| 발 간 등 록 번 호 |
| --- |
| 11-1543000-001410-01 |

고부가가치식품기술개발

R&D Report

# 마이코톡신 프리 가바 함유 고기능성 저염 된장의 제품화

## 최종보고서

2016 . 10 . .

주관연구기관 / 주식회사 비피도
협동연구기관 / 농협식품안전연구원
참여연구기관 / 남안동농업협동조합

농 림 축 산 식 품 부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "마이코톡신 프리 가바 함유 고기능성 저염 된장의 제품화"(개발기간 : 2013. 7. 16 ~ 2016. 7. 15)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. . .

주관연구기관명 : 주식회사 비피도 지 근 억 (대표자) (인)

협동연구기관명 : 농협식품연구원 조 재 호 (대표자) (인)

참 여 기 관 명 : 남안동농업협동조합 김 두 성 (대표자) (인)

주관연구책임자 : 지 근 억
협동연구책임자 : 권 혜 순
참여기관책임자 : 황 태 환

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

## 3. 보고서 요약서

# 보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>113018-3</td><td>해 당 단 계<br>연 구 기 간</td><td>2013. 7. 16 ~<br>2016. 7. 15</td><td>단 계 구 분</td><td>3/3</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4">고부가가치식품기술개발</td></tr>
<tr><td>세부 사업명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">마이코톡신 프리 가바 함유 고기능성 저염 된장의 제품화</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">지 근 억</td><td>해당단계<br>참 여<br>연구원 수</td><td>총: 12명<br>내부: 12명<br>외부: -명</td><td>해당단계<br>연 구 개 발 비</td><td>정부:160,000천원<br>민간:107,000천원<br>계:267,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간<br>참 여<br>연구원 수</td><td>총: 36명<br>내부: 36명<br>외부: -명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:480,000천원<br>민간:321,000천원<br>계:801,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및<br>소 속 부 서 명</td><td colspan="3">주식회사 비피도</td><td colspan="2">참여기업명<br>남안동농업협동조합</td></tr>
<tr><td>협 동 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:<br>마이코톡신 프리 가바 함유 전통된장 개발</td><td colspan="2">연구책임자:<br>권 혜 순</td></tr>
<tr><td colspan="3">요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)</td><td colspan="2">보고서 면수</td></tr>
</table>

## 4. 국문 요약문

| 코드번호 | D-01 |
|---|---|

| | |
|---|---|
| 연구의<br>목적 및 내용 | - 된장 발효의 주요 균인 Aspergillus의 마이코톡신 생산 프로파일을 연구하고 마이코톡신 비생산 균주 선정.<br>- 마이코톡신을 생산하지 않는 균주를 이용하여 된장을 제조하여 숙성 중 품질의 변화를 살펴보고 마이코톡신 발생 여부 확인<br>- 마이코톡신 프리 균주와 GABA를 생산하는 유산균을 이용하여 저염된장을 제조하고 숙성 중 품질 변화를 확인하고 GABA 생산을 최적화하고자 하였으며 이를 통하여 전통 된장의 안전성과 품질 확보<br>- 마이코녹신 프리 균주와 GABA 생산 유산균을 이용하여 제조한 저염 된장의 품질 및 관능을 비교하여 시장 경쟁력 평가 |
| 연구개발성과 | - 마이코톡신 생산 음성균주를 이용한 마이코톡신 프리 전통된장의 제조<br>마이코톡신 프리 균주를 이용한 된장제조 개발 결과 균주 *Aspergilus oryzae* FMB S46471과 *Aspergilus oryzae* FMB S40234로 제조한 된장이 protease 및 amylase 활성이 가장 우수하였고 숙성 기간 동안 곰팡이 독소가 검출되지 않았으며 마이코톡신 프리 균주를 이용한 된장의 관능검사 결과 또한 우수하였음<br>- GABA 생산 우수균주를 이용한 기호성이 높은 기능성 저염된장의 제조<br>*Aspergilus oryzae* FMB S46471를 이용하여 메주를 제조하여 *Lactobacillus brevis* GABA 100로 호기적 유산균 발효를 한 후 염을 8%, 12%로 첨가하여 된장 시료를 제조하였다. 된장의 아미노태 질소 함량 및 유리 아미노산 함량은 숙성기간에 따라 증가하였으며 46471 메주를 이용하며 유산균 발효한 저염된장 시료 F2가 가장 높게 나타났으며 GABA 함량 또한 높게 나타남<br>- 마이코톡신 프리 균주와 GABA생산균을 이용한 고기능성 저염된장의 공장적용<br>*Aspergilus oryzae* FMB S46471와 *Lactobacillus brevis* GABA 100을 접종하여 제조한 저염 된장은 숙성기간에 따라 아미노태 질소 및 유리 아미노산 함량이 증가하는 경향을 보였으나 실제 가공공장 숙성 환경으로 외부 온도의 영향을 그대로 받아 0-5 ℃에서 숙성되어 증가의 폭이 실험실 결과에 비하여 낮았다. 시중에 유통되는 된장과 본 실험에서 제조한 된장의 관능을 평가 결과 본 실험 된장인 G2c와 A-2는 시중 된장인 S-1에 비하여 같거나 낮았으나 시중된장 SS에 비하여 높거나 같았고 이는 G2c와 A-2의 경우 숙성기간이 4개월로 일반적인 재래된장의 숙성기간인 2년에 비하여 숙성기간이 짧았으며, 장기간 숙성을 통하여 관능적인 평가가 더 높아질 것으로 기대됨 |
| 연구개발성과의<br>활용계획<br>(기대효과) | - 과학적 미생물 안전관리 기준 마련과 저염 된장 제품의 개발로 국민 건강 증진<br>- 식품 원료 미생물의 독소에 대한 기준 규격 및 표준화<br>- 독소 생산 음성 균주의 산업적 활용 및 발효 식품의 안전성 증진<br>- 혈압조절 및 뇌기능개선에 효과가 있는 GABA생산 우수균주 *L. brevis* GABA100의 접목으로 인한 고기능성 된장의 제품화<br>- 기능성 유산균의 접목에 의한 고기능성 저염 된장의 제품화<br>- 발효 장류의 새로운 풍미 도입<br>- 고기능성 전통 된장의 개발 및 산업화를 통한 기존 전통식품의 부가가치 향상 유도 |

| 중심어<br>(5개 이내) | 식용미생물 | 곰팡이 독소 | 안전관리 | 가바 | 저염 된장 |
|---|---|---|---|---|---|

## 5. 영문 요약문

# 〈 SUMMARY 〉

| 코드번호 | D-02 |
|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Purpose& Contents | - Analysis of microorganism profiles and identification of strains isolated from Meju and Doenjang<br>- Production of mycotoxins and changes in quality of Doenjang produced using mycotoxin free strains<br>- Development of high functional low-salt Doenjang using mycotoxin free strain and lactic acid bacteria producing GABA and retaining quality and safety of the traditional Doenjang | | | | |
| Results | - Development mycotoxin free Doenjang using mycotoxin free strains<br>The results of development of Doenjang using mycotoxin free strains showed that the developed strains, *Aspergilus oryzae* FMB S46471 and *Aspergilus oryzae* FMB S40234, exhibited high protease and amylase activities and mycotoxin was not detected in the newly developed Doenjang during the ripening periods. The sensory value of the developed Doenjang was improved compared to the other comparable Doenjangs.<br>- Development of high functional low-salt Doenjang fermented using lactic acid bacteria producing GABA<br>Meju was produced using *Aspergilus oryzae* FMB S46471. When the Meju was swelling *Lactobacillus brevis* GABA 100 was innoculated. Doenjang was mase after adding salt. The contents of amino type nitrogen and free amino acid were increased during the ripening periods. Especially, sample F2 showed the highest level and contents of GABA.<br>- Applications of production processes of high functional low-salt Doenjang fermented using mycotoxin free strains and lactic acid bacteria producing GABA<br>Contents of amino type nitrogen and free amino acid of the Doenjang fermented by *Aspergilus oryzae* FMB S46471 and *Lactobacillus brevis* GABA 100 was increased during the ripening periods. The manufacture methods were applied to actual factory process. But results of the application was different from previous studies because of the temperature that is not under the control. Doenjangs (G2c, A-2) developed in this study compared with products(S-1, SS) on the markets. The results of the sensory test was G2c and A-2 was lower than S-1 and higher than SS. | | | | |
| Expected Contribution | - Establishment of safety control standards of mycotoxin-free Doenjang and improvement of the public health with low-salt Doenjang products.<br>- Industrial applications of mycotoxin free strains and improvement of safety of fermented food.<br>- Development of products of high functional Doenjang containing GABA.<br>- Development of products of high functional low-salt Doenjang using functional lactic acid bacteria.<br>- Improvement of flavors of fermented food<br>- Creating added value of traditional fermented food based on the development and industrialization of high functional Doenjang | | | | |
| Key words | food microorganism | mycotoxin | safety management | GABA | low-salt Doenjang |

6. 영문목차

CONTENTS

Chapter 1. Overview of research project ····· 1

Chapter 2. Current trends in research ····· 3

Chapter 3. Research results ····· 5

Chapter 4. Accomplishments and expected contribution ····· 173

Chapter 5. Applications of research result ····· 174

Chapter 6. Overseas scientific information collected during the study 174

Chapter 7. Reseach securities ····· 174

Chapter 8. Laboratory safety managementation performance ····· 175

Chapter 9. Representative research achievements ····· 176

Chapter 10. References ····· 179

## 7. 본문목차

# 〈 목 차 〉


1. 연구개발과제의 개요 ····· 1

2. 국내외 기술개발 현황 ····· 3

3. 연구수행 내용 및 결과 ····· 5
제 1장. 마이코톡신 음성 A. oryzae 균주 선별 및 라이브러리 확보(주관) ····· 5
제 2장. 마이코톡신 음성 A. niger aggregates 균주 선별 및 라이브러리 확보(주관) ····· 13
제 3장. 무톡신 A. oryzae 균주의 단백분해효소 활성 측정 및 된장 제조시 아플라톡신 생성 여부 확인(주관) ···· 19
제 4장. Lactobacillus brevis GABA100의 GABA 생성을 위한 최적 조건 탐색(주관) ····· 20
제 5장. 다시마를 이용한 천연 유래 glutamic acid 추출 조건 탐색(주관) ····· 22
제 6장. 마이코톡신 생산 음성 A. oryzae 와 GABA 고 생산 L. brevis GABA 100 에 의해 생산된 메주 제조 및 저염 된장 제품화(주관) 26
제 7장. 오크라톡신과 푸모니신의 신속 검출과 이들 독소를 생성하지 않는 균주 개발과 이를 이용한 된장 제조(주관) ·· 29
제 8장. 아플라톡신과 CPA의 신속 검출과 이들 독소를 생성하지 않는 균주개발과 를 이용한 된장 제조(주관) ·· 31
제 9장. 발효 식품 제조 과정(자연 발효/인공 발효)중의 aflatoxin 발현 분석량 패턴 연구(주관) ···· 34
제10장. 다시마추출물에서 L. brevis GABA100에 의한 glutamic acid의 GABA 전환(주관) ····· 48
제11장. 다시마를 첨가한 GABA 함유 액체형 메주 제조(주관) ····· 59
제12장. 콩, 다시마 혼합 발효물의 제조(주관) ····· 67
제13장. 곰팡이독소 비생산균주와 GABA 우수 생산 유산균 접종에 의해 제조된 염도별 된장의 특성(주관) ··· 81
제14장. 콩, 다시마 혼합 발효물의 ACE 저해 활성 측정(주관) ····· 84
제15장. 스타터 배양을 이용한 콩 액체 배지에서 A. oryzae 46471과 L. brevis GABA 100에 의한 GABA 생성의 최적 발효 조건(주관) · 91
제16장. 마이코톡신 프리 가바 함유 된장 제조 방법 확립(협동) ····· 99
제17장. 제조된 마이코톡신 프리 전통된장의 이화학적 특성 규명(협동) ····· 108
제18장. 마이코톡신 프리 곰팡이를 이용한 메주 제조 방법 확립(협동) ····· 116
제19장. 마이코톡신 프리 가바 함유 된장의 품질 특성 (협동) ····· 120
제20장. 마이코톡신 프리 가바 함유 저염된장 제조 방법 확립(협동) ····· 134
제21장. 전통된장 가공공장의 적용(협동) ····· 148
제22장. 결과요약 ····· 170

4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 173

5. 연구결과의 활용계획 등 ····· 174

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 174

7. 연구개발성과의 보안등급 ····· 174

8. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ····· 175

9. 연구개발과제의 대표적 연구실적 ····· 176

10. 참고문헌 ····· 179

<별첨> 초 록

# 1. 연구개발과제의 개요

| 코드번호 | D-03 |
|---|---|

1-1. 연구개발 목적

○ 마이코톡신 생산을 하지 않으며 혈압조절 및 뇌기능개선용 GABA가 강화된 저염 된장을 개발하여 전통 발효 식품에 안전성과 기능성 측면을 강화하고자 함.

○ 그동안 *Aspergillus niger*와 *Aspergillus oryzae* 등은 식품용으로 안전한 것으로 취급되어 왔으나 *Aspergillus niger*의 상당한 균주가 ochratoxin을 생산하고 *Aspergillus oryzae*의 상당한 균주가 aflatoxin을 생산하는 것으로 규명되어 유럽식품안전청(EFSA)에서 위 균주들을 식품의 원료로 인정하지 않고 있음. 따라서, 마이코톡신 생산성이 없는 균주를 선발하여 발효 된장을 제조하는 전략적 연구가 필요하며 본 연구팀에서 개발하여 확보되어 있는 혈압조절 및 뇌기능개선에 효과가 있는 GABA 생산 우수균주 *L. brevis* GABA100을 개발 제품에 접목함으로써 기능적인 측면 뿐만 아니라, 전통 발효 장류와는 차별화된 기능성 및 품질 특성을 갖는 저염 된장 개발을 목표로 함.

1-2. 연구개발의 필요성

○ 유럽식품안전청은 *Aspergillus niger*(흑국균)과 *Aspergilus oryzae*(황국균)을 안전하다고 여겨지는 기준인 QPS의 현황에 포함시키지 않고 있고, 이 균들에 대한 안전성 평가 연구를 수행하고 있으며, 2009년 QPS에 등재되었을 때부터 시작하여 가장 최근에 보고된 2012년 보고서에서도 QPS 현황에 이들 균을 포함 시키지 않고 있다.

○ 오랜 기간 안전하다고 여겨져 한국 전통 발효 식품인 된장 제조에 사용되어 온 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus niger*에서 다양한 곰팡이 독소의 생성능이 보고 되고 있음. *Aspergillus oryzae*는 대표적으로 aflatoxin과 cyclopiazonic acid *Aspergillus niger*는 ochratoxin A 과 fumonisin을 생성함.

○ 국내 발효 식품에 널리 존재하는 속하는 흑국균(*Aspergillus niger*)과 황국균(*Aspergillus oryzae*)은 오랜 기간 동안 안전하다고 여기며 식용곰팡이로서 널리 사용되어 오고 있으나 이들 균의 사용에 대한 안전성 문제가 제기되고 있어 발효 장류의 안전성에 대한 확보는 발효장류를 이용한 음식을 빈번히 이용되는 식문화를 갖는 우리나라에서는 발효 장류의 안전성에 대한 체계적인 연구가 시급하고 전통적인 방식으로 생산되는 발효 식품에 포함되어 있는 마이코톡신의 연구가 새롭게 필요하다.

○ 한국은 발효 음식에 대한 오랜 역사를 갖고 있음. 특히 전통 발효 장류는 그 종류가 다양함. 우리나라의 대표적 발효식품의 하나인 된장은 건강이나 장수에 좋은 것으로 오랫동안 섭취하여 왔으나 과잉 식염섭취에 의한 피해의 두려움도 지적되고 있으며 된장은 건강에 유익한 좋은 식품으로 더욱이 영양 balance가 잘 조절되는 영양성이 우수한 발효식품으로 알려져 있다.

○ 지역에 따른 발효법과 저장법이 발달되어 있으며, 수많은 전통적인 발효 방법이 존재하는데 이러한 국내 전통 발효 식품인 장류에는 다양한 미생물이 존재하고 있으며 식중독 미생물 및 병원성 미생물에 대한 안전성 관리와 검사는 실시되고 있으나 발효 음식에 널리 존재/이용되는 식용균이 생성하는 독소에 대한 표준화 및 안전관리 제고가 필요하며 최근에는 발효식품 진균류, 일부 유산균, 장류 제조용 *Bacillus* 등 다양한 식용미생물에 대한 독소 생산이 국제적으로 보고되고 있다.

○ 특히, 발효 식품에 대한 관심이 높아지면서 전통 발효장에 대한 관심과 수요는 증가하는 추세에 있기 때문에 이에 대한 체계적인 연구와 관심이 절실히 요구되고 있으며 앞으로 수출 상품으로 발전시키기 위하여 반드시 연구 개발이 필요하다.

○ 현재 국내에서 식용미생물 사용에 대한 가이드라인이나 규제 지침은 미비한 상황으로 식용미생물에 대한 독소 생산 패턴 연구를 실시하여 식용미생물의 안전성을 확보하고 독소 생성능 균의 사용에 대한 체계적인 표준화 및 안전 관리 지침 마련이 절실히 필요하다.

○ 또한, 발효 장류, 특히 된장의 높은 염도는 혈압 상승 등의 질환의 악화에 기여를 하게 되는데, 본 연구 책임자가 이미 개발 확보한 혈압조절 및 뇌기능개선에 효과가 있는 GABA생산 우수균주 *L. brevis* GABA100을 개발 제품에 첨가해줌으로써 기존의 장들보다 훨씬 낮은 염도의 저염 된장으로의 제품 개발을 기대하며 GABA 함유의 신제품 개발로 부가가치 창출하고자 한다.

1-3. 연구개발 범위

[1차년도]

○ 마이코톡신 생산 음성균주를 이용한 마이코톡신 프리 전통된장의 제조

○ 제조된 마이코톡신 프리 전통된장의 이화학적 특성 규명

○ 마이코톡신 프리 전통된장의 품질기준 / 제조방법 확립

[2차년도]

○ GABA 생산 우수균주를 이용한 기호성이 높은 기능성 저염 된장의 제조

○ 제조된 저염 된장의 이화학적 특성 규명

○ 기능성 저염 된장의 품질기준 / 제조방법 확립

[3차년도]

○ 독소 생성 음성 균주의 스타터 종균 / GABA 생산 우수균주를 이용한 고기능성 저염 발효 된장의 제품화

○ 제조된 고기능성 저염 발효 된장의 이화학적 특성 규명

○ 고기능성 저염 발효 된장의 품질기준 / 제조방법 확립

## 2. 국내외 기술개발 현황

| 코드번호 | D-04 |
|---|---|

○ 유럽식품안전청은 *Aspergillus niger*(흑국균)과 *Aspergilus oryzae*(황국균)을 안전하다고 여겨지는 기준인 QPS의 현황에 포함시키지 않고 있으며, 이 균들에 대한 안전성 평가 연구를 수행하고 있음. 2009년 QPS에 등재되었을 때부터 시작하여 가장 최근에 보고된 2012년 보고서에서도 QPS 현황에 이들 균을 포함 시키지 않고 있음(*Aspergillus niger*: Potential for mycotoxin production, therefore not suitable for QPS status, *Aspergillus oryzae*: Potential for mycotoxin production, therefore not suitable for QPS status) (5)(6)(7)(8).

발효 식품에 이 균들을 빈번히 이용하는 한국을 비롯한 아시아에서는 이 균들의 이용을 재평가해야 한다는 주장들도 왕왕 제기되고 있음(9). 특히, 우리나라에서는 김치 및 요리 향신료로 많이 사용되는 고춧가루와 메주, 된장, 고 추장 등 발효식품에서 오크라톡신 A가 검출된 사례가 있어 전통식품 등 관련식품의 안전성 확보를 위하여 조사 연구를 실시할 필요성이 언급되어 오고 있음(10).

한국은 발효 음식에 대한 오랜 역사를 갖고 있음. 특히 전통 발효 장류는 그 종류가 다양함. 우리나라의 대표적 발효식품의 하나인 된장은 건강이나 장수에 좋은 것으로 오랫동안 섭취하여 왔으나 과잉 식염섭취에 의한 피해의 두려움도 지적되고 있음. 된장은 건강에 유익한 좋은 식품으로 더욱이 영양 balance가 잘 조절되는 영양성이 우수한 발효식품으로 알려져 있음.

지역에 따른 발효법과 저장법이 발달되어 있으며, 수많은 전통적인 발효 방법이 존재함. 이러한 국내 전통 발효 식품인 장류에는 다양한 미생물이 존재함. 식중독 미생물 및 병원성 미생물에 대한 안전성 관리와 검사는 실시되고 있으나 발효 음식에 널리 존재/이용되는 식용균이 생성하는 독소에 대한 표준화 및 안전관리 제고가 필요함. 또한, 최근에는 발효식품 진균류, 일부 유산균, 장류 제조용 *Bacillus* 등 다양한 식용미생물에 대한 독소 생산이 국제적으로 보고되고 있음. 특히, 국내 발효 식품에 널리 존재하는 속하는 흑국균(*Aspergillus niger*)과 황국균(*Aspergillus oryzae*)은 오랜 기간 동안 안전하다고 여기며 식용곰팡이로서 널리 사용되어 오고 있으나 이들 균의 사용에 대한 안전성 문제가 제기되고 있음.

특히 발효 장류의 안전성에 대한 확보는 발효장류를 이용한 음식을 빈번히 이용되는 식문화를 갖는 우리나라에서는 발효 장류의 안전성에 대한 체계적인 연구가 시급함. 전통적인 방식으로 생산되는 발효 식품에 포함되어 있는 마이코톡신의 연구가 새롭게 필요함. 특히, 발효 식품에 대한 관심이 높아지면서 전통 발효장에 대한 관심과 수요는 증가하는 추세에 있기 때문에 이에 대한 체계적인 연구와 관심이 절실히 요구되고 있으며 앞으로 수출 상품으로 발전시키기 위하여는 반드시 연구 개발이 필용함.

오랜 기간 안전하다고 여겨져 한국 전통 발효 식품인 된장 제조에 사용되어 온 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus niger*에서 다양한 곰팡이 독소의 생성능이 보고 되고 있음. *Aspergillus oryzae*는 aflatoxin, Kojic acid, aspergillomarasmine, cyclopiazonic acid, maltoryzine, 3-nitropropionic acid, violacetin 등의 물질을, *Aspergillus niger*는 ochratoxin A, malformins, naphtho-r-pyrones, nigerazine B, nigragillin, oxalic acid, melanin 등의 다양한 이차대사사물을 생성함. 특히, 인체에 심각한 독성을 갖는 곰팡이독소인 아플라톡신(Aflatoxin)과 오크라톡신(Ochratoxin)독소 생성능에 대한 연구 내용이 보고되고 있음(1)(2).

이러한 이유로, 유럽식품안전청(EFSA)에서는 이 균들에 대한 안전성 평가를 유보하고 있음. 그 원인으로는 이 균들 중 약 5~20%가 아플라톡신이나 오클라톡신 독소 생성능을 보유하고 있다고 보고되기 때문임. 아플라톡신과 오클라톡신은 아스퍼질러스 속 또는 페니실리움속 곰팡이가 생성하는 가장 치명적이고 중요한 곰팡이독소로써 발암성(carcinogenic), 성호르몬 교란성(estrogenic), 신경독성(neurotoxic) 및 신장독성(nephrotoxic)을 띠거나 동물의 면역기능을 저하시키는 것으로 보고되고 있음(3)(4). 이러한 이유로 유럽식품안전청은 *Aspergillus niger*(흑국균)과 *Aspergilus oryzae*(황국균)을 안전하다고 여겨지는 기준인 QPS의 현황에 포함시키지 않고 있으며, 이 균들에 대한 안전성 평가 연구를 수행하고 있음. 2009년 QPS에 등재되었을 때부터 시작하여 가장 최근에 보고된 2012년 보고서에서도 QPS 현황에 이들 균을 포함 시키지 않고 있음(*Aspergillus niger*: Potential for mycotoxin production, therefore not suitable for QPS status, *Aspergillus oryzae*: Potential for mycotoxin production, therefore not suitable for QPS status) (5)(6)(7)(8).

발효 식품에 이 균들을 빈번히 이용하는 한국을 비롯한 아시아에서는 이 균들의 이용을 재평가해야 한다는 주장들도 왕왕 제기되고 있음(9). 특히, 우리나라에서는 김치 및 요리 향신료로 많이 사용되는 고춧가루와 메주, 된장, 고 추장 등 발효식품에서 오크라톡신 A가 검출된 사례가 있어 전통식품 등 관련식품의 안전성 확보를 위하여 조사 연구를 실시할 필요성이 언급되어 오고 있음(10).
아플라톡신이나 오크라톡신인 곰팡이 생성 독소는 2차 대사산물로서 곰팡이 성장을 완료된 후, 최소한 10여일이
지나야 생성되는 것으로 알려져 있고 전통 장류에 이용되는 균들은 자연스럽게 주위 환경에 의해 유입되어 오랜 기간 발효에 이용되므로 전통 발효 장류에 독소 생성능을 함유한 곰팡이가 포함되어 저장 기간 동안 지속적으로 증식을 해가며 인체에 해로운 독성을 미칠 위험성이 높음.
그러나 현재 국내에서 식용미생물 사용에 대한 가이드라인이나 규제 지침은 미비한 상황임.
이러한 이유로, 우리나라에서도 식용미생물에 대한 독소 생산 패턴 연구를 실시하여 식용미생물의 안전성을 확보하고 독소 생성능 균의 사용에 대한 체계적인 표준화 및 안전 관리 지침 마련이 절실히 필요함.또한, 발효 장류, 특히 된장의 높은 염도는 혈압 상승등의 질환의 악화에 기여를 하게 되는데, 본 연구 책임자가 이미 개발 확보한 혈압조절 및 뇌기능개선에 효과가 있는 GABA생산 우수균주 *L. brevis* GABA100을 개발 제품에 첨가해줌으로써 기존의 장들보다 훨씬 낮은 염도의 저염 된장으로의 제품 개발을 기대함. 염이 건강에 좋지 않은 영향을 미치기 때문에 저염식의 식생활이 권장되고 있지만, 실제 발효 장류에서는 잡균들의 번식으로 인한 문제점을 해결할 좋은 솔루션이 없어 저염장류의 개발에 어려움이 있어왔음. 그렇지만 현 그룹의 연구 내용에서 제안하는 GABA생산 우수 유산균주의 접목으로 인해 저염으로 인해 발생하는 잡균의 생육을 억제시킬 수가 있어 저염 된장으로의 제품화가 가능함. 또한, 기존의 짠맛이 우세인 장류의 맛과는 대비되도록 유산균에 의해 생성되는 새콤함의 풍미는 기존 전통장의 섭취를 소원해왔던 젊은 연령층에게도 새로운 풍미를 갖는 전통 장류에 대해 호감도 및 기호도 측면을 높일 수 있는 효과를 기대해 볼 수 있겠음. 또한 가바가 함유된 기능성 된장은 마이코톡신에 대한 안전성이 제고되고 혈압조절 및 두뇌 건강에 도움이 되는 거으로 알려진 GABA 함유의 신제품 개발로 부가가치 창출.

이러한 이유로, 마이코톡신 생성능을 갖고 있지 않은 독소 음성 균주로 인한 안전성의 측면과 생리활성 물질인 GABA 생산 우수균주의 시너지 역할로 인해 발효장의 안전적인 측면과 기능성이 강화된 저염 된장의 제품화를 현과제의 목표로 함.

**참고문헌**

(1) Cynthia Z. Blumenthal.:Production of toxic metabolites in Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, and Trichoderma reesei: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Regulatory Toxicology and Pharmacology 39 (2004) 214–28
(2) James F. Sanchez, Amber D. Somoza, Nancy P. Keller, Clay C. C. Wang.: Advances in Aspergillus secondary metabolite research in the post-genomic era. Nat. Prod. Rep., 2012, 29, 351
(3) Lopez-Garcia R, Mallmann CA, Pineiro M.: Design and implementation of an integrated management system for ochratoxin A in the coffee production chain. Food Addit. Contam., 25(2), 231-240 (2008)
(4) Mateo R, Medina A, Mateo EM, Mateo F, Jimnez M.: An overview of ochratoxin A in beer and wine. Int J Food Microbiol., 119(1-2), 79-83 (2007)
(5) EFSA Journal 2009; 7(12):1431
(6) EFSA Journal 2010;8(12):1944
(7) EFSA Journal 2011;9(12):2497
(8) EFSA Journal 2012;10(12):3020
(9) Visconti A, Perrone G, Cozzi G, Solfrizzo M.: Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. Food Addit. Contam., 25(2), 193-202 (2008)
(10) 서경원, 김준규, 김태완, 정세영, 김효정: Ochratoxin A의 신장독성감소 방법에 대한 연구. J. Fd Hyg. Safety, 13(2),121~128 (1998)

## 3. 연구수행 내용 및 결과

| 코드번호 | D-05 |
|---|---|

### 제 1 장. 마이코톡신 음성 *A. oryzae* 균주 선별 및 라이브러리 확보 (주관)

된장 등 발효식품으로부터 분리된 *A. oryzae* 41 종에 대해 유전자 분석 기법과 HPLC 분석법을 사용하여 곰팡이 독소 생산 여부 확인하였다. 선택 곰팡이 독소 종류는 총 아플라톡신 ($B_1$, $B_2$, $G_1$, $G_2$) 과 CPA 에 대한 독소 생성능 여부를 확인하였다. 두 종류의 곰팡이 독소 유전자에 특이적인 primer set 정보는 Table 1에 나타내었다. 아플라톡신 생합성에 필수적인 구조유전자와 조절 유전자 총 4개 (*omtB, aflaR, ver-1, omtA*)를 선택하였다. CPA 독소 생성 가능성을 선별해내기 위한 유전자로는 3개 (*maoA, dmaT, pks-nrps*) 를 선택하였다. 또한 이 분석에서 사용한 곰팡이 종이 *A. oryzae/flavus*인지를 확인하기 위해 종 특이적인 유전자에 대한 primer 를 채택하여 PCR 수행을 하였다.

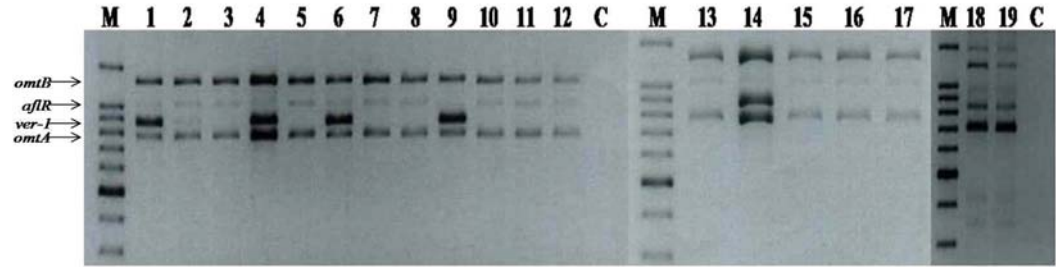
Table 1. The information of primers used in this study

| Primer | Sequence (5′>3′) | Amplicon (bp) | Gene |
|---|---|---|---|
| PEPO1 | CGACGTCTACAAGCCTTCTGGAAA | 200 | *pepO* |
| PEPO2 | CAGCAGACCGTCATTGTTCTTGTC | | |
| omtB(F)-F | GCCTTGACATGGAAACCATC | 1333 | *omtB* |
| omtB(F)-R | CCAAGATGGCCTGCTCTTTA | | |
| aflR1 | TATCTCCCCCCGGGCATCTCCCGG | 1032 | *aflR* |
| aflR2 | CCGTCAGACAGCCACTGGACACGG | | |
| ver-1F | ATGTCGGATAATCACCGTTTAGATGGC | 895 | *ver-1* |
| ver-1R | CGAAAAGCGCCACCATCCACCCCAATG | | |
| omt1 | GTGGACGGACCTAGTCCGACATCAC | 797 | *omtA* |
| omt2 | GTCGGCGCCACGCACTGGGTTGGGG | | |
| maoA F | GACCGTCGCTGTCGTTGAAC | 462 | *maoA* |
| maoA R | ACTCCGATGTACTGAATGACG | | |
| dmaT F | GTCTCTGGATCGTTCCGTCG | 765 | *dmaT* |
| dmaT R | GTATAGCACAGCTCCGATGT | | |
| pks F | GTATAGCACAGCTCCGATGT | 986 | *pks-nrps* |
| pks R | GAATGCAAGGAGCCTCTCGT | | |

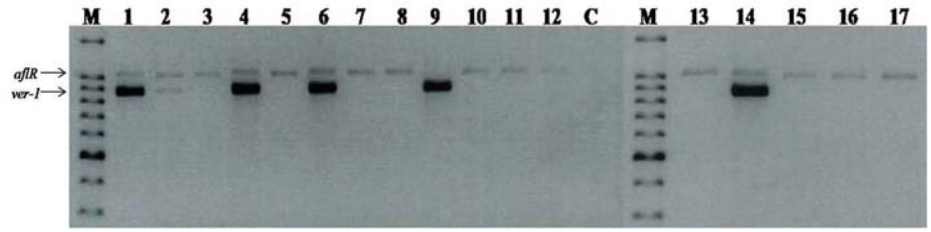
아플라톡신 확인은 다중 복합 PCR를 통해 확인하였고, 그 결과는 Figure 1에 나타내었다.

**Figure 1. Multiplex PCR analysis for the detection of aflatoxin from *Aspergillus* strains** (A) The multiplex PCR for *omtB, aflR*, *ver-1*, and *omtA*was performed against 19 *A. oryzae/flavus* strains; lane 18 and 19 showed PCR bands with different sizes compared to lanes 1-17. (B) The multiplex PCR for *aflR* and *ver-1* was performed against 17 *A. oryzae/flavus* strains. (C) *A. oryzae/flavus* identificationwas performed against 22 *Aspergillus* strains. Arrows corresponding to the different PCR products were marked. M represented 100 bp DNA ladder; C represented a PCR control without template. 1, FMB S41403; 2, FMB S41735; 3, FMB S40250; 4, FMB S44995; 5, FMB S44999; 6, FMB S41730; 7, FMB S40247; 8, FMB S44246; 9, FMB S46471; 10, FMB S41736; 11, FMB S40244; 12, FMB S40233; 13, FMB S995; 14, FMB S859; 15, FMB S998; 16, FMB S955; 17, FMB S954; 18, FMB S40234; 19, FMB S888; 20, FMB S40280; 21, FMB S46497; 22, FMB S42589.

A. *omtB/aflR/ver-1/omtA*




B. *aflR/ver-1*




C. *pepO*

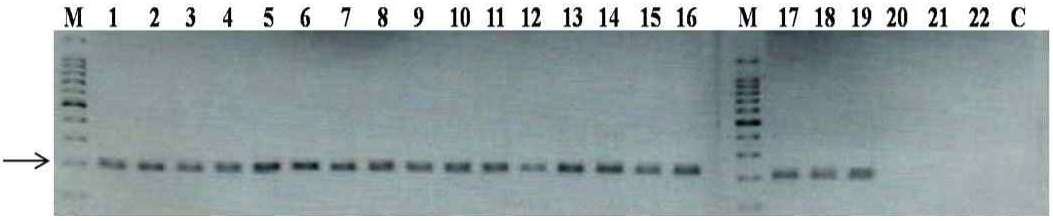



Fig.1(A)는 4개의 유전자 모두에 대한 다중 복합 PCR 분석 결과를 보이고 있다. 또한 (B)는 모든 종에 포함되어 있는 *omtB, omtA* 유전자를 제외하고 2개의 유전자 (*aflR, ver-1*)에 대한 PCR 분석 결과를 보이고 있다. 분석한 총 19종 중 2종은 4개의 유전자 사이즈가 17종과 다른 패턴을 보이고 있었다. 또한, 17종 중에서도 5종만이 4개의 유전자가 모두 존재하는 결과

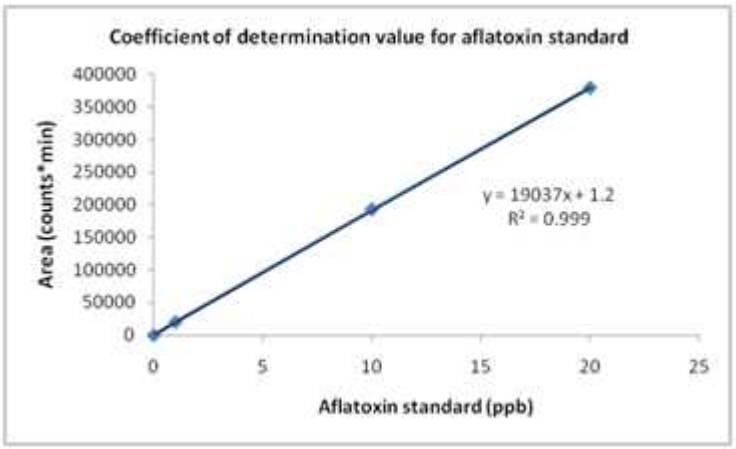
를 보였다. 다른 사이즈의 PCR 밴드 패턴을 보인 2개의 종을 포함 아플라톡신 생합성에 관여하는 유전자의 존재를 보이지 않은 14종의 *A. oryzae* 는 아플라톡신 생합성능이 없을 것으로 잠정적으로 1차 선별을 하였다. Fig 1 (C)에서는 본 실험에 사용된 19종이 모두 *A. oryzae/flavus* 종임이 종 특이적인 유전자 보유 패턴을 보임으로써 확인되었다. 그 다음 단계로써 아플라톡신 생성능을 최종 확인하기 위해 HPLC 분석을 실시하였다. 그 결과 4개의 아플라톡신 생합성 유전자 모두 PCR 밴드가 확인된 5종의 *A. oryzae* 중 1종의 KACC 41403 에서만 아플라톡신이 검출되었다. 마이코톡신 생합성 유전자 중 한 개라도 존재가 확인되지 않은 균주는 HPLC 분석 결과에서 독소 생산 음성으로 확인되었다. 또한 생합성 유전자 밴드를 모두 보인 균주라고 할지라도 HPLC 분석 결과에서는 아플라톡신이 검출되지 않았다.

FMB S41403 균주는 결과적으로는 아플라톡신 양성 대조군 균주로 사용하게 되었으나, *A. oryzae* 로 분류가 되어 있었고, 실험 진행 후 논문 리뷰가 진행되었을 때 해당 균주가 *A. flavus* 로 재분류가 되었다. 이는 본 연구의 당위성을 한번 더 확인하는 계기가 되었다. HPLC 에 대한 분석 결과는 Fig 2. 를 통해 스탠다드 유효 분석 결과와 함께 수치를 나타내었고, 유전자 분석 결과와 HPLC 분석 결과의 요약은 Table 2에서 보이고 있다.

**Figure 2. HPLC analysis for the detection of aflatoxin $G_1$, $B_1$, $G_2$, and $B_2$ from *Aspergillus* strains**

(A) The coefficient of determination value of aflatoxin $G_1$, $B_1$, $G_2$, and $B_2$ standards (B) The comprehensive result of HPLC, the repeated time and the level for total aflatoxins; *+*, positive; -, negative for the detection of total aflatoxins.Repeat 1, Repeat 2, and Repeat 3 are the detected value on non, 1/2 diluted, and 1/10 diluted samples

(A)



(B)

| Species | Repeat 1 | Repeat 2 | Repeat 3 | Comprehensive result of HPLC |
|---|---|---|---|---|
| | Detection level (ppb) | | | |
| | + | + | + | |
| FMB S41403 | $AFB_1$, 53.90; $AFB_2$, 0.67 | $AFB_1$, 26.90; $AFB_2$, 0.29 | $AFB_1$, 2.91; $AFB_2$, 0.03 | + ($AFB_1$, $AFB_2$) |
| FMB S41735 | - | - | - | - |
| FMB S40250 | - | - | - | - |
| FMB S44995 | - | - | - | - |
| FMB S44999 | - | - | - | - |
| FMB S41730 | - | - | - | - |
| FMB S40247 | - | - | - | - |
| FMB S46471 | - | - | - | - |
| FMB S44246 | - | - | - | - |
| FMB S41736 | - | - | - | - |
| FMB S40244 | - | - | - | - |
| FMB S40233 | - | - | - | - |
| FMB S995 | - | - | - | - |
| FMB S859 | - | - | - | - |
| FMB S998 | - | - | - | - |
| FMB S955 | - | - | - | - |
| FMB S954 | - | - | - | - |
| FMB S40234 | - | - | - | - |
| FMB S888 | - | - | - | - |

Table 2. Summary of PCR patterns and HPLC analysis for the detection of aflatoxin from *A. oryzae/flavus* strains

| Source | Species | PCR of aflatoxin gene cluster (*omtB/ aflR/ ver-1/ omtA*) | Comprehensive PCR result for aflatoxin | HPLC (Total aflatoxins) |
|---|---|---|---|---|
| Daemacjang[1] | *A. flavus* FMB S41403 | +/+/+/+ | 4 bands | + ($AFB_1$, $AFB_2$) |
| Traditional nuruk in market | *A. oryzae* FMB S41735 | +/+/+/+ | 4 bands | - |
| Meju | *A. oryzae* FMB S40250 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| Soy sauce | *A. oryzae* FMB S44995 | +/+/+/+ | 4 bands | - |
| Chinese soy sauce | *A. oryzae* FMB S44999 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| Traditional nuruk in market | *A. oryzae* FMB S41730 | +/+/+/+ | 4 bands | - |
| Meju | *A. oryzae* FMB S40247 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| Rice | *A. oryzae* FMB S44246 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| Meju | *A. oryzae* FMB S46471 | +/-/+/+ | w/o *aflR* | - |
| Traditional nuruk in market | *A. oryzae* FMB S41736 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| Meju[2] | *A. oryzae* FMB S40244 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| Nuruk[3] | *A. oryzae* FMB S40233 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| ATCC16507 | *A. oryzae* FMB S995 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| ATCC14605 | *A. oryzae* FMB S859 | +/+/+/+ | 4 bands | - |
| Cereal | *A. oryzae* FMB S998 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| No information | *A. oryzae* FMB S955 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| No information | *A. oryzae* FMB S954 | +/+/-/+ | w/o *ver-1* | - |
| Nuruk | *A. oryzae* FMB S40234 | Shown different size bands compared to genuine aflatoxin biosynthesis genes | | - |
| ATCC22787 | *A. oryzae* FMB S888 | | | - |

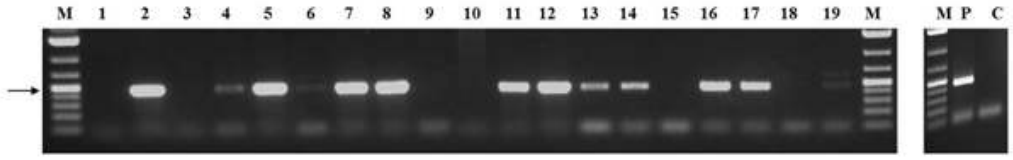
** Daemacjang[1], black soybean paste Meju[2], a brick of dried fermented soybeans; Nuruk[3], a traditional Korean fermentation starter; Abbreviations: A. flavus, Aspergillus flavus; A. oryzae, Aspergillus oryzae; without, w/o; aflatoxin $B_1$, $AFB_1$ aflatoxin $B_2$, $AFB_2$ +, positive; -, negative for the detection of aflatoxins*

19종의 *A. oryzae* 로 부터 CPA 생합성능을 확인하기 위해 3개의 유전자 *maoA* , *dmaT* , *pks-nrps* 를 이용해서 PCR 을 수행하였다. 그 결과 3개의 유전자 중 1개라도 PCR 밴드가 확인되지 않은 종은 CPA를 생산하지 않음이 HPLC 분석 결과를 통해 최종 확인되었다. 유전자 분석 결과는 Fig 3. 에서 보이고 있다. Fig 3(D)는 internal control을 나타내기 위해 *β-tubulin* 에 대한 유전자 PCR 결과를 나타내고 있다.

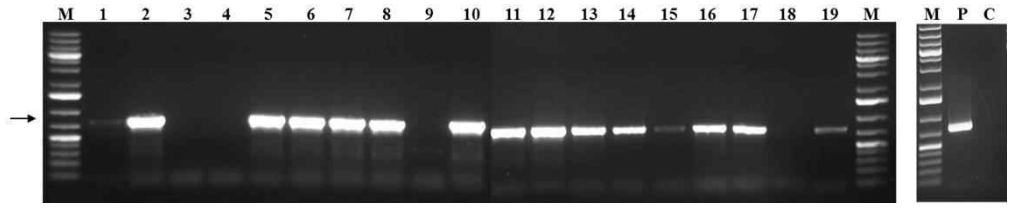
**Figure 3. PCR analysis for the detection of CPA from *Aspergillus* strains**

The PCR for the *maoA* (A), *dmaT* (B), and *pks-nrps* (C) was performed against 19 *A. oryzae/flavus* strains. The *A. oryzae* NBRC 4177 genomic DNA was used as a CPA positive control for the CPA biosynthetic genes. The *β-tubulin* gene was analyzed for a PCR control (D). M represented 100 bp DNA ladder; P represented a PCR positive control. C represented a PCR negative control without template. 1, FMB S41403; 2, FMB S41735; 3, FMB S40250; 4, FMB S44995; 5, FMB S44999; 6, FMB S41730; 7, FMB S40247; 8, FMB S44246; 9, FMB S46471; 10, FMB S41736; 11, FMB S40244; 12, FMB S40233; 13, FMB S995; 14, FMB S859; 15, FMB S998; 16, FMB S955; 17, FMB S954; 18, FMB S40234 19, FMB S888.

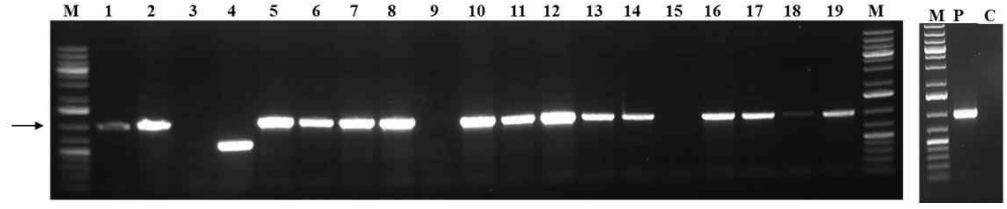
A. *maoA*




B. *dmaT*




C. *pks-nrps*




D. *β-tubulin*

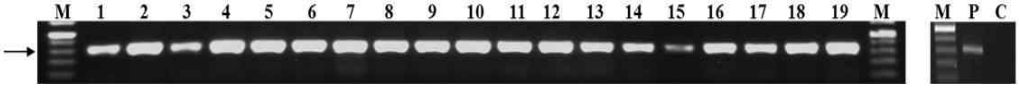


Table 3는 19종 *A. oryzae/flavus* strains 로 부터 CPA 생성능에 대한 유전자 및 HPLC 분석 결과에 대한 요약이다. 종에 따라서는 1X 농도에서는 HPLC 분석 결과 CPA가 검출되지 않았더라도, 5배 농축한 샘플에서는 CPA가 검출되었다.

Table 3. Summary of PCR patterns and HPLC analysis for the detection of CPA from *A. oryzae/flavus* strains

| Source | Species | PCR of CPA gene cluster (*maoA/ dmaT/ pks-nrps*) | Comprehensive PCR result for CPA | HPLC ($CPA^L$/ $CPA^H$) |
|---|---|---|---|---|
| Daemacjang[1] | *A. flavus* FMB S41403 | -/+/+ | w/o *maoA* | -/- |
| Traditional nuruk in market | *A. oryzae* FMB S41735 | +/+/+ | 3 bands | +/+ |
| Meju | *A. oryzae* FMB S40250 | -/-/- | w/o 3 bands | -/- |
| Soy sauce | *A. oryzae* FMB S44995 | +/-/- | w/o *dmaT, pks-nrps* | -/- |
| Chinese soy sauce | *A. oryzae* FMB S44999 | +/+/+ | 3 bands | -/+ |
| Traditional nuruk in market | *A. oryzae* FMB S41730 | +/+/+ | 3 bands | -/- |
| Meju | *A. oryzae* FMB S40247 | +/+/+ | 3 bands | -/- |
| Rice | *A. oryzae* FMB S44246 | +/+/+ | 3 bands | -/- |
| Meju | *A. oryzae* FMB S46471 | -/-/- | w/o 3 bands | -/- |
| Traditional nuruk in market | *A. oryzae* FMB S41736 | -/+/+ | w/o *maoA* | -/- |
| Meju[2] | *A. oryzae* FMB S40244 | +/+/+ | 3 bands | -/+ |
| Nuruk[3] | *A. oryzae* FMB S40233 | +/+/+ | 3 bands | +/+ |
| ATCC16507 | *A. oryzae* FMB S995 | +/+/+ | 3 bands | -/- |
| ATCC14605 | *A. oryzae* FMB S859 | +/+/+ | 3 bands | -/- |
| Cereal | *A. oryzae* FMB S998 | -/+/- | w/o *maoA, pks-nrps* | -/- |
| No information | *A. oryzae* FMB S955 | +/+/+ | 3 bands | +/+ |
| No information | *A. oryzae* FMB S954 | +/+/+ | 3 bands | +/+ |
| Nuruk | *A. oryzae* FMB S40234 | -/-/+ | w/o *maoA, dmaT* | -/- |
| ATCC22787 | *A. oryzae* FMB S888 | +/+/+ | 3 bands | +/+ |

** Daemacjang[1], black soybean paste Meju[2], a brick of dried fermented soybeans; Nuruk[3], a traditional Korean fermentation starter; $CPA^L$, the result detected in non concentrated sample; $CPA^H$, the result detected in five- fold concentrated sample; Abbreviations: A. flavus, Aspergillus flavus; A. oryzae, Aspergillus oryzae; without, w/o; cyclopiazonic acid, CPA +, positive; -, negative for the detection of CPA*

1차로 확보한 19종 *A. oryzae/flavus* 중 아플라톡신과 CPA가 모두 검출되지 않은 종은 총 11종이었다. 이 종들은 무톡신 메주/된장 제조에 활용하기 위해 스탁으로 보관되었다. 2차로 확보한 23종에 대해 아플라톡신 생성능은 HPLC 로 확인되었다. Table 4에서 해당 종에 대한 정보 및 HPLC 분석 결과 요약을 나타내었다.

Table 4. HPLC analysis for the detection of aflatoxin from 23 *A. oryzae* strains

| *ID* | HPLC (Total aflatoxins) |
|---|---|
| FMB S44847 | - |
| FMB S45006 | - |
| FMB S44989 | - |
| FMB S44990 | - |
| FMB S44994 | - |
| FMB S45007 | - |
| FMB S40242 | - |
| FMB S45001 | - |
| FMB S44992 | - |
| FMB S44997 | - |
| FMB S40232 | - |
| FMB S44969 | - |
| FMB S44823 | - |
| FMB S45002 | - |
| FMB S45107 | - |
| FMB S44988 | - |
| FMB S44968 | - |
| FMB S44993 | - |
| FMB S45004 | - |
| FMB S44971 | - |
| FMB S44966 | - |
| FMB S44967 | - |
| FMB S44991 | - |

* -, *negative for the detection of aflatoxins*

23종의 *A. oryzae*에서는 아플라톡신이 검출되지 않았다. 현재까지 1차 에서 아플라톡신/CPA 동시 독소 비생성 균주로 확인된 11종과 2차로 선별한 23종의 아플라톡신 비생성 균주를 합하여 총 34종의 아플라톡신 비생성 균주를 확보할 수가 있었고, 여러 개의 스탁으로 만들어 보관 중에 있다.

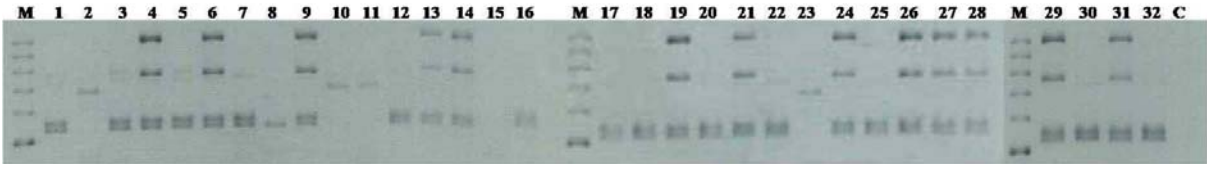
## 제 2 장. 마이코톡신 음성 *A. niger aggregates* 균주 선별 및 라이브러리 확보 (주관)

확보한 *A. niger aggregates* 38 종에 대해 다중 복합 유전자 분석 기법과 HPLC 분석법을 사용하여 오크라톡신과 푸모니신의 생성능을 확인하였다. 오크라톡신/푸모니신 각각 2개, 총 4개의 유전자 (*PKS15KS/ PKS15C-MeT/ fum1/ fum19)* 에 특이적인 primer set 를 선택하여 다중 복합 PCR 분석 기법을 이용하여 1차 스크리닝을 통해 해당 곰팡이 독소 생성 가능성 여부를 확인하였다. 오크라톡신 생합성에 관여하는 2개의 유전자 중 1개의 유전자 PCR 밴드가 없는 종은 HPLC 분석 결과에서도 오크라톡신이 검출되지 않았고, 푸모니신 생합성에 관여하는 2개의 유전자 중 1개의 유전자 PCR 밴드가 없는 종은 HPLC 분석 결과에서 역시 푸모니신이 검출되지 않았다. 해당 유전자 분석 결과가 모든 유전자 밴드 패턴을 보였을 지라도 HPLC 분석 결과에서는 독소 검출되지 않은 다수의 균 주가 존재하였다. 그 비율은 오크라톡신의 경우가 3.1%, 푸모니신의 경우가 72% 였다. 유전자 분석 결과는 Fig 1에서 나타내었다. Fig.1(C)에서는 PCR 의 internal control로써 *β-tubulin* 에 대한 PCR 결과를 보이고 있다.

**Figure 1. PCR and HPLC analysis for the detection of ochratoxin and fumonisin from *A. niger* aggregates**

(A) The multiplex PCR for *PKS15KS, PKS15C-MeT, fum1, and fum19* was performed against *32 A. niger* aggregates. (B) The PCR analysis for *β-tubulin* was done against 32 *A. niger*aggregates. M represented 100 bp DNA ladder; C represented PCR control without template. 1, FMB S993; 2, FMB S610; 3, FMB S1025; 4, FMB S984; 5, FMB S856; 6, FMB S1000; 7, FMB S994; 8, FMB S987; 9, FMB S983; 10, FMB S900; 11, FMB S901; 12, FMB S907; 13, FMB S1004; 14, FMB S982; 15, FMB S40280; 16, FMB S46497; 17, FMB S42589; 18, FMB S358; 19, FMB S980; 20, FMB S991; 21, FMB S1001; 22, FMB S990; 23, FMB S623; 24, FMB S999; 25, FMB S988; 26, FMB S6906; 27, FMB S1002; 28, FMB S37; 29, FMB S986; 30, FMB S613; 31, FMB S1003; 32, FMB S612.

A. *PKS15KS/ PKS15C-MeT/ fum1/ fum19*




B. *β-tubulin*

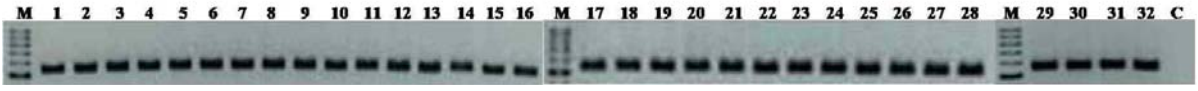



Table 1에서는 유전자 분석 결과와 HPLC 분석 결과의 요약을 보이고 있다.

Table 1. Summary of PCR patterns and HPLC analysis for the detection of ochratoxin and fumonisin from *A. niger* aggregates

| Species | *PKS15KS* | *PKS15C-MeT* | *fum1* | *fum19* | Comprehensive multiplex PCR pattern | HPLC (OTA) | HPLC ($FB_1$, $FB_2$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FMB S993 | - | + | + | + | ONFP | - | + ($FB_2$) |
| FMB S610 | - | - | - | - | ONFN | - | - |
| FMB S1025 | - | + | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S984 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S856 | - | + | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S1000 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S994 | - | - | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S987 | - | - | - | + | ONFN | - | - |
| FMB S983 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S900 | - | - | - | - | ONFN | - | - |
| FMB S901 | - | - | - | - | ONFN | - | - |
| FMB S907 | - | - | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S1004 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S982 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S40280 | - | - | - | - | ONFN | - | - |
| FMB S46497 | - | - | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S42589 | - | - | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S358 | - | - | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S980 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S991 | - | - | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S1001 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S990 | - | - | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S623 | - | - | - | - | ONFN | - | - |
| FMB S999 | + | + | + | + | OPFP | + | + ($FB_1$) |
| FMB S988 | - | - | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S6906 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S1002 | + | + | + | + | OPFP | - | - |
| FMB S37 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S986 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S613 | - | - | + | + | ONFP | - | - |
| FMB S1003 | + | + | + | + | OPFP | + | - |
| FMB S612 | - | - | + | + | ONFP | - | + ($FB_2$) |

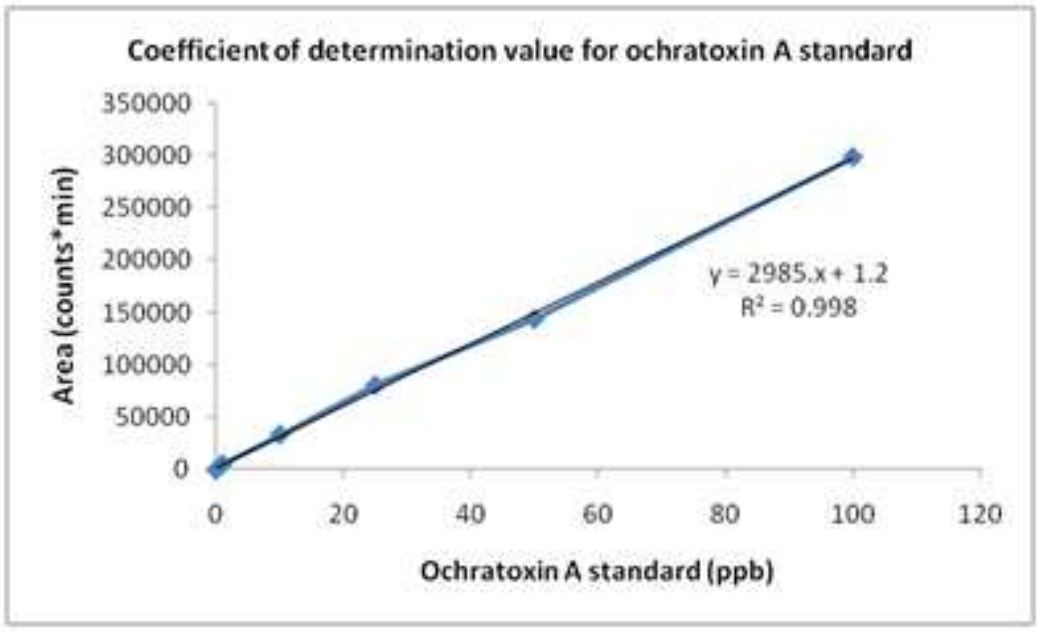
** ONFN represented the strain which did not show the PCR bands for either PKS15KS or PKS15C-MeT , and either fum1 or fum19; ONFP represented the strain which did not show the PCR band for either PKS15KS or PKS15C-MeT, but showed both bands for fum1 and fum19; OPFP represented the strain which showed all of the bands for PKS15KS, PKS15C-MeT, fum1, and fum19; +, positive; -, negative for the detection of OTA, $FB_1$, or $FB_2$ Abbreviations: ochratoxin A, OTA; fumonisin $B_1$, $FB_1$ fumonisin $B_2$, $FB_2$.*

오크라톡신과 푸모니신의 스탠다드 유효화 분석 결과와 해당 수치는 Fig. 2와 3에 나타내었다.

**Figure 2. HPLC analysis for ochratoxin A**

(A) For the validation of data, the coefficient of determination value of ochratoxin A standards was shown. (B) The table was shown the comprehensive result of HPLC , the repeated time and the level for ochratoxin A are shown. The information of repeated time and the level of ochratoxin A were shown. *+, positive; −, negative for the detection of OTA; Abbreviations: ochratoxin A, OTA.*

(A)



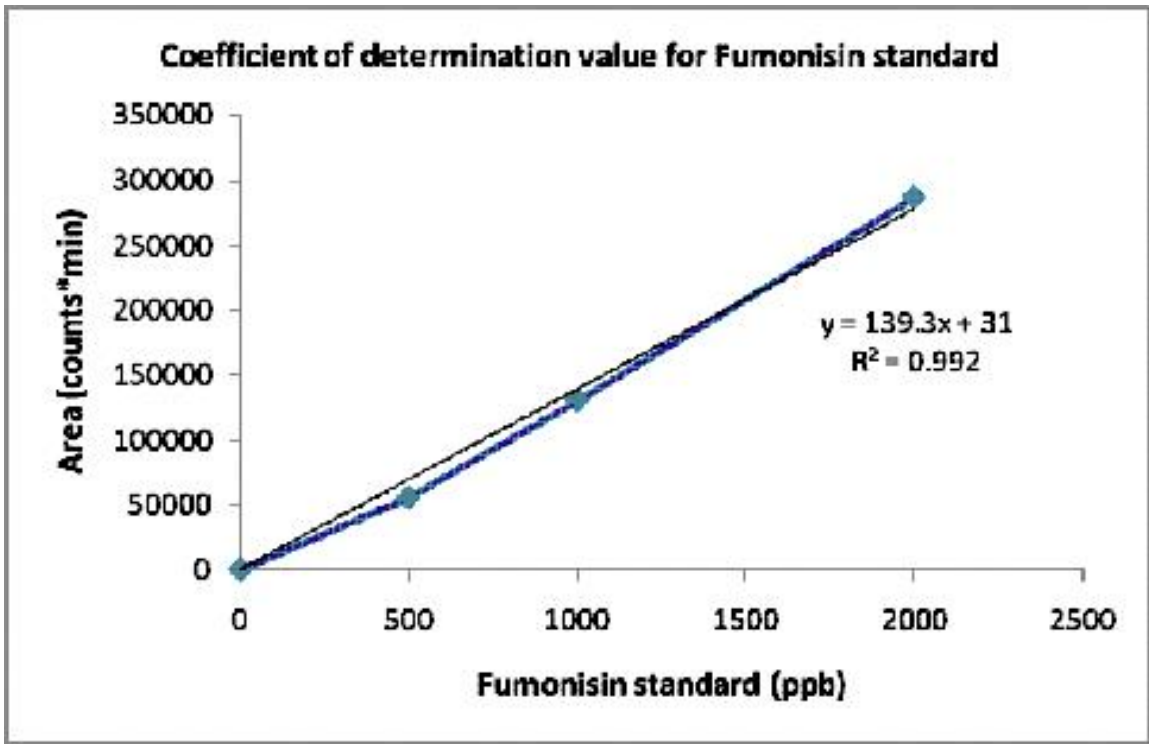
(B)

| Species | Repeat 1 | Repeat 2 | Repeat 3 | Repeat 4 | Comprehensive result of HPLC |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Detection level (ppb) | | | |
| FMB S993 | - | - | - | - | - |
| FMB S610 | - | | | | - |
| FMB S1025 | - | | | | - |
| FMB S984 | 0.17 | 0.24 | 0.62 | 0.67 | + |
| FMB S856 | - | - | - | | - |
| FMB S1000 | 0.67 | 0.08 | | | + |
| FMB S994 | - | | | | - |
| FMB S987 | - | | | | - |
| FMB S983 | 5.79 | | | | + |
| FMB S900 | - | | | | - |
| FMB S901 | - | | | | - |
| FMB S907 | - | - | - | | - |
| FMB S1004 | 0.04 | 0.32 | | | + |
| FMB S982 | 3.27 | 3.67 | 3.73 | 4.08 | + |
| FMB S40280 | - | - | - | | - |
| FMB S46497 | - | | | | - |
| FMB S42589 | - | - | - | - | - |
| FMB S358 | - | - | - | | - |
| FMB S980 | 31.32 | | | | + |
| FMB S991 | - | - | | | - |
| FMB S1001 | 0.05 | 0.35 | 0.02 | | + |
| FMB S990 | - | - | - | - | - |
| FMB S623 | - | - | - | | - |
| FMB S999 | 0.19 | 0.04 | | | + |
| FMB S988 | - | | | | - |
| FMB S6906 | 82.65 | | | | + |
| FMB S1002 | - | - | - | | - |
| FMB S37 | 0.27 | | | | + |
| FMB S986 | 0.02 | 0.08 | | | + |
| FMB S613 | - | - | - | - | - |
| FMB S1003 | 0.27 | | | | + |
| FMB S612 | - | - | - | | - |

Figure 3. HPLC analysis for fumonisin $B_1$ and $B_2$

(A) For the validation of data, the coefficient of determination value of fumonisin standards was shown. (B) The comprehensive result of HPLC, the repeated time and the level for fumnisins are shown. *+, positive; -, negative for the detection of $FB_1$ or $FB_2$ Abbreviations: fumonisin $B_1$, $FB_1$ fumonisin $B_2$, $FB_2$*

(A)



(B)

| Species | Repeat 1 | Repeat 2 | Repeat 3 | Comprehensive result of HPLC |
|---|---|---|---|---|
| | Detection level (ppb) | | | |
| FMB S993 | 752.58 | | | +($FB_2$) |
| FMB S610 | - | - | - | - |
| FMB S1025 | - | - | | - |
| FMB S984 | - | - | | - |
| FMB S856 | - | - | | - |
| FMB S1000 | - | - | - | - |
| FMB S994 | - | - | | - |
| FMB S987 | - | - | | - |
| FMB S983 | - | - | | - |
| FMB S900 | - | - | - | - |
| FMB S901 | - | | | - |
| FMB S907 | - | - | | - |
| FMB S1004 | - | - | | - |
| FMB S982 | - | - | | - |
| FMB S40280 | - | - | - | - |
| FMB S46497 | - | - | | - |
| FMB S42589 | - | - | | - |
| FMB S358 | - | | | - |
| FMB S980 | - | - | | - |
| FMB S991 | - | - | | - |
| FMB S1001 | - | | | - |
| FMB S990 | - | - | - | - |
| FMB S623 | - | - | - | - |
| FMB S999 | 704.96 | | | +($FB_1$) |
| FMB S988 | - | - | | - |
| FMB S6906 | - | - | | - |
| FMB S1002 | - | | | - |
| FMB S37 | - | - | | - |
| FMB S986 | - | - | | - |
| FMB S613 | - | - | | - |
| FMB S1003 | - | - | | - |
| FMB S612 | 443.17 | | | +($FB_2$) |

1차 선별을 통해 HPLC 분석 최종 결과에서 오크라톡신/푸모니신 동시 음성 생산인 18종의 균주 라이브러리 확보하였고, 2차로 확보된 6종의 *A. niger* 로 부터 HPLC 분석 최종 결과에서 오크라톡신/푸모니신 동시 비생성능을 보인 5종의 균주를 추가 확보하였다. 추가 6종에 대한 HPLC 분석 결과는 Table 2에 나타내었다.

Table 2. HPLC analysis for the detection of aflatoxin from 6 *A. niger* strains

| Species | ID | HPLC ( *Ochratoxin A and Fumonisins* ) |
|---|---|---|
| *Aspergillus niger* | FMB S41018 | - |
| *Aspergillus niger* | FMB S43547 | - |
| *Aspergillus niger* | FMB S46494 | - |
| *Aspergillus niger* | FMB S44993 | - |
| *Aspergillus niger* | FMB S44333 | - |
| *Aspergillus niger* | FMB S46495 | $FB_2$ |

* -, *negative for the detection of ochratoxin A and fumonisins*

그 결과, 총 23 종의 오크라톡신/푸모니신 비생성 *A. niger aggregates* 균주 라이브러리 확보하였고, 여러 개의 스탁으로 만들어 보관 중에 있다.

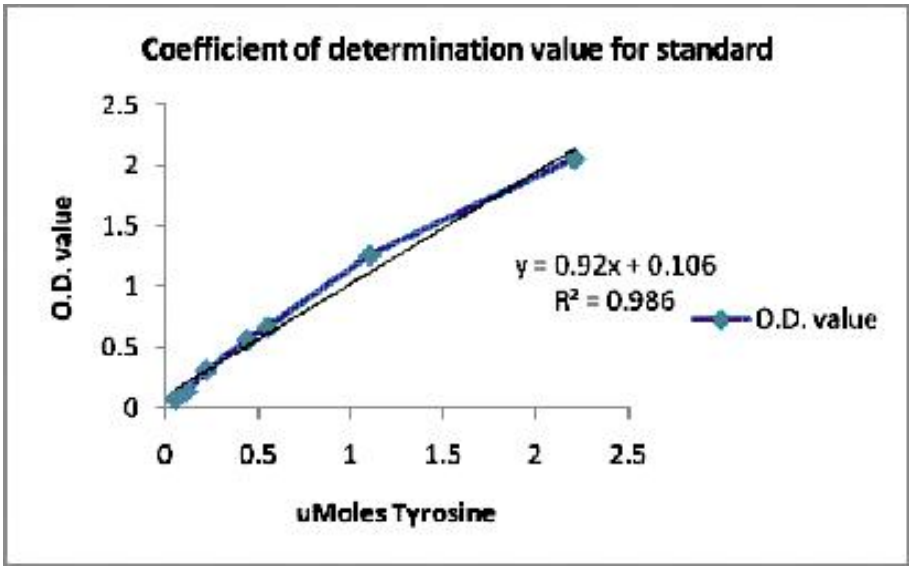
## 제 3 장. 무톡신 *A. oryzae* 균주의 단백분해효소 활성 측정 및 된장 제조시 아플라톡신 생성 여부 확인 (주관)

유전자 및 HPLC 분석 결과 모두에서 아플라톡신과 CPA 생성능이 없다고 선별된 5종의 *A. oryzae* (FMB S40250, FMB S40234, FMB S41736, FMB S46471, FMB S998)에 대한 단백질 분해 효소 활성을 측정하였다.

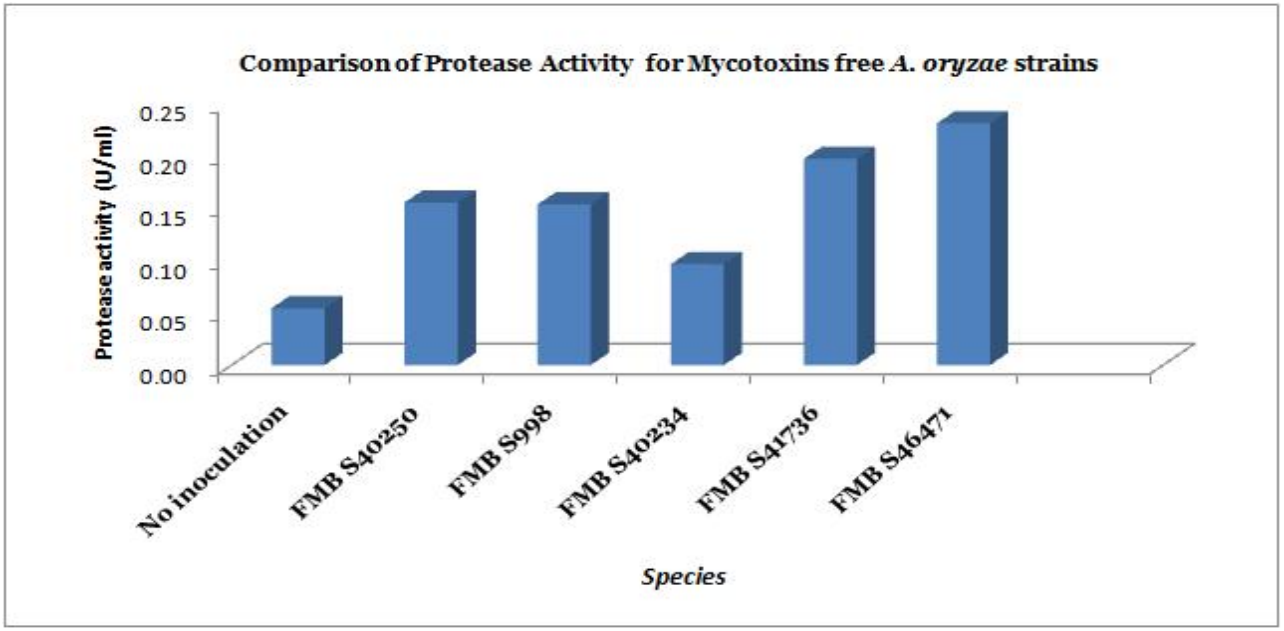
Fig 1에서 스탠다드에 대한 유효화 여부와 5종의 상대적인 단백 분해 활성능에 대해 보이고 있다.

Figure 1.

(A)



(B)




균을 접종하지 않은 샘플은 음성 대조군으로 사용하였다. 5종 중 *aflR*의 PCR 밴드를 보이지 않았으며, HPLC 분석 결과에서 마이코톡신이 검출되지 않은 FMB S46471은 가장 우수한 단백질 분해능 결과를 보였다. 또한 이들 5종의 균을 이용해 18% 의 염도로 90일간의 숙성 기간을 거쳐 제조한 된장의 아플라톡신 생성 여부를 HPLC 결과 분석을 통해 확인하였다. 그 결과 5종으로 생산한 된장에서 아플라톡신은 검출되지 않았다. (data not shown) 무톡신 균주를 실제 식품 제조에 적용하여 생산한 결과, 예상했던 바와 같이 아플라톡신은 전혀 검출되지 않았다.

## 제 4 장. *Lactobacillus brevis* GABA100의 GABA 생성을 위한 최적 조건 탐색 (주관)

1. MRS 배지에서 *L. brevis* GABA100 배양 시 pH와 CFU(Colony forming Unit)의 변화 특성 확인

-70℃ deepfreezer에서 냉동 보관 중인 *L. brevis* GABA100을 Lactobacilli MRS broth (Difco Co.) 배지에 1% 접종하였고 37℃에서 배양하였다. 2차 계대 배양한 *L. brevis* GABA100을 MRS 배지에 1% 접종하여 6시간 간격으로 5일(170h)간 관찰하였고, pH 변화와 평판희석 도말법을 이용하여 CFU 변화를 확인하였다. 배양 결과, 18시간에서 최대 CFU(2.8x10^9cells/ml)를 나타냈고(Fig. 1), 그 이후부터 CFU가 감소되어 5일(170h)차에는 1.0x10^5cells/ml 수준을 보였다. 또한 초기 pH 6.33에서 배양 18시간 후 pH 4.33으로 낮아지고(Fi. 2) 그 이후로는 pH가 유지되는 현상이 이어졌다.

