Di-O-methyl-L-arabinopyranose	10.484	0.23	
29	Thiocyanic acid, ethyl ester	10.490		0.21
30	1,3,5-Trithiane	10.900	1.15	1.18
31	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	11.829	0.12	
32	8-Azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol, 8-methyl-, endo-	12.087	0.15	
33	Dodecane	12.098		0.23
34	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	12.493	0.08	
35	Benzofuran, 2-ethenyl-	12.733	0.11	0.12
36	2-Tridecenal, (E)-	13.797	0.09	
37	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethyidene-	14.124	0.20	0.31
38	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	14.650		0.11
39	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	14.656	0.12	
40	2-Propenylthioacetone nitrile	14.862	0.38	1.15
41	2-Methoxy-4-vinylphenol	15.194		1.10
42	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.251	0.89	
43	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.560	0.18	0.36
44	Acetoxyacetic acid, 2,3-dichlorophenyl ester	16.138		0.11
45	Butanoic acid, 4-chloro-4-oxo-, ethyl ester	16.143	0.09	
46	4(3H)-Pyrimidinone, 5,6-dimethyl-2-(methylthio)-	16.530	0.52	0.52
47	Tetradecane	17.368		0.23
48	Oct-3-ene-1,5-diyne, 3-t-butyl-7,7-dimethyl-	19.073		0.10
49	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	19.525		0.23
50	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.714	0.34	0.61
51	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.966		0.29
52	Butylated Hydroxytoluene	20.349		0.58
53	n-Hexadecanoic acid	34.182	5.01	4.02
54	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.860	4.74	4.40
55	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester	36.926	0.09	0.21
56	9-Octadecenoic acid, (E)-	37.807		6.24
57	Octadec-9-enoic acid	37.813	8.18	
58	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.242	16.49	19.98
59	Octadecanoic acid, ethyl ester	38.843	0.95	0.80

④ 15% 마늘첨가 마늘된장의 향기성분

15% 마늘첨가 마늘된장 0 주째에는 38 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 45 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Butanal 3-methyl-, Furfural, 1-Propene 3,3'-thiobis-, Benzeneacetaldehyde, Diallyl disulphide, 1,3,5-Trithiane, 3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene, 3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene, Benzeneacetaldehyde alpha.-ethylidene-, 2,4-Decadienal, Trisulfide di-2-propenyl, 2,4-Decadienal (E,E)-, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, Tetradecane, 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal, Cycloheptasiloxane tetradecamethyl-, Butylated Hydroxytoluene, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester 및 Octadecanoic acid ethyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Butanal 3-methyl-와 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester으로 각각 22.50%와 13.05%를 차지하나 6 주에는 전자는 감소하여 8.938% 및 후자는 증가하여 18.97% 였다 (Table 76).

Table 76. Volatile compounds of Doenjang with 15% garlic.

No.	Volatile compounds	RT	Area%	
			0w	6w
1	Distannoxane, hexabutyl-	1.695	5.33	
2	Thiirane, methyl-	1.856		3.32
3	Butanal, 3-methyl-	2.102	22.50	8.93
4	1-Pentene	2.520		0.68
5	Cyclobutanone, 2-methyl-2-oxiranyl	2.703	0.52	
6	Hydrazine, 1,1-dimethyl-	2.978		5.28
7	Thiophene, 3-methyl-	3.029	0.33	
8	Hexanal	3.189		0.41
9	1-Nonen-3-ol	3.280	0.76	
10	Furfural	3.621	8.28	9.35
11	1-Propene, 3,3'-thiobis-	4.005	3.33	4.12
12	Furan, tetrahydro-2,2-dimethyl-5-(1-methylpropyl)-	4.757	0.60	
13	1,3-Dithiane	5.055		0.93
14	1,2,4-Triazolo[4,3-b]pyridazine	5.083	1.00	
15	1-Propene, 1-(ethylthio)-2-methyl-	5.798		0.68
16	Benzaldehyde	6.004	1.67	
17	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	6.016		0.83
18	Succinic acid, isobutyl 2-octyl ester	6.239		0.44
19	1-Octen-3-ol	6.365	0.40	
20	Furan, 2-pentyl-	6.663	0.51	0.53
21	Succinic acid, 4-heptyl isohexyl ester	6.931		0.17
22	Succinic acid, 2-ethylhexyl hexylester	6.954	0.20	
23	Benzeneacetaldehyde	7.973	7.67	9.71
24	2-Octenal, (E)-	8.322		0.14
25	1,3,2-Oxathioborolane, 2-ethyl-5-methyl-	8.505	0.12	
26	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	8.677		
27	Diallyl disulphide	8.909	6.58	6.43
28	Pyrazine, tetramethyl-	9.146		0.69
29	1-Allyl-1-cyclohexanol	9.466	1.50	
30	Phenylethyl Alcohol	9.850		0.22
31	9,11-Octadecadiynoic acid, 8-hydroxy-, methyl ester	10.485		0.39
32	1,3-Dioxolane-2-pentanol 2-methyl-2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Acetyloxyethoxy)ethoxy] ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl acetate	10.496	0.71	
33	1,3,5-Trithiane	10.900	1.73	1.48
34	Octanoic Acid	11.274		0.15
35	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	11.829	0.36	0.13
36	Dodecane, 2,7,10-trimethyl-	12.098		0.30
37	Hexadecane, 7-methyl-	12.104	0.20	
38	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	12.488	0.75	0.24
39	Furan, 3-phenyl-	12.733		0.11
40	2-Heptadecenal	13.792		0.12
41	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	14.127	0.14	0.34
42	2,4-Decadienal	14.650	0.17	0.16
43	Trisulfide, di-2-propenyl	14.856	1.63	2.09
44	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.248	1.09	1.27
45	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.560	0.74	0.42
46	Propanoic acid, 2-chloro-	16.527		0.94
47	1,2-Dithiolane	16.533	1.08	
48	Tetradecane	17.371	0.11	0.12
49	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.714	0.21	0.62

50	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.969	0.78	0.33
51	Butylated Hydroxytoluene	20.349	0.12	0.20
52	Silane, [[4-[1,2-bis[(trimethylsilyloxy)ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis(trimethyl-	26.134	0.21	
53	n-Hexadecanoic acid	34.185	4.03	3.95
54	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.860	3.69	5.75
55	Cyclic octaatomic sulfur	35.398		0.32
56	10,13-Octadecadienoic acid, methyl ester	36.926		0.13
57	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	37.818	7.16	6.73
58	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.242	13.05	18.97
59	Octadecanoic acid, ethyl ester	38.843	0.76	0.95

⑤ 20% 마늘첨가 마늘된장의 향기성분

20% 마늘첨가 마늘된장 0 주째에는 39 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 44 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Butanal 3-methyl-, Hexanal, Furfural, 1-Propene 3,3'-thiobis-, Thiacyclopentane-3-ol, Benzaldehyde, Furan 2-pentyl-, 1,4-Hexadiene 3-ethyl-, Benzeneacetaldehyde, Diallyl disulphide, 1,3,5-Trithiane, 3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene, 3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene, Benzeneacetaldehyde.alpha.-ethylidene-, 2,4-Dodecadienal (E,E)-, Trisulfide di-2-propenyl, Benzoic acid 3,4,5-trihydroxy-, Tetradecane, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- methyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester 및 Octadecanoic acid ethyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Butanal 3-methyl-와 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester으로 각각 16.43%와 13.04%를 차지하나 6 주에는 전자는 거의 비슷한 수준의 16.72% 및 후자는 증가하여 15.97% 였다 (Table 77).

Table 77. Volatile compounds of Doenjang with 20% garlic.

No.	Volatile compounds	RT	Area%	
			0w	6w
1	Cholest-3-eno[3,4-b]quinoxaline, 6',7'-dichloro-	1.730	4.39	
2	Butanal, 3-methyl-	2.108	16.43	16.72
3	2-Propenoic acid, 6-methylheptyl ester	2.531		1.36
4	Pyrazine, methyl-	2.697	0.54	
5	Thiophene, 2-methyl-	3.029	0.36	
6	Hexanal	3.218	0.28	0.21
7	Furfural	3.610	9.15	10.61
8	1-Propene, 3,3'-thiobis-	4.042	5.35	1.97
9	Thiacyclopentane-3-ol	4.831	0.56	0.41
10	1,3-Dithiane	5.072		0.80
11	Disulfide, methyl 2-propenyl	5.077	1.32	
12	Benzaldehyde	5.999	1.51	1.28
13	Succinic acid, 2,4-dimethylpent-3-yl pentyl ester	6.250		0.40
14	1-Octen-3-ol	6.365	0.16	
15	Furan, 2-pentyl-	6.668	0.60	0.41
16	Succinic acid, 4-heptyl isohexyl ester	6.954		0.12
17	1,4-Hexadiene, 3-ethyl-	7.174	0.09	0.12
18	Benzeneacetaldehyde	7.976	7.68	7.68
19	2-Tridecenal, (E)-	8.333	0.15	
20	2-Undecene, 9-methyl-, (E)-	8.333		0.13
21	Sulfide, butyl propenyl	8.510	0.18	
22	Diallyl disulphide	8.917	11.61	6.33

23	Phenol, 2-methoxy-	9.151		0.19
24	2-Vinyl-1,3-dithiane	9.466		1.17
25	2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Acetyloxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl acetate	10.496		0.67
26	1,3,5-Trithiane	10.649	2.28	1.32
27	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	11.824	0.78	0.31
28	Dodecane	12.104		0.49
29	Oxalic acid, decyl neopentyl ester	12.110		0.43
30	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	12.488	1.21	0.78
31	2-Decenal, (E)-	13.798		0.13
32	Heptane, 2,4-dimethyl-	13.820	0.11	
33	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	14.127	0.29	0.34
34	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	14.653	0.16	0.19
35	Trisulfide, di-2-propenyl	14.868	3.83	5.70
36	2-Methoxy-4-vinylphenol	15.194		1.62
37	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.245	0.71	
38	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.560		0.65
39	Benzoic acid, 3,4,5-trihydroxy-	16.533	1.76	1.02
40	2-Octynoic acid	16.870		0.11
41	Tetradecane	17.374	0.17	0.15
42	(E)-1,1-Difluoro-2-ethylidenecycopropane	17.677	0.10	
43	Hexadecane	18.924		0.09
44	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.720	0.33	
45	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.966		0.52
46	Butylated Hydroxytoluene	20.349	0.28	0.43
47	Hexasiloxane, tetradecamethyl-	26.134		0.11
48	n-Hexadecanoic acid	34.168	2.50	4.07
49	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.860	3.50	3.44
50	Cyclic octaatomic sulfur	35.404		0.37
51	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester	36.926	0.09	0.27
52	cis-Vaccenic acid	37.795	3.07	
53	Octadec-9-enoic acid	37.807		6.25
54	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.242	13.04	15.97
55	Octadecanoic acid, ethyl ester	38.843	0.49	0.66

⑥ 30% 마늘첨가 마늘된장의 향기성분

30% 마늘첨가 마늘된장 0 주째에는 39 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 53 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Thiirane, methyl-, Butanal 3-methyl-, Hexanal, Furfural, 1-Propene 3,3'-thiobis-, 1,3-Dithiane, Borinic acid diethylthio-methyl ester, Benzaldehyde, Benzeneacetaldehyde, Diallyl disulphide, Crotonic acid, 4-mercapto-3-(methylthio)-, .gamma.-(thio lactone), 1,3,5-Trithiane, 3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene, 1,2,3-Thiadiazole 5-methyl-, 3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene 2, Benzeneacetaldehyde alpha.-ethylidene-, 2,4-Decadienal (E,E)-, Trisulfide di-2-propenyl, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, Phthalic acid, butyl 2-phenylethylester, 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal, Cycloheptasiloxane tetradecamethyl-, Butylated Hydroxytoluene, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester, Cyclic octaatomic sulfur 및 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Butanal 3-methyl-와 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester으로 각각 19.94%와 11.86%를 차지하나 6 주에는 모두 감소하였고 Furfural은 증가하여 11.74% 였다 (Table 78).

Table 78. Volatile compounds of Doenjang with 30% garlic.

No.	Volatile compounds	RT	Area%	
			0w	6w
1	Distannoxane, hexabutyl-	1.701	1.74	
2	Thiirane, methyl-	1.876	2.15	3.48
3	Butanal, 3-methyl-	2.096	19.94	5.79
4	Cyclohexane, 2-propyl-1,1,3-trimethyl-	2.714	1.46	
5	Carbonyl sulfide	2.920		6.02
6	Thiophene, 3-methyl-	3.046	0.49	
7	Hexanal	3.186	0.37	0.48
8	Furfural	3.624	6.57	11.74
9	1-Propene, 3,3'-thiobis-	4.042	5.39	3.22
10	Thiophene, 2,5-dimethyl-	4.860	0.49	
11	1,3-Dithiane	5.054	1.57	1.20
12	2-Methyl-1,3-dithiacyclopentane	5.529		0.07
13	Borinic acid, diethylthio-, methyl ester	5.807	0.41	0.84
14	Benzaldehyde	6.015	0.65	0.68
15	1,3-Dioxepane, 2-pentadecyl-	6.239		0.60
16	Furan, 2-pentyl-	6.668	0.37	0.45
17	Succinic acid, ethyl isohexyl este	6.931		
18	Benzeneacetaldehyde	7.972	5.54	7.41
19	2-Tridecenal, (E)-	8.327		0.15
20	1,3,2-Oxathioborolane, 2-ethyl-5-methyl-	8.516		0.20
21	Diallyl disulphide	8.939	13.29	9.51
22	Crotonic acid, 4-mercapto-3-(methylthio)-, .gamma.-(thiolactone)	9.380	3.28	0.55
23	2-Vinyl-1,3-dithiane	9.454		1.56
24	Thiophene, 2-methoxy-5-methyl-	10.072		0.13
25	(Methylthio)-acetonitrile	10.484		0.94
26	2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Acetyloxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl acetate	10.502	1.30	
27	1,3,5-Trithiane	10.902	2.90	1.57
28	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	11.818	0.64	0.55
29	1,2,3-Thiadiazole, 5-methyl-	12.109	0.46	0.69
30	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene 2	12.490	1.27	1.53
31	Thiosulfuric acid, S-[2-[3-(4-methylbenzenesulfonamido)propionamidino]ethyl] ester	13.351		0.07
32	2-Dodecenal	13.792		0.13
33	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	14.127	0.19	0.37
34	2,4-Decadienal, (E,E)-	14.656	0.13	0.22
35	Trisulfide, di-2-propenyl	14.873	4.34	9.06
36	2-Methoxy-4-vinylphenol	15.194		1.78
37	2,4-Decadienal	15.251	0.75	
38	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.562	0.46	0.96
39	Benzene, azido-	16.138		0.10
40	Propanoic acid, 2-chloro-	16.527		1.47
41	Benzoic acid, 3,4,5-trihydroxy-	16.532	2.10	
42	2,4-Decadienal	16.864		0.11
43	Tetradecane	17.370		0.13
44	Phthalic acid, butyl 2-phenylethylester	17.671	0.11	0.19
45	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	19.519		0.07
46	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.717	0.31	0.52
47	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.971	0.30	1.12
48	Butylated Hydroxytoluene	20.349	0.34	0.25

49	Pentafluorochlorodimethyl trisulfide	21.173		0.15
50	Di(tert-butyl) disulfide, perfluoro-	21.184	0.14	
51	Hexatriacontan	23.181		0.06
52	Silane,[[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis[trimethyl-	26.128		0.28
53	Pentafluorochlorodimethyl trisulfide	29.144		0.08
54	Hexadecanoic acid, methyl ester	33.321		0.09
55	n-Hexadecanoic acid	34.168	2.25	4.26
56	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.860	3.29	2.09
57	Cyclic octaatomic sulfur	35.404	0.23	0.74
58	Methyl 10-trans,12-cis-octadecadienoate	36.926		0.31
59	Octadec-9-enoic acid	37.790	2.33	
60	cis-Vaccenic acid	37.801		6.02
61	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.236	11.86	9.81
62	Octadecanoic acid, ethyl ester	38.842	0.49	
63	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	42.716		0.11

(3) 마늘 첨가 된장의 향산화 활성

(가) 발효 중 향산화 활성 변화: 마늘 첨가 된장의 발효 중 향산화 활성을 측정하였다 (Fig. 72). 향산화 활성도 중 phenolics 함량과 마찬가지로 모든 된장 발효 과정에서 증가하였다. 특히 10% 마늘 첨가 된장의 경우 DPPH 라디칼 소거 활성은 발효 6주(6 주)로 가장 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 72A). ABTS 라디칼 소거 활성은 발효 6주(6 주)에 84.50%를 나타내었으며 (Fig. 72B) FRAP는 발효 6주(6 주)에 1.05의 환원력을 나타내었다 (Fig. 72C). 마늘 첨가 된장의 경우 향산화 활성이 가장 높았으며, 66.62% (DPPH), 64.10% (ABTS)의 소거 활성 및 0.83 (FRAP)의 환원력을 나타내었다. 이러한 향산화 활성의 증가는 높은 phenolics 함량에 기인한 것으로 판단되었다.

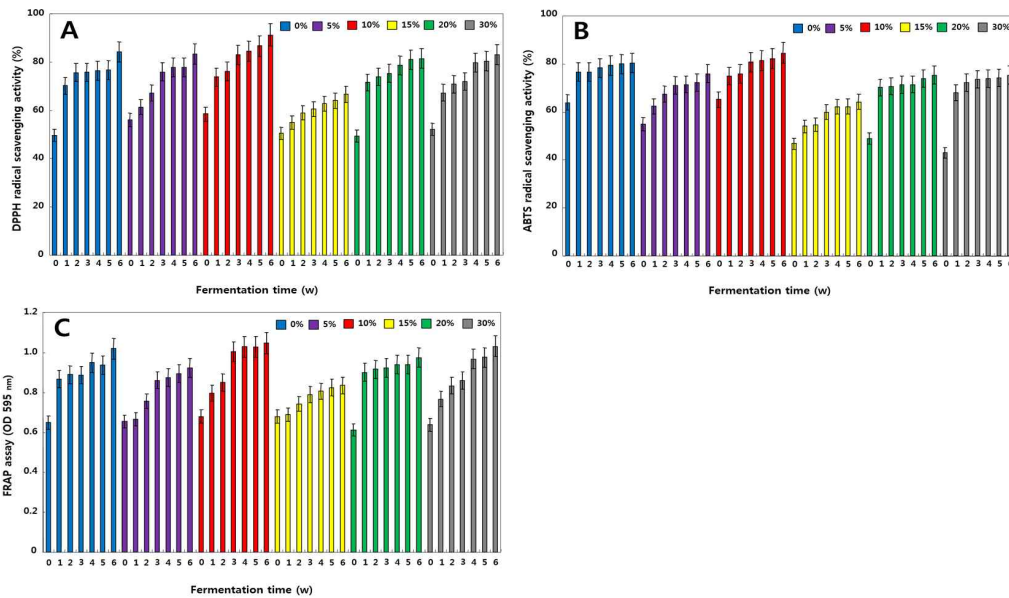


Fig. 72. Changes of DPPH (A) ABTS (B) radical scavenging activities and FRAP assay (C) of garlic doenjang during fermentations.

다. 소금 농도를 달리하여 제조한 마늘된장

(1) 소금 농도를 달리하여 제조한 마늘된장의 이화학적 특성

(가) 마늘된장의 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화 : 발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화는 Table 79와 같다. 모든 된장의 발효 중기 (6 주) pH는 5-6으로 큰 변화는 없었으며 산도는 최종 1.04-1.21%를 나타내었다. 염 농도는 12% 마늘된장에서 최종 12%를 나타내었으며 이는 소금을 많이 첨가하였기에 당연한 결과로 판단되었다. 한편 생균수는 효모의 경우 모든 된장에서 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하였으며, 바실러스 균주는 발효 1 주 경과 13.21-13.67 log cfu/g 으로 최대치에 도달하였고 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 79). 특히 모든 된장에서 효모는 바실러스 균주보다 상당히 낮은 균수가 검출되었으며, 이는 바실러스가 포자 형성균으로 효모보다 상대적으로 고 삼투압성의 환경에서 생육이 뛰어나며 이로 인해 우점종을 이룬 것으로 판단되었다.

Table 79. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of garlic doenjang with different salt concentrations during fermentations¹⁾

Conc. of salt (%)	Fermentation time (w)	Contents ²⁾				
		pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers log cfu/g	
					<i>Yeast</i>	<i>Bacillus</i>
6	0	6.39	0.31	5.60	6.33	11.92
	1	6.18	0.96	7.80	5.25	13.21
	2	6.12	1.08	9.00	4.72	12.03
	3	6.00	1.11	8.20	4.44	11.68
	4	6.09	1.09	8.80	4.35	10.54
	5	6.07	1.08	7.80	3.95	10.42
	6	5.80	1.12	10.80	4.02	10.42
8	0	6.40	0.33	6.60	6.33	11.92
	1	6.20	0.70	9.00	5.00	13.48
	2	6.10	0.90	10.00	3.27	12.14
	3	6.08	1.10	8.40	4.43	10.60
	4	6.11	0.97	9.00	4.78	10.58
	5	6.05	1.28	9.20	4.46	10.45
	6	5.97	1.16	11.00	3.92	9.68
10	0	6.34	0.31	6.80	6.33	11.92
	1	6.19	0.71	9.20	4.00	13.48
	2	6.06	0.94	10.20	4.01	13.46
	3	6.03	1.09	10.80	4.51	12.67
	4	6.12	1.06	9.60	4.35	11.27
	5	5.99	1.21	9.40	4.55	9.69
	6	6.01	1.21	11.00	4.11	9.74
12	0	6.33	0.32	7.40	6.33	11.92
	1	6.26	0.51	9.60	4.76	13.67
	2	6.09	0.72	10.20	3.85	12.81
	3	6.06	1.10	10.80	4.25	12.56
	4	6.12	0.85	11.00	4.21	11.29
	5	6.02	1.08	9.40	4.54	10.54
	6	6.00	1.04	12.00	4.36	10.55

¹⁾Garlic doenjang were fermented at room temperature for 6 week.

²⁾All values are means of determination in three independent experiments.

(2) 마늘된장의 총 phenolics 및 isoflavone 분석

(가) 발효 중 총 phenolics 함량 변화

소금 농도를 달리하여 제조한 마늘된장의 총 phenolics 함량 변화는 Fig. 73과 같다. 모든 된장은 공통적으로 발효가 진행됨에 따라 총 phenolics 함량이 증가하였으며 발효 전 (0 주)과 비교해서 종기 (6 주)의 함량은 약 2 배 증가하였다. 특히 소금 6% 첨가 된장은 발효 전 6.50 mg/g에서 발효 종기에는 12.00 mg/g으로 발효 과정 중 가장 높았다. 소금 12%를 첨가한 된장의 경우 총 phenolics 함량이 가장 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 73). 이는 삼투압 현상으로 인한 세포벽의 원형질 분리 등으로 인해 균주들의 활성이 낮아진 것으로 추정되어진다.

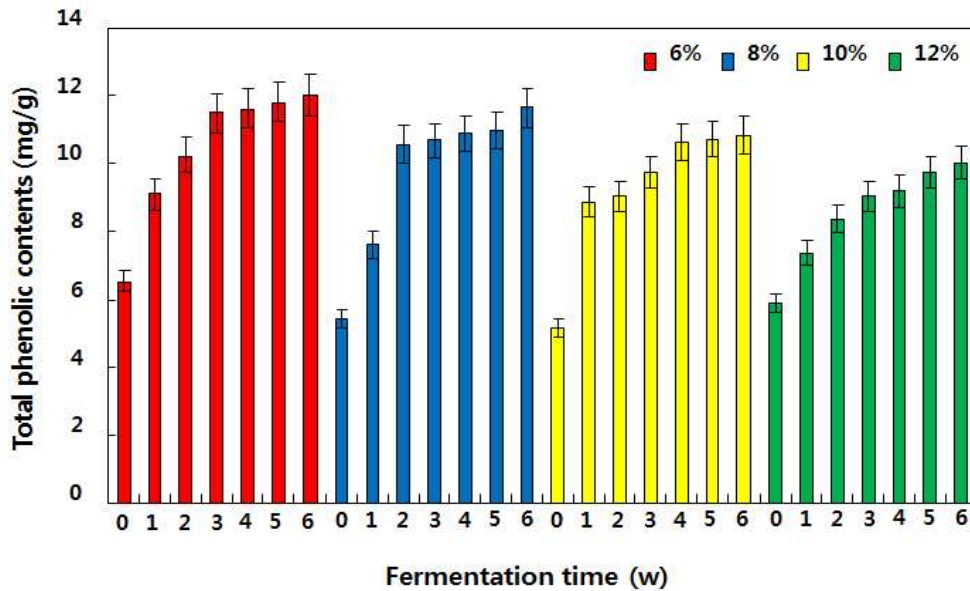


Fig. 73. Changes of total phenolic contents of garlic doenjang with different NaCl concentration during 6 weeks fermentation.

(나) 발효 중 isoflavone 함량 변화

소금 농도를 달리하여 제조한 마늘된장의 HPLC 크로마토그램, 비율 및 isoflavone 함량 변화는 Fig. 74 및 Table 80와 같다. 11 종의 isoflavone 유도체가 공통적으로 검출되었고 acetylglycosides 형태인 acetyldaidzin 유도체는 검출되지 않았다 (Fig. 74). 또한 발효 전 (0 주) 및 1 주 경과 주요 화합물로는 glycosides 형태인 daidzin, glycitin 및 genistin이 검출 되었으며 발효가 진행됨에 따라 glycosides 형태는 줄어들고 aglycones 형태가 증가하였다. 총 isoflavone 함량은 소금 10%의 마늘된장이 408.49 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았으며, 소금 6%의 마늘된장은 335.06 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 낮았다 (Table 80). 한편 6%의 마늘된장은 발효 전 (0 주) 79.79%의 glycosides 형태가 발효 종기 (6 주)에는 9.60%로 감소하였으며 이에 상응하여 aglycones 형태는 발효 전 6.05%에서 발효 종기에 81.12%로 증가하였다 (Fig. 74A). 발효 과정 중 이러한 isoflavone 비율 변화 및 aglycones 전환율은 모든 된장에서 가장 높은 것으로 나타났다 (Fig. 74A-D). 특히 소금 6%의 마늘된장은 glycosides인 daidzin, glycitin 및 genistin의 함량이 각각 217.23 $\mu\text{g/g}$, 85.59 $\mu\text{g/g}$ 및 233.48 $\mu\text{g/g}$ 이었으나 발효가 진행됨에 따라 glycosides 형태는 줄어들면서 발효 종기 (6 주)에는 aglycones 형태인 daidzein, glycitein 및 genistein의 함량이 각각 133.24 $\mu\text{g/g}$, 30.13 $\mu\text{g/g}$ 및 108.45 $\mu\text{g/g}$ 으로 증가하였다 (Table 80). 이러한 isoflavone 유도체들의 함량 변화는 평균으로 사용된 미생물들의 효소활성에 의해 배당체에서 비배당체로 전환된 것으로 판단되었다.

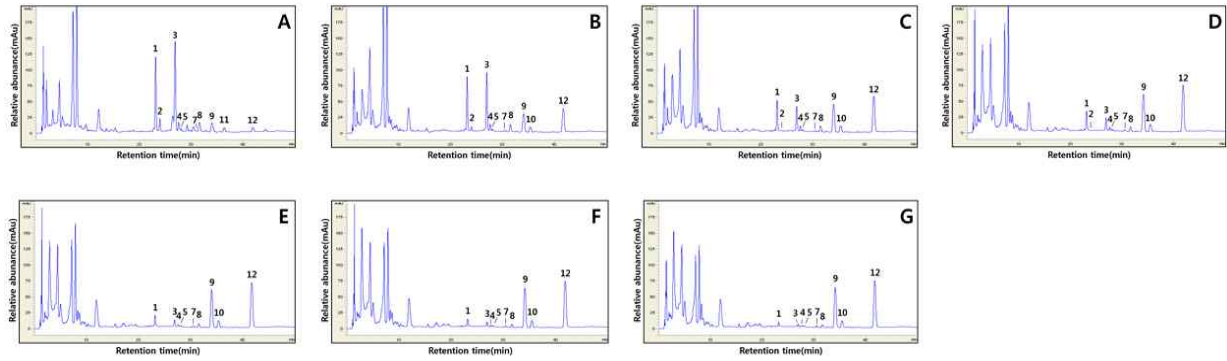


Fig. 74. Typical HPLC chromatogram of isoflavone. Garlic Doenjang with 6% salt at 0 week (A), 1 week (B), 2 week (C), 3 week (D), 4 week (E), 5 week (F), and 6 week (G). 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonyglycitin; 7, acetylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, glycitein; 11, acetylgenistin; and 12, genistein.

Table 80. Changes of isoflavone contents of garlic doenjang with different NaCl concentrations during fermentation¹⁾

Conc. of salt (%)	Fermentation time (w)	Isoflavone contents ²⁾ (µg/g)													Totals
		Glycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Aglycones				
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitein	Genistein		
6	0	217.23	85.59	233.48	29.29	17.54	48.34	nd ³⁾	nd	tr ⁴⁾	31.67	nd	8.98	679.12	
	1	176.46	53.94	151.08	27.88	27.89	46.24	nd	2.98	nd	63.14	24.18	53.64	627.43	
	2	115.93	29.26	78.57	22.44	25.22	39.00	nd	2.81	nd	95.23	30.43	82.92	521.81	
	3	88.31	26.83	38.68	17.28	25.98	32.95	nd	3.06	nd	128.33	34.70	106.58	502.7	
	4	63.89	nd	20.34	12.95	22.70	26.87	nd	2.81	nd	125.34	31.44	102.38	408.72	
	5	49.69	nd	9.89	5.98	13.88	19.67	nd	1.09	nd	131.88	31.30	107.52	370.9	
8	0	30.35	nd	1.81	2.02	11.09	16.88	nd	1.09	nd	133.24	30.13	108.45	335.06	
	1	196.43	91.94	247.25	30.32	25.93	51.86	nd	5.14	nd	28.58	nd	7.20	684.65	
	2	166.24	50.66	142.60	25.71	24.32	44.04	nd	2.37	nd	52.13	20.44	43.56	572.07	
	3	94.13	nd	52.73	12.92	12.03	30.10	nd	1.16	nd	104.94	31.14	94.58	433.73	
	4	75.28	nd	39.59	12.57	12.48	28.98	nd	1.12	nd	107.85	29.38	94.42	401.67	
	5	60.70	nd	21.61	9.80	11.21	24.98	nd	1.12	nd	116.35	30.02	98.49	374.28	
10	0	50.78	nd	15.44	8.28	11.74	22.40	nd	1.10	nd	118.89	29.54	99.24	357.41	
	1	40.35	nd	8.56	5.51	10.06	19.89	nd	1.06	nd	122.57	29.38	100.29	337.67	
	2	185.23	78.82	192.36	24.97	12.94	40.46	nd	3.82	1.91	27.87	nd	7.55	575.93	
	3	175.06	43.50	151.13	22.77	13.74	40.11	nd	1.05	0.52	51.41	20.79	44.82	564.9	
	4	109.45	38.72	70.04	22.67	23.25	17.50	nd	2.06	nd	78.89	26.60	70.54	459.72	
	5	86.88	38.57	45.49	20.74	24.33	36.03	nd	2.08	nd	94.91	28.15	82.49	459.67	
12	0	72.73	28.64	27.95	17.10	19.51	30.38	nd	1.58	nd	112.16	30.12	95.65	435.82	
	1	51.93	nd ³⁾	14.27	9.56	9.86	25.70	nd	1.07	nd	115.94	29.45	97.68	358.46	
	2	49.70	24.55	12.55	12.95	24.67	25.80	nd	1.75	0.87	123.15	30.27	102.23	408.49	
	3	207.74	93.08	224.47	32.92	24.92	55.46	nd	5.70	2.85	32.84	nd	7.69	687.67	
	4	187.06	57.14	171.46	27.30	24.38	46.96	nd	2.19	1.09	44.10	17.26	33.73	612.67	
	5	122.02	30.35	90.87	20.87	22.14	36.63	nd	1.84	nd	66.44	23.40	57.84	472.4	
12	0	108.61	29.87	71.47	20.27	23.77	36.84	nd	2.48	nd	87.67	28.59	73.61	483.18	
	1	69.28	nd	33.29	9.01	9.92	25.26	nd	0.83	nd	91.00	26.00	78.94	343.53	
	2	64.15	nd	31.02	8.38	10.19	24.67	nd	0.90	nd	10.25	27.09	83.24	259.89	
	3	50.34	nd	18.56	7.47	11.08	23.09	nd	0.99	nd	111.39	28.31	93.51	344.74	
	4	207.74	93.08	224.47	32.92	24.92	55.46	nd	5.70	2.85	32.84	nd	7.69	687.67	
	5	187.06	57.14	171.46	27.30	24.38	46.96	nd	2.19	1.09	44.10	17.26	33.73	612.67	

¹⁾ Garlic doenjang were fermented at room temperature for 6 week

²⁾ All values are presented as the mean±SD of triplicate determination

³⁾ nd: not detected

⁴⁾ tr: trace(<0.002 µg/g).

(3) 소금 농도를 달리하여 제조한 마늘된장의 항산화 활성

(가) 발효 중 항산화 활성 변화: 소금 농도를 달리하여 제조한 마늘된장의 발효 중 항산화 활성은 Fig. 75과 같다. 항산화 활성 역시 총 phenolics 함량과 마찬가지로 모든 된장은 발효가 진행됨에 따라 증가하였다. 10% 마늘된장의 DPPH 라디칼 소거활성은 발효가 진행됨에 따라 27.70, 34.94, 36.08, 37.11, 37.14, 39.60 및 40.52%의 활성을 나타내었지만 6% (34.16%), 8%

(39.49%) 및 12% (40.47%)의 마늘 된장과 과 큰 은 의 적 차 는 없었 다 (Fig. 75A), ABTS 라 디 칼 스 (39.49%) 및 12% (40.47%)의 마늘 된장과 과 큰 은 의 적 차 는 없었 다 (Fig. 75B), DPPH 와 의 활 성 차 는 6% 마 (39.49%) 및 12% (40.47%)의 마늘 된장과 과 큰 은 의 적 차 는 없었 다 (Fig. 75C). 이 는 이 가 장 높 은 활 성 이 었 으 며 이 후 발효 가 진 행 되 면 점 차 감 소 하 였 다. 생균수 역시 발효 4 주 경 과 발아 마늘 된 장 이 13.56 log cfu/g 으로 가 장 최 대 치 에 도 달 했 으 며 발효 가 진 행 되 면 점 차 감 소 하 는 경 향 을 나 타 내 었 다.

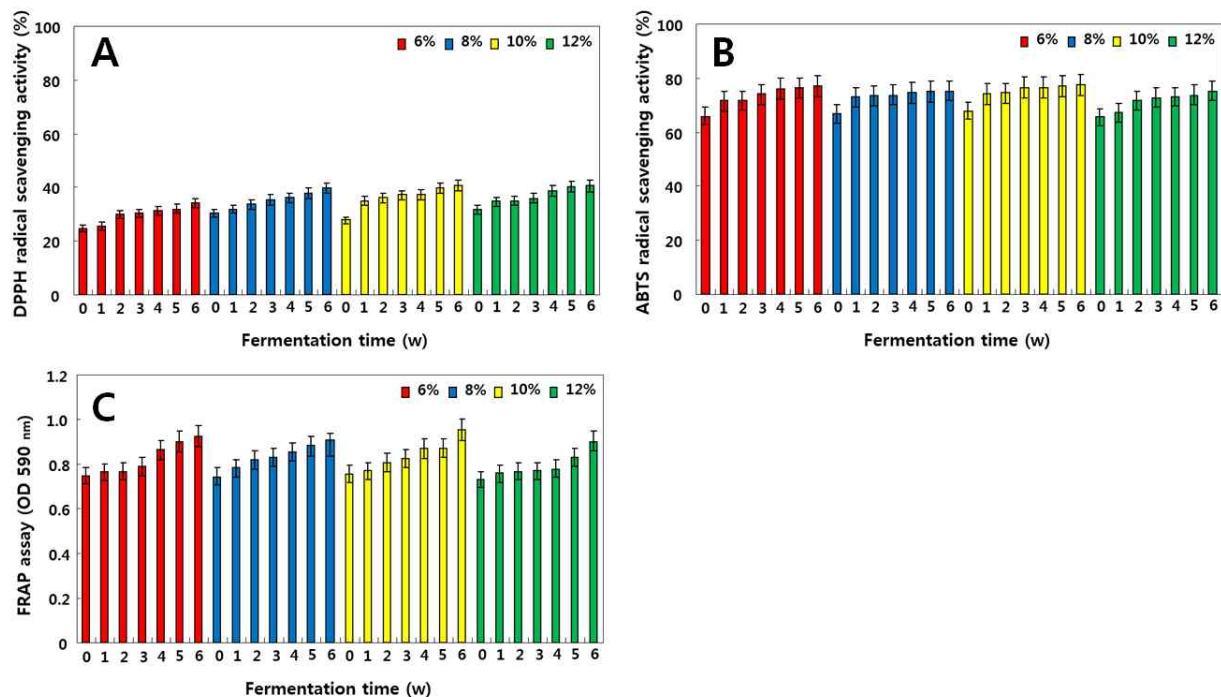


Fig. 75. Changes of DPPH (A) ABTS (B) radical scavenging activities and FRAP assay (C) of *garlic doenjang* with different NaCl contents during fermentation.

라. 전처리 방식을 달리한 마늘을 첨가한 마늘된장

(1) 마늘된장의 이화학적 특성

(가) 마늘된장의 이화학적 특성 및 생균수 변화

발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화는 Table 81과 같다. 발효 전 (0 주)과 발효 종기 (6 주)의 pH는 모든 된장에서 큰 변화 없이 5.92-6.01 수준이었다. 산도 또한 0.92-1.04%로 큰 차이가 없었으며 염도는 일반적으로 발효 4 주 경과 시 높았으며 일반된장은 8.77%로 가장 높았으며 이후 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하였다. 생균수 역시 발효 4 주 경과 발아 마늘 된장이 13.56 log cfu/g 으로 가장 최대치에 도달했으며 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 81. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of doenjang with differently prepared garlic during fermentation¹⁾

Forms of garlic	Fermentation time (w)	Contents ²⁾				
		pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers log cfu/g	
					Yeast	Bacillus
Control	0	6.23	0.36	7.40	6.75	10.63
	1	6.06	0.76	8.80	7.25	11.31
	2	6.01	0.79	9.40	7.36	11.55
	3	6.01	0.88	9.80	7.21	12.15
	4	5.98	1.06	10.00	8.77	11.62
	5	5.99	0.97	7.60	8.04	10.42
	6	5.96	1.04	11.40	5.66	10.26
Fresh garlic	0	6.30	0.46	8.40	6.75	10.63
	1	6.22	0.68	9.00	5.23	9.87
	2	5.98	0.89	10.00	3.55	12.03
	3	6.08	0.94	10.60	3.77	13.38
	4	6.04	1.09	10.20	7.37	13.48
	5	6.12	0.72	7.00	7.35	11.30
	6	6.01	1.17	12.20	6.43	10.24
Steamed garlic	0	6.24	0.42	7.80	6.75	10.63
	1	6.07	0.76	8.00	6.45	10.38
	2	6.00	0.97	10.00	7.14	10.73
	3	6.04	0.82	8.00	7.05	10.70
	4	6.00	1.03	10.80	8.10	11.03
	5	5.98	0.89	10.00	7.23	10.65
	6	6.00	1.04	10.80	6.07	10.55
Fermented garlic	0	6.16	0.32	7.20	6.75	10.63
	1	6.07	0.70	9.00	6.32	10.66
	2	5.99	0.81	8.80	6.34	11.37
	3	5.98	0.99	11.40	6.79	11.76
	4	5.83	1.04	10.20	8.27	11.66
	5	5.85	1.24	9.40	7.98	10.41
	6	5.92	0.99	10.00	6.47	10.15
Germinated garlic	0	6.17	0.33	7.40	6.75	10.63
	1	6.08	0.67	5.40	6.34	10.55
	2	6.01	0.81	8.40	4.51	11.55
	3	6.04	0.88	10.80	4.16	12.98
	4	6.01	0.97	8.80	7.40	13.56
	5	5.77	1.18	10.00	7.31	11.21
	6	5.96	0.95	12.80	6.42	10.31

¹⁾ Garlic doenjang were fermented at room temperature for 6 week

²⁾ All values are means of determination in three independent experiments.

(2) 마늘 첨가 된장의 총 phenolics, isoflavone 및 향기성분 분석

(가) 발효 중 총 phenolics 함량 변화

전처리 방식을 달리한 마늘을 첨가하여 제조한 된장의 총 phenolics 함량 변화는 Fig. 76와 같다. 생, 증자, 발효 및 발아 마늘은 모두 발효 과정 중 총 phenolics 함량이 증가하였으며 그 중 증자마늘된장이 가장 높았다. 특히 증자마늘된장은 발효 전 (0 주) 7.5 mg/g, 발효 1 주 경과 8.5 mg/g, 2 주 경과 8.6 mg/g 으로 큰 변화가 없었으나 3 주 경과 후 발효 중기 (6 주)까지 11.53 mg/g 으로 증가하였다. 여러 연구자들은 마늘의 열처리 과정 중 결합형의 페놀화합물이 분리되어 유리형으로 전환되어 증가하는 것이라 보고하였으며 이는 본 연구에서도 증자

마늘된장의 총 phenolics 함량 증가는 이러한 연구 결과들과 유사한 것으로 판단되었다. 한편 발효마늘된장은 총 phenolics 함량이 가장 낮은 것으로 나타났다.

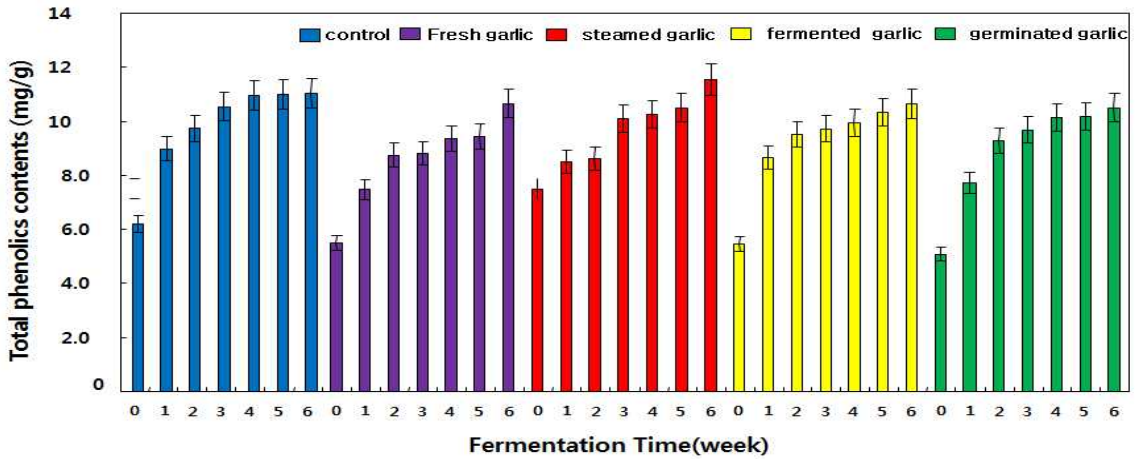


Fig. 76. Changes of total phenolic contents of doenjang with differently prepared garlic during fermentations.

(나) 발효 중 isoflavone 함량 변화

전처리 방식을 달리한 마늘 첨가 된장의 HPLC 크로마토그램, isoflavone 비율 및 함량 변화는 Fig. 77 및 Table 82와 같다. 총 11 종의 주요 isoflavone 유도체가 공통적으로 검출되었고 acetylglycosides의 acetyldaidzin 유도체는 검출되지 않았다 (Fig. 77). 또한 모든 된장에서 발효 전 (0 주) 주요 isoflavone 유도체는 glycosides 형태인 daidzin, glycitin 및 genistin이 검출되었으며 발효 과정 중 glycosides 함량은 줄어드는 반면 aglycones 함량이 증가하였다. 총 isoflavone 함량은 대조구로 사용된 일반된장이 489.45 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많았으며 생마늘된장은 311.58 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 낮은 함량을 나타냈다 (Table 82). 특히 증자마늘된장은 glycosides의 daidzin, glycitin 및 genistin 함량이 각각 165.64 $\mu\text{g/g}$, 56.97 $\mu\text{g/g}$ 및 178.19 $\mu\text{g/g}$ 이었으나 발효가 진행됨에 따라 glycosides 함량은 줄어들면서 발효 중기 (6 주)에는 aglycones의 daidzein, glycitein 및 genistein 함량이 각각 115.07 $\mu\text{g/g}$, 25.85 $\mu\text{g/g}$ 및 79.17 $\mu\text{g/g}$ 으로 증가하였다 (Table 49). 한편 발효 중기 (6 주) 비배당체 형태인 aglycones 비율은 60.30% (발아마늘된장), 58.94% (발효마늘된장), 58.89% (생마늘된장), 52.13% (일반된장), 51.88% (증자마늘된장)으로 증자마늘된장이 가장 낮은 비율을 차지하였다. 이러한 isoflavone 유도체들의 함량 변화 및 비율변화는 종균으로 사용된 미생물이 분비하는 효소 활성과 관계 있는 것으로 판단되며 부가적으로 원료, 제조과정, 배양환경 등 여러 요인에 의해 차이가 난 것으로 판단되었다.

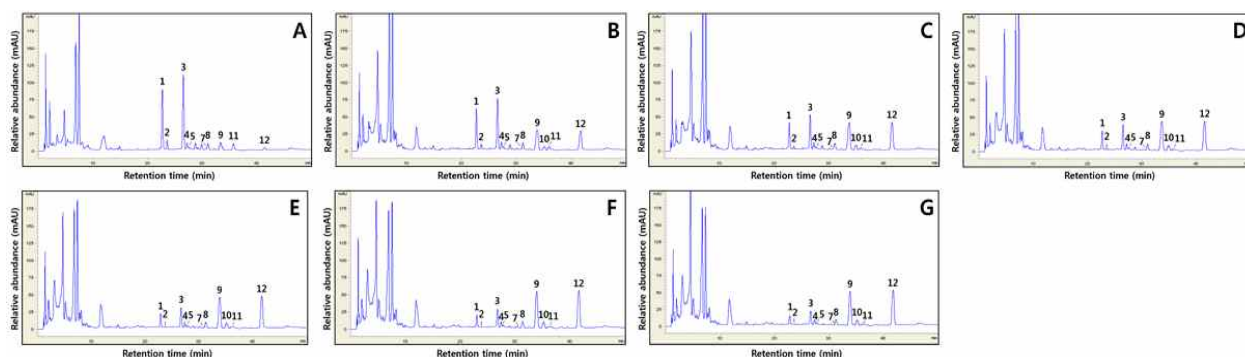


Fig. 77. Typical HPLC chromatogram of isoflavone. doenjang with steamed garlic at 0 week (A), 1 week (B), 2 week (C), 3 week (D), 4 week (E), 5 week (F), 6 week (G). 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonyglycitin; 7, acetylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, glycitein; 11, acetylgenistin; and 12, genistein.

Table 82. Changes of isoflavone contents of doenjang with differently prepared garlic during fermentation¹⁾

Forms of garlic	Fermentation time (w)	Isoflavone contents ²⁾ (µg/g)												Total S
		Glycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Aglycones			
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	
Control	0	252.47	102.62	277.76	28.88	22.47	38.37	nd	1.02	0.51	33.92	nd	5.69	763.71
	1	146.16	62.63	152.53	22.51	23.38	40.83	nd	2.17	1.09	74.04	16.74	39.15	581.23
	2	103.13	21.27	104.33	16.08	15.1	31.8	nd	nd ³⁾	tr ⁴⁾	91.62	20.29	55.41	466.03
	3	90.3	14.18	92.71	17.06	15.6	33.21	nd	nd	tr	112.61	25.54	70.76	471.97
	4	89.22	45.31	82.66	23.2	25.01	39.38	nd	2.26	1.13	121.41	27.47	77.2	534.25
	5	72.57	15.23	64.62	21.18	28.3	37.3	nd	2.31	1.16	123.12	28.24	81.66	475.69
	6	67.71	17.59	58.84	22.19	25.32	38.97	nd	2.46	1.23	134.34	30.77	90.03	489.45
Fresh garlic	0	200.71	70.92	211.67	19.48	12.73	29.4	nd	0.89	0.45	27.1	nd	5.94	579.29
	1	105.66	32.89	80.73	19.02	25.4	32.75	nd	2.14	1.07	80.48	21.74	55.8	457.68
	2	63.04	nd	40.67	11.53	12.89	25.37	nd	nd	tr	105.28	25.35	77.67	361.8
	3	56.79	15.85	29.96	17.15	26.41	31.67	nd	1.99	0.99	120.46	27.77	88.71	417.75
	4	44.22	16.57	20.01	14.73	24.66	26.79	nd	2.21	1.1	119.55	27.27	88.19	385.3
	5	41.59	45.68	15.85	16.49	28.78	30.53	nd	2.31	1.16	133.03	30.11	98.67	444.2
	6	26.28	nd	2.67	5.28	11.99	19.35	nd	nd	tr	124	26.78	95.23	311.58
Steamed garlic	0	165.64	56.97	178.19	19.43	18.11	36.26	nd	3.78	1.89	23.89	nd	3.4	507.56
	1	136.8	65.08	139.04	26.73	27.14	46.09	nd	2.43	1.21	76.76	16.84	40.86	578.98
	2	95.06	39.88	94.79	22.72	24.75	40.04	nd	1.97	0.98	98.52	21.71	59.39	499.81
	3	76.07	25.41	67.42	19.99	23.6	36.03	nd	1.9	0.95	100.88	22.63	66.27	441.15
	4	67.84	25.73	60.81	20.69	25.95	36.58	nd	2.34	1.17	105.46	23.97	69.15	439.69
	5	64.14	24.66	52	21.73	27.35	38.98	nd	2.53	1.27	121.31	27.62	81.44	463.03
	6	56.56	21.77	42.14	19.43	25.49	35.22	nd	2.34	1.17	115.07	25.85	79.17	424.21
Fermented garlic	0	204.92	91.27	223.64	30.59	29.90	39.37	nd	1.14	0.57	27.72	nd	4.76	653.88
	1	118.94	43.14	115.64	24.55	27.35	40.73	nd ²⁾	nd	tr ³⁾	82.57	19.38	49.32	526.62
	2	86.59	30.31	73.37	22.41	27.03	41.19	nd	1.89	0.95	103.52	23.96	68.75	479.97
	3	71.84	25.15	61.02	20.94	25.68	38.17	nd	1.72	0.86	108.77	24.87	76.23	455.25
	4	65.31	25.18	53.63	22.42	27.45	38.59	nd	2.42	1.21	123.77	27.73	87.30	475.01
	5	50.08	19.60	35.05	18.43	24.66	33.98	nd	2.07	1.03	114.13	25.59	84.29	408.91
	6	39.33	33.04	26.60	14.46	24.53	27.58	nd	2.05	1.03	122.30	27.19	92.59	410.7
Germinated garlic	0	188.89	92.11	195.07	31.68	37.85	36.01	nd	1.75	0.87	28.94	nd	5.97	619.14
	1	110.25	35.74	99.74	22.15	27.94	37.31	nd	nd	tr	84.75	21.03	53.96	492.87
	2	24.40	20.71	71.77	20.23	24.91	38.13	nd ²⁾	nd	tr ³⁾	110.03	26.22	76.32	417.72
	3	60.96	nd	48.71	14.33	16.95	31.00	nd	nd	tr	117.05	26.82	85.23	401.05
	4	40.11	nd	20.26	9.92	15.59	24.61	nd	nd	tr	108.06	23.89	81.70	324.14
	5	51.25	14.75	39.35	16.05	23.98	31.92	nd	1.90	0.95	128.85	29.35	96.31	434.66
	6	48.09	16.95	18.72	14.93	26.17	30.77	nd	2.26	1.13	122.65	27.74	91.10	400.51

¹⁾doenjang and Gdarlic doenjang were fermented at room temperature for 6 week,

²⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

³⁾nd: not detected, ⁴⁾tr: trace(<0.002 µg/g).

(다) 향기성분 분포

① 일반된장(대조구)의 향기성분

일반된장(대조구) 0 주째에는 43 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 35 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Butanal 3-methyl-, Furfural, Dimethyl sulfone, Furan 2-pentyl-, Benzeneacetaldehyde, Nonanal, Cyclopentasiloxane decamethyl-, 2,4-Decadienal (E,E)-, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, Cycloheptasiloxane tetradecamethyl-, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester, 6-Octadecenoic acid 및 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Nickel[II] bis(O,O'-dibutyldithiop hosphate)와 6-Octadecenoic acid 으로 각각 20.87%와 13.88%를 차지하고 6 주에는 전자의 향기성분은 검출되지 않았고 후자는 증가하여 15.55%였다. 주요 향기성분으로는 후자와 0 주째 7.19%에서 증가하여 18.86%를 차지한 Butanal 3-methyl- 이 있다 (Table 83).

Table 83. Volatile compounds of Doenjang without garlic.

No	Volatile compounds	RT	Area%	
			0W	6W
1	Tris(benzo[b]selenopheno)[2,3:2',3':2'',3'']benzene	1.678		22.70
2	Nickel[II] bis(O,O'-dibutyldithiop hosphate)	1.678	20.87	
3	Butanal, 3-methyl-	2.116	7.19	18.86
4	L-Serine, N-methyl-	2.514		2.10
5	Hydrazine, 1,2-dimethyl-	2.256	4.69	
6	4-(Prop-2-enoyloxy)octane	2.571	1.06	
7	Butane, 2-cyclopropyl-	2.845	1.64	
8	Oxirane,2-[2-(benzyloxy)-1-(1-methoxy-1-methylethoxy)ethyl]	2.943		0.55
9	1,1-Diisobutoxy-butane	3.263		6.82
10	Hexanal	3.217	3.85	
11	1-Propanol, 2,2-dimethyl-,acetate	3.395	0.96	
12	Furfural	3.632	2.62	2.73
13	Heptanal	4.762	1.22	
14	2-Nonenal, (E)-	4.768		0.35
15	Dimethyl sulfone	5.332	0.16	0.18
16	2,4-Pentadien-1-ol, 3-pentyl-,	5.661	0.13	
17	2-Heptenal, (E)-	5.878	3.80	
18	Benzaldehyde	6.015		1.31
19	2-Octen-1-ol, (E)-	6.370	0.67	
20	3-Cyclohepten-1-one	6.382		0.34
21	Furan, 2-pentyl-	6.679	2.09	0.74
22	Octanal	6.942	0.98	
23	Pyrazine, trimethyl-	6.960		0.46
24	2,4-Heptadienal, (E,E)-	7.154	0.41	
25	4-Nonyne	7.698	0.32	
26	Benzeneacetaldehyde	7.984	4.81	7.72
27	2-Octenal, (E)-	8.333	0.85	
28	Cyclododecanol, 1-ethenyl-	8.350		0.19
29	Pentane, 2-cyclopropyl-	8.653	0.37	
30	Cyclohexene,3-(2-propenyl)-	8.911	0.31	
31	Pyrazine, tetramethyl-	9.145		0.13
32	Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methyl ethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.beta.)-	9.283	0.26	
33	Nonanal	9.537	1.49	0.82
34	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	10.908	0.62	0.75

35	Cyclohexanepropanal	11.062		0.15
36	Octanoic Acid	11.274	0.28	
37	2-n-Heptylfuran	11.938	0.11	
38	Undecane	12.104	0.18	
39	Decanal	12.281	0.10	
40	Furan, 3-phenyl-	12.739		0.19
41	Dichloroacetic acid, nonyl ester	13.443	0.12	
42	2-Decenal, (E)-	13.792	1.03	
43	4-Octyne	13.797		0.12
44	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	14.656	0.82	
45	2-Cyclohexene-1-carboxaldehyde,2,6,6-trimethyl-	14.656		0.18
46	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.259	3.83	0.74
47	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.565	1.09	1.76
48	2-Dodecenal, (E)-	16.481	0.96	
49	2-Nonenal, (Z)-	16.481		0.12
50	2,4-Decadienal, (E,E)-	16.864	0.74	
51	Hexadecane	17.379	0.17	
52	Benzenebutanal,	19.531	0.24	
53	Benzocyclobutene, 1-bromo-1-methyl	19.725		0.24
54	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.977	0.53	1.29
55	Butylated Hydroxytoluene	20.355		0.30
56	Silane,[[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis[trimethyl-	26.128		0.28
57	n-Hexadecanoic acid	34.168	10.53	7.45
58	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.866	1.07	1.09
59	6-Octadecenoic acid	37.779	13.88	15.55
60	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.230	2.77	3.40
61	1H-1,3-Benzimidazole-1-acetonitrile,	42.190		0.12
62	Octadecanoic acid, butyl ester	42.201	0.18	
63	1,1,1,3,5,5,5-Heptamethyltrisiloxane	42.636		0.12
64	Silicic acid,diethylbis(trimethylsilyl) ester	50.819		0.15

② 생마늘 첨가 마늘된장의 향기성분

생마늘 첨가 마늘된장 0 주째에는 40 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 46 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Hydrazine 1,1-dimethyl-, Furfural, 1-Propene 3,3'-thiobis-, Benzaldehyde, Furan 2-pentyl-, Benzeneacetaldehyde, 2-Octenal (E)-, Diallyl disulphide, Nonanal, 2-[2-[2-[2-(2-Butoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl acetate, Cyclopentasiloxane decamethyl-, Benzeneacetaldehyde .alpha.-ethylidene-, Trisulfide di-2-propenyl, 2,4-Decadienal (E,E)-, Cycloheptasiloxane tetradecamethyl-, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester 및 cis-Vaccenic acid 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Distannoxane hexabutyl-와 Butanal 3-methyl-으로 각각 24.08%와 12.14%를 차지하고 6 주에는 전자의 향기성분은 감소하여 16.50% 이고 후자는 검출되지 않았다. 주요 향기성분으로는 0 주째보다 증가한 Hydrazine, 1,1-dimethyl-이 17.21% 이고 새로이 생성된 Ethyl Oleate는 9.59% 이다 (Table 84).

Table 84. Volatile compounds of Doenjang with fresh garlic.

No	Volatile compounds	RT	Area%	
			0W	6W
1	Distannoxane, hexabutyl-	1.673	24.08	16.50
2	Butanal, 3-methyl-	2.096	12.14	
3	Hydrazine, 1,1-dimethyl-	2.313	4.72	17.21

4	Propanamide, N-ethyl-	2.525		3.00
5	Propanoic acid	2.657	3.65	
6	Hexanal	3.212	2.70	
7	1,1-Diisobutoxy-butane	3.349	7.5	7.0
8	Furfural	3.618	2.74	3.23
9	1-Propene, 3,3'-thiobis-	4.047	2.01	1.07
10	Heptanal	4.757	0.82	
11	Thiophene, 2,5-dimethyl-	4.854		0.58
12	1,2,4-Triazolol[4,3-b]pyridazine	5.071		0.74
13	1,4-Dithiane	5.083	1.37	
14	Dimethyl sulfone	5.386	0.16	
15	Benzaldehyde	6.001	2.83	1.43
16	2,4-Octadienoic acid,7-hydroxy-,2,2,2-trichloroethyl ester	6.364		0.43
17	Alantolactone, 4.alpha.,4A.alpha.- epoxy-	6.370	0.22	
18	Furan, 2-pentyl-	6.673	1.24	0.80
19	Octanal	6.942		0.50
20	Hex-4-enylamine	6.943	0.42	
21	4-Nonyne	7.692	0.12	
22	Benzeneacetaldehyde	7.978	5.82	7.80
23	2-Octenal, (E)-	8.339	0.30	0.18
24	1-Octanol	8.636	0.18	
25	Iron, dicarbonyl(.eta.5-2,4-cyclop	8.642		0.09
26	Diallyl disulphide	8.905	5.03	2.23
27	Pyrazine, tetramethyl-	9.163		0.22
28	Nonanal	9.539	2.07	0.79
29	2-[2-[2-[2-(2-Butoxyethoxy)ethoxy] ethoxy]ethoxy]ethyl acetate	10.496	0.66	0.20
30	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	10.908	1.29	1.32
31	Octanoic Acid	11.240		0.23
32	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	11.835	0.18	
33	Chloroacetic acid, 3-tetradecyl ester	11.835		0.17
34	Dodecane	12.104		0.15
35	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	12.504	0.27	
36	Cinnoline, 3-methyl-	12.750		0.15
37	8-Oxabicyclo[5.1.0]octane	13.792		0.22
38	8-Hexadecenal, 14-methyl-, (Z)-	13.798	0.37	
39	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	14.126	0.20	0.25
40	2,4-Decadienal	14.656	0.30	
41	3-Oxatricyclo[3.2.1.0(2,4)]octane,(1.alpha.,2.beta.,4.beta.,5.alpha.)-	14.656		0.24
42	Trisulfide, di-2-propenyl	14.862	0.80	0.56
43	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.254	1.86	1.44
44	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.566	0.68	
45	DL-Norleucine,N-allyloxycarbonyl-,heptadecyl ester	16.527		0.51
46	1,2-Dithiolane	16.533	0.86	
47	2,3-Octadiene, 7-methyl-	16.864		0.12
48	2,4-Nonadiene, (E,E)-	16.870	0.57	
49	Tetradecane	17.371	0.14	0.15
50	Benzene,1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	19.531		0.15
51	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.720		0.20
52	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.971	0.32	2.47
53	Butylated Hydroxytoluene	20.355		0.71
54	Benzoic acid,2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	26.134		0.43
55	Cholestane,3-thiocyanato-, (3.alpha.,5.alpha.)-	31.055		0.10
56	n-Hexadecanoic acid	34.154	6.31	4.80
57	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.860	0.68	1.24

58	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester	36.931		0.19
59	cis-Vaccenic acid	37.790	9.67	7.60
60	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.236	0.58	
61	Ethyl Oleate	38.345		9.59
62	Hexadecanoic acid, butyl ester	38.694	1.45	
63	Octadecanoic acid, butyl ester	42.196	0.16	
64	1-Propene,3-(2-cyclopentenyl)-2-methyl-1,1-diphenyl-	42.201		0.17
65	1,2-Bis(trimethylsilyl)benzene	44.152		0.11

③ 증자마늘 첨가 마늘된장의 향기성분

증자마늘 첨가 마늘된장 0 주째에는 38 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 42 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Butanal 3-methyl-, 2-Cyclohexen-1-ol, 2,4-Dodecadienal (E,E)-, Trisulfide di-2-propenyl, 2,4-Decadienal (E,E)-, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, Cycloheptasiloxane tetradecamethyl-, Silane,[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis(trimethyl, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester, 9-Octadecenoic acid (E)- 및 9,12-Octadecadienoic acid methyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Distannoxane hexabutyl-와 9-Octadecenoic acid (E)-으로 각각 30.94%와 12.43%를 차지하고 6 주째에는 새로이 생성된 2,4-Diamino-6,8-bis[3,4-dichlorophenyl]-5,6-dihydro-8H-thiapyran[4',3'-4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine가 16.72% 이고 후자가 증가하여 16.50% 이다 (Table 85).

Table 85. Volatile compounds of Doenjang with steamed garlic.

No	Volatile compounds	RT	Area%	
			0W	6W
1	2,4-Diamino-6,8-bis[3,4-dichlorophenyl]-5,6-dihydro-8H-thiapyran[4',3'-4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine	1.667		16.72
2	Distannoxane, hexabutyl-	1.684	30.94	
3	Butanal, 3-methyl-	2.101	6.07	9.84
4	Urea	2.474		3.71
5	3-Furanol, tetrahydro-	2.594	3.87	
6	Propanoic acid	2.777		0.63
7	Propanal, oxime	3.189		0.70
8	Cyclohexane, (1,1-dimethylethyl)-	3.223	2.67	
9	2,3-Butanediol	3.509		12.54
10	1H-Imidazole, 4,5-dimethyl-	3.629	1.92	
11	5-Hexenoic acid	4.047		1.12
12	Phosphine, acetyldimethyl-	4.625		0.12
13	4-Methyl-cyclohex-2-en-1-ol	4.762	0.51	
14	Isocyanate, 4-pyridinyl	5.083	0.28	
15	1,4-Dioxane, 2,5-dimethyl-	5.203		1.28
16	Propanamide, 2-methyl-	5.209	0.78	
17	1-Propene, 1-(ethylthio)-2-methyl-	5.810		0.55
18	Benzaldehyde	6.001	3.27	0.89
19	Succinic acid, butyl 2-ethylbutyl ester	6.256		0.49
20	2-Decen-1-ol, (E)-	6.382	0.36	
21	Furan, 2-pentyl-	6.530	1.45	0.70
22	2-Pyridinamine, 4,6-dimethyl-	6.948		0.37
23	cis-9,10-Epoxyoctadecan-1-ol	6.948	0.46	
24	cis-9,10-Epoxyoctadecan-1-ol	6.948	0.46	
25	1,3-Hexadiene, 3-ethyl-2-methyl-	7.703	0.21	
26	[1,1'-Bicyclopentyl]-2-ol	7.709		0.14
27	Benzeneacetaldehyde	7.978	7.31	9.01

28	2-Undecenal	8.339		0.19
29	2-Octenal, (E)-	8.339	0.43	
30	1-Octanol	8.653	0.26	
31	1-Propene, 3,3'-thiobis-	8.908	0.74	0.45
32	6-Hydroxy-9-[tetrahydro-2H-pyran-2-yl]-9H-purine	9.157		0.09
33	Nonanal	9.540		1.62
34	Maltol	9.918		0.10
35	Pentaleno[1,2-b]oxirene, octahydro-, (1a.alpha.,1b.alpha.,4a.beta.,5a.alpha.)-	9.288	0.28	
36	Nonanal	9.540	1.62	
37	2-Propenoic acid, 2-methyl-, dodecyl ester	10.496		0.09
38	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	10.905	0.84	0.98
39	1-Hexene, 2-methyl-	11.062	0.42	
40	Dodecane	12.104		0.15
41	Furan, 3-phenyl-	12.745		0.25
42	2-Cyclohexen-1-ol	13.797	0.35	0.12
43	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	14.653	0.39	0.20
44	Trisulfide, di-2-propenyl	14.853	0.28	14.85
45	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.253	1.82	0.70
46	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.565	1.18	1.49
47	2-Tridecenal, (E)-	16.481		0.23
48	2-Heptadecenal	16.481	0.45	
49	Cyclohexene, 3-(1-methylethyl)-	16.870	0.34	
50	Decane, 1,1'-oxybis-	17.374		0.18
51	Benzenebutanal, .gamma.,4-dimethyl	19.531	0.19	
52	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.720		0.38
53	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.971	0.74	1.04
54	Butylated Hydroxytoluene	20.349		0.63
55	Silane,[[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis(trimethyl	26.134	0.19	0.21
56	n-Hexadecanoic acid	34.168	8.50	6.98
57	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.863	0.94	1.80
58	7-Heptadecyne, 1-chloro-	36.926		0.14
59	9-Octadecenoic acid, (E)-	37.804	12.43	16.50
60	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	38.233	4.29	7.39
61	Hexadecanoic acid, 1,1-dimethylethyl ester	38.688	1.64	
62	2-p-Nitrophenyl-oxadiazol-1,3,4-on e-5	42.196	0.19	
63	Silicic acid, diethyl bis(trimethyl silyl)ester	42.201		0.18

④ 발효마늘 첨가 마늘된장의 향기성분

발효마늘 첨가 마늘된장 0 주째에는 43 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 41 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Furfural, 1-Propene 3,3'-thiobis-, Benzaldehyde, Furan 2-pentyl-, Benzeneacetaldehyde, Diallyl disulphide, 6H-Purin-6-one 1,7-dihydro-, Nonanal, 4-Mercaptophenol, Cyclopentasiloxane decamethyl-, 2,4-Decadienal, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, 2-Methylene cyclopentanol, n-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester, 6-Octadecenoic acid, 9,12-Octadecadienoic acid methyl ester 및 Octadecanoic acid, butyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Pregna-2,4-dien-20-one, 17-(acetyloxy)-6-methyl-3,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, (6.beta.)-와 6-Octadecenoic acid 으로 각각 25.68%와 12.29%를 차지하고 6 주째에는 전자는 검출되지 않았고 주요 향기성분은 Tris(benzo[b]selenopheno)[2,3:2',3 ':2'',3'']benzene, Butanal 3-methyl- 및 6-Octadecenoic acid는 각각 15.24%, 13.48% 및 14.80% 였다 (Table 86).

Table 86. Volatile compounds of Doenjang with fermented garlic.

No	Volatile compounds	RT	Area%	
			0W	6W
1	Pregna-2,4-dien-20-one,17-(acetyloxy)-6-methyl-3,6-bis[(trimethylsilyloxy)-, (6.beta.)-	1.667	25.68	
2	Tris(benzo[b]selenopheno)[2,3:2',3 ':2'',3''']benzene	1.673		15.24
3	Butanal, 3-methyl-	2.096		13.48
4	Benserazide	2.296	12.83	
5	1-Pentanol	2.554		3.57
6	Propanoic acid, 3-hydroxy-2,2-dimethyl-,	2.617	1.17	
7	Propanoic acid, 2-methyl-	3.080		0.83
8	Hexanal	3.212	2.24	
9	2,3-Butanediol	3.395		8.17
10	1-Nonen-3-ol	3.435	3.00	
11	Furfural	3.618	1.20	3.07
12	1-Propene, 3,3'-thiobis-	4.050	1.55	2.38
13	Heptanal	4.757	0.60	
14	Disulfide, methyl 2-propenyl	5.071		1.11
15	Phenol, 2-methyl-	5.071	0.28	
16	Dimethyl sulfone	5.403		0.12
17	Benzaldehyde	6.007	3.16	1.30
18	4-Cycloocten-1-amine, N-methyl-	6.365		0.40
19	2-Octen-1-ol, (E)-	6.376	0.35	
20	Furan, 2-pentyl-	6.668	1.47	0.60
21	4-Piperidinecarboxylic acid hydrazide	6.942	0.57	
22	2-Fluorostyrene	6.948		0.44
23	3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 1-	7.698	0.26	
24	Benzeneacetaldehyde	7.978	8.50	9.33
25	2-Dodecenal	8.333		0.16
26	2-Octenal, (E)-	8.339	0.44	
27	Pentane, 2-cyclopropyl-	8.636		0.08
28	7-Heptadecene, 7-methyl-, (E)-	8.642	0.21	
29	Diallyl disulphide	8.905	2.94	2.06
30	6H-Purin-6-one, 1,7-dihydro-	9.157	0.15	0.21
31	Nonanal	9.534	1.60	0.67
32	4-Mercaptophenol	9.901	0.17	0.16
33	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	10.905	0.82	0.76
34	Oxalic acid, isobutyl nonyl ester	12.098		0.11
35	Tritetracontane	12.104	0.18	
36	Cinnoline, 3-methyl-	12.745		0.28
37	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol	13.792	0.42	
38	2-Decenal, (Z)-	13.803		0.13
39	Cinnamaldehyde, .beta.-methyl-	14.129		0.10
40	2-n-Octylfuran	14.650	0.41	
41	1,4-Pentadiene, 3,3-dimethyl-	14.656		0.26
42	Trisulfide, di-2-propenyl	14.856	0.19	
43	2,4-Decadienal	15.253	1.94	0.76
44	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.565	1.30	1.49
45	2-Methylene cyclopentanol	16.478	0.47	0.17
46	4-Tridecen-1-ol, acetate, (E)-	16.864	0.38	
47	Tridecane	17.374		0.13
48	Tetradecane	17.374	0.22	
49	Benzene,1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	19.528	0.36	0.09
50	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.720		0.29

51	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.971	0.75	1.59
52	Butylated Hydroxytoluene	20.355		0.44
53	Benzo[b]dihydropyran, 6-hydroxy-4, 4,5,7,8-pentamethyl-	20.360	0.21	
54	Benzenethanamine, N-[(pentafluorophenyl)methylene]-.beta.,3,4-tris[(trimethylsilyl)oxy]-	26.134		0.31
55	Silane, [[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis[trimethyl-	26.145	0.19	
56	1,1,1,5,7,7,7-Heptamethyl-3,3-bis(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	31.049		0.09
57	n-Hexadecanoic acid	34.165	8.46	6.61
58	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.863	1.24	1.89
59	Z,Z-4,15-Octadecadien-1-ol acetate	36.926		0.11
60	6-Octadecenoic acid	37.802	12.29	14.80
61	9,12-Octadecadienoic acid methyl ester	38.233	0.93	5.89
62	Hexadecanoic acid, 1,1-dimethylethyl ester	38.688	0.74	
63	Octadecanoic acid, butyl ester	42.193	0.14	0.18
64	4-Phenyl-3,4-dihydroisoquinoline	42.728		0.13

⑤ 발아마늘 첨가 마늘된장의 향기성분 : 발아마늘 첨가 마늘된장 0 주째에는 39 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 32 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Butanal 3-methyl-, Furfural, 1-Propene 3,3'-thiobis-, 1,3-Dithiane, Benzaldehyde, Benzeneacetaldehyde, Diallyl disulphide, Nonanal, Cyclopentasiloxane decamethyl-, Benzofuran 2-ethenyl-, Benzeneacetaldehyde .alpha.-ethylidene-, 2,4-Decadienal (E,E)-, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, 2-Dodecenal (E)-, Cycloheptasiloxane tetradecamethyl-, Benzoic acid,2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, -Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ester 및 6-Octadecenoic acid 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Osmium methyl, (.eta.-5-cyclopentadienyl)-bis(dimethylphenylphosphine)와 Butanal, 3-methyl-로 각각 21.00%와 14.96%를 차지하고 6 주째에는 전자는 검출되지 않고 후자의 경우 증가하여 25.22% 그리고 6-Octadecenoic acid는 16.10% 였다 (Table 87).

Table 87. Volatile compounds of Doenjang with germinated garlic.

No	Volatile compounds	RT	Area%	
			0W	6W
1	Osmium methyl, (.eta.-5-cyclopentadienyl)-bis(dimethylphenylphosphine)	1.678	21.00	
2	Hexa-2,4-dien-2,5-zirconium-3,4-molibdenum-tetra(cyclopentadienyl)	1.701		13.43
3	Butanal, 3-methyl-	2.114	14.96	25.22
4	Hydrazine, 1,1-dimethyl-	2.319	3.74	
5	D-(+)-Xylose, tetramethyl ether	2.559		3.93
6	L-Serine, N-methyl-	2.645	3.03	
7	Hexanal	3.218	2.50	
8	2,3-Butanediol	3.309		4.83
9	Furfural	3.622	3.46	4.54
10	1-Propene, 3,3'-thiobis-	4.062	1.74	0.64
11	Heptanal	4.757	0.65	
12	1,3-Dithiane	5.089	1.42	2.11
13	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-	5.398	0.15	
14	Benzaldehyde	6.010	2.78	1.38
15	Succinic acid, dodecyl pentyl este	6.267		0.40
16	Furan, 2-pentyl-	6.679	0.93	
17	3-Pyridinecarboxaldehyde, oxime	6.948	0.78	
18	1,2-Benzenediamine, 3-methyl-	6.954		0.50
19	Benzeneacetaldehyde	7.984	6.59	9.22

20	2-Octenal, (E)-	8.339	0.22	
21	Cyclopropaneacetic acid, 2-hexyl-	8.648	0.14	
22	Diallyl disulphide	8.911	2.17	1.14
23	6H-Purin-6-one, 1,7-dihydro-	9.163		0.24
24	2-Butenedioic acid, 2,3-dihydroxy-,(E)-	9.277	0.28	
25	Nonanal	9.543	0.93	0.37
26	4-Mercaptophenol	9.895		0.15
27	Thiophene, tetrahydro-2-methyl-	10.496	0.43	
28	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	10.908	1.30	0.78
29	Benzofuran, 2-ethenyl-	12.745	0.18	0.33
30	1-Pentene, 2,3-dimethyl-	13.792	0.31	
31	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	14.129	0.20	0.25
32	2,4-Decadienal, (E,E)-	14.653	0.32	0.18
33	Trisulfide, di-2-propenyl	14.856	0.18	
34	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.253	1.42	0.75
35	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.565	1.62	1.46
36	2-Dodecenal, (E)-	16.481	0.64	0.18
37	2,4-Decadienal	16.864	0.29	
38	Benzene,1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	19.537	0.16	
39	trans-1-Phenyl-1-pentene	19.714	0.13	
40	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.725		0.41
41	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.971	1.72	2.23
42	Butylated Hydroxytoluene	20.349		0.26
43	Benzoic acid,2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-,	26.134	0.34	0.30
44	n-Hexadecanoic acid	34.173	7.10	5.77
45	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.863	0.84	0.69
46	6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	37.069		0.20
47	6-Octadecenoic acid	37.819	14.99	16.10
48	9,12-Octadecadienoic acid methyl ester	38.236		1.58
49	Pyrido[2,3-d]pyrimidine, 4-phenyl-	42.184	0.14	

(2) 전처리방식을 달리한 마늘 첨가 된장의 항산화 활성 변화

(가) 발효 중 항산화 활성 변화

전처리방식을 달리한 마늘 첨가 된장의 발효 중 항산화 활성은 Fig. 78과 같다. 항산화 활성 중 DPPH 라디칼 소거활성에서는 증자마늘된장이 가장 우수하였다. 발효 전 (0 주)에는 36.01%의 낮은 활성을 나타내었으나 발효가 진행됨에 따라 점차적으로 증가하여 발효 종기 (6 주)에는 55.82%의 소거활성을 나타내었다 (Fig. 78A). ABTS 라디칼 소거활성도 DPPH와 동일한 결과로 증자마늘된장이 가장 우수하였으며 발효 과정 중 증가하여 발효 종기 (6 주)에는 95.45%의 우수한 활성을 나타내었다 (Fig. 78B). FRAP 환원력도 모든 된장에서 발효가 진행됨에 따라 증가하였으나 큰 유의적 차이는 없었다. 그 중 증자마늘된장은 발효 종기 (6 주) 0.81의 환원력으로 가장 우수하였다 (Fig. 78C). 한편 발효마늘된장은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP 환원력이 가장 낮은 것으로 나타났으며, 이러한 라디칼 소거활성과 환원력 차이는 상기 기술된 바와 같이 총 phenolics 함량에 기인한 것으로 판단되었다.

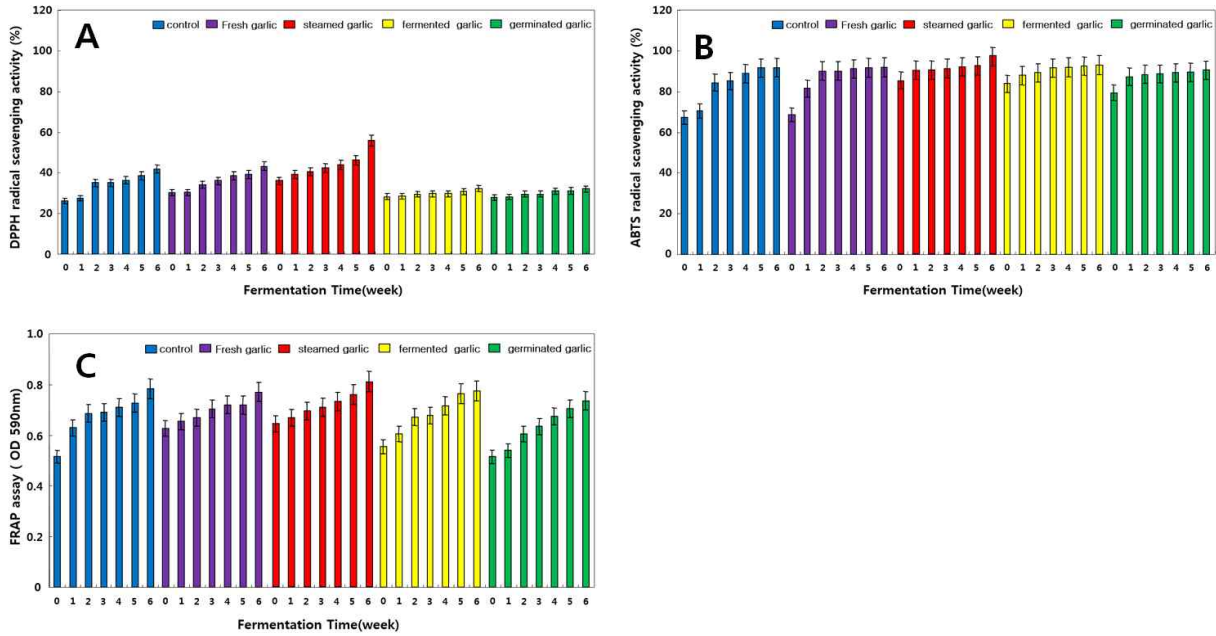


Fig. 78. Changes of DPPH (A) ABTS (B) radical scavenging activities and FRAP assay (C) of doenjang with differently prepared garlic during fermentation.

마. 공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장

(1) 마늘된장의 이화학적 특성

(가) 마늘된장의 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화

발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화는 Table 88과 같았다. 공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장의 발효 중기 (6 주) pH는 각각 5.97 - 5.87 수준이었으며 산도 또한 1.04 - 1.06%로 유의적 차이가 없었다. 염도는 발효 중기 (6 주) 선발균주를 이용한 마늘된장이 11.00%로 높았으며 생균수는 효모의 경우 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하였지만 발효 중기의 효모는 3.43 log cfu/g 으로 공시균주를 이용한 마늘된장보다 생균수가 높았다. 이는 곰팡이의 전분 분해력에 의해 효모의 생육에 도움이 됐을 것으로 판단되었다. 한편 바실러스 생균수는 선발균주를 이용한 마늘된장에서 8.53 log cfu/g의 세포수를 나타내었다.

Table 88. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of garlic doenjang during fermentations¹⁾

Samples	Fermentation time (w)	Contents ²⁾				
		pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers log cfu/g	
					<i>Yeast</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Asp.oryzae</i> with <i>Bacillus natto</i>	0	5.97	1.06	6.80	3.70	6.62
	1	6.00	0.94	7.00	3.54	6.20
	2	5.97	1.05	7.40	3.44	6.18
	3	5.99	0.95	12.20	3.10	6.28
	4	6.00	1.02	8.80	2.86	6.37
	5	5.99	0.95	7.80	2.74	6.94
	6	5.97	1.04	9.40	2.25	7.51

<i>Rhi. oryzae</i> with MJ1-4 and EMD17	0	6.12	0.93	6.80	5.21	8.94
	1	5.94	1.01	7.20	4.29	8.57
	2	5.89	1.08	7.80	4.10	8.17
	3	5.95	1.04	9.20	3.96	8.00
	4	5.93	1.04	8.20	3.62	7.36
	5	5.88	1.01	8.60	3.43	8.46
	6	5.87	1.06	11.00	3.43	8.53

¹⁾*Garlic doenjang* were fermented at room temperature for 6 week

²⁾All values are means of determination in three independent experiments.

(2) 공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장의 총 phenolics 및 isoflavone 함량 분석

(가) 발효 중 총 phenolics 함량 변화

공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장의 총 phenolics 함량 변화는 Fig. 79와 같다. 발효가 진행됨에 따라 총 phenolics 함량은 동일하게 증가를 하였으며 특히 *Rhi. oryzae*를 이용한 된장은 발효 전 (0 주) 4.96 mg/g에서 발효 중기 (6 주)에는 7.72 mg/g 의 함량을 나타내었다. 이는 곰팡이의 높은 전분 분해력과 바실러스 균주의 β -glucosidase 활성화에 기인한 것으로 판단되었다.

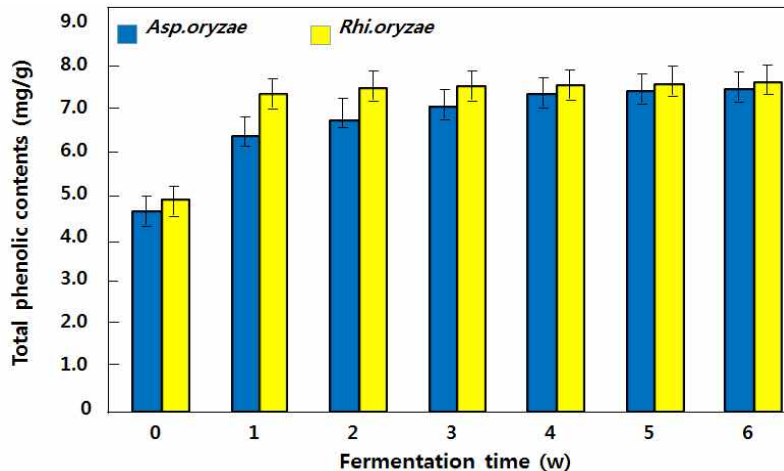


Fig. 79. Changes of total phenolic contents of garlic doenjang during fermentations.

(나) 발효 중 isoflavone 함량 변화

공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장의 HPLC 크로마토그램, isoflavone 비율 및 함량 변화는 Fig. 80 및 Table 89와 같다. 공시균주를 이용한 마늘된장은 총 11종의 isoflavone 유도체가 공통적으로 검출되었으며, acetylglycosides 형태인 acetylgenistin은 검출되지 않았다 (Fig. 80). 발효 1주 경과 glycosides의 함량은 크게 감소하였고 이에 상응하여 aglycones의 함량이 크게 증가하였다. 발효 전 (0 주) glycosides의 daidzin, glycitin 및 genistin 함량은 각각 220.29 μ g/g, 121.20 μ g/g 및 259.07 μ g/g 이었고 발효 중기 (6 주)에는 aglycones의 daidzein, glycitein 및 genistein 함량은 각각 214.42 μ g/g, 72.16 μ g/g 및 194.51 μ g/g 로 증가하였다 (Table 89). 한편 isoflavone 유도체의 변화율은 발효 전 (0 주) glycosides 형태는 77.51% 이었으며 발효 중기 (6 주)에는 9.79% 로 감소하였고 이에 상응하여 aglycones 형태는 발효 전 (0 주) 15.51% 이었고 발효 중기 (6 주)에는 86.41% 로 변화하였다. 선발균주를 이용한 마늘된장은 총 9 종의 isoflavone 유도체가 공통적으로 검출되었으며, malonylglycosides 형태인 malonyldaidzin 및 acetylglycosides 형태인 acetylgenistin은 검출되지 않았다. 공시균주를 이용한 마늘된장과는 다르게 발효가 진행됨에 따라 천천히 glycosides의 함량이 감소하였으며 이에 상응하여 aglycones의 함량이 증가하였다. 특히 발효 중기 (6 주) aglycones의 daidzein, glycitein 및 genistein 함량은 각각 191.44 μ g/g, 65.89 μ g/g 및 177.93 μ g/g 이었다. 한편

isoflavone 유도체의 변화율은 발효 전 (0 주) 4.62%를 차지하던 aglycones 형태가 발효 중기 (6 주)에는 83.42%를 나타내었고, 발효 전 (0 주) glycosides 및 aglycones 형태의 비율을 비교 하였을 때, 선발균주를 이용한 마늘된장에서의 aglycones 변화율이 우수한 것으로 판단되었다.

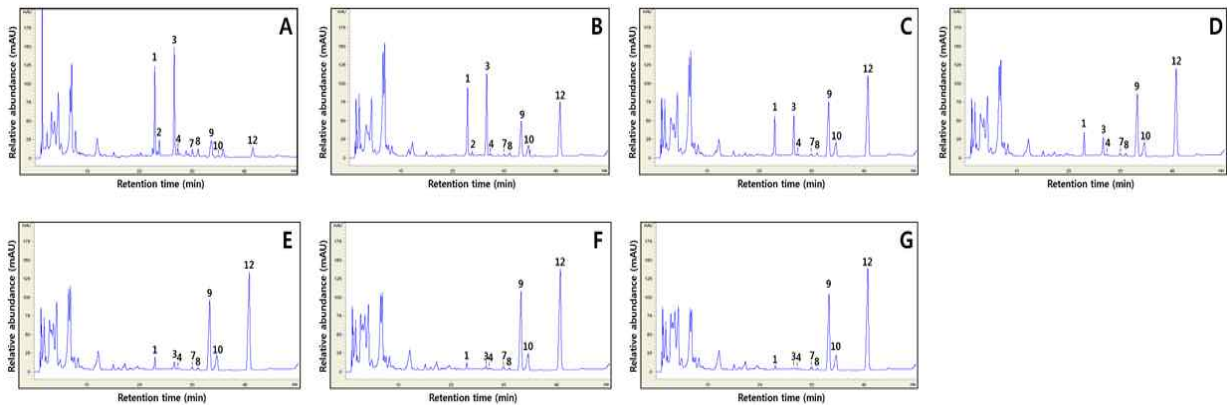


Fig. 80. Typical HPLC chromatogram of isoflavone. *Rhi. oryzae doengjang* at 0 week (A), 1 week (B), 2 week (C), 3 week (D), 4 week (E), 5 week (F), and 6 week (G). 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 7, acetylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, glycitein; and 12, genistein.

Table 89. Changes of 11 isoflavone contents of garlic doenjang prepared with different microorganisms during fermentation.

Strains	Fermentation time (w)	Isoflavone contents ²⁾ (µg/g)											Total S	
		Glycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Aglycones			
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein		Genistein
<i>Asp. oryzae</i> with <i>Bacillus natto</i>	0	220.29	121.20	259.07	12.94	11.25	23.44	nd	6.44	nd	55.97	17.17	47.03	774.8
	1	34.37	21.54	16.27	2.39	16.34	nd	nd	3.84	nd	215.08	65.17	196.92	571.92
	2	31.38	18.69	2.75	nd	20.13	nd	nd	3.76	nd	209.61	66.90	194.15	547.37
	3	32.16	21.42	nd ³⁾	nd	8.93	nd	nd	2.85	1.43	219.06	72.82	200.68	562.35
	4	33.70	26.78	tr ⁴⁾	nd	15.14	nd	nd	2.83	1.41	197.17	66.58	181.07	528.68
	5	32.85	25.79	tr	nd	13.95	nd	nd	2.62	nd	184.76	61.88	171.11	492.96
	6	31.08	23.42	tr	nd	15.58	nd	nd	3.72	1.86	214.42	72.16	194.51	556.75
<i>Rhi. oryzae</i> with MJ1-4 and EMD17	0	313.09	151.87	396.96	26.61	nd	30.26	nd	7.24	nd	20.96	10.46	13.39	970.84
	1	165.20	22.28	171.27	5.18	nd	19.25	nd	1.63	nd	90.80	45.34	95.04	615.99
	2	104.24	nd	81.12	4.44	nd	18.10	nd	2.11	nd	136.33	57.22	141.26	544.82
	3	67.43	nd	37.96	3.26	nd	16.44	nd	2.21	nd	153.76	59.73	156.95	497.74
	4	58.13	17.62	26.61	8.45	nd	18.51	nd	4.04	nd	177.91	65.01	172.74	549.02
	5	38.63	12.82	11.93	4.01	nd	12.59	nd	2.22	nd	192.87	67.22	181.50	523.79
	6	36.09	16.63	5.26	6.77	nd	17.68	nd	4.05	nd	191.44	65.89	177.93	521.74

¹⁾ *Garlic doenjang* were fermented at room temperature for 6 week.

²⁾ All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

³⁾ nd: not detected.

⁴⁾ tr: trace(<0.002 µg/g).

(다) 향기성분 분포

① *Asp. oryzae/B. natto* 마늘된장의 향기성분

Asp. oryzae/B. natto 마늘된장 0 주째에는 50 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 36 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Butanal 3-methyl-, Hexanal, Furfural, 1-Propene, 3,3'-thiobis-, 1,3-Dithiane, Benzaldehyde, 1-Octen-3-ol, Furan 2-pentyl-, Benzeneacetaldehyde, 2-Octenal (E)-, 1-Propene 3,3'-thiobis-, Nonanal, Furan 3-phenyl-, Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene- 2,4-Dodecadienal, (E,E)-, Trisulfide di-2-propenyl, 2,4-Decadienal (E,E)-, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, Cyclohexanol 1-ethynyl-, 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal, Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-,

n-Hexadecanoic acid 및 9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester 향기성분이 검출되었다. 0 주
 의 주요 향기성분은 Butanal 3-methyl- 와 Octadec-9-enoic acid으로 각각 14.12%와 17.47%
 를 차지하고 6 주에는 전자의 향기성분은 증가하여 24.31%를 차지하나 후자는 검출되지 않았
 다. 주요 향기성분으로는 전자와 새로 생성된 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-가 16.60% 였다
 (Table 90).

Table 90. Volatile compounds of garlic Doenjang with *Asp. oryzae* and *B. natto*.

No	Volatile compounds	RT	Area%	
			0W	6W
1	Hexa-2,4-dien-2,5-zirconium-3,4-molibdenum-tetra(cyclopentadienyl)	1.661	12.98	
2	Ferrocene, decachloro-	1.667		11.07
3	Butanal, 3-methyl-	2.102	14.22	24.31
4	1,2-Ethandiol, diformate	2.325	3.89	
5	2-Pentene, 3-methyl-, (E)-	2.617		2.77
6	2-Pental, (E)-	2.645	2.16	
7	Hexanal	3.212	2.30	0.86
8	1-Nonen-3-ol	3.429		1.51
9	Furfural	3.618	3.50	2.94
10	1-Propene, 3,3'-thiobis-,	4.053	2.14	1.18
11	Thiophene, 2,5-dimethyl-	4.854	0.87	
12	1,3-Dithiane	5.083	1.24	1.99
13	Dimethyl sulfone	5.392	0.14	
14	Benzaldehyde	6.004	2.51	2.07
15	1-Octen-3-ol	6.370	0.77	0.45
16	Furan, 2-pentyl-	6.674	1.49	1.07
17	Octanal	6.943	0.77	
18	Cyanamide, di-2-propenyl-	6.948		0.71
19	1,3-Hexadiene, 3-ethyl-2-methyl-,(Z)-	7.698	0.19	
20	Benzeneacetaldehyde	7.981	4.80	6.98
21	2-Octenal, (E)-	8.336	0.42	0.20
22	Acetophenone	8.585		0.15
23	Bromoacetic acid,	8.642	0.18	
24	1-Propene, 3,3'-thiobis-	8.908	3.42	1.35
25	Phenol, 2-methoxy-	9.163		1.47
26	3-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	9.277	0.42	
27	Nonanal	9.535	0.98	0.79
28	beta-[5-Methyl-2-tetrahydrofuran]alanine	10.313	0.15	
29	2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Acetyloxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl acetate	10.496		0.17
30	Sorbic Acid	10.582	0.80	
31	1,3,5-Trithiane	10.908	2.08	
32	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	10.908		1.19
33	5-Thiatricyclo[4.1.0.0(2,4)]heptan	11.835	0.15	
34	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	12.504	0.23	
35	Furan, 3-phenyl-	12.742	0.23	0.32
36	Propanoic acid, 3-chloro-, decyl ester	13.803		0.15
37	Cyclohexanol,	13.380	0.16	
38	2-Decenal, (E)-	13.797	0.46	
39	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	14.129	0.43	0.36
40	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	14.656	0.47	0.20

41	Trisulfide, di-2-propenyl	14.856	0.28	0.18
42	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.251	2.36	0.71
43	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.566	1.16	1.24
44	Hex-3-ene-1,5-diyne, 3,4-diisopropyl-	16.138	0.13	
45	Diphenyl ether	16.527		0.36
46	Propanoic acid, 2-chloro-	16.533	1.31	
47	Cyclohexanol, 1-ethynyl-	16.866	0.52	0.23
48	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	19.531	0.11	
49	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.716	0.19	0.57
50	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.971	0.98	1.20
51	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl ethylester	23.067	0.16	
52	Noradrenaline tetraTMS	26.128		0.26
53	Silane, [[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis[trimethyl-	26.134	0.23	
54	Undecanal, 2-methyl-	27.009	0.12	
55	Pentadecanal-	27.524	0.15	
56	7-Formylbicyclo[4.1.0]heptane	32.382	0.13	
57	Cycloheptene	32.537	0.14	
58	n-Hexadecanoic acid	34.173	6.74	6.16
59	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.860	0.45	
60	Octadec-9-enoic acid	37.818	17.47	
61	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.236	2.80	
62	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.866		0.71
63	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	37.818		16.60
64	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.236	2.80	7.49

② *Rhi. oryzae*/MJ1-4 + EMD17 마늘된장의 향기성분

Rhi. oryzae/MJ1-4 + EMD17 마늘된장 0 주째에는 42 종의 향기성분이 확인되었고 6 주째에는 41 종의 향기성분이 확인되었다. 0 주와 6 주에 공통으로 검출된 향기성분은 Butanal 3-methyl-, Hydrazine 1,2-dimethyl-, Hexanal, Furfural, 1-Propene 3,3'-thiobis-, Thiophene 2,4-dimethyl-, 1,3-Dithiane, Benzaldehyde, Furan 2-pentyl-, Benzeneacetaldehyde, 2-Octenal (E)-, 1-Octanol, Diallyl disulphide, Pyrazine tetramethyl-, Nonanal, Cyclopentasiloxane decamethyl, Furan 3-phenyl-, 2-Cyclohexen-1-ol, Benzeneacetaldehyde alpha.-ethylidene-, 2,4-Dodecadienal, (E,E)-, Trisulfide di-2-propenyl, 2,4-Decadienal (E,E)-, Cyclohexasiloxane dodecamethyl-, Propanoic acid 2-chloro-, 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal, Cycloheptasiloxane tetradecamethyl-, Silane [[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis[trimethyl-, n-Hexadecanoic acid 및 9-Octadecenoic acid (E)- 향기성분이 검출되었다. 0 주의 주요 향기성분은 Butanal 3-methyl- 와 9-Octadecenoic acid (E)-으로 각각 11.60%와 25.44%를 차지하고 6 주에는 전자의 향기성분은 증가하여 16.93%를 차지하나 후자는 감소하여 11.21% 이다. 주요 향기성분으로는 두 향기성분과 새로 생성된 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester가 16.60% 였다 (Table 91).

