

발간등록번호  
11-1541000-001250-01

# 장류식품의 고급화 기술개발 및 기능성 규명

(Development of Advance Fermented  
Soybean Products with Excellence  
Quality and Functions)

순창군장류식품사업소

농림수산식품자료실



0004548

농림수산식품부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “장류식품의 고급화 기술개발 및 기능성 규명” 과제(세부과제 “장류식품에 대한 HACCP 매뉴얼 개발 및 기업체 HACCP 인증확대” 협동과제 “우수발효미생물 대사체 및 전통발효식품의 기능성연구” “고부가가치 장류생산 기술연구” “유용미생물의 산업적 활용기술개발” “발효미생물 분리 및 동정, 동정 분리된 미생물 특허 및 보존” “박테리오파지를 이용한 유해균의 제어” “무독성 발효 균주 선발 및 기술 이전에 의한 현장적용”)의 보고서로 제출합니다.

2011년 12 월 19 일

주관연구기관명 : 순창군장류식품사업소

주관연구책임자 : 한 금 수

세부연구책임자 : 정 도 연(세부1)

협동연구기관명 : 한국식품연구원

협동연구책임자 : 김 현 진(협동1)

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 김 용 석(협동2)

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 김 민 수(협동3)

협동연구기관명 : 한국중균협회

협동연구책임자 : 박 정 민(협동4)

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 김 광 표(협동5)

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 엄 태 봉(협동6)

# 요 약 문

## I. 제 목

장류식품의 고급화 기술개발 및 기능성 규명

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 기술적 측면

고추장, 김치 등 발효식품의 건강기능성이 세계적으로 널리 알려지면서 2006년에는 'Health' 지에 세계건강 6대 식품에 포함될 만큼 그 기능성과 우수성을 인정받고 있다. 그러나 이런 우수성과 기능성 입증에도 불구하고 제조공정에 대한 과학화, 안전성, 건강기능성에 대한 종합적인 연구 미흡으로 인해 수출규모(300억 규모)가 열악한 실정이다. 또한 전통 장류의 수준을 식품 안전성의 관점에서 명품화하기 위하여 무독소 *Bacillus subtilis*, 무독소 *Aspergillus oryzae/A. sojae*, biogenic amine저감화 균주를 전통 발효 장류에서 분리하는 것이 중요한 관건이다.

한편 Biogenic amine은 인간에 생리적인 약리 효과로 영향을 주기 때문에 장류 제품의 위생적인 관점에서 최소화하는 것이 중요하다. 2006년 부산식약청에서 발표한 우리나라 식품에서 biogenic amine의 함량을 조사한 결과를 보면 전통 된장이 가장 많았고 그 뒤로 멸치 젓갈, 까나리 젓갈, 젓갈, 간장, 김치 순으로서 국민이 하루 섭취하는 biogenic amine양을 따졌을 때 장류로부터 섭취량이 가장 높았다. 이러한 점에서 장류 내에 biogenic amine함량의 저감화는 국민 건강에 필수적인 요소로서 이의 저감화를 위한 방법들이 개발될 필요가 있다.

### ○ 시중 유통되는 장류중의 biogenic amines 함량

Samples	N <sup>1)</sup>	Biogenic amines (mg/kg)										
		PUT <sup>2)</sup>	CAD	SPD	SPM	TRY	HIS	TYR	PHE	SER	NOR	DOP
Doenjang (traditional type)	6	99.6-1453.7 <sup>3)</sup> (462.6)	4.6-65.4 (23.5)	8.2-23.4 (15.6)	1.5-8.4 (3.8)	9.2-234.1 (105.5)	260.1-952.0 (569.4)	284.7-1430.7 (669.5)	24.5-529.2 (244.7)	2.0-48.2 (26.8)	ND <sup>4)</sup>	ND-55.9 (32.0)
Doenjang (modern type)	8	9.9-180.6 (46.4)	0.3-7.7 (3.2)	4.2-14.9 (7.4)	ND-10.2 (2.4)	6.1-43.5 (22.4)	1.5-210.7 (83.6)	3.4-295.5 (133.0)	ND-13.0 (6.5)	3.0-21.1 (6.7)	ND	ND-8.5 (1.5)
Miso	5	16.4-23.2 (19.8)	2.8-3.2 (3.0)	9.5-21.9 (15.7)	1.3-3.1 (2.2)	21.6-23.7 (22.6)	0.8-1.1 (0.9)	2.0-95.3 (48.6)	0.7-8.1 (4.4)	6.6-7.1 (6.8)	ND	ND-17.6 (8.8)
Chungkukjang	7	4.7-121.3 (26.4)	2.1-20.2 (9.7)	39.6-59.2 (52.0)	7.1-14.7 (10.7)	6.7-236.4 (69.9)	1.3-54.3 (10.1)	0.7-483.1 (133.8)	ND-40.8 (22.0)	5.2-27.9 (13.1)	ND	7.1-14.7 (10.7)
Chungkukjang powder	5	4.8-20.6 (10.2)	4.5-30.0 (12.1)	34.2-67.7 (54.6)	5.9-23.1 (15.5)	15.7-70.9 (35.0)	ND-2.0 (1.0)	5.9-162.9 (68.1)	8.4-25.2 (17.0)	3.2-9.8 (6.3)	ND	ND-16.5 (4.9)
Churjang	4	9.2-11.7 (10.7)	1.7-6.6 (3.3)	1.4-12.8 (6.1)	ND-2.9 (1.1)	13.3-19.9 (16.6)	11.6-22.4 (16.8)	29.7-54.6 (44.3)	2.2-11.8 (7.0)	ND-12.4 (6.3)	ND	ND
Soy sauce (traditional type)	6	19.8-1007.5 (376.9)	1.8-32.3 (16.1)	2.3-53.1 (24.5)	0.2-16.1 (6.6)	ND-31.2 (12.1)	3.9-398.8 (225.9)	26.8-485.9 (241.6)	1.5-23.7 (13.5)	4.3-14.8 (9.8)	ND	1.1-57.2 (21.4)
Soy sauce (modern type)	5	2.5-184.6 (56.8)	0.7-20.0 (6.1)	1.5-13.0 (6.3)	ND-2.3 (1.0)	30.7-45.8 (36.6)	13.8-229.8 (129.8)	81.6-794.3 (594.5)	3.5-121.6 (40.8)	1.1-8.0 (3.3)	ND	ND-4.3 (0.9)
Kochujang	5	2.5-3.2 (2.9)	ND-1.1 (0.5)	1.6-3.4 (2.5)	1.4-1.8 (1.6)	17.9-36.6 (27.2)	0.6-1.3 (1.0)	2.1-4.9 (3.5)	0.7-9.1 (4.9)	ND-2.9 (1.5)	ND	ND

<sup>1)</sup>Number of samples examined.

<sup>2)</sup>PUT (putrescine), CAD (cadaverine), SPD (spermidine), SPM (spermine), TRY (tryptamine), HIS (histamine), TYR (tyramine), PHE (2-phenylethylamine), SER (serotonin), NOR (noradrenaline), DOP (dopamine).

<sup>3)</sup>Minimum-maximum (mean value).

<sup>4)</sup>Not detected.

출처: 조태용 등, 한국식품과학회지 (2006년)

시장의 90%를 점유하는 공장장류산업의 경우, 일본의 발효기술(*Aspergillus oryzae* 단일균주 또는 일부 *Bacillus* 균주 혼합사용)을 접목한 대량생산시스템으로서 우리나라 고유의 발효기술(*Bacillus* 균주가 주 발효균으로 작용하며, *Aspergillus oryzae* 등 다양한 미생물이 복합발효 함)과는 차이가 있으며, 세계화제품생산을 위해서는 우리나라 고유의 발효기술을 기반으로 한 대량생산시스템 개발이 필요할 것으로 보인다.

## 2. 경제적 측면

한국은행이 제공하는 전국적 산업 연관표를 이용한 산업연관분석에 따르면, 장류산업의 최종수요가 10억원 증가하면 산업전체의 생산은 22억 4,000만원 증가하고, 부가가치는 7억 3,000만원 증가하며, 고용은 11.6명 증가하는 것으로 나타나 사업효과가 큰 것으로 분석되었다.

(사단법인 농촌연구센터, 2006.8)

전국적 산업 연관표를 이용하여 장류산업의 원료인 채소의 국산화율을 98%, 100%, 콩류의 국산화율을 10%, 12%로 제고하는 경우의 효과를 추정해 보면, 생산유발계수는 0.57% 상승하고, 부가가치유발계수는 2.47% 상승하는 것으로 추정되고 있다.

장류의 최종수요 증가가 1억원 일 때 채소는 1,640만원, 콩류는 190만원, 쌀은 810만원의 생산 증가효과가 있으며, 또한, 전국적 투입 계수하에서는 장류산업의 최종수요가 1억원 증가하면 부가가치는 장류산업과 그와 관련된 산업을 통틀어서 7,300만원 증가하지만, 전통장류산업의 투입계수로 대체된 상황에서는 장류생산 1억원의 증가는 8,200만원의 부가가치 증가로 이어지는 것으로 추정되고 있다.

## 3. 산업적 측면

식품과학과 산업(제41권, 제3호 2008년 Volume 41, No.3/2008, ISSN 0257-2397)에서 보면, 발효식품의 세계화를 위한 제품개발 방향으로 ①명품화 추진 ②소비자 지향 상품인 어울림식품(Fusion food), 신세대 수용제품개발, 편의화제품, 외식산업 진입제품 개발 ③건강기능성 제고제품개발 ④제조공정의 개선 및 저장성 향상 ⑤규격화 노력(원료의 규격화, 전통식품의 CODEX 국제규격화) ⑥포장과 디자인 개선의 필요성을 제시하였다.

농림수산식품부(출처 : 전통장류의 마케팅 시스템 구축 및 수출확대방안 연구)에서 장류의 세계적 마케팅 전략으로 전통(classic)마케팅과 문화(culture)마케팅을 비교분석 및 2008년도 미국 Top 10 Food trends에 대한 나아갈 방향을 제시하였다.

표1-1. 전통(classic)마케팅과 문화(cultrue)마케팅의 4P 분석비교

Marketing Mix	Classical marketing	Cultural marketing
Product(제품)	편의성, 기능성 강조	이미지, 느낌강조
Price(가격)	합리적 가격 혹은 할인가격	문화 프리미엄 부가
Place(유통)	대형 및 전문 유통매장	문화경험의 공간으로 탈 유통
Promotion(홍보)	미디어, 광고, 입소문	문화 이벤트, 직접체험

표1-2. 2008년도 미국 Top 10 Food trends와 극복방안

식품의 10대 Trends(미국)	극복 및 대처방안
Eco-friendly Foods	<b>Organic foods, LOHAS, 친환경</b>
Local, Natural and Fresh Foods	현지화
Concern about Food Safety	<b>GAP, HACCP</b>
Higher Prices	원가경쟁력 강화를 위한 R&D, <b>제조기술 강화</b>
Prebiotics and Probiotics	<b>균주개발, 발효기술개발</b>
Whole Grains	대체곡물 개발, <b>발효기술개발</b>
Simple Ingredients and Clearer Labels	<b>균주개발, 발효기술 개발</b>
Emphais on Lowering Salt	<b>저염장류 개발</b>
Alternative Sweeteners	맥아를 활용한 곡류전분의 당화
Bottled Water Backlash	포장용기 개발, <b>고급화</b>

※ 출처 : <http://www.webmd.com/food-recipes/features/top-10-food-trends-for-2008>

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 발효식품 안전성 연구(장류 식품에 대한 HACCP 매뉴얼 개발 및 기업체 HACCP 인증 확대)

##### 가. 장류의 매뉴얼개발 및 CCP설정

- (1) 고추장, 된장, 청국장 수거 후 모니터링
- (2) CCP 결정도 작성
- (3) CCP 관리계획 작성
- (4) HACCP 매뉴얼 보급을 통한 인증 추진

##### 나. 기능성 물질 첨가 장류제품 개발지원

- (1) 산야초를 활용한 기능성 식품소재 개발
- (2) 유산균 첨가 산야초 발효 액기스 첨가 장류 개발

##### 다. 수출전략제품 개발

- (1) 일본 수출형 발효 당침지 검은콩 스낵 개발
- (2) 발효 당침지 검은콩 제품의 영양학적 우수성 실험 진행 및 기술이전 추진

#### 2. 우수발효 미생물 대사체 및 전통발효식품의 기능성 연구

본 과제에서는 우리나라 전통발효식품인 메주와 청국장을 선발된 우수균주로 표준제조하고 제조된 시료들과 고추장의 발효과정을 대사체 분석 기술을 이용하여 발효대사체를 연구하였으며 이들 시료들의 건강 기능성을 확인함으로써 전통발효식품의 표준화를 이룩할 수 있는 기반을 다지며 이를 통해 우리나라 전통발효식품이 세계적 식품으로 발전할 수 있도록 하고자 본 연구를 수행함.

##### 가. 우수 미생물에 의한 발효 대사물질 및 대사체 연구

##### 나. 전통발효 식품의 기능성 연구 및 신규 개발된 표준제조 발효식품의 기능성 연구

#### 3. 고부가가치 장류생산 기술연구

##### 가. 편의성 장류 제품 개발 및 기술이전

- (1) 청국장 활용 음료 및 쿠키 제품 개발
- (2) 블록형 및 찌개형 제품 생산기술 개발
- (3) 편의성 컵제품(된장, 청국장) 생산기술 개발

##### 나. 전통장류 품질표준화 기술 개발

- (1) 통계적 처리방법을 이용한 starter의 고체배양 조건 최적화
- (2) 고체배양기에서의 균체 대량생산 및 분리 농축 시스템 확립
- (3) 위생메주 생산 적용 및 방법 확립

##### 다. 표준화 기술을 적용한 장류 생산기술 개발

- (1) 품질표준화 기술을 적용한 전통 장류용 메주 대량생산기술 정립
- (2) 우수발효미생물 적용 위생메주로 장류생산 시험

(3) 효소 활용 장류 발효 제어시스템 기술 개발

라. 신규 발효식품 개발 및 기술이전

- (1) 수출용 장류(고추장, 된장, 청국장) 소스 제품 개발
- (2) 우수발효미생물 적용 기능성 장류 제품 개발
- (3) 캡슐화 기능성물질을 첨가한 장류제품 개발

#### 4. 유용미생물의 산업적 활용기술 개발

가. 전통 발효식품으로부터 분리된 발효용 미생물들의 생리적, 발효학적 특성 규명 및 우수 균주의 확보

- (1) 발효용 미생물들의 효소 활성 분석
- (2) 식품 유해미생물의 생육 저해능 및 활성 스펙트럼 분석
- (3) 식품 유해미생물의 생육 저해 물질 구조 분석
- (4) 분리 미생물의 생리학적, 발효학적 특성 분석을 통한 장류제조용 유용미생물의 확보

나. 발효식품용 유용미생물 및 유용 물질의 대량 생산 기술 개발

- (1) 확보된 유용미생물로부터 생육 저해 물질의 대량 생산 및 분리 정제 기술 개발
- (2) 확보된 유용미생물의 배양학적 특성 분석
- (3) 유용미생물의 대량생산 기술 개발

다. 유용미생물의 활용 기술 개발

- (1) 유용미생물의 스타터 활용기술 개발

#### 5. 발효미생물 분리 및 동정, 동정 분리된 미생물 특허 및 보존

가. 전통 식품 시료로부터 발효 미생물의 Microflora를 확인.

나. culture-dependent 방법과 culture-independent(PCR-PAPD) 방법을 사용하여 전통 식품 시료에 존재하는 모든 미생물을 비교

다. 전통 식품시료의 metagenome 확보를 통하여 발효에 가장 많은 영향을 주는 미생물의 분리 및 동정.

라. 전통 식품시료의 microflora를 확립 함으로 인하여 다양한 전통 고추장의 발효에 관여하는 각종 발효 미생물의 정보를 확인 함.

마. 전통 식품 시료의 microflora중 다수를 차지하는 중요한 미생물을 분리 하며 또한 분리된 미생물의 안전한 보존을 위하여 장기 보존을 수행 함.

바. 전통 식품 시료로부터 분리된 발효 미생물의 이용을 원활하게 하기위한 분양시스템을 구축 하며 이에 따라 우수한 발효 미생물의 활용을 통하여 전통 장류의 과학적 기반을 마련 함.

#### 6. 박테리오파지를 이용한 유해균의 제어

가. 장류 및 장류관련 식재료에 존재하는 *B. cereus*에 특이성을 가지고 유해미생물을 불활성화시키는 박테리오파지의 분리 및 분류

- 나. 분리된 박테리오파지의 특성분석 및 genome sequencing과 genomic analysis
- 다. Bacteriophage biocontrol을 다양한 장류에 적용하여 그 효능을 확인
- 라. *B. subtilis*를 이용한 청국장 제조 시 박테리오파지를 이용하여 *B. cereus*의 제어
- 마. *B. cereus*가 제거된 볏짚유래 starter culture의 가능성 분석)

## 7. 무독성 발효 균주 선발 및 기술 이전에 의한 현장적용

본 연구의 전체적 내용은 전통 재래식 장류의 핵심적 발효균으로서 품미에 가장 중요한 역할을 하는 *Bacillus subtilis*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus sojae* 를 순수하게 분리한 뒤 전통 장류에서 문제시되는 세 가지 유해 인자(*B. cereus* 장독소, aflatoxin, biogenic amine)가 제거된 균주의 다시 분리하고 상기 두 목표를 동시에 만족하는 전통 장류 발효균주를 개발하는 것이다. 또한 맛에 관련한 품질을 높이기 위해 glutamic acid를 많이 생산하는 균주들을 위생적으로 검증된 균주들에서 분리하였다. Biogenic amine은 발효 동안 amino acid decarboxylase를 생산하는 발효세균, 발효 효모, 발효 곰팡이로부터 유래하며 이들은 species-specific 이 아닌 strain-specific하다는 것이 알려져 있다. 이를 위해 우리는 strain-specific한 특성을 고려하여 장류에서 이들 biogenic amine을 생산하지 않은 strain을 선발하고 나아가 biogenic amine을 분해까지 하는 strain을 찾고자 하였다.



#### IV. 연구개발결과

##### 1. 발효식품 안전성 연구(장류 식품에 대한 HACCP 매뉴얼 개발 및 기업체 HACCP 인증 확대)

전통장류의 안전성 확보를 위하여 식품의약품안전청 및 전통품질인증 규격 기준에 맞는 고추장, 된장에 대한 공정 매뉴얼 개발을 위한 결과 고추장, 된장, 청국장 등의 위해요소 분석, CCP 도출, 매뉴얼 작성을 실시하였다. 그 결과 고추장의 일반모델 HACCP Plane은 살균공정에서는 관리기준을 살균온도 85~100 ℃, 살균 시간 30~35 분 이상으로 설정하여 작업자가 작업 시 매 배치마다 준수하도록 하였다. 금속검출 공정에 대하여는 작업 시작 전, 작업 종료 후, 작업 중 매 30 분마다 금속검출기의 감도를 점검하도록 하였다.

된장의 일반모델 HACCP Plane은 석발, 세척공정에서는 관리기준을 세척 속도 6 RPM으로 설정하여 작업자가 작업 시작 전, 작업 중 1회, 작업종료 후 모니터하도록 하였다. 주정살균공정은 3% 주정으로 살균하도록 하였고, 금속검출 공정에 대하여는 작업 시작 전, 작업 종료 후, 작업 중 매 30 분마다 금속검출기의 감도를 점검하도록 하였다.

청국장 제조 공정 중의 CCP는 석발, 세척공정(P)와 발효공정(B) 금속검출공정(P)에서 나타났다. 일반모델 HACCP Plane은 석발, 세척공정에서는 관리기준을 세척 속도 6RPM으로 설정하여 작업자가 작업 시작 전, 작업 중 1회, 작업종료 후 모니터하도록 하였다. 발효공정은 발효시간을 44 시간으로 설정하였으며, 금속검출 공정에 대하여는 작업 시작 전, 작업 종료 후, 작업 중 매 30 분마다 금속검출기의 감도를 점검하도록 하였다.

위 결과는 참여기업에 이전하여 매뉴얼로 활용할 예정이며, 참여기업별 공정 개선 및 작업 제조 환경을 개선한 결과 클레임의 주원인인 곤충, 금속 이물 등의 발생빈도가 현저히 줄었으며, 유해미생물 및 이물 등의 안전성이 향상됨을 보여주었다. 또한 참여기업 중 장본가전통식품 장류제조 업체는 HACCP 적용업소 기준서를 획득하였으며, 농업회사법인 순창장류(주) HACCP 인증 신청 중에 있다.

기능성 신제품 개발을 위하여 산야초(머위, 미나리, 신선초, 쑥, 참나물, 취나물, 케일) 발효액을 제조하여 생리활성 분석한 결과 발효 후에 생리활성이 증가하였으며, protease activity, 항산화 효능을 분석한 결과 신선초, 미나리, 쑥이 높은 결과를 보였으며, 항혈전 효능에서는 신선초, 미나리, 쑥, 취나물이 높은 값을 나타내었다. 관능평가를 실시한 결과 전체적인 기호도는 쑥 발효액 4.4±0.5, 미나리 발효액 4.2±1.5, 머위 발효액 3.7±1.2, 신선초발효액 3.2±1.0, 참나물 발효액 3.0±0.9, 취나물 발효액 2.4±0.9, 케일발효액 2.4±0.9 순으로 쑥발효액과 미나리발효액이 나머지 발효액에 비해 전체적인 기호도가 유의적으로 높았다.

발효액을 이용하여 장류소스를 제조하여 비빔밥소스, 돈가스소스, 간장치킨소스, 간장 드레싱을 제조하여 레시피를 확립하였으며, 기술이전을 원하는 적합한 업체를 찾는 예정이다.

수출전략상품 개발을 위하여 대표적인 발효미생물인 *Bacillus subtilis*와 *Lactobacillus plantanum*을 이용하여 발효 검은콩 제품을 제조하였고 이를 통해 기능적으로 우수한 콩제품의 소비를 증가시키고 건강에 대한 가치성 뿐만 아니라 편리성을 추가한 신제품의 개발을 통하여 소비자들 쉽게 접근할 수 있도록 경제성과 기능성이 높은 콩 가공제품을 개발하였다. 발효 당침지 검정콩 스낵 개발의 공정을 확립하였으며, 기업체(해묵전통식품) 기술이전을 통하여 전통 식품의 현대화 및 편리화, 또한 더 나아가 일본의 다양한 콩 제품과의 경쟁력도 확보하였다.

## 2. 우수발효 미생물 대사체 및 전통발효식품의 기능성 연구

순창군 장류연구소에서 확보한 *B. subtilis*와 *A. oryzae*를 이용하여 표준제조 메주를 제조하였고 전통메주와 그 특성을 대사체 분석 기술을 이용하여 분석하였다. UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 메주의 발효기간별 발효대사체를 분석을 통해 메주의 품질 특성에 관여하는 37개의 발효대사체들을 동정하였으며 이들 대사체들을 이용하여 메주 발효대사경로를 도출하였다. 본 연구에서 도출된 대사체들과 대사경로는 메주의 quality control를 상당한 도움이 될 것으로 사료됨.

우수균주 *B. licheniformis* 67를 이용하여 표준제조 청국장을 제조하였으며 전통 청국장과 비교한 결과 PGA 함량과 품질특성이 우수하며 대사체 분석결과 발효에 따라 아미노산, 펩타이드, isoflavone, soyasaponin, LPC 계열의 변화가 두드러지게 관찰되었으며 60시간 발효된 표준제조 청국장에서 daidzein의 함량이 전통청국장에 비해 2배정도 낮은 값을 보였지만 soyasaponin과 LPC의 함량은 크게 증가하는 결과는 보였다.

5개월동안 발효된 고추장의 색소 대사체 분석결과 대부분의 발효는 1개월에서 3개월 사이에 일어났으며 lycopene과  $\beta$ -carotene 함량은 발효가 진행되면서 감소하는 반면 zeaxanthine, cryptoxanthine, oxidized capsanthines 함량은 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 보였다. 전통발효식품의 뇌세포사멸 억제 효과를 확인한 결과 표준제조 메주와 전통메주의 추출물의 신경세포 보호 효과는 거의 없는 반면 표준제조 청국장의 추출물에서는 신경보호효과가 있음을 확인하였다.

표준제조 청국장의 항비만 항당뇨 실험을 한 결과 isoflavone이 많이 들어있는 추출물에서 항비만과 항당뇨 효과가 확인되었으며 PGA도 항당뇨 효능이 있는 것이 확인되었다. 동물실험결과 표준제조 메주는 장염예방활성을 나타낼 가능성이 있으며 표준제조 청국장의 PGA와 고추장의 색소에서도 항염증 효능이 있는 것으로 관찰되었다.

## 3. 고부가가치 장류생산 기술연구

### 가. 편의성 장류 제품 개발 및 기술이전

#### (1) 청국장 활용 음료 및 쿠키제품 개발

##### (가) 청국장음료 제품 개발

- ① 대두를 발아시켜 isoflavone 함량을 증가시킨 후 청국장 제조
- ② 청국장을 분말화하여 청국장음료 제조 및 배합비 결정
- ③ 시판 청국장음료 제품의 성분규격 및 관능평가를 실시하였음
- ④ 청국장제조에 적합한 균주 선발함
- ⑤ 콩을 발아시킨 후 순창전통청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis*를 접종하여 청국장을 제조하였음
- ⑥ 대두의 발아시간 및 청국장 발효기간에 따라 점질물 및 isoflavone 함량 등 품질 특성의 변화 측정하였음
- ⑦ 초미세분말화한 청국장과 다른 곡물가루(발아현미, 보리 등)를 첨가하여 청국장음료 제조 방법과 배합비를 결정하였음

##### (나) 청국장쿠키 제품 개발

- ① 대두를 발아시켜 isoflavone 함량을 증가시킨 후 청국장 제조
- ② 청국장을 분말화하여 청국장쿠키 제조 및 배합비 결정
- ③ 시판 청국장쿠키 제품의 성분규격 및 관능평가를 실시하였음
- ④ 청국장제조에 적합한 균주 선발함
- ⑤ 콩을 발아시킨 후 순창전통청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis*를 접종하여 청국장을 제조하였음
- ⑥ 대두의 발아시간 및 청국장 발효기간에 따라 점질물 및 isoflavone 함량 등 품질 특성의 변화 측정하였음
- ⑦ 초미세분말화한 청국장과 죽염을 첨가하여 3종의 청국장쿠키 제조방법과 배합비를 결정하였음 : 발아청국장쿠키, 보리세순잎가루첨가 발아청국장쿠키, 머핀형 발아청국장쿠키

(2) 라면 또는 파우치 형태의 1회용 제품 개발 (과립고추장을 이용한 간편 비빔소제 개발)

- (가) 고추장 종류에 따른 과립고추장의 품질특성 측정
- (나) 과립고추장 비빔소제의 1회 제공량 및 배합비 설정
- (다) 소고기 과립고추장 비빔소제 개발
- (태) 분말고추장, 참쌀고추장, 우리밀고추장을 이용하여 과립고추장 제조하였음
- (매) 고추장 종류에 따른 과립고추장의 수분함량, pH, 산도 및 색도 등을 분석하였음
- (배) 과립고추장의 용해성, 흡습성 등의 분석하였음
- (사) 시판 포장밥을 이용하여 과립고추장 1회 제공량을 설정하였음
- (아) 고추장 종류에 따른 소고기 과립고추장 비빔밥의 관능평가를 실시하였음
- (재) 과립고추장의 향미성분 분석
- ① 과립고추장 제조
- ② 향미성분 비교 : 생고추장, 고추장분말, 과립고추장
- ③ 알코올 및 케톤류 감소, 알데히드류, 에스터류, 알칸류 증가

(3) 편의성 장류 컵제품 생산기술 개발

- (가) 된장 컵제품 개발
- ① 울금 첨가 즉석된장국 컵제품 제조방법 개발
- ② 울금 함량별 수분함량, pH, 총산함량, 색도, 아미노태질소 함량을 시판제품과 비교
- ③ 울금첨가 즉석 된장국의 용해성, 흡습성, DPPH 전자공여능, 페놀화합물 함량을 시판제품 3가지와 비교 분석
- ④ 울금 첨가 즉석 된장국 컵 제품의 제조공정 및 배합비를 관능평가를 통하여 정립
- (나) 청국장 컵제품 개발
- ① 쭈 첨가 즉석청국장 컵제품 제조방법 개발
- ② 쭈 함량별 수분함량, pH, 총산함량, 색도, 아미노태질소 함량 분석
- ③ 쭈첨가 함량별 즉석 청국장의 DPPH 전자공여능, 총페놀화합물 함량, 흡습성을 비교 분석
- ④ 쭈 첨가 즉석 청국장 컵 제품의 제조공정 및 배합비를 관능평가를 통하여 정립

나. 전통장류 품질표준화 기술 개발

- (1) 통계적 처리방법을 이용한 starter 고체배양 조건 최적화

- (가) Starter 미생물 대량생산용 고체발효 산업용 복합 생산배지 개발
- (나) 고체발효조에서의 생산균주의 배양 특성 규명
- (다) 발효조 배양공정 최적화
- (라) 탄소원, 질소원, 인원을 선정하고 통계적 배지최적화 방법을 이용하여 균체대량생산에 적합한 최적배지 선정
- (마) 발효조의 온도, 교반속도, pH, 공기유속조건을 달리하여 발효조건 확립

(2) 생물반응기에서의 균체 대량생산 및 분리 농축 시스템 확립

- (가) Starter 미생물의 고농도 배양용 발효조 운전 조건 최적화 및 자동화 발효공정 개발
- (나) 분리정제공정의 scale-up 연구
- (다) 선택된 발효조건에서의 회분식 배양과 반복회분식 배양을 이용한 발효공정 확립
- (라) 원심분리와 동결건조를 통해 starter 제조

(3) 전통장류 품질표준화 기술개발

- (가) 위생메주 생산 적용 및 방법 확립
- (나) *Bacillus licheniformis* SCK 121057의 성장곡선을 확인
- (다) *Bacillus cereus*에 대한 항균활성 측정 : *B. licheniformis* SCK 121057가 가장 효과적이었음
- ① 기본 생산배지에서의 D.C.W, Protease activity, Sucrose 함량분석
- ② OFAT 방법을 이용한 영양원의 선별 : galactose, yeast extract 선별
- ③ 최적배지에서 적용 시험

다. 표준화 기술을 적용한 장류 생산기술 개발

- (1) 품질표준화 기술을 적용한 전통장류용 메주 대량생산기술 정립
- (가) 전통고추장의 품질 개선을 위하여 우수균주로 제조한 고추장메주의 제조조건 설정 : *A. oryzae*를 성형전에 접종
- (나) 메주의 제국온도, *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*의 접종 시기, 제국방법 등에 대한 표준발효조건 시험
- (다) 수분함량, pH, 적정산도, 식염함량, 색도는 처리구 사이에 큰 차이가 없었음.
- ① 아미노산성질소 함량은 *A. oryzae*(CM)를 메주 성형 전에 접종하고 tray에서 제국하여 35°C에서 건조한 처리구에서 504.98 mg%로 가장 높았음.
- ② 유리아미노산 함량은 *A. oryzae*(CM)를 메주 성형 후에 접종하고 tray에서 제국한 처리구에서 145.61 mg%로 가장 높았음.
- ③ 효소전극의 sensing 효율의 제고
- ④ 공유결합 또는 포괄법에 의한 수식전극의 제작과 이의 효율적 이용
- ⑤ Carbodiimide activation방법으로 전극 - DTNB - NAD<sup>+</sup> assembly를 제작, 활성을 검정함. 또한 산화환원 고분자와 함께 전극표면에 고정화시킴으로써 산화환원 고분자 - 효소분자 연결 전극을 제작, 활성을 검정함.
- ⑥ 전극-diaminopropane-DTNB - NAD<sup>+</sup>/alcohol dehydrogenase assembly 및 전극-diaminopropane -DTNB-NAD<sup>+</sup>/glutamate dehydrogenase assembly를 제작하여 이의 기질에 대

한 sensitivity를 검정함.

- ⑦ DTNB수식전극을 적용한 전기화학적 NAD재생반응과 L-glutamate dehydrogenase에 의한 glutamate로부터  $\alpha$ -ketoglutarate의 생성반응을 연계한 electroenzymatic bioreactor를 구축, 이의 가능성을 검토함.

(2) DTNB수식전극(Carbon cloth-DTNB)을 적용한 NAD재생형 electroenzymatic bioreactor의 확립

- (가) NAD재생반응은 bioreactor의 효율을 좌우할 중요한 반응이므로 이의 제고를 위한 방안 모색함
- (나) 전기화학적 NAD재생반응과 L-glutamate dehydrogenase에 의한 반응을 연계한 반응계 최적화

#### 라. 신규 발효식품 개발 및 기술이전

(1) 수출용 장류(고추장, 된장) 소스 제품 개발

- (가) 설문조사를 통한 소비자 수요도 조사
- (나) 수요조사에 따라 제품개발 우선순위 및 선별
- (다) 재료의 최적 배합비율에 의한 레시피 완성
- (라) 시제품 제작 및 관능검사
- (마) 관능검사 후 제품 보완
- (바) 소비자 수요조사는 기타 된장불고기절임소스, 된장샐러드드레싱의 경우 기존에 많은 특허 출원 및 등록된 상태여서 4가지 품목을 대상으로 한 설문조사는 실시하지 않음
- (사) 제품의 개발은 카레를 원료로 소스를 만듦.
- (아) 고추장과 된장의 특유의 냄새를 저감시켜주도록 열처리의 과정을 거치며, 카레의 경우 원 재료를 구입하기가 어려워 시중에서 판매되는 카레재료를 구입하여 최적 배합비 완성
- (재) 카레의 독특한 맛과 고추장 및 된장과의 조화를 기준으로 관능검사후 제품 보완 계획

(2) 우수발효미생물적용 기능성장류제품 개발

- (가) 제품개발에 최적화 된 우수발효미생물 선택
- (나) 재료의 최적 배합비율에 의한 레시피 완성
- (다) 시제품 제작 및 관능검사
- (라) 관능검사 후 제품 보완
- (마) 양갱에 접목시키기 위해 가공제품에 대한 활용도가 떨어지는 된장을 선택
- (바) 재래식으로 제조된 전통된장과 함께 풍미를 함께 더할 수 있는 효모를 이용한 쌀된장을 이용한 제품 개발
- (사) 된장가루 첨가비에 따른 제품의 최적 배합비 완성
- (아) 양갱의 강한 단맛을 보완하면서 된장의 기능성이 함유된 양갱제품을 개발
- (재) 또한 효모를 이용한 쌀된장의 풍미를 더한 제품을 개발 중 (중간실적 발표시 추가된 사항)

(3) 복합기술 융합 장류제품 개발

- (가) 제품개발에 최적화 된 우수발효미생물 및 기능성물질 선택
- (나) 발효미생물을 이용한 장류제품에서 분리한 기능성물질의 분석
- (다) 캡슐화를 위한 조건 확립
- (라) 캡슐화 및 제품 보완
- (마) 발효식품에서 추출되는 기능성물질 중 그 효능이 입증된 peptide, isoflavone,  $\gamma$ -PGA를 선택
- (바) 풍미가 강하지 않고 섭취가 용이하도록 캡슐화 제품 개발 (isoflavone의 캡슐화제품은 이미 시중에서 유통 중인 관계로 peptide와  $\gamma$ -PGA의 캡슐화 제품 개발)
- (사) 청국장으로부터 분리한  $\gamma$ -PGA의 기능성 특징 분석 (peptide는 분리조건이 맞지 않아 대두로부터 분리된 peptide를 구입하여 사용)
- (아) 캡슐화를 위한 각 물질들의 배합조건 완성
- (자) 캡슐화를 위한 peptide의 조건 확립 과정 결과, 대두유에 녹지 않고 분리층이 생겨 캡슐화가 불가능하여 타블렛으로 고품화

#### 4. 유용미생물의 산업적 활용기술 개발

가. 전통 발효식품으로부터 분리된 발효용 미생물들의 생리적, 발효학적 특성 규명 및 우수 균주의 확보

- (1) 국내 전통 발효식품으로 2,170 종의 유용미생물 자원을 확보
- (2) *B. cereus* 등 병원성미생물에 대한 항균활성 균주 220점 확보
- (3) 발효용 미생물들의 단백질 분해능 782종, 섬유소분해능 325종, 탄수화물 분해능 미생물 210종 확보
- (4) 항균활성 우수 미생물의 특성 분석
- (5) 분리 미생물의 생리학적, 발효학적 특성 분석을 통한 장류제조용 유용미생물의 확보

나. 발효식품용 유용미생물 및 유용 물질의 대량 생산 기술 개발

- (1) 확보된 유용미생물로부터 생육 저해 물질의 대량 생산 및 분리 정제 기술 개발
- (2) 확보된 유용미생물의 배양학적 특성 분석
- (3) 유용미생물의 대량생산 기술 개발

다. 유용미생물의 활용 기술 개발

- (1) 유용미생물의 향생제 대체용 및 축산 사일리지 제조용 등 산업적 활용기술 개발 및 기술이전

#### 5. 발효미생물 분리 및 동정, 동정 분리된 미생물 특허 및 보존

가. 전통 장류의 기본 재료인 전통 고추장시료로부터 발효미생물의 Microflora의 확인을 위하여 각각의 시료로부터 전체 미생물의 cfu값을 확인하며 동시에 각 시료로부터 대표성이 있는 colony를 분리하여 동정하여 Microflora를 확인 함.

나. 수집된 전통장류로부터 발효표준미생물의 microflora를 확인하기 위하여 전통장류의 metagenome을 분석함으로 이들에 포함 되어 있는 모든 미생물의 개체군을 확인함으로써 기존에 보고되어진 각종 장류 관련 미생물 및 일반 미생물 분리 실험에서 분리가 잘 안 되

는 미생물의 유전자를 확인함으로써 각종 전통 장류에 포함되어있는 다양한 미생물 균집을 확인

- 다. 수집된 전통장류로부터 발효표준미생물의 microflora를 확인하기 위하여 전통장류의 PCR-RAPD를 분석함으로써 이들에 포함 되어 있는 모든 미생물의 개체군을 확인함으로써 기존에 보고되어진 각종 장류 관련 미생물 및 일반 미생물 분리 실험에서 분리가 잘 안 되는 미생물의 유전자를 확인함으로써 각종 전통 장류에 포함되어있는 다양한 미생물 균집을 확인 함.
- 라. 전통 장류 시료로부터 *micrifola* 확인을 위한 시험에서 protease활성 및 amylase활성을 시험 함으로써 각각의 장류에 포함된 생리활성도의 측정을 수행함.
- 마. 분리된 전통장류 미생물의 생리적 특성에 관한 기본 정보를 구축 함.
- 바. 분리된 전통장류 미생물의 관리 시스템을 구축하기 위한 database작성을 위한 기본 정보표 준화 구축.
- 사. 전통 장류 표준미생물의 안전한 보존을 위하여 미생물의 적절한 보존 시스템을 구축함.

## 6. 박테리오 파지를 이용한 유해균의 제어

- 가. 다양한 전통장류에서 31개의 박테리오파지 분리
- 나. 분리된 파지 중 8개를 선택하여 특성분석
- 다. BCP8-2의 genome sequencing 및 분석
- 라. *B. subtilis*를 이용한 청국장 발효 시 *B. cereus* 증식을 박테리오파지를 이용하여 제어
- 마. *B. cereus*가 제거된 볏짚유래 starter culture의 가능성 입증

## 7. 무독성 발효 균주 선발 및 기술 이전에 의한 현장적용

장류 제조에 *Bacillus cereus*의 오염을 줄이기 위한 방법으로 전국 150종 장류에서 분리한 무독소 *B. subtilis* 및 *B. licheniformis* 균들을 대상으로 *B. cereus*에 대해 억제능력이 큰 한 균주 SCK 121057를 선발하였다. SCK 121057은 생화학 검사 및 16S rRNA 유전자 서열에 의한 계통도 분석 결과 *B. licheniformis*로 동정되었고 12 종의 *B. cereus* 이외에 중요 병원성 균인 *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* 등의 증식을 억제 하였다. SCK 121057이 생산하는 항균 물질은 고압멸균 조건에서 열 안정성, proteinase K에 대한 가수 분해 저항성, 37°C에서 장기 저장성을 지닌 구조적으로 매우 안정한 물질이었고, 전자 현미경 관찰에서 이 물질은 *B. cereus*의 세포막을 손상시켜 ghost cell을 형성하였다. SCK 121057 균과 *B. cereus*를 혼합 접종한 청국장 적용실험 결과 *B. cereus* 균수는 대조군에 비해 극적으로 감소되었다.

아플라톡신을 생산하지 않는 *Aspergillus oryzae* 균의 선발에 전통장류에서 분리한 곰팡이 들을 대상으로 ITS1, ITS2에 대한 유전자 서열을 분석하여 *Aspergillus* 곰팡이들을 분리한 뒤 아플라톡신, 오르라톡신을 생산하는 *Aspergillus* species를 동정하여 *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Penicillium* species를 배제하였다. 1차 선발한 *Aspergillus* species를 대상으로 aflatoxin을 생산하지 않는 균들을 선발하기 위해 coconut cream milk agar에 접종, 배양한 뒤 UV 광원 하에 형광 유무를 확인하였다. 최종적으로 2차 선발된 균들을 대상으로 Aflakit와 형

광 검출기가 장착된 HPLC에서 아플라톡신 생산 유무를 확인하였다. 맛에 가장 중요한 요소인 glutamate가 높은 균주들을 고속 검색하기 위해 고proteases생산 균주들 중 gamma glutamyltranspeptidase에 대한 polyclonal 항체의 제작하여 Western blot 방법을 개발하였고 전통 된장과 청국장으로부터 분리한 무독소 균주들을 삶은 콩에 접종한 뒤 생산한 glutamate를 효소 분석법으로 정량하여 발효 균주로 최종 선발하였다.

Biogenic amine 선택 배지를 이용하여 전국에서 수집한 76종의 장류로부터 biogenic amine을 생산하지 않는 106개의 균주를 분리하였다. 목표 미생물이 amino acid decarboxylase를 생산할 경우 선택 배지에 첨가된 L-histidine 또는 L-tyrosine은 염기인 histamine이나 tyramine로 바뀌며, 이 때 변화된 pH는 cresol red의 변색으로 확인할 수 있다. 이들 균들 중 biogenic amine을 분해하는 균주를 선발하는 것은 이미 여러 미생물들의 복합적인 발효에 의해 생성된 장류 내 biogenic amine의 제거에 가장 효율적인 방법이라 할 수 있다. 이를 위해 우리는 Satake 등이 개발한 histamine 제한 배지를 변형하여, 유일한 탄소원 및 질소원으로 2% histamine 및 tyramine을 사용한 pH 7의 합성 배지를 개발하였다. 놀랍게도 biogenic amine을 생산하지 않았던 이들 균들 중 절반이 넘는 67개 균주가 이 배지에서 자랐고 이들 가운데 성장이 빨라 콜로니 직경이 컸던 26 종을 분리하였다. *Bacillus cereus*는 장류 식중독 균으로 발효 동안 증식하기 쉽기 때문에 이 식중독 균에 길항적으로 작용하는 균주의 선발은 장류 발효에 크게 유익하다. 이들 26 균주들 중 어떤 균주가 장류 식중독 균인 *Bacillus cereus*를 억제하는지 확인하기 위해 paper disc 방법을 사용하여 증식억제능력이 있는 18종을 선발하였다. 이들 중 억제 능력이 뛰어난 14종을 대상으로 각각 biogenic amine을 첨가한 합성 배지에 접종하고 20일 간 배양 후, HPLC 상에서 histamine 또는 tyramine 분해능이 높은 균주 6종을 선발할 수 있었다.



## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 발효식품 안전성 연구(장류 식품에 대한 HACCP 매뉴얼 개발 및 기업체 HACCP 인증 확대)

HACCP 매뉴얼 개발을 통하여 참여기업체 HACCP 인증(1건)을 획득하였으며, 매뉴얼에 따라 공정 개선 및 작업 환경 관리를 통하여 유해미생물 및 이물 등에 대하여 안전성이 향상 될 것이다. 참여기업 뿐만 아니라 장류제조업체에 매뉴얼 보급이 확대되어 작업 개선에 도움을 줄 것이다.

기능성 제품 및 편의성 제품을 개발한 결과 장류 소비시장 뿐만 아니라 신흥소비시장의 개척에도 도움이 될 것이다.

### 2. 우수발효 미생물 대사체 및 전통발효식품의 기능성 연구

발효식품에 대한 과학적 정보를 제공함으로써 국내외 발효식품 시장을 확대할 수 있는 기반을 마련했을 뿐만 아니라 본 과제를 통해 획득한 결과를 해외저널에 게재함으로써 우리의 전통발효식품의 이름과 우수성을 알릴 수 있는 계기를 마련함 (SCI 논문 3편, 특허출원 2건).

전통발효식품의 제조 표준화의 기반을 마련함으로써 전통발효식품의 균주 및 품질 표준화에 활용할 수 있음.

### 3. 고부가가치 장류생산 기술연구

#### 가. 기술적 측면

- (1) 전통장류에 대한 우수균주 고체배양 기술 확립
- (2) 발효식품 숙성제어 기술 90% 수준까지 향상
- (3) 발효미생물을 활용한 기능성식품 개발기술 확보

#### 나. 경제적 측면

- (1) 전통장류 및 전통주 시장 1조원 시대 개막
- (2) 1차산업 농업안전망 구축(콩, 고추, 쌀 등) : 500억 규모
- (3) 전후방 경제효과 2.24조원 창출(고용창출, 관광, 외식, 원료구입 등)

#### 다. 학술지 및 관련 홍보매체에 게재

- (1) 학술지에 2편 게재
- (2) 특허출원 3건
- (3) 학술대회 논문발표 15건

### 4. 유용미생물의 산업적 활용기술 개발

#### 가. 연구성과

- (1) 국내 전통 발효식품으로 2,170 종의 유용미생물 자원을 확보하였으며, 이 중에서 *B. cereus* 등 병원성미생물에 대한 항균활성 균주 220점, 발효용 미생물들의 단백질 분해능 균주 782종, 섬유소분해능 균주 325종, 탄수화물 분해능 미생물 210종 확보

- (2) 본 연구결과 관련 특허 5건, SCI 논문 4건, 국내 비SCI 논문 2편을 게재하였으며, 기술 이전 2건 추진하였음

나. 성과활용 계획

- (1) 본 연구에서 발효식품으로부터 확보된 다양한 활성을 갖는 유용미생물자원은 농업용, 축산용 및 식품용으로 활용이 가능함
- (2) 특히 발효식품 유래 항균활성을 갖는 유산균 자원의 경우, 항생제 대체제로 상당히 각광을 받고 있으며, 본 연구 사업에서 확보된 우수 유산균자원을 기업에 기술 이전하였음
- (3) 또한, 섬유소 발효용 및 발향 유산균 등은 축산용 조사료 발효제로서의 활용도가 우수하며, 본 연구에서 발굴된 *L. plantarum* 및 *B subtilis* 등은 조사료 발효제로서 기술이전하였음
- (4) 또한 다양한 항균활성을 갖는 유산균이 분비하는 생리활성소재는 천연 식품보존제로서의 활용이 가능함

5. 발효미생물 분리 및 동정, 동정 분리된 미생물 특허 및 보존

가. 전통 발효 식품의 원인균인 발효 미생물의 Microflora를 확인함으로써 전통 식품의 과학적 기반을 마련 할 수 있는 기반을 제공함.

나. 전통 발효 식품의 Microflora중 다수를 차지하는 중요한 미생물을 분리 하며 또한 분리된 미생물의 안전한 보존을 통하여 전통 식품의 상품성을 증진 시킬 수 있을 것으로 예상됨.

다. 전통 발효 식품으로부터 분리된 우수한 발효 미생물의 활용을 통하여 전통 장류의 품질 안정성을 유지 할 수 있도록 함.

라. 전통고추장의 Microflora에 관한 SCI급 논문을 발표하여 국내 전통식품의 과학적 기반을 마련함.

마. 전통고추장으로부터 미생물 신종을 분리하여 신종 등록을 위한 실험을 진행 중임.

6. 박테리오파지를 이용한 유해균의 제어

가. 논문

- (1) Shin et al., 2011. Prevalence of *Bacillus cereus* bacteriophages in fermented foods, and characterization of phage JBP901. *Res Microbiol.* 162: 791-797 (SCI)
- (2) Bandara et al., 2011. Bacteriophage BCP1-1 and BCP8-2 require divalent cations for efficient control of *Bacillus cereus* in fermented food. *Food Microbiol.* Submitted (SCI)

나. 유전자원 등록(1건)

- (1) Genome sequence of BCP8-2, GenBank Access Number: JF838194

다. 특허출원(1건)

- (1) 박테리오파지를 유효성분으로 함유하는 바실러스 세레우스 제어용 조성물(진행 중)

7. 무독성 발효 균주 선발 및 기술 이전에 의한 현장적용

무독성 *Bacillus subtilis* 균을 전통청국장 제조사, 발효미생물활용센터, 제과회사에 제공하여 청국장, 쿠키, 메주제조에 활용할 수 있으며, 무독성 *Aspergillus oryzae/Aspergillus sojae* 균을 발효미생물활용센터에 제공함으로써 간장, 된장, 고추장, 장아찌 제조에 aflatoxin을 생산하지 않는 제품을 만들 수 있다. 또한 저 biogenic amine 생산 *Bacillus subtilis, Aspergillus oryzae/Aspergillus sojae* 균을 발효미생물활용센터에 제공함으로써 biogenic-free 장류 생산에 사용하는 것이 가능하다.

이 연구를 통해 선발한 균주를 이용하는 경우 이의 실증을 위한 제조를 통해 biogenic amine이 저감화된 장류를 얻는 것이 가능할 것으로 판단하고 적어도 장류의 위생적인 관점에서 문제시되었던 *B. cereus* 저감화와 biogenic amine 저감화를 동시에 해결할 수 있는 성과였다고 판단한다. 이 균주들은 순창 발효미생물활용센터를 통해 전국 장류 업체에 균주를 공급해 줄 수 있다.

## SUMMARY

### I. Title of Research

Development of Advanced Fermented Soybean Products with Excellence Quality and Functions

### II. The purpose and necessity for research and development

#### 1. Scientific Side

As the fitness functionality of fermented foods like gojugang, kimchi has been known across the world, their functionalities and superiorities has been acknowledged enough to be included among World Health Top 6 Foods. But in spite of this validation of superiority and functionality, the scale of export(\$300) is so poor due to the insufficiency of scientific process and safety in manufacturing process, and the shortage of comprehensive study on the fitness functionality. In addition, it is very important matter that nontoxic factors of *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*/*A. sojae*, and reduced *Bacillus* of biogenic amine should be separated for high quality goods in the viewpoint of food safety relating with traditional Jang brand.

Meanwhile, as Biogenic amine affects physiological medicine effect on human, reducing it to the minimum is vital in terms of the hygiene Jang brand. According to the survey results of biogenic amine content in Korean food released from Busan KFDA, doenjang contains it maximally followed by salted and fermented types of anchovies, sand lance, salted fish, ganjang, kimchi in order. At this point, the reduction of biogenic amine in Jang types are essential factors for national health. Therefore the reduction methods are needed to be developed.

○ The Content of biogenic amines which is distributed at market

○ 시중 유통되는 장류중의 biogenic amines 함량

Samples	N <sup>1)</sup>	Biogenic amines (mg/kg)										
		PUT <sup>2)</sup>	CAD	SPD	SPM	TRY	HIS	TYR	PHE	SER	NOR	DOP
Doenjang (traditional type)	6	99.6-1453.7 <sup>3)</sup> (462.6)	4.6-65.4 (23.5)	8.2-23.4 (15.6)	1.5-8.4 (3.8)	9.2-234.1 (105.5)	260.1-952.0 (569.4)	284.7-1430.7 (669.5)	24.5-529.2 (244.7)	2.0-48.2 (26.8)	ND <sup>4)</sup>	ND-55.9 (32.0)
Doenjang (modern type)	8	9.9-180.6 (46.4)	0.3-7.7 (3.2)	4.2-14.9 (7.4)	ND-10.2 (2.4)	6.1-43.5 (22.4)	1.5-210.7 (83.6)	3.4-295.5 (133.0)	ND-13.0 (6.5)	3.0-21.1 (6.7)	ND	ND-8.5 (1.5)
Miso	5	16.4-23.2 (19.8)	2.8-3.2 (3.0)	9.5-21.9 (15.7)	1.3-3.1 (2.2)	21.6-23.7 (22.6)	0.8-1.1 (0.9)	2.0-95.3 (48.6)	0.7-8.1 (4.4)	6.6-7.1 (6.8)	ND	ND-17.6 (8.8)
Chungkukjang	7	4.7-121.3 (26.4)	2.1-20.2 (9.7)	39.6-59.2 (52.0)	7.1-14.7 (10.7)	6.7-236.4 (69.9)	1.3-54.3 (10.1)	0.7-483.1 (133.8)	ND-40.8 (22.0)	5.2-27.9 (13.1)	ND	7.1-14.7 (10.7)
Chungkukjang powder	5	4.8-20.6 (10.2)	4.5-30.0 (12.1)	34.2-67.7 (54.6)	5.9-23.1 (15.5)	15.7-70.9 (35.0)	ND-2.0 (1.0)	5.9-162.9 (68.1)	8.4-25.2 (17.0)	3.2-9.8 (6.3)	ND	ND-16.5 (4.9)
Churjang	4	9.2-11.7 (10.7)	1.7-6.6 (3.3)	1.4-12.8 (6.1)	ND-2.9 (1.1)	13.3-19.9 (16.6)	11.6-22.4 (16.8)	29.7-54.6 (44.3)	2.2-11.8 (7.0)	ND-12.4 (6.3)	ND	ND
Soy sauce (traditional type)	6	19.8-1007.5 (376.9)	1.8-32.3 (16.1)	2.3-53.1 (24.5)	0.2-16.1 (6.6)	ND-31.2 (12.1)	3.9-398.8 (225.9)	26.8-485.9 (241.6)	1.5-23.7 (13.5)	4.3-14.8 (9.8)	ND	1.1-57.2 (21.4)
Soy sauce (modern type)	5	2.5-184.6 (56.8)	0.7-20.0 (6.1)	1.5-13.0 (6.3)	ND-2.3 (1.0)	30.7-45.8 (36.6)	13.8-229.8 (129.8)	81.6-794.3 (594.5)	3.5-121.6 (40.8)	1.1-8.0 (3.3)	ND	ND-4.3 (0.9)
Kochujang	5	2.5-3.2 (2.9)	ND-1.1 (0.5)	1.6-3.4 (2.5)	1.4-1.8 (1.6)	17.9-36.6 (27.2)	0.6-1.3 (1.0)	2.1-4.9 (3.5)	0.7-9.1 (4.9)	ND-2.9 (1.5)	ND	ND

<sup>1)</sup>Number of samples examined.

<sup>2)</sup>PUT (putrescine), CAD (cadaverine), SPD (spermidine), SPM (spermine), TRY (tryptamine), HIS (histamine), TYR (tyramine), PHE (2-phenylethylamine), SER (serotonin), NOR (noradrenaline), DOP (dopamine).

<sup>3)</sup>Minimum-maximum (mean value).

<sup>4)</sup>Not detected.

출처: 조태용 등, 한국식품과학회지 (2006년)

In case of factory Jang brand Industry that occupies 90% at market, the mass production system combined with Japanese fermented technology(the usage of *Aspergillus oryzae* single bacillus or the mixed other *Bacillus* one)is different from Korean unique fermentation Tech(the *Bacillus* works as the main zymogen, and various microbes such as *Aspergillus oryzae* are fermented with a multiple way) It seems that the development of mass production system is needed for the purpose of international goods production.

2. Economical side

According to Industry correlation analysis using national industry correlation index by the Bank of Korea, if the last demand of Jang brand industry increased to 10 billions(₩), the total production of Industry increased to 2240 millions(₩) with the rising up of its added value of 730 millions(₩) including 11.6 % growth of employment. Therefore there have been huge business effect.

Estimating the increase effect of vegetable localization rate of 98, 100 percents and beans localization rate of 10, 20 percents in the materials of Jang brand industry with the use of national industry correlation index, production induction rate increased to 0.57% as well as the increased 2.47% of added value induction rate.

### III. The result of Research and Development

#### 1. Study on the Safety of fermented foods(Development of HACCP Manual for Soybean Products & Expansion of Corporate HACCP Certification)

In order to secure the safety of traditional Soybean Products there were the works relating to hazard analyses of *gochujang*, *doenjang*, *cheonggukgang*, and CCP drawing up, Manual Making up. This was for the purpose of development of process manual regarding *gochujang*, *deonjang*, which meets the standards of FDA and Traditional Quality Certification. As the result, the general model of *gochujang*, HACCP Plane was established with the sterilization temperature of 85~100°C, and sterilization time 30~35 for the management standard in the sterilizing process. And operator should keep the establishment every shift. For the process of metal detection, there was checking the sensitivity of metal detection instrument every 30 minute, that is before and after works including the period of course.

In case of general model HACCP Plane of *deonjang*, the process of stone separator and cleaning were monitored by workers before and after the works a time in operation as well as in the course with the setting-up 6 RPM of cleaning speed in management standard. Sterilization Process was ordered to ethyl alcohol of 3%. Metal detection Process was checked before and after the works, and every 30 mins in operation for sensitivity of metal detection instrument.

The CCP of cheonggukjang manufacturing process was manifested in the course of picking up stone(P) and fermentation process(B), metal detection process(P). The general model HACCP Plane was monitored by workers before and after the works as well as 1 time in operation with 6RPM setting-up of cleaning speed. Fermentation Process was established 44 hours for fermentation time. Metal detecting process was directed to check up the sensitivity of metal detecting instrument in the course of the operation with every 30 mins. and before and after it.

The above outcome is expected to be utilized as manual through a participating enterprise. Through enhancing the process and manufacturing circumstance of every participant company, insects, metal foreign substance that were the main causes of claims diminished sharply. Besides, there was improvement of the safety in regard of harmful microbe and foreign substances. Apart from the mentioned merits, The Jang brand manufacturing firm of Jangbonga traditional foods acquired HACCP application business among participating companies. And Sunchang Jang brand is in the midst of applying for HACCP Certification.

To develop a new functional product, firstly wild plants(butterbur, water parsley, Angelica Utilis Makino, mugwort, Pimpinella brachycarpa, Chwinamul, Kale) was

manufactured, and then analysed for the fermentation. The results of the tests for protease activity and physiological activation showed the increase. In the analysed antithrombotic outcome effect, Angelica Utilis Makino, water parsley and mugwort appeared with high grades. The outcome of sensory test, the overall preference was that fermented extracts of mugwort  $4.4\pm 0.5$ , water parsley  $4.2\pm 1.5$ , butterbur  $3.7\pm 1.2$ , Angelica  $3.2\pm 1.0$ , brachycarpa  $3.0\pm 0.9$ , Chwinamul  $2.4\pm 0.9$ , Kale  $2.4\pm 0.9$  in the order. The fermented extracts of mugwort and water parsley were significantly higher than the other extracts in the preferences.

The recipe has established by making bibimbap sauce, fried pork sauce, soy chicken sauce, soy dressing from making the paste sauce using the fermented broth.

Fermented black soy product has made using by representative microzyme, *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantanum* to develop export strategic product, and this increased the excellent soy product consumption, this lead to develop the soy product which is highly regarded upon economic side and functionality to make the customers access easier to the product which not only health-value but also convenience was added. It was established how to make the black soy snack by fermant, and technology has been transmit to the company-*Hamok traditional food* so traditional food has been modernized, and convenient, and secured the competitiveness than the various soy product of Japan.

## **2. Metabolic analysis of advanced fermented soyfoods and determination of their functional properties**

To improve the nuritional and functional qualities of fermented soy foods including meju, cheonggukjang, and kochujang, they were prepared using traditional methods and/or selected microorganism(s) and their metabolites produced during fermentation were analyzed using LC-MS. Various metabolites, including amino acids, small peptides, nucleosides, urea cycle intermediates, and organic acids in meju, amino acids, small peptides, isoflavones, soyasaponins, and lypos in cheonggukjang, and pigments in kochujang, which are responsible for the unique taste and nutritional and functional quality of fermented soy foods, were clearly altered by increasing the fermentation period. These metabolites, which were positively related to the sensory quality of fermented soy foods, can be used as fermentation biomarkers for the production of fermented soy foods. In particular, meju fermentation metabolic pathway was provided in this project. Therefore, our results indicate that monitoring the changes in metabolites during fermentation might be important for producing fermented soy foods with good nutritional and sensory quality.

In addition, it was observed that isoflavone-rich cheonggukjang (BL67) extract had the effects of anti-obestiy and anti-diabetes. Especially, PGA had strong anti-diabetes effect. Anti-inflammation effect was observed from PGA of BL67 cheonggukjang and pigments from kochujang. Additionally, we established an ischemic animal model as an brain blood circulation obstacle model. Meju fermented by *B. subtilis* and *A. oryzae* and traditional meju samples were not shown neuroprotective effect in the hippocampal CA1 region after

ischemia/reperfusion, but the positive effect was observed from cheonggukjang fermented by BL67.

### 3. Development of Advanced Technology for Production of Fermented Soybean Products

- Development of convenient food using fermented soybean products
  - Development of beverage and cookies using *cheonggukjang*
  - Development of preparation techniques for block- and stew-type products using fermented soybean products
  - Development of convenient cup-type products using *doenjang* and *cheonggukjang*
- Quality standardization for preparation of fermented soybean products
  - Optimization of solid-fermentation condition for the starter by statistical experimental method
  - Establishment of mass production techniques, isolation and concentration system of starter in solid-fermenter
  - Establishment of application methods for production of hygienic *meju*
- Development of production techniques applied with standardization techniques for fermented soybean products
  - Establishment of mass production methods applied with standardization techniques for traditional fermented soybean products
  - Production of fermented soybean products by using superior microbial strain
  - Development of enzyme-based control system for soybean fermentation
- Development of new fermented foods
  - Development of fermented soybean products-based sauces for export (gochujang, deonjang, cheonggukjang)
  - Development of functional fermented soybean products using superior strain
  - Development of fermented soybean products-based capsule products added with functional ingredients

### 4. Development of industrial application of food fermented microorganisms

We were isolated useful lactic acid bacteria(LAB), yeast and fungi from Korean tradition fermented food. Among the isolated LAB, Useful lactic acid bacteria having antibacterial activity against *Bacillus cereus* KCTC 3624 was isolated from *Jeotgal* using a MRS selective plate. Strain SY99 finally selected was identified as *Lactobacillus plantarum* based on sugar fermentation pattern test using API50 CHLsystem. The 16S rDNA sequence of strain SY99 showed 99% identity to those of reference strain of *L. plantarum*. And also Bacteriocin-producing lactic acid bacterium having antagonistic activity against *Bacillus cereus*, was isolated from *Kimchi*. The selected strain was identified as



*Lactococcus lactis* by the Bergey's manual and 16S rDNA analysis, and named as *L. lactis* ET45. The bacteriocin was stable in the pH range 3.0-11.0. The bacteriocin was active over a wide temperature range from 40°C to 121°C. The molecular weight of bacteriocin was estimated to be about 4.5 kDa by tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (TSDS-PAGE).

A new zymogram method, silver-stained fibrin zymography, for separation of protease bands and activity detection using a single substrate gel, was developed. The method takes advantage of the nanoscale sensitivity of both zymography and silver staining. After SDS-PAGE in a gel containing fibrin, the gel was incubated in enzyme reaction buffer and the zymogram was silver-stained. Bands with protease activity were stained with silver in clear areas where the protein substrate had been degraded. The molecular sizes of proteases were accurately determined.

## **5. Identification and isolation of food fermented microorganisms and their deposit of patent and preservation**

This research aim to the availability of microorganisms on the technology development as a traditional fermented food availability for microbial separation and microflora map for conducting research and traditional fermented source of microorganisms in the long run safely preserved by the traditional fermented food of the efficient maintenance of goal of each other, and each is useful conserved microbial fermentation for the efficient use of the system of permanent preservation of microorganisms for the development of information management systems.

As a functional food in Korea for a long time traditional fermented soybean meals, hot pepper and Cheonggukjang and these traditional fermented foods and the health of the world known as functional despite the fact that the manufacturing process for the scientific, safety, health, and functional strengthening the comprehensive study lack of fermented foods, especially microorganisms play an important role in research on the place many years and remained in the study state that the individual affects of the traditional fermentation process that unidentified yet to change of microorganisms.

In case of commercial *gochujang*, the viable cell numbers of total bacteria, halophilic bacteria, and thermophilic bacteria were in the range of 4~6 log CFU/g, and yeasts were not detected. Lactic acid bacteria and fungi were not detected in both types of *gochujang* after aging.

The sensory evaluation of both types of *gochujang* showed that color, flavor, savory, pungency, sweet, salty, and overall preference scores were higher in commercial *gochujang* than in traditional *gochujang*, but the sensory evaluation scores were not so different between both types of *gochujang*.

Five genera and 17 species of microorganisms were identified in commercial *gochujang*, of which 69% was *B. subtilis* subsp. *subtilis*, 10% was *B. licheniformis*, 9% was *B.*

*velezensis*, and 4% was *B. amyloliquefaciens*. In halophilic condition, *Oceanobacillus* spp. such as *O. iheyensis*, *O. oncorhynchi*, and *O. soya* were newly found.

From these results, It is found that *B. velezensis* as well as *B. licheniformis* and *B. subtilis* subsp. *subtilis* were major bacteria affecting the fermentation of *gochujang*. *B. subtilis* subsp. *subtilis* was major bacteria in commercial *gochujang*, whereas *B. velezensis*, *B. licheniformis*, and *B. subtilis* subsp. *subtilis* were major bacteria in traditional *gochujang* with similar distribution rate each other. There is no notable correlation between the microflora and taste of *gochujang*.

Many studies on *gochujang* reported that *B. licheniformis* and *B. subtilis* subsp. *subtilis* were major microorganisms especially in commercial *gochujang*, and these bacteria could affect the taste and quality of *gochujang*.

In this study, It was revealed that *B. velezensis* was a major microorganism in *gochujang*, and it is expected that these results can be used for the manufacturing high quality *gochujang* and various Korea traditional fermentation foods.

## 6. Use of Bacteriophage to Control Harmful Microorganisms

*Bacillus cereus* is widely distributed in the environment and responsible for foodborne illnesses, causing diarrhea and vomiting. In this study, prevalence of *B. cereus* bacteriophages in Korean fermented food, jangryu, was studied using 6 reference strains. In a total of 47 samples, 19 (40.4%) contained more than one kind of *B. cereus* bacteriophages. Fourteen phages were purified and determined for host lysis profile. All of them were specific for *B. cereus* group strains not able to lyse other tested gram positive and gram negative strains including *B. subtilis*. TEM, restriction enzyme digestion pattern analysis and one step growth study found that they are a member of *Myoviridae*. Furthermore, bacterial lysis studies revealed that isolated phages could be used to control the growth of *B. cereus* in various growth conditions. Complete genome sequencing and bioinformatic analysis showed that BCP901 and BCP8-2 do not contain any harmful genes such as allergen-, virulence- or toxin-related genes. In addition, the usefulness of bacteriophages to eradicate *B. cereus* from fermented food was investigated. Purified phages were used to inhibit *B. cereus* growth in a model fermented food system Cheonggukjang (fast-fermented soybean product). BCP1-1 and BCP8-2 were able to eradicate *B. cereus* from the food effectively only if divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , or  $\text{Mn}^{2+}$ ) were added in the medium. Further studies reveal that divalent cations are essential for phage adsorption while mono valent cation ( $\text{Na}^+$ ) is for post adsorption phase of phage infection. Taken together, our finding simply that phage could be an ideal anti-bacterial agent in fermented food (requiring presence of beneficial microflora) and during phage application, optimization of phage reaction conditions is critical for success of phage biocontrol. This is the first report of studying prevalence of bacteriophages in fermented foods and our study suggest that the fermented jangryu is an useful source for *B. cereus* phage isolation and

*B. cereus* bacteriophages could provide an additional tool to tackle the problems associated with *B. cereus* contamination.

## **7. Isolation of *Bacillus licheniformis* Producing Antimicrobial Agents against *Bacillus cereus* and Its Properties**

Fermented soybean products are essential food stuff in Korean cooking. Sunchang county is well-known Gochujang-producing district and has an industrial complex for the production of traditional soybean products. As the production is mainly relied on the Master's skilled experiences, concepts or manuals for the microbial safety were not established during the traditional manufacturing processes. We have focused on the screening of microbes for the production of fermented soybean products with premium quality in this region. Among microbes, *Bacillus* and *Aspergillus* species are major microbes that involved in the fermentation of soybean and are under consideration on the safety problems. In order to avoid food poisoning caused by toxins of *Bacillus cereus* in Cheongkookjang, we have designed a screening strategy using PCR and cultural properties of *B. cereus*. Eighty colonies from 30 collections of traditionally prepared Cheongkookjang had first been screened with *B. cereus* selective media and then excluded isolates harboring toxin genes responsible for vomiting and diarrhoea by PCR. As a result, 10 types of morphologically different isolates with no toxin genes were separated and confirmed as *B. licheniforminis* and *B. subtilis* when analyzed by the sequence analysis of 16S rRNA genes. Among them, 3 strains with high production of polyglutamate were suitable for the production of Cheongkookjang. This screening procedure can also be applicable to the high throughput screening of safe *Bacillus* strains.

Identification of virulent *B. cereus* strains was examined by PCR using primers specific for the detection of *plcR-papR*, which encode regulatory proteins controlling the transcription of virulence factors in *B. cereus*. Total 96 strains of *B. cereus* that carried at least one of diarrheal toxin genes including *hblACD*, *nheABC*, *cytK* showed all positive PCR products, while other 48 *Bacillus* strains that lacked the toxin genes were *plcR-papR*-negative. This PCR method targeting the *plcR-papR* genes appears to be simple and effective in identifying the enterotoxin genes-harboring *B. cereus* strains. The PCR primers were designed from the internal sequences of *plcR-papR* genes, which is transcriptional regulators in expression of diarrheal enterotoxins, and from cereulide synthetase A and B. Competition among microbial species to get nutrients for survival is general phenomenon in nature. We found that fermented soybean sauces collected from some regions showed low levels of *B. cereus* cell number. In order to manufacture *Bacillus cereus*-free fermented soybean products, an antimicrobial agent-producing isolate against *B. cereus* was obtained from 150 traditionally fermented soybean products. Some strains isolated from these sauces strongly inhibited the growth of *B. cereus* in the mixed culture. After stepwise isolation procedures, one strain named as SCK 121057 inhibited the growth of 12 different strains of *B.cereus*. This strain was identified as *B. icheniformis* by 16S

rRNA gene analysis and caused the collapse of cell shape of *B. cereus* during co-culture when judged from scanning electron microscope. The *B. licheniformis* isolate began to produce the antimicrobial agent after 48h of incubation. The agent was non-proteinaceous and insensitive to heat, long term storage and protease K. Electron microscopic observation indicated that the agent attacked the membrane of *B. cereus*, leaving the ghost cell. The isolate inhibited growth of *B. subtilis*, *L. brevis* and various types of pathogenic strains including *E. coli*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, and *A. parasiticus* as well as *B. cereus*. After inoculation of two strains, *B. licheniformis* SCK121057 and *B. cereus* JBE 008, in the ratio of 10 to 1, respectively, on the surface of cooked soybeans, the cell numbers of JBE008 were reduced from  $4 \times 10^5$  to 200 CFU/sample after 30 days of incubation, of which cell numbers satisfied the KFDA's safety guideline.. The isolates were further screened for the production of low levels of tryptamine and histamine. For fungal safety, nontoxic *Aspergillus* strains were isolated from traditional soybean sauces by using coconut milk agar medium, on which the colonies that produced aflatoxin emitted fluorescence when exposed with UV light.

### **Isolation and identification of Biogenic amine-degrading microbes**

The ability of microorganisms to decarboxylate amino acids is highly variable, often being strain specific, not being specific. The detection of bacteria possessing amino acid decarboxylase activity is important to estimate the likelihood that foods contain biogenic amines and to prevent their accumulation in food products

Assessment of amino acid decarboxylase activity was conducted using plate agar containing 1% histidine and tyrosine as biogenic amine precursor. The broths containing bromocresol purple as indicator of biogenic amine formation were inoculated with selected strains isolated from fermented soybean products and colonies showing purple colours were discarded from selection because of their ability of biogenic amine production. The current method had the potential to be used for screening for immediate producers of amino acid decarboxylase.

Selected strains(106 strains) were further screened to evaluate the degrading ability of biogenic amines using minimal media with histamine and tyramine as only carbon and energy sources. Among 67 strains grown in minimal agar media, 26 strains with high growth were selected and further examined the antibacterial capacity against *B. cereus*. The biogenic amine-degrading ability of the finally selected strain was evaluated by RP-HPLC in culture media. Although at different extent, all strains were able to degrade histamine and tyramine, which indicated that the primary selection method evaluating the growth in the minimal media was effective.

The greatest biogenic amine-degrading ability was exhibited by 6 strains belonging to the *B. licheniformis*, and all of them were able to simultaneously degrade two types of biogenic amines. Our results proved the potential of fermented soybean products-associated *B. licheniformis* as a promising strategy to reduce biogenic amine in fermented soybean products.

## C O N T E N T S

### **Study on the Safety of fermented foods(Development of HACCP Manual for Soybean Products & Expansion of Corporate HACCP Certification)**

Chapter 1. Overview of Research .....	37
Chapter 2. Current Status of Research .....	39
Chapter 3. Results and Discussion .....	41
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	183
Chapter 5. Application of Research .....	184
Chapter 6. References .....	186

### **Metabolic analysis of advanced fermented soyfoods and determination of their functional properties**

Chapter 1. Overview of Research .....	191
Chapter 2. Current Status of Research .....	193
Chapter 3. Results and Discussion .....	195
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	227
Chapter 5. Application of Research .....	231
Chapter 6. Information on Foreign Science and Technology .....	232
Chapter 7. References .....	233

### **Development of Advanced Technology for Production of Fermented Soybean Products**

Chapter 1. Overview of Research .....	237
Chapter 2. Current Status of Research .....	238
Chapter 3. Results and Discussion .....	241
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	363

Chapter 5. Application of Research .....	366
Chapter 6. References .....	367

### **Development of industrial application of food fermented microorganisms**

Chapter 1. Overview of Research .....	373
Chapter 2. Current Status of Research .....	377
Chapter 3. Results and Discussion .....	380
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	463
Chapter 5. Application of Research .....	464
Chapter 6. Information on Foreign Science and Technology .....	465
Chapter 7. References .....	468

### **Identification and isolation of food fermented microorganisms and their deposit of patent and preservation**

Chapter 1. Overview of Research .....	471
Chapter 2. Current Status of Research .....	473
Chapter 3. Results and Discussion .....	474
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	576
Chapter 5. Application of Research .....	577

### **Use of Bacteriophage to Control Harmful Microorganisms**

Chapter 1. Overview of Research .....	581
Chapter 2. Current Status of Research .....	586
Chapter 3. Results and Discussion .....	590
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	610
Chapter 5. Application of Research .....	611
Chapter 6. References .....	613

**Isolation of *Bacillus licheniformis* Producing Antimicrobial Agents against *Bacillus cereus* and Its Properties**

Chapter 1. Overview of Research .....	617
Chapter 2. Current Status of Research .....	618
Chapter 3. Results and Discussion .....	619
Chapter 4. Achievement of the Research Objectives .....	677
Chapter 5. Application of Research .....	678
Chapter 6. Information on Foreign Science and Technology .....	679
Chapter 7. References .....	683

## 목 차

### 장류식품에 대한 HACCP 매뉴얼 개발 및 기업체 HACCP 인증확대

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	37
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	39
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	41
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	183
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	184
제 6 장 참고문헌 .....	186

### 우수발효미생물 대사체 및 전통발효식품의 기능성 연구

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	191
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	193
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	195
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	227
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	231
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	232
제 7 장 참고문헌 .....	233

### 교부가가치 장류생산 기술연구

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	237
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	238
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	241
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	363
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	366
제 6 장 참고문헌 .....	367



## 유용미생물의 산업적 활용기술 개발

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	373
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	377
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	380
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	463
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	464
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	465
제 7 장 참고문헌 .....	468

## 발효미생물 분리 및 동정, 동정 분리된 미생물 특허 및 보존

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	471
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	473
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	474
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	576
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	577

## 박테리오파지를 이용한 유해균의 제어

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	581
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	586
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	590
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	610
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	611
제 6 장 참고문헌 .....	613

## 무독성 발효 균주 선발 및 기술이전에 의한 현장적용

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	617
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	618
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	619
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	677
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	678
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	679
제 7 장 참고문헌 .....	683



# 제1세부 : 장류 식품에 대한 HACCP 메뉴얼 개발 및 기업체 HACCP 인증 확대

주관연구기관명 : 순창군장류식품사업소  
주관연구책임자 : 한 금 수  
세부연구책임자 : 정 도 연(세부1)  
참 여 기 업 : (주)기폰샘  
협동연구책임자 : 농업회사법인 순창장류(주)  
협동연구기관명 : 순창문옥례식품  
협동연구책임자 : 순창진상전통식품  
협동연구기관명 : 순창장본가전통식품  
협동연구기관명 : 순창마을



# 제1장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발의 목적

장류의 안전성 확보를 위하여 영세한 중·소규모 업체에 맞는 고추장, 된장에 대한 공정 매뉴얼 개발 및 기업체 기술이전과 Lab 규모에서 개발된 다양한 기능성 신제품 및 공정기술에 대한 기업체 기술이전, 해외시장 진출을 위한 수출전략상품 개발을 목적으로 한다.

## 2절 연구개발의 필요성

장류에 대한 소비자의 인식은 오랜 기간 발효를 거친 몸에 좋은 식품이란 인식이 강하며, 웰빙 트렌드와 함께 최근 출시된 냉장 장류는 맛과 건강을 쫓는 소비자들의 큰 호응을 얻고 있다. 2005년 총 6,700억원의 시장규모를 나타냈으며, 고추장이 2,530억원으로 가장 비중이 크고, 된장 2,213억원(청국장 280억원 포함), 간장 1,943억을 차지하였음. 특히 청국장은 전년대비 24.6%의 높은 신장률을 나타내고 있다. 또한 장류시장은 생산 출하액 규모면에서 꾸준히 성장하고 있으며, 2002~2005년의 기간 동안에는 약 10%에 달하는 성장세를 기록하고 있다. 생산량과 출하량도 지속적인 증가세를 보이고 있으며, 2005년의 출하규모는 약 6,700억 원으로 나타났다. 장류 시장의 대부분을 점유하고 있는 대규모 업체들로 인해, 향후 장류제품은 가격경쟁보다는 장류제품의 차별화, 품질고급화, 다양화 추세가 지속될 것으로 보인다. 그러나 발효식품의 건강기능성이 세계적으로 널리 알려지면서 2006년에는 'Health' 지에 세계건강 6대 식품에 포함될 만큼 그 기능성과 우수성을 인정받고 있지만 이런 우수성과 기능성 입증에도 불구하고 제조공정에 대한 과학화, 안전성, 건강기능성에 대한 종합적인 연구 미흡으로 인해 수출규모(300억 규모)가 열악한 실정이다.

한편 국민식생활의 기본식품인 장류의 경우 대부분 규모의 영세성 및 안전관리능력의 결여 등으로 미생물 독소 잔류 등 위해 개연성이 높을 뿐만 아니라, 관리능력 및 관리역량의 부족으로 품질의 균질성 보장이 어려운 실정이다. 또한 식품위생법의 식품기준 및 규격개정 사항의 장류미생물 기준규격 개정(제2005-210호)에 의하면 장류식품에서 위해미생물인 *Bacillus cereus* 균의 경우  $10^4$  CFU/g로 제한하고 있다. 위해미생물 이외에도 Biogenic amines에 대한 위해가능성들이 제시되고 있어, 향후 전통장류에서도 위해인자로 관리해야할 필요성이 대두되고 있으며, 이를 위한 다양한 모니터링 조사들이 필요한 실정이다. 현행법대로라면 장류식품에서 위해미생물수가 그 일정 수 이상(가능성 있음)으로 나온다는 것이 알려지면(물론 현재까지 안전에 문제가 없다는 것이 수천년 동안 먹어온 결과 증명되었지만), 전체적으로 전통식품에 대한 안전에 문제가 있는 것으로 소비자(소비자 단체)에게 알려지게 되어 전통산업 기반이 붕괴되어 산업적으로 큰 타격을 받을 것으로 예측/ 장류 업체에서 생산되는 장류의 안전성 제고와 품질향상을 통한 국민보건 향상을 도모함과 동시에 관련 업체에 표준화된 model을 제공하여 기업체에 적용하고자 한다.

HACCP 시스템은 다른 분야에서 사용해오고 있던 risk관리 기법을 식품분야에서 도입하여 발전시킨 제도로 1993년 FAO/WHO의 합동 국제 식품 국제규격위원회가 HACCP 적용을 위한

지침을 제시하면서 전 세계적으로 도입되고 있는 새로운 식품안전관리 도구이다. 우리나라에서는 1995년 12월 식품위생법 제 32조 2의 조항을 신설하여 식품에 HACCP 제도를 도입하게 되었다. HACCP 시스템은 자기검증방식의 공정관리를 통하여 식품의 안전성을 확보하고, 완전품 사후 검사를 통한 기존 품질관리에서 초래되는 실패비용을 절감할 수 있는 예방적 관리를 가능케 하여 경영 효율을 향상시킬 수 있다. 이러한 특면에서 HACCP 제도는 나름대로 체계적인 품질관리 시스템을 갖춘 대기업보다도 시설을 개수, 보완할 자금여력이 부족하고 경쟁력 있는 인력을 갖추지 못한 영세한 중·소규모 업체에서 더 필요한 제도이다. HACCP 시스템이라는 관리 도구를 가지게 되면 계획적, 체계적, 지속적 관리가 가능하여 시간이 흐를수록 점차 작업자의 의식과 행동이 위생적으로 바뀌게 되어 안전하고 품질이 좋은 식품을 생산할 수 있게 되는 것이다. 이러한 HACCP 시스템을 장류에 도입하여 장류제품의 생산 공정시스템 확립을 통해 공정의 표준화 및 제품의 표준화를 유도하고 이를 통해 생산된 시제품에 대한 Market Test를 통해 도출되는 문제점을 Feed-back하여 최종 시장 유통이 가능할 수 있도록 한다.

현재 장류의 수출 동향으로 보아 앞으로도 증가 추세를 유지할 것으로 전망된다. 과거에는 장류가 현지 교민들 위주로 소비되는 경향이 강했으나, 발효식품에 대한 효능이 높아지면서 최근에는 해외 현지인의 소비도 늘어날 전망이다. 또한 한류 및 퓨전화 등의 진전에 따라 다른 소스와 혼합된 형태의 장류의 소비가 증가하고 있으며, 세계 각국의 입맛에 맞도록 장류의 맛을 개선한다면 수출은 더욱 늘어날 가능성이 있다. 단, 지속적인 홍보 및 연구개발, 기능성, 안전성(품질고급화), 해외 현지인의 입맛에 맞는 제품개발 등의 여부와 정도에 따라 그 성장 폭과 수명이 달라질 것임을 감안한다면, 향후 장류 수출시장에 대한 장기적인 계획과 노력이 필요하다.

그러므로 본 연구과제에서는 장류제조업소의 HACCP 매뉴얼을 개발하여 이전하고, 전략적 수출제품 생산 및 기능성물질첨가 장류제품을 개발하여 장류의 안전성, 기능성을 확대하고 이에 따른 수출 증대의 효과를 꾀하고자 하였다.

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내 연구 현황

장류에 관련된 안전성 측면에 대한 연구는 한국식품과학회에서 발표된 aflatoxin 연구는 1969년 이래 24편, 한국식품위생안전성학회에는 3편이 발표되었으며 이중 장류식품 연구로는 대두 발효 식품 중에 aflatoxin유무 검색(1969), 한국식품 중 aflatoxin 검출(1977), 대두식품 중 aflatoxin 검색(1985), 미생물을 이용한 aflatoxin의 저감방법(2000), 장에서 쏙의 aflatoxin 제거 효과(1989), 장에서 발효기간 별 Aflatoxin 함량 변화(2000), 길항 미생물에 의한 aflatoxin 제어(2000), aflatoxin에 대한 *Bacillus* 대두 발효 추출액의 항돌연변이 효과(2005), 식품 중에 aflatoxin노출량 평가(2007)등이 있다.

*Bacillus cereus* enterotoxins(BC 장독소)에 관한 연구는 한국식품과학회에 발표된 9편, 한국식품위생학회 2편의 논문 중 장류에서 이들 독소의 분포나 모니터링에 관련한 연구는 없었다.

Biogenic amine에 관해 한국식품과학회지에 발표한 총 8편 중 시판 재래식 된장 중에 biogenic amines함량의 조사(2001), 국내 유통 발효식품 중 biogenic amines함량(2006), 청국장 중 biogenic amines 함량 및 생성원인(2007)등 3편의 장류 biogenic amines 연구가 있다. HACCP 생산공정 및 위생관리에 관한 연구로는 농산물 가공이용 및 안전성 향상 연구동향 분석(2004), 장류(고추장, 된장, 간장) 제조·가공업소 HACCP 적용 일반모델 개발(2006년), 장류제품의 HACCP 적용을 위한 시스템구축(2003), 청국장 제조과정 중의 위해요소 분석 및 HACCP 시스템에 관한 연구(2010), 식품안전성 강화를 위한 HACCP 시스템 도입방안에 대한 연구(2003), 장류 등 전통식품의 Codex 규격화 기술지원(2010) 등이 있다.

### 2절 국외 연구 현황

발효식품의 고급화 및 표준화 달성, 유용 미생물의 산업자원화 연구 및 신규 발효제품 개발 HACCP 생산공정 및 위생관리에 관한 연구로 Fermented soybean and production of Fermented soybean(일본 특허), Novel microorganism and use there of(미국 특허), HACCP process for soybean fermentation(일본 특허)가 있으며, 논문은 Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu(2008), Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification(2008) 등이 있다.

최근 2003-2007년까지 식품 중 기능성 물질의 분리 및 특성규명은 대부분 식품관련 저널(J. Agricultural and Food Chemistry (ACS, USA)나 암관련 학회(International J. Cancer)등에 보고되었으며 대부분 경우 분자수준에서 신호 전달 기전이나 생리적 작용 규명, 대규모 cohort를 통해 기능성 식품 섭취에 따른 질병 역학 조사가 이루어졌다.

외국의 경우, 종합적으로 판단할 때, aflatoxin, *Bacillus cereus* enterotoxins(BC 장독소), Biogenic amine 등 안전성에 대한 기초 분야의 연구는 매우 높은 기술 수준을 갖고 있으나 장



류 발효 분야는 일본을 제외하고는 관심이 낮은 분야로 판단됨. 그러나 분석 기술에 있어서는 aflatoxin의 경우 단일 클론항체를 이용한 ELISA 법과 정제 kit 개발, *B. cereus* toxin 검출을 위한 항체 개발, *in vivo* 또는 배양 세포에서 분석법들이 개발되어왔다.

발효식품의 안전성 중 최근 문제로 대두되고 있는 Biogenic amine의 경우 NCBI에 현재까지 보고된 논문은 약 280,000편으로 tyramine에 관한 것이 약 7,500편, histamine이 약 75,000편으로 tyramine보다 약 10배 더 많음. 분석 방법, 세포에서 기능 등 전 분야에 걸쳐있으며 대부분이 의학적인 연구들이다.

## 제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 1절 장류(고추장, 청국장, 된장)에 대한 HACCP Plan 개발을 위한 연구

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 재료

순창군에 위치하고 사업의 참여기업에 속한 기업체 4개를 선정하여, 고추장·된장·청국장 공정별 위해요소 분석 실험을 위한 재료로 장류의 원료부터 반제품, 완제품까지 단계별로 가능한 공정에서 무균적으로 시료를 채취하여 실험에 이용하였다.

##### 나. 위해요소 분석

###### (1) 실험방법

(가) 공정별로 채취한 장류의 원료, 반제품, 완제품에 대해서 식품공전 상에 명시된 식중독세균, 위생지표세균으로 *E. coli*, 장류 유통 중에 문제가 되는 효모 및 곰팡이 수, 이물에 대해 식품공전상의 방법에 준하여 실시하였다.

(나) HACCP범위와 목적 결정- HACCP 시스템권리의 대상이 될 제품의 지정, 공정의 시작과 끝, 관리가 이루어질 작업장의 범위를 결정하였다.

(다) 제품에 대한 기술-생산하는 제품에 대한 완전한 이해와 발생가능성이 있는 위해요소를 식별하기 위하여 HACCP의 목적인 안전한 고추장, 된장, 간장 및 청국장에 대해서 기술하였다.

(라) 공정도 작성과 현장 검증-위해요소 분석은 공정도의 공정 순서에 따라 하므로 공정의 단계를 신속히 파악할 수 있도록 HACCP 범위에 포함된 공정의 시작부터 종료까지의 흐름을 그림으로 작성하여 현장에서 검증하였다.

(마) 위해요소분석 실시 및 예방책 식별- 위해요소분석 작업표(Codex양식)에 모든 공정 단계를 순서대로 열거하고 HACCP팀과 연구자들이 각 단계별로 모든 잠재적인 생물학적, 화학적, 물리학적 위해요소를 도출시켜 관리해야 할 중대한 위해요소를 결정하고 특정단계에서 그 위해요소를 관리할 수 있는 예방책을 설정하였다.

(바) 중요관리점(Critical Control point: CCP)의 식별- 심대한 위해요소이고 예방책이 있는 공정을 CCP결정도를 사용하여 중요관리점으로 식별한 후 HACCP팀과 연구자들의 토의로 CCP를 결정하였다.

(사) CCP관리의 한계기준(Critical Limit: CL)설정 - 현재 사용하고 있는 관리 기준을 실험과 검사로 확인하고 경제적 연건 등을 고려하여 장류제품의 안전을 위한 절대적 한계치로 CL을 설정하여 HACCP 계획서에 포함시켰다.

(아) 각 CCP의 모니터링 시스템체계 수립- 중요관리점에서 한계기준이 준수되고 있는지 보기 위해 즉 장류의 안전한 생산을 위해 절대적인 조건이 충족되고 있는지를 관찰, 측정, 감시하기 위하여 가장 효율적인 절차를 확립하여 HACCP계획서를 작성하였다.

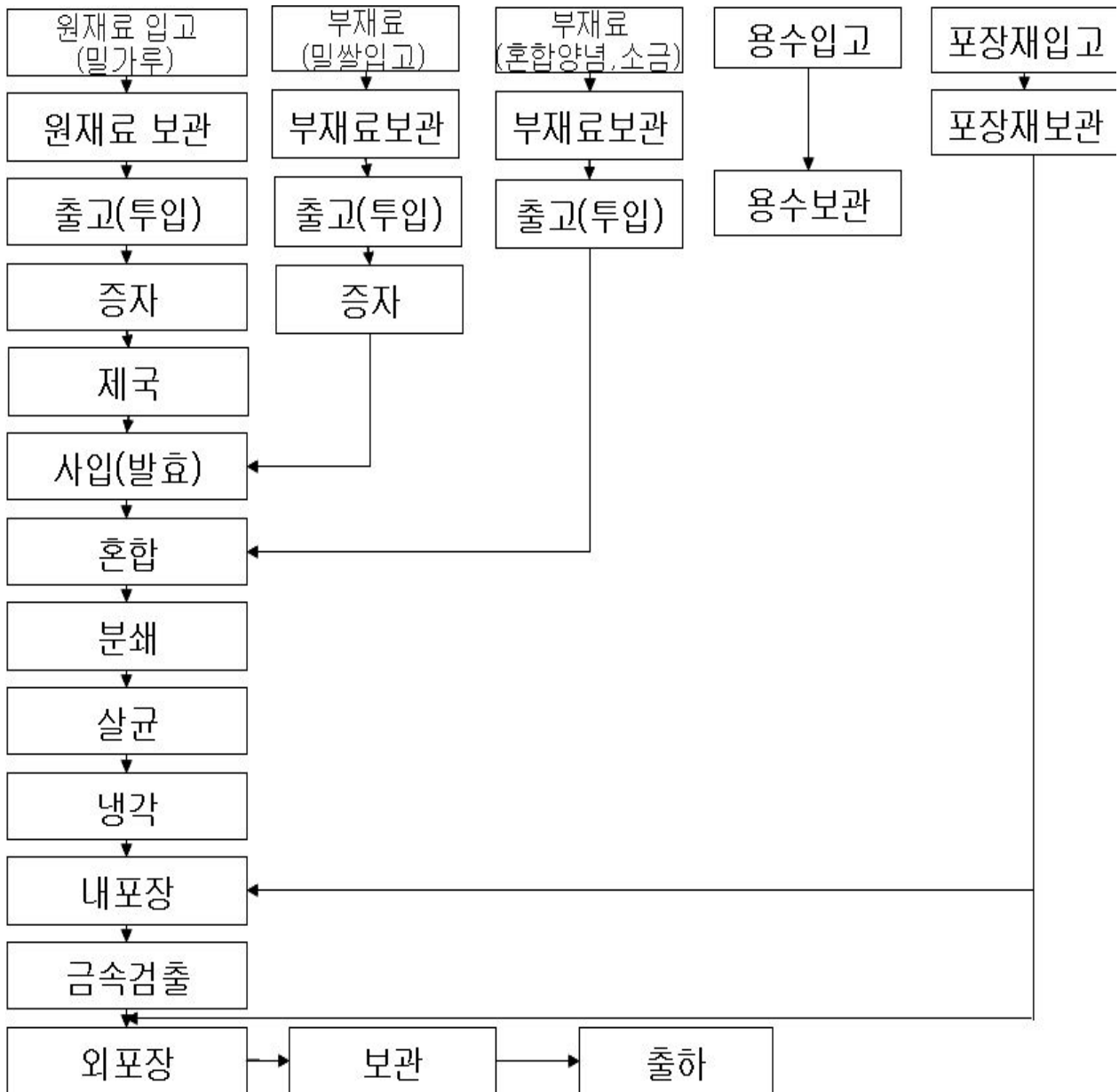
(자) 한계기준 이탈시 개선조치의 설정- 중요관리점을 모니터한 결과가 한계기준을 이탈하였을 경우를 대비하여 미리 개선조치 절차와 내용을 구체적으로 설정하여 HACCP계획서에 명시하였고, 그 발생 및 조치 내용을 문서화 하도록 하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 고추장

고추장 위해요소설정에 있어 근거 자료는 표 1 ~ 8과 같고 위해요소 분석 결과 표는 9 ~ 10과 같다. 원료별 생물학적 위해요소로 밀쌀과 소맥분은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, 진균, 대장균, 혼합양념은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, 진균, 대장균, 물엿은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*로 설정하였고 물리적 위해요소는 금속성이물로 설정하였다. 공정별 생물학적 위해요소로 원부재료 입고 및 보관은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, 진균, 대장균, 증자는 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, 대장균, 제국, 사입, 혼합공정은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, 진균, 대장균, 숙성공정은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, 진균, 대장균, 살균공정은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, 냉각, 내포장, 금속검출, 외포장, 보관 출하 공정에서는 *Bacillus cereus*로 설정하였으며 외포장, 보관, 출하 공정을 제외한 모든 공정에서 물리적 위해요소로 금속성이물을 설정하였다. 고추장의 생산 공정 중 Critical control point(CCP)는 살균공정(B)와 금속검출공정(P)으로 결정되었다. 일반모델 HACCP Plan은 표13에 제시된 것 같이 살균공정에서는 관리기준을 살균온도 85~100℃, 살균 시간 30~35분으로 설정하여 작업자가 작업 시 매 배치마다 준수하도록 하였다. 금속검출 공정(표14)에 대하여는 작업 시작 전, 작업 종료 후, 작업 중 매 30분마다 금속검출기의 감도를 점검하도록 하였다.

(1) 고추장 공정도



(2) 위해요소 분석

표1. 고추장 원료별 물리적 위해요소 분석 관련 근거 자료

공정	위해분석관련 근거자료 [발생가능성근거, 물리적 위해요소]							발생가능성평가		
								평가기준		
	마대 조각	노끈	비닐	돌	플라스 틱조각	금속성 이물	기타	높음 3회 이상/월 위해 요소	보통 2~1회/월 검출 빈도	낮음 0회 이하/월 평가 결과
밀쌀	1							연질이물	2	낮음
		1						경질 이물(돌)	0	낮음
소맥분							1	연질이물	1	낮음
								경질 이물(돌)	0	낮음
고춧 가루							1	연질 이물	2	보통
								경질 이물(돌)	0	낮음
혼합 양념							1	연질 이물	2	보통
								경질 이물(돌)	0	낮음
물엿								연질 이물	2	보통
							1	경질 이물(돌)	0	낮음
소금				1				연질 이물	2	보통
	1							경질 이물(돌)	1	낮음
용수		1						연질 이물	0	낮음
								경질 이물(돌)	0	낮음
포장재			1					연질 이물	1	낮음
								경질 이물(돌)	0	낮음

표2. 고추장 공정별 물리적 위해요소 분석 관련 근거 자료(계속)

공정	위해분석관련 근거자료 [발생가능성근거, 물리적 위해요소]							발생가능성평가		
								평가기준		
	마대 조각	노끈	비닐	돌	플라스 틱조각	금속성 이물	기타	높음 3회 이상/월 위해 요소	보통 2~1회/월 검출 빈도	낮음 0회 이하/월 평가 결과
원부 재료 입고	1							연질 이물	2	보통
							1	경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
포장재 입고							1	연질 이물	1	보통
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
용수 입고							1	연질 이물	1	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
원부재 료보관								연질 이물	1	낮음
							1 (곤충)	경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
포장재 보관								연질 이물	1	낮음
		1						경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
증자								연질 이물	0	낮음
								경질이물 (돌, 금속)	0	낮음
제국								연질이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
발효								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
혼합								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음

표3. 고추장 공정별 물리적 위해요소 분석 관련 근거 자료(계속)

공정	위해분석관련 근거자료 [발생가능성근거, 물리적 위해요소]							발생가능성평가		
								평가기준		
	마대 조각	노끈	비닐	돌	플라스 틱조각	금속성 이물	기타	높음 3회 이상/월 위해 요소	보통 2~1회/월 검출 빈도	낮음 0회 이하/월 평가 결과
숙성								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
살균								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
냉각								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
내포장								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
금속 검출								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
외포장								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
보관								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
출하								연질 이물	0	낮음
								경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음

표4. 고추장 원료별 생물학적 위해요소 분석 관련 근거 자료

시료명	검사항목	검사결과				발생 가능성
		횟 수			평균	
		1회	2회	3회		
밀쌀	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i> 진균
	<i>Salmonella spp.</i>	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	양성	음성	양성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	10	12	13	11	
	진균	41	35	52	42	
소맥분	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i> 진균
	<i>Salmonella spp.</i>	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	양성	양성	음성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	100	58	34	64	
	진균	120	110	68	99	
고춧가루	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> 진균
	<i>Salmonella spp.</i>	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	양성	음성	음성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND		
	진균	56	0	0	54	
혼합양념	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i> 진균
	<i>Salmonella spp.</i>	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	음성	양성	양성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	32	10	
	진균	560	340	280	393	



표5. 고추장 원료별 생물학적 위해요소 분석 관련 근거 자료<계속>

시료명	검사항목	검사결과				발생가능성
		횟 수			평균	
		1회	2회	3회		
물엿	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND		
	진균	0	0	0		
소금	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0		
	진균	0	0	0		
용수	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	분원성 대장균군	음성	음성	음성		
포장재	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		

표6. 고추장 공정별 생물학적 위해요소 분석 관련 근거 자료<계속>

공정명	검사항목	실험결과				발생가능성
		횟수			평 균	
		1회	2회	3회		
원부재료 입고	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i> 진균
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	양성	양성	음성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	230	180	270	226	
	진균	35	20	56	37	
포장재 입고	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>Bacillus cereus</i>	20	10	0		
용수입고	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
원부재료 보관	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i> 진균
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	양성	양성	음성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	230	180	270	226	
	진균	35	20	56	37	
포장재 보관	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
증자	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> 진균
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	
	진균	0	3	3	2	

표7. 고추장 공정별 생물학적 위해요소 분석 관련 근거 자료<계속>

공정명	검사항목	검사결과				발생가능성
		실험횟수			평균	
		1회	2회	3회		
제국	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> 진균
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	양성	양성	양성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	
	진균	79,000,000	68,000,000	4,600,000	50,533,333	
발효	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> 진균
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	양성	양성	양성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0		
	진균	26,300	32,900	18,700	25,266,666	
혼합	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i> 진균
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	양성	양성	양성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	32	26	29		
	진균	18,000	28,600	27,000	24,533	
숙성	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i> 진균
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	양성	양성	양성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	290	230	327	282	
	진균	23,000	57,000	36,500	38,833	
살균	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>B. cereus</i>
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND		
	<i>Bacillus cereus</i>	81	57	43	60	
	진균	0	0	0		
냉각	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>B. cereus</i>
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>Bacillus cereus</i>	160	260	230	216	
	진균	0	0	0		
내포장	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>B. cereus</i>
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>Bacillus cereus</i>	230	170	168	189	
	진균	0	0	0	0	

표8. 고추장 공정별 생물학적 위해요소 분석 관련 근거 자료<계속>

공정명	검사항목	검사결과				발생가능성
		실험횟수			평균	
		1회	2회	3회		
금속 검출	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>B. cereus</i>
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>Bacillus cereus</i>	183	130	102	138	
	진균	0	0	0	0	
외포장	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>B. cereus</i>
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>Bacillus cereus</i>	150	168	134	150	
	진균	0	0	0	0	
보관	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>B. cereus</i>
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>Bacillus cereus</i>	95	180	162	145	
	진균	0	0	0	0	
출하	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND		<i>B. cereus</i>
	<i>E. coli</i>	음성	음성	음성		
	<i>Bacillus cereus</i>	160	146	128	144	
	진균	0	0	0	0	

표9. 고추장 원료별 위해 요소 분석

원·부 재 료	위해요소 (생물학적:B, 화학적:C, 물리적:P)	발생원인 (유래)	위해 평가			예방조치 및 관리방법	
			심각성	발생 가능성	결과		
밀 쌀	B	<i>E. coli</i> (O157:H7)	3	1	3	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리 협력업체(생산자)점검/ 교육 관리 살균공정관리	
		대장균	2	2	4		
		<i>Bacillus cereus</i>	1	3	3		
		<i>Salmonella</i> spp.	2	1	2		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	3	1	3		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1		
		진균	1	3	3		
	C	잔류농약	협력업체 원료관리 부족으로 잔류, 오염	2	1	2	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리
		납, 비소, 카드뮴		2	1	2	
		총아플라톡신		2	1	2	
		오크라톡신		2	1	2	
		제랄레논		2	1	2	
		데옥시니발레놀		2	1	2	
	P	금속성이물(첫조각)	협력업체 제조설비/작업자 등에 대 한 이물 관리 부족으로 오염	3	1	3	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 금속검출 공정 관리
		경질성 이물(돌, 흙, 모래)		2	1	2	
		연질성 이물 (머리카락, 겨, 비닐 끈충사체)		1	2	2	
	소 맥 분	B	<i>E. coli</i> (O157:H7)	3	1	3	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 살균공정관리
			대장균	2	2	4	
			<i>Bacillus cereus</i>	1	3	3	
			<i>Salmonella</i> spp.	2	1	2	
			<i>Listeria monocytogenes</i>	3	1	3	
<i>Staphylococcus aureus</i>			1	1	1		
진균			1	3	3		
C		잔류농약	협력업체 원료관리 부족으로 잔류, 오 염	2	1	2	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리
		납, 비소, 카드뮴		2	1	2	
		총아플라톡신		2	1	2	
		오크라톡신		2	1	2	
		제랄레논		2	1	2	
		데옥시니발레놀		2	1	2	
P		금속성 이물(첫조각)	협력업체 제조설비/작업자 등에 대 한 이물 관리 부족으로 오염	3	1	3	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 금속검출 공정 관리
		경질성 이물(돌, 흙, 모래)		2	1	2	
		연질성이물 (머리카락, 겨, 비닐, 끈충사체)		1	2	2	
고 춧 가 루		B	<i>E. coli</i> (O157:H7)	3	1	3	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 살균공정관리
			대장균	2	1	2	
			<i>Bacillus cereus</i>	1	1	1	
			<i>Salmonella</i> spp.	2	1	2	
			<i>Listeria monocytogenes</i>	3	1	3	
	<i>Staphylococcus aureus</i>		1	1	1		
	진균		1	2	2		
	C	잔류농약	협력업체 원료관리 부족으로 잔류, 오 염	2	1	2	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리
		납, 비소, 카드뮴		2	1	2	
		총아플라톡신		2	1	2	
		오크라톡신		2	1	2	
	P	금속성 이물(첫조각)	협력업체 제조설비/작업자 등에 대 한 이물 관리 부족으로 오염	3	1	2	입고검사 협력업체 시험성적서 확인

		경질성 이물(돌, 흙, 모래)		2	1	2	원료재배과정 관리	
		연질성 이물 (머리카락, 겨, 비닐, 끈충사체)		1	2	2	협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 금속검출공정관리	
혼 합 양 념	B	<i>E. coli</i> O157:H7	협력업체 제조/가공기준 미준수로	3	1	3	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리 협력업체(생산자)점검/교육 관리 살균공정관리	
		대장균	오염	2	2	4		
		<i>Bacillus cereus</i>		1	2	2		
		<i>Salmonella</i> spp.	협력업체 작업자/제조설비/작업장	2	1	2		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	운반차량/제조도구 등에 대한 세	3	1	3		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	척·소독관리 부족으로 오염	1	1	1		
		진균	협력업체 원료관리 부족으로 오염	1	3	3		
	C	잔류농약		2	1	2	입고검사	
		납, 비소, 카드뮴	협력업체 원료관리 부족으로 잔류, 오	2	1	2	협력업체 시험성적서 확인	
		총아플라톡신	염	2	1	2	협력업체(생산자) 점검/	
		오크라톡신		2	1	2	교육 관리	
	P	금속성이물(첫조각)		3	1	3	입고검사	
		경질성 이물(돌, 흙, 모래)	협력업체 제조설비/작업자 등에 대	2	1	2	협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리	
		연질성 이물 (머리카락, 겨, 비닐, 끈충사체)	한 이물 관리 부족으로 오염	1	2	2	협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 금속검출공정관리	
물 엿	B	<i>E. coli</i> (O157:H7)	협력업체 제조/가공기준 미준수로 오	3	1	3	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 살균공정관리	
		대장균	염	2	1	2		
		<i>Bacillus cereus</i>		1	1	1		
		<i>Salmonella</i> spp.	협력업체 작업자/제조설비/작업장	2	1	2		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	운반차량/제조도구 등에 대한 세	3	1	3		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	척·소독관리 부족으로 오염	1	1	1		
		진균	협력업체 원료관리 부족으로 오염	1	1	1		
	C	인공감미료	협력업체 원료관리 부족으로 잔류, 오	2	1	2	입고검사	
		납	염	2	1	2	협력업체 시험성적서 확인 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리	
	P	금속성이물(첫조각)		3	1	3	입고검사	
		경질성 이물(돌, 흙, 모래)	협력업체 제조설비/작업자 등에 대	2	1	2	협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리	
		연질성 이물 (머리카락, 겨, 비닐, 끈충사체)	한 이물 관리 부족으로 오염	1	2	2	협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 금속검출공정관리	
	소 금	C	수은	토양오염, 협력업체(생산자) 외 관리 부족으로 오염	2	1	2	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리
			납		2	1	2	
카드뮴			2		1	2		
총수은			2		1	2		
메탈수은			2		1	2		
비소			2		1	2		
페로시아나화 이온			2		1	2		
P		금속성 이물(쇠뿔)		3	1	3	입고검사	
		연질성이물 (흙, 깃털, 나무조각, 플라스틱)	협력업체(생산자) 관리부족으로 혼입	2	1	2	협력업체 시험성적서 확인 원료채취과정 관리	
		머리카락, 염생생물(땅강아 지), 위생곤충, 노끈		1	2	2	협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 금속검출공정관리	
용 수		B	<i>Staphylococcus aureus</i>	유입상수 또는 지하수 자체기인	1	1	1	지하수 년 1회 이상 정기적인 수질 검사
			<i>Salmonella</i> spp.	취수 배관관리 불량으로 교차오염 취수원 관리 미흡으로 교차오염	2	1	2	해당 시 상수수질 결과 확인 취수원 주변 정리정돈 취수 원 보안관리
			대장균		2	1	2	

							정수공정에서 관리 살균공정에서 제어
		분원성 대장균		2	1	2	
	C	먹는물 수질기준에 의한 항목 47종 (유기물, 무기물 등)	유입상수 또는 지하수 자체기인 취수 배관관리 불량으로 교차오염 취수원 관리 미흡으로 교차오염	2	1	2	지하수 년 1회 이상 정기적인 수질검사 해당 시 상수수질 결과 확인 취수원 주변 정리정돈 취수원 보안관리 배관 청소관리 정수공정에서 관리 살균공정에서 제어
P	침전부유물	유입상수 또는 지하수 자체기인 취수 배관관리 불량으로 교차오염 취수원 관리 미흡으로 교차오염	1	1	1	취수원 주변 정리정돈 취수원 보안관리 배관 청소관리 정수공정에서 관리	
포 장 재	B	대장균	작업자 위생상태 불량으로 인한 오염	2	1	2	입고검사 관리
		<i>Staphylococcus aureus</i>	생산자 관리부족에 의한 오염	1	1	1	작업자 위생교육 협력업체 위생관리
	C	납, 카드뮴	가공 중 부주의에 의한 잔류	2	1	2	입고검사 관리
		틀루엔	비닐성분으로부터 용출	2	1	2	시험성적서 확인 협력업체 관리
	P	경질성 이물 (흙, 모래)	포장재 제작 불량에 의한 혼입 외포장재 파손에 의한 혼입	2	1	2	입고검수관리 협력업체 관리
		연질성 이물 (비닐, 머리카락, 먼지)	작업자 부주의 및 복장착용 불량으로 인한 이물 혼입	1	1	1	보관창고 위생관리 및 점검

표10. 고추장 공정별 위해 요소 분석

제조 공정	구분	위해요소 (생물학적: B 화학적: C 물리적: P)	발생원인(유래)	위해 평가			예방조치 및 관리방법	
				심각성	발생 가능성	결과		
원부 재료 보관	B	대장균	원료로부터 유래	2	2	4	보관실 세척소독 관리 보관실 운반도구 세척소독 관리 보관실 작업자 위생 교육훈련 보관실 설비 세척소독 관리 보관실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 보관실 온도관리 보관실 청정도 관리	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 보관실 온도관리에 의한 위해요소 증식	1	1	2		
		<i>Salmonella</i> spp.	보관실 작업자/작업장/제조설비/기구용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리	2	1	2		
		<i>Bacillus cereus</i>	작업자 위생교육 부족으로 교차오염	1	3	3		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	부적절한 보관실 청정도 관리로 교차오염	3	1	3		
		<i>E. coli</i> O157:H7	부적절한 보관실 청정도 관리로 교차오염	3	1	3		
		진균	교차 오염	1	3	3		
	P	금속성이물	보관실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 운송차량/작업자/작업장/제조설비/기구용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	보관실 세척소독 관리 보관실 운반도구 세척소독 관리 보관실 작업자 위생 교육훈련 보관실 설비 세척소독 관리 보관실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 보관실 청정도 관리 금속검출 공정 관리	
	포장재 보관	B	대장균	보관실 작업자/작업장/제조설비/기구용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	2	1	2	보관실 세척소독 관리 보관실 운반도구 세척소독 관리 보관실 작업자 위생 교육훈련 보관실 설비 세척소독 관리 보관실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 보관실 청정도 관리
			<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 보관실 청정도 관리로 교차오염	1	1	1	
		P	연질이물 (머리카락, 비닐, 끈충)	보관실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 운송차량/작업자/작업장/제조설비/기구용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	1	1	1	보관실 세척소독 관리 보관실 운반도구 세척소독 관리 보관실 작업자 위생 교육훈련 보관실 설비 세척소독 관리 보관실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 보관실 청정도 관리
		증자	B	대장균	원료로부터 유래	2	3	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 증자실 온도관리에 의한 위해요소 증식			1	1	1		
<i>Salmonella</i> spp.	증자실 작업자/작업장/제조설비/기구용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염			2	1	2		
<i>Bacillus cereus</i>	부적절한 증자실 청정도 관리로 교차오염			1	1	1		
<i>Listeria monocytogenes</i>	부적절한 증자실 청정도 관리로 교차오염			3	1	3		
<i>E. coli</i> O157:H7	부적절한 증자실 청정도 관리로 교차오염			3	1	3		
진균	교차 오염			1	2	2		
P	금속성 이물	증자실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 증자실 작업자/작업장/제조설비/기구용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	증자실 세척소독 관리 증자실 운반도구 세척소독 관리 증자실 작업자 위생 교육훈련 증자실 설비 세척소독 관리 증자실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 증자실 청정도 관리 금속검출 공정 관리		



제국	B	대장균	원료로부터 유래	2	3	6	제국실 세척소독 관리
		<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 제국실 온도관리에 의한 위해요소 증식	1	1	2	제국실 운반도구 세척소독 관리
		<i>Salmonella spp.</i>	증자실 작업자/작업장/제조설비 기구	2	1	2	제국실 작업자 위생 교육훈련
		<i>Bacillus cereus</i>	용기/검사장비/운반도구/청소도구 등	1	1	1	제국실 설비 세척소독 관리
		<i>Listeria monocytogenes</i>	세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	제국실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리
		<i>E. coli</i> O157:H7	부적절한 제국실 청정도 관리로 교차	3	1	3	제국실 온도관리
		진균	오염	1	3	3	제국실 청정도 관리
P	금속성 이물	증자실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 증자실 작업자/작업장/제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	제국실 세척소독 관리 제국실 운반도구 세척소독 관리 제국실 작업자 위생 교육훈련 제국실 설비 세척소독 관리 제국실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 제국실 청정도 관리 금속 검출 공정 관리	
발효	B	대장균	원료로부터 유래	2	3	6	사업실 세척소독 관리
		<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 제국실 온도관리에 의한 위해요소 증식	1	1	2	사업실 운반도구 세척소독 관리
		<i>Salmonella spp.</i>	사업실 작업자/작업장/제조설비 기구	2	1	2	사업실 작업자 위생 교육훈련
		<i>Bacillus cereus</i>	용기/검사장비/운반도구/청소도구 등	1	1	1	사업실 설비 세척소독 관리
		<i>Listeria monocytogenes</i>	세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	사업실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리
		<i>E. coli</i> O157:H7	부적절한 사업실 청정도 관리로	3	1	3	사업실 온도관리
		진균	교차 오염	1	3	6	사업실 청정도 관리
P	금속성 이물	사업실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 사업실 작업자/작업장/제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	사업실 세척소독 관리 사업실 운반도구 세척소독 관리 사업실 작업자 위생 교육훈련 사업실 설비 세척소독 관리 사업실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 사업실 청정도 관리 금속검출 공정 관리	
혼합	B	대장균	원료로부터 유래	2	3	6	혼합실 세척소독 관리
		<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 혼합실 온도관리에 의한 위해요소 증식	1	1	1	혼합실 운반도구 세척소독 관리
		<i>Salmonella spp.</i>	혼합실 작업자/작업장/제조설비 기구	2	1	2	혼합실 작업자 위생 교육훈련
		<i>Bacillus cereus</i>	용기/검사장비/운반도구/청소도구 등	1	1	1	혼합실 설비 세척소독 관리
		<i>Listeria monocytogenes</i>	세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	혼합실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리
		<i>E. coli</i> O157:H7	부적절한 혼합실 청정도 관리로	3	1	3	혼합실 온도관리
		진균	교차 오염	1	3	3	혼합실 청정도 관리
P	금속성 이물	혼합실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 혼합실 작업자/작업장/제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	혼합실 세척소독 관리 혼합실 운반도구 세척소독 관리 혼합실 작업자 위생 교육훈련 혼합실 설비 세척소독 관리 혼합실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 혼합실 청정도 관리 금속검출 공정 관리	
숙성	B	대장균	원료로부터 유래	2	3	6	숙성실 세척소독 관리
		<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 숙성실 온도관리에 의한 위해요소 증식	1	1	2	숙성실 운반도구 세척소독 관리 숙성실 작업자 위생 교육훈련

	P	<i>Salmonella</i> spp	숙성실 작업자/작업장/제조설비/기구/용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	2	1	2	숙성실 설비 세척소독 관리 숙성실 기구/용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 숙성실 온도관리 숙성실 청정도 관리	
		<i>Bacillus cereus</i>	숙성실 제조설비, 운반 도구 등 관리 부족으로 교차오염	1	1	1		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	숙성실 작업자/작업장/제조설비/기구/용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3		
		<i>E. coli</i> O157:H7	부적절한 숙성실 청정도 관리로 교차 오염	3	1	3		
		진균	숙성실 제조설비, 운반 도구 등 관리 부족으로 교차오염	1	3	3		
살균	B	대장균	원료로부터 유래	2	1	2	살균실 세척소독 관리 살균실 운반도구 세척소독 관리 살균실 작업자 위생 교육훈련 살균실 설비 세척소독 관리 살균실 기구/용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 살균실 청정도 관리 금속검출 공정 관리	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 살균실 온도관리에 의한 위해요소 증식	1	2	2		
		<i>Salmonella</i> spp	살균실 작업자/작업장/제조설비/기구/용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	2	1	2		
		<i>Bacillus cereus</i>	부적절한 살균실 청정도 관리로 교차 오염	1	3	3		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	부적절한 살균실 청정도 관리로 교차 오염	3	1	3		
		<i>E. coli</i> O157:H7	살균공정 관리 미흡으로 잔류	3	1	3		
		진균	살균공정 관리 미흡으로 잔류	1	1	1		
P	금속성 이물	살균실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염	3	1	3	살균실 세척소독 관리 살균실 운반도구 세척소독 관리 살균실 작업자 위생 교육훈련 살균실 설비 세척소독 관리 살균실 기구/용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 살균실 청정도 관리 금속 검출 공정 관리		
		살균실 작업자/작업장/제조설비/기구/용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염						
냉각	B	대장균	작업자/작업장/제조설비/기구/용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	2	1	2	작업장 세척소독 관리 작업장 운반도구 세척소독 관리 작업자 위생 교육훈련 작업장 설비 세척소독 관리 작업장 기구/용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 작업장 온도관리 작업장 청정도 관리	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 작업장 청정도 관리로 교차오염	1	1	1		
		<i>Bacillus cereus</i>	작업장 온도관리 미흡으로 증식	1	3	3		
	P	금속성 이물	작업장 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염	3	1	3		작업장 세척소독 관리 작업장 운반도구 세척소독 관리 작업자 위생 교육훈련 작업장 설비 세척소독 관리 작업장 기구/용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 작업장 청정도 관리 금속검출 공정관리 기준 준수
			작업자/작업장/제조설비/기구/용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염					
			작업장 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염					
내포장	B	대장균	작업자/작업장/제조설비/기구/용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	2	1	2	작업장 세척소독 관리 작업장 운반도구 세척소독 관리 작업자 위생 교육훈련 작업장 설비 세척소독 관리 작업장 기구/용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 작업장 온도관리 작업장 청정도 관리	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	부적절한 작업장 청정도 관리로 교차오염	1	1	1		
		<i>Bacillus cereus</i>	작업장 온도관리 미흡으로 증식	1	3	3		

	P	금속성 이물	<p>작업장 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염</p> <p>작업자/작업장/제조설비/기구용기/검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염</p> <p>여과공정 관리 미흡으로 잔류</p>	3	1	3	<p>작업장 세척소독 관리</p> <p>작업장 운반도구 세척소독 관리</p> <p>작업자 위생 교육훈련</p> <p>작업장 설비 세척소독 관리</p> <p>작업장 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리</p> <p>작업장 청정도 관리</p> <p>금속검출 공정관리 기준 준수</p>
금속 검출	B	<i>Bacillus cereus</i>	내포자 형성균 관리 미흡으로 증식	1	3	3	온도관리 준수
	P	금속성 이물	<p>금속검출기 감도불량으로 인한 잔류</p> <p>금속검출기 고장으로 인한 잔류</p>	3	1	3	<p>금속검출기 감도 정기적 점검</p> <p>금속검출기 정기적 점검</p>
외 포장	B	<i>Bacillus cereus</i>	내포자 형성균 관리 미흡으로 증식	1	3	3	작업장 온도관리 준수
	P	연질이물(종이, 비닐)	작업자 취급부주의로 인한 포장 파손으로 이물혼입	1	1	1	포장 상태 확인
보관	B	<i>Bacillus cereus</i>	내포자 형성균 관리 미흡으로 증식	1	3	3	냉장 온도관리 준수
	P	연질이물(종이, 비닐)	작업자 취급부주의로 인한 포장 파손으로 이물혼입	1	1	1	포장 및 적재상태 확인
출하	B	<i>Bacillus cereus</i>	내포자 형성균 관리 미흡으로 증식	1	3	3	냉장차량 온도관리 준수
	P	연질이물(종이, 비닐)	운반 중 취급 부주의로 인한 포장재 파손으로 이물 혼입	1	1	1	<p>포장상태 확인</p> <p>작업자 운반취급 교육 및 포장파손품 폐기처리</p>

표11. 고추장 원료별 CCP결정도

원/부재/공정명	구분 B, C, P	위해요소	질문1	질문2	질문2-1	질문3	질문4	질문5	중요 관리점 결정
			확인된 위해요소를 관리하기 위한 선행요건 프로그램이 있으며 잘 관리되고 있는가 ?	이 공정이나 이후의 공정에서 확인된 위해의 관리를 위한 예방 조치 방법이 있는가 ?	이 공정에서 안전성을 위한 관리가 필요한가 ?	이 공정은 이 위해의 발생가능성을 제거 또는 허용수준까지 감소 시키는가 ?	확인된 위해의 오염이 허용수준을 초과하여 발생할 수 있는가 ? 또는 그 오염이 허용할 수 없는 수준으로 증가할 수 있는가 ?	이후의 공정에서 확인된 위해를 제거하거나 발생가능성을 허용수준까지 감소시킬수 있는가 ?	
			Y: CCP아님 N: 질문 2	Y: 질문 3 N: 질문 2-1	Y: 공정, 제품 변경 → 질문 2 N: CCP아님	Y: CCP아님 N: 질문 4	Y: 질문 5 N: CP아님	Y: CP아님 N: CCP아님	
밀쌀	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Bacillus cereus</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		진균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP	
소맥분	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Bacillus cereus</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		진균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP	
혼합양념	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		진균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
	P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP
물엿	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP	
소금	P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP

표12. 고추장 공정별 CCP결정도

원/부재료 공정명	구분 BCP	위해요소	질문1	질문2	질문2-1	질문3	질문4	질문5	중요 관리점 결정
			확인된 위해요소를 관리하기 위한 선행요건 프로그램이 있으며 잘 관리되고 있는가 ?	이 공정이나 이후의 공정에서 확인된 위해의 관리를 위한 예방조치방법이 있는가 ?	이 공정에서 안전성을 위한 관리가 필요한가 ?	이 공정은 이 위해의 발생가능성을 제거 또는 허용수준까지 감소시키는가 ?	확인된 위해의 허용수준을 초과하여 발생할 수 있는 오염이 허용할 수 없는 수준으로 증가할 수 있는가 ?	이후의 공정에 서 확인된 위해를 제거하거나 발생가능성을 허용수준까지 감소시킬수 있는가 ?	
			Y: CCP아님 N: 질문2	Y: 질문3 N: 질문2-1	Y: 공정, 제품 변경 → 질문2 N: CCP아님	Y: CCP아님 N: 질문 4	Y: 질문 5 N: CP아님	Y: CP아님 N: CCP아님	
원부재료 입고	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Bacillus cereus</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		진균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP	
원부재료 보관	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Bacillus cereus</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		진균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP	
증자	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP	
제국	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		진균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP	
발효	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		진균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
	P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP

혼합	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		진균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
	P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP
숙성	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		<i>Bacillus cereus</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
		진균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP
	대장균	No	Yes	-	No	Yes	Yes 살균	CP	
P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP	
살균	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	Yes			CCP-1B
		<i>Listeria monocytogenes</i>	No	Yes	-	Yes			CCP-1B
		<i>Bacillus cereus</i>	No	Yes	-	Yes			CCP-1B
P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP	
냉각	B	<i>Bacillus cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP
	P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP
내포장	B	<i>Bacillus cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP
	P	금속성이물	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP
금속검출	B	<i>Bacillus cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP
	P	금속성이물	No	Yes	-	Yes			CCP-2P
외포장	B	<i>Bacillus cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP
보관	B	<i>Bacillus cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP
출하	B	<i>Bacillus cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP

표13. 고추장 살균 공정 HACCP계획서

구 분		내 용
CCP 번호		CCP-1B
공정단계		살균공정
위해요소		<i>E. coli, Bacillus cereus</i>
한계 기준	관리항목	살균온도 및 살균시간
	관리기준	살균온도 85-100 ℃, 살균시간 30-35 분
모니터링	대상	스팀솥 온도, 살균시간
	방법	①살균 설정온도 확인 - 스팀솥의 설정온도를 확인 후 한계기준 이상인지 확인 ②살균시간 확인 -스팀솥 실온도가 85 ℃에 도달할 때 살균시작 시간 및 종료 시간을 기록 후 모니터링 일지 CCP-1B에 기록하고 생산팀장 및 HACCP팀장에게 보고함.
	빈도	작업 시 매 Batch 마다
	담당자	모니터링 담당자
개선조치	살균온도 및 살균시간의 한계기준 이탈시	
	<b>① 한계기준 미달 시</b> - 살균 공정 담당자는 즉시 살균 공정을 계속 유지시키며 생산팀장에 보고함 - 해당 제품은 즉시 한계기준 이상으로 재 살균함 - 살균 공정 담당자는 발생내역과 조치내용을 CCP-1B 일지에 이탈 발생내역과 조치내용 을 기록하고 생산팀장과 HACCP 팀장에게 보고함 -생산팀장은 해당 롯데제품의 공정품을 품질관리팀장에 검사 의뢰함	
	<b>② 한계기준 이상일 시</b> - 살균 공정 담당자는 즉시 살균 공정을 중단하고 생산팀장에 보고함 - 살균 공정 담당자는 발생내역과 조치내용을 CCP-1B 일지에 이탈 발생내역과 조치내용을 기록하고 생산 팀장과 HACCP 팀장에게 보고함. - 생산팀장은 해당 롯데제품의 공정품을 품질관리팀장에 검사 의뢰함	
	기계적인 고장으로 한계기준 이탈시	
	① 살균공정담당자는 즉시 살균작업을 중지하고 생산팀장에게 보고함 ② 살균공정 담당자는 CCP-1B 일지에 이탈 발생내역을 기록함 ③ 품질관리팀장에게 수리 의뢰함 직접 수리가 불가능할 경우 협력업체에 의뢰하여 수리함 ④ 수리완료 후 살균 공정품은 한계기준 이상으로 재 살균함 ⑤ CCP-1B 모니터링 일지에 개선조치 내역을 기록하고 생산팀장과 HACCP팀장에게 보고	

	합 ⑥ 생산팀장은 해당 롯데제품의 공정품을 품질관리팀장에 검사 의뢰함			
검증 방법	① CCP-1B 점검표(살균공정) 기록 확인 ② 스팀솔 정상작동 확인, 작업자 인터뷰 및 초시계, 온도계 검교정			
	① CCP-1B 점검표(살균공정) 기록 확인 - 생산팀장은 CCP-1B 점검표(살균공정)가 관리계획에 따라 기록되고 있는지 매일 확인 ② 월 1회 이상 스팀 솔 정상작동 여부, 작업자 인터뷰 및 년 1회 이상 초시계, 온도계 검교정 ③ HACCP 팀장은 월1회 이상 스팀 솔의 정상작동 여부 및 작업자 인터뷰를 통해 인지도를 확인하고 년 1회 이상 초시계, 온도계 검교정 실시			
기록 및 보관	기록명	내 용	작성방법 및 주기	작성자
	CCP-1B점검표	살균	매 작업시작 전	모니터링 담당



표14. 고추장 금속공정 HACCP 계획

구 분		내 용			
CCP 번호		CCP-2P			
공정단계		금속검출			
위해요소		금속이물			
한계기준	관리항목	금속성이물 (Fe(철) : Φ3.0 mm이상 Sus(스테인레스) : Φ5.0 mm이상)			
	관리기준	불검출			
모니터링	대상	금속검출기 감도 확인			
	방법	Test Piece(Fe(철)-Φ3.0mm, Sus(스테인레스)-Φ5.0mm)를 차례로 통과시켜 감도 확인			
	빈도	작업 시작 전, 작업 중 1회/2 시간, 작업 종료 후			
	담당자	모니터링 담당자			
개선조치	감도 이상 발생				
	① 모니터링 담당자는 즉시 금속검출기의 작업을 중지하고 제품을 보류한 뒤 생산담당에게 보고함 ② 모니터링 담당자는 감도를 조정 후 정상적으로 작동 시 재가동함 ③ 모니터링 담당자는 금속검출기의 이상발생 전 정상운전 확인 시점 이후에 생산된 제품을 다시 검사함 ④ 모니터링 담당자는 그 내용을 기록, 유지함				
	기계적 고장				
	① 모니터링 담당자는 즉시 금속검출기의 작업을 중단하고 공정제품을 보류한 뒤 생산담당에게 보고함 ② 모니터링 담당자는 기계적인 고장발생 시 다른 금속 검출기를 사용하고 공무담당에게 수리를 의뢰함 ③ 모니터링 담당자는 한계기준 이탈 시 작업된 제품은 재작업을 실시함 ④ 모니터링 담당자는 그 내용을 기록, 유지함				
검증 방법	생산담당은 CCP점검표가 제대로 기록되고 있는지 매일 확인				
	생산담당은 매일 금속검출기의 정상작동 및 감도확인을 위해 테스트피스를 통과시켜 확인하고 모니터링 담당의 인터뷰를 통해 인지도를 확인				
기록 및 보관	기록명	내 용	작성방법 및 주기	작성자	
	CCP-2P 점검표	테스트피스 통과 시 검출 여부	작업 시작 전, 작업 중 2 시간 마다, 작업 종료 후 작성	모니터링 담당	

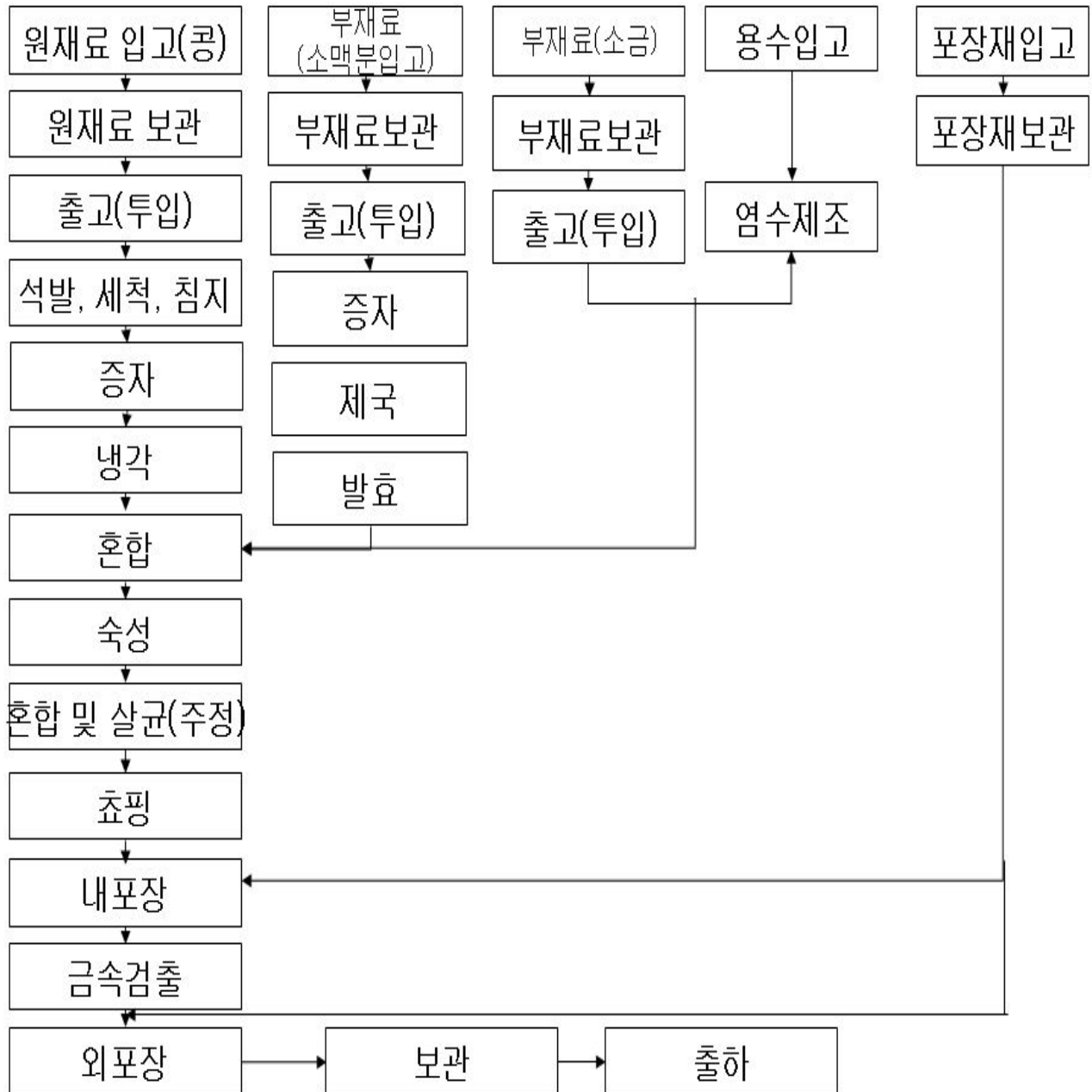
## 나. 된장

된장 위해요소설정에 있어 근거 자료는 표15 ~ 22와 같고 위해요소 분석 결과 표23 ~ 31과 같다. 원료별 생물학적 위해요소로 콩은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*로 설정하였고 물리적 위해요소는 금속성이물과 돌등의 결정성이물과 끈, 벌레등의 연결성 이물로 설정하였다.