Figure 1. *L. brevis* GABA100의 배양 시간별 CFU 변화

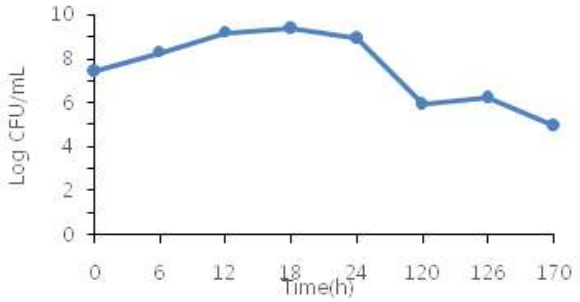
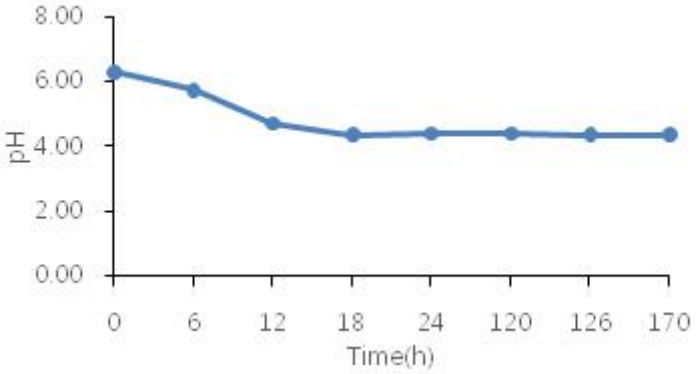



Figure 2. *L. brevis* GABA100의 배양 시간별 pH 변화




Monosodium glutamate(MSG) 3% 첨가된 MRS 배지를 pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0으로 총 5군을 설정하고 *L. brevis* GABA100 1%를 접종하였다. 30℃에서 3일 (72h) 간 배양하면서 각 군의 pH 조건을 유지하기 위해 citric acid로 pH를 조절하였고 6시간마다 CFU와 pH의 변화, TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용한 GABA 전환을 분석하였다.

배양 18시간을 기준으로 CFU 증가 상위군은 pH 4.5, 5.0, 5.5군 (Fig. 3)이고 이 중 pH 5.5가 가장 높은 CFU를 보인 반면, pH 4.0 군에서는 CFU가 가장 낮았다. 배양 18시간 이후 CFU가 유지되는 군은 pH 4.5로 배양 48시간까지 10^9cells/mL 이상이므로 추후 연구에서 배양 pH 조건을 4.5 이상으로 설정하였다.

각 군의 조건에 맞춰 citric acid를 첨가하여 pH를 조절했기 때문에 pH 변화는 전체적으로 유지되는 양상을 보이나 pH 5.0 (18h)과 pH 5.5 (24h)군에서 변화폭이 크게 나타났다 (Figure 4). MSG가 *L. brevis* GABA100의 GAD (Glutamic acid decarboxylase)에 의해 GABA로 전환될 때 pH가 증가하기 때문에 pH 5.0과 5.5 군에서 나타나는 pH 급증 현상은 GABA 생성의 영향으로 보여진다.

TLC로 GABA 전환을 확인한 결과, 3일차(72h)에 모든 군에서 MSG가 GABA로 전환되었다. pH 5.0군은 24시간 전후로 GABA전환이 급격히 발생 (Fig. 5)했고 36시간에는 대부분의 MSG가 소모되었다. 또한 pH 5.5군도 18~24시간 사이에 MSG가 GABA로 전환이 일어났고 이는 pH가 급증한 시점과 일치했다. 그 다음 GABA 전환이 많이 이뤄진 pH 4.5군의 경우 pH에 큰 변화는 없었지만 36시간 이후로 MSG가 대부분 소모되었다. GABA 전환에 의해 pH가 증가하나 pH 4.5군은 높은 CFU를 유지했기 때문에 *L. brevis* GABA100의 생장에 의한 pH 저하와 상쇄되었을 것으로 보인다. 그 외 pH 4.0과 6.0군에서는 GABA 전환이 이뤄지나 MSG를 소모하는데 다른 군보다 오래 걸렸으므로 pH 4.5~5.5 범위로 배지 환경을 조절한다면 GAD에 의한 GABA 생성을 효율적으로 진행할 수 있을 것이다.

Figure 3. pH가 조절된 MSG 3% 첨가 MRS 배지에서 *L, brevis* GABA100의 시간별 CFU 변화 pH 4.0(●, 4.5(✳), pH 5.0(■), pH 5.5(◆), pH 6.0(▲

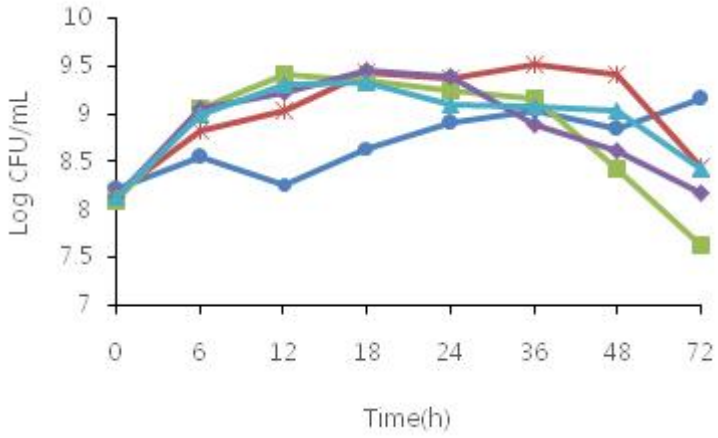



Figure 4. pH가 조절된 MSG 3% 첨가 MRS 배지에서 *L, brevis* GABA100의 시간별 pH 변화 pH 4.0(●, 4.5(✳), pH 5.0(■), pH 5.5(◆), pH 6.0(▲

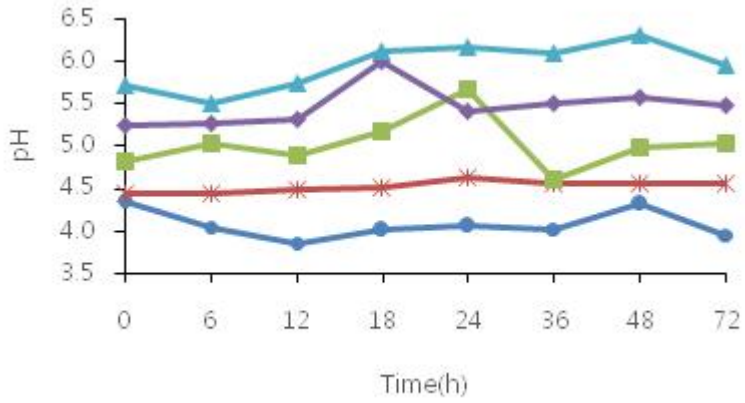
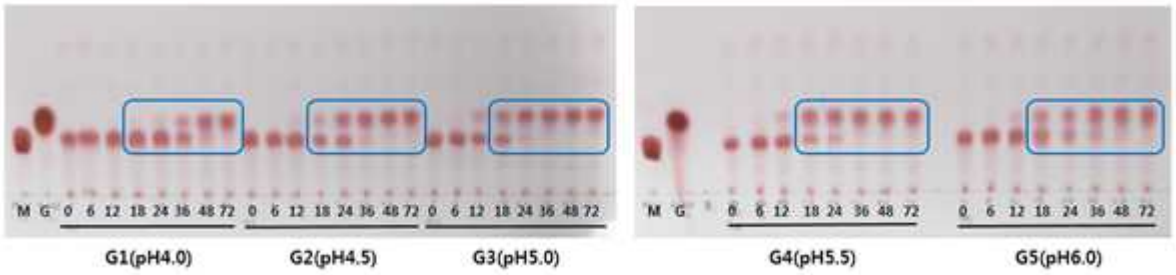



Figure 5. pH가 조절된 MSG 3% 첨가 MRS 배지에서 *L, brevis* GABA100의 시간별 GABA 생성 Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%



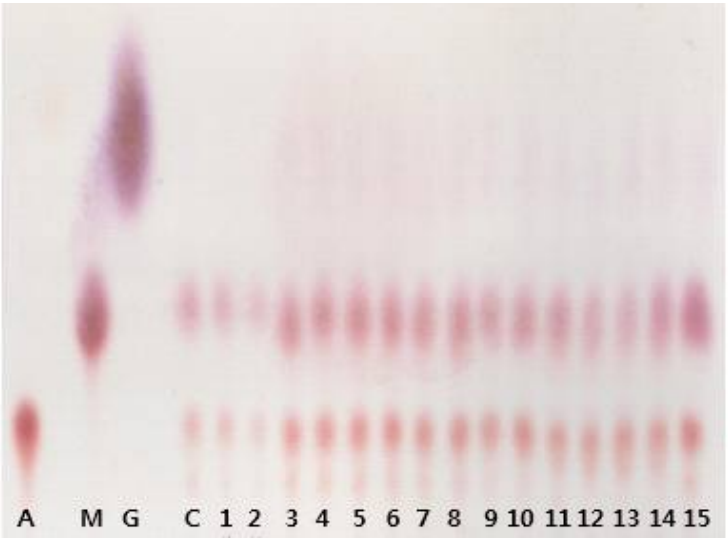
## 제 5 장. 다시마를 이용한 천연 유래 glutamic acid 추출 조건 탐색 (주관)

부산 기장산 건다시마를 서울 소재 재래 시장에서 구입하여 대용량 믹서로 분쇄 후 다시마 분말을 멸균수(DW)와 1:15(w/v) 비율로 혼합하였다. 온도별, 시간별, 첨가물별 총 15군을 설정하고 조건(Table 1)에 맞춰 열수추출을 진행 후 centrifugation(13,000rpm, 40분, 4℃)하여 상등액을 TLC 분석에 사용하였다. TLC에 나타난 아미노산 패턴을 보면 다시마에는 GABA가 거의 없고 glutamic acid와 aspartic acid가 주요 아미노산으로, group 15의 glutamic acid가 가장 진하게 나타났다(Fig. 16). 그러나 group 1, 2를 제외한 전체 군에서 glutamic acid 추출 정도가 비슷하게 나타난 것으로 보아 가열 온도, 시간, 첨가물의 영향보다는 열수추출 과정을 거치면 다시마의 glutamic acid가 대부분 추출되는 것으로 보인다. 따라서 다시마의 열수추출과 동시에 멸균 과정을 진행할 수 있도록 추후 실험에서는 121℃, 15~30분을 열수추출 조건으로 설정하였다.

Table 1. 온도, 시간, 첨가물에 따른 다시마 열수추출 조건

| | 가열 온도(℃) | 가열 시간(h) | 첨가물 |
|---|---|---|---|
| Control | - | - | - |
| Group1 | 100 | 2 | - |
| Group2 | 100 | 2 | 2% NaCl |
| Group3 | 100 | 2 | 2% sucrose |
| Group4 | 121 | 0.5 | - |
| Group5 | 80 | 9 | - |
| Group6 | 100 | 4 | - |
| Group7 | 100 | 0.5 | 0.2% citric acid |
| Group8 | 100 | 1 | 0.2% citric acid |
| Group9 | 121 | 0.5 | 0.2% citric acid |
| Group10 | 121 | 1 | 0.2% citric acid |
| Group11 | 100 | 1 | 2% citric acid |
| Group12 | 121 | 0.5 | 2% citric acid |
| Group13 | 121 | 1 | 2% citric acid |
| Group14 | 80 | 4 | - |
| | 121 | 0.25 | - |
| Group15 | 121 | 0.25 | - |

Figure 6. 다시마 열수추출 조건별 glutamic acid 추출 비교 Lane A, Aspartic acid 1%; Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%; C, control



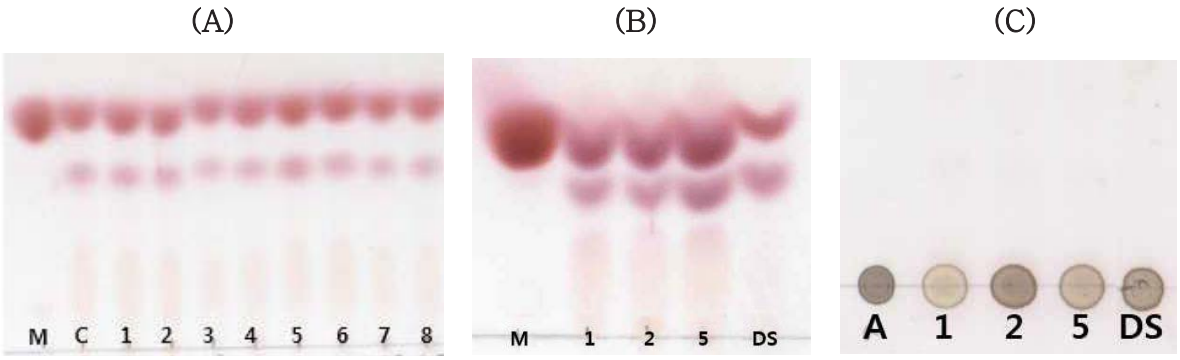

부산 기장산 건다시마를 추출 형태(분말, 조각), 다시마와 수분첨가량 비율(w/v), 탈염 여부, 열수 추출 횟수에 따라 9군으로 구성하고 시중에서 판매되고 있는 탈염다시마분말을 구입하여 총 10군으로 설정하였다. 분말 다시마는 대용량 믹서를 사용하여 최대 세기에서 1분간 분쇄, 조각 다시마는 필요 중량에 맞춰 70% ethanol로 소독한 가위를 사용하였다. 탈염 과정은 다시마에 멸균수(DW)를 1:15(w/v) 비율로 첨가하여 vortexer로 5분간 섞어준 후 centrifugation(13,000rpm, 3min, 4℃)하여 염분을 제거하였다. 다시마와 수분첨가량 비율을 각 군의 조건에 맞춰 첨가하여 121℃, 15분 열수추출 후 centrifugation(13,000rpm, 3분, 4℃)한 상등액을 TLC 분석에 사용하였다. 염도계를 사용하여 각 군별 염도를 측정하였고 TLC를 사용하여 glutamic acid와 alginic acid의 추출 정도를 비교한 결과, 다시마추출물의 염도(Table 2)는 무가열군(control)에서 2.8%, 무탈염 1회 열수추출군(group1)에서 3.4%, 무탈염 2회 열수추출군(group2)에서 3.8%로 나타났다. 다시마의 추출 형태, 탈염, 추출횟수가 동일한 조건에서 수분첨가량이 증가(group3) 했을 때 염도는 수분첨가량 증가 비율만큼 감소하였다. 다시마의 추출 형태에 따른 다시마추출물의 염도는 0.1% 차이로 유사한 수치를 보였다. 다시마추출액을 아미노산 TLC와 당 TLC로 분석한 결과, 다시마를 열수추출 시 glutamic acid는 전체 군에서 비슷하게 추출되나 수분첨가량 증가 조건에서는 glutamic acid가 다른 군에 비해 상대적으로 적고(Fig. 7A) 열수 추출 횟수는 1회 실시군과 2회 실시군이 큰 차이를 보이지 않으나 무가열군보다 glutamic acid가 많이 추출되었음을 확인할 수 있었다. 다시마의 추출 형태 중 분말 다시마보다는 조각 다시마에서 많이 추출되었고 특히 탈염 과정을 거치게 되면 상당량의 glutamic acid의 손실이 발생하였다(Fig. 7B). 당 TLC에서는 동일한 수분첨가량(1:15(w/v)) 조건에서 alginic acid는 무가열군보다는 열수추출한 군에서 많이 추출되었고 조각 다시마보다 분말 다시마 형태에서 많이 추출되었음을 확인하였다(Fig. 7C).

Table 2. 다시마의 추출 형태, 수분첨가량, 탈염, 추출 횟수에 따른 다시마추출물의 염도 비교

| | 추출 형태 | 수분첨가량(w/v)* | 탈염 유, 무 | 추출 횟수(회) | 염도 |
|---|---|---|---|---|---|
| Control 1 | 분말 | 1:15 | X | X | 2.8 |
| Group 1 | 분말 | 1:15 | X | 1 | 3.4 |
| Group 2 | 분말 | 1:15 | X | 2 | 3.8 |
| Group 3 | 분말 | 1:30 | X | 1 | 1.8 |
| Group 4 | 분말 | 1:30 | X | 2 | 2.0 |
| Group 5 | 조각 | 1:15 | X | 1 | 3.3 |
| Group 6 | 조각 | 1:30 | X | 1 | 1.7 |
| Group 7 | 분말 | 1:15 | O | 1 | 2.8 |
| Group 8 | 분말 | 1:15 | O | 2 | 3.1 |
| DS | 분말 | 1:15 | O | 1 | - |

**수분첨가량은 다시마 중량(w) 대비 멸균수(DW)의 첨가 부피(v)를 의미한다.*

Figure 7. 다시마의 추출 형태, 수분첨가량, 탈염, 추출 횟수에 따른 다시마추출물의 glutamic acid와 alginic acid의 추출 비교 Lane M, MSG 1%; Lane C, control; Lane A, sodium alginic acid 1%



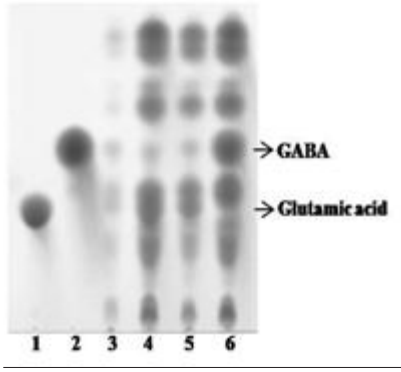
## 제 6 장. 마이코톡신 생산 음성 *A. oryzae* 와 GABA 고 생산 *L. brevis* GABA 100 에 의해 생산된 메주 제조 및 저염 된장 제품화(주관)

실제 식품에 적용한 결과 독소 생성에 대한 안전성을 확인한 후, 그 중 단백질 분해 활성이 가장 우수한 균주 46471을 이용해 무톡신 GABA 고함량 메주 제작을 계획하였다. 우선은 메주 제작의 최적화 조건을 구축하기 위해 작은 사이즈의 콩 발효에서 부터 시작하였다. 그 사이즈는 불린콩 30 g을 가지고 선행 실험을 수행하였다. 1일 동안 침수하여 불린 콩을 깨끗이 세척하여 121도, 15분 동안 고온 고압 멸균기에서 삶았다. 이 콩을 식힌 후 *A. oryzae* 를 접종하였다. 이전 실험을 통해 단백질 분해 활성이 가장 높게 측정된 7일 동안 1차 호기 발효를 했다. 1차 발효가 완료된 콩에 *L. brevis*를 추가로 접종하여 30도에서 혐기로 2차 발효를 진행했다. GABA 전환량 여부는 TLC를 통해 일자별로 확인하였고, 최적의 GABA 전환 일자를 결정하였다. 그 일자는 2차 발효를 시작한 후 7일째 되는 날이 되었다. 이에 대한 결과는 Fig 1과 Table 1에서 나타내었다.

Fig 1(A).의 TLC 결과를 보면 곰팡이를 접종하지 않은 샘플의 아미노산 패턴은 흐린 밴드 패턴을 보이고 있으며, *L. brevis*를 추가 접종하지 않은 샘플에서는 GABA 생성이 굉장히 낮은 수치에서 확인되었다. 또한, *L. brevis*를 함께 접종한 샘플에서는 GABA와 Lactic acid 가 높은 수치로 측정되었다. 정량적인 수치는 Table 1에서 보이고 있다.

**Figure 1. GABA production on small-scale cultivation conditions**

(A) Thin layer chromatogram showing the GABA production from glutamic acid. Glutamic acid (1%) (Line 1); GABA (1%) (Line 2); the sample fermented without both *A. oryzae* KACC 46471 and *L. brevis* GABA100 for 14 days (Line 3); the sample fermented by only *A. oryzae* KACC 46471 for 14 days (Line 4); the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for seven days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and without further fermentation (Line 5) ; the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for seven days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and further fermented for the following seven days (Line 6) (B) The chromatogram for quantitative values of free amino acids from the sample fermented by only *A. oryzae* KACC 46471 for 14 days (C) The chromatogram for quantitative values of free amino acids from the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for seven days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and further fermented for the following seven days *Abbreviations: w/, with; w/o, without; GABA, ɣ-aminobutyric acid; *L. brevis* GABA100, *Lactobacillus brevis* GABA100




(B) (C)

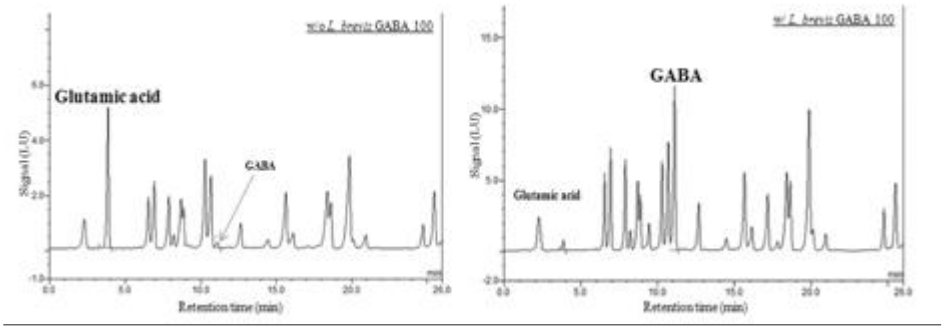



Table 1. Contents of glutamic acid, GABA, lactic acid, and acetic acid depending on the fermentation of *L. brevis* GABA 100 with *A. oryzae* KACC 46471 in small-scale cultivation conditions for GABA production

| Samples | Glutamic acid (mg/kg) | GABA[3] (mg/kg) | Lactic acid (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| Fermented with only *A. oryzae*KACC46471[1] | 3817±3 | 135±1 | N.D.[4] |
| Fermented with *A. oryzae* KACC 46471 and *L. brevis* GABA100[2] | 274±10 | 3443±58 | 11301±32 |

* *A. oryzae* KACC 46471[1],*Aspergillus oryzae* KACC 46471; *L. brevis* GABA100[2],*Lactobacillus brevis* GABA100;
GABA[3],γ-Aminobutyricacid;N.D.[4],notdetected.*Thevalueswerepresentedasthemeanoftwodeterminationswithstanderror.

작은 사이즈의 발효 조건에서 확인된 분석 결과를 바탕으로 실제 메주 사이즈 (3.5kg)에서 실험 결과의 validation을 진행하였다. 메주는  실제 생산라인인 안동 농협에서 제조를 하였다. 불린콩을 121도 15분 동안 고온 고압 멸균기에서 삶아져 준비되었고, 삶아 식힌 콩에 KACC 46471 을 접종하여 메주 형태로 성형하였다. 이렇게 제작된 메주는 실험실로 옮겨와 30도 60% 습도의 배양기에서 메주의 무게가 2,000 g이 될 때까지 12일 동안 발효시켰다.

*A. oryzae* 에 의한 1차 발효가 끝난 후 2.5 L의 멸균수와 5% 의 *L. brevis* GABA 100이 추가 접종되었다. 또한 GABA 생성을 위한 최적 pH를 맞추기 위해 1M Citric acid 70 ml이 첨가되었다. 이들은 30도, 혐기 조건으로 7일 동안 2차 발효를 진행했다. GABA 생성률은 일자별로 TLC 분석을 통해 확인했다.
스케일 업 발효 메주에 대한 결과는 Fig 2.와 Table 2에 나타내었다. GABA 와 Lactic acid 는 높은 수치로 생성이 되었고, 그 양은 작은 사이즈 과 보다, GABA 생성량의 경우는 약 2배 더 높은 생성량을 확인할 수가 있었다. 또한 이렇게 생성된 메주의 아플라톡신 생성은 HPLC 분석 결과를 통해 확인하였고, 그 결과 아플라톡신은 전혀 검출되지 않았다.

**Figure 2. GABA production on scaled-up fermentation**

(A) Thin layer chromatogram showing the GABA production from glutamic acid. Glutamic acid (1%) (Line 1); GABA (1%) (Line 2); the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for 12 days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and without further fermentation (Line 3); the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for 12 days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and further fermented for the following one day (Line 4); the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for 12 days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and further fermented for the following two days (Line 5); the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for 12 days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and further fermented for the following three days (Line 6); the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for 12 days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and further fermented for the following five days (Line 7); the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for 12 days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and further fermented for the following seven days (Line 8) (B) The chromatogram for quantitative values of free amino acids from the sample fermented by *A. oryzae* KACC 46471 for 12 days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and further fermented for the following five days *Abbreviations: w/, with; GABA, ɣ-aminobutyric acid; *L. brevis* GABA100, *Lactobacillus brevis* GABA100

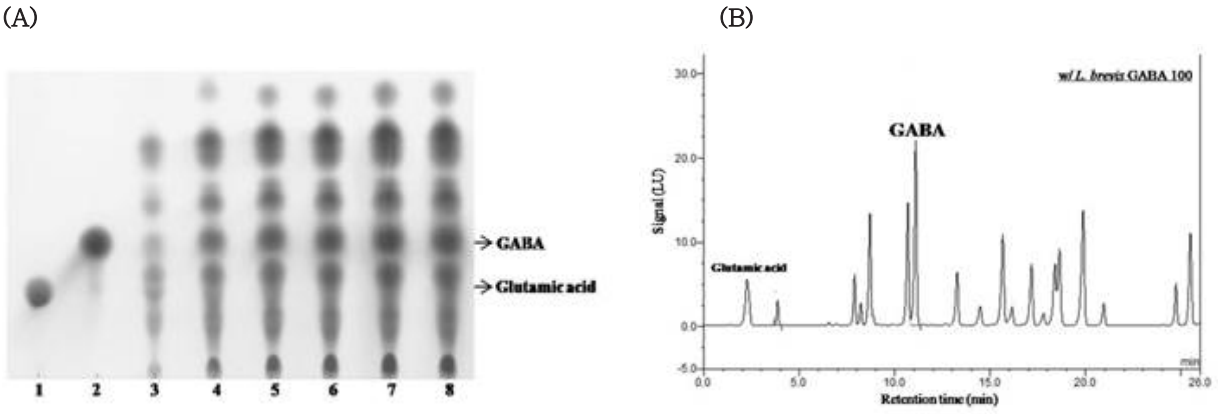


Table 2. Contents of glutamic acid, GABA, lactic acid, and acetic acid depending on the fermentation of *L. brevis* GABA 100 with *A. oryzae* KACC 46471 in scaled-up fermentation for GABA production

| Sample | Glutamic acid (mg/L) | GABA[3](mg/L) | Lactic acid (mg/L) |
|---|---|---|---|
| Fermented with *A. oryzae* KACC 46471[1]and*L. brevis* GABA100[2] | 1140±22 | 6486±133 | 14636±274 |

* *A. oryzae* KACC 46471[1],*Aspergillus oryzae* KACC 46471; *L. brevis* GABA100[2],*Lactobacillus brevis* GABA100; GABA[3],ɣ-Aminobutyricacid. *The values were presented as the mean of two determinations with standard error.

스케일업 발효 조건에서 성공적인 무독신 GABA 고 함량 메주 생산을 확인하였다.
현재는 이 메주를 이용해서 된장 제조를 진행하고 있으며, 유산균에 의한 풍부한 유기산으로 인해 기존의 된장보다 염도를 낮춘 건강한 저염 된장의 제조화 연구를 진행하고 있다.

## 제 7 장. 오크라톡신과 푸모니신의 신속 검출과 이들 독소를 생성하지 않는 균주 개발과 이를 이용한 된장 제조(주관)

본 과제에서 개발한 다중 복합 유전자 분석 기법과 HPLC 분석법을 사용하여 마이코톡신 검출 및 정량법을 확립하였고 마이코톡신 음성 균주를 선발하고 이 균주들을 이용하여 마이코톡신-free 된장을 개발하여 특허 출원하였다. 다중 복합 PCR 분석법에 사용된 primer에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다. 오크라톡신 생합성에 관여하는 2개의 유전자 중 1개의 유전자 PCR 밴드가 없는 종은 HPLC 분석 결과에서도 오크라톡신이 검출되지 않았고, 푸모니신 생합성에 관여하는 2개의 유전자 중 1개의 유전자 PCR 밴드가 없는 종은 HPLC 분석 결과에서 역시 푸모니신이 검출되지 않았다. 해당 유전자 분석 결과가 모든 유전자 밴드 패턴을 보였을지라도 HPLC 분석 결과에서는 독소 검출되지 않은 다수의 균 주가 존재하였다. 그 비율은 오크라톡신의 경우가 3.1%, 푸모니신의 경우가 72% 였다. 유전자 분석 결과는 Figure. 1에서 나타내었다.

Table 1. The information of primers used in this study

| Primer | Sequence (5'>3') | Amplicon (bp) | Gene |
|---|---|---|---|
| PKS15KS-f | CAATGCCGTCCAACCGTATG | 776 | *PKS15KS* |
| PKS15KS-r | CCTTCGCCTCGCCCGTAG | | |
| PKS15C-MeT-f | GCTTTCATGGACTGGATG | 998 | *PKS15CMeT* |
| PKS15C-MeT-r | CATTTCGTTGATCCCATCG | | |
| fum1.2f | CCATCGTGGGATCTCAGAGATG | 557 | *fum1* |
| fum1.2r | CGCCAATGTCAAGCATATGGTC | | |
| fum19.2f | CCACGCTGTTGGGACTGAACTA | 536 | *fum19* |
| fum19.2r | GCGTTGCGAAGTGTTCAATAGC | | |

*1) Amplification conditions were 95°C for 4 min; 35 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and 72°C for 7 min. Two ochratoxin biosynthetic genes and two fumonisin biosynthetic genes were amplified using the four pairs of primers for multiplex PCR analysis.*

선발한 곰팡이 독소 비생산 균주들에 대해 실제 식품 기질에서 발효할 경우 곰팡이 독소 생성 여부를 평가하기 위해 오크라톡신/푸모니신 동시 비생산 균주 FMB S40280 과 FMB S610 를 삶은 콩 (30 g)에 접종하여 10 일 간 15 도, 30 도, 40 도에서 발효 시킨 후 곰팡이 독소 검출을 HPLC 분석법으로 확인한 결과 곰팡이 독소는 검출되지 않았다 (Table 2).

Table 2. An evaluation of ochratoxin in fermented soybeans by FMB S40280 and FMB S610.

| Sample | | Ochratoxin |
|---|---|---|
| FMB S40280 | 15 ℃ | N.D. |
| | 30 ℃ | N.D. |
| | 40 ℃ | N.D. |
| FMB S610 | 15 ℃ | N.D. |
| | 30 ℃ | N.D. |
| | 40 ℃ | N.D. |

오크라톡신과 푸모니신 생성능 여부 평가를 위해 다중복합 PCR 분석법과 HPLC 분석법을 이용한 패턴 분석은 유효한 분석 결과 도출을 위한 용이성과 신속성 및 경제적 효용성과 분석 결과의 신뢰성을 높여주었다.

## 제 8 장. 아플라톡신과 CPA의 신속 검출과 이들 독소를 생성하지 않는 균주개발과 를 이용한 된장 제조(주관)

된장 등 발효식품으로부터 분리된 다양한 *A. oryzae* 에 대해 유전자 분석 기법과 HPLC 분석법을 사용하여 곰팡이 독소 생산 여부 확인하였다. 선택 곰팡이 독소 종류는 총 아플라톡신 ($AFB_1$, $AFB_2$, $AFG_1$, $AFG_2$) 과 CPA (cyclopiazonic acid) 에 대한 독소 생성능 여부를 확인하였다. 두 종류의 곰팡이 독소 유전자에 특이적인 primer set 정보는 Table 3 에 나타내었다. 아플라톡신 생합성에 필수적인 구조 유전자와 조절 유전자 총 4 개 (*omtB, aflaR, ver-1, omtA*)를 선택하였다. CPA 독소 생성 가능성을 선별해내기 위한 유전자로는 3 개 (*maoA, dmaT, pks-nrps*) 를 선택하였다. 또한 이 분석에서 사용한 곰팡이 종이 *A. oryzae/flavus* 인지를 확인하기 위해 종 특이적인 유전자에 대한 primer 를 채택하여 PCR 수행을 하였다.

Table 3. The information of primers used in this study

| Primer | Sequence (5′>3′) | Amplicon (bp) | Gene |
|---|---|---|---|
| PEPO1 | CGACGTCTACAAGCCTTCTGGAAA | 200 | *pepO* |
| PEPO2 | CAGCAGACCGTCATTGTTCTTGTC | | |
| omtB(F)-F | GCCTTGACATGGAAACCATC | 1333 | *omtB* |
| omtB(F)-R | CCAAGATGGCCTGCTCTTTA | | |
| aflR1 | TATCTCCCCCCGGGCATCTCCCGG | 1032 | *aflR* |
| aflR2 | CCGTCAGACAGCCACTGGACACGG | | |
| ver-1F | ATGTCGGATAATCACCGTTTAGATGGC | 895 | *ver-1* |
| ver-1R | CGAAAAGCGCCACCATCCACCCCAATG | | |
| omt1 | GTGGACGGACCTAGTCCGACATCAC | 797 | *omtA* |
| omt2 | GTCGGCGCCACGCACTGGGTTGGGG | | |
| maoA F | GACCGTCGCTGTCGTTGAAC | 462 | *maoA* |
| maoA R | ACTCCGATGTACTGAATGACG | | |
| dmaT F | GTCTCTGGATCGTTCCGTCG | 765 | *dmaT* |
| dmaT R | GTATAGCACAGCTCCGATGT | | |
| pks F | GTATAGCACAGCTCCGATGT | 986 | *pks-nrps* |
| pks R | GAATGCAAGGAGCCTCTCGT | | |

1) The PCR conditions for aflatoxins were initial denaturation at 95°C for 4 min; 25 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 57°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min; and final extension at 72°C for 7 min. 2) The PCR conditions for CPA were initial denaturation at 94°C for 1 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min; and final extension at 72°C for 5 min.

FMB S46471 은 신규한 된장 제조에 이용하였다. *L. brevis* GABA100 에 의해 제조된 된장에서의 GABA 생성 여부를 확인하기 위해 실제 메주 사이즈로 된장을 제조하기 전에 작은 사이즈로 된장 제조를 하여 그 결과를 TLC 분석법과 HPLC 분석법으로 확인하였다 (Figure 7). FMB S46471 과 *L. brevis* GABA100 을 접종하여 발효한 샘플에서 GABA 생성이 확인되었다. 결과 확인 후, 실제 메주 사이즈에서 연구 내용을 적용하기 위해, 안동 농협 메주 생산 라인에서 준비된 삶은 콩 (3.5kg)을 식힌 후 FMB S46471 ($10^6$ cells/g)을 접종하였다. 이는 항온 배양기에서 12 일 간 30 도 에서 호기로 배양된 이후에 *L. brevis* GABA100 (5% (v/v), $10^8$ cells CFU/ml) 를 추가 접종하고 citric acid 로 pH 5.0 으로 조정한 후 5 일 동안 30 도 에서 혐기로 추가 배양을 실시하였다.

90일 숙성 전 후 된장에서의  곰팡이 독소 생성 여부에 대한 결과는 HPLC 분석법으로 확인하였다 (Table 4). 90일 숙성 전 후의 된장에서 총 아플라톡신 ($AFG_1$, $AFG_2$, $AFB_1$, $AFB_2$)은 검출되지 않았다.  90일 숙성 전 후 된장 및 비교를 위해 선택된 상업용 된장 대조군에서의 GABA 량에 대해서는 TLC 분석법과 HPLC 분석법으로 확인하였다. 스케일 업 된장에서의 GABA 및 총 유리 아미노산 생성량은 (Figure 7, 8and Table 5) 높은 수치로 확인되었다.

**Table 4. An evaluation of aflatoxins in soybean paste fermented by *A. oryzae* FMB S46471 and *L. brevis* GABA 100.**

1) $AFG_1$, aflatoxin $G_1$; $AFB_1$, aflatoxin $B_1$; $AFG_2$, aflatoxin $G_2$; $AFB_2$, aflatoxin $B_2$ 2) N.D., Not Detected 3) The values were presented as the mean of two determinations.

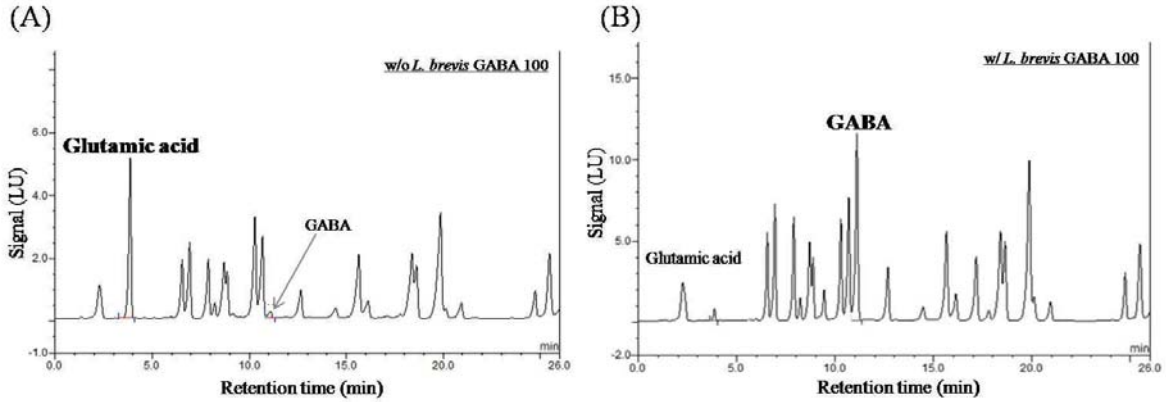
| Sample | Total aflatoxins ($AFG_1$,$AFB_1$,$AFG_2$,$AFB_2$) |
|---|---|
| Before the maturation of soybean product | N.D. |
| After the maturation of soybean product for 90 days | ND. |

Table 5. The contents of GABA in soybean pastes.

| Sample | GABA[3] (g/kg) | Free amino acids (g/kg) |
|---|---|---|
| Fermented with *A. oryzae* FMB S46471[1] and *L. brevis* GABA100[2] | 6.5±0.3 | 45.7±0.3 |
| Fermented with *A. oryzae* FMB S46471 and *L. brevis* GABA100 (After maturation for 90 days) | 11.6±0.3 | 72.7±1.8 |
| Commercial soybean paste | 0.2±0 | 24.0±0.2 |

1) *A. oryzae* FMB S46471[1], *Aspergillus oryzae* FMB S46471; *L. brevis* GABA100[2], *Lactobacillus brevis* GABA100; GABA[3], ɣ-Aminobutyric acid 2) The values were presented as the mean of two determinations with standard error.

**Figure 7. High-performance liquid chromatogram for GABA production depending on the inoculation of LAB.** (A) The chromatogram for quantitative values of free amino acids from the sample fermented by only *A. oryzae* FMB S46471 for 14 days (B) The chromatogram for quantitative values of free amino acids from the sample fermented by *A. oryzae* FMB S46471 for seven days were additionally inoculated with *L. brevis* GABA100 and further fermented for the following seven days *Abbreviations: w/, with; w/o, without



## 제 9 장. 발효 식품 제조 과정(자연 발효/인공 발효)중의 aflatoxin 발현 분석량 패턴 연구(주관)

*Aspergillus niger*와 *Aspergillus oryzae* 중에서 식품에서 분리된 균주로서, aflatoxin 생산성이 없는 균주를 7종 중 Clear zone의 상대적 크기를 비교하여 성장 속도와 활성이 높은 균주 2종을 선발하였다(Table 6). 균주는 PDA(potato dextrin agar) plate에서 배양하여 성장 속도를 확인하고, 효소 활성 측정을 위하여 Skim milk를 기질 단백질로 사용하였고 clear zone의 지름을 측정하여 protease의 상대적인 양을 측정하였다. 선발된 마이코톡신 프리 균주 2종과 사업적으로 된장의 발효에 사용되는 충무균을 대조군으로 삼아 스타터 균주로 실험을 진행하였다.

Table 6. Microorganisms used for fermentation

| Microorganisms | Strain number |
|---|---|
| *Aspergillus oryzae* | FMBS 46471 |
| *Aspergillus oryzae* | FMBS 40234 |
| *Aspergillus oryzae*(충무균) | 기존에 사용하는 균주(남안동농협) |

마이코톡신 프리 균주를 이용한 된장 제조를 위해 남안동 농협 현장에서 마이코톡신 프리 균주 46471, 40234, 대조군(충무균, 기존에 사용하는 균주)을 이용하여 전통된장을 제조하였다. 메주는 콩을 세척 및 불린 후 삶는다. 삶아진 콩을 약간 갈아서 김을 빼고 육면체로 성형하여 발효 및 겉말림 후 1개월 동안 속말림을 한 후 보관하며 시료로 사용한다. 된장은 18% 소금물 제조하여 메주를 침지한 후 메주를 꺼내고 남은 국물을 추가, 혼합하여 된장을 제조하고 보관하여 시료로 사용하였다. 마이코톡신 프리 전통 된장의 품질 관리를 위해 마이코톡신 분석을 수행하였다. Agilent HPLC를 사용하였으며, 검출기는 형광검출기(여기파장: 365 nm, 형광파장: 435 nm)를 사용하였다. 칼럼은 Capcell pak C18 UG120(4.6×250 mm, 5 μm)를 사용하고 이동상은 아세토니트릴·물 (25:75, v/v)을 분당 1 mL의 유속으로 분석하였으며 주입량은 10 μL이었다.

Table 7. Contents of mycotoxin in Soybean paste produced from the mycotoxin free strains.

| Samples | kind of mycotoxin | Contents of mycotoxin | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 제조당일 | 숙성 한달 | 숙성 두달 | 숙성 세달 | 숙성 네달 |
| 40234 | aflatoxin | ND[1)] | ND | ND | ND | ND |
| 46471 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |
| 충무균 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |

[1)]ND: Not detected.

조건 별 mycotoxin 생산 정량 분석

1. HPLC를 이용한 조건 별 ochratoxin 생산량 정량 분석

메주, CYA, PDA에 Aspergillus niger FMBS 999와 Aspergillus niger FMBS 983을 $1x10^5$ spore/g이 되도록 접종하였다. 15, 30, 40℃에서 10, 20, 30일간 배양하였다. 시료에 물을 더하여 30g으로 증량한 후 추출용액(acetonitrile-water=40:60, v/v)과 혼합하여 Whatman no.4 filter paper(Whatman International Ltd.)로 여과하였다. PBS 용액에 10배 희석한 후 50ml을 Whatman GF/A flass filter paper로 여과하였다. 여과액은 Immunoaffinity column(OchraTest WB, Vicam Co)에 통과시킨 후 Methanol 1ml로 용출하였다. 용출액은 speed vacuum에서 건조시킨 후 1ml acetonitrile-water-acetate(99:99:2, v/v/v)에 용해시켰다. HPLC를 이용하여 정량 분석하였다. HPLC를 이용한 ochratoxin 정량 분석 조건은 Table 8에 기재하였다.

Ochratoxin 의 정량분석 결과는 Table 9 에 나타내었다. FMBS 999 균주를 PDA 배지에 접종하여 30℃에서 10 일간 배양하였을 때 가장 많은 ochratoxin 을 생산하였다. 메주 배지에서의 생산량 Fig 8 에서 보여준다. 메주에서의 ochratoxin 생산량은 두 균주 모두에서 PDA, CYA 와 비교하여 가장 낮았다. FMBS 999 은 30℃에서 10 일간 배양한 샘플에서 메주에서 배양한 샘플 중 가장 높은 32.55±6.00ng/ml 를 보였지만 다른 15, 40℃ 조건에서는 10 일에서 30 일까지의 배양 기간 동안 1ng/ml 미만의 양만이 검출되었다.

Table 8. conditions of HPLC analysis to determine contents of Ochratoxin

| Parameters | Conditions |
|---|---|
| Mobile phase A | Water-acetnotrile-acetate (99:99:2, v/v/v) |
| Composition | Single step gradient 100% A (0-15min) |
| Column | Agilent polaris 5 C18-A 250x4.6mm |
| Flow rate | 1 mL/min |
| Detection Wavelength | fluorescence wavelength (excitation: 333 nm; emission: 460 nm) |
| Column temperature | 30 ℃ |
| Instrument | Ultimate 300 HPLC systems |

또한 30℃에서 배양한 샘플 역시 지속적으로 검출양이 감소하여 30 일차에서는 0.92±0.07ng/ml 으로 감소하였다. FMBS 983 균주는 10 일 동안 배양한 샘플에서 15℃를 제외한 30, 40℃에서 ochratoxin 이 검출되었다. 40℃ 샘플에서는 그 양이 지속적으로 증가하여 식품 공전 기준인 20ppb 를 넘긴 23.01±0.32 이 검출되었다. CYA 배지에서는 FMBS 983 에서 대부분 PDA 와 매주보다 높은 ochratoxin 생산량을 나타내었다.(Figure 9.) 특히 30℃ 조건에서는 10, 20, 30 일 샘플 모두 100ng/ml 를 초과하는 ochratoxin 이 검출되었으며 배양시간이 지남에 따라 생산량이 증가하였다. FMBS 999 에서는 PDA 배지에서 배양된 시료에서 주로 가장 높은 ochratoxin 생산량을 나타내었으나 그 후 20, 30 일 샘플에서는 생산량이 줄어들었다. 30℃에서 배양한 샘플에서 FMBS 999 는 PDA 에서 가장 높은 생산량을 보였고 FMBS 983 은 CYA 에서 가장 높은 생산량을 보였다. CYA 배지가 mycotoxin 의 생산을 촉진시키는 배지로 쓰이기는 하지만 균주에 따라 mycotoxin 이 최대로 생산되는 배지에 차이가 있음을 알 수 있다. FMBS 999 의 ochratoxin 최대 생산량을 측정 할 때는 PDA 에서의 생산량도 고려해야 할 것으로 보인다.

온도 조건을 보면 FMBS 983 을 메주 배지에서 20, 30 일 배양 조건을 제외한 나머지 조건들에서는 30℃가 ochratoxin 이 생산되는데 가장 최적의 온도로 확인되었다. 온도에 따른 성장속도의 차이는 Figure 10 과 같다. 30℃는 Aspergillus oryzea 의 최적 생장 온도로 균의 생장과 ochratoxin 의 생산에 관련이 있다고 볼 수 있다. FMBS 983 을 메주에서 키운 샘플에서는 40℃에서 배양한 샘플은 지속적으로 양이 증가하였으나 배양 온도가 30℃인 샘플은 최종적으로 감소하였음을 알 수 있다.

FMBS 999 에서는 배양 시간이 지남에 따라 ochratoxin 의 양이 감소함을 확인하였다. FMBS 983 은 메주 배지에서 40℃ 온도로 배양하는 조건과 CYA 배지에서 30℃로 배양하는 조건에서 ochratoxin 의 양이 증가함을 보였다.

Figure 8. Ochratoxin production in meju media

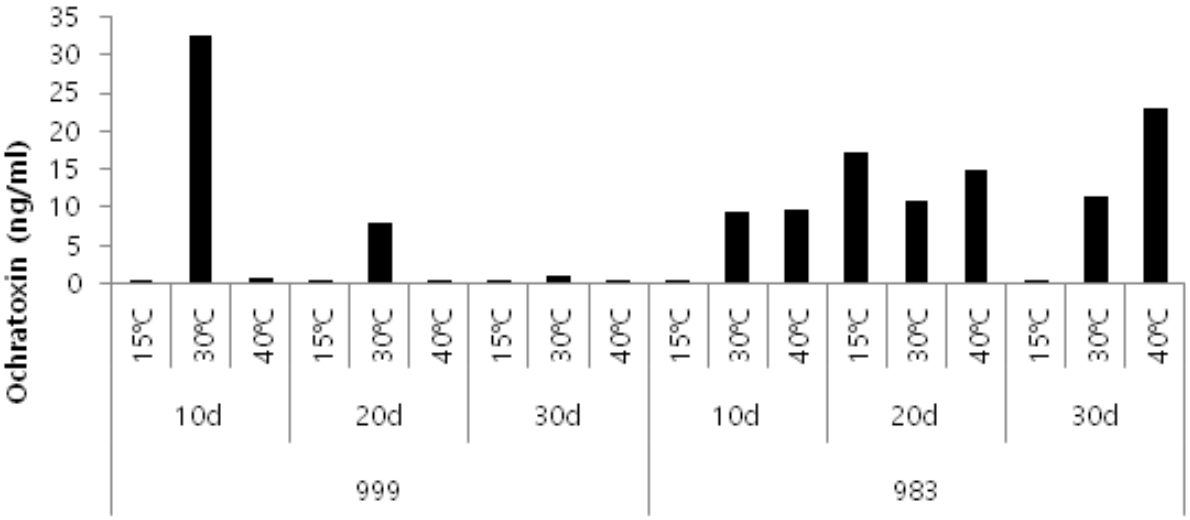



Figure 9. Ochratoxin production by strains. , PDA; , CYA; ,Meju

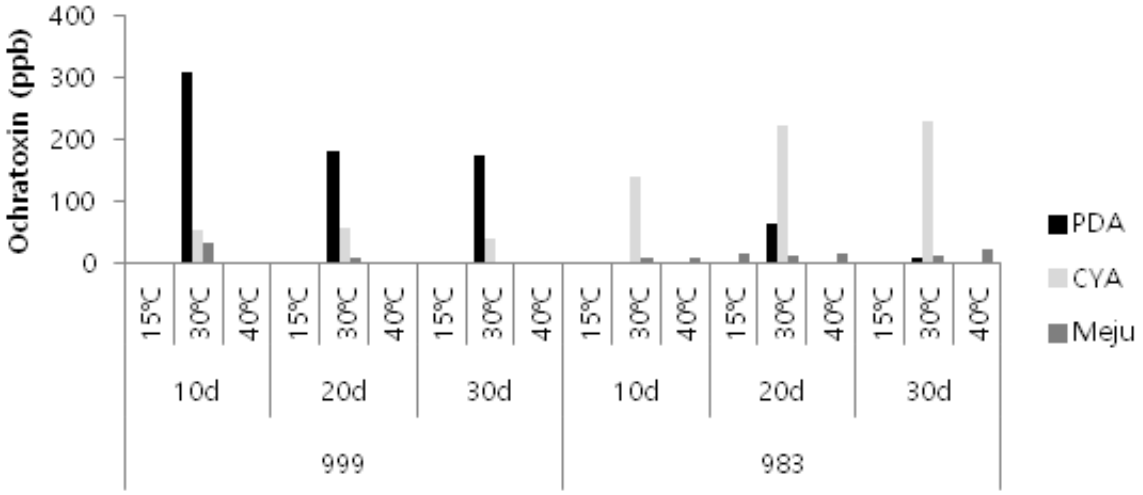
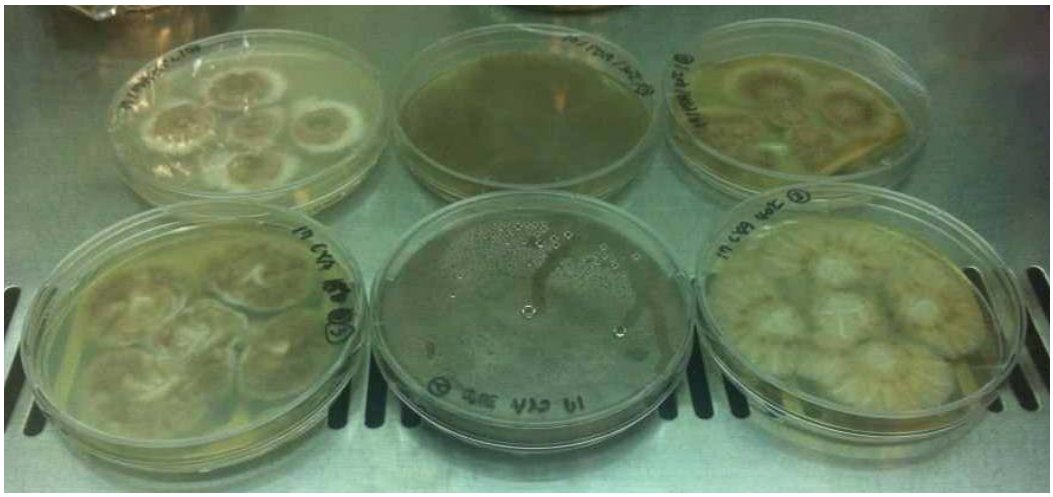


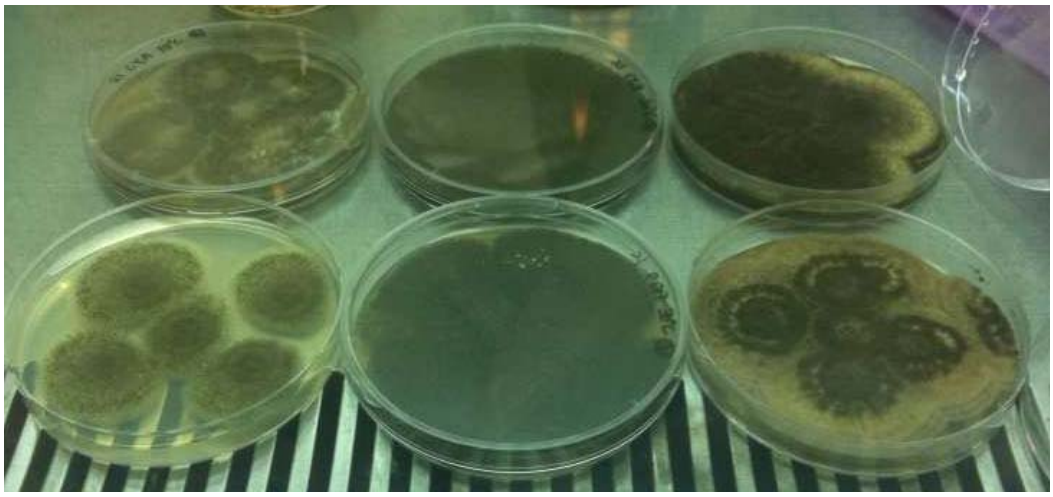
**Figure 10. Growth of hypha in various temperature and media for 30 days.** (A) FMBS 999 PDA 15℃; (B) FMBS 999 PDA 30℃; (C) FMBS 999 PDA 40℃; (D) FMBS 999 CYA 15℃; (E) FMBS 999 CYA 30℃; (F) FMBS 999 CYA 40℃;(G) FMBS 983 CYA 15℃; (H) FMBS 983 CYA 30℃; (I) FMBS 983 CYA 40℃; (J) FMBS 983 PDA 15℃; (K) FMBS 983 PDA 30℃; (L) FMBS 983 PDA 40℃

(A) (B) (C)



(D) (E) (F)

(G) (H) (I)



(J) (K) (L)

Table 9. The determination of ochratoxin depending on various conditions(ng/ml)

| Ochratoxin | FMBS 999 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10 일 | | | 20 일 | | | 30 일 | | |
| | 15℃ | 30℃ | 40℃ | 15℃ | 30℃ | 40℃ | 15℃ | 30℃ | 40℃ |
| PDA | 1.10 ±0.08 | 310.36 ±6.00 | 0.03 ±0.04 | 0.05 ±0.03 | 180.26 ±1.91 | 0.04 ±0.02 | 0.77 ±0.04 | 174.80 ±0.65 | 0.01 ±0.00 |
| CYA | 0.05 ±0.02 | 53.30 ±1.27 | 0.01 ±0.01 | 0.57 ±0.16 | 57.99 ±1.16 | 0.02 ±0.01 | 0.49 ±0.07 | 40.93 ±0.22 | 0.01 ±0.01 |
| 메주 | 0.03 ±0.01 | 32.55 ±6.00 | 0.63 ±0.04 | 0.01 ±0.01 | 8.06 ±0.01 | 0.02 ±0.00 | 0.02 ±0.01 | 0.92 ±0.07 | 0.05 ±0.02 |

| Ochratoxin | FMBS 983 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10 일 | | | 20 일 | | | 30 일 | | |
| | 15℃ | 30℃ | 40℃ | 15℃ | 30℃ | 40℃ | 15℃ | 30℃ | 40℃ |
| PDA | 0.05 ±0.03 | 2.44 ±0.04 | 0.02 ±0.02 | 0.02 ±0.00 | 64.38 ±7.86 | 0.02 ±0.01 | 0.02 ±0.03 | 9.71 ±0.04 | 0.01 ±0.01 |
| CYA | 0.28 ±0.09 | 138.52 ±8.47 | 0.02 ±0.01 | 0.36 ±0.60 | 224.24 ±2.24 | 0.34 ±0.13 | 0.02 ±0.02 | 230.38 ±1.62 | 1.29 ±0.11 |
| 메주 | 0.01 ±0.01 | 9.31 ±0.62 | 9.68 ±5.06 | 17.29 ±0.86 | 10.92 ±0.19 | 14.86 ±3.59 | 0.03 ±0.02 | 5.58 ±0.16 | 23.01 ±0.32 |

**배양 환경에 따른 aflatoxin 생산량과 HPLC 를 이용한 정량 분석**

메주(분쇄한 콩:D.W.=1:9, w/w), CYB, PDB 배지를 citric acid 와 NaOH 로 pH4, pH6, pH8 이 되도록 조정하고 Aspergillus flavus FMBS 41403 과 Aspergillus oryzea FMBS 46471 을 $1x10^5$ spore/g 이 되도록 접종하였다. 15, 30, 40℃ 배양기에서 rpm150 의 호기적 조건에서 배양하였다. 샘플은 10 일, 20 일, 30 일마다 수거되었고 시료에 물을 더하여 30g 으로 증량하였다. NaCl-MeOH(1:1000, w/v)과 동량으로 혼합하여 Whatman no.4 filter paper(Whatman International Ltd.)로 여과하였다. 1% tween 20 용액 30ml 과 여과한 시료 10ml 을 섞은 후 Whatman GF/A flass filter paper 로 여과하였다. 그 중 20ml 여과액을 Immunoaffinity column(AflaTest WB, Vicam Co)에 통과시킨 후 acetonitrile 3ml 로 용출하고 speed vacuum 에서 건조켰다. 건조 후 200ul 의 trifluoroacetic acid 를 넣고 암소에서 15 분간 활성화시켰다. 15 분 후 800ul acetonitrile-water(20:80, v/v/v)을 추가하여 반응을 종료시켰다. Aflatoxin 양은 HPLC 를 이용하여 정량 분석하였다. HPLC 를 이용한 aflatoxin 정량 분석 조건은 Table 10 에 기재하였다.

Table 10. conditions of HPLC analysis to determine contents of aflatoxin

| Parameters | Conditions |
|---|---|
| Mobile phase A | Water-acetnotrile (75:25, v/v) |
| Composition | Single step gradient 100% A (0-25min) |
| Column | Agilent polaris 5 C18-A 250x4.6mm |
| Flow rate | 1 mL/min |
| Detection Wavelength | fluorescence wavelength (excitation: 360 nm; emission: 450 nm) |
| Column temperature | 30 ℃ |
| Instrument | Ultimate 300 HPLC systems |

Aflatoxin 15℃의 분석 결과는 Table 11 에 나타내었다. 결과가 없는 것은 결과값이 기준곡선을 넘었거나 시료의 오염이 있었기 때문이다. 30℃와 40℃ 시료는 분석 중에 있다. Aflatoxin 은 B1, B2, G1, G2 의 4 가지 종류가 있으면 실험 결과에서는 이 중 B1 이 가장 높게 나왔다.

가장 높은 aflatoxin 량을 나타낸 것은 pH8 의 CYB 배지에서 20 일간 배양한 경우이다. 이 경우 aflatoxin G1 과 G2 은 다른 시료들과 마찬가지로 낮게 나왔으나 B1 와 B2 의 경우 각각 17720.20ng/ml 와 35.65ng/ml 로 가장 많은 수치를 나타내었다. 그러나 figure 11 과 figure 12 를 보면 가장 높은 수치를 제외하고 보았을 때는 pH4 에서 대체로 높은 aflatoxin 이 생성되었으며 pH6 에서 가장 적은 양의 aflatoxin 이 생성되었다. Aflatoxin G1 과 G2 는 1ng/ml 를 넘긴 시료가 없어 15℃ 조건에서는 A. flavus FMBS 41403 은 G1 과 G2 를 거의 생산하지 않는다고 볼 수 있다. B2 의 경우에는 CYB, pH8 20 일 조건을 제외한 나머지 시료 중 5 개의 시료에서 8ng/ml 이하로 검출되었으며 그 외 나머지 시료에서는 1ng/ml 이하의 양만이 검출되었다.

배지별로 보았을 대는 PDB 에서 대체로 많은 양의 aflatoxin 이 생성되었으나 가장 많은 양이 생성된 것은 CYB 배지이고 메주 배지에서는 가장 적은 양의 aflatoxin 이 검출되었다. 메주 배지의 경우 3 개의 시료에서 B1 이 2ng/ml 이하로 분석되었으나 다른 aflaltoxin 은 거의 검출되지 않았다.

40℃의 10 일차 시료의 분석 결과를 보면 거의 검출되지 않고 있는데 15℃에서도 10 일에는 거의 분석되지 않고 있으므로 40℃가 15℃보다 적은 양의 aflatoxin 이 생산된다고는 할 수 없으면 온도의 영향은 나머지 시료를 분석해야 알 수 있다.
배양 시간이 aflatoxin 의 양에 미치는 영향은 배지의 종류와 pH 에 따라 다르나 10 일까지는 aflatoxin 이 생산되지 않는다.

Table 11. Aflatoxin analyzation fermented in 15℃ and 40℃

| | | 15℃ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | pH4 | | | pH6 | pH8 | |
| | | 10 일 | 20 일 | 30 일 | 10 일 | 20 일 | 30 일 |
| G1 | PDB | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | |
| | CYB | | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| | Meju | 0.07 | 0.07 | | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| B1 | PDB | 0.60 | 26.63 | 27.93 | 0.28 | 9.15 | |
| | CYB | | 0.71 | 32.68 | 0.84 | 0.26 | 0.34 |
| | Meju | 1.65 | 1.44 | | 0.37 | 0.24 | 1.12 |
| G2 | PDB | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | |
| | CYB | | 0.49 | 0.51 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| | Meju | 0.50 | 0.50 | | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| B2 | PDB | 0.06 | 6.73 | 7.91 | 0.06 | 1.70 | |
| | CYB | | 0.08 | 7.22 | 0.07 | 0.07 | 0.08 |
| | Meju | 0.13 | 0.09 | | 0.07 | 0.08 | 0.06 |

| | | 40℃ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | pH4 | | | pH6 | pH8 | |
| | | 10 일 | 20 일 | 30 일 | 10 일 | 10 일 | 10 일 |
| G1 | PDB | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| | CYB | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| | Meju | 0.07 | 0.07 | | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| B1 | PDB | 0.26 | 0.38 | 18.65 | 0.20 | 0.10 | 0.11 |
| | CYB | 1.51 | 17720.20 | 0.39 | 0.10 | 0.12 | 0.11 |
| | Meju | 0.25 | 2.03 | | 0.10 | 0.11 | 0.11 |
| G2 | PDB | 0.52 | 0.50 | 0.49 | 0.50 | 0.50 | 0.51 |
| | CYB | 0.49 | 0.50 | 0.50 | 0.49 | 0.50 | 0.50 |
| | Meju | 0.49 | 0.50 | | 0.49 | 0.50 | 0.50 |
| B2 | PDB | 0.07 | 0.07 | 7.66 | 0.07 | 0.06 | 0.07 |
| | CYB | 0.08 | 32.65 | 0.09 | 0.06 | 0.07 | 0.09 |
| | Meju | 0.07 | 0.09 | | 0.08 | 0.06 | 0.07 |

Figure 11. The determination of Aflatoxin B1 exept pH8 CYB in 15℃ for 20days sample.

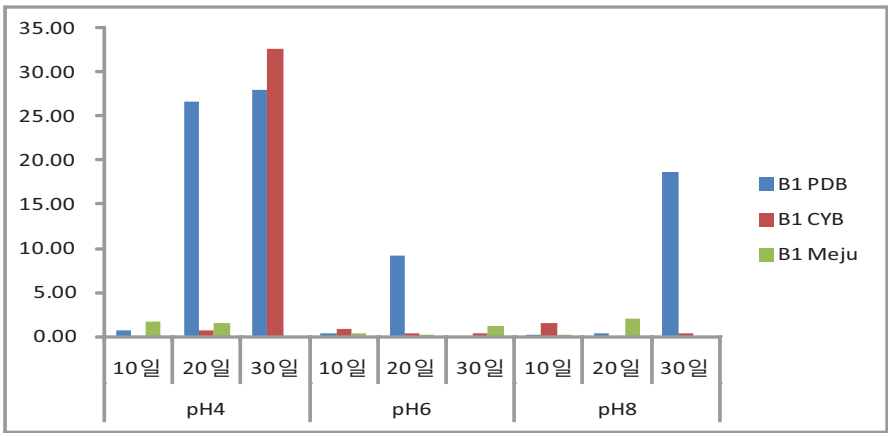
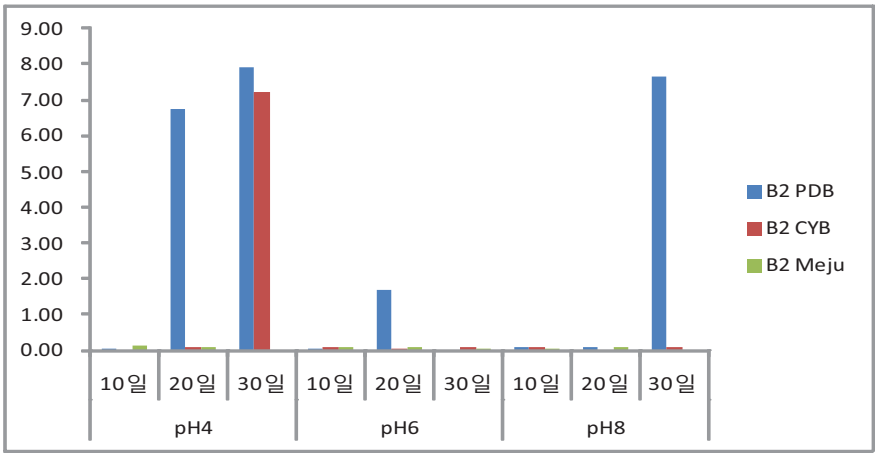



Figure 12. aflatoxin B2 exept pH8 CYB in 15℃ for 20days sample




추가적인 Aflatoxin 의 분석 결과는 table S2, S3, S4 에 나타내었다. 오염 시료의 결과 값은 나타내지 않았다. 가장 높은 aflatoxin 량을 나타낸 것은 pH8 의 CYB 배지에서 30℃, 30 일간 배양한 경우이다. 이 경우 aflatoxin G1 과 G2 은 다른 시료들과 마찬가지로 낮게 나왔으나 B1 의 경우 각각 2008.18 ng/ml 로 가장 많은 수치를 나타내었다. 그러나 B2 에서는 1 ng/ml 이하의 낮은 수치를 보였다. 전체 aflatoxin 양을 합산한 결과에서는 pH8 의 CYB 배지에서 30℃, 10 일간 배양한 샘플이 가장 높았다. Fig. S1 과 Fig. S2 를 보면 30℃에서 가장 높은 aflatoxin 이 생성되었으며 40℃에서 가장 적은 양의 aflatoxin 이 생성되었다. 15℃에서는 대체로 낮으나 몇몇 샘플에서 높은 농도의 aflatoxin 이 검출되었다. 15℃는 PDB 와 CYB 의 aflatoxin 양이 높은 경향을 보였으나 30℃에서는 PDA 에서 가장 낮은 경향을 보였고 40℃에서는 배지에 상관없이 1 ng/ml 이하의 aflatoxin 이 검출되었다.
배양 시간에서는 10 일이 가장 낮았으며 20 일과 30 일은 샘플에 따라 그 경향성이 다르게 나타났다. pH 에서 보았을 때는 pH4 가 가장 낮은 aflatoxin 생산량을 보였고 pH6 과 pH8 은 비슷한 경향을 보였다. 그러나 배지에 따라 선호하는 pH 가 다른 것으로 나타났는데 CYB 는 염기인 pH8 에서 더 많은 aflatoxin 이 생산되었고 PDB 는 pH6 이 가장 선호되었으며 메주는 pH 에 상관없이 고른 분포를 보여주었으나 pH4 가 가장 낮은 경향을 보였다.
CYB 배지는 mycotoxin 의 생산량을 늘리는 배지로 가장 높은 aflatoxin 생산량을 보였으며 PDB 의 경우 가장 aflatoxin 이 높은 샘플의 aflatixn 양은 메주보다 높지만 더 많은 메주의 시료에서 aflatixn 이 검출되었다.

