

최 중
연구보고서

**혼합고정화 기술을 이용한 고품질 캡슐메주의
제조 및 고기능성 전통장류의 개발**

Development of High Quality Capsule Meju
and Functional Fermented Soybean Products
Using Some Mixed Strains

연 구 기 관
효 자 식 품

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “혼합고정화 기술을 이용한 고품질 캡슐메주의 제조 및 고기능성 전통장류의 개발” 최종보고서로 제출합니다.

2004년 10월 10일

주관연구기관명 : 효자식품
총괄연구책임자 : 손 미 예
세부연구책임자 : 손 미 예
협동연구책임자 : 이 상 원
협동연구책임자 : 박 정 로
연 구 원 : 박 석 규
연 구 원 : 성 찬 기

요 약 문

I. 제목

혼합고정화 기술을 이용한 고품질 캡슐메주의 제조 및 고기능성 전통장류의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

정부가 2002년부터 300명 이상의 콩을 재배할 경우 50만원의 농업 정책자금을 지급하기로 발표하였기 때문에 앞으로 대두의 재배가 활발히 이루어져 대두의 생산량이 급증할 것으로 예상된다. WTO체제 하에서 과잉으로 생산되는 콩 소비를 위한 대책으로서 전통 장류발효식품의 개발을 들 수 있는데, 이 장류발효식품의 품질에 가장 큰 영향을 미치는 것은 메주이다. 메주는 한국의 전통 장류발효식품을 제조하는데 필요한 starter cake로서 그 품질은 장류의 맛과 향 및 위생적인 안전성을 결정하는 중요한 발효소재이다. 그런데 전통메주는 장기간 자연발효를 실시하므로 표면에 푸른 곰팡이, 검은 곰팡이 및 붉은 곰팡이 등과 같은 유해곰팡이가 발생하게 되어 인체에 유해한 곰팡이 독소(mycotoxin)가 생성될 수 있다. 특히 메주표면의 발효균주인 황국균 *Aspergillus oryzae*와 외형적으로 거의 비슷한 유해곰팡이인 *Aspergillus flavus*가 번식하게되면 강력한 발암물질인 아플라톡신을 생성하게 된다. 그렇기 때문에 이러한 문제점을 해결하기 위해서 메주의 유용 발효균주인 황국균, 백국균 및 버섯균사체(팽이, 동충하초 및 느타리 등)를 혼합하여 메주의 표면을 얇게 코팅시켜 발효시킨 고정화 캡슐메주를 제조함과 동시에 위생적인 전통 장류발효식품을 생명공학적인 기법으로 생산할 필요가 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 전통장류의 저염화, 변색 및 냄새억압 기술 개발
 - ① 캡슐메주를 이용한 저염된장 개발
 - ② 각종 한약재를 이용한 저염된장 개발
 - ③ 분말화에 의한 저염된장 개발
 - ④ 저장기간에 따른 전통된장의 변색억제 기술
 - ⑤ 전통된장의 냄새억압 기술
2. 기능성 캡슐메주 개발을 위한 균주선정 및 혼합고정화 기술개발
 - ① 캡슐메주 외층부의 선정
 - 외층부의 곰팡이 선정
 - 외층부의 버섯균사체 선정

- ② 캡슐메주 중간층의 Chitinase 생성균주 선정
 - ③ 캡슐메주 내층의 항균물질 생성균주 선정
3. 캡슐메주 개발을 위한 최적 발효조건과 표준화 및 대량생산
- ① 증자콩 분쇄도가 발효도에 미치는 영향
 - ② 메주콩의 증자시간과 증자온도가 발효도에 미치는 영향
 - ③ 캡슐메주 성형의 크기가 발효도에 미치는 영향
 - ④ 캡슐메주의 표준화 및 대량생산

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 전통장류의 저염화, 변색 및 냄새억압기술의 개발

1) 캡슐메주를 이용한 저염된장 제조

캡슐메주를 이용한 저염된장의 염농도, pH, 총산도 및 수분함량은 담금염수 농도가 동일할 경우 대조구와 시험구 사이에 큰 차이는 없었으나, 아미노태 질소함량과 환원당은 시험구에서 높게 나타났다. 19~17%의 담금염수에서 캡슐메주를 사용한 된장의 L값은 일반 전통된장과 비슷한 31.98~32.37를 나타내었으나 일반메주를 사용한 된장은 25.83~29.87를 나타내어 된장색이 검은 색을 띄었다. 또한 된장중의 생균수에서 일반 세균수는 비슷하였으나 효모수는 적게 검출되었으며, 효소의 활성, 항균력 및 혈전용해활성 등은 상당한 차이를 나타내었다.

2) 한방약재를 첨가한 저염된장 제조

한방약재를 첨가한 된장은 수분, pH, 총산도 및 염도는 대조구와 비슷하였으나, 환원당, 조지방, 조단백 및 아미노태질소 함량은 약간 높게 나타났다. 한방약재를 첨가한 된장 중에서 수용성 갈변도는 I군과 II군이 III군 및 IV군보다 높게 나타났으며, 색도의 L값(명도)은 I군과 II군이 낮게 나타나 된장의 색이 검게 보였다. 이상의 결과로 한방약재 III군 및 IV군을 첨가하여 제조한 된장은 색택이 대조구와 유사하고, 관능검사의 기호도, 생리활성 등이 우수하여 기능성이 강화된 전통된장의 개발이 가능한 것으로 판단되었다.

3) 캡슐메주와 주정을 이용한 분말용 저염 생된장 제조

총질소(TN)는 1.68 ~ 1.85% 범위였으며, 발효를 나타내는 아미노태질소(AN)은 저염도일수록 높았고, 주정첨가량이 많을수록 낮게 나타났다. 환원당(RS) 함량은 염도와 주정농도에 따른 큰 차이가 없었다. 경시적으로 염도가 낮으면 pH강하가 크게 나타났으며, 주정농도가 증가하면 낮게 나타났다. 일반 세균수의 변화는 염도가 낮으면 높게 크게 나타났으며, 주정농도가 증가하면 낮게 나타났다. 특히 4% 염도는 생된장 숙성 중에 균수 증가가 크게 나타나므로 인하여 문제가 있었다.

염도가 낮으면 대체로 전체적인 기호도가 낮아졌으며, 주정농도가 증가하면 알코올 및 그 반응생성물로 인하여 기호도가 상대적으로 낮게 나타났다. 대체로 8% 및 6% 염도에서 각각 1% 주정첨가가 효과적인 저염 생된장의 숙성에 효과적인 것으로 나타났다.

4) 전통된장 변색억압 기술

저염된장의 변색억제를 검토하기 위하여 먼저 된장에 증자콩, 메주가루 및 청국장 첨가에 따른 색도 변화를 검토한 결과 숙성시간이 경과함에 따라 L값(명도)이 약간 감소하였으며, 메주를 첨가한 된장은 첨가량이 많을수록 낮은 값을 나타내었다. 그 이외는 대조구보다 높게 나타났으며 갈색도는 지용성 및 수용성 모두 증가하였다. 산가 및 아미노태 질소함량은 메주를 첨가한 된장이 가장 높게 나타났다. 된장에 광선을 조사하여 색도를 측정된 결과 백열등, 형광등, 자외선, 햇빛의 플라스틱 필름, 일반용기, 유리용기의 순으로 L값이 낮아졌으며, a값은 역순으로 나타났고, 갈색도는 지용성 및 수용성 모두 증가하였다. 유기산 첨가에 따른 된장의 색도 변화는 발효시간이 경과함에 따라 L값은 약간씩 낮아졌으나 a값 및 갈색도는 증가하였다.

5) 전통된장 냄새억압 기술

백국균(RO)나 팽이버섯 균사체(FV)의 된장이 비교적 기호성이 양호하였으나 균사체의 성장속도가 늦기 때문에 2차 오염의 가능성이 높다. 반면에 황국균은 기호성은 약간 낮지만 빠른 증식성과 강한 가수분해효소 생성력으로 현장적용에서 용이하다. 백국균(RO)나 황국균(AO) 및 팽이버섯 균사체(FV)의 캡슐메주 된장은 메주 크기에 증가함에 따라 기호성이 떨어지는 경향을 나타내었다. 버섯균사체와 백국균이 기호성에서 황국균보다 유리하게 평가되었으며, 이는 황국의 강한 향과 균사체의 성장속도가 빠른 이유로 발효중 메주내의 암모니아 가스 배출이 지연되어 상대적으로 기호성이 낮은 것으로 추측된다. 캡슐메주의 경우, 대체로 통풍횟수를 증가시키면 이상취 냄새가 크게 개선되는 경향을 나타내었다. 이상취를 억압하는데 가장 효과적인 것은 매실 농축액을 4% 이하로 첨가하여 후숙성을 하는 것이 효과적이었다.

나. 기능성 캡슐메주 개발을 위한 균주선정 및 혼합고정화 기술개발

1) 메주 외층부 발효를 위한 곰팡이 선정

가) 황국균과 백국균 배양액 중의 효소활성

메주의 외층부에 접종할 곰팡이 선별을 위하여 액체배양한 후 protease와 α -amylase활성은 *Aspergillus oryzae*가 *Rhizopus japonicus* 및 *R. oligosporus*보다 높았고, glucoamylase활성은 *R. japonicus* 가 높게 나타났다.

나) 대두배지가 곰팡이의 성장에 미치는 영향

곰팡이 포자를 분쇄대두에 접종하여 메주를 바로 야외발효시키는 것 보다 25℃ 황토방에서 1차 발효시킨 후 2차 야외발효가 대두표면에 효과적으로 곰팡이가 증식하였다.

2) 메주 외층부 발효를 위한 버섯균주의 선정

가) 대두 고체배지의 최적 수분함량 및 증자시간

느타리버섯 균사체 성장을 위한 대두 고체배지에서는 곡물의 수분함량을 25~30% 로 하고, 증자시간 60분이 양호하였다.

나) 콩 배지를 이용한 버섯의 고체배양

대두와 검정콩 배지는 버섯생육 정도의 차이가 나타나지 않았지만, 동일 배지에서 는 느타리와 팽이버섯 생육이 영지와 상황버섯 생육보다 빠르게 나타났다.

다) 버섯 액체배지의 최적기질농도 및 초기 pH의 영향

버섯 액체배양의 기질농도는 5%였으며, 9% 에서는 배지의 높은 점성으로 인하여 진탕이 곤란하였고, 초기 pH는 5.2가 적당하였다.

라) 버섯 배양추출물의 항암력 및 혈전용해능

인체 폐암세포주(A549)의 증식 억제효과는 느타리버섯 균사체에서 효과적이었고, 혈전용해 활성은 팽이버섯 균사체에서 높게 나타났으며, 배양액보다 침전물(균체)을 분쇄하여 추출한 시료에서 혈전용해능이 우수하게 나타났다.

마) 버섯균사체 배양액의 항균활성

4가지 버섯균사체의 대두박과 검정콩에 배양한 배양액은 모두 *S. aureus*에 대한 항균력을 나타내었고, 균사체(pellet) 추출물은 대두박과 검정콩에 배양한 팥이버섯에서만 *S. aureus*, *Lac. plantarum*, *E. coli*에 대하여 약간의 활성을 나타내었다.

3) 중간층 올리고당 대량생성 세균의 선정

가) Chitinase 생산균주의 분리, 동정 및 곰팡이와의 대치배양

메주의 외부에 번식하는 사상균들의 균사가 지나치게 메주의 중심부로 증식해 들어오는 것을 억제할 수 있도록 chitinase 활성이 높으면서 곰팡이 및 버섯균사체의 균사성장 억제력이 우수한 *Bacillus subtilis* SJ-61을 최종균주로 분리, 동정하였다.

나) 배지 및 배양조건의 영향

Bacillus subtilis SJ-61의 chitinase 생산을 위한 배지조건은 2% colloidal chitin, 0.5% peptone, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 초기 pH 7.0이었으며, 배양조건은 배양 온도 35°C, 배양시간 4일, 진탕속도 180 rpm이었다.

4) 항균물질 대량 생성 세균의 선정

가) 박테리오신 생산 균주의 분리 및 동정

캡슐메주의 내부층 발효 및 유해미생물의 생육을 억제할 항균미생물은 장류 발효식품으로부터 단백질, 전분 및 섬유소 분해효소 활성이 높으면서 항균활성이 강한 HS-25균주를 분리, 동정하여 *Bacillus subtilis*와 유사한 것으로 판명되었다.

나) 항균스펙트럼

E. coli, *Sta. aureus*, *Sal. enteritidis*, *Pro. mirabilis* 및 *V. parahaemolyticus*를 비롯한 모든 식품유해 미생물에 대하여 비교적 높은 항균활성을 갖고 있었다.

다) 박테리오신 생산을 위한 최적 조건

분리균주의 최적배양 온도는 30~40°C, 최적 pH는 pH8.0, 진탕속도 180rpm이었으며, 생육가능 온도범위는 20~50°C, pH범위는 pH4.5~10.5이었다. 배지조성은 soluble 1%, yeast extract 1%, peptone 0.5%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05%로 구성된 배지에서 가장 균체 수율이 양호하였으며, 배양시간은 24~36 hr이었고, 대수증식기 중기 이후부터 박테리오신을 생산하는 증식비관련형이었다.

라) 분리 균주가 생산하는 박테리오신 특성

① 열 및 pH 안정성

열 안정성은 100℃, 25분 처리에서 대조구의 약 20%정도는 유지되었으며, pH 안정성은 pH4.5 및 5.0의 산성측보다는 알칼리성측 (pH11 이상)에서 항균성이 우수하였다.

② 최소저해농도

최소저해농도는 *E. coli*가 5 mg/ml로 가장 낮게 나타났으며, *Pro. mirabilis*는 7.5 mg/ml, *Sta. aureus*, *Sal. enteritidis*, *Kle. pneumoniae* 및 *V. parahaemolyticus* 균주에서는 15 mg/ml를 나타내었다.

③ 미생물의 형태 변화

Bacillus subtilis HS-25 균주의 배양 상정액에 의해 유해미생물의 세포벽 및 세포막의 기능이 파괴되었거나 용균현상이 일어나 유해미생물의 균체 성분이 누출된 것으로 생각되어 진다.

④ 각종 단백질 분해효소에 대한 안정성

Bacillus subtilis HS-25균주가 생산한 박테리오신은 papain에 의해서는 분해되지 않지만 protease, pancreatin 및 pepsin의 효소에 의해서 완전히 분해되어 단백질 성 항균물질임을 추측할 수 있었다.

⑤ 항균물질의 계통분획 및 분리

HS-25균주가 생산하는 항균물질의 계통분획하여 항균활성을 검토한 결과 hexane 및 water층은 항균활성이 전혀 없었으며, EtOAc, CHCl₃, BuOH층의 순으로 항균활성이 우수하였다.

5) 캡슐메주 제조를 위한 미생물의 고정화

캡슐메주에 여러 종류의 미생물을 고정화시킬 때 메주의 내부에는 *Bacillus subtilis* HS-25, 중간층에는 *Bacillus subtilis* SJ-61 그리고 외부층에는 *Aspergillus oryzae* 혹은 버섯 균사체를 액체배양하여 고정화하는 것이 효과적이었다.

다. 캡슐메주 개발을 위한 최적 발효조건 확립 및 캡슐메주의 표준화

1) 증자콩의 분쇄도

메주외부에 피복하는 증자콩의 분쇄도에 따른 외층부의 유용곰팡이 생육도는 노란콩보다 검정콩 캡슐메주에서 곰팡이 생육이 양호하고, 유해곰팡이 오염도 적었다. 증자콩 분쇄도가 클수록 외부에 유용곰팡이 성장이 양호하였다(*A. oryzae* > *R. oligosporus* > *R. japonicus*). 메주 총산도, 아미노태질소, 환원당 및 명도(L값)은 캡슐메주 분쇄도가 높으면 높게 나타났고, 검정콩이 노란콩보다 높게 나타났으며, *A. oryzae*에서 높게 나타났다. 내층부는 증자콩 분쇄도별 총산도, 아미노태질소, 환원당 큰 차이는 없었으며, *B. megaterium* SMY-212가 높은 편이었다. L값(명도)은 분쇄도가 증가할수록 극소량 증가하였으며, 외층의 L값보다 높게 나타났다.

2) 증자온도와 시간

메주콩의 증자온도와 증자시간에 따른 외층부의 총산도, 아미노태질소, 환원당은 증자시간이 증가할수록, 온도가 높을수록 함량이 약간 증가하였고, 노란콩보다 검정콩을 이용한 캡슐메주가 높게 나타났다. L값은 증자시간이 증가할수록 온도가 높을수록 증가하는 경향이었고, a값은 감소하는 경향이었으나, b값은 일정하지 않았다. 내층부는 총산도, 아미노태질소, 환원당 등은 증자온도와 증자시간에 큰 차이를 보이지 않았으며, 외층에 비하여 높게 나타났다. L값은 외층에 비하여 약간 증가하였다.

3) 캡슐메주의 메주크기가 발효에 미치는 영향

외층의 총산도, 아미노태질소, 환원당은 메주크기가 작을수록 증가하였고, 노란콩 캡슐메주보다 검정콩이 높게 나타났다. L값은 메주크기가 증가할수록 높아졌으며 a값은 감소하는 경향이었으나, b값은 증가하는 약간 경향을 나타내었다. 내층은 총산도를 비롯한 아미노태질소, 환원당은 메주크기에 따라 차이가 있으며, 외층에 비하여 높게 나타났다. L값은 외층에 비하여 약간 증가하였고, a값은 약간 감소, b값은 유의적 차이가 없었다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구과제는 전통메주를 제조에서 위생적 안전성을 제고하면서 고품질, 고기능성 메주를 대량으로 생산할 수 있는 연구결과로서 전통 장류식품의 우수성을 입증시키고 소비자들의 식성에 맞도록 다양한 전통 된장 및 간장을 생산하기 위하여 캡슐메주를 제조하는 농가형 소형 캡슐메주 성형기를 개발하여 실제적인 농민들에게 도움을 줄 수 있는 연구가 더욱 진행되어지길 바란다.

SUMMARY

we examined to develop the functional capsule type - traditional *Meju*(CM) prepared with mixed fermenting strains to improve quality and to inhibit easily contamination of wild molds(mycotoxin - producing fungi) originated from air and soil in traditional *Meju*. CM was fermented in *Korean* red clay room(1 step = 25°C, RH 60%, 7 days) and in outdoor natural condition(2 step = 5~18°C, RH 40~70%, 30 days).

Development of Technology for Low Salt, Inhibition of Dark Browning and Masking of Odor of Traditional Doenjang

1. Low Salt of Traditional Doenjang

Amino type nitrogen, reducing sugar, lightness(L) of Hunter color index in CM doenjang(CMD) was higher than those of control doenjang. Change in color of CMD was not shown at low salt concentration. Viable cell bacteria of CMD was slowly increased at low salt as compared with control. Nitrite scavenging activity, hydrogen donating activity and fibrinolytic activities of CMD was accelerated and antibacterial activity was effective in order of *E. coli* > *Sta. aureus* > *Sal. typhimurium*. CMD prepared with Korean medicine herbs(Group III) could be a good CMD in sensory score, functionality and low salt doenjang. Addition of 4% alcohol distillate was desirable in storage stability of CMD.

2. Inhibition of Dark Browning of Traditional Doenjang

Addition of cooked soybean to raw CMD was effective to browning inhibition, while chungkugjang and meju powder were not effective because of browning-forming food components. The browning of CMD exposed with some lights was delayed in order of incandescent light, fluorescent light, UV light and sunlight. Removal of oxygen within packaging materials of CMD had a high potential for the color improvement of doenjang during maturation and storage.

3. Masking of Odor of Traditional Doenjang

Off flavor of traditional doenjang was decreased by the control of fermentation period, meju size, ventilation of fermentation room and addition of maesil extract.

Selection of Fermenting Strain and Development of Technology for Mixed Strain Addition in Capsule Meju(CM)

1. Selection of Fungi in Outer Layer of CM

Adequate molds in outer layer of CM was found to be the yellow Koji *Aspergillus oryzae*, followed by *Rhizopus japonicus* and mycelial mushrooms(*Flammulina velutipes*)

2. Selection of Bacteria in Medium Layer of CM

Bacillus subtilis SJ-61, which had an potent chitinase activity, was isolated from natue and identified by the morphological, cultural and biochemical properties and then finally confirmed by GP-microplate identification. Optimal composition of media for chitinase production were 2% colloidal chitin, 0.5% peptone and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, and initial pH 7.0, and then cultural condition were temperature 35°C, culture time 4 days and shaking speed 180 rpm.

3. Selection of High - Producing Bacteria of Antibacterial Substance

Bacillus subtilis HS-25, which was an high bacteriocin - producing bacterium, was isolated from *chungkugjang* and identified by the identification procedure. HS-25 bacteriocin showed a strong antibacterial activity against *E. coli*, *St. aureus*, *Sal. enteritidis*, *Pro. mirabilis* and *V. parahaemolyticus*. Optimal cultural conditions were culture temperature 30~40°C ; pH 8.0 ; shaking speed, 180rpm ; range of growth temperature, 20~50°C ; pH range, pH4.5~10.5 and culture time, 24~36 hr. Basic medium were 1% soluble, 1% yeast extract, 0.5% peptone, 0.05% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Bacteriocin HS-25 for heat and pH shock was stable in the range of 100°C, 25 min ; pH 5.0~11.0.

Fermentation Condition and Standadization for Mass Production and Biological Activities of CM

1. Effect of crushing degree of cooked soybean on fermentation of CM

In growth of mold, cooked black soybean was more effective than cooked yellow soybean. Contents of total acidity, amino type nitrogen and reducing sugar were increased by the increasing of crushing degree in cooked soybean

2. Effect of cooking temperature and time of soybean on fermentation of CM

Contents of total acidity, amino type nitrogen and reducing sugar were increased by the increasing of cooking temperature and time of soybean in cooked soybean. Hunter color value(L) was increased in proportion to cooking time and temperature.

3) Effect of meju size of cooked soybean on fermentation of CM

Contents of total acidity, amino type nitrogen and reducing sugar were increased by the decreasing of meju size. Hunter color value(L) was increased in proportion to meju size. Major components of inner CMD was higher than that of outer layer.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. Domestic and International Research Trends	3
Chapter 3. Research Contents and Results	4
Section 1. Development of Technology for Low Salt, Inhibition of Dark Browning and Masking of Odor of Traditional Doenjang	4
1. Low Salt of Traditional Doenjang	4
2. Inhibition of Dark Browning of Traditional Doenjang	34
3. Masking of Odor of Traditional Doenjang	56
Section 2. Selection of Fermenting Strain and Development of Technology for Mixed Strain Addition in Capsule Meju(CM)	60
1. Selection of Molds in Outer Layer of CM	60
2. Selection of Mycelial Mushrooms in Outer Layer of CM	64
3. Selection of Bacteria in Medium Layer of CM	73
4. Selection of High - Producing Bacteria of Antibacterial Substance	87
5. Growth of Mixed Strains for Production of CM	119
Section 3. Fermentation Condition and Standardization for Mass Production and Biological Activities of CM	124
1. Effect of Crushing Degree of Cooked Soybean on Fermentation of CM	124
2. Effect of Cooking Temperature and Time of Soaked Soybean on Fermentation of CM	130
3. Effect of Fermentation Time and Meju Size of Cooked Soybean on Fermentation of CM	132
4. Standardization and Mass Production of CM	134
Chapter 4. Degrees of Achieving the Research Goals and Contribution to the Related Fields	136
Chapter 5. Plans for the Utilization of Results	137
Chapter 6. References	140

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	3
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	4
제 1 절 전통장류의 저염화, 변색 및 냄새억압기술의 개발 -----	4
1. 전통장류의 저염화 기술 -----	4
가. 실험재료 및 방법 -----	4
나. 실험결과 -----	10
1) 캡슐메주를 이용한 저염된장 제조 -----	10
2) 한방약재를 이용한 저염된장 제조 -----	14
3) 캡슐메주와 주정을 이용한 분말용 저염 생된장 제조 -----	30
2. 전통장류의 변색억제 기술 -----	34
가. 실험재료 및 방법 -----	34
나. 실험결과 -----	35
1) 발효콩 첨가에 따른 저염 전통된장의 갈변억제 및 발효특성 -----	35
2) 광선 종류에 따른 전통된장의 갈변억제 및 발효특성 -----	41
3) 용기 종류에 따른 전통된장의 갈변억제 및 발효특성 -----	46
4) 유기산 첨가에 따른 전통된장의 갈변억제 및 발효특성 -----	52
3. 전통된장의 냄새억압 기술 -----	56
가. 실험재료 및 방법 -----	56
나. 실험결과 -----	57
1) 발효기간과 의한 냄새 저감화 -----	57
2) 메주크기에 따른 냄새에 따른 냄새 저감화 -----	57
3) 통풍조절에 의한 냄새 저감화 -----	58
4) 식물성 재료의 농축물 첨가에 의한 냄새억압 -----	59
제 2 절 기능성 캡슐메주 개발을 위한 균주선정 및 혼합고정화 기술 -----	60
1. 메주 외충부 발효를 위한 곰팡이 선정 -----	60

가. 실험재료 및 방법 -----	60
나. 실험결과 -----	61
1) 황국균 및 백색균 배양액 중의 효소활성 -----	61
2) 대두 배지가 곰팡이의 성장에 미치는 영향 -----	63
2. 메주 외층부 발효를 위한 버섯균주의 선정 -----	64
가. 실험재료 및 방법 -----	64
나. 실험결과-----	65
1) 증자대두 고체배지의 최적 수분함량 -----	65
2) 증자대두 고체배지의 증자시간 -----	66
3) 증자대두를 이용한 버섯 고체배지 -----	66
4) 버섯 액체배지의 최적 기질농도 -----	68
5) 버섯 액체배지의 초기 pH영향 -----	68
6) 버섯 고체배양 추출물의 항암력 -----	69
7) 버섯 고체배양 추출물의 혈전용해능 -----	70
8) 버섯균사체 배양액의 항균활성 -----	72
9) 분쇄대두에서의 버섯균사체 배양 -----	73
3. 중간층 울리고당 대량생성 세균의 선정 -----	73
가. 실험재료 및 방법 -----	73
나. 실험결과 -----	75
1) Chitinase 생산균주의 분리 -----	75
2) 분리균과 곰팡이와의 대치배양 -----	77
3) 분리 미생물의 동정 -----	78
4) 배양조건의 영향 -----	79
4. 항균물질 대량 생성 세균의 선정 -----	87
가. 실험재료 및 방법 -----	87
나. 실험결과 -----	88
1) 박테리오신 생산 균주의 분리 및 선정 -----	88
2) 박테리오신 생산 균주의 동정 -----	92
3) 박테리오신 생산을 위한 최적 조건 -----	94
4) 박테리오신 생산 균주와 활성비교 -----	108
5) 분리 균주가 생산하는 박테리오신 특성 -----	109
5. 캡슐메주 제조를 위한 미생물의 고정화 -----	119

제 3 절	캡슐메주 대량 생산을 위한 발효조건 확립과 표준화 및 생리활성 -----	124
1.	증자콩의 분쇄도가 캡슐메주에 미치는 영향 -----	124
가.	실험재료 및 방법 -----	124
나.	실험결과 -----	124
1)	캡슐메주 외층의 곰팡이 생육 및 이화학적 성분 변화 -----	124
2)	캡슐메주 내층의 이화학적 성분 변화 -----	129
2.	메주콩의 증자온도와 증자시간이 캡슐메주에 미치는 영향 -----	130
가.	실험재료 및 방법 -----	130
나.	실험결과 -----	130
1)	캡슐메주 외층의 곰팡이 생육 및 이화학적 성분 변화 -----	130
2)	캡슐메주 내층의 이화학적 성분 변화 -----	130
3.	캡슐메주의 메주크기가 발효에 미치는 영향 -----	132
가.	실험재료 및 방법 -----	132
나.	실험결과 -----	132
1)	캡슐메주 외층의 곰팡이 생육 및 이화학적 성분 변화 -----	132
2)	캡슐메주 내층의 이화학적 성분 변화 -----	132
4.	캡슐메주의 표준화 및 대량생산 -----	134
가.	실험재료 및 방법 -----	134
나.	실험결과 -----	134
1)	콩의 전처리 공정 -----	134
2)	균종선택 및 균체접종량 -----	134
3)	메주의 크기 -----	134
4)	송풍횟수 -----	135
5)	발효기간 -----	135
6)	발효온도 및 습도 -----	135
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	136
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 -----	137
제 6 장	참고문헌 -----	140

제 1 장 연구개발과제의 개요

장류발효식품의 품질에 가장 큰 영향을 미치는 것은 메주이다. 메주는 한국의 전통 장류발효식품을 제조하는데 필요한 starter cake로서 그 품질은 장류의 맛과 향 및 위생적인 안전성을 결정하는 중요한 발효재이다. 그런데 전통메주는 장기간 자연발효를 실시하므로 표면에 푸른 곰팡이, 검은 곰팡이 및 붉은 곰팡이 등과 같은 유해곰팡이가 발생하게 되어 인체에 유해한 곰팡이 독소(mycotoxin)가 생성될 수 있다. 특히 메주표면의 발효균주인 황국균 *Aspergillus oryzae*와 외형적으로 거의 비슷한 유해곰팡이인 *Aspergillus flavus*가 번식하게되면 강력한 발암물질인 아플라톡신을 생성하게 된다. 그렇기 때문에 이러한 문제점을 해결하기 위해서 메주의 유용발효균주인 황국균, 백국균 및 버섯균사체(팽이, 동충하초 및 느타리 등)를 혼합하여 메주의 표면을 얇게 코팅시켜 발효시킨 고정화 캡슐메주를 제조함과 동시에 위생적인 전통 장류발효식품을 생명공학적인 기법으로 생산하고자 한다.

한국의 재래식 전통메주는 장기간의 자연발효를 행하기 때문에 품질이 균일하지 못하면서 비위생적으로 제조되어 최종제품인 전통된장의 품질에 나쁜 영향을 미치게 된다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 본 연구자들은 일반 전통메주에 황국균이나 버섯균사체를 코팅한 캡슐메주에 대한 연구를 행하게 되었다. 이러한 캡슐메주의 기술을 전통장류 발효식품의 스타트 케이크(starter caker)로서 활용한다면 우리나라 콩발효식품의 발전에 크게 기여할 것으로 생각된다. 이 기술은 ① 메주품질을 균일화할 수가 있고, ② 메주의 발효기간을 대폭 단축시킬 수 있으며, ③ 위생적인 메주제조(유해곰팡이 생육억제 효과) 및 ④ 메주의 갈라짐 방지 등의 장점이 있으나 단점으로는 메주의 외부에 코팅한 곰팡이 균사가 과잉성장하면 곰팡이의 균사가 메주내부로 침투하여 최종 전통된장에 좋지 않은 향기를 부여할 수가 있다. 따라서 본 연구자들은 외층부의 곰팡이 균사가 과잉 성장하여 메주 내부로 침투하는 것을 방지할 목적으로 메주의 외층부와 내층부 중간에 곰팡이 균사를 용해하여 올리고당을 생성하는 세균층(중간층)을 부가하여 새로운 고정화 캡슐메주를 제조함과 동시에 기능성 캡슐메주 개발을 위한 최적 발효조건을 확립하여 국민건강에 기여할 수 있는 위생적인 고기능성 저염된장 생산을 위한 연구를 행하고자 하였다.

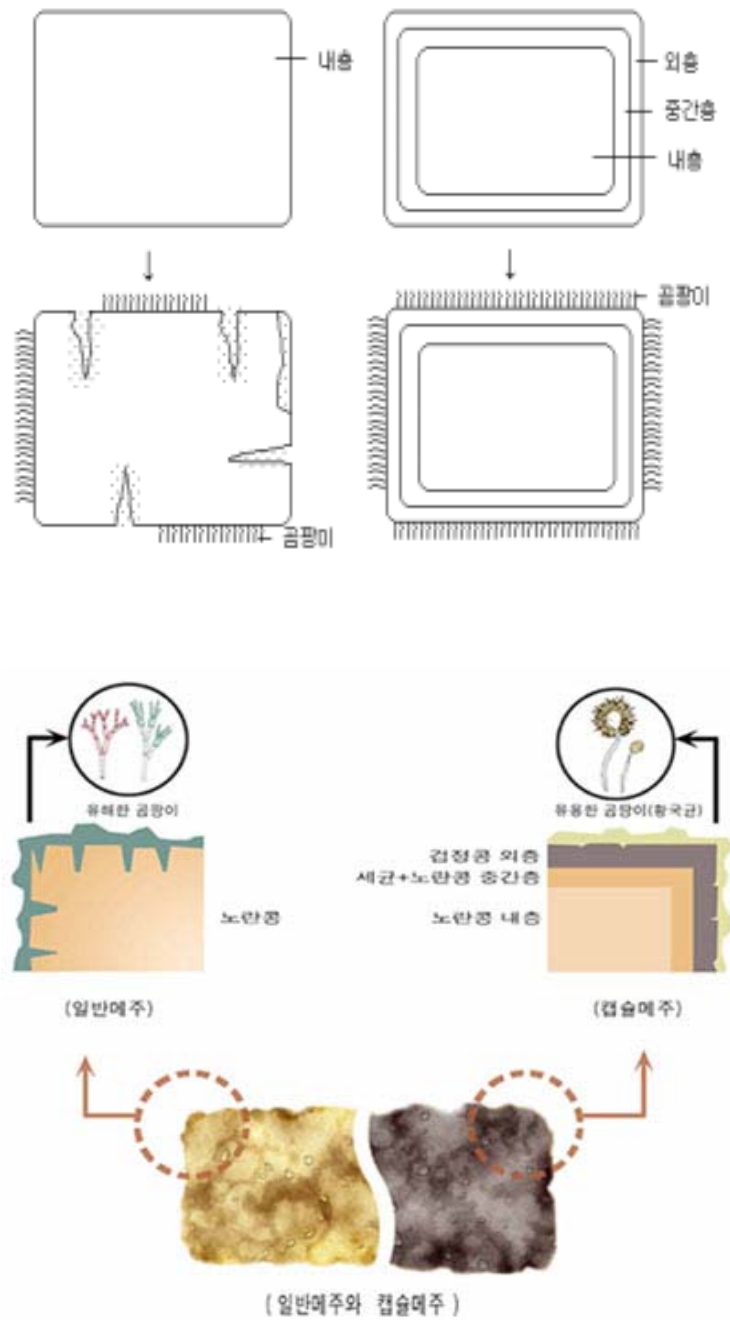


Fig. 1-1. Capsule type meju prepared with *Bacillus* sp., molds and edible mushrooms.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

메주는 콩을 주원료로 사용하는 반건조상태의 발효원으로, 특히 전통장류 제조를 위한 중요한 starter cake로써 그 품질은 장의 맛과 향, 위생적인 품질지표를 결정하는 매우 중요한 발효 소재이다.

자연발효에 의하여 만들어지는 전통메주의 표면에는 수분함량은 비교적 적고 산소농도는 높아 곰팡이가 많이 발생할 수 있는데, 그 중에서 유용 곰팡이로는 털곰팡이(*Mucor*속), 거미줄곰팡이(*Rhizopus*속) 및 일부 황국균(*Aspergillus*속)이 주류를 이루어 메주표면에서 부수적인 발효를 행한다. 메주내부는 표면에 비하여 수분함량이 많고 산소농도가 낮으므로 *Bacillus*속 세균이 증식하면서 독특한 냄새를 발생하고 단백질과 당질 분해효소 등 각종 효소를 생성하여 메주의 주도적인 발효를 행하며 우리나라 전통장류의 독특한 맛과 향을 부여하게 된다.

그러나 장기간 자연발효를 행하는 경우 불리한 자연환경 조건에서 유용 발효균주인 황국균 *A. oryzae*와 외형적으로 거의 유사한 *A. flavus* 및 *A. parasiticus* 등은 발암물질로 알려진 aflatoxin과 같은 인체에 유해한 곰팡이 독소(mycotoxin)가 생성될 잠재성이 충분히 있으며, 메주를 외부 환경에서 2~3개월간 장기 발효시키므로 그 표면이 과도하게 건조되어 갈라져, 그 틈으로 유해 곰팡이가 메주 내부까지 깊게 번식할 가능성이 높다. 과도한 메주 표면의 건조화로 콩 단백질 분해율의 저하와 콩 지방의 산패가 일어나므로 품질저하와 영양적 가치가 손실이 우려된다.

현재까지 메주에 관한 연구로는 메주에 관련된 유용 발효 미생물의 분리와 동정, 분리 우수균주의 효소 생산 및 특성, 전통메주의 제조 및 품질특성, 스타트 균주를 이용한 개량식 메주(콩알, 도너츠형, 압출성형 등)의 제조 및 품질특성, 전통메주의 균독소 및 안전, 메주의 형태와 종류에 따른 장류의 이화학적 품질특성 등에 관한 것이 있다. 그러나 이들 연구의 대부분은 개량식 메주의 제조법과 품질특성에 관한 연구가 주류를 이루고, 전통메주 자체의 품질증진과 곰팡이 오염에 따른 위생적 문제 해결에 대한 연구는 아주 미비한 실정이다.

또한 메주의 품질은 전통 장류 발효식품의 품질과 직결되기 때문에 기존의 전통메주의 위생적 안전성과 메주표면의 발효율 및 콩 단백질 분해율의 증진을 목적으로 “캡슐메주”를 착안하게 되었으며, 수 년 전부터 전통장류의 국제화 및 품질개선을 위하여 고품질의 메주개발은 대단히 중요하다고 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 전통장류의 저염화, 변색 및 냄새억압기술의 개발

1. 전통장류의 저염화 기술

가. 실험재료 및 방법

1) 실험재료

캡슐메주 제조를 위한 대두는 [*Glycine max* (L.) Merrill] 2001년 가을에 수확한 태광 품종을, 종균은 <제 2 과제>의 연구결과에 따라 한국종균협회에서 분양받은 *Aspergillus oryzae*와 전통 청국장에 분리된 박테리오신을 생성하는 고초균 *Bacillus subtilis* HS-25를 사용하였다. 식품위생 세균은 *Bacillus cereus* KCCM-11204, *Staphylococcus aureus* R-209, *Micrococcus roseus* JAM-1295, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Sal. typhimurium* TV-110, *Sal. enteritidis* KCCM-1202, *Pro. malabilis* KCTC-2433, *V. parahaemolyticus*를 사용하였으며, 배지는 LB배지에 식품위생 균주의 배양액 50 μ l와 0.7% soft agar 7 mL를 혼합하여 중층한 LB평판배지를 사용하였다.

2) 저염된장의 제조

가) 캡슐메주 HS-25를 이용한 저염된장 제조

콩은 대두를 사용하여 수돗물에 12시간 불린 다음 상압에서 4시간(강-중-약 불) 삶은 후 메주를 성형하였는데, 메주의 전체 크기는 10×20×8 cm(1600 mL)의 목각형으로 만들었다. 그 중 외층은 수침하고 껍질을 박피한 증자 검정콩(흑태) 및 대두를 마쇄하여 종국(*Aspergillus oryzae*)을 0.3% 농도(w/w)로 고르게 섞어 두께를 1 cm 정도로 하였으며, 중간층은 대두를 외층보다 더욱 세밀하게 분쇄하여 <제 1 협동과제>에서 제공한 *Bacillus subtilis* SJ-61 균체액을 0.5% 농도(w/w)혼합하여 두께를 0.5 ~ 0.8 cm로 코팅하여 캡슐메주로 성형하였다<그림 1-1>. 그리고 내층도 <제 1 협동과제>에서 제공한 박테리오신을 강하게 생성하는 전통 청국장으로부터 분리·동정된 *Bacillus subtilis* HS-25균주 배양액 균체를 2%(w/w) 농도로 첨가하였다. 대조구는 증자한 대두를 목각형으로 성형한 다음, 3일간 자연건조하여 캡슐메주와 동시에 한국전통발효식품연구소의 황토방 발효실에서 온도 25℃, 습도 60%로 메주를 7일 동

안 발효시킨 후, 실외<평균기온 12월(3.6℃), 1월(0.5℃)>에서 2차 발효를 30일간 실시하였다. 각 염수농도별로 메주를 염수에 담아서 대조구와 캡슐메주를 45일 염장숙성하고 난 후에 된장을 분리하고, 일부 생된장에는 HS-25 발효액을 재첨가하여 3가지의 시료 된장을 실외에서 45일간 숙성하여 분석시료 하였다.

나) 한방약재를 이용한 저염된장 제조

한방약재는 한약재료 판매상에서 국산만을 구입하여 사용하였으며, 한방약재의 선택기준은 약재추출물로 메주를 담금 하였을 때 전통된장의 맛, 향기 및 색 등에 약 영향을 미치지 않으면서 전통된장의 기능성을 증진시킬 것으로 추측되는 21종의 약재를 한의학 박사 서정주 한의원장께 추천 받아 <표 3-1-1>과 같이 4그룹의 군으로 나누어 사용하였다.

Table 3-1-1. Composition of Korean medicine herbs for production of traditional *doenjang* (I ~ IV)

Groups	Korean medicine herbs	
I	<i>Cervrs nippon</i> Temminck, <i>Dioscorea batatas</i> Decaisne, <i>Polygonatum odoratum</i> Drud,	<i>Melandryum firmum</i> Rohrb, <i>Cibotium barometz</i> Z. Smith, <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch
II	<i>Lycium Chinense</i> Miller, <i>Rubus coreanus</i> Miquel, <i>Schizandra chinensis</i> Baillon,	<i>Cuscuta chinensis</i> Lamark, <i>Torilis japonica</i> Houtt, <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch
III	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Semen, <i>Astragalus membranaceus</i> Bunge, <i>Cornus officinalis</i> Siebold et Zuccarini,	<i>Euryale ferox</i> Salisbury, <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch, <i>Carthamus tinctorius</i> Linne
IV	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaerther, <i>Epimedium koreanum</i> Nakai, <i>Polyporus umbellatus</i> Fries,	<i>Kalopanax pictum</i> Nak, <i>Eucommia ulmoides</i> Oliver, <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch

(1) 캡슐메주의 제조

“가) 캡슐메주 HS-25를 이용한 저염된장 제조”에 준하였다.

(2) 한방약재 추출물의 제조

수돗물 10ℓ에 4군으로 나눈 각 군의 한방약재 900g를 첨가하고 120℃에서

추출한 후, 150 ml씩 봉지에 담아 5℃ 이하에 보관하면서 사용하였다.

(3) 한방된장의 제조 및 숙성

캡슐메주를 이용한 저염된장의 제조과정은 일반 전통된장의 제조방법에 준하였으나, 한방약재 된장의 담금은 <표 3-1-2>와 같이 각 군의 한방 약재추출용액을 A~C농도로 희석하여 부피가 9ℓ 되도록 정용한 다음, 여러 농도의 염수에 캡슐메주 7.5 kg를 넣어 60일 동안 발효시킨 후, 된장과 간장을 분리하여 60일 동안 후발효를 행하였다.