Table 91. Volatile compounds of garlic Doenjang with *Rhi. oryzae*, EMD17, and MJ1-4.

No	Voliate compound	RT	Area%	
			0W	6W
1	Pregna-2,4-dien-20-one,17-(acetyloxy)-6-methyl-3,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, (6.beta.)-	1.690	10.71	
2	[1,1'-Bianthracene]-9,9',10,10'-tetrone,4,4',5,5',8,8'-hexahydroxy-7,7'-dimethyl-	1.707		7.47
3	Butanal, 3-methyl-	2.113	11.60	16.93

4	Hydrazine, 1,2-dimethyl-	2.352	3.28	3.81
5	2-Hexene, (E)-	2.657	2.55	
6	2-Butenal, 2-methyl-, (E)-	2.680		1.39
7	Hexanal	3.220	1.52	0.75
8	1-Nonen-3-ol	3.395		0.68
9	Furfural	3.638	3.61	5.30
10	1-Propene, 3,3'-thiobis-	4.058	1.56	1.41
11	Thiophene, 2,4-dimethyl-	4.863	0.50	0.70
12	1,3-Dithiane	5.089	0.98	0.88
13	Benzaldehyde	6.013	2.17	1.74
14	1,2-Benzenediol, o-di(acethoxyacetyl)-	6.262		0.51
15	1-Octen-3-yl-acetate	6.376	0.33	
16	Furan, 2-pentyl-	6.676	1.04	0.65
17	Cyclopentanone, 2-ethyl-	6.948	0.21	
18	Cyclopentene, 1-(1-methylethyl)-	7.703	0.14	
19	Benzeneacetaldehyde	7.987	4.85	7.62
20	2-Octenal, (E)-	8.339	0.31	0.13
21	1-Octanol	8.647	0.14	0.15
22	Diallyl disulphide	8.911	3.92	2.63
23	Pyrazine, tetramethyl-	9.137	0.77	0.15
24	Nonanal	9.540	0.75	0.62
25	2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Acetyloxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl acetate	10.496		0.31
26	3-(Methylthio)pent-1-yne	10.582	0.66	
27	Cyclopentasiloxane, decamethyl	10.908	1.91	1.99
28	Octanoic Acid	11.274		0.15
29	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	11.829		0.09
30	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	12.504	0.17	
31	Furan, 3-phenyl-	12.747	0.19	0.20
32	2-Cyclohexen-1-ol	13.797	0.26	0.15
33	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	14.129	0.49	0.46
34	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	14.653	0.44	0.21
35	Trisulfide, di-2-propenyl	14.856	0.35	0.62
36	2,4-Decadienal, (E,E)-	15.251	2.19	1.12
37	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	15.565	1.68	2.20
38	3-Heptyne	16.138		0.14
39	Propanoic acid, 2-chloro-	16.533	1.00	0.64
40	Cyclohexanol, 1-ethynyl-	16.864	0.49	
41	2,4-Decadienal	16.870		0.16
42	Tetradecane	17.374		0.10
43	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	19.531	0.14	
44	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	19.720	0.19	0.73
45	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	19.971	1.88	1.83
46	Butylated Hydroxytoluene	20.349	0.16	
47	Diethyl Phthalate	23.067	0.26	
48	Silane,[[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis[trimethyl-	26.140	0.41	0.33
49	n-Hexadecanoic acid	34.187	9.52	8.47
50	Hexadecanoic acid, ethyl ester	34.863	1.11	3.40
51	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester	36.931		0.23
52	9-Octadecenoic acid, (E)-	37.815	25.44	11.21
53	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	38.236		11.91

(3) 공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장의 항산화 활성 변화

(가) 발효 중 항산화 활성 변화

공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장의 발효 중 항산화 활성은 Fig. 81와 같다. 공시균주 및 선발균주를 이용한 마늘된장은 발효 전 (0 주) DPPH 라디칼 소거활성은 유사하였으나, 선발균주를 이용한 마늘된장의 경우 발효 1 주 경과 55.32%로 활성이 증가하였고 그 후 발효가 진행됨에 따라 큰 유의적 차이 없이 서서히 증가하여 발효 중기 (6 주)에는 64.42%의 활성을 나타내어 공시균주를 이용한 마늘된장보다 우수하였다 (Fig. 81A). ABTS 라디칼 소거활성 역시 우수하였으며 (Fig. 81B), FRAP 환원력 또한 발효 전 (0 주)에는 활성이 낮았지만 발효 중기 (6 주)에는 2.68의 환원력을 나타냈으며 발효가 진행됨에 따라 환원력이 증가하였다 (Fig. 81C). 이는 곰팡이의 높은 전분 분해력과 이로 인해 바실러스 균주들이 분해된 영양소를 더 많이 이용한 것으로 추정되었다. 그 결과 β -glucosidase 활성이 증가함에 따라 총 phenolics 함량 및 항산화 활성이 증가한 것으로 판단되었다.

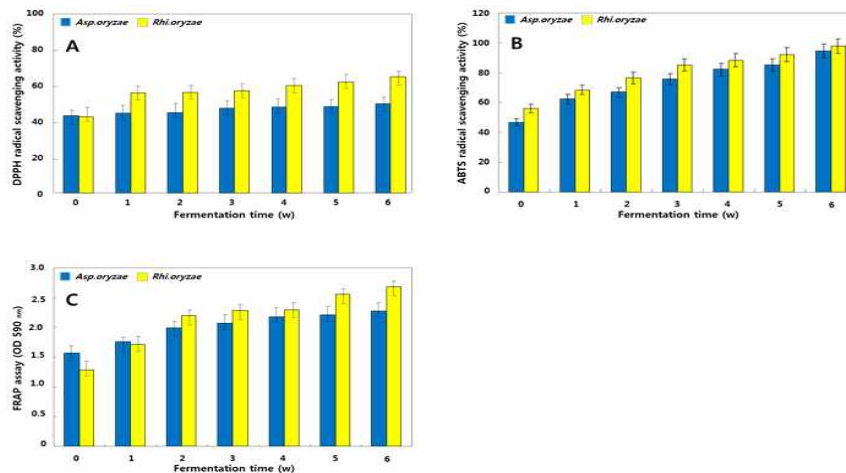


Fig. 81. Changes of DPPH (A), ABTs (B) and FRAP assay (B) of garlic doenjang prepped with different microorganisms during fermentation.

바. 된장 및 간장의 메타게놈 효모 다양성 분석

(1) 된장 메타게놈 효모 다양성

(가) 상동성 분석 결과

각 된장시료에서 (1DJ, 2DJ, 및 3DJ) 각각 60 개의 균을 확인한 결과 3 개의 된장에서 35 개의 *Candida etchellsii* Miso 0209 상동성 99-100%, 43 개의 *Candida etchellsii* IFO 1595 상동성 99-100%, 2 개의 *Candida sake* SYZW 상동성 100%, 2개의 *Candida sorbosivorans* DMic 113940 상동성 100%, 68 개의 *Candida* sp. MUCL 45721 상동성 97-98%, 3 개의 *Clavispora lusitaniae* FSMP-Y31 상동성 99%, 4 개의 *Pichia kluyveri* H1S0K2가 상동성 99%, 4 개의 *Saccharomyces cerevisiae* D3C가 상동성 90-99%, 13 개의 *Zygosaccharomyces pseudorouxii* ATCC 42981가 상동성 99%, *Debaryomyces hansenii* N02-2.2, *Hanseniaspora uvarum* 13w76, *Kazachstania unispora* D190, *Rhodotorula mucilaginosa* ZIM 2410 BGAL3-Y58, *Rhodotorula* sp. M65, 및 *Zygosaccharomyces pseudorouxii* ABT301가 상동성 99%를 나타내었다 (Table 92).

(나) 효모 분포도

1DJ, 2DJ, 및 3DJ에서 *Candida etchellsii*, *Candida sake*, *Candida sorbosivorans*, *Candida* sp., *Clavispora lusitana*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania unispora*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, 및 *Zygosaccharomyces pseudorouxii*의 총 13종이 나타났다. *Candida etchellsii*는 1TDJ에서 58.2%, 2TDJ에서 71.7%, *Candida sake*는 1TDJ에서 3.3%, *Candida sorbosivorans*는 1TDJ에서 3.3%, *Candida* sp.는 1TDJ에서 16.6%, 2TDJ에서 3.3%, 및 3TDJ에서 93.3%, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Kazachstania unispora*, *Rhodotorula mucilaginosa*, 및 *Rhodotorula* sp.는 1TDJ에서 각각 1.7%, *Pichia kluyveri*는 1TDJ에서 6.7%, *Saccharomyces cerevisiae*는 1TDJ에서 1.7%, 및 2TDJ에서 5%, *Zygosaccharomyces pseudorouxii*는 1TDJ에서 1.7%, 2TDJ에서 9%, 및 3TDJ에서 6.7%로 나타났다(Fig. 82).

Table 92. Similarity values of 26S rRNA sequences retrieved DJY library from three *doenjang*.

No.	No. of clones	Phylum	Species ¹⁾	Accession No. ²⁾	Similarity (%)
DJY1	35	Ascomycota	<i>Candida etchellsii</i> Miso 0209	AB196193	99-100
DJY2	43	Ascomycota	<i>Candida etchellsii</i> IFO 1595	AB196185	99-100
DJY3	2	Ascomycota	<i>Candida sake</i> SYZW	EU326138	100
DJY4	2	Ascomycota	<i>Candida sorbosivorans</i> DMic 113940	JN031573	100
DJY5	68	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. MUCL 45721	FM209492	97-98
DJY6	3	Ascomycota	<i>Clavispora lusitaniae</i> FSMP-Y31	FJ627986	99
DJY7	1	Ascomycota	<i>Debaryomyces hansenii</i> N02-2.2	FJ455103	99
DJY8	1	Ascomycota	<i>Hanseniaspora uvarum</i> 13w76	HQ149311	99
DJY9	1	Ascomycota	<i>Kazachstania unispora</i> D190	HM627101	99
DJY10	4	Ascomycota	<i>Pichia kluyveri</i> H1S0K2	FM180530	99
DJY11	1	Ascomycota	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ZIM 2410 BGAL3-Y58	HE66006	99
DJY12	1	Ascomycota	<i>Rhodotorula</i> sp. M65	FJ795014	99
DJY13	4	Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	90-99
DJY14	13	Ascomycota	<i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i> ATCC 42981	AM947681	99
DJY15	1	Ascomycota	<i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i> ABT301	AM947682	99

¹⁾Range of 26S rDNA gene sequences is similarity values between fermented mugwort extract beverage clones and cultural isolated strain.

²⁾Accession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number the first sequence is given.

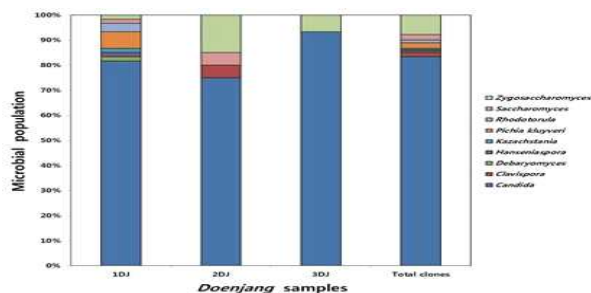


Fig. 82. Distribution of microbial population of dominant species of *doenjang*. Percentage of microcosm in each of the three libraries is shown.

(2) 간장 메타게놈 효모 다양성

(가) 상동성 분석 결과

각 간장시료에서 (1KJ, 2KJ 및 3KJ) 각각 60 개 균을 확인한 결과 18 개의 *Saccharomyces*

cerevisiae D3C가 상동성 99%, *Candida etchellsii* 33Z2 및 *Candida etchellsii* Miso 0209 각각 1 개씩 각각 상동성 99%, 100%, 3 개의 *Candida sp.* MUCL 45721가 상동성 97-98%, 21 개의 *Candida versatilis*가 상동성 99%, 42 개의 *Wallemia ichthyophaga* AFTOL-ID 1901가 상동성 99%, 24 개 *Zygosaccharomyces pseudorouxii* ABT301가 상동성 99%, 및 70 개의 *Zygosaccharomyces pseudorouxii* ATCC 42981가 상동성 99%로 나타났다 (Table 93).

Table 93. Similarity values of 26S rRNA sequences retrieved DJY library from three traditional *kanjang*

No.	No.of clones	Phylum	Species ¹⁾	Accession No.	Similarity (%)
1KJY	18	Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99
2KJY	1	Ascomycota	<i>Candida etchellsii</i> 33Z2	AB196190	99
3KJY	1	Ascomycota	<i>Candida etchellsii</i> Miso 0209	AB196193	100
4KJY	3	Ascomycota	<i>Candida sp.</i> MUCL 45721	FM209492	97-98
5KJY	21	Ascomycota	<i>Candida versatilis</i>	AF526266	99
6KJY	42	Ascomycota	<i>Wallemia ichthyophaga</i> AFTOL-ID 1901	DQ847516	99
7KJY	24	Ascomycota	<i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i> ABT301	AM947682	99
8KJY	70	Ascomycota	<i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i> ATCC 42981	AM947681	99

¹⁾Range of 26S rDNA gene sequences is similarity values between fermented mugwort extract beverage clones and cultural isolated strain.

²⁾Accession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number the first sequence is given.

(나) 효모 분포도

1KJ, 2KJ, 및 3KJ에서 *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida etchellsii*, *Candida sp.*, *Candida versatilis*, *Wallemia ichthyophaga*, *Zygosaccharomyces pseudorouxii*의 총 7종이 나타났다. *Saccharomyces cerevisiae*는 1KJ에서 30%, *Candida etchellsii* 2KJ 및 3KJ에서 1.7%, *Candida sp.*가 3KJ에서 5%, *Candida versatilis*는 2DJ에서 33.3% 및 3KJ에서 1.7%, *Wallemia ichthyophaga*는 1KJ에서 70%, *Zygosaccharomyces pseudorouxii*는 2KJ에서 65%, 3KJ에서 91.7%로 나타났다 (Table 94).

Table 94. Yeast distribution of the three libraries from *kanjang* samples.

Nearest relative	Number of clones / Percentage(%)			Number of total clones
	1TKJ	2TKJ	3TKJ	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18 / 30	-	-	18
<i>Candida etchellsii</i>	-	1 / 1.7	1 / 1.7	2
<i>Candida sp.</i>	-	-	3 / 5	3
<i>Candida versatilis</i>	-	20 / 33.3	1 / 1.7	21
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	42 / 70	-	-	72
<i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i>	-	39 / 65	55 / 91.7	94
Number of total clones	60	60	60	180

2-3. 연구결과 (3차 년도)

가. 대용량 마늘된장의 특성 및 기능성 대사체 분포

(1) 대용량 마늘된장의 이화학적 특성

(가) 발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화 : 발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화는 Table 95와 같다. pH는 발효 전 (0 d) 5.97 이고 발효 중기 (20 d)에는 5.87로 약간 감소하였

다. 산도 및 염도는 최종적으로 각각 1.17 및 11.2%를 나타내었다 (Table 95). 한편 생균수 변화는 발효 중기에 효모가 6.72 log cfu/g, 바실러스는 9.37 log cfu/g 수준이었다.

Table 95. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of garlic doenjang in pilot scale during fermentations¹⁾

Samples	Fermentation time (d)	Contents ²⁾				
		pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers log cfu/g	
					<i>Yeast</i>	<i>Bacillus</i>
Bulk garlic doenjang	0	5.97	0.51	6.6	5.52	10.34
	5	5.87	0.76	9.0	6.09	9.81
	10	5.98	1.03	10.6	6.60	9.76
	15	5.95	1.02	10.0	6.51	9.43
	20	5.87	1.17	11.2	6.72	9.37
	30	5.29	1.49	11	6.38	9.45
	45	5.40	1.73	10.8	6.48	9.56
	60	4.81	1.98	13.0	5.18	9.51

¹⁾Bulk *garlic doenjang* were fermented at room temperature for 60 day

²⁾All values are means of determination in three independent experiments.

(나) 발효 중 유리아미노산 변화 : 발효 중 유리아미노산을 변화를 살펴본 결과 총 아미노산 함량은 약 2.5 배 증가하였고, 필수아미노산은 4 배 증가하였다. 주요아미노산 발효 전기간 동안 glutamic acid와 arginine으로 glutamic acid는 131.50 mg/100 g에서 713.30 mg/g으로 증가하였고, arginine 279.45 mg/g에서 326.58 mg/g으로 증가하였다. 이는 발효미생물이 생산하는 protease에 의한 것으로 판단되었다 (Table 96).

Table 96. Changes of free amino acid contents of garlic doenjang in pilot scale during fermentations¹⁾

Contents ¹⁾ (mg/100g)	Fermentation time (day)							
	0	5	10	15	20	30	45	60
General amino acids								
Phosphoserine	nd	24.75	59.63	79.93	44.05	40.42	29.45	0.00
Taurine	nd	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phosphoetanolamine	nd	25.95	31.47	0.00	13.69	0.00	0.00	0.00
Urea	356.69	95.83	280.66	474.63	0.00	249.28	0.00	0.00
Proline	34.81	67.95	97.97	123.19	143.57	199.13	210.00	251.24
Aspartic acid	25.28	96.98	75.81	70.91	109.13	149.36	134.92	118.91
Serine	20.93	47.43	68.38	75.29	88.62	112.23	120.34	141.89
Glutamic acid	131.50	313.67	388.61	432.99	519.68	656.39	706.06	713.30
Amino adipic acid	5.67	10.95	13.91	18.86	19.07	23.77	25.97	25.11
Glycine	16.09	24.78	32.20	36.18	40.76	49.10	49.38	57.89
Alanine	50.14	79.56	99.59	109.43	122.01	153.23	175.59	207.26
Citrulline	16.62	23.50	24.35	28.42	27.29	35.20	21.15	21.73
Cystine	nd	nd	nd	13.95	nd	nd	nd	17.14
Cystathionine	nd	16.78	8.72	11.73	9.81	20.64	17.39	8.87
Tyrosine	44.10	99.84	131.99	160.21	164.76	204.19	191.25	207.23

b-alanine	25.08	22.86	205.90	74.54	16.46	56.80	52.22	64.46
b-aminoisobutyric acid	2.37	23.32	25.54	58.42	11.69	37.51	38.97	47.97
γ-aminobutyric acid	11.07	16.66	25.83	23.63	17.74	28.72	28.94	13.14
Aminoethanol	0.00	6.52	14.98	11.35	12.53	13.60	9.89	13.24
Hydroxyproline	4.25	0.59	15.43	16.50	16.11	19.51	0.76	20.65
Ornithine	10.75	11.57	15.79	17.18	17.19	47.22	83.70	160.89
Anserine	10.97	34.55	44.41	47.05	55.04	65.34	66.90	61.54
Carnosine	nd	nd	nd	1.39	3.34	4.37	3.62	22.85
Arginine	279.45	359.88	395.04	432.44	462.05	452.28	395.43	326.58
Totals	1045.76	1403.92	2056.19	2338.50	1914.57	2618.30	2361.97	2501.90
Essential amino acids								
Threonine	30.55	45.99	65.82	80.31	93.34	103.52	103.27	128.78
Valine	74.87	104.33	136.19	151.94	165.56	191.49	185.33	203.47
Methionine	7.86	44.88	42.51	37.27	57.08	76.96	70.52	56.31
Isoleucine	43.77	84.96	116.42	134.32	145.16	172.21	170.34	196.87
Leucine	82.87	162.60	222.95	252.33	280.54	332.19	340.03	382.39
Phenylalanine	95.18	157.96	205.90	249.64	247.60	299.80	288.43	320.95
Lysine	91.52	167.59	202.21	228.44	246.36	262.96	266.51	289.28
Histidine	26.39	31.43	36.94	41.64	45.49	48.94	48.79	53.28
Totals	453.02	799.73	1028.94	1175.89	1281.13	1488.06	1473.20	1631.33
Total amino acids	1498.77	2203.65	3085.13	3514.39	3195.70	4106.36	3835.17	4133.23
Ammonia	39.96	35.81	46.75	51.73	54.91	62.11	60.79	90.56

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

(2) 대용량 마늘된장 발효 중 isoflavone 및 향기성분 함량

(가) Isoflavone 함량 : 대용량 마늘 된장의 발효 중 isoflavone 함량 변화는 Table 97 및 Figs. 83-84와 같다. 발효 0 일 glycoside, aglycone 및 총 isoflavone 함량은 각각 687.27, 69.20 및 891.40 µg/g이었다. Glycoside는 발효가 진행됨에 따라 감소하는 경향을 나타내어 발효 중기인 60 일에는 104.13 µg/g로 나타났다. 반면 aglycone 함량의 경우 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 나타내어 발효 45 일에 388.95 µg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며 발효 60 일에는 약간 감소하여 308.72 µg/g으로 나타났다(Table 97 및 Fig. 83). 총 isoflavone 함량은 감소하여 발효 5 일 이후부터 발효 60 일까지 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 최종 발효 60 일에는 454.90 µg/g으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 발효가 진행됨에 따라 isoflavone 비율은 glycoside의 경우 발효 0 일 77.10%이었으며 aglycone은 7.76%에서 발효가 진행됨에 따라 glycoside은 감소하였으며 aglycone은 증가하여 발효 60일에 각각 22.89% 및 67.89%이었다(Fig. 84).

Table 97. Change of isoflavone contents of garlic doenjang in pilot scale during fermentation.

Contents ¹⁾ (µg/g)	Fermentation time (day)							
	0	5	10	15	20	30	45	60
Glycosides								
Daidzin	240.45	170.51	121.22	130.52	119.38	81.06	92.50	54.42
Glycitin	129.26	71.53	35.55	36.92	28.85	17.94	36.14	11.75
Genistin	317.56	210.12	148.10	147.90	133.69	76.42	77.31	37.96
Total	687.27	452.16	304.87	315.34	281.92	175.42	205.95	104.13
Molonylglycosides								
Daidzin	65.05	42.78	33.35	34.62	32.61	23.01	30.00	14.72
Glycitin	28.80	20.30	16.58	16.27	15.39	12.54	15.51	11.40
Genistin	40.15	22.57	18.64	18.31	17.94	14.66	23.68	15.93
Total	134.00	85.65	68.57	69.20	65.94	50.21	69.19	42.05

Acetylglycosides								
Daidzin	0.93	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Glycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Genistin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	0.93	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Aglycones								
Daidzein	43.04	56.80	79.46	80.77	98.64	123.58	176.02	137.92
Glycitein	9.55	18.27	24.29	26.23	30.40	33.54	45.55	33.88
Genistein	16.61	40.64	67.47	71.29	89.00	118.37	167.38	136.92
Total	69.20	115.71	171.22	178.29	218.04	275.49	388.95	308.72
Total isoflavones	891.40	653.52	544.66	562.83	565.90	501.12	664.09	454.90

¹⁾ All values are means of determinations in three independent experiments

²⁾ nd: not detected

³⁾ tr: trace(<0.002 µg/g)

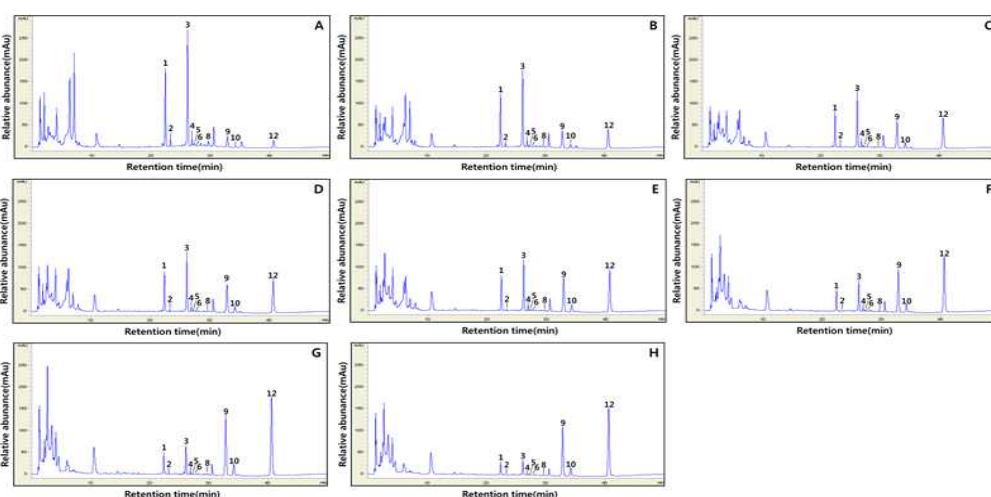


Fig. 83. Changes of HPLC chromatogram during fermentation of garlic doenjang in pilot scale. Samples: A; 0 day, B; 5 day, C; 10 day, D; 15 day, E; 20day, F; 30 day, G; 45 day, H; 60 day. Chromatogram: 1; Daidzin, 2; Glycitin, 3; Genistin, 4; Malonyldaidzin, 5; Malonylglycitin, 6; Acetyldaidzin, 7; Acetylglycitin, 8; Malonylgenistin, 9; Daidzein, 10; Glycitein, 11; Acetylgenistin and 12; Genistein.

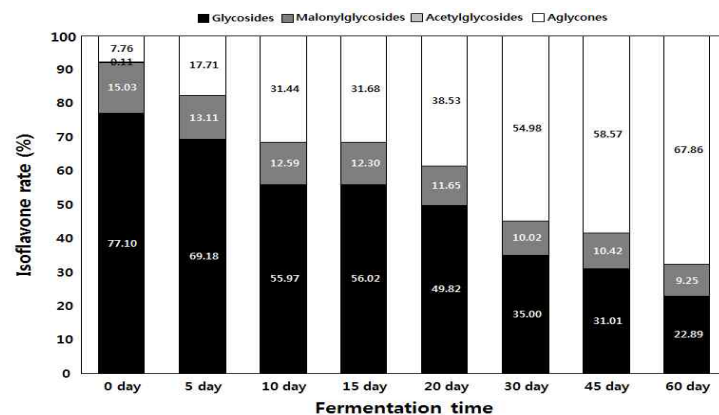


Fig. 84. Changes of isoflavone glycosides, malonylglycosides, acetylglycosides and aglycones contents during fermentation of garlic doenjang in pilot scale.

(나) 향기성분 분포

발효 기간 중 총 37 종의 향기성분이 확인되었고 주요 향기성분으로는 di-2-Propenyl disulfide, tetradecane, α -Curcumene, β -Sesquiphellandrene 및 diethyl phthalate 있었다. 한편 발효초기에는 확인되지 않았으나 20 일 이후 dodecanoic acid ethyl ester가 검출되어 발효 후기 주요 향기성분으로 확인되었다 (Table 98). 이는 발효미생물의 작용에 의한 것으로 판단되었다.

Table 98. Volatile compounds in garlic doenjang in pilot scale (peak area $\times 10^3$)

No.	Compounds	RT	Fermentation time (day)							
			0	5	10	15	20	30	45	60
1	Trimethyl pyrazine	14.84	122.1	251.4	234.1	365.9	302.9	343.1	350.2	397.4
2	dl-Limonene	15.46	382.2	268.6	279.9	348.2	480.1	363.7	463.4	578.4
3	3,5-octadiene-2-one	16.86	845.8	326.4	321.8	31.8	261.1	249.4		
4	di-2-Propenyl disulfide	17.05	6,536.1	6,329.6	7,000.8	6,345.2	6,539.9	9,155.1	10,841.2	9,440.9
5	Tetramethylpyrazine	17.40	539.2	450.1	495.3	604.7	546.5	931.4	960.1	964.9
6	Allyl propyl disulfide	17.52	253.9		482.2		465.9	632.5	696.1	666.5
7	Nonanal	17.82	156.2	241.6	170.8	222.5	174.4	134.9	144.7	224.0
8	Maltol	18.23			226.6	274.6	269.2	117.7	258.3	654.9
9	Methyl allyl trisulfide	18.88			52.9	61.5			87.7	73.1
10	Dodecane	20.54	424.1	372.7	364.8	358.1	604.5	476.8	597.4	675.5
11	4-Ethyl-1,2-dimethyl benzene	20.64	135.2						156.6	
12	3-Acetylpropyl benzene	20.78	141.9							
13	4-vinyl phenol	21.18			59.0	34.1	89.4	27.0	126.2	231.2
14	Tridecane	23.79	552.1	398.4	277.4	361.5	627.2	240.9	299.8	475.3
15	2-methoxy-4-vinylphenol	23.81			410.1	721.8	477.9	351.4	564.1	723.9
16	Oxalic acid heptadecyl hexyl ester	24.52	86.7	58.9	119.5	124.0	87.3		53.6	
17	Longifolene	25.39	107.3							
18	2-Eicosanol	25.47								106.4
19	3-Dodecen-1-al	25.50	280.3							
20	2-nonadecene	25.66	134.1							
21	Isotridecanol	25.68					176.2			
22	Tetradecane	25.86	1,592.2	1,248.2	1,166.3	1,490.0	1,822.2	1,198.5	1,363.1	1,763.5
23	1-dodecanol	26.81	137.4	92.2	463.2					
24	1-Eicosanol	27.09	713.9							
25	trans-beta-Farnesene	27.35		199.0	456.5	375.9	538.8	195.3		339.8
26	7-Hexadecenal	27.77	189.5							
27	1-Fluoro dodecane	27.85	255.2							148.7
28	γ -Gurjunene	27.89						182.0		
29	γ -Curcumene	27.97						242.1		455.5
30	α -Curcumene	28.03	4,456.8	3,438.8	10,219.8	6,575.0	4,834.1	7,455.7	8,334.9	5,629.8
31	β -Bisabolene	28.66	2,157.4	1,393.0	2,988.9	2,144.0	1,993.6	2,204.1	2,232.8	1,958.7
32	2,6-bis phenol	28.77	10,238.6	5,129.9	11,105.6	13,449.8	8,054.2	1,334.5	1,815.2	7,913.8
33	α -Amorphene	28.86	687.8	512.9	785.2	1,074.0	932.9	2,240.5	1,799.1	2,139.9
34	β -Sesquiphellandrene	29.04	3,999.6	2,850.8	8,615.5	5,041.6	4,779.0	5,649.5	5,584.5	4,726.2
35	1-Octadecanol	29.15	547.3					58.7		
36	Dodecanoic acid ethyl ester	30.53					663.2	2,158.2	3,116.8	2,211.3
37	Diethyl phthalate	30.66	2,406.4	596.3	764.5	1,720.6	2,597.2			6,466.2

(2) 대용량 마늘된장 발효 중 효모 다양성 분석

(가) 상동성 분석

대용량 마늘된장 발효 0, 15, 30 및 60일 각각 약 40개의 효모 균주를 확인한 결과는 Tables 99-102와 같았다. 발효 0일 (BGDY0), 발효 15일 (BGDY15), 발효 30일 (BGDY30) 및 발효 60일 (BGDY60)에서는 *Candida* sp. NCYC 386, *Endomyces fibuliger* 8014, *Hyphopichia burtonii*, *Pichia fabianii* UWFP-345, *Pichia farinosa* CBS 185, *Pichia farinosa* UWFP-389 및 *Saccharomyces cerevisiae* D3C으로 총 7개의 종이 확인되었다.

(나) 효모분포도

발효 0일 (BGDY0) *Candida* sp. NCYC 386, *Endomyces fibuliger* 8014, *Hyphopichia*

burtonii, *Pichia fabianii* UWFP-345 및 *Pichia farinosa* CBS 185의 총 5개의 균이 확인 되었다. *Candida* sp. NCYC 386 및 *Endomyces fibuliger* 8014은 모든 기간에서 확인되었으며 이 중 *Candida* sp. NCYC 386은 발효 0일 (BGDY0) 에서 발효 30일 (BGDY30)까지 6 개에서 35 개로 증가하였으며 *Endomyces fibuliger* 8014은 발효 30일 (BGDY30)부터 급격하게 감소하였다. *Hyphopichia burtonii*, *Pichia fabianii* UWFP-345 및 *Pichia farinosa* CBS 185은 발효 0일 (BGDY0)에서 각각 16, 2 및 1 개로 이후 발효 기간 동안 확인되지 않았다. 발효 0일 (BGDY0), 발효 15일 (BGDY15), 발효 30일 (BGDY30) 및 발효 60일 (BGDY60)에서는 *Candida* sp., *Endomyces fibuliger*, *Hyphopichia burtonii*, *Pichia fabianii*, *Pichia farinosa* 및 *Saccharomyces cerevisiae* 으로 총 6개가 확인되었다. *Candida* sp. 및 *Endomyces fibuliger* 은 모든 기간에서 확인되었다. 이 중 *Candida* sp.은 발효 0일 (BGDY0), 발효 15일 (BGDY15), 발효 30일 (BGDY30) 및 발효 60일(BGDY60)에서 각각 15%, 35.7%, 77.8% 및 97.7%로 증가하였으며 *Endomyces fibuliger*은 발효 30일 (BGDY30)부터 급격하게 감소하여 이후 2.3~15.5% 수준으로 확인되었다. *Hyphopichia burtonii*, *Pichia fabianii* 및 *Pichia farinosa*은 발효 0일(BGDY0)에서 각각 40%, 5% 및 2.5%로 *Hyphopichia burtonii* 및 *Pichia fabianii*은 이후 발효 기간 동안 확인되지 않았으며 *Candida* sp.은 발효가 진행됨에 따라 증가하여 발효 60일에는 97.7%의 우점을 차지하였다(Table 103 및 Fig. 85).

Table 99. Similarity values of 26S rDNA sequences retrieved from BGDY0

No.	Phylum	Species ¹⁾	Accession No. ²⁾	Similarity (%)
BGDY0-1	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-2	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-3	Ascomycota	<i>Pichia fabianii</i> UWFP-345	AF335971	99
BGDY0-4	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-5	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-6	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-7	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-8	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	93
BGDY0-9	Ascomycota	<i>Pichia farinosa</i> CBS 185	AF335974	94
BGDY0-10	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-11	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-12	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-13	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-14	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-15	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i>	U09238	99
BGDY0-16	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY0-17	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-18	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-19	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY0-20	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-21	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-22	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-23	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-24	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-25	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY0-26	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-27	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-28	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-29	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-30	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY0-31	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-32	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY0-33	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-34	Ascomycota	<i>Pichia fabianii</i> UWFP-345	AF335971	99
BGDY0-35	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99

BGDY0-36	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY0-37	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-38	Ascomycota	<i>Hyphopichia burtonii</i>	HF952839	99
BGDY0-39	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY0-40	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99

¹⁾Range of 26S rDNA gene sequences is similarity values between fermented mugwort extract beverage clones and cultural isolated strain.

²⁾Accession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number the first sequence is given.

Table 100. Similarity values of 26S rDNA sequences retrieved from BGDY15

No.	Phylum	Species ¹⁾	Accession No. ²⁾	Similarity (%)
BGDY15-1	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-2	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-3	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-4	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-5	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-6	Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99
BGDY15-7	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-8	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-9	Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	95
BGDY15-10	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-11	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-12	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-13	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-14	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-15	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-16	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-17	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-18	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-19	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-20	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-21	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-22	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-23	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-24	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-25	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-26	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-27	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-28	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-29	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-30	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-31	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-32	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY15-33	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-34	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-35	Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99
BGDY15-36	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-37	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-38	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-39	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-40	Ascomycota	<i>Pichia farinosa</i> UWFP-389	AF335973	99
BGDY15-41	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY15-42	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99

¹⁾Range of 26S rDNA gene sequences is similarity values between fermented mugwort extract beverage clones and cultural isolated strain.

²⁾Accession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number the first sequence is given.

Table 101. Similarity values of 26S rDNA sequences retrieved from BGDY30

No.	Phylum	Species ¹⁾	Accession No. ²⁾	Similarity (%)
BGDY30-1	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-2	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-3	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-4	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-5	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-6	Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99
BGDY30-7	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-8	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-9	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY30-10	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-11	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-12	Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99
BGDY30-13	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-14	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-15	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY30-16	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-17	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-18	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-19	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-20	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-21	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-22	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-23	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-24	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-25	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-26	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-27	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-28	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY30-29	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-30	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-31	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-32	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY30-33	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY30-34	Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99
BGDY30-35	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY30-36	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-37	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-38	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-39	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-40	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-41	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-42	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-43	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY30-44	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY30-45	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99

¹⁾Range of 26S rDNA gene sequences is similarity values between fermented mugwort extract beverage clones and cultural isolated strain.

²⁾Accession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number the first sequence is given.

Table 102. Similarity values of 26S rDNA sequences retrieved from BGDY60

No.	Phylum	Species ¹⁾	Accession No. ²⁾	Similarity (%)
BGDY60-1	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-2	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-3	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-4	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-5	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-6	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-7	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-8	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-9	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-10	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-11	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-12	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-13	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-14	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-15	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-16	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-17	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-18	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-19	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-20	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-21	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-22	Ascomycota	<i>Endomyces fibuliger</i> 8014	U09238	99
BGDY60-23	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-24	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-25	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-26	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-27	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-28	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-29	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-30	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-31	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-32	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-33	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-34	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-35	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-36	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-37	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-38	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-39	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-40	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-41	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-42	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99
BGDY60-43	Ascomycota	<i>Candida</i> sp. NCYC 386	FN565484	99

¹⁾Range of 26S rDNA gene sequences is similarity values between fermented mugwort extract beverage clones and cultural isolated strain.

²⁾Accession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number the first sequence is given.

Table 103. Change of microorganism distribution during fermentation of BGD

Nearest relative	Number of clones / Percentage(%)				Number of total clones
	BGDY0	BGDY15	BGDY30	BGDY60	
<i>Candida</i> sp.	6/ 15.0	15/ 35.7	35/ 77.8	42/ 97.7	98
<i>Endomyces fibuliger</i>	15/ 37.5	23/ 54.8	7/ 15.5	1/ 2.3	46
<i>Hyphopichia burtonii</i>	16/ 40.0	-	-	-	16
<i>Pichia fabianii</i>	2/ 5.0	-	-	-	2
<i>Pichia farinosa</i>	1/ 2.5	1/ 2.4	-	-	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	3/ 7.1	3/ 6.7	-	6
Number of total clones	40/ 100	42/ 100	45/ 100	43/ 100	170

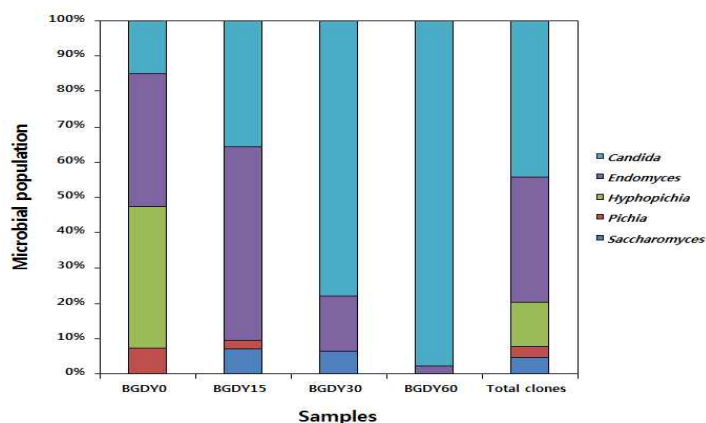


Fig. 85. Distribution of microbial population of dominant species on BGD during fermentation time. Percentage of microcosm in each of the three libraries is shown.

나. 몽고 모로미 베이스 흑마늘-간장의 이화학적 특성 및 기능성 대사체분석

(1) 몽고 모로미 간장의 이화학적 특성

(가) 발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화

간장의 발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화는 Table 104와 같다. 흑마늘 엑기스를 첨가하지 않은 간장과 첨가한 간장의 발효 중 pH는 전체적으로 4-5 수준으로 큰 변화는 없었으며 산도 또한 pH에 상응하여 모든 간장에서 2-3%의 수준으로 나타났다. 염도는 전체적으로 16-18%의 수준이었으며 생균수는 바실러스의 경우 흑마늘 엑기스의 첨가율에 따른 모든 간장에서 발효가 진행됨에 따라 5-6 log cfu/g 수준이었고, 효모는 6-7 log cfu/g의 수준이었으나 모든 간장에서 발효 중기에는 검출이 되지 않았다 (Table 104).

Table 104. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of ganjang prepared by mixing different amount of black garlic extract with moromi¹⁾

Black garlic extract quantity (%)	Fermentation time (day)	Contents ²⁾				
		pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers (log cfu/g)	
					Bacillus	Yeast
0	0	5.06	1.60	15.00	6.41	6.09
	15	4.77	1.91	15.17	5.66	6.41
	30	4.81	1.96	15.28	6.01	6.89
	45	4.89	2.00	15.83	6.12	5.61
	60	4.95	2.02	17.58	5.79	5.28
	90	4.76	2.05	16.43	5.94	4.70
	120	4.91	2.68	17.03	5.72	5.51
	180	4.81	2.81	17.03	5.81	0.00

0.5	0	5.03	1.60	16.48	5.89	6.09
	15	4.73	1.94	17.03	5.48	6.78
	30	4.84	1.98	14.24	5.92	7.08
	45	4.90	2.01	14.89	5.86	5.89
	60	4.94	2.11	15.33	5.82	5.80
	90	4.79	2.30	15.50	5.72	6.05
	120	4.91	2.81	14.95	5.64	5.74
	180	4.82	2.90	15.83	5.60	0.00
1	0	5.02	1.66	19.77	5.89	6.09
	15	4.70	1.96	17.03	5.71	7.51
	30	4.79	2.00	17.58	5.76	7.25
	45	4.90	2.12	16.37	5.85	6.33
	60	4.91	2.23	16.48	5.74	6.07
	90	4.79	2.27	16.43	5.71	6.09
	120	4.90	2.84	16.16	5.70	5.69
	180	4.81	2.95	18.02	5.72	0.00
2	0	5.00	1.71	16.48	5.91	6.09
	15	4.68	2.03	16.37	5.82	6.69
	30	4.79	2.05	19.77	5.83	7.06
	45	4.88	2.11	15.72	5.85	6.53
	60	4.89	2.27	17.03	5.54	5.77
	90	4.78	2.30	16.05	5.60	5.65
	120	4.88	2.91	15.99	5.82	5.59
	180	4.79	3.01	17.03	5.76	0.00
4	0	4.97	1.85	16.48	6.05	6.09
	15	4.65	2.09	17.03	5.63	6.93
	30	4.76	2.20	15.39	5.86	7.13
	45	4.83	2.26	16.48	5.71	5.81
	60	4.87	2.32	16.21	5.83	5.91
	90	4.73	2.39	17.03	5.69	5.62
	120	4.84	3.01	17.03	5.65	5.67
	180	4.74	3.26	18.68	5.77	0.00

¹⁾Black garlic Extract quantity *Kanjang* were fermented at room temperature for 180day.

²⁾All values are means of determination in three independent experiments.

(나) 유리아미노산 함량

모로미 첨가 흑마늘 엑기스 간장의 유리아미노산 함량은 Table 105와 같다. 주요 유리아미노산으로 비필수 아미노산에서 aspartic acid와 glutamic acid가 있었으며 필수아미노산에서 leucine과 lysine이었다. 흑마늘 엑기스 0%, 0.5%, 1%, 2% 및 4% 첨가 시 모로미 간장의 aspartic acid 함량은 4160.35~4618.03 mg/100g이며 glutamic acid 함량은 6902.45~7551.42 mg/100g으로 흑마늘 엑기스 첨가에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. Leucine 함량은 4255.93~4683.05 mg/100g 수준이었으며 lysine은 3074.40~3385.87 mg/100g 수준이었다. 그 밖의 비필수 및 필수 아미노산의 함량은 흑마늘 엑기스 함량이 따른 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 105. Free amino acid contents of ganjang prepared by mixing different amount of black garlic extract with moromi.

Contents ¹⁾ (mg/100g)	Samples				
	0%	0.5%	1%	2%	4%
General amino acids					
o-Phosphoserine	nd ²⁾	nd	224.47	244.56	249.08
Taurine	119.58	97.32	107.44	119.24	109.28
o-Phosphoethanolamine	332.62	266.89	324.62	351.37	272.99
Urea	nd	nd	nd	nd	nd
Proline	nd	nd	nd	nd	nd

Aspartic acid	4618.03	4160.35	4163.52	4469.88	4228.38
Serine	2821.96	2558.64	2575.46	2763.62	2594.06
Glutamic acid	7506.16	6902.45	7123.98	7551.42	6934.58
Sarcosine	298.08	252.59	266.84	300.69	274.61
Aminoadipic acid	569.39	523.71	540.19	581.36	533.45
Glycine	1449.27	1313.46	1311.57	1409.44	1333.67
Alanine	2751.25	2504.15	2533.70	2728.68	2588.47
Citrulline	nd	nd	nd	nd	nd
α -aminobutyric acid	202.38	191.17	192.65	218.81	224.38
Cystine	357.61	325.53	315.81	352.80	366.02
Cystathionine	133.39	121.56	123.98	134.58	126.88
Tyrosine	654.55	602.94	604.35	647.55	612.14
β -Alanine	224.62	189.72	199.29	219.27	194.23
β -aminoisobutyric acid	449.26	394.11	408.18	450.50	423.11
γ -aminobutyric acid	218.55	199.21	199.31	228.63	233.58
Aminoethanol	54.88	49.03	48.05	50.47	47.33
Hydroxylysine	59.58	54.79	55.71	57.83	52.14
Ornithine	2400.96	2201.81	2215.51	2382.83	2266.24
1Methylhistamine	24.48	22.72	21.42	22.93	23.35
3Methylhistamine	15.30	14.93	13.23	14.69	14.89
Anserine	686.45	649.77	635.28	687.87	678.65
Carnosine	100.44	96.67	89.87	96.92	98.39
Arginine	978.30	911.32	934.10	1030.97	1030.10
Total	27027.09	24604.84	25228.53	27116.91	25510.00
Essential amino acids					
Threonine	2207.39	1996.41	2011.42	2161.51	2027.33
Valine	2815.88	2646.05	2672.86	2814.27	2716.75
Methionine	860.16	776.65	779.37	843.13	792.41
Isoleucine	2917.56	2654.71	2666.04	2850.99	2695.82
Leucine	4683.05	4255.93	4281.47	4599.26	4360.75
Phenylalanine	2942.86	2681.16	2687.79	2907.93	2776.94
Lysine	3385.87	3074.40	3102.79	3335.82	3164.09
Histamine	134.26	125.72	122.63	129.64	123.81
Total	19947.03	18211.03	18324.37	19642.55	18657.90
Total amino acids	46974.12	42815.87	43552.9	46759.46	44167.9
Ammonia	285.82	252.92	250.58	270.11	259.45

¹⁾ All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination

²⁾ nd: not detected

(2) 몽고 모로미 간장의 총 phenolics 및 isoflavone 함량

(가) 총 phenolics 함량

몽고 모로미 간장의 총 phenolics 함량을 변화는 Fig. 86와 같다. 간장 중 총 phenolics 함량이 가장 높은 것은 흑마늘 엑기스를 4% 첨가한 간장이 가장 높았으며, 모든 간장들은 발효가 진행됨에 따라 총 phenolics 함량이 증가하였다. 실험구 중 가장 낮은 함량을 나타낸 흑마늘 엑기스가 0% 첨가된 간장은 발효 전 (0 일) 5.7 mg/g에서 발효 중기(120 일)에는 6.3 mg/g을 나타내었고 4% 흑마늘 엑기스를 첨가한 간장의 경우 발효 전(0 일) 6.3 mg/g에서 발효 중기(120 일)에는 6.6 mg/g을 나타내었다.

(나) Isoflavone 함량

몽고 모로미 간장의 HPLC 크로마토그램 및 isoflavone 함량 변화는 Figs. 87-89 및 Tables 106-110과 같다. 모로미 간장은 공통적으로 주요 화합물인 12 종의 isoflavone 유도체가 검출되었다 (Figs. 87-88). 총 isoflavone 함량이 가장 높은 것은 흑마늘 엑기스를 4% 첨가한 간장이 301.98 μ g 으로 가장 높았다 (Table 110). 전체적으로 흑마늘 엑기스 무첨가 간장의 경우 총 isoflavone 함량이 낮았으며 발효 30 일 쯤에 203.33 μ g/g 으로 가장 낮은 함량을 나타내었

다. Glycosides의 함량은 4%의 흑마늘 엑기스를 첨가한 간장에서 발효 전(0 일) 38.16 μg , 발효 종기(120 일) 66.60 μg 으로 모든 간장 중 가장 높은 함량을 나타내었으며, malonylglycosides의 함량 역시 4%의 흑마늘 엑기스를 첨가한 간장에서 발효 전(0 일) 23.01 μg , 발효 종기(120 일) 27.52 μg 으로 모든 간장 중 가장 높은 함량을 나타내었다. Acetylglycoside와 aglycones 함량 역시 각각 발효 전(0 일) 14.63 μg , 발효 종기(120 일) 163.29 μg , 발효 전(0 일) 188.46 μg , 발효 종기(120 일) 66.60 μg 으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 발효가 진행됨에 따라 전체적으로 총 isoflavone의 함량이 발효 30 일 쯤에 감소하다가 점차 증가하는 경향을 나타내는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 89). 이러한 isoflavone 유도체들은 콩 품종, 재배 토양, 환경, 열처리 및 미생물 종류에 따라 그 작용이 틀리며 분포도가 달라진다고 보고되어있다. 특히 여러 연구자들은 *Bacillus* sp.들이 생성하는 β -glucosidase에 의해 배당체가 비배당체 형태로 전환된다고 보고하였다.

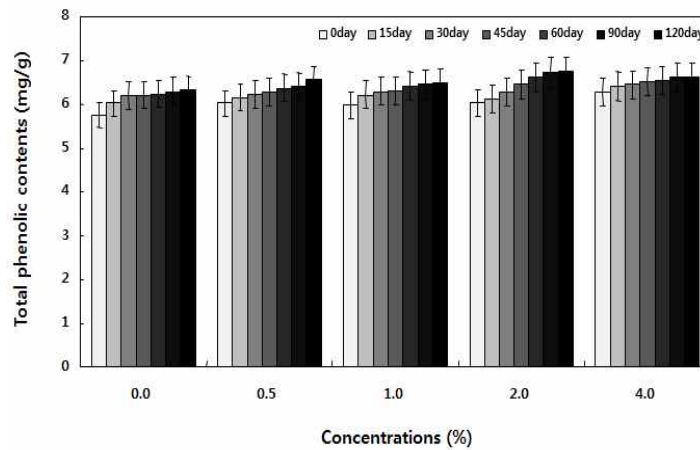


Fig. 86. Changes of total phenolic contents during *kanjang* fermentations.

Table 106. Changes of 12 isoflavone contents during fermentation of *kanjang* without black garlic extract.

Isoflavone contents ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Fermentation time (day)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	7.34	7.22	7.27	8.01	8.90	8.46	8.44
Glycitin	6.35	6.89	6.89	7.84	9.88	8.92	9.47
Genistin	13.30	13.47	12.94	14.62	18.19	15.52	13.45
Total	26.99	27.58	27.1	30.47	36.97	32.9	31.36
Malonylglycosides							
Daidzin	nd ²⁾	nd	nd	nd	nd	8.23	nd
Glycitin	8.48	8.39	8.09	8.79	10.45	5.89	9.48
Genistin	2.87	2.92	2.69	3.04	3.97	3.12	9.55
Total	11.35	11.31	10.78	11.83	14.42	17.24	19.03
Acetylglycosides							
Daidzin	4.30	4.22	3.47	4.31	6.81	nd	4.64
Glycitin	3.73	3.50	3.57	4.09	4.93	3.95	4.30
Genistin	1.87	1.75	1.79	2.05	2.46	1.97	2.15
Total	9.9	9.47	8.83	10.45	14.2	5.92	11.09
Aglycones							
Daidzein	74.64	67.05	67.11	68.18	75.57	67.98	71.12
Glycitein	20.13	18.18	17.13	16.96	22.68	17.83	18.49
Genistein	81.74	72.98	72.38	73.03	81.63	71.45	74.52
Total	176.51	158.21	156.62	158.17	179.88	157.26	164.13
Total isoflavones	224.75	206.57	203.33	210.92	245.47	213.32	225.61

¹⁾Data are presented as the mean \pm SD of triplicated determinations.

²⁾nd, not detected.

Table 107. Changes of 12 isoflavone contents during fermentation of kanjang with 0.5% black garlic extract.

Isoflavone contents ¹⁾ (µg/g)	Fermentation time (day)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	8.68	8.87	9.28	8.56	8.72	8.79	9.32
Glycitin	8.64	9.50	10.39	9.69	10.03	10.29	22.33
Genistin	8.19	15.53	15.80	14.22	13.59	15.81	17.37
Total	25.51	33.90	35.47	32.47	32.34	34.89	49.02
Malonylglycosides							
Daidzin	8.72	nd	9.31	nd	nd	nd	nd
Glycitin	9.72	10.14	7.63	9.31	9.18	9.96	10.10
Genistin	12.33	13.30	11.24	9.77	9.43	9.92	10.30
Total	30.77	23.44	28.18	19.08	18.61	19.88	20.4
Acetylglycosides							
Daidzin	6.82	7.09	nd	4.98	4.57	4.81	5.01
Glycitin	4.18	4.69	4.76	4.10	3.89	3.95	4.13
Genistin	2.09	2.34	2.38	2.05	1.94	1.98	2.06
Total	13.09	14.12	7.14	11.13	10.4	10.74	11.20
Aglycones							
Daidzein	69.98	72.07	71.48	70.27	65.31	67.97	67.91
Glycitein	22.08	23.39	23.78	18.57	17.18	18.08	18.27
Genistein	78.36	79.13	77.73	74.98	69.36	71.31	70.69
Total	170.42	174.59	172.99	163.82	151.85	157.36	156.87
Total isoflavones	239.79	246.05	243.78	226.50	213.20	222.87	237.49

¹⁾Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

²⁾nd, not detected.

Table 108. Changes of 12 isoflavone contents during fermentation of kanjang with 1% black garlic extract.

Isoflavone contents ¹⁾ (µg/g)	Fermentation time (day)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	8.34	7.82	7.74	7.63	7.65	8.05	8.15
Glycitin	8.11	7.96	8.13	18.37	18.29	18.91	20.15
Genistin	7.40	14.79	15.28	15.52	16.56	16.62	17.06
Total	23.85	30.57	31.15	41.52	42.5	43.58	45.36
Malonylglycosides							
Daidzin	7.55	nd ²⁾	nd	nd	nd	nd	nd
Glycitin	9.04	10.13	10.02	10.91	11.28	11.67	11.72
Genistin	8.97	9.41	9.36	5.78	6.02	6.14	6.28
Total	25.56	19.54	19.38	16.69	17.3	17.81	18.00
Acetylglycosides							
Daidzin	4.97	4.86	4.99	4.52	4.69	4.66	4.94
Glycitin	3.58	3.77	4.02	4.19	3.64	3.65	4.38
Genistin	1.79	1.88	2.01	2.09	1.82	1.82	2.19
Total	10.34	10.51	11.02	10.8	10.15	10.13	11.51
Aglycones							
Daidzein	69.41	66.89	67.63	67.97	69.79	69.58	70.00
Glycitein	18.83	18.81	18.90	19.23	20.01	20.11	20.35
Genistein	76.00	17.92	72.26	71.76	73.24	72.50	72.62
Total	164.24	103.62	158.79	158.96	163.04	162.19	162.97
Total isoflavones	223.99	218.24	220.34	227.97	232.99	233.71	237.84

¹⁾Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

²⁾nd, not detected.

Table 109. Changes of 12 isoflavone contents during fermentation of kanjang with 2% black garlic extract.

Isoflavone contents ¹⁾ (µg/g)	Fermentation time (day)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	7.62	7.90	7.91	8.65	9.10	4.71	9.11
Glycitin	11.06	8.60	15.24	22.81	23.03	2.64	12.05
Genistin	15.32	15.87	16.66	17.15	17.40	2.79	18.68
Total	34.00	32.37	39.81	48.61	49.53	10.14	39.84
Malonylglycosides							
Daidzin	nd ²⁾	10.06	nd	nd	nd	nd	nd
Glycitin	10.83	6.88	11.42	11.37	11.67	4.55	12.24
Genistin	10.16	10.44	10.85	11.08	6.80	nd	6.99
Total	20.99	17.32	22.27	22.45	18.47	4.55	19.23
Acetylglycosides							
Daidzin	5.54	nd	6.02	5.93	5.98	tr ³⁾	6.04
Glycitin	3.68	4.34	4.49	4.28	4.46	2.19	4.42
Genistin	1.84	2.17	2.25	2.14	2.23	1.10	2.21
Total	11.06	6.51	12.76	12.35	12.67	3.29	12.67
Aglycones							
Daidzein	69.21	68.43	69.84	68.64	69.44	63.89	71.47
Glycitein	19.50	19.73	20.54	20.44	20.58	15.48	21.36
Genistein	75.48	73.33	74.43	72.62	72.81	68.80	73.85
Total	164.19	161.49	164.81	161.7	162.83	148.17	166.68
Total isoflavones	230.24	227.75	239.65	245.11	243.50	166.15	238.42

¹⁾Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations. ²⁾nd, not detected.

³⁾tr, trace < 0.002 µg/g.

Table 110. Changes of 12 isoflavone contents during fermentation of kanjang with 4% black garlic extract.

Isoflavone contents ¹⁾ (µg/g)	Fermentation time (day)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	10.54	9.43	8.36	9.18	10.22	11.20	11.57
Glycitin	10.45	20.73	19.58	20.19	26.69	29.98	30.98
Genistin	17.17	20.05	18.63	18.51	19.80	28.50	24.05
Total	38.16	50.21	46.57	47.88	56.71	69.68	66.60
Malonylglycosides							
Daidzin	nd ²⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glycitin	11.83	12.45	11.13	11.29	6.07	16.76	17.17
Genistin	11.18	7.39	5.91	5.78	7.03	10.16	10.35
Total	23.01	19.84	17.04	17.07	13.10	26.92	27.52
Acetylglycosides							
Daidzin	7.64	5.32	3.96	3.74	18.55	9.18	9.59
Glycitin	4.66	4.26	3.99	4.09	4.89	5.89	6.54
Genistin	2.33	2.13	1.99	2.04	2.44	2.94	3.27
Total	14.63	11.71	9.94	9.87	25.88	18.01	19.40
Aglycones							
Daidzein	68.65	67.44	69.25	66.71	69.93	70.73	77.30
Glycitein	20.17	18.45	14.79	14.15	22.09	27.33	29.67
Genistein	74.47	71.67	71.89	68.14	73.47	74.48	81.49
Total	163.29	157.56	155.93	149.00	165.49	172.54	188.46
Total isoflavones	239.09	239.32	229.48	223.82	261.18	287.15	301.98

¹⁾Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

²⁾nd, not detected.

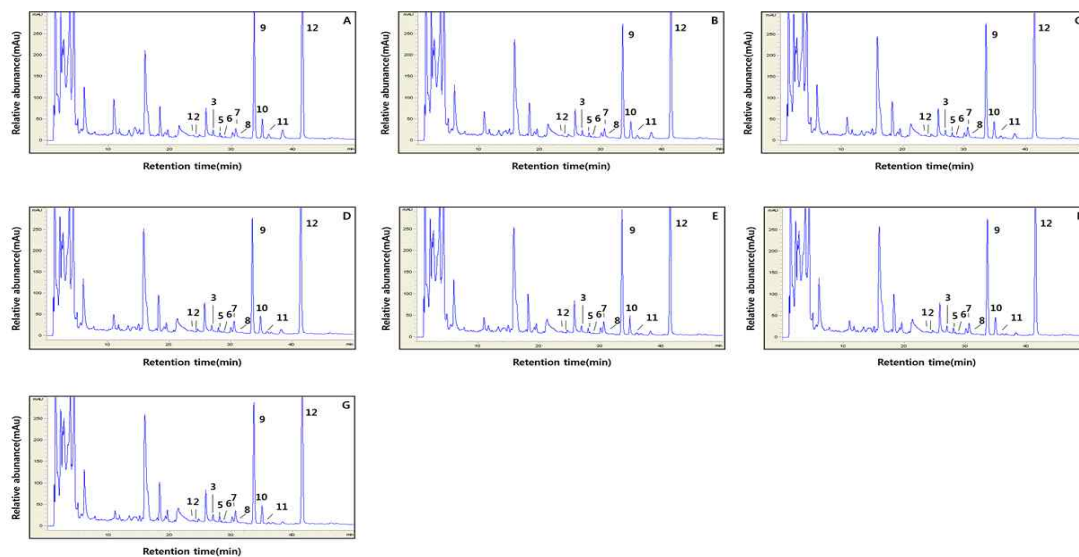


Fig. 87. Typical HPLC chromatogram of isoflavone from ganjang with 0% black garlic extract 0 day (A), 15 day (B), 30 day (C), 45 day (D), 60 day (E), 90 day (F), and 120 day (G). 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, acetylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, glycitein; 11, acetylgenistin; and 12, genistein.

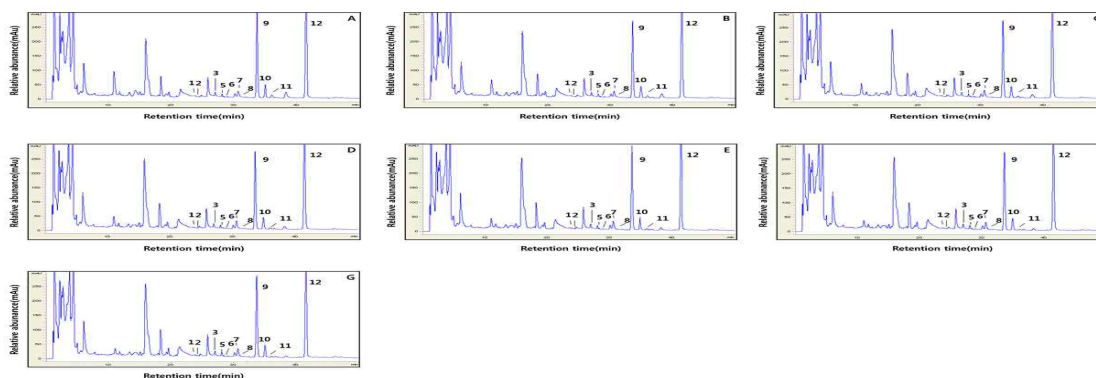


Fig. 88. Typical HPLC chromatogram of isoflavone from ganjang with 4% black garlic extract 0 day (A), 15 day (B), 30 day (C), 45 day (D), 60 day (E), 90 day (F), and 120 day (G).

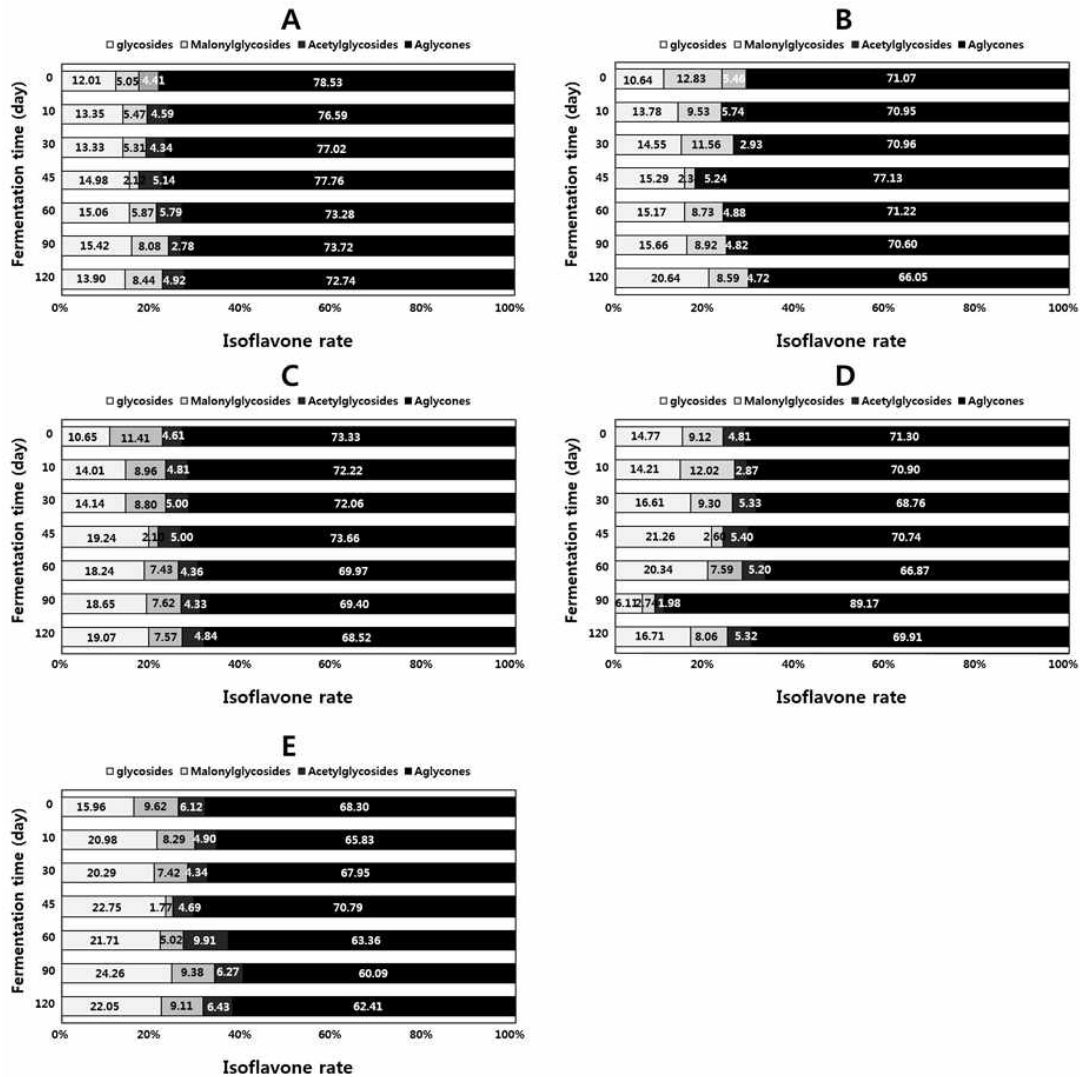


Fig. 89. Changes of isoflavone glycosides, malonylglycosides, acetylglycosides and aglycones contents during fermentation of kanjang with different black garlic extracts. A, 0% black garlic extract; B, 0.5% black garlic extract; C, 1% black garlic extract; D, 2% black garlic extract; and E, 4% black garlic extract.

(3) 콩고 모로미 간장의 생리활성 변화

(가) 항산화 활성

콩고 모로미 간장의 발효 중 항산화 활성은 Fig. 90과 같다. 항산화 활성 역시 총 phenolics 함량과 마찬가지로 모든 간장에서 발효가 진행됨에 따라 증가하였다. 특히 4% 흑마늘 엑기스를 첨가한 간장의 경우 DPPH 라디칼 소거활성이 발효 과정 중 95.52 (0 일), 96.00 (15 일), 96.41(30 일), 96.69(45 일), 96.90(60 일), 97.10(90 일) 및 97.31%(120 일)로 가장 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 90A). ABTS와OH 라디칼 소거활성 역시 발효가 진행됨에 따라 활성이 증가하였으며 4%의 흑마늘 엑기스를 첨가한 간장에서 각각 발효 전 (0 일)에 84.46%, 발효 중기 (120 일)에 90.08%, 발효 전 (0 일)에 84.21%, 발효 중기 (120 일) 88.72%로 가장 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 90B-C). 마찬가지로 FRAP는 가장 높은 활성을 나타낸 발효 중기 (120 일)에 1.69의 환원력을 나타내었다 (Fig. 90D). 이러한 항산화 활성의 증가는 높은 phenolics 함량에 기인한 것으로 판단되었다.

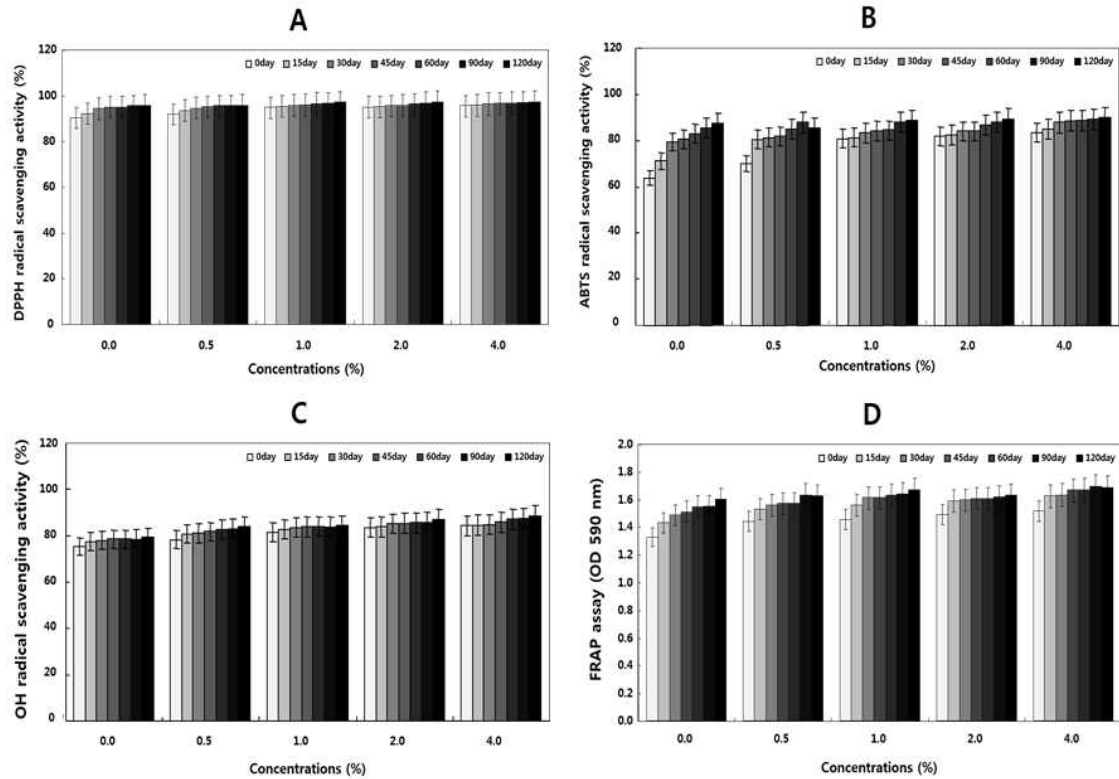


Fig. 90. Change of DPPH (A), ABTS (B), OH (C) radical scavenging activities and FRAP assay (D) during fermentation of kanjang with different black garlic extracts.

다. 콩알 메주 베이스 흑마늘 엑기스 첨가별 간장의 특성 및 기능성 대사체 분석

(1) 간장의 발효 중 이화학적 특성

(가) pH, 산도, 염도 및 생균수 변화

흑마늘 엑기스 첨가 간장의 pH, 산도 및 염도는 Table 111과 같았다. 흑마늘 첨가에 따른 pH 변화는 발효 전 크게 나타나지 않았으나 발효 120일 후에는 흑마늘 1.0% 첨가한 경우에 4.37로 가장 낮은 수치를 나타내었다. pH 감소에 상응하여 모든 흑마늘 엑기스 첨가 간장의 산도는 꾸준히 증가하였고 염도는 발효 120일 후에 평균 14.22%를 나타내었다.

Table 111. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of kanjang with different black garlic extracts

Black garlic extract quantity (%)	Contents ^{a)}					
	Fermentation time (d)	pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers (log cfu/mL)	
					<i>Bacillus</i>	<i>Yeast</i>
0	0	5.84	0.32	13.74	9.09	6.53
	15	5.69	0.52	13.96	9.52	6.85
	30	5.68	0.57	13.91	9.52	6.52
	45	5.53	0.74	14.18	9.49	6.59
	60	5.61	0.86	14.02	9.92	6.79
	90	4.53	1.53	14.24	9.74	nd
	120	4.41	1.60	14.46	10.15	nd

0.5	0	5.62	0.47	12.87	9.09	6.53
	15	5.62	0.56	13.91	9.37	7.00
	30	5.64	0.56	13.85	9.61	6.78
	45	5.53	0.77	13.69	9.69	6.86
	60	5.58	0.86	13.96	10.62	6.91
	90	4.52	1.55	13.74	10.61	0.00
	120	4.36	1.60	14.35	10.62	3.00
1.0	0	5.44	0.57	13.52	9.09	6.53
	15	5.61	0.61	14.29	9.38	7.26
	30	5.58	0.66	13.96	9.67	6.94
	45	5.51	0.79	13.96	9.68	6.41
	60	5.54	1.08	13.96	9.93	6.64
	90	4.49	1.57	13.63	11.10	nd
	120	4.37	1.69	14.18	10.64	4.00
2.0	0	5.18	0.63	12.81	9.09	6.53
	15	5.56	0.65	13.91	9.75	7.14
	30	5.58	0.67	13.74	9.53	6.83
	45	5.49	0.81	13.91	10.17	7.10
	60	5.53	1.26	13.80	10.66	6.92
	90	4.47	1.58	13.85	9.96	nd
	120	4.39	1.75	14.07	11.16	nd
4.0	0	5.07	0.75	13.74	9.09	6.53
	15	5.53	0.68	13.80	9.54	6.69
	30	5.56	0.70	13.58	9.49	6.90
	45	5.43	1.12	13.58	9.79	6.73
	60	5.48	1.31	13.19	9.77	6.74
	90	4.50	1.71	13.58	10.61	nd
	120	4.39	1.91	14.02	11.18	nd

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

^{b)}Ten gram or milliliter were titrated with 0.1N NaOH to pH 8.2±0.1 for titratable acidity

(나) 유리아미노산 함량

흑마늘 엑기스 첨가 간장의 유리아미노산 함량은 Table 112와 같다. 주요 유리아미노산으로 비필수 아미노산에서 glutamic acid와 alanine이 있었으며 필수아미노산에서 leucine과 phenylalanine이었다. 흑마늘 엑기스 0%, 0.5%, 1%, 2% 및 4% 첨가 시 콩알메주 간장의 glutamic acid 함량은 2092.51~2569.31 mg/100g수준이었고 alanine은 771.33~948.11 mg/100g 수준으로 흑마늘 엑기스 첨가에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. Leucine 함량은 1307.29~1485.65 mg/100g 수준이었으며 phenylalanine은 1069.74~1221.51 mg/100g 수준이었다. 그 밖의 비필수 및 필수 아미노산의 함량은 흑마늘 엑기스 함량이 따른 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 112. Free amino acid contents of kanjang with different amount of black garlic extracts.

Contents ¹⁾ (mg/100g)	Samples				
	0%	0.5%	1%	2%	4%
General amino acids					
o-Phosphoserine	nd ²⁾	nd	nd	nd	nd
Taurine	nd	nd	nd	nd	nd
o-Phosphoethanolamine	70.75	70.68	86.87	77.69	112.61
Urea	nd	nd	nd	nd	nd
Proline	nd	nd	nd	nd	nd
Aspartic acid	160.94	169.13	187.34	189.79	206.57
Serine	392.82	359.46	329.04	374.50	377.72
Glutamic acid	2569.31	2341.64	2092.51	2256.54	2283.34
Sarcosine	228.35	237.77	61.08	250.65	79.90

Amino adipic acid	238.01	239.69	176.44	254.81	206.32
Glycine	296.11	278.83	249.37	274.27	275.13
Alanine	948.11	871.15	771.33	830.01	916.78
Citrulline	nd	nd	61.31	81.10	nd
α -aminobutyric acid	27.50	24.60	10.84	24.16	16.17
Cystine	161.43	161.91	136.64	174.15	171.39
Cystathionine	77.60	78.41	59.15	81.07	69.31
Tyrosine	585.23	696.94	647.50	695.38	738.28
β -Alanine	90.96	92.64	76.60	95.02	91.29
β -aminoisobutyric acid	184.09	194.08	173.58	210.71	221.79
γ -aminobutyric acid	79.83	107.39	77.84	117.36	120.78
Aminoethanol	25.20	23.89	24.22	27.67	30.64
Hydroxylysine	72.17	69.44	66.64	70.76	74.46
Ornithine	881.54	787.59	736.62	762.43	823.94
1Methylhistamine	23.95	23.69	21.49	24.13	25.41
3Methylhistamine	62.58	60.15	57.89	60.63	63.95
Anserine	682.20	650.73	639.73	665.99	708.54
Carnosine	65.78	92.57	85.86	92.26	95.41
Arginine	117.24	138.44	129.38	144.43	142.94
Total	8041.70	7770.82	6959.27	7835.51	7852.67
Essential amino acids					
Threonine	452.30	410.95	368.09	401.65	409.84
Valine	977.13	914.67	854.68	916.58	972.19
Methionine	389.33	368.53	338.74	378.76	385.81
Isoleucine	886.34	819.34	757.56	810.34	848.82
Leucine	1482.70	1389.15	1307.29	1395.51	1485.65
Phenylalanine	1197.68	1157.17	1069.74	1168.64	1221.51
Lysine	817.05	772.37	724.75	744.21	778.35
Histamine	298.33	282.51	268.83	275.09	288.21
Total	6500.86	6114.69	5689.68	6090.78	6390.38
Total amino acids	14542.56	13885.51	12648.95	13926.29	14243.05
Ammonia	132.84	127.74	124.72	127.45	136.53

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

(2) 간장의 발효 중 total phenolics 및 isoflavone 함량

(가) 발효 중 total phenolics 함량

흑마늘 엑기스 첨가 간장의 total phenolics 함량은 공통적으로 발효 시작 전보다 발효 후에 그 함량이 증가한 것으로 나타났다 (Fig. 91). 발효 시작전에는 각각 0.90 (0%), 0.79 (0.5%), 0.91 (1.0%), 1.25 (2.0%) 및 1.35 (4.0%) mg/g으로 나타났고 이는 흑마늘 엑기스 첨가량이 많을수록 total phenolics 함량이 높았다. 한편 발효 후에는 흑마늘 엑기스를 첨가하지 않은 간장이 2.56 mg/g으로 가장 높았으나 이들 간의 큰 차이는 없었다.

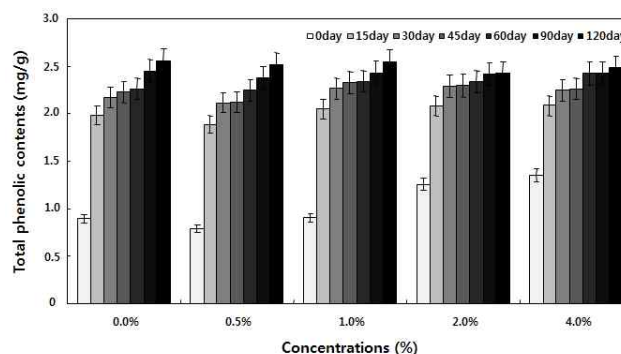


Fig. 91. Changes of total phenolic contents of kanjang with different amount of black garlic extracts.

(나) 발효 중 isoflavone 함량

흑마늘 엑기스 첨가 간장의 isoflavone 함량 변화는 Tables 113-117와 같다. 흑마늘 엑기스를 첨가하지 않은 것과 엑기스를 농도별로 첨가한 간장의 경우에는 공통적으로 발효가 진행됨에 따라 배당체 형태인 glycosides (daidzin, glycitin 및 genistin) 및 malonyl-glycosides (malonyl-daidzin, -glycitin 및 -genistin 그룹은 조금씩 감소하였고 비배당체인 aglycones (daidzein, glycitein 및 genistein) 그룹은 증가하였다(Tables 113-117). HPLC 크로마토그램 변화에서는 peak 9 (daidzein), 10 (glycitein) 및 12 (genistein)번이 크게 증가하여 주요 화합물인 것으로 나타났으며 발효 전 기간에 걸쳐 6, 7, 11번인 acetyl-glycosides 그룹은 큰 변화 없이 미량 존재하는 것으로 나타났다 (Figs. 92-93). 한편 모든 흑마늘 간장은 평균적으로 발효 120 일째 glycosides 그룹은 11.95%를 나타내었고 aglycones 그룹은 79.21%의 높은 점유율을 나타내고 있었다 (Fig. 94).

Table 113. Changes of isoflavone contents of kanjang without black garlic extract.

Contents ²⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	6.02	6.56	6.66	6.69	6.65	6.85	11.63
Glycitin	4.77	8.29	9.00	13.93	18.58	19.51	15.92
Genistin	tr	0.26	0.42	0.39	0.29	0.72	1.56
Total	10.79	15.11	16.08	21.01	25.52	27.08	29.11
Molonylglycosides							
Malonydaidzin	0.72	2.12	2.08	2.13	1.82	1.49	1.67
Molonylglycitin	1.97	6.03	5.52	5.61	5.27	5.35	5.48
Molonylgenistin	3.52	5.37	4.67	4.71	4.43	3.96	4.56
Total	6.21	13.52	12.27	12.45	11.52	10.8	11.71
Acetylglycosides							
Acetyldaizdin	tr	4.43	4.42	4.44	4.46	4.51	5.47
Acetylglycitin	0.66	0.39	1.68	1.82	1.59	1.62	1.91
Acetylgenistin	0.33	0.19	0.84	0.91	0.79	0.81	0.95
Total	0.99	5.01	6.94	7.17	6.84	6.94	8.33
Aglycones							
Daidzin	21.21	73.54	64.29	72.74	55.88	57.48	63.16
Glycitein	6.49	22.60	20.00	22.5	17.85	17.70	20.02
Genistein	17.30	55.74	52.56	62.49	48.92	48.81	53.85
Total	45.00	151.88	136.85	157.73	122.65	123.99	137.03
Total isoflavones	62.99	185.52	172.14	198.36	166.53	168.81	186.18

²⁾All values are presented as the mean±SD of determinations in three independent experiments.

³⁾tr: trace(<0.002 µg/g).

⁴⁾nd: not detected.

Table 114. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extract (0.5%).

Contents ²⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	4.99	6.48	6.76	6.19	7.71	6.64	6.97
Glycitin	5.24	8.18	13.68	12.04	18.95	13.39	15.81
Genistin	10.47	14.93	6.43	1.33	4.36	1.98	2.86
Total	20.70	29.59	26.87	19.56	31.02	22.01	25.64
Molonylglycosides							
Malonydaidzin	0.81	3.71	2.14	6.7	8.41	4.67	3.29
Molonylglycitin	nd	nd	nd	nd	4.61	nd	nd
Molonylgenistin	2.47	4.29	4.04	3.71	5.28	4.63	5.35

Total	3.28	8.00	6.18	10.41	18.30	9.30	8.64
Acetylglycosides							
Acetyl daidzin	tr	3.94	0.9	3.81	2.32	4.66	0.79
Acetyl glycitin	0.55	1.90	1.82	1.84	2.13	1.97	2.17
Acetyl genistin	0.28	0.95	0.91	0.92	1.06	0.98	1.09
Total	0.83	6.79	3.63	6.57	5.51	7.61	4.05
Aglycones							
Daidzin	15.34	68.15	62.51	72.63	54.91	71.58	75.50
Glycitein	4.69	20.10	18.97	22.07	19.06	22.39	24.16
Genistein	10.32	52.02	49.84	61.22	39.36	63.19	66.10
Total	30.35	140.27	131.32	155.92	113.33	157.16	165.76
Total isoflavones	55.16	184.65	168.00	192.46	168.16	196.08	204.09

²All values are presented as the mean±SD of determinations in three independent experiments.

³tr: trace(<0.002 µg/g).

⁴nd: not detected.

Table 115. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extract (1.0%).

Contents ²⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	6.43	7.18	8.47	7.52	nd	nd	nd
Glycitin	5.79	10.26	12.97	12.94	17.34	15.85	17.26
Genistin	19.64	15.93	12.13	6.24	4.76	3.56	3.25
Total	31.86	33.37	33.57	26.70	22.10	19.41	20.51
Molonylglycosides							
Malony daidzin	2.75	2.98	3.95	5.75	4.36	3.5	4.02
Molony glycitin	2.45	5.86	8.01	6.53	5.4	5.73	5.87
Molony genistin	4.04	4.00	7.49	4.31	3.77	3.41	3.52
Total	9.24	12.84	19.45	16.59	13.53	12.64	13.41
Acetylglycosides							
Acetyl daidzin	tr	5.03	8.33	5.28	4.39	3.77	3.64
Acetyl glycitin	1.09	1.95	2.16	2.22	1.68	1.64	1.75
Acetyl genistin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	1.09	6.98	10.49	7.50	6.07	5.41	5.39
Aglycones							
Daidzin	25.42	62.47	80.59	82.39	54.78	62.02	68.81
Glycitein	7.74	19.38	27.24	26.19	17.86	19.39	21.34
Genistein	17.51	44.33	51.23	69.25	46.5	53.89	60.78
Total	50.67	126.18	159.06	177.83	119.14	135.3	150.93
Total isoflavones	92.86	179.37	222.57	228.62	160.84	172.76	190.24

²All values are presented as the mean±SD of determinations in three independent experiments.

³tr: trace(<0.002 µg/g).

⁴nd: not detected.

Table 116. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extract (2.0%).

Contents ²⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	6.74	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glycitin	9.77	14.06	14.04	17.63	16.73	17.3	16.38
Genistin	23.04	17.28	10.31	6.7	4.25	3.98	3.23
Total	39.55	31.34	24.35	24.33	20.98	21.28	19.61
Molonylglycosides							
Malonyldaidzin	2.84	4.93	5.07	5.72	6.34	5.46	6.87
Molonylglycitin	3.06	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylgenistin	4.27	3.52	4.55	3.77	5.4	3.73	5.94
Total	10.17	8.45	9.62	9.49	11.74	9.19	12.81
Acetylglycosides							
Acetyldaidzin	0.48	5.20	6.36	5.33	3.61	5.04	4.73
Acetylglycitin	1.53	1.76	2.08	2.13	1.68	1.54	2.38
Acetylgenistin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	2.01	6.96	8.44	7.46	5.29	6.58	7.11
Aglycones							
Daidzin	32.73	73.40	90.24	75.62	52.3	69.12	72.97
Glycitein	9.54	22.72	28.38	23.6	16.7	21.85	23.45
Genistein	20.03	55.80	75.66	62.43	43.76	60.87	65.63
Total	62.3	151.92	194.28	161.65	112.76	151.84	162.05
Total isoflavones	114.03	198.67	236.69	202.93	150.77	188.89	201.58

²⁾All values are presented as the mean±SD of determinations in three independent experiments.

³⁾tr: trace(<0.002 µg/g).

⁴⁾nd: not detected.

Table 117. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extract (4.0%).

Contents ²⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glycitin	9.83	16.59	15.83	15.35	17.51	19.81	19.01
Genistin	35.06	19.75	9.97	7.09	6.15	4.22	3.48
Total	44.89	36.34	25.80	22.44	23.66	24.03	22.49
Molonylglycosides							
Malonyldaidzin	1.14	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylglycitin	3.72	6.94	6.77	6.89	6.78	6.83	6.74
Molonylgenistin	2.48	105.65	nd	nd	106.43	nd	nd
Total	7.34	112.59	6.77	6.89	113.21	6.83	6.74
Acetylglycosides							
Acetyldaidzin	3.85	7.40	6.56	6.58	6.54	6.37	5.93
Acetylglycitin	1.56	2.30	2.27	2.42	2.26	1.61	1.70
Acetylgenistin	0.78	nd	1.13	1.21	nd	0.81	0.85
Total	6.19	9.70	9.96	10.21	8.80	8.79	8.48
Aglycones							
Daidzin	40.72	15.66	80.90	85.46	16.28	63.03	74.99
Glycitein	11.92	7.72	24.62	26.26	6.04	20.40	23.73
Genistein	25.98	49.10	63.98	71.06	57.53	55.84	67.63
Total	78.62	72.48	169.50	182.78	79.85	139.27	166.35
Total isoflavones	137.04	231.11	212.03	222.32	225.52	178.92	204.06

²⁾All values are presented as the mean±SD of determinations in three independent experiments.

³⁾tr: trace(<0.002 µg/g).

⁴⁾nd: not detected.

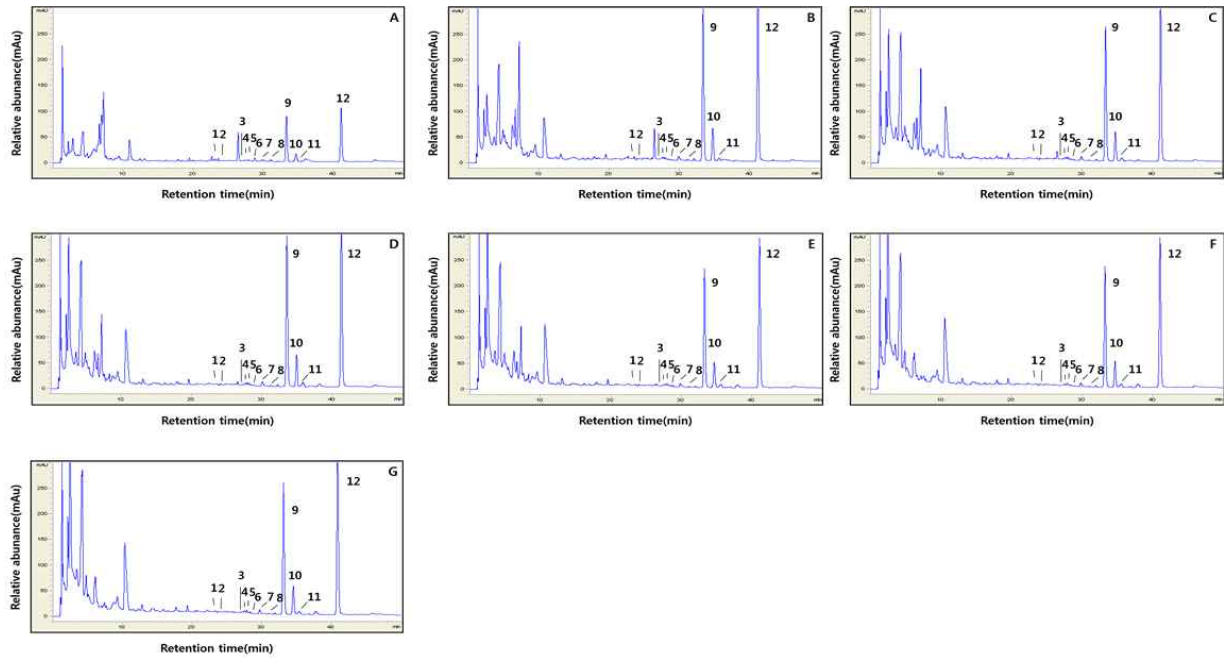


Fig. 92. Changes of isoflavone contents of kanjang without black garlic extract. A; 0 d B; 15 d, C; 30 d, D; 45 d, E; 60 d, F; 90 d and G; 120 d. 1; daidzin, 2; glycitin, 3; genistin, 4; malonyl-daidzin, 5; malonyl-glycitin, 6; acetyl-daidzin, 7; acetyl-glycitin, 8; malonyl-genistin, 9; daidzein, 10; glycitein, 11; acetyl-genistin and 12; genistein.

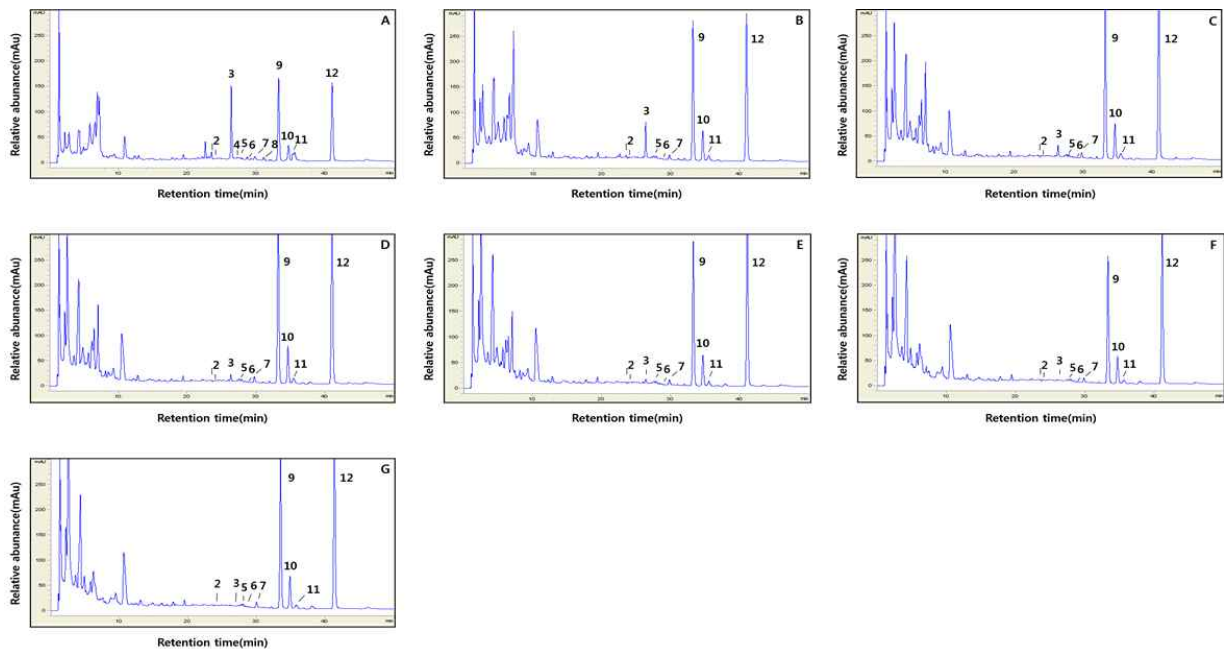


Fig. 93. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extract (4.0%). A; 0 d B; 15 d, C; 30 d, D; 45 d, E; 60 d, F; 90 d and G; 120 d.

