

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001345-01

전통된장의 농가기업형 대량생산 system 개발
(Development of the mass production system of
traditional Korean *Doenjang* for the rural agribusiness)

영남대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통된장의 농가기업형 대량생산 system 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 3일

주관연구기관명 : 영남대학교
주관연구책임자 : 김 명 희
세부연구책임자 : 김 명 희
연 구 원 : 김 종 규
연 구 원 : 박 혜 경
연 구 원 : 슈리티슈클라
연 구 원 : 이시형, 박선현
연 구 원 : 최승영, 임혜림
연 구 원 : 송신지에, 왕신약
연 구 원 : 박정현, 이종숙
참 여 기 업 명 : 대가야우특식품
참여기업대표자 : 최 대 봉

요 약 문

I. 제 목

전통된장의 농가기업형 대량생산 system 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

전통메주에서 분리한 새로운 종균을 이용하여 안전성이 확립된 전통된장의 풍미를 지닌 위생적인 된장을 농가기업에서 대량생산할 수 있는 system을 개발하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

- 현재 우리나라 장류업체에서 생산되는 대부분의 된장제품은 대두나 밀 등을 이용하여 *Aspergillus oryzae*만을 사용하거나 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 혼합하여 메주를 제조하는 개량식 제조방식으로 일본의 미소 풍미와 흡사하다.
- 반면, 전통된장은 대두만을 이용하여 다양한 자연발효미생물에 의해 장기간의 발효기간을 거쳐 제조되어 개량식 된장과는 다른 한국 고유의 전통적 풍미를 지니게 되나 제조시마다 풍미가 균일하지 못하여 규격화된 전통메주의 산업적 model의 적용에 문제점을 가지고 있다.
- 각 장류 공장에서 생산되는 개량식 된장의 가정내 소비율은 30% (제주형발효식품산업 발전전략 심포지엄, 2008)미만에 그치고 있어, 전통된장의 산업화를 위해서는 된장의 품질특성에 영향을 미치는 전통메주의 model system을 개선하여 개량식 된장과 차별화할 필요성이 있다.
- 이에 본 연구에서는 종래 개량식 된장용 종균메주에 전통메주에서 분리한 미생물을 이용하여 종균메주를 제조하여 일본의 미소 풍미 대신 전통된장과 유사한 풍미를 지닌 된장을 농

가에서 위생적으로 대량생산할 수 있는 농가기업형 전통된장 system을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

■ 연구개발의 최종목표

- 새로운 종균개발과 위생적 된장의 개발
- 우수한 전통풍미를 지닌 전통된장의 산업화
- 위해요소 모니터링을 통한 안전성이 확립된 된장 제품의 완성 (HACCP)

■ 연구개발의 주요내용

- ▶ 제주에서 분리된 균 중 전통된장의 풍미를 생산할 수 있는 다수의 균을 선정하고 각각의 균으로 된장을 제조한 후 품질을 평가한다.
- ▶ 선정한 균을 이용하여 전통된장을 제조하고 그 제조과정을 위생화하기 위해서 HACCP를 적용하여 biogenic amines, aflatoxin, *Bacillus cereus*, 기타 식중독균을 측정한다.
- ▶ 위생적인 된장을 제조하기 위하여 원재료 및 된장의 biogenic amines, aflatoxin, *Bacillus cereus*, 기타 식중독균 등의 위해요소를 모니터링하여 저감화 방안을 개발한다.
- ▶ 각각의 균으로 제조한 된장의 protease 역가측정, 방향 측정 (관능검사)을 한다.
- ▶ 선정한 균을 이용한 전통된장의 관능검사와 맛 성분 (유리아미노산, 유기산, 유리당)을 분석한다.
- ▶ 선정한 균을 이용한 HACCP 기준을 통과하는 농가기업형 대량생산 공정을 개발한다.
 - 원료의 증자 및 살균
 - 국실의 무균화
 - 대량 발효조의 위생화
 - 제조된장을 상품화 용기에 위생적 분주
- ▶ 기존의 공장 시설을 이용하여 최적 조건으로 전통된장 대량생산
- ▶ 최적 조건 하에서 풍미의 특징이 서로 다른 다수의 된장을 pilot plant 생산
- ▶ 서로 다른 특징적 된장의 풍미를 지닌 다수의 된장 생산조건을 조사하고 맛 성분 및 방

향성분을 분석하여 전통 된장과 비교 검토

IV. 연구개발결과

- 본 연구의 기초자료를 위한 민가전통된장의 대조구 된장 확보
- 전통된장의 풍미를 생산할 수 있는 다수의 우수균 확보
- 새로운 종균 및 우수한 전통적 풍미를 지닌 위생적 종균된장 개발
- 종균을 이용한 위생적 전통된장의 발효조건 확립
- 위해요소 모니터링을 통한 안전성이 확립된 된장 제품의 완성

1. 본 연구의 기초자료를 위한 민가전통된장의 대조구 된장 확보

<민간전통된장의 관능검사 및 맛 성분 분석>

- 본 연구의 수행목적인 우수한 풍미를 지닌 위생적 된장제조 시 기술적 자료의 확보와 대조구로 이용하기 위해 대구, 경북 지역의 전통메주로 제조한 풍미가 우수한 민가전통된장 18종을 수집하여 5점 척도법으로 관능검사를 실시하여 맛과 향을 측정된 결과 18종 된장 중 3.9점의 관능 점수를 획득한 우수한 전통적 풍미를 지닌 대조구의 된장을 확보하였다.
- 민가전통된장 18종의 관능검사 성적과 맛 성분함량과의 관계를 비교해 볼 때 된장의 풍미를 결정하는 여러 가지 맛 성분 중 구수한 맛과 단맛을 나타내는 성분함량이 높은 된장은 관능검사 점수가 높았고 쓴맛과 신맛 성분의 총 맛 성분 함량비는 낮게 나타났다.
- 민가전통된장 18종의 관능검사 결과에서 관능검사 성적이 3.5점 이상인 된장시료는 3종으로 앞으로 전통된장의 연구적 좌표로 이용됨을 시사하였다.

<민가전통된장의 위해요소 검토>

- 총 aflatoxin은 2종 된장에서 식품공전 상의 허용한계치인 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상 검출되었으나 9종의 biogenic amines는 문제가 되지 않았으며, 된장제조 중 유입가능성이 있는 식중독 세균 중 *Bacillus cereus*는 식품공전 상의 허용한계치인 10⁴ CFU/g를 넘은 된장이 4종이었고, coliform bacteria (대장균군)는 10³ CFU/g 이상 검출된 된장이 9종이었으며, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7은 18종 된장 모두 검출되지 않았다.
- 민가전통된장의 위해요소 검토 결과에서 볼 때 biogenic amines 및 aflatoxin의 생성을 억제하기 위하여 전통된장제조 시 미생물 관리의 중요성과 종균 사용에 대한 필요성이 강조되어 본 연구 과제 목표에 근접하는 결과로 사료되었다.

2. 전통된장의 풍미를 생산할 수 있는 다수의 우수균 확보

<1차 선별: 7종>

- 전통메주에서 분리하여 보존 중인 세균 8종과 사상균 45종 중 1차적으로 protease 생산 능력이 높고 균이 생성하는 향이 좋은 균을 선정하여 동정한 균은 7종으로, *Bacillus subtilis* TKSP 24, *Aspergillus oryzae* J, *Mucor racemosus* 15, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor racemosus* 42, *Cladosporium uredinicola*, *Penicillium fellutanum* 이었다.

3. 새로운 종균개발 및 우수한 전통적 풍미를 지닌 위생적 종균된장 제조

<2차 선별: 4종>

- 우수한 전통적 풍미를 지닌 위생적 종균된장을 제조하기 위하여 1차 선별된 균 (7종)을 종균으로 개량식 메주 (알알이 형태의 메주)를 제조한 후 단독균으로 제조한 단독메주된장 (7종), 세균메주 1종과 사상균메주 1종을 혼합하여 제조한 2균주 혼합메주된장 (5종), 세균메주 1종과 사상균메주 2종을 혼합하여 제조한 3균주 혼합메주된장 (5종)등 총 17종 된장을 제조하였다.
- 종균을 이용한 17종 된장 중 세균메주 및 사상균메주를 조합한 3균주 혼합메주된장이 가장 우수한 관능성적을 나타내었으며, 대조구인 민가전통된장보다 더 우수한 풍미를 나타내었다. 우수한 전통적 풍미를 생성하는 균주는 *Bacillus subtilis* TKSP 24, *Aspergillus oryzae* J, *Mucor racemosus* 15, *Mucor racemosus* 42임을 확인할 수 있었으며, 새로운 종균을 이용한 위생적 종균된장을 개발할 수 있었다.

<위생적 종균된장의 품질검토>

- 관능성적이 가장 우수한 된장은 *Bacillus subtilis* TKSP 24 및 *Aspergillus oryzae* J메주에 *Mucor racemosus* 15메주 또는 *Mucor racemosus* 42메주를 혼합한 3균주 혼합메주된장으로 맛 성분함량 또한 단독메주된장, 2균주 혼합메주된장보다 많은 것으로 나타났다.
- 종균을 이용하여 제조한 된장의 관능검사 성적과 맛 성분함량과의 관계를 비교해 볼 때 관능성적이 높으면 맛 성분의 함량도 많은 것으로 나타나 전통된장과 유사한 결과를 보였으며 된장의 우수한 맛은 각종 맛 성분 (구수한 맛, 쓴맛, 단맛의 유리아미노산과 유리당, 신맛의 유기산)들의 성분함량비와 관련이 있음을 알 수 있었다.
- 종균을 이용한 17종 된장의 biogenic amines 및 aflatoxin의 경우 문제시 되는 시료는 없었으며, 식중독균인 *Bacillus cereus*, coliform (대장균군), *Staphylococcus aureus*,

Salmonella spp., *Escherichia coli* O157:H7은 모두 검출되지 않았다.

- 종균을 이용한 17종 된장의 위해요소 검토 결과에서 볼 때 종균 사용에 대한 중요성과 필요성 (전통풍미, 위생확보)이 강조되어 본 연구 과제 목표를 달성하는 결과로 사료되었다.

4. 종균을 이용한 위생적 전통된장의 발효조건 확립을 위한 pilot plant 연구

<종균된장의 발효조건 검토>

- 참여업체의 시설규모 및 pilot plant 규모로 된장을 제조함으로써 종균을 이용한 위생적 전통된장의 최적 발효조건을 검토하였다.
- 우수한 전통풍미 생성균주 4종 즉, *Bacillus subtilis* TKSP 24, *Aspergillus oryzae* J, *Mucor racemosus* 15, *Mucor racemosus* 42를 이용하여 메주를 제조한 후 세균메주와 사상균메주의 중량비를 다양하게 조합하여 6종의 된장을 제조하여 품질을 검토하였다.
- *Bacillus subtilis* TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주, *Mucor racemosus*메주의 중량비가 1:1:1인 조합의 3균주 혼합메주가 전통풍미를 갖는 된장제조에 가장 적합하였다.
- 종래 메주제조용 균주인 *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus oryzae* J에 *Mucor racemosus*를 첨가함으로써 개량식 된장의 풍미와는 다른 한국의 전통적 풍미를 지닌 콩알메주된장을 제조할 수 있음을 시사하였다.

<종균된장의 품질검토>

- 세균메주와 2종의 사상균메주를 조합한 3균주 혼합메주된장의 관능평가를 실시한 결과 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주와 *Aspergillus oryzae* J메주에 *Mucor racemosus* 15메주 또는 *Mucor racemosus* 42메주를 1:1:1 (w/w)로 조합한 된장의 관능성적이 가장 우수하였다. 이는 대조구로 이용된 민가전통된장보다 관능성적이 더 우수하였으며 맛 성분함량도 많은 것으로 나타났다.
- 위 3균주 비율별 혼합메주된장 6종의 위해요소를 검토한 결과 biogenic amine과 총 aflatoxin은 식품공전 상의 허용한계치에는 위배되지 않았으며, 기타 식중독균인 *Bacillus cereus*, coliform, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp.는 모두 검출되지 않았다.
- 대조구인 민가전통된장 18종은 biogenic amines과 총 aflatoxin 그리고 식중독균인 *Bacillus cereus*와 대장균군이 일부 시료에서 문제시 되었으나 종균을 이용하여 제조한 된장의 경우에는 위해적인 요소는 없는 것으로 나타나 본 연구목표인 미생물 관리의 주

요점을 반영하는 결과였다.

5. 위해요소 모니터링을 통한 안전성이 확립된 된장 제품의 완성

<참여기업 공장의 위해요소 조사>

- 사전조사 결과, 참여기업 공장 내부 및 된장제조 공정 중에 물리적, 화학적 위해요소는 없는 것으로 나타났다.
- 참여기업의 위생검토를 위해 공장 안과 국실 및 된장제조실의 세균 및 곰팡이의 분포를 조사한 결과, 곰팡이는 2종이 분포하였으며, 모두 *Aspergillus* spp.인 것으로 동정되었다.
- 식중독균인 *Bacillus cereus*는 검출되지 않았으나 유해균으로 알려진 *Bacillus firmus*가 참여기업의 공장 안과 국실 및 된장제조실에 분포하는 것으로 나타났다. 주로 토양에서 유래하는 것으로 알려진 *Bacillus firmus*는 병원성 세균으로 분류되고 있지 않지만, 항생제에 대한 내성이나 위해성이 보고되므로 참여기업 시설의 위생관리를 개선할 필요가 있다는 것을 시사하였다.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

■ 교육·지도

- 경상북도 풍기 및 군위 농업기술센터에서 각각 총 4회 전통장류제조자 교육 실시
- 장류관련업체 (수향식품)에 대해 수차례 된장 생산에 관한 전반적 지도 실시

■ 특허 및 논문

- 특허등록: 제 1056546, '콩알메주를 이용하여 한국 전통풍미를 지닌 장류 및 이의 제조 방법'
- Shukla Shurti, Kim JK, Kim M. Soybean and Health (Edited by Hany A. El-shemy). Chapter 9. Occurrence of Biogenic Amines in Soybean Food Products. p 181-206. 2011.
- Shukla Shurti, Choi TB, Park HK, Kim M, Lee IK, Kim JK, Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste

(Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*. 2005-2010, 2010.

- Shukla Shurti, Park HK, Kim JK, Kim M. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*. 1191-1195, 2010.

2. 성과활용 계획

- 우선적으로 참여기업에 대해 기술 이전을 실시할 계획이며, 차선으로는 장류관련업체에 대해 기술 이전을 실시할 계획임
- 본 연구결과를 바탕으로 전통된장의 색소 개선에 대한 추가연구를 추진 계획 중임
- 전통된장의 산업화에 활용 계획
- 관련학회에서의 발표를 통해 새로 개발된 이론과 기술을 공개

SUMMARY

I . Title of Research

Development of the mass production system of traditional Korean *Doenjang* for the rural agribusiness

II . The Objective of Importance of Research

1. The Objective of Research

This study we was performed to develop commercial mass production system for obtaining good flavor of Korean *Doenjang* fermented using new strains isolated from traditional Korean *Meju*.

2. The Importance of Research

- In most of Korean manufacturing company for *Doenjang* products fermented with 1 *Koji* (*Meju*) using only *Aspergillus oryzae* or mixing ratio of 2 *Meju* using *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*. These *Doenjang* were manufactured using soy bean, wheat, rice and barley for raw materials of *Doenjang*, has similar flavor like Japanese Miso. It take *Doenjang* products 1 month to finish fermentation.
- On the other hand, traditional Korean *Doenjang* fermented with *Meju* using various natural microorganisms such as *Bacillus subtilis* group strains and few molds. The traditional Korean *Doenjang* was manufactured using only soy bean for raw materials of *Doenjang*. The flavor distinguish traditional Korean *Doenjang* from Japanese Miso. It take traditional Korean *Doenjangs* 5-6 months to finish fermentation.
- The Korean *Meju* is very important to manufacture the traditional Korean *Doenjang*, because it effects on quality of the traditional Korean *Doenjang*.
- The Korean *Meju* manufactured using various natural microorganisms has hardship

to develop for quality improvements and industrialization of the traditional Korean *Doenjang*.

- The improved (commercially modified) *Doenjang* products manufactured by Korean manufacturing company, they has similar flavor like Japanese *Miso* and is occupied less then 30 % of domestic consumption in Korea.
- As the domestic less consumption ratio of improved *Doenjang* reflected the uppermost limit of improved *Doenjang*, quality improvement for traditional Korean *Doenjang* will be expended greatly in the market .
- Therefore, this study was performed to develop commercial mass production system for obtaining good flavor of traditional Korean *Doenjang*.
- For this examination, the strains for making *Meju* were prepared with bacteria and fungi, which *have* already been using in the company for fermentation of *Doenjang* and prepared with micro-flora isolated from traditional Korean *Meju*. Precisely, by adding strains isolated from traditional *Meju*, we could be find new starter occurred traditional characteristics.

III. Research Contents and Scope

1. The Objective of Research

This study we was performed to develop commercial mass production system for obtaining good flavor of Korean *Doenjang* fermented using new strains isolated from traditional Korean *Meju*.

- Development for new strains and sanitary traditional Korean *Doenjang*
- The development for commercial mass production system for obtaining good flavor of Korean *Doenjang*
- Estimation for safety *Doenjang* products decrease an element of unsanitary such as biogenic amines and aflatoxin and food born pathogenic organisms through hazard analysis critical control point (HACCP)

2. Contents and Scope of Research

- Selection of strains for obtaining good flavor of Korean *Doenjang* fermented using various strains isolated from traditional Korean *Meju*, and then estimation for quality of *Doenjangs* fermented with *Meju* using new selected various strains
- Estimation for safety *Doenjang* products decrease an element of unsanitary such as biogenic amines and aflatoxin and food born pathogenic organisms through hazard analysis critical control point (HACCP)
- Analysis of biogenic amines
 - Analysis of aflatoxin
 - Analysis of food born pathogenic organisms such as *Bacillus cereus*, coliform, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. *E. coli* O157:H7
- Analysis of protease activity and sensory characteristics in *Doenjangs* fermented with *Meju* using new selected various strains
- Analysis of taste compounds such as free amino acids, free sugars, non-volatile organic acids, volatile organic acids in *Doenjangs* fermented with *Meju* using new selected various strains
- Development of the mass production system for the rural agribusiness using new selected various strains
- Development of the mass production system for the rural agribusiness through hazard analysis critical control point (HACCP)
 - Cooking and sterilization for raw materials
 - Sterilization for sterile culture of *Meju*
 - Sanitary facilities for mass fermentation tank
 - Estimation put for sanitary reasons *Doenjang* products into instrument for commodity
- The mass production of traditional Korean *Doenjang* with optimum fermentation condition using the existing facilities of the rural agribusiness
- The pilot production of different flavor of characteristics *Doenjangs* fermented with *Meju* using various strains through optimum fermentation condition and hazard analysis critical control point(HACCP).

- Estimation for product condition of different characteristics flavor of various kinds of *Doenjangs*
- After analysis of taste compounds with sensory score, relationship of traditional Korean *Doenjang* with *Doenjang* fermented by *Meju* using new new selected various strains

IV. Result of Study

- Establishment for the control of home-made traditional *Doenjang* for source research material of this study
- Selection and Establishment of various strains could be obtain good flavor of Korean *Doenjang*
- Development of new starter culturing strains and establishment for sanitary *Doenjang* obtained good flavor of Korean *Doenjang*
- Establishment for fermentation condition by planning of pilot in *Doenjang* fermented with *Meju* using starter culture
- Estimation for safety *Doenjang* products decrease an element of unsanitary such as biogenic amines and aflatoxin and food born pathogenic organisms using monitoring of hazard analysis critical control point (HACCP)

1. Establishment for control of home-made traditional Korean *Doenjang* for source research material of this study

<Sensory characteristics and taste compounds in home-made traditional *Doenjang*>

- We purchased and selected 18 samples of *Doenjang* from local of Deju and Keoungbook, this *Doenjangs* was home-made traditional *Doenjang* products fermented with traditional Korean *Meju*.
- We estimated sensory characteristics of 18 home-made traditional *Doenjangs* using ranges of 5 point, As results, 1 kind of home-made traditional *Doenjangs* showed sensory score 3.9. We made use of the control for source research material of this study.

- In comparison with sensory and taste compounds characteristics (sweet, umami, bitter, sour) of 18 samples of home-made traditional *Doenjangs*, umami and sweet of taste compound and sensory characteristics suggested relationship of simple proportion.
- Three kinds of home-made traditional *Doenjangs* showed over 3.5 in sensory score, this research suggested application of basic standard for study in traditional Korean *Doenjang*.

<Estimation of hazard factor in home-made traditional *Doenjangs*>

- Determination of total aflatoxin, 2 kinds of samples showed over 10 μ g/1kg of tolerance limit. biogenic amines detected extremely small quantities.
- Determination of the food borne pathogenic organisms such as *Bacillus cereus* and coliform bacteria, 7 samples showed over tolerance limit (10⁴ CFU/g), 9 samples detected over tolerance limit (10³ CFU/g), responsibility.
- Determination of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 do not showed all.

2. Selection and Establishment of various strains could be obtain good flavor of Korean *Doenjang*

- The strains for making *Doenjang* were prepared with 1 kinds of bacteria and 6 kinds of fungi such as *Bacillus subtilis* TKSP 24 (*B. subtilis* TKSP 24), *Aspergillus oryzae* J (*A. oryzae* J), *Mucor racemosus* 15 (*M. racemosus* 15), *Penicillium chrysogenum*, *Mucor racemosus* 42 (*M. racemosus* 42), *Cladosporium uredinicola*, *Penicillium fellutanum* were isolated from traditional *Meju*.

3. Development of new starter culturing strains and establishment for sanitary *Doenjang* obtained good flavor of Korean *Doenjang*

- The strains for making *Doenjang* were prepared with 1 kinds of bacteria and 3 kinds of fungi, *B. subtilis* TKSP 24, *A. oryzae* J, *M. racemosus* 15, *M. racemosus* 42.
- We manufactured total 17 kinds of *Doenjangs* fermented with *Meju* using only 1 strain and *Doenjangs* fermented with same mixing ratio of *Meju* using 2 strains or 3 strains.

- *Doenjangs* fermented with same mixing ratio of *Meju* using 3 strains showed the highest sensory score among *Doenjangs* fermented with various *Meju*, they showed more higher sensory score than home-made *Doenjang* used of the control.
- As well as 2 samples of *Doenjang* fermented with same mixing ratio of *Meju* using 3 strains, *B. subtilis* TKSP 24, *A. oryzae* J, *M. racemosus* 15 or *M. racemosus* 42 showed highest results in sensory score among *Doenjangs* fermented with *Meju* using 1 strain and *Doenjangs* fermented with same mixing ratio of *Meju* using 2 strain, showed highest results in amounts of taste compounds.
- Determination of biogenic amines and total aflatoxin showed extremely small quantities
- Determination of the food borne pathogenic organisms such as *Bacillus cereus* and coliform bacteria and *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 do not showed all.

4. Performing to develop fermentation condition by pilot plan system for obtaining good flavor of Korean *Doenjang*

- The results showed highest sensory score of *Doenjang* fermented by mixed ratio (1 : 1 : 1) of *Meju* using 3 strains, *Bacillus subtilis* TKSP 24, *Aspergillus oryzae* J, *Mucor racemosus* 15 or *Bacillus subtilis* TKSP 24, *Aspergillus oryzae* J, *Mucor racemosus* 42.
- Determination of biogenic amines and total aflatoxin showed extremely small quantities
- Determination of the food borne pathogenic organisms such as *Bacillus cereus* and coliform bacteria and *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 do not showed all.

5. Estimation for safety *Doenjang* products decrease an element of unsanitary using monitering of hazard analysis critical control point (HACCP)

<Estimate of microflora in rural participant agribusiness>

- Determination of biogenic amines and aflatoxin and food born pathogenic organisms

- We estimated sanitary conditions of participant agribusiness such as workroom of inner factory and Koji room, room for *Doenjang* making.
- The fungi distributed 2 kinds of strains, it were identified with *Apergillus* species all.
- Determination of the food borne pathogenic organisms, *Bacillus cereus*, do not showed, but determination of *Bacillus firmus* showed equally workroom of inner factory and Koji and workroom for *Doenjang* making.
- Determination of coliform bacteria and *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 do not showed all.

V . Result of Study and Application Plan

1. Achievement of study

- Education and guidance
 - 4 times practice for education at Agricultural Research & Extention Services in Poogki and Kunwee, responsibility
 - Various times generally practice for education for business related soy and bean paste (SooHyang Food Co. Ltd)
- Patent and papers
 - Patent : patent no. 1056546, 'Development and methods of manufacturing for *Doenjang* fermented with *Meju* using various strain obtained good flavor of Korean'
 - Book : Shukla Shurti, Kim JK, Kim M. SOYBEAN AND HEALTH (Edited by Hany A. El-shemy). Chapter 9 Occurrence of Biogenic Amines in Soybean Food Products. p 181-205. 2011.
 - Paper 1 : Shukla Shurti, Choi TB, Park HK, Kim M, Lee IK, Kim JK, Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (*Doenjang*). *Food and Chemical Toxicology*. 2005-2010, 2010.
 - Paper 2 : Shukla Shurti, Park HK, Kim JK, Kim M. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (*Doenjang*). *Food and Chemical Toxicology*. 1191-1195, 2010.

2. Application Plan of Research Results

- First, we plan transference of the techniques for rural participant agribusiness, secondly, planning transference of the techniques for business related soy and bean paste
- We are planning added research of traditional Korean *Doenjang* using base on this study
- Application for commercialization of traditional Korean *Doenjang*
- Open the new theories and techniques by presentations in related conference

CONTENTS

Chapter 1. Summary of research	----- 23
Section 1. The objective of research	----- 23
Section 2. The importance of research	----- 23
Section 3. Research contents and scope	----- 24
Chapter 2. Technical development on the domestic and foreign researches	----- 25
Section 1. Technical development of our study on the domestic and foreign researches	----- 25
Section 2. Present situation of our study on the domestic and foreign researches	----- 26
Chapter 3. Contents and results of research	----- 28
Section 1. Analysis of sensory characteristics and taste compounds in traditional Korean home-made <i>Doenjangs</i>	----- 28
Section 2. Determination of biogenic amines and aflatoxin and food borne pathogenic organisms in traditional soybean paste samples	----- 38
Section 3. Determination of Starter and its characteristics of quality in <i>Doenjangs</i> fermented with <i>Meju</i> using starter culture	----- 48
Section 4. Determination of Starter and its characteristics of quality in <i>Doenjangs</i> fermented with mixing ratio of <i>Meju</i> using starter culture	----- 71
Section 5. Determination of biogenic amines and aflatoxin and food borne pathogenic organisms in <i>Doenjangs</i> fermented with mixing ratio of <i>Meju</i> using starter culture	----- 85
Section 6. Determination of biogenic amines and aflatoxin and food borne pathogenic organisms in participant of small and medium sized enterprises	----- 91
Section 7. Cleaning of Koji room	----- 97
Section 8. Summarization (Generalization)	----- 103

Chapter 4. Achievement of study and contribution	-----	108
Section 1. Achievement of study	-----	108
Section 2. Application Plan of Research Results	-----	109
Chapter 5. Application plan of research results	-----	110
Section 1. The application of research results	-----	110
Section 2. The plan of research results	-----	110
Chapter 6. Information of foreign scientific techniques	-----	111
Chapter 7. References	-----	112

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	9
CONTENTS	17
목 차	19
제 1 장 연구개발과제의 개요	23
제 1 절 연구개발의 목적	23
제 2 절 연구개발의 필요성	23
제 3 절 연구개발의 범위 및 내용	24
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	25
제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발 현황	25
1. 국내 기술개발 현황	25
2. 국외 기술개발 현황	26
제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치	26
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	28
제 1 절 전통메주로 제조한 민가된장의 품질검토	28
1. 연구개발의 배경	28
2. 재료 및 방법	29
가. 시료수집	29
나. 관능검사 (맛, 방향)	29
다. 맛 성분 분석	30
3. 결과 및 고찰	32
가. 관능검사	32
나. 맛 성분	33
제 2 절 전통메주로 제조한 민가된장의 위해성분	38

1. 연구개발의 배경	38
2. 재료 및 방법	38
가. Biogenic amines	38
나. Aflatoxin	40
다. 기타 식중독균	42
3. 결과 및 고찰	45
가. Biogenic amines과 aflatoxin	45
나. 기타 식중독균	45
제 3 절 종균의 선정 및 이를 이용하여 제조한 된장의 품질검토	48
1. 연구개발의 배경	48
2. 재료 및 방법	48
가. 우수균 선정	48
나. 관능검사	50
다. 선별균주의 동정	50
라. 맛 성분 분석	50
마. 통계처리	51
바. pH 측정	52
사. Biogenic amines과 aflatoxin 분석	52
3. 결과 및 고찰	53
가. 우수균 선정	53
나. 관능검사	59
다. 선정 균주의 동정	60
라. 맛 성분	63
마. 관능평가 점수와 맛 성분과의 관계	67
바. Biogenic amines과 aflatoxin	69
사. pH	70
제 4 절 메주 중량비를 달리하여 제조한 종균된장의 품질 특성	71
1. 연구개발의 배경	71
2. 재료 및 방법	71
가. 사용균주	71
나. 종균제조	71

다. 메주제조	71
라. 된장제조	72
마. 관능검사	72
바. pH 측정	72
사. 색도	72
아. 맛 성분 분석	72
자. 통계처리	73
3. 결과 및 고찰	74
가. 된장제조	74
나. pH, color 및 향의 특징	75
다. 관능검사	76
라. 맛 성분 분석	77
마. 관능검사와 맛 성분과의 관계	80
바. 색도 측정	82
제 5 절 새로운 종균으로 제조한 메주의 혼합비에 따른 된장의 위해요소 검토	85
1. 연구개발의 배경	85
2. 재료 및 방법	85
가. Biogenic amines	85
나. Aflatoxin	86
다. 기타 식중독균	86
3. 결과 및 고찰	89
가. Biogenic amines과 aflatoxin	89
나. 기타 식중독균	89
제 6 절 참여기업 공장의 위생검토	91
1. 연구개발의 배경	91
2. 재료 및 방법	91
가. 참여기업의 미생물 분포 조사	91
나. 참여기업의 식중독균 분포 조사	91
3. 결과 및 고찰	92
가. 참여기업의 미생물 분포	92
나. 참여기업의 주요 식중독 세균 분포	94

제 7 절 참여기업 koji room (콩알메주 제조실)의 청정도	97
1. 연구개발의 배경	97
2. 재료 및 방법	97
가. Biogenic amines과 aflatoxin	97
나. 기타 식중독균	98
3. 결과 및 고찰	100
가. Biogenic amines과 aflatoxin	100
나. 기타 식중독균 검토	101
제 8 절 총괄; 전통된장의 농가기업형 대량생산을 위한 system 개발	103
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	108
제 1 절 연구개발 목표 달성도	108
제 2 절 관련분야에의 기여도	109
제 5 장 연구 개발 성과 및 성과활용 계획	110
제 1 절 연구성과	110
제 2 절 연구성과 활용계획	110
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	111
제 7 장 참고문헌	112

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

전통메주에서 분리한 새로운 종균을 이용하여 안전성이 확립되면서 동시에 전통된장의 풍미를 지닌 위생적인 된장을 농가기업에서 대량생산할 수 있는 system을 개발하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

- 현재 우리나라 장류업체에서 생산되는 대부분의 된장제품은 대두나 밀 등을 이용하여 *Aspergillus oryzae*만을 사용하거나 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 혼합하여 메주를 제조하는 개량식 제조방식으로 일본의 미소 풍미와 흡사하다.
- 반면, 전통된장은 대두만을 이용하여 다양한 자연발효미생물에 의해 장기간의 발효기간을 거쳐 제조되어 개량식 된장과는 다른 한국 고유의 전통적 풍미를 지니게 된다. 그러나, 제조 시 마다 풍미가 균일하지 못하여 규격화된 전통메주의 산업적 model의 적용에 문제점을 가지고 있다.
- 각 장류 공장에서 생산되는 개량식 된장의 가정 내 소비율은 30% 미만에 그치고 있어, 전통된장의 산업화를 위해서는 된장의 품질특성에 영향을 미치는 전통메주의 model system을 개선하여 개량식 된장과 차별화할 필요성이 있다.
- 이에 본 연구에서는 종래 개량식 된장용 종균메주에 전통메주에서 분리한 미생물을 이용하여 종균메주를 제조하고 된장의 품질을 규격화함으로써 일본의 미소 풍미 대신 전통된장과 유사한 풍미를 지닌 된장을 농가에서 위생적으로 대량생산할 수 있는 전통된장의 산업적 model system의 개발 가능성을 제시하고자 하였다.

제 3 절 연구개발의 범위 및 내용

■ 연구개발의 최종목표

전통된장의 풍미를 지닌 위생적 된장을 각 농가기업에서 대량생산할 수 있는 system 개발

- 새로운 종균개발과 위생적 된장의 개발
- 우수한 전통풍미를 지닌 전통된장의 산업화
- 위해요소 모니터링을 통한 안전성이 확립된 된장 제품의 완성

■ 연구개발의 주요내용

- 메주에서 분리된 균 중 전통된장의 풍미를 생산할 수 있는 다수의 균을 선정하고 각각의 균으로 된장을 제조한 후 품질을 평가한다.
- 선정한 균을 이용하여 전통된장을 제조하고 그 제조과정을 위생화하기 위해서 HACCP을 적용하여 biogenic amines, aflatoxin, *Bacillus cereus*, 기타 식중독균을 측정한다.
- 위생적인 된장을 제조하기 위하여 원재료 및 된장의 biogenic amines, aflatoxin, *Bacillus cereus*, 기타 식중독균 등의 위해요소를 모니터링하여 저감화 방안을 개발한다.
- 각각의 균으로 제조한 된장의 protease 역가측정, 방향측정 (관능검사)을 한다.
- 선정한 균을 이용한 전통된장의 관능검사와 맛 성분 (유리아미노산, 유기산, 유리당)을 분석한다.
- 선정한 균을 이용한 HACCP 기준을 통과하는 농가기업형 대량생산 공정을 개발한다.
 - 원료의 증자 및 살균
 - 국실의 무균화
 - 대량 발효조의 위생화
 - 제조된장을 상품화 용기에 위생적 분주
- 기존의 공장 시설을 이용하여 최적 조건으로 전통된장 대량생산
- 최적 조건하에서 풍미의 특징이 서로 다른 다수의 된장을 pilot plant 생산
- 서로 다른 특징의 된장풍미를 지닌 다수의 된장 생산조건을 조사하고 맛 성분 및 방향성분을 분석하여 전통된장과 비교 검토

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

제 1 절 국내 · 외 관련분야에 대한 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

- 된장은 다양한 자연발효미생물을 이용한 자연발효메주로 제조되는 전통식 된장과 1종 혹은 2종을 종균으로 이용한 종균발효메주로 제조되는 개량식 된장으로 구별된다.
- 전통된장은 대두를 이용하여 다양한 자연발효미생물에 의해 2개월간 발효된 전통메주에 소금물을 첨가하여 2-3개월의 발효기간을 거쳐 된장과 간장을 분리한 후 재발효시키는 방식으로 한국 고유의 전통적 풍미를 지니게 된다.
- 반면, 개량식 된장은 증자한 대두, 보리, 밀, 쌀 등에 종균을 접종하여 2-5일간 배양한 메주에 소금물을 첨가하여 1개월의 발효기간을 거쳐 된장만을 제조하는 방식으로 일본 미소와 흡사한 풍미를 지니게 된다.
- 우리나라 장류업체에서 생산되는 대부분의 된장제품은 대두나 밀 등을 이용하여 종균으로 *Aspergillus oryzae*만을 단독으로 사용하여 된장을 제조하거나 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 혼합하여 제조하는 개량식 된장으로 전통된장의 풍미와 일본 미소의 중간 정도의 풍미를 지닌다.
- 현재 우리나라 각 장류공장에서 제조하는 종균메주발효방식의 개량식 된장은 전통된장의 풍미와는 다른 일본 미소와 흡사한 풍미를 지니게 되어 개량식 된장의 가정 내 소비율은 30% 미만에 그치고 있다.
- 이처럼 개량된장의 가정 내 저조한 사용율은 현재 시판되고 있는 공장형 된장의 한계점을 반영하는 것으로서 우리나라 고유의 풍미를 간직한 전통된장을 복원하여 시장을 확대시킬 필요성이 있음을 시사한다.
- 다양한 자연발효미생물과 자연환경에 노출되어 제조되는 전통된장은 식중독균의 오염과 자연발효미생물에 의한 biogenic amines, aflatoxin의 함유 경향이 많음에도 불구하고 위생처리가 가능하며 동시에 중소형규모로 생산 가능한 농가형 된장 생산 시설은 전혀 되어 있지 않다.
- 지금까지 전통메주의 산업적 모델에 대한 선행연구로는 일본의 장류제조용 균주인 *Aspergillus oryzae*를 단독으로 이용하거나, *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 함께 사용하여 된장을 제조하는 개량식 메주 model에 대한 연구에 그쳐 전통메주의

model을 이용한 전통된장의 산업화를 위한 기술개발은 되지 못하고 있다.