Table 3-1-2. Formulation of water, medicine herb extract, salt and capsule meju

Group	Total volume(ℓ)		Salt solution (%)	Meju (Kg)
	Water(ℓ)	Extract(ℓ)		
A	5.0	4.0	19	7.5
B	6.5	2.5	19	7.5
C	8.0	1.0	19	7.5

다) 박테리오신 함유 배양액과 에탄올을 이용한 저염 분말된장 제조

(1) 배양액 제조

제 2과제(협동)의 박테리오신 항균성물질을 다량 생산하는 *Bacillus subtilis* HS-25균주를 포도당을 보강한 대두 천연배지를 이용하여 배양한 후에 염수에 첨가하여 메주 염장발효를 행하였다.

(2) 에탄올 첨가

대조구 된장은 염도 12%로 하였으며, 저염된장의 소금함량을 8%, 6%, 4%로 하여서 에탄올(주정, 풍국)을 각각 1, 2, 3%를 첨가하여 제조하였다.

3) 실험방법

가) 이화학적 분석

(1) 수분

된장의 수분 함량은 상압가열 건조(105℃)법으로 측정하였다.

(2) pH 및 총산

pH는 된장 10 g에 증류수 40 ml를 가하여 마쇄하고 여과하여 50 ml로 정용한 후, pH meter로 측정하였고, 총산도는 여과액 20 ml를 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 소요되는 0.1N NaOH의 양(ml)으로 나타내었다.

(3) 조단백질 및 조지방

조단백질과 조지방은 각각 micro Kjeldahl법과 Soxhlet 에테르 추출법으로 행하였다.

(4) 아미노태질소 및 환원당

아미노태 질소(NH₂-N)함량은 된장 5 g를 250 ml로 정용하고 마쇄한 후, 1 시간 동안 교반하여 충분히 혼합한 다음, 원심분리하여 그 상징액 25 ml을 취하여 Formol 적정법으로 측정하였고, 환원당은 원심분리한 상징액을 여과하여 DNS법으로 측정하였다.

(5) 갈변도

지용성 색소는 각 된장시료를 3회 탈지시킨 후 여과한 잔사에 chloroform-methanol(2 : 1, v/v)혼합액 50 ml를 가하여 3회 추출하여 사용하였으며, 수용성 색소는 추출잔사에 methanol-증류수(1 : 1, v/v)혼합액 50 ml를 가하여 5℃에서 추출한 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) 산가

산가는 된장 3 g에 ethanol과 ether 용액을 1 : 2로 섞은 용매 100 mL에 용해하여, 지시약을 2~3 방울 첨가한 후, 0.1 N ethanolic KOH 용액으로 엷은 홍색이 될 때까지 적정하였다.

(7) 색도

된장 20g를 색채 색차계(Chroma Meter CR-200)의 측정대에 고르게 담은 후, L, a, b값을 측정하였으며, 이때 사용한 표준 백색 판의 L, a, b값은 각각 89.2, 0.921 및 0.78이었다.

(8) 지방산

된장과 Folch용액(chloroform : methanol=2:1, v/v) 100 ml를 혼합하여 마쇄한 후, 질소증진전에 밀봉하여 30분간 교반한 다음, 용액을 분액여두에 옮겨 두 층을 분리시키고 5% sulfuric acid-methanol 3 ml를 가하여 메칠에스테르화하여 석유ether 100 μ l에 녹여 GC로 분석하였다.

(9) 유리아미노산

된장 5 g에 증류수를 첨가하여 20배 희석한 다음 60°C에서 30분간 추출한 후 0.2 μ m membrane filter와 Sep-pak C₁₈ cartridge로 여과하여 아미노산분석기로 분석하였다.

(10) 유기산

된장 5 g에 증류수 50 ml를 첨가하고 마쇄한 후 원심분리하여 얻어진 상액의 일부를 0.45 μ m membrane filter와 Sep-pak C₁₈ cartridge에 차례로 통과시킨 다음 HPLC로 분석하였다.

(11) Daidzein 및 Genistein

마쇄한 된장 2 g에 acetonitril 10 ml, 0.1N HCl 2 ml를 첨가하여 교반하고 이를 여과한 다음 농축한 뒤 membrane filter로 여과하여 HPLC로 분리하였다.

(12) 관능검사

된장의 관능평가는 훈련된 전문패널원 5명을 통하여 발효된 각각의 된장 시료를 대상으로 실시하였으며, 평가방법은 5점 기호도 채점법(1 매우 싫다, 2 약간 싫다, 3 보통이다, 4 약간 좋다, 5 매우 좋다)을 이용하여 맛, 향, 색 및 종합적인 기호도로 평가하였다.

(13) 생균수 및 효소활성

호기성 세균의 생균수는 마쇄한 된장 1 g를 멸균 생리식염수로 희석한 다음, plate count agar배지에 평판 도말하여 측정하였고, 효소활성 측정을 위한 조효소액은 무균적으로 마쇄한 된장 10 g에 증류수 100 ml를 혼합하여 진탕 추출한 다음 원심분리하여 조제하였다.

Protease활성 측정은 0.6% casein 기질용액 1 mL와 조효소액 1 mL를 시험관에 넣고 35°C, 30분간 반응시킨 다음, 0.4 M trichloro acetic acid 3 mL를 가하여 반응을 정지시키고 0.5 M Na₂CO₃과 Folin phenol으로 발색시킨 후 흡광도를 측정하여 나타내었다.

Protease 1 unit는 조효소액 1 mL가 1분간에 1 μ g의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 하였다. α -amylase활성 측정은 조효소액 1 mL에 1% 수용성 전분 10 mL를 가하여 10분간 반응시킨 반응액 1 mL에 HCl를 가하여 반응을 정지시키고, 0.005% iodine과 0.05% potassium iodine을 함유한 발색액 10 mL를 가한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -amylase 1 unit는 amylose-iodine complex의 blue color가 10% 감소되는 효소량으로 하였다. Glucoamylase의 활성측정은 1% 수용성 전분에 조효소액 1 mL를 가하고 30분간 반응시킨 후, 그 용액 1 mL를 취하여 3,5-dinitrosalysilic acid법에 따라 반응 전후 액 중의 환원당 양을 측정하여 양자의 차이로부터 효소반응에서 생성된 환원당의 양을 산출하였다. Glucoamylase의 1 unit는 1분간에 1 μ M의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

나) 생리활성의 측정

(1) 아질산염 소거 작용 및 수소공여능

된장 추출물에 대한 아질산염 소거 효과는 Gray 등의 방법에 준하였으며, 수소공여능은 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazine(DPPH)의 환원성을 이용하여 516 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 항균활성

된장 75 g에 methanol 및 hexane 용액을 첨가하여 24시간 추출한 후 감압 농축시켜 agar diffusion법으로 측정하였다. 멸균된 paper disc(직경, 8mm)에 시료용액 150 μ l씩 spot한 다음 용매를 완전히 휘발시키고 중층배지의 표면에 밀착시켜 30~35 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 병원성균의 생육저해를 나타내는 clear zone의 크기(직경, mm)를 측정하였다.

(3) 혈전용해능

마쇄한 된장 5g을 인산 완충액으로 24시간 추출한 후 원심분리한 상정액을 여과하여 사용하였다. Fibrin plate는 0.1 g의 fibrinogen과 50 mM Tris-buffer 15ml을 혼합하여 37 $^{\circ}$ C의 항온기에서 fibrinogen을 완전히 용해시킨 후 petri dish에 분주하여 thrombin 10 μ l를 첨가하여 배지를 응고시켰다. Fibrinolytic activity의 측정은 응고된 fibrin배지 상에 제조한 된장시료용액을 각각 10 μ l씩 loading한 후 37 $^{\circ}$ C에 일정시간 반응시켜 형성된 clear zone의 장축지름(mm)의 크기를 측정하여 나타내었다.

나. 실험결과 및 고찰

1) 캡슐메주를 이용한 저염된장 개발

제 2 과제(협동)에서 전통 청국장으로부터 분리·동정된 *Bacillus subtilis* HS-25균주가 생성하는 박테리오신 HS-25 (이하 HS-25)를 이용하여 제조된 캡슐메주의 “저염된장” 실용화(염수농도 21, 19, 17%)에 관한 연구결과를 나타낸다.

가) 저염된장 HS-25의 이화학적 성분 분석

B. subtilis HS-25균주가 생성하는 박테리오신 HS-25 (이하 HS-25)를 이용하여 제조된 캡슐메주를 이용한 저염된장의 이화학적 성분을 분석하여 <표 3-1-3>에 나타내었다. 염농도는 종균을 접종한 시험구와 대조구 사이에서 크게 차이를 나타내지 않았나 메주를 담금하는 초기 염수 농도에 따라서 된장의 염농도가 크게 영향을 받았으며, 21%, 19% 및 17%염수에 메주를 담금하였을 때 제품의 염농도는 12.5~13.5, 10.9~11.3 및 8.2~8.9%으로 나타났다. pH, 총산도 및 수분함량은 종균접종 및 초기 염농도에 관계없이 모든 시험구에서 pH 6.2~7.3, 총산도는 1.08~1.37(mL/g), 수분은 52.7~57.3%를 나타내었고, pH변화와 총산도 사이에서 유의성은 찾을 수가 없었다.

아미노태 질소는 대조구에 비하여 황국균(*A. oryzae*) 및 *B. subtilis* HS-25를 이용한 캡슐메주 된장에서 높게 나타났다. 대조구는 480.2~597.3mg%, 캡슐메주 된장은 690.4~848.6mg%, 간장과 된장을 분리한 후 *B. subtilis* HS-25를 재첨가한 된장은 724.2~843.4mg%를 나타내었다. 환원당은 대조구보다 캡슐메주를 사용한 두 시험구에서 약간 높게 나타났다. 된장의 색차계 색도는 종균을 접종한 두 시험구에서는 초기 염수농도에 거의 영향을 받지 않아 L값은 31.86~32.48, a값은 5.13~5.96, b값은 15.15~16.92를 나타내었지만, 대조구에서는 염수농도를 21%, 19% 및 17%로 조정함에 따라 21%염수에 담금한 된장은 L, a, b값이 각각 30.72, 6.15, 13.26를 19%염수에 담금한 된장은 28.87, 7.21 12.75를 19%염수에 담금한 된장은 25.83, 7.34, 12.35나타내어 염수의 농도가 낮을수록 L값이 낮아져 된장의 색상이 검은색을 띄었다.

나) 저염된장 중의 생균 수

<표 3-1-4>는 저염된장의 일반세균 수와 효모 수를 상호 비교한 결과이다. 대조구의 경우 초기 염수농도가 낮을수록 일반세균의 수는 급격하게 증가하여 17% 염수된장에서는 2.4×10^8 CFU/ml을 나타내었지만 효모는 점진적인 증가 현상을 나타내었다. 그러나 종균을 접종한 두 시험구에서는 대조구에 비하여 일반세균과 효모증식수가 낮았으며, 생된장에 HS-25 발효액을 재첨가 하면 생균수 증식이 억제되는 효과를 나타내었다.

Table 3-1-3. Proximate composition of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju*

Items	Control			Capsule <i>meju</i> (<i>A. oryzae</i> +HS-25*)			Raw <i>doenjang</i> + HS-25			
	21%	19%	17%	21%	19%	17%	21%	19%	17%	
Salt(%)	13.4	11.0	8.6	13.1	11.3	8.9	12.5	10.9	8.2	
pH	6.7	6.5	6.8	6.2	6.4	6.2	6.7	7.2	7.1	
TA(mL)	1.08	1.37	1.45	1.44	1.65	1.82	1.35	1.57	1.64	
Moisture (%)	55.4	57.6	57.3	53.2	52.8	52.5	53.6	54.3	52.7	
NH ₂ -N (mg%)	480.2	567.8	597.3	690.4	760.2	848.6	724.2	794.5	843.4	
RS(%)	0.91	0.74	0.48	1.2	1.6	1.4	1.1	1.3	1.5	
Color	L	30.72	29.87	25.83	32.48	32.37	31.98	31.86	32.34	32.21
	a	6.15	7.21	7.34	5.95	5.13	5.21	5.96	5.27	5.51
	b	13.26	12.75	12.35	15.26	15.15	16.92	16.52	16.02	15.79

*HS-25, *Bacillus subtilis* HS-25 ; TA, Total acidity(0.1N-NaOH mL / g *doenjang*)
RS, Reducing sugar

Table 3-1-4. Viable cell count of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju*

Viable cell	Control			Capsule <i>meju</i> (<i>A. oryzae</i> +HS-25*)			Raw <i>doenjang</i> + HS-25		
	21%	19%	17%	21%	19%	17%	21%	19%	17%
Bacteria ($\times 10^7$ CFU/ml)	1.9	9.5	24	1.2	4.7	6.8	0.6	3.5	4.2
Yeast ($\times 10^3$ CFU/ml)	4.1	5.5	6.2	2.6	2.5	2.7	2.2	2.8	2.1

*HS-25 ; *Bacillus subtilis* HS-25

다) 저염된장의 효소활성비교

캡슐메주를 이용한 저염된장의 효소활성을 측정하여 <3-1-5>에 나타내었다. 된장 중의 Protease, glucoamylase 및 α -amylase활성은 캡슐메주를 이용한 시험구에

서 대조구에 비하여 효소활성이 높았고, 두 시험구에서는 초기 염농도 감소에 따라 점진적인 높은 효소활성(Protease; 72.43~84.23, glucoamylase; 16.07~19.27, α -amylase; 5.36~8.23 units/g)을 나타내었으나, 대조구에서는 염 농도가 낮을수록 모든 시험구에서 세 종류의 효소활성이 증가되는 현상을 나타내었다.

Table 3-1-5. Protease and amylase activities of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju*

Enzyme (Units/g)	Control			Capsule <i>meju</i> (<i>A. oryzae</i> +HS-25*)			Raw <i>doenjang</i> + HS-25		
	21%	19%	17%	21%	19%	17%	21%	19%	17%
Protease	12.39	35.69	52.48	64.56	68.65	74.23	65.36	72.43	81.49
Glucoamylase	2.03	4.45	10.35	16.25	18.09	18.47	16.07	19.27	18.65
α -Amylase	0.69	1.43	2.89	5.36	6.82	7.24	6.42	7.72	8.23

*HS-25 ; *Bacillus subtilis* HS-25

라) 저염된장의 생리활성비교

캡슐메주를 이용한 저염된장의 여러 가지 생리활성을 측정하여 <표 3-1-6>에 나타내었다. 캡슐메주로 제조한 된장 시험구는 메주 담금염수의 농도에 관계없이 아질산염소거능과 수소공여능이 64~76%, 61~70%의 높은 활성을 나타내었으나, 대조구는 메주 담금염수의 농도에 관계없이 비슷한 활성을 나타내었다. 또한 혈전용해 활성도 대조구의 21% 담금염수에서 1.5mm를 나타내었으나 17%에서는 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 캡슐메주로 이용한 두 시험구에서는 담금염수의 농도에 관계없이 12.8~13.8mm의 크고 뚜렷한 투명환을 확인할 수 있었다.

마) 저염된장의 항균활성

캡슐메주를 이용한 저염된장 추출물의 식품위생미생물에 대한 항균 활성을 <표 3-1-7>에 나타내었다. 캡슐메주로 제조한 두 된장 시험 그룹에서는 메주 담금염수의 농도에 관계없이 식품위생미생물에 대하여 높은 항균활성을 나타내었으며, 대조구도 염농도 관계없이, 이보다 훨씬 낮은 9~12mm 투명환의 크기를 나타내었다.

Table 3-1-6. Physiological activities of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju*

Activities	Control			Capsule <i>meju</i> (<i>A. oryzae</i> +HS-25)			Raw <i>doenjang</i> + HS-25		
	21%	19%	17%	21%	19%	17%	21%	19%	17%
Nitrite scavenging activity (%)	49	45.7	48.2	64	69	72	67	73	76
Hydrogen donating activity (%)	38	39	40	61	65	70	65	70	69
Fibrinolytic activity (diameter, mm)	1.5	1.8	1.4	12.8	13.5	13.2	13.2	13.8	13.8

Table 3-1-7. Antibacterial activity of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju*

Bacteria	Antibacterial activity (mm)*								
	Control			Capsule <i>meju</i> (<i>A. oryzae</i> +HS-25)			Raw <i>doenjang</i> + HS-25		
	21% ^a	19%	17%	21%	19%	17%	21%	19%	17%
<i>B. cereus</i>	12	11	10	13	11	12	13	14	16
<i>Sta. aureus</i>	11	12	12	17	16	17	15	15	16
<i>M. roseus</i>	-	-	-	12	11	14	12	14	13
<i>E. coli</i>	12	11	11	16	17	18	13	14	16
<i>Sal. typhimurium</i>	10	11	10	15	16	17	16	15	15
<i>Sal. enteritidis</i>	12	10	10	16	13	14	15	14	15
<i>Pro. malabilis</i>	11	10	9	16	15	16	13	15	13
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	9	11	14	15	16	16	15	16

^a Concentration of salt solution, Methanol ext. 10mg / paper disk(8 mm)

2) 한방약재를 이용한 저염된장 제조

가) 한방약재 추출물의 일반성분

I ~ IV군의 조합으로 나눈 한방약재 추출물의 일반성분은 <표 3-1-8>과 같다. 각 성분 중에서 환원당 및 조단백질 등은 각 시험군 간에 별 차이가 없었으나 총산과 색도는 상당한 차이를 보였다. 이러한 결과는 각 군을 구성하고 있는 성분차이 때문인 것으로 생각된다.

Table 3-1-8. Quality properties of extract of Korean medicine herbs

Items	Groups			
	I	II	III	IV
pH	4.34	4.28	4.57	4.59
Total acidity(ml)	11.96	16.91	10.64	7.01
Reducing sugar(%)	1.21	0.91	1.09	0.93
Crude protein(%)	0.29	0.58	0.67	0.41
Amino type nitrogen(%)	0.01	0.02	0.03	0.02
Hunter color index (L)	14.70	20.36	28.01	26.67
(a)	4.36	1.46	0.39	2.73
(b)	6.12	2.80	3.18	2.26

나) 한방약재 첨가 된장의 일반특성

(1) 수분

사용한 한방약재 제 I 군~제IV군의 추출물을 각각 3 단계의 농도(A:80%, B:38%, C:12%)로 나누어 발효·숙성시킨 된장의 수분함량은 <그림 3-1-1>과 같다. 전체적인 수분함량은 대조구 된장의 61.9%와 비슷한 58.2%~61.9% 범위였다.

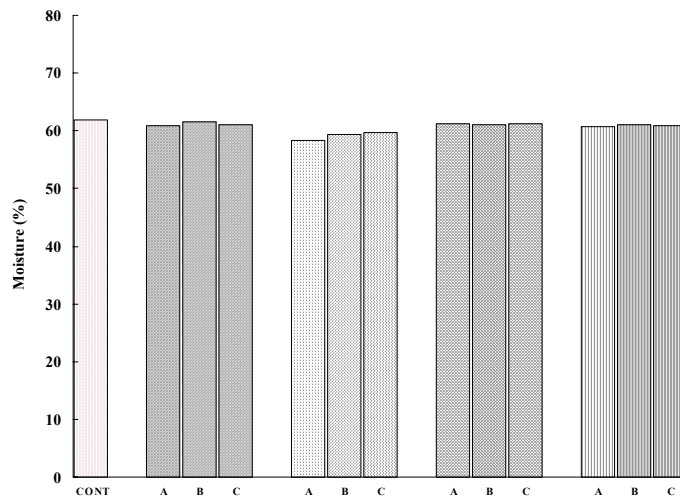


Fig. 3-1-1. Moisture content of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

Concentration of extract : A, 80% ; B, 38% ; C, 12%.

□ : Control ■ : I ▨ : II ▩ : III ▪ : IV

(2) pH 및 총산

한방약재 첨가 된장의 pH 및 총산도를 측정한 결과는 <그림 3-1-2>와 <그림 3-1-3>과 같다. 시험구 된장의 pH는 대조구 된장의 pH 5.50과 비슷하거나 약간 낮았으며, 염수에 첨가하는 추출물의 농도가 낮을수록 된장 중의 pH는 낮은 경향을 나타내었다. 총산도는 대조구 된장 3.25%에 비하여 한방약재 첨가 된장은 3.07~3.70% 범위로 비슷한 값을 나타내었고, pH변화와 적정산도량이 비례하지는 않았다.

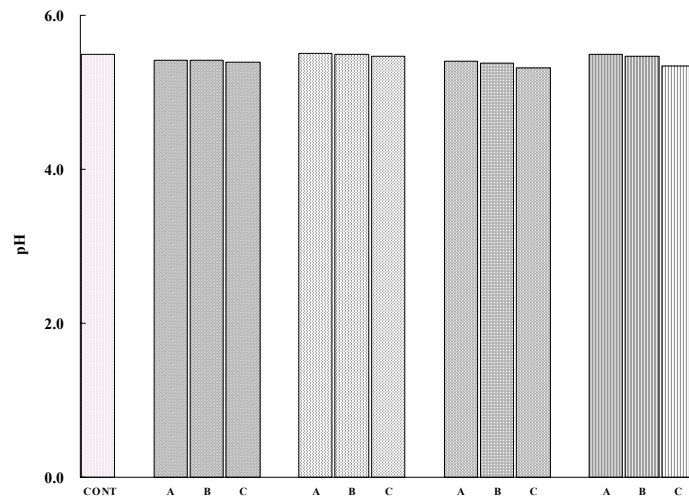


Fig. 3-1-2. pH of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

□ : Control ■ : I ▨ : II ▩ : III ▪ : IV

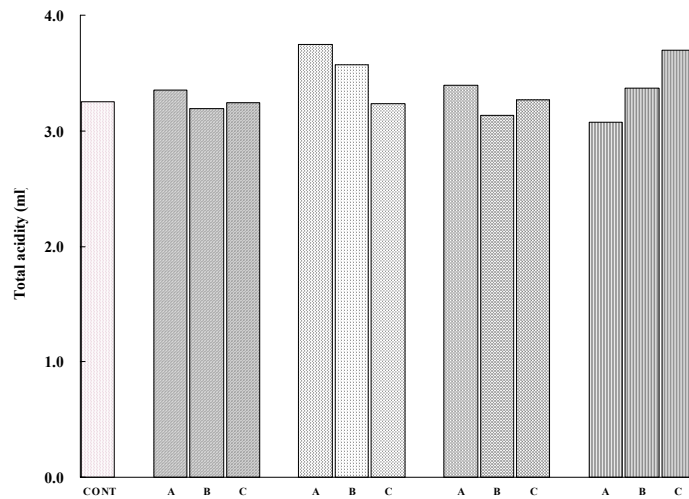


Fig. 3-1-3. Total acidity of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

□ : Control ■ : I ▨ : II ▩ : III ▪ : IV

(4) 환원당

환원당 함량은 대조구 된장 0.62%에 비하여 대체로 높게 나타났다<그림 3-1-4>. 제Ⅲ군 및 제Ⅳ군이(0.66%~14.02%) 제Ⅰ군 및 제Ⅱ군보다(0.58%~1.07%) 약간 높았으며, 각 군에 있어서는 한방약재 추출물의 희석율이 높을수록 환원당 함량은 낮아지는 경향을 보였다.

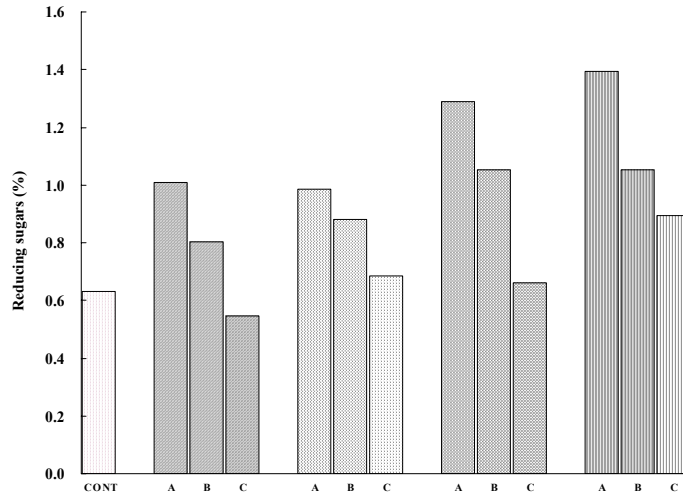


Fig. 3-1-4. Reducing sugar content of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

□: Control ▨: I ▩: II ▪: III ▫: IV

(5) 조단백질

한방약재 첨가 된장 중의 조단백질 함량을 측정하여 <그림 3-1-5>에 나타내었다. 대조구 된장은 12.5%를 나타내었으나 시험구 된장의 평균 조단백질 값은 각각 13.5%, 12.2%, 14.6% 및 14.3%를 나타내어 제Ⅱ군을 제외한 나머지 군에서는 약간 높게 나타났다.

(6) 조지방

한방약재 첨가 된장의 조지방 함량을 측정한 결과는 <그림 3-1-6>과 같다. 대조구 된장의 조지방은 5.9% 이었으나 제Ⅰ군~제Ⅳ군의 시험구 6%~7%를 함유하여 대조구보다 대체로 높게 나타났다.

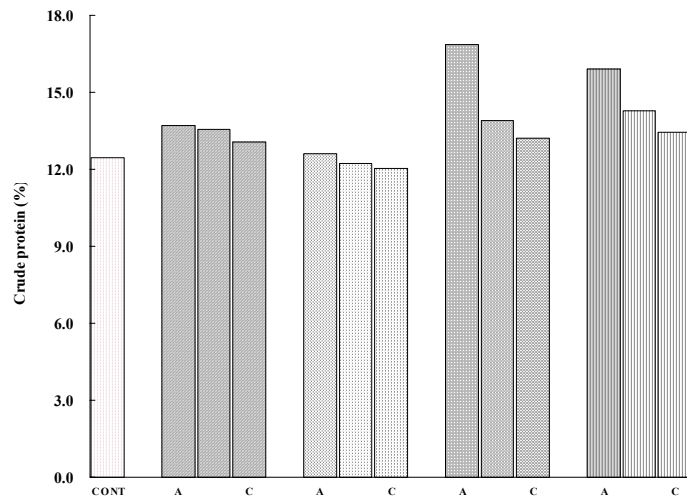


Fig. 3-1-5. Crude protein content of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

□: Control ■: I □: II ■: III ■: IV

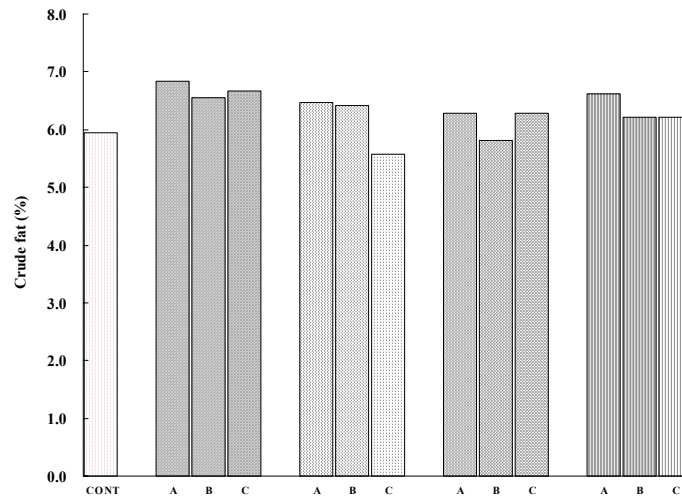


Fig. 3-1-6. Crude lipid content of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

□: Control ■: I □: II ■: III ■: IV

(7) 아미노태 질소

된장의 품질지표를 나타내는 아미노태 질소 함량을 측정하여 <그림 3-1-7>에 나타내었다. 대조구 된장의 아미노태 질소함량은 639.8mg%에 비하여 한방약재 첨가 된장의 모든 시험구에서는 640mg% 이상을 나타내었으며, 제 I 군 및 제 II 군(640~685mg%)의 된장보다 제 III 군과 제 IV 군(670~798mg%)의 된장에서 그 함량이 높았다.

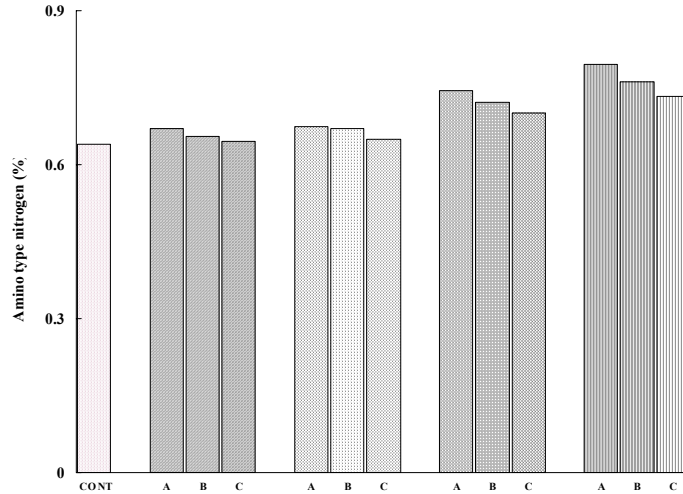


Fig. 3-1-7. Amino type nitrogen content of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

□: Control ■: I ▨: II ▩: III ▤: IV

(8) 갈변도

<그림 3-1-8>는 한방약재 첨가 된장 중의 갈변물질 생성도를 조사하기 위하여 수용성 및 지용성 갈변물질의 갈변도를 검토한 결과이다. 한방약재 첨가 된장은 대조구 된장에 비하여 지용성 갈변도는 큰 차이가 없이 비슷하였지만, 수용성 갈변도는 전체적으로 아주 높게 나타났으며, 한방약재추출물의 첨가 농도가 높을수록 높게 나타났다. 특히 제 I 군 및 제 II 군의 한방약재 첨가 된장은 수용성 갈변물질이 높게 나타났다.

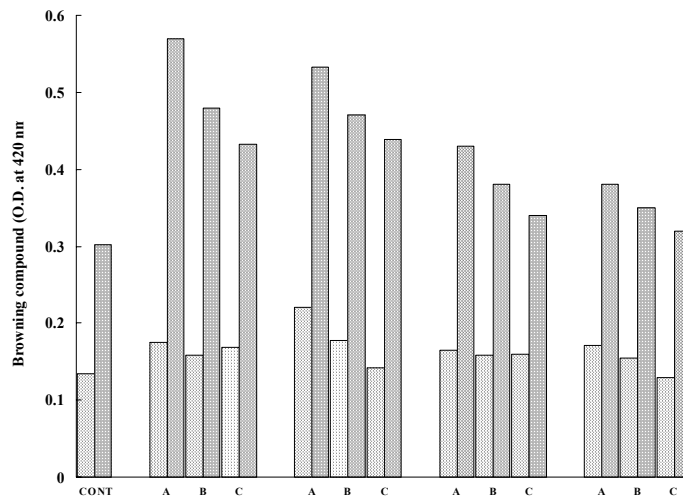


Fig. 3-1-8. Brown pigment content of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

▨ : Fat soluble ▨ : Water soluble

(9) 색차계 색도

한방추출물의 종류 및 농도가 된장의 색도에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각 된장 시료를 채취하여 색차계 색도를 조사하였다<표 3-1-9>. 대조구 된장의 명도(L)값인 31.72와 비교할 때 제Ⅲ군의 B, C와 제Ⅳ군의 명도는 30.04~30.55로 거의 비슷한 값을 보였지만, 제Ⅰ군 및 제Ⅱ군의 명도(L)는 24.32~27.71로 낮게 나타나 된장의 색깔이 약간 검게 보였다. 적색도(a)는 제Ⅰ군의 A~C 한방약제 첨가 된장을 (+5.97~+6.51) 제외한 대부분의 시험구에서 대조구(+6.16) 보다 약간 낮은 수치를 나타내었다. 황색도(b)는 Ⅲ군 및 제Ⅳ군의 된장에서 대조구와 비슷한 값(17.29)을 나타내었고 다른 시험구에서는 낮은 값을 나타내었다. 그리고 모든 된장의 표면과 내부의 색상을 육안으로 관찰한 결과 공기와 접촉이 많은 된장의 표면이 내부보다 변색이 더욱 현저하여 암갈색 혹은 흑색을 띠고 있었다.

Table 3-1-9. Hunter color value of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

Groups		L	a	b
Control		31.72	+6.16	17.29
I	A	26.49	+6.51	13.90
	B	27.24	+6.51	15.14
	C	27.71	+5.97	15.23
II	A	24.32	+5.06	10.64
	B	25.95	+5.13	11.55
	C	27.05	+5.20	13.18
III	A	29.78	+5.95	16.57
	B	30.45	+5.90	16.72
	C	30.55	+6.03	16.90
IV	A	30.25	+5.81	16.83
	B	30.34	+5.93	16.93
	C	30.04	+5.97	17.08

다) 한방약재 첨가 된장의 맛성분 및 미생물특성

(1) 지방산

한방약재 첨가 된장 중의 지방산 조성을 검토하여 <그림 3-1-9>에 나타내었다. 주요 지방산의 조성 비율은 linoleic acid가 전체 지방산중에 약 50%, oleic acid가 26%를 차지하였다. 그리고 palmitic acid, linolenic acid 및 stearic acid는 모두 전체 지방산 조성의 15% 이하를 차지하였다.

(2) 유리아미노산

한방약재 첨가 된장 중의 유리아미노산의 함량을 측정한 결과는 <표 3-1-10>과 같다. 총 유리아미노산 함량은 제 I 군, 제 II 군, 제 III 군 및 제 IV 군의 된장에서 각각 434.47 mg%, 585.58 mg%, 543.82 mg% 및 621.60 mg% 나타내어 대조구 된장 446.79 mg%과 비교해 볼 때 제 I 군을 제외하고는 모두 높게 나타났다.

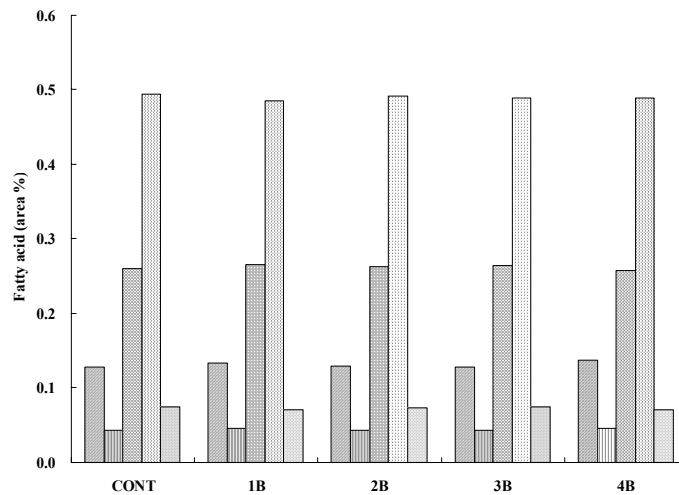


Fig. 3-1-9. Fatty acid composition of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

■ 16:00 ▨ 18:00 ▩ 18:01 ▤ 18:2w6 ▨ 18:3w3

그 중에서 제IV군의 된장은 621.60 mg%로 대조구 된장보다 약 1.5배나 높게 나타났다. 또한 아미노산 함량 중에서 대조구 된장은 glutamic acid가 검출되지 않았으나 제 I 군의 B한방약재 첨가 된장에서는 10.56 mg%를 나타내었으며, 나머지 제II군, 제III군 및 제IV군의 된장에서는 각각 130.68, 119.28 및 135.62 mg%를 나타내었다.

(3) 유기산

한방약재 첨가 된장의 주요 유기산 조성을 조사한 결과는 <표 3-1-11>과 같다. 유기산은 phytic acid를 비롯하여 총 9종이 검출되었으나 된장의 종류에 따라서 그들 성분간의 함량 차이는 상당히 나타났다. 그 중에서 phytic acid, lactic acid, butyric acid의 함량이 각각 609~744 mg%, 118~1059 mg%, 0~332 mg%으로 전체 유기산 함량의 96~99%를 차지하였다. 총 유기산함량은 제II군의 B된장이 2,336 mg%로 가장 높았으며 제III군 및 제IV군의 B된장 함량은 각각 1,141 mg% 및 1,333mg%로 대조구의 1,392 mg%와 유사한 값을 나타내었다.

(4) Daidzein 및 Genistein

한방약재 첨가 된장의 isoflavone 함량을 조사한 결과는 <그림 3-1-10> 및

<그림 3-1-11>과 같다. 대조구 된장의 daidzein 함량은 150.69 $\mu\text{g/g}$ 인데 비하여 제 II군(144.43 $\mu\text{g/g}$)을 제외한 제 I군, 제 III군 및 제 IV군 된장은 각각 152.34 $\mu\text{g/g}$, 164.74 $\mu\text{g/g}$ 및 170.76 $\mu\text{g/g}$ 으로 대조구보다 높게 나타났다(Fig. 2-11). Genistein 함량은 대조구 된장에서 295.44 $\mu\text{g/g}$ 이 검출되었으나 제 I군~제 IV군의 한방약재 첨가 된장에서는 각각 298.02 $\mu\text{g/g}$, 296.87 $\mu\text{g/g}$, 301.39 $\mu\text{g/g}$ 및 299.46 $\mu\text{g/g}$ 이 검출되어 모든 시험구에서 대조구보다 높은 값을 나타내었다(Fig. 2-12).

Table 3-1-10. Free amino acid content of low salt *doenjang* prepared with capsule *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution (mg%)

Amino acids	CONT	I-B	II-B	III-B	IV-B
Threonine	26.03	18.70	33.45	29.91	34.65
Serine	29.82	25.13	45.70	39.62	47.92
Glutamic acid	-	10.56	130.68	119.28	135.62
Proline	35.91	37.44	38.15	38.82	41.02
Glycine	22.57	20.07	23.10	18.67	24.71
Alanine	63.36	63.66	67.43	64.34	77.12
Valine	37.11	35.71	38.14	33.96	42.05
Cystine	2.07	2.91	1.26	1.49	3.41
Methionine	10.28	12.18	10.95	9.71	12.50
Isoleucine	33.48	30.84	30.02	27.27	32.26
Leucine	50.25	47.32	42.29	38.68	44.30
Tyrosine	18.82	17.10	11.52	16.57	8.59
Phenylalanine	32.76	31.29	26.94	24.89	28.15
Lysine	61.80	60.73	63.40	60.86	66.79
Histidine	20.21	19.01	20.58	18.19	20.84
Arginine	2.32	1.82	1.97	1.56	1.67
Total amino acid	444.47	432.65	583.61	542.26	619.93

Table 3-1-11. Organic acid content of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

	(mg%)				
Organic acids	CONT	I-B	II-B	III-B	IV-B
Phytic acid	744	609	990	990	651
Oxalic acid	0	1	0	0	1
Citric acid	0	0	0	7	36
Tartaric acid	0	0	2	0	0
Malonic acid	6	12	14	10	10
Lactic acid	388	235	1059	118	296
Acetic acid	11	8	0	16	0
Pyroglutamic acid	5	3	4	0	7
Butyric acid	238	125	267	0	332
Total organic acid	1,154	868	2,069	1,141	1,001

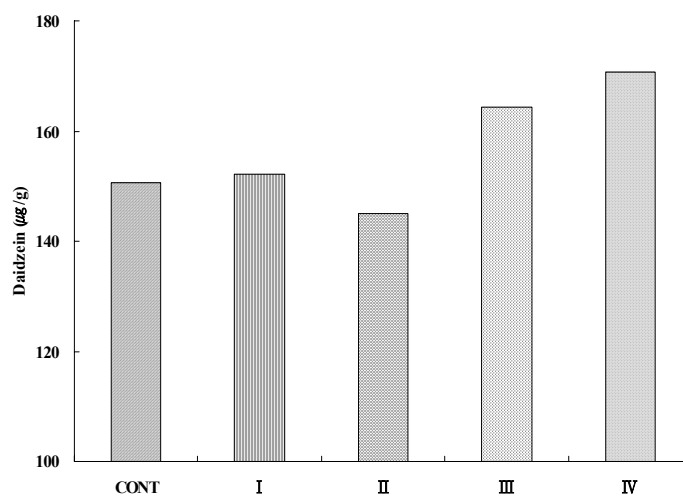


Fig. 3-1-10. Daidzein content of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

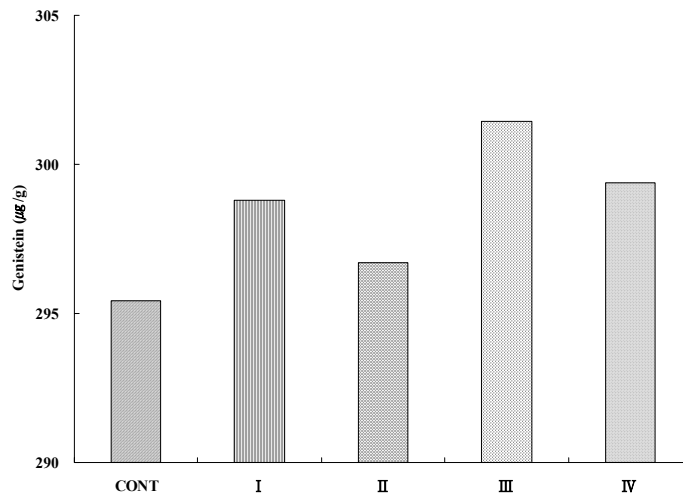


Fig. 3-1-11. Genistein content of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

(5) 생균수 및 효소활성

한방약재 첨가 된장 중에 서식하고 있는 생균수를 측정하여 <그림 3-1-12>에 나타내었다. 대조구 된장은 2.2×10^7 CFU/ml의 콜로니가 검출되었으나 제 I 군 및 제 II 군의 한방약재 첨가 된장에서는 각각 3.6×10^7 CFU/ml와 2.3×10^7 CFU/ml의 콜로니가 관찰되어 대조구 된장보다는 생균수가 약간 많이 나타났다. 그러나 제 III 군 및 제 IV 군의 된장에서는 각각 1.3×10^7 CFU/ml와 1.6×10^7 CFU/ml의 생균수가 나타나 대조구보다 약간 적은 수의 콜로니가 관찰되었다.

한방약재 첨가 된장중의 효소활성은 <그림 3-1-13>과 같다. 4종류의 한방약재 첨가 된장 protease 활성은 67.5~83.6 U 범위로서 대조구 된장의 60.05 U 보다 약간 높았으나, α -amylase 활성은 2.23~2.52 U 범위로서 대조구 된장(2.01 U)과 비슷하였다.