공정별 생물학적 위해요소로 원부재료 입고 및 보관, 출고, 석발, 세척, 침지,증자, 혼합, 숙성, 살균(주정)공정은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, 냉각 및 초핑, 내포장, 금속검출, 외포장, 보관, 출하공정은 *Bacillus cereus*로 설정하였다. 공정별 물리적 위해요소는 원재료입고 및 보관, 투입 , 석발, 세척, 침지공정에서 금속성이물과 돌등의 결정성이물과 끈, 벌레등의 연결성 이물로 설정하였다. 증자, 냉각, 혼합, 숙성, 살균(주정), 초핑, 내포장, 금속검출은 금속성 이물로 설정하였다.

된장 제조 공정 중의 Critical control point(CCP)는 표 32~35와 같이 석발, 세척공정과 혼합 및 살균, 금속검출공정에서 나타났다. 일반모델 HACCP Plan은 표 36 ~ 38에 제시된 것 같이 석발, 세척공정에서는 관리기준을 세척 속도 6 RPM으로 설정하여 작업자가 작업 시작 전, 작업 중 1회, 작업종료 후 모니터하도록 하였다. 살균(주정)공정은 주정함량 3%로 하였고, 금속검출 공정에 대하여는 작업 시작 전, 작업 종료 후, 작업 중 매 30 분마다 금속검출기의 감도를 점검하도록 하였다.

(1) 된장 제조 공정도



(2) 위해요소 분석

표15. 된장의 물리적 위해분석관련 근거 자료

공정	위해분석관련 근거자료 [발생가능성근거, 물리적 위해요소]								발생가능성평가		
									평가기준		
	마대 조각	콩깍지	노끈	비닐	돌	플라스 틱조각	금속성 이물	기타	높음 3회 이상/월	보통 2~1회/월	낮음 0회 이하/월
콩	1	17			3				연질 이물	많음	높음
		24			1				경질 이물 (돌)	10	높음
	2	28		1	5		1		경질 이물 (금속)	1	
소맥분								1	연질 이물	1	낮음
									경질 이물 (돌)	0	낮음
소금									연질 이물	2	보통
	1								경질 이물 (돌)	0	낮음
원재료 입고	1	17			3				연질 이물	많음	높음
		24			1				경질 이물 (돌)	10	높음
	2	28		1	5		1				
부재료 입고 (소금)	1								연질 이물	1	보통
									경질 이물 (돌)	0	낮음
용수 입고							1		연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌)	0	낮음
포장재 입고									연질 이물	1	높음
				1				1 (곤충)	경질 이물 (돌)	0	낮음
원부 재료 보관	1	17			3				연질 이물	많음	높음
		24			1				경질 이물 (돌)	10	높음
	2	28		1	5		1				

표16. 된장의 물리적 위해분석관련 근거 자료(계속)

공정	위해분석관련 근거자료 [발생가능성근거, 물리적 위해요소]								발생가능성평가			
									평가기준			
	마대 조각	콩깍지	노끈	비닐	돌	플라스틱조각	금속성 이물	기타	높음 3회 이상/월	보통 2~1회/월	낮음 0회 이하/월	
								위해 요소	검출 빈도	평가 결과		
포장재 보관									연질 이물	2	보통	
				1				1 (곤충)	경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음	
염수 제조				1					연질 이물	1	보통	
							1		경질 이물 (금속)	1	보통	
출고 (투입)	3	11		1	4				연질 이물	많음	높음	
	2	16			6		1		경질 이물(돌)	17	높음	
		7			7				경질 이물(금속)	1	보통	
곡 자	증 자								연질 이물	0	낮음	
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음	
	제 국								연질 이물	0	낮음	
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음	
	발 효									연질 이물	0	낮음
										경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
대 두	세 척 석 발 침 지	2	15			3			연질 이물	66	높음	
			21			2			경질 이물(돌)	11	높음	
		2	22		1	4		1	경질 이물(금속)	1	보통	
	증 자									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음	

표17. 된장 위해분석관련 근거 자료-물리적요인(계속)

공정	위해분석관련 근거자료 [발생가능성근거, 물리적 위해요소]								발생가능성평가		
									평가기준		
	마대 조각	콩깍지	노끈	비닐	돌	플라스틱 조각	금속성 이물	기타	높음 3회 이상/월 위해 요소	보통 2~1회/월 검출 빈도	낮음 0회 이하/월 평가 결과
냉각									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
혼합									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
숙성									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
혼합 및 살균 (주정)									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
초핑									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
내포장									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
금속 검출									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
외포장									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
출하									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음

표18. 된장의 생물학적 위해 분석관련 근거 자료

공정명	시료명	검사항목	검사결과				발생가능성
			실험횟수			평균	
			1회;	2회	3회		
입고	대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	50	30	40	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
	소맥분	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>E. coli</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	양성	ND	ND		
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
	소금	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
	용수	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
<i>E. coli</i> O157:H7		ND	ND	ND	ND		
분변성대장균		ND	ND	ND	ND		
원재료 보관	대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	55	ND	80	50	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
	소맥분	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>E. coli</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	양성	ND	양성		
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	

표19. 된장 중 생물학적 위해분석관련 근거 자료(계속)

공정명	시료명	검사항목	검사결과				발생가능성
			실험횟수			평균	
			1회	2회	3회		
	소금	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
부재료 보관	포장재	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
출고	대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	60	10	ND	23	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
	소맥분	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>E. coli</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	양성	양성	양성	양성	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
소금	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND		
	<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND		
	<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND		
	<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND		
	<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND		
	<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND		
증자	소맥분	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	



표20. 된장의 생물학적 위해 분석관련 근거 자료(계속)

공정명	시료명	검사항목	검사결과				발생가능성
			실험횟수			평균	
			1회	2회	3회		
제국	소맥분	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>E. coli</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	양성	양성	양성	양성	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
발효	곡자	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>E. coli</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	양성	양성	양성	양성	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
염수 제조	식염수	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
석발 세척 침지	대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	20	50	ND	35	
		<i>E. coli</i>	ND	양성	ND		
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
증자	대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
냉각	대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	

표21. 된장의 생물학적 위해분석관련 근거 자료(계속)

공정명	시료명	검사항목	검사결과				발생가능성
			실험횟수			평균	
			1회	2회	3회		
혼합	사입죽 (된장)	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	180	150	140	156	
		<i>E. coli</i>	양성	양성	양성	양성	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
숙성	숙성죽 (된장)	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	860	790	840	830	
		<i>E. coli</i>	양성	양성	양성	양성	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
혼합 및 살균 (주정)	혼합죽 (된장)	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	20	30	25	25	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
초평	된장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	180	150	140	156	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
내포장	된장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	600	540	700	613	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
금속 검출	된장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	450	430	370	416	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	

표22. 된장 위해분석관련 근거 자료-생물학적요인

공정명	시료명	검사항목	검사결과				발생가능성
			실험횟수			평균	
			1회	2회	3회		
외포장 (완제품)	된장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	610	540	530	560	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	

표23. 된장 원·부재료별 위해 목록표

원부 재료	위해요소 (생물학적B, 화학적C, 물리적)	발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법	
			심각성	발생 가능성	종합 평가		
콩	B	<i>E. coli</i> O157:H7	자연계에 상재, 야생동물, 오물, 폐수	3	1	3	협력업체 관리: 원료 입고 검사 작업자 세척, 소독 관리 증자 및 발효 공정관리 작업자 위생 교육
		<i>L. monocytogenes</i>	등오염	3	1	3	
		<i>Salmonella</i> spp.	공기, 토양, 사람에 의해 오염	2	1	2	
		<i>B. cereus</i>	작업자의 취급, 보관 부실오염	1	3	3	
		<i>E. coli</i>	원료 자체에서 발생 가능	2	1	2	
		<i>S. aureus</i>	원료 자체에서 발생 가능	1	1	1	
	C	잔류농약	병충해 방제목적에 따른 과도한 살포 가능성 농약 사용 안전기준 미준수	2	1	2	입고검사(성적서 확인) 외부공인기관검사의뢰 (주기 : 산지별 1회/6개월 정기, 수시 검사 실시)
		총아플라톡신	보관관리 미흡으로 발생가능	2	1	2	입고검사(성적서 확인) 외부 공인 기관 검사의뢰 (주기 : 산지별 1회/7개월 정기, 수시 검사 실시)
		중금속(Pb, Cd)	재배 환경으로 부터 오염	2	1	2	외부 공인 기관 검사 의뢰 (주기 : 산지별 1회/6개월 정기, 수시 검사 실시)
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	재배환경 및 유통과정 취급 부주의	3	2	6	입고검사 이물 선별, 금속 검출 자동 세척 공정 관리 작업자 위생 교육
		경질성 이물 (돌 등)	재배환경 및 유통과정 취급 부주의	2	3	6	입고검사 자동 세척 공정 관리 작업자 위생 교육
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	재배환경 및 유통과정 취급 부주의	1	3	3	입고검사 자동 세척 공정 관리 작업자 위생교육
소 맥 분	B	<i>E. coli</i> O157:H7	협력업체 제자/가공기준 미준수로 오염	3	1	3	입고검사 협력업체 시험성적서 확인 원료재배과정 관리 협력업체(생산자) 점검/ 교육 관리 살균공정관리
		<i>L. monocytogenes</i>	협력업체 작업자/제조설비/작업장	3	1	3	
		<i>Salmonella</i> spp.	운반차량/제조 도구 등에 대한 세	2	1	2	
		<i>B. cereus</i>	척·소독관리 부족으로 오염	1	1	1	
		<i>E. coli</i>	척·소독관리 부족으로 오염	2	2	4	
		<i>S. aureus</i>	협력업체 원료관리 부족으로 오염	1	1	1	
	C	잔류농약	병충해 방제목적에 따른 과도한 살포 가능성 농약 사용 안전기준 미준수	2	1	2	입고검사(성적서 확인) 외부공인기관검사의뢰 (주기 : 산지별 1회/6개월 정기, 수시 검사 실시)
		총아플라톡신	보관관리 미흡으로 발생가능	2	1	2	입고검사(성적서 확인) 외부 공인 기관 검사의뢰 (주기 : 산지별 1회/7개월 정기, 수시 검사 실시)
		중금속(Pb, Cd)	재배 환경으로부터 오염	2	1	2	외부 공인 기관 검사 의뢰 (주기 : 산지별 1회/6개월 정기, 수시 검사 실시)
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	재배환경 및 유통과정 취급 부주의	3	1	3	입고검사 이물 선별, 금속 검출 자동 세척 공정 관리 작업자 위생 교육
		경질성 이물 (돌 등)	재배환경 및 유통과정 취급 부주의	2	1	2	입고검사 자동 세척 공정 관리 작업자 위생 교육
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	재배환경 및 유통과정 취급 부주의	1	2	2	입고검사 자동 세척 공정 관리 작업자 위생교육

표24. 된장 원·부재료별 위해 목록표

원부 재료	위해요소 (생물학적B, 화학적C, 물리적)		발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법
				심각성	발생 가능성	종합 평가	
소 금	C	수은 카드뮴 비소 납 총수은 메탈수은	원료 가공자의 취급 부적합 취급자 부주의 제조 과정 관리 부적절	2	1	2	협력업체 관리 시험성적서 수령 및 확인 외부공인기관 검사 의뢰 (주기 : 1회/6개월 수시, 정기 검사 실시)
		페로시아화이온		2	1	2	
	P	연질이물(비닐, 끈)	제조 및 유통과정 불량	1	2	2	작업자 위생교육 협력업체 관리 입고검사
용 수	B	<i>E. coli</i>	수처리 부적절에 의한 잔존	2	1	2	검사관리(수질검사) 년1회 정기 수질 검사 공인기관에 의뢰 월1회 자체 수질검사
		분원성대장균, 일반세균	수처리 부적절에 의한 잔존	1	1	1	
	C	중금속, 잔류염소	주위환경 부적합	2	1	2	
	P	이물오염(금속)	배관 노후 및 물탱크 오염	3	1	3	
포 장 재 (PET)	B	<i>E. coli</i>	관리 소홀	2	1	2	협력업체 관리 검사관리(포장재검사)
		<i>S. aureus</i>	제조업체 작업자 위생관리 미흡 작업자의 취급, 보관부실에 의한 오염	1	1	1	
	C	잔류용제	포장재 제조 시 사용 규정 미준수로 인한 기준치 초과 우려	1	1	1	협력업체 관리 시험 성적서 수령 및 확인 외부 공인기관 검사 의뢰 (주기 : 1회/6개월 수시, 정기 검사 실시)
		중금속(Pb)	제조업체의 부적절한 원료 사용으로 인한 화학 물질, 잔류용출로 인한 용출	2	1	2	
	P	연질 이물(머리카락, 곤충)	포장재료 취급자의 부적절한 취급	1	1	1	입고 검사
포장재 (박스)	P	연질 이물(머리카락, 곤충)	포장재료 취급자의 부적절한 취급	1	2	2	입고 검사

표25. 된장 공정별 위해 목록표

공정명	B, C, P	위해종류	발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법
				심각성	발생 가능성	종합 평가	
원재료 입고 (콩)	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염 보관창고 온도 미흡 산지로부터 비위생적인 운반	1	3	3	보관 창고 청결 상태 유지 보관, 운송 관리 세척(세척시간)공정 관리 증자 공정 관리 발효 공정 관리
		<i>E. coli</i> O157:H7		3	1	3	
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
		<i>E.coli</i>		2	1	2	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	보관창고 보관관리 미흡으로 인한 유래	3	2	6	입고검사, 입고 시 이물 제거 이물 선별 공정관리, 조도관리 작업자 위생교육
		경질성 이물(돌 등)	작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	2	3	6	
		연질성 이물 (근, 벌레 등)	원료자체에서 유래	1	3	3	
소맥분	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염 보관창고 온도 미흡 산지로부터 비위생적인 운반	1	1	1	보관 창고 청결 상태 유지 보관, 운송 관리 세척(세척시간)공정 관리 증자 공정 관리 발효 공정 관리
		<i>E. coli</i> O157:H7		3	1	3	
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
		<i>E.coli</i>		2	3	6	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	보관창고 보관관리 미흡으로 인한 유래	3	1	3	입고검사, 입고 시 이물 제거 이물 선별 공정관리, 조도관리 작업자 위생교육
		경질성 이물(돌 등)	작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	2	1	2	
		연질성 이물 (근, 벌레 등)	원료자체에서 유래	1	2	2	
부재료 (소금) 입고	B	<i>S. aureus</i>	작업자로부터의 오염 보관창고 온도 미흡 산지로부터 비위생적인 운반	1	1	1	보관창고 청결 상태 유지 보관, 운송 관리 세척(세척시간)공정 관리
		대장균	보관창고 보관 관리 미흡으로 인한 유래, 작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	2	1	2	
	P	연질성 이물 (종이, 비닐 등)	보관창고 보관 관리 미흡으로 인한 유래, 작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	1	2	2	입고검사, 입고 시 이물 제거 이물 선별 공정관리, 조도관리 작업자 위생 교육
용수입 고	B	대장균	수처리 부적절에 의한 잔존	2	1	2	작업장 관리 작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 제조시설, 설비관리 자외선 살균
		분원성 대장균 군		2	1	2	
포장재 입고	B	대장균	포장재 파손 취급 부주의로 인한 오염 및 증식	2	1	2	작업장관리 작업자위생관리 작업자위생교육 제조시설, 설비관리
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
	P	연질성 이물 (박스잔존물(종이자투러, 끈충사채 등)	보관창고의 위생불량 및 출입문 관리 불량 작업장 위생관리 불량-박스 포장재의 절단시 칼날 마모에 의한 발생	1	2	2	제조시설, 설비관리, 입고 시 이물제거 작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 방충, 방서 관리 협력업체 관리

표26 된장 공정별 위해 목록표

공정	위해요소 (생물학적B, 화학적C, 물리적P)	발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법	
			심각성	발생 가능성	종합 평가		
대두보관	B	<i>E. coli</i> O157:H7	3	1	3	보관창고청결상태유지 세척(세척시간)공정관리 세척, 소독관리 청결도검사 실시 청소도구별도보관 증자공정관리 발효공정관리	
		<i>L. monocytogenes</i>	3	1	3		
		<i>Salmonella</i> spp.	2	1	2		
		<i>B. cereus</i>	1	3	3		
		<i>E. coli</i>	2	1	2		
		<i>S. aureus</i>	1	1	2		
	C	총아플라톡신	보관 중 독소 생성, 곰팡이의 증식으로 인한 오염	2	1	2	외부공인기관검사의뢰 (주기 : 산지별 1회/개월 정기, 수시 검사 실시)
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	보관창고 보관 관리 미흡으로 인한 유래	3	2	6	작업자 위생관리 작업자 위생교육 세척(세척시간)공정관리
		경질성 이물 (돌 등)	작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	2	3	6	
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	원료자체에서 유래	1	3	3	
소맥분보관	B	<i>E. coli</i> O157:H7	3	1	3	보관창고청결상태유지 세척(세척시간)공정관리 세척, 소독관리 청결도검사 실시 청소도구별도보관 증자공정관리 발효공정관리	
		<i>L. monocytogenes</i>	3	1	3		
		<i>Salmonella</i> spp.	2	1	2		
		<i>B. cereus</i>	1	1	1		
		<i>E. coli</i>	2	2	4		
		<i>S. aureus</i>	1	1	1		
	C	총아플라톡신	보관관리 미흡으로 발생가능	2	1	2	입고검사(성적서 확인) 외부 공인 기관 검사의뢰 (주기 : 산지별 1회/7개월 정기, 수시 검사 실시)
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	보관창고 보관 관리 미흡으로 인한 유래	3	2	6	작업자 위생관리 작업자 위생교육 세척(세척시간)공정관리
		경질성 이물 (돌 등)	작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	2	3	6	
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	원료자체에서 유래	1	3	3	
소금보관	B	<i>S. aureus</i>	1	1	1	보관창고청결상태유지 보관, 운송 관리 세척(세척시간)공정관리	
		<i>E.coli</i>	2	1	2		
	P	연질성 이물 (종이, 비닐 등)	보관창고 보관 관리 미흡으로 인한 유래, 작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	1	2	2	입고검사, 입고 시 이물 제거 이물선별 공정관리, 조도관리 작업자 위생 교육
염수제조	B	<i>S. aureus</i>	1	1	1	작업장 관리 작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 세척, 소독관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관 공정별 오염도 검사 실시	
		<i>E.coli</i>	2	1	2		
	P	연질성 이물 (끈, 비닐 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급부주의로 인하여 발생	1	1	1	제조시설, 설비관리
		경질성 이물 (금속성이물 등)	제조시설, 설비로부터 유래 취급부주의로 인한 혼입	3	1	3	제조시설, 설비관리 금속검출기 공정관리

표27. 된장 공정별 위해 목록표

공정	위해요소 (생물학적B, 화학적C, 물리적)		위해요소평가			예방조치 및 관리방법	
			심각성	발생 가능성	종합 평가		
포장재 보관	B	<i>E. coli</i>	포장재 파손 취급 부주의로 인한 오염 및 증식	2	1	2	작업장 관리 작업자 위생관리 작업자 위생 교육
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
	P	연질성 이물 (박스 잔존물, 끈충사체 등)	보관창고의 위생불량 및 출입문 관리 불량, 작업장 위생 관리 불량 박스포장재의 절단 시 칼날 마모에 의한 발생	1	3	3	작업자 위생관리 작업자 위생교육
대두 출고	B	<i>E. coli</i> O157:H7	작업자로부터의 오염 작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염 청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차 오염발생	3	1	3	작업장 관리 작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
		<i>B. cereus</i>		1	3	3	
		<i>E. coli</i>		2	1	2	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	2	6	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 선별공정 관리, 세척(세척시간)공정관리 선별, 공정관리, 세척(세척시간)관리 제조시설, 설비 관리 금속검출 공정 관리
		경질성 이물 (돌 등)	원료 자체에서 유래	2	3	6	
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급부주의로 인하여 발생	1	3	3	
소맥분 출고	B	<i>E. coli</i> O157:H7	작업자로부터의 오염 작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염 청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차 오염발생	3	1	3	작업장 관리 작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
		<i>B. cereus</i>		1	1	1	
		<i>E. coli</i>		2	3	6	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	2	6	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 선별공정 관리, 세척(세척시간)공정관리 선별, 공정관리, 세척(세척시간)관리 제조시설, 설비 관리 금속검출 공정 관리
		경질성 이물 (돌 등)	원료 자체에서 유래	2	3	6	
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급부주의로 인하여 발생	1	3	3	
소금 출고	B	<i>E. coli</i> O157:H7	작업자로부터의 오염 작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염 청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차 오염발생	3	1	3	작업장 관리 작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
		<i>B. cereus</i>		1	1	1	
		<i>E. coli</i>		2	1	2	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	2	6	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 선별공정 관리, 세척(세척시간)공정관리 선별, 공정관리, 세척(세척시간)관리 제조시설, 설비 관리 금속검출 공정 관리
		경질성 이물 (돌 등)	원료 자체에서 유래	2	3	6	
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급부주의로 인하여 발생	1	3	3	



표28. 된장 공정별 위해 목록표

공정	위해요소 (생물학적B, 화학적C, 물리적P)	발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법	
			심각성	발생 가능성	종합 평가		
증자	B	<i>E. coli</i> O157:H7	원료로부터 유래 부적절한 증자실 온도관리에 의한 위	3	1	3	증자실 세척소독 관리
		<i>L. monocytogenes</i>	해요소 증식	3	1	3	증자실 운반도구 세척소독 관리
		<i>Salmonella</i> spp.	증자실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등	2	1	2	증자실 작업자 위생 교육훈련 증자실 설비 세척소독 관리
		<i>B. cereus</i>	세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	1	1	1	증자실 기구용기/검사장비 청소도구 세척소독 관리
		<i>E. coli</i>	부적절한 증자실 청정도 관리로 교	2	1	1	증자실 온도관리
		<i>S. aureus</i>	차 오염	1	1	1	증자실 청정도 관리
	P	경질성 이물 (금속)	증자실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 증자실 작업자/작업장/제조설비/기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	3	1	3	증자실 세척소독 관리 증자실 운반도구 세척소독 관리 증자실 작업자 위생 교육훈련 증자실 설비 세척소독 관리 증자실 기구용기/검사장비 청소도구 세척소독 관리 증자실 청정도 관리 금속검출 공정 관리
	B	<i>E. coli</i> O157:H7	원료로부터 유래 부적절한 제국실 온도관리에 의한 위	3	1	3	제국실 세척소독 관리
		<i>L. monocytogenes</i>	해요소 증식	3	1	3	제국실 운반도구 세척소독 관리
		<i>Salmonella</i> spp.	증자실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등	2	1	2	제국실 작업자 위생 교육훈련 제국실 설비 세척소독 관리
		<i>B. cereus</i>	세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	1	1	1	제국실 기구용기/검사장비 청소도구 세척소독 관리
		<i>E. coli</i>	부적절한 제국실 청정도 관리로 교차	2	3	6	제국실 온도관리
<i>S. aureus</i>		오염	1	1	1	제국실 청정도 관리	
P	경질성 이물 (금속 등)	증자실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 증자실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	3	1	3	제국실 세척소독 관리 제국실 운반도구 세척소독 관리 제국실 작업자 위생 교육훈련 제국실 설비 세척소독 관리 제국실 기구용기/검사장비 청소도구 세척소독 관리 제국실 청정도 관리 금속 검출 공정 관리	
곡자	B	<i>E. coli</i> O157:H7	원료로부터 유래 부적절한 제국실 온도관리에 의한 위	3	1	3	발효실 세척소독 관리
		<i>L. monocytogenes</i>	해요소 증식	3	1	3	발효실 운반도구 세척소독 관리
		<i>Salmonella</i> spp.	사입실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등	2	1	2	발효실 작업자 위생 교육훈련 발효실 설비 세척소독 관리
		<i>B. cereus</i>	세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	1	1	1	발효실 기구용기/검사장비 청소도구 세척소독 관리
		<i>E. coli</i>	부적절한 사입실 청정도 관리로 교	2	3	6	발효실 온도관리
		<i>S. aureus</i>	차 오염	1	1	1	발효실 청정도 관리
	P	경질성 이물 (금속 등)	발효실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 발효실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	3	1	3	발효실 세척소독 관리 발효실 운반도구 세척소독 관리 발효실 작업자 위생 교육훈련 발효실 설비 세척소독 관리 발효실 기구용기/검사장비 청소도구 세척소독 관리 발효실 온도관리 발효실 청정도 관리

표29. 된장 공정별 위해 목록 표

공정	위해요소 (생물학적B, 화학적C, 물리적P)	발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법		
			심각성	발생 가능성	종합 평가			
대두	세척 석발 침지	B	<i>E. coli</i> O157:H7	작업자로부터의 오염	3	1	3	작업장 관리
		<i>L. monocytogenes</i>	작업환경으로부터의 오염	3	1	3	작업자 위생 관리	
		<i>Salmonella</i> spp.	제조시설, 설비로부터의 오염	2	1	2	작업자 위생 교육	
		<i>B. cereus</i>	청소도구에 의한 교차오염 발생	1	3	3	세척, 소독 관리	
		<i>E. coli</i>	운반도구에 의한 교차오염 발생	2	2	4	청결도 검사 실시	
		<i>S. aureus</i>	표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생	1	1	1	청소도구 별도 보관	
		P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	3	3	작업자 위생관리 작업자 위생교육
	경질성 이물 (돌, 플라스틱 등)	원료 자체에서 유래	2	3	6	선별공정관리, 세척(세척시간)공정관리		
	경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	선별, 공정관리, 세척(세척시간)관리 제조 시설, 설비 관리 금속 검출 공정 관리		
	증자	B	<i>E. coli</i> O157:H7	작업자로부터의 오염	3	1	3	작업장 관리
		<i>L. monocytogenes</i>	작업환경으로부터의 오염	3	1	3	작업자 위생 관리	
		<i>Salmonella</i> spp.	제조시설, 설비로부터의 오염	2	1	2	작업자 위생교육	
		<i>B. cereus</i>	청소도구에 의한 교차오염 발생	1	1	1	세척, 소독 관리	
		<i>E. coli</i>	운반도구에 의한 교차오염 발생	2	1	2	청결도 검사 실시	
		<i>S. aureus</i>	표면균, 낙하균에 의한 교차 오염 발생	1	1	1	청소도구 별도 보관	
		P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	1	1	작업자 위생관리 작업자 위생교육 작업장 관리
	경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조 시설, 설비 관리 금속 검출 공정 관리		
	냉각	B	<i>E. coli</i> O157:H7	작업자/작업장/제조설비/기구용기 검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소 독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	작업장 세척소독 관리
		<i>L. monocytogenes</i>	작업자/작업장/제조설비/기구용기 검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소 독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	작업장 운반도구 세척소독 관리 작업자 위생 교육훈련	
		<i>Salmonella</i> spp.	작업자/작업장/제조설비/기구용기 검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소 독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	2	1	2	작업장 설비 세척소독 관리	
		<i>B. cereus</i>	부적절한 작업장 청정도 관리로 교차오염	1	1	1	작업장 기구용기/검사장비/청소도구 세 척소독 관리	
		<i>E. coli</i>	작업장 온도관리 미흡으로 증식	2	1	2	작업장 온도관리	
		<i>S. aureus</i>	작업장 청정도 관리	1	1	1	작업장 청정도 관리	
		P	경질성 이물 (금속 등)	작업장 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 작업자/작업장/제조설비/기구용기 검사장비/운반도구/청소도구 등 세척소 독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	작업장 세척소독 관리 작업장 운반도구 세척소독 관리 작업자 위생 교육훈련 작업장 설비 세척소독 관리 작업장 기구용기/검사장비/청소도구 세 척소독 관리 작업장 청정도 관리 금속검출 공정관리 기준 준수

표30. 된장 공정별 위해 목록 표

공정	위해요소 (생물학적B, 화학적C, 물리적P)	발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법	
			심각성	발생 가능성	종합 평가		
혼합	B	<i>E. coli</i> O157:H7	원료로부터 유래 부적절한 혼합실 온도관리에 의한 위	3	1	3	혼합실 세척소독 관리
		<i>L. monocytogenes</i>	해요소 증식	3	1	3	혼합실 운반도구 세척소독 관리
		<i>Salmonella</i> spp.	혼합실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등	2	1	2	혼합실 작업자 위생 교육훈련 혼합실 설비 세척소독 관리
		<i>B. cereus</i>	세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	1	3	3	혼합실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리
		<i>E. coli</i>	부적절한 혼합실 청정도 관리로 교	2	3	6	혼합실 온도관리
		<i>S. aureus</i>	차오염	1	1	1	혼합실 청정도 관리
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	혼합실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 혼합실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	3	1	3	혼합실 세척소독 관리 혼합실 운반도구 세척소독 관리 혼합실 작업자 위생 교육훈련 혼합실 설비 세척소독 관리 혼합실 기구용기/검사장비/청소도구 세 척소독 관리 혼합실 청정도 관리 금속검출 공정 관리
숙성	B	<i>E. coli</i> O157:H7	원료로부터 유래 부적절한 숙성실 온도관리에 의한 위	3	1	3	숙성실 세척소독 관리
		<i>L. monocytogenes</i>	해요소 증식	3	1	3	숙성실 운반도구 세척소독 관리
		<i>Salmonella</i> spp.	숙성실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등	2	1	2	숙성실 작업자 위생 교육훈련 숙성실 설비 세척소독 관리
		<i>B. cereus</i>	세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	1	3	3	숙성실 기구용기/검사장비/청소도구 세 척소독 관리
		<i>E. coli</i>	부적절한 숙성실 청정도 관리로 교	2	3	6	숙성실 온도관리
		<i>S. aureus</i>	차오염	1	1	1	숙성실 청정도 관리
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	숙성실 제조설비, 운반 도구 등 관리 부족으로 교차오염 숙성실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	3	1	3	숙성실 세척소독 관리 숙성실 운반도구 세척소독 관리 숙성실 작업자 위생 교육훈련 숙성실 설비 세척소독 관리 숙성실 기구용기/검사장비/청소도구 세 척소독 관리 숙성실 청정도 관리 금속검출 공정 관리
살균(주정)	B	<i>E. coli</i> O157:H7	원료로부터 유래 부적절한 살균실 온도관리에 의한 위해요소	3	1	3	살균실 세척소독 관리
		<i>L. monocytogenes</i>	증식	3	1	3	살균실 운반도구 세척소독 관리
		<i>Salmonella</i> spp.	살균실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등	2	1	2	살균실 작업자 위생 교육훈련 살균실 설비 세척소독 관리
		<i>B. cereus</i>	세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	1	3	3	살균실 기구용기/검사장비/청소도구 세 척소독 관리
		<i>E. coli</i>	부적절한 살균실 청정도 관리로 교차 오염	2	1	2	살균실 온도관리
		<i>S. aureus</i>	살균공정 관리 미흡으로 잔류	1	1	1	살균실 청정도 관리 살균공정관리 기준준수
	P	경질성 이물 (금속 등)	살균실 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 살균실 작업자/작업장 제조설비 기구 용기/검사장비/운반도구 청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족 으로 교차오염	3	1	3	살균실 세척소독 관리 살균실 운반도구 세척소독 관리 살균실 작업자 위생 교육훈련 살균실 설비 세척소독 관리 살균실 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 살균실 청정도 관리 금속 검출 공정 관리

표31. 된장 공정별 위해 목록 표

공정	위해요소 (생물학적B, 화학적C, 물리적P)		발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법
				심각성	발생 가능성	종합 평가	
효핑	B	<i>B. cereus</i>	작업자/작업장/제조설비/기구용기 검사 장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차 오염 부적절한 작업장 청정도 관리로 교차 오염	1	3	3	작업장 세척소독 관리 작업장 운반도구 세척소독 관리 작업자 위생 교육훈련 작업장 설비 세척소독 관리 작업장 기구용기/검사장비/청소도구 세 척소독 관리 작업장 온도관리 작업장 청정도 관리
		<i>E. coli</i>		2	1	2	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	작업장 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 작업자/작업장/제조설비/기구용기 검 사장비/운반도구/청소도구 등 세척소 독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차오염	3	1	3	작업장 세척소독 관리 작업장 운반도구 세척소독 관리 작업자 위생 교육훈련 작업장 설비 세척소독 관리 작업장 기구용기/검사장비/청소도구 세 척소독 관리 작업장 청정도 관리 금속검출 공정관리 기준 준수
내포장	B	<i>B. cereus</i>	작업자/작업장/제조설비/기구용기 검사 장비/운반도구/청소도구 등 세척소독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교차 오염 부적절한 작업장 청정도 관리로 교차 오염	1	3	3	작업장 세척소독 관리 작업장 운반도구 세척소독 관리 작업자 위생 교육훈련 작업장 설비 세척소독 관리 작업장 기구용기/검사장비/청소도구 세 척소독 관리 작업장 온도관리 작업장 청정도 관리
		<i>E. coli</i>		2	1	2	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	작업장 제조설비, 운반도구 등 관리 부족으로 교차오염 작업자/작업장/제조설비/기구용기 검 사장비/운반도구/청소도구 등 세척소 독 관리, 작업자 위생교육 부족으로 교 차오염 여과공정 관리 미흡으로 잔류	3	1	3	작업장 세척소독 관리 작업장 운반도구 세척소독 관리 작업자 위생 교육훈련 작업장 설비 세척소독 관리 작업장 기구용기/검사장비/청소도구 세척소독 관리 작업장 청정도 관리 금속검출 공정관리 기준 준수
금속검출	B	<i>B. cereus</i>	내포자 형성균 관리 미흡으로 증식	1	3	3	온도관리 준수
	P	경질성 이물 (금속 등)	금속검출기 감도불량으로 인한 잔류 금속검출기 고장으로 인한 잔류	3	1	3	금속검출기 감도 정기적 점검 금속검출기 정기적 점검
외포장	B	<i>B. cereus</i>	내포자 형성균 관리 미흡으로 증식	1	3	3	작업자 위생 교육 작업자 위생 관리 냉장참고 관리
출하	B	<i>B. cereus</i>	내포자 형성균 관리 미흡으로 증식	1	3	3	작업자 위생 교육 작업자 위생 관리 냉장참고 관리

표32. CCP결정도-원부재료

원부 재료 명	위해 요소		질문 1	질문 2	질문 2-1	질문 3	질문 4	질문 5	CCP No.
	B, C, P	위해 종류	선행요건 프로그램 에 의해 잘 관리되 고 있는 가?	확인된 위해에 대한 예방조치 방법이 있는가?	해당 공정 에서의 관 리가 안정 성을 위하 여 필요한 가? Yes→제조 단계, 공 정, 제품변 경 후	해당 공정은 식별된 위해 요소를 제거 또는 허용수 준까지 감소 시키기 위해 특별히 고안 된 것인가?	확인된 위해 의 오염이 허 용수준을 초 과 하거나 또 는 허용할 수 없는 수준으 로 증가하는 가?	확인된 위해를 제거하거나 또 는 그 발생을 허용수준 이하 로 감소시키는 이후의 공정이 있는가?	
			Yes → CCP아님	Yes →질문3	질문2	Yes → CCP	Yes → 질문5	Yes → CCP아님	
			No → 질문2	No → 질문2-1	No→CCP아 님 →면출	No → 질문4	No→ CCP아님 → 면출	No → CCP	
콩	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	No	Yes (세척, 금속검출기)		No	Yes	Yes (세척, 금속검출기)	CP
		경질성 이물 (돌 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
소 맥 분	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E-coil</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	No	Yes (금속검출기)		No	Yes	Yes (금속검출기)	CP
용수	P	이물오염(금속)	No	Yes (금속검출기)		No	Yes	Yes (금속검출기)	CP

표 33. CCP결정도-제조공정

원부재료/공정	위해 요소		질문 1	질문 2	질문 2-1	질문 3	질문 4	질문 5	CCP No.
	B, C, P	위해 종류	실행요건프로그램에 의해 잘 관리되고 있는가?	확인된 위해에 대한 예방조치방법이 있는가?	해당 공정에서의 관리가 안정성을 위하여 필요한가? Yes → 제조단계 공정, 제품변경 후	해당공정은 식별된 위해요소를 제거 또는 허용수준까지 감소시키기 위해 특별히 고안된 것인가?	확인된 위해의 오염이 허용수준을 초과하거나 또는 허용할 수 없는 수준으로 증가하는가?	확인된 위해를 제거하거나 또는 그 발생을 허용수준 이하로 감소시키는 이후의 공정이 있는가?	
			Yes → CCP아님 No → 질문2	Yes → 질문3 No → 질문2-1	질문2 No→CCP아님 →멈춤	Yes → CCP No → 질문4	Yes → 질문5 No→CCP아님 → 멈춤	Yes → CCP아님 No → CCP	
원부재료 입고	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속 조각, 유리 조각 등)	No	Yes (세척, 금속검출)		No	Yes	Yes (세척, 금속검출)	CP
		경질성 이물 (돌 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
포장재 입고	P	연질성 이물 (박스 물(종이자투리), 끈충사체 등)	Yes					CP	
원재료 보관	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	No	Yes (세척, 금속검출)		No	Yes	Yes (세척, 금속검출)	CP
		경질성 이물 (돌 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
염수 제조	P	경질성 이물 (금속성 이물 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes (금속검출)	CP	
포장재 보관	P	연질성 이물 (박스잔존물 끈충사체 등)	Yes (보관참고관리)					CP	
출고 (투입)	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	No	Yes (세척, 금속검출)		No	Yes	Yes (세척, 금속검출)	CP
		경질성 이물 (돌 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	No	Yes (세척, 발)		No	Yes (세척, 석발)	CP	

표34. CCP결정도-제조공정(계속)

증자 (소맥분)	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
제국	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>E. coli</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
발효	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>E. coli</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
세척발지 (대두)	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	No	Yes (세척, 금속검출)		Yes (세척, 금속검출)			CCP-IP
		경질성 이물 (돌 등)	No	Yes (세척, 석발)		Yes (세척, 석발)			CCP-IP
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	No	Yes (세척, 석발)		Yes (세척, 석발)			CCP-IP
증자	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
냉각	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
혼합	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>E. coli</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP

표35. CCP결정도-제조공정(계속)

숙성	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
		<i>B.cereus</i>	No	Yes	-	No	Yes	Yes (살균)	CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
살균 (주정)	B	<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes	-	Yes			CCP- 2B
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes	-	Yes			CCP- 2B
		<i>B. cereus</i>	No	Yes	-	Yeso			CCP- 2B
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
초핑	B	<i>B. cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP
내포장	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes	-	No	Yes	Yes 금속검출	CP
금속 검출	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes	-	Yes			CCP- 3P
외포장	B	<i>Bacillus cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP
보관	B	<i>Bacillus cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP
출하	B	<i>Bacillus cereus</i>	Yes (보관기준 준수)						CP



표36. 된장 세척·석발 공정 HACCP 관리 계획

구 분		내 용			
CCP 번호		CCP-1P			
모니터링단계		세척, 석발			
위해요소		이물 : 경질이물(금속조각) 경질이물(돌, 플라스틱) 연질이물(끈, 벌레등)			
한계기준	관리항목	세척 속도 : 6 RPM			
	관리기준	이물 : 불검출			
모니터링	대상	자동세척, 석발기 RPM 확인			
	방법	RPM : 6 확인			
	빈도	작업시작 전, 작업 중 1회, 작업 종료 후			
	담당자	모니터링 담당자			
개선조치		세척 속도(RPM) 이탈시 모니터링담당자는 즉시 세척, 석발기의 작업을 중지하고 제품을 보류한 뒤 생산담당에게 보고 모니터링담당자는 속도 조정 후 정상적으로 작동 시 재가동 모니터링담당자는 세척, 석발기의 이상발생 전 정상운전 확인 시점 이후에 생산된 제품을 다시 검사 모니터링담당자는 그 내용을 기록, 유지			
검증 방법		생산담당은 CCP점검표가 제대로 기록되고 있는지 매일 확인 생산담당은 작업 시 세척, 석발기의 정상작동을 위해 모니터링 방법을 확인하고 모니터링 담당의 인터뷰를 통해 인지도를 확인			
기록 및 보관		기록명	내 용	작성방법 및 주기	작성자
		CCP-1P점검표	세척 속도 확인	작업 시작 전, 작업 중1회, 작업 종료 후 작성	모니터링 담당

표37 . 된장 살균 공정 HACCP 관리 계획

구분		내용			
CCP 번호		CCP-2B			
모니터링단계		혼합 및 살균(주정)			
위해요소		<i>B. cereus</i> , <i>E.coli</i> O157 : 17, <i>L. monocytogenes</i>			
한계 기준	관리항목	주정합량 : 3 %			
	관리기준	<i>B. cereus</i> : 10,000 이하/g, <i>E.coli</i> O157 : 17 , <i>L. monocytogenes</i> 불검출			
모니터링	대상	주정 첨가량	완제품의 주정 함량		
	방법	저울 사용	주정 정량분석법		
	빈도	매 작업시작 전	작업 완료 후		
	담당자	모니터링 담당자	품질관리 담당자		
개선조치		주정 첨가량 부족으로 기준 이탈 시			
		<p>모니터링 담당자는 주정 양을 확인하고 모니터링일지에 기록한 후 품질관리팀장에게 연락하고 품질관리팀장은 HACCP 팀장에게 보고한다.          품질관리팀장은 제품을 냉장고로 이동시키고 표시를 하여 생산을 중지한 후 제품의 품질검사를 실시하여 문제가 없을 시 생산 지시를 한다.          품질검사 결과 문제가 발생 시 제품을 폐기한다.</p>			
검증 방법		품질관리팀장은 CCP점검표가 제대로 기록되고 있는지 매일 확인			
		품질관리팀장은 첨가량 및 저울의 정상작동을 확인하고 모니터링 담당의 인터뷰를 통해 인지도를 확인.			
기록 및 보관		기록명	내용	작성방법 및 주기	작성자
		CCP-2B점검표	주정첨가량	매 작업시작 전	모니터링 담당

표38 . 된장 금속검출 HACCP 관리 계획

구 분		내 용			
CCP 번호		CCP-3P			
공정단계		금속검출			
위해요소		금속이물			
한계기준	관리항목	금속성이물 (Fe(철) ; Φ2.0mm이상 Sus(스테인레스) : Φ4.5mm이상)			
	관리기준	불검출			
모니터링	대상	금속검출기 감도 확인			
	방법	Test Piece(Fe(철)-Φ2.0mm, Sus(스테인레스)-Φ4.5mm)를 차례로 통과시켜 감도 확인			
	빈도	작업 시작 전, 작업 중 1회/2 시간, 작업 종료 후			
	담당자	모니터링 담당자			
개선조치	감도 이상 발생				
	모니터링 담당자는 즉시 금속검출기의 작업을 중지하고 제품을 보류한 뒤 생산담당에게 보고 모니터링 담당자는 감도를 조정 후 정상적으로 작동 시 재가동 모니터링 담당자는 금속검출기의 이상발생 전 정상운전 확인 시점 이후에 생산된 제품을 다시 검사 모니터링 담당자는 그 내용을 기록, 유지				
	기계적 고장				
	모니터링 담당자는 즉시 금속검출기의 작업을 중단하고 공정제품을 보류한 뒤 생산담당에게 보고한다. 모니터링 담당자는 기계적인 고장발생 시 다른 금속 검출기를 사용하고 공무담당에게 수리를 의뢰한다. 모니터링 담당자는 한계기준 이탈 시 작업된 제품은 재작업을 실시한다. 모니터링 담당자는 그 내용을 기록, 유지한다.				
검증 방법	생산담당은 CCP점검표가 제대로 기록되고 있는지 매일 확인				
	생산담당은 매일 금속검출기의 정상작동 및 감도확인을 위해 테스트피스를 통과시켜 확인하고 모니터링 담당의 인터뷰를 통해 인지도를 확인				
기록 및 보관	기록명	내 용	작성방법 및 주기	작성자	
	CCP-3P 점검표	테스트피스 통과 시 검출 여부	작업 시작 전, 작업 중 2 시간 마다, 작업 종료 후 작성	모니터링 담당	

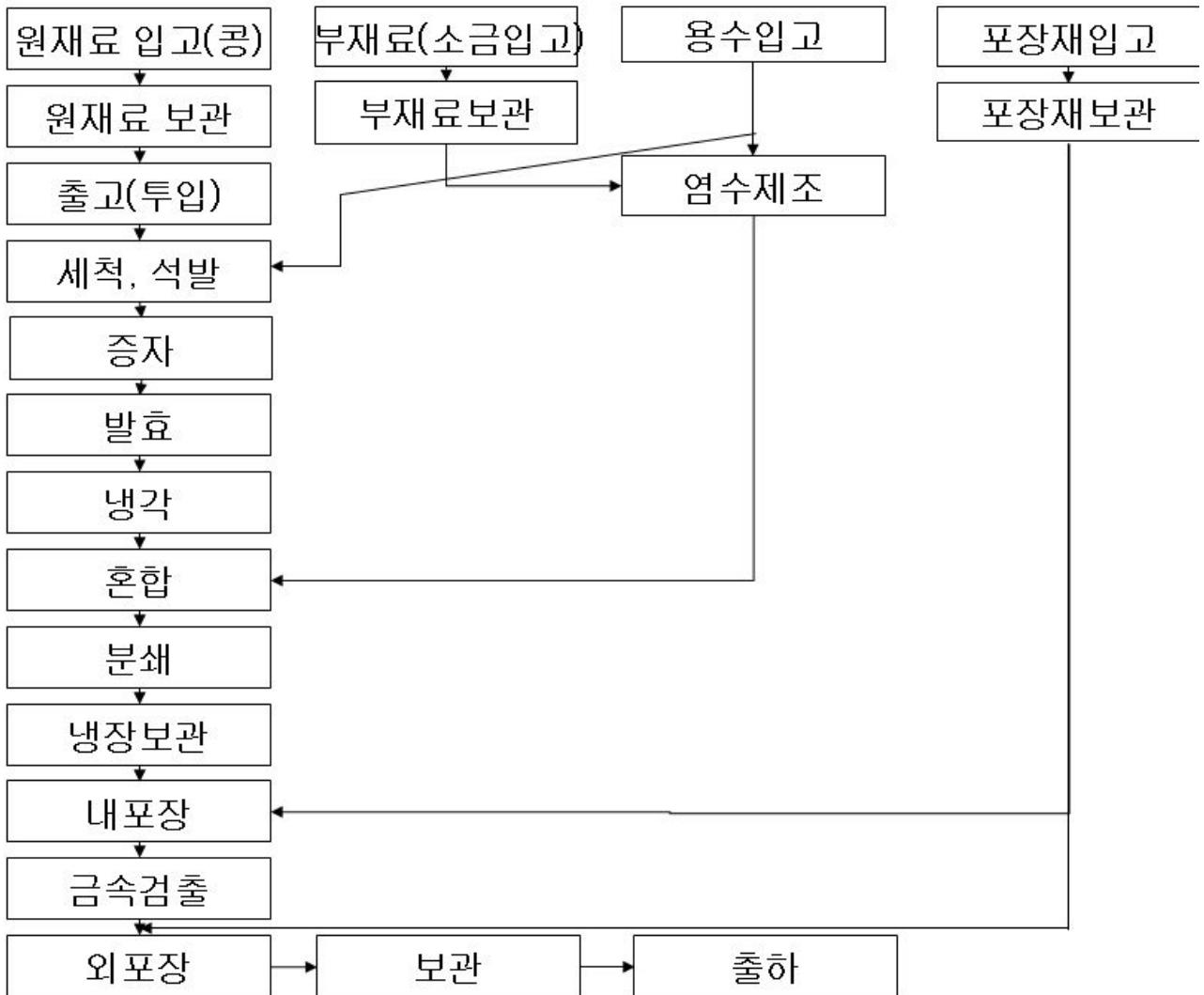
#### 다. 청국장

청국장 위해요소설정에 있어 근거 자료는 표 38 ~ 43과 같고 위해요소 분석 결과표는 44 ~ 48과 같다. 원료별 생물학적 위해요소로 콩은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*로 설정하였고 물리적 위해요소는 금속성이물과 돌 등의 결정성이물과 끈, 벌레등의 연질성 이물로 설정하였다.

공정별 생물학적 위해요소로 원부재료 입고 및 보관, 출고, 석발, 세척, 침지는 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, 증자공정은 *E. coli* O157:H7 *Listeria monocytogenes*, 발효, 냉각, 혼합, 분쇄, 냉장보관, 내포장, 금속검출, 외포장, 보관, 출하공정은 *Bacillus cereus*로 설정하였다. 공정별 물리적 위해요소는 원재료입고 및 보관, 투입, 석발, 세척, 침지공정에서 금속성이물과 돌 등의 결정성이물과 끈, 벌레등의 연질성 이물로 설정하였다. 증자, 발효, 냉각, 혼합, 분쇄, 냉장보관, 내포장은 금속성이물로 설정하였다.

청국장 제조 공정 중의 Critical control point(CCP)는 표 49~51 같이 석발, 세척공정(P)와 발효공정(B) 금속검출공정(P)에서 나타났다. 일반모델 HACCP Plane은 표 52~54에 제시된 것 같이 석발, 세척공정에서는 관리기준을 세척 속도 6RPM으로 설정하여 작업자가 작업 시작 전, 작업 중 1회, 작업종료 후 모니터하도록 하였다. 발효공정은 발효시간을 44시간으로 설정하였으며, 금속검출 공정에 대하여는 작업 시작 전, 작업 종료 후, 작업 중 매 30분마다 금속검출기의 감도를 점검하도록 하였다.

(1) 공정도



(2) 위해요소 분석

표39 . 청국장 물리적 위해분석관련 근거 자료

위해분석관련 근거자료 [발생가능성근거, 물리적 위해요소]									발생가능성평가		
공정	* 위해요소로 도출된 항목에 대하여 실험 * 도출 방법: 원재료(콩) 1포(40KG) 전수 검사 실시 * 부재료(천일엽, 정제염)은 1포(30KG) 전수 검사 실시								평가기준		
									높음 3회이상/월	보통 2~1회/월	낮음 0회 이하/월
	마대 조각	콩깍지	노끈	비닐	돌	플라스 틱조각	금속성 이물	기타	위해 요소	검출 빈도	평가 결과
콩	1	17			3				연질 이물	많음	높음
		24			1				경질이물 (돌)	10	높음
	2	28		1	5		1				
천일엽									연질 이물	2	보통
	1								경질이물 (돌)	0	낮음
원재료 입고	1	17			3				연질 이물	많음	높음
		24			1				경질 이물(돌)	10	높음
	2	28		1	5		1				
부재료 입고 (소금)	1								연질 이물	1	보통
									경질이물 (돌)	0	낮음
용수 입고							1		연질이물	0	낮음
									경질 이물(돌)	0	낮음
포장재 입고									연질이물	1	높음
				1				1 (곤충)	경질 이물(돌)	0	낮음
원재료 보관	1	17			3				연질이물	많음	높음
		24			1				경질 이물 (돌)	10	높음
	2	28		1	5		1				
부재료 보관 (소금)	1								연질 이물	1	보통
									경질 이물(돌)	0	낮음

표40. 청국장 물리적 위해분석관련 근거 자료(계속)

염수 제조				1					연질 이물	1	보통
							1		경질 이물 (금속)	1	보통
포장재 보관				1					연질 이물	2	보통
							1 (곤충)		경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
출고 (투입)	3	11		1	4				연질 이물	많음	높음
	2	16			6		1		경질 이물 (돌)	17	높음
		7			7						
세척 석발 침지	2	15			3				연질 이물	66	높음
		21			2				경질 이물 (돌)	11	높음
	2	22		1	4		1				
증자									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
메주 성형									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
건조 발효									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
세척 · 염장									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음
분리 · 마쇄									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌, 금속)	0	낮음

표41 . 청국장 물리적 위해분석관련 근거 자료(계속)

냉장 보관									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌)	0	낮음
내포장									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌)	0	낮음
금속 검출									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌)	0	낮음
외포장									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌)	0	낮음
보관									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌)	0	낮음
출하									연질 이물	0	낮음
									경질 이물 (돌)	0	낮음



표42. 청국장 생물학적 위해분석관련 근거 자료

공정명	시료명	검사항목	검사결과				발생가능성
			1회	2회	3회	평균	
입고	대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	50	30	40	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
원재료 보관	대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	10	ND	20	15	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
출고	대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	60	10	ND		
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
세척 및 석발	세척 대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	20	50	ND	35	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
혼합	청국장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	730	750	870	783	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	

표43 . 청국장 생물학적 위해분석관련 근거 자료

증자	증자 대두	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
발효	청 국 장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	760	847	790	799	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
냉각	청 국 장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	820	850	790	820	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
혼합	청 국 장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	730	750	870	35	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
분쇄	청 국 장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	750	750	870	783	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	

표44. 청국장 생물학적 위해분석관련 근거 자료

숙성	청 국 장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	860	790	840	ND	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
내포장	청 국 장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	870	790	840	833	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
금속 검출	청 국 장	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	850	810	830	830	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	
외포장 (완제품)	완 제 품	<i>E. coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	<i>B. cereus</i>
		<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	
		<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	
		<i>B. cereus</i>	850	810	830	830	
		<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	

표45. 청국장 원·부재료별 위해 목록표

원부재료명	B,C,P	위해종류	발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법	
				심각성	발생가능성	종합평가		
주원료	B	<i>B. cereus</i>	자연계에 상재, 야생동물, 오물	1	3	3	협력 업체 관리: 원료입고 검사 작업자 세척, 소독관리(부패, 변질 부위 제거) 증자 및 발효공정 관리 작업자 위생교육	
		<i>E. coli</i> O157:H7	,폐수등 오염	3	1	3		
		<i>L. monocytogenes</i>	공기, 토양, 사람에 의해 오염	3	1	3		
		<i>S. aureus</i>	작업자의 취급, 보관 부실에	1	1	1		
		<i>E. coli</i>	의한 오염	2	3	6		
		<i>Salmonella</i> spp.	원료자체에서 발생 가능	2	1	2		
	C	잔류농약	병충해 방제목적에 따른 과다한 살포 가능성 농약사용 안전기준 미준수	2	1	2	입고검사(성적서 확인) 외부 공인 기관 검사 의뢰 (주기 : 산지별 1회/6개월 정기, 수시 검사 실시)	
		총 아플라톡신	보관 관리 미흡으로 발생 가능	2	1	2	입고검사(성적서 확인) 외부 공인기관 검사 의뢰 (주기 : 산지별 1회/7개월 정기, 수시 검사 실시)	
		중금속(Pb, Cd)	재배환경 으로부터 오염	2	1	2	외부 공인기관 검사 의뢰 (주기 : 산지별 1회/6개월 정기, 수시 검사 실시)	
	P	경질성 이물 (금속조각 유리조각 등)	재배환경 및 유통과정 취급 부주의	3	2	6	입고검사 이물선별, 금속 검출 자동세척 공정관리 작업자 위생교육	
		경질성 이물 (돌 등)	재배환경 및 유통과정 취급 부주의	2	3	6	입고검사 자동 세척 공정 관리 작업자 위생 교육	
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	재배환경 및 유통과정 취급 부주의	1	3	3	입고검사 자동 세척 공정 관리 작업자 위생교육	
	소금	C	수은 카드뮴 비소 납 총수은 메탈수은 페로시아화이온	원료가공자의 취급 부적합 취급자 부주의 제조과정 관리 부적절	2	1	2	협력 업체 관리 시험성적서 수령 및 확인 외부공인 기관 검사 의뢰 (주기 :1회/6개월 수시, 정기 검사 실시)
			P	연질성 이물 (비닐, 끈)	제조 및 유통과정 불량	1	2	
	부재료	용수	B	<i>E. coli</i>	수처리 부적절에 의한 잔존	2	1	2
			분원성대장균	수처리 부적절에 의한 잔존	2	1	2	
P			중금속, 잔류 염소	주위 환경 부적합	2	1	2	
C		이물오염(금속)	배관 노후 및 물탱크 오염	3	1	3		
포장재 (PET)		B	<i>E. coli</i>	관리 소홀	2	1	2	협력업체 관리 검사관리(포장재검사)
			<i>S. aureus</i>	제조업체 작업자 위생 관리 미흡 작업자의 취급, 보관부실 오염	1	1	1	
	C	잔류용제	포장재 제조 시 사용규정 미준수로 인한 기준치 초과 우려	1	1	1	협력업체 관리 시험성적서 수령 및 확인 외부공인기관검사의뢰 (주기 :1회/6개월 수시, 정기 검사)	
		중금속(납)	제조업체의 부적절한 원료 사용으로 인한 화학 물질, 잔류용출로 인한 용출	2	1	2		
P	이물(머리카락, 곤충)	포장재료 취급자의 부적절한 취급	1	1	1	입고 검사		
포장재 (박스)	P	이물(머리카락, 곤충)	포장재료 취급자의 부적절한 취급	1	2	2	입고 검사	

표46. 공정별 위해 목록 표

공정명	B, C, P	위해종류	발생원인	위해요소평가			예방조치 및 관리방법
				심각성	발생 가능성	종합 평가	
원재료 입고	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염	1	3	3	보관 창고 청결 상태 유지 보관, 운송 관리 세척(세척시간)공정 관리 증자 공정 관리 발효 공정 관리
		<i>E. coli</i> O157:H7		3	1	3	
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		진균		1	3	3	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
		<i>E. coli</i>		2	3	6	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	보관 창고 보관 관리 미흡으로 인한 유래	3	2	6	입고검사, 입고 시 이물 제거 이물 선별 공정 관리, 조도 관리 작업자 위생교육
		경질성 이물(돌 등)	작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	2	3	6	
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	원료 자체에서 유래	1	3	3	
부재료 (소금) 입고	B	<i>S. aureus</i>	작업자로부터의 오염	1	1	1	보관창고 청결상태 유지 보관, 운송관리 세척(세척시간)공정 관리
		<i>E. coli</i>	보관 창고 온도 미흡 산기로부터 비위생적인 운반	2	1	2	
	P	연질성이물질 (종이, 비닐 등)	보관 창고 보관 관리 미흡으로 인한 유래, 작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	1	2	2	
용수 입고	B	<i>E. coli</i>	수처리 부적절에 의한 잔존	2	1	2	작업장 관리 작업자 위생관리 작업자 위생교육 제조시설, 설비관리 자외선 살균
		병원성 대장균		2	1	2	
포장재 입고	B	<i>E. coli</i>	포장재 파손 취급 부주의로 인한 오염 및 증식	2	1	2	제조시설, 설비관리, 입고 시 이물 제거 작업자 위생관리 작업자 위생교육 방충, 방서 관리 협력업체 관리
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
	P	연질성 이물 (박스잔존물(종이자투리), 끈충 사체 등)	보관창고의 위생불량 및 출입문 관리 불량, 작업장 위생관리 불량 박스포장재의 절단 시 칼날 마모에 의한 발생	1	3	3	
원재료 보관	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염	1	3	3	보관창고 청결상태 유지 세척(세척시간)공정관리 세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관 증자 공정 관리 발효 공정 관리
		<i>E. coli</i> O157:H7		3	1	3	
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		진균		1	3	3	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
		<i>E. coli</i>		2	3	6	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
	P	총아플라톡신	보관 중 독소 생성, 곰팡이의 증식으로 인한 오염	2	1	2	외부공인기관검사 의뢰 (주기 : 산지별 1회/6개월 정기, 수시 검사 실시)
	C	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	보관창고 보관 관리 미흡으로 인한 유래	3	2	6	작업자 위생관리 작업자 위생교육 세척(세척시간)공정 관리
		경질성 이물(돌 등)	작업자의 위생 관리 소홀로 인한 혼입	2	3	6	
연질성 이물 (끈, 벌레 등)		원료자체에서 유래	1	3	3		
소금 보관	B	<i>S. aureus</i>	작업자로부터의 오염	1	1	1	보관창고 청결상태 유지 보관, 운송 관리 세척(세척시간)공정관리
		<i>E.coli</i>	보관창고 온도미흡 산기로부터 비위생적인 운반	2	1	2	
	P	연질성 이물 (종이, 비닐 등)	보관 창고 보관 관리미흡으로 인한 유래, 작업자의 위생관리 소홀로 인한 혼입	1	2	2	

표47. 공정별 위해 목록 표-〈계속〉

염수 제조	B	<i>S. aureus</i>	작업자로부터의 오염 작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염 청소도구에 의한 교차오염 발생	1	1	1	작업장 관리 작업자 위생관리 작업자 위생교육
		<i>E.coli</i>	운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생 공정관리 미흡에 의한 오염	2	1	2	세척, 소독관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관 공정별 오염도 검사 실시
	P	연질성 이물 (끈, 비닐 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급부주의로 인하여 발생	1	1	1	제조시설, 설비 관리
		경질성 이물 (금속성 이물 등)	제조시설, 설비로부터 유래 취급부주의로 인한 혼입	3	1	3	제조시설, 설비 관리 금속검출기 공정관리
포장재 보관	B	<i>E.coli</i>	포장재 파손취급 부주의로 인한 오염 및 증식	2	1	2	작업장 관리 작업자 위생관리 작업자 위생 교육
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
	P	연질성 이물 (박스 잔존물, 끈충사체 등)	보관창고의 위생불량 및 출입문 관리 불량, 작업장 위생 관리 불량 박스포장재의 절단 시 칼날마모에 의한 발생	1	3	3	작업자 위생관리 작업자 위생교육
출고 (투입)	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염 작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염 청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생	1	3	3	작업장관리 작업자위생관리 작업자위생교육 세척, 소독관리 청결도검사실시 청소도구별도보관
		<i>E. coli</i> O157:H7		3	1	3	
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		진균		1	3	3	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
		<i>E. coli</i>		2	3	6	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
	P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장관리로 인하여 발생 취급부주의로 인하여 발생	1	3	3	작업자위생관리 작업자위생교육 선별공정관리, 세척(세척시간) 공정관리
		경질성 이물 (돌, 플라스틱 등)	원료 자체에서 유래	2	3	6	선별, 공정관리, 세척(세척시간) 관리
		경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조시설, 설비관리 금속검출 공정 관리
세척 석발	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염 작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염 청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생	1	3	3	작업장 관리 작업자 위생관리 작업자 위생교육 세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관
		<i>E. coli</i> O157:H7		3	1	3	
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		진균		1	3	6	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
		<i>E. coli</i>		2	3	6	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
	P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	3	3	작업자 위생관리 작업자 위생교육 선별 공정관리, 세척(세척시간) 공정관리
		경질성 이물 (돌, 플라스틱 등)	원료 자체에서 유래	2	3	6	선별, 공정관리, 세척(세척시간) 관리
		경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조시설, 설비관리 금속검출 공정관리
증자	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염 작업환경으로부터의 오염 제조 시설, 설비로부터의 오염 청소 도구에 의한 교차오염발생 운반 도구에 의한 교차오염발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염발생	1	1	1	작업장 관리 작업자 위생 관리 작업자 위생 교육 세척, 소독관리 청결도 검사실시 청소도구별도보관 증자시간, 증자온도관리
		<i>E. coli</i> O157:H7		3	1	3	
		<i>L. monocytogenes</i>		3	1	3	
		<i>S. aureus</i>		1	1	1	
		<i>E. coli</i>		2	1	2	
		<i>Salmonella</i> spp.		2	1	2	
		P		연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	
	경질성 이물 (금속 조각 등)		제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조시설, 설비관리 금속검출공정관리

표48. 공정별 위해 목록 표-〈계속〉

발효	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염	1	3	3	작업장 관리
		<i>S. aureus</i>	작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		<i>E.coli</i>	청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생	2	1	2	세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관 발효시간 관리
	P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조시설, 설비 관리 금속검출 공정 관리
냉각	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염	1	3	3	작업장 관리
		<i>S. aureus</i>	작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염	1	1	1	냉장창고 온도 관리 작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		<i>E.coli</i>	청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생	2	1	2	세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관
	P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조시설, 설비 관리 금속검출 공정 관리
혼합	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염	1	3	3	작업장 관리
		<i>S. aureus</i>	작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염	1	1	1	냉장창고 온도 관리 작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		<i>E.coli</i>	청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생	2	1	2	세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관
	P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조시설, 설비 관리 금속검출 공정 관리
분쇄	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염	1	3	3	작업장 관리
		<i>S. aureus</i>	작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		<i>E.coli</i>	청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생	2	1	2	세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관 냉장창고 온도 관리
	P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조시설, 설비 관리 금속검출 공정 관리
냉장보관	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염	1	3	3	작업장 관리
		<i>S. aureus</i>	작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		<i>E.coli</i>	청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생	2	1	2	세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관 냉장창고 온도 관리
	P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조시설, 설비 관리 금속검출 공정 관리
내포장	B	<i>B. cereus</i>	작업자로부터의 오염	1	3	3	작업장 관리
		<i>S. aureus</i>	작업환경으로부터의 오염 제조시설, 설비로부터의 오염	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		<i>E.coli</i>	청소도구에 의한 교차오염 발생 운반도구에 의한 교차오염 발생 표면균, 낙하균에 의한 교차오염 발생	2	1	2	세척, 소독 관리 청결도 검사 실시 청소도구 별도 보관 냉장창고 온도 관리
	P	연질성 이물 (끈, 벌레사체 등)	부적절한 작업장 관리로 인하여 발생 취급 부주의로 인하여 발생	1	1	1	작업자 위생 관리 작업자 위생 교육
		경질성 이물 (금속조각 등)	제조시설, 설비로부터의 유래	3	1	3	제조시설, 설비 관리 금속검출 공정 관리

표49. 공정별 위해 목록 표-<계속>

금속 검출	B	<i>B. cereus</i>	냉장창고 온도관리 미흡으로 인한 발생	1	3	3	작업자 위생교육 작업자 위생관리 냉장창고 관리
	P	경질성 이물 (금속성 이물 등)	공정 중 기계마모에 의한 혼입 금속검출기의 오작동	3	1	3	제조시설, 설비관리 금속검출 공정관리 선별 공정관리 브랭크테스트: susΦ4,5,feΦ2.0이상 불검출
외포장	B	<i>B. cereus</i>	냉장창고 온도관리 미흡으로 인한 발생	1	3	3	작업자 위생교육 작업자 위생관리 냉장창고 관리
보관	B	<i>B. cereus</i>	냉장창고 온도관리 미흡으로 인한 발생	1	3	3	작업자 위생교육 작업자 위생관리 냉장창고 관리
출하	B	<i>B. cereus</i>	냉장창고 온도관리 미흡으로 인한 발생	1	3	3	작업자 위생교육 작업자 위생관리 냉장창고 관리



표50. CCP결정도-원부재료

원부 재료 명	위해 요소		질문 1	질문 2	질문 2-1	질문 3	질문 4	질문 5	CCP No.
	B, C, P	위해 종류	선행요건 프로그램 에 의해 잘 관리되 고 있는 가?	확인된 위해 에 대한 예방 조치 방법이 있는가?	해당공정에서 의 관리가 안 정성을 위하 여 필요한가? Yes→제조단 계, 공정, 제 품변경 후	해당공정은 식별된 위해 요소를 제거 또는 허용수 준까지 감소 시키기 위해 특별히 고안 된 것인가?	확인된 위해 의 오염이 허 용수준을 초 과 하거나 또 는 허용할 수 없는 수준으 로 증가하는 가?	확인된 위해를 제거하거나 또 는 그 발생을 허용수준 이하 로 감소시키는 이후의 공정이 있는가?	
			Yes → CCP아님	Yes →질문3	질문2	Yes → CCP	Yes → 질문5	Yes → CCP아님	
No → 질문2	No → 질문2-1	No→CCP아님 →멈춤	No → 질문4	No→CCP아님 → 멈춤	No → CCP				
콩	B	<i>E-coil</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E.coli</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		진균	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각, 등)	No	Yes (세척, 금속검출기)		No	Yes	Yes (세척, 금속검출기)	CP
		경질성 이물 (돌 등)	No	Yes (세척, 석말)		No	Yes	Yes (세척, 석말)	CP
		연질성 이물 (끈, 벌레 등)	No	Yes (세척, 석말)		No	Yes	Yes (세척, 석말)	CP
용수	P	이물오염(금속)	No	Yes (금속검출기)		No	Yes (금속검출기)	CP	

표51. CCP결정도-제조공정

원부재료 /공정	위해 요소		질문 1	질문 2	질문 2-1	질문 3	질문 4	질문 5	CCP No.
	B ,C ,P	위해 종류	선행요건프로그램에 의해 잘 관리되고 있는가?	확인된 위해에 대한 예방조치방법이 있는가?	해당 공정에서의 관리가 안정성을 위하여 필요한가? Yes → 제조단계 공정, 제품변경 후	해당공정은 식별된 위해요소를 제거 또는 허용수준 까지 감소시키기 위해 특별히 고안된 것인가?	확인된 위해의 오염이 허용수준을 초과하거나 또는 허용할 수 없는 수준으로 증가하는가?	확인된 위해를 제거하거나 또는 그 발생을 허용수준 이하로 감소시키는 이후의 공정이 있는가?	
			Yes → CCP아님 No → 질문2	Yes → 질문3 No → 질문2-1	질문2 No→CCP아님 →면출	Yes → CCP No → 질문4	Yes → 질문5 No→CCP아님 → 면출	Yes → CCP아님 No → CCP	
원재료 입고	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E.coli</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		진균	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (세척, 금속검출)		No	Yes	Yes (세척, 금속검출)	CP
		경질성 이물 (뜰 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
		연질성 이물 (근, 벌레 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
	포장재 입고	P	연질성 이물 (박스 물(종이자투리), 끈충사체 등)	YES					CP
원재료 보관	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E.coli</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		진균	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각 등)	No	Yes (세척, 금속검출)		No	Yes	Yes (세척, 금속검출)	CP
		경질성 이물 (뜰 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
		연질성 이물 (근, 벌레 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
	염수 제조	P	경질성 이물 (금속성 이물 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes (금속검출)	CP
포장재 보관	P	연질성 이물 (박스진준물, 끈충사체등)	Yes					CP	
출고 (투입)	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		대장균군	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		진균	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	경질성 이물 (금속조각, 유리조각 등)	No	Yes (세척, 금속검출)		No	Yes	Yes (세척, 금속검출)	CP
		경질성 이물 (뜰 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP
		연질성 이물 (근, 벌레 등)	No	Yes (세척, 석발)		No	Yes	Yes (세척, 석발)	CP

표52. CCP결정도-제조공정

세척·석발·침지	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>E. coli</i> O157:H7	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		<i>L. monocytogenes</i>	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		대장균군	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
		진균	No	Yes (증자)		No	Yes	Yes (증자)	CP
	P	연질성 이물 (끈, 벨레사체)	No	Yes (세척, 석발)		Yes (세척, 석발)			
경질성 이물 (돌, 플라스틱 등)		No	Yes (세척, 석발)		Yes (세척, 석발)				CCP-1P
경질성 이물 (금속조각 등)		No	Yes (세척, 석발)		Yes (세척, 석발)				CCP-1P
증자	B	<i>E. coli</i> O157:H7	Yes (증자)						CP
		<i>L. monocytogenes</i>	Yes (증자)						CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
발효	B	<i>B. cereus</i>	No	Yes (발효)		Yes (발효)			CCP-2B
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
냉각	B	<i>B. cereus</i>	Yes (발효)						CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
혼합	B	<i>B. cereus</i>	Yes (발효)						CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
분쇄	B	<i>B. cereus</i>	Yes (발효)						CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
냉장보관	B	<i>B. cereus</i>	Yes (발효)						CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
내포장	B	<i>B. cereus</i>	Yes (발효)						CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		No	Yes	Yes (금속검출)	CP
금속검출	B	<i>B. cereus</i>	Yes (발효)						CP
	P	경질성 이물 (금속 조각 등)	No	Yes (금속검출)		Yes (금속검출)			CCP-3P
외포장	B	<i>B. cereus</i>	Yes (발효)						CP
보관	B	<i>B. cereus</i>	Yes (발효)						CP
출하	B	<i>B. cereus</i>	Yes (발효)						CP

표53. 세척·석발 HACCP 관리 계획

구 분		내 용			
CCP 번호		CCP-1P			
공정단계		세척, 석발공정			
위해요소		이물: 경질이물(금속조각) 경질이물(돌, 플라스틱) 연질이물(끈, 벌레 등)			
한계기준	관리항목	세척속도 : 6 RPM			
	관리기준	이물 : 불검출			
모니터링	대상(What)	자동세척, 석발기 RPM 확인			
	방법(How)	RPM : 6 확인			
	빈도(Frequency)	작업시작 전, 작업 중 1회, 작업 종료 후			
	담당자(who)	모니터링 담당자			
개선조치		세척 속도(RPM) 이탈시 이상 발생			
		모니터링담당자는 즉시 세척, 석발기의 작업을 중지하고 제품을 보류한 뒤 생산담당에게 보고 모니터링담당자는 속도 조정 후 정상적으로 작동 시 재가동 모니터링담당자는 세척, 석발기의 이상발생 전 정상운전 확인 시점 이후에 생산된 제품을 다시 검사 모니터링담당자는 그 내용을 기록, 유지			
검증 방법		생산담당은 CCP점검표가 제대로 기록되고 있는지 매일 확인			
		생산담당은 작업 시 세척, 석발기의 정상작동을 위해 모니터링 방법을 확인하고 모니터링 담당의 인터뷰를 통해 인지도를 확인			
기록 및 보관		기록명	내 용	작성방법 및 주기	작성자
		CCP-1P 점검표	세척 속도 확인	작업시작 전, 작업 중 1회, 작업 종료 후 작성	모니터링담당

표54. 발효 HACCP 관리 계획

구 분		내 용			
CCP 번호		CCP-2B			
공정단계		발효공정			
위해요소		<i>B. cereus</i>			
한계기준	관리항목	발효시간 : 44 ± 1 hr			
	관리기준	<i>B. cereus</i> : 10,000 이하/g			
모니터링	대상(What)	발효시간			
	방법(How)	발효시간 확인			
	빈도 (Frequency)	작업시작 전 ,작업 종료 후			
	담당자(Who)	모니터링 담당자			
개선조치		발효 시간 관리 미흡으로 기준시간 이탈 시			
		모니터링담당자는 발효시간을 확인하고 이상 발생시간을 모니터링 일지에 기록한 후 품질관리 팀장에게 연락하고 품질관리팀장은 HACCP팀장에게 보고 품질관리팀장은 발효품을 냉장 숙성고로 이동시키고 표시를 하여 생산을 중지한 후 제품의 품질검사를 실시하여 문제가 없을시 생산지시 품질검사 결과 문제가 발생 시 제품을 폐기			
검증 방법		품질관리팀장은 CCP점검표가 제대로 기록되고 있는지 매일 확인			
		품질관리팀장은 작업시간을 확인하고 모니터링 담당의 인터뷰를 통해 인지도를 확인			
기록 및 보관		기록명	내 용	작성방법 및 주기	작성자
		CCP-2B점검표	발효시작시간, 발효종료시간	작업 시작 전 작업 종료 후 작성	모니터링 담당

표55. 금속검출 HACCP 관리 계획

구 분		내 용			
CCP 번호		CCP-3P			
공정단계		금속검출공정			
위해요소		금속이물			
한계기준	관리항목	금속성이물 (Fe(철) : Φ 2.0mm이상 Sus(스테인레스) : Φ 4.5mm이상)			
	관리기준	불검출			
모니터링	대상	금속검출기 감도 확인			
	방법	Test Piece(Fe(철) : Φ 2.0mm, Sus(스테인레스) : Φ 4.5mm)를 차례로 통과시켜 감도 확인			
	빈도	작업 시작 전, 작업 중 1회/2시간, 작업 종료 후			
	담당자	모니터링 담당자			
개선조치		감도 이상 발생			
		모니터링 담당자는 즉시 금속검출기의 작업을 중지하고 제품을 보류한 뒤 생산담당에게 보고 모니터링 담당자는 감도를 조정 후 정상적으로 작동 시 재가동 모니터링 담당자는 금속검출기의 이상발생 전 정상운전 확인 시점 이후에 생산된 제품을 다시 검사 모니터링 담당자는 그 내용을 기록, 유지			
		기계적 고장			
		모니터링 담당자는 즉시 금속검출기의 작업을 중단하고 공정제품을 보류한 뒤 생산담당에게 보고 모니터링 담당자는 기계적인 고장발생 시 다른 금속검출기를 사용하고 공무담당에게 수리를 의뢰 모니터링담당자는 한계기준이탈시 작업된 제품은 재작업을 실시한다. 모니터링 담당자는 그 내용을 기록, 유			
검증 방법		생산담당은 CCP점검표가 제대로 기록되고 있는지 매일 확인한다.			
		생산담당은 매일 금속검출기의 정상작동 및 감도확인을 위해 테스트피스를 통과시켜 확인하고 모니터링 담당의 인터뷰를 통해 인지도를 확인			
기록 및 보관		기록명	내 용	작성방법 및 주기	작성자
		CCP-3P 점검표	테스트피스 통과 시 검출 여부	작업 시작 전, 작업 중 2 시간 마다, 작업 종료 후 작성	모니터링 담당

라. CCP 주기적 관리계획

주기적으로 관리해야 할 위생, 공정관리는 매일, 주간, 월간, 분기, 연간별로 점검·확인한다.

(1) 주기적 관리내용

- ① 본 업소에서는 매일 종업원 개인위생관리·제조설비 정상작동 여부·제조공정 적정성·작업장 청결상태 등을 전반적으로 확인·관리 한다.
- ② 본 업소에서는 매주 방충·방서설비에 포획된 개체수, 작업장 및 제조설비(제품과 직접 닿지 않는 부분) 청소·소독 상태, 위생복 세탁여부 등을 확인한다.
- ③ 본 업소에서는 매월 작업 장내 전체청소, 원·부재료 보관상태, 종업원 위생교육, 완제품 검사, 중요관리점(CCP) 검증 등을 확인한다.
- ④ 본 업소에서는 매분기별 용수탱크 청소·소독을 실시하고 있는지 확인 한다.
- ⑤ 본 업소에서는 매년 가열기 및 냉장창고 온도계 등 검·교정 여부, 금속검출기 정기점검 여부, 용수검사 실시여부를 확인한다.

(2) 종사자별 관리내용

① 생산팀장은 매일 「일반위생관리 및 공정점검표」를 작성·관리하고, 작업 중에는 청결작업 구역에 교차오염 발생여부를 확인하고, 매월 첫째 주 월요일에 「중요관리점(CCP) 검증표」를 작성한다.

② 생산팀원A는 매일 작업시작 전에 위생복 및 외출복장의 구분보관 여부, 종업원복장 및 위생상태, 위생설비 이상 유무 등을 확인하고, 「중요관리점(CCP-1) 점검표(세척공정)」를 작성하고, 작업 중에는 세척방법 및 세척량을 확인하며, 작업종료 후에는 작업장 바닥, 배수로 청소·소독 상태, 제조설비(제품과 직접 닿는 부분) 청소·소독상태를 확인한다.

매주 금요일에 냉장창고 내부청소 상태, 작업장 벽 청소 상태, 제조설비(제품과 직접 닿지 않는 부분) 청소·소독 상태, 위생복 세탁 실시여부 등을 확인한다. 매월 첫째 주 월요일에 종업원 위생교육여부, 작업장 전체 청소 상태를 확인한다.

③ 생산팀원B는 매일 작업시작 전에 작업장 밀폐상태, 작업도구의 파손여부 등 시설설비 고장여부를 점검하고 매일 작업 중에는 「중요관리점(CCP-2) 점검표(살균공정, 발효공정)」를 작성하고 가열온도, 가열시간, 발효시간, 모니터링 장비 사용전후 세척·소독상태를 확인하며, 매일 작업종료 후에는 폐기물 처리상태 확인한다.

매주 목요일에는 방충방서설비에 포획된 개체수를 확인한다.

→ 방충방서 설비 확인 결과 개선조치(작업장 방역 등)가 필요한 경우 주말을 이용하여 실시한다.

매월 첫째 주 월요일에는 완제품검사 의뢰여부 확인한다.

매년 12월 마지막 주 월요일에는 가열기 및 냉장창고 온도계 등의 검·교정 여부, 금속검출기 정기점검 여부, 용수검사 여부를 확인한다.

④ 생산팀원C는 원·부재료 입고 시에 원·부재료 시험성적서 수령여부, 운송차량 온도 및 제품 품온 등을 확인하고 육안검사를 실시하며, 매일 작업시작 전에는 냉장창고 온도를 확인한다. 매일 작업 중에는 중요관리점(CCP-3) 점검표(금속검출공정)」를 작성하고 냉장온도, 완제품의 포장 상태를 확인한다. 매주 금요일에는 냉장창고 내부청소상태를 확인한다.

매월 첫째 주 월요일에 원·부재료의 보관 상태를 확인한다.

마. 개인위생관리

(1) 올바른 손 씻기

(가) 종사자 : 작업장 출입 또는 작업 중 필요시 손 세척·소독 실시

(나) 작업장 출입구 : 물비누, 페이퍼타월, 손소독기 등의 세척·소독시설·설비 구비

(2) 위생복장

(가) 위생복장 구분 및 청결관리

① 청결구역 및 일반구역 종사자별로 위생복장(위생모, 위생화, 위생복)을 구분·착용

② 위생복은 복장 착용방법 및 기준에 따라 올바르게 착용

③ 작업장 입실 시 끈끈이롤러, 진공흡입기 또는 종사자끼리의 확인을 통해 이물질 제거

④ 위생복 착용 후 작업장 외부로 출입 금지

⑤ 위생복장은 정해진 세척·소독방법에 따라 세척·소독 진행 및 항상 청결 유지·관리

(나) 위생복장 보관

① 탈의실을 설치하여 외출복과 위생복, 외출화와 실내화 구분·보관

② 외부 신발은 탈의실 위생복장 등과 교차오염을 막기 위해 탈의실 외부 보관

③ 옷장과 신발장은 별도로 분리 보관

④ 탈의실은 항상 깨끗이 관리

(3) 종사자의 개인위생

(가) 위생복장 구분 및 청결관리

① 청결구역 및 일반구역 종사자별로 위생복장(위생모, 위생화, 위생복)을 구분·착용

② 위생복은 복장 착용방법 및 기준에 따라 올바르게 착용

③ 작업장 입실 시 끈끈이롤러, 진공흡입기 또는 종사자끼리의 확인을 통해 이물질 제거

④ 위생복 착용 후 작업장 외부로 출입 금지

⑤ 위생복장은 정해진 세척·소독방법에 따라 세척·소독 진행 및 항상 청결 유지·관리

(나) 두발 및 용모

① 작업장 내 종사자 : 모두 위생모 착용

② 위생모 : 외부에 모발이 노출되지 않도록 정확히 착용

③ 남자 종사자 : 깨끗이 면도

(다) 화장 및 악세사리

① 시계, 반지, 목걸이, 귀걸이, 팔찌 등의 장신구 착용 금지

② 손톱 : 짧고 청결히 유지 및 매니큐어 또는 광택제를 칠하거나 인조손톱 착용 금지

③ 진한 화장 및 향이 강한 향수 사용 금지

④ 작업 중 개인용품 휴대 금지

(라) 상처

① 손이 갈라지거나 상처가 있을 시 상처부위가 노출되지 않도록 밴드, 고무골무 등으로 처리 후 임해야 함



## 바. 작업장 관리

### (1) 보관관리

#### (가) 보관장소

- ① 오염발생원으로부터 영향을 받지 아니하는 곳에 위치
- ② 해충, 설치류 등의 유입방지가 가능한 곳
- ③ 세균, 곰팡이 등이 증식 예방할 수 있는 곳(온·습도관리)

#### (나) 원·부자재 및 제품 보관방법

- ① 원·부자재, 제품 등 구분·보관
- ② 원료 및 제품은 선입선출에 따라 입출고 관리
- ③ 부적합한 원·부자재, 제품은 식별표시 후, 별도 장소 보관 후 반송 및 폐기 처리
- ④ 바닥 또는 벽으로부터 이격관리(벽과 바닥으로부터 15cm 이상 거리), 사용 또는 사용대기인 원·부자재 및 제품은 밀봉처리 관리(이물 및 오염 방지)
- ⑤ 부패·변질되기 쉬운 원·부자재 및 제품 : 냉동·냉장시설 보관·관리
- ⑥ 보존 및 유통기준에 적합하게 관리(온도관리)
- ⑦ 표시사항 없는 원·부자재 및 제품 보관 금지
- ⑧ 사용하고 남은 원·부자재는 유통기한 정기적 점검 및 “사용중” 표시 후 선입선출에 따라 소진

### (2) 청결관리

#### (가) 정리정돈

- ① 원재료, 기구류 등의 명확한 구분 및 정확한 위치 선정
- ② 오염물 보관장소 지정
- ③ 세척, 청소에 필요한 설비, 기구류, 약재 등의 완비
- ④ 정리·정돈에 대한 기준 수립

#### (나) 세척·소독

- ① 영업장 내 기계·설비, 기구·용기 등을 충분히 세척·소독 가능한 시설 또는 장비 구비
- ② 올바른 세척·소독방법 기준 수립
- ③ 세제·소독제, 세척 및 소독용 기구나 용기는 정해진 장소에 보관·관리

### (3) 기계·기구관리

#### (가) 재질관리

- ① 식품과 접촉하는 시설·설비·기구 : 인체에 무해한 내수성, 내부식성 재질로 열탕·증기·살균제 등으로 소독·살균이 가능하여야 함.
- ② 나무, 녹슨 재질, 고무 다라 등 사용 불가  
※ 관련 기준·규격에 적합한 재질 사용

### (4) 방충·방서 관리

(가) 밀폐관리

- ① 작업장 출입문은 항상 닫혀 있어야 함.
- ② 작업장 출입문에는 외부 침입 방충·방서에 대응할 수 있는 설비 설치(에어커튼 등)
- ③ 작업장의 창문 : 모두 방충망 설치
- ④ 설치된 방충망은 찢어진 곳이 없어야 함.(방충망 관리)
- ⑤ 전기 살충기 또는 포충기 설치
- ⑥ 외부로 개방된 흡배기구 등의 여과망 또는 방충망 설치
- ⑦ 배수구, 배수관의 정기적 청소
- ⑧ 배수관, 트랩, 배관 등에는 쥐나 곤충 등의 침입 방지를 위한 스테인레스 스틸망 또는 트랩 설치

(5) 이물관리

(가) 원·부재료 및 공정관리

- ① 원료 입고시 시험성적서 등 수령 확인
- ② 포장된 원료는 랩핑, 외박스 등을 외부에서 작업 후 작업장 반입
- ③ 분체, 액상원료는 스크린, 여과망 등을 사용하여 이물 제거
- ④ 금속성 이물 혼입 우려 원료는 자석을 사용하거나, 금속검출기 이용하여 이물 선별
- ⑤ 고체 돌이나 이물질은 석발기, 세척조 등을 이용하여 이물 제거 후 원료 사용
- ⑥ 제조 작업에 사용하는 기계·설비의 정기적 점검 및 청소를 통한 나사, 볼트, 찌든 때, 탄화물, 녹 등이 혼입되지 않도록 관리
- ⑦ 조명 보호등 설치

## 2절 기능성물질 첨가 장류제품 개발

### 1. 산야초 발효액 조제

#### 가. 서론

##### (1) 연구개발의 필요성

식품업계는 기존 시장의 한계성을 인식하여 기능성 식품 쪽으로 제품개발을 강화하고 있는 추세이며 소비자들도 소득증대와 건강에 대한 관심증가로 기능성 식품에 대한 소비가 계속 증대되고 있어 식품업체와 소비자들의 요구가 부합되어 기능성 식품 시장은 계속해서 성장하고 있다. 그러나 관심증가와 함께 많은 문제점들도 나타나고 있는데 가장 큰 문제점은 효능검증이 나 구체적인 과학적인 규명 없이 기능성 식품이 생산 된다는 점이다.

또한 경제성장과 식생활의 서구화로 인한 식생활 환경의 변화는 관상동맥 질환, 퇴행성 뇌 질환, 고혈압, 당뇨, 암 등을 일으키는 주원인으로 알려져 있으며 이를 예방하기 위한 여러 가지 식이요법들이 권장되고 있으므로 이런 측면에서 국내 전통식품을 활용한 기능성 소재에 의한 건강 기능 향진 효능 연구에 많은 관심이 요구된다. 그러나 우리나라의 경우 전통식품을 활용한 기능성 식품 소재들에 대한 과학적 기전 연구는 아직 미비한 상태이다.

우리나라는 세계적인 기능성 식품시장에 내세울 만한 김치, 된장, 고추장, 전통차, 인삼, 마늘제품 등 전통식품이 있으며 최근에는 전통식품의 함유성분인 캡사이신(고추성분), 펩타이드(고추장, 된장), 플라보노이드(콩 등) 폴리페놀(차성분), 사포닌(인삼), 알리신(마늘) 등 전통식품을 포함한 여러 가지 식품에서도 여러 가지 기능성이 있다는 결과가 많이 발표되고 있다.

이처럼 전통 발효식품은 식품 저장성이 우수하여 보존성과 위생상 안정성이 확보되는 경제적인 식품으로 식량자원으로 효율적으로 이용 가능성이 있으며 최근에는 발효식품에서 3차 기능 식품효과가 있는 유용한 물질 탐색 및 발효대사의 연구가 활발하게 진행되고 있어 새로운 건강 및 생리 작용에 긍정적인 효과를 보이고 있다.

국내 식용식물자원에 대한 관심이 높아지면서 생리활성물질에 대한 많은 연구결과들이 보고되어오고 있으나 아직 그 자체가 식품화되어 개발되는 일은 미비한 실정이다.

우리나라 산야에 야생적으로 자라고 있으며 그 가치에 따라 재배가 가능한 식용식물 자원의 기능성 성분을 활용한 식품개발은 식량자원의 확대, 고부가가치를 창출하는 농촌 경제적인 면과 인류의 건강증진을 위해 매우 필요한 일이라 사료된다.

그러나 식용식물자원은 그 특성상 저장성이 좋지 않기 때문에 쉽게 색의 변화 및 비타민류의 파괴 등 품질변화가 빨리 일어나므로 이를 개선해야 하며 또한 식품개발의 종류도 현대인의 취향에 맞게 다양하게 이루어 져야 할 것으로 보인다.

천연물은 생체에 투여했을 때 부작용이 거의 없을 뿐 아니라 생리활성물질로서 큰 효과를 나타내는 새로운 기능성 물질원이 된다는 점에서 높이 평가되고 있다. 이러한 생리활성물질은 그 화학적 구조의 특이성과 식품 내에 같이 존재하는 물질에 의해 많은 영향을 받게 되므로 개개 식품과 화합물에 대한 정확한 분리, 정량법이 확립되어야 할 것으로 보이며 아울러 완전한 식품으로서의 효과에 대한 연구가 체계적으로 진행되어야 할 것으로 보인다.

##### (2) 산야초의 일반 특성

국내에서 자생하고 있는 식물자원 중에서 식, 약용식물은 약 120과 350속으로 이중에서 산채류는 320여종으로 지역적으로도 전국에 걸쳐 고루 분포하고 있다. 녹색 채소류를 비롯한 각종 산야초류들은 각종 비타민류, 무기물류, 색소류 그리고 각종 특수성분 등 중요한 영양소를 풍부하게 함유하고 있어 건강의 유지, 개선 및 질병예방에 크게 기여하고 있다.

#### (가) 비타민

산채류에는 비타민 A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C 등이 많이 함유되어 있으며, 비타민 A는 저항력을 높여주고, 야맹증을 예방한다. 비타민 B<sub>1</sub>은 당질의 대사에 관여하여 에너지를 생성하게 하는데 부족하면 피로해지기 쉽다. 비타민 B<sub>2</sub>는 단백질과 지방을 연소시키는데 필요하며, 단백질의 대사나 해독작용을 하며 노화를 억제한다. 비타민 C는 세포내 산화환원에 관여하며, 항산화 활성이 있어 부족하면 저항력이 약화되고, 괴혈병을 일으킨다. 비타민류는 빛, 공기, 금속(철분, 구리 등)이나 산화효소에 의해 파괴되는데 이를 최소화하려면 70℃이상의 끓는 물과 소금농도가 진하면 효소활성이 실행되므로 채소나 산채를 비롯한 산야초류를 데칠 때는 끓는 소금물에 데치는 것이 비타민의 손실을 막을 수 있다.

#### (나) 무기질

무기질은 뼈를 구성할 뿐만 아니라 생리기능 조절과 신진대사에 많이 관여하여 건강에 밀접한 관계가 있다. 산채를 비롯한 산야초류에는 무기질 중 칼륨(K)이 가장 많이 함유되어 있다. 칼륨은 나트륨과 결합하여 체외로 배출되는 성질이 있으므로 식염의 과다섭취에 따른 고혈압 등의 예방에 중요한 역할을 할 수 있다.

줄기와 잎에는 칼슘(Ca)이 비교적 많이 함유되어 있는데 칼슘은 인과 더불어 뼈를 형성하는 중요한 영양소이다. 칼슘은 마그네슘과 함께 체외로 배출되므로 마그네슘이 많이 함유되어 있는 곡류 및 육류 위주의 식사를 하면 칼슘의 손실이 커지므로 이를 보충하기 위해서는 칼슘이 많이 함유되어 있는 산채류를 많이 섭취해야 할 필요가 있다.

뿌리에는 마그네슘(Mg)이 많으며 해초류에는 나트륨(Na)이나 요오드(I)가 많이 함유되어 있다. 이외에 인, 황, 철분, 구리 등과 같은 무기질이 많이 함유되어 있다. 철분의 흡수율에 칼슘과 인의 비율, 비타민 C등의 함량이 영향을 주지만, 산채를 많이 섭취함으로써 철분 흡수율을 높일 수 있다. 식품 중에 함유되어 있는 마그네슘, 칼슘, 칼륨 및 기타 염류는 아린 맛의 원인으로 작용하는 경우가 많다. 이 아린 맛은 blanching하여 우려내거나 증조를 넣은 물 또는 소금물로 우려내어 제거할 수 있다.

#### (다) 단백질, 지방, 섬유질

산채류에는 단백질과 지방 함량은 적으나 섬유질이 풍부한 편으로, Linoleic acid, Linolenic acid 등과 같은 필수 지방산이 함유되어 있어 이는 콜레스테롤치를 낮추는 역할을 한다. 섬유질은 에너지원은 아니지만, 장운동을 촉진하여 배변을 원활하게 하고, 콜레스테롤치를 정상화하고 대장암의 발생율을 낮추는 작용을 한다.

#### (라) 알칼로이드, 탄닌, 사포닌, 유기산

산채를 비롯한 산야초류에 함유되어 있는 알칼로이드는 질소를 함유한 염기성 물질의 총칭으로 알칼로이드 자체는 난용성이지만 산과 결합하여 염을 만들어 물에 녹기 쉬워진다. 알칼로이드는 쓴맛을 나타내는 것이 많고 강한 생리작용을 수반하여 약과 독의 양면성을 가진다.

탄닌은 배당체로 물이나 알코올에 잘 용해되고 약산성을 띄며 떫은 맛을 나타내며 단백질을 응고시킨다. 공기 접촉으로 산화해서 갈색 또는 적색으로 변하고 수렴작용이 있어 정장 지

사제로 사용한다.

사포닌은 배당체로서 물이나 90%이하의 알코올 용액에 녹으며 쓴맛을 나타내고 강한 생리 기능을 가지고 있다.

산채류에는 유기산으로서 구연산, 사과산, 주석산 등을 함유하고 있으며 수산은 칼슘과 결합하여 난용성물질을 형성하여 칼슘의 흡수를 방해한다. 정유는 식물을 정제해서 얻는 방향성 유분으로 휘발성이 있어 풍미의 원인물질로 작용한다.

이와 같이 산채를 비롯한 산야초류는 일반채소에 비해 비교적 다양한 생리활성 물질이 함유되어 있어, 건강식품과 기능성 식품의 소재로서 개발가능성이 많다고 판단된다.

### (3) 산야초 선별 및 종류별 특성

산채류의 이용실태에 대한 조사결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 전국적으로 잘 알려져 있는 산채류는 더덕, 도라지, 고사리, 쑥, 달래이었으며, 자주 먹는 산채는 고사리, 도라지, 달래, 더덕, 쑥, 고들빼기 순으로, 밥에 넣어 먹는 산채는 총 25종류로 그 중 쑥의 이용율이 41.9%로 가장 높았다. 산채의 저장법으로 데쳐서 말려서 저장하는 산채는 43종이었으며 그 중 고사리가 32.3%로 가장 높은 비율이었으며 참취, 고비, 참나물, 쑥, 곰취도 데쳐서 건조하여 저장하고 있었다.

이와 같이 살펴본 바와 같이 잘 알려져 있으면서도, 이용 빈도가 높은 산채류는 더덕, 도라지, 고사리, 쑥, 달래, 고들빼기, 참취, 고비, 참나물, 곰취 등이었다.

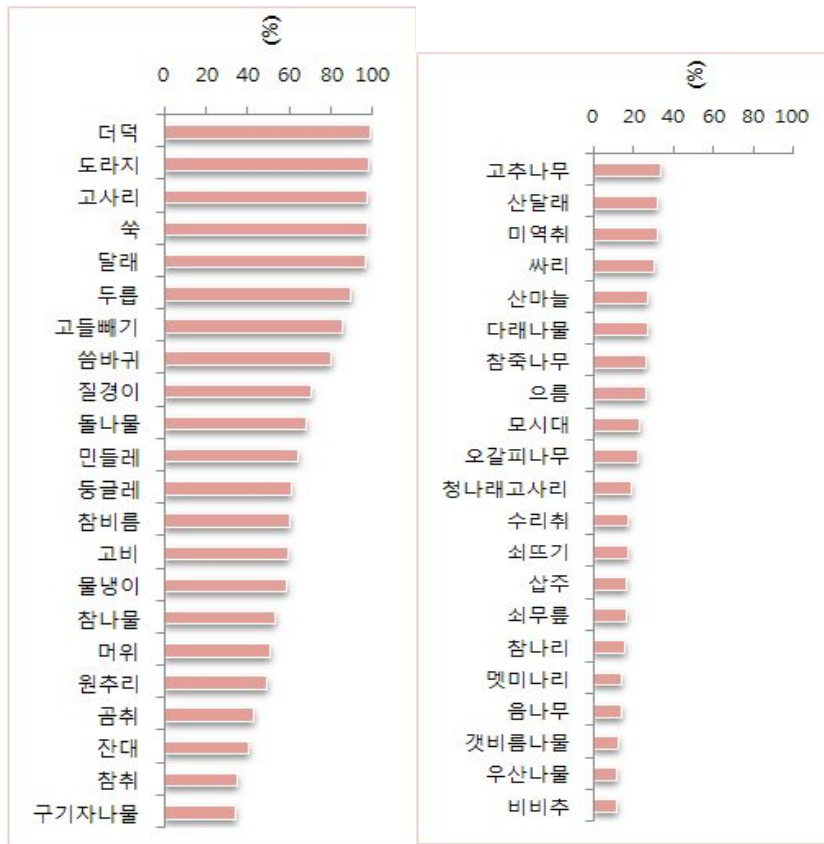


그림1. Well-known wild vegetables.

한편, 생리활성이 있는 식물소재로서 식품공전 등을 통해 식품에 주성분으로서 사용가능하면서도, 비교적 수급이 원활한 소재로 머위, 쑥, 참나물, 취나물, 미나리, 신선초, 케일 등을 선 발하였으며, 문헌에 나타난 이들의 특성은 다음과 같다.

(가) 머위(*Petasites japonicus* Maxim)

머위는 중국, 일본, 우리나라의 제주도, 울릉도, 남주지방과 중부지방의 산야지 특히 햇별이 잘드는 산비탈의 숲이나 계곡 주변의 습지에서 자생하는 국화과에 속하는 다년생 초본식물이다. 머위는 30cm의 높이로 자라고 꽃은 5, 6월에 피며 암수의 구별이 있어 암그루는 꽃이 희고 숫그루는 황백색으로 구별이 가능하다.

머위는 머우, 머구 등 지방에 따라 달리 불리우는데, 특유의 향기와 쓴맛이 있으며 주로 데 치거나 삶아 먹는다. 머위 잎은 비타민 A를 비롯한 각종 비타민이 골고루 들어 있으며, 칼슘이 풍부한 알칼리성 식품이다. 이른 봄에 뜯는 새순일수록 무기질과 비타민이 풍부하며, 예로부터 잎을 달인 물은 천식치료에 사용해 왔으며, 말린 것은 간장이 나빠지는 것 같을 때, 달여 마시면 좋다. 털머위라 하여 해변 근처의 산에서 나는 머위의 잎에는 강한 항균작용이 있는 것으로 알려져 있다.

한방에서는 꽃봉오리를 관동화라 하여 한약재로 사용한다. 민간에서는 진해, 거담, 진위, 진정, 소종, 이뇨, 풍한 등에 효능이 있는 것으로 알려져서 오랫동안 사용되어 왔으며 예로부터 어린잎을 채취하여 쌈과 생채로 이용하거나 엽병은 나물로 이용하고 탕의 재료로 이용하였다. 머위 뿌리의 추출물은 편두통, 위궤양, 천식 예방에 사용되었으며, 추출물은 혈압강하 효과가 있다고 보고되었다. 잎에 플라보노이드, 트리테르펜, 사포닌이 함유되어 있다

머위의 생리활성으로는 항알레르기, 항산화활성, 항균활성, 항염증활성, 항암활성 등이 보고된 바 있으며 특히 체내 산화적 방어 능력에 효과적임이 밝혀져 있다.

(나) 쑥(*Artemisia princeps* var. *orientalis*)

쑥은 번식력이 강한 다년생 식물로서 약 2,000여종이 있으며 우리나라 자생종만도 300여종이나 알려져 있다. 쑥은 독특한 맛과 향으로 인하여 여러 가지 형태의 식품 재료로 이용되어 오고 있다. 쑥잎의 독특한 향기는 치네올이라는 정유 성분으로 쑥떡이나 쑥버무리는 떡의 산성을 중화하고 영양적인 보완을 하여 고른 영양 섭취를 가능케 해준다.

쑥은 예로부터 구황식품으로 이용되어 온 장수식품으로 단백질이 5%나 함유되어 있는 고단백 채소로서 필수지방산, 당질, 비타민 C,  $\beta$ -carotene, 철분, 칼슘의 함량이 비교적 높은 편으로, 잎에는 정유가 약 0.02% 있으며 아테닌 0.02%, 콜린 0.11%, 비타민 A, B, D 등이 있다. 특히, 쑥은 무기질과 비타민 C가 많아 쑥을 자주 먹게 되면 몸의 저항력을 높여 주어 감기 예방과 치료에 효과적이다.

쑥은 한방에서 지혈약으로 사용될 뿐 아니라 소화, 구충, 악취 제거와 위장병, 변비, 신경통, 천식, 부인병 등에 효과가 있다고 알려져 있다. 쑥의 연한 잎을 말려서 찐 다음 즙을 만들어 마시면 해열과 진통, 해독, 구충, 혈압강하, 소염작용 효과를 볼 수 있다. 쑥잎을 애엽이라고 하는데, 한방에서는 복통, 토사, 출혈의 치료와 평상시 인체 내의 백혈구수를 2~3배 가까이 늘려서 면역 기능을 높이는 쑥뜸으로 이용한다.

쑥은 예로부터 동맥경화, 고혈압, 당뇨병과 같은 노화관련 질환을 예방하는 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 최근 쑥에 대한 연구로 쑥의 인체내 항균, 항돌연변이, 항산화, 항당뇨, 항염증, 항위궤양, 항암 작용 뿐만 아니라 흰쥐의 간과 혈청 중 중성지방 및 지질의 억제작용, 간세포 손상에 대한 방지작용 등이 시험을 통해 확인된 바 있다.

(다) 참나물(*pimpinella brachycarpa* Nakai)

우리나라, 일본, 중국, 유럽 등에 분포하며, 수풀 밑 음지의 비옥한 땅에 자생하며 미나리과에 속하는 다년초로서 높이 50~80cm으로 자라며 전체에 털이 없다. 뿌리에서 나오는 잎은 잎자루가 길며 원대궁에 올라가면서 잎자루가 짧아진다. 잎은 세 개씩 달리는 3출잎으로 잔잎은 끝이 뾰족한 난형으로서 가장자리에 거치가 있다. 꽃은 6~8월에 가지 끝에 흰 잔꽃이 복산형 화서로 핀다. 가을에 둥글납작한 열매가 열린다. 참나물의 잎줄기는 붉은 것이 많다.

참나물은 향채의 하나로 “셀러리”와 미나리의 향기를 합친 듯한 상쾌하면서도 독특한 개성 있는 향기가 구미를 잃기 쉬운 봄철에 입맛을 되찾아 주는 맛있고 귀한 산나물이다. 미나리과의 참나물은 미나리과에 속하는 향채로서 아직도 미나리와 달리 재배되지 못하고 봄에 자연생물을 수집 채취하여 판매 소비되고 있다.

참나물은 산형과에 속하며 체내 신진대사와 생리활성을 증진시킬 수 있는 유리당, 필수아미노산, 필수지방산을 비롯한 비타민과 무기질을 다량함유하고 있다. 특히 비타민 C가 풍부하며  $\beta$ -carotene, flavonoid, polyphenol 등과 같은 다양한 항산화 생리활성 물질을 함유하고 있다. 주로 생채로 활용하여 쌈 싸먹기도 하고 셀러드로 활용가능하며 참나물 김치를 담그는데 줄기가 자주색인 참나물로 담근 김치는 붉은 국물이 우러나와 향기와 더불어 식욕을 증진시키는 북부지방의 봄철 별미김치로 손꼽힌다. 또한 튀김옷을 입힌 튀김도 맛이 있다. 일반적으로 끓는 물에 데쳐서 나물로 무침이나 볶음, 국거리 등으로 향미를 즐기며 들깨즙으로 갖은 양념에 무친 참나물 생김치는 맛과 영양면에서 우수한 건강식품이다.

참나물은 영양뿐만 아니라 고혈압, 중풍을 예방하고 신경통과 대하증에도 좋으며 지혈과 해열제로서의 효과도 있다. 유럽에서는 열매에 방향성 정유가 있으므로 민간에서 최유약으로 사용한 적이 있고, 일본에서는 소스와 과자의 향료로 사용된다. 우리나라에서는 귀한 구황식량이었다.

참나물의 생리활성으로는 에탄올추출물의 항돌연변이 효과, 항산화 효과, 콜레스테롤을 감소시켜 고지혈증을 예방하는 효과 등이 있다.

(라) 취나물(참취 : *Aster scabar* Thunb)

취나물은 산채류를 대표하는 식물로서 우리나라 자생종은 60여종이고 식용이 가능한 것은 24종이 있다. 우리나라에서 재배되고 있는 취나물은 참취, 개미취, 각시취, 곰취, 미역취, 청옥취, 수리취 등이 있는데 그중에서 참취가 향기가 독특하고 수확량이 많기 때문에 농가에서 많이 재배하고 있다.

취나물은 자연 상태에서는 30%정도 차광이 되는 시원한 반음지에서 잘 자라며 부식질이 풍부하면서 습도 유지가 잘되고 그러면서도 물 빠짐도 잘되는 토양에서 잘 자란다.

취나물은 맛과 향기가 뛰어나고 탄수화물, 비타민 A 등 다양한 영양분이 함유되어 있어 묵나물, 튀김, 부침용으로 이용되며 감기, 두통, 진통, 해독, 항암 등에 효과가 있어 한약재로도 이용된다. 취나물에는 비타민 A의 모체가 되는 카로틴과 비타민 B복합체가 있고, 칼슘과 철분 등을 비교적 골고루 가지고 있는 알칼리성 식품이다. 취나물 중의 비타민 C가 알코올 분해의 도움을 주며, 비타민 B<sub>2</sub>는 간의 해독작용을 도와주기도 한다.

전초에는 쿠에르세틴, 아스테르사포닌, 정유가 들어 있고 꽃에는 많은 플라보노이드와 카로티노이드가 있다. 뿌리에는 트리테르페노이드와 쿠마린 화합물과 정유가 들어 있다. 특히 천식, 각혈, 폐결핵성 기침, 만성기관지염을 앓는 사람이 복용하면 효과를 본다. 쓴맛이 강하므로 삶아서 여러 날 우려내어 나물로 무쳐 먹어야 된다.

보통 취나물로 불리는 것이 참취인데, 어린잎을 살짝 데쳐서 나물로 무쳐 먹거나 햇볕에 살짝 말렸다가 하루(2~3회)에 매번 5~10g정도를 달여서 지속적으로 마시면 당뇨병에 좋다. 또한 진통, 해독, 혈액순환촉진 작용이 있어 두통을 비롯한 요통, 근골통증, 장염으로 인한 복통, 인후염에 효과가 있다.

취나물의 생리활성으로는 항산화 및 항균활성이 보고된 바 있다.

#### (마) 미나리(*Oenanthe javanica*)

미나리는 다습한 땅이나 물이 흐르는 곳에서 자생하는 산형과의 다년생 초본으로 물기가 있는 곳이나 냇가에서 자라는 호습성으로 한방에서는 수영, 수근이라고도 한다. 원산지는 중국 북부지방으로 동남아시아 일대에 걸쳐 광범위하게 분포하고 있으며, 중국에서는 이미 기원 전 2천년 경부터 논미나리, 밭미나리를 재배했다고 알려져 있을 정도로 식품으로서 오랫동안 상용되어진 식물이다.

미나리는 신선한 빛깔과 특유의 방향을 지니고 있으므로 미각을 돋구는 채소로 이용되어 왔으며 식용뿐만 아니라 오래전부터 민간요법이나 한방에서 숙취제거, 이뇨작용, 간경변 억제 작용, 혈중 콜레스테롤 저하작용, 해독작용, 지혈작용 등의 여러 약리작용을 지니고 있어, 물고기 중독, 혈뇨, 자궁출혈, 고혈압, 불면증 등 여러 질병의 치료에 다양하게 응용되어 왔다. 특히 급만성 간염의 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다.

최근에는 미나리 추출물의 간기능 회복, 항산화, 항돌연변이 작용과 함께 위암세포의 성장 억제 효과 등이 보고된 바 있다.

#### (바) 신선초(*Angelica keiskei* Koize)

신선초는 아열대지방에서 자생하는 미나리과에 속하는 다년생 초본으로 명일엽, 선삼초, 신립초 등으로 알려져 있으며, 생리활성을 나타내는 각종 유기산, flavonoid, coumarin, saponin 등과 각종 무기질 특히, 게르마늄이 함유되어 있다.

Flavonoid는 야채, 한약, 과일 및 콩과식물에서 발견되는 다양한 polyphenol 물질에 대한 통칭으로 적어도 5천종 이상의 flavonoid가 알려져 있으며, 이는 항산화, 항균, 항바이러스, 항염증, estrogen 유사작용, 항estrogen 작용, 항돌연변이 작용, 항암작용, 효소활성화 및 효소저해 작용 등 다양한 효과가 있음이 알려져 있다. 인체를 대상으로 한 역학조사에서 flavonoid의 섭취량과 심장 관상혈관 질환의 발생과 반비례관계가 있음이 발견되어 flavonoid류를 함유하는 식품은 약리학적 및 영양학적 측면에서 매우 유용한 건강식품으로 인식되어 있다.

신선초의 가식부의 일반성분은 대략 수분 88%, 회분 2%, 조지방 0.2%, 조단백 3%, 조섬유 1%로 구성되어 있으며, 미량성분 중 비타민 C는 67mg%, 사포닌은 약 500mg%를 함유하고 있다.

신선초의 효능은 고혈압, 간장병, 신경통 등에 민간요법으로 사용되어 왔다고 전해지고 있고, 최근에는 고지혈증 및 간독성 개선 등에 관한 생리활성이 보고된 바 있다.

#### (사) 케일(*Brassica oleracea* var. *acephala*)

케일은 십자화과 채소 중 하나로 지중해로부터 유래되었고, 케일 잎의 일반성분은 수분 90.1%, 조단백 4.1%, 조지방 0.6%, 조회분 1.0%, 조섬유 1.5%로 양질의 단백질과 함께 비타민 C(146mg%), 비타민 U(54mg%),  $\beta$ -carotene(7.0mg%), 칼슘 (181mg%) 등이 많이 함유되어 있다. 한편, 클로로필 (187mg%), flavonoid인 quercetin (11mg%), kaempferol (21.1mg%) 등 항콜레스테롤, 항돌연변이, 항산화, 항암 활성을 갖는 성분이 많이 함유되어 있어 영양뿐만 아니라 기능성 측면에서도 매우 가치가 있는 식품소재로 알려져 있다.



## 나. 재료 및 방법

### (1) 재료 및 시료 조제

2009년 4월 전주시내 농협하나로 마트에서 구입한 머위, 곰취, 참나물, 취나물, 미나리, 케일, 신선초와 철원군 명성산에서 2009년 5월에 채취한 쑥을 수돗물로 세척 후 물기를 제거한 후 녹즙기(Dong Ah Inc, Korea)를 이용하여 착즙액을 조제하여 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다.

쑥분말 용액은 함양농협의 쑥가루를 2009년 6월 전주시내 농협하나로 마트에서 구입하여 증류수로 희석하여 시료로 사용하였다. 청국장 분말은 순창 전통고추장 민속마을에서 2009년 4월에 입수하였고, 전지대두분말(Full fat soy flour)은 기린농협의 콩가루를 2009년 5월에 구입하여 사용하였다.

Nutrition broth(NB)는 Difco社 제품을, 이 외 시약은 시판용 특급 및 1급 시약을 구입하여 사용하였다.

### (가) 산야초 착즙액 조제

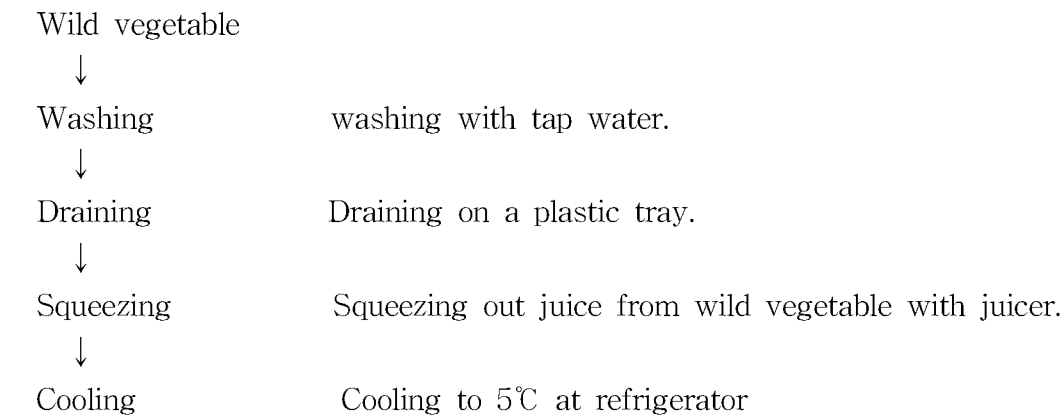


그림2. Procedure of wild vegetable juice preparation.

### (나) 산야초 발효액 조제

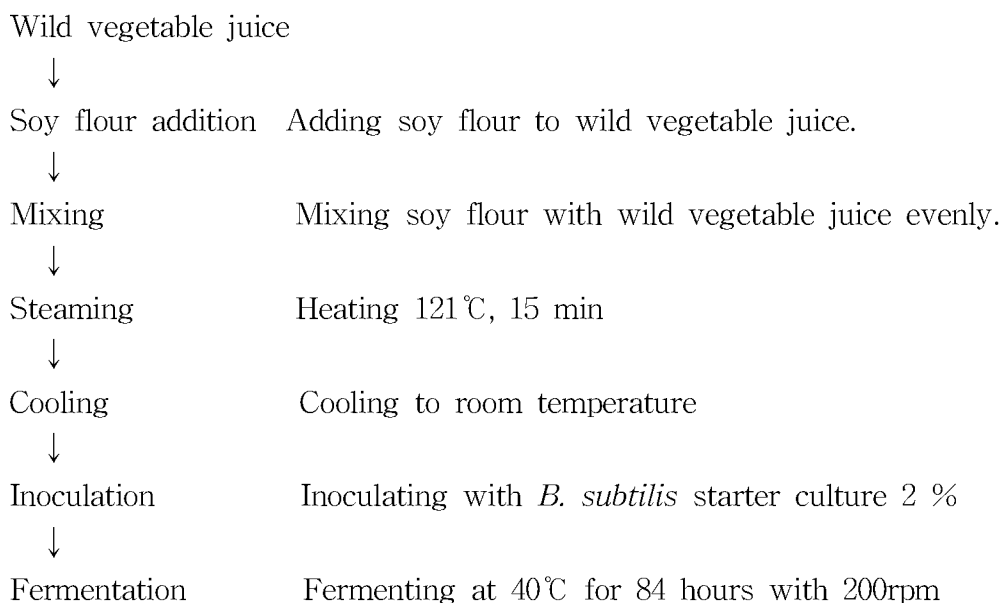


그림 3. Procedure of fermented wild vegetable juice preparation.

### ***Bacillus subtilis* sp. starter** 조제

300ml Erlenmeyer flask에 Nutrition broth(NB) 100ml을 취하여 멸균하고 121℃에서 15분간 가압 멸균한 후에 *Bacillus subtilis* sp. 1백균이를 접종하고 37℃에서 24시간 200rpm으로 진탕 배양하여 starter를 조제하였다.

### **Protease생산을 위한 배양조건 검토**

항산화 활성이 비교적 우수한 쪽분말 10% 환원액을 기본배지로 하여 *Bacillus subtilis* sp. starter 2%(V/V)를 접종하고 37℃에서 60시간, 200rpm으로 진탕 배양하면서 protease 생산에 미치는 탄소원과 질소원의 영향을 검토한 후, 초기배양 pH, 배양온도 및 배양 시간 등 배양조건이 protease 생산에 미치는 영향을 검토하였다.

### **발효액 종류에 따른 protease 생산성 비교**

산야초 발효액 종류에 따른 protease 생산성을 검토하기 위하여 산야초 착즙액 종류별로 전지 대두분 0.5%를 첨가하고 균일하게 혼합, 멸균, 멸균 (121℃/15분)후, *B. subtilis* sp. starter 2%를 무균 접종하였다.

*B. subtilis* sp. starter를 무균 접종한 착즙액을 40℃ shaking incubator (LSI-2005 RL, DAIHAN LABTECH. Co., Ltd)에서 200rpm으로 84시간 진탕 배양하여 발효액을 만들고 이들의 protease 생산성을 비교하였다.

## (2) 실험방법

### (가) 착즙액 수율

착즙된 재료의 중량과 착즙후 착즙액 중량으로부터 착즙액 수율을 산출하였다.

### (나) pH, 적정산도, 당도

pH는 pH meter(Mettler Toledo, USA)로 측정하였으며, 적정산도는 시료 10 ml에 1% 페놀프탈레인 용액을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 적정하고 NaOH 소비량을 유산함량으로 환산하여 산도(% w/v)로 표시하였다. 당도는 굴절당도계(Atago DR-A1, Atago Co., Ltd., Japan)를 이용하여 측정하였다.

### (다) 세포독성

96well plate에 mouse melanoma cell line인 B16 F10 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 well당  $5 \times 10^3$  씩 분주 한 후 overnight 배양 한 다음, FBS가 들어있지 않은 DMEM 배지로 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 산야초 시료를 농도 별 (1/1000, 1/10000, 1/100000)로 처리 하고 다시 24시간 배양 후, MTS 방법을 이용하여 세포 독성 정도를 확인 하였다.

### (라) 항산화 활성

새로운 기능성 발효 식품의 소재 개발을 위한 후보 식용식물자원을 선별 하고자 쪽, 미나리, 참나물, 머위, 취나물, 곰취, 신선초, 양파, 케일, 민들레의 항산화 활성을 DPPH free radical 소거능을 통해 확인하였다. DPPH free radical 소거능은 Blois와 Lee등의 방법(Blois MS, 1958Lee JS *et al.*, 1997)을 변형하여 측정하였다. 즉, ethanol에 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 용해하여 0.1mM DPPH 용액을 준비하였다.

시료는 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000로 희석하여 0.1mM DPPH 용액과 1:1로 섞어 최종적으로 희석 배수가 1/20, 1/200, 1/2000, 1/20000이 되게 처리 하였다. 37℃에서 30분반응 후, 517nm 파장에서 흡광도를 측정하고 시료 무침가 대조구와 비교하여 아래 식에서 수소 공여능을 산출하였다. ascorbic acid는 항산화능 비교물질로 ethanol에 녹여10ug/ml로 만들어 상기와 동일한 방법으로 처리하여 항산화능을 비교하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A - B/C)\} \times 100$$

A : sample 추출액과 DPPH를 반응시킨 후 흡광도

B : sample 추출액과 ethanol로 반응시킨 후 흡광도

C : ethanol과 DPPH를 반응시킨 후 흡광도

#### (마) 항혈전 활성

항혈전 활성은 fibrin plate법(Astrup TS, and Mulletts S. 1991; Seo *et al.*, 2007)을 사용하였다.

0.01 M phosphate buffered saline(pH 7.25)에 fibrinogen을 0.6%가 되도록 용해시킨후 petri dish에 10 ml을 분주하고 thrombin 10 unit를 가하여 균일한 두께의 fibrin clot 을 형성시킨 후 실온에 30분 방치하여 혈전용해효소 활성 측정에 사용하였다.

활성측정은 제조한 fibrin plate 표면에 paper disk(7 mm, Watman, USA)를 놓고 발효액을 10ul를 점적하여 37℃에서 20 시간동안 반응 후 생성된 투명한 부위의 직경을 측정하였다. 대조구로서는 plasmin(Roche, USA) 1 unit를 사용하였다.

#### (바) 항암 활성

한국인에게 흔한 대장암, 위암, 유방암, 간암과 관련된 암세포주 HT-29, A431, MCF-7, HepG2를 이용하여 인체 암세포 성장 억제능을 평가하였다.

산야초 착즙액이 암세포성장의 억제효과가 있는지의 여부를 확인하기 위해 세포들을96 well plate에  $2 \times 10^4 - 10^5$ 개/well씩 seeding하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 항온 세포배양기에서 배양 후 MTS solution (cellTiter 96 Aqueous Non-radioactive cell proliferation assay, promega, USA) 시약을 이용하여 세포의 생존능을 측정하였다.

#### (사) 항균 활성

산야초 착즙액 및 발효액의 항균력을 *E. coli*, *S. aureus* 및 *B. subtilis*에 대해 확인하였다. 즉, *E. coli*, *S. aureus* 및 *B. subtilis* O.D<sub>595</sub> =0.3 에서 산야초 착즙액 100 ug/ml을 처리한 후 24시간 배양 하여 microplate reader기를 사용, 490 nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였다.

#### (아) 세균수

식품공전의 미생물시험법에 준하여 각 발효액 10진 희석 시료 1ml씩을 멸균페트리접시에 무균적으로 취하고 45℃로 유지한 표준한천배지 약 15ml을 무균적으로 분주하여 고르게 혼합, 고화 시킨후 37℃에서 48시간 배양한 후 생성된 집락수로부터 산출하였다.

#### (자) 효소활성도 측정

##### ① 조효소액 조제

Protease생산을 위한 썩 발효 배양액에 종균 배양액을 2%(v/v)양으로 집중하여 37℃에서 60시간 진탕 배양한 후에 배양액을 원심분리(4,000 x g, 10 min)하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

## ② Protease activity

단백질 분해 효소의 활성은 Anson-萩原 變法(萩原文二, 1956)에 의하여 측정하였다. 즉, 1/15 M 인산염 완충용액(pH 7.0)에 녹인 0.6 % casein 기질용액 5 mL에 조효소액 1 mL를 첨가한 후 30°C에서 10분간 반응시키고 0.44 M trichloroacetic acid(TCA)용액 5 mL을 가하여 반응을 정지시킨 다음 30분간 정치하였다. 이 반응액을 No. 2(Toyo, Japan)여과지로 여과시키고 여액 2 mL에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 5 mL과 1 N Folin reagent 1 ml을 신속히 가하여 30°C, 30분 발색시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에 의한 tyrosine양으로 환산하여 표시하였다. 즉, 시료 1ml이 1분 동안 생성한 tyrosine 1 $\mu$ g을 1단위로 하였다.

## ③ Amylase activity

전분분해효소 활성은 Lin 등(Lin et al., Food chemistry 117, 2009, 94-98)의 방법으로 측정하였다. 2% soluble starch(pH 6.0) 용액 0.5 ml에 조효소액 50 ul를 첨가하여 37°C, 10 분 동안 반응을 시켰다. 반응이 완료되면 DNS solution 0.5 ml를 첨가하여 100°C, 10 분 동안 끓여 식힌 후, 반응액을 50배 희석하여 540 nm에서 측정하였다. Glucose 표준곡선에 의하여 정량하였고, 37°C에서 1분 간 생성한 glucose 1 mg을 생성할 수 있는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

### (차) 관능특성

산야초 발효액의 색, 냄새, 맛, 전체 기호도 등의 관능적 특성은 발효액에 친숙한 12명의 관능검사 panel에 의한 difference test를 적용하여 7점 채점법(7 아주 좋음, 4 보통, 1 아주 나쁨)으로 평가하였다.

### (타) 통계처리

SAS-PC프로그램에 의한 분산분석 및 Duncan's 다중검정에 의해 p<0.05 수준에서 유의적 차이를 검증하였다.

## 다. 결과 및 고찰

### (1) 산야초 착즙액의 이화학적 특성

산야초 착즙액의 이화학적 특성은 그림4 에 나타낸 바와 같다. 착즙액 수율은 미나리 착즙액 81%로 최대치, 쑥 착즙액 63%로 최저치를 나타내었다. 나머지 머위, 참나물, 취나물, 신선초, 케일 착즙액 등은 70~80%를 나타내 비교적 경제성이 있다고 판단된다.

pH는 대부분 산야초 착즙액이 중성 pH를 나타낸 반면, 미나리 착즙액은 pH 4.9로 약산성을 나타내었다. 산도는 쑥 착즙액이 0.57%로 최대치를, 참나물 착즙액이 0.25%로 최소치를 나타내었다.

당도는 쑥 착즙액이 7.9brix로 가장 높았고, 신선초, 케일, 취나물 착즙액 등이 5~6 brix로 두 번째로 높았다. 머위, 미나리, 참나물 착즙액 등이 2~3 brix로 가장 낮았다.