- 전통메주에서 분리한 각종 사상균과 우점종 세균을 조합한 전통메주의 개선에 대한 기술개발은 전무하며, 된장제조 공정 중 유입되는 위해요소의 저감화를 위한 연구와 전통발효식품에 함유된 biogenic amine 함유량 조사 혹은 aflatoxin의 오염 검사에 대한 연구에만 그치고 있다.

2. 국외 기술개발 현황

- 된장의 연구는 주로 일본과 우리나라에서 가장 많이 이루어져 있다.
- 우리나라 장류업체에서는 일본의 미소제법으로 된장을 제조하게 되지만 우리나라 공장형 된장은 미소와 전통된장의 중간 정도의 풍미를 지니게 된다.
- 이는 일본 미소 제조 시 종균으로 *Aspergillus oryzae*만을 단독으로 사용하여 다른 균 특히 *Bacillus* spp.의 오염을 방지하고 있고, 우리나라 장류업체에서는 *Bacillus* spp.의 오염을 방지하지 못하기 때문이다.
- 우리나라 전통된장의 풍미는 주로 *Bacillus* spp.에 의해 생성되고, 일본 미소는 주로 *Aspergillus oryzae*에 의해 풍미가 생성된다.
- 일본의 경우 중소형규모의 미소 제조 공장에서는 위생시설이 비교적 잘 되어 있다.
- 된장은 주로 미국, 중국 시장으로 많이 수출되며, 두 나라에 대한 수출량이 전체의 55.8%를 차지하고 있다.
- 국가별로는 미국이 가장 큰 시장이며, 2007년 기준 시 된장 수출량의 35% 이상이 미국으로 수출되고 있다.

제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 전통된장제조에 이용되는 메주는 된장의 품질에 영향을 미치는 주요 인자로서 다양한 자연발효미생물을 이용하여 제조되므로 제조 시 마다 풍미가 균일하지 못하여 규격화된 전통메주의 산업적 model의 적용에 문제점을 안고 있다.
- 본 연구에서는 전통메주에서 분리한 종균으로 제조한 메주를 종래 사용하는 장류제조용

종균메주와 다양하게 조합하여 개량식 된장과 차별화되는 전통식 콩알메주된장을 제조함으로써 된장의 품질특성에 영향을 미치는 전통메주의 model system을 개선하고자 하였다.

- 종균을 이용한 위생적인 전통된장의 풍미에 대한 기술개발은 전통메주의 model system을 개선함으로써 전통된장의 품질 규격화와 전통된장의 산업적 대량생산의 계기로 국내의 소비 증대와 더불어 국외에 수출과 농가소득의 극대화 실현이 가능하리라 본다.
- 우리나라 전통된장제조용 메주는 직육면체인 벽돌형태가 대부분으로 본 연구에서는 개량식 된장의 용이한 콩알메주제조방식을 전통식 된장제조방식에 적용함으로써 일본 미소 풍미 대신 전통된장과 유사한 품질을 지닌 발효기술개발로서 소규모로 생산하는 농가에 전수하여 농가의 소득을 극대화할 수 있을 것이다.
- 기존 국내의 특허는 기능성 증강 및 발효과정 중, 야기될 수 있는 문제점의 해결 분야에 치중되어 있으나, 본 연구에서는 전통된장의 풍미를 나타낼 수 있는 종균개발 및 이 종균들을 이용하여 위생적이고 서로 다른 전통풍미를 지닌 여러 종의 전통된장을 농가형 공장 (중소규모)에서 생산할 수 있는 system을 개발하는 방향으로 연구를 추진하고자 한다. *Bacillus subtilis* 및 *Aspergillus oryzae*와 새로운 종균으로 전통된장의 풍미를 지닌 된장의 제조법을 개발하여 우리나라 각 대규모의 장류공장과 전통된장을 생산하는 농가기업형 공장에 기술 전수가 가능할 것이다.
- 우리나라 가정에서는 풍미가 기호도를 충족치 못해 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis* 만으로 제조한 공장산 된장의 소비는 30%도 되지 않고, 70% 이상은 전통된장을 소비하고 있다.
- 특히 *Aspergillus oryzae* 만으로 된장을 제조하면 일본 미소의 풍미와 같아지므로 소비율이 더욱 나빠지고 특수하게도 작은 식당에서만 이용하게 되므로 (된장생산 공장에서 확인이 가능함) 본 연구기술을 활용하여 전통된장의 대량생산의 산업화가 가능하리라 사료된다.
- 국내 및 국외시장 분석결과, 콩의 우수한 기능성과 더불어 전통된장 등의 판매가 지속적인 성장을 보이고 있으므로 한국 전통식품 중의 하나인 된장으로 국내 및 국외 시장을 공략하기에 충분한 가치가 있다고 사료된다.
- 본 연구과제에서는 전통된장의 고유의 맛과 풍미를 향상시키는 방향으로 연구를 추진하여 전통된장 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 소비 증진에 기여할 것으로 판단된다.
- 전통된장 제품이 우리나라 고유의 맛과 문화가 융·복합된 한류 식문화 브랜드로서 국제적으로 자리 잡는다면 국가브랜드도 더불어 격상할 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 전통메주로 제조한 민가된장의 품질검토

1. 연구개발의 배경

된장은 우리의 식생활에 중요한 부분을 차지하고 있는 전통적 대두발효식품으로서 다른 식품에 비해 아미노산, 유기산, 미네랄, 비타민 등이 풍부(1)할 뿐만 아니라 다양한 생리활성을 가지는 기능성 식품(2-4)이다.

된장은 제조 공정 중 메주의 발효과정을 거치게 되는데, 메주는 다양한 미생물인 *Bacillus subtilis* group, *Mucor* 속, *Rhizopus* 속, *Penicillium* 속, *Syncepharastrum* 속, *Cladosporium* 속, *Scopulariopsis* 속, *Eurotium* 속, *Aspergillus* 속 등(5-8) 자연균에 의해 발효되는 자연발효메주 (전통식 된장)와 *Bacillus subtilis* group, *Aspergillus oryzae*를 단독 또는 공동으로 이용하는 종균발효메주 (개량식 된장)로 구분된다(9).

전통메주는 대두를 증자하고 분쇄하여 성형한 다음 이를 건조시켜 다양한 자연발효미생물에 의해 2개월간 발효시킨 후 된장을 제조하는 방식으로 한국 전통된장의 풍미를 지니며, 반면 개량식 메주는 증자한 대두, 보리, 밀, 쌀 등에 종균을 접종하여 2-5일간 배양한 후 된장을 제조하는 방식으로 다양한 미생물에 의해 제조되는 한국 전통된장의 풍미와는 다른 일본 미소의 풍미를 지니게 된다(10,11).

이와 같이 된장의 품질은 된장제조용 메주의 발효방법에 따라 그 영향을 미치게 되므로 메주의 model을 개선하는 것은 매우 중요한 일이다. 하지만 전통메주는 다양한 자연발효미생물에 의해 장기간 제조되므로 제조 시 마다 풍미가 균일하지 못하여 규격화된 전통메주의 산업화 적용에 문제점을 안고 있다.

현재 우리나라 각 장류 공장에서 생산되는 개량식 된장의 가정 내 소비율은 30% 미만으로 이처럼 가정 내 저조한 사용율은 현재 시판되고 있는 공장형 된장의 한계점을 반영하는 것으로써 개량식 된장보다 영양 및 기능적 측면에서 월등히 우수한(12) 전통된장의 산업화를 위해서는 전통메주의 model system을 개선하여 개량식 된장과 차별화되는 전통된장의 풍미에 대한 연구가 필요하다.

이에 본 연구에서는 종래 개량식 된장용 종균메주에 전통메주에서 분리한 종균메주를 첨가하여 종균된장제조 조건을 규명하고 된장의 품질을 규격화하여 전통된장의 풍미를 지닌 된장을 농가에서 위생적으로 대량생산할 수 있는 system을 제시하고자 하였다. 우수 선정균

을 이용한 위생적이고 우수한 풍미를 지닌 전통식 된장제조를 위한 기초자료로 사용하기 위하여 전통메주로 제조한 민가된장을 수집하여 전통된장의 관능검사와 맛 성분 분석을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료 수집

대구 및 경북 고령지역에서 전통식으로 제조한 민가된장 18종을 수집하여 사용하였다. 시료의 기원과 수집날짜는 Table 1과 같다.

Table 1. List of the analyzed traditional fermented soybean paste samples of *Doenjang*

Sample No.	Sample name	Collection period (month/year)	Color	pH
1	Chungdo		Dark brown	5.0
2	Phalkong		Dark brown	4.8
3	Yeungju		Dark brown	4.9
4	Koreung-1		Dark brown	5.6
5	Wookog		Light brown	6.1
6	Ssanglim		Yellowish brown	6.5
7	Dukkog-1		Dark brown	5.7
8	Dukkog-2	04/2009	Dark brown	5.6
9	Koreung-2		Yellowish brown	6.5
10	Woonsu-1		Dark brown	5.5
11	Sanglim		Dark brown	5.3
12	Woonsu-2		Dark brown	5.0
13	Wookog-2		Dark brown	5.8
14	Munhwa		Dark brown	5.8
15	Andong-1		Light brown	5.4
16	Aphsan Halmai		Yellowish brown	6.2
17	Andong-2	10/2008 - 05/2009	Yellowish brown	6.0
18	Andong-3		Yellowish brown	5.2

나. 관능검사 (맛, 방향)

관능검사 요원은 건강하고 의욕적이며 참여 가능성과 성별 등을 고려하여 영남대학교 식품공학과 대학원생 (20-30대) 및 40-50대 남성과 여성 총 8명을 대상으로 장의 기법에 따라 맛과 향 등에 대한 기본지식을 훈련시켰으며(13), 매우 나쁨 1점, 보통임 3점, 매우 좋음 5점 법으로 시료의 풍미를 채점하도록 하였다.

다. 맛 성분 분석

(1) 맛 성분 추출

Setsuko 등(14)의 방법을 준용하여 Fig. 1과 같이 된장 100 g에 처음에는 86.7% ethanol 150 mL를 첨가하여 65°C에서 1시간 동안 추출한 후 여액 잔유물은 다시 65% ethanol로 2번 더 반복 추출한 다음 filter paper로 filtering한 후 그 여액들을 합하여 4000×g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리한 상등액은 60°C에서 감압농축 후 90% methanol로 완전히 탈염을 시켰다. 탈염 후 여과한 여액은 다시 감압 건조시켜 물 100 mL로 용해하였다.

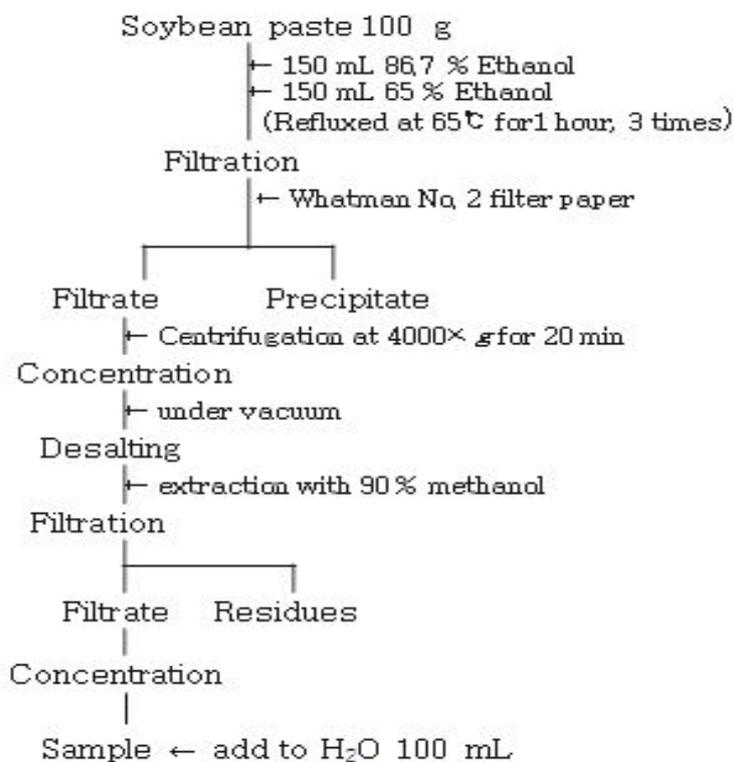


Fig. 1. Procedure for the extraction of taste compounds from *Doenjang*.

(2) 맛 성분의 분리 및 정제

추출된 맛 성분 시료는 Fig. 2와 같이 이온교환수지(15)를 이용하여 분리, 정제하였다. 즉 양이온 교환수지 amberlite IR-120과 음이온 교환수지 amberlite IRA-400을 직경 2 cm, 길이 35 cm의 column에 충전시켜 맛 성분 정제에 사용하였다. 추출 시료를 amberlite IR-120과 amberlite IRA-400에 차례로 서서히 통과시킨 후 다시 200 mL의 증류수로 washing을 하여 양쪽을 모두 통과한 용출액은 유리당의 분석시료로 사용하였으며, 유리당의 HPLC 분석 조건은 instruments: Waters Co. 600E Model; column: Sugar-Pak I column (6.5×300

mm); column temperature: 90°C; mobile phase: Ca EDTA buffer (50 mg Ca-EDTA/1 L dH₂O); flow rate: 0.5 mL/min; detector: refractive index detector (RI Model 410)와 같다. 유리아미노산은 amberlite IR-120에 흡착된 부분을 2 N NH₄OH 150 mL로 서서히 용출시킨 후 감압 건조하여 0.1 M lithium citrate buffer (pH 2.2) 2 mL로 용해시켜 아미노산자동분석기 (Biochrom 20)로 분석하였다.

비휘발성 유기산은 amberlite IRA-400에 흡착된 부분을 1.5 N (NH₄)₂CO₃ 150 mL로 서서히 용출 후 감압 건조하여 P₂O₅가 든 desiccator에 하루 동안 방치한 다음 diehtyl ether 20 mL로 용해한 후 HPLC로 분석하였으며, 분석 조건은 instruments: Waters Co.; column: RSpak KC-811 (Φ8.0×300 mm); column temperature: 40°C; flow rate: 1.0 mL/min; mobile phase: eluent 0.1% H₃PO₄/dH₂O; detector: model RI (differential refractive index detector) 와 같다.

(3) 휘발성 유기산의 분리

휘발성 유기산은 Kageyama(16) 방법에 준하여 된장 10 g에 물 20 mL를 첨가하여 mixing한 후 filter paper로 여과하여 분석 시료로 사용하였으며 시료에 2%의 H₂SO₄를 0.1%의 농도가 되게 가하여 pore size가 0.45 μm인 membrane filter로 여과한 후 GC로 분석하였다. GC의 분석 조건은 instrument: GC-Hewlett-Packard 5980 II; column: 10% PEG 6000이 충전된 2 m glass column; detector와 injector temperature: 200°C; column temperature: 170°C; carrier gas: He; flow rate: 0.9 mL/min와 같다

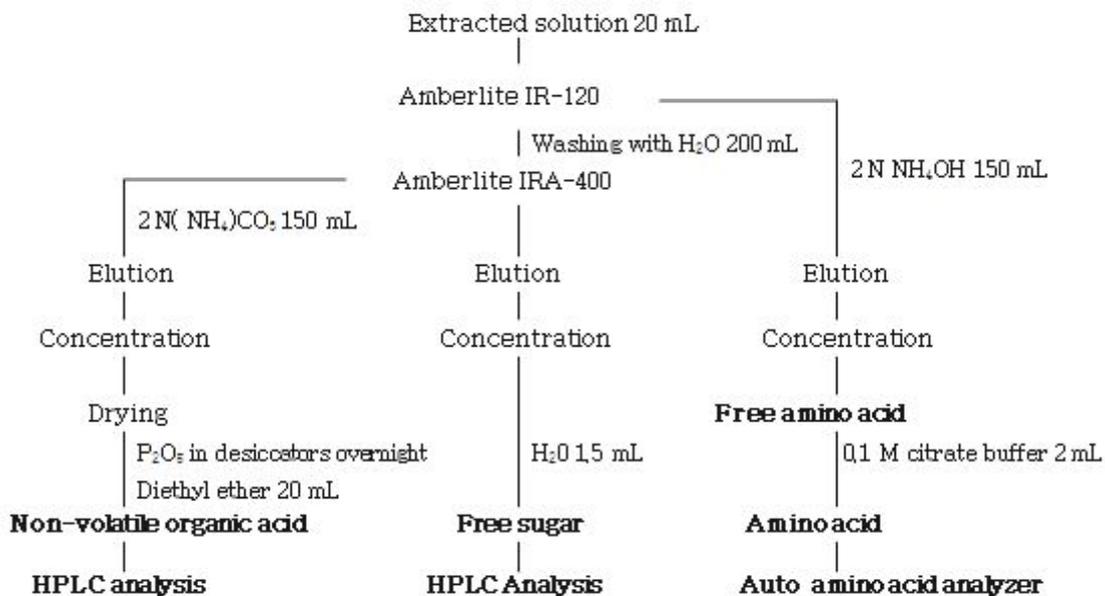


Fig. 2. Procedure for the purification of taste compounds from *Doenjang*.

3. 결과 및 고찰

가. 관능검사

전통메주로 제조한 민가된장의 관능검사 결과는 Table 2와 같다. 전통된장의 풍미를 나타내는 맛과 향의 관능검사 점수가 가장 높게 나타난 된장은 8번 된장 (3.9점/5점)이었으며, 3번과 14번 된장의 관능검사 점수도 3.5점 보다 높은 것으로 나타났다.

관능검사 점수가 3.6점-3.9점으로 나타난 8번, 3번 14번 된장은 Fig. 3에서와 같이 된장의 풍미를 결정하는 구수한 맛을 나타내는 함량 (유리 아미노산)과 단맛 (유리당 및 유리 아미노산)을 나타내는 함량이 높았으나, 쓴맛을 나타내는 아미노산의 함량과 신맛을 나타내는 유기산의 함량은 상대적으로 낮았다. 또한 관능검사 점수가 3.0점-3.4점 범위에 있는 2번, 7번, 16번 된장에서도 맛 성분의 함량 분포에서 관능검사 점수가 가장 높은 group과 비슷한 양상을 나타냈으나, 단맛, 구수한 맛, 쓴맛, 신맛의 성분비는 차이가 있었다.

관능검사 점수가 낮아질수록 맛 성분의 전체 함량이 관능검사 점수가 높은 group의 총 함량에 비해 현격하게 낮게 나타났으며, 관능검사 점수가 높은 group의 단맛과 구수한 맛의 성분함량보다 현저히 낮았다. 전통메주로 제조한 전통된장 및 공장산 된장의 관능검사 성적이 우수할수록 맛 성분 중 구수한 맛과 단맛을 나타내는 함량이 높는데 비해 쓴맛과 신맛의 함량은 상대적으로 낮게 나타났으며, 맛 성분의 총 함량도 많았다. 구수한 맛과 단맛의 성분함량이 쓴맛 및 신맛의 성분함량에 비해 높을수록 된장 맛의 품질이 향상되는 것으로 사료되며, 전통된장의 맛에 영향을 미치는 것은 단맛, 구수한 맛, 쓴맛, 신맛, 짠맛들의 성분함량비에 따른 맛의 조화에 의해 결정되는 것으로 사료된다.

된장의 풍미를 결정하는 여러 가지 맛 성분 중 구수한 맛과 단맛을 나타내는 성분함량이 높은 된장은 관능검사 점수가 높았고 쓴맛 성분 및 신맛의 총 맛 성분함량비는 낮게 나타났다.

전통메주로 제조한 민가된장 18종 된장에서 관능검사 점수가 3.9점 (5점 만점)으로 나타난 된장 (시료 8번)을 본 연구의 기초자료를 이용하기 위한 대조구로 사용하기에 충분하다고 사료되며, 관능검사 성적이 3.5점 이상인 된장시료는 3종으로 앞으로 전통된장의 연구적 좌표로 이용됨을 시사하고 있다고 사료된다.

Table 2. Sensory evaluation of home-made *Doenjang* fermented with traditional Korean *Meju*

Sample No. ¹⁾	Taste	Flavor
	Mean±SD	Mean±SD
1	2.6±0.67 ^{cd1)}	2.4±2.19 ^c
2	3.4±0.67 ^{ab}	3.3±0.12 ^{ab}
3	3.7±0.14 ^a	3.3±0.12 ^b
4	2.9±0.53 ^{bc}	3.3±0.52 ^b
5	2.9±0.27 ^{bc}	2.4±0.67 ^c
6	2.3±1.34 ^{cde}	2.3±0.29 ^c
7	3.3±0.89 ^{bc}	3.1±0.34 ^b
8	3.9±0.07 ^a	3.9±0.14 ^a
9	2.9±1.34 ^{bc}	3.0±0.32 ^{ab}
10	2.4±1.14 ^{de}	2.4±0.24 ^c
11	2.3±0.89 ^{de}	2.9±1.14 ^{bc}
12	2.7±1.52 ^{de}	2.7±0.19 ^{bc}
13	2.0±1.67 ^e	1.4±0.55 ^c
14	3.6±0.89 ^a	3.4±0.14 ^a
15	2.6±0.44 ^{cde}	2.4±0.52 ^{bc}
16	3.0±0.34 ^{bc}	2.7±0.89 ^{bc}
17	2.9±0.67 ^c	2.3±1.05 ^{bc}
18	2.6±0.19 ^{cde}	3.0±0.34 ^b
F-value	2.578**	2.600**

** : p<0.01

¹⁾The origin of each sample was listed in Table 1.

나. 맛 성분

전통메주로 제조한 전통된장 및 시판 공장산 된장의 유리아미노산, 유리당, 유기산의 분포는 Table 3-5와 민가된장 18종의 단맛, 구수한 맛, 쓴맛, 신맛의 성분함량의 2구간 이동평균 추이는 Fig. 3과 같다.

Table 3, 4 및 Fig. 3에서 맛 성분 중 단맛(유리당 및 유리 아미노산)과 성분함량이 900 mg%-1,400 mg%인 된장은 3종(2번, 3번, 7번)이었으며 500 mg%-900 mg%인 된장은 5종 (4번, 5번, 8번, 14번, 16번)이었고, 그 외 10종(1번, 6번, 9번, 10번, 11번, 12번, 13번, 15번, 17번, 18번) 된장의 단맛 성분 함량은 극히 적었다. 구수한 맛(유리 아미노산)의 성분함량이

760 mg%-800 mg%인 된장은 2종(2번, 3번)이었으며, 그 외 5번, 7번, 8번 된장이 330-530 mg%였으며, 그 외 시료는 150 mg% 이하로 낮은 함량을 나타내었다.

2번, 3번 된장 시료는 단맛과 구수한 맛의 함량이 다른 시료에 비해 함량이 높았으며 또한 여러 맛 성분(단맛, 구수한 맛, 쓴맛, 신맛)의 총 함량이 가장 많았으며, Table 4와 Fig. 3에서 보는 바와 같이 쓴맛을 나타내는 아미노산의 함량과 신맛을 나타내는 유기산의 함량은 상대적으로 낮게 나타났다.

이에 반해 13번 된장은 신맛(유기산)의 성분 함량비는 단맛과 구수한 맛에 비해 상대적으로 많았으며, 여러 맛 성분의 총 함량은 가장 낮은 것으로 나타났다(Table 4, Fig. 3).

대조구로 이용된 민가된장 18종의 맛 성분을 검토한 결과 된장의 풍미를 결정하는 여러 가지 맛 성분 중 구수한 맛과 단맛을 나타내는 맛 성분의 총 함량이 많은 시료의 된장은 8종이었고, 그 외 10종은 맛 성분의 총 함량이 낮은 것으로 나타났다.

단맛 성분함량과 구수한 성분함량의 비가 높은 것은 상대적으로 쓴맛 및 신맛의 함량이 낮았으나, 단맛 성분함량과 구수한 맛 성분함량이 낮으면 쓴맛과 신맛의 함량이 높은 것으로 나타났다.

이러한 결과로 볼 때, 구수한 맛과 단맛의 성분함량이 높을수록 된장 맛의 품질이 향상되는 것으로 나타났으며, 전통된장의 맛에 영향을 미치는 것은 단맛, 구수한 맛, 쓴맛, 신맛, 짠맛들의 성분 함량비에 따라 맛의 조화가 이루어질 때 전통된장의 우수한 맛을 나타내는 것으로 사료된다. 우수한 맛을 지니기 위한 맛 성분의 구체적인 성분함량비율 등에 관해서는 본 실험을 통하여 검토해 볼 때 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

Table 3. Composition of free amino acids in home-made *Doenjang* fermented with traditional Korean *Meju*

(mg/100 g)

Sample No ¹⁾	Free A.A.	Sweetness					Sub-total	Umami			Sub-total	
		Thr.	Ser.	Gly.	Ala.	Lys.		Asp.	Glu.	Cys.		
1		15.6	18.5	12.5	29.8	24.9	101.4	24.9	70.4	0.0	95.2	
2		111.9	133.2	73.7	105.1	143.2	567.2	42.6	357.1	0.0	399.7	
3		98.3	84.8	53.5	139.8	144.8	521.1	26.2	354.9	0.4	381.5	
4		19.8	15.9	39.4	110.8	46.9	232.8	14.9	73.5	1.2	89.6	
5		0.0	1.6	57.7	90.0	121.3	270.5	2.3	187.8	1.1	191.3	
6		26.6	27.3	18.3	45.4	35.7	153.4	11.9	75.0	0.1	87.1	
7		63.7	55.8	54.9	124.5	124.7	423.7	38.2	126.6	0.0	164.7	
8		86.8	85.7	53.6	85.0	79.0	390.0	35.6	227.6	0.0	263.2	
9		4.4	12.6	24.1	82.6	72.5	196.1	33.3	141.6	0.0	174.9	
10		18.7	19.1	15.1	51.6	39.2	143.8	15.1	75.2	0.0	90.3	
11		36.0	44.2	30.6	120.2	86.2	317.2	13.7	152.0	0.0	165.8	
12		19.8	19.8	17.4	103.7	67.4	228.3	6.5	121.6	0.0	128.1	
13		0.0	2.2	45.2	183.6	69.2	300.3	3.6	161.3	5.2	170.1	
14		70.6	87.0	84.7	285.0	164.5	691.8	40.5	38.1	2.5	81.0	
15		0.0	1.3	26.1	100.5	66.5	194.3	3.0	6.5	0.2	9.7	
16		0.0	0.9	105.1	245.0	198.8	549.9	125.9	16.4	1.5	143.8	
17		9.3	5.5	27.6	117.2	70.8	230.4	6.1	156.0	1.1	163.2	
18		6.7	3.9	19.9	87.7	53.8	172.0	2.2	113.7	0.8	116.6	
Mean		32.7	34.4	42.2	117.1	89.4	315.8	24.8	136.4	0.8	162.0	
Sample No. ¹⁾	Free A.A.	Bitterness			Sub-total	Other taste				Sub-total	Sum	
		Met.	Ileu.	Leu.		Tyr.	Phe.	Val.	His.			Pro.
1		5.5	26.7	43.7	75.9	15.3	26.7	26.4	6.8	30.0	105.3	377.8
2		24.7	112.0	11.6	148.3	106.3	11.8	95.9	22.3	146.1	382.5	1,497.6
3		25.6	108.6	159.0	293.3	8.4	123.5	102.9	43.3	113.7	391.8	1,587.6
4		15.1	59.7	92.4	167.2	7.2	46.3	61.6	6.9	42.0	164.1	653.6
5		31.5	107.3	171.1	309.9	6.6	83.4	93.0	1.4	24.3	208.8	980.5
6		8.4	51.7	80.3	140.4	11.2	43.6	49.4	9.6	37.3	151.1	532.0
7		23.8	103.1	169.3	296.2	14.1	73.8	90.0	16.1	114.3	308.4	1,193.0
8		13.9	75.6	120.0	209.5	7.1	56.0	82.5	10.6	99.6	255.7	1,118.5
9		18.5	72.2	117.5	208.1	10.0	64.1	73.2	19.2	40.6	207.2	786.3
10		7.7	48.3	78.6	134.6	15.0	44.2	48.0	2.9	40.1	150.2	518.9
11		17.2	62.7	101.4	181.4	18.4	61.0	71.6	25.7	55.3	232.0	896.3
12		13.3	54.2	96.0	163.4	22.9	49.2	56.9	1.0	44.8	174.8	694.6
13		19.9	82.7	132.2	234.8	1.4	54.0	87.6	0.6	10.7	154.3	859.5
14		26.8	117.5	181.0	325.4	15.6	105.3	136.6	0.7	102.0	360.1	1,458.3
15		16.5	51.7	112.6	180.7	0.3	60.7	59.4	0.3	34.2	155.0	539.7
16		27.6	107.4	162.7	297.7	22.7	68.3	138.7	10.2	106.2	346.1	1,337.6
17		22.5	79.4	140.8	242.7	109.6	71.6	77.2	0.0	27.5	286.0	922.3
18		16.8	59.4	104.7	180.9	0.8	52.1	57.7	0.0	20.7	131.3	600.8
Mean		18.6	76.7	115.3	210.6	21.8	60.9	78.3	9.9	60.5	231.4	919.7

Abbreviations: Thr., Threonine; Ser., Serine; Gly., Glycine; Ala., Alanine; Lys., Lysine; Asp., Asparatic acid; Glu., Glutamic acid; Cys., Cysteine; Met., Methionine; Ileu., Isoleucine; Leu., Leucine; Tyr., Tyrosine; Phe., Phenylalanine; Val., Valine; His., Histidine; Pro., Proline

¹⁾The origin of each sample was listed in Table 1.

Table. 4. Composition of free sugars in home-made *Doenjang* fermented with traditional Korean *Meju* (mg/100 g)

Free sugar Sample No. ¹⁾	Sucrose	Maltose	Glucose	Galactose	Fructose	Sum
1	26.97	0.81	12.17	-	16.89	56.84
2	33.58	1.18	46.82	-	90.89	172.48
3	4.46	0.46	9.58	285.51	53.99	354.00
4	1.24	3.51	17.20	-	12.59	34.54
5	2.78	-	0.47	-	6.93	10.18
6	3.83	0.09	0.77	-	0.31	5.00
7	85.46	72.94	36.59	-	47.08	242.08
8	22.31	4.82	48.08	-	40.97	116.18
9	1.00	0.73	3.03	-	9.78	14.54
10	0.80	1.60	4.22	-	2.66	9.28
11	8.09	0.26	28.22	-	31.32	67.90
12	0.98	-	20.10	-	18.57	39.65
13	1.26	1.56	5.61	-	0.24	8.66
14	2.83	0.54	8.79	-	43.35	55.51
15	4.67	13.82	5.26	-	1.67	25.42
16	2.17	0.36	6.04	-	40.87	49.45
17	3.49	2.51	7.05	-	4.71	17.76
18	2.41	0.12	4.27	-	3.06	9.85
Mean	11.57	5.85	14.68	15.86	23.66	71.63

¹⁾The origin of each sample was listed in Table 1.

Table. 5. Composition of organic acids in home-made *Doenjang* fermented with traditional Korean *Meju* (mg/100 g)

Sample No. ¹⁾	Non-volatile organic acid					Volatile organic acid				
	Oxalic acid	Citric acid	Succinic acid	Lactic acid	Sum	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	3-Methylbutanoic acid	Sum
1	-	-	-	-	-	63.84	122.74	68.94	8.94	264.45
2	27.53	5.56	-	7.11	40.20	151.84	100.63	42.46	8.60	303.52
3	1.84	-	0.25	13.02	15.11	62.05	34.15	52.00	6.69	154.90
4	-	-	-	51.73	51.73	79.19	47.69	1.06	3.82	131.75
5	-	-	-	6.95	6.95	136.96	37.21	15.42	26.29	215.89
6	-	-	-	-	0.00	50.22	32.34	-	7.32	89.88
7	-	-	-	7.69	7.69	42.05	16.49	-	59.04	117.58
8	-	-	-	9.48	9.48	84.78	59.26	-	16.70	160.74
9	-	-	-	5.40	5.40	81.38	33.50	-	43.04	157.92
10	-	-	-	-	0.00	63.82	30.99	23.81	36.55	155.17
11	-	-	-	4.87	4.87	63.29	30.69	-	29.28	123.26
12	-	-	-	6.42	6.42	31.74	40.49	-	14.44	86.67
13	-	-	0.17	0.86	1.03	178.28	218.20	126.36	14.31	537.16
14	-	-	-	8.72	8.72	105.04	109.09	53.09	14.58	281.80
15	-	-	-	11.85	11.85	117.65	91.16	39.00	16.13	263.94
16	-	-	-	7.55	7.55	77.14	75.84	22.87	16.62	192.47
17	-	-	-	6.11	6.11	139.10	124.19	48.48	15.89	327.65
18	-	-	-	1.53	1.53	122.76	56.65	38.22	18.08	235.71
Mean	10.12	0.33	0.02	8.29	10.26	91.73	70.07	29.54	19.80	211.14

¹⁾The origin of each sample was listed in Table 1.