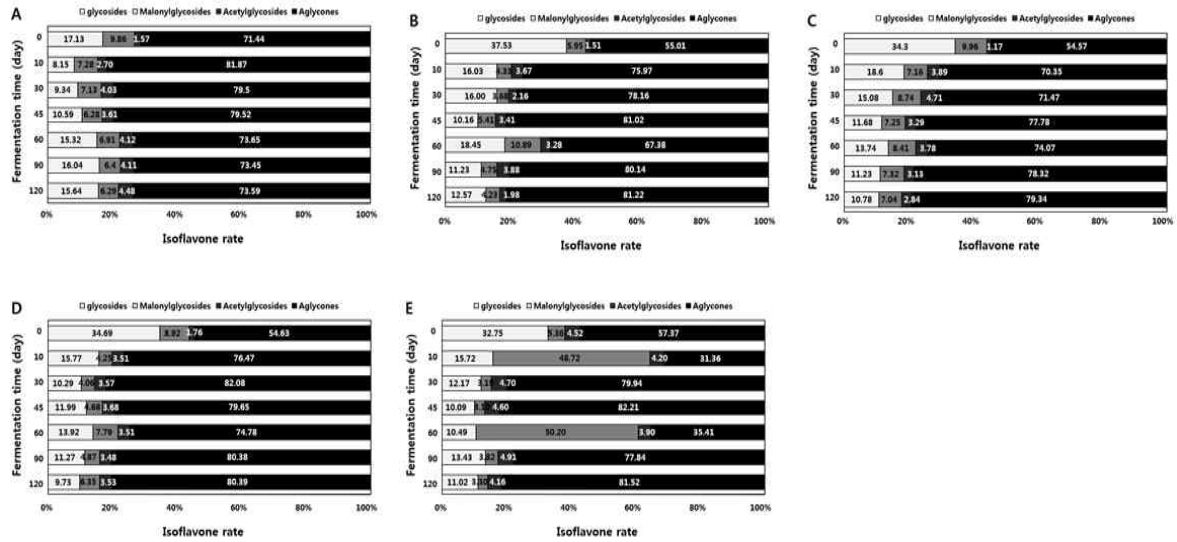


Fig. 94. Changes of isoflavone glycosides, malonyl-glycosides, acetyl-glycosides and aglycones rate (%) of kanjang with different black garlic extracts. A; 0% B; 0.5%, C; 1.0%, D; 2.0% and E; 4.0%.

(3) 간장의 발효 중 항산화 활성

(가) 항산화 활성

흑마늘 첨가 간장의 발효 중 DPPH, ABTS, $\cdot\text{OH}$ 라디칼 소거활성과 FRAP 환원력 측정 결과 Fig. 95와 같다. DPPH 라디칼 소거활성은 흑마늘 엑기스를 4.0%를 첨가한 간장에서 95.14%로 가장 높았으나 흑마늘 엑기스 첨가량과 발효 과정에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 95A). ABTS 라디칼 소거활성은 발효 과정에 따른 변화가 조금씩 나타났으며 이 역시 흑마늘 엑기스를 4.0% 첨가한 간장에서 발효 120일째 98.96%로 가장 높았다(Fig. 95B). $\cdot\text{OH}$ 라디칼은 DPPH 라디칼 소거활성과 유사한 경향으로 나타났으며 발효 과정에 따른 변화는 크지 않았고 4.0% 흑마늘 엑기스 첨가 간장에서 발효 120일째 88.174%로 가장 높았다(Fig. 95C). 그러나 이들 간의 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 한편 FRAP 환원력은 발효 시작부터 발효가 끝나는 시점까지 큰 변화가 없는 것으로 나타났고 이 역시 4.0% 흑마늘 엑기스 첨가 간장이 발효 120일째 1.907의 가장 높은 환원력을 나타내었다(Fig. 95D).

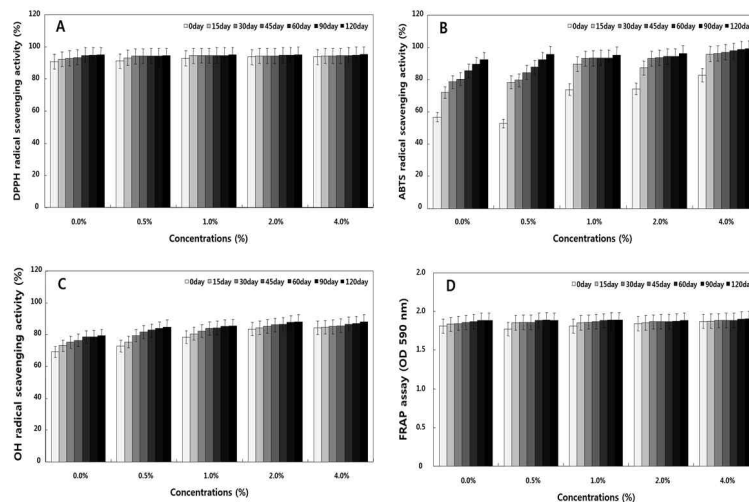


Fig. 95. Changes of DPPH (A), ABTS (B) and $\cdot\text{OH}$ (C) radical scavenging activity (%) and FRAP (D) assay of kanjang with different amounts of black garlic extracts.

라. 콩알 메주 베이스 소금 농도별 흑마늘 엑기스 간장의 특성 및 기능성 대사체 분석

(1) 간장의 발효 중 이화학적 특성

(가) pH, 산도, 염도 및 생균수 변화

소금 농도별 흑마늘 엑기스 간장의 pH, 산도 및 염도는 Table 118과 같았다. 흑마늘 첨가에 따른 pH 변화는 발효 전 크게 나타나지 않았으나 발효 120 일 후에는 흑마늘 1.0% 첨가한 경우에 4.37로 가장 낮은 수치를 나타내었다. pH 감소에 상응하여 모든 흑마늘 엑기스 첨가 간장의 산도는 꾸준히 증가하였고 염도는 발효 120일 후에 평균 14.22%를 나타내었다.

(나) 유리아미노산

소금 농도별 흑마늘 엑기스 간장의 유리아미노산 함량은 Table 119와 같았다. 주요 유리아미노산으로 비필수 아미노산에서 glutamic acid와 alanine이 있었으며 필수아미노산에서 leucine과 phenylalanine이었다. 염농도 12%, 15% 및 18% 첨가 시 간장의 glutamic acid 함량은 각각 3173.88, 2888.49 및 2463.80 mg/100g 이었고 alanine은 1077.19, 975.79 및 862.42 mg/100g으로 소금 농도가 증가함에 따라 glutamic acid와 alanine 함량이 감소하는 경향을 나타내었다. Leucine 함량은 소금 농도별 각각 1649.29, 1541.01 및 1401.80 mg/100g 수준이었으며 phenylalanine은 1366.08, 1277.26 및 1190.98 mg/100g으로 소금 농도가 증가함에 따라 유의적으로 함량이 감소하는 경향을 나타내었다. Ammonia 함량 역시 염농도가 증가함에 따라 감소하여 소금 농도 12%, 15% 및 18% 흑마늘 엑기스 간장은 140.82, 133.95 및 125.37 mg/100g의 함량을 나타내었다. 그 밖의 대부분의 비필수 및 필수 아미노산의 함량은 소금 농도가 증가함에 따라 유리아미노산 함량이 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 118. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of kanjang with black garlic extracts and different salt concentration during fermentation.

Salt quantity (%)	Contents ^{a)}					
	Fermentation time (d)	pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers (log cfu/mL)	
					<i>Bacillus</i>	<i>Yeast</i>
12.0	0	6.01	0.71	9.85	9.84	6.92
	15	5.44	1.39	10.01	10.70	6.83
	30	4.39	2.63	9.36	10.43	5.32
	45	4.32	2.79	9.14	9.57	3.00
	60	4.23	2.70	9.47	9.61	3.53
	90	4.20	2.61	8.81	9.77	3.46
	120	3.93	2.92	5.74	10.17	4.49
15.0	0	5.76	1.07	13.14	9.84	6.92
	15	5.39	1.44	12.10	10.50	6.82
	30	4.36	2.65	11.82	10.61	5.64
	45	4.24	2.90	11.71	9.23	3.00
	60	4.18	2.92	11.93	10.84	3.30
	90	4.11	2.11	11.11	10.75	2.74
	120	3.93	2.72	9.85	10.70	3.30
18.0	0	5.71	1.22	14.89	9.84	6.92
	15	5.31	1.51	14.73	10.66	5.53
	30	4.49	2.36	14.51	10.66	5.43
	45	4.25	2.61	13.80	9.72	nd
	60	4.17	2.66	14.46	11.44	2.60
	90	4.1	2.45	13.30	10.34	nd
	120	3.96	2.39	12.81	10.90	2.06

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

^{b)}Ten gram or milliliter were titrated with 0.1N NaOH to pH 8.2±0.1 for titratable acidity

Table 119. Free amino acid contents of kanjang with black garlic extracts and different salt concertation during fermentation.

Contents ¹⁾ (mg/100g)	Samples		
	12%	15%	18%
General amino acids			
o-Phosphoserine	nd ²⁾	nd	nd
Taurine	nd	nd	nd
o-Phosphoethanolamine	99.96	87.34	82.02
Urea	nd	nd	nd
Proline	nd	nd	nd
Aspartic acid	278.73	269.55	254.52
Serine	440.57	466.43	426.03
Glutamic acid	3173.88	2888.49	2463.80
Sarcosine	nd	nd	230.98
Aminoadipic acid	286.00	286.08	279.66
Glycine	384.48	344.44	306.78
Alanine	1077.19	975.79	862.42
Citrulline	166.13	nd	nd
α-aminobutyric acid	nd	nd	nd
Cystine	nd	161.90	156.09
Cystathionine	88.08	83.06	79.54
Tyrosine	617.89	595.63	702.68
β-Alanine	113.84	107.53	105.15
β-aminoisobutyric acid	223.00	212.32	203.44
γ-aminobutyric acid	117.48	111.92	111.29
Aminoethanol	28.60	67.31	64.36
Hydroxylysine	77.16	88.86	80.36
1Methylhistamine	15.87	26.22	12.80
Ornithine	807.62	867.87	722.37
3Methylhistamine	30.41	48.23	4.35
Anserine	471.63	528.83	336.91
Carnosine	65.57	73.50	40.69
Arginine	160.82	132.21	128.59
Total	8724.91	8423.51	7654.83
Essential amino acids			
Threonine	515.71	472.08	414.34
Valine	1049.68	899.92	811.16
Methionine	425.80	403.14	375.05
Isoleucine	923.94	849.31	761.65
Leucine	1649.29	1541.01	1401.80
Phenylalanine	1366.08	1277.26	1190.98
Lysine	812.53	741.59	638.02
Histamine	295.12	288.72	240.20
Total	7038.15	6473.03	5833.20
Total amino acids	15763.06	14896.54	13488.03
Ammonia	140.82	133.95	125.37

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination

²⁾nd: not detected

(2) 간장의 발효 중 total phenolics 및 isoflavone 함량

(가) 발효 중 total phenolics 함량

소금 농도별 흑마늘 엑기스 간장의 total phenolics 함량은 Fig. 96에 나타낸바와 같다. 전체적인 결과로는 발효가 진행됨에 따라 total phenolics 함량은 서서히 증가하였고 이는 소금 농도가 높을수록 비례적으로 증가하였다. 발효 시작 전에는 각각 2.84 (12.0%), 3.13 (15.0%) 및 3.44 (18.0%) mg/g으로 약간 차이가 있었으며 발효 120 일째에는 각각 3.84 (12.0%), 4.00

(15.0%) 및 4.26 (18.0%) mg/g으로 소금 농도 18.0%에서 가장 높게 증가한 것으로 나타났다.

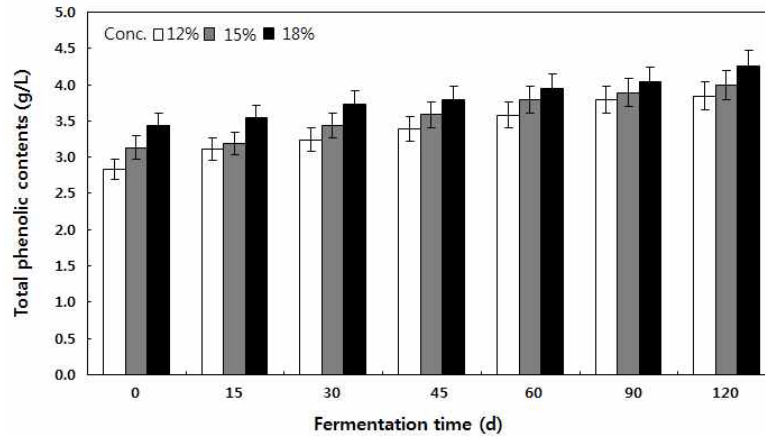


Fig. 96. Changes of total phenolic contents of kanjang with black garlic extracts and different salt concentration during fermentation.

(나) 발효 중 isoflavone 함량

소금 농도별 흑마늘 엑기스 간장의 isoflavone 함량 변화는 Tables 120-122 및 Figs. 97-99와 같다. 소금 첨가량과 발효에 따른 isoflavone 함량에는 큰 유의적 차이는 없으며 대체적으로 모든 흑마늘 간장은 유사한 수준인 것으로 나타났다. 소금 농도별 간장은 공통적으로 발효 시작 전에 배당체 형태인 glycosides(daidzin 및 glycitin) 및 malonyl-glycosides(malonyl-daidzin 및 -glycitin) 그룹의 화합물이 검출되지 않았다. 추가적으로 acetyl-glycosides 그룹의 acetyl-daidzin, -glycitin 및 -genistin 화합물 역시 발효 전 기간동안 검출되지 않았다. 이에 비례적으로 비배당체인 aglycones(daidzein, glycitein 및 genistein) 그룹은 증가하였다(Tables 119-121). HPLC 분석결과, 모든 소금 농도별 흑마늘 간장은 peak 9(daidzein), 10(glycitein) 및 12(genistein)번이 크게 증가하여 주요 화합물인 것으로 나타났으며, aglycones 함량은 각각 151.36 µg/g(12.0%), 136.23 µg/g(15.0%) 및 141.25 µg/g(18.0%)으로 소금 농도 12% 흑마늘 엑기스 간장이 가장 높은 것으로 나타났다(Table 119). 이로써 isoflavone 함량은 소금 첨가 농도에 따라 큰 차이가 없는 것으로 판단되었다. 한편 모든 흑마늘 간장은 발효 120일째 aglycones 비율은 평균 96.49% 높은 점유율을 차지하고 있었다(Fig. 100).

Table 120. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extracts and 12% salt concentration during fermentation.

Contents ²⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Genistin	24.08	3.19	0.69	3.08	6.56	3.75	3.78
Total	24.08	3.19	0.69	3.08	6.56	3.75	3.78
Molonylglycosides							
Malonyldaidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylglycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylgenistin	6.46	6.02	6.02	6.15	3.02	2.65	2.66
Total	6.46	6.02	6.02	6.15	3.02	2.65	2.66
Acetylglycosides							
Acetyldaidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetylglycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetylgenistin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Aglycones							
Daidzin	55.87	59.89	58.75	59.82	56.62	56.61	60.56
Glycitein	10.81	11.90	11.78	12.05	11.75	11.90	12.76
Genistein	64.27	75.94	74.00	75.56	72.43	72.62	78.03
Total	130.94	147.72	144.53	147.43	140.80	141.13	151.36
Total isoflavones	161.49	156.93	151.25	156.66	150.39	147.53	157.80

²All values are presented as the mean±SD of determinations in three independent experiments.

³tr: trace(<0.002 µg/g).

⁴nd: not detected.

Table 121. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extracts and 15% salt during fermentation.

Contents ²⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Genistin	5.75	0.35	3.05	0.95	6.32	1.21	1.33
Total	5.75	0.35	3.05	0.95	6.32	1.21	1.33
Molonylglycosides							
Malonydaidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylglycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylgenistin	5.71	nd	3.27	3.32	3.30	2.48	2.45
Total	5.71	0.00	3.27	3.32	3.30	2.48	2.45
Acetylglycosides							
Acetylaidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetylglycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetylgenistin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Aglycones							
Daidzin	59.29	58.62	59.38	57.72	53.95	57.32	54.51
Glycitein	12.27	11.82	12.18	11.87	11.27	11.88	11.48
Genistein	67.27	74.74	75.33	73.16	69.38	73.81	70.23
Total	138.82	145.17	146.88	142.75	134.60	143.01	136.23
Total isoflavones	150.29	145.52	153.20	147.02	144.22	146.71	140.00

²All values are presented as the mean±SD of determinations in three independent experiments.

³tr: trace(<0.002 µg/g).

⁴nd: not detected.

Table 122. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extracts and 18% salt during fermentation.

Contents ²⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Genistin	10.18	1.56	1.69	1.52	3.71	4.78	1.42
Total	10.18	1.56	1.69	1.52	3.71	4.78	1.42
Molonylglycosides							
Malonydaidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylglycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylgenistin	3.52	3.75	3.71	3.70	5.98	4.82	4.08
Total	3.52	3.75	3.71	3.70	5.98	4.82	4.08
Acetylglycosides							
Acetylaidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetylglycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Acetylgenistin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Aglycones							
Daidzin	63.83	60.04	59.29	55.87	59.51	59.38	56.94
Glycitein	15.00	12.10	11.97	11.39	12.18	12.47	11.85
Genistein	68.67	75.83	75.01	70.93	75.97	74.89	72.46
Total	147.49	147.97	146.26	138.18	147.66	146.73	141.25
Total isoflavones	161.18	153.28	151.66	143.40	157.35	156.33	146.75

²All values are presented as the mean \pm SD of determinations in three independent experiments.

³tr: trace (<0.002 μ g/g).

⁴nd: not detected.

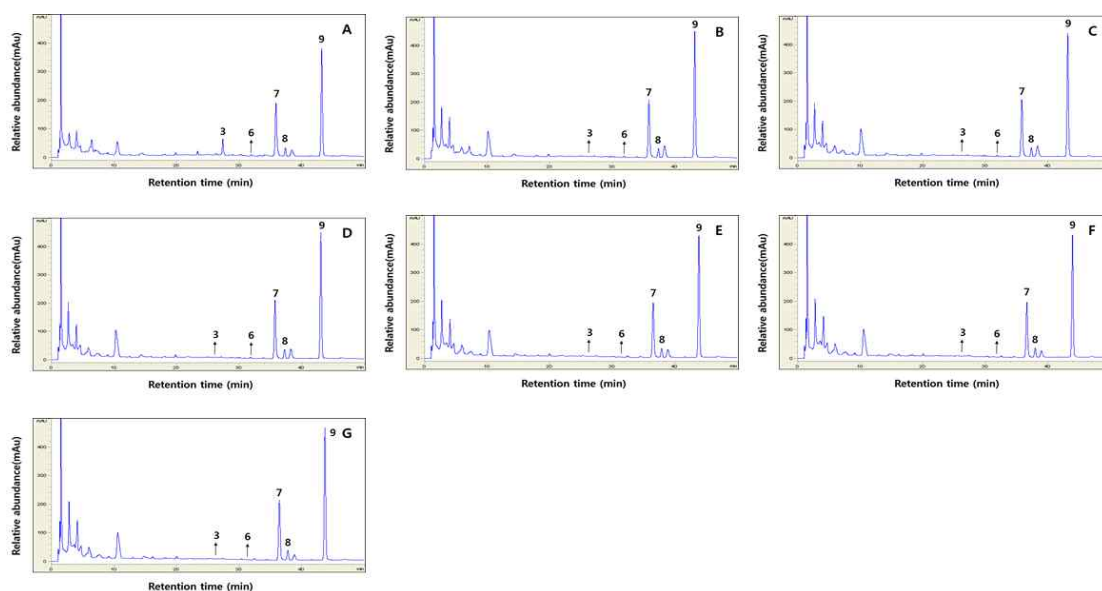


Fig. 97. Typical HPLC chromatogram of isoflavone in kanjang (NaCl 12.0%). A; 0 d B; 15 d, C; 30 d, D; 45 d, E; 60 d, F; 90 d and G; 120 d. 1; daidzin, 2; glycitin, 3; genistin, 4; malonyl-daidzin, 5; malonyl-glycitin, 6; acetyl-daidzin, 7; acetyl-glycitin, 8; malonyl-genistin, 9; daidzein, 10; glycitein, 11; acetyl-genistin and 12; genistein.

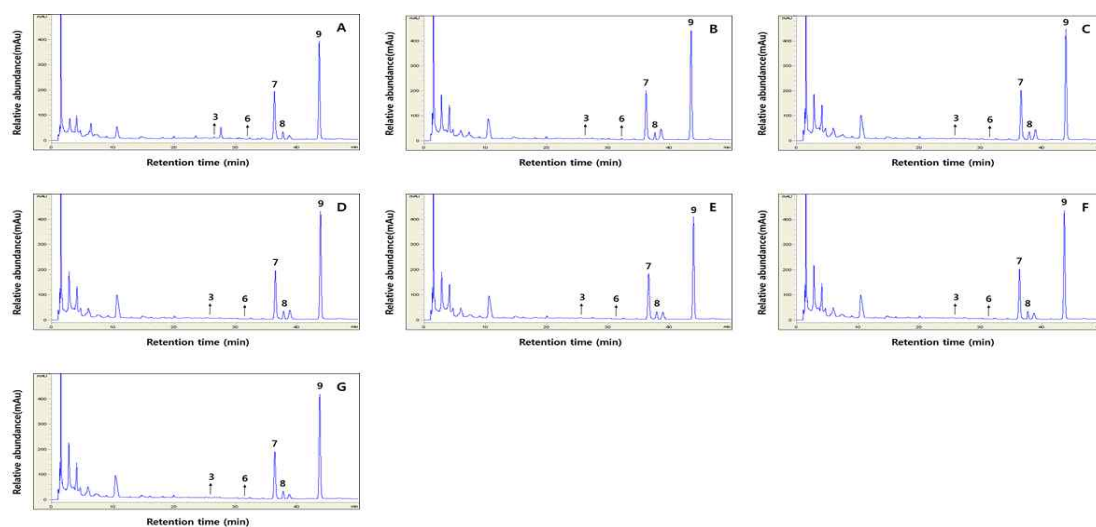


Fig. 98. Typical HPLC chromatogram of isoflavone in kanjang (NaCl 15.0%). A; 0 d B; 15 d, C; 30 d, D; 45 d, E; 60 d, F; 90 d and G; 120 d.

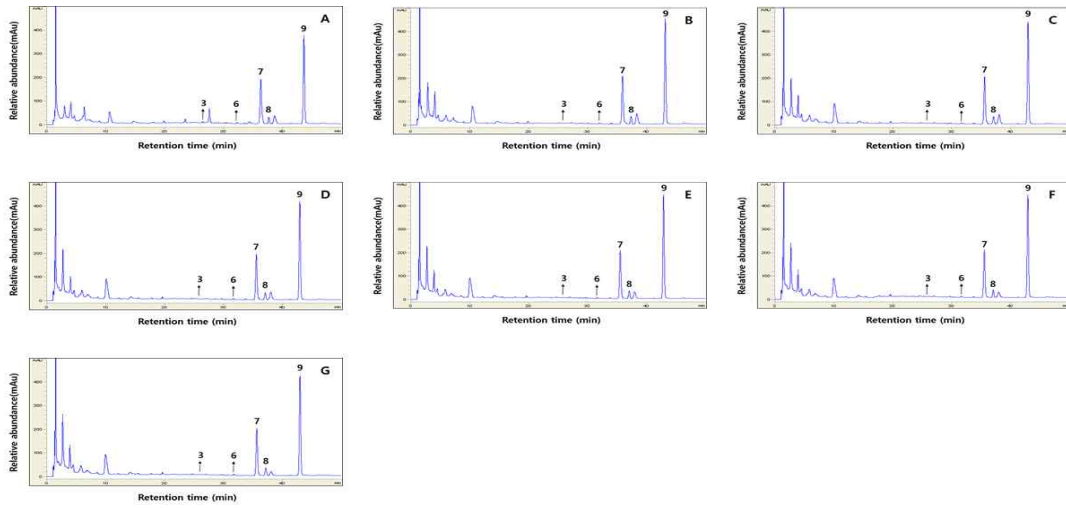


Fig. 99. Typical HPLC chromatogram of isoflavone in kanjang (NaCl 18.0%). A; 0 d B; 15 d, C; 30 d, D; 45 d, E; 60 d, F; 90 d and G; 120 d.

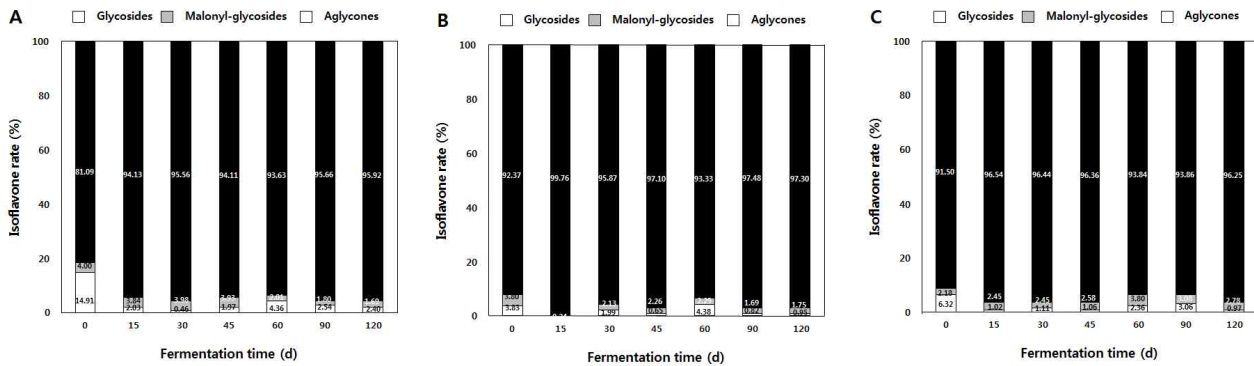


Fig. 100. Changes of isoflavone glycosides, malonyl-glycosides, acetyl-glycosides and aglycones ratios (%) of Kanjang with black garlic extract and salt. A; 12.0% B; 15.0% and C; 18.0% NaCl.

(3) 간장의 발효 중 항산화 활성

(가) 항산화 활성

소금 농도별 흑마늘 간장의 발효 과정에 따른 DPPH, ABTS, $\cdot\text{OH}$ 라디칼 소거활성과 FRAP 환원력 변화는 Fig. 101와 같았다. DPPH 라디칼 소거활성은 소금 첨가량이 많을수록 발효가 진행될수록 증가하는 경향으로 소금 18.0% 첨가 흑마늘 엑기스 간장의 경우 발효 150 일째 90.65%의 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 101A). ABTS, $\cdot\text{OH}$ 라디칼 소거활성과 FRAP 환원력 역시 발효가 진행될수록 그 활성을 증가하였고 이 역시 소금 농도가 높을수록 우수한 경향을 나타내었다 (Fig. 101B-D).

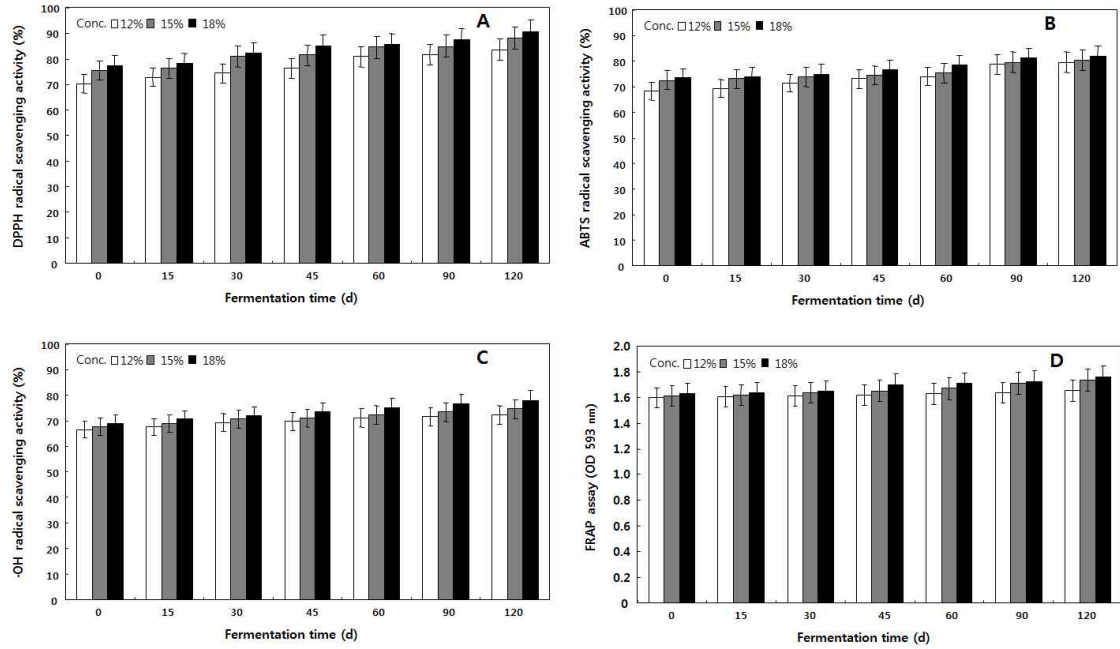


Fig. 101. Changes of DPPH (A), ABTS (B) and $\cdot\text{OH}$ (C) radical scavenging activity (%) and FRAP (D) assay of of Kanjang with black garlic extract and salt.

마. 콩알 메주 베이스 공시균주 및 선발 균주별 흑마늘 엑기스 간장의 특성 및 기능성 대사체 분석

(1) 흑마늘 엑기스 간장의 발효 중 이화학적 특성

(가) pH, 산도, 염도 및 생균수 변화

균주별 흑마늘 엑기스 간장의 pH, 산도 및 염도는 Table 123과 같았다. *Asp. oryzae/B. natto*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장은 따른 pH 변화는 발효가 진행됨에 따라 큰 감소를 보이지 않았고 오히려 발효 120 일째에는 5.97로 약간 증가하였다. 반면에 *Rhi. oryzae/EMD17&MJ1-4*를 이용한 간장에서는 발효 시작 전 5.77에서 발효 30 일까지는 조금씩 감소하다 45 일째부터 120 일까지는 약간의 pH 감소 및 증가를 반복하다 발효 120 일에 4.84를 나타내었다. 산도 역시 pH 변화에 비례적으로 증가와 감소 추세를 보이다 발효 120 일째 0.92%(*Asp. oryzae/B. natto*) 및 2.14% (*Rhi. oryzae/EMD17&MJ1-4*)를 나타내었다. 염도는 두 균주를 이용한 흑마늘 간장에서 모두 발효 시작 전보다는 감소하였다. 생균수는 *Bacillus*의 경우에는 발효 과정 중 서서히 감소하였고 *Yeast*는 오히려 증가하는 경향을 나타내었다.

(나) 유리아미노산 함량

균주별 흑마늘 엑기스 간장의 유리아미노산 함량은 Table 124와 같았다. *Asp. oryzae/B. natto*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장의 주요 유리아미노산은 비필수 아미노산에서 aspartic acid 및 glutamic acid이며 필수아미노산에서 leucine 및 lysine이다. 반면 *Rhi. oryzae/EMD17&MJ1-4*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장의 주요 유리아미노산은 비필수 아미노산에서 glutamic acid 및 alanine이며 필수아미노산에서 leucine 및 phenylalanine이다. 비필수 아미노산, 필수아미노산 및 암모니아 함량의 합계는 *Asp. oryzae/B. natto*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장에서 각각 16511.51, 11574.87 및 193.36 mg/100g 이었으며 *Rhi. oryzae/EMD17&MJ1-4*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장은 각각 8761.23, 6817.16 및 136.54 mg/100g으로 *Asp. oryzae/B. natto*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장의 유리아미노산 함량이 전체 적으로 높았다.

Table 123. Changes of pH, acidity, salinity and viable cell numbers of kanjang with black garlic extract and fermented by different starters during fermentation.

Strains	Contents ^{a)}					
	Fermentation time (d)	pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers (log cfu/mL)	
					<i>Bacillus</i>	<i>Yeast</i>
<i>Asp. oryzae</i> with <i>B. natto</i>	0	5.55	0.54	11.06	6.87	8.66
	15	5.47	1.22	10.23	7.08	8.76
	30	5.36	1.59	11.00	5.83	9.28
	45	5.44	1.62	10.73	5.65	8.88
	60	5.36	1.26	7.05	6.17	10.84
	90	5.22	1.44	10.73	3.78	9.08
	120	5.97	0.92	7.05	3.63	9.77
<i>Rhi. oryzae</i> with EMD17 & MJ1-4	0	5.77	0.74	10.78	6.81	9.87
	15	5.40	1.44	10.73	7.60	11.28
	30	4.20	3.06	10.62	3.72	11.24
	45	4.36	3.10	10.40	3.20	11.21
	60	4.15	2.57	6.45	4.96	9.76
	90	3.86	2.59	10.18	4.59	9.40
	120	4.84	2.14	9.25	3.70	10.55

^{a)}Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

^{b)}Ten gram or milliliter were titrated with 0.1N NaOH to pH 8.2±0.1 for titratable acidity.

Table 124. Free amino acid contents of kanjang with black garlic extracts and fermented by different starters during fermentation.

Contents ¹⁾ (mg/100g)	Samples	
	<i>Asp. oryzae</i> with <i>B. natto</i>	<i>Rhi. oryzae</i> with EMD17 & MJ1-4
General amino acids		
o-Phosphoserine	269.41	nd
Taurine	nd ²⁾	nd
o-Phosphoethanolamine	344.78	82.42
Urea	nd	nd
Proline	nd	nd
Aspartic acid	2260.30	234.41
Serine	1043.32	416.54
Glutamic acid	7238.34	2879.10
Sarcosine	nd	nd
Aminoadipic acid	132.61	286.16
Glycine	965.04	351.59
Alanine	1403.38	1047.89
Citrulline	1121.52	nd
α-aminobutyric acid	77.45	nd
Cystine	176.68	nd
Cystathionine	45.14	85.00
Tyrosine	543.59	834.17
β-Alanine	113.87	109.55
β-aminoisobutyric acid	117.58	218.22
γ-aminobutyric acid	69.59	121.09
Aminoethanol	30.98	58.34
Hydroxylysine	26.04	95.59
Ornithine	298.33	920.80
1Methylhistamine	11.42	34.43
3Methylhistamine	12.28	63.30
Anserine	98.08	647.69
Carnosine	69.54	108.54
Arginine	42.24	166.40
Total	16511.51	8761.23

Essential amino acids		
Threonine	1210.79	486.95
Valine	1669.44	1014.95
Methionine	562.69	408.72
Isoleucine	1603.86	889.61
Leucine	2441.06	1590.72
Phenylalanine	1631.66	1346.56
Lysine	1860.10	774.56
Histamine	595.27	305.09
Total	11574.87	6817.16
Total amino acids	28086.38	15578.39
Ammonia	193.36	136.54

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination

²⁾nd: not detected

(2) 흑마늘 엑기스 간장의 발효 중 total phenolics 함량

(가) 총 phenolics 함량 변화

균주별 흑마늘 엑기스 간장의 total phenolics 함량은 공통적으로 발효 시작 전보다 발효 후에 그 함량이 증가하는 경향으로 나타났다(Fig. 102). 발효 시작 전에는 각각 3.43 (*Asp. oryzae*) 및 3.59 (*Rhi. oryzae*) mg/g으로 *Rhi. oryzae*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장이 좀 더 많은 함유량을 나타내었으며 발효 후 역시 두 균주를 이용한 간장은 점차적으로 증가하였고 발효 120일째에는 각각 4.76(*Asp. oryzae*) 및 4.89(*Rhi. oryzae*) mg/g으로 큰 차이는 없었다.

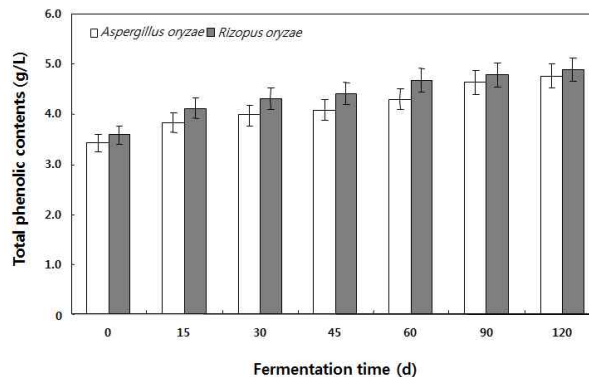


Fig. 102. Changes of total phenolic contents during fermentation of kanjang with black garlic extract and fermented by different starters during fermentation.

(나) Isoflavone 함량

균주별 흑마늘 엑기스 간장의 isoflavone 함량을 확인한 결과는 다음 Tables 125, 126와 Figs. 103-105와 같다. *Asp.oryzae* 및 *Rhi.oryzae*에 의해 발효된 흑마늘 엑기스 간장의 총 glycosides 함량은 발효 0 일 각각 10.34 및 46.16 $\mu\text{g/g}$ 에서 발효 30일 까지 감소하는 경향을 나타내어 각각에서 1.04 및 9.92 $\mu\text{g/g}$ 으로 확인되었으며 이후 발효 120 일 까지 증가하여 각각 3.25 및 25.43 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. Malonyl-glycosides 그룹은 발효 15 일까지 감소하여 이후 발효기간 동안 큰 변화를 나타내지 않아 *Asp.oryzae* 및 *Rhi.oryzae* 각각 2.50~7.29 및 17.47~18.92 $\mu\text{g/g}$ 수준이었다. Acetyl-glycosides 그룹은 *Asp.oryzae* 및 *Rhi.oryzae*에서 공통적으로 확인되지 않았다. Aglycones 함량은 *Asp.oryzae*의 경우 발효 30 일 까지 증가하여 171.01 $\mu\text{g/g}$ 이었으며 이후에는 일정한 경향을 나타내지 않았으며, *Rhi.oryzae*는 발효 0 일 총 aglycone 함량이 143.64 $\mu\text{g/g}$ 에서 발효가 진행됨에 따라 비슷한 경향을 보였으며 발효 90 일에 163.21 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 전체적으로 총 isoflavone 함량은 *Rhi. oryzae*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장이 *Asp. oryzae*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장에 비해 높은 함량을 나타내었다. 발효가 진행됨에 따라 isoflavone 비율은 *Asp. oryzae*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장의 경우 발효 0 일 malonyl-glycoside가 51.49%로 가장 높은 비율을 나타내며 이후 발효 120 일 기

간 동안 aglycone 비율이 92.66~97.66% 수준이었다. *Rhi. oryzae*를 이용한 흑마늘 엑기스 간장의 경우 발효 0 일 aglycone 비율이 64.76%으로 가장 높은 비율을 나타내었으며 이후 발효 120 일 기간 동안 76.76~84.77 µg/g 수준이었다.

Table 125. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extract and fermented by *Asp. oryzae* with *B. natto* during fermentation.

Contents ¹⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	6.62	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glycitin	nd ²⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Genistin	3.72	6.65	1.04	1.1	1.04	1.56	3.25
Total	10.34	6.65	1.04	1.1	1.04	1.56	3.25
Molonylglycosides							
Malonydaidzin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylglycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylgenistin	58.98	5.43	3.08	5.63	5.73	2.5	7.29
Total	58.98	5.43	3.08	5.63	5.73	2.5	7.29
Acetylglycosides							
Acetyldaizidin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetylglycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetylgenistin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total							
Aglycones							
Daidzin	5.88	68.32	76.66	69.15	61.86	66.49	63.76
Glycitein	3.87	13.8	15.54	14.16	12.77	13.76	13.26
Genistein	35.47	70.48	78.81	72.59	64.53	69.57	66.06
Total	45.22	152.6	171.01	155.9	139.16	149.82	143.08
Total isoflavones	114.54	164.68	175.13	162.63	145.93	153.88	153.62

¹⁾All values are presented as the mean±SD of determinations in three independent experiments.
²⁾nd: not detected.

Table 126. Changes of isoflavone contents of kanjang with black garlic extract and fermented by *Rhi. oryzae* with EMD17 and MJ1-4 during fermentation.

Contents ¹⁾ (µg/g)	Fermentation time (d)						
	0	15	30	45	60	90	120
Glycosides							
Daidzin	6.77	5.85	7.16	7.19	5.91	22.58	22.19
Glycitin	29.46	13.80	nd	nd	nd	nd	nd
Genistin	9.93	2.44	2.77	2.91	2.83	3.18	3.24
Total	46.16	22.10	9.92	10.10	8.74	25.76	25.43
Molonylglycosides							
Malonydaidzin	nd ²⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Molonylglycitin	25.44	14.13	13.88	13.49	13.57	10.68	14.82
Molonylgenistin	6.56	4.00	3.92	3.89	3.90	4.16	4.10
Total	32.00	18.13	17.80	17.38	17.47	14.84	18.92
Acetylglycosides							
Acetyldaizidin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetylglycitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetylgenistin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Aglycones							
Daidzin	60.14	62.21	58.14	59.62	58.90	66.41	59.91
Glycitein	13.14	12.57	11.86	12.16	12.03	13.66	12.56
Genistein	70.36	79.22	73.36	75.51	74.98	83.14	73.98
Total	143.64	153.99	143.35	147.28	145.91	163.21	146.45

Total isoflavones	221.80	194.23	171.08	174.76	172.12	203.81	190.80
-------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

¹⁾ All values are presented as the mean \pm SD of determinations in three independent experiments.

²⁾ nd: not detected.

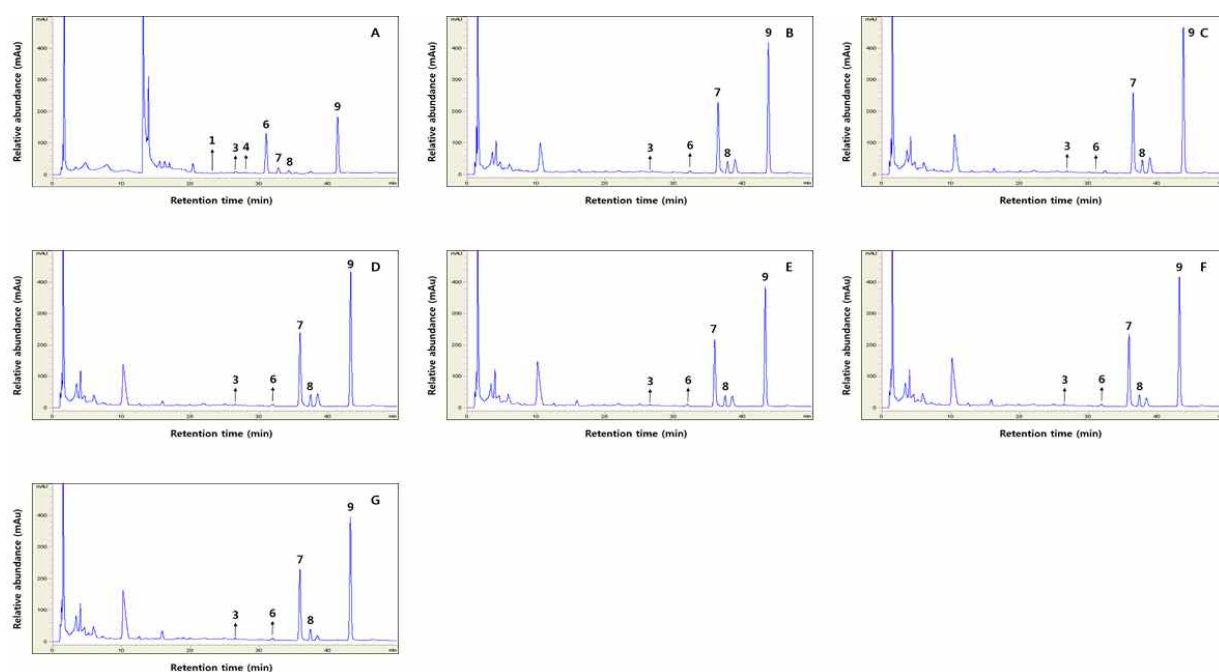


Fig. 103. Typical HPLC chromatogram of isoflavone in kanjang (*Asp. oryzae/B. natto*). A; 0 d B; 15 d, C; 30 d, D; 45 d, E; 60 d, F; 90 d and G; 120 d. 1; daidzin, 2; glycitin, 3; genistin, 4; malonyl-daidzin, 5; malonyl-glycitin, 6; acetyl-daidzin, 7; acetyl-glycitin, 8; malonyl-genistin, 9; daidzein, 10; glycitein, 11; acetyl-genistin and 12; genistein.

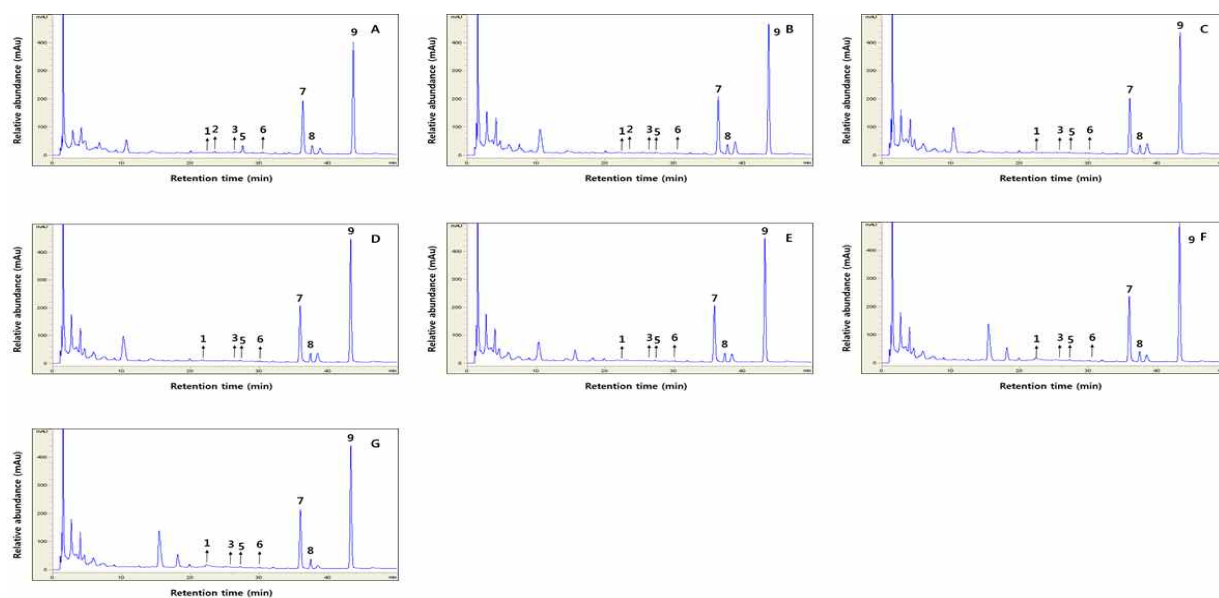


Fig. 104. Typical HPLC chromatogram of isoflavone in kanjang (*Rhi. oryzae/EMD17* and MJ1-4). A; 0 d B; 15 d, C; 30 d, D; 45 d, E; 60 d, F; 90 d and G; 120 d. 1; daidzin, 2; glycitin, 3; genistin, 4; malonyl-daidzin, 5; malonyl-glycitin, 6; acetyl-daidzin, 7; acetyl-glycitin, 8; malonyl-genistin, 9; daidzein, 10; glycitein, 11; acetyl-genistin and 12; genistein.

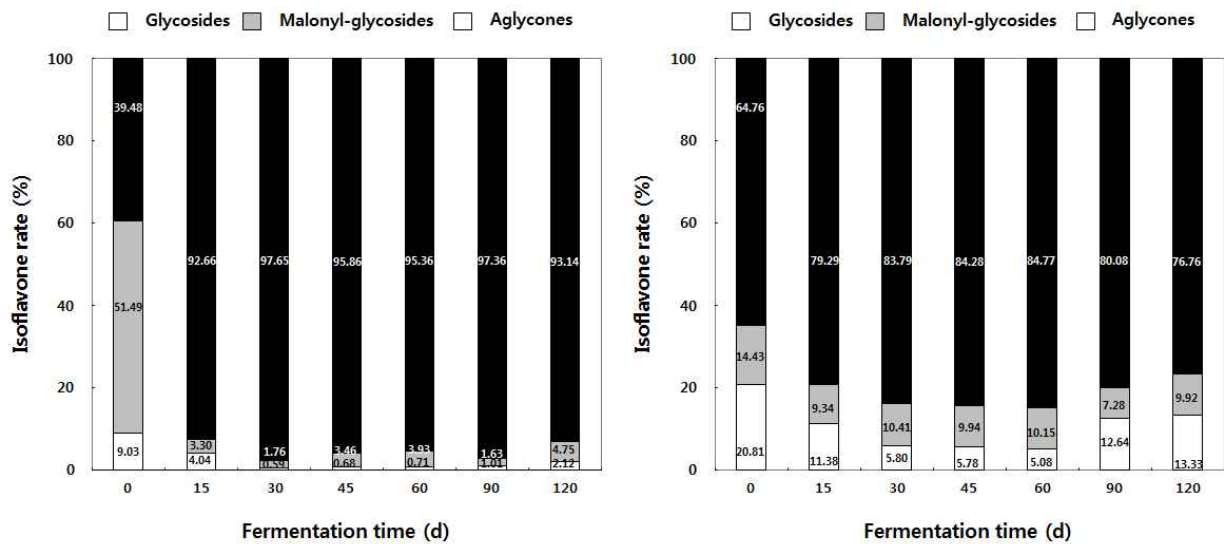


Fig. 105. Changes of isoflavone glycosides, malonyl-glycosides, acetyl-glycosides and aglycones ratio (%) of Kanjang with black garlic extract fermented by *Asp. oryzae* and *Rhi. oryzae*. A; 12.0% B; 15.0% and C; 18.0% NaCl.

(3) 흑마늘 엑기스 간장의 발효 중 항산화 활성

(가) 항산화 활성

균주별 흑마늘 엑기스 간장의 항산화 활성 측정 결과는 Fig. 106와 같았다. DPPH 라디칼 소거활성 확인결과 발효가 진행됨에 따라 *Asp. oryzae*/*B. natto* 와 *Rhi. oryzae*/*EMD17&MJ1-4*를 이용한 간장 모두 항산화력이 증가하는 경향을 나타내었으며, 발효 기간 중 *Asp. oryzae*/*B. natto*를 이용한 간장과 비교하여 *Rhi. oryzae*를 이용하여 제조한 간장의 항산화 활성이 전체적으로 뛰어나 발효 0일 *Asp. oryzae*/*B. natto*와 *Rhi. oryzae*/*EMD17&MJ1-4*를 이용한 간장 각각 63.27%과 68.67%에서 발효 120일에 각각 85.98%과 88.15%의 항산화력을 나타내었다 (Fig. 106A). ABTS 및 $\cdot\text{OH}$ 라디칼 소거활성 또한 DPPH 라디칼소거활성과 같은 경향을 나타내어 ABTS는 발효 0일 *Asp. oryzae*/*B. natto*와 *Rhi. oryzae*/*EMD17&MJ1-4*를 이용한 간장 각각 57.12%과 58.68%에서 발효 120일에 각각 78.36%과 79.22%의 항산화력을 나타내었고(Fig. 106B) $\cdot\text{OH}$ 는 발효 0일 *Asp. oryzae*/*B. natto*와 *Rhi. oryzae*/*EMD17&MJ1-4*를 이용한 간장 각각 61.09%와 63.28%에서 발효 120일에 각각 77.70%와 79.17%의 항산화력을 나타내었다 (Fig. 106C). FRAP역시 라디칼 소거활성과 유사한 경향을 나타내어 발효기간 중 증가하는 경향을 나타내었으며 발효 120일에 *Asp. oryzae*/*B. natto*와 *Rhi. oryzae*/*EMD17&MJ1-4*를 이용한 간장에서 각각 1.599와 1.626으로 나타났(Fig. 106D). 균주별 흑마늘 엑기스 간장의 항산화 활성 확인 결과 발효기간에 따라 항산화력이 전체적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 *Rhi. oryzae*/*EMD17&MJ1-4*를 이용하여 제조한 간장이 *Asp. oryzae*/*B. natto*를 이용하여 제조한 간장과 비교하여 항산화 활성이 전체적으로 뛰어나다.

발아마늘추출물이 함유된 장류의 활성, 지표성분 함량등에 대해 추후 분석해서 구체적으로 어떤 성분들이 가장 중요한 역할을 수행하는지에 대해 추가적으로 연구할 것이다.

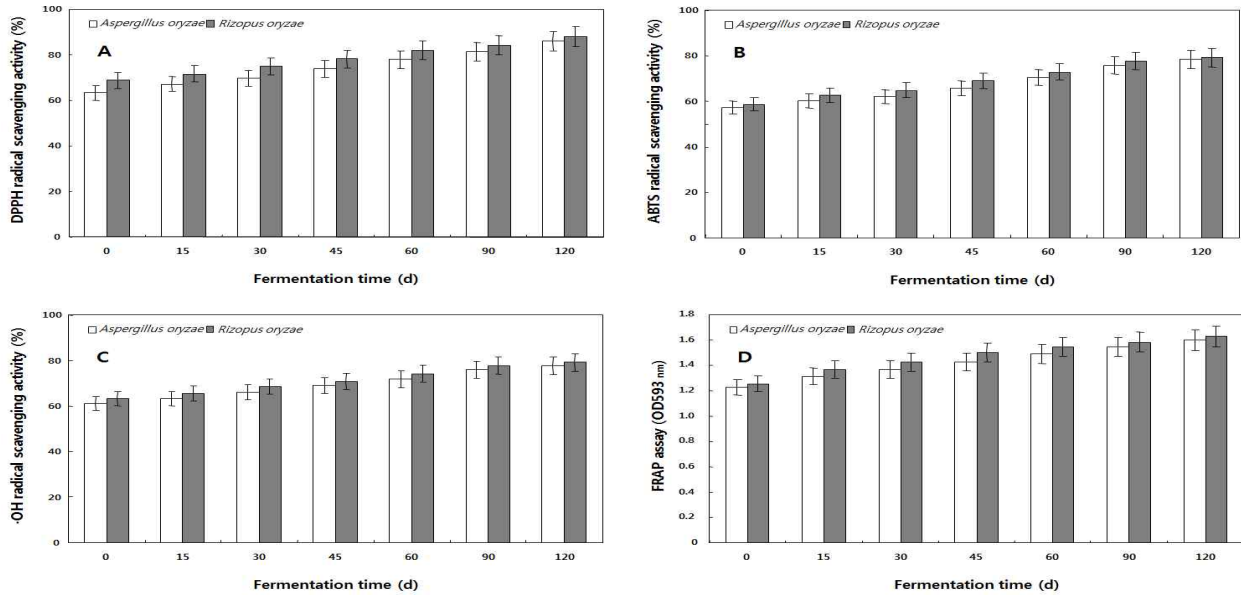


Fig. 106. Changes of DPPH (A), ABTS (B) and \cdot OH (C) radical scavenging activity (%) and FRAP (D) assay of kanjang with black garlic extract and fermented by different starters during fermentation.

제 2 절 마늘 첨가 장류의 품질특성 규명 및 생산공정 개발 (제 1 협동 남해마늘연구소)

1-1. 연구수행 방법 (1차 년도)

가. 청국장 시료의 제조

(1) 발효균주

경상대학교와 경남과학기술대학교에서 청국장에서 분리한 *Bacillus* 9 종을 분양받아 실험에 사용하였다. 9 종 균주를 각각 마늘을 혼합한 배지에서 배양한 후 마늘 내성 및 악취 정도를 평가하여 마늘 청국장 발효용 균주로 3 종을 선발 사용하였다.

(2) 청국장 발효를 위한 starter 배양

Bacillus 균주는 tryptic soy agar (TSA, Difco, USA) 평판배지에 streaking하고 37°C 항온기에서 48-72 시간 배양하였다. 단일 균락을 TSA broth에 접종하여 170 rpm 속도로 48 시간 진탕 배양하여 실험에 사용하였다. 배양된 균주는 실험시 3%씩 접종하였다.

(3) 마늘 청국장 제조를 위한 재료 및 전처리

청국장 제조용 대두는 함양농협에서 산지가 확인된 것을 구입 사용하였으며, 마늘은 2012년 생산된 남해산 깎마늘을 새남해농협에서 구입 사용하였다. 콩은 세척 후 상온에서 12 시간 불린 후 그리고 마늘은 충분히 다진 것을 청국장 제조에 사용하였다.

마늘의 첨가 형태에 따른 청국장 품질 평가를 위하여 생마늘, 발효마늘 및 발아마늘을 실험에 사용하였다. 발효마늘은 경남과학기술대학교에서 보유한 특허기술인 무취마늘 제조 방법에 따라 얻었다. 소금과 설탕이 각 3% 첨가된 용액에 깎마늘을 침지시키고 유산균주 S65를 접종

하여 20℃에서 10 일간 발효시킨 후 발효액은 제거하고 마늘만을 취하여 마늘 뿌리부분을 제거하여 실험에 사용하였다. 발아마늘은 한지를 깐 용기에 물을 적정량 뿌린 후 마늘의 간격을 4-5 cm 로 20℃에서 발아를 진행하였다. 마늘 싹이 0.5 cm 자랐을 때 뿌리 부위를 제거하고 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 각 마늘 형태는 Fig. 1과 같다.

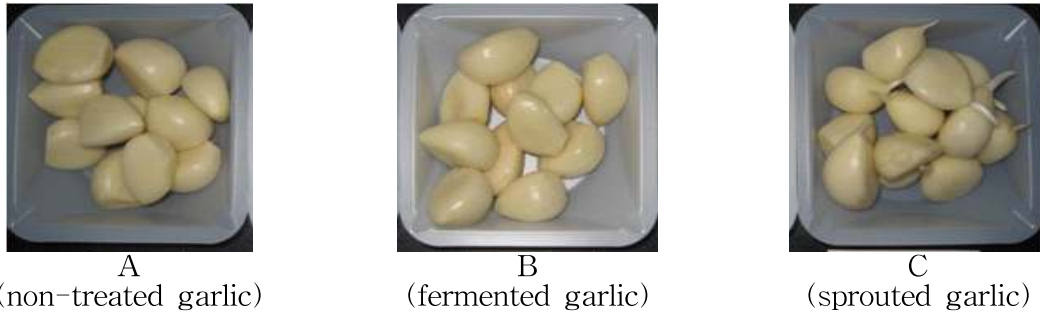


Fig. 1. Different pre-treated garlic for *Cheonggukjang*.

(4) 마늘 청국장 제조

1차 선발한 균주 9 종들 중 마늘 내성균주 선발을 위한 마늘 청국장은 팽윤된 콩 50 g씩에 다진 마늘을 0, 5, 10, 15, 20%씩 첨가하였다. 최종 선발된 3 종 균주를 사용한 청국장은 마늘 무첨가균과 10% 첨가균으로 나누어 제조하였다. 칭량된 시료를 121℃에서 30 분 살균한 다음 식힌 후 각 균주를 3%씩 접종하여 37℃에서 72 시간 배양하여 마늘 청국장을 제조하였다.

(5) 중심합성 계획법에 따른 마늘 청국장 제조

마늘 첨가량은 1~10%, 마늘 열처리 시간 0~15분, 청국장 발효는 48~72 시간 범위에서 실시한 예비실험 결과에 기초하여 반응표면분석에 적합한 범위를 설정하였다. 마늘 첨가량 및 열처리 시간과 청국장 발효시간 최적화를 위하여 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM)을 이용하였으며, 주요 독립변수 (X_i)로 고려되는 마늘 첨가량 (X_1 , 1.3-9.7%), 열처리 시간 (X_2 , 0-15.1분) 및 발효시간 (X_3 , 48.2-71.8시간)에 대한 실험범위를 설정하여 각각 5단계로 부호화하였고, 18 균으로 구분하였다. 종속변수 (Y_n)는 청국장 점질물 생성량 (Y_1), 산도 (Y_2), 아미노태 질소량 (Y_3), γ -GTP (Y_4) 및 ABTS 라디칼 소거활성 (Y_5)을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다.

나. 마늘 첨가 청국장 발효특성 조사

(1) 이취도 평가

Bacillus 균주들의 마늘함유 청국장 제조 적합성 확인을 위한 관능 평가를 위해 각각의 조건에 따라 37℃에서 72 시간 발효한 마늘 청국장 시료 flask의 면전을 열고 청국장 고유의 향 이외에 감지되는 이취 정도를 조사하여 그 강도를 (+) 부호로 표시하였다.

(2) 생균수 측정

생균수는 시료 1 g을 0.1% 펄프수를 이용하여 단계별로 희석한 희석액을 TSA 배지에 도말한 후 37℃에서 배양 후 얻은 콜로니 수에 희석배수를 곱해서 얻었다.

(3) 점질물 생성량 측정

청국장 시료에 동량의 증류수를 가하여 30 분간 진탕한 후 여과한 다음 3,000 rpm에서 15 분 원심분리하여 얻은 상등액 5 mL을 105℃에서 건조시켜 그 무게를 측정하여 시료에 대한 건물량(%)으로 나타내었다.

(4) 산도 측정

산도는 청국장 5 g에 증류수 50 mL를 가하여 30 분간 교반한 다음 여과지로 여과한 여액 20 mL를 pH 8.4가 될 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 시료 100 mL에 함유되어 있는 젖산 함량으로 환산하여 표시하였다.

(5) 아미노태 질소량 측정

아미노태 질소량은 formol 적정법에 준하였다. 시료 5 g에 증류수를 가하여 50 mL로 정용한 다음 30 분간 진탕한 후 여과지로 여과한 여액 20 mL에 0.1 N NaOH 용액을 가해 pH 8.4로 조정하여 포르말린 용액 20 mL를 가하였다. pH가 산성화 되면 다시 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4까지 적정하여 소비된 NaOH 양으로부터 아미노태 질소 함량을 구하였다.

(6) γ -GTP (γ -Glutamyltranspeptidase) 활성

청국장 5 g에 증류수를 가하여 20 mL로 만든 후 진탕 혼합하여 3000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 얻은 상정액을 효소액으로 하여 γ -GTP (AM158-K, Asan Pharmaceutical) 측정용 시판 kit를 이용해 5-aminolicylic acid 법으로 측정한 다음 mU/mL 단위로 나타내었다.

(7) 총 phenolics 함량

총 phenolics 함량은 Folin-Denis법 (Singleton VL와 Rossi JA, 1965)으로 측정하였다. 100 배 희석한 추출물 500 μ L를 시험관에 분주한 다음 25% Na₂CO₃ 용액 500 μ L를 첨가하여 3 분간 상온에 정치시킨 후, 2 N Folin-Ciocalteu phenol 시약 250 μ L 첨가하여 혼합한 다음 상온에서 1 시간 발색시켰다. 발색된 청색을 분광광도계를 이용하여 흡광도 (750 nm)를 측정하였다. 총 phenolics 함량은 100, 250, 500, 750, 1000 mg/L의 6개 gallic acid 표준 용액을 이용하여 얻은 표준곡선으로부터 구하였고 mg/g으로 표시하였다.

(8) 총 flavonoids 함량

총 flavonoids 함량은 10 배 희석한 추출물 100 μ L를 시험관에 분주하고 diethylene glycol 2 mL, 1 N NaOH 20 μ L를 가한 다음 37°C 1시간 발색시킨 후 분광광도계를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoids 함량은 rutin를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였고 mg/g으로 표시하였다(Jia 등 1999).

(9) DPPH 라디칼 소거 활성

추출물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma D9132, FW 393.4, C₁₈H₁₂N₅O₆) 라디칼 소거활성은 Blois의 방법 (Blois, 1954)을 약간 변형하여 측정하였다. 1.5 \times 10⁻⁴ M 용액 800 μ L과 10-500 μ g/mL 농도의 추출물 200 μ L를 가하여 10 초간 vortex 후 실온에서 30 분 둔 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구는 시료 대신 에탄올 200 μ L를 사용하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 실험구와 음성 대조구의 흡광도를 구하여 백분율(%)로 표시하였다.

(10) ABTs 라디칼 소거활성

7 mM ABTs (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Sigma) 용액과 2.45 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈, Sigma)을 1:1 (v/v)로 섞고, 실온의 암실에서 12-16 시간 반응시켰다. ABTs는 734 nm에서 흡광도가 0.7 \pm 0.02가 되게 에탄올로 희석하여 사용하였다. 에탄올로 희석된 ABTs 용액 900 μ L과 추출물 100 μ L를 섞고, 정확히 3 분 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구는 시료 대신에 에탄올 100 μ L를 사용하였다. ABTs 라디칼 소거활성은 실험구와 음성 대조구의 흡광도를 구하여 백분율(%)로 표시하였다 (Choi JS 등 2012).

(11) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay

FRAP 분석은 Choi 등 (2012)의 방법을 응용하여 수행하였다. 30 mM sodium acetate buffer

(pH 3.6)와 40 mM HCl로 용해시킨 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl -s-triazine, C₁₈H₁₂N₆, Sigma) 용액 그리고 20 mM FeCl₃ 용액을 사용하였다. Sodium acetate buffer, TPTZ 용액 및 FeCl₃ 용액을 10:1:1 (v/v/v) 비율로 혼합하여 37°C 15 분 반응시켜 FRAP 시약을 준비하였다. FRAP 시약 1.5 mL를 추출물 50 µL에 혼합하여 37°C 15 분 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구로 에탄올 50 µL를 사용하였다. FRAP 활성은 흡광도 값으로 표시하였다.

(12) 통계처리

모든 실험은 4 회 반복하였으며 결과는 SAS package 9.1을 사용하여 분석하였다. 결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 시행하였다.

반응표면분석 실험은 중심합성계획 (central composite design)에 따라 분석하였으며, 분석결과 정상점이 안정점일 경우에는 능선분석 (ridge analysis)을 통하여 원래 설정된 실험영역보다 좁아진 제한된 실험영역에서 원하는 최대값 및 최소값을 구하였다.

1-2. 연구수행 방법 (남해마늘연구소 2차 년도)

가. 된장 시료 제조

(1) 된장 재료

대두는 경남 함양농협에서 판매하는 태광품종, 마늘은 경남 남해산 생마늘을 소금은 신안에서 생산된 천일염을 구입하였다. 소맥곡자 (wheat koji)는 몽고간장에서 분양받아 사용하였다.

(2) 마늘 첨가량을 달리한 마늘 된장 제조

마늘을 첨가하지 않은 대조군은 불린 콩 2,000 g, Koji 1,080 g, 청국장 300 g, 효모 120 g, 식염 500 g 및 물 1,000 g을 혼합하여 제조하였다. 마늘 첨가군은 시료 총량에 대하여 10, 20, 30%에 해당하는 마늘을 각각 첨가하여 제조하였다. 종균으로 첨가한 청국장은 상온에서 12 시간 물에 불린 콩을 121°C 30 분간 증자한 다음 *Bacillus amyloliquefaciens* MJ1-4와 EMD17 균주를 각각 3%씩 접종한 후 37°C에서 72 시간 배양하여 제조하였다. 곰팡이는 재래된장에서 분리한 *Rhizopus oryzae*를 YPD 배지(Difco, USA)에 접종한 후 30°C 48 시간 진탕배양하여 준비하였다. 된장 제조용 콩도 세척해 12 시간 수침 후, 121°C, 40 분 증자하였다. 준비한 재료를 비율대로 혼합하여 상온에서 6 주간 발효시키면서, 1 주일 간격으로 시료를 채취하여 실험에 사용하였다 (Fig. 2).

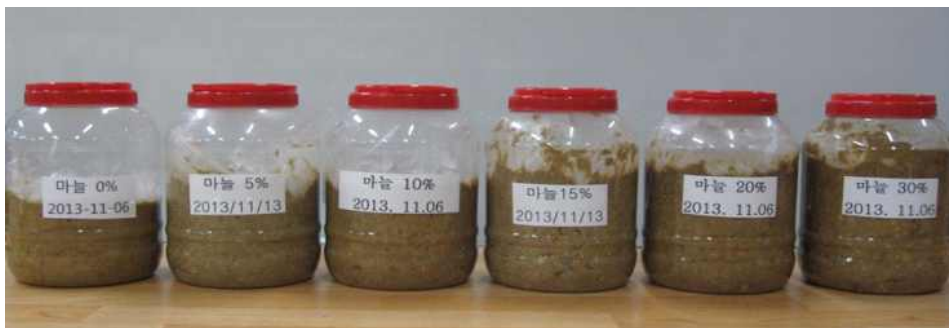


Fig. 2. Doenjang prepared with different amount of garlic.

(3) 식염 농도를 달리한 마늘 된장의 제조

식염 농도를 달리한 된장 제조를 위한 재료의 혼합 비율은 Table 1과 같다. 된장에 첨가된 청국장과 곰팡이는 위와 동일한 방법들로 얻었다. 준비한 재료들을 비율대로 혼합하여 상온에서 42 일간 발효시키면서, 7 일 간격으로 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

Table 1. The mixing ratio of raw ingredients for garlic *Doenjang* with low salt concentration.

Materials	Salt content (% for <i>Doenjang</i>)			
	6	8	10	12
Soybean	2,000	2,000	2,000	2,000
Wheat koji	1,080	1,080	1,080	1,080
<i>Cheonggukjang</i> ¹⁾	300	300	300	300
Fungus ²⁾	120	120	120	120
Salt	300	400	500	600
Water	1,000	1,000	1,000	1,000
Garlic	500	500	500	500
Total	5,300	5,400	5,500	5,600

¹⁾*Cheonggukjang* : fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* MJ1-4 and EMD17.

²⁾fungus : YPD broth of *Rhizopus oryzae* grown well isolated from *Doenjang*.

(4) 전처리 방법을 달리한 마늘 첨가 된장의 제조

첨가한 마늘 형태 (생, 발아, 발효 및 증숙마늘)를 달리한 된장 제조 방법은 상기 기술된 방법과 동일하며 마늘을 첨가하지 않은 것이 대조군이다. 생마늘은 깬 마늘을 분쇄하여 첨가하였고, 발아마늘은 생마늘을 35℃에서 수분을 공급하면서 보관하여 마늘 톨 길이의 2 배 만큼 발아시킨 것을 사용하였다. 발효마늘은 3% glucose와 3% NaCl을 함유한 물에 마늘을 잠기도록 한 후 *L. plantarum*을 접종하여 37℃ 15 일 발효하여 얻었다. 증숙마늘은 100℃ 10 분 쪄 것을 분쇄하여 사용하였다. 참여기업 (몽고식품)의 제조법에 의해 Table 2 배합비에 따라 마늘된장을 제조하였고 이후 총 6 주 발효하면서 일주일 간격으로 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

Table 2. The mixing ratio of raw ingredients for garlic *Doenjang* with differently pretreated garlic.

Materials	pretreated garlic				
	Control	Fresh garlic	Sprouted garlic	Fermented garlic	Steamed garlic
Swelling soybean	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Wheat koji	1,080	1,080	1,080	1,080	1,080
<i>Cheonggukjang</i> ¹⁾	300	300	300	300	300
Fungus ²⁾	120	120	120	120	120
Salt	500	500	500	500	500
Water	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Garlic	0	500	500	500	500
Total	5,000	5,500	5,500	5,500	5,500

¹⁾*Cheonggukjang* : fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* MJ1-4 and EMD17

²⁾Fungus : YPD broth of *Rhizopus oryzae* grown well isolated from *Doenjang*.

(5) 발효 균주별 마늘 된장의 제조

된장 제조를 위해 공시균주인 *Asp. oryzae*와 *Bacillus subtilis* (natto) 및 본 연구팀이 분리한 *Rhi. oryzae*와 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4 및 EMD17 균주를 사용하여 비교하였다. 즉, 상기 기술된 바와 동일하게 소맥 koji 제조 시 *Asp. oryzae* 및 *Rhi. oryzae* 균주를 사용하여 제조하였으며, 대두 koji (청국장)는 *Bacillus natto*와 MJ1-4 및 EMD17 균주를 이용하여 제조하였다. 참여기업인 몽고식품의 제조법에 준하여 Table 3 배합비에 따라 마늘된장을 제조하였다. 이후 총 6 주 발효하였으며 1 주 간격으로 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

Table 3. The mixing ratio of raw ingredients for garlic *Doenjang* with different microorganisms. (g)

Materials	Strains used	
	<i>Asp. oryzae</i> with <i>Bacillus natto</i>	<i>Rhi. oryzae</i> with MJ1-4 and EMD17
Steam soybean	2,000	2,000
Wheat koji	1,080	1,080
Soybean koji	300	300
Fungus	120	120
Salt	500	500
Water	1000	1,000
Garlic	500	500
Totals	5,000	5,000

포장용기에 따른 품질 변화를 확인하고자 발효가 완료된 된장을 500 g씩 취하여 진공포장과 시판 유통 중인 포장 형태인 향아리형 플라스틱 용기에 각각 담아 30°C 항온기에 4 주간 보관하면서 2 주와 4 주에 색도 및 미생물 변화를 분석하였다.

(6) Pilot 규모 마늘 된장 제조

5 kg 규모에서 설정된 된장의 제조 조건이 100 kg 규모 pilot에서의 적용 정도를 확인하고자 증자대두 40 kg, 소맥곡자 21.6 kg, 대두곡자 6 kg, 생마늘 10% (10 kg), 곰팡이 2.4 kg, 염도 15%인 염수 20 kg을 혼합하여 된장을 제조하였다. 담금 후 상온에서 20 일간 발효시키면서 5 일 간격으로 시료를 취하여 품질특성을 분석하였다.

나. 마늘 첨가 된장 발효 특성조사

(1) 색도 측정

된장을 60 mm petri dish에 빈 공간이 없도록 담아 색차계 (Ultra Scan VIS, Hunter Lab, USA)로 측정된 후 Hunter scale에 의해 L (lightness), a (redness), b (yellow) 값으로 표시하였다. 각 실험군별로 5 개씩 시료를 측정된 후 평균±편차값으로 나타내었다. 사용한 표준백판의 L, a 및 b 값을 각각 99.40, -0.13 및 +0.04로 보정하여 측정하였다.

(2) 염도 측정

시료 5 g을 칭량하여 증류수 50 mL에 희석한 후 침출시킨 다음 여과지 Advantec No. 2 (Tokyo, Japan)로 여과하여 얻은 여액을 측정하였다. Saltneter (Atago ES-421, Atago Co., Japan)로 3 회 반복 측정된 값에 희석 배수를 곱하여 평균값으로 표시하였다.

(3) pH 및 적정 산도 측정

시료의 pH와 적정산도는 G20 compact titrator (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)를

이용하여 측정하였다. 시료 5 g을 취해 증류수 50 mL를 가한 후 균질화하여 여과한 여액의 pH를 측정하고 적정산도는 시료액을 0.1 N NaOH 용액으로 pH가 8.4가 될 때까지 적정하고 초산 양으로 환산하여 나타내었다.

(4) 환원당 함량 측정

환원당 함량은 dinitrosalicylic acid (DNS)법 (Lee GY 등 1997)에 따라 측정하였다. 시료 5 g에 증류수 50 mL를 가하여 진탕 혼합한 후 여과지로 여과한 여액을 20 배 희석하여 시료액으로 하였다. 희석액 2 mL와 DNS 시약 6 mL를 혼합하여 100°C에서 5 분 중탕한 것을 식힌 후 550 nm 흡광도를 측정하였다. 포도당을 표준물질로 작성한 검량곡선으로부터 환원당 함량 (g/100 g)을 계산하였다.

(5) 아미노태 질소 함량의 측정

1차년도 실험방법 나-(5)와 동일하게 실험하였다.

(6) 마늘 형태를 달리하여 첨가한 된장의 유리 아미노산 분석

수분을 제거한 시료 각 100 mg에 증류수 5 mL 가하여 60°C heating block에서 1시간 분해한 다음 10% 5-sulfosalicylic acid dihydrate 1 mL를 가해 4°C에서 단백질을 응고시킨 후 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 15 min) 하였다. 침전한 단백질을 제외한 상등액을 모아 0.45 µm membrane filter로 여과하여 농축한 다음 pH 2.2 lithium citrate 완충액을 가해 2 mL로 정용한 후 0.45 µm membrane filter에 여과하여 아미노산 자동분석기(Biochrom 30+, Biochrom, Egland)로 분석하였다.

(7) 이소플라본 정량

이소플라본 정량은 Cho KM 등 (2011) 방법에 준하여 HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Co., Santa Clara, California, USA)로 분석하였다. Lichrophore 100 RP C18 column (4.6×250 mm, 5 µm, Merck, Germany)을 사용하였고, 이동상 용매는 0.1% glacial acetic acid (solution A)와 100% acetonitrile (solution B)을 solution B 기준으로 각각 20, 10, 10 및 10 분 동안 각각 10%, 20%, 25% 및 35%로 유지시켰다. 시료는 20 µL를 주입하였고 이동상 속도는 30°C에서 1 mL/min로 유지하였다. 이소플라본은 254 nm에서 diode array UV detector (Agilent 1200 series, Agilent Co.)로 분석하였다. 검출된 이소플라본은 aglycone인 daidzein, genistein, glycitein (Sigma-Aldrich)과 glycoside인 genistin, daidzin 및 glycitin (Indofine, Hillsborough, NJ, USA) 및 LC Laboratories사 (Woburn, MA, USA)에서 구입한 3 종의 malonylglycoside (malonylgenistin, malonyldaidzin 및 malonylglycitin)와 3 종의 acetylglycoside (acetylgenistin, acetyldaidzin 및 acetylglycitin)을 표준품으로 하여 각각을 시료와 동일한 조건에서 분석하여 머무름 시간 비교를 통해 확인하였고 표준품의 검량곡선으로부터 정량하였다.

(8) 생균수 측정

1차년도 실험방법 나-(2)와 동일하게 실험하였다.

(9) 통계 처리

측정값은 각 분석항목에 대하여 3 회 반복 측정하였으며, SPSS (statistical package for social science) 통계 package를 이용하여 ANOVA 분석 (Duncan's multiple range test)으로 시행하였다 (p<0.05).

1-3. 연구수행 방법 (남해마늘연구소, 3차 년도)

가. 흑마늘 첨가 간장 제조

(1) 조건별 흑마늘 첨가 간장의 제조

(가) 흑마늘 추출물 첨가량을 달리한 모로미 간장의 재료 및 제조방법

간장 제조에 사용한 몽고 모로미 간장은 몽고식품에서 제공받았으며, 흑마늘 추출물 (65 brix)은 (재)남해마늘연구소에서 제조하여 사용하였다. Table 4의 비율표를 따라 총 3 L 기준으로 흑마늘 추출물을 각각 0, 0.5, 1, 2 및 4% 첨가하여 모로미 간장을 제조하였다. 제조한 날을 기준으로 총 180 일 발효하였으며 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 및 180 일에 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

Table 4. Mixing ratio of moromi *Ganjang* and black garlic extracts (BGE)

Materials	Concentrations of black garlic extract (%)				
	0	0.5	1	2	4
Black garlic extracts	0	15	30	60	120
Monggo moromi	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000

(나) 흑마늘 추출물 첨가량을 달리한 콩알메주 간장 제조

청국장과 콩·소맥 코오지 제조 방법은 다음과 같다. 증자한 콩에 복합균주 (EMD17/MJ1-4 균주, 9.12 log cfu/mL)를 콩 중량대비 2.5% (w/w) 접종하고 37°C에서 72 시간 발효하여 생청국장을 제조한 후 55°C에서 2 일간 건조하여 콩알 메주를 제조하였다. 콩·소맥 코오지는 증자한 콩과 밀에 *Rhizopus oryzae*를 접종하여 25°C에서 5 일 발효 후 55°C에서 2 일간 건조하여 제조하였다. Table 5의 비율에 따라 염수 대비 흑마늘 추출물을 각각 0, 0.5, 1, 2 및 4% 첨가하여 콩알메주 간장을 제조하였다. 제조한 날을 기준으로 20°C에서 120 일 발효하면서 이화학적 특성과 생균수를 측정하였다.

Table 5. Mixing ratio of soybean meju *Ganjang* with different concentrations of black garlic extracts (BGE).

Materials	Concentrations of BGE (%)				
	0	0.5	1	2	4
Soybean/Wheat koji (kg)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
<i>Cheonggukjang</i> koji (kg)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Fungus (g)	100	100	100	100	100
Black garlic extracts (g)	0	20	40	80	160
15% salt water (mL)	4000	3980	3960	3920	3840

(다) 염 농도별 흑마늘 추출물 첨가 콩알메주 간장의 제조

앞서 기술한 대로 콩을 세척, 수침, 증자한 다음 복합균주 (EMD17/MJ1-4 균주, 9.12 log cfu/mL)를 콩 중량 대비 2.5% (w/w) 접종하고 37°C에서 72 시간 발효하여 생청국장을 제조한 후 55°C에서 2 일간 건조하여 콩알 메주를 얻었다. 콩·소맥 코오지는 증자한 콩과 밀에 *Rhizopus oryzae*를 접종하여 25°C 5 일 발효 후 55°C에서 2 일 건조하여 제조하였다 (Table 6). 염수 대비 흑마늘 추출물은 선행 연구 결과와 상업성을 고려하여 2% 첨가하였으며, Table 6의 비율표를 따라 콩알메주 간장을 제조하였다. 제조한 날을 기준으로 20°C에서 120 일 동안 발효하면서 이화학적 특성과 생균수를 측정하였다.

Table 6. Mixing ratio of black garlic extracts (BGE) added *Ganjang* by different salt concentration

Materials	Salt Concentration (%)		
	12	15	18
Soybean/Wheat koji (kg)	0.75	0.75	0.75
<i>Cheonggukjang</i> koji (kg)	0.25	0.25	0.25
Fungus (g)	75	75	75
Black garlic extracts (g)	60	60	60
Brine (mL)	2940	2940	2940

(라) 발효 균주별 흑마늘 간장 제조

콩/소맥 코오지를 만들 때 흔히 사용되는 *Aspergillus oryzae*와 본 실험에 사용된 *Rhizopus oryzae* 균주를 각각 이용하여 간장을 제조하여 품질을 비교하였다. 이전 연구 결과를 통해 확립된 배합표에 따라 흑마늘 간장을 제조한 후 (Table 7) 20°C에서 120일간 발효를 진행하면서 이화학적 특성을 비교 분석하였다.

Table 7. Mixing ratio of black garlic extracts (BGE) added *Ganjang* using different microorganisms.

Materials	Strains for fermentation	
	<i>Asp. oryzae</i>	<i>Rhi. oryzae</i>
Soybean/Wheat koji (kg)	0.56	0.56
<i>Cheonggukjang</i> koji (kg)	0.18	0.18
Fungus (g)	75	75
Black garlic extracts (g)	60	60
15% Brine (mL)	2940	2940

(2) 흑마늘 추출액 첨가량과 농도 최적화를 위한 간장의 제조

흑마늘 추출액이 첨가된 간장 제조시 산업적 생산공정 및 비용을 고려하여 기 발효된 생간장과 흑마늘 추출액을 혼합하여 단기간 발효하는 방법을 고려하였으며, 이를 위한 흑마늘 추출액의 첨가량과 농도 최적화를 위하여 반응표면 분석법에 따라 시료를 제조하였다.

실험에 사용된 간장은 (주)몽고식품 (Changwon, Korea)에서 발효 완료된 생간장을 제공받아 사용하였으며, 흑마늘 추출액은 남해마늘연구소가 보유한 흑마늘 및 흑마늘 추출물의 제조방법 특허 (제 10-1236251호)에 따라 제조된 것을 사용하였다. 전처리한 통마늘을 55-90°C의 범위에서 발효 단계별로 온도 및 시간을 조절하면서 15일 이상 발효시켜 제조한 흑마늘에 10배의 물을 가하여 추출기 (COSMOS 660, Kyungseo Machine Co., Incheon, Korea)에서 85-100°C에서 6시간 추출한 다음 여과하여 60 brix로 농축한 것을 사용하였다. 흑마늘 농축액은 정제 식음수를 가해 각각의 실험 조건에 따라 농도를 조절하여 간장과 혼합하였다.

흑마늘 추출액의 첨가 농도는 0.5-30 brix, 첨가량은 0.1-10% 범위에서 실시한 예비실험 결과에 기초하여 반응표면분석에 적합한 범위를 설정하였다. 흑마늘 첨가 농도 및 양의 최적화를 위하여 반응표면분석법을 이용하였으며, 주요 독립변수 (X_i)로 고려되는 흑마늘 추출액의 농도 (X_1 , 9-26.7 brix), 흑마늘 추출액의 첨가량 (X_2 , 1.6-9.5%)에 대한 실험범위를 설정하여 각각 5단계로 부호화하였고, 12군으로 구분하였다 (Table 2). 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수 (Y_n)는 염도 (Y_1), 환원당 (Y_2), 총 페놀화합물의 함량 (Y_3) 및 ABTS 라디칼 소거능 (Y_4)을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다.

(3) 흑마늘 추출액 첨가 저염 간장의 품질특성 비교를 위한 간장의 제조

(가) 흑마늘 추출액 첨가 저염 간장의 제조

염도 15%의 간장을 대조군 (C-15)으로 하고, 저염간장 대조군은 염도 12%로 조정된 것 (C-12)을 사용하였다. 흑마늘 추출액이 첨가된 저염간장은 염도 12% 간장에 65 brix의 흑마늘 추출액을 각각 0.3% (E-12-0.3), 0.5% (E-12-0.3), 1.0% (E-12-1), 3.0% (E-12-3) 및 5.0 % (E-12-5) 첨가하여 제조하였다.

(나) 저염간장과 흑마늘 추출액 첨가 간장의 생리활성 비교를 위한 간장 다당체의 분리

염도 12%의 저염 대조군과 흑마늘이 5% 첨가된 저염 간장 각각 1 L에 최종농도 80%가 되도록 4 배의 에탄올을 첨가하고 하룻밤 방치한 후, 원심분리 (3,000 rpm, 30분)하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 소량의 증류수를 가하여 침전물을 재용해하고, 최종농도가 60%가 되도록 2 배의 에탄올을 첨가하여 재차 침전물을 회수하였다. 본 침전물은 증류수에 재용해한 다음 dialysis tubing cellulose membrane (MW cut off 12,000, Sigma Co., St, Louis, MO, USA)을 이용하여 2-3 일간 투석한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다.

나. 흑마늘 첨가 간장 발효 특성조사

(1) 염농도, pH 및 산도 측정

염농도는 2 차년도 실험방법 나-(2)에 따라 실시하였으며, pH와 산도는 2 차년도 실험방법 나-(3)과 동일하게 실험하였다.

(2) 조단백질, 총 질소 및 아미노태 질소의 함량

총 질소 함량은 식품공전(19)에 따라 자동 단백질 분석장치 (Kjelflex K-360, PTT Chemical, Bangkok, Thailand)를 이용하여 분석하였으며 질소계수 5.71을 곱하여 조단백질 함량을 계산하였고, 아미노태질소 함량은 1차년도 실험방법 나-(5)와 동일하게 실시하였다.

(3) 환원당 측정

2차년도 실험방법 나-(4)와 동일한 방법에 따라 실험하였다.

(4) 총 페놀 및 플라보노이드 분석

총 폴리페놀 함량은 1 차년도 실험방법 나-(7)과 동일한 방법에 따라 실험하였으며, 플라보노이드 함량은 1 차년도 실험방법 나-(8)과 동일하게 실험하였다.

(5) 생균수 측정

간장의 발효 기간 동안 *Bacillus*와 효모의 생균수는 시료 10 g을 0.1% 펩톤수를 이용하여 10 배씩 희석한 후 1 차년도 실험방법 나-(2)와 동일하게 실험하였다.

(6) 유리당 함량 분석

시료를 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 HPLC-ELSD (Agilent 1260, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다. 컬럼은 COSMOSIL Sugar-D (4.6 \times 250 mm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)를 사용하였고, 이동용매는 water과 acetonitrile을 3:7로 혼합한 용액을 사용하였으며, 컬럼 온도는 30 $^{\circ}$ C를 유지하였다. 이동상 속도는 1.0 mL/min, 시료 주입량은 10 μ L, 검출기는 ELSD (Agilten LT-ELSD G4128A)를 사용하였으며, 분석 온도는 30 $^{\circ}$ C를 유지하였다. 총 3 종의 유리당 (fructose, glucosae, sucrose) 표준물질을 시료와 동일한 조건에서 분석하여 머무름 시간을 비교해 확인하였으며, 검량곡선들로부터 함량을 산출하였다.

(7) DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 1 차년도 실험방법 나-(9)와 동일하게 실험하였고, ABTS radical

을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization 방법을 수정한 1 차년도 실험방법 나-(10)에 따라 실시하였다.

(8) 통계처리

반응표면분석은 미니탭 (Minitab Release 16.0, Minitab Inc., State College, PA, USA)을 사용하여 중심합성계획 (central composite design)에 따라 분석하였으며, 분석결과 정상점이 안정점일 경우에는 SAS (version 9.3 for windows, Cary, NC, USA)를 이용하여 능선분석 (ridge analysis)을 통해 원래 설정된 실험영역보다 좁아진 제한된 실험영역에서 원하는 최대값 및 최소값을 구하였다.

2-1. 연구결과 (남해마늘연구소 1차 년도)

가. 마늘 청국장 제조조건 확인 및 품질특성

(1) 기존 청국장에서 분리한 9 종 균주들의 마늘 내성 및 관능적 특성 확인

(가) 청국장 이취도 평가

주관기관이 제공한 균주 9 종을 대상으로 마늘을 0, 5, 10, 15 및 20% 첨가한 후 각각의 균주를 접종한 다음 72 시간 발효시켜 청국장을 제조한 후 이취 정도를 관능검사를 통하여 평가한 결과는 Table 8과 같다.

Table 8. Odor level of *Cheonggukjang* with different garlic content and fermented by different strains

Strains	Garlic content	Odor level ²⁾	Strains	Garlic content	Odor level	Strains	Garlic content	Odor level
#8	con ¹⁾	-	#24	con	-	EMD17	con	-
	5%	-		5%	w		5%	w
	10%	w		10%	+		10%	w
	15%	+		15%	++		15%	+
	20%	++		20%	++		20%	++
#9	con	-	#27	con	w	HCD2	con	-
	5%	w		5%	w		5%	w
	10%	+		10%	++		10%	w
	15%	++		15%	+++		15%	+
	20%	++		20%	+++		20%	+
#10	con	-	#28	con	w	191	con	-
	5%	-		5%	+		5%	+
	10%	w		10%	+		10%	++
	15%	+		15%	+++		15%	++
	20%	+++		20%	+++		20%	+++

¹⁾con : *Cheonggukjang* without garlic

²⁾Order level : - ; has no odor, w ; weak garlic odor, + ; feeling the odor

마늘 첨가량이 많을수록 이취도는 증가하는 경향을 나타내었으며, #8, #10, EMD-17, HCD-2 균주는 다른 균주들 보다 마늘 첨가량 10%까지 이취 생성 정도가 낮았다. 비교적 이취의 생성이 낮은 4 균주 중에서 #10 균주는 마늘 첨가량이 20%로 증가할 경우 강한 이취를 형성하였다. 이취 발생 정도를 기준으로 할 때 마늘 청국장 제조에 적합한 균주는 #8, EMD-17 및 HCD-2 균주 3 종이었으며, 이들은 마늘 농도를 10% 이하로 할 때 이취 생성이 거의 없어 청

국장의 관능적 특성을 저해하지 않음을 확인하였다.

(나) 생균수

9 종 균주를 접종한 마늘 첨가량에 따른 청국장 발효기간 중 생균수 변화는 Table 9와 같다. 10% 마늘 첨가 청국장에서는 6 종이 (#8, #9, #27, #28, EMD17, HCD2) 마늘이 첨가되지 않은 청국장 (대조군)에 비해 생육 정도가 증가하였고 3 종은 (#10, #24, 191) 생육정도가 낮았다. 하지만 20% 마늘 첨가 청국장에서는 #27 균주를 제외한 나머지 균주들은 대조군에 비해 낮은 생육정도를 나타내었다.

Table 9. Viable cells of *Cheonggukjang* with different garlic content and fermented with different strains. (Log CFU/g)

Strains	Garlic content of <i>Cheonggukjang</i>		
	0%	10%	20%
#8	10.23±0.04	10.77±0.16	9.97±0.10
#9	8.13±0.07	8.34±0.08	7.83±0.18
#10	10.49±0.08	10.06±0.05	9.69±0.21
#24	10.61±0.12	10.16±0.02	10.07±0.05
#27	9.54±0.04	9.71±0.05	9.70±0.11
#28	9.79±0.03	9.88±0.08	9.49±0.04
EMD17	11.60±0.09	11.98±0.08	11.09±0.08
HCD2	9.66±0.09	10.08±0.05	9.63±0.21
191	10.38±0.02	9.71±0.03	9.47±0.07

Table 8과 9의 실험결과를 종합하여 이취도가 낮으면서 마늘 첨가 청국장에서 생육이 우수한 #8, EMD17, HCD2 균주를 선별하였다. 향후 실험은 이 3 종의 균주를 이용하여 마늘 첨가 청국장을 제조하였다.

(2) 선별한 3 종 단일균주로 제조한 마늘 청국장의 품질 특성

(가) 생균수

마늘 청국장 발효기간 중 생균수 변화는 Table 10과 같다. 청국장 발효가 진행될수록 균주의 생육은 증가되었으며, 각 균주마다 발효가 완료 되었을 때 마늘이 첨가되지 않은 청국장 (대조군)에 비해 마늘이 10% 첨가된 청국장 (G10)에서 생육정도가 더 높았다. 마늘을 10% 이하로 첨가하였을 때는 마늘의 항균활성 보다는 영양성분이 더 큰 영향을 미쳐 균주 생육에 도움을 주지만 20% 이상의 고농도로 첨가할 경우는 마늘에 함유되어 있는 allicin과 같은 항균활성 물질의 영향이 커져 미생물 생육을 억제하는 것으로 추정된다.

Table 10. Viable cells of *Cheonggukjang* with 10% garlic and fermented by 3 different strains. (Log CFU/g)

Fermentation time(h)	#8		EMD17		HCD2	
	Control ¹⁾	G10 ²⁾	Control	G10	Control	G10
0	7.19	7.11	7.37	7.52	7.03	7.02
12	8.39	7.35	8.91	8.24	8.28	7.62
24	9.07	8.31	9.35	9.21	9.01	8.2
48	9.25	9.08	9.74	9.29	9.21	8.9
72	10.59	12.52	11.75	12.09	11.42	11.79

¹⁾Control : *Cheonggukjang* without garlic

²⁾G10 : *Cheonggukjang* with 10% garlic

(나) 총 phenolics 함량

마늘 청국장 발효기간 중 총 phenolics 함량 변화는 Fig. 3과 같다. 마늘의 첨가 유무와는 관계없이 발효기간 동안 꾸준히 증가하였으며, 마늘 첨가 청국장이 대조군에 비해 비슷하거나 높은 함량을 나타내었다. 특히, #8 균주로 발효한 마늘 청국장의 총 phenolics 함량은 발효 완료 후 15.184 mg/g으로 발효 초기의 5.486 mg/g보다 약 2.8 배 더 높았으며, 동 시간대의 대조군 13.580 mg/g 보다 유의적으로 높은 함량이었다.