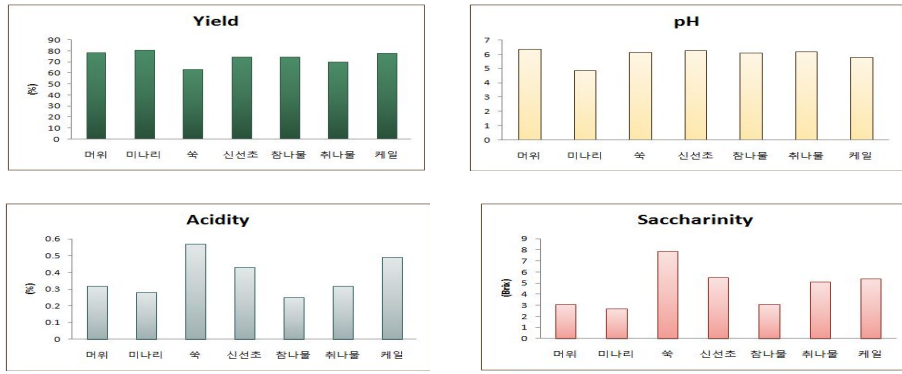
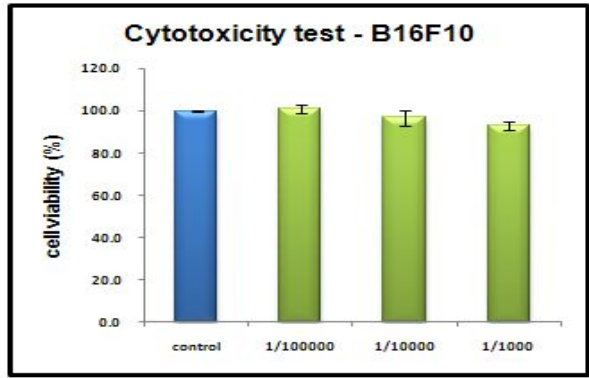


그림 4. physicochemical characteristics of various wild vegetable juice

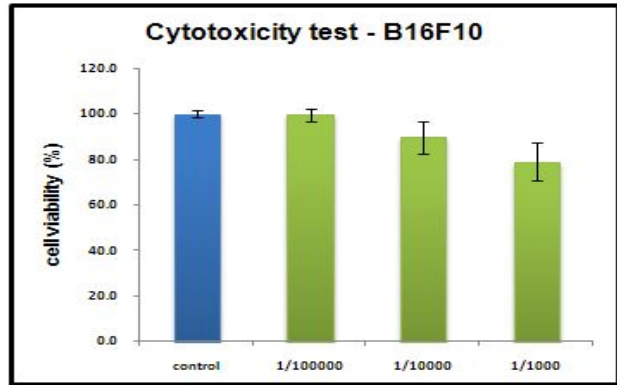
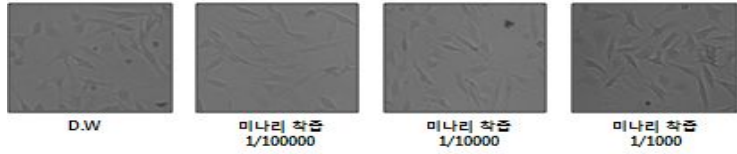
## (2) 산야초 착즙액 및 발효액의 생리활성

### (가) 착즙액의 세포독성

기능성 발효 식품 소재 개발을 위한 후보 식물자원 선별을 위해 산야초 시료의 세포 독성 여부를 알아본 결과 그림 5(a)~(d)에 나타난 바와 같이 모든 시료에서 세포 독성이 없는 것으로 나타났다.



미나리 추출	control	1/100000	1/10000	1/1000
cell viability (%)	100.0	101.2	96.8	93.3



쑥 추출	control	1/100000	1/10000	1/1000
cell viability (%)	100.0	99.6	89.6	79.0

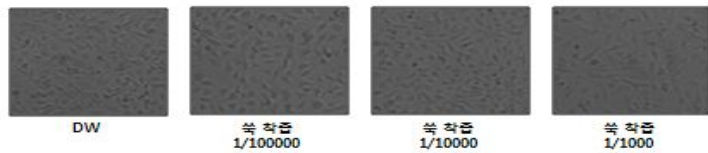
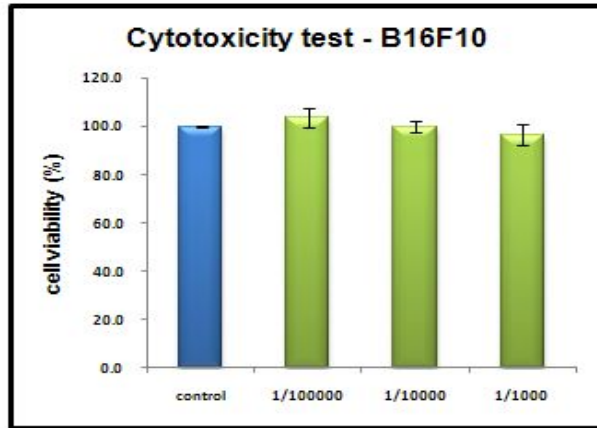
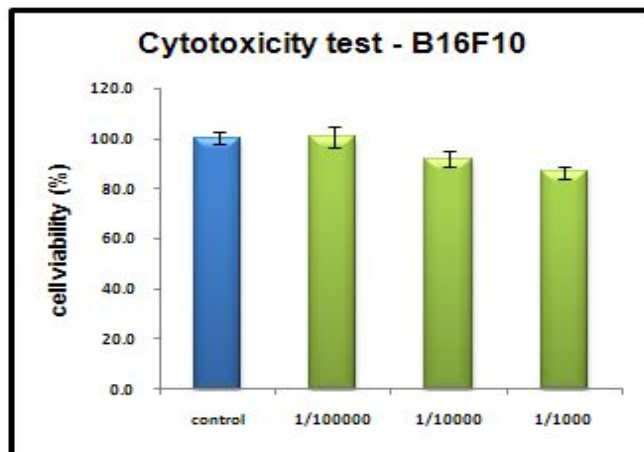


그림 5(a). Cytotoxicity of various wild vegetable juice.



미나리 열처리	control	1/100000	1/10000	1/1000
cell viability (%)	100.0	103.8	100.0	96.5



취나물 착즙	control	1/100000	1/10000	1/1000
cell viability (%)	100.0	100.4	91.9	86.6

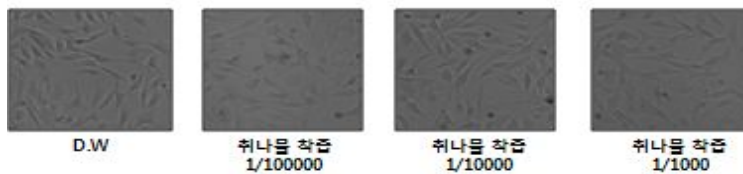
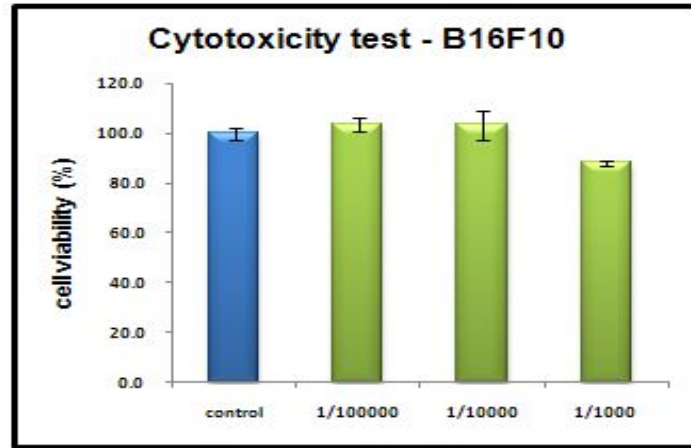
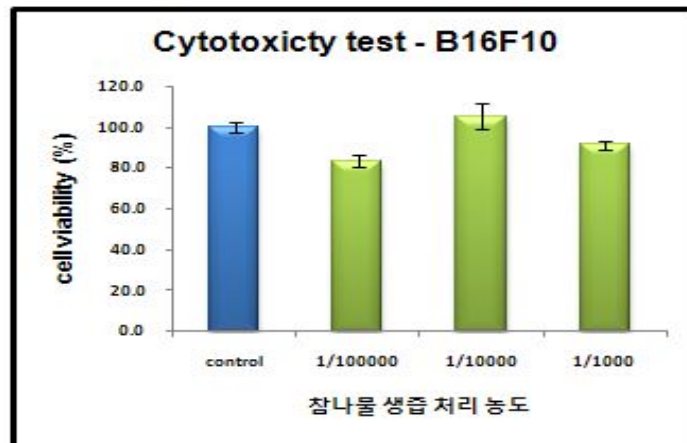
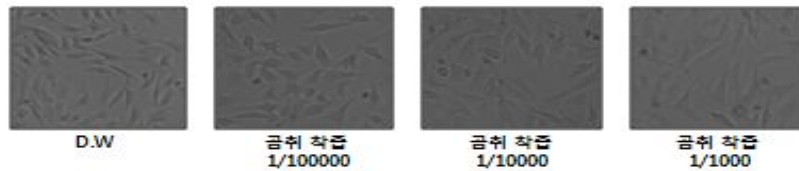


그림 5(b). Cytotoxicity of various wild vegetable juice.



금취 약증	control	1/100000	1/10000	1/1000
cell viability (%)	100.0	103.5	103.3	88.2



참나물 생즙 처리 농도	control	1/100000	1/10000	1/1000
cell viability (%)	100.0	83.2	105.3	91.2

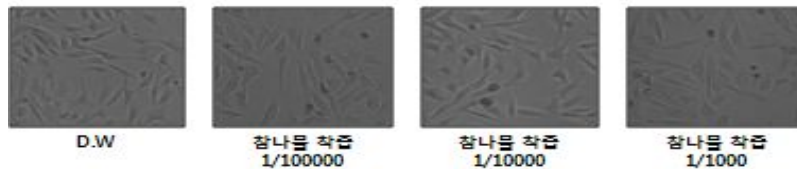


그림 5(c). Cytotoxicity of various wild vegetable juice.



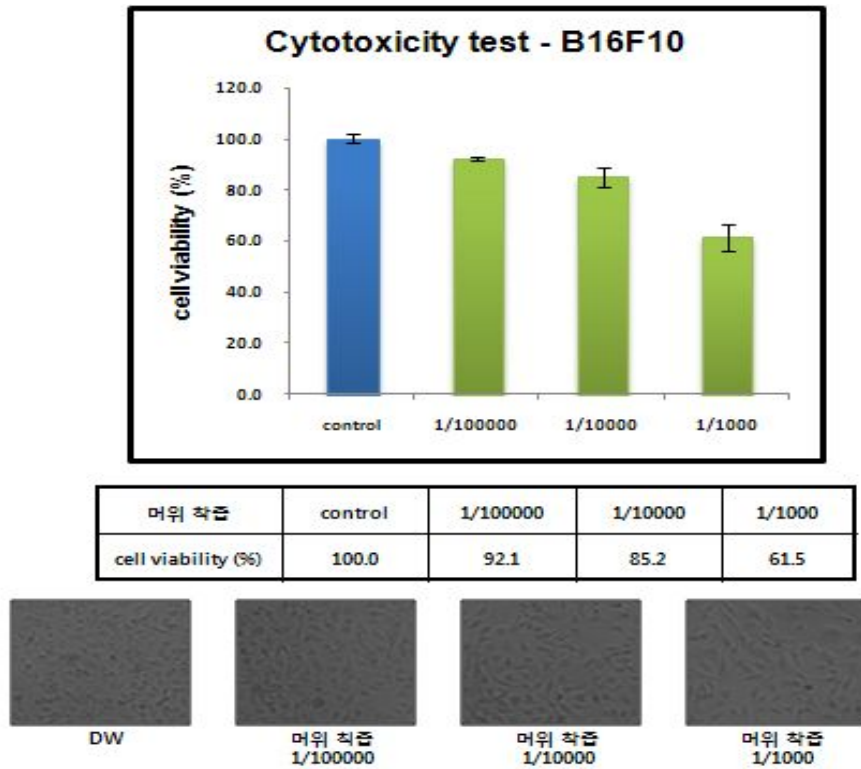


그림 5(d). Cytotoxicity of various wild vegetable juice.

(나)항산화 활성

머위, 미나리, 쑥, 신선초, 참나물, 취나물, 케일 추출액의 DPPH free radical 소거능은 그림 6(a)~6(g)에 나타난 바와 같다. 즉, 각 추출액 1/20 희석액에서 항산화능은 쑥 추출액 65%, 참나물 추출액 55%, 머위추출액 51%, 취나물 추출액 51%, 미나리 추출액 51%, 신선초 추출액 43%, 케일 추출액 22%순으로 쑥 추출액의 항산화 활성이 가장 높았고, 신선초, 케일은 Ascorbic acid의 IC<sub>50</sub>값 (50%까지 DPPH 라디칼의 형성을 저해하는데 필요한 ml 당 µg 농도) 미만의 상대적으로 약한 항산화 활성을 보였다.

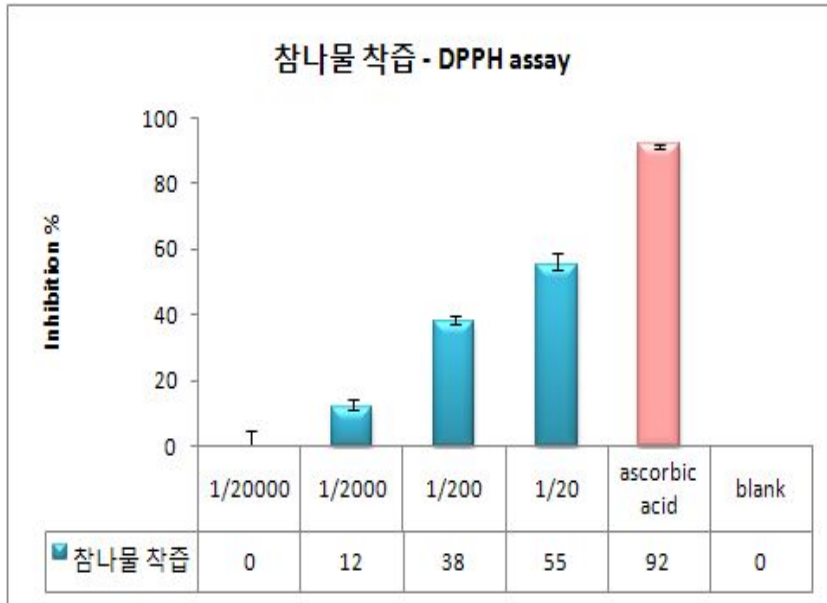


그림 6(a). DPPH free radical scavenger activity of *pimpinella brachycarpa* Nakai juice.

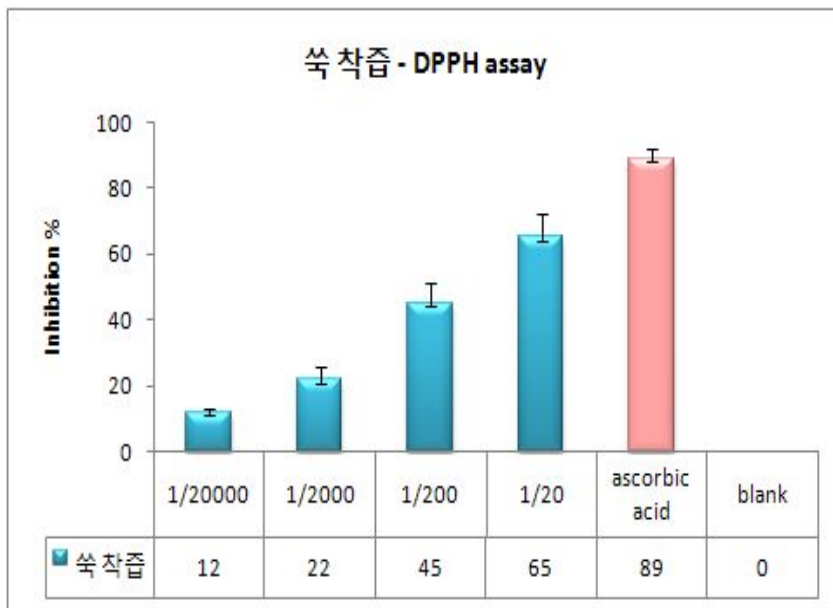


그림 6(b). DPPH free radical scavenger activity of *Artemisia princeps* var. *orientalis* juice.

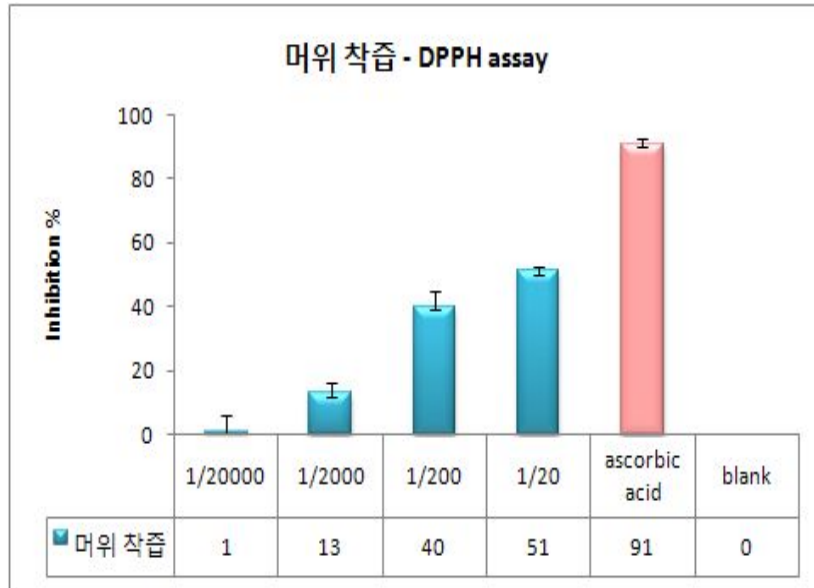


그림 6(c). DPPH free radical scavenger activity of *Petasites japonicus* Maxim juice.

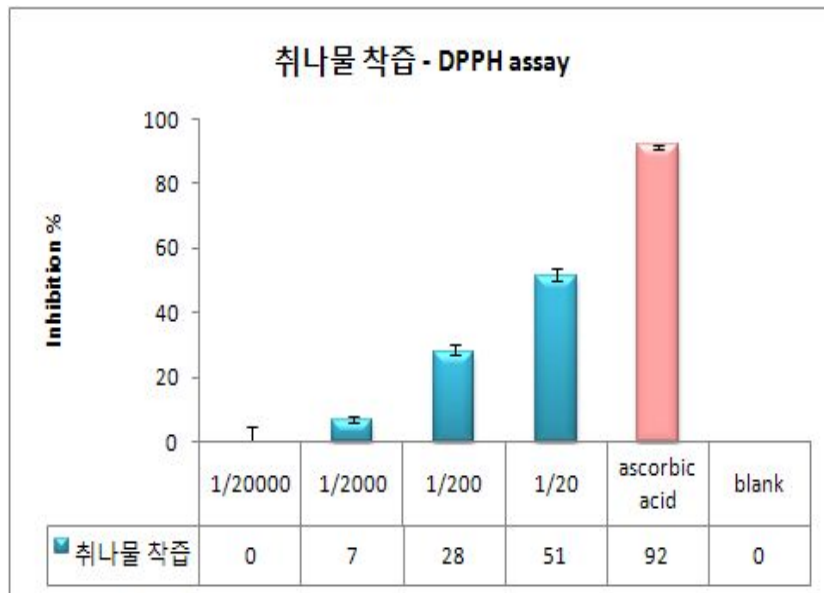


그림 6(d). DPPH free radical scavenger activity of *Aster scabar* Thunb juice.

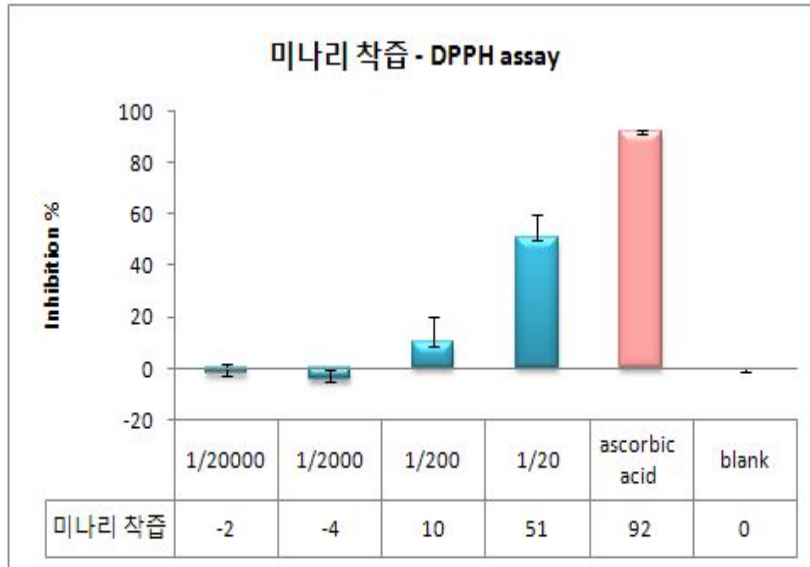


그림 6(e). DPPH free radical scavenger activity of *Oenanthe javanica* juice.

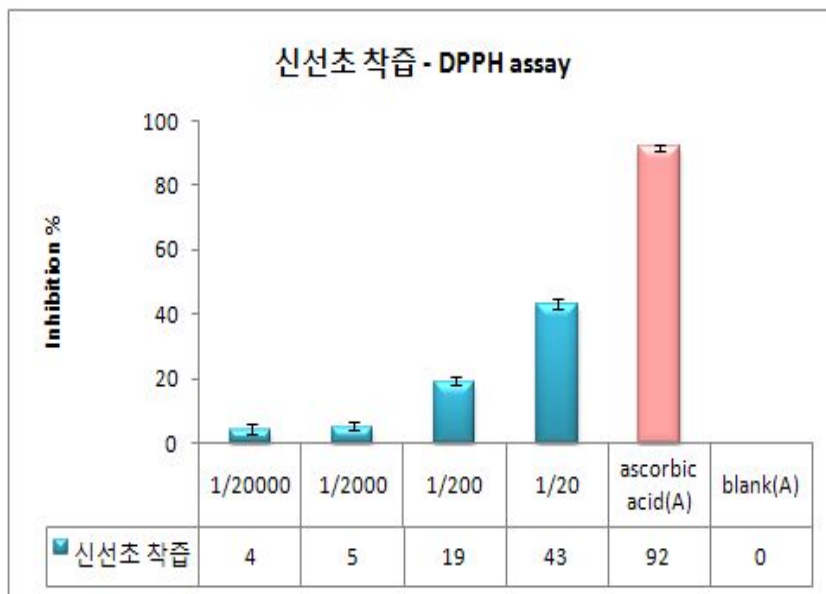


그림 6(f). DPPH free radical scavenger activity of *Angelica keiskei* Koizejuice.

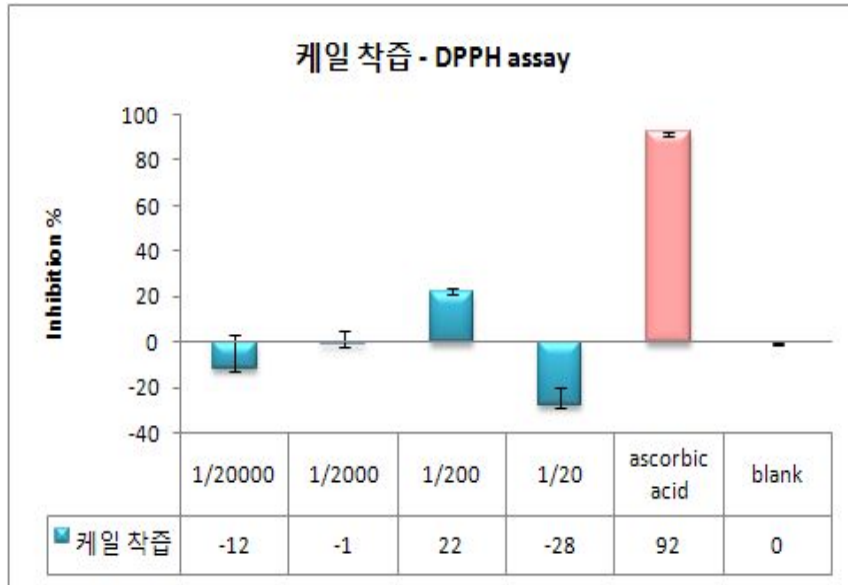


그림6(g). DPPH free radical scavenger activity of *Brassica oleracea var. acephala* juice.

산야초 시료 중 항산화 활성이 가장 높은 쑥을 기능성 발효 식품 소재 개발에 이용하기 위하여 실제 발효에 사용할 쑥 분말을 증류수에 10배와 20배로 희석한 다음, 각각 열처리와 비열처리를 하여 총 4그룹의 시료에 대한 항산화 활성을 확인한 결과는 그림 7(a) ~ 7(d)와 같다. 즉, 10배 희석한 시료의 항산화 활성이 20배 희석한 시료 보다 높게 나타난 바 이는 쑥 분말 중에 함유되어 있는 항산화 물질의 농도가 희석배수 증가에 따라 낮아졌기 때문으로 사료된다. 10배 희석액의 비열처리구와 열처리구 사이의 항산화 활성차이는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났고, 20배 희석한 시료들에서는 열처리한 시료의 활성이 보다 높게 나타났다.

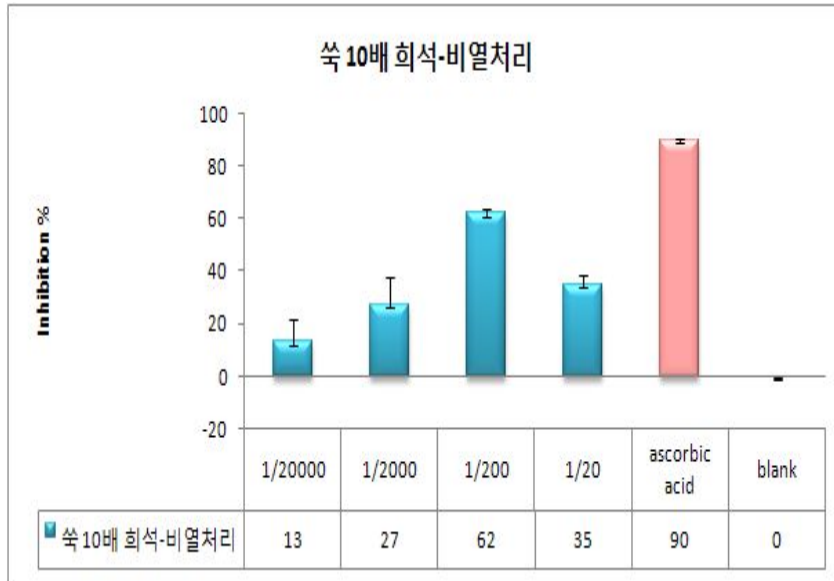


그림 7(a). DPPH free radical scavenger activity of juice reconstituted 10% mugwort powder without heat treatment.

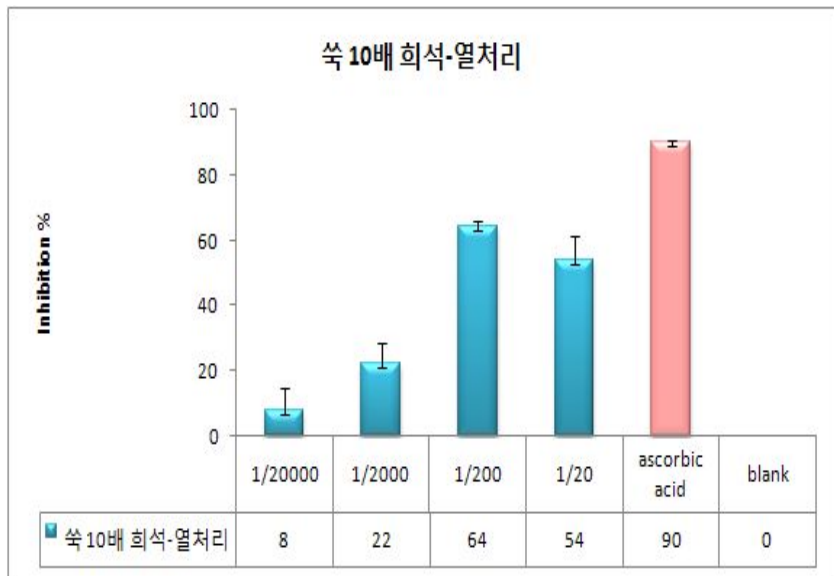


그림 7(b). DPPH free radical scavenger activity of juice reconstituted 10% mugwort powder with heat treatment.

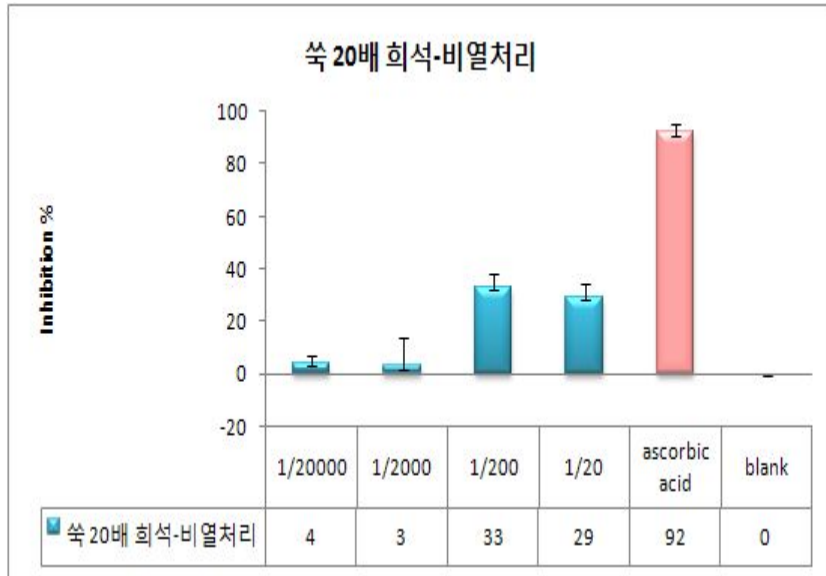


그림 7(c). DPPH free radical scavenger activity of juice reconstituted 5% mugwort powder without heat treatment.

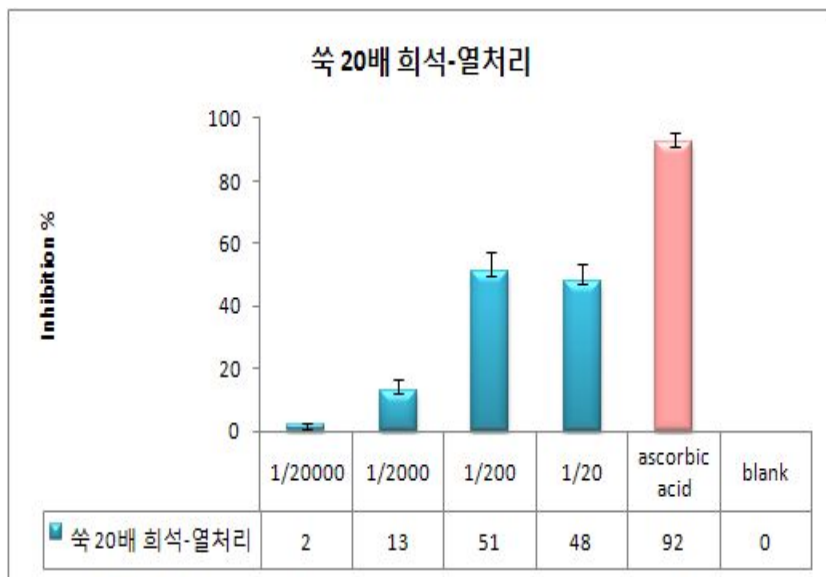


그림 7(d). DPPH free radical scavenger activity of juice reconstituted 5% mugwort powder with heat treatment.

*B. subtilis*로 발효한 산야초 발효액의 항산화 활성은 그림 8(a)~ 8(h)에 도시한 바와 같다. 즉 산야초 발효액에 있어서 항산화 활성은 쑥 66%, 미나리 53%, 신선초 52%, 케일 33%, 취나물 32%, 머위 10%, 참나물 3%로 쑥이 가장 높았다. 한편, 머위, 취나물, 참나물 등의 발효액의 1/200과 1/20 희석배수의 활성 결과는 시료 고유의 색에 의한 영향으로, 1/2000 희석배수보다 수치상의 활성이 낮게 나타났다.

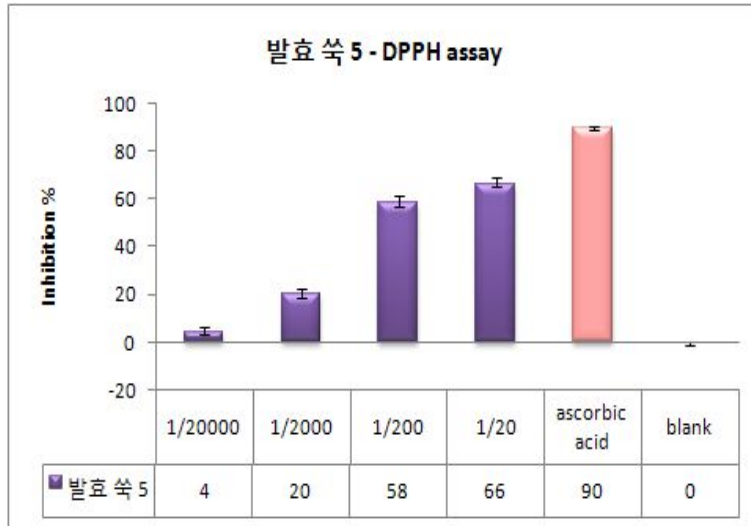


그림 8(a). DPPH free radical scavenger activity of juice reconstituted 5% mugwort powder and fermented with *B. subtilis* sp.

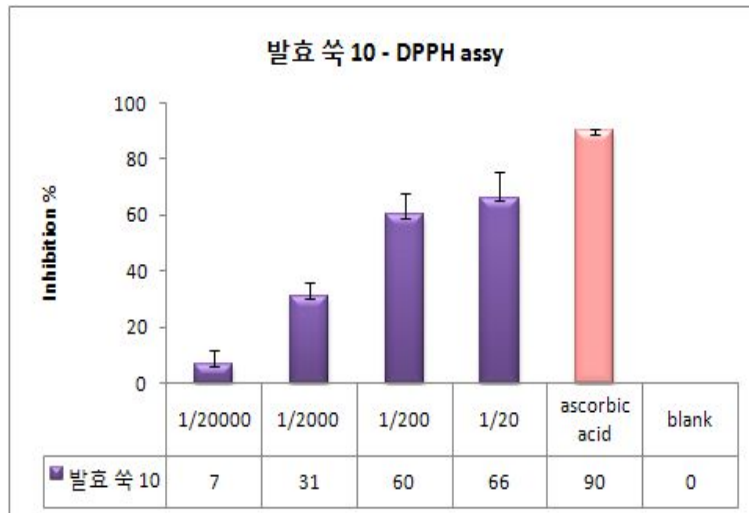


그림 8(b). DPPH free radical scavenger activity of juice reconstituted 10% mugwort powder and fermented with *B. subtilis* sp.



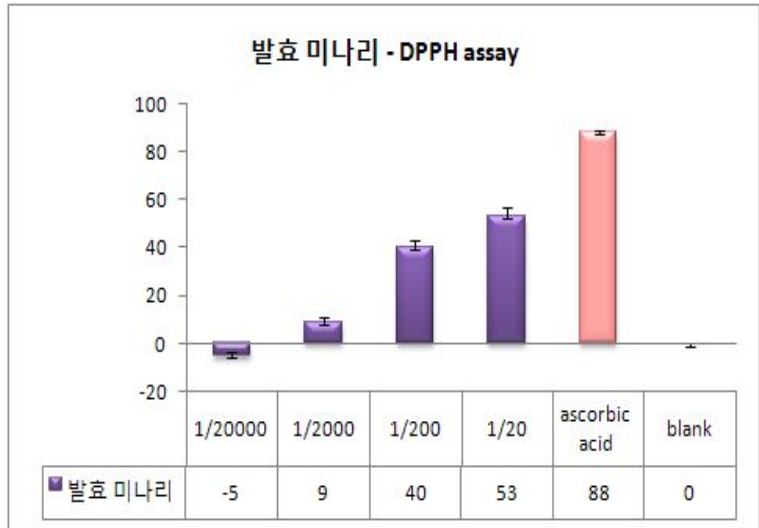


그림 8(c). DPPH free radical scavenger activity of *Oenanthe javanica* juice fermented with *B. subtilis* sp.

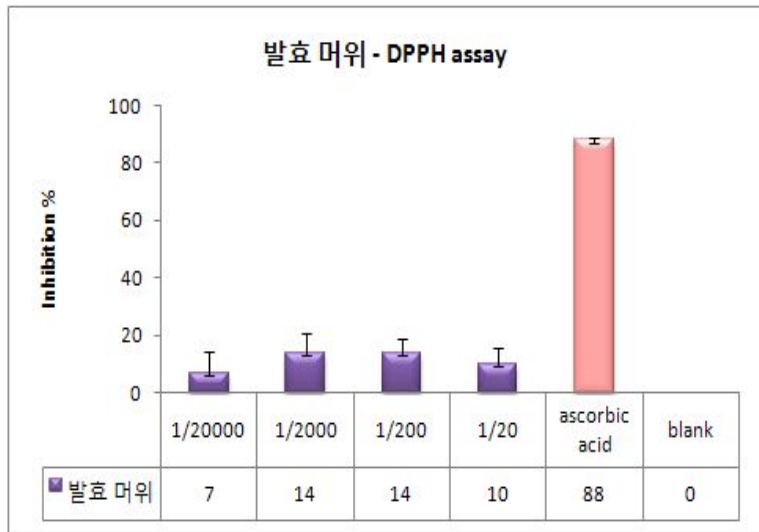


그림 8(d). DPPH free radical scavenger activity of *Petasites japonicus* Maxim juice fermented with *B. subtilis* sp.

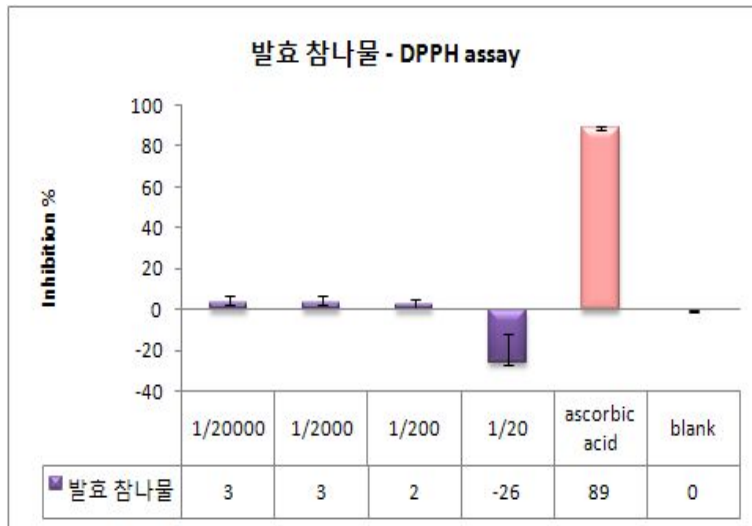


그림 8(e). DPPH free radical scavenger activity of *pimpinella brachycarpa* Nakai juice fermented with *B. subtilis* sp.

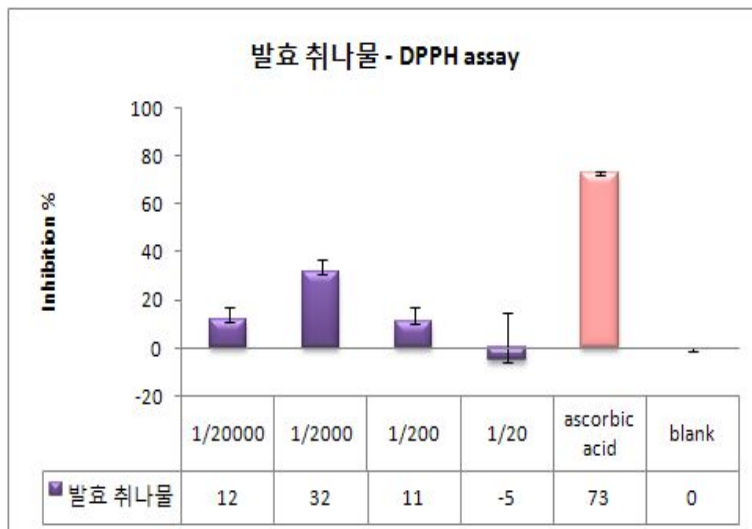


그림 8(f). DPPH free radical scavenger activity of *Aster scabar* Thunb juice fermented with *B. subtilis* sp.

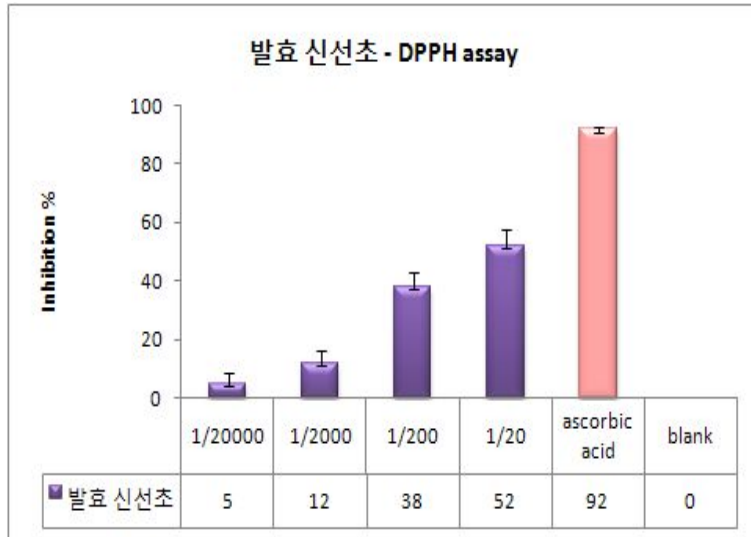


그림 8(g). DPPH free radical scavenger activity of *Angelica keiskei* Koize juice fermented with *B. subtilis* sp.

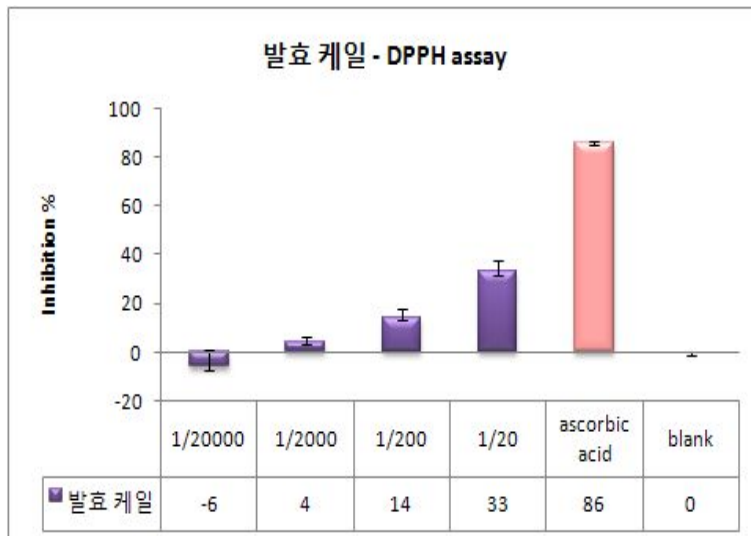


그림 8(h). DPPH free radical scavenger activity of *Brassica oleracea* var. *acephala* juice fermented with *B. subtilis* sp.

(다) 항혈전 활성

산야초 착즙액과 이들을 *B. subtilis* sp.로 발효한 산야초 발효액의 항혈전 활성은 그림 9(a), 그림 9(b), 표 55, 그리고 표 56에 나타난 바와 같이, 산야초 착즙액은 항혈전 활성을 나타내지 않았으나, 산야초 발효액은 항혈전 활성을 나타내었다.

즉, 산야초 착즙액 시료는 그림 9(a)와 표 54에 나타난 바와 같이 반응시간이 경과해도 Fibrinogen plate 상의 clear zone이 형성되지 않았으며, 반응 20 시간 이후에도 clear zone이 나타나지 않았다. 반면에, *B. subtilis* sp.를 접종하여 발효시킨 산야초 발효액은 그림 9(b)와 표 55에 나타난 바와 같이 반응시간이 경과함에 따라 Fibrinogen plate 상에서 clear zone의 크기가 확대되었다.

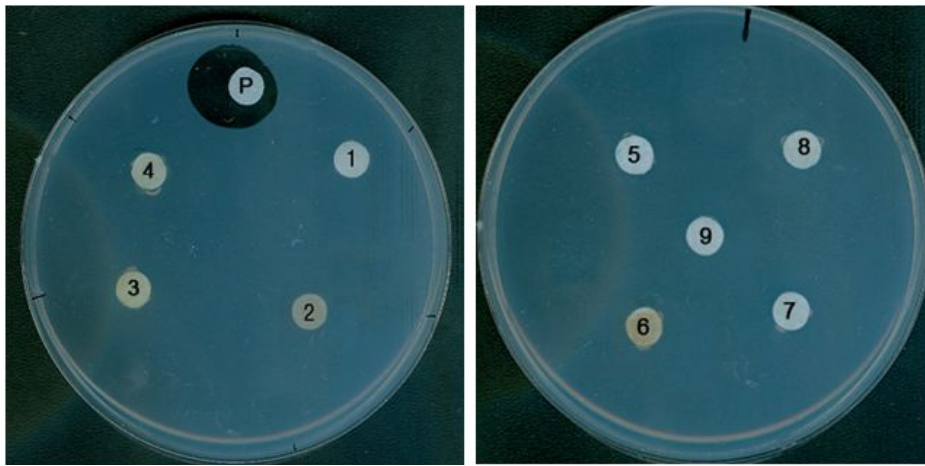


그림 9(a). Fibrinolytic activity of wild vegetable juice.

표55. Size of clear zone depending on wild vegetable juice.

시료		반응시간	20 hr (mm)	30 hr (mm)
P	Plasmin	1 U/disk	17*17	19*18
1	Distilled water		0*0	0*0
2	머위 착즙액		0*0	0*0
3	미나리 착즙액		0*0	0*0
4	신선초 착즙액		0*0	0*0
5	쭈(5%) 환원액	10 ul/disk	0*0	0*0
6	쭈(10%) 환원액		0*0	0*0
7	참나물 착즙액		0*0	0*0
8	취나물 착즙액		0*0	0*0
9	케일 착즙액		0*0	0*0

산야초 발효액에 따른 clear zone 지름의 크기(mm)는 표 56에 나타난 바와 같다. 반응 20 시간에 *B. subtilis* sp. media와 쭈분말 5%를 함유하는 발효액에서는 clear zone이 나타나지 않았으나, 반응 30시간부터 clear zone이 나타나기 시작했다. 미나리 발효액과 신선초 발효액은 plasmin에 비하여 높은 항혈전 활성을 나타냈으며, 쭈(10%) 발효액과 취나물 발효액은 plasmin과 비슷한 활성을 보였다.

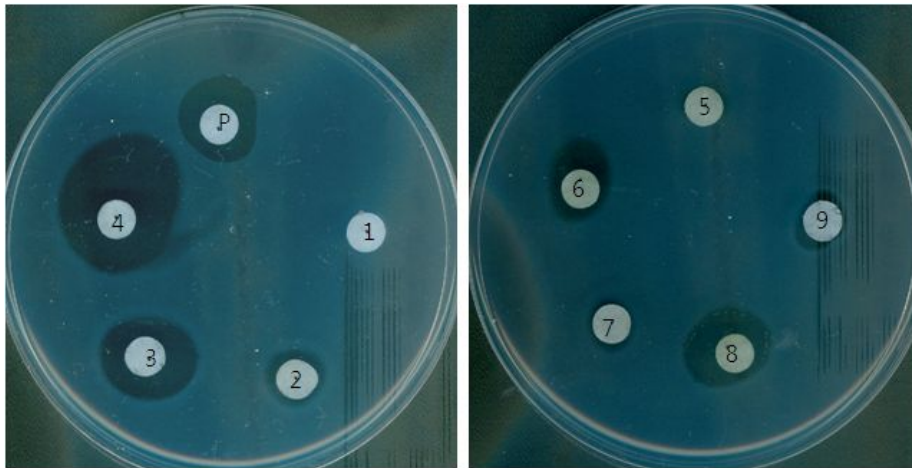


그림 9(b) Fibrinolytic activity of fermented wild vegetable juice.

표56. Size of clear zone depending on fermented wild vegetable juice.

반응시간 시료			20 hr (mm)	30 hr (mm)
P	Plasmin	1 U/disk	15*14	18*16
1	<i>B. subtilis</i> media		0*0	9*9
2	머위 발효액		10*9	11*10
3	미나리 발효액		17*14	19*16
4	신선초 발효액		25*20	28*24
5	쭈(5%) 발효액	10 ul/disk	0*0	8*8
6	쭈(10%) 발효액		15*10	16*12
7	참나물 발효액		8*8	9*8
8	취나물 발효액		15*13	16*15
9	케일 발효액		10*8	11*9

(라) 항암 활성

산야초 착즙액의 항암 활성을 분석한 결과는 표 57에서 나타난 바와 같이 착즙액에서 항암 활성이 나타나지 않았다. 산야초 착즙액의 항암활성은 주로 유기용매 추출 농축물에서 일부 보고된 바 있는데, 착즙액 상태에서는 항암활성이 나타나지 않았다.

표 57. Anticancer activity of wild vegetable juice.

Samples	293T	HT-29	A431	MCF-7	HepG2
참나물 착즙액	X (98%)	X (91%)	X (99%)	X (84%)	X (105%)
취나물 착즙액	X (88%)	X (99%)	X (103%)	X (93%)	X (81%)
미나리 착즙액	X (98%)	X (98%)	X (100%)	X (102%)	X (101%)
곰취 착즙액	X (95%)	X (99%)	X (104%)	X (88 %)	X (81%)

293T : human kidney epithelial cell; control

HT-29 : human colon carcinoma cell

A431 : human epidermoid carcinoma cell

MCF-7 : human breast adenocarcinoma cell

HepG2 : human hepatocellular carcinoma cell

(마) 항균 활성

표 58에 나타낸 바와 같이, 산야초 착즙액의 항균활성은 없는 것으로 나타났다. 즉, 참나물, 취나물, 미나리, 곰취 착즙액에 대해 *E. coli*는 85~109%, 황색 포도상 구균인 *S. aureus*는 97~104%를, *B. subtilis*는 95~106%의 생존율을 나타내어 이들 균에 대한 항균효과가 없는 것으로 판단된다. 한편으로, 장류의 주요 발효균 가운데 하나인 *B. subtilis*에 대해 항균활성을 나타내지 않아 장류 소재 개발에 산야초 착즙액을 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

표58. Antibacterial activity of wild vegetable juice.

Samples	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
참나물 착즙액	X (109%)	X (98%)	X (106%)
취나물 착즙액	X (105%)	X (101%)	X (103%)
미나리 착즙액	X (88%)	X (98%)	X (95%)
곰취 착즙액	X (106%)	X (104%)	X (101%)

(3) 산야초 발효액의 발효조건 최적화

(가) 탄소원의 영향

쭈분말 10% 환원액을 기본배지로 하여 탄소원 종류별로 1%를 첨가하여 *Bacillus subtilis* sp. starter 2%(V/V)를 접종하고 37℃에서 60시간, 200rpm으로 진탕 배양하면서 protease 활성에 미치는 탄소원의 영향을 검토한 결과는 표 59와 그림 10에 나타난 바와 같다. protease 활성이 전반적으로 낮은 상태로 비교적 높은 효과를 나타내는 탄소원은 dextrose이었다. 이는 변 등이 trypticase soy broth를 기본배지로 하여 *Bacillus subtilis*에서의 protease를 생산할 때, 탄소원으로 soluble starch 첨가시 효소활성이 높았다는 결과와 상이한 결과를 나타내었으나, 이 등이 fructose를 첨가했을 때 활성이 높았다는 보고와는 유사한 결과를 보였다.

표 59. Effect of carbon source on the growth and enzyme production of *B. subtilis* sp.

C-source	Final pH	Viable cell counts (CFU/ml)	Amylase activity (U/ml/min)
None	6.34	$4.6 \times 10^7$	195.3
Dextrose	6.12	$2.7 \times 10^7$	206.4
Sucrose	6.63	$1.7 \times 10^7$	202.0
Soluble starch	5.66	$8.2 \times 10^7$	197.9

*B. subtilis* sp. was grown at 37°C for 60 hours with 200 rpm in a 300 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of juice reconstituted 10% mugwort powder and supplemented with 1% of each carbon source.

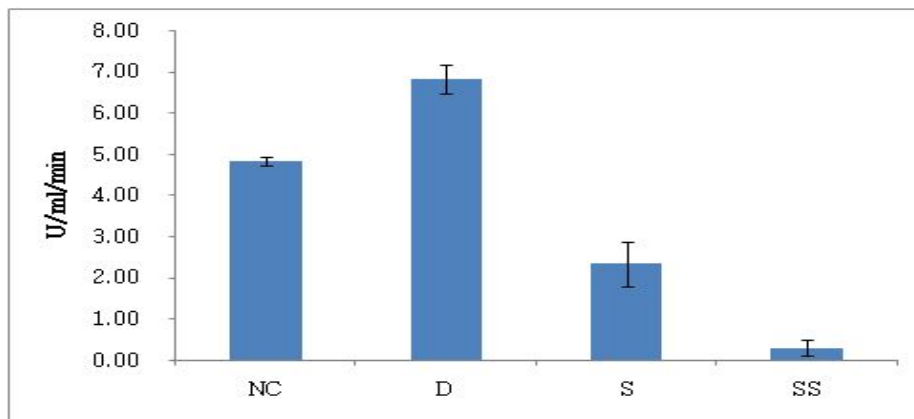


그림 10. Effect of carbon source on the protease production of *B. subtilis* sp.

*B. subtilis* sp. was grown at 37 °C for 60 hours with 200 rpm on the juice reconstituted 10% mugwort powder.

; NC, none carbon ; D, dextrose ; S, sucrose ; SS, soluble starch.

dextrose를 0~5%로 농도를 조정하여 효소활성을 측정한 결과는 표 60과 그림 1에 나타난 바와 같다. 즉, protease 활성이 전반적으로 낮은 상태로 비교적 높은 활성을 나타내는 시료는 dextrose 3% 첨가구이었다.

표 60. Effect of dextrose concentration on the growth and enzyme production of *B. subtilis* sp.

Dextrose	Final pH	Viable cell counts (CFU/ml)	Amylase activity (U/ml/min)
Dextrose 0%	6.44	$5.7 \times 10^7$	195.87
Dextrose 0.5%	5.41	$1.2 \times 10^7$	189.76
Dextrose 1%	6.33	$5.7 \times 10^7$	208.74
Dextrose 2%	5.56	$2.3 \times 10^7$	191.10
Dextrose 3%	5.92	$2.4 \times 10^7$	211.69
Dextrose 5%	5.86	$6.2 \times 10^7$	244.22

*B. subtilis* sp. was grown at 37°C for 60 hours with 200 rpm in a 300 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of juice reconstituted 10% mugwort powder and supplemented with each concentration of dextrose.

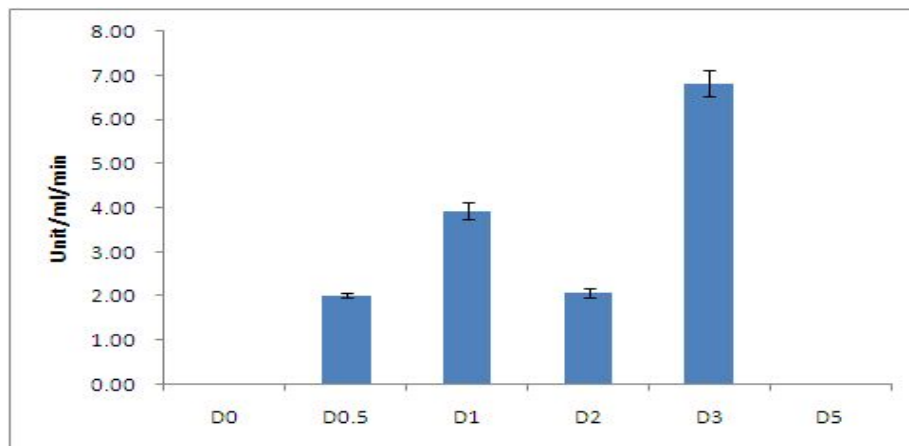


그림 11 Effect of dextrose concentration on the protease production of *B. subtilis* sp.

*B. subtilis* sp. was grown at 37 °C for 60 hours with 200 rpm on the juice reconstituted 10% mugwort powder ; D, dextrose

#### (나) 질소원의 영향

쭉분말 10% 환원액을 기본배지로 하여 질소원 종류별로 1%를 첨가하여 *Bacillus subtilis* sp. starter 2%(V/V)를 접종하고 37°C에서 60시간, 200rpm으로 진탕 배양하면서 protease 활성에 미치는 질소원의 영향을 검토한 결과는 표 61과 그림 12에 나타난 바와 같다.

protease 활성에 우수한 효과를 보인 질소원은 전지대두분과 청국장 분말로 protease 활성이 약 30unit를 나타내 비교적 높은 것으로 판단된다. 경제성을 고려할 때, 청국장 분말보다 전지



대두분을 첨가하는 것이 유리할 것으로 판단된다.

한편, dextrose와 전지 대두분 병용시 dextrose 첨가 유무가 protease 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 dextrose 농도를 0%와 3%로 대별하고 여기에 전지 대두분을 0~5%로 조정하여 protease 활성화에 미치는 영향을 검토한 결과는 표 62, 그림 13에 나타낸 바와 같이 dextrose를 첨가하지 않고, 전지대두분 0.5%를 첨가한 시료에서 protease activity가 높게 나타났다.

표61. Effect of nitrogen source on the growth and enzyme production of *B. subtilis* sp.

N-source	Final pH	Viable cell counts (CFU/ml)	Amylase activity (U/ml/min)
None	5.76	$2.1 \times 10^8$	211.98
Yeast Extract	5.88	$8.3 \times 10^8$	209.93
Peptone	6.55	$2.9 \times 10^8$	206.21
Full Fat Soy Flour	6.37	$8.8 \times 10^8$	205.35
Cheong Kuk Jang powder	6.33	$3.2 \times 10^8$	220.40
NaNO <sub>3</sub>	7.30	$3.6 \times 10^8$	226.22

*B. subtilis* sp. was grown at 37°C for 60 hours with 200 rpm in a 300 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of juice reconstituted 10% mugwort powder and supplemented with 1% of each nitrogen source.

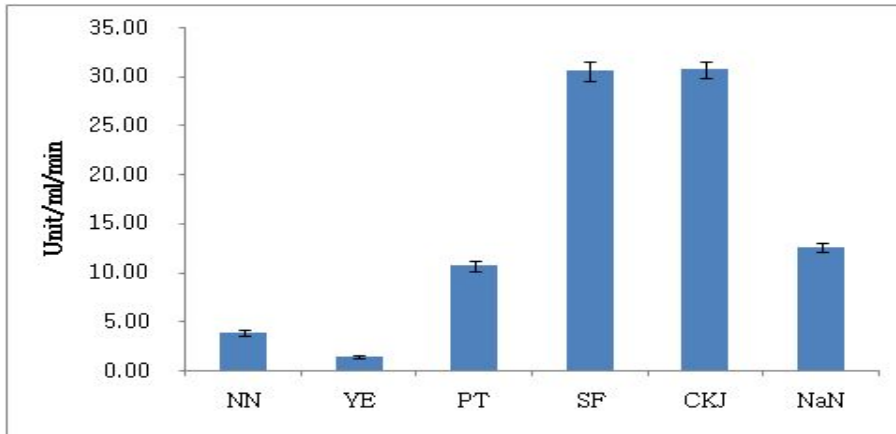


그림 12. Effect of nitrogen on the protease production of *B. subtilis* sp.

*B. subtilis* sp. was grown at 37 °C for 60 hours with 200 rpm on the juice reconstituted 10% mugwort powder and supplemented with different nitrogen source ; NN, none nitrogen; YE, yeast extract; PT, peptone; SF, soy flour; CKJ, cheongkukjang powder; NaN, NaNO<sub>3</sub>

표 62. Effect of soy flour and dextrose on the growth and enzyme production of *B. subtilis* sp.

	Final pH	Viable cell counts (CFU/ml)	Amylase activity (U/ml/min)	
	SF 0%	6.15	9.0×10 <sup>7</sup>	115.94
	SF 0.5%	6.31	1.9×10 <sup>8</sup>	134.28
Dextrose 3%	SF 1%	6.33	2.2×10 <sup>8</sup>	121.85
	SF 2%	5.67	3.0×10 <sup>8</sup>	129.96
	SF 3%	5.38	2.8×10 <sup>8</sup>	140.84
	SF 5%	5.49	6.1×10 <sup>8</sup>	142.56
		SF 0%	6.09	2.3×10 <sup>8</sup>
	SF 0.5%	5.48	1.4×10 <sup>8</sup>	224.62
Dextrose 0%	SF 1%	5.56	2.1×10 <sup>8</sup>	211.14
	SF 2%	5.38	5.7×10 <sup>8</sup>	208.61
	SF 3%	5.39	9.5×10 <sup>8</sup>	208.36
	SF 5%	5.78	1.9×10 <sup>9</sup>	213.51

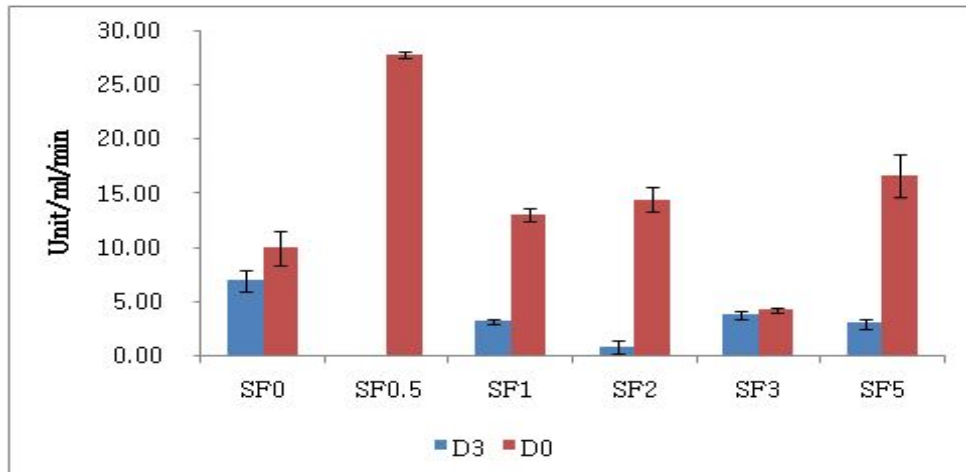


그림 13. Effect of soy flour concentration on the protease production of *B. subtilis* sp.

*B. subtilis* sp. was grown at 37 °C for 60 hours with 200 rpm on the juice reconstituted 10% mugwort powder and supplemented with different concentrations of nitrogen source ; SF, soy flour; D, dextrose; D3 dextrose 3%; D0 dextrose 0%;SF0 soy flour 0%; SF0.5 soy flour 0.5%; SF1 soy flour 1%; SF2 soy flour 2%; SF3 soy flour 3%; SF5 soy flour 5%;

(다) 초기 pH가 protease의 생산에 미치는 영향

protease 생산에 미치는 발효액의 초기 pH의 영향을 조사하기 위해 최대 효소생산을 나타내는 전지 대두분 0.5%만을 첨가한 쉰분말 10% 환원액을 멸균 후 pH를 6, 7, 8, 9, 10으로 조정하여 37°C에서 200 rpm으로 60 시간 발효한 발효액의 protease 활성도를 측정된 결과는 표 63과 그림 14와 같다.

쉰 분말 10% 환원액의 본래 pH는 7.3으로 이를 1N HCl용액과 1N NaOH용액으로 각각의 배양 초기 pH를 조정하였다. 변과 최 등은 초기 pH 7.2~7.6 범위에서 효소활성이 높게 나타났다고 보고한 바 있고, 심 등은 초기배양 pH 10.2에서 높은 효소활성이 나타났다고 보고한 바 있으나, 본 실험에서는 pH에 따른 protease 활성은 큰 차이를 보이지 않았다.

표 63. Effect of initial pH on the growth and enzyme production of *B. subtilis* sp.

	Final pH	Viable cell counts (CFU/ml)	Amylase activity (U/ml/min)
pH6	5.76	$5.9 \times 10^8$	200.48
pH7	6.44	$2.0 \times 10^8$	199.07
pH8	6.34	$4.5 \times 10^8$	203.36
pH9	6.44	$8.7 \times 10^8$	207.17
pH10	5.42	$4.1 \times 10^8$	208.13

*B. subtilis* sp. was grown at 37°C for 60 hours with 200 rpm in a 300 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of juice reconstituted 10% mugwort powder with different initial pH.

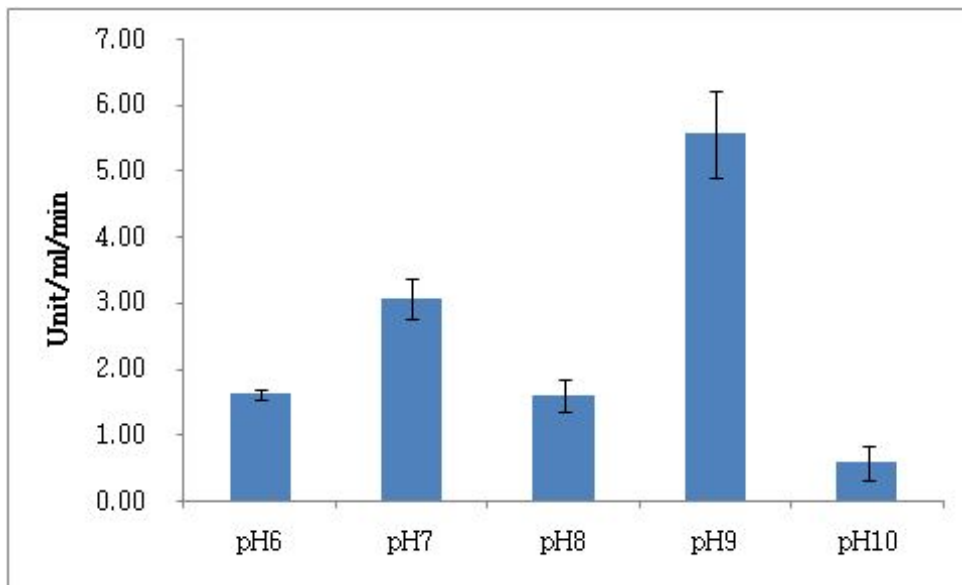


그림 14. Effect of initial pH on the protease production of *B. subtilis* sp.

*B. subtilis* sp. was grown at 37 °C for 60 hours with 200 rpm on the juice reconstituted 10% mugwort powder with different initial pH.

(라) 배양온도가 protease의 생산에 미치는 영향

protease생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위해 전지 대두분 0.5%를 첨가한 쑥 분말 10% 환원액을 실온(RT, 25±2℃), 40±2℃, 50±2℃에서 200rpm으로 60시간 발효한 발효액의 protease 활성도를 측정 한 결과는 표 64와 그림 15에 나타난 바와 같다.

배양온도에 따른 protease활성도는 비교적 낮은 편으로 배양온도 40℃에서 protease 활성도가 높게 나타났다. 즉, 실온 배양액에서는 protease 활성도가 거의 나타나지 않았고, 50℃배양액에서는 40℃배양액에 비하여 낮게 측정되었다. 이를 통해 protease 생산을 위한 *B. subtilis* 발효는 40℃ 전후에서 하는 것이 바람직하다고 판단된다.

*B. subtilis*로 효소생산을 위한 발효를 함에 있어서, 일반적으로 40~50℃에서 효소활성도가 높은 것으로 보고된 바 본 실험결과도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

표 64. Effect of temperature on the growth and enzyme production of *B. subtilis* sp.

	Final pH	Viable cell counts (CFU/ml)	Amylase activity (U/ml/min)
RT	5.95	1.1×10 <sup>9</sup>	10.53
40℃	6.34	2.9×10 <sup>9</sup>	14.15
50℃	6.13	1.8×10 <sup>9</sup>	11.27

*B. subtilis* sp. was grown at 37℃ for 60 hours with 200 rpm in a 300 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of the juice reconstituted 10% mugwort powder with different temperature.

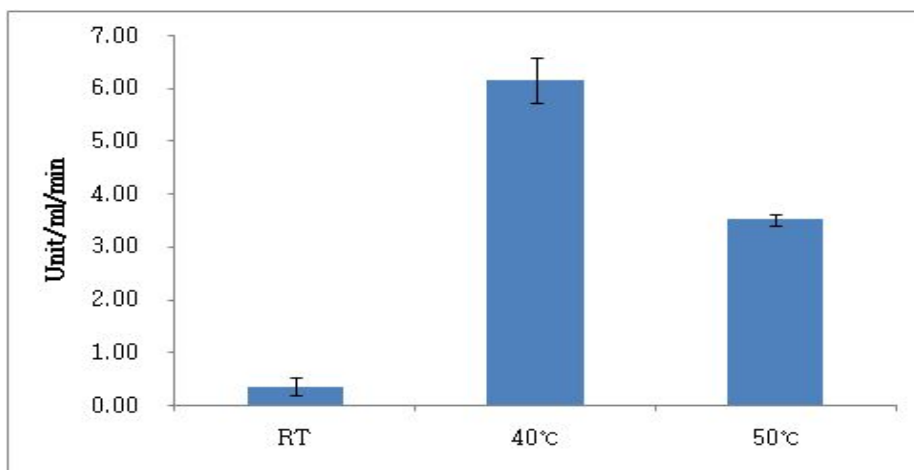


그림 15. Effect of temperature on the protease production of *B. subtilis* sp.

*B. subtilis* sp. was grown at different temperature for 60 hours with 200 rpm on the juice reconstituted 10% mugwort powder ; RT, room temperature

(마) 배양시간이 protease의 생산에 미치는 영향

protease생산에 미치는 배양시간의 영향을 조사하기 위해 전지 대두분 0.5%를 첨가한 쑥분말 10% 환원액을 40±2℃에서 200rpm으로 발효할 때, 배양시간 별로 protease활성을 측정 한 결과는 표 65와 그림 16에 나타난 바와 같다.

그림 16에서, 발효 48시간까지는 protease 활성이 증가하나, 발효 60시간에서 그 활성이 대폭 감소하다가 발효 72시간에 다시 증가하였다. 발효 84시간에 protease 활성은 약 15unit로서 최대치를 나타내었다. 이상에서 쑥분말 10%환원액에 전지대두분 0.5%를 첨가하고 *B. subtilis*로 발효시킬 때 protease활성이 높게 나타나는 발효시간은 72시간 이상임을 확인하였다. 본 실험 결과는 변 등, 장 등이 보고한 18~24시간에서 최대활성이 나타났다는 것과는 상이하고, 이 등이 5일 이상 발효시 효소생산이 가장 높았다는 결과와는 유사하였다.

표 65. Effect of fermentation time on the growth and enzyme production of *B. subtilis* sp.

fermentation time	Final pH	Viable cell counts (CFU/ml)	Amylase activity (U/ml/min)
12hr	6.26	5.0×10 <sup>7</sup>	109.29
24hr	5.86	1.1×10 <sup>8</sup>	106.06
36hr	5.51	1.3×10 <sup>8</sup>	103.78
48hr	5.94	2.3×10 <sup>8</sup>	103.44
60hr	5.43	2.6×10 <sup>8</sup>	104.30
72hr	6.43	3.5×10 <sup>8</sup>	115.61
84hr	6.66	1.2×10 <sup>9</sup>	109.14

*B. subtilis* sp. was grown at 37℃ with 200 rpm in a 300 ml Erlenmeyer flask

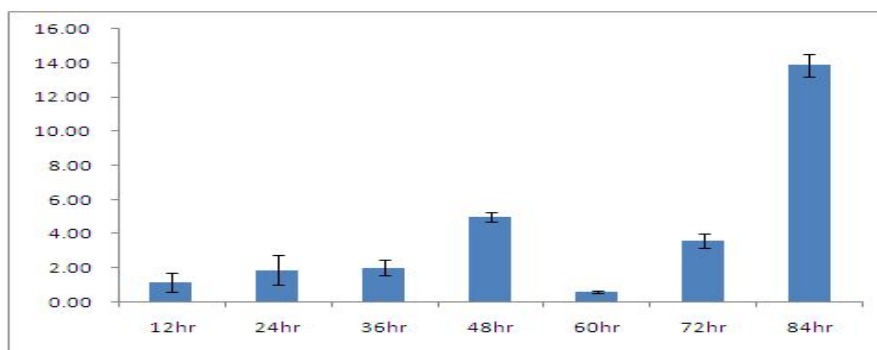


그림 16. Effect of fermentaion time on the protease production of *B. subtilis* sp.

*B. subtilis* sp. was grown at various temperature with 200 rpm on the juice reconstituted 10% mugwort powder. containing 100 ml of juice reconstituted 10% mugwort powder and supplemented with 0.5% of soy flour.

(바) 산야초 착즙액이 protease의 생산에 미치는 영향

protease 생산에 미치는 종류별 산야초 착즙액의 영향을 조사하기 위하여 최대 효소생산을 나타내는 전지대두분 0.5%로 첨가한 종류별 산야초 착즙액을 가압 멸균후 *B. subtilis*를 무균적으로 접종하고 40℃에서 5일간 200rpm으로 진탕 배양했을 때, 종류별 산야초 발효의 protease 활성도는 그림 17에 나타난 바와 같다.

미나리발효액과 신선초발효액의 protease 활성이 30unit내외로 가장 높았고, 다음으로 쭈분말 10%환원 발효액이 약 25unit를 나타내 기능성 식품소재로서 이용할 수 있는 가능성이 있는 것으로 판단되며, 취나물발효액, 머위발효액, 케일발효액의 protease활성도는 약 5unit 내외를 나타내었다. 한편, 참나물발효액에서는 활성이 나타나지 않았다.

이와같이 산야초 착즙액 종류별로 동일한 조건에서 발효시킨 발효액에서 활성도 차이는 착즙액중에 *B. subtilis* sp.의 생육에 영향을 주는 bacteriostatic effect와 관련이 있을 것으로 추정된다.

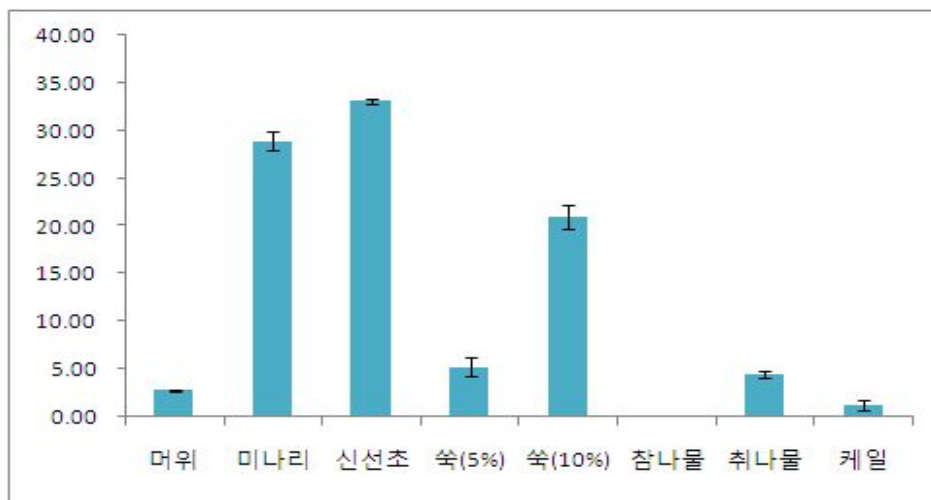


그림 17. Effect of wild vegetable juice on the protease production of *B. subtilis* sp.

*B. subtilis* sp. was grown at 40℃ for 5days with 200 rpm on different juices

(4) 산야초 발효액의 관능특성

산야초 발효액의 색, 향, 맛, 전체적인 기호도를 7점 채점법 (7점 아주좋다, 4점 보통이다, 1점 아주 나쁘다) 으로 검사한 결과는 그림 18(a)~18(d)에 나타난 바와 같다.

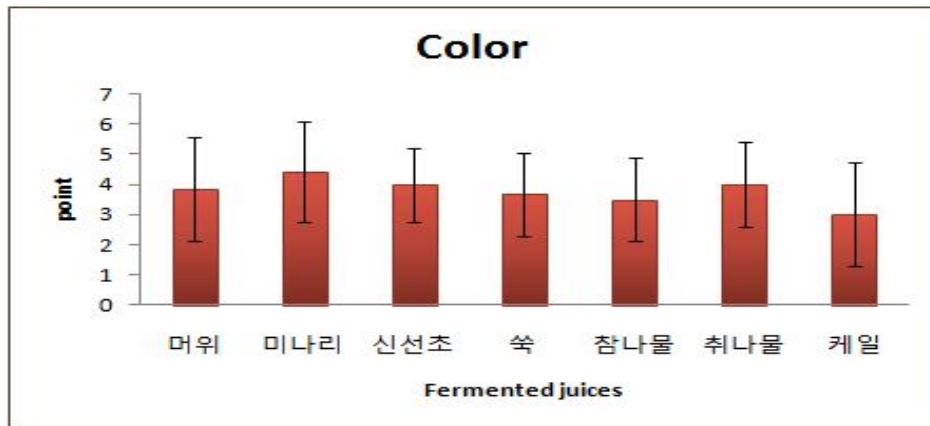


그림 18(a). Color evaluation of fermented wild vegetable juices.

산야초 발효액의 색상의 선호도는 그림 18(a)에 나타난 바와 같이 미나리발효액 4.4±1.7, 신선초발효액 4.0±1.2, 취나물 발효액 4.0±1.4, 머위발효액 3.8±1.7, 쑥발효액 3.7±1.4, 참나물발효액 3.5±1.4, 케일발효액 3.0±1.7 순으로 산야초 발효액간의 유의차는 없는 것으로 나타났다. 그러나, 미나리발효액, 신선초발효액, 취나물발효액 색상이 선호되는 경향이 있고, 케일발효액의 색상은 선호되지 않는 경향이 있는 것으로 나타났다.

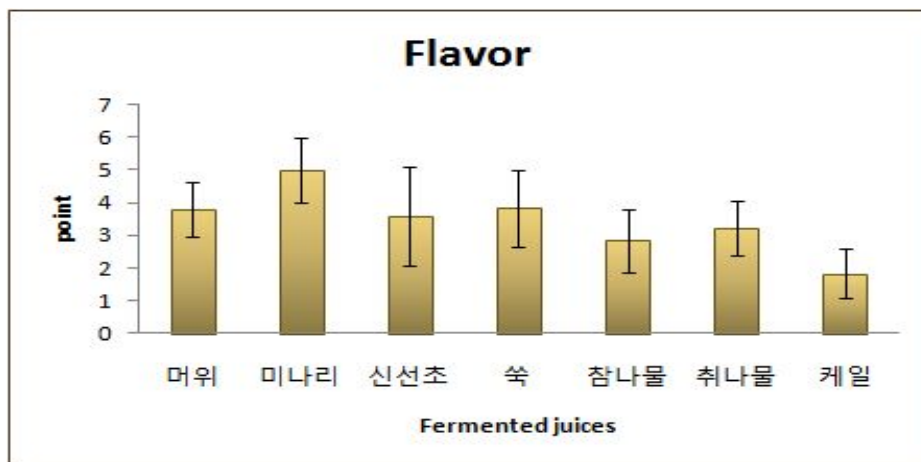


그림 18(b). Flavor evaluation of fermented wild vegetable juices.

산야초 발효액의 향의 선호도는 그림 18(b)에 나타난 바와 같이 미나리발효액 5.0±1.0, 쑥발효액 3.8±1.2, 취나물 발효액 3.8±0.8, 신선초발효액 3.6±1.5, 머위발효액 3.2±0.7, 참나물발효액 2.8±1.0, 케일발효액 1.8±0.8 순으로 미나리발효액, 쑥발효액, 취나물 발효액 향이 유의적으로 선호되었다.



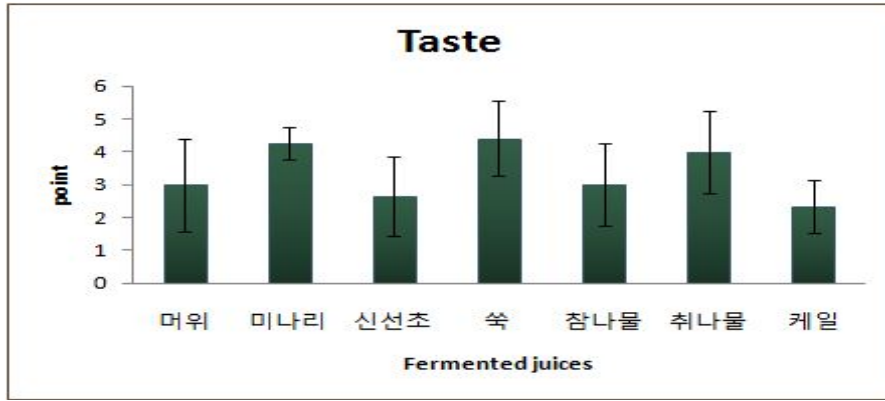


그림 18(c). Taste evaluation of fermented wild vegetable juices.

산야초 발효액의 맛의 선호도는 그림18(c)에 나타난 바와 같이 쑥 발효액  $4.4 \pm 1.1$ , 미나리 발효액  $4.3 \pm 0.5$ , 머위 발효액  $4.0 \pm 1.3$ , 참나물 발효액  $3.0 \pm 1.3$ , 취나물 발효액  $3.0 \pm 1.4$ , 신선초 발효액  $2.7 \pm 1.2$ , 케일 발효액  $2.3 \pm 0.8$  순으로 쑥 발효액과 미나리 발효액의 맛이 유의적으로 선호되었다.

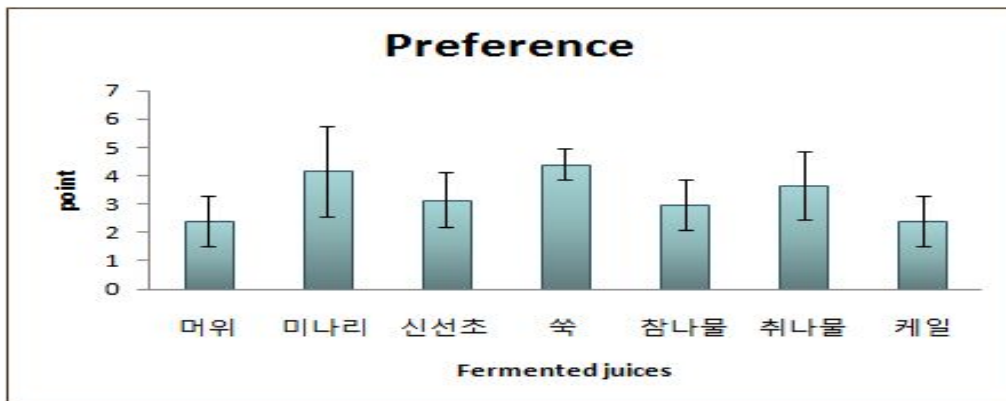


그림 18(d). Taste evaluation of fermented wild vegetable juices.

산야초 발효액의 전체적인 기호도는 그림 18(d)에 나타난 바와 같이 쑥 발효액  $4.4 \pm 0.5$ , 미나리 발효액  $4.2 \pm 1.5$ , 머위 발효액  $3.7 \pm 1.2$ , 신선초 발효액  $3.2 \pm 1.0$ , 참나물 발효액  $3.0 \pm 0.9$ , 취나물 발효액  $2.4 \pm 0.9$ , 케일 발효액  $2.4 \pm 0.9$  순으로 쑥 발효액과 미나리 발효액이 나머지 발효액에 비해 전체적인 기호도가 유의적으로 높았다.

## 2. 유산균 첨가한 산야초 발효액 조제 및 장류 제품 개발

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 재료 및 시료 조제

각 지역이 원산지인 산야초 7종(쑥, 취, 민들레, 갯잎, 명이, 미나리)을 구입하여 시료로 사용하였다.

황색설탕을 사용하였으며 유산균은 동치미에서 분리한 *Latobacillus plantarum*을 사용하였고, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 20252를 사용하였다.

Nutrition broth(NB)는 Difco社 제품을, 이 외 시약은 시판용 특급 및 1급 시약을 구입하여 사용하였다

#### - 산야초 발효액 조제



#### 자연 발효구

- Vegetable : yellow sugar = 1 : 1

#### 유산균 접종구

- Vegetable : yellow sugar = 1 : 1 + *L. plantarum* 2%

#### 효모, 유산균 접종구

- Vegetable : yellow sugar = 1 : 1 + *L. plantarum* 2% + *S. cerevisiae* 2%

그림 19. 산야초 발효액의 제조방법

### 나. 결과 및 고찰

#### (1) 산야초의 일반성분

산야초 착즙액의 일반성분은 그림20 에 나타낸 바와 같다.

수분함유량은 80% 이상이나, 솔잎만 낮음. 조회분은 0.5~2% 내이며 썩이 가장 높고 미나리가 가장 낮고. 조지방은 솔잎이 4%로 가장 높으나 그 외는 1% 내외이다  
조단백질은 1~5%내이며 솔잎이 가장 높고 미나리가 가장 낮다.

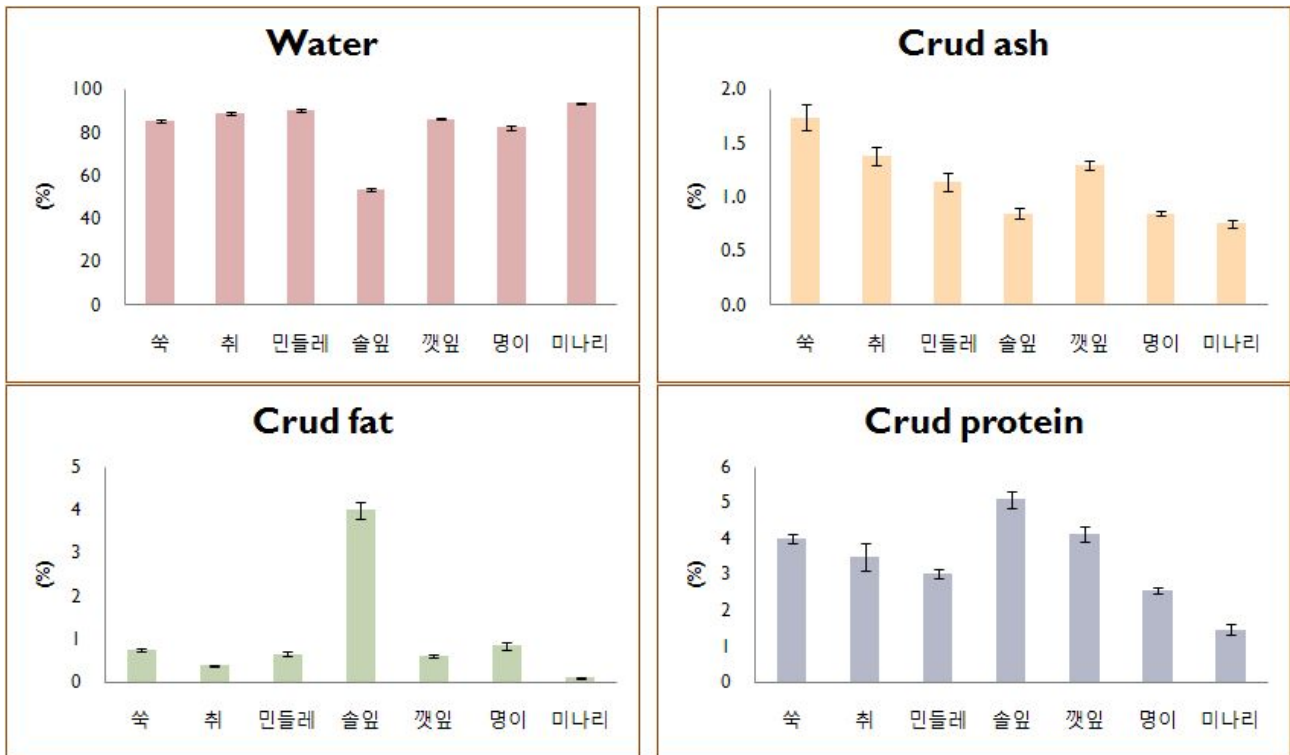


그림 20. 산야초의 일반성분

## (2) 산야초 발효액의 이화화학적 특성

산야초 발효액의 이화화학적 특성은 그림 21~24에 나타내었다. 당도는 시간이 지날수록 증가하는 추세이며, pH변화는 시간이 지날수록 감소하는 추세임. 0 day에서는 높았으나 그 후로는 낮아지거나 변화가 없다. 자연발효구의 색도 변화는 시간이 지날수록 명도, 적색도는 증가하나 황색도는 감소하고, 유산균 접종구 색도는 명도-증감(썩, 솔잎, 명이), 감소(취, 깻잎), 증가(민들레, 미나리), 적색도-증가하다 감소 황색도는 증감하고 밝기, 적색도, 황색도는 증가하다 감소하였고, 효모 유산균 접종구는 밝기, 적색도, 황색도 모두 증가하였다.

젖산 기준으로 산도 측정 시 자연발효 처리구는 시간 경과 할수록 증가 하였으며, 미나리만이 15일 발효시 산도 높았고, 유산균발효는 시간 경과 시 증가 혹은 변화 없고 명이와 미나리는 15일에 최대차를 보였다. 효모유산발효는 시간이 경과할수록 증가하였으며 15일에 높은 균이 있으나 60일에 최대값을 나타내었다.

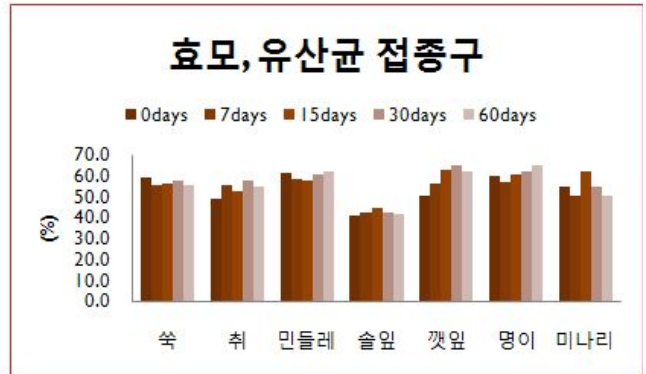
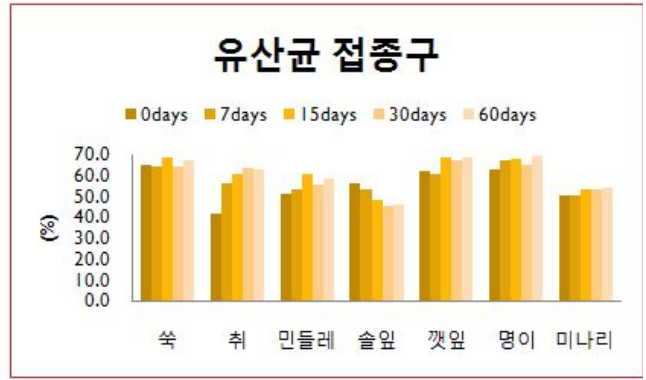
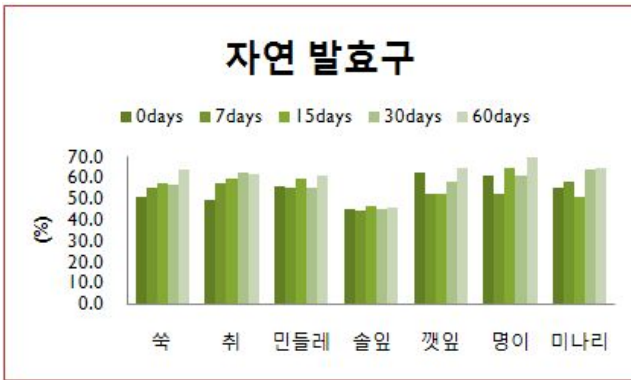


그림 21. 산야초 발효액의 당함량 변화

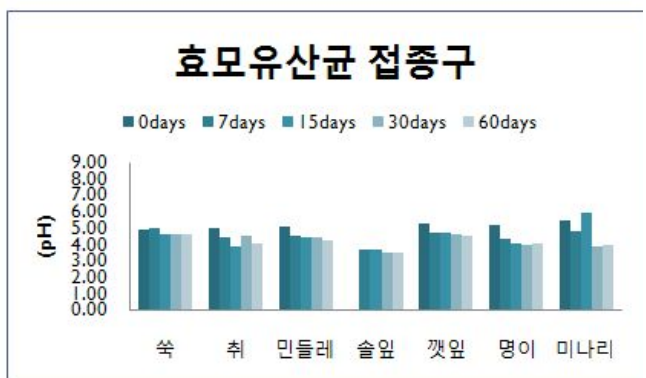
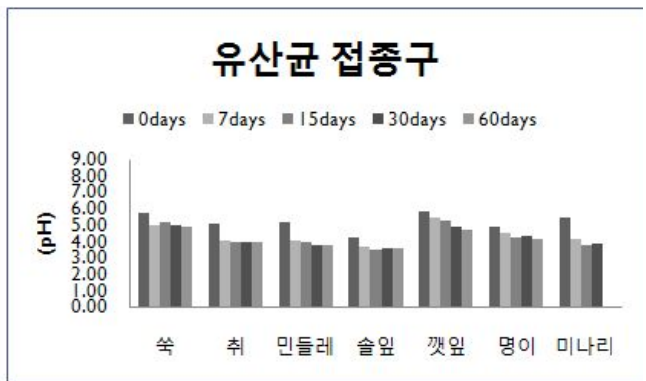
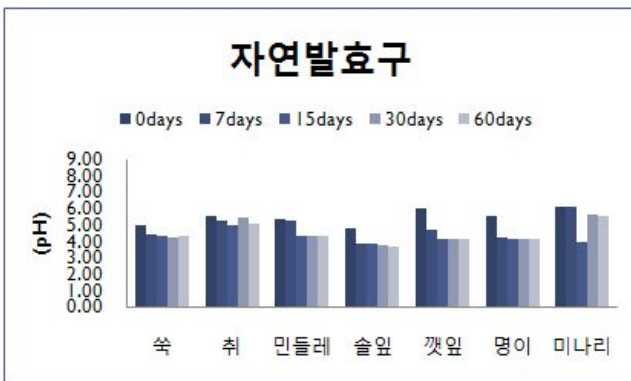


그림 22. 산야초 발효액의 pH 변화

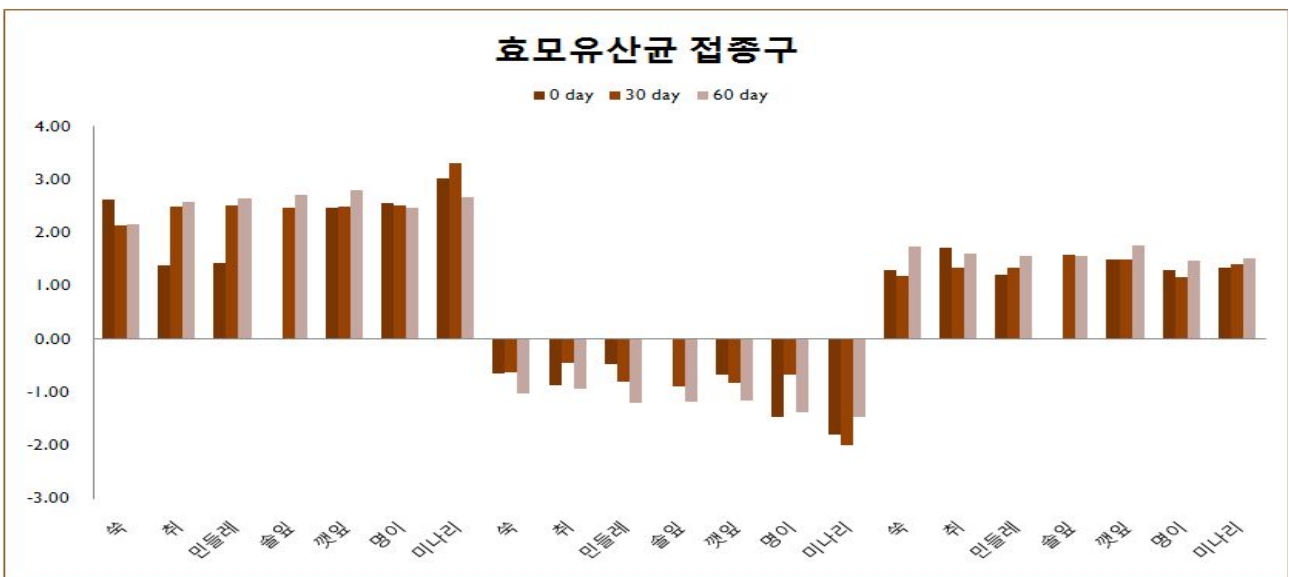
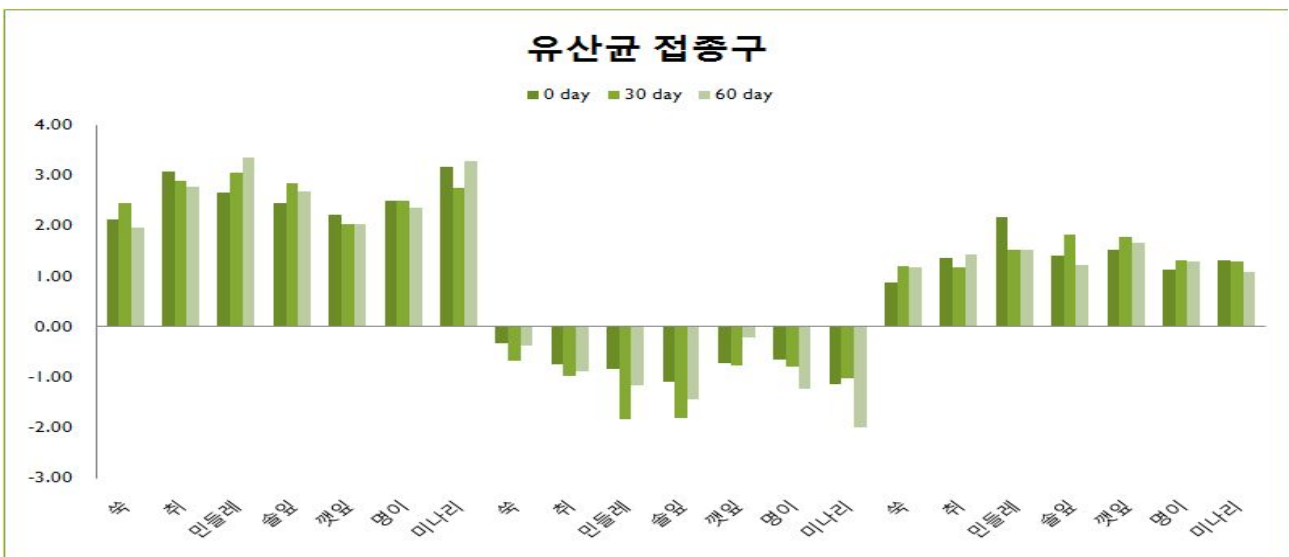
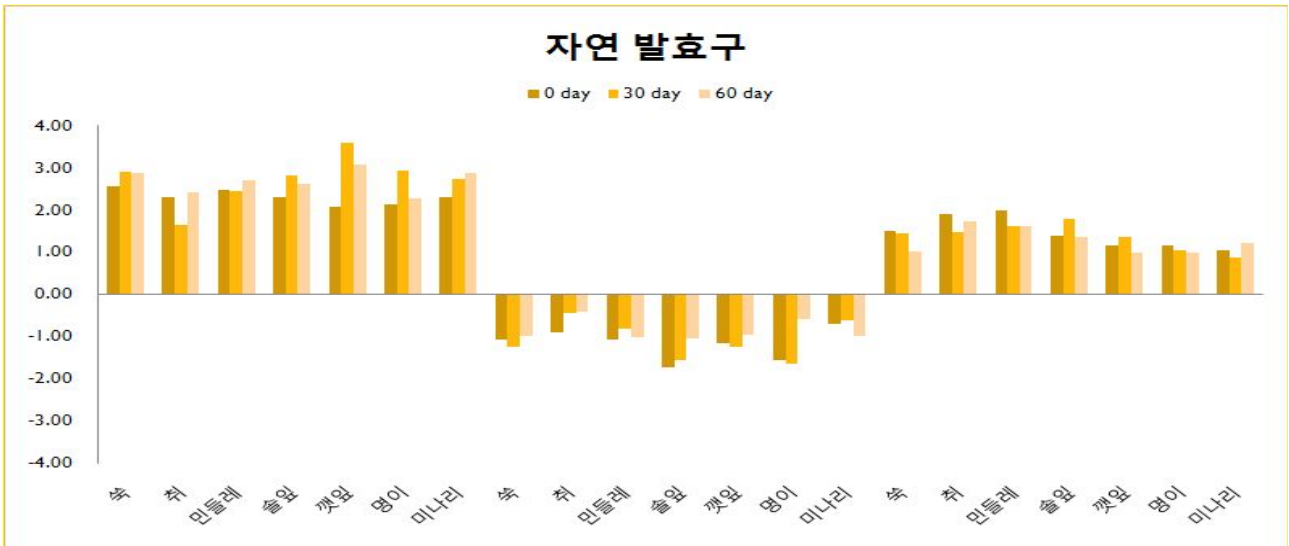


그림 23. 산야초 발효액의 색도변화

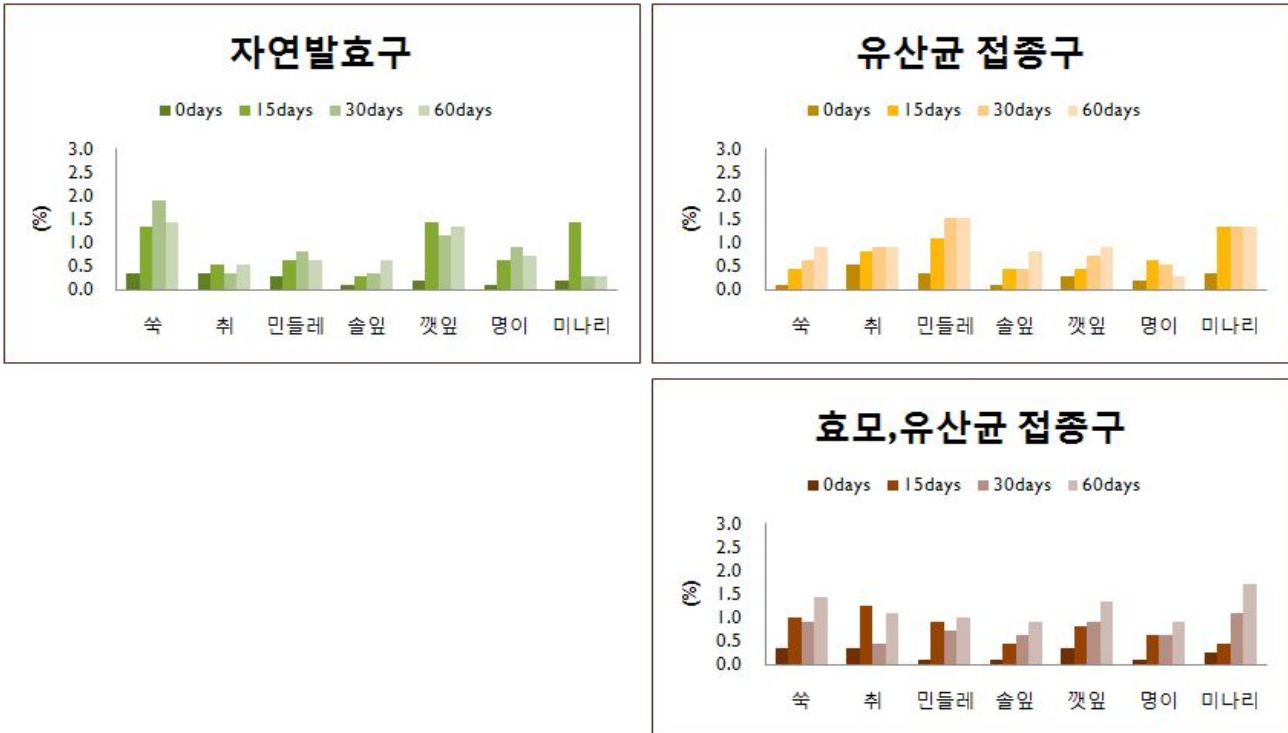


그림 24. 산야초 발효액의 산도변화

### (3) 산야초 발효액의 미생물 변화

산야초 발효액의 미생물 변화는 그림 25 ~ 27에 나타내었다. 유산균 수 변화는 자연발효 처리구는 30일차 높은 균수를 보였으며, 그 후 감소하였다. 유산균 발효구는 0일차엔 최고이다가 계속 감소하였다.

효모 유산 발효구는 30일차까지는 유지되나 60일에 감소하였다.

일반세균 수의 변화는 자연발효 처리구는 30일차 최고이며, 그 후 감소하였고 유산균 발효구는 30일까지 유지하다가 그 후 감소하였다. 효모 유산발효 처리구에서는 취, 명이는 감소하였고 그 외는 유지하였다.

효모 수 변화는 자연발효는 30일차 최고였으며, 그 후 감소하였고 취는 계속 증가하였다. 유산 발효구는 30일차 최고치를 보였으며 그 후 유지되었고 쑥, 명이는 유지되는 결과를 보여주었다. 효모 유산 발효구는 30일차 최고치를 보였으며, 그 후 감소하였다.

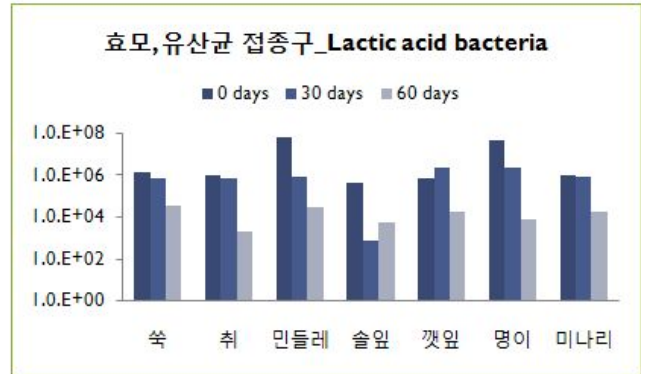
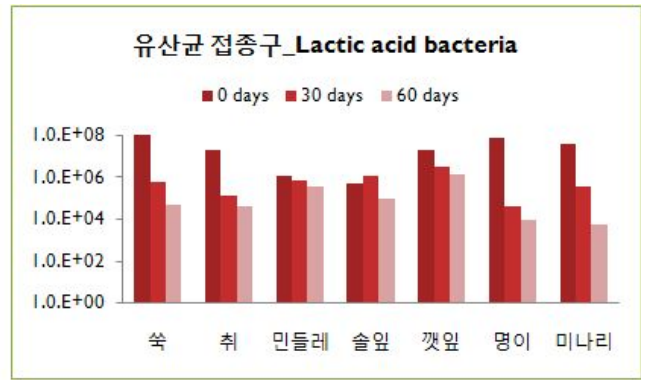
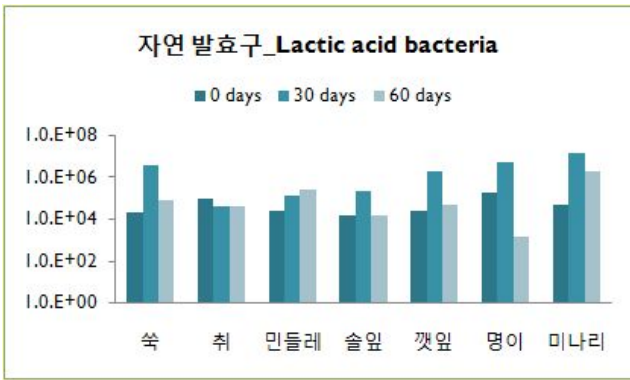


그림 25. 산야초 발효액의 유산균수 변화

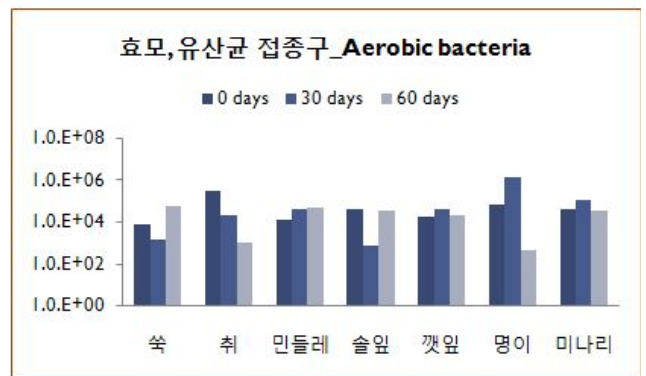
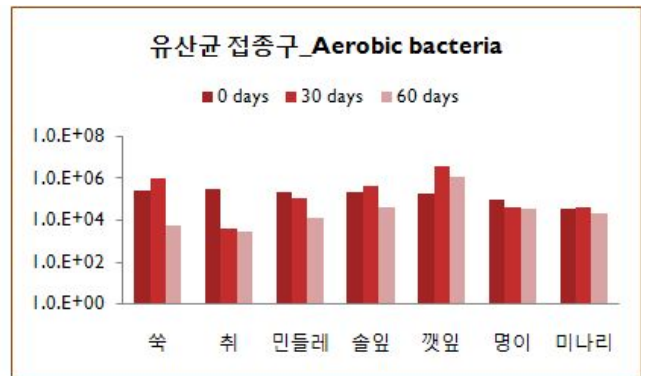
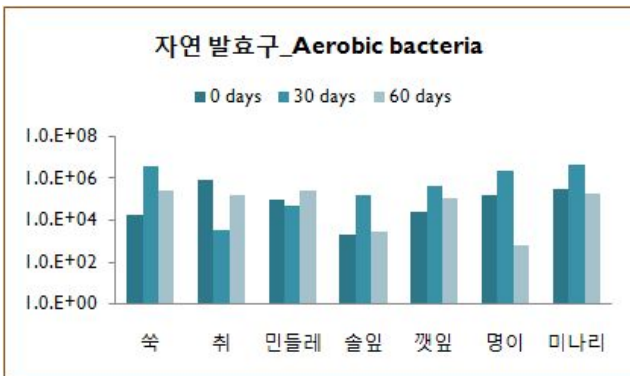


그림 26. 산야초 발효액의 일반 세균수 변화

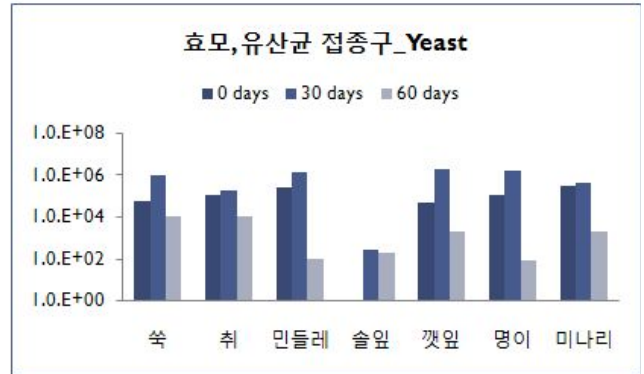
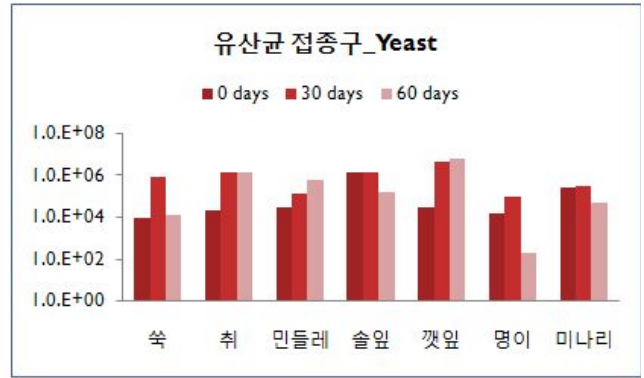
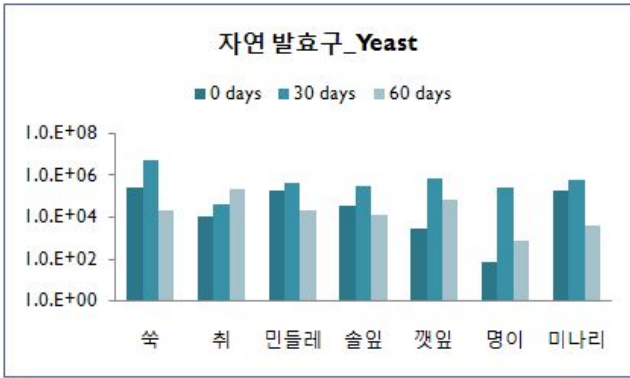


그림 27. 산야초 발효액의 효모수 변화

(4) 산야초 발효액의 효소활성 변화

효소활성 변화는 그림28 ~ 30에 나타내었다.

아밀레이즈 활성 시간별 변화 추이는, 자연발효에서 깻잎은 7일차 최고치를 보이다가 감소하였고 명이, 미나리, 솔잎은 30일차 최고치를 보이다 감소 그 외는 15일차 최고치를 보이고 감소하였다. 유산발효, 효모 유산균 발효 처리구 에서는 깻잎이 우수하였고 대부분이 15일에 최고치를 보이다가 감소하였다.

수크레이즈는 전체적으로 활성이 낮으며, 깻잎, 취가 비교적 활성이 나타났으며, 세 군 모두 깻잎에서의 활성이 높았다.

셀룰레이즈 활성 역시 깻잎이 세 군 모두 가장 높았고 솔잎, 명이, 미나리는 활성이 거의 나타나지 않았다. 유산발효와 효모유산발효에서 썩, 민들레의 활성이 자연발효보다 증가함을 알 수 있었다.



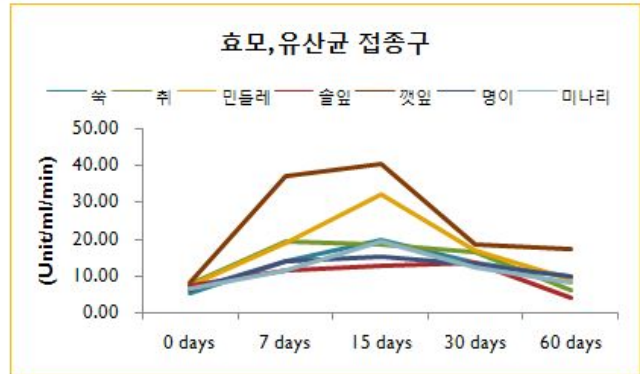
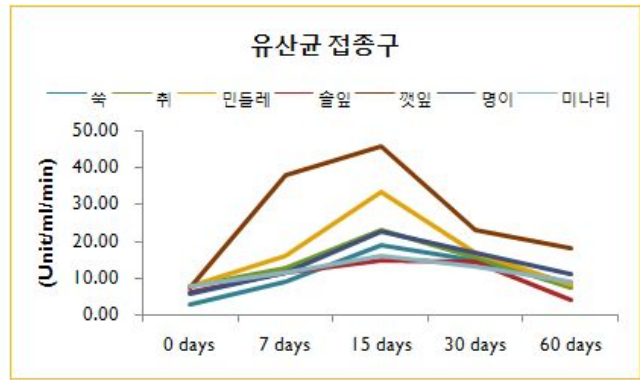
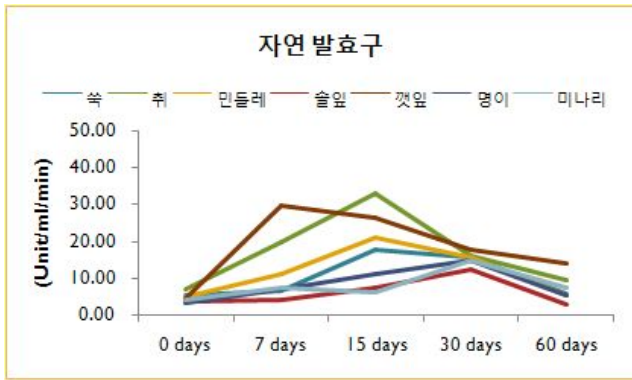


그림 28. 산야초 발효액의 아밀레이즈 활성 변화

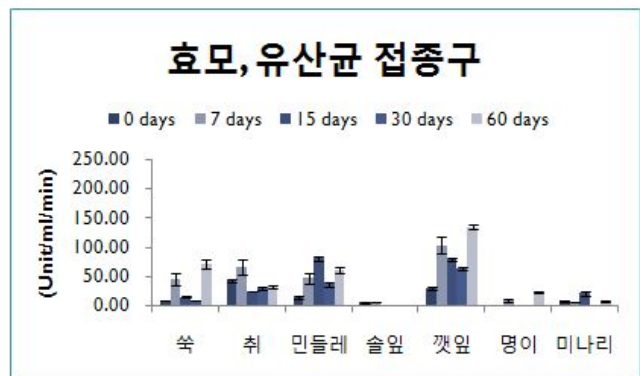
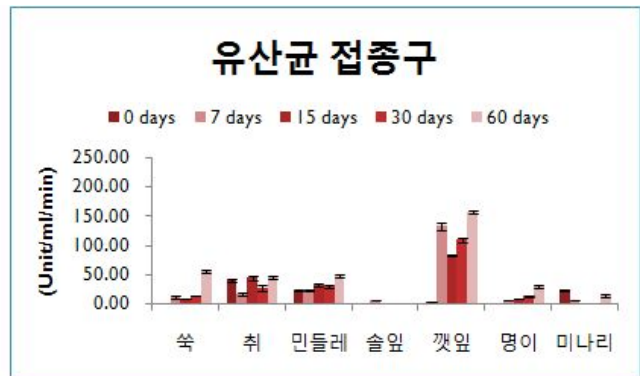
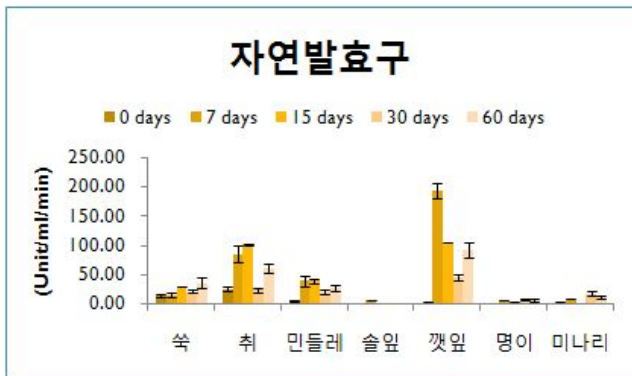


그림 29. 산야초 발효액의 수크레이즈 활성 변화

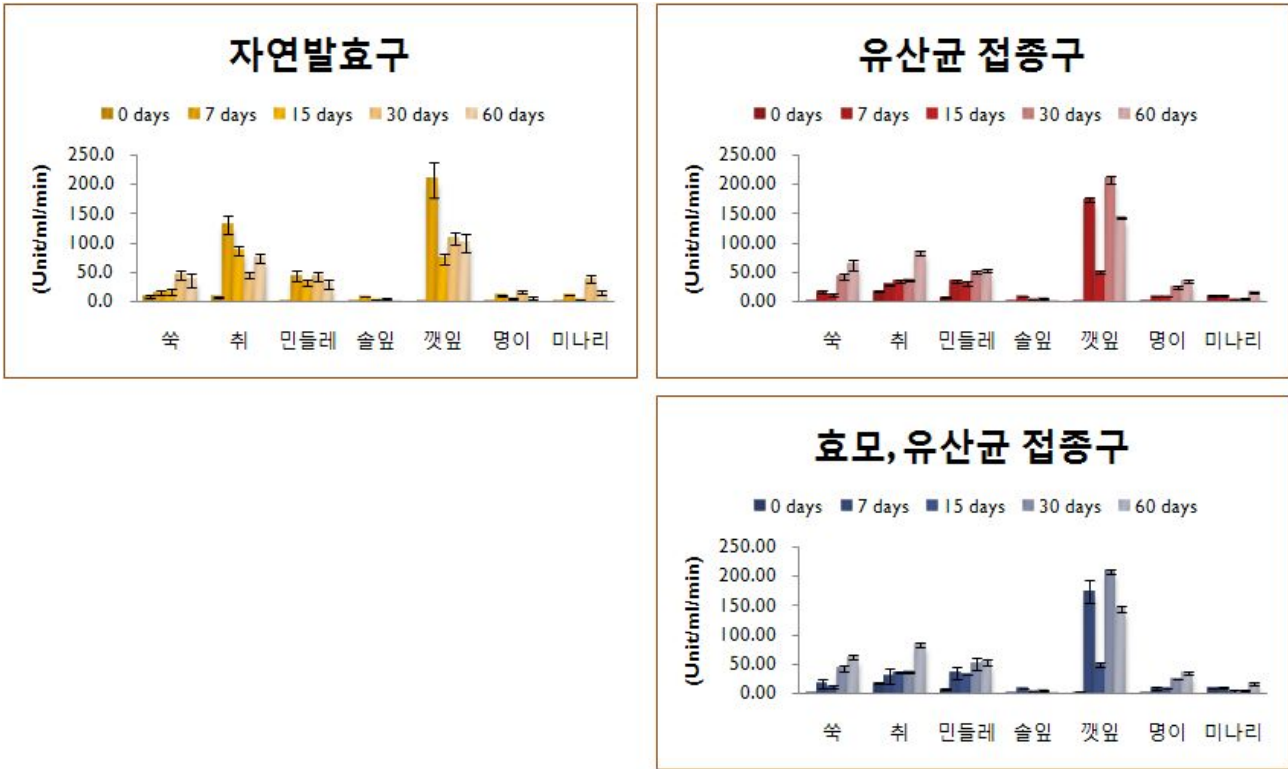


그림 30. 산야초 발효액의 셀플레이즈 활성 변화

다. 산야초 발효액을 이용한 장류소스 개발

(1) 비빔밥 소스

고추장과 발효액의 비율을 조정하여 비빔밥소스의 기본 레시피를 설정하였으며, 이때 비빔밥 소스의 재료 배합비는 표 65와 같았다. 발효액을 뺀 모든 재료는 배합하여 80℃에서 10분간 볶아 순창고추장 특유의 매콤함과 깊은 맛을 주었다.

표 66. 미나리 발효액을 이용한 고추장소스 배합비

Material	고추장	미나리 발효액	다진양파	다진마늘	참기름	깨소금	다진사과
Content (%)	65.5	26.2	6.5	1.0	0.2	0.3	0.3

(2) 된장 찜장 소스

한국인들이 좋아하는 고기류와 궁합이 잘 맞는 미나리, 깻잎 효소를 넣어 고기와 함께 먹을 수 있는 소스로서 미나리는 간에 좋고 깻잎 또한 고기의 비릿한 맛을 없앨 수 있어 좋을 것 같다. 된장의 염도가 높아 콩을 쪄 1:1로 혼합하여 숙성시켜 염도(16% → 7.9%)를 저하시켰다. 깻잎발효액은 고기의 특유냄새를 없애주고 소화촉진을 시켜주며 염도를 저하시켜 기존의 찜장보다 개운한 맛이 더하고 깻잎의 향이 어우러져 찜장의 맛을 한층 더하였다.

표 67. 갯잎발효액을 이용한 된장쌈장소스 배합비

Material	된장	삶은콩	갯잎 발효액	다진양파	다진마늘	참기름	깨소금
Content (%)	27.6	27.6	38.4	4.8	1.2	0.1	0.2

(3) 간장 치킨 소스

전통간장의 깊은 맛에 민들레 발효액을 첨가하여 기존의 치킨 소스와 차별화를 시켰다. 청국장 분말을 첨가하여 비만이 우려되는 젊은 여성층의 욕구도 충족시키며 짭조름하면서 달달한 맛을 강조하였다.

표 68. 민들레발효액을 이용한 간장치킨소스 배합비

Material	물	간장	마늘	사과	양파	배	대파	다시다	청양고추	L-글루타민 산나트륨	민들레 발효액	청국장 분말	물엿
Contents (%)	49.9	10.0	2.0	5.0	4.0	5.0	5.0	1.0	1.0	0.2	5.0	2.0	10.0

(4) 된장 돈가스 소스

전통 된장, 물, 간장 흑설탕 식초를 넣어 끓인 후 피망 양파 파인애플 슬라이드를 넣은 후 끓이다가 쭈발효액과 전분으로 마무리한다. 달콤새콤의 조화가 어우러지면서 전통장류의 향미를 느낄 수 있었다.

표 69. 쭈발효액을 이용한 된장 돈가스 소스 배합비

Material	1/2된장	우유	버터	마늘	양파	피망	전분가루	쭈발효액
Contents (%)	0.8	76.9	0.4	0.4	11.5	5.8	0.4	3.8

(5) 간장 드레싱

맵지 않은 드레싱 및 비빔소스를 제조하기 위하여 간장의 염도를 낮추고 단맛을 솔잎발효액으로 보강하였다. 소면의 비빔소스, 야채류 드레싱으로 활용 가능한 제품이다.

표 70. 솔잎발효액을 이용한 간장 드레싱 배합비

Material	간장	솔잎 발효액	깨소금	참기름	다진 마늘	다진 파	설탕	사과 식초	땅콩 가루
contents (%)	24.2	24.2	4.8	1.0	14.5	2.4	4.8	4.8	19.3

### 3절. 수출전략 제품 개발(발효 당침지 검은콩 편이식 제품 개발)

#### 1. 서론

검은콩은 필수 영양소의 지속적인 공급 및 신체 내에서 일어나는 좋지 않은 여러 가지 변화를 억제하거나 지연시켜주는 생리적 기능을 갖춘 식품으로 필수 아미노산이 콩의 40% 가량 차지하고 있으며 검은콩에 포함된 지방의 대부분이 불포화 지방산으로 이루어져 있다. 뿐만 아니라 비타민 E, 카로테노이드, 사포닌, 안토시아닌 등 노화를 예방하는 항산화 물질이 일반 콩의 4배로 풍부하며, 탈모예방에 효과적인 cystein 또한 풍부하게 포함되어있으며, 검은콩 안의 대표 생리활성 물질인 이소플라본류는 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사한 기능을 하여 폐경기에 일어나는 골다공증을 예방하고 유방암, 난소암, 자궁암 감소에 효과적이며 신부전증, 신장 질환, 만성질환에 효과적인 것으로 밝혀졌다.

이러한 콩 속에 함유된 생리활성물질의 흡수율은 제조방법에 따라 크게 차이를 나타내는데 콩 자체만을 섭취시 약 30%만의 흡수율을 보이거나 발효된 콩을 섭취시에는 그 흡수율이 3배 이상 높아져 약 90% 이상 흡수된다고 알려져 있다. 이는 발효과정 중에 미생물의 작용에 의해서 이러한 비흡수성 생리활성물질이 장내에서 흡수되어지기 쉬운 형태로 전화되거나 흡수율을 도와주기 때문인 것으로 알려져 있다. 따라서 기능적으로 우수한 콩을 이용한 식품이 여러 식품의 원재료로 사용되고 있으나, 흡수율의 문제와 더불어 전세계 인구의 약 0.5%의 인구에 있어서 콩제품을 이용할 수 없는 경우가 있는데 이는 콩제품에 함유되어있는 알레르기성 물질 때문이며, 면역성의 감소추세와 더불어 콩제품에 대한 알레르기반응을 보이는 인구수는 증가세를 보이고 있다. 한편, 스페인 발효산업연구소(CSIC)와 일리노이대학이 공동으로 실시한 최신의 연구에서는 세균이나 곰팡이, 효모균 등 여러 종류의 미생물에 콩을 노출시켜 고체 발효와 액체 발효를 시킨 결과 사람의 혈장 감수성에 따라 면역반응성이 96%~99% 낮아져 최대 저하율을 나타낸다는 놀라운 결과를 발표하였다. 즉, 발효를 통해 콩제품에 들어있는 알레르기원으로 알려져있는 일부 단백질이 분해되어 없어지거나, 필수 아미노산의 조성이 개선되면서 건강에 도움이 되는 새로운 성질이 부여되며 또한 발효 과정에서 생산되는 일부 생물활성물질들이 면역반응 개선효과를 부여하게 된다. 따라서 영양가 높고 저자극성인 콩제품을 개발하고, 이용을 촉진시키는데 있어서 발효를 이용한 수단이 매우 중요함을 시사하고 있다.

예로부터 콩은 한국의 대표적 전통 식품인 된장, 간장, 청국장등의 발효식품으로써 오래전부터 한국인과 아주 밀접하게 섭취되어 오고 있는데, 최근 콩을 발효시킴으로써, 콩의 대표적 기능성 성분인 이소플라본의 소화 흡수율의 증가됨이 여러 논문에서 밝혀졌다. 이 밖에도 콩을 발효시킴으로써 혈압강하효과를 유도하며 갱년기 발생하는 불면증, 우울, 불안들에 대한 신경 안정에 효과적인 것으로 알려져 있는 신경전달 물질인 GABA의 함량이 증가된다는 연구결과도 발표되었다.

그러나 최근 콩을 이용한 전통 발효식품의 건강에 대한 효용성이 많이 증명되어져 오고 있음에도 불구하고 이의 전체적인 섭취량은 전통식품의 감소추세와 더불어 점점 감소하고 있는 추세이다. 이는 건강에 대한 관심의 증가에도 불구하고 바빠지는 현대인의 생활에 비추어 편리성이 부족하다는 단점 때문이라고 보여 진다. 따라서 기능적으로 우수한 콩제품의 소비를 증가시키기 위해서는 건강에 대한 가치성 뿐만 아니라 편리성을 추가한 신제품의 개발을 통하여 소비자들이 쉽게 접근할 수 있도록 경제성과 기능성이 높은 콩 가공제품을 개발하는 것은 매

우 중요하다.

본 연구에서는 대표적인 발효미생물인 *Bacillus subtilis*와 *Lactobacillus plantarum*을 이용하여 발효 검은콩 제품을 제조하여, 최적 발효시간, 최적 당침지 조건에 대하여 검토하고 최종 시제품에 대한 수분함량 측정, 조직감 분석, 관능평가, 일반성분분석, 기능성 분석, 제품 품질평가, 최종제품의 당도를 측정하여, 비발효 검은콩 제품과 비교 분석함으로써 새로운 형태의 기능성 발효 당침지 콩제품의 가능성에 대하여 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 사용 균주

#### (1) 유산균 발효

유산균 발효 균주로는 *Lactobacillus plantarum* 을 사용하였다. 실험실 보균 균주 중 발효능이 뛰어난 균주를 선택하여 삶은 검은콩 100g에 전배양액 10mL ( $2.4 \times 10^9$ CFU)을 무균적으로 접종 후 37°C의 항온기에서 24시간, 48시간 동안 발효한 후 당침지 검은콩 편이식 제품의 재료로 사용하였다.

#### (2) 고초균 발효

고초균 발효 균주는 장류에서 분리한 균주 *Bacillus subtilis*를 사용하여 삶은 100g에 전배양액 10mL( $1.09 \times 10^9$ CFU)을 무균적으로 검은콩에 접종 후 37°C의 항온기에서 24시간, 48시간 동안 발효한 후 당침지 재료로 사용하였다.