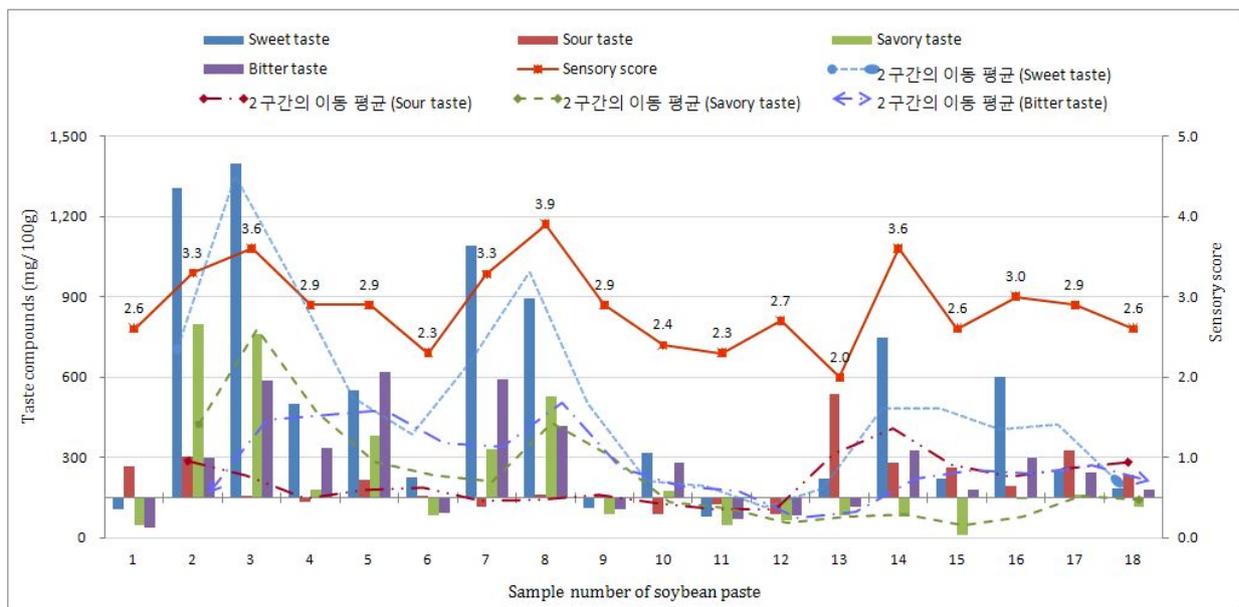


Fig. 3. Relationship of taste compounds with sensory score in home-made *Doenjang* fermented with traditional Korean *Meju*.

¹⁾The origin of each sample number was listed in Table 1.

제 2 절 전통메주로 제조한 민가된장의 위해성분

1. 연구개발의 배경

위생적인 농가형 전통된장의 대량생산 system의 확립을 위해 전통된장 생산 공정의 위생 관리 방안을 위하여 전통된장의 우수한 맛과 향을 지닌 대구, 경북 지역의 전통메주로 제조한 전통된장 및 공장산 된장 18종의 biogenic amines, aflatoxin, 대장균군, *Bacillus cereus* 와 주요 식중독 세균을 분석하였다.

발효식품의 발효과정 중 미생물에 의해 생성되는 biogenic amines은 발효식품의 숙성 과정에서 발생하며 biogenic amines 중 histamine과 tyramine은 많이 섭취하면 신경 및 혈관을 자극해 식중독, 편두통, 알레르기 등의 증상을 일으킬 수 있는 유해물질이며, 이는 발암물질로 전환될 개연성이 있는 것으로 biogenic amines에 대한 저감화의 필요성이 강조되고 있다. 따라서, *Aspergillus flavus*에 의해서 생성되어 간암을 일으키는 자연독소인 aflatoxin 과 함께 된장 미생물에 대한 관리와 조절의 중요성이 강조된다.

Biogenic amines는 HPLC로 정량분석하였고, aflatoxin은 veratox aflatoxin test kit를 사용하여 분석하였으며, 총 균수, 대장균군, *Bacillus cereus*와 주요 식중독 세균분석법은 식품 공전 및 국제적으로 인증된 방법에 따라 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. Biogenic amines

(1) 시약

Biogenic amines의 표준품으로 tryptamine hydrochloride (TRP), 2-phenyl-ethylamine (PHE), spermidine trihydrochloride (SPD), putrescine dihydrochloride (PUT), histamine dihydrochloride (HIS), cadaverine dihydrochloride (CAD), spermine tetrahydrochloride (SPM), tyramine hydrochloride (TYR), agmatine sulfate (AGM), acetone은 Sigma-Aldrich사의 제품을 사용하였다. Dansyl chloride는 Fluka사, sodium hydroxide, sodium hydrogen carbonate, ammonium hydroxide와 perchloric acid는 Junsei Chemicals사의 1급 제품을 사용하였으며, acetonitrile과 ammonium acetate는 Merck사의 HPLC용 등급을 사용하였다.

(2) 분석방법

(가) 시료추출 및 유도체화

Fig. 4와 같이 시료 5 g을 취하여 내부표준용액 (internal standard; I.S.)인

1,7-diaminoheptane (0.1 mg/mL)이 함유된 0.4 M perchloric acid 10 mL를 가한 후 균질화하였다. 3000×g, 4°C에서 원심분리를 10분간 하여 상층액을 취하고 잔사에 다시 0.4 M perchloric acid 10 mL를 가해 위의 조작을 반복하여 얻은 상층액을 합친 25 mL의 perchloric acid solution을 Whatman filter paper No. 1로 여과하여 추출하였다. Dansyl chloride를 이용한 유도체화는 Ben-Gigirey 등의 방법(17)에 따라 혼합 표준용액 및 추출용액 각각 1 mL을 마개 달린 시험관에 취한 다음 sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) 300 μL과 2M NaOH 200 μL를 가한 다음 dansyl chloride 용액을 2 mL 가하여 혼합한 후 마개를 하여 40°C에서 45분 동안 반응시켰다. 남아 있는 dansyl chloride를 제거하기 위하여 25% ammonium hydroxide 100 μL를 첨가한 후 acetonitrile를 이용하여 volume이 5 mL 되게 하여 3000 ×g, 10분 동안 원심분리시켰으며, 그 상층액을 0.2 μm-pore-size filter로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다.

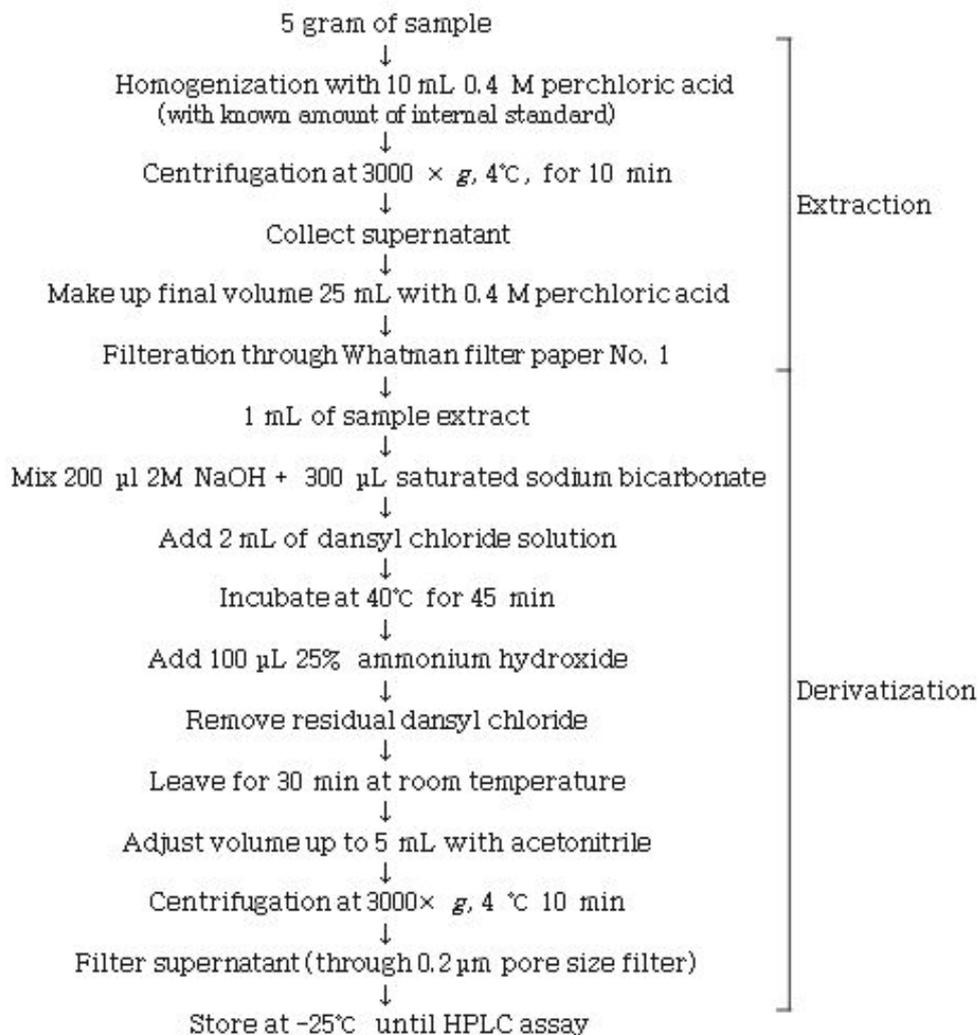


Fig. 4. Preparation and derivatization of sample.

(나) HPLC 분석 조건

검체를 0.4 M perchloric acid로 추출하고 1,7-diaminoheptane (0.1 mg/mL)을 내부표준액으로 하고 1% dansyl chloride 아세톤액으로 유도체화한 후 HPLC (UV 254 nm)로 분석하였다. 분리칼럼은 Supelco column (4.6 mm×250 mm, 5 μm particle size)을 사용하였고, 유속은 1 mL/min이었으며, 이동상 조건은 Table 6과 같다.

(다) pH 분석

시료 5 g와 증류수 25 mL을 혼합하여 균질화 시킨 후 Whatman No. 2로 여과하여 Kim 등(18)의 법에 따라 pH meter (Thermo Fisher Scientific Inc., Orion 5-Star Plus pH Benchtop Meter)로 측정하였다.

Table 6. Gradient elution program(flow rate 1.0 mL/min)

Time (min)	0.1 M Ammonium acetate (%)	Acetonitrile (%)
0.00	65	35
5.00	55	45
10.05	35	65
17.05	20	80
26.25	10	90
35.00	65	35

나. Aflatoxin

(1) 시약 및 기기

총 aflatoxin의 정량분석을 위한 모든 시약은 Neogen Corp. Wells사에서 구입하여 사용하였다. 시약의 구성은 aflatoxin HRP blue conjugate solution, K-blue substrate solution, red stop solution, aflatoxin controls (0, 5, 15, 50 ppb)이다. 총 aflatoxin의 정량분석을 위해 ELISA reader (Infinite M 200, TECAN)를 이용하였다.

(2) 분석방법

Fig. 5에서와 같이 시료 10 g에 70% MeOH 50 mL를 첨가하여 2-3분 동안 균질화시키고 Whatman filter paper No. 2로 여과한 후 Neogen veratox kit # 8030을 이용하여 분석하였다.

총 aflatoxin의 정량분석을 위한 Neogen veratox kit # 8030 이용방법은 Fig. 6과 같다.

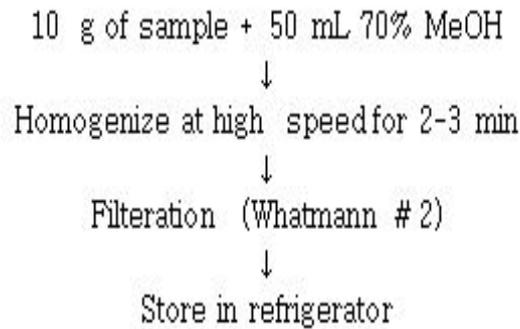


Fig. 5. Extraction of aflatoxin.

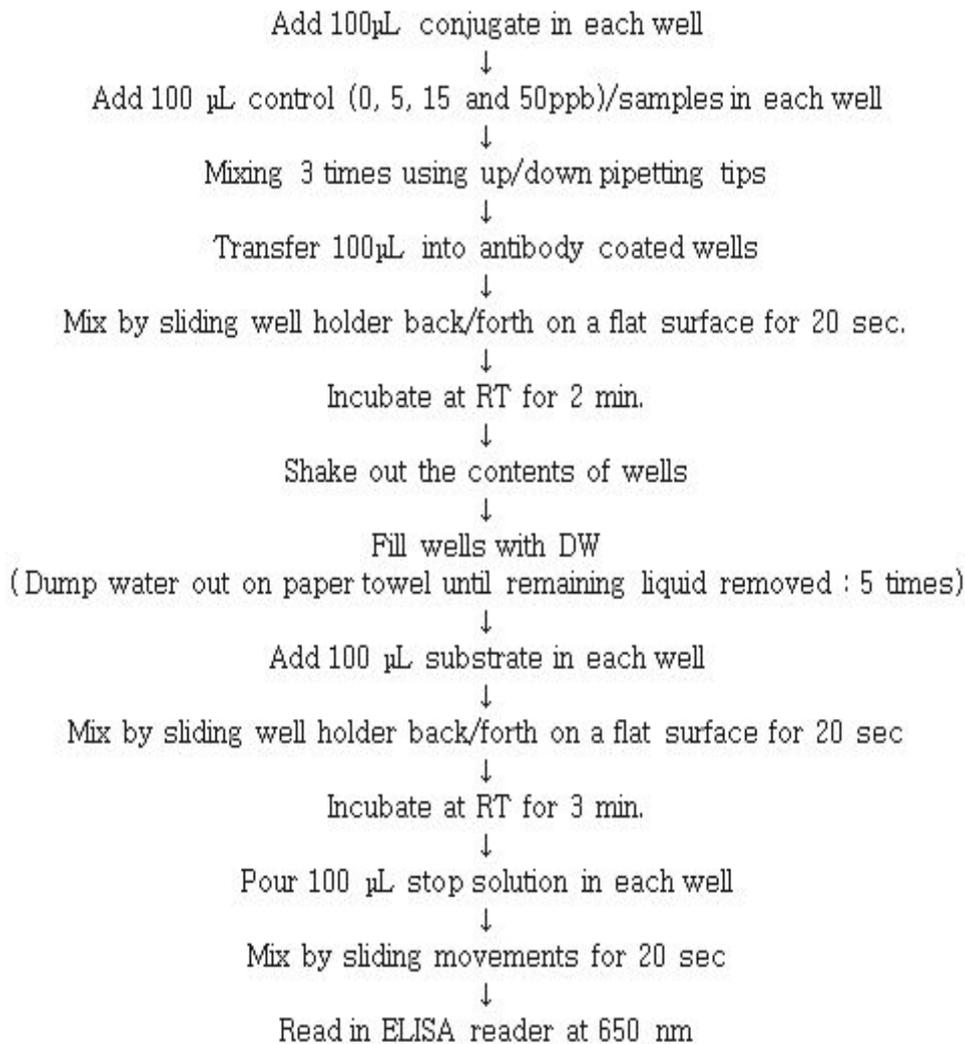


Fig. 6. Procedure of ELISA.

다. 기타 식중독균

(1) *Bacillus cereus*

(가) 시약 및 배지

*Bacillus cereus*의 정성 및 정량시험에 mannitol egg yolk polymyxin (MYP) agar (Oxoid), egg yolk emulsion (Oxoid), polymyxin B supplement (Oxoid), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였다. pH 7.2로 조정된 KH_2PO_4 희석액으로 심진희석을 하였으며 API50CHB (bioMerieux)를 사용하여 동정하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g과 멸균 D.W. 90 mL를 가하여 균질화한 후 균질화된 시료액의 1 mL를 10^1 - 10^6 까지 멸균 인산 완충용액으로 심진희석하여 각 단계 희석액 0.1 mL을 MYP agar에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 선별하여 nutrient agar에 접종하고 30°C에서 24시간 배양하여 배양된 개별 집락을 취하여(19) API50CHB를 통해 최종확인을 하였다(20). MYP agar 배지에 나타난 *Bacillus cereus* 집락은 Fig. 7과 같다.

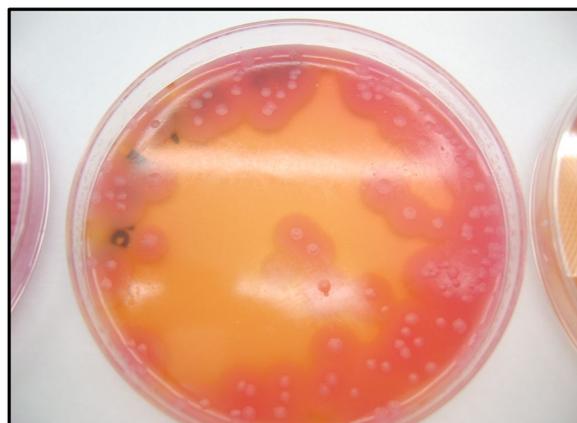


Fig. 7. *Bacillus cereus* on MYP agar plate.

(2) Coliform

(가) 시약 및 배지

Coliform의 정성 및 정량시험에 desoxycholate lactose agar (Difco), eosin methylene blue (EMB) agar (Difco), lactose broth (Difco), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였다. Peptone (Difco) 0.01%로 심진희석을 하였으며 crystal violet (Sigma), Gram's iodine, 95% alcohol, safranin (Sigma)으로 그람염색을 실시하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g과 멸균 D.W. 90 mL를 가하여 균질화하고 시료액 1 mL을 10^1 - 10^6 로 희석하여 각 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시에 접종하였다. 여기에 desoxycholate lactose agar를 무균적으로 15 mL 분주하여 35°C에서 20시간 배양하였다. 전형적인 암적색의 집락을 EMB agar에서 35°C에서 24시간 분리 배양을 한 후 녹색의 금속성 광택의 집락을 1 개 이상 취하여 lactose broth와 nutrient agar에서 35°C에서 20시간 배양을 하였다. 가스의 생성유무를 확인한 후 nutrient agar에서 해당되는 집락은 그람염색을 실시(21)하였다. Desoxycholate lactose (좌)와 EMB 배지상 (우)의 대장균군 집락은 Fig. 8과 같다.

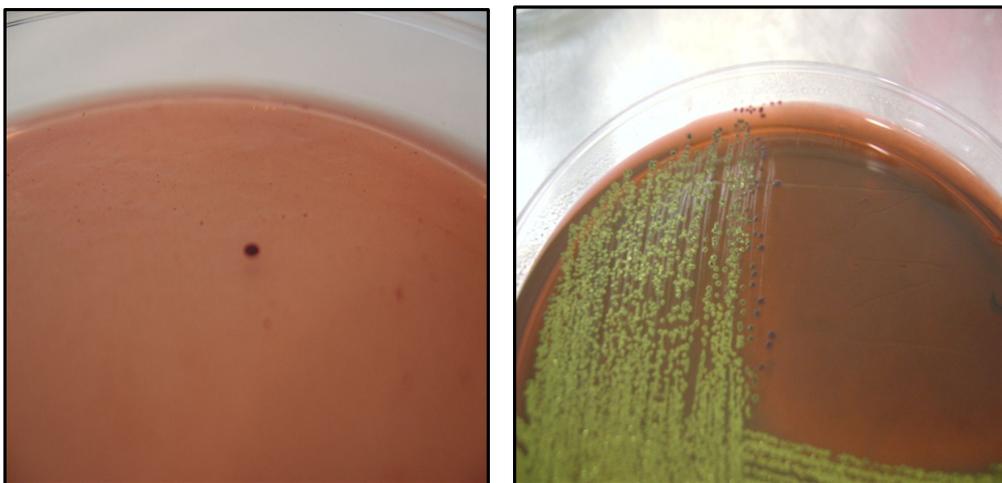


Fig. 8. Coliforms on desoxycholate lactose agar plate (left) and MB agar plate (right).

(3) *Staphylococcus aureus*

(가) 시약 및 배지

*Staphylococcus aureus*의 정성 및 정량시험에 Baird-Parker agar (Oxoid), egg yolk tellurite emulsion (Oxoid), nutrient agar (Difco), tryptic soy broth (Difco)을 사용하였고, 멸균 KH_2PO_4 희석액으로 십진희석을 하였으며 APIStaph (bioMerieux)를 통해 균의 동정을 하였다. (나) 분리방법

시료 10 g을 90 mL의 10% NaCl을 첨가한 tryptic soy broth에 가한 후 35°C에서 16시간 증균 배양하였다. 증균 배양액의 1 mL를 멸균 인산 완충 희석액으로 10^1 - 10^6 까지 십진희석을 하여 각 단계 희석액 0.1 mL씩을 Baird-Parker agar에 평판 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 결과 투명한 띠로 둘러싸인 광택의 검정색 집락을 취하여 nutrient agar에 접종 후 37°C에서 24시간 배양하였다(22). 이후 개별 집락을 취하여 APIStaph를 사용하여

최종확인을 하였으며(23), Baird-Parker 평판배지 상의 *Staphylococcus aureus*의 집락은 Fig. 9와 같다.

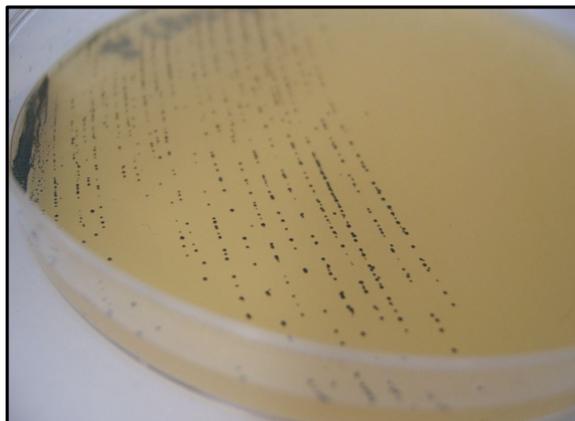


Fig. 9. *Staphylococcus aureus* on Baird-Parker agar plate.

(4) *Salmonella* spp.

(가) 시약 및 배지

Salmonella spp.의 정성시험에 MacConkey agar (Difco), Rappaport-Vassiliadis broth (Merck), peptone (Difco), nutrient agar (Difco)배지를 사용하였고 AP I20 E (bioMerieux)를 통해 균의 동정을 하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g을 취하여 90 mL의 peptone water에 가한 후 35°C에서 20시간 증균 배양하였다. 배양액 0.1 mL를 10 mL의 Rappaport-Vassiliadis broth에 접종하여 42°C에서 24간 배양하였다. 이후 증균 배양액을 MacConkey agar에 분주하여 35°C에서 24시간 배양한 후 무색의 유당 비분해균의 집락을 취하여 nutrient agar에 접종하여(24), 35°C에서 24시간 배양하였다. 생성된 집락을 API 20 E를 사용하여 최종 확인하였다(25). MacConkey 배지 상의 *Salmonella* spp. 집락은 Fig. 10과 같다.

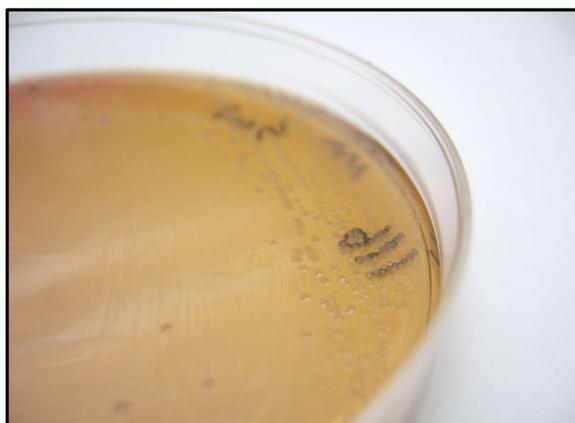


Fig. 10. *Salmonella* spp. on MacConkey agar plate.

(5) *Escherichia coli* O157:H7

(가) 시약 및 배지

Escherichia coli O157:H7 정성시험에 MacConkey sorbitol agar (Difco), novobiocin 함유 mEc-broth (Merck), eosin methylene blue (EMB) agar (Difco), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였다. API 20 E (bioMerieux)를 대장균임을 확인할 때 사용하였으며 O157 항혈청과 H7 혈청형시험으로 최종시험을 하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g을 취하여 90 mL의 novobiocin이 함유된 mEc-broth에 가한 후 35°C에서 24시간 증균 배양하였다. 증균 배양액 0.1 mL을 MacConkey sorbitol agar에 접종하여 35°C에서 18시간 배양하였다. Sorbitol을 분해하지 않는 무색집락을 취하여 EMB agar에 접종하여 35°C에서 24시간 배양을 하였다. 녹색 금속성 광택의 전형적인 집락을 취하여 nutrient agar에 옮겨 35°C에서 24시간 배양 후(26) API20E를 통하여 대장균임을 확인하였다(27). 이후 O157 항혈청을 사용하여 혈청형을 결정하고 O157이 확인된 균은 H7의 혈청형시험을 하여 최종확인을 하였다(26).

3. 결과 및 고찰

가. Biogenic amines과 aflatoxin

전통메주로 제조한 전통된장 및 공장산 된장 18종의 amines를 분석한 결과는 Table 7에 제시하였다. 전통된장에서 문제시 되고 있는 tyramine은 시료 4종에서 histamine은 2종에서 미량 검출되었으나, tyramine과 histamine의 평균함량은 다른 amines에 비해 미량인 것으로 나타났다. Amines 섭취는 40 mg/식사량 이하에서는 인체에 무해하다는 보고에 의하면 18종의 전통된장의 amines 함량은 별 문제가 되지 않았다(27). Table 8에서와 같이 총 aflatoxin의 정량분석은 16종 된장에서 미량 (0.1-4.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)으로 검출되었으나 2종의 된장 시료는 식품공전 상의 허용한계치인 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상 검출되었다.

나. 기타 식중독균

Table 8에서와 같이 coliform bacteria는 18종의 된장 중 9종의 된장에서 10^3 CFU/g 이상 검출되었으므로 전통된장제조 시 위생관리의 문제점이 제기되며, *Bacillus cereus*는 10^4 CFU/g 이상이 4종의 된장에서 추정 검출되었으며(Table 8), 이들은 *Bacillus cereus*로 동정되었다 (Table 9). *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7은 18종의 된장에서 검출되지 않았다.

Table 7. Determination of biogenic amines in home-made *Doenjang* fermented with traditional Korean *Meju*

Sample No. ¹⁾	Biogenic amine (mg/100 g)									pH ²⁾
	TRY	2-PH	PUT	CAD	AG.	HIS	TYR	SPD	SPM	
1	280.8	NA	270.0	97.27	NA	NA	138.7	NA	694.0	5.0
2	NA	NA	NA	NA	66.1	NA	618.0	NA	NA	4.8
3	NA	NA	362.9	74.32	NA	NA	NA	NA	NA	4.9
4	NA	9.3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	342.7	5.6
5	6.7	77.0	NA	NA	2.52	NA	NA	NA	286.6	6.1
6	NA	NA	53.0	56.39	NA	143.48	NA	NA	NA	6.5
7	NA	NA	NA	NA	550.8	NA	NA	NA	694.0	5.7
8	NA	NA	155.7	41.65	NA	NA	NA	NA	973.0	5.6
9	NA	NA	NA	NA	NA	193.10	NA	NA	543.7	6.5
10	NA	870.5	35.2	NA	NA	NA	423.1	62.3	NA	5.5
11	NA	618.89	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.3
12	2215	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.0
13	NA	311.4	29.3	NA	NA	NA	338.3	NA	418.9	5.8
14	NA	NA	5756	NA	62.4	NA	NA	880.4	NA	5.8
15	NA	NA	429.3	323.6	NA	NA	NA	768.0	NA	5.4
16	113.0	NA	38.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6.2
17	NA	NA	195.2	39.0	336.4	NA	434.6	NA	787.6	6.0
18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	133.3	NA	NA	5.2

¹⁾The origin of each sample was listed in Table 1.

²⁾pH was expressed as mean values of triplicates.

Abbreviation: TRY, Tryptamine; 2-PH, 2-Phenylalanine; PUT, Putrescine; CAD, Cadaverine; AGA, Agmatine; HIS, Histamine; TYR, Tyramine; SPD, Spermidine; SPM, Spermine

Table 8. Determination of foodborne pathogenic organisms and aflatoxin in home-made *Doenjang* fermented with traditional Korean *Meju*

Sample No. ¹⁾	Coliform (CFU/g)	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	Total aflatoxin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
		(CFU/g) MYP ³⁾	(CFU/g) BP ⁴⁾ API test	O157:H7 (CFU/g) MSA ⁵⁾ API test	spp. (CFU/g) MA ⁶⁾ API test	
1	1.33×10 ⁴	-	-	-	-	1.9
2	- ²⁾	-	-	-	-	11.9
3	-	-	-	-	-	10.8
4	-	-	-	-	-	3.1
5	-	-	-	-	-	0.9
6	-	-	-	-	-	0.8
7	4.63×10 ⁴	2.0×10 ³	-	-	-	4.3
8	1.9×10 ³	-	-	-	-	1.7
9	9.47×10 ³	1.27×10 ⁴	-	-	-	0.6
10	3.47×10 ³	-	-	-	-	0.1
11	1.23×10 ⁴	6.67×10 ²	-	-	-	3.2
12	3.27×10 ³	-	-	-	-	1.7
13	-	4.67×10 ⁵	-	-	-	2.3
14	4.43×10 ⁶	-	-	-	-	2.6
15	3.9×10 ⁶	-	-	-	-	2.0
16	-	-	-	-	-	1.4
17	-	2.67×10 ⁵	-	-	-	2.3
18	-	1.67×10 ⁵	-	-	-	1.3

¹⁾The origin of each sample was listed in Table 1.

²⁾not detected; ³⁾Mannitol egg yolk polymyxin agar plate;

⁴⁾Baird-Parker agar plate; ⁵⁾MacConkey sorbitol agar plate; ⁶⁾MacConkey agar plate

Table 9. Identification of *Bacillus* spp. with API 50 CHB

Sample No. ¹⁾	API test		
	Identification	% ID	T Index
7	<i>Bacillus cereus</i> 1	94.8	0.74
9	<i>Bacillus cereus</i> 1	98.9	0.95
11	<i>Bacillus cereus</i> 1	99.6	0.95
13	<i>Bacillus cereus</i> 1	99.5	0.82
17	<i>Bacillus mycoides</i>	66.7	0.96
	<i>Bacillus cereus</i> 1	30.3	0.91
18	<i>Bacillus cereus</i> 1	81.1	0.95
	<i>Bacillus mycoides</i>	16.1	0.91

¹⁾The origin of each sample was listed in Table 1.

제 3 절 종균의 선정 및 이를 이용하여 제조한 다수 된장의 품질검토

1. 연구개발의 배경

소수의 균만으로 전통적 풍미를 지닌 위생적 된장을 제조하기 위하여 전통적 풍미를 지닌 종균을 선정한 다음 선정된 균을 이용하여 품질이 서로 다른 다수의 된장을 제조하고 된장의 품질 (맛 성분 분석, 관능검사, biogenic amine, aflatoxin)을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. 우수균 선정

(1) 사용균주

(가) 세균

우수 장류제조용 세균 *Bacillus subtilis* group 8종을 대상으로 우수세균을 선정하였다.

(나) 사상균

대구, 경북 지역 전통메주에서 분리한 사상균 45종과 종래 장류제조용 사상균 *Aspergillus oryzae* J를 대상으로 우수 사상균을 선정하였다.

(2) 1차 선별

(가) Protease activity 측정

Potato dextrose agar (PDA: 사상균용 배지) 및 plate counting agar (PCA: 세균용 배지)에 milk casein을 1%되도록 첨가하여 균을 접종한 후 사상균은 28℃, 세균은 30℃에서 각각 3일, 2일간 배양하여 colony가 형성된 후 1N-HCl을 배지 상에 가해서 형성된 halo zone의 크기로 비교분석하였다.

(나) 배양온도에 따른 colony의 크기 변화 및 관능검사

1차 선별 균주의 protease activity를 측정된 후 배양기간 및 배양온도를 달리하여 colony의 크기 변화를 검토하였으며, PDA 및 PCA 배지에 형성된 colony의 냄새 (좋음, 나쁨)로 colony의 관능검사를 실시하였다.

(3) 2차 선별

(가) 종균 제조

500 mL 용량의 버섯 용기에 불린 (침지)콩 200 g을 가하여 멸균한 후 각 균주를 접종하고 *Bacillus subtilis* TKSP 24는 30℃에서 2일간, *Aspergillus oryzae* J와 전통메주에서 분리된 1차 선별 사상균은 28℃에서 3일간 배양하여 종균으로 이용하였다.

(나) 메주 제조

메주제조공정과정은 Fig. 11B와 같이 삶은 대두에 앞서 제조한 종균을 1 % (w/w)로 접종하였다. 종균을 접종한 콩을 clean bench에서 stainless 사각 용기 (36×32×6 cm)에 분주한 후 사상균메주 (*Aspergillus oryzae* J메주, *Mucor racemosus*메주)는 28℃, 상대습도 70%에서 3일 동안, 세균메주 (*Bacillus subtilis* TKSP 24메주)는 30℃, 상대습도 70% 조건에서 2일 동안 배양한 후 열풍건조기에서 50℃, 20시간 건조하여 메주를 제조하였다.

(다) 된장제조

① 사용균주

Bacillus subtilis TKSP 24, *Aspergillus oryzae* J (strain 15, 24, 42, 60, 70)를 종균으로 사용하였다.

② 된장제조공정과정은 Fig. 11B와 같다. 건조된 메주 무게의 3배 (w/v)가 되도록 15% 염수를 가한 후 30℃에서 30일간 발효하였다. 발효 후 액체를 분리하고 고형물은 30℃에서 다시 1개월 발효하여 된장을 얻었다. 된장 발효 시 갈변 현상을 막기 위해 된장을 제조할 때 용기의 윗부분에 15% 염수에 담근 비닐 랩을 씌워 Table 11과 같이 균주별 된장 17종을 제조하였다. 된장 17종을 분류하면 다음과 같다.

㉠ 1차 선별균 단독으로 제조된 메주를 이용한 7종의 단독된장제조

㉡ 세균메주와 1종의 사상균메주를 혼합하여 5종의 혼합메주된장제조
(메주혼합비율= 1:1)

㉢ 세균메주와 2종의 사상균메주를 혼합하여 5종의 혼합메주된장제조
(메주혼합비율= 1:1:1)

된장의 숙성기간은 다음과 같다.