Table S2. Aflatoxin analyzation fermented in 15℃

| | | 15℃ | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | pH4 | | | pH6 | | | pH8 | | |
| | | 10 일 | 20 일 | 30 일 | 10 일 | 20 일 | 30 일 | 10 일 | 20 일 | 30 일 |
| G1 | PDB | 0.11 | 0.10 | 0.11 | 0.11 | 0.14 | 0.48 | 0.11 | 0.11 | 0.11 |
| | CYB | 0.23 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.10 | 0.11 | 0.11 | 0.43 | 0.10 |
| | Meju | 0.11 | 0.11 | - | 0.10 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | - |
| B1 | PDB | 0.37 | 16.60 | 16.94 | 0.17 | 61.84 | 896.63 | 0.16 | 0.21 | 11.05 |
| | CYB | 781.15 | 0.43 | 19.69 | 0.52 | 0.12 | 0.20 | 0.93 | 1070.81 | 0.23 |
| | Meju | 1.02 | 0.89 | - | 0.23 | 0.13 | 0.67 | 0.15 | 1.21 | - |
| G2 | PDB | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.48 | 0.46 | 0.17 | 0.14 | 0.14 |
| | CYB | 0.42 | 0.14 | 0.15 | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.13 | 1.53 | 0.14 |
| | Meju | 0.15 | 0.15 | - | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.14 | - |
| B2 | PDB | 0.38 | 4.88 | 5.42 | 0.38 | 24.24 | 533.02 | 0.38 | 0.38 | 4.92 |
| | CYB | 108.33 | 0.38 | 4.87 | 0.38 | 0.38 | 0.39 | 0.39 | 45.97 | 0.39 |
| | Meju | 0.42 | 0.40 | - | 0.39 | 0.39 | 0.38 | 0.38 | 0.47 | - |

Table S3. Aflatoxin analyzation fermented in 30℃

| | | 30℃ | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | pH4 | | | pH6 | | | pH8 | | |
| | | 10 일 | 20 일 | 30 일 | 10 일 | 20 일 | 30 일 | 10 일 | 20 일 | 30 일 |
| G1 | PDB | 0.11 | 0.11 | 0.13 | 0.11 | 0.11 | 0.12 | 0.11 | 0.13 | - |
| | CYB | - | 0.27 | 0.30 | - | 0.19 | 0.19 | 0.25 | 0.27 | 0.19 |
| | Meju | 0.13 | 0.11 | 0.15 | 0.19 | 0.12 | - | 0.36 | 0.18 | 0.24 |
| B1 | PDB | 33.71 | 68.82 | 163.04 | 7.75 | 43.80 | 34.74 | 80.57 | 389.44 | - |
| | CYB | - | 1288.00 | 1.90 | - | 1106.85 | 1989.18 | 1651.02 | 1854.96 | 2008.18 |
| | Meju | 226.61 | 2.63 | 372.04 | 706.42 | 38.11 | - | 98.23 | 919.03 | 414.24 |
| G2 | PDB | 0.15 | 0.15 | 0.19 | 0.15 | 0.15 | 0.18 | 0.16 | 0.19 | - |
| | CYB | - | 0.47 | 0.55 | - | 0.85 | 0.42 | 0.75 | 0.64 | 0.46 |
| | Meju | 0.23 | 0.17 | 0.52 | 0.29 | 0.14 | - | 0.15 | 0.40 | 0.39 |
| B2 | PDB | 1.04 | 1.93 | 7.62 | 0.41 | 2.21 | 0.60 | 1.77 | 7.66 | - |
| | CYB | - | 16.62 | 0.64 | - | 15.64 | 21.73 | 1.42 | 21.04 | 0.75 |
| | Meju | 10.93 | 0.39 | 25.06 | 33.07 | 2.05 | - | 3.31 | 37.67 | 9.17 |

Table S4. Aflatoxin analyzation fermented in 40℃

| | | 40℃ | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | pH4 | | | pH6 | | | pH8 | | |
| | | 10 일 | 20 일 | 30 일 | 10 일 | 20 일 | 30 일 | 10 일 | 20 일 | 30 일 |
| G1 | PDB | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.13 |
| | CYB | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.10 | 0.11 |
| | Meju | 0.11 | 0.11 | 0.12 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.13 | 0.11 |
| B1 | PDB | 0.11 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.06 |
| | CYB | 0.07 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| | Meju | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| G2 | PDB | 0.14 | 0.17 | 0.17 | 0.14 | 0.14 | 0.15 | 0.14 | 0.17 | 0.15 |
| | CYB | 0.14 | 0.17 | 0.14 | 0.14 | 0.16 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.16 |
| | Meju | 0.14 | 0.15 | 0.17 | 0.15 | 0.15 | 0.16 | 0.14 | 0.14 | 0.15 |
| B2 | PDB | 0.38 | 0.41 | 0.39 | 0.38 | 0.39 | 0.41 | 0.38 | 0.40 | 0.39 |
| | CYB | 0.38 | 0.40 | 0.38 | 0.38 | 0.38 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.40 |
| | Meju | 0.38 | 0.40 | 0.42 | 0.38 | 0.39 | 0.40 | 0.38 | 0.41 | 0.41 |

Fig. S1. The determination of Aflatoxin B1 and B2

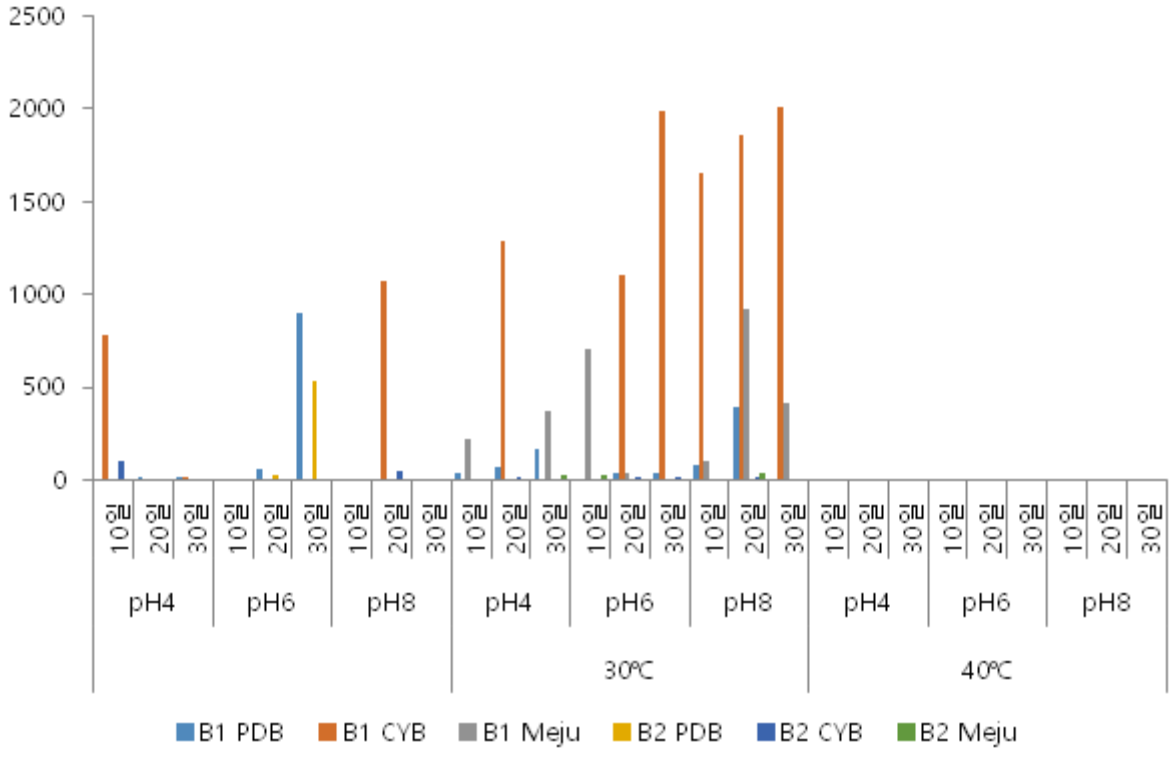
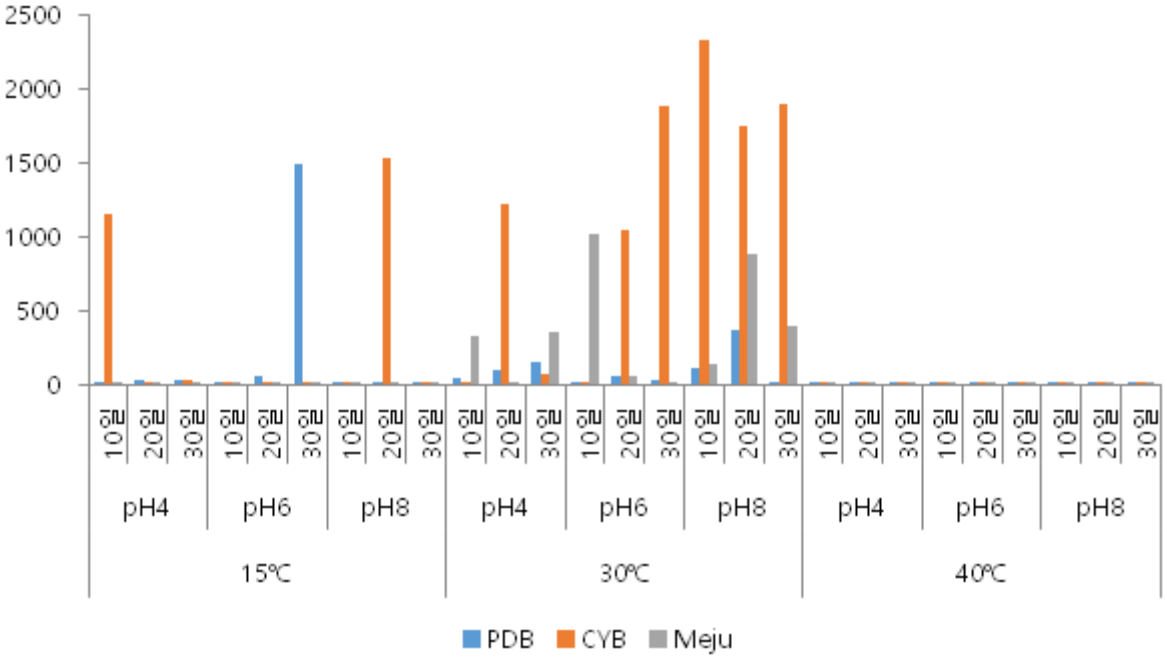



Fig. S2. Determination of total aflatoxinin level



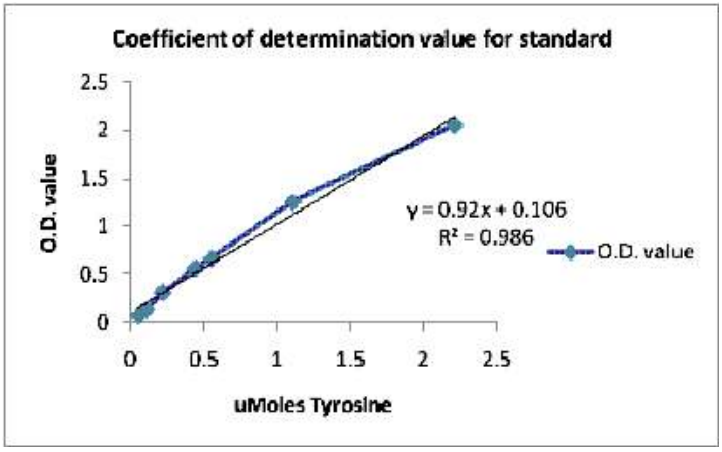
무독신 *A. oryzae* 균주의 단백분해효소 활성 측정

유전자 및 HPLC 분석 결과 모두에서 아플라톡신과 CPA 생성능이 없다고 선별된 5종의 *A. oryzae* (FMB S40250, FMB S40234, FMB S41736, FMB S46471, FMB S998)에 대한 단백질 분해 효소 활성을 측정하였다.

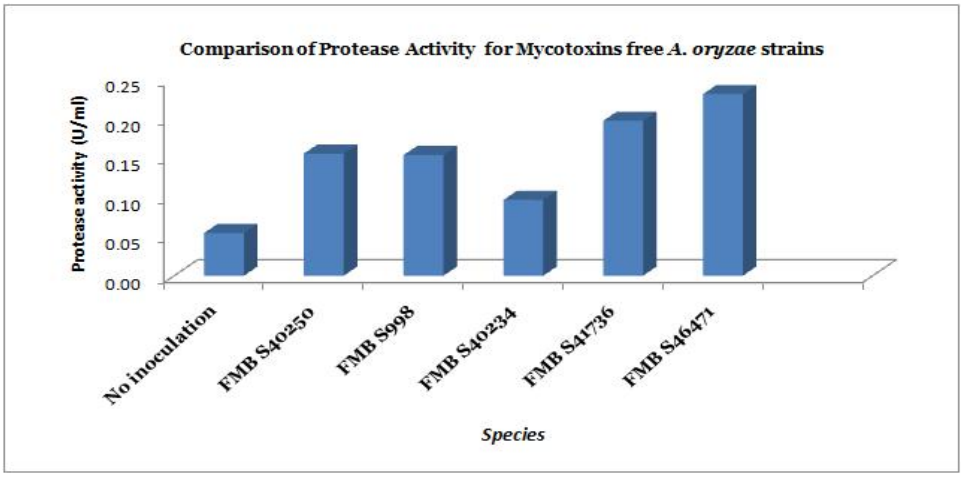
Fig. 1에서 스탠다드에 대한 유효화 여부와 5종의 상대적인 단백 분해 활성능에 대해 보이고 있다.

Fig. S3.

(A)




(B)




균을 접종하지 않은 샘플은 음성 대조군으로 사용하였다. 5종 중 *aflR*의 PCR 밴드를 보이지 않았으며, HPLC 분석 결과에서 마이코톡신이 검출되지 않은 FMB S46471은 가장 우수한 단백질 분해능 결과를 보였다.

## 제 10 장. 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100에 의한 glutamic acid의 GABA 전환(주관)

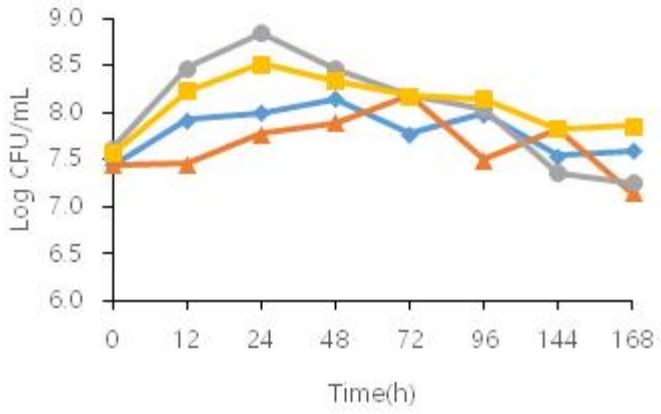
### 1. MSG, Yeast extract를 첨가한 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100에 의한 GABA 전환

다시마에 1:15(w/v) 비율로 멸균수(DW)를 첨가한 후 MSG 3%, Ye(Yeast extract) 0.5%를 첨가 유, 무에 따라 총 4군으로 구성하였다. 멸균(121℃, 15분) 후 *L. brevis* GABA100를 1% 접종하여 37℃에서 7일간 발효하였고 이 과정에서 CFU, pH 변화와 TLC를 이용하여 GABA 전환을 확인하였다.

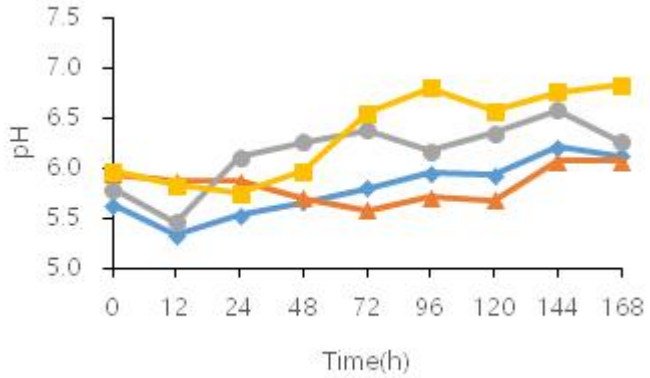
MSG 3% 첨가군은 무첨가군에 비해 CFU가 낮은 경향을 보였고, Ye 0.5% 첨가군에서 가장 높은 CFU를 나타냈다(Figure 13A). MSG 3%, Ye 0.5% 모두 첨가한 군보다 Ye 0.5% 첨가군이 CFU가 높은 것으로 보아 Ye는 *L. brevis* GABA100의 생장을 촉진하는 요인으로 작용하고 MSG를 3% 첨가하는 경우 초기 *L. brevis* GABA100의 생장을 저해하는 요인으로 판단된다.

Figure 13. MSG, Yeast extract 첨가에 따른 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100의 (A) 7일간 생장 변화 및 (B) pH 변화; G1, control(◆); G2, MSG 3%(▲); G3, Ye 0.5%(●); G4, MSG 3%, Ye 0.5%(■)

(A)



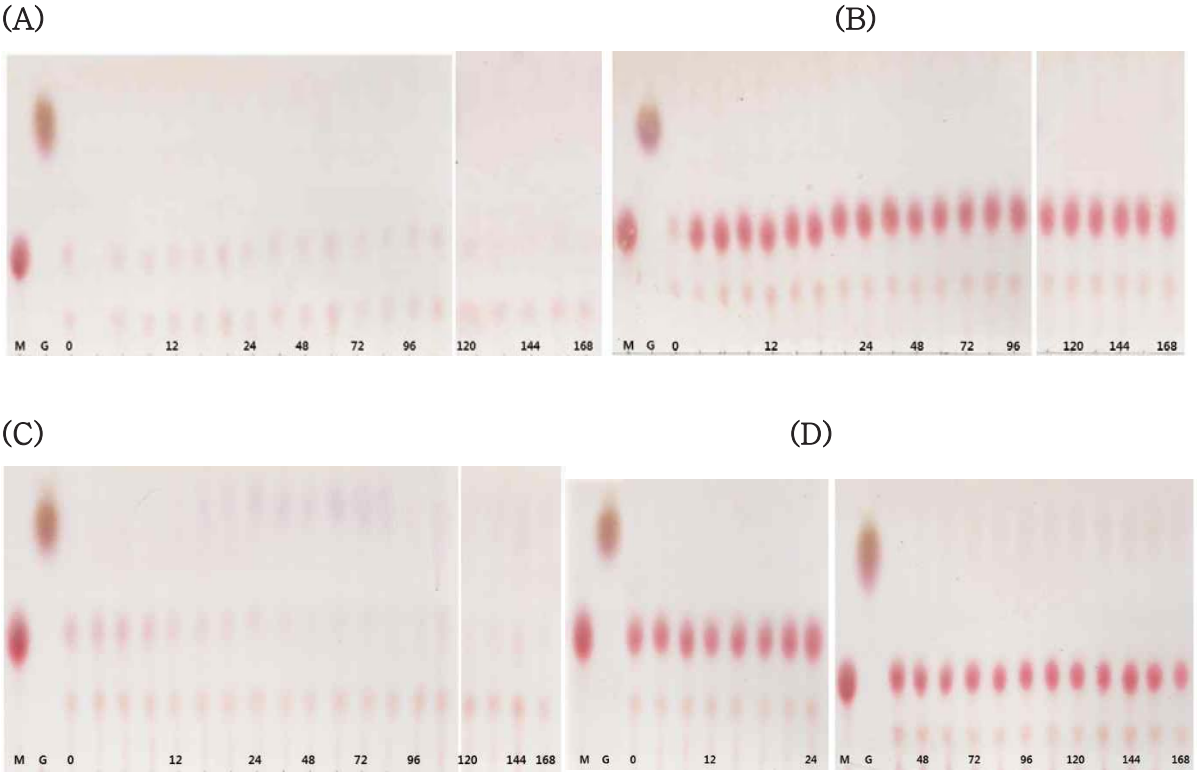

(B)



MSG를 첨가한 군(G2, G4)은 초기 pH가 높고 발효 과정 동안 pH 5.5 이상을 유지하였다(Figure 13B). 이 중 Ye도 넣어준 G4의 경우 48시간 전후로 pH가 급증하는 현상이 나타났고 이는 Ye에 의한 *L. brevis* GABA100의 생장이 증대되어 GAD 분비도 증가했을 것이라고 비춰진다(Figure 13C, D). 반면 MSG 무첨가군인 G1, G3는 발효 12시간까지 pH가 낮아지다가 그 후 증가하는데 증가폭은 Ye를 첨가한 G3가 더 높았다. *L. brevis* GABA100는 접종하고 나서 환경에 적응 후 glutamic acid를 GABA로 전환하는 대사를 하기까지 12시간 정도 소요되는 것으로 보인다.

TLC로 GABA 전환을 확인한 결과, Ye 0.5% 첨가군(G3)에서 가장 많은 전환이 일어났고(Figure 14), 그 다음으로 MSG, Ye 첨가군(G4), 무첨가군(G1), MSG 첨가군(G2) 순서로 GABA 전환이 일어났으나 7일간 다시마추출물을 발효하면서 다시마 자체의 glutamic acid와 MSG의 상당량이 전환되지 않고 남아있었다.

**Figure 14. MSG, Yeast extract 첨가에 따른 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100의 GABA 생성. (A), G1, control; (B), G2, MSG 3%; (C), G3, Ye 0.5%; (D), G4, MSG 3%, Ye 0.5%; Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%.**



## 2. MSG, Yeast extract를 첨가한 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100의 접종량 증가에 의한 GABA 전환 관찰

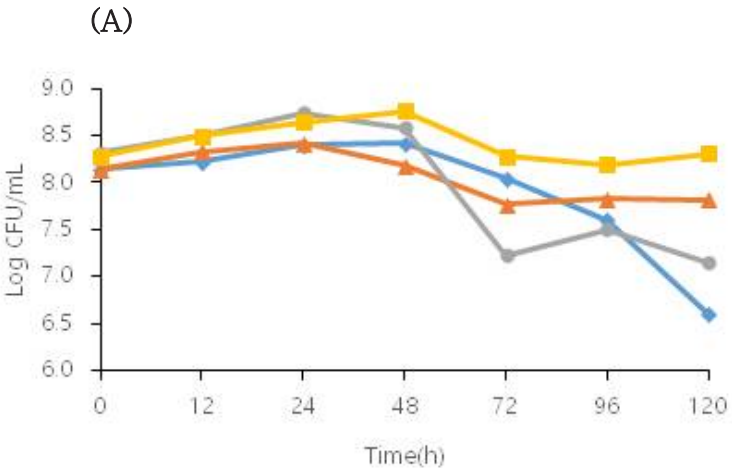
*L. brevis* GABA100 1%를 접종한 앞의 실험과 동일하게 총 4군으로 구성하고 멸균(121℃, 15분) 후 *L. brevis* GABA100 접종량을 5%로 증가하여 다시마추출물을 37℃에서 5일간 발효하였다. CFU, pH 변화와 TLC를 이용하여 *L. brevis* GABA100의 접종량이 증가했을 때 GABA 전환 시점과 MSG 소모 정도를 확인하였다.

*L. brevis* GABA100의 접종량이 5%로 증가했을 경우, 모든 군이 24시간까지 10^8 CFU/mL 이상으로 증가하였고, 1% 접종했을 때와 마찬가지로 Ye 0.5% 첨가군(G3)이 가장 높은 CFU를 보였다. 그 다음으로 MSG, Ye첨가군(G4), 무첨가군(G1), MSG 첨가군(G2)순서로 나타났고 (Figure 15A) 48시간 이후 무첨가군과 Ye 0.5% 첨가군은 CFU가 낮아지는 반면, MSG 첨가군(G2, G4)에서는 CFU가 일부 감소하나 5일(120h)까지 10^7 CFU/mL 이상을 유지하였다.

pH 변화에서는 앞선 실험과 마찬가지로 MSG, Ye 첨가군(G4)의 pH가 5일간 발효하는 과정에서 가장 높이 증가하였고 (Figure 15B), 그 다음 Ye 첨가군(G3), MSG 첨가군(G2), 무첨가군(G1) 순서로 나타났다. *L. brevis* GABA100의 접종량을 증가시켰기 때문에 1%를 접종했을 때보다 pH가 낮아진 경향이 있지만, GAD에 의한 MSG의 GABA 전환은 pH 5.0 범위에서 가장 잘 되므로 발효 진행시 pH 조절이 필요함을 알 수 있었다..

*L. brevis* GABA100 5%를 접종한 다시마추출물의 TLC분석에서는 1% 접종한 결과에 비해 GABA 전환이 향상되었고 특히 MSG를 첨가한 군(G2, G4)에서 GABA 생성 패턴이 진하게 나타났음을 확인할 수 있었다(Figure 16). Ye 첨가군(G3)은 대부분 GABA로 전환되었으나 소량 MSG가 남아있고, MSG를 첨가한 군에서는 5일 이상 발효하여도 GABA로 전환되지 않고 남아있는 양이 많으므로 pH 조절의 필요성이 다시 부각되었다.

Figure 15. MSG, Yeast extract 첨가에 따른 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100 5% 접종 시 (A) 5일간 생장 변화 및 (B) pH 변화; G1, control(◆); G2, MSG 3%(▲); G3, Ye 0.5%(●); G4, MSG 3%, Ye 0.5%(■)



(B)

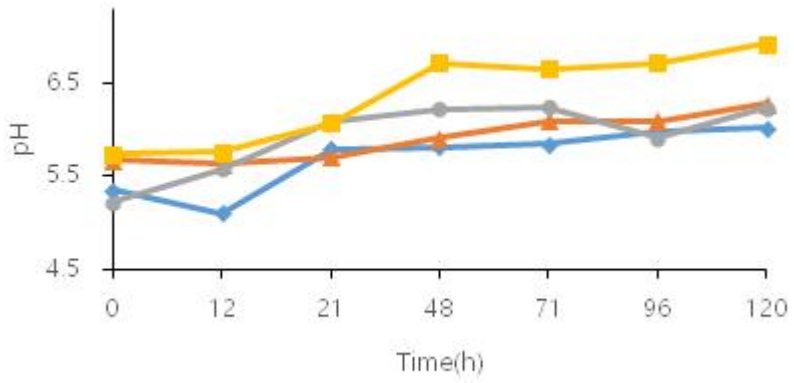
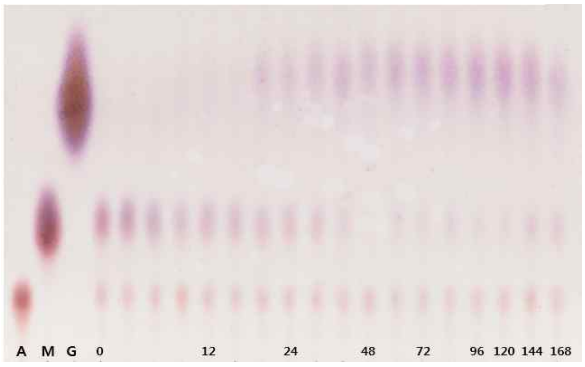
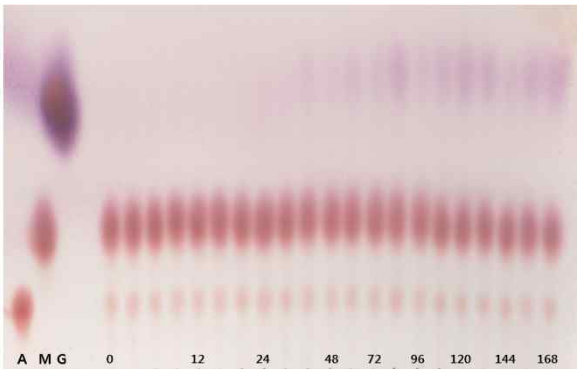



Figure 16. MSG, Yeast extract 첨가에 따른 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100 5% 접종 시 GABA 생성. (A), G1, control; (B), G2, MSG 3%; (C), G3, Ye 0.5%; (D), G4, MSG 3%, Ye 0.5%.; Lane A, aspartic acid 1%; Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%.

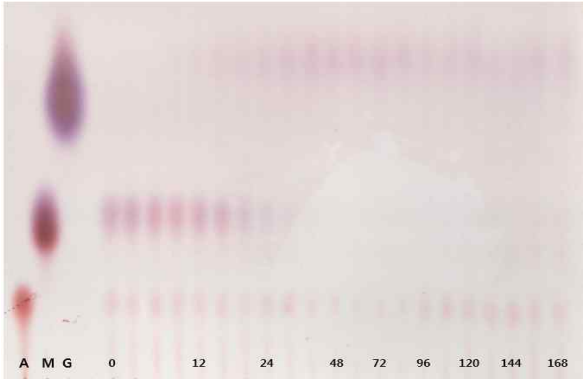
(A)



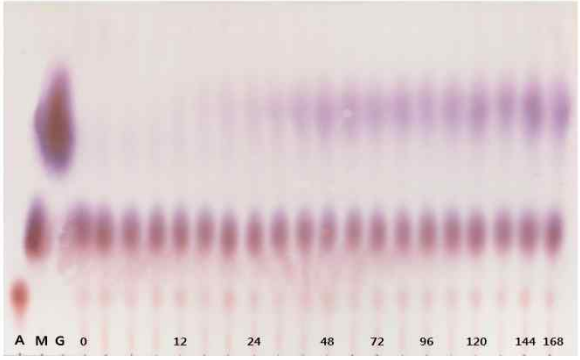

(B)




(C)




(D)



### 3. MSG, Yeast extract 첨가 다시마추출물에서 pH 조절에 의한 *L. brevis* GABA100의 GABA 전환

다시마에 1:15(w/v) 비율로 멸균수(DW)를 첨가한 후 MSG 3%, Ye(Yeast extract) 0.5%를 첨가 유, 무에 따라 총 4군으로 구성하였고 멸균(121℃, 15분) 후 *L. brevis* GABA100 5%를 접종하여 37℃에서 15일간 발효하였다. 이 과정 중에서 pH가 5.5 이상 증가하면 citric acid를 첨가하여 pH 4.8~5.0으로 조절함으로써 pH가 유지될 수 있도록 하였다.

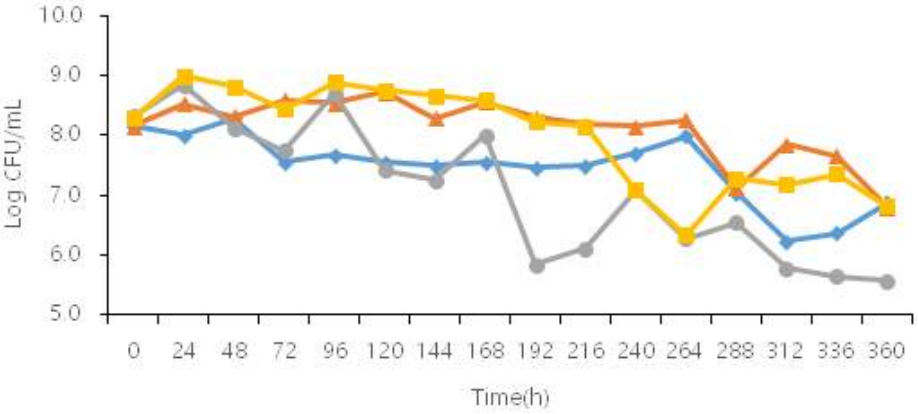
Ye가 첨가된 군(G3, G4)의 CFU가 24시간을 기점으로 상위그룹에 속하나 Ye 첨가군(G3)은 그 후로 급격히 CFU가 낮아지는 경향을 보였고 8일차(192h)부터 무첨가군(G1)보다도 CFU가 낮아짐을 확인하였다(Figure 17A). MSG, Ye 첨가군(G4)은 9일(216h)까지 10^8CFU/mL 이상을 유지하였고 무첨가군(G1)과 MSG 첨가군(G2)은 11일(264h)이후 급격이 CFU가 감소하였다. 이전 실험 결과에서 pH를 조절하지 않고 *L. brevis* GABA100을 접종한 단기 발효에서는 MSG 첨가군에서 CFU가 다소 낮은 경향을 보였는데 pH를 조절하며 5일(120h) 이상 발효하는 경우 무첨가군보다 MSG 첨가군이 *L. brevis* GABA100의 CFU를 유지하는데 도움이 되는 것으로 판단된다.

pH 결과에서 4일차(96h)까지는 무첨가군(G1)을 제외한 나머지 군이 10^8 CFU/mL 이상으로 증가했기 때문에 pH를 조절하여도 MSG의 GABA 전환에 의해 지속적으로 증가했음을 볼 수 있다(Figure 17B). Ye 첨가군의 경우, 5일차(120h) 이후로 pH 증가가 미미하고 CFU 결과를 함께 봤을 때 *L. brevis* GABA100 1%를 접종하면 Ye에 의해 생장 촉진 시기가 빨라지고 최대 CFU를 증가시킬 수 있으나, *L. brevis* GABA100을 5% 이상 접종하면 생장 촉진 시기는 빨라지되 최대 CFU는 Ye를 첨가하지 않은 군과 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 5일 미만의 단기 발효 시에는 Ye를 첨가하는 것이 효율적이나 발효 과정이 5일 이상일 경우 특별히 Ye를 첨가 하지 않아도 CFU는 일정 수준에 이를 수 있었다.

15일간 *L. brevis* GABA100로 발효한 다시마추출물을 TLC로 분석한 결과에서는 다시마 자체의 glutamic acid는 *L. brevis* GABA100에 의해 24시간 전후로 GABA로 전환되는 것을 볼 수 있었다(Figure 18). MSG를 첨가한 군(G2, G4)에서는 시간에 따라 점차 MSG가 줄어드는 것을 확인할 수 있고 특히 MSG와 Ye를 함께 첨가한 군(G4)에서 8일 전후로 MSG가 대부분 GABA로 전환되었다. MSG만 첨가한 군(G2)에서는 GABA가 진한 패턴으로 나타났으나 15일(360h)까지 발효하여도 MSG가 일부 남아있기 때문에 추가적인 최적 조건 요인을 설정하였다

Figure 17. MSG, Yeast extract 첨가한 다시마추출물에서 pH 조절 시 *L. brevis* GABA100의 (A) 15일간 생장 변화 및 (B) pH 변화; G1, control(◆); G2, MSG 3%(▲); G3, Ye 0.5%(●); G4, MSG 3%, Ye 0.5%(■)

(A)




(B)

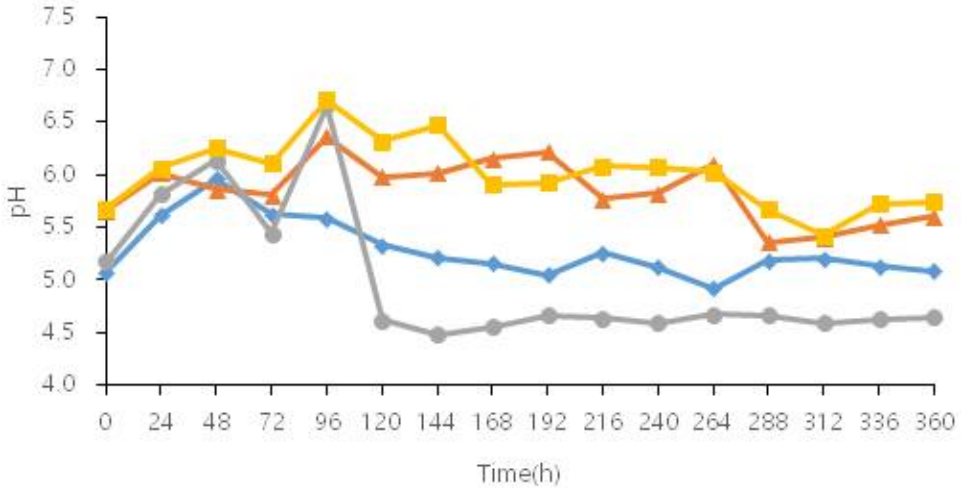
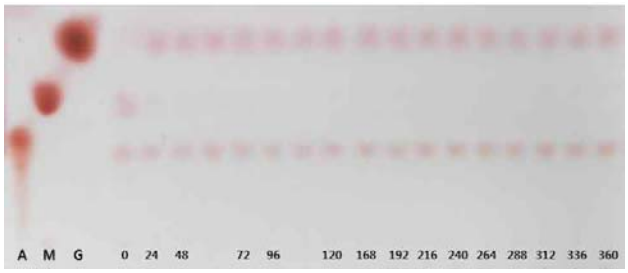
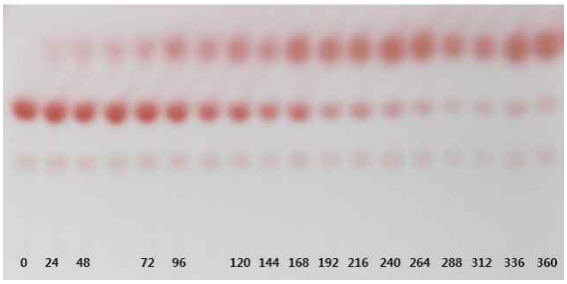


Figure 18. MSG, Yeast extract 첨가 다시마추출물에서 pH 조절 시 *L. brevis* GABA100의 GABA 생성. (A), G1, control; (B), G2, MSG 3%; (C), G3, Ye 0.5%; (D), G4, MSG 3%, Ye 0.5%. Lane A, aspartic acid 1%; Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%.

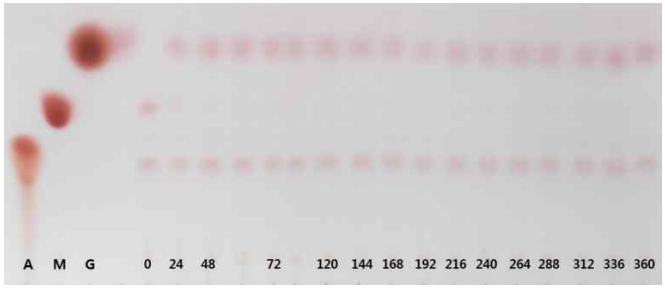
(A)



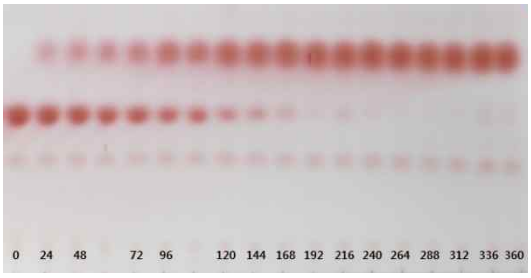

(B)




(C)




(D)




### 4. MSG, Yeast extract 첨가 다시마추출물에서 *L.. brevis* GABA100의 GABA 전환에 영향을 미치는 온도 비교

다시마에 1:15(w/v)비율로 멸균수(DW)를 첨가한 후 MSG 3%, Ye(Yeast extract) 0.5%를 첨가 유, 무에 따라 총 4군으로 구성하였다. 멸균(121℃, 15분) 후 *L. brevis* GABA100 5%를 접종하여 30℃와 37℃에서 8일간 발효하였고, 이 실험에서는 pH 조절을 배제하여 30℃와 37℃, 두 조건에 대한 상대적 비교로 진행하였다.

48시간마다 CFU와 pH를 측정한 결과, MSG 첨가군(G2)을 제외한 전체 군에서 *L..brevis* GABA100은 30℃에서 발효했을

때 37℃ 조건보다 높은 CFU를 보였다(Figure 19). MSG 첨가군은 4일차(98h) 이후부터 30℃ 발효 조건에서 CFU가 증가하였고 또한 pH 변화에서도 전체 군에서 37℃보다 30℃에서 pH가 더 증가하였다(Figure 20. TLC로 GABA 전환 양상을 보면 무첨가군(G1)에서 다시마 자체의 glutamic acid는 30℃ 발효에서 2일(48h)전에 소모된 반면 37℃ 발효에서는 아직 남아있었고 Ye 첨가군(G2)는 온도 차이가 있음에도 모두 GABA로 전환되었다(Figure 21). MSG 첨가군(G3)에서는 37℃보다 30℃에서 GABA 패턴이 진하게 나타났고 MSG, Ye 첨가군(G4)은 pH를 조절하지 않았음에도 30℃ 발효 조건에서 MSG가 대부분 GABA로 전환되고 소량 남아있었다. 이에 다시마추출물 발효 시 pH 5.0 범위로 조절하는 점과 더불어 발효 온도는 30℃로 진행하면 GABA 생성을 효율적으로 높일 수 있을 것이다.

Figure 19. MSG, Yeast extract 첨가한 다시마추출물에서 온도 조절 시 *L. brevis* GABA100의 5일간 생장 변화. (A), G1, control; (B), G2, MSG 3%; (C) G3, Ye 0.5%; (D) G4, MSG 3%, Ye 0.5%; 30℃(●); 37℃(■).

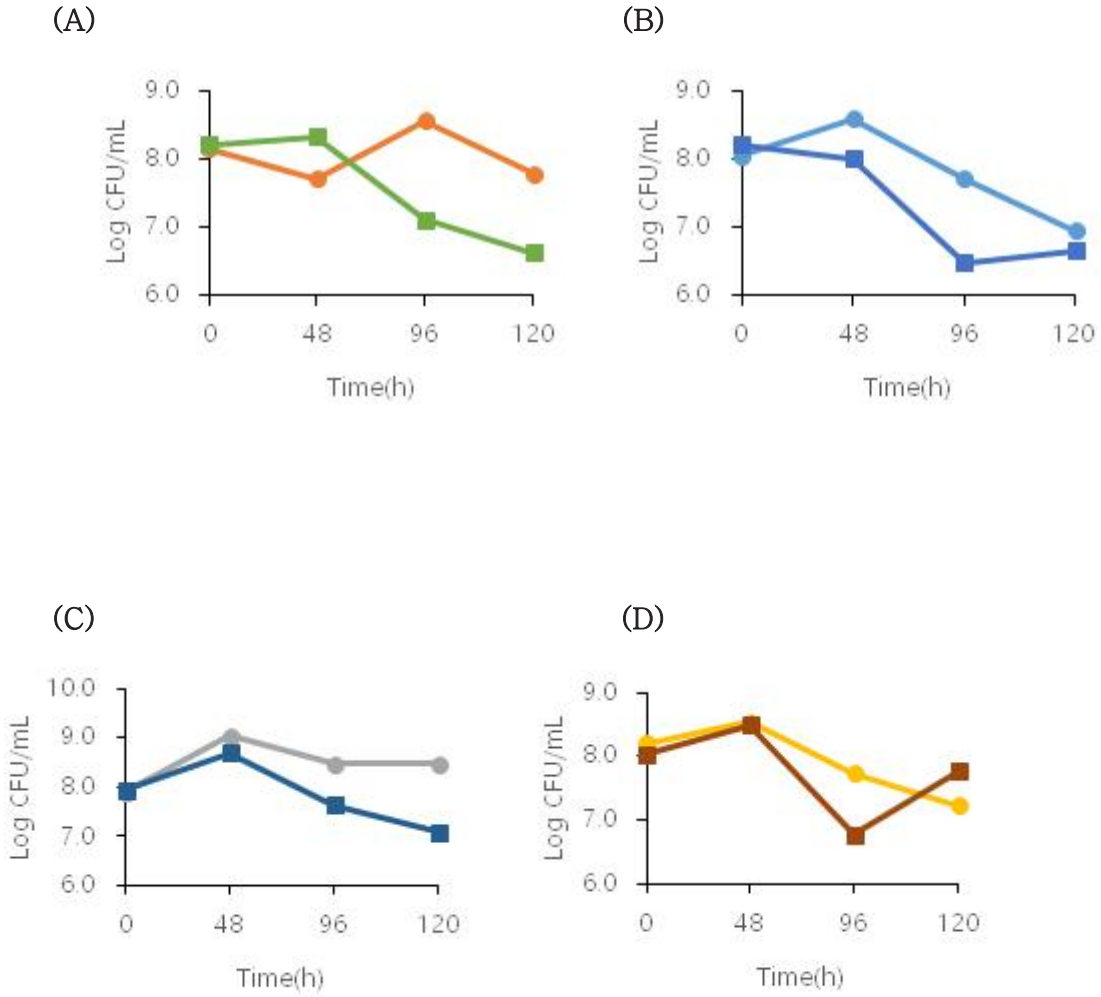


Figure 20. MSG, Yeast extract 첨가한 다시마추출물에서 온도 조절 시 *L. brevis* GABA100의 5일간 pH 변화. (A), G1, control; (B), G2, MSG 3%; (C) G3, Ye 0.5%; (D) G4, MSG 3%, Ye 0.5%; 30℃(●); 37℃(■).

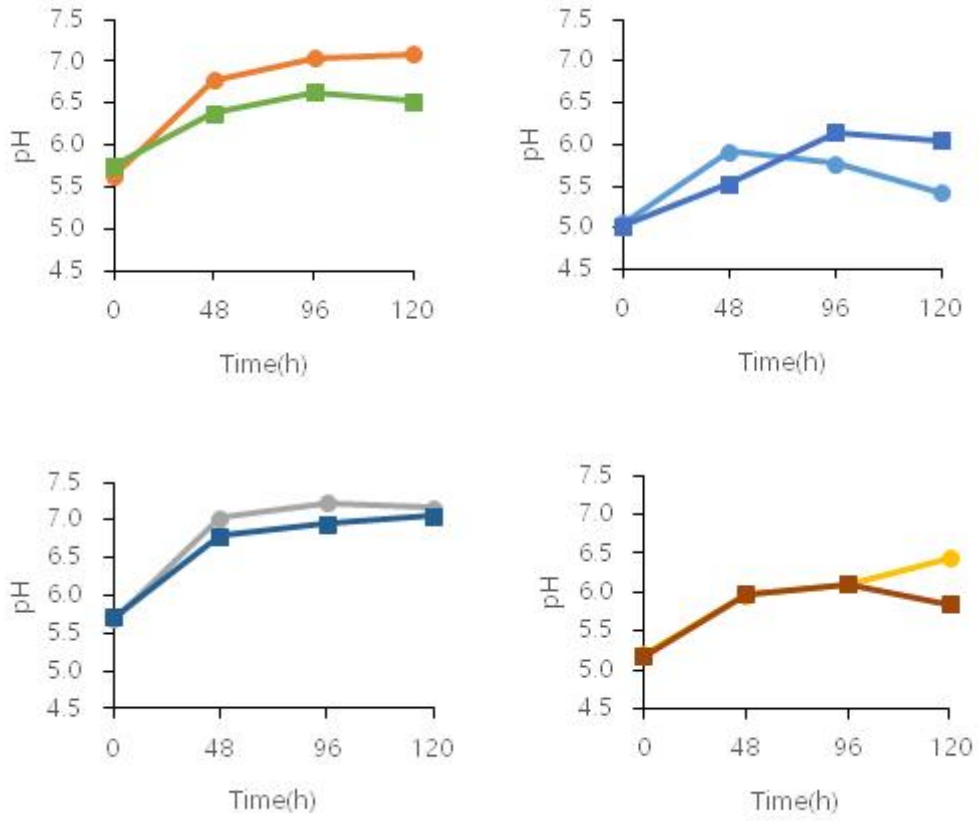
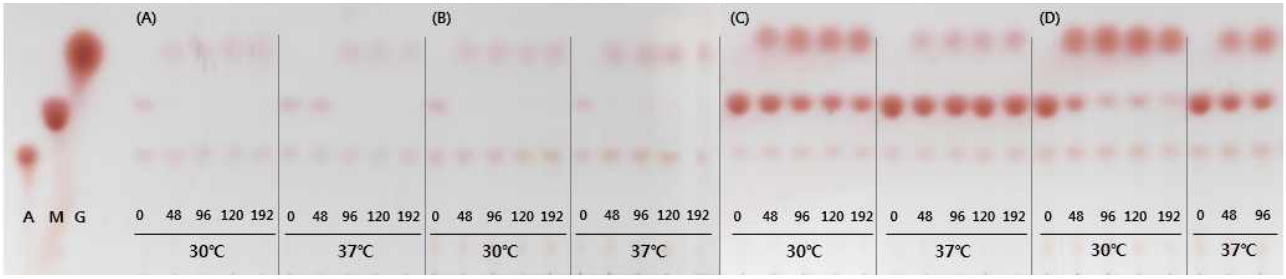



Figure 21. MSG, Yeast extract 첨가한 다시마추출물에서 온도 조절 시 *L. brevis* GABA100의 GABA 생성. (A), G1, control; (B), G2, MSG 3%; (C) G3, Ye 0.5%; (D) G4, MSG 3%, Ye 0.5%; Lane A, aspartic acid 1%; Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%



### 5. MSG를 첨가한 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100의 GABA전환에 영향을 미치는 탄소원 비교

다시마에 1:15(w/v)비율로 멸균수(DW)를 첨가한 후 MSG 3%를 첨가하고 탄소원 9종을 선정하여 총 10군으로 구성하였다. 다시마와 DW 혼합물을 멸균(121℃, 15분) 후 각 탄소원은 filtering 하여 1% 첨가하였고 *L. brevis* GABA100는 5%를 접종하여 30℃에서 3일간 발효하였다. 이 실험에서는 Ye는 첨가하지 않고 MSG만 첨가하여 pH 조절과 30℃ 발효 최적 조건에서 탄소원을 첨가했을 때 *L. brevis* GABA100의 CFU, pH 변화, GABA 생성 정도를 확인하였다.

탄소원 첨가 시 mannose를 제외한 전체 군에서 DW보다 높은 CFU를 보였고 CFU 증가 상위군으로는 maltose, glucose, fructose로 나타났다(Figure 22A, B). pH 변화에서는 CFU 증가 상위군이 다른 군에 비하여 상대적으로 낮은 pH를 나타내었고 발효 시간이 길어져도 glucose를 제외하고는 pH 증가 현상이 미미하게 나타났다(Figure 22C, D). 반면, CFU 증가율이 DW와 비슷한 탄소원의 경우 pH가 점차 증가하였고 대부분 무첨가군(DW)의 pH 이상으로 상승하였다.

TLC 결과에서는 CFU 증가 상위군인 maltose, fructose와 가장 낮은 CFU를 보인 mannose, 그리고 발효 중 pH 최저점을 나타낸 sucrose군에서 GABA 전환이 적게 일어났음을 확인할 수 있었고(Figure 23), DW와 유사한 CFU를 보여준 탄소원 중 특히 rhamnose 첨가군에서 가장 많은 MSG가 소모되었다(Figure 24). 결과를 종합해보면, CFU를 증가시키는 탄소원은 *L. brevis* GABA100의 생장이 증대되면서 대사 산물의 축적에 의한 pH 저하 현상이 발생하고, 그 pH가 GABA 전환 최적 pH 범위에 있음에도 MSG를 소모하지 못하는 것으로 보아 *L. brevis* GABA100의 GAD는 생장이 마무리 되는 시점에 분비되거나 활성을 가지는 것으로 판단된다(Figure 24).

Figure 22. MSG 첨가한 다시마추출물에서 탄소원 첨가 시 *L. brevis* GABA100의 3일간 생장 및 pH 변화. (A),(C), DW, control(▲); maltose(—); lactose(■); galactose(●); rhamnose(◆); (B), (D), glucose(●); fructose(■); sucrose(◆); arabinose(▲); mannose(—);

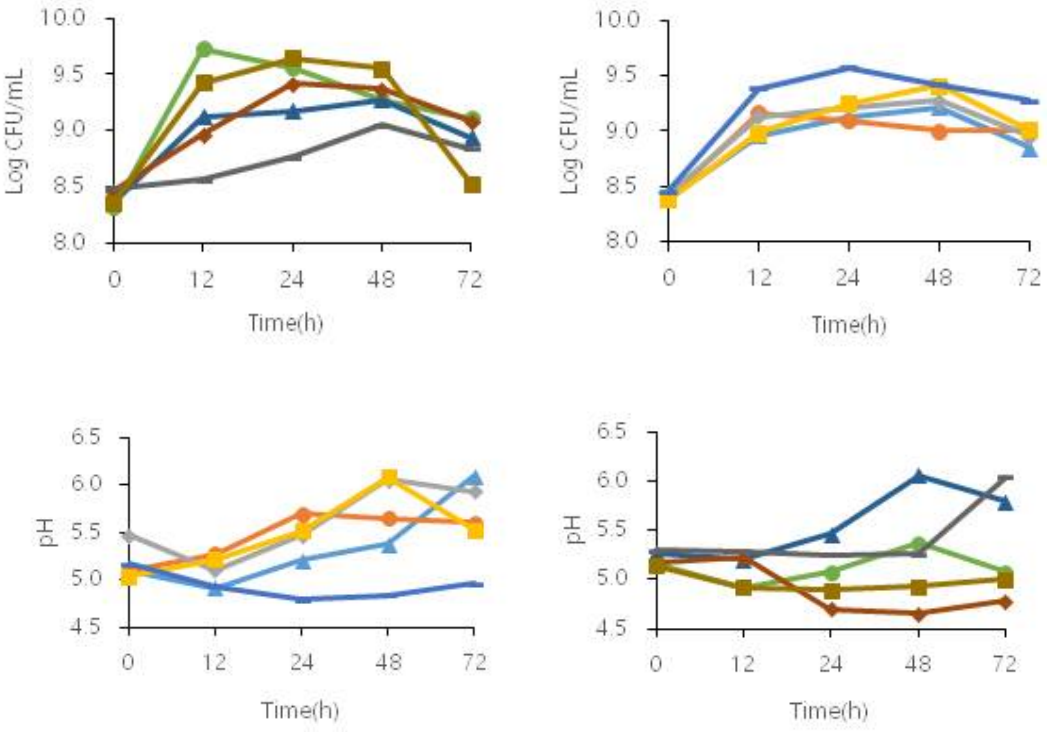


Figure 23. MSG 첨가한 다시마추출물에서 탄소원 첨가 시 *L. brevis* GABA100의 GABA 전환. Lane A, aspartic acid 1%; Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%; DW, distilled water; Glu, glucose; Gal, galactose; Fru, fructose; Suc, sucrose; Lac, lactose; Rham, rhamnose; Man, mannose; Ara, arabinose; Mal, malatose

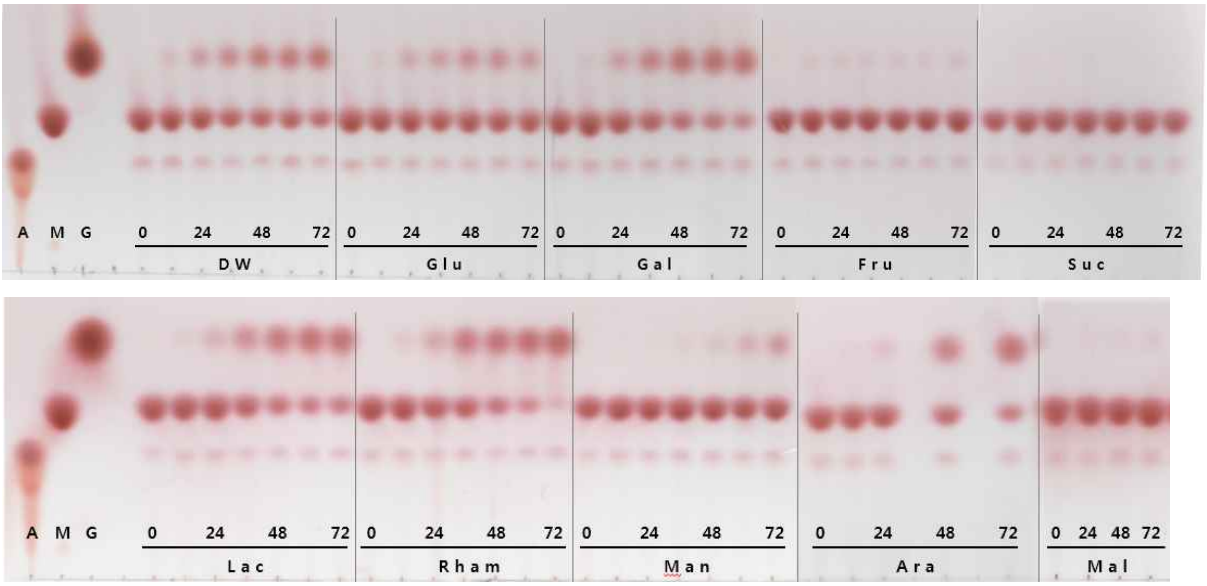
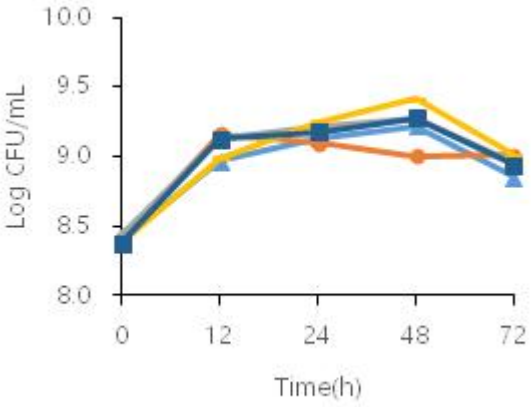
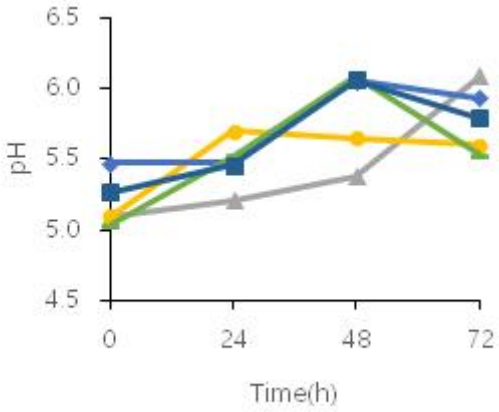



Figure 24. MSG 첨가한 다시마추출물에서 탄소원 첨가 시 *L. brevis* GABA100의 GABA 전환 상위 그룹. (A) CFU; (B) pH; (C) TLC; DW(▲), rhamnose(◆), galactose(●), arabinose(■), lactose(—); Lane A, aspartic acid 1%; Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%

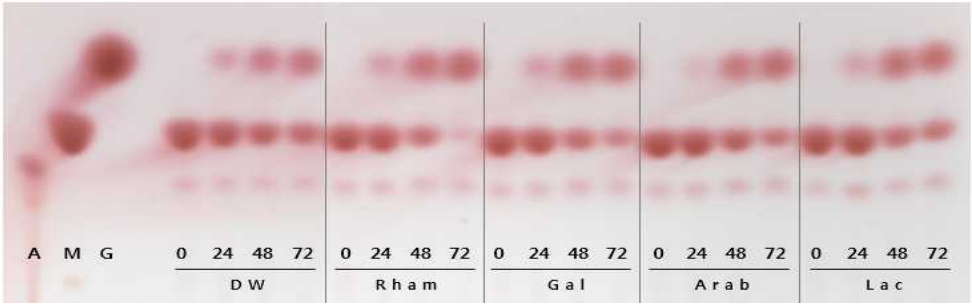
(A)




(B)




(C)



## 제 11 장. 다시마를 첨가한 GABA 함유 액체형 메주 제조(주관)

### 1. 백태, MSG, Ye 조합군에 *L. brevis* GABA100 5%를 접종하여, 최적 조건(30℃, pH 5.0)에서 3일간 CFU, pH 변화와 TLC를 이용한 GABA 전환 확인

메주의 주요 구성인 백태(국내산)와 기장산 다시마에 MSG 3%, Ye 0.5%를 조합하여 총 10군을 설정하였다(Table 12). 멸균수를 백태 중량을 기준으로 1:10(w/v) 비율로 첨가한 후 18~24시간 수침시켜 멸균 및 열수추출(121℃, 30분)을 하였고 각 군에 *L. brevis* GABA100 5%를 접종하여 30℃, 3일(72h)간 pH 범위를 조절하는 발효 조건에서 CFU, pH 변화, TLC로 GABA 전환을 확인하였다.

Table 12. 백태, 다시마분말, MSG와 Yeast extract를 조합한 그룹 설정

| 구분 | 주요 구성 | 첨가 구성 | |
|---|---|---|---|
| Group1 | 백태 | | |
| Group2 | 다시마분말 | | |
| Group3 | 백태 | MSG 3%* | |
| Group4 | 다시마분말 | MSG 3% | |
| Group5 | 백태 | 다시마분말(5:1)** | |
| Group6 | 백태 | 다시마분말(2:1) | |
| Group7 | 백태 | Yeast extract 0.5% | |
| Group8 | 다시마분말 | Yeast extract 0.5% | |
| Group9 | 백태 | MSG 3% | Yeast extract 0.5% |
| Group10 | 백태 | 다시마분말(2:1) | Yeast extract 0.5% |

*수분첨가량은 백태, 다시마 분말의 중량(w) 대비 멸균수(DW)의 첨가부피(v)를 의미함.
**비율은 백태:다시마분말(w/w)을 의미함.

MSG와 Ye를 조합한 백태와 다시마의 CFU는 발효 과정 동안 유사한 경향을 보인 것(data not shown)과 달리 pH 변화는
백태 군보다 다시마 군에서 높게 나타났다(Figure 25). 이는 각 군의 glutamic acid 또는 첨가한 MSG가 GABA로 전환된 정도에 따라 pH가 증가한 것으로 각 군내 glutamic acid와 MSG의 총량이 영향을 준 것으로 판단된다.

TLC 결과에서는 백태로만 구성된 군(G1)에서는 glutamic acid, GABA가 거의 나타나지 않았는데 백태는 열수추출해도 glutamic acid가 나오지 않고 백태에 Ye 0.5%를 첨가한 군(G7)에서도 glutamic acid가 진해지는 양상이 없으므로 *L. brevis* GABA100의 단백 분해 활성이 낮음을 알 수 있다(Figure 26). 백태에 MSG 3%를 첨가한 군(G3)에서는 3일간의 발효에서 MSG 대부분이 소모되었고 백태에 MSG 3%, Ye 0.5%를 첨가한 군(G9)에서는 MSG를 GABA로 전환하는데 걸리는 시간이 단축되었다. 백태에 다시마를 첨가한 군(G5, G6)에서는 다시마의 함량이 높을수록 glutamic acid와 GABA가 진하게 나타났지만 MSG 3% 수준에는 못 미치는 양임을 TLC로 확인할 수 있었다.

Figure 25. MSG와 Ye를 첨가한 백태, 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100에 의한 pH 변화. (A), G1, G2; (B), G3, G4; (C), G5, G6; (D), G7, G8; 백태(■); 다시마추출물(●).

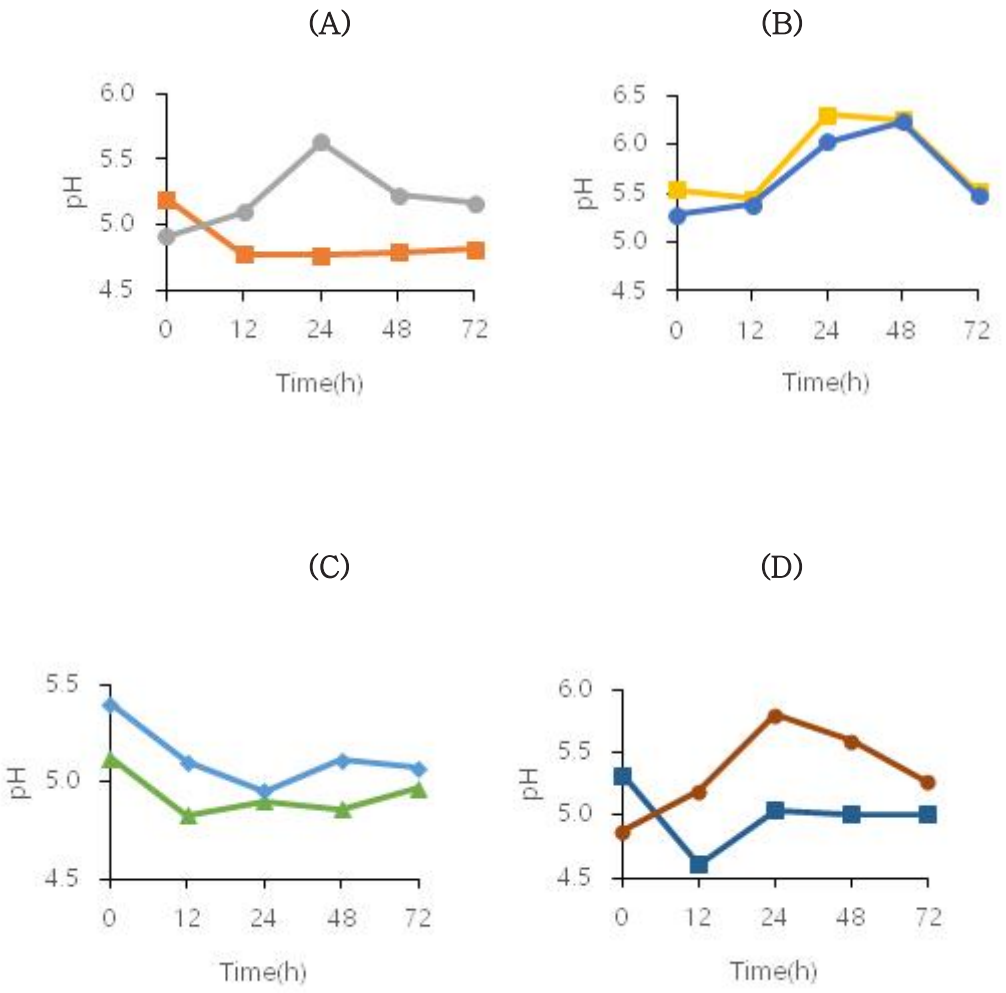
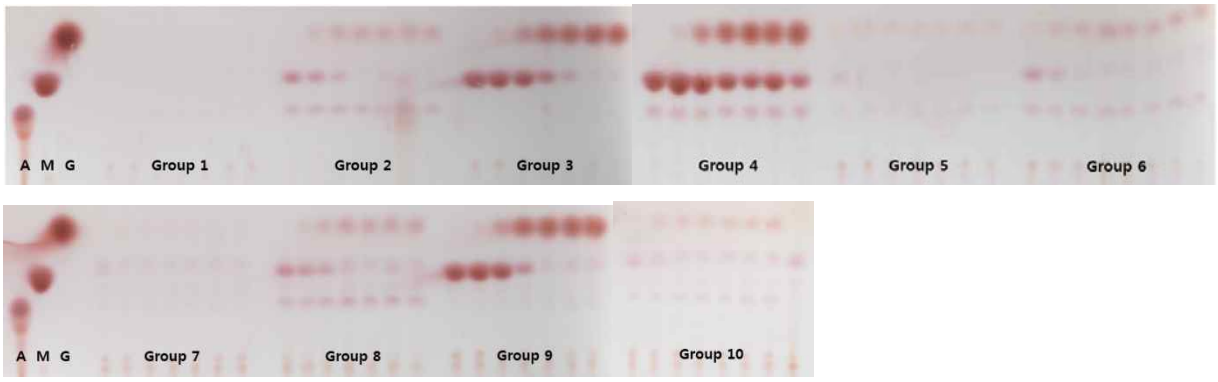



Figure 26. MSG와 Ye를 첨가한 백태, 다시마추출물에서 *L. brevis* GABA100의 GABA 전환 비교. Lane A, aspartic acid 1%; Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%.



## 2. 백태, 파인애플, 맥아, *Aspergillus oryzae* 46471 조합군에서 *L. brevis* GABA100의 GABA 전환 비교

단백 분해능이 뛰어난 파인애플과 전분 분해능이 좋은 맥아를 백태에 첨가하여 glutamic acid 생성과 *L. brevis* GABA100의 GABA 전환을 촉진시킬 수 있는지에 대해서 TLC 분석을 실시하였다(Table 13). 백태는 멸균수와 1:10(w/v) 비율로 12-18시간 수침하여 멸균(121℃, 30분)하였고 파인애플은 재래 시장에서 구입한 후 멸균한 거즈로 즙을 짜내어 열처리(70℃, 1시간)를 하였다. 맥아는 멸균수를 넣고 vortexer로 5분간 섞어준 후 1시간 동안 수침시켜 열처리(70℃, 1시간) 하였고, 30℃에서 3일간 발효하는 과정에서 *A. oryzae* 46471과 *L. brevis* GABA100의 대사 영향을 보기 위해 pH 조절은 제외하였다.

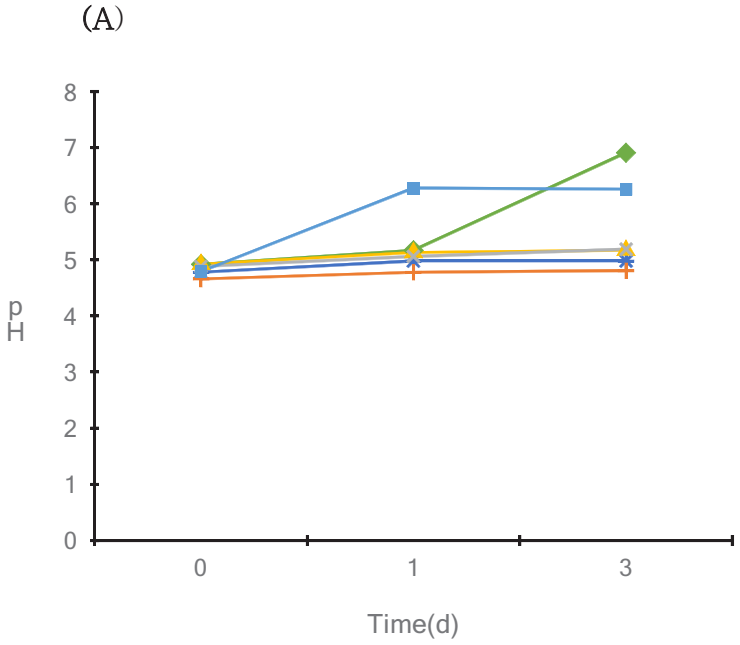
Table 13. 백태, 파인애플, 맥아와 *A. oryzae* 46471, *L. brevis* GABA100을 조합한 그룹 설정

| 구분 | 기본 구성 | 첨가 구성 |
|---|---|---|
| Group1 | 백태 | - |
| Group2 | 백태 | 파인애플즙 50%* |
| Group3 | 백태 | 파인애플즙 10% |
| Group4 | 백태 | 맥아즙 5% |
| Group5 | 백태 | 파인애플즙 10%, 맥아즙 1.25% |
| Group6 | 백태 | *A. oryzae* 46471** |
| Group7 | 백태 | *L. brevis* GABA100*** |
| Group8 | 백태 | 파인애플즙 50%, *L. brevis* GABA100 |
| Group9 | 백태 | 파인애플즙 10%, *L. brevis* GABA100 |
| Group10 | 백태 | 맥아즙 5%, *L. brevis* GABA100 |
| Group11 | 백태 | 파인애플즙 10%, 맥아즙 1.25%, *L. brevis* GABA100 |
| Group12 | 백태 | *A. oryzae* 46471, *L. brevis* GABA100 |

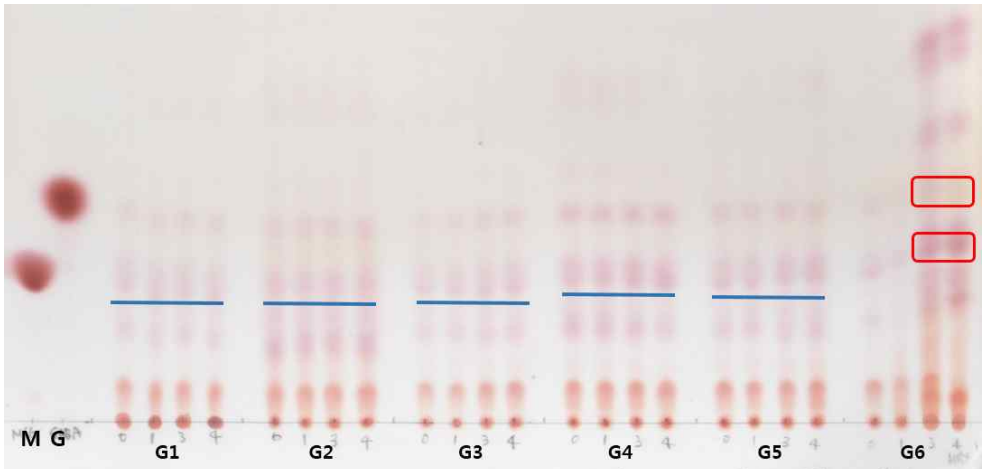
*파인애플즙, 맥아즙의 첨가량은 각 군의 총 수분첨가량(v)을 기준으로 함
**A. oryzae 46471은 10^6 cells로 seeding함
***L. brevis GABA100은 총 수분첨가량(v) 기준 5%를 접종함.

pH 변화에서는 무첨가군(G1)과 *A. oryzae* 46471 접종군(G6)에서 pH가 증가하였고 나머지 군에서는 pH 5.5 이하를 유지하였다(Figure 27A). pH 증가 원인으로는 *A. oryzae*의 단백분해효소가 백태 단백질을 대사하여 생기는 아미노태 질소가 원인으로 판단된다. *L. brevis* GABA100을 접종하지 않은 군(G1-G6)에서는 효소 활성을 가진 파인애플즙과 맥아즙을 첨가한 발효 초기의 아미노산 수준이 크게 변하지 않았다(Figure 27B). 반면 *A. oryzae* 46471 접종군에서는 초기 대사 때의 아미노산이 파인애플즙 50% 첨가군보다 발색이 옅으나 3일차부터 아미노산 발색이 진해지는 것을 확인할 수 있고, GABA 전환은 미미한 편이었다. *L. brevis* GABA100을 접종한 군(G7-12)에서는 발효가 진행될수록 GABA 발색이 진해지나 *A. oryzae* 46471 접종군(G12)을 제외하고는 glutamic acid가 소모되어 GABA 전환에 한계가 있었다(Figure 27C). *L. brevis* GABA100와 *A. oryzae* 46471 함께 접종하면 *L. brevis* GABA100에 의해 glutamic acid가 소모되어도 *A. oryzae* 46471의 단백분해효소가 glutamic acid를 만들어내므로 다른 군보다 GABA 양이 많아졌음을 알 수 있다.

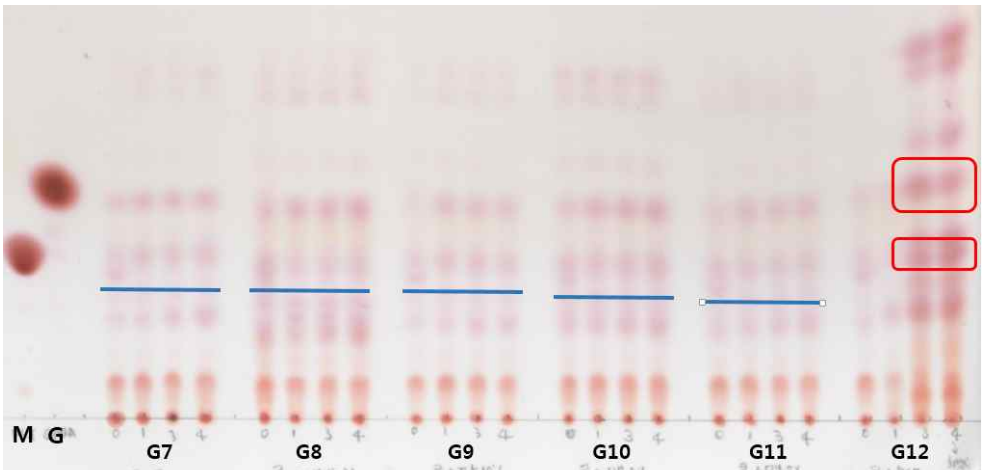
**Figure 27. 백태, 파인애플, 맥아와 *A. oryzae* 46471, *L. brevis* GABA100을 조합한 그룹에서 (A) pH 변화 및 (B) 아미노산 변화.** (A), G1(■), G2(+), G3(X), G4(▲), G5(ж), G6(◆); (B), *A. oryzae* 46471 inoculated; (C), *A. oryzae* 46471 and *L. brevis* GABA100 inoculated; Lane M, MSG 1%; Lane G, GABA 1%.



(B)




(C)




### 3. 백태, 파인애플, 맥아, 다시마추출물 조합군에서 *A. oryzae* 46471과 *L. brevis* GABA100에 의한 GABA 전환

단백 분해능이 뛰어난 파인애플과 전분 분해능이 좋은 맥아, glutamic acid의 공급원으로 다시마추출물을 백태에 첨가하여 glutamic acid 생성과 GABA 전환을 향상시킬 수 있는지에 대해서 액체 메주의 구성은 Table 14와 같이 진행하였다. 백태는 멸균수와 1:10(w/v) 비율로 12-18시간 수침하여 멸균(121℃, 30분)하였다. 파인애플은 껍질을 제거하여 대용량 믹서로 갈아주고 열처리(50℃, 1시간) 과정과 centrifutaion(10,000rpm, 3분, 20℃)을 거쳐 사용하였다. 맥아는 멸균수를 넣고 vortexer로 5분간 섞어준 후 1시간 동안 수침시켜 열처리(50℃, 1시간)하여 사용하였다. 30℃에서 7일간 발효하며 pH 5.5 이상 증가하지 않도록 조절하였고 CFU, pH 변화, TLC 분석을 통한 GABA 전환을 확인하였다.

파인애플즙을 첨가한 군은 무첨가보다 *L. brevis* GABA100의 CFU가 증가하는 경향이 있는데 이는 파인애플즙에 있는 fructose, sucrose 등 당 성분이 *L. brevis* GABA100의 생장에 이용되기 때문(data not shown)이고 파인애플즙 첨가량이 증가하면 CFU도 소폭 더 증가하는 것을 알 수 있다(Figure 28A). 맥아즙의 경우 발효 과정 동안 무첨가군보다 2.5% 첨가군이 더 높은 CFU를 보였으나 5% 첨가군은 무첨가군보다 낮아지는 현상을 보였다(Figure 28B). 파인애플즙과 맥아즙을 모두 첨가한 군은 파인애플즙만 첨가한 군에 비해 CFU가 낮게 관찰되어, 맥아즙을 2.5% 미만으로 첨가하는 것이 CFU 증가에 도움이 될 수 있을 것으로 보인다(Figure 28C). 다시마추출물을 첨가한 군에서는 각 군별 CFU 차이가 크지 않으나 역시 파인애플즙을 첨가한 군에서 가장 높은 CFU가 나타났다(Figure 28D)

pH 변화에서는 파인애플즙 첨가량이 증가할수록 pH가 저하되는데 파인애플즙 자체는pH 4.32이지만 CFU 증가에 따른 대사 산물에 의한 pH감소가 주 원인으로 보인다(Figure 29A). 맥아즙은 2.5% 첨가군에서 CFU가 높았던 점으로 보아 다량의 GAD를 분비되어 glutamic acid가 GABA로 전환될 때 pH 증가하는 것과 관련이 있는 것으로 판단된다(Figure 29B). 그러나 전체적으로 pH가 3.5-4.5 범위까지 떨어졌기 때문에 *A. oryzae* 46471와 *L. brevis* GABA100의 생장을 저해하는 요인으로 작용할 수 있으므로 파인애플즙의 첨가량을 줄이거나 *L. brevis* GABA100의 접종량을 줄이는 것이 최적 pH를 유지하는데 도움이 될 것이다. .