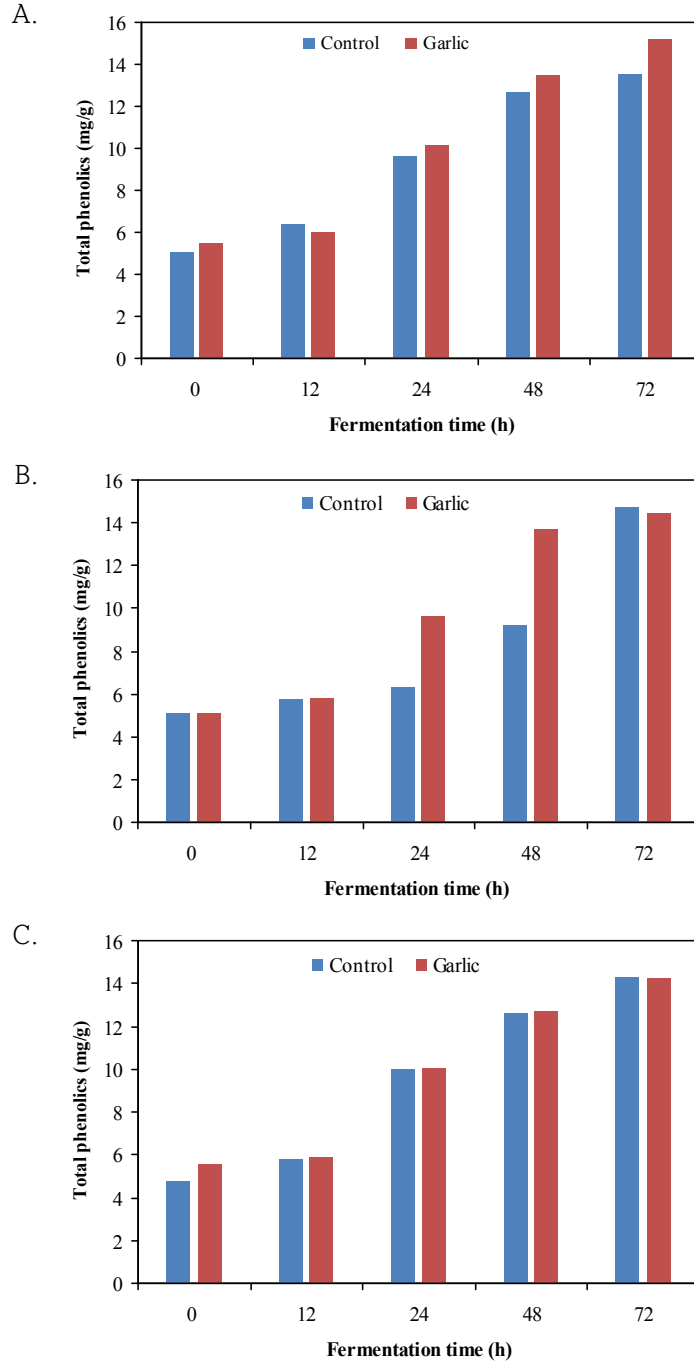


Fig. 3. Total phenolics contents of *Cheonggukjang* with 10% garlic and fermented by 3 different strains. A, fermented by #8 strain; B, fermented by EMD17 strain; C, fermented by HCD2 strain.

(다) DPPH 라디칼 소거 활성

마늘 청국장 발효기간 중 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. DPPH

라디칼 소거 활성은 총 phenolics 함량과 같이 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 나타내었다. 발효가 완료된 72 시간에 #8과, HCD2 균주로 발효한 마늘 첨가 청국장의 DPPH 라디칼 소거 활성은 각각 90.75%, 83.33%로 대조군에 비해 더 높았다.

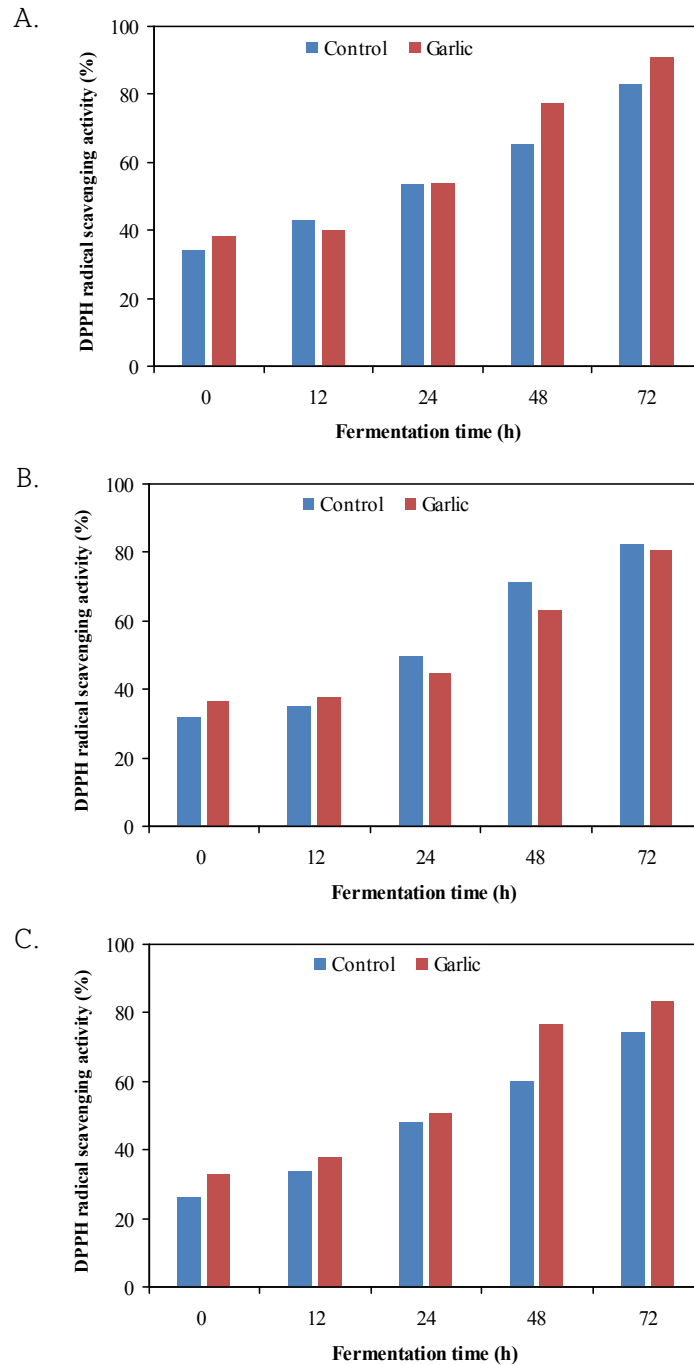


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of *Cheonggukjang* with 10% garlic and fermented by 3 different strains. A, fermented by #8 strain; B, fermented by EMD17 strain; C, fermented by HCD2 strain.

(라) ABTs 라디칼 소거 활성

발효기간 중 ABTs 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같았다. 총 phenolics 함량

및 DPPH 라디칼 소거 활성과 동일한 경향을 나타내어 발효가 진행될수록 활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 발효 중 총 phenolics 함량과 DPPH 라디칼 소거 활성은 대조군에 비해 마늘 첨가군에서 함량이나 활성이 비슷하거나 더 높았던 것에 비해 ABTs 라디칼 소거 활성은 마늘을 혼합한 청국장에서 유의적인 차이가 없었으며, 오히려, 대조군에서 활성이 더 높아 그 양상에 다소 차이가 있었다. 그러나 발효가 완료된 72 시간 후에는 대조군과 마늘 첨가군 모두 동일한 범위를 나타내었다.

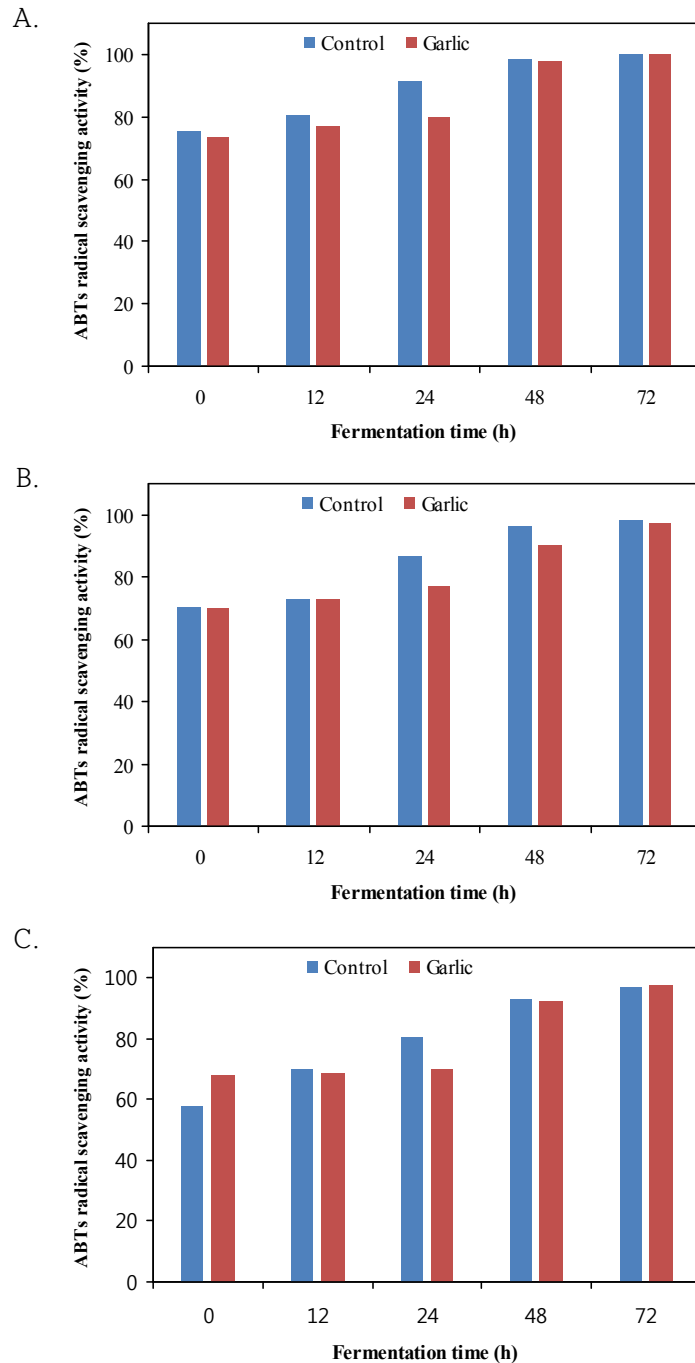


Fig. 5. ABTs radical scavenging activity of *Cheonggukjang* with 10% garlic and fermented by 3 different strains. A, fermented by #8 strain; B, fermented by EMD17 strain; C, fermented by HCD2 strain

(마) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay

마늘을 10% 첨가하여 제조한 청국장의 발효 중 FRAP를 확인하여 흡광도 값으로 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다. FRAP는 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 나타내었다. #8과 HCD2 균주를 이용한 마늘 첨가 청국장이 대조군에 비해 발효 완료 후 FRAP가 더 높았으며, 각각의 흡광도 값은 1.47과 1.39였다.

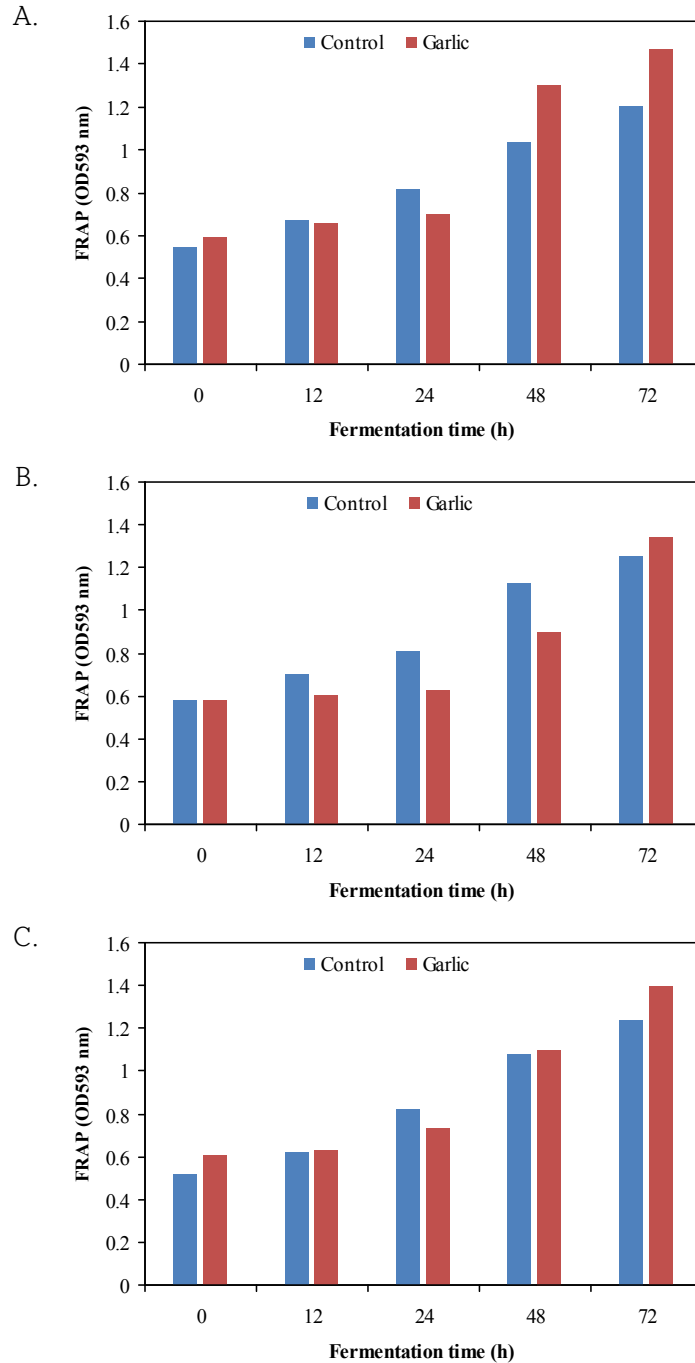


Fig. 6. FRAP of *Cheonggukjang* with 10% garlic and fermented by 3 different strains. A, fermented by #8 strain; B, fermented by EMD17 strain; C, fermented by HCD2 strain.

(3) 선발한 균주 3 종을 복합균주로 하여 제조한 마늘 청국장의 품질 특성

(가) 생균수

선발된 균주 3 종을 2 종씩 조합한 것과 3 종을 모두 혼합한 혼합균주들을 이용해 마늘 10% 첨가 청국장을 제조하고, 발효기간 중 생균수의 변화를 분석한 결과는 Table 11와 같다. 청국장 발효가 진행될수록 모든 실험군에서 혼합균주의 생육 정도는 증가되었으며, 2 종의 혼합균주 실험군들에 비해 3 종 혼합균주인 HCD2/EMD17/#8 실험군이 발효가 완료되었을 때 가장 높은 생육정도 (12.14 Log CFU/g)를 나타내었다.

Table 11. Viable cells of *Cheonggukjang* with 10% garlic and fermented by combined 2 and 3 strains. (Log CFU/g)

Fermentation time(h)	Fermentation strains			
	HCD2 / EMD17	HCD2 / #8	EMD17 / #8	HCD2/EMD17/#8
0	8.29	8.38	8.38	8.18
12	8.46	8.67	8.61	8.43
24	8.65	9.28	8.9	8.74
48	9.65	9.76	9.47	9.72
72	11.63	11.91	11.96	12.14

(나) 총 phenolics 함량

혼합균주를 이용한 10% 마늘 첨가 청국장의 발효기간 중 총 phenolics 함량 변화는 Fig. 7과 같다. 총 phenolics 함량은 단일균주와 동일하게 발효가 진행될수록 증가하였으며, 24 시간 이후에 그 함량이 급격히 증가하여 발효 48 시간에는 발효 균주에 따라 총 phenolics 함량 차이가 확연하였는데, EMD17과 #8 혼합균주와 HCD2와 EMD17 혼합균주로 발효한 마늘 청국장의 총 phenolics 함량은 13 mg/g 이상으로 HCD2와 #8 혼합균주와 3 종 혼합균주를 사용하였을 때에 비해 높은 함량이었다. 발효 72 시간 이후에는 모든 시료에서 14 mg/g 이상의 함량으로 모든 청국장은 발효 초기에 비해 발효 완료 후 총 phenolics 함량이 2.6-2.8 배 높았다.

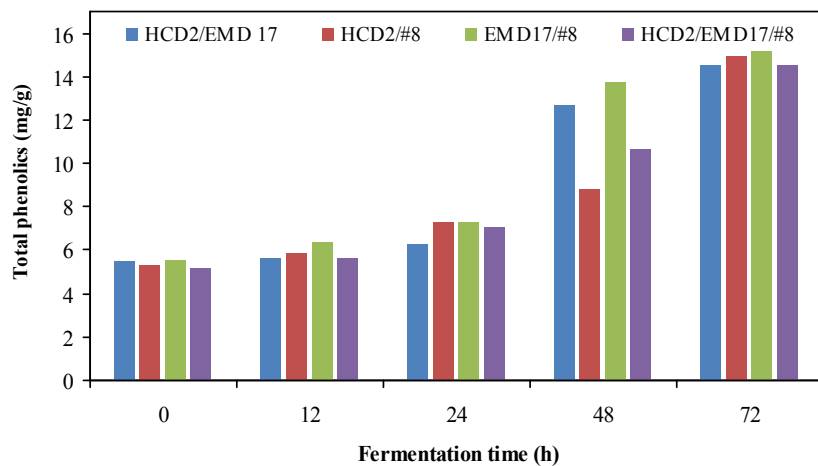


Fig. 7. Total phenolics contents of *Cheonggukjang* with 10% garlic and fermented by combined strains.

(다) DPPH 라디칼 소거 활성

혼합균주를 이용한 10% 마늘 첨가 청국장의 발효기간 중 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. 마늘 첨가 청국장 발효기간 중 DPPH 라디칼 소거 활성은 총 phenolics 함량과 같이 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 나타내었다. HCD2/#8 혼합균주를 이용한 청

국장의 활성은 78.18%로 다른 혼합균주(HCD2/EMD17, EMD17/#8, HCD2/EMD17/#8) 마늘 청국장에 비해 다소 높았다(64.14, 75.93, 75.93%).

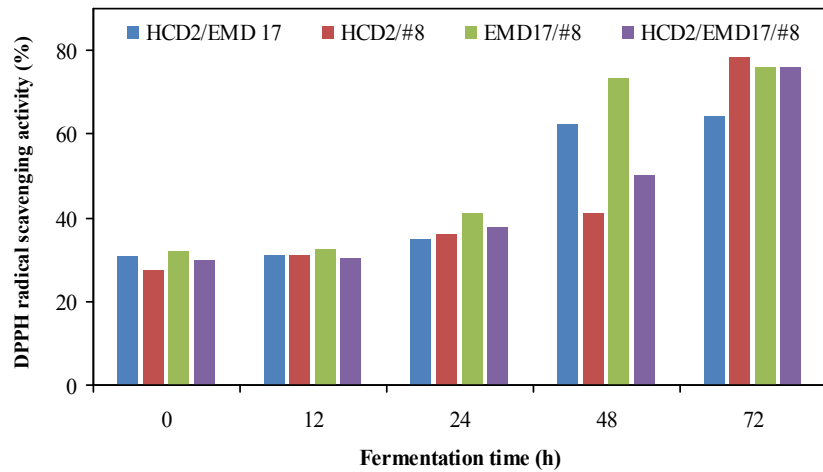


Fig. 8. DPPH radical scavenging activity of *Cheonggukjang* with 10% of garlic and fermented by mixture strains.

(라) ABTs 라디칼 소거활성

혼합균주를 이용한 10% 마늘 첨가 청국장 발효기간 중 ABTs 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 9와 같다. 발효기간 중 ABTs 라디칼 소거 활성 역시 모든 혼합균주 실험군에서 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 나타내었다. HCD2/EMD17 혼합균주 실험군이 타 실험군에 비해 발효시간대별로 높은 활성을 나타내었으며, 72 시간 발효시킨 모든 실험군들의 활성은 100%로 확인되었다.

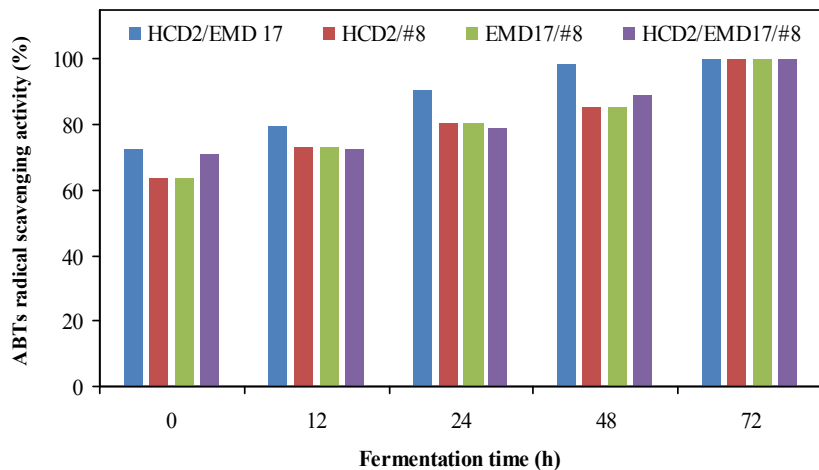


Fig. 9. ABTs radical scavenging activity of *Cheonggukjang* with 10% garlic and fermented by combined strains.

(마) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay

혼합균주를 이용한 10% 마늘 첨가 청국장 발효기간 중 FRAP를 확인한 결과는 Fig. 10과 같다. 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 나타내었고 EMD17/#8 혼합균주로 발효한 청국장은 24 시간 이하의 발효 초기에 FRAP 활성이 낮았으나 발효 48 시간에는 활성이 큰 폭으로 증가하여 시료 중 가장 활성이 높았다. 발효 72 시간 후 FRAP는 HCD2/#8 혼합균주를 이용한

청국장에서 흡광도 값 1.57로 다른 혼합균주인 HCD2/EMD17(흡광도값 1.25), EMD17/#8(흡광도값 1.43), HCD2/EMD17/#8(흡광도값 1.35) 청국장에 비해 높았다. 실험균 보다 다소 높았다.

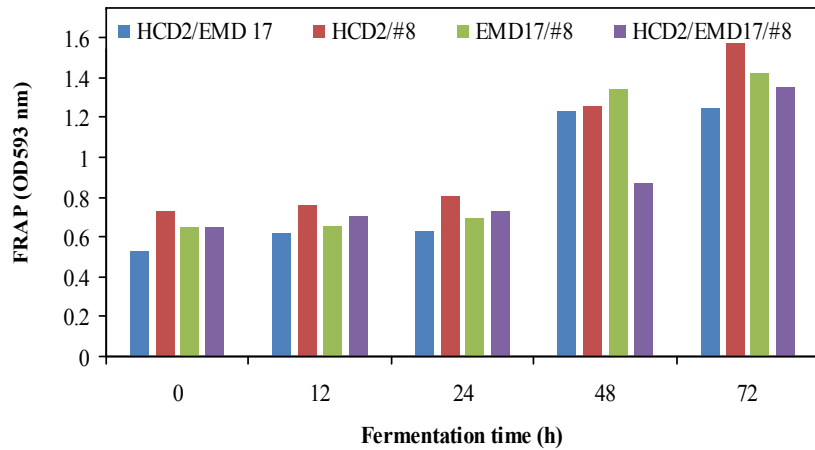


Fig. 10. FRAP of *Cheonggukjang* with 10% garlic and fermented by combined strains.

(4) 마늘의 성상에 따른 복합균주로 제조한 마늘 청국장의 품질특성

(가) 생균수

상기의 연구들을 통하여 최종 선발된 균주 3 종을 혼합한 복합균주를 이용하고, 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 발효기간 중 생균수의 변화는 Table 12와 같다. 마늘을 첨가하지 않은 청국장을 대조군으로 하여 생마늘, 발효마늘, 발아마늘을 첨가한 청국장의 생균수를 비교하였을 때, 발효가 진행될수록 생균수는 증가되었고 발효 완료 후 대조군 생균수가 마늘 첨가 청국장들에 비해 다소 높게 나타났다.

Table 12. Viable cells of *Cheonggukjang* with garlic differently pre-treated.

Fermentation time(h)	(Log CFU/g)			
	Control	garlic	Fermented garlic	Sprouted garlic
0	6.96	7.01	6.93	6.88
12	8.77	8.43	8.52	8.86
24	9.14	8.97	9.10	9.15
48	9.70	9.85	9.85	10.15
72	10.12	9.72	9.87	9.93

(나) 총 phenolics 함량

전처리 방법을 달리한 마늘을 첨가하여 제조한 청국장의 발효기간 중 총 phenolics 함량의 변화는 Fig. 11과 같다. 총 phenolics 함량은 발효 12 시간 이후부터 큰 폭으로 증가한 후 48 시간 이후부터는 큰 차이를 나타내지 않았다. 발효 완료 후 총 phenolics 함량은 대조군이 14.611 mg/g이었고, 생마늘, 발아마늘 및 발효마늘을 첨가한 청국장은 각각 13.938, 13.504, 13.561 mg/g으로 대조군에 비해서는 다소 낮았으나 이들 시료간에는 차이가 없었다. 모든 청국장 시료에서 총 phenolics 함량은 발효 초기에 비해 발효 완료 후 2.3-3.2배 증가하였다.

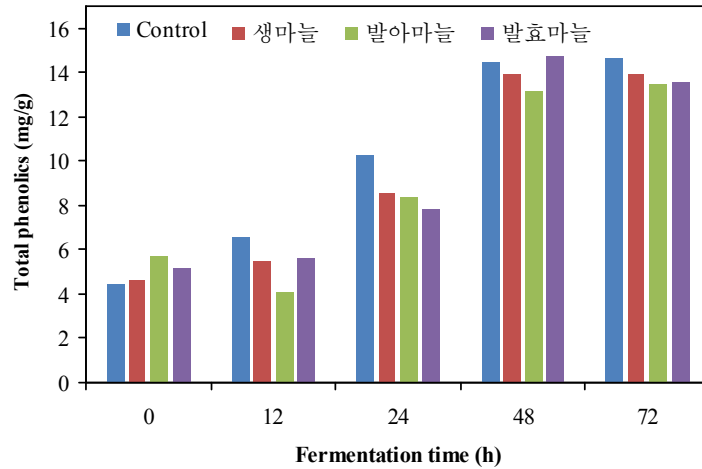


Fig. 11. Total phenolics contents of *Cheonggukjang* with garlic differently pre-treated.

(다) 총 flavonoids 함량

전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 발효기간에 따른 총 flavonoids 함량 변화를 살펴본 결과 (Fig. 12), 발효 전에는 시료간의 차이가 미미하였으나 발효 12 시간 이후부터는 발효 조건에 따라 함량 차이가 발생하였으며, 최종 72 시간 발효 후에는 대조군이 0.380 mg/g으로 가장 낮았다. 발효기간 동안 총 flavonoids 함량은 점차적으로 증가하는 경향이었으며, 발효 완료시 생마늘, 발아마늘, 발효마늘을 첨가한 청국장은 각각 0.427, 0.465, 0.469 mg/g으로 정량되었다.

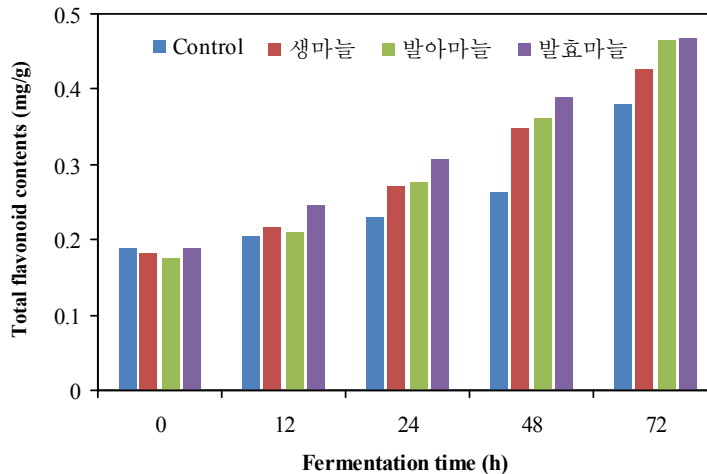


Fig. 12. Total flavonoids contents of *Cheonggukjang* with garlic differently pre-treated.

(라) DPPH 라디칼 소거 활성

전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 발효기간에 따른 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 13과 같이 발효 완료시 대조군 (86.08%)에 비해 마늘 첨가 청국장의 활성이 높았다. 발효기간 동안 DPPH 라디칼 소거 활성은 점차 증가하여 발효 완료시 생마늘을 첨가한 청국장의 DPPH 라디칼 소거 활성은 89.18%, 발아마늘 첨가군은 90.73% 였으며, 발효마늘 첨가 청국장은 89.47%로 대조군에 비해 더 활성이 높았다.

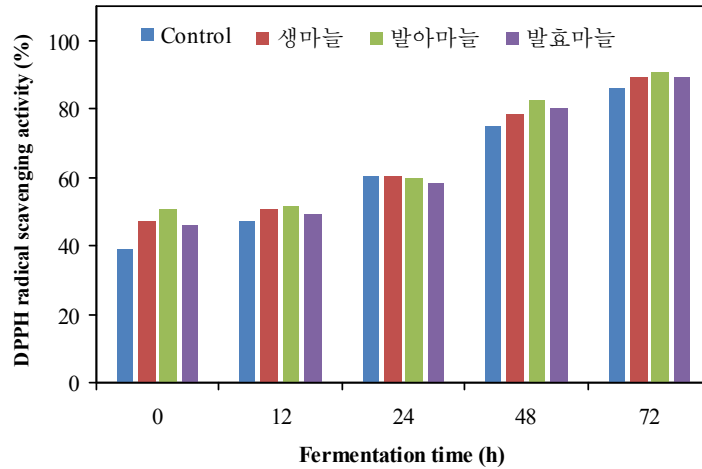


Fig. 13. DPPH radical scavenging activity of *Cheonggukjang* with garlic by different pre-treatment.

(마) ABTs 라디칼 소거활성

전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 발효기간에 따른 ABTs 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 14와 같다. ABTs 라디칼 소거 활성은 대조군과 실험군 모두 발효기간이 경과됨에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 발효 완료시 대조군 (90.44%)에 비해 마늘 첨가 청국장의 소거 활성이 다소 높았다. 발효 완료시 생마늘, 발아마늘, 발효마늘을 각각 첨가한 청국장의 ABTs 라디칼 소거 활성은 91.54, 92.96, 94.77%로 대조군에 비해서 다소 높았으나 시료간에 차이는 미미하였다.

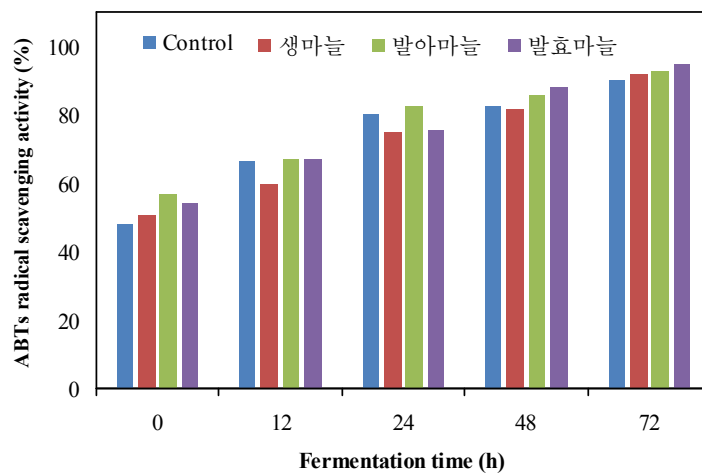


Fig. 14. ABTs radical scavenging activity of *Cheonggukjang* with garlic differently pre-treated.

(바) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay

전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 발효기간에 따른 FRAP assay를 확인한 결과는 Fig. 15와 같다. FRAP는 대조군과 실험군 모두 발효기간이 경과됨에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며, 발효 24 시간 이후에 더 큰 폭으로 증가함을 확인할 수 있었다. 발효가 완료된 72 시간에 FRAP는 생마늘 첨가 청국장이 1.546, 발효마늘 첨가 청국장에서 1.539, 발아마늘 첨가 청국장에서 1.502로 마늘 첨가군간에는 유의적인 활성의 차이가 없었으나 대조군 (흡광도 1.319)에 비해서는 활성이 높았다.

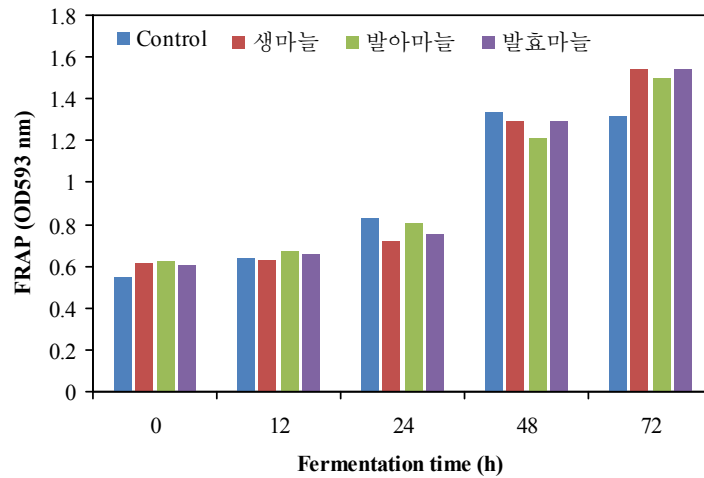


Fig. 15. FRAP of *Cheonggukjang* with garlic differently pre-treated.

(5) 마늘 첨가량, 첨가형태, 가열시간, 청국장 발효시간 최적화를 위한 중심합성 계획법에 따른 청국장 제조 및 특성실험

(가) 점질물 생성량

중심합성계획에 의한 18 구간의 마늘 첨가조건에 따른 청국장의 점질물 생성량을 측정한 결과는 Table 13과 같으며, Table 14에서와 같은 반응표면 회귀식을 얻었다. 점질물의 생성량은 마늘 첨가량, 마늘 열처리 및 청국장 발효시간에 따라 4.85~14.27% 범위로 8%, 3분, 53시간 (Exp. 6) 발효조건에서 가장 높았다. 회귀식의 유의성은 결정계수 (R^2)가 62.33%로 비교적 높게 나타났으며, 분산분석 결과 유의확률이 0.0001로 모형이 적합하다고 판단할 수 있다. 반응표면의 정상점은 최대점이며, 이 때 마늘 첨가량, 마늘 열처리 및 청국장 발효시간은 각각 6.53%, 6.81 분, 55.18 시간이었고 이 조건에서 점질물 최대값은 13.02%로 예상되었다(Fig. 16).

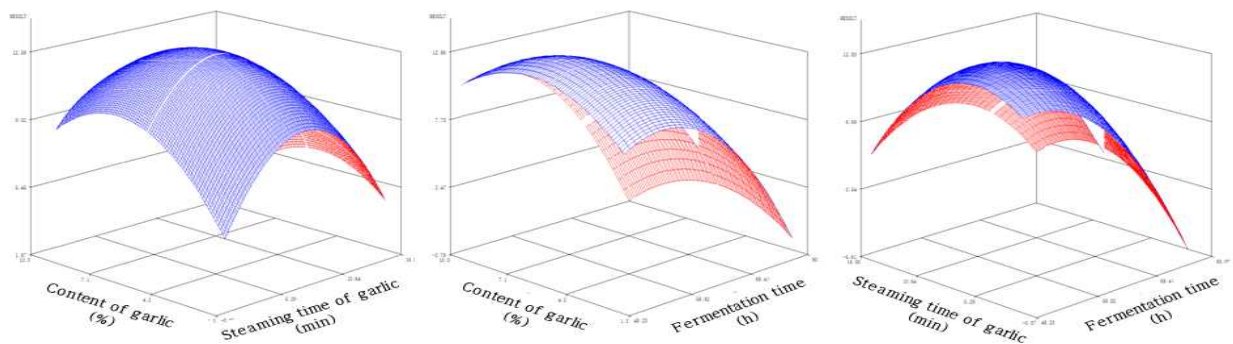


Fig. 16. Response surface plot for viscous substance content of *Cheonggukjang* with garlic.

청국장의 점질물은 발효과정 중 fructose와 glutamic acid가 중합된 levan from fructan과 polyglutamate의 혼합 물질이라고 보고되어 있으며 (Lee 등, 1992), Choi 등 (1999)은 일반적인 청국장에는 2.15~6.03%의 점질물이 함유되어 있다고 보고하였는데, 본 연구의 마늘 첨가 청국장은 일반 청국장보다 점질물 함량이 더 높은 것으로 나타났다.

Table 13. Experimental data on viscous substance, acidity, amino type nitrogen, γ -GTP activity and ABTS scavenging radical activity of *Cheonggukjang* prepared with garlic by response surface methodology analysis

Exp. No ¹⁾	Conditions			Experimental items				
	Content of garlic(%)	Steaming time of garlic(min)	Fermentation time(h)	Viscous substance (%)	Acidity (%)	Amino type nitrogen (mg %), Y ₃	γ -GTP activity (mU/mL)	ABTS radical activity (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂		Y ₄	Y ₅
1	3.0(-1)	3.0(-1)	53(-1)	8.52±0.01 ^{BC}	0.73±0.01 ^{DE}	80.58±0.71 ^A	18.05±0.84 ^{AB}	66.18±0.15 ^{EF}
2	3.0(-1)	3.0(-1)	67(1)	4.85±0.06 ^A	0.73±0.06 ^{DE}	89.44±1.77 ^B	14.55±1.15 ^{AB}	68.66±1.11 ^G
3	3.0(-1)	12.0(1)	67(1)	6.69±0.06 ^{AB}	0.77±0.06 ^{EF}	89.91±7.54 ^B	13.44±0.84 ^{AB}	71.82±0.64 ^H
4	3.0(-1)	12.0(1)	53(-1)	11.17±0.05 ^{DEF}	0.41±0.05 ^A	103.29±1.89 ^{CD}	361.14±12.87 ^F	70.63±1.06 ^H
5	8.0(1)	3.0(-1)	67(1)	5.41±0.02 ^A	0.73±0.02 ^{DE}	97.84±0.71 ^{BC}	14.92±0.96 ^{AB}	62.50±0.43 ^{DE}
6	8.0(1)	3.0(-1)	53(-1)	14.27±0.08 ^G	0.45±0.08 ^A	90.22±7.13 ^B	426.89±14.95 ^H	58.90±0.67 ^B
7	8.0(1)	12.0(1)	67(1)	9.35±0.03 ^{CD}	0.99±0.03 ^G	114.96±8.47 ^E	31.68±4.70 ^B	56.51±0.40 ^A
8	8.0(1)	12.0(1)	53(-1)	10.22±0.07 ^{CDE}	0.77±0.07 ^{EF}	127.71±1.50 ^F	9.02±1.59 ^A	63.18±0.56 ^E
9	5.5(0)	7.5(0)	60(0)	12.13±0.01 ^{EFG}	0.53±0.01 ^B	136.42±2.21 ^G	334.44±1.78 ^{DE}	61.58±0.31 ^C
10	5.5(0)	7.5(0)	60(0)	13.15±0.00 ^{FG}	0.54±0.00 ^B	141.09±1.43 ^{GH}	348.80±27.05 ^{EF}	58.05±0.14 ^B
11	5.5(0)	7.5(0)	60(0)	12.38±0.02 ^{EFG}	0.44±0.02 ^A	140.93±1.62 ^{GH}	400.74±31.43 ^G	63.21±1.73 ^D
12	5.5(0)	7.5(0)	60(0)	12.45±0.01 ^{EFG}	0.52±0.01 ^B	133.16±3.00 ^{FG}	317.31±11.35 ^D	65.40±0.58 ^E
13	1.3(-1.682)	7.5(0)	60(0)	8.05±0.03 ^{BC}	0.67±0.03 ^{CD}	91.78±8.22 ^B	14.55±0.84 ^{AB}	67.17±0.43 ^F
14	9.7(1.682)	7.5(0)	60(0)	9.20±0.02 ^{CD}	0.65±0.02 ^C	103.29±5.14 ^{CD}	14.36±1.46 ^{AB}	62.28±1.10 ^{DE}
15	5.5(0)	0(-1.682)	60(0)	6.75±0.06 ^{AB}	0.67±0.06 ^{CD}	146.07±7.24 ^H	53.78±2.61 ^C	57.65±0.42 ^{AB}
16	5.5(0)	15.1(1.682)	60(0)	6.40±0.02 ^{AB}	0.78±0.02 ^{EF}	158.82±3.44 ^I	25.41±1.99 ^{AB}	82.52±0.43 ^I
17	5.5(0)	7.5(0)	71.774(-1.682)	8.54±0.03 ^{BC}	0.84±0.03 ^F	112.78±3.91 ^E	12.34±0.32 ^{AB}	67.05±0.61 ^F
18	5.5(0)	7.5(0)	48.226(1.682)	9.46±0.03 ^{CD}	0.72±0.03 ^{CDE}	107.02±4.99 ^{DE}	13.63±1.39 ^{AB}	69.13±0.19 ^G

1) The number of experimental conditions by central composite design.

^{A-I} Mean±SD in the same column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

Table 14. Polynomial equations calculated by RSM program of *Cheonggukjang* prepared with garlic

Response	Polynomial equations	R ²	Si
Viscous substance	$12.478794 + 0.729145X_1 + 0.277506X_2 - 1.194493X_3 - 1.159506X_1X_1 - 0.577500X_1X_2 - 1.884701X_2X_2 - 0.198333X_1X_3 + 0.898333X_2X_3 - 1.026956X_3X_3$	62.33%	0.0001
Acidity	$Y = 0.509114 + 0.019746X_1 + 0.034934X_2 + 0.049408X_3 + 0.045476X_1X_1 + 0.108750X_1X_2 + 0.069630X_2X_2 + 0.017083X_1X_3 + 0.037083X_2X_3 + 0.087892X_3X_3$	69.72%	0.0001
Amino type nitrogen	$Y = 138.845290 + 6.360002X_1 + 7.265210X_2 - 1.414729X_3 - 8.516012X_1X_1 + 3.926667X_1X_2 + 0.892823X_2X_2 - 0.78333X_1X_3 - 5.328333X_2X_3 - 14.144812X_3X_3$	82.02%	0.0001
γ-GTP activity	$Y = 345.085124 + 5.491551X_1 - 7.821437X_2 - 54.058926X_3 - 95.199013X_1X_1 - 92.887500X_1X_2 - 86.312870X_2X_2 - 4.765833X_1X_3 + 11.303333X_2X_3 - 95.719787X_3X_3$	69.74%	0.0001
ABTS radical scavenging activity	$Y = 62.212175 - 3.253111X_1 + 3.494523X_2 + 0.299503X_3 + 0.255774X_1X_1 - 1.165417X_1X_2 + 2.150353X_2X_2 - 0.842917X_1X_3 - 1.447917X_2X_3 + 1.444599X_3X_3$	62.07%	0.0001

(나) 산도

마늘의 첨가량, 마늘 열처리 및 청국장 발효시간을 달리한 조건에서 청국장의 산도를 측정한 결과는 Table 13과 같으며, 0.41~0.99%의 범위였다. 반응표면분석의 R² 값은 69.72%로 유의확률 0.0001이하로 모형이 적합하였다 (Table 14). 정상점은 최소점으로 실제변수인 마늘의 첨가량 7.75%, 열처리 시간 3.42 분, 청국장 발효시간 58.60 시간에서 산도의 최적값은 0.50%로 예측되었다 (Fig. 17).

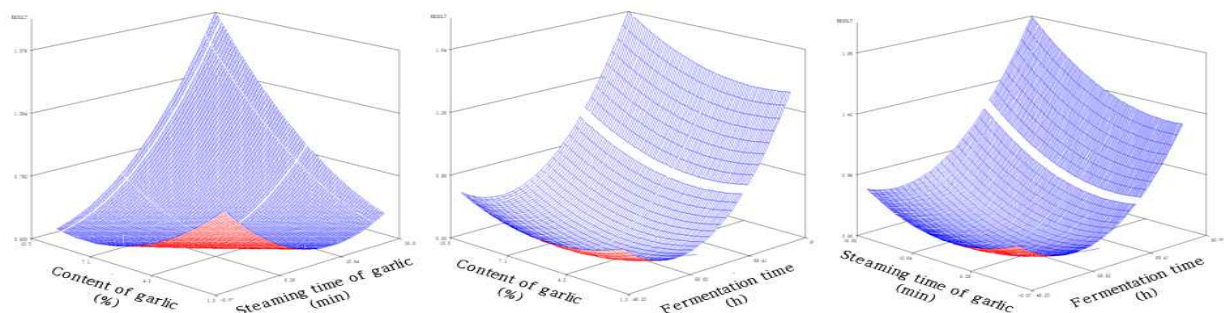


Fig. 17. Response surface plot for acidity of *Cheonggukjang* with garlic.

Zheng 등 (2011)은 72 시간 자연 발효시킨 청국장의 산도를 측정된 결과, 0.8%로 보고하였는데, 이는 본 실험에서 71.774 시간 발효시킨 청국장의 산도와 비슷한 결과였다. 본 실험결과, 청국장 발효시간에 따른 산도는 53 시간에서 0.41~0.77%, 60 시간에서 0.52~0.78%, 67 시간에서 0.73~0.99% 범위로 발효시간이 길어질수록 산도가 증가하는 경향이며, 이는 상기의 연구보고들과 유사한 결과였다.

(다) 아미노태 질소량

마늘 청국장의 마늘 첨가조건에 따른 아미노태 질소량을 측정된 결과 (Table 13), 마늘 첨가량 5.5%, 열처리 시간 15 분, 청국장 발효 60 시간 (Exp. 16)에서 158.82 mg%로 유의적으로 가장 높았다. 반응표면 회귀식에 따라 결정계수 (R^2)는 82.02%로 높게 나타났으며, 분산분석 결과 유의확률이 0.0001로 모형의 적합성이 인정되었다 (Table 14). 정상점은 안장점으로 능선 분석을 통해 마늘 첨가량과 열처리 시간은 높이고 청국장 발효시간은 낮추는 경우 아미노태 질소량의 최고값을 얻을 수 있었다 (Fig. 18). 마늘 첨가량 및 열처리 시간은 각각 6.21% 및 14.85 분, 청국장 발효시간은 58.04 시간에서 아미노태 질소의 최고값 156.97 mg%로 나타났다.

본 실험에서 청국장에 마늘을 5%로 첨가한 구간은 마늘을 3%로 첨가한 구간에 비해 아미노태 질소가 증가한 반면에, 마늘을 8%로 첨가할 경우 아미노태 질소량이 감소하였다. 이는 더덕을 첨가한 청국장의 아미노태 질소변화를 측정된 Hong과 Kwon (2011)의 보고에서 15% 이상의 더덕을 첨가할 경우 대조군에 비해 아미노태 질소량이 감소되었다는 결과와 유사한 경향이었다.

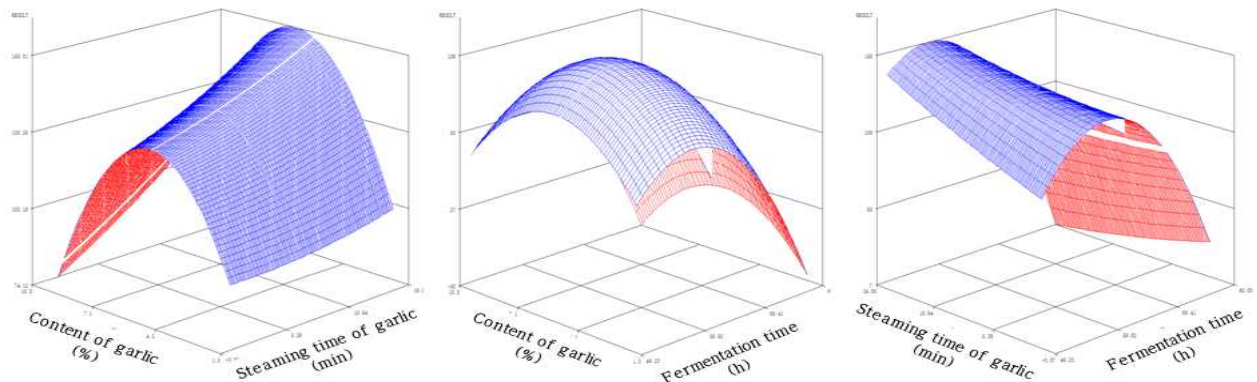


Fig. 18. Response surface plot for amino type nitrogen content of *Cheonggukjang* with garlic.

(라) γ -GTP 활성

청국장의 생리활성 평가를 위하여 18 구간의 마늘 첨가조건에 따른 청국장의 γ -GTP 활성을 측정된 결과 (Table 13), 반응표면분석에 의한 회귀식의 유의성 결정계수 (R^2)는 69.74%로 나타났으며, 분산분석 결과 유의확률이 0.0001로 모형이 적합하다고 할 수 있다 (Table 14). 예측된 정상점은 최대점으로 353.66 mU/mL의 최대값을 얻을 수 있다. 즉 마늘 첨가량, 마늘 열처리 시간 및 청국장 발효시간이 각각 5.73%, 6.99분, 57.96 시간에서 γ -GTP 활성을 최적화시키는 최적반응 조건으로 나타났다.

본 실험 결과, 마늘 첨가량 및 열처리시간, 청국장 발효시간이 각각 8%, 3.0 분, 53 시간 (Exp. 6) 일 때 가장 높은 γ -GTP 활성을 나타내었으며, Exp. 4구간 (3%, 12 min, 53 h)과 중간 범위인 Exp. 9~12구간 (5.5%, 7.5 min, 60 h)은 비슷한 범위의 활성을 나타내었다 (Fig. 19). 즉, 점질물의 생성량이 높았던 구간에서 γ -GTP의 활성도 높았는데, 이는 상기의 연구보고와 일치하는 결과로 점질물과 γ -GTP 사이에 양의 상관관계가 성립되는 것으로 판단된다.

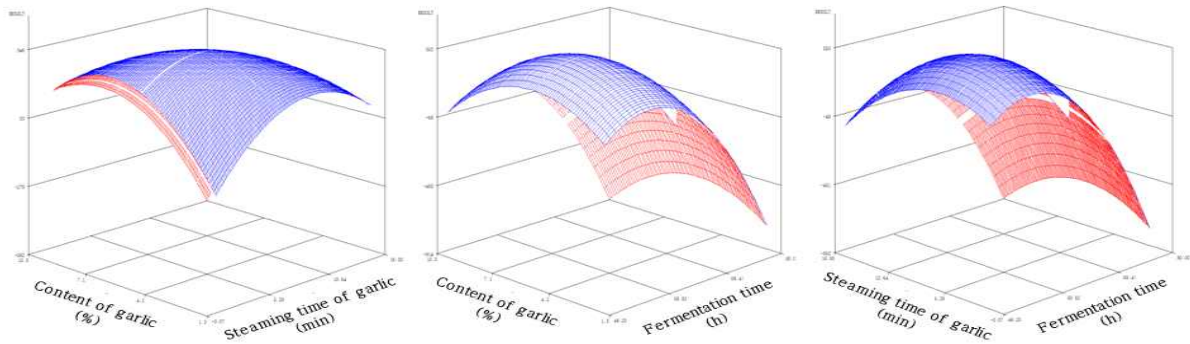


Fig. 19. Response surface plot for γ -GTP activity of *Cheonggukjang* prepared with garlic.

(마) ABTs 라디칼 소거활성

청국장의 마늘 첨가조건에 따른 항산화 활성을 ABTs 라디칼 소거활성으로 측정하였다 (Table 13). 중심합성계획에 의한 18 구간의 청국장에서 마늘 첨가량이 5.5%, 열처리 시간 15.1 분, 청국장을 60 시간 (Exp. 16) 발효시켰을 때 유의적으로 가장 높았으며, 다음으로 마늘 첨가량과 열처리 시간을 각각 3% 및 12 분으로 설정한 구간 (Exp. 3, 4)에서 높은 활성을 나타내었다. 즉, 마늘 비열처리 구간 (Exp. 15)과 비교할 때, 마늘의 열처리 시간이 높을수록 라디칼 소거활성이 증가하였는데, 이는 열처리 방법을 달리한 마늘의 항산화능을 평가한 Lee 등(2012)의 보고에서 마늘을 steaming한 경우 처리시간이 높을수록 라디칼 소거능이 증가하였으며, 폴리페놀 함량에 의존적이었다는 결과와 유사한 경향으로 생각된다.

반응표면분석 결과 (Table 14), 회귀식 유의성은 결정계수 (R^2)가 62.07%로 비교적 높게 나타났으며, 유의확률이 0.0001로 모형이 적합한 분산분석 결과라고 할 수 있다. 정상점은 안장점으로 능선분석을 이용하여 마늘 첨가량과 청국장 발효시간을 낮추고 마늘의 열처리 시간을 높임으로써 최고값을 예측할 수 있었다 (Fig. 20). 즉 실제변수인 마늘의 첨가량과 열처리시간이 각각 3.78% 및 14.28 분과 청국장 발효시간이 57.99 시간 일 때 ABTs 라디칼 소거활성의 최고값인 76.43%를 얻을 수 있었다.

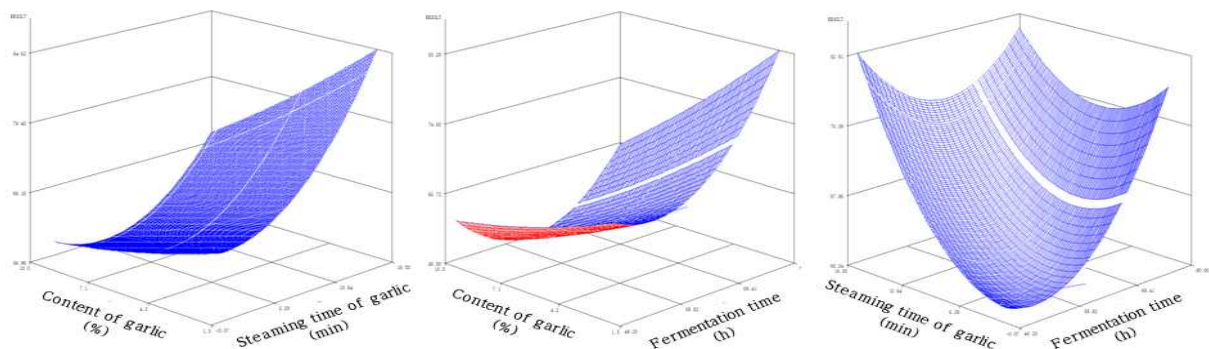


Fig. 20. Response surface plot for ABTS radical scavenging activity of *Cheonggukjang* with garlic.

이상의 반응표면 분석 결과를 종합하여 볼 때 마늘 첨가량 (1.3–9.7%), 마늘 열처리 시간 (0–15.1분) 및 청국장 발효시간 (48.2–71.8 시간)을 독립변수로 하여 청국장의 품질특성과 관련된 5 개의 인자에 대한 분석 결과 아미노태 질소의 함량이 가장 결정 계수가 높아 82.02%였고, 여타 항목은 62.07–69.74%의 범위였다. 분석된 5 개의 항목 중 산도는 최소값을 여타 분석 항목은 최대값을 나타내었으며, 이들이 최소 또는 최대를 나타내는 조건에서의 마늘 첨가량은 3.78–7.75%이며, 마늘의 열처리 시간은 3.42–14.85 분 이었고, 청국장의 발효 시간은

55.18-58.60 시간이었다 (Table 15).

Table 15. Treatment conditions and maximum and minimum value of *Cheonggukjang* with garlic by response surface methodology analysis

Experimental items	Predicted values		Treatment conditions		
			Content of garlic(%)	Steaming time of garlic(min)	Fermentation time(h)
Viscous substance (%)	Max.	13.02	6.53	6.81	55.18
Acidity (%)	Min.	0.50	7.75	3.42	58.60
Amino type nitrogen (mg %)	Max.	156.97	6.21	14.85	58.04
γ -GTP activity (mU/mL)	Max.	353.66	5.73	6.99	57.96
ABTS radical scavenging activity (%)	Max.	76.43	3.78	14.28	57.99

2-2. 연구결과 (남해마늘연구소 2차 년도)

가. 마늘 첨가 된장의 제조조건 확인 및 품질특성

(1) 마늘 첨가량을 달리한 된장의 발효기간 중 품질 특성 변화

(가) 색도의 변화

Table 16은 마늘을 0, 10, 20 및 30%로 첨가, 제조한 된장의 발효 기간에 따른 색도를 측정 한 결과로 Hunter's scale에 의한 L, a, b 값으로 표시하였다. 밝기를 보이는 L 값은 모든 시 료가 발효 기간이 길어짐에 따라 감소하였으며, 마늘 첨가량이 많을수록 유의하게 감소하는 경 향을 보였다. L값은 제조 직후 52.5-53.2에서 6 주 발효 후에는 44.0-46.5로 감소하였다. 적색도 (a)는 별다른 경향을 보이지 않았으나 황색도 (b)는 발효 초기보다 후기에 감소하였는데 일반 된장보다 마늘 첨가된장이 더 낮았다.

(나) 염도의 변화

마늘 첨가 된장의 발효 기간 중 염도 변화를 측정한 결과(Table 17), 마늘 첨가량이 많을수 록, 발효 기간이 경과할수록 염도는 유의하게 증가하였다. 된장제조 직후 염도는 3.77-4.90%로 대조군과 마늘 10% 첨가군간에는 유의차가 없었으나 20% 이상 첨가시 염도는 유의적으로 낮 았고, 발효 6 주차에는 4.77-6.20%로 증가하였다. 식염은 미생물의 생육에 매우 중요한 역할을 하 며, 부패를 방지하고 저장성을 부여 (Mok CK 등 2005) 하지만 과다한 식염 사용은 강한 짠 맛으로 품질에 악영향을 주며 고혈압, 뇌졸중과 같은 성인병을 유발하는 것이 알려져 있다 (Kim JD 등 1995, Park BJ 등 2002). 이로 인해 된장의 식염농도를 줄이는 것은 중요한 요소 로 생각되는데, 저장 및 유통과정을 고려하여 일반적으로 사용되는 식염의 첨가 농도는 그대로 유지하되 저장성 향상에 기여할 수 있는 부재료의 첨가를 통하여 상대적인 짠맛을 감소시키는 것도 한 가지 방법이 될 수 있을 것으로 생각한다. 이런 면에서 마늘은 항균활성이 강해 발효 균의 생육조건 등을 고려해 적정량 첨가할 경우 저장성 향상과 기능성 부여에도 기여할 수 있 는 부재료로 판단된다.

Table 16. Changes in Hunter's color value of garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks

Items	Garlic content (%)	Fermentation periods (week)						
		0	1	2	3	4	5	6
L	0	53.2±1.0 ^{abE}	49.5±1.3 ^{ad}	48.6±0.7 ^{cC}	47.5±0.8 ^{bb}	47.6±0.6 ^{cb}	47.2±1.1 ^{cAB}	46.5±0.4 ^{ba}
	10	52.5±1.6 ^{ae}	49.2±1.1 ^{ad}	48.0±1.5 ^{bcCD}	47.7±1.2 ^{bBC}	46.7±1.2 ^{bcAB}	45.8±1.7 ^{ba}	45.7±1.2 ^{ba}
	20	52.5±1.1 ^{ae}	49.8±1.2 ^{ad}	47.1±1.5 ^{abC}	47.1±1.4 ^{bc}	45.9±1.8 ^{abBC}	45.2±0.5 ^{baB}	44.5±1.7 ^{aa}
	30	52.5±1.6 ^{ad}	49.0±0.8 ^{ac}	46.3±1.4 ^{ab}	45.7±0.9 ^{ab}	45.5±0.6 ^{ab}	43.9±1.0 ^{aa}	44.0±1.6 ^{aa}
a	0	5.2±0.2 ^{cA}	5.6±0.3 ^{cb}	5.6±0.3 ^{cbC}	5.5±0.2 ^{bb}	5.7±0.4 ^{cbC}	5.5±0.2 ^{cb}	5.8±0.3 ^{bc}
	10	4.6±0.3 ^{ba}	5.1±0.4 ^{abB}	5.0±0.6 ^{baB}	4.9±0.5 ^{aaB}	4.7±0.3 ^{aaB}	4.9±0.6 ^{baB}	4.7±0.3 ^{aaB}
	20	4.2±0.3 ^{aa}	4.8±0.3 ^{acD}	4.5±0.6 ^{abABC}	5.1±0.5 ^{ad}	4.6±0.3 ^{abC}	4.4±0.3 ^{aaB}	4.5±0.4 ^{aaB}
	30	4.9±0.4 ^{cbC}	5.2±0.2 ^{bc}	4.5±0.3 ^{aa}	5.0±0.3 ^{abC}	5.0±0.3 ^{bcB}	4.5±0.5 ^{ba}	4.7±0.4 ^{aaB}
b	0	17.0±0.5 ^{bc}	15.9±1.3 ^{aaB}	16.5±0.5 ^{cbC}	15.6±0.9 ^{ba}	16.0±0.4 ^{baB}	15.2±1.1 ^{ba}	16.4±0.5 ^{bcB}
	10	16.4±0.8 ^{abc}	16.2±0.8 ^{ac}	15.5±1.1 ^{bcB}	14.5±1.6 ^{aaB}	14.1±1.6 ^{aa}	13.9±1.7 ^{aa}	14.1±1.2 ^{aa}
	20	15.7±0.8 ^{ac}	15.8±1.1 ^{ac}	15.4±1.3 ^{bc}	15.2±0.7 ^{abc}	14.3±0.5 ^{ab}	13.3±0.7 ^{aa}	13.2±1.1 ^{aa}
	30	16.6±1.2 ^{be}	16.1±0.8 ^{de}	14.1±1.0 ^{aaB}	15.2±1.0 ^{abcd}	14.7±1.3 ^{abc}	13.4±0.9 ^{aa}	13.6±1.1 ^{aa}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-E} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

Table 17. Changes in salinity of garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks. (%)

Garlic content (%)	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
0	4.90±0.10 ^{cA}	5.73±0.06 ^{dB}	5.80±0.17 ^{dB}	5.93±0.21 ^{dB}	5.70±0.35 ^{dB}	5.97±0.06 ^{dB}	6.20±0.00 ^{dC}
10	4.87±0.40 ^{cA}	5.23±0.12 ^{cbC}	5.07±0.15 ^{caB}	5.23±0.06 ^{cbC}	5.07±0.06 ^{caB}	5.47±0.06 ^{cd}	5.60±0.10 ^{cd}
20	4.37±0.15 ^{ba}	4.50±0.00 ^{baB}	4.50±0.17 ^{baB}	4.73±0.06 ^{bc}	4.67±0.06 ^{bcB}	5.00±0.00 ^{bd}	5.20±0.17 ^{be}
30	3.77±0.15 ^{aA}	4.10±0.00 ^{abC}	4.07±0.06 ^{ab}	4.30±0.17 ^{aCD}	3.80±0.10 ^{aA}	4.43±0.06 ^{ad}	4.77±0.15 ^{ae}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-E} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

Table 18. Changes in pH and TA of garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks

Items	Garlic content (%)	Fermentation periods (week)						
		0	1	2	3	4	5	6
pH	0	8.15±0.02 ^{ce}	6.78±0.05 ^{ac}	6.48±0.01 ^{aA}	6.96±0.02 ^{bd}	6.79±0.02 ^{ac}	6.59±0.13 ^{ab}	6.82±0.01 ^{bc}
	10	8.07±0.04 ^{be}	6.83±0.03 ^{acD}	6.44±0.09 ^{aA}	6.90±0.02 ^{ad}	6.78±0.06 ^{ac}	6.60±0.10 ^{ab}	6.79±0.04 ^{abc}
	20	7.99±0.02 ^{ae}	6.84±0.02 ^{ad}	6.50±0.01 ^{aA}	6.89±0.02 ^{ad}	6.77±0.02 ^{ac}	6.67±0.01 ^{ab}	6.78±0.01 ^{ac}
	30	7.96±0.03 ^{af}	6.84±0.02 ^{ad}	6.51±0.01 ^{aA}	6.90±0.01 ^{ae}	6.79±0.00 ^{ac}	6.70±0.01 ^{ab}	6.80±0.01 ^{abc}
TA (%)	0	0.067±0.001 ^{aA}	0.166±0.009 ^{bf}	0.136±0.005 ^{be}	0.099±0.001 ^{dbC}	0.095±0.001 ^{bb}	0.106±0.002 ^{cc}	0.118±0.001 ^{ad}
	10	0.070±0.002 ^{aA}	0.154±0.003 ^{ad}	0.128±0.003 ^{ac}	0.098±0.001 ^{cb}	0.099±0.001 ^{cb}	0.099±0.003 ^{bb}	0.128±0.002 ^{bc}
	20	0.076±0.004 ^{ba}	0.167±0.002 ^{bd}	0.125±0.001 ^{ac}	0.094±0.001 ^{bb}	0.094±0.001 ^{bb}	0.094±0.002 ^{bb}	0.125±0.001 ^{bc}
	30	0.80±0.001 ^{aA}	0.159±0.000 ^{abf}	0.122±0.003 ^{ae}	0.092±0.000 ^{ac}	0.091±0.001 ^{ac}	0.088±0.003 ^{ab}	0.118±0.001 ^{ad}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-F} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

(다) pH 및 적정산도의 변화

마늘 된장의 발효 기간별 pH 및 산도를 측정한 결과는 Table 18과 같다. pH는 된장 제조 직후 모든 시료에서 약 8.0의 값들을 나타내었으나 발효 1주차에 큰 폭으로 감소하여 6.78-6.84였고, 발효 6 주에는 6.78-6.82였다. 마늘 첨가량에 따른 pH 차이는 없어 마늘의 양이 된장의 pH에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

적정산도의 경우 된장 제조 직후와 비교하여 발효 1 주차에 큰 폭으로 증가하였는데, 이는 pH의 변화와 일치하는 결과였다. 발효 2 주차부터 산도는 점차 감소하는 경향을 보이다가 발효 6 주에 다시 증가하여 0.118-0.128%의 범위였고, 마늘 첨가량에 따른 유의차는 뚜렷한 경향이 없었다. 매실분말 및 농축액을 첨가한 된장은 발효 기간 중에 총산이 2 주 동안 현저히 증가하다가 그 이후에는 시험구에 따라 완만하게 증가하거나 다소 감소한다고 보고되어 있다 (Park WP 등 2006). 마늘 첨가된장의 발효 중 pH와 산도 변화 결과들로 미루어볼 때 마늘을 30%까지 첨가하는 것은 발효에 따른 된장 품질변화에는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

(라) 환원당 함량의 변화

Table 19는 마늘 첨가 된장의 환원당 측정 결과이다. 시료의 환원당은 발효기간이 길어짐에 따라 증가하였는데, 제조 직후에 비하여 6 주 뒤에는 모든 시료군에서 약 2.5 배 증가하였다. 환원당은 발효 6 주차까지는 지속적으로 증가하였는데, 이와 같은 환원당의 지속적인 증가는 된장 중의 당화효소에 의해 원료 중의 당이 서서히 분해되어 영향을 준 결과로 추정된다.

Table 19. Changes in reducing sugar content of garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks. (g/100 g)

Garlic content (%)	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
0	4.99±0.06 ^{aA}	8.96±0.24 ^{dB}	8.96±0.18 ^{cB}	10.04±0.11 ^{dC}	9.90±0.07 ^{bC}	11.09±0.23 ^{dD}	12.09±0.11 ^{bE}
10	5.66±0.07 ^{dA}	8.50±0.07 ^{cB}	9.36±0.13 ^{dC}	9.53±0.08 ^{cD}	10.20±0.10 ^{cE}	11.01±0.01 ^{bcF}	12.45±0.04 ^{bG}
20	5.18±0.05 ^{bA}	8.00±0.08 ^{bB}	7.71±0.01 ^{bC}	9.16±0.06 ^{bD}	9.62±0.09 ^{aE}	10.83±0.05 ^{bF}	12.38±0.04 ^{bG}
30	5.31±0.05 ^{cA}	7.27±0.14 ^{aB}	7.49 ±0.04 ^{aC}	8.51±0.01 ^{aD}	9.68±0.08 ^{aE}	9.93±0.02 ^{aF}	11.87±0.05 ^{bG}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-G} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

Table 20. Changes in amino nitrogen content of garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks. (mg%)

Garlic content (%)	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
0	231.58±15.14 ^{cA}	283.38±26.41 ^{ab}	356.79±25.01 ^{abC}	523.38±2.23 ^{dD}	539.23±10.51 ^{dD}	592.45±7.21 ^{aE}	546.88±12.30 ^{aD}
10	195.40±13.39 ^{aA}	266.37±13.33 ^{ab}	328.75±27.52 ^{aC}	516.25±12.06 ^{bcD}	511.70±7.41 ^{bD}	543.07±55.58 ^{aD}	535.33±14.96 ^{aD}
20	222.39±3.62 ^{bcA}	269.98±28.49 ^{ab}	401.42±48.87 ^{bc}	500.07±6.89 ^{abD}	500.73±4.76 ^{bD}	566.68±16.87 ^{aE}	551.19±9.58 ^{aE}
30	206.06±5.53 ^{abA}	243.32±12.27 ^{ab}	376.43±10.89 ^{abC}	492.72±12.64 ^{aD}	453.37±13.01 ^{aE}	544.09±29.75 ^{aF}	553.16±21.50 ^{aF}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-F} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

(마) 아미노태 질소 함량의 변화

마늘 첨가 된장의 아미노태 질소의 변화를 측정한 결과(Table 20), 마늘 첨가량에 따라 변화

의 양상이 상이하였다. 대조군의 경우 발효 3 주에 아미노태 질소 함량이 가장 큰 폭으로 증가하고 그 이후부터는 523.38-592.45 mg% 범위였다. 마늘 10% 첨가군의 경우 제조 직후에 비해 발효 2 주까지 아미노태 질소 함량이 유의하게 증가하였다가 그 이후부터는 별 다른 변화가 없었다. 마늘 30% 첨가군의 경우 발효 5 주까지 지속적으로 아미노태 질소 함량이 증가하였다. 마늘 첨가량에 따라서도 차이가 있었는데 된장 담금 직후에는 마늘 첨가군들 보다 대조군이 더 높은 함량이었다. 발효 6 주에 아미노태 질소 함량은 535.33-553.16 mg%로 시료군 간에 유의차가 없었다. 국내산 대두된장의 함량 범위보다 높은 195.40-592.45 mg%의 함량을 보여 품질기준을 만족시키는 것으로 판단된다.

(바) 유리 아미노산 함량 변화

마늘을 첨가하지 않은 된장 (대조군)의 6 주 간 발효과정중 유리 아미노산 함량을 측정한 결과는 Table 21에 나타내었다. 총 유리 아미노산 함량은 제조 직후 3365.94 mg/100 g 이며 발효 4 주차 7040.78 mg/100 g 까지 증가하며 발효 5 주차부터 감소하여서 6 주차에는 4990.53 mg/100 g이었다. 2 주차에 유리 아미노산 함량이 전주와 비교하여 가장 많이 증가하였다.

된장 중에 많이 함유된 유리 아미노산은 L-glutamic acid, L-arginine, L-isoleucine들이고 특히 L-glutamic acid 증가가 가장 뚜렷하였다. L-glutamic acid 함량 변화는 총 유리 아미노산 함량 변화 경향과 일치하였다. 제조 직후 397.31 mg/100 g에서 발효 4 주차에 1480.29 mg/100 g으로 약 3.7 배 증가하고 5, 6 주차에는 감소하면서 6 주차에 1224.68 mg/100 g이었다. 따라서 된장의 유리 아미노산 총 함량 변화는 L-glutamic acid 함량 증감이 가장 영향을 많이 준 것으로 생각된다. L-glutamic acid는 혈압강화 기능성을 지닌 GABA의 전구물질이면서 (Bae JO 등 2012) 구수한 맛을 내는 것으로 알려져 있다 (Yang SH 등 1992).

Table 21. Changes in free amino acids contents of *Doenjang* without garlic during fermentation for 6 weeks (mg/100 g)

Free amino acids	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
L-Threonine	91.10	133.53	200.79	226.03	280.57	251.58	242.69
L-Serine	115.56	247.81	270.25	322.75	382.02	353.17	316.87
L-Asparagine	156.81	189.47	95.65	51.47	108.11	33.72	39.41
L-Glutamic acid	397.31	919.42	1201.70	1147.35	1480.29	1301.25	1224.68
Sarcosine	162.66	131.86	87.08	90.34	165.81	45.69	40.36
L-Proline	196.25	260.34	206.36	209.86	299.76	228.12	174.62
Glycine	63.18	130.99	147.56	174.77	199.82	192.70	175.90
L-Alanine	147.35	253.77	265.20	326.69	328.98	334.19	279.06
L-Valine	152.14	260.57	274.41	320.35	356.65	339.81	303.42
L-Cystine	10.63	44.52	5.90	41.67	58.36	42.53	30.23
L-Methionine	100.74	140.73	137.58	154.81	171.70	152.89	117.41
L-Isoleucine	221.11	342.41	353.59	337.40	379.08	370.95	324.04
L-Leucine	109.79	204.72	210.33	222.01	263.73	230.28	198.23
L-Tyrosine	133.63	148.30	128.08	129.37	1203.77	123.70	82.12
β-Alanine	136.47	207.56	212.25	231.26	15.16	236.26	203.25
L-Homocystine	122.82	126.39	107.84	109.36	87.89	99.45	51.87
δ-Hydroxylysine	73.69	73.36	65.07	70.50	16.39	69.50	23.13
Ornithine	223.06	345.44	351.43	376.85	162.10	380.62	309.87
L-Lysine	18.02	16.51	14.47	21.03	9.47	19.83	7.71
L-Histidine	261.27	241.64	241.62	295.19	248.64	295.79	93.25
L-Arginine	472.34	705.36	747.08	823.84	822.47	836.92	752.39
Total	3365.94	5124.72	5324.25	5682.91	7040.78	5938.97	4990.53

마늘을 10% 첨가하여 제조한 된장의 발효 중 유리 아미노산 함량을 측정한 결과 (Table 22), 대조군과 마찬가지로 유리 아미노산 총 함량은 발효 4 주차까지 증가하다가 그 이후로는 감소하였다. 10% 마늘 첨가 된장은 대조군과 비교하여 유리 아미노산이 제조 직후에는 다소 높다가 발효 시간이 경과함에 따라 다소 낮거나 비슷한 결과를 보이다가 발효 후반 (5-6주차)에는 더 높고 6 주차에 5852.27 mg/100 g을 나타내었다. L-glutamic acid와 L-arginine 함량이 매우 높아서 총 유리 아미노산 함량과 L-glutamic acid 경향이 일치하였다.

Table 22. Changes in free amino acids contents of *Doenjang* with 10% garlic during fermentation for 6 weeks. (mg/100 g)

Free amino acids	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
L-Threonine	101.69	121.98	212.01	250.29	275.72	261.56	256.70
L-Serine	131.61	201.76	295.14	317.66	361.46	372.53	368.26
L-Asparagine	107.39	102.39	85.22	38.83	90.30	29.99	44.25
L-Glutamic acid	509.93	449.82	1128.26	1291.01	1361.36	1355.79	1328.96
Sarcosine	115.40	87.62	134.66	116.89	146.94	79.23	79.29
L-Proline	188.56	138.23	239.69	167.89	273.56	225.21	235.98
Glycine	71.84	94.64	153.97	188.35	191.57	199.87	200.01
L-Alanine	154.50	187.46	288.36	329.29	309.32	340.18	317.99
L-Valine	131.06	200.58	309.03	315.45	359.22	370.82	342.93
L-Cystine	26.00	55.06	50.71	28.15	62.82	47.08	38.89
L-Methionine	111.01	97.81	144.05	140.26	157.77	153.67	148.22
L-Isoleucine	235.69	296.99	341.09	344.51	368.35	386.12	427.26
L-Leucine	85.09	163.47	203.38	216.12	240.59	233.18	235.42
L-Tyrosine	122.66	104.28	139.60	63.83	149.34	113.07	119.59
β -Alanine	145.30	107.02	209.40	229.19	240.44	241.86	240.29
L-Homocystine	132.74	44.71	118.62	66.37	112.88	103.07	90.55
δ -Hydroxylysine	81.67	64.38	70.51	24.74	70.35	71.63	58.03
Ornithine	189.47	280.14	349.15	337.98	376.90	384.57	368.90
L-Lysine	24.41	19.71	19.17	3.34	15.49	17.56	19.27
L-Histidine	259.34	264.52	285.97	301.60	283.90	350.04	100.10
L-Arginine	635.31	629.45	831.31	913.49	923.71	958.54	831.36
Total	3560.68	3712.01	5609.31	5685.22	6371.98	6295.55	5852.27

Table 23은 20% 마늘 첨가 된장의 6 주간의 발효기간 중 유리 아미노산 함량 변화를 측정한 결과로, 대조군 및 10% 마늘 첨가군과 달리 발효기간에 따른 일정한 패턴을 보이지 않고 불규칙한 증감을 나타내었다. 유리 아미노산 함량도 가장 낮았지만 가장 많이 함유된 아미노산들이 L-glutamic acid와 L-arginine 인 점은 앞선 두 시료군과 같았다. 된장의 유리 아미노산은 맛을 결정짓는 중요한 요인으로 원료, 발효온도, 발효기간에 따라 차이가 있는데, 재래 된장에서 맛에 대한 기여도는 leucine과 isoleucine 같은 쓴맛 성분이 가장 큰 영향을 미치며 cystine, aspartic acid, glutamic acid와 같은 구수한 맛 성분이 그 다음으로 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Yang SH 등 1992). 본 연구 결과 L-isoleucine 같은 쓴 맛 성분들이 다소 높게 검출되었으나, L-glutamic acid가 훨씬 더 많이 함유되어 있어 전체적인 된장의 풍미에는 크게 영향을 미치지 못할 것으로 판단된다.

30% 마늘 첨가된장의 발효 중 유리 아미노산 함량 변화 (Table 24)는 추이가 앞선 시료군들과 차이가 있었다. 발효 기간이 경과함에 따라 총 유리 아미노산 함량 역시 증가하였고 제조 직후부터 발효 중기까지는 그 함량이 다른 시료군들에 비해 다소 낮았으나 꾸준히 증가하여 발효 6 주차에는 모든 시료군들 중 가장 높은 수치인 6692.38 mg/100 g이었다.

Table 23. Changes in free amino acids contents of *Doenjang* with 20% garlic during fermentation for 6 weeks. (mg/100 g)

Free amino acids	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
L-Threonine	68.40	101.44	210.12	189.52	210.76	247.36	250.26
L-Serine	90.14	144.76	290.96	280.18	295.00	347.85	335.81
L-Asparagine	88.71	74.56	97.01	42.12	29.38	27.15	35.87
L-Glutamic acid	429.78	572.69	1154.37	1120.38	1151.80	1323.03	1246.76
Sarcosine	95.29	107.78	126.82	69.08	42.93	35.69	69.73
L-Proline	91.27	161.08	241.58	166.70	148.28	205.12	199.38
Glycine	51.29	74.75	151.44	150.07	155.33	188.17	177.03
L-Alanine	125.80	155.27	281.43	277.13	268.10	318.44	290.31
L-Valine	133.29	188.72	343.00	317.91	300.57	358.76	334.15
L-Cystine	39.82	50.06	7.32	42.73	27.60	47.97	33.01
L-Methionine	63.67	109.04	141.00	127.68	104.39	138.98	112.07
L-Isoleucine	180.18	209.32	328.76	323.80	320.31	373.16	339.31
L-Leucine	81.68	115.80	194.14	188.57	165.62	216.03	184.47
L-Tyrosine	43.90	115.40	138.82	106.56	43.62	115.88	55.74
β -Alanine	97.79	117.36	208.93	197.70	181.94	229.27	196.37
L-Homocystine	55.68	88.97	114.77	94.99	47.78	95.17	43.84
δ -Hydroxylysine	28.35	60.81	70.52	61.58	23.00	61.95	14.90
Ornithine	183.45	211.63	348.06	349.38	287.34	369.33	292.48
L-Lysine	4.16	17.92	18.83	16.81	15.77	29.97	2.43
L-Histidine	257.17	240.35	237.84	249.09	241.03	211.41	35.79
L-Arginine	683.85	776.78	926.17	900.72	781.97	998.66	801.38
Total	2893.68	3694.49	5631.89	5272.70	4842.53	5939.34	5051.07

사) 이소플라본 함량 변화

마늘 첨가 된장의 이소플라본 함량 변화는 Table 25와 같다. 마늘 된장에서는 공통적으로 12 종의 이소플라본 유도체가 검출되었다. 제조 직후 이소플라본 함량은 498.76-668.93 $\mu\text{g/g}$ 이었으나 발효시간이 경과함에 따라 그 함량은 감소하는 경향을 보여 6 주차에는 361.10-448.05 $\mu\text{g/g}$ 이었다. 마늘을 첨가하지 않은 대조구에 비해 마늘 첨가 된장의 이소플라본 함량은 다소 낮았으나 마늘 첨가량에 따른 일관성 있는 결과를 보이지는 않았다. 발효 초기에는 glycoside와 malonylglycoside 같은 배당체 형태의 이소플라본 함량이 높았으나 발효 경과에 따라 그 함량은 감소하고 비배당체 형태가 증가하였다. 제조 직후 비배당체 형태의 daidzein, glycitein, genistein 함량은 각각 36.70-51.08 $\mu\text{g/g}$, 5.12-7.29 $\mu\text{g/g}$, 12.79-15.05 $\mu\text{g/g}$ 이었으나 6 주차에는 118.33-153.05 $\mu\text{g/g}$, 34.71-40.59 $\mu\text{g/g}$, 83.94-103.69 $\mu\text{g/g}$ 로 크게 증가하였다.

(아) 미생물 수 변화

마늘 된장의 발효기간 중 *Bacillus*와 효모의 생균수를 측정한 결과는 Fig. 21과 같다. *Bacillus* 균수는 효모와는 달리 발효 초기부터 발효 완료시점까지 유지되는 경향을 나타내었으며, 마늘 함량에 따른 균수는 큰 차이가 없었다. 효모는 된장 발효기간이 경과함에 따라 점차 감소하다가 발효 4 주부터 다시 증가하는 경향을 나타내었으며, 마늘 첨가량이 많을수록 효모 수가 더 적어 마늘 농도가 클수록 효모의 생육을 억제하는 것으로 보인다.

(2) 저염 마늘 된장 발효 중 품질 특성 변화

(가) 색도의 변화

발효기간에 따른 염 농도별 마늘된장의 색도 변화를 나타낸 결과는 Table 26과 같다. L 값은 염 농도에 따른 통계적인 유의차는 없었으나, 제조 직후 62.6-63.2에서 발효 6 주에는 57.8-58.3으로 발효기간이 경과함에 따라 점차 낮아졌다. 적색도를 나타내는 a 값의 경우 발효

2 주 이후부터 증가하는 경향을 보여, 4 주에 4.6-4.9 로 유의적으로 높았으나 이후 다시 감소하였다. 황색도를 나타내는 b 값은 식염농도 6%와 8% 첨가군에서는 발효기간에 따른 통계적인 차이가 없었고, 10%와 12% 식염군에서는 발효기간 경과와 더불어 불규칙한 증감을 나타내었으나 전체적으로 식염농도 차이에 따른 유의차는 미미하였다.

(나) 염도 변화

마늘을 10% 첨가하고, 식염 첨가량을 6-12%로 달리하여 제조한 된장의 발효기간에 따른 염도를 측정된 결과 (Table 27), 발효기간이 경과할수록 증가하는 경향을 보여 제조 직후 3.23-5.87%였으나 발효 6 주 에는 4.07-6.80% 였다. Ku KH 등 (2009)이 고추씨 첨가에 따른 된장 품질 특성의 변화를 보기 위하여 염도를 측정된 결과, 된장 염도를 약 14%로 조정하여 제조하였을 때 제조 직후 13.28-14.05%에서 발효가 진행됨에 따라 큰 변화를 보이지 않았다고 밝힌 바 있는데 이는 본 연구 결과와는 차이가 있다. Kim HE 등 (2011)은 발아 대두 및 발아 검정콩으로 제조한 된장의 염도가 발효기간 중 미량 상승하였다고 보고하였고 이는 본 연구결과와 일치한다. 된장의 염 농도는 된장 품질을 평가하는데 있어 중요한 지표가 되는 아미노태질소 및 환원당 함량에 영향을 주는 것으로 알려져 있고, 염 농도가 낮을수록 이들의 함량은 증가하는 것으로 알려져 있다 (Lee JY와 Mok CK 2010).

Table 24. Changes in free amino acids contents of *Doenjang* with 30% garlic during fermentation for 6 weeks. (mg/100 g)

Free amino acids	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
L-Threonine	66.08	108.17	178.68	198.04	233.84	235.13	2462.04
L-Serine	113.26	149.72	257.62	290.22	323.58	320.32	0.00
L-Asparagine	84.69	62.48	45.18	40.43	33.50	36.15	20.41
L-Glutamic acid	482.84	873.02	1067.84	1184.11	1269.56	1272.18	1242.46
Sarcosine	101.42	128.10	45.30	70.75	66.70	86.71	43.06
L-Proline	85.61	215.20	131.79	177.21	202.06	214.16	170.15
Glycine	42.21	110.47	138.01	140.19	177.84	175.47	168.24
L-Alanine	129.48	142.38	259.32	292.61	310.46	304.82	276.26
L-Valine	133.41	194.53	286.45	346.81	376.29	372.73	326.70
L-Cystine	65.19	63.54	31.87	48.12	48.83	50.24	30.89
L-Methionine	73.43	119.09	108.76	130.21	134.06	131.44	111.12
L-Isoleucine	177.52	293.58	305.50	342.16	359.34	356.18	322.16
L-Leucine	93.14	164.75	164.18	198.52	212.18	207.30	182.42
L-Tyrosine	54.74	143.16	56.14	112.90	112.56	121.28	65.10
β-Alanine	95.94	172.85	182.64	216.45	229.99	219.53	195.69
L-Homocystine	53.79	115.15	55.31	97.87	62.18	95.19	46.82
δ-Hydroxylysine	28.33	60.89	28.08	64.70	74.21	69.76	22.46
Ornithine	181.42	204.89	298.28	357.61	291.34	358.05	295.66
L-Lysine	4.72	17.31	17.38	16.22	15.77	30.05	2.04
L-Histidine	216.02	196.12	243.89	185.84	187.95	196.37	29.47
L-Arginine	769.38	864.32	907.76	1025.70	937.30	1009.48	679.22
Total	3052.62	4399.71	4809.97	5536.66	5659.56	5862.54	6692.38

Table 25. Changes in isoflavone contents of garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks.

Garlic Conc. (%)	Ferm. periods (week)	Glycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Aglycones			Totals
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	
0	0	196.36±9.82	100.19±4.01	206.33±10.32	22.22±1.33	31.47±1.89	37.27±1.86	nd ³⁾	nd	nd	51.08±3.06	7.29±0.44	13.72±0.69	668.93
	1	133.12 ±6.66	62.89±3.14	126.74±5.07	33.34±2.00	33.27±1.33	55.59±3.34	15.03±0.90	10.92±0.66	5.46±0.33	143.68±8.62	53.65±2.68	105.18±6.31	778.87
	2	90.07±5.40	33.33±1.67	71.98±4.32	18.40±0.92	19.22±0.96	33.05±1.94	tr ⁴⁾	4.98±0.25	nd	127.00±6.35	34.48±1.72	79.79±3.99	516.3
	3	77.92±3.12	32.22±1.93	56.48±3.39	17.90±0.90	19.82±0.79	34.56±2.07	0.84±0.05	5.90±0.35	nd	153.22±7.66	41.22±2.47	98.78±4.94	538.86
	4	55.76±2.79	25.90±1.55	32.43±1.95	13.78±0.69	17.68±0.88	29.79±1.79	tr	4.82±0.29	nd	141.35±7.07	36.82±2.21	92.92±4.65	451.25
	5	45.90±2.30	24.58±1.47	24.34±1.46	13.37±0.67	17.45±1.05	31.40±1.57	tr	4.54±0.27	nd	148.77±7.44	37.43±1.87	99.38±4.97	447.16
	6	41.64±2.50	25.24±1.51	21.80±1.08	12.18±0.73	16.50±3.40	31.27±1.88	tr	4.52±0.18	nd	153.05±9318	38.16±1.91	103.69±5.18	448.05
10	0	200.08±12.00	107.98±5.40	207.70±8.31	20.89±1.25	18.22±1.09	29.25±1.76	5.20±0.26	1.43±0.06	0.72±0.04	36.70±1.84	6.84±0.41	15.05±0.75	650.06
	1	93.31±5.96	29.91±1.20	74.38±4.46	14.13±0.71	15.30±0.77	23.35±0.93	3.36±0.17	0.71±0.04	0.35±0.02	89.65±4.48	28.43±1.42	56.91±3.41	429.79
	2	79.07±4.74	25.06±1.50	58.86±2.94	14.01±0.70	15.13±0.76	23.53±0.47	4.64±0.28	0.58±0.52	0.29±0.02	114.24±5.71	35.35±2.12	76.67±4.60	447.43
	3	67.36±3.37	25.11±1.00	44.73±2.24	13.85±0.83	15.55±0.47	23.63±1.42	7.63±0.31	0.54±0.03	0.27±0.02	135.26±6.76	42.04±2.10	92.59±4.63	468.56
	4	47.54±2.38	15.71±0.94	25.81±1.55	9.56±0.57	12.28±0.74	21.49±1.29	1.07±0.06	3.61±0.18	1.80±0.09	140.77±8.45	42.40±2.12	102.92±6.18	424.96
	5	34.16±1.37	13.76±0.69	11.97±0.72	6.33±0.25	10.96±0.44	17.78±0.71	tr	3.20±0.16	1.60±0.08	124.59±6.23	36.12±2.17	92.64±4.63	353.11
	6	31.07±1.55	14.69±0.88	8.63±0.34	6.02±0.02	11.00±0.55	17.49±0.87	0.35±0.02	2.96±0.18	1.48±0.06	131.46±6.56	37.60±2.26	98.35±4.92	361.1
20	0	160.16±9.61	65.94±3.15	166.46±8.32	11.29±0.56	12.18±0.73	22.61±1.36	nd	0.75±0.04	0.38±0.02	40.54±2.43	5.12±0.31	13.33±0.80	498.76
	1	87.13±4.36	26.11±1.57	59.87±2.99	14.25±0.86	17.37±1.04	23.05±1.38	4.54±0.07	0.80±0.05	0.40±0.02	110.83±5.54	38.79±1.94	74.77±3.74	457.91
	2	54.70±2.73	14.81±0.89	26.53±1.06	8.81±0.53	13.10±0.66	16.63±2.83	tr	3.32±0.20	nd	114.95±6.90	36.99±1.85	84.33±4.22	374.17
	3	37.45±2.25	25.65±1.54	12.87±0.77	5.60±0.34	11.02±0.44	15.22±0.91	tr	2.94±0.18	nd	120.61±6.03	37.08±1.85	87.33±4.37	355.77
	4	28.82±1.73	24.88±1.49	5.79±0.29	4.39±0.22	11.24±0.67	14.55±0.73	tr	3.11±0.19	nd	118.15±5.91	39.70±1.96	85.44±5.13	336.07
	5	21.03±1.05	nd ³⁾	tr ⁴⁾	1.30±0.08	nd	12.37±0.74	nd	2.59±0.16	nd	115.74±6.94	36.20±1.81	81.45±4.07	277.68
	6	23.20±1.39	nd	1.84±0.11	2.22±0.13	9.77±0.59	12.46±0.75	0.46±0.02	2.70±0.16	nd	118.33±5.92	34.71±2.06	83.94±5.04	289.63
30	0	147.55±8.85	66.90±3.35	117.13±5.86	15.14±8.61	17.76±0.89	20.23±1.21	tr	0.45±0.02	0.23±0.01	48.24±2.41	5.39±0.27	12.79±0.64	385.39
	1	73.02±3.65	23.97±1.20	47.47±2.37	11.39±0.68	14.45±0.87	142.47±5.70	0.38±0.02	4.20±0.21	2.10±0.13	88.39±5.30	30.83±1.85	62.09±3.73	500.76
	2	37.70±1.86	nd	10.98±0.55	1.52±0.07	nd	13.61±0.82	nd	2.11±0.13	nd	98.98±5.94	32.78±1.64	70.32±3.52	268.00
	3	33.41±1.67	nd	9.36±0.56	4.35±0.22	11.18±0.56	14.01±0.70	tr	2.84±0.14	nd	108.41±5.42	36.37±2.18	78.64±4.72	298.57
	4	28.46±1.53	nd	6.10±0.37	4.16±0.21	10.78±0.65	13.21±0.79	1.61±0.10	3.19±0.19	nd	126.58±6.33	43.46±2.17	89.65±5.34	327.20
	5	25.36±1.52	nd	3.51±0.21	3.07±0.18	19.82±0.79	11.33±0.57	nd	3.12±0.19	nd	118.94±7.14	39.63±2.38	82.38±4.94	307.16
	6	24.30±1.22	nd	1.80±0.11	9.49±0.57	11.40±0.57	10.98±0.66	9.35±0.56	3.42±0.17	nd	131.71±7.90	40.59±2.44	91.19±4.56	334.23

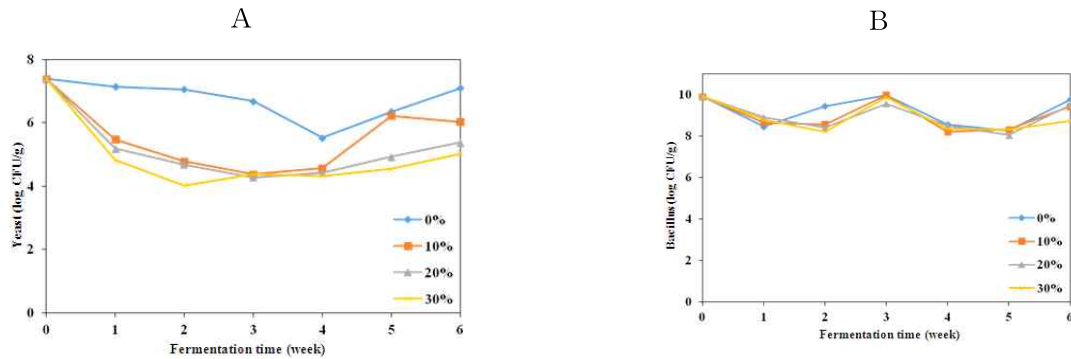


Fig. 21. Changes in viable cell, *Bacillus* (A) and yeast (B) of added garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks.