- 1차 발효 (간장 및 된장): 30℃에서 1개월 발효

- 2차 발효 (된장): 1차 발효 후 30℃에서 1개월 발효

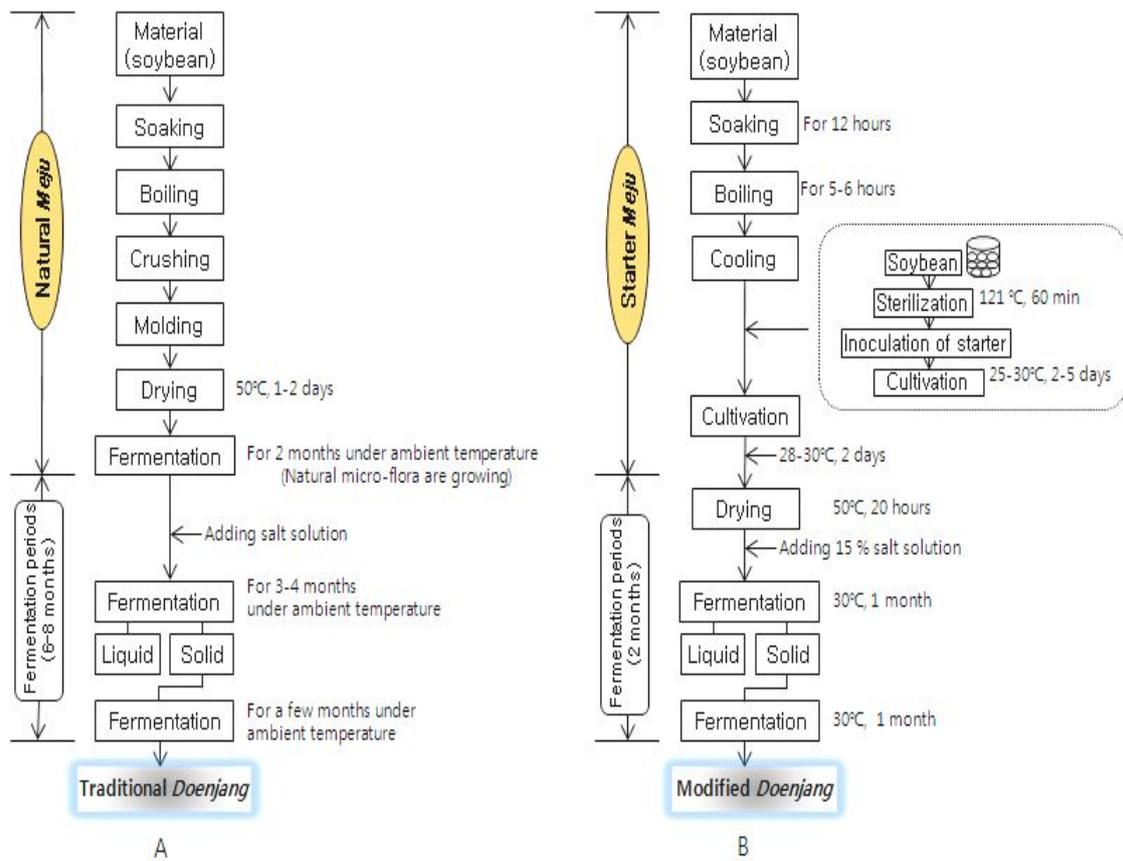


Fig. 11. Schematic diagram for making *Doenjang*.

나. 관능검사

관능검사 요원은 건강하고 의욕적이며 참여 가능성과 성별 등을 고려하여 영남대학교 식품공학과 대학원생 (20-30대) 및 40-50대 남성과 여성 총 8명을 대상으로 장의 기법에 따라 맛과 향 등에 대한 기본지식을 훈련시켰으며(13), 매우 나쁨 1점, 보통임 3점, 매우 좋음 5점으로 시료의 풍미를 채점하도록 하였다.

다. 선별균주의 동정

사상균은 18S rRNA를 sequencing한 후 sequence를 BLAST search하여 확인하였고 세균은 16S rRNA를 sequencing한 후 sequence를 BLAST search하여 확인하였다.

라. 맛 성분 분석

(1) 맛 성분의 추출

Setsuko 등(14)의 방법을 준용하여 Fig. 1과 같이 된장 100 g에 처음에는 86.7% ethanol 150 mL를 첨가하여 65°C에서 1시간 동안 추출한 후 여액 잔유물은 다시 65% ethanol로 2

번 더 반복 추출한 다음 filter paper로 filtering한 후 그 여액들을 합하여 4000 ×g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리한 상등액은 60℃에서 감압농축 후 90% methanol로 완전히 탈염을 시켰다. 탈염 후 여과한 여액은 다시 감압 건조시켜 물 100 mL로 용해하였다.

(2) 맛 성분의 분리 및 정제

추출된 맛 성분 시료는 Fig. 2와 같이 이온교환수지(15)를 이용하여 분리, 정제하였다. 즉 양이온 교환수지 amberlite IR-120과 음이온 교환수지 amberlite IRA-400을 직경 2 cm, 길이 35 cm의 column에 충전시켜 맛 성분 정제에 사용하였다. 추출 시료를 amberlite IR-120과 amberlite IRA-400에 차례로 서서히 통과시킨 후 다시 200 mL의 증류수로 washing을 하여 양쪽을 모두 통과한 용출액은 유리당의 분석시료로 사용하였으며, 유리당의 HPLC 분석 조건은 instruments: Waters Co. 600E Model; column: Sugar-Pak I column (6.5×300 mm); column temperature: 90℃; mobile phase: Ca EDTA buffer (50 mg Ca-EDTA/1 L dH₂O); flow rate: 0.5 mL/min; detector: refractive index detector (RI Model 410)와 같다. 유리아미노산은 amberlite IR-120에 흡착된 부분을 2 N NH₄OH 150 mL로 서서히 용출시킨 후 감압 건조하여 0.1 M lithium citrate buffer (pH 2.2) 2 mL로 용해시켜 아미노산자동분석기 (Biochrom 20)로 분석하였다.

비휘발성 유기산은 amberlite IRA-400에 흡착된 부분을 1.5 N (NH₄)₂CO₃ 150 mL로 서서히 용출 후 감압 건조하여 P₂O₅가 든 desiccator에 하루 동안 방치한 다음 diethyl ether 20 mL로 용해한 후 HPLC로 분석하였으며, 분석 조건은 instruments: Waters Co.; column: RSpak KC-811 (Φ8.0×300 mm); column temperature: 40℃; flow rate: 1.0 mL/min; mobile phase: eluent 0.1% H₃PO₄/dH₂O; detector: model RI (differential refractive index detector)와 같다.

휘발성 유기산은 Kageyama(16) 방법에 준하여 된장 10 g에 물 20 mL를 첨가하여 mixing한 후 filter paper로 여과하여 분석 시료로 사용하였으며 시료에 2%의 H₂SO₄를 0.1%의 농도가 되게 가하여 pore size가 0.45 μm인 membrane filter로 여과한 후 GC로 분석하였다. GC의 분석 조건은 instrument: GC-Hewlett-Packard 5980II; column: 10% PEG 6000이 충전된 2 m glass column; detector와 injector temperature: 200℃; column temperature; 170℃; carrier gas: He; flow rate: 0.9 mL/min와 같다.

마. 통계처리

데이터의 통계처리는 IBM SPSS Statistics 19 프로그램을 이용하여 분산분석을 실시한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 각 시료간의 유의성을 검증하였다.

바. pH 측정

시료 5 g과 증류수 25 mL를 혼합하여 균질화 시킨 후 Whatman No. 2로 여과하여 Kim 등(28)의 법에 따라 pH meter (Thermo Fisher Scientific Inc., Orion* 5-Star Plus pH Benchtop Meter)로 측정하였다.

사. Biogenic amines과 aflatoxin 분석

(1) Biogenic amines

(가) 시약

Biogenic amines의 표준품으로 tryptamine hydrochloride (TRP), 2-phenyl-ethylamine (PHE), spermidine trihydrochloride (SPD), putrescine dihydrochloride (PUT), histamine dihydrochloride (HIS), cadaverine dihydrochloride (CAD), spermine tetrahydrochloride (SPM), tyramine hydrochloride (TYR), agmatine sulfate (AGM), acetone은 Sigma - Aldrich사의 제품을 사용하였다. Dansyl chloride는 Fluka사, sodium hydroxide, sodium hydrogen carbonate, ammonium hydroxide와 perchloric acid는 Junsei Chemicals사의 1급 제품을 사용하였으며, acetonitrile과 ammonium acetate는 Merck사의 HPLC용 등급을 사용하였다.

(나) 분석방법

① 시료추출 및 유도체화

시료 5 g을 취하여 내부표준용액 (internal standard; I.S.)인 1,7-diaminoheptane (0.1 mg/mL)이 함유된 0.4 M perchloric acid 10 mL를 가한 후 균질화하였다. 3000 ×g, 4°C에서 원심분리를 10분간 하여 상층액을 취하고 잔사에 다시 0.4 M perchloric acid 10 mL를 가해 위의 조작을 반복하여 얻은 상층액을 합친 25 mL의 perchloric acid solution을 Whatman filter paper No. 1로 여과하여 추출하였다. Dansyl chloride를 이용한 유도체화는 Ben-Gigirey 등의 방법(17)에 따라 혼합 표준용액 및 추출용액 각각 1 mL를 마개 달린 시험관에 취한 다음 sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) 300 μL과 2M NaOH 200 μL를 가한 다음 dansyl chloride 용액을 2 mL 가하여 혼합한 후 마개를 하여 40°C에서 45분 동안 반응시켰다. 남아 있는 dansyl chloride를 제거하기 위하여 25% ammonium hydroxide 100 μL를 첨가한 후 acetonitrile를 이용하여 volume이 5 mL 되게 하여 3000 ×g, 10분 동안 원심분리시켰으며, 그 상층액을 0.2 μm-pore-size filter로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다.

② HPLC 분석 조건

검체를 0.4 M perchloric acid로 추출하고 1,7-diaminoheptane (0.1 mg/mL)을 내부표준액으로 하고 1% dansyl chloride 아세톤액으로 유도체화한 후 HPLC (UV 254 nm)로 분석하였다. 분리칼럼은 Supelco column (4.6 mm×250 mm, 5 μm particle size)를 사용하였고, 유속

은 1 mL/min이었다.

(2) Aflatoxin

(가) 시약 및 기기

총 aflatoxin의 정량분석을 위한 모든 시약은 Neogen Corp. Wells사에서 구입하여 사용하였다. 시약의 구성은 aflatoxin HRP blue conjugate solution, K-blue substrate solution, red stop solution, aflatoxin controls (0, 5, 15, 50 ppb)이다. 총 aflatoxin의 정량분석을 위해 ELISA reader (Infinite M 200, TECAN)를 이용하였다.

(나) 분석방법

시료 10 g에 70% MeOH 50 mL를 첨가하여 2-3분 동안 균질화시키고 Whatman filter paper No. 2로 여과한 후 Neogen veratox kit # 8030을 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 우수균 선정

(1) 1차 선별

(가) Protease activity 측정

전통메주에서 분리한 5종의 사상균 외 *Aspergillus oryzae* J 및 *Bacillus subtilis* TKSP 24를 포함한 총 7균주의 protease activity를 측정한 결과는 Fig. 11-Fig. 17과 같다.

메주 사상균 분리용 대조구로 이용된 *Aspergillus oryzae* J와 전통메주에서 분리된 사상균 45종 중 strain 24, 60, 70의 halo zone의 크기가 유사하였으며, strain 24와 15의 halo zone 크기는 27°C, 2일간 배양했을 때에는 거의 나타나지 않았으나 28°C에서 1일간 배양했을 때에는 halo zone의 크기는 보다 크게 나타났다.

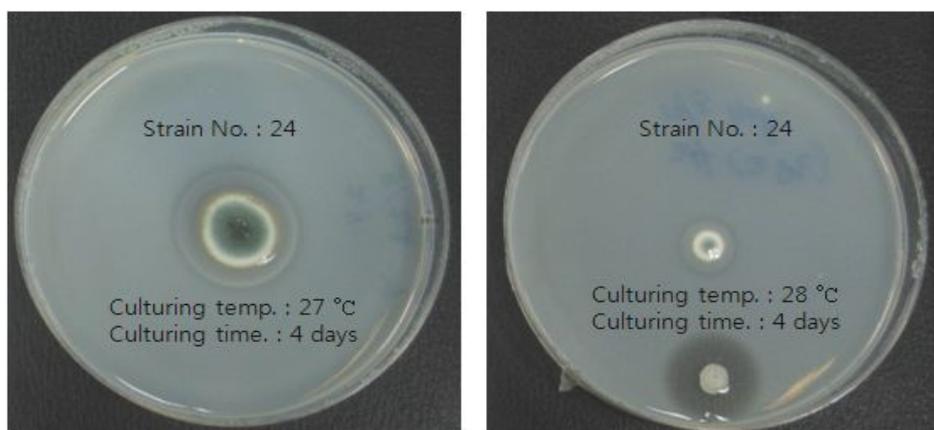


Fig. 11. Halo zone of strain 24.

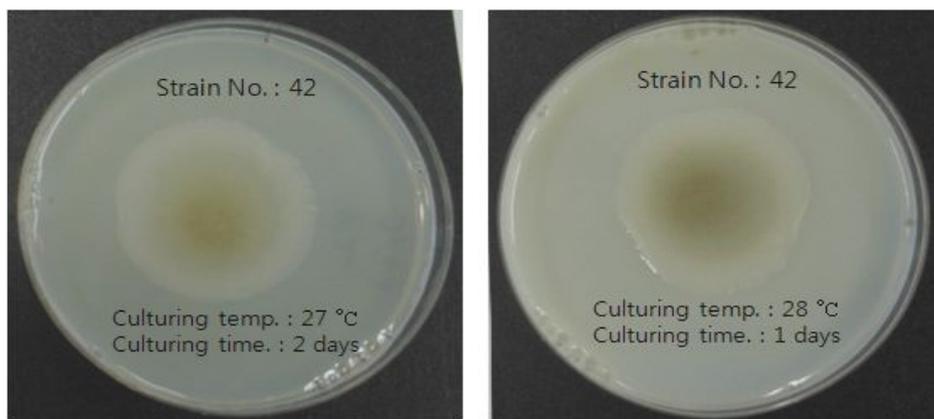


Fig. 12. Halo zone of strain 42.

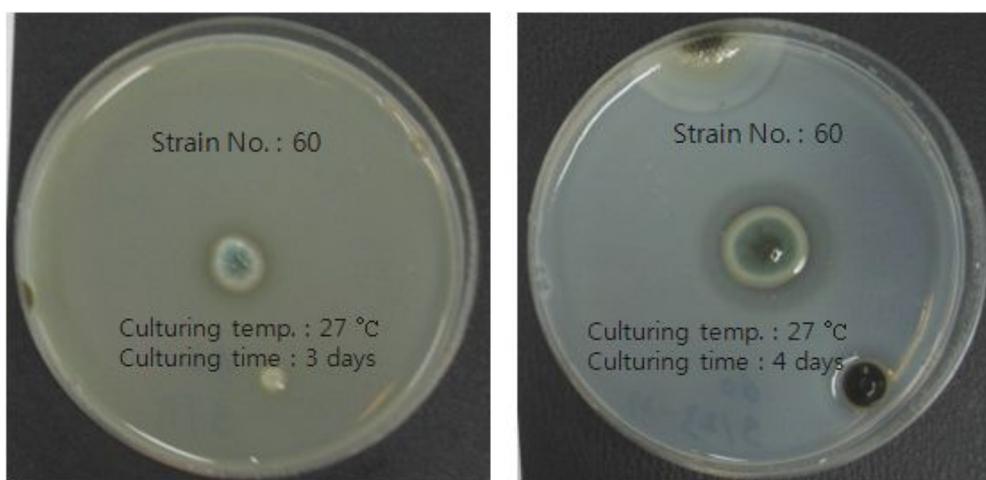


Fig. 13. Halo zone of strain 60.



Fig. 14. Halo zone of strain 70.

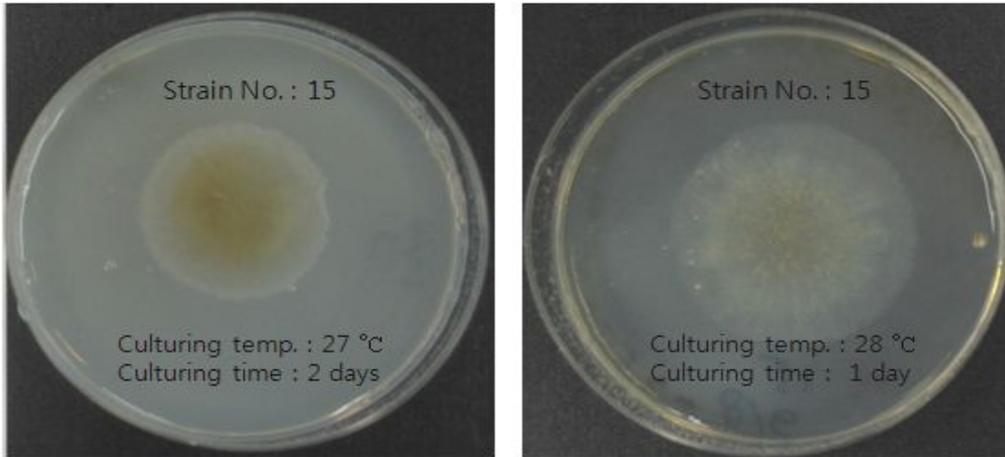


Fig. 15. Halo zone of strain 15.

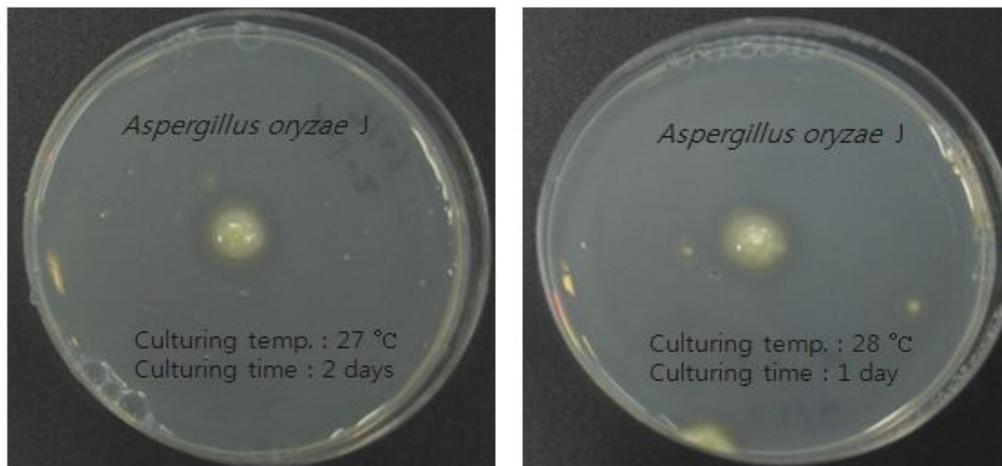


Fig. 16. Halo zone of *Aspergillus oryzae* J.

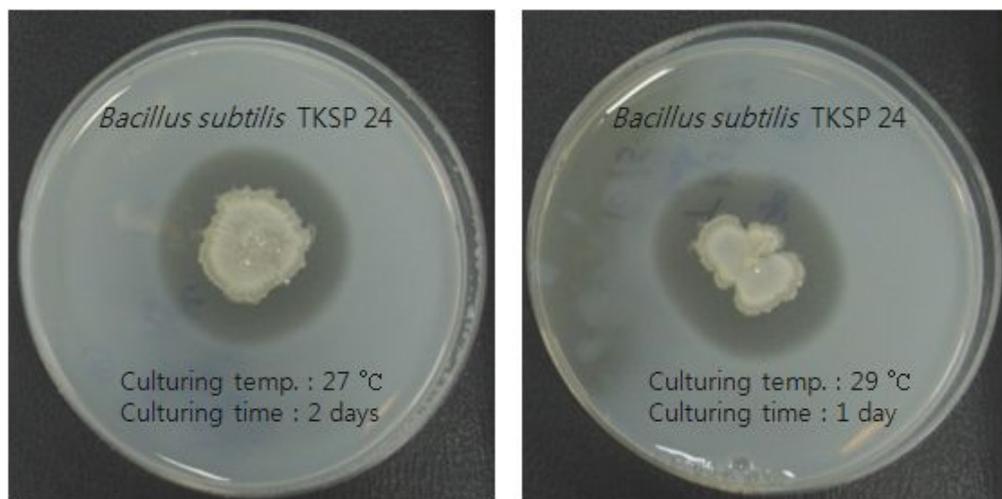


Fig. 17. Halo zone of *Bacillus subtilis* TKSP 24.

(2) 배양온도에 따른 colony의 크기 변화 및 관능검사

배양온도 및 배양기간에 따라 colony의 크기 변화 및 배지에 형성된 colony의 냄새 (좋은, 나쁨)의 관능검사결과를 살펴본 결과 Fig. 11-Fig. 17과 같이 배양온도 27℃와 28℃에서 3일간 배양한 colony의 크기가 가장 컸으며, Table 10에서와 같이 colony의 관능검사 결과 전 통메주에서 분리한 45종의 균주 중 15, 24, 42, 60, 70번 균주의 colony 냄새가 좋았으며, *Aspergillus oryzae* J와 *Bacillus subtilis* TKSP 24의 colony 냄새가 비교적 좋은 것으로 나타났다.

Table 10. Flavor and colony size according to the culture temperature and time

Strain	Culturing temperature (°C), culturing time (days), and colony size (mm)										Flavor
	27°C					28°C					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
15		38				20		69			good good good good good
24			25				16				
42		44				42					
60				20				10			
70			22					15			
<i>Aspergillus oryzae</i> J		16									good
<i>Bacillus subtilis</i> TKSP 24							17				good

(2) 2차 선별

(가) 된장제조

건조 메주 무게의 3배에 도달하도록 15% 염수를 가하여 30℃에서 1개월간 발효시킨 후 고체를 분리하였으며, 고형분은 다시 30℃에서 1개월간 더 숙성시킨 후 10℃에 냉장 보관하였다. 메주 및 된장제조에 사용된 균은 Table 11과 같다.

Table 11. *Doenjang* fermented with different *Mejus*

Strains used for making <i>Meju</i>	Mixing ratio of <i>Meju</i> for making <i>Doenjang</i>	Code of <i>Doenjang</i>
<i>Bacillus subtilis</i> TKSP 24 (B)	1	A
<i>Aspergillus oryzae</i> J (A)	1	B
Strain 24 (S24)	1	C
Strain 42 (S42)	1	D
Strain 60 (S60)	1	E
Strain 70 (S70)	1	F
Strain 15 (S15)	1	G
<hr/>		
B:A	1:1	AB
B:S24	1:1	AC
B:S42	1:1	AD
B:S60	1:1	AE
B:S70	1:1	AF
<hr/>		
B:A:S24	1:1:1	ABC
B:A:S42	1:1:1	ABD
B:A:S60	1:1:1	ABE
B:A:S70	1:1:1	ABF
B:A:S15	1:1:1	ABG

1차 선정된 7종의 균 또는 사상균 단독으로 메주를 만들어 발효한 된장 7종은 Fig. 18과 같으며, 세균메주와 1종의 사상균메주를 혼합하여 발효한 2균주 혼합메주된장은 Fig. 19와 같으며 세균메주와 2종의 사상균메주를 혼합하여 발효한 3균주 혼합메주된장은 Fig. 20과 같다.

제조된 된장의 색도는 용기의 바깥 부분에는 약간의 갈변 현상이 있었으나 된장 용기의 안쪽 부위의 색상은 노란색인 것으로 나타났다. 우리나라 사람들의 된장 색상에 대한 황금색 선호도를 감안할 때 된장 숙성 중 된장 용기의 윗부분의 공기의 유입을 방지하는 것이 매우 중요하리라 사료되며, 제조한 된장의 숙성도는 단독균으로 제조한 단독메주된장의 경우에는 사상균메주 및 세균메주의 혼합균주로 제조한 된장의 숙성정도보다 낮은 것으로 나타났다. 3종의 메주를 이용한 3균주 혼합메주된장의 숙성도가 2균주 혼합메주된장의 숙성도보다 높다는 것을 알 수 있었다.



Fig. 18. Doenjang fermented with single strain inoculated Meju.

A: *Bacillus subtilis* TKSP 24; B: *Aspergillus oryzae* J;

C: strain 24; D: strain 42; E: strain 60; F: strain 70; G: strain 15



Fig. 19. Doenjang fermented with two different types of Meju.

H: *Bacillus subtilis* TKSP 24+*Aspergillus oryzae* J;

I: *Bacillus subtilis* TKSP 24+strain 24;

J: *Bacillus subtilis* TKSP 24+strain 42;

K: *Bacillus subtilis* TKSP 24+strain 60;

L: *Bacillus subtilis* TKSP 24+strain 70



Fig. 20. *Doenjang* fermented with three different types of *Meju*.

M: *Bacillus subtilis* TKSP 24+*Aspergillus oryzae* J+strain 24;

N: *Bacillus subtilis* TKSP 24+*Aspergillus oryzae* J+strain 42;

O: *Bacillus subtilis* TKSP 24+*Aspergillus oryzae* J+strain 60;

P: *Bacillus subtilis* TKSP 24+*Aspergillus oryzae* J+strain 70;

Q: *Bacillus subtilis* TKSP 24+*Aspergillus oryzae* J+strain 15

나. 관능검사

1차 선정균으로 제조한 된장의 관능검사는 Table 12와 같으며 세균메주와 2종의 사상균메주를 혼합하여 제조한 된장 (ABC-ABG)은 단독메주로 제조된 된장 (A-G)과 세균메주와 사상균메주를 혼합하여 제조한 된장 (AB-AF)보다 관능검사 점수가 높게 나타났다.

그 중 세균 (*Bacillus subtilis* TKSP 24)메주와 사상균 2종 (*Aspergillus oryzae* J, 42번 균주 및 15번 균주)메주를 혼합하여 제조한 된장 (ABD)의 관능검사 점수가 가장 높은 것으로 나타났다. 특히 세균메주와 *Aspergillus oryzae* J메주, 42번 메주를 혼합하여 제조한 된장의 관능 평가는 가장 높은 점수인 5점을 준 panel이 4명이었으며, 세균메주와 사상균 2종 (*Aspergillus oryzae* J, 15번 균주)의 메주를 혼합하여 제조한 된장 (ABG)의 관능평가는 5점법 중 가장 높은 점수인 5점을 준 panel이 3명이었다.

세균메주와 *Aspergillus oryzae* J메주 및 15번 메주 혹은 42번 메주를 혼합하여 제조한 된장의 풍미가 전통메주로 제조한 우수한 전통된장보다 더 우수한 풍미를 나타냈으며, 이는 우리나라 전통메주 중 총 균수의 95%이상 점유하고 있는 *Bacillus subtilis* 외에 전통된장의 서로 다른 우수한 풍미를 나타내는 다수의 사상균이 전통된장의 풍미에 크게 영향을 미친다

는 것을 시사한다. *Aspergillus oryzae* J 단독된장 (A) 혹은 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주와 *Aspergillus oryzae* J메주를 혼합하여 제조한 된장 (AB)은 우리나라 전통된장의 향과 다르거나 일본 미소와 흡사한 냄새를 내는데 비해 사상균 종균 특히 15번 혹은 42번 균주와 같은 *Mucor racemosus*메주로 된장을 제조할 때 우리나라 전통된장의 우수한 특징적 맛과 향을 생성할 수 있었다. 이는 본 연구의 목표 달성에 큰 의미를 부여한다고 사료된다.

Table 12. Sensory characteristics of *Doenjang* fermented with various *Mejus*

Code of <i>Doenjang</i> ¹⁾	Taste	Smell	Characteristics
	Mean±SD	Mean±SD	
C-1 ²⁾	7.1±2.07 ^a	5.7±1.14 ^{abcd}	traditional flavor and taste
A	5.4±0.58 ^{ab}	4.6±1.5 ^{cdef}	salty flavor
B	3.9±1.53 ^b	2.6±0.71 ^g	sweet flavor
C	3.9±0.58 ^b	2.8±1.53 ^{fg}	off-flavor
D	5.4±1.53 ^{ab}	4.6±0.96 ^{cdef}	no flavor
E	4.4±0.96 ^b	4.4±0.96 ^{defg}	bad flavor
F	5.9±0.96 ^{ab}	4.4±2.31 ^{defg}	good flavor
G	5.9±0.89 ^{ab}	4.6±0.96 ^{bcd}	good flavor
AB	5.7±0.96 ^{ab}	4.6±1.53 ^{cdef}	good flavor
AC	4.4±0.96 ^b	3.6±0.96 ^{efg}	bad flavor
AD	6.9±0.96 ^a	4.9±1.53 ^{bcd}	sweet flavor
AE	5.1±0.96 ^{ab}	5.1±0.58 ^{bcd}	less aged flavor
AF	6.9±0.96 ^a	5.9±1.15 ^{abcd}	traditional flavor
ABC	5.9±0.58 ^{ab}	5.4±0.96 ^{bcd}	traditional flavor
ABD	7.5±1.50 ^a	6.4±0.71 ^{abc}	traditional flavor (salty smell)
ABE	5.9±1.15 ^{ab}	5.9±2.12 ^{abcd}	traditional flavor
ABF	6.9±1.53 ^a	6.9±1.50 ^{ab}	<i>Doenjang</i> flavor (salty smell)
ABG	7.5±0.58 ^a	7.5±1.53 ^a	<i>Doenjang</i> flavor (salty smell)
F-value	2.850**	4.557**	

** : p<0.01

¹⁾Code description of *Doenjang* was shown in Table 11.

²⁾Home-made *Doenjang* fermented with traditional Korean *Meju* (sample 8 in Table 2)

다. 선정 균주의 동정

전통메주에서 분리한 사상균 45종 중 protease의 역가와 colony의 관능검사를 통하여 7종의 우수균주를 선정하였다. 동정된 7균주는 *Bacillus subtilis* TKSP 24, *Aspergillus oryzae* J, *Mucor racemosus* (strain 15), *Penicillium chrysogenum* (strain 24), *Mucor racemosus* (strain 42), *Cladosporium uredinicola* (strain 60), *Penicillium fellutanum* (strain 70)이었으며, 선정 균주의 염기서열은 Table 13-19와 같다.