(6) 관능검사

본 실험에서 제조한 한방약재 첨가 된장을 전통된장 찌개용의 레시피에 적합하도록 조리하여 관능 평가를 실시한 결과는 <그림 3-1-14>와 같다. 제 III 군 및 제 IV 군의 한방약재 첨가 된장찌개는 제 I 군 및 제 II 군 된장찌개 보다 밝은 색깔을 나타내며, 전통된장찌개의 이상취를 절감하는 효과를 나타내었다. 특히 제 I 군 및 제 II 군의 한방약재 첨가 된장찌개는 첨가한 두부 및 무의 색을 검게 하고 약간의 한약재 냄새를 띄었으나, 제 III 군 및 제 IV 군의 한방약재 첨가 된장찌개는 단맛이 적절하게 보완되어 대조구 된장보다 종합적인 맛 및 기호도가 우수한 것으로 평가되었다.

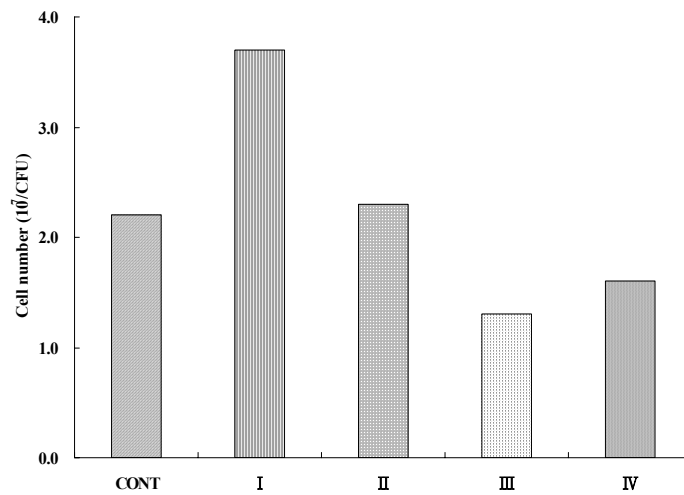


Fig. 3-1-12. Viable cell bacteria of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

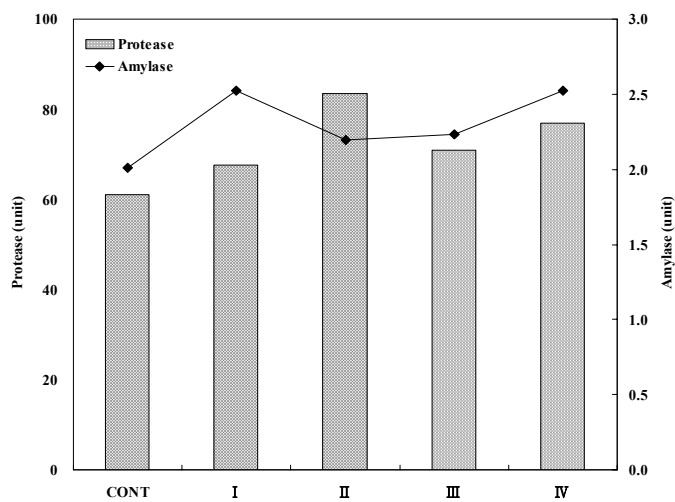


Fig. 3-1-13. Protease and amylase activity of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

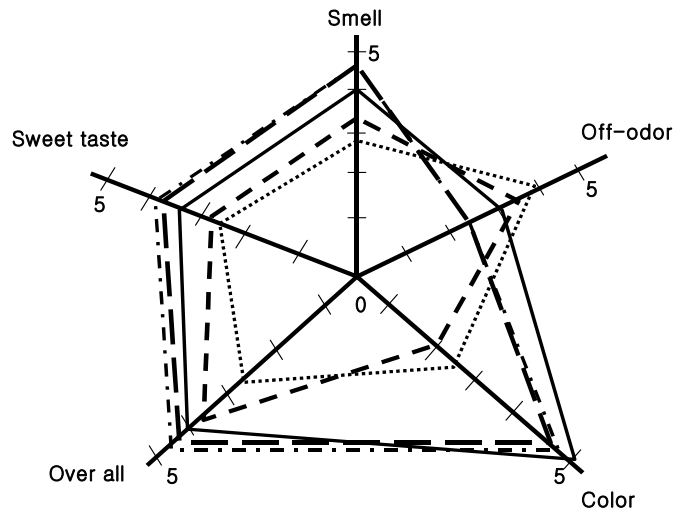


Fig. 3-1-14. Sensory evaluation of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

— : Control : I - - - : II - · - : III - · · : IV

라) 한방약재 첨가 된장의 생리활성

(1) 아질산염 소거 작용

한방약재 첨가 된장의 아질산염 소거능을 검토하여 <그림 3-1-15>에 나타내었다. 대조구의 아질산염 소거능은 약 21%인데 비하여 제 I 군~제 IV군의 된장에서는 55%~71%로 높게 나타났으며, 한방약재 첨가 된장 중에서는 제 III군, 제 IV군, 제 II군 및 제 I군의 순으로 각각 71%, 66%, 60% 및 55%를 나타냈다. 특히 제 III군 및 제 IV군은 대조구에 비하여 3배 이상, 제 II군은 2.5배 이상의 높은 아질산염 소거능을 나타내었다.

(2) 수소공여능

<그림 3-1-16>은 수소공여능을 측정한 결과, 대조구 된장의 44%보다 제 I 군~제 IV군의 한방약재 첨가 된장의 수소공여능이 높은 경향을 나타내었다. 각 한방약재 첨가 된장군 사이에서는 제 IV군이 70%로 가장 높았으며 그 다음은 제 III군(63%), 제 I군(56%) 및 제 II군(52%)으로 나타났다. 이러한 결과는 콩 및 한약재료 중에 함유된 토코페롤, 이소플라본, 사포닌과 같은 항산화 물질의 효과일 것으로 추정한다.

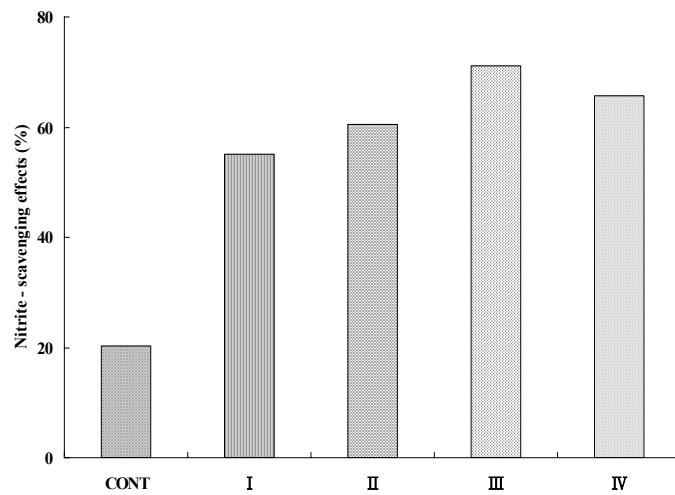


Fig. 3-1-15. Nitrite scavenging activity of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

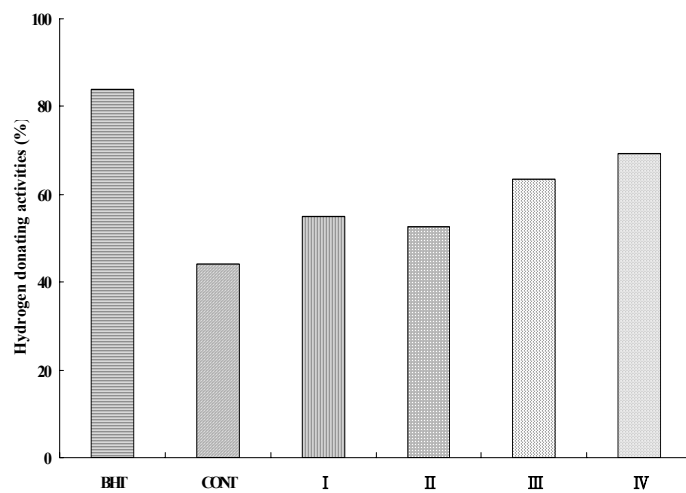


Fig. 3-1-16. Hydrogen - donating activity of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

(3) 항균활성

한방약재 첨가 된장의 항균력을 검토한 결과는 <표 3-1-14>과 <그림 3-1-17>과 같다. 4종류의 한방약재 첨가 된장은 대조구보다 대체적으로 투명환이 크게 나타났으며, 특히 제Ⅲ군 및 제Ⅳ군이 제Ⅰ군 및 제Ⅱ군의 된장보다 높은 항균력을 나타내었다.

Table 3-1-14. Antibacterial activity of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution

Bacteria	Tested strains	Antibacterial activity (mm)*				
		Control	I	II	III	IV
Gram (+)	<i>Bacillus cereus</i> KCCM-11204	9.5	17	14	17	19
	<i>B. licheniformis</i> NFRI-8008	12	14	13	15	15
	<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	11	12	12	13	14
	<i>Micrococcus roseus</i> JAM-1295	13	13	15	15	17
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC-27607	11	22	24	19	20
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC-25922	12	14	15	18	19
	<i>Salmonella typhimurium</i> TV-110	12	16	11	14	16
	<i>Sal. enteritidis</i> KCCM-1202	12	15	14	15	16
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC-2208	13	14	16	15	16
	<i>Proteus malabilis</i> KCTC-2433	14	16	12	16	17
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	13	15	16	18	18
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3899	13	13	12	14	14

* Size of clear zone on culture media against bacteria tested

(4) 혈전용해능

한방약재 첨가 된장의 혈전용해능을 검토하여 <표 3-1-15>에 나타내었다. 모든 한방약재 첨가 된장 시험구의 혈전용해능은 전통된장인 대조구보다 크게 나타났으며, 제Ⅰ군 및 제Ⅳ군의 한방약재 첨가 된장이 제Ⅱ군 및 제Ⅲ군의 한방약재 첨가 된장보다 혈전용해능이 높게 나타났다. 혈전용해능은 반응 1시간 내에 그의 완료되며 그 이후에는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다.

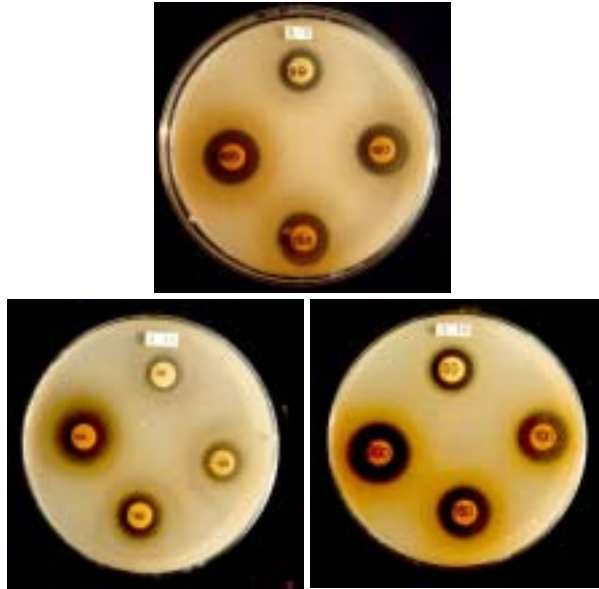


Fig. 3-1-17. Clear zone size of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution.

A-7, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *V. parahaemolyticus* ; A-16, *St. mutans* ATCC-27607.

Table 3-1-15. Fibrinolytic activity of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* and extract of Korean medicine herb as salt solution

Incubation time (hr)	Fibrinolytic activity(mm)*				
	Control	I	II	III	IV
1	3.1	9.2	8.0	9.4	7.4
3	4.2	10.4	8.5	10.7	9.6
10	4.6	10.4	9.2	10.9	10.7

* Size of clear zone on fibrin plate

3) 캡슐메주와 알코올을 이용한 분말용 저염 생된장의 품질특성

제 2(협동)과제와 제 3과제(협동)에서 최적화된 캡슐메주를 제조하여 전통적인 방법으로 된장 중의 최종 염농도가 8, 6, 4%로 되도록 조절한 한 다음, 생간장과 생된장으로 분리하고 그 생된장에 주정을 1, 2, 3% 농도로 첨가하여 1년간 실온에서 숙성

시킨 전통된장의 총질소, 아미노태질소, 암모니아태질소 및 환원당 함량은 <표 3-1-16>과 같다.

총질소(TN)는 1.68 ~ 1.85% 범위였으며, 발효를 나타내는 아미노태질소(AN)은 저염도일수록 높았고, 주정첨가량이 많을수록 낮게 나타났다. 암모니아태 질소(AM)는 아미노태 질소에 비하여 1/3 정도로 낮은 함량을 나타내었으며 아미노태질소와 마찬가지로 염도와 주정농도에 유사한 경향을 나타내었다. 환원당(RS) 함량은 5.3 - 6.1%로 염도와 주정농도에 따른 큰 차이가 없었다.

실온에서 90일간 저장하면서 각 염도와 주정 함량에 따른 pH의 변화를 <표 3-1-17>에 나타내었다. 경시적으로 염도가 낮으면 pH강하가 크게 나타났으며, 주정농도가 증가하면 낮게 나타났다. 한편 실온에서 90일간 저장하면서 염도와 주정 함량에 따른 적정산도의 변화를 <표 3-1-18>에 나타내었다. 경시적으로 염도가 낮으면 적정산도가 높게 나타났으며, 주정농도가 증가하면 낮게 나타났다.

Table 3-1-16. Quality properties of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* on concentration of salt and alcohol distillary

Concentration		Total nitrogen(%)	NH ₂ -N (mg%)	NH ₃ -N (mg%)	Reducing sugar(%)
Salt(%)	AD(%)				
Control	0	1.72	439	76	5.3
	0	1.75	532	89	5.8
	8	1	1.69	510	76
8	2	1.73	497	78	5.7
	0	1.84	587	95	5.2
	6	1	1.76	564	98
6	2	1.85	548	86	5.6
	0	1.75	631	106	6.1
	4	1	1.73	611	98
4	2	1.68	587	84	5.3

*Capsule *meju* - *Doenjang* (*Asp. oryzae* + *B. subtilis* SJ-61 + HS-25)

AD, alcohol distillary

Table 3-1-17. pH value of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* on concentration of salt and alcohol distillary

Concentration		pH			
Salt(%)	AD(%)	0	30	60	90
Control*	0	6.31	5.43	5.36	5.18
	0	6.12	5.21	5.16	4.79
8	1	6.26	5.27	5.24	5.13
	2	6.19	5.39	5.32	5.17
6	0	6.25	5.15	5.03	4.31
	1	6.17	5.24	5.18	5.03
	2	6.28	5.26	5.20	5.11
4	0	6.37	4.96	4.93	4.78
	1	6.04	5.37	5.17	4.88
	2	6.23	5.42	5.19	5.06

*Capsule *meju* - *Doenjang* (*Asp. oryzae* + *B. subtilis* SJ-61 + HS-25)

AD, alcohol distillary

Table 3-1-18. Total acidity of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* on concentration of salt and alcohol distillary

Concentration		Total acidity (0.1N NaOH, mL / 10g)			
Salt(%)	AD(%)	0	30	60	90
Control	0	8.13	10.45	14.43	15.57
	0	8.34	11.65	15.39	16.76
8	1	8.29	11.23	15.11	16.54
	2	8.28	11.10	14.98	16.21
6	0	8.23	12.64	16.66	16.81
	1	8.31	12.51	15.48	16.76
	2	8.23	12.40	15.33	16.42
4	0	8.34	14.76	18.94	19.21
	1	8.27	14.23	17.65	18.03
	2	8.29	14.03	16.97	17.55

*Capsule *meju* - *Doenjang* (*Asp. oryzae* + *B. subtilis* SJ-61 + HS-25)

AD, alcohol distillary

Table 3-1-19. Viable cell bacteria of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* on concentration of salt and alcohol distillary

Concentration		Viable cell count (Log CFU/g)			
Salt(%)	AD(%)	0	30	60	90
Control	0	4.22	4.43	4.67	4.87
8	0	4.48	4.85	5.12	5.23
	1	4.43	4.71	5.02	5.19
	2	4.32	4.54	4.68	4.76
6	0	4.53	4.99	5.76	5.79
	1	4.47	5.16	5.65	5.68
	2	4.32	5.05	5.24	5.31
4	0	4.44	5.87	6.76	7.68
	1	4.38	5.79	5.65	7.11
	2	4.35	5.31	5.46	6.48

*Capsule meju - Doenjang (*Asp. oryzae* + *B. subtilis* SJ-61 + HS-25)
AD, alcohol distillary

실온에서 90일간 저장하면서 각 염도와 주정 함량에 따른 일반 세균수의 변화를 <표 3-1-19>에 나타내었다. 경시적으로 염도가 낮으면 높게 크게 나타났으며, 주정농도가 증가하면 낮게 나타났다. 4% 염도는 생된장 숙성 중에 균수 증가가 크게 나타나므로 인하여 문제가 있었다. 그리고 각 염도와 주정 함량에 따른 일반 관능의 변화를 <표 3-1-20>에 나타내었다. 염도가 낮으면 대체로 전체적인 기호도가 낮아졌으며, 주정농도가 증가하면 알코올 및 그 반응생성물로 인하여 기호도가 상대적으로 낮게 나타났다. 대체로 8% 및 6% 염도에서 각각 1% 주정첨가가 효과적인 저염 생된장의 숙성에 효과적인 것으로 나타났다.

Table 3-1-20. Sensory evaluation of low salt *doenjang* prepared with capsule type *meju* on concentration of salt and alcohol distillary

Concentration		Sensory score (5 point)			
Salt(%)	AD(%)	Flavor	Color	Taste	Over all eating quality
Control	0	4.5±0.2	4.3±0.3	4.1±0.1	4.3±0.3
8	0	3.6±0.4	4.2±0.2	4.4±0.2	4.3±0.2
	1	3.5±0.2	4.3±0.2	4.2±0.3	4.2±0.3
	2	3.8±0.3	4.1±0.4	3.9±0.4	3.9±0.3
6	0	3.8±0.2	4.4±0.1	4.3±0.2	3.8±0.2
	1	3.6±0.4	4.2±0.3	4.2±0.3	3.6±0.3
	2	3.8±0.2	4.5±0.2	3.4±0.2	3.4±0.2
4	0	3.4±0.3	4.3±0.4	3.2±0.3	3.6±0.2
	1	3.1±0.2	4.1±0.2	3.1±0.4	3.3±0.5
	2	2.9±0.2	4.2±0.3	2.7±0.2	3.1±0.3

1(Very poor) ; 2(Poor) ; 3(Moderate) ; 4(Good) ; 5(Very good)

2. 전통장류의 변색 억제기술

가. 실험재료 및 방법

1) 실험재료

국산 태광콩을 이용하여 캡슐메주 HS-25를 이용한 전통된장을 변색억제에 관한 실험재료로 사용하였다.

2) 실험구성

전통된장의 숙성중 갈변억제를 할 수 있는 여러 가지 요인에 따른 실험구성은 다음과 같이 하였다.

가) 콩 및 콩 발효식품의 첨가

실험구 I 은 전통된장에 증자콩, 메주분말 및 청국장을 각각 5%, 10%(w/w)를 첨가하여 5℃와 20℃에서 35일간 숙성하면서 전통된장의 색소와 그 원인물질 및 발효특

성의 변화를 조사하였다.

나) 빛의 종류

실험구 II는 전통된장을 형광등, 백열등, 자외선등 및 햇빛(투명 플라스틱통, 유리병, 플라스틱필름)에 노출시키면서 5℃와 20℃에서 35일간 숙성중 전통된장의 색소와 그 원인물질 및 발효특성의 변화를 조사하였다.

다) 용기별/ 산소차단정도

실험구 III은 전통된장을 산소 및 햇빛 투과도가 상이한 용기, 유리병, PVC 용기(투명, 불투명) 및 PVC필름(투명, 불투명)에서 5℃와 20℃에서 35일간 숙성시키면서 전통된장의 색소와 그 원인물질 및 발효특성의 변화를 조사하였다.

라) 갈변억제제

실험구 IV는 전통된장에 sodium pyrophosphate, ascorbic acid 및 oxalic acid를 0.1, 0.5, 1.0%(w/w) 농도로 첨가하여 5℃와 20℃에서 35일간 숙성시키면서 전통된장의 색소와 그 원인물질 및 발효특성의 변화를 조사하였다.

3) 실험방법

<전통장류의 저염화>에서 해당하는 이화학 분석법에 준하여 실시하였다.

나. 실험결과

1) 발효콩 첨가에 따른 저염 전통된장의 갈변억제 및 발효특성

가) 색도

증자콩, 메주가루 및 청국장 첨가에 따른 숙성과정 중 전통된장의 색차계 색도의 L, a, b값을 측정한 결과는 <표 3-1-16> 및 <표 3-1-17>과 같다. L값(명도)은 시간이 경과함에 따라 약간씩 감소하는 경향이었는데, 메주를 첨가한 된장은 첨가량이 증가할수록 대조구보다 낮은 값을 나타내었고, 그 외에는 대조구보다 높은 값을 나타내었으며, 저온(5℃) 된장이 실온(20℃) 된장 보다 높은 값을 나타내었다. a값(적색도)은 시간이 경과함에 따라 약간씩 증가하는 경향이었고, 메주를 첨가한 된장을 제외하고 대조구보다 낮게 나타났으며, 저온 된장이 실온의 된장 보다 높게 나타났다. b값(황색도)은 발효시간이 경과함에 따라 유의적인 변화는 없었으며, ΔE 값은 L값과 비슷한 경향이였다.

Table 3-1-16. Changes of Hunter color value in traditional *doenjang* added with cooked soybean, capsule *meju* and *chungkugjang* at 5°C for 35 days

Color	Days	Control	Cooked soybean ¹		Capsule <i>meju</i> ¹		<i>Chungkugjang</i> ¹	
			5%	10%	5%	10%	5%	10%
L	0	33.77	36.15	36.79	32.19	31.55	33.88	33.61
	10	35.64	36.41	37.71	34.57	33.74	35.49	37.64
	25	33.92	35.49	36.20	33.67	34.11	35.60	35.83
	35	33.88	35.22	35.44	33.38	33.56	33.21	34.66
a	0	4.65	4.45	4.25	5.19	5.33	4.71	4.90
	10	4.73	4.58	4.55	5.36	5.44	4.88	5.13
	25	4.76	4.69	4.62	5.50	5.50	4.82	5.40
	35	4.82	4.78	4.67	5.53	5.71	5.08	5.37
b	0	15.14	14.27	14.61	14.25	12.36	13.33	12.33
	10	15.27	14.23	13.91	13.94	14.23	13.58	12.36
	25	15.70	14.81	15.22	15.24	15.14	14.11	14.05
	35	15.66	16.06	16.51	15.44	14.55	14.32	13.63

¹dry basis

나) 갈색도

증자콩, 메주가루 및 청국장 첨가에 따른 전통된장의 갈색도를 측정한 결과는 <표 3-1-18>과 같다. 지용성 색소와 수용성 색소 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 지용성 색소 보다 수용성 색소 쪽에서 약간 높게 나타났으며, 저온(5°C)의 전통된장이 지용성 색소나 수용성 색소 모두 실온(20°C)의 전통된장보다 낮게 나타났다.

다) 산가

증자콩, 메주 및 청국장 첨가에 따른 전통된장의 산가를 측정한 결과는 <표 3-1-19>와 같다. 산가는 시간이 경과함에 따라 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 메주를 첨가한 된장이 가장 높은 값을 나타내었고, 메주를 첨가한 된장을 제외한 모든 된장은 대조구에 비하여 낮은 값을 나타내었으며, 저온된장이 실온된장보다 낮은 값을 나타내었다.

Table 3-1-17. Changes of Hunter color value in traditional *doenjang* added with cooked soybean, capsule *meju* and *chungkugjang* at 20°C for 35 days

Color	Days	Control	Cooked soybean ¹		Capsule <i>meju</i> ¹		<i>Chungkugjang</i> ¹	
			5%	10%	5%	10%	5%	10%
L	0	33.77	36.15	36.79	31.19	32.55	33.88	33.61
	10	34.62	34.64	36.31	32.06	33.29	34.62	34.79
	25	33.11	32.23	35.29	31.75	33.51	33.92	34.19
	35	28.13	30.93	31.84	26.96	26.96	28.29	28.24
a	0	4.65	4.45	4.25	5.19	5.33	4.71	4.90
	10	5.40	5.28	4.69	6.33	6.54	5.50	5.12
	25	5.67	5.46	4.93	6.59	6.98	5.78	5.52
	35	6.19	5.68	5.54	6.72	7.15	5.93	5.96
b	0	15.14	14.27	14.61	14.25	12.36	13.33	12.33
	10	15.19	14.44	14.05	14.11	12.31	13.81	11.56
	25	15.50	14.70	14.27	14.43	13.49	12.58	12.03
	35	15.97	15.19	14.02	15.80	14.69	13.57	13.76

¹dry basis

Table 3-1-18. Changes of brown pigment in traditional *doenjang* added with cooked soybean, capsule *meju* and *chungkugjang* at 5°C and 20°C for 35 days (OD at 420 nm/g)

Temp.	Pigment	Days	Control	Cooked soybean ¹		Capsule <i>meju</i> ¹		<i>Chungkugjang</i> ¹	
				5%	10%	5%	10%	5%	10%
5°C	LBP ²	0	0.06	0.07	0.10	0.08	0.10	0.07	0.08
		10	0.10	0.08	0.09	0.10	0.11	0.11	0.09
		25	0.09	0.10	0.09	0.10	0.14	0.11	0.13
		35	0.11	0.11	0.10	0.14	0.13	0.12	0.16
	HBP ³	0	0.14	0.13	0.10	0.10	0.09	0.13	0.15
		10	0.15	0.14	0.11	0.11	0.10	0.17	0.14
		25	0.15	0.16	0.12	0.13	0.12	0.17	0.16
		35	0.17	0.17	0.14	0.16	0.17	0.18	0.17
20°C	LBP	0	0.06	0.07	0.10	0.08	0.10	0.07	0.08
		10	0.10	0.09	0.10	0.09	0.12	0.10	0.11
		25	0.12	0.09	0.11	0.13	0.15	0.10	0.13
		35	0.16	0.14	0.17	0.14	0.20	0.12	0.17
	HBP	0	0.14	0.13	0.10	0.10	0.09	0.13	0.15
		10	0.17	0.14	0.11	0.13	0.13	0.14	0.17
		25	0.20	0.15	0.13	0.16	0.15	0.14	0.22
		35	0.25	0.20	0.18	0.21	0.20	0.15	0.25

¹dry basis ; ²Lipophilic brown pigment ; ³Hydrophilic brown pigment

Table 3-1-19. Changes of acid value in traditional *doenjang* added with cooked soybean, capsule *meju* and *chungkugjang* at 5°C and 20°C for 35 days

Temp.	Days	Control	Cooked soybean ¹		Capsule <i>meju</i> ¹		<i>Chungkugjang</i> ¹	
			5%	10%	5%	10%	5%	10%
5°C	0	12.72	12.64	12.59	13.02	12.96	12.28	13.37
	10	16.03	18.24	19.96	15.52	27.27	15.43	20.20
	25	26.05	30.66	32.98	24.18	26.88	24.56	27.74
	35	35.59	32.40	33.69	28.11	35.97	31.10	33.96
20°C	0	12.72	12.64	12.59	12.96	13.02	13.28	13.37
	10	30.71	19.98	19.60	19.71	31.74	22.95	25.21
	25	37.09	30.73	31.48	25.31	37.65	30.36	26.24
	35	40.46	34.47	36.34	43.82	48.90	37.65	41.95

¹dry basis

라) 아미노태질소

증자콩, 메주 및 청국장 첨가에 따른 전통된장의 아미노태질소를 측정 한 결과는 <표 3-1-20>과 같다. 아미노태질소는 시간이 경과함에 따라 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 메주를 첨가한 된장이 가장 높은 값을 나타내었고, 증자콩은 첨가량이 증가할수록 대조구보다 낮은 값을 나타내었으며, 저온된장이 실온된장보다 낮은 값을 나타내었다.

마) 환원당

증자콩, 메주 및 청국장 첨가에 따른 전통된장의 환원당을 측정 한 결과는 <표 3-1-21>과 같다. 환원당은 시간이 경과함에 따라 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 첨가 종류 중에는 메주를 첨가한 된장이 가장 높은 값을 나타내었고, 첨가량이 증가할수록 값이 높게 나타났으며, 저온(5°C) 된장이 실온(20°C) 된장보다 낮은 값을 나타내었다.

Table 3-1-20. Changes of amino type nitrogen in traditional *doenjang* added with cooked soybean, capsule *meju* and *chungkugjang* at 5°C and 20°C for 35 days (mg%)

Temp.	Days	Control	Cooked soybean ¹		Capsule <i>meju</i> ¹		<i>Chungkugjang</i> ¹	
			5%	10%	5%	10%	5%	10%
5°C	0	1,134	789	912	1,667	1,796	1,296	1,542
	10	1,119	812	925	1,680	1,833	1,330	1,556
	25	1,211	836	983	1,730	1,840	1,374	1,610
	35	1,271	878	1,082	1,817	1,937	1,390	1,741
20°C	0	1,134	789	912	1,667	1,796	1,296	1,542
	10	1,218	834	945	1,672	1,867	1,389	1,589
	25	1,298	853	1,013	1,713	1,977	1,334	1,632
	35	1,328	895	1,145	1,784	2,146	1,518	1,795

¹dry basis

Table 3-1-21. Changes of reducing sugar in traditional *doenjang* added with cooked soybean, capsule *meju* and *chungkugjang* at 5°C and 20°C for 35 days (%)

Temp.	Days	Control	Cooked soybean ¹		Capsule <i>meju</i> ¹		<i>Chungkugjang</i> ¹	
			5%	10%	5%	10%	5%	10%
5°C	0	0.48	0.38	0.51	0.49	0.64	0.52	0.64
	10	0.48	0.40	0.53	0.51	0.66	0.53	0.68
	25	0.49	0.42	0.56	0.54	0.67	0.56	0.70
	35	0.51	0.44	0.60	0.57	0.69	0.57	0.72
20°C	0	0.48	0.38	0.51	0.49	0.64	0.52	0.64
	10	0.49	0.46	0.61	0.55	0.72	0.58	0.69
	25	0.51	0.50	0.63	0.59	0.78	0.60	0.72
	35	0.54	0.56	0.66	0.64	0.79	0.63	0.75

¹dry basis

바) pH

증자콩, 메주 및 청국장 첨가에 따른 전통된장의 pH를 측정한 결과는 <표 3-1-22>와 같다. pH는 시간이 경과함에 따라 모두 감소하는 경향이 나타났는데, 메주를 10% 첨가한 된장이 가장 낮은 값을 나타내었고, 실온된장이 저온된장보다 낮은 값을 나타내었다.

Table 3-1-22. Changes of pH in traditional *doenjang* added with cooked soybean, capsule *meju* and *chungkugjang* at 5°C and 20°C for 35 days

Temp.	Days	Control	Cooked soybean ¹		Capsule <i>meju</i> ¹		<i>Chungjugjang</i> ¹	
			5%	10%	5%	10%	5%	10%
5°C	0	6.13	6.12	6.20	6.17	6.14	6.06	6.18
	10	6.09	6.10	6.15	6.03	6.05	6.02	6.14
	25	5.91	5.94	5.97	5.89	6.01	5.94	5.96
	35	5.89	5.93	5.95	5.82	5.94	5.88	5.92
20°C	0	6.13	6.12	6.20	6.17	6.14	6.06	6.18
	10	6.02	6.04	5.94	5.97	5.92	5.94	5.97
	25	5.89	5.88	5.85	5.80	5.71	5.82	5.90
	35	5.74	5.83	5.81	5.69	5.63	5.75	5.83

¹dry basis

2) 광선 종류에 따른 전통된장의 갈변억제 및 발효특성

가) 색도

광선의 종류에 따른 전통된장의 색도는 발효과정중 색차계의 L, a, b값을 측정한 결과는 <표 3-1-23>과 같다. L값(명도)은 발효시간이 경과함에 따라 약간씩 감소하는 경향이었고, a값(적색도)은 오히려 발효시간이 경과함에 따라 조금씩 증가하였다. 된장의 색도의 차이를 보면, L값의 경우, 백열등, 형광등, 자외선, 햇빛의 플라스틱 필름, 일반용기, 유리의 순으로 나타났으며, a값의 경우 그와 반대되었다. b값(황색도)은 발효시간이 경과함에 따라 유의적인 변화는 없었다.

Table 3-1-23. Changes of Hunter color value in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 20°C for 35 days by some lights

Lights		Days								
		0	0.25	1	2	5	10	15	25	35
Fluorescent light	L	33.77	33.22	34.36	33.2	32.39	33.32	31.05	30.17	28.73
	a	4.86	4.75	4.44	5.11	5.48	5.70	5.77	4.29	7.23
	b	15.74	16.91	11.08	15.16	16.93	13.25	15.72	17.54	17.95
Incandescen t light	L	33.77	32.90	35.78	32.49	31.79	33.86	29.94	32.77	28.73
	a	4.86	4.75	4.44	5.11	5.48	5.70	5.77	4.285	7.23
	b	15.74	14.94	11.08	15.16	16.16	13.25	15.72	10.83	17.95
Ultraviolet light	L	33.77	36.51	33.97	32.75	32.04	33.94	33.36	33.86	27.74
	a	4.86	3.85	4.94	4.99	5.23	5.20	5.09	4.35	6.13
	b	15.74	12.22	15.76	14.87	16.88	12.70	13.23	10.99	14.76
PVC vessel	L	33.77	34.62	34.18	33.01	32.81	35.21	30.41	28.33	26.78
	a	4.86	3.89	4.31	4.80	5.12	4.56	6.11	6.55	6.01
	b	15.74	11.53	13.16	14.56	16.14	14.21	14.73	15.33	14.61
Sun Glass light bottle	L	33.77	36.38	34.61	33.09	31.82	34.41	30.17	28.07	25.91
	a	4.86	3.58	4.53	4.45	5.145	5.14	5.65	6.47	6.44
	b	15.74	11.66	13.52	12.77	16.42	11.71	15.11	16.93	16.06
PVC film	L	33.77	35.51	34.13	32.96	32.47	33.87	31.47	27.93	27.73
	a	4.86	3.96	4.16	4.70	5.67	5.85	5.38	6.04	6.21
	b	15.74	11.95	13.57	15.02	16.04	13.64	13.32	11.38	13.32

나) 갈색도

광선의 종류에 따른 전통된장의 갈색도를 측정한 결과는 <표 3-1-24>와 같다. 지용성 색소와 수용성 색소 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 지용성 색소 보다 수용성 색소 쪽에서 약간 높게 나타났으며, 햇빛에 노출되었던 된장들이 약간 높은 값을 나타내었다.

Table 3-1-24. Changes of brown pigment in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 20°C for 35 days by some lights

(OD, 420 nm/g)

Lights		Days								
		0	0.25	1	2	5	10	15	25	35
Fluorescent light	LBP ¹	0.06	0.09	0.10	0.03	0.12	0.14	0.11	0.12	0.12
	HBP ²	0.14	0.05	0.13	0.07	0.13	0.16	0.15	0.16	0.12
Incandescent light	LBP	0.06	0.07	0.07	0.08	0.12	0.11	0.11	0.12	0.13
	HBP	0.14	0.14	0.15	0.16	0.16	0.17	0.14	0.15	0.16
Ultraviolet light	LBP	0.06	0.08	0.08	0.05	0.14	0.12	0.12	0.12	0.13
	HBP	0.14	0.14	0.16	0.08	0.09	0.11	0.18	0.14	0.16
PVC vessel	LBP	0.06	0.06	0.08	0.06	0.08	0.15	0.14	0.14	0.16
	HBP	0.14	0.14	0.14	0.14	0.15	0.18	0.19	0.22	0.23
Sun light bottle	LBP	0.06	0.07	0.07	0.09	0.10	0.11	0.11	0.12	0.14
	HBP	0.14	0.13	0.14	0.15	0.15	0.17	0.20	0.26	0.25
PVC film	LBP	0.06	0.10	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12	0.13	0.16
	HBP	0.14	0.14	0.14	0.15	0.17	0.19	0.21	0.22	0.29

¹Lipophilic brown pigment ; ²Hydrophilic brown pigment

다) 산가

광선의 종류에 따른 전통된장의 산가를 측정한 결과는 <표 3-1-25>와 같다. 산가는 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 햇빛에 저장한 된장이 다른 된장보다 높은 수치를 나타내었으며, 다음으로 백열등, 자외선, 형광등 순으로 나타났다.

Table 3-1-25. Changes of acid value in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 20°C for 35 days by some lights

Lights	Days						
	0	5	10	15	25	35	
Fluorescent light	12.72	15.35	18.37	20.76	24.56	33.16	
Incandescent light	12.72	13.08	18.97	18.76	25.96	36.15	
Ultraviolet light	12.72	12.16	17.04	19.36	26.35	35.59	
Sun light	PVC vessel	12.72	17.67	22.49	23.46	29.91	39.71
	Glass bottle	12.72	18.98	22.60	25.82	30.16	40.40
	PVC film	12.72	15.10	20.24	28.21	34.37	36.81

라) 아미노태질소

광선의 종류에 따른 전통된장의 아미노태 질소를 측정된 결과는 <표 3-1-26>과 같다. 아미노태질소는 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 햇빛에 저장한 된장이 다른 된장보다 높은 수치를 나타내었다.

마) 환원당

광선의 종류에 따른 전통된장의 환원당을 측정된 결과는 <표 3-1-27>과 같다. 환원당은 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 햇빛에 저장한 된장이 다른 된장보다 높은 값을 나타내었으며, 자외선, 백열등, 형광등 순으로 나타났다.

바) pH

광선의 종류에 따른 전통된장의 pH를 측정된 결과는 <표 3-1-28>과 같다. pH는 모두 감소하는 경향이 나타났는데, 햇빛에 저장한 된장이 다른 된장보다 낮은 값을 나타내었고, 햇빛에 저장한 용기별 된장의 pH는 비슷하였다.

Table 3-1-26. Changes of amino type nitrogen in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 20°C for 35 days by some lights (mg%)

Lights	Days					
	0	5	10	15	25	35
Fluorescent light	1,134	1,313	1,477	1,505	1,521	1,597
Incandescent light	1,134	1,354	1,540	1,578	1,586	1,666
Ultraviolet light	1,134	1,463	1,792	1,823	1,846	1,938
PVC vessel	1,134	1,601	2,058	2,097	2,020	2,226
Sun light Glass bottle	1,134	1,158	1,169	1,193	2,004	2,264
PVC film	1,134	1,165	1,176	1,205	1,811	2,272

Table 3-1-27. Changes of reducing sugar in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 20°C for 35 days by some lights (%)

Lights	Days					
	0	5	10	15	25	35
Fluorescent light	0.48	0.48	0.50	0.51	0.58	0.60
Incandescent light	0.48	0.49	0.52	0.54	0.54	0.66
Ultraviolet light	0.48	0.50	0.53	0.55	0.55	0.67
PVC vessel	0.48	0.52	0.58	0.62	0.73	0.74
Sun light Glass bottle	0.48	0.53	0.55	0.60	0.64	0.76
PVC film	0.48	0.52	0.56	0.57	0.59	0.83

Table 3-1-28. Changes of pH value in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 20°C for 35 days by some lights

Lights	Days					
	0	5	10	15	25	35
Fluorescent light	6.13	5.89	5.81	5.72	5.77	5.84
Incandescent light	6.13	5.96	5.88	5.79	5.80	5.81
Ultraviolet light	6.13	6.04	5.95	5.86	5.84	5.63
PVC vessel	6.13	5.93	5.85	5.76	5.79	5.60
Sun light Glass bottle	6.13	6.09	6.00	5.91	5.86	5.59
PVC film	6.13	5.98	5.90	5.81	5.81	5.61

3) 용기 종류에 따른 전통된장의 갈변억제 및 발효특성

가) 색도

용기종류별 산소차단 정도에 따른 전통된장의 색도는 발효과정중 색차계의 L, a, b값을 측정된 결과는 <표 3-1-29>, <표 3-1-30>과 같다. L값(명도)은 시간이 경과함에 따라 약간씩 감소하는 경향이었고, a값(적색도)은 오히려 발효시간이 경과함에 따라 조금씩 증가하였다. 된장의 색도의 차이를 보면, L값의 경우, 불투명하고, 밀폐가 되는 PVC필름에 저장된 된장이 가장 높은 값은 나타내었으며, 용기를 제외하고 모든 된장의 L값이 일반용기보다 높았다. 그리고, 실온(20℃) 된장보다 냉장(5℃) 된장이 값이 낮게 나타났다.

Table 3-1-29. Changes of Hunter color value in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 5℃ for 35 days by some vessel

Color	Days	Vessel	Glass (TP)	PVC vessel		PVC film			
				TP	NTP	TP		NTP	
						S	NS	S	NS
L	0	33.77	33.77	33.77	33.77	33.77	33.77	33.77	33.77
	10	37.12	35.11	35.68	35.64	37.07	36.38	37.21	37.15
	25	34.42	32.86	35.34	33.92	34.12	34.47	34.61	35.71
	35	33.54	33.69	33.89	33.88	33.96	32.90	35.11	33.44
a	0	4.85	4.85	4.85	4.65	4.85	4.85	4.85	4.85
	10	4.94	4.81	5.39	4.73	4.17	4.88	4.39	4.44
	25	4.40	4.34	4.45	4.76	4.16	3.85	4.33	4.36
	35	4.73	5.08	5.13	4.82	4.00	4.67	4.21	5.33
b	0	15.74	15.74	15.74	15.14	15.74	15.74	15.74	15.74
	10	14.52	13.23	14.64	15.27	11.69	13.86	13.04	12.72
	25	15.58	15.91	14.74	15.70	14.65	14.54	14.16	15.12
	35	16.49	16.62	17.18	15.66	14.16	14.54	15.18	16.88

TP, colorless and transparent ; NTP, opaque ; S, sealed ; NS, not sealed.

Table 3-1-30. Changes of Hunter color value in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 20°C for 35 days by some vessel

Color	Days	Vessel	Glass (TP)	PVC vessel		PVC film			
				TP	NTP	TP		NTP	
						S	NS	S	NS
L	0	33.77	33.77	33.77	33.77	33.77	33.77	33.77	33.77
	10	33.85	34.67	33.80	34.62	34.68	34.19	33.63	34.39
	25	29.71	31.24	32.66	33.11	31.51	33.68	32.51	30.08
	35	27.89	28.68	29.03	28.13	29.86	30.00	31.33	30.77
a	0	4.86	4.86	4.86	4.65	4.86	4.86	4.86	4.86
	10	5.54	5.06	5.02	5.40	5.29	4.55	5.46	5.34
	25	5.89	5.46	4.67	5.67	4.49	4.17	4.59	5.37
	35	5.52	6.07	5.96	6.19	5.55	5.50	6.51	6.36
b	0	15.74	15.74	15.74	15.14	15.74	15.74	15.74	15.74
	10	13.38	11.72	13.95	15.19	13.22	11.84	14.49	14.35
	25	16.24	12.79	11.82	15.50	10.51	10.93	11.53	13.62
	35	16.57	16.61	17.02	15.97	12.04	13.61	18.32	15.26

TP, colorless and transparent ; NTP, opaque ; S, sealed ; NS, not sealed.