### 나. 분석방법

#### (1) 수분함량 측정

부드러운 씹힘 성을 가진 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 발효 조건, 당침지 조건을 확립하기 위하여 검은콩을 *B. subtilis*와 *L. plantarum*를 이용하여 24시간 또는 48시간 발효하고 당침지 조건을 달리하여 당침지 검은콩 편이식 제품 제조 공정과 같은 방법 (그림 3-1-4)으로 제조한 후 수분자동측정기 (Ohaus, switzerland)를 사용하여 검은콩 편이식 제품의 수분함량을 측정하고 비발효 당침지 검은콩 편이식 제품과 두 가지 균주를 사용하여 발효하여 만든 발효 당침지 검은콩 편이식 제품을 비교하였다. 전 실험에서 1차 당침지 최적조건이 40°brix이었던 결과에 의거하여 1차 당침지 조건은 40°brix로 하였고, 2차 당침지 조건을 20°brix, 30°brix, 40°brix, 50°brix로 달리하여 최적의 발효 균주, 발효 시간, 당침지 조건을 결정하였다.

#### (2) Texture 측정

*B. subtilis* 와 *L. plantarum*을 이용하여 24시간 또는 48시간 발효하여 1차 당침지 조건 40°brix, 2차 당침지 조건 50°brix로 당 침지 공정을 통해 만든 검은콩 편이식 제품과 같은 당침지 조건으로 발효하지 않은 검은콩 제품의 texture를 측정하였다. Texture는 texture analyzer (Model TA -XT2, England)를 사용하여 hardness와, chewiness, gumminess를 분석하고 각각의 물성을 발효의 균주별, 시간별 발효의 효과를 비교 분석하였다. Texture analyzer의 분석조건은 다음과 같다.

표71. Texture analyzer 분석조건

Caption	Value
Pre test	3.00 mm/sec
Test speed	1.00 mm/sec
Post test	5.00 mm/sec
Distance	5.000 mm
Time	5.00 sec
Trigger type	Auto
Triger Force	5.0g
Tare Mode	Auto

(3) 관능평가

대학생 31명 (여학생: 15명, 남학생: 16명)을 대상으로 (*B. subtilis* 24시간 발효 후 40°brix/50°brix, *B. subtilis* 48시간 발효 후 40°brix/50°brix, *L. plantarum* 24시간 발효 후 40°brix/50°brix, *L. plantarum* 48시간 발효 후 40°brix/50°brix)의 조건으로 제조한 발효 검은콩 제품의 관능평가를 실시 후 외관, 색, 풍미, 씹힘성, 전체적인 바람직성을 5점 척도 (5점: 매우좋다, 4점: 좋다, 3점: 보통, 2점: 나쁘다, 1점: 매우나쁘다)를 사용하여 평가한 후 통계처리하였다.

(4) 일반성분분석

검은콩을 *B. subtilis*와 *L. plantarum*를 이용하여 24시간 48시간 발효하여 1차 당침지 조건:40°brix, 2차당침지 조건 50°brix 로 당침지 공정을 통해 만든 검은콩 당침지 검은콩 편이식 제품과 발효하지 않은 당침지 검은콩 편이식 제품의 수분함량, 조회분, 조단백, 조지방을 측정하여 비교 분석하였다. 수분함량은 검은콩 편이식 제품 형태의 시료를 자동수분측정기에 넣어 측정하였고, 조회분, 조단백, 조지방은 시료를 동결건조하여 분말의 형태를 취해 분석하였다. 조회분은 550°C 직접 회화법을 사용하여 분석하였고, 조단백질과 조지방 함량은 검은콩 편이식 제품을 AOAC법에 준하여 분석하였으며, 탄수화물 함량은 100에서 다른 성분들의 함량을 뺀 값으로 하였다.

(5) GABA 함량 측정

발효하지 않은 당침지 검은콩 스낵과 발효 당침지 검은콩 스낵의 기능성 성분 비교분석을 위하여 동결 건조한 파우더 형태의 시료를 이용하여 HPLC를 사용하여 발효 당침지 검은콩 스낵의 GABA 함량을 측정하였다. 분석에 이용할 시료는 먼저 발효콩 powder 1 g과 4% (v/v) acetic acid 6 mL을 혼합한 후 1시간동안 침전시킨 후 8,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 ethanol 4 mL을 첨가해 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 acetic acid와 ethanol을 기화시켰다 (0.1 Mpa, 45°C). 잔여물은 0.5 mL miliQ에 녹인 후 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 0.45 µm membrane filter를 이용해 여과한 후 HPLC (Waters co. US/Waters 1525 Binary HPLC pump)를 이용하여 분석하였다 (Rossetti et al., 1996). 분석 조건은 표 72와 같다.

표72. HPLC를 통한 GABA 함량 분석 조건

Column	Luna 5 $\mu$ C18 100A
Detection	ELSD Detector
Mobile phase	Water : MeOH
Flow rate	0.5 mL/min
Drift tube temp.	55 $^{\circ}$ C
Column temp.	37 $^{\circ}$ C

(6) Isoflavone 함량 측정

발효하지 않은 당침지 검은콩 스낵과 발효한 당침지 검은콩 스낵의 기능성 성분 비교분석을 위하여 동결 건조한 파우더 형태의 시료를 이용하였으며, 검은콩 스낵의 이소플라본 함량 분석은 HPLC (High performance liquid chromatography) 방법을 사용하였다. 콩스낵으로부터 이소플라본은 동결건조된 시료 2 g을 36 mL의 60% 에탄올에 첨가해 40 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 교반함으로써 추출되었다. 추출액은 syringe filter (mm, Advantec, Toyo, Japan)로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다. 표준물질로는 daidzin, genistin, daidzein, genistein (Sigma Co., St. Louis, USA)을 사용하였으며, HPLC의 분석 조건은 표 73과 같다.

표 73. HPLC를 통한 Isoflavone 함량 분석 조건

Column	Hypersil ODS column (250 $\times$ 4 mm, 5 mm particle size)	
Detection	ELSD Detector	
Mobile phase	A:0.5% trifluoroacetic acid/Water B:0.5% trifluoroacetic acid/ 60% MeCN	
Flow rate	1.0 mL/min	
Drift tube temp.	60 $^{\circ}$ C	
Column temp.	40 $^{\circ}$ C	
Gradient	0-5 min	A:B = 100:0
	5-35 min	A:B = 100:0 $\rightarrow$ 17:83
	35-40 min	A:B = 17:83
	40-50 min	A:B = 17:83 $\rightarrow$ 100:0

(7) 총 페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Denis 변법 (Hagerman et al., 2000)에 따라 동결건조 시료 0.1 g에 80% methanol 100 mL을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 추출한 후 추출액 1.0 mL를 시험관에 취하고 5 mL의 증류수를 가하여 희석하고, 희석한 용액에 0.1 mL의 Folin-ciocaltue's phenol reagent를 가하여 잘 섞은 후 2 mL의 증류수를 가하여 희석하였다. 그 후 혼합액을 1시간동안

방치 후 8,000 rpm에서 원심분리한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tannic acid (sigma co., USA)를 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드는 Davis 변법 (한국식품영양과학회 2000)에 따라 동결건조 시료 0.1 g에 80% methanol 100 mL을 가하여 37°C에서 하룻밤 동안 추출한 후 이 검액 1.0 mL를 시험관에 취하고 10 mL의 diethylen glycol을 가하여 혼합한 후 혼합액에 1N NaOH 0.1 mL를 혼합시켜 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응 시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 표준물질로는 gallic acid (sigma co., USA)를 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

(8) 항산화능 측정

발효 당침지 검은콩 스낵의 항산화 활성 측정은 메탄올을 이용한 추출과정을 거친 뒤 분석하였다. 동결 건조한 콩 시료 1 g에 80% methanol 100 mL를 가한 후 37°C에서 24시간 동안 교반한 추출액은 왓만 종이 (Whatman No.1)로 두 번 여과하였다. 최종 샘플은 0.45 µm filter (Advantec, Toyo, Japan)로 여과된 후 분석을 위하여 사용되었다.

(9) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 전자공여작용 (electron donating abilities, EDA)에 대한 효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 시료 0.1 mL에 0.2 mM DPPH solution (99% MeOH에 용해) 0.4 mL을 가한 후 30분간 상온에서 방치한 후 분광광도계를 사용하여 흡광도 517 nm에서 측정하였다. 이때 상대 활성의 비교를 위해 대조군으로 caffeic acid를 사용하였고 각 시료의 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 시료 첨가구 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left( 1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}} \right) \times 100$$

(10) SOD 유사활성능 측정

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성능은 Superoxide 라디칼 소거능을 분석하는 방법으로서 Marklund 와 Marklund (1974)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 시료 0.3 mL을 취하여 0.9 mL의 tris-HCl buffer (pH 8.2)와 60 µL의 7.2 mM pyrogallol를 잘 섞어 준 후 25°C에서 10분간 방치하여 반응시켰다. 1N HCl 0.2 mL을 첨가하여, 반응을 정지시킨 후 분광광도계를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 상대 활성의 비교를 위해 대조군으로 caffeic acid를 사용하였고 각 시료의 SOD 유사활성능은 아래의 식에 의해 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left( 1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}} \right) \times 100$$

(11) 하이드록실 라디칼 소거능 측정

하이드록실 라디칼 소거능은 FeSO4 존재하에 Fenton 반응으로 생성된 라디칼에 대한 소거능으로서 Aruoma (1987)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 즉, 0.5 mL의 시료는 2.8 mM 2-deoxy-D-ribose 0.1 mL, 0.1 mM FeCl3 (0.104 mM EDTA solution에 1:1로 섞인) 0.2 mL, 1 mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.1 mL 및 0.1 mM ascorbic acid 0.1 mL과 잘 섞어 주었다.



이 혼합물은 37℃에서 60분 동안 incubation 시킨 다음, 0.5 % thiobarbituric acid (10% trichloroacetic acid에 용해된, w/v)를 1.0 mL 넣은 후 항온수조에서 15분 동안 100℃로 가열하였다. ice에 5분 동안 방치한 후, 원심분리 (10,000 rpm, 5 min, 4℃)를 통해 상정액을 취하여 분광광도계를 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 상대 활성의 비교를 위해 대조군으로 caffeic acid를 사용하였고 각 시료의 하이드록실 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### (12) 품질평가

발효 당침지 콩스낵을 제조한 후 초기의 품질상태 및 저장 중 품질변화를 측정하기 위하여, 70일간 (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 28, 42, 56, 70일) 각각 4℃와 37℃에서 보관하면서 일정간격으로 시료를 채취하여 pH 및 일반세균수의 변화를 측정하였다. pH는 완성된 발효콩 스낵의 1 g을 10 mL의 증류수와 혼합 마쇄하여 pH meter를 사용하여 측정하였다. 발효 당침지 콩스낵의 미생물 균수 측정은 당침지 콩스낵 1 g을 채취하여 무균적으로 5 mL의 0.85% NaCl 용액으로 혼합하였다. 이 용액을 순차적으로 0.85% NaCl 용액으로 희석하고 이 용액의 0.1 mL를 plate Count Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 도말하고 35℃에서 3일간 배양하였다. 이상의 실험은 3회 반복으로 하였으며, 평균값을 실험 수치로 사용하였다.

#### (13) 통계처리

본 실험에서 얻어진 모든 결과는 통계분석용 소프트웨어인 SPSS version 12.0 package를 이용하여 분석하였다. 모든 데이터는 평균(mean) ± 표준편차(SD)로 나타내었으며 각 결과는 일원분산분석(One-Way ANOVA)에 의해 유의성을 검정하였다. P<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 검증하였다.

#### (14) 최종 당함량 측정

동결건조한 시료5g을 30ml의 증류수에 희석한 후 3000rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 얻어서 당도측정계(Refractometer PLA-1 ATAGO, Japan)를 이용하여 최종 당함량을 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 콩 수분함량에 미치는 당 침지 농도

당침지 조건을 달리하여 수분함량을 측정한 결과는 표 74와 같다. 가장 높은 수분 함량을 나타낸 것은 *Bacillus subtilis*을 접종하여 48시간 발효 한 후 40°brix/50°brix의 당침지 조건에서 만든 콩 제품이 수분함량이 6.73%로 가장 높게 나타났다. 이는 발효하지 않고 40°brix/40°brix의 당침지 조건에서 만든 제품의 수분함량 5.67% 보다 1.6% 가량 높은 수분함량을 나타냈다. 이는 비교제품인 일본제품 흑태랑의 수분함량 7.51% 보다 낮은 수분함량이지만 가장 높은 근사값을 보였으며 *Lactobacillus plantarum*보다 *B. subtilis*가 발효시간은 24시간 일 경우보다 48일 경우, 당침지 조건은 2차 당침지 농도가 높을수록 높은 수분함량을 나타내는 것을 알 수 있다.

표74. 콩 수분함량에 미치는 당 침지 농도

Sample	Moisture (%)
비발효 당침지 검은콩 편이식 제품	5.67±0.21
<i>L. plantarum</i> 24h (40°brix/20°brix)	4.15±0.04
<i>L. plantarum</i> 24h (40°brix/30°brix)	4.37±0.14
<i>L. plantarum</i> 24h (40°brix/40°brix)	4.25±0.01
<i>L. plantarum</i> 24h (40°brix/50°brix)	4.45±0.07
<i>L. plantarum</i> 48h (40°brix/20°brix)	2.66±0.04
<i>L. plantarum</i> 48h (40°brix/30°brix)	5.23±0.01
<i>L. plantarum</i> 48h (40°brix/40°brix)	5.52±0.42
<i>L. plantarum</i> 48h (40°brix/50°brix)	5.36±0.27
<i>B. subtilis</i> 24h (40°brix/20°brix)	2.23±0.01
<i>B. subtilis</i> 24h (40°brix/30°brix)	4.23±0.01
<i>B. subtilis</i> 24h (40°brix/40°brix)	4.38±0.21
<i>B. subtilis</i> 24h (40°brix/50°brix)	4.43±0.02
<i>B. subtilis</i> 48h (40°brix/20°brix)	2.78±0.01
<i>B. subtilis</i> 48h (40°brix/30°brix)	5.43±0.20
<i>B. subtilis</i> 48h (40°brix/40°brix)	5.74±0.26
<i>B. subtilis</i> 48h (40°brix/50°brix)	6.73±0.15

나. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 제조과정

발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 제조과정은 그림 31과 같다.

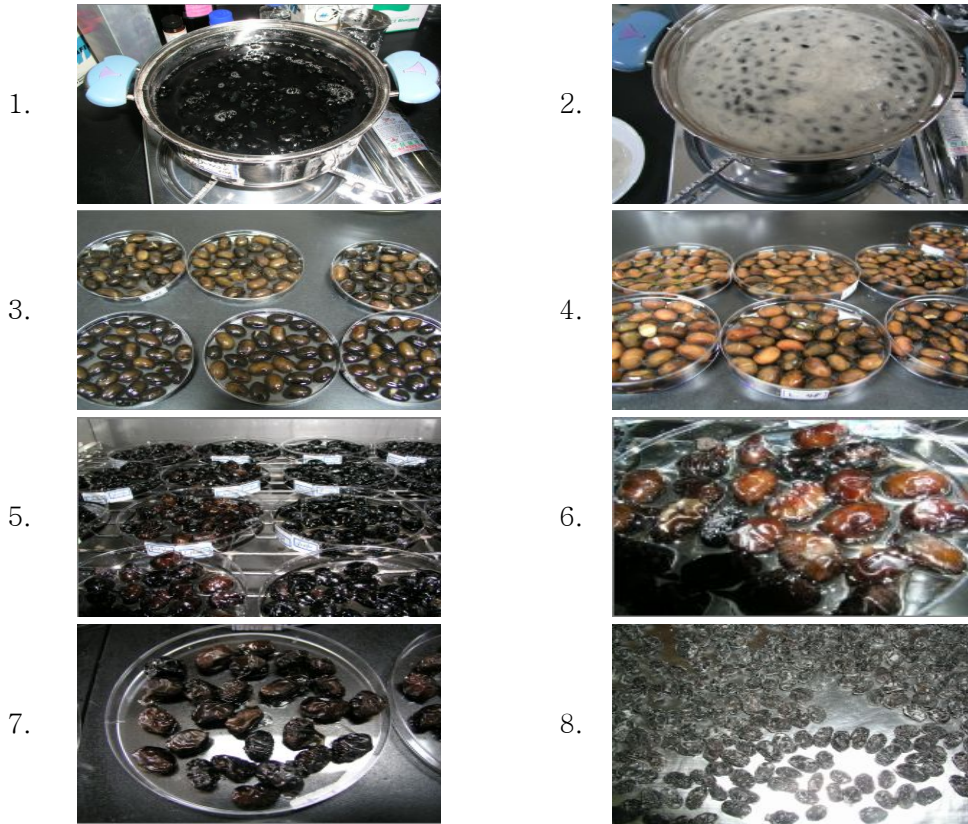


그림 31. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 제조과정

1. 수침 (14시간), 2. 삶기 (7시간), 3. *B. subtilis* 48시간 발효 후 1차 당침지,
4. *L. plantarum* 48시간 발효 후 1차 당침지,
5. *B. subtilis* 48시간 발효 후 2차 당침지
6. *L. plantarum* 48시간 발효 후 2차 당침지, 7. 자연건조, 8. 완성품

다. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 Texture 분석

비 발효 당침지 검은콩 편이식 제품과 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 조직감 분석표는 표 75와 다. 전 실험에서 당침지 조건이 높을수록 부드러운 질감의 제품을 얻을 수 있었던 점과 발효시간이 48시간일 경우 보다 높은 수분함량을 나타낸 결과에 의거하여 다음과 같은 6개의 샘플 (비발효 40°brix/40°brix, 비발효 40°brix/50°brix, *B. subtilis* 48시간 발효 후 40°brix/40°brix, *B. subtilis* 48시간 발효 후 40°brix/50°brix, *L. plantarum* 48시간 발효 후 40°brix/40°brix, *L. plantarum* 48시간 발효 후 40°brix/50°brix)를 조건으로 제작하여 texture analysis를 사용해 세가지의 조직감 (hardness, chewiness, gumminess)를 측정하였다. 측정값은 3회 측정 후 평균값을 사용하였다.

표75. 비 발효 당 칩지 검은콩 제품과 발효 당칩지 검은콩 편이식 제품의 조직감 분석표

Sample	Texture characteristics		
	Hardness	Chewiness	Gumminess
비발효 (40°brix/40°brix)	21310.94±7424.53	3456.80±1681.16	7380.83±3550.72
비발효 (40°brix/50°brix)	17764.58±5884.59	2573.62±1362.01	6307.15±2996.58
<i>B. subtilis</i> 48h (40°brix/40°brix)	17447.29±9117.86	2200.74±2013.90	5570.71±4291.97
<i>B. subtilis</i> 48h (40°brix/50°brix)	12686.58±4963.62	1294.00±985.79	3373.42±1983.55
<i>L. plantarum</i> 48h (40°brix/40°brix)	22985.13±7228.76	3065.46±1656.79	8479.71±4784.10
<i>L. plantarum</i> 48h (40°brix/50°brix)	16673.69±5570.95	1861.82±1126.25	4927.92±2501.66

라. 발효 당칩지 검은콩 편이식 제품의 관능평가

당칩지 조건을 달리하여 만든 검은콩 편이식 제품의 관능평가의 결과는 표76과 같다. 외관, 색, 향미, 씹힘 성, 전체적인 바람직성을 5점 척도로 평가하여 평균을 산출한 결과 전체적으로 비 발효 당칩지 검은콩 편이식 제품이 2.45점으로 가장 높게 나타났고, *B. subtilis* 를 접종하여 48시간 발효한 당칩지 검은콩 편이식 제품이 2.40점으로 발효한 당칩지 검은콩 편이식 제품 중 가장 높은 점수를 받았다.

표76. 발효 당 칩지 검은콩 편이식 제품의 관능평가

Sample	sensory characteristics				
	External	Color	Flavor	Texture	Overall
비발효	2.40±0.86	2.57±0.90	2.73±0.94	2.77±0.88	2.45±0.91
<i>B. subtilis</i> 24h	2.40±0.90	2.44±0.90	2.68±0.93	2.73±0.87	2.39±0.90
<i>B. subtilis</i> 48h	2.37±0.99	2.35±1.03	2.64±1.07	2.65±1.07	2.40±1.10
<i>L. plantarum</i> 24h	2.31±1.02	2.28±1.06	2.55±1.07	2.71±1.01	2.30±1.03
<i>L. plantarum</i> 48h	2.24±0.94	2.21±0.98	2.50±0.98	2.59±0.96	2.19±0.92

마. 발효 당칩지 검은콩 편이식 제품의 기능성성분 함량

GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid)는 신경전달 물질로써 혈압강하효과 및 갱년기에 발생하는 불편증, 우울, 불안등에 대한 신경안정에 효과적인 물질로써 콩 발효식품, 김치 및 젓갈 등에서 분리한 유산균들이 고농도로 생산한다는 보고 (Cross, 2004; Han & Kim, 2006; Jeun et al.,

2004)에 따라 당침지 검은콩 스낵과 발효 당침지 검은콩 스낵의 GABA 함량을 HPLC로 분석하였고 결과는 표 77과 같다. 비발효 콩스낵의 GABA 함량은 15.24 mg/g을 나타내었고, *L. plantarum* 발효 콩스낵의 GABA 함량은 15.91 mg/g를 나타낸 반면, *B. subtilis* 발효 콩스낵의 GABA 함량은 21.63 mg/g으로 유의적으로 가장 높았다 ( $p < 0.05$ ). GABA는 각종 야채, 과일, 쌀, 콩 등에 널리 분포되어 있다고 이미 알려진바 있으며, 이들을 발효시켰을 때 유산균들이 GABA를 고농도로 생산한다는 것은 많은 연구를 통해 증명된바 있다 (Cross, 2004; Han & Kim, 2006; Jeun et al, 2004). 그러나 *B. subtilis*을 이용해 발효를 통한 GABA 함량 증가에 관한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구를 통해 유산균 발효 보다 고초균 발효가 GABA 함량이 증가한다는 것을 알 수 있었다.

표77. 발효 당 침지 검은콩 편이식 제품의 GABA 함량

항목	발효 당침지 시제품		
	비발효 콩스낵 <sup>1)</sup>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. subtilis</i>
GABA (mg/g)	15.24 ± 1.47 <sup>b2)3)</sup>	15.91 ± 0.47 <sup>b</sup>	21.63 ± 1.23 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>비발효 콩스낵 ; 비발효 당침지 콩스낵

*L. plantarum* ; *L. plantarum* 48시간 발효 후 당침지 콩스낵

*B. subtilis* ; *B. subtilis* 48시간 발효 후 당침지 콩스낵

<sup>2)</sup>values are mean ± S.D. (n=3)

<sup>3)</sup>abc ; value with different superscripts within the same column are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at  $P < 0.05$

당침지 검은콩 스낵과 발효하지 않은 당침지 검은콩 스낵의 이소플라본 (daidzin, genistin, daidzein, genistein) 함량 결과는 표 78과 같다. Glycosides형태인 daidzin의 함량은 발효하지 않은 당침지 검은콩 스낵에서 755.8 µg/g 수준과 비교하여 *L. plantarum* 발효 콩스낵에서 각각 1001.6 µg/g, *B. subtilis* 발효 콩스낵에서 857.5 µg/g로 유의적으로 더 높은 함량을 나타냈다 ( $p < 0.001$ ). 즉, 대조군인 비발효 당침지 검은콩 스낵에 비하여 *L. plantarum*과 *B. subtilis*를 이용한 발효 후에 각각 33%, 14% 가량 함량이 증가되었다. 또한 Glycosides 다른 형태인 genistin 함량은 발효하지 않은 당침지 검은콩 스낵에서 1640.7 µg/g 수준과 비교하여 *B. subtilis* 발효 콩스낵에서 1980.9 µg/g을 나타내었으며 *L. plantarum* 발효 콩스낵에서 2275.5 µg/g으로 가장 높은 수치를 보였다 ( $p < 0.05$ ).

한편 glycoside의 유리형태로 aglycone 형태인 daidzein은 발효하지 않은 당침지 검은콩 스낵에서 695.7 µg/g 수준과 비교하여 *L. plantarum* 발효 콩스낵에서 각각 935.9 µg/g, *B. subtilis* 발효 콩스낵에서 920.2 µg/g으로 더 높은 수준을 보였으며 ( $p < 0.001$ ), 이는 대조군인 비발효 당침지 검은콩 스낵에 비하여 *L. plantarum*과 *B. subtilis*를 이용한 발효 후에 각각 39%, 21% 가량 함량이 증가되었다. genistein은 발효하지 않은 당침지 검은콩 스낵에서 810.6 µg/g 수준과 비교하여 *L. plantarum* 발효 콩스낵에서 각각 913.5 µg/g, *B. subtilis* 발효 콩스낵에서 825.6 µg/g으로 유의적으로 더 높은 수준을 나타냈다 ( $p < 0.001$ ). 총 이소플라본의 함량은 비발효군은 3902.8 µg/g, 발효군인 *L. plantarum* 발효 콩 스낵 5123.5 µg/g 및 *B. subtilis* 발효 콩스낵에서 4584.2 µg/g 수준을 나타내면서, 각각 1220.7 µg/g 및 681.7 µg/g의 차이를 보

여 발효를 통해 isoflavone의 함량이 증가하는 것을 알 수 있다. 이런 이소플라본의 함량 차이는 본 발효 당침지 콩스낵에 접종된 균주의 활성에서 기인된 것으로 사료된다.

표 78. 발효 당 침지 검은콩 편이식 제품의 이소플라본 함량

Isoflavones (µg/g)	발효 당침지 시제품		
	비발효 콩스낵 <sup>1)</sup>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. subtilis</i>
Daidzin	755.8 ± 39.6 <sup>2)3)</sup>	1001.6 ± 22.6 <sup>a</sup>	857.5 ± 16.7 <sup>b</sup>
Genistin	1640.7 ± 390.8 <sup>b</sup>	2275.5 ± 19.4 <sup>a</sup>	1980.9 ± 77.4 <sup>ab</sup>
Daidzein	695.7 ± 6.08 <sup>b</sup>	932.9 ± 57.9 <sup>a</sup>	920.2 ± 26.2 <sup>a</sup>
Genistein	810.6 ± 3.9 <sup>c</sup>	913.5 ± 6.7 <sup>a</sup>	825.6 ± 6.4 <sup>b</sup>
Total	3902.8	5123.5	4584.2

<sup>1)</sup>비발효 콩스낵 ; 비발효 당침지 콩스낵

*L. plantarum* ; *L. plantarum* 48시간 발효 후 당침지 콩스낵

*B. subtilis* ; *B. subtilis* 48시간 발효 후 당침지 콩스낵

<sup>2)</sup>values are mean ± S.D. (n=3)

<sup>3)</sup>abc ; value with different superscripts within the same column are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at  $P < 0.05$

발효하지 않은 당침지 검은콩 스낵과 발효한 당침지 검은콩 스낵의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 나타낸 결과는 표 79와 같다. 총 페놀 함량은 비발효 콩스낵군이 0.16 mg/g, *L. plantarum* 발효 콩스낵과 *B. subtilis* 발효 콩스낵이 0.17 mg/g 및 0.16 mg/g으로 *L. plantarum*을 이용하여 발효한 당침지 검은콩 스낵의 총 페놀 함량이 가장 높게 나타났다.

총 플라보노이드 함량은 비발효 콩스낵이 2.33 mg/g, *L. plantarum* 발효 콩스낵과 *B. subtilis* 발효 콩스낵이 5.3 mg/g 및 2.37 mg/g으로 나타났다. 특히, *L. plantarum* 발효 콩스낵의 플라보노이드 함량이 유의적으로 가장 높은 함량을 나타냈다 ( $p < 0.001$ ). 이는 *B. subtilis* BCRC 14715를 이용하여 검은콩을 발효했을 때 발효하지 않은 검은콩의 페놀 및 플라보노이드의 함량이 증가되는 결과와도 비슷한 결과이다. 이러한 결과는 검은콩의 발효 시 미생물이 검은콩을 기질로 사용하여 총 페놀 및 총 플라보노이드의 함량이 증가하는 것으로 사료된다 (Juan et al., 2009).

표 79. 발효 당 칩지 검은콩 편이식 제품의 총 페놀 및 플라보노이드 함량

성분 (mg/g)	발효 당칩지 시제품		
	비발효 콩스낵 <sup>1)</sup>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. subtilis</i>
Total phenols	0.16 ± 0.01 <sup>b2)3)</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.23 <sup>b</sup>
Total flavonoids	2.33 ± 0.40 <sup>b</sup>	5.36 ± 0.83 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.15 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>비발효 콩스낵 ; 비발효 당칩지 콩스낵

*L. plantarum* ; *L. plantarum* 48시간 발효 후 당칩지 콩스낵

*B. subtilis* ; *B. subtilis* 48시간 발효 후 당칩지 콩스낵

<sup>2)</sup>values are mean ± S.D. (n=3)

<sup>3)</sup>abc ; value with different superscripts within the same column are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at  $P < 0.05$

#### 바. 발효 당칩지 검은콩 편이식 제품의 항산화능 분석

DPPH는 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민에 의해서 환원되어 짙은 자색이 노란색으로 탈색되는 정도를 측정하는 것으로, 항산화 물질의 전자 공여능력을 측정할 때 사용되고 있다. 즉, DPPH는 분자 내에 위치한 안정한 라디칼을 함유하지만 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되며, 이때의 DPPH의 거동은 ·OH와 유사하여, 이런 DPPH 라디칼이 감소하는 정도를 분광광도계로 측정하여 시료의 항산화 활성을 측정하는 방법으로 널리 쓰이고 있다. 발효하지 않은 당칩지 검은콩 스낵과 발효 당칩지 검은콩 스낵의 DPPH 라디칼 소거능을 나타낸 결과는 그림 32과 같다. 발효하지 않은 당칩지 검은콩 스낵과 발효한 당칩지 검은콩 스낵 모두 농도가 증가함에 따라서 항산화 활성 역시 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 농도별로 각 군 간의 항산화 활성을 살펴보면 농도가 1 g/mL 일 때, 비발효 콩스낵의 13.34% 보다 *L. plantarum* 발효 콩스낵과 *B. subtilis* 발효 콩스낵이 각각 16.27%, 19.35%로 유의적으로 높은 항산화 활성을 나타내었으며 ( $p < 0.001$ ), 특히 *B. subtilis* 군이 유의적으로 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다.

항산화 효소 중의 하나인 Superoxide dismutase (SOD)는 산패에 인하여 형성된 세포에 해로운 환원산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응 ( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )을 촉매하고, catalase는 SOD에 의해 생성된  $H_2O_2$ 를 무해한 물분자와 산소분자로 전환시키는 역할을 한다. 이러한 SOD와 유사한 역할을 하여, superoxide anion의 활성을 억제시킬 수 있는 유사물질의 활성능을 측정한 결과를 그림 33에 나타내었다. SOD 유사활성능을 측정한 결과, 발효하지 않은 당칩지 검은콩 스낵과 발효한 당칩지 검은콩 스낵 모두 농도가 증가함에 따라서 항산화 활성 역시 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 농도별로 각 군 간의 항산화 활성을 살펴보면 농도가 1 g/mL 일 때, 비발효 콩스낵의 20.12% 보다 *L. plantarum* 발효 콩스낵과 *B. subtilis* 발효 콩스낵이 각각 23.44%, 26.94%로 유의적으로 높은 항산화 활성을 나타내었으며 ( $p < 0.001$ ), 특히 *B. subtilis* 군이 유의적으로 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 이는 *Bacillus subtilis* BCRC 14715를 이용하여 검은콩을 발효했을 때 발효하지 않은 검은콩 보다 항산화 활성이 높게 나타나는 선행연구결과와도 같은 양상을 나타내었다 (Juan et al., 2009).

하이드록실 라디칼은 DNA의 핵산과 결합함으로써 DNA 손상을 일으키므로 돌연변이와 암을 유발하는 것으로 알려져 있고 지질 산화를 일으켜 세포막을 손상시키므로 세포 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 하이드록실 라디칼 소거능은 FeSO<sub>4</sub> 존재하에 Fenton 반응으로 생성된 라디칼에 대한 소거능을 측정하게 된다. 추출방법에 따른 오미자 막걸리의 hydroxyl radical 소거능을 그림 34에 나타내었다. 하이드록실 라디칼 소거능을 측정한 결과, 발효하지 않은 당침지 검은콩 스낵과 발효한 당침지 검은콩 스낵 모두 농도가 증가함에 따라서 항산화 활성 역시 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 농도별로 각 군 간의 항산화 활성을 살펴보면 농도가 1 g/mL 일 때, 비발효 콩스낵의 32.55% 보다 *L. plantarum* 발효 콩스낵과 *B. subtilis* 발효 콩스낵이 각각 42.7%, 37.01%로 유의적으로 높은 항산화 활성을 나타내었으며 (p<0.001), 특히 *L. plantarum*군이 유의적으로 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 이상의 결과로 추출물의 함량이 증가함에 따라 hydroxyl 소거능이 증가함을 확인할 수 있었고, 비발효 콩스낵에 비하여 *L. plantarum*과 *B. subtilis*를 이용하여 발효 한 당침지 콩스낵에서 더 높은 항산화능 수준을 확인할 수 있었음.

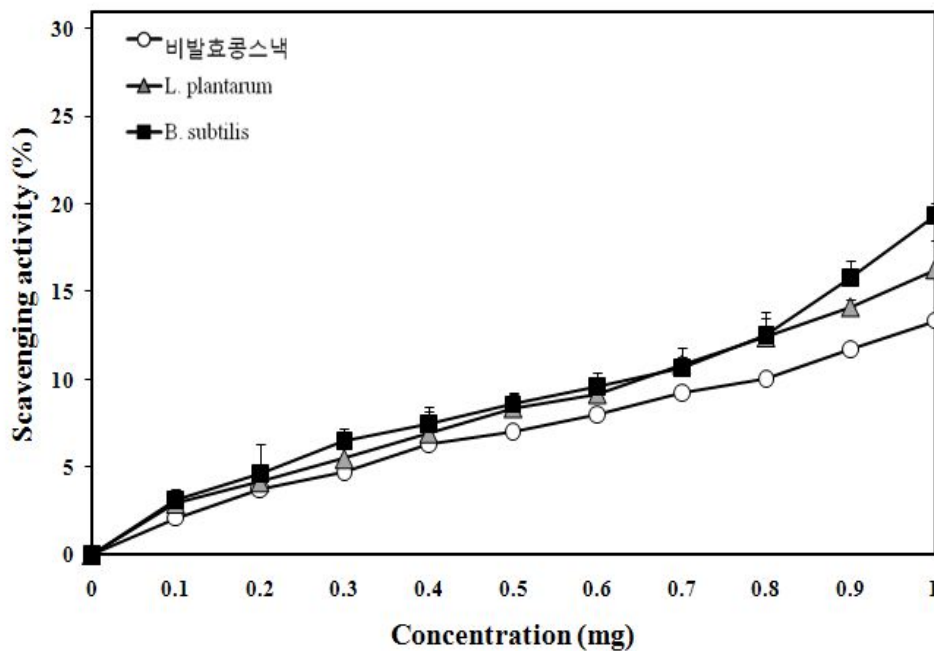


그림 32. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 DPPH 라디칼 소거능



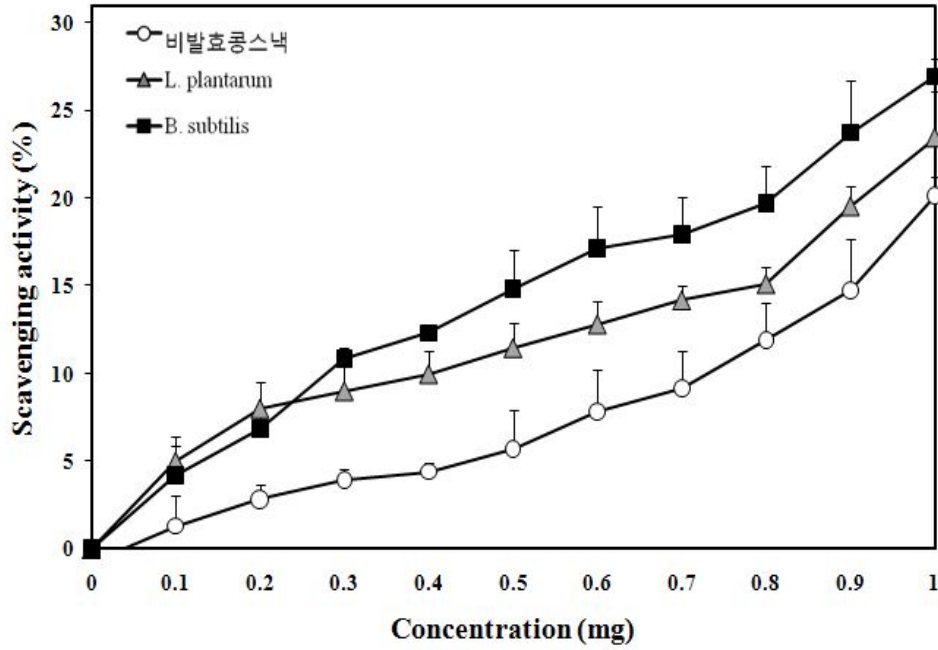


그림 33. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 SOD 유사활성능

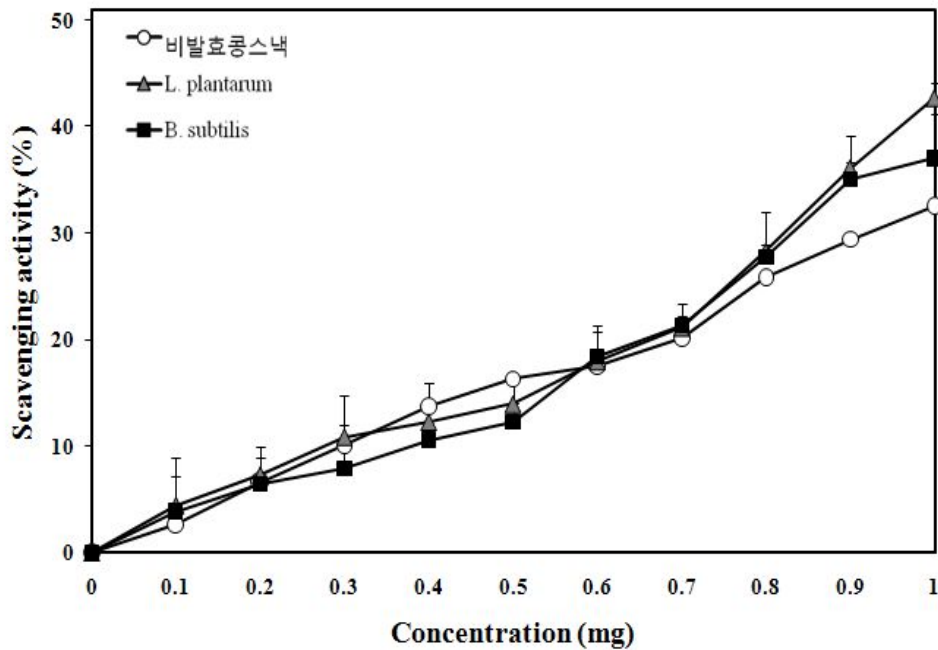


그림 34. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 하이드록실 라디칼 소거능

사. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 품질평가

*L. plantarum* 및 *B. subtilis*을 통한 발효 당침지 콩스낵과 비발효 콩스낵을 각각 제조한 후 특별한 살균과정 없이 70일간 각각 4°C와 37°C에서 보관하면서 일정간격으로 시료를 채취하여 pH 및 일반세균수의 변화를 측정하였다.

저장기간 동안 pH의 변화를 나타낸 결과는 그림35와 같다. 각각의 콩스넥의 제조 후 pH 수준은 비발효 콩스넥의 pH 9.2 수준과 비교하여 *B. subtilis* 발효 콩스넥에서 pH 8.9와 *L. plantarum* 발효 콩스넥에서 pH 7.9 수준으로 특히 유산균 발효를 통한 발효 콩스넥의 pH가 더 낮은 결과를 보였다. 발효 콩스넥의 제조공정의 초기단계에서 검은콩과 각각의 균주를 사용하여 발효 과정을 거친 후 제조되었기 때문인 것으로 보인다. 저장기간 동안 pH는 발효 콩스넥과 비발효 콩스넥 모두 감소하였으며 발효콩스넥보다 비발효 콩스넥의 pH가 더 급격하게 pH가 낮아지는 경향을 보였다. 최종적으로 10주째 pH는 모두 7.06에서 7.24 수준으로 비슷한 pH 수준을 나타냈다. 그러나 각 발효콩스넥 균에서의 pH에 대한 저장온도는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

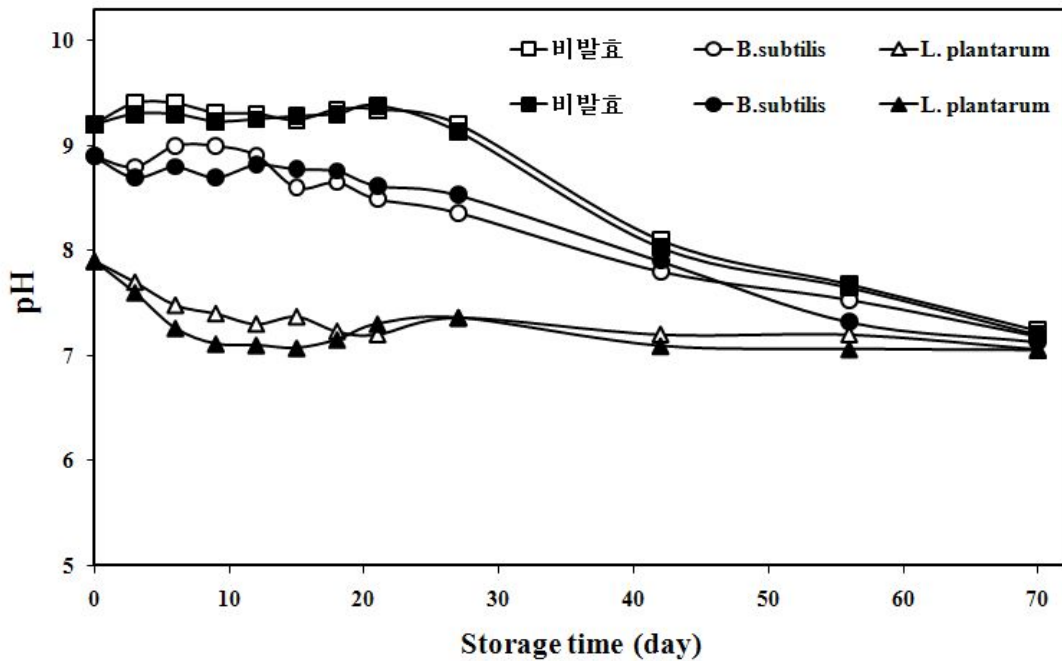


그림35. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 pH 변화: 4°C(white), 37°C(black)

저장기간 동안 일반 세균수의 변화를 나타낸 결과는 그림 36과 같다. 각각의 콩스넥의 제조 직후 세균수는 비발효 콩스넥과 발효 콩스넥에서 시료 g당 0의 수치를 나타내면서, 배양을 통해 분리될 수 있는 세균수의 한계보다 낮은 수치의 세균이 존재하는 것으로 보여진다. 저장 6 일째부터 한달간 세균수의 변화를 보면, 저장온도에 관계없이 세균수는 지속적으로 증가하였고 저장 8주째인 56일에서 모든 샘플의 세균수가  $2.5 \times 10^6$ /g 이상으로 나타나면서 부패가 시작되었다고 보여지며, 저장기간 10주째 모든 샘플에서  $1.2 \times 10^7$ /g 이상의 수치에 도달하였다. 그러나 비발효 콩스넥과 *L. plantarum* 및 *B. subtilis* 발효 콩스넥간의 유의적인 차이는 없었다. 이는 비발효한 당침지 검은콩 스넥과 비교하여 본 연구에서 개발한 발효 당침지 검은콩 스넥의 저장성이 크게 다르지 않음을 나타내는 결과이다. 이와같은 결과는 발효과정이 당침지 검은콩 스넥의 초기 단계에서 이루어지고, 그 뒤 당침, 가열 및 건조 등의 공정의 스트레스적인 환경으로 인한 미생물의 생육이 저하되었기 때문이라고 보여진다.

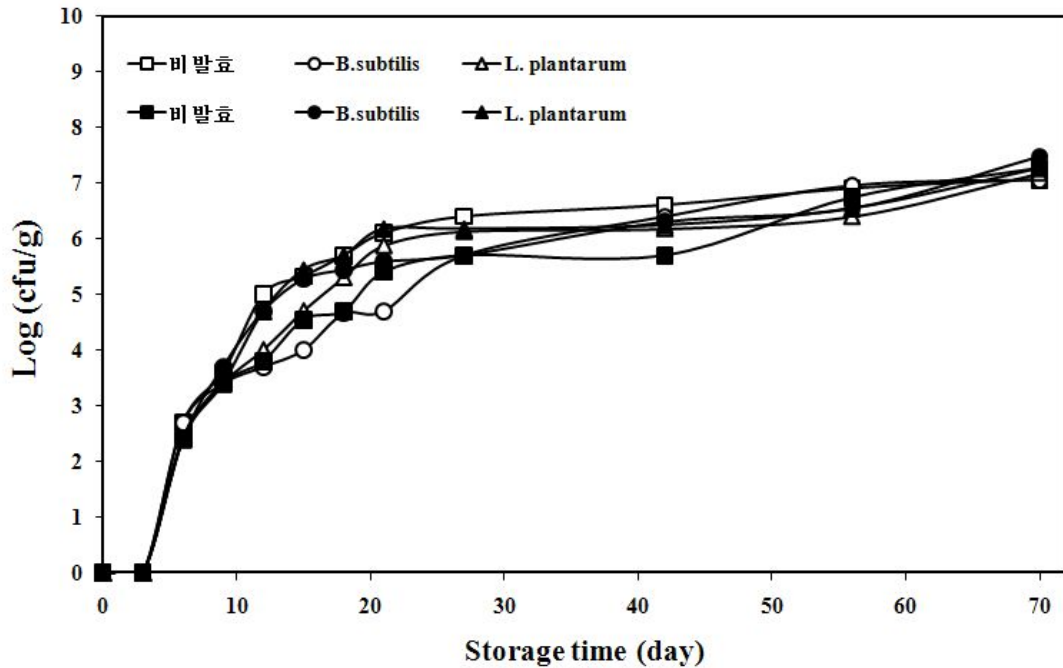


그림 36. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 세균수 변화: 4°C (white), 37°C (black)

#### 아. 일반성분 분석 및 최종 제품의 당 함량

비 발효 당침지 검은콩 편이식 제품과 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 일반성분 분석 및 최종 제품의 당 함량 분석 비교표는 표80과 같다. 수분함량은 *B. subtilis* 을 이용하여 48시간 발효한 당침지 검은콩 제품이 6.73%로 가장 높게 나타났고, 조단백질은 *L. plantarum* 을 이용하여 48시간 발효한 당침지 검은콩 편이식 제품이 25.14%로 가장 높게 나타났다. 이는 비 발효 검은콩 편이식 제품의 조단백질 함량 16.25%보다 높게 나타나 발효 후 단백질의 함량이 증가됨을 알 수 있었다. 조지방 역시 *L. plantarum*을 이용하여 48시간 발효 후 당 침지 한 검은콩 편이식 제품이 50.205로 가장 높게 나왔고, 조회분은 *B. subtilis* 이용하여 24시간 발효, *L. plantarum*을 이용하여 24시간, 48시간 발효 후 만든 당침지 검은콩 편이식 제품이 1.00%로 동일한 결과를 보였으며, 탄수화물 함량의 경우 비 발효 검은콩 편이식 제품이 43.48%로 높았다. 반면에 *L. plantarum*을 이용하여 48시간 발효한 검은콩 편이식 제품은 18.20%로 2배 이상 작은 수치를 나타내어 발효 후 탄수화물의 함량이 줄어드는 결과를 볼 수 있었다. 최종 당 함량은 비 발효 검은콩 편이식 제품이 10.20°brix로 가장 높았고, *L. plantarum*을 이용하여 48시간 발효 후 당침지 한 검은콩 편이식 제품이 8.10°brix로 가장 낮았다. 따라서, 일반성분 분석 결과 발효 과정을 거쳐 제조한 발효 당침지 검은콩 편이식 제품이 비 발효 검은콩 편이식 제품에 비해 높은 조단백질의 함량, 낮은 탄수화물의 함량, 낮은 최종 당 함량을 나타냄을 알 수 있었다.

표80 발효 콩 제품의 일반성분 분석

항목	비발효	발효 당침지 시제품			
		<i>B. subtilis</i> 24h	<i>B. subtilis</i> 48h	<i>L. plantarum</i> 24h	<i>L. plantarum</i> 24h
수분(%)	5.50±0.39	4.43±0.02	6.73±0.15 *	4.45±0.07	5.36±0.27
조단백질(%)	16.25±0.07	18.81±0.98	20.15±2.08	19.69±4.81	25.14±0.01 *
조지방(%)	34.26±3.95	40.10±4.20	39.22±0.42	37.70±8.11	50.20±0.97 *
회분(%)	0.50±0.71	1.00±0.00 *	0.50±0.71	1.00±0.00 *	1.00±0.00 *
탄수화물(%)	43.48±0.01 *	35.66±0.01	33.41±0.01	37.16±0.01	18.20±0.14
최종당함량(°brix)	10.20±0.10	9.20±0.10	9.25±0.49	9.00±0.87	8.10±0.40 *

자. 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 최종 제조 공정

발효 당침지 검은콩 제품의 최종 제조 공정도는 그림 37과 같다.

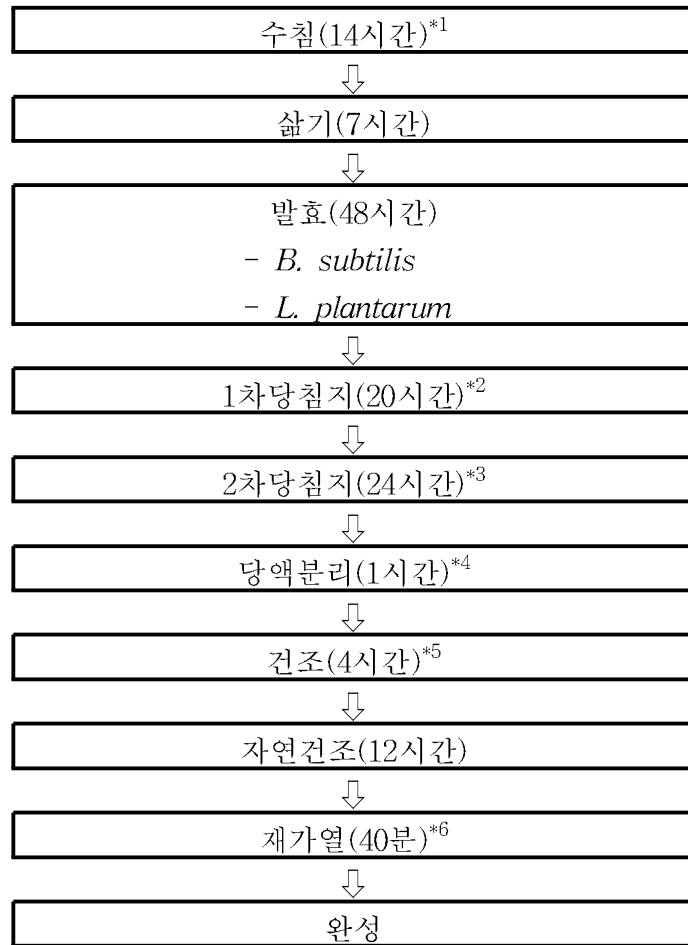


그림 37. 발효 당침지 검은콩 제품의 제조 공정도

\*1: 콩 125g/L(수도물), 설탕 1.5% (w/v),

소금 1.5% (w/v), 중소 3% (w/v)

\*2: 60℃ 건조기에서 20시간 건조

\*3: 60℃ 건조기에서 24시간 건조

\*4: 1시간 동안 체에 받쳐 당액분리

\*5: 70℃ 건조기에서 4시간 건조

\*6: 70℃에서 재가열

#### 4. 연구결과 고찰 및 결론

당침지 최적조건을 확립하기 위해서 당침지 조건을 달리하여 수분함량과 texture (hardness, chewiness, gumminess)를 측정하고, 관능평가를 실시하였다. 그 결과 모델로 삼았던 (일본제품: 흑태랑)의 수분함량 7.51%와 가장 근사값을 나타낸 것은 1차 당침지 조건과 2차 당침지 조건이 (40°brix/40°brix)인 경우였으며, hardness는 (40°brix/20°brix)일 때, chewiness는 (40°brix/40°brix), gumminess (40°brix/40°brix)일 때 흑태랑과 근사한 수치를 나타내었다. 관능평가 결과 역시 당침지 조건이(40°brix/40°brix)일 때 평균 3.44점으로 가장 높은 점수를 받아 최종 당침지 조건으로 1차 당 침지 농도 40°brix, 2차 당침지농도 40°brix로 결정하였다.

당침지 최적조건을 결정한 후 최종제품에 대한 일반성분과 당함량을 측정하였다. 측정 결과

수분 5.50%, 조단백질 16.25%, 조지방 34.26%, 조회분 0.50%, 탄수화물 43.48%, 최종 제품의 잔존 당함량은 10.20°brix였다.

발효 당침지 검은콩 편이식 제품 제조 조건을 검토한 결과 이전 연구에서 밝혀진 바와 같이 당침지 조건이 높을수록 수분함량이 높았던 결과를 토대로 1차 당침지 조건을 40°brix로 선정하고 2차 당침지 조건을 20°brix, 30°brix, 40°brix, 50°brix로 다르게 하여 수분함량을 측정된 결과 2차 당 침지 조건이 50°brix일 때 가장 높은 수분함량인 6.86%로 나타났다. 이러한 결과는 비 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 수분함량이 5.50%인 결과와 비교하여 발효를 통하여 더욱 부드러운 질감의 당침지 검은콩 편이식 제품을 얻을 수 있음을 시사하고 있다. 또한 발효 시간이 24시간인 경우 보다 48시간인 경우, 사용된 균주의 경우 *Bacillus subtilis*를 이용해서 만든 검은콩 편이식 제품이 *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 검은콩 편이식 제품보다 높은 수분함량을 나타내었다.

최종 완성된 시제품 (발효 균주와 발효 시간을 달리하여 만든 검은콩 제품)의 일반성분 분석 및 최종 당함량을 비교 분석한 결과 *B. subtilis* 을 이용하여 48시간 발효시킨 당침지 검은콩 편이식 제품이 6.73%로 가장 높은 수분함량을 보였으며, 조단백질은 *L. plantarum* 을 이용하여 48시간 발효한 당 침지 검은콩 편이식 제품이 25.14%로 가장 높게 나타났다. 이는 비 발효 검은콩 편이식 제품의 조단백질 함량 16.25%보다 높은 조단백질 함유량이었으며, 비교제품으로 사용한 일본제품인 흑태랑의 조단백질 함량 23% 보다도 높은 수치를 나타내 발효 후 조단백질의 함량이 향상됨을 알 수 있었다. 조지방 역시 *L. plantarum*을 이용하여 48시간 발효 후 당 침지 한 검은콩 편이식 제품이 50.20%로 가장 높게 나왔고, 조회분은 *B. subtilis* 이용하여 24시간 발효, *L. plantarum* 을 이용하여 24시간, 48시간 발효 후 만든 당침지 검은콩 편이식 제품이 1.00%로 같은 수치를 나타내었으며 탄수화물 함량은 비 발효 검은콩 편이식 제품이 43.48%로 높게 나타났다. 반면에 *L. plantarum*을 이용하여 48시간 발효한 검은콩 제품은 18.20%로 2배 이상 작은 수치를 나타내어 발효 후 탄수화물의 함량이 줄어드는 효과를 볼 수 있었다. 최종 당 함량은 비 발효 검은콩 제품이 10.20°brix로 가장 높게 나타났고 *L. plantarum* 을 이용하여 48시간 발효 후 당침지 한 검은콩 편이식 제품이 8.10 °brix로 가장 낮았다.

검은콩의 기능성을 향상시키기 위하여 당침지 공정에 발효의 과정을 도입함으로써 새로운 발효 당침지 검은콩 편이식 시제품 개발을 성공적으로 달성하였다. 즉, 본 연구에서는 영양학적으로 우수한 식품인 검정콩을 활용하여 발효의 공정을 접목시켜 건강 기능성 식품을 개발하고자 발효 미생물 *Lactobacillus plantarum*균 과 *Bacillus subtilis*균을 이용하여 콩을 고상발효 후 당침지 시켜 편의식 형태인 스낵형태로 제조하여, 간식이나 보조식으로 이용할 수 있는 발효 검정콩 기능성 식품을 개발하였다. 발효 당침지 검은콩 편이식 시제품의 영양학적 우수성을 입증하기 위하여 발효하지 않은 일반 당침지 검은콩 편이식 제품과 비교하여 일반성분 변화 뿐만 아니라 기능성성분인 GABA, 이소플라본, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량의 변화와 항산화 활성능을 분석함으로써 그 기능성을 입증하였다. 최종적으로 발효 당침지 검은콩 편이식 시제품의 저장성을 검토함으로써 영양적으로 우수한 새로운 발효 당침지 검은콩 편이식 시제품의 개발 가능성을 성공적으로 확인하였다.

일반성분을 분석한 결과 발효 후 비 발효 검은콩 편이식 제품에 비해 높은 조단백질의 함량, 낮은 탄수화물의 함량, 낮은 최종 당함량을 나타냈다. 이러한 결과는 콩을 발효시킴으로서 영양적으로도 우수한 당침지 검은콩 편이식 제품의 제조가 가능함을 시사하며 향후 발효의 생리학적인 효과를 과학적으로 검증할 통해 뛰어난 기능성 발효 당침지 검은콩 편이식 제품의 제조가 기대되어진다.

#### 4절 분리균주의 산업적 적용

된장은 청국장, 간장, 등과 함께 대표적인 콩 발효식품으로서 콩을 주원료로 하여 발효·숙성과정 중 생성되는 각종 펩타이드, 아미노산, 유리당 등에 의해 구수한 맛과 향을 가지는 식품이다(Kwak et al., 2003). 특히 된장은 곡류 위주의 식생활에서 부족 되기 쉬운 필수아미노산 및 지방산, 유기산, 미네랄, 비타민류 등의 영양소를 보충해 줌으로써 영양학적으로도 중요한 기능을 가진다. 또한 된장은 각종 생리활성, 즉 콜레스테롤 및 혈압강하, 항돌연변이 및 항암작용, 혈전용해능 항산화작용 등의 효과가 우수함이 입증되어 된장에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 된장은 제조 방식에 따라 재래식 된장과 개량식 된장으로 대별되며, 재래식 된장은 개량식 된장 보다 제조기간이 오래 걸리고 자연발효 방식을 취하므로 잡균의 혼입과 같은 문제점을 지닌다. 특히 최근 장류에 있어 식중독균인 바실러스 세레우스가 문제가 되고 있다. 따라서 본 연구에서는 전통장류로부터 분리한 균을 이용하여 순창메주공장에서부터 제조한 메주를 5개 기업체에 공급하여 된장을 제조 하도록하였다. 된장 최종제품의 이화학분석 결과 평균 수분 56.6 8%, pH 5.80, 식염 14.35 %를 나타내었으며, 바실러스 세레우스는 4개 업체에서는 검출되지 않고, 1개 업체에서만 검출(650 cfu/g)되었으나(표 94) 규격기준인  $10^4$  cfu/g이하였다.

표 94. 산업적 적용 테스트 된장의 분석 결과

업체명	수분(%)	pH	염도(%)	<i>B.cereuse</i> (Log <sub>10</sub> CFU/g)
순창전통민속고추장(영)	55.98	5.9	17.00	-
김용순전통식품(영)	62.71	6.01	10.05	-
내고향순창전통식품	57.17	5.75	15.90	-
궁중음식본가	55.64	5.44	13.30	-
태광전통식품	51.90	5.88	15.50	1.81
평균	56.68	5.80	14.35	0.36

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 세부과제에서는 전통장류의 안전성을 확보하기 위하여 장류제조업체에 맞는 제조 공정별 HACCP 매뉴얼을 개발하여 보급하고자 하였다. 고추장, 된장, 청국장 등의 원료 및 공정별 위해요소 분석, CCP를 도출하기 위하여 참여기업의 공정 중 샘플링을 진행하였으며, 3개 품목의 CCP 관리계획을 설정하였다. 고추장의 생산 공정 중 CCP는 살균공정(B)과 금속검출공정(P)에서 나타났다. 일반모델 HACCP Plan은 살균공정에서는 관리기준을 살균온도 85~100 ℃, 살균 시간 30~35 분으로 설정하여 작업자가 작업 시 매 배치마다 준수하도록 하였다. 금속검출 공정에 대하여는 작업 시작 전, 작업 종료 후, 작업 중 매 30분마다 금속검출기의 감도를 점검하도록 하였다. 된장 제조 공정 중의 CCP는 석발, 세척공정(P)과 혼합 및 주정살균(B), 금속검출공정(P)에서 나타났다. 일반모델 HACCP Plane은 석발, 세척공정에서는 관리기준을 세척 속도 6 RPM으로 설정하여 작업자가 작업 시작 전, 작업 중 1회, 작업종료 후 모니터링하도록 하였다. 혼합 및 주정살균공정은 3% 주정으로 살균하도록 하였고, 금속검출 공정에 대하여는 작업 시작 전, 작업 종료 후, 작업 중 매 30 분마다 금속검출기의 감도를 점검하도록 하였다. 청국장 제조 공정 중의 CCP는 석발, 세척공정(P)과 발효공정(B) 금속검출공정(P)에서 나타났다. 일반모델 HACCP Plane은 석발, 세척공정에서는 관리기준을 세척 속도 6RPM으로 설정하여 작업자가 작업 시작 전, 작업 중 1회, 작업종료 후 모니터링하도록 하였다. 발효공정은 발효시간을 44 시간으로 설정하였으며, 금속검출 공정에 대하여는 작업 시작 전, 작업 종료 후, 작업 중 매 30 분마다 금속검출기의 감도를 점검하도록 하였다. 원래 계획된 목표의 HACCP 인증은 1건(순창장본가전통식품)으로 미진하였으나 현재 참여기업 3개 업체가 HACCP 인증관련 컨설팅을 진행 중에 있다. 또한 세부과제에서 도출된 CCP를 활용하여 기업체의 작업환경 개선 및 매뉴얼에 따른 관리를 통해 이물 관련 클레임 및 대장균 발생 검출 빈도를 현저히 줄이는 성과를 얻었다.

새로운 기능성 장류소스 신제품 개발을 위해 추진한 결과, 사업성이 있는 5건의 장류소스 제품을 개발하였다. 기능성물질 첨가 장류소스 제품은 기능성이 뛰어난 산야초를 선정하여 항산화 활성 분석 및 일반성분 분석을 하였고, 선발된 산야초의 발효조건 확립 및 미생물을 접종하여 발효액을 제조하였다. 이 중 관능평가를 실시한 결과 점수가 높은 미나리, 쑥, 솔, 민들레 발효액과 접목한 다양한 장류소스를 개발하였다. 이는 장류소스를 전반으로 하는 업체와 접목하여 기술이전을 시도할 것이며, 장류제조업체의 새로운 수익을 창출 할 수 있을 것으로 사료되며, 향후 외국인들이 기호에 맞는 수출용 소스제품으로 활용하는 것이 가능할 것으로 본다.

수출제품 생산은 편의식 시제품이 가능하고 일본식 콩제품에 대응할 수 있는 발효 당칩지 검정콩 스낵을 개발하였다. 발효 당칩지 검정콩은 간식이나 보조식으로 이용할 수 있는 간편한 제품일 뿐만 아니라 검정콩이 가지고 있는 영양학적 우수성을 발효를 통하여 더 높은 활성을 가지는 제품으로 개발되어졌으며 특허출원과 SCI 논문발표를 통해 차별성을 부여하였다. 이 제품은 순창군에 위치하는 장류 제조업체에 기술이전 하여 제품화 되었으며, 또한 장류제조업체의 다양한 용도 개발, 블루오션 시장 창출 등 매출증진에 이바지 할 것으로 보인다.

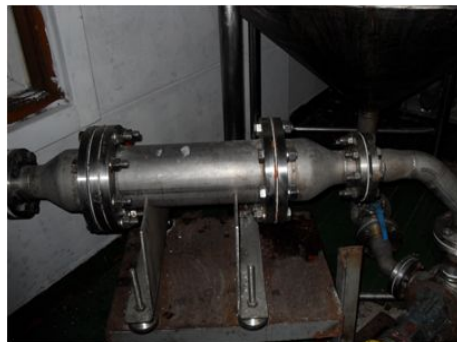
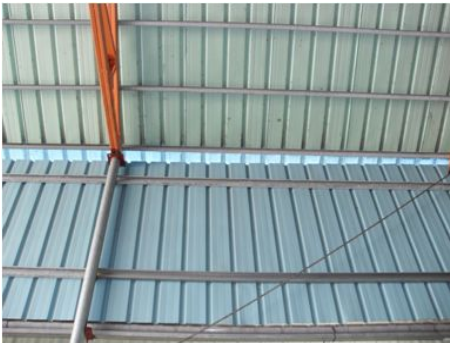


## 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절 연구개발 성과

1. 장류(고추장, 청국장, 된장)에 대한 HACCP Plan 개발을 위한 연구

가. 고추장, 청국장, 된장 메뉴얼 보급에 따른 공정 환경 개선 및 작업환경관리



- (1) 물리적 위해요인 발생건수 : 연질이물 클레임 7건 → 0  
 곤충 및 벌레 이물 287 → 8
- (2) 생물학적 위해요인 : 대장균 불검출
- 나. HACCP 지정 1개 업체(순창장본가전통식품), 추진 중(농업회사법인 순창장류)
- 다. 학술발표(포스터)
- 신미진(2010) 순창민속마을에서 생산되는 전통간장의 품질특성 조사. 한국식품영양과학회 정기학술대회
  - 신미진(2010) 순창민속마을에서 생산되는 전통고추장의 품질특성 조사. 한국식품영양과학회 정기학술대회
  - 조승화(2011) 전통 청국장의 위해요소분석 및 중요관리점 결정. 한국식품과학회 정기학술대회
2. 기능성 물질 첨가 장류제품 개발
- 가. 지적재산권 : 특허 출원 1건
- 단백질 분해효소 활성을 갖는 산야초 발효액 및 이의 제조방법 2009-0097482
3. 수출전략 제품 개발(발효 당침지 검은콩 편의식 제품 개발)
- 가. 지적재산권 : 특허 출원 1건
- 발효 당침지 검정콩 스낵의 제조방법 2010-0037665
- 나. 논문
- Preparation of fermented sugar-soaked black soybean snacks(FSBSS) and characterization of their quality changes
- 다. 기술이전 : 1건(해복전통식품)
4. 우수균주를 활용한 위생메주 제조
- 균주관리를 통한 위생메주 제조
  - 생산량 : 130톤/년
  - 매출액 : 10억 달성

## 2절 성과활용 계획

1. 실용화 산업화 계획
  - 장류소스 제조업체에 기술이전을 통한 상품화 실시(산야초발효액 장류소스)
  - 장류업체의 공정개선을 위한 지침 매뉴얼로 활용
2. 교육, 지도, 홍보 등 기술확산 계획
  - 참여기업의 HACCP 인증 확대에 기여
  - 장류제조업체 위생교육 및 HACCP 교육 확대 실시
  - 우수분리 균주 관련 학술대회 홍보
3. 특허, 논문, 품종 등 지식재산권 확보계획 등
  - 논문 3편(비SCI) : 장류의 CCP 설정 및 HACCP 관리 매뉴얼 관련
4. 소비자에게 좀 더 가까운 장류소스 및 맞춤형 제품 개발 및 기술이전을 통한 장류매출 신장에 기여
5. 장류 소비 확대 및 수출증대에 기여
6. 새로운 개념의 제품 출시로 신형 소비 시장 개척 활용
7. 국내 전통장류산업 발전을 위한 기업체 교육자료로 활용

## 제6장 참고문헌

1. 권오복. 2005. 한류를 이용한 전통식품 수출확대 방안. 농수산물무역정보 200호 679-690.
2. 노형준. 2003. 한국과 일본된장의 특허 동향. 식품세계 제4권 12호.
3. 농림부. 2002. 전통 장류의 마케팅 시스템 구축 및 수출확대방안 연구.
4. 농수산물유통공사. 2005. 주요 농산물 소비패턴 조사분석(양념류, 엽근채류).
5. 농수산물유통공사. 2006. 주요농산물유통실태(2005).
6. 농수산물유통공사. 2005. 중국시장 고추장·된장. 농수산물무역정보 196호 13-27.
7. 농산물품질관리원. 2004. 농산물 전처리에 적용될 수 있는 HACCP Manual 개발.
8. 농촌진흥청. 2004. 농산물 가공 이용 및 안전성 향상 연구동향 분석.
9. 식품경제신문. 2006.01.22 美된장·간장·고추장·청국장 시장동향.
10. 식품음료신문 2006. 5. 15
11. 식품의약품안전청. 2003. 곡류가공품(생식)의 HACCP 적용을 위한 일반모델 개발.
12. 식품의약품안전청. 2005. 고춧가루제조·가공업소 HACCP 적용 일반모델 개발.
13. 식품의약품안전청. 2004a. 어묵류 등 6개 HACCP 의무적용품목의 위해관리지침서 개발(구축편).
14. 식품의약품안전청. 2004b. 어묵류 등 6개 HACCP 의무적용품목의 위해관리지침서 개발(자료편).
15. 식품의약품안전청. 2005. 위해미생물전문위원회 회의 자료.
16. A.O.A.C Official methods of analysis. 15th ed. Association of official analytical chemists. Washington, D.C., Cd 8-35, 1990.
17. Coward L, Barnes NC, Kenneth DR, Setchell DR, Barnes S. Genistein, Daidzein, and their  $\beta$ - glycoside conjugates: antitumor isoflavonose in soybean foods from Amer. Asi. diet. J. Agric. Food Chem. 41:1961-1967, 1993.

18. Yi ES, Kim HD, Chae JC and Kim YH. Variation of Isoflavone and Saponin During Maturity in Black Soybean. *Kor. J. Crop Sci.* 53(1):34-41, 2008.
19. Lee HY and Cha YJ. Isoflavone Content in Sauce made with Whole Grain Soybean Meju during fermentation. *Kor. J. Food & Nutr.* 19(4):460-465, 2006.
20. Lee JS, Oh MS. Quality Characteristics of Cookies With Black Rice Flour. *Kor. J. Food Cookery Sci.* 22(2):193-203, 2006.
21. Kim JS and Yoon S. Isoflavone Contents and  $\beta$ -glycosid Activities of Soybeans, Meju, and Doenjang. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 31(6):1405-1409, 1999.
22. Kim KS, Park KH, Baik MY, Kang KJ and Park CS. Rapid Quantitative Analysis of Isoflavones using TLC. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36(4):558-562, 2004.
23. Naim M, Gestetner B, Bondi A, Birk Y. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *J Agric. Food Chem.* 24:1174-1177, 1976.
24. Naim M, Gestetner B, Kirson I, Berk Y, Bondi A. A new isoflavone from soya beans. *Phytochem.* 12:169-170, 1973.
25. Pratt DE, Birac PM. Sources of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J Food Sci* 44:1720-1722, 1979.
26. Que-King Wei, Tong-Rong Chen, Jyun-Ting Chen. Using OF Lactobacillus and Bifidobacterium to produce the isoflavone aglycones in fermented soymilk. *Int. Jour.of Food Mic.* 177:120-124, 2007.
27. Brouns F, Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. *Food Research International* 35:187-193, 2002.
28. Yang SO, Chang PS, Baek BK, Hong SD and Lee JH. Changes of Isoflavone Distribution in Soybeans Using Almond Powder. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 39(3):231-236, 2007.
29. Pham TT, Shah NP. Effects of Lactulose Supplementation on the Growth of Bifidobacteria and Biotransformation of Isoflavone Glycosides to Isoflavone Aglycones in Soymilk. *J. Agric. Food Chem.* 56(12):4703-4709, 2008.
30. Kim YH, Kim SD, Hong EH, and Ahn W.S. Physiological function of isoflavones and

their genetic and environmental variation in soybean. *Kor. J. Crop. Sci.* 41:25-45, 1996.

31. Lee SY, Bae YJ, Lee SY, Choi MK, Choe SH, Sung CJ. The effect of soy isoflavone on sex hormone status and premenstrual syndrome in female college students. *Kor. J Nutr* 38:203-210, 2005.

32. Lin, RIS. Phytochemicals and antioxidants. In *Functional Foods*, Chapman & Hall, New York, USA, 1994.

33. Shon M, Seo KI, Park SK, Cho YS, and Sung NI. Some Biological Activities and Isoflavone Content of Chungkugjang Prepared With Black Beans and Bacillus Strains. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 30(4):662-667, 2001.

34. Thuy TP, Nagendra PS. Skim milk powder supplementation affects lactose utilization, microbial survival and biotransformation of isoflavon glycosides to isoflavone aglucones in soymilk by *Lactobacillus*. *Food Mic.* 25:653-661, 2008.

35. Troll W, Lim JS and Frekel K. Prevention of cancer by agents that suppress production of oxidants, In *Food Phytochemicals for cancer Prevention*, Ho, C.T., Osawa, T., Huang, M.T. and Rosen, R.T.(eds), ACS symp. Series 547, Amer. Chem. Soc. Wash. USA, 1994.

36. Rhee CO, Kim DY, Jung JH, Kim K, Park KH and Chung HJ. Effect of Cooking Conditions on the Texture of Cooked Soybeans. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 32(3): 216-221, 1989.

## 제1협동 : 우수발효미생물 대사체 및 전통발효식품의 기능성 연구

협동연구기관명 : 한국식품연구원

협동연구책임자 : 김 현 진



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발의 목적

발효과정 중 대사체들의 변화를 연구하여 우리나라 발효식품관련 발효 대사체 정보를 축적함으로써 발효식품의 제조 표준화의 기반을 마련하고자 하며 우리나라 발효식품의 기능성을 확인함으로써 우리나라 전통발효식품이 세계적 식품으로 발전할 수 있는 기반을 마련하고자 함.

## 2절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 배경

우리나라는 세계적인 기능성 식품시장에 내세울 만한 김치, 된장, 고추장, 청국장 등 전통식품이 있음에도 불구하고 연구와 홍보부족으로 인하여 김치를 제외한 타 발효식품들은 세계 시장에 진출을 못하고 있는 실정임.

발효식품의 세계 시장의 진출을 위해서는 발효식품의 표준화가 반드시 필요한데 현재 발효식품들은 표준화가 되어있지 않으며 시중에서 판매되고 있는 전통발효식품들도 전통의 맛과 다소 거리감이 있으며 일본의 자료를 많이 참조하여 제조하고 있는 실정임.

많은 문헌에 천연물이나 식품 소재가 인체건강유지 및 질병예방, 질환치료에 효과가 있다는 많은 자료가 있으며 최근에는 전통식품을 포함한 여러 가지 식품에서도 여러 가지 기능성이 있다는 결과가 많이 발표됨

대부분의 연구결과는 동물시험 결과 아니면 고문헌의 결과에 많이 의존하고 있음. 동물시험의 경우 과학적인 뒷받침이 없이 효과가 있었다, 좋았다, 등의 결과로 어떤 물질이 어떻게 작용하여 어디에 구체적으로 좋았다는 과학적인 결과는 부족함.

### 2. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

#### 가. 기술적 측면

자연환경에서 전통적인 방법으로 제조된 전통발효식품의 품질을 균일화하고 건강기능성에 대한 올바른 과학적 정보를 얻기 위해서는 표준화된 제조 방법을 통한 제품의 생산이 필요함. 대사체 분석 기술을 이용하여 발효과정 중 발효산물의 변화를 연구함으로써 발효대사 경로를 도출하고 발효대사체 data를 축적하여 발효식품의 제조 표준화의 기반을 마련하고자 함.

우수 미생물에 의한 제조된 발효식품과 전통발효식품의 차이를 발효대사체 관점에서 비교 분석할 수 있는 기술을 확립함.

#### 나. 경제·산업적 측면

우리나라에는 세계적 바이오식품으로 성장할 수 있는 전통발효식품이 있음에도 불구하고 과학적 자료의 뒷받침이 안 되어 세계시장으로 진출해 나가는데 한계가 있음.

따라서 전통발효식품의 건강 기능성에 대한 과학적 접근성을 부여하고 제품을 표준화 시킨다면 그 경제적 가치는 막대함.

기능성 식품 시장이 세계적으로 연 평균 8-11%의 시장 성장률을 나타내고 있으며 2010년에는 약 5,000억불 정도의 시장을 형성할 것으로 예측되며 국내 기능성 식품 시장도 2000년도



이후 매년 20-30% 성장을 이루고 있으며 향후 2010년에는 세계시장의 10%에 육박할 것으로 추정되며 다양한 가능성을 갖고 있는 우리나라 발효식품이 세계 건강 기능성 식품시장에 진출할 과학적 data가 필요함.

우리 발효식품의 경우 발효과정에 따라 물리적/생리적 성질이 변화하는 것으로 알려져 있으나, 발효에 따른 생리기능성 변화에 대한 연구 또는 발효 식품으로 분리된 바이오 소재에서의 생리적 기능성에 관한연구 과학적 data는 극히 부족한 실정임.

#### 다. 사회·문화적 측면

예전부터 전통발효식품은 많은 사람들에게 사랑받고 있으나 최근 들어 전통의 맛은 사라지고 일본식 제품을 모방한 제품들이 쏟아지면서 우리 고유의 발효식품의 맛과 기능이 많이 퇴색되고 있음. 이는 표준화에 많은 노력을 기울린 일본과는 달리 우리나라는 전통발효식품에 대한 과학적인 연구가 미미하며 특히 표준화 연구는 거의 안 되어 있기 때문임.

과학적 연구가 뒷받침 되지 않는다면 발효식품의 잠재적인 시장이 사장되어 버릴 것으로 사료됨.

최근에 전통발효식품의 건강 기능성에 대해 보고되면서 관심이 높아지기는 했지만 구체적인 기능성 효능평가 등 소비자의 신뢰를 쌓기 위한 다각적인 연구를 진행시킴으로 인하여 다양한 건강 기능성을 함유한 전통발효식품을 보호하고 바이오식품 개발에 필요한 원천기술이 확보될 수 있을 것으로 사료됨.

### 3절 연구개발의 범위

본 과제에서는 우리나라 전통발효식품인 메주와 청국장을 선발된 우수균주로 표준제조하고 제조된 시료들과 고추장의 발효과정을 대사체 분석 기술을 이용하여 발효대사체를 연구하였으며 이들 시료들의 건강 기능성을 확인함으로써 전통발효식품의 표준화를 이룩할 수 있는 기반을 다지며 이를 통해 우리나라 전통발효식품이 세계적 식품으로 발전할 수 있도록 하고자 본 연구를 수행함.

우수 미생물에 의한 발효 대사물질 및 대사체 연구

전통발효 식품의 기능성 연구 및 신규 개발된 표준제조 발효식품의 기능성 연구

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내 현황

우리나라의 전통발효식품은 영양학적인 가치와 더불어 질병을 예방하고 건강을 증진시키는 효과를 오랫동안 경험을 통해 인식하고 있었으나 이를 뒷받침할 수 있는 연구 결과가 부족한 상태임

지금까지의 전통 발효식품의 연구는 주로 원료, 성분, 제조공정, 관여미생물, 발효·숙성 중 성분 동태, 저장 발효·숙성에 미치는 영향인자 등을 주로 다루어 왔으며 대두원료와 첨가물 또는 숙성 온도, 대두 가열조절 등을 달리한 발효식품의 성분 및 효소활성의 변화에 관한 연구는 극히 제한적일 이루어져 왔음.

균주를 달리하여 제조한 발효식품의 제조, 저장 중 성분 및 효소 활성의 변화에 관한 연구, 청국장 제조 또는 발효과정중의 phytic acid 함량 변화, 질소화합물 및 아미노산의 동태 조사 등은 체계적으로 연구가 이루어지지 못하고 있음.

전통발효식품의 원료가 되는 콩 및 콩 발효산물의 건강기능성을 나타낸다는 연구 결과가 보고되고 있으며 그 대표적인 활성성분에는 isoflavonoid 및 isoflavonoid의 발효 대사체, 그리고 발효 펩타이드 성분이 있음

고추장에는 주로 원료에 함유되어 있는 capsaicinoid 와 carotenoid, 그리고 비타민류에 의한 항산화, 암 예방, 항비만, 항염증 활성 등의 건강기능성을 나타내고 있으나 발효과정을 통해 활성성분과 발효가 진행됨에 따라 생성하는 발효대사체의 profile이 변화하지만 이에 관한 연구는 체계적으로 진행된 적이 없음

된장의 특징적 flavors, off-flavors 및 색소를 생산하는 미생물을 조사한 결과 한국 재래식 된장의 독특한 맛과 향을 생산하는 균은 *B.subtilis*이었으며 *A.oryzae*로 만든 개량식 메주에는 많은 *Bacillus*속 세균이 포함되어 있음.

된장에 대한 연구로는 항암효과, 항산화효과, 콜레스테롤 저하효과, 혈전용해능, 고혈압 저하효과, 면역조절기능 등과 같은 기능성에 관한 연구 (박진희 등 2005; Jung et al, 2006) 결과가 활발하게 발표되고 있음.

고추장은 우리나라 고유의 조미 식품으로서 예로부터 각 가정에서 애용되고 있으나 이에 대한 연구는 재래식보다는 일본식 코오지를 이용한 개량식 담금 방법 위주로 진행되어 개량 메주의 품질 특성과 고추장 제조시 메주의 영향, 전분질 원료를 달리한 고추장 숙성중의 성분 특성, 숙성 과정중의 성분 변화와 그 맛 성분, 표준화에 관한 연구 등이 이루어졌음. 고추장 발효 미생물에 관하여는 고추장 중의 성분 변화와 그 맛 성분, 표준화에 관한 연구 등이 이루어졌음. 또한 고추장의 항비만 효과에 대한 연구가 진행됨 (Koo et al, 2008)

고추장 발효 미생물에 관여하는 고추장 중의 세균수에 대한 보고이외에 숙성중의 미생물의 변화, 숙성중 효모 첨가 효과 등에 대한 보고가 있으나 개량식 고추장의 경우 *A. oryzae*가 분비하는 amylase와 protease를 이용하기 때문에 전토적인 재래의 메주 중에 번식한 각종 세균과 곰팡이류가 어우러져 작용하는 숙성 과정과 는 제품의 맛이나 향기에서 차이가 남.

청국장, 된장, 간장 등 발효대사체에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있음 (Park et al, 2010; Namgung et al, 2010 등).

## 2절 국외 현황

일본은 좋은 나토 제품 생산을 위해 하마나토에서 분리한 *Bacillus natto* 균 이용 청국장 제조, 발효 및 그 과정 중의 품질특성 변화 조사, 부재료를 이용한 영양성분 보강 및 품질 개선을 위한 연구가 수행되어 왔음 (Schallmey et al, 2004; Sulisyo et al, 1998).

발효과정이 soy-dawadawa에 미치는 영향 (Dakwa et al, 2005), 발효과정에 생성되는 펩타이드들의 생리활성에 관한 연구 (Bernard et al, 2004) 등이 진행되었음.

와인을 비롯한 발효식품의 대사체 연구가 꾸준히 진행되고 있음.

## 3절 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

선발된 우수균주를 이용하여 제조한 표준제조 발효식품들과 전통발효식품들의 발효대사과정의 차이를 대사체적 기법을 이용하여 확인함으로써 전통발효식품과 맛이 유사하면서 우수한 품질을 갖는 발효식품을 생산할 수 있는 발효식품의 quality control 분야에 적용될 수 있을 것으로 사료됨.

발효식품에 대한 발효대사체 및 기능성 연구에 대한 기반기술을 확보함으로써 발효 대사체 및 국내 기능성 식품 개발의 인프라구축에 기여하며 발효식품산업의 새로운 패러다임을 제공해 줄 수 있을 것으로 사료됨

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절 연구개발 목표

발효과정 중 대사체들의 변화를 연구하여 우리나라 발효식품관련 발효대사체 정보를 축적함으로써 발효식품의 제조 표준화의 기반을 마련하고자 하며 우리나라 발효식품의 기능성을 확인함으로써 우리나라 전통발효식품이 세계적 식품으로 발전할 수 있는 기반을 마련하고자 함.

### 2절 연구 수행 방법

#### 1. 전통 메주 및 표준제조 메주의 제조

##### 가. 전통 메주 제조

수세한 메주콩을 상온에서 12시간 침지 후 상압에서 4시간 정도 삶은 후 8×12×20 cm의 크기로 성형하여 방에서 벗짚을 깔고 일주일간 걸말림을 한 후 벗짚으로 메주를 묶어 2개월 동안 처마 밑에 매달아 자연 발효시켰다. 시료는 0일, 10일, 20일, 40일, 60일 채취하여 발효대사체 연구팀과 기능성연구팀에게 전달하였다.

##### 나. 표준제조메주 제조방법

본 과제에서 사용된 표준제조메주는 순창장류연구소에서 제조하였다. 수세한 메주콩을 상온에서 12시간 침지 후 120℃, 상압에서 30분간 증자하고 냉각한 후 *B. subtilis* UM0026 (순창군 자체 분리균주) 접종 후 9×9×15 cm 크기의 벽돌형으로 성형하여 60℃ 건조기에 24시간 걸말림을 한 후 *A. oryzae*를 접종하여 메주발효실(온도 30℃, 통풍)에서 발효시켰으며 0일, 3일, 5일, 6일에 각각 시료를 채취하여 발효대사체 연구팀과 기능성연구팀에게 전달하였다.

#### 2. 전통 청국장 및 표준제조 청국장의 제조

##### 가. 전통 청국장 (TCK)의 제조방법

메주콩을 수세 후 실온에서 12시간 침지 후 삶는다. 증자한 콩을 플라스틱 상자나 나무상자에 담고 사이사이에 벗짚을 깔고 35-40℃에서 3일 발효시키고, 발효시 습도는 별도로 조절하지 않는다. 72시간동안 발효시켜 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간의 시료를 채취하였다.

##### 나. PGA 생성능이 우수한 *B. licheniformis* (BL) 67를 이용한 청국장 제조

메주콩을 수세 후 실온에서 12시간 침지 후 120℃, 상압의 NK증자기에서 2시간 증자 냉각

후 *Bacillus licheniformis* (순창군 자체 분리균주, 균주위탁 준비 중)을 대두 중량의 0.5%(turbidity 0.15 ~ 0.16(Abs.)) 기준으로 접종하여 40℃도, 습도 90%되는 청국장발효실에서 40시간동안 발효시켜 12시간, 24시간, 36시간, 48시간의 시료를 채취하였다.

#### 다. 청국장의 PGA 측정

청국장(TCK, 67CK)의 PGA (poly- $\gamma$ -glutamic acid)생성량은 청국장 50 g에 증류수 150 mL을 가해 혼합하고 낱알이 부서지지 않게 저어 추출 하고 4℃에서 10,000 rpm로 원심분리하여 분리된 상등액을 동결 건조시킨 후 중량을 측정하였다.

### 3. 고추장의 제조

#### 가. 고추장의 제조

고추장은 전통방법으로 순창문육레식품에서 시간별로 (0개월, 1개월, 3개월, 4개월, 5개월) 제조하였다.

#### 나. 고추장 색소 분리 및 정제

고추장 시료 30 g을 ether 100 mL과 acetone 100 mL을 가하여 4℃, 암조건에서 2시간동안 교반한 후 10% NaCl 50 mL을 가하여 1시간 동안 다시 교반하였다. 그 후에 상등액을 감압농축하여 total carotenoids (W.E.)를 추출하였다. 분리한 색소추출물의 정제를 위해 silica gel 60 (Merch)을 사용하여 hexane층(A)과 acetone, ether층으로 분리하였고, acetone, ether층에서 분리되어 나온 추출액에서 capsaicinid를 제거하기 위해서 sep-pak C18 column(Waters)을 이용해 분리하였다. Sep-pak C18은 acetonitrile과 methanol을 흘려보낸 후, acetone, ether에서 나온 추출액 2 mL에 acetonitrile 8mL을 가하여 loading한다. 그 후에 acetonitrile 4 mL과 1% acetic acid를 넣은 acetonitrile 1 mL을 elution(B)하고, 다시 acetone 5 mL으로 elution(C)한다. 분리된 색소추출물과 나머지 분액물 (A, B, C)는 HPLC (Jasco) 이용하여 profile을 보았다. 분석에 이용한 revers phase Develosil C30 (2.1 \* 100 mm, 3um)을 사용하였으며, 유속은 1 mL/min이었다. solvent A는 acetone : methyl tert-butyl ether(MTBE) : water = 81 : 15 : 4 를 solvent B는 acetone : MTBE = 9 : 91을 사용하였고, 10uL injection하고 detector는 PDA, 450nm에서 분석하였다.

### 4. 메주, 청국장, 고추장의 대사체 분석

청국장과 메주의 발효시간별 대사체 변화와 주요성분의 분리 동정을 위하여 UPLS-Q-TOF를 이용하여 분석하였다. Binary solvent delivery system, auto-sampler, PDA detector가 연결된 UPLC system (Waters)에 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 \* 100 mm, 1.7 um; Waters)을 연결하여 0.1% TFA가 함유된 DW (solvent A)로 equilibration 시켰다. 시료를 5 uL loading한 후 0.35 mL/min의 유속으로 solvent B (0.1% TFA in acetonitrile)를 gradient 방법을 이용하여 분석하였다. Eluent는 PDA detector와 Q-TOF MS를 이용하여 분석하였다. PDA detector는 200 ~ 400 nm에서 scan하였으며 Q-TOF (waters)는 ESI positive mode에서 분석

하였다. Q-TOF 분석 조건은 다음과 같다. Capillary와 sampling cone voltage는 각각 2.78 kV와 26 V이며 desolvation flow는 300°C에서 700 L/h이고 source 온도는 110 °C에서 분석하였다. TOF MS data는 0.2 sec의 scan time과 0.02 sec의 interscan delay time 조건에서  $m/z$  50~1000 범위에서 분석하였다. MS/MS spectra는 10~30 eV의 collision energy ramp에서 분석하였다. precursor와 fragment ions의 정확한 mass값과 composition은 MassLynx (Waters)으로 계산하였으며 성분의 동정은 elemental composition analysis software와 online databases ([www.chemspider](http://www.chemspider), [www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca) 등)을 이용하였다. 분리된 성분 중 peptide는 peptide sequencing software를 이용하였다.

대사체 분석을 위해 분석된 MS data는 SIMCA-P+를 이용한 다변량통계분석 (PLS-DA; partial least square-discriminant analysis)로 분석하였다. Mass intensities는 one-way ANOVA를 이용하여 통계분석하였으며 least significant difference (LSD)를 이용하여 시료들 간의 차이를 확인하였다.

고추장 색소의 대사체 분석은 HPLC에 의해 분리된 색소 data를 엑셀 data로 전환한 후 SIMCA-P+를 이용한 다변량통계분석로 분석하였다.

## 5. 전통발효식품의 기능성 연구

### 가. 항당뇨 연구

C57/BL6 쥐에 정상군 (con), 대조군 (dss), 삶은 콩 5, 10 % (ss5, ss10), 삶은 콩 + 바실러스 균 5, 10 % (ssb5, ssb10), 표준제조 메주 1, 5, 10 % (mj1, mj5, 그리고 mj10), 전통제조 메주 1, 5, 10 % (kmj1, kmj5, 그리고 kmj10)으로 군을 나누어 각각의 사료를 2 주 동안 미리 식이 하였다. 이후에는 각 시료를 식이하면서 동시에 2.5 % DSS (dextran sodium sulfate)를 식수를 통해 일주일 동안 급수한 뒤, 일반 식수로 교환하여 3 일간 급수하였다. cytokine 측정은 세포실험에서 수행 것과 동일함 또한 청국장 항당뇨 실험을 위해 C57/BL6 쥐에 정상군 (con), 대조군 (Dss, 2.5%), 표준제조 청국장 + DSS, PGA + DSS 군으로 나누어 각각의 사료를 2 주 동안 미리 식이 하였다. 이후에는 각 시료를 식이하면서 동시에 2.5 % DSS (dextran sodium sulfate)를 식수를 통해 일주일 동안 급수한 뒤, 일반 식수로 교환하여 3 일간 급수하였다.

### 나. 항비만 연구

세포 배양 계에서 비만예방효과를 분석하기 위하여 3T3-L1preadipocyte를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가하여 세포가 100% confluent해질 때까지 배양. 세포가 100% confluent해졌을 때 0.5 $\mu$ M dexamethasone, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 10  $\mu$ g/ml 인슐린이 첨가된 배지로 24시간 자극하여 지방으로 분화 유도하였다. 비만예방 타겟 단백질 발현분석을 위한 Western blot을 위해 lysis buffer (50mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 $\mu$ g/ml aprotinin, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 $\mu$ M phenylarsine oxide)를 넣어 세포로부터 단백질을 추출. 단백질을 10% SDS-PAGE를 시행후 nitrocellulose membrane으로 transfer, blocking buffer(5% skim milk)로 상온에서 1시간 반응 한다. 특이적인 1차 항체를 TBS에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 2

차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP(TBS로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응 후 다시 1시간 washing 후 ECL kit(Amersham Co., England)를 사용하여 ECL film에 현상하였다.

#### 다. 뇌세포 사멸 억제 효능 연구

수컷 Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) 30 마리를 사용함. 폐주 물 추출물을 P-2 column을 이용하여 분획한 3개의 peaks과 표준제조 청국장(67) 추출물을 증류수에 녹여 50mg/kg의 농도로 7일간 투여하였다. 온목동맥(common carotid arteries)을 노출시키고 aneurysm clip을 이용하여 5분 동안 결찰하여 허혈을 일으킨 후 aneurysm clip을 제거하여 재관류시켰으며, 정상군은 sham operation을 시행하였다. 조직을 2% cresyl violet acetate 용액으로 염색함. 신경세포 사멸확인을 위하여 위의 조직을 DW에 수세한 후 potassium permanganate 용액에서 15분간 immerge시킨 후 다시 DW로 수세한다. Fluoro-Jade B 용액에 30분간 염색한 후 DW로 수세하여 dry oven에서 건조 후 DPX로 mount하여 형광현미경으로 확인한다.

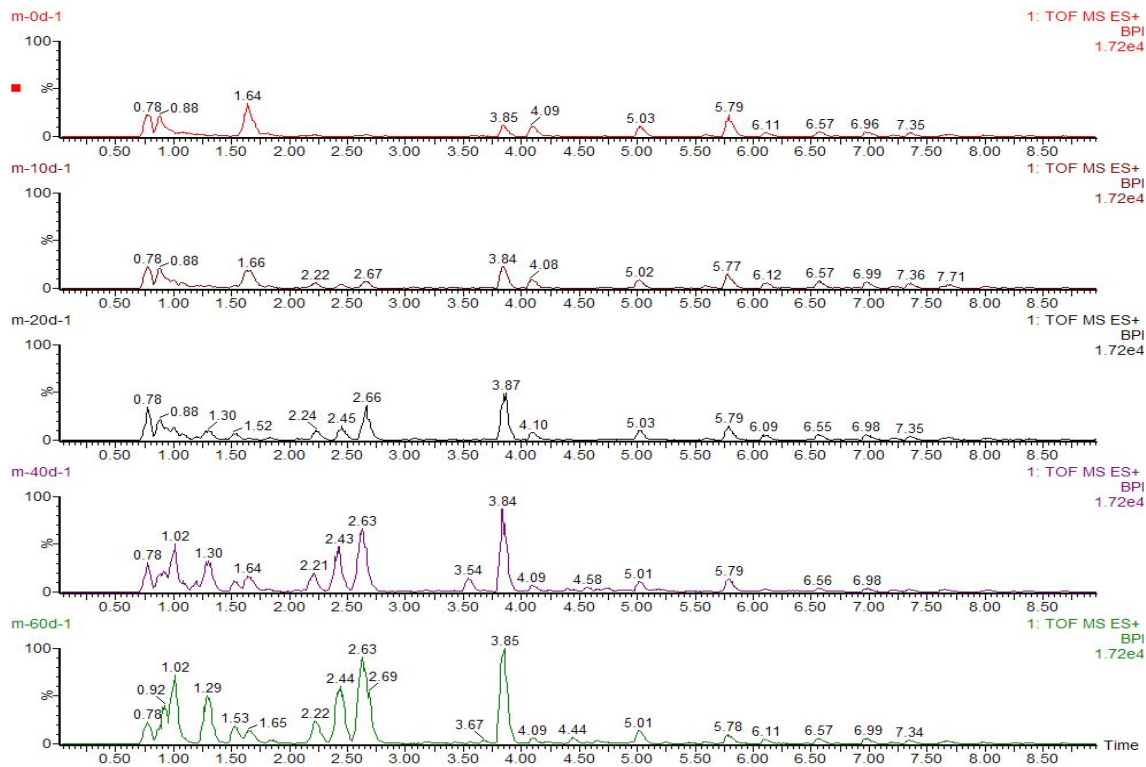
### 3절 연구 수행 결과

#### 1. 전통발효식품의 발효 대사체 분석

##### 가. 전통메주의 발효 대사체 분석

###### (1) UPLC-Q-TOF MS를 이용한 메주 수용성 대사체의 분석

메주를 전통방식으로 제조한 후 발효시간별 (0d, 10d, 20d, 40d, 60d)로 수용성 물질을 추출하여 UPLC-Q-TOF MS로 분석한 결과는 **그림 1**에서 보는바와 같이 발효가 진행됨에 따라 찐콩 (0d)의 주요 peak들이 분해되고 새로운 친수성 물질들이 생성되는 것을 확인되었다. 발효는 주로 20-40일 사이에 진행된 것으로 확인되었으나 40일 이후에는 더 이상의 발효가 진행되지 않는 것으로는 확인되었다.



**그림 1.** UPLC-Q-TOF mass spectrometer를 이용한 발효시간별 메주 수용성 대사체의 분석

###### (2) 메주 수용성 대사체의 다변량통계 분석

UPLC-Q-TOF MS를 이용한 분석한 메주 대사체를 alignment와 normalization 과정을 거쳐 raw data를 보정한 후 PLS-DA를 이용하여 통계학적으로 분석한 결과는 **그림 2**와 같다. PLS-DA의 score plot에서 보는 바와 같이 각 발효시간별로 cluster는 형성이 잘 이루어졌으며 장기간 (40-60 d) 발효된 메주와 짧게 발효된 메주 (0-20 d)는 제1주요물질 (PC1, t[1])에 의해서 뚜렷하게 분리가 되었으며 찐콩과 10-20d 메주는 제2주요물질 (PC2, t[2])에 의해서 분리된 반면 40일 발효된 메주와 60일 발효된 메주는 분리가 거의 안되는 것으로 보아 비슷한 대사체



를 갖고 있는 것으로 사료됨으로 앞에서 언급한 바와 같이 40일 이후에는 거의 발효가 진행되지 않은 것으로 사료된다. 발효시간별 메주들이 서로 차이는 보이는데 기여하는 대사체가 어떤 것들인지를 확인하기 위하여 PLS-DA loading plot를 실시한 결과 발효에 따른 함량의 증감이 뚜렷하게 구분되었다.

발효기간에 따른 메주 발효대사체의 변화를 확인하기 위하여 그림3과 같이 기간별로 분류하여 PLS-DA loading plot을 실시하여 발효가 진행되면서 뚜렷하게 구별되는 것을 확인하였고 40일과 60일도 서로 분리되는 것을 확인하였다. 발효기간별 그룹별로 분리되는데 관여하는 대사체들을 확인하기 위하여 S-plots을 실시하여 유의적인 차이를 나타내는 대사체들 중 동정된 것들을 숫자로 표시하였다.

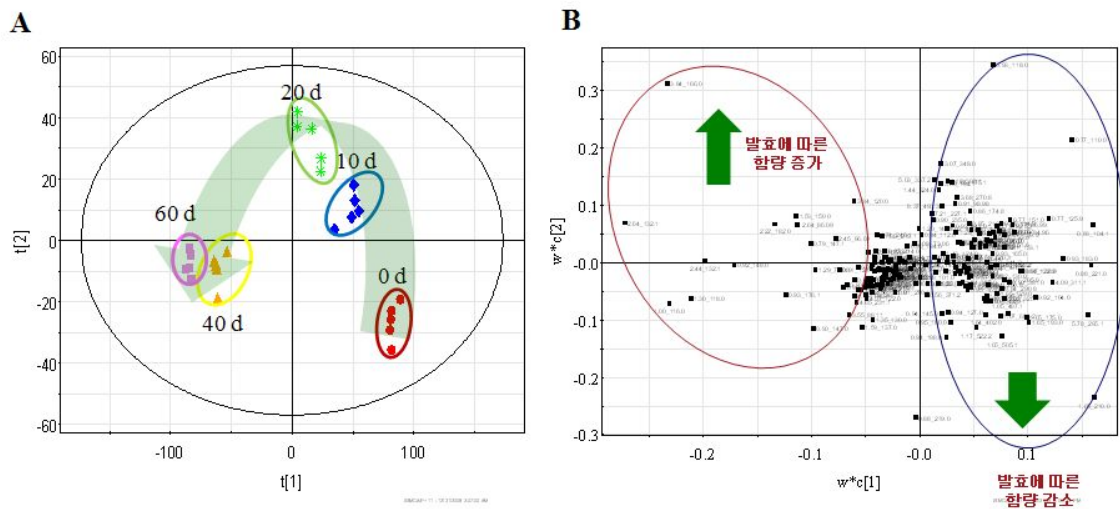


그림 2. UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 분석된 발효시간별 메주 수용성 대사체의 PLS-DA의 score plot (A) 과 loading plot (B)

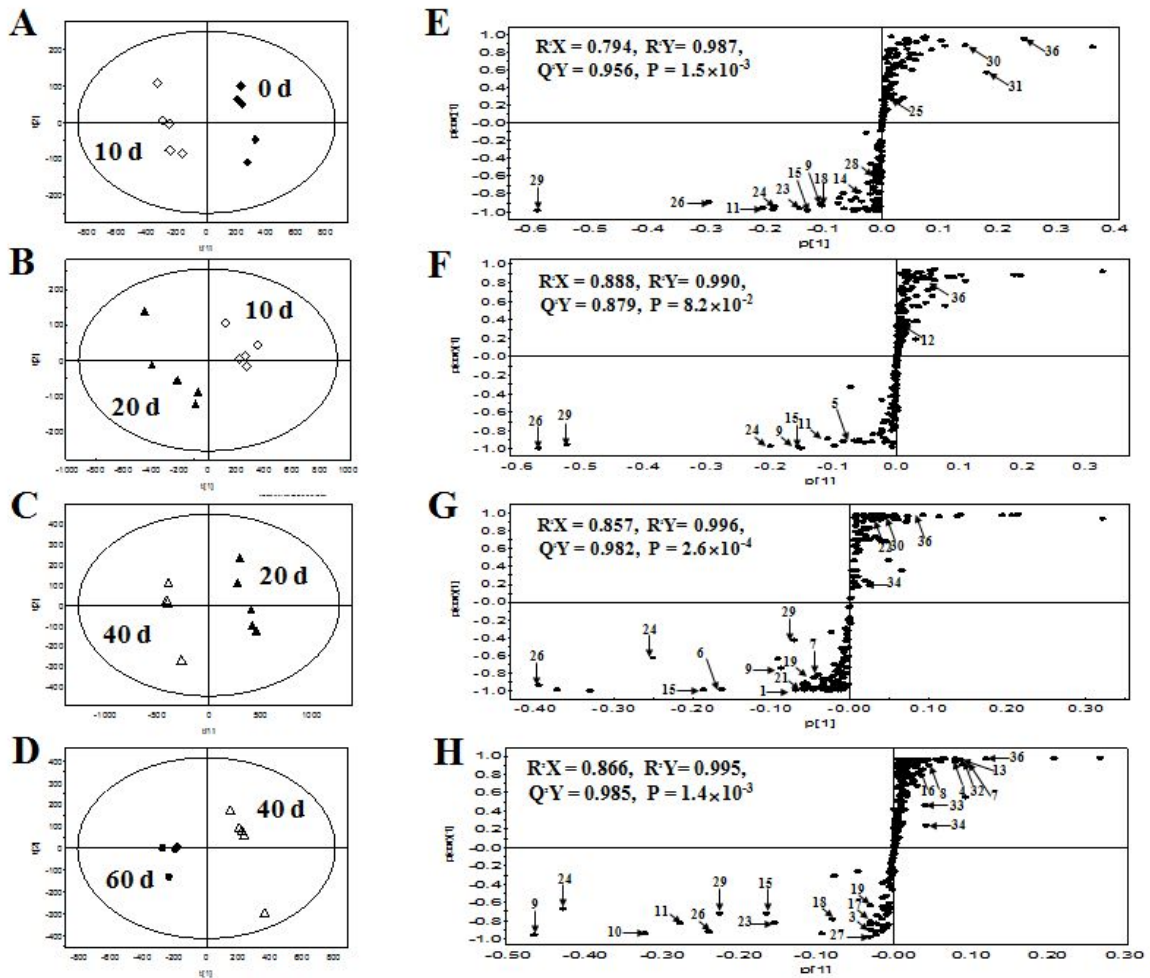


그림 3. UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 분석된 발효시간별 메주 수용성 대사체의 PLS-DA의 score plot (A-D) 과 S-plot (E-H)

### (3) 메주 발효대사체의 정성 및 정상 분석

발효시간별 메주들이 서로 차이는 보이는데 기여하는 대사체들을 loading plot으로 분석한 후 이들 대사체를 LC-MS/MS와 peptide sequencing program, online database들을 이용하여 동정하고 정량분석한 결과는 표 1, 2, 그림 4와 같다. 분자량 424 Da 이하의 저분자물질들 (유리아미노산, 비단백질 유래 아미노산, 펩타이드) 30개가 확인되었으며 이들 중 높은 VIP 값을 보이는 phenylalanine, glutamic acid, leucine, citrulline이 발효에 의해 가장 많이 변하는 것으로 확인되었으며 이들이 주로 발효시간이 다른 메주들이 서로 차이를 보이는데 기여한 것으로 조사되었다. 발효시간이 길어짐에 따라 콩발효식품의 독특한 맛에 관여하는 유리지방산의 함량이 증가되는 것을 확인하였다. 특히 메주 발효대사체들 중에서 가장 많은 함량을 차지하면서 감칠맛을 나타내는 glutamic acid의 함량은 발효에 의해 17배 증가하였으며 단맛과 쓴맛을 나타내는 유리아미노산의 함량들도 발효에 의해 각각 14배, 54배 증가하였다. 다양한 기능성을 갖는 citrulline의 함량도 발효에 의해 93배 증가한 반면 GABA와 pyroglutamic acid의 함량은 감소하였다. 펩타이드의 함량은 발효 40일까지 대부분 증가하였다가 발효 60일에 다시 감소하는 것으로 나타났다.

표 1. UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 분석된 발효시간별 메주 수용성 대사체의 동정

Ion rank	Retention time (min)	Formula [M+H] <sup>+</sup>	Exact mass	Actual mass	Mass error (ppm)	MS fragments (ESI <sup>+</sup> )	VIP*	Identity
1	0.79	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	147.11	147.11	13.6	104.10, 110.01, 116.07	0.79	Lysine
2	0.88	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	156.07	156.07	14.1	104.10, 110.01, 116.07, 118.08	0.58	Histidine
3	0.88	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	175.12	175.12	10.3	104.10, 116.07, 118.08, 148.06	1.07	Arginine
4	0.90	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	90.05	90.05	13.3	70.06, 82.01, 82.53, 84.96, 86.99	0.60	Alanine
5	0.90	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	147.07	147.07	-1.1	104.10, 110.01, 116.07, 130.05	1.47	Glutamine
6	0.91	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	120.06	120.06	8.8	104.10, 110.01, 116.07	0.60	Threonine
7	0.92	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	104.07	104.07	14.8	70.06, 85.03, 90.05, 102.05	1.00	γ-aminobutylic acid
8	0.92	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	148.06	148.06	13.6	104.10, 116.07, 118.08, 147.11	2.34	Glutamic acid
9	0.94	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	176.10	176.10	6.8	104.10, 116.07, 148.06	2.18	Citrulline
10	1.02	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	116.07	116.07	19.8	90.05	1.95	Proline
11	1.02	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	276.12	276.12	9.1	104.10, 116.07, 118.08, 148.06, 176.10	0.49	Glu-Gln
12	1.07	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	175.11	175.11	6.7	72.08, 104.10, 116.07, 118.08, 148.06	1.53	Acetylmethionine
13	1.30	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	118.08	118.08	17.4	72.08	1.61	Valine
14	1.53	C <sub>3</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	150.06	150.06	18.9	129.02, 137.04, 147.03	1.09	Methionine
15	1.59	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> O	137.04	137.04	11.7	104.05, 118.08, 129.02, 133.03	0.92	Hypoxanthine
16	1.82	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	130.05	130.05	2.2	101.02, 129.02	0.62	Pyroglutamic acid
17	2.22	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	182.08	182.08	1.6	130.05, 136.07, 153.04, 165.05, 175.11	1.45	Tyrosine
18	2.44	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	132.10	132.10	12.3	86.09	1.76	Isoleucine
19	2.52	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	260.16	260.16	2.8	86.09, 132.10, 133.10	0.61	Leu-Gln
20	2.64	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	132.10	132.10	6.2	86.09	2.38	Leucine
21	3.19	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	261.14	261.15	6.5	79.25, 120.08, 166.08, 167.09, 207.16	0.55	Leu-Glu
22	3.47	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	247.13	247.13	10.1	120.08, 132.10, 166.08, 167.09	0.67	Val-Glu
23	3.85	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	166.09	166.09	5.6	120.08, 132.10	2.84	Phenylalanine
24	4.09	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	311.12	311.12	-1.6	98.98, 189.12, 215.14, 246.14, 230.16	1.04	Glu-Tyr
25	4.16	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	219.13	219.13	8.7	166.08, 189.12, 215.14	0.94	Val-Thr
26	4.40	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	203.14	203.14	5.1	166.08, 182.08, 189.12	1.34	Ser-Pro
27	4.65	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	231.17	231.17	6.1	189.12, 205.09	0.75	Val-Leu
28	4.86	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	229.15	229.15	7.0	189.12, 205.09	0.48	Leu-Pro
29	5.78	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	295.13	295.13	-0.3	79.02, 130.01, 207.16, 283.17	1.72	Glu-Phe
30	6.49	C <sub>21</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	425.27	425.27	-15.0	98.98, 207.16, 227.13, 358.24, 388.25	1.24	Leu-Val-Pro-Pro

Non-peptide metabolites were assigned by elemental composition analysis software and chemspider online database, and peptides were sequenced by peptide sequencer.

\* VIP was variable importance in the projection and the value of more than 1.0 calculated by PLS-DA indicated high relevance for explaining the differences of sample groups.

표 2. 메주 수용성 대사체들의 발효시간별 함량 변화

Group	Identity	Fermentation period (d, ug/g)					p-value
		0	10	20	40	60	
Free amino acids	Lysine	13.10 <sup>a</sup>	158.92 <sup>b</sup>	269.28 <sup>c</sup>	714.64 <sup>d</sup>	1085.12 <sup>e</sup>	0.013
	Histidine	7.21 <sup>a</sup>	8.62 <sup>ab</sup>	10.38 <sup>b</sup>	62.17 <sup>c</sup>	96.69 <sup>d</sup>	0.007
	Arginine	4.57 <sup>a</sup>	168.83 <sup>a</sup>	286.07 <sup>a</sup>	1257.09 <sup>c</sup>	1261.51 <sup>b</sup>	0.001
	Alanine	117.21 <sup>a</sup>	228.43 <sup>a</sup>	483.58 <sup>b</sup>	2341.61 <sup>d</sup>	2806.12 <sup>c</sup>	0.001
	Glutamine	6.20 <sup>a</sup>	17.84 <sup>a</sup>	22.32 <sup>a</sup>	386.37 <sup>b</sup>	323.23 <sup>b</sup>	0.001
	Threonine	216.77 <sup>a</sup>	749.70 <sup>b</sup>	918.52 <sup>c</sup>	1686.48 <sup>d</sup>	892.04 <sup>c</sup>	0.001
	Glutamic acid	552.96 <sup>a</sup>	2495.45 <sup>b</sup>	5753.82 <sup>c</sup>	14349.53 <sup>c</sup>	28992.20 <sup>d</sup>	0.003
	Proline	384.43 <sup>a</sup>	665.22 <sup>b</sup>	913.68 <sup>c</sup>	2707.34 <sup>e</sup>	4016.00 <sup>d</sup>	0.001
	Valine	195.61 <sup>a</sup>	321.00 <sup>b</sup>	545.64 <sup>c</sup>	1573.87 <sup>d</sup>	2257.93 <sup>c</sup>	0.007
	Methionine	4.07 <sup>a</sup>	65.40 <sup>b</sup>	125.48 <sup>c</sup>	256.54 <sup>d</sup>	410.64 <sup>c</sup>	0.003
	Tyrosine	9.71 <sup>a</sup>	27.73 <sup>b</sup>	339.79 <sup>c</sup>	600.72 <sup>d</sup>	581.32 <sup>a</sup>	0.001
	Isoleucine	14.86 <sup>a</sup>	83.29 <sup>b</sup>	183.19 <sup>c</sup>	709.14 <sup>d</sup>	1027.43 <sup>e</sup>	0.013
	Leucine	35.49 <sup>a</sup>	256.60 <sup>a</sup>	901.86 <sup>b</sup>	2831.10 <sup>c</sup>	3954.16 <sup>d</sup>	0.001
	Phenylalanine	89.56 <sup>a</sup>	287.92 <sup>b</sup>	560.73 <sup>c</sup>	118.46 <sup>d</sup>	1471.26 <sup>e</sup>	0.001
Non-protein amino acids	γ-aminobutylic acid	179.55 <sup>a</sup>	142.44 <sup>d</sup>	124.75 <sup>c</sup>	110.52 <sup>b</sup>	60.90 <sup>a</sup>	0.002
	Citrulline	11.48 <sup>a</sup>	61.69 <sup>b</sup>	190.53 <sup>c</sup>	602.74 <sup>d</sup>	1069.05 <sup>e</sup>	0.001
	Acetylmethine	14.04 <sup>a</sup>	25.07 <sup>b</sup>	28.74 <sup>c</sup>	41.53 <sup>d</sup>	26.39 <sup>b</sup>	0.004
	Hypoxanthine*	16.00 <sup>c</sup>	11.40 <sup>b</sup>	10.80 <sup>a</sup>	60.00 <sup>d</sup>	82.40 <sup>e</sup>	0.021
	Pyroglutamic acid	31.84 <sup>b</sup>	26.60 <sup>a</sup>	24.09 <sup>a</sup>	22.08 <sup>a</sup>	15.07 <sup>a</sup>	0.002
Peptides	Glu-Gln*	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>ab</sup>	5.20 <sup>b</sup>	45.20 <sup>d</sup>	40.20 <sup>c</sup>	0.001
	Leu-Gln*	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	24.40 <sup>c</sup>	18.00 <sup>b</sup>	0.001
	Leu-Glu*	0.00 <sup>a</sup>	1.60 <sup>a</sup>	1.80 <sup>a</sup>	20.80 <sup>a</sup>	9.20 <sup>a</sup>	0.035
	Val-Glu*	0.00 <sup>a</sup>	2.00 <sup>b</sup>	2.20 <sup>b</sup>	6.00 <sup>c</sup>	1.80 <sup>b</sup>	0.045
	Glu-Tyr*	21.51 <sup>e</sup>	17.41 <sup>d</sup>	15.72 <sup>c</sup>	12.57 <sup>b</sup>	9.87 <sup>a</sup>	0.001
	Val-Thr*	0.00 <sup>a</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.18 <sup>c</sup>	0.89 <sup>d</sup>	0.63 <sup>c</sup>	0.015
	Ser-Pro*	0.00 <sup>a</sup>	8.60 <sup>b</sup>	10.00 <sup>b</sup>	62.40 <sup>d</sup>	20.00 <sup>c</sup>	0.002
	Val-Leu	0.00 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	4.06 <sup>b</sup>	3.74 <sup>b</sup>	0.001
	Leu-Pro*	2.00 <sup>a</sup>	12.40 <sup>b</sup>	19.20 <sup>c</sup>	75.80 <sup>e</sup>	62.20 <sup>d</sup>	0.001
	Glu-Phe	286.22 <sup>d</sup>	215.28 <sup>c</sup>	192.63 <sup>a</sup>	211.62 <sup>c</sup>	125.13 <sup>b</sup>	0.001
	Leu-Val-Pro-Pro*	0.00 <sup>a</sup>	18.80 <sup>b</sup>	23.00 <sup>c</sup>	30.80 <sup>d</sup>	2.20 <sup>a</sup>	0.001

Different letters on the same line indicated significant differences at each p-value analyzed by ANOVA. All experiments were replicated five times.  
 \* The contents of commercially unavailable compounds were expressed as the intensity of UPLC-Q-TOF base peak.

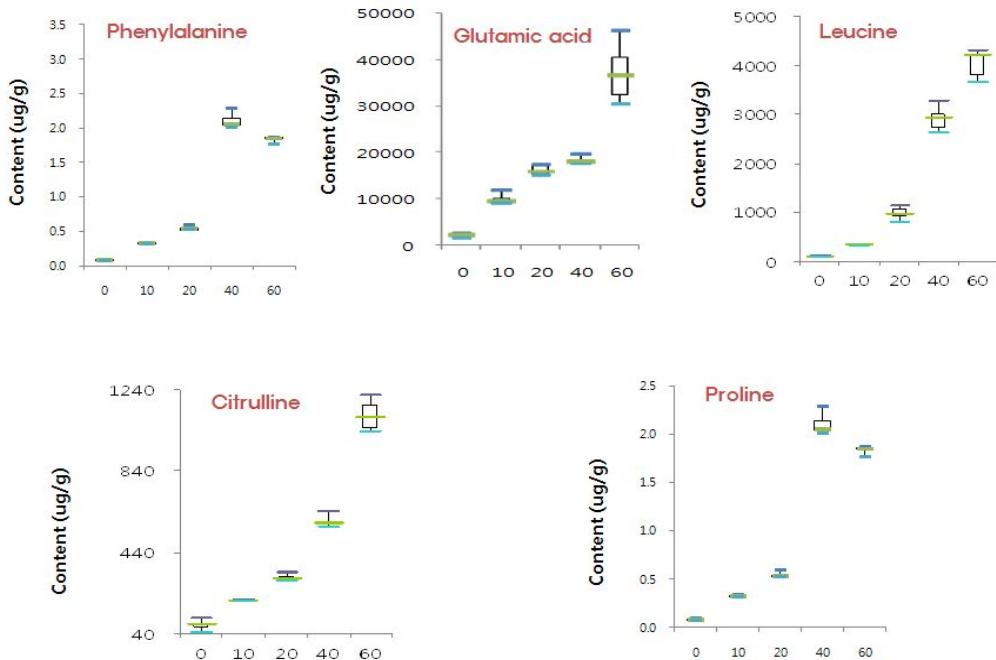


그림 4. 주요 메주 발효대사체들의 Box plot

(4) 메주 발효대사경로 도출

동정된 메주발효대사물질들을 이용하여 그림 5와 같이 메주발효대사 경로를 도출하였다. 메주 발효과정에 생성되는 대부분의 발효대사물질들은 원료인 콩의 거대분자인 단백질, 지방, 탄수화물의 메주제조 공정의 물리적 효소적 반응에 의해서 생성되지만 일부는 균주에 의해서 생성되는 by-products일 가능성이 상당히 높다. 이들 대사체들의 변화가 메주의 관능적 품질적 변화에 직접적으로 관여하는 것으로 사료된다 (그림 6).

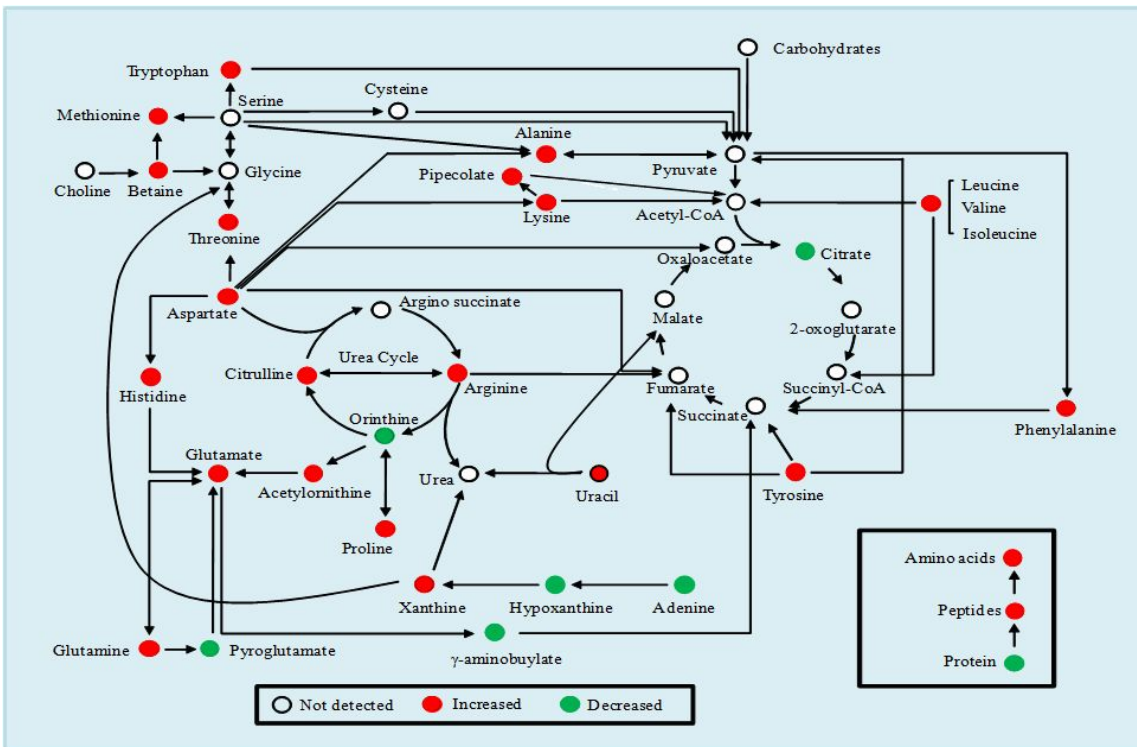


그림 5. 메주 발효대사경로

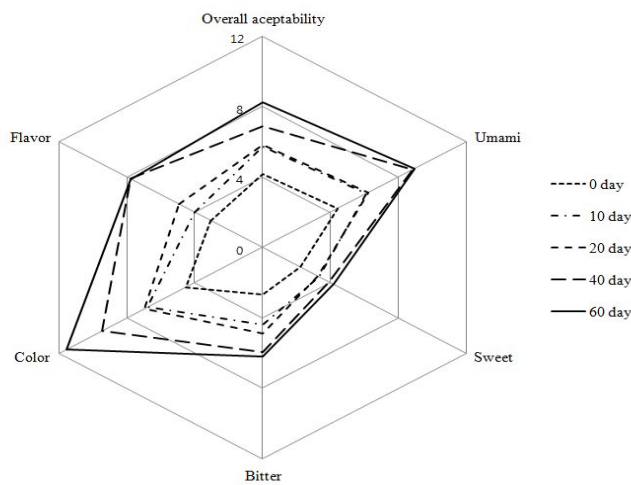
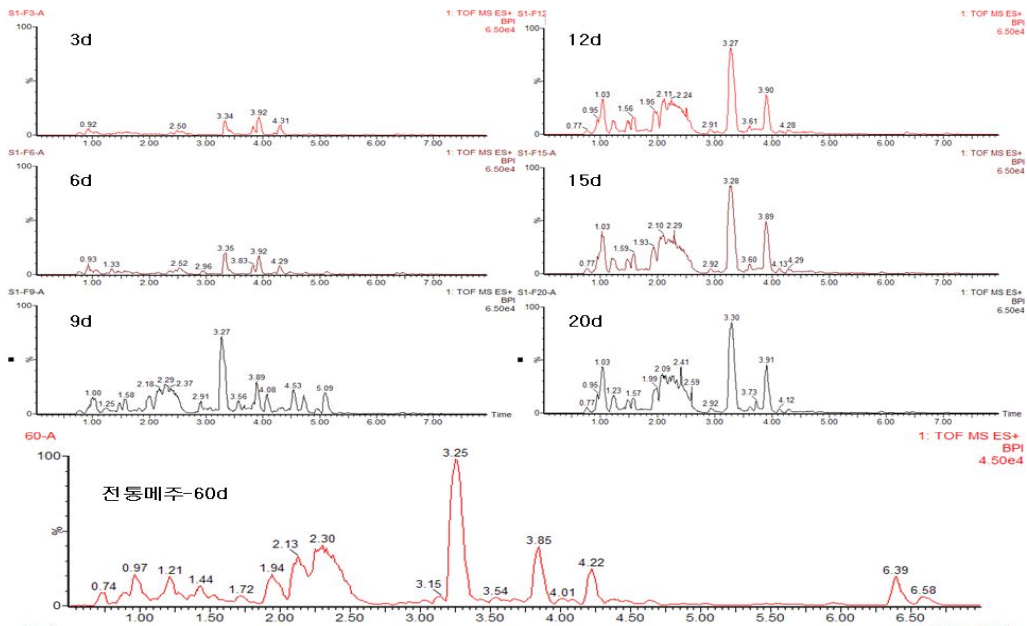


그림 6. 메주의 제조 시기별 관능검사

## 나. 표준제조된 메주의 발효대사체 분석

### (1) UPLC-Q-TOF MS를 이용한 표준제조 메주의 대사체 분석

*Aspergillus oryzae*와 *Bacillus licheniformis*를 접종한 후 28°C에서 3일, 6일, 9일, 12일, 15일, 20일간 발효시켜서 제조한 표준제조 메주의 수용성 대사체를 UPLC-Q-TOP MS로 분석한 결과는 **그림 7**와 같다. 9일 이후 발효가 급격히 진행되다가 12일 이후 거의 발효가 진행되지 않아 12일 발효된 메주와 20일 발효된 메주의 대사체 profile는 거의 유사한 것으로 조사되었다. 또한 12일-20일 발효된 표준제조 메주의 대사체 profile은 전통메주 60일의 대사체 profile과 매우 유사한 것으로 확인되었다. 그러나 전통메주에서 4.22분에 나오는 peak이 표준제조 메주에서는 매우 낮게 나오는 것으로 확인되었다. 이들 data를 export하여 보정한 후 PLS-DA를 통해 다변량 통계 분석한 결과 **그림 8**에서 보는 바와 같이 score plot상에서 발효시간이 다른 모든 메주시료는 각각 cluster가 잘 형성된 것으로 보이며 12일에서 20일간 발효된 메주들을 사이의 차이를 제외하고는 3일, 6일, 9일, 12일-20일 발효된 메주들 사이에는 분명한 차이를 확인하였다. 그리고 9일보다 짧게 발효된 메주와 12일 이상 발효된 메주는 제2주요성분에 의해 분리가 이루어진 것으로 조사되었다. 발효시간이 길어짐에 따른 표준제조 메주의 score plot 패턴이 전통메주의 흐름과는 다소 다르기는 하지만 12일에서 20일간 발효된 메주는 60일간 발효된 전통메주와 유사성을 보이는 것으로 확인되었다. 그러나 발효온도를 20°C 또는 24°C에서 28°C로 변화를 주면서 제조한 표준제조 메주인 경우 20일까지 발효를 시켜야만이 전통메주의 대사체 profile가 비슷한 것으로 확인되었으며 (**그림 9**) 전통메주의 발효과정 중에 주요하게 변화는 5개의 지표물질들 (phenylalanine, glutamic acid, leucine, citrulline)의 변화를 28°C에서 제조한 표준제조 메주에서 확인한 결과 발효 15일에서 glutamic acid와 citrulline의 함량이 다소 전통에 비해 낮기는 하지만 어느정도 전통에 근접한 것으로 사료된다 (**그림 10**).