**Table 14. 백태, 파인애플, 맥아, 다시마추출물과 *A. oryzae* 46471, *L. brevis* GABA100을 조합한 그룹 설정**

| 구분 | 기본 구성 | 첨가 구성 |
|---|---|---|
| Group1 | 백태 | - |
| Group2 | 백태 | 파인애플즙 50%* |
| Group3 | 백태 | 파인애플즙 25% |
| Group4 | 백태 | 맥아즙 5% |
| Group5 | 백태 | 맥아즙 2.5% |
| Group6 | 백태 | 파인애플즙 25%, 맥아즙 5% |
| Group7 | 백태 | 파인애플즙 25%, 맥아즙 2.5% |
| Group8 | 백태 | 다시마추출물(2:1)** |
| Group9 | 백태 | 다시마추출물(2:1), 파인애플즙 25% |
| Group10 | 백태 | 다시마추출물(2:1), 맥아즙 5% |
| Group11 | 백태 | 다시마추출물(2:1), 파인애플즙 25%, 맥아즙 5% |

*파인애플즙, 맥아즙의 첨가량은 각 군의 총 수분첨가량을 기준으로 함

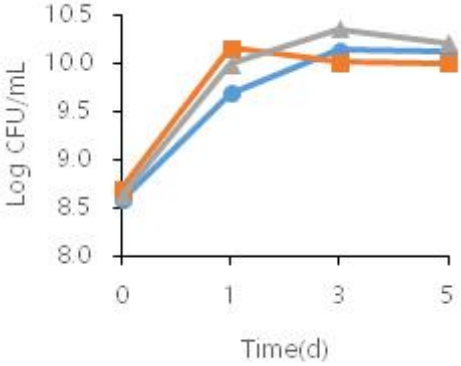
** 백태와 다시마추출물의 비율은 중량(w/w)을 기준으로 함

***A. oryzae 46471은 10^6 cells로 seeding함

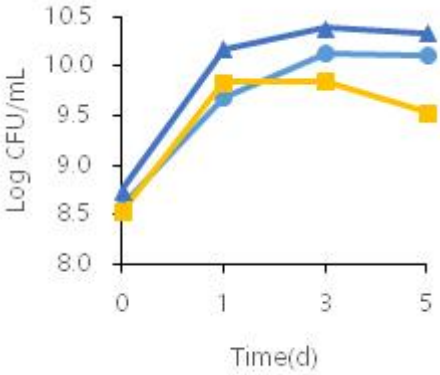
****L. brevis GABA100은 총 수분첨가량(v) 기준으로 5%를 접종함.

Figure 28. 백태, 파인애플, 맥아, 다시마추출물 조합군에서 *A. oryzae* 46471와 *L. brevis* GABA100에 의한 pH 변화. (A), G1(●), G2(■), G3(▲); (B) G1(●), G4(■), G5(▲); (C) G3(●), G6(■), G7(▲); (D), G8(●), G9(▲), G10(◆), G11(■).

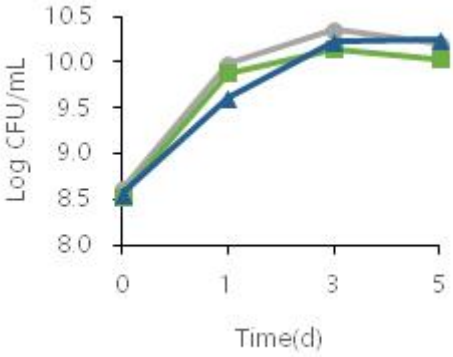
(A)




(B)




(C)




(D)

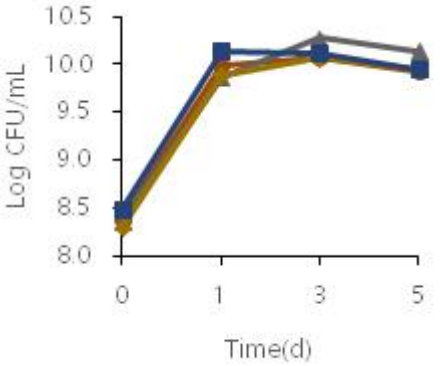
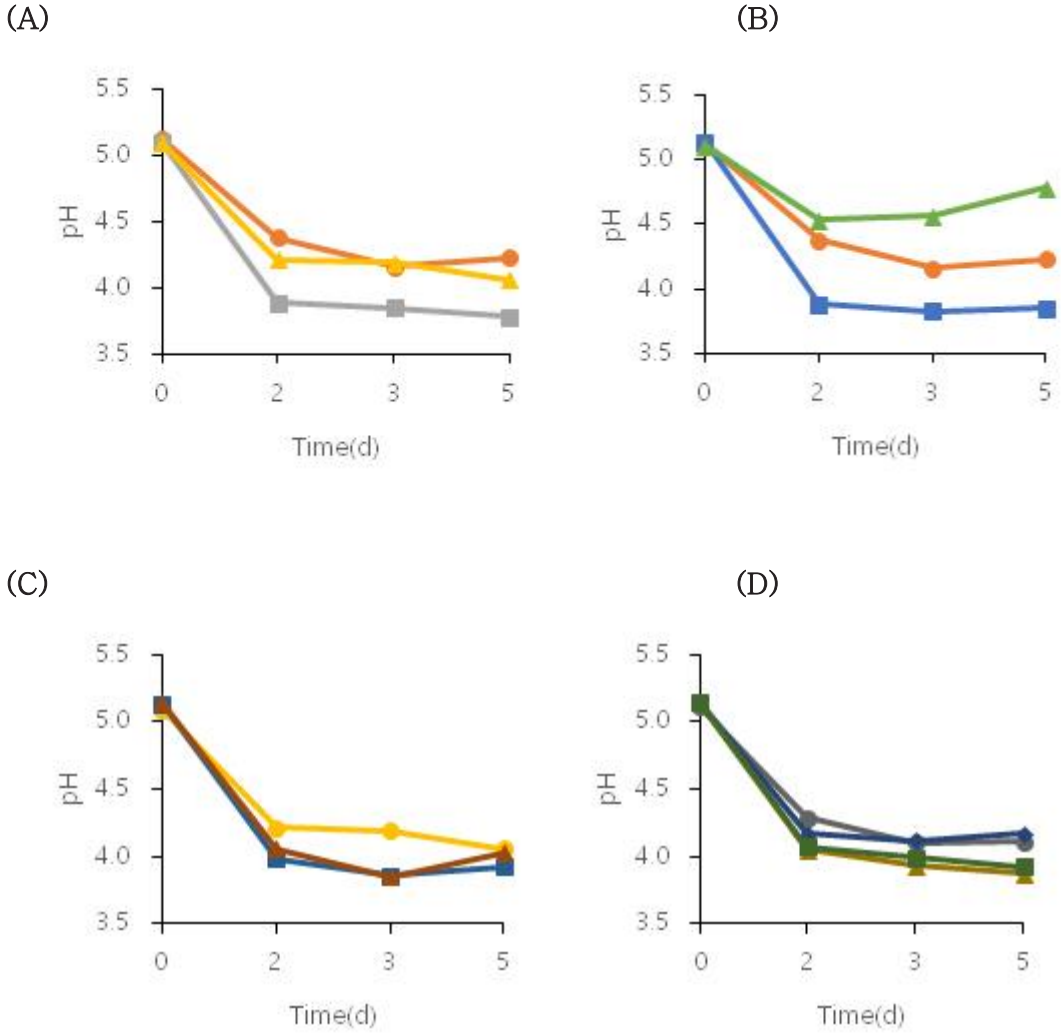


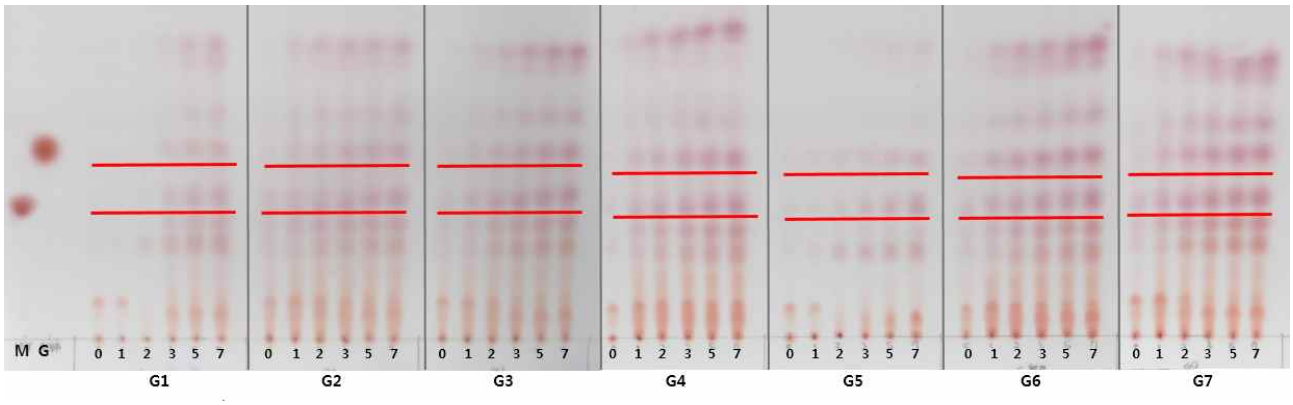
Figure 29. 백태, 파인애플, 맥아, 다시마추출물 조합군에서 *A. oryzae* 46471와 *L. brevis* GABA100에 의한 pH 변화. (A), G1(●), G2(■), G3(▲); (B) G1(●), G4(■), G5(▲); (C) G3(●), G6(■), G7(▲); (D), G8(●), G9(▲), G10(◆), G11(■).



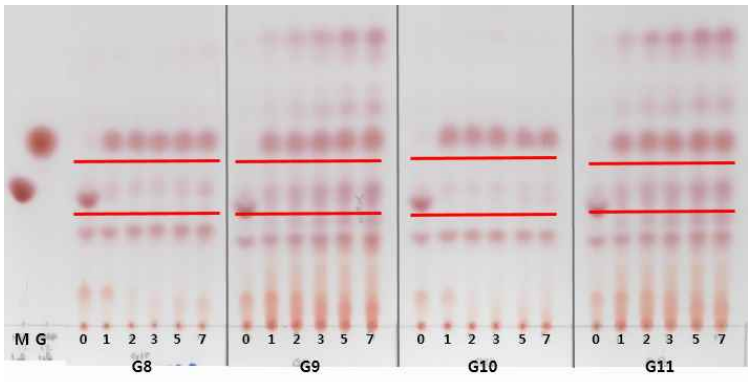

TLC 결과를 보면 파인애플 첨가군은 파인애플의 단백분해효소가 발효 초기에 작용하여 다른 군에 비해 아미노산 패턴이 진하게 나타났고, 파인애플즙 첨가량이 감소하면 발효 초기 아미노산의 발색이 옅어지는 것을 볼 수 있다(Figure 30A). 그러나 7일차에서는 파인애플즙25% 첨가군 또한 아미노산 패턴이 진해지기 때문에 파인애플즙을 25% 내외로 첨가하는 것이 효율적일 것으로 판단된다. 맥아즙 첨가군에서는 2.5% 첨가군이 CFU가 가장 높았음에도 아미노산 패턴이 약하게 나타난 것으로 보아 *L. brevis* GABA100가 생육이 증가할 때는 GABA 전환능력이 활성화되지 않는 것으로 보인다. 반면 *A. oryzae* 46471은 파인애플즙과 맥아즙에 크게 영향을 받지 않고 백태 단백질을 분해하는 것으로 나타났다. 다시마추출물을 첨가한 군에서는 전체적으로 GABA의 발색이 진하고 역시 파인애플즙을 첨가한 군에서 다양한 아미노산 패턴이 나온 것을 볼 수 있다(Figure 30B). 따라서 *A. oryzae* 46471와 *L. brevis* GABA100을 접종한 GABA 함유 액체 메주를 제조할 때 천연 glutamic acid의 급원으로 다시마추출물을 첨가하고 파인애플즙을 총 부피 기준 25%, 맥아즙은 총 부피 기준 2.5% 미만으로 첨가하면 최적 조건에서 발효(30℃, pH 5.0)시 고함유 GABA 메주를 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

Figure 30. 백태, 파인애플, 맥아, 다시마추출물 조합군에서 *A. oryzae* 46471와 *L. brevis* GABA100에 의한 glutamic acid와 GABA 생성. (A), 다시마추출물 미첨가군(G1-G6); (B) 다시마추출물 첨가군(G8-G11)

(A)




(B)




## 제 12 장. 콩, 다시마 혼합 발효물의 제조(주관)

콩과 건조 다시마는 분쇄기 (Hanil Electric Co., Korea)를 사용하여 분말로 준비하고 여분은 냉장 보관 (4℃)하였다. 다시마 추출물 (sea tangle extract, STE)은 다시마 분말(sea tangle powder, STP) 2.5 g에 증류수 50 mL를 첨가하여 고압멸균기 (autoclave)로 121℃ 에서 15 분간 열수 추출하였고, Whatman No. 5 filter paper (Whatman Ltd., Maidstone, United Kingdom)로 다시마의 불용 성분을 제거한 후 여과액을 다시마 추출물로 사용하였다.

GABA 생성을 위한 발효 최적화 연구에서는 콩 5 g에 다시마 추출물 50 mL을 첨가하여 증숙한 콩, 다시마 혼합물 (SB-STE)을 기본 배지로 사용하였다. 배지 구성이 변경되는 경우, 해당 실험 에서 배지 구성을 별도로 기재하였다. *A. oryzae* FMB S46471, *B. subtilis* natto와 *L. brevis* GABA 100의 접종은 GABA 생성을 위한 발효 최적화 연구에서 제시한 미생물의 접종 조합, 접종 시점, 접종량에 따라 진행하였다. 발효는 shaking incubator에서 150 rpm, 호기 조건으로 총 7 일간 진행하였고, 발효 0, 3, 5, 7 일차의 생균수와 pH를 측정한 후 1 mL씩 sampling 하여 -20℃에서 보관하였다.

### 1. *A. oryzae*, *B. subtilis*와 *L. brevis*의 GABA 생성능 확인

*A. oryzae* FMB S46471, *B. subtilis* natto와 *L. brevis* GABA 100의 GABA 생성능 확인 실험은 Table 15의 내용에 따라 진행하였다. *A. oryzae* FMB S46471은 기본 배지 SB-STE에 $5x10^4$ spores/mL가 되도록 접종하였고, *B. subtilis* natto 와 *L. brevis* GABA 100은 1 % (v/v)를 접종하였다. 발효는 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 7 일간 진행하였다.

*A. oryzae* FMB S46471, *B. subtilis* natto와 *L. brevis* GABA 100 세 균주를 SB-STE 배지에 접종하여 7 일간 발효한 결과, group G와 AG에서만 GABA가 생성되었음을 확인하였다 (Fig 31A). 두 group의 공통 균주인 *L. brevis* GABA 100은 glutamic acid decarboxylase (GAD)를 분비하는 GABA-producing lactic acid bacteria로 본 연구에서 유일하게 GABA를 생성할 수 있는 균이나, 단독 접종 시 유리아미노산을 생성하지 않는 것으로 보아 protease 활성은 낮은 경향을 보였다.

Table 15. The various inoculation with different microorganisms.

| Group | Microorganism |
|---|---|
| A | *A. orzyae* |
| B | *B. subtilis* |
| G | *L. brevis* |
| AB | *A. oryzae, B. subtilis* |
| AG | *A. oryzae, L. brevis* |
| BG | *B. subtilis, L. brevis* |
| ABG | *A. oryzae, B. subtilis, L. brevis* |

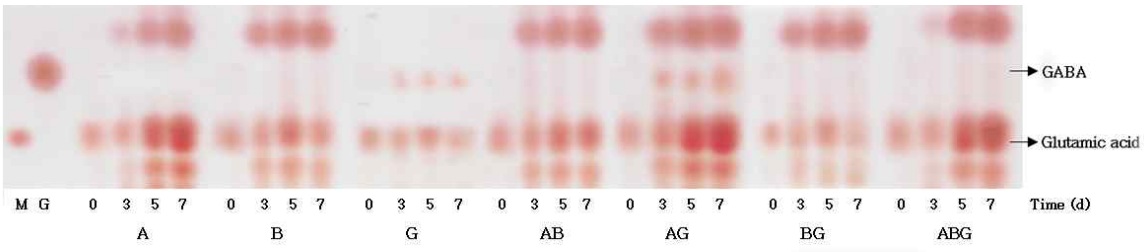
*A. oryzae, Aspergillus oryzae* FMB S46471; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis* natto; *L. brevis, Lactobacillus brevis* GABA 100. Fermentation was conducted at 30℃, 150 rpm for seven days in SB-STE medium.

반면, *L. brevis* GABA 100을 접종한 group BG와 ABG에서는 GABA가 생성되지 않았는데, *A. oryzae* FMB S46471과의 공동 배양과는 달리 *B. subtilis* natto의 protease 활성은 *L. brevis* GABA 100의 GAD 활성을 억제하는 것 사료된다. 또한 *B. subtilis* natto 접종량을 증가시켜 SB-STE에서 배양했을 때 TLC plate에서 glutamic acid의 양이 감소하고 점질물이 발생한 점으로 보아 *B. subtilis* natto가 glutamic acid를 소비하여 poly ɣ-glutamate를 생성하는 점과 관련이 있는 것으로 관찰되었다. Glutamic acid의 감소는 GABA 생성을 증가시키는 목적과 반대되는 양상이므로 *B. subtilis* natto는 추후 실험에서 제외되었다

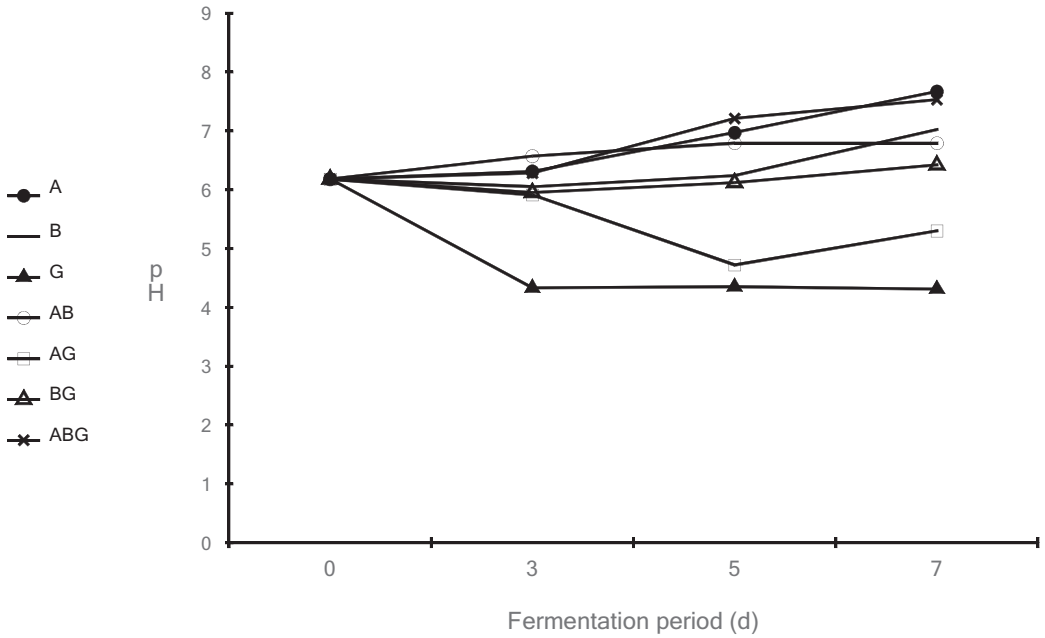
*A. oryzae* FMB S46471 역시 유리아미노산을 생성하였고 이는 *B. subtilis* natto보다 protease 활성이 더 높은 것으로 나타났다. *A. oryzae* FMB S46471의 강력한 protease 활성에도 불구하고 GAD의 활성은 저해되지 않고 GABA를 생성하였다. 또한 공동배양 시 pH 범위가 GAD의 최적 pH인 pH 5.0에 가까운 환경을 조성하는 것을 확인하였다 (Fig 31B). 이 결과를 토대로 *A. oryzae* FMB S46471와 *L. brevis* GABA 100을 공동 배양하는 조건으로 GABA 생성 최적 발효 조건을 설정하였다.

Fig 31. Production of amino acids and GABA by *A. oryzae*, *B. subtilis*, and *L. brevis* GABA 100. M, MSG; G, GABA; (A) pattern of free amino acids; (B) Change of pH in SB-STE during fermentation, symbols: (●), group A; (■), group B; (▲), group G; (○), group AB; (□), group AG; (△), group BG; (×), group ABG (refer to Table 15 for abbreviations).

(A)




(B)



**2. L. brevis의 접종 시점 및 A. oryzae와 L. brevis의 접종량에 따른 발효 중 GABA 생성 효과**

1의 실험 결과를 토대로 *A. oryzae* FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100을 GABA 생성을 위한 균주로 선택하였다. 접종 시점에 대한 GABA 생성 최적화 연구에서는 SB-STE 배지에 *A. oryzae* FMB S46471을 발효 시작일에 $5x10^4$ spores/mL로 접종하였고 *L. brevis* GABA 100의 접종시점을 각각 0, 3, 4, 5, 6 일차로 설정하여 1% (v/v) 접종하였다. 발효는 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 7 일간 진행하였다.

접종량에 대한 GABA 생성 최적화 연구에서는 SB-STE 배지에 *A. oryzae* FMB S46471을 각각 $10^4$, $10^5$, $10^6$ spores/mL를 발효 시작일에 접종하였고 *L. brevis* GABA 100은 발효 3 일차에 각각 1, 2, 3% (v/v)를 접종하여 총 9 개 그룹으로 구성하였다. 발효는 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 7 일간 진행하였다.

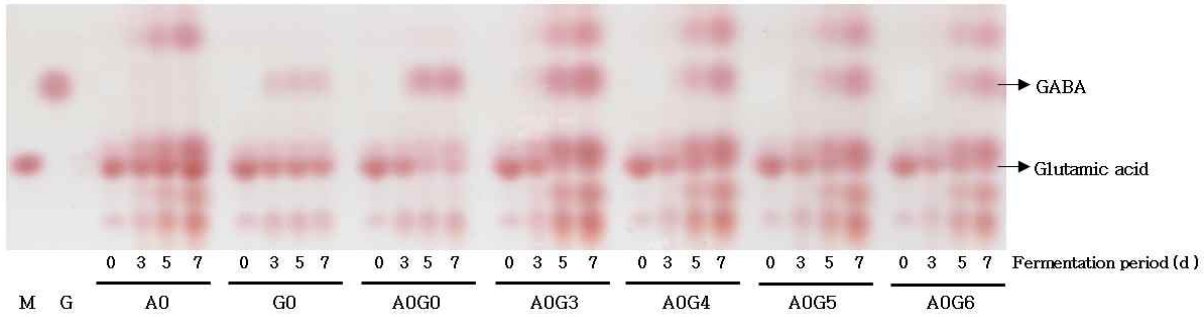
*L. brevis* GABA 100의 접종시점에 대해 비교한 결과는 Fig 2A와 같다. *A. oryzae* FMB S46471은 *L. brevis* GABA 100에 비해 강력한 단백 분해력을 보여주었으나, *A. oryzae* FMB S46471이 단백질을 분해하여 유리아미노산을 생성하기까지 접종일로부터 최소 3일정도 소요되었다. 이 점을 근거로 하여 *A. oryzae* FMB S46471의 접종 시점은 발효 시작일로 고정하였고 7 일간 단기 발효를 하면서 콩, 다시마 혼합 발효물이 protease에 가장 오랜 시간 노출될 수 있도록 하였다. 또한 *L. brevis* GABA 100을 단일 접종하는 경우 (group G0), 24 시간 이내에 pH가 4.3으로 낮아지기 때문에 GAD의 최적 활성 pH로 알려진 pH 5.0 보다 낮아 GABA 생성이 어려운 조건을 형성하였다 (Fig 32B).

*A. oryzae* FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100을 공동 배양하였을 때, 가장 GABA 생성이 많았던 group A0G3는 *A. oryzae* FMB S46471의 protease가 단백질을 분해하여 유리 아미노산이 나타나기 시작하는 시점에 *L. brevis* GABA 100을 접종하여 *A. oryzae* FMB S46471의 protease 활성에 의해 나타나는 pH 증가와 *L. brevis* GABA 100이 분비하는 유기산에 의한 pH 저하가 상쇄되는 효과가 있었다. Group A0G3은 발효 7 일차까지 pH 5.2-5.6 수준을 나타냈고 GAD의 최적 활성 pH 5.0에 근접하여 GABA 생산을 지속적으로 유지할 수 있었음을 확인하였다.

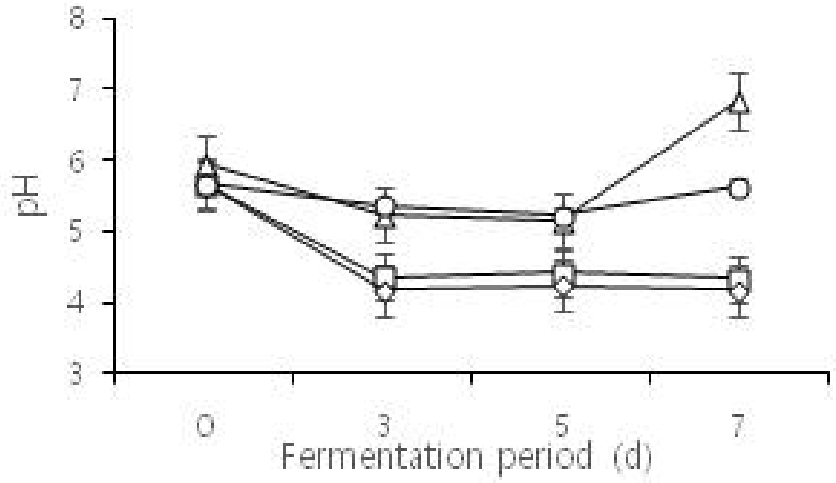
*A. oryzae* FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100의 접종량과 관련한 실험에서는 비교 그룹 간 GABA 생성 정도가 유사했으나 *A. oryzae* FMB S46471 접종량을 증가시켰을 때 pH가 지속적으로 증가하였고, *L. brevis* GABA 100의 접종량을 증가시켰을 때 pH 와 GABA 생성 두 요인 모두 감소하는 현상을 보였다. 따라서 pH 변화를 고려하여 *A. oryzae* FMB S46471은 $10^4$ spores/mL, *L. brevis* GABA 100은 1% (v/v) 수준으로 접종하는 것으로 결정하였다.

**Fig 32. Effect of inoculation time point of *L. brevis* GABA 100 on the GABA production.** M, MSG; G, GABA; (A) pattern of free amino acids on TLC plate; A, *A. oryzae* FMB S46471; G, *L. brevis* GABA 100; The inoculation date of each microorganism was written on the right of microorganism abbreviation in fermented groups; (B) change of pH and (C) change of cell viability in SB-STE during fermentaton; triangle, group A0; square, group G0; diamond, group A0G0; and circle, A0G3.

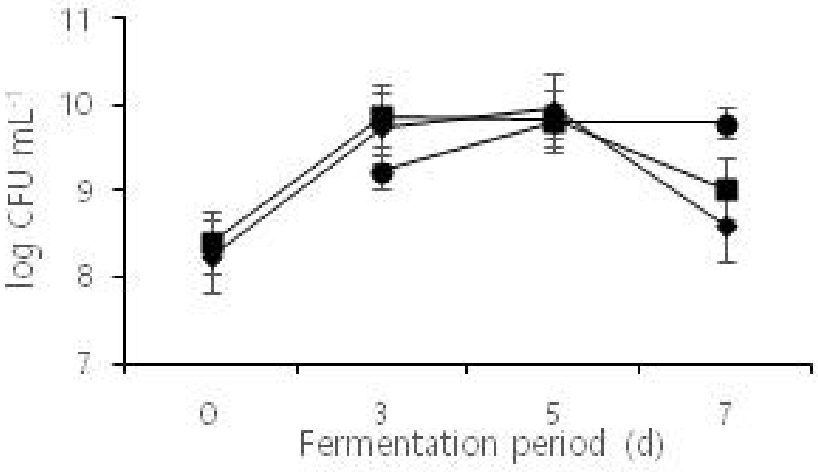
(A)




(B)




(C)



### 3. 발효 온도와 pH에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

1, 2의 실험 결과를 토대로 *L. brevis* GABA 100의 GABA 생성 최적 온도와 최적 pH에 대한 연구를 먼저 수행하였다.

3% MSG를 함유한 MRS broth에 *L. brevis* GABA 100을 1% (v/v) 접종하여 각각 25, 30, 37℃에서 3 일간 혐기 배양하였고 생균수와 pH 변화는 24 시간 마다 확인하였다. 최적 pH 확인 실험은 3% MSG를 함유한 MRS broth를 pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 의 5 가지 그룹으로 설정하여 3 M citric acid (Sigma-Aldrich Co., USA)로 pH를 조절한 후, *L. brevis* GABA 100 1% (v/v)를 접종하여 30℃ 에서 3 일간 혐기 배양하였다. 생균수와 pH 변화는 24 시간 마다 확인하였고 pH가 증가한 경우 3 M citric acid를 처리하여 각 실험군의 pH 조건을 유지할 수 있도록 모니터링 하였다. *L. brevis* GABA 100의 GABA 생성 최적 온도와 pH는 TLC 분석법을 이용하여 각 조건에서 생성된 GABA 패턴을 비교하여 최적 조건을 선택하였다.

콩 발효 단계에서 *A. oryzae* FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100의 GABA 생성 최적 온도를 확인하기 위해 SB-STE 배지에 *A. oryzae* FMB S46471을 발효 시작일에 접종 ($5x10^4$ spores/mL)하고 발효 온도를 각각 25, 30, 37℃로 설정한 후 150 rpm, 호기 조건에서 배양하였다. *L. brevis* GABA 100은 발효 3 일차에 모든 그룹에 접종 (1%, v/v) 하였고 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 총 7 일간 발효를 수행하였다

pH가 미치는 영향을 확인하기 위해서는 SB-STE의 초기 pH를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0으로 설정하였고 위의 온도 실험과 동일한 조건으로 7 일간 발효를 진행하였다.

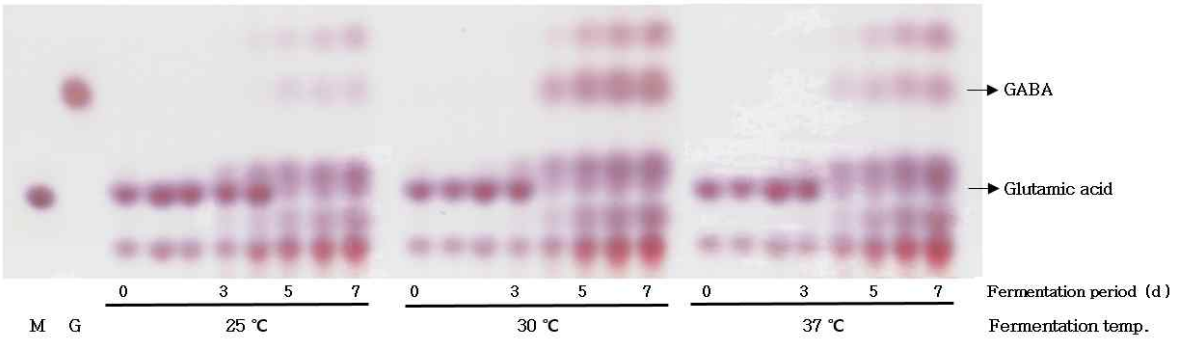
*L. brevis* GABA 100의 특성 연구 (characterization)를 먼저 수행하여 GABA를 생성하는 최적 온도와 pH를 확인한 결과, 3% MSG를 첨가한 MRS broth에서 *L. brevis* GABA 100은 각각 30℃와 pH 5.0에서 MSG를 GABA로 가장 많이 전환하였음을 확인하였다.

SB-STE에서 *A. oryzae* FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100을 공동 배양했을 때 또한 30℃에서 가장 많은 GABA가 생성되었고 (Fig 33A), 발효 기간 동안 SB-STE의 pH 범위가 5.0-6.0 사이로 나타났다. 아미노태 질소와 GABA 생성에 의한 pH 증가 및 *L. brevis* GABA 100의 유기산 생성에 의한 pH 감소를 상쇄하여 GAD 최적 활성 pH에 근접한 수준임을 보였다 (Fig 33B).

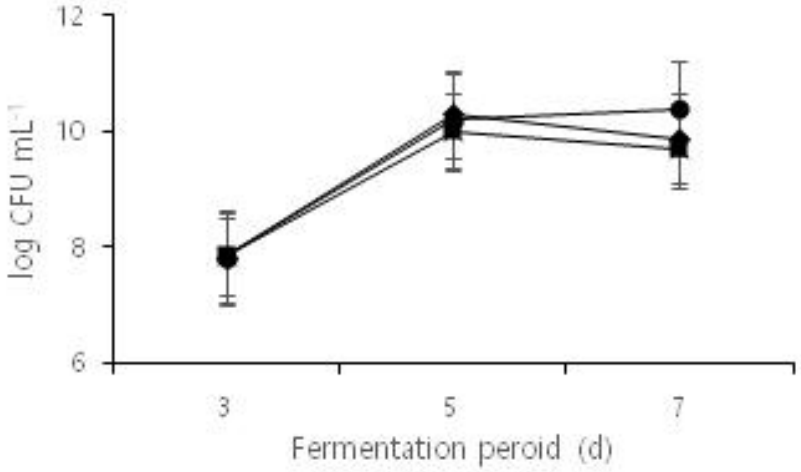
SB-STE에서 GABA 생성을 위한 최적 pH는 초기 pH 4.0일 경우를 제외하고는 GABA 생성이 전체적으로 유사하게 나타났다. 초기 pH가 낮으면 *A. oryzae* FMB S46471가 접종된 시점부터 생장이 억제되어 유리아미노산 생성량도 줄어드는 것으로 사료된다. 따라서 SB-STE에서 GABA 생성을 위한 발효 조건으로는 발효 온도 30℃를 유지하고 본래 콩, 다시마 혼합 발효물의 초기 pH인 pH 6.0에서 발효를 시작하여 발효 기간 동안 pH 변화를 보며 pH가 5.0-6.0 수준으로 유지되는지 확인하였다.

**Fig 33. Effect of fermentation temperature for GABA production in SB-STE.** M, MSG; G, GABA; (A) patterns of free amino acids on TLC plate; (B) change of pH and (C) change of cell viability in SB-STE during fermentation; circle, 25℃; diamond, 30℃; square, 37℃.

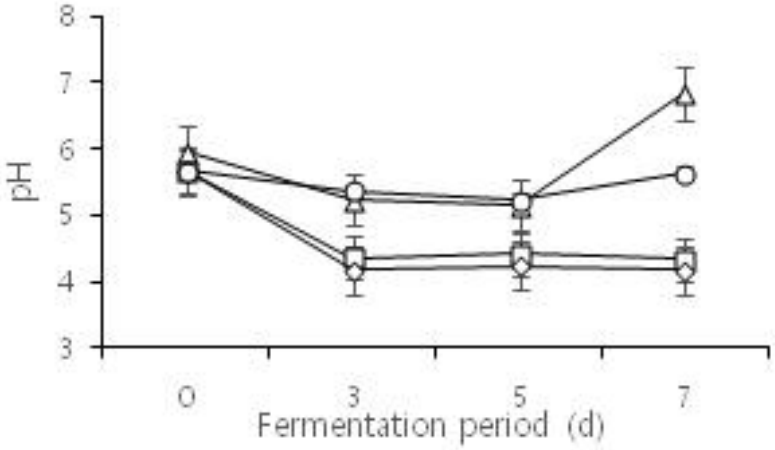
(A)




(B)




(C)



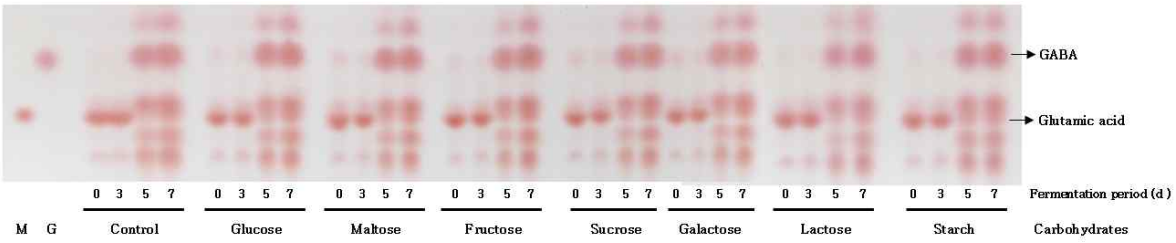
### 4. 탄소원 첨가에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

Glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, lactose, starch를 증류수에 용해하여 0.2 μm PVDF membrane filter (PALL Acrodisc ® Syringe Filters, Ann Arbor, MI, USA)로 여과한 후 SB-STE 배지에 각각 1% 농도가 되도록 첨가하였다. *A. oryzae* FMB S46471는 발효 시작일에 $5x10^4$ spores/mL을 접종하였고, *L. brevis* GABA 100은 발효 3 일차에 1% (v/v) 접종한 후 탄소원을 각각 1% 농도가 되도록 한 번 더 첨가하였다. 발효 조건은 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 총 7 일간 진행 하였다.

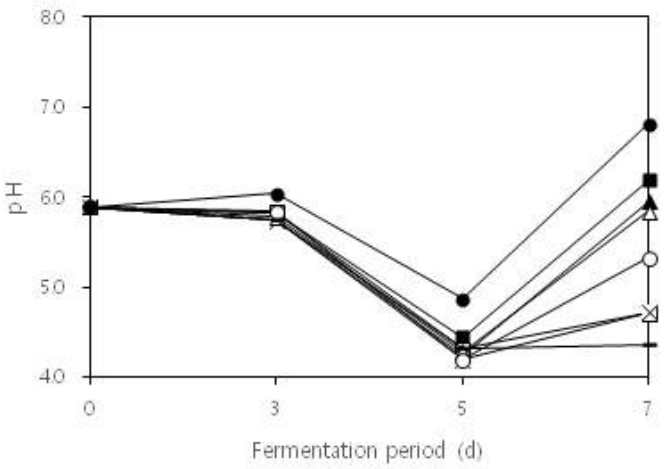
SB-STE에 1% (v/v) 수준으로 탄소원을 첨가한 후 7 일간 발효 하였을 때 나타난 GABA 생성은 다음과 같다 (Figure 34A). 탄소원 첨가 그룹의 경우, 탄소원의 종류와 관계없이 탄소원 무첨가 그룹 (control)보다 GABA 생성량이 유사하거나 약간 적게 나타났고 대조군을 제외한 전체 그룹이 발효 5 일차에 pH 4.5 이하로 감소하는 경향을 나타냈다 (Figure 34B). 본 실험에서는 탄소원의 첨가가 *L. brevis* GABA 100의 대사에 따른 유기산 생성을 증가시키고 pH 감소로 인한 GAD 활성 억제를 고려하여 추후 실험에서는 GABA 생산을 증진시키는 최적 조건 중 탄소원 첨가는 고려하지 않았다.

**Fig 34. Effect of various carbohydrates added into SB-STE on the production of GABA.** M, MSG; G, GABA; (A) pattern of free amino acids on TLC plate; (B) change of the pH in SB-STE during fermentation; ●, control; ■, glucose; ▲, galactose; △, fructose; ○, sucrose; □, lactose; x , maltose; -, starch.

(A)




(B)



### 5. 배지 내 콩, 다시마, 증류수 첨가 비율에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

배지를 구성하는 콩과 다시마, 증류수의 비율에 의한 GABA 생성 최적 조건을 확인하기 위하여 실험에서 사용한 배지 구성은 Table 16과 같다. 각 그룹별 배지 조성에 맞춰 100 mL 삼각플라스크에 첨가한 후 고압멸균기 (121℃, 15 분)에서 증숙 및 멸균하였다.

*A. oryzae* FMB S46471은 발효시작일에 $5x10^4$ spores/mL을 접종하였고, *L. brevis* GABA 100은 발효 3 일차에 1% (v/v) 접종 하였고 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 총 7 일간 발효를 진행하였다

배지를 구성하는 콩과 다시마, 증류수의 비율에 따른 GABA 생성 결과는 Figure 35와 같다. GABA 생성량은 다시마보다 콩의 함량이 증감할 때 영향을 더 크게 받는 것으로 나타났고 이는 다시마의 첨가 형태 (STP, STE)와 상관없이 동일한 경향을 보였다 (Figure 35A). 다시마로만 구성된 group G5와 G9의 유리 아미노산 패턴을 토대로 다시마는 단백질보다 주로 glutamate를 제공하는 역할임을 확인 하였다.

다시마의 첨가 형태에 따른 GABA 생성에서는 다시마 분말 첨가그룹 (group 2-5)이 다시마 추출물 첨가그룹 (group 6-9)보다 GABA 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 첨가한 콩의 중량이 동일함에도 유리아미노산과 GABA 생성 정도에 차이가 있는 것은 다시마의 열수 추출 과정에서 *A. oryzae* FMB S46471의 생장 또는 protease의 활성에 필요한 일부 성분들이 추출되지 않았을 것으로 사료된다.

Table 16. The various medium compositions with different ratios of soybean, sea tangle, and water, used for the fermentation and production of GABA.

| Group | Composition of the steamed soybean | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | SB (g) | STP (g) | DW (mL) | STE (g/mL) | |
| | | | | STP (g) | DW (mL) |
| G1 | 5.0 | - | 50 | - | - |
| G2 | 3.75 | 1.25 | 50 | - | - |
| G3 | 2.5 | 2.5 | 50 | - | - |
| G4 | 1.25 | 3.75 | 50 | - | - |
| G5 | - | 5.0 | 50 | - | - |
| G6 | 3.75 | - | - | 1.25 | 50 |
| G7 | 2.5 | - | - | 2.5 | 50 |
| G8 | 1.25 | - | - | 3.75 | 50 |
| G9 | - | - | - | 5.0 | 50 |
| G10 | 5.0 | - | - | 2.5 | 50 |
| G11 | 5.0 | 2.5 | 50 | - | - |
| D50 | 5.0 | - | 50 | - | - |
| D30 | 5.0 | - | 30 | - | - |
| D10 | 5.0 | - | 10 | - | - |
| STE50 | 5.0 | - | - | 2.5 | 50 |
| STE40 | 5.0 | - | - | 2.5 | 40 |
| STE30 | 5.0 | - | - | 2.5 | 30 |
| STE20 | 5.0 | - | - | 2.5 | 20 |
| STE10 | 5.0 | - | - | 2.5 | 10 |

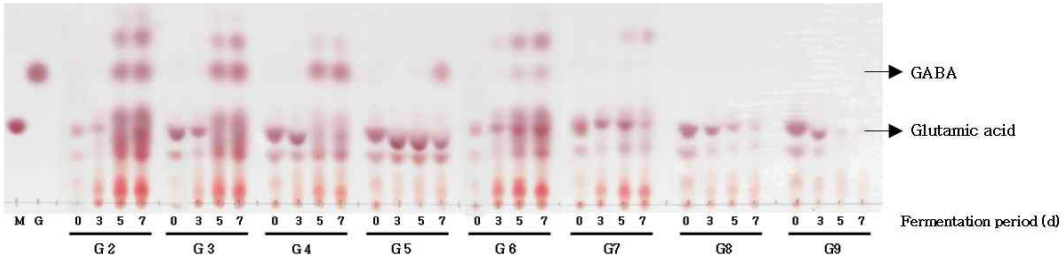
SB, soybean; STP, dried sea tangle powder; STE, sea tangle extract; DW, distilled water.

Figure 35B에서는, 콩 함량을 동일하게 설정하고 증류수 (group G1)를 첨가하는 대신 다시마 추출물 (group G10) 또는 다시마 분말 (group G11)로 대체하여 발효하였을 때 GABA 생성이 더 증가하였고, 역시 다시마 추출물보다 다시마 분말을 직접 첨가했을 때 GABA 생성 효과가 더 좋은 것으로 나타났다. 또한 증류수를 첨가했을 때보다 다시마를 첨가했을 때 GAD 최적 활성 조건인 pH 5.0에 더 가까운 환경을 조성하여 발효 후반까지 일정 수준으로 유지하는 현상을 보였다 (Figure 35C). 즉, 콩 발효식품을 제조할 때 다시마를 첨가하는 것은 GABA로 전환될 수 있는 glutamic acid의 양을 증가시키고 GAD의 최적 조건인 pH인 5.0에 가깝게 유지할 수 있다는 장점이 있었다.

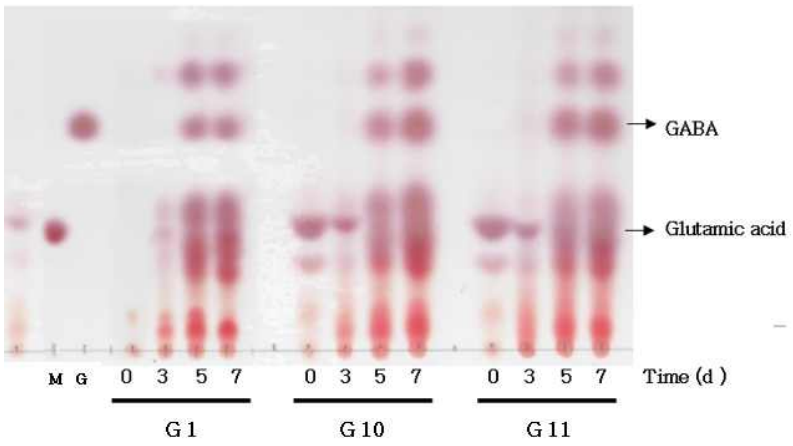
또한 배지에 첨가하는 수분량에 따라 GABA 생성량도 차이가 있었고 각 그룹의 유리 아미노산과 GABA는 첨가한 수분량이 증가할수록 TLC plate 상에서 강한 발색을 나타냈다 (Figure 36A). *L. brevis* GABA 100은 호기보다 혐기적인 조건에서 생균수가 더 오래 유지되고 GABA 생성이 촉진된다. 수분량의 증가는 배지 내에서 일부 혐기 조건을 형성할 수 있기 때문에 증류수 및 다시마 추출물 함량이 증가함에 따라 GABA 함량은 증가하고 pH가 감소하는 것은 *L. brevis* GABA 100의 특성이 반영된 결과라고 보여진다 (Figure 36B). 또한 배지 구성이 동일하나 수분 첨가량이 증가할수록 유리 아미노산이 진하게 나타나는 것으로 보아 *A. oryzae* FMB S46471이 수분 함량이 높은 환경에서 생육이 촉진되는 것으로 사료된다.

**Fig 35. Effect of various medium composition with different ratio of soybean, sea tangle used for fermentation and production of GABA.** M, MSG; G, GABA; (A), (B) patterns of free amino acids on TLC plate after fermentation with various medium composition (refer to Table 16 for details); (C) changes of pH during fermentation; circle, group G1; diamond, G10; and square, G11.

(A)




(B)




(C)

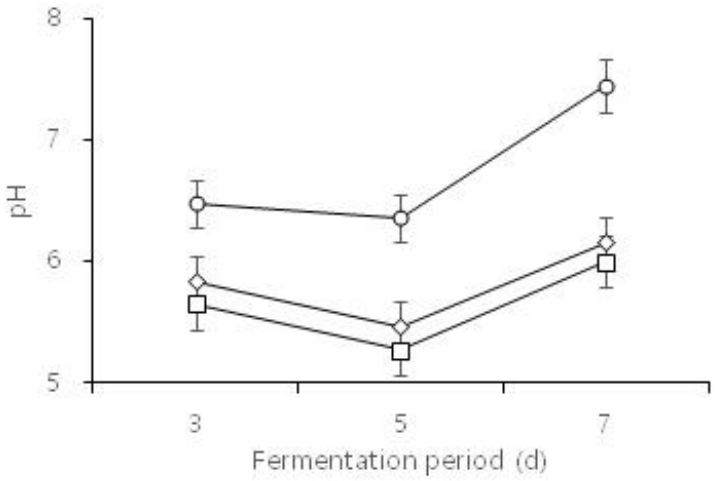
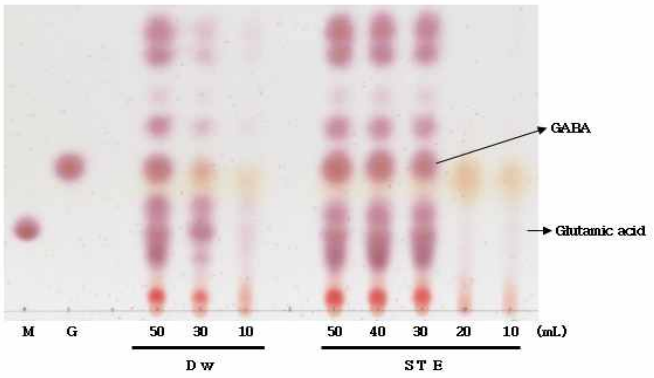
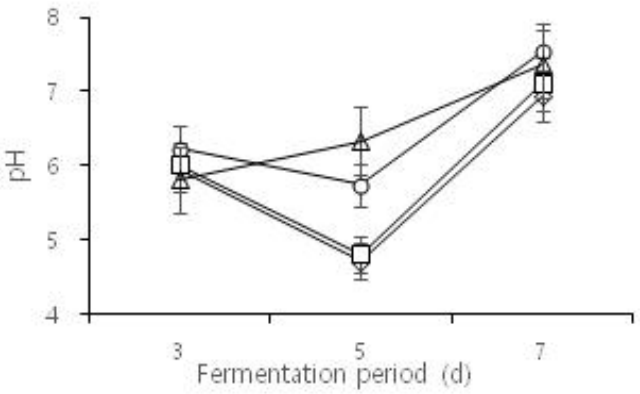


**Figure 36. Effect of different water content on GABA production.** M, MSG; G, GABA; (A) patterns of free amino acids on TLC plate; STE, sea tangle extract; the amount of soybean and sea tangle were same in whole groups (refer to Table 16 for details); (B) change of cell viability and (C) change of pH during fermentation; circle, group DW50; diamond, STE50; square, STE40; and triangle, STE30.

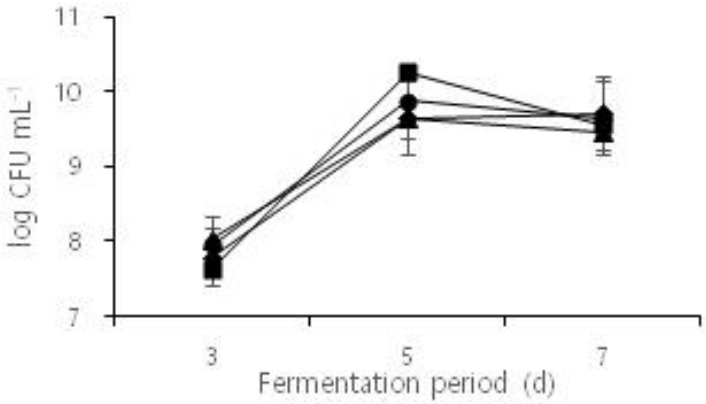
(A)




(B)




(C)



### 6. HPLC를 이용한 유리 아미노산 정량분석

콩, 다시마 혼합 발효물을 1 mL 취하여 micro refrigerated centrifuge (Hanil Science industrial Co., Korea)로 14,000 x*g*, 4℃에서 3 분간 원심분리한 후 상징액을 0.2-μm PVDF membrane filter (PALL Acrodisc ® Syringe Filters, Ann Arbor, MI, USA)로 여과하였다. HPLC를 이용한 아미노산 정량 분석은 서울대학교 농생 명과학공동기기원 (National Instrument Center for Environmental Management, Seoul National University, Korea)에서 분석을 수행하였다. 콩 발효물의 유리 아미노산은 Ultimate 300 HPLC systems (Thermo Fisher Scientific, USA)로 분석하였고 VDSpher 100 C18-E column (4.6 x 150 mm i.d., 3.5 μm; VDS optilab, Germany)을 사용하였다. HPLC를 이용한 유리 아미노산 분석 조건은 Table 17에 기재하였다. 1차, 2차 아미노산의 자동화 유도체화를 위해 borate buffer (Agilent Technologies), O-phthalaldehyde reagent (OPA, Agilent Technologies), 9-fluorenyl methyl chloroformate solution (FMOC, Agilent Technologies)을 사용하였다. 아미노산 standard (Agilent Technologies)는 10, 100, 500, 1000 μM 을 사용하였다.

GABA 생성 최적 발효 조건들을 모두 적용하여 콩, 다시마 혼합 발효를 진행하였고 HPLC로 GABA 및 유리 아미노산 정량 실험을 수행하였다. SB-STE 배지에 첨가한 다시마 추출물의 고형분은 50 mL을 기준으로 약 1.61 g이었고 발효 7 일 후 GABA 함량은 약 1.89 g/kg으로 나타났다. 다시마 분말을 첨가한 SB-STP에서는 GABA 함량이 약 1.92 g/kg으로 SB-STE 보다 약간 높은 수치를 보였다 (Table 18). 물을 첨가하여 발효한 콩 (SB-DW)의 경우 GABA 함량은 1503.1 mg/kg으로 다시마를 첨가하지 않아도 상당히 많은 양의 GABA를 형성하였는데 앞서 언급하였던 연구 결과 중 GABA 함량은 다시마보다 콩 함량에 더 많은 영향을 받는다는 점과 관계가 깊다.

SB-DW의 경우 다시마를 첨가하지 않았지만 GABA 생성을 위한 최적 발효 조건을 적용했기 때문에 GABA 생성량이 증대된 것으로 사료된다. 이는 시중에서 구매한 된장과 메주에서 TLC로 분석했을 때 GABA가 나타나지 않은 반면 본 연구의 발효 7 일차 SB-DW, SB-STE, SB-STP에서는 GABA가 생성된 점에 근거한다.

본 연구에서 얻은 GABA 함량은 한국 재래식 된장에 비해 상당히 높은 편인데, 한 연구에 따르면 1, 3, 5, 6, 10 년 동안 담근 된장 에서 GABA 함량은 각각 43.8, 120.6, 569.5, 930.7, 1938.7 mg/kg으로 나타났다 (31). 콩, 다시마 혼합 발효물은 발효 기간이 짧음에도 불구하고 GABA를 생성하는 특정 균주 사용과 다양한 발효 조건에 대해 최적화한 결과를 적용하여 발효했기 때문으로 보인다.

식품의약품안전처 (KFDA)에서는 L-monosodium glutamate로부터 만든 GABA를 20 mg/day로 섭취했을 때 혈압 조절 효과가 있다는 기능성 내용으로써 건강기능식품 개별인정원료로 등록하였다. 이 점을 토대로 본 연구에서 개발한 콩, 다시마 혼합 발효물을 일일 약 10.5 g 섭취 시 유사 함량의 GABA를 섭취할 수 있으므로 혈압을 조절하는데 도움이 될 수 있을 것으로 보고 이 연구에서의 콩, 다시마 혼합 발효물의 GABA 함량은 혈압 조절 기능성을 기대하기에 충분하다고 판단되었다.

Table 17. Operation conditions of HPLC analysis to determine contents of free amino acids.

| Parameters | Conditions |
|---|---|
| Mobile phase A | 40 mM sodium phosphate dibasic (pH 7.8) |
| Mobile phase B | water-acetonitrile-methanol (10:45:45, v/v/v) |
| Composition | Multi-step gradient : 0-55% B (0-24 min), 55-80% B (24-24.5 min), 80-80% B (24.5-26 min), 0% B (26.5-30 min) |
| Column | VDSpher 100 C18-E column (4.6 x 150 mm i.d., 3.5 μm; VDS optilab, Germany) |
| Flow rate | 1.5 mL/min |
| Detection Wavelength | fluorescence wavelength (excitation: 340 nm; emission: 450 nm) |
| Column temperature | 40 ℃ |
| Instrument | Ultimate 300 HPLC systems |

Table 18. Change of free amino acids in fermented soybeans during fermentation.

| Amino acid | Amino acid contents (mg/kg) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | SB-DW (G1) | | SB-STE (G10) | | SB-STP (G11) | |
| | 0 day | 7 day | 0 day | 7 day | 0 day | 7 day |
| Asp | 56.0 | 1390.7 | 797.4 | 1219.1 | 749.8 | 950.0 |
| Glu | 46.2 | 1058.6 | 1384.2 | 936.1 | 1413.6 | 389.2 |
| Asn | 40.5 | 22.3 | 36.8 | 61.78 | 37.7 | 628.2 |
| Ser | 6.3 | 499.8 | 19.4 | 197.2 | 15.7 | 658.0 |
| Gln | - | 309.1 | - | 532.1 | - | 536.5 |
| His | 8.7 | 382.5 | 5.3 | 429.9 | 5.3 | 254.3 |
| Gly | 6.0 | 460.5 | 8.9 | 281.4 | 8.7 | 404.6 |
| Thr | 4.7 | 353.7 | 13.1 | 332.1 | 13.1 | 343.8 |
| Arg | 135.8 | 18.7 | 111.0 | 9.8 | 105.1 | 156.7 |
| Ala | 20.34 | 564.8 | 94.1 | 412.3 | 95.5 | 540.4 |
| GABA | 16.3 | 1503.1 | 104.8 | 1894.1 | 50.6 | 1919.7 |
| Tyr | 9.7 | 579.1 | 12.0 | 531.4 | 10.6 | 503.7 |
| Val | 6.1 | 694.1 | 13.1 | 706.0 | 13.0 | 624.0 |
| Met | 3.2 | 140.1 | 3.2 | 120.9 | 4.7 | 149.7 |
| Trp | 44.0 | 727.3 | 48.6 | 748.1 | 45.3 | 376.3 |
| Phe | 13.0 | 710.7 | 19.2 | 764.4 | 17.7 | 807.7 |
| Ile | 4.9 | 722.0 | 8.2 | 728.8 | 7.7 | 659.0 |
| Leu | 5.5 | 961.5 | 11.4 | 1046.7 | 9.5 | 1091.1 |
| Lys | 11.6 | 652.9 | 18.3 | 884.9 | 16.7 | 645.3 |
| Pro | 5.3 | 141.7 | 68.6 | 267.7 | 66.0 | 466.8 |

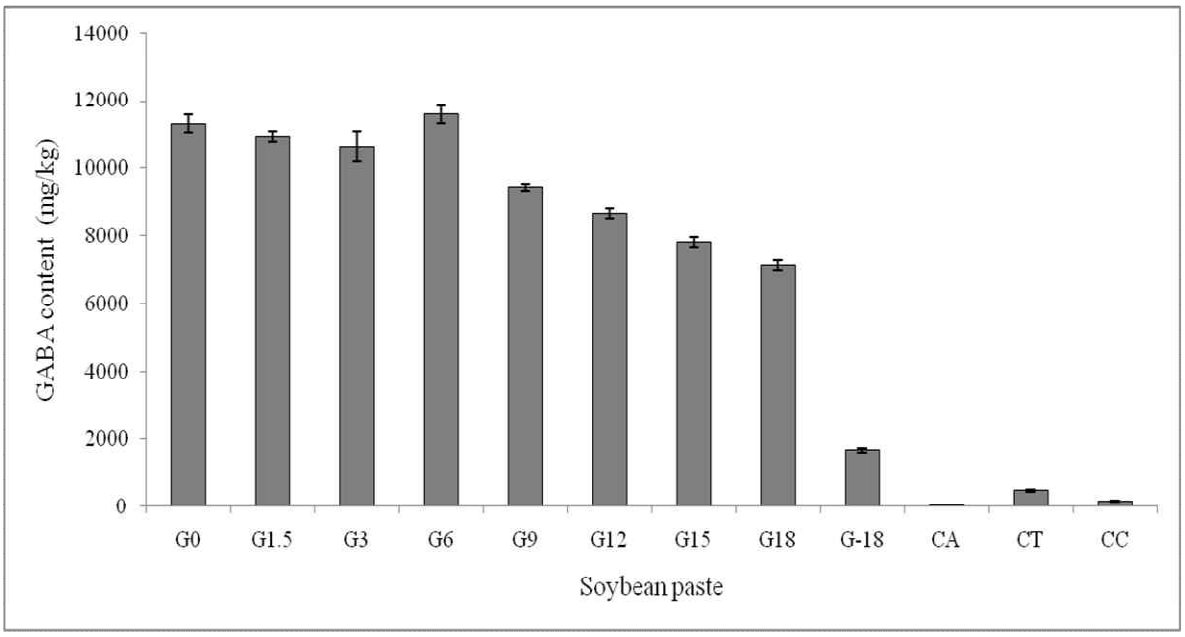
SB, soybean; DW, distilled water; STE, sea tangle extract; STP, dried sea tangle powder. The most GABA-riched fermented soybeans were selected as a result of 2.3.5.

## 제 13 장. 곰팡이독소 비생산균주와 GABA 우수 생산 유산균 접종에 의해 제조된 염도별 된장의 특성(주관)

*A. oryzae* FMB S46471 와 *L. brevis* GABA100 에 의해 스케일업 공정에서 발효된 된장은 염도별로 저온 (4-6℃)에서 90 일의 숙성 과정을 거쳤다. 소금은 0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 15, 18%로 첨가해주었다. 대조군의 4 종류 된장을 함께 분석하였다. GABA 된장 및 대조군 된장의 GABA 함량은 Figure 37 의 결과와 같았다.

Figure 37. GABA production in the experimental fermented soybean pastes.

The values were presented as the mean of two determinations with standard error.




GABA 된장은 염도별 차이는 있었지만, 7.1-11.6 g/kg 의 GABA 가 함유된 된장 제조가 가능하였다. 반면, 4 종의 대조군 된장에서는 이 보다 적은 함량의 GABA 가 포함되어 있었다. 자세한 함량은 Table 19 에 나타내었다.

Table 19. The determination of GABA in the experimental fermented soybean pastes

(mg/kg, *wet weight*)

| | Sample | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | G0 | G1.5 | G3 | G6 | G9 | G12 | G15 | G18 | G-18 | CA | CT | CC |
| GABA | 11,315±275 | 10,914±135 | 10,622±435 | 11,592±262 | 9,418±96 | 8,656±135 | 7,815±149 | 7,130±155 | 1,671±72 | 30±6 | 473±22 | 165±15 |

*GABA, gamma-aminobutyric acid.

또한 본 연구에서는 단백질이 풍부한 콩에서 유산균을 이용해 발효 를 했기에 GABA 함량의 증가 뿐만이 아니라 바이오제닉아민류의 생성에 대한 우려가 있었다. 이러한 이유로 된장에서 빈번히 검출되는 4 종의 바이오제닉아민류인 티라민, 히스타민, 푸트레신, 캐더버린에 대한 분석을 GABA 된장과 대조군 된장을 대상으로 분석하였다. Figure 38 에서는 바이오제닉아민류의 상대적인 함량을 나타내었다. Table 20 에서는 결과 값을 나타내었다.

**Figure 38. BA production in the experimental fermented soybean pastes.** ■ , Tyramine; ▒ , Putrescine; ■ , Histamine; □ , Cadaverine; The values were presented as the mean of two determinations with standard error.

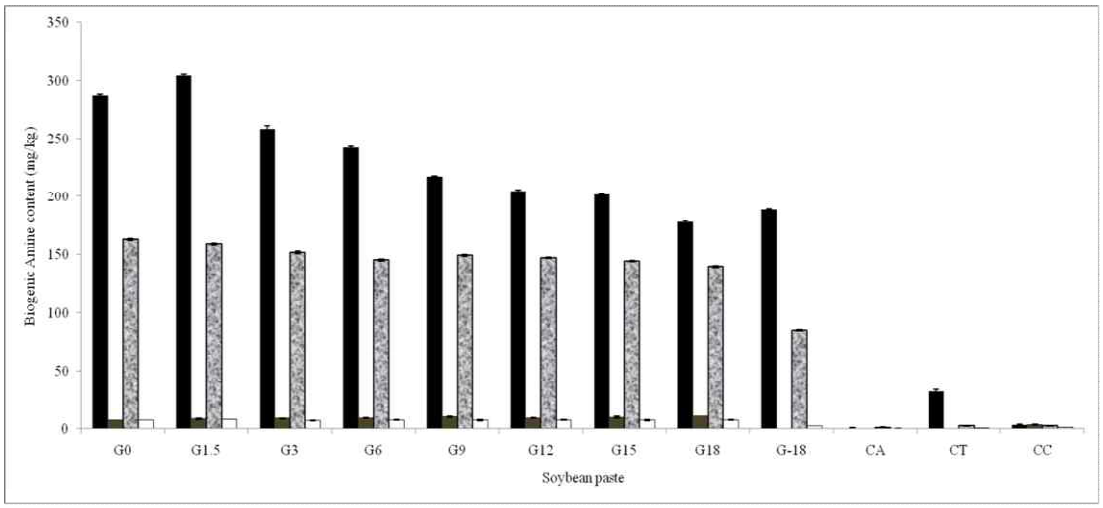



**Table 20 The determination of biogenic amines in the experimental fermented soybean pastes**

(mg/kg, *wet weight*)

| | Sample | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | G0 | G1.5 | G3 | G6 | G9 | G12 | G15 | G18 | G-18 | CA | CT | CC |
| Tyramine | 287.1±1.1 | 304.7±0.8 | 258.2±2.9 | 242.8±0.9 | 217.3±0.5 | 205.0±1.3 | 201.6±0.8 | 178.2±0.9 | 188.9±0.1 | 0.8±0.1 | 32.1±1.6 | 3.4±0.4 |
| Histamine | 7.4±0.1 | 8.3±0.6 | 8.8±0.2 | 9.1±0.3 | 10.2±0.5 | 9.1±0.3 | 9.7±0.7 | 10.8±0.0 | N.D. | N.D. | N.D. | 3.6±0.3 |
| Putrescine | 163.2±0.7 | 159.3±0.8 | 151.6±0.9 | 145.2±0.9 | 149.2±0.8 | 147.3±0.5 | 144.3±0.6 | 139.6±0.8 | 84.8±0.7 | 1.3±0.1 | 2.7±0.3 | 2.6±0.2 |
| Cadaverine | 7.7±0.1 | 7.9±0.1 | 7.1±0.4 | 7.6±0.2 | 7.4±0.4 | 7.5±0.4 | 7.4±0.5 | 7.5±0.1 | 2.4±0.1 | 0.2±0.1 | 0.6±0.2 | 1.1±0.1 |

* N.D., Not Detected.

GABA된장에서의 티라민의 평균 오염도는 178-305 mg/kg, 푸트레신의 평균 오염도는 139-163 mg/kg, 캐더버린의 평균 오염도는 7.1- 7.9 mg/kg, 히스타민의 평균 오염도는 7.4-10.8 mg/kg 으로 분석되었다. '2010 식품의약품안전청 '바이오제닉 아민' Risk Profile' 보고서에 따르면 된장에서의 티라민과 히스타민의 평균 오염도는 약 363 mg/kg과 292 mg/kg으로 보고되어 있었다. 또 다른 연구 논문에서는 전통 발효 된장 및 개량식 제조 된장에서의 푸트레신과 캐더버린의 평균 오염도는 약 397 mg/kg과 23 mg/kg 으로 보고되어 있었다. 본 연구에서 개발된 된장의 바이오제닉아민류의 평균 오염도는 기존에 보고된 된장들의 평균 오염도보다 비교적 낮은 함량을 나타내었다. 특히, 그 위험성이 높은 히스타민의 생성량은 본 연구에서 개발된 된장에서는 그 함량 (7.4-10.8 mg/kg)이 매우 낮았다.

또한, 된장의 특성을 나타내는 지표에 대한 결과들은 Table 21에 나타내었다.

16s RNA 염기서열 분석을 통해 90일 숙성된 GABA된장에서는 L. brevis가 우점종으로 존재하고 있음을 확인하였으며, DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) agar plate 분석법을 통해 A. oryzae를 접종하여 발효한 된장에서는 A. oryzae가 우점종으로 존재하고 있음을 확인하였다. 또한, 위생상 지표를 나타내는 대장균/대장균군은 모든 된장에서 검출되지 않았다. GABA 된장의 저염 된장으로의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

Table 21. Characteristics in the experimental fermented soybean pastes

| Index | Sample | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | G0 | G1.5 | G3 | G6 | G9 | G12 | G15 | G18 | G-18 | CA | CT | CC |
| Aerobic Plate count (log CFU/g) | 7.2±0.1 | 7.1±0.1 | 7.1±0.1 | 6.8±0.1 | 6.9±0.1 | 6.9±0.1 | 6.9±0.1 | 6.9±0.0 | 6.4±0.1 | 6.4±0.0 | 7.9±0.0 | 7±0.0 |
| E.coli/ Coliform (log CFU/g) | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| pH | 5.5±0.1 | 5.3±0.1 | 5.2±0.1 | 5.1±0.0 | 5.1±0.1 | 5.1±0.1 | 5.0±0.0 | 5.0±0.0 | 4.1±0.1 | 5.6±0.1 | 5.4±0.0 | 5.1±0.1 |
| Salinity | 0.5±0.1 | 1.9±0.2 | 3.3±0.3 | 6.3±0.2 | 8.8±0.4 | 11.8±1.0 | 14.1±0.8 | 17.4±0.6 | 17.1±0.2 | 17.7±0.6 | 17.4±0.7 | 5.9±0.4 |
| LAB (log CFU/g) | 6.9±0.1 | 6.6±0.2 | 6.4±0.2 | 6.3±0.5 | 6.2±0.2 | 5.9±0.1 | 6.0±0.2 | 5.7±0.4 | 5.4±0.1 | 4.5±0.5 | 5.7±0.4 | N.D. |
| A. oryzae (10^4 cells/g) | 3.7±0.1 | 3.9±0.1 | 3.9±0.1 | 3.7±0.2 | 3.8±0.1 | 3.9±0.1 | 3.9±0.1 | 4.0±0.0 | 3.9±0.1 | 4.2±0.6 | - | - |

*N.D., Not Detected at 2 log CFU/g; LAB, Lactic Acid Bacteria; *A. oryzae*, *Aspergillus oryzae*; -, Not Detected as an *A. oryzae*'s morphology as using DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) agar plate The values were represented the mean of two determinations with standard error.

## 제 14 장. 콩, 다시마 혼합 발효물의 ACE 저해 활성 측정(주관)

### 1. 콩, 다시마 혼합 발효물의 ACE 저해 활성 측정

콩, 다시마 혼합 발효물 45 μL를 ACE solution (0.1M sodium borate buffer containing 0.3 M NaCl, and 10 munits/mL of ACE, pH 8.3) 45 μL와 혼합하여 37℃에서 10 분간 반응시킨 후 3 mM hippuryl-histidyl-L-leucine (HHL)을 45 μL 첨가하여 37℃에서 30 분간 반응시켰다. 30 분 후 1N HCl 150 μL를 첨가하여 반응을 중지시키고 최종 혼합물을 0.2-μm PVDF membrane filter로 여과하여 HPLC로 hippuric acid (HA)의 양을 분석하였다. HPLC 분석 시 사용한 기기와 분석 조건은 Table 22에 기재하였고, ACE 저해 활성은 아래의 공식에 근거하여 계산하였다. $IC_{50}$는 ACE 활성을 50% 저해하는 물질의 농도로 정의하였다.

ACE inhibitory activity (%) = [(Ac-As)/(Ac-Ab)] x 100

Ac : area of HA peak without the sample (added buffer and ACE)
As : area of HA peak with the sample and ACE
Ab : area of HA peak without ACE (added buffer and sample)

GABA 외에 또 다른 생리 활성을 줄 수 있는 ACE 저해 활성에 대하여 SB-STE 배지에서 접종 균주별 ACE 저해 활성 (%)을 비교한 결과는 Figure 39에 나타내었다. *A. oryzae* FMB S46471 (group A0)은 다른 두 균주 (group B0, G0)보다 ACE 저해 활성이 높았고, 전체 그룹 중에서 ACE 저해 활성이 상대적으로 높은 4 개 그룹의 공통점도 *A. oryzae* FMB S46471를 접종했다는 공통점을 확인하였다. 이 중 group A0G3는 ACE 저해 활성뿐만 아니라 유일하게 GABA를 생성한 그룹이었기 때문에 다음 실험 에서는 group A0G3 조합으로 접종하여 GABA 생성과 ACE 저해 활성이 높은 콩, 다시마 혼합 발효물을 조사하였다.

Table 22. Operation conditions of HPLC analysis of ACE inhibitory activity.

| Parameters | Conditions |
|---|---|
| Mobile phase A | Water (containing 0.1% (v/v) of TFA) |
| Mobile phase B | Acetonitrile |
| Composition | Multi-step gradient : 15-75% B (0-12 min), 75-100% B(12-15 min), 100% B (15-17 min), 100-15% B(17-18 min), 15% B (18-30min) |
| Column | ZORBAX SB $C_{18}$, 4.6 x 250 mm id, 5 μm |
| Flow rate | 1.0 mL/min |
| Injection volume | 20 μL |
| Detection Wavelength | 228 nm |
| Column temperature | 25 ℃ |
| Instrument | Dionex P680 HPLC |

**Figure 39. ACE inhibitory activities of fermented soybeans depending on the inoculation combination.** A, *A. oryzae* FMB S46471; B, *B. subtilis* natto; G, *L. brevis* GABA 100. The inoculation date of each microorganism was written on the right of the microorganism abbreviation in the fermented groups.