나) 갈색도

용기종류별 산소차단 정도에 따른 전통된장의 갈색도를 측정한 결과는 <표 3-1-31>, <표 3-1-32>와 같다. 지용성 색소와 수용성 색소 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 지용성 색소 보다 수용성 색소 쪽에서 약간 높게 나타났다. 이는 Lee(24)의 수용성색소에서의 갈변물질이 수용성 색소의 갈변물질보다 저장 초기에 증가하고, 지용성색소는 낮은 값으로 완만하게 증가한다는 결과와 일치하였다. 그리고, 밀폐가 되는 PVC필름에 저장된 된장이 가장 낮은 값을 나타내었으며, 실온된장이 냉장된장보다 약간 높았다.

Table 3-1-31. Changes of brown pigment in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 5°C for 35 days by some vessel

(OD 420 nm/g)

Color	Days	Vessel	Glass (TP)	PVC vessel		PVC film			
				TP	NTP	TP		NTP	
						S	NS	S	NS
LBP ¹	0	-	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
	10	-	0.11	0.09	0.10	0.14	0.08	0.07	0.08
	25	-	0.12	0.27	0.08	0.20	0.12	0.21	0.13
	35	-	0.13	0.17	0.11	0.11	0.08	0.11	0.10
HBP ²	0	-	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
	10	-	0.16	0.13	0.15	0.11	0.09	0.10	0.11
	25	-	0.14	0.19	0.11	0.11	0.17	0.26	0.18
	35	-	0.09	0.17	0.12	0.06	0.11	0.05	0.10

¹Lipophilic brown pigment), ²Hydrophilic brown pigment)

Table 3-1-32. Changes of brown pigment in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 20°C for 35 days by some vessel

(OD 420 nm/g)

Color	Days	Vessel	Glass (TP)	PVC vessel		PVC film			
				TP	NTP	TP		NTP	
						S	NS	S	NS
LBP ¹	0	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
	10	0.32	0.12	0.68	0.10	0.15	0.10	0.10	0.10
	25	0.15	0.14	0.12	0.13	0.13	0.11	0.12	0.14
	35	0.09	0.10	0.25	0.21	0.11	0.15	0.12	0.13
HBP ²	0	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
	10	0.16	0.19	0.11	0.17	0.13	0.13	0.12	0.17
	25	0.13	0.21	0.18	0.13	0.35	0.36	0.14	0.19
	35	0.14	0.14	0.29	0.25	0.21	0.25	0.19	0.24

¹Lipophilic brown pigment), ²Hydrophilic brown pigment)

다) 산가

용기종류별 산소차단 정도에 따른 전통된장의 측정된 결과는 <표 3-1-33>과 같다. 산가는 시간이 경과함에 따라 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 투명하고 밀폐를 하지 않은 PVC 필름에 저장한 된장의 값이 가장 높았으며, 불투명하고 밀폐 PVC 필름에 저장한 된장이 가장 낮은 값을 나타내었으며, 저온(5℃) 된장이 실온(20℃) 된장 보다 낮은 값을 나타내었다.

Table 3-1-33. Changes of acid value in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 5℃ and 20℃ for 35 days by some vessel

Temp.	Days	Vessel	Glass (TP)	PVC vessel		PVC film			
				TP	NTP	TP		NTP	
						S	NS	S	NS
5℃	0	-	12.72	12.72	12.72	12.72	12.72	12.72	12.72
	10	-	18.35	30.46	30.71	12.35	14.25	16.44	20.91
	25	-	25.44	39.56	37.09	22.91	27.36	23.44	26.84
	35	-	33.72	43.00	40.45	30.42	34.10	29.42	35.41
20℃	0	12.72	12.72	12.72	12.72	12.72	12.72	12.72	12.72
	10	21.15	23.48	23.08	16.03	17.40	19.00	15.40	21.40
	25	25.42	28.20	29.86	26.05	34.66	33.35	25.87	33.16
	35	36.34	39.52	40.84	40.46	48.50	51.12	33.72	45.13

라) 아미노태질소

용기종류별 산소차단 정도에 따른 전통된장의 아미노태 질소를 측정된 결과는 <표 3-1-34>와 같다. 아미노태질소는 시간이 경과함에 따라 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 투명하고 밀폐를 하지 않은 PVC 필름에 저장한 된장의 값이 가장 높았으며, 불투명하고 밀폐 PVC 필름에 저장한 된장이 가장 낮은 값을 나타내었으며, 저온(5℃) 된장이 실온(20℃) 된장 보다 낮은 값을 나타내었다.

Table 3-1-34. Changes of amino type nitrogen in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 5°C and 20°C for 35 days by some vessel (mg%)

Temp.	Days	Vessel	Glass (TP)	PVC vessel		PVC film			
				TP	NTP	TP		NTP	
						S	NS	S	NS
5°C	0	-	1,134	1,134	1,134	1,134	1,138	1,137	1,135
	10	-	1,423	1,541	1,119	1,230	1,537	1,584	1,652
	25	-	1,464	1,590	1,211	1,269	1,583	1,633	1,703
	35	-	1,542	1,678	1,271	1,326	1,664	1,714	1,794
20°C	0	1,134	1,134	1,134	1,134	1,134	1,134	1,134	1,134
	10	1,232	1,715	2,127	1,218	1,773	2,046	1,640	1,838
	25	1,270	1,774	2,373	1,298	1,821	2,115	1,696	1,899
	35	1,338	1,857	2,464	1,328	1,928	2,213	1,777	1,986

마) 환원당

용기종류별 산소차단 정도에 따른 전통된장의 환원당을 측정된 결과는 <표 3-1-35>와 같다. 환원당은 시간이 경과함에 따라 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 투명하고 밀폐를 하지 않은 PVC 필름에 저장한 된장의 값이 가장 높았고, 불투명하고 밀폐된 PVC 필름에 저장한 된장이 가장 낮은 값을 나타내었으며, 저온(5°C) 된장이 실온(20°C) 된장 보다 낮은 값을 나타내었다.

바) pH

용기종류별 산소차단 정도에 따른 전통된장의 pH를 측정된 결과는 <표 3-1-36>과 같다. pH는 시간이 경과함에 따라 모두 감소하는 경향이 나타났는데, 투명하고 밀폐를 하지 않은 PVC 필름에 저장한 된장의 값이 가장 낮았고, 불투명하고 밀폐된 PVC 필름에 저장한 된장이 가장 높은 값을 나타내었으며, 저온(5°C) 된장이 실온(20°C) 된장 보다 높은 값을 나타내었다.

Table 3-1-35. Changes of reducing sugar in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 5°C and 20°C for 35 days by some vessel (%)

Temp.	Days	Vessel	Glass (TP)	PVC vessel		PVC film			
				TP	NTP	TP		NTP	
						S	NS	S	NS
5°C	0	-	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
	10	-	0.43	0.50	0.48	0.46	0.50	0.43	0.49
	25	-	0.45	0.51	0.49	0.47	0.52	0.45	0.49
	35	-	0.48	0.52	0.51	0.49	0.56	0.48	0.52
20°C	0	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
	10	0.51	0.46	0.50	0.49	0.48	0.55	0.37	0.51
	25	0.52	0.48	0.52	0.51	0.49	0.66	0.39	0.58
	35	0.53	0.51	0.55	0.54	0.50	0.72	0.41	0.65

Table 3-1-36. Changes of pH value in traditional *doenjang* prepared with capsule *meju* and stored at 5°C and 20°C for 35 days by some vessel

Temp.	Days	Vessel	Glass (TP)	PVC vessel		PVC film			
				TP	NTP	TP		NTP	
						S	NS	S	NS
5°C	0	-	6.13	6.13	6.13	6.13	6.13	6.13	6.13
	10	-	5.95	5.90	6.09	5.96	5.82	6.07	6.06
	25	-	5.78	5.73	5.91	5.89	5.81	5.87	5.85
	35	-	5.74	5.70	5.89	5.81	5.79	5.83	5.81
20°C	0	6.13	6.13	6.13	6.13	6.13	6.13	6.13	6.13
	10	5.99	5.90	6.14	6.02	5.99	5.88	6.05	6.02
	25	5.82	5.73	5.75	5.89	5.82	5.70	5.86	5.84
	35	5.81	5.73	5.66	5.74	5.69	5.61	5.81	5.65

4) 유기산 첨가에 따른 전통된장의 갈변억제 및 발효특성

가) 색도

유기산 첨가에 따른 전통된장의 색도는 발효과정중 색차계의 L, a, b값을 측정한 결과는 <표 3-1-37>과 같다. L값(명도)은 발효시간이 경과함에 따라 약간씩 감소하는 경향이었고, a값(적색도)은 발효시간이 경과함에 따라 조금씩 증가하였으며, b값(황색도)은 유의적으로 변화가 없었다. 된장의 색도의 차이를 보면, L값의 경우, 갈변억제제를 첨가한 양이 많은 된장일수록 L 값이 높았고, 첨가 순으로는 oxalic acid, sodium pyrophosphate, ascorbic acid 첨가 된장 순이었으며, 실온된장이 냉장된장보다 높았다.

나) 갈색도

유기산 첨가에 따른 전통된장의 갈색도를 측정한 결과는 <표 3-1-38>과 같다. 지용성 색소와 수용성 색소 모두 증가하는 경향이 나타났는데, 지용성 색소 보다 수용성 색소 쪽에서 약간 높게 나타났고, ascorbic acid의 첨가 된장이 sodium pyrophosphate나 oxalic acid 첨가 된장보다 값이 높게 나타났다.

다) 산가

유기산 첨가에 따른 전통된장의 산가를 측정한 결과는 <표 3-1-39>와 같은데, 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향이었고, 첨가 종류에 따라서는 oxalic acid를 첨가한 된장이 가장 낮게 나타났으며, sodium pyrophosphate, ascorbic acid 첨가 된장 순서였다. 또한 ascorbic acid는 첨가량이 증가할수록 값이 증가하는 반면, sodium pyrophosphate나 oxalic acid 첨가 된장은 감소하였다.

Table 3-1-37. Changes of Hunter color value in traditional *doenjang* added with sodium pyrophosphate, ascorbic acid and oxalic acid at 20°C for 35 days

Color	Days	Control	Sodium pyrophosphate			Ascorbic acid		Oxalic acid		
			0.1%	0.5%	1.0%	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	1.0%
L	0	33.77	30.89	32.57	35.76	31.95	32.02	34.75	38.19	38.78
	10	34.62	29.89	30.18	30.77	27.92	27.34	32.72	39.26	36.39
	25	33.11	27.69	29.39	28.01	19.91	20.65	31.03	38.37	36.92
	35	28.13	27.25	28.29	29.25	20.12	18.11	31.27	34.86	32.89
a	0	4.65	6.12	5.56	4.36	6.21	5.85	5.71	4.18	3.97
	10	5.40	6.13	6.51	5.95	5.48	6.12	5.86	3.77	4.14
	25	5.67	6.92	7.86	7.64	6.63	7.95	6.08	3.32	3.18
	35	6.19	6.83	6.89	7.71	5.68	8.13	5.68	4.20	4.33
b	0	15.14	15.91	15.99	13.87	17.38	15.65	15.74	20.65	20.42
	10	15.19	14.34	17.26	15.16	11.93	9.83	17.76	16.80	17.88
	25	15.50	16.44	18.42	15.55	12.09	11.34	18.33	15.09	11.99
	35	15.97	15.53	13.43	16.21	7.01	11.62	17.86	18.11	16.63

라) 아미노태질소

유기산 첨가에 따른 전통된장의 아미노태질소를 측정 한 결과는 <표 3-1-40>과 같다. 시간이 증가할수록 증가하는 경향이었고, 유기산을 첨가하는 양이 증가할수록 낮게 나타났으며, oxalic acid을 1.0% 첨가한 된장이 가장 낮은 값을 나타내었다.

마) 환원당

유기산 첨가에 따른 전통된장의 환원당을 측정 한 결과는 <표 3-1-41>과 같다. 시간이 증가할수록 증가하는 경향이었고, ascorbic acid 1.0%와 oxalic acid의 첨가 양을 증가할수록 대조구에 비하여 더 높은 값을 나타내었으며, 나머지 된장은 대조구보다 낮았다.

Table 3-1-38. Changes of brown pigment in traditional *doenjang* added with sodium pyrophosphate, ascorbic acid and oxalic acid at 20°C for 35 days (OD 420 nm/g)

Pigment	Days	Control	Sodium pyrophosphate			Ascorbic acid		Oxalic acid		
			0.1%	0.5%	1.0%	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	1.0%
LBP ¹	0	0.06	0.09	0.10	0.11	0.18	0.15	0.12	0.19	0.11
	10	0.10	0.14	0.19	0.11	0.20	0.26	0.14	0.12	0.07
	25	0.12	0.17	0.11	0.18	0.39	1.99	0.12	0.16	0.19
	35	0.16	0.25	0.20	0.21	0.17	1.96	0.15	0.16	0.18
HBP ²	0	0.14	0.18	0.12	0.12	0.21	0.25	0.19	0.17	0.12
	10	0.17	0.27	0.21	0.23	0.39	0.54	0.22	0.19	0.17
	25	0.20	0.25	0.23	0.23	0.53	1.46	0.19	0.16	0.15
	35	0.25	0.20	0.21	0.21	0.98	1.62	0.18	0.19	0.22

¹Lipophilic brown pigment, ²Hydrophilic brown pigment

Table 3-1-39. Changes of acid value in traditional *doenjang* added with sodium pyrophosphate, ascorbic acid and oxalic acid at 20°C for 35 days

Days	Control	Sodium pyrophosphate			Ascorbic acid		Oxalic acid		
		0.1%	0.5%	1.0%	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	1.0%
0	12.72	12.16	12.01	12.05	12.10	12.43	12.05	12.15	11.84
10	30.71	22.16	20.42	18.91	25.23	35.86	17.58	25.96	25.41
25	37.09	32.61	36.63	32.61	31.58	38.52	30.74	39.46	29.38
35	40.46	39.08	39.10	37.08	42.63	46.94	36.27	34.35	31.23

Table 3-1-40. Changes of amino type nitrogen in traditional *doenjang* added with sodium pyrophosphate, ascorbic acid and oxalic acid at 20°C for 35 days (mg%)

Days	Control	Sodium pyrophosphate			Ascorbic acid		Oxalic acid		
		0.1%	0.5%	1.0%	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	1.0%
0	1,134	845	741	553	986	1,011	641	553	435
10	1,119	896	760	569	1,026	2,006	665	569	450
25	1,211	912	785	572	1,523	2,181	695	572	464
35	1,271	988	800	569	1,826	2,190	623	569	437

Table 3-1-41. Changes of reducing sugar in traditional *doenjang* added with sodium pyrophosphate, ascorbic acid and oxalic acid at 20°C for 35 days (%)

Days	Control	Sodium pyrophosphate			Ascorbic acid		Oxalic acid		
		0.1%	0.5%	1.0%	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	1.0%
0	0.48	0.39	0.33	0.32	0.48	0.57	0.98	0.96	0.91
10	0.49	0.41	0.34	0.32	0.46	1.59	0.79	1.37	1.04
25	0.51	0.43	0.36	0.34	0.48	1.67	0.83	1.44	1.09
35	0.54	0.45	0.38	0.36	0.51	1.77	0.88	1.52	1.16

바) pH

유기산 첨가에 따른 전통된장의 pH를 측정한 결과는 <표 3-1-42>와 같다. 시간이 증가할수록 감소하는 경향이었고, oxalic acid을 첨가한 된장은 첨가량이 증가함에 따라 pH가 낮아지는 것에 비하여 sodium pyrophosphate, ascorbic acid은 첨가량이 증가할수록 pH가 증가하였다.

Table 3-1-42. Changes of pH value in traditional *doenjang* added with sodium pyrophosphate, ascorbic acid and oxalic acid at 20°C for 35 days

Days	Control	Sodium pyrophosphate			Ascorbic acid		Oxalic acid		
		0.1%	0.5%	1.0%	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	1.0%
0	6.13	5.69	5.74	5.81	5.92	5.82	5.64	4.74	3.70
10	6.02	5.20	5.21	5.46	5.81	5.65	5.37	3.02	2.28
25	5.89	5.42	5.43	5.68	5.99	5.55	5.33	2.93	2.23
35	5.74	5.73	5.72	5.99	5.71	5.74	4.75	3.14	2.39

3. 전통된장의 냄새억압 기술

가. 실험재료 및 방법

1) 실험재료

전통메주는 제 3장 제 1절 <캡슐메주를 이용한 저염화된장의 제조법>에 준하였으며, 냄새 저감화를 사용한 16가지 식물성 재료중에 예비실험을 통하여 비교적 효과가 있는 매실, 마늘, 양파를 사용하였다. 신선한 이들 재료를 가식부만 믹서기에 미세하게 갈아서 넣거나 혹은 추출 농축액을 각 농도별(2~6%, w/w)로 생된장에 잘 혼합하여 용기에 담아서 실외에서 6개월(4월~10월)동안 후숙성시켰다.

2) 캡슐메주 제조를 위한 발효실 조건

건조시키지 않은 캡슐메주를 제조하여 대형 황토발효실(10평)에 각 캡슐 종균의 최적 온도와 습도에서 발효를 행하였으며, 균일 발효를 위하여 발효실내의 공기회전을 유도하였으며, 발효실 상단에는 배출구(20 × 20 cm, 강제송풍, 800 rpm / min)를 설치하였다.

3) 관능검사

된장의 관능평가는 훈련된 전문패널원 5명을 통하여 발효된 각각의 된장 시료를 대상으로 실시하였으며, 평가방법은 5점 기호도 채점법(1 매우 싫다, 2 약간 싫다, 3 보통이다, 4 약간 좋다, 5 매우 좋다)을 이용하여 맛, 향, 색 및 종합적인 기호도로 평가하였다.

나. 실험결과

1) 발효기간에 따른 냄새 저감화

캡슐메주 외층부 제조용의 백국균, 황국균 및 팽이버섯을 이용하여 캡슐메주를 발효시켜 진통된장에 대한 이상취 검사를 실시한 결과는 <그림 3-1-43>과 같다. 대조구는 자연 유래의 오염곰팡이 등으로 인하여 기호성이 낮았고, 백국균(RO)나 팽이버섯 균사체(FV)를 이용한 된장이 비교적 기호성이 양호하였으나 균사체의 성장속도가 늦기 때문에 2차 오염의 가능성이 높다. 반면에 황국균은 기호성은 약간 낮지만 빠른 증식성과 강한 가수분해효소 생성력으로 현장적용에서 용이하다.

Table 3-1-43. Sensory evaluation of of *Doenjang* from capsule *meju* prepared with fermenting strains during fermentation period

Fermentation (days)	Sensory evaluation (5 point)			
	Control	AO	RO	FV
3	2.6±0.4	-	-	-
4	3.7±0.2	3.2±0.4	-	-
6	4.1±0.3	4.4±0.2	3.4±0.2	2.7±0.2
10		4.3±0.3	4.1±0.3	3.7±0.4
15			4.5±0.2	4.7±0.2
30				4.5±0.3

AO, *Aspergillus oryzae* ; RO, *Rhizopus oligosporus* ; FV, *Flammulina velutipes*

2) 메주크기에 따른 냄새 저감화

백국균, 황국균 및 팽이버섯을 이용하여 캡슐메주 외층부를 코팅하여 메주 크기별로 발효시켜 진통된장에 대한 이상취 검사를 실시한 결과는 <그림 3-1-44>와 같다. 대조구는 기호성이 낮았지만 메주 크기에 큰 영향이 없었다. 그러나 백국균(RO)나 황국균(AO) 및 팽이버섯 균사체(FV)를 이용한 캡슐메주의 된장은 메주 크기에 증가함에 따라 기호성이 떨어지는 경향을 나타내었다. 버섯 균사체와 백국균이 기호성에서 황국균보다 유리하게 평가되었으며, 이는 황국의 강한 향과 균사체의 성장속도가 빠른 이유로 발효중 메주내의 암모니아 가스 배

출이 지연되어 상대적으로 기호성이 낮은 것으로 추측된다.

Table 3-1-44. Sensory evaluation of of *Doenjang* from capsule *meju* prepared with fermenting strains according to *meju* size

<i>Meju</i> size (mL)	Sensory evaluation (5 point)			
	Control	AO	RO	FV
1800	3.6±0.6	4.1±0.4	4.4±0.3	4.6±0.6
2200	3.4±0.5	3.8±0.5	4.1±0.4	4.5±0.4
2600	3.7±0.8	3.2±0.3	3.6±0.3	3.6±0.5

RO, *Rhizopus oligosporus* ; AP, *Aspergillus oryzae* ; FV, *Flammulina velutipes*

다. 통풍조절에 의한 냄새 저감화

메주 대형 황토방 발효실의 강제 통풍의 횟수에 따른 백국균, 황국균 및 팽이버섯을 이용하여 제조된 캡슐메주의 전통된장에 대한 이상취를 조사한 결과는 <그림 3-1-45>와 같다. 캡슐메주의 경우, 대체로 통풍횟수를 증가시키면 이상취 냄새가 크게 개선되는 경향을 나타내었다. 하루에 평균 4회이상은 통기를 하는 것이 메주 품질을 개선시키는 필요할 것으로 판단된다.

Table 3-1-45. Sensory evaluation of of *Doenjang* from capsule *meju* prepared with fermenting strains according to ventilation

Ventilation (times)	Sensory evaluation (5 point)			
	Control	AO	RO	FV
2	3.3±0.4	3.1±0.5	3.5±0.4	3.6±0.5
4	3.6±0.6	4.1±0.3	4.3±0.3	4.2±0.2
8	3.8±0.3	4.3±0.4	4.6±0.2	4.6±0.4

RO, *Rhizopus oligosporus* ; AP, *Aspergillus oryzae* ; FV, *Flammulina velutipes*
Ventilation period = 10 min / each time ; *meju* size 2,200 mL

라. 식물성 재료의 농축물 첨가에 의한 냄새억압

전통된장의 퀴퀴한 냄새를 억압하기 위하여 전통된장과 맛의 조화가 이루어 질 수 있는 16가지의 과채류를 농도별로 첨가하여 후숙성을 시킨 결과는 <표 3-1-46>과 같다. 그 중에 비교적 효과가 있는 매실, 마늘, 양파를 농도별로 첨가한 결과 전통된장의 맛을 유지하면서 이상취를 억압하는데 가장 효과적인 것은 매실 농축액을 4% 이하로 첨가하여 후숙성을 하는 것이 효과적이었다. 다음으로는 마늘이 약간 효과적이었으며, 양파는 크게 개선되지는 못하였다.

Table 3-1-46. Sensory evaluation of *Doenjang* prepared with fermenting strains and food stuffs

Food stuff (w/w, %)	Sensory score (5 point)				
	Control	AO	RO	FV	
None	3.4±0.3	3.5±0.2	3.9±0.3	4.3±0.4	
2	3.5±0.2	4.1±0.3	4.0±0.4	4.5±0.2	
Maesil	4	3.9±0.4	4.3±0.5	4.4±0.3	4.7±0.4
6	3.3±0.3	3.9±0.3	4.1±0.5	4.4±0.2	
2	3.4±0.6	3.6±0.2	4.0±0.7	4.4±0.4	
Garlic	4	3.6±0.5	4.2±0.4	4.3±0.2	4.5±0.3
6	3.3±0.3	4.0±0.5	4.1±0.3	4.0±0.5	
2	3.5±0.3	3.9±0.4	3.6±0.3	4.3±0.3	
Onion	4	3.5±0.4	4.1±0.3	3.8±0.2	4.4±0.4
6	3.3±0.2	4.0±0.2	4.0±0.3	3.9±0.3	

RO, *Rhizopus oligosporus* ; AP, *Aspergillus oryzae* ; FV, *Flammulina velutipes*

제 2 절 기능성 캡슐메주 개발을 위한 균주선정 및 혼합고정화 기술개발

1. 메주 외층부 발효를 위한 곰팡이 선정

가. 실험재료 및 방법

1) 공시균주

메주 외층부 발효를 위한 곰팡이 선정을 위한 균주로는 *Asp. oryzae* ATCC 14156와 *Rhizopus japonicus* KOFRI 1129, *Rhizopus oligosporus* KCCM 35109를 사용하였으며, 버섯은 느타리(*Pleurotus ostreatus* KCTC 6730), 영지(*Ganoderma lucidum* KOFRI 1023), 상황(*Phellinus linteus* KCTC 6719), 팽이버섯(*Flammulina velutipes* KCTC 6367)을 한국종균협회, 생명공학연구원 및 한국전통발효식품연구소로부터 분양받아 사용하였고, 향균미생물 및 올리고당 대량생산 미생물은 직접 순수분리하여 사용하였다. 향균활성 검토를 위한 병원성 세균은 세부과제에서 사용한 병원성 미생물을 선택하여 사용하였다.

2) 사용배지

곰팡이 및 버섯의 보존은 potato dextrose agar (PDA ; Difco)배지, 배양을 위한 대두배지는 국산대두(태광, 2000년 수확)를 구입하여 사용하였다. 암세포는 10% FBS를 함유한 α -DMEM을 사용하였고, 혈전용해활성은 fibrin배지를, 향균미생물의 분리를 위해서는 2% skim milk가 함유된 LB평판배지(SM배지)와 2% soluble starch가 함유된 LB평판배지(CM배지)를 사용하였으며 올리고당 대량생산 미생물의 분리를 위해서는 1% colloidal chitin을 함유한 LB배지를 사용하였다. 분리미생물의 생화학적 특성 등은 starch 1%, yeast extract 1%, peptone 0.5%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05%의 성분으로 구성된 최적배지(SY배지)를 조사하여 사용하였고, chitinase활성측정은 1% colloidal chitin, 0.1% yeast extract, 0.05% sodium citrate, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 으로 구성된 배지를 사용하였다.

3) 효소활성 측정

각 미생물을 배양하면서 일정시간마다 채취한 시료를 8,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였으며, protease활성, glucoamylase활성 및 α -amylase활성 측정방법은 세부과제의 기술방법에 따랐고 chitinase활성은 1% colloidal chitin을 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 용해한 기질용액에 조효소액 1ml

를 가하여 37℃에서 1hr동안 천천히 진탕하면서 효소반응을 시킨 다음, 100℃에서 5분 동안 끓여 반응을 정지시키고 잔존하는 colloidal chitin을 원심분리하여(12,000×g, 10분) 얻은 효소반응 용액 중의 환원당을 DNS법에 따라 측정하였다. 효소 1unit는 1시간동안 1μM의 N-acetyl-D-glucosamine을 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

나. 실험결과

1) 황국균 및 백색균 배양액 중의 효소활성

대두 발효식품에서는 단백질분해효소 및 전분분해효소가 중요한 작용을 하기 때문에 여러 국균을 액체배양하면서 각 배양시간마다 시료를 채취하여 효소활성을 측정한 결과를 <그림 3-2-3~그림 3-2-5>에 나타내었다. <그림 3-2-3>은 protease의 활성을 측정한 결과인데 *A. oryzae*와 *R. japonicus*는 배양 72시간째까지 효소의 활성이 점진적으로 증가하여 배양 96시간째에 각각 59.3 units/mL와 38.7 units/mL의 효소활성을 나타내었고, *R. oligosporus*는 배양 종료시점까지 효소활성이 아주 완만하게 증가하여 배양 120시간째에 약 20 units/mL의 효소활성을 나타내었다.

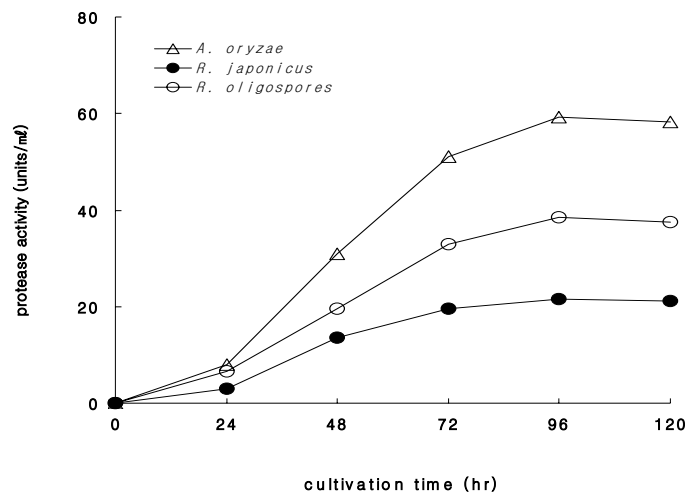


Fig. 3-2-3. Changes in protease activity of culture broth from *A. oryzae* (Δ), *R. japonicus* (\circ) and *R. oligosporus* (\bullet).

<그림 3-2-4>는 glucoamylase의 효소활성을 검토하여 나타낸 것으로 *R. japonicus*, *R. oligosporus* 및 *A. oryzae*의 순으로 효소활성이 높게 나타나 배양 96시간째에 각각 41 units/mL, 35 units/mL, 16 units/mL를 나타내었다. α -amylase는 *A. oryzae*, *R. oligosporus*

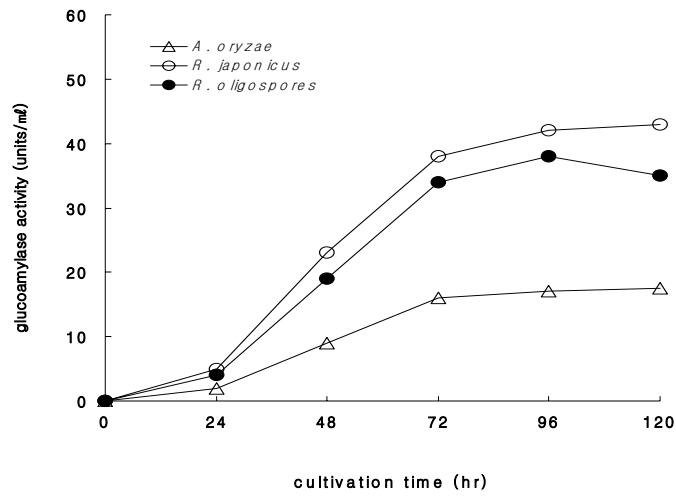


Fig. 3-2-4. Changes in glucoamylase activity of culture broth from *A. oryzae*(Δ), *R. japonicus*(○) and *R. oligosporus*(●).

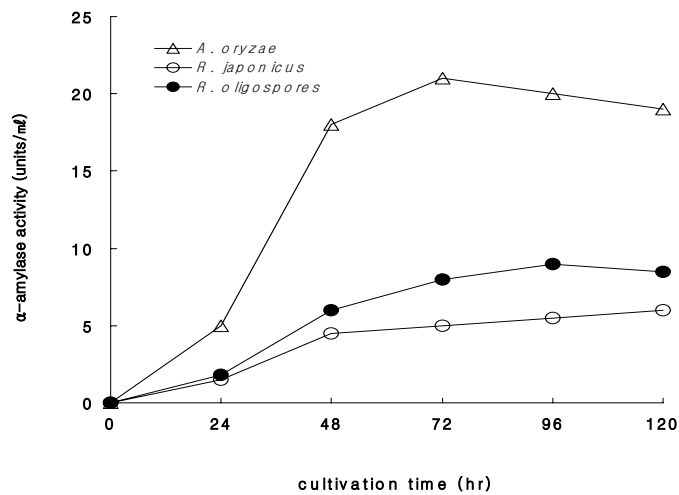


Fig. 3-2-5. Changes in α-amylase activity of culture broth from *A. oryzae* (Δ), *R. japonicus*(○) and *R. oligosporus*(●).

및 *R. japonicus*가 배양 72시간째에 각각 21 units/mL, 7.5 units/mL, 5 units/mL를 나타내어 *A. oryzae*의 효소활성이 다른 *Rhizopus* sp. 곰팡이의 효소활성보다 3~4배 높게 나타났다<그림 3-2-5>. 특히 *A. oryzae*의 α-amylase 생성 패턴은 배양 48시간

이전에 80%이상이 생산됨을 관찰할 수 있었다.

2) 대두 배지가 곰팡이의 성장에 미치는 영향

각 가정에서 전통 장류를 제조할 때 메주는 자연 발효를 행하고 있으나 산업적으로 대량 장류를 생산하는 곳에서는 메주를 건조 후 30~35℃의 일정온도에서 발효를 실시하고 있다. 그렇기 때문에 온도 변화에 따른 국균의 생육상태를 관찰하기 위하여 증자한 대두를 분쇄한 다음 각 곰팡이의 포자를 접종하고 각 환경조건에서 증식 상태를 관찰하였다. <그림 3-2-6>는 각 곰팡이의 포자를 접종한 직후에 야외(12월중)에서 발효시킨(정온발효) 결과이고, <그림 3-2-7>는 각 곰팡이의 포자를 접종하고 잘 혼합하여 성형한 다음 20℃의 incubator에서 48시간 발효시킨 후 야외에서 후발효를 실시(변온발효)한 결과이다. 두 결과에서 보는바와 같이 처음부터 야외에서 발효를 행하는 경우는 종균을 접종하여 30일간 발효를 행하여도 3종류의 곰팡이 모두 균사의 증식이 아주 미약함을 알 수 있었다<그림 3-2-6>.

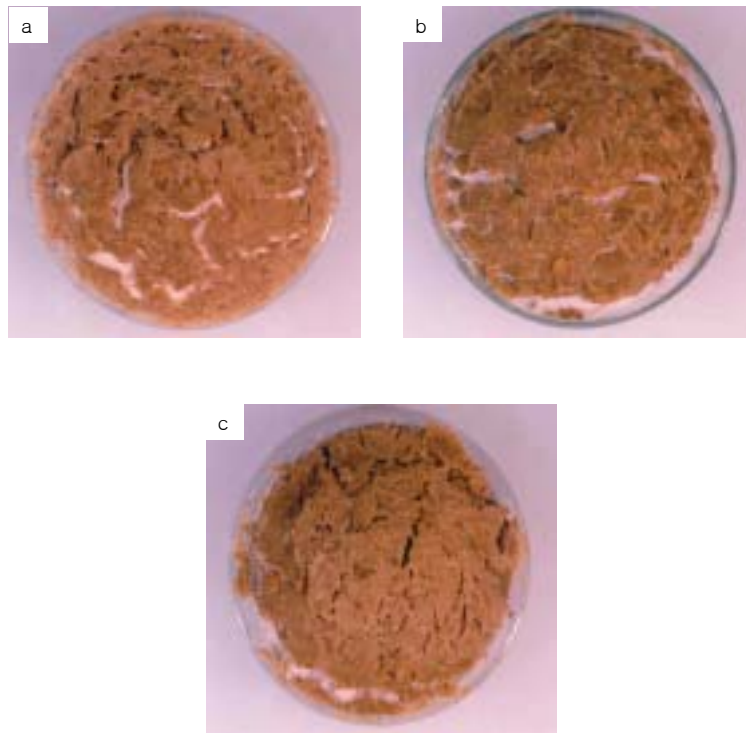


Fig. 3-2-6. Growth of molds at room temperature (outdoor ; mean 10±4℃) for 20 days on cooked soybean for production of capsule meju.

a, *A. oryzae* ; b, *R. japonicus* ; c, *R. oligosporus*.

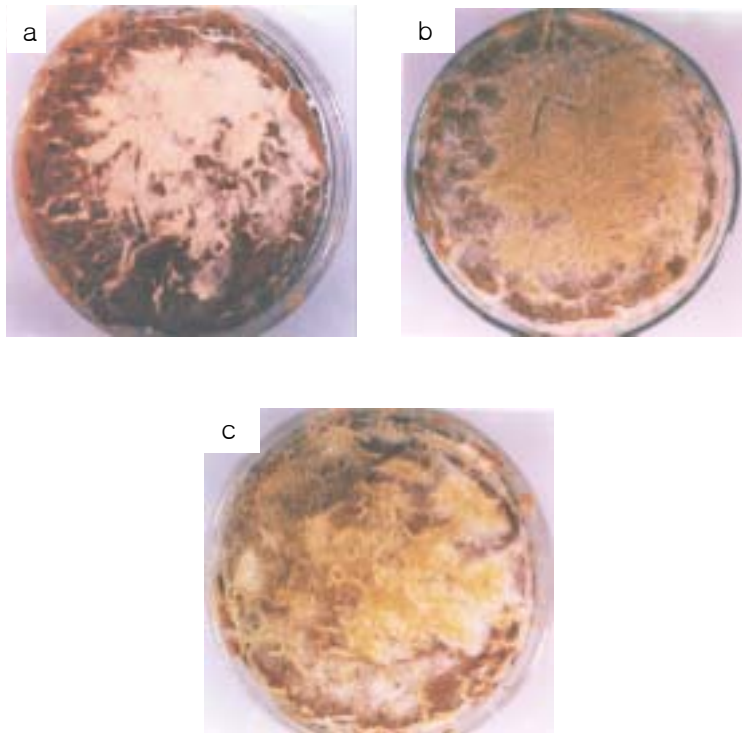


Fig. 3-2-7. Growth of molds at 30℃(indoor) for 5 days on cooked soybean for production of capsule meju.

a, *A. oryzae* ; b, *R. japonicus* ; c, *R. oligosporus*.

<그림 3-2-7>에서 보는 바와 같이 곰팡이의 포자를 접종하고 일정시간 30℃에서 발효시킨 다음 후발효를 실시하는 것이 메주의 표면에 곰팡이의 증식을 촉진하는 것으로 나타났다.

2. 메주 외층부 발효를 위한 버섯 균사체의 선정

가. 실험재료 및 방법

1) 공시균주와 사용배지는 제 3장 제 2절의 <1. 메주 외층부 발효를 위한 곰팡이 선정>에 준한다.

2) 버섯 액체배양에서 기질농도

250ml의 삼각플라스크에 증류수 100ml와 분쇄한 분말을 3%, 5%, 7% 및 9%(V/W)의 농도가 되도록 첨가하여 멸균한 다음, 버섯균사의 액체배양법과 동일하게 배양한 후 성장한 버섯균사의 건조 균사체의 무게를 측정하여 나타내었다.

3) 버섯액체 배양에서 pH영향

대두분말 5%를 증류수에 현탁시켜 배지를 제조했을 때의 pH를 대조구로 하였으며, 다른 시험구는 대조구 배지의 pH를 중심으로 0.1N HCl과 0.1N NaOH를 사용하여 여러 pH 범위로 조정하여 배양한 다음 버섯의 액체배양 시의 기질농도 측정법과 동일하게 검토하였다.

4) 혈진용해능 검토

시료를 항균활성 검토 방법에 준하여 전 처리한 다음 세부과제의 기술방법에 따라 검토하였고, 대조구는 곡물배지 자체를 동일조건으로 처리하여 사용하였다.

5) 암세포 증식억제 효과 측정

Monolayer로 자란 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받은 인체 폐암 세포주(A549)를 0.25% Trypsin-EDTA용액으로 처리하여 단일 세포로 만든 후 최종세포농도가 5×10^4 cells/ml 되도록 희석하여 48well plate에 각 well 당 $450 \mu\text{l}$ 씩 seeding한 다음, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 전 배양하였다. 여기에 버섯균사체를 $50 \mu\text{l}$ 씩 농도별로 첨가하고 48시간 배양한 후 세포증식 정도를 SRB방법에 의하여 측정하였다.

나. 실험결과

1) 증자대두 고체배지의 최적 수분함량

증자한 대두를 배지로 사용하여 버섯 균사체를 고체배양 할 때 첨가하는 최적 수분함량을 검토하여 <표 3-2-1>에 나타내었다. 느타리버섯 균사체 생육은 배지의 수분함량이 25%~30% 전후에서 왕성하지만, 수분함량이 35%, 40% 및 45%로 높아질수록 균사체의 생육속도는 현저하게 떨어졌다.

Table 3-2-1. Effect of moisture content of soaked soybean on growth of *Flammulina velutipes*

Moisture content	25%	30%	35%	40%	45%
Mycelial growth (mm)	78	80	62	50	38

2) 증자대두 고체배지의 증자시간

대두배지에 수분을 25%(V/W) 함유시키고 증자시간을 121℃에서 30분, 60분, 90분, 120분으로 달리 하였을 때 증자시간이 버섯 균사 성장에 미치는 영향을 검토하여 <표 3-2-2>에 나타내었다. 30분, 60분, 90분, 120분 증자하였을 때 각각 73 mm, 82 mm, 81 mm 및 75 mm의 균사가 증식하여 본 실험의 조건에서는 대두배지의 증자시간을 60분~90분 행하는 것이 적당하였다. 이상의 결과로 버섯균사체 성장을 위한 고체 배양에서는 곡물에 25%~30%의 수분을 함유시키고, 증자시간은 60분 행하였다.

Table 3-2-2. Effect of cooking time of soaked soybean on growth of *Flammulina velutipes*

Cooking time	30 min	60 min	90 min	120 min
Mycerial growth (mm)	73	82	81	75

3) 증자대두를 이용한 버섯의 고체배양

대두 및 검정콩을 배지로 사용하여 느타리, 영지, 팽이 및 상황버섯을 배양하였을 때의 생육정도를 관찰하여 <표 3-2-3> 및 <그림 3-2-8>에 나타내었다. 배지로 사용한 대두 및 검정콩배지에서 본 실험에 사용한 모든 버섯의 생육은 가능하였지만, 버섯의 성장속도는 사용한 배지의 종류보다 버섯 균종에 따라 큰 차이를 나타내었다. 즉, 대두 및 검정콩배지 사이에는 버섯생육정도의 차이가 나타나지 않았지만, 같은 배지에서 느타리 및 팽이버섯의 생육이 영지 및 상황버섯의 생육보다 빠르게 나타났다.