**그림 7.** 발효시간별 표준제조 메주와 전통메주의 수용성 대사체 분석

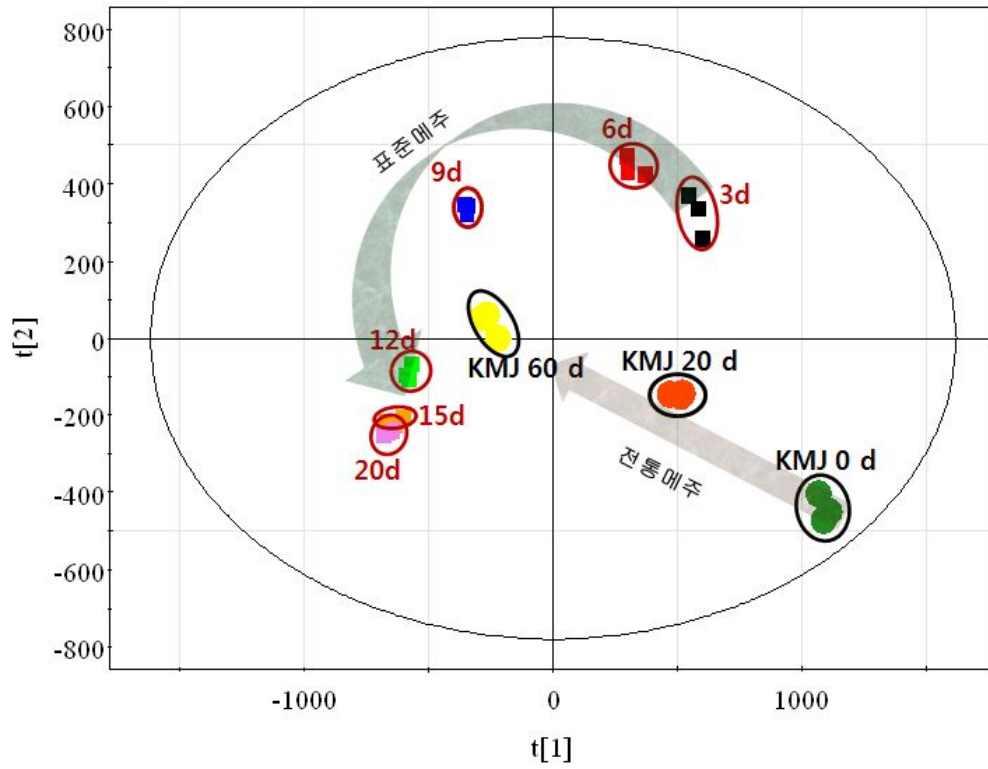


그림 8. UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 분석된 발효시간별 표준제조 메주 수용성 대사체와 전통메주 수용성 대사체의 PLS-DA score plot

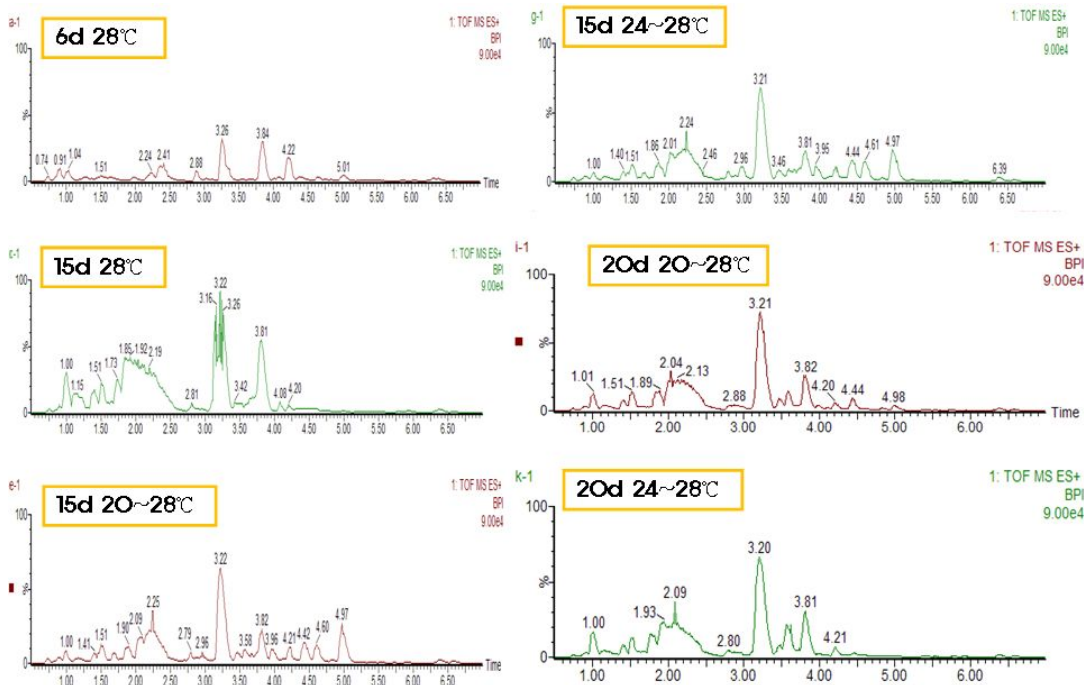


그림 9. 온도를 달리하여 제조한 표준제조 메주의 대사체 profiles

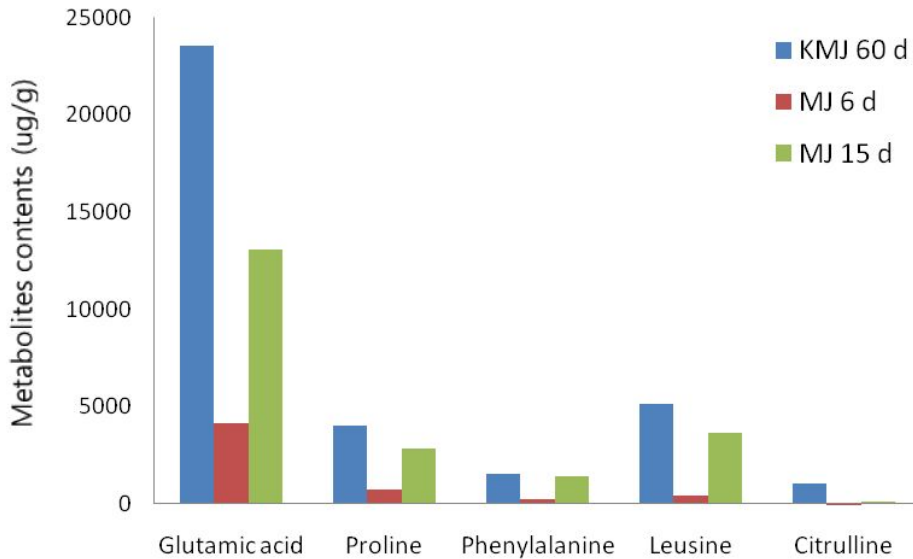


그림 10. 전통메주와 표준제조 메주의 주요 대사체 함량

## (2) 표준제조 메주의 lipid 변화

표준제조된 메주의 lipid의 변화를 관찰한 결과는 그림 11에서 보는 바와 같이 다른 lipid함량의 변화보다 free fatty acid의 함량 변화가 가장 큰 것으로 관찰되었으며 이는 발효에 관여하는 균주에서 생성하는 lipase의 활성의 증가로 인해 기인한 것으로 사료된다. 개별 free fatty acid의 함량 변화를 관찰한 결과 6일간 발효된 표준제조에서 5개의 fatty acid (pamitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid)가 주요 구성 물질인 것으로 확인되었으며 이 중에서 linoleic acid의 함량의 가장 높고 발효에 의해서 가장 많이 변한 것으로 조사됨으로 인하여 이들 5개 fatty aci의 함량 비율과 linoleic acid 함량은 표준제조 메주의 발효 지표물질로 사용될 수 있을 것으로 사료된다. Free fatty acid의 GC/MS data를 alignment, normalization에 의해 보정한 후 PLS-DA 다변량 통계 분석을 실시한 결과 발효 3일까지는 거의 변화가 없다가 발효 5일과 6일에서 급격히 발효가 진행되어 초기 표준제조 메주와 뚜렷하게 구분되는 것으로 확인되었다.



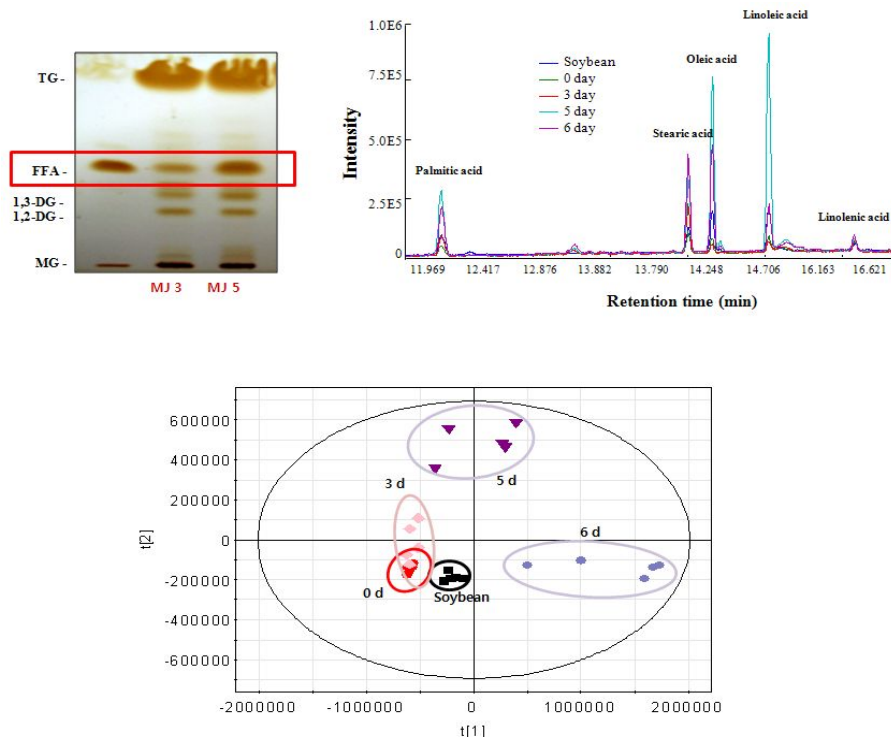


그림 11. 표준제조 메주의 lipid 변화 및 PLS-DA score plot

#### 다. 표준제조된 청국장의 발효대사체 분석

*B. licheniformis* 67 균주 (BL67)를 이용하여 콩을 그림 11과 같이 60시간 동안 발효하여 표준제조 청국장을 제조하였으며 동일 시간동안 볏짚으로 제조한 전통 청국장과 시간별로 비교하였다. 전통 청국장과 표준제조 청국장을 비교한 결과 PGA 생성은 전통청국장인 경우 12시간동안 2배정도 (삶은 콩에 비해) 증가한 후 발효 60일까지 큰 변화가 관찰되지 않은 반면 BL 67 표준 제조 청국장인 경우 36시간까지 꾸준히 증가하여 삶은 콩에 비해 5배 이상의 하였으며 그 후 큰 변화는 없었다. 최종 60시간 후 표준제조 청국장의 PGA 함량은 전통 청국장에 비해 약 2.5배 증가한 것으로 관찰되었다 (그림 12 A). 또한 두 청국장의 관능을 비교한 결과 그림 12 B에서 보는 바와 같이 off-odor를 제외한 모든 항목에서 표준제조 청국장이 더 우수한 것으로 조사되었다.

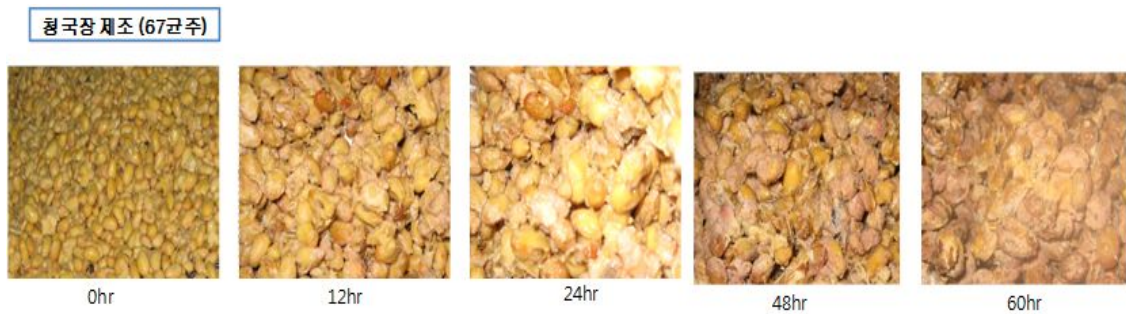


그림 11. 표준제조 청국장의 제조

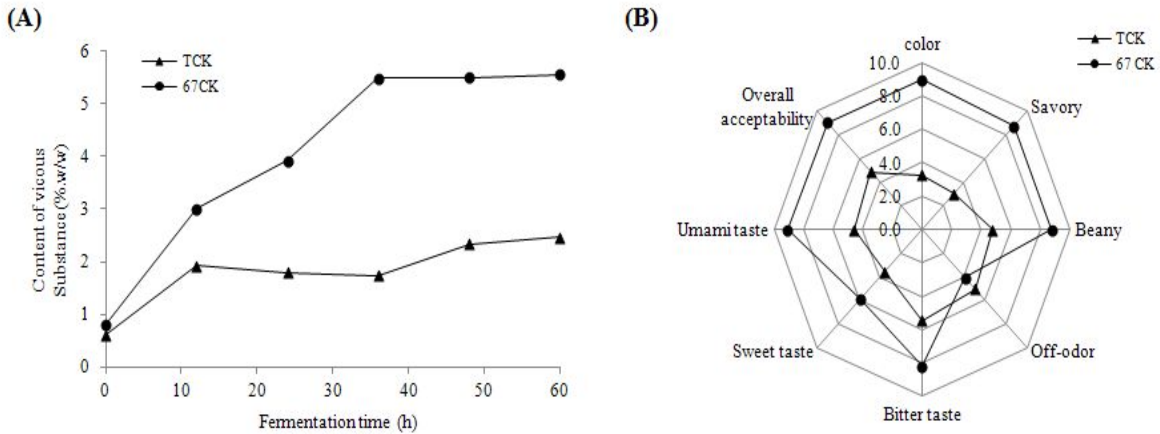


그림 12. 표준제조 청국장과 전통 청국장의 PGA 함량과 관능검사

표준제조 청국장과 전통청국장을 50% methanol로 추출한 후 UPLC-Q-TOF MS로 분석한 결과 두 청국장 시료에서 발효가 진행될수록 지질 관련 대사물들의 새롭게 발생하는 것이 관찰되었으나 단일 균주로 제조된 표준제조 청국장이 복잡한 균주들로 발효된 전통청국장에 비해 단순한 프로파일을 보여주고 있으며 이들 LC-MS data를 PLS-DA score plot 상에서 표현한 결과 표준제조 청국장과 전통 청국장이 발효가 되면서 서로 다른 방향으로 진행되고 있는 것이 관찰되었으며 두 청국장 모두 36시간 이후에는 발효에 의한 큰 차이는 관찰되지 않았다. PLS-DA score plot상의 이들 청국장들의 발효시간에 따른 변화에 관여하는 발효대사체들을 동정하기 위하여 loading plot을 실시하였고 유의적으로 차이를 보이는 것들 중 동정된 대사체들은 loading plot상에 숫자로 표시하였다 (그림 13).

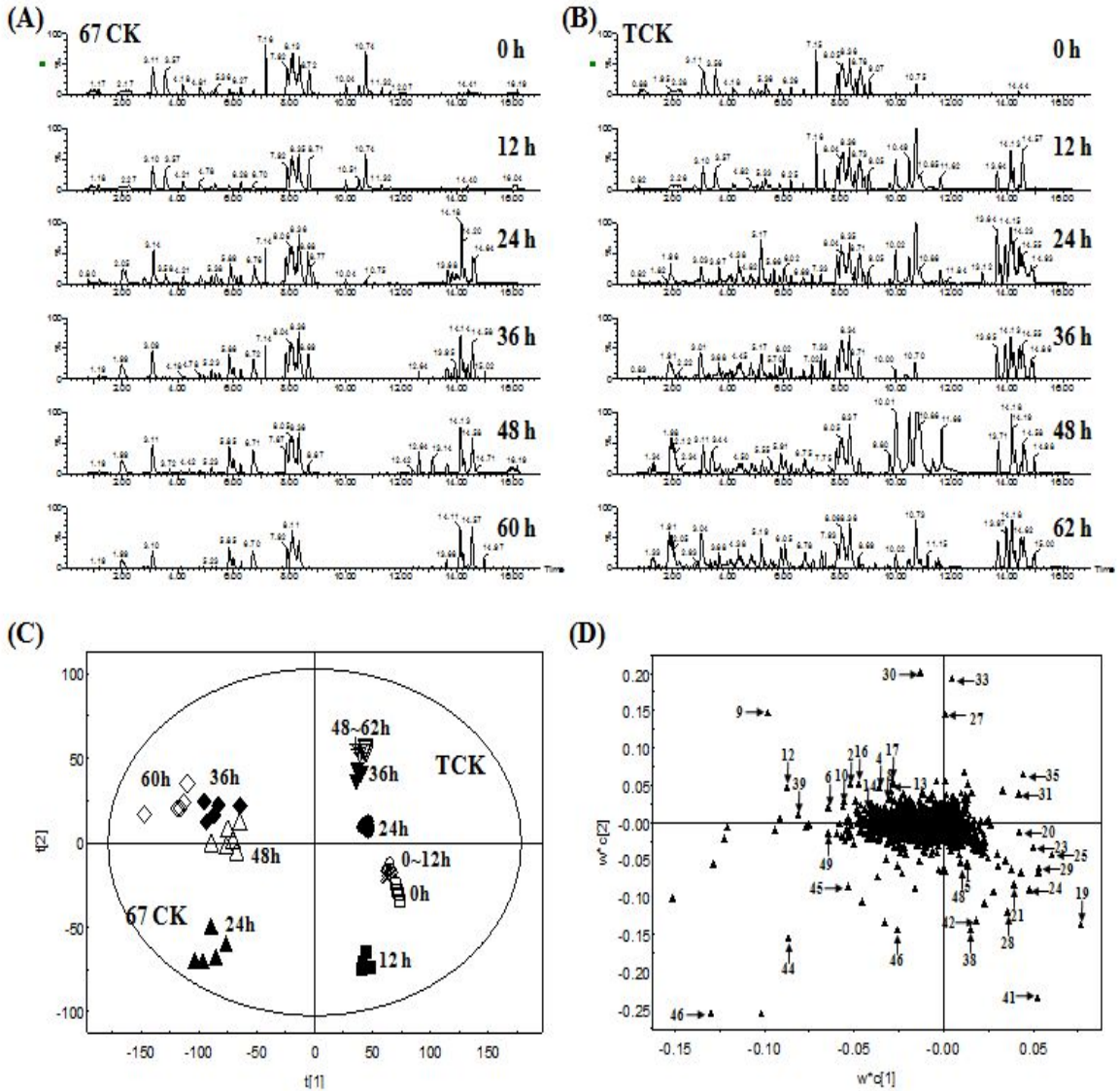


그림 13. UPLC-Q-TOF MS를 이용한 표준제조 청국장과 전통 청국장의 대사체 분석

두 청국장을 따로 분리하여 PLS-DA로 분석한 결과 그림 14에 보는 바와 같이 발효기간에 따라 두 청국장에서 모두 더 극명하게 분리되는 것을 확인할 수 있었으며 발효는 주로 24시간을 전후로 발효가 진행된 것으로 확인되었고 이때 관여하는 대사체들 중 동정된 대사체들은 숫자로 표기하였다.

청국장 대사체분석을 위한 PLS-DA 모델들이 잘 성립되었는지를 확인하기 위한 parameters을 분석한 결과 표 3에서 보는 바와 같이 goodness of fitness의 파라미터인 R2X와 R2Y 값과 예측가능치를 보여주는 Q2Y 값이 매우 높은 것으로 보아 청국장 대사체분석을 위한 PLS-DA 모델들은 잘 성립된 것으로 확인되었다. 또한 cross validation를 통해 얻어진 R와 Q intercept 값이 각각 0.48이하, -0.56이하 값을 보여 over-fit 되지 않았고 p-value로 매우 낮아서 분석하는데 아무런 통계적 문제가 없는 것으로 확인되었다.

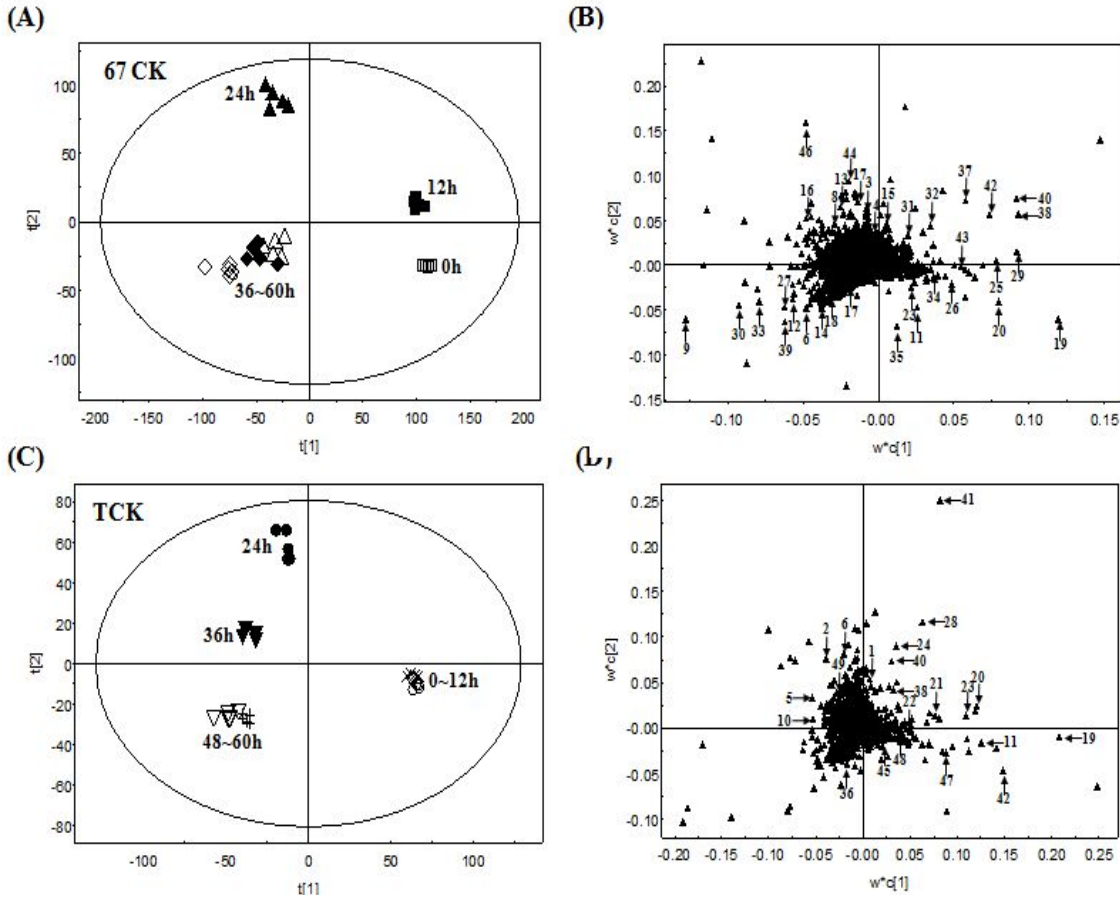


그림 14. 표준제조 청국장과 전통 청국장 대사체의 PLS-DA score와 loading plots

표 3. 청국장 대사체 분석을 위한 PLS-DA models의 quality parameters

Models	No. <sup>a</sup>	R <sup>2</sup> X <sub>cum</sub> <sup>b</sup>	R <sup>2</sup> Y <sub>cum</sub> <sup>b</sup>	Q <sup>2</sup> Y <sub>cum</sub> <sup>b</sup>	R intercept <sup>c</sup>	Q intercept <sup>c</sup>	p-value <sup>d</sup>
67 CK & TCK	12	0.842	0.960	0.886	0.480	-0.774	0.001
67 CK 0 ~ 60 h	5	0.792	0.977	0.957	-0.297	-0.560	0.001
TCK 0 ~ 60 h	7	0.804	0.982	0.916	-0.622	-0.696	0.001

<sup>a</sup>No. was the number of components. <sup>b</sup>R<sub>2</sub>X<sub>cum</sub> and R<sub>2</sub>Y<sub>cum</sub> were the cumulative modeled variation in X and Y matrix, respectively, and Q<sub>2</sub>Y<sub>cum</sub> was the cumulative predicted variation in Y matrix. <sup>c</sup>R and Q intercepts were obtained after permutation test (n=200). <sup>d</sup>p-value obtained from 7-fold cross validation ANOVA.

청국장의 발효시간별 대사체의 변화를 UPLC-Q-TOF MS로 분석한 후 발효 시간별 차이에 관여하는 주요 대사체들을 동정한 결과 표 4에서 보는 바와 같이 49종의 대사체들을 동정하였다. 주로 아미노산, 저분자 펩타이드, isoflavones, soyasaponins, LPCs 등 인 것으로 확인되었다. 동정된 이들 모두는 VIP (variable importance in the projection) 값이 1.0 이상으로 주요 관여 대사체들인 것으로 확인되었다.

동정된 이들 물질들의 발효시간별 또는 두 청국장 별 정량변화를 확인한 결과 발효기간에 따라 증감이 확실하게 나타났으며 표준제조 청국장과 전통청국장 사이의 차이를 관찰한 결과 표 5에서 보는 바와 같이 다양한 기능성에 관여하는 것으로 알려진 C18:2와 C18:3를 갖고 있

는 lysophosphatidylcholine (LysoPC) 함량이 표준제조 청국장에서 급증한 반면 전통 청국장에서는 발효에 의해 감소하는 경향을 보였다. 이들 대사체들은 청국장의 품질과 직접적으로 연관성을 갖고 있는 것으로 보아 청국장의 quality control 하는데 중요한 지표물질들로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

표 4. UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 분석된 발효시간별 청국장 대사체의 동정

No.	Ret. Time	Formula (M+H) <sup>+</sup>	Identity	Exact Mass	Actual Mass	VIP*
1	0.91	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Arginine	175.1195	175.1193	1.35
2	0.94	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	Valine	118.0868	118.0841	1.35
3	1.03	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	Proline	116.0712	116.0688	1.27
4	1.17	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub> S	Methionine	150.0589	150.0565	1.05
5	1.20	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	Adenine	136.0623	136.0642	2.45
6	1.20	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	Tyrosine	182.0817	182.0767	2.59
7	1.35	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	Leucine	132.1025	132.097	3.73
8	1.35	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Leu-Glu	261.145	261.1422	1.06
9	1.99	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Phenylalanine	166.0868	166.0823	6.02
10	1.99	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Threonine	120.0661	120.0717	6.35
11	2.05	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Glu-Tyr	311.1243	311.1205	2.62
12	2.09	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	L-proline betaine	114.1025	144.0974	2.17
13	2.14	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ser-Pro	203.1396	203.1354	1.45
14	2.44	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Val-Glu	247.1294	247.1258	1.02
15	2.99	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tryptophane	205.0977	205.0944	1.7
16	3.21	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Val-Leu	231.1709	231.1653	1.3
17	3.27	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Val-Thr	219.1345	219.1326	1.42
18	3.59	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Phenylalanine	166.0868	166.0823	4.27
19	3.59	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Glu-Phe	295.1294	295.1253	6.64
20	4.20	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>5</sub>	Daidzin	417.1186	417.1167	4.08
21	4.29	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub>	Glycitin	447.1291	447.1282	2.4
22	4.49	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub>	Dihydrogenistin	273.0763	273.0725	1.11
23	4.80	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	Genistin	433.1135	433.1115	4.94
24	4.82	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	Malonyldaidzin	503.1190	503.1196	5.95
25	5.24	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	Acetyldaidzin	459.1291	459.1275	2.6
26	5.28	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	Acetylglycistin	489.1397	489.1387	1.91
27	5.28	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub>	Glycetin	285.0763	285.0722	1.26
28	5.38	C <sub>24</sub> H <sub>33</sub> O <sub>13</sub>	Malonylgenistin	519.1139	519.1144	6.18
29	5.86	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	Acetylgenistin	475.1240	475.1231	3.31
30	5.87	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub>	Daidzein	475.1240	255.0606	1.28
31	8.26	C <sub>41</sub> H <sub>61</sub> O <sub>13</sub>	B soyasaponin Bc	255.0657	913.5155	1.07
32	6.73	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>19</sub>	E soyasaponin Bd	957.5059	957.504	2.32
33	6.74	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>5</sub>	Genistein	271.0606	271.0557	6.64
34	7.93	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>19</sub>	B soyasaponin Ba	959.5216	959.5197	4.41
35	8.10	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>18</sub>	B soyasaponin Bb	943.5200	943.523	7.04
36	8.11	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>14</sub>	B soyasaponin Bb'	797.4687	797.468	1.46
37	8.43	C <sub>41</sub> H <sub>59</sub> O <sub>13</sub>	B soyasaponin Bc	767.4582	767.4579	3.26
38	8.55	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>22</sub>	DDMP soyasaponin ag	1085.5532	1085.551	7.22
39	8.69	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>13</sub>	E soyasaponin Be	941.5110	941.5083	3.76
40	8.70	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>17</sub>	DDMP soyasaponin yg	923.5004	923.4977	2.87
41	8.71	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>21</sub>	DDMP soyasaponin βg	1069.5583	1069.557	1.83
42	8.87	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>20</sub>	DDMP soyasaponin βa	1039.5478	1039.5451	4.64
43	8.87	C <sub>41</sub> H <sub>59</sub> O <sub>16</sub>	DDMP soyasaponin ya	893.4899	893.4879	1.86
44	10.03	C <sub>36</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC(18:3)	518.3247	518.3245	7.18
45	10.32	C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC(16:1)	494.3247	494.3238	1.54
46	10.51	C <sub>38</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC(18:2)	520.3403	520.3401	7.29
47	10.78	C <sub>38</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC(20:4)	544.3403	542.3301	1.24
48	12.75	C <sub>38</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC(18:0)	524.3716	524.3709	1.05
49	14.01		PC <sub>3</sub>	758.5656	782.5688	1.96

\*VIP was variable importance in the projection and the value of 1.00 indicated high relevance for explaining the differences of sample groups.

표 5. 동정된 발효시간별 청국장 대사체의 정량분석

Identification	67 CK						TCK					
	0h	12h	24h	36h	48h	60h	0h	12h	24h	36h	48h	60h
Arginine	49.76 <sup>a</sup>	43.73 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	80.86 <sup>a</sup>	63.76 <sup>a</sup>	10.53 <sup>a</sup>	18.78 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>
Valine	2.30 <sup>a</sup>	18.65 <sup>a</sup>	47.59 <sup>a</sup>	68.72 <sup>a</sup>	70.35 <sup>a</sup>	83.73 <sup>a</sup>	15.12 <sup>a</sup>	17.10 <sup>a</sup>	51.35 <sup>a</sup>	52.12 <sup>a</sup>	53.10 <sup>a</sup>	54.23 <sup>a</sup>
Proline	0.24 <sup>a</sup>	1.21 <sup>a</sup>	14.07 <sup>a</sup>	15.87 <sup>a</sup>	21.96 <sup>a</sup>	25.85 <sup>a</sup>	1.89 <sup>a</sup>	2.06 <sup>a</sup>	22.35 <sup>a</sup>	2.60 <sup>a</sup>	0.63 <sup>a</sup>	0.68 <sup>a</sup>
Methionine	1.71 <sup>a</sup>	2.83 <sup>a</sup>	20.58 <sup>a</sup>	38.33 <sup>a</sup>	44.08 <sup>a</sup>	48.80 <sup>a</sup>	14.89 <sup>a</sup>	19.88 <sup>a</sup>	19.86 <sup>a</sup>	26.34 <sup>a</sup>	27.94 <sup>a</sup>	31.00 <sup>a</sup>
Tyrosine	56.41 <sup>a</sup>	58.40 <sup>a</sup>	73.22 <sup>a</sup>	79.26 <sup>a</sup>	102.49 <sup>a</sup>	52.95 <sup>a</sup>	79.59 <sup>a</sup>	70.45 <sup>a</sup>	162.26 <sup>a</sup>	209.48 <sup>a</sup>	175.02 <sup>a</sup>	222.33 <sup>a</sup>
Leucine	28.72 <sup>a</sup>	98.08 <sup>a</sup>	142.68 <sup>a</sup>	273.81 <sup>a</sup>	298.46 <sup>a</sup>	385.15 <sup>a</sup>	114.61 <sup>a</sup>	143.66 <sup>a</sup>	180.29 <sup>a</sup>	208.29 <sup>a</sup>	210.80 <sup>a</sup>	338.80 <sup>a</sup>
Phenylalanine	231.00 <sup>a</sup>	174.75 <sup>a</sup>	1032.15 <sup>a</sup>	1611.17 <sup>a</sup>	1796.01 <sup>a</sup>	1877.30 <sup>a</sup>	213.02 <sup>a</sup>	230.79 <sup>a</sup>	942.01 <sup>a</sup>	1429.52 <sup>a</sup>	1459.81 <sup>a</sup>	1486.97 <sup>a</sup>
Threonine	190.70 <sup>a</sup>	168.84 <sup>a</sup>	333.49 <sup>a</sup>	356.37 <sup>a</sup>	438.65 <sup>a</sup>	699.18 <sup>a</sup>	168.92 <sup>a</sup>	228.56 <sup>a</sup>	228.22 <sup>a</sup>	320.40 <sup>a</sup>	466.58 <sup>a</sup>	544.09 <sup>a</sup>
Tryptophane	0.01 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	139.74 <sup>a</sup>	154.48 <sup>a</sup>	273.09 <sup>a</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06
Leu-Glu	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	16.56 <sup>a</sup>	19.65 <sup>a</sup>
Glu-Tyr	114.08 <sup>a</sup>	120.57 <sup>a</sup>	5.81 <sup>a</sup>	3.56 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	33.97 <sup>a</sup>	126.89 <sup>a</sup>	13.49 <sup>a</sup>	3.86 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a</sup>	2.88 <sup>a</sup>
Ser-Pro	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	2.97 <sup>a</sup>	79.11 <sup>a</sup>	58.68 <sup>a</sup>	127.26 <sup>a</sup>	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
Val-Glu	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	49.88 <sup>a</sup>	62.92 <sup>a</sup>	54.21 <sup>a</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Val-Leu	0.00 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	78.73 <sup>a</sup>	125.40 <sup>a</sup>	134.49 <sup>a</sup>	152.96 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	13.85 <sup>a</sup>	14.38 <sup>a</sup>	38.42 <sup>a</sup>	22.12 <sup>a</sup>
Val-Thr	0.00 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	14.22 <sup>a</sup>	16.48 <sup>a</sup>	27.12 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	13.34 <sup>a</sup>	18.40 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
Glu-Phe	1793.51 <sup>a</sup>	1218.64 <sup>a</sup>	324.53 <sup>a</sup>	310.67 <sup>a</sup>	244.05 <sup>a</sup>	123.37 <sup>a</sup>	1680.77 <sup>a</sup>	1404.97 <sup>a</sup>	431.74 <sup>a</sup>	91.08 <sup>a</sup>	72.22 <sup>a</sup>	58.49 <sup>a</sup>
Adenine	36.28 <sup>a</sup>	57.17 <sup>a</sup>	83.02 <sup>a</sup>	145.24 <sup>a</sup>	150.09 <sup>a</sup>	157.84 <sup>a</sup>	91.18 <sup>a</sup>	98.71 <sup>a</sup>	96.39 <sup>a</sup>	102.20 <sup>a</sup>	125.60 <sup>a</sup>	147.01 <sup>a</sup>
L-proline betaine	0.00 <sup>a</sup>	0.47 <sup>a</sup>	141.20 <sup>a</sup>	190.55 <sup>a</sup>	272.11 <sup>a</sup>	411.01 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	35.52 <sup>a</sup>	49.78 <sup>a</sup>	54.24 <sup>a</sup>	54.58 <sup>a</sup>
Daidzin	463.65 <sup>a</sup>	376.92 <sup>a</sup>	111.29 <sup>a</sup>	110.19 <sup>a</sup>	109.18 <sup>a</sup>	79.87 <sup>a</sup>	625.40 <sup>a</sup>	599.54 <sup>a</sup>	321.92 <sup>a</sup>	121.65 <sup>a</sup>	92.56 <sup>a</sup>	100.16 <sup>a</sup>
Glycitin	275.62 <sup>a</sup>	194.46 <sup>a</sup>	24.97 <sup>a</sup>	46.86 <sup>a</sup>	59.38 <sup>a</sup>	33.45 <sup>a</sup>	246.10 <sup>a</sup>	230.94 <sup>a</sup>	116.59 <sup>a</sup>	42.40 <sup>a</sup>	30.07 <sup>a</sup>	29.50 <sup>a</sup>
Genistin	310.73 <sup>a</sup>	244.14 <sup>a</sup>	143.41 <sup>a</sup>	116.12 <sup>a</sup>	113.04 <sup>a</sup>	96.92 <sup>a</sup>	611.38 <sup>a</sup>	583.28 <sup>a</sup>	334.56 <sup>a</sup>	194.59 <sup>a</sup>	185.11 <sup>a</sup>	179.07 <sup>a</sup>
Dihydrogenistin	15.59 <sup>a</sup>	6.02 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	16.75 <sup>a</sup>	17.21 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
Malonyldaidzin	648.67 <sup>a</sup>	548.45 <sup>a</sup>	204.59 <sup>a</sup>	105.67 <sup>a</sup>	58.30 <sup>a</sup>	80.90 <sup>a</sup>	136.91 <sup>a</sup>	172.20 <sup>a</sup>	221.72 <sup>a</sup>	120.50 <sup>a</sup>	42.03 <sup>a</sup>	27.83 <sup>a</sup>
Malonylgenistin	904.61 <sup>a</sup>	863.22 <sup>a</sup>	374.00 <sup>a</sup>	206.08 <sup>a</sup>	149.62 <sup>a</sup>	164.28 <sup>a</sup>	327.24 <sup>a</sup>	383.82 <sup>a</sup>	439.95 <sup>a</sup>	234.70 <sup>a</sup>	78.02 <sup>a</sup>	69.73 <sup>a</sup>
Acetyldaidzin	287.21 <sup>a</sup>	255.65 <sup>a</sup>	31.22 <sup>a</sup>	3.73 <sup>a</sup>	1.69 <sup>a</sup>	3.75 <sup>a</sup>	215.80 <sup>a</sup>	184.25 <sup>a</sup>	90.21 <sup>a</sup>	63.38 <sup>a</sup>	16.21 <sup>a</sup>	5.33 <sup>a</sup>
Acetylglystin	107.30 <sup>a</sup>	87.69 <sup>a</sup>	11.21 <sup>a</sup>	1.76 <sup>a</sup>	1.01 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	50.52 <sup>a</sup>	44.86 <sup>a</sup>	22.09 <sup>a</sup>	15.14 <sup>a</sup>	1.28 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>
Acetylgenistin	21.48 <sup>a</sup>	20.16 <sup>a</sup>	0.35 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	10.79 <sup>a</sup>	10.33 <sup>a</sup>	4.29 <sup>a</sup>	1.61 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>
Glycitein	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	29.35 <sup>a</sup>	35.77 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.64 <sup>a</sup>	15.12 <sup>a</sup>	11.75 <sup>a</sup>
Daidzein	78.71 <sup>a</sup>	81.43 <sup>a</sup>	501.42 <sup>a</sup>	642.06 <sup>a</sup>	1081.41 <sup>a</sup>	987.36 <sup>a</sup>	291.46 <sup>a</sup>	304.27 <sup>a</sup>	880.96 <sup>a</sup>	1296.86 <sup>a</sup>	1748.40 <sup>a</sup>	1836.98 <sup>a</sup>
Genistein	0.08 <sup>a</sup>	5.06 <sup>a</sup>	12.43 <sup>a</sup>	14.92 <sup>a</sup>	24.45 <sup>a</sup>	27.66 <sup>a</sup>	3.72 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	3.90 <sup>a</sup>	17.08 <sup>a</sup>	11.84 <sup>a</sup>	29.93 <sup>a</sup>
BsoyasaponinEb	4135.98 <sup>a</sup>	3810.75 <sup>a</sup>	3801.16 <sup>a</sup>	3613.29 <sup>a</sup>	3629.60 <sup>a</sup>	3650.27 <sup>a</sup>	4361.62 <sup>a</sup>	4266.40 <sup>a</sup>	4063.93 <sup>a</sup>	3986.99 <sup>a</sup>	3765.83 <sup>a</sup>	3690.22 <sup>a</sup>
BsoyasaponinBc	692.93 <sup>a</sup>	689.01 <sup>a</sup>	684.32 <sup>a</sup>	726.64 <sup>a</sup>	713.96 <sup>a</sup>	737.88 <sup>a</sup>	774.18 <sup>a</sup>	745.68 <sup>a</sup>	759.10 <sup>a</sup>	720.83 <sup>a</sup>	673.63 <sup>a</sup>	672.06 <sup>a</sup>
BsoyasaponinEb'	21.34 <sup>a</sup>	39.73 <sup>a</sup>	40.51 <sup>a</sup>	33.64 <sup>a</sup>	47.27 <sup>a</sup>	40.02 <sup>a</sup>	43.04 <sup>a</sup>	30.21 <sup>a</sup>	45.94 <sup>a</sup>	39.30 <sup>a</sup>	52.93 <sup>a</sup>	53.03 <sup>a</sup>
BsoyasaponinBc'	351.00 <sup>a</sup>	314.72 <sup>a</sup>	332.36 <sup>a</sup>	186.85 <sup>a</sup>	60.98 <sup>a</sup>	102.75 <sup>a</sup>	371.19 <sup>a</sup>	372.11 <sup>a</sup>	380.48 <sup>a</sup>	316.63 <sup>a</sup>	310.37 <sup>a</sup>	409.31 <sup>a</sup>
BsoyasaponinBa	1531.40 <sup>a</sup>	1489.02 <sup>a</sup>	1474.64 <sup>a</sup>	1444.50 <sup>a</sup>	1335.56 <sup>a</sup>	1492.45 <sup>a</sup>	1449.62 <sup>a</sup>	1447.92 <sup>a</sup>	1399.21 <sup>a</sup>	1343.89 <sup>a</sup>	1604.55 <sup>a</sup>	1660.64 <sup>a</sup>
EsoyasaponinBd	226.32 <sup>a</sup>	228.06 <sup>a</sup>	216.05 <sup>a</sup>	181.92 <sup>a</sup>	156.12 <sup>a</sup>	150.23 <sup>a</sup>	205.27 <sup>a</sup>	173.88 <sup>a</sup>	174.19 <sup>a</sup>	156.26 <sup>a</sup>	143.10 <sup>a</sup>	137.15 <sup>a</sup>
EsoyasaponinBe	17.40 <sup>a</sup>	50.92 <sup>a</sup>	97.01 <sup>a</sup>	361.75 <sup>a</sup>	321.71 <sup>a</sup>	633.39 <sup>a</sup>	83.20 <sup>a</sup>	86.56 <sup>a</sup>	108.95 <sup>a</sup>	121.41 <sup>a</sup>	133.28 <sup>a</sup>	266.28 <sup>a</sup>
DDMPsoyasaponinog	942.18 <sup>a</sup>	818.83 <sup>a</sup>	546.88 <sup>a</sup>	79.53 <sup>a</sup>	18.39 <sup>a</sup>	30.73 <sup>a</sup>	81.07 <sup>a</sup>	80.63 <sup>a</sup>	85.41 <sup>a</sup>	55.19 <sup>a</sup>	28.65 <sup>a</sup>	4.88 <sup>a</sup>
DDMPsoyasaponinβa	562.56 <sup>a</sup>	679.25 <sup>a</sup>	427.82 <sup>a</sup>	158.91 <sup>a</sup>	38.98 <sup>a</sup>	26.41 <sup>a</sup>	152.49 <sup>a</sup>	157.11 <sup>a</sup>	380.35 <sup>a</sup>	171.35 <sup>a</sup>	66.32 <sup>a</sup>	27.07 <sup>a</sup>
DDMPsoyasaponinβg	3176.21 <sup>a</sup>	2838.58 <sup>a</sup>	2549.21 <sup>a</sup>	1221.03 <sup>a</sup>	292.81 <sup>a</sup>	208.65 <sup>a</sup>	1226.84 <sup>a</sup>	1425.58 <sup>a</sup>	1829.55 <sup>a</sup>	1392.57 <sup>a</sup>	618.03 <sup>a</sup>	108.81 <sup>a</sup>
DDMPsoyasaponinγa	51.84 <sup>a</sup>	78.57 <sup>a</sup>	40.34 <sup>a</sup>	20.29 <sup>a</sup>	7.73 <sup>a</sup>	3.54 <sup>a</sup>	11.26 <sup>a</sup>	15.97 <sup>a</sup>	22.92 <sup>a</sup>	22.25 <sup>a</sup>	13.64 <sup>a</sup>	0.62 <sup>a</sup>
DDMPsoyasaponinγg	154.64 <sup>a</sup>	154.70 <sup>a</sup>	100.09 <sup>a</sup>	45.80 <sup>a</sup>	11.64 <sup>a</sup>	6.09 <sup>a</sup>	27.79 <sup>a</sup>	41.59 <sup>a</sup>	63.37 <sup>a</sup>	34.88 <sup>a</sup>	20.03 <sup>a</sup>	1.62 <sup>a</sup>
LPC(16:1)	0.39 <sup>a</sup>	75.89 <sup>a</sup>	53.33 <sup>a</sup>	17.82 <sup>a</sup>	81.88 <sup>a</sup>	35.07 <sup>a</sup>	13.95 <sup>a</sup>	13.31 <sup>a</sup>	3.85 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
LPC(18:0)	1.64 <sup>a</sup>	5.39 <sup>a</sup>	12.73 <sup>a</sup>	5.61 <sup>a</sup>	4.27 <sup>a</sup>	17.97 <sup>a</sup>	9.11 <sup>a</sup>	13.52 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>
LPC(18:2)	713.43 <sup>a</sup>	5172.65 <sup>a</sup>	4986.78 <sup>a</sup>	1167.98 <sup>a</sup>	5234.83 <sup>a</sup>	3641.05 <sup>a</sup>	2307.75 <sup>a</sup>	2324.66 <sup>a</sup>	154.90 <sup>a</sup>	9.48 <sup>a</sup>	1.76 <sup>a</sup>	10.58 <sup>a</sup>
LPC(18:3)	123.89 <sup>a</sup>	1988.42 <sup>a</sup>	1792.69 <sup>a</sup>	479.13 <sup>a</sup>	2508.48 <sup>a</sup>	1223.25 <sup>a</sup>	532.54 <sup>a</sup>	574.47 <sup>a</sup>	222.87 <sup>a</sup>	4.61 <sup>a</sup>	0.84 <sup>a</sup>	3.71 <sup>a</sup>
LPC(20:4)	10.38 <sup>a</sup>	47.34 <sup>a</sup>	32.42 <sup>a</sup>	16.27 <sup>a</sup>	16.70 <sup>a</sup>	9.51 <sup>a</sup>	28.61 <sup>a</sup>	15.24 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
PCs	465.76 <sup>a</sup>	63.26 <sup>a</sup>	78.45 <sup>a</sup>	42.34 <sup>a</sup>	52.29 <sup>a</sup>	96.04 <sup>a</sup>	48.40 <sup>a</sup>	23.47 <sup>a</sup>	181.73 <sup>a</sup>	338.76 <sup>a</sup>	292.09 <sup>a</sup>	229.19 <sup>a</sup>

## 다. 표준제조된 청국장의 발효대사체 분석

고추장 발효시간 (0, 1, 3, 5 개월)에 따른 색소 대사체 변화를 HPLC로 관찰하였다. Capsanthine인 경우 고추에는 산화가 되지않은 정상상태로 존재하다가 고춧가루 상태로 보관 되는 과정에 산화되는 것으로 확인되었다. 발효시간별 고추장 색소를 HPLC로 분석 후 PLS-DA로 분석한 결과 그림 15에서 보는 바와 같이 1개월에서 3개월 사이에 주요 발효는 다 일어나고 3개월 이상에서는 큰 차이가 없는 것으로 관찰되었다. 발효에 따른 주요물질들은 zeaxanthine, cryptoxanthine, lycopene,  $\beta$ -carotene, oxidized capsanthines 으로 동정되었으며 lycopene과  $\beta$ -carotene 함량은 발효가 진행되면서 감소하는 반면 zeaxanthine, cryptoxanthine, oxidized capsanthines 함량은 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 보였다 (그림 16). 이들 물질의 변화는 고추장의 품질과 직접적으로 연관성이 있는 것으로 사료되며 이들 물질들이 고추장의 quality control에 사용될 수 있는 지표물질로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

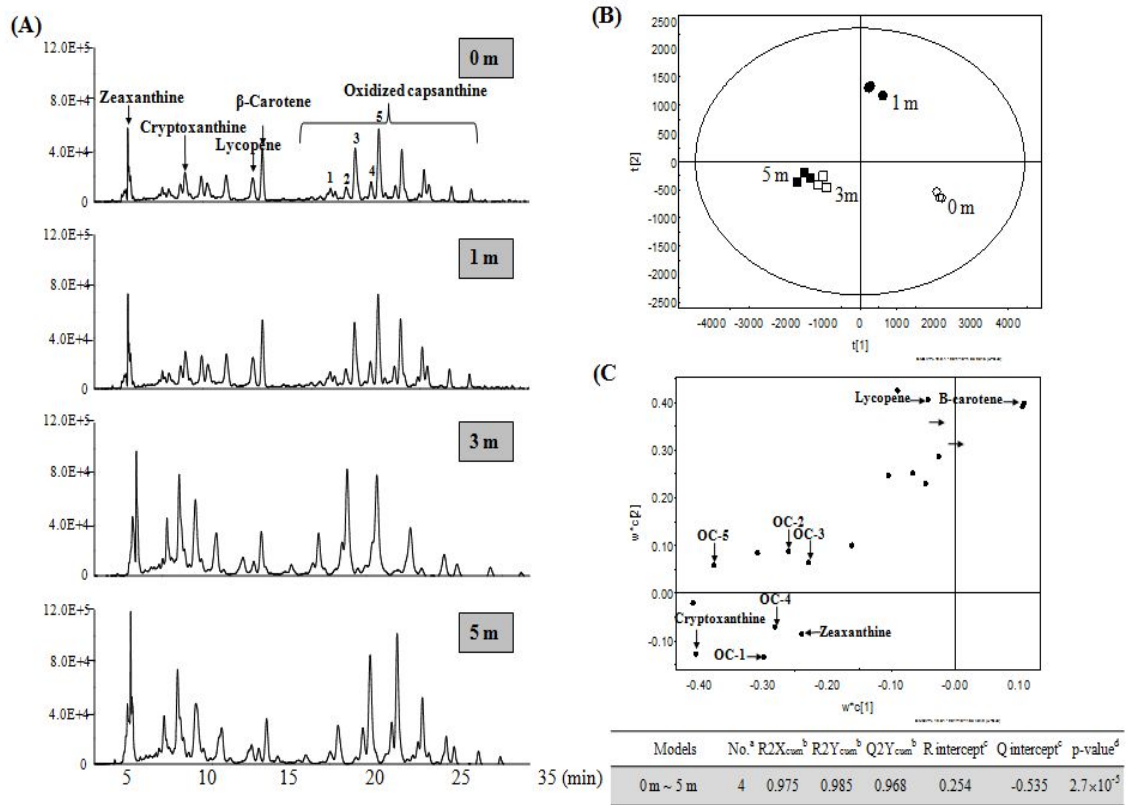


그림 15. 고추장 색소 대사체 분석

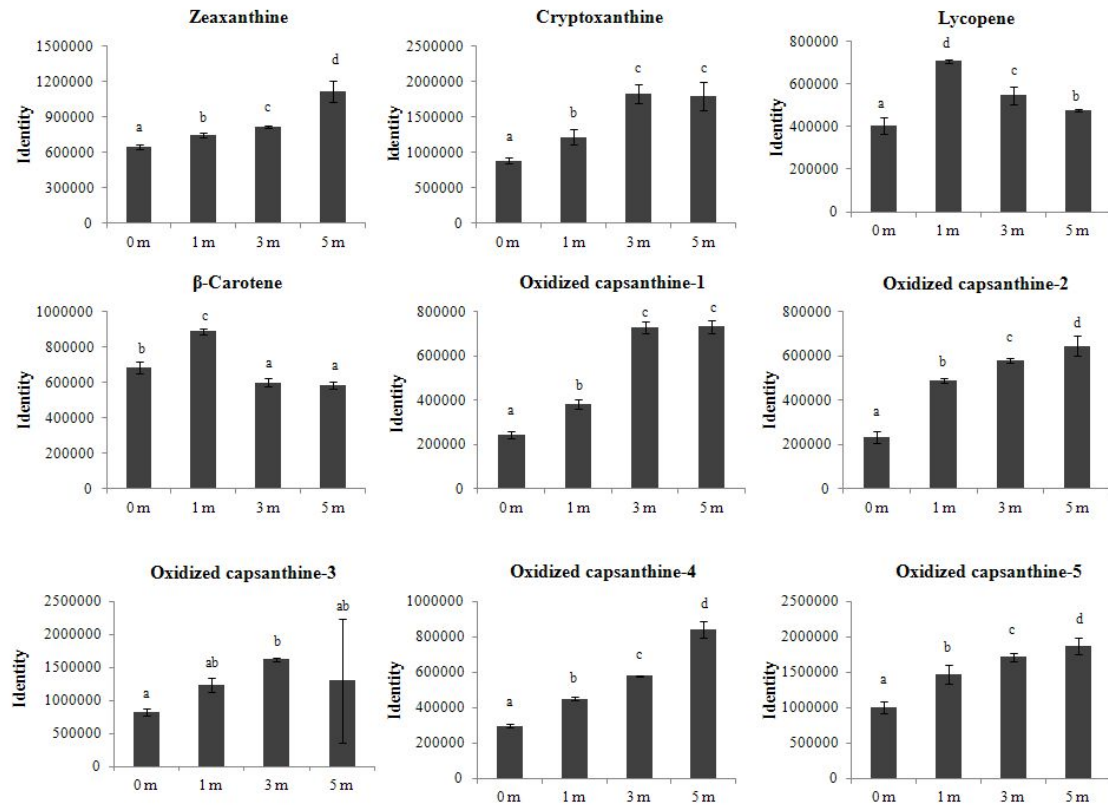


그림 16. 주요 고추장 색소 대사체들의 정량 분석

## 2. 전통발효식품의 기능성 연구

### 가. 청국장의 비만 예방 효능 분석

#### (1) 청국장의 지방세포분화 억제 효능 평가

48시간 발효된 청국장을 메탄올(67청국장 MeOH) 또는 물 (67청국장 Water)로 추출하여 아미노산 rich fraction과 Isoflavone rich fraction으로 분류한 후 각각의 항 비만 효능을 검증하기 위하여 3T3-L1세포를 이용하였는데, 세포에 지방분화 유도 cocktail (Induction) 과 각각의 추출물 또는 positive control인 luteolin을 각각 동시에 처리한 후 지방의 생성정도를 Oil-red O염색법을 이용하여 측정하였다. 그림 17에서 보는 바와 지방의 분화는 지방분화 유도 cocktail (Induction)에 의해 유도되었고 각각의 추출물은 지방의 생성을 억제하지 못하는 것으로 나타났다. 이때 luteolin은 지방억제의 positive control로 사용하였다.



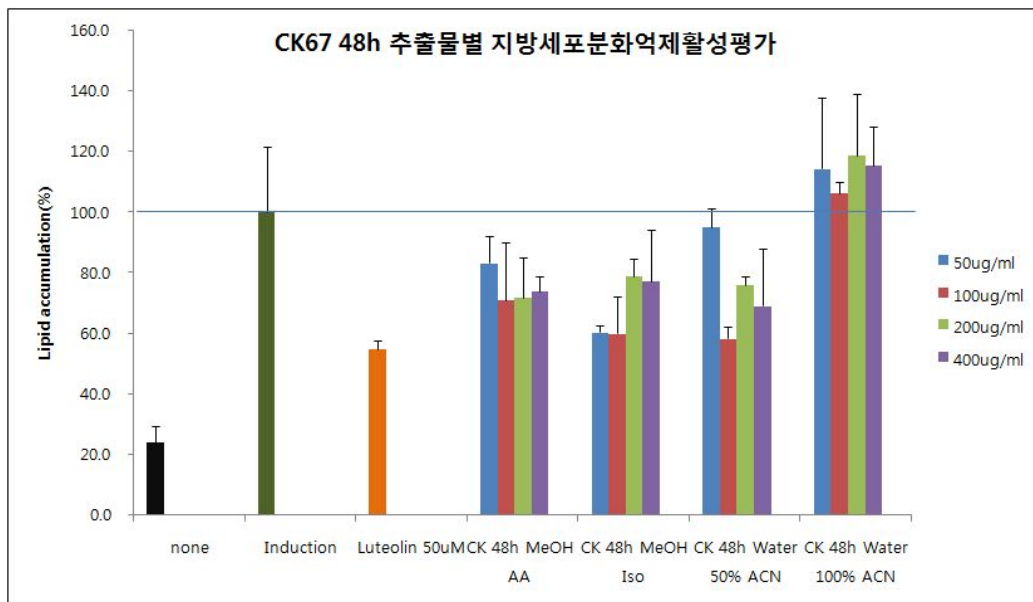
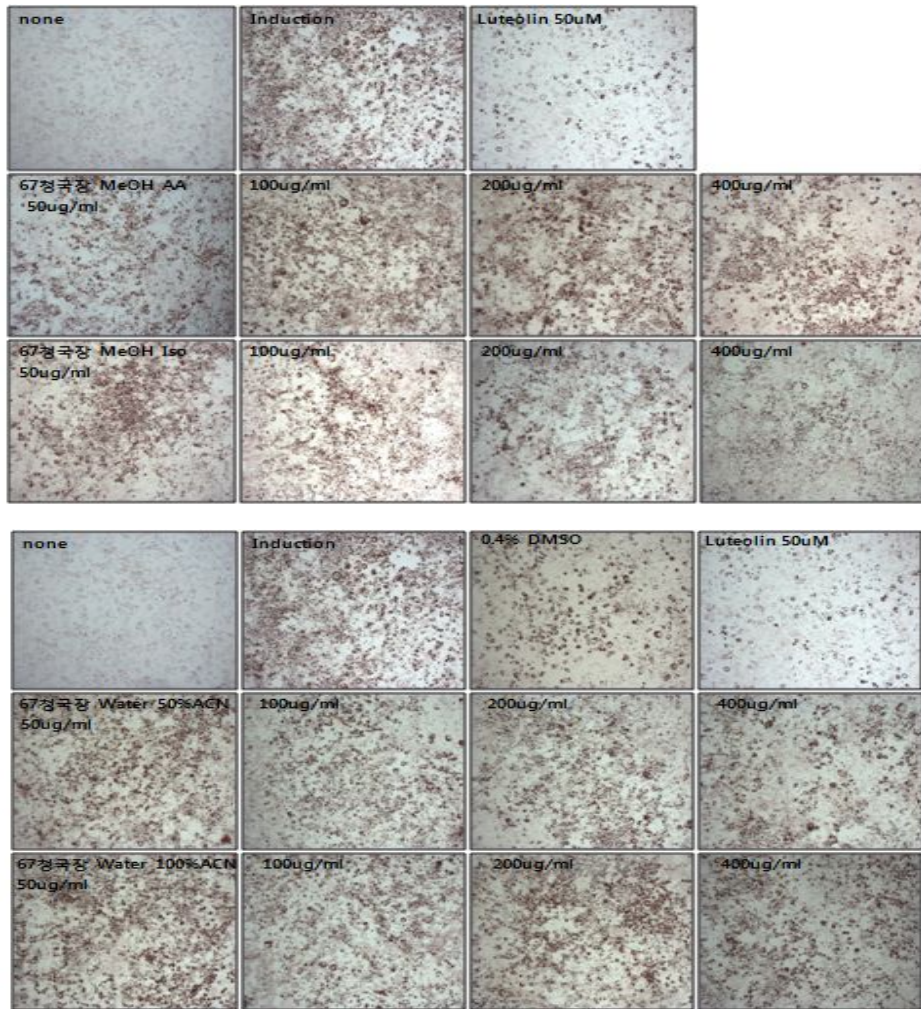


그림 17. 청국장 추출물의 지방세포 분화 억제 효능 평가

다음으로 항 당뇨 효능을 검증하기 위해 먼저 항 당뇨의 타겟인 PPAR감마의 전사활성을 측정하였는데 HEK293세포를 사용하여 PPAR관련 gene들을 transfection한 후 luciferase assay를 실시하였다. 그림 18에서 보는 바와 같이 청국장의 Isoflavone rich fraction에서 유의하게 전사활성을 증가시키는 것으로 관찰되었다. 그러나 그 외의 군에서는 증가 시키지 못하는 것을 알 수 있었다. 이로서 청국장이 PPAR감마의 전사활성을 증가시키며 이는 Isoflavone의 영향으로 가능할 수 있었고 또한 PPAR감마가 항 당뇨의 타겟이기 때문에 혈당 흡수능을 증가시킬 가능성이 있음을 알 수 있었다. 로지글리타존(Rosi)은 PPAR감마의 positive control로 사용하였다. 이로서 향후 청국장을 활용한 항 당뇨 소재의 개발이 가능할 수 있음을 알 수 있었다.

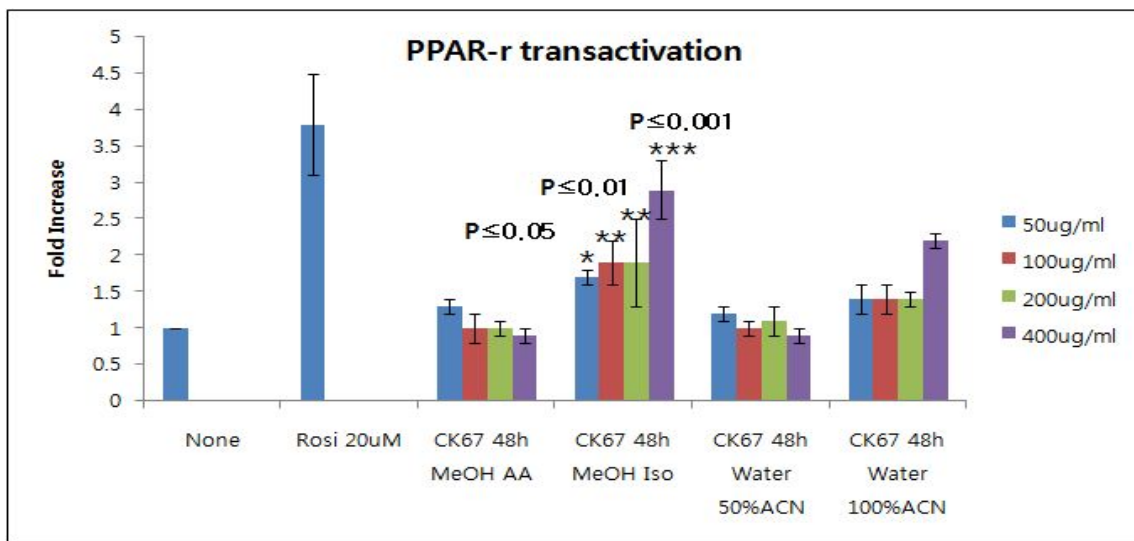


그림 18. 청국장의 HEK293세포에서의 PPAR감마전사 활성 능력 평가

청국장의 주요성분인 PGA의 항 당뇨 효능 가능성을 타진하기 위해 항 당뇨의 대표적 바이오 마커인 AMPK 및 Akt의 활성을 웨스턴 블롯팅법을 이용하여 측정하였다. Akt는 인슐린 신호전달의 중심 단백질로서 인슐린 감수성 개선을 증가시켜 궁극적으로 항 당뇨 효능을 나타내고 항 당뇨병약물인 로지글리타존의 타겟이 된다. AMPK도 항 당뇨의 또 다른 타겟으로 임상에서 쓰이는 항 당뇨 약물인 메트포민에 의해 활성화 된다고 잘 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 AMPK또는 Akt의 인산화 정도를 평가하여 항 당뇨 효능을 예측할 수 있다. 근육세포를 사용하여 PGA를 각각의 농도별로 처리하고 3시간 후 각 단백질의 인산화를 측정하였다. 그림 18에서 보는 바와 같이 PGA는 None에 비해 3시간 쯤 AMPK와 그의 direct한 substrate인 ACC의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 하지만 Akt의 인산화에는 영향을 끼치지 못하는 것으로 나타났다. 이로서 PGA는 AMPK를 선택적으로 증가 시키는 것을 알 수 있었고 이는 항 당뇨의 효능이 있을 것으로 예측할 수 있었다.

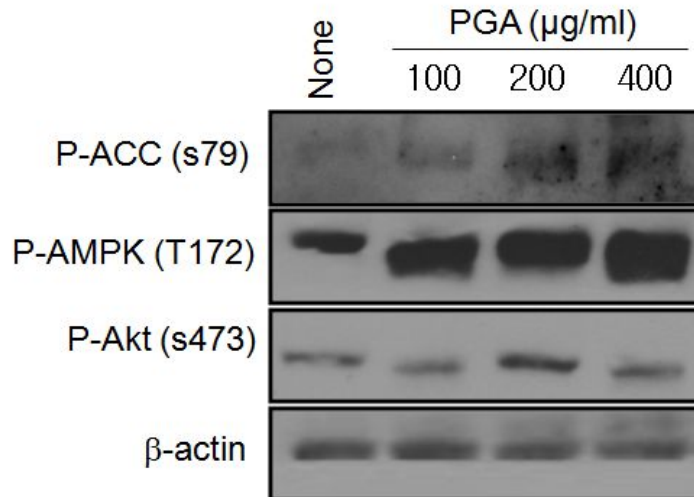


그림 19. 추출물의 근육세포에서의 인슐린신호전달 단백질활성 평가

#### 나. 청국장의 염증 예방 효능 분석

##### (1) 메주 추출물의 염증조절 관련 기능 연구

6일간 발효된 표준제조 메주의 염증조절 및 기전을 확인하기 위하여 발효시간이 다른 메주 메탄올 추출물을 처리하여 NO생성 및 cytokine의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과는 **그림 20**과 같다. LPS를 처리하여 염증을 유도한 후 대식세포에 메주 추출물을 처리한 결과 NO 생성이 농도 의존적으로 급격히 감소하지만 발효시간에 따른 효과는 없는 것으로 확인되었다. 또한 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-6, MCP-1 모든 처리 농도 의존적으로 감소하였으며 고농도에서 발효시간의 길어짐에 따라 cytokine의 억제효능도 증가하는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 보아 표준제조 메주는 NO생성, TNF-α, IL-6, MCP-1d의 발현의 억제를 통해 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

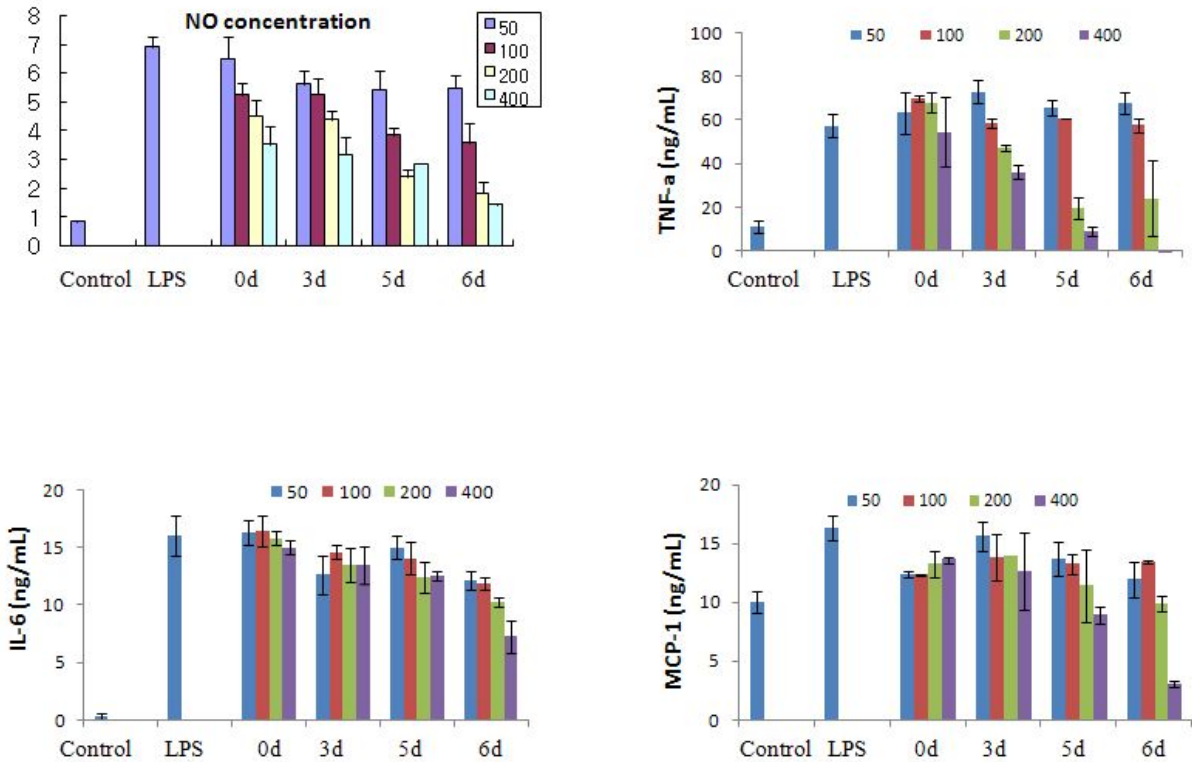


그림 20. 표준제조 메주의 NO 생성 및 cytokine의 발현에 미치는 효과

(2) 동물모델을 통한 메주의 항염증 활성 규명

- 메주의 항염증 활성을 동물실험상에서 확인하기 위하여 대장염 동물모델을 구축하여 실험을 수행하였다. C57/BL6 쥐에 정상군 (con), 대조군 (dss), 삶은 콩 5, 10 % (ss5, ss10), 삶은 콩 + 바실러스 균 5, 10 % (ssb5, ssb10), 표준제조 메주 1, 5, 10 % (mj1, mj5, 그리고 mj10), 전통제조 메주 1, 5, 10 % (kmj1, kmj5, 그리고 kmj10)으로 군을 나누어 각각의 사료를 2 주 동안 미리 먹이 하였다. 이후에는 각 시료를 먹이하면서 동시에 2.5 % DSS (dextran sodium sulfate)를 식수를 통해 일주일 동안 급수한 뒤, 일반 식수로 교환하여 3 일간 급수하였다. 최종일에 쥐 무게를 측정 한 뒤에 희생하여 장 길이를 측정하고 혈액과 대장을 분리하여 생화학 지표를 측정하였다 (그림 21).

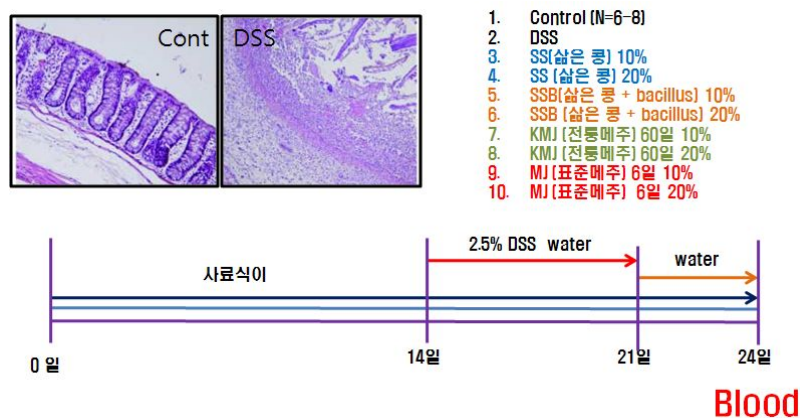


그림 21. 메주의 대장염 예방활성 규명을 위한 실험 설계 도안

그림 22에서 보는 바와 같이 DSS 군에서는 체중감소, 대장의 길이가 감소하여 장염이 잘 유발되었음을 알 수 있다. 그러나 전통제조 메주, 표준제조 메주, 삶은 콩, 그리고 바실러스 균의 식이의 처리는 DSS에 의한 몸무게 감소와 대장 길이의 축소에 대한 예방효과를 나타내지 않았다. 그러나 대장 길이/체중의 비율에 있어서 DSS에서 감소한 대장 길이/체중 비율이 표준제조 메주를 먹인 그룹에서는 증가하여 장염 예방 활성이 있을 것으로 기대할 수 있으나 유의성은 나타나지 않았다. 또한 혈중 염증성 싸이토카인 (inflammatory cytokine) 농도를 측정한 결과 표준제조 메주는 DSS에 의해 증가한 종양괴사인자 알파 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF $\alpha$ )를 감소시켰으나 유의성은 나타나지 않았다 (그림 23). 상기 결과를 통해서 표준제조 메주는 장염 예방 활성을 나타낼 가능성을 제시할 수 있으나 유의성 있는 결과를 도출하기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 사료한다.

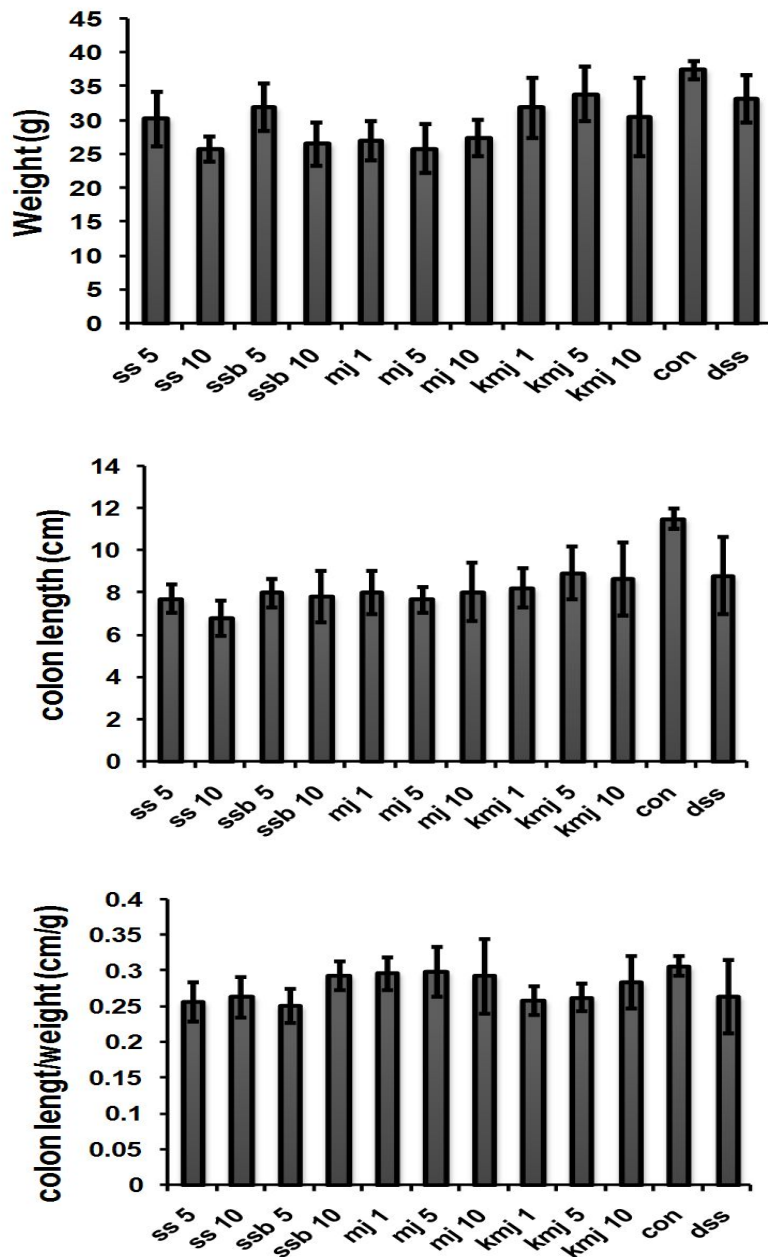


그림 22. 메주, 삶은 콩, 바실러스 균이 장염 유발 쥐의 무게와 장 길이에 미치는 영향

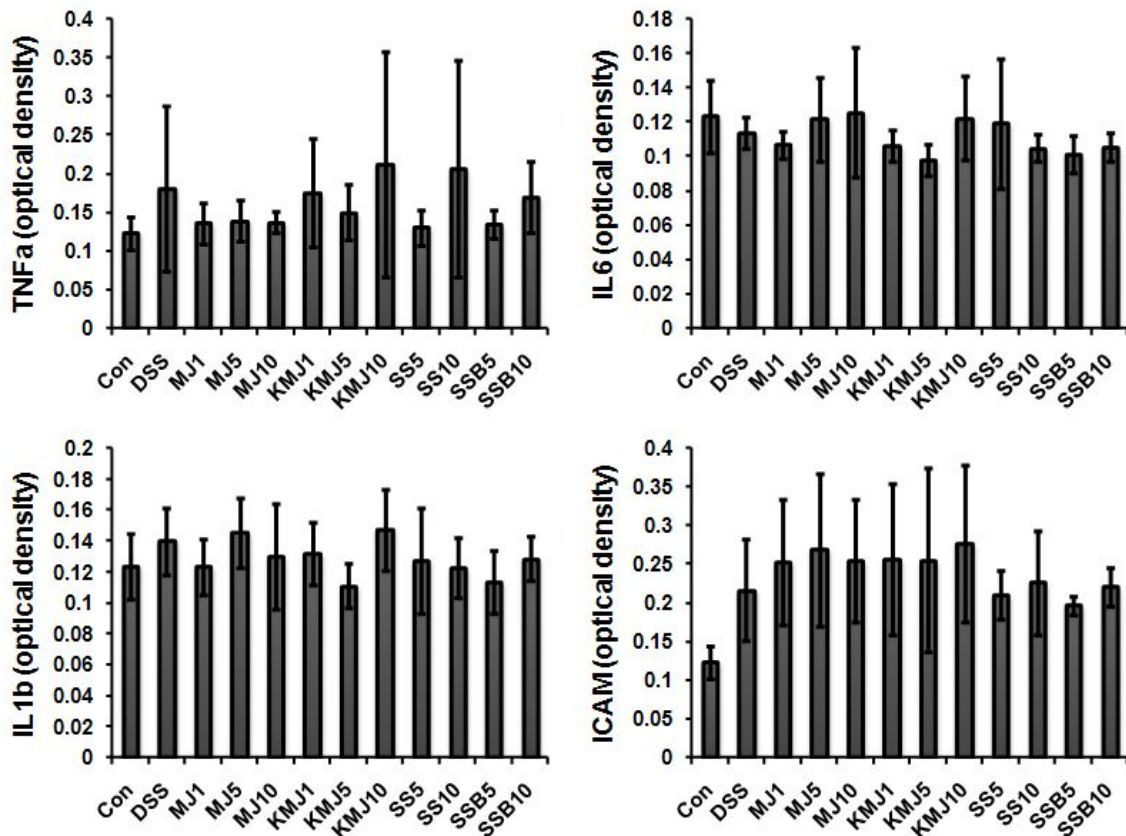


그림 23. 메주, 삶은 콩, 바실러스 균이 장염 유발 쥐의 혈중 염증성 사이토카인 농도에 미치는 영향

(3) 동물모델을 통한 청국장의 항염증 활성 규명

- 타과제 “바이오식품 발효대사체 연구 및 통합정보 시스템구축에 관한 연구”의 연구에서 청국장의 메탄올 추출물을 이용한 세포실험에서 LPS에 의해 증가한 NO 생성, 및 iNOS, Cox-2의 발현이 억제된다는 결과를 얻었다. 이를 바탕으로 본 연구에서는 67번 균주를 이용한 청국장 48시간 발효시킨 것이 가장 우수한 효능을 나타냈으며, 또한 BA균주를 이용해 만든 청국장의 물 추출물에서 분리해서 얻은 단일 물질인 PGA (polyglutamic acid)도 동물실험의 시료로 이용하였다.

- DSS (dextran sodium sulfate)를 마우스에 식수로 마시게 하여 장염증을 유발하였다. 이를 위해 c57BL/6 mouse를 control, DSS, DSS +PGA, DSS +67의 4그룹으로 나누고 DSS를 먹이기 3일전부터 PGA와 67번 균주 200mg/kg을 제조하여 경구투여하고 희생시키는 skfRK지 매일 투여하였다. 그런후 DSS을 물에 타서 일주일간 먹인 후 물로 다시 물을준 후 7일 후에 혈액을 채취하고 장길이를 측정하였다.

-염증모델이 잘 만들어 졌는지 보기 위해 장길이를 측정하였다. 그결과 DSS에 의해 짧아진 장길이는 PGA와 67번 균주를 먹인 그룹에서 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

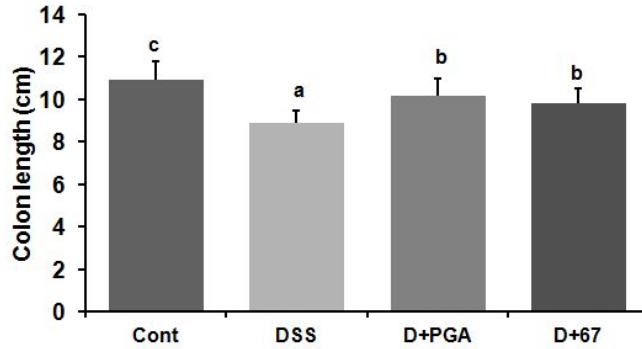


그림 24. 메주, 삶은 콩, 바실러스 균이 장염 유발 쥐의 혈중 염증성 사이토카인 농도에 미치는 영향

- DSS에 의해 유발된 장염증모델에서 혈액내의 염증물질인 cytokine의 발현에 청국장 추출물이 영향을 미쳤는지 ELISA를 통해 측정하였다. 그 결과 DSS에 의해 TNF-a, IL-6, 그리고 MCP-1의 발현은 증가하였다. 그러나 PGA를 같이 투여한 군에서는 TNF-a, IL-6, 그리고 MCP-1의 발현이 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 67번 균주도 이러한 cytokine의 발현이 감소하는 경향을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다.

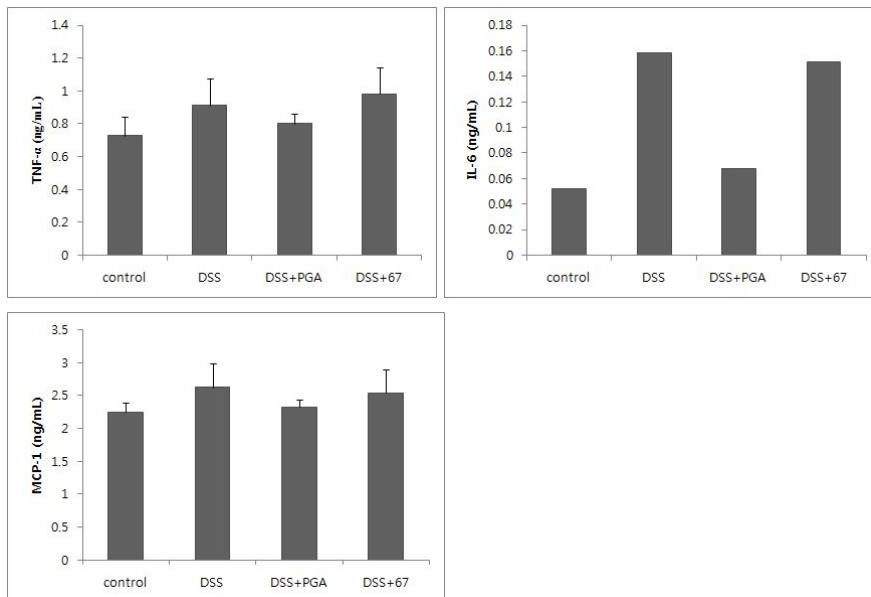
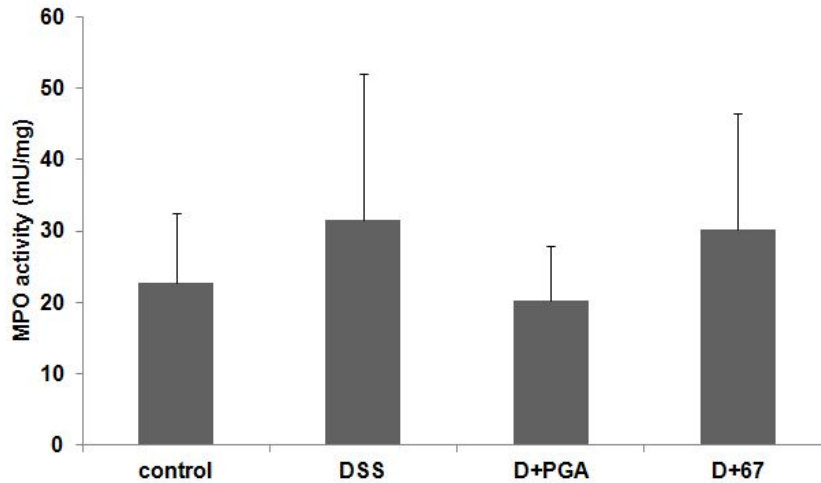


그림 25. 메주, 삶은 콩, 바실러스 균이 장염 유발 쥐의 혈중 염증성 사이토카인 농도에 미치는 영향

- 또한 염증에 의해 유발된 neutrophil infiltration을 보기 위해 MPO (myeloperoxidase) activity를 측정하였다. 그 결과 DSS에 의해 증가한 neutrophil infiltration은 PGA에 의해 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 67번 균주를 먹인 그룹에서도 감소하는 경향을 나타내는 것을 관찰하였다.



**그림 26.** 메주, 삶은 콩, 바실러스 균이 장염 유발 쥐의 혈중 염증성 사이토카인 농도에 미치는 영향

-이상의 결과를 종합해 보면, DSS에 의해 유발된 장손상은 청국장에서 분리한 단일물질인 PGA에 의해 보호되는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 PGA는 장염증모델에서 항염증효과가 있다고 사료된다.

#### 다. 메주와 청국장의 신경세포 보호효능 연구

##### (1) 메주 추출물의 뇌허혈에 의한 세포사멸 억제 효능

메주 추출물의 분획 A, B, C (**그림 27**)에 대하여 뇌허혈에 의한 세포사멸 억제효과를 확인하였다. 음성대조군의 경우 해마의 모든 영역에서 cresyl violet에 염색된 세포를 확인할 수 있었다. 한편 용매인 증류수를 투여한 다음 수술을 진행한 군에서는 해마의 CA2, CA3 영역에서는 음성대조군과 비슷한 cresyl violet 염색 결과를 나타냈으나, CA1영역에서는 cresyl violet에 염색된 세포가 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있어, 세포사가 유발되었음을 확인할 수 있었다. 메주 분획A의 경우 투여 1일 후 모든 동물에 폐사하였다. 메주 분획B(TMF B)의 경우 1마리의 폐사가 있었으나, CA1 영역에서 약 50% 가량의 신경세포 보호효과를 관찰할 수 있었다. 메주 분획C (TMF C)의 경우는 투여 시 동물의 폐사는 없었으나 약 20% 미만의 신경세포가 생존하거나 신경세포 보호효과가 거의 없는 것을 확인할 수 있었다 (**그림 28**).



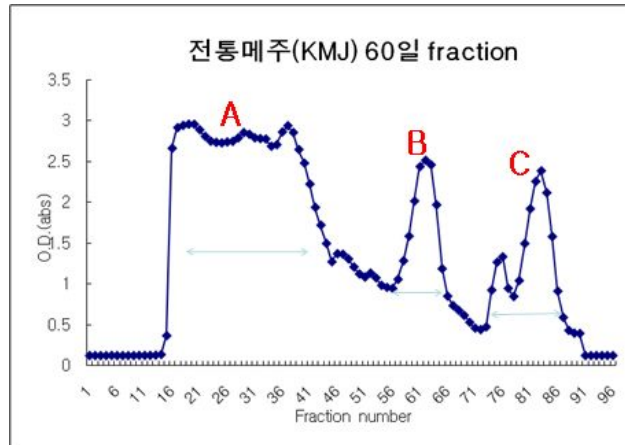


그림 27. P-2 column를 이용한 메주추출물의 분획

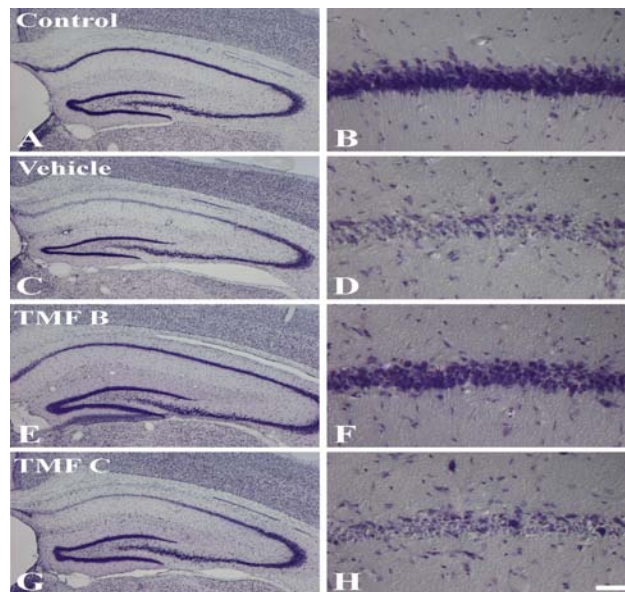


그림 28. Microphotographs of the hippocampus stained with cresyl violet in control(A and B), vehicle-treated (C and D), 50 mg/kg the Korea Meju fraction B (TMF B) treated (E and F) and 50 mg/kg the Tradition Meju fraction C (TMF C) treated (G and H) group 4 days after ischemia/reperfusion. In the vehicle-treated group (C and D), a few neurons are stained with cresyl violet of the CA1 region. In TMFB treated groups, abundant cresyl violet positive neurons are detected in the hippocampal 1CA1 region. Bar = 800  $\mu\text{m}$  (A, C, E and G), 50  $\mu\text{m}$  (B, D, F and H).

## (2) 청국장 추출물의 뇌허혈에 의한 세포사멸 억제 효능

### (가) Cresyl violet staining

전통장류로부터 추출한 물질인 CK67, KMJ60, MJ6에 대한 뇌허혈에 의한 신경세포사멸에서 효능을 확인하기 위하여 신경세포의 Nissle에 특이적으로 반응하는 Cresyl violet 염색을 통하여 해마 및 해마 CA1 영역을 확인한 결과 정상군에서는 해마 모든 영역에서 cresyl violet에 염색된 세포를 확인할 수 있었으며, CA1 영역에서도 피라밋층에 cresyl violet에 염색된 피라밋세포를 다수 관찰할 수 있었다. 한편 용매인 증류수를 투여한 다음 수술을 진행한 군에서는 해마의 CA2, CA3 영역에서는 음성대조군과 비슷한 cresyl violet 염색 결과를 나타냈으나, CA1영역에서는 cresyl violet에 염색된 세포가 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있어, 세포사가 유발되었음을 확인할 수 있었다. CK67, KMJ60, MJ6 추출물을 투여한 군에서는 CK67 투여한 군의 CA1 영역에서 cresyl violet에 염색된 세포는 정상군대비 약 50% , KMJ60 투여군에서는 약 25%, MJ6 투여군에서는 약 30%의 신경세포가 생존하였음을 확인하였다.

### (나) NeuN immunohistochemistry

정상군의 해마 CA1 영역에서 NeuN 면역반응세포는 다수관찰되었으며, 용매투여 후 뇌허혈 유발군에서는 지연성 신경세포사멸로 인하여 NeuN 면역반응세포가 감소하여 정상군대비 약 9.5% 가량 생존하였음을 확인하였다. CK67, KMJ60, MJ6 추출물을 투여한 군에는 각각 정상군대비 CK67투여군에서 78%, KMJ60 투여군에서 약 14%, MJ6 투여군에서 30% 가량 확인되었다.

### (다) Fluoro-Jade C staining

정상군의 해마 CA1영역에서 Fluoro-Jade B에 염색된 세포를 관찰할 수 없었다. 한편 용매를 투여한 후에 뇌허혈을 유발한 군에서는 CA1 영역에서 다수의 신경세포가 Fluoro-Jade C에 염색되는 것을 확인할 수 있었다. CK67, KMJ60, MJ6 추출물을 투여한 군에는 각각 CA1 영역에서 용매투여군 대비 Fluoro-Jade C 염색 신경세포의 수가 CK67 투여군에서 49%, KMJ60 투여군에서 30%, MJ6 투여군에서는 35% 씩 각각 감소하였다.

따라서 KMJ60, MJ6 추출물 투여군에서는 뇌허혈에 의한신경세포 보호효과가 거의 없음이 확인되었으며, CK67 추출물 투여군에서는 다소 뇌허혈에 의한 신경세포 보호효과가 있음을 확인할 수 있었다 (그림 28).

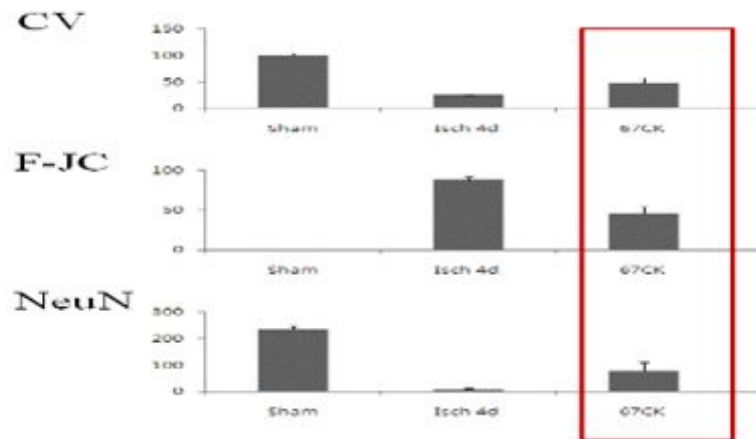
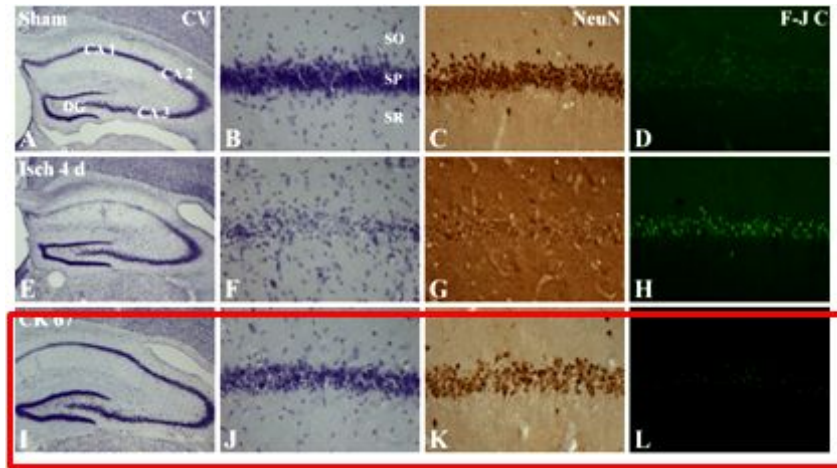


그림 29. 표준제조 청국장, 전통메주, 표준제조 메주 추출물의 신경세포 보호효과

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

전통 방식으로 발효 제조된 청국장, 된장, 고추장의 발효시간에 따른 발효대사체의 연구를 수행함으로써 발효대사체 연구 기반기술을 확립함으로써 다른 발효식품에 쉽게 적용할 수 있음

발효식품의 건강 기능성 (항염증, 항비만 등)에 대한 과학적 정보를 제공함

전 세계적으로 각광을 받고 있는 콩 관련 발효식품인 청국장, 된장, 고추장의 국내외 규격 제시를 위한 자료를 정립하고 이들의 국제적인 인지도 개선에 기여함.

발효대사체 및 소재에 대한 database을 구축함으로써 관련 인프라를 구축함

지금까지 연구결과들은 국제 학회지에 수록함으로써 우리나라 전통 발효식품의 이름과 우수성을 세계에 알릴 수 있음.

### 2절 목표 달성도

#### (1) 연구개발의 최종목표

발효과정 중 대사체들의 변화를 연구하여 우리나라 발효식품관련 발효대사체 정보를 축적함으로써 발효식품의 제조 표준화의 기반을 마련하고자 하며 우리나라 발효식품의 기능성을 확인함으로써 우리나라 전통발효식품이 세계적 식품으로 발전할 수 있는 기반을 마련하고자 함.

(2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	전통메주의 발효대사체 연구	- 발효과정 중의 peptidome, lipidome 프로파일링 분석 - 선발된 단일품종의 콩 (백태, 대원) 과 선발된 우수균주를 이용하여 메주 (Aspergillus oryzae, Bacillus subtilis)와 청국장 (Bacillus amyloliquefaciens ch86-1, Bacillus subtilis ch3-5) 제조.
	메주와 청국장의 표준 제조	- 완제품의 primary, secondary metabolites 분석
	뇌혈관 혈액순환 장애에 의한 뇌질환 예방 효능 탐색	- 발효 식품 추출물의 뇌혈관 혈액 순환 장애에 의한 뇌질환 효능 평가를 위한 system 구축 - 청국장 추출물의 생체 안전성 확인 - 혈액순환 장애에 의한 뇌질환에서 효능을 보이는 청국장 추출물의 효능확인
	청국장 추출물의 건강 기능성 물질 분리 동정	- 항염증, 항당뇨, 항비만, 뇌세포보호능에 관련된 기능성 물질 분리 동정
2차년도	청국장기능성물질의 대량 분리 및 시료 제공	- 항염증, 항당뇨, 항비만, 뇌세포보호능에 관련된 기능성 물질 대량 분리 및 시료 제공
	메주 추출물의 건강 기능성물질 분리 동정	- 항염증, 항당뇨, 항비만, 뇌세포보호능에 관련된 기능성 물질 분리 동정
	청국장에서부터 분리한 단일 생리활성 물질의 혈액순환관련 뇌질환에서 효능, 효능 용량 검증 및 기전 확인	- 1차년도에 확보한 청국장 추출물을 보다 구체적인 분획화를 통한 단일 생리활성 물질 확보 - 혈액순환 장애에 의한 뇌질환에서 효능을 보이는 분획물 효능 평가 - 혈액순환 장애에 의한 뇌질환에서 용량별 효능 평가를 통한 유효 범위 설정 및 안전성 확인 - 청국장 분획물의 혈액순환 관련 뇌질환 보호 효능 기전 확인
	메주 추출물의 소재의 안전성 확인 및 뇌혈관 혈액순환 장애에 의한 뇌질환 예방 효능 탐색	- 메주 추출물의 생체 안전성 확인 - 혈액순환 장애에 의한 뇌질환에서 효능을 보이는 메주 추출물의 효능 확인
3차년도	메주 기능성물질의 대량 분리 및 시료 제공	- 항염증, 항당뇨, 항비만, 뇌세포보호능에 관련된 기능성 물질 대량 분리 및 시료 제공
	고추장 주요 성분의 분리 및 시료 제공	- 항염증, 항당뇨, 항비만, 뇌세포보호능에 대한 효과를 보기 위하여 고추장 주요 성분제공
	메주로부터 분리한 단일 생리활성 물질의 혈액순환관련 뇌질환에서 효능, 효능 용량 검증 및 기전확인	- 2차년도에 확보한 메주 추출물을 보다 구체적인 분획화를 통한 단일 생리활성 물질 확보 - 혈액순환 장애에 의한 뇌질환에서 효능을 보이는 분획물 효능 평가 - 혈액순환 장애에 의한 뇌질환에서 용량별 효능 평가를 통한 유효 범위 설정 및 안전성 확인 - 메주 분획물의 혈액순환 관련 뇌질환 보호 효능 기전 확인
	고추장 추출물의 소재의 안전성 확인 및 뇌혈관 혈액순환 장애에 의한 뇌질환 예방 효능 탐색	- 고추장 추출물의 생체 안전성 확인 - 혈액순환 장애에 의한 뇌질환에서 효능을 보이는 고추장 추출물의 효능 확인

(3) 계획대비 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	전통메주의 발효대사체 연구	전통메주의 발효대사체 중 lipidome과 peptidome을 발효시간에 따라 분석하였음.	100
2	메주와 청국장 표준 제조	메주는 순창장류연구소에서 <i>Bacillus subtilis</i> 와 <i>Aspergillus oryzae</i> 를 접종하여 6일간 30℃에서 발효시켜 제조하였으며 청국장은 <i>Bacillus subtilis</i> 를 접종하여 40℃에서 발효시켜 제조하였음.	100
3	뇌혈관 혈액순환 장애에 의한 뇌질환 예방 효능 탐색	효능평가를 위한 모델 동물 system을 완벽히 구축하였으며 표준제조 청국장 40시간, 전통제조 메주 60일, 표준제조 메주 6일 추출물 및 전통제조 메주 60일의 분획 peptide I,II에 대하여 효능 평가를 하였음.	100
4	청국장 추출물의 건강 기능성물질 분리 동정	물과 methanol로 추출한 청국장 추출물을 동결건조한 후 기능성 분석팀에게 시료를 제공하였으며 뇌허혈 실험을 위해 peptide 추출물을 제공하였으며 효과가 있는 추출물을 open column으로 분리하여 시료를 제공하였음.	100
5	(우수균주발효 청국장 제조	PGA 생성능력이 뛰어나고 <i>B. cereus</i> 생성을 억제하며 여러 가지 효소활성 능력이 우수한 선발균주 3개 ( <i>B. licheniformis</i> 58, <i>B. licheniformis</i> 67, <i>B. amyloliquefaciens</i> )를 이용하여 청국장 제조하였으며 이중 기능성이 우수하고 전통에 근접한 청국장 ( <i>B. licheniformis</i> 67)을 제조하여 다른 세부과제 팀에게 전달하였음.	100
6	청국장기능성물질의 대량 분리 및 시료 제공	우수균주로 제조된 청국장으로부터 기능성 물질 (PGA 등)을 분리하여 기능성 연구팀에게 시료를 제공하였으며 물과 methanol로 추출한 분획물 중 효과가 있는 부분의 물질들을 동정하였음. 그러나 PGA의 단일 기능성 물질의 대량 분리는 안됨. Isoflavones 제공	100
7	메주의 건강 기능성 물질 분리 동정	표준 제조된 메주로부터 건강 기능성이 있는 분획물에서 주요 성분들을 동정하였음. 사포닌 시료제공	100
8	청국장으로부터 분리한 단일 생리활성 물질의 혈액순환관련 뇌질환에서 효능, 효능 용량 검증 및 기전 확인	청국장에서 분리한 peptide 대한 복강 투여 시 효능성이 없음을 확인하였으며, 이 peptide에서 뇌허혈 보호 효과가 없어 효능 기전은 확인할 수 없었음.	100
9	메주유래 기능성물질의 안전성 확인 및 뇌혈관 혈액순환 장애에 의한 뇌질환 예방 효능 탐색	표준 및 전통제조 메주의 분획에 대하여 효능성을 평가하였으나, 일부 효능성에서는 독성이 발견되었고 그 이외에는 효능성을 확인할 수 없었음. 경구투여에서는 안전성을 확인하였음.	100

10	청국장 및 메주 건강 기능성물질의 대량 분리 및 시료 제공	표준제조 청국장 시료 제공 PGA, isoflavones 등 시료 제공	100
11	고추장 추출물 및 주 요 성분의 시료제공	고추장 물 추출물, 80% 에탄올 추출물 시료제공 고추장 색소 추출물 및 주요 물질 시료제공	100
12	메주 유래 단일 물질 의 뇌신경세포 보호 조사	메주와 청국장 추출물, 청국장 동결건조 시료, 방사능조사 시료에서 뇌신경세포보호 조사를 했지만 효과가 없었음.	100

**(4) 위 연구목표(총연구기간)에서 중요도 순으로 4-5개 목표 추출 및 가중치 부여**

번호	세부연구목표	가중치
1	(우수균주발효)청국장 제조	30
2	청국장기능성물질의 대량 분리 및 시료 제공	25
3	고추장 추출물 및 주요 성분의 시료제공	20
4	뇌혈관 혈액순환 장애에 의한 뇌질환 예방 효능 탐색	15
5	메주와 청국장의 표준 제조	10
계		총 100%

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 과정에서 획득된 결과들을 토대로 전통발효식품의 건강 기능성에 대한 새로운 접근 방법을 제시해 줌으로 인하여 전통발효식품의 가치를 향상시킬 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 사료되며 발효식품의 건강 기능성 물질의 분리 동정 및 분리에 대한 기술을 확립함으로써 다른 발효식품에도 적용이 가능할 것으로 사료됨.

전통발효식품에 대한 과학적 정보를 제공함으로써 국내 발효식품 시장을 확대할 수 있는 계기가 될 뿐만 아니라 본 과제를 통해 획득한 결과를 국외저널에 게재함으로써 우리의 전통발효식품의 이름과 우수성을 알릴 수 있는 계기를 마련할 수 있음.

전통발효식품의 제조 표준화의 기반을 마련함으로써 전통방법으로 제조하는 장류제품의 균주 표준화 및 품질 표준화에 활용할 수 있음.

구축된 동물 시스템을 이용하여 발효식품의 뇌세포보호 효능평가 연구에 활용이 가능하며 지속적으로 다른 물질의 검색에 활용할 수 있음.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### “International Niigata Symposium on Diet and Health“

심포지엄은 주로 약학 또는 임상 연구자들이 식품의 기능성, 특히 항산화 및 대사성 질병에 대한 임상 및 동물 data를 보고하는 심포지엄으로 주로 식품전공자들이 아닌 약학 전공자들이 대부분이었음. 내용별로는 크게 6개 분야 (Molecular bases of cancer chemoprevention, Molecular bases of metabolic disease prevention, Multiple functions of antioxidant molecules, Stress and disease prevention, Food functions for disease prevention and amelioration, Anti-aging as basic strategy for disease prevention)로 나누어져 있으나 주로 모든 분야가 항산화와 관련해서 진행되었음.

## 제 7 장 참고문헌

1. 박진희, 하애화, 조정순. 녹차 된장이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 체중 및 혈청 지질성분에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 37, 806-811 (2005)
2. Bernard, F.G., Alexandre Z., Robert M. & Gatherine, M. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. Food Research International, 37, 123-131.
3. Dakwa, S., Sakyi-Dawson, E., Diako, C., Annan, N.T. & Amoa-Awua, W.K. (2005). Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybean into dawadawa (soy-dawadawa). International Journal of Food Microbiology, 104, 69-82.
4. Jung, K.-O., Park, S.-Y. & Park, K.-Y. (2006). Longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of doenjang. Nutrition, 22, 539-545.
5. Koo, B., Seong, S.-H., Kwon, D.Y., Sohn, H.S. & Cha, Y.-S. (2008). Fermented Kochujang supplement shows anti-obesity effects by controlling lipid metabolism in C57BL/6J mice fed high fat diet. Food Science and Biotechnology, 17, 336-342.
6. Kwon, D.Y., Jang, J.S., Hong, S.M., Lee, J.E., Sung, S.R., Park, H.R. & Park, S. (2007). Long-term consumption of fermented soybean-derived Chungkookjang enhances insulinotropic action unlike soybeans in 90% pancreatectomized diabetic rats. European Journal of Nutrition, 46, 44-52.
7. Namgung H.-J., Park, H.-J., Cho, I. H., Choi, H.-K., Kwon, D.-Y., Shim, S.-M. & Kim, Y.-S. (2010). Metabolite profiling of doenjang, fermented soybean paste, during fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, online publication.
8. Park, M.K., Cho, I.H., Lee, S., Choi, H.-K., Kwon, D.-Y. & Kim, Y.-S. (2010). Metabolite profiling of Cheonggukjang, a fermented soybean paste, during fermentation by gas chromatography-mass spectrometry and principal component analysis. Food Chemistry, 122, 1313-1319.
9. Sulisyo, J., Natioshi, T., Kazaumi, F. & Kan, K. (1988). Production of Natto starter. Journal of Food Technology, 35, 280-281.
10. Schallmey, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004) Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Can J Microbiol. 50(1):1-17



## 제2협동 : 교부가가치 장류생산 기술연구

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 김 용 석



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

식품에 대한 소비자의 위생수준이 향상되고 있으며, 향토산업 육성을 위한 지방자치단체의 경쟁 심화되고, 식품산업의 글로벌화에 따라 위생수준이 높은 식품의 공급이 필요하다.

전통장류의 품질 균일화와 제조방법 표준화, 위생적인 발효제품 생산을 위해서는 자연환경에서 제조된 것과 유사한 조건에서 대량 생산을 하는 것이 중요한 기술이다.. 그러나 고추장, 된장 및 청국장 등 우리 전통장류에 대한 탐색 및 선별작업이 미흡했으며, 전통장류의 제조방법 표준화와 과학적인 효능 검증, 위생적인 제품 생산, 현대인의 기호에 적합한 제품 개발, 산업화를 위한 제조공정의 확립이 필요하다.

Glutamate의 분석에는 chromatography, spectrophotometry, 및 fluorometry가 이용되고 있으나 장비가 고가이고 분석요원이 있어야 하며 시료의 전처리과정이 필요하고 시간을 요하는 문제점이 있어 영세한 장류제조 현장에서는 이용에 한계가 있다. 따라서 높은 선택성, 간편성, 신속성 및 낮은 가격의 바이오센서의 개발이 요구된다.

산업용 복합배지를 이용하여 starter로 사용되는 미생물(이후 “starter 미생물” 또는 “생산균주”로 명명)인 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 산업용 발효조에서 대량 생산하기 위한 액상배양공정을 개발하고자 한다. 액상 배양공정에 있어서 과다 영양원으로 인한 기질저해 현상 및 유기산 등의 발효산물로 인한 산물저해현상을 극복하기 위해서 배양환경을 정밀하게 조절할 수 있는 고급 기질공급 제어전략을 개발하고, 온도, pH, 교반속도, 용존산소 공급 등의 물리화학적 배양환경을 최적으로 유지시키는 발효조 운전 전략을 lab-scale (bench-scale) 규모에서 우선 확립하는 것이 필수적이다. 그러나 lab-scale의 연구결과를 산업화하기 위해서는 최소한 5톤 규모의 pilot-scale의 발효공정 및 분리정제공정에 대한 연구가 필수적으로 이루어져야 한다. 즉 대규모의 산업적 배양시스템에서는 균일성 유지가 어렵고, 부피에 대한 표면적비의 변화로 인해 산소공급과 열 제거 등 복잡한 설계요건이 요구되며, 또한 배양 중 거품발생과 같은 다양한 문제가 발생한다. 산업용 발효조의 이러한 복잡한 특성 때문에 5L, 500L 와 5,000L의 배양환경은 크게 다르다고 할 수 있다. 따라서 산업화를 이루기 위해서는 최소한 5000L pilot-scale의 발효공정 및 같은 규모의 down-stream 공정, 즉 분리정제공정에 대한 집중적인 연구가 체계적으로 이루어져야 한다.

맛별이 부부의 증가로 편의식품에 대한 소비자의 요구가 증대되는 경향이다. 따라서 장류 제품도 편의성이 높은 제품의 개발이 필요하다.

장류를 이용한 소스 제품이 새롭게 출시되어 주목을 끌고 있으며, 비만억제 기능이 알려져 있는 고추장을 활용한 제품, 기능성 물질이 첨가된 장류 제품에 대한 새로운 수요가 발생하고 있는 추세이다. 따라서 기능성을 함유한 새로운 형태의 장류 제품 개발이 필요하다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 세계적 수준

- 세계적으로 사용하는 향신료는 후추, 고추, 커리 등을 들 수 있으나 대부분 식물체나 열매를 건조하여 분말로 식품에 첨가하거나 hot sauce를 생산하고 있음. 그러나 세계적으로 알려진 hot sauce는 발효과정이 없고 콩 혹은 전분질을 사용한 예가 없어 우리나라의 고추장, 된장, 청국장 등 전통장류의 제조방법과는 근본적인 차이가 있으며, 이에 대한 연구는 대부분 국내에서 이루어지고 있는 실정임
- 전통장류는 극히 일부를 제외하고 외국의 사례나 연구결과를 참고할 수 없는 우리만의 식품으로 이에 대한 기초적인 과학적 자료가 부족한 상태임
- Glutamate biosensor의 개발을 위해 반응소자로서 glutamate oxidase glutamate decarboxylase, 및 glutamate dehydrogenase가 적용되어 연구되고 있으나 아직 실용화에 이르지 못하고 있음. 그 이유는 이들 효소를 전극에 안정하게 고정화시키지 못하고 있기 때문임.

개념정립 단계	○	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

### 제 2 절 국내 수준

- 국내에서 고추장, 된장, 청국장 등 전통장류에 대한 연구는 많이 이루어져 있지만 대부분 개량식 장류를 대상으로 연구되었고, 제품의 고유 특성에 따른 불균일성과 복합성에 의해 연구결과에 일관성이 없으며, 제조 지역 및 시기의 차이에 의해서도 결과 및 특성이 달라지는 실정임
- 전통장류는 아직까지 가정을 중심으로 지역에 따라 혹은 가정에 따라 각각 다른 방법과 조합으로 만들어지고 있으며, 가장 큰 차이는 메주 제조방법, 원료의 차이 등이며, 고장에 따라 특색을 가진 제품이 생산되고 있음
- 고추장, 된장, 청국장 등 우리나라의 전통장류는 세계에서 유래가 별로 없는 우리 고유의 두류 발효식품이며, 이에 대한 규격을 국제식품규격위원회(CODEX)에 상정하여 국제식품규격에 수록하고자 하는 노력을 진행 중에 있음
- 그러나 제품 고유의 반고체 특성, 원료의 복합성, 제조 지역 및 시기의 차이에 따른 품질의 불균일성 등으로 인하여 품질의 표준화가 어려우며, 따라서 우리의 고유한 전통식품인 장류를 세계에 알리고 보급시키기 위해서는 과학적인 방법을 이용한 품질 고급화와 표준화가 절실한 실정임
- 국내에서는 일부 대학 및 기업이 참여하는 형태로 제품개발에 대해서는 기업화단계에 있

으며 생산 메카니즘 구명에 대한 연구는 사실상 일본 등과 같은 선진국에서 선도적으로 연구가 이루어진 상태임.

- 따라서 새로운 exopolymer의 개발 및 생산 균주의 검색 등이 총체적으로 이루어져야 할 필요가 있으며 현재 국내에서는 exopolymer를 이용해 증점안정제와 조직개선제로써 식품 첨가물 형태로 음료, 제과, 제빵의 첨가물로 사용되고 있음.
- 국내에서는 glutamate측정용 biosensor에 관한 연구는 아직 행하여지고 있지 않음.
- 국내에서는 glutamate측정용 biosensor 뿐 만 아니라 alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase 등 NAD(P)<sup>+</sup>의존성 효소를 반응소자 또는 인식소자 (bioreceptor) 로 하는 biosensor에 관한 연구는 아직 행하여지고 있지 않음
- 균사형성 고등균류의 액상배양에 의한 고농도 starter 미생물 생산기술에 대한 연구는 lab-scale 수준의 연구가 대부분이며, 본 연구팀이 추구하고자 하는 자동화 산업용 발효기를 이용한 대량 생산, 고순도 분리정제를 통한 starter 미생물의 제품화 등에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 시장 쟁탈전이 본격화될 때를 대비해서 이 분야에 대한 집중적인 산업화 연구가 조속히 이루어져야, 경쟁국과의 가격 경쟁력 우위를 확보할 수 있는 효율적이고 새로운 독자적 원천기술의 starter 미생물의 대량 생산공정이 개발될 수 있을 것으로 판단된다.

## 제 2 절 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국식품연구원	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 전통발효균주의 genome 및 proteome 분석</li> <li>○ 장류의 발효과정중 미생물대사체의 물리화학적, 구조적, 생리기능적 변화 추적</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 전통발효식품의 발효대사체 이용 기반기술 제공</li> <li>○ 발효과정중 생성되는 다양한 대사산물의 기능성 검증으로 경쟁력있는 바이오식품 개발</li> </ul>
영국 Applied Neuroscience Co.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Glutamate oxidase를 cell표면에 고정화하였으며 3종의 전극을 cell에 연결한 amperometric biosensor를 Bio-Glut라는 이름으로 상품화함.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 효소가 전극에 직접 고정화되어 있지 않고 전극은 고가의 장비인 Potentiostat에 연결되도록 되어 있음 (큰 규모의 고가 장비임).</li> </ul>
인도 Indian Institute of Technology	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Electrochemistry Communication 저널에 glutamate amperometric biosensor 연구 결과 보고 (2007년)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구논문 발표</li> </ul>
Japan International Research Center for Agricultural Science	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고품질의 스타터 배양조건 확립 및 기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Koji</i> 대량생산 및 이를 이용한 발효제품 생산</li> </ul>



- Glutamate oxidase와 Glutamate decarboxylase는 보조효소 의존성이 아닌 장점이 있는 반면, 아직까지 자연으로부터 높은 활성의 효소가 얻어지지 않고 있으며 가격이 매우 비싼 단점이 있음. 한편 glutamate dehydrogenase는 자연으로부터 비교적 높은 활성의 효소가 얻어지고 있으며 가격도 낮은 반면에, NAD(P)<sup>+</sup> 의존성이므로 biosensor구성을 위하여는 보조효소도 효소와 함께 전극표면에 고정화해야 하는데 고정화가 어렵고 고정화된 효소-보조효소 간의 interaction이 저해 받을 수 있는 단점이 있음.
- 본 연구팀의 경우 자동화 computer-controlled fermentation에 기반한 실시간 최적제어 알고리즘을 개발하여 고등균류의 유가식 액상배양공정에 이를 성공적으로 적용하였으며, 현재 이 알고리즘을 다른 종류의 미생물 배양공정에 적용하는 연구를 진행하고 있다. 또한 본 연구팀은 미생물 배양 유래 고부가가치 유용물질의 scale-up 분리정제공정을 개발함으로써 다양한 종류의 생물산업제품을 경제적으로 분리정제하는데 성공한 경험이 있어 빠르고 정확하게 고 기능성의 생물소재 물질을 정량분석할 능력을 보유하고 있다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 청국장 활용 음료 제품 개발

#### 서 론

청국장의 원료인 대두는 단백질과 지방질이 풍부하고 필수아미노산과 필수지방산의 함량이 높아 육류의 섭취량이 비교적 적은 우리나라를 비롯한 동양에서는 중요한 단백질과 지방질의 급원으로 오랫동안 이용하고 섭취해온 영양식품이다(Korean J. Food Sci. Technol. 36: 294~298, 2004).

청국장은 삶은 콩을 벗짚에 깔아 벗짚에 붙어있는 *Bacillus*속 미생물에 의해 40~42℃에서 2~3일간 발효시킨 것으로, 발효과정 중 미생물이 생산하는 효소에 의해 그 특유의 맛과 향, 점질물질이 생성된다. 청국장은 오래 전부터 우리가 섭취해왔던 식품임에도 불구하고, *Bacillus*속 미생물로부터 생성되는 암모니아 화합물의 특이한 냄새로 인해 소비자들이 기피하는 경향이 있었다. 그러나 최근에 항산화 효과, 혈압강하 효과, 항균효과 등 각종 유용한 생리활성 기능이 보고됨에 따라 기능성 식품으로 관심이 증가하고 있는 추세이며, 또한 청국장으로부터 혈전 용해 활성이 우수한 균주를 분리하여 향후 의약품 또는 식품 첨가물의 기초 원료로 이용하려는 시도가 매우 활발하게 진행되고 있다.

청국장은 1970년대 초반부터 제조 방법 및 성분 등에 관한 연구가 진행되어 왔으며, 최근에는 청국장의 제조방법과 품질개선 등이 이루어지면서 청국장의 점질물질, 향기성분, 영양성분, 고기능성 건강 발효 식품 등 여러 분야에서 상당한 연구가 진행되어 왔다. 하지만 청국장은 각 지방 또는 가정마다 제조 방법이 일정하지 않으며, 또한 발효 미생물의 종류에 따라 품질의 재현성이 좋지 않으므로 균일하고 위생적인 청국장을 제조하기 위해서는 우수 균주의 필요성이 대두 되고 있는 실정이다. 청국장의 품질은 주로 발효 과정에 관여하는 미생물에 의해 달라지기 때문에 청국장 발효 종균으로 복합균주를 이용하거나, 청국장 발효에 관여되는 미생물을 규명하려는 연구가 진행되어 왔으며, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* 등이 청국장에서 분리되었다.

대두는 발아가 진행됨에 따라 생리적 활성이 증대되고 성분의 변화가 일어나게 되며, 호흡과 대사작용으로 영양성분 및 기능성 물질의 변화가 일어나게 된다. 대두를 발아시키면 기능성 물질인 isoflavone의 함량이 증가된다. Isoflavone은 포유동물에서 약한 estrogen 활성을 보이며 항암 효과, 고혈압, 항산화 효과, 폐경기 증후군, 골다공증, 심혈관계질환, 유방암, 전립선암, 대장암 등과 같은 호르몬과 관련된 질환에 예방효과가 있는 것으로 알려져 있다(한국생활과학회지, 14(3), 2005).

발아현미란 현미의 싹을 1~5 mm까지 발아시킨 것으로 현미의 영양과 기능을 높인 쌀이다. 발아과정 중 식이섬유, 비타민 B1, B2, E, 칼슘, 인 등의 무기질과 GABA( $\gamma$ -amino butyric acid) 등 미량의 기능성 성분들이 증가하게 된다(한국식품저장유통학회지, 11(2), 2004). 또한 발아시에 전분분해효소 작용에 의해 생성된 포도당 등의 유리당과 올리고당에 의해 식미가 개선되는 등의 효능을 가지고 있다(Korean J. Food Sci. Technol. 38: 674~678, 2006).

## 재료 및 방법

### 균주

청국장에서 분리한 점질물 생성능이 우수한 청국장 분리균 SCD 115035를 사용하여 청국장을 제조하였다.

### 대두의 수침 및 발아

대두를 25℃에서 12시간 수침하여, 각각 0, 12, 24, 36시간 incubator에서 발아(25℃, 85% 상대습도)하였다.

### 발아 청국장 제조(그림 1)

청국장에서 분리한 점질물 생성능이 우수한 균주인 청국장 분리균 SCD 115035를 사용하여 청국장을 제조하였다. 발아시킨 대두를 121℃에서 20분간 증자하였고, 증자된 대두는 300 g씩 1 L 삼각플라스크에 분주하고 멸균한 뒤, 121℃에서 15분간 멸균하여 40~45℃ 정도로 냉각 후 각 삼각플라스크마다 균주를 대두량의 1%(v/v)가 되게 접종하였다. 42℃에서 48시간 배양 후 15℃에서 24시간 후숙 과정을 거쳤고, 발효 중 72시간 동안 24시간 간격으로 이화학적 특성을 분석하였다.

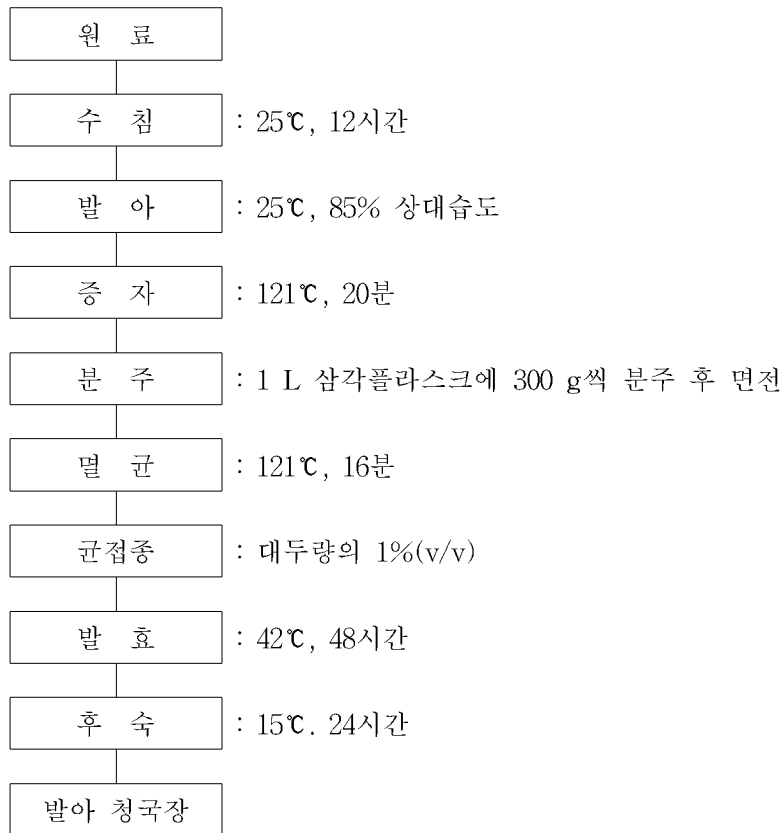


그림 1. 발아 청국장 제조과정.

### 초미세 분쇄

동결건조 된 시료 및 곡물가루를 blender로 1차 분쇄 후, 미세고속분쇄기(KMS-200, RPM 28000)로 초미세 분쇄를 하였다.

### 수분

청국장 2~3 g을 항량을 구한 칭량병에 넣고 105°C dry oven에서 2시간 건조하고 데시케이터에서 30분 방냉 후 측정을 반복해 항량을 구하였다.

### 염도

염도는 SALT meter(Model TM-30D, Takemura electric works. LTD., Japan)를 이용하여 측정한 후 회석배수를 곱해준다.

### pH

pH는 시료 5 g을 취해 증류수 45 mL을 가한 후 잘 용해하고, pH meter(model ORION STAR SERIES, U.S.A)로 측정하였다.

### 적정산도

적정산도는 시료 5 g을 취해 증류수 45 mL을 가한 후 잘 용해하고, 전량에 0.1 N NaOH 용액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하고 초산 양으로 환산하였다.

$$\text{총산(g/100 mL)} = V_a \times f \times a \times 100/W$$

$V_a$  : 0.1 N NaOH 표준용액의 적정값(mL)

$f$  : 0.1 N NaOH 표준용액의 factor

$a$  : 해당 산의 0.1 N NaOH 1mL 중화 소요량(초산: 0.0060)

$W$  : 시료량(g)

### 점질물 함량

시료 100 g에 8배의 증류수(800 mL)를 가한 뒤, 10분간 homogenizer하고, 원심분리(10,000 × g)를 20분하여 상등액을 취해서 동결건조하였다.

### 아미노태 질소 함량

시료 2 g을 취해 증류수 100 mL를 가하고 1시간 동안 교반(shaking incubater)하여 충분히 용해한 다음 0.1 N NaOH용액으로 적정하여 pH 8.4로 맞춘 후, 여기에 20 mL의 중성formalin을 가하고 다시 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.4가 되도록 중화 적정하였다. 별도로 증류수에 대한 바탕시험을 실시하여 다음 식에 따라 아미노태 질소 함량을 구하였다.

$$\text{Amino nitrogen(mg\%)} = (A-B) \times 1.4 \times F \times 100 / \text{시료량(g)}$$

$A$  : 0.1 N NaOH 용액의 시료적정량(mL)

$B$  : 0.1 N NaOH 용액의 blank test(mL)

$F$  : 0.1 N NaOH 용액의 역가

## 총균수

시료 10 g에 0.1% peptone water를 90 mL 가하여 균질화한 후, 10진법에 따라 연속 희석하여 3M™ petri film에서 35°C, 72시간 배양하여 나타난 colony를 계수하여 단위를 CFU/mL로 나타내었다.

## 산성·중성 protease 활성

조효소액의 조제는 시료 10 g에 증류수 90 mL을 넣고, shaking incubater에서 150 rpm, 20°C, 3 hr 동안 교반한 후, centrifuge에서 10000 × g로 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 0.2 μm syringe filter로 여과한 여액을 조효소액으로 하였다.

Protease 활성은 pH 7(중성) 또는 pH 3(산성)으로 조정한 0.6% casein 용액 3 mL에 조효소액 1 mL를 첨가한 후 30°C, 10분간 가열한 뒤, 0.4 M trichloroacetic acid(TCA) 5 mL을 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 액을 여과지(No.2)를 이용하여 여과한 후, 여액 2 mL에 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 mL와 folin시약 1 mL을 혼합한 후 30°C에서 30분 동안 발색시켜 660 nm로 흡광도를 측정하여 효소액 1 mL에서 1분간 1 μM의 tyrosine을 유리할 때를 1 unit로 하였다.

## α-Amylase 활성

α-Amylase 활성은 40°C에서 예열한 1% soluble starch용액 1 mL에 조효소액 1 mL을 가하고 40°C에서 30분간 반응시킨 후 1 M acetic acid 10 mL를 가하고 반응을 중지시켰다. 0.01 N 요오드 용액 1 mL을 가하여 660 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조구와의 흡광도 차이를 환산하여 표시하였다.

## β-Amylase 활성

β-Amylase 활성은 dinitrosalicylic acid(DNS)법에 의하여 측정하였다. 0.5% soluble starch용액 1 mL를 시험관에 넣고 조효소액 1 mL를 가하여 30°C 수조에서 30분간 반응시킨다. 반응용액과 동량의 DNS 시약을 넣고 끓는 물에서 5분간 반응시킨 후 증류수 10 mL를 넣어 희석한 다음 535 nm에서 흡광도를 측정하여 효소액 1 mL가 나타내는 흡광도를 효소역가로 표시하였다.

## Isoflavone 함량 측정

Isoflavone 성분은 HPLC법으로 정량 하였다(표 1). 동결건조 시킨 콩 가루 0.5 g에 1 N HCl 7.5 mL를 첨가하고 100°C에서 90분간 가수분해 시켜 isoflavone 배당체를 aglycone으로 전환시킨 뒤, 상온으로 냉각 후 메탄올을 첨가하여 25 mL로 정용하였고, 6시간 교반 후 3.200 × g에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 0.2 μm syringe filter(Chrom Tech. Inc., MN, U.S.A)로 여과한 뒤 분석하였다.

표 1. Isoflavone의 분석조건

Instrument	Shimadzu (Japan)
Column	25 cm × 4.6 mm ID SUPELCO SIL™ LC-18 5 μm
Mobile phase	Acetonitrile/0.005 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25:75 (v/v)
Flow rate	1.2 mL/min
Injection volume	20 μL
Detection	UV detector (Shimadzu, Japan), λ=254
Column temp	40°C

### 관능평가

시제품 및 제조된 음료는 전북대학교 식품공학과 대학원생 10명을 대상으로 관능평가를 실시하였고, SAS(Statistical Analysis System)통계 package(SAS Institute, Inc, 1990)를 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였으며, ANOVA 분석 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다.

### 결과 및 고찰

#### 청국장 음료 시판제품 성분규격 및 관능평가

청국장 음료로서 시중에 판매되고 있는 제품을 구입하여 성분규격 및 특성을 비교하고 관능평가를 하였다. 표 2에 있는 각 제품의 특성을 보면 '마시는 청국장'의 경우 청국장 특유의 냄새를 줄이기 위해 많은 양의 곡물가루와 자일리톨, 감초추출액 등을 넣은 것을 볼 수 있고, 곡물가루 첨가로 인해 미숫가루 맛과 비슷하였다. '바스빈'의 경우는 여러 종류의 감미료와 첨가물로서 청국장 냄새를 줄이는 방법을 선택하였으며, 가장 색이 진하고 다른 제품보다 결쭉한 느낌이 있었다. 두 종류의 '슬림청' 제품은 청국장의 함량이 다른 제품에 비해 많이 낮고, 산미료가 많이 첨가되어 청량감이 느껴지고 청국장 특유의 냄새는 가장 약했으나, 신맛이 강하였다.

관능평가 결과 '바스빈'과 '마시는 청국장'이 '슬림청' 제품에 비하여 더 좋은 기호도를 나타내었고, 신맛이 강한 '슬림청' 제품은 다소 낮은 기호도를 나타냈다(표 3).