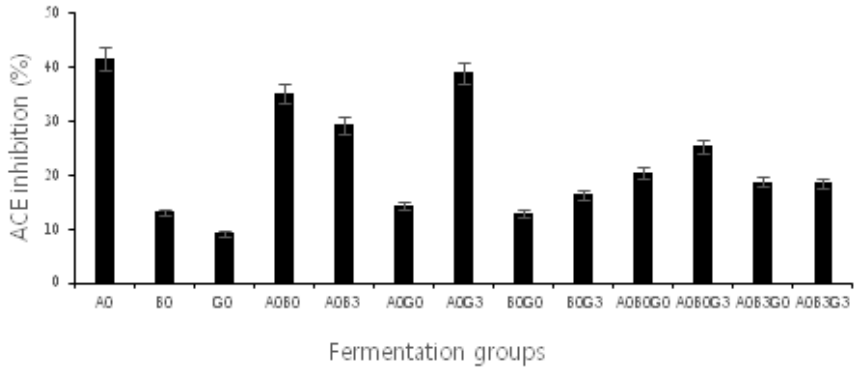
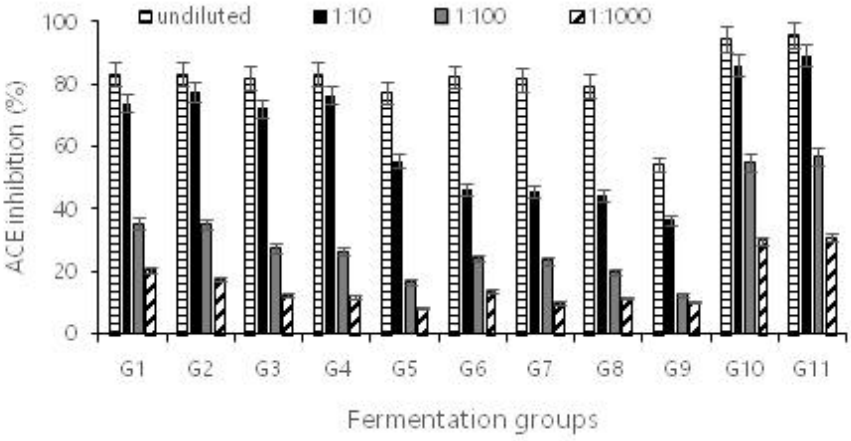



Figure 40의 콩, 다시마 혼합 발효물은 ACE 저해활성이 최소 77.9% 이상으로 나타났고 그 중 group G10과 G11의 경우 1:100 비율로 희석하여도 54.7% 이상의 저해 활성을 보였다. 배지를 구성하는 콩과 다시마의 비율 또한 ACE 저해 활성에 차이를 보였고 특히 TLC 분석법에서 나타난 유리 아미노산의 생성 경향과 유사한 결과를 나타냈다. 유리 아미노산 함량이 많을수록 ACE 저해 활성이 높았기 때문에 배지 성분이 얼마나 가수분해가 되었는지가 중요한 요인이고, GABA 생성량 또한 유리 아미노산 중 glutamic acid의 함량이 많을수록 증가하기 때문에 GABA 생성 최적 조건에서 ACE 저해 활성은 GABA 생성량과 연관이 있음을 알 수 있다.

**Figure 40. The ACE inhibitory activity by various medium composition with different ratio of soybean, sea tangle used for fermentation and production of GABA.** ▤, the result of ACE inhibition with undiluted samples; ■, diluted at a ratio of 1:10; ■, a ratio of 1:100; and ▨, a ratio of 1:1000; the composition of each group was based on the Table 20.

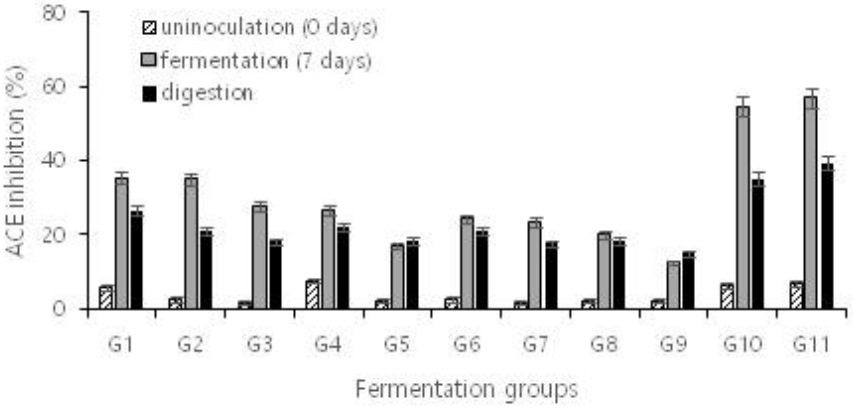


### 2. *in vitro* 소화 시뮬레이션

콩, 다시마 혼합 발효물을 섭취했을 때 소화에 의한 ACE 저해 활성의 변화를 확인하기 위해서 *in vitro* 소화 시뮬레이션을 수행 하였다. 콩, 다시마 혼합 발효물을 동결 건조 한 후 pepsin solution (enzyme:substrate=1:100, w/w, pH 2.0) 500 μL를 건조한 콩, 다시마 혼합 발효물 30 mg에 첨가하여 37℃에서 5 시간 동안 가수 분해하였다. Pepsin에 의해 가수분해된 발효물은 NaOH로 pH를 7로 조절하고 10 분간 끓여서 불활성화 시켰다. Pepsin 가수분해물을 동결 건조한 후 trypsin과 α-chymotrypsin을 혼합한 효소액 (each enzyme:substrate =1:200, w/w, pH 8.0) 500 μL를 첨가하여 37℃에서 5 시간 동안 가수분해하였다. 10 분간 끓여 효소 반응을 종결하고 콩, 다시마 혼합 발효물 가수분해물 (fermented soybean hydrolysate, FSH)은 14,000 x*g*, 4℃에서 3 분간 원심 분리하여 얻어진 상징액으로 ACE 저해 활성을 확인하였다.

콩, 다시마 혼합 발효물을 1:100 비율로 희석한 후 소화 효소 (pepsin, trypsin, α-chymotrypsin)를 첨가하여 가수 분해했을 때 발효 전, 후 및 소화 후 ACE 저해 활성은 Figure 41과 같다. 발효 전 단계에서 모든 그룹은 10 % 미만으로 나타났고 발효를 거치면 ACE 저해 활성이 급격하게 증가하여 group G10과 G11의 경우 54.7-57.0% 수준으로 측정되었다. 발효 후의 ACE 저해 활성은 소화 효소를 처리 했을 때 일부 감소하는 경향이 있었는데, group G10과 G11는 다른 그룹에 비해 소화 후 ACE 저해 활성이 31-36% 정도 감소했음에도 약 40.3%의 ACE 저해 활성을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 발효는 ACE 저해 활성을 향상시키는 중요한 과정이고 발효 중 가수분해 정도가 높을수록 소화 후에도 ACE 저해 활성이 높은 것으로 나타났다.

**Fig 41. Changes of the ACE inhibitory activity from uninoculation to digestion.** ▨, uninoculated soybean at the beginning of fermentation; ■, soybean fermented for 7 days; ■, fermented soybeans diluted at a ratio 1:100, and digested by gastrointestinal enzymes. The composition of each medium was based on the Table 20.



### 3. 시중 된장 및 메주와 ACE 저해 활성 비교 평가

GABA 생성 최적화 조건에서 발효한 콩, 다시마 혼합물은 시중에서 판매하는 전통 된장 및 메주와 비교했을 때도 ACE 저해 활성이 높게 나타났다. 전통 된장 (group D1-D4)과 메주 (group M1)는 1:100 비율로 희석 시 ACE 저해 활성이 22.2-31.8%, 소화 효소 처리 후 13.9-24.3%를 보인 반면, GABA 생성 최적화 조건에서 발효한 group G11의 경우 1:100 비율로 희석 시 43.2%, 희석액을 소화 효소 처리한 후 35.1%로 나타났다 (Figure 42). 또한 TLC로 free amino acids를 분석한 결과, 시중에서 구매한 된장과 메주 모두 GABA가 나타나지 않았다. 따라서 Group G11은 단기간의 발효에도 GABA 및 ACE 저해 활성이 높게 나타나 생리활성을 증가시킨 기능성 식품 소재로 사용할 수 있을 것으로 보인다.

**Figure 42. The ACE inhibitory activity of the short-course fermentation (G11) and traditional fermented soybean products in market.** G11; group G11 (refer to Table 20 for details); D1 to D4, four different *Doenjang* purchased from the local market; M1, *Meju* purchased from the local market; ■, diluted fermented soybean at a ratio of 1:100; ▤, fermented soybean diluted at a ratio of 1:100, and digested by gastrointestinal enzymes.

### 4. ACE 저해 활성 분획의 구성 펩타이드 확인

콩, 다시마 혼합 발효물 가수분해물 (FSH)에서 ACE 저해 활성이 가장 높은 분획을 얻기 위하여 분자량을 기준으로 Ultrafiltration (UF)을 하였다. FSH를 14,000 x*g*, 4℃에서 3 분간 원심 분리 한 후 상징액을 0.2-μm PVDF membrane filter로 여과하였다. 여과한 FSH를 UF membrane filter (Amicon Ultra, Millipore)로 여과하여 3 kDa 미만, 10 kDa 미만, 가수분해물 원액으로 분획을 설정하였다. 분자량을 기준으로 여과한 분획들은 다음과 같이 명명하였다: FSH I (unfractionated FSH, 가수분해물 원액), FSH II (MW<10 kDa, 분자량 10 kDa 미만 가수분해물), FSH III (MW<3 kDa, 분자량 3 kDa 미만 가수분해물).

3 개의 분획 중 ACE 저해 활성이 가장 높은 분획을 선택하여 nano-liquid chromatography-electro spray ionization tandem mass spectrometry (nanoLC-ESI-MS/MS)로 분석하였고 분획 내에 존재하는 펩타이드의 아미노산 서열과 분자량을 확인하였다. 본 실험은 서울대학교 기초과학공동기기원 (National Center for Inter-University Research Facilities, NCIRF)에서 수행하였다. MS system은 Dual Cell Linear Ion Trap 과 Orbitrap Mass spectrometer (Thermo Scientific)로 구성된 기기를 사용하였고 ion charge 는 2+, 3+, 4+로 설정하였다. 펩타이드의 아미노산 서열과 분자량은 SEQUEST 와 NCBInr protein database (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA)에서 검색하여 parent protein을 확인하였다. ACE 저해 활성 펩타이드에 대한 정보와 유사 서열은 BIOPEP (http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep)에서 검색하여 ACE 저해 활성 펩타이드가 있는지 비교하였다.

콩, 다시마 혼합 발효물에서 GABA 함량과 ACE 저해 활성이 높게 나타났고 1:100 비율로 희석하여 소화 효소를 처리하여도 약 35%의 ACE 저해 활성이 나타나 섭취 후의 ACE 저해 활성도 기대할 수 있었다. 콩, 다시마 혼합 발효물의 가수분해물을 UF membrane filter로 분획하였을 때, 각 분획의 ACE 저해 활성은 Table 23에 나타내었다. 전반적으로, ACE 저해 활성(%)은 각 분획 별로 유사하였고 3 kDa 이하 분획에서 IC50가 11.69 μg/mL로 가장 효과적인 것으로 나타났다. IC50 수치를 토대로 ACE 저해활성이 가장 높은 3 kDa 미만의 분획을 선택하여 그 분획을 구성하는 펩타이드에 대하여 조사하였다.

Table 23 The ACE inhibitory activities of fermented soybean hydrolysate (FSH) fractionated by molecular weight.

| Fraction group | ACE inhibition (%) | $IC_{50}$ (μg/mL) |
|---|---|---|
| FSH Ⅰ (unfractioned FSH) | 66.0 | 68.4 |
| FSH Ⅱ (MW <10 kDa) | 64.6 | 36.1 |
| FSH Ⅲ (MW < 3 kDa) | 64.0 | 11.7 |

FSH Ⅲ의 펩타이드 분석 결과에서는 총 9 종의 펩타이드를 확인하였고 모두 콩으로부터 유래하였음을 알 수 있었다 (Table 24). 이는 콩, 다시마 혼합 발효물에서 다시마가 glutamate를 제공하고 pH를 조절 또는 유지하는데 효과가 있지만 ACE 저해 활성에는 크게 기여하지 않는 것으로 보인다. 본 연구에서는 다시마를 1:100 비율로 희석 및 소화 효소처리까지 모두 마쳤을 때 다시마 분말의 경우 약 16.7%, 다시마 추출물의 경우 12.5%의 ACE 저해 활성을 나타냈다.

이번에 확인된 9종의 펩타이드는 이전엔 보고된 적 없는 새로운 서열로써, 서열 끝부분의 아미노산이 Arg, Lys인 것으로 보아 Arg과 Lys의 다음 부분을 가수분해하는 trypsin의 영향이 크게 작용한 것으로 보인다. 일반적으로 ACE 저해 활성을 갖는 펩타이드는 그 서열에 특정 아미노산이 있다고 알려져 있다. 펩타이드 서열의 C-말단에 Pro 또는 방향족 아미노산과 같이 고리 구조를 가진 아미노산이 있는 점과 N-말단에는 Leu, Ile과 같은 소수성, 지방족 아미노산이 있는 점이 특징이다.

이 중 WAMLGALGCVFPELLARNGVKFGEASWFK는 N-말단에 소수성 아미노산이 많은 부분을 차지하고 있고 C-말단에 Trp과 Phe이 있어서 ACE와 결합하기 좀 더 용이한 구조를 형성할 것으로 기대한다. 또한 VFDGELQEGR과 LQESVIVEISKK은 soybean oil body-associated proteins (OBAP)로부터 유래할 수 있는 poly-peptides 또는 polypeptide fragments로서 Caco-2 cell의 콜레스테 롤 흡수를 저해하여 심혈관계 질환을 치료 및 예방하는 기능성을 나타낸 soybean fraction의 구성 펩타이드로 확인되었다. 따라서 생리활성을 가지는 펩타이드가 하나의 기능성만 가지고 있는 것이 아니라 여러 가지 기능성을 가질 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 콩, 다시마 혼합 발효물의 ACE 저해 활성에 대한 *in vitro* assay를 수행하여 혈압 조절 기능성이 있는 식품 소재로 제언하였으므로, 분리한 펩타이드와 ACE와의 molecular docking 구조를 예측하는 *in silico* 분석 또는 실제 섭취 시 효능을 보기 위한 *in vivo* 연구가 추가적으로 필요하다고 판단한다. 결과적으로 본 연구에서 개발한 콩, 다시마 혼합 발효물은 GABA 함량과 ACE 저해 활성이 높은 점을 토대로 혈압 조절을 위한 기능성 식품 소재로서의 이용 가치 가 있을 것으로 판단한다.

Table 24. Identified peptides in fermented soybean hydrolysate (FSH) fractionated below 3 kDa.

| Sequences | Charge | m/z (Da) | Position | NCBI accession number<br>Source protein |
|---|---|---|---|---|
| LQESVIVEISK | 2 | 622.8587 | 309-319 | **gi\|9967357**<br>Alpha subunit of beta conglycinin, partial [Glycine max] |
| EEGQQQGEQR | 2 | 594.7692 | 299-308 | |
| GSEEEQDER | 2 | 539.7177 | 74-82 | **gi\|9967361**<br>Alpha' subunit of beta-conglycinin, partial [Glycine max] |
| LQESVIVEISK | 2 | 686.9056 | 325-335 | |
| LQESVIVEISKK | 2 | 686.9056 | 325-336 | |
| DNPNWTSDTR | 2 | 603.2662 | 788-796 | **gi\|126406**<br>Lipoxygenase-3 (Seed linoleate 9S-lipoxygenase-3) [Glycine max] |
| QLEALIETLSK | 2 | 622.8587 | 218-228 | **gi\|571468558**<br>Uncharacterized protein LOC102659859 [Glycine max] |
| WAMLGALGCVFPELLARNGVKFGEASWFK | 4 | 800.1650 | 84-112 | **gi\|115779**<br>ChloroplasticChlorophyll a-b binding protein (LHCII type I CAB), precursor [Glycine max] |
| VNGNLVSPAHVLANAEVVEIITYNALSSKSAFQRHK | 3 | 1293.0221 | 601-646 | **gi\|356570978**<br>Uncharacterized protein LOC100814134 [Glycine max] |
| VFDGELQEGR | 2 | 575.2829 | 382-391 | **gi\|15988119**<br>Chain C, Crystal Structure Of Soybean Proglycinin A1ab1b Homotrimer [Glycine max] |

## 제 15 장. 스타터 배양을 이용한 콩 액체 배지에서 *A. oryzae* 46471과 *L. brevis* GABA 100에 의한 GABA 생성의 최적 발효 조건(주관)

### 1. *A.oryzae* 46471과 *L.brevis* GABA 100의 접종 순서하고 배양 조건이 GABA 생산에 미치는 영향

분쇄한 콩을 1:10 (w/v) 비율로 3차 증류수(DW)를 첨가한 후 MSG 2%를 첨가하고 pH이 5으로 맞춘다. *A.oryzae* 46471과 *L.brevis* GABA 100을 접종하는 순서와 배양 조건(산소 유무)에 따라 총 12군으로 구성하였다. 멸균 (121℃, 15분) 후 20ml 배지에 Table 25.에 나오는 순서에 따라서 접종한다.

*A.oryzae* 46471을 $10^6$cells/ml로 접종하고 *L.brevis* GABA 100을 5% 접종한다. 호기 환경은 면전으로 삼각플라스크의 입구를 막고 shaking incubator에서 30℃ 150rpm로 배양한다. 혐기 환경은 호일로 삼각플라스크의 입구를 막고 37℃ incubator에서 배양한다.

배양 7일 후에 샘플을 채위하고 다시 Table 25.의 내용 대로 접종한다. 14일 때도 샘플을 채취한다. TLC를 이용하여 GABA의 생산량을 확인한다(Figure 43.).

*A.oryzae* 46471만 접종했을 때 GABA 더 이상 생산되지 않고 *L.brevis* GABA 100을 접종하면 GABA가 생산된다. *L.brevis* GABA 100만 접종했을 때는 free amino acid가 많이 생산하지 않으며 *A.oryzae* 46471을 접종했을 때는 free amino acid가 많이 생산된다. 따라서 상대적인 좋은 발효 조건은 처음 부터 두 균이 같이 접종하는 것이다.

**Figure 43. Production of GABA by *A.oryzae* 46471 and *L.brevis* GABA 100.** G, GABA; g, Glutamic acid (Glu); 1~12, groups showed in Table 25.

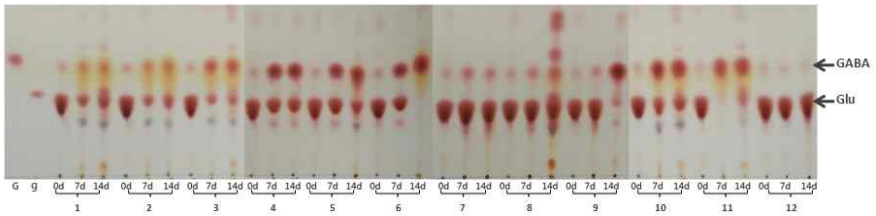


Table 25. Inoculation order and culture condition of each group

| **Group** | 0~7days | 7~14days | Total |
|---|---|---|---|
| 1 | *A.oryzae* aerobic | - | *A.oryzae* aerobic 14d |
| 2 | *A.oryzae* aerobic | *L.brevis* aerobic | *A.oryzae* aerobic 7d *L.brevis* aerobic 7d |
| 3 | *A.oryzae* aerobic | *L.brevis* anaerobic | *A.oryzae* aerobic 7d *L.brevis* anaerobic 7d |
| 4 | *L.brevis* anaerobic | - | *L.brevis* anaerobic 14d |
| 5 | *L.brevis* anaerobic | *A.oryzae* aerobic | *L.brevis* anaerobic 7d *A.oryzae* aerobic 7d |
| 6 | *L.brevis* anaerobic | *A.oryzae* anaerobic | *L.brevis* anaerobic 7d *A.oryzae* anaerobic 7d |
| 7 | *L.brevis* aerobic | - | *L.brevis* aerobic 14d |
| 8 | *L.brevis* aerobic | *A.oryzae* aerobic | *L.brevis* aerobic 7d *A.oryzae* aerobic 7d |
| 9 | *L.brevis* aerobic | *A.oryzae* anaerobic | *L.brevis* aerobic 7d *A.oryzae* anaerobic 7d |
| 10 | *L.brevis, A.oryzae* aerobic | *L.brevis, A.oryzae* anaerobic | *L.brevis, A.oryzae* aerobic 7d anaerobic 7d |
| 11 | *L.brevis, A.oryzae* anaerobic | *L.brevis, A.oryzae* aerobic | *L.brevis, A.oryzae* anaerobic 7d aerobic 7d |
| 12 | Blank aerobic | Blank anaerobic | Blank aerobic 7d anaerobic 7d |

Table 26. Inoculation order and culture condition of each group with different volume

| Group | | 0~7days | 7~14days | Total |
|---|---|---|---|---|
| 20 ml | 1 | *A.oryzae* aerobic | - | *A.oryzae* aerobic 14d |
| | 2 | *A.oryzae* aerobic | *L.brevis* anaerobic | *A.oryzae* aerobic 7d *L.brevis* anaerobic 7d |
| | 3 | *A.oryzae* aerobic | *L.brevis* aerobic | *A.oryzae* aerobic 7d *L.brevis* aerobic 7d |
| | 4 | *L.brevis* anaerobic | - | *L.brevis* anaerobic 14d |
| | 5 | *L.brevis* aerobic | - | *L.brevis* aerobic 14d |
| | 6 | *L.brevis, A.oryzae* aerobic | *L.brevis, A.oryzae* anaerobic | *L.brevis, A.oryzae* aerobic 7d anaerobic 7d |
| | 7 | *L.brevis, A.oryzae* anaerobic | *L.brevis, A.oryzae* aerobic | *L.brevis, A.oryzae* anaerobic 7d aerobic 7d |
| | 8 | Blank aerobic | Blank anaerobic | Blank aerobic 7d anaerobic 7d |
| 50 ml | 9 | *A.oryzae* aerobic | - | *A.oryzae* aerobic 14d |
| | 10 | *A.oryzae* aerobic | *L.brevis* anaerobic | *A.oryzae* aerobic 7d *L.brevis* anaerobic 7d |
| | 11 | *A.oryzae* aerobic | *L.brevis* aerobic | *A.oryzae* aerobic 7d *L.brevis* aerobic 7d |
| | 12 | *L.brevis* anaerobic | - | *L.brevis* anaerobic 14d |
| | 13 | *L.brevis* aerobic | - | *L.brevis* aerobic 14d |
| | 14 | *L.brevis, A.oryzae* aerobic | *L.brevis, A.oryzae* anaerobic | *L.brevis, A.oryzae* aerobic 7d anaerobic 7d |
| | 15 | *L.brevis, A.oryzae* anaerobic | *L.brevis, A.oryzae* aerobic | *L.brevis, A.oryzae* anaerobic 7d aerobic 7d |
| | 16 | Blank anaerobic | Blank aerobic | Blank anaerobic 7d aerobic 7d |

## 2. 스타터 배양을 이용한 콩 액체 배지의 부피가 *A.oryzae* 46471과 *L.brevis* GABA 100의 GABA의 생산에 미치는 영향

콩을 갈고 1:10 (w/v) 비율로 3차 증류수(DW)를 첨가한 후 MSG 2%를 첨가한다. 20ml이나 50ml으로 삼각플라스크에서 분주한다. *A.oryzae* 46471과 *L.brevis* GABA 100을 접종하는 순서와 배양 조건(산소 유무)에 따라 총 16군으로 구성하였다. 멸균 (121℃, 15분) 후 Table 26.에 나오는 순서에 따라서 접종한다.

*A.oryzae* 46471을 $10^6$cells/ml로 접종하고 *L.brevis* GABA 100을 5% 접종한다. 호기 환경은 면전으로 삼각플라스크의 입구를 막고 shaking incubator에서 30℃ 150rpm로 배양한다. 혐기 환경은 호일로 삼각플라스크의 입구를 막고 37℃ incubator에서 배양한다.

배양 7일 후에 샘플을 뽑고 다시 Table 25.의 내용 대로 접종했다. 14일 때 도 샘플을 뽑는다. 0d, 7d, 14d의 pH을 측정하고 TLC를 이용하여 GABA의 생산량을 확인한다(Figure 44., Figure 45.).

**Figure 44. pH changes of each group.** (A) 20ml; (B) 50ml; ◆ 1, 9; ■ 2, 10; ▲ 3, 11; ╳ 4, 12; ✳ 5, 13; + 6, 14; ● 7, 15; none 8, 16.

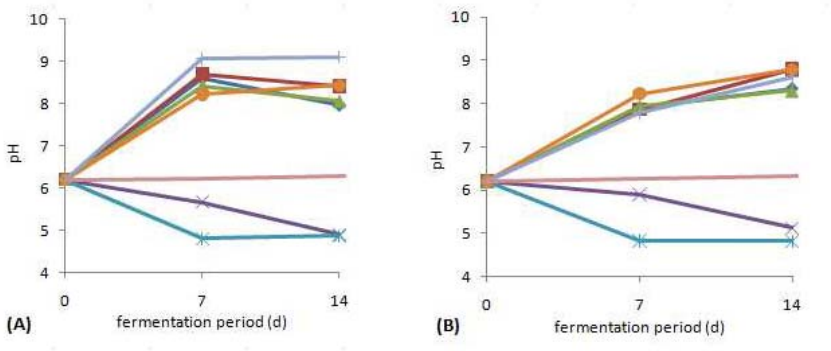
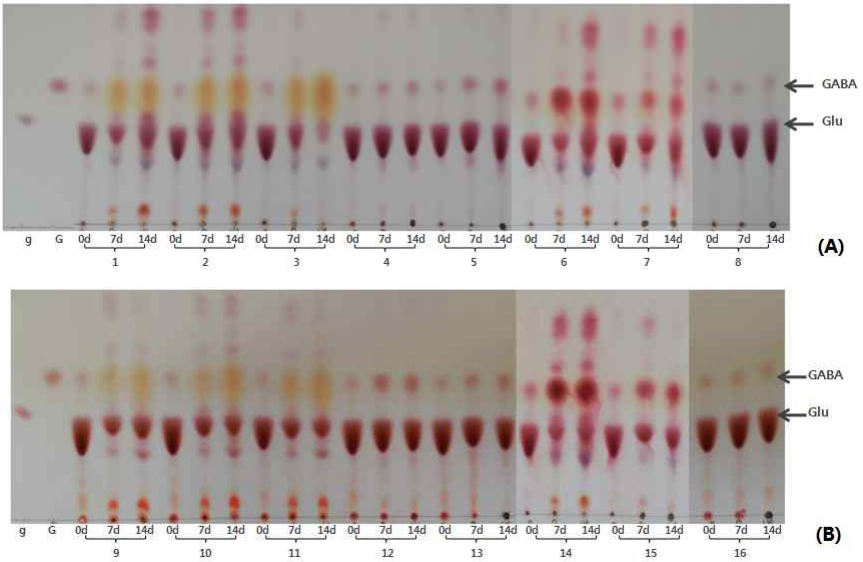



**Fig 45. Production of GABA by *A.oryzae* 46471 and *L.brevis* GABA 100.** (A) 20ml; (B) 50ml; g, Glutamic acid (Glu); G, GABA; 1~16, groups showed in Table 26.



50ml 배지에서 발효했을 때의 pH 변화는 20ml 배지 발효 보다 서서히 변한다. 똑같은 비율의 MSG을 첨가하여도 50ml 배지에서 GABA가 20ml 보다 많이 생산된다. 두 균을 같이 접종했을 때 GABA가 가장 많이 생산되고 최초 7일을 호기에서 배양하는 것이 최초 7일을 혐기에서 배양하는 것보다 GABA 생산량이 많다.

### 3. 스타터배양시 발효 초기 pH가 *A.oryzae* 46471과 *L.brevis* GABA 100에 의한 GABA의 생산에 미치는 영향

콩을 갈고 1:10 (w/v) 비율로 3차 증류수(DW)를 첨가한 후 MSG 2%를 첨가한다. 20ml이나 50ml으로 삼각플라스크에서 분주한다. 발효 조건(산소 유무)에 따라 총 10군으로 구성하였다. 멸균 (121℃, 15분) 후 *A.oryzae* 46471과 *L.brevis* GABA 100 같이 접종하고 Table 27.에 나오는 조건에 따라서 배양한다.

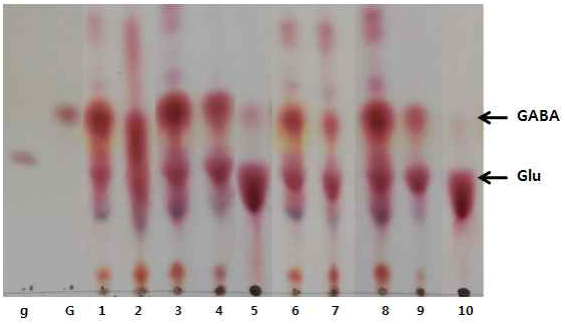
Table 27. Inoculation order and culture condition of each group with start pH

| Group | | | 0~7days | 7~14days | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| pH맞춤 | 20ml | 1 | aerobic | anaerobic | aerobic 7d anaerobic 7d |
| | | 2 | anaerobic | aerobic | anaerobic 7d aerobic 7d |
| | 50ml | 3 | aerobic | anaerobic | aerobic 7d anaerobic 7d |
| | | 4 | anaerobic | aerobic | anaerobic 7d aerobic 7d |
| | | 5 | Blank anaerobic | Blank aerobic | aerobic 7d anaerobic 7d |
| pH맞추지 않음 | 20ml | 6 | aerobic | anaerobic | aerobic 7d anaerobic 7d |
| | | 7 | anaerobic | aerobic | anaerobic 7d aerobic 7d |
| | 50ml | 8 | aerobic | anaerobic | aerobic 7d anaerobic 7d |
| | | 9 | anaerobic | aerobic | anaerobic 7d aerobic 7d |
| | | 10 | Blank aerobic | Blank anaerobic | aerobic 7d anaerobic 7d |

*A.oryzae* 46471에 $10^6$cells/ml을 접종하고 *L.brevis* GABA 100을 5% 접종한다. 호기 환경은 면전으로 삼각플라스크의 입구를 막고 shaking incubator에서 30℃ 150rpm로 배양한다. 혐기 환경은 호일로 삼각플라스크의 입구를 막고 37℃ incubator에서 배양한다. 배양 7일 후 샘플을 채취하고발효 조건을 바꾼다. 발효 조건은 table3에 나와있다. 14일 때도 샘플을 채취한다. 최총 GABA량을 TLC를 이용하여 확인하였다(Figure 46.).

TLC 결과를 보면 pH를 처음에 5로 맞추었을 때 GABA 나 free amino acid의 생산량이 pH를 조절하지 않은 군보다 많다. 적당한 산성 환경에서 균의 생리활성이 가장 높기 때문이다.

**Figure 46. GABA content in the fermentation with different start pH.** g, Glutamic acid (Glu); G, GABA; 1~10, groups showed in Table 29.




## 4. 스타터배양시 *A.oryzae* 46471과 *L.brevis* GABA 100에 의한 GABA 생산의 최적 발효 시간

콩을 갈고 1:10 (w/v) 비율로 3차 증류수(DW)를 첨가한 후 MSG 2%를 첨가한다. 멸균 (121℃, 15분) 후 50ml 배지에서 *A.oryzae* 46471을 $10^6$cells/ml 먼저 접종한다. 3일, 7일, 14일 호기 배양 후에 *L.brevise* GABA 100 접종해서 호기 환경에서 4일 더 배양한다. 매 번 접종 전의 pH을 측정하고 TLC를 이용하여 GABA의 생산량을 확인한다(Figure 47, Figure 48).

**Figure 47. pH changes of each group.** ◆ 3+4 days; ■ 7+4 days; ▲ 14+4days

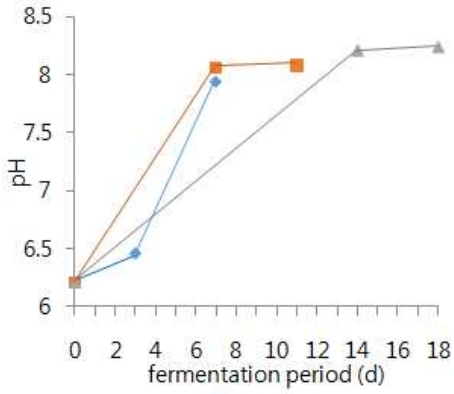
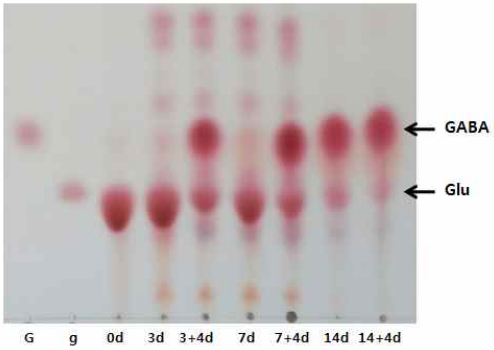



**Figure 48. Production of GABA during different fermentation time.** G, GABA; g, Glutamic acid (Glu)



콩을 갈고 1:10 (w/v) 비율로 3차 증류수(DW)를 첨가한 후 MSG 2%를 첨가하고 pH 5로 맞춘다. 멸균 (121℃, 15분) 후 50ml 배지에서 *A.oryzae* 46471과 *L.brevise* GABA 100 같이 접종하고 호기환경에 10일간 배양한다. 샘플은 매일 수거하였으며 pH를 측정하고 TLC를 이용하여 GABA의 생산량을 확인한다(Figure 49, Figure50).

Fig 49. pH changes during fermentation.

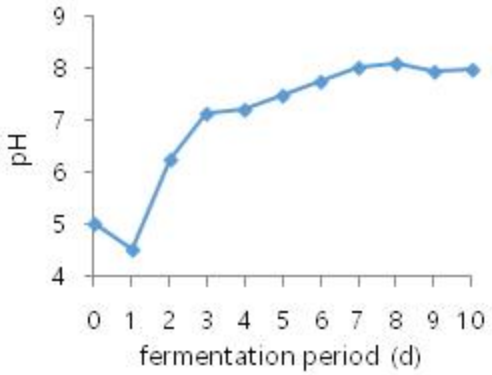
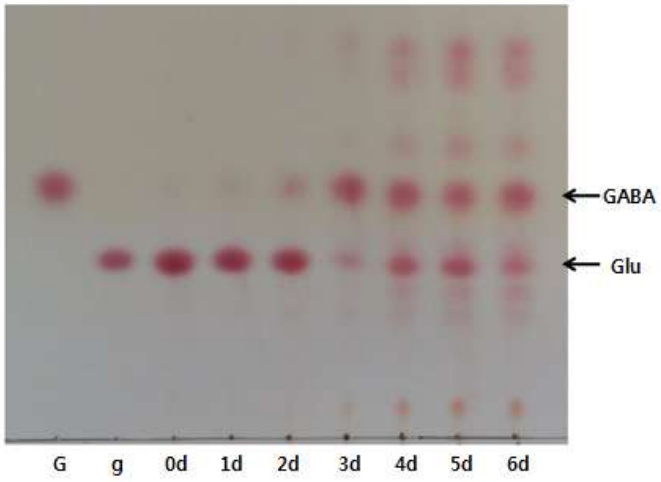



Fig 50. Production of GABA during fermentation. g, Glutamic acid (Glu); G, GABA.




pH 변화를 보면 하루 발효 후 pH 약간 내렸다가 다시 올라간다. 그리고 하루 지난 후에 GABA 생산 거의 완료된다. *L.brevis* GABA 100의 생장 기간 짧아서 발효 전기에 신속히 자라 GABA 전환을 완료한다.

## 5. 스타터배양시 MSG 첨가량이 *A.oryzae* 46471과 *L.brevis* GABA 100에 의한 GABA의 생산에 미치는 영향

콩을 갈고 1:10 (w/v) 비율로 3차 증류수(DW)를 첨가한다. MSG를 첨가에 따라 2군을 나눈다. 멸균 (121℃, 15분) 후 50ml 배지에서 *A.oryzae* 46471 $10^6$cells/ml 먼저 접종한다. 3일, 7일, 14일 호기 배양 후에 *L.brevise* GABA 100 접종한 후 호기 환경에서 4일 더 배양한다. 매 번 접종 전의 pH을 측정하고 TLC를 이용하여 GABA의 생산량을 확인한다(Figure 51, Figure 52).

**Figure 51. pH changes of each group.** (A) MSG 2% 첨가; (B) MSG 첨가 안함; ◆ 3+4 days; ■ 7+4 days; ▲ 14+4 days.

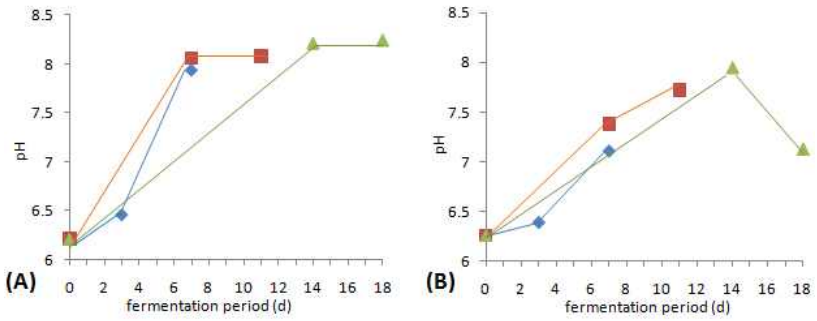
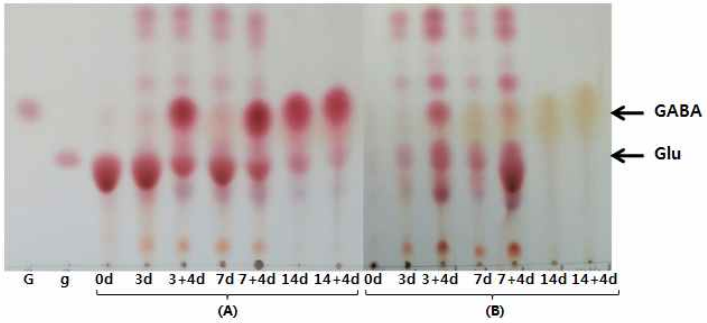
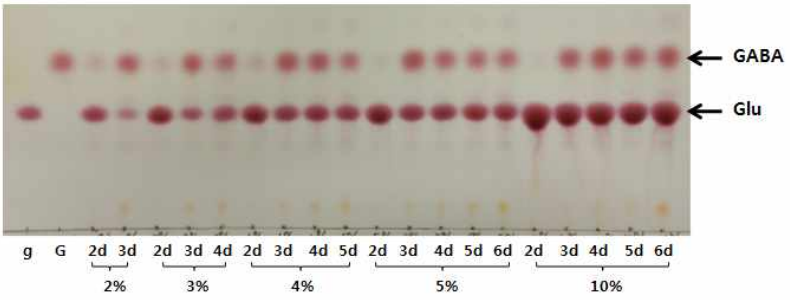



**Figure 52. GABA content of each group.** (A) MSG 2% 첨가; (B) MSG 첨가 안함; G, GABA; g, Glutamic acid (Glu).




콩을 갈고 1:10 (w/v) 비율로 3차 증류수(DW)를 첨가한다. 배지에서 MSG 2%, 3%, 4%, 5%, 10%를 첨가하고 *A.oryzae* 46471 $10^6$cells/ml, *L.brevise* GABA 100 5% 같이 접종한다. 일주일 동안 호기 배양하고 매일 샘플을 뽑는다. TLC를 이용하여 GABA의 생산량을 확인한다 (Figure 53)

**Figure 53. GABA production of each group with different addition of MSG.** g, Glutamic acid (Glu); G, GABA;.




MSG를 첨가하면 GABA의 생산량이 훨씬 많아진다. 하지만 MSG 너무 많이 첨가하면 *L. brevis* GABA 100의 GABA 전환 능력이 포화되고 MSG 첨가해도 더 이상 GABA의 생산량이 올라가지 않는다.

## 제 16 장.마이코톡신 프리 가바 함유 된장 제조 방법 확립 (협동)

*Aspergillus niger*와 *Aspergillus oryzae* 중에서 식품에서 분리된 균주로서, aflatoxin 생산성이 없는 균주를 7종 중 Clear zone의 상대적 크기를 비교하여 성장 속도와 활성이 높은 균주 2종을 선발하였다(Table 6). 균주는 PDA(potato dextrin agar) plate에서 배양하여 성장속도를 확인하고, 효소 활성 측정을 위하여 Skim milk를 기질 단백질로 사용하였고 clear zone의 지름을 측정하여 protease의 상대적인 양을 측정하였다. 선발된 마이코톡신 프리 균주 2종과 사업적으로 된장의 발효에 사용되는 충무균을 대조군으로 삼아 스타터 균주로 실험을 진행하였다.

**Table 6. Microorganisms used for fermentation**

| Microorganisms | Strain number |
|---|---|
| *Aspergillus oryzae* | KACC 46471 |
| *Aspergillus oryzae* | KACC 40234 |
| *Aspergillus oryzae*(충무균) | 기존에 사용하는 균주(남안동농협) |

마이코톡신 프리 균주를 이용한 된장 제조를 위해 남안동 농협 현장에서 마이코톡신 프리 균주 46471, 40234, 대조군(충무균, 기존에 사용하는 균주)을 이용하여 전통된장을 제조하였다. 메주는 콩을 세척 및 불린 후 삶는다. 삶아진 콩을 약간 갈아서 김을 빼고 육면체로 성형하여 발효 및 겉말림 후 1개월 동안 속말림을 한 후 보관하며 시료로 사용한다. 된장은 18% 소금물 제조하여 메주를 침지한 후 메주를 꺼내고 남은 국물을 추가, 혼합하여 된장을 제조하고 보관하여 시료로 사용하였다. 마이코톡신 프리 전통 된장의 품질 관리를 위해 마이코톡신 분석을 수행하였다. 검체를 분쇄하여 균질화 한 시료 25 g을 추출용액 100 mL를 가하고 균질기로 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 여과지로 여과한다. 여액 10 mL를 100 mL 플라스크에 취하고 1% 트윈 20 용액 30 mL를 가하여 흔들어 섞은 후 유리섬유 여과지로 여과한 것을 추출액으로 한다. 정제 추출액 20 mL를 정제용 칼럼에 주입하여 초당 1 방울 정도의 속도로 통과시킨 후 물 10 mL를 같은 유속으로 유출시키고 칼럼 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 아세토니트릴 3 mL로 용출시킨다. 그리고 유도체화하기 위하여 용출액을 50℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 트리플루오로초산 0.2 mL를 가하여 어두운 곳에서 15분간 방치시킨 후 아세토니트릴·물(20:80, v/v) 혼합용액 0.8 mL를 가하여 혼합하고 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 했다.  전처리된 시료를 액체크로마토그래프법으로 분석하였으며 분석 조건은 Table 7와 같다. 분석조건은 식품의약품안전청에서 고시한 방법을 그대로 사용하였다. Agilent HPLC를 사용하였으며, 검출기는 형광검출기(여기파장: 365 nm, 형광파장: 435 nm)를 사용하였다.  칼럼은 Capcell pak C18 UG120(4.6×250 mm, 5 μm)를 사용하고 이동상은 아세토니트릴·물 (25:75, v/v)을 분당 1 mL의 유속으로 분석하였으며 주입량은 10 μL이었다.

Table 7. HPLC  analysis conditions of aflatoxin

| | |
|---|---|
| Instrument | Agilent HPLC |
| Column | Capcell pak C18 UG120(4.6 × 250 mm, 5 μm) |
| Sample volume | 10 μL |
| Eluent | 아세토니트릴 · 물 (25:75, v/v) |
| Flow rate | 1 mL/min |
| Detection | 형광검출기(여기파장 365 nm, 형광파장 435 nm) |
| Temperature | 25 ℃ |
| Reagent | AccQ-Fluor reagent |

그 결과  40234, 46471, 충무균을 사용하여 제조한 각각의 시료를 숙성기간에 따라 아플라톡신을 분석한 결과 모든 시료에서 아플라톡신이 검출되지 않았다 (Table 8).

Table 8. Contents of mycotoxin in Soybean paste produced from the mycotoxin free strains.

| Samples | kind of mycotoxin | Contents of mycotoxin | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 제조당일 | 숙성 한달 | 숙성 두달 | 숙성 세달 | 숙성 네달 |
| 40234 | aflatoxin | ND[1)] | ND | ND | ND | ND |
| 46471 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |
| 충무균 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |

[1)]ND: Not detected.

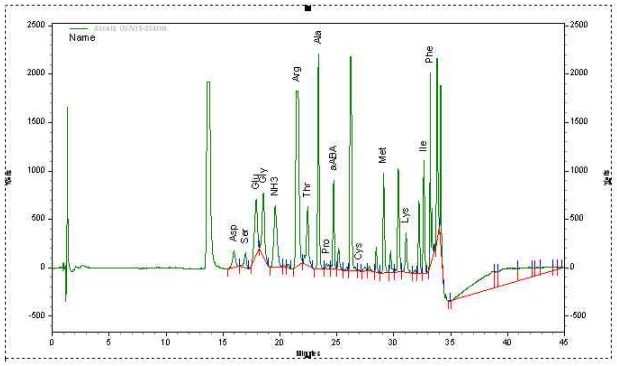
또한 마이코톡신 프리 전통 된장의 품질 관리를 위해 마이코톡신 프리 전통 된장의 유리 아미노산 분석을 수행하였다. 시료 2g에 증류수 100ml를 섞은 후, 200rpm에서 1시간 동안 교반한다. Watman No.2 filter paper로 여과하고, 다시 0.45 ㎛ membrane filter로 재여과한 후 분석에 사용하였다. 아미노산 분석을 위한 시료의 전처리는 AccQ-Tag 방법을 사용하여, sample tube에 분석하고자 하는 시료 10uL와 AccQ-Fluor Borate Buffer 60uL를 넣고 Vortexing 한 후, 여기에 0.1mM의 내부표준물질(α-aminobutric acid를 20mM HCl에 0.1mM로 녹인다) 10uL와 AccQ-Fluor reagent 20uL를 첨가하여 vortexing 하고 실온에서 1분간 반응시킨 후 Heating Block을 이용하여 55℃에서 10분간 가열하여 유도체화 하였다. 유도체화가 끝난 시료는 아미노산 조성 분석을 위하여 위해 “AccQ·Tag Method”를 이용하여 HPLC running 조건을 확립하였으며, HPLC의 분석 조건은 Table 9과 같다.

Table 9. HPLC analysis conditions of aminoic acid

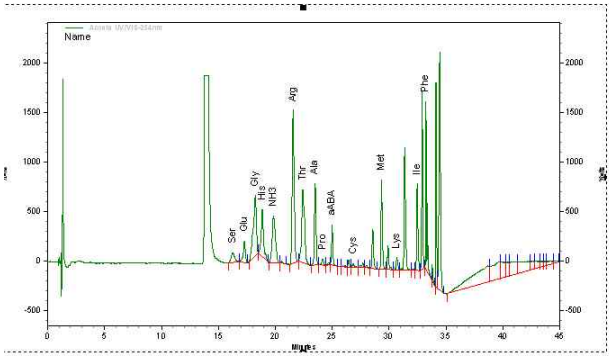
| | |
|---|---|
| Instrument | Sureyor$^{TM}$ HPLC Plus |
| Column | Accq tag $C_{18}$ |
| Sample volume | 20 uL |
| Eluent | A: Accq-Tag Eluent A<br>B: Acetonitrile<br>C: water |
| Flow rate | 1 ml/min |
| Detection | UV 250nm |
| Temperature | 25 ℃ |
| Reagent | AccQ-Fluor reagent |

그 결과 마이코톡신 프리 균주를 이용하여 제조하여 만든 농협된장 시료(2013년 9월 채취, 숙성 1, 2, 3 및 4개월)와 남안동에서 메주를 소금물에 담가서 제조된 간장과 된장시료 및 메주시료에서 유리아미노산 함량을 분석하였다(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5). 분석결과 마이코톡신 프리 균주를 이용해 제조하여 만든 된장의 유리아미노산 함량은 총 5.55-42.78 mM으로, 46471균주에서 가장 높은 유리아미노산 함량을 보였다. 된장의 아미노산 함량은 숙성기간이 3개월까지 증가하다가 4개월부터는 오히려 감소하는 변화를 보였다. 간장의 아미노산 함량은 4.31 mM이고, 메주는 4.68M이며, 메주를 이용해 간장을 만들고 남은 된장의 유리아미노산 함량은 3.74 mM으로 많은 유리 아미노산이 간장에 포함되어, 소금물에 3개월 숙성 후 된장의 유리 아미노산 함량은 상대적으로 낮아졌다. 된장의 아미노산 함량의 분석 결과, 된장의 우마미와 관련된 Arg, Asp, Glu가 다소  높음을 확인되었다. 특히 Glu의 함량은 HPLC와 YSI의 분석 결과에 차이를 보였으나, YSI로 분석한 결과 Glu의 함량은 숙성 3달째까지 지속적으로 증가하여 0.423-0.508g/l로 나타났으며, 숙성4달째는 다소 감소하는 경향을 보였다. 따라서 숙성 기간은 3달 전후가 된장을 맛을 유지하기 위해서는 최적으로 생각되며, 쓴맛과 관련된 아미노산인 Arg, His, Try, Val의 함량은 시료별로 다소 차이를 보였지만 일반적으로 숙성기간이 길어짐에 따라 감소함을 보였다. 단맛을 내는 proline의 함량은 간장에서 0.177 mM로 높게 나타났으며, 숙성 3달째 충무균과 40234에서 된장의 숙성기간이 길어질수록 증가함을 보였다.

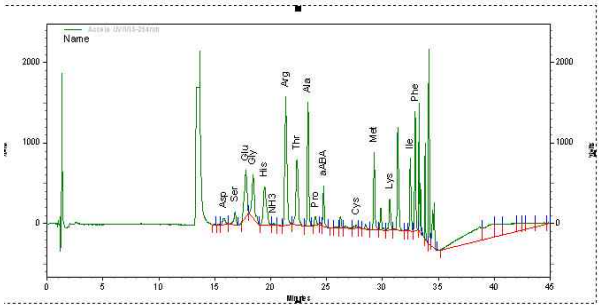
a. 2013년 9월(제조 당일)



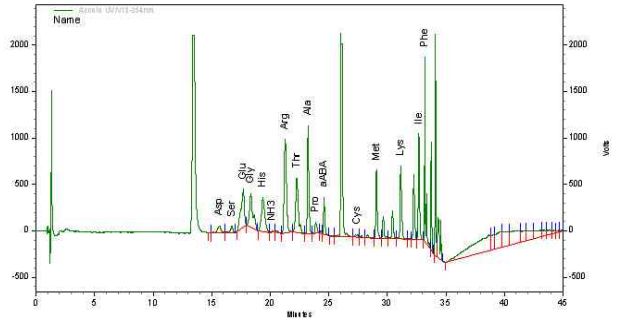

b. 2013년 12월(숙성 1달)




c. 2014년 1월(숙성 2달)




d. 2014년 2월(숙성 3달)




e. 2014년 3월(숙성 4달)

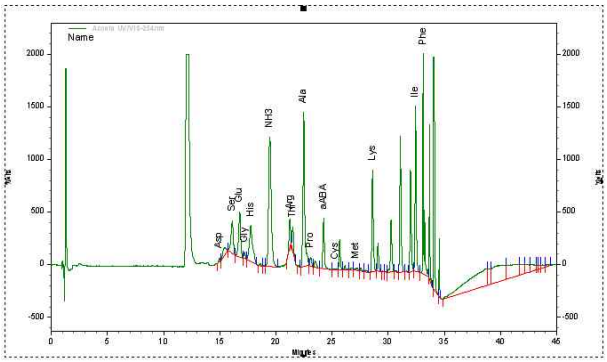
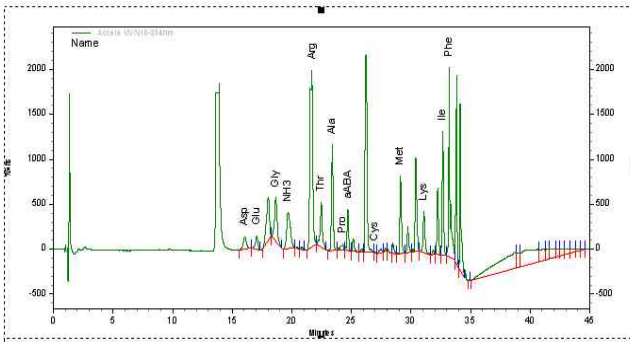
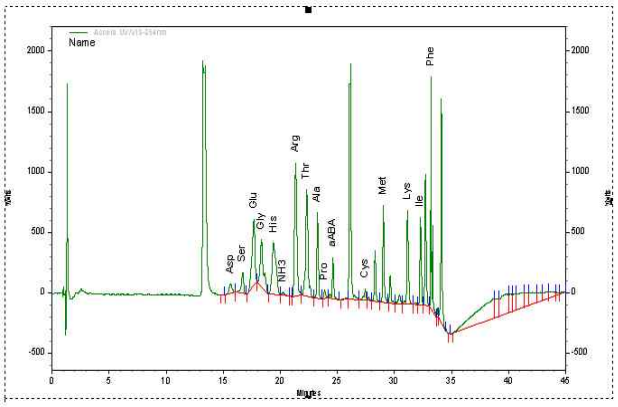



Figure 1. HPLC chromatogram of free amino acids of Soybean paste inoculated strain 40234 produced in September 2013. a. 2013년 9월(제조 당일) b. 2013년 12월(숙성 1달) c. 2014년 1월(숙성 2달) d. 2014년 2월(숙성 3달) e. 2014년 3월(숙성 4달)

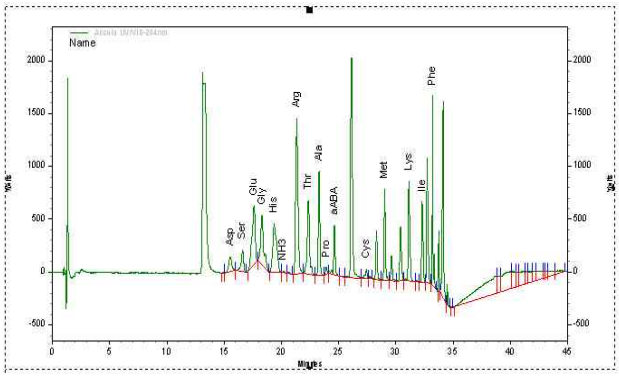
a. 2013년 9월(제조)



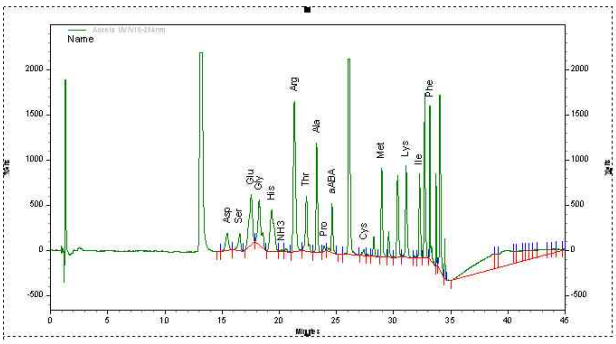

b. 2013년 12월(숙성 1달)




c. 2014년 1월(숙성 2달)




d. 2014년 2월(숙성 3달)




e. 2014년 3월(숙성 4달)

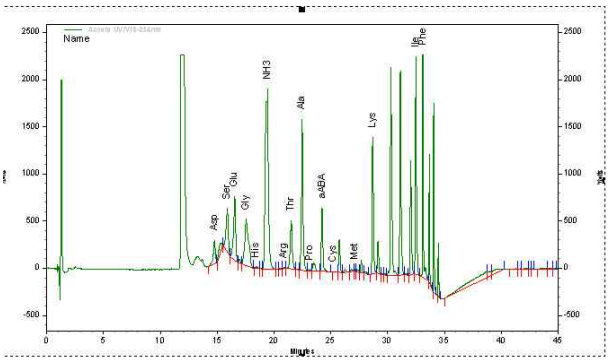
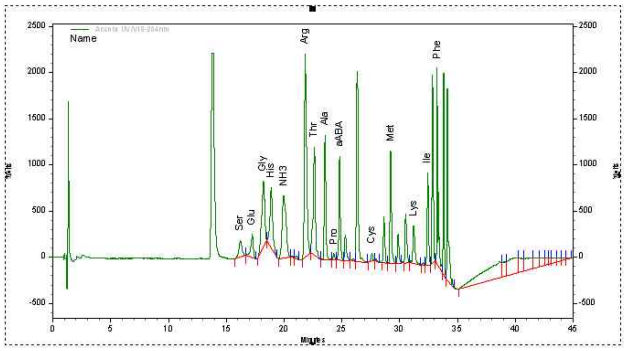
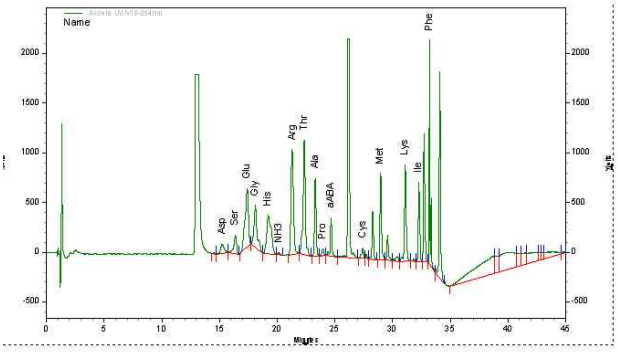



Figure 2. HPLC chromatogram of free amino acids of Soybean paste inoculated strain 46471 produced in September 2013. a. 2013년 9월(제조 당일) b. 2013년 12월(숙성 1달) c. 2014년 1월(숙성 2달) d. 2014년 2월(숙성 3달) e. 2014년 3월(숙성 4달)

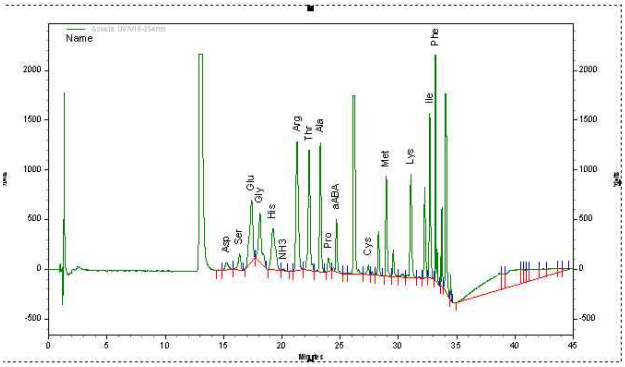
a. 2013년 9월(제조)



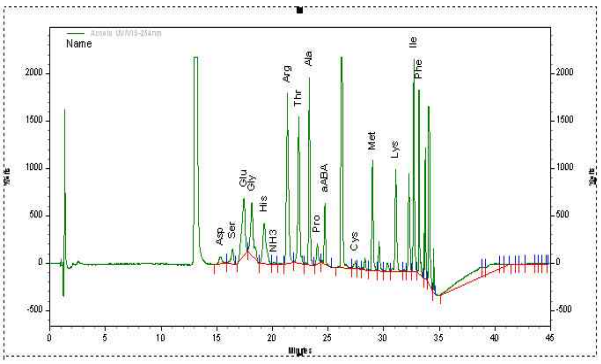

b. 2013년 12월(숙성 1달)




c. 2014년 1월(숙성 2달)




d. 2014년 2월(숙성 3달)




e. 2014년 2월(숙성 4달)

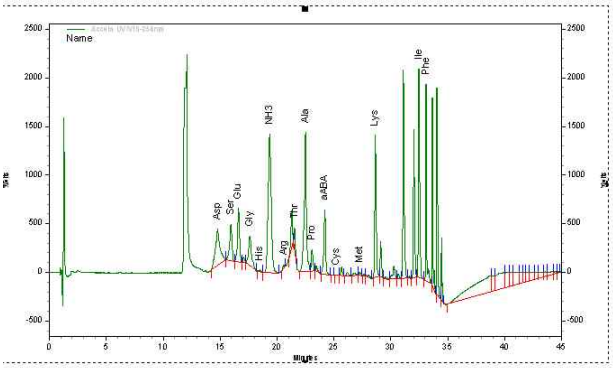



Figure 3. HPLC chromatogram of free amino acids of Soybean paste inoculated 충무균 produced in September 2013. a. 2013년 9월(제조 당일) b. 2013년 12월(숙성 1달) c. 2014년 1월(숙성 2달) d. 2014년 2월(숙성 3달) e. 2014년 3월(숙성 4달)

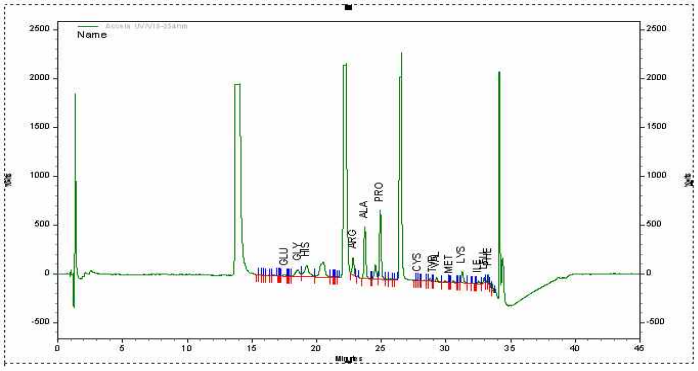



Figure 4. HPLC chromatogram of free amino acids of soy sauce produced by south-Andong Nonghyup(간장)

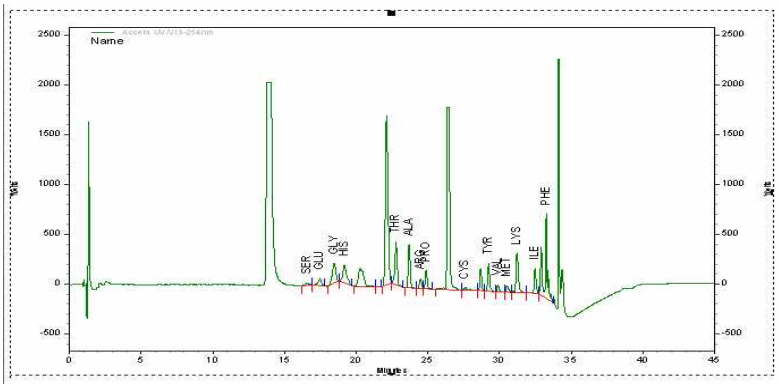



Figure 5. HPLC chromatogram of free amino acids of Meju produced by south-Andong Nonghyup(메주)

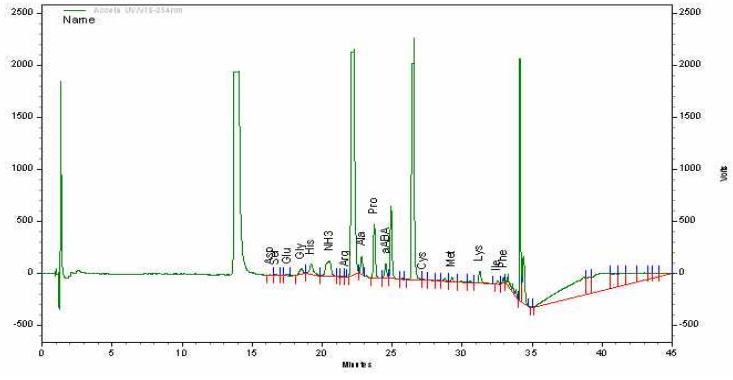



Figure 6. HPLC chromatogram of free amino acids of Soybean paste remained making soy sauce.(간장을 만들고 남은 된장의 유리 아미노산 분석)

마이코톡신 프리 균주를 이용하여 제조된 된장의 맛, 향, 색과 종합적인 기호도를 최고 5점, 최저 1점으로 5점 척도로 관능 평가를 수행하였다. 마이코톡신 프리 균주 40234, 46471와 충무균을 이용하여 제조된 된장 시료의 관능평가 결과는 Table 10에 나타내었다. 관능검사 결과 맛, 향, 색 및 종합적인 기호도 항목에서 3가지 시료 모두 숙성 3개월째에 가장 높은 값을 보여주었으며 4개월 숙성 시 오히려 3개월 숙성 된장시료보다 모든 항목에서 낮은 값을 나타내었다. 마이코톡신 프리 균주를 접종하여 발효, 숙성시킨 40234, 46471은 대조군인 충무균 발효 된장에 비하여 평가가 좋았고 특히 46471가 가장 높은 값을 보여주었다. 이러한 관능평가 결과는 아미노산 함량과 관련된 것으로 보인다. 위의 유리 아마노산 분석결과 아미노산 함량은 숙성기간이 3개월까지 증가하다가 4개월부터는 오히려 감소하였으며 우마미와 관련된 Arg, Asp, Glu가 다소 높게 확인 되었다. 따라서 숙성 기간은 3개월 전후가 된장을 맛을 유지하기 위해서는 최적으로 생각된다.

Table 10. 마이코톡신 프리 균주를 이용하여 제조된 된장의 관능평가

| Samples | Period of ripening (months) | Taste | Flavor | Color | Overall acceptability |
|---|---|---|---|---|---|
| 40234 | 1 | 3.1 | 3.2 | 3.3 | 3.2 |
| | 2 | 3.6 | 3.7 | 3.6 | 3.7 |
| | 3 | 4.0 | 3.8 | 3.8 | 3.9 |
| | 4 | 3.7 | 3.7 | 3.7 | 3.7 |
| 46471 | 1 | 3.2 | 3.2 | 3.4 | 3.2 |
| | 2 | 3.9 | 3.7 | 3.8 | 3.9 |
| | 3 | 4.1 | 3.9 | 3.8 | 4.1 |
| | 4 | 3.9 | 3.7 | 3.8 | 3.9 |
| 충무균 | 1 | 3.2 | 3.2 | 3.3 | 3.1 |
| | 2 | 3.2 | 3.5 | 3.4 | 3.4 |
| | 3 | 3.4 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| | 4 | 3.1 | 3.5 | 3.4 | 3.4 |

## 제 17 장. 제조된 마이코톡신 프리 전통된장의 이화학적 특성 규명(협동)

된장 시료의 수분 및 회분정량을 다음과 같이 수행하였다. 시료 1g을 칭량하여 105℃의 건조기에 넣고 약 16시간이 지난 후 무게를 1차 측정하였다. 다시 105℃의 건조기에 넣고 약 6시간이 지난 후 무게를 2차 측정한다. 1차 측정과 2차 측정의 무게가 다른 시료들은 다시 건조기에 넣고 약 16시간 후 무게를 재서 각 시료가 무게의 변화가 없을 때까지 무게를 기록하였다. 용기무게를 제외하여 샘플무게의 변화를 계산하여 수분정량을 백분율(%)로 기록하였다. 회분정량을 위하여 시료 1g을 도가니에 칭량한 후 550℃의 회화로에서 5시간 건조시킨 후, 건조기에서 꺼내서 20분정도 방냉한 후 무게를 측정하여 시료의 무게를 백분율(%)로 계산하여 회분 정량을 시행하였다.

수분 또는 회분(%) = (W1-W2)/(W1-W0)*100
W0: 칭량접시의 무게 (g)
W1: 시료와 칭량접시의 무게(g)
W2: 건조 후 시료와 칭량접시의 무게 (g)

마이코톡신 프리 균주를 이용하여 제조한 된장시료의 수분과 회분을 분석한 결과는 Table 11과 같다. 40234, 46471, 충무균을 이용하여 제조한 된장 시료의 수분 및 회분 함량은 각각의 시료마다 차이가 없었으며 또한 숙성기간에 따라 변화가 없는 것으로 나타났다.

Table 11. Proximate compositionof soybean paste produced by Nonghyup

| Samples | Period of ripening (months) | Moisture contents(%) | Ash contents(%) |
|---|---|---|---|
| 40234 | 1 | 61 | 12 |
| | 2 | 58 | 12 |
| | 3 | 59 | 12 |
| | 4 | 59 | 13 |
| 46471 | 1 | 50 | 13 |
| | 2 | 60 | 12 |
| | 3 | 60 | 12 |
| | 4 | 60 | 13 |
| 충무균 | 1 | 58 | 10 |
| | 2 | 60 | 11 |
| | 3 | 60 | 12 |
| | 4 | 60 | 13 |

조지방 정량은 Soxhlet's 추출법을 사용하여 측정하였다. 된장 시료 1 g을 원통여지에 넣은 다음, 항량된 수기에 ether를 120 ml을 넣은 후 냉각관, 추출관, 수기를 연결하여 heating block에서 60-70℃ 정도로 12시간 가온하였다. 추출이 끝나면 수기만 따로 분리하여 105℃에서 2-3시간 건조한 후, 방냉·칭량하였다. 이 과정을 반복 하여 항량을 구하여 아래 식으로 조지방을 정량하였다.

조지방(%) = (W1-W0)/S*100

W1: 지방 추출 후 건조한 수기의 중량(g)

W0: 수기의 중량(g)

S: 시료 채취량(g)

또한, 조단백 측정을 위해 시료의 적당량(질소량 10-25 mg, 단백질함량 50-150 mg)을 내벽에 시료가 부착되는 것을 막기 위해 기름종이로 싸서 분해용 플라스크에 담았다. 황산 20-30 ml와 분해촉진제($K_2SO_4$ 9g+ $CuSO_4$·$5H_20$ 1 g을 막자사발로 분쇄 혼합) 2 g을 첨가하고 boiling stone 몇 개를 넣어주었다. 시료의 분해는 보통 약 4-6시간 진행하며, 반응물의 색상 변화(검은색-흑갈색-다갈색-청색-황록색의 투명한 색이 1시간 정도 더 가열되어 분해 완료)를 관찰하여 분해시간을 조절하고, 방냉 후 H20를 가하여 250 ml로 희석하였다. 얻어진 시료의 조단백은 증류하여 적정하여 측정하였다. 수증기 발생용 round bottom flask에 2/3가량의 물을 넣고 비등석을 넣었다. Round bottom flask에 끓인 증류수를 넣고, 암모니아를 포집할 삼각플라스크에 4% boric acid 50ml과 지시약 200 ㎕을 첨가하고 냉각관의 끝부분이 용액에 충분히 잠기도록 하였다. 냉각기에 냉각수를 통하게 하고 round bottom flask의 배출 cock을 열어둔 채 가열하였다. 깔때기를 통해 증류 플라스크에 10 ml의 시료와 20 ml의 30%의 NaOH를 넣고, 약 30-40분 정도 증류하여 150 ml 정도의 증류액을 포집하였다. 증류가 끝나면 냉각관  끝부분은 증류수로 세척하였다. 시료의 적정은 증류가 끝난 삼각플라스크 중의 붕산암모늄을 0.1N HCl 표준액으로 적정하여, 지시약의 색이 더 이상 변하지 않는 점을 종말점으로 한다. Blank는 시료를 제외한 나머지 과정을 동이하게 실시한다. 총 질소량은 다음과 같이 계산하였다.

총 질소량(%)=0.001401 × (a-b) × f × 100/w × 희석배수

조단백질(%) = 총질소량 × 질소계수(콩은 5.71)

a: 0.1N HCl 적정값(ml)

b; blank에 소비된 0.1N HCl 적정값(ml)

f: 역가(1.03)

w: 시료무게

마이코톡신 프리 균주 40234, 46471와 충무균을 이용하여 제조된 된장 시료의 조지방과 조단백 함량은 Table 12에 나타내었다. 조지방 함량은 마이코톡신 프리 균주 2종 모두 비슷한 함량을 나타내었으며 충무균에 비하여 높게 나타났다. 된장 시료의 조단백을 분석한 결과 40234가 가장 높게 나타났고 충무균이 가장 낮은 함량을 나타내었다.

Table 12. Proximate composition of soybean paste produced by Nonghyup

| Samples | Crude fat contents(%) | Crude protein contents(%) |
|---|---|---|
| 40234 | 30 | 10.3 |
| 46471 | 29.5 | 8.2 |
| 충무균 | 26.5 | 6.2 |

시료의 pH 측정하기 위해 시료4 g과 증류수 40 ml를 섞고 200 rpm에서 10분 동안 진탕한다. Watman No1 filter paper로 여과한다. pH meter를 이용하여 측정하였다. 또한 산도 측정을 위해 시료 4 g과 증류수 40 ml를 섞고 200 rpm에서 10분 동안 진탕하였다. watman No.1 filter paper로 여과하고, 여액 25 mL에 0.1N NaOH로 적정하여 pH가 8.3에 도달하는데 필요한 0.1N NaOH mL 양을 측정한다. 젖산의 양으로 환산하여 총 산도를 계산하였다. 마이코톡신 프리 균주 40234, 46471 와 충무균을 이용하여 제조한 된장 시료의 pH는 대략 4.7-5.9 값을 나타내었으며 숙성기간에 따라 다소 감소하는 경향을 보였다(Table 13). 총 산도의 경우 4.0-1.6%을 나타내었으며 3개월째까지는 변화가 없었으나 숙성 4개월째에 산도가 급격히 증가하였다. 된장의 산도는 신맛과 향미에 영향을 주는 인자로, 발효 식품에서 품질에 영향을 주는 주요인자 중 하나이다(Joo 등 1997). 된장 시료의 발효과정에 증식하는 젖산균과 같은 산 생성균이나 구균 등의 작용으로 유기산이 증가하여 pH가 낮아지는 것으로 사료된다(Seo 등 1992, Kim 2005).

Table 13. Proximate composition of soybean paste produced by Nonghyup

| Samples | Period of ripening (months) | pH | Total acidity(%) |
|---|---|---|---|
| 40234 | 1 | 5.49 | 2.0 |
| | 2 | 5.38 | 2.0 |
| | 3 | 5.02 | 1.9 |
| | 4 | 5.07 | 3.7 |
| 46471 | 1 | 5.81 | 1.0 |
| | 2 | 5.13 | 1.7 |
| | 3 | 5.20 | 1.6 |
| | 4 | 5.10 | 3.5 |
| 충무균 | 1 | 5.90 | 1.6 |
| | 2 | 4.96 | 1.8 |
| | 3 | 5.05 | 1.9 |
| | 4 | 4.72 | 3.9 |

된장의 염도 함량은 Mohr법으로 분석하였다. 시료 1 g을 증류수 50 ml로 희석한 후, Watman No.1 filter paper로 여과한 여액 10 ml에 지시약 2% $K_2Cr_2O_4$ 1 ml을 가하고 혼합하면서 0.1N $AgNO_3$용액으로 적갈색이 될 때까지 적정하여 염도 함량을 구하였다.

NaCl 함량(%) = 0.00585 × V × F × D × 100/S

V: 0.1N $AgNO_3$ 용액의 적정소비량

F: 0.1N $AgNO_3$ 용액의 역가

D: 희석배수

S: 시료채취량

0.00585; 0.1N $AgNO_3$ 용액 1ml에 해당하는 NaCl의 양

마이코톡신 프리 균주 40234, 46471 와 충무균을 이용하여 제조된 된장 시료의 염도 함량은 시료에 따라 차이를 보였지만 유의적인 변화로 보이지는 않으며, 숙성기간에 따라서도 큰 차이를 보이지 않았다(Table 14). 된장의 수분함량의 유의적 차이가 없어 염도 함량에도 큰 차이가 없이 측정된 걸로 보인다.