Table 3-2-3. Mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*(PO), *Ganoderma lucidum*(GL), *Phellinus linteus*(PL) and *Flammulina velutipes*(FV) on cooked soybean and black soybean

Media	PO	GL	FV	PL
Soybean	¹⁾ +++	++	+++	++
Black soybean	+++	++	+++	++

¹⁾Mycelial growth rate = +, Slow ; ++, Moderate ; +++, Fast

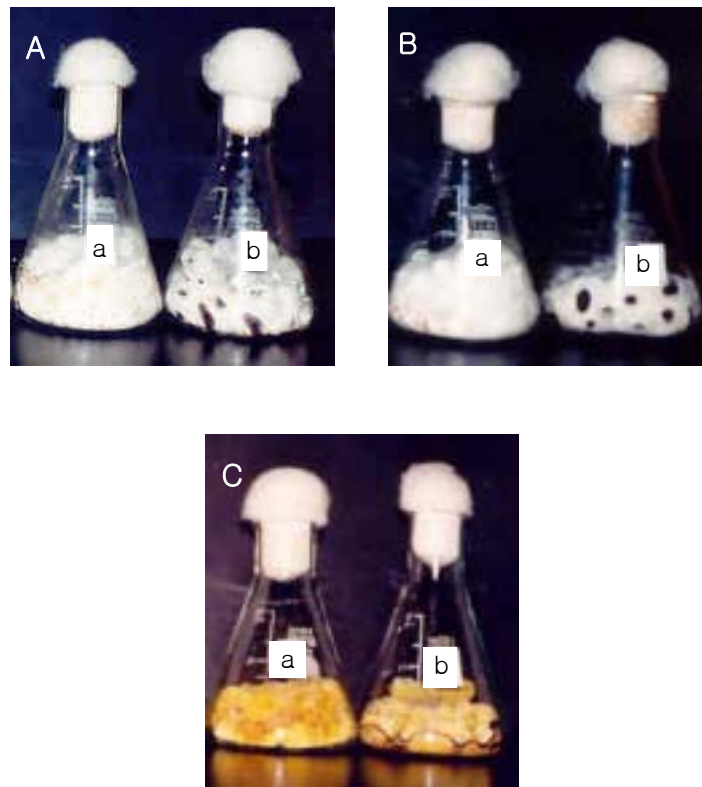


Fig. 3-2-8. Mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Phellinus linteus* and *Flammulina velutipes* on cooked soybean and black soybean.

A, *Pleurotus ostreatus* ; B, *Flammulina velutipes* ; C, *Phellinus linteus* ; a, soybean ; b, black soybean.

<그림 3-2-8-A> 및 <그림 3-2-8-B>는 7일 동안 배양한 느타리버섯 및 팽이버섯의 결과이고, <그림 3-2-8-C>는 20일 동안 배양한 상황버섯의 결과이다. 상황 및 영지버섯은 2주일 이상을 배양하여도 균사체의 성장이 아주 미약하였으나 팽이 및 느타리버섯의 경우는 1주일 정도 배양하면 배지로 사용한 콩 알갱이가 거의 버섯균사로 피복 되는 것을 관찰하였다.

4) 버섯 액체배지의 최적 기질농도

버섯을 액체배양 할 때 첨가하는 대두 및 검정콩의 최적 기질농도를 검토하기 위하여 500 mL의 삼각플라스크에 100 mL의 증류수를 넣고 각 곡물을 3%, 5%, 7% 및 9% 농도로 첨가하고 팽이버섯을 배양한 결과를 <표 3-2-4>에 나타내었다.

사용한 모든 배지에서 버섯 균사체는 pellet를 형성하면서 잘 성장하였으나, 5~9% 기질 농도에서는 거의 비슷한 건조균체 무게를 나타내었다. 그 중에서 7%의 기질농도에서 건조균체 무게가 약간 높게 나타났다. 그러나 7% 이상의 기질 농도에서는 121°C에서 멸균할 때 전분질이 호화 되면서 점성이 높아져 배지가 튀어 오르는 현상이 일어나 삼각플라스크의 면전에 배지성분이 묻어 배양 도중에 오염될 우려가 있었으며, 9% 기질농도에서는 배지의 높은 점성으로 인하여 진탕이 곤란하였다. 그렇기 때문에 이후의 실험에서는 5%의 곡물농도를 최적기질 농도로 결정하였다. 결과는 나타내지 않았지만 조, 보리 및 밀 등의 곡물배지를 사용한 버섯의 액체배양에서도 동일한 현상이 발견되었다.

Table 3-2-4. Effect of grain concentration on growth of liquid-cultured *Flammulina velutipes*

Media	Concentration (%)	Dry cell weight (g/L)
Soybean	3	1.27
	5	3.13
	7	3.51
	9	3.38
Black soybean	3	1.31
	5	3.02
	7	3.64
	9	3.25

5) 버섯 액체배지의 초기 pH영향

배지의 초기 pH가 팽이버섯의 생육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 대두의

분말을 5% 농도로 첨가하고 액체배지의 pH를 4.7, 5.2, 5.7, 6.2 및 6.7로 조절한 다음 25°C에서 팽이버섯을 배양한 결과를 <표 3-2-5>에 나타내었다. 대조구는 대두의 분말을 증류수에 현탁하였을 때의 pH를 사용하였다(pH 5.2). 표에서 보는 바와 같이 실험에 사용한 pH의 범위에서는 pH가 버섯의 생육에 거의 영향을 미치지 못하여 모두 3.0 g/L이상의 건조균체를 생성하였으나 그 중에서 pH 5.2~6.2가 최적인 것으로 나타났다.

Table 3-2-5. Effect of initial pH on growth of liquid-cultured *Flammulina velutipes* on soybean medium

Initial pH (medium)	Final pH (after cultivation)	Dry cell weight (g/L)
4.7	4.2	3.02
5.2	4.7	3.27
5.7	5.2	3.38
6.2	5.7	3.30
6.7	5.8	3.01

그렇기 때문에 이후의 액체배양에서는 초기 pH를 조절하지 않고 행하였다. 느타리 버섯의 경우는 합성배지에서 배양하였을 때 애느타리는 pH 5.5에서 생육이 가장 왕성하였으나, 원형느타리 및 여름느타리 등은 pH 6.5에서 가장 균사 생장이 왕성하였으며, 버섯은 초기 pH의 적용범위가 넓은 것으로 보고하였다. 또한 고체배지에서 팽이버섯을 배양하였을 때 배지의 pH에 따른 균사생장 길이 및 분열자 수를 조사한 결과 pH 5.2~6.0범위에서 균사생장이 70~74 mm로 양호하였으며, 분열자 수도 적은 것으로 보고한 내용과 일치하였다.

6) 버섯 고체배양 추출물의 항암력

<표 3-2-6>은 느타리, 영지, 상황 및 팽이버섯을 대두 및 검정콩배지에 고체 배양한 후 그 추출물이 인체 폐암세포주(A549)의 성장에 미치는 영향을 현미경으로 관찰하여 나타낸 결과이다. 느타리버섯의 대두 및 검정콩배지 추출물은 높은 폐암세포의 생육억제를 나타내었지만 영지, 팽이 및 상황버섯 추출물은 약간의 생육억제를 나타내었다. 이와 같은 결과는 버섯을 대두 및 검정콩배지에서 배양한 후 추출하는 조건 및 용매의 조건과 버섯배지의 조성 및 생육환경 차이에 따른 결과로 생각된다.

Table 3-2-6. Inhibitory activity of extract of semi-solid culture from *Pleurotus ostreatus*(PO), *Ganoderma lucidum*(GL), *Phellinus linteus*(PL) and *Flammulina velutipes*(FV) on cooked soybean against human lung cancer cell(A549)

Media	Control	PO	GL	FV	PL
Soybean	-	¹⁾ +++	+	++	+
Black soybean	-	+++	+	-	-

¹⁾Inhibition of cancer cell = +, below 10% ; ++, 10~30% ; +++, over 30%

7) 버섯 고체배양 추출물의 혈전용해능

<표 3-2-7>과 <그림 3-2-9>는 느타리버섯, 영지, 팽이 및 팽이버섯 추출액의 혈전용해능을 검토한 결과이다. 버섯의 종류에 따라 Fibrin배지에서 투명환이 나타나는 시기 및 크기는 상당한 차이가 있었다. 버섯 균사체 추출물을 집중한 후 느타리버섯은 약 30분 이후부터 투명환이 나타나기 시작하여 3시간 이후에는 대두배지에서 배양한 추출물에서 뚜렷하고 큰 투명환이 나타났다.

Table 3-2-7. Fibrinolytic activity of extract of semi-solid culture from *Pleurotus ostreatus*(PO), *Ganoderma lucidum*(GL), *Phellinus linteus*(PL) and *Flammulina velutipes*(FV) on cooked soybean

Media	Control	PO	GL	FV	PL
Soybean	-	¹⁾ +++	-	++	+
Black soybean	-	+	+	++	-

¹⁾Size of clear zone = +, 1~10mm ; ++, 10~15mm ; +++, over 15mm

그러나 영지 및 상황버섯의 추출물에서는 투명환이 없거나 미약하게 나타났다. 대조구는 버섯을 배양하지 않은 곡물자체를 같은 용매로 추출하여 사용하였다. 이상의 결과로 버섯균사체 배양 추출물의 혈전용해능은 버섯 균종에 따라서 차이가 나지만 사용하는 배지의 종류에 따라서도 그 활성에 많은 차이를 나타내었다.

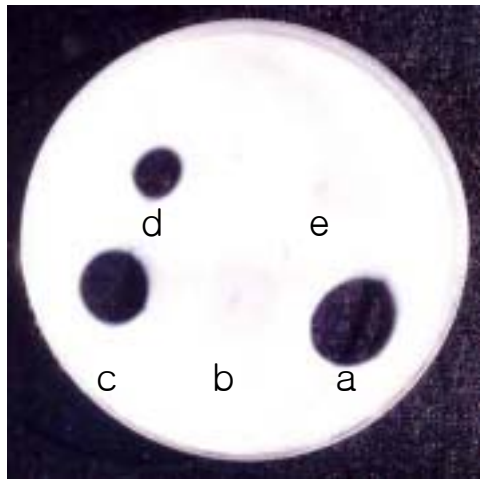


Fig. 3-2-9. Fibrinolytic activity of extract of semi-solid culture from *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Phellinus linteus* and *Flammulina velutipes* on cooked soybean.

a, *Pleurotus ostreatus* ; b, *Ganoderma lucidum* ; c, *Flammulina velutipes* ; d, *Phellinus linteus* ; e, control.

Table 3-2-8. Fibrinolytic activity of mycelia and culture broth of *Pleurotus ostreatus*(PO), *Ganoderma lucidum*(GL), *Phellinus linteus*(PL) and *Flammulina velutipes*(FV) (diameter, mm)

Mushroom		PO	GL	PL	FV
Media					
Soybean	MY ¹	4.7	3.4	3.2	12.1
	CB ²	-	3.5	2.7	9.3
Black soybean	MY	4.2	4.2	4.3	11.9
	CB	-	3.7	2.8	8.6

¹MY, mycelia of mushrooms ; ²CB, Supernatant of culture broth

버섯은 액체 배양을 할 경우 균괴(pellet)를 형성하기 때문에 균사체의 액체배양액을 원심분리하여 침전물(균체)과 상등액(배양액)으로 나누어서 실험을 행하였다. <표 3-2-8>은 4종류 버섯의 혈전용해능을 검토하여 투명한 직경 크기를 측정된 결과인데 팽이버섯이 느타리버섯, 영지 및 상황버섯에서 보다 대체로 높은 활성을 나타내었

다. 팽이버섯의 경우는 배양액에서 보다 침전물(균체)을 분쇄하여 추출한 시료에서 혈전용해능이 우수하게 나타났으며, 느타리버섯의 경우는 균체를 분쇄한 시료에서만 약간의 혈전용해능이 나타났으나 상등액 중에서는 전혀 활성이 나타나지 않았다.

8) 버섯균사체 배양액의 항균활성

<표 3-2-9>는 느타리버섯, 영지, 팽이버섯 및 상황버섯의 균사체 배양액이 병원성 세균의 생육에 미치는 항균력을 검토한 결과이다. 대두 및 검정콩배지에서 배양된 버섯 배양액의 항균력은 황색포도상 구균에 대하여 공통적으로 약간의 항균활성을 나타내었고, *E. coli*에 대해서는 대두에서 배양한 영지 및 팽이버섯과 검정콩에서 배양한 영지버섯의 추출물에서만 약간의 활성을 나타내었다. 그 이외의 병원성 균에 대해서는 모든 추출물들이 전혀 항균효과를 나타내지 못하였다.

<표 3-2-10>은 액체 배양한 버섯 균체추출물의 항균력을 나타낸 결과인데, 중층 배양한 7종류의 병원성 미생물에 대하여 느타리, 영지 및 상황버섯의 배양상등액과 균체추출물은 전혀 항균활성은 나타내지 않았고, 팽이버섯의 균체추출물(pellet)에서만 *S. aureus*, *Lac. plantarum*, *E. coli*에 대하여 약간의 활성을 나타내었다. 배지 자체를 사용한 대조구는 전혀 항균활성이 없었다. 이상의 결과로 본 실험에 사용한 버섯추출물의 항균활성은 그다지 높지 않음을 알 수 있었다.

Table 3-2-9. Antibacterial activity of culture broth of mycerial *Pleurotus ostreatus*, *Garnoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Phellinus linteus*
(diameter of clear zone : mm)

Medium	Mushrooms	Tested bacteria						
		A-3	A-7	A-8	A-12	A-20	A-23	A-27
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	-	-	+	-	-	-
Defatted	<i>Garnoderma lucidum</i>	-	-	-	+	-	-	+
soybean	<i>Flammulina velutipes</i>	-	-	-	+	-	-	+
	<i>Phellinus linteus</i>	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	-	-	+	-	-	-
Black	<i>Garnoderma lucidum</i>	-	-	-	+	-	-	+
soybean	<i>Flammulina velutipes</i>	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Phellinus linteus</i>	-	-	-	+	-	-	-

A-3, *B. cereus* KCCM-11204 ; A-7, *P. aeruginosa* ATCC-15442 ; A-8, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *S. aureus* ; A-20, *Kl. pneumoniae* KCTC-2208 ; A-23, *Lac. plantarum* ; A-27, *E. coli* KCCM-12177.

Table 3-2-10. Antibacterial activity of extract of mycelial *Flammulina velutipes* (diameter of clear zone : mm)

Strains	A-3	A-7	A-8	A-12	A-20	A-23	A-27
Media							
Defatted soybean	-	-	-	14.6	-	13.2	11.0
Black soybean	-	-	-	13.1	-	14.3	10.5

A-3, *Bacillus cereus* KCCM-11204 ; A-7, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-15442 ; A-8, *Escherichia coli* ATCC-25922 ; A-12, *Staphylococcus aureus* ; A-20: *Klebsiella pneumoniae* KCTC-2208 ; A-23, *Lactobacillus plantarum* ; A-27, *Escherichia coli* KCCM-12177.

9) 분쇄대두에서의 버섯균사체 배양

메주는 증자한 대두를 분쇄하여 압착·성형하기 때문에 메주 내부로의 균사성장 등이 어려울 것으로 예상되므로 증자대두를 조밀하게 분쇄한 것에 각 버섯균사체를 접종하여 실온에 방치하면서 각 버섯균사체의 생육상태를 관찰하였다<그림 3-2-10>. 느타리 및 팽이버섯은 접종 5일 이후부터, 영지 및 상황버섯은 10일 이후부터 균사의 성장이 관찰되었다. 이상의 결과로 분쇄한 대두에서도 버섯균사의 생육은 가능하므로 자연발효를 행하는 메주의 표면에서도 버섯균사의 생육이 가능함을 시사하였다.

3. 중간층 올리고당 대량생성 세균의 선정

가. 실험재료 및 방법

1) 공시균주와 사용배지

제 3장 제 2절의 <1. 메주 외층부 발효를 위한 곰팡이 선정>에 준한다.

2) Colloidal chitin제조

Colloidal chitin의 제조는 chitin(Sigma) 15g을 HCl원액 150ml에 첨가하여 4℃에서 교반하면서 24시간 방치한 후 가아제와 whatmann paper No. 2로 여과하여 여과용액을 얻었다. 이 여과용액에 4℃ 증류수 2.0 L를 첨가한 후 4℃에서 12시간 방

치하여 colloidal chitin을 완전히 침전시킨 후 상등액을 버리는 과정을 반복하여 pH 5.0이상이 될 때까지 세척하였다. 이를 5 N KOH를 이용하여 pH 7.0으로 조정하여 colloidal chitin을 제조한 다음 121℃에서 15분 멸균하여 4℃에 보관하면서 미생물의 배양 및 효소활성의 기질로 사용하였다.

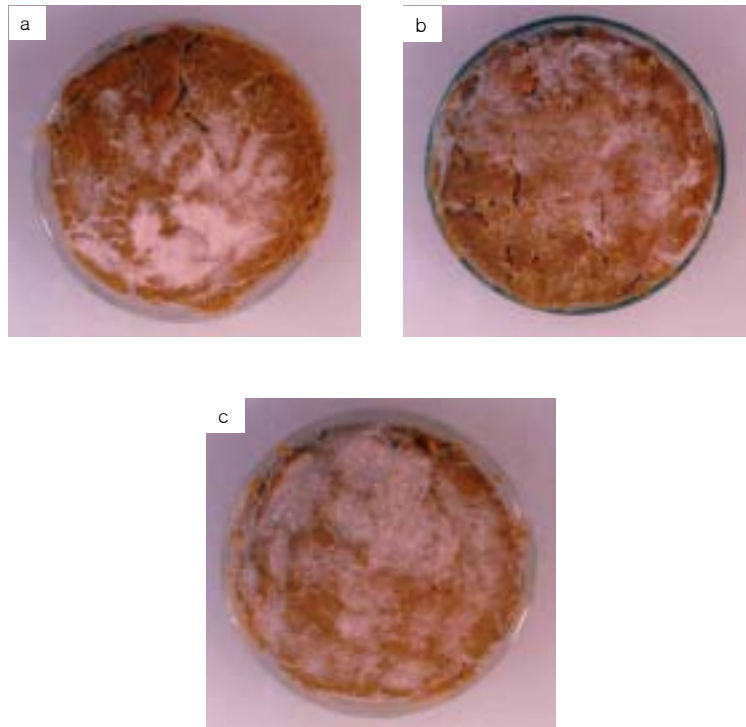


Fig. 3-2-10. Growth of *Pleurotus ostreatus*, *Garnoderma lucidum* and *Flammulina velutipes* on cooked soybean.

a ; *Pleurotus ostreatus* , b ; *Garnoderma lucidum*, c ; *Flammulina velutipes*

3) 세균의 형태학적 특성

L자 시험관에 LB broth 10ml을 분주하여 멸균한 배지에 각 분리 미생물을 접종하여 35℃, 50rpm으로 진탕 배양한 다음 2% phosphotungstate negative로 염색하여 투과전자현미경(TEM, JEOL 100S, Japan)으로 그 형태를 관찰하였다.

4) 세균의 배양학적 특성

분리한 세균의 전 배양액을 100ml의 본 배양 배지에 1%씩 접종하고 24시간 배양 후 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 최적배양온도의 검토는 15~55℃ 범위, 배지의 최적pH의 검토는 pH3.5~10.5의 범위, 최적진탕속도의 검토는 80~230rpm의 범위에서 행하였다.

5) 세균의 생화학적 특성

분리균을 LB broth 배지에서 충분히 활성화시켜 saline 10ml를 함유한 시험관에 접종하여 희석한 다음 API 50ch kit에 200 μ l씩 loading하여 35 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 24~48hr 배양 후 결과를 분석하여 동정하였다.

나. 실험결과

1) Chitinase 생산균주의 분리

본 연구자들이 연구 개발하여 특허 출원한 캡슐형 메주는 전통메주의 위생적인 문제점을 비롯한 여러 가지 단점을 보완하기 위하여 메주를 성형할 때 메주의 외부표면에 황국균의 곰팡이 및 버섯을 접종하여 성형하기 때문에 외부에 접종한 곰팡이 등의 균사체가 과잉 성장하여 메주 내부로 침투할 경우 최종제품인 장류 발효식품에 좋지 않은 맛 및 향기를 부여한다. 그렇기 때문에 곰팡이 및 버섯 균사체가 메주 외부에서 과잉 성장하여 메주내부로 침투하는 것을 억제하고, 또한 chitin 분해산물인 키틴올리고당의 기능성을 장류 발효식품에 부여할 목적으로 전통발효식품으로부터 chitinase 고 분비 세균을 분리하여 메주의 발효시에 이용하고자 하였다. 채취한 균원 시료로부터 1차 순수분리한 80여 점의 균주와 실험실에 분리하여 보관 중인 미생물들을 1% colloidal chitin 함유 LB평판배지(LBC)에 이식하여 생육속도가 빠르고 균체 주위에 투명환이 크게 나타난 콜로니를 2차 분리하여 <표 3-2-11> 및 <그림 3-2-11>에 나타내었다. 분리한 미생물 중에서 SJ-06, SJ-61 및 SA-72 등의 분리균주는 콜로니의 성장속도가 빠르고 투명환이 뚜렷하게 나타났으나 항균미생물로 밝혀진 HS-2, HS-14 및 HS-25균주는 콜로니의 주위에 거의 투명환을 나타내지 않았다. 이상의 결과로 분리한 미생물 중에서 SJ-61을 최종분리 미생물로 선정하여 이하의 실험을 행하였다.

Table 3-2-11. Comparison of cell growth and enzyme activities of the isolated bacterial strains by agar diffusion method

Isolated strains	Growth	Clear zone(mm)
SJ-06	++	5.2
SJ-14	+++	4.5
SJ-32	++	1.8
SJ-43	+++	4.5
SJ-45	+++	1.5
SJ-54	++	1.4
SJ-61	+++	7.5
HS-02	++	3.0
HS-14	+++	3.7
HS-25	+	2.3
HS-32	+	3.2
SA-48	+++	3.6
SA-52	+++	2.0
SA-55	+	3.4
SA-68	+++	1.8
SA-72	+++	4.5



Fig. 3-2-11. Colony shape and clear zone size of various isolated microbes on LBC agar plate.

2) 분리균과 곰팡이와의 대치배양

분리한 미생물 중에서 colloidal chitin의 기질을 함유한 평판배지 상에서 비교적 성장속도가 빠르고 clear zone의 크기가 크게 나타난 미생물을 선택하여 메주의 외부발효균인 황국균과 메주에 빈번하게 오염되어 번식하는 푸른곰팡이와의 대치배양을 행하여 <그림 3-2-12>에 나타내었다. PDA평판배지 중앙에 corker borer NO.5 (직경 7 mm)를 이용하여 사상균을 블록형태로 접종한 다음 30℃에서 배양하여 식물사상균의 균사가 평판배지의 1/2정도를 덮었을 때(colony 직경 : 약 3 cm) 사상균의 균사 끝으로부터 1 cm 정도 떨어진 지점에 각 분리균주를 획선으로 접종하여 사상균의 균사성장 억제 정도(inhibition zone)를 관찰하였다<그림 3-2-12>.

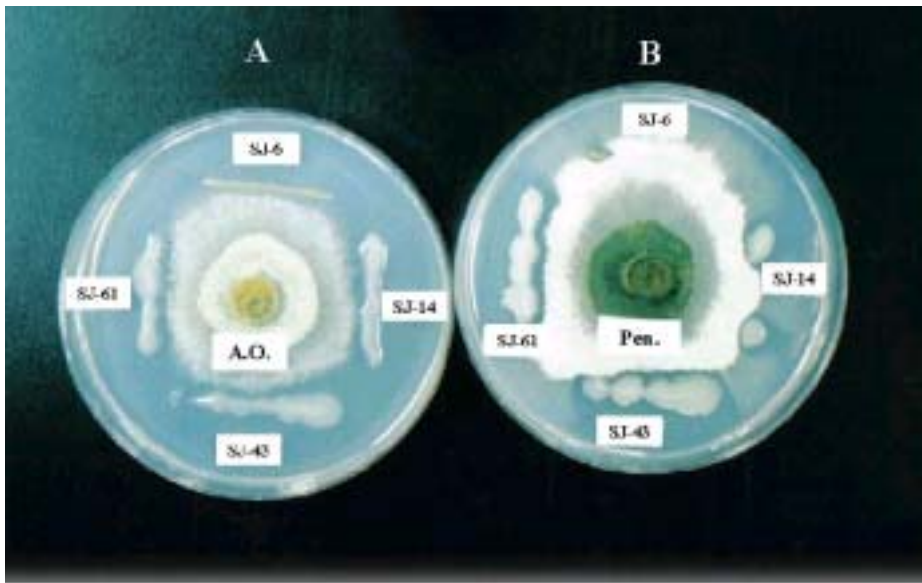


Fig. 3-2-12. Effect of the isolated strain on mycelial growth of *Aspergillus oryzae*(A.O.) and *Penicillium* sp.(Pen.).

황국균<그림 3-2-12의 A>에 대해서는 SJ-14, SJ-43 및 SJ-61의 분리균이 균사성장 억제력이 우수하였으며, 푸른곰팡이<그림 3-2-12의 B>에 대하여는 SJ-43 및 SJ-61의 분리균이 균사성장 억제력이 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과로 캡슐메주를 제조할 때 메주의 중심부에 chitinase활성이 높은 SJ-43이나 SJ-61 분리균을 이식했을 경우는 메주의 외부에 접종한 황국균이나 자연에서 오염된 사상균들의 균사가 지나치게 메주의 중심부로 증식해 들어오는 것을 억제할 수 있을 것으로 추측되었다.

이상의 결과로 분리한 미생물 중에서 chitinase활성이 높으면서 사상균의 군사성장 억제력이 우수한 SJ-61분리균을 최종분리한 미생물로 선정하여 이하의 실험을 행하였다.

3) 분리 미생물의 동정

최종 분리 선정한 SJ-61균주의 당 발효성 등을 ATB system에 의한 API kit test를 행한 결과를 <표 3-2-12>에 나타내었다. 그 결과로서 Glycerol, L-arabinose, ribose,

Table 3-2-12. Characteristics of the isolated bacterium SJ-61

Substrate	Read	Substrate	Read
Control	-	Inocitol	+
Glycerol	+	Mannitol	+
Erythritol	-	Sorbitol	+
D-Arabinose	-	a-Methyl-D-Mannoside	-
L-Arabinose	+	a-Methyl-D-Glucoside	+
Ribose	+	N-Acetyl-Glucosamide	-
D-xylose	+	Amygdalin	+
L-xylose	-	Arbutin	+
Adonitol	-	Esculin	+
B-methyl-D-xyloside	-	Salicin	+
Galactose	-	Celobiose	+
Glucose	+	Maltose	+
Fructose	+	Lactose	+
Mannose	+	Sucrose	+
Sorbose	-	Trehalose	+
Rhamnose	-	Inulin	-
Dulcitol	-	Melezitose	-

D-xylose, inocitol, mannitol 및 sorbitol 등에 대하여는 양성을 나타내었으나, erythritol, D-arabinose, L-xylose, rhamnose 및 dulcitol에 대하여는 음성으로 나타났다. <표 3-2-13>은 분리한 SJ-61균주의 형태 및 생화학적 특성을 검토한 결과

인데 SJ-61은 gram염색 결과 양성으로 나타났고, 크기는 약 $2.0 \times 1.5 \mu\text{m}$ 의 간균으로 관찰되었다. 그리고 편모를 가져 운동성이 있으며, 내생포자를 형성하였다. gelatin, casein 및 starch의 분해능을 가지고 있으며, oxidase, catalase 및 urease반응은 양성이었다, Voges-Prostauer test도 양성으로 나타났으나, indol 생성능은 없었다. 이상의 결과로 분리균주 SJ-61은 ATB system에 의한 API test 및 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의하여 동정한 결과 *Bacillus subtilis*와 아주 유사한 균주로 동정되어 *Bacillus subtilis* SJ-61로 잠정적으로 명명하였다.

Table 3-2-13. Characteristics of physiological and biochemical strain SJ-61

Gram stain		+	Gelatin	+
Cell type		Rod	Casein	+
Size(μm)	long	2.0	Starch	+
	wide	1.5	Oxidase reaction	+
Motility		+	Catalase reaction	+
Colony color		Ivory	Urease reaction	+
Fluorescence		-	Voges-Prostauer test	+
Flagellum		+	Citrate utilization	+
Spore formation		+	Indol production	-

4) 배양조건의 영향

가) 배양시간의 영향

배양시간이 *Bacillus subtilis* SJ-61 균주의 생육 및 chitinase의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 효소 생산용 액체배지에 *Bacillus subtilis* SJ-61 균주의 전배양액을 2% 접종하고 35℃, 180rpm으로 배양하면서 배양액의 탁도와 효소의 활성을 측정하여 <그림 3-2-13>에 나타내었다. 배양시간이 경과함에 따라 균의 생육은 1일째까지 직선적으로 증가하다가 서서히 감소하였으나, chitinase의 활성은 배양 1일째 이후부터 증가하기 시작하여 배양 4일째에 3.2units/ml의 활성을 나타내었다가 서서히 감소하는 현상을 나타내었다.

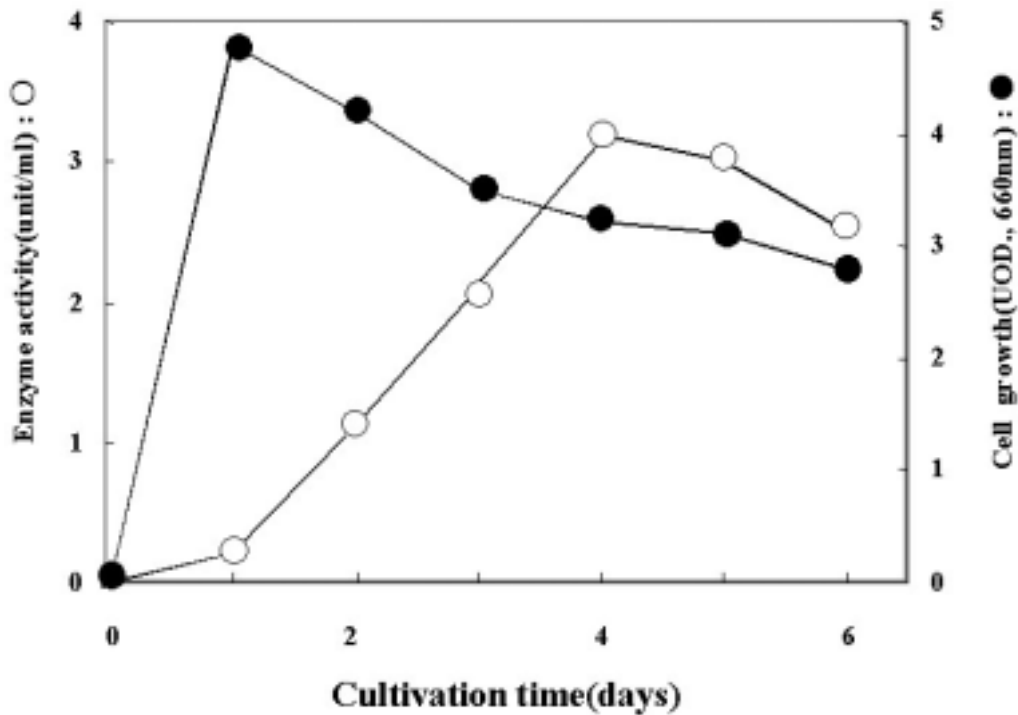


Fig. 3-2-13. Effect of cultivation time on cell growth and chitinase production from *Bacillus subtilis* SJ-61.

나) 배지의 초기 pH영향

배지의 초기 pH를 결정하기 위하여 효소 생산용 액체배지에 *Bacillus subtilis* SJ-61의 전배양액을 2% 접종하고 배지의 pH범위를 pH 4~12까지 변화시키면서 35°C, 180rpm으로 4일 동안 배양한 다음 배양액의 탁도와 효소의 활성을 측정하여 <그림 3-2-14>에 나타내었다. 균체의 증식은 배지의 pH가 증가함에 따라 거의 직서적으로 증가하여 pH 7~8의 중성부근에서 가장 왕성한 균체 증식이(OD : 4.8) 이루어졌다. 효소의 활성도 pH 5이하에서는 급격히 떨어졌으나 pH 5이상에서는 서서히 증가하기 시작하여 중성부근에서 가장 높은 3.5 units/ml의 활성을 나타내었다가 pH 8이상에서는 급격하게 떨어져 pH 9에서 2.9 units/ml, pH 10에서 0.8 units/ml의 활성을 나타내었다. 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* SJ-61의 배지의 초기 pH는 중성부근의 pH 7로 결정하였다.

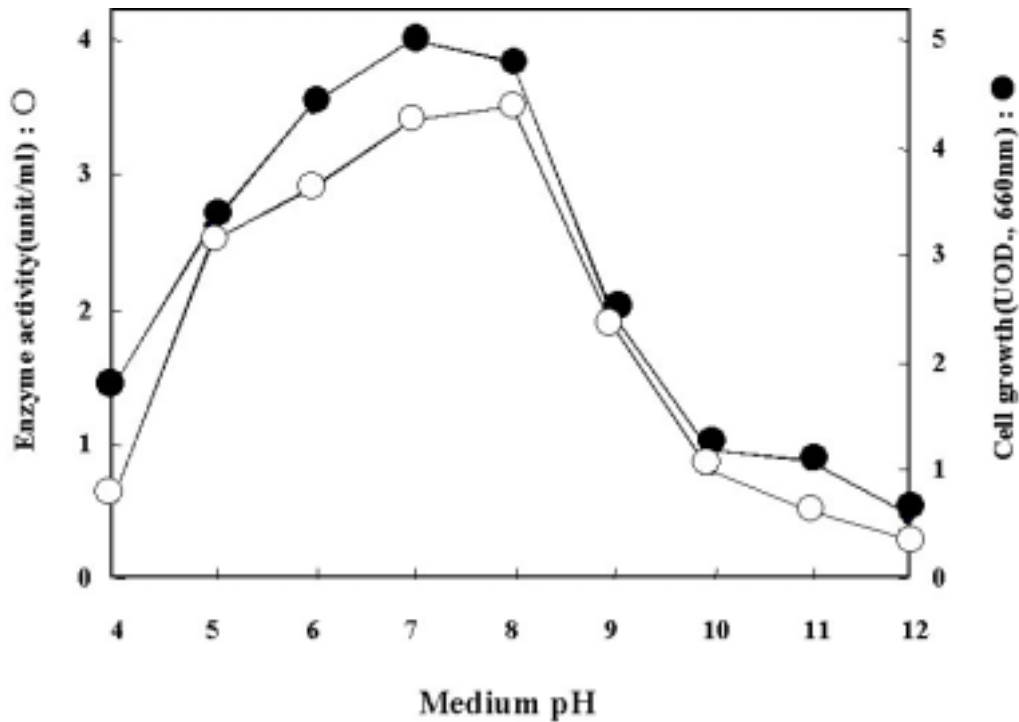


Fig. 3-2-14. Effect of initial pH of medium on cell growth and chitinase production from *Bacillus subtilis* SJ-61.

다) 배양온도의 영향

Bacillus subtilis SJ-61의 배양 최적온도를 검토하기 위하여 효소 생산용 액체배지의 pH를 pH 7로 조정하여 멸균하여 미리 준비한 전배양액을 2% 접종하고 배양온도의 범위를 15~50℃로 변화시키면서 4일 동안 배양한 다음 배양액의 탁도와 효소의 활성을 측정하여 <그림 3-2-15>에 나타내었다. 균체의 증식은 30~40℃의 범위에서 가장 왕성하게 이루어졌으나 20℃ 이하의 낮은 온도에서는 45℃ 이상의 고온에서보다 현저하게 낮은 OD값을 나타내었다. Chitinase의 활성은 배양온도가 35℃까지 증가함에 따라 증가하기 시작하여 배양 35℃에서 가장 높은 3.5 units/ml를 나타내었으나 40℃ 이상에서는 급격하게 떨어져 배양 45℃에서는 1.2 units/ml 정도 잔존하였다. 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* SJ-61의 배양 최적온도는 35℃로 결정하였다.

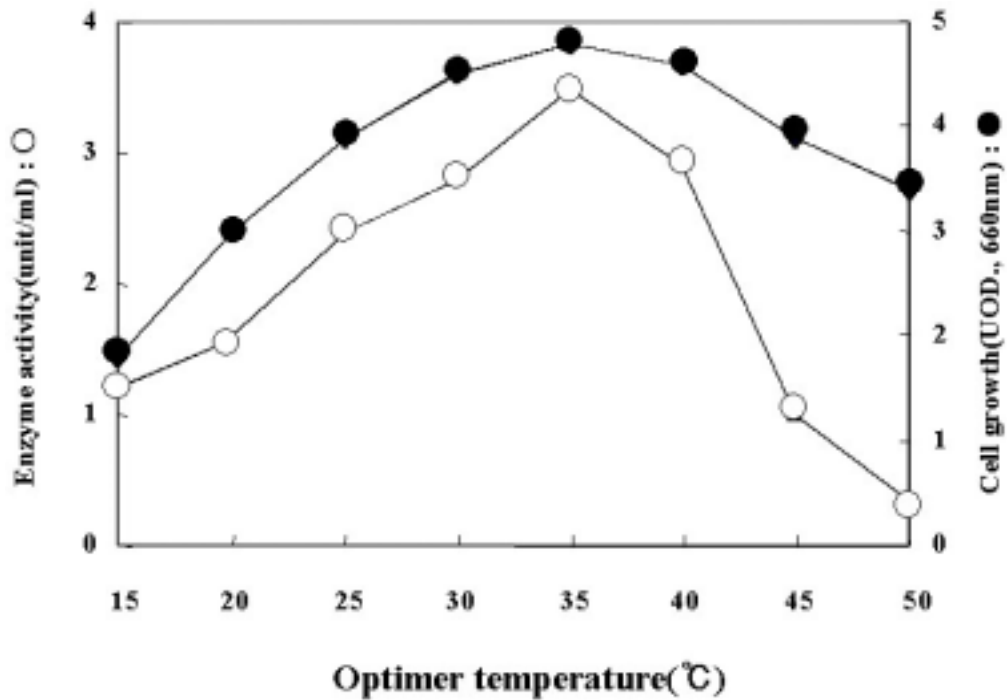


Fig. 3-2-15. Effect of cultivation temperature on cell growth and chitinase production from *Bacillus subtilis* SJ-61.

라) 진탕 속도의 영향

진탕 속도가 *Bacillus subtilis* SJ-61의 생육 및 chitinase생산에 미치는 영향을 검토하여 <표 3-2-14>에 나타내었다. 배지의 초기 pH는 배지를 제조하여 조절하지 않은 pH 7.0으로 하고 35°C의 배양온도에서 진탕 속도를 100, 140, 180, 260 rpm으로 변화시키면서 배양한 결과 진탕 속도가 100 rpm에서 180 rpm까지 증가함에 따라 미생물의 증식 및 효소의 생산이 약간 증가하였다. 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* SJ-61의 배양을 위한 최적 진탕 속도는 180 rpm으로 결정하였다.

Table 3-2-14. Effect of shaking speed on cell growth and chitinase production from *Bacillus subtilis* SJ-61

Shaking speed(rpm)	Cell growth (OD, 660nm)	Relative activity(%)
100	3.27	56
140	4.53	82
180	4.75	100
220	4.68	105
260	4.85	105

마) 배지의 조성

① 탄소원의 영향

탄소원의 종류가 *Bacillus subtilis* SJ-61의 chitinase생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 효소생산용 배지에 각종 탄소원을 1%씩 첨가한 후 35℃에서 180rpm으로 4일 동안 진탕배양한 다음 chitinase의 상대활성을 측정하여 <표 3-2-15>에 나타내었다. 실험에서 기질로 사용한 여러 종류의 탄소원 중에서 colloidal chitin을 제외한 다른 탄소원을 사용한 시험구에서는 균체의 생육 및 chitinase의 생산이 아주 미약하였다. 이 결과로 chitinase는 다른 탄소원에 의해서 유도되는 것이 아니라 colloidal chitin에 의해서 유도되는 효소임을 알 수 있었다. 그리고 colloidal chitin의 첨가농도가 chitinase의 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 첨가하는 colloidal chitin의 농도를 0~3.5%까지 변화시키면서 배양한 결과를 <그림 3-2-16>에 나타내었다. 배지에 colloidal chitin의 첨가농도가 증가함에 따라 chitinase의 활성 및 균체의 생육은 거의 직선적으로 증가하여 2% 첨가 시험구에서 효소의 활성은 7.0units/ml, 균체의 OD는 5.43을 나타내었으나 그 이상의 첨가농도에서는 효소의 활성 및 OD 모두 감소하였다. 이상의 결과를 고려하여 *Bacillus subtilis* SJ-61의 배지에 첨가하는 colloidal chitin의 첨가농도 2%로 결정하였다.

Table 3-2-15. Effect of carbon source on cell growth and chitinase production from *Bacillus subtilis* SJ-61

Carbon sources	Cell growth (OD, 660nm)	Relative activity(%)
Colloidal chitin	5.02	100
Sodium citrate	2.43	10.8
Lactose	3.05	43.2
N-acetylglucosamine	3.91	68.4
Cellulose	2.84	38.6
Chitin	3.26	41.7
Chitosan	2.56	17.4
Sucrose	3.63	26.5
Glucose	3.97	11.5
Soluble starch	3.85	15.9

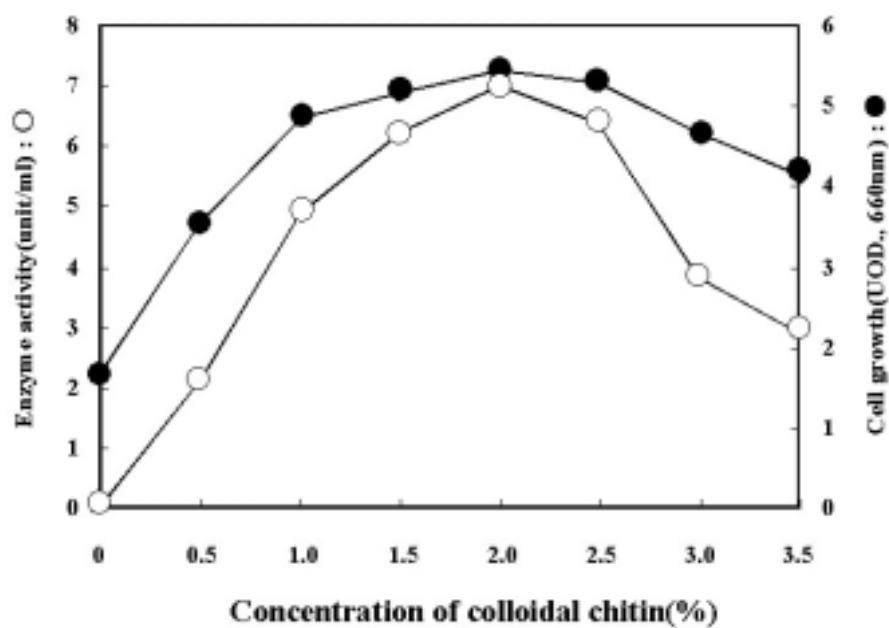


Fig. 3-2-16. Effect of concentration of colloidal chitin on cell growth and chitinase production from *Bacillus subtilis* SJ-61.

② 질소원의 영향

질소원의 종류가 *Bacillus subtilis* SJ-61의 생육 및 chitinase 효소생산에 미치는 영향을 검토하여 <표 3-2-16>에 나타내었다. 효소생산용 배지에 colloidal chitin을 2.0% 첨가하고 여러 종류의 질소원을 각각 0.1%씩 첨가 후 35℃에서 180 rpm으로 배양한 다음 배양액의 탁도 및 chitinase의 상대활성을 측정하였다. 질소원으로서 yeast extract, beef extract, peptone 및 tryptone 등의 유기질소원을 잘 이용하였으며, 효소활성은 peptone, tryptone, yeast extract 등의 순으로 높게 나타났다. 그러나 NH₄Cl 및 NaNO₃와 같은 무기질소원은 잘 이용하지 못하였으며 효소활성도 낮은 것으로 나타났다. 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* SJ-61의 생육 및 chitinase 효소생산을 위한 질소원으로서 peptone을 결정하였다.