표 2. 청국장 음료 시판제품의 성분규격 및 특성

제품명	마시는 청국장	바스빈
제조원	(주)초가집식품	우일바이오F&B
판매원	(주)초가집식품	우일바이오F&B
원재료명	국산가루청국장(대두) 53.5%, 국산현미가루 11.4%, 국산올무가루 4.5%, 국산보리쌀가루 2.2%, 자일리톨 21.8%, 감초추출액 6.4%, 비타민 C 0.2%	청국장 86.98%(대두고형분7%:국산), 시크로텍스트린, 올리고당, 포도당, 과당, 옥수수추출액, 카라기난, 비타민-C
제품형태	기타발효음료	기타(낫또) 발효음료
보관방법	직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관	냉장보관(40일), 냉동보관(4개월)
기타특징 및 효능	- 무색소, 무방부제, 무향료 - 2005년 제4회 전국지식농업인 창 업벤처경연대회 장려상 - 특허 제 0475827호 및 76120호	- 조선대학교 조정일 박사, 나광출 박사가 개발한 제품. - 납두균이 살아있으며 청국장에 부족한 영양분과 올리고당 같은 기 능성 물질을 함유

제품사진



제품명	슬림청(생청국 슬림청)	슬림청(Lady 슬림청)
제조원	(주)창성테크	(주)창성테크
판매원	(주)한국기능성식품연구소	(주)한국기능성식품연구소
원재료명	(대두건조 고형물 5%, 생청국 94%국산) : 대두(황, 흑), 올리고당, 비타민C, 글리신 타우린, 구연산, 농축사과즙, 농축대추즙, 농축계피즙, 스테비오사이드, 향료	(대두건조 고형물 2.5%, 생청국 46%국산) : 대두(황, 흑), 올리고당, 비타민C, 글리신 타우린, 구연산, 농축사과즙, 농축대추즙, 농축계피즙, 스테비오사이드, 향료
제품형태	기타발효음료	기타발효음료
보관방법	냉장(단기:40일) 냉동(장기:12개월)	냉장(단기:40일) 냉동(장기:12개월)
기타특징 및 효능	- 설사를 방지하고 변비를 개선 - 청국장에 함유된 제니스틴은 각종 암을 예방 - 청국장에 들어있는 단백질 분해효 소는 혈액순환을 돕고, 비타민B2는 알콜분해를 촉진한다. - 당뇨병 예방, 성기능 회복, 빈혈 예방, 고혈압예방, 골다공증 예방 - 불포화지방산 풍부, 피부노화 방 지, 비만예방	- 비타민C, 타우린 함유 - 섬유질이 풍부하며, 청국장 30g속 에 들어있는 300억 마리의 미생물들 과 바실러스 균에 의한 정장효과가 뛰어나 설사를 방지 - 사포닌이란 물질도 변비개선에 도 움을 주며 발효가 일어나면서 비타 민 등도 만들어져 신진대사를 촉진. - 영양분이 지방으로 축적되는 것을 예방하고 영양분이 완전 분해되도록 도우며 빈혈을 예방하는 효과

제품사진



표 3. 청국장 음료 시제품 관능평가 결과

항 목	제품명			
	슬림청 (생청국 슬림청)	슬림청 (Lady 슬림청)	마시는 청국장	바스빈
색	4.00 <sup>b</sup>	5.09 <sup>a</sup>	5.55 <sup>a</sup>	4.18 <sup>b</sup>
향	3.45 <sup>b</sup>	3.45 <sup>b</sup>	5.09 <sup>a</sup>	3.64 <sup>b</sup>
단맛	3.64 <sup>a</sup>	4.82 <sup>a</sup>	4.64 <sup>a</sup>	4.45 <sup>a</sup>
신맛	5.64 <sup>a</sup>	4.91 <sup>a</sup>	1.45 <sup>b</sup>	1.45 <sup>b</sup>
전체적기호도	3.82 <sup>b</sup>	4.82 <sup>a</sup>	5.18 <sup>a</sup>	5.27 <sup>a</sup>

청국장 음료 제조한 적합한 균주의 선발

청국장 특유의 냄새를 줄이는 것이 가장 중요한 사항이므로, 우선 청국장 특유의 이취가 적고, 기능성 물질인 점질물의 생성능이 우수한 균주(청국장 분리균 SCD 115035)를 관능평가 및 점질물 양 측정 결과(표 4)를 통하여 선정하였다. 다음으로 곡물가루(볶은 발아현미 가루, 볶은 보리 가루, 볶은 울무 가루, 볶은 옥수수 가루 등)를 사용하여 발아 청국장 음료를 제조하였고, 관능평가를 통하여 가장 청국장 특유의 냄새를 줄인 볶은 발아현미 가루와 볶은 보리 가루를 사용하여 발아 청국장 음료를 제조하였다. 곡물가루를 첨가하여 제조한 청국장 관능평가 결과 매실농축액이나 오미자농축액보다 첨가하였을 때보다 더 좋은 관능을 나타냈다. 또, 청국장 음료에 죽염을 일정량 첨가하였을 때 청국장의 냄새가 확연하게 줄어드는 것을 확인하고, 죽염을 첨가하여 음료를 제조하였다.

표 4. 균주를 달리하여 제조한 청국장의 점질물 양 및 향미 특성

균주명	점질물 양(%)	청국장 제조 후 향미
<i>Bacillus subtilis</i> (대상)	9.78	-
<i>Bacillus subtilis</i> MB4(청국장 분리균)	10.83	++
청국장 분리균 SCD 115003	8.03	+
청국장 분리균 SCD 115026	11.68	+
청국장 분리균 SCD 115035	14.21	+
청국장 분리균 SCD 115036	12.42	++
청국장 분리균 SCD 115037	17.44	++

-: 불쾌취 없음, +: 약간의 불쾌취, ++: 보통정도의 불쾌취, +++: 심한 불쾌취

시제품 청국장 음료를 24시간동안 정치시켜 내용물이 가라앉는지 여부를 관찰해 보았는데, 4 제품 모두 24시간 정치시에 청국장분말 및 곡물가루 등이 가라앉는 것을 볼 수 있었고, 이 상태에서 2~3회 저어주거나 흔들어주면 원상태로 되돌아갔다.

이러한 문제점을 해결하기 위해 청국장 및 곡물을 초미세 분쇄하여 물에 잘 용해되고, 정치시켜도 내용물이 가라앉지 않는 방법을 선택하였다.

현재는 제조한 청국장 음료 점도가 시제품에 비해 높아서 이를 낮추는 실험을 하고 있으며, 점도가 낮추어지면 살균조건 및 저장성 실험을 계획하고 있다.



**발아 시간 및 발효 시간을 달리하여 제조한 청국장의 특성**

그림 2는 발아 시간 및 발효 시간을 달리하여 제조한 청국장의 외관을 나타낸 사진이고, 발효 0시간은 증자 후 균을 접종한 상태이다.

















		발아 (시간)			
		0	12	24	36
발효 (시간)	0				
	24				
	48				
	72				

그림 2. 발아 시간 및 발효 시간에 따른 청국장의 외관.

**수분함량 및 염도**

발아 청국장의 발아 시간 및 발효 시간에 따른 수분함량(그림 3)은 58.46~62.61% 범위에 있었으며, 발아 36시간-발효 24시간의 경우가 62.12%로 가장 높은 수분함량을 나타내었다. 전체적으로 발아 시간이 긴 경우(24~36시간)의 수분함량은 60.31~62.12%로 발아 시간이 짧은 경우(0~12시간)인 58.46~60.67%보다 다소 높은 값을 나타내었다.

염도(그림 4)는 발아 시간에 따른 차이는 크지 않았지만, 발효 시간에 의한 약간의 차이를 나타내었다. 염도가 발효 24시간 까지는 0.60~0.70%를 나타내었는데, 발효 48시간 이후로는 0.90~1.10%의 범위로 다소 증가하는 경향을 보였다.

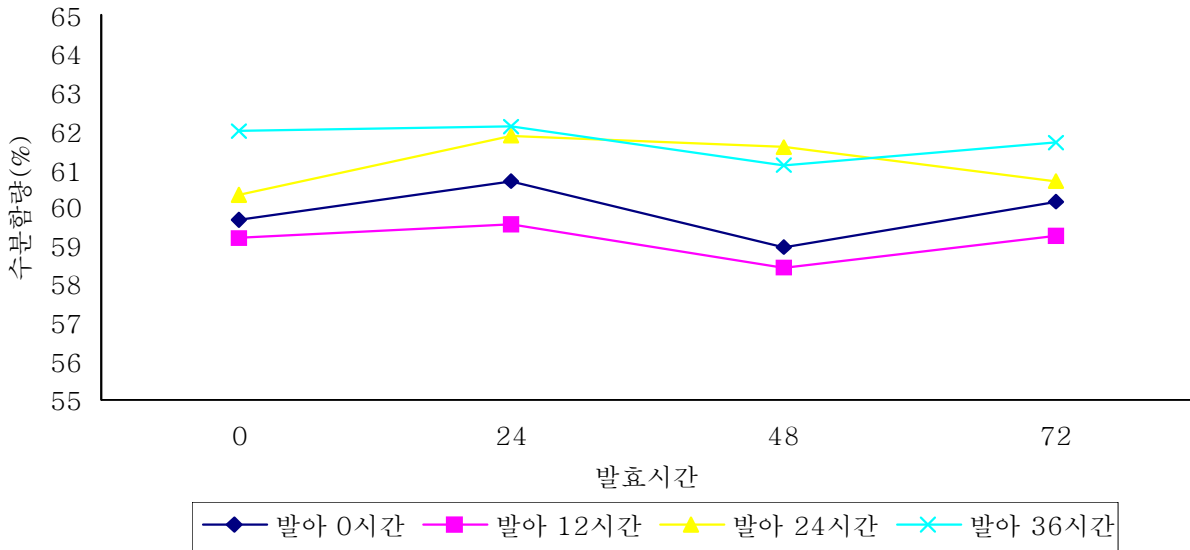


그림 3. 발아청국장의 발아시간 및 발효시간에 따른 수분함량 변화.

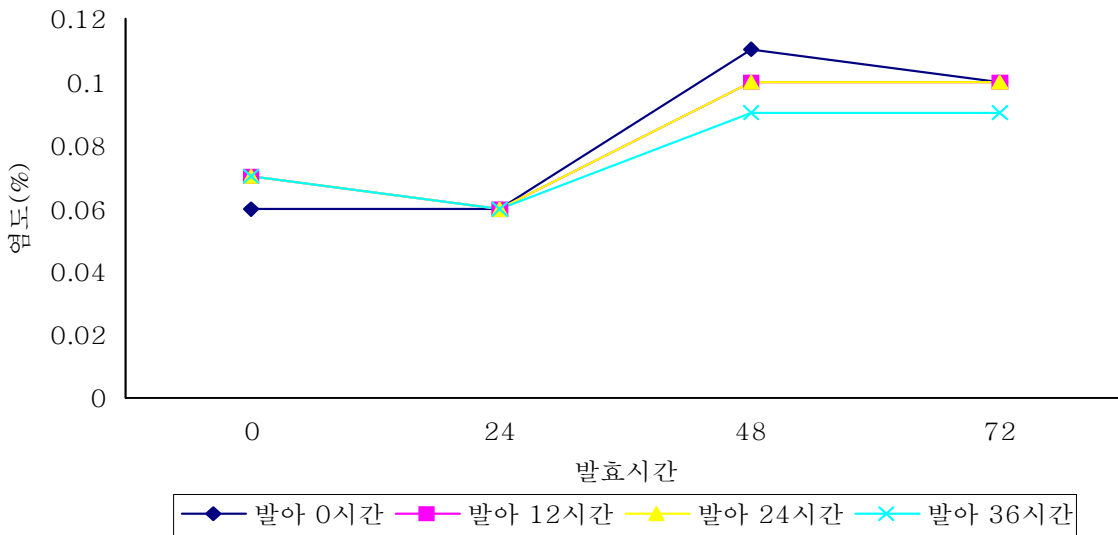


그림 4. 발아청국장의 발아시간 및 발효시간에 따른 염도 변화.

### pH 및 총산

발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 pH(그림 5)는 발효초기에 6.68~6.74에서 발효 시간이 늘어남에 따라 증가하여 발효 48시간에는 7.47~7.68까지 증가하였고, 발효 72시간에는 7.21~7.49로 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 발아 시간에 따른 pH 차이는 크지 않았다.

총산(그림 6)은 발효 0시간 0.18~0.22%에서 발효 72시간 0.25~0.30%로 발효가 진행되면서 점차 증가하는 경향을 나타내었고, 발아 시간에 따른 변화는 크지 않았다.

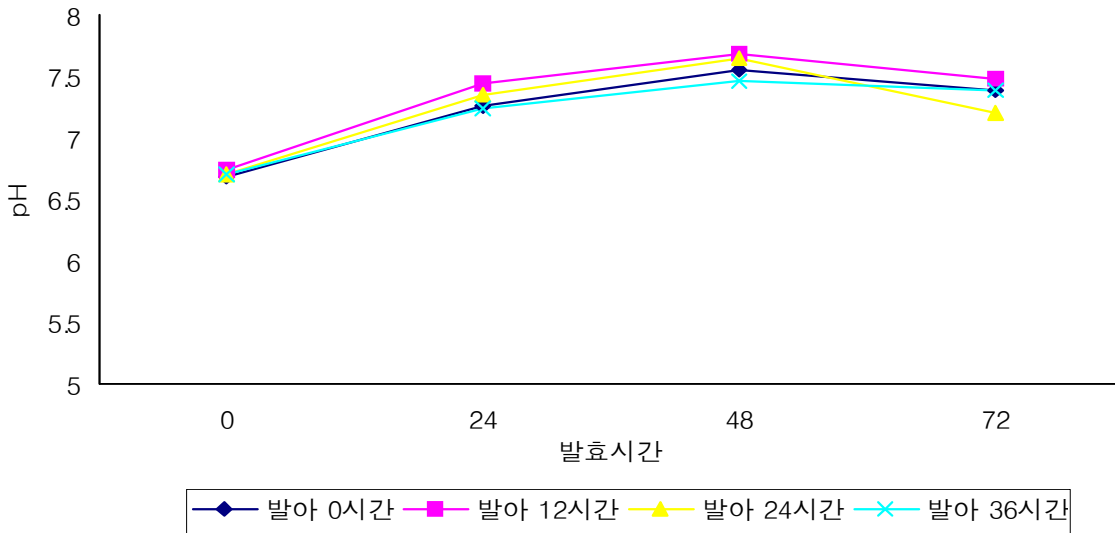


그림 5. 발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 pH의 변화.

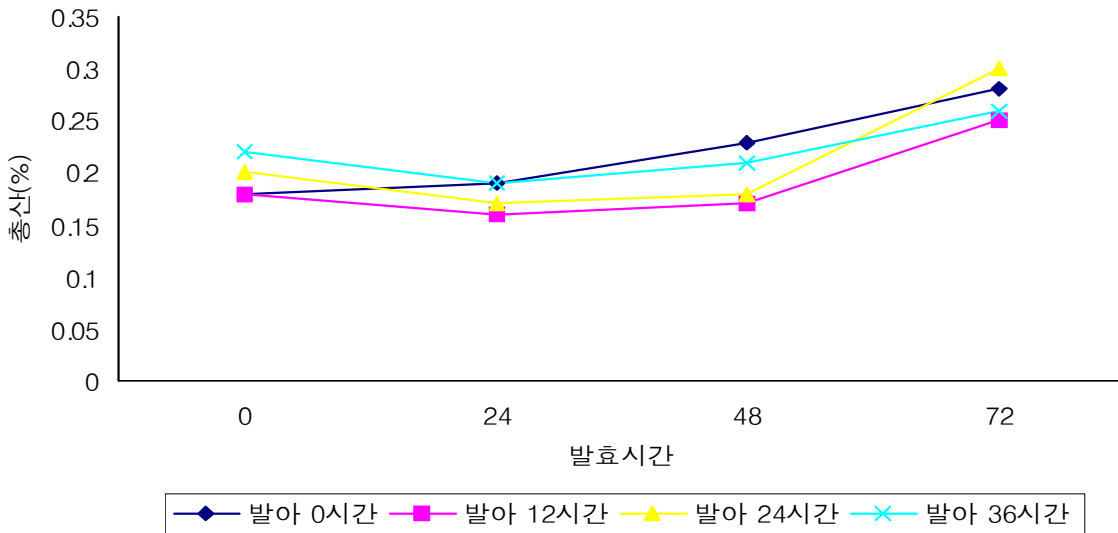


그림 6. 발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 총산의 변화.

### 점질물 양

발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 점질물의 양은 그림 7에서 보는 바와 같이 발효가 진행되면서 증가하는 경향을 보였으며, 발효 48시간에서 13.22%로 가장 높은 함량은 나타내었다. 발아 36시간인 경우는 발효 72시간에서 12.33%로 높게 나타났다. 청국장의 점질물은 인체에 무해하고 식용이 가능한 기능성 물질로서 생리활성 및 항산화 효과를 가지고 있기 때문에 청국장 음료 제조시 점질물의 생성량이 높은 조건에서 제조한 청국장을 사용하였다.

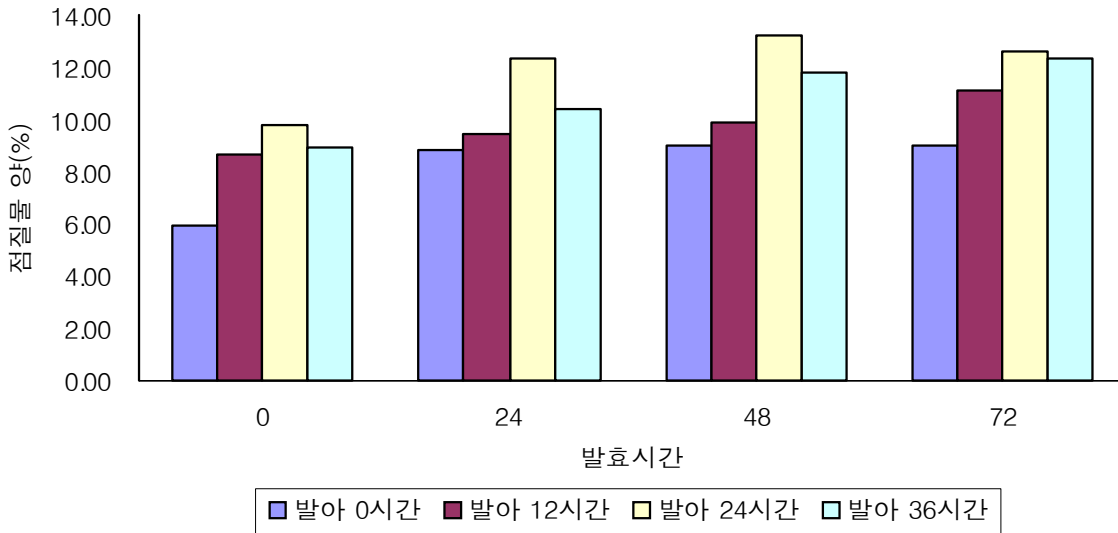


그림 7. 발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 점질물의 양 변화.

#### 아미노태 질소 함량

청국장의 구수한 맛을 좌우하는 아미노태질소 함량(그림 8)은 발효 0시간 58.68~92.38 mg%에서 발효가 진행되면서 급격하게 증가하여 발효 72시간에는 336.53~425.03 mg%의 값을 나타내었다. 발아 0시간의 경우가 다른 발아 시간들보다 높은 값을 나타냈으며, 발아 0시간에서 발효 48시간 일 때 436.93 mg%로 가장 높은 아미노태 질소 함량을 나타내었다.

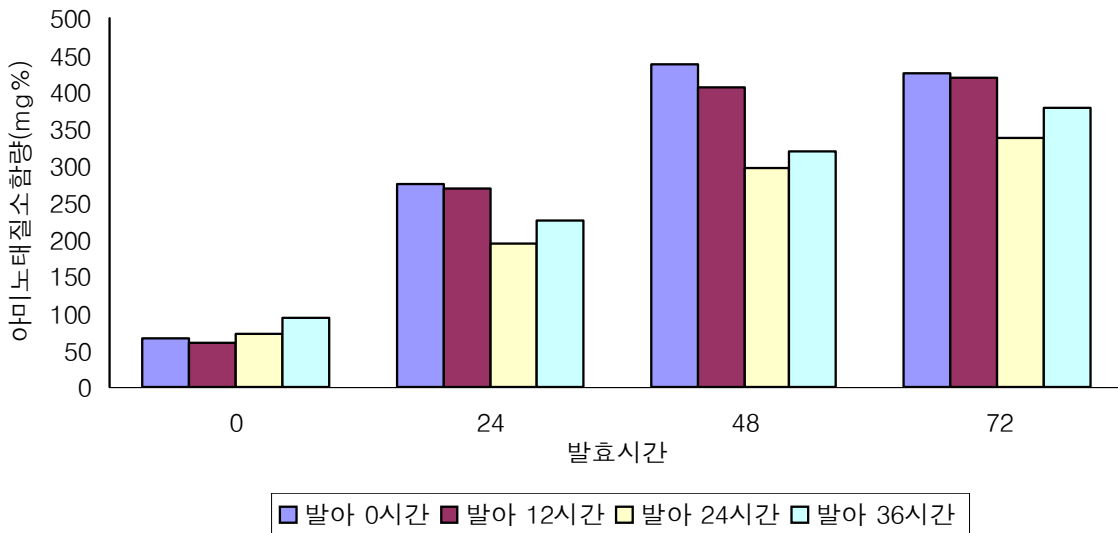


그림 8. 발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 아미노태질소 함량의 변화.

### 총균수

발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 총균수(그림 9)는 발효 0시간 4.84~6.22 log CFU/mL에서 발효 48시간에 9.33~9.55 log CFU/mL까지 증가를 하였다가 발효 72시간째에는 8.78~9.02 log CFU/mL로 감소하는 경향을 나타내었다. 발효 0시간에 발아 시간에 따른 총균수의 차이는 있었지만 발효가 진행되면서 거의 비슷하게 유지되었다. 발효 48시간 후 24시간 후숙하는 과정에서 균이 0.3~0.8 log CFU/mL정도 감소하는 경향을 보였다.

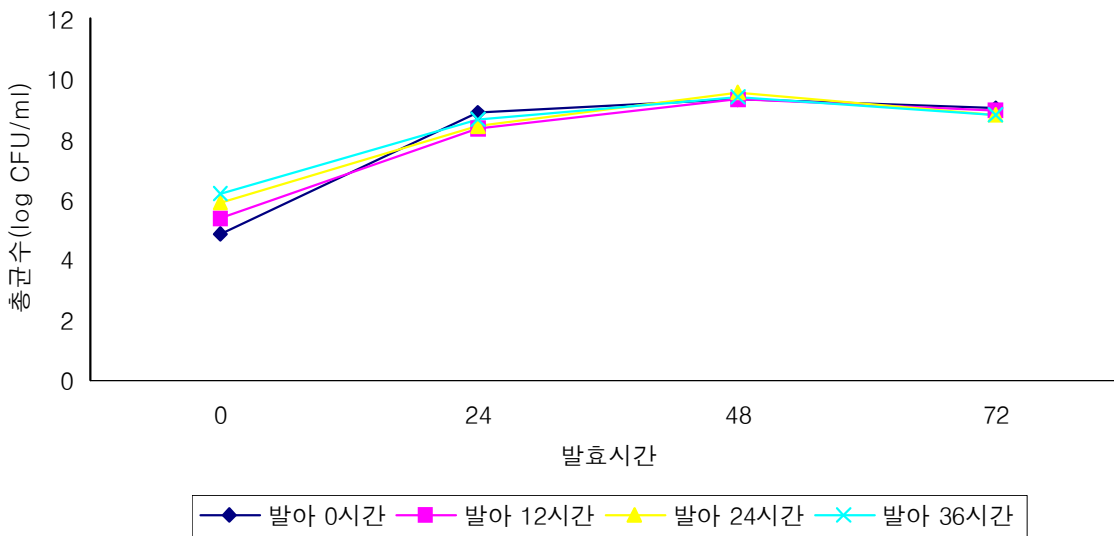


그림 9. 발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 총균수의 변화.

### 효소활성 측정

발아콩으로 제조한 청국장의 효소활성을 측정한 결과는 표 5와 같다.

발아 청국장의 발아 시간 및 발효 시간에 따른 효소활성에서 산성 protease 활성은 발효 0시간 0.073~0.084 unit/mL에서 발효가 시작되면 급격하게 증가하여 발효 72시간에는 0.284~0.323 unit/mL로 발효가 진행되면서 증가하는 경향을 나타내었다. 발아 0시간-발효 72시간에서 0.323 unit/mL으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 중성 protease 활성은 발효 0시간에 0.066~0.083 unit/mL에서 발효가 진행되면서 급격히 증가하여 발효 72시간에는 0.280~0.332 unit/mL로 측정되었다. 산성·중성 protease 활성 모두 발아를 시키지 않은 경우 활성이 발아를 시킨 경우에 비하여 높게 나타났다.

$\alpha$ -Amylase의 활성은 발효 24시간까지는 2.227~2.405 unit/mL에서 발효가 더 진행되어 발효 48~72시간에는 2.155~2.203 unit/mL로 다소 낮아지는 경향을 나타냈다.  $\beta$ -amylase는 발효 0시간 0.068~0.102 unit/mL에서 발효가 진행되면서 급격히 증가하였다. 발아시간이 24시간까지는 발효 24시간에서 가장 높은 활성을 나타냈고, 발아 36시간에서는 72시간 발효시킨 경우가 가장 높은 활성을 나타내었다.

표 5. 발아 청국장의 발아 시간 및 발효 시간에 따른 효소활성

(단위 : unit/mL)

발아시간	발효시간	산성 protease	중성 protease	$\alpha$ -amylase	$\beta$ -amylase
0	0	0.083±0.002	0.083±0.003	2.395±0.002	0.074±0.002
	24	0.251±0.007	0.252±0.003	2.227±0.007	0.225±0.003
	48	0.320±0.008	0.327±0.004	2.158±0.008	0.180±0.010
	72	0.323±0.009	0.332±0.006	2.155±0.009	0.188±0.006
12	0	0.073±0.002	0.069±0.003	2.405±0.002	0.068±0.001
	24	0.163±0.006	0.157±0.004	2.315±0.006	0.208±0.015
	48	0.301±0.003	0.294±0.003	2.177±0.003	0.176±0.012
	72	0.284±0.007	0.280±0.003	2.194±0.007	0.183±0.002
24	0	0.084±0.004	0.082±0.003	2.394±0.004	0.102±0.003
	24	0.126±0.005	0.123±0.005	2.352±0.005	0.211±0.011
	48	0.275±0.008	0.269±0.003	2.203±0.008	0.157±0.008
	72	0.292±0.010	0.287±0.007	2.186±0.010	0.177±0.015
36	0	0.073±0.003	0.066±0.002	2.405±0.003	0.077±0.004
	24	0.170±0.008	0.163±0.009	2.308±0.008	0.157±0.008
	48	0.304±0.005	0.291±0.003	2.174±0.005	0.160±0.005
	72	0.296±0.003	0.293±0.003	2.182±0.003	0.189±0.003

**Isoflavone 함량 측정**

발아 청국장의 발아 시간 및 발효 시간에 따른 isoflavone 함량은 표 6 및 그림 10과 같다. 전체적으로 총 이소플라본 함량은 발효가 진행되면서 값이 감소하다가 증가하는 경향을 나타냈다. 발아 36시간-발효 72시간의 경우가 839.86  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 발아 시간에 따른 총 이소플라본 함량도 발아 36시간에서 가장 높은 함량을 나타내었다.

표 6. 발아 청국장의 발아 시간 및 발효 시간에 따른 isoflavone 함량

발아시간	발효시간	Isoflavone 함량			
		daidzein	genistein	glycitein	total(μg/g)
0	0	262.75	150.54	361.67	774.96
	24	229.00	109.42	343.14	681.56
	48	224.00	97.27	334.82	656.09
	72	247.68	119.03	338.93	705.64
12	0	259.49	139.82	361.08	760.39
	24	224.98	100.28	335.09	660.35
	48	220.01	87.69	336.18	643.87
	72	254.56	126.09	342.12	722.76
24	0	260.25	139.13	362.80	762.18
	24	227.76	102.81	337.16	667.73
	48	220.36	91.85	328.35	640.56
	72	252.28	121.68	340.97	714.93
36	0	272.46	150.34	369.67	792.47
	24	251.64	122.13	353.98	727.75
	48	284.45	145.38	379.86	809.70
	72	295.84	162.99	381.02	839.86

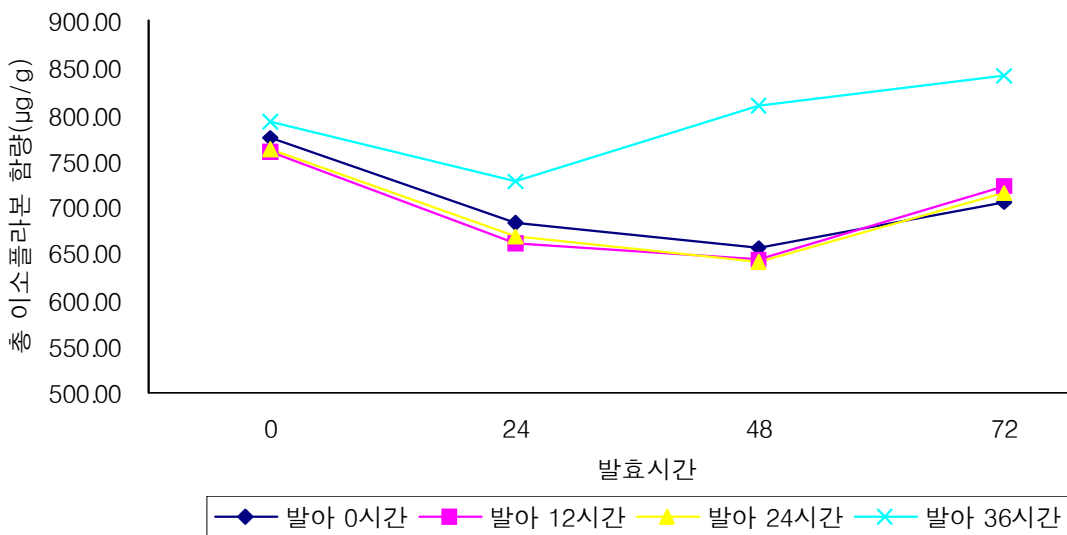


그림 10. 발아청국장장의 발아시간과 발효시간에 따른 isoflavone 함량 변화.

### 발아 청국장 음료의 제조

초미세 분쇄한 발아 청국장 가루 5 g, 발아현미 가루 5 g, 보리 가루 5 g, 올리고당 30 g, 구연산 0.05 g, 죽염 0.4 g에 물 100 mL을 가하고, 10분간 homogenizer한 뒤, 115°C에서 20분간 살균하여 4°C에 저장한다. 배합비는 표 7과 같다.

표 7. 발아청국장으로 제조한 청국장음료의 배합비

재료	배합량 (g)	배합비 (%)	비고
발아 청국장 분말	5	3.44	국산
발아현미 가루	5	3.44	국산
보리 가루	5	3.44	국산
올리고당	30	20.65	오뚜기
구연산	0.05	0.03	
죽 엽	0.4	0.27	
정제수	100	68.75	
총계	145.45	100	

### 요 약

- 콩 발효식품 중 하나인 청국장을 이용한 음료를 개발하기 위하여 실험을 하였다.
- 청국장을 음료에 적용하기 위해서는 청국장 특유의 냄새를 줄이는 것이 가장 중요하다고 생각되어 청국장 냄새에 가장 큰 영향을 미치는 요인인 균주를 선별하기 위해 관능평가 및 점질물 양 측정을 하였다. 결과로 청국장 분리균 SCD 115035를 선택하여 사용하였다.
- 청국장 원료인 대두를 발아시킴으로써 증가하는 기능성 물질인 isoflavone을 가장 높은 함량을 나타내는 조건을 찾기 위해 발아 시간(0, 12, 24, 36시간) 및 발효 시간(0, 24, 48, 72시간)을 달리하여 분석하였으며, isoflavone 이외의 이화학적 분석도 같이 진행하였다.
- 발아 청국장의 발아 시간 및 발효 시간에 따른 수분함량은 58.46~62.61% 범위에 값을 나타냈으며, 발아 36시간-발효 24시간의 경우가 62.12%로 가장 높은 수분함량을 나타내었다. 전체적으로 발아 시간이 긴 경우(24~36시간)의 수분함량은 60.31~62.12%로 발아 시간이 짧은 경우(0~12시간)인 58.46~60.67%보다 다소 높은 값을 나타내었다. 이는 높은 습도에서 발아하는 과정에 수분이 콩 내부로 들어갔기 때문으로 생각한다.  
 염도는 발아 시간에 따른 차이는 크지 않았지만, 발효 시간에 의한 차이를 나타내었다. 염도가 발효 24시간까지는 0.60~0.70%를 나타내었는데, 발효 48시간 이후로는 0.90~1.10%의 범위로 다소 증가하는 경향을 보였다.
- 발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 pH는 발효초기에 6.68~6.74에서 발효 시간이 늘어남에 따라 증가하여 발효 48시간에는 7.47~7.68까지 증가하였고, 발효 72시간에는 7.21~7.49로 약간 감소하는 경향을 나타내었다.



총산은 발효 0시간 0.18~0.22%에서 발효 72시간 0.25~0.30%로 발효가 진행되면서 점차 증가하는 경향을 나타내었고, 발아 시간에 따른 변화는 크지 않았다.

pH와 총산은 발아 시간에 따른 변화는 크지 않았다

- 발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 점질물의 양은 발효가 진행되면서 증가하는 경향을 보였으며, 발효 48시간에서 13.22%로 가장 높은 함량은 나타내었다. 발아 36시간인 경우는 발효 72시간에서 12.33%로 높게 나타났다.
- 아미노태질소 함량은 발효 0시간 58.68~92.38 mg%에서 발효가 진행되면서 급격하게 증가하여 발효 72시간에는 336.53~425.03 mg%의 값을 나타내었다. 발아 0시간의 경우가 다른 발아 시간들보다 높은 값을 나타냈으며, 발아 0시간에서 발효 48시간 일 때 436.93 mg%로 가장 높은 아미노태 질소 함량을 나타내었다.
- 발아청국장의 발아시간과 발효시간에 따른 총균수는 발효 0시간 4.84~6.22 log CFU/mL에서 발효 48시간에 9.33~9.55 log CFU/mL까지 증가를 하였다가 발효 72시간째에는 8.78~9.02 log CFU/mL로 감소하는 경향을 나타내었다. 발효 0시간에 발아 시간에 따른 총균수의 차이는 있었지만 발효가 진행되면서 거의 비슷하게 유지되었다. 발효 48시간 후 24시간 후 숙하는 과정에서 균이 0.3~0.8 log CFU/mL정도 감소하는 경향을 보였는데, 이는 후숙 온도인 15°C에서 중온균들의 생장이 억제되었기 때문으로 생각하였다.
- 발아 청국장의 발아 시간 및 발효 시간에 따른 효소활성에서 산성 protease 활성은 발효 0시간 0.073~0.084 unit/mL에서 발효가 시작되면 급격하게 증가하여 발효 72시간에는 0.284~0.323 unit/mL로 발효가 진행되면서 증가하는 경향을 나타내었다. 발아 0시간-발효 72시간에서 0.323 unit/mL으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 중성 protease 활성은 발효 0시간에 0.066~0.083 unit/mL에서 발효가 진행되면서 급격히 증가하여 발효 72시간에는 0.280~0.332 unit/mL로 측정되었다. 산성·중성 protease 활성 모두 발아를 시키지 않은 경우 활성이 발아를 시킨 경우에 비하여 높게 나타났다.  
α-amylase의 활성은 발효 24시간까지는 2.227~2.405 unit/mL에서 발효가 더 진행되어 발효 48~72시간에는 2.155~2.203 unit/mL로 다소 낮아지는 경향을 나타냈다. β-amylase는 발효 0시간 0.068~0.102 unit/mL에서 발효가 진행되면서 급격히 증가하였다. 발아시간이 24시간 까지는 발효 24시간에서 가장 높은 활성을 나타냈고, 발아 36시간에서는 72시간 발효시킨 경우가 가장 높은 활성을 나타내었다.
- 발아 청국장의 발아 시간 및 발효 시간에 따른 isoflavone 함량은 발아시간과 발효시간이 진행되면서 값이 감소하다가 증가하는 경향을 나타냈다. 발아 36시간-발효 72시간의 경우가 839.86 µg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, daidzein, genistein, glycitein이 각각 295.84 µg/g, 162.99 µg/g, 381.02 µg/g으로 측정되었다.

## 제 2 절 청국장쿠키 제품 개발

### 서 론

최근 식생활 문화의 서구화와 여성들의 사회생활 참여의 증가, 외식산업의 성장, 주거환경의 변화, 단체급식을 이용 증가 등으로 주식으로 간편한 빵을 대용하는 경우가 증가하고 있다. 이러한 식생활의 서구화로 제과제빵 제조 시 기능성 물질을 첨가한 건강지향적 제과제빵류를 시도하는 연구가 이루어지고 있다. 제과제빵의 연구로는 주재료인 밀가루에 빵잎, 신선초가루, 송화가루, 부추 미역과 다시마 가루, 마늘과 양파분말, 보리가루, 흑미가루, 메밀가루 등의 식물성 기능성 물질을 빵과 쿠키에 첨가한 연구로 제과제빵의 품질특성에 관한 연구들이 있으며 기능성 물질을 첨가한 제품의 저장중의 품질변화 연구 및 이화학적 및 관능특성 연구와 미생물 특성연구와 기능성 빵류의 제조에 관한 연구들을 들 수 있다.

쿠키는 건과자의 일종으로 미국의 작고 납작한 비스킷, 영국의 플레인 번, 프랑스의 푸르세크, 독일의 게베크에 해당하는 과자이다. 번이란 화학팽창제나 이스트를 이용하여 부풀린 과자이며 제법에 따르면 반죽을 일정한 두께로 밀어 펴고 형틀로 모양을 찍거나 알맞은 크기로 잘라 만든 과자, 반죽을 찰주머니에 채우고 짜내어 구운 과자, 반죽을 냉장고에 냉장하여 굳힌 뒤 잘라 만든 과자로 분류한다.

청국장은 우리나라 대두 발효식품의 대표로 발효 숙성 과정 중 *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis* 등이 생산하는 효소 작용에 의해 콩 단백질이 분해되어 특유의 구수한 맛과 냄새를 내는 동시에 끈적끈적한 점질물을 생성하는 웰빙식품으로 소화율이 높은 고 영양 식품이며 기능성에 있어서도 효과가 인정되었다.

본 연구는 이소플라본함량이 높은 발아청국장 분말을 이용하여 쿠키를 제조하여 관능적 특성을 살펴보았다.

### 재료 및 방법

#### 발아 청국장의 제조 및 성분 분석

청국장 제조에 사용한 균주, 대두의 수침 및 발아, 발아 청국장 제조, 초미세 분쇄, 수분, 염도, pH, 적정산도, 점질물 함량, 아미노태 질소 함량, 총균수, 산성·중성 protease 활성, Isoflavone 함량 측정, 관능평가 및 통계처리 방법은 청국장음료 제조와 같다.

#### 경도

소성하여 냉각시킨 쿠키를 가로, 세로, 높이 각각 일정하게 자른 후 texture analyzer(TA)를 사용하여 측정하였다. 이때 분석조건은 표 1과 같으며, 시료별로 10개 이상의 시료를 취하여 측정 후 평균 및 편차로 나타내었다.

표 1. 청국장쿠키의 경도 측정 조건

Items	Conditions
probe	5 mm cylinder probe
mode	Measure force in compression
option	T.P.C
pre test speed	2 mm/s
test speed	0.5 mm/s
post test speed	10 mm/s
distance	4 mm
trigger type	Auto 5g

## 결과 및 고찰

### 시판제품 성분규격 및 분석결과

청국장 쿠키로써 시중에서 판매되고 있는 제품을 구매하여 성분규격은 표 2와 같다. (주)크라운소베니아에서는 유기농 설탕과 오리농법과 우렁이농법으로 재배한 쌀을 이용하여 쿠키를 만들고 여기에 기능성이 첨가된 청국장 분말을 첨가하였다. (주)크라운소베니아에서는 청국장의 향을 없애기 위해 치즈, 코코넛, 아몬드를 각각 첨가하였다. 라이스치즈쿠키의 경우 관능평가 결과 치즈의 향이 강하고 가루가 많이 날리는 결과가 나왔다. 라이스코코넛쿠키의 경우 향이 고소하나 입안에서 씹힐 때 바삭거리기 보다는 으스러지는 느낌이 났다. 라이스아몬드쿠키의 경우 고소한 맛과 쿠키의 바삭함이 잘 어울려져 있다. 순창청국장쿠키는 ‘순창장류연구소’에서 분리한 점질물의 양이 우수한 발효균을 사용하여 청국장을 제조한 뒤 발효시켜 쿠키를 제조하였다. 순창청국장쿠키의 경우 청국장 향이 강하고 쿠키가 딱딱한 느낌이 났다.

청국장 쿠키의 시제품 일반분석의 결과는 표 3과 같다. pH는 6.94~7.35의 범위에서 나타났으며 총산의 경우는 0.10~0.24%의 범위에서 나타났다. 시제품의 경도는 라이스치즈쿠키, 라이스코코넛쿠키, 라이스아몬드쿠키, 순창청국장쿠키 각각 1266, 1446, 4747, 12443로 나타났다. 쿠키의 색도는 명도를 나타내는 L값은 50.03~59.02의 범위에서 나타났으며, 적색도를 나타내는 a값은 치즈가 15.04로 가장 높게 나타나고, 3.74로 청국장 쿠키가 가장 낮게 나타났다. 쿠키의 황색도를 나타내는 b의 값은 19.59~27.42의 범위로 나타났다.

청국장 쿠키의 시제품 관능평가 결과는 표 4에서 보는바와 같이 외관은 7.5로 라이스치즈쿠키가 가장 좋은 결과를 나타냈고, 향은 라이스치즈쿠키, 라이스코코넛쿠키, 라이스아몬드쿠키와 비교하여 순창청국장쿠키가 유의적 차이를 보였다. 관능평가의 맛의 경우에서도 향과 같이 순창청국장쿠키가 다른 처리구에 비해 3.83으로 낮은 값을 나타냈다. 조직감의 경우 6.50으로 라이스치즈쿠키가 가장 높게 나타났고, 4.08로 순창청국장쿠키가 가장 낮은 값을 나타냈다. 전체적으로 라이스치즈쿠키, 라이스코코넛쿠키, 라이스아몬드쿠키는 유의적으로 차이가 없었다.

표 2. 청국장쿠키 시판제품의 성분규격





제품명	라이스치즈쿠키	라이스코코넛쿠키	라이스아몬드쿠키	순창 청국장쿠키
제조사	(주)크라운소베니아	(주)크라운소베니아	(주)크라운소베니아	썬베이커리
판매원	(주)리뉴얼라이프	(주)리뉴얼라이프	(주)리뉴얼라이프	순창고추장마을(영)
원재료명	무농약현미(국산) 32.8%, 유기농설탕 21%, 전란액(계란, 국산), 쇼트닝, 마아가린(정제가공유지, 버터(우유), 식물성유지(대두), 전지분유, 대용버터지, 체다치즈가공, 청국장분말, 천연 착색료(파프리카추출), 혼합제제식품첨가물(옥수수전분, 산도조절제)	무농약현미(국산) 24.1%, 유기농설탕 17.8%, 마아가린(정제가공유지 버터), 식물성유지(대두), 전지분유, 대용버터지(수입산), 코코넛분말, 쇼트닝, 전란액(계란), 난백액, 청국장분말, 혼합제제식품첨가물(옥수수전분, 산도조절제)	무농약현미(국산) 7.2%, 유기농설탕 20%, 아몬드슬라이스(미국산) 20%, 난백액(계란국산), 아몬드분말, 코코넛분말, 가공버터(유지방), 야자경화유, 무지고형분, 식염, 청국장분말	청국장분말(대두(국산)100%) 4.1%, 우리밀(국산) 37.3%, 버터(수입) 9.6%, 마가린(수입) 9.6%. 설탕(수입) 19.3%, 소금(국산). 베이킹파우더(수입), 아몬드 5.5%
제품형태	비스킷류	비스킷류	비스킷류	과자류
보관방법	직사광선과 고온 다습한 곳을 피하고 통풍이 잘되는 곳에 보관	직사광선과 고온 다습한 곳을 피하고 통풍이 잘되는 곳에 보관	직사광선과 고온 다습한 곳을 피하고 통풍이 잘되는 곳에 보관	서늘한 곳에 보관하시고 개봉 후에는 냉장고에 보관하세요
영양성분	1회 분량 100g 당 : 열량 515Kcal, 탄수화물 64g(20%), 단백질 6g(10%), 지방 26g(52%), 나트륨 370mg(11%)	1회 분량 100g 당 : 열량 570Kcal, 탄수화물 52g(16%), 단백질 7g(12%) 지방 37g(74%) 나트륨 200mg(6%)	1회 분량 100g 당 : 열량 550Kcal, 탄수화물 54g(16%), 단백질 12g(20%) 지방 31g(62%) 나트륨 90mg(3%)	
포장재질	PP	PP	PP	PP
용량	100 g	100 g	100 g	100g
가격	3000원/1팩	3000원/1팩	3000원/1팩	3000원/1팩
기타특징 및 효능	유기농 설탕과 오리농법과 우렁이농법으로 재배한 쌀로 만들	유기농 설탕과 오리농법과 우렁이농법으로 재배한 쌀로 만들	유기농 설탕과 오리농법과 우렁이농법으로 재배한 쌀로 만들	제품에 사용된 청국장균은 순창군 '장류연구사업소'에서 분리한 발효균과 발효과정을 거쳐 만들어진 제품임
제품사진				
의견	치즈의 향이 강하고 가루가 많이 있음	향이 고소하여 좋으나 입안에서 씹힐 때 바삭보다는 으스러지는 느낌이 남	아몬드의 고소한 맛과 쿠키의 바삭함이 잘 어울려짐	청국장 향이 강하고 조직감이 좋지 않음

표 3. 청국장쿠키 시판제품의 일반분석

	라이스치즈쿠키	라이스코코넛쿠키	라이스아몬드쿠키	순창청국장쿠키	
pH	6.94±0.05	7.04±0.07	7.35±0.03	7.15±0.03	
산도(%)	0.24±0.01	0.12±0.01	0.10±0.01	0.13±0.01	
경도	1266±238	1446±268	4745±451	12443±1088	
L	52.18±0.01	50.03±0.01	54.99±0.02	59.02±0.01	
색도	a	15.04±0.02	9.15±0.02	7.02±0.01	3.74±0.02
	b	27.42±0.01	19.59±0.01	20.82±0.00	20.82±0.00

표 4. 청국장쿠키 시판제품의 관능평가

	치즈	코코넛	아몬드	순창청국장쿠키
외관	7.5 <sup>a</sup>	6.3 <sup>b</sup>	6.42 <sup>b</sup>	6.00 <sup>b</sup>
향	6.75 <sup>a</sup>	7.17 <sup>a</sup>	6.17 <sup>a</sup>	4.50 <sup>b</sup>
맛	7.00 <sup>a</sup>	6.08 <sup>a</sup>	6.42 <sup>a</sup>	3.83 <sup>b</sup>
조식감	6.50 <sup>a</sup>	5.92 <sup>a</sup>	5.75 <sup>a</sup>	4.08 <sup>b</sup>
전체적기호도	7.17 <sup>a</sup>	6.00 <sup>a</sup>	6.67 <sup>a</sup>	4.25 <sup>b</sup>

### 발아청국장 쿠키의 제조

발아청국장을 첨가한 쿠키를 제조하기 위해서 먼저 발아청국장의 가장 문제가 되는 청국장 취를 제거하기 위해 죽염과 소금을 첨가하여 쿠키를 제조한 뒤 관능평가를 실시하였다. 관능평가의 결과는 표 4와 같다. 관능평가의 결과 색, 맛, 향에서는 유의적인 차이가 없었으나 향의 경우 죽염을 첨가한 발아청국장쿠키에서는 6.60으로 소금을 넣은 발아청국장쿠키 5.60보다 높은 값을 나타냈고 유의적 차이를 나타냈다.

죽염이 청국장의 냄새를 제어하는 것을 알기위해 죽염 1%에 발아청국장 분말의 양을 다르게 첨가하여 쿠키를 제조한 뒤 관능평가를 실시한 결과(표 5) 발아청국장 분말 9%에서는 색, 향, 맛, 조식감, 전체적 기호도 각각 0, 3, 6% 보다 낮게 나타났다. 6%의 경우 0, 3%와 유의적 차이는 있었지만 청국장쿠키임을 알고 먹었을 때 유의적 차이가 없을 것 이라 판단하여 발아청국장 분말의 함량을 6%로 정하였다.

발아청국장 함량을 6%로 결정한 후 보리새순잎 발아청국장쿠키, 발아청국장 쿠키, 머핀형 발아청국장쿠키로 쿠키를 제조한 뒤 관능평가를 실시한 결과는 표 6과 같다. 색, 향, 맛, 조식감에서 약간의 차이를 나타냈지만, 전체적 기호도에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

표 4. 발아청국장 분말쿠키의 죽염첨가 효과(관능평가)

항 목	죽염 첨가구	소금 첨가구
색	5.80 <sup>a</sup>	5.40 <sup>a</sup>
향	6.60 <sup>a</sup>	5.60 <sup>b</sup>
맛	7.13 <sup>a</sup>	6.20 <sup>a</sup>
조직감	6.93 <sup>a</sup>	6.33 <sup>a</sup>

표 5. 죽염 1%의 발아청국장 분말의 함량에 따른 발아 청국장쿠키 관능평가 결과

항 목	0%	3%	6%	9%
색	6.93 <sup>a</sup>	6.93 <sup>a</sup>	6.36 <sup>a</sup>	4.57 <sup>b</sup>
향	7.14 <sup>a</sup>	6.93 <sup>a</sup>	5.64 <sup>b</sup>	3.86 <sup>c</sup>
맛	7.14 <sup>a</sup>	7.00 <sup>a</sup>	5.36 <sup>b</sup>	5.57 <sup>b</sup>
조직감	6.93 <sup>a</sup>	6.50 <sup>a</sup>	4.57 <sup>b</sup>	4.93 <sup>b</sup>
전체적 기호도	7.29 <sup>a</sup>	7.29 <sup>a</sup>	5.36 <sup>b</sup>	4.50 <sup>b</sup>

표 6. 발아청국장 분말(6%)을 첨가한 쿠키의 관능평가

항 목	보리새순잎 발아청국장쿠키	발아청국장 쿠키	머핀형 발아청국장 쿠키
색	5.52 <sup>b</sup>	7.41 <sup>a</sup>	6.36 <sup>a</sup>
향	7.52 <sup>a</sup>	7.42 <sup>a</sup>	6.34 <sup>a</sup>
맛	7.96 <sup>a</sup>	7.42 <sup>a</sup>	7.45 <sup>a</sup>
조직감	6.93 <sup>a</sup>	6.50 <sup>a</sup>	5.32 <sup>b</sup>
전체적 기호도	7.34 <sup>a</sup>	7.24 <sup>a</sup>	7.11 <sup>a</sup>

#### 청국장쿠키의 제조

#### 보리새순잎가루 첨가 발아청국장 쿠키 제조방법 및 배합비(표 7)

- ① 버터와 쇼트닝을 부드럽게 한 후 설탕, 물엿, 소금을 넣고 크림상태로 만든다.  
(경도가 다를 경우 높은 것부터 유연하게 만든 후 섞는다.)
- ② 계란분말과 물을 조금씩 넣으면서 믹싱해 부드럽게 만든 후 향을 넣어 섞는다.
- ③ 밀가루를 체로 친 후 2.와 혼합해 반죽을 한 덩어리로 만든다.
- ④ ③을 비닐에 넣어 냉장고에서 30분 휴지 시킨다.
- ⑤ 밀어펴기 쉽도록 반죽을 2개로 나눈 후 0.5cm 정도의 두께로 균일하게 밀어 편다.

- ⑥ 정형기를 이용해 반죽을 찍어낸다.
- ⑦ 철판에 기름을 친 후 상하좌우 간격을 2.5 cm 씩 맞춰 팬닝한다.
- ⑧ 150℃에서 10분 구운 후 180℃에서 5분 구워낸다.

**표 7. 보리새순잎가루 발아청국장 쿠키의 배합비**

	Bakery percent(g)	%
밀가루(박력분)	100	36.83
발아청국장분말	6	2.21
버터	33	12.15
쇼트닝	33	12.15
설탕	35	12.89
죽염	1	0.37
물엿	20	7.37
계란분말	6	2.21
물	14	5.16
바닐라향	0.5	0.18
호두	20	7.37
보리새순잎가루	3	1.10
합계	271.5	100.00

**발아청국장 쿠키 제조방법 및 배합비(표 8)**

- ① 볼에 버터를 넣고 거품기로 부드럽게 만든다.
- ② ①에 설탕과 소금을 넣어 섞은 다음 계란분말과 물을 조금씩 넣으면서 부드러운 크림을 만든다.
- ③ ②에 바닐라 향을 넣는다.
- ④ 체로 친 박력분을 넣고 가볍게 섞는다.
- ⑤ 평철판에 찰주머니로 모양을 찐다.
- ⑥ 150℃에서 10분동안 구운다음 180℃에서 5분정도 구워낸다.

**표 8. 발아청국장 쿠키의 배합비**

	Bakery percent(g)	%
밀가루(박력분)	100	41.93
발아청국장분말	6	2.52
버터	33	13.84
쇼트닝	33	13.84
설탕	35	14.68
죽염	1	0.42
계란분말	9	3.77
물	21	8.81
바닐라향	0.5	0.21
합계	238.5	100.00

**머핀형 발아청국장 쿠키 제조방법 및 배합비(표 9)**

- ① 계란분말과 물을 골고루 섞은 후 설탕, 소금을 넣고 세계 믹싱한 후 향을 섞는다.
- ② 박력분, 탈지분유를 체로 친 후 ①에 넣고 가볍게 혼합한다.
- ③ 5분간 실온에서 휴지 시킨다.
- ④ 찰주머니에 지름 0.6 cm의 둥근꼭지를 끼우고 반죽을 채운다.
- ⑤ 머핀모양 유산지 위에 반죽을 1/3만큼 찐다.
- ⑥ 마르기 전에 설탕을 뿌려준다.
- ⑦ 150℃에서 10분 구운 후 180℃에서 10분 구워낸다.

**표 9. 머핀형 발아청국장 쿠키의 배합비**

	Bakery percent(g)	%
밀가루(박력분)	100	36.43
발아청국장분말	6	2.19
탈지분유	2	0.73
설탕	90	32.79
소금	1	0.36
계란분말	22.5	8.20
물	52.5	19.13
바닐라	0.5	0.18
합계	274.5	100.00

**요 약**

- 이소플라본함량이 높은 발아청국장 분말을 이용하여 쿠키를 제조하기 위하여 발아청국장의 특성을 조사한 뒤 발아청국장 분말을 제조하여 쿠키의 배합비를 완성하였다.
- 발아청국장 분말의 첨가 시 가장 문제가 되는 냄새를 제어하기 위해 청국장 냄새에 효과가 있는 죽염을 1%첨가하여 관능평가를 실시하여 효과가 있음을 알고 죽염 1%가 청국장 분말 향기를 몇 %를 제어하는지를 알기 위해 청국장 분말의 함량을 달리하여 쿠키를 제조한 뒤 관능평가의 결과 청국장 쿠키임을 알고 평가를 했을 때 6%까지 효과적이었다.
- 청국장분말 6%와 죽염을 첨가한 발아청국장 쿠키 3종(발아청국장쿠키, 보리새순잎가루첨가 발아청국장쿠키, 머핀형 발아청국장쿠키)의 배합비를 결정하였다.



### 제 3 절 블록형 또는 찌개형 제품 생산기술 개발 (과립고추장을 이용한 간편 비빔소재 개발)

#### 서 론

고추장이라 함은 두류 또는 곡류 등을 제국한 후 여기에 덧밥, 고춧가루, 식염 등을 혼합하여 발효, 숙성시킨 것이거나 제국한 후 덧밥 등과 함께 발효, 숙성시킨 것에 고춧가루(6%이상), 식염 등을 혼합하여 제품화한 것으로써 된장 및 간장과 함께 오랜 기간 사용되어 온 우리나라 고유의 전통 발효식품으로 간장, 된장 등 다른 장류에 비하여 역사가 그리 길지 않음에도 우리 식탁에서 가장 중요한 조미료로 자리 잡아 왔다(Korean J. Food Sci. Technol. 32: 854~859, 2000).

최근 현대인들은 외식증가와 핵가족화, 그리고 여성들의 사회참여 확대로 가정에서 전통장류를 담아서 섭취하는 경우는 드물며, 이런 생활방식의 변화에 따라 우리나라 장류 소비시장은 꾸준히 증가 추세에 있다. 하지만 장류 등의 발효식품, 특히 고추장은 응용분야가 조미식품으로 극히 제한되어 있고, 신세대의 경우 고추장 메주에서 오는 친숙치 못한 향기와 고추에서 유래한 매운맛, 부재료에서 오는 짠맛 등으로 기피하고 있는 추세이며, 현대인의 기호와 식생활 문화에 따르지 못하고 있어 소비시장에서 점차 외면 받고 있으므로 이에 대한 개선이 절실하게 요구되고 있는 실정이다.

하지만 최근 국내에서 고추장과 관련하여 진행되고 있는 연구로는 전통고추장의 제법조사, 품질개량을 위한 전통메주의 효과, 재래식 고추장 숙성 중의 미생물상과 효소력의 변화 및 성분변화, 쥐를 대상으로 한 고추장의 생리활성 등에 대하여 제한적으로 진행되고 있다.

비빔밥은 궁중요리로 점심때 가볍게 먹던 음식이라고 전해지며 여러 가지 야채 및 소고기, 버섯 등의 재료가 고루 혼합되어 있어 건강에 좋을 뿐만 아니라 맛도 좋고 편리하게 먹을 수 있으며, 포만감도 갖게 된다(Korean J. Soc. Food Cookery Sci. 20: 677~683, 2004). 또한 비빔밥은 김치, 불고기와 함께 한국을 대표하는 음식으로서 자리매김 하였으나, 한식의 경우 제조하는 과정이 복잡하고 들어가는 재료의 종류가 많아 쉽게 접하지 못한다는 단점을 가지고 있어 세계화를 위해 세계인의 입맛을 맞추고 간편하게 섭취할 수 있는 방법에 관한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 우리나라의 전통 장류인 고추장의 기호성 및 소비 증대를 위하여 밥만 있으면 언제 어디서나 간편하게 고추장 비빔밥을 즐길 수 있도록 과립고추장을 이용한 간편 비빔소재를 개발하고자 하였다.

최근 국내 외에 한류 확산과 더불어 웰빙(well-being)에 대한 관심 증가 등으로 한식의 세계화에 대한 요구가 증가되고 있으며, 건강에 대한 의식 변화로 식품의 첨가물에 대한 관심이 높아지면서 발효식품과 천연 향신료가 부각되고 있다<sup>(1)</sup>. 우리나라의 고추장은 약 200년의 전통을 가진 전통 발효식품으로 고추분, 찹쌀, 콩의 발효물에서 유래된 단백질, 당류, 카로틴, 비타민과 캡사이신, 대두 펩타이드 등 영양성분 및 생리 활성 물질을 함유하고 있으며, 매운맛, 단맛, 감칠맛이 잘 조화된 특성이 있어 각종 요리에 이용가치가 높다<sup>(2)</sup>.

고추장은 수분함량이 높아 paste 상태이고 저장성이 낮아 여러 종류의 가공식품소재로 혼합하여 이용하기가 어려운 점이 있다<sup>(3)</sup>. 이런 문제점을 해결하기 위한 방법으로 40% 정도의 수분을 가지고 있는 고추장을 분말화 하여 여러 식품분야에 응용하고 또한 분말화를 통하여 고추

장의 저장기간 및 안정성을 늘려 운반 및 휴대를 간편하게 하려는 연구가 많이 진행되어 왔다<sup>(3)</sup>. 또한 과립형태는 분말에 비해 용해성과 저장 안정성이 높아 다양한 원료를 이용한 음용차, 조미료 및 의약품 등의 제조에 널리 적용되고 있다<sup>(4)</sup>.

한편, 고추장을 분말화 하는 건조과정에서 향미의 손실이 불가피하며 최종제품의 품질특성에 영향을 끼치는 중요한 요인으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 고추장으로 과립을 제조한 후, 향기성분을 분석함으로써 과립고추장의 품질특성을 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용된 고추장은 즉석식 분말고추장(고추장 제조에 사용되는 재료를 건조 분말 상태로 혼합하여 끓는 물을 40% 첨가하여 섭취하도록 제조됨)은 순창 장본가전통식품, 찹쌀고추장은 순창성도집 전통고추장, 우리밀고추장(우리밀 함량 36%)은 순창마을에서 각각 구입하여 과립 고추장 제조에 사용하였다. 소고기 과립고추장 비빔소재를 만들기 위한 소고기, 호박, 적색양배추, 당근, 시금치 등은 전북 전주시내의 대형 유통마트에서 구입하여 사용하였다.

### 과립의 제조

동결건조한 고추장을 분쇄하여 48 mesh 이하의 크기로 체질하여 고추장분말을 얻었고, 이의 100 g당 dextrin 30 g을 첨가하여 반죽한 후 건조 및 분쇄하고, 다시 48 mesh 이하의 크기로 체질한 후, 이를 습도 50% 이상의 조건에서 과립화하여 18 mesh의 체를 통과시켜 과립고추장을 제조하였다.



<생고추장>



<고추장분말>



<과립고추장>

### 수분 측정

과립고추장 2~3 g을 항량을 구한 칭량병에 넣고 105℃ dry oven에서 2시간 건조하고 테시케이터에서 30분 방냉 후 측정을 반복해 항량을 구하였다.

### pH

pH는 시료 5 g을 취해 증류수 45 mL을 가한 후 잘 용해하고, pH meter(model ORION STAR SERIES, U.S.A)로 측정하였다.

### 총산

시료 5 g을 취해 증류수 45 mL을 가한 후 잘 용해하고, 전량에 0.1 N NaOH 용액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하고 초산 양으로 환산하였다.

$$\text{총산(g/100 mL)} = V_a \times f \times a \times 100/W$$

$V_a$  : 0.1 N NaOH 표준용액의 적정값(mL)

$f$  : 0.1 N NaOH 표준용액의 factor

$a$  : 해당 산의 0.1 N NaOH 1mL 중화 소요량(초산: 0.0060)

$W$  : 시료량(g)

### 색도

색도는 색차계(Chroma meter, Model CR-400, Minolta Co., Ltd., Japan)로 Hunter scale에 따라 L(Lightness), a(redness), b(yellowness)와  $\Delta E [(L_0-L_1)^2+(a_0-a_1)^2+(b_1-b_0)^2]^{1/2}$  값으로 표시하였다.

### 용해성 측정

용해성은 과립 1 g을 20℃의 증류수 20 mL에서 1분간 용해시키고 5,000 rpm에서 30분간 원심분리(Model J2-21 Centrifuge, Beckman LTD., USA)하여 남은 고형분의 양을 측정하여 나타내었다.

### 흡습성 측정

흡습성은 과립 0.5 g을 증류수를 채운 데시케이터에 넣고 1시간 간격으로 7시간 동안 흡습에 따른 무게 증가를 측정하여 나타내었다.

### 향기성분 분석

향기성분의 추출은 Oh 등의 방법에 따라 SDE(Simultaneous steam distillation-extraction)장치를 이용하여 추출하였다<sup>(5)</sup>. 즉 샘플플라스크에 시료 200 g과 증류수 600 mL를 혼합한 시료액을 넣고, 용매플라스크에는 추출용매(ethyl ether:pentane = 2:1) 50 mL를 넣은 후 100℃에서 1.5시간 추출하였다. 추출용매에 무수황산나트륨을 가하여 하룻밤 방치한 후 여과한 여액을 질소가스하에서 1 mL로 농축시켜 GC/MS를 이용하여 아래와 같은 조건으로 분석하였다.

Instrument	QP 2010 (Shimadzu Co., Ltd)
Column	SPB-5 , 60m x 0.25mm , thickness 0.25 $\mu$ m
Oven temp.	40 $^{\circ}$ C (10min) $\rightarrow$ 2 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 230 $^{\circ}$ C (30min)
Column temp.	40 $^{\circ}$ C
Flow rate	57.3 mL/min(He)
Injector temp.	230 $^{\circ}$ C
Interface temp.	250 $^{\circ}$ C
Ion source temp.	200 $^{\circ}$ C
Ionizing voltage	70 eV
Split ratio	1:60

### 관능평가

과립고추장은 전북대학교 식품공학과 대학원생 15명을 대상으로 관능평가를 실시하였고, SAS(Statistical Analysis System)통계 package(SAS Institute, Inc, 1990)를 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였으며, ANOVA 분석 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 수분 함량

과립고추장의 수분함량을 측정한 결과 분말고추장이 8.43 $\pm$ 0.34%로 가장 낮게 나타났으며, 찹쌀고추장 및 우리밀고추장은 각각 11.28 $\pm$ 0.10%, 12.53 $\pm$ 0.35%를 나타내었다. 이는 고추장은 동결건조 후에도 흡습성이 뛰어나며 높은 수분함량을 갖게 되는데 분말고추장의 경우 고추장을 발효시키지 않고 재료들을 건조한 후 분말화 하여 혼합해 놓은 건조분말 상태였기 때문에 다른 고추장에 비하여 수분함량이 낮게 나타난 것으로 보인다.

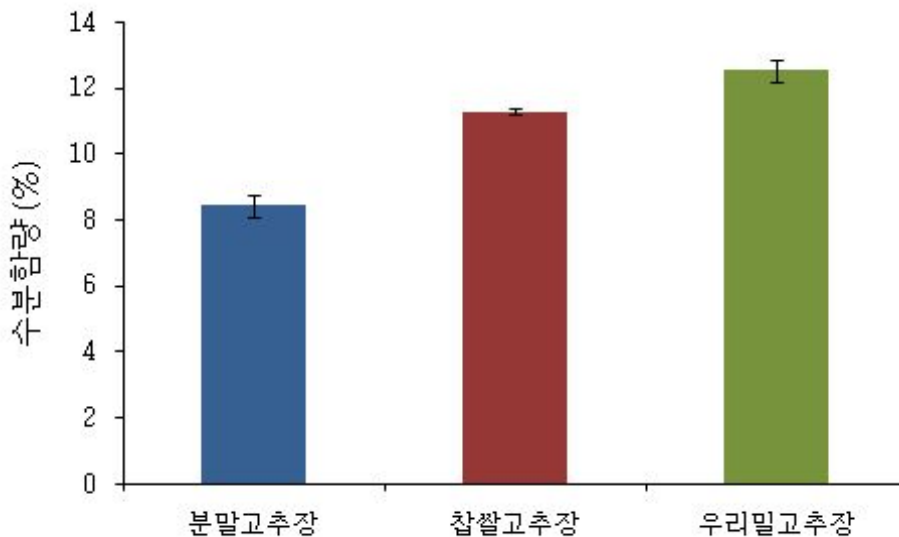


그림 1. 고추장 종류에 따른 과립고추장의 수분함량.

### pH 및 총산

고추장의 pH는 분말고추장  $4.93 \pm 0.01$ , 찹쌀고추장  $4.72 \pm 0.01$ , 우리밀고추장  $4.54 \pm 0.00$ 으로 처리구 간에 약간의 차이가 있는 것으로 확인되었으며, 총산함량은 각각  $1.50 \pm 0.03\%$ ,  $1.47 \pm 0.04\%$ ,  $1.54 \pm 0.01\%$ 로 차이가 없음을 확인하였다.

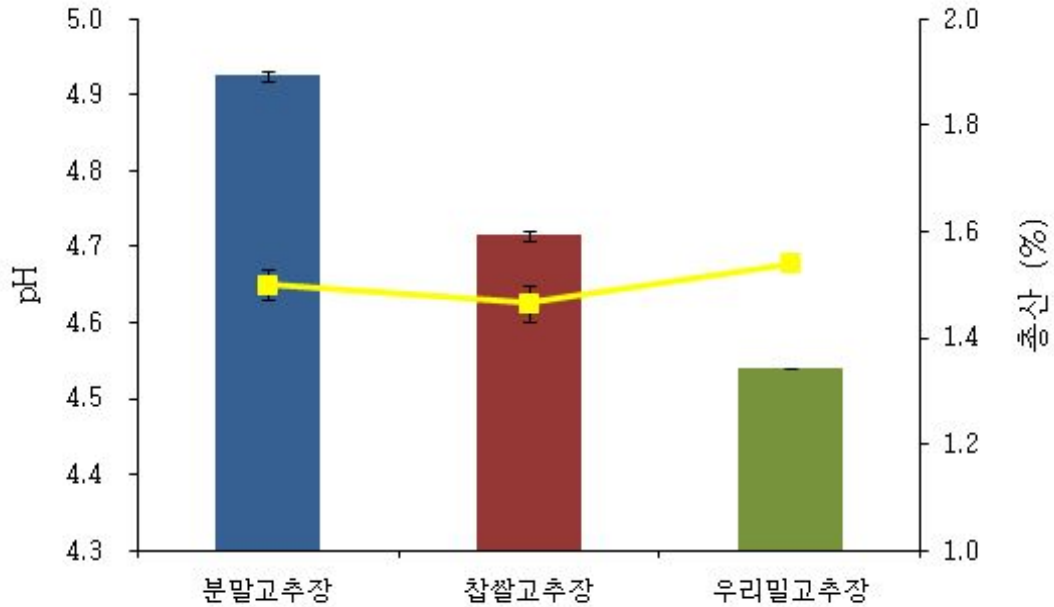


그림 2. 고추장 종류에 따른 과립고추장의 pH 및 총산.

### 색도

색도는 고추장의 품질지표로 사용되기도 하는데, 과립고추장의 색도는 과립상태와 고추장 1g을 증류수 10 mL에 용해시킨 후 액체상태의 두가지 형태로 측정하였다. 과립상태의 처리구에서는 분말고추장과 찹쌀고추장의 색도는 큰 차이를 보이지 않았으며, 우리밀고추장의 명도(L)  $29.96 \pm 0.00$ , 황색도(b)  $16.95 \pm 0.00$ 가 낮게 나타났다. 액체상태의 처리구에서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

표 1. 고추장 종류에 따른 과립고추장의 색도

시 료	과립			액체		
	L	a	b	L	a	b
분말고추장	$37.46 \pm 0.02$	$23.35 \pm 0.11$	$20.52 \pm 0.04$	$1.22 \pm 0.00$	$4.78 \pm 0.52$	$0.85 \pm 0.00$
찹쌀고추장	$34.24 \pm 0.00$	$22.88 \pm 0.08$	$19.66 \pm 0.00$	$1.41 \pm 0.00$	$4.29 \pm 0.54$	$0.85 \pm 0.21$
우리밀고추장	$29.96 \pm 0.00$	$22.04 \pm 0.04$	$16.95 \pm 0.00$	$1.66 \pm 0.11$	$4.12 \pm 0.64$	$1.16 \pm 0.08$

### 용해성

용해성은 과립의 용해도를 알아보기 위해 물에 용해시킨 후 고형물의 양을 측정된 결과로서 분말고추장 0.786±0.056 g, 찹쌀고추장 0.601±0.011 g, 우리밀고추장 0.529±0.020 g 으로 우리밀고추장의 용해도가 가장 높은 것으로 확인되었으며, 분말고추장의 용해도가 가장 낮게 나타났다.

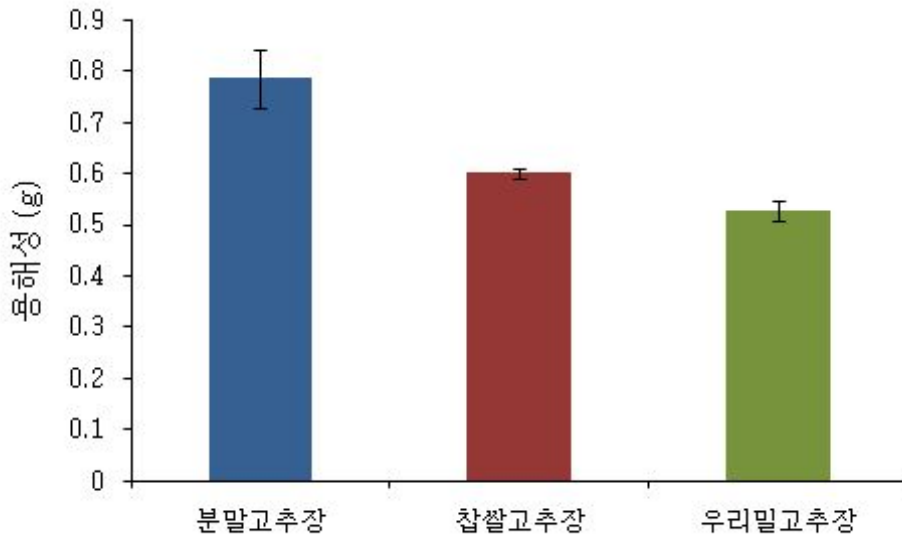


그림 3. 고추장 종류에 따른 과립고추장의 용해성.

### 흡습성

고추장 종류에 따른 과립고추장의 흡습성(그림 4)은 모든 처리구에서 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 찹쌀고추장의 경우 초기 흡습성이 다른 과립고추장에 비해 높게 나타났고, 5 시간 경과 후 우리밀고추장이 0.186±0.002 g으로 찹쌀고추장 0.185±0.003 g 보다 높아지기 시작하여 7 시간 후 우리밀고추장 0.238±0.08 g, 찹쌀고추장 0.218±0.003 g, 분말고추장 0.159±0.000 g 순으로 나타났다. 분말고추장의 흡습성이 가장 낮은 것으로 나타나 저장안정성이 좋을 것으로 확인되었다.

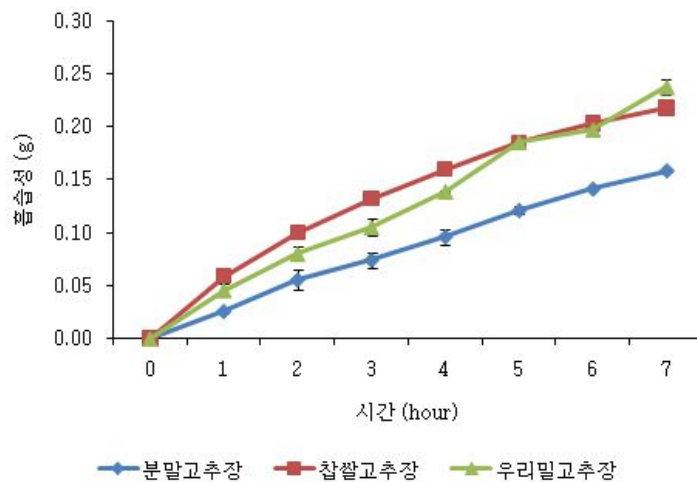


그림 4. 고추장 종류에 따른 과립고추장의 흡습성 변화.

### 소고기 과립고추장 비빔의 제조

- ① 동결건조한 고추장 분말을 18 mesh의 크기를 갖는 과립체를 통과시켜, 체질한 다음 50℃에서 2시간 건조하여 과립을 제조한다.
- ② 소고기는 핏물을 제거한 뒤 잘게 다져 익힌 뒤 동결건조 한다.
- ③ 과립고추장 비빔의 재료에 사용되는 당근, 호박, 시금치, 양배추 등은 세척한 뒤 0.5 × 0.5 × 0.2 cm의 크기로 절단 후 blanching하고 냉각시켜 동결건조 한다.
- ④ 각각의 재료를 표 I-2의 배합비율에 따라 혼합한다.
- ⑤ 뜨거운 밥에 과립고추장 비빔 1회 제공량을 첨가하고 기호에 따라 참기름 또는 김가루 등을 첨가하여 섭취한다.



그림 5. 고추장 종류에 따른 과립고추장 사진.

### 소고기 과립추장 비빔소재의 1회 제공량 설정

시중에 유통되고 있는 포장밥 1회 제공량 210 g을 기준으로 하여 소고기 과립고추장 비빔소재의 1회 제공량을 설정하였다. 그림 I-6과 같이 즉석 포장밥 210 g에 소고기 과립고추장 비빔소재를 각각 10 g, 20 g, 24 g, 30 g 첨가한 결과 10~20 g의 경우 고추장 및 야채가 적어 고루 비벼지지 않았으며, 30 g 첨가해줄 경우 과립고추장의 양이 너무 많아 뭉치거나 오히려 색택이 어두워지는 것을 알 수 있었다. 소고기 과립고추장 비빔소재의 1회 제공량은 시중에 유통되고 있는 다른 비빔소재 등의 1회 제공량 및 비빔밥의 형태와 맛을 고려하여 24 g으로 설정하였다.



< 10 g 첨가 >      < 20 g 첨가 >      < 24 g 첨가 >      < 30 g 첨가 >

그림 6. 소고기 과립고추장 비빔소재의 첨가량에 의한 비빔밥.

표 2. 과립고추장 비빔소재의 1회 제공량 및 배합비

원 재료	1회 제공량 (g)	배합비 (%)
과립 고추장	19.20	80
소고기	2.40	10
당근	0.72	3
시금치	0.72	3
호박	0.48	2
적색 양배추	0.48	2
합계	24	100



그림 7. 고추장 종류에 따른 소고기 과립고추장 비빔소재의 1회 제공량.

#### 고추장 종류에 따른 소고기 과립고추장 비빔밥의 관능평가

고추장 종류에 따른 소고기 과립고추장 비빔밥의 관능평가(표 3)를 실시한 결과 색상, 향미, 맛, 전반적 기호도 모두에서 참쌀고추장이 높은 값을 나타내었다. 용해도 분석결과 가장 낮은 값을 나타내었던 분말고추장의 경우 밥과 융화되는 정도가 떨어졌으며, 높은 적색도가 비빔밥으로 제공되었을 때는 오히려 기호성을 떨어뜨리고, 발효되지 않은 고추장이기 때문에 풍미가 떨어져 향미에서 참쌀고추장 및 우리밀고추장과 유의적인 차이를 보였다. 또한 우리밀고추장의 경우 전반적으로 전통고추장에서 나는 감칠맛이 부족하다는 의견이 있었으며, 맛에서  $4.86 \pm 1.96$ 으로 참쌀고추장에 비하여 유의적으로 낮은 값을 보였다. 참쌀고추장 비빔밥은 평소 먹던 비빔밥의 맛과 향을 그대로 복원하였으며, 참기름을 약간 첨가하여 밥을 조금 더 부드럽게 하면 좋겠다는 의견이 있었다.



표 3. 고추장 종류에 따른 소고기 과립고추장 비빔밥의 관능평가 결과

항 목	분말고추장	참쌀고추장	우리밀고추장
색상	4.21±1.48 <sup>b1)</sup>	7.21±0.89 <sup>a</sup>	5.07±1.59 <sup>b</sup>
향미	4.21±1.37 <sup>b</sup>	5.64±1.82 <sup>a</sup>	5.86±1.61 <sup>a</sup>
맛	4.14±1.23 <sup>b</sup>	6.00±1.88 <sup>a</sup>	4.86±1.96 <sup>ab</sup>
전반적 기호도	4.00±1.36 <sup>b</sup>	6.21±1.48 <sup>a</sup>	5.29±1.86 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p<0.05$ ).



그림 8. 고추장 종류에 따른 소고기 과립비빔밥.

### 향기성분

생고추장, 고추장분말, 과립고추장의 향기성분을 분석한 결과는 Table I-3-1과 같다. 생고추장의 향기성분은 알데히드류 5종, 알코올류 4종, 케톤류 1종, 산류 2종, 에스터류 11종, 알칸류 1종 등 총 26종의 향기성분이 동정되었다.

이를 동결건조하고 분쇄한 고추장분말의 향기성분은 알데히드류 4종, 알코올류 5종, 케톤류 1종, 산류 4종, 에스터류 4종, 알칸류 3종, 알켄류 2종 등 총 26종의 향기성분이 동정되었다. 고추장분말의 향기성분 수는 생고추장의 향기성분 수와 동일하게 나타났으나 그 구성 성분에는 차이가 있었다. 생고추장을 동결건조하였을 때 알데히드류 1종 감소, 알코올류 1종 증가, 산류 2종 증가, 에스터류 7종 감소, 알칸류 2종 증가, 알켄류 2종 이 생성되는 등의 변화가 있었다.

이 고추장분말을 이용한 과립고추장의 향기성분은 알데히드류 3종, 알코올류 4종, 산류 2종, 에스터류 4종, 알칸류 4종 등 총 18종이 동정되었다. 고추장분말을 과립형태로 제조 했을 때 향기성분은 알데히드류 1종 감소, 알코올류 1종 감소, 케톤류 1종 감소, 산류 2종 감소, 알칸류 1종 증가, 알켄류 1종 감소하는 등의 변화를 나타냈다.

향기성분의 면적비율의 변화를 살펴보면, 고추장을 과립형태로 제조했을 때 알데히드류, 산류, 에스터류, 알칸류의 비율이 증가하였고, 알코올류, 케톤류의 비율이 감소하였다.

생고추장, 고추장분말, 과립고추장에서 공통된 향기성분으로는 3-methyl-butanal, furfural, benzeneacetaldehyde, ethanol, 2-propoxy-2-propanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 9-octadecynoic acid, ethyl acetate, ethyl tetradecanoate, ethyl hexadecanoate, ethyl E-11-hexadecenoate, 1-ethoxy propane, tetramethyl pyrazine로 총 14종으로 나타났다.

생고추장을 동결건조 하면 향기성분의 종류가 달라졌으며, 이를 이용하여 과립을 제조하면 향기성분의 수가 다소 감소하는 결과를 나타내었다.

**알데히드** 생고추장의 알데히드류는 3-methyl-butanal, 2-methyl-butanal, n-hexanal, furfural, benzeneacetaldehyde로서 총 5종의 향기성분이 검출되었고, 이들은 전체 면적비율의 0.38%를 차지하고 있었으며, 이 중 furfural과 benzeneacetaldehyde가 주를 이루고 있었다. 이를 동결건조하여 분쇄한 고추장분말은 3-methyl-butanal, furfural, 5-methyl furfural, benzeneacetaldehyde로서 총 4종의 향기성분이 검출되었고, 이들은 전체 면적비율의 6.54%를 차지하였으며, 이는 생고추장의 0.38%의 면적비율보다 약 20배 증가한 값이었다. 고추장분말의 향기성분에서 생고추장에서 검출되었던 2-methyl-butanal과 n-hexanal 성분이 검출되지 않고, 반면 생고추장에 없었던 5-methyl furfural 성분이 새롭게 검출되었으며, 고추장분말의 알데히드류 중 furfural이 가장 큰 비중을 차지하고 있었다.

고추장분말을 이용하여 과립 제조시 분말고추장에 있었던 5-methyl furfural 성분을 제외한 3-methyl-butanal, furfural, benzeneacetaldehyde 성분이 동일하게 검출되었다. 과립고추장에서 분말고추장에서와 마찬가지로 furfural이 가장 큰 비중을 차지하고 있었으며, 과립고추장의 알데히드류가 차지하는 면적비율은 14.33%로서 고추장분말에서의 면적비율보다 2배 이상 증가한 값이었다.

생고추장, 고추장분말, 과립고추장의 공통적 주된 향기성분인 furfural은 Oh 등의 결과에서도 고추장의 알데히드류 향기성분 중 가장 큰 비율을 차지하는 성분으로 나타났다<sup>(5)</sup>.

**알코올** 생고추장의 알코올류 향기성분은 ethanol, 2-propoxy-2-propanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol이 동정되었고, 전체 면적비율의 79.62%를 나타내며 가장 큰 비율을 차지하였다. 이 중에서도 ethanol이 77.94%의 면적비율을 차지하며 알코올류의 대부분을 차지하였다.

고추장분말은 생고추장의 향기성분에 추가적으로 2-methyl-2-propanol이 동정되었고, 알코올류의 전체 면적비율은 42.95%로서 생고추장의 알코올류 면적비율의 약 1/2 수준으로 감소를 보였으며, 고추장분말에서도 ethanol이 가장 큰 비율을 차지하였다.

과립고추장의 알코올류 향기성분은 고추장분말에서 검출되었던 2-methyl-2-propanol 성분이 다시 검출되지 않으면서, 생고추장의 향기성분 종류와 동일한 결과를 나타내었다. 그러나 면적비율에서는 다소 차이가 있었으며, 생고추장에 비해 약 1/7로 감소한 값이었고, 고추장분말에 비해 약 1/4로 감소한 값이었다.

전체적으로 ethanol이 가장 많은 면적비율을 차지하였으며, 이는 여러 연구 결과에서도 밝혀진 바 있으며<sup>(6,7)</sup>, 고추장의 알코올류 중 가장 중요한 향기성분이라고 판단된다. 또한 2-methyl-1-propanol과 3-methyl-1-butanol 성분도 여러 연구에서 ethanol과 함께 주된 알코올류 성분으로 나타났고<sup>(6,7)</sup>, 이와는 달리 본 연구의 생고추장에서는 미량으로 나타났으나, 과립제조시 ethanol의 상대적 감소로 인한 2-methyl-1-propanol과 3-methyl-1-butanol 등의 비율 증가의 결과로서 알코올류의 주된 향기성분으로 나타났다.

**케톤** 생고추장과 고추장분말의 케톤류 향기성분은 1-(1-methylethoxy)-2-propanone이 동정되었고, 각각 0.24%과 0.67%의 낮은 면적비율을 차지하였으며, 과립고추장에서는 케톤류 성분이 검출되지 않았다.

**산** 생고추장의 산류 향기성분은 9-octadecynoic acid, 9,12,15-octadecatrienoic acid로 나타났고, 이들은 전체 면적비율에서 7.15%를 차지하였다.

고추장분말의 산류 향기성분은 acetic acid, 2-methyl propanoic acid, 3-methyl-butanoic acid, 9-octadecynoic acid가 동정되었다. 고추장분말의 산류 향기성분 수는 생고추장의 향기성분 수에 비해 증가하였으며, 그 면적비율도 증가하여 17.32%를 나타냈다.

과립고추장의 산류 향기성분은 그 수가 다시 감소하여, 3-methyl-butanoic acid, 9-octadecynoic acid가 검출되었다. 그 면적비율도 다소 감소하여 12.09%를 나타내었다.

동정된 산류 향기성분인 acetic acid, 2-methyl-propanoic acid, 3-methyl-butanoic acid, 9,12,15-octadecatrienoic acid는 Oh 등의 연구 결과에서 고추장의 향기성분으로 동정된 바 있다<sup>(5)</sup>. Acetic acid는 효모발효에 의한 것으로 알려져있고, 2-methyl-propanoic acid는 고추장에서 발견되는 주요 지방산으로서 상쾌한 과일향으로 보고 되어있다<sup>(6,8)</sup>.

**에스터** 생고추장의 에스터류 향기성분은 ethyl acetate, ethyl nonanoate, ethyl tetradecanoate, ethyl nonadecanoate, methyl 4,6,10,14-tetramethyl pentadecanoate, methyl hexadecanoate, dibutyl 1,2-benzenedicarboxylate, ethyl hexadecanoate, methyl 9,12-octadecadienoate, ethyl (E)-9-octadecenoate, ethyl E-11-hexadecenoate가 동정되었다. 총 11종의 향기성분으로서 가장 많은 종류가 동정되었고, 그 면적 비율은 12.52%를 차지하였으며, 그 중에서도 ethyl hexadecanoate가 가장 많은 비율을 차지하였다.

고추장분말의 에스터류 향기성분 수는 생고추장에 비하여 크게 감소하였으며, 그 향기성분으로는 ethyl acetate, ethyl tetradecanoate, ethyl hexadecanoate, ethyl E-11-hexadecenoate가 동정되었다. 이 역시 ethyl hexadecanoate가 가장 높은 비율을 차지하였으며, 고추장분말의 에스터류 향기성분의 전체 면적비율은 16.15%로서 생고추장에 비해 약간 증가한 값이었다.

과립고추장의 에스터류 향기성분의 종류는 고추장분말과 동일하였으나, 전체면적비율이 증가하여 43.60%로 나타났으며, 마찬가지로 ethyl hexadecanoate가 가장 많은 비율을 차지하고 있었다.

고추장의 에스터류 향기성분은 알코올류와 함께 여러 종류의 성분들 중 가장 많은 수의 향기성분이 동정되고 있다<sup>(7,9)</sup>. 본 연구에서는 생고추장, 고추장분말, 과립고추장 모두 ethyl hexadecanoate가 가장 많은 비율을 차지하고 있었는데, ethyl acetate가 에스터류의 주 성분으로 나타난 결과와는 상이하였다<sup>(7,10)</sup>.

**알칸** 생고추장의 알칸류 향기성분은 1-ethoxy propane이 동정되었고, 이는 전체 면적비율 0.05%의 미량으로 나타났다.

고추장분말의 알칸류 향기성분은 2,2-dimethyl butane, ethyl cyclopropane, 1-ethoxy propane이 동정되었다. ethyl cyclopropane가 주를 이루고 있었으며, 고추장분말의 알칸류 향기성분의 전체 면적비율은 13.79%로 나타났다.

과립고추장의 알칸류 향기성분은 고추장분말의 알칸류 향기성분에 추가적으로 2-methoxy-propane이 동정되었다. 이들의 전체 면적 비율은 17.25%로 나타났으며, 역시 ethyl cyclopropane가 가장 높은 비율을 차지하였다.

**알켄** 알켄류 향기성분은 생고추장과 과립고추장에서는 검출되지 않았고, 고추장 분말에서만 2종류가 검출되었다. 검출된 향기성분은 3,3,3-D3-propene, 2,4-dimethyl-1-heptene이었고, 면적비율은 1.30%의 낮은 값이었다.

**기타** 생고추장, 고추장분말, 과립고추장의 공통적 기타 향기성분으로서 tetramethyl pyrazine이 동정되었고, 이 외에 생고추장에서 n-benzylamine, 고추장분말에서 acetamide와 benzene이 동정되었다.

**표 4. 생고추장, 고추장분말, 과립고추장의 향기성분**

Components	Retention time (min)	Peak area (%)		
		생고추장	고추장분말	과립고추장
<b>Aldehydes</b>				
3-Methyl-butanal	8.317	0.03	0.16	4.53
2-Methyl-butanal	8.700	0.02	-	-
n-Hexanal	8.867	0.01	-	-
Furfural	20.275	0.15	4.63	7.12
5-Methyl furfural	32.383	-	0.42	-
Benzeneacetaldehyde	39.500	0.16	1.33	2.67
subtotal		0.38	6.54	14.33
<b>Alcohols</b>				
Ethanol	4.967	77.94	34.61	6.02
2-Methyl-2-propanol	5.542	-	0.62	-
2-Propoxy-2-propanol	5.983	0.14	2.28	2.08
2-Methyl-1-propanol	7.450	0.80	2.49	1.22
3-Methyl-1-butanol	12.600	0.74	2.95	2.21
subtotal		79.62	42.95	11.52
<b>Ketone</b>				
1-(1-Methylethoxy)-2-propanone	19.433	0.24	0.67	-
subtotal		0.24	0.67	0.00

표 4. Continued

Components	Retention time (min)	Peak area (%)		
		생고추장	고추장분말	과립고추장
<b>Acids</b>				
Acetic acid	6.608	-	1.78	-
2-Methyl-propanoic acid	15.533	-	3.06	-
3-Methyl-butanoic acid	22.258	-	8.69	4.14
9-Octadecynoic acid	110.142	6.04	3.80	7.95
9,12,15-Octadecatrienoic acid	110.517	1.11	-	-
subtotal		7.15	17.32	12.09
<b>Esters</b>				
Ethyl acetate	7.108	0.15	0.75	0.50
Ethyl nonanoate	79.492	0.09	-	-
Ethyl tetradecanoate	91.025	0.92	1.55	2.51
Ethyl nonadecanoate	94.425	0.15	-	-
Methyl 4,6,10,14-tetramethyl pentadecanoate	94.858	0.05	-	-
Methyl Hexadecanoate	98.025	0.27	-	-
Dibutyl 1,2-benzenedicarboxylate	100.117	0.05	-	-
Ethyl hexadecanoate	101.542	8.88	11.91	35.73
Methyl 9,12-octadecadienoate	106.500	0.21	-	-
Ethyl (E)-9-octadecenoate	110.358	1.55	-	-
Ethyl E-11-hexadecenoate	110.450	0.18	1.94	4.66
subtotal		12.52	16.15	43.40
<b>Alkanes</b>				
2-Methoxy-propane	5.575	-	-	0.18
2,2-Dimethyl butane	5.650	-	1.89	2.91
Ethyl cyclopropane	6.092	-	11.10	13.00
1-Ethoxy propane	6.675	0.05	0.80	1.16
subtotal		0.05	13.79	17.25
<b>Alkenes</b>				
3,3,3-D3-Propene	14.592	-	0.30	-
2,4-Dimethyl-1-heptene	21.067	-	1.00	-
subtotal		0.00	1.30	0.00
<b>Others</b>				
Acetamide	7.317	-	0.12	-
Benzene	8.567	-	0.17	-
n-Benzylamine	39.483	0.02	-	-
Tetramethyl pyrazine	43.375	0.03	1.00	1.41
subtotal		0.04	1.28	1.41
total		100.00	100.00	100.00

## 요 약

- 고추장의 제조방법 및 주재료가 다른 3종류의 고추장(분말고추장, 찹쌀고추장, 우리밀고추장)을 이용하여 과립고추장을 제조하였다.
- 과립고추장의 용해성은 우리밀고추장, 찹쌀고추장, 분말고추장 순으로 높았으며, 용해성이 높은 우리밀고추장이 흡습성 측정결과에서 7시간 경과 후 가장 많은 물을 흡습하였고, 찹쌀고추장, 분말고추장 순이었다.
- 소고기 과립고추장 비빔소재의 1회 제공량은 24 g이며, 고추장 80%, 소고기 10%, 당근 3%, 시금치 3%, 호박 2%, 양배추 2%로 배합비를 설정하였다.
- 고추장 종류에 따른 소고기 과립고추장 비빔밥의 관능평가를 실시한 결과 찹쌀고추장이 색상, 향미, 맛, 그리고 전반적 기호도 모두에서 유의적인 차이를 보이며 높게 나타났다.
- 연구결과를 통해 찹쌀고추장을 이용하여 과립고추장 비빔소재를 개발할 경우 전통비빔밥과 유사한 맛의 비빔밥을 언제 어디서나 밥만 있으면 간편하게 즐길 수 있을 것으로 판단되며, 버섯, 마른 해물 등 재료를 이용하면 다양한 과립고추장 비빔소재를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.
- 전통찹쌀고추장을 이용하여 과립고추장을 제조하여 향기성분을 분석하였다.
- 생고추장, 고추장분말, 과립고추장의 향기성분 수는 각각 26종, 26종, 18종으로 동정되어 고추장으로 과립제조시 향기성분의 수가 감소하는 결과를 나타내었다.
- 생고추장, 고추장분말, 과립고추장에서 공통된 향기성분으로는 3-methyl-butanal, furfural, benzeneacetaldehyde, ethanol, 2-propoxy-2-propanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 9-octadecynoic acid, ethyl acetate, ethyl tetradecanoate, ethyl hexadecanoate, ethyl E-11-hexadecenoate, 1-ethoxy propane, tetramethyl pyrazine로 총 14종으로 나타났다.
- 고추장으로 과립을 제조 했을 때, 알코올류 및 케톤류의 비율이 감소하였고, 알데히드류, 에스터류, 알칸류 등의 비율이 증가하였다.
- 과립고추장의 향기성분의 면적비율은 에스터류가 43.40%로 가장 높은 비율을 차지하였고, 그 다음은 알칸류 17.25%, 알데히드류 14.33%, 산류 12.09%, 알코올류 11.52% 순으로 나타났다.
- 고추장을 과립형태로 제조시 알코올류의 향기성분의 비율이 크게 감소되어 이로 인해 상대적으로 다른 향기성분들의 비율이 증가하였으며, 이 점이 향기성분의 변화에 큰 영향을 미칠 것으로 판단된다.

## 제 4 절 울금을 첨가한 즉석 된장국 컵 제품 생산기술 개발

### 서 론

된장은 콩류의 가공식품의 하나로서 간장, 고추장과 함께 예로부터 전해지는 우리나라 고유의 조미식품으로 단백질 급원식품이자 음식의 간을 맞추고 맛을 내는데 널리 이용되어 왔습니다(1). 또한 된장은 필수 아미노산, 미네랄, 비타민류 등의 영양소를 보충해줌으로써 영양학적으로 중요한 기능을 가질 뿐만 아니라 각종 생리활성 즉 항산화, 혈전 용해, 항암 효과, ACE 저해 효과가 입증됨에 따라 된장에 연구 활발히 진행되고 있다(1-5).

울금(*Curcuma longa* Linne)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생 초본식물로서 열대 아시아 원산으로 인도·중국·동남아시아 동지에 주로 재배된다(6). 울금의 효능은 간장의 해독 촉진과 담즙의 분비 작용 및 이혈 작용이 뛰어나다. 따라서 이담작용과 방향성 건위약, 이뇨약, 해열약, 소화제, 급·만성 담낭염 치료약, 담도염약, 카라르성 황달약, 담석증, 급성간염약 등 다양한 처방과 제약의 원료로 국내외에 수요가 많다(7). 또한 울금은 항산화(6, 8)가 뛰어나다고 알려져 있고 이러한 울금을 첨가한 된장국 컵 제품을 개발함으로써 항산화활성 증대 및 편의성을 향상시킨 즉석 식품을 개발하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 재료

실험에 사용된 된장은 재래식 된장(청정원)을 이용하였고, 울금은 약재상에서 구입하였다. 시판제품 된장국, 부재료(양파, 멸치가루, 다시마 가루, 다진 마늘, 고추 등)는 전북 전주시내의 대형 마트에서 구입하여 사용하였다.

#### 수분함량

된장국 시료 1~2 g을 항량을 구한 칭량병에 넣고 105℃ dry oven에서 2시간 건조하고 데시케이터에서 30분 방냉 후 측정을 반복해 항량을 구하였다.

#### pH

pH는 시료 2 g을 취해 증류수 100 mL을 가한 후 잘 용해하고, pH meter(model ORION STAR SERIES, U.S.A)로 측정하였다.

#### 총산

시료 2 g을 취해 증류수 100 mL을 가한 후 잘 용해하고, 전량에 0.1 N NaOH 용액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하고 구연산 양으로 환산하였다.

$$\text{총산(\%)} = V_a \times f \times a \times 100/W$$

$V_a$  : 0.1 N NaOH 표준용액의 적정값(mL)

$f$  : 0.1 N NaOH 표준용액의 factor

a : 해당 산의 0.1 N NaOH 1mL 중화 소요량(구연산: 0.0064)

W : 시료량(g)

### 아미노태질소 함량

청국장 2 g을 취하여 증류수 100 mL를 가하고 1시간 동안 교반하여 충분히 용해한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4로 맞춘다. 여기에 20 mL의 중성 formaldehyde를 가하고 다시 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화 적정하였다. 별도로 증류수에 대한 바탕 시험을 실시하여 다음 식에 따라 아미노태질소 함량을 구하였다.

$$\text{Amino-type nitrogen (mg\%)} = (A-B) \times 1.4 \times F \times 100/\text{시료량(mL)}$$

A : 0.1 N NaOH 용액의 시료 적정량(mL)

B : 0.1 N NaOH 용액의 바탕시험 적정량(mL)

F : 0.1 N NaOH 용액의 역가

### 색도

색차계(SP-80, Tokyo Denshoku, Japan)로 Hunter scale에 따라 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값으로 표시하였다.

### 용해성 측정

용해성은 시료 1 g을 20°C의 증류수 20 mL에서 1분간 용해시키고 3,500 rpm에서 30분간 원심분리(Model Speed Control HA - 1003 - 3 Hanil Science Industrial Co. LTD., Korea)하여 남은 고형분의 양을 측정하여 나타내었다.

### 흡습성 측정

흡습성은 시료 0.5 g을 증류수를 채운 데시케이터에 넣고 1시간 간격으로 7시간 동안 흡습에 따른 무게 증가를 측정하여 나타내었다.

### DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 Williams 등(10)의 방법을 응용하였다. 일정농도의 추출물 0.2 mL에 1.5 mM DPPH 2.8 mL를 첨가하여 515 nm에서 측정하여 시료첨가구와 시료 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### 페놀 화합물

페놀 화합물정량은 Dewanto(11)의 방법을 응용하여 측정하였다. 일정농도의 추출물 0.1 mL에 folin-ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL와 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.5 mL를 첨가하였다. 암소에서 1 hr동안 반응시켜 725 nm에서 측정하였으며 표준물질로는 gallic acid를 이용하였다.

### 관능평가

울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국은 전북대학교 식품공학과 대학원생 12명을 대상으



로 관능평가를 실시하였다. 향, 색, 전반적 기호도 3가지를 보고 쓴맛은 강도 별로 매우 좋지 않다(1), 약간 좋지 않다(3), 그럭저럭 이다(5), 약간 좋다(7), 매우 좋다(9)로 채점하여 얻은 성적을 SPSS 12.0 (SPSS Inc., 1989-2003)을 이용하여 분산 분석하였으며, 결과는 평균±표준편차로 나타 내었다.

## 결과 및 고찰

### 수분함량, pH 및 총산

울금을 첨가한 된장국 및 시판제품 된장국의 수분함량을 측정한 결과 7.77±0.07%(시판제품3) - 17.61±0.15%(울금 0% 된장국)의 함량을 나타냈다. pH는 5.62±0.03(울금0.3%) - 4.98±0.01(시판제품3)의 범위에서 울금을 첨가 된장국의 pH는 유사한 형태를 보였다. 총산은 2.68±0.02%(시판제품1) - 1.59±0.03%(시판제품3)의 범위에서 각 시료에 따라 다소 차이를 나타내었다.

표 1. 울금 첨가 된장국 및 시판제품 된장국의 수분 함량, pH 및 총산 함량

처리구	수분(%)	pH	총산(%)
울금 0% 된장국	17.61±0.15	5.59±0.09	2.36±0.02
울금 0.1% 된장국	13.99±0.76	5.55±0.01	2.37±0.04
울금 0.2% 된장국	16.45±0.86	5.59±0.01	2.34±0.02
울금 0.3% 된장국	16.42±0.09	5.62±0.03	2.29±0.05
시판제품1	11.45±0.57	5.33±0.03	2.68±0.02
시판제품2	9.81±0.15	5.53±0.02	2.42±0.16
시판제품3	7.77±0.07	4.98±0.01	1.59±0.03

### 아미노태질소 함량

울금을 첨가한 된장국과 시판제품 된장국의 아미노태질소 함량은 전체적으로 843.78±11.90 mg%(시판제품1) - 270.74±2.98 mg%(시판제품3)의 함량을 보였고, 울금을 첨가한 된장국에서도 높은 함량이 나타났다.

표 2. 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 아미노태질소 함량(mg%)

된장국 종류	울금 0% 된장국	울금 0.1% 된장국	울금 0.2% 된장국	울금 0.3% 된장국	시판제품1	시판제품2	시판제품3
아미노태질소 함량	689.83	714.38	698.95	701.75	843.78	733.31	270.74

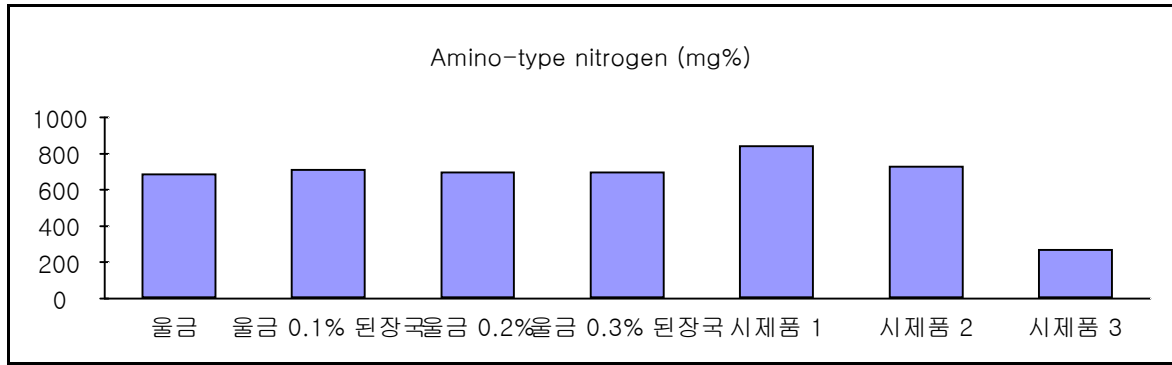


그림 1. 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 아미노태질소 함량.

### 색도

각 된장국의 색도는 다른 된장국에 비해 뚜렷한 차이가 없었다. 명도를 나타내는 L값은 전체적으로  $45.81 \pm 0.01$  (울금 0% 된장국) -  $60.68 \pm 0.00$  (시판제품2)의 값을 보였고, 적색도를 나타내는 a는  $1.37 \pm 0.00$  (시판제품2) -  $5.38 \pm 0.00$  (울금 0% 된장국)의 범위에서 나타났다. 황색도를 나타내는 b값은 전체적으로  $18.63 \pm 0.01$  (시판제품2) -  $26.51 \pm 0.01$  (울금 0.3% 된장국)의 범위로 나타났다.

표 3. 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 색도

된장국 종류	L(명도)	a(적색도)	b(황색도)
울금 0% 된장국	$45.81 \pm 0.01$	$5.38 \pm 0.00$	$19.53 \pm 0.02$
울금 0.1% 된장국	$50.52 \pm 0.00$	$4.64 \pm 0.03$	$23.43 \pm 0.00$
울금 0.2% 된장국	$48.19 \pm 0.01$	$4.16 \pm 0.00$	$24.38 \pm 0.01$
울금 0.3% 된장국	$50.32 \pm 0.01$	$3.78 \pm 0.00$	$26.51 \pm 0.01$
시판제품1	$51.92 \pm 0.00$	$5.72 \pm 0.02$	$20.69 \pm 0.00$
시판제품2	$60.68 \pm 0.00$	$1.37 \pm 0.00$	$18.63 \pm 0.01$
시판제품3	$60.39 \pm 0.01$	$5.35 \pm 0.06$	$21.38 \pm 0.00$

### 용해성

용해성은 시료의 용해도를 알아보기 위해 물에 용해시킨 후 고형물 양을 전체적으로 측정 한 결과  $3.481 \pm 0.050$  g (시판제품 1) -  $0.029 \pm 0.018$  g (시판제품 3)의 범위로 나타났다.

표 4. 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 용해성(g)

처리구	울금 0% 된장국	울금 0.1% 된장국	울금 0.2% 된장국	울금 0.3% 된장국	시판제품 1	시판제품 2	시판제품 3
용해성	1.880	1.493	1.489	1.563	3.481	1.805	0.029

### 흡습성

울금을 첨가한 된장국 및 시판제품 된장국의 흡습성(그림 2)은 전체적으로 시간이 경과함에 따라 증가되어 7시간 후  $0.1107 \pm 0.0033$  g(울금 0.1%된장국) -  $0.0570 \pm 0.0023$  g(시판제품3)으로 나타났다. 시판제품 3이 흡습성이 가장 낮아 저장성 좋을 것으로 판단된다.

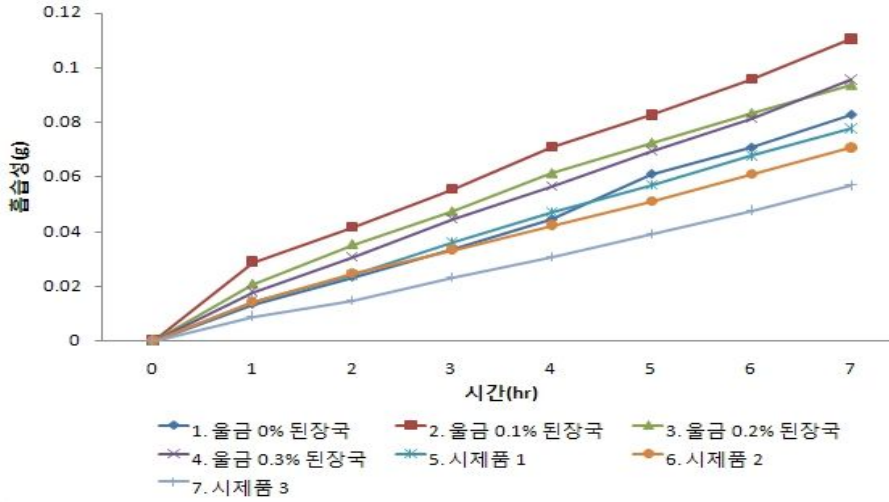


그림 2. 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 흡습성.

### DPPH 전자 공여능(%)

울금을 첨가한 된장국 및 시판제품 된장국의 DPPH 전자 공여능  $76.28 \pm 0.38\%$  (울금 0.3% 된장국) -  $40.14 \pm 1.00\%$  (시판제품2)의 범위로 나타났고, 울금의 함량이 증가 될수록 DPPH 전자 공여능이 상승하였다.

표 5. 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 DPPH 전자 소거능(%)

된장국 종류	울금 0% 된장국	울금 0.1% 된장국	울금 0.2% 된장국	울금 0.3% 된장국	시판제품 1	시판제품 2	시판제품 3
전자 소거능(%)	$62.84 \pm 1.46$	$68.89 \pm 3.01$	$71.93 \pm 0.05$	$76.28 \pm 0.38$	$57.79 \pm 1.42$	$40.14 \pm 1.00$	$52.45 \pm 2.80$

### 페놀 화합물

각 된장국의 페놀 화합물의 함량을 비교해 본 결과  $7869.38 \pm 13.26$  mg% (울금 0.3% 된장국) -  $4369.38 \pm 4.42$  mg%(시판제품3)의 범위로 보였고, 울금의 함량이 증가함에 따라 페놀 화합물의 함량도 증가하는 경향을 보였다.

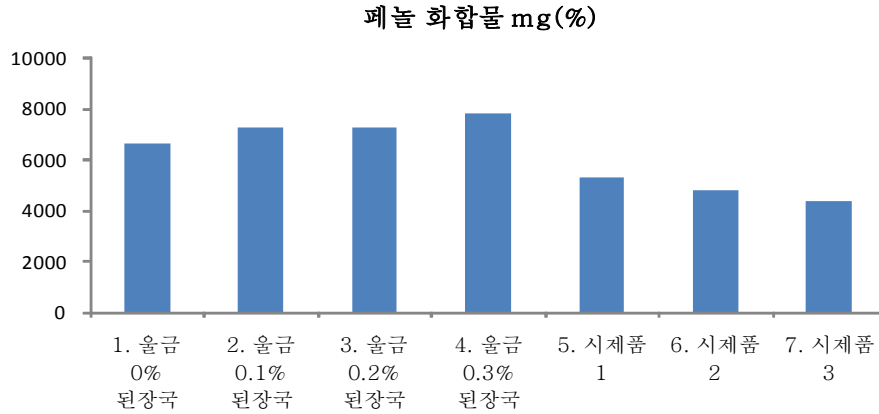


그림 3. 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 폐놀 화합물 (mg%).

### 울금 된장국 제조

- ① 건조된 울금을 분쇄한 후 30 mesh의 크기에 통과시켜, 체질한 다음 이용한다.
- ② 물 500mL에 마늘, 멸치가루, 다시마가루를 넣고 끓인다.
- ③ 물이 끓기 시작하면 된장, 울금을 넣고 끓인다.
- ④ 대파, 양파, 풋고추를 체 망에 넣고 3분30초 정도 끓인다.
- ⑤ 조리된 된장국을 냉각 후 동결 건조 시킨다.
- ⑥ 동결 건조된 된장국을 분쇄하여 분말 형태로 제조 한다.



(울금0% 된장국분말) (울금0.1% 된장국분말) (울금0.2% 된장국분말) (울금0.3% 된장국분말)

그림 4. 울금 된장국의 동결 건조된 분말 형태.

### 표 6. 울금된장국 배합비

원 재 료	1회 제공량(g)	배합비 (%)	첨가 형태
물	500	88.5	-
된장	35	6.2	-
마늘	3	0.5	다진 마늘
풋고추	3	0.5	0.2cm 두께로 어슷썰기
대파	5	0.9	0.2cm 두께로 어슷썰기
양파	15	2.7	0.5cm 두께로 사각형태로 썰기
멸치	3	0.5	-
다시마	1	0.2	분말
합계	565	100	

표 7. 처리구별 된장국에 대한 울금 첨가비율(%)

	대조구	처리구1	처리구2	처리구3
울금(g)	-	0.1	0.2	0.3

#### 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 관능평가

울금이 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 관능평가 (표 I-3-8)를 결과 색상, 향, 쓴맛은 대체적으로 울금이 첨가된 된장국에 영향이 컸다. 울금이 첨가 될수록 향미 성분이 좋아지지만 울금이 첨가되지 않는 된장국의 선호도가 대부분 높은걸 볼 수 있다. 하지만 전반적 기호도로 비교해 본 결과 시판제품 보다는 울금을 함유한 된장국의 선호도가 높은 것을 볼 수 있다.



<울금 0% 된장국> <울금 0.1% 된장국> <울금 0.2% 된장국> <울금 0.3% 된장국>

그림 4. 울금 된장국.

#### 표 8. 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 관능평가

	색	향	쓴맛	전반적기호도
울금0% 된장국	6.63±1.69 <sup>c</sup>	6.38±2.07 <sup>b</sup>	3.24±2.51 <sup>a</sup>	7.50±2.38 <sup>c</sup>
울금0.1%된장국	5.75±1.04 <sup>bc</sup>	5.88±2.10 <sup>b</sup>	3.13±2.42 <sup>a</sup>	6.38±2.10 <sup>bc</sup>
울금0.2%된장국	5.75±1.49 <sup>bc</sup>	4.88±2.42 <sup>b</sup>	5.75±2.76 <sup>b</sup>	4.63±2.62 <sup>ab</sup>
울금0.3%된장국	5.63±2.07 <sup>bc</sup>	5.38±2.77 <sup>b</sup>	6.25±1.83 <sup>b</sup>	5.38±2.26 <sup>bc</sup>
시판제품 1	5.75±2.43 <sup>bc</sup>	5.13±2.30 <sup>b</sup>	2.00±1.51 <sup>a</sup>	4.75±2.19 <sup>ab</sup>
시판제품 2	3.00±1.51 <sup>a</sup>	4.25±2.12 <sup>ab</sup>	2.38±2.07 <sup>a</sup>	5.50±2.07 <sup>bd</sup>
시판제품 3	4.13±1.81 <sup>a</sup>	2.25±1.49 <sup>a</sup>	1.63±0.92 <sup>a</sup>	3.00±1.93 <sup>a</sup>

1) a-d에서 같은 알파벳은 유의적 차이가 없다.

### 요 약

- 각 시중에 판매되는 시판제품(시판제품1, 2, 3) 된장국 및 울금이 첨가된 된장국(0, 0.1, 0.2, 0.3%)을 제조하였다.
- 울금을 첨가한 된장국 및 시판제품 된장국의 수분 함량은 7.77±0.07%(시판제품 3) - 17.61±0.15%(울금 0% 된장국)의 함량을 나타냈다.
- 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 pH는 5.62±0.03(울금 0.3% 된장국) - 4.98±0.01(시판제품 3)의 범위에서 나타났다.
- 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 총산은 2.68±0.02%(시판제품 1) - 1.59±0.03%(시판제품3)의 범위에서 각 시료에 따라 다소 차이를 나타내었다.
- 울금 첨가한 된장국과 시판제품의 된장국의 아미노태질소 함량은 전체적으로 843.78±11.90 mg%(시판제품 1) - 270.74±2.98 mg%(미소 된장국)의 함량을 보였고, 시판제품 및 울금을 첨가한 된장국에서도 높은 함량이 나타났다.
- 각 된장국의 색도는 크게 뚜렷한 차이가 없이 유사한 값은 나타내었다.
- 용해성은 각 시료의 고형물 양을 전체적으로 측정한 결과 3.481±0.050g(시판제품1) - 0.029±0.018g(시판제품3)의 범위로 나타났다.
- 흡습성은 7시간 후 0.1107±0.0033g(울금 0.1%된장국)-0.0570±0.0023g(시판제품3)의 범위에서 나타났다.
- 울금 첨가된 된장국 및 시판제품 된장국의 DPPH 라디칼 소거능 76.28±0.38%(울금 0.3% 된장국) - 40.14±1.00% (시판제품 2)의 범위로 나타났다.
- 각 된장국의 Total Phenolic Compound의 함량을 비교해 본 결과 7869.38±13.26 mg%(울금 0.3% 된장국) - 4369.38±4.42 mg%(시판제품 3)의 범위로 보여 졌다.
- 시판제품의 된장국에 반해 울금이 첨가된 된장국이 맛, 향, 쓴맛이 강하게 나타났고, 전반적 기호도도 높게 나타났다.

## 제 5 절 쪽 청국장 컵제품 생산기술 개발

### 서 론

청국장은 대두 발효식품으로서 발효숙성 과정에서 *B. subtilis*, *B. natto* 등이 생산하는 효소 작용으로 대두의 단백질이 분해되고 끈끈한 점질물이 생성되어 그 특유의 맛과 향을 낸다.(1) 청국장은 증자한 대두에 청국장균을 접종하여 숙성 발효한 후 가미해서 식용할 수 있기 때문에 제조기간이 짧은 장점이 있을 뿐 만 아니라 소화율이 좋고 영양적 측면에서도 된장이나 고추장보다 단백질과 지방함량이 높은 고영양식품이다. 청국장은 기능성에 있어서도 우수하여 항암효과, 혈압강하, 혈청콜레스테롤 저하, 혈전용해작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 조리시에 발생하는 특유의 불쾌취로 현대의 소비자들에게 기피되고 있는 실정이다(2, 3).

쪽은 한국에서 자생하는 대표적인 야생식물로 번식력이 강한 국화과의 다년생 식물로서 식용 또는 약용으로 많이 이용되고 있다. 복통, 토사 자궁출혈, 천식증, 진통, 구토 만성 기관지염의 치료에 약효가 있는 것으로 알려져 있어 다양하게 식품 첨가물로 사용되고 있으며 주요성분으로 isocoumarin, coumarin, diterpenelactone, flavonoid 등의 정유성분을 포함하고 있다(4, 5). 현재까지 보고된 쪽에 관련된 논문에 의하면 청국장 발효시 쪽 추출물을 첨가하여 청국장의 품질을 향상 시키려는 연구가 진행되었다(6, 7). 또한 청국장 조리시 쪽의 첨가가 불쾌취를 현저하게 저하시켰다는 실험결과(8)는 불쾌취 문제를 해결할 수 있는 가능성을 보여준다.

본 연구에서는 청국장찌개 제조시 쪽을 첨가하여 청국장 불쾌취 제거는 물론 기능성이 증대된 청국장찌개를 만들고 이를 동결건조 시켜 언제 어디서나 취식이 가능한 즉석청국장찌개를 개발하고자 하였다.

### 재료

실험에 사용된 청국장은 찬마루에서 제조한 것을 사용하였고 쪽은 제주웰빙쪽에서 판매하는 냉동쪽을 사용하였다. 찌개에 들어가는 부재료인 마늘, 파, 양파, 멸치가루, 소금은 전주시내의 대형 유통마트에서 구입하여 사용하였다.

### 쪽첨가 청국장찌개 배합비

표 I-2-1. 청국장찌개 기본 배합비

재료	중량 (g)
물	100
청국장	25
파	2
마늘	1
양파	10
멸치가루	0.1
소금	0.15

표 2. 청국장찌개 처리구별 썩 첨가량

처리구 1	썩 0%첨가
처리구 2	썩 1.5%첨가
처리구 3	썩 3.0%첨가
처리구 4	썩 4.5%첨가

### 썩첨가 청국장찌개 제조

끓는 물 500 mL에 마늘, 양파, 썩을 넣고 2분간 더 끓인 후 청국장, 파를 넣고 가열을 종료하여 청국장찌개를 제조하였다. 완성된 청국장찌개는 건더기와 국물을 분리하여 동결건조시켰다.



<썩 0%첨가 청국장> <썩 1.5%첨가 청국장> <썩 3%첨가 청국장> <썩 4.5%첨가 청국장>

그림 1. 동결건조 썩 청국장찌개.

### 수분 측정

시료 1~2 g을 항량을 구한 칭량병에 넣고 105°C dry oven에서 2시간 건조하고 데시케이터에서 30분 방냉 후 측정을 반복해 항량을 구하였다.

### pH

pH는 시료 2 g을 취해 증류수 100 mL를 가한 후 잘 용해하고, pH meter(model ORION STAR SERIES, U.S.A)로 측정하였다.

### 총산

시료 2 g을 취해 증류수 100 mL를 가한 후 잘 용해하고, 전량에 0.1 N NaOH 용액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하고 구연산 양으로 환산하였다.

$$\text{총산(\%)} = V_a \times f \times a \times 100/W$$

$V_a$  : 0.1 N NaOH 표준용액의 적정값(mL)

$f$  : 0.1 N NaOH 표준용액의 factor

$a$  : 해당 산의 0.1 N NaOH 1 mL 중화 소요량(구연산: 0.0064)

$W$  : 시료량(g)

### 아미노태질소

시료 2 g을 취하여 증류수 100 mL를 가하고 1시간 동안 교반하여 충분히 용해한 다음 0.1



N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4로 맞춘다. 여기에 20 mL의 중성 formaldehyde를 가하고 다시 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화 적정하였다. 별도로 증류수에 대한 바탕시험을 실시하여 다음 식에 따라 아미노태질소 함량을 구하였다.

$$\text{아미노태질소 함량 (mg\%)} = (A-B) \times 1.4 \times F \times 100/\text{시료량(g)}$$

A : 0.1 N NaOH 용액의 시료 적정량(mL)

B : 0.1 N NaOH 용액의 바탕시험 적정량(mL)

F : 0.1 N NaOH 용액의 역가

### DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 Williams 등(9)의 방법을 응용하였다. 일정농도의 추출물 0.2 mL에 1.5 mM DPPH 2.8 mL를 첨가하여 515 nm에서 측정하여 시료첨가구와 시료 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### 총페놀성 화합물

총페놀성 화합물정량은 Dewanto의 방법(10)을 응용하여 측정하였다. 일정농도의 추출물 0.1 mL에 folin-ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL과 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.5 mL를 첨가하였다. 암소에서 1 hr 동안 반응시켜 725 nm에서 측정하였으며 표준물질로는 gallic acid를 이용하였다.

### 흡습성 측정

흡습성은 시료 0.5 g을 증류수를 채운 데시케이터에 넣고 1시간 간격으로 7시간 동안 흡습에 따른 무게 증가를 측정하여 나타내었다.

### 색도

색도는 색차계(Chroma meter, Model CR-400, Minolta Co., Ltd., Japan)로 Hunter scale에 따라 L(Lightness), a(redness), b(yellowness)값으로 표시하였다.

### 관능평가

쑥 청국장찌개는 전북대학교 식품공학과 대학원생 11명을 대상으로 관능평가를 실시하였다. 색깔, 맛, 향, 전체적기호도 4가지 항목별로 쑥 청국장찌개 처리구 4개를 비교하여 매우 나쁘다(1), 나쁘다(3), 보통(5), 좋다(7), 아주 좋다(9)로 채점하여 얻은 성적을 SPSS 12.0 package(SPSS Inc., 1989-2003)를 사용하여 분산분석 하였으며, 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료의 분석 결과에 대한 유의성 검정은 분산분석을 한 후 p<0.05수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 수분 함량

쑥 청국장찌개의 수분함량을 측정한 결과 쑥 0% 첨가구가  $10.82 \pm 0.15\%$ 로 가장 낮게 나타났으며 쑥 1.5%, 3%, 4.5% 첨가구에서는 각각  $12.44 \pm 0.10\%$ ,  $11.29 \pm 0.26\%$ ,  $14.05 \pm 0.06\%$ 를 나타내었다

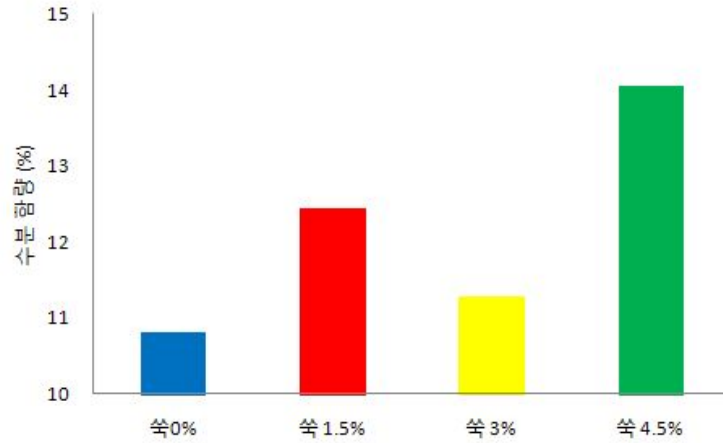


그림 2. 쑥 첨가량에 따른 청국장찌개의 수분함량.

### pH

청국장찌개의 pH는 쑥 0%, 1.5%, 3%, 4.5%첨가 청국장에서 각각  $7.24 \pm 0.02$ ,  $7.23 \pm 0.01$ ,  $7.31 \pm 0.02$ ,  $7.33 \pm 0.01$ 을 나타냈으며 쑥 첨가량이 많아질수록 pH가 높게 나타났다.

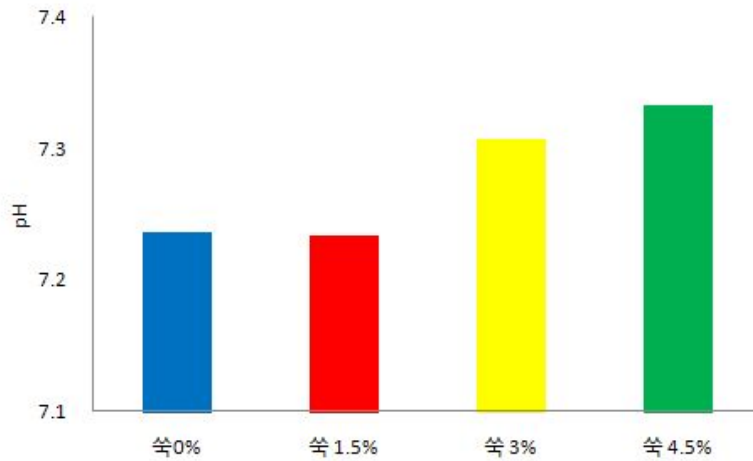


그림 3. 쑥 첨가량에 따른 청국장찌개의 pH.

### 총산

청국장찌개의 총산함량은 쑥 1.5% 첨가구에서  $1.48 \pm 0.02\%$ 로 가장 높게 나타났고 쑥 4.5% 첨가구에서  $1.25 \pm 0.04\%$ 를 나타냈다. 쑥 첨가량이 1.5%로 적었을 때는 쑥 미첨가구에 비해 총산함량이 높았으나 쑥 첨가량이 증가할수록 총산함량이 감소하는 경향을 보였다.

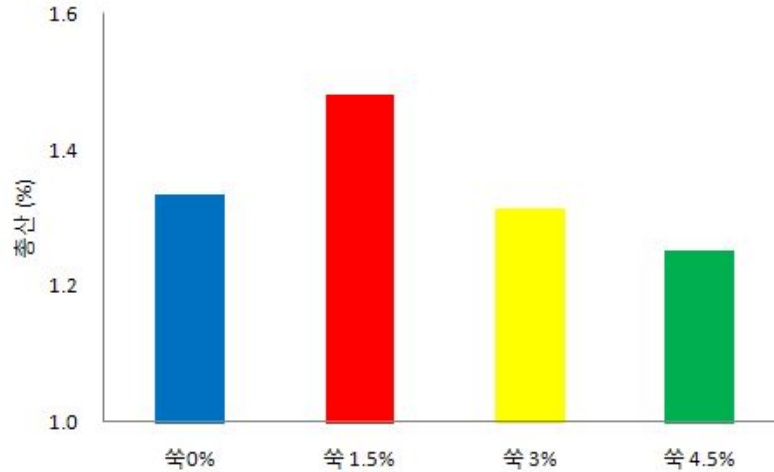


그림 4. 쑥 첨가량에 따른 청국장찌개의 총산.

#### 아미노태질소 함량

청국장찌개의 아미노태질소 함량은  $1012.82 \pm 4.21$  mg%(쑥 0%첨가구)~ $1086.82 \pm 0.50$  mg%(쑥 1.5%첨가구)의 범위를 나타내었다. 쑥을 첨가한 청국장찌개에서 쑥을 첨가하지 않은 청국장찌개보다 높은 아미노태 질소 함량을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

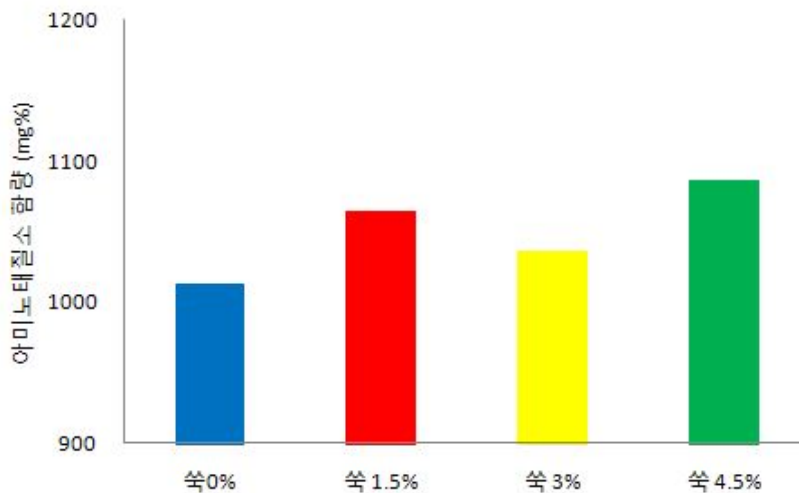


그림 5. 쑥 첨가량에 따른 청국장찌개의 아미노태질소 함량.

#### DPPH 라디칼 소거능

청국장찌개의 DPPH라디칼 소거능은 쑥 4.5%첨가구 청국장에서  $69.28 \pm 1.37\%$ 로 가장 높은 활성을 보였고 쑥 0 % 첨가구 청국장에서  $39.19 \pm 0.49$  %로 가장 낮은 활성을 보였다. 청국장찌개에 쑥의 첨가량이 많아질수록 DPPH 라디칼 소거능이 높게 나타났다.

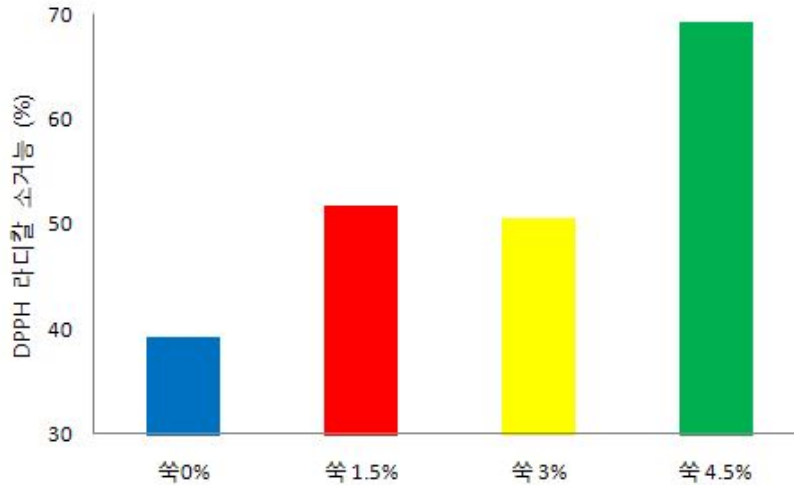


그림 6. 추 첨가량에 따른 청국장찌개의 DPPH 라디칼 소거능.