Table 13. 16S rRNA sequence of *Bacillus subtilis* TKSP 24

1	ggacgaacgc tggcggcgtg ctaatacat gcaagtcgag cggacagatg ggagcttct
61	ccctgatgtt agcggcggac gggtagtaa cacgtgggta acctgcctgt aagactggga
121	taactccggg aaaccggggc taataccgga tggttgtttg aaccgcatgg ttcagacata
181	aaagtggtct tcggctacca cttacagatg gaccgcggc gcattagcta gttggtgagg
241	taacggctca ccaaggcgac gatgcgtagc cgacctgaga gggtagtcgg ccacctggg
301	actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag ggaatctcc gcaatggacg
361	aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggttt tcggatcgtg aagctctgtt
421	gttagggaag aacaagtgcc gttcaaatag ggccggcact tgacggtacc taaccagaaa
481	gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg ggtggcaagc gttgtccgga
541	attattgggc gtaaagggtc cgcagccggt tcttaagtc tgatgtgaaa gccccggct
601	caaccgggga gggtcattgg aaactgggga acttgagtgc agaagaagag agtggaaatc
661	cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaacac cagtggcgaa ggcgactctc
721	tggctgtaa ctgacgtga ggagcgaaag cgtggggagc gaacaggatt agatacctg
781	gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgttaa gtgttagggg gtttccgcc cttagtctg
841	cagctaacgc attaagcact ccgctgggg agtacggtcg caagactgaa actcaaagga
901	attgacgggg gccgcacaa gcggtggagc atgtggtta attcgaagca acgcaagaa
961	ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaat ctagagata ggacgtcccc ttcgggggca
1021	gagtgcacag ggtgcatgg ttgtctcag ctctgtctgt gagatgttgg gtaagtccc
1081	gcaacgagcg caacccttga tcttagttgc cagcattcag ttgggcactc taaggtgact
1141	gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaaat catcatgcc cttatgact
1201	gggctacaca cgtgctaca tggacagaac aaagggcagc gaaaccgca ggtaagcca
1261	atcccacaaa tctgttctca gttcggatcg cagtctgcaa ctgactcgg tgaagtggg
1321	atcgctagta atcgcggatc agcatcccgc ggtgaatag tcccgggccc ttgtacac
1381	cgcccgctac accacgagag ttgtaacac ccgaagtcgg tgaggtaacc ttttaggagc
1441	cagccgcca aggtgggaca gatgattggg gtgaagtcgt aacaaggtag ccgt

Table 14. Sequence of internal transcribed spacer of *Aspergillus oryzae* J

1	tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta ccgagttag gttcctagc gagcccaacc
61	tcccaccgt gtttactgta ctttagttgc ttcggcgggc ccgccattca tggccgccc
121	gggctctcag ccccggccc gcgccgccc gagacaccac gaactctgtc tgatctagt
181	aagtctgagt tgattgtatc gcaatcagtt aaaacttca acaatggatc tttggttc
241	ggcatgatg aagaacgcag cgaatgcga taactagtgt gaattgcaga attccgtgaa
301	tcategagtc tttgaacgca cattgcgcc cctggttatc cggggggcat gctgtccga
361	gcgtcattgc tgccatcaa gcacggcttg tgtgtgggt cgtcgtccc tctccgggg
421	ggacgggcc caaaggcagc ggcggcaccg cgtccgatc tcgagcgtat gggccttgt
481	caccgctct gtaggccgg cggcgcttg ccgaacgaa atcaatctt tccaggttg
541	acctggatc aggtagggat accgctgaa cttagcata tcaataagcg gaggaaaaga
601	aaccaaccgg gattgctc

Table 15. 18S rRNA sequence of *Mucor racemosus* 15

1	tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta aataatcaat aatcttggct tgtccattat
61	tatctattta ctgtgaactg tattattatt tgacatttga gggatgttcc aatgttataa
121	ggatagacat tggaaatggt aaccgagtca taatcagggt taggcctggt atcctattat
181	tattaccaa atgaattcag aattaatatt gtaacataga ctaaaaaat ctataaaaca
241	actttaaca acggatctct tggttctcgc atcgatgaag aacgtagcaa agtgcgataa
301	ctagtgtgaa ttgcatattc agtgaatcat cgagctttg aacgcaactt gcgctcattg
361	gtattccaat gagcacgctt gtttcagtat caaaacaaac cctctatcca acttttgttg
421	tataggatta ttgggggcct ctcgatctgt atagatcttg aaatccctga aatttactaa
481	ggcctgaact tgtttaaag cctgaacttt ttttaatat aaaggaaagc tcttgaattg
541	actttgatg gggcctccca aataaatctc ttttaattt gatctgaaat caggcgggat
601	taccgctga acttaagcat atcaataagc ggagga

Table 16. 18S rRNA sequence of *Penicillium chrysogenum* (strain 24)

1	ctccgagtg atgcacttg gtcacctcc acccgtggtt atttacctt gttgctcgg
61	cgggccgcc ttaatggccg ccggggggct tacgccccg ggcccgcgcc cgccaagac
121	accctgaac tctgtctgaa gattgtagtc tgagtgaaa tataaattat ttaaacttt
181	caacaacgga tccttgggt cggcatcga tgaagaacgc agcgaatgc gatacgtaat
241	gtgaattgca aattcagtga atcatcgagt ctttgaacgc acattgcgcc cctgtgtatt
301	ccggggggca tgctgtcgc agcgtcattt ctgccctcaa gcacggcttg tgtgtgggc
361	cccgtctcc gatcccgggg gacggggccg aaaggcagcg gcggcaccgc gtcggtctc
421	cgagcgtatg gggctttgct accgctctg taggcccgcg cggcgcttgc cgatcaacc
481	aaattttat ccaggttgac ctggatcag gtagggatac ccgctgaact taagcatalc
541	aataagcgga ggaaatcatt accgagtgag ggcctctggt gtccaacctc ccaccggtg
601	ttattgttac cttgttctt cgcgggccgc ctttaactgg ccgccggggg ggcttacgc
661	cggccgcgce cgcaaaaacc ccaacaatgc tctgtaaata tggtagggag ggaaaaaata
721	aattatgta aacttaaac accgggattc cttggttcg gcatcatga agaacgcacg
781	aatgcatag tatgtgaatt tgcaatcat gaatcatcag tcttgaacgc attgtcctg
841	gtattccggg gggcatgtgg gtcgaacgat cattcgctc taacgctggt gtttgacta
901	ccctccatc ccggggaatg gtcgtaatga tattggttgt ac

Table 17. 18S rRNA sequence of *Mucor racemosus* 42

1	ccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta aataatcaat aatcttggct tgtccattat
61	atctattta ctgtgaactg tattattatt tgacatttga gggatgttcc aatgttataa
121	gatagacat tggaaatggt aaccgagtca taatcagggt taggcctggt atcctattat
181	attaccaa atgaattcag aattaatatt gtaacataga ctaaaaaat ctataaaaca
241	ctttaaca acggatctct tggttctcgc atcgatgaag aacgtagcaa agtgcgataa
301	tagtgtgaa ttgcatattc agtgaatcat cgagctttg aacgcaactt gcgctcattg
361	tattccaat gagcacgctt gtttcagtat caaaacaaac cctctatcca acttttgttg
421	ataggatta ttgggggcct ctcgatctgt atagatcttg aaatccctga aatttactaa
481	gcctgaact tgtttaaag cctgaacttt ttttaatat aaaggaaagc tcttgaatt
541	actttgatg gggcctccca aataaatctc ttttaattt gatctgaaat caggcgggat

Table 18. 18S rRNA sequence of *Cladosporium uredinicola* (strain 60)

1	gggtagtga cgggtctacc accgggatgt tcataaccct ttgtgtccg actctgttc
61	ctccggggcg accctgcctt cgggcggggg ctccgggtgg acactcaaa ctcttgcgta
121	actttgcagt ctgagtaaac ttaattaata aattaaact ttaacaacg gatctcttgg
181	ttctggcatc gatgaagaac gcagcgaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag
241	tgaatcatcg aatctttgaa cgcacattgc gcccctgggt attccggggg gcatgcctgt
301	tcgagcgtca tttcaccact caagcctcgc ttggattgg gcaacgcggt ccgccgcgtg
361	cctcaaatcg accggctggg tcttctgtcc cctaagcgtt gtggaaacta ttcgctaaag
421	ggtgttcggg aggctacgcc gtaaaacaac cccatttcta aggttgacct cggatcaggt
481	agggataccc gctgaactta agcatatcat agcccggagg aatcgttacg agtgaccgg
541	gtctaccocg gggaagggtc ataacctttg ttggccgaat ctgttgctc gggggcgact
601	tgccttcggg gggggggctc gggggggaaa ctcaaacctc tgga

Table 19. 18S rRNA sequence of *Penicillium fellutanum* (strain 70)

1	aaggatcatt actgagtgcg ggccctctgg gtccaacctc ccaccctgtg atacttaccg
61	tggtgcttcg gcgggcccgc ctgccagcc gccggggggc aaccgecccc gggcccgcgc
121	ccgccgaaga cccccacgaa ctctttctac cttgcagtct gagcgataag cataaattat
181	taaaacttfc aacaacggat ctcttggttc cggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg
241	ataagtaatg tgaattgcag aattcagtga atcatcgagt ctttgaacgc acattgcgcc
301	ccctggtatt ccggggggca tgccctgtcc agcgtcatta ctgccctcaa gcccggcttg
361	tggtttgggc gccgcccc cgggggcggg ccgaaaggc agcggcggca ccgctccgg
421	tctcgagcgc tatggggctt tgcacccgc ccgtaggccc ggccggcgcc cgccgacccc
481	ctccaacctt tttttcag gttgacctcg gatcaggtag ggatacccgc tgaacttaag
541	catatcaata agcggaggaa aagaaaccaa cagggttgc ctagtaacg gcgagtgaag
601	cggcaagagc tcaatttga aagctggccc cctcggggcc cgcattgtaa ttgcagagg
661	atgcttcggg cgtggccct gtctaagtgc cctggaacgg gccgtcagag aggggtgagaa
721	tcccgtatgg gatggggtgc ccacgccct gtgaagctcc ttcgacgagt cgagttgttt
781	gggaatgcag ctctaatgg gtggtaaatt tcactaaag ctaaatattg gccggagacc
841	gatagcgcac aagtagagtg atcgaaagat gaaaagcact ttgaaaagag agttaaaaag
901	cacgtgaaat tgttgaaagg gaagcgttg cgaccagact cgccccagg gttcaaccgg
961	cttccggcc ggtgtactc cccggggcg ggccagcgtc ggttttggcg gccggtcaaa
1021	ggccctgga atgtaacgcc cccggggcg tcttatagcc aggggtgcca tgcggcccgc
1081	cgggaccgag gaacgcgctt cggctcggac gctggcataa

라. 맛 성분

7종의 균주를 이용하여 제조한 된장 17종의 유리아미노산, 유리당, 유기산의 분포는 Table 20-22와 같다. 단맛 (유리당 및 유리 아미노산)을 나타내는 성분함량의 분포는 Table 20, 21과 같이 시료 간 성분함량이 차이가 많은 것으로 나타났으며, 단맛을 나타내는 성분함량이 가장 많은 시료는 3균주 혼합메주된장 ABG (756.0 mg%)로서 다른 된장보다 월등하게 많은

함량을 보였다. 그 다음으로 혼합메주된장 ABE (519.5 mg%)였으며, 단맛 성분함량이 가장 낮은 시료는 단독메주된장 A (114.2 mg%)와 2균주 혼합메주된장 AF (157.1 mg%)이었다. 그 외 13종 된장의 단맛 성분함량은 242.5-421.5 mg%로 각각 다른 양상을 보였다.

구수한 맛을 나타내는 성분함량의 분포는 69.2-365.8 mg%로 시료 간 성분함량이 다양하게 나타났다. 구수한 맛의 성분함량이 가장 높은 시료는 단독메주된장 F (365.8 mg%)였으며, 가장 낮은 함량을 나타낸 시료는 단독메주된장 A (69.2 mg%)와 혼합메주된장 AF (70.1 mg%)로 나타났으며, 그 외 14종의 구수한 맛의 성분함량은 비슷하게 나타났다.

쓴맛을 나타내는 성분함량의 분포는 154.0-342.0 mg%로 시료 간 비슷하게 분포하였으며, 단맛과 구수한 맛을 나타내는 성분함량에 비해 쓴맛의 함량은 적은 것으로 나타났다. 쓴맛 성분함량이 가장 많은 시료는 단독메주된장 E, F, G로 308.9-342.0 mg%였으며, 혼합메주된장 10종 중 AF (154.0 mg%)와 ABC (179.4 mg%) 2종을 제외하고 8종 된장은 227.5-295.3 mg%로 비슷한 함량을 보여주었다.

신맛을 나타내는 성분함량의 분포 (Table 22)는 97.0-329.6 mg%로 시료 간 비슷하게 분포하였으며, 단맛과 구수한 맛의 성분함량에 비해 신맛 성분함량은 적은 것으로 나타났다. 신맛 성분함량이 많은 시료는 단독메주된장 C (329.5 mg%), D (259.6 mg%), G (294.5 mg%)였으며, 혼합메주된장 중 쓴맛 성분함량을 많이 나타내는 시료는 AC (271.6 mg%)와 ABF (240.5 mg%)였다. 신맛 성분함량이 가장 적은 시료는 단독메주된장 F로 97.0 mg%를 나타내었고, 그 외에는 시료 간 비슷한 분포를 나타내었다.

종균을 이용하여 단독메주된장 7종과 혼합메주된장 10종의 총 17종 된장의 맛 성분을 측정 한 결과, 세균 1종 메주와 사상균 1종 메주를 혼합하여 만든 된장보다 세균 1종 메주와 사상균 2종 메주를 혼합하여 제조한 된장이 맛 성분 중 단맛을 나타내는 성분함량의 분포가 많은 것으로 나타났다.

Table 20. Composition of free amino acids in *Doenjang* fermented with various *Mejus* (mg/100 g)

Free A.A. Code of <i>Doenjang</i> ¹⁾	Sweetness					Sum	Umami			Sum
	Thr.	Ser.	Gly.	Ala.	Lys.		Asp.	Glu.	Cys.	
A	3.7	5.4	10.0	47.2	28.2	94.5	4.7	63.8	0.7	69.2
B	47.4	59.0	28.8	100.5	84.0	319.8	16.8	163.4	-	180.2
C	-	8.0	30.7	126.3	63.8	228.9	6.2	126.7	0.3	133.2
D	-	3.1	37.1	147.3	80.6	268.1	9.1	168.6	-	177.6
E	-	5.9	32.6	152.3	65.1	255.9	4.3	143.4	-	147.7
F	60.3	38.8	44.8	103.7	100.2	347.8	92.0	272.7	1.1	365.8
G	0.0	5.1	36.6	138.8	76.6	257.2	8.2	158.6	-	166.8
AB	55.6	69.4	37.3	106.7	98.9	368.0	39.7	243.9	-	283.6
AC	-	7.7	30.9	128.4	62.0	229.0	13.3	132.7	-	146.0
AD	-	4.2	29.7	114.9	66.3	215.2	10.5	141.1	-	151.6
AE	41.1	49.7	25.3	87.7	67.8	271.7	32.1	173.9	-	206.0
AF	20.0	9.4	13.4	49.9	27.9	120.6	7.2	62.9	-	70.1
ABC	23.3	30.7	17.2	67.7	54.5	193.4	13.2	100.0	-	113.1
ABD	47.7	39.9	29.8	95.2	83.1	295.8	31.6	197.0	-	228.6
ABE	36.9	43.1	23.3	60.0	68.7	232.0	36.0	157.9	-	193.9
ABF	38.5	48.4	22.9	62.8	69.4	242.0	34.9	151.1	-	186.0
ABG	42.5	50.9	24.2	75.1	67.3	260.0	40.5	168.9	-	209.4
Mean	24.5	28.2	27.9	97.9	68.5	247.0	23.5	154.5	0.1	178.2

Free A.A. Code of <i>Doenjang</i> ¹⁾	Bitterness			Sum	Other taste					Sum
	Met.	Ileu.	Leu.		Tyr.	Phe.	Val.	His.	Pro.	
A	17.1	52.1	95.9	165.1	2.1	51.2	44.6	4.5	10.0	112.3
B	26.0	81.0	148.4	255.4	10.3	80.9	77.8	6.2	44.6	219.9
C	27.2	89.2	146.9	263.3	1.3	83.5	96.8	0.4	2.9	184.9
D	25.7	95.2	160.7	281.6	2.4	81.5	108.4	0.3	42.9	235.5
E	32.2	115.1	194.7	342.0	1.2	91.8	115.3	0.3	5.8	214.4
F	30.6	112.0	180.0	322.6	9.5	78.6	108.9	35.0	67.5	299.6
G	29.5	102.6	176.8	308.9	12.1	62.3	104.5	0.3	25.1	204.3
AB	35.9	103.6	186.9	326.4	9.6	89.0	105.1	18.3	60.4	282.5
AC	28.4	93.5	157.4	279.4	0.5	84.9	96.9	0.1	0.6	183.0
AD	30.2	97.5	167.5	295.3	1.0	75.5	96.4	0.3	33.1	206.3
AE	26.2	76.9	139.7	242.8	8.0	7.3	74.4	0.1	42.6	132.5
AF	17.0	49.9	87.1	154.0	1.2	45.8	49.6	-	7.7	104.3
ABC	19.5	55.4	104.5	179.4	0.8	57.4	58.7	14.6	32.4	163.9
ABD	30.8	91.7	169.1	291.6	0.4	61.2	93.5	0.3	51.8	207.2
ABE	24.8	69.7	133.4	227.8	9.8	71.0	71.5	17.5	37.6	207.4
ABF	23.9	73.4	139.1	236.4	12.2	69.3	74.5	17.1	37.6	210.5
ABG	23.0	73.3	131.1	227.5	9.8	58.0	72.9	18.0	41.9	200.6
Mean	26.4	84.2	148.2	258.8	5.4	67.6	85.3	7.8	32.0	198.2

¹⁾Code description of *Doenjang* was shown in Table 11.

Abbreviations: Thr., Threonine; Ser., Serine; Gly., Glycine; Ala., Alanine; Lys., Lysine; Asp., Asparatic acid; Glu., Glutamic acid; Cys., Cysteine; Met., Methionine; Ileu., Isoleucine; Leu., Leucine; Tyr., Tyrosine; Phe., Phenylalanine; Val., Valine; His., Histidine; Pro., Proline

Table. 21. Composition of free sugars in *Doenjang* fermented with various *Mejus* (mg/100 g)

Free sugar Code of <i>Doenjang</i> ¹⁾	Sucrose	Maltose	Glucose	Galactose	Fructose	Sum
A	9.66	1.61	-	2.35	6.10	19.72
B	16.68	-	-	23.71	61.26	101.66
C	9.87	0.38	-	-	10.31	20.56
D	3.61	0.44	14.05	-	-	18.11
E	36.95	-	-	-	31.75	68.71
F	7.91	-	-	-	55.99	63.89
G	6.26	0.51	0.00	-	6.42	13.19
AB	12.24	-	12.20	-	120.93	145.37
AC	5.82	-	1.26	-	14.58	21.66
AD	15.07	-	1.23	-	11.41	27.70
AE	38.31	-	5.57	-	76.52	120.40
AF	1.25	-	2.01	-	33.24	36.50
ABC	33.87	-	10.59	-	102.13	146.59
ABD	16.78	-	8.14	-	95.21	120.12
ABE	120.90	-	93.68	-	72.88	287.46
ABF	27.78	-	13.28	-	114.98	156.05
ABG	260.76	-	-	155.08	80.18	496.02
Mean	36.69	0.17	9.53	10.66	52.58	109.63

¹⁾Code description of *Doenjang* was shown in Table 11.

Table. 22. Composition of organic acids in *Doenjang* fermented with various *Mejus* (mg/100 g)

Code of <i>Doenjang</i> ¹⁾	Non-volatile organic acid				Volatile organic acid				Sum
	Oxalic acid	Citric acid	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	3-Methyl butanoic acid	
A	0.2	-	-	3.1	97.0	20.5	42.5	14.2	177.5
B	-	-	-	0.9	79.0	-	11.7	65.5	157.1
C	0.2	-	-	0.1	271.2	8.3	29.0	20.7	329.5
D	-	-	-	2.8	190.4	23.6	22.9	19.9	259.6
E	-	-	-	-	168.4	18.0	10.9	7.3	204.6
F	-	-	-	1.0	84.5	2.0	7.8	1.7	97.0
G	0.2	-	-	1.1	261.9	1.2	15.7	14.4	294.5
AB	0.2	-	-	1.1	165.2	-	8.1	5.2	179.8
AC	-	-	-	-	223.8	-	27.6	20.2	271.6
AD	-	-	-	0.9	154.0	4.6	14.5	9.9	183.9
AE	-	-	-	1.0	152.8	1.9	9.4	7.0	172.1
AF	-	-	-	2.1	119.9	1.0	8.8	3.3	135.1
ABC	-	-	-	-	133.7	2.7	18.1	3.0	157.5
ABD	-	-	-	7.6	156.9	-	-	6.1	170.6
ABE	-	-	-	7.5	142.0	-	-	4.1	153.6
ABF	-	-	-	8.9	208.2	15.5	7.9	-	240.5
ABG	0.8	-	-	18.2	94.6	-	-	2.9	116.5
Mean	0.3	-	-	4.0	159.0	5.8	13.8	12.1	194.18

¹⁾Code description of *Doenjang* was shown in Table 11.

마. 관능평가 점수와 맛 성분과의 관계

된장의 맛과 향 (풍미)을 결정하는 관능검사와 맛 성분의 함량에 대한 추이는 Fig. 21-23과 같다. Fig. 21-23에서와 같이 관능검사 점수가 가장 높은 시료인 ABD와 ABG는 1종의 세균메주와 2종의 사상균메주로 제조한 혼합메주된장 (즉, 3균주 혼합메주된장)으로 단맛의 성분함량이 가장 높았다. 다음으로 관능검사 점수가 높은 AD와 AF (2균주 혼합메주된장), ABF (3균주 혼합메주된장)는 단맛, 구수한 맛, 신맛, 쓴맛의 성분함량비가 비슷하게 분포하였다. 맛과 향이 좋은 된장은 ABD와 ABG이었으며, 이것은 모두 *Bacillus subtilis* TKSP 24 메주와 *Aspergillus oryzae* J메주에 전통메주에서 분리한 사상균인 *Mucor racemosus*로 제조한 메주를 첨가하여 발효한 된장으로서 관능검사 결과 맛과 향이 우수하여 전통된장 향과 짠 향을 동시에 생성하고 있는 우리나라 전통된장의 우수한 풍미를 지니고 있는 것으로 나타났다.

또한 *Aspergillus oryzae* J메주 단독으로 제조한 된장 (A)과 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주와 *Aspergillus oryzae* J메주를 혼합하여 제조한 된장 (AB)의 경우, 우리나라 전통된장의 향과 다르거나 일본 미소와 흡사한 냄새가 났다. 사상균 종균 특히 15번 균주 또는 42번 균주를 이용한 혼합메주된장을 제조할 때 우리나라 전통된장의 우수한 특징적 풍미 (맛과 향)를 생성할 수 있었다. 이는 본 연구의 목표 달성에 큰 의미를 부여하는 것으로 구수한 맛과 단맛의 성분함량이 높을수록 된장 맛의 품질이 향상되는 것으로 나타났으며, 전통된장의 맛에 영향을 미치는 것은 단맛, 구수한 맛, 쓴맛, 신맛들의 성분함량이 일정한 수준으로 서로 조화로움을 나타낼 때 우수한 풍미를 지닌 전통된장제조 가능성 시사하고 있다. 우수한 맛을 지니기 위한 맛 성분의 구체적인 성분함량비율 등에 관해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

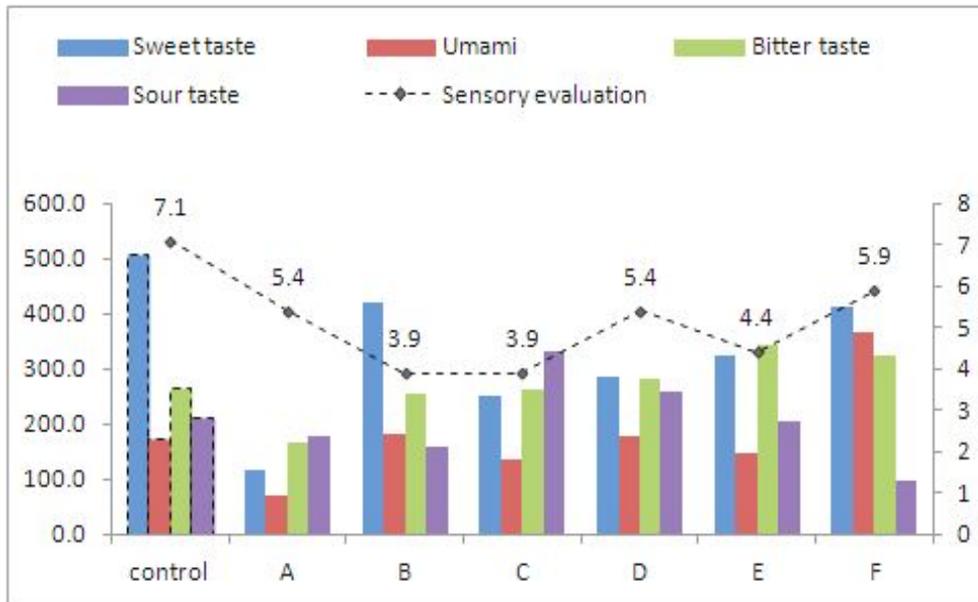


Fig. 21. Taste compounds and sensory evaluation score in *Doenjang* fermented with various *Mejus*.
Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 11. Control was the sample no. 8 in Table 1.

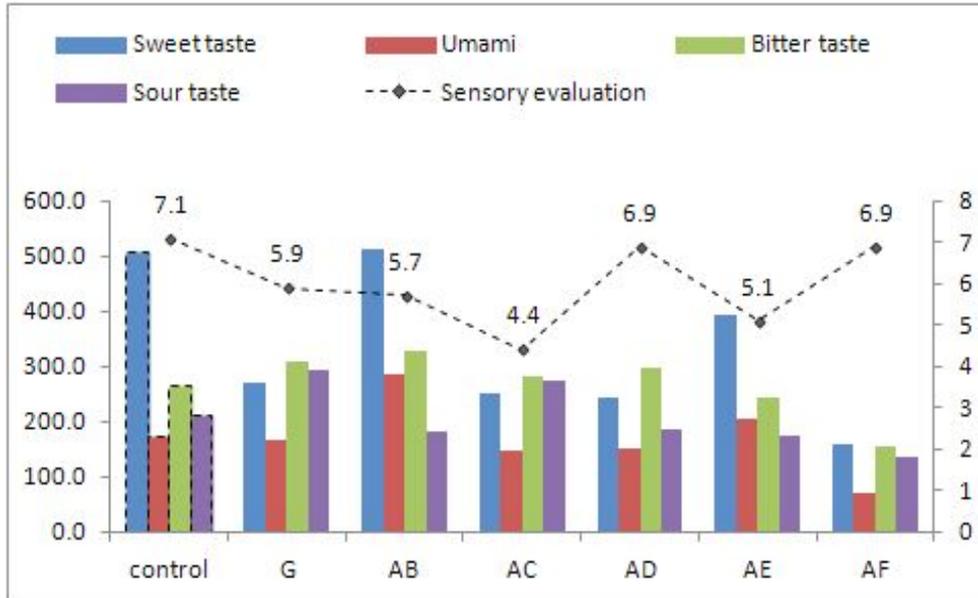


Fig. 22. Taste compounds and sensory evaluation score in *Doenjang* fermented with various *Mejus*.
Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 11. Control was the sample no. 8 in Table 1.

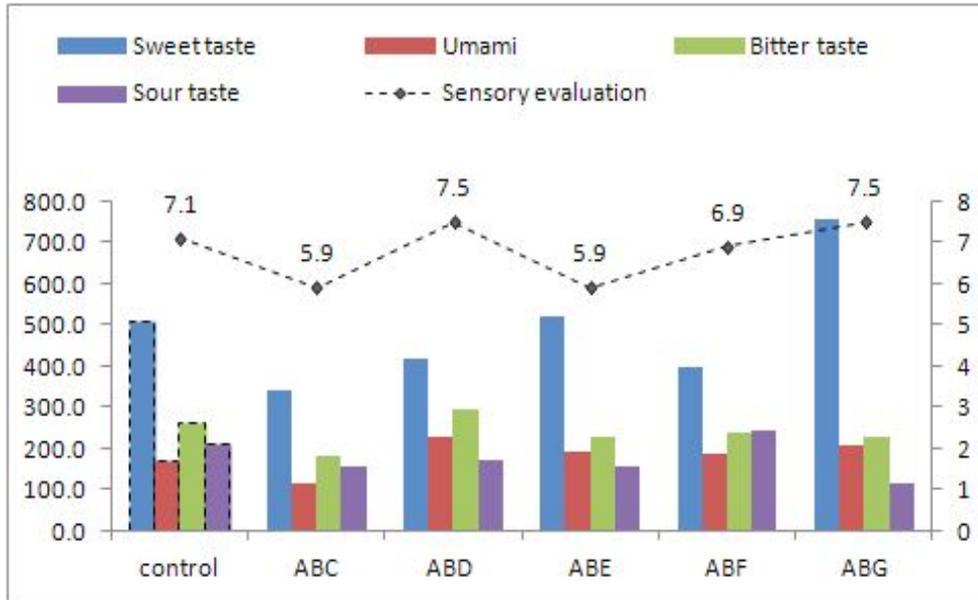


Fig. 23. Taste compounds and sensory evaluation score in *Doenjang* fermented with various *Mejus*.

Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 11. Control was the sample no. 8 in Table 1.

바. Biogenic amines과 aflatoxin

종균을 이용하여 제조한 17종 된장의 biogenic amines과 aflatoxin을 분석한 결과는 Table 23과 같다. Biogenic amines 중 agmatine, spermidine, spermine은 17종 된장에서 아주 소량 검출되었거나 거의 검출되지 않은 것으로 나타났다. Tryptamine, 2-phenylalanine, putrescine은 17종 된장 모두 소량 검출되었으며, cadaverine, histamine, tyramine은 다른 종류의 biogenic amine 보다 많이 검출되었다.

종균을 이용하여 제조한 된장 중 3균주 혼합메주된장 ABD는 다른 종균된장보다 cadaverine, histamine이 4.67-4.88 mg/kg으로 더 검출되었으며, 또 다른 3균주 혼합메주된장 ABG는 9종의 biogenic amines가 1.5 mg/kg 이하로 검출되었다. 단독메주된장과 2균주 혼합메주된장의 경우 9종의 biogenic amines가 골고루 검출되었다.

총 aflatoxin은 단독종균메주로 제조한 된장인 E, F, G와 세균 1종메주 및 사상균 1종메주로 제조한 혼합메주된장인 AB, AC의 종균된장에서는 전혀 검출되지 않았으며, 단독메주된장인 A, B, C, D와 세균 1종메주 및 사상균 1종메주로 혼합하여 제조한 된장인 AD, AE, AF에서 미량인 0.2-3.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 검출되었다. 세균 1종메주 및 사상균 2종메주로 혼합하여 제조한 3균주 혼합메주된장 ABC, ABD, ABE, ABF, ABG에서는 4.0-6.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로, 단독메주된장과 2균주 혼합메주된장보다는 더 많이 검출되었다.

종균을 이용하여 제조한 17종 된장의 biogenic amines과 aflatoxin을 분석한 결과 biogenic

amines은 40 mg/총 섭취음식량 이하의 amines 섭취는 인체에 무해하다는 보고에 의하면
 종균된장의 amines 함량의 검토결과로 볼 때 별 문제가 되지 않음을 알 수 있었다. 총
 aflatoxin은 식품공전 상의 허용한계치인 10 μ g/kg 이상 검출된 시료가 하나도 나타나지 않았
 으므로 본 연구 목적인 종균을 이용하여 위생적 전통된장의 제조 가능성을 위해요소 검토
 를 통하여 알 수 있었다.

사. pH

종균을 이용하여 제조한 17종 된장의 pH 측정 결과는 Table 23과 같으며, pH 범위는
 4.8-6.4이었다. 단독종균메주로 제조한 된장의 pH는 5.3-6.4로 높은 편이었으며, 세균 1종메
 주와 사상균 1종메주를 혼합하여 제조한 2균주 혼합메주된장의 pH는 5.0-5.9로 단독메주된
 장보다 약간 낮은 경향을 나타냈다. 세균 1종메주와 사상균 2종메주를 혼합하여 제조한 3균
 주 혼합메주된장의 pH는 4.8-5.5로 종균을 이용하여 제조한 17종 된장의 pH는 단독메주된
 장 > 2균주 혼합메주된장 > 3균주 혼합메주된장 순으로 나타났다.

Table 23. Determination of biogenic amines and total aflatoxin in *Doenjang* using various *Mejus*

Code of <i>Doenjang</i> ¹⁾	Biogenic amine (mg/kg)									Total aflatoxin (μ g/kg)	pH ²⁾
	TRY	2-PH	PUT	CAD	AGA	HIS	TYR	SPD	SPM		
A	1.62	0.46	0.31	2.05	0.07	0.35	1.84	0.14	0.1	0.20	5.3
B	1.49	0.08	Trace	3.76	Trace	4.70	0.06	0.08	ND	0.40	5.4
C	0.38	0.86	0.42	3.95	0.05	4.44	2.49	Trace	ND	2.20	6.4
D	0.65	1.01	0.85	3.98	0.05	2.89	2.63	0.06	0.1	2.00	5.5
E	0.69	0.83	1.03	3.46	0.08	2.80	2.21	0.11	Trace	-	5.9
F	0.84	0.83	0.86	4.94	0.20	0.36	1.65	ND	ND	-	5.2
G	0.53	0.84	1.38	3.70	ND	2.74	1.84	0.10	Trace	-	6.1
AB	0.88	0.42	0.40	2.58	ND	1.21	1.79	0.08	Trace	-	5.0
AC	0.78	0.66	0.43	3.13	0.06	2.71	2.25	0.10	Trace	-	5.9
AD	0.70	0.71	0.48	3.01	0.06	2.63	2.40	0.12	Trace	3.80	5.1
AE	1.42	0.58	0.39	2.36	0.07	1.92	2.51	0.19	ND	3.20	5.0
AF	1.21	0.46	Trace	2.00	Trace	3.92	0.34	ND	Trace	1.00	5.1
ABC	1.39	0.57	0.35	0.26	Trace	0.26	1.82	0.08	Trace	4.00	4.8
ABD	1.58	0.64	1.28	4.88	0.11	4.67	2.14	0.10	ND	5.00	4.9
ABE	1.68	0.51	0.06	0.22	Trace	0.13	Trace	0.12	0.1	5.00	5.5
ABF	2.21	0.05	Trace	2.23	0.11	Trace	Trace	Trace	Trace	3.00	4.8
ABG	1.19	0.78	0.58	0.24	0.05	0.42	0.19	Trace	ND	6.60	5.0

¹⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 11.

²⁾pH; expressed in mean values of triplicates

Abbreviation: TRY, Tryptamine; 2-PH, 2-Phenylalanine; PUT, Putrescine; CAD, Cadaverine; AGA, Agmatine; HIS, Histamine; TYR, Tyramine; SPD, Spermidine; SPM, Spermine

제 4 절 메주 중량비를 달리하여 제조한 종균된장의 품질 특성

1. 연구개발의 배경

우수한 전통적 풍미를 지닌 된장제조용 종균을 선별하기 위하여 1차년도와 2차년도에 수행된 결과를 토대로 우수 전통풍미 생성균주를 이용한 된장의 품질을 검토하여 종균을 이용한 위생적이고 우수한 전통된장의 생산 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. 사용균주

콩알메주 제조용 종균으로 *Bacillus subtilis* TKSP 24와 *Aspergillus oryzae* J, *Mucor racemosus* 15, *Mucor racemosus* 42를 사용하였다.

나. 종균제조

500 mL 용량의 버섯 용기에 불린콩 200 g을 분주하여 멸균한 후 각 균주를 접종하고 *Bacillus subtilis* TKSP 24는 30℃에서 2일간, *Aspergillus oryzae* J와 *Mucor racemosus*는 28℃에서 3일간 배양하여 종균으로 이용하였다.

다. 메주제조

(1) 소량제조

메주제조공정과정은 Fig. 11B와 같이 앞서 제조한 종균을 삶은 대두에 1% (w/w)로 접종하였다. 종균을 접종한 삶은 콩을 clean bench에서 stainless 사각 용기 (36×32×6 cm)에 분주한 후 사상균메주 (*Aspergillus oryzae* J 메주, *Mucor racemosus* 메주)는 28℃, 상대습도 70%에서 3일 동안, 세균메주 (*Bacillus subtilis* TKSP 24메주)는 30℃, 상대습도 70% 조건에서 2일 동안 배양한 후 열풍건조기로 50℃에서 20시간 건조하여 메주를 제조하였다.

(2) 대량제조

메주제조공정과정은 Fig. 11B와 같이 앞서 제조한 종균을 삶은 대두에 1% (w/w)로 접종하였다. 종균을 접종한 삶은 콩을 국실 (koji room)에서 국실 상자에 분주한 후 사상균메주는 28℃, 상대습도 70%에서 3일 동안, 세균메주는 30℃, 상대습도 70% 조건에서 2일 동안 배양한 후 열풍건조기로 50℃에서 20시간 건조하여 메주를 제조하였다.

라. 된장제조

된장제조 공정은 Fig. 11B와 같다. 건조된 메주 무게의 3배 (w/v)가 되도록 15% 염수를 가한 후 30℃에서 30일간 발효하였다. 발효 후 액체를 분리하고 고형물은 30℃에서 다시 1개월 발효하여 된장을 얻었다. 된장발효 시 갈변 현상을 막기 위해 된장을 제조할 때 용기의 윗부분에 15% 염수에 담근 비닐 랩을 씌웠다.

마. 관능검사

관능검사 요원은 20-60대의 남성과 여성을 각각 10명, 13명으로 총 23명을 구성하여 맛과 향 등에 대한 기본지식을 훈련시킨 후(13) 된장 13종의 관능평가를 실시하였다. 된장의 평가는 된장의 맛과 향에 대해 9점 척도법으로 실시하여 매우 나쁨 1, 보통 5, 매우 좋음 9점으로 평가하였다. 대조구로는 민가에서 선별하여 수집한 우수한 풍미를 지닌 전통된장 18종 중 관능 성적이 가장 우수한 된장을 (7.1점/9점 만점) 사용하였다.

바. pH 측정

시료 5 g과 증류수 25 mL을 혼합하여 균질화시킨 후 Whatman No. 2로 여과하여 Kim 등의 방법(18)에 따라 pH meter (Thermo Fisher Scientific Inc., Orion 5-Star Plus pH Benchtop Meter)로 측정하였다.

사. 색도

된장제조 6개월 후 3번 반복하여 색차계를 이용하여 측정하였다.

아. 맛 성분 분석

Setsuko 등(14)의 방법을 준용하여 된장 100 g에 처음에는 86.7% ethanol 150 mL를 첨가하여 65℃에서 1시간 동안 추출한 후 여액 잔유물은 다시 65% ethanol로 2번 더 반복 추출한 다음 filter paper로 filtering한 후 그 여액들을 합하여 4000×g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리한 상등액은 60℃에서 감압농축 후 90% methanol로 완전히 탈염을 시켰다. 탈염 후 여과한 여액은 다시 감압 건조시켜 물 100 mL로 용해하였다.