Table 14. Salt contents of soybean paste produced by Nonghyup

| Samples | Salt contents (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 숙성 1달 | 숙성 2달 | 숙성 3달 | 숙성 4달 |
| 40234 | 14.7 | 12.3 | 12.8 | 13.5 |
| 46471 | 11.6 | 12.8 | 14.4 | 12.5 |
| 충무균 | 12.1 | 13.2 | 13.6 | 12.4 |

된장의 아미노태 질소 함량은 Formol 적정법으로 분석하였다. 시료 2 g에 증류수 100ml를 섞은 후, 200rpm에서 1시간 동안 교반한다. Watman No.1 filter paper로 여과하고, 여액 25 ml를 0.1N NaOH용액으로 pH 8.3이 되도록 하였다. 중성 포르말린 용액 20 ml를 가하고, 다시 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.3이 되도록 하였다. 증류수로 Blank 실험을 실시하였다.

아미노태 질소함량(%) = V × F × 0.0014 × D × 100/S

V; 0.1N NaOH 용액의 적정 소비량

F; 0.1N NaOH 용액의 역가(1.03)

D; 희석배수

S; 시료 채취량

0.0014; 0.1N NaOH 용액 1ml에 해당하는 NaCl의 양

마이코톡신 프리 균주 40234, 46471 와 충무균을 이용하여 제조된 된장 시료의 아미노태 질소 함량은 Table 15에 나타내었다. 아미노태 질소 함량은 숙성기간이 길어질수록 증가하는 경향을 보였으며 46471의 숙성 4개월째에 가장 높게 나타났다. 다만 40234만 숙성 4달째에 값이 다소 감소하였다. 아미노태 질소 함량은 발효식품의 발효정도를 판단하는 기준으로, 된장의 제조와 숙성 과정중에 protease의 효소 작용으로 콩 단백질이 아미노산으로 가수분해 되어 감칠맛을 내는 아미노산을 생성하기 때문에 숙성이 증가할수록 증가되는 것으로 알려져 있다. 한국 전동 식품 규격에 따르면 메주의 아미노산성 질소는 110 mg/% 이상이고, 된장은 300 mg/%이상으로 규정하고 있다.

Table 15. Amino type nitrogen contents of soybean paste produced by Nonghyup

| Samples | Contents of amino type nitrogen(mg/g) | | |
|---|---|---|---|
| | 숙성 2달 | 숙성 3달 | 숙성 4달 |
| 40234 | 152 | 277 | 256 |
| 46471 | 106 | 135 | 291 |
| 충무균 | 133 | 149 | 285 |

마이코톡신 프리 균주를 이용하여 제조된 메주 및 된장의 protease 효소 활성 결과는 모든 시료에서 건조 후 시료가 건조 전보다 protease 활성이 다소 높게 나타났다. 건조 후 효소 활성이 높은 이유는 건조 후 시료가 수분이 제거된 상태이므로 메주콩의 수가 많기 때문이다. 또한 마이코톡신 프리 균주 46471는 충무균에 비하여 건조 전과 후 모두 더 높은 protease 활성을 보였다. 따라서 단백분해효소 활성이 우수하며 마이코톡신 프리균주인 46471를 이용하여 제조된 메주를 이용한 된장의 AN 값이 우수할 것으로 예상된다. 그러나 시료의 주기적인 확보를 통해 단백분해효소 활성의 지속성을 평가하고, 제조된 된장의 관능평가를 통해 이미 또는 이취가 나지 않는 된장 제조에 적합한 균주를 선정하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

Table 16. Protease activity of soybean paste produced from the mycotoxin free strains.

| Samples | State of samples | Protease activity (milli-Unit/mL) |
|---|---|---|
| 충무균 | 건조 전 | 105.588 |
| | 건조 후 | 208.138 |
| 46471 | 건조 전 | 192.224 |
| | 건조 후 | 253.544 |
| 40234 | 건조 전 | 46.078 |
| | 건조 후 | 55.276 |

마이코톡신 프리 균주 40234, 46471의 protease 활성은 제조 당일에는 충무균에 비하여 높았으나 숙성기간 동안 활성이 낮아진 것으로 나타났다. 충무균의 경우 숙성 2개월째에 가장 높은 protease 활성을 보이다가 숙성 3개월째에 활성도가 감소하였고 46471의 경우 숙성 3개월째에는 충무균에 비하여 protease 활성이 높게 나타났으나 4개월째에 다시 감소하였다.

Table 17. Protease activity of Soybean paste produced from the mycotoxin free strains.

| Samples | Protease activity(milli-Unit/mL) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 제조 (‘13. 10월) | 숙성 한달 (‘13. 12월) | 숙성 두달 (‘14. 1월) | 숙성 세달 (‘14. 2월) | 숙성 네달 (‘14. 3월) |
| 40234 | 190.0 | 55.6 | 76.49 | 72.36 | 35.42 |
| 46471 | 192.2 | 58.4 | 101.12 | 114.99 | 68.27 |
| 충무균 | 105.5 | 97.3 | 184.77 | 72.79 | 81.84 |

또한, 모든 시료에서 건조 후 시료가 건조 전보다 흡광도가 낮아 amylase 활성이 다소 높은 것으로 나타났다. 건조 후 효소 활성이 높은 이유는 건조 후 시료가 수분이 제거된 상태이므로 메주콩의 수가 많기 때문이다. 또한 46471의 amylase 활성을 충무균과 비교하였을 때 다소 높게 나타나, 당화력이 우수한 것으로 보인다.

Table 18. amylase activity of Soybean paste and Meju produced from the mycotoxin free strains.

| Samples | State of samples | $Abs_{510nm}$ |
|---|---|---|
| 충무균 | 건조 전 | 0.450 |
| | 건조 후 | 0.374 |
| 46471 | 건조 전 | 0.369 |
| | 건조 후 | 0.289 |

된장시료의 amylase 활성을 측정한 결과 시료 간 활성의 차이가 크지 않아서, amylase의 활성의 변화는 시료의 유리당 중 glucose 함량을 측정하여 활성의 변화여부를 확인하였다(Table 19). 측정결과 glucose의 함량은 숙성기간이 길어짐에 따라 함량이 감소하였다. 이는 amylase의 활성이 감소에 의한 결과이며, 또한 glucose가 균주의 에너지원으로 소모되어 감소되는 것으로 보인다. glutamate의 함량은 숙성기간이 길어짐에 따라 증가함으로 보였고 이는 균주의 protease 활성에 의한 것으로 생각된다. glutamate의 함량은 숙성 3개월 이후에는 함량이 다로 감소하는 것으로 보아 우마미의 최적화를 위해서는 3개월 내외로 된장을 숙성시키는 것이 좋을 것으로 사료된다.

Table 19. Contents of free glucose and glutamate of Soybean paste produced from the mycotoxin free strains.

| Samples | period of ripening (months) | Glucose | Glutamate |
|---|---|---|---|
| 40234 | 1 | 0.180 | 0.330 |
| | 2 | 0.009 | 0.363 |
| | 3 | 0.004 | 0.423 |
| | 4 | 0.010 | 0.444 |
| 46471 | 1 | 0.316 | 0.375 |
| | 2 | 0.027 | 0.432 |
| | 3 | 0.011 | 0.470 |
| | 4 | 0.012 | 0.506 |
| 충무균 | 1 | 0.331 | 0.406 |
| | 2 | 0.094 | 0.488 |
| | 3 | 0.051 | 0.508 |
| | 4 | 0.030 | 0.496 |

마이코톡신 프리 균주를 이용한 된장제조 개발 결과 균주 46471과 40234로 제조한 된장이 protease 및 amylase 효소 활성이 가장 우수하였다. 최종적으로 마이코톡신 프리 균주를 이용한 된장제조 개발 결과 균주 46471과 40234로 제조한 된장이 관능검사 결과 우수하였고 곰팡이 독소가 검출되지 않았다. 된장의 아미노산의 연구 결과, 된장의 우마미 맛을 결정하는 Glutamic acid 함량 및  총 아미노산 함량은 숙성기간이 3개월까지 증가하다가 4개월부터는 오히려 감소하는 변화를 보였다. 된장의 아미노산은 된장의 우마미와 관련된 Arg, Asp, Glu가 다소 높게 확인 되었다. 또한 쓴맛과 관련된 아미노산인 Agr, His, Try, Val의 함량은 시료별로 다소 차이를 보였지만 일반적으로 숙성기간이 길어짐에 따라 감소함을 보였다. 단맛을 내는 proline의 함량은 간장에서 0.177 mM로 높게 나타났으며, 숙성 3달째 충무균과 40234에서 된장의 숙성기간이 길어질수록 증가함을 보였다. 따라서 숙성 기간은 3달 전후가 된장을 맛을 유지하기 위해서는 최적으로 생각된다.

## 제18 장. 마이코톡신 프리 곰팡이를 이용한 메주 제조 방법 확립(협동)

1) 제조방법

남안동 장류 가공공장과 동일한 조건에서 대두(백태)를 수세, 침수, 증자, 분쇄, 성형이 이루어지도록 하였으며 Aspergilus oryzae 46471을 105 CFU/mL 농도로 접종하였으며, 발효 및 건주 조건은 남안동 가공공장과 동일하게 온도 35℃, 상대습도 36%로 하였다. 발효 중 메주의 최초 무게인 3.5kg에서 건조 후 최종 메주 무게가 1.4kg이 되면 발효 및 건조를 멈추고 된장 제조에 시료로 사용하였다.

2) 제조결과

메주를 제조하여 남안동 가공공장 발효조건과 동일하게 실험실 배양기에서 발효시킨 결과 a-1, a-2와 같이 밀폐형 배양 중에는 습도조절의 어려움으로 메주 표면에 곰팡이가 생육하여 메주의 상품 품질이 저하되었다. 그리하여 발효 중 발생하는 수분을 제거하여 습도를 조절할 수 있도록 하여 4주간 발효 및 건조를 수행하였고 그 결과 b-1, b-2와 같은 시료를 얻었다.

Figure. 54. State of Meju during the fermentation by Aspergilus oryzae 46471

a-1(발효 2일차)

a-2(발효 3일차)

b-1(발효 7일차)

b-2(발효 및 건조 4주차)

### 2. Lactobacillus brevis GABA 100을 이용한 유산균 발효 방법 확립

1) 제조방법

위와 같은 방법으로 제조된 메주는 GABA를 생성하기 위하여 Lactobacillus brevis GABA 100을 이용하여 30℃에서 5일간 발효하였다. 유산균의 혐기적 발효는 가공공장에 적용하는데 어려움이 있어 혐기 및 호기 발효 조건을 통하여 아미노태 질소 함량, Glutamic acid, GABA 생산량을 비교하였다. 또한 염이 첨가되지 않고 호기적으로 유산균을 발효시킬 경우 부패균이 번식하여 품질 저하가 우려되어 염의 첨가 유무에 따른 유산균의 발효 정도를 확인하였다. 조건에 따른 시료는 표에 나타내었으며 대조군으로 남안동에서 생산하는 메주(이하 ADM)를 이용하였다.

Table 28. Samples of different conditions of fermentation by Lactobacillus brevis GABA 100

| Samples | Meju | State of air | Contents of salt |
|---|---|---|---|
| A1 | 46472 Meju | anaerobic | 0 |
| A2 | | aerobic | 0 |
| A3 | | aerobic | 8% |
| A4 | | anaerobic | 8% |
| B1 | 남안동 Meju | anaerobic | 0 |
| B2 | | aerobic | 0 |
| B3 | | aerobic | 8% |
| B4 | | anaerobic | 8% |

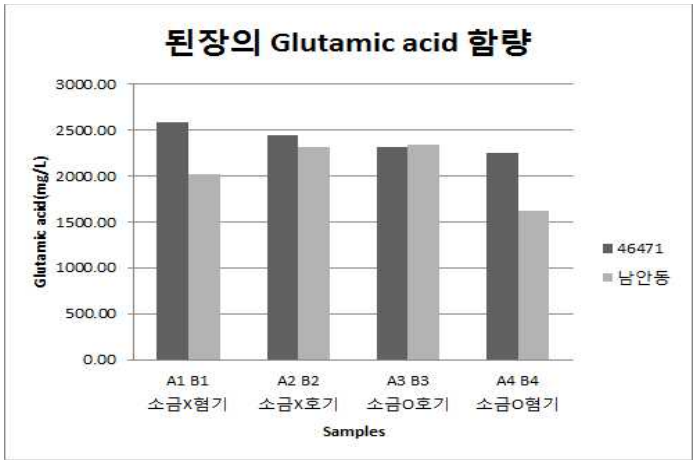
2) 유산균 배양 결과

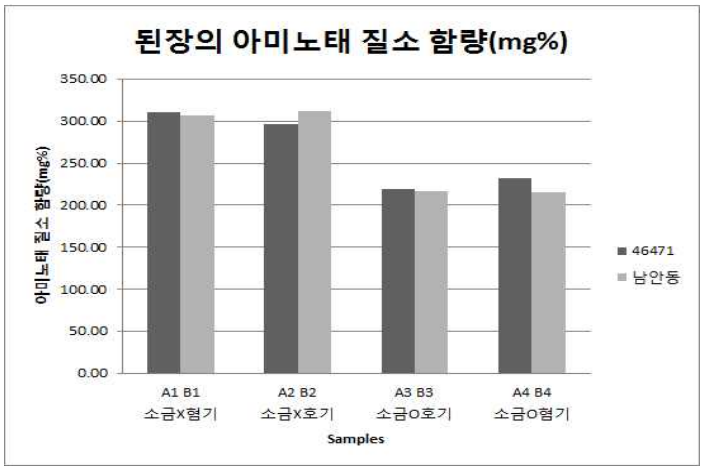
위의 각 조건별 유산균 발효 결과 아미노태 질소 함량의 경우 소금을 넣지 않고 발효시킨 발효시킨 A1, A2, B1, B2가 각각 311.1mg%, 296.3mg%, 306.5mg%, 311.7mg%으로 소금을 첨가하여 발효한 A3(219.4mg%), A4(231.8mg%), B3(216.1mg%), B4(215.3mg%)에 비하여 높게 나타났으며 호기발효와 혐기발효의 차이는 거의 없었으며 남안동 메주와 46471 균을 이용하여 발효시킨 메주의 차이도 거의 없었다. Glutamic acid 함량의 경우 46471메주를 이용하여 염을 첨가하지 않고 발효한 A1(2,582.7mg/L), A2(2,436.9mg/L)가 가장 높게 나타났으며 남안동 메주를 이용하여 호기적으로 발효한 경우 대체적으로 낮게 나타났으며 소금첨가의 유무의 차이는 거의 없었다. GABA 함량의 경우 소금을 첨가하지 않고 유산균을 발효 시킨 A1, A2, B1, B2 시료의 경우 각각 2,937.2mg/L, 2,780.7mg/L, 2,796.5mg/L, 2,916.7mg/L으로 매우 높게 나타났으며 소금을 첨가한 A3, A4, B3, B4의 GABA 함량이 각각 55.8mg/L, 42.8mg/L, 35.7mg/L, 23.0mg/L로 거의 생산되지 않았다. 따라서 유산균 발효는 혐기 발효와 호기 발효의 차이가 크지 않았으므로 장류가공공장의 실정에 맞도록 호기적으로 발효하는 것이 가능할 것으로 생각되며, 염의 첨가는 유산균의 생육 및 활성을 저해하므로 염을 첨가하지 않은 상태에서 유산균 발효해야 할 것으로 생각된다.

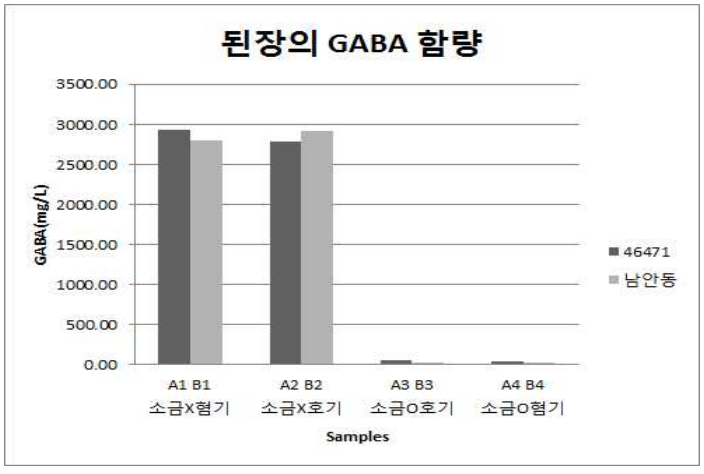
Table 29. Contents of amino type nitrogen, glutamic acid, and GABA

| Samples | 아미노태 질소 함량(mg%) | Glutamic acid(mg/L) | GABA(mg/L) |
|---|---|---|---|
| A1 | 311.1 | 2,582.7 | 2,937.2 |
| A2 | 296.3 | 2,436.9 | 2,780.7 |
| A3 | 219.4 | 2,310.7 | 55.8 |
| A4 | 231.8 | 2,244.0 | 42.8 |
| B1 | 306.5 | 2,011.8 | 2,796.5 |
| B2 | 311.7 | 2,306.4 | 2,916.7 |
| B3 | 216.1 | 2,332.2 | 35.7 |
| B4 | 215.3 | 1,620.9 | 23.0 |

Figure. 55. Contents of amino type nitrogen, glutamic acid, and GABA



### 3.된장 제조 방법 확립

1) 제조방법

된장은 Aspergilus oryzae 46741을 105 CFU/mL 농도로 접종하여 남안동 가공공장의 발효 온도 35℃, 상대습도 36%로 5일간 발효하였으며 이후 4주간 발효 및 건조하여 최초 메주 무게인 3.5kg에서 최종 메주 무게가 1.4kg이 되었을 때 발효 및 건조 완료하였다. 이후 Lactobacillus brevis GABA 100을 이용하여 염을 첨가하지 않고 호기적 상태로 30℃에서 5일간 발효하여 GABA를 생산하였으며, 이후 남안동 전통된장(염 12%)을 대조군으로 저염 된장을 생산하기 위하여 염을 5%, 8%로 낮추어 첨가하여 된장을 제조하였으며 2주간 15℃에서 숙성하면서 관찰하였다.

Table 30. Samples of soybean pastes according to salt contents.

| Samples | Meju | State of air | Contents of salt |
|---|---|---|---|
| A1 | 46471 | aerobic | 12% |
| A2 | 46471 | aerobic | 8% |
| A3 | 46471 | aerobic | 5% |

2) 제조결과

46471 균으로 제조한 메주의 유산균 발효한 후 된장을 제조하고 2주간 숙성한 결과 염 5% 첨가한 A3 된장의 경우 표면에 된장으로서의 품질이 매우 저하되는 것을 확인할 수 있었으며 아미노산 분석결과 Glutamic acid 함량은 전통된장 그대로의 염 농도 12%의 A1 에서 1,805.1mg/L로 가장 높게 나타났으며 염을 가장 적게 첨가한 A3에서 1,377.2mg/L로 가장 낮게 나타났다. GABA 함량의 경우 A3이 10,367.1mg/L으로 가장 높게 나타났으며 A1이 7,430.2mg/L으로 가장 낮게 생성되었다. 이에 저염 5%의 A3의 GABA 함량은 가장 높게 나타났으나 미생물로 인한 변패가 발생하므로 이후 실험에서는 염을 8%로 첨가하여 저염 된장을 제조하고자 한다.

Table 31. Contents of glutamic acid, and GABA of soybean pastes.

| Samples | Glutamic acid(mg/L) | GABA(mg/L) |
|---|---|---|
| A1 | 1805.1 | 7430.2 |
| A2 | 1531.6 | 8835.1 |
| A3 | 1377.2 | 10367.1 |

Figure. 56. State of soybean pastes according to salt contents.

A1 A2 A3

## 제 19장. 마이코톡신 프리 가바 함유 된장의 품질 특성 (협동)

### 1.마이코톡신 프리 곰팡이를 이용한 메주 제조 및 품질 특성

1) 메주 제조 방법

남안동 장류 가공공장에서 실제 공정에 Aspergilus oryzae 46471을 이용하여 메주를 제조하였으며 수세, 침수, 증자, 분쇄, 성형, 발효 및 건조 등 일련의 과정 중 분쇄 후 메주를 성형하는 단계에서 각각 분쇄 메주 3.5kg에 대하여 Aspergilus oryzae 46471를 105 CFU/mL의 농도로 접종하였고 발효 건조장에서 발효 및 건조가 이루어지도록 하였다. 대조군으로는 당일 동일한 대두를 이용하여 Aspergilus oryzae 46471를 접종하지 않고 제조한 남안동 전통 메주로 하였다.

2) 남안동 장류 가공공장에서 제조한 메주 및 원료의 특성

(1) 미생물 수

원료콩, 증자대두 및 메주의 미생물 수를 측정한 경과 유산균은 모든 시료에서 나타나지 않았으며 일반세균은 원료콩에서 셀 수 없이 많은 수가 검출되었으며 증자 후 감소되었으며 메주 발효 7일에 5.2×107 CFU/g으로 증가하였으며 발효 및 건조가 종료되는 시점인 4주차에 46471 메주, 남안동 메주가 각각 8.1×106, 1.7×106 CFU/g으로 감소하였다. 이는 메주의 건조에 의하여 미생물의 생육이 어려워진 것으로 생각된다. 대장균수는 대두 및 증자대두에서는 검출되지 않았으며 메주 발효 동안 소량 검출되었다. 진균수의 경우 대두에는 많이 검출되었으나 증자 후 감소하였고 이후 46471 메주의 경우 Aspergilus oryzae 46471을 접종하여 1.6×107 CFU/g으로 남안동 메주(4.9×105 CFU/g)에 비하여 에서 높게 검출되었다.

Table 32. Microflora of soybean, steamed soybean, and meju.

| Samples | Lactic acid bacteria | Aerobic bacteria | Coliform | Yeast+Mold |
|---|---|---|---|---|
| 대두 | ND | TNTC | ND | $2.5\times10^{7}$ |
| 증자대두 | ND | $4.4\times10^{1}$ | ND | $1.6\times10^{1}$ |
| 메주(7일발효) | ND | $5.2\times10^{7}$ | $4.0\times10^{0}$ | $8.3\times10^{5}$ |
| 46471(4주발효) | ND | $8.1\times10^{6}$ | $8.0\times10^{0}$ | $1.6\times10^{7}$ |
| 남안동(4주발효) | ND | $1.7\times10^{6}$ | $6.0\times10^{0}$ | $4.9\times10^{5}$ |

* Unit: CFU/g

1) TNTC: Too numerous to count.

2) ND: Not detected.

(2) 일반성분

대두(원료 콩), 증자대두 및 메주의 수분, 조회분, 조지방, 조단백질 함량은 Table 33와 같으며 이 결과는 이 등(1976)의 연구와 유사하게 나타났으며 46471 메주와 남안동 메주의 차이가 거의 없었다.

Table 33. contents of moisture, crude fat, crude protein, and crude ash of soybean, steamed soybean, and meju.

| Samples | Moisture contents(%) | Crude fat contents(%) | Crude protein contents(%) | Crude ash contents(%) |
|---|---|---|---|---|
| 대두 | 12.5 | 19.2 | 38.4 | 4.3 |
| 증자대두 | 62.1 | 9.6 | 37.8 | 1.5 |
| 메주(7일발효) | 43.1 | 14.5 | 36.8 | 2.0 |
| 46471(4주발효) | 23.1 | 19.1 | 48.3 | 3.8 |
| 남안동(4주발효) | 22.6 | 18.9 | 48.9 | 4.0 |

(3) 품질특성

대두(원료 콩), 증자대두 및 메주의 pH, 총 산도, 아미노태 질소 함량, 환원당 함량 및 아미노산 함량을 측정한 결과는 Table 28, 29에 나타내었다. pH는 메주 발효 7일째에 낮아졌다가 4주 발효 종료 후 46471, 남안동이 각각 7.3, 7.1으로 높아졌으며 46471 메주가 남안동 메주에 비하여 높았다. 총 산도는 메주 발효 7일차에 증가하였다가 종료시점에 다시 낮아졌으며 46471 메주가 남안동 메주에 비하여 낮게 나타났다. 아미노태 질소 함량의 경우 메주 4주 발효후 46471, 남안동 각각 621.30 mg/g, 486.13 mg/g으로 46471메주가 남안동에 비하여 매우 높게 측정되었다. 환원당 함량은 메주 4주 발효후 46471, 남안동 각각 1.16 %, 2.05 %으로 남안동 메주가 높게 나타났다.

Table 34. pH, total acidity, amino type nitrogen, and reducing sugar of soybean, steamed soybean, and meju.

| Samples | pH | Total acidity(%) | Contents of amino type nitrogen(mg/g) | Contents of reducing sugar(%) |
|---|---|---|---|---|
| 대두 | 6.84 | 0.46 | 167.41 | 1.22 |
| 증자대두 | 6.73 | 0.22 | 46.72 | 4.28 |
| 메주(7일발효) | 5.09 | 1.00 | 140.96 | 2.05 |
| 46471(4주발효) | 7.30 | 0.50 | 621.30 | 1.16 |
| 남안동(4주발효) | 7.10 | 0.55 | 486.13 | 2.05 |

유리 아미노산 함량을 분석한 결과 메주는 발효 기간에 따라 아미노산 함량이 증가하였으며 특히 된장의 맛을 결정하고 GABA 합성에 관여하는 Glutamic acid의 경우 매우 크게 증가하는 것을 확인하였다. 메주의 4주 발효 후 Glutamic acid의 함량이 46471, 남안동 각각 2,500.0 mg/L, 2,052.9 mg/L로 남안동에 비하여 Aspergilus oryzae 46471을 이용하여 발효시킨 46471 메주의 Glutamic acid 함량이 높게 나타났다. GABA의 함량의 경우 매우 낮게 나타났으며 46471와 남안동의 차이가 크지 않았다. 이와 같은 결과로 볼 때 차후 46471 메주가 유산균 발효를 통하여 GABA 생산하는데 더 적합할 것으로 생각된다.

Table 35. Free amino acids of soybean, steamed soybean, and meju.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | 증자대두 | 메주 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 메주(7일발효) | 46471(4주발효) | 남안동(4주발효) |
| Aspartic acid | 51.5 | 124.5 | 683.5 | 759.8 |
| **Glutamic acid** | **169.5** | **351.9** | **2,500.0** | **2,052.9** |
| asparagine | 124.7 | 120.4 | 52.3 | 26.7 |
| Serine | 19.2 | 60.0 | 380.6 | 400.1 |
| Glutamine | 2.5 | 202.8 | 576.4 | 674.4 |
| Histidine | 132.5 | 125.5 | 298.4 | 339.1 |
| Glycine | 18.0 | 38.9 | 412.5 | 347.1 |
| Threonine | 21.1 | 54.8 | 318.8 | 370.8 |
| Arginine | 417.4 | 190.8 | 45.0 | 140.0 |
| Alanine | 63.7 | 175.1 | 1,118.0 | 1,058.8 |
| **GABA** | **147.5** | **174.0** | **129.1** | **111.5** |
| Tyrosine | 34.6 | 90.1 | 413.8 | 451.0 |
| Valine | 19.0 | 70.6 | 522.7 | 555.3 |
| Methionine | 13.5 | 28.1 | 186.0 | 183.8 |
| Tryptophane | 120.6 | 106.5 | 278.1 | 256.9 |
| Phenylalanine | 46.1 | 106.6 | 496.5 | 504.6 |
| Isoleucine | 16.2 | 41.1 | 400.7 | 423.1 |
| Leucine | 17.3 | 116.4 | 651.2 | 719.6 |
| Lysine | 34.4 | 169.6 | 560.5 | 760.1 |
| proline | 16.2 | 409.7 | 979.3 | 1,422.5 |
| **Total aminoic acid** | **1,485.5** | **2,757.4** | **11,003.3** | **11,558.2** |

## 2.메주의 유산균 발효 및 품질특성

1)메주의 유산균 발효

(1) 미생물 수

제조된 메주에 Lactobacillus brevis GABA 100을 접종하여 발효시킨 결과 염을 첨가하여 발효시킨 경우 유산균이 거의 자라지 못하였으며 염을 첨가하지 않고 발효시킨 경우 46471, 남안동이 각각 8.6×108 CFU/g, 3.0×108 CFU/g으로 나타났다. 일반세균 및 대장균군의 경우에도 염에 의하여 생육이 억제되는 것을 확인 할 수 있었으며 염을 첨가하지 않은 경우 대장균군이 번식하는 것을 확인할 수 있었다. 진균수의 경우 이전 메주에서 Aspergilus oryzae 46471을 접종한 46471 메주에서 더 높게 나타났으며 염을 첨가하는 경우 진균수가 낮게 나타났다.

Table 36. Microflora of soybean, steamed soybean, and meju fermented by Lactobacillus brevis GABA 100.

| Samples | Salt contents | Lactic acid bacteria | Aerobic bacteria | Coliform | Yeast+Mold |
|---|---|---|---|---|---|
| 46471 메주 | 0% | $8.6\times10^{8}$ | $7.2\times10^{7}$ | $4.0\times10^{2}$ | $1.0\times10^{6}$ |
| | 8% | $3.7\times10^{1}$ | $8.0\times10^{5}$ | $1.0\times10^{0}$ | $5.5\times10^{5}$ |
| | 12% | $6.3\times10^{1}$ | $9.3\times10^{5}$ | $1.0\times10^{0}$ | $3.6\times10^{5}$ |
| 남안동 메주 | 0% | $3.0\times10^{8}$ | $2.7\times10^{7}$ | $2.8\times10^{2}$ | $1.2\times10^{5}$ |
| | 8% | $4.2\times10^{1}$ | $1.2\times10^{5}$ | $1.0\times10^{0}$ | $4.7\times10^{4}$ |
| | 12% | $2.7\times10^{1}$ | $1.0\times10^{5}$ | $1.7\times10^{0}$ | $6.7\times10^{4}$ |

* Unit: CFU/g

1) TNTC: Too numerous to count.

2) ND: Not detected.

(2) 유리 아미노산 측정 결과

유산균 발효된 메주의 유리 아미노산을 측정한 결과 염을 첨가하지 않고 배양한 군에서 glutamic acid의 함량이 낮고 GABA 함량이 높게 나타났다. 이는 유산균에 의해서 glutamic acid가 GABA로 전환된 것이며 염을 첨가한 경우에는 유산균의 작용이 저해된 것으로 생각된다. 또한 46471 메주가 남안동 메주에 비하여 GABA 함량이 매우 높게 나타났다.

Table 37. Free amino acids of soybean, steamed soybean, and meju fermented by Lactobacillus brevis GABA 100.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | 46471 메주 | | | 남안동 메주 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0% | 8% | 12% | 0% | 8% | 12% |
| Aspartic acid | 333.8 | 324.3 | 485.9 | 144.2 | 683.8 | 580.6 |
| **Glutamic acid** | **1678.3** | **1094.4** | **2031.1** | **1411.8** | **2058.5** | **1761.1** |
| asparagine | 67.0 | 87.1 | 113.7 | 5.7 | 193.8 | 189.5 |
| Serine | 159.1 | 204.2 | 240.0 | 68.2 | 465.2 | 411.8 |
| Glutamine | 823.0 | 729.2 | 1078.3 | 424.4 | 743.4 | 469.7 |
| Histidine | 207.6 | 174.6 | 263.3 | 165.0 | 296.8 | 240.3 |
| Glycine | 389.8 | 310.9 | 427.1 | 235.1 | 363.2 | 289.8 |
| Threonine | 230.5 | 236.0 | 380.7 | 163.1 | 408.4 | 362.9 |
| Arginine | 18.5 | 28.4 | 31.1 | 13.3 | 106.7 | 252.5 |
| Alanine | 816.9 | 688.2 | 943.5 | 608.5 | 928.4 | 697.3 |
| **GABA** | **308.6** | **198.7** | **194.6** | **53.0** | **35.0** | **22.4** |
| Tyrosine | 177.8 | 124.4 | 201.3 | 260.2 | 335.4 | 317.0 |
| Valine | 598.4 | 563.2 | 716.5 | 413.0 | 645.5 | 518.5 |
| Methionine | 176.1 | 170.2 | 232.0 | 139.6 | 166.0 | 120.7 |
| Tryptophane | 181.3 | 194.1 | 234.8 | 135.5 | 198.2 | 185.2 |
| Phenylalanine | 672.4 | 648.9 | 820.9 | 474.4 | 635.8 | 566.6 |
| Isoleucine | 540.5 | 498.7 | 673.6 | 361.2 | 575.4 | 482.7 |
| Leucine | 906.0 | 858.4 | 1092.8 | 619.6 | 902.0 | 780.0 |
| Lysine | 657.0 | 333.4 | 784.3 | 353.9 | 568.0 | 535.6 |
| proline | 671.6 | 433.7 | 635.6 | 513.1 | 875.1 | 501.3 |
| **Total aminoic acid** | **9,614.2** | **7,901.2** | **11,581.0** | **6,562.9** | **11,184.4** | **9,285.3** |

### 3. 마이코톡신 프리 가바 함유 된장 제조 및 품질특성

1) 마이코톡신 프리 전통 된장의 마이코톡신 분석결과

조건별로 제조된 46471 된장, 남안동 된장 각각의 시료를 숙성기간에 따라 아플라톡신을 분석한 결과 모든 시료에서 아플라톡신이 검출되지 않았다(Table 38).

Table 38. Contents of mycotoxin in Soybean paste produced by Aspergilus oryzae 46471.

| Samples | kind of mycotoxin | Contents of mycotoxin during the ripening(month) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| F1 | aflatoxin | ND[1)] | ND | ND | ND | ND |
| F2 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |
| F3 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |
| F4 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |
| F5 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |
| F6 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |
| F7 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |
| F8 | aflatoxin | ND | ND | ND | ND | ND |

1)ND: Not detected.

2) GABA 및 유리 아미노산 분석

마이코톡신 프리 균주 Aspergilus oryzae 46471를 이용하여 메주를 만들고 Lactobacillus brevis GABA 100로 유산균 발효여 제조한 46471 된장 시료와 남안동 메주를 이용하여 담근 된장의 유리아미노산 함량을 분석하였다(Table 14-18).

분석결과 GABA 함량은 모든 시료에서 숙성기간에 따라 증가하는 경향을 보였다. 숙성 4개월의 GABA 함량은 46471메주를 이용하여 유산균 발효한 저염 된장 시료인 F2 시료에서 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 46471메주를 이용하여 유산균 발효하지 않은 저염 된장 F4, 남안동 메주를 이용하여 유산균 발효한 저염 된장 F6 순으로 높게 나타났다. 저염된장(8%) 시료인 F2, 4, 6, 8의 GABA 함량은 일반 된장(12%) 시료인 F1, 3, 5, 7에 비하여 높게 나타났으며 유산균을 발효시킨 경우(F1, 2, 5, 6) 발효시키지 않은 된장 시료(F3, 4, 7, 8)보다 높게 나타났다. 남안동 가공공장에서 제조되는 된장과 동일하게 제조된 된장 시료 F7의 경우 GABA 함량이 가장 낮게 나타났다.

Glutamic acid 함량 또한 모든 시료에서 숙성기간에 따라 4개월 동안 지속적으로 증가하는 경향을 보였다. 4개월 숙성 후 Glutamic acid 함량은 남안동 전통 된장인 남안동 메주를 이용하여 유산균 발효하지 않고 제조된 일반된장 시료 F7이 가장 높게 나타났으며, 일반 염 농도의 된장(12%) 시료 F1, 3, 5, 7이 저염된장(8%) 시료 F2, 4, 6, 8에 비하여 매우 높게 나타났다. 46471 메주를 이용하여 유산균을 발효시키지 않은 시료 F3, 4가 유산균을 발효시킨 시료 F3, 4에 비하여 약간 높았으나 거의 차이는 없었다. 남안동 메주를 이용하여 된장을 제조한 경우 유산균을 발효시키지 않은 시료 F7, 8이 유산균을 발효시킨 시료 F5, 6에 비하여 매우 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 숙성 중 유산균의 지속적인 작용으로 Glutamic acid가 GABA로 전환된 것으로 보이며 염 함량이 낮은 저염된장에서 유산균의 생육이 더욱 활발하게 일어난 것으로 생각된다. 또한 Aspergilus oryzae 46471을 이용하여 메주를 제조한 후 Lactobacillus brevis GABA 100을 접종하여 유산균 발효 후 저염에서 숙성할 경우 GABA 함량이 높은 된장을 제조할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 39. Free amino acids of soybean pastes on the day of soybean paste manufactured.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 |
| Aspartic acid | 356.4 | 172.1 | 682.2 | 996.9 | 281.1 | 170.7 | 356.4 | 502.0 |
| **Glutamic acid** | **2273.9** | **1704.9** | **1837.8** | **2468.5** | **1701.2** | **1234.8** | **1955.6** | **1800.0** |
| asparagine | 125.8 | 66.6 | 218.7 | 313.4 | 17.9 | 22.5 | 77.3 | 85.9 |
| Serine | 304.6 | 174.2 | 362.8 | 600.7 | 339.2 | 190.7 | 319.6 | 448.8 |
| Glutamine | 1561.0 | 1543.5 | 1691.8 | 2150.6 | 776.1 | 869.6 | 906.7 | 944.2 |
| Histidine | 499.8 | 439.8 | 490.9 | 650.2 | 321.6 | 350.7 | 374.8 | 315.3 |
| Glycine | 687.5 | 812.2 | 656.4 | 841.5 | 432.7 | 465.5 | 473.1 | 362.3 |
| Threonine | 447.9 | 285.3 | 469.2 | 644.6 | 361.9 | 365.6 | 393.8 | 430.8 |
| Arginine | 33.0 | 35.6 | 30.5 | 31.7 | 61.3 | 65.8 | 41.4 | 67.6 |
| Alanine | 1325.0 | 1527.2 | 1327.8 | 1635.0 | 896.4 | 928.4 | 946.2 | 828.8 |
| **GABA** | **806.8** | **1365.0** | **888.8** | **1069.3** | **409.6** | **838.0** | **409.0** | **186.0** |
| Tyrosine | 239.6 | 207.7 | 281.0 | 259.1 | 327.9 | 238.7 | 366.4 | 313.4 |
| Valine | 1004.7 | 1040.8 | 964.2 | 1209.6 | 659.6 | 712.7 | 702.1 | 608.3 |
| Methionine | 326.0 | 333.0 | 264.8 | 317.0 | 198.2 | 228.3 | 196.2 | 170.8 |
| Tryptophane | 327.1 | 401.6 | 366.0 | 402.8 | 289.4 | 338.9 | 291.8 | 251.8 |
| Phenylalanine | 1200.3 | 1309.4 | 1125.4 | 1351.1 | 799.0 | 915.2 | 861.3 | 726.9 |
| Isoleucine | 1027.3 | 1066.2 | 965.0 | 1232.8 | 657.7 | 722.6 | 708.2 | 584.2 |
| Leucine | 1621.9 | 1726.4 | 1520.5 | 1903.8 | 1076.3 | 1215.7 | 1148.9 | 984.2 |
| Lysine | 1084.9 | 1033.1 | 975.4 | 1007.5 | 556.5 | 688.8 | 758.9 | 776.1 |
| proline | 770.4 | 864.0 | 698.9 | 1027.5 | 564.8 | 544.0 | 488.4 | 487.3 |
| **Total aminoic acid** | **16023.9** | **16108.7** | **15818.1** | **20113.6** | **10728.4** | **11107.2** | **11776.2** | **10874.6** |

Table 40. Free amino acids of soybean pastes aged for a month.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 |
| Aspartic acid | 912.6 | 2513.7 | 1581.5 | 803.2 | 1105.1 | 1031.5 | 1184.9 | 1848.2 |
| **Glutamic acid** | **2879.5** | **2724.9** | **2954.8** | **1879.4** | **3198.6** | **1425.0** | **3093.3** | **4747.4** |
| asparagine | 218.0 | 320.2 | 238.7 | 175.0 | 73.2 | 92.5 | 84.4 | 183.1 |
| Serine | 841.9 | 1091.7 | 1048.5 | 519.3 | 1133.1 | 717.4 | 1025.8 | 1517.3 |
| Glutamine | 1165.4 | 945.5 | 1021.4 | 930.4 | 777.2 | 393.5 | 716.2 | 1126.9 |
| Histidine | 926.4 | 1261.4 | 865.3 | 832.2 | 760.6 | 948.3 | 866.2 | 891.7 |
| Glycine | 1069.9 | 1503.1 | 929.0 | 1369.8 | 744.8 | 1041.3 | 870.7 | 875.4 |
| Threonine | 996.0 | 1357.6 | 959.6 | 1014.2 | 932.7 | 1121.0 | 950.0 | 1211.6 |
| Arginine | 69.9 | 44.5 | 57.7 | 124.8 | 93.9 | 147.5 | 94.1 | 139.0 |
| Alanine | 1923.4 | 2503.1 | 1815.9 | 2351.3 | 1578.7 | 1866.4 | 1623.0 | 1786.3 |
| **GABA** | **2188.5** | **4165.4** | **1823.9** | **3649.5** | **1174.0** | **3569.1** | **1578.1** | **838.5** |
| Tyrosine | 365.9 | 298.9 | 399.5 | 340.0 | 677.6 | 475.9 | 475.7 | 518.2 |
| Valine | 1733.1 | 2324.7 | 1598.2 | 2027.7 | 1421.6 | 1717.2 | 1479.4 | 1631.3 |
| Methionine | 527.9 | 579.0 | 418.0 | 631.5 | 382.6 | 505.3 | 382.7 | 407.3 |
| Tryptophane | 233.9 | 273.2 | 265.2 | 254.8 | 261.5 | 320.2 | 284.0 | 316.5 |
| Phenylalanine | 1847.6 | 2286.5 | 1684.7 | 2178.9 | 1608.1 | 1968.9 | 1646.6 | 1803.1 |
| Isoleucine | 1803.6 | 2381.8 | 1625.5 | 2127.3 | 1446.8 | 1773.1 | 1530.8 | 1653.7 |
| Leucine | 2674.5 | 3436.8 | 2410.7 | 3151.0 | 2205.7 | 2755.6 | 2294.6 | 2513.4 |
| Lysine | 1680.4 | 1869.2 | 1501.4 | 1810.1 | 1303.1 | 1606.8 | 1341.9 | 1628.8 |
| proline | 1655.4 | 2504.4 | 1558.4 | 1895.4 | 1658.5 | 1615.9 | 1448.8 | 1920.6 |
| **Total aminoic acid** | **25713.9** | **34385.6** | **24757.8** | **28066.0** | **22537.6** | **25092.2** | **22971.1** | **27558.3** |

Table 41. Free amino acids of soybean pastes aged for 2 months.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 |
| Aspartic acid | 1489.6 | 3344.8 | 2344.3 | 1533.3 | 1643.8 | 1705.3 | 1763.7 | 2571.6 |
| **Glutamic acid** | **4120.3** | **3125.3** | **4641.1** | **2447.3** | **4451.8** | **1796.5** | **4297.9** | **6464.0** |
| asparagine | 150.0 | 210.4 | 182.8 | 155.5 | 78.0 | 91.4 | 83.5 | 174.7 |
| Serine | 1060.7 | 1436.4 | 1475.7 | 573.3 | 1446.2 | 1084.8 | 1370.4 | 1976.6 |
| Glutamine | 646.9 | 454.8 | 692.8 | 524.9 | 489.0 | 315.5 | 436.4 | 767.8 |
| Histidine | 980.6 | 1282.8 | 944.1 | 933.0 | 854.9 | 1071.9 | 966.7 | 1142.9 |
| Glycine | 1255.0 | 1798.7 | 1211.8 | 1818.2 | 917.5 | 1382.1 | 1107.6 | 1145.3 |
| Threonine | 1212.9 | 1670.5 | 1284.0 | 1394.0 | 1181.0 | 1418.2 | 1217.2 | 1556.4 |
| Arginine | 67.3 | 46.5 | 67.0 | 119.3 | 106.3 | 124.4 | 103.6 | 126.5 |
| Alanine | 2137.0 | 2806.4 | 2258.7 | 2776.0 | 1842.2 | 2182.6 | 1904.8 | 2162.8 |
| **GABA** | **2311.8** | **5252.2** | **2109.0** | **4846.7** | **1282.9** | **4612.6** | **1863.3** | **1050.5** |
| Tyrosine | 380.6 | 234.5 | 482.6 | 230.7 | 790.8 | 476.9 | 504.6 | 566.3 |
| Valine | 1986.4 | 2677.7 | 2041.2 | 2530.6 | 1720.6 | 2094.7 | 1799.6 | 2059.2 |
| Methionine | 580.7 | 663.3 | 530.7 | 745.9 | 451.8 | 584.4 | 451.9 | 501.3 |
| Tryptophane | 359.7 | 618.6 | 651.9 | 589.1 | 414.7 | 552.1 | 327.5 | 277.5 |
| Phenylalanine | 2048.1 | 2530.6 | 2114.3 | 2483.9 | 1871.3 | 2256.7 | 1925.1 | 2187.0 |
| Isoleucine | 2117.6 | 2788.4 | 2125.6 | 2656.7 | 1787.7 | 2180.7 | 1888.0 | 2125.7 |
| Leucine | 3058.9 | 3961.5 | 3100.5 | 3825.0 | 2654.4 | 3273.8 | 2767.8 | 3140.1 |
| Lysine | 2257.9 | 2728.3 | 2266.4 | 2502.3 | 1816.7 | 2347.5 | 2039.5 | 2517.3 |
| proline | 1480.3 | 2183.1 | 1534.3 | 1961.4 | 1458.4 | 1555.7 | 1401.5 | 1686.4 |
| **Total aminoic acid** | **29702.4** | **39814.8** | **32058.8** | **34647.0** | **27259.8** | **31107.8** | **28220.5** | **34200.0** |

Table 42. Free amino acids of soybean pastes aged for 3 months.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 |
| Aspartic acid | 2162.7 | 4263.8 | 3196.8 | 2545.1 | 2151.0 | 2713.7 | 2572.7 | 3698.5 |
| **Glutamic acid** | **6175.9** | **3922.4** | **6727.7** | **3938.5** | **6298.3** | **3183.3** | **6657.4** | **8741.5** |
| asparagine | 238.8 | 220.2 | 325 | 205.7 | 116.5 | 81.4 | 158.4 | 253.4 |
| Serine | 738.8 | 1784.9 | 2067.6 | 909 | 1715.9 | 1407.5 | 109.8 | 2700.1 |
| Glutamine | 505.6 | 365.7 | 524.5 | 431.6 | 424 | 289 | 239.6 | 517.9 |
| Histidine | 1030.6 | 1453.7 | 1075.4 | 1044.4 | 925.1 | 1192.9 | 967.8 | 1067.5 |
| Glycine | 1848.6 | 2411.8 | 1693.3 | 2597.8 | 1406.2 | 2018.9 | 1795.7 | 1572.3 |
| Threonine | 1054.8 | 2129.5 | 1720.9 | 1731.9 | 1398.7 | 1479.5 | 805.9 | 2069.6 |
| Arginine | 26.9 | 69.3 | 73 | 81.6 | 43.4 | 52.3 | 35 | 91.9 |
| Alanine | 2480.6 | 3117.2 | 2661.9 | 3280.2 | 2146.6 | 2636.2 | 2356 | 2643.3 |
| **GABA** | **2029.2** | **6139.2** | **1796.2** | **5193.4** | **1051.5** | **4707.3** | **1775.9** | **912.8** |
| Tyrosine | 273.9 | 278.2 | 647.5 | 272.3 | 594.6 | 406.6 | 24.1 | 740.2 |
| Valine | 2467.9 | 3164.8 | 2685.6 | 3172.9 | 2141.9 | 2648 | 2469.3 | 2849.8 |
| Methionine | 623.6 | 845.6 | 706.8 | 849.8 | 458.3 | 660.8 | 617.3 | 701.2 |
| Tryptophane | 337.5 | 697.4 | 655.2 | 346.1 | 316.7 | 277.7 | 542.2 | 626.8 |
| Phenylalanine | 2299.4 | 2718.7 | 2498.3 | 2841.7 | 2084.2 | 2646.1 | 2338.4 | 2690.9 |
| Isoleucine | 2454.6 | 3099.6 | 2621.8 | 3215.8 | 2070.3 | 2691 | 2405 | 2735.8 |
| Leucine | 3505.7 | 4267.1 | 3680.4 | 4570.5 | 3006.9 | 3917.4 | 3387.8 | 3921.4 |
| Lysine | 2598.1 | 3561.5 | 2590.6 | 2917.5 | 2004.4 | 3133.8 | 2462.4 | 2937.3 |
| proline | 3386.9 | 2795.1 | 2627.6 | 4604.3 | 2807.8 | 3176.4 | 2331.5 | 3083.8 |
| **Total aminoic acid** | **36240** | **47305.8** | **40576.1** | **44750** | **33162.1** | **39319.9** | **34052.3** | **44555.9** |

Table 43. Free amino acids of soybean pastes aged for 4 months.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 |
| Aspartic acid | 3154.3 | 5405.4 | 3892.7 | 3548.9 | 3070.7 | 3827.8 | 4775.0 | 3332.1 |
| **Glutamic acid** | **7852.1** | **4554.1** | **7853.7** | **4477.3** | **7745.7** | **3524.6** | **10860.7** | **7897.0** |
| asparagine | 230.6 | 251.2 | 268.1 | 166.0 | 143.5 | 122.5 | 234.8 | 137.4 |
| Serine | 2056.6 | 2542.6 | 2553.0 | 1179.7 | 2535.9 | 2310.7 | 3425.6 | 2485.5 |
| Glutamine | 316.3 | 219.5 | 387.8 | 265.0 | 287.3 | 188.0 | 415.6 | 226.7 |
| Histidine | 1599.0 | 1674.3 | 1366.5 | 1381.1 | 1270.0 | 1576.0 | 1557.5 | 1251.8 |
| Glycine | 2146.9 | 2813.0 | 1861.4 | 3026.5 | 1483.2 | 2327.6 | 1994.3 | 1806.4 |
| Threonine | 2010.0 | 2570.5 | 2039.7 | 2273.8 | 1973.9 | 2433.4 | 2588.8 | 2045.7 |
| Arginine | 77.4 | 109.2 | 95.6 | 207.1 | 145.3 | 196.4 | 198.7 | 123.2 |
| Alanine | 3236.4 | 3933.4 | 3151.3 | 4006.5 | 2739.6 | 3303.3 | 3307.1 | 2923.8 |
| **GABA** | **2447.5** | **6616.9** | **1976.5** | **6281.3** | **1234.7** | **5891.2** | **1136.0** | **1912.4** |
| Tyrosine | 857.0 | 341.1 | 874.4 | 272.7 | 1397.2 | 759.8 | 938.1 | 899.9 |
| Valine | 3482.8 | 4047.8 | 3278.0 | 4071.2 | 2940.6 | 3517.1 | 3623.7 | 3105.4 |
| Methionine | 1060.0 | 1122.8 | 925.6 | 1249.1 | 797.1 | 1017.1 | 922.4 | 826.8 |
| Tryptophane | 771.3 | 1017.5 | 821.6 | 910.3 | 691.6 | 770.1 | 814.7 | 738.1 |
| Phenylalanine | 3229.2 | 3494.2 | 3096.2 | 3477.2 | 2918.4 | 3471.1 | 3438.9 | 3035.6 |
| Isoleucine | 3420.5 | 4083.3 | 3230.9 | 4093.1 | 2876.9 | 3590.5 | 3519.6 | 3098.5 |
| Leucine | 4883.0 | 5742.9 | 4614.0 | 5765.7 | 4198.7 | 5137.9 | 5078.4 | 4436.4 |
| Lysine | 3413.3 | 3803.8 | 3161.1 | 3567.1 | 2701.7 | 3494.7 | 3866.5 | 3146.0 |
| proline | 2681.0 | 3312.5 | 2824.3 | 3597.2 | 2369.2 | 2868.1 | 3466.7 | 2302.8 |
| **Total aminoic acid** | **48925.2** | **57655.8** | **48272.4** | **53816.7** | **43521.3** | **50328.1** | **56162.9** | **45731.5** |

3) 일반적인 특성 분석

(1) 미생물 수

된장의 유산균 수는 유산균을 접종한 F1, F2, F5, F6의 경우 초기에 106 CFU/mL 의 농도로 나타나다가 이후 숙성 중 46471 메주로 제조한 된장 F1, 2에서 107 CFU/mL로 증가한 후 일정량을 유지하였다. 유산균을 접종하지 않은 된장 시료 F3, F4, F7, F8에서는 초기에 104 CFU/mL 의 농도였으나 이후 숙성 중 106-7 CFU/mL 의 농도로 증가하였고 이 수준을 유지하였다. 일반세균수의 경우 숙성 기간 중 106-7 CFU/mL 의 농도를 유지하였으며 대장균군의 수는 숙성 초기에는 일부 검출되었으나 숙성 3개월 이후부터는 모든 시료에서 검출되지 않았다. 진균수의 경우 숙성 중 모든 시료에서 104-5 CFU/mL로 변화가 없었다.

Table 44. Microflora of soybean paste during the ripening.

| Samples | Period of ripening (months) | Lactic acid bacteria | Aerobic bacteria | Coliform | Yeast+Mold |
|---|---|---|---|---|---|
| F1 | 0 | $4.7\times10^{6}$ | $1.2\times10^{1}$ | $6.0\times10^{0}$ | $4.5\times10^{5}$ |
| | 1 | $4.5\times10^{7}$ | $2.6\times10^{1}$ | $3.7\times10^{0}$ | $5.1\times10^{5}$ |
| | 2 | $1.8\times10^{7}$ | $1.5\times10^{7}$ | $6.0\times10^{0}$ | $5.2\times10^{4}$ |
| | 3 | $1.7\times10^{7}$ | $7.2\times10^{6}$ | ND | $2.2\times10^{5}$ |
| | 4 | $1.7\times10^{7}$ | $6.2\times10^{6}$ | ND | $2.6\times10^{5}$ |
| F2 | 0 | $5.2\times10^{6}$ | $2.5\times10^{7}$ | $7.3\times10^{0}$ | $4.9\times10^{5}$ |
| | 1 | $3.1\times10^{7}$ | $1.8\times10^{7}$ | $3.2\times10^{1}$ | $2.7\times10^{5}$ |
| | 2 | $2.0\times10^{7}$ | $3.0\times10^{7}$ | $6.7\times10^{1}$ | $4.4\times10^{5}$ |
| | 3 | $1.9\times10^{7}$ | $7.6\times10^{6}$ | ND | $1.8\times10^{5}$ |
| | 4 | $1.1\times10^{7}$ | $7.7\times10^{6}$ | ND | $1.9\times10^{5}$ |
| F3 | 0 | $1.3\times10^{4}$ | $1.1\times10^{7}$ | $2.0\times10^{0}$ | $3.7\times10^{5}$ |
| | 1 | $2.2\times10^{7}$ | $2.4\times10^{7}$ | $2.0\times10^{0}$ | $2.6\times10^{5}$ |
| | 2 | $1.1\times10^{7}$ | $1.3\times10^{7}$ | ND | $4.6\times10^{5}$ |
| | 3 | $1.6\times10^{7}$ | $1.9\times10^{7}$ | ND | $1.8\times10^{5}$ |
| | 4 | $1.5\times10^{7}$ | $4.7\times10^{6}$ | ND | $2.0\times10^{5}$ |
| F4 | 0 | $3.7\times10^{4}$ | $5.0\times10^{7}$ | $4.3\times10^{0}$ | $2.7\times10^{5}$ |
| | 1 | $5.1\times10^{7}$ | $2.6\times10^{7}$ | $4.3\times10^{1}$ | $4.6\times10^{5}$ |
| | 2 | $1.0\times10^{7}$ | $1.2\times10^{7}$ | $1.3\times10^{0}$ | $4.7\times10^{5}$ |
| | 3 | $2.9\times10^{7}$ | $2.4\times10^{7}$ | ND | $2.0\times10^{5}$ |
| | 4 | $1.9\times10^{7}$ | $1.9\times10^{7}$ | ND | $1.7\times10^{5}$ |
| F5 | 0 | $6.4\times10^{6}$ | $1.8\times10^{7}$ | $5.3\times10^{0}$ | $3.0\times10^{5}$ |
| | 1 | $5.6\times10^{7}$ | $2.3\times10^{6}$ | $1.3\times10^{0}$ | $5.4\times10^{4}$ |
| | 2 | $2.8\times10^{6}$ | $1.9\times10^{6}$ | ND | $7.9\times10^{4}$ |
| | 3 | $5.0\times10^{6}$ | $5.1\times10^{6}$ | ND | $1.2\times10^{5}$ |
| | 4 | $1.5\times10^{6}$ | $1.8\times10^{6}$ | ND | $4.2\times10^{5}$ |
| F6 | 0 | $4.3\times10^{6}$ | $3.2\times10^{7}$ | $4.0\times10^{0}$ | $1.1\times10^{5}$ |
| | 1 | $2.6\times10^{7}$ | $4.5\times10^{6}$ | ND | $5.9\times10^{4}$ |
| | 2 | $1.1\times10^{6}$ | $1.2\times10^{6}$ | ND | $3.0\times10^{4}$ |
| | 3 | $7.4\times10^{6}$ | $5.8\times10^{6}$ | ND | $6.3\times10^{4}$ |
| | 4 | $3.0\times10^{6}$ | $2.6\times10^{6}$ | ND | $1.9\times10^{5}$ |
| F7 | 0 | $3.6\times10^{4}$ | $3.9\times10^{7}$ | $5.0\times10^{0}$ | $2.5\times10^{5}$ |
| | 1 | $2.2\times10^{7}$ | $3.5\times10^{6}$ | ND | $1.5\times10^{4}$ |
| | 2 | $1.4\times10^{6}$ | $1.4\times10^{6}$ | ND | $1.4\times10^{4}$ |
| | 3 | $3.8\times10^{6}$ | $3.5\times10^{6}$ | ND | $3.7\times10^{4}$ |
| | 4 | $1.9\times10^{6}$ | $2.7\times10^{6}$ | ND | $1.5\times10^{5}$ |
| F8 | 0 | $4.4\times10^{4}$ | $2.1\times10^{7}$ | $7.0\times10^{0}$ | $1.4\times10^{5}$ |
| | 1 | $1.6\times10^{7}$ | $4.5\times10^{6}$ | ND | $3.4\times10^{4}$ |
| | 2 | $2.0\times10^{6}$ | $2.8\times10^{6}$ | ND | $1.7\times10^{4}$ |
| | 3 | $4.9\times10^{6}$ | $3.5\times10^{6}$ | ND | $6.0\times10^{4}$ |
| | 4 | $2.7\times10^{6}$ | $2.1\times10^{6}$ | ND | $1.8\times10^{5}$ |

* Unit: CFU/g

1) TNTC: Too numerous to count.

2) ND: Not detected.

(2) 일반성분 함량

수분함량은 모든 된장 시료에서 55.0-61.4%로 나타났으며 숙성기간이 지남에 따라 약간 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 조지방의 경우 7.9-8.4% 각각의 조건에 따른 차이가 없었으며 숙성기간에 따른 유의적인 변화가 없었다. 조지방의 경우 13.0-15.8%로 조건 및 숙성기간에 따른 변화가 없었다.

Table 45. Proximate composition of soybean paste during the ripening.

| Samples | Period of ripening (months) | Moisture contents(%) | Crude fat contents(%) | Crude protein contents(%) |
|---|---|---|---|---|
| F1 | 0 | 59.4 | 8.2 | 13.6 |
| | 1 | 58.9 | 8.3 | 13.0 |
| | 2 | 56.3 | 8.2 | 13.8 |
| | 3 | 56.8 | 8.3 | 13.8 |
| | 4 | 56.4 | 8.3 | 13.9 |
| F2 | 0 | 61.4 | 7.9 | 15.4 |
| | 1 | 60.9 | 8.0 | 14.4 |
| | 2 | 60.3 | 8.1 | 15.0 |
| | 3 | 59.4 | 8.0 | 14.8 |
| | 4 | 59.4 | 8.1 | 14.8 |
| F3 | 0 | 59.5 | 8.2 | 15.3 |
| | 1 | 58.6 | 8.2 | 13.8 |
| | 2 | 56.4 | 8.1 | 13.8 |
| | 3 | 56.9 | 8.2 | 13.9 |
| | 4 | 56.1 | 8.1 | 14.1 |
| F4 | 0 | 61.5 | 8.2 | 14.3 |
| | 1 | 61.5 | 8.1 | 14.3 |
| | 2 | 59.4 | 8.2 | 15.2 |
| | 3 | 60.1 | 8.2 | 14.3 |
| | 4 | 58.9 | 8.3 | 14.3 |
| F5 | 0 | 57.5 | 8.3 | 15.0 |
| | 1 | 56.6 | 8.2 | 14.0 |
| | 2 | 54.5 | 8.2 | 14.3 |
| | 3 | 55.2 | 8.2 | 14.1 |
| | 4 | 55.0 | 8.3 | 14.1 |
| F6 | 0 | 61.1 | 8.2 | 14.9 |
| | 1 | 60.8 | 8.1 | 15.7 |
| | 2 | 59.3 | 8.1 | 15.8 |
| | 3 | 59.3 | 8.3 | 14.4 |
| | 4 | 58.3 | 8.2 | 14.4 |
| F7 | 0 | 60.8 | 8.2 | 14.0 |
| | 1 | 59.4 | 8.3 | 13.2 |
| | 2 | 57.9 | 8.3 | 13.8 |
| | 3 | 58.0 | 8.4 | 13.2 |
| | 4 | 57.1 | 8.3 | 13.3 |
| F8 | 0 | 59.4 | 8.2 | 15.3 |
| | 1 | 59.0 | 8.2 | 14.3 |
| | 2 | 56.1 | 8.1 | 15.0 |
| | 3 | 58.0 | 8.2 | 14.9 |
| | 4 | 56.6 | 8.2 | 14.8 |

(3) 염도 및 회분 함량

제조된 된장의 염도는 기존의 남안동 된장과 같은 염도로 제조된 된장 시료 F1, 2, 5, 6는 12.0-12.2%로 나타났으며 저염으로 제조한 된장은 8.1-8.3%로 나타났다. 된장 시료의 회분 함량은 염도 12%로 제조된 된장 F1, 2, 5, 6가 13.4-14.0%로 나타났으며 저염으로 제조된 된장 시료 F3, 4, 7, 8의 경우 9.2-9.6%로 나타났다. 이러한 회분 함량의 차이는 염 첨가량에 따른 것으로 보인다.

Table 46. Salt contents of soybean paste during the ripening.

| Samples | Period of ripening(months) | Salt contents(%) | Crude ash contents(%) |
|---|---|---|---|
| F1 | 0 | 12.3 | 14.0 |
| | 1 | 12.2 | 14.0 |
| | 2 | 12.1 | 13.6 |
| | 3 | 12.1 | 13.7 |
| | 4 | 12.2 | 14.0 |
| F2 | 0 | 8.2 | 9.4 |
| | 1 | 8.3 | 9.5 |
| | 2 | 8.3 | 9.6 |
| | 3 | 8.2 | 9.4 |
| | 4 | 8.2 | 9.5 |
| F3 | 0 | 12.1 | 13.6 |
| | 1 | 12.0 | 13.5 |
| | 2 | 12.1 | 13.5 |
| | 3 | 12.0 | 13.5 |
| | 4 | 12.1 | 13.3 |
| F4 | 0 | 8.3 | 9.4 |
| | 1 | 8.3 | 9.3 |
| | 2 | 8.3 | 9.2 |
| | 3 | 8.2 | 9.5 |
| | 4 | 8.2 | 9.2 |
| F5 | 0 | 12.1 | 13.8 |
| | 1 | 12.2 | 13.8 |
| | 2 | 12.2 | 13.6 |
| | 3 | 12.1 | 13.4 |
| | 4 | 12.2 | 13.7 |
| F6 | 0 | 8.2 | 9.2 |
| | 1 | 8.1 | 9.1 |
| | 2 | 8.1 | 9.1 |
| | 3 | 8.2 | 9.1 |
| | 4 | 8.2 | 9.2 |
| F7 | 0 | 12.2 | 13.7 |
| | 1 | 12.2 | 13.8 |
| | 2 | 12.1 | 13.8 |
| | 3 | 12.1 | 13.5 |
| | 4 | 12.2 | 13.6 |
| F8 | 0 | 8.2 | 9.4 |
| | 1 | 8.2 | 9.5 |
| | 2 | 8.1 | 9.6 |
| | 3 | 8.2 | 9.5 |
| | 4 | 8.2 | 9.4 |

(4) pH 및 산도 측정

종류별로 제조된 된장의 pH와 총 산도는 Table 47, 48에 각각 나타내었으며 모든 종류의 된장에서 pH는 숙성 기간에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 숙성 초기 유산균을 배양한 시료(F1,2,5,6)의 pH가 6.60-6.66으로 유산균을 배양하지 않은 시료(F3,4,7,8)의 pH 6.92-7.00에 비하여 낮게 나타났으나 숙성 4개월째에는 저염된장(F2,4,6,8)이 pH 5.81-5.98로 일반된장(F1,3,5,7)에 비하여 낮게 나타났다. 된장의 총 산도는 pH 측정 결과와 반대로 모든 종류으 된장에서 숙성기간에 따라 증가하였다. 숙성 초기 유산균을 배양한 시료(F1,2,5,6)의 총 산도가 0.47-0.49%로 유산균을 배양하지 않은 시료(F3,4,7,8)의 0.29-0.32%에 비하여 높았으나 숙성 4개월째에는 저염된장(F2,4,6,8)이 1.59-1.87%로 일반된장(F1,3,5,7) 1.02-1.07%에 비하여 높게 나타났다.

일반적으로 된장 숙성 중 pH와 산도는 숙성 중 당질 및 단백질의 분해정도와 작용 미생물, 효소 등에 따라 영향을 받는데 이러한 미생물의 작용으로 glutamic acid, aspartic acid, phosphoric acid 등 이 생성되어 pH가 저하되고 산도가 증가된다. 이는 유 등(2001)의 연구에서 적정산도가 숙성 90일 후 증가하였다고 보고한 결과와 유사하였다. 또한 산도는 신맛과 향미에 영향을 주는 인자로, 발효 식품에서 품질에 영향을 주는 주요인자 중 하나이다(Joo 등 1997). 된장 시료의 발효과정에 증식하는 젖산균과 같은 산 생성균이나 구균 등의 작용으로 유기산이 증가하여 pH가 낮아지는 것으로 사료된다(Seo 등 1992, Kim 2005).

Table 47. Proximate composition of soybean paste during the ripening.

| Samples | pH | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| F1 | 6.65 | 6.46 | 6.41 | 6.35 | 6.22 |
| F2 | 6.66 | 6.37 | 6.21 | 6.03 | 5.82 |
| F3 | 6.92 | 6.52 | 6.38 | 6.29 | 6.11 |
| F4 | 7.00 | 6.33 | 6.30 | 6.12 | 5.81 |
| F5 | 6.64 | 6.34 | 6.27 | 6.19 | 6.12 |
| F6 | 6.60 | 6.32 | 6.16 | 6.07 | 5.98 |
| F7 | 6.97 | 6.56 | 6.31 | 6.20 | 6.12 |
| F8 | 6.98 | 6.32 | 6.19 | 6.02 | 5.93 |

Table 48. Proximate composition of soybean paste during the ripening.

| Samples | Total acidity(%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| F1 | 0.48 | 0.62 | 0.79 | 0.92 | 1.03 |
| F2 | 0.49 | 0.78 | 1.16 | 1.57 | 1.87 |
| F3 | 0.32 | 0.66 | 0.81 | 0.99 | 1.02 |
| F4 | 0.31 | 0.71 | 0.98 | 1.32 | 1.79 |
| F5 | 0.47 | 0.68 | 0.83 | 0.96 | 1.05 |
| F6 | 0.48 | 0.87 | 1.32 | 1.43 | 1.59 |
| F7 | 0.29 | 0.57 | 0.91 | 1.01 | 1.07 |
| F8 | 0.31 | 0.71 | 1.25 | 1.55 | 1.80 |

5) 아미노태 질소 함량

모든 종류의 된장에서 아미노태 질소 함량은 숙성 기간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 아미노태 질소 함량은 46471 메주를 이용하며 유산균 발효한 저염된장 시료 F2가 1,123.2 mg%으로 가장 높게 나타났으며 그 다음으로 46471 메주로 유산균 발효하지 않은 저염된장 시료 F4가 1,094.2mg%, 남안동 메주로 만든 저염된장 F8이 922.3 mg% 순으로 높게 나타났다. 된장의 숙성 기간 중 아미노태 질소 함량은 된장의 숙성도는 평가하는데 활용할 수 있는 품질지표가 될 수 있다. 윤 등(1977)은 된장 숙성 40-50 경에 아미노태 질소 함량이 최고치에 도달한 이후 감소한다고 보고하였고 김 등(2007)은 60일간 숙성하는 동안 아미노태 질소 함량이 지속적으로 증가하는 것으로 보고하였다. 박 등(2000)의 연구에서 시판 전통된장의 아미노태 질소 함량은 308.4 mg%, 가정제조 된장 345.3mg%, 전통식 제조 된장 423.2mg%이라고 보고한 결과와 본 실험 결과를 비교하면 본 실험결과는 월등히 높은 아미노태 질소 함량을 보인다.

Table 49. Amino type nitrogen contents of soybean paste during the ripening.

| Samples | Contents of amino type nitrogen(mg%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| F1 | 644.0 | 716.8 | 802.7 | 860.8 | 901.2 |
| F2 | 781.2 | 846.5 | 1,012.7 | 1,097.9 | 1,123.2 |
| F3 | 597.3 | 741.1 | 787.7 | 810.3 | 852.3 |
| F4 | 750.4 | 879.2 | 983.7 | 1,053.9 | 1,094.2 |
| F5 | 660.8 | 629.1 | 677.6 | 794.4 | 850.2 |
| F6 | 658.0 | 720.5 | 829.7 | 863.5 | 902.2 |
| F7 | 617.9 | 713.1 | 730.8 | 785.6 | 823.2 |
| F8 | 618.8 | 691.6 | 798.9 | 853.1 | 922.3 |

## 제20 장. 마이코톡신 프리 가바 함유 저염된장 제조 방법 확립 (협동)

### 1. 유통 중인 재래된장 시료분석

1) 시료

판매중인 남안동 재래된장을 포함하여 서울 시중에 유통되고 있는 전통방법으로 제조된 재래된장을 8개를 수거하여 아미노산 및 GABA 함량을 측정하고 된장과 각 된장으로 만든 장국을 5점 척도로 맛, 향, 색상, 전체적인 기호도를 평가하는 관능평가를 수행하였다.

2) 시중에 유통되는 전통 된장의 아미노산 및 GABA 함량

서울 시중에 유통되는 전통된장의 아미노산 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같이 나타났다. 맛과 관련된 아미노산은 일반적으로 sweet amino acid인 Gly, Ala, Ser, Thr, Prp, 우마미 관련 아미노산 Asp, Glu, bitter amino acid와 관련된 Val, Met, Ile, Lue, Tyr, Phe, His, Arg 등이 있다. 시료 SP에서 우마미와 관련된 아미노산인 Aspartic acid, Glutamic acid이 각각 5,998.2 mg/L, 20,151.0 mg/L로 다른 시료에 비하여 높게 나타났지만 쓴맛을 내는 아미노산인 Val, Met, Ile, Lue, Tyr, Phe, His, Arg이 3,340.0 mg/L, 975.4 mg/L, 3,563.0 mg/L, 5,794.4 mg/L, 2,712.1 mg/L, 3,645.6 mg/L, 1,194.6 mg/L으로 가장 높게 나타났으며 GABA 함량은 100.1 mg/L로 낮게 나타났다. 시중에 유통 중인 된장 시료의 GABA 함량은 61.9 - 201.5 mg/L으로 다양하게 나타났으며, 남안동 된장의 경우 GABA 함량이 2,051.6 mg/L로 시중에 유통 중인 재래 된장에 비하여 약 20 - 30배 정도 높게 나타났다. 또한 남안동 된장의 경우 우마미와 관련된 아미노산인 Aspartic acid, Glutamic acid이 각각 1,521.2 mg/L, 8,535.0 mg/L로 높게 나타났으며 쓴맛을 내는 아미노산인 Val, Met, Ile, Lue이 각각 4,038.7 mg/L, 1,094.3 mg/L, 3,749.3 mg/L, 5,250.3 mg/L으로 높게 나타났다.