Table 3-2-16. Effect of nitrogen source on cell growth and chitinase production from *Bacillus subtilis* SJ-61

Nitrogen sources	Cell growth (OD, 660nm)	Relative activity(%)
Yeast extract	5.42	100
Beef extract	5.48	82
Peptone	5.52	168
Ttryptone	5.45	145
Urea	5.04	97
NH ₄ Cl	4.66	72
NaNO ₃	4.47	56
Malt extract	5.01	93
Asparagine	4.85	86

분리한 *Bacillus subtilis* SJ-61이 가장 잘 이용하는 질소원인 peptone 첨가농도의 영향을 검토하여 <그림 3-2-17>에 나타내었다. Peptone의 첨가농도를 0~0.8%까지 여러 농도범위로 각각 첨가하고 질소원 종류의 검토방법과 동일하게 배양한 결과 peptone의 첨가 농도가 증가할수록 효소의 활성은 약간 증가하였으나 균체의 증가는 거의 증가하지 않았다. 이상의 결과로 peptone의 첨가농도는 효소의 활성이 가장 높은 0.5%로 결정하였다.

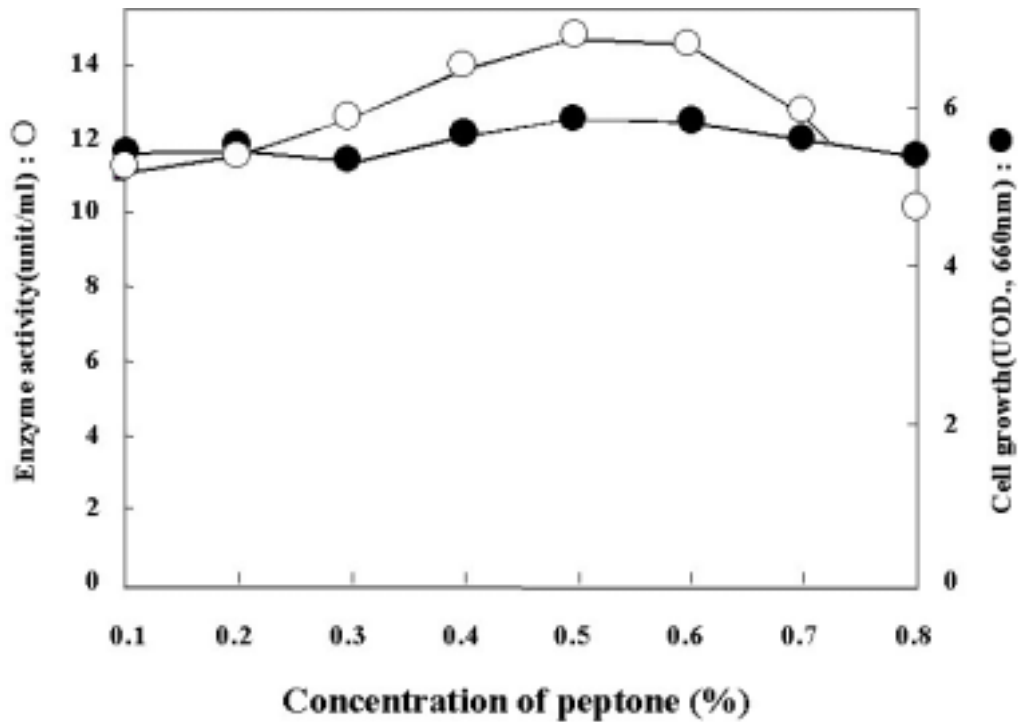


Fig. 3-2-17. Effect of peptone concentraion on cell growth and chitinase production from *Bacillus subtilis* SJ-61.

③ 무기염의 영향

무기염이 분리한 *Bacillus subtilis* SJ-61의 생육 및 효소생산에 미치는 영향을 검토하여 <표 3-2-17>에 나타내었다. 효소생산 배지에 탄소원은 2.0%의 colloidal chitin, 질소원은 0.5%의 peptone을 첨가하고 각종 무기염을 0.05%씩 첨가하여 35℃에서 180 rpm으로 배양하였으며 대조구는 효소생산배지 자체를 사용하였다. 그 결과 CaCl₂, NaCl 및 FeSO₄·7H₂O는 *Bacillus subtilis* SJ-61의 생육 및 효소생산에 약간의 영향을 미쳤으나 CoCl₂·6H₂O, ZnCl₂, HgCl₂ 및 AgNO₃과 같은 중금속 염은 *Bacillus subtilis* SJ-61의 생육 및 효소생산에 오히려 저해하는 것으로 나타나 최적 무기염은 CaCl₂·2H₂O 0.05%로 결정하였다.

Table 3-2-17. Effect of inorganic source on cell growth and chitinase production from *Bacillus subtilis* SJ-61

Inorganic source	Cell growth (OD, 660nm)	Relative activity(%)
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5.13	48
ZnCl ₂	4.72	36
HgCl ₂	4.68	34
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4.96	42
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5.86	104
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5.85	103
NaCl	5.83	102
AgNO ₃	4.98	46
Control	5.82	100

4. 항균물질 대량 생성 세균의 선정

가. 실험재료 및 방법

1) 사용배지와 배양조건 및 분리균주의 동정

각각 제 3장 제 2절의 <1. 메주 외층부 발효를 위한 곰팡이 선정> 및 <3. 중간층 올리고 대량생성 세균의 선정>에 준한다.

2) 항균활성

측정 방법은 세부과제의 기술법에 따랐다. 버섯고체배양 시는 버섯균사체를 막자사발에 넣고 분쇄시킨 후, 원심분리하여 얻은 상등액을 membrane filter로 여과하여 사용하였으며, 액체배양 시는 배양액을 원심분리 하여 침전물(균체)과 상등액(배양액)으로 나누어서 실험을 행하였다. 분리한 세균의 항균력은 SY배지에 배양하면서 일정시간마다 시료를 채취하여 버섯액체배양시의 상등액 검사 방법에 준하였다.

3) 항균물질의 pH 및 열 안정성

항균물질의 열 안정성은 각 분리균주의 배양 상등액을 membrane filter로 여과한 다음 그 여과액을 100℃에서 5~25분 가열처리 후 항균력을 측정하였고, pH 안정성은 시료를 0.1N NaOH 및 HCl로 pH 4.5~12까지 조정한 다음 실온에서 2hr 방치한 후 항균력을 측정하였다.

4) 항균물질의 최소저해 투여량

최소저해 투여량(minimum inhibitory dose ; MID) 측정은 각 분리균주를 배양하여 여과한 여액을 paper disc에 0~140 μ l까지 각 농도별로 흡착시킨 다음 병원성 균주를 증충하여 미리 준비해둔 평판배지 위에 얹어 35℃에서 7시간 배양하여 항균활성을 나타내는 농도를 MID로 결정하였다.

5) 용매극성에 따른 계통분획

분리균주를 20 l 액체배양 한 배양액을 10000rpm에서 30분간 원심분리한 뒤 얻은 상등액에 Hexane, CHCl₃, EtOAc 및 BuOH을 가하여 계통분획을 실시하였다.

나. 실험결과

1) 박테리옌 생산 균주의 분리 및 선정

가) 미생물의 분리

장류 발효식품의 생리활성 기능을 강화하고 발효를 촉진시킬 우수한 균주를 분리할 목적으로 균원시료로부터 약 150여종의 균주를 1차 선별하여 skim milk가 함유된 SM, soluble starch가 함유된 AM 및 carboxy methyl cellulose(CMC)가 함유된 CM평판배지 상에서 동시에 clear zone의 크기가 크고 뚜렷하며 성장속도가 빠른 10균주를 2차 분리하여 <표 3-2-18> 및 <그림 3-2-18>에 나타내었다. 대부분의 분리균들은 성장속도가 빠르고 뚜렷한 단일 콜로니를 형성하였으나 SM, AM 및 CM배지 상에 나타나는 clear zone의 크기는 균주에 따라 많은 차이를 보였다. SM배지 상에서는 HS-02, HS-14, 및 HS-25, AM배지 상에서는 HS-02, HS-03, HS-14, HS-25 및 HS-32, CM배지 상에서는 HS-02, HS-04, HS-25 및 HS-32 분리균주에서 비교적 clear zone이 크고 뚜렷하게 나타났다<표 3-2-18>. <그림 3-2-18>은 이들 분리균주 중에서 HS-25균주를 3종류의 평판배지 상에

각각 배양하였을 때의 결과를 나타낸 것인데 순수분리 된 단일 콜로니는 SM, AM 및 CM평판배지 상에서 비교적 성장속도가 빠르고 뚜렷한 clear zone을 나타내었다. 2차 분리한 미생물을 효소생산용 액체배지에서 24시간 진탕 배양하여 protease, amylase 및 cellulase등의 효소활성을 측정한 다음 비교적 3종류의 효소활성이 동시에 높게 나타난 6균주를 3차 분리하여 <표 3-2-20>에 나타내었다. Protease와 amylase 효소활성은 HS-14 및 HS-25균주가 높은 활성을 보였으며, cellulase 효소활성은 HS-02 및 HS-25균주가 높은 활성을 나타내었다.

Table 3-2-18. Comparison of cell growth and enzyme activities of the isolated bacterial strains by agar diffusion method

Isolated strains	Growth rate ¹⁾	Clear zone (mm) ²⁾		
		SM ³⁾	AM ⁴⁾	CM ⁵⁾
HS-01	++	10.3	16.9	7.1
HS-02	+++	19.3	18.1	8.3
HS-03	+++	16.2	18.0	5.2
HS-04	++	14.7	14.9	8.5
HS-14	+++	18.4	18.9	6.4
HS-17	++	12.3	12.3	4.5
HS-19	+++	16.9	15.3	5.5
HS-25	+++	18.4	23.5	9.6
HS-32	++	14.5	18.0	8.5
HS-46	++	11.7	12.7	7.6

¹⁾ Growth rate : + slow, ++ medium, +++ fast

²⁾ Size of clear zone on SM³⁾ containing skim milk for protease, AM⁴⁾ containing soluble starch for amylase and CM⁵⁾ media containing carboxy methyl cellulose for cellulase activity. Composition of each media is well described in the Materials and Methods.

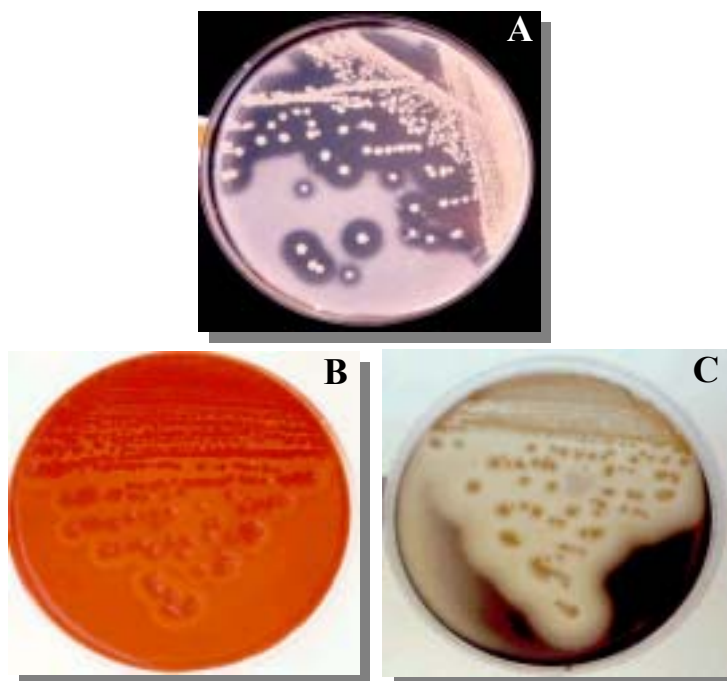


Fig. 3-2-18. Cell growth and enzyme activities of the isolated bacterium HS-25 on SM for protease(A), CM for cellulase(B) and AM agar plates for amylase(C) by agar diffusion method.

Table 3-2-20. Comparison of protease, amylase and cellulase activities of culture broth obtained from the isolated bacteria

Isolated strains	Enzyme activities (Units/ml)		
	Protease	Amylase	Cellulase
HS-02	50.53	7.11	3.34
HS-03	31.88	6.0	1.07
HS-04	34.94	4.80	0.98
HS-14	55.53	8.65	2.52
HS-19	46.00	6.60	0.86
HS-25	66.70	7.80	2.78

나) 식품유해 미생물에 대한 항균활성

저염장류 발효식품을 생산하기 위해서는 식품유해 미생물의 생육을 억제할 수 있는 항균활성이 중요한 요소로 생각되어 3차 분리한 미생물의 항균활성을 검토하여 <표 3-2-21>에 나타내었다. 3차 분리한 미생물들은 식품유해 미생물에 대하여 비교적 높은 항균활성을 갖고 있었으나, 그 중에서도 HS-25, HS-14 및 HS-02 분리균주의 순으로 활성이 높게 나타났다.

Table 3-2-21. Antibacterial activity of the culture broth of bacteria isolated from traditional *Doenjang* against food poisoning and pathogenic bacteria

Tested strains	Antibacterial activity (mm, size of clear zone) ¹⁾					
	HS-02 ²⁾	HS-03	HS-04	HS-14	HS-19	HS-25
A-02 ³⁾	9.25	8.00	8.00	10.65	8.25	12.65
A-03	8.35	8.00	8.25	9.65	8.25	12.45
A-05	8.05	8.45	8.00	8.45	8.00	8.00
A-07	8.20	8.45	8.45	9.45	8.45	10.37
A-08	12.80	13.45	11.45	13.75	8.25	13.45
A-12	9.85	8.65	8.25	12.45	8.50	12.45
A-14	10.80	10.75	10.50	12.25	8.50	12.56
A-17	8.05	8.05	8.25	8.45	8.00	9.45
A-18	9.65	8.65	8.25	8.75	8.25	10.45
A-23	8.05	8.05	8.45	8.25	8.00	8.25
A-25	12.50	9.65	10.15	12.65	8.20	12.65
A-26	10.50	10.75	10.55	12.45	8.30	12.55

¹⁾Inhibitory effect of the culture broth of isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method. ²⁾Bacteria isolated from traditional *Doenjang*.

³⁾Tested strains = A-2, *B. subtilis* ; A-3, *B. cereus* KCCM-11204 ; A-5, *Str. mutans* ATCC-27607 ; A-7, *Pseu. aeruginosa* ATCC-15442 ; A-8, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; A-14, *Sal. enteritidis* KCCM-1202 ; A-17, *Sal. typhimurium* KCTC-2208 ; A-18, *Kle. pneumoniae* KCCM-11319 ; A-23, *L. plantarum* ; A-25, *Pro. mirabilis* KCTC-2433 ; A-26, *V. parahaemolyticus*

HS-02 분리균주는 *E. coli*, *Sal. enteritidis* 및 *Pro. mirabilis*에 높은 항균활성을 나타

내었으며 HS-14 및 HS-25 분리균주는 *E. coli*, *Sta. aureus*, *Sal. enteritidis*, *Pro. mirabilis* 및 *V. parahaemolyticus*를 비롯한 모든 식품유해 미생물에 대하여 비교적 높은 항균활성을 갖고 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 본 연구에서는 SM배지, AM배지 및 CM평판배지 상에서 clear zone의 크기가 크고 뚜렷하며 액체배지에서 효소활성이 비교적 높고, 유해미생물에 대한 항균활성이 우수한 HS-25균주를 최종 선정하여 이하의 실험을 행하였다.

2) 박테리오신 생산 균주의 동정

최종 분리 선정한 HS-25 균주의 동정을 위하여 미생물의 형태학적 및 생화학적 특성을 검토한 결과를 <그림 3-2-19> 및 <표 3-2-22>에 나타내었다. 분리한 HS-25 항균 미생물은 편모를 가지고 있으며, 세포벽 외부에 다량의 점질물을 형성하는 간균으로 관찰되었다(Fig. 3-2). 그리고 내생포자를 형성하며 세포의 크기는 $0.5 \sim 0.8 \times 3 \sim 5 \mu\text{m}$ 이었으며 그람양성 세균으로 나타났다. 생화학적 특성을 검토한 결과 catalase와 oxidase 양성 이었으며, esculin을 가수분해하였다<표 3-2-22>.

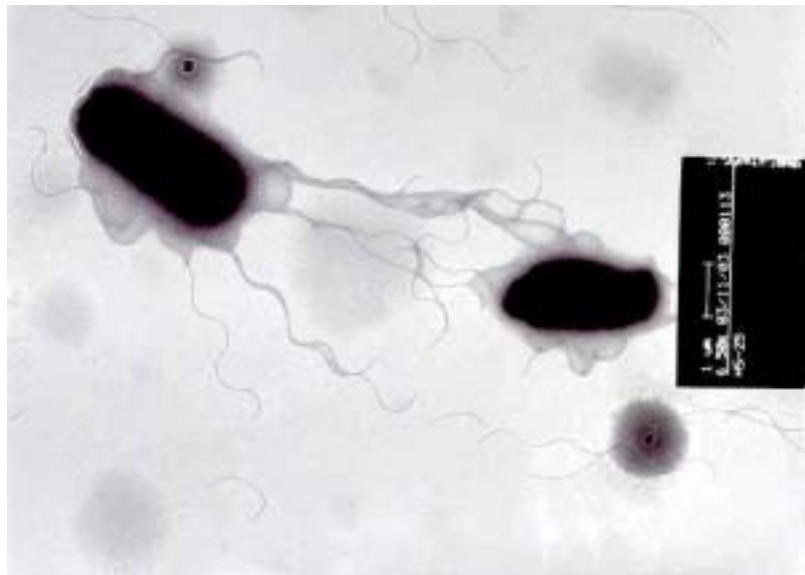


Fig. 3-2-19. Transmission electron micrography of the strain HS-25 from 18 hrs on LB broth medium. Scale bar was 1 μm .

Table 3-2-22. Morphological and biochemical characteristics of the bacterium HS-25 isolated from traditional *Doenjang*

Characteristics	Reaction	Characteristics	Reaction
Morphology shape	Rod	N-Acetyl-glucosamine	-
Gram stain	+	Amygdalin	-
Cell dimension(μm)	0.5~0.8×3~5	Oxidase	-
Catalase	+	Esculin	+
Spore	+	Salicin	+
Flagellum	+	Cellobiose	+
Control	-	Maltose	+
Glycerol	+	Lactose	-
Erythritol	-	Melibiose	+
D-Arabinose	-	Sucrose	+
L-Arabinose	+	Trehalose	+
Ribose	+	Inulin	+
D-Xylose	+	Melezitose	-
L-Xylose	-	Raffinose	+
Adonitol	-	Starch	+
β-Methyl-D-xyloside	-	Glycogen	+
Galactose	-	Xylitol	-
Glucose	+	Gentiobiose	-
Fructose	+	D-Turanose	-
Mannose	+	D-Lyxose	-
Sorbose	-	D-Tagatose	-
Rhamnose	-	D-Fucose	-
Dulcitol	-	L-Fucose	-
Inositol	+	D-Arabitol	-
Mannitol	+	L-Arabitol	-
Sorbitol	+	Gluconate	-

+, Positive reaction ; -, Negative reaction

이상의 결과를 토대로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 준하여 동정한 결과 *Bacillus*속인 것으로 추정되었으며, <표 3-2-22>의 API kit(API, France)를 사용한 당 발효실험의 결과를 ATB indentification program에 입력하여 분석한 결과 분리균 HS-25 균주는 98% 정도 *Bacillus subtilis*와 유사한 것으로 판명되었다. 이상의 결과로 본 연구에서 최종 분리 선정된 항균미생물을 *Bacillus subtilis* HS-25로 명명하였다.

3) 박테리오신 생산을 위한 최적 조건

가) 최적 배지조건

각종 배지의 성분은 미생물의 생육 및 생산물의 생산에 있어 중요한 요인으로 작용하기 때문에 분리한 *Bacillus subtilis* HS-25의 최적배지조성을 조사하였다.

① 탄소원 종류의 영향

GY기본배지에 탄소원 15종을 각각 1%(w/v)씩 첨가하여 배양한 결과는 <표 3-2-23>과 같다. 전체적으로 탄소원을 첨가한 경우가 탄소원을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 균주의 생육이 왕성하였으나, sorbitol, mannitol, xylose 및 maltose 등은 분리균주의 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 탄소원으로는 soluble starch, cellobiose 및 raffinose 등의 첨가 순으로 잘 생육하였으며, 이들 15종류의 탄소원 첨가에 따른 항균활성은 soluble starch, cellobiose 및 raffinose 등을 첨가한 시험구에서 유해미생물에 대하여 매우 높은 항균활성을 나타내었다. 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* HS-25균주의 항균활성은 균의 생육과 깊은 관계가 있는 것으로 판단되었다. 또한 Raffinose를 첨가한 시험구에서 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 생육이 왕성하다는 것은 대두 중에 비 소화성당으로 존재하는 raffinose를 분해할 수 있는 galactosidase 및 invertase의 분비력이 우수한 것으로 사료된다.

② 탄소원 농도의 영향

Bacillus subtilis HS-25균의 생육이 가장 왕성하고 높은 항균활성을 나타내는 soluble starch, cellobiose, raffinose의 3종류 각 탄소원에 대한 첨가 농도를 검토하여 <그림 3-2-20> 및 <표 3-2-24>에 나타내었다. Soluble starch, cellobiose 및 raffinose의 첨가농도가 1%까지 증가함에 따라 균의 생육은 급격하게 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 완만하게 감소하는 현상을 나타내었다<그림 3-2-21>.

Table 3-2-23. Effect of various carbon sources on antibacterial activity of culture broth of the isolated *Bacillus* sp. HS-25

Carbon sources	Cell growth	Antibacterial activity(mm) ¹⁾		
		A-8 ²⁾	A-12	A-25
Control	0.467	9.05	10.00	9.50
Glucose	0.716	11.85	10.34	10.05
Sorbitol	0.481	10.50	10.10	10.86
Mannitol	0.435	10.32	9.65	9.27
Soluble starch	1.350	15.50	14.52	14.70
Xylose	0.469	10.23	9.75	10.15
Maltose	0.576	11.46	11.64	10.85
Lactose	0.552	9.45	10.00	10.35
Fructose	0.738	10.85	10.25	11.05
Arabinose	1.138	13.75	13.05	13.45
Cellobiose	1.330	15.30	14.50	14.10
Raffinose	1.254	14.50	15.90	14.50
Rhamnose	1.078	13.55	13.95	13.85
Mannose	0.742	11.75	11.35	11.70
Sucrose	0.830	11.25	11.00	9.65
Galactose	0.974	10.00	11.80	11.20

¹⁾Size of clear zone and inhibitory effect of culture broth of the isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method. ²⁾Tested strains = A-8, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; A-25 ; *Pro. mirabilis* KCTC-2433.

E. coli, *Sta. aureus* 및 *Pro. mirabilis*에 대한 항균활성도 균의 생육과 마찬가지로 대조구에 비하여 3종류의 탄소원을 1% 농도까지 첨가함에 따라 급격하게 증가하였으나 그 이상의 첨가 농도에서는 거의 변화가 없거나 감소하는 현상을 나타내었다<표 3-2-24>. 탄소원의 첨가 농도 검토를 행한 soluble starch, cellobiose 및 raffinose 중에서 soluble starch 첨가 시험구가 다른 시험구에 비하여 항균활성은 비슷하게 나타났으나 균의 생육이 약간 양호한 것으로 나타났다.

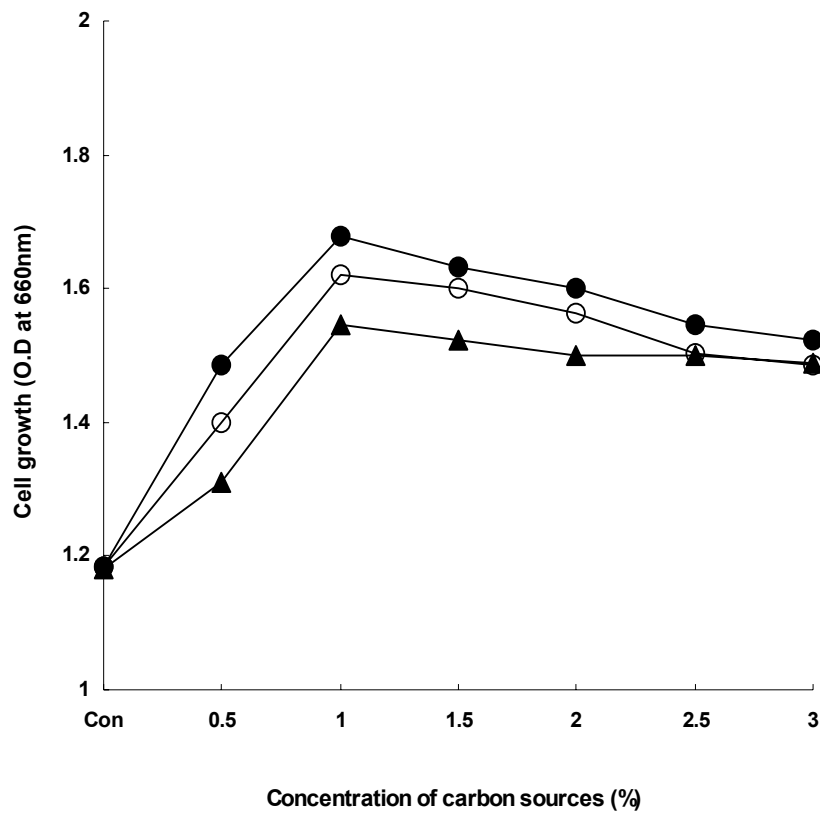


Fig. 3-2-20. Effect of concentration of carbon sources on the growth of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25.

●-●, Soluble starch ; ○-○, Cellobiose ; ▲-▲, Raffinose

Table 3-2-24. Effect of concentrations carbon sources on antibacterial activity of culture broth of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25

Carbon sources	Concentration	Antibacterial activity(mm) ¹⁾		
		A-8 ²⁾	A-12	A-25
Control	—	9.05	10.00	9.50
Soluble starch	0.5	11.50	10.90	10.50
	1.0	15.60	14.70	14.90
	1.5	15.50	14.70	14.70
	2.0	15.50	14.50	15.00
	2.5	14.50	14.00	14.70
	3.0	13.50	12.00	15.00
Cellobiose	0.5	11.20	10.50	10.00
	1.0	15.30	14.00	14.50
	1.5	15.50	14.50	14.00
	2.0	15.00	14.00	14.00
	2.5	12.00	13.00	11.50
	3.0	11.50	11.00	10.00
Raffinose	0.5	10.50	11.50	10.50
	1.0	14.50	15.50	14.50
	1.5	15.00	15.50	15.00
	2.0	15.00	15.00	14.00
	2.5	13.50	12.00	11.50
	3.0	11.00	10.50	10.00

¹⁾Size of clear zone and inhibitory effect of culture broth of the isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method. ²⁾Tested strains = A-8, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; A-25, *Pro. mirabilis* KCTC-2433.

③ 질소원 종류의 영향

기본배지에 1%의 soluble starch를 첨가한 후 10종류의 질소원을 각 0.5% 농도로 첨가하고 분리균주를 접종하여 배양한 결과는 <표 3-2-25>와 같다. 대조구는 질소원을 첨가하지 않고 배양한 시험구를 사용하였다. 분리균의 생육은 대조구에 비하여 질소원을 첨가한 각 시험구에서 양호하였으며, 질소원 중에서도 무기태 질소보다는 유기태 질소를 첨가하였을 때가 생육이 양호하고 항균활성이 높게 나타났다. 유기태 질소 중에서도 yeast extract와 peptone을 첨가하였을 때 균체의 생육이 양호하였다. *E. coli*, *Sta. aureus* 및 *Pro. mirabilis*의 유해미생물에 대한 항균활성도 다른 시험구에 비하여 높게 나타났다.

Table 3-2-25. Effect of various nitrogen sources on antibacterial activity of culture broth of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25

Nitrogen sources	Cell growth	Antibacterial activity(mm) ¹⁾		
		A-8 ²⁾	A-12	A-25
Control	1.312	14.90	14.00	14.50
NH ₄ Cl	1.558	14.90	15.45	15.50
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.434	14.45	14.00	14.85
NH ₄ NO ₃	1.431	14.05	14.55	14.75
NaNO ₃	1.539	15.55	15.00	15.50
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	1.474	14.95	14.40	14.70
Malt extract	1.587	16.10	15.20	15.50
Yeast extract	1.807	16.90	16.50	16.90
Asparagine	1.623	15.85	15.00	15.55
Peptone	1.816	16.70	15.20	16.50

¹⁾Size of clear zone and inhibitory effect of culture broth of the isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method. ²⁾Tested strains = A-8, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; A-25, *Pro. mirabilis* KCTC-2433.

④ 질소원 농도의 영향

Bacillus subtilis HS-25균주가 가장 잘 이용하는 질소원으로 yeast extract와 peptone을 선정하고 이들 성분의 최적 첨가 농도를 조사하여 균의 생육은 <그림 3-2-21>에, 항균활성은 <표 3-2-26>에 나타내었다. Yeast extract 및 peptone을 단독으로 첨가하는 것 보다 2종류의 성분을 혼합하여 첨가한 시험구에서 균의 생육이 가장 왕성하였다. <표 3-2-26>은 각 성분의 첨가농도에 따른 항균활성을 나타낸 것으로 yeast extract와 peptone을 단독으로 첨가하는 것 보다 두 성분을 각각 0.5%씩 혼합 첨가한 시험구에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 또한 yeast extract의 경우는 첨가농도를 증가하여도 항균활성의 변화가 거의 일어나지 않았으나 peptone의 경우는 0.5% 이상의 첨가농도에서 급격하게 항균활성이 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* HS-25 균주를 배양할 때 질소원으로서 yeast extract와 peptone을 각각 0.5%씩 혼합하여 첨가하였다.

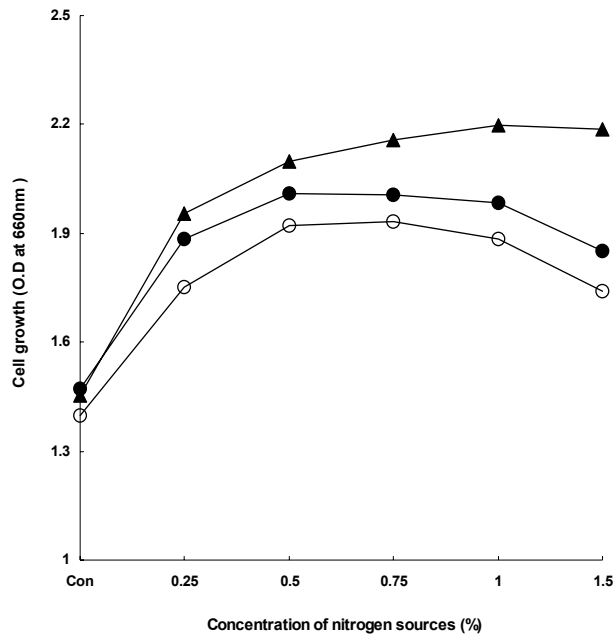


Fig. 3-2-21. Effect of concentration of nitrogen sources on the growth of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25.

●-●, Yeast extract ; ○-○, Peptone ; ▲-▲, Yeast extract+Peptone (1:1)

Fig. 3-2-26. Effect of concentrations nitrogen sources on antibacterial activity of culture broth of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25

Nitrogen sources	Concentration	Antibacterial activity(mm) ¹⁾		
		A-8 ²⁾	A-12	A-25
Yeast extract	Con.	14.50	14.00	14.50
	0.25	16.00	15.50	16.00
	0.5	16.50	16.00	16.20
	1.0	16.90	15.35	15.90
	1.5	16.90	15.35	15.90
Peptone	0.25	16.00	15.00	15.50
	0.5	16.00	15.50	16.20
	1.0	12.50	10.50	11.00
	1.5	11.90	9.90	9.00
Yeast extract + Peptone(1 : 1)	0.25	15.50	15.50	16.00
	0.5	16.50	15.50	16.50
	1.0	17.50	16.70	17.00
	1.5	17.50	17.00	17.00

¹⁾Size of clear zone and inhibitory effect of culture broth of the isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method. ²⁾Tested strains = A-8, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; A-25, *Pro. mirabilis* KCTC-2433.

⑤ 무기염의 영향

Bacillus subtilis HS-25 균주의 생육 및 항균활성에 미치는 무기염의 영향을 검토하기 위하여 soluble starch 1%와 yeast extract 및 peptone을 각각 0.5% 농도로 첨가한 후 13종류의 각종 무기염을 각각 0.05%농도로 첨가하여 배양시킨 결과를 <표 3-2-27>에 나타내었다. 전반적으로 무기염의 첨가는 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 생육 및 항균활성에 큰 영향은 미치지 못하였으나 MgCl₂·6H₂O를 비롯한 몇몇의 무기염 첨가 시험구에서 약간 생육이 양호하였으며, 유해미생물에 대한 항균활성도 다른 시험구에 비하여 약간 높게 나타났다. 반면 HgCl₂, CoCl₂·6H₂O, ZnSO₄·7H₂O 및 ZnCl 등의 무기염은 오히려 균의 생육을

억제하였으며, 유해미생물에 대한 항균활성도 거의 나타나지 않았다. 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 배양 및 항균활성 증가를 위하여 배지에 첨가하는 무기염은 0.05%의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 로 선정하였다.

Table 3-2-27. Effect of various inorganic salts on the growth of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25

Nitrogen sources	Cell growth	Antibacterial activity(mm) ¹⁾		
		A-8 ²⁾	A-12	A-25
Control	2.051	17.50	16.70	17.00
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.197	10.50	9.50	9.85
KH_2PO_4	2.058	17.50	17.00	17.20
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.103	17.50	17.00	17.50
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2.544	19.50	18.00	19.00
$HgCl_2$	0.134	-	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.701	18.00	17.00	17.50
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.137	19.00	18.00	17.50
NaCl	2.085	18.50	18.00	18.50
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.147	-	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.169	-	-	-
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	2.102	18.00	18.50	17.50
K_2HPO_4	2.087	18.00	18.00	17.50
$ZnCl_2$	0.278	-	-	-

¹⁾Size of clear zone and inhibitory effect of culture broth of the isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method. ²⁾Tested strains = A-8, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; A-25, *Pro. mirabilis* KCTC-2433

나) 최적 배양조건

미생물의 배양환경은 그 미생물의 생육 및 물질생산에 중요한 요인으로 작용하기 때문에 *Bacillus subtilis* HS-25 항균미생물의 최적 배양조건을 조사하였다.

① 배양 온도의 영향

균주의 배양온도가 *Bacillus subtilis* HS-25의 생육 및 박테리오신의 생산에 미치는 영향을 검토하여 <그림 3-2-22>에 나타내었다. 배양온도를 15℃~55℃의 범위로 변화시키면서 24시간 180 rpm으로 진탕 배양한 결과 미생물의 생육은 25℃ 이하와 45℃ 이상의 배양온도에서 생육이 급격히 저하하였으나 25℃~45℃까지의 온도범위에서는 생육이 왕성하였다. 항균활성은 *Pro. mirabilis*에 대하여 20℃~45℃의 배양온도에서 거의 대등한 활성을 나타내었으며, 50℃의 배양온도에서는 약 85%의 항균활성을 유지하였고, 15℃의 배양온도에서는 약 60%, 55℃의 배양온도에서는 약 65%의 활성을 나타내었다. *E. coli*, *Sta. aureus*, *Sal. enteritidis* 및 *Kle. pneumoniae*의 5균주에 대한 결과도 유사한 경향을 나타내었다.(결과 미제시) 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 생육은 배양온도에 크게 영향을 받으나 박테리오신의 생산은 배양온도에 그다지 영향을 받지 않는 것으로 판단할 수 있다. 따라서 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 배양온도는 생육에 초점을 맞추어 35℃~40℃로 결정하였다.

② 배지의 초기 pH 영향

Bacillus subtilis HS-25 균주의 생육 및 박테리오신 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하여 <그림 3-2-23>에 나타내었다. 배지의 초기 pH를 pH 3.5~10.5범위로 조절하여 35℃의 최적 배양온도에서 배양한 결과 초기 pH 3.5에서 4.5까지는 생육이 급격하게 증가하였으나, pH 4.5~9.5까지는 아주 왕성한 생육상태를 나타내어 생육가능 초기 pH 범위는 상당히 넓은 것으로 판단되었다.

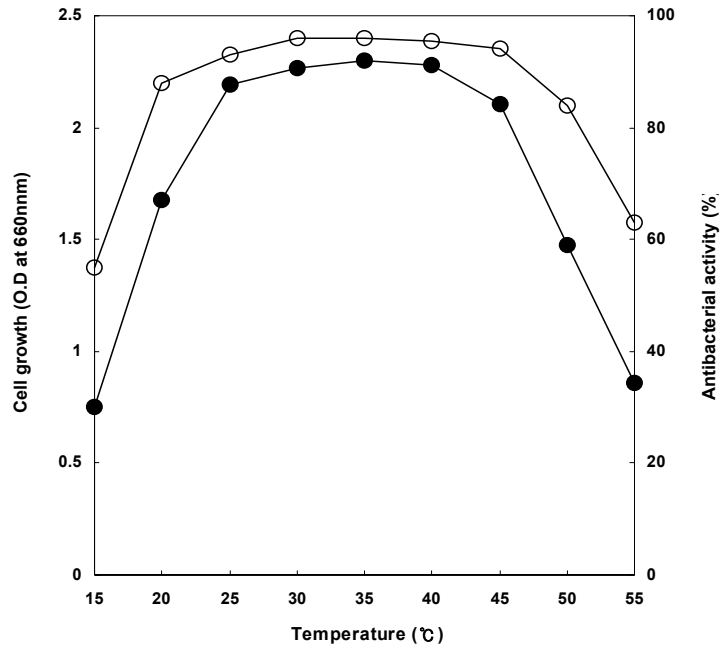


Fig. 3-2-22. Effect of temperature on the growth(●) and antibacterial activity(○) of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25.

*Pro. mirabilis*에 대한 항균활성은 배지의 초기 pH를 pH 4.5에서 배양하였을 경우는 약 10%만이 나타내었으나 pH 5.5에서 배양하였을 때는 60%, pH 6.5에서 배양하였을 때는 80% 정도의 활성을 나타내어 배지의 초기 pH가 산성에서 중성 측으로 변화함에 따라 항균활성은 거의 직선적으로 증가하였다. *E. coli*, *Sta. aureus*, *Sal. enteritidis* 및 *Kle. pneumoniae*의 5균주에 대한 결과도 유사한 경향을 나타내었다.(결과 미제시) 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 생육은 약산성~약알칼리성에서 양호하였고, 항균활성은 산성측보다는 중성~알칼리의 범위에서 높게 나타났다. 따라서 이하의 실험에서는 균의 생육과 항균활성을 동시에 고려하여 배지를 제조 할 때 pH를 조절하지 않은 pH 7.5로 하였다.

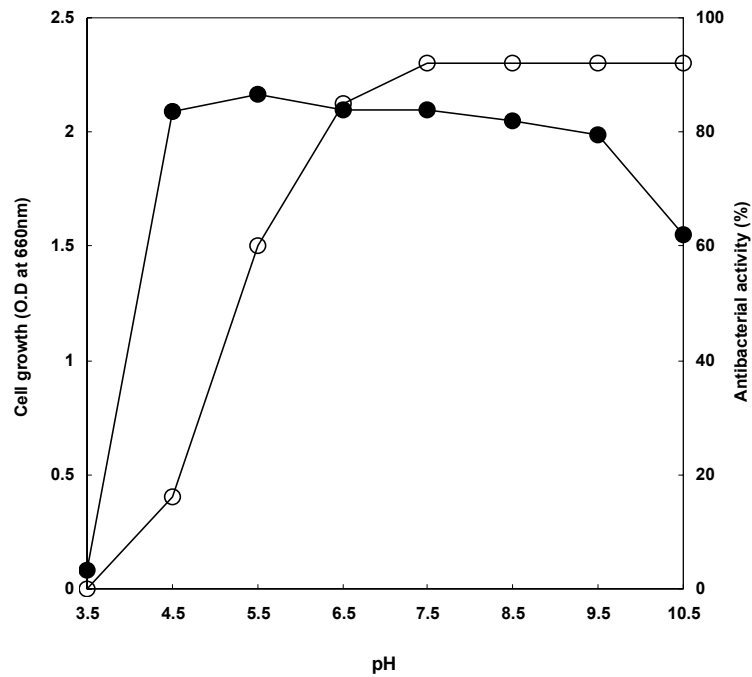


Fig. 3-2-23. Effect of pH on the growth(●) and antibacterial activity(○) of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25.

③ 진탕 속도의 영향

진탕 속도가 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 생육 및 박테리오신의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 최적배지에 분리균의 전 배양액을 1%씩 접종하고 35°C에서 80 rpm, 120 rpm, 160 rpm, 200 rpm 및 240 rpm으로 24시간 배양한 결과를 <그림 3-2-24>에 나타내었다. 진탕 속도가 80 rpm에서 120 rpm까지 증가함에 따라 균의 생육은 직선적으로 급격히 증가하였으나 그 이상의 진탕 속도에서는 완만하게 균체 증식이 이루어졌다. 그리고 *Pro. mirabilis*에 대한 항균활성은 진탕 속도에 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, 진탕 속도가 80 rpm에서 160 rpm까지 증가하여도 아주 완만하게 증가하여 160 rpm에서 약 90%의 항균활성을 유지하였다. 이상의 결과로 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 경우, 진탕 속도가 생육에는 크게 영향을 미치지 않지만 박테리오신의 생산에는 거의

영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 따라서 *Bacillus subtilis* HS-25균주를 배양할 때 진탕 속도는 균체증식 및 박테리오신의 생산을 고려하여 180 rpm정도가 적당한 것으로 판단하였다.