추출된 맛 성분 시료는 이온교환수지(15)를 이용하여 분리, 정제하였다. 즉 양이온 교환수지 amberlite IR-120과 음이온 교환수지 amberlite IRA-400을 직경 2 cm, 길이 35 cm의 column에 충전시켜 맛 성분 정제에 사용하였다. 추출 시료를 amberlite IR-120과 ambertlite IRA-400에 차례로 서서히 통과시킨 후 다시 200 mL의 증류수로 washing을 하여 양쪽을 모두 통과한 용출액은 유리당의 분석시료로 사용하였으며, 유리당의 HPLC 분석 조건은

instruments: Waters Co. 600E Model; column: Sugar-Pak I column (6.5×300 mm); column temperature: 90°C; mobile phase: Ca EDTA buffer (50 mg Ca-EDTA/1 L dH₂O); flow rate: 0.5 mL/min; detector: refractive index detector (RI Model 410)와 같다. 유리아미노산은 amberlite IR-120에 흡착된 부분을 2 N NH₄OH 150 mL로 서서히 용출시킨 후 감압 건조하여 0.1 M lithium citrate buffer (pH 2.2) 2 mL로 용해시켜 아미노산자동분석기 (Biochrom 20)로 분석하였다.

비휘발성 유기산은 amberlite IRA-400에 흡착된 부분을 1.5 N (NH₄)₂CO₃ 150 mL로 서서히 용출 후 감압 건조하여 P₂O₅가 든 desiccator에 하루 동안 방치한 다음 diethyl ether 20 mL로 용해한 후 HPLC로 분석하였으며, 분석 조건은 instruments: Waters Co.; column: RSpak KC-811 (Φ8.0×300 mm); column temperature: 40°C; flow rate: 1.0 mL/min; mobile phase: eluent 0.1% H₃PO₄/dH₂O; detector: model RI (differential refractive index detector)와 같다.

휘발성 유기산은 Kageyama(16) 방법에 준하여 된장 10 g에 물 20 mL를 첨가하여 mixing한 후 filter paper로 여과하여 분석 시료로 사용하였으며 시료에 2%의 H₂SO₄를 0.1%의 농도가 되게 가하여 pore size가 0.45 μm인 membrane filter로 여과한 후 GC로 분석하였다. GC의 분석 조건은 instrument: GC-Hewlett-Packard 5980II; column: 10% PEG 6000이 충전된 2 m glass column; detector와 injector temperature: 200°C; column temperature: 170°C; carrier gas: He; flow rate: 0.9 mL/min와 같다.

자. 통계처리

데이터의 통계처리는 IBM SPSS Statistics 19 프로그램을 이용하여 분산분석을 실시한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 각 시료간의 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 된장제조

메주제조용 균주로는 Table 24와 같이 장류제조용 우수 세균인 *Bacillus subtilis* TKSP 24, 종래 사용하는 개량식 메주제조용 사상균인 *Aspergillus oryzae* J, 전통메주에서 분리한 사상균 2종인 *Mucor racemosus* 15와 *Mucor racemosus* 42을 이용하였다. *Bacillus subtilis* TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주, *Mucor racemosus* 15메주, *Mucor racemosus* 42메주를 이용하여 각각 제조한 된장 (B, A, M15, M42), 세균메주와 사상균메주를 1:1로 조합한 된장 (BA, BM15, BM42), *Bacillus subtilis* TKSP 24메주와 *Aspergillus oryzae* J메주에 *Mucor racemosus* 15메주 또는 *Mucor racemosus* 42메주를 1:1:1의 중량비로 조합한 된장 2종(BAM15-1, BAM42-1), *Bacillus subtilis* TKSP 24메주와 *Aspergillus oryzae* J메주에 *Mucor racemosus* 15메주 또는 *Mucor racemosus* 42메주를 1:0.5:1.5의 중량비로 조합한 된장 (BAM15-2, BAM42-2), *Bacillus subtilis* TKSP 24메주와 *Aspergillus oryzae* J메주에 *Mucor racemosus* 15메주 또는 *Mucor racemosus* 42메주를 1:1.5:0.5의 중량비로 조합한 된장 (BAM15-3, BAM42-3)등 총 13종을 제조하였다.

Fig. 24와 25에서와 같이 종균을 이용하여 제조한 된장의 색도는 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주와 *Aspergillus oryzae* J메주에 *Mucor racemosus* 15메주를 첨가한 된장이 *Mucor racemosus* 42메주를 첨가한 된장보다 밝은 노란색을 나타내었다. 세균메주와 사상균메주 중량비를 달리하여 제조한 된장은 Fig. 24와 25에서와 같이 색도에는 영향을 미치지 않았다.

Table 24. *Doenjang* fermented with various *Mejus*

Strain used for making <i>Meju</i>	Mixing ratio of <i>Meju</i> for making <i>Doenjang</i>	Code of <i>Doenjang</i>
<i>Bacillus subtilis</i> TKSP 24 (B)	1	B
<i>Aspergillus oryzae</i> J (A)	1	A
<i>Mucor racemosus</i> 15 (M15)	1	M15
<i>Mucor racemosus</i> 42 (M42)	1	M42
B:A	1:1	BA
B:M15	1:1	BM15
B:M42	1:1	BM42
B:A:M15	1:1:1	BAM15-1
B:A:M15	1:0.5:1.5	BAM15-2
B:A:M15	1:1.5:0.5	BAM15-3
B:A:M42	1:1:1	BAM42-1
B:A:M42	1:0.5:1.5	BAM42-2
B:A:M42	1:1.5:0.5	BAM42-3



Fig. 24. *Doenjang* fermented with different *Mejus*.

Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.



Fig. 25. *Doenjang* fermented with different *Mejus*.

Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

나. pH, color 및 향의 특징

종균을 이용하여 제조한 13종 된장의 pH, color, 향의 특징은 Table 25와 같다. Table 25에서와 같이 13종 된장의 pH 범위는 4.9-5.5이었으며, 단독메주로 제조한 된장 (B, A, M15, M42)의 pH는 5.2-5.5로 높은 편이었으며, 세균메주와 1종류의 사상균메주를 혼합한 된장 (BA, BM15, BM42)의 pH는 5.0-5.1로 단독메주로 제조한 된장보다 약간 낮은 경향을 나타내었다. 세균메주와 2종의 사상균메주로 혼합하여 제조한 된장 (BAM15-1, BAM15-2, BAM15-3, BAM42-1, BAM42-2, BAM42-3)의 pH는 4.9-5.3이었다. 된장의 색상은 M42를 제외하고 단독메주로 제조한 된장은 모두 밝은 갈색이었으며, 2균주 혼합메주된장 (BA, BM15, BM42)과 3균주 혼합메주된장 6종 모두 노란색으로 나타났다. 향의 특징은 단독메주 된장 4종은 아주 열은 된장향이 났으며, *Bacillus subtilis* TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주 및 *Mucor racemosus* 15메주로 구성된 된장 (BAM15-1, BAM15-2, BAM15-3)이 대조구와 가장 유사한 된장향을 지닌 것으로 나타났다.

Table 25. pH, color, and description of flavor in *Doenjang* fermented with various *Mejus*

Code of <i>Doenjang</i> ¹⁾	pH ³⁾	Color	Description of flavor
Control ²⁾	5.6	light brown	Sweet and traditional Korean soybean paste smell
B	5.3	light brown	A little soybean paste smell
A	5.4	yellow	A little good sweet smell
M15	5.2	light brown	A little soybean paste smell
M42	5.5	dark brown	A little soybean paste smell
BA	5.0	yellow	A little commercial soybean paste smell
BM15	5.1	yellow	Sweet and soybean paste smell
BM42	5.1	yellow	A little soybean paste smell
BAM15-1	5.3	yellow	Sweet smell from Korean traditional soybean paste
BAM15-2	5.2	yellow	Sweet smell from Korean traditional soybean paste
BAM15-3	5.3	yellow	Sweet smell from Korean traditional soybean paste
BAM42-1	4.9	yellowish	Korean traditional soybean paste smell
BAM42-2	4.9	yellowish	Korean traditional soybean paste smell
BAM42-3	5.1	yellowish	Korean traditional soybean paste smell

¹⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

²⁾Traditional Korean *Doenjang* made of natural microflora (sample no. 8 in Table 2)

³⁾pH was expressed as mean values of triplicates.

다. 관능검사

중균된장의 9점 평점법을 이용한 맛과 향에 대한 관능검사 결과는 Table 26과 같다. Table 26에서와 같이 세균 및 사상균 단독메주로 제조한 된장 4종 중 *Aspergillus oryzae* J 메주만으로 제조한 된장이 가장 낮은 맛과 향의 관능점수 (3.9/2.6)를 보였다.

세균메주와 사상균메주 중량비가 1:1인 된장 (BA, BM15, BA42) 중 BM15와 BM42가 맛에 대한 관능성적이 우수하였고, 향은 다소 낮은 점수를 보였다.

3종류의 메주로 제조한 혼합메주된장 (BAM15-1, BAM15-2, BAM15-3, BAM42-1, BAM42-2, BAM42-3) 중 맛에 대한 관능성적이 가장 좋은 시료는 세균메주와 사상균메주 중량비가 1:1:1인 BAM15-1, BAM42-1로 맛의 관능성적이 모두 7.5였으며, 향의 관능점수는 각각 7.5, 6.4였다. BAM15-1의 향은 대조구로 사용된 전통식 민가된장 (7.1)보다 우수한 성적을 나타내었다.

세균메주와 2종의 사상균메주 중량비가 1:0.5:1.5 또는 1:1.5:0.5인 된장 (BAM15-2, BAM15-3, BAM42-2, BAM42-3)은 메주 중량비가 1:1:1인 된장 (BAM15-1, BAM42-1)보다

맛과 향에 대한 관능성적이 전반적으로 낮았다. 이와 같이 각 종균메주를 다양하게 조합하여 된장을 제조한 결과 관능성적이 가장 우수한 된장은 3균주 혼합메주된장>2균주 혼합메주된장>단독메주된장 순이었다. 맛과 향에 대한 관능성적이 가장 우수한 메주조합은 세균메주와 2종의 사상균메주를 1:1:1로 조합하여 제조한 된장 (BAM15-1, BAM42-1)이었다.

Table 26. Sensory evaluation score of *Doenjang* fermented with various *Mejus*

Code of <i>Doenjang</i> ¹⁾	Taste	Smell
	Mean±SD	Mean±SD
Control ²⁾	7.1±1.22 ^{a3)}	5.7±1.24 ^b
B	5.4±1.47 ^b	4.6±1.42 ^b
A	3.9±1.24 ^c	2.6±0.96 ^c
M15	5.9±2.48 ^b	4.6±1.76 ^{bc}
M42	5.4±1.80 ^b	4.6±2.04 ^{bc}
BA	5.7±1.92 ^b	4.6±1.42 ^{bc}
BM15	7.0±1.00 ^a	4.6±1.20 ^{bc}
BM42	6.9±2.19 ^{ab}	4.6±1.71 ^{bc}
BAM15-1	7.5±1.62 ^a	7.5±1.24 ^a
BAM15-2	4.9±1.36 ^c	5.4±1.36 ^b
BAM15-3	5.7±1.2 ^b	5.7±1.24 ^b
BAM42-1	7.5±2.19 ^a	6.4±0.96 ^{ab}
BAM42-2	5.9±1.36 ^b	4.9±1.47 ^b
BAM42-3	6.4±0.96 ^{ab}	5.1±1.92 ^b

¹⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

²⁾Traditional Korean *Doenjang* made of natural microflora (sample no. 8 in Table 2)

³⁾Superscripts in the same column not sharing a common superscript are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

라. 맛 성분 분석

(1) 유리아미노산

관능평가 성적이 비교적 우수한 3균주 혼합메주된장그룹 6종의 유리아미노산 분석 결과는 Table 27과 같다. 유리아미노산 맛 성분은 Solms(29)와 이(30)에 따라 단맛, 구수한 맛, 쓴맛을 나타내는 성분으로 분류하였다. Table 27에서와 같이 단맛을 나타내는 유리아미노산 성분함량이 가장 많은 된장은 대조구인 전통식 민가된장 (391.1 mg/100 g)이었다. 그 다음은 BAM15-1과 BAM42-1로 각각 333.7 mg/100 g, 295.8 mg/100 g이었다.

구수한 맛을 나타내는 유리아미노산은 대조구, BAM42-1, BAM15-1 순으로 각각 263.2 mg/100 g, 228.6 mg/100 g, 187.2 mg/100 g이었다. 쓴맛 성분함량이 가장 많은 시료는 BAM42-1이었고, 그 다음이 대조구, BAM15-1순이었다. 세균메주와 2종의 사상균메주를 1:

0.5:1.5 또는 1:1.5:0.5로 조합한 3균주 혼합메주된장 (BAM15-2, BAM15-32, BAM42-2, BAM42-3)은 1:1:1인 된장 (BAM15-1, BAM42-1)보다 유리아미노산 함량이 모두 적었다.

단맛을 나타내는 유리아미노산의 성분함량이 가장 많은 대조구와 BAM15-1, BAM42-1된장은 Table 26에서 보는 바와 같이 맛에 대해 높은 관능성적을 보였다. 이는 된장의 맛은 단맛을 나타내는 유리아미노산의 성분함량이 주도적으로 관여한다는 연구보고(31-33)와 일치하는 결과였다.

(2) 유리당

3균주 혼합메주된장의 유리당 분석 결과는 Table 28과 같다. Table 28과 같이 유리당의 함량이 높은 된장은 BAM15-1, BAM15-2, BAM15-3으로 각각 72.09, 70.41, 75.99 mg/100 g으로 대조구인 전통식 민가된장 (37.62 mg/100 g)보다 높았다. *Mucor racemosus* 42메주로 제조한 된장 (BAM42-1, BAM42-2, BAM42-3)은 *Mucor racemosus* 15메주로 제조한 된장 (BAM15-1, BAM15-2, BAM15-3)보다 총 유리당 함량이 낮게 나타났는데 이는 된장 제조에 사용된 균주에 따라 대두에 많이 함유되어 있는 oligo당을 분해하는 효소의 성질이 다르기 때문으로 사료된다.

(3) 불휘발성 유기산 및 휘발성 유기산

3종류의 메주를 혼합하여 제조한 3균주 혼합메주된장의 불휘발성 유기산 및 휘발성 유기산의 분석 결과는 Table 29와 같다. 불휘발성 유기산인 glutaric acid는 대조구인 전통식으로 제조한 민가된장 (107.30 mg/100 g)이 가장 많은 함량을 나타내었다. BAM15-1, BAM42-1된장은 각각 70.85 mg/100 g, 82.42 mg/100 g로 대조구보다 낮았으나, BAM15-2, BAM15-3, BAM42-2, BAM42-3보다 높은 함량을 나타내었다. 불휘발성 유기산인 succinic acid는 전통된장을 비롯하여 종균을 이용한 6종 된장 (0.46-1.61 mg/100 g) 모두 낮은 함량을 나타내었다. 휘발성 유기산이 가장 많은 된장은 BAM15-2 (238.96 mg/100 g)로 대조구인 전통식 민가된장 (173.38 mg/100 g)보다 높은 함량을 나타냈다. 휘발성 유기산의 함량이 가장 적은 된장은 BAM15-3 (130.58 mg/100 g)이었다.

Table 27. Composition of amino acids in *Doenjang* fermented with various *Mejus*

(mg/100 g)

<i>Doenjang</i> ¹⁾		Control	BAM15-1	BAM15-2	BAM15-3	BAM42-1	BAM42-2	BAM42-3
Amino acid								
Sweet-ness	Thr.	86.8±2.34 ^a	40.1±1.80 ^c	11.8±1.38 ^e	15.8±3.18 ^d	47.7±0.45 ^b	10.4±0.79 ^e	40.0±1.13 ^c
	Ser.	85.8±3.57 ^a	52.1±1.85 ^b	12.6±1.34 ^e	18.1±3.60 ^d	39.9±0.59 ^c	10.9±1.23 ^e	41.0±1.90 ^c
	Gly.	53.6±1.52 ^a	33.9±0.80 ^b	9.3±0.93 ^f	9.9±1.85 ^f	29.8±0.49 ^c	21.1±3.00 ^e	25.1±1.77 ^d
	Ala.	85.0±4.84 ^c	132.6±5.52 ^a	40.5±4.67 ^d	37.4±7.5 ^d	95.2±1.36 ^{bc}	98.8±7.8 ^b	95.1±2.4 ^{bc}
	Lys.	79.0±2.01 ^{ab}	75.3±5.06 ^b	22.7±3.12 ^d	26.2±6.01 ^d	83.2±0.56 ^a	60.1±4.87 ^c	65.8±0.94 ^c
Subtotal		391.1	333.7	96.8	107.1	295.8	201.2	267.0
Umami	Asp.	35.6±0.12 ^a	12.8±1.93 ^d	2.3±0.31 ^f	5.0±1.31 ^e	31.6±0.20 ^b	12.1±1.13 ^d	20.6±0.88 ^c
	Glu.	227.6±2.08 ^a	165.7±6.22 ^c	41.7±4.64 ^g	56.2±1.55 ^e	197.2±1.89 ^b	110.2±11.43 ^e	138.2±5.47 ^d
	Cys.	0.0 ^d	0.5±0.08 ^a	0.2±0.02 ^{bc}	0.2±0.04 ^c	0.0 ^d	0.3±0.09 ^b	0.3±0.04 ^b
Subtotal		263.2	187.2	49.1	74.25	228.6	135.1	165.5
Bitter-ness	Met.	13.9±0.21 ^c	17.9±1.08 ^b	6.5±0.60 ^d	6.7±1.16 ^d	30.9±0.36 ^a	12.8±0.98 ^c	17.1±0.64 ^b
	Ile.	75.6±2.18 ^b	71.0±3.42 ^c	21.9±2.27 ^f	23.2±4.42 ^f	91.7±1.02 ^a	45.8±1.71 ^e	60.3±1.01 ^d
	Leu.	120.0±1.87 ^b	113.9±5.10 ^b	35.6±3.25 ^e	36.7±6.28 ^e	169.1±2.35 ^a	66.6±1.72 ^d	100.2±2.53 ^c
Subtotal		209.5	202.8	64.0	66.55	291.6	125.2	177.6
Other taste	Tyr.	82.5±0.05 ^a	31.1±0.84 ^b	8.8±0.28 ^c	7.5±1.20 ^c	0.4±1.86 ^c	42.0±1.16 ^b	1.71±0.07 ^c
	Phe.	7.1±0.08 ^e	64.7±1.54 ^a	19.6±2.03 ^d	21.7±4.18 ^d	61.2±1.12 ^a	52.9±.44 ^b	42.0±.15 ^c
	Val.	29.6±0.18 ^c	53.3±0.88 ^b	23.1±3.29 ^c	22.7±5.19 ^c	93.5±1.00 ^a	51.9±4.23 ^b	63.0±1.73 ^b
	His.	5.9±0.01 ^d	14.6±0.75 ^b	1.2±0.14 ^e	7.4±1.58 ^d	0.3±0.29 ^e	11.9±2.07 ^c	17.5±1.61 ^a
	Pro.	56.0±0.24 ^a	39.4±1.45 ^c	10.5±1.31 ^f	11.9±2.49 ^f	51.8±0.58 ^b	25.1±2.20 ^e	34.7±1.04 ^d
Arg.	3.2±0.64 ^b	4.2±0.34 ^a	1.6±0.31 ^{cd}	1.1±0.32 ^d	2.1±0.42 ^c	1.4±0.04 ^{cd}	1.5±0.09 ^{cd}	
Subtotal		184.1	207.3±	64.8	72.5	207.2	185.2	160.4

¹⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

²⁾Traditional Korean *Doenjang* made of natural microflora (sample no. 8 in Table 2)

Abbreviations: Thr., Threonine; Ser., Serine; Gly., Glycine; Ala., Alanine; Lys., Lysine; Asp., Aspartic acid; Glu., Glutamic acid; Cys., Cysteine; Met., Methionine; Ileu., Isoleucine; Leu., Leucine; Tyr., Tyrosine; Phe., Phenylalanine ; Val., Valine; His., Histidine; Pro., Proline

Table 28. Composition of free sugars in *Doenjang* fermented with various *Mejus*

(mg/100 g)

Free sugar		Maltose	Glucose	Fructose	Total
<i>Doenjang</i> ¹⁾					
Control ²⁾		9.1±1.12 ^c	17.54±1.15 ^{ab}	10.98±1.01 ^a	37.62
BAM15-1		27.61±2.43 ^b	22.53±0.53 ^{ab}	21.95±0.88 ^a	72.09
BAM15-2		37.59±5.90 ^a	20.32±0.90 ^{ab}	12.50±0.15 ^a	70.41
BAM15-3		25.83±1.21 ^b	27.72±2.81 ^a	22.47±0.35 ^a	75.99
BAM42-1		0.00 ^c	7.37±1.09 ^{ab}	3.72±0.92 ^a	11.09
BAM42-2		30.15±4.32 ^b	6.21±1.04 ^{ab}	3.40±0.20 ^a	39.76
BAM42-3		41.12±0.19 ^a	16.15±0.18 ^{ab}	10.69±0.35 ^a	67.96

¹⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

²⁾Traditional Korean *Doenjang* made of natural microflora (sample no. 8 in Table 2)

Table 29. Composition of organic acids in *Doenjang* fermented with various *Mejus*

(mg/100 g)

Organic acid <i>Doenjang</i> 1)	Non-volatile organic acid			Volatile organic acid				
	Succinic acid	Glutaric acid	Sub-total	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	3-Methylbutanoic acids	Sub-total
Control ²⁾	0.00 ^g	107.30±5.21 ^a	107.30	116.10±2.90 ^d	1.63±0.25 ^b	8.07±0.18 ^b	47.58±1.24 ^a	173.38
BAM15-1	0.46±0.01 ^f	70.85±3.86 ^c	71.31	134.68±8.42 ^c	1.33±0.27 ^b	0.00 ^f	18.23±1.14 ^d	154.24
BAM15-2	0.60±0.00 ^d	19.07±0.16 ^f	19.68	208.8±9.19 ^a	2.19±0.72 ^a	0.00 ^f	27.97±0.29 ^e	238.96
BAM15-3	0.53±0.03 ^e	57.39±2.28 ^d	57.92	118.74±3.70 ^d	0.00 ^c	2.63±0.02 ^e	9.20±1.47 ^f	130.58
BAM42-1	1.61±0.09 ^a	80.81±4.49 ^b	82.42	160.57±0.52 ^b	1.76±0.11 ^{bc}	6.28±0.73 ^c	23.64±1.98 ^c	192.26
BAM42-2	0.98±0.01 ^b	59.31±3.34 ^d	60.30	110.78±4.07 ^d	1.23±0.08 ^b	11.44±1.10 ^a	20.38±2.41 ^d	143.84
BAM42-3	0.87±0.02 ^c	43.78±1.56 ^e	44.65	134.66±7.62 ^c	0.00 ^c	5.28±0.94 ^d	15.19±2.10 ^e	155.12

¹⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

²⁾Traditional Korean *Doenjang* made of natural microflora (sample no. 8 in Table 2)

마. 관능검사와 맛 성분과의 관계

3균주 혼합메주된장의 관능검사와 맛 성분의 관계를 spider-web diagram으로 나타낸 결과는 Fig. 26과 같다. 맛의 관능성적이 가장 높은 BAM15-1과 BAM42-1은 대조구와 같이 단맛을 나타내는 성분이 많은 spider-web diagram을 보였다. 관능성적이 가장 낮은 BAM15-2는 단맛, 구수한 맛, 쓴맛을 나타내는 함량이 적고 신맛을 나타내는 성분함량이 많은 spider-web diagram을 보였다. Spider-web diagram에 표시한 단맛, 구수한 맛, 신맛, 쓴맛 성분의 함량은 이들 각각의 threshold나 강도를 고려하지 않고, 맛 성분의 함량분포만을 나타냈다. 즉, 맛 성분함량이 다소 많고 적음은 맛의 강약을 의미하는 것이 아니라 맛과 향의 관능검사를 통한 된장의 선호도를 구별하기 위해 spider-web diagram을 활용하였다.

우리나라 전통의 풍미를 갖는 된장을 산업적으로 대량생산할 수 있는 시스템을 개발하고자 본 연구에서는 전통메주에서 분리한 다양한 종균으로 콩알메주를 만들고 각각의 콩알메주를 혼합하여 된장을 제조하였다. 메주제조용 균주로는 전통메주에서 분리한 사상균 2종 (*Mucor racemosus* 15, *Mucor racemosus* 42)과 장류제조용 우수 세균 *Bacillus subtilis* TKSP 24, 종래 사용하는 개량식 메주제조용 균주 *Aspergillus oryzae* J를 이용하였다. 각 종균을 다양하게 조합하여 세균메주된장 및 사상균메주된장, 세균메주와 사상균메주를 이용한 2균주 혼합메주된장, 세균메주와 2종류의 사상균메주를 조합한 3균주 혼합메주된장의 관능평가 (맛과 향)를 실시하였다. 그 결과 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주, *Mucor racemosus* 15메주 또는 *Mucor racemosus* 42메주를 1:1:1 (w/w)로

조합한 BAM15-1, BAM42-1의 관능성적이 가장 우수하였다. 이들은 대조구로 사용된 전통 민가된장과 유의적 차이를 보이지 않았다.

세균메주와 2종류의 사상균메주 비율이 1:0.5:1.5 또는 1:1.5:0.5인 된장 (BAM15-2, BAM15-3, BAM42-2, BAM42-3)의 관능평가와 맛 성분 분석결과는 단맛을 나타내는 유리 아미노산과 유리당의 함량이 많은 된장은 대조구로 사용된 전통 민가된장, 그 다음이 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주, *Mucor racemosus* 15메주 또는 *Mucor racemosus* 42메주를 1:1:1로 조합한 된장 (BAM15-1, BAM42-1)이었으며 이들 된장의 관능성적은 민가된장보다 더 우수하였다.

쓴맛 성분함량은 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주, *Mucor racemosus* 42메주 중량비가 1:1:1인 된장 (BAM42-1)이 가장 많았다. 불휘발성 유기산은 민가된장인 대조구가 혼합메주된장 6종 보다 월등히 많았으며, 휘발성 유기산은 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주, *Mucor racemosus* 15메주의 중량비가 1:0.5:1.5인 된장 (BAM15-2)에서 가장 많은 함량을 보였다.

관능성적이 가장 높은 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주, *Mucor racemosus* 15메주 또는 *Mucor racemosus* 42메주 중량비가 1:1:1인 된장 (BAM15-1, BAM42-1)은 대조구로 사용된 민가된장과 같이 단맛 성분이 많고 단맛을 나타내는 성분에 비하여 신맛과 쓴맛 성분이 적은 것으로 나타났다. 관능성적이 가장 낮은 BAM15-2는 단맛, 구수한 맛, 쓴맛은 적었으나 신맛을 나타내는 성분함량이 많았다. 본 연구 결과, *Bacillus subtilis* TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주, *Mucor racemosus*메주 중량비가 1:1:1인 조합의 3균주 혼합메주가 전통풍미를 갖는 된장제조에 가장 적합함을 알 수 있었다. 이는 종래 메주제조용 균주인 *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus oryzae* J에 *Mucor racemosus*를 첨가함으로써 개량식 된장의 풍미와는 다른 한국의 전통적 풍미를 지닌 콩알메주된장을 제조할 수 있음을 시사한다.

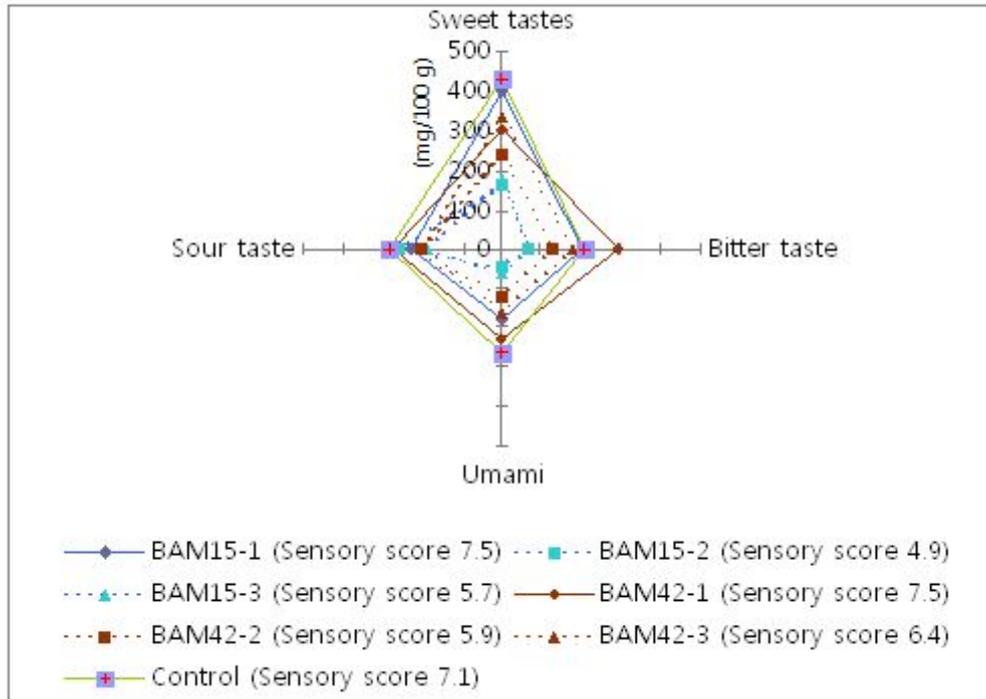


Fig. 26. Relationship of taste compounds with sensory score.

Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.
Control: traditional Korean *Doenjang* made of natural microflora (sample no. 8 in Table 2)

바. 색도 측정

선별 종균인 세균 1종 및 사상균 2종 메주를 1:1:1, 1:0.5:1.5, 1:1.5:0.5로 혼합하여 제조한 된장 12종의 숙성 후 6개월의 된장 색도를 측정한 결과는 Table 30 및 Fig. 27, 28과 같다.

Table 30과 Fig. 27에서 보는 바와 같이 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주와 *Aspergillus oryzae* J메주와 *Mucor racemosus* 15메주를 이용하여 제조한 된장 (BAM15-1, BAM15-2, BAM15-3) 겉 부위 L (명도)값이 각각 46.13, 44.21, 44.21이었고, a (적색도)값이 각각 5.83, 5.25, 5.35였고, b (황색도)값이 각각 17.67, 15.97, 15.75로 나타났다. 안쪽 부위 L 값은 각각 50.03, 50.95, 52.92였고, a 값은 6.41, 6.21, 6.34였고, b 값은 20.14, 20.23, 21.48로 나타났다.

Bacillus subtilis TKSP 24메주, *Aspergillus oryzae* J메주와 *Mucor racemosus* 42메주를 이용하여 제조한 된장 (BAM42-1, BAM42-2, BAM42-3)은 겉 부위 L값이 각각 43.42, 45.41, 44.96, a값이 각각 7.49, 7.70, 7.23, b값이 각각 17.19, 18.28, 17.87로 나타났다. 안쪽 부위 L 값은 각각 50.74, 53.42, 52.78이었고, a 값은 9.01, 10.30, 9.35, b 값은 26.48, 28.62, 25.61로 나타났다.

Mucor racemosus 42메주와 *Mucor racemosus* 15메주의 서로 다른 첨가구 된장 겉 부위의 L 값과 b 값은 $p < 0.05$ 에서 유의적 차이는 없었으며, a 값은 유의적인 차이가 있는 것으

로 나타났다. 안쪽 부위의 경우 *Mucor racemosus* 42메주로 제조한 된장의 L, a, b 값이 *Mucor racemosus* 15메주로 제조한 된장보다 높은 것으로 나타났으며, 이는 $p < 0.05$ 에서 L, a, b 값 모두 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다.

된장 색도의 밝은 정도는 Table 30과 Fig. 27과 28에서 보는 바와 같이 *Bacillus subtilis* TKSP 24메주와 *Aspergillus oryzae* J메주에 *Mucor racemosus* 42메주를 혼합한 된장의 색도가 *Mucor racemosus* 15메주를 조합한 된장의 색도보다 밝고 노란색 된장을 지닌 것으로 나타났다.

Table 30. Color values of *Doenjang* fermented with various *Mejus*

Side	Hunter's value ¹⁾			
	Code of <i>Doenjang</i> ⁵⁾	L ²⁾	a ³⁾	b ⁴⁾
Outer	BAM15-1	46.13±1.44 ^{ab}	5.83±0.13 ^b	17.67±1.42 ^a
	BAM15-2	44.21±0.90 ^{bc}	5.25±0.33 ^b	15.97±2.75 ^a
	BAM15-3	44.21±1.65 ^{bc}	5.35±0.61 ^b	15.75±2.15 ^{ab}
	BAM42-1	43.42±0.82 ^{bc}	7.49±0.25 ^a	17.19±0.27 ^a
	BAM42-2	45.41±1.24 ^{ab}	7.70±0.72 ^a	18.28±1.70 ^a
	BAM42-3	44.96±2.00 ^{ab}	7.23±0.41 ^a	17.87±0.62 ^a
Inner	BAM15-1	50.03±0.84 ^b	6.41±0.22 ^d	20.14±0.80 ^c
	BAM15-2	50.95±0.44 ^b	6.21±0.31 ^d	20.23±0.69 ^c
	BAM15-3	52.92±1.53 ^a	6.34±0.21 ^d	21.48±0.58 ^c
	BAM42-1	50.74±0.37 ^b	9.01±0.23 ^{bc}	26.48±0.41 ^b
	BAM42-2	53.42±0.46 ^a	10.30±0.12 ^a	28.62±0.27 ^a
	BAM42-3	52.78±0.24 ^a	9.35±0.15 ^b	25.61±0.47 ^b

¹⁾L, lightness 0-100 (black: 1, white: 100,); a, redness (-: green, +: red);
b, yellowness (-: blue, +: yellow)

²⁾Standard L: 96.43; ³⁾Standard a:+0.03; ⁴⁾Standard b:+1.79;

⁵⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

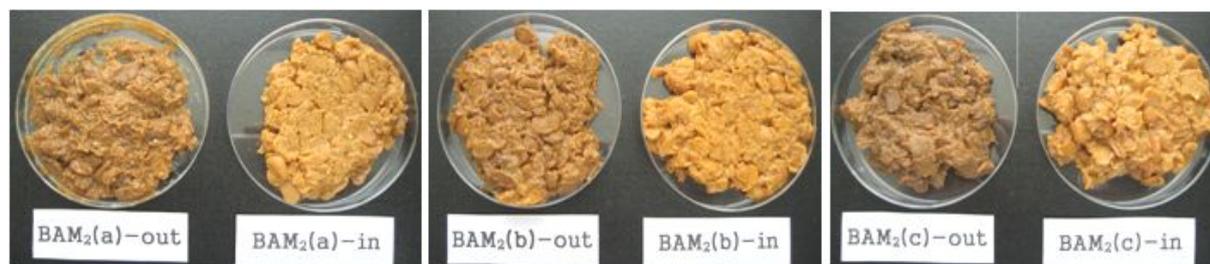


Fig. 27. Color of outer and inner side in *Doenjang*.

Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

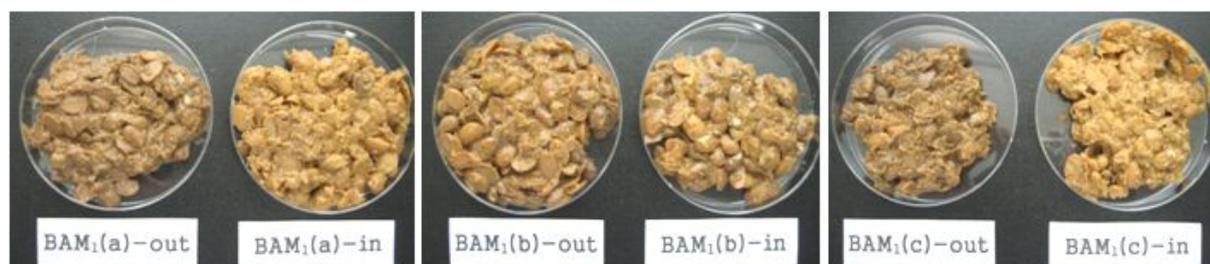


Fig. 28. Color of outer and inner side in *Doenjang*.

Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

제 5 절 새로운 종균으로 제조한 메주의 혼합비에 따른 된장의 위해요소 검토

1. 연구개발의 배경

된장 생산 공정의 Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)에 필요한 위생관리 방안으로 1차년도에 수집한 민가된장의 biogenic amines, aflatoxin, 기타 식중독균을 측정 분석한 결과 amines은 40 mg/총 섭취음식량 이하의 amines 섭취는 인체에 무해하다는 보고에 근거하여 수집한 18종 된장의 amines은 별 문제가 되지 않았으며, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7은 18종의 된장에서 검출되지 않았다. 그러나 총 aflatoxin은 식품공저 상의 허용한계치인 10 μ g/kg 이상 검출된 시료가 2종, coliform bacteria (대장균군)는 민가된장 18종 중 9종의 된장에서 10³ CFU/g 이상 검출되었으며, *Bacillus cereus*는 10⁴ CFU/g 이상이 5종의 된장에서 검출되었으므로 전통메주 제조 시 미생물 관리의 중요성과 위생관리의 문제점이 제기되었다. 따라서, 본 연구에서는 새로운 종균의 안전성을 검토하기 위하여 종균으로 제조한 된장의 biogenic amines와 aflatoxin, 기타 식중독균을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. Biogenic amines

(1) 시약

Biogenic amines의 표준품으로 tryptamine hydrochloride (TRP), 2-phenyl-ethylamine (PHE), spermidine trihydrochloride (SPD), putrescine dihydrochloride (PUT), histamine dihydrochloride (HIS), cadaverine dihydrochloride (CAD), spermine tetrahydrochloride (SPM), tyramine hydrochloride (TYR), agmatine sulfate (AGM), acetone은 Sigma-Aldrich사의 제품을 사용하였다. Dansyl chloride는 Fluka 사, sodium hydroxide, sodium hydrogen carbonate, ammonium hydroxide와 perchloric acid는 Junsei Chemicals사의 1급 제품을 사용하였으며, acetonitrile과 ammonium acetate는 Merck사의 HPLC용 등급을 사용하였다.

(2) 분석방법

(가) 시료추출 및 유도체화

시료 5 g을 취하여 내부표준용액 (internal standard; I.S.)인 1,7-diaminoheptane (0.1

mg/mL)이 함유된 0.4 M perchloric acid 10 mL를 가한 후 균질화하였다. 3000×g, 4°C에서 원심분리를 10분간 하여 상층액을 취하고 잔사에 다시 0.4 M perchloric acid 10 mL를 가해 위의 조작을 반복하여 얻은 상층액을 합친 25 mL의 perchloric acid solution을 Whatman filter paper No. 1로 여과하여 추출하였다. Dansyl chloride를 이용한 유도체화는 Ben-Gigirey 등의 방법(17)에 따라 혼합 표준용액 및 추출용액 각각 1 mL을 마개 달린 시험관에 취한 다음 sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) 300 μL과 2M NaOH 200 μL를 가한 다음 dansyl chloride 용액을 2 mL 가하여 혼합한 후 마개를 하여 40°C에서 45분 동안 반응시켰다. 남아 있는 dansyl chloride를 제거하기 위하여 25% ammonium hydroxide 100 μL를 첨가한 후 acetonitrile를 이용하여 volume이 5 mL 되게 하여 3000×g, 10 분 동안 원심 분리시켰으며, 그 상층액을 0.2 μm-pore-size filter로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다.

검체를 0.4 M perchloric acid로 추출하고 1,7-diaminoheptane (0.1 mg/mL)을 내부표준액으로 하고 1% dansyl chloride 아세톤액으로 유도체화한 후 HPLC (UV 254 nm)로 분석하였다. 분리칼럼은 Supelco column (4.6 mm×250 mm, 5 μm particle size)를 사용하였고, 유속은 1 mL/min이었다.

나. Aflatoxin

(1) 시약 및 기기

총 aflatoxin의 정량분석을 위한 모든 시약은 Neogen Corp. Wells사에서 구입하여 사용하였다. 시약의 구성은 aflatoxin HRP blue conjugate solution, K-blue substrate solution, red stop solution, aflatoxin controls (0, 5, 15, 50 ppb)이다. 총 aflatoxin의 정량분석을 위해 ELISA reader (Infinite M 200, TECAN)를 이용하였다.

(2) 분석방법

시료 10 g에 70% MeOH 50 mL를 첨가하여 2-3분 동안 균질화시키고 Whatman filter paper No. 2로 여과한 후 Neogen veratox kit # 8030을 이용하여 분석하였다.

다. 기타 식중독균

(1) *Bacillus cereus*

(가) 시약 및 배지

*Bacillus cereus*의 정성 및 정량시험에 mannitol egg yolk polymyxin (MYP) agar (Oxoid), egg yolk emulsion (Oxoid), polymyxin B supplement (Oxoid), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였다. pH 7.2로 조정된 KH₂PO₄ 회석액으로 십진회석을 하였으며 API50CHB (bioMerieux)를 사용하여 동정하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g과 멸균 D.W. 90 mL를 가하여 균질화한 후 균질화된 시료액의 1 mL를 10^1 - 10^6 까지 멸균 인산 완충용액으로 십진희석하여 각 단계 희석액 0.1 mL을 MYP agar에 접종하여 30 °C에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 선별하여 nutrient agar에 접종하고 30 °C에서 24 시간 배양하여 배양된 개별 집락을 취하여(19) API50CHB를 통해 최종확인을 하였다(20).

(2) Coliform

(가) 시약 및 배지

Coliform의 정성 및 정량시험에 desoxycholate lactose agar (Difco), eosin methylene blue (EMB) agar (Difco), lactose broth (Difco), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였다. Peptone (Difco) 0.01%로 십진희석을 하였으며 crystal violet (Sigma), Gram's iodine, 95% alcohol, safranin (Sigma)으로 그람염색을 실시하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g과 멸균 D.W. 90 mL를 가하여 균질화하고 시료액 1 mL을 10^1 - 10^6 로 희석하여 각 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시에 접종하였다. 여기에 desoxycholate lactose agar를 무균적으로 15 mL 분주하여 35 °C에서 20 시간 배양하였다. 전형적인 암적색의 집락을 EMB agar에서 35 °C에서 24 시간 분리 배양을 한 후 녹색의 금속성 광택의 집락을 1 개 이상 취하여 lactose broth와 nutrient agar에서 35 °C에서 20 시간 배양을 하였다. 가스의 생성유무를 확인한 후 nutrient agar에서 해당되는 집락은 그람염색을 실시(21)하였다. Coliform의 정성 및 정량시험에 desoxycholate lactose agar (DLA, Difco), eosin methylene blue (EMB) agar (Difco), lactose broth (Difco), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였고 peptone (Difco) 0.01%로 십진희석을 하였다.

(3) *Staphylococcus aureus*

(가) 시약 및 배지

*Staphylococcus aureus*의 정성 및 정량시험에 Baird-Parker agar (Oxoid), egg yolk tellurite emulsion (Oxoid), nutrient agar (Difco), tryptic soy broth (Difco)을 사용하였고 멸균 KH_2PO_4 희석액으로 십진희석을 하였으며 APIStaph (bioMerieux)를 통해 균의 동정을 하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g을 90 mL의 10% NaCl을 첨가한 tryptic soy broth에 가한 후 35 °C에서 16 시간 증균 배양하였다. 증균 배양액의 1 mL을 멸균 인산 완충 희석액으로 10^1 - 10^6 까지 십진희석을 하여 각 단계 희석액 0.1 mL씩을 Baird-Parker agar에 평판 도말하여 37 °C에서 24

시간 배양하였다. 배양 결과 투명한 띠로 둘러싸인 광택의 검정색 집락을 취하여 nutrient agar에 접종 후 37 °C에서 24 시간 배양하였다(22). 이후 개별 집락을 취하여 APIStaph를 사용하여 최종확인을 하였다(23).

(4) *Salmonella* spp.

(가) 시약 및 배지

Salmonella spp.의 정성시험에 MacConkey agar (Difco), Rappaport-Vassiliadis broth (Merck), peptone (Difco), nutrient agar (Difco)배지를 사용하였고 API20E (bioMerieux)를 통해 균의 동정을 하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g을 취하여 90 mL의 peptone water에 가한 후 35 °C에서 20 시간 증균 배양하였다. 배양액 0.1 mL를 10 mL의 Rappaport-Vassiliadis broth에 접종하여 42 °C에서 24 시간 배양하였다. 이후 증균 배양액을 MacConkey agar에 분주하여 35 °C에서 24 시간 배양한 후 무색의 유당 비분해균의 집락을 취하여 nutrient agar에 접종하여(24), 35°C에서 24 시간 배양하였다. 생성된 집락을 API20E를 사용하여 최종 확인하였다(25).

(5) *Escherichia coli* O157:H7

(가) 시약 및 배지

Escherichia coli O157:H7 정성시험에 MacConkey sorbitol agar (Difco), novobiocin 함유 mEc-broth (Merck), eosin methylene blue (EMB) agar (Difco), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였다. API20E (bioMerieux)를 대장균임을 확인할 때 사용하였으며 O157 항혈청과 H7 혈청형시험으로 최종시험을 하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g을 취하여 90 mL의 novobiocin이 함유된 mEc-broth에 가한 후 35 °C에서 24 시간 증균 배양하였다. 증균 배양액 0.1 mL을 MacConkey sorbitol agar에 접종하여 35 °C에서 18 시간 배양하였다. Sorbitol을 분해하지 않는 무색집락을 취하여 EMB agar에 접종하여 35 °C에서 24 시간 배양을 하였다. 녹색 금속성 광택의 전형적인 집락을 취하여 nutrient agar에 옮겨 35 °C에서 24 시간 배양 후(26) API20E를 통하여 대장균임을 확인하였다(27). 이후 O157 항혈청을 사용하여 혈청형을 결정하고 O157이 확인된 균은 H7의 혈청형시험을 하여 최종확인을 하였다(26).

3. 결과 및 고찰

가. Biogenic amines과 aflatoxin

된장 생산 공정의 HACCP에 필요한 위생관리 방안을 강구하기 위해 종균을 이용하여 제조한 12종 종균된장의 biogenic amines, aflatoxin 및 기타 식중독균을 분석한 결과는 Table 31과 같다.

종균된장의 총 aflatoxin은 1.85-2.41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 아주 미량 검출되어 총 aflatoxin의 허용한계치 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)에는 위배되지 않았다. Amines은 agmatin이 된장에서 모두 검출되었으며, 전통된장에서 중요한 biogenic amine인 histidine과 tyramine은 불검출 내지 아주 소량 검출되었다. 전통된장제조 시 문제되고 있는 발암물질인 biogenic amine의 생성을 억제하기 위하여 종균 사용에 대한 필요성이 강조되어 본 연구 과제 목표에 근접하는 결과였다.

Table 31. Determination of total aflatoxin and biogenic amines in *Doenjang* fermented with various *Mejus*

Doenjang ¹⁾	Aflatoxin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Biogenic amines (mg/100 g)								
	Mean \pm SD	Ratio ²⁾	AGA	TRP	2-PH	PUT	CAD	HIS	SPD	TYR	SPM
		1:1:1	1.02	0.03	0.02	0.14	0.02	0.00	0.16	0.02	0.99
BAM15-1	2.41 \pm 0.77	1:0.5:1.5	1.13	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00	0.22	0.00	1.86
		1:1.5:0.5	2.79	0.06	0.01	0.02	0.03	0.16	0.00	0.00	1.23
BAM42-1	1.85 \pm 0.10	1:1:1	0.65	0.03	0.20	0.11	0.09	1.61	0.85	0.00	3.92
		1:0.5:1.5	0.20	0.28	0.01	0.00	0.00	0.00	0.32	0.05	0.44
		1:1.5:0.5	0.24	0.31	0.01	0.00	0.03	0.00	0.07	0.05	0.15
BAM42-1 ³⁾	2.11 \pm 0.49	1:1:1	2.85	0.00	0.02	0.03	0.11	0.17	0.55	1.12	8.59

¹⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

²⁾Ratio indicates the weight of different *Mejus*.

³⁾*Doenjang* product manufactured by Daegaya Uruk

Abbreviation: TRY, Tryptamine; 2-PH, 2-Phenylalanine; PUT, Putrescine; CAD, Cadaverine; AGA, Agmatine; HIS, Histamine; TYR, Tyramine; SPD, Spermidine; SPM, Spermine

나. 기타 식중독균

(1) *Bacillus cereus*

된장제조 시 유입 가능성이 있는 *Bacillus cereus*, coliform, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp.를 측정된 결과는 Table 32와 같다.

*Bacillus cereus*의 정성 및 정량 실험을 위해 MYP agar 배지 상에 나타난 집락을 취하여 nutrient agar에 배양한 후 무색의 집락을 cell forming unit로 counting한 후 API50CHB를

이용하여 동정하였다. Nutrient agar 배지 상에 나타난 콩알메주 된장의 *Bacillus cereus* 총균수는 Table 32과 같이 3.5×10^4 – 5.4×10^5 으로 나타났다. API kit 동정 결과, 이들 집락은 *Bacillus firmus*로 판정되었다.

Coliform의 정성실험을 위한 desoxycholate lactose agar 배지 상에서 녹색의 금속성 광택의 집락이 형성되지 않았다. Tryptic soy broth를 이용한 *Staphylococcus aureus*의 증균 배양 후 배지 (Baird–Parker agar) 상에서 투명한 띠로 둘러싸인 광택의 검정색 집락은 형성되지 않았다. Rappaport–Vassiliadis broth를 이용한 *Salmonella* spp.의 증균 배양 후 MacConkey agar 배지 상에서 무색의 집락은 형성되지 않았다.

종균을 이용한 된장에서는 *Bacillus cereus*, coliform, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp.는 검출되지 않았으나, 전통식으로 제조한 기업형 농가된장에서 *Bacillus cereus*가 검출되어 전통식으로 제조되는 전통된장 생산 공정의 문제점을 시사하는 것으로서 전통식 된장제조 시 미생물 관리와 위생 검토가 절실히 요구되고 있다.

Table 32. Determination of foodborne pathogenic organisms in *Doenjang* fermented using various *Mejus*

<i>Doenjang</i> ¹⁾	Coliform (CFU/g)	<i>Bacillus cereus</i> (CFU/g)		<i>Staphylococcus aureus</i> (CFU/g)		<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (CFU/g)		<i>Salmonella</i> spp. (CFU/g)	
		MYP ³⁾	NA ⁴⁾	BP ⁵⁾	API test	MSA ⁶⁾	API test	MA ⁷⁾	API test
BAM15-1	-	+	1.9×10^5	-	-	-	-	-	-
BAM42-1	-	+	3.5×10^4	-	-	-	-	-	-
BAM42-1 ²⁾	-	+	5.4×10^5	-	-	-	-	-	-

¹⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

²⁾*Doenjang* product manufactured by Daegaya Uruk

³⁾Mannitol egg yolk polymyxin agar; ⁴⁾Nutrient agar;

⁵⁾Baird–Parker agar; ⁶⁾MacConkey sorbitol agar; ⁷⁾MacConkey agar

Table 33. Identification of microorganism using API50CHB

<i>Doenjang</i> ¹⁾	Identified strains	% ID	T Index	Discussion of identification result
BAM15-1	<i>Bacillus firmus</i>	99.5	0.53	Doubtful profile
BAM42-1	<i>Bacillus firmus</i>	99.9	0.76	Excellent identification
BAM42-1 ²⁾	<i>Bacillus cereus</i> 2	97.9	0.78	Good identification

¹⁾Description on the code of *Doenjang* was shown in Table 24.

²⁾*Doenjang* product manufactured by Daegaya Uruk

제 6 절 참여기업 공장의 위생검토

1. 연구개발의 배경

전통된장의 발효과정 중 미생물에 의해 생성되며 발암유발 물질로 전환될 개연성이 있는 biogenic amines과 된장제조에 사용되는 메주곰팡이 (*Aspergillus flavus*)에서 유래하는 간암 유발 자연 독소인 aflatoxin의 저감화는 다양한 균들에 의해 제조되는 전통된장의 제조 특성상 중요한 일이며, 전통된장의 제조 시 유입되는 식중독균의 제어 또한 대단히 중요하다.

본 연구과제에서는 위생적인 전통된장의 대량생산 system을 개발하기 위하여 1, 2, 3년차에 걸쳐 전통된장제조용 메주 제조 시 유입되는 미생물에 의해 생성하는 biogenic amines과 aflatoxin을 분석하여 종균의 필요성을 검증하였으며, 된장제조과정 중 유입되는 식중독균들을 검토한 바 있다.

본 연구과제 수행 목적인 위생적이고 우수한 풍미를 지닌 농가기업형 전통된장의 대량생산 system의 최종 목표를 달성하기 위한 일환으로 참여기업의 국실 및 된장제조실의 위생검토를 실시하였다. 참여기업의 위생검토를 위해 공장 안과 국실 및 된장제조실 등의 미생물 (세균 및 곰팡이)의 분포를 조사하여 전통된장의 제조 시 유입되는 주요 식중독 세균을 분리 검토하여 동정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 참여기업 시설의 미생물 분포 조사

참여기업 시설의 위생검토를 위해 공장 안과 국실 및 된장제조실의 세균 및 곰팡이의 분포를 조사하였다. 주요 식중독 세균인, *Bacillus cereus*, 대장균군, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7과 메주 제조 시 유입 가능한 곰팡이의 분포를 조사하기 위하여 potato dextrose agar (PDA) 및 plate count agar (PCA)로 조제된 배지를 5시간 동안 참여기업의 공장 안과 국실 및 된장제조실에서 방치한 후 PDA 배지는 3-4일, PCA 배지는 1-2일간 각각 30℃에서 배양하여 주요 식중독 세균 및 곰팡이의 분포를 조사하였다.

나. 참여기업 시설의 식중독균 분포 조사

(1) *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus*의 1차 확인은 PCA 배지상에 나타난 집락을 취하여 *Bacillus cereus* 선택

배지 mannitol egg yolk polymyxin (MYP) agar (Oxoid) 배지 상에서 30 °C에서 24 시간 배양하였다. 의심되는 집락은 nutrient agar (Difco) 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 1차 동정은 API50CHB (bioMerieux)를 이용하여 확인하였으며, 불확실한 동정은 18S rRNA를 sequencing한 후 sequence를 BLAST search하여 동정하였다.

(2) Coliform

대장균군의 1차 확인은 PCA 배지상에 나타난 집락을 취하여 선택배지인 desoxycholate lactose agar (Difco)를 무균적으로 15 mL를 분주하여 35°C에서 20시간 배양하였으며, 2차 확인은 eosin methylene blue (EMB) agar (Difco)를 이용하여 35°C에서 24시간 분리 배양하였다. 1, 2차로 배양된 균은 18S rRNA를 sequencing한 후 sequence를 BLAST search하여 동정하였다.

(3) *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus*의 1차 확인은 PCA 배지 상에 나타난 집락을 취하여 *Staphylococcus aureus*의 선택배지인 Baird-Parker agar (Oxoid)에 37°C에서 24시간 배양하였으며, 투명한 환으로 둘러싸인 광택을 갖는 검정색 집락을 nutrient agar (Difco)에 접종 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 균의 최종 확인은 18S rRNA를 sequencing한 후 sequence를 BLAST search하여 동정하였다.

(4) *Salmonella* spp.

Salmonella spp.의 1차 확인은 PCA 배지상에 나타난 집락을 취하여 선택배지인 MacConkey agar에 35°C에서 24시간 배양하였으며, 최종 확인은 18S rRNA를 sequencing한 후 sequence를 BLAST search하여 동정하였다.

(5) *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli O157:H7의 1차 확인은 PCA 배지 상에 나타난 집락을 취하여 MacConkey sorbitol agar (Difco) 배지에 접종하여 35°C에서 18시간 배양하였으며, 2차 확인은 MacConkey sorbitol agar 상에 나타난 집락을 취하여 EMB agar에 접종하여 35°C에서 24시간 배양을 하였으며, 최종 확인은 18S rRNA를 sequencing한 후 sequence를 BLAST search하여 동정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 참여기업 시설의 미생물 분포

(1) 미생물의 분포

참여기업 시설의 위생검토를 위해 공장 안과 국실 및 된장제조실의 세균 및 곰팡이의 분

포를 조사한 결과는 Fig. 29와 같다. 곰팡이 종류는 2-3종이었으며, 세균은 다수 많은 것으로 나타났다. 공장 안과 국실의 미생물의 분포는 곰팡이와 세균이 고루 분포하였으나, 된장 제조실은 세균이 곰팡이 보다 많이 분포하는 것으로 나타났다. 이는 참여기업에서는 *Bacillus subtilis* group의 종균을 이용하여 된장을 제조하고 있으므로 된장제조실의 세균의 분포가 더 많이 나타난 것으로 사료된다.

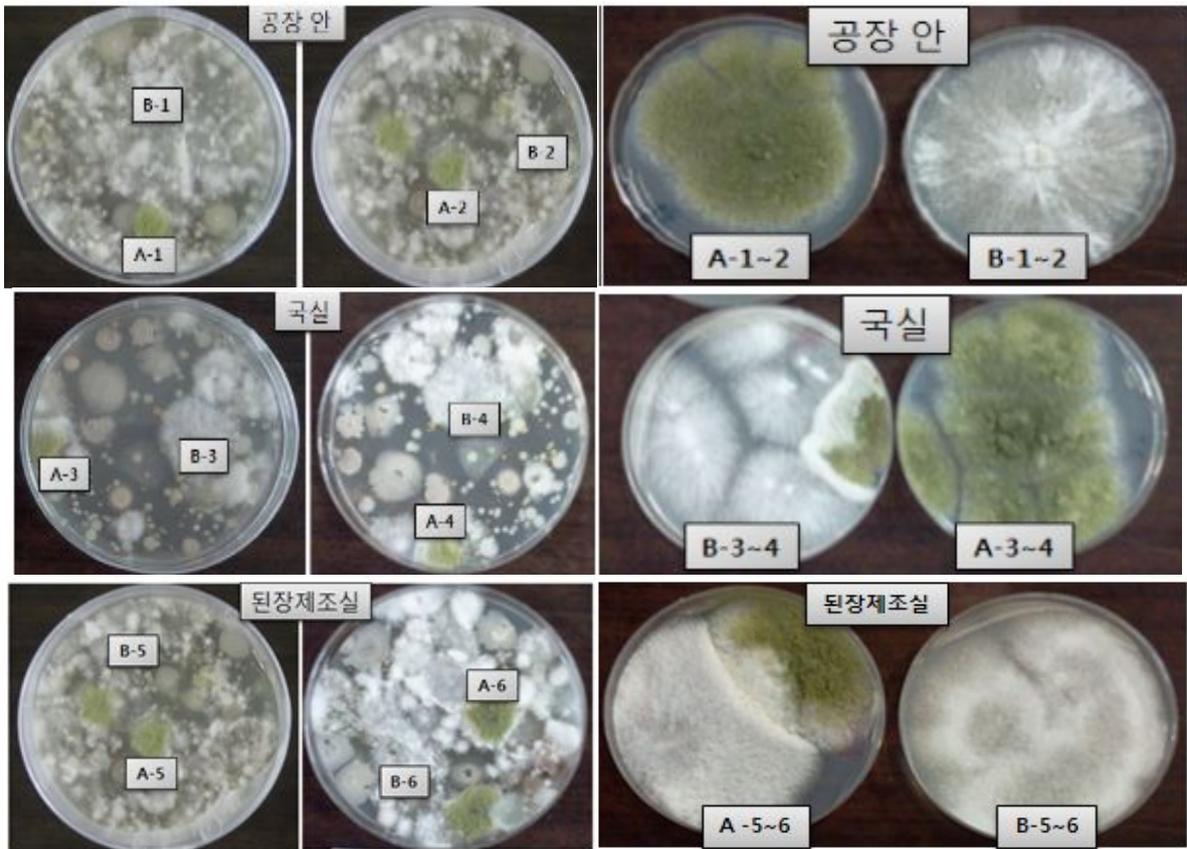


Fig. 29. Microflora of interior plant, koji room, and fermentation room.

(2) 현미경을 이용한 곰팡이 동정

참여기업 시설의 위생검토를 위해 공장 안과 국실 및 된장제조실의 세균 및 곰팡이의 형태학적인 곰팡이의 동정 결과는 Fig. 30, 31과 같다.

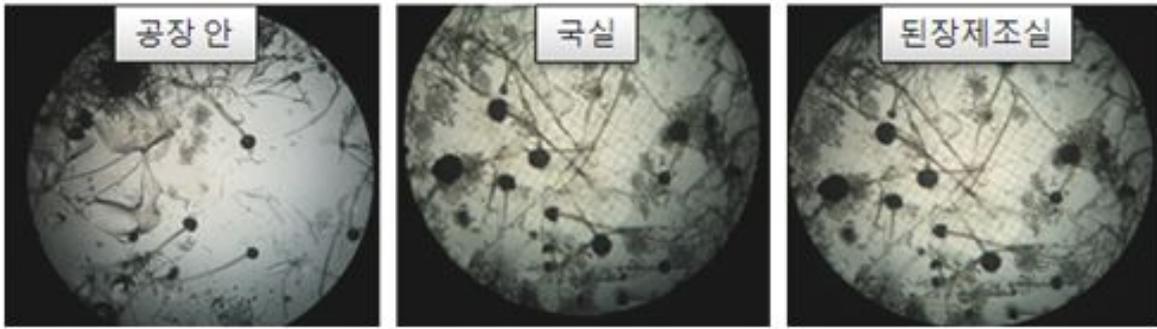


Fig. 30. Molds found in interior plant, koji room, and fermentation room (10×10).

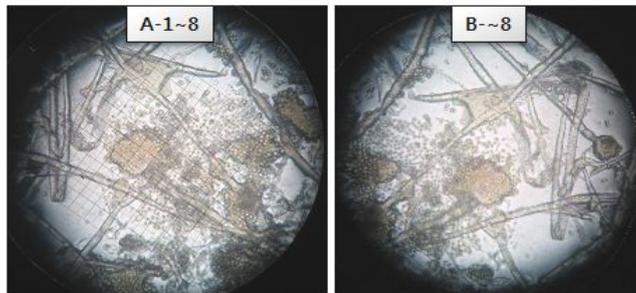


Fig. 31. Molds found in interior plant, koji room, and fermentation room (10×40).

나. 참여기업 시설에 존재하는 주요 식중독 세균

(1) *Bacillus cereus*

(가) 배양 결과

참여기업의 된장제조실, 공장 안, 국실을 대상으로 *Bacillus cereus*의 1차 확인은 Fig. 32와 같다.

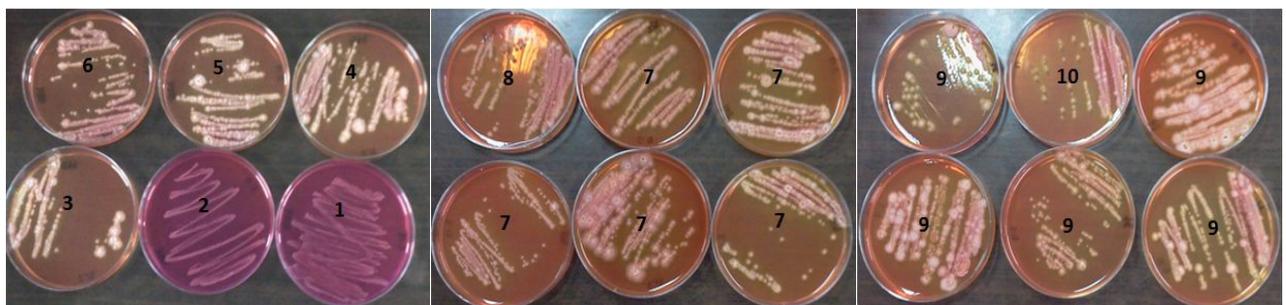


Fig. 32. Presumptive test of *Bacillus cereus* on MYP agar plate.

1-6: Fermentation room; 7-8: Inside plant; 9-10: Koji room

(나) 균주 확인 및 동정

MYP 배지 상에서 확인된 균주를 API kit를 이용하여 동정한 결과는 Table 34에 나타내었다. *Bacillus cereus*의 확실한 동정을 위하여 NA 배지 상에 배양된 균주를 18S rRNA를 sequencing한 후 sequence를 BLAST search하여 동정하였으며, 세균 동정 그림 및 결과는 Fig. 33-34 및 Table 35와 같다.

Fig. 33-34에서 세균은 1-6이며, 공장 안은 7-8이며, 국실 세균은 9-10이다. Table 35에서와 같이 된장 제조실의 세균은 *Bacillus subtilis*, *Chryseobacterium sp.*, *Brevundimonas vesicularis*, *Pseudomonas putida*로 동정되었으며, 공장 안 세균은 *Bacillus subtilis*, *Bacillus vallismortis*였으며, 국실은 *Bacillus vallismortis*, *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

식중독균인 *Bacillus cereus*는 검출되지 않았으나 유해균으로 알려진 *Bacillus firmus*가 참여기업의 공장 안과 국실 및 된장제조실에 분포하는 것으로 나타났다. 주로 토양에서 유래하는 것으로 알려진 *Bacillus firmus*는 병원성 세균으로 분류되고 있지 않지만, 항생제에 대한 내성이나 위해성이 보고(34-36)되므로 참여기업 시설의 위생관리를 개선할 필요가 있다는 것을 시사하였다.

Table 34. Identification of the colonies on MYP agar plate by using API kit

Facility	Identified strains	% ID	T Index	Discussion of identification result
Fermentation room				
1	<i>Bacillus firmus</i>	99.5	0.53	Doubtful profile
2	<i>Brevibacillus non reactive</i>	84.4	0.52	Low discrimination
3	<i>Bacillus non reactive</i>	11.1	0.42	Low discrimination
4	<i>Bacillus firmus</i>	4.1	0.52	Low discrimination
5	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	0.2	0.38	Low discrimination
6	<i>Bacillus firmus</i>	99.2	0.71	Very good identification
Interior plant				
1	<i>Bacillus firmus</i>	99.9	0.76	Excellent identification
2	<i>Brevibacillus non reactive</i>	0.1	0.34	Excellent identification
Koji room				
1	<i>Brevibacillus firmus</i>	99.9	0.76	Excellent identification
2	<i>Bacillus cereus</i> 2	97.9	0.78	Good identification

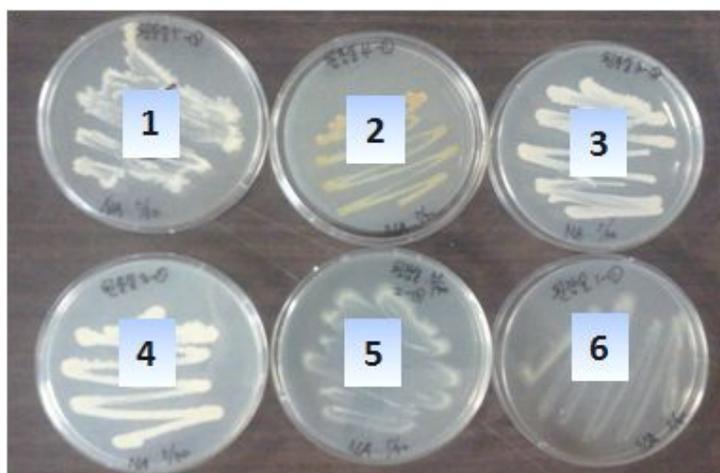


Fig. 33. Bacterial growth on NA plate.

The bacteria were collected from 6 different locations in fermentation room



Fig. 34. Bacterial growth on NA plate.

The bacteria were collected from 2 different locations inside plant (7-8) and 2 different locations in koji room

Table 35. Identification of bacteria found in plant by using 18S rRNA sequencing

Location	Facility	Identification
1	Fermentation room	<i>Bacillus subtilis</i>
2	"	<i>Chryseobacterium sp.</i>
3	"	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
4	"	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
5	"	<i>Pseudomonas putida</i>
6	"	<i>Pseudomonas putida</i>
7	Inside plant	<i>Bacillus subtilis</i>
8	"	<i>Bacillus vallismortis</i>
9	Koji room	<i>Bacillus vallismortis</i>
10	"	<i>Bacillus subtilis</i>

제 7 절 참여기업 koji room (콩알 메주 제조실)의 청정도

1. 연구개발의 배경

전통된장의 농가기업형 위생적 대량생산공정 개발 목표를 달성하기 위해 현 참여기업의 된장제품에 대해 biogenic amines, aflatoxin 및 식중독균인 *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp.을 검토했다.

2. 재료 및 방법

가. Biogenic amines과 aflatoxin

(1) Biogenic amines

(가) 시약

Biogenic amines의 표준품으로 tryptamine hydrochloride (TRP), 2-phenyl-ethylamine (PHE), spermidine trihydrochloride (SPD), putrescine dihydrochloride (PUT), histamine dihydrochloride (HIS), cadaverine dihydrochloride (CAD), spermine tetrahydrochloride (SPM), tyramine hydrochloride (TYR), agmatine sulfate (AGM), acetone은 Sigma-Aldrich사의 제품을 사용하였다. Dansyl chloride는 Fluka 사, sodium hydroxide, sodium hydrogen carbonate, ammonium hydroxide와 perchloric acid는 Junsei Chemicals사의 1급 제품을 사용하였으며, acetonitrile과 ammonium acetate는 Merck사의 HPLC용 등급을 사용하였다.

(나) 분석방법

① 시료추출 및 유도체화

시료 5 g을 취하여 내부표준용액 (internal standard; I.S.)인 1,7-diaminoheptane (0.1 mg/mL)이 함유된 0.4 M perchloric acid 10 mL를 가한 후 균질화하였다. 3000×g, 4°C에서 원심분리를 10분간 하여 상층액을 취하고 잔사에 다시 0.4 M perchloric acid 10 mL를 가해 위의 조작을 반복하여 얻은 상층액을 합친 25 mL의 perchloric acid solution을 Whatman filter paper No. 1로 여과하여 추출하였다. Dansyl chloride를 이용한 유도체화는 Ben-Gigirey 등의 방법(17)에 따라 혼합 표준용액 및 추출용액 각각 1 mL을 마개 달린 시험관에 취한 다음 sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) 300 μL과 2M NaOH 200 μL를 가한 다음 dansyl chloride 용액을 2 mL 가하여 혼합한 후 마개를 하여 40°C에서 45분 동안 반응시켰다. 남아 있는 dansyl chloride를 제거하기 위하여 25% ammonium hydroxide 100 μL

를 첨가한 후 acetonitrile를 이용하여 volume이 5 mL 되게 하여 3000×g, 10 분 동안 원심 분리시켰으며, 그 상등액을 0.2 μm-pore-size filter로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다.