Table 26. Change on Hunter's color value of low salted garlic *Doenjang* during fermentation

Items	NaCl (%)	Fermentation periods (week)						
		0	1	2	3	4	5	6
L	6	62.9±0.9 ^{aD}	62.1±1.3 ^{aD}	60.9±1.0 ^{aC}	59.5±1.0 ^{aB}	58.8±1.3 ^{abAB}	58.4±1.1 ^{aA}	58.1±0.6 ^{aA}
	8	63.2±1.5 ^{aD}	62.9±0.7 ^{aD}	60.3±1.1 ^{aC}	59.4±1.3 ^{abBC}	58.9±1.1 ^{abAB}	58.2±1.5 ^{aA}	58.3±0.7 ^{aAB}
	10	62.6±1.3 ^{aC}	61.9±1.3 ^{aC}	60.7±1.3 ^{aB}	59.7±0.4 ^{aB}	58.0±1.1 ^{aA}	58.3±1.2 ^{aA}	57.8±0.5 ^{aA}
	12	62.8±0.8 ^{aI}	62.1±1.2 ^{aI}	61.0±1.1 ^{aDI}	60.4±1.1 ^{aCI}	59.6±1.0 ^{bBC}	58.9±0.5 ^{aAB}	57.9±2.5 ^{aA}
a	6	4.2±0.3 ^{aA}	4.5±0.3 ^{bAB}	4.6±0.3 ^{abB}	4.6±0.2 ^{aB}	4.9±0.4 ^{aC}	4.6±0.3 ^{aB}	4.6±0.3 ^{abC}
	8	4.2±0.5 ^{aA}	4.2±0.3 ^{aA}	4.6±0.4 ^{bB}	5.1±0.3 ^{bC}	4.8±0.3 ^{abC}	4.7±0.4 ^{aB}	4.6±0.3 ^{aB}
	10	4.4±0.4 ^{aAB}	4.3±0.3 ^{abAB}	4.2±0.5 ^{aA}	4.6±0.3 ^{aB}	4.9±0.2 ^{aC}	4.6±0.3 ^{aB}	4.5±0.2 ^{aB}
	12	4.1±0.2 ^{aA}	4.5±0.3 ^{abABC}	4.2±0.4 ^{abAB}	4.5±0.3 ^{aABC}	4.6±0.4 ^{aC}	4.5±0.3 ^{aBC}	4.6±0.6 ^{abC}
b	6	17.3±0.4 ^{aA}	17.3±1.1 ^{aA}	17.5±0.6 ^{bA}	17.4±0.3 ^{aA}	18.4±0.9 ^{aB}	17.1±0.5 ^{aA}	17.4±0.6 ^{aA}
	8	17.5±0.5 ^{abA}	17.6±0.6 ^{aA}	17.6±0.5 ^{bA}	17.9±0.5 ^{bA}	17.8±0.7 ^{aA}	17.7±0.6 ^{abA}	17.4±0.7 ^{aA}
	10	17.9±0.4 ^{bCD}	17.5±0.7 ^{abC}	16.8±0.5 ^{aA}	17.3±0.6 ^{aABC}	18.3±1.0 ^{aD}	17.8±0.5 ^{bCD}	17.1±0.3 ^{aCD}
	12	17.6±0.8 ^{abB}	18.4±0.5 ^{bC}	17.4±0.5 ^{bAB}	17.5±0.6 ^{abB}	18.4±0.4 ^{aC}	17.3±0.9 ^{abAB}	16.8±1.3 ^{aA}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-F} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

Table 27. Changes in salinity of low salted garlic *Doenjang* during fermentation 6 weeks.

NaCl (%)	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
6	3.23±0.21 ^{aA}	3.53±0.06 ^{aB}	3.60±0.00 ^{aB}	3.80±0.00 ^{aC}	3.87±0.06 ^{aC}	3.80±0.10 ^{aC}	4.07±0.06 ^{aD}
8	4.23±0.06 ^{bB}	3.93±0.06 ^{bA}	4.47±0.06 ^{bC}	4.50±0.00 ^{bC}	4.40±0.17 ^{bC}	4.70±0.10 ^{bD}	4.37±0.06 ^{bBC}
10	4.37±0.06 ^{baA}	5.37±0.06 ^{cB}	5.33±0.12 ^{cB}	5.50±0.10 ^{cB}	5.73±0.06 ^{cC}	5.50±0.10 ^{cB}	5.80±0.17 ^{cC}
12	5.87±0.15 ^{cB}	5.40±0.00 ^{cA}	5.80±0.10 ^{dB}	6.10±0.10 ^{dC}	6.80±0.10 ^{dD}	6.20±0.10 ^{dC}	6.80±0.00 ^{dD}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-F} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

(다) pH 및 적정 산도의 변화

염 농도가 다른 10% 마늘첨가 된장들을 발효시키면서 추출물의 pH 및 적정산도 변화를 측정하였다 (Table 28). 식염의 첨가량에 따른 된장의 pH는 통계적 유의차는 없었으며, 발효기간

이 경과함에 따라 유의하게 감소하였다. 된장과 같은 발효식품은 일반적으로 발효과정 중에 pH는 저하하고 산도는 증가하며 (Choi SY 등 2006), 식염 농도를 달리하여 제조한 마늘첨가 된장 역시 이와 일치하는 경향을 보였다. 발효기간이 길어지면서 산도는 증가하여 제조 직후 0.076-0.085%에서 발효 6 주차에는 0.131-0.149%였다. 산도가 증가하는 것은 lactic acid, acetic acid, oxalic acid, succinic acid 등과 같은 유기산에 의한 것으로 생각되는데, Kum JS와 Han O (1997)은 발효과정 중 된장의 pH 감소 및 산도 증가는 미생물 대사작용으로 생성되는 유기산들의 축적에서 기인된 결과라고 보고하였다.

Table 28. Change on pH and acid level of low salted garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks

Items	NaCl (%)	Fermentation periods (week)						
		0	1	2	3	4	5	6
pH	6	7.58±0.03 ^{aF}	7.22±0.02 ^{aE}	7.06±0.02 ^{aD}	6.96±0.01 ^{aC}	6.88±0.02 ^{aB}	6.88±0.01 ^{aB}	6.77±0.02 ^{aA}
	8	7.61±0.01 ^{aE}	7.28±0.02 ^{bD}	7.10±0.03 ^{bC}	6.94±0.06 ^{abB}	6.91±0.01 ^{aAB}	6.91±0.01 ^{bAB}	6.88±0.01 ^{bA}
	10	7.59±0.02 ^{aF}	7.35±0.01 ^{cE}	7.15±0.01 ^{cD}	7.00±0.02 ^{bC}	6.93±0.01 ^{aB}	6.95±0.02 ^{cB}	6.90±0.00 ^{bA}
	12	7.60±0.01 ^{aF}	7.39±0.00 ^{dE}	7.19±0.01 ^{dD}	7.09±0.01 ^{cC}	6.99±0.04 ^{bB}	7.00±0.01 ^{dB}	6.91±0.06 ^{bA}
Acid (%)	6	0.085±0.001 ^{bA}	0.113±0.004 ^{cB}	0.126±0.002 ^{dC}	0.131±0.003 ^{bD}	0.137±0.005 ^{bE}	0.138±0.001 ^{bE}	0.149±0.002 ^{fF}
	8	0.077±0.002 ^{aA}	0.102±0.005 ^{bB}	0.121±0.003 ^{cC}	0.126±0.007 ^{bC}	0.127±0.003 ^{aC}	0.134±0.003 ^{abD}	0.138±0.002 ^{bD}
	10	0.077±0.002 ^{aA}	0.101±0.008 ^{abB}	0.116±0.002 ^{bC}	0.123±0.006 ^{abC}	0.123±0.005 ^{aC}	0.133±0.004 ^{aD}	0.134±0.001 ^{aD}
	12	0.076±0.002 ^{aA}	0.091±0.000 ^{abB}	0.111±0.003 ^{aC}	0.116±0.001 ^{aD}	0.123±0.003 ^{aE}	0.128±0.003 ^{aF}	0.131±0.003 ^{aF}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-F} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

(라) 환원당 함량의 변화

Table 29는 저장기간에 따른 염 농도별 마늘된장의 환원당 측정 결과로, 발효기간이 경과할 수록 환원당 함량은 유의적으로 증가하였고 식염농도가 높을수록 환원당 함량이 더 낮았다. 된장 제조직후 식염 6% 첨가 시료의 환원당 함량은 1.88 g/100 g으로 8, 10 및 12% 염 첨가구에 비해 각각 1.6%, 26.6% 및 28.7% 더 높았다. 식염 6% 첨가군의 경우 발효 6 주차 환원당 함량은 9.13 g/100 g으로 제조 직후에 비해 4.9 배 증가하였고, 식염 10%와 12% 첨가군은 각각 7.94 g/100 g 및 7.25 g/100 g으로 값은 더 낮았지만 증가폭은 5.7 배와 5.4 배 씩이었다.

Table 29. Change on reducing sugar content of low salted garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks. (g/100 g)

NaCl (%)	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
6	1.88±0.02 ^{bA}	3.42±0.03 ^{dB}	5.13±0.15 ^{cC}	6.22±0.11 ^{dD}	7.51±0.56 ^{bF}	7.39±0.01 ^{cE}	9.13±0.17 ^{dG}
8	1.85±0.20 ^{bA}	3.11±0.01 ^{cB}	5.04±0.08 ^{cC}	5.94±0.07 ^{cD}	6.87±0.22 ^{abE}	7.44±0.09 ^{cF}	8.32±0.12 ^{cF}
10	1.38±0.01 ^{aA}	2.92±0.00 ^{bB}	4.65±0.07 ^{bC}	5.71±0.04 ^{bD}	6.84±0.66 ^{abE}	6.86±0.04 ^{bE}	7.94±0.10 ^{bG}
12	1.34±0.01 ^{aA}	2.27±0.01 ^{aB}	3.94±0.01 ^{aC}	4.97±0.07 ^{aD}	6.32±0.07 ^{aE}	6.17±0.07 ^{aE}	7.25±0.05 ^{aF}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-F} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

(마) 아미노태 질소 함량의 변화

식염 농도를 달리하여 제조된 마늘된장의 아미노태 질소 (Table 30)는 식염 농도가 증가할 수록 함량이 낮았으며, 발효기간이 길어질수록 유의하게 증가하였다. 된장 제조 직후 식염 6% 첨가군의 아미노태 질소 함량은 114.35 mg%였으나 식염 12% 첨가군에서는 101.96 mg%로 그

함량이 더 낮았는데, 발효기간 경과와 더불어 그 값이 점차 증가하여 6 주 후에는 각각 287.39 mg%와 212.63 mg%로 통계적인 유의차를 보였다.

Table 30. Changes in amino nitrogen content of low salted garlic *Doenjang* during fermentation. (mg%)

NaCl (%)	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
6	114.35±13.11 ^{abA}	165.59±9.20 ^{cB}	205.14±3.51 ^{cC}	209.46±26.24 ^{bcC}	248.84±6.98 ^{cdD}	274.00±3.03 ^{ceE}	287.39±10.74 ^{deE}
8	127.32±8.26 ^{baA}	146.52±11.97 ^{bcA}	196.63±30.61 ^{cbB}	187.87±7.66 ^{bbB}	241.01±12.42 ^{ccC}	230.14±15.37 ^{bcC}	253.38±2.44 ^{ccC}
10	121.11±8.78 ^{abA}	124.72±14.59 ^{aA}	158.91±8.01 ^{bbB}	156.79±8.17 ^{abB}	204.19±9.27 ^{bcC}	214.06±15.30 ^{bcdD}	231.96±7.71 ^{bdD}
12	101.96±12.15 ^{aaA}	129.42±2.96 ^{abB}	117.28±13.14 ^{aaB}	145.80±11.07 ^{acC}	181.05±9.28 ^{adD}	188.36±5.95 ^{adD}	212.63±2.78 ^{aeE}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-d} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-F} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

(바) 이소플라본 함량 변화

Table 31은 식염 농도별 마늘 된장의 발효 중 이소플라본 함량 변화를 나타낸 결과이다. 발효 경과에 따라 이소플라본 총 함량은 감소하는 경향이었는데 제조 직후에는 566.36-679.96 $\mu\text{g/g}$ 이었으나 발효 6 주차에는 196.48-275.99 $\mu\text{g/g}$ 으로 시료군에 따라 많게는 3.4 배, 작게는 2.1 배 감소하였다. 식염 첨가 농도에 따른 차이는 크게 두드러지지 않았으나, 8% 첨가군이 특히적으로 제조 직후에는 시료군 중 가장 작은 경향을 보인 반면 발효 6 주차에는 가장 높은 함량을 나타내었다. 발효 시간의 경과에 따라 배당체 형태의 이소플라본은 감소하고 비배당체 형태가 증가하는 것도 확인할 수 있었다. Jo SJ 등 (2011)이 장기간 발효에 따른 전통된장의 이소플라본 함량을 측정 한 결과, 배당체 형태의 daidzin, glycitin 및 genistin은 미량 존재하였으며, 비배당체 형태의 daidzein과 genistein은 발효기간에 따라 증가하는 경향을 보인다고 하였는데 이는 본 연구 결과와도 일치한다.

(사) 미생물 수 변화

식염 농도를 달리한 마늘 10% 첨가 된장의 발효 중 생균수를 측정 한 결과는 Fig. 22와 같다. *Bacillus* 균수는 발효 1-2 주까지는 증가하였으나 발효가 진행될수록 완만하게 감소하는 경향을 나타내었다 (A). 반면에 효모는 발효기간 동안 점차 감소하는 경향을 나타내었고 발효 1주에 가장 감소폭이 컸다. 식염 농도가 높을수록 효모는 더 많이 감소하였다 (B). 발효 2 주까지는 염 농도에 따른 효모의 균수 차이가 컸으나 발효 3 주부터는 큰 차이없이 불규칙한 미량 증감을 보였다.

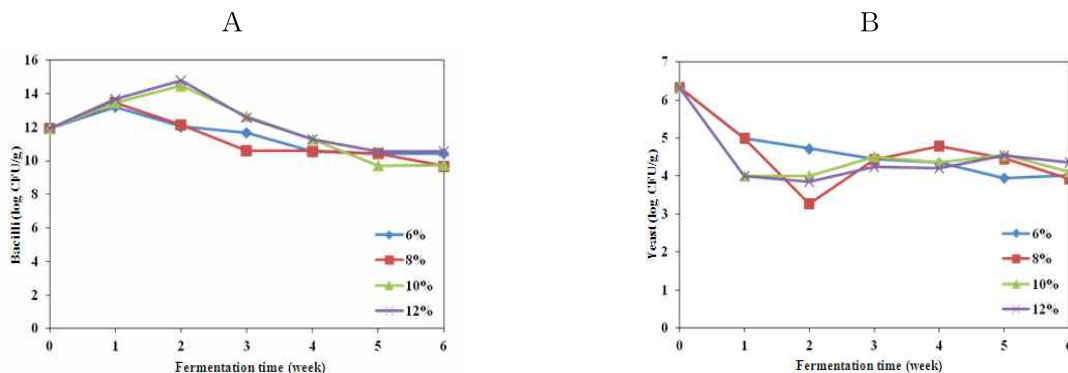


Fig. 22. Changes in cell number of *Bacillus*(A) and yeast (B) of low salted *Doenjang* during fermentation for 6 weeks.

Table 31. Changes in isoflavone contents of low salted garlic *Doenjang* during fermentation for 6 weeks

NaCl (%)	Ferm. periods (week)	Glycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides		Aglycones			Totals
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	
6	0	217.23±10.86	85.59±5.14	233.48±14.00	29.29±1.17	17.54±0.70	48.34±0.19	nd	tr ⁴⁾	31.67±1.58	nd	8.98±0.45	667.14
	1	176.46±8.83	53.94±3.24	151.08±9.06	27.88±1.67	27.89±1.12	46.24±1.85	2.98±0.15	nd ³⁾	63.14±3.16	24.18±1.21	53.64±2.68	552.61
	2	115.93±6.96	29.26±1.76	78.57±3.93	22.44±0.90	25.22±1.01	39.00±1.56	2.81±0.14	nd	95.23±4.76	30.43±1.52	82.92±4.15	408.46
	3	88.31±4.27	26.83±1.61	38.68±1.93	17.28±0.69	25.98±1.04	32.95±1.32	3.06±0.15	nd	128.33±6.42	34.70±1.74	106.58±5.33	361.42
	4	63.89±3.42	nd	20.34±1.02	12.95±0.52	22.70±0.91	26.87±1.07	2.81±0.14	nd	125.34±6.27	31.44±1.57	102.38±5.12	274.9
	5	49.69±2.48	nd	9.89±0.59	5.98±0.24	13.88±0.56	19.67±0.79	1.09±0.05	nd	131.88±6.59	31.30±1.57	107.52±5.38	232.08
	6	30.35±1.52	nd	1.81±0.11	2.02±0.08	11.09±0.44	16.88±0.68	1.09±0.05	nd	133.24±6.66	30.13±1.51	108.45±5.42	196.48
8	0	196.43±9.82	91.94±4.60	247.25±12.36	30.32±1.82	25.93±1.56	51.86±3.11	5.14±0.26	nd	28.58±1.43	nd	7.20±0.36	677.45
	1	166.24±9.97	50.66±3.04	142.60±8.56	25.71±1.54	24.32±1.46	44.04±2.64	2.37±0.12	nd	52.13±2.61	20.44±1.02	43.56±2.18	508.07
	2	94.13±4.71	nd	52.73±2.11	12.92±0.78	12.03±0.72	30.10±1.81	1.16±0.06	nd	104.94±5.25	31.14±1.56	94.58±4.73	308.01
	3	75.28±4.52	nd	39.59±2.34	12.57±0.75	12.48±0.75	28.98±1.74	1.12±0.06	nd	107.85±5.39	29.38±1.47	94.42±4.72	277.87
	4	60.70±3.03	nd	21.61±1.30	9.80±0.59	11.21±0.67	24.98±1.50	1.12±0.06	nd	116.35±5.82	30.02±1.50	98.49±4.92	245.77
	5	50.78±2.54	nd	15.44±0.93	8.28±0.50	11.74±0.70	22.40±1.34	1.10±0.06	nd	118.89±5.94	29.54±1.48	99.24±4.96	228.63
	6	40.35±2.42	nd	8.56±0.43	5.51±0.33	10.06±0.60	19.89±1.19	1.06±0.05	nd	122.57±6.13	29.38±1.47	100.29±5.01	208
10	0	185.23±11.11	78.82±4.73	192.36±9.62	24.97±1.60	12.94±0.78	40.46±2.43	3.82±0.23	1.91±0.11	27.87±1.67	nd	7.55±0.45	568.38
	1	175.06±10.50	43.50±2.61	151.13±7.56	22.77±1.87	13.74±0.82	40.11±2.41	1.05±0.06	0.52±0.03	51.41±3.08	20.79±1.25	44.82±2.69	499.29
	2	109.45±6.57	38.72±2.32	70.04±3.50	22.67±1.88	23.25±1.40	17.50±1.05	2.06±0.12	nd	78.89±4.73	26.60±1.60	70.54±4.23	362.58
	3	86.88±5.21	38.57±2.31	45.49±1.82	20.74±1.24	24.33±1.46	36.03±2.16	2.08±0.12	nd	94.91±5.69	28.15±1.69	82.49±4.95	349.03
	4	72.73±4.36	28.64±1.43	27.95±1.68	17.10±1.08	19.51±1.17	30.38±1.82	1.58±0.09	nd	112.16±6.73	30.12±1.81	95.65±5.74	310.05
	5	51.93±3.12	nd ³⁾	14.27±0.86	9.56±0.67	9.86±0.59	25.70±1.54	1.07±0.06	nd	115.94±6.96	29.45±1.77	97.68±5.86	231.33
	6	49.70±2.49	24.55±1.47	12.55±0.75	12.95±0.78	24.67±1.48	25.80±1.55	1.75±0.11	0.87±0.05	123.15±7.39	30.27±1.82	102.23±6.13	275.99
12	0	207.74±12.46	93.08±5.58	224.47±11.22	32.92±1.08	24.92±1.50	55.46±3.33	5.70±0.34	2.85±0.17	32.84±1.97	nd	7.69±0.46	679.98
	1	187.06±9.35	57.14±2.29	171.46±10.29	27.30±1.84	24.38±1.46	46.96±2.82	2.19±0.13	1.09±0.07	44.10±2.65	17.26±1.04	33.73±2.02	561.68
	2	122.02±7.32	30.35±1.82	90.87±5.45	20.87±1.26	22.14±1.33	36.63±2.20	1.84±0.11	nd	66.44±3.99	23.40±1.40	57.84±3.47	391.16
	3	108.61±5.43	29.87±1.79	71.47±4.29	20.27±1.22	23.77±1.43	36.84±2.21	2.48±0.15	nd	87.67±5.26	28.59±1.72	73.61±4.42	380.98
	4	69.28±4.16	nd	33.29±1.66	9.01±0.54	9.92±0.60	25.26±1.52	0.83±0.05	nd	91.00±5.46	26.00±1.56	78.94±4.74	238.59
	5	64.15±3.21	nd	31.02±1.86	8.38±0.50	10.19±0.61	24.67±1.48	0.90±0.05	nd	10.25±0.62	27.09±1.63	83.24±4.99	149.56
	6	50.34±3.02	nd	18.56±1.11	7.47±0.44	11.08±0.66	23.09±1.39	0.99±0.06	nd	111.39±6.68	28.31±1.70	93.51±5.61	222.92

Mok CK 등 (2005)은 8, 10, 12, 14%의 염을 첨가하여 제조한 된장은 염 농도에 따라 미생물 수에 차이를 보이는데, 염도가 낮을수록 세균, 곰팡이 및 효모가 감소하였다고 하였다. 메주 발효에 관여하는 *Bacillus*는 주로 가수분해 효소를 생산하여 영양물질을 분해하는 역할을 하는데, 염이 첨가되는 된장의 발효과정에는 활성이 미미한 것으로 알려져 있다 (Lee NS와 Oh NS 1996). 효모에 의한 된장 발효는 된장의 풍미와 품질을 결정하는 중요한 요인이나 지나치게 많은 효모는 이상발효를 일으키고 가스를 발생시켜 된장제품의 포장 및 유통에 악영향을 미치기도 한다 (Mok CK 등 2005). 본 연구에서는 발효 초기 *Bacillus* 생육은 촉진된 반면 효모 생육은 억제되었고, 발효 3 주부터는 이들 모두 일정 수준의 균수를 유지하고 있어 저염 된장 제조시 마늘 첨가는 *Bacillus* 생육은 유지하되, 이상발효는 억제시키고, 적절한 발효 속도를 유지하는데 기여할 것으로 판단된다.

(3) 전처리를 달리한 마늘을 첨가한 마늘 된장의 발효 중 품질 특성 변화

(가) 색도의 변화

생마늘, 발아마늘, 발효마늘, 증숙마늘을 첨가한 된장과 마늘 무첨가 된장의 6 주간의 발효기간 중 색도 변화는 Table 32와 같다. L 값은 발효기간이 경과함에 따라 모든 시료군에서 유의적으로 감소하였고 시료군간에 차이가 없었다. 적색도 값은 제조 직후와 비교하여 전반적으로 발효기간에 따라 증가하였으며 마늘을 첨가하지 않은 일반 된장이 마늘 첨가 된장들보다 그 값이 높았다. 황색도는 발효기간 및 시료군들 간에 일정한 경향을 보이지 않았다.

Table 32. Changes in Hunter's color value of *Doenjang* added to each type of garlic during fermentation for 6 weeks.

Items	Sample code ¹⁾	Fermentation periods (week)						
		0	1	2	3	4	5	6
L	C	62.0±1.5 ^{aC}	60.9±1.3 ^{ab}	59.7±1.0 ^{aA}	59.4±1.1 ^{aA}	59.1±1.1 ^{aA}	59.0±1.2 ^{aA}	58.7±0.8 ^{aA}
	NTG	62.6±1.1 ^{aC}	60.6±1.4 ^{ab}	60.3±1.0 ^{ab}	60.9±1.1 ^{bB}	58.9±0.5 ^{aA}	58.7±0.7 ^{aA}	58.8±1.5 ^{aA}
	SPG	62.2±0.7 ^{aE}	60.9±0.7 ^{ad}	59.8±1.2 ^{aC}	59.2±0.6 ^{abC}	59.3±0.6 ^{abC}	58.8±0.5 ^{aAB}	58.1±0.4 ^{aA}
	FG	63.1±2.0 ^{ad}	60.6±1.0 ^{aC}	59.3±1.2 ^{ab}	59.4±0.5 ^{ab}	59.7±1.1 ^{abC}	59.0±0.9 ^{aAB}	58.1±0.7 ^{aA}
	STG	62.4±1.2 ^{ad}	60.3±0.7 ^{aC}	60.0±1.0 ^{abC}	59.8±1.1 ^{abC}	59.0±1.6 ^{aAB}	58.7±0.6 ^{aA}	58.2±1.1 ^{aA}
a	C	4.7±0.6 ^{bA}	4.8±0.4 ^{aA}	5.0±0.2 ^{cAB}	5.3±0.4 ^{cB}	5.3±0.3 ^{bB}	5.4±0.5 ^{cB}	5.4±0.4 ^{cB}
	NTG	4.2±0.4 ^{aA}	4.8±0.6 ^{ab}	4.7±0.2 ^{bB}	4.6±0.4 ^{ab}	4.9±0.2 ^{ab}	5.0±0.2 ^{bB}	4.8±0.8 ^{ab}
	SPG	4.0±0.4 ^{aA}	4.4±0.3 ^{aBC}	4.2±0.2 ^{aB}	4.7±0.4 ^{abDE}	4.6±0.2 ^{aCD}	4.7±0.2 ^{aCD}	5.0±0.3 ^{abE}
	FG	4.4±0.2 ^{abA}	4.7±0.4 ^{ab}	5.2±0.3 ^{cD}	4.8±0.3 ^{abBC}	4.9±0.3 ^{aBCD}	4.9±0.3 ^{bBCD}	5.0±0.3 ^{abCD}
	STG	4.3±0.5 ^{abA}	4.5±0.3 ^{aAB}	4.7±0.3 ^{bBC}	5.0±0.3 ^{cCD}	4.9±0.6 ^{aCD}	5.1±0.2 ^{bCD}	5.2±0.3 ^{abD}
b	C	17.8±0.6 ^{bB}	17.0±0.6 ^{bcA}	16.6±0.9 ^{aA}	16.6±1.0 ^{abA}	16.9±0.6 ^{abA}	17.2±0.7 ^{bAB}	17.1±0.6 ^{aA}
	NTG	17.3±0.5 ^{bA}	17.2±0.7 ^{cA}	17.1±0.9 ^{aA}	17.2±0.5 ^{bA}	17.2±0.4 ^{bA}	17.1±0.3 ^{bA}	16.8±1.3 ^{aA}
	SPG	16.6±0.7 ^{aA}	16.3±0.3 ^{aA}	16.4±0.7 ^{aA}	16.2±0.6 ^{aA}	16.5±0.4 ^{aA}	16.5±0.4 ^{aA}	16.5±0.6 ^{aA}
	FG	17.4±0.9 ^{bD}	16.7±0.6 ^{abcABC}	17.2±0.7 ^{cD}	16.2±0.6 ^{aA}	17.0±0.3 ^{abBCD}	16.6±0.6 ^{aABC}	16.5±0.4 ^{aAB}
	STG	17.2±0.9 ^{abA}	16.6±0.7 ^{abA}	16.8±0.6 ^{aA}	17.2±0.7 ^{bA}	16.5±0.6 ^{aA}	16.8±0.5 ^{abA}	17.2±1.1 ^{aA}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-c} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-E} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

¹⁾C ; Control, garlic not added sample, NTG ; non-treated fresh garlic, SPG ; sprouted garlic, FG ; fermented garlic, STG ; steamed garlic

(나) 염도의 변화

전처리를 달리한 마늘 첨가 된장의 염도를 측정된 결과 (Table 33), 마늘을 첨가하지 않은 된장은 발효가 경과함에 따라 염도가 상승하였다. 생마늘 및 발효마늘 첨가된장들은 마늘 무첨가 구와 마찬가지로 발효 경과에 따라 염도가 증가한 반면 발아마늘 첨가된장의 염도는 일정 수준 증가하다가 다시 감소하였고 증숙마늘 첨가 된장은 통계학적으로 일정한 변화의 양상을 보이지 않았다. 전체적으로 마늘 무첨가 된장에서 염도는 가장 큰 폭으로 증가하였다.

Table 33. Changes in salinity of *Doenjang* added to each type of garlic during fermentation (%)

Sample code ¹⁾	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
C	5.23±0.06 ^{aA}	5.57±0.15 ^{cB}	5.47±0.06 ^{cB}	5.90±0.00 ^{dC}	5.97±0.15 ^{cC}	5.87±0.06 ^{dC}	6.00±0.10 ^{cC}
NTG	5.23±0.15 ^{aA}	5.27±0.06 ^{bA}	5.57±0.06 ^{dB}	5.77±0.12 ^{cdB}	5.60±0.17 ^{bB}	5.63±0.12 ^{cB}	5.67±0.15 ^{bB}
SPG	5.33±0.06 ^{aC}	5.30±0.10 ^{abBC}	5.37±0.06 ^{bC}	5.60±0.10 ^{bD}	5.43±0.06 ^{bC}	5.17±0.06 ^{aAB}	5.07±0.12 ^{aA}
FG	5.17±0.06 ^{aA}	5.47±0.15 ^{bcB}	5.43±0.06 ^{bcB}	5.63±0.06 ^{bcC}	5.63±0.06 ^{bC}	5.40±0.00 ^{bB}	5.77±0.06 ^{bC}
STG	5.33±0.12 ^{aCD}	5.23±0.06 ^{aABC}	5.10±0.00 ^{aA}	5.30±0.10 ^{aBCD}	5.13±0.06 ^{aAB}	5.43±0.06 ^{bD}	5.27±0.15 ^{aABCD}

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-c} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-D} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

¹⁾ Refer to the footnote of Table 32.

(다) pH 및 적정 산도 변화

전처리를 달리한 마늘 첨가 된장의 발효 중 pH 및 적정산도 변화를 측정한 결과는 Table 34와 같다.

Table 34. Changes in pH and acid level of *Doenjang* added to each type of garlic during fermentation for 6 weeks.

Items	Sample code ¹⁾	Fermentation periods (week)						
		0	1	2	3	4	5	6
pH	C	7.77±0.01 ^{bF}	7.43±0.02 ^{bE}	7.34±0.01 ^{dD}	7.22±0.01 ^{bC}	7.12±0.02 ^{bB}	7.10±0.02 ^{bB}	7.03±0.02 ^{bA}
	NTG	7.77±0.02 ^{bF}	7.40±0.02 ^{abE}	7.33±0.02 ^{cdD}	7.23±0.01 ^{bC}	7.14±0.02 ^{bB}	7.05±0.02 ^{abA}	7.05±0.02 ^{bA}
	SPG	7.76±0.02 ^{abF}	7.39±0.01 ^{abE}	7.26±0.01 ^{bD}	7.21±0.01 ^{bC}	7.12±0.02 ^{bB}	7.03±0.01 ^{aA}	7.01±0.02 ^{abA}
	FG	7.72±0.02 ^{abE}	7.36±0.01 ^{aD}	7.30±0.04 ^{cC}	7.21±0.07 ^{bB}	7.06±0.01 ^{aA}	7.06±0.01 ^{aA}	7.01±0.01 ^{abA}
	STG	7.70±0.08 ^{aE}	7.37±0.06 ^{aD}	7.22±0.01 ^{aC}	7.13±0.02 ^{aB}	7.06±0.01 ^{aB}	7.07±0.04 ^{aB}	6.97±0.04 ^{aA}
Acid (%)	C	0.069±0.000 ^{abA}	0.094±0.006 ^{abB}	0.104±0.001 ^{bC}	0.107±0.001 ^{aC}	0.115±0.003 ^{cd}	0.118±0.002 ^{bd}	0.123±0.001 ^{abE}
	NTG	0.068±0.001 ^{abA}	0.091±0.002 ^{abB}	0.097±0.001 ^{aC}	0.104±0.001 ^{ad}	0.104±0.001 ^{ad}	0.117±0.001 ^{bE}	0.118±0.006 ^{aE}
	SPG	0.067±0.001 ^{abA}	0.090±0.002 ^{abB}	0.098±0.001 ^{aC}	0.106±0.002 ^{ad}	0.110±0.001 ^{bE}	0.115±0.000 ^{abF}	0.119±0.001 ^{abG}
	FG	0.067±0.004 ^{aA}	0.093±0.002 ^{abB}	0.104±0.003 ^{bc}	0.112±0.002 ^{bd}	0.112±0.003 ^{bcd}	0.111±0.004 ^{ad}	0.119±0.003 ^{abE}
	STG	0.074±0.006 ^{ba}	0.097±0.003 ^{bb}	0.106±0.004 ^{bc}	0.115±0.003 ^{bd}	0.113±0.003 ^{bcd}	0.115±0.003 ^{bd}	0.125±0.001 ^{bE}

Each value represents mean±SD (n=3)

^{a-c} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-G} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

¹⁾ Refer to the footnote of Table 32.

발효 기간이 경과함에 따라 모든 시료의 pH는 유의적으로 감소하고 반대로 산도는 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 마늘을 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 마늘 첨가 된장의 pH는 다소 높은 경향이었으나 큰 차이는 없었다. 적정산도 변화는 일정한 경향을 확인 할 수는 없었다. 전반적으로 증숙마늘 첨가 된장이 pH는 낮고 산도는 높은 결과를 나타내었다.

(라) 환원당 함량의 변화

Table 35는 전처리를 달리한 마늘 첨가 된장의 환원당 함량 변화를 측정한 결과이다. 발효 기간 경과에 따라 증가하여 발효 6 주차에는 7.07-7.97 g/100 g 함량을 나타내었는데 이는 제조 직후와 비교하여 2.9-3.9 배 증가한 수치이다. 대부분의 발효주간에서 마늘 무첨가 된장이 가장 높은 결과를 나타내었는데, 발효 후기로 갈수록 그 경향이 뚜렷하였다. 그러나 마늘 전처

리 방법 차이에 따른 결과는 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다.

Table 35. Change on reducing sugar content of *Doenjang* added to each type of garlic during fermentation for 6 weeks. (g/100 g)

Sample code ¹⁾	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
C	2.04±0.04 ^{aA}	4.39±0.04 ^{cB}	5.04±0.03 ^{bcC}	5.69±0.07 ^{cd}	6.63±0.03 ^{dE}	6.85±0.02 ^{dE}	7.97±0.37 ^{bfF}
NTG	2.12±0.02 ^{cA}	3.92±0.02 ^{aB}	4.94±0.05 ^{abC}	5.39±0.05 ^{bd}	6.33±0.04 ^{bE}	6.39±0.03 ^{bE}	7.91±0.58 ^{bfF}
SPG	2.05±0.01 ^{abA}	4.47±0.03 ^{dB}	5.02±0.09 ^{bcC}	5.61±0.08 ^{bcd}	6.47±0.07 ^{cE}	5.86±0.11 ^{aF}	7.07±0.29 ^{aG}
FG	2.08±0.01 ^{bcA}	4.10±0.01 ^{bb}	4.88±0.05 ^{aC}	5.09±0.26 ^{aC}	6.33±0.04 ^{bE}	5.88±0.12 ^{aD}	7.54±0.17 ^{abF}
STG	2.45±0.01 ^{dA}	4.76±0.01 ^{eb}	5.09±0.02 ^{cC}	5.54±0.06 ^{bcd}	6.24±0.03 ^{aE}	6.60±0.02 ^{cf}	7.18±0.18 ^{aG}

Each value represents mean±SD (n=3)

^{a-c} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-G} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

¹⁾ Refer to the footnote of Table 32.

(마) 아미노태 질소 함량의 변화

전처리를 달리한 마늘 첨가 된장의 아미노태 질소 함량 변화를 측정한 결과는 Table 36과 같다. 발효 기간이 경과함에 따라 아미노태 질소 함량은 증가하였고 제조 직후와 비교하여 발효 6 주차에는 2 배 가량 증가한 것을 확인할 수 있었다. 발효 초기에 그 함량이 큰 폭으로 증가한 후 중후반에는 거의 증가하지 않거나 소폭 증가하는 것을 알 수 있었다. 마늘의 전처리 방법에 따른 환원당 함량 차이는 통계적으로 존재하지 않았고 마늘 무첨가 된장과 마늘 첨가 된장들 간에도 유의적인 차이는 없었다.

Table 36. Change on amino type nitrogen content of *Doenjang* added to each type of garlic during fermentation for 6 weeks. (mg%)

Sample code ¹⁾	Fermentation periods (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
C	106.35±16.48 ^{aA}	168.45±21.63 ^{ab}	200.49±1.80 ^{bc}	214.68±2.52 ^{acd}	216.35±1.63 ^{abcd}	220.26±4.78 ^{abcd}	230.27±6.69 ^{ad}
NTG	102.82±6.67 ^{aA}	150.10±6.49 ^{ab}	207.96±5.34 ^{bc}	216.06±7.10 ^{acd}	220.52±2.80 ^{abcd}	196.45±31.32 ^{aC}	237.48±9.05 ^{ad}
SPG	110.66±8.84 ^{aA}	150.80±4.20 ^{ab}	207.32±3.61 ^{bc}	212.75±5.20 ^{acd}	210.79±8.34 ^{abcd}	226.69±10.79 ^{abDE}	234.91±20.01 ^{aE}
FG	117.50±15.93 ^{aA}	142.22±6.55 ^{ab}	181.90±1.68 ^{aC}	214.84±5.84 ^{ade}	205.03±13.83 ^{ad}	239.66±3.14 ^{bf}	223.72±4.17 ^{aE}
STG	114.13±11.44 ^{aA}	148.16±18.43 ^{ab}	189.82±9.36 ^{aC}	220.92±1.48 ^{ad}	223.12±6.66 ^{bd}	217.71±19.79 ^{abd}	230.54±3.20 ^{ad}

Each value represents mean±SD (n=3)

^{a-c} Means with different in the same column are significantly different at $p<0.05$.

^{A-F} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p<0.05$.

¹⁾ Refer to the footnote of Table 32.

(바) 유리 아미노산 함량의 변화

마늘을 첨가하지 않은 된장 (대조구)을 6 주간 발효시키면서 유리 아미노산 함량을 측정한 결과는 Table 37과 같다. 유리 아미노산 함량은 발효 기간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하였고 발효 6 주차에 1551.58 mg/100 g 함량을 보였다. 이는 제조 직후와 비교하여 2.4 배 증가한 수치이다. 제조 직후 유리 아미노산은 L-proline > L-homocystine > L-arginine > L-glutamic acid 순으로 함량이 높았으나 126.70 mg/100 g의 함량을 보인 L-proline을 제외한 L-homocystine, L-arginine 및 L-glutamic acid은 수치의 차이가 1.28 mg/100 g으로 매우 작았다. 하지만 발효 6 주차에는 L-glutamic acid > L-proline > L-arginine > L-isoleucine 순으로 그 함량이 높은 것을 확인할 수 있었는데, 특히 L-glutamic acid 함량은 231.89 mg/100

g으로 제조 직후와 비교하여 3.7 배 큰 폭으로 상승하였다. 두 번째로 함량이 높은 L-proline은 133.43 mg/100 g으로 제조 직후와 비교하여 소폭 상승하였다. 제조 직후 65.44 mg/100 g으로 3 번째로 많았던 L-homocystine은 발효 6 주차에 60.49 mg/100 g으로 다소 감소하였다.

Table 38은 생마늘을 첨가한 된장의 발효 중 유리 아미노산 함량을 측정한 결과이다. 생마늘 첨가 된장 역시 발효 기간 경과에 따라 유리 아미노산 함량은 증가하였으나 대조구보다는 유리 아미노산 함량이 낮았다. 제조 직후의 총 유리 아미노산 함량은 355.09 mg/100 g으로 대조구 함량의 54.1% 수준이었다. 발효 6 주차에는 그 차가 줄어들었으나 여전히 대조구보다

Table 37. Changes in free amino acids content of *Doenjang* (control) without garlic during fermentation for 6 weeks. (mg/100 g)

Free amino acids	Fermentation period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
L-Aspartic Acid	8.30	19.79	17.23	19.90	38.79	32.91	31.23
L-Threonine	9.84	26.75	22.91	25.65	34.41	38.29	36.59
L-Serine	10.69	27.45	26.78	26.56	54.11	44.56	44.52
L-Asparagine	15.83	14.22	27.82	27.45	53.60	45.84	43.14
L-Glutamic acid	62.90	122.63	141.44	221.37	231.05	223.33	231.89
Sarcosine	11.33	17.07	21.17	46.89	56.42	51.64	55.74
L-Proline	126.70	124.32	127.72	122.44	116.29	104.01	133.43
Glycine	16.36	19.72	12.86	18.14	21.31	26.43	27.40
L-Alanine	32.13	40.85	40.80	39.49	69.98	66.50	71.61
L-Citrulline	1.48	1.78	2.34	2.87	1.80	2.07	5.61
L-Valine	24.36	42.22	36.28	49.91	65.45	64.93	63.28
L-Cystine	3.31	1.50	0.31	0.94	0.24	0.20	0.23
L-Methionine	7.04	13.10	30.89	31.61	31.21	39.97	39.59
L-Isoleucine	58.73	123.20	121.37	125.91	131.90	135.45	141.32
L-Leucine	43.57	58.68	73.68	85.82	91.41	84.99	87.80
β-Alanine	35.36	82.39	73.50	85.17	102.50	54.86	74.30
L-Homocystine	65.44	54.64	59.27	56.10	67.22	50.40	60.49
Ornithine	40.91	53.93	57.26	56.46	137.44	135.96	132.98
L-Histidine	17.49	24.70	33.18	34.70	69.01	69.13	122.28
L-Arginine	64.50	108.52	108.17	117.16	150.72	150.86	148.15
Total	656.28	977.46	1034.99	1194.53	1524.86	1422.34	1551.58

Table 38. Changes in free amino acids content of *Doenjang* with fresh garlic during fermentation for 6 weeks. (mg/100 g)

Free amino acids	Fermentation period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
L-Aspartic Acid	4.48	4.45	6.74	4.14	4.36	4.23	3.94
L-Threonine	4.16	7.77	10.07	19.63	20.67	23.91	22.84
L-Serine	5.45	7.13	11.82	21.46	23.66	32.82	35.53
L-Asparagine	12.63	13.13	17.25	24.49	25.13	40.43	37.73
L-Glutamic acid	33.75	71.82	81.85	125.85	141.83	149.95	155.95
Sarcosine	5.76	10.81	14.70	29.16	44.25	42.60	40.14
L-Proline	25.79	42.44	86.17	94.22	104.42	198.99	194.56
Glycine	5.80	6.82	12.95	17.80	17.32	24.96	30.21
L-Alanine	10.37	13.89	26.57	27.04	42.42	54.69	81.43
L-Citrulline	0.10	0.19	0.33	0.51	3.74	3.84	3.57
L-Valine	5.33	9.45	19.73	40.69	47.79	45.86	48.27
L-Cystine	3.17	3.53	3.52	4.25	5.20	5.05	5.86
L-Methionine	6.35	5.15	7.21	16.51	15.62	30.84	67.34
L-Isoleucine	60.24	62.47	68.02	61.56	67.88	102.81	127.61
L-Leucine	31.79	32.22	37.98	48.23	43.95	83.48	80.00
β-Alanine	33.26	38.68	39.26	37.96	53.03	62.44	79.93
L-Homocystine	13.89	13.55	16.58	12.50	14.89	16.72	15.81
Ornithine	25.46	26.56	26.61	45.63	46.58	50.84	46.92
L-Histidine	8.06	8.42	8.62	8.45	13.17	13.32	16.36
L-Arginine	59.25	66.48	77.24	129.97	129.94	135.07	235.67
Total	355.09	444.95	573.22	770.07	865.84	1122.86	1329.68

낮은 1329.68 mg/100 g의 수치를 보였다. 생마늘 첨가 된장의 유리 아미노산 함량은 대조구 뿐 아니라 다른 방식으로 전처리한 마늘첨가 된장들 보다 낮았다. 생마늘 첨가 된장의 유리 아미노산은 제조 직후에는 L-isoleucine > L-arginine > L-glutamic acid > β-alanine 순이었으며 그 함량은 각각 60.24 mg/100 g, 59.25 mg/100 g, 33.75 mg/100 g, 33.26 mg/100 g였다. 발효 6 주차에는 L-arginine과 제조 직후에 25.79 mg/100 g에 불과하였던 L-proline의 함량이 큰 폭으로 증가하여 235.67 mg/100 g와 194.56 mg/100 g으로 가장 많았으며, 155.95 mg/100 g의 L-glutamic acid와 127.61 mg/100 g의 L-isoleucine이 뒤를 이었다.

발아 마늘 첨가 된장의 발효 기간 중 유리 아미노산 함량 변화를 측정한 결과는 Table 39와 같다. 제조 직후 922.32 mg/100 g이던 함량이 지속적으로 상승하여 발효 6 주차에는 1650.40 mg/100 g이었고 이는 대조구보다 높다. 발아마늘 첨가 된장 역시 L-glutamic acid, L-arginine, L-isoleucine이 공통적 6 주간의 발효중 꾸준히 높은 경향을 보였다. 그러나 제조 직후 221.60 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타낸 L-proline의 경우 발효 1 주차에는 급격히 감소하여 79.07 mg/100 g이고 6 주차에는 42.80 mg/100 g이었다. 발효 6 주차에는 L-glutamic acid > L-arginine > L-isoleucine 순으로 높은 수치를 나타내었는데, 각각 275.57 mg/100 g, 199.36 mg/100 g, 163.88 mg/100 g이었다.

Table 39. Changes in free amino acids content of *Doenjang* with sprouted garlic during fermentation for 6 weeks. (mg/100 g)

Free amino acids	Fermentation period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
L-Aspartic Acid	12.62	22.66	23.27	28.80	21.93	22.30	23.46
L-Threonine	9.02	21.07	31.15	31.75	30.09	32.06	35.21
L-Serine	11.65	25.81	34.24	36.79	47.18	43.32	46.69
L-Asparagine	18.25	24.59	42.60	39.34	44.33	41.18	46.86
L-Glutamic acid	76.59	159.72	207.46	248.07	244.76	247.18	275.57
Sarcosine	55.08	55.46	57.48	53.96	55.77	59.93	59.32
L-Proline	221.60	79.07	78.46	79.46	40.73	47.07	42.80
Glycine	11.09	12.71	10.00	16.25	11.97	24.06	31.92
L-Alanine	41.47	48.14	43.83	46.52	73.93	74.92	75.88
L-Citrulline	4.46	4.56	4.27	4.14	4.12	4.44	4.73
L-Valine	41.71	41.70	77.11	72.12	119.37	146.50	140.74
L-Cystine	5.57	5.84	26.58	29.84	27.13	25.58	22.78
L-Methionine	63.41	65.69	71.58	70.25	73.54	71.84	76.77
L-Isoleucine	93.22	91.20	93.88	100.87	144.34	124.42	163.88
L-Leucine	35.37	83.03	86.74	84.07	85.11	81.46	86.36
β-Alanine	27.89	30.24	91.71	83.34	58.55	63.60	54.53
L-Homocystine	20.21	34.54	57.48	56.45	53.87	54.04	50.46
Ornithine	25.49	55.75	109.40	106.06	107.35	115.22	117.86
L-Histidine	25.46	31.58	55.32	69.94	73.76	88.02	95.21
L-Arginine	122.14	159.35	198.34	200.61	197.60	196.07	199.36
Total	922.32	1052.72	1400.89	1458.63	1515.42	1563.20	1650.40

발효마늘 첨가 된장의 유리 아미노산 함량을 분석한 결과는 Table 40과 같다. 발효가 진행될수록 유리 아미노산 함량은 증가하였다. 발효마늘 첨가 된장의 유리 아미노산 함량은 대조구 포함 모든 된장들 중에서 가장 높았다. 제조 직후 1000.91 mg/100 g에서 발효 6 주차에는 1840.98 mg/100 g으로 증숙마늘 첨가 된장 다음으로 높았다. 발효기간 중 다른 마늘 첨가 된장들과 유사하게 L-glutamic acid, L-arginine, L-isoleucine이 공통적으로 높은 함량이었으며, 발효 6 주차의 유리 아미노산은 L-glutamic acid (266.51 mg/100 g) > L-arginine (212.71 mg/100 g) > L-isoleucine (172.62 mg/100 g) 순으로 높았다.

Table 40. Changes in free amino acids content of *Doenjang* with fermented garlic during fermentation for 6 weeks. (mg/100 g)

Free amino acids	Fermentation period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
L-Aspartic Acid	0.63	0.14	0.56	10.66	23.86	22.00	27.78
L-Threonine	11.77	12.27	13.09	15.36	37.43	35.74	40.63
L-Serine	12.27	12.12	17.33	26.42	40.25	41.75	46.04
L-Asparagine	26.35	32.54	43.21	43.89	47.61	46.13	51.38
L-Glutamic acid	164.58	165.60	169.05	230.72	259.42	236.48	266.51
Sarcosine	36.77	35.61	33.89	35.64	32.24	38.65	40.24
L-Proline	167.48	157.76	138.67	100.51	127.16	97.03	82.39
Glycine	24.37	24.20	17.83	23.25	23.34	21.66	23.20
L-Alanine	51.75	50.00	47.58	62.29	68.23	60.44	72.06
L-Citrulline	20.73	23.65	27.60	20.19	26.62	22.51	22.23
L-Valine	52.44	50.48	47.58	50.93	76.89	71.93	99.81
L-Cystine	22.69	22.27	20.39	20.96	28.30	31.72	30.69
L-Methionine	13.87	13.75	31.68	33.45	55.69	60.10	79.05
L-Isoleucine	60.81	85.54	83.52	82.01	122.69	153.02	172.62
L-Leucine	25.33	62.40	67.07	73.68	88.41	89.32	99.28
β -Alanine	44.41	53.58	68.98	64.94	65.06	90.50	97.53
L-Homocystine	28.74	27.07	39.08	39.49	61.84	65.86	65.72
Ornithine	66.41	64.94	68.53	69.70	121.26	122.87	156.99
L-Histidine	29.77	25.52	29.77	24.75	47.71	137.51	154.12
L-Arginine	139.73	149.73	181.57	194.25	199.98	194.72	212.71
Total	1000.91	1069.16	1146.98	1223.10	1553.97	1639.94	1840.98

Table 41. Changes in free amino acids content of *Doenjang* with steamed garlic during fermentation for 6 weeks. (mg/100 g)

Free amino acids	Fermentation period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
L-Aspartic Acid	35.40	30.45	30.61	35.03	32.88	53.22	81.70
L-Threonine	19.12	22.53	38.79	38.50	38.64	44.51	82.56
L-Serine	14.09	12.78	12.23	16.98	37.19	49.95	82.34
L-Asparagine	4.24	4.38	4.50	20.63	49.07	64.95	144.94
L-Glutamic acid	86.64	84.81	225.30	221.14	351.21	352.09	407.92
Sarcosine	14.80	13.00	14.48	35.80	38.10	46.37	206.71
L-Proline	39.36	38.39	87.57	88.90	151.59	158.09	262.80
Glycine	9.06	8.87	23.22	27.14	22.24	28.51	46.09
L-Alanine	20.23	18.35	57.21	56.47	57.29	75.71	110.03
L-Citrulline	0.34	0.86	11.23	17.66	18.47	23.89	64.33
L-Valine	22.15	22.29	66.58	70.79	67.41	83.22	169.71
L-Cystine	23.58	28.50	28.78	26.78	25.45	34.08	78.09
L-Methionine	35.34	32.54	37.06	56.81	60.97	66.55	124.65
L-Isoleucine	119.24	144.24	165.28	176.91	173.05	177.70	215.35
L-Leucine	49.18	59.00	72.30	101.44	97.14	99.04	133.20
β -Alanine	24.84	50.95	70.20	84.79	91.11	99.10	116.27
L-Homocystine	59.43	57.94	56.71	60.65	58.47	58.43	59.70
Ornithine	50.05	49.25	110.68	112.13	114.81	134.96	120.41
L-Histidine	45.04	53.69	52.50	56.21	59.91	53.13	51.36
L-Arginine	99.93	188.37	212.77	213.86	224.28	332.41	333.93
Total	772.04	921.19	1377.98	1518.63	1769.29	2035.89	2892.11

Table 41은 증숙 마늘 첨가 된장의 유리 아미노산 함량을 측정된 결과이다. 증숙마늘 첨가 된장의 유리아미노산 함량은 다른 시료들과 비교해서 발효기간이 경과할수록 더 급격하게 상승하였다. 제조 직후 772.04 mg/100 g에서 발효 6 주차에는 2892.11 mg/100 g을 나타내었다. 이는 대조구의 186.4%, 생마늘 첨가 된장의 217.5%에 해당하는 수치이다. 발효 6 주차에 L-glutamic acid와 L-arginine은 각각 407.92 mg/100 g과 333.93 mg/100 g으로 여타 아미노산에 비해 높은 함량이었다.

(사) 미생물 수의 변화

전처리를 달리한 마늘 첨가 된장의 발효 중 생균수 변화를 측정된 결과는 Fig. 23과 같다. 마늘이 첨가되지 않은 대조군의 경우 발효기간이 경과함에 따라 효모수는 점차 증가하다가 4주차부터 감소하여 발효 6주차에서는 마늘 첨가 된장들 보다 낮은 생균수를 나타내었다. 발효 중 *Bacillus* 생균수 또한 효모와 마찬가지로 대조군이 발효 초기에 더 많은 생균수가 관찰이 되었으나 발효가 경과함에 따라 생마늘 첨가 된장과 발아마늘 첨가 된장에서 더 많은 균수가 검출되었다. 발효 중 효모의 균수는 변화가 적었으나 발효 4-5주차부터 감소하는 경향을 나타내었다. 마늘이 첨가되지 않은 대조군은 마늘의 항균활성 물질의 영향을 받지 않아 초기 생균수는 높게 나타났으나 발효가 경과함에 따라 효모가 마늘의 영양성분을 이용하면서 발효 완료 시점에서는 마늘 첨가 된장들에서 효모 균수가 높게 나타난 것으로 보인다. 발효완료 시점에서는 대조군과 실험군 모두 비슷한 균수를 나타내었다.

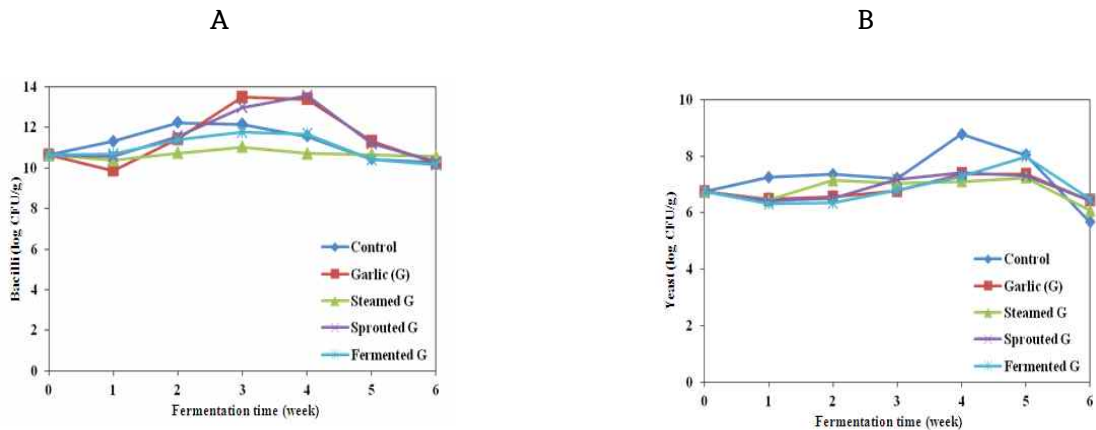


Fig. 23. Changes in viable cells of *Bacillus*(A) and yeast (B) of *Doenjang* with differently pretreated garlic during fermentation for 6 weeks.

(4) 발효 균주에 따른 마늘 된장의 발효기간 중 품질 특성의 변화

(가) 색도의 변화

Table 42는 발효 균주를 달리한 마늘 된장의 발효 중 색도 변화를 측정된 결과이다. 전반적으로 L 및 a 값은 발효 경과에 따라 감소하였고 b 값은 증가하였다. 제조 직후 L, a, b 값은 60.3-60.4, 5.1-5.6, 16.6-17.3 범위였으나 6 주 후에는 54.6-54.6, 5.5-6.3, 17.1-18.3이었다. 발효 균주 별로는 *Asp. oryzae* + *Bacillus natto* 균주(이하 공시균주)로 발효한 된장에 비해 *Rhi. oryzae* + #8 + EMD17 균주(이하 선발균주)로 발효한 된장이 모든 항목에서 값들이 낮았다.

Table 42. Change on Hunter's color value of garlic *Doenjang* added different stain during fermentation for 6 weeks.

Items	Fermentation stains	Fermentation periods (week)						
		0	1	2	3	4	5	6
L	<i>Asp. oryzae</i>	60.4±0.2 ^e	59.2±0.5 ^d	58.2±0.4 ^{bc}	57.8±1.5 ^{bc}	58.7±0.3 ^{cd}	57.6±0.3 ^b	56.3±0.6 ^a
	+ <i>Bacillus natto</i>							
	<i>Rhi. oryzae</i>	60.3±0.5 ^f	58.6±0.6 ^c	57.2±0.6 ^{d*}	56.9±0.4 ^d	56.3±0.3 ^{c***}	55.3±0.2 ^{b***}	54.6±0.2 ^{a***}
a	+ #8 + EMD17							
	<i>Asp. oryzae</i>	5.6±0.4 ^a	5.9±0.2 ^{abc}	6.0±0.2 ^{abc}	6.0±0.4 ^{abc}	5.8±0.2 ^{ab}	6.2±0.2 ^{bc}	6.3±0.3 ^c
	+ <i>Bacillus natto</i>							
b	<i>Rhi. oryzae</i>	5.1±0.2 ^{a*}	4.9±0.4 ^{a***}	5.1±0.3 ^{a***}	5.0±0.3 ^{a***}	5.1±0.3 ^{a***}	5.5±0.2 ^{b***}	5.5±0.2 ^{b**}
	+ #8 + EMD17							
	<i>Asp. oryzae</i>	17.3±0.1 ^a	17.5±0.3 ^a	17.5±0.3 ^a	17.2±0.5 ^a	18.4±0.3 ^b	18.5±0.6 ^b	18.3±0.6 ^b
	+ <i>Bacillus natto</i>							
	<i>Rhi. oryzae</i>	16.6±0.4 ^{a**}	16.3±0.9 ^{a*}	16.1±0.9 ^{a*}	16.4±0.6 ^{a*}	16.7±0.6 ^{a***}	16.8±0.7 ^{a**}	17.1±0.2 ^{a**}
	+ #8 + EMD17							

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-f} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

(나) 염도 변화

선발균주와 공시균주로 각각 발효시킨 마늘 된장의 발효 중 염도 변화를 측정된 결과는 Fig. 24와 같다. 공시균주 발효 마늘 된장의 염도는 6 주간의 발효 중에 4.27-4.60%를 나타내었다. 그리고 선발균주 발효 마늘 된장은 4.10-4.27% 범위로 공시균주로 발효시킨 된장보다 염도가 낮은 경향이였다. 된장 제조에 있어 염도는 오랜 시간동안 발효시키는 장류의 특성상 매우 중요한 요소인데, 본 연구에서 두 시료구 모두 6 주간의 발효 중 염도가 대폭 증감되는 결과를 보이지 않고 4% 대로 일정수준 유지되는 경향을 보였다.

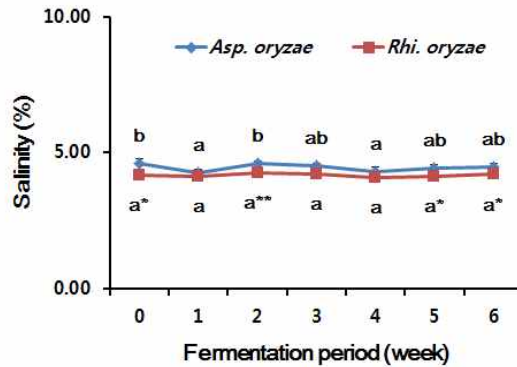


Fig. 24. Changes in salinity of garlic *Doenjang* with different starter organisms during fermentation for 6 weeks. Each value represents mean±SD (n=3).

^{a-b} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

(다) pH 및 적정 산도 변화

선발균주와 공시균주를 이용하여 발효시킨 마늘된장의 발효 기간별 pH 및 적정산도 변화를 측정된 결과는 Table 43과 같다. 발효 균주의 종류와는 상관없이 두 시료구 모두 발효 경과에 따라 pH는 감소하고 산도는 증가하였다. 제조 직후 공시균주 발효 시료의 pH와 산도는 각각 7.36 ± 0.05 와 $0.087 \pm 0.001\%$ 에서 6 주 뒤에는 6.96 ± 0.03 와 $0.112 \pm 0.03\%$ 로 변화하였으며, 선발균주 발효 시료는 pH는 7.44 ± 0.01 , 산도는 $0.077 \pm 0.02\%$ 에서 pH 6.96 ± 0.03 과 $0.116 \pm 0.002\%$ 로 변화하였다. 두 시료군 간의 pH 및 산도 차이는 확인할 수 없었다.

Table 43. Changes in pH and TA of garlic *Doenjang* with different starter organisms during fermentation for 6 weeks.

Items	Fermentation stains	Fermentation periods (week)							
		0	1	2	3	4	5	6	
pH	<i>Asp. oryzae</i>	7.36 ± 0.05^d	7.11 ± 0.01^c	7.08 ± 0.01^c	7.01 ± 0.02^b	6.94 ± 0.01^a	6.97 ± 0.01^a	6.96 ± 0.03^a	
	+ <i>Bacillus natto</i>								
	<i>Rhi. oryzae</i>	7.44 ± 0.01^d	7.13 ± 0.01^c	7.07 ± 0.01^c	7.06 ± 0.01^b	6.97 ± 0.01^a	6.97 ± 0.01^a	6.96 ± 0.03^a	
Acid (%)	<i>Asp. oryzae</i>	0.087 ± 0.001^a	0.103 ± 0.004^b	0.107 ± 0.005^{bc}	0.110 ± 0.003^{cd}	0.117 ± 0.005^d	0.114 ± 0.002^d	0.112 ± 0.003^{cd}	
	+ <i>Bacillus natto</i>								
	<i>Rhi. oryzae</i>	$0.077 \pm 0.002^{a***}$	0.098 ± 0.001^b	0.110 ± 0.005^c	0.105 ± 0.002^d	0.119 ± 0.000^e	$0.119 \pm 0.002^{***}$	0.116 ± 0.002^e	
	+ #8 + EMD17								

Each value represents mean±SD (n=3)

^{a-e} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

(라) 환원당 함량 변화

선발균주와 공시균주를 각각 첨가하여 발효시킨 마늘 된장의 환원당 함량을 측정된 결과 (Fig. 25), 두 시료구 모두 발효 경과에 따라 환원당 함량은 증가하였다. 공시균주 (*Asp.*

oryzae) 발효된장은 제조 직후 2.34±0.01 g/100 g에서 6 주차에는 6.20±0.01 g/100 g으로, 선발균주 (*Rhi. oryzae*) 발효된장은 1.12±0.02 g/100 g에서 9.79±0.07 g/100 g으로 큰 폭으로 증가하였다. 또한 1-6 주간 발효시킨 마늘 된장은 선발균주를 이용하여 발효시켰을 때 환원당 함량이 더 높았다.

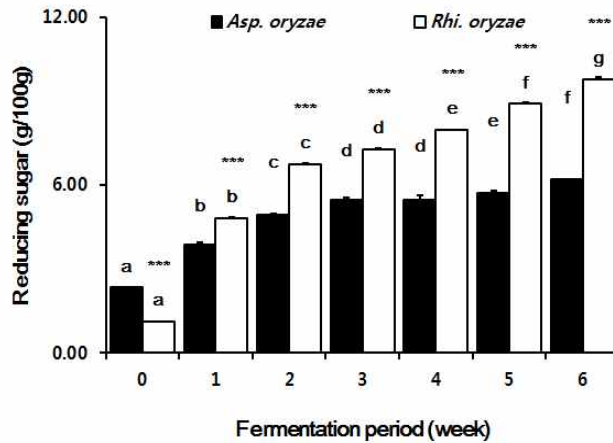


Fig. 25. Changes in reducing sugar content of garlic *Doenjang* with different starter organisms during fermentation for 6 weeks. Each value represents mean±SD (n=3)

^{a-g} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

(마) 아미노태 질소 함량 변화

Fig. 26은 선발균주와 공시균주를 이용하여 발효시킨 마늘 된장의 아미노태 질소 함량의 변화를 측정한 결과로 두 시료구 모두 발효 진행에 따라 아미노태 질소가 증가함을 확인할 수 있었다. 특히 공시균주 (*Asp. oryzae*)를 이용한 시료구가 선발균주 (*Rhi. oryzae*)를 이용한 시료에 비해 발효 기간 중 아미노태 질소 함량이 더 높았다. 공시균주 발효 마늘 된장은 제조 직후 107.11 mg%에서 6 주차에는 429.06 mg%로 아미노태 질소 함량이 4 배 증가하였으나 선발균주 발효 마늘 된장은 83.25 mg%에서 273.04 mg%로 3.2 배 증가하였다.

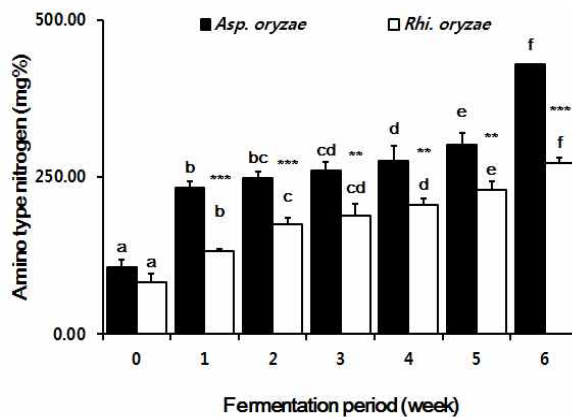


Fig. 26. Changes in amino type nitrogen content of garlic *Doenjang* with different starter organisms during fermentation for 6 weeks. Each value represents mean±SD (n=3)

^{a-f} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

(바) 미생물 균수의 변화

공시균주와 선발균주를 이용하여 발효시킨 마늘 된장의 *Bacillus* (A)와 효모수 (B)의 변화를 조사한 결과는 Fig. 27과 같다. *Bacillus* 균수는 6 주 발효기간 중 공시균주 (*Asp. oryzae*) 이용 된장보다 선발균주 (*Rhi. oryzae*) 이용 된장에서 더 높았다. *Bacillus* 균수의 추이 변화를

보면, 공시균주 발효 된장은 제조 직후와 비교하여 다소 감소하였다가 그 후 다시 증가하는 경향을 보인데 반해 선발균주 발효 된장은 제조 직후 발효 4 주까지는 감소하는 경향을 보이다가 발효 5-6 주차에 다시 증가하였다. 효모 수는 두 시료 모두 제조 직후가 가장 높았으며 1 주차에 다소 감소하다가 발효 2 주차부터는 검출되지 않았다.

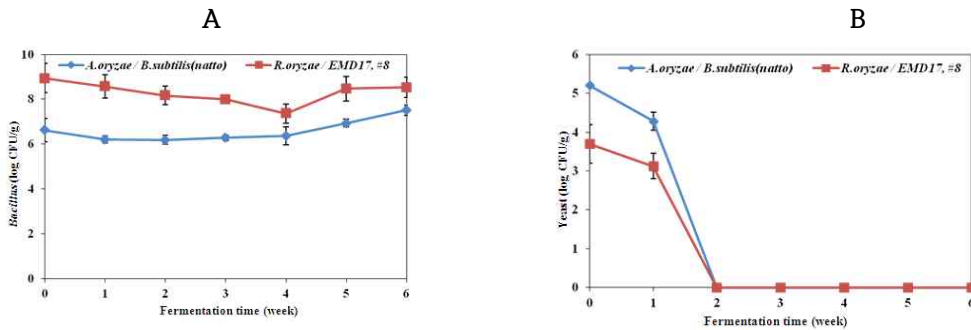


Fig. 27. Changes in viable cells of *Bacillus* (A) and yeast (B) of garlic *Doenjang* with different starter organisms during fermentation for 6 weeks.

(5) 대량 발효 마늘 된장의 발효기간 중 품질 특성의 변화

(가) 색도 변화

설정된 마늘 된장 제조조건에 따라 대용량의 된장을 제조하여 상온에서 20 일간 발효시키면서 5 일 간격으로 시료를 채취하여 색도 변화를 측정된 결과를 Table 44에 나타내었다.

발효 경과에 따라 L 값은 통계적으로 유의하게 감소하였고 a 값과 b 값은 증가하는 경향이 있었다. 이는 발효가 경과함에 따라 시료 중 갈변반응이 활발하여 적색도 및 황색도가 증가하고 그 영향으로 전반적인 시료 밝기가 감소한 것으로 생각된다.

Table 44. Changes in Hunter's color value of garlic *Doenjang* prepared in large scale during fermentation for 20 days.

Items	Fermentation periods (day)				
	0	5	10	15	20
L	63.6±0.8 ^d	62.4±0.6 ^c	61.2±0.6 ^b	59.8±0.6 ^a	59.6±0.7 ^a
a	3.2±0.1 ^a	3.7±0.5 ^b	3.9±0.2 ^{bc}	4.0±0.4 ^{bc}	4.2±0.3 ^c
b	15.8±0.5 ^a	15.9±0.8 ^a	16.5±0.5 ^a	16.3±0.2 ^a	16.7±0.8 ^a

Each value represents mean±SD (n=5)

^{a-c} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

(나) 염도 변화

Fig. 28은 대량 제조한 마늘 된장의 염도 변화를 제조 직후부터 20 일까지 5 일 간격으로 측정된 결과이다. 염도는 4.43-4.60%로 큰 폭의 증감 없이 일정 수준인 것을 확인할 수 있었다.

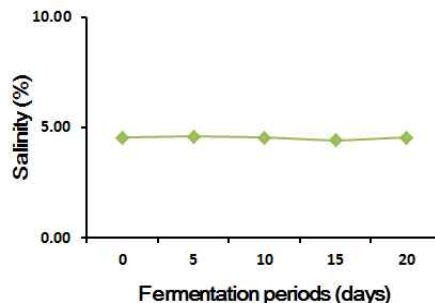


Fig. 28. Changes in salinity of garlic *Doenjang* prepared in large scale during fermentation for 20 days. Each value represents mean±SD (n=3).

(다) pH 및 산도의 변화

대용량 마늘 된장의 발효 중 pH 및 적정 산도 변화를 측정된 결과는 Fig. 29와 같다. 발효가 진행됨에 따라 pH는 감소하고 산도는 증가하였다. 제조 직후 pH 및 산도는 6.95 ± 0.06 과 $0.086 \pm 0.002\%$ 였으나 발효 20 일차에는 각각 6.63 ± 0.00 과 $0.111 \pm 0.001\%$ 을 나타내었다.

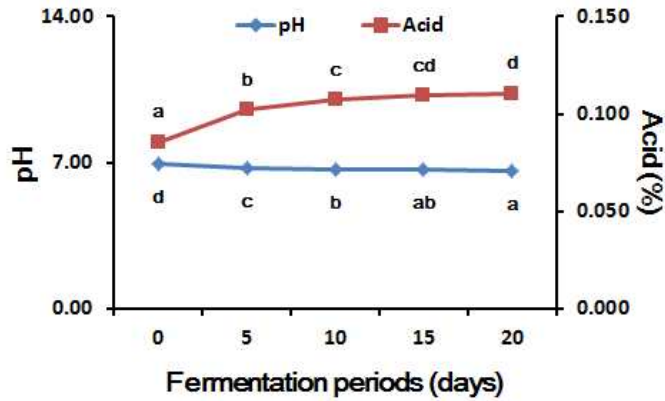


Fig. 29. Changes in pH and TA of garlic *Doenjang* prepared in large scale during fermentation for 20 days. Each value represents mean \pm SD (n=3).

^{a-d} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

(라) 환원당 함량 변화

대량 발효 마늘 된장의 환원당 함량을 측정된 결과는 Fig. 30과 같다. 발효가 진행될 수록 환원당 함량은 유의하게 증가하였고 제조 직후 2.47 ± 0.24 g/100 g에서 발효 5 일차에 2.3 배 증가한 5.67 ± 0.05 g/100 g을 보였다. 20 일차에 8.42 ± 0.14 g/100 g를 나타내었는데 이는 제조 직후와 비교하여 3.4 배 상승한 수치이다. 발효기간에 따른 마늘 된장 환원당의 꾸준한 증가는 앞선 마늘 첨가량에 따른 된장, 식염 농도별 마늘 된장, 마늘의 첨가 형태별 된장 및 발효 균주를 달리한 마늘 된장에서도 관찰된 결과로 마늘이 기여하는 것으로 추측된다.

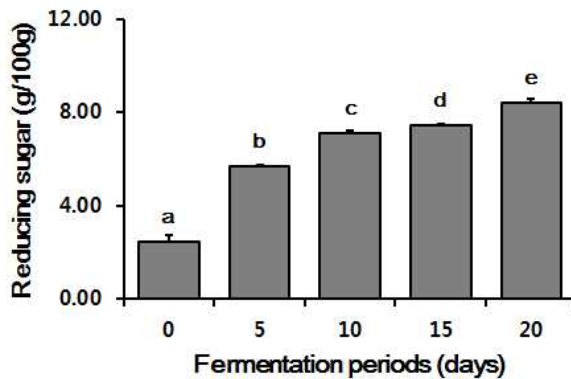


Fig. 30. Changes in reducing sugar content of garlic *Doenjang* prepared in large scale during fermentation for 20 days. Each value represents mean \pm SD (n=3).

^{a-e} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

(마) 아미노태 질소 함량 변화

Fig. 31은 대량 발효 마늘 된장의 아미노태 질소 함량 변화를 나타내었다. 제조 직후 27.23 ± 6.74 mg%에서 발효 5 일차에 6 배 증가한 162.17 ± 15.63 mg%의 함량을 보였다. 이후로도 발효가 진행되면서 지속적으로 증가하여 20 일차에는 293.91 ± 18.15 mg%의 함량을 보였다. 이는 제조 직후와 비교하여 10.8 배 증가한 수치이다.

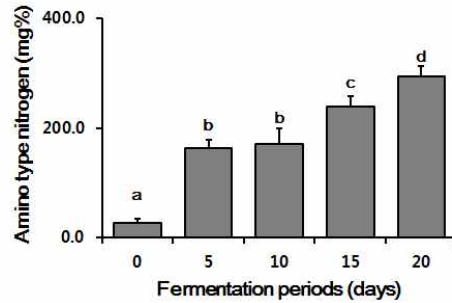


Fig. 31. Changes in amino type nitrogen content of garlic *Doenjang* prepared in large scale during fermentation for 20 days. Each value represents mean±SD (n=3).

^{a-d} Means with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

(바) 미생물 수 변화

대량 제조 마늘 된장의 *Bacillus* 및 효모수를 측정된 결과를 Fig. 32에 나타내었다. *Bacillus* 생균수는 발효 기간중 별 변화가 없었으나 효모는 발효기간이 경과함에 따라 증가하였고 처음 5 일내에 큰 폭으로 상승한 후 이후에는 소폭 상승하는 것을 확인할 수 있었다.

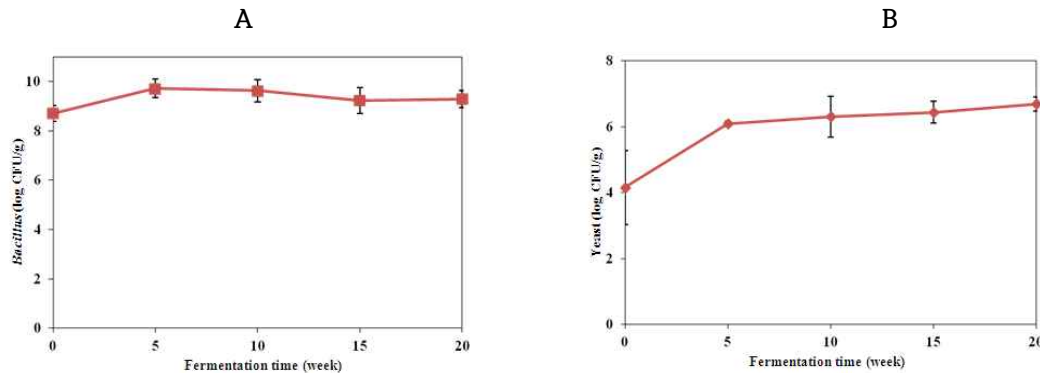


Fig. 32. Changes in cell number of *Bacillus* (A) and yeast (B) of garlic *Doenjang* prepared in large scale during fermentation for 20 days.

(6) 포장 용기에 따른 마늘 된장의 품질 특성

(가) 색도의 변화

선발균주와 공시균주를 이용하여 각각 된장을 제조한 후 60 일간 발효시킨 것을 진공포장과 시중에서 유통되는 항아리형 마늘 된장 용기에 각각 500 g씩 포장하여 30°C 항온기에서 보관하면서 색도를 분석한 결과는 Table 45와 같다. 발효가 진행됨에 따라 전체적으로 색의 밝기는 감소하고 적색도와 황색도는 증가하였다. 또한 선발균주로 발효시킨 된장이 공시균주 발효 된장보다 색의 밝기, 적색도 및 황색도 모두에서 포장 용기에 상관없이 더 낮았다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 시료의 포장 방법은 된장의 색도에 큰 영향을 주지 않으며, 발효 균주의 영향이 더 커서 균주에 따라 제조 초기부터 된장 색에 차이가 발생하며, 발효 완료 후 저장 중의 색도 초기의 색이 영향을 미치는 것으로 판단된다.

(나) 미생물의 변화

Fig. 33은 포장 용기에 따른 마늘 된장의 *Bacillus* 생균수 변화를 측정된 결과이다. 모든 시료군에서 *Bacillus* 생균수는 발효가 진행될수록 조금씩 감소하였다. 또한, 선발균주로 발효시킨 된장은 저장 방법 형태에 상관없이 공시균주 발효 된장보다 *Bacillus* 생균수가 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 하지만 저장 방법에 따른 된장의 *Bacillus* 생균수 차이는 확인할 수 없었다.

Table 45. Changes in Hunter's color value of garlic *Doenjang* packaged using two different methods during fermentation for 4 weeks.

Items	Fermentation strains	Form of packing	Fermentation periods (week)		
			0	2	4
L	<i>Asp. oryzae</i>	Pack	56.6±0.4	51.7±0.5	47.8±0.2
	+ <i>Bacillus natto</i>	Bottle		49.6±1.5	47.8±0.4
	<i>Rhi. oryzae</i>	Pack	53.4±0.6	47.8±0.5	43.3±0.7
	+ #8 + EMD17	Bottle		48.0±0.3	42.5±1.6
a	<i>Asp. oryzae</i>	Pack	6.4±0.2	8.6±0.4	9.7±0.3
	+ <i>Bacillus natto</i>	Bottle		8.5±0.7	10.1±0.2
	<i>Rhi. oryzae</i>	Pack	5.5±0.3	7.7±0.2	8.9±0.2
	+ #8 + EMD17	Bottle		8.0±0.1	8.9±0.6
b	<i>Asp. oryzae</i>	Pack	19.5±0.4	20.2±0.3	19.5±0.1
	+ <i>Bacillus natto</i>	Bottle		18.8±1.7	20.6±1.3
	<i>Rhi. oryzae</i>	Pack	16.6±0.7	17.4±0.4	15.9±0.8
	+ #8 + EMD17	Bottle		18.0±0.3	15.1±2.1

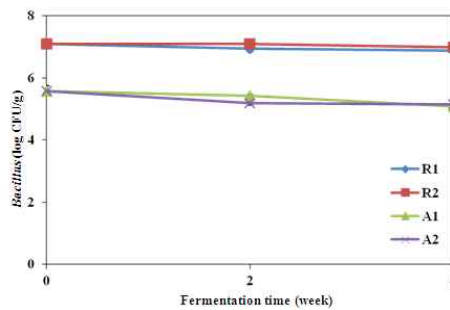


Fig. 33. Changes in *Bacillus* cell numbers of garlic *Doenjang* packaged using two different methods during fermentation for 4 weeks. A1; *Asp. oryzae*, vacuum pack A2; *Asp. oryzae*, bottle R1; *Rhi. oryzae*, vacuum pack R2; *Rhi. oryzae*, bottle.

2-3. 연구결과 (남해마늘연구소, 3차 년도)

가. 흑마늘 첨가 간장의 제조조건 설정 및 이화학적 특성 분석

(1) 모로미 간장의 발효 중 이화학적 특성

참여 기업인 몽고식품에서 사용 중인 모로미를 제공받아 흑마늘 추출액을 0.5, 1, 2 및 4% 첨가하여 간장을 제조하였다. 180 일 발효 시키면서 pH, 산도, 염도 및 생균수 변화를 측정한 결과는 Table 46과 같다. pH는 4.65-5.06 범위였고, 발효가 진행되면서 조금 낮아졌으나 흑마늘 추출액 첨가량에 따른 차이는 없었다. 적정산도는 발효 초기 1.6-1.85% 범위였는데 흑마늘 추출액 첨가량이 많을수록 산도도 높아져서 흑마늘 추출액 자체의 산도가 간장의 초기 산도에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 발효가 진행되면서 산도는 불규칙한 증감을 보이다가 180 일 발효 후에는 2.81-3.26% 였다.

염도는 15-19% 수준이었으며, 생균수는 흑마늘 엑기스의 첨가량을 달리한 간장에서 발효가 진행됨에 따라 바실러스는 5-6 log cfu/g 수준이었고 발효 전 과정에서 큰 변화없이 일정 수가 유지되었다. 반면 효모는 발효초기 5-7 log cfu/g의 수준이었으나 발효 말기에는 모든 시료에서 검출되지 않았다.

Table 46. Changes in pH, TA, salinity, and viable cell numbers of moromi *Ganjang* with black garlic extract (BGE) during fermentation for 180 days.

BGE addition ratio (%)	Fermentation periods (days)	pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers (log cfu/g)	
					Bacillus	Yeast
0	0	5.06	1.60	15.00	6.41	6.09
	15	4.77	1.91	15.17	5.66	6.41
	30	4.81	1.96	15.28	6.01	6.89
	45	4.89	2.00	15.83	6.12	5.61
	60	4.95	2.02	17.58	5.79	5.28
	90	4.76	2.05	16.43	5.94	4.70
	120	4.91	2.68	17.03	5.72	5.51
	180	4.81	2.81	17.03	5.81	0.00
0.5	0	5.03	1.60	16.48	5.89	6.09
	15	4.73	1.94	17.03	5.48	6.78
	30	4.84	1.98	14.24	5.92	7.08
	45	4.90	2.01	14.89	5.86	5.89
	60	4.94	2.11	15.33	5.82	5.80
	90	4.79	2.30	15.50	5.72	6.05
	120	4.91	2.81	14.95	5.64	5.74
	180	4.82	2.90	15.83	5.60	0.00
1	0	5.02	1.66	19.77	5.89	6.09
	15	4.70	1.96	17.03	5.71	7.51
	30	4.79	2.00	17.58	5.76	7.25
	45	4.90	2.12	16.37	5.85	6.33
	60	4.91	2.23	16.48	5.74	6.07
	90	4.79	2.27	16.43	5.71	6.09
	120	4.90	2.84	16.16	5.70	5.69
	180	4.81	2.95	18.02	5.72	0.00
2	0	5.00	1.71	16.48	5.91	6.09
	15	4.68	2.03	16.37	5.82	6.69
	30	4.79	2.05	19.77	5.83	7.06
	45	4.88	2.11	15.72	5.85	6.53
	60	4.89	2.27	17.03	5.54	5.77
	90	4.78	2.30	16.05	5.60	5.65
	120	4.88	2.91	15.99	5.82	5.59
	180	4.79	3.01	17.03	5.76	0.00
4	0	4.97	1.85	16.48	6.05	6.09
	15	4.65	2.09	17.03	5.63	6.93
	30	4.76	2.20	15.39	5.86	7.13
	45	4.83	2.26	16.48	5.71	5.81
	60	4.87	2.32	16.21	5.83	5.91
	90	4.73	2.39	17.03	5.69	5.62
	120	4.84	3.01	17.03	5.65	5.67
	180	4.74	3.26	18.68	5.77	0.00

¹⁾Black garlic extract added *Ganjang* were fermented at room temperature for 180 day.

All values are means of determination in three independent experiments.

(2) 흑마늘 추출물 첨가 농도별 콩알메주 간장의 발효 중 이화학적 특성

증자한 콩에 선발한 복합균주 (*B. amyloliquefaciens* EMD17/MJ1-4)를 접종하여 생청국장을 제조한 다음 건조하여 얻은 콩알메주를 사용하고 흑마늘 추출액을 농도별로 첨가한 간장을 제조한 다음 이화학적 특성들 (pH, 산도, 염도 및 생균수)을 분석한 결과는 Table 47과 같다.

Table 47. Changes in pH, TA, salinity and viable cell numbers of soybean meju *Ganjang* with BGE during fermentations.

BGE addition ratio (%)	Fermentation periods (days)	pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers (log cfu/mL)	
					<i>Bacillus</i>	<i>Yeast</i>
0	0	5.84	0.32	13.74	9.09	6.53
	15	5.69	0.52	13.96	9.52	6.85
	30	5.68	0.57	13.91	9.52	6.52
	45	5.53	0.74	14.18	9.49	6.59
	60	5.61	0.86	14.02	9.92	6.79
	90	4.53	1.53	14.24	9.74	nd
	120	4.41	1.60	14.46	10.15	nd
0.5	0	5.62	0.47	12.87	9.09	6.53
	15	5.62	0.56	13.91	9.37	7.00
	30	5.64	0.56	13.85	9.61	6.78
	45	5.53	0.77	13.69	9.69	6.86
	60	5.58	0.86	13.96	10.62	6.91
	90	4.52	1.55	13.74	10.61	0.00
	120	4.36	1.60	14.35	10.62	3.00
1.0	0	5.44	0.57	13.52	9.09	6.53
	15	5.61	0.61	14.29	9.38	7.26
	30	5.58	0.66	13.96	9.67	6.94
	45	5.51	0.79	13.96	9.68	6.41
	60	5.54	1.08	13.96	9.93	6.64
	90	4.49	1.57	13.63	11.10	nd
	120	4.37	1.69	14.18	10.64	4.00
2.0	0	5.18	0.63	12.81	9.09	6.53
	15	5.56	0.65	13.91	9.75	7.14
	30	5.58	0.67	13.74	9.53	6.83
	45	5.49	0.81	13.91	10.17	7.10
	60	5.53	1.26	13.80	10.66	6.92
	90	4.47	1.58	13.85	9.96	nd
	120	4.39	1.75	14.07	11.16	nd
4.0	0	5.07	0.75	13.74	9.09	6.53
	15	5.53	0.68	13.80	9.54	6.69
	30	5.56	0.70	13.58	9.49	6.90
	45	5.43	1.12	13.58	9.79	6.73
	60	5.48	1.31	13.19	9.77	6.74
	90	4.50	1.71	13.58	10.61	nd
	120	4.39	1.91	14.02	11.18	nd

Data are presented as the mean of triplicated determinations.

Ten gram or milliliter were titrated with 0.1N NaOH to pH 8.4±0.1 for titrable acidity

흑마늘 추출물을 0.5, 1, 2 및 4% 첨가한 간장을 120 일 발효시켰을 때 초기 pH는 5.07-5.84 이고 발효 30 일까지는 미량 증가하다가 그 이후부터는 다시 낮아져서 120 일에는 4.36-4.41을 나타내었다. 적정 산도는 발효기간이 경과할수록 점차 증가하는 경향을 보였고 발효 초기 흑마늘 추출액이 첨가되지 않은 대조군의 산도는 0.32% 였고, 흑마늘 추출액 0.5% 첨가 군의 산도는 0.47%, 4% 첨가 군 산도는 0.75%로 흑마늘 추출액 첨가량이 많을수록 산도가 높았다. 흑마늘 추출액 4% 첨가 군의 최종 산도는 1.91%였다. 하지만 발효 중 산도의 증가 폭은 대조구가 5 배로 4% 첨가 군의 증가 폭인 2.5 배 보다 더 높았다.

염도는 발효 120 일째에 평균 14.22%로 발효 초기에 비해 미량 증가하였다. 발효 기간 동안 바실러스 생균수는 9-11 log cfu/mL였고, 효모는 1% 흑마늘 추출액 첨가 간장을 제외하고는

90일 이후 관찰되지 않았다. 생균수는 모로미 간장과 유사한 경향을 나타내었다.

(3) 염 농도별 흑마늘 추출물을 첨가한 콩알메주 간장의 발효 중 이화학적 특성
간장 제조시 첨가되는 염수의 농도를 12, 15, 18%로 달리하고, 흑마늘 추출액을 2% 첨가하여 제조한 흑마늘 간장의 pH, 산도, 염도 및 생균수는 Table 48과 같다.

Table 48. Changes in pH, TA, salinity and viable cell numbers of soybean meju *Ganjang* with 2% BGE and different salt concentrations during fermentations.

Salt concentration (%)	Fermentation periods (days)	pH	TA (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers (log cfu/mL)	
					<i>Bacillus</i>	<i>Yeast</i>
12.0	0	6.01	0.71	9.85	9.84	6.92
	15	5.44	1.39	10.01	10.70	6.83
	30	4.39	2.63	9.36	10.43	5.32
	45	4.32	2.79	9.14	9.57	3.00
	60	4.23	2.70	9.47	9.61	3.53
	90	4.20	2.61	8.81	9.77	3.46
	120	3.93	2.92	9.44	10.17	4.49
15.0	0	5.76	1.07	13.14	9.84	6.92
	15	5.39	1.44	12.10	10.50	6.82
	30	4.36	2.65	11.82	10.61	5.64
	45	4.24	2.90	11.71	9.23	3.00
	60	4.18	2.92	11.93	10.84	3.30
	90	4.11	2.11	11.11	10.75	2.74
	120	3.93	2.72	11.97	10.70	3.30
18.0	0	5.71	1.22	14.89	9.84	6.92
	15	5.31	1.51	14.73	10.66	5.53
	30	4.49	2.36	14.51	10.66	5.43
	45	4.25	2.61	13.80	9.72	nd
	60	4.17	2.66	14.46	11.44	2.60
	90	4.1	2.45	13.30	10.34	nd
	120	3.96	2.39	12.81	10.90	2.06

Data are presented as the mean of triplicated determinations.

Ten gram or milliliter were titrated with 0.1N NaOH to pH 8.2±0.1 for titrable acidity

염수의 식염 농도가 높을수록 초기 pH는 낮아 12% 염수로 제조한 간장의 초기 pH는 6.01이 었으며, 18% 염수로 제조한 간장의 pH는 5.71이었다. 발효가 진행되면서 pH는 점차 낮아져서 120 일에는 3.93-3.96으로 간장 제조시 염수 농도에 따른 차이는 없었다.

산도는 모든 실험군에서 발효 45 일에 가장 큰 폭으로 증가하였다가 이후부터는 불규칙한 증감을 보였으나 120 일 발효 후에는 초기에 비해 증가하였다. 초기 염도가 낮을수록 산도 증가폭이 크고, 염도가 높을수록 산도 증가폭이 낮았다. 12% 염수 첨가 간장 산도는 120 일 이 후에 4.13 배 증가한 반면, 15% 염수 첨가군은 2.56 배, 18% 염수 첨가군은 2 배 증가하였다.

발효 기간별 염도 측정 결과 모든 실험군에서 발효 초기에 비해 점차 염도가 낮아지는 경향 이었다. 이를 생균수 측정 결과와 연관지어 볼 때 식염의 농도 차이가 미생물의 생육을 저해하 는 수준으로 영향을 미치지 않는 것으로 발효 초기에 비해 콩알메주의 고형분에 흡수되면서 미량 의 변화를 일으킨 것으로 생각된다. 선행 간장 실험에서와 마찬가지로 효모는 발효가 진행될수 록 감소하였으며, 바실러스 생균수는 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었다.

(4) 발효 균주를 달리한 흑마늘 간장의 발효 중 이화학적 특성

*Asp. oryzae*와 *Rhi. oryzae*를 발효균주로 하고, 흑마늘 추출물 2% 첨가한 후 콩알메주로 제

조한 저염간장의 발효 중 pH, 산도, 염도 및 생균수 측정 결과는 Table 49와 같다.

Table 49. Changes in pH, TA, salinity and viable cell numbers of soybean meju *Ganjang* with 2% BGE and different microorganisms during fermentation.

Strains	Fermentation periods (days)	pH	Acidity (% as lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Viable cell numbers (log cfu/mL)	
					<i>Bacillus</i>	<i>Yeast</i>
<i>Asp. oryzae</i>	0	5.55	0.54	11.06	6.87	8.66
	15	5.47	1.22	10.23	7.08	8.76
	30	5.36	1.59	11.00	5.83	9.28
	45	5.44	1.62	10.73	5.65	8.88
	60	5.36	1.26	10.23	6.17	10.84
	90	5.22	1.44	10.73	3.78	9.08
	120	5.97	0.92	10.75	3.63	9.77
<i>Rhi. oryzae</i>	0	5.77	0.74	10.78	6.81	9.87
	15	5.40	1.44	10.73	7.60	11.28
	30	4.20	3.06	10.62	3.72	11.24
	45	4.36	3.10	10.40	3.20	11.21
	60	4.15	2.57	9.78	4.96	9.76
	90	4.50	2.59	10.18	4.59	9.40
	120	4.84	2.14	10.25	3.70	10.55

Data are presented as the mean±SD of triplicated determinations.

Ten gram or milliliter were titrated with 0.1N NaOH to pH 8.2±0.1 for titrable acidity.

*Asp. oryzae*를 접종한 흑마늘 간장의 pH는 발효 90 일까지는 불규칙한 증감을 보이면서 미량 감소하였다가 120 일에는 5.97로 발효 초기보다 조금 증가하였다. 반면 *Rhi. oryzae*를 이용한 간장의 pH는 발효 초기 5.77에서 발효가 진행되면서 점진적으로 낮아지다가 발효 90 일 이후 다시 증가하여 120 일에는 4.84였다. 산도 역시 pH 변화에 비례적으로 증가와 감소 추세를 보이다 발효 120 일째 0.92% (*Asp. oryzae*) 및 2.14% (*Rhi. oryzae*)로 발효 균주에 따라 산도와 pH 모두가 영향을 받음을 알 수 있었다.

염도는 두 균주를 이용한 흑마늘 간장에서 모두 발효 중 미량의 불규칙한 증감은 있었으나 10% 전후의 범위로 유지되었다. 바실러스의 생균수는 발효 기간의 경과와 더불어 서서히 감소하였으나 효모는 오히려 증가하는 경향을 나타내어 단일 균주를 사용한 경우와 상기의 메주 자체를 이용한 때에 비해 다른 결과를 얻었다.

(5) 반응표면 분석에 의한 흑마늘 추출액 첨가량과 농도 최적화를 위한 간장의 제조

상기 (1)-(4)의 실험에 의해 흑마늘 추출액을 2% 첨가하고, 콩알메주를 이용하여 염도 11%의 저염 간장 제조가 가능함을 확인하였다. 하지만 장기간의 발효기간을 고려할 때 저염 간장을 대량생산하고 산업화함에 있어서 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단되며, 비용과 향기성분 변화 등을 고려하여 기존 공정에서 생산되는 생간장을 활용하여 흑마늘 추출액과 혼합하는 혼합간장 제조 가능성을 확인하고자 하였다. 참여기업인 몽고간장에서 발효한 생간장과 흑마늘 추출액을 혼합하여 흑마늘 간장을 제조함에 있어 흑마늘 추출액 첨가량과 농도를 최적화하기 위하여 반응표면분석을 실시하였다.