Table 3. Free amino acids of soybean pastes

(Unit: mg/L)

| Samples | SS | JP | SP | S-1 | S-2 | HC-1 | HC-2 | 남안동된장 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Aspartic acid | 776.7 | 2,601.9 | 5,998.2 | 2,877.7 | 2,716.5 | 415.9 | 1,407.6 | 1,521.2 |
| **Glutamic acid** | **3,165.1** | **9,629.9** | **20,151.0** | **16,732.1** | **9,248.8** | **4,593.2** | **3,654.4** | **8,535.0** |
| asparagine | 90.0 | 147.3 | 93.3 | 179.7 | 20.6 | 201.2 | 113.5 | 39.4 |
| Serine | 687.6 | 3,532.3 | 3,799.1 | 2,296.7 | 2,097.0 | 961.5 | 1,158.7 | 1,680.5 |
| Glutamine | 368.8 | 153.2 | 101.4 | 262.7 | 1,302.0 | 168.7 | 1,048.7 | 58.1 |
| Histidine | 213.3 | 385.2 | 1,194.6 | 546.1 | 765.4 | 184.5 | 480.9 | 475.5 |
| Glycine | 430.3 | 1,745.3 | 2,044.4 | 1,106.2 | 1,030.9 | 391.3 | 575.5 | 2,718.4 |
| Threonine | 535.2 | 2,705.7 | 2,953.2 | 1,863.2 | 1,534.7 | 800.0 | 898.7 | 1,477.5 |
| Arginine | 1,399.3 | 103.0 | 4,466.5 | 2,610.9 | 4,150.7 | 775.9 | 2,425.0 | 51.3 |
| Alanine | 822.7 | 4,972.4 | 3,533.3 | 2,640.2 | 2,079.0 | 1,703.6 | 1,263.3 | 8,592.9 |
| **GABA** | **144.5** | **61.9** | **100.1** | **137.8** | **180.3** | **190.7** | **201.5** | **2,051.6** |
| Tyrosine | 460.9 | 656.0 | 2,712.1 | 1,482.6 | 1,704.1 | 461.8 | 1,047.4 | 533.9 |
| Valine | 570.6 | 2,838.0 | 3,340.0 | 2,225.3 | 1,790.3 | 1,114.0 | 1,093.5 | 4,038.7 |
| Methionine | 229.4 | 832.3 | 975.4 | 647.4 | 634.8 | 374.1 | 386.6 | 1,094.3 |
| Tryptophane | 67.4 | 162.0 | 437.7 | 330.5 | 291.4 | 107.6 | 188.5 | 1,060.4 |
| Phenylalanine | 703.3 | 3,229.4 | 3,645.6 | 2,831.7 | 2,450.9 | 1,588.1 | 1,498.1 | 3,127.7 |
| Isoleucine | 430.5 | 3,216.4 | 3,563.0 | 2,394.6 | 1,879.8 | 1,018.2 | 1,032.4 | 3,749.3 |
| Leucine | 1,101.3 | 5,019.2 | 5,794.4 | 4,282.1 | 3,679.1 | 2,320.5 | 2,215.1 | 5,250.3 |
| Lysine | 906.1 | 3,015.2 | 3,925.6 | 3,046.6 | 2,769.8 | 1,620.9 | 1,651.1 | 4,914.8 |
| Proline | 1,134.3 | 4,811.9 | 3,003.5 | 2,064.5 | 2,910.0 | 1,384.9 | 1,898.2 | 2,147.3 |
| **총 아미노산 함량** | **14,237.2** | **49,818.5** | **71,832.6** | **50,558.3** | **43,236.0** | **20,376.6** | **24,238.7** | **53,118.1** |

3) 시중에 유통되는 된장의 관능평가 결과

서울 시중에 유통되는 된장과 이를 이용하여 만든 장국의 맛, 향, 색상, 전체적인 기호도의 관능을 평가한 결과는 Table4, 5, Fig.1에 나타내었다. 된장의 관능평가 결과 맛은 SS 시료가 3.7로 가장 높게 나타났으며 남안동 된장은 1.7로 가장 낮은 점수를 받았다. 향의 경우 SP 시료가 3.8, 색상은 HC-1 시료가 4.0으로 가장 높게 나타났으며, 전체적인 기호도는 SS, S-2 시료가 동일하게 3.7점으로 높게 나타났다. 그에 비하여 남안동 된장의 전체적인 기호도는 JP와 동일하게 1.8점으로 가장 낮게 나타났다.

각각의 된장을 이용하여 만든 장국을 관능 평가한 결과 시료 S-1이 맛, 색상, 전체적인 기호도에서 각각 4.0, 4.0, 4.1로 가장 높게 나타났으며 향은 S-2 시료가 3.8로 높게 나타났다. 남안동 재래 된장의 경우 맛, 향, 전체적인 기호도가 각각 1.5, 1.7, 1.7로 모든 시료 중 가장 낮았다.

따라서 남안동 재래된장은 관능적으로 개선할 필요가 있을 것으로 보이며 본 연구를 통하여 GABA 함량이 높고 저염의 마이코톡신 프리 된장을 제조하여 비교하고자 한다. 또한 제조된 된장과 시중에 유통중인 된장 중 관능평가 결과가 가장 우수하였던 SS, S-1 시료를 관능평가하여 관능적으로 시장 경쟁력을 가질 수 있는지를 평가하고자 한다.

Table 4. The sensory evaluation results of soybean pastes in markets.

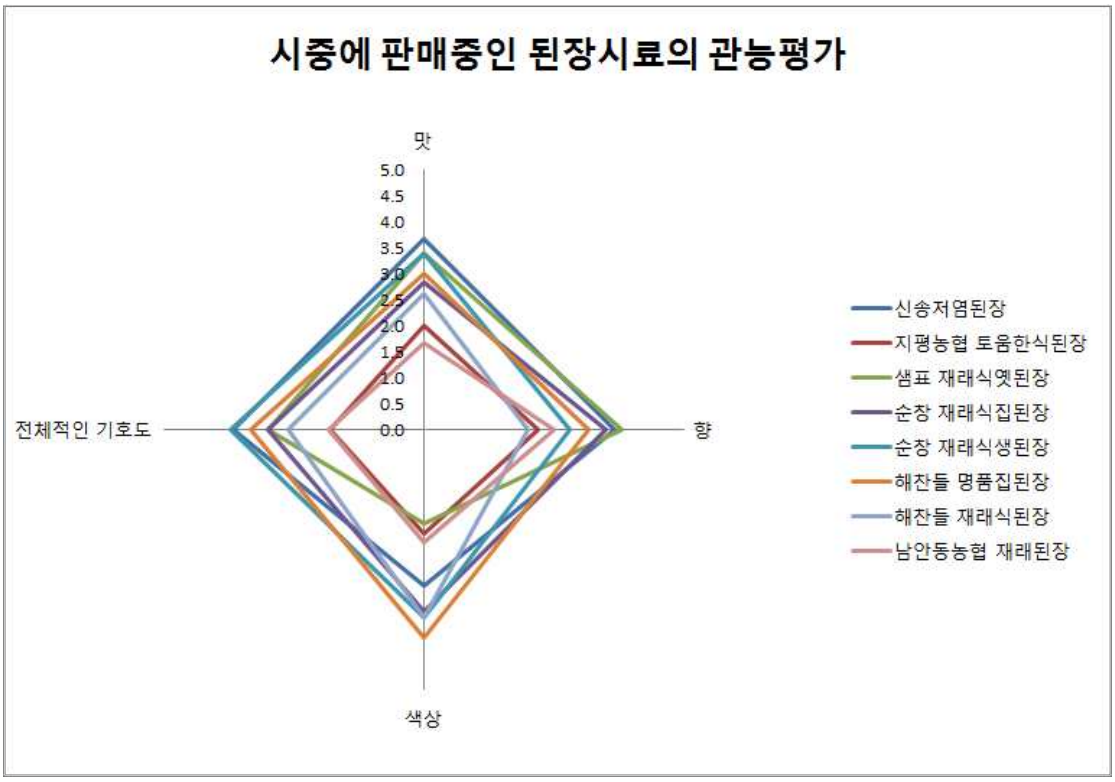
| Samples | SS | JP | SP | S-1 | S-2 | HC-1 | HC-2 | *남안동 된장* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| taste | **3.7** | 2.0 | 3.4 | 2.8 | 3.4 | 3.0 | 2.6 | *1.7* |
| flavor | 3.7 | 2.2 | **3.8** | 3.5 | 2.8 | 3.2 | 2.0 | *2.5* |
| color | 3.0 | 2.0 | 1.8 | 3.5 | 3.6 | **4.0** | 3.6 | *2.2* |
| overall preference | **3.7** | 1.8 | 3.0 | 3.0 | **3.7** | 3.3 | 2.6 | *1.8* |

Unit: score

Table 5. The sensory evaluation results of soybean paste soups.

| Samples | SS | JP | SP | S-1 | S-2 | HC-1 | HC-2 | *남안동 된장* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| taste | 2.4 | 2.5 | 2.7 | **4.0** | 3.2 | 2.2 | 2.2 | *1.5* |
| flavor | 3.4 | 2.3 | 2.2 | 3.6 | **3.8** | 1.8 | 3.0 | *1.7* |
| color | 2.0 | 3.2 | 3.3 | **4.0** | 2.8 | 3.2 | 3.4 | *3.0* |
| overall preference | 2.6 | 2.7 | 2.7 | **4.1** | 3.5 | 2.4 | 2.6 | *1.7* |

Unit: score



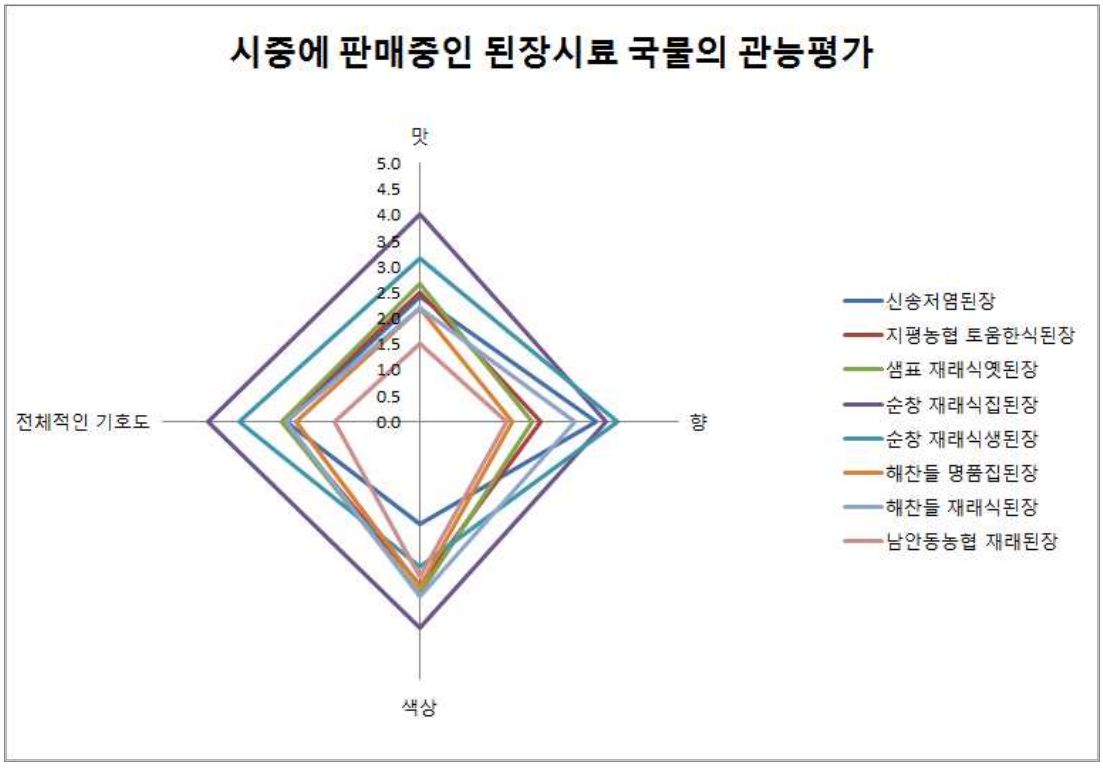




Fig. 1. The sensory evaluation results of soybean pastes and soups.

## 2. 유산균을 이용한 메주 발효 가능성 확인

1) 제조방법

장류 가공공장에서 된장 제조 중 GABA를 다량 생산하기 위한 유산균을 접종 시기를 결정하기 위하여 1차 예비 실험으로 메주제조 및 발효 시 *Asp. oryzae* 46471과 *Lac. brevis* 이 혼합 배양이 가능한지 검토하였다. 남안동 장류 가공공장과 동일한 조건에서 대두(백태)를 수세, 침수, 증자, 분쇄, 성형이 이루어지도록 하였으며 메주 및 된장 제조 시 첨가되는 균주는 *Asp. oryzae* 46471는 $10^5$ CFU/g, *Lac. brevis* 는 $10^{7-8}$ CFU/g 농도로 접종하였으며, 8일 동안 메주의 향과 외관을 관찰하였다.

2) 결과

*Lac. brevis* 와 *Asp. oryzae* 46741을 혼합 배양한 메주를 관찰한 결과 다음과 같았다. 배양 중 메주에서 약간의 시큼한 냄새가 발생하지만 건조가 지속적으로 일어나며 *Asp. oryzae* 46471이 배양되는 것이 확인되어 *Lac. brevis*과 *Asp. oryzae* 46471이 혼합배양이 가능할 것으로 판단하였다.

Table 6. The appearance and odor of Meju using *Lac. brevis* and *Asp. oryzae* 46741.

| Date | Appearance | Odor |
|---|---|---|
| 0일차 | 겉과 안이 모두 촉촉한 상태 | 콩 찐 냄새 남<br>신 냄새 나지 않음 |
| 1일차 | 안쪽은 촉촉한 상태<br>겉이 마름 | 구수한 냄새 약간 남<br>신 냄새 나지 않음 |
| 2일차 | 겉부터 계속 마르고 있음<br>메주 표면에 흰색 점 있음 | 구수한 냄새 약간 남<br>신 냄새 나지 않음 |
| 3일차 | 겉부터 계속 마르고 있음<br>메주 표면에 흰색 점 있음 | 구수한 냄새 약간 남<br>신 냄새 나지 않음 |
| 4일차 | 겉부터 계속 마르고 있음<br>메주 표면에 흰색 점 있음 | 구수한 냄새 약간 남<br>신 냄새 미세하게 남 |
| 5일차 | 겉부터 계속 마르고 있음<br>메주 표면 및 안쪽에 흰색 점 있음 | 표면에서는 냄새 안남<br>안쪽에서 신 냄새 약간 남 |
| 6일차 | 겉부터 계속 마르고 있음<br>메주에 흰색 점 마름 | 표면에서는 냄새 안남<br>안쪽에서 신 냄새 남 |
| 7일차 | 겉부터 계속 마르고 있음<br>메주에 흰색 점 마름 | 표면에서는 냄새 안남<br>안쪽에서 신 냄새 남 |
| 8일차 | 겉부터 계속 마르고 있음<br>메주에 흰색 점 마름 | 표면에서는 냄새 안남<br>안쪽에서 시큼한 냄새 남 |

## 3. 마이코톡신 프리 균주와 GABA 생산 유산균을 이용한 된장 제조 방법 확립

1) 제조방법

마이코톡신 프리 GABA 함유 저염된장을 제조하기 위하여 실험적으로 Table 7, Fig.2와 같은 된장 시료를 제조하였다. 남안동 장류 가공공장과 동일한 조건에서 대두(백태)를 수세, 침수, 증자, 분쇄, 성형이 이루어지도록 하였으며 메주 및 된장 제조 시 첨가되는 균주는 *Asp. oryzae* 46471는 $10^5$ CFU/g, *Lac. brevis* 는 $10^{7-8}$ CFU/g 농도로 접종하였으며, 발효 및 건조 조건은 남안동 가공공장과 동일하게 온도 35 ℃, 상대습도 36 %로 하였다. 발효 중 메주의 최초 무게인 3.5 kg에서 건조 후 최종 메주 무게가 1.4 kg이 되면 발효 및 건조를 멈추고 된장 제조에 시료로 사용하였다. 건조된 메주는 저염 된장을 제조하기 위하여 남안동 소금물 염도(18 %)보다 낮은 14 %의 염도에서 10일 동안 수침시켜 부드럽게 한 후 이겨서 된장을 제조하였다. 각각의 된장은 Table 1, Fig. 1과 같이 제조하였으며 3주간 20 - 25 ℃에서 숙성하면서 유산균수, pH, 산도, 아미노태 질소 함량, 염도, 유리아미노산(GABA 포함) 함량을 측정하였다.

Table 7. Manufacturing process of samples.

| Samples | Strain | Method of production |
|---|---|---|
| Control-1 | - | 균주 접종하지 않고 된장 제조 |
| Control-2 | - | 균주를 접종하지 않고 최종에 GABA 분말 첨가하여 된장 제조 |
| A-1 | *Asp. oryzae* 46471 | 메주에 46471을 접종하여 발효하여 된장 제조 |
| A-2 | *Asp. oryzae* 46471, *Lac. brevis* | 메주에 46471을 접종하여 발효시킨 후 된장 제조 시 유산균을 접종하여 발효 및 숙성 |
| B | *Asp. oryzae* 46471, *Lac. brevis* | 메주에 46471과 유산균을 동시에 접종하여 발효시킨 후 된장 제조 |
| C | *Lac. brevis* | 메주에 유산균을 접종하여 발효시킨 후 된장 제조 |

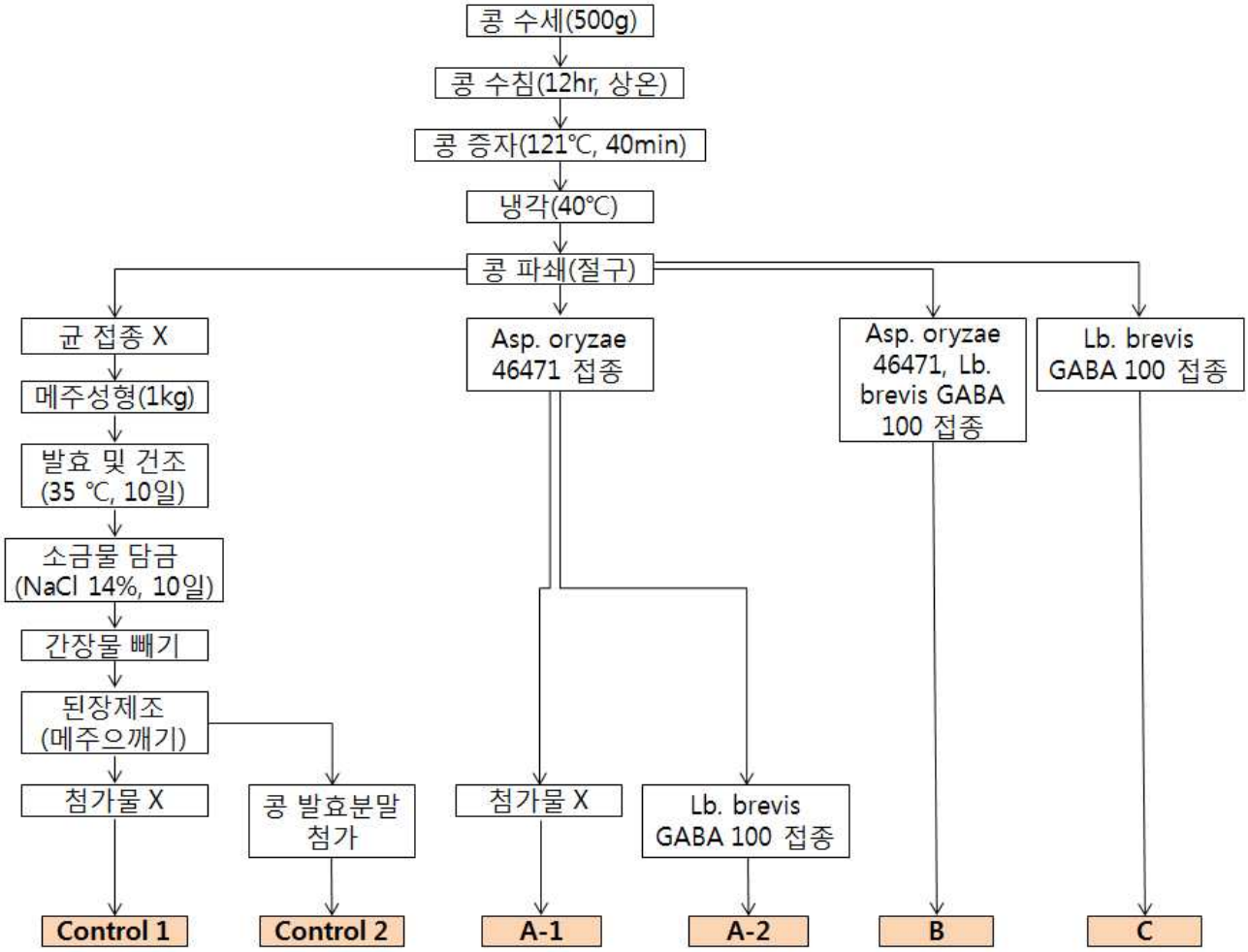



Fig. 2. Manufacturing process of samples.

2) 결과

(1) 유산균 수

유산균 수를 측정한 결과는 Fig. 3과 같이 나타났다. *Lac. brevis* 를 접종하지 않은 Control 1, 2, A-1은 유산균이 검출되지 않았으며, *Lac. brevis*를 접종한 A-2, B, C에서는 된장 제조 당일에 비하여 3주 숙성 후 유산균 수가 증가하였다. 그 중에서도 *Asp. oryzae* 46471을 접종하여 메주를 제조하고 된장제조 시 *Lac. brevis*를 첨가하여 숙성한 A-2가 가장 높게 검출되었고 *Lac. brevis* 와 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 배양한 메주를 이용하여 제조한 된장인 B가 가장 낮게 검출되었다.

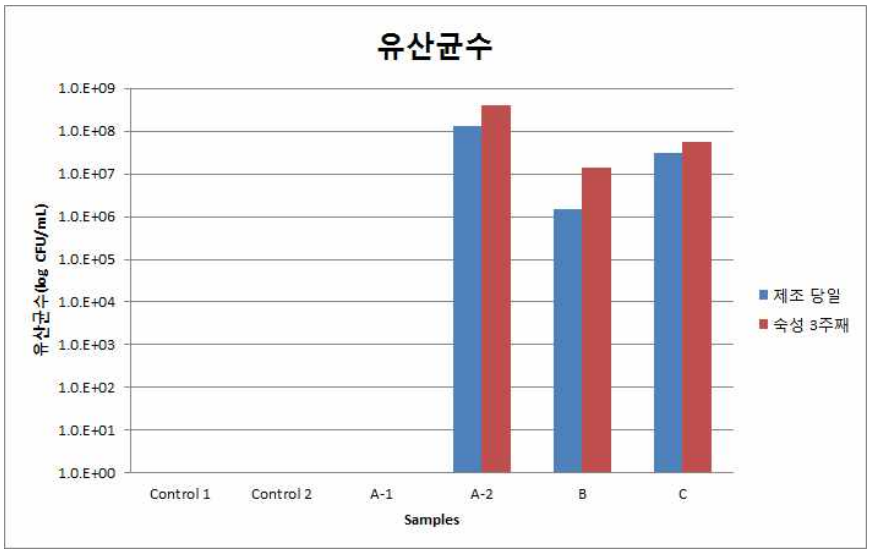



Fig. 3. The number of lactic acid bacteria in soybean pastes during ripening.

(2) pH

각각 된장의 제조 당일 및 3주 숙성 후의 pH는 Fig.4와 같이 나타났다. 모든 시료에서 된장 제조 당일에 비하여 3주 숙성 뒤 된장의 pH가 높게 나타났다.

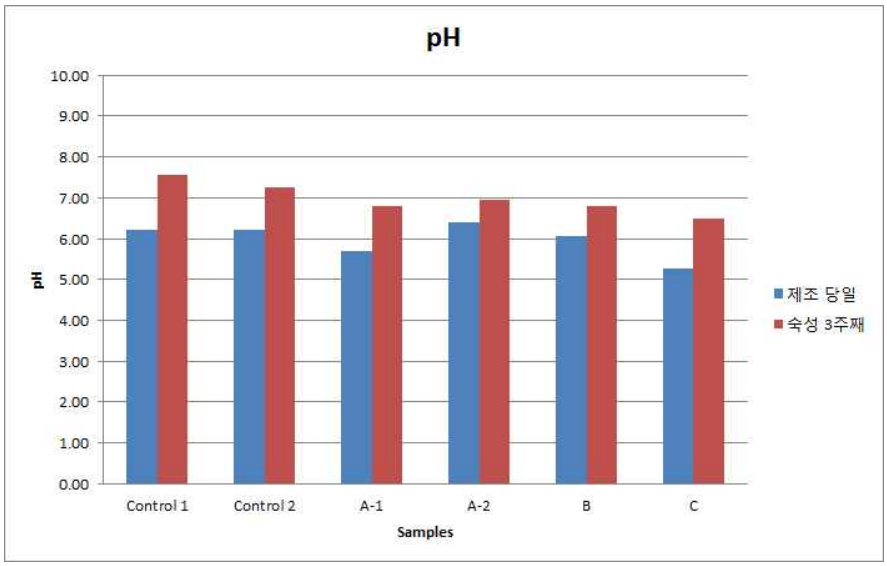



Fig. 4. The pH of soybean pastes during ripening.

(3) 산도

된장 시료의 산도(%)를 측정한 결과는 Fig.5와 같았다. 제조 당일에는 어떤 균주도 접종하지 않은 Control 1, Control 2의 산도가 가장 낮게 나타났으며, 메주에 *Asp.*

*oryzae* 46741만 접종한 A-1, A-2가 그 다음으로 높게 나타났고, *Lac. brevis*와 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 접종하여 발효시킨 메주를 이용한 B 된장이 가장 높게 나타났다. 3주 숙성 후에 모든 시료에서 산도가 증가하였으며 된장제조 시 *Lac. brevis*를 접종한 A-1에서 가장 많이 증가하였고 *Lac. brevis*와 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 접종하여 발효시킨 메주를 이용한 B 된장이 가장 높게 나타났다.

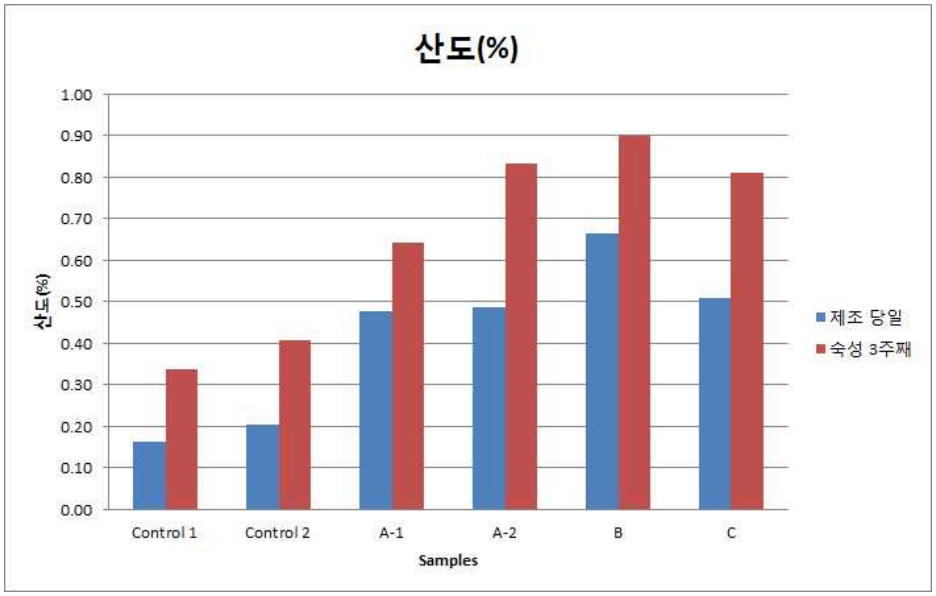



Fig. 5. The total acidity of soybean pastes during ripening.

(4) 염도

염도(%)를 측정한 결과는 Fig. 6과 같았다. 제조 당일에는 균일하지 않은 시료로 인하여 각각 된장의 염도가 일정하지 않았으나 3주 숙성 후 균질해진 된장시료의 염도를 분석한 결과 염도 8-9%로 기존의 남안동 된장의 염도 14 %에 비하여 낮게 나타났다.

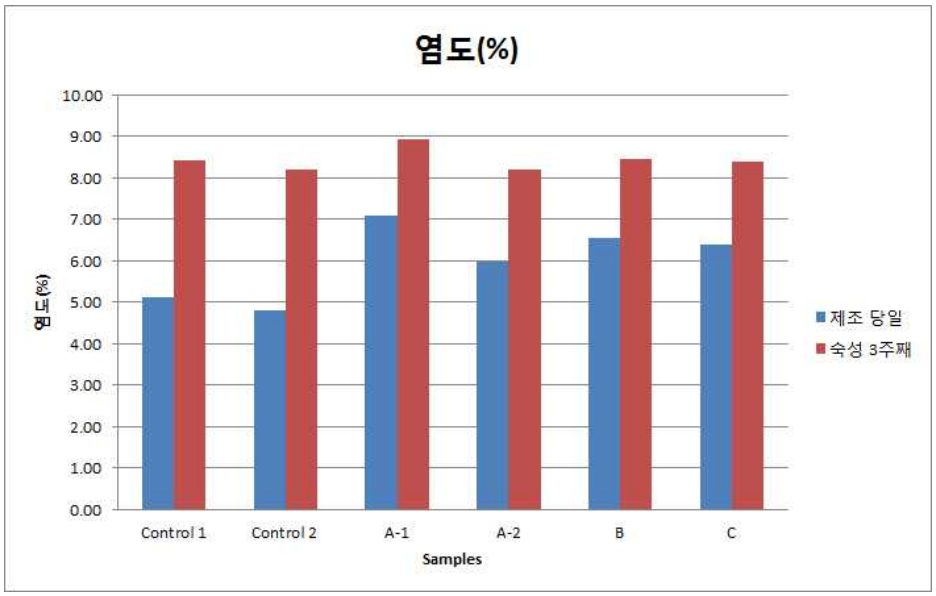



Fig. 6. The salt contents of soybean pastes during ripening.

(5) 아미노태 질소 함량

아미노태 질소 함량의 경우 3주 숙성 후 모든 된장에서 아미노태 질소 함량이 증가하였다(Fig.7). *Asp. oryzae* 46471만 접종한 메주를 이용하여 제조한 된장 A-1은 *Lac. brevis*만 접종한 메주를 이용하여 제조한 된장 C에 비하여 높게 나타났다. *Lac. brevis*와 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 배양한 메주를 이용하여 제조한 된장 B에 비하여 *Asp. oryzae* 46471로 발효시킨 메주를 이용하여 된장 제조 시에 *Lac. brevis*를 첨가한 A-2에서 더 높게 검출되었다. 이는 *Asp. oryzae* 46471이나 *Lac. brevis*를 메주에 단독 배양하는 것보다 혼합 배양하는 것이 아미노태 질소 함량 증가에 영향을 주며, 또한 메주에 *Lac. brevis*와 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 배양하는 것보다 *Lac. brevis*를 된장 제조 시에 따로 접종하는 것이 아미노태 질소 함량 증가에 효과적일 것으로 생각된다.

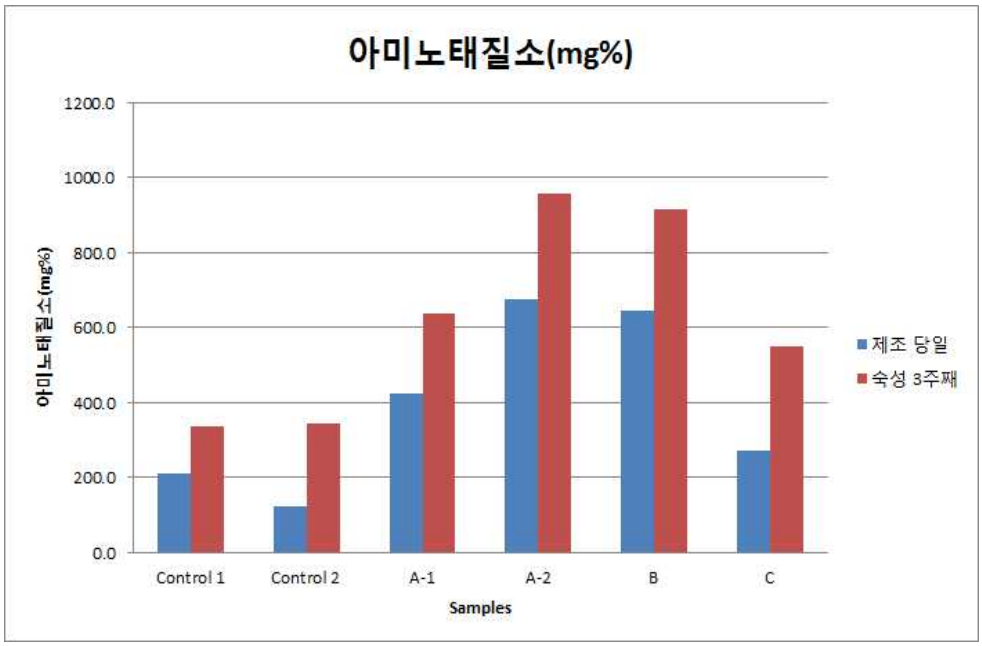
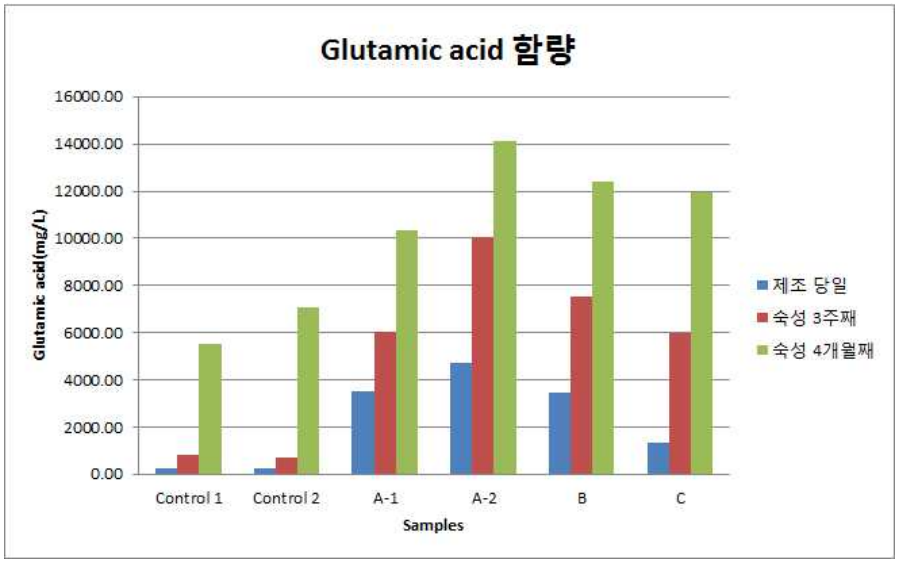


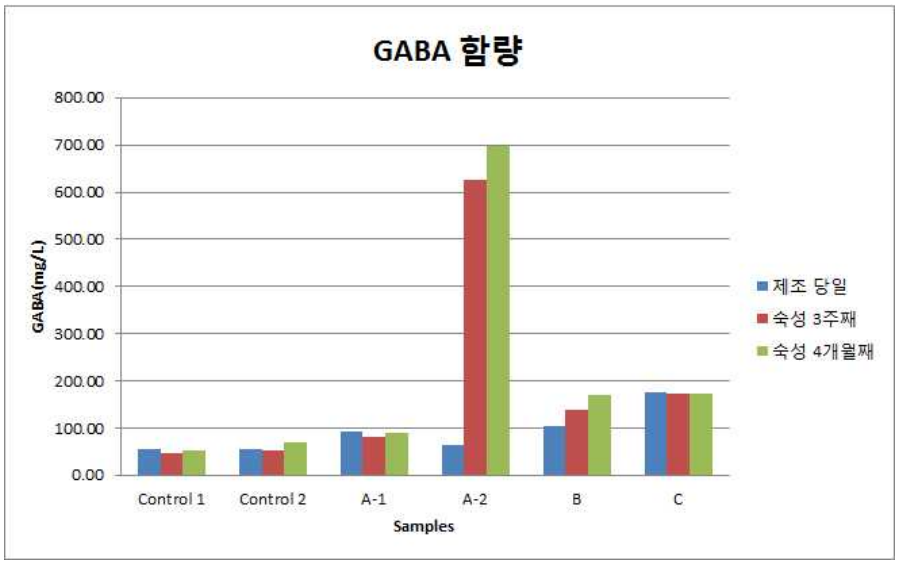

Fig. 7. Amino type nitrogen contents of soybean paste during the ripening.

(6) 유리 아미노산 함량

유리 아미노산 함량의 경우 3주 숙성 후 모든 된장에서 총 유리아미노산 함량이 증가하였다. GABA 함량의 경우 *Asp. oryzae* 46471만 접종한 메주를 이용하여 제조한 된장 A-1은 *Lac. brevis*만 접종한 메주를 이용하여 제조한 된장 C에 비하여 높게 나타났다. *Lac. brevis*와 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 배양한 메주를 이용하여 제조한 된장 B에 비하여 *Asp. oryzae* 46471로 발효시킨 메주를 이용하여 된장 제조 시에 *Lac. brevis*를 첨가한 A-2에서 더 높게 검출되었다. 4개월 숙성 후 GABA 함량의 변화는 3주 숙성 결과와 마찬가지로 의 경우 A-1이 C에 비하여 높게 나타나고 B에 비하여 A-2에서 더 높게 검출되었다. 이는 *Asp. oryzae* 46471이나 *Lac. brevis*을 메주에 단독 배양하는 것보다 혼합 배양하는 것이 GABA 함량 증가에 영향을 주며, 또한 메주에 *Lac. brevis*과 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 배양하는 것보다 *Lac. brevis*를 된장 제조 시에 따로 접종하는 것이 유리아미노산 함량 증가에 효과적일 것으로 생각된다.

따라서, *Lac. brevis*와 *Asp. oryzae* 46471을 메주에 혼합 배양하는 B와 메주에 *Asp. oryzae* 46471을 단독 배양한 후 *Lac. brevis*를 된장 제조 시에 따로 접종하는 A-2를 본 실험에 이용하고자 하였다.



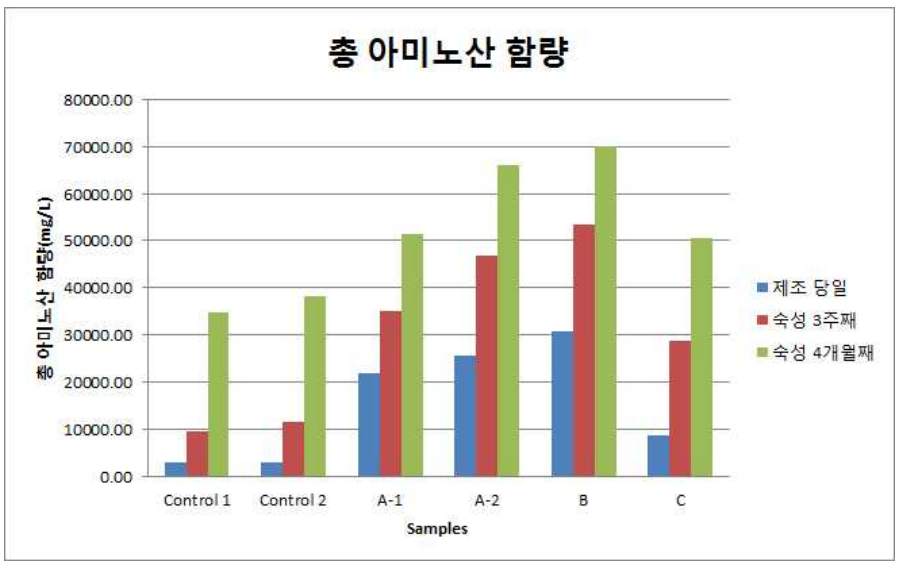




Fig. 8. Free amino acids of soybean pastes.

Table 8. Free amino acids of soybean pastes on the day of production.

| Samples | Control 1 | Control 2 | A-1 | A-2 | B | C |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aspartic acid | 74.3 | 74.3 | 958.0 | 2,168.3 | 1,439.1 | 268.5 |
| **Glutamic acid** | **244.3** | **244.3** | **3,510.0** | **4,724.1** | **3,438.7** | **1,333.6** |
| asparagine | 27.9 | 27.9 | 960.1 | 265.3 | 1,251.0 | 289.6 |
| Serine | 27.9 | 27.9 | 1,171.0 | 1,252.4 | 1,575.8 | 311.8 |
| Glutamine | 7.9 | 7.9 | 674.3 | 227.3 | 2,154.9 | 319.8 |
| Histidine | 93.0 | 93.0 | 576.6 | 740.3 | 883.7 | 203.2 |
| Glycine | 54.7 | 54.7 | 455.6 | 642.5 | 669.4 | 108.3 |
| Threonine | 71.9 | 71.9 | 1,000.0 | 1,151.8 | 1,370.8 | 290.4 |
| Arginine | 43.8 | 43.8 | 785.8 | 849.0 | 1,288.5 | 581.6 |
| Alanine | 142.6 | 142.6 | 1,104.6 | 1,319.8 | 1,415.3 | 417.6 |
| **GABA** | **55.0** | **55.0** | **92.8** | **63.1** | **103.9** | **175.4** |
| Tyrosine | 362.6 | 362.6 | 1,235.2 | 1,534.0 | 1,639.0 | 546.1 |
| Valine | 230.3 | 230.3 | 1,213.6 | 1,413.8 | 1,625.1 | 383.5 |
| Methionine | 79.9 | 79.9 | 386.8 | 432.3 | 507.5 | 163.5 |
| Tryptophane | 115.1 | 115.1 | 376.1 | 398.0 | 455.0 | 155.3 |
| Phenylalanine | 561.8 | 561.8 | 1,693.7 | 2,030.2 | 2,101.4 | 773.2 |
| Isoleucine | 187.6 | 187.6 | 1,373.1 | 1,554.6 | 1,891.2 | 395.8 |
| Leucine | 384.6 | 384.6 | 2,268.6 | 2,496.2 | 2,887.4 | 968.7 |
| Lysine | 103.2 | 103.2 | 1,341.7 | 1,745.5 | 1,963.9 | 801.6 |
| Proline | 69.9 | 69.9 | 773.5 | 723.0 | 2,090.5 | 300.3 |
| **총 아미노산 함량** | **2,938.4** | **2,938.4** | **21,951.1** | **25,731.7** | **30,752.1** | **8,787.8** |

Table 9. Free amino acids of soybean pastes aged for 3 weeks.

| Samples | Control 1 | Control 2 | A-1 | A-2 | B | C |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aspartic acid | 478.7 | 758.5 | 3,728.6 | 6,126.4 | 5,619.9 | 1,552.7 |
| **Glutamic acid** | **809.5** | **694.0** | **6,050.1** | **10,063.4** | **7,507.6** | **6,000.8** |
| asparagine | 91.2 | 34.1 | 743.8 | 144.2 | 1,154.1 | 1,373.7 |
| Serine | 64.9 | 100.6 | 1,166.8 | 533.4 | 1,725.8 | 462.8 |
| Glutamine | 48.1 | 68.4 | 246.9 | 104.5 | 1,660.8 | 668.0 |
| Histidine | 202.0 | 278.3 | 1,144.7 | 997.1 | 1,813.7 | 414.6 |
| Glycine | 208.7 | 312.2 | 1,001.2 | 1,501.0 | 1,607.5 | 580.1 |
| Threonine | 172.3 | 271.2 | 1,781.1 | 2,438.9 | 2,830.0 | 1,147.4 |
| Arginine | 157.4 | 181.0 | 184.8 | 95.0 | 632.7 | 904.6 |
| Alanine | 572.0 | 643.5 | 1,659.1 | 2,867.4 | 2,266.7 | 1,346.5 |
| **GABA** | **47.0** | **53.0** | **82.6** | **627.5** | **137.7** | **173.8** |
| Tyrosine | 980.5 | 1,183.0 | 1,576.5 | 353.4 | 2,406.1 | 1,005.1 |
| Valine | 809.1 | 1,001.2 | 2,212.6 | 3,077.9 | 3,284.8 | 1,578.9 |
| Methionine | 304.1 | 361.5 | 660.1 | 905.7 | 962.2 | 556.6 |
| Tryptophane | 306.5 | 349.4 | 629.0 | 858.6 | 893.4 | 523.7 |
| Phenylalanine | 1538.0 | 1,694.0 | 2,614.6 | 3,220.2 | 3,868.1 | 2,224.1 |
| Isoleucine | 785.7 | 985.3 | 2,398.7 | 3,276.7 | 3,758.6 | 1,727.7 |
| Leucine | 1,465.2 | 1,723.4 | 3,354.4 | 4,635.4 | 5,172.8 | 3,067.6 |
| Lysine | 415.8 | 585.4 | 2,388.6 | 3,660.1 | 3,702.1 | 2,485.3 |
| Proline | 204.1 | 209.8 | 1,483.6 | 1,474.0 | 2,413.0 | 997.2 |
| **총 아미노산 함량** | **9,660.9** | **11,487.8** | **35,107.6** | **46,960.6** | **53,417.2** | **28,791.3** |

Table 10. Free amino acids of soybean pastes aged for 4 months.

| Samples | Control 1 | Control 2 | A-1 | A-2 | B | C |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aspartic acid | 3,253.3 | 4,198.5 | 7,348.9 | 9,357.5 | 9,795.7 | 5,336.6 |
| **Glutamic acid** | **5,527.0** | **7,054.3** | **10,320.0** | **14,128.8** | **12,380.2** | **11,932.7** |
| asparagine | 503.2 | 371.2 | 99.7 | 69.8 | 457.7 | 2,272.5 |
| Serine | 54.4 | 59.1 | 173.1 | 248.4 | 402.0 | 220.4 |
| Glutamine | 29.4 | 48.5 | 41.8 | 59.5 | 229.0 | 94.1 |
| Histidine | 703.9 | 701.8 | 1,691.9 | 788.4 | 2,171.7 | 350.0 |
| Glycine | 1,064.6 | 1,486.7 | 1,995.1 | 2,537.9 | 3,092.5 | 1,726.8 |
| Threonine | 545.2 | 681.5 | 2,751.8 | 3,375.2 | 3,718.0 | 1,797.1 |
| Arginine | 62.0 | 73.4 | 44.4 | 56.6 | 70.2 | 49.9 |
| Alanine | 2,932.5 | 3,077.3 | 3,106.2 | 5,203.1 | 4,102.1 | 3,877.2 |
| **GABA** | **51.9** | **69.0** | **91.2** | **698.1** | **171.4** | **174.1** |
| Tyrosine | 533.1 | 375.8 | 1,083.5 | 523.3 | 2,210.1 | 309.8 |
| Valine | 2,923.1 | 3,154.5 | 3,595.2 | 4,549.6 | 4,902.6 | 3,463.6 |
| Methionine | 889.6 | 881.4 | 968.0 | 1,168.3 | 1,171.1 | 899.4 |
| Tryptophane | 950.2 | 1,090.8 | 1,095.8 | 1,395.8 | 1,395.9 | 1,095.3 |
| Phenylalanine | 3,081.4 | 3,479.2 | 3,579.5 | 4,032.9 | 4,553.7 | 2,530.8 |
| Isoleucine | 2,754.5 | 2,791.5 | 3,617.5 | 4,601.9 | 4,833.2 | 3,545.0 |
| Leucine | 4,372.1 | 4,378.4 | 4,857.3 | 6,362.6 | 6,875.2 | 5,343.5 |
| Lysine | 2,586.2 | 1,996.3 | 3,879.1 | 5,055.8 | 4,941.4 | 4,047.9 |
| Proline | 2,091.8 | 2,292.3 | 1,005.1 | 1,717.0 | 2,547.4 | 1,480.5 |
| **총 아미노산 함량** | **34,909.5** | **38,261.5** | **51,345.0** | **65,930.7** | **70,021.0** | **50,547.0** |

## 제 21장. 전통된장 가공공장의 적용(협동)

### 1. 콩 발효 분말의 특성

1) 제조방법

물에 콩가루 10 %, MSG 2 %를 섞은 혼합액을 멸균한 뒤 *Lac. brevis*, *Asp. oryzae* 46471를 접종한 후 30 ℃에서 호기적으로 발효하여 발효액을 제조하였다. 발효액을 회수한 후 동결 건조하여 GABA가 다량 함유된 콩 발효분말을 제조된 분말을 (주)비피도에서 제공받아 사용하였다.

2) 분석결과

콩 발효 분말을 분석한 결과 수분함량은 7.2 %, 조단백질 함량은 41.7 %, 조지방 함량은 12.3 %, 아미노태 질소 함량은 1,687 mg%, pH 6.5, 산도는 11.0 %, GABA 함량은 5,822.6 mg/kg로 나타났다. 콩 발효분말의 GABA 함량이 매우 높게 나타났다.

Table 11. Proximate composition of fermented soybean powder.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Moisture contents | 7.2 % | pH | 6.5 |
| Crude protein contents | 41.7 % | Total acidity | 11.0 % |
| Crude fat contents | 12.3 % | GABA contents | 5,822.6 mg/kg |
| Amino type nitrogen contents | 1,687 mg% | | |

### 2. 마이코톡신 프리 균주와 GABA 생산 유산균을 이용한 된장 제조 및 품질특성

1) 제조방법

남안동 장류 가공공장에서 실제 사용기기를 이용하여 동일한 가공 방법대로 대두(백태)를 수세, 침수, 증자, 분쇄, 성형이 이루어지도록 하였으며 메주 및 된장 제조 시 첨가되는 균주는 *Asp. oryzae* 46471는 $10^{4-5}$ CFU/g, *Lac. brevis* 는 $10^{7-8}$ CFU/g 농도로 접종하였으며, 온도 35 ℃, 상대습도 36 %로 발효 및 건조하였다. 발효 중 메주의 최초 무게인 3.5 kg에서 건조 후 최종 메주 무게가 1.4 kg이 되면 발효 및 건조를 멈추고 된장 제조에 시료로 사용하였다. 건조된 메주는 소금물 염도(18 %)에서 40일 동안 수침시켜 부드럽게 한 후 손으로 으깨어 일정한 소금물 양으로 농도를 조절한 후 된장을 제조하였다. 각각의 된장은 다음과 같이 제조하였으며(Fig. 9, Table 12, Photo 2, 3) 4개월 동안 숙성하면서 유산균수, pH, 산도, 아미노태 질소 함량, 염도, 유리 아미노산(GABA 포함) 함량을 측정하였다.

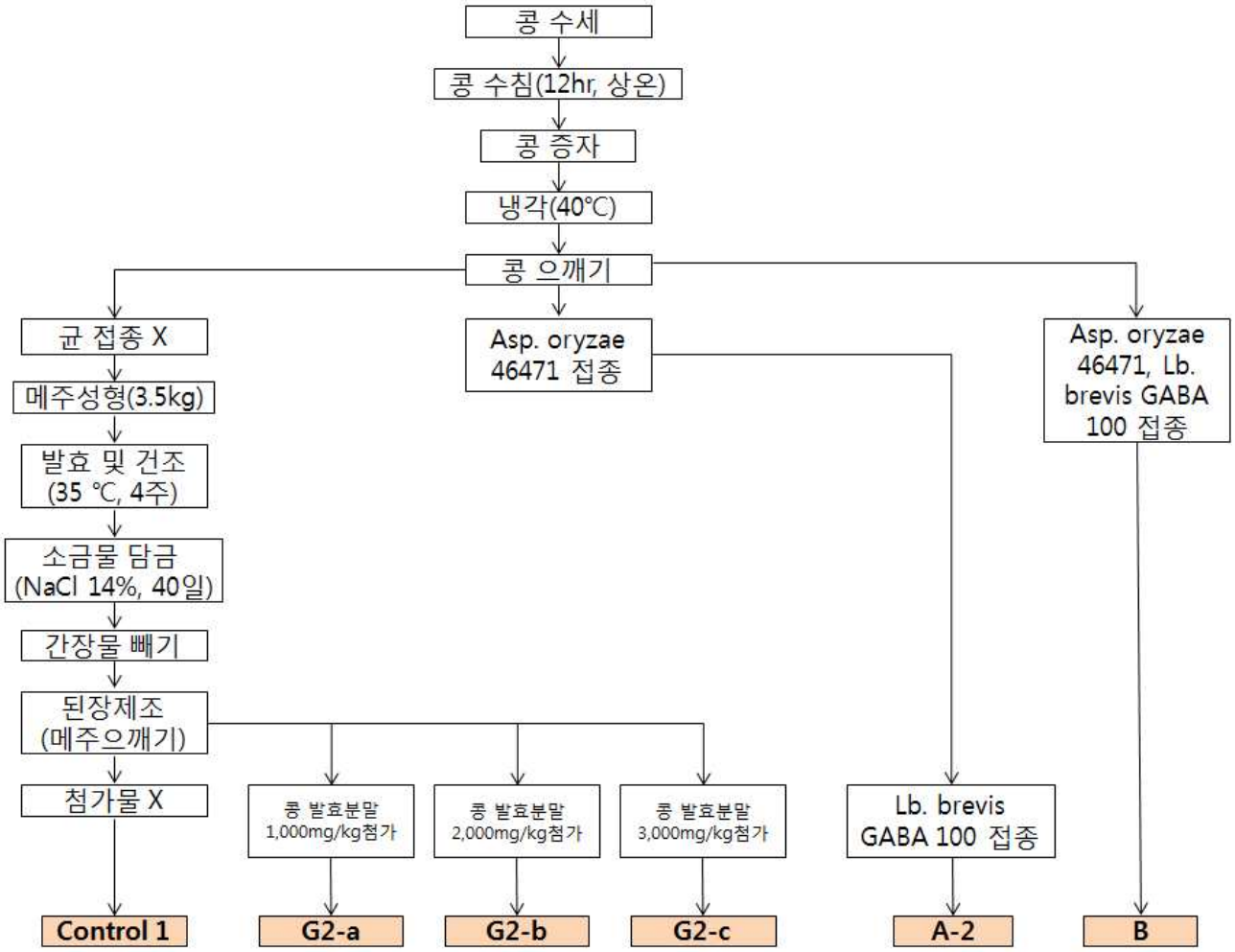



Fig. 9. Manufacturing process of samples

Table 12. Manufacturing process of samples.

| Samples | Strains | Methods of production |
|---|---|---|
| Control | - | 균주 접종하지 않고 된장 제조 |
| G2a | - | 균주를 접종하지 않고 마지막 공정에서 GABA 1,000 mg/kg 농도로 첨가하여 된장 제조 |
| G2b | - | 균주를 접종하지 않고 마지막 공정에서 GABA 2,000 mg/kg 농도로 첨가하여 된장 제조 |
| G2c | - | 균주를 접종하지 않고 마지막 공정에서 GABA 3,000 mg/kg 농도로 첨가하여 된장 제조 |
| A-2 | *Asp. oryzae* 46471, *Lac. brevis* | 메주에 46471을 접종하여 발효시킨 후 된장 제조 시 유산균을 접종하여 발효 및 숙성 |
| B | *Asp. oryzae* 46471, *Lac. brevis* | 메주에 46471과 유산균을 동시에 접종하여 발효시킨 후 된장 제조 |

Photo 2. The procedure of soybean paste samples.

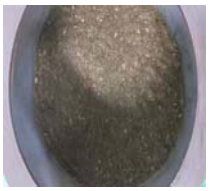
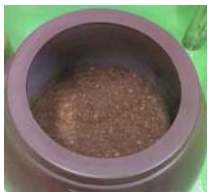
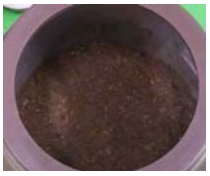
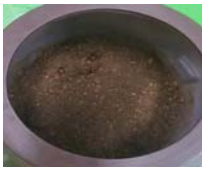
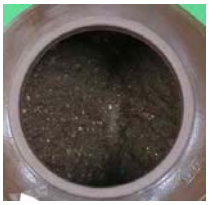
| | 제조당일 | 숙성 1개월 | 숙성 2개월 | 숙성 3개월 | 숙성 4개월 |
|---|---|---|---|---|---|
| Control |  |  |  |  | |
| G2a | | | | | |
| G2b | | | | | |
| G2c | | | | | |
| A-2 | | | | | |
| B |  | | | | |

Photo 3. The soybean paste during aging periods.

Photo 4. The water-soaking process of Meju.

Photo 5. Actual environments during the ripening soybean pastes in the plant.

2) 일반적인 특성 분석

(1) 미생물 수

된장의 유산균 수는 *Lac. brevis* 를 접종하지 않은 Control과 G2a, G2b, G2c의 경우 초기에 $10^6$ CFU/mL로 나타나다가 숙성 2 - 3개월까지 감소하다가 숙성 4개월째에 증가하는 것으로 나타났다(Table 13). 또한 메주에 *Asp. oryzae* 46471을 접종하여 발효시킨 후 된장 제조 중 *Lac. brevis* 를 접종한 A-2 시료의 경우 초기에 $2.0\times10^8$ CFU/mL이었으나 숙성 4개월째에 $1.0\times10^7$ CFU/mL으로 나타났으며 메주에 *Asp. oryzae* 46471과 *Lac. brevis* 를 혼합 배양하여 제조한 된장시료 B는 초기에 $1.9\times10^7$ CFU/mL이었으나 숙성 4개월째에 $6.0\times10^6$ CFU/mL으로 모두 숙성 2 - 3개월째까지 감소하다가 다시 3 - 4개월 차에 약간의 증가를 보였다.

제조된 된장시료의 곰팡이 수의 경우에도 숙성 중 점차 감소하다가 3 - 4개월째에 약간 증가하는 경향을 보였다. *Asp. oryzae* 46471을 접종하지 않은 Control과 G2a, G2b, G2c의 경우 초기에 $10^4$ CFU/mL로 나타나다가 숙성 2 - 3개월까지 감소하다가 숙성 4개월째에 증가하는 것으로 나타났다. 또한 메주에 *Asp. oryzae* 46471을 접종하여 발효시킨 A-2 시료의 경우 초기에 $1.6\times10^6$ CFU/mL이었으나 1 - 2개월째에 감소하다가 다시 증가하여 숙성 4개월째에 $1.4\times10^6$ CFU/mL으로 나타났으며 메주에 *Asp. oryzae* 46471과 *Lac. brevis* 를 혼합 배양하여 제조한 된장시료 B는 초기에 $2.1\times10^6$ CFU/mL이었으나 2개월째까지 감소하다가 다시 증가하여 숙성 4개월째에 $8.3\times10^5$ CFU/mL으로 모두 숙성 1 - 2개월째에는 감소하다가 다시 3 - 4개월 차에 증가함을 보였다.

남안동 재래된장은 온도가 일정하게 유지되는 곳에서 숙성하지 않고 외기에 그대로 노출된 상태에서 2년간 숙성이 진행된 후 제품화가 이루어진다. 이에 본 실험에서도 유사하게 진행하기 위하여 격리되어 있으나 온도가 조절이 불가능한 공간에 숙성하였다. 따라서 온도가 조절되는 실험실에서 진행된 예비실험과 다른 결과를 보였으며, 외부 온도의 영향을 그대로 받아 0 - 5 ℃에서 숙성되어 미생물의 생육이 활발하게 일어나지 않은 것으로 보인다.

Table 13. Microflora of soybean paste during the ripening.

| Samples | Period of ripening (months) | Lactic acid bacteria | Yeast+Mold |
|---|---|---|---|
| Control | 0 | $1.3\times10^{6}$ | $2.7\times10^{4}$ |
| | 1 | $1.4\times10^{6}$ | $1.7\times10^{4}$ |
| | 2 | $5.7\times10^{5}$ | $1.3\times10^{4}$ |
| | 3 | $8.8\times10^{5}$ | $1.7\times10^{4}$ |
| | 4 | $6.9\times10^{5}$ | $8.8\times10^{4}$ |
| G2a | 0 | $1.3\times10^{6}$ | $2.7\times10^{4}$ |
| | 1 | $7.7\times10^{5}$ | $2.3\times10^{4}$ |
| | 2 | $2.6\times10^{5}$ | $1.0\times10^{3}$ |
| | 3 | $2.2\times10^{5}$ | $5.1\times10^{4}$ |
| | 4 | $1.5\times10^{5}$ | $1.5\times10^{4}$ |
| G2b | 0 | $1.3\times10^{6}$ | $2.7\times10^{4}$ |
| | 1 | $4.6\times10^{5}$ | $1.7\times10^{4}$ |
| | 2 | $3.8\times10^{5}$ | $2.0\times10^{3}$ |
| | 3 | $3.0\times10^{5}$ | $3.8\times10^{4}$ |
| | 4 | $3.6\times10^{5}$ | $4.4\times10^{4}$ |
| G2c | 0 | $1.3\times10^{6}$ | $2.7\times10^{4}$ |
| | 1 | $1.5\times10^{6}$ | $1.4\times10^{4}$ |
| | 2 | $8.5\times10^{5}$ | $4.0\times10^{3}$ |
| | 3 | $7.7\times10^{5}$ | $1.7\times10^{4}$ |
| | 4 | $4.9\times10^{5}$ | $5.3\times10^{4}$ |
| A-2 | 0 | $2.0\times10^{8}$ | $1.6\times10^{6}$ |
| | 1 | $1.6\times10^{7}$ | $2.0\times10^{5}$ |
| | 2 | $7.3\times10^{6}$ | $3.0\times10^{5}$ |
| | 3 | $1.9\times10^{7}$ | $1.3\times10^{6}$ |
| | 4 | $1.0\times10^{7}$ | $1.4\times10^{6}$ |
| B | 0 | $1.9\times10^{7}$ | $2.1\times10^{6}$ |
| | 1 | $1.1\times10^{7}$ | $2.0\times10^{5}$ |
| | 2 | $5.0\times10^{6}$ | $3.0\times10^{4}$ |
| | 3 | $5.9\times10^{6}$ | $7.2\times10^{5}$ |
| | 4 | $6.2\times10^{6}$ | $8.3\times10^{5}$ |

* Unit: CFU/g

(2) 수분 함량

수분함량은 모든 된장 시료에서 56.1 - 59.4 %로 나타났으며 숙성기간이 지남에 따라 약간 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었으며 된장 제조 중 일정한 소금물을 첨가하여 시료에 따른 차이가 거의 나타나지 않았다.

Table 14. Moisture contents of soybean paste during the ripening.

| Samples | Moisture contents(%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 59.1 | 59.4 | 58.5 | 58.4 | 58.7 |
| G2a | 56.7 | 57.3 | 57.1 | 57.0 | 57.0 |
| G2b | 57.0 | 57.6 | 57.6 | 57.3 | 57.5 |
| G2c | 56.5 | 57.0 | 56.9 | 56.1 | 56.2 |
| A-2 | 58.5 | 58.9 | 58.7 | 58.9 | 58.6 |
| B | 57.5 | 57.4 | 56.9 | 57.3 | 56.9 |

(3) 염도

숙성기간에 따른 염도의 변화는 Table 15에 나타내었다. 제조된 된장의 염도는 10.0 - 11.5 %로 기존의 남안동 된장과 같은 염도(14 %)에 비하여 2.5 - 4.0 % 낮게 나타났다.

Table 15. Salt contents of soybean paste during the ripening.

| Samples | Salt contents(%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 11.1 | 10.1 | 10.5 | 10.9 | 11.0 |
| G2a | 10.3 | 10.0 | 10.4 | 10.9 | 10.4 |
| G2b | 10.5 | 10.1 | 10.6 | 10.2 | 10.4 |
| G2c | 10.5 | 10.8 | 10.2 | 10.2 | 10.4 |
| A-2 | 11.1 | 11.3 | 11.2 | 11.1 | 11.0 |
| B | 11.1 | 11.3 | 11.5 | 11.0 | 11.3 |

(4) pH 및 산도

각각 제조된 된장의 pH와 총 산도는 Table 16, 17에 각각 나타내었으며 모든 종류의 된장에서 pH는 숙성 기간에 따라 약간 감소하였으나 유의적인 변화는 없었으며 시료에 따른 유의적인 차이도 없었다. 된장의 총 산도는 pH 측정 결과와 반대로 모든 종류의 된장에서 숙성기간에 따라 증가하였으며 기온이 올라가는 4월(숙성 4개월째)에 큰 폭으로 증가하였다.

된장 숙성 중 pH와 산도는 숙성 중 작용 미생물, 효소 등이 당질 및 단백질의 분해하여 영향을 주는데 미생물의 작용으로 단백질과 당질이 분해되어 다량의 아미노산 및 유기산이 생성되어 pH가 저하되고 산도가 증가된다(Seo 등 1992, Kim 2005). 이는 유 등(2001)의 연구에서 적정산도가 숙성 90일 후 증가하였다고 보고한 결과와 유사하였다. 또한 산도는 신맛과 향미에 영향을 주는 인자로, 발효 식품에서 품질에 영향을 주는 주요인자 중 하나이다(Joo 등 1997).

본 실험에서는 낮은 숙성온도로 인하여 미생물 발효와 효소의 활성이 낮아 pH와 산도의 변화 폭이 크지 않은 것으로 나타난다. 또한 4월에 기온이 점차 올라가면서 산도가 급증한 것으로 보아 날씨가 더워지는 7 - 8월(30 - 35 ℃)에는 더 큰 폭으로 증가할 것으로 생각되며 또한 잡균의 번식도 일어날 수 있을 것으로 생각된다.

Table 16. Proximate composition of soybean paste during the ripening.

| Samples | pH | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 6.8 | 6.7 | 6.6 | 6.6 | 6.6 |
| G2a | 7.2 | 7.1 | 7.0 | 6.9 | 6.8 |
| G2b | 7.0 | 7.0 | 6.8 | 6.8 | 6.8 |
| G2c | 7.0 | 6.9 | 6.8 | 6.7 | 6.7 |
| A-2 | 7.0 | 6.9 | 6.8 | 6.8 | 6.8 |
| B | 7.0 | 7.0 | 6.9 | 6.8 | 6.8 |

Table 17. Proximate composition of soybean paste during the ripening.

| Samples | Total acidity(%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 0.42 | 0.63 | 0.72 | 0.85 | 1.14 |
| G2a | 0.55 | 0.58 | 0.79 | 0.83 | 1.17 |
| G2b | 0.42 | 0.73 | 0.86 | 0.85 | 1.16 |
| G2c | 0.49 | 0.73 | 0.95 | 0.99 | 1.24 |
| A-2 | 0.37 | 0.65 | 0.82 | 0.86 | 1.11 |
| B | 0.55 | 0.66 | 0.87 | 0.89 | 1.14 |

(5) 아미노태 질소 함량

숙성기간에 따른 아미노태 질소 함량 변화는 Table 18에 나타내었다. 모든 종류의 된장에서 아미노태 질소 함량은 숙성 기간이 경과함에 따라 증가하였다. 아미노태 질소 함량은 Control이 가장 낮게 나타났으며 *Asp. oryzae* 46471과 *Lac. brevis* 를 접종한 된장 보다 GABA를 다량 함유한 콩 발효분말을 넣은 G2a, G2b, G2c가 970.7 mg%, 1,022.3 mg%, 1,038.0 mg%으로 높게 나타났다. G2a, G2b, G2c에는 콩 발효 분말이 GABA 농도가 각각 1,000 mg/kg, 2,000 mg/kg, 3,000 mg/kg으로 첨가하였고 이에 따라 G2a가 가장 낮고, G2c가 가장 높은 아미노태 질소 함량을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 아미노태 질소 함량은 된장의 숙성도를 평가하는데 활용할 수 있는 품질지표로서 본 결과는 월등히 높은 아미노태 질소 함량을 보여준다.

Table 18. Amino type nitrogen contents of soybean paste during the ripening.

| Samples | Contents of amino type nitrogen(mg%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 437.4 | 542.4 | 658.4 | 740.1 | 773.5 |
| G2a | 630.0 | 731.0 | 822.3 | 929.6 | 970.7 |
| G2b | 695.6 | 767.1 | 865.0 | 928.7 | 1,022.3 |
| G2c | 698.1 | 769.1 | 874.2 | 948.3 | 1,038.0 |
| A-2 | 506.1 | 635.6 | 775.6 | 843.7 | 913.4 |
| B | 540.6 | 640.8 | 745.8 | 837.2 | 920.0 |

(6) 유리아미노산 함량(GABA 포함)

마이코톡신 프리 균주 *Asp. oryzae* 46471와 *Lac. brevis* 를 이용하여 제조한 된장 시료와 콩 발효분말을 첨가한 된장의 유리아미노산 함량을 분석하였다(Table 19 - 23).

제조된 된장의 유리 아미노산을 분석한 결과 총 아미노산 함량과 Glutamic acid 함량은 모든 시료에서 숙성기간에 따라 증가하였으며 숙성 4개월째에 콩 발효분말을 첨가한 G2c가 가장 높게 나타났다. 이는 콩 발효분말이 첨가된 G2a, G2b, G2c가 콩 발효분말이 농도별로 첨가되었고 가장 높은 농도를 첨가한 G2c가 콩 발효분말 자체의 아미노산에 의하여 이러한 결과를 나타낸 것으로 보인다. 또한 A-2, B 시료의 경우 첨가된 미생물의 작용에 의하여 Control 된장에 비하여 Glutamic acid 함량이 높았으나 콩 발효분말을 첨가한 시료보다 낮게 나타났다. GABA 함량 변화는 숙성 기간에 따라 큰 변화가 일어나지 않았으며 특히 GABA를 생성하는 *Lac. brevis* 가 숙성 시 낮은 온도에 의하여 생육하지 못한 것으로 보인다.

Table 19. Free amino acids of soybean pastes on the day of soybean paste manufactured.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | G2a | G2b | G2c | A-2 | B |
| Aspartic acid | 1,372.8 | 1,605.9 | 1,749.9 | 2,620.1 | 1,819.6 | 1,780.5 |
| **Glutamic acid** | **2,716.4** | **4,164.0** | **4,648.0** | **6,577.0** | **3,716.0** | **4,038.7** |
| asparagine | 195.7 | 277.1 | 476.4 | 331.8 | 388.7 | 458.4 |
| Serine | 991.0 | 1,179.9 | 1,385.8 | 1,829.3 | 1,463.3 | 1,410.2 |
| Glutamine | 835.4 | 871.8 | 1,132.3 | 554.4 | 1,631.7 | 1,344.1 |
| Histidine | 559.0 | 869.7 | 869.4 | 914.9 | 901.8 | 838.0 |
| Glycine | 625.3 | 811.3 | 887.1 | 1,174.5 | 835.2 | 843.6 |
| Threonine | 797.1 | 946.7 | 1,158.3 | 1,244.4 | 1,136.4 | 1,088.2 |
| Arginine | 233.2 | 363.0 | 489.1 | 121.6 | 803.9 | 637.7 |
| Alanine | 1,061.8 | 1,684.2 | 1,558.1 | 1,756.4 | 1,417.4 | 1,442.1 |
| **GABA** | **55.7** | **1,035.7** | **1,936.4** | **3,071.5** | **44.1** | **46.0** |
| Tyrosine | 802.9 | 995.6 | 1,134.1 | 1,235.8 | 1,204.8 | 1,174.6 |
| Valine | 902.6 | 1,148.7 | 1,299.4 | 1,651.6 | 1,293.7 | 1,265.4 |
| Methionine | 316.5 | 336.2 | 383.6 | 406.9 | 351.9 | 343.7 |
| Tryptophane | 249.8 | 272.7 | 314.6 | 488.5 | 314.1 | 319.9 |
| Phenylalanine | 1,039.8 | 1,262.5 | 1,498.1 | 1,617.2 | 1,710.0 | 1,734.1 |
| Isoleucine | 878.9 | 1,089.7 | 1,263.0 | 1,594.4 | 1,285.9 | 1,280.6 |
| Leucine | 1,286.5 | 1,618.7 | 1,878.7 | 2,441.8 | 1,932.6 | 1,895.0 |
| Lysine | 985.8 | 1,511.5 | 1,686.2 | 2,202.1 | 1,599.3 | 1,485.7 |
| proline | 527.9 | 1,564.8 | 1,513.3 | 1,394.2 | 2,193.4 | 1,939.2 |
| **Total amino acid** | **16,433.9** | **23,609.6** | **27,261.8** | **33,228.5** | **26,043.7** | **25,365.6** |

Table 20. Free amino acids of soybean pastes aged for a month.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | G2a | G2b | G2c | A-2 | B |
| Aspartic acid | 2,278.3 | 2,635.9 | 2,774.1 | 2,929.8 | 2,928.3 | 2,896.7 |
| **Glutamic acid** | **4,751.7** | **6,530.4** | **6,552.1** | **7,362.7** | **5,832.7** | **6,149.5** |
| asparagine | 209.6 | 247.0 | 382.0 | 375.3 | 355.3 | 407.9 |
| Serine | 1,638.8 | 1,852.5 | 2,028.6 | 2,051.7 | 2,192.1 | 2,196.3 |
| Glutamine | 854.1 | 772.1 | 1,279.5 | 611.7 | 1,688.0 | 1,414.3 |
| Histidine | 750.1 | 1,010.8 | 1,009.5 | 1,061.1 | 1,082.2 | 1,036.8 |
| Glycine | 947.2 | 1,112.1 | 1,263.3 | 1,302.3 | 1,176.8 | 1,176.5 |
| Threonine | 1,470.5 | 1,782.7 | 1,547.0 | 1,426.0 | 1,576.4 | 2,174.0 |
| Arginine | 506.5 | 556.4 | 835.7 | 141.7 | 742.0 | 721.3 |
| Alanine | 1,576.0 | 2,192.2 | 2,070.8 | 1,963.9 | 1,986.4 | 2,085.6 |
| **GABA** | **60.9** | **971.4** | **1,898.0** | **3,033.8** | **57.9** | **53.1** |
| Tyrosine | 1,286.8 | 1,445.2 | 1,536.3 | 1,375.8 | 1,712.9 | 1,796.8 |
| Valine | 1,574.1 | 1,882.0 | 2,035.0 | 1,865.7 | 2,214.2 | 2,235.8 |
| Methionine | 470.1 | 544.2 | 593.9 | 456.7 | 617.7 | 625.3 |
| Tryptophane | 199.9 | 261.6 | 263.3 | 541.4 | 276.7 | 276.2 |
| Phenylalanine | 1,680.3 | 1,905.2 | 2,002.5 | 1,769.3 | 2,253.1 | 2,346.9 |
| Isoleucine | 1,499.6 | 1,772.0 | 1,895.9 | 1,803.7 | 2,056.2 | 2,103.8 |
| Leucine | 2,229.7 | 2,604.1 | 2,766.5 | 2,730.6 | 3,052.4 | 3,132.9 |
| Lysine | 2,105.1 | 2,361.5 | 2,644.9 | 2,435.8 | 2,712.4 | 2,632.6 |
| proline | 1,000.5 | 2,894.0 | 2,615.4 | 1,677.9 | 3,677.0 | 2,593.7 |
| **Total amino acid** | **27,089.5** | **35,333.3** | **37,994.4** | **36,916.9** | **38,190.7** | **38,056.0** |

Table 21. Free amino acids of soybean pastes aged for 2 months.