### 총페놀성 화합물

청국장찌개의 총페놀성 화합물함량은 추 무첨가구보다 추 첨가구에서 높게 나타났다. 추0%, 1.5%, 3%, 4.5%첨가 청국장찌개에서 각각  $776.63 \pm 12.50$  mg%,  $848.81.81 \pm 2.81$  mg%,  $920.58 \pm 10.41$  mg%,  $886.94 \pm 1.56$  mg%의 함량을 나타내었다.

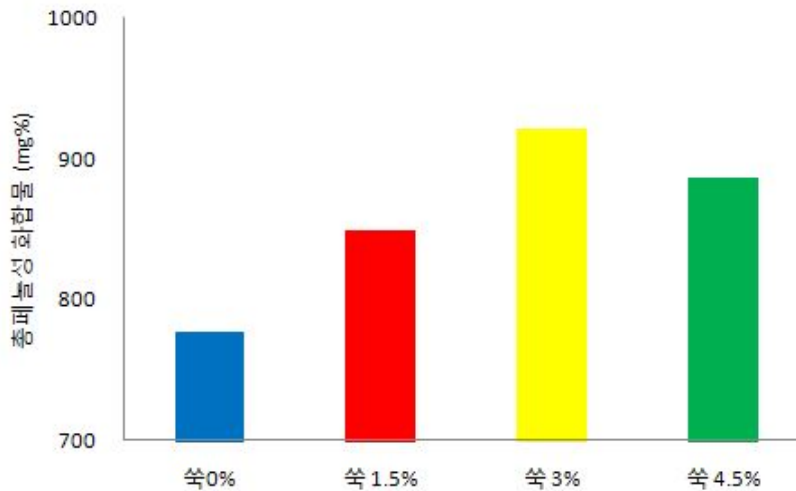


그림 7. 추 첨가량에 따른 청국장찌개의 총페놀성 화합물.

### 흡습성

동결건조 청국장의 흡습성은 시간이 지남에 따라 모든 처리구에서 증가하였고 7시간 경과 후  $0.0705 \pm 0.0037$  g(추 4.5%첨가구)~ $0.0802 \pm 0.0039$  g(추 3%첨가구)의 흡습성을 보였다. 치료 간 흡습성의 큰 차이는 나타나지 않았고 추 첨가에 따른 흡습성의 영향도 나타나지 않았다.

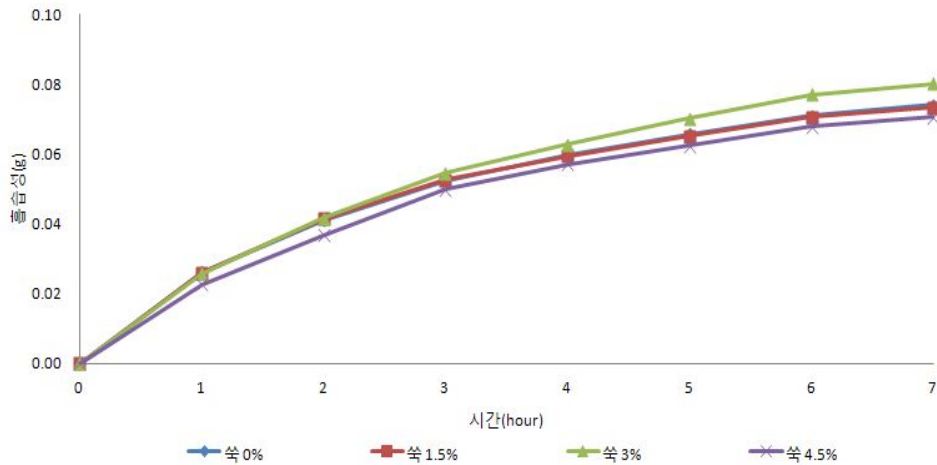


그림 8. 쑥 첨가량에 따른 청국장찌개의 흡수성.

### 색도

청국장찌개의 색도는 쑥 함량이 증가 할수록 L, a, b값 모두 감소하는 경향을 보였다. 명도를 나타내는 L값은  $44.52 \pm 0.04$ (쑥 4.5%첨가구)~ $53.21 \pm 0.01$ (쑥 0%첨가구), 적색도를 나타내는 a 값은  $4.52 \pm 0.00$ (쑥 4.5%첨가구)~ $5.25 \pm 0.01$ (쑥 0%첨가구), 황색도를 나타내는 b값은  $16.04 \pm 0.01$ (쑥 4.5%첨가구)~ $18.93 \pm 0.01$ (쑥 0%첨가구)의 범위를 나타냈다.

표 3. 쑥 첨가량에 따른 청국장찌개의 색도

	L	a	b
쑥 0% 첨가구	$53.21 \pm 0.01$	$5.25 \pm 0.01$	$18.93 \pm 0.01$
쑥 1.5% 첨가구	$47.91 \pm 0.04$	$5.06 \pm 0.00$	$17.11 \pm 0.01$
쑥 3.0% 첨가구	$46.31 \pm 0.01$	$4.76 \pm 0.01$	$16.75 \pm 0.01$
쑥 4.5% 첨가구	$44.52 \pm 0.04$	$4.52 \pm 0.00$	$16.04 \pm 0.01$

### 관능평가

청국장찌개의 관능평가를 실시한 결과 맛, 향, 전반적 기호도 모두에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 색에서 쑥 1.5%, 3%첨가 청국장찌개에서  $6.75 \pm 1.67$ ,  $5.75 \pm 1.49$ 로 쑥 0%첨가 청국장찌개보다 좋은 결과를 보였다.

표 4. 쑥 첨가량에 따른 청국장찌개의 관능평가

	색	향	맛	전반적기호도
쑥 0% 첨가구	$5.38 \pm 1.69^a$	$4.75 \pm 1.67^a$	$5.50 \pm 1.77^a$	$5.75 \pm 1.04^a$
쑥 1.5% 첨가구	$6.75 \pm 1.67^{ab}$	$5.75 \pm 1.04^a$	$5.00 \pm 2.39^a$	$5.25 \pm 2.71^a$
쑥 3.0% 첨가구	$5.75 \pm 1.49^{ab}$	$5.50 \pm 1.41^a$	$4.88 \pm 2.03^a$	$4.88 \pm 2.03^a$
쑥 4.5% 첨가구	$4.63 \pm 2.00^b$	$5.38 \pm 1.85^a$	$3.75 \pm 1.49^a$	$5.03 \pm 1.98^a$

## 요 약

- 썬을 농도별로 첨가하여 청국장찌개를 제조하고 동결건조 하여 어디서나 취식이 가능한 즉석 청국장찌개를 제조하였다.
- 썬을 첨가함으로써 청국장찌개의 아미노태질소함량을 높일 수 있었으나 유의적으로 큰 차이는 나타나지 않았다.
- 관능평가 결과 썬을 첨가함으로써 청국장찌개의 색을 더욱 좋게 증진시킬 수 있었다.
- DPPH라디칼 소거능, 총 페놀성 화합물실험을 통하여 청국장찌개에 썬을 첨가함으로써 항산화활성을 증대시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- 청국장찌개에 썬을 첨가함으로써 아미노태질소, 항산화활성을 증진시킬 수 있었으며 관능평가 결과 청국장찌개 제조시 썬은 1.5%를 첨가하는 것이 가장 적합하다고 판단된다.

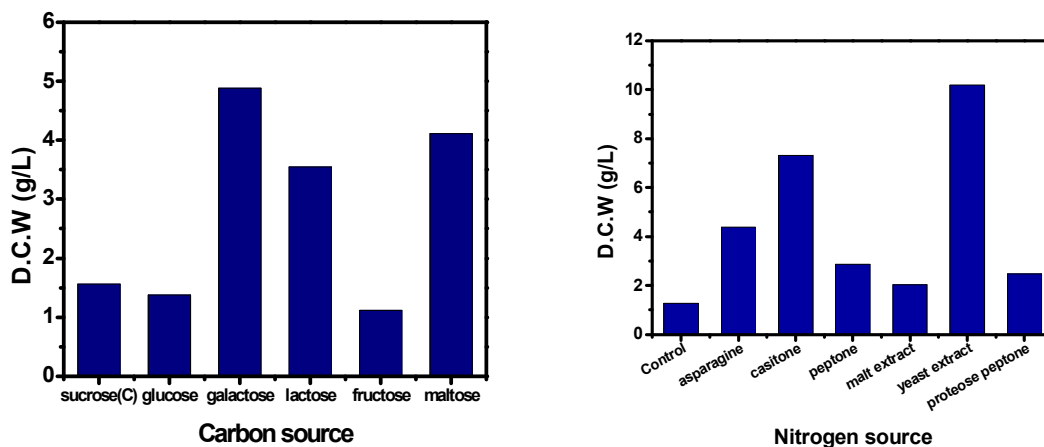
## 제 6 절 통계적 처리방법을 이용한 starter 고체배양 조건 최적화

### 배지최적화

통계적 배지 최적화 방법을 수행하기 전에 우선적으로 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인들을 고정시켜 실험하는 “one factor at a time (OFAT) method”에 의해 다양한 배지 성분이 *Bacillus subtilis* SCD121067 균체의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 OFAT 방법에서는 확인할 수 없는 각 변수간의 상호작용의 정도를 확인하는 통계적인 방법인 full or fractional factorial design (FFD) 방법을 이용해서 균체생산성 증가에 효과를 보이는 최적의 배지 성분을 선정하는 과정을 거쳤다. 이 FFD의 실험에 의해 선별된 배지성분을 이용해서 곧바로 각 배지성분의 최적 농도를 선정하기 위한 반응표면분석법(response surface method, RSM)를 실행할 경우, 어느 정도의 농도 범위에서 최적의 농도가 존재하는지를 추정하기가 매우 어려운 문제점이 존재한다. 따라서 최종적인 RSM 실험을 수행하기 전에 최적농도가 존재하는 근사치를 추정하기 위해서 최급상승법(steepest ascent method, SAM)를 이용한 실험을 먼저 수행하였다.

### One factor at a time

배지성분은 생산성에 직결되며 농도와도 매우 밀접한 관련이 있다. 따라서 Cell mass를 효과적으로 높이기 위해서는 무엇보다 생산배지 최적화 연구가 우선적으로 이루어져 한다. OFAT 실험은 하나의 요인만을 변화시키고 다른 요인들은 고정시키는 것이므로, 요인간의 상호작용을 전혀 고려하지 않았기 때문에 결과를 신뢰할 수 없는 한계를 가지고 있다. 하지만 다양한 배지 성분의 영향력을 관찰함으로써 세포 성장에 좋은 배지 성분을 선별해 낼 수 있는 장점이 있다. One Factor At a Time의 방법을 통해 액상 배양에서의 *Bacillus subtilis* 균체 성장에 효과적인 배지 성분을 선별하는 실험을 수행한 결과(Fig. 1) 탄소원으로 galactose, 질소원으로 yeast extract, 인원으로 Potassium phosphate dibasic을 선정하였다.



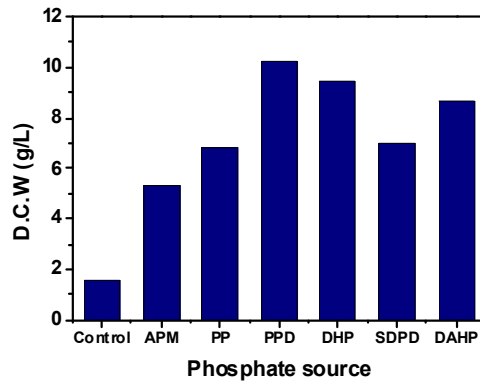


Figure 1. The selected nutrient source for mass production of *Bacillus subtilis* SCD121067 by using one factor at a time.

APM : Ammonium phosphate monobasic, PP : Potassium phosphate, PPD : Potassium phosphate dibasic, DHP : Disodium hydrogen phosphate, SDPD : Sodium dihydrogen phosphate dihydrate, DAHP : Diammonium hydrogen phosphate

Control(g/L) : Sucrose (20), Asparagine (10),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.4),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.25),  $\text{CaCl}_2$  (0.01)

#### Plackett-Burman design을 통한 중요인자 선정

앞서 진행된 OFAT 실험의 결과에 따라 선별된 영양원이 균체 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Plackett-Burman design을 수행하였다. 총 factor는 6가지(Table 1)로 하였다. 실험을 진행하기 위해 High(+값)과 Low(-값)은 Table 2에 제시하였다. Plackett-Burman design 결과(Table 3)로 얻어진 Table 4를 통해 factor B, C 그리고 D를 선택하였다. B(Yeast extract)는 질소원으로 Mean square값이 151.3로 높게 나왔고, C( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )는 인원으로 8.05 그리고 D( $\text{CaCl}_2$ )는 10.08 로 Mean square값이 두 번째로 높게 측정되어 선정하였다.

Table 1. The composition of select product medium for Plackett-Burman design

Component	Concentration(g/L)	Factor
Galactose	20.0	A
Yeast extract	10.0	B
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.0	C
$\text{CaCl}_2$	0.01	D
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	E
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.25	F



Table 2. High and Low factor of Plackett–Burman design(6 components)

	Galactose	Yeast extract	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
High(+)	24	15	3	0.015	0.6	0.375
Low(-)	16	5	1	0.005	0.2	0.125

Table 3. Plackett–Burman design for seven variables

Trial	Variables						D.C.W (g/L)
	A	B	C	D	E	F	
M1	+	+	-	+	+	+	12.40
M2	-	+	+	-	+	+	13.05
M3	+	-	+	+	-	+	7.72
M4	-	+	-	+	+	-	15.99
M5	-	-	+	-	+	+	6.78
M6	-	-	-	+	-	+	5.55
M7	+	-	-	-	+	-	5.14
M8	+	+	-	-	-	+	8.34
M9	+	+	+	-	-	-	13.65
M10	-	+	+	+	-	-	13.05
M11	+	-	+	+	+	-	5.96
M12	-	-	-	-	-	-	2.71
Control							1.29

Table 4. Analysis of the dry cell weight shown in Table II-3

	A	B	C	D	E	F
$\Sigma(H)$	53.2028	76.4723	60.2173	60.6663	59.3195	53.8388
$\Sigma(L)$	57.1310	33.8615	50.1165	49.6675	51.0143	56.4950
<b>Difference</b>	-3.9281	42.6107	10.1009	10.9987	8.3052	-2.6562
<b>Effect</b>	-0.6547	7.1018	1.6835	1.8331	1.3842	-0.4427
<b>Mean square</b>	1.2858	151.3063	8.5023	10.0810	5.7480	0.5879

#### Full factorial design을 통한 *B. subtilis* 배지 최적화

Plackett–Burman design을 통해 주요 요소로 선정된 yeast extract, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 그리고 CaCl<sub>2</sub>를 세가지 factor로 각각의 농도를 다르게 하여(Table 5) FFD를 수행한 결과 Table 6의 D.C.W 값과 Design Expert pro S/W를 통해 Table 7을 얻을 수 있었다.

Yeast extract와 CaCl<sub>2</sub> 양이 많을수록, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 양이 적을수록 균체량이 높아지는 경향을 보였으므로 균체량이 최대가 되는 점을 찾기 위하여 각각 yeast extract의 농도는 10을 중심으로 4.5씩 증가시키고, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 2를 중심으로 0.45씩 감소시켜 SAM을 진행하였다. CaCl<sub>2</sub>는 변화값이 0.0001로 너무 작아서 SAM실험에서 제외하였다.

Table 5. Levels of each medium component for 3-factor full factorial design(FFD)

	Yeast extract	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>
+1	15	3	0.015
0	10	2	0.01
-1	5	1	0.005

Table -6. Experimental matrix for 3-factor full factorial design(FFD) and the resulting mycelial growth of *B. subtilis* (D.C.W)

	Yeast extract	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	D.C.W (g/L)
1	-1	-1	-1	10.6940
2	+1	-1	-1	13.2192
3	-1	+1	-1	8.87961
4	+1	+1	-1	11.9473
5	-1	-1	+1	10.6005
6	+1	+1	+1	13.3502
7	-1	-1	+1	8.91702
8	+1	+1	+1	12.2279
9	0	0	0	11.3487
10	0	0	0	11.5545

Table 7. Experimental design for the optimization of D.C.W medium concentration through steepest ascent method(SAM)

	Yeast extract	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>
<b>center point</b>	10	2	0.01
<b>origin step</b>	5	1	0.005
<b>main effect</b>	2.91	-1.47	0.09
<b>coefficient</b>	1.455	-0.735	0.045
<b>r value</b>	5.099021965		
<b>slope value</b>	4.549547993	-2.298225275	0.14070767
<b>new step</b>	22.74773996	-2.298225275	0.000703538
<b>r = 1</b>			
5.099021965			
22.74773996	-2.298225275	0.000703538	
4.4611967	-0.450718842	0.000137975	

### Steepest ascent method을 통한 *B. subtilis* 배지 최적화

각 배지성분과 기여도를 이용해서 생산배양 배지성분의 최적 농도지점을 대략적으로 결정하기 위해 SAM 실험을 수행하였다. 즉, 상기 full factorial design(FFD) 실험을 바탕으로 SAM을 이용하여 2가지의 배지성분의 농도를 순차적으로 변화시켜(Table 8) 균체량이 어느 지점에서 최대치를 주는지 확인하였다. 2가지 배지성분 상호간의 영향을 조사한 상기의 FFD 실험결

과에 근거해서 계산한 실험 설계값(Table 8)으로 RSM을 진행하였다.

**Table 8. Run table for the D.C.W experiments design by SAM**

No.	yeast extract	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	D.C.W
1	10	2	13.85
2	14.5	1.5	14.19
3	19	1.1	14.17
4	23.4	0.65	14.12
5	27.8	0.2	14.90

**반응표면분석법(response surface method)**

최종 선별된 배지성분의 최적 농도를 결정하기 위해 배지성분 각각의 농도 변화가 *B. subtilis*의 생산성에 미치는 영향을 반응표면분석법을 이용하여 분석하였다. 이를 위한 실험계획법으로 중심합성계획법(central composite design, CCD)을 이용하였다. (Table 9, 10)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 yeast extract의 교호작용을 그림으로 보았을 때 실험이 진행된 농도범위에서 yeast extract는 36 g/L에서 균체량이 높은 경향성을 보였지만, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 0.3 g/L 보다 농도를 높게 하거나 0.1 g/L보다 낮은 농도에서 균체량이 올라가는 경향을 보였기 때문에, Table 1-10으로 2차 RSM을 진행하였다. 각 배지조합과 그 배지조합에서 얻은 최종 D.C.W (g/L)을 Table 11에 제시하였다.

Figure 2 및 3은 yeast extract와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 반응표면을 나타낸 것이다. yeast extract가 36 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>의 농도가 0.26 g/L일 때 D.C.W가 15.4 g/L로 최적점임을 알 수 있었다.

배지최적화 실험을 통한 최적배지의 농도는 Table 12에 제시하였다.

**Table 9. Concentration of the respective medium components at each level (central composite design for the response surface method)**

X <sub>n</sub>	Independent variables	Level				
		-α	-1	0	+1	+α
X <sub>1</sub>	Yeast extract	11.94	14	28	42	44.06
X <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.09	0.1	0.2	0.3	0.31

※ α : 1.147 (중심점의 수 : 2EA / 독립변수의 수 : 2EA)

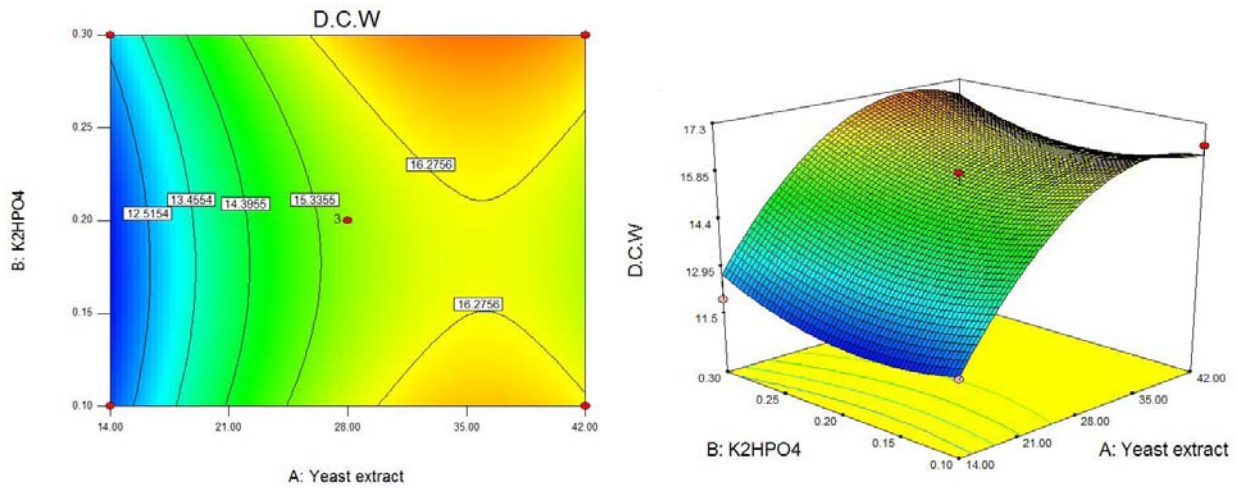


Figure 2. Response surface plot showing the effect of  $K_2HPO_4$  and yeast extract concentration.

Table 10. Concentration of the respective medium components at each level (central composite design for the response surface method)

$X_n$	Independent variables	Level				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
$X_1$	Yeast extract	25.68	27	36	45	46.32
$X_2$	$K_2HPO_4$	0.11	0.13	0.26	0.39	0.41

※  $\alpha$  : 1.147 (중심점의 수 : 2EA / 독립변수의 수 : 2EA)

Table 11. Experimental matrix for the central composite design experiment and the resulting mycelial growth of *B. subtilis* (D.C.W)

Exp No.	Culture condition		D.C.W (g/L)
	Yeast extract (g/L)	$K_2HPO_4$ (g/L)	
1	-1(27)	-1(0.13)	14.95884
2	+1(45)	-1(0.13)	15.07108
3	-1(27)	+1(0.39)	13.89264
4	+1(45)	+1(0.39)	14.75309
5	$-\alpha$ (25.68)	0(0.26)	14.60344
6	$+\alpha$ (46.32)	0(0.26)	14.19193
7	0(36)	$-\alpha$ (0.11)	14.43509
8	0(36)	$+\alpha$ (0.41)	15.52
9	0(36)	0(0.26)	15.01496
10	0(36)	0(0.26)	15.46389
11	0(36)	0(0.26)	15.38907
C			1.96799

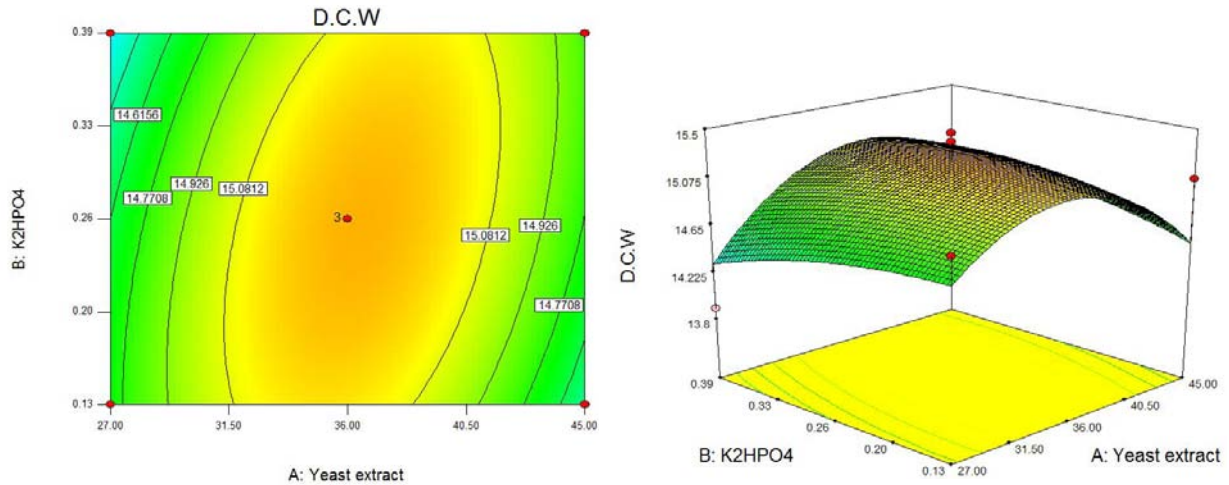


Figure 3. Response surface plot showing the effect of  $K_2HPO_4$  and yeast extract concentration.

Table 12. Concentration of optimum medium

Component	Concentration (g/L)
Galactose	20
Yeast extract	36
$K_2HPO_4$	0.41
$Na_2CO_3$	0.25
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01

### 발효조건 최적화

2.5 L 부피의 발효조 (Kobio Tech Co. Ltd.)에서 조업부피를 1.5 L로 한다. 배양온도는 32°C, 37°C, 42°C, 47°C, pH는 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 교반속도는 200 rpm, 300 rpm 그리고 공기유속은 1 vvm (volume of air/volume of fluid/min), 2 vvm, 3 vvm 으로 바꾸어 실험을 진행하였다. 거품을 제거하기 위해 소포제를 사용하였고, 발효 중 증발로 인한 배지의 감소를 막기 위해서 습윤기를 공기 공급라인에 설치하여 공기 중의 수분함량이 포화상태로 되게 하여 공급하였다. 균체는 3%의 비율로 발효조에 접종하여 배양하였다.

온도 조건을 다르게 하여 *B. subtilis*를 24시간 배양한 결과(Fig. 4), 42°C에서 균체 성장이 20.9 g/L로 가장 좋았고, 총 당량 역시 5.2 g/L까지 떨어진 것을 확인하였다. 32°C와 37°C에서는 6시간이 지날 때 까지 균체량이 0에 가까웠지만 9시간이 지난 후부터 조금씩 성장하였다. 47°C의 조건에서는 6시간까지 성장이 좋았지만 그 후에는 거의 자라지 않았다. 균체 성장이 가장 좋은 42°C를 제외한 나머지 온도에서는 glucose 역시 모두 소모되지 않았다.

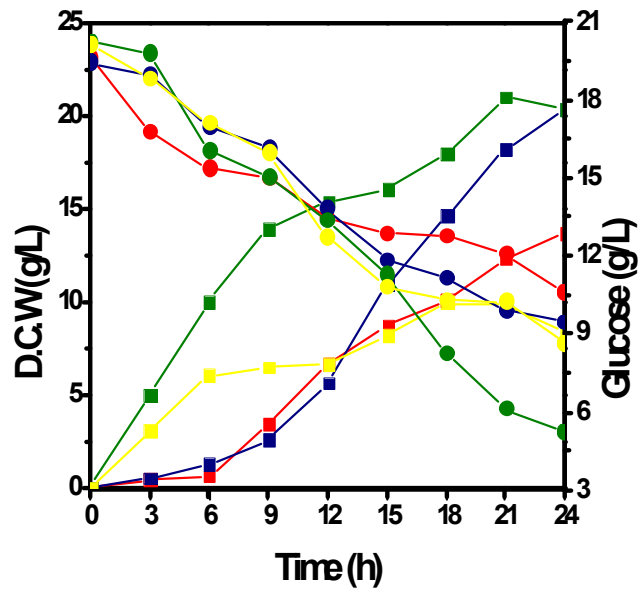


Figure 4. Effect of various temperature on D.C.W and glucose in optimum medium.

■ : D.C.W ● : total glucose — : 32°C — : 37°C — : 42°C — : 47°C

이전실험에서 얻은 배양 최적온도 42°C에서 교반속도를 다르게 해서 실험을 하였을 때(Fig. 5) 200 rpm에서 균체량은 배양 24시간 후 14.5 g/L에 그쳤지만 300 rpm에서는 배양 15시간 후 24 g/L까지 성장하였다.

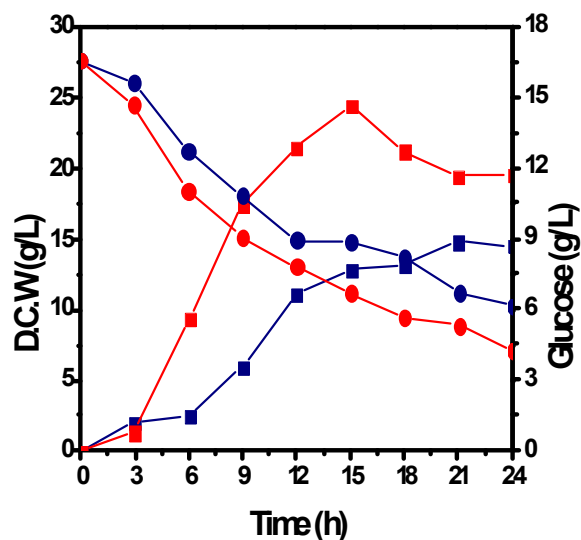


Figure 5. Effect of various agitation speed on D.C.W and glucose in optimum medium.

■ : D.C.W ● : total glucose — : 300 rpm — : 200 rpm

42°C, 300 rpm의 배양조건을 고정시키고 pH를 6.0부터 8.5까지 변화시켜 실험을 진행한 결과(Fig. II-6) pH 8.0의 조건에서 균체량은 30.8 g/L까지 증가하였고 glucose 5 g/L까지 감소하였다.

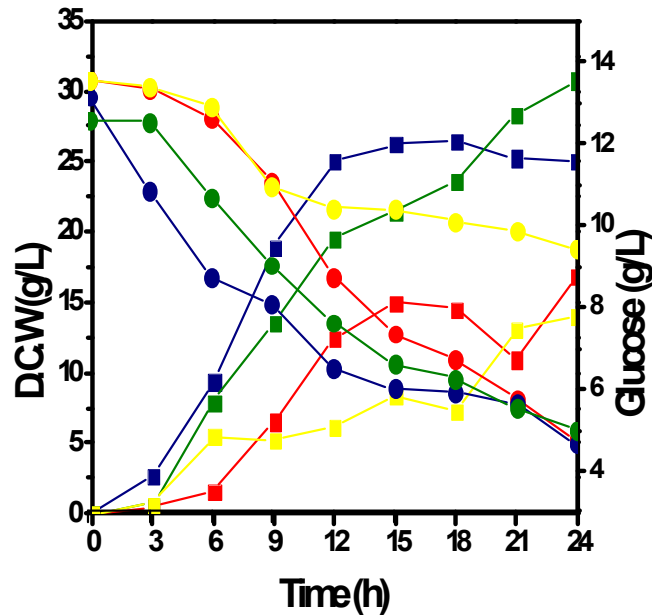


Figure 6. Effect of various pH on D.C.W and glucose in optimum medium.

(data of pH 6.0 and 6.5 are not shown) ■ : D.C.W ● : total glucose

— : pH 7.0 — : pH 7.5 — : pH 8.0 — : pH 8.5

42°C, 300 rpm 그리고 pH 8.0의 조건에서 1, 2, 3 vvm으로 *B.subtilis*를 배양했을 때(Fig. 7), 통기량이 높을수록 균체 성장이 높을 것이라는 예상과 달리 3 vvm에서는 균성장에 저해를 받는 것을 알 수 있었다. 균체는 1 vvm과 2 vvm에서 30.7 g/L까지 성장하였다. 1 vvm의 조건에서는 21시간이 지날 때 까지 균체가 일정하게 성장하는데 반해 2 vmm에서는 균이 6시간부터 15시간까지 대수기로 빠르게 성장하였다. 그래서 2 vvm을 최적 조건으로 선택하였다.

최종적으로, 배양 조건 최적화 실험을 통한 42°C, 300 rpm, pH 8.0 그리고 2 vvm의 배양 최적조건에서 30.7 g/L의 균체량을 얻을 수 있었다.

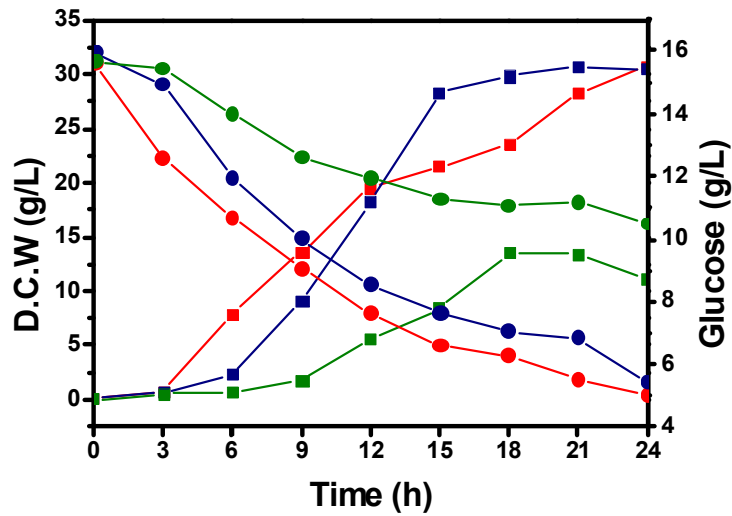


Figure 7. Effect of various aeration rate on D.C.W and glucose in optimum medium.

■ : D.C.W ● : total glucose — : 1 vvm — : 2 vvm — : 3 vvm

### 요 약

통계적 배지최적화 방법을 이용하여 균체대량생산에 적합한 최적배지 선정 결과, galactose 20 g/L, yeast extract 36 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.41 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.25 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.4g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.01g/L 으로 최종 건조 균체량 15.4 g/L 을 얻을 수 있었다.

2.5 L 발효조를 이용하여 최적배지에서 배양온도 42°C, 교반속도 300 rpm, pH 8.0, 공기유속 2 vvm의 발효 최적조건을 확립하였다. 그 결과 30.8 g/L 건조 균체량을 얻었다.

결과적으로 통계적 처리방법을 이용하여 starter 고체배양 조건 최적화, 고체 발효조 에서의 생산균주의 배양 특성 규명 그리고 발효조 배양공정 최적화를 할 수 있었다.



## 제 7 절 최적배지와 선택된 발효 조건을 이용한 회분배양과 반복 회분배양

최적 배지에서 높은 균체량을 얻기에 적합하다고 선정된 발효조건은 1차년도 실험결과에 의하면, 온도, 교반속도, pH와 공급되는 공기유속이 각각 42℃, 300 rpm, 8.0 그리고 2 vvm이었다. 최적발효배지와 조건에서 생물반응기를 이용하여 회분식 배양을 수행한 결과, 균체의 성장이 재현성이 있음을 확인하였고, 생물반응기 내의 용존산소는 발효 시작 후 급격히 감소하는 경향을 보였으며, 균체 성장이 정상상태에 도달하는 15시간에는 바닥상태에 도달하였다. 그리고 발효 말기에도 탄소원이 약5% 정도로 추정되었다. 이는 배지의 균형이 적절하지 않은 상태로 생각되었다. 최대균체량은 30.7 g/L로 최적화 배지를 이용해 플라스크 배양 하였을 때(15.4 g/L)보다 약 2배 상승하였다(Fig. 1). 이러한 원인으로 첫째, 발효조 배양은 플라스크 배양과 다르게 임펠러에 의해 배지와 균체 등 다양한 변수들이 잘 조절되고 유지되도록 하는 교반 형태를 가지고 있고, 둘째, 마개에 의해 산소의 공급이 제한되는 플라스크 발효와 달리 발효에 필요한 공기를 직접 공급해주기 때문이라고 추측할 수 있다.

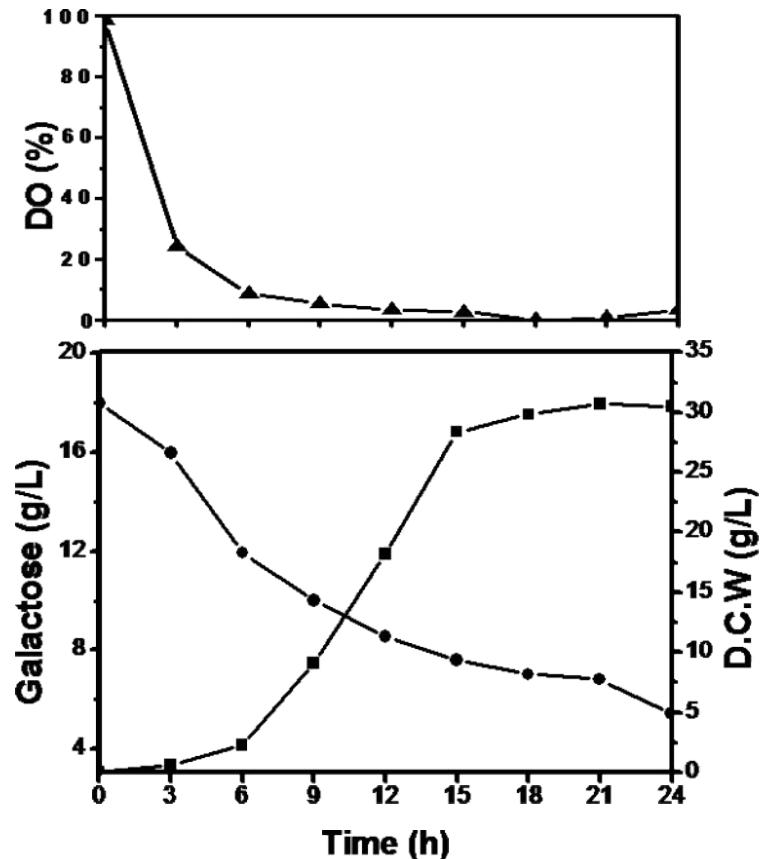


Fig. 1. Time profiles of residual galactose concentration(●), DO(▲) and D.C.W(■) in the batch culture at 42℃, 300 rpm, pH 8.0 and 2 vvm.

회분배양과 동일한 조건으로 반복 회분 배양을 수행하였다. 배양 24시간이 지난 후 균체는 26.2 g/L까지 성장하였다(Fig. 2). 이 때 남아있는 galactose의 양은 3.1 g/L였고, 배지 1.35 L를 첨가 해준 후에는 galactose의 양은 11.39 g/L가 되었다. 배지를 첨가해준 후 6시간동안 균체의 성장이 급격하게 일어나고, galactose의 농도가 약 4.45 g/L로 떨어졌다. 배지 첨가 두 번째와 세 번째도 비슷한 경향으로 균체 성장과 galactose 소모가 이루어 졌다.

배양 90시간이 지났을 때(4번째 발효)의 균체량이 26.18 g/L로 배양 24시간 후인 26.2 g/L와 거의 비슷한 수준이었다. 이결과로부터 회분식 배양의 단점인 매 배양마다 접종균을 준비하고, 발효 후 생물반응기를 청소함으로 생산성의 감소를 극복할 수 있었다. 특히 *B. licheniformis* SCD121067 균의 안정성이 확보됨으로 4번 이상의 반복회분배양도 가능하리라 생각되었다.

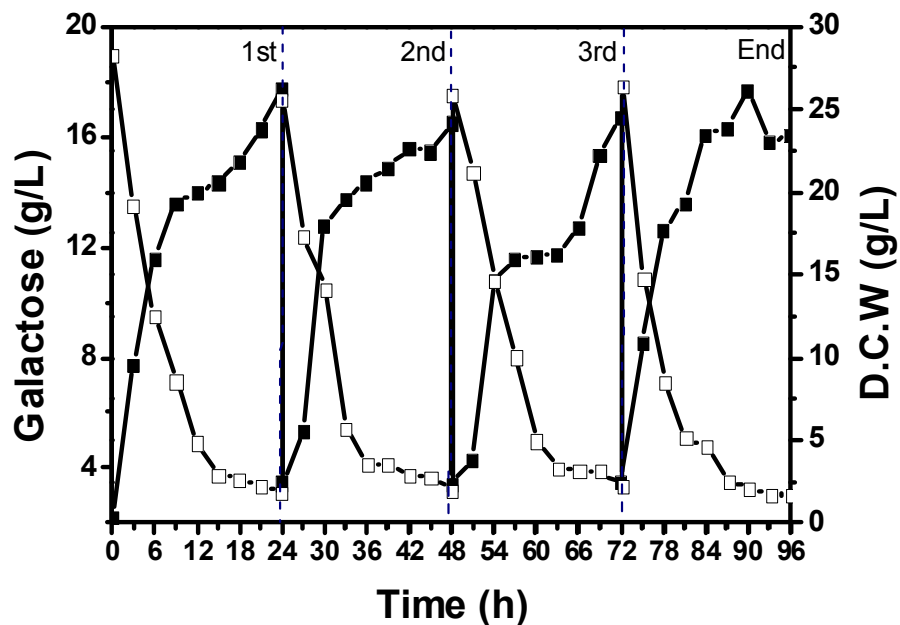
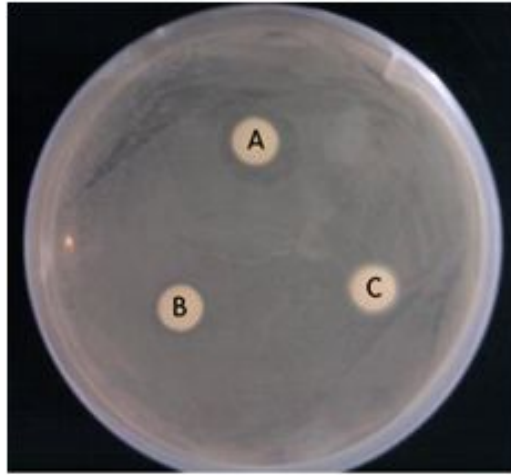


Fig. 2. Time profiles of D.C.W(■) and residual galactose concentration(□) during repeated-batch fermentation using the optimized medium at 42°C, 300 rpm, pH 8.0 and 2 vvm.

*B. cereus* 항균활성 능력은 배양 24시간이 지났을 때 1.8 cm의 환이 생성되었는데(Fig. 3), 24시간 배양이 반복 되어도 항균활성이 줄어들지 않고 일정하게 유지되는 것을 확인하였다 (Table 1). Protease activity는 배양 24시간 후에 15.2 U/mL로 측정되었고, 48시간, 72시간 그리고 96시간에 각각 18.84 U/mL, 14.98 U/mL 그리고 17.62 U/mL였다. 효소 활성 역시 *B. cereus*에 대한 항균활성 능력과 마찬가지로 배양이 반복되어도 일정하게 유지 된다는 것을 확인하였다. 이것으로 장시간 발효를 진행하여도 큰 무리가 없을 정도로 균의 안정성이 있는 것으로 판단되었다.



**Fig. 3.** The effect of three *Bacillus* strains on the inhibition of *B. cereus* growth.  
 A: *Bacillus licheniformis* SCD121067(Soonchang)  
 B: *Bacillus subtilis*(Daesang, Co. Ltd)  
 C: *Bacillus subtilis*(Busan Univ.)

**Table 1.** The antibacterial effect against *B. cereus* and protease activity by *B. licheniformis* SCD121067 during the repeated-batch fermentation

	1st	2nd	3rd	End
Diameter (cm)	1.8	1.5	1.7	1.6
Protease (U/mL)	15.2	18.84	14.98	17.62

*B. licheniformis* SCD121067의 배지와 발효조건 최적화 실험을 통한 세포비성장속도( $\mu$ )와 생산성을 비교하여 Table 1-2에 나타내었다. 기본 배지보다 최적배지에서  $\mu$ 값은 각각  $0.054 \text{ h}^{-1}$ 와  $0.14 \text{ h}^{-1}$ 로 최적배지에서 2배 높았고, 생산성 역시 예상한 바와 같이 최적배지( $0.640 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ )가 기본배지( $0.065 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ )보다 10배 높았다. 최적 배지를 이용한 회분배양을 통한 미생물의 비성장속도( $\mu$ )는 플라스크에서 배양한 최적배지(B)보다 1.85배 높은  $0.26 \text{ h}^{-1}$ 이었고, 회분배양을 반복 수행한 C의 경우  $\mu$ 값이  $0.17 \text{ h}^{-1}$ 로 회분배양보다 다소 낮은 성장속도를 보였다. 그러나 균체의 생산성은 반복회분배양이  $1.125 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ 로 회분배양( $1.023 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ )보다  $0.1 \text{ g/L}\cdot\text{h}$  높은 값을 보이며 시간당 얻을 수 있는 균체량이 반복회분배양에서 가장 많음을 확인하였다(Table 2).

**Table 2.** Cell growth productivity and specific growth rate( $\mu$ ) under each experiment step by *B. licheniformis* SCD121067

configuration		D.C.W (g/L)	specific growth rate(h <sup>-1</sup> )	productivity (g/L·h)
A	Flask	1.56	0.054	0.065
B	Flask	15.4	0.14	0.640
C	batch	30.7	0.26	1.023
D	repeated-batch	27.0*	0.17*	1.125

A : Basic medium

B : Optimized medium

C : Batch fermentation using the optimized medium at selected conditions

D : Repeated-batch fermentation using the optimized medium at selected conditions

\* average about each cycle

### 균체 분리에 의한 스타터의 제조와 저장성(균의 활성 측정)

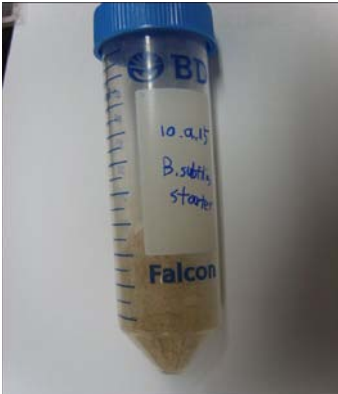
반복 회분 배양을 통해 얻은 배양액에서 균체만을 분리하기 위해 원심분리기(Beckman, US)를 사용하였다(Fig. 4 (a)). 10000 rpm의 조건으로 3번 워싱 하여 분리된 균체를 동결건조기(IIShin Lab Co., LTD; Fig. 4 (b))를 이용하여 -55°C 감압상태에서 동결 건조시켜 미생물 스타터를 제조하였다(Fig. 4 (c)). 원심분리 후에 얻은 균체는 회분배양 1회당 약 52.5 g/L였고, 이것을 동결건조시켜 얻은 건조균체량은 25.1 g/L로 수율( $Y_{x/s}$ )은 0.48로 측정되었다. 이것은 원심분리 후에 균체와 함께 남아있던 수분이 모두 제거되어 생긴 현상이라고 할 수 있다. 미생물 스타터를 메주의 제조에 이용하기 위해서는 스타터를 보존하는 오랜 기간 동안 스타터의 활성이 떨어지지 않고 유지되어야 하는 것이 필수적이다. *B. licheniformis* SCD121067 스타터의 항균활성과 protease 활성을 확인하는 실험을 진행한 결과 2개월, 4개월 그리고 6개월이 지났을 때 *B. cereus* 항균활성 능력은 대조구와 비교하여  $\pm 0.2$  cm의 근소한 차이를 보였고, protease 활성은 각각 10.35 U/mL, 8.8 U/mL 그리고 9.7 U/mL로 측정되었다(Table 3). 이러한 결과는 동결건조 분말이 생균 보다는 낮은 활력을 갖는 것이 일반적인 경향임을 감안한다면 본 연구의 *B. licheniformis* SCD121067 스타터의 *B. cereus*에 대한 항균능력과 protease 활성은 6개월이 지나도 유지된다고 볼 수 있다. Park가 보고한 문헌에서도 균의 성장을 촉진하는 액체 배지에서 대량으로 증식시킨 후 원심 분리한 균체를 동결건조 하였을 때 최소 12개월 이상 저장 할 수 있다고 하였다. 덴마크의 크리스찬 한센(Chr. Hansen)사의 농축종균의 예에서도 동결건조한 균주의 저장기간이 최소 12개월에서 수년간 보존할 수 있다고 보고되었다. 현재 발효 중 자동으로 용존산소를 조절하기 위한 발효시스템을 구축하였으며(Fig. 5) 임펠러의 회전속도(rpm)와 공기공급(vvm 조절)에 의한 발효를 수행 중에 있다. 그리고 동결건조 균주의 저장 중 활성 연구를 위해 동결건조 후 균체에 첨가제(skim milk 등)를 첨가한 것과 하지 않은 것의 균 활성에 관한 비교 실험을 진행 중에 있으며, 발효 후 균의 분리를 위해 막 시스템을 구축 하였으며 운전 최적조건(막의 기공 크기, 재질, 압력, 농도 등)을 확립 중에 있다(Fig. 6).



(a)



(b)



(c)

Fig. 4. Photograph of (a) a centrifuge, (b) a freeze dryer and (c) *B. licheniformis* SCD121067 starter obtained from separation process.

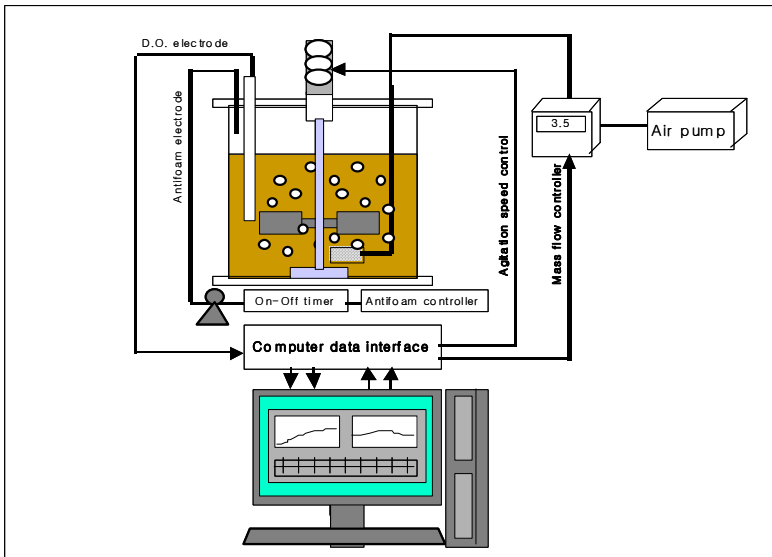
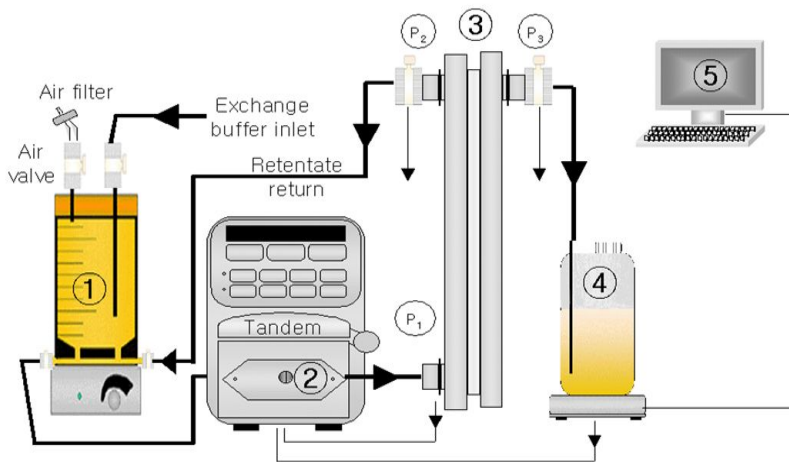


Fig. 5. Configuration of an on-line computer-controlled fermentation system for the control of dissolved oxygen.



**Fig. 6. Configuration of membrane system to separate the biomass.**

1 : Feed Tank, 2 : Peristaltic pump, 3 : Membrane module, 4 : Permeate tank  
 5 : Computer, P1, P2, P3 : Pressure gage

**Table 3. The antibacterial effect against *B. cereus* and protease activity by *B. licheniformis* SCD121067 starter**

	Control	after 2 month	after 4 month	after 6 month
Diameter (cm)	1.8 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.12 <sup>a</sup>	2 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.17 <sup>a</sup>
Protease activity (U/mL)	10.54	10.35	8.8	9.7

<sup>a</sup>means with the same letter in row are not significantly different(p<0.1)

### 배지단가 비교

최적화배지와 기본배지의 단가를 비교해본 결과 각각 4911.6 원/L과 6767.7 원/L으로 실험용 배지가 약 1.4 배 높았고, 균체량의 경우 기본배지에서의 균체량은 1.56 g/L, 최적배지에서의 균체량은 15.4 g/L으로 최적배지에서의 균체량이 약 9.9배 높았다. 결과적으로, 균체량에 대한 배지단가를 계산하면 각각 3148.4원과 439.5원으로 최적화배지의 단가가 건조균체 1g 생산 시 약 7배정도 더 저렴하므로 산업에 이용되었을 때 최적배지가 균체단가를 저렴하게 생산할 수 있는 배지임을 알 수 있었다(Table 4, 5).

Table 4. Production cost of DCW(g) by using basic medium

Control	조성	g/L	단가(원/g)	단가(원/L)
	Sucrose	20	5.6	112
	Asparagine	10	477.6	4776
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	10	20
	MgSO <sub>4</sub>	0.4	5.6	2.24
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.25	5	1.25
	CaCl <sub>2</sub>	0.01	8.8	0.088
	합성배지 단가(원/L)			4911.6
	D.C.W (g/L)			1.56
	합성배지 단가(원) / D.C.W(g)			3148.4

Table 5. Production cost of DCW(g) by using optimum medium

Optimum medium	조성	g/L	단가(원/g)	단가(원/L)
	galactose	20	212	4240
	Yeast extract	36	70	2520
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.41	10	4.1
	MgSO <sub>4</sub>	0.4	5	2.24
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.25	5.6	1.25
	CaCl <sub>2</sub>	0.01	8.8	0.088
	합성배지 단가(원/L)			6767.7
	D.C.W (g/L)			15.4
	합성배지 단가(원) / D.C.W(g)			439.5

## 결 론

*B. licheniformis* SCD121067의 대량생산을 위해 최적배지를 이용하여 2.5 L 생물반응기에서의 발효 배양 온도, 교반속도, pH, 공기유속은 각각 42℃, 300 rpm, 8.0 와 2 vvm으로 측정되었고, 이때의 균체 생산량은 30.7 g/L 이었다. 같은 조건에서 반복 회분배양을 실시하였을 때 원심분리 후에 얻은 균체는 회분배양 1회당 약 52.5 g/L, 이것을 다시 동결건조 시켜 얻은 건조균체량은 25.1 g/L으로 수율(Y)은 약 82%로 측정되었다. 스타터로 활용하기 위하여, 균체를 배양 후 분리와 동결건조하여 6개월 동안 활성을 관찰한 결과 *B. cereus* 항균활성 능력과 protease 생산능력이 줄어들지 않고 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

## 제 8 절 전통장류 품질 표준화를 위한 starter 배양 및 성장곡선 확인

### 실험 재료 및 방법

#### 사용 균주

실험에 사용된 균주는 순창 장류연구센터에서 *Bacillus cereus* 증식 억제능을 가지는 균주로 새로 분리한 *Bacillus licheniformis* SCK 121057를 사용하였다(1). 균주보관은 tryptic soy broth(TSB)에 접종하여 12시간 30℃에서 배양한 후 30% glycerol이 함유된 증류수에 넣어 -80℃ deep freezer에 liquid stock으로 냉동 보관 하였으며 필요시마다 해동하여 사용하였다.

#### 배양 배지

성장 배지는 Tryptic soy broth(Becton, Dickinson and Co. France)를 사용하였다. 생산 배지 살균 시 고온고압에 의한 당성분의 카라멜 화 또는 배지 중 아미노화합물(아미노산, 펩티드, 단백질, 아민류 등)과 카르보닐 화합물(알도오스와 케토오스와 같은 환원당, 올리고당이나 다당류의 환원성말단 및 카르보닐 화합물로 쉽게 변하는 물질 등)이 반응하는 메일라드 반응(Maillard reaction)이나 무기물 성분의 침전이 있을 수 있으므로 이를 방지하기 위해 각 배지 성분을 따로 살균하고 방냉한 후 무균 상자에서 각 배지 성분을 혼합하여 사용하였다. 생산배지의 조성은 Table 1에 나타내었다(2).

#### 종균 배양

Tryptic soy broth 10 mL 당 tryptic soy agar(TSA)에 도달된 균주 1 colony를 접종하여 200 rpm, 30℃의 조건으로 12시간 배양하여 종균으로 사용하였다.

#### 플라스크 배양

배지최적화 및 성장실험을 위해 플라스크 배양이 이용되었다. 250 mL의 플라스크에 배양부피 50 mL의 배지를 넣어 종균으로 배양한 *Bacillus licheniformis* SCK 121057 배양액을 1 % 접종하였고 200 rpm, 30℃에서 24시간 배양하였다.

#### *Bacillus cereus* 배양

Tryptic soy broth 10 mL당 tryptic soy agar에 도달된 균주 1 colony를 접종하여 200 rpm 과 30℃에서 15시간 배양하였다.

#### *Bacillus licheniformis* SCD 121067 배양

Tryptic soy broth 10 mL당 tryptic soy agar에 도달된 균주 1 colony를 접종하여 200 rpm 과 30℃에서 15시간 배양하였다.

#### 발효조 배양

2.5 L의 발효조(KobioTech Co. Ltd. Korea)에서 1.5 L로 조업부피를 유지하며 실험을 수행



하였다. 종균 배양액을 발효조에 3 %(vol.%) 접종하여 실험을 수행하였다. 배양 기간 동안 3 시간마다 일정량의 시료를 취하여 건조균체량과 효소활성을 분석하였다.

### *Bacillus cereus*에 대한 항균활성 측정

항균활성은 paper disc를 이용한 디스크 확산법(Disc diffusion method)으로 측정하였다(3). *Bacillus cereus* 배양액 100  $\mu$ l를 tryptic soy agar(TSA) 평판배지에 골고루 도말한 후, 직경 8 mm의 멸균 paper disk (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)를 올려놓은 다음 *Bacillus licheniformis* SCD 121067과 *Bacillus licheniformis* SCK 121057 배양액 80  $\mu$ l씩 분주하고 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 paper disc 주변에 생성된 환의 직경을 측정하였다. 대조구로는 종균 배지로 쓰는 tryptic soy broth 를 사용하였다.

### 건조균체량(Dry cell weight, D.C.W)

건조균체량은 원심분리기로 균체를 분리시켜 105 $^{\circ}$ C로 유지된 건조기에서 항량이 될 때까지 건조하여 질량을 측정하고 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정한 값으로 표준곡선식을 수립하였다. 발효액의 건조균체량은 측정된 흡광도 값을 표준곡선식(Fig. 1)에 대입하여 계산하였다.

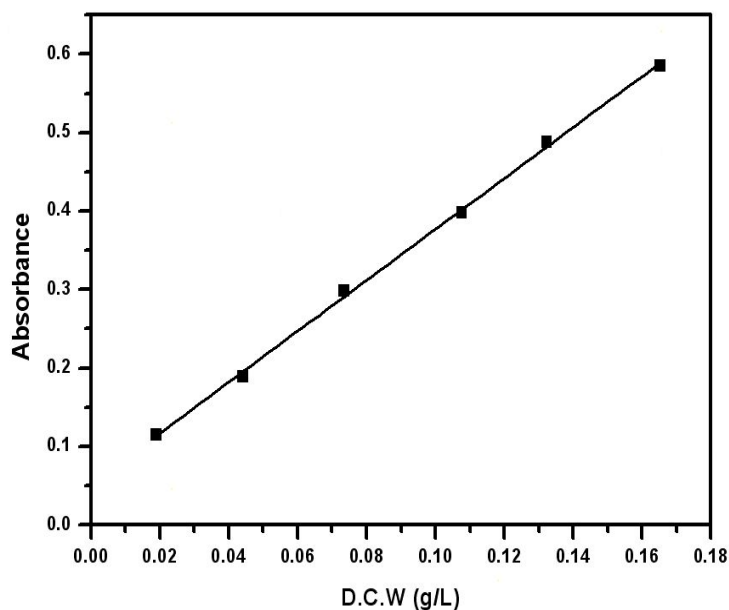


Fig. 1. Standard curve for dry cell weight ( $\lambda$  ; 660 nm).

$$Y=aX+b$$

Parameter	Value	R	N	P
a	3.2452	0.9989	6	<0.0001
b	0.0526			

### Protease activity 측정

10000 rpm에서 10분간 원심분리한 효소 상정액 1 ml과 0.6% casein용액 3 ml을 혼합하여

30°C에서 10분간 반응시켰다. 그리고 0.4 M TCA용액 5 mL을 넣고 30°C에서 30분간 반응시킨 후 여과지(Whatman 1)를 이용하여 여과하였다. 여액 2 mL과 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 5 mL과 folin 시약 1 mL을 혼합하여 30°C에서 30분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 흡광도 값을 표준곡선식(Fig. 2)에 대입하여 계산하였다. 이 때 효소활성은 1분간 1 µg에 해당하는 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다(4).

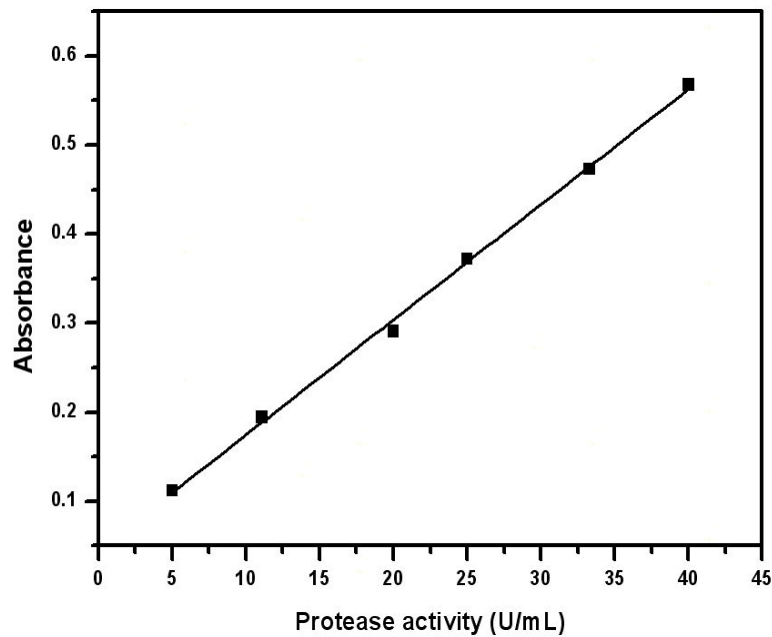


Fig. 2. Standard curve for protease contents by casein ( $\lambda$  ; 660 nm).

$$Y=aX+b$$

Parameter	Value	R	N	P
<b>a</b>	0.0129	0.9983	6	<0.0001
<b>b</b>	0.0451			

#### 당 함량 분석

Sucrose를 분석하기 위하여 phenol sulfuric acid법을 사용하였다(5). 적당량 희석한 시료 1 mL에 5 % phenol 1 mL과 sulfuric acid 5 mL을 넣고 반응시킨 후 상온에서 2시간 정치하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 표준곡선식(Fig. 3)에 대입하여 sucrose 함량을 계산하였다.

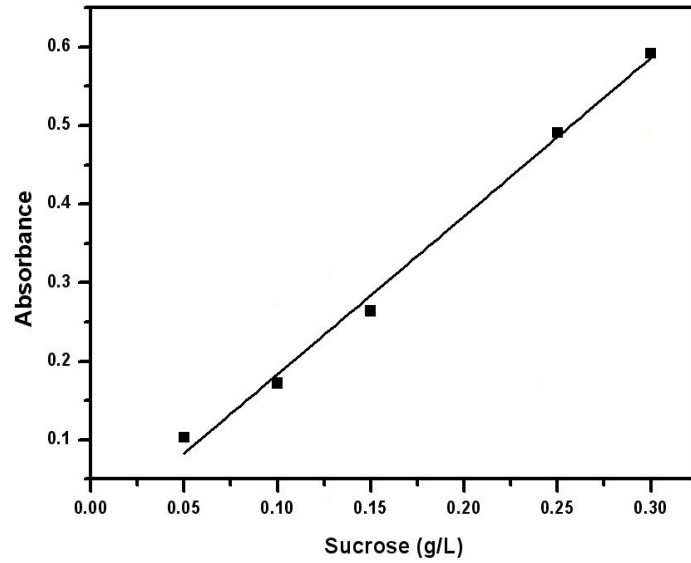


Fig. 3. Standard curve for sucrose contents( $\lambda$  ; 490 nm).

$$Y=aX+b$$

Parameter	Value	R	N	P
a	2.0130	0.9942	5	<0.0001
b	-0.0178			

## 결과 및 고찰

### 성장배지에서 미생물의 성장곡선

생산배지를 최적화함에 앞서 성장배지에서 *Bacillus licheniformis* SCK 121057의 성장곡선을 확인하였다(Fig. 4). 성장배지인 tryptic soy broth에서 30℃, 200 rpm의 조건으로 24시간 동안 배양한 결과 미생물의 성장이 활발한 시기인 12시간째를 생산배지 접종을 위한 성장시간으로 정하였다. 성장배지에서 12시간 배양한 균을 생산배지에 접종하여 실험을 진행하였다.

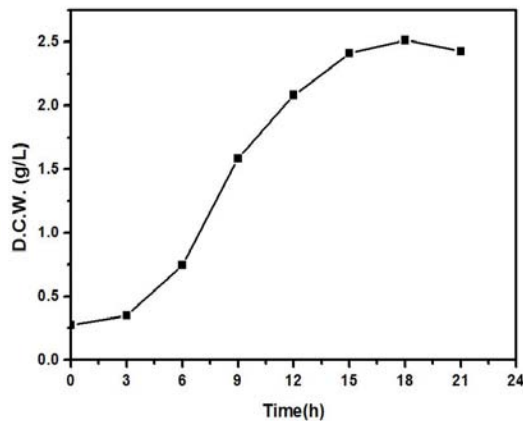


Fig. 4. Growth curve at tryptic soy broth at 30℃, 200 rpm.

Table 1. The component of production medium

Component	Concentration(g/L)
Sucrose	20
Asparagine	10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.25
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01

**Bacillus cereus에 대한 항균활성 측정**

식중독 균인 *Bacillus cereus*에 대한 *Bacillus licheniformis* SCD121067과 *Bacillus licheniformis* SCK 121057의 항균활성을 확인하기 위해 실험을 진행하였다(Table 2). *Bacillus licheniformis* SCD 121067과 *Bacillus licheniformis* SCK 121057가 각각 지름 1.6 cm와 1.9 cm의 환을 생성하였고 tryptic soy broth는 환을 생성하지 않았다(Fig. 5). 이 결과를 토대로 *Bacillus cereus*에 대한 항균 능력은 *Bacillus licheniformis* SCK 121057 균주가 가장 좋다는 것을 알 수 있었다.

Table 2. The effect of two *Bacillus* strains on the inhibition of *Bacillus cereus* growth (A: *Bacillus licheniformis* SCD121067, B: *Bacillus licheniformis* SCK121057, C : Tryptic Soy Broth )

	A	B	C
Diameter(cm)	1.6	1.9	-

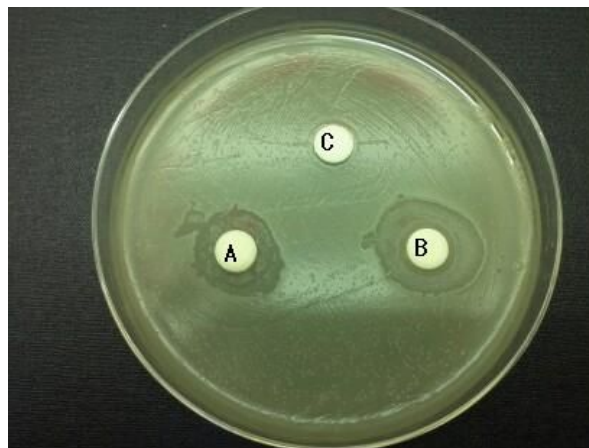


Fig. 5. The effect of two *Bacillus* strains on the inhibition of *Bacillus cereus* growth.

- A : *Bacillus licheniformis* SCD121067 (diameter:1.6 cm)
- B : *Bacillus licheniformis* SCK121057 (diameter:1.9 cm)
- C : Tryptic soy broth

### 기본 생산배지에서의 D.C.W, Protease activity, Sucrose 함량분석

Table 1에 나온 성분의 조성으로 기본 생산배지와 30℃, 200 rpm의 조건에서 24시간 동안 플라스크에서 배양한 후 D.C.W와 protease activity과 sucrose 함량을 분석한 결과이다(Fig. 6). D.C.W는 12시간에 가장 최대인 0.144 g/L를 보였으며 균체가 많이 증가하지 않아서인지 protease activity의 증가와, sucrose의 감소가 아주 작은 폭으로 변화하는 것을 볼 수 있었다.

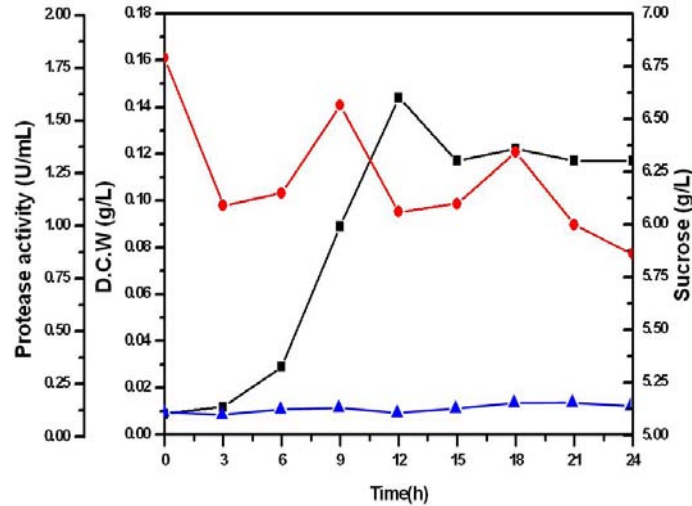
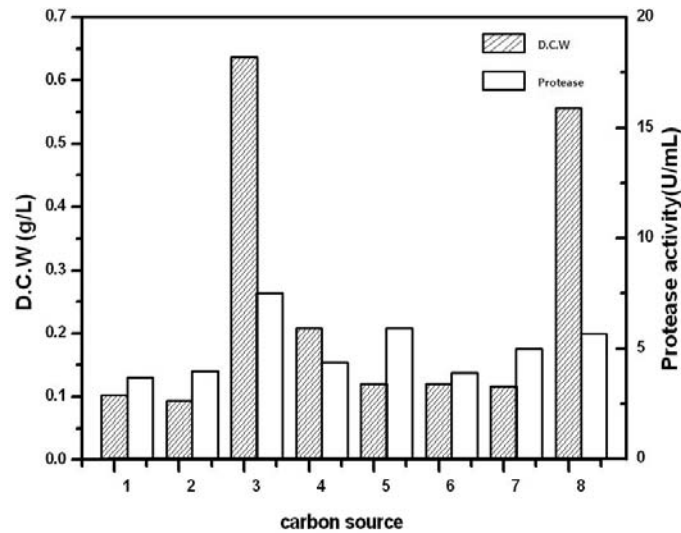


Fig. 6. Time profiles of D.C.W (■), protease activity (▲) and sucrose (●) in the basic production medium at 30°C, 200 rpm.

### One factor at a time(OFAT) 방법을 이용한 영양원의 선별

#### 탄소원 선별

세포가 성장하고 에너지를 이용해 다양한 대사활동을 하기 위한 가장 기본적인 영양분은 탄소원이다. 탄소원은 배양을 위한 필수성분이라 할 수 있는데 세포가 이러한 탄소원을 배양액으로부터 공급받아 이용할 때 다양한 탄소원 중에서도 어느 성분을 더 쉽게 이용할지는 세포마다 가진 효소에 의한 분해 능력에 따라 좌우된다고 볼 수 있다. 따라서 기본배지의 성분에서 탄소원인 sucrose를 대조구로 glucose, galactose, lactose, fructose, maltose, cellobiose, soluble starch로 바꾸어 30℃, 200rpm의 조건으로 24시간 배양한 후 D.C.W와 protease 활성을 측정해 보았다(Fig. 7). 가장 높은 D.C.W를 보인 탄소원은 galactose(0.6371 g/L)로 대조구인 sucrose(0.1021 g/L)를 사용했을 때보다 6배의 증가량을 보였다. Soluble starch를 사용한 경우 D.C.W는 0.5569 g/L로 5배의 증가량을 보였다. Protease activity 또한 galactose가 가장 높은 7.53 U/mL을 보였으며 이는 대조구인 sucrose를 사용했을 때의 3.68 U/mL보다 2배 높은 값이다. soluble starch 또한 sucrose보다 1.6배 높은 값인 5.68 U/mL을 보였으며 fructose의 경우 D.C.W는 sucrose와 비슷한 0.1206 g/L를 보였으나 protease activity는 sucrose를 사용한 경우보다 1.6배 높은 5.92U/mL를 보였다.



**Fig. 7. Effect of various carbon sources on D.C.W and protease activity.**

(1:sucrose, 2:glucose, 3:galactose, 4:lactose, 5:fructose, 6:maltose, 7:cellobiose, 8:soluble starch)

### 질소원 선별

탄소원 못지않게 중요한 배지성분인 질소원은 배양액내에서 세포성장 및 에너지 대사를 위해 이용될 뿐 아니라 다양한 아미노산의 공급원이다. 기본 생산배지를 바탕으로 탄소원으로 galactose를 선별하고 질소원인 asparagine을 대조구로 yeast extract, beef extract, tryptone, soybean flour, casitone, ammonium chloride( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), ammonium sulfate( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )를 질소원으로 하여  $30^\circ\text{C}$ , 200rpm의 조건으로 24시간 배양한 후 D.C.W와 protease activity를 측정해 보았다(Fig. 8). 가장 높은 D.C.W를 보인 질소원은 yeast extract로 대조구인 asparagine의 D.C.W인 0.7233 g/L보다 1.3 g/L로 1.8 배 증가하였다. Tryptone의 경우도 대조구보다 D.C.W가 1.7배 증가하는 것을 볼 수 있었다. Protease activity를 측정한 결과 가장 높은 D.C.W를 보인 yeast extract에서 88.5 U/mL로 대조구를 사용한 경우 7.07 U/mL보다 13배 증가하는 것을 볼 수 있었다. Ammonium chloride( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), ammonium sulfate( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 등의 무기질소원을 사용한 경우보다 yeast extract, tryptone, soybean flour 등의 유기질소원을 사용한 경우가 D.C.W와 protease activity가 모두 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다(6).

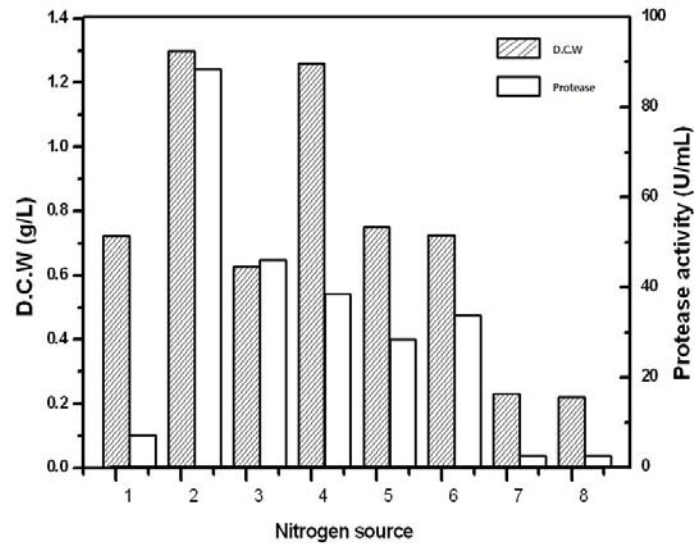


Fig. 8. Effect of various nitrogen sources on D.C.W and protease activity.  
 (1:Asparagine, 2:yeast extract, 3:beef extract, 4:tryptone, 5:soybean flour, 6:casitone,  
 7:NH<sub>4</sub>Cl, 8:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

#### 최적 배지를 이용한 발효조 배양

OFAT를 이용하여 얻은 최적배지(Table 3)를 이용하여 30°C, 200 rpm, pH 7과 공기공급량 1 vvm의 조건으로 발효조에서 균주를 배양한 후 D.C.W와 protease activity을 측정해 보았다 (Fig. 9). 균체량은 24시간동안 2.563 g/L까지 계속 증가하는 경향을 볼 수 있었고 protease activity는 15시간에 가장 높은 63.07 U/mL로 측정되었으며 그 이후로는 감소하는 영향을 보여 주었다.

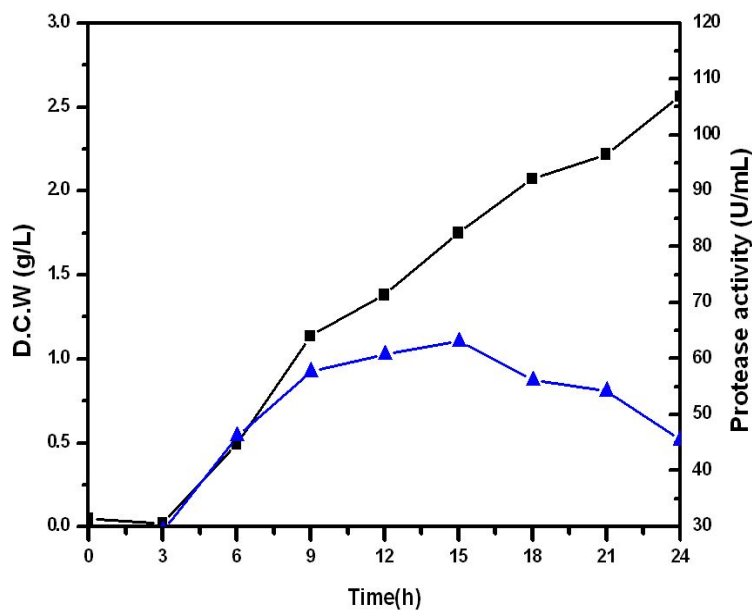


Fig. 9. Time profiles of D.C.W (■) and protease activity (▲) in the batch culture at 30°C, 200 rpm, pH 7.0 and 1 vvm.

## 제 9 절 Pilot plant 규모에서 고추장 메주의 위생적 생산조건 정립

### 서 론

전통 대두발효식품은 자연 발생적으로 생성되어 오랫동안 우리 민족의 중요한 식품의 하나가 되어왔으며, 인공 첨가물 등을 가미하지 않고 자연에서 얻은 천연 식품이라는 것에서 그 우수성을 찾을 수 있다.

식품에 대한 소비자의 위생수준이 향상되고 있으며, 향토산업 육성을 위한 지방자치단체의 경쟁이 심화되고, 식품산업의 글로벌화에 따라 위생수준이 높은 식품의 공급 필요하다.

전통장류의 품질 표준화를 위해서는 자연환경에서 제조된 것과 유사한 조건에서 대량 생산을 하는 것이 중요한 기술이다.

고추장은 발효식품으로서 고추장의 품질은 원료의 배합비, 제조방법, 숙성조건 뿐만 아니라 메주 또는 *koji*에 따라 크게 달라진다. 고추장의 품질을 관리하기 위해서는 미생물의 관리를 통한 발효공정을 관리하고 표준화해야 한다. 따라서 메주발효를 관리하는 것은 고추장의 품질에서 매우 중요한 부분이다. 품질이 균일한 전통고추장 제품을 생산하기 위해서는 amylase 활성과 protease 활성이 우수한 *Aspergillus*속과 *Bacillus*속 미생물을 이용하여 품질이 균일한 메주를 제조하는 것이 필수적이다.

그러나 고추장 등 우리 전통장류는 제품 고유의 반고체 특성, 원료의 복합성, 제조 지역 및 시기의 차이에 따른 품질의 불균일성 등으로 인하여 품질의 표준화가 어려우며, 품질 고급화와 표준화에 대한 탐색 및 선별작업이 미흡했으며, 전통고추장의 품질 및 제조방법 표준화, 위생적인 제품 생산 및 산업화를 위해서는 전통 메주를 대량생산하는 제조공정의 확립이 필요한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 전통고추장 메주의 제조조건, 즉 메주의 제국온도, *Aspergillus oryzae*의 종류, *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*의 접종시기, 제국방법 등에 대한 표준 발효조건을 설정하기 위하여 순창장류연구사업소의 pilot plant 시설을 활용하여 메주를 제조하였고, 제국기간 중 그 특성들을 비교, 분석하였다.

### 재료 및 방법

#### *Koji* 제조

초기 곰팡이 접종 수는 *A. oryzae*의 경우  $5.2 \times 10^7$  CFU/g 이었으며, *A. sojae*의 경우는  $2.4 \times 10^7$  CFU/g였다. *A. sojae*와 *A. oryzae* 균을 0.1% Tween 80을 첨가한 0.1% peptone 수 10 mL에 각각 1백금이를 희석한 후 이 peptone 수 0.1 mL를 취해 Malt Extracts Broth(MB) 배지를 이용하여 48시간 배양하였다.

*Koji* 제조과정은 그림 1과 같다. 즉 멥쌀(일미)을 121℃에서 30분간 증자하고, 30℃까지 냉각시킨 후 *A. sojae* 또는 *A. oryzae*균을 배양한 평판배지에 0.1% Tween 80을 첨가한 0.1% peptone water 10 mL를 분주하여 균일화시킨 후 이 peptone water를 멥쌀 100 g 당 3 mL를



접종하였다. 균을 접종한 쌀은 25℃에서 5일간 배양하여 사용하였다.

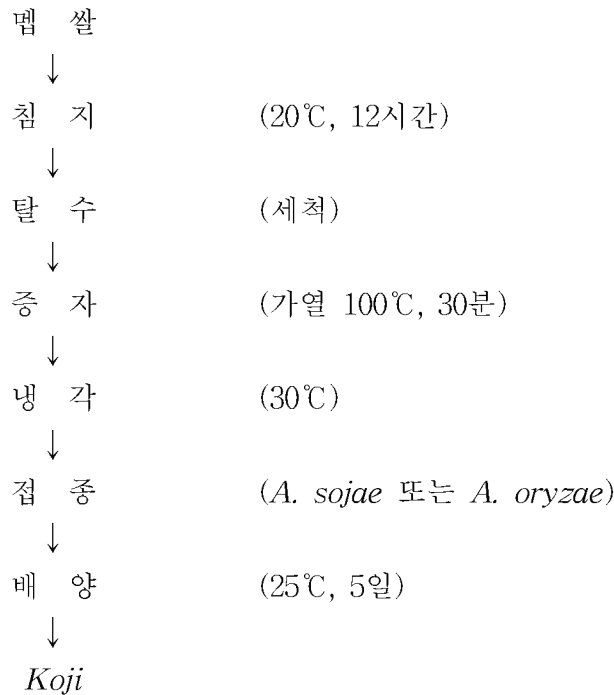
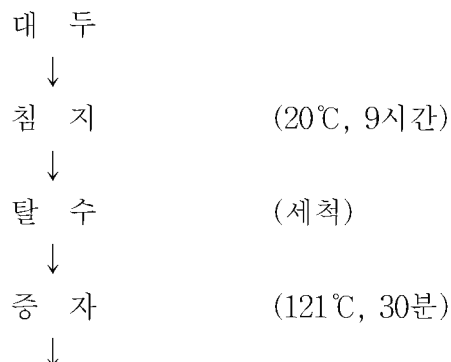


그림 1. 코지 제조 과정.

#### 메주제조

메주에 사용된 콩의 성분은 분석결과 수분 10.50%, 회분 5.40%, 지방 17.90%, 조단백질 38.70%, 탄수화물 26.2%였다.

메주 제조공정은 그림 2와 같다. 즉 콩을 20℃에서 9시간 침지시킨 후 소쿠리에 담아 1시간 동안 물을 빼고 고압멸균기를 이용하여 121℃에서 30분간 증자하여 30℃까지 냉각한 후 사용하였다. 이 콩을 마쇄기를 이용하여 마쇄하였다. 멥쌀은 12시간 침지시킨 후 고압멸균기를 이용하여 121℃에서 30분간 증자하고 30℃까지 냉각시켜 사용하였다. *A. oryzae*에 *B. subtilis*를 섞은 메주는 콩과 멥쌀을 6 : 4 비율로 섞은 후 *A. oryzae*를 이용하여 만든 쌀 *koji* 0.5%(w/w)를 분주하여 각각 18 : 10 : 3 cm인 국상자를 이용하여 메주를 성형하여 메주를 만든 후 *B. subtilis* 배양액을 메주에 대하여 0.5%(w/w) 섞어 분무한 다음 상기 성형 틀에서 메주를 성형하였다(표 1). 상기 방법으로 제조된 메주를 제곡실에서 제곡한 후 25-28℃로 유지한 발효실에서 12일간 띄워 메주를 제조하였다.



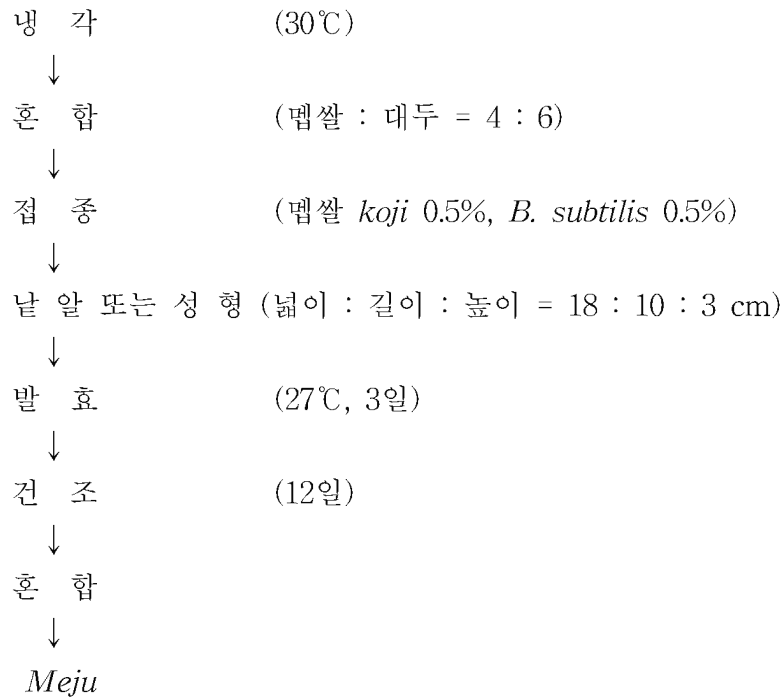


그림 2. 메주 제조 과정.

표 1. 메주의 처리구

시료	<i>Asp. oryzae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Asp. oryzae</i> 접종시기	제국방법	조건
S-1			성형전	tray	
S-2	CM	DS		양파망	
S-3			성형후	tray	35℃ 건조
S-4			양파망		
S-5	HK	DS		tray	
S-6			성형후	양파망	

## 결과 및 고찰

### 수분함량

제국 0일째 시료들의 수분함량은 57.31-58.12%로서 비슷하였으며, 제국 8일째 28.96-31.69%를 나타냈다. 제국 후 35℃에서 2일 건조시 S-1, S-2, S-4 및 S-6은 21.86-22.83%의 수분함량을 나타내어 비슷하였으나, S-3과 S-5는 25.25-26.71%로서 다른 시료보다 약간 높았다. 45℃에서 2일간 건조한 경우 tray에서 제국한 S-1, S-3, S-5의 수분함량은 17.58-17.82%를 나타냈으나 양파망에서 제국한 S-2, S-4, S-6은 20.14-22.56%로서 tray의 경우보다 약간 높게 나타났다.

표 2. 고추장메주의 제국기간 중 수분함량(%)의 변화

제국기간(일) <sup>a</sup>	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
0	57.31	57.31	57.71	57.71	58.12	58.12
2	43.96	43.96	43.20	42.52	25.95	43.00
4	34.64	37.30	40.30	38.04	39.50	40.49
6	34.83	34.04	36.70	34.14	36.88	35.27
8	28.99	28.96	29.30	28.96	31.69	28.99
35℃ 건조 <sup>b</sup>	21.86	22.84	26.71	22.83	25.25	22.48

<sup>a</sup> 30℃에서 8일 동안 제국.

<sup>b</sup> 30℃에서 8일 동안 제국 후 35℃에서 2일 동안 건조.

### pH

제국 0일째 시료들의 pH는 4.97-5.07로서 비슷하였으며, 제국 8일째 6.22-6.47을 나타냈다(표 3). 제국 후 35℃에서 2일 건조시 S-3(pH 6.21)을 제외한 다른 시료들은 pH 6.51-6.76을 나타내어 큰 차이가 없었으며, 45℃에서 2일간 건조한 경우 S-1과 S-6이 각각 pH 6.67, pH 6.54로서 다른 시료보다 높았으며, 다른 시료들은 pH 6.34-6.43의 범위에 있었다.

표 3. 고추장메주의 제국기간 중 pH의 변화

제국기간(일) <sup>a</sup>	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
0	4.97	4.97	5.07	5.07	4.97	4.97
2	5.89	5.80	5.59	6.24	5.73	5.58
4	5.59	5.37	5.39	5.66	5.55	5.16
6	5.98	6.12	5.71	6.06	5.67	5.95
8	6.40	6.47	6.33	6.39	6.33	6.22
35℃ 건조 <sup>b</sup>	6.69	6.60	6.21	6.51	6.76	6.73

<sup>a</sup> 30℃에서 8일 동안 제국.

<sup>b</sup> 30℃에서 8일 동안 제국 후 35℃에서 2일 동안 건조.

### 적정산도

제국 0일째 시료들의 적정산도는 7.43-9.32 mL를 나타냈으며, 제국 4일째 가장 높았으며, 이후 점차 감소하여 제국 8일째 초기보다 약간 낮은 6.54-8.50 mL를 나타냈다(표 4). 35℃ 건조시 약간 증가 또는 감소하는 경향을 보였다.

표 4. 고추장메주의 제국기간 중 적정산도(0.1 N NaOH mL/10 g)의 변화

제국기간(일) <sup>a</sup>	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
0	8.40	8.40	7.43	7.43	9.32	9.32
2	4.64	5.09	5.80	3.87	5.17	5.93
4	9.04	11.51	7.91	7.36	7.92	11.84
6	8.93	8.43	7.40	6.94	7.57	6.71
8	7.74	7.53	6.99	7.47	6.54	8.50
35℃ 건조 <sup>b</sup>	7.33	8.18	7.56	8.58	5.34	7.05

<sup>a</sup> 30℃에서 8일 동안 제국.

<sup>b</sup> 30℃에서 8일 동안 제국 후 35℃에서 2일 동안 건조.

### 식염

고추장메주의 식염 농도는 제국 0일째 0.50-0.55%로서 비슷하였으며, 제국이 진행됨에 따라 수분함량이 낮아지면서 식염 농도가 높아져 제국 8일째 S-1과 S-2의 식염 농도는 1.85-1.90%로서 다른 시료들(1.30-1.40%)보다 높았다(표 5). 35℃ 건조시 모든 시료에서 식염 농도가 증가하여 1.93-2.08%로서 비슷하였다.

표 5. 고추장메주의 제국기간 중 식염 농도(%)의 변화

제국기간(일) <sup>a</sup>	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
0	0.50	0.50	0.50	0.50	0.55	0.55
2	0.85	1.00	0.95	0.95	0.85	0.95
4	1.25	1.25	1.00	1.05	1.05	1.20
6	1.55	1.40	1.25	1.15	1.20	1.20
8	1.90	1.85	1.35	1.35	1.30	1.40
35℃ 건조 <sup>b</sup>	2.08	2.18	1.93	1.95	1.95	1.93

<sup>a</sup> 30℃에서 8일 동안 제국.

<sup>b</sup> 30℃에서 8일 동안 제국 후 35℃에서 2일 동안 건조.

### 아미노산성질소

고추장메주의 아미노산성질소 함량은 제국 0일째 69.90-70.63 mg%로서 비슷하였으며, 제국이 진행됨에 따라 점차 증가하여 제국 8일째 S-1과 S-2가 각각 355.63, 326.98 mg%로서 높았으며, 다른 시료들은 210.83-291.98 mg%를 나타냈다(표 6). 35℃ 건조시 S-1의 아미노산성질소 함량은 504.98 mg%로서 가장 높았으며, 다른 시료들도 제국 8일째 보다 증가하였다.

표 6. 고추장메주의 제국기간 중 아미노산성질소 함량(mg%)의 변화

제국기간(일) <sup>a</sup>	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
0	70.03	70.03	69.90	69.90	70.63	70.63
2	103.68	248.15	121.00	125.50	131.13	118.20
4	230.13	211.95	130.50	136.65	142.95	158.73
6	280.65	305.50	167.43	180.48	171.60	174.00
8	355.63	326.98	218.03	291.98	210.83	268.15
35℃ 건조 <sup>b</sup>	504.98	475.83	388.53	409.20	269.53	397.53

<sup>a</sup> 30℃에서 8일 동안 제국.

<sup>b</sup> 30℃에서 8일 동안 제국 후 35℃에서 2일 동안 건조.

## 색도

고추장메주의 명도(L)는 제국 0일째 50.49-52.15로서 시료간의 차이가 거의 없었으며, 제국이 진행됨에 따라 점차 감소하여 제국 8일째 46.37-48.15를 나타냈으며 S-1이 48.15로서 가장 높았다. 35℃ 건조시 약간 증가하여 45.39-49.33을 나타냈으나 큰 차이가 없었다(표 7).

적색도(a)는 제국 초기 4.73-5.46에서 제국 8일째 4.92-5.95로 약간 증가하는 경향을 나타냈다. 35℃ 건조시 약간 증가하는 경향을 나타냈으나 큰 차이는 없었다.

황색도(b)는 제국 0일째 14.69-14.86에서 제국 8일째 13.86-15.34로 비슷하게 유지되었다. 35℃ 건조시 제국 8일째보다 약간 감소하여 13.69-15.05를 나타냈다.

표 7. 고추장메주의 제국기간 중 색도의 변화

제국기간(일) <sup>a</sup>	시료	색도			제국기간(일) <sup>a</sup>	시료	색도		
		L	a	b			L	a	b
0	S-1	50.49	4.80	14.69	6	S-1	46.50	5.28	14.57
	S-2	50.49	4.80	14.69		S-2	46.91	4.97	14.04
	S-3	51.06	4.73	14.80		S-3	48.39	5.62	15.06
	S-4	51.06	4.73	14.80		S-4	47.35	5.63	14.49
	S-5	52.15	5.46	14.86		S-5	46.03	4.79	14.39
	S-6	51.70	5.26	14.86		S-6	46.51	4.39	14.29
2	S-1	49.41	4.69	14.72	8	S-1	48.15	4.92	15.34
	S-2	53.00	3.93	14.86		S-2	47.96	4.99	15.17
	S-3	49.71	5.13	14.61		S-3	47.43	5.66	14.37
	S-4	48.75	5.19	14.20		S-4	46.37	5.95	14.01
	S-5	48.36	5.15	14.30		S-5	44.39	5.27	14.05
	S-6	48.74	5.36	13.96		S-6	46.69	5.15	13.86
4	S-1	49.82	4.33	13.89	35℃ 건조 <sup>b</sup>	S-1	49.33	5.43	14.93
	S-2	52.78	4.08	15.04		S-2	47.37	5.42	14.22
	S-3	52.11	4.58	14.75		S-3	49.00	5.60	15.05
	S-4	49.04	4.75	13.91		S-4	47.75	5.63	14.22
	S-5	51.23	4.29	14.58		S-5	45.39	5.26	14.18
	S-6	48.75	5.18	15.20		S-6	46.81	5.49	13.69

<sup>a</sup> 30℃에서 8일 동안 제국.

<sup>b</sup> 30℃에서 8일 동안 제국 후 35℃에서 2일 동안 건조.

## 효소 활성

S-1과 S-2 시료의 α-amylase 활성은 제국 초기 0.060 unit/mL에서 제국 4일째 2.400 unit/mL까지 급격히 증가하다가 그 이후 제국 8일째까지 비슷한 수준을 유지하였다(표 8). S-3과 S-4 시료는 제국 6일째까지 증가다가 S-1 및 S-2와 비슷한 경향을 보였으며, S-5와 S-6은 제국 8일째까지 증가하였다. 제국 8일째 S-4(2.095 unit/mL)를 제외한 다른 시료들의 활성은 2.315-2.435 unit/mL로서 비슷한 활성을 나타냈다. 35℃ 건조시 α-amylase 활성은 약간 감소하는 경향을 보였으나 제국 8일째와 큰 차이는 관찰되지 않았다.

제국 초기 β-amylase 활성은 0.015-0.019 unit/mL를 나타냈으며, 제국이 진행됨에 따라 점차 증가하여 제국 8일째 0.020-0.028 unit/mL를 나타냈으며, 시료사이에 큰 차이는 보이지 않았다.

35℃ 건조시 0.032-0.044 unit/mL로서 전반적으로 45℃에서 제국한 메주의 0.023-0.030 unit/mL보다 약간 높았다.

산성 및 중성 protease 활성은 제국 초기 4.578-5.204 unit/mL에서 제국 기간중 점차 증가하여 S-1을 제외한 나머지 시료는 모두 제국 8일째에 각각 최대치를 나타냈다. S-1은 제국 6일째 각각 20.628 및 20.204 unit/ml로서 최고치를 나타냈으나 그 이후 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 35℃ 건조의 경우 시료에 따른 일정한 경향을 나타내지 않았다.

표 8. 고추장메주의 제국기간 중 효소 활성(Unit/mL)의 변화

효소	제국기간(일) <sup>a</sup>	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
α-Amylase	0	0.060	0.060	0.045	0.045	0.045	0.045
	2	0.300	0.306	0.105	0.680	0.280	0.470
	4	2.400	2.400	1.520	1.900	1.865	1.740
	6	2.465	2.390	2.335	2.305	1.900	2.375
	8	2.435	2.315	2.390	2.095	2.365	2.345
	35℃ 건조 <sup>b</sup>	2.290	2.365	2.350	2.340	2.280	.300
β-Amylase	0	0.015	0.015	0.019	0.019	0.019	0.019
	2	0.023	0.021	0.016	0.024	0.025	0.027
	4	0.029	0.030	0.031	0.029	0.030	0.030
	6	0.021	0.018	0.016	0.029	0.026	0.032
	8	0.027	0.020	0.027	0.024	0.028	0.022
	35℃ 건조	0.030	0.028	0.028	0.028	0.023	.023
Acidic protease	0	5.204	5.204	4.578	4.578	4.578	4.578
	2	8.234	7.571	5.895	9.219	8.298	9.781
	4	17.912	12.212	12.525	11.033	11.687	9.661
	6	20.628	15.020	19.053	13.768	14.007	13.262
	8	16.936	27.645	20.370	23.409	23.335	25.389
	35℃ 건조	16.595	19.772	16.236	21.530	24.357	3.400
Neutral protease	0	5.011	5.011	3.685	3.685	3.685	3.685
	2	6.770	6.457	5.343	7.829	6.862	7.976
	4	16.052	12.018	11.576	10.352	11.236	9.274
	6	20.204	15.278	18.004	14.026	15.232	9.947
	8	18.372	28.538	22.460	24.661	24.827	27.387
	35℃ 건조	18.427	21.742	20.241	22.755	26.963	26.254

<sup>a</sup> 30℃에서 8일 동안 제국.

<sup>b</sup> 30℃에서 8일 동안 제국 후 35℃에서 2일 동안 건조.

### 미생물

고추장메주의 제국 초기 호기성세균수는 9.29-9.49 log CFU/g 수준이었으며, 제국 기간중 큰 변화없이 제국 8일째 9.07-9.49 log CFU/g를 나타냈다(표 9). 건조온도에 따른 차이도 발견되지 않았다. 혐기성세균수는 호기성세균의 경우와 비슷한 경향을 나타냈다.

효모는 제국 초기 검출되지 않았으나 제국 2일째 4.00-5.87 log CFU/g로 증가하였고, 그 이후 점차 증가하여 제국 8일째 5.19-6.96 log CFU/g를 나타냈다. 35℃ 건조 후 약간 감소하여 각각 4.49-5.67, 3.79-5.09 log CFU/g를 나타냈다.

곰팡이는 제국 초기 1.05-2.05 log CFU/g수준에서 검출되었으며, 제국중 점차 증가하여 제국

8일째 5.23-6.79 log CFU/g를 나타냈고, 35℃ 건조시 5.91-7.18 log CFU/g였다.

*Bacillus cereus*의 수는 제국 초기 모든 시료에서 7.20-8.01 log CFU/g에서 제국 8일째 8.60-9.09 log CFU/g로 약간 증가하는 경향을 나타냈다.

표 9. 고추장메주의 제국기간 중 미생물(log CFU/g)의 변화

미생물	제국기간(일) <sup>a</sup>	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
호기성세균	0	9.49	9.49	9.29	9.29	9.29	9.29
	2	9.08	9.35	9.61	9.63	9.51	9.64
	4	9.17	9.23	9.76	9.38	9.26	9.67
	6	9.10	9.40	9.34	9.34	9.23	9.06
	8	9.08	9.07	9.18	9.17	9.49	9.37
	35℃ 건조 <sup>b</sup>	9.20	9.17	9.14	8.95	9.09	9.10
혐기성세균	0	9.45	9.45	9.40	9.40	9.40	9.40
	2	9.03	9.40	9.62	9.65	9.51	9.53
	4	9.22	9.23	9.73	9.10	9.11	9.22
	6	9.27	9.38	9.60	9.26	9.17	9.17
	8	9.11	9.09	9.08	10.12	9.38	9.16
	35℃ 건조	9.09	9.39	8.85	8.81	8.90	8.97
효모	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	5.87	4.93	5.08	4.00	5.07	4.98
	4	6.28	6.41	5.20	4.01	4.55	5.25
	6	5.99	5.95	5.66	4.49	6.20	5.94
	8	6.64	5.92	5.80	5.19	5.25	6.96
	35℃ 건조	5.13	5.00	4.49	4.98	5.50	5.67
곰팡이	0	1.05	1.05	2.05	2.05	2.05	2.05
	2	4.75	3.71	4.12	4.21	4.26	3.51
	4	4.97	4.84	4.81	3.90	4.31	5.46
	6	5.10	5.43	5.17	4.47	6.65	6.40
	8	6.29	6.36	5.23	5.41	6.10	6.79
	35℃ 건조	6.01	6.42	5.91	6.52	6.99	7.18
<i>Bacillus cereus</i>	0	8.01	8.01	7.20	7.20	7.20	7.20
	2	8.38	8.69	9.08	9.38	8.76	9.09
	4	8.65	8.79	9.34	8.99	8.77	8.60
	6	8.62	8.71	8.92	8.82	8.82	8.71
	8	8.67	8.62	8.60	9.09	8.68	8.66
	35℃ 건조	8.59	8.62	8.33	8.48	8.35	8.26

<sup>a</sup> 30℃에서 8일 동안 제국.

<sup>b</sup> 30℃에서 8일 동안 제국 후 35℃에서 2일 동안 건조.

## 결 론

- 전통고추장의 품질 개선을 위하여 우수균주로 제조한 고추장메주의 제조조건을 설정하였다.
- 메주의 제국온도, *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*의 접종 시기, 제국방법 등에 대한 표준발효조건을 시험하였다

- 수분함량, pH, 적정산도, 식염함량, 색도는 처리구 사이에 큰 차이가 없었다.
- 아미노산성질소 함량은 *A. oryzae*(CM)를 메주 성형 전에 접종하고 tray에서 제국하여 35°C에서 건조한 처리구에서 504.98 mg%로 가장 높았다.
- 유리아미노산 함량은 *A. oryzae*(CM)를 메주 성형 후에 접종하고 tray에서 제국한 처리구에서 145.61 mg%로 가장 높았다.
- *B. cereus*는 처리구 사이에 큰 차이가 없었음. 대조구(전통메주)에서는  $10^4$ - $10^5$  CFU/g 검출되었으나 시험제조한 메주에서는  $10^1$ - $10^3$  CFU/g로 시험제조 메주에서 적게 검출되었다.



# 제 10 절 효소전극의 sensing 효율의 제고 및 NAD 재생형 electroenzymatic bioreactor의 확립

## 1. Glutamate 함량 측정을 위한, 효소를 bioreceptor로 한 amperometric biosensor의 개발(1차년도)

- 제 1차년도 효소전극의 제작

Bioreceptor로서 glutamate dehydrogenase(GDH,  $L\text{-glutamate} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD(P)}^+ \rightarrow 2\text{-oxoglutarate} + \text{NH}_4^+ + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ )와 glutamate oxidase(GOx,  $2 L\text{-glutamate} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 2\text{-oxoglutarate} + 2 \text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}$ )를 각각 이용한 amperometric biosensor의 구축에 있어 glutamate dehydrogenase수식전극과 glutamate oxidase수식전극을 각각 제조하고자 하였다.

### 1-1. Glutamate dehydrogenase biosensor

전극-mediator-NAD<sup>+</sup>/효소 assembly의 제작을 위하여 mediator, NAD<sup>+</sup> 및 효소를 순차적으로 결합시키려고 하였다.

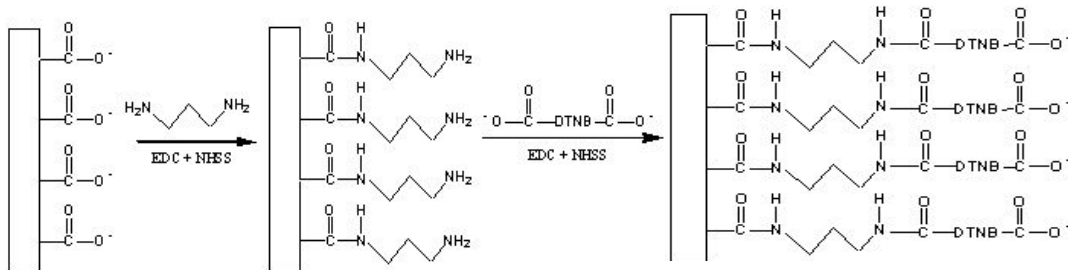
(1) 전극 carbon cloth의 산화

- Carbon cloth를 70% HNO<sub>3</sub>에 15분간 침지한 후, conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 침지하여 170°C에서 1시간 동안 가열하여 carbon cloth표면에 carboxyl group을 형성시켰음.

(2) 전극-spacer-mediator의 합성

- 전극에 spacer로서 diaminopropane을 도입한 후 5,5'-dithiobis(2-aminobenzoic acid) (DTNB)를 결합시켰음. 산화된 전극(의 carboxyl group)을 NHSS (5 mM)와 EDC(20 mM)가 용해된 Tris 완충용액에 10분간 담궈 carbodiimide activation시킨 후 diaminopropane을 amide coupling시키고, 같은 방법으로 DTNB를 amide coupling시킴으로써 전극표면에 spacer arm과 함께 mediator인 DTNB를 공유결합시켰음.

Stepwise Organization of the DTNB-NAD<sup>+</sup>/ADH- Assembled Monolayer and Bioelectrocatalyzed Oxidation of Ethanol Using the Integrated Enzyme Electrode



- 공유결합된 DTNB가 전기화학반응의 촉매로서 활성을 갖는지를 확인하기 위하여 cyclic voltammetry를 행한 결과 아래의 그림 1에서와 같이 DTNB는 활성을 나타냄이 확인됨. DTNB 수식전극에 의해 NADH의 산화촉매반응을 테스트한 결과 DTNB는 활성을 가

짐을 확인함 (지지 전해질: pH8.0, 50 mM Tris buffer, 주사속도: 10 mV/sec).

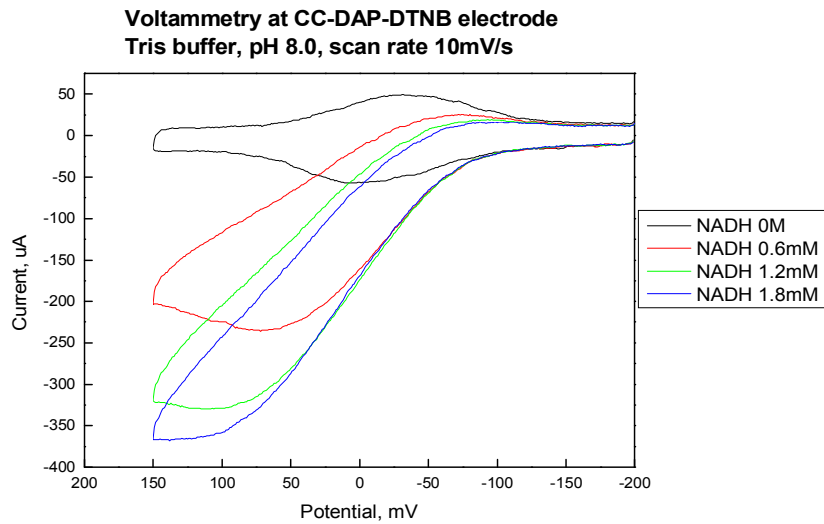
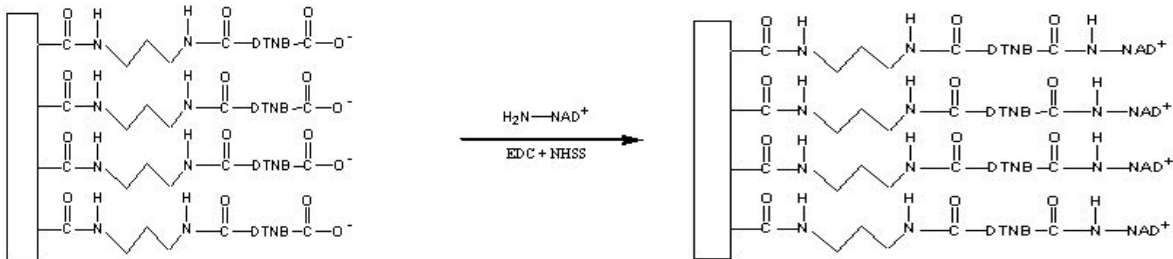


그림 1. DTNB 수식전극을 이용한 NADH의 산화촉매반응을 테스트한 cyclic voltammogram.

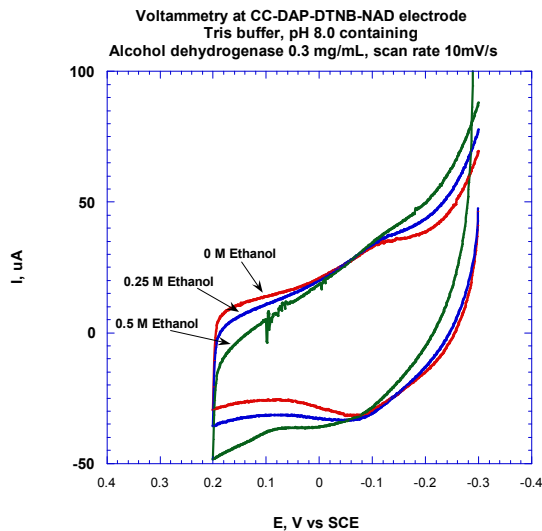
지지 전해질: pH 8.0, 50 mM Trisbuffer, 주사속도: 10 mV/sec.

(3) 전극-diaminopropane-DTNB-NAD<sup>+</sup>의 합성

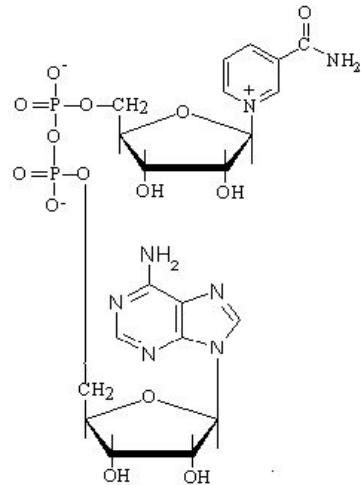
- 전극-diaminopropane-DTNB를 NHSS(5 mM)와 EDC(20 mM)가 용해된 Tris 완충용액에 10분간 담구어 carbodiimide activation시킨 후 NAD<sup>+</sup>(2 mM) 용액에 2시간 담구어 NAD<sup>+</sup>를 DTNB에 amide coupling시켰음.



- 결합된 NAD<sup>+</sup>의 활성을 검정하기 위하여 효소가 함유된 완충용액에 ethanol을 가하여 산화전류의 변화를 관찰함. 아래의 그림 2에서와 같이 활성을 나타냈으나 sensitivity가 너무 낮음을 알 수 있었는데 이는 결합된 NAD<sup>+</sup>가 너무 소량이기 때문인 것으로 여겨짐.
- NAD의 adenine ring의 NH<sub>2</sub>기가 DTNB의 COOH기와 amide coupling이 효과적으로 행하여지지 않았기 때문인 것으로 보이는데, 이는 NAD의 NH<sub>2</sub>기가 분자 내 깊숙이 존재하여 DTNB의 COOH기와의 결합이 저해받기 때문인 것으로 여겨짐. 따라서 NAD<sup>+</sup>가 다량 결합할 수 있는 방안 이 모색되어야 할 것임.



<그림 2>



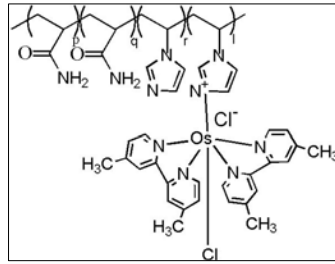
<그림 3>

## 1-2. Glutamate oxidase biosensor

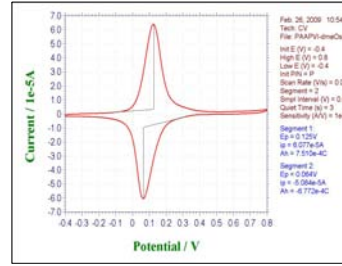
산화환원 고분자-효소분자 연결 전극의 제작을 위하여 산화환원 고분자를 합성하고 합성한 산화환원 고분자를 전극 표면에 얹어 고정화시킴으로써 산화환원고분자 수식전극을 제작하였다.

### (1) 고분자 합성

- Polyacryamide (PAA)와 Poly (N-vinylimidazole)(PVI)이 섞인 고분자 체인에 Osmium 콤플렉스가 결합된 산화환원 고분자 (PAA-PVI-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2</sup>)를 합성하였음.
- Osmium 콤플렉스는 Ethylene glycol에 Ammonium hexachloroosmate와 4,4'-Dimethyl-2,2'-dipyridyl를 넣어 고온에서 합성하고 Sodium hydrosulfide로 환원시킴. 결정을 Ethyl ether로 씻으면서 감압한 후 건조하였음.
- 이어 PAA-PVI 고분자와 오스뮴 콤플렉스를 알곤하에서 고온에서 가열하여 산화환원 고분자를 합성하고 원심분리를 통해 정제, 농축한 후 NMR과 Cyclic Voltammetry를 통해 합성을 확인하였음.
- 6 mm 흑연 전극 표면에 합성한 고분자를 얹어 공기 중에서 건조 시킨 후 포스페이트 완충용액에서 볼타모 그래프를 얻어 합성을 확인하고 농도를 계산함.
- 합성한 산화환원 고분자의 산화환원 고분자 구조는 그림 4와 같고 볼타모그래프는 그림 5와 같음.



<그림 4>



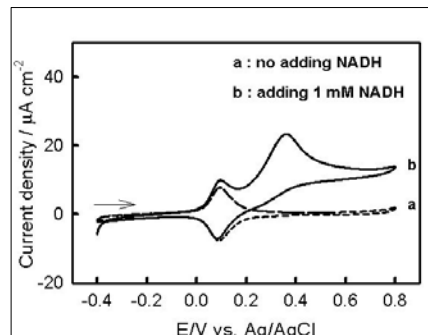
<그림 5>

(2) 산화환원 고분자 수식전극의 제작

- 합성한 산화환원 고분자와 가교제인 Poly(ethylene glycol)diglycidyl ether와 함께 6 mm 흑연 전극 표면에 얹어 고정화시킴으로써 산화환원고분자 수식전극을 제작하였음.
- 산화환원 고분자와 가교제의 혼합비, 전극표면에 고정시키는 양, 그리고 건조 시키는 조건을 최적으로 하기 위한 다양한 실험을 수행하였음.
- 흑연전극 처리는 전극표면을 SIC 페이퍼에 갈아낸 다음 초음파 세척을 하고 공기 중에서 완전히 건조시키고, 산화환원 고분자와 가교제 혼합용액을 흑연전극 표면에 얹은 후 18시간 동안 오븐에서 건조시킴
- 산화환원 고분자 수식전극 표면을 주사현미경 (Scanning Electron Microscope: SEM)을 통하여 다양한 배율로 관찰하여 고분자가 전극표면에 고정된 모양을 확인하였음.

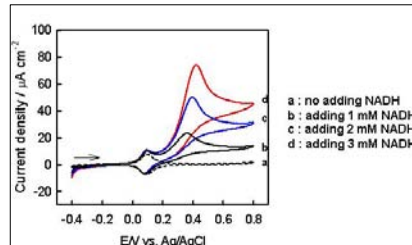
(3) NADH의 전극촉매 산화반응

- 전극반응은 상온의 알콘으로 포화된 pH=7.4, 20 mM Potassium phosphate 버퍼 용액을 지지 전해질로 사용하여 시행하였음.
- 작업전극은 산화환원 고분자 수식전극을 사용하였고, 기준전극과 보조전극은 각각 Ag/AgCl과 백금 전극을 사용함. 이때 온도는 room temperature (22±2 °C)임.
- 산화환원 고분자 수식전극에서 글루타메이트 탈수소효소의 글루타메이트 산화반응에 보조인자인 NADH의 농도에 대하여 감응을 나타내는 것을 확인하였음.
- NADH 산화의 최적의 조건을 얻기 위하여 주사 속도, NADH 농도 등을 변화 시키며 연구 수행.
- 산화환원 고분자 수식전극에서의 NADH의 감응은 그림 III-6의 볼타모그램과 같음
- 전위범위는 -0.4 V에서 0.8 V로 설정하였고, 주사속도는 1 mV/s 임.



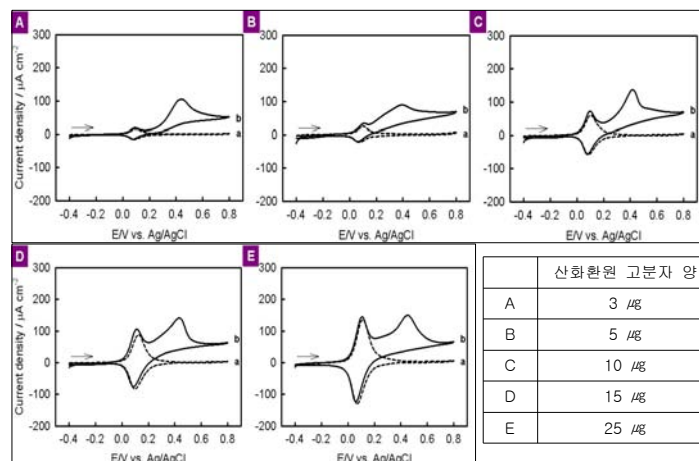
<그림 6>

- 위의 결과를 통하여 산화환원 고분자 수식전극은 NADH의 산화반응에 대한 과전위를 낮추고 있음을 확인하였으며 수식전극 표면의 산화환원의 최적조건 및 NADH 농도, 주사속도, 촉매 양과 같은 다양한 parameter에 따른 효과를 관찰하였음.
- NADH 농도에 따른 볼타모그램은 그림 7과 같고, NADH 농도가 증가함에 따라 산화전류가 증가함.



<그림 7>

- 산화환원 고분자의 양에 따른 효과는 그림 8의 볼타모그램과 같고, 산화환원 고분자의 양에 따라 산화전류가 증가함을 관찰함.



<그림 8>

## 2. Glutamate 함량 측정을 위한, 효소를 bioreceptor로 한 amperometric biosensor의 개발(제 2차년도 효소전극의 제작)

Bioreceptor로서 glutamate dehydrogenase(GDH, L-glutamate + H<sub>2</sub>O + NAD(P)<sup>+</sup> → 2-oxoglutarate + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + NAD(P)H + H<sup>+</sup>)를 이용한 amperometric biosensor의 구축에 있어 glutamate dehydrogenase수식전극을 제조하고자 하였음.

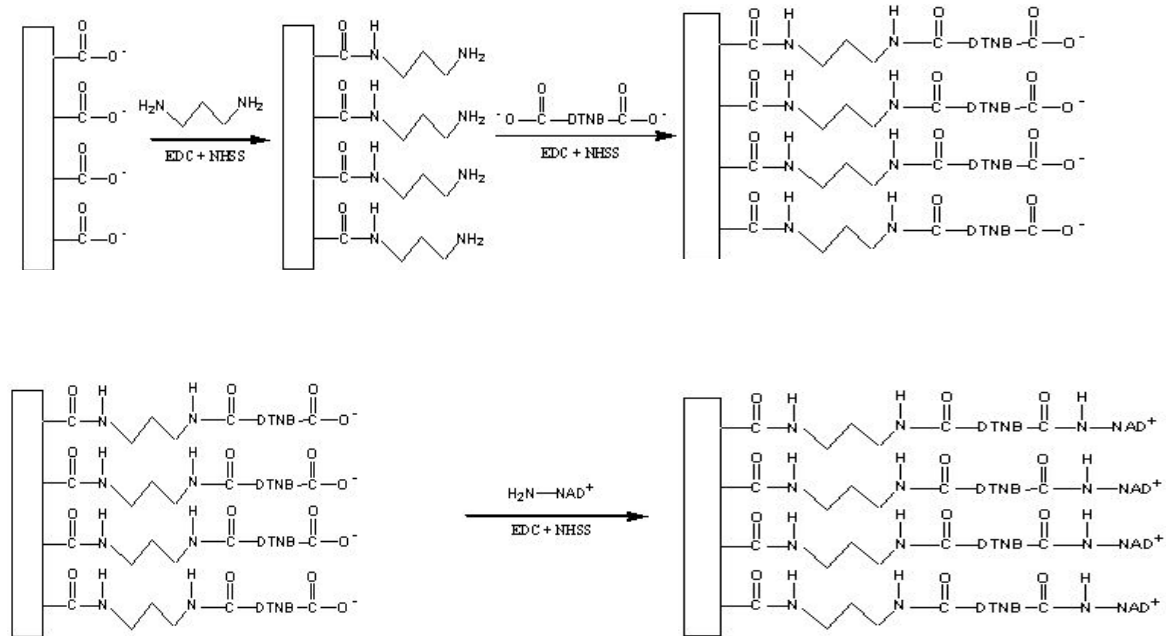
### 2-1. Alcohol dehydrogenase biosensor

제 1차년도의 연구에서 glutamate dehydrogenase의 활성이 너무 낮아 대신에 alcohol dehydrogenase를 이용하여 수식전극의 유용성을 검토하였음(glutamate dehydrogenase, 42 U/mg; alcohol dehydrogenase, 331 U/mg). 제 1차년도의 연구에서 제작된 전극-mediator-

NAD<sup>+</sup> assembly는 활성이 확인되었으므로, 전극에 mediator, NAD<sup>+</sup> 및 효소를 순차적으로 결합시키어 전극-mediator-NAD<sup>+</sup>/효소 assembly를 제작하여 이의 활성을 검정하였음.

(1) 전극-diaminopropane-DTNB-NAD<sup>+</sup>의 합성

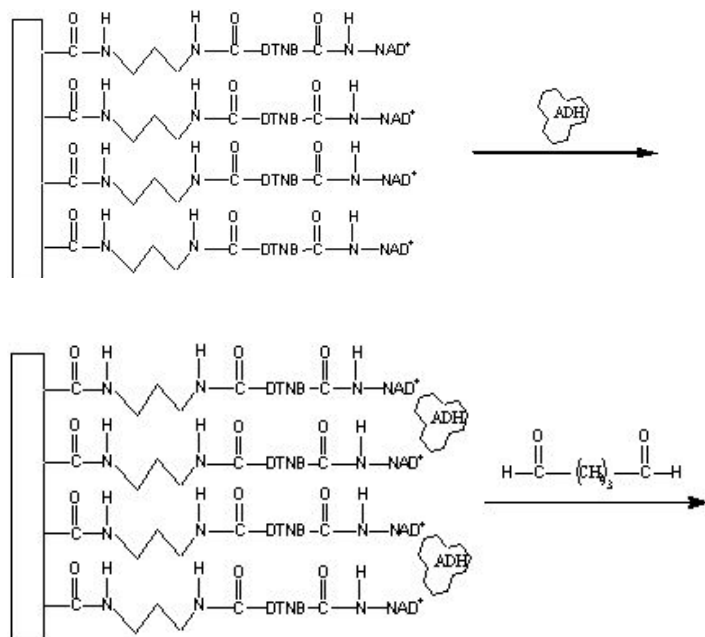
**Stepwise Organization of the DTNB-NAD<sup>+</sup>/ADH- Assembled Monolayer and Bioelectrocatalyzed Oxidation of Ethanol Using the Integrated Enzyme Electrode**

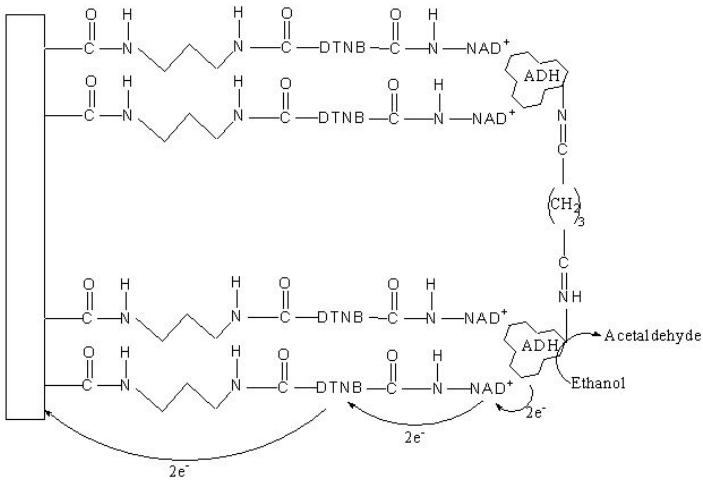


<그림 1>

(2) 전극-diaminopropane-DTNB-NAD<sup>+</sup>/alcohol dehydrogenase의 합성

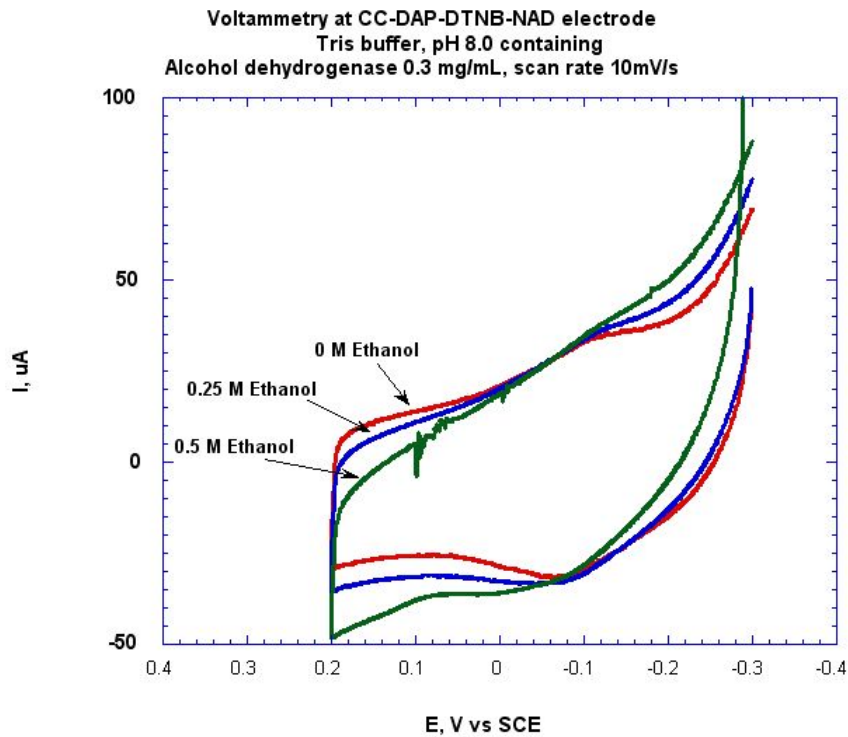
- 전극-diaminopropane-DTNB-NAD<sup>+</sup> assembly를 효소용액에 10분간 침지하여 NAD<sup>+</sup>와 효소를 회합시킨 후 10% glutaraldehyde용액에 5분간 침지함으로써 효소분자들 간을 cross-linking시켰음.





<그림 2>

- 그 결과 아래의 그림에서와 같이 ethanol의 농도변화에 따라 산화 전류의 증가가 관찰됨으로써 작성된 수식전극(전극-diaminopropane-DTNB-NAD<sup>+</sup>/alcohol dehydrogenase assembly)은 sensitivities 낮았지만 기능하는 것으로 확인됨.



<그림 3>

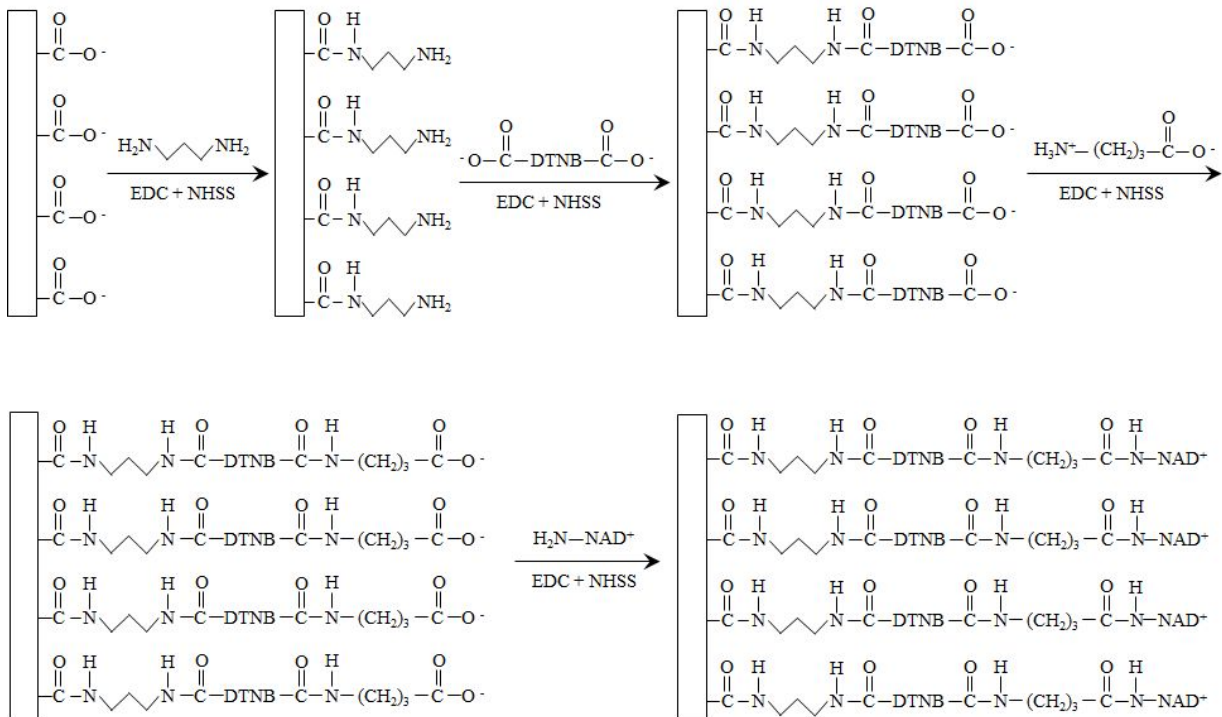
## 2-2. Glutamate dehydrogenase biosensor

상기의 결과로부터 전극-diaminopropane-DTNB-NAD<sup>+</sup>/효소 assembly가 전극으로서의 기능이 있음이 확인되었으므로 전극-diaminopropane-DTNB-NAD<sup>+</sup>/glutamate dehydrogenase assembly를 제작하여 이의 기능을 확인하고자 함.