검체를 0.4 M perchloric acid로 추출하고 1,7-diaminoheptane (0.1 mg/mL)을 내부표준액으로 하고 1% dansyl chloride 아세톤액으로 유도체화한 후 HPLC (UV 254 nm)로 분석하였다. 분리칼럼은 Supelco column (4.6 mm×250 mm, 5 μm particle size)를 사용하였고, 유속은 1 mL/min이었다.

(2) Aflatoxin

(가) 시약 및 기기

총 aflatoxin의 정량분석을 위한 모든 시약은 Neogen Corp. Wells사에서 구입하여 사용하였다. 시약의 구성은 aflatoxin HRP blue conjugate solution, K-blue substrate solution, red stop solution, aflatoxin controls (0, 5, 15, 50 ppb)이다. 총 aflatoxin의 정량분석을 위해 ELISA reader (Infinite M 200, TECAN)를 이용하였다.

(나) 분석방법

시료 10 g에 70% MeOH 50 mL를 첨가하여 2-3분 동안 균질화시키고 Whatman filter paper No. 2로 여과한 후 Neogen veratox kit # 8030을 이용하여 분석하였다.

나. 기타 식중독균

(1) *Bacillus cereus*

(가) 시약 및 배지

*Bacillus cereus*의 정성 및 정량시험에 mannitol egg yolk polymyxin (MYP) agar (Oxoid), egg yolk emulsion (Oxoid), polymyxin B supplement (Oxoid), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였다. pH 7.2로 조정된 KH₂PO₄ 희석액으로 십진희석을 하였으며 API50CHB (bioMerieux)를 사용하여 동정하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g과 멸균 D.W. 90 mL를 가하여 균질화한 후 균질화된 시료액의 1 mL를 10¹-10⁶ 까지 멸균 인산 완충용액으로 십진희석하여 각 단계 희석액 0.1 mL을 MYP agar에 접종하여 30 °C에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 선별하여 nutrient agar에 접종하고 30 °C에서 24 시간 배양하여 배양된 개별 집락을 취하여(19) API50CHB를 통해 최종확인을 하였다(20).

(2) Coliform

(가) 시약 및 배지

Coliform의 정성 및 정량시험에 desoxycholate lactose agar (Difco), eosin methylene blue

(EMB) agar (Difco), lactose broth (Difco), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였다. Peptone (Difco) 0.01%로 십진희석을 하였으며 crystal violet (Sigma), Gram's iodine, 95% alcohol, safranin (Sigma)으로 그람염색을 실시하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g과 멸균 D.W. 90 mL를 가하여 균질화하고 시료액 1 mL을 10^1 - 10^6 로 희석하여 각 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시에 접종하였다. 여기에 desoxycholate lactose agar를 무균적으로 15 mL 분주하여 35 °C에서 20 시간 배양하였다. 전형적인 암적색의 집락을 EMB agar에서 35 °C에서 24 시간 분리 배양을 한 후 녹색의 금속성 광택의 집락을 1 개 이상 취하여 lactose broth와 nutrient agar에서 35 °C에서 20 시간 배양을 하였다. 가스의 생성유무를 확인한 후 nutrient agar에서 해당되는 집락은 그람염색을 실시(21)하였다. Coliform의 정성 및 정량시험에 desoxycholate lactose agar (DLA, Difco), eosin methylene blue (EMB) agar (Difco), lactose broth (Difco), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였고 peptone (Difco) 0.01%로 십진희석을 하였다.

(3) *Staphylococcus aureus*

(가) 시약 및 배지

*Staphylococcus aureus*의 정성 및 정량시험에 Baird-Parker agar (Oxoid), egg yolk tellurite emulsion (Oxoid), nutrient agar (Difco), tryptic soy broth (Difco)을 사용하였고 멸균 KH_2PO_4 희석액으로 십진희석을 하였으며 APIStaph (bioMerieux)를 통해 균의 동정을 하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g을 90 mL의 10% NaCl을 첨가한 tryptic soy broth에 가한 후 35 °C에서 16 시간 증균 배양하였다. 증균 배양액의 1 mL을 멸균 인산 완충 희석액으로 10^1 - 10^6 까지 십진희석을 하여 각 단계 희석액 0.1 mL씩을 Baird-Parker agar에 평판 도말하여 37 °C에서 24 시간 배양하였다. 배양 결과 투명한 띠로 둘러싸인 광택의 검정색 집락을 취하여 nutrient agar에 접종 후 37 °C에서 24 시간 배양하였다(22). 이후 개별 집락을 취하여 APIStaph를 사용하여 최종확인을 하였다(23).

(4) *Salmonella* spp.

(가) 시약 및 배지

Salmonella spp.의 정성시험에 MacConkey agar (Difco), Rappaport-Vassiliadis broth (Merck), peptone (Difco), nutrient agar (Difco)배지를 사용하였고 API20E (bioMerieux)를 통해 균의 동정을 하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g을 취하여 90 mL의 peptone water에 가한 후 35 °C에서 20 시간 증균 배양하였다. 배양액 0.1 mL를 10 mL의 Rappaport-Vassiliadis broth에 접종하여 42 °C에서 24 시간 배양하였다. 이후 증균 배양액을 MacConkey agar에 분주하여 35 °C에서 24 시간 배양한 후 무색의 유당 비분해균의 집락을 취하여 nutrient agar에 접종하여(24), 35°C에서 24 시간 배양하였다. 생성된 집락을 API 20 E를 사용하여 최종 확인하였다(25).

(5) *Escherichia coli* O157:H7

(가) 시약 및 배지

Escherichia coli O157:H7 정성시험에 MacConkey sorbitol agar (Difco), novobiocin 함유 mEc-broth (Merck), eosin methylene blue (EMB) agar (Difco), nutrient agar (Difco) 배지를 사용하였다. API20E (bioMerieux)를 대장균임을 확인할 때 사용하였으며 O157 항혈청과 H7 혈청형시험으로 최종시험을 하였다.

(나) 분리방법

시료 10 g을 취하여 90 mL의 novobiocin이 함유된 mEc-broth에 가한 후 35 °C에서 24 시간 증균 배양하였다. 증균 배양액 0.1 mL를 MacConkey sorbitol agar에 접종하여 35 °C에서 18 시간 배양하였다. Sorbitol을 분해하지 않는 무색집락을 취하여 EMB agar에 접종하여 35 °C에서 24 시간 배양을 하였다. 녹색 금속성 광택의 전형적인 집락을 취하여 nutrient agar에 옮겨 35 °C에서 24 시간 배양 후(26) API20E를 통하여 대장균임을 확인하였다(27). 이후 O157 항혈청을 사용하여 혈청형을 결정하고 O157이 확인된 균은 H7의 혈청형시험을 하여 최종확인을 하였다(26).

3. 결과 및 고찰

가. Biogenic amines과 aflatoxin

된장 생산 공정의 HACCP에 필요한 위생관리 방안을 강구하기 위해 참여기업에서 제조한 된장의 biogenic amines, aflatoxin을 분석한 결과는 Table 36과 같다.

전통식으로 제조한 참여기업 된장의 총 aflatoxin은 2.11 µg/kg으로 아주 미량 검출되어 총 aflatoxin의 허용한계치 (10 µg/kg)에는 위배되지 않았다.

Amines은 spermine이 8.59 mg/100 g으로 가장 많이 분포하였으며, 그 다음이 agmatin으로 2.85 mg/100 g이 검출되었다. 전통된장에서 중요한 biogenic amine인 histidine과 tyramine은 각각 0.17 mg/100 g, 1.12 mg/100 g으로 소량 검출되었다.

Table 36. Determination of total aflatoxin and biogenic amines in *Doenjang* product manufactured by Daegaya Uruk

Aflatoxin($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Biogenic amine (mg/100 g)								
	AGA	TRP	2-PH	PUT	CAD	HIS	SPD	TYR	SPM
2.11 \pm 0.49	2.85	0.00	0.02	0.03	0.11	0.17	0.55	1.12	8.59

Abbreviation: TRY, Tryptamine ; 2-PH, 2-Phenylalanine; PUT, Putrescine; CAD, Cadaverine; AGA, Agmatine; HIS, Histamine; TYR, Tyramine; SPD, Spermidine; SPM, Spermine

나. 기타 식중독균 검토

된장제조 시 유입가능성이 있는 *Bacillus cereus*, coliform, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp.를 측정된 결과는 Table 37과 같다. *Bacillus cereus*의 정성 및 정량실험을 위해 MYP agar 배지 상에 나타난 집락을 취하여 nutrient agar에 배양한 후 무색의 집락을 cell forming unit로 counting한 후 API50CHB를 이용하여 동정하였으며, 그 결과는 Table 38과 같다.

Nutrient agar 배지 상에 나타난 참여기업 생산 된장의 *Bacillus cereus* 총 균수는 1.5×10^6 으로 나타났으며, API kit를 이용한 동정 결과, Table 38과 같이 참여기업에서 생산되고 있는 된장은 *Bacillus cereus* % ID가 97.9로 판정되었다.

Coliform의 정성실험에서는 desoxycholate lactose agar 배지 상에서 녹색의 금속성 광택의 집락이 형성되지 않았다. *Staphylococcus cereus* 정성실험에서는 tryptic soy broth를 이용한 *Staphylococcus aureus*의 증균 배양 후 배지 (Baird-Parker agar) 상에서 투명한 띠로 둘러싸인 광택의 검정색 집락은 형성되지 않았다. Rappaport-Vassiliadis broth를 이용한 *Salmonella* spp.의 증균 배양 후 MacConkey agar 배지 상에서 무색의 집락은 형성되지 않았다.

전통식으로 제조한 참여기업의 농가형 된장에서 *Bacillus cereus*가 검지되어 전통식으로 제조되는 전통된장 생산 공정의 문제점을 보였다. 전통식 된장제조 시 미생물 관리와 위생 검토에 대한 필요성이 강조되어 본 연구 과제 목표에 근접하는 결과라고 사료된다.

Table 37. Determination of foodborne pathogenic organisms in *Doenjang* product manufactured by Daegaya Uruk

Coliform (CFU/g)	<i>Bacillus cereus</i> (CFU/g)		<i>Staphylococcus aureus</i> (CFU/g)		<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (CFU/g)		<i>Salmonella</i> spp. (CFU/g)	
	MYP ³⁾	NA ⁴⁾	BP ⁵⁾	API test	MSA ⁶⁾	API test	MA ⁷⁾	API test
- ¹⁾	+ ²⁾	1.5×10 ⁶	-	-	-	-	-	-

¹⁾Not detected; ²⁾presumptively positive;

³⁾Mannitol egg yolk polymyxin agar; ⁴⁾Nutrient agar;

⁵⁾Baird-Parker agar; ⁶⁾MacConkey sorbitol agar; ⁷⁾MacConkey agar

Table 38. Identification of *Bacillus* spp. using API50CHB in *Doenjang* product manufactured by Daegaya Uruk

Identified strains	% ID	T Index	Discussion of identification result
<i>Bacillus cereus</i> 2	97.9	0.78	Good identification

제 8 절 총괄: 전통된장의 농가기업형 대량생산을 위한 system 개발

대두를 선별 및 세척을 한 후 삶고 살균을 한 후 국실에서 위생적으로 종균을 배양하여 콩알 메주를 제조할 필요가 있다. 제조한 콩알 메주는 잡균 번식을 막기 위해 건조할 필요가 있다. 이를 위하여 전통식 된장의 풍미를 생산할 수 있는 종균의 개발과 위생적 콩알 메주를 제조할 수 있는 저가의 설비가 필수적이다.

- 전통된장 제조용 메주의 형태는 대부분 성형메주로 이루어져 있으며, 성형메주는 다양한 자연발효미생물에 의해 제조되어 규격화된 된장을 제조할 수 없다
- 본 연구에서는 소수의 일정한 균으로 전통된장의 우수한 풍미를 생성할 수 있는 새로운 종균을 이용하여 전통된장의 농가형 대량생산을 위한 system을 개발하고자 하였다.
- 종균을 이용한 위생적 종균된장을 제조하기 위해서는 우선적으로 살균처리하여 청정화된 콩알메주제조용 koji room (국실)이 절실히 필요하다.
- 근래에는 고품질의 위생적 된장을 제조하기 위하여 콩알메주 제조용 국실의 여러 가지 형태가 개발되어 있으나 매우 고가이므로 농가에서 적용하기에는 어려운 실정이다.
- 그러므로 기존에 사용하고 있는 국실의 오염도를 최대한 줄이는 것이 필수적이며, 메주 제조 시 출입하는 인원 제한과 국실을 출입하는 인원의 위생적 검토가 절실히 필요하다.
- 본 연구과제에 참여한 대가야우룩 사업장에서는 과제 수행기간동안 아래와 같은 설비를 갖추어 위생시스템을 현격히 개선하였다.
 - ▶ 원료 (대두)의 HACCP을 위한 semi-auto의 증자술을 설치하였다(Fig. 35).
 - ▶ 위생적 된장을 제조하기 위하여 종균의 접종실과 종균배양기를 갖추었으며 이는 설치 비용이 많이 소요되지 않아 농가에서 구입 가능하리라 사료된다(Fig. 36).
 - ▶ 종균으로 메주 제조 시 국실 출입에 의한 오염방지 시설 및 온도 및 습도 조절장치를 설치하였다(Fig. 37).
 - ▶ 사상균메주의 오염을 방지하기 위해서는 세균메주의 국실은 다른 장소에 분리 설치하였다(Fig. 38).
 - ▶ 제조된 콩알메주의 오염과 품질저하방지를 위해 메주 건조실을 설치하였다.
 - ▶ 콩알메주는 koji room (국실)을 이용함으로써 위생적으로 된장을 제조할 수 있다.
- 본 연구과제를 수행한 결과, 종균으로는 *Bacillus subtilis* TKSP 24, *Aspergillus oryzae* J, *Mucor racemosus* 15를 이용하여 전통된장의 우수한 풍미를 지닌 된장을 제조할 수 있다.

- 농가형 koji room은 고가의 자동식 국실의 설비는 불가능하므로 위생처리가 가능한 수동형의 koji room을 설치하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.
- 국실에서는 종균 사용이 필수적이기 때문에 본 연구에서 규명한 세균 1종, 사상균 2종을 각각 배양할 수 있는 3개의 국실을 추가 시설한다면 위생적인 농가형 전통된장의 대량생산이 가능하리라 사료된다.

1. 농가 기업형 대량생산 시스템

가. Hardware

- 대두 선별기 : 대두를 모래, 티끌 등과 선별하는 기기
- 대두 세척기 : 대두에 묻은 먼지 등을 세척하는 기기
- 운반 벨트 : 원료운반
- 세척대두 살균기 : 대두를 물에 부풀리면서 110℃~121℃로 1시간 이상 물속에서 살균하여 대두에 들어있는 *Bacillus cereus*등을 살균함
- 종균실 : 종균을 보존 관리하여 대량으로 배양하는 실
- 국 실 : 살균한 삶은 대두에 종균을 접종하여 위생적으로 국을 만드는 곳
- 국 건조실 : 제조한 국을 변하지 않게 수분 10%정도 함유하게 건조하는 실
- 발효실 : 제조하여 건조한 *Bacillus subtilis*국, *Aspergillus oryzae* 국, *Mucor racemosus* 국을 1:1:1로 배합하여 tank에 넣고 15~20%의 염수를 국 무게의 3배 양을 가하여 30℃ 이상에서 발효 시키는 실
- 된장 주입기 : 제조된 된장을 판매용 용기에 주입하는 장치

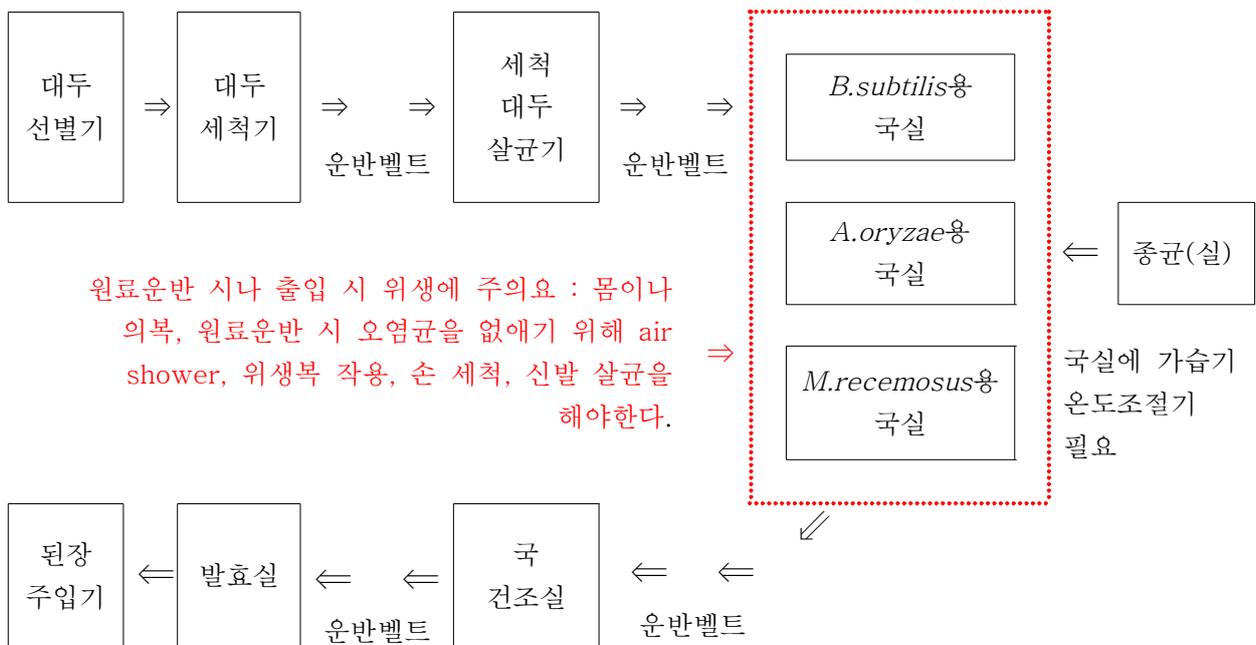


Fig. 35. Hardware의 배치도

(1) 된장제조용 Hardware의 종류 : Fig. 36 ~ Fig. 39



Fig. 36. Semi-automatic steam utensil.



Fig. 37. Culture rooms for molds.



Fig. 38. Air-shower, humidifier, and temperature controller.



Fig. 39. Fermentation room for *Bacillus subtilis* inoculated *Meju*.

나. Software

- (1) 종균 : (가) 세균인 *Bacillus subtilis* TKSP 24
(나) 사상균 ① *Aspergillus oryzae* J
② *Mucor racemosus*
- (2) 배지 : 세균용 배지는 plate count agar
사상균용 배지는 potato dextrose agar
- (3) 종균 대량 배양 방법 : Test tube에 사면 배양된 균을 샐레에 이식 배양하고(포자가 생길 때 까지 약 7일간) 500 ml 용량의 버섯 종균 배양 용기에 물에 불린 콩 200 g을 분주하여 멸균 한 후 각 균주를 접종하고 *Bacillus subtilis* TKSP 24는 30℃에서 4일간, *Aspergillus oryzae* J와 *Mucor racemosus*는 28℃에서 6~7일간 배양하여 종균으로 이용한다.(주의사항은 각 균이 포자가 형성할 때까지 배양함)
- (4) 제국 방법 : 대두를 선별하고 세척한 후 물에 충분히 불린 후 110℃에서 5시간 이내 삶은 후 (콩이 80~100 g에 파쇄 되도록) 무균적으로 국실에서 운반 후 총 균을 1% 되게 접종한다. 이를 국 상자에 두께 3~5cm되게 담은 후 사상균 메주는 28℃상대습도 70%에서 3일동안, 세균메주는 30℃ 상대습도 70%조건에서 2일동안 배양한 후(포자형성하면 안됨) 열풍건조기를 50℃에서 20시간 건조하여 메주를 제조함. 균이 다르면 국실이 각각 별도로 있어야함(그렇지 않으면 국실을 살균 후 사용가능)
- (5) 발효방법 : *Bacillus subtilis*메주, *Aspergillus oryzae*메주, *Mucor racemosus*메주를 1:1:1로 혼합 후 tank에 넣고 이 무게의 3배(w/v)가 되게 15~20%염수를 가하여 이를 30℃의 경우 1개월이 지난 후 염수 부분과 고형물 부분을 분리 하고 고형물 부분은 짓이긴 후 될수 있는한 내부에 공간이 없게 한 후 2차 발효를 30℃에서는 1개월 이상 시키면 된장이 된다.
- (6) 위생관리 방법 : 국실에 원료인 삶고 살균된 대두를 국실에 넣을 때와 원료 출입문에는 air curtain이 필요하고 사람이 출입 시에는 출입문에 이중으로 air shower기가 필요하며 출입하는 사람은 신발을 소독해야 하고, 손을 세척하며 머리와 옷은 위생복, 위생모를 착용할 필요가 있다. 삶은 콩에 종균을 접종할 때는 살균된 장갑을 착용할 필요성이 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표달성도

년 도	연구개발 목표	달성도
1 차	<ul style="list-style-type: none"> ■ 본 연구의 기초자료를 위한 민가 전통된장의 대조구 된장 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 대조구 확보를 위한 관능검사 - 민가된장의 품질검토 <ul style="list-style-type: none"> ◦ 맛 성분 분석 (유리아미노산, 유리당, 유기산) ◦ 위해요소 검토 (biogenic amines, aflatoxin, <i>Bacillus cereus</i>, 기타 식중독균 측정) 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 민가된장 18종 중 관능성적이 3.5점 (5점 만점) 이상 나온 시료가 3종이었고, 관능성적 3.9점을 획득한 우수품미의 대조구 된장을 확보하였으므로 본 연구의 기초자료로 활용하기에 충분함 ◦ 민가된장 18종에서 amines은 문제시 되지 않았으나 aflatoxin은 18종 된장 중 2종에서 허용한계치를 벗어남 ◦ 식중독균은 된장 18종 중 7종이 <i>Bacillus cereus</i>와 대장균균 검출되었으며, 기타 식중독균은 모두 미검출
	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전통된장의 풍미를 생산할 수 있는 우수균 선별 <ul style="list-style-type: none"> - 1차 우수균 선정 <ul style="list-style-type: none"> ◦ protease 역가측정과 배지상 colony의 관능검사 실시 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 1차 우수균 선정 (세균 1종, 사상균 6종) <ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus subtilis</i> TKSP 24, <i>Aspergillus oryzae</i> J, <i>Mucor racemosus</i> 15, <i>Penicillium chrysogenum</i>, <i>Mucor racemosus</i> 42, <i>Cladosporium uredinicola</i>, <i>Penicillium fellutanum</i>
	<ul style="list-style-type: none"> ■ 새로운 종균개발 및 우수한 전통적 풍미를 지닌 위생적 종균된장 제조 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 종균메주를 이용하여 제조한 17종 된장 중 세균 메주 및 사상균메주를 조합한 3균주 혼합메주된장이 가장 우수한 관능성적을 나타냄 ◦ 대조구 민가전통된장보다 더 우수한 풍미생성
2 차	<ul style="list-style-type: none"> ■ 2차 우수균 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 종균을 이용하여 우수전통생성품미 균주 선정하여 각각의 균으로 제조된 된장의 품질을 평가한 후 다수의 우수균 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 우수한 전통적 풍미 생성 균주 4종 확보 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus subtilis</i> TKSP 24, <i>Aspergillus oryzae</i> J, <i>Mucor racemosus</i> 15, <i>Mucor racemosus</i> 42
	<ul style="list-style-type: none"> ■ 종균을 이용한 위생적 전통된장의 발효조건 확립을 위한 된장제조 <ul style="list-style-type: none"> - 우수한 전통적 풍미를 지닌 위생적 종균된장의 품질검토 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 우수한 전통된장의 풍미를 지닌 된장 완성 <ul style="list-style-type: none"> - 메주 중량비가 1:1인 조합의 3균주 혼합메주된장의 우수품미 전통된장의 최적발효조건 확보 - 우수한 전통적 풍미 생성 균주확보 (3종); <i>Bacillus subtilis</i> TKSP 24, <i>Aspergillus oryzae</i> J, <i>Mucor racemosus</i> ◦ 민가된장 7종에서는 위생적으로 문제시 되었으나 종균을 사용함으로써 위생적 된장 제품 완성
3 차	<ul style="list-style-type: none"> ■ 원재료 및 종균된장의 HACCP을 이용한 저감화 방안 <ul style="list-style-type: none"> - 원료의 증자살균 및 국실 무균화 - 대량 발효조의 위생화 및 상품화 용기의 위생적 분주 ■ 기존의 공장 시설을 이용한 전통된장의 대량생산 <ul style="list-style-type: none"> - 참여기업 공장의 미생물 조사 ■ HACCP 기준을 통과하는 종균을 이용한 농가기업형 대량생산 공정 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 참여기업 공장 안, 국실, 된장제조실의 미생물검토 - 현대화된 국실형태는 매우 고가이므로 원가절감효과를 위해 개량된 수동형 국실 시설 신축 - 현 공장의 국실 및 된장제조실을 신축한 후 콩알 메주제조용 국실을 특히 대폭 보완 - 발효실 및 국실: 이산화염소로 살균 - 참여기업 국실의 청정도조사 - 농가기업형 위생적 전통된장의 대량생산을 위한 시설보완 - 종균으로 메주 제조시 국실 출입에 의한 오염방지 시설 및 온도 및 습도 조절장치 설치 - 사상균메주의 오염을 방지하기 위해서 세균메주의 국실은 다른 장소에 설치

제 2 절 관련분야에의 기여도

<연구기술 분야>

- 기존의 된장 생산 공장에서 전통된장을 생산하고자 할 때 이 기술을 활용할 수 있음
- 기존의 된장 공장에서 기술 이전을 요구할 때 본 연구에 참여하고 있는 기업에서 본 연구에서 개발될 기술을 이용하여 위생적이고 전통된장의 풍미를 지닌 제품을 생산하여 국내와 국외(수출)에 판매하고자 하므로 참여기업의 동의하에 기술 이전을 실시할 수 있음
- 전통된장을 제조할 때마다 풍미가 달라지는 기존의 전통된장을 위생적이면서 전통된장의 풍미가 일정한 여러 종류의 규격화된 된장을 생산할 수 있음
- 된장 산업을 한 단계 up grade하여 전통된장의 풍미를 지닌 위생적이며 전통적인 한류 된장의 수출을 가능하게 함
- 본 기술을 가지고 외국산 대두로 전통된장을 제조할 때에는 저렴한 가격으로 수출을 가능하게 함으로써 농민들의 안정된 대두 재배가 가능하며, 농가 소득을 일정 증가시킬 수 있음.
- 전통된장의 소비 (우리나라 인구의 약 70 %)층에게 더욱 위생적인 전통된장의 공급이 가능함
- 대량생산 system 개발에 의한 농가 소득을 증대할 수 있음
- 전통된장의 풍미 연구는 우수한 관능을 지닌 전통된장을 기준으로 관능적 특성이 우수하거나 이와 유사한 된장을 개발하는 방법으로 접근하여 시판개량된장과는 맛을 차별화하고, 우리나라 국민 다소비 식품 순위 중 우위를 차지하는 우수한 기능성 식품인 전통된장의 국내 소비 증대와 더불어 국외에 수출을 기대할 수 있음

제 5 장 연구 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구 성과

■ 교육·지도

- 풍기 및 군위 농업기술센터에서 각각 총 4회 교육 실시
- 장류관련업체 (수향식품)에 대해 수차례 된장 생산에 관한 전반적 지도 실시

■ 특허 및 논문

- 특허등록: 제 1056546, '콩알메주를 이용하여 한국 전통풍미를 지닌 장류 및 이의 제조 방법'
- Shukla Shurti, Kim JK, Kim M. Soybean and Health (Edited by Hany A. El-shemy). Chapter 9. Occurrence of Biogenic Amines in Soybean Food Products. p 181-206. 2011.
- Shukla Shurti, Choi TB, Park HK, Kim M, Lee IK, Kim JK, Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (*Doenjang*). *Food and Chemical Toxicology*. 2005-2010, 2010.
- Shukla Shurti, Park HK, Kim JK, Kim M. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (*Doenjang*). *Food and Chemical Toxicology*. 1191-1195, 2010.

제 2 절 연구 성과 활용 계획

- 우선적으로 참여기업에 대해 기술 이전을 실시할 계획이며, 차선으로는 장류관련업체에 대해 기술 이전을 실시할 계획임
- 본 연구결과를 바탕으로 전통된장의 색소 개선에 대한 추가연구를 추진 계획 중임
- 전통된장의 산업화에 활용
- 관련학회에서의 발표를 통해 새로 개발된 이론과 기술을 공개

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

1. Cheigh HS, Lee CY. 1993. Antioxidative and antimutagenic characteristics of melanoidin related products. *J Korean Soc Food Nutr.* 22: 246-245
2. Choi MR, Lim HS, Chung YJ, Yoo EJ, Kim JK. 1999. Selective cytotoxic effects of *Doenjang* Korean soybean paste fermented with *Bacillus* strains on human liver cell lines. *J Microbiol Biotechnol.* 9: 504-508
3. Jung KO, Park SY, Park KY. 2006. Longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of *Doenjang*. *Nutrition.* 22: 539-545
4. Hong SS. 1994. Anticancer effects of Korean traditional soy-bean paste. *Food Technol.* 7: 56-57
5. Kim TW, Kim YH, Kim SE, Lee JH, Park CS, Kim HY. 2010. Identification and distribution of *Bacillus* species in *Doenjang* by whole-cell protein patterns and 16S rRNA gene sequence analysis. *J Microbiol Biotechnol.* 20: 1210-1214
6. Lee SK, Bae DH, Kwon T, Lee SB, Lee HH, Park JH, Heo, S, Johnson MG. 2001. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. *J Microbiol Biotechnol.* 11: 842-45
7. Sakurai Y, Shioda H, Komagata K, Kim CS. 1984. The physical properties and identification of molds isolated from Korean *Meju*. *Collection of learned papers.* 23: 273-90
8. Yoo SK, Cho WH, Kang SM, Lee SH. 1999. Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybean paste and soybean sauce. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol.* 27:113-17
9. Park KY, Hwang KM, Jung KO, Lee KB. 2002. Studies on the standardization of *Doenjang* (Korean soybean paste) 1. Standardization of manufacturing method of *Doenjang* by literatures. *J Korean Soc Food Sc Nutr.* 31: 343-50
10. Kim HG, Hong JH, Song CK, Shin HW, Kim KO. 2010. Sensory characteristics and consumer acceptability of fermented soybean paste (*Doenjang*). *J Food Sci.* 75: 375-383
11. Jo YJ, Cho IH, Song CK, Shin HW, Kim YS. 2011. Comparison of fermented soybean paste (*Doenjang*) prepared by different methods based on profiling of

- volatile compounds. J Food Sci. 76: 368-379
12. Park KY, Moon SH, Baik HS, Cheigh HS. 1990. Antimutagenic effect of *Doenjang* (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. J Korean Soc Food Nutr. 19: 156-62
 13. Chang KY, Chae SK. 1977. Korean industrial standards (KS), Experimental studies on standardization of flavor evaluation method by sensory testing. J KSQM. 5: 36-45
 14. Setsuko I, Sato M, Shibasaki K. 1977. Study on the aroma of Miso, Nippon Shokuhio Kogyo Gakkaishi. 24(2): 65-71
 15. Park, YH, Koizumi, C, Nonaka J. 1973. Effect of humid atmosphere upon the chemical constitution of "Mori"-II composition of organic acids, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 39(10): 1051-1054
 16. Kageyama H, Mori S, Sato O. 1972. The simultaneous measurement of volatile fatty acid and lactic acid in the sludge gas chromatography. Anim Sci Technol. 44: 465-69
 17. Ben-Gigirey, B., de Sousa, J.M.V.B., Villa, T.G., Barros-Velazquez, J. 1998. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. J. Food Prot. 61:608-615
 18. Kim JH, Kim DH, Ahn HJ, Park HJ, Byun MW. 2005. Reduction of biogenic amine content in low salt fermented soybean paste by gamma irradiation. Food Cont. 16: 43-49.
 19. 식품공전, 2008, 미생물시험법, pp. (10-8-39)
 20. 볶음밥의 *Bacillus cereus* 위해 수준 및 위해 관리를 위한 모니터링 기준 설정, 2009, 장혜자, 이지혜. Korean J. Food Cookery Sci. 25:45-54
 21. 식품공전, 2008, 미생물시험법, pp. (10-8-23)
 22. 식품공전, 2008, 미생물시험법, pp. (10-8-34)
 23. 식품공전, 2008, 미생물시험법, pp. (10-8-33)
 24. 채래 된장과 시판 된장의 미생물 오염 및 바이오제닉 아민 함량 분석, 2009, 이학태, 김종호, 이상선. J. Fd Hyg. Safety. 24:102-109
 25. 식품공전, 2008, 미생물시험법, pp. (10-8-38)
 26. 대구 · 경북지역 초등학교 급식에 공급되는 식재료의 제조·가공단계별 미생물 평가. 2009.김윤화, 류 경, 이연경. J Korean Diet Assoc. 15:152-167
 27. Nout M. J. R. 1994, fermented foods and food safety, Food Research Int. 27 p. 291
 28. Kim JH, Kim DH, Ahn HJ, Park HJ, Byun MW, 2005. Reduction of biogenic amine content in low salt fermented soybean paste by gamma irradiation. Food Cont. 16:

29. Solms JJ. 1969. The taste of amino acids, peptides, and proteins. *Agric. Food Chem.* 17:687
30. Lee CH. 1973. Studies on the amino acids composition of Korean fermented soybean *Meju* products and the evaluation of the protein quality, *Korean J Food Sci Technol.* 5: 210-214
31. Choi KS, Rhee HS. 1994. Characteristics of *Doenjang* made from different material and ratio koji. *Korean J Food Sci.* 10: 39-44
32. Kim JG. 2004. Changes of components affecting organoleptic quality during the ripening of traditional Korean soybean paste, -amino nitrogen, amino acids, and color-, *J Fd Hyg Safety.* 19:31-37
33. Kim, SH, Lee KA. 2003. Evaluation of taste compounds in water-soluble extract of *Doenjang* (soybean paste). *J Food Chem.* 83:339-342
34. 함희진, 김무상, (2006) 시판 건포류에서 *B. cereus* 균주 분리와 항생제 감수성. *한국식품위생안전학회지*, 21:159-163
35. 황상용 (2001) 최신식품위생학, 신광문화사, p13
36. Proposed Registration Decision PRD 2011-24, *Bacillus firmus* strain I1582, Pest Management Regulatory Agency. 2011

주 의

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