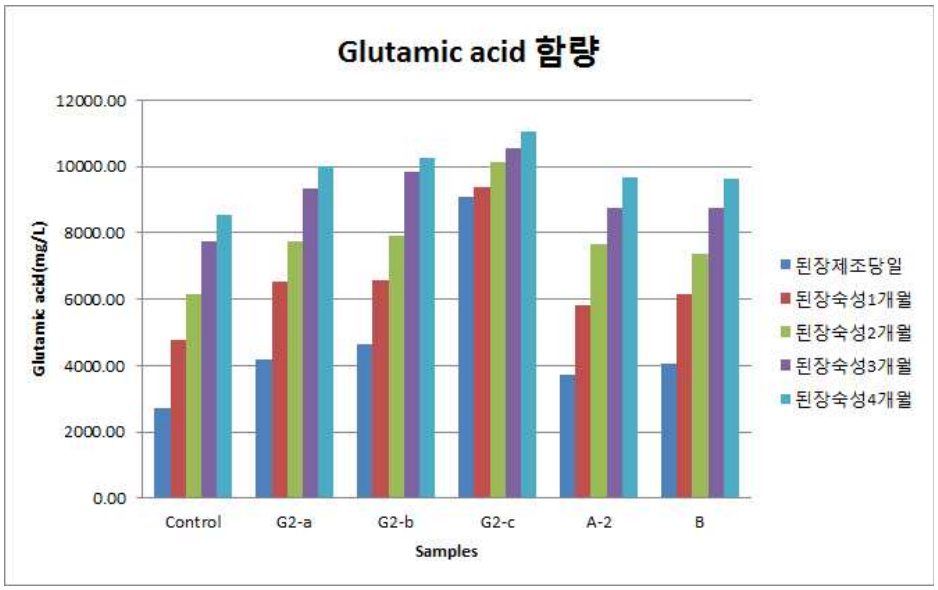
| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | G2a | G2b | G2c | A-2 | B |
| Aspartic acid | 2,895.5 | 3,193.5 | 3,468.1 | 2,865.2 | 3,815.5 | 3,478.5 |
| **Glutamic acid** | **6,158.9** | **7,758.9** | **7,923.7** | **9,046.7** | **7,650.5** | **7,343.9** |
| asparagine | 173.1 | 203.7 | 294.3 | 371.8 | 288.7 | 296.6 |
| Serine | 1,995.3 | 2,171.2 | 2,366.3 | 2,012.7 | 2,636.6 | 2,447.1 |
| Glutamine | 668.9 | 573.6 | 1,099.1 | 620.2 | 1,453.6 | 1,056.1 |
| Histidine | 885.4 | 1,078.4 | 1,248.2 | 1,036.6 | 1,203.9 | 1,081.7 |
| Glycine | 1,147.0 | 1,339.7 | 1,461.5 | 1,268.4 | 1,391.0 | 1,309.3 |
| Threonine | 1,980.9 | 1,535.6 | 1,750.8 | 1,387.2 | 2,675.8 | 2,630.9 |
| Arginine | 220.0 | 217.9 | 346.1 | 155.4 | 433.6 | 338.9 |
| Alanine | 1,826.6 | 2,417.1 | 2,331.8 | 1,916.8 | 2,328.9 | 2,287.0 |
| **GABA** | **63.4** | **975.9** | **1,911.7** | **3,033.8** | **53.7** | **58.1** |
| Tyrosine | 1,400.0 | 1,458.6 | 1,622.0 | 1,356.8 | 1,958.1 | 1,889.2 |
| Valine | 1,864.4 | 2,163.8 | 2,318.8 | 1,813.0 | 2,586.4 | 2,496.3 |
| Methionine | 517.9 | 580.2 | 651.9 | 459.7 | 676.9 | 661.5 |
| Tryptophane | 240.3 | 242.0 | 242.1 | 517.8 | 293.7 | 282.2 |
| Phenylalanine | 1,975.0 | 2,122.0 | 2,234.8 | 1,745.8 | 2,616.8 | 2,545.2 |
| Isoleucine | 1,860.2 | 2,064.9 | 2,210.2 | 1,771.9 | 2,495.0 | 2,389.6 |
| Leucine | 2,666.4 | 2,976.7 | 3,119.6 | 2,673.1 | 3,625.8 | 3,479.3 |
| Lysine | 2,426.0 | 2,747.6 | 2,927.0 | 2,369.4 | 2,999.1 | 2,819.2 |
| proline | 1,713.3 | 3,850.5 | 2,057.0 | 1,540.1 | 3,662.0 | 3,284.3 |
| **Total aminoic acid** | **32,678.4** | **39,671.8** | **41,585.0** | **37,962.4** | **44,845.5** | **42,174.7** |

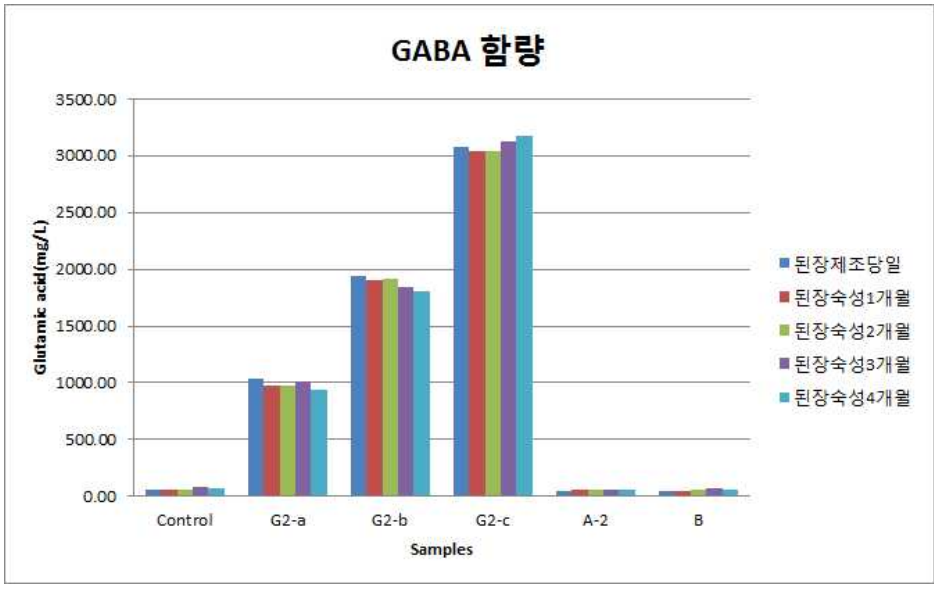
Table 22. Free amino acids of soybean pastes aged for 3 months.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | G2a | G2b | G2c | A-2 | B |
| Aspartic acid | 3,579.5 | 3,896.4 | 3,795.9 | 3,168.2 | 4,295.3 | 4,135.7 |
| **Glutamic acid** | **7,737.6** | **9,318.3** | **9,819.9** | **10,560.2** | **8,746.5** | **8,729.9** |
| asparagine | 255.9 | 307.1 | 433.3 | 404.8 | 342.7 | 349.3 |
| Serine | 2,407.7 | 2,614.7 | 2,614.6 | 2,254.4 | 2,924.8 | 2,830.2 |
| Glutamine | 537.8 | 476.4 | 850.4 | 695.4 | 1,100.6 | 847.9 |
| Histidine | 1,010.4 | 1,336.5 | 1,284.6 | 1,046.9 | 1,262.7 | 1,256.6 |
| Glycine | 1,353.7 | 1,521.3 | 1,667.0 | 1,436.2 | 1,518.6 | 1,503.5 |
| Threonine | 1,795.5 | 1,894.4 | 1,820.7 | 1,575.2 | 2,217.8 | 2,145.5 |
| Arginine | 200.4 | 272.7 | 144.3 | 148.2 | 268.3 | 328.1 |
| Alanine | 2,199.5 | 2,801.4 | 2,462.0 | 2,170.0 | 2,614.4 | 2,626.5 |
| **GABA** | **77.8** | **1,009.1** | **1,837.7** | **3,127.5** | **65.5** | **69.8** |
| Tyrosine | 1,751.1 | 2,112.6 | 1,762.8 | 1,500.0 | 2,377.7 | 2,328.2 |
| Valine | 2,106.0 | 2,359.0 | 2,273.9 | 2,005.1 | 2,625.5 | 2,565.8 |
| Methionine | 653.6 | 643.4 | 550.2 | 536.3 | 689.0 | 681.3 |
| Tryptophane | 684.0 | 675.0 | 704.1 | 581.0 | 788.6 | 790.8 |
| Phenylalanine | 2,598.2 | 3,028.8 | 2,231.9 | 2,043.2 | 3,219.1 | 3,176.4 |
| Isoleucine | 2,237.7 | 2,457.7 | 2,265.8 | 2,004.0 | 2,784.7 | 2,764.0 |
| Leucine | 3,247.8 | 3,607.8 | 3,420.9 | 3,010.5 | 4,124.9 | 4,088.1 |
| Lysine | 2,635.5 | 3,021.4 | 3,200.4 | 2,587.2 | 3,256.6 | 3,159.8 |
| proline | 1,270.0 | 2,947.7 | 2,283.0 | 3,238.9 | 3,123.6 | 2,758.6 |
| **Total aminoic acid** | **38,339.9** | **46,301.7** | **45,423.4** | **44,093.3** | **48,346.9** | **47,135.9** |

Table 23. Free amino acids of soybean pastes aged for 4 months.

| Contents of aminoic acid(mg/L) | samples | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | G2a | G2b | G2c | A-2 | B |
| Aspartic acid | 3,997.4 | 4,297.4 | 4,349.1 | 4,490.5 | 4,615.9 | 4,541.4 |
| **Glutamic acid** | **8,518.2** | **9,991.7** | **10,240.8** | **11,053.6** | **9,653.8** | **9,607.8** |
| asparagine | 218.2 | 286.8 | 365.7 | 380.8 | 292.4 | 345.0 |
| Serine | 2,578.1 | 2,760.4 | 2,813.0 | 2,937.6 | 3,048.2 | 3,036.4 |
| Glutamine | 344.3 | 327.8 | 587.9 | 576.9 | 512.8 | 526.0 |
| Histidine | 1,146.0 | 1,295.5 | 1,310.1 | 1,322.9 | 1,290.2 | 1,254.6 |
| Glycine | 1,571.2 | 1,724.9 | 1,777.5 | 1,864.7 | 1,712.9 | 1,678.9 |
| Threonine | 1,789.0 | 1,897.5 | 2,035.0 | 2,086.5 | 2,223.7 | 2,165.1 |
| Arginine | 69.6 | 105.7 | 130.7 | 166.7 | 134.2 | 190.7 |
| Alanine | 2,308.8 | 2,883.3 | 2,650.8 | 2,821.2 | 2,672.0 | 2,740.2 |
| **GABA** | **68.0** | **940.4** | **1,806.7** | **3,174.4** | **59.2** | **62.8** |
| Tyrosine | 1,749.5 | 1,946.0 | 1,945.4 | 1,928.4 | 2,308.4 | 2,279.3 |
| Valine | 2,320.7 | 2,537.0 | 2,542.3 | 2,735.4 | 2,778.4 | 2,742.8 |
| Methionine | 618.1 | 642.7 | 627.4 | 672.9 | 644.3 | 648.0 |
| Tryptophane | 707.0 | 704.0 | 706.2 | 732.7 | 797.4 | 819.8 |
| Phenylalanine | 2,300.7 | 2,392.9 | 2,287.5 | 2,486.4 | 2,841.0 | 2,857.0 |
| Isoleucine | 2,345.8 | 2,558.0 | 2,539.7 | 2,700.7 | 2,854.3 | 2,864.9 |
| Leucine | 3,413.0 | 3,745.7 | 3,679.6 | 3,936.8 | 4,209.3 | 4,201.7 |
| Lysine | 2,865.0 | 3,190.3 | 3,191.2 | 3,358.7 | 3,478.1 | 3,267.9 |
| proline | 1,448.2 | 3,062.2 | 2,215.8 | 2,187.4 | 2,950.2 | 2,766.1 |
| **Total aminoic acid** | **40,376.7** | **47,290.1** | **47,357.3** | **51,615.0** | **49,076.7** | **48,596.5** |



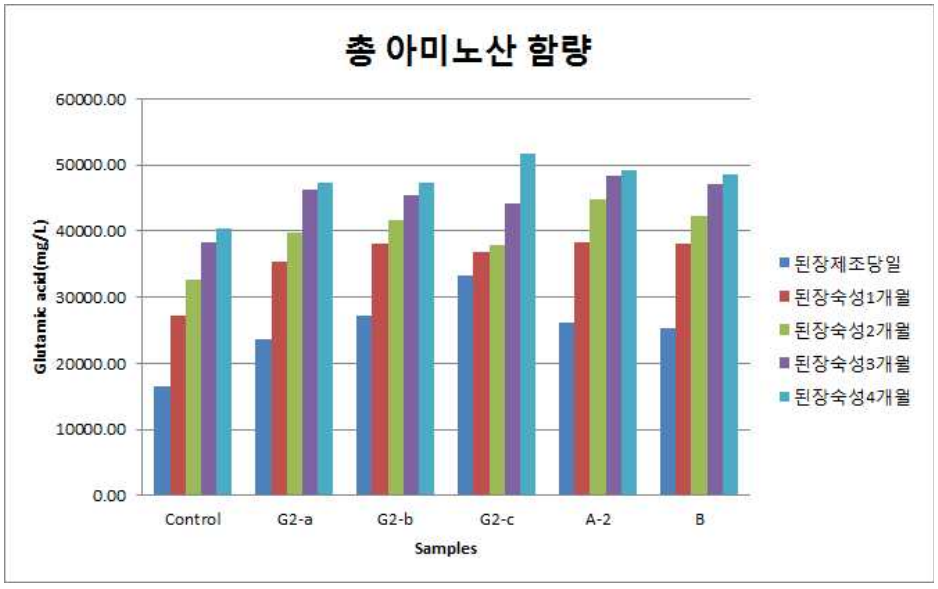




Fig. 10. Free amino acids of soybean pastes.

### 3. 마이코톡신 프리 균주와 GABA 생산 유산균으로 제조된 된장의 관능평가

1) 관능평가 방법

1-4개월 동안 숙성된 마이코톡신 프리 가바 함유 저염된장 Control에 GABA 분말을 농도별로 첨가하여 G1 시료를 제조하고, control, G1, G2a, G2b, G2c, A-2, B 된장 시료를 관능평가 하였다. 각 된장시료 10 g을 100 ml의 물을 넣고 3분간 끓인 장국을 관능검사의 시료로 사용하였으며 된장국의 맛, 향, 색상, 종합적인 기호도는 선호도로 최고 5점, 최저 1점으로 5점 척도로 평가하였다.

2) 관능평가 결과

마이코톡신 프리 균주 *Asp. oryzae* 46471와 GABA 생성 *Lac. brevis*를 이용하여 제조한 후 1-4개월 동안 숙성된 된장시료(A-2, B)와 GABA가 고농도로 생성된 콩 발효분말을 첨가한 된장시료(G2a, G2b, G2c) 및 이를 사용하여 제조한 장국의 관능평가 결과는 Table 24 - 27, Fig. 11 - 14에 나타내었다.

관능검사 결과 맛 항목에서 모든 된장시료 및 장국시료는 숙성 기간에 따라 점수가 높아졌으며 숙성 4개월째 된장시료에서 **G2a**, G2c, **A-2**, **B**, G2b, Control이 각각 3.5, 3.4, 3.3, 3.3, 3.2, 3.1 순으로 높게 나타났으며 장국시료의 경우 **G2c**, **A-2**, **B**, G2a, G2b, Control이 각각 4.3, 4.0, 4.0, 3.7, 3.5, 3.4 순으로 높게 나타났다(Table 24, Fig. 11). 이러한 결과는 아미노산 함량과 관련된 것으로 보인다. 위의 유리 아마노산 분석결과 총 아미노산 함량은 숙성기간이 지남에 따라 증가하였으며 또한 우마미와 관련된 Asp, Glu가 다소 높게 확인 되었다. *Asp. oryzae* 46471와 *Lac. brevis*를 이용하여 제조한 된장의 경우 된장 시료와 장국 시료 모두 **A-2**, **B**의 점수가 동일하였으며 콩 발효분말을 첨가한 시료 중 된장시료는 **G2a**, 장국시료는 **G2c**가 가장 높게 나타났다.

향 항목에서 된장시료 G2b, G2c가 숙성기간에 따라 점수가 낮아지고 A-2가 숙성기간에 따라 점수가 높아졌으나 이를 제외한 된장시료는 숙성기간에 따른 변화가 없었으며 장국시료에서도 마찬가지로 숙성기간에 따른 변화를 확인할 수 없었다. 숙성 4개월째 된장시료의 향은 **A-2**, **B**, **G2a**, G2c, G2b, Control이 각각 3.7, 3.7, 3.0, 2.5, 2.3, 2.2 순으로 높게 나타났으며 장국시료의 경우 **A-2**, **G2c**, G2b, G2a, B, Control이 각각 3.7, 3.5, 3.3, 3.2, 3.0, 3.0 순으로 높게 나타났다(Table 25, Fig. 12). 유용균주를 이용하여 제조한 된장은 된장 시료와 장국 시료 모두 **A-2**의 점수가 가장 높았으며 콩 발효분말을 첨가한 시료 중 된장시료는 **G2a**, 장국시료는 **G2c**가 가장 높게 나타났다.

관능평가 결과 색상 항목에서 장국시료 A-2가 숙성기간에 따라 선호도 점수가 높아졌으나 이외의 모든 된장시료 및 장국시료는 숙성기간에 따른 변화를 확인할 수 없었다. 숙성 4개월째 된장시료의 색상은 **G2a**가 3.5점으로 가장 높고 **A-2**, G2c, G2b, Control가 동일하게 3.0점, B가 2.8점으로 가장 낮게 나타났다. 장국시료의 경우 **A-2**, **G2c**,

G2a, Control, G2b, B이 각각 3.7, 3.3, 3.2, 3.3, 3.0, 2.8 순으로 높게 나타났다(Table 26, Fig. 13). 된장 A-2와 B 중 된장시료와 장국 모두 **A-2**의 점수가 가장 높았으며 콩 발효분말을 첨가 시료 중 된장은 **G2a**, 장국은 **G2c**가 가장 높게 나타났다.

전체적인 기호도 항목에서 된장시료 G2a, G2b가 숙성기간에 따라 기호도가 감소하였으나 이 외의 모든 시료에서는 숙성기간에 따라 전체적인 기호도 점수가 증가하는 것으로 나타났다. 숙성 4개월째 된장시료에서 **A-2**, **G2c**, B, Control, G2a, G2b가 각각 3.7, 3.6, 3.5, 3.2, 2.7, 2.5 순으로 높게 나타났으며 장국시료의 경우 **A-2**, **G2b**, B, G2a, Control, G2c가 각각 4.2, 3.9, 3.8, 3.6, 3.6, 3.3 순으로 높게 나타났다(Table 27, Fig. 14). 균주를 이용하여 발효된 된장 A-2와 B 중 된장시료와 장국 모두 **A-2**의 점수가 가장 높았으며 콩 발효분말을 첨가한 시료 중 된장시료는 **G2c**, 장국시료는 **G2b**가 가장 높게 나타났다.

따라서 *Asp. oryzae* 46471와 *Lac. brevis*를 이용하여 제조한 된장 A-2와 B 중에서 관능이 우수한 **A-2**, 콩 발효분말을 첨가한 시료 중 대체적으로 관능이 우수하였던 **G2a**, **G2c**를 선발하여 시중에 판매중이 재래된장 제품과 관능평가를 수행하고자 한다.

Table 24. The taste of soybean paste during the ripening.

| Samples | | the months of ripening(Unit: score) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Control | G2a | G2b | G2c | A-2 | B |
| soybean paste | 1 | 2.2 | 3.0 | 3.1 | 2.7 | 2.5 | 3.1 |
| | 2 | 2.8 | 3.1 | 3.1 | 2.9 | 3.3 | 3.2 |
| | 3 | 3.0 | 3.2 | 3.2 | 3.3 | 3.2 | 3.2 |
| | 4 | 3.1 | 3.5 | 3.2 | 3.4 | 3.3 | 3.3 |
| soup | 1 | 2.8 | 2.3 | 2.5 | 2.9 | 2.7 | 2.5 |
| | 2 | 2.9 | 2.3 | 3.3 | 2.9 | 3.1 | 2.7 |
| | 3 | 3.3 | 3.3 | 3.5 | 3.0 | 3.2 | 3.1 |
| | 4 | 3.4 | 3.7 | 3.5 | 4.3 | 4.0 | 4.0 |

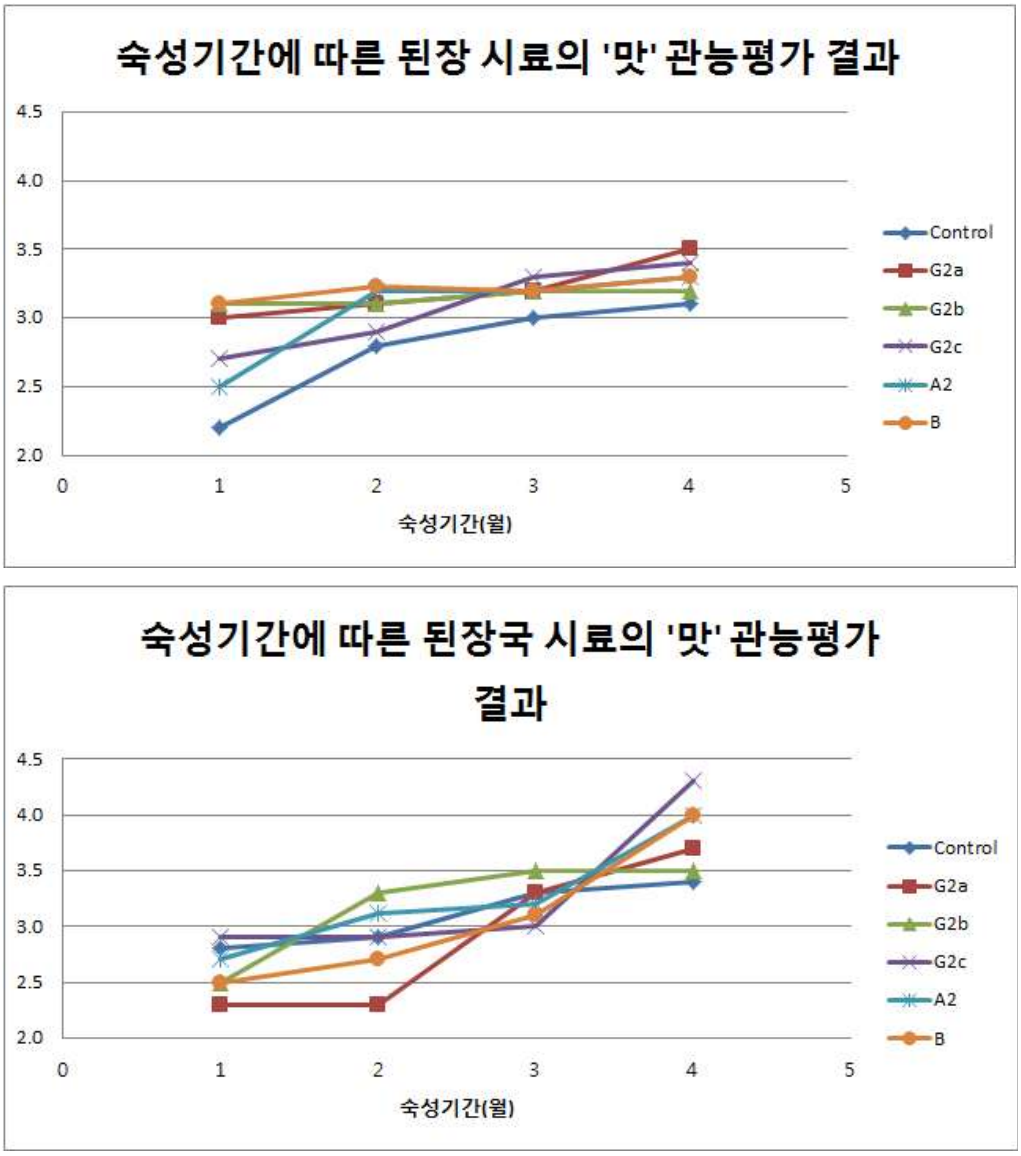



Fig. 11. The taste of soybean paste during the ripening.

Table 25. The flavor of soybean paste during the ripening.

| Samples | | the months of ripening(Unit: score) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Control | G2a | G2b | G2c | A-2 | B |
| soybean paste | 1 | 2.3 | 3.0 | 3.5 | 3.2 | 2.5 | 3.7 |
| | 2 | 2.5 | 2.5 | 3.2 | 3.2 | 3.0 | 3.0 |
| | 3 | 2.8 | 3.0 | 2.7 | 2.8 | 3.5 | 3.3 |
| | 4 | 2.2 | 3.0 | 2.3 | 2.5 | 3.7 | 3.7 |
| soup | 1 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.3 | 3.0 | 2.8 |
| | 2 | 2.7 | 3.2 | 2.8 | 2.5 | 2.8 | 3.0 |
| | 3 | 3.3 | 3.5 | 3.3 | 3.2 | 3.5 | 3.0 |
| | 4 | 3.0 | 3.2 | 3.3 | 3.5 | 3.7 | 3.0 |

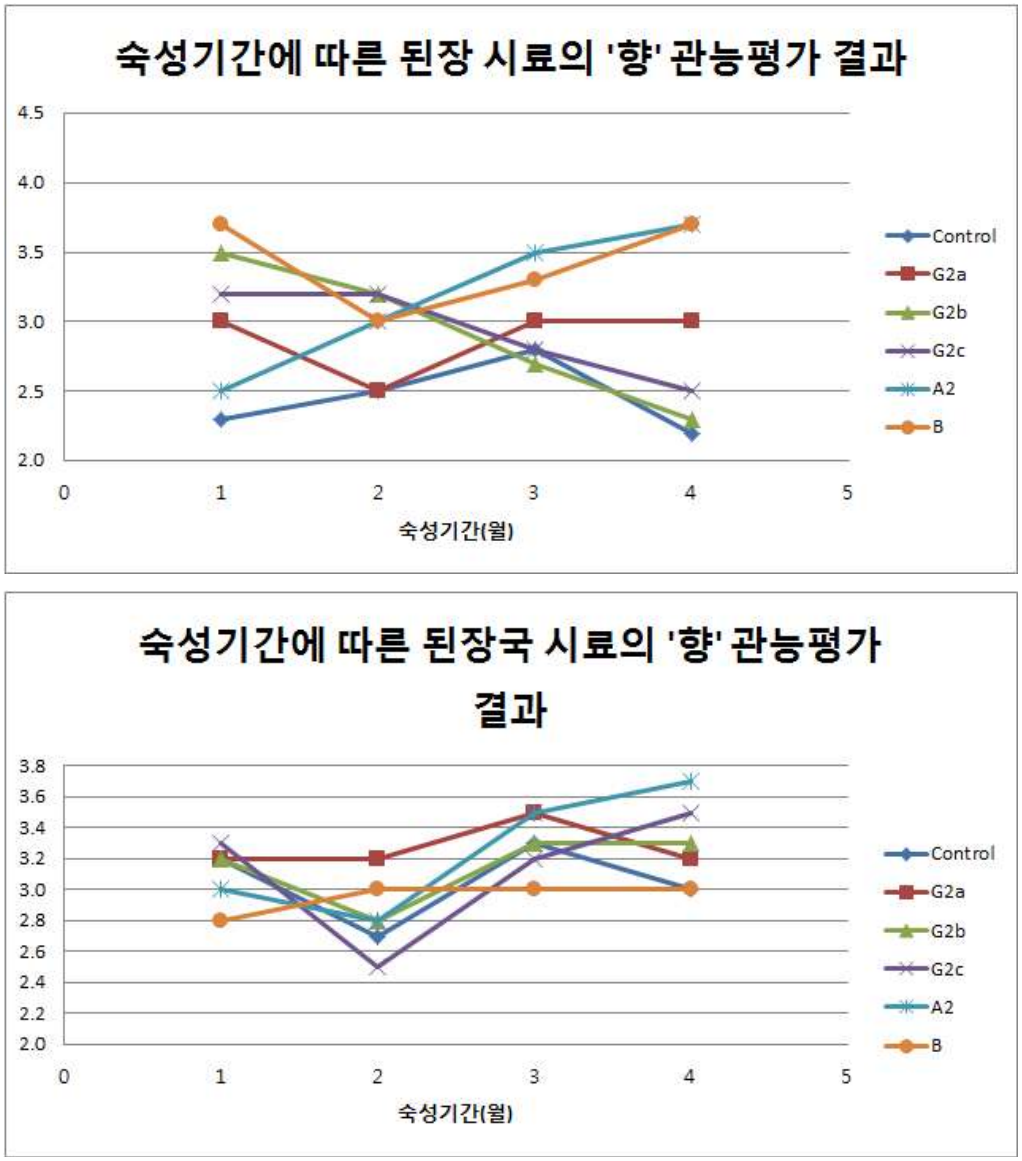



Fig. 12. The flavor of soybean paste during the ripening.

Table 26. The color of soybean paste during the ripening.

| Samples | | the months of ripening(Unit: score) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Control | G2a | G2b | G2c | A-2 | B |
| soybean paste | 1 | 3.2 | 3.7 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.0 |
| | 2 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.3 | 2.7 | 3.0 |
| | 3 | 3.3 | 3.2 | 3.2 | 3.5 | 2.8 | 3.3 |
| | 4 | 3.0 | 3.5 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 2.8 |
| soup | 1 | 3.0 | 3.3 | 3.5 | 3.2 | 3.0 | 3.3 |
| | 2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 2.8 | 3.2 | 3.3 |
| | 3 | 3.5 | 3.3 | 3.3 | 3.0 | 3.7 | 3.3 |
| | 4 | 3.2 | 3.2 | 3.0 | 3.3 | 3.7 | 2.8 |

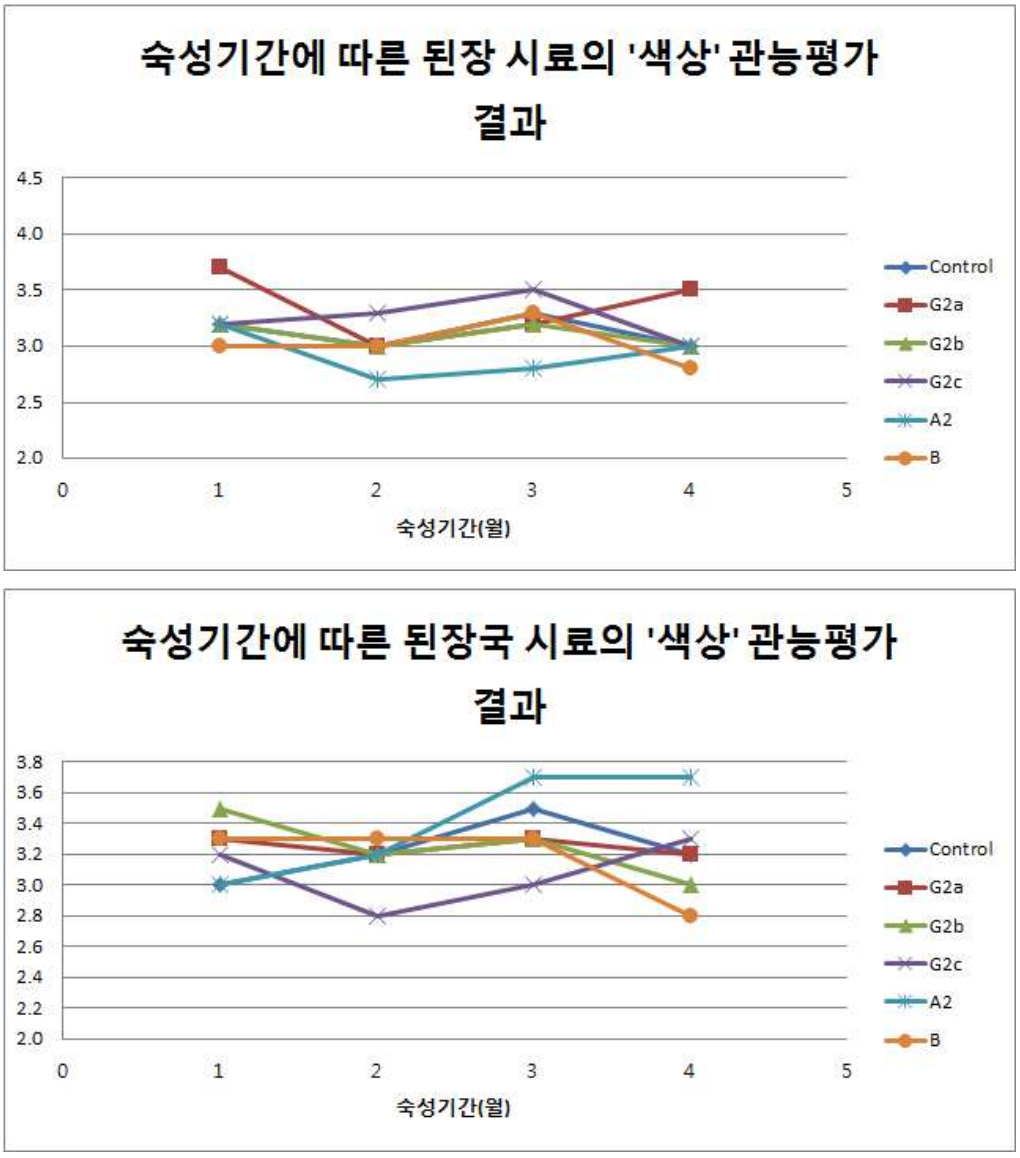



Fig. 13. The color of soybean paste during the ripening.

Table 27. The overall preference of soybean paste during the ripening.

| Samples | | the months of ripening(Unit: score) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Control | G2a | G2b | G2c | A-2 | B |
| soybean paste | 1 | 2.3 | 3.0 | 3.7 | 3.0 | 2.5 | 3.3 |
| | 2 | 3.0 | 2.8 | 3.0 | 3.0 | 3.5 | 3.3 |
| | 3 | 3.2 | 2.7 | 3.0 | 3.6 | 3.5 | 3.4 |
| | 4 | 3.2 | 2.7 | 2.5 | 3.6 | 3.7 | 3.5 |
| soup | 1 | 2.6 | 2.2 | 2.6 | 2.9 | 2.3 | 2.3 |
| | 2 | 2.7 | 2.8 | 3.3 | 2.9 | 3.0 | 2.5 |
| | 3 | 3.5 | 3.7 | 3.8 | 3.0 | 3.2 | 3.0 |
| | 4 | 3.6 | 3.6 | 3.9 | 3.3 | 4.2 | 3.8 |

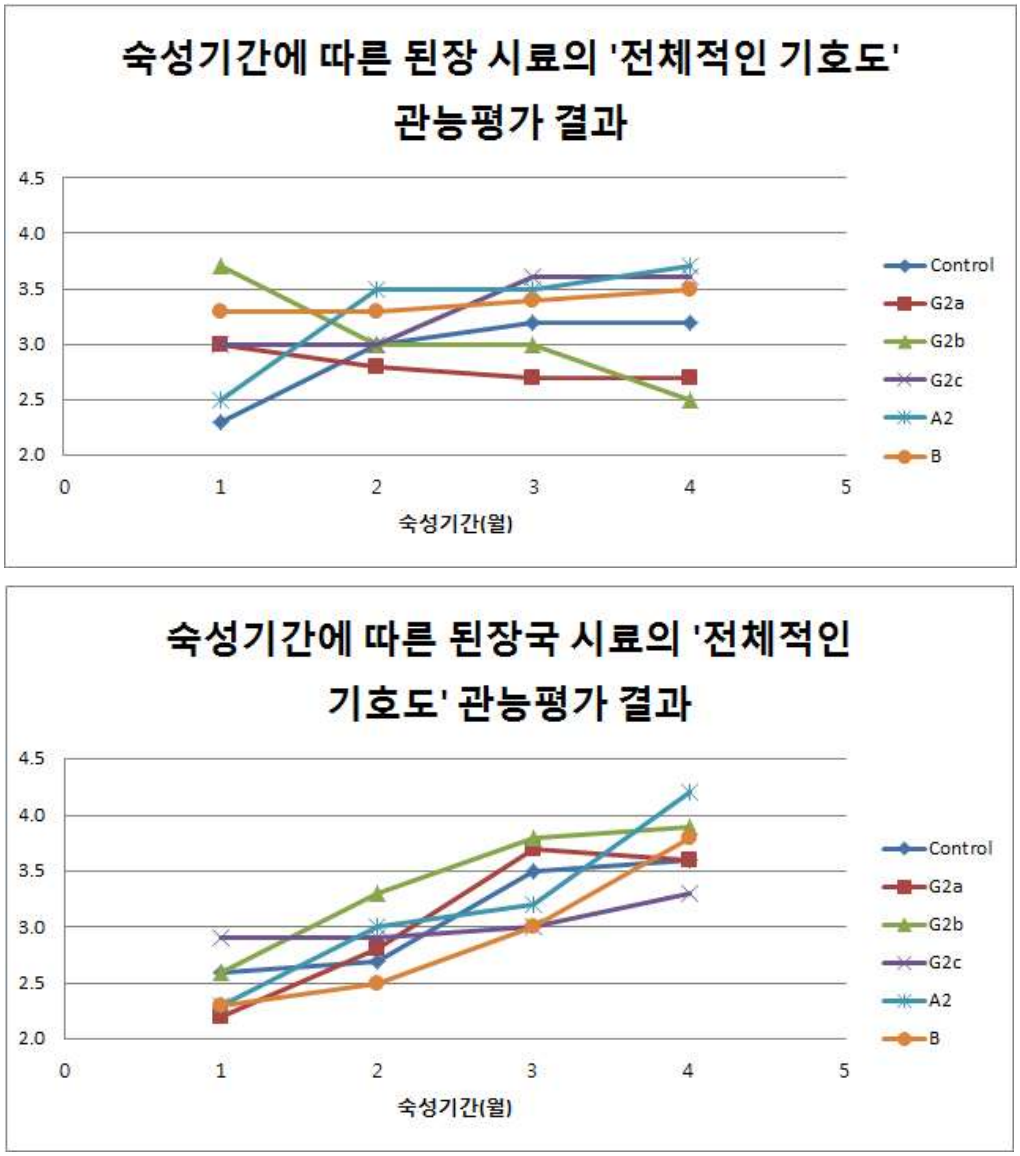



Fig. 14. The overall preference of soybean paste during the ripening.

## 4. 시중 된장과 제조 된장의 관능적 평가

1) 관능평가 방법

이전의 관능평가를 통하여 선발된 관능이 우수한 시중된장 SS, S-1과 남안동 재래된장, 본 실험에서 제조한 된장 중 관능이 우수하였던 숙성 4개월째 된장 A-2와 G2a, G2c의 총 6개의 시료를 관능평가의 시료로 사용하였다. 또한 각 된장시료 10 g을 100 ml의 물을 넣고 3분간 끓인 장국을 관능검사의 시료로 사용하였으며 된장 및 된장국의 맛, 향, 색상, 종합적인 기호도를 최고 5점, 최저 1점으로 5점 척도로 평가하였다.

2) 관능평가 결과

된장의 관능평가 결과는 Table 28, Fig. 15에 나타내었다. 평가의 결과는 이전의 시중된장 제품을 평가했을 때와 마찬가지로 된장 시료와 장국 시료 모두에서 시중에 판매중이 제품인 S-1 시료의 점수가 가장 높게 나타났고 이에 반하여 시중에 함께 판매중인 남안동 된장의 경우 된장 시료에서 향과 색상을 제외한 모든 항목에서 가장 낮은 점수를 나타내었다. 또한 이전 본 실험에서 제조한 된장시료 6가지를 관능 평가한 결과와 달리 이번 평가에서는 A-2가 G2c에 비하여 낮은 점수를 나타내었다. 본 실험을 통하여 제조하여 4개월간 숙성된 된장 A-2의 경우 향 항목을 제외한 모든 항목에서 시중에 판매중인 SS 된장시료에 비하여 높은 점수를 나타내었다. 균주 *Asp. oryzae* 46471와 *Lac. brevis*를 이용하여 제조한 A-2의 경우에는 콩 발효분말을 첨가한 G2c에 비하여 낮지만 된장시료 중 맛, 전체적인 기호도 점수가 2.8, 3.0, 장국시료의 맛, 향 등에서 2.8, 2.4로 SS 시료와 같은 점수를 얻었다. G2a 시료의 경우에도 된장시료와 장국시료의 향이 각각 3.2, 2.8로 SS 시료에 비하여 높게 나타났다. 된장시료 G2c와 A-2가 시중 된장인 S-1에 비하여 낮은 관능점수를 얻었으나 본 실험에서 제조된 된장의 경우 숙성기간이 4개월로 일반적인 남안동 재래된장의 숙성기간인 2년에 비하여 숙성기간이 짧았으며 장기간 숙성을 통하여 관능적인 평가가 더 높아질 것으로 기대된다.

Table 28. The results of sensory test.

| Samples | | the months of ripening(Unit: score) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | G2b | G2c | A-2 | SS | S-1 | *남안동된장* |
| soybean paste | taste | 2.6 | **3.0** | 2.8 | 2.8 | **3.2** | *2.4* |
| | flavor | **3.2** | 3.0 | 2.2 | 3.0 | **3.2** | *2.4* |
| | color | 2.4 | **3.2** | 2.2 | 2.8 | **4.0** | *1.4* |
| | overall preference | 2.8 | **3.2** | 3.0 | 3.0 | **3.4** | *2.2* |
| soup | taste | 2.6 | **3.0** | 2.8 | 2.8 | **3.2** | *1.4* |
| | flavor | 2.8 | **3.0** | 2.4 | 2.4 | **3.0** | *1.8* |
| | color | 2.4 | **2.8** | 2.2 | 2.6 | **3.0** | *2.2* |
| | overall preference | 2.4 | **2.8** | 2.4 | 2.6 | **3.2** | *2.2* |

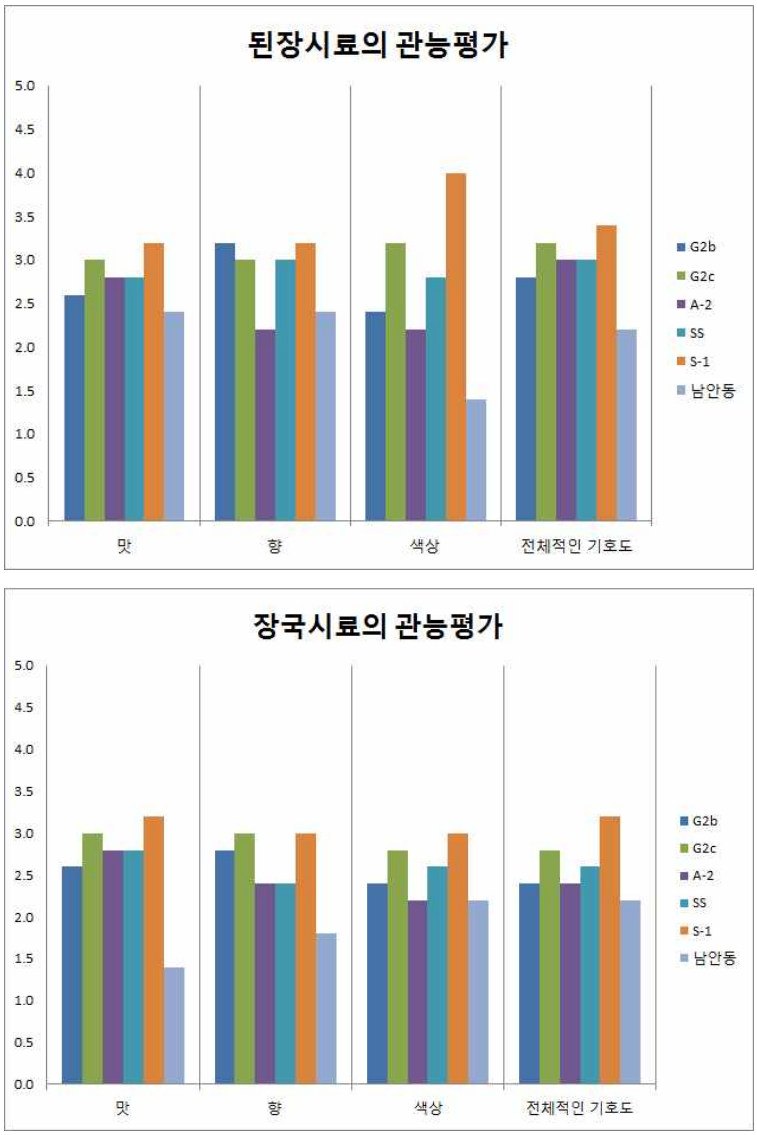



Fig. 15. The results of sensory test

## 제 22장. 결과 요약

이상의 결과를 보면  유산균 혼합 발효된 메주를 이용할 경우 염도를 8%로 첨가하여 저염 된장을 제조하는 것이 적정한 것으로 나타났다. 조건별로 제조된 46471 된장, 남안동 된장 각각의 시료를 숙성기간에 따라 아플라톡신을 분석한 결과 모든 시료에서 아플라톡신이 검출되지 않았다. 된장의 아미노태 질소함량은 숙성 기간에 따라 증가하였으며 46471 메주를 이용하며 유산균 발효한 저염된장 시료 F2가 1,123.2 mg/g으로 가장 높게 나타났으며 그 다음으로 46471 메주로 유산균 발효하지 않은 저염된장 시료 F4가 1,094.2mg/g, 남안동 메주로 만든 저염된장 F8이 922.3 mg/g 순으로 높게 나타났다. 마이코톡신 프리 균주 Aspergilus oryzae FMBS 46471를 이용하여 메주를 제조하여 Lactobacillus brevis GABA 100로 유산균 발효를 한 후 만든 46471 된장 시료와 남안동 된장을 이용하여 담근 된장의 유리아미노산 함량을 분석한 결과 GABA 함량은 숙성기간에 따라 증가하는 경향을 보였다. GABA 함량은 46471메주를 이용하여 유산균 발효한 저염 된장 시료인 F2 시료에서 가장 높게 나타났다.

○ 시중에 유통되는 된장의 관능평가 결과 된장시료에서는 맛 항목에서 SS 시료가 3.7, 향의 경우 SP 시료가 3.8, 색상은 HC-1이 4.0, 전체적인 기호도는 SS, S-2가 동일하게 3.7로 가장 높았다. 장국을 관능 평가한 결과 시료 S-1이 맛, 색상, 전체적인 기호도에서 각각 4.0, 4.0, 4.1로 가장 높게 나타났으며 향은 S-2가 3.8로 높게 나타났다. 이에 시중에서 가장 관능이 우수한 SS, S-1과 본 실험에서 제조한 된장이 관능적으로 시장 경쟁력을 가질 수 있는지를 평가하고 남안동 재래된장을 관능적으로 개선고자 하였다.

○ 실험적으로 *Asp. oryzae* 46471와 *Lac. brevis*를 메주 또는 된장에 접종하여 3주간 숙성한 결과 유산균 수는 *Lac. brevis*를 접종한 A-2, B, C에서는 된장 제조 당일에 비하여 3주 숙성 후 유산균 수가 증가하였으며 그 중에서도 *Asp. oryzae* 46471을 접종하여 메주를 제조하고 된장제조 시 *Lac. brevis*를 첨가하여 숙성한 A-2가 가장 높게 검출되었고 *Lac. brevis* 와 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 배양한 메주를 이용하여 제조한 된장인 B가 가장 낮게 검출되었다. pH는 모든 시료에서 된장 제조 당일에 비하여 3주 숙성 뒤 된장의 pH가 높게 나타났으며 산도는 3주 숙성 후에 모든 시료에서 산도가 증가하였고 염도는 8 - 9 %로 기존의 남안동 된장의 염도 14 %에 비하여 낮게 나타났다. 아미노태 질소 함량의 경우 3주 숙성 후 모든 된장에서 아미노태 질소 함량이 증가하였으며 _*Asp. oryzae* 46471이나 *Lac. brevis*를 메주에 단독 배양하는 것보다 혼합 배양하는 것이 아미노태 질소 함량 증가에 영향을 주는 것으로 보인다.

○ 또한 메주에 *Lac. brevis*와 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 배양하는 것보다 *Lac. brevis*를 된장 제조 시에 따로 접종하는 것이 아미노태 질소 함량 증가에 효과적이었다. 유리 아미노산 함량은 3주 숙성 후 모든 된장에서 총 유리아미노산 함량이 증가하였다.

○ GABA 함량의 경우 *Lac. brevis*와 *Asp. oryzae* 46471을 혼합 배양한 메주를 이용하여 제조한 된장 B에 비하여 *Asp. oryzae* 46471로 발효시킨 메주를 이용하여 된장 제조 시에 *Lac. brevis*를 첨가한 A-2에서 더 높게 검출되었다. 4개월 숙성 후 GABA 함량의 변화는 3주 숙성 결과와 마찬가지로 의 경우 A-1이 C에 비하여 높게 나타나고 B에 비하여 A-2에서 더 높게 검출되었다. 따라서 된장 시료 B와 A-2를 본 실험에 이용하였다.

○ 예비 실험의 된장 제조 과정과 GABA을 함유한 콩 발효분말을 이용하여 가공공장에 적용한 결과 된장의 유산균 수는 숙성 중 감소하다가 숙성 4개월째에 다시 증가하였고 곰팡이 수의 경우에도 숙성 중 점차 감소하다가 3 - 4개월째에 약간 증가하는 경향을 보였다. 이는 온도가 일정하게 유지되는 곳에서 숙성하지 않고 외기에 그대로 노출된 상태에서 2년간 숙성하는 남안동 재래된장이 생산되는 환경을 그대로 적용한 결과로 된장시료가 외부 온도의 영향을 그대로 받아 0 - 5 ℃에서 숙성되어 미생물의 생육이 활발하게 일어나지 않은 것으로 보인다.

○ 수분함량은 모든 된장 시료에서 56.1 - 59.4 %로 나타났으며 숙성기간이 지남에 따라 약간 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었으며 염도는 10.0 - 11.5 %로 기존의 남안동 된장과 같은 염도(14 %)에 비하여 2.5 - 4.0 % 낮게 나타났다. pH는 숙성기간에 따라 약간 감소하였으나 유의적인 변화는 없었으며 시료에 따른 유의적인 차이도 없었으나 총 산도는 모든 종류의 된장에서 숙성기간에 따라 증가하였으며 기온이 올라가는 4월(숙성 4개월째)에 큰 폭으로 증가하였다. 이는 낮은 숙성온도로 인하여 미생물 발효와 효소의 활성이 낮아 산도의 변화 폭이 크지 않다가 4월에 기온이 점차 올라가면서 산도가 급증하였다.

○ 아미노태 질소 함량은 숙성 기간이 경과함에 따라 증가하였으며 Control이 가장 낮았고 *Asp. oryzae* 46471과 *Lac. brevis* 를 접종한 된장 보다 콩 발효분말을 첨가한 G2a, G2b, G2c가 970.7 mg%, 1,022.3 mg%, 1,038.0 mg%으로 높게 나타났다. G2a, G2b, G2c에는 콩 발효 분말이 GABA 농도가 각각 1,000 mg/kg, 2,000 mg/kg, 3,000 mg/kg으로 첨가하였고 이에 따라 G2a가 가장 낮고, G2c가 가장 높은 아미노태 질소 함량을 보였다.

○ 유리아미노산 함량은 총 아미노산 함량과 Glutamic acid 함량은 모든 시료에서 숙성기간에 따라 증가하였으며 숙성 4개월째에 콩 발효분말을 가장 많이 첨가한 G2c가 가장 높게 나타났다. A-2, B의 경우 접종된 미생물의 작용에 의하여 Control 된장에 비하여 Glutamic acid 함량이 높았으나 콩 발효분말을 첨가한 시료보다 낮았고 GABA 함량 은 숙성 기간에 따라 큰 변화가 일어나지 않았으며 이는 GABA를 생성하는 *Lac. brevis*가 숙성 시 낮은 온도에 의하여 생육하지 못한 것으로 보인다.

○ 관능검사 결과 맛 항목에서 모든 된장시료 및 장국시료는 숙성 기간에 따라 점수가 높아졌으며 숙성 4개월째 된장시료에서 G2a, G2c, A-2, B, G2b, Control 순으로 높게 나타났고 장국시료의 경우 G2c, A-2, B, G2a, G2b, Control 순으로 높게 나타났다. 향 항목에서 향은 A-2, B, G2a, G2c, G2b, Control 순으로, 장국시료의 경우 A-2, G2c, G2b, G2a, B, Control 순으로 높게 나타났다. 색상 항목에서 G2a가 3.5점으로 가장 높고 A-2, G2c, G2b, Control가 동일하게 3.0점, B가 2.8점으로 가장 낮게 나타났으며 장국시료는 A-2, G2c, G2a, Control, G2b, B 순으로 높게 나타났다. 전체적인 기호도 항목에서 숙성기간에 따라 전체적인 기호도 점수가 증가하는 것으로 나타났으며 숙성 4개월째 된장시료에서 A-2, G2c, B, Control, G2a, G2b 순으로, 장국시료의 경우 A-2, G2b, B, G2a, Control, G2c 순으로 높게 나타났다. 이에 *Asp. oryzae* 46471와 *Lac. brevis*를 이용하여 제조한 된장 A-2와 B 중에서 관능이 우수한 A-2, 콩 발효분말을 첨가한 시료 중 대체적으로 관능이 우수하였던 G2a, G2c를 선발하여 시중에 판매중이 재래된장 제품과 관능평가를 수행하였다.

○ 시중된장 SS와 S-1과 남안동 재래 된장, 본 실험에서 제조한 A-2와 G2a, G2c의 총 6개의 시료를 관능 평가한 결과 S-1 시료의 점수가 가장 높게 나타났으며 남안동 된장의 경우 된장 시료에서 향과 색상을 제외한 된장, 장국의 모든 항목에서 가장 낮은 점수를 나타내었다. 본 실험 된장인 G2c는 SS 된장시료에 비하여 점수가 높았으며 A-2는 G2c보다 낮았지만 된장시료 중 맛, 전체적인 기호도 점수가 2.8, 3.0, 장국시료의 맛, 향 등에서 2.8, 2.4로 SS 시료와 같은 점수를 얻었다. 된장시료 G2c와 A-2가 시중 된장인 S-1에 비하여 낮은 관능점수를 얻었으나 본 실험에서 제조된 된장의 경우 숙성기간이 4개월로 일반적인 남안동 재래된장의 숙성기간인 2년에 비하여 숙성기간이 짧았으며 장기간 숙성을 통하여 관능적인 평가가 더 높아질 것으로 기대된다.

## 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 4-1. 목표 달성도

| 연도 | 연구개발 목표 | 달성도(%) |
|---|---|---|
| 1차년도<br>2013.07<br>-<br>2014.07 | ○ 마이코톡신 생산 음성균주를 이용한 마이코톡신 프리 전통된장의 제조 | 100 |
| | ○ 제조된 마이코톡신 프리 전통된장의 이화학적 특성 규명 | 100 |
| | ○ 마이코톡신 프리 전통된장의 품질기준 / 제조방법 확립 | 100 |
| 2차년도<br>2014.07<br>-<br>2015.07 | ○ GABA 생산 우수균주를 이용한 기호성이 높은 기능성 저염 된장의 제조 | 100 |
| | ○ 제조된 저염 된장의 이화학적 특성 규명 | 100 |
| | ○ 기능성 저염 된장의 품질기준 / 제조방법 확립 | 100 |
| 3차년도<br>2015.07<br>-<br>2016.07 | ○ 독소 생성 음성 균주의 스타터 종균 /<br>GABA 생산 우수균주를 이용한 고기능성 저염 발효 된장의 제품화 | 100 |
| | ○ 제조된 고기능성 저염 발효 된장의 이화학적 특성 규명 | 100 |
| | ○ 고기능성 저염 발효 된장의 품질기준 / 제조방법 확립 | 100 |

### 4-2. 관련분야 기여도

○ 국내 발효 식품에 널리 존재하는 속하는 황국균(*Aspergillus oryzae*) 사용에 대한 안전성 문제에 대한 연구를 통하여 식용 미생물의 안전성을 확보하고 독소 생성능 균의 사용에 대한 체계적인 표준화 및 안전 관리에 기여하였다.

○ 혈압조절 및 뇌기능개선에 효과가 있는 GABA를 생산하는 *Lactobacillus. brevis* GABA 100을 된장에 이용하여 발효시킴으로서 기존의 장들보다 훨씬 낮은 염도와 마이코톡신 프리 저염 된장 제품을 개발하여 소비자의 니즈에 부합하고 건강에 유익한 된장을 개발하였다.

○ 관련 기술은 된장 외에도 다양한 콩 발효 식품의 개발에 적용이 가능하여 기술의 적용 범위를 확대하였다.

## 5. 연구결과의 활용계획

| 코드번호 | D-07 |
|---|---|

○ 활용방안
- 안전성, 기능성, 기호성이 확보된 된장 신제품을 개발하여 농업협동조합의 매출 증대 및 농민의 소득 향상
- 식품원료미생물의 인정 기준 규격 재검토를 위한 기초 자료로 활용
- 안전성이 확보된 스타터 종균의 라이브러리 확보
- 마이코톡신프리 가바 저염 장류의 제품화

○ 기대성과
- 본 연구는 안전성이 확보된 전통 장류의 개발, 국민 건강 증진에 기여
- 저염 장류의 개발로 인한 국민 건강 증진에 기여
- 건강에 대한 관심의 증대로 전통적인 방식 제조 장류의 시장이 성장하고 있는 가운데, 안전성이 확보된 스타터 종균의 선별 및 균주 뱅크 확립을 통한 안전성이 확보된 전통 장류의 개발
- 기능성이 강화된 발효 장류의 개발
- 장류의 풍미의 다변화 개발

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

| 코드번호 | D-08 |
|---|---|

○ 그동안 *Aspergillus niger*와 *Aspergillus oryzae* 등은 식품용으로 안전한 것으로 취급되어 왔으나 *Aspergillus niger*의 상당한 균주가 ochratoxin을 생산하고 *Aspergillus oryzae*의 상당한 균주가 aflatoxin을 생산하는 것으로 규명되어 유럽식품안전청(EFSA)에서 위 마이코톡신 생산 균주들을 식품의 원료로 인정하지 않고 있음. 따라서, 마이코톡신 생산성이 없는 균주를 선발하여 발효 된장을 제조하는 전략적 연구가 필요하며 본 연구팀에서 개발하여 확보한 마이코톡신 생산 프리 *Aspergillus* 균주 자원 확보는 매우 의미 있는 결과임. 마이코톡신 프리 가바 함유 된장은 해외에서는 아직 개발 되지 못하였음.

## 7. 연구개발결과의 보안등급

| 코드번호 | D-09 |
|---|---|

○ 공개 가능

## 8. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

| 코드번호 | D-11 |
|---|---|

○ (주) 비피도

**1. 연구실 안전관리 이행조치**

**가. 위험인자 분석**

- 표준품 및 시약관리 : 사용 시약의 특성별 위험요소를 확인하고 관리하기 위해 유통기한 관리 및 MSDS를 구비
- 생물분야 : 매년 정기 건강진단을 통해 장티프스, 전염성피부질환, 결핵 등 연구원의 건강 및 생물학적 위해요소 관리
- 기타분야 : 연구실 내 위험, 유해인자를 확인하고 기계 및 기구류의 사용방법을 매뉴얼을 작성하여 관리하고, 담당자를 지정하여 관리

**나. 위생교육**

- 정기교육 : 분기에 1회 이상, 연구원 임직원 및 과제참여자를 대상으로 식품품질안전교육 실시하여 기록
- 비정기교육 : 신입사원 대상 OJT교육 등 추가적인 교육이 필요한 경우 실시하여 기록

**다. 안전점검**

- 일일점검 : 매일 연구실 종사자가 실시
- 주간점검 : 주1회, 연구실책임자 및 연구실종사자가 실시하여 부적정 시 개선대책 및 조치
- 안전교육 : 매월 작업자안전보건교육을 실시하여 기계, 기구류 및 실험실 안전교육을 실시하여 기록

○농협식품연구원은 아래 계획들을 수립, 운용하고 있음.

**1. 연구실 안전관리 계획**

**가. 위험인자 분석**

- 화학분야 : 사용 시약의 특성별 위험요소 확인 및 안전표지 부착
- 생물분야 : 병원성 미생물 및 바이러스 등 인체 유해물질 확인 및 안전표지 부착
- 기타분야 : 전기, 기계, 환기, 폐기물 등 연구실내 위험, 유해인자 확인 및 개선

**나. 안전교육**

- 정기교육 : 반기 1회 이상, 연구원 임직원 및 과제참여자 전원

**다. 안전점검**

- 일일점검 : 매일 연구실 종사자가 실시 및 기록
- 주간점검 : 주1회, 연구실책임자 및 연구실종사자가 실시 및 안전점검표 기록, 안전점검 결과 부적정 시 개선대책 및 조치결과 등 기재

## 9. 연구개발과제의 대표적 연구실적

| | | | | | | 코드번호 | | D-12 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 번호 | 구분(논문/특허/기타) | 논문명/특허명/기타 | 소속 기관명 | 역할 | 논문게재지/특허등록국가 | Impact Factor | 논문게재일/특허등록일 | 사사여부(단독사사 또는 중복사사) | 특기사항(SCI여부/인용횟수 등) |
| 1 | 논문 | The reliable and simple detection of ochratoxin and fumonisin production in black Aspergillus | ㈜비피도 | 책임자 | J. Food Protection | 1.85 | 77, 653-658 (2014) | 단독 | SCI |
| 2 | 논문 | An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in Aspergillus strains. | ㈜비피도 | 책임자 | J. Food Protection | 1.85 | 77, 1010-1016 (2014) | 단독 | SCI |
| 3 | 논문 | Characterization of the production of biogenic amines and gamma-aminobutyric acid in the soybean pastes fermented by Aspergillus oryzae and Lactobacillus brevis. | ㈜비피도 | 책임자 | J. Microbiol. Biotechnol. | 1.68 | 25, 464-468 (2015). | 외 1 | SCI |
| 4 | 특허 | 오크라톡신과 푸모니신을 생산하지 않은 균주의 선별 방법 및 이를 이용하여 선별된 균주로 발효하여 제조된 무독소 된장 | ㈜비피도 | 책임자 | 출원번호 10-2014-0151542 | | 2014년 11월3일 | 단독 | 특허 |
| 5 | 특허 | 아플라톡신과 시클로피아존산을 생산하지 않은 균주의 선별 방법 및 이를 이용하여 선별된 균주로 발효하여 제조된 무독소 된장 | ㈜비피도 | 책임자 | 출원번호 10-2014-0151543 | | 2014년 11월3일 | 단독 | 특허 |

*논문게재

| 논문(국내외 전문학술지) 게재 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 번호 | 논문명 | 학술지명 | 주저자명 | 호 | 국명 | 발행기관 | SCI 여부 |
| 1.<br>1차년도 | The reliable and simple detection of ochratoxin and fumonisin production in black Aspergillus | J. Food Protection | Kim NY | 77, 653-658 (2014) | USA | International Association for Food Protection | SCI |
| 2.<br>1차년도 | An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in Aspergillus strains. | J. Food Protection | Kim NY | 77, 1010-1016 (2014) | USA | International Association for Food Protection | SCI |
| 3.<br>1차년도 | Characterization of soybean fermented by aflatoxin non-producing Aspergillus oryzae and ɣ-aminobutyric acid producing Lactobacillus brevis | J Korean Soc Appl. Biol. Chem. | Kim NY | 57, 703-708 (2014) | 대한민국 | 한국응용생명화학회 | SCIE |
| 4.<br>1차년도 | 고엽산 생산능 선발 유산균을 이용한 공동배양과pH-조절 발효조건에서의 엽산 생산 | J. Food Sci. Technol. | 두경민 | 46, 328-333 (2014) | 대한민국 | 한국식품과학회 | SCOPUS |
| 5.<br>2차년도 | Production of ɣ-aminobutyric acid during fermentation of Gastrodia elata Bl. by co-culture of Lactobacillus brevis GABA 100 with Bifidobacterium bifidum BGN4 | Food Sci. Biotechnol. | Kim JA | 23, 459-466 (2014) | 대한민국 | 한국식품과학회 | SCIE |
| 6<br>2차년도 | Characterization of the production of biogenic amines and gamma-aminobutyric acid in the soybean pastes fermented by Aspergillus oryzae and Lactobacillus brevis. | J. Microbiol. Biotechnol. | Kim NY | 25, 464-468 (2015). | 대한민국 | 한국미생물생명공학회 | SCIE |
| 7.<br>2차년도 | Fermentation of Platycodi radix and bioconversion of platycosides using co-culture of Saccharomyces cerevisiae KCTC 7828 and Aspergillus awamori FMB S900 | Food Sci. Biotechnol. | Hwang YH | 24, 183-189 (2015) | 대한민국 | 한국식품과학회 | SCIE |
| 8.<br>3차년도 | 다양한 배양조건이 Aspergillus Sp. 의 곰팡이 독소 생산에 미치는 영향. | J. Food Hyg. Saf. | 이유나 | 31, 1-6 (2016) | 대한민국 | 한국식품위생안전성학회 | |
| 9.<br>3차년도 | Korean Ginseng Berry Fermented by Mycotoxin Non-producing Aspergillus niger and Aspergillus oryzae | BPB J. | Li ZP | in press | 일본 | BPB J. | SCI |

**학술발표**

1. Nam Yeun Kim, Geun Eog Ji

Characterization of soybean fermented by mycotoxin non-producing *Aspergillus oryzae* and ɣ-aminobutyric acid producing *Lactobacillus brevis* 한국식품과학회 학술발표회 (2014)

2. Nam Yeun Kim, Geun Eog Ji

Characterization of ɣ-aminobutyric acid production in radish *Kimchi* and cabbage *Kimchi* using *Lactobacillus brevis* GABA 100 한국식품과학회 학술발표회 (2014)

3. Li Zhipeng, Ahn Hyung Jin, Kim Nam Yeon, Ji Geun Eog

Fermentation of ginseng berry by mycotoxin non-producing molds. 한국식품과학회 학술발표회 (2014)

4. Eun Kyeong Jang, Nam Yeon Kim, Geun Eog Ji

Production of GABA in fermented soybean by *L. brevis* GABA100 and *Aspergillus oryzae* KACC 46471. 한국식품과학회 학술발표회 (2014)

5. Kim NY, Lee JH, Lee IH, Ji GE. An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in *Aspergillus* strains. IFT Annual Meeting and Food Expo 2014, New Orleans, USA

6. Kim NY, Lee IH , Ji GE. The reliable and simple detection of ochratoxin and fumonisin production in black *Aspergillus*. IFT Annual Meeting and Food Expo 2014, New Orleans, USA

7. Kim NY, Ji GE. Characterization of the production of biogenic amines and GABA in the soybeans fermented by *Aspergillus oryzae* and *Lactobacillus brevis* IFT Annual Meeting and Food Expo 2015, Chicago, USA

8. Kim NY, Ji GE. Characterization of soybean fermented by aflatoxin non-producing *Aspergillus oryzae* and GABA producing *Lactobacillus brevis* IFT Annual Meeting and Food Expo 2015, , Chicago, USA

9. Lee YN, Kim NY, Ji GE. Effect of temperature, and growth media on the production of ochratoxin by *Aspergills usamii* and *A. awamori* 한국식품과학회 학술발표회 (2015)

10. Li ZP, Ahn HJ, Kim NY, Lee YN, Ji GE. Fermentation of Ginseng Berry by Mycotoxin Non-producing Molds and its biological activities 한국식품과학회 학술발표회 (2015)

## 10. 참고문헌

| 코드번호 | D-14 |
|---|---|


○AOAC. 1990. AOAC, Official methods of analysis (15th edn.).

Bang HP, Choi OK, Cho GS, Son JY, Ryu GH. 2006. The change of compositions and antioxidant effect in soybean cultivars picked in persimmon vineger. Korean J. Food Nutr. 19(4):398~409

Bown AW, Shelp BJ. 1997. The metabolism and functions of ɣ-aminobutyric acid. Plant Physiol 115:1-5.

Cappuccio FP, MacGregor CA. 1991. Does potassium supplementation lower blood pressure. A meta analysis of published trials. American J. Hypertension. 9:465-473

Chen Hm, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. J. Aric. Food Chem. 44(9):2619-2623

Cho YS, Bae YI, Shim KH. 1999. Chemical components in different parts of korean sword bean(canavalia gladiata). Korean J. Postharvest Sci. Technol. 6(4):475-480

Cho YS, Song J, Koo BC, Sea JH, Kim SD, Choi IS, Shin JC, Yang WH, Ha TJ. 2007. Effects of color differentiation and seed size of soybean on isoflavone concentration in soybean. Korean J. Crop Sci. 52(4):359-362

Choi JS, Kwon TW, Kim JS. 1996. Isoflavone contents in some cultivars of soybean. Food Sci. Biotechnol. 5(2):91-93

Choi JK, Kim MY, Lee NH, Jeong YS, Hwang YH. 2007. Changes in quality characteristics of Meju made with germinated soybean during fermentation. Korean J. Food Sci. Techenal. 39:304-308

Chung IM, Kim KH, Ahn JK. 1998. Screening of Korean medicinal and food plants with antioxidant activity. Korean J. Med. Sci. 6:311-322

Jung SW, Kwon DJ, Koo MS, Kim YS. 1994. Quality characteristics and acceptance of Doenjang prepared with rice. Agric Chem Biotechnol. 37(4):266-271

Kim EK. 2004. Quality Assessment and fermentation ability study using domestic and imported soybean. Inje University. Master's Thesis

Kim JS. 2005. A comparative study of physicochemical characteristics of Soy Sauce and OYUKJANG during storage at different ripening temperatures. Masters degree thesis Kyung Hee

Park JS, Lee MR, Kim JS, Lee TS. 1994. Composition of nitrogen compound and amion acid in soybean paste (Doengjang) propared with different microbial sources. Korean J. Food Sci. Thechnol. 26:609-615

Seo JS, Lee TS. 1992. Free amino acid in traditional soy sauce prepared from Meju under different formations. Korean J. Dietary Culture, 7(4):323-328

Cynthia Z. Blumenthal.:Production of toxic metabolites in Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, and Trichoderma reesei: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Regulatory Toxicology and Pharmacology 39 (2004) 214–28

James F. Sanchez, Amber D. Somoza, Nancy P. Keller, Clay C. C. Wang.: Advances in Aspergillus secondary metabolite research in the post-genomic era. Nat. Prod. Rep., 2012, 29, 351

Lopez-Garcia R, Mallmann CA, Pineiro M.: Design and implementation of an integrated management system for ochratoxin A in the coffee production chain. Food Addit. Contam., 25(2), 231-240 (2008)

Mateo R, Medina A, Mateo EM, Mateo F, Jimnez M.: An overview of ochratoxin A in beer and wine. Int J Food Microbiol., 119(1-2), 79-83 (2007)

EFSA Journal 2009; 7(12):1431

EFSA Journal 2010;8(12):1944

EFSA Journal 2011;9(12):2497

EFSA Journal 2012;10(12):3020

Visconti A, Perrone G, Cozzi G, Solfrizzo M.: Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. Food Addit. Contam., 25(2), 193-202 (2008)

서경원, 김준규, 김태완, 정세영, 김효정: Ochratoxin A의 신장독성감소 방법에 대한 연구. J. Fd Hyg. Safety, 13(2),121~128 (1998)

[별첨 1]

# 연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">(국문)마이코톡신 프리 가바 함유 고기능성 저염 된장의 제품화</td></tr>
<tr><td colspan="5">(영문)Product development for mycotoxin-free GABA containing low-salt Doenjang</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">(주)비피도</td><td rowspan="2">주 관 연 구<br>책 임 자</td><td colspan="2">(소속) (주)비피도</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">농협식품안전연구원</td><td colspan="2">(성명) 지 근 억</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비<br><br>(801,000천원)</td><td>계</td><td>801,000</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2013.7.16.~ 2016.7.15.(3년)</td></tr>
<tr><td>정부출연<br>연구개발비</td><td>480,000</td><td rowspan="3">총 참 여<br>연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>36</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>321,000</td><td>내부인원</td><td></td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td>-</td><td>외부인원</td><td></td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 성과

마이코톡신 음성 Aspergillus 균주와 GABA 생산이 우수한 유산균을 이용하여 마이코톡신 프리 저염 된장을 개발하는 목표. 연구 결과 목표를 달성하여 마이코톡신이 생산되지 않고 GABA 함량이 높은 저염 된장을 개발 하였고 성과의 일부는 8 편의 논문, 2 건의 특허, 10 여 건의 학술 발표로 소개 되었음.

○ 연구내용 및 결과

- 100 여 균주의 다양한 Aspergilus 균에 대하여 본 연구에서 개발한 다중 유전자 PCR신속 검출법 및 표준화 HPLC 분석법을 조건을 이용하여 Aflatoxin, cyclopiazonic acid, fumonisin, ochratoxin을 생산하지 않는 Aspegillus 균주들을 확보함. 선발된 마이코톡신 생산 음성 균주들을 대상으로 protease등 된장 발효에 유리한 효소특성을 갖는 균주들을 선발함.

- 전통 장류 제조시 마이코톡신 저감화에 활용할 수 있는 다양한 온도, pH, 배양시간, 영양 환경, 유산균 및 효모의 동시 접종 방법 등을 연구하였음..

- 이를 이용한 제조한 발효된장에서 histamine, tyramine, cadaverine, putrescine의 바이오제닉 아민류를 분석하였고 특히 다양한 전통된장에는 약 300 ppm의 히스타민이 함유되어 있는데 비하여 본 연구에서 개발한 된장은 histmine이 10ppm 이하로 존재함을

- 가바 생산성이 우수한 L. brevis GABA100 균주와 마이코톡신 프리 선발 Aspergillus oryzae 균을 이용하여 접종 균수, 온도, 발효 기간, 발효 pH, 다양한 과일 및 해산물 추출물 첨가 효과들을 연구하였고 특히 염도를 달리하며 마이코톡신 생산성, 잡균, 오염도, 바이오제닌 아민 함량, 관능성, GABA 함량, 일반성분 분석 등을 수행하였음.

- 결과적으로 가바 함량이 높은 마이코톡신 프리 저염 된장을 성공적으로 개발하였고 기능성 저염 된장의 품질 기준 및 제조 방법을 확립하였음.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 연구 성과는 8 편의 논문, 2 건의 특허, 10 여 건의 학술에 활용하였음. 연구 관련 일부 균주는 진균류 균주 은행에 기탁하였음.

- 가바함량이 높고 비배당체 이소플라본 함량이 증가된 콩발효 분말 시제품과 가바 함량이 높은 마이코톡신 프리 저염 된장 시제품을 개발하였음.

- 본 과제 참여 업체인 남안동 농협을 통하여 안전성, 기능성, 기호성이 확보된 된장 신제품을 개발하여 농업협동조합의 매출 증대 및 농민의 소득 향상에 활용할 것임.

- 식품원료미생물의 인정 기준 규격 재검토를 위한 기초 자료로 활용

- 안전성이 확보된 스타터 종균의 라이브러리 확보

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.