(가) 원료 간장의 성분

흑마늘 추출액이 첨가된 간장의 제조조건 설정을 위한 반응표면 분석을 위하여 사용된 원료 간장의 성분을 분석하였다. 1차 발효된 생간장을 사용하였고 3회 측정하여 평균치를 구하였다. 염도는 17.50±0.10% 였으며, 총질소 함량은 1.76±0.01%로 간장의 기초 품질 조건에 적합하였다. 환원당 함량은 6.00±0.02 g/mL, 총 페놀화합물 함량은 100 mL당 383.99±9.08 mg이었고, ABTs 라디칼 소거활성은 33.27±0.39%였다.

(나) 흑마늘 첨가 간장의 총 질소 및 조단백 함량

중심합성 계획법에 따라 12 종의 흑마늘 첨가 간장을 제조하고, 흑마늘 추출액 첨가로 인해 간장의 기초 품질인자인 총질소와 조단백 함량에 미치는 영향을 확인하고자 그 함량을 분석한 결과는 Table 50과 같다. 총 질소 함량은 1.58-1.74% 범위였고, 조단백 함량은 9.86-10.84% 범위였다. 9 brix 흑마늘 추출액을 9.5% 첨가하였을 때와 17.85 brix를 10.06% 첨가하였을 때 두 성분의 함량이 모두 시료 중 가장 낮았으나 9와 17.85 brix로 동일하지만 첨가량이 1.6%와 1.04%로 낮을 경우 총 질소와 조단백질의 함량은 유의적으로 높아 총질소와 조단백질 모두 흑마늘 추출액 농도 보다는 첨가량에 더 영향을 많이 받았다. 이는 흑마늘 추출액의 총 질소 및 조단백 함량이 낮아 첨가 비율이 높을수록 간장을 희석시키는 효과를 나타내기 때문이다.

(다) 염도

중심합성 계획에 따라 반응표면 분석법으로 흑마늘 추출액이 첨가된 간장의 제조 조건 최적화를 위하여 12 단계로 구분한 조건별 간장의 염도를 분석한 결과는 Table 51과 같다. 염도는 15.80-17.07% 범위였는데, 흑마늘 추출액 농도를 9 brix로 하고, 첨가량을 9.5%로 하였을 때 가장 낮았고, 흑마늘 추출액 농도를 9 brix로 하고, 첨가량을 1.6%로 하였을 때 가장 높아 흑마늘 추출액 농도 보다는 첨가량이 간장 염도에 영향을 미치는 주된 인자임을 알 수 있었다.

염도에 대한 반응표면 분석 결과 (Fig. 34) 결정계수는 90.06%로 매우 높으며 (Table 51), 정상점 (stationary point)은 최고값도 아니고 최소값도 아닌 안부점 (saddle point, 안장점)을 가지므로 실험영역을 좁혀서 능선분석 (Ridge Analysis)을 통해 염도의 최소값을 갖는 실험조건을 찾으면 흑마늘 추출액의 농도는 낮게, 첨가량을 높게 하였을 때 최소값을 얻을 수 있었다. 이 때 농도와 첨가량에 대한 코드변수는 각각 -0.343229과 0.939252이며, 이들의 실제 값은 각각 14.84 brix와 9.26%이고, 이 때 염도의 최소값은 16.03%였다 (Table 52).

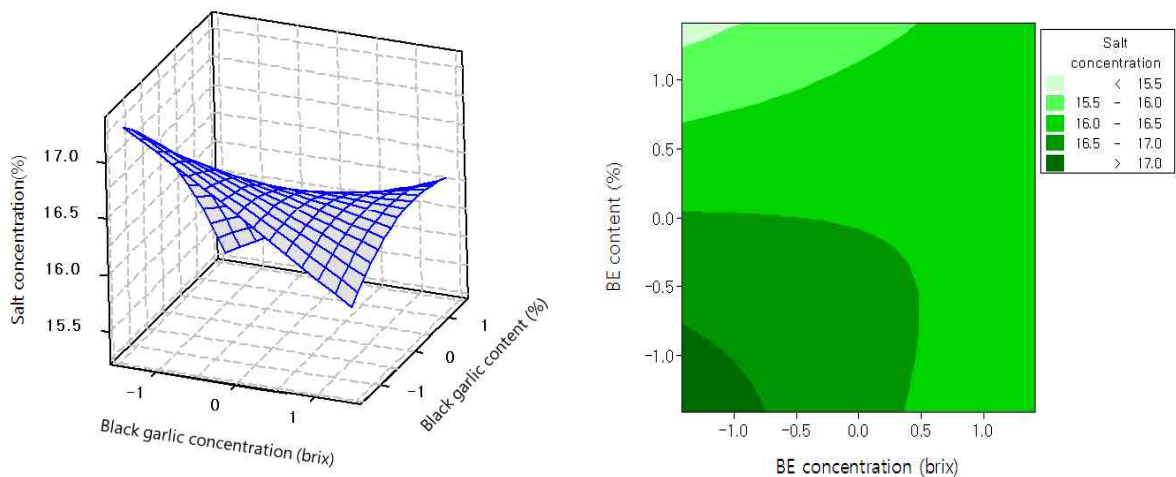


Fig. 34. Response surface plot for salt concentration of soy sauce prepared with black garlic extract. BE: black garlic extract.

Table 50. Experimental data on total nitrogen, salt concentration, reducing sugar, total phenolic compounds and ABTS scavenging radical activity of low slated soy sauce prepared with black garlic extract by response surface methodology analysis

Exp. Number ¹	Conditions		Experimental items					
	Concentration (brix) X1	Content (%) X2	Total nitrogen (%)	Crude protein (%)	Salt concentration (%) Y ₁	Reducing sugar (g/mL) Y ₂	Total phenolic compounds (mg/100mL) Y ₃	ABTS radical scavenging activity (%) Y ₄
1	17.85(0)	5.55(0)	1.67±0.01 ^D	10.45±0.08 ^D	16.50±0.00 ^{EF}	6.50±0.00 ^C	404.57±0.71 ^{BCD}	34.58±0.22 ^{DEF}
2	17.85(0)	5.55(0)	1.64±0.01 ^{BC}	10.24±0.03 ^{BC}	16.43±0.06 ^E	6.50±0.01 ^C	403.88±5.85 ^{BCD}	34.58±0.94 ^{DEF}
3	17.85(0)	5.55(0)	1.65±0.01 ^C	10.29±0.05 ^C	16.47±0.06 ^{EF}	6.56±0.01 ^C	405.12±3.73 ^{BCDE}	35.80±0.46 ^{FG}
4	17.85(0)	5.55(0)	1.64±0.02 ^{BC}	10.24±0.10 ^{BC}	16.50±0.00 ^{EF}	6.56±0.00 ^C	410.05±10.12 ^{DE}	34.99±0.28 ^{EF}
5	26.7(1)	9.5(1)	1.62±0.01 ^B	10.11±0.07 ^B	16.10±0.10 ^C	7.71±0.02 ^F	391.67±8.67 ^{AB}	40.81±1.15 ^H
6	26.7(1)	1.6(-1)	1.73±0.00 ^{EF}	10.82±0.00 ^{EF}	16.23±0.06 ^D	6.55±0.03 ^C	433.65±3.09 ^F	33.90±1.02 ^{CDE}
7	9(-1)	1.6(-1)	1.71±0.01 ^E	10.68±0.08 ^E	17.07±0.06 ^H	6.30±0.09 ^B	415.82±7.25 ^{DE}	32.30±0.72 ^B
8	9(-1)	9.5(1)	1.58±0.00 ^A	9.86±0.01 ^A	15.80±0.00 ^A	6.30±0.05 ^B	386.87±6.42 ^A	30.77±0.60 ^A
9	30.36(1.414)	5.55(0)	1.66±0.03 ^{CD}	10.37±0.16 ^{CD}	16.53±0.06 ^{FG}	7.40±0.02 ^E	419.52±8.08 ^E	36.70±0.88 ^G
10	5.34(-1.414)	5.55(0)	1.65±0.02 ^C	10.29±0.13 ^C	16.47±0.06 ^{EF}	5.68±0.06 ^A	374.69±7.54 ^{ABC}	33.15±0.29 ^{BC}
11	17.85(0)	10.06(1.414)	1.58±0.02 ^A	9.88±0.11 ^A	15.97±0.06 ^B	7.06±0.03 ^D	409.23±9.26 ^{CDE}	35.03±0.54 ^{EF}
12	17.85(0)	1.04(-1.414)	1.74±0.01 ^F	10.84±0.07 ^F	16.63±0.06 ^G	6.27±0.03 ^B	445.17±13.59 ^F	33.72±0.42 ^{CD}

1)The number of experimental conditions by central composite design.

^{A-H}Mean±SD in the same column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

Table 51. Polynomial equations calculated by RSM program of soy sauce prepared with black garlic extract by response surface methodology analysis

Response	Polynomial equations	R ²	F-value
Salt concentration	$Y = 16.4750 - 0.0549X_1 - 0.2929X_2 - 0.0125X_1 \times X_1 - 0.1125X_2 \times X_2 - 0.2833X_1 \times X_2$	90.06	54.35
Reducing sugar	$Y = 6.52850 + 0.50942X_1 + 0.28484X_2 + 0.03358X_1 \times X_1 + 0.09608X_2 \times X_2 + 0.28867X_1 \times X_2$	96.40	160.55
Total phenol contents	$Y = 405.905 + 7.218X_1 - 15.218X_2 - 1.937X_1 \times X_1 + 8.111X_2 \times X_2 - 3.258X_1 \times X_2$	78.29	51.64
ABTS radical scavenging activity	$Y = 34.9883 + 2.0849X_1 + 0.9059X_2 - 0.0823X_1 \times X_1 - 0.3588X_2 \times X_2 + 2.1095X_1 \times X_2$	83.37	30.08

X₁ : concentration(brix) of black garlic extract, X₂ : content(%) of black garlic extract

Table 52. Predicted conditions and maximum and minimum value of soy sauce prepared with black garlic extract by ridge analysis

Experimental items	Predicted values	Black garlic treatment conditions	
		Concentration (brix)	Content (%)
Salt concentration (%)	Saddle point 16.03	14.84	9.26
Reducing sugar (g/mL)	Saddle point 7.30	24.58	8.08
Total phenolic compounds (mg/100 g)	Saddle point 430.74	20.33	1.80
ABTS radical scavenging activity (%)	Saddle point 38.04	25.02	7.80

(라) 환원당 함량

흑마늘 추출액이 첨가된 간장의 제조조건 최적화를 위하여 반응표면 분석을 실시한 결과 (Fig. 35) 환원당에 대한 결정계수는 96.40%로 매우 높았다(Table 51). 12 단계로 구분한 조건 하에서 환원당의 함량은 5.68-7.71 g/mL의 범위였는데, 흑마늘 추출액의 농도를 5.34 brix로 하고, 첨가량을 5.55%로 하였을 때 최소값을 가지며, 흑마늘 추출액의 농도와 첨가량을 각각 26.7 brix와 9.5%로 하였을 때 최대값을 가졌다 (Table 51).

반응표면 분석 결과 (Fig. 35) 정상점은 최고값도 아니고 최소값도 아닌 안부점을 가지므로 변수의 원점을 중심으로 적당한 반경에 있는 반응표면 값들을 검사하여 우리가 찾고 싶은 최적의 반응값을 계산하기 위해 능선분석을 실시한 결과 농도와 첨가량을 높게 하였을 때 최대값을 얻을 수 있었다. 이 때 흑마늘 추출액의 농도와 첨가량에 대한 코드변수는 각각 0.76 brix와 0.64%였으며, 이들의 실제 변수는 각각 24.58 brix와 8.08%이며, 이 때 환원당은 최대값 7.30 g/mL를 가진다(Table 52).

(마) 총 페놀 화합물 함량

흑마늘 간장 제조시 총 페놀 화합물 함량이 최대화되는 간장의 제조조건 설정을 위하여 흑마늘 추출액의 첨가 농도와 함량을 설정하기 위해 반응표면 분석을 실시한 결과는 Table 6과 같다. 흑마늘 추출액 농도가 5.34 brix이고, 첨가 농도가 5.55%일 때 최소값 374.69±7.54 mg/100 mL을 가지며 흑마늘 추출액 농도의 첨가 비율이 각각 17.85 brix, 1.04%일 때 최고값은 445.17±13.59 mg/100 mL이었다.

반응 표면 분석 결과 (Fig. 36) 간장 중 총 페놀화합물은 흑마늘의 첨가 농도 보다는 첨가량에 영향을 더 많이 받아 첨가량이 낮을수록 페놀화합물의 반응 값은 더 증가하였다. 이 때 얻어진 결정계수는 78.39%였고, 반응식은 Table 51과 같다. 실험된 범위 내에서 총 페놀화합물의 함량이 최고가 되는 조건을 찾았을 때 정상점은 안부점을 가지므로 능선분석(Ridge Analysis)

을 실시한 결과 보다 작아진 실험영역에서 농도의 최소값은 20.33 brix, 첨가량의 최대값은 1.80%로 하였을 때 총 페놀화합물의 최대값 430.74 mg/100 mL을 얻을 수 있었다.

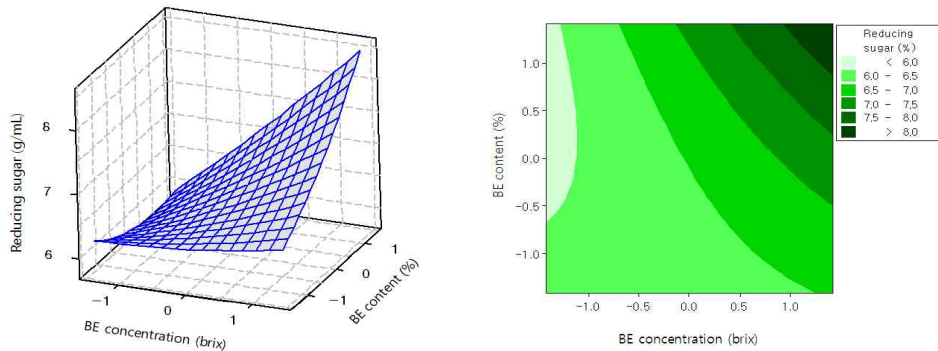


Fig. 35. Response surface plot for reducing sugar of soy sauce prepared with black garlic extract. BE: black garlic extract.

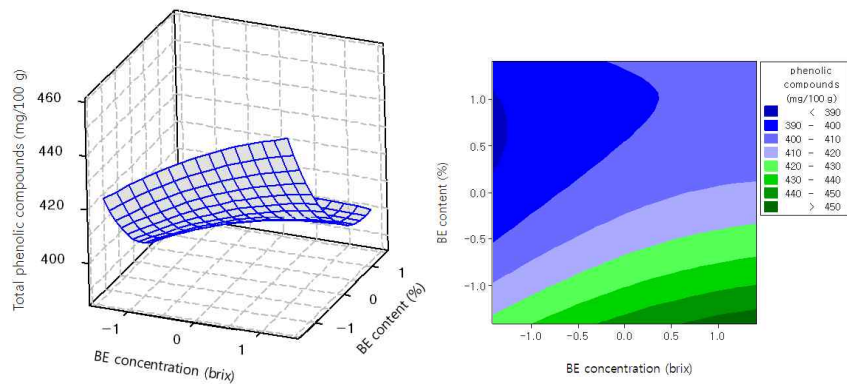


Fig. 36. Response surface plot for total phenolic compounds of soy sauce prepared with black garlic extract. BE: black garlic extract.

(바) ABTS 라디칼 소거활성

흑마늘 추출물 첨가된 간장을 제조함에 있어 적정 첨가농도와 양을 설정하고자 반응표면분석을 실시한 결과 항산화활성을 나타내는 지표인 ABTS 라디칼 소거활성은 30.77 ± 0.60 - $40.81 \pm 1.15\%$ 범위였으며, 실험된 12 구간의 시료 중 흑마늘 추출액 농도가 26.7 brix이고, 첨가량이 9.5%일 때 그 활성이 가장 높았다 (Table 51). 능선분석을 실시한 결과 (Fig. 37) 보다 작아진 실험영역에서 흑마늘 추출액의 농도와 첨가량을 모두 증가시킴으로써 ABTS 라디칼 소거활성이 최대화 되는 값을 얻을 수 있었다. 이 때 흑마늘 추출액의 농도는 25.02 brix이며, 첨가량은 7.80%였고, ABTS 라디칼 소거활성은 38.04%였다.

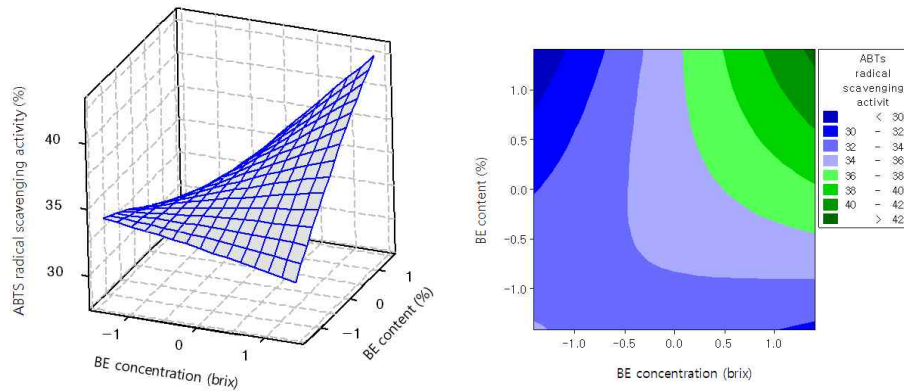


Fig. 37. Response surface plot for ABTs radical scavenging activity of soy sauce prepared with black garlic extract. BE: black garlic extract.

반응표면 분석을 통하여 염도는 최소화되고, 환원당, 총페놀화합물 및 ABTs 라디칼 소거활성은 최대화되는 값을 확인하고자 하였다. 실험결과는 모두 원래 설정된 실험영역에서는 안부점을 가지므로 실험영역을 좁혀서 능선분석을 실시하였으며, 그 결과 염도는 흑마늘 추출액의 농도가 14.84 brix, 첨가량이 9.26%일 때 16.03%로 최소값을 가지며, 환원당은 흑마늘 추출액 농도가 24.58 brix일 때 최대값이 7.30%이며, 총 페놀화합물 함량과 ABTS 라디칼 소거활성도 흑마늘 추출액 농도가 각각 20.33과 25.02 brix로 높을 때 최고값을 나타내어 간장 제조시 흑마늘 추출액의 첨가는 염도에는 크게 영향을 미치지 않지만 당, 페놀화합물 및 항산화활성의 향상에 기여하는 것으로 판단된다.

반응표면 분석 결과를 중심으로 염도는 낮고, 관능 및 기능성이 향상된 흑마늘 간장의 제조를 위해서 흑마늘 추출액 농도는 15-25 brix 로 조정하여 7.8-9.3% 범위로 첨가하는 것이 적합하였다.

(6) 흑마늘 추출액 첨가 저염 간장의 품질특성

(가) 간장의 염도, pH 및 산도

기존 15% 염도인 간장을 12%로 저염화합에 있어 흑마늘 추출액 첨가가 미치는 영향을 확인하고자 65 brix의 고농도 흑마늘 추출액을 0.3, 0.5, 1, 3 및 5% 첨가하여 혼합간장을 제조한 다음 품질관련 인자를 확인하였다.

대조군의 염도는 15.67%였고, 흑마늘 첨가량을 달리한 실험군 염도는 12.35- 12.77%의 범위로 흑마늘 추출액을 3% 미만으로 첨가하였을 때는 흑마늘 첨가에 따른 염도 감소가 없었으며, 5% 첨가시는 염도가 12.35%로 여타 실험군에 비해 유의적으로 염도가 낮아졌다 (Table 53).

흑마늘 첨가량을 달리하여 제조한 간장의 pH 및 산도를 측정된 결과, 흑마늘 첨가량이 많을수록 pH는 5.17에서 4.99까지 낮아지고 산도는 1.86%에서 2.12%까지 높아졌다. 흑마늘 추출물을 3% 미만으로 첨가하였을 때에 비해 5% 이상 첨가함으로써 유의적인 차이를 나타내었는데, 이는 흑마늘 추출액의 강한 산성으로 인해 (Yang SM 등 2011), 일정량 이상 첨가되면 간장의 산도에 영향을 미치기 때문으로 판단된다.

(나) 조단백질, 총질소 및 아미노태 질소 함량

흑마늘 추출액의 첨가량을 달리하여 제조한 간장의 조단백질, 총 질소 및 아미노태 질소의 함량을 측정된 결과는 Table 54와 같다. 염도 15% 대조군 간장에 비해 염도 12% 대조군의 총 질소 및 조단백질 함량이 높은 것으로 보아 저염간장으로 제조하였을 경우에도 풍미나 영양적으로 품질이 떨어지지 않을 것으로 판단된다. 흑마늘 추출액의 첨가량을 달리하여 제조한 저염간장의 경우 흑마늘 추출액의 첨가량이 증가할수록 조단백질과 총 질소의 함량은 증가하였으나 아미노태 질소의 경우 전 시료에서 0.53%로 시료간에 통계적인 차이가 없었다.

Table 53. Salt concentration, pH and acidity of *Ganjang* with different amount of black garlic extract added.

Sample Code ¹⁾	Salt concentration (%)	pH	Acidity (%)
C-15	15.67±0.06 ^d	5.17±0.07 ^c	1.86±0.05 ^a
C-12	12.67±0.06 ^{bc}	5.16±0.08 ^c	1.87±0.09 ^a
E-12-0.3	12.77±0.06 ^c	5.15±0.07 ^c	1.90±0.05 ^a
E-12-0.5	12.73±0.06 ^{bc}	5.13±0.04 ^{bc}	1.93±0.02 ^a
E-12-1	12.65±0.05 ^b	5.11±0.04 ^{bc}	1.98±0.04 ^{ab}
E-12-3	12.67±0.06 ^{bc}	5.04±0.04 ^{ab}	2.07±0.06 ^{bc}
E-12-5	12.35±0.05 ^a	4.99±0.02 ^a	2.12±0.08 ^c

^{a-d} Means with different superscripts within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

All values are mean ± SD (n=3).

¹⁾C-15 : 15% salt contained *Ganjang*, C-12 : 12% salt contained(low-salt) *Ganjang*, E-12-0.3 : Low-salt *Ganjang* containing 0.3% of black garlic extract (65 brix), E-12-0.5 : Low-salt *Ganjang* containing 0.5% of black garlic extract (65 brix), E-12-1 : Low-salt *Ganjang* containing 1.0% of black garlic extract (65 brix), E-12-3 : Low-salt *Ganjang* containing 3.0% of black garlic extract (65 brix), E-12-5 : Low-salt *Ganjang* containing 5.0% of black garlic extract (65 brix).

Table 54. Crude protein, total nitrogen and amino form nitrogen content of *Ganjang* with different amount of black garlic extract added. (%)

Sample Code ¹⁾	Crude protein	Total nitrogen	Amino form nitrogen
C-15	6.09±0.07 ^a	1.07±0.01 ^a	0.53±0.02 ^a
C-12	6.25±0.02 ^b	1.10±0.00 ^b	0.53±0.01 ^a
E-12-0.3	6.42±0.00 ^c	1.13±0.00 ^c	0.52±0.02 ^a
E-12-0.5	6.28±0.00 ^b	1.10±0.00 ^b	0.53±0.01 ^a
E-12-1	6.49±0.01 ^{cd}	1.14±0.00 ^{cd}	0.53±0.00 ^a
E-12-3	6.62±0.00 ^d	1.16±0.00 ^d	0.53±0.00 ^a
E-12-5	6.61±0.19 ^d	1.16±0.03 ^d	0.53±0.01 ^a

^{a-d} Means with different superscripts within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

All values are mean ± SD (n=3).

¹⁾Refer to foot note of Table 54.

(다) 환원당 및 유리당 함량

흑마늘 추출액의 첨가량을 달리하여 제조한 간장의 환원당을 측정한 결과(Table 55), 흑마늘 추출액이 첨가되지 않은 염도 15%와 12%의 대조군 시료의 환원당 함량은 각각 10.73 g/100 mL과 10.67 g/100 mL로 유의적인 차이가 없었으며, 흑마늘 추출액 첨가량이 많을수록 환원당 함량도 높아져 11.11±0.07-13.34±0.03 g/100 mL 범위였다.

흑마늘 추출액 첨가량에 따른 간장의 유리당 함량을 분석한 결과 fructose 및 glucose 2 종만 검출되었으며, fructose 및 glucose 함량은 염도 15% 대조군에서는 각각 6.58±0.59, 8.27±0.67 g/100 mL이었고, 염도 12% 대조군에서는 각각 5.35±0.93, 8.01±0.79 g/100 mL로 간장의 염도 차이에 따른 유리당 함량에는 유의적인 차이가 없었다. 흑마늘 추출액을 첨가한 간장의 fructose 함량은 5.66±0.18-8.03±0.40 g/100 mL 범위이며, glucose는 8.17±0.42-9.09±0.50 g/100 mL 범위로 흑마늘 추출액의 첨가량이 증가할수록 유리당 함량도 증가하는 경향이나, 0.5%와 1.0% 첨가군 간에는 유의적인 차이가 없었다.

Table 55. Reducing and free sugar contents of *Ganjang* with different amount of black garlic extract added. (g/100 mL)

Sample Code ¹⁾	Reducing sugar	Free sugar		
		Fructose	Glucose	Total
C-15	10.73±0.12 ^A	6.58±0.59 ^{bc}	8.27±0.67 ^a	14.85
C-12	10.67±0.15 ^A	5.35±0.93 ^a	8.01±0.79 ^a	13.36
E-12-0.3	11.11±0.07 ^B	5.66±0.18 ^{ab}	8.41±0.47 ^a	14.07
E-12-0.5	11.26±0.04 ^{BC}	5.99±0.29 ^{ab}	8.17±0.42 ^a	14.16
E-12-1	11.41±0.07 ^C	6.03±0.21 ^{ab}	8.90±0.62 ^a	14.93
E-12-3	12.48±0.12 ^D	7.08±0.63 ^c	8.40±0.12 ^a	15.48
E-12-5	13.34±0.03 ^E	8.03±0.40 ^d	9.09±0.50 ^a	17.12

^{a-e} Means with different superscripts within the same column are significantly different (p < 0.05).

All values are mean ± SD (n=3).

¹⁾Refer to foot note of Table 54.

(라) 총 페놀 및 플라보노이드 함량

흑마늘 추출액 첨가량에 따른 간장의 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 56과 같다. 흑마늘 추출액을 1.0% 이하로 첨가하였을 때 총 페놀 화합물은 236.55±5.15-246.00±1.57 mg/100 mL 범위로 시료간에 통계적인 유의차가 없었으며, 흑마늘 추출액을 3% 및 5% 첨가하였을 때 각각 261.12±1.57 mg/100 mL과 283.80±1.07 mg/100 mL로 흑마늘 추출액 첨가량이 많을수록 그 함량도 유의적으로 증가하였다.

총 플라보노이드의 함량도 동일한 경향으로 흑마늘 추출액을 1% 이하로 첨가하였을 때는 시료간에 유의적인 차이가 없었으며, 3%와 5% 첨가시 각각 40.43±0.47 mg/100 mL과 49.84±0.00 mg/100 mL로 유의적으로 증가하였다.

Table 56. Total phenolic compounds and flavonoid contents of *Ganjang* with different amount of black garlic extract added. (mg/100 mL)

Sample Code ¹⁾	Total phenolic compounds	Flavonoid
C-15	239.12±3.61 ^{ab}	30.75±1.86 ^a
C-12	236.55±5.15 ^a	29.41±0.47 ^a
E-12-0.3	240.33±5.41 ^{abc}	30.22±0.47 ^a
E-12-0.5	246.00±1.57 ^c	29.95±0.93 ^a
E-12-1	245.48±3.62 ^{bc}	29.41±0.93 ^a
E-12-3	261.12±1.57 ^d	40.43±0.47 ^b
E-12-5	283.80±1.07 ^e	49.84±0.00 ^c

^{a-e} Means with different superscripts within the same column are significantly different (p < 0.05).

All values are mean ± SD (n=3).

¹⁾Refer to foot note of Table 54.

(마) 간장 분리 다당체의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성

간장 다당체는 발효 과정에서 완전히 분해되지 않고 간장 내에 일부분만 분해된 형태로 존재하며, 알레르기 억제 효과 (Kobayashi M 등 2004), macrophage 및 lymphocyte 기능 증진 효과 (Matsushita H 등 2006), 장관 면역 증진활성 (Matsushita HF 등 2008) 및 철분 흡수 증진 효과 (Kobayashi M 등 2006) 등이 보고되었는데, 본 연구에서는 일반 간장과 흑마늘 추출액의 첨가 농도에 따른 간장 다당체의 항산화활성을 비교하였다.

간장으로부터 분리한 다당체를 62.5, 125, 250, 500, 1,000 및 2,000 µg/mL 농도로 조절하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Table 57과 같다. 흑마늘이 첨가되지 않은 염도 15% 대조군 간장의 다당체와 흑마늘 추출물이 첨가된 간장 다당체의 DPPH 라디칼 소거활성은 각각 4.75±0.08-34.71±0.11%와 8.15±0.62-52.48±1.36%로 농도 의존적으로 활성을 나타내었다.

Table 57. DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from black garlic extract added *Ganjang*. (%)

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	62.5	125	250	500	1000	2000
Control	4.75±0.08 ^A	5.49±0.19 ^A	7.04±0.41 ^B	9.83±0.76 ^C	19.54±0.84 ^D	34.71±0.11 ^E
BEG	8.15±0.62 ^{A***}	10.78±0.24 ^{B***}	17.16±1.74 ^{C***}	28.69±0.52 ^{D***}	43.29±1.01 ^{E***}	52.48±1.36 ^{F***}
Positive control	6.25	12.5	25	50	100	
Ascorbic acid	38.07±0.79	74.44±1.22	89.18±0.33	89.87±0.14	90.03±0.07	

Each value represents mean±SD, n=3

^{A-F}Means with different superscript in the same column are significantly different at $P < 0.05$.

***Means with different column in the same superscript are significantly different at $P < 0.001$.

Control : black garlic extract not added ganjang, BEG : black garlic extract 5% added ganjang

간장으로부터 분리한 다당체를 62.5-2,000 $\mu\text{g/mL}$ 로 농도를 조절하여 ABTS 라디칼 소거활성을 측정 한 결과 (Table 58)를 보면 DPPH와 마찬가지로 농도가 증가할수록 활성이 높아지는 경향을 나타내었으며, 간장 및 흑마늘 간장 다당체의 ABTS 라디칼 소거활성은 각각 9.12 ± 0.62 - $88.96\pm 0.05\%$, 16.29 ± 1.13 - $85.66\pm 0.70\%$ 활성을 보였으며, 간장 다당체는 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 100%에 상응하는 활성을 나타내었고, 흑마늘 간장 다당체는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 100%에 상응하는 활성을 나타내어 흑마늘 간장에서 활성이 더 높게 나타났다. 특히, DPPH 및 ABTS에서 흑마늘 간장 활성이 높았는데 이는 흑마늘이 함유하고 있는 유효성분으로 인하여 높은 활성을 나타낸 것으로 생각된다.

Table 58. ABTS radical scavenging activity of polysaccharides from black garlic extract added *Ganjang*. (%)

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	62.5	125	250	500	1000	2000
Control	9.12±0.62 ^A	16.38±0.56 ^B	30.76±0.59 ^C	57.93±1.90 ^D	88.96±0.05 ^E	>100 ^F
BEG	16.29±1.13 ^{A***}	27.45±1.12 ^{B***}	52.01±1.59 ^{C***}	85.66±0.70 ^{D***}	>100 ^{E***}	>100 ^E
Positive control	6.25	12.5	25	50	100	
Ascorbic acid	69.85±1.73	99.91±0.03	99.84±0.12	99.96±0.03	99.98±0.03	

Each value represents mean±SD, n=3

^{A-F}Means with different superscript in the same column are significantly different at $P < 0.05$.

***Means with different column in the same superscript are significantly different at $P < 0.001$.

Control : black garlic extract not added ganjang, BEG : black garlic extract 5% added ganjang

(7) 저염 흑마늘 간장의 생산공정 확립

이상의 연구결과를 볼 때 저염 간장 제조시 흑마늘 추출액의 첨가량이 많을수록 생리활성물질인 페놀화합물이나 플라보노이드 함량이 증가하여 우수한 간장을 제조할 수 있음을 알 수 있었다. 첨가량이 1% 미만으로 낮을 경우 무 첨가시에 비해 유의적인 차이를 얻을 수 없었고, 다량 첨가할 경우 흑마늘 추출액 비용, 흑마늘의 향 등이 간장 품질에 영향을 미칠 수 있다. 흑마늘 추출액 농도는 너무 낮을 경우 간장 저장성에 영향을 미칠 수 있고, 고농축액을 사용할 경우 일정 농도 이상으로 제조될 때 고비용이 투입되는 단점이 발생하여서 시판 흑마늘 추출 음료 (12-14 Brix)들 보다는 높은 20 ± 5 brix 정도로 농축된 것을 사용하는 것이 적합할 것으로 판단된다. 반응표면 분석을 통하여 간장 품질 및 생리활성 관련 인자들을 강화할 수 있는 조건에서 흑마늘 추출액 첨가는 염도에 직접적인 영향을 미치지 않는 것을 확인하여서 저염 흑마늘 간장을 제조할 때 저염화한 생간장을 제조하고, 여기에 일정 농도 이상으로 농축된 흑마늘 추출액을 첨가한 다음 후 발효시켜 간장을 완성하는 공정이 타당한 것으로 확인 된다. 이상의 결과들과 기업의 간장 제조 공정을 반영하여 완성된 제조 공정도는 다음과 같다.

흑마늘 간장 제조 공정도



제 3 절 기억력 개선·치매 예방 효능 평가 (제 2 협동 경북대학교)

1-1. 연구수행 방법 (경북대 1차년도)

가. 마늘새싹 추출물의 제조

(1) 마늘새싹 제조

한지형인 의성마늘은 의성 농협에서, 난지형인 남해 마늘은 남해마늘 연구소로부터 각각 공급받아 본 연구에 사용하였다. 마늘 껍질을 벗긴 후 날개 쪽으로 분리하여 물에 적신 솜이 깔린 petri dish에 올려놓고 0일에서 6일 동안 25℃에서 배양하여 싹이 발생되도록 하였다. 의성마늘은 뿌리는 성장했으나 싹은 마늘 내부에 머물러 있는 정도였고, 남해 마늘은 배양기간이 증가함에 따라 새싹이 성장하였다 (Fig. 1).

- 시료의 용매 추출액 제조

마늘을 약 0.3 cm 간격으로 얇게 저민 후 grinder로 분쇄하였다. 분쇄물의 10 배 해당하는 용매를 첨가하여 상온의 암조건에서 150 rpm으로 24 시간 진탕추출하였다. 추출용매로는 멸균수, 에탄올수용액 (20%, 40%, 60%, 80%, 100%)과 메탄올 수용액 (20%, 40%, 60%, 80%, 100%)을 사용하였고, FRAP 수준 측정 결과 100% 에탄올 추출물이 가장 높은 철이온 환원능력을 나타내어 이후 실험에서는 100% 에탄올 추출액을 사용하였다. 각 용매 추출물은 speed vac과 rotary evaporater를 사용 최고 50 mg/mL 농도로 농축하였고 편의에 따라 저농도로 희석하여 사용하였다. 각 시료는 고열건조방법의 고형분함량 측정법으로 농도 결정을 하였다.

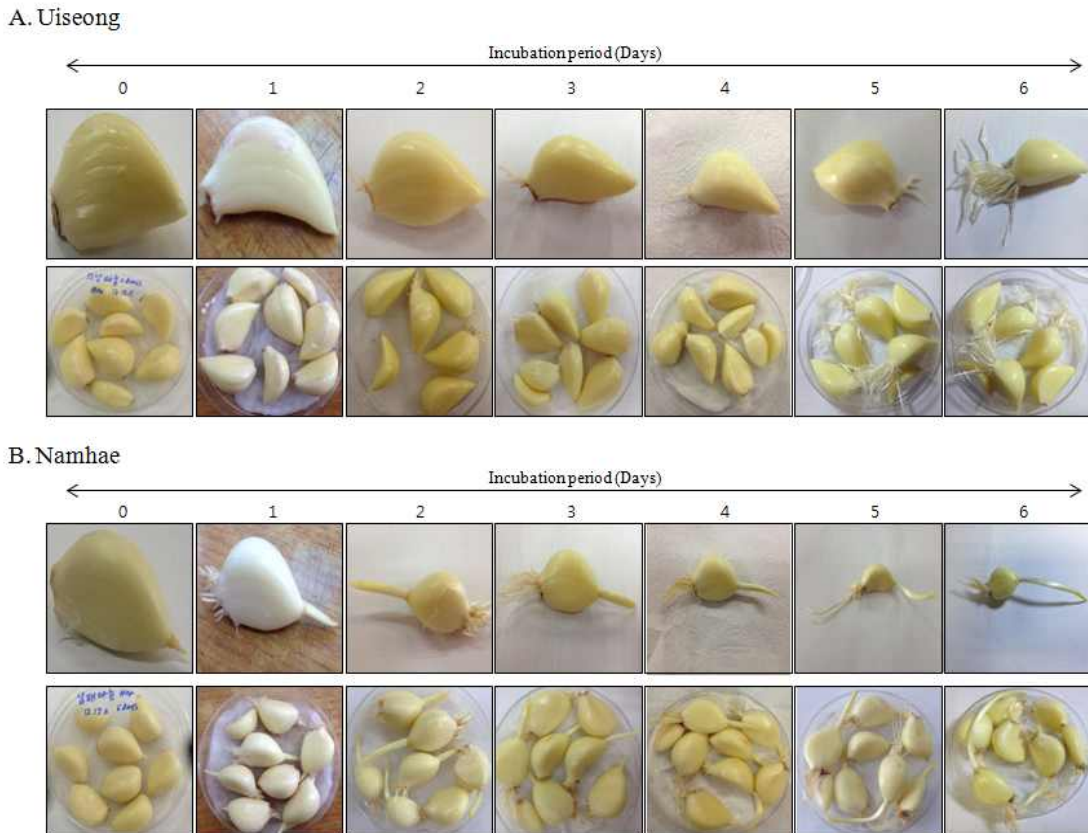


Fig. 1. Morphological changes of two different garlic cultivar (Euisung, Namhae) during sprouting.

나. 마늘함유 된장 및 추출물 제조

마늘함유 된장은 마늘 함량이 전체 무게의 0, 10%, 20%가 되도록 혼합하여 56 일간 발효시켜 제조하였다. 각 시료를 150 mg씩 칭량하여 1.5 mL의 농도별 에탄올 (0, 20, 40, 60, 80, 100%)을 첨가하여 상온 암조건에서 150 rpm으로 24 시간 진탕추출하였다. 추출한 시료는 1500 rpm으로 10 분 동안 원심분리 후 상등액을 수집하여 사용하였다.

다. 균주별 청국장 추출물의 제조

(1) 청국장 제조

청국장 제조에 사용한 콩은 함양농협에서 2011년과 2012년산을 구입하였다. 청국장 제조를 위해 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* HCD2 3 균주를 사용하였고 (Lee and Kim, 2012), 각 균주를 Table 1과 같이 혼합하여 접종하였다. 접종량은 총량의 2.5%가 되도록 하였으며, 37°C 72 시간 발효시키면서 6-12시간 간격으로 시료를 채취하였다.

(2) 추출 및 농축

시료를 동결건조시켜 grinder를 사용해 분쇄하였다. 시료를 4 g 칭량하여 10 배의 80% 에탄올을 첨가하여 상온 암조건에서 150 rpm으로 24 시간 진탕추출하였다. 0.45 µm pore size의 nylon filter로 여과한 후 rotary evaporator를 사용하여 전체 용량의 1/10이 될 때까지 농축하였다. 이 때 항온수조의 온도는 45°C 이하로 유지하였다.

Table 1. Microorganisms used for preparing *cheonggukjang* in this study

실험군	사용균주	시료이름
대조구 1	균주 접종 없음 (벗짚만 사용)	벗짚
대조구 2	시판청국장 접종 (진주 중앙시장에서 구입)	시판
시료 1	MJ1-4만 접종	MJ1-4
시료 2	MJ1-4 +EMD17	4 +17
시료 3	MJ1-4 +HCD2	4 +2
시료 4	HCD2 +EMD17	2 +17
시료 5	MJ1-4 + HCD2 +EMD17	all

라. 된장 및 간장의 제조 및 에탄올 추출물 제조

된장 제조는 수침 콩 (대원콩) 2,000 g, koji 1,080 g, 청국장 300 g, 효모 120 g, 식염 500 g 및 물 1,000 g을 혼합하여 25°C에서 6 주간 발효시켜 제조하였다. 한편, koji 제조는 상온에서 6 시간 동안 물에 불려 팽윤시킨 통밀을 121°C에서 30 분간 증자한 다음 상온에서 35°C까지 냉각한 후 *Rhizopus oryzae* 포자를 5% 접종하고 25°C 배양기에서 5 일간 배양하여 제조하였다. 청국장 제조는 상온에서 12 시간 물에 불려 팽윤시킨 콩을 121°C에서 30 분 증자한 다음 상온에서 35°C까지 냉각한 후 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 EMD17 균주를 각각 3%씩 접종한 후 37°C 배양기에서 3 일간 배양하여 제조하였고 효모는 *Pichia farinosa* SY80를 malt extract 배지에 접종하여 2 일 배양하여 사용하였다. 시료의 80% 에탄올 추출물은 상기 청국장과 같은 방법으로 제조하였다.

마. 항산화활성평가

(1) DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능 분석 방법의 원리는 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH*)에 대한 항산화제 및 시료의 환원능력을 측정하는 것이다. DPPH의 색이 소실되는 정도를 515

nm 파장에서 흡광도를 측정하여 남아있는 DPPH 함량을 다음과 같이 계산하였다 (Alma et al, 2003).

$$\text{환산식: } \% \text{ DPPH}^*_{\text{REM}} = 100 \times [\text{DPPH}^*]_{\text{REM}} / [\text{DPPH}^*]_{\text{T=0}}$$

(2) 총 페놀 함량

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 사용하여 측정하였다. 이 방법은 alkali solution (5-10%의 soluble carbonate)에서 tungstate와 molybdate의 혼합물을 이용하는 것으로 phenolic compound는 산화되어 $\cdot\text{O}_2^-$ 를 형성하여 molybdate와 반응하여 molybdenum oxide (MoO^{4+})를 형성되는데 이를 750 nm 흡광도로 측정하였으며, gallic acid equivalent (GAE)로 나타내었다 (Singleton et al, 1965).

(3) FRAP assay

Ferric 2,4,6-tripyridyl-triazine (TPTZ) 시약이 산화반응에 의하여 2가의 철이 3가로 산화되면서 colored product로 전환되는 원리를 이용한 것이다. 그러나 radical quenching (수소전이)에 의하여 작용하는 화합물 (예, thiols, 단백질)의 항산화활성은 측정하지 못하는 결점을 가지고 있다. Ferrous sulphate solution 1 mM (0.278 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$)을 제조후 표준용액으로 사용하였으며, FRAP 용액은 300 mM acetate buffer (pH 3.6) 200 mL, 10 mM TPTZ 용액 20 mL, 20 mM FeCl_3 용액 20 mL, 멸균수 24 mL를 혼합한 후 37°C를 유지시켜 사용하였다. 96-well plate를 사용하여 well 당 멸균수 170 μL , standard와 시료용액 7 μL 와 FRAP 용액 30 μL 를 혼합하고 4 분 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP level은 흡광도의 표준용액에 대한 선형회귀분석을 통해 산출하였다 (Benzie et al., 1996).

(4) ABTS⁺라디칼 소거능

7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate (final concentration)을 혼합하여 상온 및 암조건에서 밤동안 shaking incubation하여 반응 시켜 라디칼을 생성시키고 ethanol로 415 nm 흡광도가 0.7 ± 0.02 가 되도록 희석시켰다. ABTS 라디칼 용액 250 μL 와 시료 28 μL 를 상온에서 5분 동안 반응시킨 후, 분광광도계 (415 nm)를 이용해 흡광도를 측정하였다. 양성대조군 (positive control)으로 Trolox를 사용하였으며 계산식은 다음과 같다 (Re et al., 1999).

$$\text{계산식 : } I_{\text{ABTS}^{+\cdot}} \% = \left[\frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

(5) ORAC_{ROO-} assay

Fluorescence을 acetone과 멸균수를 1:1의 비율로 혼합한 용매에 8 mM의 농도가 되도록 용해한 후 75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 희석하여 160 nM이 되도록하였다. 160 nM fluorescence 용액 100 μL , 시료 50 μL 와 80 mM AAPH 25 μL 를 혼합하여 excitation 485 nm/ emission 535 nm에서 2분 간격으로 100 cycle을 측정하여 면적을 사용해 그래프화하였다 (Kurihara et al, 2004).

(6) DCFDA dye를 사용한 ROS 억제활성

HepG2 세포를 1×10^4 농도가 되도록 black coated 96-well plate에 seeding하고, 다음날 시료를 24 시간 처리한 후 10 μM 의 DCFDA를 30 분 처리하였다. DCFDA를 제거하고 PBS에 용해한 200 μM 의 H_2O_2 를 30 분 처리한 후 excitation 485 nm/ emission 535 nm에서 형광을 측정하였다 (Wang et al., 1999).

(7) Mouse 조직내 lipid peroxidation 측정

ICR 마우스의 뇌, 간, 신장을 적출하여 각 조직무게의 10 배에 해당하는 cold phosphate buffered saline (PBS)를 첨가하고 sonication을 하여 homogenate를 제조하였다. Homogenate

는 10,000 x g에서 5 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 조직 상등액 50 μ L와 0.15 M KCl 500 μ L를 잘 혼합한 후, 0.4 mM FeCl₂ 100 μ L를 첨가하였다. 혼합액은 37°C에서 30 분간 incubation 하였고, 반응 종료액 (0.25 N cold HCl, 15% TCA, 0.385 MBA, 0.05% BHT) 1 mL을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 90°C에서 조직에 따라 30 분에서 2 시간 동안 incubation 한 후 상등액을 535 nm에서 측정하였다 (Mihara et al., 1978).

(8) MTT에 의한 세포 생존율 측정

HT22 세포를 2×10³의 농도로 seeding 하고, 5 mM의 glutamate (final concentration)와 시료를 배양액에 희석하여 50 μ L 첨가하였다. 24 시간 후, MTT 시약을 최종농도가 0.5 mg/mL (최종농도)로 2시간 동안 처리하였다. 생성된 purple formazan을 DMSO로 용해하여 570 nm/reference 690 nm에서 측정한 후 아래의 식을 사용해 계산하였다 (Mosmann, 1983).

$$\text{Cell viability (\%)} = \text{Abs}_{\text{solvent}}/\text{Abs}_{\text{sample}} \times 100$$

바. 발아마늘의 항산화 및 신경보호 효과

(1) 신경세포에서 발아마늘 추출물의 세포내 GSH 농도에 미치는 영향

글루타치온 (glutathione)은 식물과 동물조직에서 가장 풍부한 항산화 성분이며, 세포방어시스템에서 가장 중요한 역할을 담당한다. 본 연구에서는 monochlorobimaine (mBCl) 시약을 이용하여 마우스 해마세포 (HT22)내 GSH 농도를 측정하였다. HT22 세포를 3×10⁴의 농도로 seeding 하고, 5 mM glutamate (최종농도)와 시료를 배양액에 희석하여 1 mL 첨가하였다. 24 시간 후, 20 μ M의 mBCl (최종농도)을 배양액에 희석하여 500 μ L 첨가한 후 1시간동안 배양하였다. Cover glass를 슬라이드로 옮겨 형광현미경을 사용해 가시화 하였다 (Rice et al, 1986).

사. 시료의 기억 및 학습 개선 효과

마우스의 기억력을 인위적으로 감소시키기 위하여 scopolamine을 처리하고, 시료의 개선효과를 3 종류의 행동실험을 통해 확인하였다.

(1) 시료의 탐구능력 개선 효과

시료투여는 수동회피시험에서와 같은 방법으로 실시하였다. Y-미로실험에 이용되는 기구는 3 개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지 (arm)의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm 이고 세 팔이 접히는 각도는 120° 이다. 모든 실험장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8 분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 mouse가 들어간 가지를 기록하였다. 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점 (실제변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력 (alternation behavior)은 3 가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적식에 의해 계산된다 (Sarnyai et al, 2000).

$$\text{변경행동력 (\%)} = \text{실제변경 (actual alternation)} / \text{최고변경 (maximum alternation)} \times 100$$

(최고변경 : 총 입장횟수 - 2)

(2) 시료의 학습 및 기억력개선 효과

조건회피반응 시험장치 (Gemini avoidance system, San Diego Instruments, San Diego, U.S.A.)는 shuttle box (52.6 X 17.3 X 21.3 cm)는 동일한 크기의 두 방으로 나뉘어 있으며, 두 방을 나누는 벽에는 길로틴 문 (guillotine door) (8.9 x 8.9 cm)가 설치되어 있어 자동으로 상하로 열고 닫을 수 있게 되어 있다. 우측 방에는 매우 밝은 전구가 설치되어 있어 실험동물이 싫어하는 밝은 환경을 조성하였으며, 좌측 방에는 빛이 들어오는 것을 차단하여 실험동물이 상

대적으로 편안함을 느끼게 하였다 (Ferry et al., 1999).

(가) 학습시험 (training trial)

왕복상자의 우측 방에 불을 켜고 실험동물의 머리가 길로틴 문의 반대쪽으로 향하게 살며시 내려놓았다. 실험동물을 10 초간 탐색시킨 후 길로틴 문을 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다. 실험동물은 방을 탐색하다가 본능적으로 어두운 좌측 방으로 이동하는데, 이때 길로틴 문이 열린 후 300 초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 mouse는 실험에서 제외 시켰다. 일단 mouse가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴 문이 닫히고 0.5 mA의 전기충격이 3 초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 되고 mouse는 이를 기억하게 된다.

(나) 기억검사 (retention trial)

기억감사는 학습시험 (training trial)이 끝난 후, 24 시간 후에 장기기억에 미치는 시료의 효과를 확인하고자 수행하였다. 실험동물을 왕복상자에 넣고 10 초 동안 탐색시킨 후 길로틴 문을 열고 어두운 쪽으로 mouse의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간 (latency time : 머무름 시간)을 300 초까지 측정하였다. 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다.

(3) 시료의 인지기능 개선에 미치는 영향

마우스의 인지 및 학습능력을 Morris water maze test로 측정하였다. Morris 수중미로를 통한 공간학습 및 인지력 개선에 대한 실험은 치매 개선약물의 탐색을 위한 한 방법으로 알려져 있다. 본 maze의 재원은 지름 90 cm, 높이 45 cm 이며 플랫폼의 지름은 6 cm로 구성되어있다. 수중미로의 주변은 비디오카메라와 연결된 컴퓨터 시스템과 수온 조절용 장치 등 공간단서들을 항상 일정하게 유지시켰다. 실험방법으로는 maze에 물의 높이가 30 cm가 되도록 물을 채우고 마우스가 플랫폼을 볼 수 없도록 물 높이의 1 cm 밑에 설치하였다. Maze에는 4개의 marker를 사용하여 maze를 4 분원이 되도록 나누어서 북동 (NE), 북서 (NW), 남동 (SE), 남서 (SW)로 구분하였고, maze의 한 4 분원에 플랫폼을 설치하였다. Morris 수중미로시험은 6 일 동안 진행하는데, 첫째 날에는 각 마우스들이 물에 대하여 적응을 할 수 있도록 1 분간 maze 안에서 자유로이 수영하도록 하며, 이때 플랫폼은 설치하지 않으며 둘째 날부터 5 일째 되는 날까지 하루에 각각의 마우스가 1 일 4 회씩 1 분 동안 30 초 간격으로 maze에서 수영하도록 하였다. 두번째 되는 날부터 5 일째가 되는 4 일간 1 회의 실험방법은 이미 maze안에 설치한 플랫폼에 1 분 이내에 10 초간 올라가 있는 마우스는 실험을 마치고 1 분 이내에 플랫폼을 찾지 못하거나 플랫폼에 10 초간 올라가 있지 않은 마우스는 실험종료 후 인위적으로 10 초간 플랫폼에 올려둔 후 실험을 종료하며, 이때 플랫폼의 위치는 같은 자리에 고정시켰다. 6 일째 되는 날에는 플랫폼을 maze에서 제거한 후 플랫폼이 있던 위치에 마우스가 멈춘 시간을 측정하였다. 건망증 유발물질로는 scopolamine을 사용하였으며, 투여는 매일 첫 번째 입수 30 분 전에 1 mg/kg body weight으로 복강에 주사하였다 (Bromley-Brits et al., 2011).

(4) 시료의 scopolamine으로인해 유도된 해마 신경손상 보호효과

Morris water maze test를 종료한 후 수집한 뇌 조직을 사용하여 파라핀 block을 제조하였다. 뇌 조직을 10 μ m 두께로 절단한 후 수세, 탈수, 투명화 과정을 통하여 slide를 제작하였다. Hematoxyline과 eosine을 사용하여 해마부위의 핵과 세포질을 염색하여 손상부위를 확인하였다 (Shirayama et al., 2002).

1-2. 연구수행 방법 (경북대 2차 년도)

가. 발아마늘첨가 장류의 기능성 평가

(1) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 및 추출물 제조

마늘함유 청국장은 청국장에 일반마늘, 발아마늘, 발효마늘을 혼합하여 3 일간 발효시켜 제조하였다. 각 시료를 1 g씩 칭량하여 10 mL의 농도별 에탄올 (0, 20, 40, 60, 80, 100%)을 첨가하여 상온 암조건에서 150 rpm으로 24 시간 진탕추출 하였다. 추출한 시료는 1500 rpm으로 10 분 원심분리 후 상등액을 수집하여 사용하였다

(2) 마늘함유 된장 및 추출물 제조

마늘함유 된장은 마늘 함량이 전체 무게의 0, 10%, 20%가 되도록 혼합하여 56 일간 발효시켜 제조하였다. 각 시료를 1 g씩 칭량하여 10 mL의 농도별 에탄올 (0, 20, 40, 60, 80, 100%)을 첨가하여 상온 암조건에서 150 rpm으로 24 시간 진탕추출하였다. 추출한 시료는 1500 rpm으로 10분 동안 원심분리 후 상등액을 수집하여 사용하였다.

(3) 균주별 청국장 추출물의 제조

(가) 청국장 제조

청국장 제조에 사용한 콩은 함양농협에서 2011년과 2012년산을 구입하였다. 청국장 제조를 위해 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, EMD17, HCD2 3 균주를 사용하였고 각 균주를 Table 1과 같이 혼합하여 접종하였다. 접종량은 총량의 2.5%가 되도록 하였으며, 37°C에서 72 시간 발효시키면서 6-12시간 간격으로 시료를 채취하였다.

(나) 추출 및 농축

시료를 동결건조시켜 grinder를 사용해 분쇄하였다. 시료를 4 g 칭량하여 10 배의 80% 에탄올을 첨가하여 상온 암조건에서 150 rpm으로 24시간 진탕추출하였다. 0.45 μm pore size의 nylon filter로 여과한 후 rotary evaporator를 사용하여 전체 용량의 1/10이 될 때까지 농축하였다. 이 때 항온수조의 온도는 45°C 이하로 유지하였다.

(4) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 항산화 활성 평가

(가) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 ORAC_{ROO-} 활성

마늘 종류별 청국장 추출물의 in vitro 상에서의 항산화 효능을 알아보기 위해 ORAC assay를 시행하였다 (Kurihara et al., 2004).

(나) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 HepG2 세포모델계 항산화 활성

마늘종류별 청국장 추출물의 인체간암세포 HepG2 세포에서의 항산화효능을 알아보기 위해 과산화수소로 세포내 산화적 스트레스를 유도한 후, 마늘종류별 제조 청국장의 항산화활성을 평가하였다. 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 HepG2 세포에 처리하고 DCFH₂DA 방법을 이용하여 대조군과 비교하였다 (Wang and Joseph, 1999).

(5) 마늘 함량별 된장의 항산화 활성

(가) 마늘 함량별 된장 추출물의 ORAC_{ROO-} 값

항산화 활성 지표로서 시료의 ORAC_{ROO-} 값을 측정하였다.

(나) 마늘 함량별 된장 추출물의 HepG2 모델계 항산화 활성

마늘함량별 제조 된장 추출물의 인체간암세포 HepG2 세포에서의 항산화효능을 알아보기 위해 과산화수소로 세포내 산화적 스트레스를 유도하여 마늘함량별 된장 추출물의 항산화활성을 측정하였다. 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 인체간암세포 유래 세포주인 HepG2에 처리하고 DCFH₂DA 방법을 이용하여 대조군과 비교하였다 (Wang and Joseph, 1999).

(6) 사용균주에 따른 청국장의 항산화 활성 평가

(가) 사용균주에 따른 청국장 추출물의 HepG2 cell line에서의 항산화 활성평가

사항으로 선별한 균주를 사용한 청국장 추출물의 HepG2 세포에서 항산화 활성을 평가하기 위해 과산화수소 처리하여 세포내 산화적 스트레스를 유도하여 사항별 청국장의 항산화활성을 측정하였다. 추출물을 100 µg/ml 농도로 인체간암세포 유래 세포주인 HepG2에 처리하고 DCFH₂DA 방법을 이용하여 대조군과 비교하였다 (Wang and Joseph, 1999).

(7) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 신경세포 보호활성 평가

(가) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 신경세포 보호활성 평가

마늘종류별 제조 청국장의 신경세포 보호효과를 평가하기 위해 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트 (glutamate)로 세포 내 산화적 스트레스를 유도하여 마늘종류별 제조청국장 추출물의 세포보호활성을 측정하였다.

(나) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 HT22 세포에서의 NQO1 유도활성

전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 NQO1 활성 촉진여부를 평가하기 위해 NQO1 assay를 통하여 마늘종류별 청국장 추출물의 NQO1 활성 촉진으로 인한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 마늘종류별 청국장 추출물을 100 µg/ml 으로 처리하여 대조군, 양성대조군인 설포라판 (sulforaphane)과 비교하였다 (Benson et al, 1980).

(다) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 ROS 소거 활성 평가

마늘 함유 청국장 시료의 신경흥분독성 물질인 glutamate가 유발하는 ROS의 생성 저해 효과를 평가하기 위하여 DCFH₂DA를 이용하여 마늘종류별 청국장 추출물의 ROS에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다.

(라) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 superoxide anion 소거 활성

마늘함유 청국장 추출물의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 superoxide anion의 생성 억제 효과를 조사하기 위하여 DHE (dihydroethidium)를 이용하여 마늘종류별 청국장 추출물의 superoxide anion에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다 (Melendez et al, 1999).

(마) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 GSH (glutathione) 농도에 미치는 효과

마늘 함유 청국장 추출물의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트에 의해 감소된 glutathione 농도를 증가시키는 지 여부를 알아보기 위하여 monochlorobimane (mBCl) 를 이용하여 마늘종류별 청국장 추출물의 glutathione 감소에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다 (Rice et al, 1986).

(8) 마늘 함량별 제조 된장의 신경세포 보호활성 평가

(가) 마늘함량별 된장 추출물의 신경세포 보호활성 평가

마늘 함량별 된장 추출물의 신경세포 보호효과를 알아보기 위해 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트 (glutamate)로 세포 내 산화적 스트레스 독성을 유도하여 마늘함량별 된장 추출물의 세포보호활성을 측정하였다.

(나) 마늘함량별 된장 추출물의 HT22 cell line에서의 NQO1 유도 활성

마늘함량별 된장 추출물의 NQO1 활성 촉진여부를 평가하기 위해 NQO1 assay를 통하여 마늘함량별 된장 추출물의 NQO1 활성 촉진으로 인한 신경세포 보호효과를 조사하였다 (Benson, 1980)

(다) 마늘함량별 제조 된장 추출물의 ROS 소거 활성

마늘 함유 된장 추출물의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 ROS의 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 DCFH₂DA를 이용하여 마늘함량별 된장 추출물의 ROS에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다 (Wang, 1999).

(라) 마늘함량별 된장 추출물의 superoxide 소거 활성 평가

마늘 함량별 제조 된장의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 superoxide의 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 DHE를 이용하여 마늘함량별 된장 추출물의 superoxide 생성 저해 활성을 조사하였다 (Melendez et al, 1999).

(마) 마늘함량별 된장 추출물의 glutathione 감소 억제 평가

마늘 함유 된장 추출물의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트에 의해 감소된 glutathione을 회복시키는 효과를 알아보기 위하여 mBCl 를 이용하여 마늘함량별 된장 추출물의 glutathione 감소에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다 (Rice et al, 1986).

(9) 사용균주에 따른 청국장 추출물의 신경세포 보호활성

(가) 사용균주에 따른 청국장 추출물의 신경세포 보호활성

제1세부에서 선별한 균주를 사용한 청국장 추출물의 신경세포 보호효과를 알아보기 위해 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트 (glutamate)로 세포 내 산화적 스트레스를 유도하여 청국장 추출물의 세포보호활성을 측정하였다. 청국장 추출물을 100 µg/ml 농도로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22에 처리하고, MTT assay 방법을 이용하여 대조군과 cell viability를 비교하였다.

(나) 청국장 추출물의 HT22 cell line에서의 NQO1 유도 활성

청국장 추출물의 NQO1의 활성 촉진여부를 평가하기 위해 NQO1 assay를 통하여 청국장 추출물의 NQO1 활성 촉진으로 인한 신경세포 보호효과를 조사하였다 (Benson et al., 1980).

(다) 청국장 추출물의 ROS 소거 활성 평가

마늘 함유 청국장의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 ROS의 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 DCFH₂DA 를 이용하여 청국장 추출물의 ROS에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다 (Wang et al., 1999).

(라)청국장 추출물의 superoxide 소거 활성 평가

마늘함유 청국장의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 superoxide의 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 DHE 를 이용하여 청국장 추출물의 superoxide에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다 (Melendez et al, 1999).

(마) 청국장 추출물의 glutathione 감소 억제 평가

마늘 함유 청국장의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트에 의해 감소된 glutathione을 증가시키는 것을 알아보기 위하여 mBCl 를 이용하여 제조된 마늘 함유 청국장 추출물의 glutathione 감소에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다 (Rice et al, 1986).

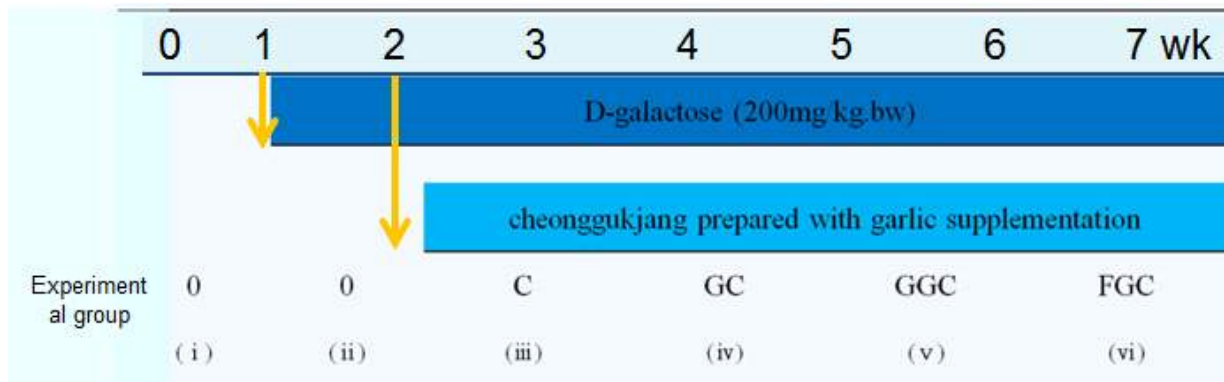
1-3. 연구수행 방법 (경북대 3차 년도)

가. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 동물계에서 항산화 활성 및 인지기능개선 평가

(1) Mouse model 계를 이용한 마늘함유 청국장의 항산화 활성 및 인지기능개선 효능 평가를 위한 실험 디자인

첨가한 마늘 가공형태 (생마늘, 발아마늘, 발효마늘)를 달리하여 제조한 청국장의 동물모델계 항산화 활성 및 인지기능개선 활성을 평가하기 위하여 아래 그림과 같이 계획을 세우고 실험을 실시하였다. C57BL/6J (5 주령)을 이용하여 사육실 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 50%를 유지하면서 실험을 실시하였다. 식이는 AIN-76A를 기초로 하였으며, 여기에 마늘 종류별 청국장 분말을 식이당 3%를 첨가하여 제조하여 자유급식을 실시하였다. 한편, 산화적 스트레스 유도군에는 D-galactose (200 mg/kg bw)를 2 일 1 회 복강 투여하였으며, 대조군은 0.9% saline을 복강주사하였다. 총 시험기간은 7 주간으로 1 주는 적응기간을 두었으며, 이후 6 주간 실험식이를 급여하였다. 실험군은 6 개 군으로 (i) 음성대조군 (s.c. injected with 0.9% saline), (ii) D-galactose (200 mg/kg bw) 주사군, (iii) D-galactose 주사 + 생 청국장 급여군 (3%), (iv) D-galactose 주사 + 일반마늘 청국장 급여군 (3%), (v) D-galactose 주사 + 발아마늘 청국장 급여군 (3%), (vi) D-galactose 주사 + 발효마늘 청국장 급여군 (3%)이었다.

Table 2. Experimental design for assessing antioxidant and cognition enhancing activities of garlic-containing *cheonggukjang* in C57BL/6J model



(2) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 급여가 혈청 FRAP에 미치는 영향

동물실험 시 혈액을 수집하여 3,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 FRAP 실험에 사용하였다. 3 개의 철이 전자를 얻어 2 가철로 환원 될 때, TPTZ (ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 시약이 2 가 철과 반응하여 푸른색을 띠는 물질로 전환되는 원리를 이용하였다. 96-well plate에 170 μL 증류수, 7 μL 표준용액 또는 시료, 30 μL FRAP 용액을 넣어 4 분간 반응시킨 뒤 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 FRAP 값은 표준용액의 흡광도를 이용한 표준검량곡선으로부터 계산하였다 (Benzie et al., 1996).

(3) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 급여가 혈청 4-HNE 함량에 미치는 영향

혈청 내 4-HNE 농도는 4-HNE kit (MyBioSource, San Diego, California, USA)를 사용하여 측정하였다. 4-HNE plate에 혈청을 50 μL 씩 넣고 HRP conjugate를 각 well에 100 μL 씩 넣은 후 37°C 에서 1 시간 반응 시켰다. 반응이 끝나면 wash buffer로 세척한 후, chromogen solution A, B를 각각 50 μL 씩 넣고 37°C 에서 15 분간 반응시킨 후, stop solution을 50 μL 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Weber, 2013).

(4) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 급여가 혈청 내 8-OHdG 농도에 미치는 영향

DNA 손상정도의 지표인 혈청 내 8-OHdG 농도는 DNA damage EIA kit (Assay designs)

를 사용하여 측정하였다. 8-OHdG plate에 혈청을 50 μ L 씩 넣고 Anti-8-OHdG를 각 well에 50 μ L씩 넣은 후 상온에서 1 시간 반응 시켰다. 반응이 끝나면 wash buffe로 세척한 후, HRP conjugate, TMB substrate를 각각 100 μ L씩 넣고 상온에서 15 분간 반응시킨 후, stop solution을 100 μ L 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 급여가 마우스 혈청 지질과산화물 함량에 미치는 영향
혈청 내 MDA 농도는 TBARS Assay kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 100 μ L의 혈청과 100 μ L SDS lysis 용액을 5 분간 상온에서 반응시킨 후 250 μ L의 TBA reagent를 넣고 95°C에서 1 시간 반응시켰다. 용액의 색이 분홍색으로 변하면, 3000 rpm에서 15 분간 원심분리 한 후 상층액만 분리하여 n-butanol을 넣어 2 분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 10,000 \times g에서 5 분간 원심분리 한 후 상층액 200 μ L를 96 well plate에 넣어 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) 마우스모델을 이용한 D-galactose에 의해 유도된 산화적 스트레스에서 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장이 기억 및 인지 능력에 미치는 영향
마늘 종류별 청국장이 D-galactose에 의해 유도된 산화적 스트레스 모델에서 기억 및 인지 능력을 개선시키는지 여부를 확인하기 위해 Y-maze를 수행하였다.

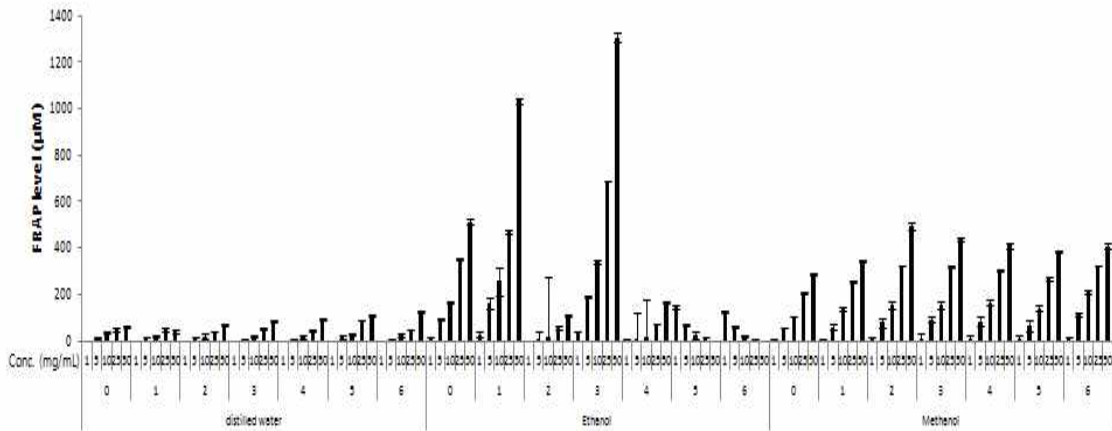
2-1. 연구결과 (경북대 1차 년도)

가. 산지별 마늘 새싹 추출물의 항산화 활성

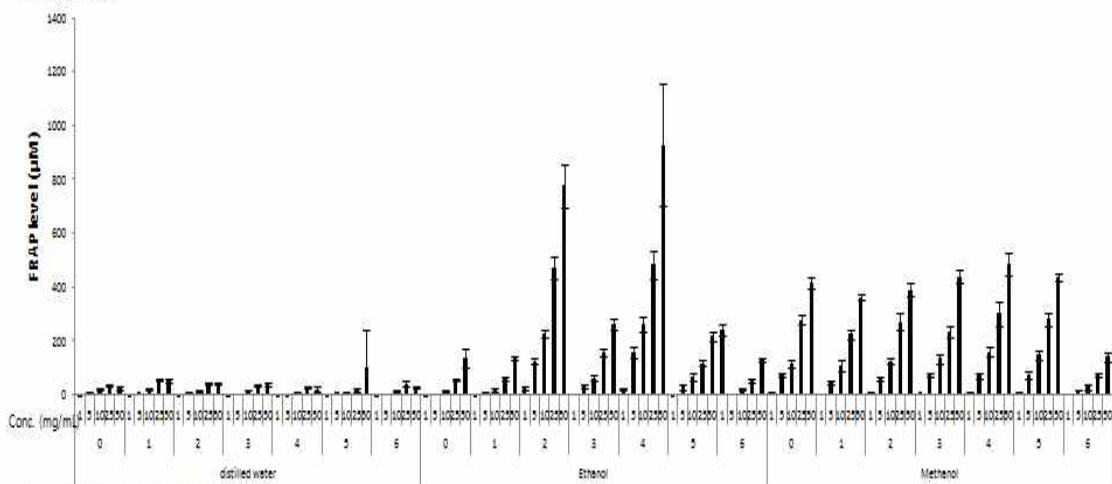
(1) FRAP 활성

FRAP assay 결과, 의성마늘새싹과 남해마늘새싹 모두 물과 메탄올로 추출한 것에 비해서 에탄올 추출물이 더 높은 철이온 환원능력을 보였다. 또한 의성마늘새싹 에탄올 추출물은 0, 1, 3 일 배양한 시료에서, 남해마늘새싹 에탄올 추출물은 2, 4 일 배양한 시료에서 높은 FRAP 값을 나타내었다 (Fig. 2). 이 결과를 바탕으로 추출용매로 에탄올이 가장 적합하다고 사료되어 두 종류의 마늘을 에탄올로 추출하여 연구를 진행하였다.

A. Uiseong



B. Namhae



C. Positive controls

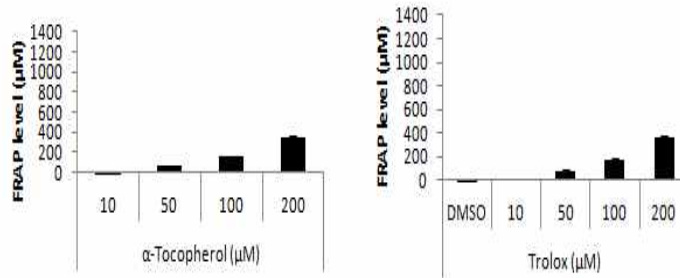


Fig. 2. FRAP activity of activity of garlic extracts prepared using garlic sprouted for different periods and extraction solvents.

(2) DPPH 라디칼 소거능

발아기간에 따른 의성마늘새싹 에탄올 추출물과 남해마늘새싹 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 평가한 결과, 의성마늘새싹추출물은 0, 1, 3 일 동안 배양한 군에서, 남해마늘새싹 추출물은 2, 3, 4 일 동안 발아시킨 군에서 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 또한 각 마늘새싹추출물은 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL 농도범위에서 농도의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 양상을 나타내었다 (Fig. 3).

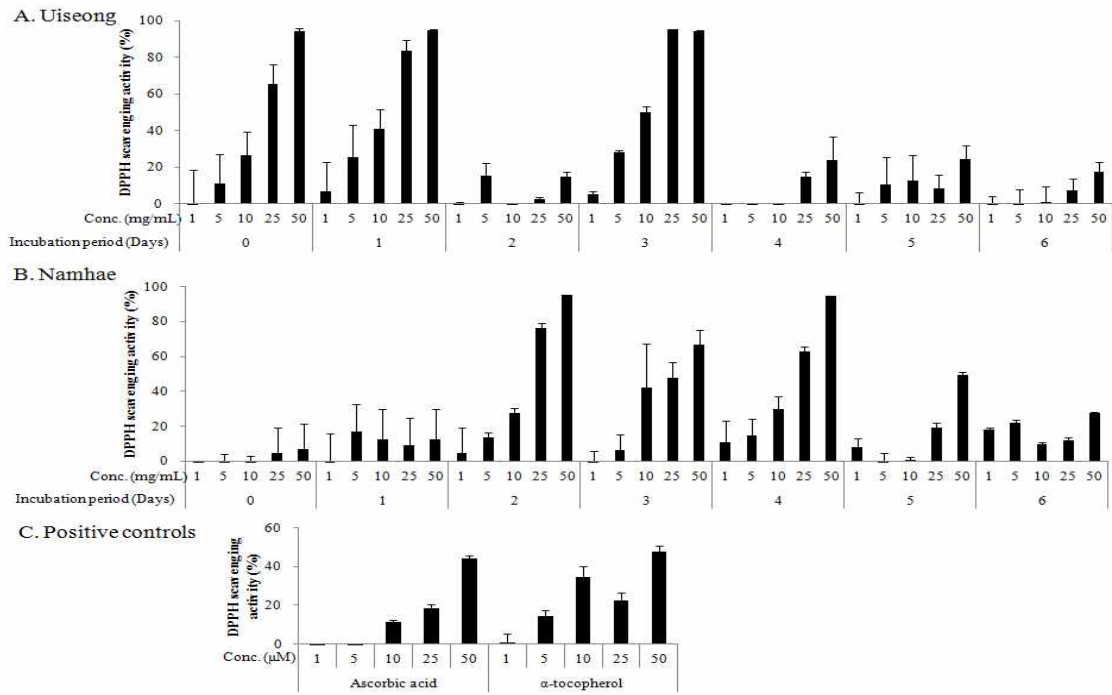


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of garlic extracts prepared using garlic sprouted for different periods and extraction solvents.

(3) ABTS 양이온 라디칼 소거능

의성마늘새싹 에탄올추출물은 0, 1, 3 일 동안 발아시킨 군에서, 남해마늘새싹 에탄올추출물은 2, 4 일 동안 배양한 군에서 높은 ABTS 양이온 라디칼 저해능을 나타내었다 (Fig. 4).

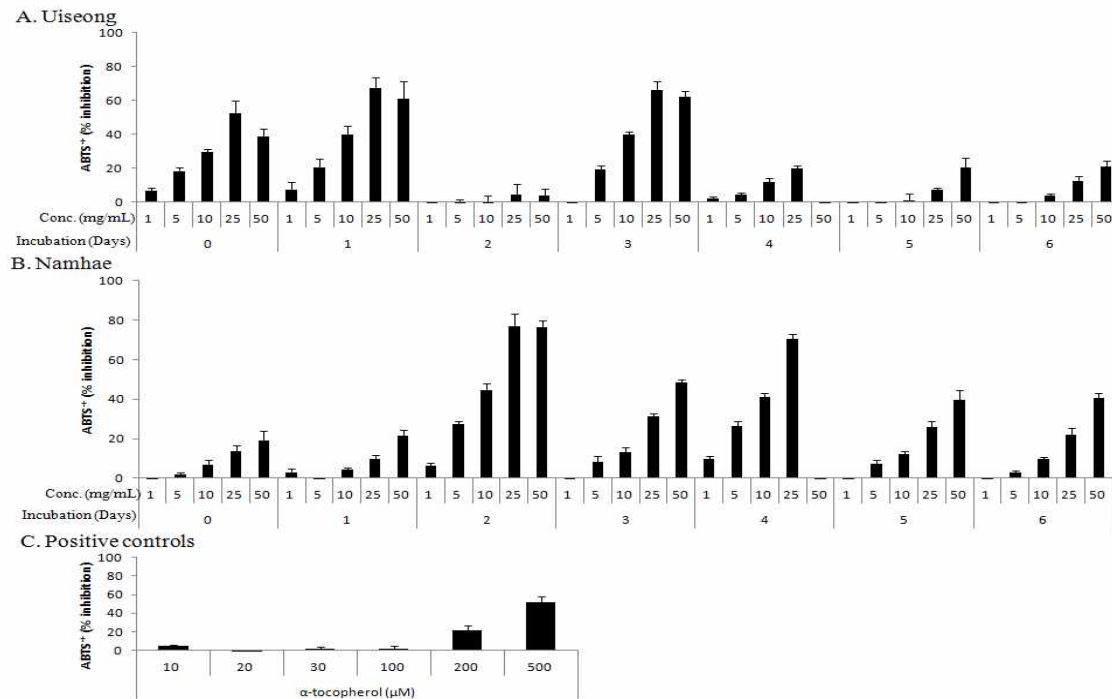


Fig. 4. ABTS radical scavenging activity of garlic extracts prepared using garlic sprouted for different periods and extraction solvents.

(4) 발아마늘 에탄올 추출물의 총 페놀함량

총 페놀함량을 측정한 결과, 의성마늘새싹 에탄올 추출물은 0, 2, 3 일 동안 발아시킨 군 가운데 50 µg/mL 농도에서 총 페놀함량이 높게 나타났으나, 남해마늘새싹 에탄올 추출물은 전반적으로 총 페놀함량이 낮게 나타났다 (Fig. 5).

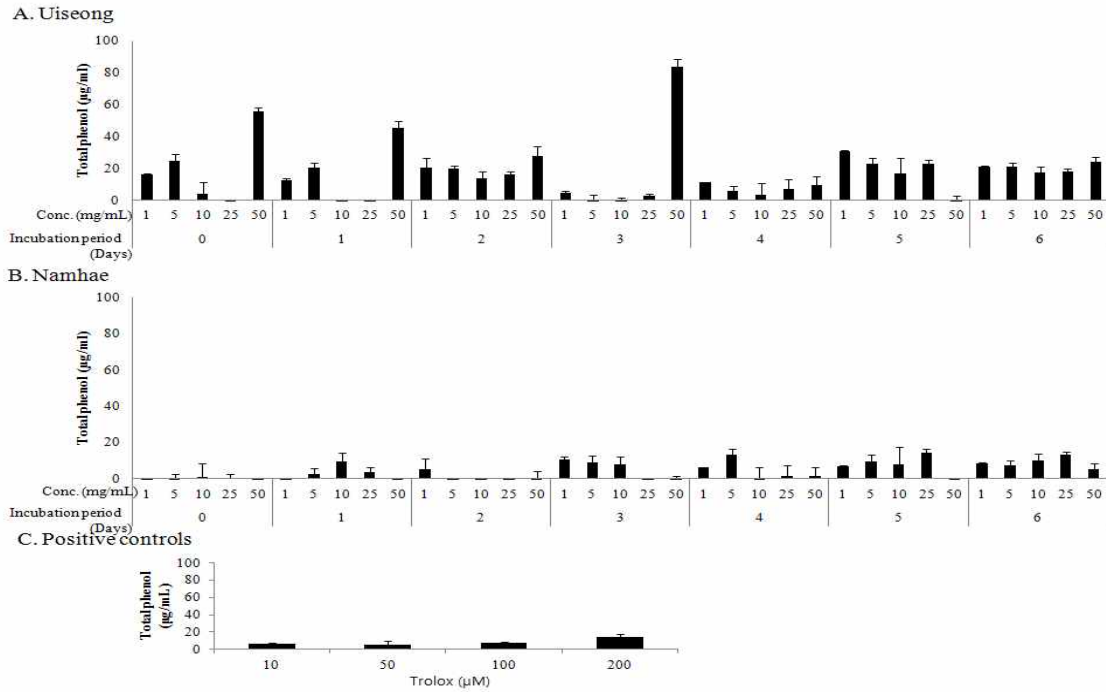


Fig. 5. Total phenolic contents of garlic extracts prepared using garlic sprouted for different periods and extraction solvents.

(5) 발아마늘 에탄올 추출물의 ORAC_{ROO-} 저해 활성

ORAC_{ROO-} 저해 활성을 조사한 결과, 의성마늘새싹 에탄올추출물은 0, 1, 3 일 동안 발아한 군에서 그리고 남해마늘새싹 에탄올추출물은 2, 3, 4 일 동안 발아한 군에서 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 6).

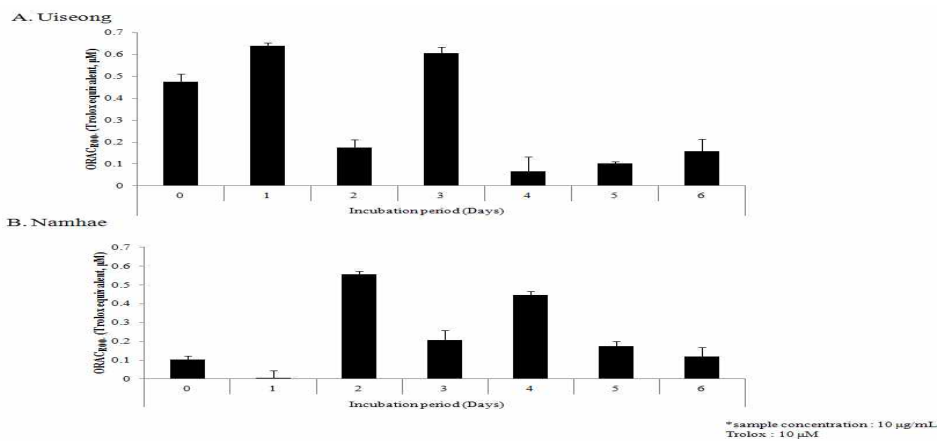


Fig. 6. ORAC activity of garlic extracts prepared using garlic sprouted for different periods and extraction solvents.

(6) 발아마늘 에탄올 추출물의 ROS 소거능

마늘새싹 에탄올 추출물이 과산화수소에 의한 산화적 손상으로부터 간세포를 보호하는 효과를 측정하기 위해 DCFDA assay를 이용하여 평가하였다. 그 결과, 의성마늘새싹 에탄올 추출물은 2 일 발아군을 제외하고 모든 실험군에서 ROS 소거능을 나타내었다. 뿐만 아니라, 남해마늘새싹 에탄올추출물은 배양 0-4일 군에서 Trolox에 상응하는 ROS 소거능을 나타내었다. 그러나, 5 일, 6 일 배양군에서는 보호효과를 나타내지 않았다 (Fig. 7).

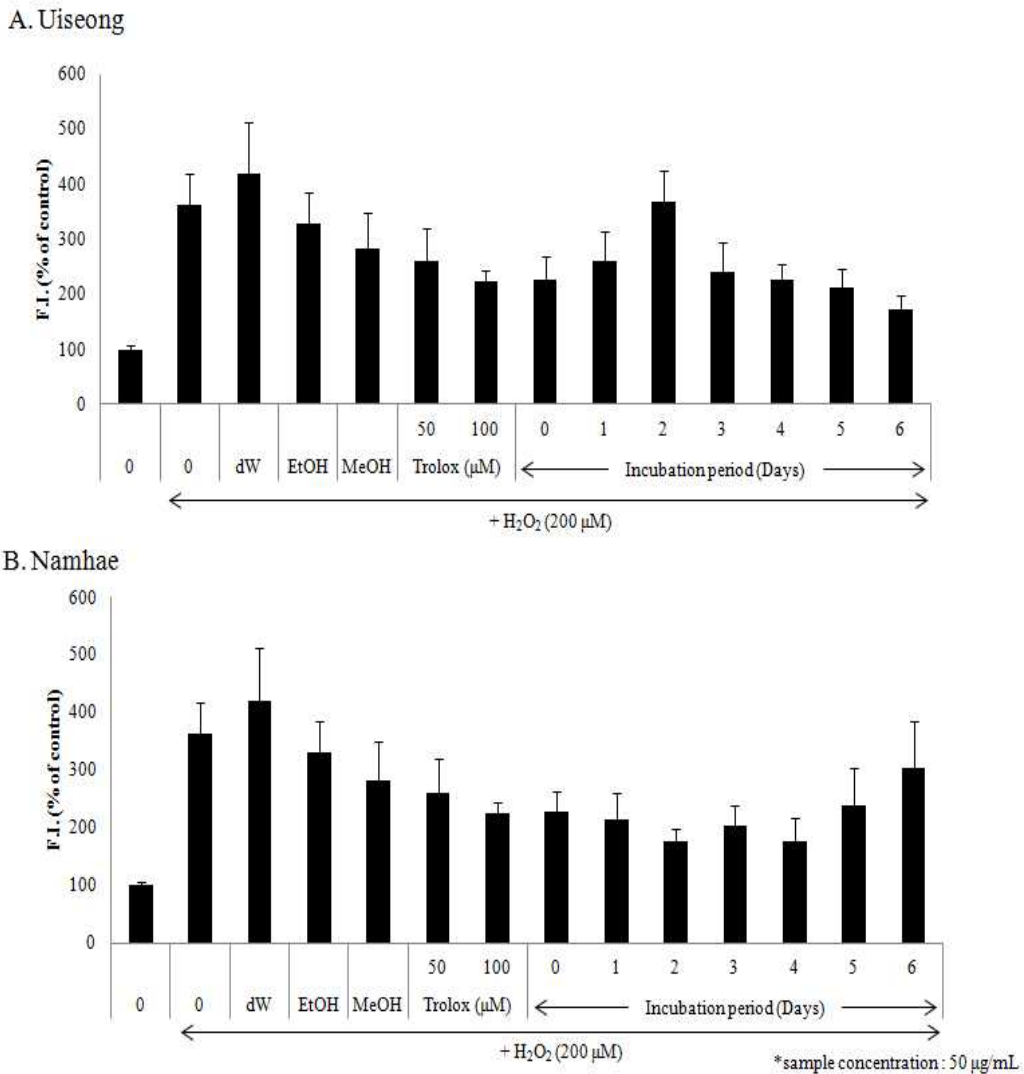


Fig. 7. Inhibitory activity of sprouted garlic against hydrogen peroxide-mediated ROS generation in HepG2 cells.

(7) 발아마늘 에탄올추출물의 lipid peroxidation 저해효과

과산화수소로 유도되는 뇌조직과 간조직의 지질과산화에 대해 의성마늘새싹의 경우 1, 3 일 발아군이 그리고 남해마늘새싹의 경우는 뇌조직에서 2, 4 일 발아군이, 간조직에서 3, 4일 발아군이 유의적인 억제 효과를 나타내었다. 그러나 두 종류 추출물 모두 신장조직에서의 지질과산화를 억제하지는 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 8).

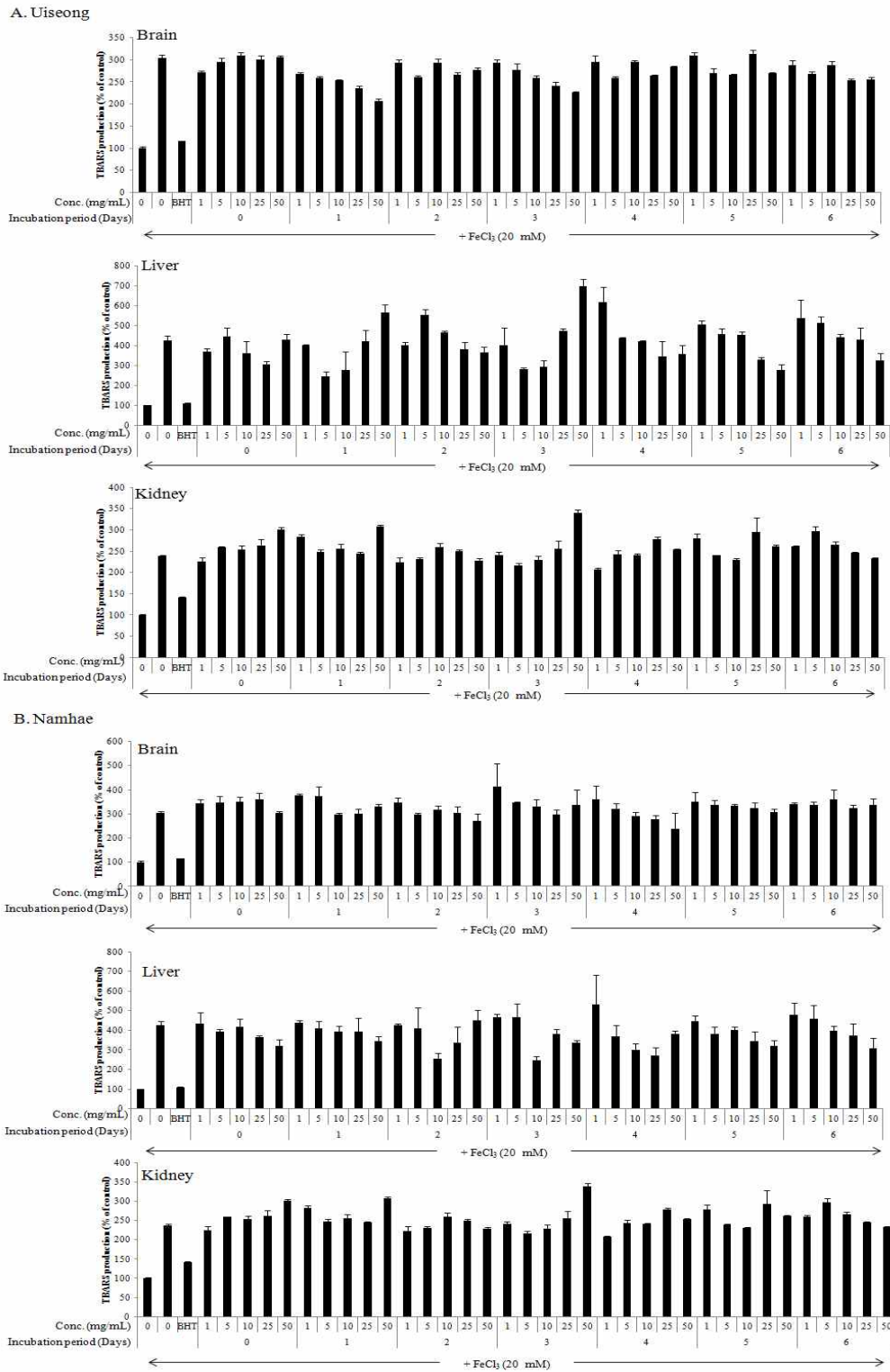


Fig. 8. Inhibitory activity of sprouted garlic extract against lipid peroxidation.

(8) 발아마늘의 신경보호 및 인지기능개선 효과

(가) 신경세포에서 발아마늘 추출물의 세포내 GSH 농도에 미치는 영향

본 연구에서는 mBCI 시약을 이용하여 마우스 해마세포 (HT22)내 GSH 농도를 측정하였으며, 발아마늘추출물 처리된 세포가 GSH 농도가 높았다. 특히 산화적 스트레스 유도물질로서

glutamate를 처리한 경우, 세포내 GSH 농도가 감소되다가 발아마늘추출물 처리를 한 경우 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 9). 이러한 항산화효과는 3 일 이상 발아된 마늘, 특히 5 일 발아한 마늘에서 높게 나타났다.

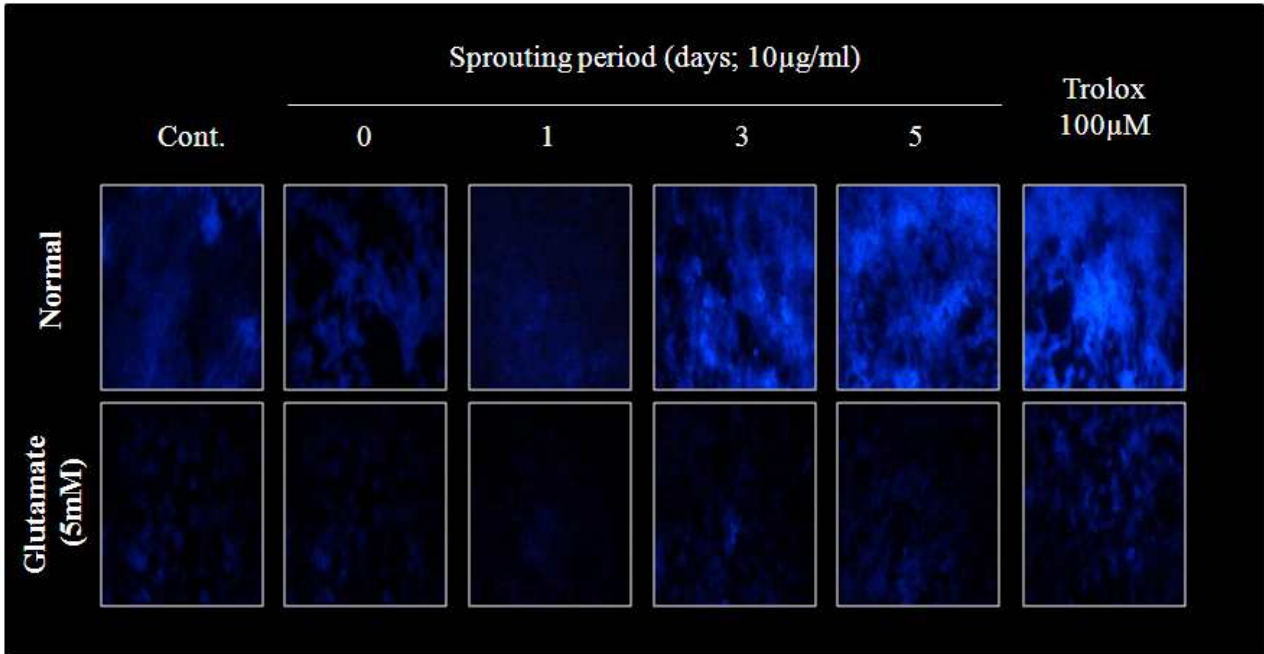


Fig. 9. Fluorescent microscopic images of increased glutathione synthesis by SGE. Cells images were visualized by mBCL staining using fluorescence microscope

(나) 산지별 발아마늘 추출물의 신경세포 보호효과

남해 및 의성 두 종류의 마늘새싹 에탄올추출물의 1, 5, 10 µg/mL 농도에서 5 mM의 glutamate로 유도시킨 산화적스트레스에 대한 보호효과를 HT22세포를 이용하여 조사하였다. 의성마늘새싹 에탄올추출물의 0 일-6 일 발아군 중 10 µg/mL의 고농도에서 모두 glutamate에 의한 세포독성에 대한 보호효과를 나타내었다. 반면, 남해마늘새싹 에탄올추출물은 1 µg/mL의 낮은 농도에서 glutamate에 의한 세포독성에 대한 보호효과를 나타내었다 (Fig. 10).