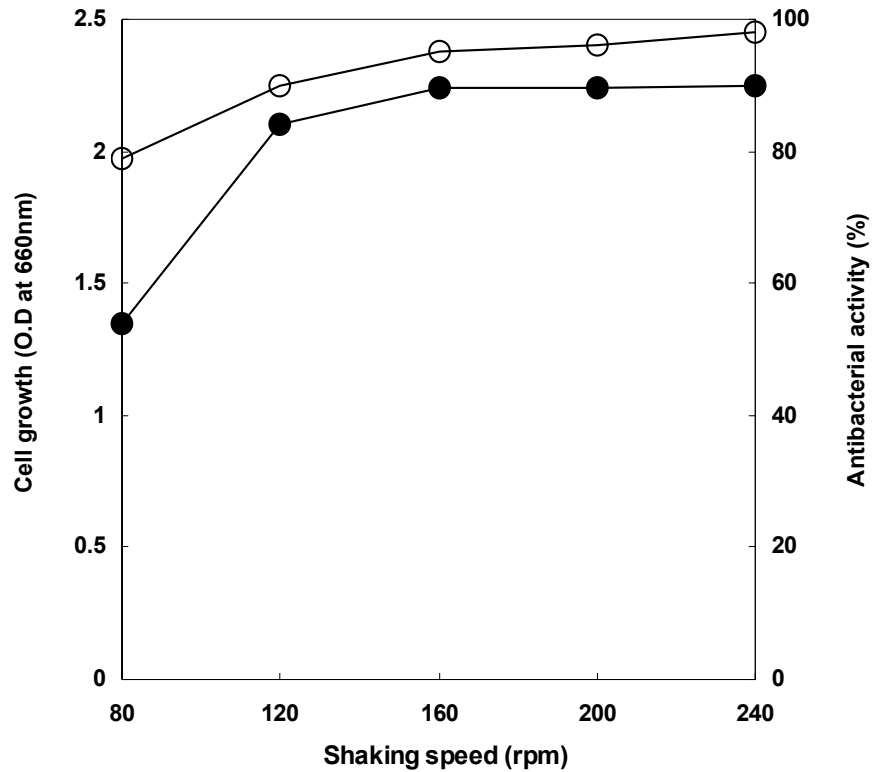


Fig. 3-2-24. Effect of shaking speed on the growth(●) and antibacterial activity(○) of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25.

④ 배양시간에 따른 박테리오신의 생산

지금까지의 연구결과에서 얻어진 최적 배지조성 및 배양조건<표 3-2-28>으로 *Bacillus subtilis* HS-25 균주를 배양하면서 배양시간에 따른 균주의 성장 및 박테리오신의 생산정도를 조사하여 <그림 3-2-25> 및 <그림 3-2-26>에 나타내었다. <그림 3-2-25>은 *Bacillus subtilis* HS-25의 생육곡선을 나타낸 것으로 배양 3 hr까지는 유도기, 그 이후부터 18hr째까지 균의 증식이 급격하게 이

루어지는 대수증식기로 접어들어 전형적인 S자형의 생육곡선을 나타내었다. <그림 3-2-26>는 각 배양시간에 따른 항균활성의 결과인데 배양 12 hr~48 hr째까지는 매우 높은 항균활성을 나타내었고, 배양 60 hr 이후부터는 항균활성이 급격하게 떨어져 배양 72 hr째에는 거의 활성이 나타나지 않았다. 그러나 *E. coli* 및 *P. mirabilis*의 유해미생물에 대하여 배양 84 hr째의 시료에서도 약 30%의 항균활성을 나타내었다. 이상의 결과로 본 연구에서 분리한 *Bacillus subtilis* HS-25 균주는 대수증식기 중기 이후부터 박테리오신을 생산하는 증식비관련형임을 알 수 있으며, 박테리오신 생산을 위한 배양시간은 24~36 hr 정도가 적당한 것으로 판단되었다.

Table 3-2-28. Medium composition and cultural conditions of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25 of antibacterial substance

Medium composition	Soluble starch	1%
	Yeast extract	0.5%
	Peptone	0.5%
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.05%
Cultural conditions	pH range of growth	pH 4.5~9.5
	Optimum pH	pH 7.5
	Temp. range of growth	25~45°C
	Optimum temperature	35°C
	Shaking speed	180 rpm

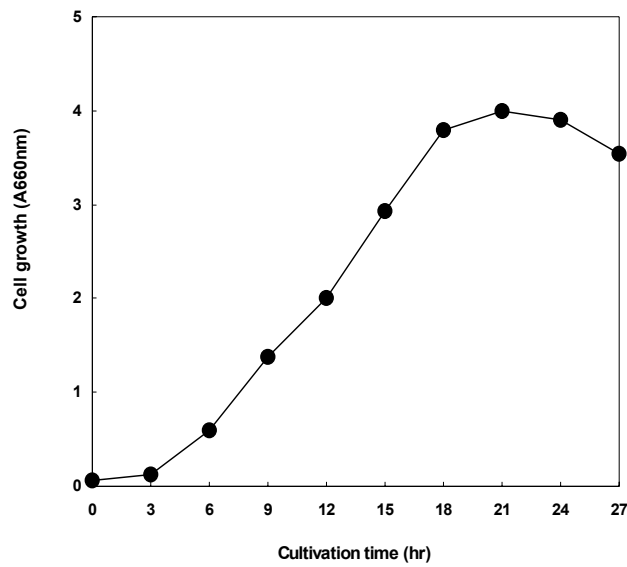


Fig. 3-2-25. Growth curve of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25 on SY broth medium for 27 hrs.

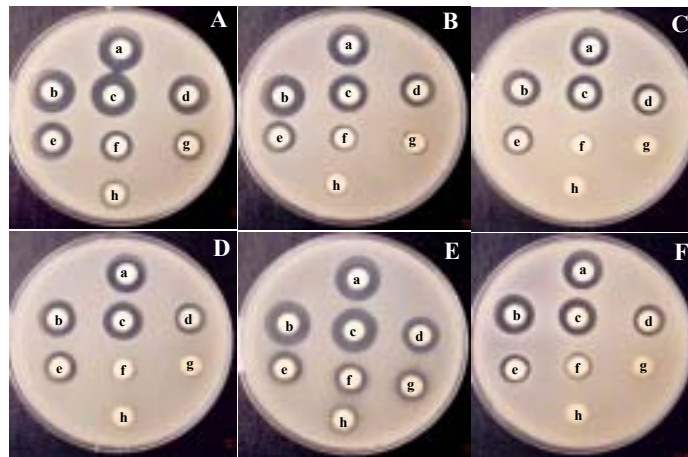


Fig. 3-2-26. Antibacterial activity of the culture broth of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25 cultured for 96 hrs against food poisoning and pathogenic bacteria.

A, *E. coli* ATCC-25922 ; B, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; C, *Sal. enteritidis* KCCM-1202 ; D, *Kle. pneumoniae* KCCM-11319 ; E, *Pro. mirabilis* KCTC-2433 ; F, *V. parahaemolyticus*. a, 12hr ; b, 24hr ; c, 36hr ; d, 48hr ; e, 60hr ; f, 72hr ; g, 84hr ; h, 96hr.

4) 박테리오신 생산 균주와 활성비교

본 연구에서 분리한 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 항균활성을 이미 항균활성이 높은 미생물로 알려져 있는 *B. natto*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* 및 *B. megaterium* SMY 212 균주를 구입하여 동일조건에서 액체배양 한 후 원심분리 하여 얻은 상정액을 membrane filter로 여과한 다음 항균활성을 비교 검토하여 <표 3-2-29>에 나타내었다. *E. coli*를 비롯한 6종류의 유해미생물에 대하여 *Bacillus subtilis* HS-25균주는 아주 높은 항균활성을 나타내었으나 *B. subtilis* 및 *B. licheniformis*는 거의 항균활성을 나타내지 않았으며, *B. natto*와 *B. megaterium* SMY 212 균주는 약간의 항균활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 항균미생물을 배양하는 조건, 배지조성 및 항균활성을 나타내는 대상 미생물의 종류에 따른 차이 때문으로 생각된다. 특히 검정콩 청국장을 제조 할 때 *B. megaterium* SMY 212을 접종하여 만든 청국장의 추출물은 *Streptococcus mutans*, *B. licheniformis*, *Brevibaeterium linens* 및 *Pro. vulgaris*에 대하여 높은 항균활성을 나타낸 것으로 보고한 내용과 배양액 자체가 나타내는 항균활성에 약간의 차이가 있었다.

Table 3-2-29. Comparison of antibacterial activities of antibacterial substance producing bacteria

Antibacteria	Antibacterial activity(mm) ¹⁾					
	A-8 ²⁾	A-12	A-14	A-18	A-25	A-26
<i>Bacillus</i> sp. HS-25	21	18	19	18	20	17
<i>B. natto</i>	14	11	13	12	10	12
<i>B. subtilis</i>	10	9	9	9	9	9
<i>B. licheniformis</i>	12	10	10	9	10	10
<i>B. megaterium</i> SMY212	13	12	12	11	9	13

¹⁾Size of clear zone and inhibitory effect of culture broth of the isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method.²⁾Tested strains = A-8, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; A-14, *Sal. enteritidis* KCCM-1202 ; A-18, *Kle. pneumoniae* KCCM-11319 ; A-25, *Pro. mirabilis* KCTC-2433 ; A-26, *V. parahaemolyticus*

5) 분리 균주가 생산하는 박테리옌 특성

가) 열 안정성

Bacillus subtilis HS-25 균주가 생산하는 박테리옌의 열 안정성을 조사하기 위하여 균체를 제거한 배양 상정액을 100℃에서 5분~25분 동안 열처리한 후 잔존하는 항균활성을 측정하여 <그림 3-2-27>에 나타내었다. 5분 및 10분 동안 열처리한 a 및 b시험구는 열처리하지 않은 대조구(f)의 항균활성과 비교하여 조금도 떨어지지 않는 대등한 항균활성을 유지하였다. 그리고 100℃에서 25분 동안 열처리하여도 모든 시험구에서 항균활성은 완전히 실패 되지 않았으며, 특히 *E. coli*와 *Pro. mirabilis*의 유해 미생물의 경우는 약 70% 이상의 항균활성이 유지되었다<그림 3-2-27-A 및 E의 e). 이와 같은 결과는 *Pediococcus pentosaceus* FB61이 생산한 pediocin A의 물질은 100℃에서 10분간 열 처리하면 단지 5% 정도의 항균활성만이 유지되었다는 결과와 비교할 때 상당히 열 안정성이 높은 것으로 판단되었다.

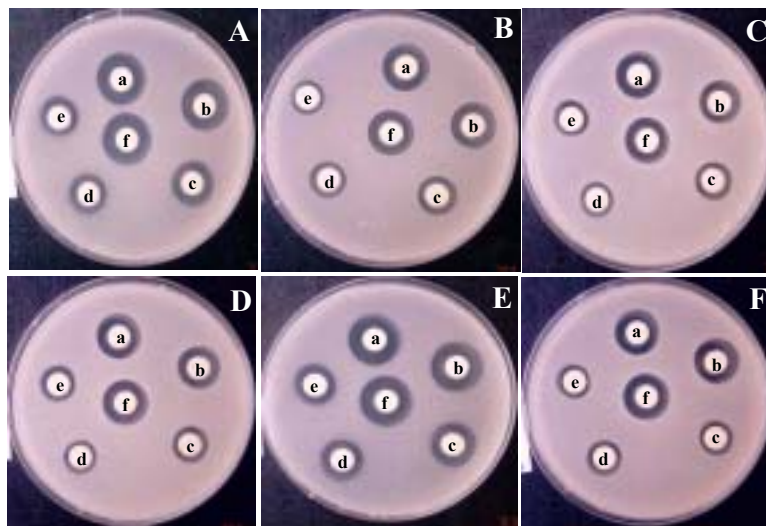


Fig. 3-2-27. Heat stability of the supernatant of culture broth obtained from the isolated *Bacillus subtilis* HS-25.

The supernatant was heated at 100℃ for 0 min(f), 5 min(a), 10 min(b), 15 min(c), 20 min(d) and 25 min(e). A, *E. coli* ATCC-25922 ; B, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; C, *Sal. enteritidis* KCCM-1202 ; D, *Kle. pneumoniae* KCCM-11319 ; E, *Pro. mirabilis* KCTC-2433 ; F, *V. parahaemolyticus*.

나) pH 안정성

Bacillus subtilis HS-25이 생산하는 박테리오신의 pH 안정성을 조사하여 <그림 3-2-28>에 나타내었다. 최적 배양조건에서 배양한 배양용액을 원심분리하여 얻은 상정액의 pH를 pH 4.5~12.0까지 조정하여 4℃에서 2시간 방치 후, pH 7.42로 중화시켜 잔존하는 항균활성을 pH를 조정하지 않은 대조구(pH 7.42)의 항균활성과 비교 검토하였다.

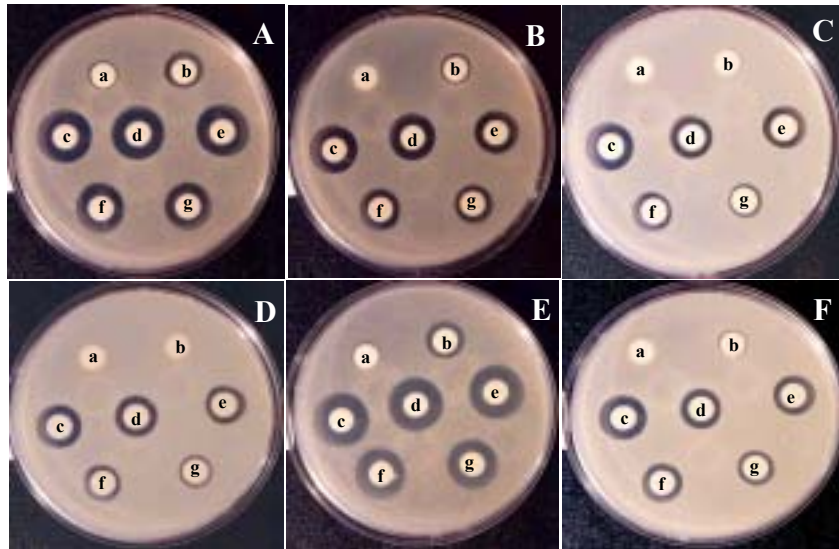


Fig. 3-2-28. pH stability of the supernatant of culture broth obtained from the isolated *Bacillus subtilis* HS-25.

A, *E. coli* ATCC-25922 ; B, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; C, *Sal. enteritidis* KCCM-1202 ; D, *Kle. pneumoniae* KCCM-11319 ; E, *Pro. mirabilis* KCTC-2433 ; F, *V. parahaemolyticus*. The supernatant was heated for 2 hrs at pH 4.5(a), 5.0(b), 7.42(c), 10.5(d), 11.0(e), 11.5(f) and 12.0(g), and then was adjusted to pH 7.42.

그 결과 *Bacillus subtilis* HS-25 균주가 생산하는 박테리오신은 모든 유해미생물에 대하여 pH 4.5 및 5.0의 산성 측에서는 거의 항균활성을 나타내지 않았지만, pH 7.42~11.5까지의 알칼리성 범위에서는 매우 안정하게 항균활성을 유지하였다. 이상의

결과로 본 연구에서 분리한 *Bacillus subtilis* HS-25 균주가 생산하는 항균물질은 산성 조건보다는 알칼리성 조건에서 더욱 안정한 것으로 확인되었다.

다) 최소저해농도

Bacillus subtilis HS-25 균주의 항균미생물이 유해미생물의 생육저해에 미치는 최소저해농도(MIC)를 검토하여 Table 3-12에 나타내었다. <표 3-2-30>에서 보는 바와 같이 고체배지에서 최소저해농도는 *E. coli*가 5 mg/ml로 가장 낮게 나타났으며, *Pro. mirabilis*는 7.5 mg/ml, *Sta. aureus*, *Sal. enteritidis*, *Kle. pneumoniae* 및 *V. parahaemolyticus* 균주에서는 15 mg/ml를 나타내었다. 따라서 *Bacillus subtilis* HS-25 균주가 생산하는 박테리오신은 낮은 농도로도 유해미생물의 생육을 저해시킬 수 있는 물질임이 밝혀져 식품보존제로서의 이용 가능성이 높은 것으로 생각되어진다.

Table 3-2-30. Minimum inhibition concentration(MIC) of antibacterial substances obtained from the isolated *Bacillus subtilis* HS-25 against food poisoning and pathogenic bacteria

Strains	Treated concentration (mg/ml)							0MIC (mg/ml)
	Con.	5	10	20	40	60	80	
<i>E. coli</i> ATCC-25922	+	-	-	-	-	-	-	5
<i>Sta. aureus</i> KCTC-1927	+	+	±	-	-	-	-	15
<i>Sal. enteritidis</i> KCCM-1202	+	+	±	-	-	-	-	15
<i>Kle. pneumoniae</i> KCCM-11319	+	+	±	-	-	-	-	15
<i>Pro. mirabilis</i> KCTC-2433	+	±	-	-	-	-	-	7.5
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+	±	-	-	-	-	15

+ ; Growth, ± ; Uncertain in growth, - ; No growth

라) 미생물의 형태 변화

Bacillus subtilis HS-25 균주가 생산한 박테리오신이 유해미생물의 형태변화에 미치는 영향의 검토는 *Bacillus subtilis* HS-25의 배양용액을 원심분리한 후 membrane filter로 여과한 여액을 사용하여 행하였다. 즉, 미리 배양하여 둔 유해미생물의 각 배양액과 *Bacillus subtilis* HS-25의 배양 여액을 1 : 1로 혼합한 후, 7시

간 동안 천천히 진탕 반응시킨 다음, 박테리옌을 처리하지 않은 대조구(I)와 처리한 시험구(II)를 주사전자현미경으로 관찰하여 <그림 3-2-29>에 나타내었다. A는 *E. coli*, B는 *Sal. enteritidis*, C는 *Pro. mirabilis*의 각 유해미생물에 *Bacillus subtilis* HS-25 균주가 생산한 항균물질을 처리한 것으로 대조구인 I은 완전한 균체의 형태를 유지하고 있는데 비하여 박테리옌을 처리한 시험구 II는 균체의 표면이 불규칙적이며, 타원형으로 변형되어 3 균주 모두 표층구조가 손상을 받아 심한 형태학적 변화를 관찰할 수 있었다. 이와 같은 현상은 *Bacillus subtilis* HS-25 균주의 배양 상정액에 의해 유해미생물의 세포벽 및 세포막의 기능이 파괴되었거나 용균현상이 일어나 유해미생물의 균체 성분이 누출된 것으로 생각되어 진다.

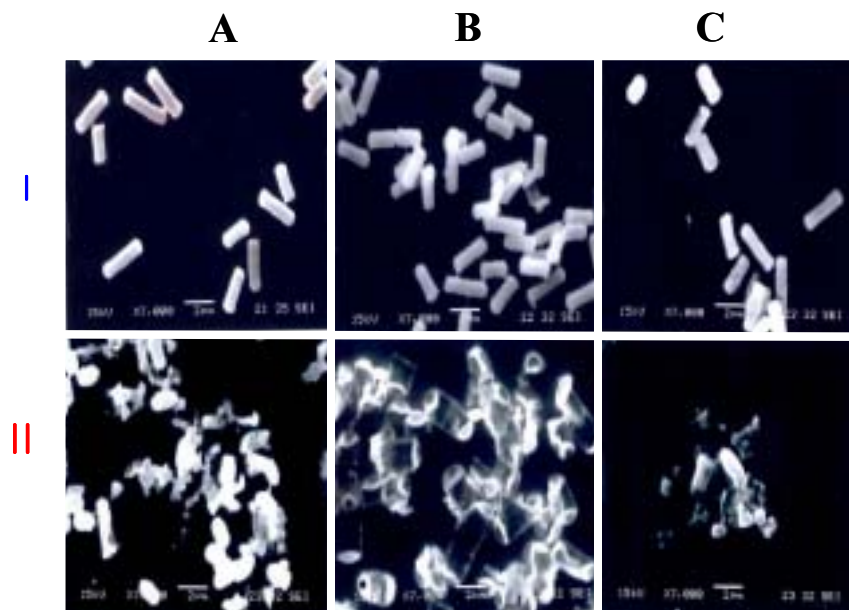


Fig. 3-2-29. Morphological change in *E. coli* ATCC-25922(A), *Sal. enteritidis* KCCM-1202(B) and *Pro. mirabilis* KCTC-2433(C) treated with the supernatant of culture broth obtained from the isolated *Bacillus subtilis* HS-25 by SEM.

I, Control ; II, Strains treated with supernatant.

마) 각종 단백질 분해효소에 대한 안정성

Bacillus subtilis HS-25 균주가 생산한 박테리오신이 단백질성 물질인지를 확인하기 위하여 *Bacillus subtilis* HS-25의 배양용액을 membrane filter로 여과한 다음 시판중인 protease, pancreatin, pepsin 및 papain을 각 200 units/ml씩 첨가하여 2시간 동안 처리한 후 잔존하는 항균활성을 검토한 결과는 <표 3-2-31>과 같다. 대조구는 각 효소를 용해할 때 사용한 완충용액을 동량 첨가하여 사용하였다. 효소처리를 하지 않은 대조구에서는 매우 높은 항균활성을 나타내었지만 protease, pancreatin, pepsin을 처리한 시험구에서는 모든 유해미생물에 대하여 전혀 항균활성이 나타나지 않았다. 그러나 papain을 처리한 시험구는 전혀 영향을 받지 않고 대조구의 활성과 동일한 항균활성을 나타내었다.

이러한 결과는 *Bacillus subtilis* HS-25균주가 생산한 박테리오신은 papain에 의해서는 분해되지 않지만 protease, pancreatin 및 pepsin의 효소에 의해서 완전히 분해되었기 때문에 유해미생물에 대하여 항균활성이 전혀 나타나지 않는 것으로 판단된다. 따라서 *Bacillus subtilis* HS-25 균주가 생산하는 박테리오신은 단백질성 항균물질임을 추측할 수 있으며, 식품보존제로서 사용될 경우 인체내에서 완전히 분해되어 무해할 것으로 판단된다.

Table 3-2-31. Effect of various enzyme on the inhibitory of bacteriocin produced by *Bacillus* sp. HS-25

Enzymes	Antibacterial activity(mm) ¹⁾					
	A-8 ²⁾	A-12	A-14	A-18	A-25	A-26
Control	21.50	19.00	18.50	18.50	19.50	17.00
Protease	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Pancreatin	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Pepsin	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Papasin	21.50	19.00	18.50	18.50	19.50	17.00

¹⁾Size of clear zone and inhibitory effect of culture broth of the isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method.²⁾Tested strains = A-8, *E. coli* ATCC-25922 ; A-12, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; A-14, *Sal. enteritidis* KCCM-1202 ; A-18, *Kle. pneumoniae* KCCM-11319 ; A-25, *Pro. mirabilis* KCTC-2433 ; A-26, *V. parahaemolyticus*

바) 박테리오신의 분리 및 정제

① 각종 용매 추출액의 항균활성

분리한 *Bacillus subtilis* HS-25 균주가 생산하는 박테리오신의 분리·정제는 유기용매의 극성증가 순에 따라 계통분획하여 얻은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물 층의 항균활성을 측정하여 <그림 3-2-30>에 나타내었다. *E. coli*, *Sal. enteritidis*, *Kle. pneumoniae* 및 *Pro. mirabilis*의 유해미생물에 대한 항균활성은 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 층의 분획물에서 뚜렷하게 나타났으며, 헥산과 물 층의 분획물에서는 활성이 전혀 나타나지 않았다.

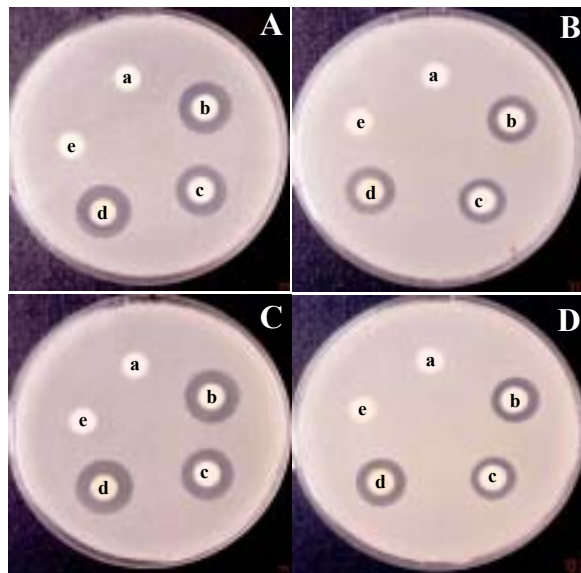


Table 3-2-30. Antibacterial activity of Hexane, CHCl_3 , EtOAc, BuOH and water fractions obtained from the culture broth of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25.

A, *E. coli* ATCC-25922 ; B, *Sal. enteritidis* KCCM-1202 ; C, *Kle. pneumoniae* KCCM-11319 ; D, *Pro. mirabilis* KCTC-2433. a, Hexane fraction ; b, CHCl_3 fraction ; c, EtOAc fraction ; d, BuOH fraction ; e, Water fraction.

이와 같이 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 층에서 공통적으로 높은 항균활성을 나타내는 것으로 보아 *Bacillus subtilis* HS-25 균주가 생산하는 박테리오신은 특정 용매에만 용해되는 것이 아니라 여러 종류의 용매에 용해되는 성분임을 추측할 수 있었다. 그리고 4종류의 유해미생물에 높은 항균활성을 나타낸 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물의 수율은 부탄올 층이 약 98%를 차지하여 이하의 실험은 부탄올 분획물의 항균성분만을 취하여 분리·정제를 행하였다.

② Silica gel column chromatography에 의한 활성물질의 분리

항균활성이 가장 강한 부탄올 분획물로부터 박테리오신을 분리정제하기 위하여 부탄올 분획물 9,400 mg을 silica gel column chromatography(Ø7 × 19 cm, 70~230 mesh, ASTM)를 행하여 얻은 50개의 subfraction을 TLC plate로 유사 박테리오신을 확인하여 최종 20개의 A그룹 분획물을 얻었다. 얻어진 A그룹의 분획물에 대한 항균활성을 측정하여 <그림 3-2-31>에 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이 A16 및 A17+A18 분획물에서 가장 높은 항균활성을 나타내었고, 또한 얻어진 박테리오신의 양도 가장 많았다.

Table 3-2-31. Antibacterial activity of each fractions separated from BuOH fraction by silica gel column chromatography

Fractions	Antibacterial activity(mm) ¹⁾		
	<i>E. coli</i> ATCC-25922	<i>Sta. aureus</i> KCTC-1927	<i>Pro. mirabilis</i> KCTC-2433
A1	—	—	—
A2+3	8.65	8.25	8.05
A4+5	—	—	—
A6	15.35	12.55	14.35
A7+8	11.05	10.75	11.75
A9+10	11.55	10.95	11.75
A11~14	13.95	13.55	15.05
A15	13.45	12.25	13.35
A16	14.65	13.35	14.95
A17+18	16.85	15.75	17.35

¹⁾Size of clear zone and inhibitory effect of culture broth of the isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method.

③ Sephadex gel column chromatography에 의한 활성물질의 분리

활성이 가장 높은 것으로 확인된 A그룹의 A17+A18 분획물을 모아 감압 농축한 후 이 농축액을 분자량에 따라 분리를 행하기 위하여 Sephadex column chromatography (Ø3 × 31 cm, Sephadex™ LH-20)를 행하여 얻은 50개의 subfraction을 TLC plate(CHCl₃ : MeOH = 4 : 1)로 유사 항균물질을 확인하여 최종 5개의 E그룹의 분획물을 얻었다(E1~E5). 얻어진 E그룹의 분획물에 대한 항균활성을 측정한 결과 E1 분획물에서 가장 높은 활성을 나타내었다<그림 3-2-31>.

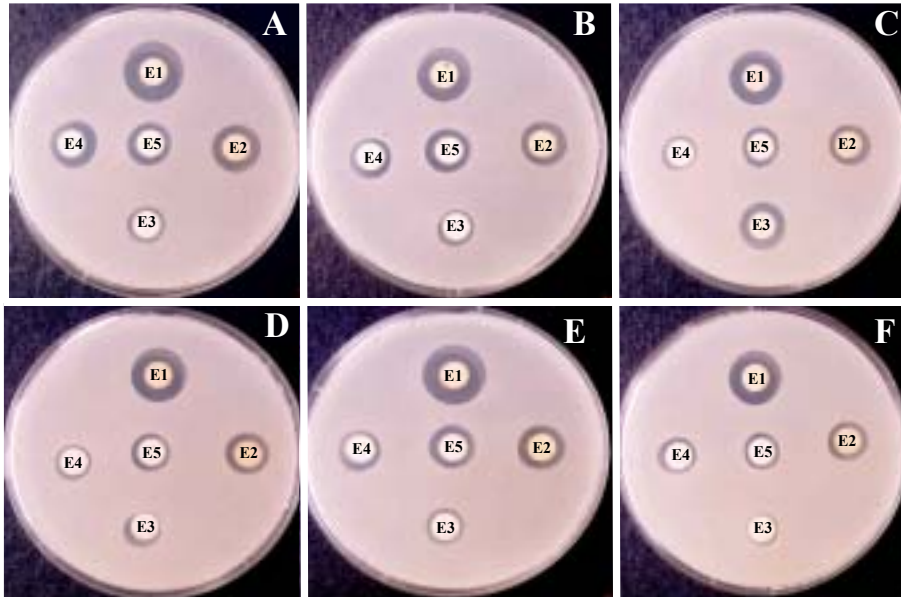


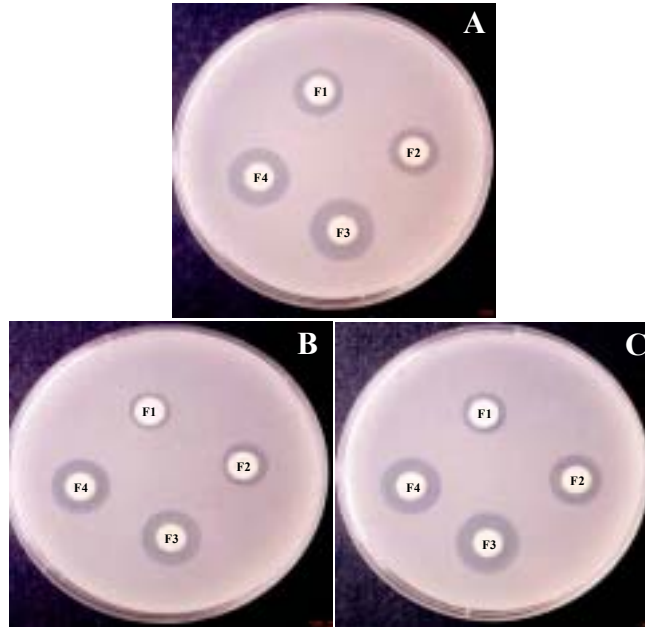
Fig. 3-2-31. Antibacterial activity of A17+18 fraction separated by silica gel column chromatography.

A, *E. coli* ATCC-25922 ; B, *Sta. aureus* KCTC-1927 ; C, *Sal. enteritidis* KCCM-1202 ; D, *Kle. pneumoniae* KCCM-11319 ; E, *Pro. mirabilis* KCTC-2433 ; F, *V. parahaemolyticus*. E1, E2, E3, E4 and E5 fractions were separated from A17 +A18 fraction of A group by Sephadex column chromatography.

④ MPLC에 의한 활성물질의 분리

Sephadex column chromatography를 행하여 항균성이 확인된 E그룹의 E1 분획물을 회수하여 감압 농축한 후 이 농축액을 단일물질로 순수분리하기 위하여 MPLC(pump 540, UV-10V, Yamazen co.,)를 실시한 결과는 <그림 3-2-32>과 같다. MPLC를 실시하여 얻

은 10개의 분획물을 TLC plate ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 2 : 1$)로 유사물질을 확인하여 최종 5개의 분획물 중 F그룹의 F3 분획물에서 가장 강한 항균활성이 확인되었다.



<Fig. 3-2-32> Antibacterial activity of E1 fraction separated by Sephadex column chromatography.

A, *E. coli* ATCC-25922 ; B, *Sal. enteritidis* KCCM-1202 ; C, *Pro. mirabilis* KCTC-2433. F1, F2, F3, and F4 fractions were separated from E1 fraction of E group by MPLC column chromatography.

⑤ Recyclic HPLC에 의한 활성물질의 분리

MPLC를 실시하여 항균성이 확인된 F3 분획물을 모아 감압 농축하고, 이 농축액을 다시 단일물질로 순수분리 하기 위하여 recyclic HPLC(LC 908, Japan Analytical Industry Co., LTD)를 행하였다. 여기에서 얻어진 10개의 G그룹 분획물을 TLC plate ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$)로 유사물질을 회수하여 최종 5개의 G그룹분획물을 얻어 항균활성을 paper disc법에 준하여 조사한 결과를 <그림 3-2-33> 및 <그림 3-2-34>와 같다. Recyclic HPLC를 실시하여 얻은 5개의 분획물을 유해미생물 중 가장 강한 활성을 보이는 *E. coli*, *Pro. mirabilis* 두 균주를 통해 확인한 결과 G그룹의 G3 및 G4 분획물에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

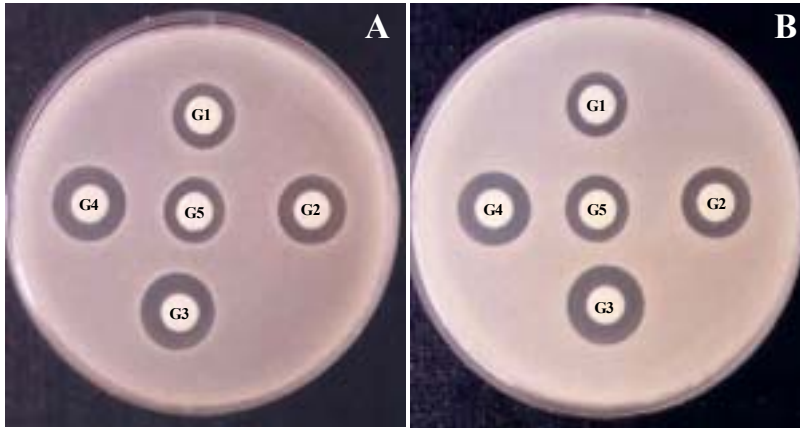


Fig. 3-2-33. Antibacterial activity of F3 fraction separated by MPLC chromatography.

A, *E. coli* ATCC-25922 ; B, *Pro. mirabilis* KCTC-2433. G1, G2, G3, G4 and G5 fractions were separated from F3 fraction of F group by recycle HPLC.

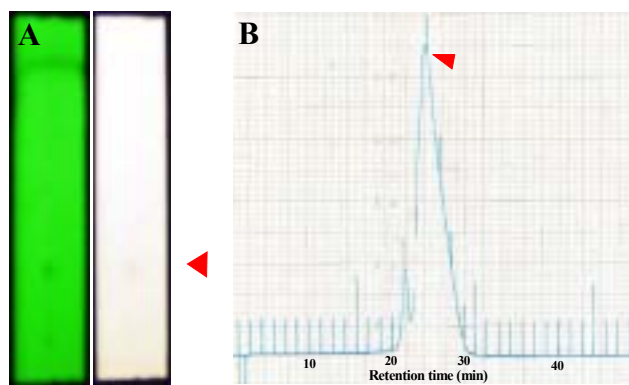


Fig. 3-2-34. Thin layer chromatogram(A) and recycle HPLC spectrogram(B) of the F3 fraction separated from culture supernatant of the isolated *Bacillus subtilis* HS-25 by recycle HPLC.

A : Developing solvent ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH} = 3 : 1$)

B : Eluent solvent ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH} = 9 : 1$), Flow rate (2.5/min), wavelength (250 nm).

5. 캡슐메주 제조를 위한 미생물의 고정화

가. 실험재료 및 방법

1) 사용균주와 배지 및 배양조건

제 3장 제 2절 <1. 메주 외층부 발효를 위한 곰팡이 선정>에 준한다.

2) 미생물고정화법을 이용한 캡슐메주의 관찰

고정화 기법을 이용하여 발효시킨 캡슐메주의 단면도는 <그림 3-2-1> 및 <그림 3-2-2>에 나타내었다. 캡슐메주를 제조할 때 메주의 내부에는 항균활성이 높은 *Bacillus subtilis* HS-25, 중간층에는 chitinase활성이 우수한 *Bacillus subtilis* SJ-61를 접종하고, 메주의 외부에는 곰팡이 및 버섯의 균사체를 액체배양하여 세밀하게 마쇄한 증자한 콩에 각각 혼합하여 피복시키고 세부과제의 연구방법에서 설명한 캡슐메주제조 방법과 동일하게 발효시켜 캡슐메주 외부표면의 곰팡이 및 버섯균사의 번식상태를 육안으로 관찰하였고, 또한 예리한 칼로 메주를 2등분으로 절단하여 내부의 발효상태 및 미생물의 번식상태를 육안으로 관찰하였다.

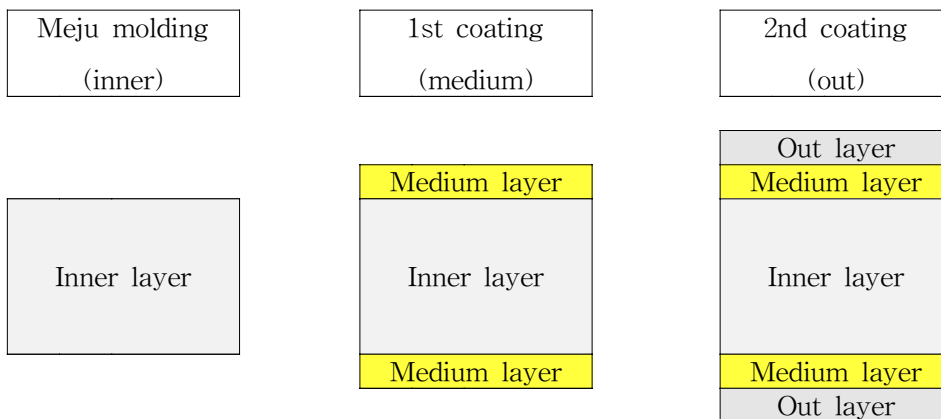


Fig. 3-2-1. Cross section of capsule type meju after coating process(1st step).

Inner layer, cooked soybean(coarse partical) ; Medium layer , cooked soybean(fine partical) + bacteria ; Outer layer, cooked soybean(fine partical) + mold or mushroom.

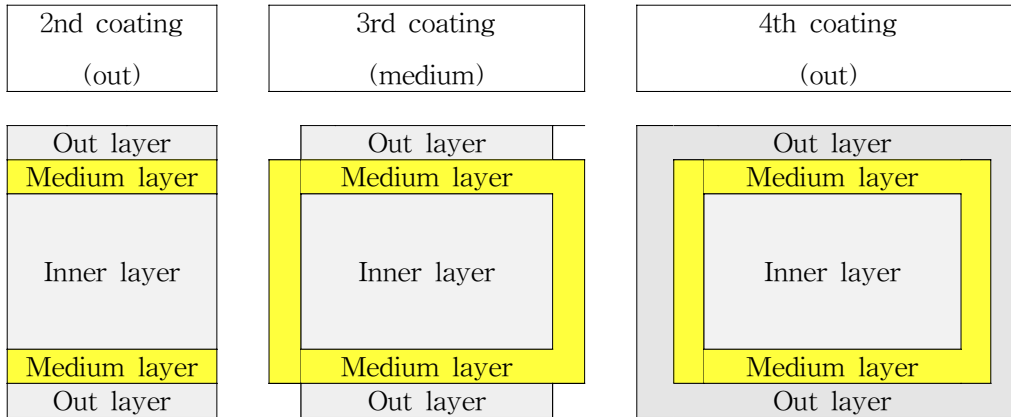


Fig. 3-2-2. Cross section of capsule type meju after coating process(2nd step).

나. 실험결과

1) 접종원의 선발

캡슐메주를 제조할 때 메주의 외부에 피복하는 곰팡이 및 버섯균사체를 곡물배지에 고체 및 액체배양을 행하여 접종원이 캡슐메주의 발효에 미치는 영향을 검토하였다. 결과는 나타내지 않았지만 고체배양의 경우는 배양한 균사체를 증가하여 잘 분쇄한 콩에 혼합할 경우 포자의 비산 등으로 인하여 작업실 오염 등의 우려가 있을 뿐 아니라 증가하여 분쇄한 콩에 균일한 혼합이 어려웠다. 또한 액체배양 할 경우는 균사체가 성장함에 따라 pellet를 형성하여 pellet를 무균적으로 분쇄하여야 하는 번거로움이 있었다. 그렇기 때문에 곰팡이 및 버섯을 액체배양 할 때는 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 마그네틱 바(3 cm)를 액체배지에 넣고 살균 및 냉각한 후 각 균주를 접종하여 배양할 때 배양 24시간마다 30분 동안 실온에서 강하게 교반하여 형성된 pellet를 파쇄하면서 배양한 결과를 <그림 3-2-35>에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 액체배지의 종류에 관계없이 곰팡이 및 버섯의 균사체는 세균 및 효모의 배

양액과 같이 아주 균일한 현탁액을 얻을 수 있어 이하의 실험은 곡물액체배지에 배양한 곰팡이 및 버섯의 균사체를 회수하여 캡슐메주 제조원으로 사용하였다.

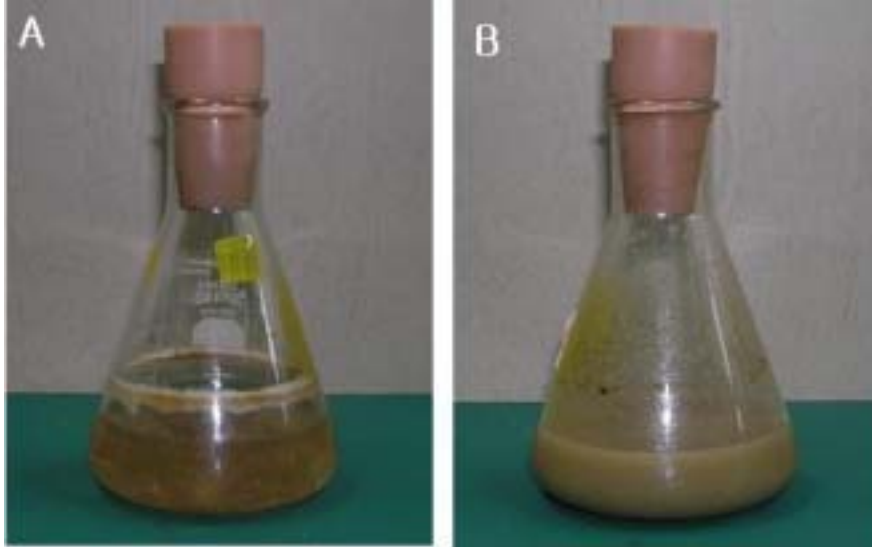


Fig. 3-2-35. Liquid cultivation of removal of pellet fom *Flammulina velutipes*
A, 2 days after cultivation ; B, 4 days for cultivation

2) 미생물 고정화법을 이용한 캡슐메주의 제조

미생물의 고정화 방법을 이용하여 캡슐메주를 제조하기 위한 개념도를 <그림 3-2-36>에 나타내었다. 증자하여 과쇄한 콩에 분리한 항균미생물인 *Bacillus subtilis* HS-25를 혼합하여 로울러를 통과시키는 동안 메주의 중간층에 chitinase생성 미생물인 *Bacillus subtilis* SJ-61균주를 세밀하게 분쇄한 콩과 함께 부착시키고 메주의 외부층에는 곰팡이 혹은 버섯의 균사체를 고정화하여 캡슐메주를 제조하도록 착안하였다.