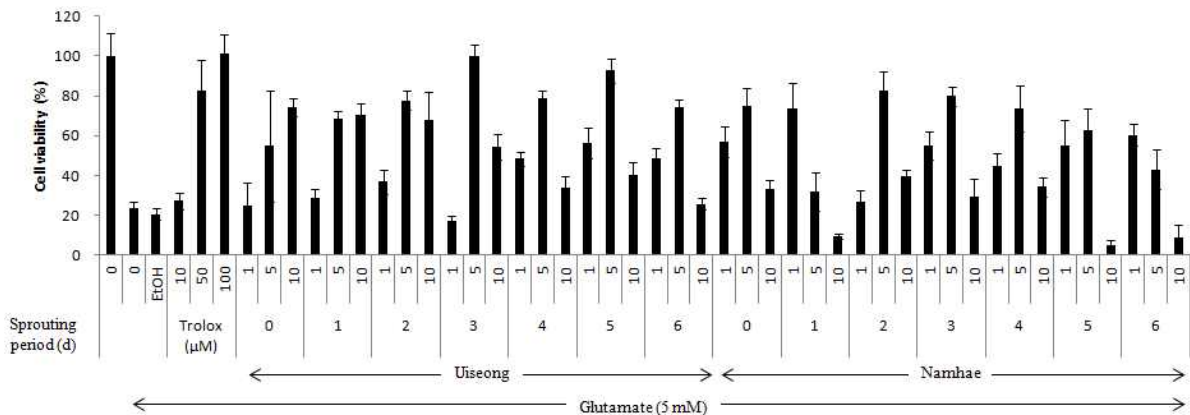


Fig 10. Protective effects of extracts of garlic from different origins against glutamate-induced cytotoxicity in HT22.

(다) 발아마늘의 학습 및 기억력개선 효과

마우스의 기억력을 인위적으로 감소시키기 위하여 scopolamine을 처리하고, 발아마늘의 개선효과를 passive avoidance test로 평가한 결과, 5 일 발아 마늘에서 제조된 추출물이 기억력 개선효과가 유의적으로 높은 것으로 나타났다 (Fig. 11).

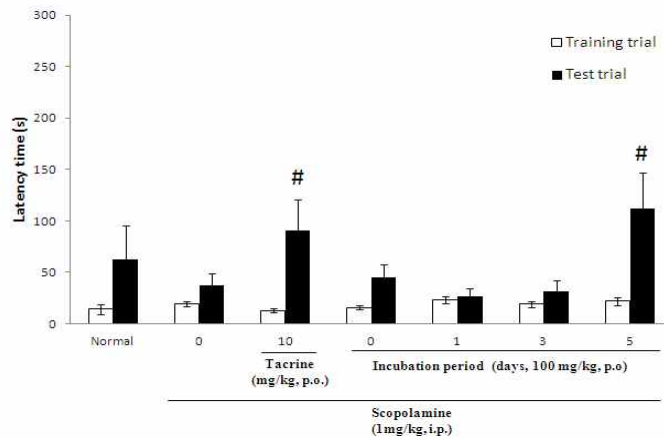


Fig. 11. Effect of administration of sprouted garlic extract on scopolamine-induced memory deficits in passive avoidance test. Data represented as mean \pm S.E.M. (N = 8~ 11) , * $P < 0.05$, as compared to control group, # $P < 0.05$, as compared to the scopolamine-treated group.

(라) 발아마늘의 탐구능력 개선 효과

마우스의 새로운 환경을 탐색하는 능력을 Y-maze test로 측정된 결과, 발아마늘 추출물은 scopolamine 처리에 의하여 감소된 마우스의 새로운 환경 탐색 경향을 상승시키는 것으로 나타났다 (Fig. 12).

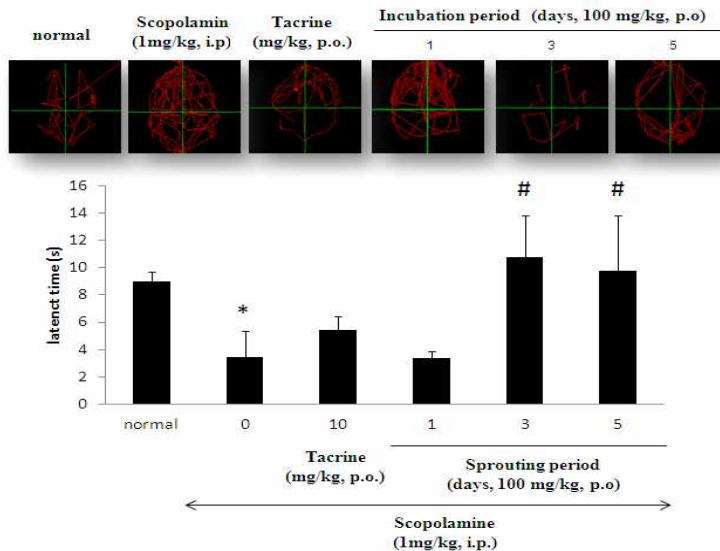


Fig. 12. Effect of administration of garlic sprout extract on scopolamine-induced memory deficits in Y-maze test in mice. A; spontaneous alternation, B; total arm entry, Data represent means \pm S.E.M (N=7), * $P < 0.05$ as compared to control group, # $P < 0.05$ as compared to the scopolamine-treated group.

(마) 발아마늘의 인지기능 개선에 미치는 영향

마우스의 물리적 자세 조절능력 및 단기 기억력을 water maze test로 측정하였다. 3 일, 5 일 발아한 마늘 추출물이 scopolamine에 의하여 유도된 마우스의 단기 기억력 감소를 효과적으로 방어하는 것으로 나타났다 (Fig. 13).

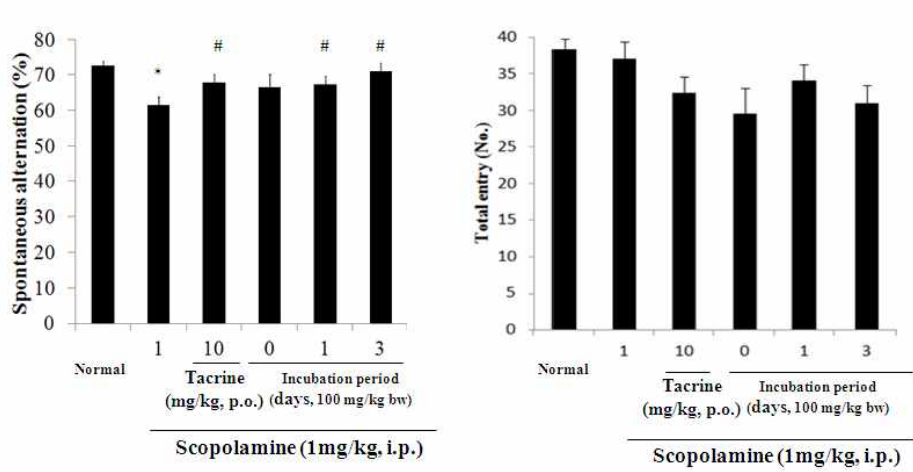


Fig. 13. Effect of administration of sprouted garlic extract on scopolamine-induced memory deficits in Morris water maze test in mice. Data represent as means \pm S.E.M. (N= 8~11). * $P < 0.05$ as compared to control group, # $P < 0.05$ as compared to the scopolamine-treated group

(바) 발아마늘의 scopolamine으로 유도된 해마 신경손상 보호효과

마우스의 해마부위를 손상시키기 위하여 scopolamine을 투여한 결과, Fig. 14에 나타낸 바와 같이 CA1 부위가 손상된 것이 관찰되었다. 그러나 발아 마늘 처리군, 특히 5 일간 발아한 마늘 추출물 처리군에서 CA1 부위 손상이 현저히 감소되는 것이 관찰되었다.

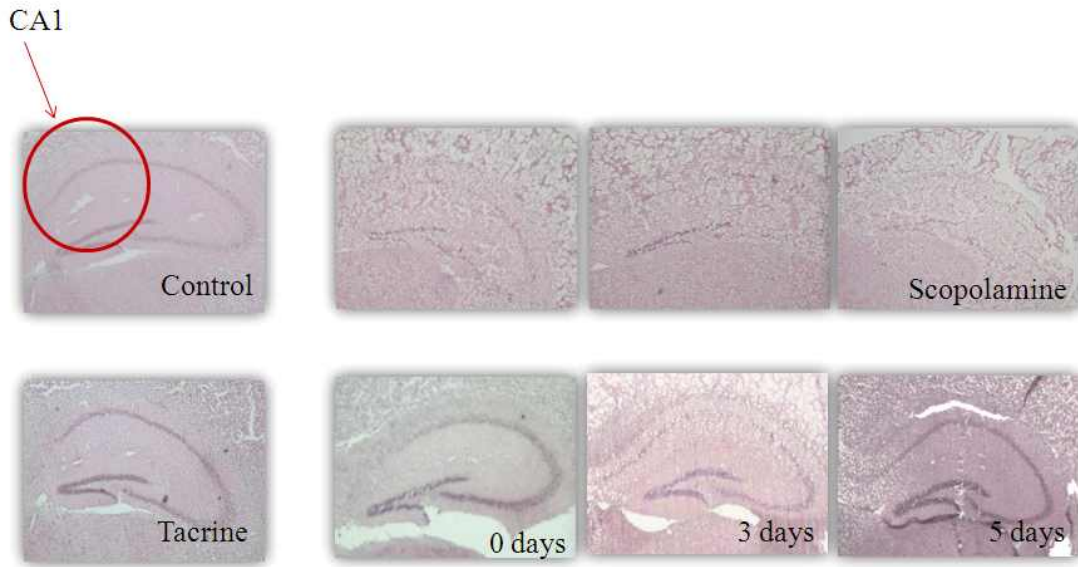


Fig. 14. Protective effect of sprouted garlic extract on scopolamine-induced neuronal damage on hippocampal CA1 region of mice model.

2-2. 연구결과 (경북대 2차 년도)

가. 전처리된 달리한 마늘 첨가 청국장의 항산화 및 신경보호 활성

(1) 전처리된 달리한 마늘 첨가 청국장의 항산화 활성

(가) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 ORAC 값

전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 *in vitro* 상에서의 항산화 효능을 알아보기 위해 ORAC assay를 시행한 결과, 대조군인 마늘을 첨가하지 않은 생청국장 (C) 보다 마늘을 첨가한 그룹이 ORAC value가 높게 나타났다 (Fig. 15).

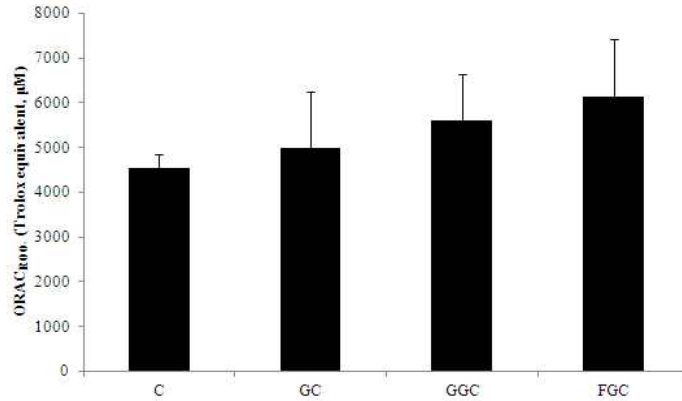


Fig. 15. ORAC values of *cheonggukjang* prepared using regular garlic (GC), sprouted garlic (GGC) and fermented garlic (FGC).

(나) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 superoxide anion 소거 활성

마늘함유 청국장 추출물의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 superoxide anion의 생성 억제 효과를 조사하기 위하여 DHE (dihydroethidium)를 이용하여 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 superoxide anion에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물을 100 µg/ml으로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 마늘을 첨가하지 않은 생청국장 (C) 보다 마늘 함유 청국장 추출물을 첨가한 그룹이 글루타메이트로 유도된 superoxide anion 소거능이 유의적으로 높게 나타났다. (Fig. 16).

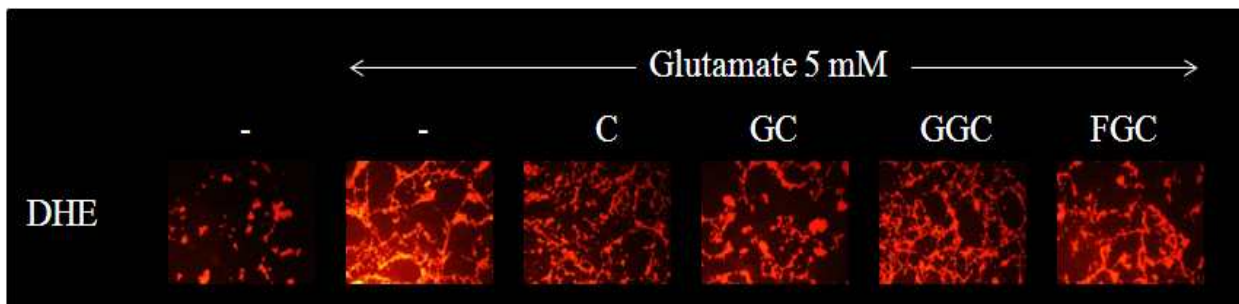


Fig. 16. Inhibitory activity of garlic-containing *cheonggukjang* extracts from glutamate-induced superoxide anion production in HT22 cells.

(2) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 HepG2 세포모델계 항산화 활성

전처리를 달리한 마늘을 첨가하여 제조한 청국장 추출물의 인체간암세포 HepG2 세포에서의 항산화활성 평가 결과, 대조군인 생청국장 (C) 보다 마늘함유 청국장 추출물이 효과적으로 활성 산소종을 제거하였으며, 특히 전처리하지 않은 일반마늘 (GC) 보다 발아마늘 (GGC)과 발효마늘 (FGC)이 더욱 효과적으로 활성산소종을 감소시켰다 (Fig. 17).

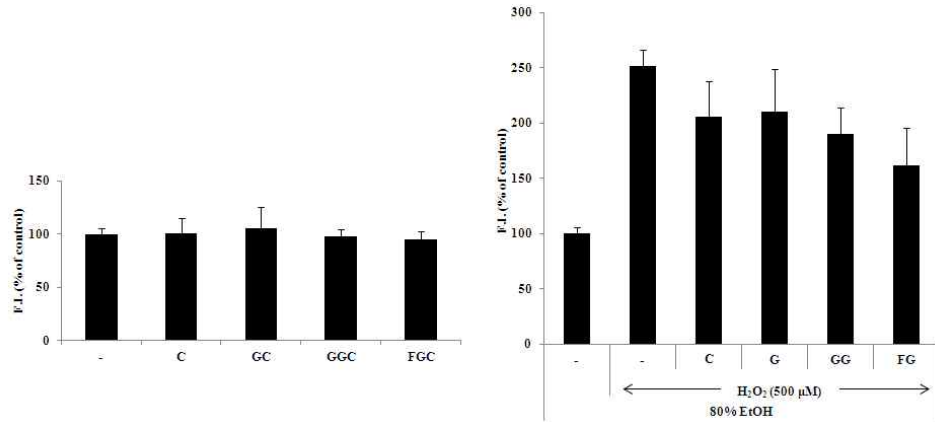
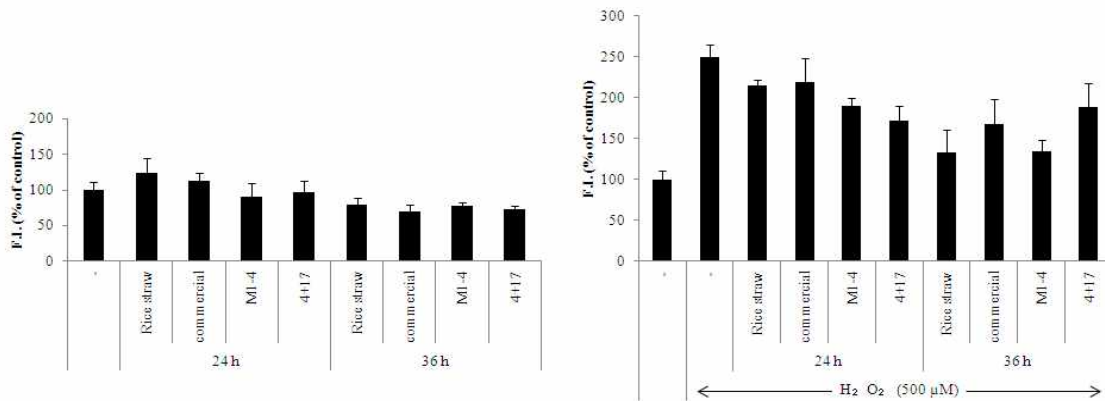


Fig. 17. ROS scavenging activity of garlic-containing *cheonggukjang* extracts in HepG2 cells. Please refer to Fig. 15 for abbreviations.

(3) 사용균주에 따른 청국장의 항산화 활성

(가) 사용균주에 따른 청국장 추출물의 HepG2 cell line에서의 항산화 활성평가

사향으로 선별한 균주를 사용한 청국장 추출물을 100 μg/ml 농도로 인체간암세포 유래 세포주인 HepG2에 처리하고 DCFH₂DA 방법을 이용하여 대조군과 비교하였다. 사향별 청국장 추출물 처리군에서 활성산소종을 억제하였으며, 대조군인 벚짚 (rice straw), 시판균주 (commercial) 보다 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4을 접종한 그룹, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 EMD17을 같이 접종한 그룹이 더욱 효과적으로 활성 산소종을 억제하였다 (Fig. 18).



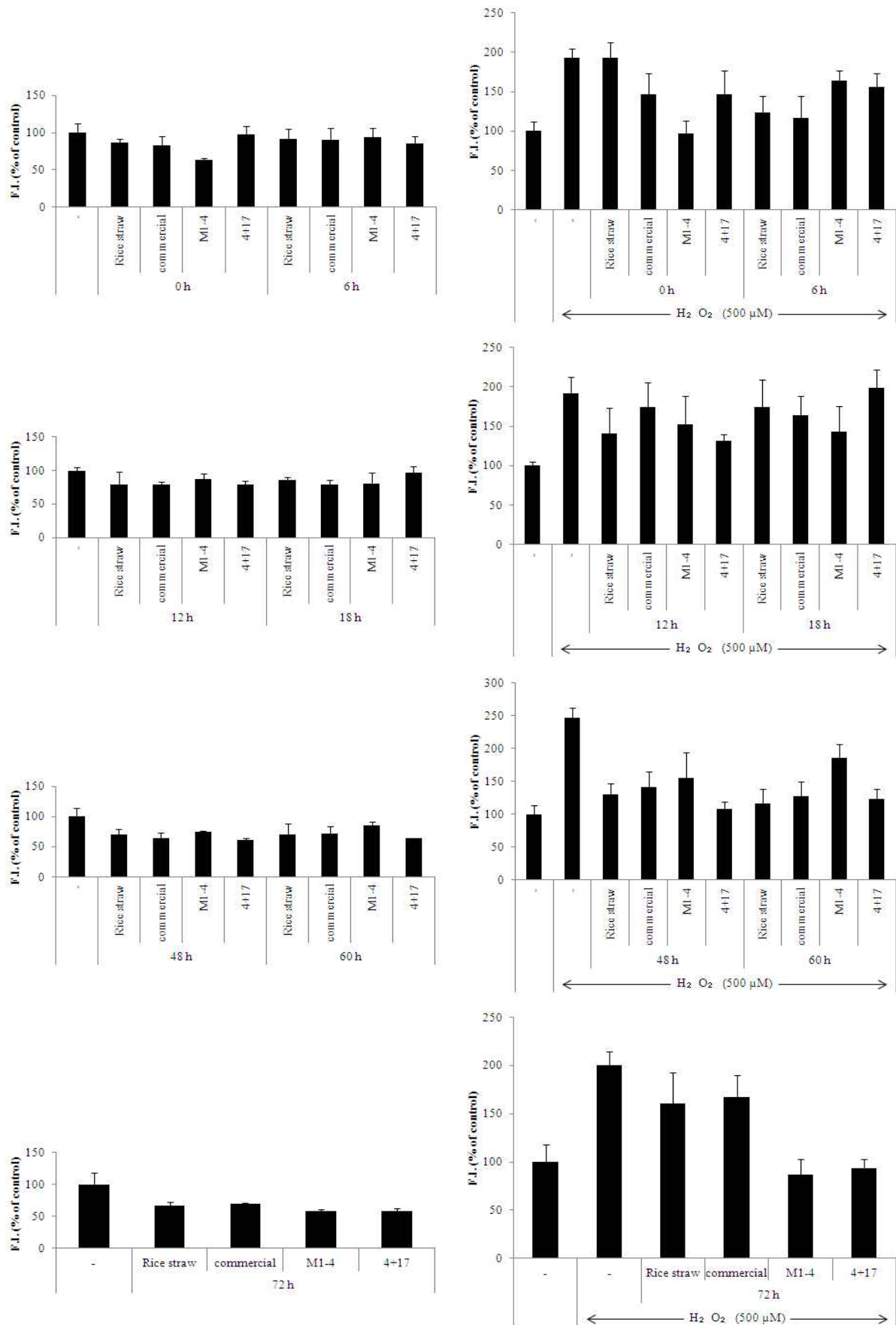


Fig. 18. ROS scavenging activity of extracts of *cheonggukjang* prepared by different *Basillus* species in HepG2 cells.

(4) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 신경세포 보호활성 평가

(가) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 신경세포 보호활성 평가

전처리를 달리한 마늘을 각각 첨가하여 제조한 청국장들을 100 µg/ml 농도로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22에 처리하고, MTT assay 방법을 이용하여 세포생존율을 대조군과 비교하였다. 대조군인 생청국장 (C)보다 마늘을 첨가한 그룹에서 세포생존율이 증가하였다. 또한, 전처리하지 않은 일반마늘 (GC)을 첨가한 청국장보다 발아마늘 (GGC), 발효마늘 (FGC)을 첨가한 청국장이 세포생존율을 유의적으로 증가시켰다 (Fig. 19).

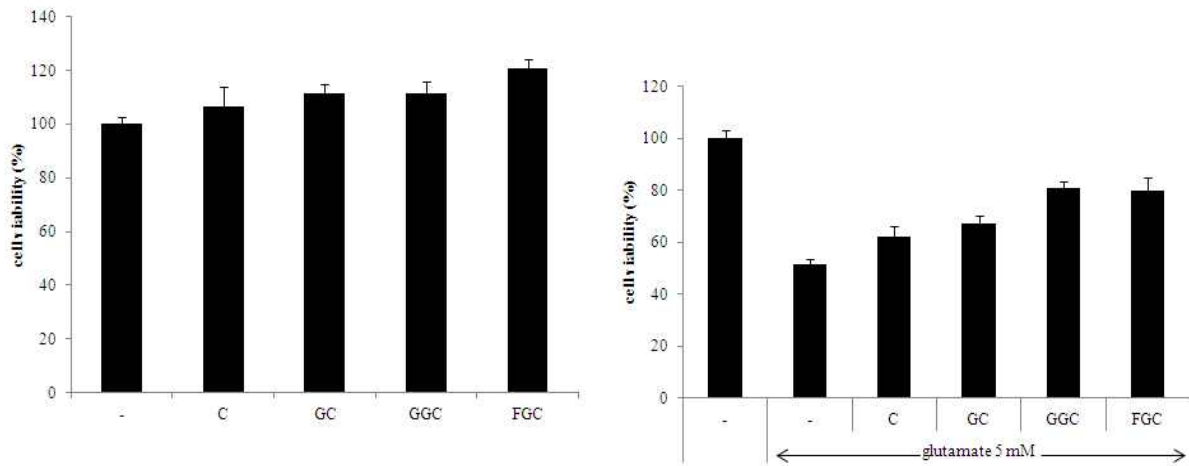


Fig 19. Neuroprotective effects of garlic-containing *cheonggukjang* extracts from glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells.

(나) 전처리를 달리한 마늘을 첨가한 청국장 추출물의 HT22 세포에서의 NQO1 유도활성

마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 전처리를 달리한 마늘을 첨가하여 제조한 청국장들의 추출물을 100 µg/ml 으로 처리하여 대조군, 양성대조군인 설포라판(sulforaphane)과 비교하였다. 대조군인 생청국장 (C)보다 마늘을 첨가한 그룹에서 NQO1의 활성이 유의적으로 증가하였으며, 일반마늘 (GC)을 첨가한 청국장보다 발아마늘 (GGC) 에서 더 높은 활성을 보였으며, 발효마늘 (FGC)에서 가장 높은 활성을 확인하였다 (Fig. 20).

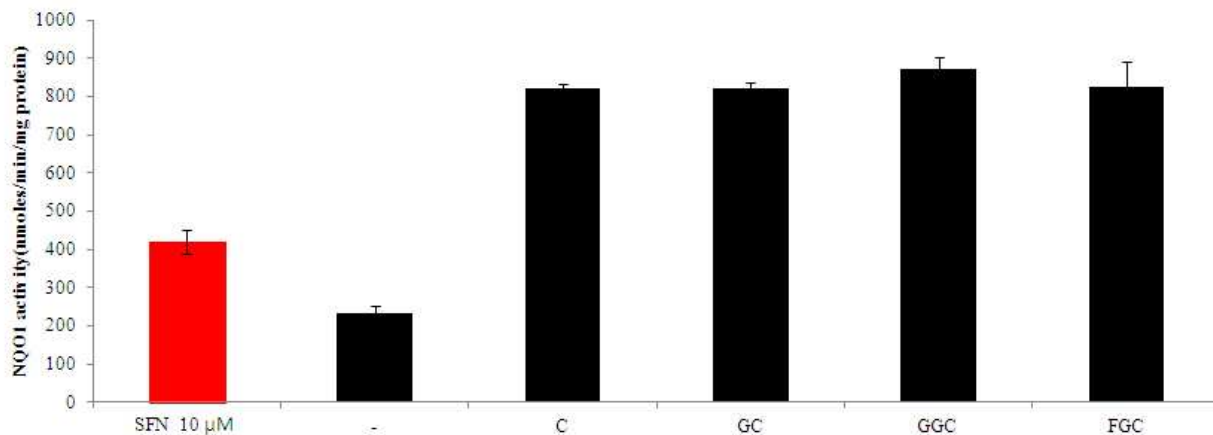


Fig 20. NQO1 induction activity of garlic-containing *cheonggukjang* extracts in HT22 cells.

(다) 전처리를 달리한 마늘을 첨가한 청국장 추출물의 ROS 소거 활성 평가

마늘 함유 청국장 시료의 신경흥분독성 물질인 glutamate가 유발하는 ROS의 생성 저해 효과를 평가하기 위하여 DCFH₂DA를 이용하여 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 ROS에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물을 100 µg/ml 농도로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 생청국장 (C) 보다 마늘 첨가한 그룹이 glutamate로 인해 유도되는 ROS의 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 발아마늘 (GGC)이 가장 높은 ROS 생성 억제 활성을 보였다 (Fig. 21).

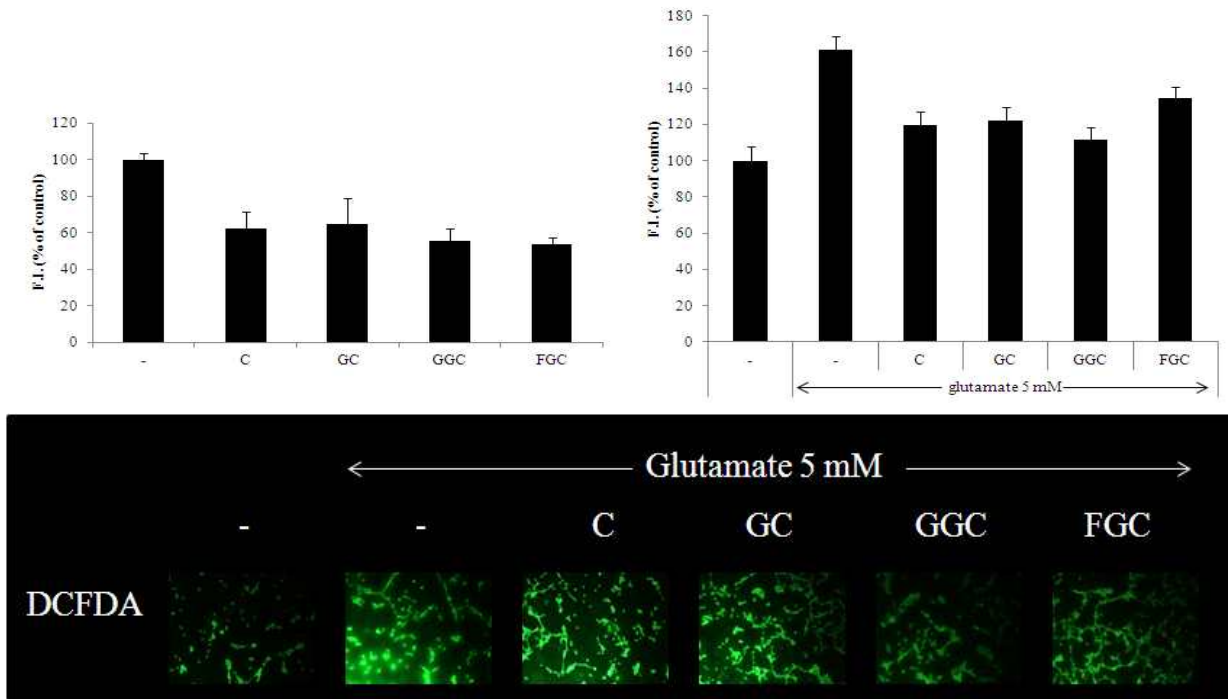


Fig. 21. Inhibitory activity of garlic-containing *cheonggukjang* extracts from glutamate-induced ROS production in HT22 cells.

(라) 전처리를 달리한 마늘을 첨가한 청국장 추출물의 superoxide anion 소거 활성

마늘함유 청국장 추출물의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 superoxide anion의 생성 억제 효과를 조사하기 위하여 DHE (dihydroethidium)를 이용하여 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 superoxide anion에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물들을 100 µg/ml으로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 생청국장 (C) 보다 마늘 함유 청국장 추출물을 첨가한 그룹이 글루타메이트로 유도된 superoxide anion 소거능이 유의적으로 높게 나타났다. (Fig. 22).

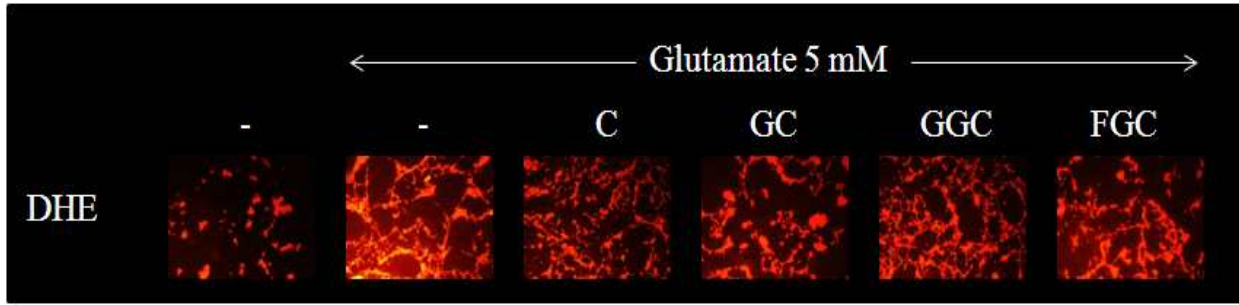


Fig. 22. Inhibitory activity of garlic-containing *cheonggukjang* extracts from glutamate-induced superoxide anion production in HT22 cells.

(마) 전처리를 달리한 마늘을 첨가한 청국장 추출물의 GSH (glutathione) 농도에 미치는 효과
 마늘 함유 청국장 추출물이 신경흥분독성 물질인 글루타메이트에 의해 감소된 glutathione 농도를 증가시키는 지 여부를 알아보기 위하여 monochlorobimane (mBCl) 를 이용하여 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물들의 glutathione 감소에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물들을 100 µg/ml으로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 생청국장 (C) 보다 마늘 함유 청국장 추출물을 첨가한 그룹이 글루타메이트로 인해 감소된 glutathione을 효과적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 그중에서도 발효마늘 (FGC) 청국장이 glutathione 감소를 가장 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 23)

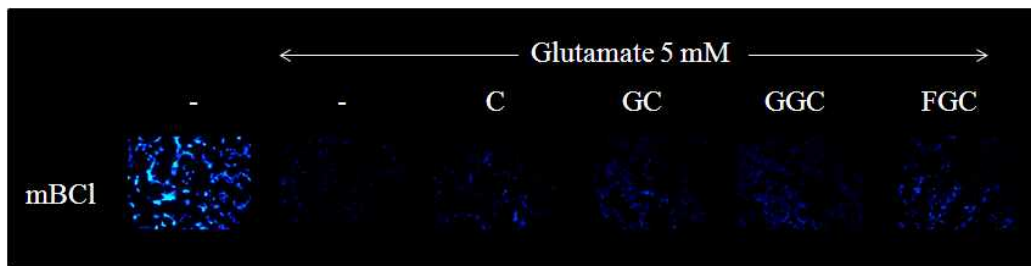
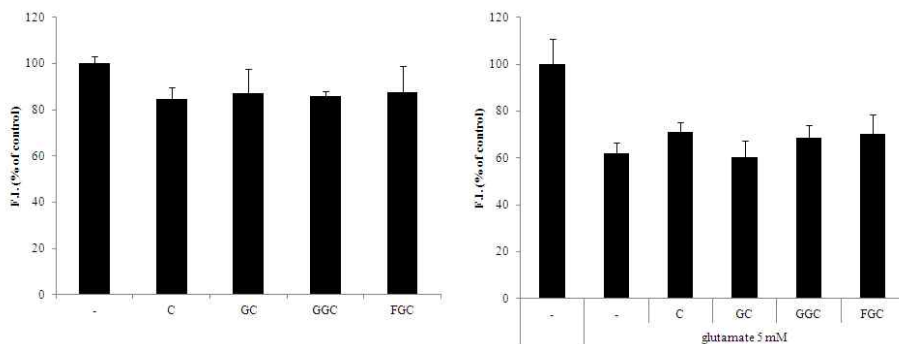


Fig. 23. Recovery of glutamate-induced GSH level decrease by garlic-containing *cheonggukjang* extracts in HT22 cells.

(바) 마늘 함량별 제조 청국장의 신경세포 보호활성 평가

① 마늘함량별 제조 청국장 추출물 신경세포 보호활성 평가

마늘함량별 제조 된장 추출물의 신경세포 보호효과를 알아보기 위해 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트 (glutamate)로 세포 내 산화적 스트레스 독성을 유도하여 마늘함량별 된장 추출물의 세포보호활성을 측정하였다. 마늘함량별 된장 추출물을 100 µg/ml 농도로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22에 처리하고, MTT assay 방법을 이용하여 대조군과 cell viability를 비교하였다. 대조군인 마늘 0% 된장보다 마늘을 첨가한 그룹에서 세포생존율이 유의적으로 증가하

였다 (Fig. 24)

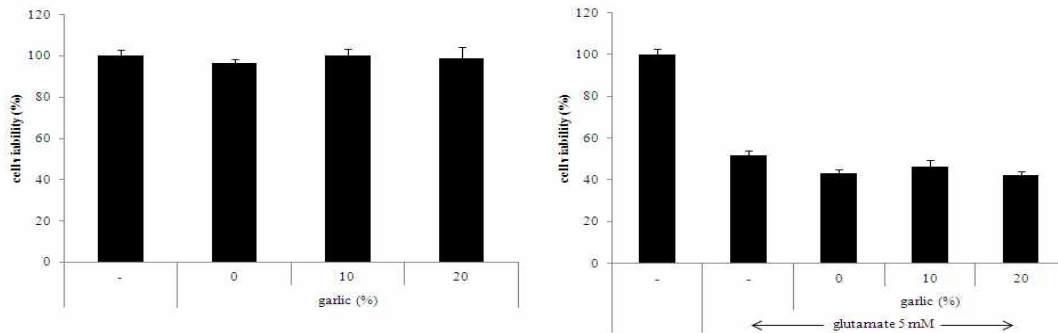


Fig. 24. Neuroprotective effects of extracts of *cheonggukjang* prepared with different levels of garlic from glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells.

② 마늘함량별 된장 추출물의 HT22 cell line에서의 NQO1 유도 활성

마늘함량별 된장 추출물의 NQO1의 활성 촉진여부를 평가하기 위해 NQO1 assay를 통하여 마늘함량별 된장 추출물의 NQO1 활성 촉진으로 인한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 마늘함량별 된장 추출물을 100 µg/ml 으로 처리하여 대조군, 양성대조군인 설포라판 (sulforaphane)과 비교하였다. 실험결과, 대조군인 마늘 0% 첨가 된장보다 마늘을 첨가한 그룹에서 NQO1의 활성이 유의적으로 증가하였다 (Fig. 25).

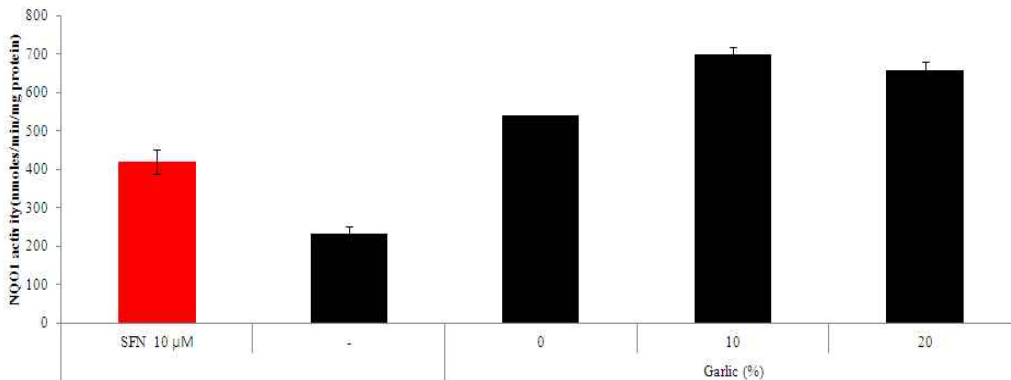


Fig 25. NQO1 induction activity of extracts of *cheonggukjang* prepared with different levels of garlic in HT22 cells.

③ 마늘함량별 제조 청국장 추출물의 ROS 소거 활성

마늘 함유 된장 추출물의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 ROS의 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 DCFH₂DA를 이용하여 마늘함량별 된장 추출물의 ROS에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 마늘함량별 된장 추출물을 100 µg/ml으로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 마늘 0% 된장보다 마늘을 첨가한 그룹이 글루타메이트로 유도되는 ROS를 효과적으로 저해하는 것으로 나타내었다 (Fig. 26).

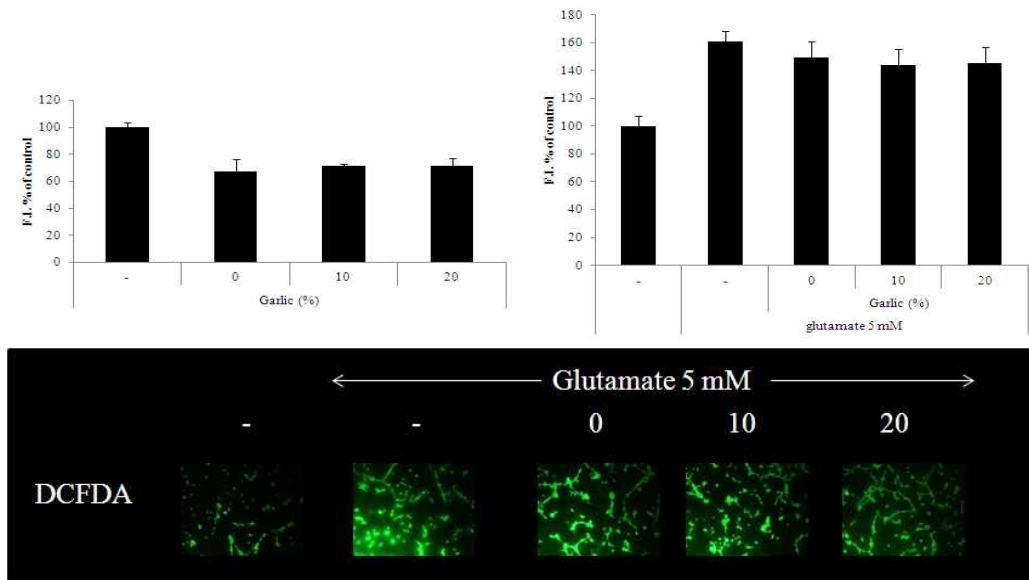


Fig. 26. Inhibitory activity of garlic-containing *Doenjang* extracts from glutamate-induced ROS production in HT22 cells.

④ 마늘함량별 청국장 추출물의 superoxide 소거 활성 평가

마늘 함량별 제조 된장의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 superoxide의 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 DHE를 이용하여 마늘함량별 된장 추출물의 superoxide 생성 저해 활성을 조사하였다. 마늘함량별 된장 추출물을 100 µg/ml으로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 마늘 0% 첨가 된장보다 마늘을 첨가한 그룹이 글루타메이트처리로 인한 superoxide 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 27).

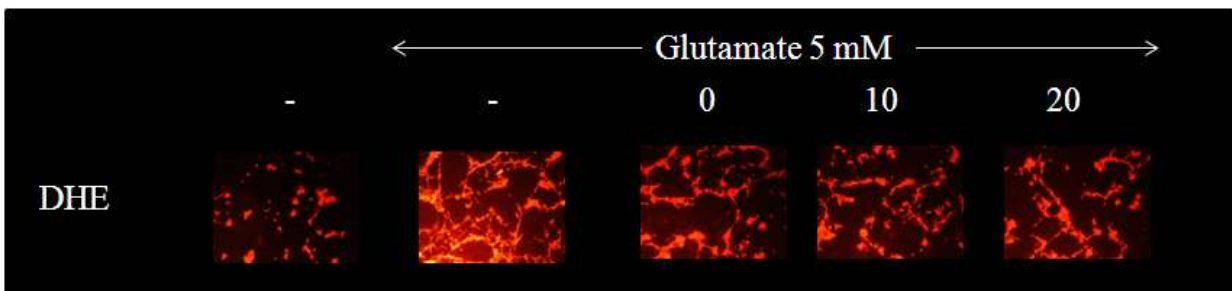


Fig. 27. Inhibitory activity of garlic-containing *cheonggukjang* extracts from glutamate-induced superoxide anion production in HT22 cells.

⑤ 마늘함량별 청국장 추출물의 glutathione 감소 억제 평가

마늘 함유 된장 추출물의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트에 의해 감소된 glutathione을 회복시키는 효과를 알아보기 위하여 mBCl 를 이용하여 마늘함량별 된장 추출물의 glutathione 감소에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 마늘함량별 된장 추출물을 100 µg/ml으로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 마늘 0% 첨가 된장보다 마늘을 첨가한 그룹이 글루타메이트로 인한 glutathione 농도 감소를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 28).

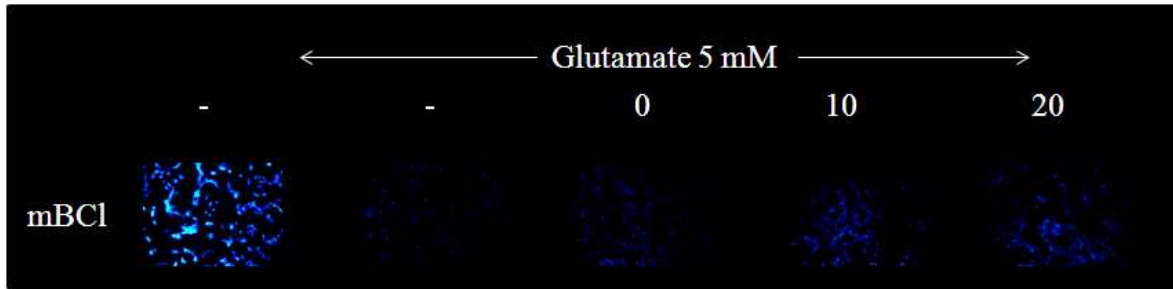
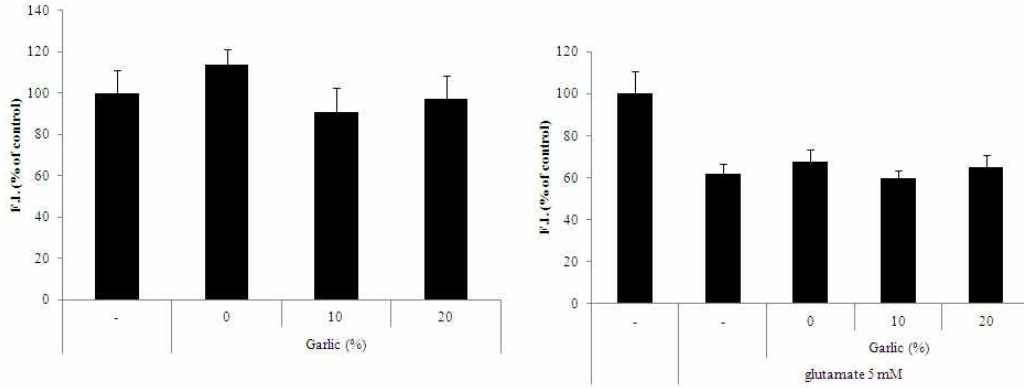


Fig. 28. Recovery of glutamate-induced GSH level decrease by garlic-containing *cheongguk-jang* extracts in HT22 cells.

(5) 사용균주에 따른 청국장 추출물의 신경세포 보호활성

(가) 사용균주에 따른 청국장 추출물의 신경세포 보호활성

앞서 선별한 균주를 사용한 청국장 추출물의 신경세포 보호효과를 알아보기 위해 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트 (glutamate)로 세포 내 산화적 스트레스를 유도하여 청국장 추출물의 세포보호활성을 측정하였다. 청국장 추출물을 100 µg/ml 농도로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22에 처리하고, MTT assay 방법을 이용하여 대조군과 cell viability를 비교하였다. 대조군인 벗짚, 시판 청국장보다 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4을 접종한 그룹, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 *B. amyloliquefaciens* EMD17을 같이 접종한 그룹에서 세포생존율이 유의적으로 높은 것으로 나타났다 (Fig. 29a). 특히, 18 시간, 24 시간 발효한 마늘함유 청국장이 세포보호 활성이 가장 높은 것으로 나타났다 (Fig. 29b)

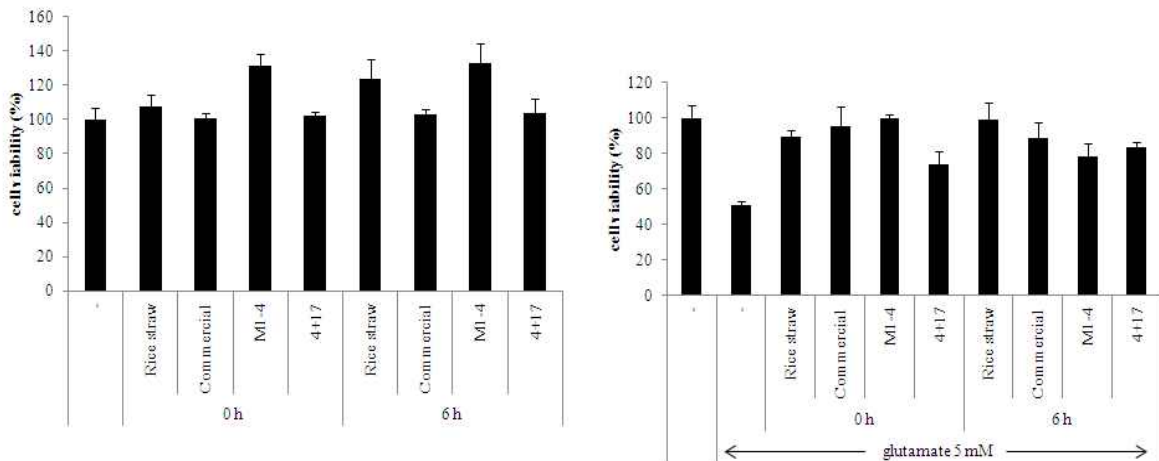


Fig 29a. Neuroprotective effect of extracts of *cheonggukjang* prepared with various *Bacillus* species against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells.

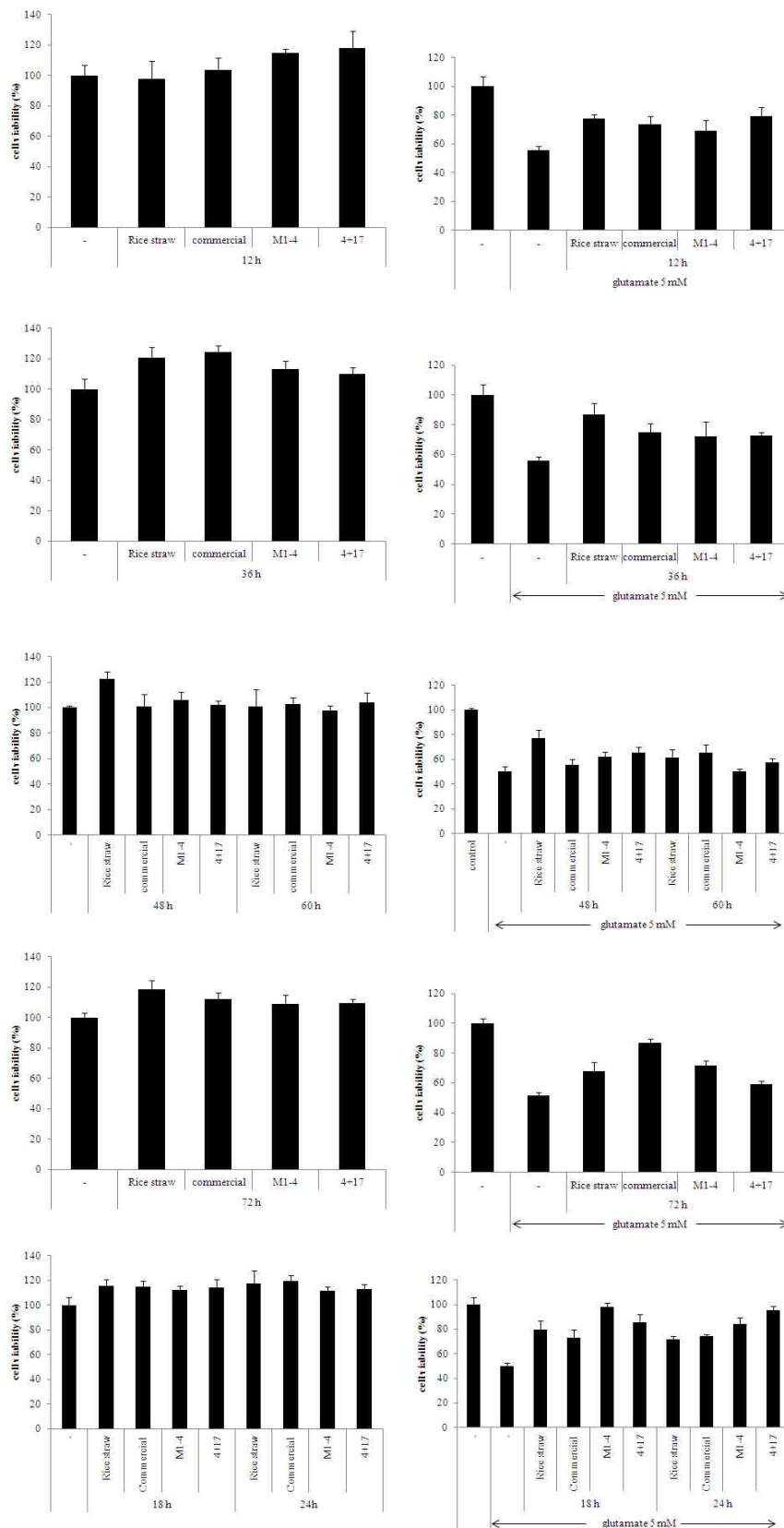


Fig 29b. Neuroprotective effect of extracts of *cheonggukjang* prepared by fermenting for different times with various *Bacillus* species against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells.

(나) 청국장 추출물의 HT22 cell line에서의 NQO1 유도 활성

청국장 추출물의 NQO1의 활성 촉진여부를 평가하기 위해 NQO1 assay를 통하여 청국장 추출물의 NQO1 활성 촉진으로 인한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 균주를 달리하여 제조한 청국장 추출물을 100 µg/ml 으로 처리하여 대조군, 양성대조군인 설햄라판(sulforaphane)과 비교하였다. 그 결과, 대조군인 벧짚, 시판 청국장보다 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4을 접종한 그룹, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 EMD17을 같이 접종한 그룹에서 NQO1 활성이 유의적으로 증가하였다. 청국장 발효시간별로는 12 시간 발효한 시료가 NQO1 유도활성이 가장 높은 것으로 나타났다 (Fig 30).

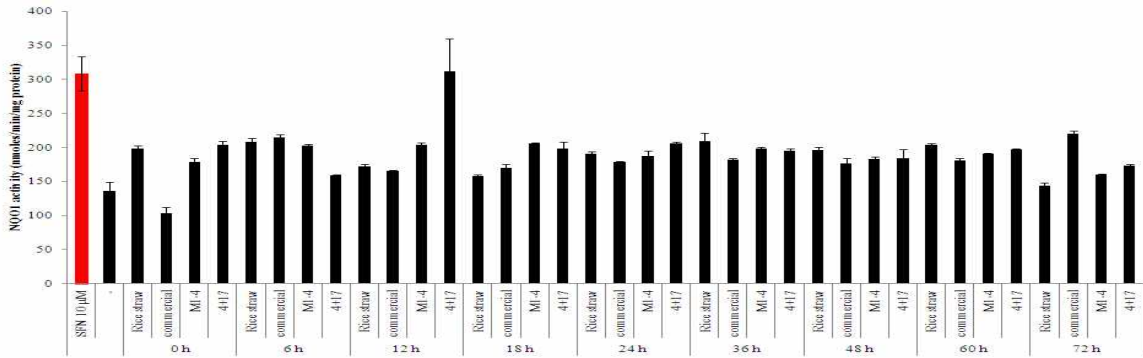
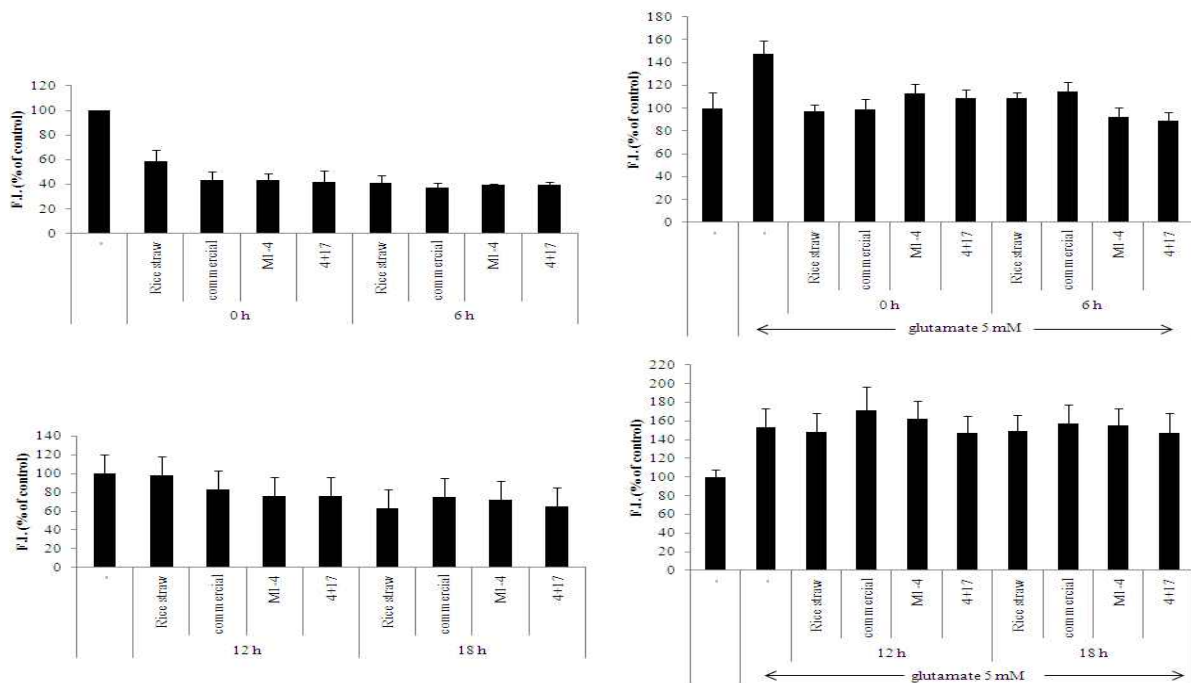


Fig 30. NQO1 induction by extracts of *cheonggukjang* prepared with various *Bacillus* species in HT 22 cells.

(다) 청국장 추출물의 ROS 소거 활성 평가

마늘 함유 청국장의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 ROS의 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 DCFH₂DA를 이용하여 청국장 추출물의 ROS에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 청국장 추출물을 100 µg/ml으로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 벧짚, 시판 청국장보다 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4을 접종한 그룹, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 EMD17을 같이 접종한 그룹이 글루타메이트로 유도된 ROS를 가장 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 또한 시간대 별로 비교해본 결과 0, 6 시간 발효시킨 그룹이 다른 그룹에 비해 ROS 소거능이 높게 나타났다 (Fig. 31)



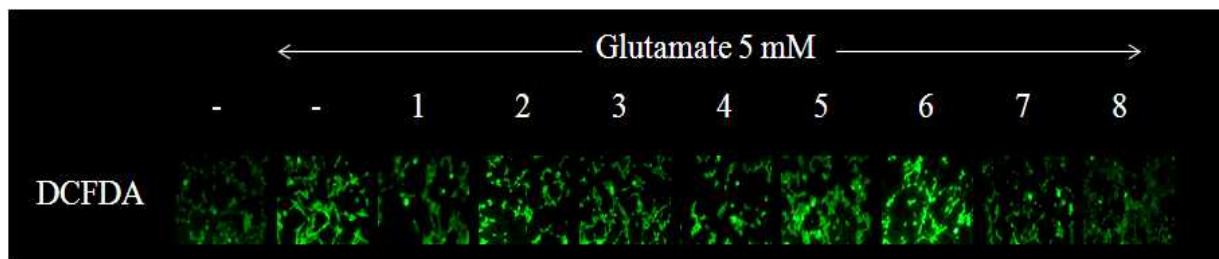
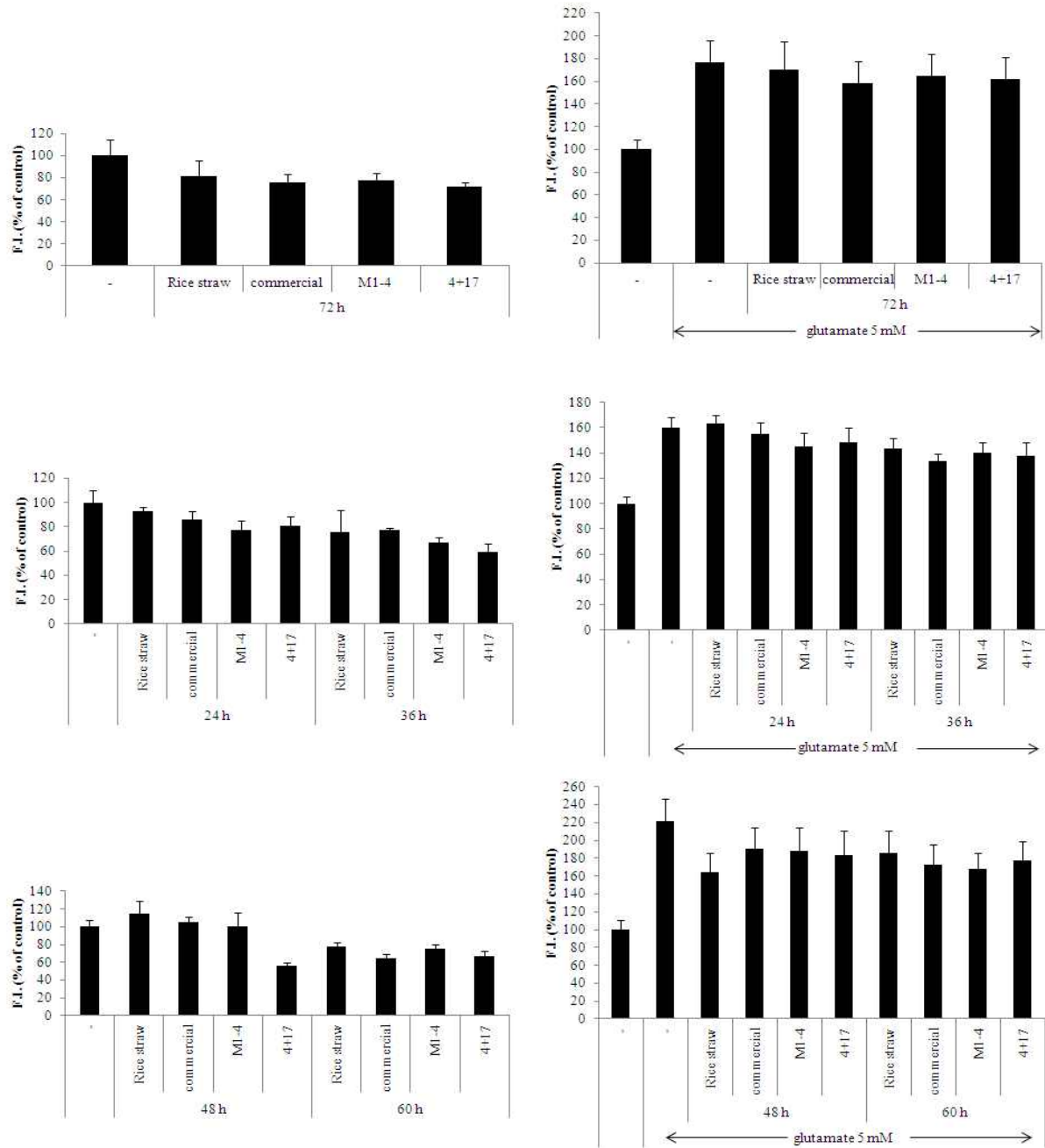


Fig. 31. Inhibitory activity of extracts of *cheonggukjang* prepared with various *Bacillus* species against glutamate-induced ROS production in HT 22 cells.

1: Rice straw (0 h) , 2: commercial (0 h) , 3: M1-4 (0 h) , 4: MJ1-4+ EMD17 (0 h)
 5: Rice straw (6 h) , 6: commercial (6 h) , 7: M1-4 (6 h) , 8: MJ1-4+ EMD17 (6 h)

(라) 청국장 추출물의 superoxide 소거 활성 평가

마늘함유 청국장의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트가 유발하는 superoxide의 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 DHE를 이용하여 청국장 추출물의 superoxide에 대한 신경세포 보호 효과를 조사하였다. 청국장 추출물을 100 µg/ml으로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 벧짚, 시판 청국장보다 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4을 접종한 그룹, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 EMD17을 같이 접종한 그룹이 글루타메이트 처리에 의한 superoxide의 생성을 효과적으로 저해하는 것으로 나타났다 (Fig. 32).

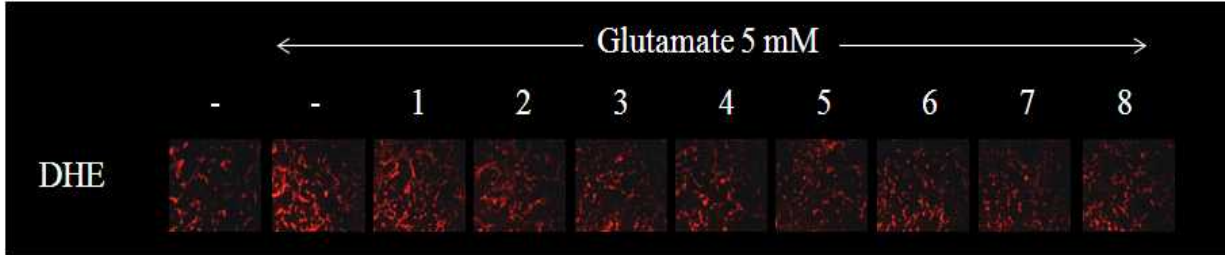


Fig. 32. Inhibitory activity of extracts of *cheonggukjang* prepared with various *Bacillus* species against glutamate-induced superoxide anion production in HT 22 cells.

(마) 청국장 추출물의 glutathione 감소 억제 평가

마늘 함유 청국장의 신경흥분독성 물질인 글루타메이트에 의해 감소된 glutathione을 증가시키는 것을 알아보기 위하여 mBCL를 이용하여 제조한 마늘 함유 청국장 추출물의 glutathione 감소에 대한 신경세포 보호효과를 조사하였다. 청국장 추출물을 100 µg/ml으로 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포에 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 대조군인 벧짚, 시판 청국장보다 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4을 접종한 그룹, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 EMD17을 같이 접종한 그룹이 글루타메이트 처리에 의해서 감소된 glutathione 감소를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 33).

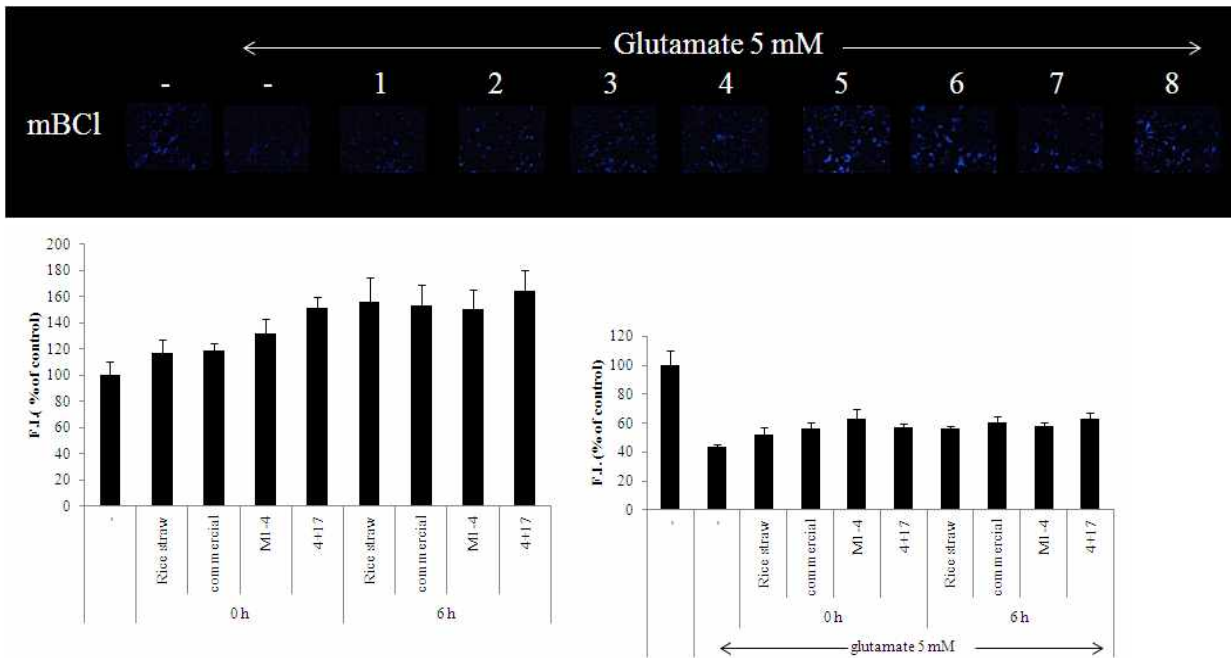


Fig. 33. Recovery of glutamate-induced GSH level decrease by garlic-containing *cheonggukjang* prepared with various *Bacillus* species in HT22 cells.

2-3. 연구결과 (경북대 3차 년도)

가. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 생쥐에서 항산화 활성 및 인지기능개선 평가

(1) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 급여가 혈청 FRAP에 미치는 영향

동물실험 시 혈액을 수집하여 3,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 FRAP 실험에 사용하였다. 마우스의 혈장 항산화지표인 FRAP 값은 처리군간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 특히, D-galactose 처리군과 대조군간의 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 34).

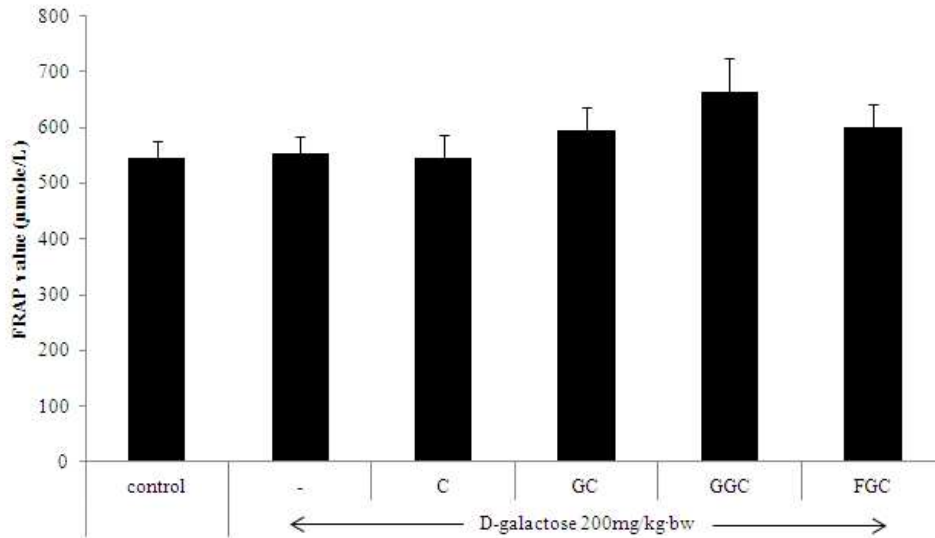


Fig. 34. Effect of garlic-containing *cheonggukjang* supplementation on plasma FRAP in mice treated with galactose.

(2) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 급여가 혈청 4-HNE 함량에 미치는 영향

4-HNE 함량은 처리군간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 특히, D-galactose 처리군과 대조군간의 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 35).

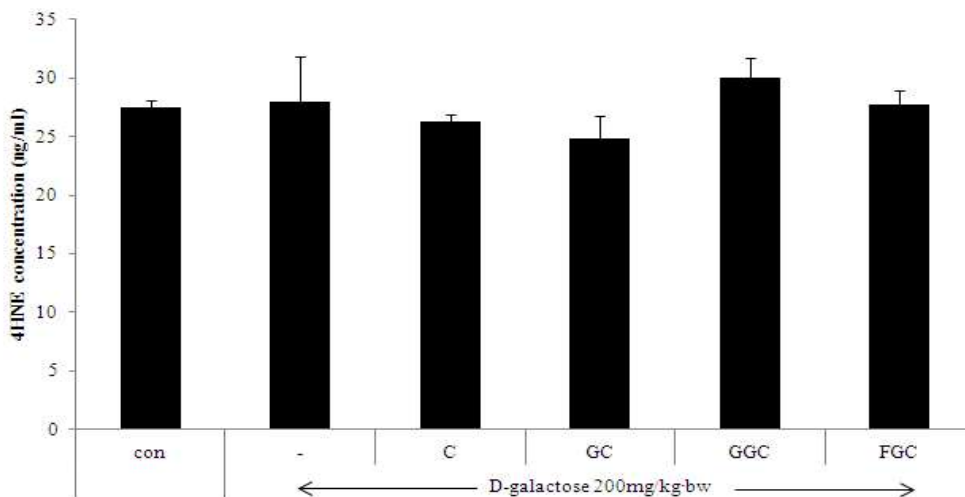


Fig. 35. Effect of garlic-containing *cheonggukjang* supplementation on plasma 4-HNE in mice treated with galactose.

(3) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 급여가 혈청 내 8-OHdG 농도에 미치는 영향

DNA 손상 정도의 지표인 혈청 내 8-OHdG 농도는 DNA damage EIA kit (Assay designs)를 사용하여 측정하였다. 혈청 내 8-OHdG 농도는 처리군간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 특히, D-galactose 처리군과 대조군간의 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 36).

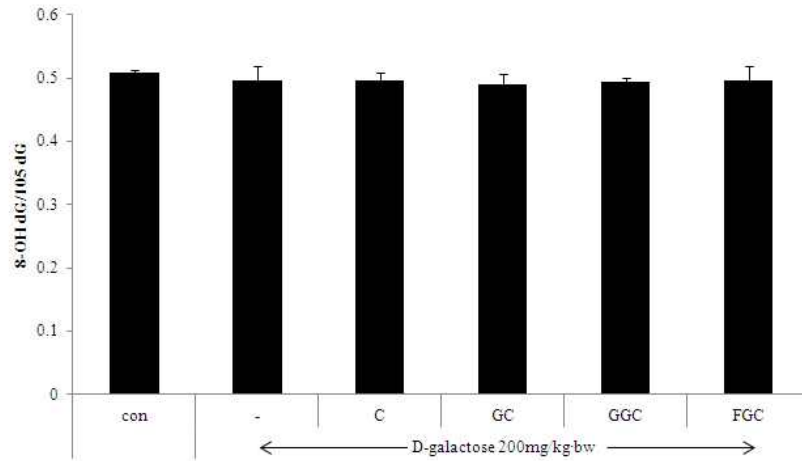


Fig. 36. Effect of garlic-containing *cheonggukjang* supplementation on plasma 8-OH-dG level in mice treated with galactose.

(4) 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 급여가 마우스 혈청 지질과산화물 함량에 미치는 영향

혈청 내 MDA 농도는 TBARS Assay kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. D-Galactose (200 mg/kg bw)의 주사군에서는 혈청내 TBARS 농도가 유의적으로 증가하였으며, 발아마늘, 발효마늘 청국장을 급여한 군에서 MDA 농도가 유의적으로 감소하였다. 마늘을 첨가한 청국장 중 특히 발아마늘 청국장이 D-galactose에 의하여 유도되는 지질 과산화를 억제하는 것으로 사료된다 (Fig. 37).

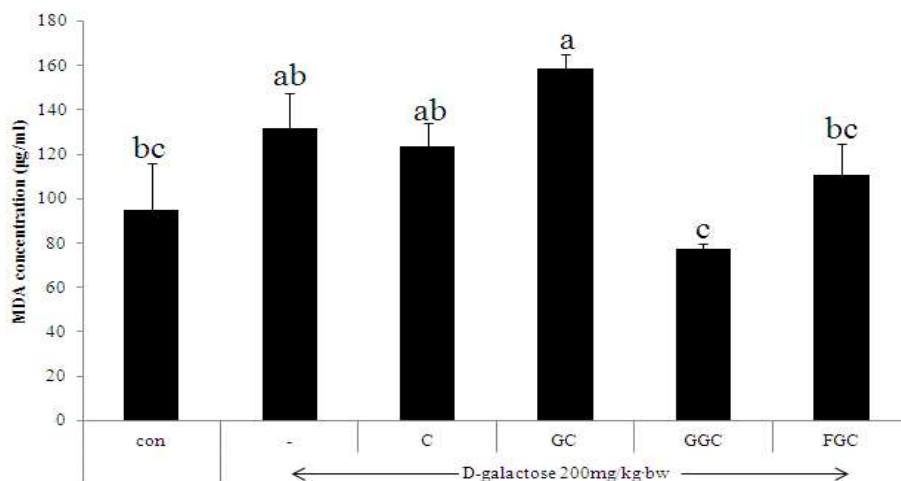


Fig. 37. Effect of garlic-containing *cheonggukjang* supplementation on MDA level in mice treated with galactose

(5) 마우스모델을 이용한 D-galactose에 의해 유도된 산화적 스트레스에서 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장이 기억 및 인지 능력에 미치는 영향

마늘을 첨가한 청국장이 D-galactose에 의해 유도된 산화적 스트레스 모델에서 기억 및 인지능력을 개선시키는지 여부를 확인하기 위해 Y-maze test를 수행하였다. D-galactose 군에서는 실험동물의 공간변경능력이 유의적으로 감소하였으며, 마늘 첨가 청국장은 공간변경능력을 유의적으로 증가 시켰으며, 발아마늘 (GGC), 발효마늘 (FGC) 청국장에서 증가율이 더욱 크게 나타났다 (Fig. 38).

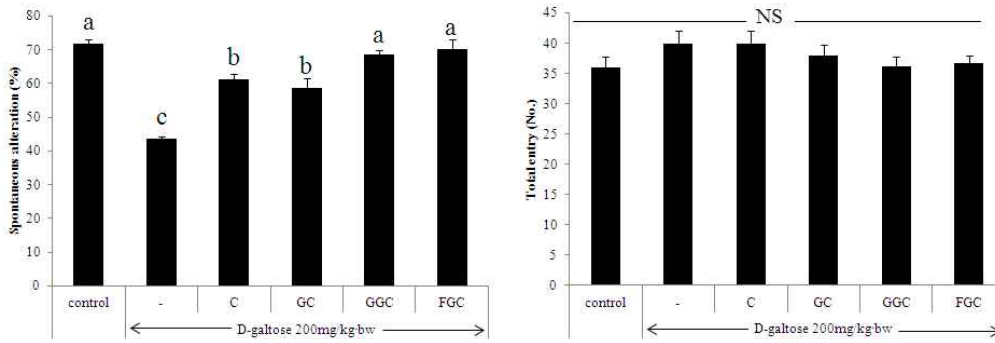


Fig. 38. Effect of garlic-containing *cheonggukjang* supplementation on cognition impairment caused by galactose administration in mice.

나. 마늘 함량별 된장의 항산화 및 신경보호 활성

(1) 마늘 함량별 된장 추출물의 ORAC_{FRAP} 값

항산화 활성 지표로서 시료의 ORAC_{FRAP} 값을 측정된 결과, 마늘 함량별 된장 추출물은 마늘 무첨가 된장 보다 마늘을 첨가한 그룹에서 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 39).

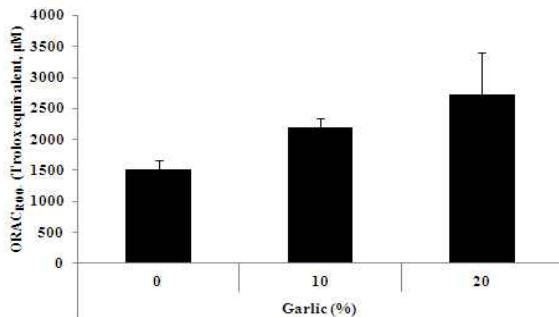


Fig. 39. ORAC values of *Doenjang* containing different levels of garlic

(2) 마늘 함량별 된장 추출물의 HepG2 모델계 항산화 활성

마늘함량별 제조 된장 추출물의 인간간암세포 HepG2 세포에서의 항산화효능을 알아보기 위해 과산화수소로 세포내 산화적 스트레스를 유도하여 마늘함량별 된장 추출물의 항산화활성을 측정된 결과, 대조군인 마늘 0% 된장보다 마늘 첨가군에서 활성 산소종이 더 효과적으로 제거되었다 (Fig. 40).

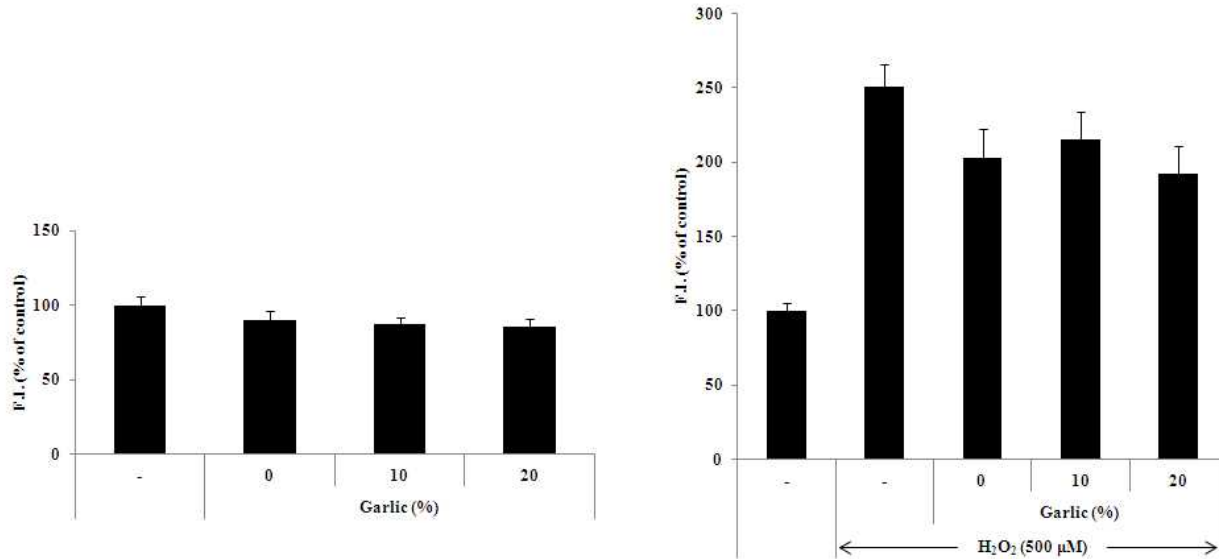


Fig. 40. ROS scavenging activity of garlic-containing *doenjang* extract in HepG2 cells.

(3) DPPH 라디칼 소거능

마늘함량을 달리하여 제조한 된장의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 마늘을 10% 함유한 된장의 물 추출물에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 뿐만아니라, 추출용매가 물추출물에서 에탄올의 비율이 증가할수록 DPPH 소거능은 감소하였다. 반면, 청국장의 경우에는 생청국장, 일반마늘 청국장, 발아마늘 청국장, 발효마늘 청국장 모두 물의 비율이 높은 추출용매로 추출한 시료와 비교했을 때 60%-100% 에탄올 추출물에서 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다 (Fig. 41).

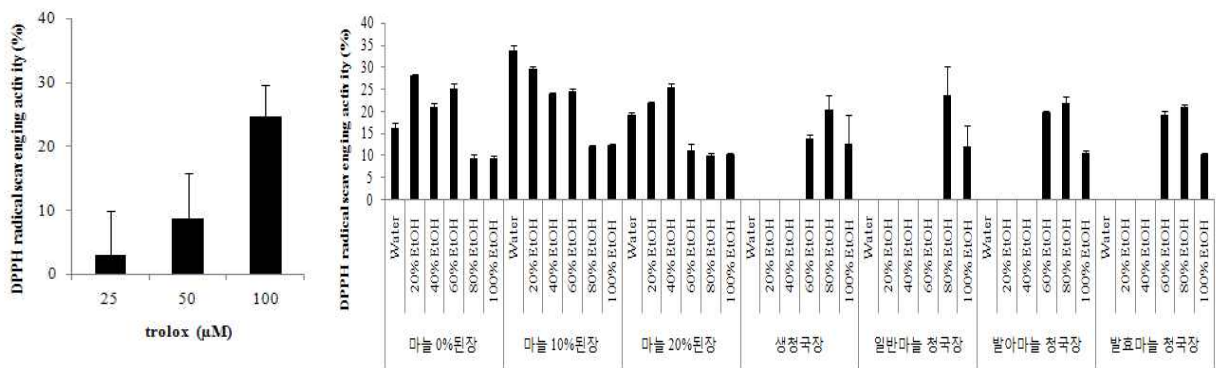


Fig. 41. DPPH radical scavenging activities of garlic-containing *doenjang* and *cheonggukjang*.

(4) 마늘 함유 된장 (및 청국장) 추출물의 총 페놀함량

마늘 함유 비율이 다른 된장과 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 총페놀 함량을 측정한 결과, 모든 군의 물추출물에서 50 μg/mL에 가까운 함량을 나타내었다. 또한, 마늘 함량별 된장 추출물의 경우, 함유 비율에 의존적으로 미미한 증가폭을 나타내었고, 청국장 추출물 중에는 발효마늘>발아마늘>일반마늘>생청국장 순으로 총페놀함량이 증가하였다. 마늘이 함유된 된장은 마늘 함량이 20%인 경우 추출용매 중 물의 비율이 높을수록 총 페놀함량이 높았고, 이는 대조군과 저농도의 마늘을 함유하는 경우 추출용매에 크게 영향을 받지 않은 것으로 보인다. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장의 경우에는 모든 군에서 추출용매의 비율 중 물의 함량이 높을수록 총 페놀함량이 높게 나타났다 (Fig. 42).

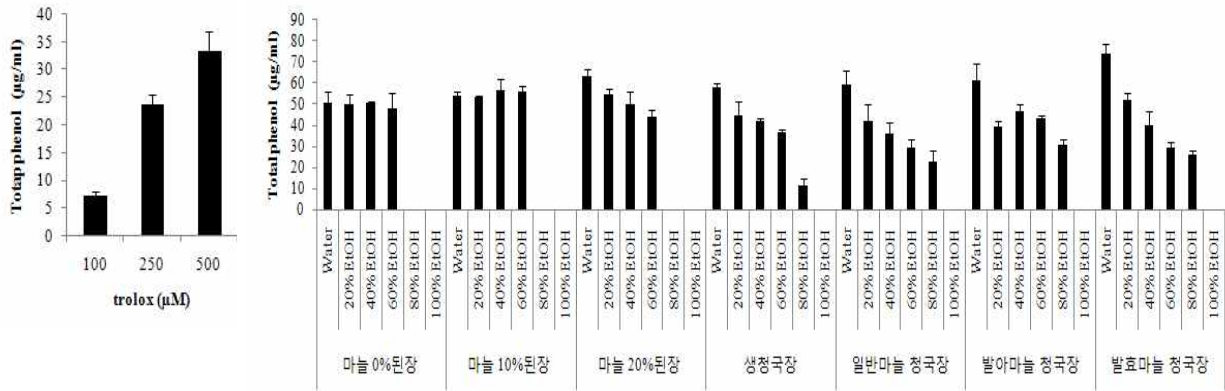


Fig. 42. Total phenolic contents of garlic-containing *doenjang* and *cheonggukjang*.

(5) 마늘함량별 된장의 FRAP 수준

FRAP 분석 결과, 마늘을 첨가하지 않은 군에서 더 높은 철이온 환원능력을 나타내었고 추출용매로 물을 사용한 경우 추출물이 가장 높은 FRAP 수준을 보였다. 전처리를 달리한 마늘 첨가 청국장 추출물의 항산화활성은 발효마늘>발아마늘>일반마늘>생청국장의 순으로 높은 FRAP 수준을 나타내었다 (Fig. 43).

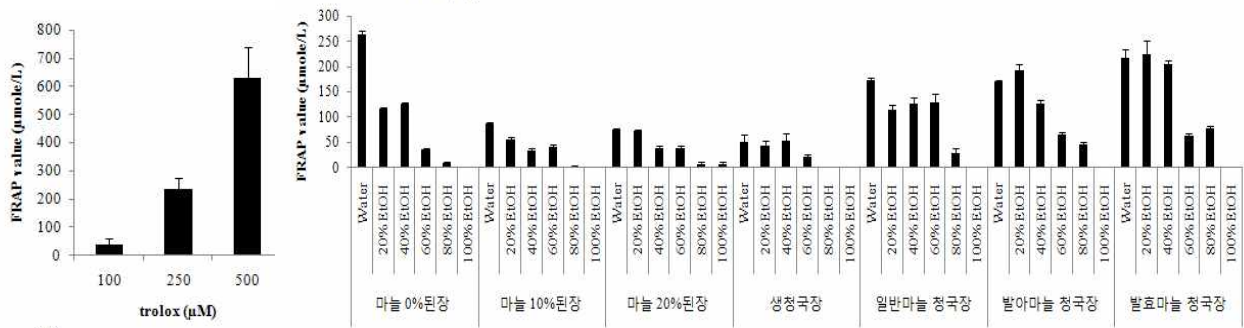


Fig. 43. FRAP capacity of garlic-containing *doenjang* and *cheonggukjang*.

(6) 마늘 함량별 된장의 ABTS 라디칼 소거 효과

마늘 함량별 된장과 청국장의 ABTS 라디칼 소거능을 평가한 결과, 마늘의 함량이나 전처리 조건에 따른 저해효과 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 마늘 함량별 된장의 경우, 추출용매 가운데 물의 비율이 높을 수록 ABTS 라디칼 양이온 저해효과가 높아지는 경향을 나타냈다. 반면, 청국장의 경우는 추출용매에 따른 ABTS 라디칼 양이온 저해효과에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 44).

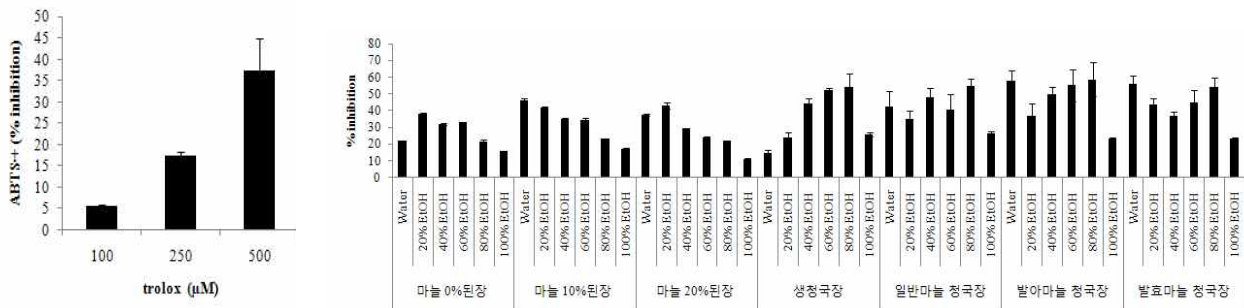


Fig. 44. ABTS radical scavenging activity of garlic-containing *doenjang* and *cheonggukjang*.

다. 된장의 숙성과정중 항산화 활성 변화

Table 3에 나타낸 바와 같이, 6 주 숙성된 된장이 숙성하지 않은 된장에 비하여 항산화활성 지표들 (DPPH, ABTS 라디칼 소거능, FRAP, ORAC), 세포모델계 항산화 활성 등은 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 그러나 뇌조직을 이용한 지질과산화 억제능, glutamate 처리로부터 신경세포보호효과 등은 일반된장과 숙성된장간의 유의적인 차이가 관찰되지 않았다 (Fig 45, 46, 47).

Table 3. Comparison of antioxidant parameters of non-aged *doenjang* with those of aged *doenjang*.

	Samples*	
	CGJ	GC
DPPH (% Inhibition)	8.6 ± 3.1	84.9 ± 4.6
FRAP (μ M)	649.7 ± 77.0	1073.7 ± 37.8
ABTS ⁺ (% Inhibition)	50.7 ± 3.3	57.1 ± 4.9
Total phenolics (GAE mg/g)	6.0 ± 0.3	10.8 ± 0.3
Total flavonoids (μ g/g)	277.1 ± 15.8	546.5 ± 75.9
ORAC (TE, μ M)	3676.5 ± 363.5	5299.5 ± 385.9
TBARS (% control)	316.1 ± 15.9	347.5 ± 10.8

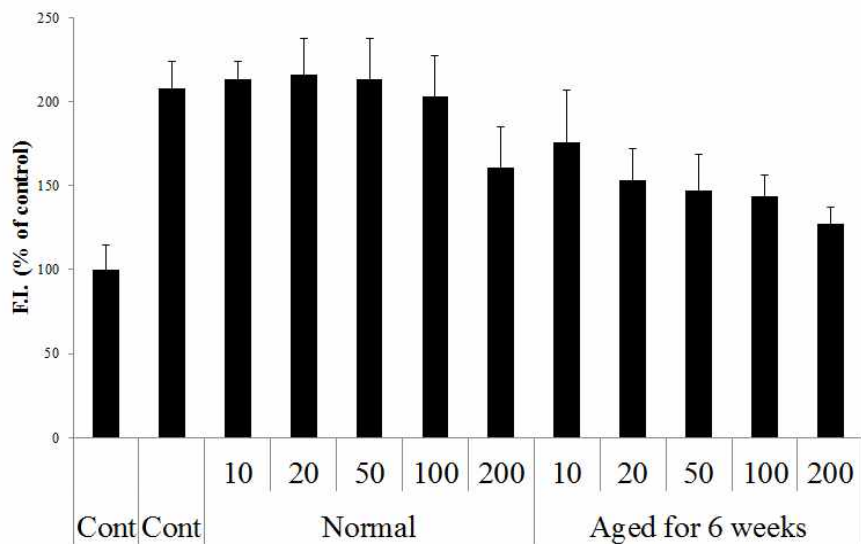


Fig. 45. Inhibitory activity of *doenjang* and aged *doenjang*'s extracts against ROS generation.

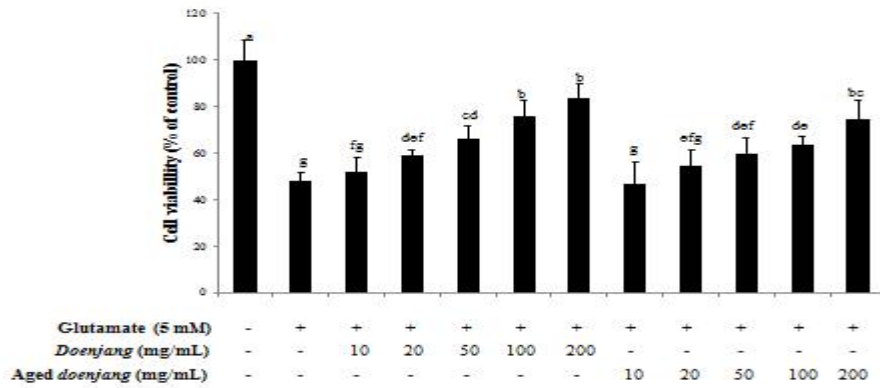


Fig. 46. Protective effect of *doenjang* extract from glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells.

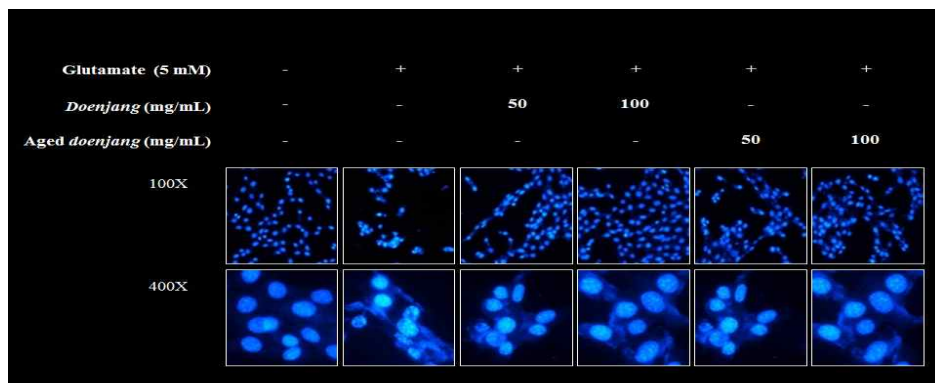


Fig. 47. Protective effect of *doenjang* extract from glutamate-induced nuclear damage in HT22 cells.