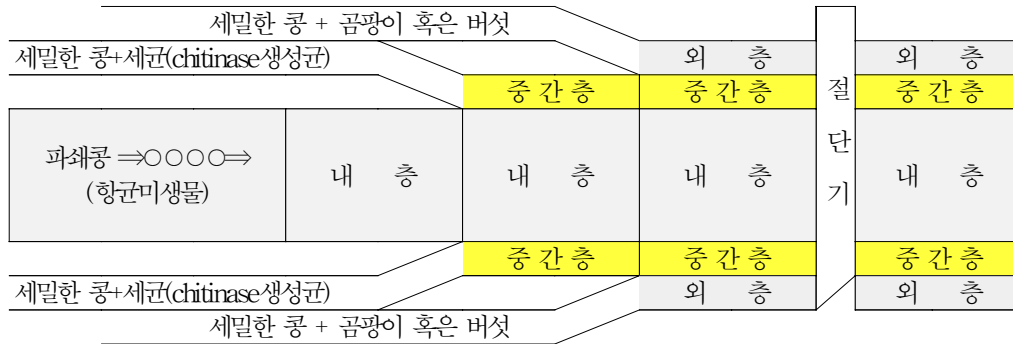


Fig. 3-2-36. Cross section of meju molding system for production of capsule type meju.

<그림 3-2-37> 및 <그림 3-2-38>는 위의 개념도에 따라 캡슐메주를 제조하여 1차 및 2차 발효시킨 캡슐메주의 형태와 그 단면도를 나타낸 결과이다. 전통적인 방법으로 제조한 대조구 메주는 메주의 외부가 지나친 건조로 인하여 갈라져 있었으며 또한 갈라진 틈 사이에 여러 종류의 미생물이 서식하고 있는 것도 있었다<그림 3-2-37> 및 <그림 3-2-38 A>. 캡슐메주의 외부에는 곰팡이나 버섯을 고정화시키지 않고 중심부 및 중간층에 각각 *Bacillus subtilis* HS-25의 항균미생물 및 *Bacillus subtilis* SJ-61의 chitinase생성 미생물을 고정화한 메주는 세균의 과잉성장으로 인하여 메주가 너무 검은 색을 띄었고 발효초기에는 진한 점질물의 액체가 메주의 내부에서 외부로 흘러나오기도 하였다(<그림 3-2-37> 및 <그림 3-2-38 B>). 그리고 메주의 내부에는 세균을 고정화시키지 않고 외부에 *A. oryzae*만을 고정화한 캡슐메주는 육안으로 보기에 잘 발효된 메주로 보였으나 메주를 절단하여 내부를 관찰한 결과 메주의 내부까지 곰팡이의 균사체가 침투하여 증식하고 있는 것을 관찰 할 수 있었다(<그림 3-2-37> 및 <그림 3-2-38 C>). 또한 캡슐메주의 외부에 버섯을 고정화한 경우는 30℃의 발효실에서 발효시킬 때는 버섯의 균사체가 잘 증식하였으나 실외에서 2차 발효 시에 메주의 표면이 건조함에 따라 거의 사멸하였다(<그림 3-2-38 D>). <그림 3-2-37 D> 및 <그림 3-2-38 E>는 캡슐메주의 중심부 및 중간층에 각각 *Bacillus subtilis* HS-25의 항균미생물 및 *Bacillus subtilis* SJ-61의 chitinase생성 미생물을 고정화하고 외부에는 *A. oryzae*을 고정화하여 제조한 메주의 사진인데 메주의 갈라짐뿐만 아니라 메주외부에 고정화한 *A. oryzae*의 과잉성장도 없이 메주내부에서는 *Bacillus subtilis* HS-25가, 중간층에서는 *Bacillus subtilis* SJ-61가 잘 증식하고 있음을 관찰할 수 있었다. <그림 3-2-37 E> 및 <그림 3-2-38 F>는 팽이버섯을 캡슐메주의 외부에 고정화하고 내부 및 중간층에 *Bacillus subtilis* HS-25 및 *Bacillus subtilis* SJ-61를 고정화한 결과인데 외부에 고정화한 버섯의 생육이 약간 미진함이 관찰되었다.

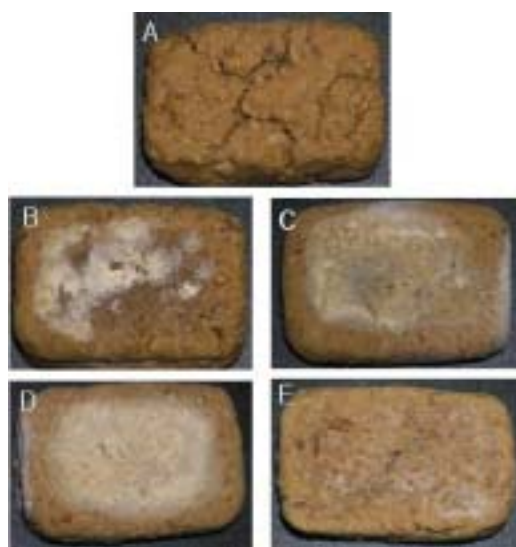


Fig. 3-2-38. Capsule type meju(CM) prepared with variuos fermenting microbes.

A, traditional meju ; B, CM prepared with *Bacillus subtilis* HS-25 and *Bacillus subtilis* SJ-61 in inner layer ; C, CM prepared with *A. oryzae* in out layer; D, B+C ; E, CM prepared with *Flammulina velutipes* + B.

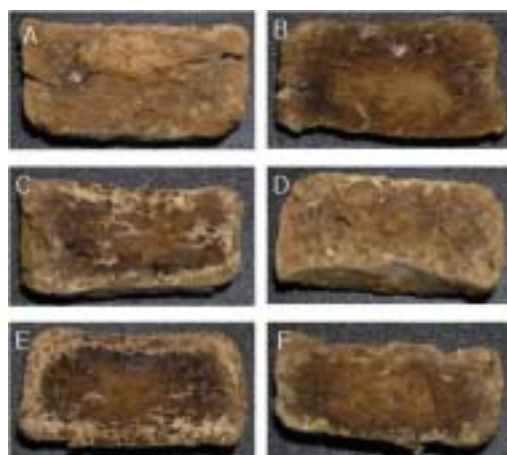


Fig. 3-2-39. Cross section of CM meju prepared with fermenting microbes.

A, traditional meju ; B, CM prepared with *Bacillus subtilis* HS-25 and *Bacillus subtilis* SJ-61 in inner layer ; C, CM prepared with *A. oryzae* in out layer; D, B+C ; E, CM prepared with *Flammulina velutipes* + B.

제 3 절 캡슐메주 개발을 위한 최적 발효조건 확립 및 캡슐메주의 표준화

1. 증자콩의 분쇄도가 캡슐메주에 미치는 영향

가. 실험 재료 및 방법

1) 실험재료 및 종균

캡슐메주 제조용의 콩 [Glycine max (L.) Merrill] 은 2002년에 한국전통발효식품연구소에서 수확한 태광 품종의 대두를 사용하였고, 검정콩은 대립종(흑태)를 사용하였다. 중국제조는 한국종균협회에서 분양받은 곰팡이는 *Aspergillus oryzae*와 *Rhizopus oligosporus*를 사용하였고, 버섯은 균사체 증식속도가 빠른 *Flammulina velutipes*를 분양 받아서 쌀 혹은 콩코오지로 제조하여 사용하였다.

2) 캡슐메주의 제조법

제 3장 제 1절. 1. 저염된장의 제조. 가) 캡슐메주 HS-25를 이용한 저염된장 제조”법에 준하였다.

3) 곰팡이의 생육상태 관찰

메주 발효기간 중 메주 표면에 나타나는 곰팡이의 생육은 균사 성장도를 기준으로 하여 육안적 관찰을 실시하였다.

나. 실험결과

1) 캡슐메주 외층의 곰팡이 생육 및 이화학적 성분 변화

가) 곰팡이 생육정도

메주의 과도한 건조와 표면의 갈라짐 및 곰팡이의 2차 오염현상의 문제점을 해결하기 위하여 캡슐형 메주를 만드는데 목적이 있다. 메주표면의 곰팡이의 생육

상태를 증자콩의 분쇄도별, 외층의 *Koji*의 종류별에 따라 비교한 결과는 <표 3-3-1>과 같다. 노란콩을 이용한 캡슐메주보다 검정콩을 이용한 캡슐메주가 곰팡이의 생육정도가 높았는데, 이는 검정콩이 대두보다 곰팡이 성장에 효과적인 당 성분이 많고, 지방질 함량이 적었기 때문이라고 판단되며, 캡슐메주의 표면에서 유해곰팡이의 오염은 발견되지 않았다. 그리고, 증자콩의 분쇄정도가 클수록 높았으며, 대조구와 비교하여 *Aspergillus oryzae* 가 월등하게 높았으며, *Rhizopus oligosporus*, *F. velutipes* 순으로 나타났다. 캡슐메주의 갈라짐에 있어서는 *Koji*로서 *Aspergillus oryzae*를 이용한 캡슐메주가 가장 적게 갈라졌으며, 대조구가 가장 많이 갈라졌다.

Table 3-3-1. Effect of crushing degree of cooked soybean on the growth of molds and distribution of cracking degree in outer layer of capsule meju

Soybean	Molds	Crushing degree(CD)			Cracking degree		
		CD75	CD85	CD95	CD75	CD85	CD95
Yellow	Control		+	+	---	---	--
	<i>A. oryzae</i>	++	+++	+++	-		
	<i>R. oligosporus</i>	+	++	++	-		-
	<i>F. velutipes</i>	+	+	++	--	--	-
Black	Control	+	++	++	---	---	--
	<i>A. oryzae</i>	+++	++++	++++			
	<i>R. oligosporus</i>	++	+++	++++	--	-	-
	<i>F. velutipes</i>	+	++	+++	-	-	

-(none), +(20), ++(40), +++(60), ++++(80%) : Mycelial growth on surface of meju

나) 총산도

캡슐메주의 총산도를 증자콩의 분쇄도별, *Koji*의 종류별에 따라 비교한 결과는 <표 3-3-2>과 같다. 캡슐메주의 외층의 분쇄도가 높으면 높을수록 총산도가 높게 나타났고, 검정콩이 노란콩보다 약간 높게 나타났으며, *Koji*의 균종으로는 *Aspergillus oryzae*가 가장 높게 나타났다. 이는 유용 발효 곰팡이의 생육에 따른 캡슐메주에 유기산이 축적되었기 때문인 것으로 사료된다.

Table 3-3-2. Effect of crushing degree of cooked soybean on total acidity in outer layer of capsule *meju* (%)

Soybean	Molds	Crushing degree(CD)		
		CD75	CD85	CD95
Yellow	Control	0.88	0.92	0.99
	<i>A. oryzae</i>	1.35	1.42	1.52
	<i>R. oligosporus</i>	1.19	1.25	1.33
	<i>F. velutipes</i>	1.25	1.34	1.48
Black	Control	0.99	1.03	1.11
	<i>A. oryzae</i>	1.51	1.59	1.70
	<i>R. oligosporus</i>	1.33	1.40	1.49
	<i>F. velutipes</i>	1.37	1.47	1.75

다) 아미노태질소

증자콩의 분쇄정도와 koji의 균종별, 콩의 종류에 따른 아미노태질소의 함량의 변화는 <표 3-3-3>과 같다. 아미노태 질소 함량은 메주 콩단백질의 발효율을 나타내는 지표로서 증자콩의 분쇄정도가 크면 클수록 높게 나타났으며, *A. oryzae* koji에 검정콩을 이용한 캡슐메주가 다른 캡슐메주보다 월등하게 높았다.

라) 환원당

증자콩의 분쇄정도와 koji의 균종별, 콩의 종류에 따른 환원당의 함량의 변화는 <표 3-3-4>와 같다. 표에서 나타난 바와 같이 자연발효조건으로만 제조된 메주의 환원당은 발효도가 낮은 편이나, *A. oryzae*를 이용하여 제조한 캡슐메주는 높아졌다. 뿐만 아니라 외층의 분쇄도가 크면 클수록 환원당 값은 높았으며, 검정콩이 노란콩보다 높았다.

Table 3-3-3. Effect of crushing degree of cooked soybean on amino type nitrogen in outer layer of capsule *meju* (mg%)

Soybean	Molds	Crushing degree(CD)		
		CD75	CD85	CD95
Yellow	Control	247.7	254.3	265.1
	<i>A. oryzae</i>	284.2	393.2	306.7
	<i>R. oligosporus</i>	261.9	270.1	281.9
	<i>F. velutipes</i>	274.3	283.2	294.4
Black	Control	285.2	294.4	208.0
	<i>A. oryzae</i>	351.8	363.4	270.4
	<i>R. oligosporus</i>	304.3	314.2	229.2
	<i>F. velutipes</i>	320.4	338.3	250.4

Table 3-3-4. Effect of crushing degree of cooked soybean on reducing sugar in outer layer of capsule *meju* (%)

Soybean	Molds	Crushing degree(CD)		
		CD75	CD85	CD95
Yellow	Control	2.10	2.21	2.36
	<i>A. oryzae</i>	3.56	3.73	4.00
	<i>R. oligosporus</i>	3.13	3.29	3.52
	<i>F. velutipes</i>	2.84	2.97	3.22
Black	Control	2.39	2.44	2.58
	<i>A. oryzae</i>	4.34	4.56	4.88
	<i>R. oligosporus</i>	3.82	4.01	4.29
	<i>F. velutipes</i>	3.02	3.27	3.69

마) 색도

증자콩의 분쇄정도와 koji의 균종별, 콩의 종류에 따른 색도의 함량의 변화는 <표 3-3-5>와 같다. 표에서 나타난 바와 같이 검정콩 캡슐메주가 노란콩 캡슐메

주보다 높게 나타났으며, 분쇄정도가 클수록 그 값이 높았는데, 이는 검정콩이 지방질 성분이 적고 발효균에 의한 캡슐화가 잘되어 균사체의 색깔이 일부 영향을 준 것으로 생각된다. 그리고, koji 종균의 종류에 따라서는 *A. oryzae* 가 가장 높았으며, *R. oligosporus*, *F. velutipes* 순이었다. 적색도(a값)은 L 값과 반대로 검정콩 캡슐메주의 *A. oryzae*가 가장 낮았다.

Table 3-3-5. Effect of crushing degree of cooked soybean on Hunter color index in outer layer of capsule *meju*

Color	Soybean	Fungi	Crushing degree(CD)				
			CD75	CD85	CD95		
L	Yellow	Control	55.64	59.43	64.14		
		<i>A. oryzae</i>	58.43	61.59	66.56		
		<i>R. oligosporus</i>	50.13	53.37	55.41		
		<i>F. velutipes</i>	52.32	53.54	54.23		
	Black ¹	Control	48.34	48.41	49.67		
		<i>A. oryzae</i>	50.81	51.36	51.68		
		<i>R. oligosporus</i>	46.25	47.62	48.07		
		<i>F. velutipes</i>	47.43	48.27	49.46		
		a	Yellow	Control	4.54	4.41	4.26
				<i>A. oryzae</i>	3.98	3.73	3.54
<i>R. oligosporus</i>	4.27			4.12	4.06		
<i>F. velutipes</i>	3.87			3.76	3.58		
b	Black	Control	4.58	4.42	4.29		
		<i>A. oryzae</i>	3.64	3.42	3.36		
		<i>R. oligosporus</i>	4.28	3.85	3.69		
		<i>F. velutipes</i>	4.65	4.40	4.28		
b	Yellow	Control	22.60	23.05	23.51		
		<i>A. oryzae</i>	21.82	22.26	22.70		
		<i>R. oligosporus</i>	21.17	21.59	22.02		
		<i>F. velutipes</i>	21.32	21.54	21.67		
	Black	Control	20.79	21.32	21.79		
		<i>A. oryzae</i>	20.07	20.48	20.89		
		<i>R. oligosporus</i>	19.34	19.97	20.32		
		<i>F. velutipes</i>	20.13	20.39	21.26		

¹ Black soybean (Heuktae) : after removal of seed coat

2) 캡슐메주 내층의 이화학적 성분 변화

가) 총산도, 아미노태질소 및 환원당

내층에서 증자콩의 분쇄도별 캡슐메주의 일반성분의 함량을 측정한 결과는 <표 3-3-6>과 같은데, 증자콩의 분쇄정도에 따른 총산도, 아미노태질소, 환원당 모두 크게 차이는 없었으며, koji 의 종류에 따라서는 *B. megaterium* SMY-212 가 대조구나 *Bacillus* sp. HS-25 에 비하여 높은 편이었다. 이는 *Bacillus subtilis* HS-25가 박테리오신을 많이 분비하여 항균성은 좋으나, *B. megaterium* SMY-212 보다 Protease를 적게 분비하여 발효도의 지표인 아미노태질소를 비롯한 총산도, 환원당 모두 낮게 나타난 것으로 사료된다.

Table 3-3-6. Effect of crushing degree of cooked soybean on acidity, amino type nitrogen and reducing sugar in inner layer of capsule *meju*

Items	Molds	Crushing degree(CD)		
		CD75	CD85	CD95
Acidity (%)	Control	1.54	1.61	1.73
	<i>Bacillus subtilis</i> HS-25	1.15	1.18	1.33
	<i>B. megaterium</i> SMY-212	1.46	1.48	1.55
NH ₂ -N (mg%)	Control	288.94	303.39	324.63
	<i>Bacillus subtilis</i> HS-25	318.27	334.18	357.58
	<i>B. megaterium</i> SMY-212	361.67	379.75	406.34
Reducing sugar(%)	Control	2.00	2.20	2.49
	<i>Bacillus subtilis</i> HS-25	3.96	3.05	3.11
	<i>B. megaterium</i> SMY-212	3.97	4.11	4.20

나) 색도

증자콩의 분쇄도별 캡슐메주의 내층의 색차계 색도를 측정한 결과는 <표 3-3-7>과 같다. L값(명도)는 분쇄도가 증가할수록 극소량 증가하였으며, 외층의 L값 보다 높게 나타났으며, a값과 b값은 분쇄정도에 따른 차이가 없었다.

Table 3-3-7. Effect of crushing degree of cooked soybean on Hunter color index in inner layer of capsule *meju*

Color	Molds	Crushing degree(CD)		
		CD75	CD85	CD95
L	Control	51.34	52.46	53.58
	<i>Bacillus subtilis</i> HS-25	54.37	59.21	60.43
	<i>B. megaterium</i> SMY-212	49.90	49.54	50.41
a	Control	4.47	4.32	4.12
	<i>Bacillus subtilis</i> HS-25	3.70	3.62	3.51
	<i>B. megaterium</i> SMY-212	3.89	3.65	3.48
b	Control	19.51	20.32	20.75
	<i>Bacillus subtilis</i> HS-25	17.28	17.43	17.59
	<i>B. megaterium</i> SMY-212	18.31	18.43	18.40

2. 메주콩의 증자온도와 증자시간이 캡슐메주에 미치는 영향

가. 실험재료 및 방법

제 3절 <1. 증자콩의 분쇄도가 캡슐메주에 미치는 영향>의 재료 및 방법에 준하였다.

나. 실험결과

1) 캡슐메주 외층의 곰팡이 생육 및 이화학적 성분 변화

메주콩의 증자온도와 증자시간에 따른 캡슐메주의 외층의 일반성분을 <표 3-3-8>과 같으며, 총산도, 아미노태질소, 환원당은 상압에서 증자시간이 증가할수록 약간 증가하였고, 가압에서는 감소하는 경향이였다. 대체를 노란콩을 이용한 캡슐메주보다 검정콩을 이용한 캡슐메주가 높게 나타났다. L값은 증자시간이 증가할수록 온도가 올라갈수록 감소하는 경향이였고, a값은 감소하는 경향이였으며, b값도 약간씩 감소하는 경향을 보였다.

2) 캡슐메주 내층의 이화학적 성분 변화

메주콩의 증자온도와 증자시간별 캡슐메주 내층의 이화학 성분을 측정한 결과는 <표

3-3-9>와 같다. 총산도를 비롯한 아미노태질소, 환원당 등은 상압에서는 증자온도와 증자시간에 약간 차이를 나타내었으며, 외층의 결과에 비하여 약간 낮거나 비슷하게 나타났다. 그리고, 색도의 L값은 노란콩으로 보면 약간 증가하였고, a값은 약간 감소, b값은 높게 나타났다.

Table 3-3-8. Effect of cooking temperature and time of soaked soybean on acidity, amino type nitrogen, reducing sugar and Hunter color index in outer layer of capsule *meju* prepared with *Aspergillus oryzae*

Items	Soybean	100°C-2hr	100°C-4hr	100°C-6hr	121°C-0.5hr	121°C-1hr	
Acidity (%)	Yellow	1.32	1.49	1.53	1.66	1.57	
	Black	1.50	1.72	1.77	1.78	1.59	
NH ₂ -N (mg%)	Yellow	345.0	370.1	387.0	360.6	354.6	
	Black	347.9	373.4	390.8	379.8	368.4	
Reducing sugar(%)	Yellow	2.10	2.31	3.11	2.09	2.13	
	Black	2.23	2.38	2.43	2.14	2.28	
Color	L	Yellow	54.01	53.87	53.53	54.74	53.08
		Black	46.81	45.32	43.17	47.57	42.92
	a	Yellow	3.83	3.76	3.65	3.61	3.58
		Black	3.36	3.30	3.20	3.17	3.14
	b	Yellow	21.73	19.82	19.68	19.76	17.76
		Black	17.23	16.97	15.59	17.03	14.87

Table 3-3-9. Effect of cooking temperature and time of soaked soybean on acidity, amino type nitrogen, reducing sugar and Hunter color index in inner layer of capsule *meju* prepared with *Bacillus subtilis* HS-25

Items	100°C-2hr	100°C-4hr	100°C-6hr	121°C-0.5hr	121°C-1hr	
Acidity (%)	1.17	1.49	1.52	1.47	1.24	
NH ₂ -N(mg%)	318.89	356.63	367.32	347.65	324.27	
Reducing sugar(%)	2.48	2.74	2.68	2.57	2.16	
Color	L	56.71	54.41	49.37	50.31	47.48
	a	3.19	3.14	3.04	3.01	2.98
	b	24.77	25.79	25.43	25.73	25.74

3. 캡슐메주의 메주크기가 발효에 미치는 영향

가. 실험재료 및 방법

제 3절 <1. 증자콩의 분쇄도가 캡슐메주에 미치는 영향>의 재료 및 방법에 준하였다.

나. 실험결과

1) 캡슐메주 외층의 곰팡이 생육 및 이화학적 성분 변화

메주콩의 메주크기에 따른 캡슐메주의 외층의 이화학적 성분을 측정한 결과는 <표 3-3-10>과 같으며, 총산도, 아미노태질소, 환원당은 모두 메주크기가 작을수록 증가하였고, 노란콩을 이용한 캡슐메주보다 검정콩을 이용한 것이 높게 나타났다. L값은 메주크기가 증가할수록 높아지는 경향이었고, a값도 증가하는 경향이었으며, b값은 비슷하거나 약간 증가하였다.

2) 캡슐메주 내층의 이화학적 성분 변화

증자콩의 메주크기에 따른 캡슐메주 내층의 이화학적 성분을 측정한 결과는 <표 3-3-11>과 같다. 총산도를 비롯한 아미노태질소, 환원당 등은 메주크기에 따라 차이를 나타내었으며, 외층의 결과에 비하여 높게 나타났다. 그리고, 색도의 L값은 외

층에 비하여 약간 증가하였고, a와 b값 모두 약간 증가하였다.

Table 3-3-10. Effect of *meju* size on total acidity, amino type nitrogen, reducing sugar and Hunter color index in outer layer of capsule *meju* prepared with *Aspergillus oryzae*

Items	Soybean	1,800	2,200	2,600	
Acidity (%)	Yellow	1.75	1.64	1.42	
	Black	1.86	1.75	1.52	
NH ₂ -N (mg%)	Yellow	354.7	326.3	305.3	
	Black	387.8	346.1	328.7	
Reducing sugar(%)	Yellow	2.37	2.12	1.96	
	Black	2.52	2.46	2.37	
Color	L	Yellow	55.28	57.50	59.73
		Black	45.54	47.86	49.34
	a	Yellow	3.23	3.56	3.67
		Black	2.43	2.54	2.68
	b	Yellow	18.47	18.95	19.34
		Black	16.21	15.32	14.41

Table 3-3-11. Effect of *meju* size on total acidity, amino type nitrogen, reducing sugar and Hunter color index in inner layer of capsule *meju* prepared with *Bacillus subtilis* HS-25

Items		1,800	2,200	2,600
Acidity (%)		1.84	1.72	1.58
NH ₂ -N(mg%)		447.13	410.38	398.45
Reducing sugar(%)		2.38	2.21	2.04
Color	L	58.93	60.31	61.42
	a	3.43	3.12	2.97
	b	21.65	22.39	23.56

4. 캡슐메주의 표준화 및 대량생산

가. 실험재료 및 방법

제 3절 <1. 증자콩의 분쇄도가 캡슐메주에 미치는 영향>의 재료 및 방법에 준하였다.

나. 실험결과

캡슐메주는 변온조건의 1차 황토방 발효실(7~30일)과 2차 자연발효실(야외, 30~35일)을 통하여 완성되는 2단계 발효공정으로 만들어진다. 1단계 발효공정은 앞서의 세부와 협동과제의 결과를 종합적인 토대로 항온항습이 가능한 황토방 발효실(10평, 2000 mL 캡슐메주, 700개 동시 투입 / 3단, 20×20 cm, 환풍장치)에서 캡슐메주의 최적화 제조공정을 확립하였으며, 2단계 발효는 직사광선이 차단되고 통풍이 아주 우수한 반차광 비닐하우스(지상 2m 이상, 3단)를 이용하여 자연발효 및 숙성공정을 하게된다. 각 단계별 주요사항을 요약하면 다음과 같다.

1) 콩의 전처리 공정

일반메주에서 마찬가지로 캡슐메주도 원료 콩의 스팀, 상압증자 방식이 가장 좋고, 다음으로 스팀방식, 가압증자순으로 되어 있다. 세균주도형 발효로 만들어지는 전통메주는 자연발효를 행하는 전통 콩발효식품 제조의 발효원(stater cake)로서 토양과 같은 자연 유래의 바실러스균들이 최종 증자콩에 많이 존재하면서, 콩속의 내용물이 콩 종피나 증자콩 표면에 많이 누출되어서 세균들이 번식하기 좋은 초기영양원으로 제공될 수 있는 증자방식이 유리하다.

2) 균종선택 및 균체접종량

자연으로부터 유래하는 야생 유해 곰팡이의 오염도를 줄이기 위해서는 균사체 증식도를 보면 황국균(*Aspergillus oryzae*)이 가장 효과적이고, 다음으로는 백국균(*Rhizopus oligosporus*)와 팽이버섯 균사체(*Flammulina velutipes*) 순이었으며, 특히 백국균과 버섯 균사체는 증식속도가 매우 늦기 때문에 고 활성 균사체를 액체배양한 생균체(10~15%, w/v) 혹은 콩 종국으로 고체배양한 고체종국(5%이내)을 첨가하여야 한다. 그 외 버섯균사체로는 동충하초(*Paecilomyces japonicus*), 신령버섯(아가리쿠스, *Agaricus blazei*), 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)이 캡슐메주 제조에 유리한 버섯 균사체류이다.

3) 메주의 크기

캡슐메주 제조에서 메주의 크기는 아주 중요하다. 캡슐메주는 메주 표면을

균사체가 서로 엉켜서 메주가 갈라지지 않게 하기 때문에 메주내부의 수분이 건조되지 않거나 유해 곰팡이가 내부로 침투하지 못하는 유리한 점이 있다. 그러나 큰 캡슐 메주(2600 mL 이상)는 황토방 초기발효에서 메주내부의 가스발생에 의한 내부압력이 존재하여 메주가 허물어지거나 그 가스로 인하여 메주의 냄새를 많이 존재하여 최종적인 된장에서 이상취를 발생하여 전통된장의 기호적 품질을 저하시킨다. 따라서 캡슐메주는 2,000mL 전후에 하여 메주를 성형하는 것이 유리하다.

4) 송풍횟수

일반 메주를 대량으로 만드는 장소에서는 반드시 발효실내를 신선한 공기로 자주 교체하는 것이 전통된장의 기호성을 좋게 하므로 온도와 습도에 문제를 유발하지 않는 범위내에서 10분전후로 1일 3-4회 이상 통기를 시키는 것이 중요하다.

5) 발효기간

캡슐메주의 외부 표면에 이용하는 균종과 접종량에 따라서 발효기간을 달리 하여야 한다. 그러나 대체로 황국균은 4~6일, 백국균 10~15일, 버섯균사체는 20~30일 정도가 좋은데, 발효기간은 발효온도와 균종 및 접종 균체량에 따라서 적절하게 조절하여야 한다. 특히 1차 발효후기의 경우에는 가능하면 상대습도를 50~60%로 낮추어 메주표면을 건조시키면, 다습한 기후조건의 2차 야외발효에서 야생 유해곰팡이의 재오염 기회가 많이 줄어든다.

6) 발효온도 및 습도(황토방)

캡슐메주 제조에서 발효온도는 균사체 생육이 빠른 황국곰팡이는 저온(2-3일) → 적온(3-4일)으로 변온발효 실시하며, 그리고 성장속도가 늦은 백국균과 홍국균 및 버섯균사체는 정온의 최적 발효온도를 유지하며, 특히 증식력이 강한 오염곰팡이(푸른 곰팡이, 붉은 곰팡이, 검은곰팡이)의 성장이 촉발되지 않도록 온도와 습도조절 및 발효실 살균을 보완하면서 캡슐메주를 제조하여야 한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구 목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 에의 기여도
전통장류의 저염화 기술	항균성물질 생성의 HS-25 균주를 이용한 캡슐메주와 한방약재 및 알코올 첨가에 의한 저염생된장을 개발하였다.	천연방부제(미생물성 항균제, 항균성 한방약재) 이용과 분말화에 따른 저염된장 제조법을 확립하였다.
전통장류의 변색억제 기술	고발효 메주가루와 유기산 첨가 및 광선과 용기에 따른 전통된장의 변색도 차이를 구명하였다.	전통된장의 저장·유통에서 가장 큰 문제인 변색원인을 파악하므로, 품질개선에 기여할 수 있다.
전통장류 냄새억압 기술	발효기간, 메주크기, 발효실 통풍의 조절 및 식물추출물 첨가로 냄새 저감화 방안을 확립하였다.	발효공정상에서 전통된장의 냄새 저감화 방안을 확립하여 다른 콩 발효식품에서도 적용가능하다.
메주 외층부 발효를 위한 곰팡이 및 버섯균사체 선정	백국균, 황국균 및 버섯균사체 배양에서 생육특성을 검색하였다.	진균류의 종류에서 증식도와 관련성분의 가수분해도를 파악하였다.
메주 중간층 올리고당 생성 세균의 선정	진균류의 메주내부로 과도한 성장억제를 위한 세균을 분리하였다.	유용 진균류의 균사체 분해에 의한 세포벽 올리고당 생성에 응용가능하다.
항균물질 대량 생성 세균의 선정	pH와 열안정이 우수하고, 항균물질 고생산균으로 <i>B. subtilis</i> HS-25균주를 분리하였다.	콩 발효식품의 저장유통중의 천연 보존제로서 활용성이 매우 높다
캡슐메주 대량생산을 위한 발효조건 확립	캡슐메주의 대량생산에서 증자콩의 전처리 및 메주 특성을 결정하였다.	위생적 안전성이 확보된 캡슐메주를 대량생산할 수 있는 조건을 확립하였다.
캡슐메주 대량생산을 위한 표준화 공정	대량생산에서 캡슐화의 전체 공정도를 확립하였다.	캡슐화를 위한 변온발효를 통하여 타 발효원에 기술 적용이 가능하다.
캡슐메주 종류에 따른 전통된장의 생리활성	사용하는 발효균 종류에 따른 캡슐메주의 생리활성을 검토하였다.	발효공정에 따른 기능성 증진에 대한 기술을 확립하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

“캡슐형 메주”는 콩발효식품의 중간소재로서 활용가능하다. 즉, 자연발효를 통하여 만들어지는 우리나라 전통메주의 품질을 증진시키면서, 아울러 위생적 안전성 제고를 위하여 개발된 것으로 다음과 같은 특징으로 다양한 콩발효식품 중간소재로서 활용도가 높을 것으로 판단된다.

1. 캡슐형 메주의 특징

가. 유해곰팡이 오염을 차단한다.

- 캡슐메주는 유용균주에 의하여 메주표면에 2중으로 코팅되므로 외부 오염된 환경으로부터 안전하여 곰팡이 독소생성에 따른 불안감을 해결할 수 있다.
- 일반메주는 과도한 건조에 의하여 메주표면이 깊숙하게 갈라짐으로써 그 틈으로 다시 2차 유해 곰팡이들이 감염되어 메주의 품질을 크게 떨어진다.
- 일반메주는 불리한 환경에서 유해한 검은 곰팡이와 푸른 곰팡이 등이 많이 발생되어 오염 곰팡이가 증식하여 이취를 많이 발생시킨다.

나. 캡슐메주는 발효율을 증진시킬 수 있다.

- 일반메주는 제조공정에서 메주성형 후 곰팡이 증식을 억제하기 위하여 메주의 표면을 건조시키기 때문에 메주의 주도 발효균인 고초균(*Bacillus subtilis*)을 포함한 *Bacillus*속 세균이 메주표면에서 증식이 어렵기 때문에 콩단백질의 분해율이 매우 낮다. 특히 장시간 건조하기 때문에 메주 내부에 까지 과도한 건조에 의하여 발효율이 아주 낮다.
- 그러나 캡슐메주는 건조과정이 없고 메주의 발효/숙성과정에서 갈라짐이 발생되지 않으므로 메주내부의 수분함량이 상당히 많이 유지되므로 세균의 발효조건에 매우 유리하다.

다. 캡슐메주는 메주의 과도한 건조와 갈라짐이 발생되지 않는다.

- 일반메주는 장시간 발효를 실시하여 메주 자체가 매우 딱딱하여 염수 담금과정에서도 메주덩어리 자체가 쉽게 풀어지지 않기 때문에 메주 내부로 염수가 침투하는데도 시간이 많이 소요되고, 담금과정에서 숙성 효율도 떨어진다. 캡슐메주는 상대적으로 메주내부의 수분 감소량이 적어서 세균의 발효환경이 좋아진다.
- 일반메주는 메주의 갈리짐을 방지하므로써 메주내부의 수분증발을 최대한 막을 수 있어서 메주 발효균의 성장에 유리한 조건을 형성시켜주며, 또한 갈라진 틈으로 유해균의 2차 증식을 방지할 수 있는 효과가 있다.

라. 캡슐메주는 발효공정을 단축시킬 수 있다.

캡슐메주는 30일 내외로서 일반메주가 60~90일 소요되는 것에 비하여 전체공정을 1/2~1/3로 단축시킬 수 있다.

2. 캡슐형 메주의 활용방안

캡슐형 메주의 제조에 이용되고 있는 각 단계별 기술들을 부분적으로 활용하면 다음과 같은 곡류 및 두류발효식품 소재를 개발하는데 활용가능하다.

가. 전통된장과 고추장의 저염화를 위한 기능성 stater cake로서 활용

캡슐메주의 내층에 항균성 bacteriocin을 생산하는 *Bacillus subtilis* HS-25균주 및 *Bacillus megaterium* SMY-212(한국전통발효식품연구소와 생명공학연구소에 기탁 보관된 균주 : KCTC 1005BP)을 첨가하여 메주를 발효하므로 메주 내부의 콩 발효율을 높이면서 동시에 천연 항균성 물질이 존재하도록 하여 장류의 저염화 및 그 저장성을 증진시킬 수 있다.

나. 바실러스균과 버섯균사체 2단 배양법을 통한 청국장을 포함한 전통장류의 기능성증진을 위한 중간소재로서 활용

- 콩에 함유된 비활성형 배당체 이소플라본을 β -glucosidase 활성이 높은 유용버섯류를 이용하여 활성형 이소플라본의 아글리콘 형태로 생물전환율을 높혀주므로써 전통장류(청국장의 2단 발효에서 1차 중간소재 개발)의 생리활성(항산화능,

항돌연변이 및 항암성 등)을 증진시키는데 활용가능하다.

- 캡슐메주 중간층에 chitinase와 cellulase효소를 강력하게 생산하는 세균을 혼합하여 코팅시킴으로써 메주 외층에 다량으로 번식된 유용곰팡이 균사(키틴 : 곰팡이 세포벽의 구성성분)가 내부로 침투하여 다량으로 증식되지 않도록 하면서 이들 곰팡이 균사를 효소적으로 가수분해시킴으로써 기능성 올리고당(키토올리고당, 셀룰로올리고당)을 메주에 생성되게 한다.

다. 유산균 혼합배양하므로서 선식용 캡슐형 메주분말을 개발하는데 활용가능

유산균(미호기성/혐기성, 유산생성)과 바실러스균(호기성, 포자형성)의 생체내 공력효과를 이용하면서, 베이컨 향기를 유도하여 독특한 메주냄새를 줄이면서 선식용 “바로먹는 캡슐형 메주분말”을 개발하는데 기초적인 기술로 활용가능하다.

제 6 장 참고문헌

1. 이서래 : 한국의 발효식품. 이화여자대학교 출판부, p.53(1994)
2. Osawa R. et al. : Digestion of staphylococcal enterotoxin by *Bacillus natto*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **71**, 307-311(1997).
3. Akimoto, T., Yamada, S. and Matsumoto, I. : The relation between protease and Ψ -glutamyl transpeptidase activities and qualities of Natto. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 872-876(1990).
4. Sugawara, E., Ito, T., Odagiri, S., Kubota, K. and Koboyashi, A. : Comparision of compositions of odor components of natto and soybeans. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 311-317(1985).
5. Sulisty, J., Taya, N., Funane, K. and Kiuchi, K. : Production of Natto starter. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**, 278-284(1988).
6. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. : A novel fibrinolytic enzyme(Nattokinase) in the vegetable cheese Natto : A typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, **43**, 1110-1117(1987).
7. 건국대학교 식품개발연구소 : 개교 50주년기념 심포지움 자료, 전통 콩 발효식품 (된장, 청국장, 간장)의 기능 및 생리활성. (1996).
8. 권태완, 송영선, 문갑순 : 콩의 생리활성물질의 탐색에 관한 연구. 과학재단 목적기초연구 보고서, 1997.
9. Schoene, N.W. and Guidry, C.A. : Genistein inhibits reactive oxygen species (ROS) formation during activation of rat platelets in whole blood. in Proceeding of second international symposium on the roe of soy in preventing and treating chronic disease. Brussel, Belgium (1996).
10. 배은아, 문갑순 : 국산 대두의 항산화효과. 한국식품영양과학회지, **26**, 203-208 (1997).
11. 배은아, 권태완, 문갑순 : 콩, 두부 및 두부부산물중의 isoflavone함량 및 항산화 효과. 한국식품영양과학회지, **26**, 371-375(1997).
12. Pratt, D.E. and Birac, P.M. : Sources of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, **44**, 1720-1727(1979).

13. Wei, H., Wei, L., Frenkel, K., Bowen, R. and Barnes, S. : Inhibition of tumor promotor-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr. Cancer*, **20**, 1-10(1993).
14. Wei, H., Cai, Q. and Rahn, R. : Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis*, **17**, 73-79(1996).
15. Cancer Institute News : The anticarcinogenic properties of soybean. U.S.A., 1998. 3. 6.
16. 성미경 : 대두의 항암효과에 관한 고찰. 한국콩연구회지, **13**, 19-31(1996).
17. 김정상 : 콩의 생리활성에 관한 최근 연구동향. 한국콩연구회지, **13**, 17-24(1996).
18. Rao, A.V. : Anticarcinogenic properties of plant saponins. in in Proceeding of second international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease. Brussel, Belgium (1996).
19. 김석동, 김용호, 이석하, 홍은희 : 우리나라 밥밀콩의 식미, 종실 및 성분특성-검정콩중심. 한국콩연구회지, **9**, 1-13(1992).
20. 이홍석, 박의호, 임병기 : 콩에 있어서 알칼리 붕괴도와 그의 유전에 관한 연구. 한국작물학회지, **29**, 179-185(1984).
21. 구자옥, 하기용, 홍은희 : 유색대두 수집종(蒐集種)의 특성연구. 제4보. 유색대두 수집종의 식미특성과 관련형질간의 상호작용. 한국작물학회지, **28**, 462-468(1983).
22. 박의호 : 혼반용(混飯用) 대두품종의 종실특성에 관한 연구. 서울대 대학원 박사 학위논문(1986).
23. Krieg, N.R. and J.G. Holt : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, p. 140-219, Williams & Wilkins, Baltimore/London(1984).
24. Miller, L.T. and Berger, T.: Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. *Hewlett-Packard Application Note*, p.228(1985).
25. Logan, N.A. and Berkeley, R.C.W.: Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1871-1876(1984).
26. 이숙희, 김선기, 최홍식 : 한국장류식품의 지질성분에 관한 연구. 한국식품과학회지, **15**, 123-131(1983)
27. 박정숙, 이명렬, 이택수 : 제조원료를 달리한 된장의 숙성중 당과 지방산 조성의

- 변화. 한국영양식량학회지, **24**, 917-924(1995)
28. 이정수, 최홍식 : 콩 발효식품에 있어서 페놀물질의 분리와 이의 항산화성. 한국 식품영양과학지, **26**, 376-383(1997)
 29. Jun-Sun Choi, Tai-Wan Kwon and Jong Sang Kim : Isoflavone contents in some varieties of soybean. *Food and Biotechnolgy*, **5**, 167-171(1996)
 30. 최계선, 임선영, 최재수 : 대두, 메주 및 된장의 항산화 효과와 아질산염 소거 효과. 한국생명과학회지, **8**, 473-478(1998)
 34. 박석규, 강갑석, 이상원, 서권일 : 검은콩을 이용한 장류 및 그 제조방법. 특허출원(출원번호 98-3515), (1998)
 31. 박석규, 강갑석, 이상원, 서권일 : 검은콩을 이용한 청국장 및 그 제조방법. 특허출원(출원번호 98-3516)(1998)
 32. 박석규, 서권일, 박정로, 문주석, 이영환 : 한국 전통식 된장의 지방산 및 아미노산 함량. 한국식품과학회 및 한국식품영양과학회 춘계 공동학술발표회(1998)

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.