라. 일반된장과 숙성된장의 인지기능개선 효과

마우스를 이용한 행동실험에서 두 종류의 된장 모두 scopolamine에 의해서 유도되는 인지 기능저하를 개선하는 것으로 나타났음. 그러나 Y-maze test에서 일반된장과 숙성된장간의 효능 차이는 없는 것으로 나타났으나, water maze test에서는 숙성된장이 우수한 것으로 나타났음 (Fig. 48, 49).

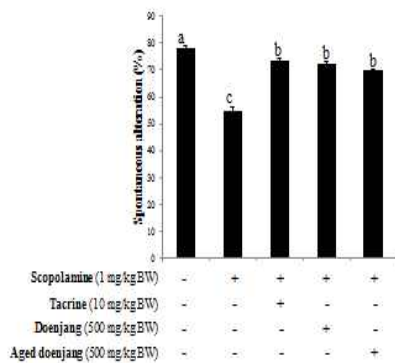


Fig. 48. Effect of *doenjang* extract on cognitive function as measured by Y-maze test.

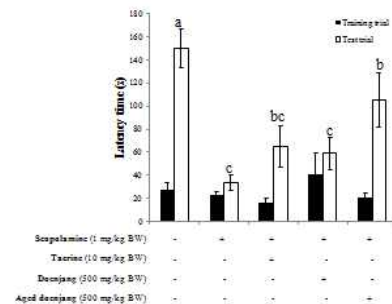


Fig 49. Effect of *doenjang* extract on cognitive function as measured by passive avoidance test.

마. 흑마늘 함유 간장의 항산화 활성

흑마늘 자체는 FRAP 활성과 DPPH 라디칼 소거능, 총 플라보노이드 함량이 높은 것으로 나타났으나, 간장을 제조하였을 때는 흑마늘 첨가군간 라디칼 소거능이나 총 플라보노이드 함량에서 유의적인 차이가 없었으며, FRAP 활성만 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였음.

Table 4. Antioxidative activities of *Ganjang* supplemented with black garlic concentrate.

	DPPH (% of inhibition)	ABTS ^{•+} (% of inhibition)	FRAP (FeSO ₄ , μM)	Total flavonoids (mg QE/ml)
<i>Ganjang</i>				
15% salt	33.9 ± 1.2	89.5 ± 4.6	1104.3 ± 23.0	11.3 ± 1.7
12% salt	34.9 ± 1.2	90.5 ± 3.4	1117.0 ± 37.3	13.7 ± 0.8
12% salt, 0.3% black garlic concentrate	37.7 ± 1.5	90.6 ± 5.6	1393 ± 36.9	14.2 ± 1.3
12% salt, 0.5% black garlic concentrate	39.6 ± 0.6	90.3 ± 0.8	1408.5 ± 24.7	14.2 ± 0.8
12% salt, 1% black garlic concentrate	34.8 ± 0.7	90.5 ± 3.8	1424.5 ± 27.4	9.9 ± 1.7
12% salt, 3% black garlic concentrate	41.1 ± 0.8	87.8 ± 8.7	1455.3 ± 30.4	12.9 ± 0.7
12% salt, 5% black garlic concentrate	42.9 ± 0.6	89.0 ± 10.5	1366.0 ± 13.2	15.4 ± 1.6
Black garlic concentrate				
0.3%	1.8 ± 0.2	25.8 ± 0.3	365.2 ± 8.5	0.4 ± 0.3
0.5%	4.0 ± 0.7	30.9 ± 2.8	527 ± 8.5	1.2 ± 0.4
1%	4.6 ± 0.4	20.0 ± 0.6	757.4 ± 29.4	3.0 ± 0.5
3%	9.4 ± 0.4	20.5 ± 1.4	1561.3 ± 22.5	7.7 ± 0.1
5%	14.5 ± 2.8	22.8 ± 2.0	2193.6 ± 75.5	12.7 ± 0.8

바. 흑마늘 함유 간장섭취가 마우스 인지기능 및 해마 조직에 미치는 영향

흑마늘을 함유하여 제조한 간장을 섭취시킨 마우스의 경우, 새로운 환경을 탐색하는 능력이 개선되는 경향을 보였으나, 일반 간장과 비교하여 유의적인 차이가 없었음 (Fig. 50).

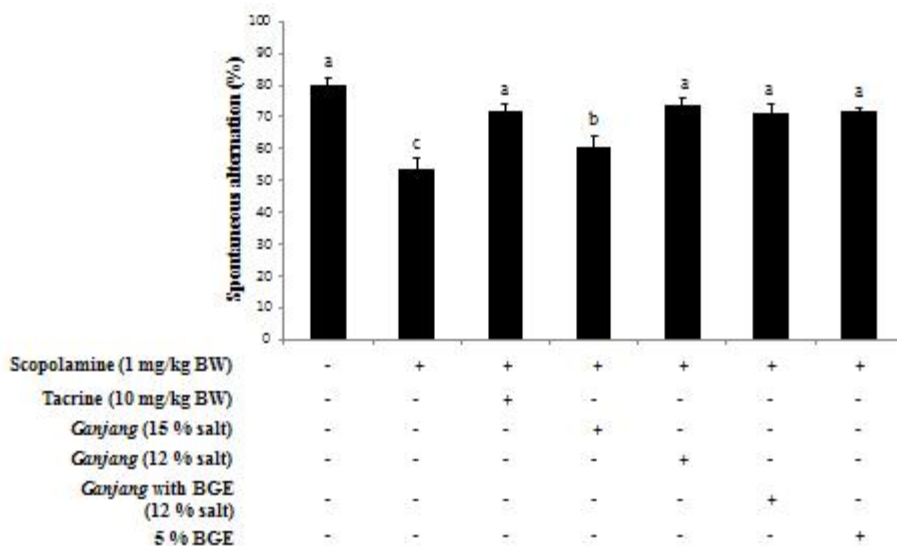


Fig. 50. Effect of administration of *Ganjang* supplemented with black garlic extract on scopolamine-induced cognition deficits in Y-maze test.

한편, 수동적회피능력을 조사한 결과, 흑마늘 함유 간장을 섭취한 마우스가 다른 군 (흑마늘, 간장 섭취군)에 비하여 유의적으로 인지능력이 향상되는 것이 확인되었음 (Fig. 51).

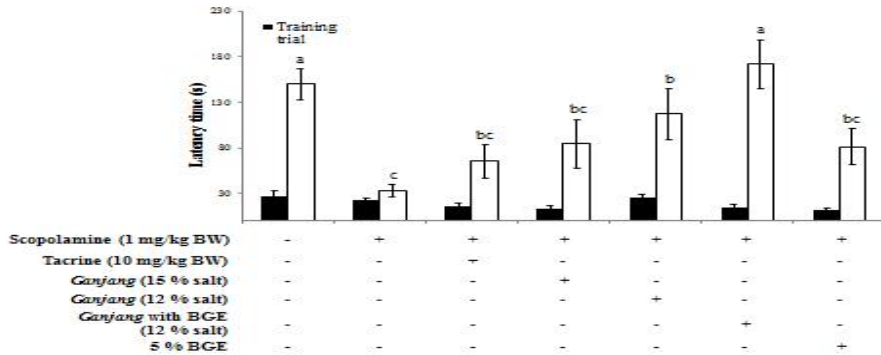


Fig. 51. Effect of administration of *Ganjang* supplemented with black garlic extract on scopolamine-induced cognition deficits in passive avoidance test.

흑마늘 첨가 간장이 마우스의 인지기능에 미치는 영향을 Morris water maze test로 평가한 결과, 흑마늘 섭취군이 간장 섭취군, 흑마늘 함유 간장 섭취군에 비하여 우수한 것으로 나타났음 (Fig. 52).

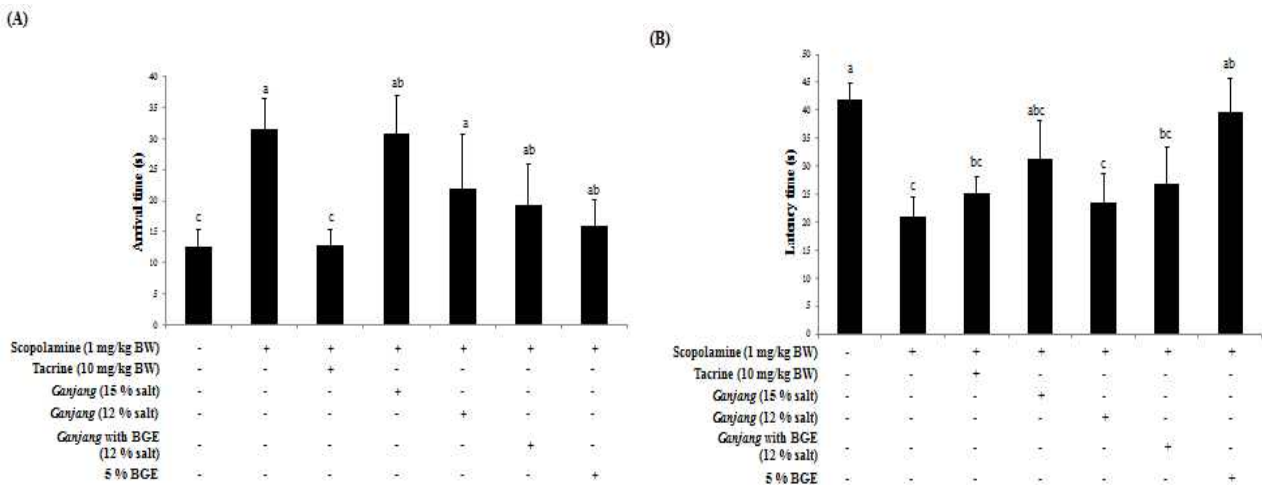


Fig. 52. Effect of administration of *Ganjang* supplemented with black garlic extract on scopolamine-induced cognition deficits in Morris water maze. (A) arrival time, (B) latency time.

한편, 흑마늘 첨가 간장의 scopolamine에 의하여 유도되는 해마의 손상을 억제하는지 알아보기 위하여 시료 섭취시킨 후 해마부위를 염색하여 관찰한 결과, 흑마늘, 흑마늘 함유 간장, 간장 추출물 모두 해마 보호효과는 있었으나, 섭취군간 유의적인 차이는 관찰되지 않았음 (Fig. 53).

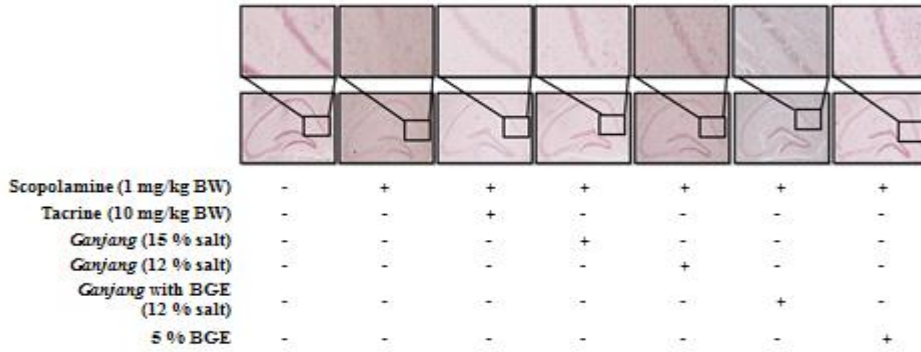


Fig. 53. Protective effect of *Ganjang* supplemented with black garlic extract on scopolamine-induced neuronal damage on hippocampal CA1 region in mice model.

사. 흑마늘 함유 간장섭취가 마우스 혈중 AST 및 ALT 효소활성에 미치는 영향

흑마늘 함유 간장의 섭취는 혈중 AST 효소활성을 감소시키는 경향을 보였으나, ALT 효소활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났음. 즉, scopolamine 투여에 의해서 증가된 간 손상을 간장 또는 흑마늘 함유 간장이 어느 정도 보호해주는 효과가 있는 것으로 나타났음 (Fig. 54).

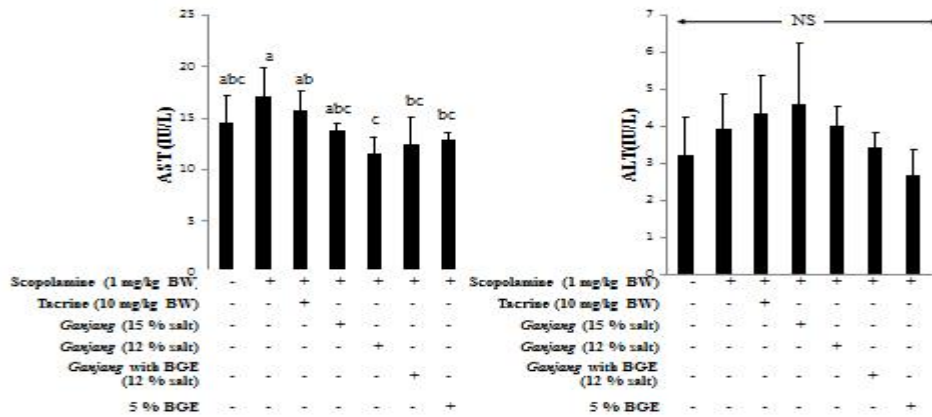


Fig. 54. Hepatoprotective effect of *Ganjang* supplemented with black garlic extract on scopolamine-induced damage in mice model.

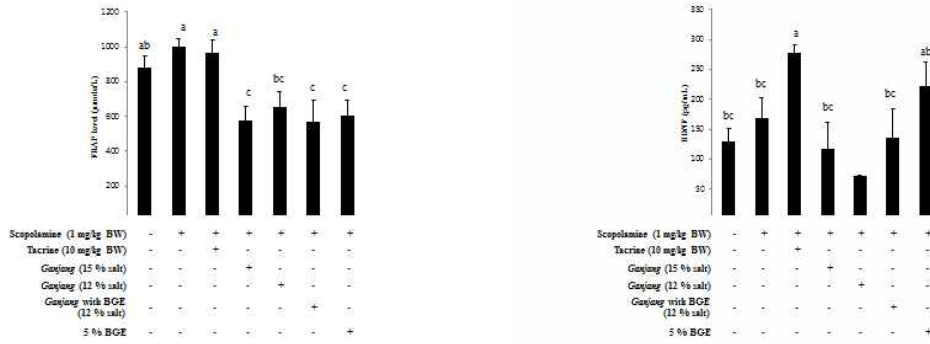


Fig. 55. Effect of *Ganjang* supplemented with black garlic extract on FRAP in mice model. Fig. 56. Effect of *Ganjang* supplemented with black garlic extract on BDNF level in mice model.

아. 흑마늘 함유 간장섭취가 마우스 혈중 FRAP 및 BDNF 농도에 미치는 영향

간장 및 흑마늘 함유간장 섭취가 scopolamine을 투여한 마우스의 혈장 항산화용량 및 brain derived neurotrophic factor (BDNF)의 농도에 미치는 영향을 살펴본 결과, 간장 또는 흑마늘 함유간장은 FRAP (ferric reducing activity of plasma)를 낮추는 경향을 보였으며 (Fig. 55), 이는 간장의 항산화 활성으로 인하여 체내 항산화물질 농도가 낮아진 때문으로 추정된다. 한편, 간장 및 흑마늘 간장 섭취는 혈중 BDNF 농도에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구개발 목표의 달성도

연도	연구개발 목표	달성도	연구 수행결과
1차년도 2012.08 - 2013.08	장류의 기능성 향상 및 유해균 증식 억제 효과를 주는 Bacillus, 곰팡이, 효모 복합종균 구성 균주들 확보	100	기존 균주 보다 월등히 (20%이상) 우수한 Bacillus 균주 5 종 이상 확보함. 곰팡이, 효모 각 1종 확보
	기존 장류 제품들의 성분 특성 및 향기 성분, 미생물 분석을 통한 품질 지표 확보	100	기존 제품 [몽고식품(주) 포함] 5 종 이상에 대한 성분 특성, 대사체, 및 장류 미생물 분석 완료함.
	마늘 청국장의 품질특성 분석 및 생산공정 확립, 저장조건 최적화	100	마늘의 첨가농도 결정, 숙성과정 및 저장 조건별 이화학적 특성과 미생물상의 변화 분석 완료함.
	시료의 in vitro 및 세포모델계 신경세포보호효과 검증	100	3 종 이상 항산화지표 사용하여 효능 평가 방법 정립. 기억력 관련 적합한 세포모델계 선정 및 평가방법 정립
2차년도 2013.08 - 2014.08	장류에서 복합종균들의 생육과 기능성 (혈전용해능, 유해균 증식 억제) 평가	100	선발 균주들에 의한 장류의 혈전용해능 개선 확인. 혈전용해유전자들 확보. 유해균 증식 억제 물질 정제 및 특성 조사 완료
	상업적 규모의 마늘 된장 제조 및 이화학적 특징, 기능성대사체/미생물 분석, 시제품화 여부	100	상업적 규모의 마늘 된장 제조 및 이화학적 특징 및 기능성 대사체인 isoflavone/phenolic acid와 향기성분 분석 완료
	저염 마늘 된장의 특성 분석 및 포장 방법의 최적화	100	마늘의 적정 첨가 형태 및 비율 결정, 숙성기간별 및 포장방법별 이화학적 특성과 미생물상의 변화분석 완료
	시료의 세포모델계 알츠하이머 예방 활성 평가	100	해마유래세포주 사용하여 시료의 예방효과 확인.
3차년도 2014.08 -2015. 08	최적 복합종균 조합들 확보 및 각 균주들의 생육 촉진방법 연구. 된장에서의 효능 검증	100	복합종균 집중한 된장의 촉질 특성 조사 및 강력한 B. cereus 억제효과 확인. 복합종균 조합별 차이와 균주 생육촉진방법 시도
	마늘된장의 향기성분, 기능성 대사체, 미생물분석. 상업적 규모의 마늘 간장 제조 및 이화학적 특징, 기능성 대사체 분석	100	상업적 규모의 마늘 간장 제조 및 이화학적 특징, 향기성분 분석/미생물 분석 완료
	저염 흑마늘 간장 제조 조건의 최적화 및 숙성 중 품질특성 분석	100	흑마늘 추출액 첨가 농도, 비율 및 숙성 기간에 따른 저염 간장의 이화학적특성과 미생물상의 변화분석 완료
	동물모델계 기억력개선 및 알츠하이머 예방 효능 평가	100	시료의 기억력 개선능을 마우스를 동물모델로 사용하여 인지기능회복 실험 수행.하여 효과 확인.

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도.

- ☞ 복합종균을 구성하는 *Bacillus*, 곰팡이, 효모 균주들을 각각 2 종, 1 종, 1종 씩 선발하고 이들 4 균을 동시에 배양하는 기술을 개발하였다. 이들 균주들과 공동배양기술은 종균을 사용하는 모든 발효식품 제조에 참고될 수 있고 장류에는 적용 가능하여 발효식품들 제조 기술 향상에 기여할 것이다. 장류나 김치에서 소비자들이 선호할 수 있는, 식중독으로부터 더 안전하면서 혈전용해와 같은 기능성도 지닌 제품들의 제조에는 우수한 종균 사용이 필수적이다. 수치화 하기는 어렵지만 복합종균 개발과 적용은 분명 발효식품 산업의 수준을 업그레이드 하는데 크게 기여할 것이다. .
- ☞ 기능성 소재인 마늘의 기능성 강화를 위해 발아, 발효과정을 거친 마늘의 효과를 생마늘과 비교하고 특히 단순한 항산화능에서 나아가 신경세포보호나 인지능력개선과 같은 소비자들이 관심을 가질만한 기능성을 세포주와 동물모델로 조사하였다. 보다 과학적, 객관적으로 마늘과 전처리마늘의 효과를 조사함으로써 마늘함유 정류들의 제조 기술 발전에 기여하였다.
- ☞ 마늘함유 청국장, 된장, 간장의 최적 제조조건을 설정하고 마늘의 첨가형태별, 저장용기별, 저장기간별 품질 특성을 상세히 조사함으로써 마늘과 같은 기능성 부재료를 활용한 장류제조 기술의 발전에 기여하였다.
- ☞ 흑마늘 추출액을 이용한 간장제조와 품질 평가를 통해 기능성이 우수한 새로운 간장제품들을 제조하는 기술들의 발전에 기여하였다.
- ☞ 시판 장류제품들과 본 연구를 통해 제조한 장류제품들의 향기성분, 기능성 대사체들, BAs 함량들을 측정된 자료들을 얻음으로써 장류의 품질 비교와 평가에 중요하게 활용될 수 있는 자료들을 축적하게되어서 간접적으로 장류산업 발전에 기여하였다.
- ☞ 장류로부터 젖산균과 biogenic amine의 상관성 분석을 통한 표준화 방안 기초자료 확보. 장류로부터 효모다양성과 향기성분의 상관성 분석을 통한 표준화 방안 기초자료 확보.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 논문 발표실적 SCI(E) 9 편, 학진등재지 5 편

순번	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
1.	Characterization of a fibrinolytic enzyme secreted by <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CB1 and its gene cloning	허경	김정환	조계만, 이창권, 김경민, 신정혜, 김정상	Journal of Microbiology and Biotechnology	23(7): 974-983 2013.07	국내	SCIE
2.	반응표면분석을 이용한 청국장 제조시 마늘의 첨가조건 최적화	황초롱	신정혜	심혜진, 김경민, 조계만, 김정환	한국식품조리과학회지	29(6): 661-669 2013.12	국내	비SCI
3.	Garlic sprouting is associated with increased antioxidant activity and concomitant changes in the metabolite profile	Alexandra Zakarova	Jong-Sang Kim	JY Seo, HY Kim, JH Kim, JH Shin, KM Cho, CH Lee	Journal of Agricultural and Food Chemistry	62(8): 1875-1880 2014.02	국외	SCI
4.	Anti-obesity activity of peanut sprout extract	Seong Soon Kim	Jong-Sang Kim	JY Seo, BR Kim, HJ Kim, HY Lee	Food Science and Biotechnology	23(2): 601-607 2014.04	국내	SCIE
5.	전통대두발효식품들에서 분리한 <i>Bacillus</i> 균주들의 혈전용해능	이재용	김정환	정선주, 조민정, 조계만, 김경민, 신정혜, 이창권, 김정상	농업생명과학연구	48(2): 163-173 2014.04	국내	비SCI
6.	Overexpression of <i>aprE2</i> , a fibrinolytic enzyme gene from <i>Bacillus subtilis</i> CH3-5, in <i>Escherichia coli</i> and the properties of AprE2	Seon-Ju Jeong	Jeong Hwan Kim	KM Cho, CK Lee, GM Kim, JH Shin, JS Kim	Journal of Microbiology and Biotechnology	24(7): 969-978 2014.07	국내	SCIE
7.	Characteristics and antioxidant Effect of garlic in the fermentation of cheonggukjang by <i>Bacillus amyloquifecens</i> MJ1-4	Jeong Hwan Kim	Kye Man Cho	CE Hwang, CK Lee, JH Lee, KM Kim, SH Jeong, JH Shin, JS Kim,	Journal of Microbiology and Biotechnology	24(7): 959-968 2014.07	국내	SCIE

순번	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
8.	마늘첨가된장의 숙성중 품질 특성 변화	강재란	신정혜	김경민, 황조홍, 조계만, 황정은, 김정환, 김정상	한국식품조리과학회지	30(4): 435-443 2014.08	국내	비 SCI
9.	Microbial and physiochemical properties of cheonggukjang fermented using <i>Bacillus</i> Strains with antibacterial or antifungal activities	Min Jeong Cho	Jeong Hwan Kim	Jae Yong Lee	Food Science and Biotechnology	23(5): 1525-1532 2014.10	국내	SCIE
10.	저염 마늘된장의 숙성기간에 따른 품질특성	조계만	신정혜	강재란, 김경민, 강민정, 황정은, 심상, 김정환, 이창권	한국식품저장유통학회지	21(5): 627-635 2014.10	국내	비 SCIE
11.	Properties of Doenjang (Soybean Paste) fermented with multiple starters	Min Jeong Cho	Jeong Hwan Kim	JY Lee, KW Lee, KM Cho, CK Lee, GM Kim, JH Shin, JS Kim	농업생명과학연구	48(6): 291-300 2014.12	국내	비 SCI
12.,	Characterization of AprE176, a fibrinolytic enzyme from <i>Bacillus subtilis</i> HK176	Seon-Ju Jeong	Jeong Hwan Kim	K Heo, JY Park, KW Lee, JY Park, SH Joo,	Journal of Microbiology and Biotechnology	25(1), 89-97. 2015.01	국내	SCIE
13.	Properties of a bacteriocin produced by <i>Bacillus subtilis</i> EMD4 isolated from <i>Ganjang</i> (Soy Sauce)	Liu Xiaoming	Jeong Hwan Kim	JY Lee, SJ Jeong, KM Cho, GM Kim, JH Shin, JS Kim	Journal of Microbiology and Biotechnology	25(9): 1497-1505 2015.09	국내	SCIE
14	Improvement of fibrinolytic activity of <i>B. subtilis</i> 168 by integration of a fibrinolytic gene into the chromosome	Seon-Ju Jeong	Jeong Hwan Kim	JY Park, JY Lee, KW Lee, KM Cho, GM Kim, JH Shin, JS Kim	Journal of Microbiology and Biotechnology	25(11) 게재예정 2015.11	국내	SCIE

Certificate of Publication

Manuscript number	JMB15-05062
Title of manuscript	Improvement of Fibrinolytic Activity of <i>B.subtilis</i> 168 by Integration of a Fibrinolytic Gene into the Chromosome
Authors	Seon Ju Jeong ¹ , Ji Yeong Park ¹ , Jae Yong Lee ¹ , Kang Wook Lee ² , Kye Man Cho ³ , Gyoung Min Kim ⁴ , Jung Hye Shin ⁴ , Jong Sang Kim ⁵ , and Jeong Hwan Kim ^{1,2*}
Affiliation	¹ Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Graduate School, and ² Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea ³ Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Republic of Korea ⁴ Namhae Garlic Research Institute, Namhae, Gyeongnam 668-812, Republic of Korea ⁵ School of Applied Biosciences and Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

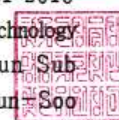
This is to certify that the above manuscript will be published (Vol. 25 No. 11) in *Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Aug. 31 2015

The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

President Chung, Kun Sub

Editor-in-Chief Kim, Kun Soo



심사중, 투고 예정 논문

- 1) 우지은, 서지연, 김정환, 신정혜, 조계만, 김정상. Soy Product Fermented with Sprouted Garlic Has Increased Antioxidative and Neuroprotective Activities. (심사중)
- 2) JY Lee, JM Shim, Y Zhuang, KW Lee, HJ Kim, KS Ham, and JH Kim. Antimicrobial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17 Isolated from *Cheonggukjang* and Its Potential as a Starter for Soybean Fermentations. (심사중)
- 3) 강수진, 서지연, 김정환, 신정혜, 조계만, 김정상. Improvement of Antioxidative and Neuroprotective Effects of Doenjang by Aging. (논문 작성중)
- 4) Change of metagenomic microbial population and biogenic amine (histamine and tyramine) contents and during the fermentation of *kanjang*. Food Microbiology, 투고 준비 중 (SCI급)
- 5) Yeast diversity and volatile compounds in soybean paste. Food Science and

Biotechnology, 투고 준비 중 (SCI급)

- 6) Changes of total phenolic and isoflavone contents and antioxidant activities during *cheonggukjang* fermentation of Korean soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars by potential probiotics *Bacillus subtilis* CSY191. Prev. Nutr. Food Sci., 투고 준비 중 (Scopus)
- 7) Change of yeast population and metabolites during the fermentation of *doenjang* with garlic. LWT-Food Science and Technology, 투고 준비 중 (SCI급)

제 2 절 특허.

1. 기 출원 2 건

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2014	마늘 새싹 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 조성물	경북대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0011548
2014	마늘 새싹 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물	경북대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0011542

2. 출원 준비중 2 건

- (1) 마늘 청국장 및 된장 제조 방법, 특허출원 준비 중 (9월 중 출원 완료 예정)
- (2) 흑마늘 간장 및 이의 제조 방법, 특허출원 준비 중 (10월 중 출원 완료 예정)

3. 대학원생 배출 실적 : 박사 1인, 석사 2인, 그 외 다수 학생들 지원.

가. 박사

정선주 (2015. Feb), 경상대학교.

“Characterization and utilization of fibrinolytic enzyme genes produced by *Bacillus subtilis* strains isolated from Cheonggukjang”

나. 석사

(1). 이재용 (2015, Feb), 경상대학교

“Characteristics of antimicrobial substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17”

(2). 우지은 (2015, Feb), 경북대학교

“Antioxidant and neuroprotective effects of cheonggukjang prepared with various *Bacillus* strains and garlic supplementation”

4. 학술대회 발표실적: 37 건

연번	제목	발표자	학회명	발표 국가 및 장소	발표일
1	Change of antioxidant activities during cheonggukjang fermentation by soybean cultivars	C.E. Hwang 외 6명, Kye Man Cho	한국식품영양과학회	대한민국	2012.11.01
2	Isolation of a <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 135 with Aantimicrobial Activity from <i>Cheonggukjang</i>	J.Y. Lee, jeong Hwan Kim	한국미생물생명공학회	대한민국	2013.07.03
3	Change of total Phenolic and Isoflavone Content and Antioxidant Activities During <i>Cheonggukjang</i> Fermentation by <i>Bacillus</i> sp. EMD17	C.E. Hwang 외 5명, kye Man Cho	한국미생물생명공학회	대한민국	2013.07.03
4	Heterologous Overexpression of <i>aprE2</i> , a Fibrinolytic Enzyme Gene from <i>Bacillus subtilis</i> CH3-5 in <i>E. coli</i>	S.J Jeong 외 1명, jeong Hwan Kim	한국미생물생명공학회	대한민국	2013.07.03
5	Properties of <i>Cheonggukjang</i> Fermented with <i>Bacillus</i> Strains with Antimicrobial or Antifungal Activity	M.J Cho, jeong Hwan Kim	한국미생물생명공학회	대한민국	2013.07.03
6	Enhancement of the Antioxidant Capacity and Total Phenolic and Aglycone Contents of <i>Cheonggukjang</i> by Fermentation with <i>Bacillus subtilis</i> HCD02	C.E. Hwang 외 5명, kye Man Cho	한국미생물생명공학회	대한민국	2013.07.03
7	Antioxidant Effect of Cheonggukjang Prepared with Various Bacillus Strains.	J.E.Woo 외 9명, Jong-Sang Kim.	한국식품과학회	대한민국	2013.08.28
8	Antioxidant and Neuroprotective Effects of Sprouted Garlic Extracts	A. Zakharova 외 7명, Jong-Sang Kim.	한국식품과학회	대한민국	2013.08.28
9	Selection of Microorganisms for Multiple Starters for Fermented Soy Foods	M.J Cho 외 2명, jeong Hwan Kim	한국미생물학회연합	대한민국	2013.10.17
10	Characteristics and antioxidant effect of garlic in the fermentation of cheonggukjang by <i>Bacillus amyloquiefacens</i> MJ1-4	C.E. Hwang 외 1명, Kye Man Cho	한국미생물연합	대한민국	2013.10.17
11	The Improvement effect of Scopolamine-induced Short Term Memory Deficiency by Sprouted Garlic Extract	A. Zakharova 외 7명, Jong-Sang Kim.	(사)한국영양학회	대한민국	2013.11.08
12	Antioxidant and Neuroprotective Effects of Doenjang and Cheonggukjang Prepared with Garlic Supplementation	J.E. Woo 외 8명, Jong-Sang Kim	한국식품영양과학회	대한민국	2013.11.14
13	Antioxidant and Neuroprotective Effects of Sprouted Garlic Extracts	A. Zakharova 외 7명, Jong-Sang Kim.	한국식품영양과학회	대한민국	2013.11.14
14	Antioxidative Activity of <i>Chenggukjang</i> Fermented with <i>Bacillus</i> Strain	M.J Cho, jeong Hwan Kim	한국식품영양과학회	대한민국	2013.11.14
15	Isolation of a <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EMD17 with Antimicrobial and Fibrinolytic Activity from <i>Cheonggukjang</i>	J.Y Lee 외 6명, jeong Hwan Kim	한국식품영양과학회	대한민국	2013.11.14

연번	제목	발표자	학회명	발표 국가 및 장소	발표일
16	Comparison fo total phenolic and isoflavone contents in soybean fermented foods (Doenjang)	C.E. Hwang 외 2명, Kye Man Cho	한국식품영양과학회	대한민국	2013.11.14
17	Yeast community in soybean fermented foods (doenjang) using 26S rRNA sequence analysis	H.E. Lee 외 2명, Kye Man Cho	한국식품영양과학회	대한민국	2013.11.14
18	Isolation of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EMD17 with Antimicrobial and Fibrinolytic Activities	J.Y Lee 외 2명, jeong Hwan Kim	American Scoeity for Microbiology	미국 Boston	2014.05.17
19	Characteristics and antioxidnat effect of the garlic concentrations in the fermentation of doenjang	C.E. Hwang 외 3명, Kye Man Cho	한국응용생명화학회	대한민국	2014.06.19
20	Overexpression of <i>aprE2</i> , a Fibrinolytic Enzyme Gene from <i>Bacillus subtilis</i> CH3-5, in <i>Escherichia coli</i> and the Properties of AprE2.	S.J Jeong 외 1명, jeong Hwan Kim	한국미생물학회연합	대한민국	2014.06.25
21	Properties of <i>Meju</i> Fermented with Multiple Starters.	M.J Cho, jeong Hwan Kim	한국미생물생명공학회	대한민국	2014.06.25
22	Properties of a Bacteriocin produced by <i>Bacillus subtilis</i> EMD4 Isolation from <i>Cheonggukjang</i>	X. Liu, jeong Hwan Kim	한국미생물생명공학회	대한민국	2014.06.25
23	Characteristics and Antioxidant Effect of Galic in the fermentation of Doenjang with Different salt concentrations	Y.S Jeong 외 4명, kye Man Cho	한국미생물생명공학회	대한민국	2014.06.25
24	Fermented Soybean Product and Their Bioactive Compounds	jeong Hwan Kim	한국식품과학회	대한민국	2014.08.25
25	Improvement of learning and memory by sprouted garlic extract through antioxidant activity in mouse model	A. Zakharova 외 7명, Jong-Sang Kim.	Experimental Biology	미국 San Diego	2014.04.26
26	Neuroprotective Effects of Cheonggukjang Prepared with B. amyloliquefaciens MJ1-4 and Bacillus sp. EMD17	J.E. Woo 외 8명, Jong-Sang Kim	Experimental Biology	미국 San Diego	2014.04.26
27	Cheonggukjang Prepared with Garlic Supplementation Alleviates Cognitive Impairment and Oxidative Stress Induced by D-galactose in Mice	J.E. Woo 외 8명, Jong-Sang Kim	한국식품과학회	대한민국	2014.08.25
28	Neuroprotective Effects of Doenjang Supplemented with Different Kinds of Garlic	S.J. Kang 외 7명, Jong-Sang Kim	한국식품과학회	대한민국	2014.08.25
29	Neuroprotective Effect of Doenjang Supplemented with Various Garlic Products	S.J. Kang 외 10명, Jong-Sang Kim	한국식품영양과학회	대한민국	2014.10.27
30	Protective Effect of Cheonggukjang Prepared with Garlic Supplementation on D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Cognitive Impairment in Mice	J.E. Woo 외 10명, Jong-Sang Kim	한국식품영양과학회	대한민국	2014.10.27
31	Antioxidant and Neuroprotective Effects of Korean Fermented Food Doenjang	S.J. Kang 외 9명, Jong-Sang Kim	Experimental Biology	미국 Boston	2015.03.28
32	Cognition-enhancing Effect of Ganjang (Korean Soy Sauce) Supplemented with Black Garlic Extracts	S.J. Kang 외 12명, Jong-Sang Kim	한국식품과학회	대한민국	2015.06.03

연번	제목	발표자	학회명	발표 국가 및 장소	발표일
33	Properties of a Bacteriocin produced by <i>Bacillus subtilis</i> EMD4 Isolation from Ganjang(Soy Sauce)	X. Liu, jeong Hwan Kim	한국미생물생명공학회	대한민국	2015.06.24
34	Properties of an Antimicrobial Substance Produced by <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CJW15, Isolated from <i>Cheonggukjang</i>	X. Liu 외 2명, jeong Hwan Kim	한국미생물생명공학회	대한민국	2015.06.24
35	Characteristics of <i>Doenjang</i> (Soybean paste) Fermented with Three Different Multiple Starters Combination	J.Y Lee 외 5명, jeong Hwan Kim	한국미생물생명공학회	대한민국	2015.06.24
36	Properties of a Fibrinolytic Enzyme from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HCD2, Isolated from <i>Cheonggukjang</i>	Y. Zhuang 외 2명, jeong Hwan Kim	한국미생물생명공학회	대한민국	2015.06.24
37	A Daily Regiment of Ganjang Supplementation with Black Garlic Extract Alleviates Scopolamine-Induced Memory Deficiency	S.J. Kang 외 12명, Jong-Sang Kim	한국식품영양과학회	대한민국	2015.08.24

5. 인력 양성 실적 : 박사 1 명, 석사 2 명 배출

박사 학위

정선주, 경상대학교, 2015. 02. 25.

“Characterization and utilization of fibrinolytic enzyme genes produced by *Bacillus subtilis* strains isolated from Cheonggukjang”

석사 학위

1. 이재용, 경상대학교, 2015. 02. 25.

“Characteristics of antimicrobial substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17”

2. 우지은, 경북대학교, 2015. 02.

“Antioxidant and neuroprotective effects of cheonggukjang prepared with various *Bacillus* strains and garlic supplementation”

- 이외 다수 대학원생들 지원

6. 홍보실적

가. 언론홍보

- 2014. 2. 26일 미국화학협회 (American Chemical Society)의 홍보용 기사로 본 과제의 성과인 논문 내용이 소개됨. 다수의 웹사이트에서 인용 홍보됨.

(<http://www.prevention.com/food/healthy-eating-tips/why-old-sprouted-garlic-actually-good-you;>

[http://www.naturalnews.com/049214_garlic_sprouting_antioxidants.html;](http://www.naturalnews.com/049214_garlic_sprouting_antioxidants.html)

[http://simpleorganiclife.org/sprouted-garlic/\)](http://simpleorganiclife.org/sprouted-garlic/)

ACS News Service Weekly PressPac: February 26, 2014

Don't throw out old, sprouting garlic — it has heart-healthy antioxidants

["Garlic Sprouting Is Associated with Increased Antioxidant Activity and Concomitant Changes in the Metabolite Profile"](#)

Journal of Agricultural and Food Chemistry

"Sprouted" garlic — old garlic bulbs with bright green shoots emerging from the cloves — is considered to be past its prime and usually ends up in the garbage can. But scientists are reporting in ACS' *Journal of Agricultural and Food Chemistry* that this type of garlic has even more heart-healthy antioxidant activity than its fresher counterparts.

Jong-Sang Kim and colleagues note that people have used garlic for medicinal purposes for thousands of years. Today, people still celebrate its healthful benefits. Eating garlic or taking garlic supplements is touted as a natural way to reduce cholesterol levels, blood pressure and heart disease risk. It even may boost the immune system and help fight cancer. But those benefits are for fresh, raw garlic. Sprouted garlic has received much less attention. When seedlings grow into green plants, they make many new compounds, including those that protect the young plant against pathogens. Kim's group reasoned that the same thing might be happening when green shoots grow from old heads of garlic. Other studies have shown that sprouted beans and grains have increased antioxidant activity, so the team set out to see if the same is true for garlic.

They found that garlic sprouted for five days had higher antioxidant activity than fresher, younger bulbs, and it had different metabolites, suggesting that it also makes different substances. Extracts from this garlic even protected cells in a laboratory dish from certain types of damage. "Therefore, sprouting may be a useful way to improve the antioxidant potential of garlic," they conclude.

The authors acknowledge funding from the [IPET High Value-Added Food Technology Development Program](#).



Garlic that has sprouted has more heart-healthy antioxidant activity than its younger counterparts. Credit: pbnew/iStock/Thinkstock

제 3 절 성과 활용 계획

1. 기술이전 및 상품화

복합종균과 마늘침가 장류 제조 기술들을 관심있는 업체들에 기술이전을 통한 상품화 시도를 계속함. 이를 위한 추가 연구들도 실시함.

특히 출원(등록) 및 관련업체 (식품, 생물공학, 의약/제약회사 등) 기술이전을 통한 산업화에 활용. 도착 자원 유래 고초균/진균 등의 개량식 종균 제조 기술과 이를 활용한 기능성이 강화되고 일관된 품질을 보장할 수 있는 콩 발효식품 제조기술에 대한 기업체 기술이전을 통한 대량생산 체계 확립과 연계 사업화 구축.

2. 추가 연구, 타 연구에 활용 계획

가. 추가연구

(1) 후속연구를 통해 복합종균을 사용하여 제조한 장류들의 특성을 상세히 조사할 예정이다. 특히 관능 조사를 통해 기호성이 우수한 제품 제조를 목표로 예정임. 산업체에 적용하기 위해서는 복합종균 접종과 제조공정 단순화가 요구됨으로 공정 간소화를 추가 연구할 예정이다.

(2) 유용미생물의 발효공학기술 혹은 새로운 발효공학기술(저 생물생성 아민 고초균의 발효법)을 이용한 콩 단백질로 새로운 기능성 peptide 전환 및 기능성 검정에 대한 추가적인 연구가 필요.

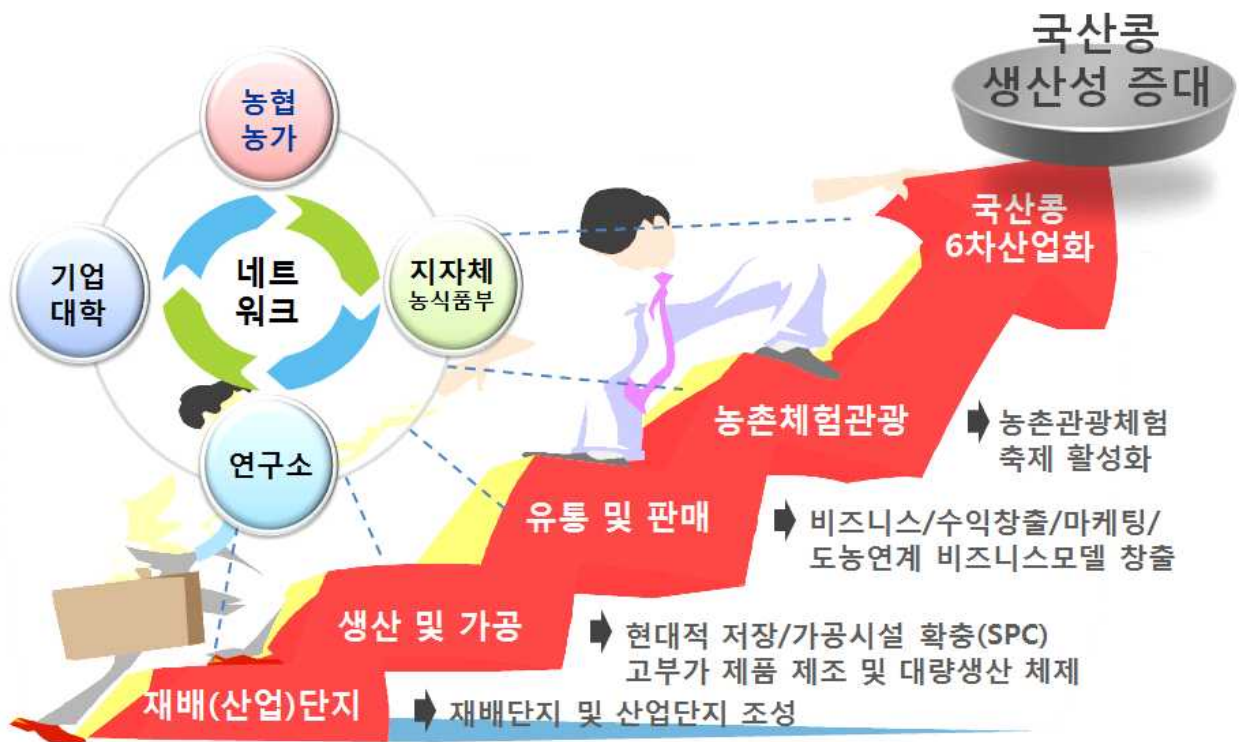
(3) 한편 최근 GABA 소재 시장이 성장하고 있으며, 콩의 또 다른 특이자원 중 GABA

전구물질인 glutamic acid가 작물체 중 가장 높은 함량으로 존재하고 있어 향후 복합종균 발효방식을 이용하여 CLA, 비배당체 이소플라본 및 GABA를 동시에 생산할 수 있는 콩 발효물 이용 다기능성 (체지방 감소, 혈압저하, 갱년기 개선 등) 기능성식품 제품화 기술 개발에 연구가 필요.

나. 타 연구

(1) 주관기관인 경상대 연구팀은 본 연구를 통해 개발된 종균들을 타 연구과제에서 된장 제조에 종균으로 접종, 활용하고 있음. 해양수산부 지원과제 “천일염이 발효식품 종균에 미치는 영향 분석 및 발효식품 품질개선“

(2) 국산콩 6차산업화를 위해 산학관연 유기적인 네트워크 구축을 통하여 실현이 가능하며, 현재 참여기업 몽고식품(주)은 지리산권 약용작물 활용 자연조미료 개발과 6차산업화 과제를 2차년도 수행하고 있으며, 새로운 형태의 조미료 제품이 가능



【콩 소비촉진 방안 : 6차산업화 전략】

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 연구동향

장류 제조나 품질에 관한 연구들은 대부분 한국과 일본에서 수행되고 있고 그 외 국가들에서는 이루어지지 않고 있다. 그러나 장류발효에 관여하는 미생물들에 대한 기초 연구는 전 세계에서 활발히 이루어지고 있다. 여기에는 *Bacillus*의 항균능, 혈전용해능, 효소역가들, 정장제제로서의 기능들이 해당되고 장류발효에 관여하는 *Aspergillus* 속이나 *Rhizopus* 속 곰팡이들에 대한 연구들도 여러 분야에서 이루어지고 있다.

발효식품들로부터 여러 균들을 분리하고 특성들을 조사한 후 바람직한 특성들을 지닌 균주들을 사람과 동물의 건강개선을 위한 정장제제 (Probiotics)로 활용하는 연구들이 최근 활발히 진행되고 있다. PubMed database를 “Probiotics”로 검색하면 12,961 편 논문이 검색되고 2015년에만 1,000 편이 보고될 정도로 활발히 연구 수행이 이루어지고 있다. 최근 과학계의 관심이 큰 “Human Microbiome” 연구 결과들도 장내미생물에 대한 관심을 높여서 장기적으로 probiotics 제품들에 대한 수요를 증가시킬 것이 예상된다. 현재 정장제제로 이용되는 균주들은 유산균 (lactic acid bacteria)와 Bifidobacteria들이 대부분이고 일부 *Bacillus* 균주들도 활용되고 있다 (Cutting 2011). Probiotics 균주들이 부여하는 여러 건강증진 효과들을 확실히 누릴려면 인체의 장내에서 성공적으로 증식할 수 있는 특성들을 지닌 균주들을 선발, 사용해야한다. Probiotics 들이 지녀야할 특성들로 산과 담즙산에 대한 높은 저항성, 상피세포 흡착능력, 유용한 효소활성 보유, 항생제 민감성, 콜레스테롤 흡착능력, 면역증강능 등이 포함된다. 각종 발효식품들로부터 분리한 균주들에 대해 산 내성, Caco-2 세포주 등을 이용한 세포 흡착능, 항생제 민감성 등을 조사하여 probiotics로 유망해 보이는 균주들을 선발한다 (Lee 등, 2014).

Probiotics 들의 개량을 위해서는 균주들의 유전정보 파악이 중요하다. 이 때문에 치즈나 요구르트 제조시 종균으로 사용되는 유산균주들과 probiotics로 알려진 균주들을 대상으로 한 genome project는 오래전에 시작되어 이미 많은 균주들이 완료되어 있다. 급속히 발전하는 차세대 DNA 염기서열결정법 (Next generation DNA sequencing)은 짧은 시간에 적은 비용으로 균주들의 Genome 염기서열 결정을 가능케 해서 다양한 균주들을 대상으로 probiotics 적합성 조사나 혹은 이미 probiotics로 사용되는 균주들에 대한 검토나 개량을 용이하게 하고 있다. 한 예로서 독소생성균으로 알려진 *Bacillus cereus* 들중에는 동물의 probiotics로 사용되는 경우도 있다. 해당 균주의 probiotics 적합성 여부를 판단하기 위해서는 genome 분석을 통해서 독소 유전자들의 존재여부를 파악하는 것이 필요하다.

전 세계적으로 식품 안전성 확보가 심각한 현안이 되고 있다. 식품에서 식중독 균들의 증식을 줄이는 한 가지 방법은 식용에 안전하면서 (GRAS) 유해균이나 식중독균 증식을 억제할 수 있는 균들을 찾아서 이들을 식품에 접종하는 것이다. 항균력을 지닌 균주 접종은 식품 안전성을 확보하기 위해 식품의 온도나 pH를 조절하는 방안들과 함께 Hurdle 중 하나로 활용될 수 있다. 유산균인 *Lactococcus lactis*가 생산하는 박테리오신인 nisin은 가장 대표적인 GRAS 항균물질로 식품에 첨가될 경우 *B. cereus*, *Listeria monocytogenes* 등 유해균 증식을 억제한다. Nisin은 현재 시판되고 있으나 식품보존제로 상업화에 성공한 박테리오신들은 극 소수이다. 식품보존제로서 박테리오신은 여러 장점들을 지니고 있어서 전 세계적으로 유산균과 *Bacillus*를 대상으로 박테리오신 탐색 연구가 매우 활발하다.

항균력을 지닌 균주를 치즈, sauerkraut, 김치, 청국장, 된장 등 각종 발효식품들로부터 분리하고 항균물질을 분리 정제한 후 상세한 특성들을 조사한 실험결과들이 많이 보고되었다. 그러나 박테리오신들의 낮은 안정성, 좁은 저해 스펙트럼, 낮은 생산수율들은 산업화에 큰 장애가

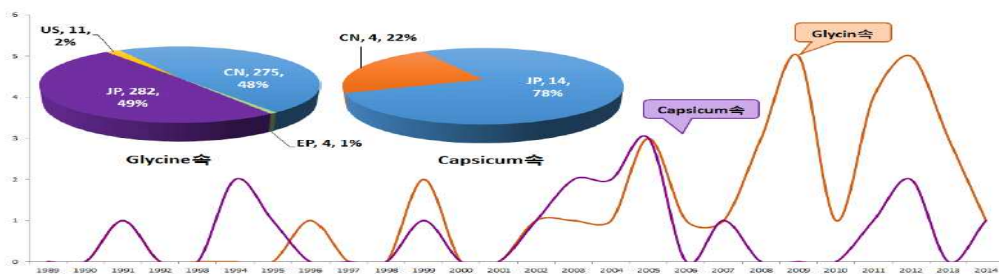
되고 있다. 인공합성된 보존제들에 대한 소비자들의 의구심이 커질수록 박테리오신을 보존제로 개발할 필요성이 증가한다. 이런 점에서 박테리오신들과 그 외 비단백질성 항균물질들에 대한 연구는 지속될 것이다. 대사공학과 유전공학, 단백질공학 기술들의 발전은 박테리오신의 문제점들인 낮은 안정성과 생산수율을 크게 개선할 수 있게 해주어서 이 분야의 연구들도 활발히 진행되고 있다 (Gálvez 등, 2007). 유산균과 함께 GRAS 균으로 분류되는 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*들이 만드는 항균물질들에 관한 연구도 활발하다. 이들 균주들은 박테리오신 생산외에 surfactin, fengycin, iturin 등의 lipopeptide들도 여러종 생산한다. 실제로 Bacillus 균주들은 다양한 항균, 항진균 물질들을 생산하여 식품보존뿐 만 아니라 식물 병들을 유발하는 곰팡이들을 억제하는 생물농약으로도 활용되고 있다. *Bacillus* 들이 생산하는 다양한 항균물질들의 구조 결정, genome에 위치한 해당 유전자들의 클로닝, 유전공학, 대사공학 기법들을 이용한 항균물질 특성 개량과 생산수율 개선연구들이 진행되고 있다.

*Bacillus*들이 분비하는 혈전용해효소 관련 연구들도 주로 한국, 일본, 중국에서 수행되고 있다. 혈전용해효소를 생산하는 bacilli들을 이용한 대두발효식품들의 생산과 소비가 주로 동아시아에서 이루어 지기 때문이다. Nattokinase와 이와 유사한 특성을 지닌 혈전용해효소들은 혈전(fibrin)을 직접 용해할 수 있기 때문에 정제된 효소는 혈전에 기인하는 혈관계 질환을 치료 혹은 예방하는 대체 치료제로 그리고 건강기능 식품으로 판매되고 있다. 혈전용해효소를 함유한 발효식품들을 섭취하는 것도 효과가 있을 것으로 예상된다. 치료제나 기능성 식품의 주된 구성분으로 혈전용해효소를 사용하기 위해서는 효소의 온도, pH 안정성을 개선할 필요가 있다. 동시에 혈전용해능도 향상되는 것이 바람직하다. 혈전용해효소들의 안정성, 혈전용해능력을 개선하는 연구들 중 하나는 X-ray 분석을 통해서 혈전용해효소의 구조를 해석하고 그 결과에 기초해서 안정성 혹은 효소역가에 중요한 아미노산들을 site-directed mutagenesis 방법으로 치환하는 것이다. 이렇게 얻은 변이주들의 효소 활성과 안정성 조사들이 이루어졌다 (Dabbagh 등, 2014).

제 2 절 특허

장류와 관련한 해외 출원인의 특허 출원 동향은 1990년대 초반부터 증감을 반복하였으나 대체로 증가하는 경향을 보였으며, 2011년부터 출원 건수가 급격히 증가하였고, 출원인을 기준으로 할 때 일본 출원인의 비중이 높으며, 다음으로 중국에서 장류 관련 특허가 활발히 이루어지고 있음을 알 수 있음.

가. 간장과 관련한 국제 특허는 2015년 현재 미국이 15건, 유럽이 23건, PCT 3건, 일본 123건 중국이 26건으로 일본이 가장 높은 건수를 보유하고 있음.



장류의 생물자원종 관련 해외 출원인의 특허 동향

- (1). 해외 출원인들이 사용하고 있는 생물자원종도 한국의 경우와 동일하게 *Capsicum* 속과 *Glycine* 속의 사용 비율이 높으며 이 두 종의 모두 일본과 중국의 출원 비중이 높아 아시아 국가들의 장류 관련 연구에서 이들 균주가 가장 활발하게 사용됨을 알 수 있음

(2). 일본은 간장의 제조방법에 대한 특허가 주를 이루고 있으며 중국은 해산물을 활용한 간장 제조 방법에 대한 내용이 주를 이루며, 미국은 소스류로 등록이 몇몇 건이 있으며 Koji produced from soybean hypocotyl, preparation method there of, and soy hypocotyl products prepared from said koji (미국 특허, 2002)에서는 코지를 기관으로서 콩에 여러 균을 접종 시켜 간장제조에 관한 논문들이 있음.

(3). 국외의 특허는 간장 제조에 있어 국내에서처럼 콩을 주재료로 활용하지 않고 어류 등 다양한 단백질원과 균을 사용한 소스류와 관련한 연구를 진행하고 있음

나. 중국 간장시장 현황 (출처 2004 한국보건산업진흥원)

(1). 중국 간장 생산 현황

중국의 간장은 제조방법에 따라 양조간장과 배합간장으로 구분되며 양조간장은 전통적 방법에 따라 보리·밀을 원료로 발효 과정을 거치고 배합간장은 양조간장에 염수 등을 희석한 화학간장으로 낮은 단가로 대량생산하고 있음.

(2). 간장의 종류는 원료 배합비율, 양조간장, 발효온도에 따라 콩과 보리가 1대 1인 농구간장, 보리가 20% 이하인 담구 간장, 보리 80%에 콩 20%인 백 간장 등이 있으며 농구간장의 생산량이 가장 많고 진공건조법에 의해 생산되는 분말간장은 사발면 등의 국물 재료로 사용됨.

(3). 식용방법에 따라 노추와 생추로 구분하며 노추간장은 색과 맛이 진하여 일반적으로 요리시 조미와 색을 입히는데 사용되고 생추간장은 색이 진하지 않고 맛이 담백한 간장을 식사시 사용하는데 한국으로 보면 노추는 조선간장, 생추는 진간장과 조미간장에 해당됨

(4). 중국은 음식을 요리할 때 색, 향, 미, 형을 중요시 하는데 중국 간장의 주요 용도는 색과 향기, 짠맛을 가미하는 것으로 간장의 색과 맛을 중요시해 한국의 간장이 단색을 맛 위주로 하는 것과는 차이가 있음.

다. 중국 장류시장 현황 및 진출전략 (출처 : 베이징 aT 센터)

(1). 시장현황 : 2013년 중국 조미료시장 규모는 2,149억 위안으로 추산되며, 이중 장류시장 규모는 100억 위안에 달함. 장류시장은 소비자의 다양한 입맛을 만족시키기 위해 더욱 세분되고 있으며, 특히 중고급 장류시장 전망이 낙관적임.

(2). 중국인들의 소비의식이 향상됨에 따라 우수한 품질의 장류 제품을 더욱 합리적으로 구매하고자 하는 계층이 증가하면서 장류시장의 중·고급제품 성장 가능성 높음.

(3). 간장의 경우 2013년 1 L에 16 위안이 넘는 간장이 전체 간장시장의 25%에 달하며, 고가 간장을 구매하는 소비자가 2012년 대비 16% 증가 소비자가 장류 구매 시 맛, 원료, 가격, 브랜드 및 포장 중에서 맛이 결정적인 작용을 함

(4). 장류 구매목적이 입맛을 돋우기 위한 것으로 맛이 구매요인 중 55.5%를 차지하며, 다음은 사용하는 원료가 14%를 차지.

(5). 현재 시중에 유통되는 장류 브랜드가 여타 조미료에 비해 적어 브랜드에 대해서 크게 고려하지 않으며, 포장요인은 2.7%로 크게 주목하지 않는 편임.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당 사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

1 절 경상대학교

경상대학교 본부 차원에서 아래 계획들을 수립, 운용하고 있음. 유사한 프로그램들을 경북대학교와 경남과학기술대학은 수립, 운용하고 있음. 남해마늘연구소는 아래 별도 기술.

가. 연구실 안전 관리 계획

1) 위험인자 분석

- 화학 분야 : 사용 시약의 특성별 위험요소 확인 및 안전표지 부착
- 생물 분야 : 병원균 미생물 및 바이러스 등 인체 유해물질 확인 및 안전표지 부착
- 기타 분야 : 전기, 기계, 환기, 폐기물 등 연구실내 위험, 유해인자 확인 및 개선

2) 안전 교육

- 자체교육 : 월 1 회 이상 연구실 자체 안전교육 실시(위험물질 취급요령, 보호구 착용 등)
- 정기교육 : 반기 1회, 학교주관 연구실안전교육 참석(연구과제 참여자 전원)

3) 안전점검

- 일일점검 : 매일 연구실책임자 및 연구실종사자가 실시 및 기록
- 정기점검 : 연구실안전팀에서 년 2회 측정장비 등을 이용하여 연구실내 불안전사항 점검 실시
- 특별점검 : 연구실 안전사고 발생 시 점검을 실시하여 문제점 개선 및 재발방지 계획 수립

2) 실험실 정밀안전진단 실시

- 대상 : 유해화학물질을 취급하는 연구실, 유해인자를 취급하는 연구실, 독성가스를 취급하는 연구실
- 실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고

나. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
연구실 안전보험	사망/후유장해 : 1억 원/인	연구활동종사자 (학생, 수료생, 연구원등)	안전관리실
	상해 치료비 : 1천만 원/인 한도		"
경영자배상책임보험	사망/후유장해 : 2억 원/인	재학생, (학부생, 대학원생)	학생과
	상해 치료비 : 2백만 원/인		
	대물배상책임: 2백만 원/인		
산업재해보상보험	사망/후유장해 : 관련 법률에 정한 기준	과제참여자 (재학생 제외)	산학협력단
	상해 치료비 : 무한		
공무원연금보험	사망/후유장해 : 관련 법률에 정한 기준	공무원 (교수, 직원)	교무과, 총무과
	상해 치료비 : 무한		

다. 추가 이행 계획

1) 실험종사자 건강검진 실시	유해물질 노출 여부 검사 특수 건강검진 실시
2) 실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립
3) 실험실 환경개선공사	노후 실험실 개선공사 시행
4) 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치	특수소화기 설치(금속하재 전용 소화기 등)
5) 유기용매 별도 보관	실험실외부 보관창고 보관, 필요시 운반 사용
6) 실험실 환경안전지침 게시	실험실 특성에 맞는 안전수칙 게시(장비사용 등)
7) 고압가스 안전관리	용기고정장치 설치, 경보기 설치, 노후가스 용기 폐기
8) 안전보호장비 시설 보완	응급샤워기, 응급세안기, 응급구급함 등

2 절 남해마늘연구소

1. 연구실 안전관리 규정 신규 제정 : 2014. 9. 12
2. 연구실 안전관리 교육
 - 일자 : 2014. 13. 02. 9:00~13:00 (4시간)
 - 대상 : 남해마늘연구소 전 직원
 - 강사 : 국가과학기술인력개발원 외부강사(인제대학교 박미정 팀장)
 - 교육내용 : 연구실 안전법 입법취지와 개정안 소개
안전관리 실태, 주의사항, 점검사항 및 타 기관의 사례

제 9장 참고문헌

- Alma, M. H., Mavi, A., Yildirim, A., Digrak, M., & Hirata, T. 2003. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 1725 - 1729
- Ann YG. 2011. Changes in components and peptides during fermentation of *Chunggukjang*. *Korean J Food Nutr* 24: 124-131.
- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 239(1):70-76
- Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. 2011. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp*. 53, pii: 2920
- Cadwell R.C. and G. F. Joyce. 1994. Mutagenic PCR. *Genome Res*. 3: S136-S140.
- Chang M., H. C. Chang. 2012 Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp. *Int. J. Food Microbiol*. 153: 269-274.
- Cho KM, Ha TJ, Lee YB, Seo WD, Kim JY, Ryu HW, Jeong SH, Kang YM, Lee JH. 2013. Soluble phenolics and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* L.) cultivars with varying seed coat colours. *J. Funct. Foods* 5: 1065-1076.
- Cho KM, Hong SY, Math RK, Lee JH, Kambiranda DM, Kim JM, Islam SMA, Yun MG, Cho JJ, Lim WJ, Yun HD. 2009. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of *cheonggukjang* by *Bacillus pumilus* HY1. *Food Chem*. 114: 413-419.
- Cho KM, Lee JH, Yun HD, Ahn BY, Kim H, Seo WT. 2011. Changes of phytochemical constituents (isoflavone, flavanols, and phenolic acids) during cheonggukjang soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. *J. Food Comp. Anal*. 24: 402-410.
- Cho, M. J., Cho, J. Y. Lee, and J. H. Kim. 2014. Microbial and physiochemical properties of Cheonggukjang fermented using *Bacillus* strains with antibacterial or antifungal activities. *Food Sci. Biotechnol*. 23(5): 1525-1532.
- Cho, M. J., J. Y. Lee, K. W. Lee, K. M. Cho, C. K. Lee, G. M. Kim, J. H. Shin, J. S. Kim and J. H. Kim. 2014. Properties of Doenjang (Soybean Paste) fermented with multiple starters. *농업생명과학연구* 48(6): 291-300.
- Choi YM, Kim YS, Ra KS, Suh HJ. 2007. Characteristics of fermentation and bioavailability of isoflavones in Korean soybean paste (*doenjang*) with application of *Bacillus sp.* KH-15. *International Journal of Food of Technology*. 42, 1497-1503.

- Cotton E., M. Cotton. 2005. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 63: 296-304.
- Cutting S.M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 28(2): 214-220.
- Dabbagh F, M. Negahdaripour, A. Berenjian, A. Behfar, F. Mohammadi, M. Zamani, C. Irajie, Y. Ghasemi. 2014. Nattokinase: production and application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 9199-9206.
- Ehling-Schulz M., M.-H. Guinebretiere, A. Monthan, O. Berge, M. Fricker, and B. Svensson. 2006. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 232-240.
- Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL. 1999. Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between α - and 1 -adrenoceptors. *J. Neurosci.* 19: 5119-5123.
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-243.
- Gálvez A., H. Abriouel, R. L. López, N. B. Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51-70.
- Heo K., K. M. Cho, C. K. Lee, G. M. Kim, J.-H. Shin, J. S. Kim, and J. H. Kim. 2013. Characterization of a fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* CB1 and its gene cloning. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23(7): 974-983.
- Jeong S. J., G. H. Kwon, J. Chun, J.-S. Kim, C.-S. Park, D. Y. Kwon, and J. H. Kim. 2007. Cloning of fibrinolytic enzyme gene from *Bacillus subtilis* isolated from Cheonggukjang and its expression in protease-deficient *Bacillus subtilis* strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(6): 1018-1023.
- Jeong S. J., K. Heo, J. Y. Park, K. W. Lee, J.-Y. Park, S. H. Joo, and J. H. Kim. 2015. Characterization of AprE176, a Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* HK176. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(1): 89-97.
- Jo H.-D., H. A Lee, S.-J Jeong, and J. H. Kim. 2011. Purification and Characterization of a major fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* MJ5-41 isolated from Meju. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(11): 1166-1173
- Kenneth D. R. Setchell K. D. R. and C. Clerici. 2010. Equol: history, chemistry, and formation. *J. Nutr. Supplement (Equol, Soy, and Menopause)*: 1355S-1362S.
- Kim, G. M., G.-H. Kwon, A. R. Lee, K. W. Lee, J.-Y. Park, J. Cha, Y.-S. Song, and J. H. Kim. 2009. Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from Cheonggukjang. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(9): 997-1004.
- Kim JR, Kim YK, Kim DH. 2013. Effects of Anti-Microbial Materials on Storages of Low

Salted *Doenjang*. *J. Korean Soci. Food Sci. Nutri.* 42(11), 1864–1871.

Kim TW, Lee JH, Kim SE, Park MH, Chang HC, Kim HY. 2009. Analysis of microbial communities in *doenjang*, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR–denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 265–271.

Kim YS, Jeong DY, Hwang YT, Uhm TB. 2011. Bacterial Community Profiling during the Manufacturing Process of Traditional Soybean Paste by Pyrosequencing Method. *Kor. J. Microbiol.* 47: 275–280.

Korean Food Standard Codex. 2010. KFDA, 10. General test methods, Korean Food Drug Administration. Seoul. Korea.

Kwak CS, Lee MS, Park SC. 2007. Higher antioxidant properties of *Chungkookjang*, a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. *Nut. Research* 27, 719–727.

Kindoli S., H. A Lee, and J. H. Kim. 2012. Properties of Bac W42, a bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* W42 isolated from *Cheonggukjang*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(8): 1092–1100.

Kurihara H, Fukami H, Asami S. 2004. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Biological & pharmaceutical bulletin.* 27(7):1093–1098

Kwon G.-H., H.-A Lee, J.-Y. Park, J. S. Kim, J. Lim, C.-S. Park, D. Y. Kwon, Y.-S. Kim, and J. H. Kim. 2009. Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *Int. J. Food Microbiol.* 129: 282–287.

Lee H. A and J. H. Kim. 2012. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* strains with antifungal activities from *Meju*, *Prev. Nutri. Food, Sci.* 17(1): 64–70.

Lee K. W., J. Y. Park, H. D. Sa, J. H. Jeong, D. E. Jin, H. J. Heo, and J. H. Kim. 2014. Probiotic properties of *Pediococcus* strains isolated from jeotgals, salted and fermented Korean sea-food. *Anaerobe* 28: 199–206.

Lee M. R., J. Y. Kim, J. Chun, S. Park, H. J. Kim, J.-S. Kim, J.-I. Jeong, and J. H. Kim. 2010. Induction of glyceollins by fungal infection in varieties of Korean soybean. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(8): 1226–1229.

Melendez JA, Melathe RP, Rodriguez AM, Mazurkiewicz JE, Davies KJ. 1999. Nitric oxide enhances the manganese superoxide dismutase-dependent suppression of proliferation in HT-1080 fibrosarcoma cells. *Cell Growth Differ* 10:655–664

Mok CK, Song KT, Lee JY, Park YS, Lim SB. 2005. Change in microorganisms and enzyme activity of low salt soybean paste (*Doenjang*) during fermentation. *Food Eng. Prog.* 9: 112–117.

Park YH, Park SJ, Han GJ, Choe JS, Lee JY, Kang MS. 2012. Quality characteristics of pre-processed garlic during storage according to storage temperature. *Korean Soc Food Sci*

Nutr 41: 994-1001.

Re, Roberta; Pellegrini, Nicoletta; Proteggente, Anna; Pannala, Ananth; Rice-Evans, Catherine. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9-10): 1231-1237.

Rhee CH, Kim WC, Rhee IK, Park HD. 2008. Effects of inoculation of *Bacillus subtilis* cells on the fermentation of korea traditional soy paste. *J. Kor. Chem. Soc.* 15: 598-605.

Rice GC, Bump EA, Shrieve DC, Lee W, Kovacs M. 1986. Quantitative analysis of cellular glutathione by flow cytometry utilizing monochlorobimane: some applications to radiation and drug resistance in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 46(12 Pt 1):6105-10

Sarnyai Z, Sibille EL, Pavlides C, Fenster RJ, McEwen BS, Toth M. 2000. Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A* 97(26): 14731-14736.

Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci.* 22(8): 3251-3261.

Sumi H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43, 1110-1111.

Weber D1, Milkovic L, Bennett SJ, Griffiths HR, Zarkovic N, Grune T. 2013. Measurement of HNE-protein adducts in human plasma and serum by ELISA-Comparison of two primary antibodies. *Redox. Biol.* 1:226-33

고종민, 김현태, 윤홍태, 하태정, 백인열. 2011. 콩의 전성시대: 식품에서 문화까지. RDA Interroban, 35호.

이재용, 정선주, 조민정, 조계만, 김경민, 신정혜, 이창권, 김정상, 김정환 2014. 전통대두발효식품들에서 분리한 *Bacillus* 균주들의 혈전용해능. *농업생명과학연구* 48(2): 163-173.

조소연, 강인호, 심영훈, 양동혁, 오세욱, 이병희, 현성예, 장승엽, 정춘식, 이용수, 김영식, 강신정. 2007. 아플라톡신 오염 및 저감화 방안. *생약학회지* 38(3): 205-216.

[별첨 1]

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	복합중균과 마늘을 이용한 인지능력 개선과 안전성이 확보된 장류제조		
주관연구책임자	김정환	주관기관	경상대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
콩 발효식품 제조 및 발효를 통한 기능성 강화	일본, 대한민국	90	90	90	
콩 발효식품의 알츠하이머(AD) 보호 효과 및 그 작용기작 규명	미국	30	20	40	콩 및 콩 발효식품에 대한 연구는 초기단계임
동물모델을 이용한 기능성 평가 기술	미국	80	80	90	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	한국, 미국, 일본, 유럽
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 10년간
검색범위	장류(soybean fermentation food), 기능성 식품 (functional food), 알츠하이머(Alzheimer's disease), 기억력 개선 (memory improvement)

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		혈전용해능 향상	저염 장류 제조
Keyword		Nattokinase	Soybean fermented foods, low salt
검색건수		99	30
유효특허건수		4	3
핵심특허 및 관련성	특허명	브로멜라인 및 나토키나아제를 포함하는 정맥혈전성 상태의 예방 및 치료용 피브리린 용해성 조성물	저염 된장 제조방법 및 이에 의하여 제조된 저염 된장
	보유국	이탈리아	대한민국
	등록년도	2013년11월06일 (국제출원일자)	2012년08월14일 (출원일)
	관련성 (%)	60	50
	유사점	<i>B. subtilis</i> 균 배양액을 원료로 하여 혈전 치료효과가 있는 제품 개발을 시도한 점에서 유사함	증자 콩에 <i>Aspergillus oryzae</i> 또는 <i>Bacillus licheniformis</i> 또는 이들의 혼합균을 포함하는 배양액을 균질화시켜 분무 방식으로 접종
차이점	- 나토키나제와 브로멜라인만을 포함한 제품으로 발효식품 자체가 아닌 <i>B. subtilis</i> 균 배양에서 얻는 나토키나제와 파인애플에서 추출한 브로멜라인 혼합물인 점. - 약처럼 타블렛으로 제형화되어 섭취함.	단순히 저염된장 생산이 목적으로 복합종균의 기능성, 인지능력 개선은 연구되지 않았음.	

개발기술명		기능성 장류 제조	콩의 기억력 개선효과
Keyword		Soybean fermented foods, low salt	Soybean, memory improvement
검색건수		25	8
유효특허건수		2	1
핵심특허 및 관련성	특허명	장류의 유해 미생물에 대한 항균 활성 및 바이오제닉 아민 분해 활성이 있는 바실러스 리케니포미스 SCK B11 균주 및 이의 용도	청국장 또는 그의 추출물을 함유하는 치매의 예방 및 치료용 조성물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2014	2013.02.04
	관련성 (%)	60	70
	유사점	여러 유해균 억제하는 한종의 <i>Bacillus</i> 균주 선발 및 특성 조사	콩을 활용한 청국장을 유효성분으로 하는 치매 예방 및 개선용 건강기능식품
차이점	본 연구는 복합 종균을 이용한 기능성 저염 장류 제조 기술	<i>B. licheniformis</i> 균을 활용함. - 본 연구는 복합 종균을 이용하여, <i>Bacillus cereus</i> (독소 생성균)와 곰팡이 증식 억제 및 biogenic amine 생성을 최소화하여 장류 제품의 안전성을 추구함.	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한

- 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Pubmed DB(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), Science-direct(http://www.sciencedirect.com/), Kiss-krip(http://kiss.kstudy.com/), DBpia(http://www.dbpia.co.kr/index.asp)
검색기간	최근 5년간
검색범위	장류(soybean fermentation food), 저염(low-slat), 미늘장류 혈전용해능 (fibrinolytic activity), 기억력 개선 (memory improvement) 알츠하이머(Alzheimer's disease)

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	기능성 콩 발효식품의 작용 기전	콩 발효식품의 기억력 개선	
Keyword	fermented soybean, functional food	soybean, Alzheimer's	
검색건수	40(국외), 18(국내)	23(국외), 3(국내)	
유효논문건수	1(국외), 0(국내)	3(국외), 1(국내)	
핵심논문 및 관련성	논문명	Neuroprotective effects of fermented soybean products (Cheonggukjang) manufactured by mixed culture of Bacillus subtilis MC31 and Lactobacillus sakei 383 on trimethyltin-induced cognitive defects in mice	
	학술지명	Eur J Nutr	Nutr Neurosci
	저자	Yang HJ 외 10명	Go J 외 8명
	게재년도	2015	2015
	관련성(%)	30%	30
	유사점	B. licheniformis로 발효한 콩의 인지능과 혈당항상성 개선 효능 연구	고초균과 젖산균으로 발효한 콩의 신경 보호 효과 연구
차이점	본 연구는 복합 종균을 이용한 전통 발효 장류의 항노화, 인지능 개선 활성을 규명	- 본 연구팀은 콩 발효식품, 특히 복합 종균에 의해 발효된 장류의 인지능 개선효과를 연구하고자함.	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

개발기술명		혈전용해효소	저염 콩 발효식품 제조 및 기능성 대사체 변화 양상 규명
Keyword		fibrinolytic enzymes	장류(Soybean fermented foods), 생물전환(Bioconversion), 기능성 대사체(Functional metabolites)
검색건수		22,521	4,900
유효논문건수		200	179
핵심논문 및 관련성	논문명	Thrombolytic effects in vivo of nattokinase in a carrageenan-induced rat model of thrombosis.	High Expression of β -Glucosidase in Bifidobacterium bifidum BGN4 and Application in Conversion of Isoflavone Glucosides During Fermentation of Soy Milk
	학술지명	Acta Haematology	J. Microbiol. Biotechnol.
	저자	Xu J. · Du M. · Yang X. · Chen Q. · Chen H. · Lin D.-H.	You, HJ외 4인
	게재년도	2014	2015
	관련성 (%)	60	50
	유사점	<i>Bacillus</i> 균주들이 분비하는 혈전용해효소의 혈전용해능을 이용하고자 하는 점.	두유중의 isoflavone들의 생전환을 통해 기능이 개선된 두유 제조 가능성을 조사함.
	차이점	본 연구는 nattokinase와 유사한 역가를 지닌, 다양한 혈전용해효소들을 조사하고 이중 가장 활성이 우수한 균주로부터 해당 효소를 정제하여 특성을 조사하는 점에서 차이가 있음. 상업화된 Nattokinase보다는 활성은 비슷하지만 다른 효소들을 한국 전통발효식품들에서 찾아서 개발하는 방안에 주안점을 둘 예정임.	효소원으로 <i>Bacillus</i> 가 아닌 <i>Bifidobacterium bifidum</i> 을 이용했고 isoflavone 배당체들의 비배당체로의 전환만 조사함. 다른 기능성들에 대한 조사는 없음.

개발기술명		마늘을 첨가한 기능성, 저염 장류 개발 및 품질특성 규명	
Keyword		마늘, 저염된장, 청국장, 품질특성(이화학적 특성, 미생물 특성)	
검색건수		294(국내), 5(국외)	
유효논문건수		14(국내), 0(국외)	
핵심논문 및 관련성	논문명	흑마늘 첨가에 따른 청국장의 항산화 및 아미노산의 변화	흑마늘의 항산화, 항균 및 항혈전 활성
	학술지명	한국식품저장유통학회지	Korean J microbiol. Biotechnol.
	저자	정태성외 4인	정인창 손호용
	게재년도	2013	2014
	관련성(%)	60%	60%
	유사점	흑마늘 첨가에 따른 청국장 기능성과 기호성 개선 가능성 조사 연구	흑마늘의 기능성 식품소재로서의 활용을 위한 기능성들 검토
	차이점	복합종균 사용하지 않고 벗짚을 사용하여 발효균은 완전히 다름.	흑마늘 자체의 특성을 조사하고 장류에서는 조사하지 않음.
핵심논문 및 관련성	논문명	미더덕 껍질, 뽕잎, 양과 추출물을 첨가한 항고혈압 저염간장의 제조 및 특성	GABA 함량이 높은 청국장을 발효하는 균주의 분리 및 동정
	학술지명	한국식품영양과학회지	생명과학회지
	저자	신유진외 5인	만소연 외 6인
	게재년도	2014	2013
	관련성(%)	50%	50%
	유사점	식물 추출물 첨가를 통한 기능성 저염 간장의 제조와 특성 조사	기능성 물질 (GABA) 생성 Bacillus subtilis 균 분리 및 청국장 제조에 활용 가능성 조사
	차이점	흑마늘이 아니고 복합종균도 사용하지 않음. 기능성의 대상도 항고혈압과 항산화 활성을 조사함.	기능성은 가바 생성에 맞추어져 있고 복합종균은 사용 고려되지 않음. 성격이 다른 균주 사용함.

4. 제품(사업화)

대상국가	대한민국
과제 DB	농림수산물식품 연구개발사업 통합정보서비스 (http://www.fris.go.kr/)
검색기간	최근 5년간 (2010.09.01-2015.08.31)
검색범위	전통 장류(traditional soybean paste), 발효 (fermentation), 기능성 식품 (functional food)

개발기술명		기능성 전통 장류 제품 개발	콩 발효식품 개발
Keyword		전통 장류	콩, 발효식품
검색건수		8	26
유효과제건수		2	8
핵심과제 및 관련성	과제명	기능성 전통장류제품 생산공정 최적화 및 상품화	콩 유래 효능맞춤형 파이토케미컬 대사체의 기능성 소재 적용 연구
	총연구기간	2013-11-20 ~ 2016-11-19	2013-02-01 ~ 2014-12-31
	발주기관	농림수산물식품기술기획평가원	농촌진흥청
	주관연구 기관	농업회사법인순창문옥레식품주식회 사	서울대학교
	관련성 (%)	30	30
	유사점	저염전통장류 개발 및 향토 자원의 기능성 발굴	콩 유래 효능맞춤형 기능성 소재 개 발 연구
차이점	본 연구는 콩 발효식품의 기억력 개선, 치매 예방 기능성 및 안전성을 주된 목표로 함.	콩 유래 파이토케미컬 대사체의 기 능성을 연구, 콩 대사체 함유 음료 개발 및 안정성을 확인함. 본 연구는 복합 균주를 활용한 전통 장류의 기능성을 탐색함.	

5. 제품 및 시장 분석 (최신의 자료로 작성하되, 반드시 출처 명시)

가. 생산 및 시장현황

1. 국내 장류 시장 현황

- 장류의 출하량은 2010년을 기준으로 55만톤, 출하액은 9,114억원으로 2000년부터 평균 6%의 성장을 보였는데, 시장 규모는 약 6조원으로 추정되며, 지역별 출하액은 충남이 28.9%로 가장 높고, 경남은 5.1%로 4위 수준임

장류의 연도별 생산실적 현황

연도	생산현황		수출현황	
	생산량(T)	생산액(천원)	수출량(T)	수출액(\$)
2008	654,030	681,068,248	19,194	30,293,323
2009	631,030	728,174,851	21,208	28,982,492
2010	636,753	702,971,023	20,630	29,657,991
2011	618,083	744,257,578	25,535	30,945,262
2012	613,933	888,523,941	24,161	37,586,479
2013	621,764	783,681,183	23,970	40,105,932

자료 : 식품의약품안전처 통계자료

- 2012년 장류 시장은 출하액 기준으로 약 9,800억원 규모이며 장류 세분시장별로는 고추장이 약 3,000억원, 된장이 약 1,500억원, 간장이 약 2,800억원 수준임
- 출하액 비중으로 보면, 고추장이 32.4%로 가장 많고, 간장이 31.9%, 된장류는 14.3%의 출하 비중을 가짐.
- 출하액을 기준으로 한 장류 시장의 연평균 성장률은 3.3%로 전체 식품군 평균 성장률 9.9% 보다 낮은 수준을 보이고 있는데 이와 같이 성장률이 낮은 것은 장류 시장이 성숙기에 들어섰기 때문인 것으로 판단됨
- 2013년을 기준으로 최근 10년간 간장, 된장, 고추장과 같은 전통장류의 수출은 2.5배 증가하였고, 연평균 수출 증가율은 10.7%로 성장세이며, 수출 대상국가도 57개국에서 81개국으로 확대되고 있는 추세인데, 고추장이 3배, 간장이 2.4배, 된장은 1.5배 수출 규모가 확대되었음 (관세청 보도자료)
- 된장은 2013년을 기점으로 최근 10년간 수출시장이 1.5배 확대되었으며, 규모는 연평균 4.8%씩 성장하였고, 수출대상국이 33개국에서 63개국으로 1.9배가 증가하였음

된장의 수출 동향

구분	연도	2003년	2006년	2009년	2012년		
						'03 대비	연평균증가율
수출량(톤)		2,541	4,753	3,482	3,619	(42.4)	(4.0)
수출액(천불)		4,074	8,945	5,583	6,231	(52.9)	(4.8)
수출대상국(개)		33	45	54	63	(90.9)	

- 간장 시장 규모 및 추이
 - 국내 간장 시장 규모는 2012년 판매액 기준 약 2,095억원 수준이며 2010년 1,937억원에서 2011년 2,037억원, 2012년 2,095억원으로 꾸준히 성장하며 반면, 판매량은 2010년 51,353 KL에서 2011년 49,783 KL로 1,570 KL가 감소한 데 이어 2012년에는 48,029 KL로 1,754 KL가 감소하였음

간장의 시장 판매액 및 판매량 추이

구분	2010년	2011년	2012년
판매액 (백만원)	193,738	203,729	209,450
판매량 (톤)	51,353	49,783	48,029
KL 당 판매액 (원/KL)	3,773	4,092	4,361

- 간장 특성별(타입 및 용량) 현황 : 간장 타입별 판매액 점유율은 2012년 기준 혼합간장이 53.5%, 양조간장 36.5%, 국간장 5.7%, 조림간장 4.3%의 순서를 보이며 국간장의 점유율이 증가한 반면, 조림간장의 점유율은 감소하여 2011년을 기점으로 점유율의 역전을 보이고 있음
- 간장의 수출 동향을 보면 2013년을 기준으로 최근 10년간 수출시장이 2.4배 확대되었고, 수출 대상국이 45개국에서 62개국으로 약 1.4배 확대되면서 수출규모도 연평균 10.5%씩 증가하였음

간장의 수출 동향

구분	연도	2003년	2006년	2009년	2012년		
						'03 대비	연평균증가율
수출량(톤)		5,401	7,451	9,933	11,124	(105.9)	(8.4)
수출액(천불)		5,659	9,184	11,733	13,864	(145.0)	(10.5)
수출대상국(개)		45	48	55	62	(37.8)	

● 건강기능성 식품- 식품의약품안전청 홈페이지 참조 (2015. 09 현재)

<http://www.foodnara.go.kr/hfoodi/>

- 콩이나 발효콩, 콩성분을 이용하여 50여건이 건강기능식품으로 등록되어 있음. 예를 들어, 대두올리고당, 대두식이섬유 (장 건강, 콜레스테롤 개선), 콩 발효추출물(식후혈당조절), 대두이소플라본 (관절/뼈 건강), 대두식이섬유, 대두단백 (콜레스테롤 개선), 나토배양물 (혈행개선), 대두레시틴 (콜레스테롤 개선), 대두효소 (체질개선), 등이 인정되어 있음.
- 혈행개선 기능으로 나토배양물, 은행잎추출물, 정어리정제어유, 정제오징어유, 프랑스해안 송껍질추출물, 홍삼농축액, DHA농축유지 7 종이 개별인증을 받았고 고시형으로는 감마리놀렌산 함유 유지와 영지버섯 자실체 추출물 2 종이 등록되어 있다.
- 기억력개선 효능으로 피브로인효소가수분해물, 원지추출분말, 홍삼 3 종이 등록되어 있음.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

● Nattokinase 함유제품들의 효능이 알려지면서 혈전치료제들의 대체제인 치료제로 투여하거나 또는 건강보조식품으로 일상적으로 섭취하는 것에 대한 홍보 및 소비가 점진적으로 증가하고 있음. 기존 혈전치료제들 대신 투여할 경우 의사 처방이 필요함. 아직까지 치료제로서의 효능에 관한 충분한 임상 결과들은 미흡한 형평임. 이 때문에 건강기능성식품으로 섭취가 장점

이 잇을 것으로 보임. 국내에서도 몇 종류의 nattokinase 제품들이 출시되고 있으나 아직까지 제품별 비교나 효능에 관한 자료들은 크게 부족한 실정임. 심혈관, 뇌혈관 환자들의 수가 많고 고령화에 수반되는 치매나 인지능력 감소 문제도 계속 커지고 있어 관련 증상을 완화내지 예방하는 효과를 지닌 기능성 식품이나 소재들의 개발 필요성은 계속 증가하고 있음.

● 마늘 시장개요

대한민국 성인 1인당 연평균 8.7 kg을 소비하고 한국 식단에서 빠질 수 없는 음식재료이며 양념이나 가공식품으로 개발이 가속화되고 있음.

2000년 6월 중국산 냉동마늘과 초산조제 마늘의 관세율을 30%에서 315%로 대폭 올리는 세이프가드 조치를 취한 한중 마늘분쟁을 시작으로 현재까지 중국산 마늘의 수입이 계속 이루어짐에 따라 일반 소비자는 물론 학교 급식업체나 김치공장 등에서도 가격이 저렴한 중국 마늘을 선호하게 되면서 우리 마늘이 큰 타격을 받고 있음.

우리나라에서 마늘은 대표적인 환금성 작물로서 다수의 영세 농가가 소량씩 재배, 출하하고 있어 원가 경쟁력이 낮고 그에 따라 상품화도 원활히 추진되지 못하고 있음. 마늘 생산비중 가장 큰 비중을 차지하는 종구비는 아직 매우 높은 수준을 보이고 있고 노동비 또한 매우 높은 수준임.

우리나라 마늘 생산농가의 평균 경작 면적은 700평 정도로 중국에 비해 협소하며 기계화가 이루어지지 않은 것이 과도한 생산비의 원인이 되고 있음. 2002년 이후 추진된 마늘 산업 발전 대책에서도 기계화는 생산의 영세성 때문에 큰 효과를 보지 못하고 있는 상황임.

● 국외 마늘산업 시장동향

세계의 마늘 생산량은 300 만톤을 넘는데 중국, 한국, 인도를 포함한 아시아 지역 생산량이 세계 생산량의 65%로 아시아가 생산을 주도함. 이중 30%가 중국에서 생산되며, 과거 25년 동안 마늘의 생산 실적을 보면 스페인은 2 배, 이집트, 멕시코, 브라질은 3 배, 미국은 4 배 정도 증가하였음.

● 마늘 및 가공품의 value chain

2008년 기준으로 가공마늘의 양은 33,809 톤이며, 이 중 깐마늘이 92.10%에 달하고, 깐마늘 외 가공품의 생산은 7.9%로 아주 미미한 수준임. 가공품에서는 마늘 추출액과 흑마늘 가공품의 비중이 약 46% 수준임. 마늘 생산과 소비의 안정화를 위해서는 다양한 가공제품들의 개발이 필수적이며 특히 발효기술과 생물전환 기술 도입을 통해 제품에 고 기능성 부여를 통한 고부가 제품 개발을 위한 연구들이 필요함.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 본 과제에서 개발을 목표로 하는 제품은 순수 100% 국내산 콩 이용 복합 중균기술을 통한 프리미엄급 된장, 간장 제품들로 참여 업체에서 타사와 구별되는 기술력을 확보함으로써 여러 타사 제품들과의 치열한 경쟁에서도 우위를 점할 수 있을 것이며 대량 생산될 경우 국내 소비외 수출도 가능할 것으로 기대됨.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	-	-	-	500	1000	1500
경제적 파급효과	-	-	100	300	500	900
부가가치 창출액	-	-	100	500	1000	1600
합 계	0	0	200	1300	2500	4000

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

6. 3P(특허, 논문, 제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 추가 연구계획 (특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 방사선조사/버섯균사체 이용/부재료 첨가를 통한 저염 장류 개발 분야에 치중되어 있으나, 본 연구는 순수 100% 국내산 콩 이용 복합종균기술을 이용하여 저염 장류, 흑마늘 혹은 흑마늘추출액을 첨가한 고품질 간장 제품들 상업화를 목표로 추가 연구를 계속하고 관련 특허를 국내에 출원할 계획임.
- 기존 특허는 *B. subtilis* Natto균과 버섯 균사체 혼합물을 사용하였으나 본 과제는 전통 발효식품들에서 분리한 혈전용해 우수 균주를 선발하여 사용하였고 결과를 보완하여 특허로 출원 할 예정임. 장류에서 *Bacillus cereus* 같은 유해균 증식 강력 억제 및 biogenic amine들은 생성하지 않는 균주들을 종균으로 사용하는 점에서 혈전용해능과 같은 한 가지 성질만 보는 기존 특허와 차별화가 가능함.
- 콩 기능성 관련 기존 특허들은 항산화, 비만예방, 혈당조절, 항암 분야에 치중되어 있어서, 본 연구에서는 콩 발효식품 (전통 장류)의 산화적 스트레스 개선효과를 기초로 한 알츠하이머 예방 및 세포보호 효과로 연구를 보완하여 알츠하이머 예방 및 세포보호 활성과 그 조성물에 대한 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획임.

2) 논문분석 측면

- 기존 논문들은 단일 균주를 종균으로 접종하고 발효후 생성된 기능성 대사체 분석을 하거나 벗짚과 같은 자연발효 방식으로 발효 후 대사체들을 분석하였다. 본 연구에서는 복합종균 (*Bacillus* 2 종, 효모와 곰팡이 각 1 종씩)을 접종하여 얻은 장류를 대상으로 발효과정 중 생성된 isoflavone 같은 기능성 대사체와 향기성분 분석을 실시하였다. 분석결과 논문 등을 Food Microbiology/Food Chemistry/한국식품과학회지 등에 게재할 계획임

- 기존 논문은 콩 발효식품인 natto, tofu에서 기억인지 능력 개선 및 항치매 활성 연구가 이루어진 반면, 본 연구는 복합종균과 마늘을 첨가한 고품질 장류의 산화적 스트레스 개선효과를 기초로 한 알츠하이머 예방 및 세포보호 활성 방향으로 연구를 추진하였고 해당 결과들은 국제 SCI 학술지에 게재할 계획임.
- 기존 논문은 신규 혈전용해효소 생산 균주 탐색과 효소특성 이해 분야, 즉 효소정제를 통한 특성 조사와 같은 기초연구 분야에 치중되어 있고 효소를 활용한 제품 개발은 실험결과들이 매우 부족함. 본 연구에서는 장류에서 분리한 혈전용해 우수 균주들이 분비하는 혈전용해효소들을 정제하고 그 특성을 조사하였으며 유전자 클로닝도 수행하였다. 분리균주와 효소 특성들은 SCI 저널에 게재되었고 추후에도 투고 예정이다.
- 마늘 첨가 장류 제조에 관한 논문들은 체계적으로 마늘을 첨가하여 기능성 제고 목적이 아닌 여러 첨가물들 중 하나로 사용하여 장류를 제조하였음. 복합종균을 사용하지 않았고 자연발효 방식으로 제조한 점도 큰 차이점임. 마늘 첨가에 의해 부수적인 효능은 있지만 생물전환 능력이 우수한 종균을 접종하지 않았고, 독소생산 유해균 대비가 없고 biogenic amine 부분도 고려되지 않았다. 본 연구에서는 복합종균 사용, 마늘 진처리를 달리한 첨가, 흑마늘 추출액 첨가등에서 기존 논문들과 큰 차이를 지니고 차이점들은 논문으로 발표할 예정임.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 다양한 장류 제품의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 기존 장류제품들의 경우 현재 정체 내지 쇠퇴기에 접어들었으므로 신규 수요를 일으킬 수 있는 신 제품 개발이 필요함. 본 연구과제에서는 순수 100% 국내산 콩을 재료로 여기에 복합종균과 마늘을 사용한 프리미엄급 기능성 청국장, 저염 된장, 간장 제품 개발에 초점을 맞추어 연구를 추진하여 소비자들의 요구에 부응하는 고품질, 고부가 제품으로 개발 판매할 계획임.
- 복합종균 효능을 가장 빨리 확인할 수 있는 장류는 청국장으로 제일 먼저 청국장 제조에 적용하여 기능성과 안전성 개선을 확인할 예정임. 신제품 개발의 비중은 간장에 두되 된장 제품 개발도 병행하며 기능성 청국장 제품의 개발 가능성도 확인할 예정임.
- 인지능력 개선이나 혈행개선과 같은 기능성이 확인될 경우 해당 장류제품들은 소비자들의 선택을 받을 것으로 예상됨. 건강유지에 대한 국민들의 높은 관심을 고려한다면 과학적 근거가 분명한, 건강증진 효과를 지닌 장류 제품 개발은 정체 상태인 장류산업의 도약에 필수라 생각됨.