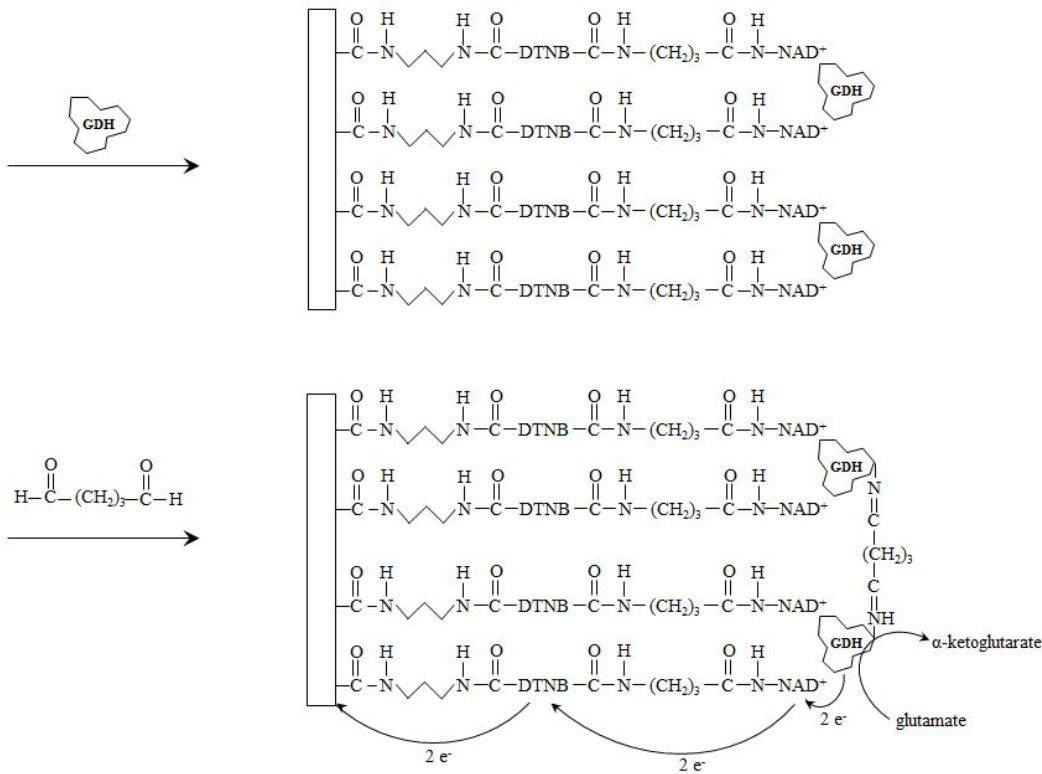
(1) 상기의 실험방법과 동일한 방법에 따라 전극-diaminopropane-DTNB-NAD<sup>+</sup>/glutamate dehydrogenase assmby를 제작하고 glutamate의 농도변화에 따른 산화전류의 변화를 확인하고자 하였으나 alcohol dehydrogenase의 경우와는 달리 기능을 하지 않았음. 이는 NAD의 adenine ring의 NH<sub>2</sub>기가 NAD분자 내 깊숙이 존재하여 NAD가 DTNB의 COOH기와의 결합이 저해받기 때문인 것으로 여겨짐. 따라서더 많은 양의 NAD<sup>+</sup>를 결합시킬 수 있는 방안으로서 spacer로서 GABA를 도입하고자 하였음.

(2) GABA를 spacer로 도입하여 전극-diaminopropane-DTNB-GABA-NAD<sup>+</sup>/glutamate dehydrogenase assmby를 작성

NAD의 결합을 용이하게 할 목적으로 아래의 그림에서와 같이 GABA를 DTNB의 COOH기와 NAD(의 adenine ring)의 NH<sub>2</sub>기와의 사이에 도입함으로써 NAD의 결합을 촉진시키고자 하였음. 그러나 최종적으로 작성된 수식전극은 상기(1)에서와 마찬가지로 기능하지 않았음. 아마도 이는 glutamate dehydrogenase의 활성이 alcohol dehydrogenase에 비해 너무 낮은 데에 기인하는 것으로 여겨짐(glutamate dehydrogenase, 42 U/mg; alcohol dehydrogenase, 331 U/mg).







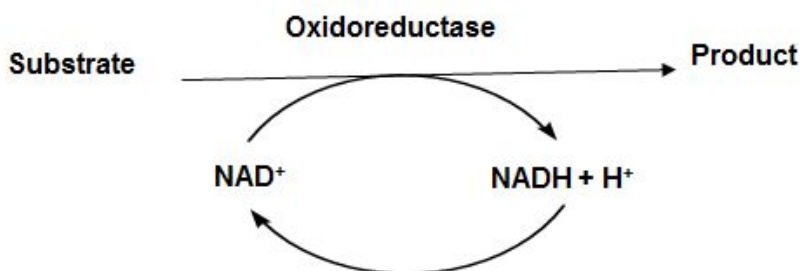
<그림 4>

### 2-3. Glutamate dehydrogenase를 이용한 electroenzymatic bioreactor의 구축

상기의 결과에서와 같이 제작된 수식전극은 glutamate에 대하여 기능하지 않았기 때문에 연구의 방향을 바꾸어 수식전극제작 연구과정에서 얻은 DTNB수식전극의 유용한 이용을 위한 방안으로서 glutamate dehydrogenase를 이용한 electroenzymatic bioreactor의 구축을 위한 연구를 수행하였음. 전자전달물질을 전극에 공유결합법으로 결합시킴으로써 안정한 전자전달물질 수식전극을 제작하였는데 이는 본 연구에서 세계 최초의 일이며 이를 적용한 바이오리액터의 구축은 매우 중요한 과제임.

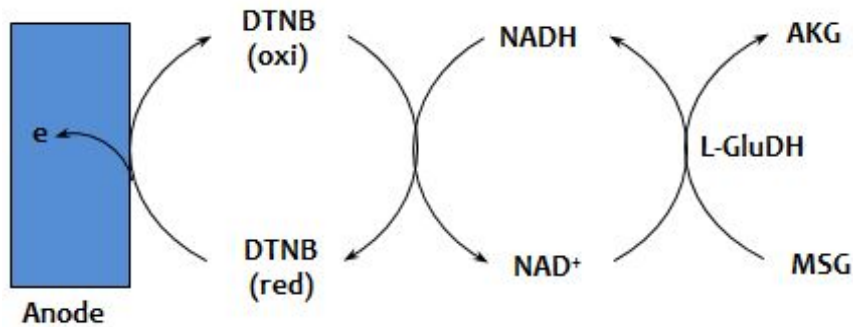
(1) Glutamate dehydrogenase에 의한 glutamate(MSG)로부터 α-ketoglutarate(AKG)의 생산을 위한 반응

- Glutamate dehydrogenase 등 대부분의 dehydrogenase는 NAD의존성이므로 이의 물질생산에의 이용을 위하여는 효율적인 NAD재생방법의 확립이 선결문제임. 본 연구에서는 NAD재생을 위하여 DTNB수식 carbon cloth(CC-DTNB)를 작업전극으로 한 전기화학적 재생방법을 적용함.



<그림 5>

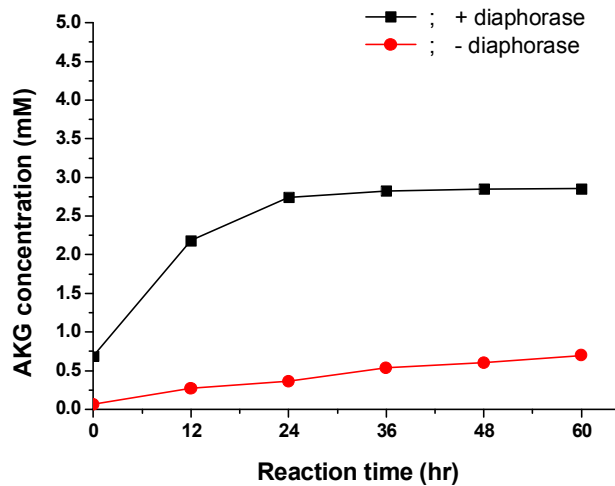
- CC-DTNB를 작업전극으로 하고 Tris buffer(0.1 M, pH 7.3)을 전해질로 하여 이 용액에 NAD(0.5 mM), L-glutamate dehydrogenase(3.2 U/ml), 및 glutamate(5 mM)를 가하고 30°C에서 150 mV(vs. Ag/AgCl)의 전압을 가하면서 반응시켰음.



<그림 6>

(2) 전자전달효소의 유용성 검토

- 전해산화반응은 일반적으로 전자전달효소의 도움 없이도 잘 일어나는 것으로 알려져 있으나 본 연구에서는 전자전달효소의 유용성을 검토한 결과, 전자전달효소의 유용성이 매우 큼을 확인하는 동시에 DTNB수식전극(Carbon cloth-DTNB)을 적용한 NAD재생형 electroenzymatic bioreactor의 의 가능성이 확인됨. 이는 DTNB수식전극의 효율에 기인하는 것으로 여겨지며 전자전달물질인 DTNB가 성공적으로 전극에 공유결합된 상태이므로 이 공정은 연속공정으로의 발전가능성도 예상됨. 생성물의 분석은 HPLC에 의하였음.



<그림 7>

### 3. DTNB수식전극(Carbon cloth-DTNB)을 적용한 NAD재생형 electroenzymatic bioreactor의 확립

전년도 연구결과를 바탕으로 DTNB수식전극의 유용한 이용을 위한 방안으로서 glutamate dehydrogenase를 이용한 electroenzymatic bioreactor의 최적화를 행함.

### 3-1. Glutamate dehydrogenase의 활성화에 대한 생성물 농도의 영향

Glutamate dehydrogenase(GDH)는 생성물저해를 받는 것으로 알려져 있으므로 생성물인  $\alpha$ -ketoglutarate와 암모니아의 저해 농도를 확인함. 2 mM까지는 저해가 없었으나 3 mM이상의 농도에서는 농도가 증가함에 따라 저해가 더욱 크게 나타남으로써 고농도 생산이 어려운 반응임을 알 수 있었음(Fig. 8).

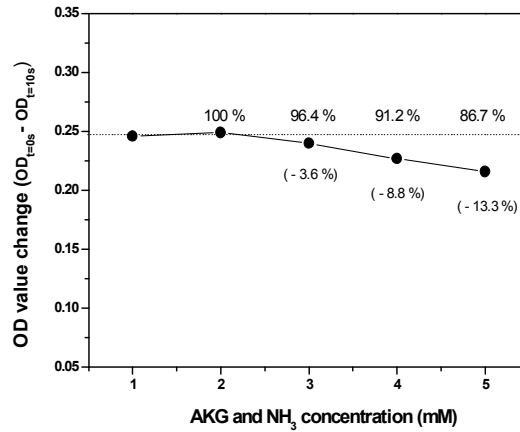


Fig. 8. Effect of the concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate and ammonia on the activity of L-glutamate dehydrogenase.

### 3-2. $\alpha$ -Ketoglutarate의 생산에 대한 전자전달효소 diaphorase의 영향

전자전달효소 diaphorase(DP)가 존재할 경우, diaphorase가 존재하지 않을 경우보다 약 4배의 생산성을 보였으며 반응도 빠르게 진행되어 24시간의 반응으로 반응이 종료되었음. 그러나 수율에 있어서는 diaphorase가 존재할 경우에 있어서도 60%에도 미치지 못 하는 낮은 전환율을 나타내었는데 이는 생성물저해에 의한 것으로 여겨짐(Fig. 9).

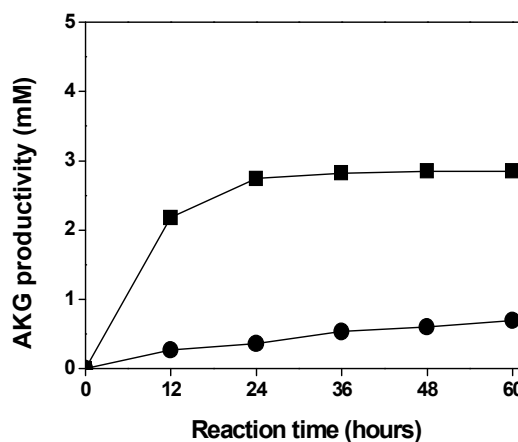


Fig. 9. Production of AKG under the conditions (■) of 1.5 U DP ml<sup>-1</sup>, 0.5 mM NAD<sup>+</sup>, 3.2U GDH ml<sup>-1</sup>, 5 mM MSG and the conditions (●) of 0.5 mM NAD<sup>+</sup>, 3.2U GDH ml<sup>-1</sup>, 5 mM MSG.

### 3-3. $\alpha$ -Ketoglutarate의 생산에 대한 기질 농도의 영향

기질인 monosodium glutamate(MSG)의 농도를 3, 4, 또는 5 mM이 되도록 가하였으며, 전자전달효소로서 diaphorase를 가하거나 또는 가하지 않고 반응시켰음. Fig. 5에서와 같이 diaphorase가 존재할 경우 매우 높은 전환율을 나타내었음. MSG의 농도가 3 mM인 경우 4와 5 mM인 경우보다 2배 이상의 전환율을 보였으며 특히 MSG의 농도가 3 mM인 경우 12시간의 반응에서 90%정도의 높은 전환율을 나타내었음. 이 경우에는 생성물 저해가 나타나지 않기 때문인 것으로 여겨짐.

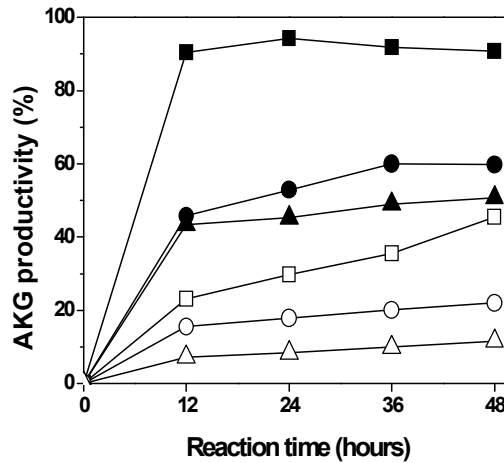


Fig. 10. Production of AKG under the conditions (■) of 3 mM MSG, 0.5 mM  $\text{NAD}^+$ , 3.2 U GDH  $\text{ml}^{-1}$ , 1.5 U DP  $\text{ml}^{-1}$ , and conditions (●) of 4 mM MSG, 0.5 mM  $\text{NAD}^+$ , 3.2 U GDH  $\text{ml}^{-1}$ , 1.5 U DP  $\text{ml}^{-1}$ , and conditions (▲) of 5 mM MSG, 0.5 mM  $\text{NAD}^+$ , 3.2 U GDH  $\text{ml}^{-1}$ , 1.5 U DP  $\text{ml}^{-1}$ . The closed symbols are the result in the presence of diaphorase and open symbols are the result in the absence of diaphorase. Working electrode: DTNB-modified carbon cloth.

# 제 11 절 신규 발효식품 개발

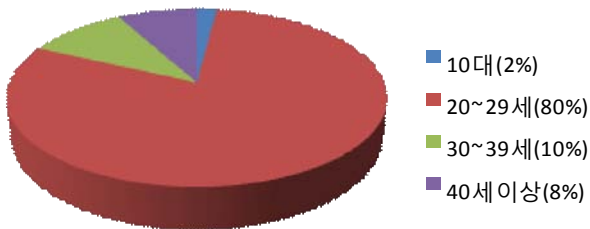
## 1. 수출용 장류(고추장, 된장) 소스 제품 개발

### 설문조사

전북대학교 식품공학과 학생 등 50명에게 된장, 고추장등 장류의 섭취량 및 섭취 방법, 그리고 장류가 함유된 제품의 선호도를 조사하였습니다.

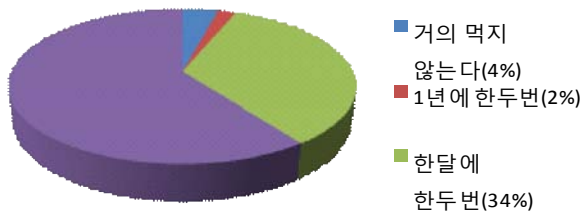
#### (1) 귀하의 연령대는?

비교적 가공식품의 섭취량이 많은 20대를 대상으로 설문을 실시하였습니다.



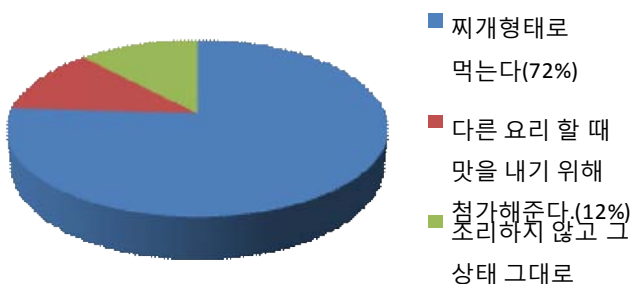
#### (2) 된장, 고추장등 장류의 섭취빈도?

된장, 고추장등은 장류 중에서도 특히 우리 식단과 밀접한 식품으로 일주일에 한번이상 섭취하는 설문자가 약 60%로 섭취량이 비교적 높은 것으로 나타났습니다.



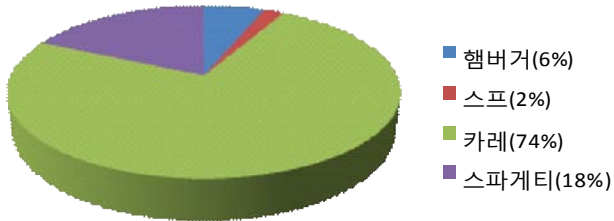
#### (3) 된장, 고추장등 장류 섭취는 주로 어떤 형태입니까?

된장, 고추장등은 그 섭취 형태가 대부분 찌개 형태인 것으로 나타났습니다.

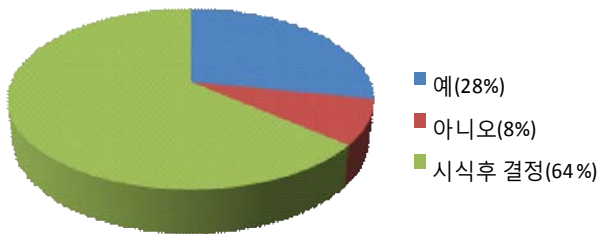


(4) 된장, 고추장이 첨가된 제품이 나온다면 어떤 것을 선호하시겠습니까?

된장, 고추장이 함유된 소스 제품 중 레토르트화 할 수 있는 제품을 타겟으로 하여 설문을 실시 한 결과, 카레가 74%로 압도적으로 많은 수를 차지하였다.



(5) 된장, 고추장등 장류 제품이 함유된 레토르트 제품이 상품화 된다면 구입하실 의향이 있으십니까?

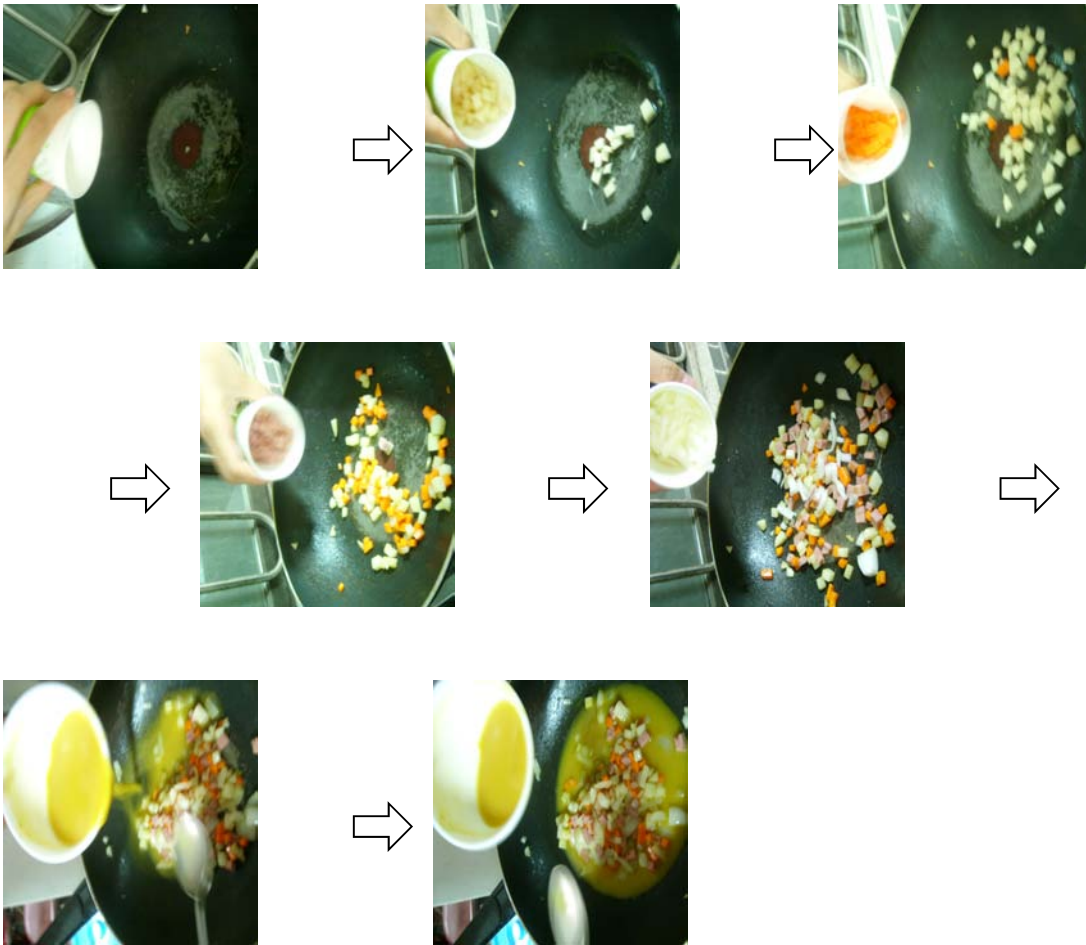


**사용된 재료**



감자 40g(12.5%), 당근 24g(7.5%), 햄(또는 돼지고기) 30g(9.4%), 양파 60g(18.75%), 오일(또는 식용유) 6g(1.9%)과 카레가루와 동결건조된 고추장을 물 140mL(43.75%)에 섞어 사용하였다.

**제조방법**



- ① 오일(또는 식용유) 6g (1.9%)를 넣고 골고루 저어준다.
- ② 감자 40g(12.5%)을 넣고 충분히 볶아준다.
- ③ 당근 24g(7.5%)을 넣고 충분히 볶아준다.
- ④ 햄(또는 돼지고기) 30g(9.4%)을 넣고 볶아준다.
- ⑤ 양파 60g(18.75%)을 넣고 볶아준다.
- ⑥ 카레가루와 동결건조된 고추장을 물 140mL(43.75%)에 잘 풀어 준 다음 앞에서 볶아준 채소들과 잘 섞어준다.
- ⑦ 잘 저어주면서 끓여준다.

**사용된 재료들의 성분분석**  
**고추장**

	측정값		
당도(Brix)	21.2		
염도(%)	0.9		
	L <sup>1)</sup>	a <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>
색도	18.2	20.7	11.2

- 1) Means a measure of lightness and varies from 0(black) to 100(white).
- 2) Means a measure of redness varies from -100(green) to +100(red).
- 3) Means a measure of yellowness and varies from -100(blue) to +100(yellow).

**된장**

	측정값		
당도(Brix)	15.6		
염도(%)	2.5		
	L <sup>1)</sup>	a <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>
색도	30.42	9.58	15.36

- 1) Means a measure of lightness and varies from 0(black) to 100(white).
- 2) Means a measure of redness varies from -100(green) to +100(red).
- 3) Means a measure of yellowness and varies from -100(blue) to +100(yellow).

**카레가루**

	측정값		
당도(Brix)	23.0		
염도(%)	0.3		
	L <sup>1)</sup>	a <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>
색도	53.0	6.4	30.4

- 1) Means a measure of lightness and varies from 0(black) to 100(white).
- 2) Means a measure of redness varies from -100(green) to +100(red).
- 3) Means a measure of yellowness and varies from -100(blue) to +100(yellow).

**고추장 첨가된 카레**

고추장이 첨가된 카레를 고추장을 첨가하지 않은 카레에 비해 당도는 낮은 반면, 붉은색을 나타내는 색도 a 값은 증가함을 알 수 있다.

	Control <sup>1)</sup>			제조한 카레 <sup>2)</sup>		
당도(Brix)	10.5			9.3		
염도(%)	0.9			1.0		
	L <sup>3)</sup>	a <sup>4)</sup>	b <sup>5)</sup>	L	a	b
색도	35.8	<b>4.7</b>	22.6	35.0	<b>6.2</b>	22.0

- 1) 고추장이 첨가되지 않은 카레
- 2) 고추장이 3% 첨가된 카레



- 3) Means a measure of lightness and varies from 0(black) to 100(white).  
 4) Means a measure of redness varies from -100(green) to +100(red).  
 5) Means a measure of yellowness and varies from -100(blue) to +100(yellow).

### 동결건조된 고추장 첨가에 따른 특성

	당도(Brix)	염도(%)	색도		
			L <sup>1)</sup>	a <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>
Control <sup>4)</sup>	10.7	0.9	35.8	<b>4.7</b>	22.6
1% <sup>5)</sup>	10.5	0.8	35.9	<b>5.1</b>	22.7
2% <sup>6)</sup>	10.4	1.0	36.1	<b>5.2</b>	22.5
3% <sup>7)</sup>	9.3	1.0	35.0	<b>6.2</b>	22.0
4% <sup>8)</sup>	8.1	0.9	34.8	<b>6.5</b>	21.9
5% <sup>9)</sup>	8.6	1.0	34.5	<b>6.8</b>	21.8

- 1) Means a measure of lightness and varies from 0(black) to 100(white).  
 2) Means a measure of redness varies from -100(green) to +100(red).  
 3) Means a measure of yellowness and varies from -100(blue) to +100(yellow).  
 4) 고추장이 첨가되지 않은 카레  
 5) ~ 9) 첨가된 고추장의 양

### 관능평가

관능평가 결과 고추장의 첨가량이 늘어날수록 매운맛이 증가하기 보다는 오히려 고추장의 양이 증가할수록 텁텁한 맛이 느껴진다는 의견이 많았다. 염도 측정값에서 알 수 있듯이 짠맛은 큰 차이를 보이지 않았으며 색도 매운맛과 마찬가지로 고추장양이 4%를 넘어가게 되면 오히려 낮은 점수를 나타냈다.

	색	향	짠맛	매운맛	선호도
Control <sup>1)</sup>	6.3	5.7	5.4	5.0	5.7
1% <sup>2)</sup>	6.8	6.2	6.0	5.5	6.5
2% <sup>3)</sup>	5.8	5.5	5.6	5.2	5.3
<b>3%<sup>4)</sup></b>	6.5	6.0	6.2	6.0	<b>7.2</b>
4% <sup>5)</sup>	5.6	5.4	5.7	5.6	5.6
5% <sup>6)</sup>	6.1	6.0	5.7	5.5	5.7

- 1) 고추장이 첨가되지 않은 카레  
 2) ~ 6) 첨가된 고추장의 양

## 2. 우수 발효미생물 적용 기능성 장류제품 개발

### 2-1. 된장양갱 제품 개발

#### 서 론

된장은 전통적인 맛과 향을 지닌 대두 발효식품으로서 탄수화물 원료에 *Aspergillus* sp.의 균을 이용하여 대두와 함께 제조하는 것으로 우리나라의 대표적인 조미식품이다.(J. Kor. Agric. Chem. Soc., 35, 286-293, 1992) 된장의 원료인 콩은 isoflavone, chlorogenic acid isomers, caffeic acid ferulic acid 등이 함유되어 있어 항산화성이 우수한 것으로 알려져 있으며, (J. Food Sci., 44, 1720-1722, 1979; J. Food Sci., 47, 24-25, 1981) 대두 발효식품에는 항산화효과를 나타내는 물질이 확인되었고(Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37, 474-477, 1990), 혈압강화능력(J. Agric Food. Chem., 49, 3004-3009, 2001; Current Pharmaceutical Design, 9, 1345-1355, 2003; Agric. Biol. Chem., 53, 27-63, 1989)과 혈전용해능(Kor, J, Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 1-5, 1995) 등의 기능성이 있는 것으로 알려져 있다. 된장의 품질을 향상시키기 위한 연구는 표고버섯 첨가(J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 43, 277-284, 2000), *Bacillus brevis*로 제조한 된장(J. Korean Soc., Food Nutr., 23, 980-985, 1994) 등의 연구가 있으나 된장을 가공식품 소재로 이용하기 위한 연구는 미비한 상황이고 특히 쌀된장을 가공식품 소재로 이용하기 위한 연구는 쿠키제조(Korean J. Food Preserv., 12, 432-435, 2005)에 관한 연구가 있을 뿐이다.

우리나라 전통식품인 양갱은 단묵 또는 갱(羹)이라고도 하여 앵두, 모과, 복분자, 오미자, 살구, 유자, 꿀, 버찌 등의 과즙에 녹말이나 꿀을 넣고 조려서 묵과 같이 굳혀서 만든 음식이다. 팥을 이용한 조선시대 단묵의 제조법을 보면 팥을 삶아 으갠 다음 체에 내려 껍질을 제거한 팥물을 불에 올려 당분, 소금, 녹말을 붓고 되직하게 졸이다가, 삶아서 당분물 (또는 꿀)에 재워둔 밤을 넣고 식힌 후 반듯하게 썰다고 하였다.(최필승, 자랑스런 민족음식·북한의 요리 p.424 한마당, 1989) 양갱은 색과 향이 다채로워서 잔치음식 또는 후식으로 이용되었다고 알려져 있으며, 조선시대 궁중음식 관련 문헌인 '진연의궤'나 '진찬의궤' 등에 의하면 연회상차림에 자주 등장하였다. 일반적으로 양갱은 팥으로만 만들어지는 제품으로 인식하고 있으나 최근에는 인삼, 딸기, 유자, 밤, 고구마 등이나 여러 향미를 첨가한 제품이 있다. (Korea J. Soc. Food Cookery Sci., 20: 614-618, 2004)

따라서 본 연구에서는 우리 전통 된장과 쌀된장을 양갱의 부재료로 사용하여 맛과 향미를 증진시킨 된장 양갱제품을 제조함으로써, 기능성이 우수한 된장의 활용도 증진과 양갱제품의 상품성 증대를 도모하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 재료 및 균주

전통된장은 순창장류마을에서 재래식 방법에 의해 제조한 된장을 구입하여 동결건조 하였으며 80mesh 이상으로 분쇄하여 사용하였다. 쌀된장은 직접 제조하여 사용하였으며 이에 사용된 *Aspergillus oryzae* 균주는 충무발효(주) 제품을 구입하여 사용하였고 *Saccharomyces*

*cerevisiae*는 한국미생물보존센터에서 분리한 균을 받아 사용하였다.

### 원료별 메주 제조

원료 콩, 백미를 수세한 다음 콩은 24시간 침지하여 물을 빼내고 121°C 1기압에서 30분간 삶고, 현미는 취사솥을 사용하여 증자한 다음 백미와 콩을 1: 1.5의 비율로 섞은 후 약 40°C 정도로 식힌다. 그런 다음 혼합 무게에 대하여 0.5%의 건조분말 *Asp. oryzae* 와 0.5% *S. cerevisiae*를 접종하여 30°C에서 습도 70%를 유지하면서 24시간 동안 발효하였다.

### 된장 제조

준비된 메주에 11%의 염수를 1:1(w/w)의 비율로 혼합하여 마쇄한 뒤 용기에 담아 25°C 숙성실에서 30일간 발효시킨다.

### 된장양갱 제조

된장 양갱 제조는 팔암금과 백암금으로 나누어 동결건조된 된장 첨가량을 달리하여 제조하였다. 된장양갱의 재료 배합은 된장 분말 비율에 따라 양금의 양이 달라졌으며, 한천, 소금, 설탕, 물은 일정한 양으로 하였다. 먼저 된장분말을 첨가하지 않은 Control과 동결건조하여 분말화 시킨 된장을 양금 대비 1%, 2%, 및 4%를 첨가하여 양갱을 제조하였다. 재료배합은 <Table 1>와 같으며 제조과정은 <Figure 1>와 같다. 즉, 분말한천 30g 과 물 200mL를 냄비에 넣고 겉화될 때까지 끓여준 후, 양금과 설탕, 물엿을 넣고 10분간 저으면서 끓여준다. 그런 다음 각 분량만큼의 된장가루를 넣고 5분간 저으면서 끓여준 뒤 마지막으로 소금을 첨가하여 5분간 끓여준다. 제조된 양갱은 사각틀에 부어 2시간동안 굳힌 후 4°C 냉장고에 저장하였다가 실온에서 1시간 방치한 후 실험하였다.

**Table 1. Ingredient composition for *yanggaeng* with different contents of *Doenjang* powder**

	<unit : g>			
Ingredient	Control	1%	2%	4%
Cooked bean (Black or White)	600	595	590	580
Agar	30	30	30	30
Deonjang powder	0	5	10	20
Sugar / Syrup	75/75	75/75	75/75	75/75
Salt	0.6	0.6	0.6	0.6
Water	200	200	200	200



Figure 1. Procedures for preparation of *Deonjang yanggaeng*.

#### 색도 측정

색도는 색차계 (SP-80, Tokyo Denshoku, Japan)를 사용하여 L; 백색, a: 적색, b: 황색으로 구분하여 측정하였다. L값은 명도(lightness)로 0(흑색)~100(백색), a 값은 적색도(redness)로 -100(녹색)~+100(적색), b값은 황색도(yellowness)로 -100(청색)~+100(황색)의 범위로 표현하였다.

#### IV-1-2-6. Texture 측정

Texture는 Texture analyser(TAST2 i, Stable Microsystems LTD, Godalming, UK)를 사용하였다. 사용한 probe는 Stainless steel rod 로 직경이 75mm, Contact Area가 4417.860mm<sup>2</sup> 이었으며, 경도(Hardness), 접착성(Adhesiveness)등은 Two-Bite Test 압착시험인 TPA(Texture Profile Analysis) Test로 조사하였다. Texture 특성의 평가는 <Table 2>과 같은 조건으로 시료를 압착 할 때의 힘을 측정하였으며, 측정 시 그래프는 <Figure 2>과 같다.

Table 2. Texture analyser condition

Probe	P-75
Force unit	grams
Pre test speed	5.0 mm/s
Test speed	1.7 mm/s
Post test speed	10.0 mm/s
Time	5.00 sec
Distance	70.0%
Trigger Type	Auto 20g

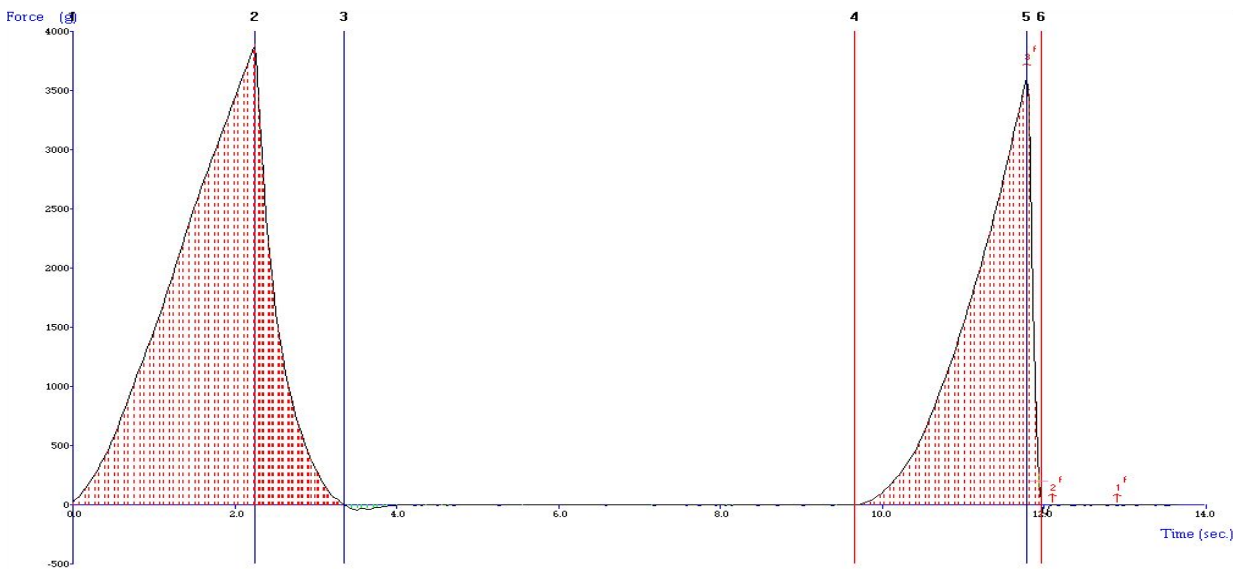


Figure 2. Graph of Texture by TPA test.

### 관능평가

Control을 포함한 제조된 된장양갱은 전북대학교 식품공학과 대학원생 15명을 대상으로 관능평가를 실시하였다. 관능평가는 향과 색 단맛, 씹힘성 등에 대하여 9점 척도법(9; 아주 좋음, 1; 아주 나쁨)으로 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 된장양갱의 색도

된장가루의 첨가량을 달리한 양갱의 색도를 측정된 결과는 <Table 3>과 같다. 된장양갱의 색도는 된장을 첨가함에 따라 양갱의 첨가량이 감소하여 본래 붉은색을 띄는 팔앙금의 경우 a 값이 점점 줄어드는 것을 알 수가 있었고, 팔앙금과 백앙금 둘 모두에게서 b값인 황색도가 증가함을 알 수 있었다. 이는 본래 황색을 띄고 있는 된장가루의 첨가량이 증가함에 따른 것으로

생각되며 특히 색을 띄고 있지 않은 백앙금의 경우 그 값이 눈에 띄게 증가함을 알 수 있었다.

**Table 3. Color values for *yanggaeng* with different contents of *Deonjang* powder**

	red-bean paste		
	L	a	b
A (Control)	18.54	5.58	4.06
B (1%첨가)	16.79	5.02	4.25
C (2%첨가)	15.98	4.92	4.45
D (4%첨가)	15.71	4.73	4.53
	white-bean paste		
	L	a	b
E (Control)	40.50	-0.34	7.67
F (1%첨가)	37.87	0.22	8.73
G (2%첨가)	33.63	1.49	10.56
H (4%첨가)	33.06	1.91	11.31

#### 된장양갱의 Texture

Texture analyzer로 된장가루를 첨가하여 제조한 양갱의 조직감을 측정된 결과는 <Table 4>와 같다. 된장가루의 첨가량이 증가할수록 경도(Hardness)는 증가하는 것으로 나타났으나 접착성(Adhesiveness)의 경우 된장 첨가량이 증가 할수록 감소하는 경향을 보여 된장가루를 첨가하지 않은 Control과 4%의 된장가루를 첨가한 양갱에서 큰 차이를 보였으나, 탄력성(Springiness)와 씹힘성(Chewiness)등은 된장첨가량에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다.

**Table 4. Textural characteristics of *yanggaeng* with different contents of *Deonjang* powder**

	red-bean paste				
	Hardness	Adhesiveness	Springiness	Chewiness	Cohesiveness
A (Control)	3698.13	-45.81	0.87	2238.15	0.70
B (1%첨가)	3817.47	-46.49	0.87	2391.67	0.72
C (2%첨가)	3737.88	-82.56	0.83	2143.26	0.69
D (4%첨가)	4537.90	-103.90	0.85	2625.36	0.68
	white-bean paste				
	Hardness	Adhesiveness	Springiness	Chewiness	Cohesiveness
E (Control)	4592.07	-68.74	0.83	2742.45	0.72
F (1%첨가)	3445.27	-71.47	0.87	2103.25	0.70
G (2%첨가)	4968.66	-86.68	0.87	2970.70	0.69
H (4%첨가)	5052.55	-98.33	0.86	2999.05	0.69

### 관능평가

된장가루 첨가량을 달리하여 제조한 양갱의 색(color), 냄새(flavor), 맛(sweetness), 씹힘성(chewiness), 전체적인 기호도(overall acceptability)의 관능평가를 실시한 결과 <Table 5>와 같다. 색과 맛 등을 포함한 전체적인 평가에서 1%를 첨가한 팥앙금 제품이 가장 높은 기호도를 보였고, 4%를 첨가한 백앙금 제품에서 가장 낮은 기호도를 나타내었다. 이는 색이 없어 된장을 첨가 할수록 황색이 진해지는 백앙금의 제품이 식욕을 감소시키는 데에 영향을 미쳤을거라 여겨진다. 또한 된장 첨가량이 많아 질수록 된장 특유의 향이 강해지고 짠맛 역시 강해지기 때문에 본래 향을 가지고 있지 않은 백앙금의 경우 팥앙금에 비해 더욱 더 첨가된 된장의 맛과 향을 느꼈던 것으로 보인다.

Table 5. Sensory evaluations of *yanggaeng* with different contents of *Deonjang* powder

	red-bean paste				Overall acceptability
	Color	Flavor	Sweetness	Chewiness	
A (Control)	6.86	5.43	6.29	5.43	6.57
B (1%첨가)	8.43	6.86	7.00	6.14	7.14
C (2%첨가)	6.43	5.00	5.71	4.86	5.00
D (4%첨가)	6.57	3.86	3.86	4.71	4.29
	white-bean paste				Overall acceptability
	Color	Flavor	Sweetness	Chewiness	
E (Control)	3.86	4.29	4.43	4.29	5.00
F (1%첨가)	4.43	4.29	4.71	4.86	4.71
G (2%첨가)	3.71	3.71	3.71	3.57	3.71
H (4%첨가)	4.29	3.00	2.57	3.00	2.71

### 완제품



## 결 론

- 된장가루 첨가량을 달리하여 팔앙금과 백앙금으로 나누어 제조한 양갱의 색도, 물성, 관능 평가를 조사하였다.
- 된장분말을 첨가한 양갱의 색도를 측정된 결과 적색도를 나타내는 a 값은 팔앙금의 경우 된장가루의 색에 의해 감소하였지만, 백앙금을 이용한 양갱의 경우 오히려 a값이 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만 황색도를 나타내는 b값의 경우 두종류의 양갱 모두 증가하는 것을 알 수 있었다.
- 된장양갱의 물성을 측정된 결과 두종류의 양갱 모두 견고성이 증가한 반면 집착성은 감소하였다.
- 된장양갱의 관능검사를 실시한 결과 된장가루를 1% 첨가하여 팔앙금을 이용하여 제조한 양갱 제품에서 전체적인 기호도가 가장 높게 나타났다.
- 된장의 짠맛과 강한 향을 개선한 된장양갱을 제조하기 위하여 쌀된장을 이용하고자 하며 현재 실험 진행 중에 있습니다.

### 3. 복합기술 융합 장류제품 개발

#### 3-1 우수균주가 생산한 기능성물질(peptide와 $\gamma$ -PGA)의 캡슐화

## 서 론

우리나라의 청국장, 된장, 간장과 일본의 미소, 낫또, 인도네시아의 템페 등은 대표적인 콩 발효식품으로 콩을 발효시키는 제조과정 중 콩 속에 함유되어 있는 이소플라본 및 유용성분의 배당체가 당이 떨어지는 아글리콘 형태로 변화하여 콩 자체보다 높은 생리활성을 나타내는 것으로 밝혀지고 있으며(Koctoral thesis. Inje University of Korea, 23-122, 2002), 필수아미노산, 비타민 B1, B2, 나이아신, 판토텐산 등을 더 많이 가지고 있고 각종 효소가 풍부하게 들어있다(J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 47, 176-181, 2004). 이러한 청국장은 청국장균의 정장효과, 섬유질의 변비에방효과, 발암물질과 콜레스테롤의 체외 배출효과, 점질물의 알콜 흡수에 의한 해장효과, 사포닌의 혈관강화, 혈액순환 촉진 및 젖산분해효과, 레시틴의 뇌노화, 치매, 고혈압 및 동맥경화 예방 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(Korean J. Postharvest Sci. Technol., 8,449-455, 2001), 혈전용해(Kor. J. Appl. Microbiol. Bioechnol., 26,507-514, 1998 ; Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26, 226-231, 1998), 골다공증 예방에 있어서도 우수한 것으로 알려져 있다. 특히 청국장의 특징은 끈끈한 점질물이 있다는 것이다. 이것은 글루타민이 함유되어 있는 폴리펩타이드(polypeptide)와 과장이 중합된 프락탄(fructan)의 혼합물로서, 펩티드가 60-80%를 차지한다(Chem.Pharm. Bull.22: 938-944, 1974). 점질물은 대두 발효과정 중 생성되는 생리활성 물질로서 향균활성(Chunbuk National University, 2003) 및 혈전용해능(J. Food Sci, Technol., 23, 478-484, 1991)등이 있다고 보고 되었다.

또한 예로부터 한국인은 대두의 미생물효소 분해에 의해 된장, 간장, 고추장등의 형태로 대두 펩타이드를 식생활중에 도입하여 중요한 단백질 자원으로 이용하여 왔다. 대두펩타이드는 특히



영양적 가치가 높아 스포츠 음료등에 적용되어 단백질 보강식품으로 이용되고 있으며 많은 연구를 통해 대두펩타이드의 항암활성, 혈압 저하 효과, 콜레스테롤 저하 효과 및 항산화 작용 등이 밝혀져 있다.

캡슐화 기술은 고체, 액체, 기체상의 물질을 특정 조건하에서 어떤 물질이나 조직내부에 포장하는 기술이다(Korean J. Food Sci. Technol. 32: 132-139, 2000). 캡슐화의 기술은 불안정한 물질을 외부환경, 즉, 빛, 산소, 수분으로부터 보호하여 손실을 줄이고 반응성이 큰 물질을 격리시키고 독성, 냄새, 맛을 은폐시키며 고형화시켜 취급을 간편하게 하고, 내용물의 용출속도를 조절하는 등의 목적으로 이용되고 있다(J. Microencapsul. 22: 253-259, 2005).

이에 본 연구는 기능성물질로 알려진 이들을 캡슐화 또는 타정하여 기능성물질의 제조 유통을 간편하게 하고 섭취를 용이하게 함으로써 기능성 물질의 섭취를 증진시키고자 한다.

## 재료 및 방법

### 청국장 제조

본 실험에 사용한 청국장은 전북 무주군에서 재배된 콩을 사용하여 Fig 1.과 같은 방법으로 제조하였다. 증자 후 냉각 된 콩에 37℃에서 18 hr 배양 된 각 균의 배양액을 원료의 5% (v/v) 접종하여 발효시켰다.

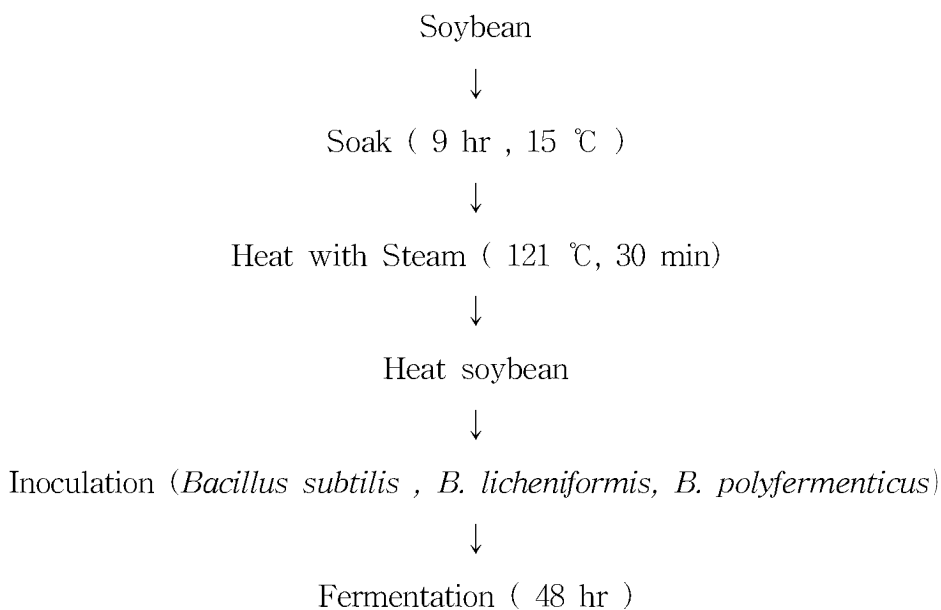


Fig. 1. The procedure for preparation of *Chungkook-jang*.

### 점질물 추출

청국장에서 점질물의 분리는 Fig. 2와 같은 방법으로 행하였다. 즉, 청국장 300 g을 증류수 2.4 L와 혼합하여 10 min 간 Homogenizer를 이용하여 진탕하고, 원심분리 (10,000 x g ,

20 min) 한 상등액을 동결 건조하였다.

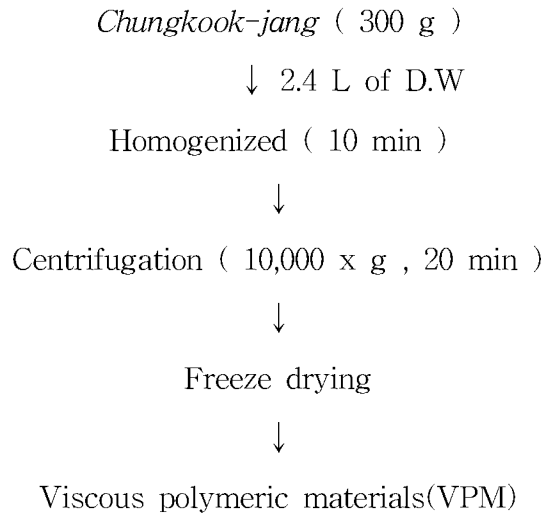


Fig. 2. Separation of viscous polymeric materials(VPM) from *Chungkook-jang*.

#### 사용 균주 및 배지

청국장 제조시 사용된 균주는 점질물 생성능이 좋다고 알려진 *Bacillus subtilis* KCCM 11316 와 *Bacillus licheniformis* KCCM 41412 , 그리고 전통적 방법에 의해 제조된 청국장에서 분리한 *Bacillus polyfermenticus* 를 분양받아 사용하였다. 각 균은 Tryptic Soy Broth ( Bacto™ , USA)에서 37 °C, 18 hr 동안 배양하여 사용하였다.

#### 사용 시약 및 기기

Isoflavon 표준시약은 daidzein (4,7-dihydroxyisoflavone, 98%), genistein (4,5,7-trihydroxyisoflavone, 98%),glycitein (4,7-dihydroxy -6-methoxyisoflavone)을 구입 (Sigma Co., U.S.A)하였으며, 모든 시료들은 주입하기 전에 0.2µm syringe filter (Chrom Tech. Inc., MN, U.S.A)를 이용하여 여과하였다. Isoflavone 분석을 위하여 HPLC (Futecs NSG-Series, Futecs Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 사용하였다. 캡슐코팅제인 젤라틴 제조에는 젤라틴멜팅 탱크1세트(200L)(Sky soft gel co.,LTD,Korea)를 사용하였으며, 캡슐화에는 Soft Gelatin Encapsulation Machine 연질캡슐성형기(SS-R&D, Sky soft gel co., LTD, Korea)를 사용하였다. 마지막으로 타블렛화를 위한 타정기(Rotary Tablet Press)는 HRT-16 SERIES (한양파마텍, Korea)를 사용하였다.

#### 일반성분 분석

일반 성분 분석은 AOAC법(AOAC, 1995)에 준하여 실시하였다. 즉, 수분은 105°C 상압 가열 건조법, 조회분은 550°C 직접회화법, 조단백질은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet 추출법으로 분석하였다. 탄수화물은 100에서 수분, 조회분, 조단백질, 조지방 함량을 차감한 값으로 나

타내었다.

### Isoflavone 함량

Isoflavone 성분은 HPLC법으로 정량 하였다. 동결건조 시킨 각 시료 0.5g에 1N HCl 7.5mL를 첨가하고 100°C에서 90분간 가수분해 시켜 isoflavone 배당체를 aglycone으로 전환시킨 뒤, 상온으로 냉각 후 메탄올 첨가하여 15mL로 정용하였고, 6시간 교반 후 3,202 x g에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 0.2 µm syringe filter(Chrom tech. Inc., MN, U.S.A)로 여과한 뒤 Table 1.과 같이 분석하였다.(Korean Living Science Association. 14(3): 485-489, 2005)

**Table 1. Conditions of isoflavone analysis**

HPLC	Futechs NSG-Series (Korea)
Column	25 cm x 4.6 mm ID SUPELCOSIL™ LC-18 5 µm
Detector(UV)	254 nm
Column temp.	40°C
Injection volume	20 µL
Mobile phase	Acetonitrile : 0.005 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> = 25 : 75 (v/v)
Flow rate	1.2 mL/min

### DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성

DPPH radical assay은 Williams WB *et al*, LWT. 28: 25-30 (1995) 등의 방법을 응용하였다. 시료를 20000 µg/mL의 농도로 용해하여 추출물 200 µL을 60 µM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 2.8 mL에 첨가한 후 vortex를 이용하여 혼합하였다. 혼합한 용액을 30min간 암실에서 반응 시킨 후 spectrophotometer (UV-1650PC, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 515 nm에서 흡광도의 감소를 관찰하였다. Scavenging capacity는 다음과 같이 계산 하였다.

Scavenging capacity (%)

$$= \left( 1 - \frac{\text{Absorbance of sample at 515 nm after 30 min}}{\text{Absorbance of control at 515 nm after 30 min}} \right) \times 100$$

### 항균성 측정

동결건조한 청국장 시료 1g 에 ethylether 50 mL씩을 가하여 3회 추출한 후 추출액 모두를 질소 기류 하에서 건조시킨 후 최종으로 ethylether 1000 µL로 정용하였다. 항균활성은 *B. cereus*, *E.coli*, *stap. aureus*를 사용하였으며, Kirby-Bauer disk diffusion method로 clear zone의 직경(mm)을 측정하였다. 배지는 Tryptic soy agar (Bacto™, USA)를 사용하였다.(Kim SD, 2005)

### 젤라틴 제조

풍미를 위한 소량의 vanilin과 titanium dioxide와 Table 1과 같은 배합비로 탱크안에 주입한 뒤 65°C로 온도를 맞춰주며 2차레에 거쳐 진공상태를 유지 및 해지하며 가열해 준다. 재료들이 완전히 녹으면 식기전에 온도가 유지되는 이송탱크로 옮겨준다.

Table 2. 젤라틴 제조를 위한 배합 조건

	%	g
젤라틴	42	10,000
글리세린	19	4,419
정제수	38	8,837
Total	100	23,256



Fig. 3. 가열함에 따른 젤라틴 생성과정.

### 캡슐화 공정

Gelatin 42%, Glycerin 19%, Water 38%, Vanilin 0.2%, Titanium dioxide 0.5% 의 비율로 적절히 조제한 피복제와 유화안정성 실험을 거쳐 선정된  $\gamma$ -PGA 32%, Amino acid 3%, Lecithin 5%, Soybean oil 60% 비율로 제조하였다.

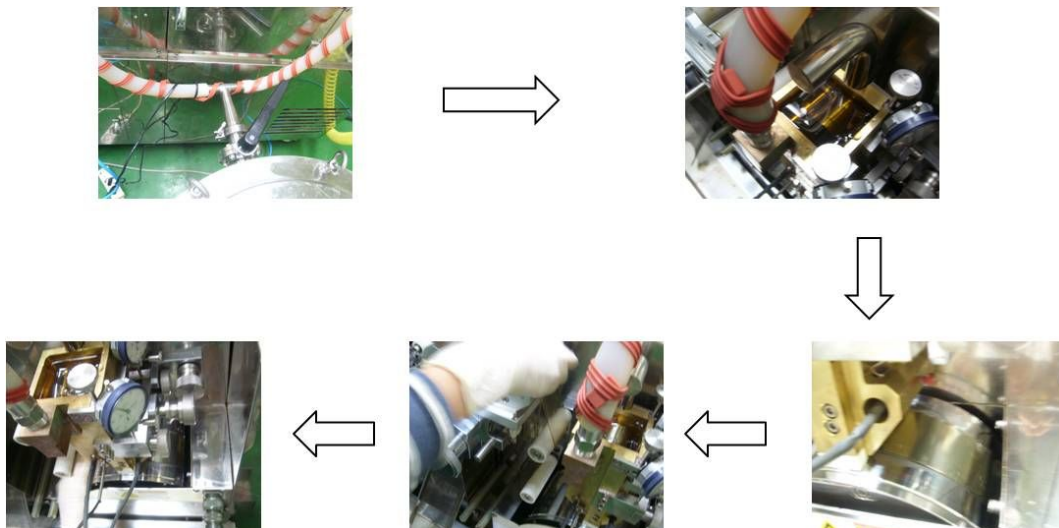


Fig. 4. 캡슐화 공정에서 젤라틴의 이동경로.

## 타정 공정

웹타이드 분말과 결정 cellulose를 6:4의 비율로 충분히 섞은 다음 타정기(Rotary Tablet Press HRT-16 SERIES)를 사용하여 제조하였다.



Fig. 5. 타정기 공정 순서.

## 통계처리

통계처리는 SAS(statistical analysis system) 통계 package(SAS Institute, 1990)를 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였으며, ANOVA분석 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 회분함량

점질물과 청국장에서 점질물을 제거한 고형분의 회분은 *B. subtilis*에 의한 시료의 경우 각각 7.34%, 2.50%를, *B. licheniformis*에 의한 시료의 경우 10.381%, 2.57%를 함유하였다. 또 *B. polyfermenticus*에 의한 시료의 경우 7.45%, 2.85%를 함유하였고, 마지막으로 증자한 후 균을 접종하지 않은 콩에서는 4.49%의 회분율을 나타내었다.

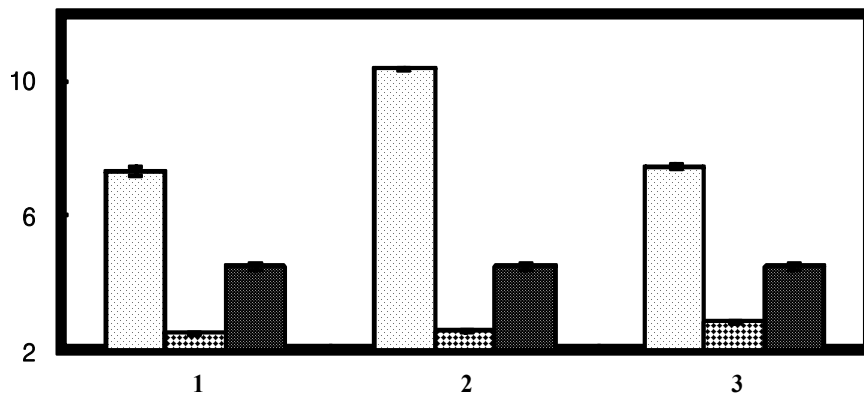


Fig. 6. Crude ash content of various substance fermented with *Bacillus* species.

□ VPM<sup>1)</sup> ▨ Exclusion VPM<sup>1)</sup> in Chungkook-jang ■ Steamed soybean

A; *B. subtilis* B; *B. licheniformis* C; *B. polyfermenticus*

<sup>1)</sup> VPM: Viscous Polymeric Materials

### 조단백질 함량

점질물과 청국장에서 점질물을 제거한 고형분의 단백질은 *B. subtilis*에 의한 시료의 경우 각각 41.02%, 26.35%를, *B. licheniformis*에 의한 시료의 경우 29.131%, 31.30%를 함유하였다. 또

*B. polyfermenticus*에 의한 시료의 경우 40.55%, 21.75%를 함유하였고, 마지막으로 증자한 후 균을 접종하지 않은 콩에서는 34.29%의 단백질 양을 나타내었다.

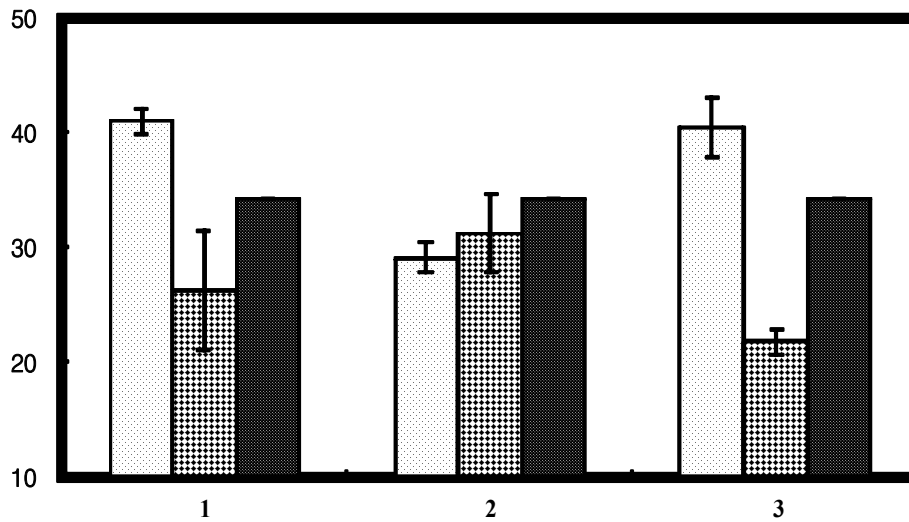


Fig. 7. Crude protein content of various substance fermented with *Bacillus* species.

□ VPM<sup>1)</sup> ▣ Exclusion VPM<sup>1)</sup> in Chungkook-jang ▤ Steamed soybean  
 A; *B. subtilis*      B; *B. licheniformis*      C; *B. polyfermenticus*

<sup>1)</sup> VPM: Viscous Polymeric Materials

#### 조지방 함량

점질물과 청국장에서 점질물을 제거한 고형분의 지방은 *B. subtilis*에 의한 시료의 경우 각각 1.031%, 41.74%를, *B. licheniformis*에 의한 시료의 경우 2.62%, 16.04%를 함유하였다. 또 *B. polyfermenticus*에 의한 시료의 경우 2.20%, 42.17%를 함유하였고, 마지막으로 증자한 후 균을 접종하지 않은 콩에서는 16.04%의 지방 양을 나타내었다.

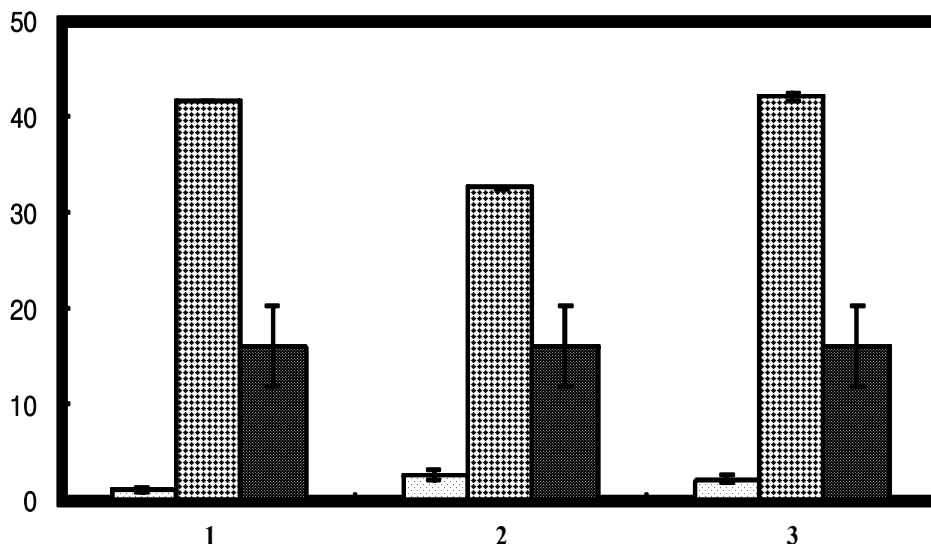


Fig. 8. Crude fat content of various substance fermented with *Bacillus* species.

□ VPM<sup>1)</sup> ▣ Exclusion VPM<sup>1)</sup> in Chungkook-jang ▤ Steamed soybean  
 A; *B. subtilis*      B; *B. licheniformis*      C; *B. polyfermenticus*

<sup>1)</sup> VPM: Viscous Polymeric Materials

## 수율

*B. subtilis*와 *B. licheniformis*, *B. polyfermenticus*의 점질물 수율은 각각 5.87%, 6.01%, 7.07%로 전체적으로 전통 재래식 청국장장의 수율이 2.6%(Master thesis, Chonbuk National University, Jeonju, Korea, 2005)에서 많게는 5%(Korean J. Food Sci, Technol., 23, 478-484, 1991)인 것에 비해 높게 나타났다.

**Table 3. Yield of viscous polymeric materials by different *Bacillus* species**

	Yield (%)
<i>B. subtilis</i> VPM <sup>1)</sup>	5.87±0.08
<i>B. licheniformis</i> VPM <sup>1)</sup>	6.01±0.32
<i>B. polyfermenticus</i> VPM <sup>1)</sup>	7.07±0.37

<sup>1)</sup> VPM; Viscous polymeric materials

## Isoflavone 함량

대두, 청국장 등에는 genistein, daidzein, glycitein과 같은 isoflavone이 존재하며(J. Agric. Food Chem. 52, 2763-2769, 2004), 이들이 항산화효과, tyrosine 인산화효과(Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev. 12, 1213-1221, 2003)등을 통해, 세포신호전달의 다양한 경로에 영향을 미치는 것으로 알려져있다.(Biochem. Pharmacol. 71, 1397-1421, 2006; FEBS Lett. 579, 1732-1740, 2005)특히 genistein이나 daidzein은 특이하게 여성호르몬의 하나인 estrogen과 구조적으로 많이 닮아있어(J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 94, 499-518, 2005) 여성의 골다공증 예방(Am J Clin Nutr 72. 844-852, 2000), 갱년기 증상의 완화 작용(FL: CRC Series in modern Nutrition, 2001), 유방암, 전립선암, 대장암 등의 항암작용(J Nutr 132, 552-558, 2002; Cacer Lett 136(2) 195-201, 1999; Am J clin Nutr 68(66) 1394-1399, 1998; J Nutr 130(2S Suppl) 467S-471S, 2000) 등 isoflavone의 유방암과 전립선암 예방 및 치료에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. Isoflavone 함량은 원료 대두의 품종, 가공 공정, 다른 원료와 혼합비율 등에 의해 영향을 받을 수 있으며, 발효 식품인 경우 관련된 미생물의 종류에 따라 총량이 변할 수 있다(Korean J. Food Sci.Technol. 30(4) 745-750, 1998).특히 발효 식품의 경우에는 발효 중에 미생물에 의해 상당한 양의 이소플라본이 분해되어 손실되는 것으로 알려져 있다.(Foods Technol. 36 60-64, 1982) 이에 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polyfermenticus*를 접종한 점질물과 청국장에서 점질물을 제외한 고형분의 Isoflavone의 함량을 분석 한 결과 *B. subtilis*를 접종한 경우 daidzein이 83.82, 66.53  $\mu\text{g/g}$ , Geinstein이 80.51, 74.38  $\mu\text{g/g}$ , *B. licheniformis*를 접종한 경우 daidzein이 62.43, 72.95  $\mu\text{g/g}$ , Genistein이 62.99, 76.89  $\mu\text{g/g}$  이었으며, *B. polyfermenticus*를 접종한 경우 daidzein이 65.41, 55.61  $\mu\text{g/g}$ , genistein이 64.76, 61.71  $\mu\text{g/g}$ 로 총량은 각각 164.33, 190.56  $\mu\text{g/g}$ , 176.61, 202.40  $\mu\text{g/g}$ , 130.18, 117.31  $\mu\text{g/g}$ 를 나타내었다. 전체적으로 유사한 함량을 나타내고 있으나 처리방법에 따라서는 발효한 청국장에서 점질물을 제외한 고형분의 Isoflavone의 함량이 높았음을 알 수 있다. 삶은콩은 daidzein이 66.59 $\mu\text{g/g}$ , Genistein이 71.05 $\mu\text{g/g}$ 로 Isoflavon 총량이 137.64 $\mu\text{g/g}$ 였다.

Table 4. Isoflavone contents of various substance fermented with *Bacillus* species (µg/g)

		Daidzein	Glycitin	Genistein	Total
<i>B. subtilis</i>	A	83.82	ND <sup>1)</sup>	80.51	164.33
	B	66.53	49.65	74.38	190.56
<i>B. licheniformis</i>	A	62.43	51.18	62.99	176.61
	B	72.95	52.55	76.89	202.40
<i>B. polyfermenticus</i>	A	65.41	ND <sup>1)</sup>	64.76	130.18
	B	55.61	ND <sup>1)</sup>	61.71	117.31
Steamed soybean		66.59	ND <sup>1)</sup>	71.05	137.64

A: VPM<sup>2)</sup> B; Exclusion VPM<sup>1)</sup> in *Chungkook-jang*

<sup>1)</sup> ND; Not detected

<sup>2)</sup> VPM; Viscous polymeric materials

### DPPH free radical 소거법에 의한 항산화 활성

식품의 유통기한을 연장하기 위한 천연항산화물질에 대한 연구가 계속되는 가운데 대두에 항산화효과가 있었으며 식품에 응용할 수 있는 항산화제로서의 가능성이 있다는 연구가 발표되었다.(Food Chemistry 106 1128-1137, 2008) 이에 대두 발효식품인 청국장 각 균주에 의한 항산화력을 알아보았다. *B. subtilis* 를 접종한 점질물과 청국장에서 점질물을 제외한 고형분의 DPPH free radical 소거능은 20mg/mL에서 각각 65.40%, 15.56%이고, *B. licheniformis*를 접종한 경우는 각각 68.31%, 15.73%였으며, *B. polyfermenticus*를 접종한 시료는 67.90%, 17.74%로 세가지 균 모두 청국장 점질물에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. 대조구로 사용된 삶은 콩의 경우 17.10%였다. 점질물이 다른 대조구에 비해서 항산화력이 월등히 높았는데 이는 같은 농도에서 64%의 항산화능을 나타낸 비타민 C보다 높은 수치이나 0.01mg/mL에서 87.4%의 항산화 활성을 나타내는 비타민 D보다는 낮게 나타났다. (J. Sci.& Nutr, 2007)

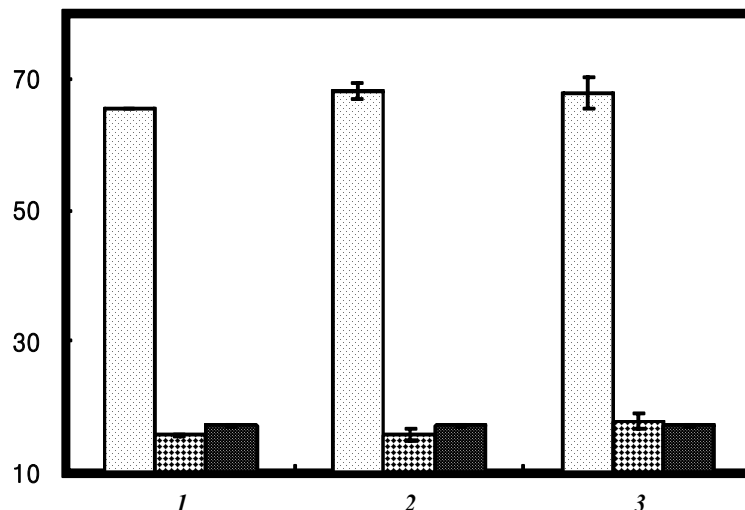


Fig. 9. Antioxidative activity of various substance fermented with *Bacillus* species.

□ VPM<sup>1)</sup>    ▨ Exclusion VPM<sup>1)</sup> in *Chungkook-jang*    ■ Steamed soybean

A; *B.subtilis*    B; *B. licheniformis*    C; *B. polyfermenticus*

<sup>1)</sup> VPM: Viscous Polymeric Materials



### 접종 균 및 처리구별 항균 효과

*B. subtilis* 와 *B. licheniformis*, *B. polyfermenticus*를 접종한 점질물과 청국장에서 점질물을 제외한 고형분의 항균을 알아 본 결과 *B. cereus*에 대하여 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polyfermenticus*의 점질물에서 1.73-4.97mm의 clearzone을 형성하였으면 청국장에 비해 점질물의 항균력이 월등하다는 걸 확인할 수 있었다.

Table 5. Antimicrobial of various substance fermented with *Bacillus* species

		Clear zone(mm)
<i>B. subtilis</i>	A	1.73±0.25
	B	ND <sup>1)</sup>
<i>B. licheniformis</i>	A	4.97±0.25
	B	ND <sup>1)</sup>
<i>B. polyfermenticus</i>	A	2.53±0.15
	B	ND <sup>1)</sup>
Steamed soybean		ND <sup>1)</sup>

A: VPM<sup>2)</sup>                      B; Exclusion VPM<sup>2)</sup> in *Chunkook-jang*

<sup>1)</sup> ND; Not detected

<sup>2)</sup> VPM; Viscous polymeric materials

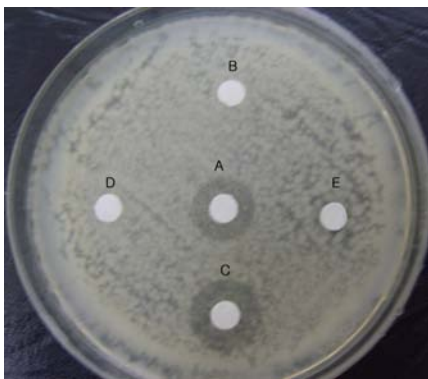


Fig. 10. Photograph of antimicrobial of various substance fermented with *Bacillus* species.

A; *Chungkook-jang*

B; Steamed soybean

C: VPM<sup>1)</sup>

D; Exclusion VPM<sup>1)</sup> in *Chunkook-jang*

E; Steamed soybean

<sup>1)</sup> VPM; Viscous polymeric materials

## 펩타이드의 캡슐화

기본적으로 캡슐화를 하기위해선 젤라틴 내부를 채우고있는 대두유에 샘플이 녹아야 한다.  $\gamma$ -PGA는 대두유의 양을 약간 늘림으로써 용해되었지만 펩타이드는 대두유의 비율을 늘렸음에도 용해되지 못하고 층분리가 일어남으로써 제품화하였을 때 심미적으로 나쁜 영향을 미친것이라 판단되었다. 캡슐 내부에서 다음 사진과 같은 층분리가 일어나면 제품의 이상등의 상황으로 판단되기가 쉽고 소화능력에도 이상을 끼칠 수 있을거라 생각되어 캡슐화 대신 정제화하기로 하였다.

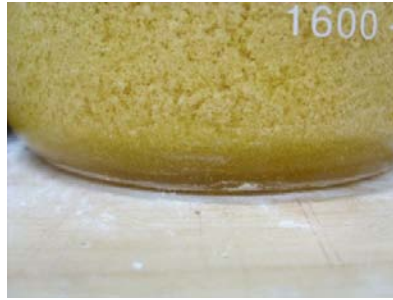
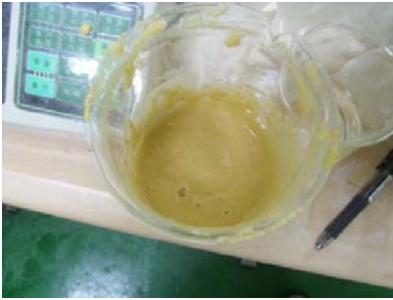


Fig. 11. 완전히 대두유에 용해된  $\gamma$ -PGA. Fig. IV-12. 대두유와 층분리가 일어나는 펩타이드.

## 개발된 제품



Fig. 13. 캡슐화된 VPM( $\gamma$ -PGA).

Fig. 14. 타정된 펩타이드.

## 결 론

- 기능성이 입증된 청국장의 점질물( $\gamma$ -PGA)의 대량생산을 위해 전통방식으로 제조된 청국장에서 직접 분리한 균을 분양 받아 청국장을 만들고 점질물( $\gamma$ -PGA)을 분리하여 실험하였다.
- 같이 실험에 사용한 *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 역시 점질물을 생성하는 균으로 알려졌지만 여러 가지 실험을 통해 *B. polyfermenticus*를 통해 얻은 점질물이 수율, 항산화, 항균 등에서 더 좋은 효과를 보이는 것을 알 수 있었다.
- 이에 *B. polyfermenticus*를 통해 얻은 점질물을 이용하여 캡슐화 시켰으며 캡슐물질은 젤라틴을 사용하였고, 점질물과 대두유가 충분히 녹아서 분리층이 생기지 않은 배합비로 증진시켰다.
- Peptide는 순수분리에 어려움이 있어 대두에서 분리한 peptide를 구입하여 사용하였으며, 점질물( $\gamma$ -PGA)과 같은 조건에서 실험을 실시하였으나 peptide 분말자체의 부피가 크고

대두유와 섞이지 못해 층분리가 일어나 캡슐화는 불가능하였다.

- 대신 간편하게 섭취가 용이하게 하고자 하는 취지를 충족시키고자 캡슐화 대신 타정하였으며, 가루가 풀리지 않고 단단하게 타정될 수 있는 조건을 찾아 배합하였다.
- 점질물( $\gamma$ -PGA)을 이용한 캡슐을 하루 한알씩 섭취할 경우 갱년기 여성 및 남성에게서 눈에 띄는 생리적인 효과를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발 목표 달성도

1. 편의성 장류 제품 개발(청국장 음료, 청국장 쿠키, 과립고추장, 울금된장국 컵 제품, 숙청국장 컵 제품 등 5종)을 성공적으로 완료하였다.
2. *B. cereus*에 대한 저항성을 가지며 전통 장류에서 분리한 *B. licheniformis* starter를 통계적 처리방법에 의해 고체배양 조건을 최적화하였다.
3. 생물반응기에서 *B. licheniformis* starter를 대량생산하는 발효조건을 확립하였다.
4. 고체배양한 *B. licheniformis* starter의 성장곡선 및 *B. cereus*에 대한 항균효과를 시험하였고, 최적배지 적용시험을 완료하였다.
5. 우수균주로 제조한 고추장메주의 제조조건을 설정하였다. 메주의 제국온도, *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*의 접종 시기, 제국방법 등에 대한 표준발효조건을 확립하였다.
6. 장류발효의 표준화를 위한 효소전극의 sensing 효율제고 조건을 확립하여 전기화학적 NAD 재생반응과 L-glutamate dehydrogenase에 의한 반응을 연계한 반응계를 최적화하였다.
7. 신규 발효식품 개발(수출용 장류 소스, 된장양갱, 청국장의 기능성성분 캡슐화 제품 등 4종)을 성공적으로 완료하였다.

### 제 2 절 대외기여도

#### 1. 학술분야

##### 가. 논문 게재

- (1) 정유민, 이주희, 정혜중, 전계택, 정용섭. *Bacillus licheniformis* SCD121067 균체 생산성 증가를 위한 통계적 생산배지 및 발효조건 최적화. 한국생물공학회지. 25: 155-166 (2010)
- (2) 정진보, 최승권, 정도연, 김영수, 김용석. 분리 균주로 제조한 청국장의 이화학적 특성과 효소활성에 대한 대두 발아시간의 영향. 한국식품과학회지. Accepted (2012.02. 게재예정)

##### 나. 학술발표

- (1) 신봉선, 신호철, 강찬. Electrocatalytic oxidation of NADH at redox hydrogel electrodes.

- 대한화학회 제 103회 총회 및 학술발표회. 2009.04.16-17.
- (2) 한송이, 김민화, 정진보, 김용석. 발아청국장 분말을 첨가한 쿠키의 관능적 특성. Proceeding P-6. 2009 전주국제발효식품심포지엄. 전북대학교 진수당, 전주, 한국. 2009. 10. 24.
  - (3) 정진보, 김민화, 한송이, 김용석. 대두의 발아 및 발효 시간을 달리하여 제조한 청국장의 미생물과 효소활성. Proceeding P-5. 2009 전주국제발효식품심포지엄. 전북대학교 진수당, 전주, 한국. 2009. 10. 24.
  - (4) 정유민, 이주희, 정혜중, 정용섭, 전계택. Optimization of Medium and Fermentation Conditions for Mass Production of *Bacillus subtilis* SCD121067 by Statistical Experimental Design. 전주국제발효식품심포지엄 proceeding. 전북대학교 진수당, 전주, 한국. 2009. 10. 24.
  - (5) 정유민, 이주희, Enkhtsetseg, 정혜중, 정용섭, 전계택. Medium Optimization and Fermentation Conditions for Mass Production of *Bacillus subtilis* by Statistical Experimental Design. 2009 춘계 생물공학회. 2009.11.02.
  - (6) 정유민, 이주희, 정혜중, 정용섭, 전계택. Medium Optimization and Fermentation Conditions for Mass Production of *Bacillus subtilis* SCD121067 by Statistical Experimental Design. 2009 춘계 생물공학회. 2009.11.02.
  - (7) 정진보, 김민화, 한송이, 김용석. 발아시간과 발아시간을 달리하여 제조한 발아 청국장의 이소플라본 함량 및 이화학적 특성. 2009 International Symposium and Annual Meeting: Food for Health and Longevity. Proceeding P2-05. 한국식품영양과학회. Changwon Exhibition Convention Center, Changwon, Korea. 2009. 11. 4-6.
  - (8) 김형은, 김용석. 제조방법이 다른 고추장으로 제조한 과립고추장의 품질특성. 2010 International Symposium and Annual Meeting: Green and Personalized Foods. Proceeding P2-40. 한국식품영양과학회. Hotel Inter-Burgo Daegu, Daegu, Korea. 2010. 10. 27-29.
  - (9) 정유민, 이주희, 정혜중, 전계택, 정용섭. Medium and Bioreactor Operating Condition Optimization for Mass Production of *Bacillus licheniformis* SCD121067. 2010년 한국미생물·생명공학회
  - (10) 정은선, 박송이, 정수현, 라슈자야발란, 윤세억. Immobilization of DTNB to carbon cloth electrode and employment of the DTNB-modified electrode to electroenzymatic bioreactor for chiral synthesis of  $\alpha$ -ketoglutarate. 2010 한국미생물생명공학회 정기학술대회 (2010).
  - (11) 라슈자야발란, 정은선, 윤세억. Characterization of bioelectrocatalytic NADH-regeneration reaction for the improvement of the efficiency of electroenzymatic bioreactor for chiral synthesis of L-lactate. 2010 한국미생물생명공학회 정기학술대회 (2010)
  - (12) 최승권, 김수연, 김용석. 울금을 첨가한 된장국 및 시판제품 된장국의 품질특성 비교. Proceeding . 한국식품저장유통학회. 서울교육문화회관, 서울, 한국. 2011. 11. 17-18.
  - (13) 최승권, 김수연, 김용석. 울금을 첨가한 된장국과 시판제품 된장국의 항산화 효과 및 품질특성 비교. Proceeding . 한국식품저장유통학회. 서울교육문화회관, 서울, 한국. 2011.

11. 17-18.

- (14) 심동준, 김수연, 김용석. 썩 첨가 청국장찌개의 품질특성 및 항산화효과. Proceeding . 한국식품저장유통학회. 서울교육문화회관, 서울, 한국. 2011. 11. 17-18.
- (15) Eun Seon Jeong, Su Hyeon Jeong, Sei Eok Yun. An electroenzymatic process in alpha-ketoglutarate from L-glutamate: the coupled system L-glutamate dehydrogenase/electrolysis. The Korean Society for Microbiology and Biotechnology Annual Meeting. 2011.06.

## 2. 특허출원

- (1) 발아청국장 분말과 죽염을 첨가하는 이소플라본 함량이 높고 불쾌취가 감소된 청국장 쿠키의 제조 방법. 출원인: 전북대학교산학협력단. 발명인: 김용석, 한송이. 특허출원번호: 10-2009-0120008 (2009.12.04)
- (2) 항산화 활성이 증진된 즉석 썩 청국장의 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 즉석 썩 청국장. 출원인: 전북대학교산학협력단. 발명인: 김용석, 심동준. 특허출원번호: 10-2011-0110432 (2011.10.27)
- (3) 항산화 활성이 증진된 즉석 울금 된장국의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 즉석 울금 된장국. 출원인: 전북대학교산학협력단. 발명인: 김용석, 최승권. 특허출원번호: 10-2011-0110433 (2011.10.27)

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 기술적 측면

- 전통장류에 대한 우수균주 고체배양 기술 확립
- 발효식품 숙성제어 기술 90% 수준까지 향상
- 발효미생물을 활용한 기능성식품 개발기술 확보

### 2. 경제적 측면

- 전통장류 및 전통주 시장 1조원 시대 개막
- 1차산업 농업안전망 구축(콩, 고추, 쌀 등) : 500억 규모
- 전후방 경제효과 2.24조원 창출(고용창출, 관광, 외식, 원료구입 등)

### 3. 학술지 및 관련 홍보매체에 게재

- 연구결과의 학술지 게재 및 학술대회 발표를 통한 홍보 예정

## 제 6 장 참고문헌

1. Ahn DG. Korean herbal flora. Kyohak Publishing Co, Seoul, Korea, p 568-569 (2000)
2. Cheigh HS, Park KS, Moon GS, Park KY. Antioxidant characteristics of fermented soybean paste and its extracts on the lipid oxidation. J. Korean Soc. Food Nutr. 19: 163-167 (1990)
3. Choe GC, Choi SK. Quality and sensory characteristics of *gochujang* added with Coriander (*Coriandrum sativum* L.). The Korean Journal of Culinry Research. 15: 73-85 (2009)
4. Choi BD, Lee SK, Yun SE, Joo HK. Effect of mugwort extract on the quality and the changes of chemical composition of the *Chungkookjang* prepared with frozen soybean. Agric. Chem. Biotechnol. 41(7): 510-515 (1998)
5. Choi HD, Kim YS, Choi IW, Seog HM, Park YD. Anti-obesity and cholesterol-lowering effects of germinated brown rice in rats fed with high fat and cholesterol diets. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 674-678 (2006)
6. Choi JY, Lee TS. Characteristics of volatile flavor compounds in *kochujang* prepared with commercial enzyme during fermentation. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 46: 207-213 (2003)
7. Choi JY, Lee TS, Noh BS. Characteristics of volatile flavor compounds in improved *kochujang* prepared with glutinous rice *koji* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1221-1226 (1999)
8. Choi JY, Lee TS, Noh BS. Characteristics of volatile flavor compounds in *kochujangs* with *meju* and soybean *koji* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 1035-1042 (2000)
9. Choi JY, Lee TS, Park SO, Noh BS. Changes of volatile flavor compounds in traditional *kochujang* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 745-751 (1997)
10. Choo JJ, Shin HJ. Sensory evaluation and changes in physicochemical properties, and microflora and enzyme activities of pumpkin-added *kochujang*. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 851-859 (2000)
11. Dewanto V, Wu X, Adonm KK, Liu RH. Thermal processing enhance the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 50:



3010-3014 (2002)

12. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
13. Hwang SH, Kim SJ, Shin SR, Kim NW, Youn KS. Effect of binding agents on physicochemical quality characteristics of granule prepared by *Lentinus edodes*. *Korean J. Food Preserv.* 12: 572-577 (2005)
14. Hyun KW, Lee JS, Ham JH, Choi SY. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from Korean traditional doenjang. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 24-28 (2005)
15. Jeon SH, Lee KA, Byoun KE. Studies on changes of isoflavone and nutrients during germination of soybean varieties. *Korean J. Human Ecology.* 14: 485-489 (2005)
16. Jeong YM, Lee JH, Chung HJ, Chun GT, Yun SI, Jeong YS. Optimization of Medium and Fermentation conditions for mass production of *Bacillus licheniformis* SCD121067 by statistical experimental design. *KSBB Journal.* 25: 539-546 (2010)
17. Kim CG, Lee JS, Oh KK, Yi SD, Oh MJ. Sensory evaluation and changes in physicochemical properties of *gochujang* powder with different drying methods. *Korean J. Food Preserv.* 13: 24-29 (2006)
18. Kim HJ, Lee JW, Kim YD. Antimicrobial activity and antioxidant effect of *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* and *Curcuma zedoaria*. *Korean J Food Preserv* 18(2): 219-225 (2011)
19. Kim JS, Kim JG, Kim WJ. Changes in isoflavone and oligosaccharides of soybeans during germination. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 294-298 (2004)
20. Kim KJ, Ryu MK, Kim SS. *Chungkookjang koji* fermentation with rice straw. *Korean J. Food Sci. Technol.* 14: 4 (1982)
21. Kim SH, Lee YJ, Kwon DY. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from *doenjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 848-854 (1999)
22. Kim TH, Kim BH. A study on propagation and utilization of mugwort. II. Difference in ability and productivity of mugwort species under the different propagation Method. *J. Inst. Develop. Livestock Prod.* 13: 45-52 (1986)

23. Kim US, Yoon HK, Koo SJ. Electron donating ability and nitrite scavenging activity of materials in a traditional one-dish meal (Bibimbab). *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 20: 677-683 (2004)
24. Kim YS, Oh HI. Volatile flavor components of traditional and commercial *kochujang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 494-501 (1993)
25. Kim YS, Yun SH, Jeong DY, Hahn KS, Uhm TB. Isolation of *Bacillus licheniformis* Producing Antimicrobial Agents against *Bacillus cereus* and Its Properties. *The Korean Journal of Microbiology.* 46(3): 270-277 (2010)
26. Ko MS, Yang JB. Antimicrobial Activities of Extracts of *Prunus mume* by Sugar. *Korean J. Food Preserv.* 16: 759-764 (2009)
27. Kum JS, Choi BK, Lee HY, Park JD, Park HJ. Physicochemical properties of germinated brown rice. *Korean J. Food Preserv.* 11: 182-188 (2004)
28. Kwon SH, Shon MY. Antioxidant and anticarcinogenic effects of traditional doenjang during maturation periods. *Korean J. Food Preserv.* 11: 461-467 (2004)
29. Lee GD, Kim JS, Bae JO, Yoon HS. Antioxidative effectiveness of water extract and ether extract in wormwood. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21(1): 17-22 (1992)
30. Lee KA, Jang JO, Yoon HK, Kim MS. Antithrombotic activities of *cheongkookjang* and *cheongkookjang* fermented with green tea or mugwort. *Korean J. Microbiol.* 43(44): 298-303 (2007)
31. Lim SY, Rhee SH, Park KY. Inhibition effect of methanol eExtract of doenjang on growth and DNA synthesis of human cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 936-940 (2004)
32. Oh HI, Park HB, Ju MS, Jung SY, Oh MS. Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between *Curcumae longae Radix* and *Curcumae longae Rhizoma*. *Kor. J. Herbology.* 25(1)83-91 (2010)
33. Oh JY, Kim YS, Kim YH, Shin DH. Volatile flavor components of *kochujang* prepared with different *kojis*. *Food Sci. Biotechnol.* 10: 45-53 (2001)
34. Park WJ, Park HY, Yoo JH, Rhee MS. Effect of *Artemisia asiatica* Nakai extract on the flavor of chung-kuk-jang. *Korean. J. Food Eng. progress.* 5(2): 115-124 (2001)

35. Seo DC, Ko JA, Gal SW, Lee SW. Characterization of *Bacillus licheniformis* KJ-9 Isolated from Soil. J. Life Sci.. 20(3): 403-410 (2010)
36. Shin JH, Yang SM, Kang MJ, Sung NJ. Quality changes of garlic added seasoning *gochujang* during storage. J. Agric. Life Sci. 45: 115-123 (2011)
37. Vostrowsky O, Michaelis K, Ihm H, Knobloch K. Essential oil of *Artemisia Abrotanum*. Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung and Forschung, 179(2): 125 (1984)
38. Williams WB, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. L.W.T., 28: 25-30 (1995)
39. Yoo JY. Present status of industries and research activities of Korean fermented soybean products. The Microorganism and Industry. 23: 13-30 (1997)
40. 채수규. 표준 식품분석학. p678-679. 지구문화사. 서울 (2000)

## 제3협동 : 유용미생물의 산업적 활용기술개발

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 김 민 수



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

- 발효식품은 세계 각국이나 민족의 생활방식, 기후, 및 식생활문화에 따라 다양한 형태로 발전되어 왔으며, 발효식품에 사용되는 원료도 각 지역별로 생산되는 곡류, 채소류, 육류, 어패류 및 유제품 등으로 상당히 다양 함
- 현재 일반적으로 이용되고 있는 발효식품의 종류는 사용하는 원료나 발효기작을 기준으로 표 1이나 2와 같이 개괄적으로 분류할 수 있음

표 1. 사용재료에 따른 발효식품의 종류

사용재료	발효식품
축산물(우유, 축육)	치즈, 버터, 발효유, 햄, 소시지 등
농산물(곡류, 두류, 과채류)	주류, 식초, 간장, 된장, 청국장, 고추장, 김치, Sauerkraut, Pickle, Miso, Natto, Tempeh, Zukemono 등
수산물	젓갈류, 식혜류 등

표 2. 발효기작에 따른 발효식품의 종류

발효기작	사용재료	발효식품
젖산발효	채소류, 고기, 우유	김치, Sauerkraut, Pickle, Zukemono, 발효유 등
아미노산발효	곡류, 고기	간장, 된장, 청국장, 고추장, Miso, Natto, Tempeh, Zukemono, 젓갈 등
알코올발효	곡류, 과채류	맥주, 과일주, 약주 등의 주류
초산발효	곡류, 과채류	식초

- 우리 경제가 발전하고 우리 문화에 대한 인식이 높아질수록 우리 전통식품에 대하여 외국인의 관심이 지대함
- 우리나라는 오래전부터 기능성식품으로 전통발효식품을 갖고 있었음

### 기능성식품 *Functional Foods*

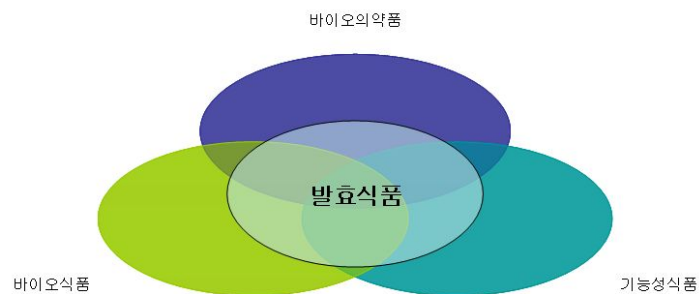
생체방어, 신체리듬 조절 등에 관계되는 기능을 생체에 대해 충분히 발현할 수 있도록 설계된 일상적으로 섭취 가능한 식품

※ 기능성식품이란 ‘사람의 건강에 유효하게 작용하도록 설계되어 건강의 유지, 증진, 질병의 방지 등을 목적으로 하는 식품’으로 정의

### 건강기능 식품 *Nutraceuticals*

인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조, 가공한 제품

- 전통발효식품으로 대표되는 것이 우리나라에는 발효주, 김치와 된장, 고추장, 청국장으로 대표되는 콩발효 식품이 있음
- 올해 초 미국의 건강기능식품 잡지인 Health (2006년도 4월호)에서는 세계 5대 Healthy Foods로 우리나라의 김치, 콩발효식품, 서구의 요구르트, 올리브유, 그리고 인도식품의 렌틸을 선정하였음
- 위에 선정된 5대 건강식품이 사실상 우리나라에서 기원된 건강식품이 두 개(김치, 콩발효식품)나 선정되었음
- 이와 같이 우리나라 전통 발효식품의 건강기능성이 세계적으로 알려졌음에도 불구하고 제조공정에 대한 과학화, 안전성, 건강기능성에 강화 등 종합적인 연구와 관리 체계가 미흡한 편임



- 전통식품인 메주 발효에 관여하는 미생물로는 *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Lactobacillus* sp.,와 *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp. 등이며, 산 생성균은 대부분 외부층에 주로 존재하며, 내부층에는 주로 호기성보다는 혐기성 균이 존재하는 복합 발효 과정으로 다양한 미생물에 의해 복잡한 생물학적 반응을 수반

- 발효식품 중 김치발효에 관여하는 젖산균은 주로 *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Leuconostoc* sp., *Streptococcus* sp. 등이며, 김치발효는 이러한 미생물들이 복합적으로 관여하는 혼합발효로 특히 김치의 숙성이나 풍미에 관여하는 젖산균임이 확인되었으며, 젖산균은 당을 대사하는 과정에서 유산(lactic acid)를 생산하는 미생물들 중에서 인간에게 유용한 세균(lactic acid bacteria, LAB)을 의미
- 고추장 등 발효식품의 건강기능성이 세계적으로 알려졌음에도 불구하고 제조공정에 대한 과학화, 안전성, 건강기능성에 대한 종합적인 연구가 미흡
- 발효식품 중 김치와 콩 발효식품은 2006년 'Health'에 세계건강 6대식품에 포함될 만큼 그 기능성과 우수성을 인정받고 있으며, 2008년도 농림수산식품부 업무계획 중 '6대 전통발효식품'을 세계 명품으로 육성하는 계획과 부합
- 우리나라 발효식품 시장은 2007년도 총 4조원 규모로 추정하고 있으며, 매년 8% 규모의 성장을 거듭하고 있지만, 대외적 환경변화(안전성, 기능성, 표준화, 유통구조 개선 등)에 대한 대응 미흡으로 성장세가 둔화되고 있는 실정임
- MB 정부에서 요구하는 광역경제권과 연계한 선진농촌시스템 구축과 관련 발효식품 산업은 호남권의 경우 전북(순창, 고창, 임실 등), 광주, 전남(신안, 곡성 등)에 고루 분포되어 있기 때문에 기술적 활용측면의 광역경제권 실현 가능
- 발효식품 기술발전을 위해 전라북도 생물산업기술지도(2007.5, 한국생명공학연구원&전라북도생물산업진흥원)에 따른, 고부가가치 장류생산기술(품질표준화기술, 기능성증진 및 세계화, 편의성제품 등), 고부가가치 전통주생산기술(지역특성전통주개발, 다양한전분질원료및미생물원천기술, 기능성천연물질활용 등), 고부가가치 발효식품공통적용기술(우수발효미생물동정및산업화, 유통용기및포장기술, 기능성식품소재생산기술) R&D 산업 추진필요
- 발효식품은 원료에서 유통까지 1차+2차+3차 산업을 연계한 다차산업육성이 가능한 품목군으로 2차 산업형 집중지원을 통해 산업별 시장확대가 가능한 신성장 동력산업 임
- 과학의 발전으로 말미암아 노령인구가 증가(순창의 경우 고령화율이 25%)하고 있으며 앞으로 가까운 시일 내에 전 국민 중 노령인구의 비율이 크게 증가할 것으로 예상되며, 노후의 인간 삶의 질 향상은 매우 중요한 과제가 될 것이며 무엇보다도 노령화에 따라 질병의 증가를 억제하고 건강하고 활동성 있게 사는 것이 요구 될 것임. 따라서 노후에 생기기 쉬운 질환을 예방하기 위한 다양한 건강기능성을 갖는 고령친화용 발효제품(장류중심) 개발이 필요함
- 식품산업에 대한 SWOT 분석결과 21C 신성장 동력 산업으로서의 충분한 잠재성 보유
  - 식품산업 발전을 통한 식품의 안정적 공급기반 구축 없이는 선진국 도약에 한계
  - 최근 곡물가 급등, 식품안전문제 등은 식품산업의 중요성을 재인식시키는 계기



○ 발효식품이 주로 동양에서 발전한 이유는 서양인이 즐기는 육류의 경우, 그 자체가 맛이 있지만, 동양의 주식인 쌀 보리는 그 자체로는 맛이 없기 때문에 이를 보완하는 수단으로 자연스럽게 형성된 것이라 할 수 있음. 그러나 같은 동양권이면서도 중국과 일본은 우리에게 비해 발효문화가 일반화되지 못했음.

○ 우리나라는 독특하게도 동남아의 어장문화와 동북아의 장류 문화를 모두 가지고 있으며, 이처럼 우리나라는 전통적으로 발효와 깊은 연관을 가진 전통 바이오 기술의 종주국이라 할 수 있음. 이러한 전통 바이오 산업을 현대화하는 일은 우리의 식문화를 계승 발전 시키는 의미도 가지고 있음. 따라서 오늘의 BT산업을 이러한 발효기술을 기반으로 추진한다면 보다 효과적으로 발돋움할 것이며, 여기에서 창출된 발효기술과 발효물질은 새로운 기능의 발견으로 이어질 가능성이 큼

○ 발효기술은 그 생산물의 영양적 가치에 관한 인식고조와 더불어 최근 생명공학 등 관련 기술의 발전의 영향으로 식품분야에서 그 중요도가 높아지고 있는 분야임. 발효의 전통적 의미는 미생물을 이용하여 기질을 우리가 원하는 대사물질로 전환시키는 작용이지만, 현대적으로는 미생물이 전자전달체를 환원할 때 발생하는 에너지를 이용하여 생육하면서 생성하는 대사작용을 뜻하며, 발효는 미생물의 산소요구도에 따라 호기 발효, 혐기발효, 통성혐기발효 등으로 나눌 수 있다. 발효로 만들어지는 대표적인 제품은 발효식품과 양조주, 발효물질과 그 유도체, 효소류, 식 사료 단백질 및 바이오 에너지 등임.

○ 발효식품의 중요한 공통적인 기능은 첫째, 맛과 향의 제공 기능으로 발효에 의해 생성되는 아미노산, 유기산, 핵산 등에 의한 복합적인 천연조미의 맛과 향을 제공하고 둘째는 영양 제공의 기능으로 곡류에서 결여되기 쉬운 아미노산, 무기질, 비타민 및 가용성 섬유질의 영양성분의 제공 기능 있으며, 셋째는 열장이나 건조처리를 등의 가공 처리로 식품의 보존기간 연장 기능의 제공으로 식품의 장기보존 수단으로서의 기능을 제공하고, 이중에서 식문화의 관점에서 발효식품의 가장 중요한 제조 목적은 식품저장의 수단으로 여겨지며, 우리나라의 경우도 동절기 식품저장의 역할이 가장 중요한 목적으로 평가 되고 있음.

○ 발효식품은 숙성중 미생물이 자라는데 어떤 미생물들이 지배적으로 성장하는지에 따라 품질과 맛이 결정되나, 전통기술로는 숙성 중 발효식품에서 생육하는 미생물의 종류와 수를 조절할 수 없기 때문에 제조할 때 마다 미생물 조성이 달라져 품질과 맛이 달라지는 문제를 가지고 있다. 이러한 문제를 서양에서는 종균을 사용하여 해결하고 있음. 종균을 발효식품 제조시 첨가하면 종균이 지배균으로 성장하여 발효식품의 품질을 일정하게 조절하게 된다. 그러나 아직 국내에서는 전통발효식품의 종균 개발이 거의 이루어지지 않고 있음.

○ 그 이유는 김치나 고추장은 야쿠르트나 된장에서와 같이 원료를 살균하지 않기 때문에 유입되는 미생물이 훨씬 복잡하여 종균 사용이 쉽지 않다고 여겨져 왔기 때문으로 종균 개발이 안되면 결국 균일한 품질을 가지면서 위생적인 제품을 생산할 수 없기 때문에 세계시장에서 외면당할 수 밖에 없음. 이러한 상황에서 이웃나라에서 김치와 고추장 등 발효식품의 종균을 먼저 개발하여 표준화된 제품을 시장에 내놓으면서 우리나라에서 개발한 발효식품의 시장을 빼앗기고 결국에는 전통문화의 주권마저 상실하게 될 것임

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

전통발효식품의 본격적인 개발은 1930년경 장류를 중심으로 한 공업적 생산방식의 도입과 더불어 시작되었으며, 한국전쟁을 계기로 군납을 위한 대량생산체제가 기틀을 잡아지게 되었다가 1980년대 이후 전통발효식품에 관한 국가규격이 제정되어 비로소 공업적 생산을 위한 본격적인 단계에 접어들었으나 전반적인 공업적 생산 비율은 아직도 10 ~ 20% 수준에 머물러 있는 실정이다. 발효된 유기물을 식품적으로 이용하게 된 기원 및 종류는 지역별로 다양할 수 있으나, 식품의 발효적 처리의 목적은 인간에게 영양학적으로 유용한 성분을 미생물의 생리작용을 통해 얻는 있는 것으로 식품소재의 저장성 부여 및 영양성 증진이라는 점에서 식품학적으로 중요한 의의를 갖는다.

우리나라의 전통발효식품의 경우에서도 식품의 분류 기준에 따라 여러 가지 형태로 구분할 수 있으나, 사용원료를 기준으로 김치류 (발효채소), 장류 (발효대두식품), 젓갈류 (발효생선) 및 전통주류 등으로 분류되며 김치는 우리나라의 가장 대표적인 발효식품으로 식이섬유, 유산균, 비타민, 무기염류, 생리활성인자 등을 고루 갖춘 건강의 보고이고, 우리나라의 김치의 종류는 배추김치 25종, 무김치 63종, 기타김치 102종 등 총 190여종으로 이중 공장에서 생산되는 김치는 약 16종이다. 김치 종류별 생산비중은 배추김치 70%, 무김치 20%, 기타김치 10%로 구성된다. 젓갈은 어패류 자체가 가진 효소계로 자기 소화시킨 식품으로 해안선이 발달한 동남아를 중심으로 발전해 왔으며, 어패류를 이용한 식해류, 육류를 이용한 해류, 어패류나 갑각류의 알이나 내장을 이용한 청해 등으로 나누며, 국내에서 생산되는 젓갈의 종류는 약 50 여 가지가 있으며 젓갈산업은 저염 또는 무염젓갈의 대량생산체제를 확립, 숙성 시간의 단축 여부에 주도권 경쟁의 주요한 쟁점으로 부각되고 있는 실정이다. 전통민속주는 1980년대 후반부터 제조기능 보유자에 민속주 제조 면허 부여함으로써 각 지역별 민속주 제조 사업이 활발히 진행되기 시작하였다. 김치발효의 경우, 다양한 미생물이 복합적으로 관여하는 혼합발효이나 김치의 숙성과 풍미에 관여하는 주미생물은 젓산균인 것으로 밝혀졌으며, 국내외적으로 발효유제품 관련 젓산균에 대한 연구는 많이 이루어졌으나 김치발효관련 젓산균들에 대한 연구는 최근에만 관심의 대상이 되고 있다.

또한 대두 중에는 갈변물질 외에도  $\alpha$ -토코페롤, isoflavones 및 phenolic acid 등의 항산화 물질들이 포함되어 있으며 이들 화합물들은 메주의 숙성 과정동안 *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*으로부터 생산되는 효소에 의해 함량이 증진되는 것으로 알려져 있고, 이러한 항산화 물질들은 갈변현상에 의해 생성되는 갈변물질에 의해 생성이 증진되는 것으로 알려져 *Bacillus subtilis*에 의한 갈변현상과 항산화물질들의 생산은 밀접한 관계가 있는 것으로 밝혀져 있다. 김치는 한국의 전통적인 채소 발효식품으로  $10^9$ CFU/김치-g의 젓산균을 함유하고 있으며, 김치를 섭취하는 동안 장내 젓산균의 수도 증가할 뿐만 아니라, 장내 유해효소인  $\beta$ -glucosidase와  $\beta$ -glucuronidase의 수준이 유의적으로 감소시키는 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 젓산균은 생균제로서 인체나 가축에 급여시 장내의 해로운 미생물을 감소시키고, 소화기 내 미생물 환경을 개선시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 이러한 젓산균이 생균제로 사용될 경우 위장관을 통과하여 장내에서 기능성을 발휘하기 위해서는 위에서 분비되는 산과 담즙에 대한 내성을 필요로 하기 때문에 젓산균 자체가 산이나 담즙에 대한 내성을 갖아야만 생균으로서의 기능

성을 나타낼 수 있다.

김치 유래 젖산균은 항암, 항종양, 항돌연변이성 효과를 갖는다는 많은 연구들이 보고되어 있으며, 최근 국내 연구진에 의해 활발히 연구되고 있으며, 김치 유래 젖산균에 의해 생성되는 유기산이나 젖산균 자체의 영양학적 가치에 대해 보고하고 있으며, 젖산균에 의해 생산되는 EPS(Exopolysaccharide)에 대한 연구는 젖산균 자체가 GRAS(Generally Recognized As Safe) 등급의 안전한 세균이므로 이들이 생산하는 다당류 역시 그 안전성을 이미 확보한 상태이며 식품산업에 적용하기 위한 많은 연구가 진행되었다.

젖산균 유래 다당류에 관한 연구는 대부분 유제품을 중심으로 이루어졌으나 최근에는 김치로부터 유래한 EPS에 대한 연구도 보고되고 있으며 일부 젖산균은 항균활성을 나타내는 bacteriocin을 생산하는 특성을 갖고 있으며, *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., 등이 bacteriocin을 생산하는 것으로 보고되어 있다. 최근에는 bacteriocin을 생산하는 젖산균을 미생물 스타터를 이용한 김치의 제조하여 김치 내 유해미생물 생육의 억제나 김치의 보존성 증진에 관한 연구도 진행되고 있고 젖산균을 이용한 생균제는 이미 식품 및 사료용으로 사용이 허가된 미생물이기 때문에 이들을 이용한 생균제에 관한 연구는 많이 진행되고 있으며, 특히 bacteriocin을 생산하는 젖산균을 이용한 항균활성을 지닌 생균제 개발도 활기를 띠고 있다. 그러나 젖산균을 이용한 생균제는 가공과정이나 보관 과정 동안의 열악한 환경으로 인한 사멸율이 높아 생균제로서의 기능을 잃어버리기 때문에 장기 보존이 가능한 형태의 제품화가 시급한 실정으로 균체 건조를 통한 분말화 제제가 그 대표적인 예라 할 수 있다. 이는 식품이나 사료용으로 사용이 간편하기는 하나 건조 시 세포 내 수분 부족으로 인한 세포의 손상이나 사멸을 초래하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 최근에는 이러한 문제점을 충족시킬 수 있는 해결방안으로 젖산균 생균제의 캡슐화 방법이 주로 이용되고 있으며, 캡슐을 제조하기 위한 소재나 방법 등에 관한 연구가 진행 중에 있다.

또한 오늘날 식품산업의 발달과 위생관련기술의 향상에도 불구하고 우리나라에서는 매년 식중독 발생사태가 증가하는 추세에 있으며, 최근에는 식중독환자의 발생이 점차적으로 대형화 및 집단화되어 발생하는 경향을 보이고 있어 사회적으로 문제가 되고 있다. 다양한 식중독 원인균들 중 특히 *Bacillus cereus*는 그람 양성 균으로서 포자를 형성하며, 운동성을 지닌 호기성 균으로 혐기적 상태에서도 생육이 우수하다. *B. cereus*는 물, 토양, 공기 등 자연계에서 흔히 발견되는 토양미생물로, 식품에 혼입될 기회가 많아 유제품, 건조제품, 향신료, 식육 및 식육가공품, 과일, 채소류 및 각종 식품가공품, 등 매우 다양하게 검출되고 있다. 또한 *B. cereus*는 열처리에 견딜 수 있는 내성포자를 생성하여 일반적인 살균방법으로는 사멸되지 않으며, 독성 물질(ereulide)을 생성하여 식중독을 유발할 수 있다

*E. coli*로부터 미생물의 성장을 억제하는 박테리오신인 colicin이 처음으로 발견된 이후 현재까지 다양한 종류의 박테리오신이 보고되고 있다. 박테리오신은 세포 밖으로 분비되는 단백질 또는 펩타이드계 항균물질로서 생산균주와 근연관계에 있는 미생물을 죽이거나 생육을 억제하는 물질이라고 알려져 있다[14]. 특히 유산균이 생산하는 박테리오신은 세포표면의 특정 혹은 비특정 수용체에 부착하여 항균작용을 나타내며 1차 표적인 세포질 막의 투과성을 변화시켜 막 수송을 방해하거나 PMF(proton motive force)에 영향을 미쳐 에너지 생산과 단백질이나 핵산의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 또한 소화기계의 여러 단백질 분해효소에 의해 분해됨으로 인체에 무해하고 잔류성이 없다는 장점이 있기 때문에 최근에는 천연의 식품보존제로서 활용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 지금까지 밝혀진 박테리오신 중에서 식품보존

제로서 산업적으로 실용화되고 있는 박테리오신은 Mattick 등이 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 균주에서 발견한 nisin으로서 장내세균이나 소화효소에 의해 쉽게 분해되고, 독성이 없기 때문에 FDA(Food and Drug Administration)로부터 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 인정되어 현재 약 50개국에서 가공치즈, 야채, 과일의 통조림, 발효유 제품, 육류가공품 등에 식품보존제로서 사용되고 있다

최근 소비자들의 건강에 대한 관심이 급증하면서 화학합성 식품보존제에 대한 거부감 또한 증가하였으며, 따라서 좀더 신선하고, 천연 그대로의 화학방부제 무첨가 식품 등의 웰빙 식품을 선호하고 있다. 그럼으로, 인체에 대해 잔류성이 없으며, 무독성인 천연의 항균성물질인 박테리오신이 식품 산업에 있어 최소의 열처리와 저온 유통으로 안정성을 확보할 수 있는 수단으로 인식되고 있다.

이에 본 연구에서는 우리 고유의 전통 발효 식품인 젓갈로부터 식품유해균인 *B. cereus*의 성장을 효과적으로 저해하는 미생물을 분리하고, 분리한 균주의 특성 및 박테리오신 자체의 생화학적 특성을 조사하여 향후 식품산업의 천연보존제로서의 활용가능성에 대한 기초연구를 수행하였다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 발효식품으로부터 유용미생물 자원의 확보

#### 1. 발효식품으로부터 유용미생물자원의 분리

##### 가. 시료 채취

다양한 시료로부터 생리활성 물질을 생산하는 유용 균주를 분리하고자 하였다. 전통발효식품인 김치, 젓갈과 된장, 청국장, 고추장 등의 장류 뿐만 아니라 토양 등의 자연환경 시료, 어류의 장내로부터 유용 균주를 1차 선별을 하였다.

##### 나. 균주 선별

균주 분리를 위하여 시료에 0.85% 생리 식염수를 이용하여 적정 농도로 희석하고 선택 배지에 도말 하여 1차 선별을 하였다. 전통 식품으로부터 활성을 갖는 유산균 및 활성균주를 1차 선별하기 위하여 MRS 혹은 LBS 평판배지에 각 각  $10^4$ ,  $10^3$ 으로 희석한 시료를 도말 하고 30°C 항온 배양기에서 20시간 이상 배양하였다.

##### 다. 항균 활성 검사

1차 선별을 위한 평판배지에서 집락의 특징에 따라 균주를 분리하여 선택하고, 그 균주에 대한 활성 검사를 위하여 액체배양 하였다. Test tube에 각 균주의 특징에 따라서 유산균의 집락 형태를 보이는 콜로니는 MRS broth에 접종하고 그 외 *Bacillus*의 집락 형태를 보이는 콜로니는 LB broth에 접종하여 30°C의 항온 진탕 배양기에서 20시간 동안 배양하였다. 배양액은 원심분리하고 배양액을 제거한 균체 침전물을 이용하여 활성 검사를 수행하였다.

다양한 병원성 미생물의 생육을 억제하는 항균물질을 생산하는 균주를 선별하기 위하여 일차 선별된 균주들을 대상으로 항균활성 검사를 수행하였다. 항균활성 검사를 위하여 대표적인 그람 음성과 양성 병원성 미생물과 식중독 유발 미생물의 생장억제를 측정하였다.

측정 방법은 일차 선별된 균주가 생육 가능한 조건의 배지에 항균 활성 검사를 위한 표준 균주를 20 mL에  $1 \times 10^4$  CFU/mL로 접종하여 평판 배지를 만든 후, 선별된 균주의 배양액을 spotting 하고 배양액을 건조한 후, 37°C 항온 배양기에서 18시간 이상 배양하여 시험균주에 대한 투명한 형성 유무를 조사하여 항균 활성을 측정하였다.

본 연구에서 사용된 균주 (Table 1)는 생물자원센터에서 분양 받은 type strain을 사용하였으며 각 균주의 생육조건에 맞추어 seed cultivation하여 균주를 준비하였다.

Table 1. 항균 활성 시험에 사용된 시험균주

균주명	KCTC No.	Classification	생육조건
<i>E. coli</i> CFT073	ATCC 700928	그람 음성균의 병원성미생물	LB, 37°C
<i>Bacillus cereus</i>	3624	그람 양성균으로 콩 발효식품 숙성시 생산되는 유해 미생물	NB, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	1928	그람 양성균으로 자연계에 흔히 존재하는 식중독을 일으키는 미생물	NB, 37°C
<i>Erwinia carotovora</i>	2567	기생균, 식물 조직을 분해시켜 연부 (soft rot)를 일으키는 식물 병원균	NB, 30°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	3444	그람 양성균으로 인체의 유산을 일으키는 미생물	BHI, 37°C

라. 효소활성

Protease 효소 활성 검사를 위한 배지로는 2.0%(w/v) skim milk 그리고 1.5%(w/v) agar를 혼합하여 만들었다. 배지는 멸균(121°C, 15분) 후 1회용 petri dish에 25ml씩 분주하여 사용하였다. plate상에 멸균된 살균된 tip으로 well상에 구멍(8 mm)을 만들어 여기에 배양 상등액 100µl을 첨가하여 건조 시킨 후 37°C에서 24시간 배양 한 후 효소에 의해서 기질이 분해되어 나타나는 clear zone(투명환)을 확인하였다

Cellulase 생산성 확인은 1.0%(w/v) CMC (carboxy methyl cellulose), 1.5%(w/v) agar를 혼합하여 만들었다. 배지는 멸균(121°C, 15분) 후 1회용 petri dish에 25ml씩 분주하여 사용하였다. plate상에 멸균된 살균된 tip으로 well상에 구멍(8 mm)을 만들어 여기에 배양 상등액 100µl을 첨가하여 건조 시킨 후 37°C에서 24시간 배양 한 후 0.5% congo red solution으로 30분 동안 염색한 후, 1M NaCl을 이용하여 탈색과정을 수행하고 기질이 분해되어 생성된 clear zone(주황색의 환)을 확인하였다.

Amylase 효소 활성 검사는 1.0%(w/v) soluble starch, 1.5%(w/v) agar를 혼합하여 만들었다. 배지는 멸균(121°C, 15분) 후 1회용 petri dish에 25ml씩 분주하여 사용하였다. plate상에 멸균된 살균된 tip으로 well상에 구멍(8 mm)을 만들어 여기에 배양 상등액 100µl을 첨가하여 건조 시킨 후 37°C에서 24시간 배양 한 후, lugol solution을 이용하여 염색한 후, 효소에 의해 기질이 분해되어 생성된 clear zone(투명환)을 확인하였다.

마. polymer 생산 여부 확인

Polymer를 생산하는 균주를 선별하기 위하여 EPS(Extracellular polysaccharide) 생산배지 (1.0% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% Dipotassium phosphate, 0.5% Diammonium citrate, 5.0% Sucrose, pH7.0)에 1차 선별된 균을 spotting하여 평판배지에 나타나는 균주 형태를 육안으로 식별하여 선별 균주에 대한 polymer 생산여부를 확인하였다.

바. 항진균 활성

효소활성, 항균활성, 그리고 EPS 생산능력을 갖는 균주를 2차 선별하여 작물 병원성 진균

류와 대치배양을 통하여 병원성 진균의 생육을 억제하는 활성도를 측정하였다.

항진활성 실험은 일차 선별 균주의 생육을 위하여 1% peptone이 첨가된 PDA(potato dextrose agar) 평판 배지에 식물병원균을 접종하여 대치 배양 하였다. 식물병원균의 접종과 배양은 배지 중앙에 균주 성장부위가 배지면과 맞닿도록 0.5cm X 0.5cm 크기의 식물병원균을 접종하고 2차 선별 균주 배양액을 표준 곰팡이를 접종한 배지에 일정 간격으로 spotting하여 25℃의 항온기에서 배양하면서 작물 병원성 미생물의 생육 저해도를 측정하였다.

실험에 사용한 6종의 식물 병원성 곰팡이 균주는 한국농용미생물보존센터 (Korea Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 분양 받은 type strain을 사용하였으며 각 균주의 생육 조건에 따라 계대 배양하여 사용하였다. (Table 2)

Table 2. 항진균 활성 시험에 쓰인 시험 균주

균주명	K A C C No.	증상	생육 조건
<i>Botrytis cinerea</i>	40573	작물병원성 회색곰팡이균	PDA, 25℃
<i>Fusarium solani</i>	42181	근부병	PDA, 25℃
<i>Phytophthora cactorum</i>	40166	고추역병	PDA, 25℃
<i>Phytium ultimum</i>	40705	인삼, 고추 썩음병	PDA, 25℃
<i>Rhizoctonia solani</i>	40123	인삼 근부병	PDA, 25℃
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	41065	고추 균핵병	PDA, 22℃

#### 사. 균주 동정

효소활성, 항균활성, 작물 병원성 곰팡이에 대해 항진활성을 갖는 균주의 동정을 위하여 고전적으로 증균, 선택적 배지를 이용하여 순수분리 한 후, 생화학적인 특징을 이용하여 균주를 분리하는 방법을 사용하였으나 많은 시간을 필요로 하기 때문에 본 연구에서는 PCR(polymerization chain reaction)을 이용한 분자생물학적인 방법을 이용하였다.

3차 선별된 균주의 동정을 위하여 균체를 genomic DNA purification kit(ZYMO research, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하여 PCR 반응을 위한 주형으로 사용하였다.

16S rRNA 유전자의 증폭을 위하여 E9F (5'- GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'), E1541R (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 COSMO(Custom Oligonucleotide Synthesis Manufacture Office, Seoul)사로부터 주문 제작하여 이용하였다. PCR 반응은 100ng의 주형 DNA, 2  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Buffer (20mM Tris-HCl(pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 % Tween 20, 0.5 % Nonidet P-40, 50 % Glycerol, 20 mM Mg<sup>2+</sup>), 1 $\mu$ l의 2.5 mM dNTP Mixture, 10 pM forward, reverse primer와 1 unit의 Ex Taq polymerase(TAKARA)를 첨가하여 최종 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다.

PCR 반응 조건은 94℃에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, 94℃에서 1분 동안 denaturation 하고, 55℃의 annealing 온도에서 1분 동안 반응하고, 72℃에서 2분 동안 elongation 과정을 30 회 반복하고 효소 불활성화를 위하여 72℃에서 10분 동안 반응하였다. PCR 증폭 산물은 1%

agarose gel에서 전기영동하여 증폭산물을 확인하였다. PCR 증폭 산물은 PCR purification kit(Qiagen, USA)을 이용하여 정제한 후, 바로 염기서열 분석을 하거나 pGEM-T Easy Vector system(Promega, USA)을 사용하여 제조합 유전자에 삽입되어 있는 PCR 증폭 산물의 염기서열을 분석하였다.

유전자의 염기서열은 COSMO사에 의뢰하여 분석하였으며 분석된 염기서열 단편은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 blast search를 통하여 GenBank에 등록되어 있는 유전자의 염기서열과 비교하여 동정하였다.

#### 아. 선별 균주의 보관

유산균의 집락 형태를 나타내는 최종 선별 균주는 MRS 액체배지에 계대 배양하고, Bacillus의 집락 형태를 나타내는 최종 선별 균주는 Schaeffer's sporulation medium (Difco sporulation medium[DSM]) 액체배지를 제조하여 계대 배양 한 후, 배양액과 40% glycerol을 1:1비율로 혼합하여 -70℃에 보관하였다. Schaeffer's sporulation medium는 8 g의 Bacto-nutrient broth 기본배지에 10 ml 10% KCl, 10 ml 1.2% MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 0.5 ml 1M NaOH를 첨가하여 증류수로 1L를 채운 후, 121℃에서 15분간 감압 멸균 후, 50℃로 배지를 식히고 멸균된 1 ml 1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 ml 0.01 M MnCl<sub>2</sub>, 1 ml 1 mM FeSO<sub>4</sub>(resuspended before use)를 첨가하여 배지를 제조하고 균주를 배양하였다.



## 2. 결과 및 고찰

전통발효식품으로부터 유용미생물을 분리 발굴하여 건강기능성 증진 등의 특성을 분석하고 이들 미생물을 활용하는 새로운 발효식품, 발효산물과 균체를 이용하는 신제품을 개발하여 발효미생물 산업의 기술수준과 제품경쟁력을 제고하고자 한다.

유용균주 분리를 위하여 콩 발효식품, 김치, 젓갈 등의 전통 발효식품을 시료로 준비하였다. 김치 시료는 전라북도 정읍시에서 생산되는 배추김치, 무우김치를 이용하였으며, 장류 샘플은 전라북도 지역에서 생산되는 간장게장, 꽃게장, 감장아찌, 울외장아찌(나라스케), 양파장아찌, 굴젓갈, 명란젓갈, 매실 고추장, 송이고추장, 시골고추장, 메주, 청국장, 천혜땅 청국장, 청국장환, 죽염 된장 시료를 준비 하였다. 젓갈 샘플은 전라남도 영광군에서 만들어진 명란젓갈, 멸치젓갈, 황석어젓갈, 갈치속젓갈, 조개젓갈, 잡젓갈, 자리비, 육젓(새우젓), 어리굴젓 그리고 전라북도 부안군의 곰소항에서 만들어진 가리비젓갈, 갈치젓갈, 갈치속젓갈, 간장게장, 고추젓갈, 꿀뚜기젓갈, 굴젓, 낙지젓갈, 뽕맹이젓갈, 아가미젓갈, 오징어젓갈, 전어속젓갈, 청어알젓갈, 토하젓갈, 황석어젓갈로부터 시료를 채취하였다. 몇 종류의 김치류와 젓갈류 그리고 된장 고추장 청국장 같은 발효식품을 중심으로 수집하였으며 전체 41개의 시료를 수집하여 실험을 실시하였다.

이들 균을 분리하기 위해 먼저 유산균의 경우 각 시료를 식염수에 희석하여 MRS배지에 균을 도말하여 유산균을 얻었다. 또한 바실러스 균을 선별하기 위하여 시료를 90℃에서 10분간 열처리 하여 LB 배지에 도말하여 포자를 형성하는 바실러스 균주를 분리하였다. 분리된 유산균과 바실러스 균을 효소활성 항균활성을 조사하였으며 여기서 좋은 활성을 갖는 균주를 선별하였으며 항진균활성 조사를 추가적으로 실시하였다.

효소활성을 측정할 이유는 주재료가 식물성 소재에 미생물이 발효를 통하여 고분자의 물질을 저분자화 하면서 생기는 펩타이드 성분에 의해 깊은 맛이 생기고 또한 미생물이 갖는 특성에 의해 기능성이 첨가되는데 이러한 식물성 주재료를 잘 발효시키려면 여러가지 효소를 생산하는 미생물이 유리하기 때문에 이러한 효소의 활성을 조사하였다.

항균. 항진균 활성을 조사한 이유는 된장이나 고추장 발효에서 문제가되는 잡균으로 *Bacillus cereus*균이 있는데, 이러한 균의 생장을 억제하는 균주가 있다면 바실러스 시리우스균을 제어하는데 유용하게 사용될 수 있다. 또한 식품을 통한 식중독 등의 문제를 일으킬 수 있는 미생물에 대해 생장 억제능력을 가지는 유산균이나 바실러스스 균주로 발효를 수행한다면 식중독과 같은 식품의 부패를 억제하는 효과를 얻기 때문이다.

총 41개의 발효식품으로부터 500 여개의 유산균과 250 여개의 *Bacillus* 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별한 500개의 유산균은 항균활성과 EPS 생산능을 비교하여 133개의 균주를 2차 선별하였다. 또한 1차 선별한 250 여개의 *Bacillus* 균주는 효소활성과 항균활성, EPS 생산능을 비교하여 119개의 균주를 2차 선별하였다.

가. *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성을 갖는 유용 미생물 선별

인체의 유산(流産)을 일으키는 병원균이다. 병해부의 기관·혈액·뇌척수액에서 분리된다. 포유류와 조류에도 감염한다. 세균체는 작은 간균(桿菌)으로 주위에 생긴 섬모(纖毛)로 운동한다. 그람양성으로 호기성이며 분리 배양(培養)할 수 있다. 이 속에는 리스테리아병을 일으키는 리스테리아 모노키토게네스(*Listeria monocytogenes*) 1종만이 알려져 있으며, 자연계에 광범위하게 분포하고 있다. 식품의 부패에도 관여하는 종으로 알려져 있다.

*L. monocytogene*에 항균활성을 갖는 유용 미생물을 선별하기 위하여 분리된 유산균과 바

실러스 균을 대상으로 선별 실험을 하였다.

Table 3. *L.monocytogene*에 항균활성을 갖는 유산균 균주

Stock No.	Source	Sequencing	BU
PS070095	강경-멸치젓	<i>Lactobacillus pentosus</i>	80
PS070098	강경-멸치젓	<i>Lactobacillus pentosus</i>	80
PS070101	강경-멸치젓		40
PS070106	강경-조개젓		40
PS070118	강경-자리비젓		40
PS070141	곰소-가리비젓	<i>Lactobacillus pentosus</i>	80
PS070143	곰소-가리비젓		80
PS070150	곰소-갈치젓	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	40
PS070151	곰소-갈치젓	<i>Lactobacillus pentosus</i>	80
PS070162	곰소-꼴뚜기젓	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	80
PS070164	곰소-꼴뚜기젓	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	80
PS070179	곰소-밴댕이젓	<i>Lactobacillus brevis</i>	40
PS070180	곰소-밴댕이젓		40
PS070193	곰소-오징어젓		80
PS070203	곰소-토하젓		40
PS070219	곰소-낙지젓	<i>Weissella cibaria</i>	40
PS070221	곰소-낙지젓	<i>Lactobacillus pentosus</i>	80

*L.monocytogene*에 항균활성을 갖는 유산균은 17여종 선별하였다. *Lactobacillus*속과 *Pediococcus* 속, 그리고 *Weissella*속에 포함되었다. 대체로 항균 저해능은 높지는 않았지만 다양한 유산균 속에서 *L.monocytogene*에 저해능을 보이는 것을 알 수 있었다(Table 3). 또한 발효식품 중에서 주로 젓갈류에서 *L.monocytogene*에 항균활성을 보이는 미생물이 선별되었다. 된장과 같은 발효 식품에서는 선별되지 않고 젓갈류에서만 *L.monocytogene*에 항균활성을 보이는 미생물만 선별되었다는 것은 발효식품 중에 따라 특정 유산균이 잘 서식할 환경이 되고 이로 인해 특정 활성을 갖는 미생물이 특정 발효식품에 존재할 수 있을 것이라 추정할 수 있다.

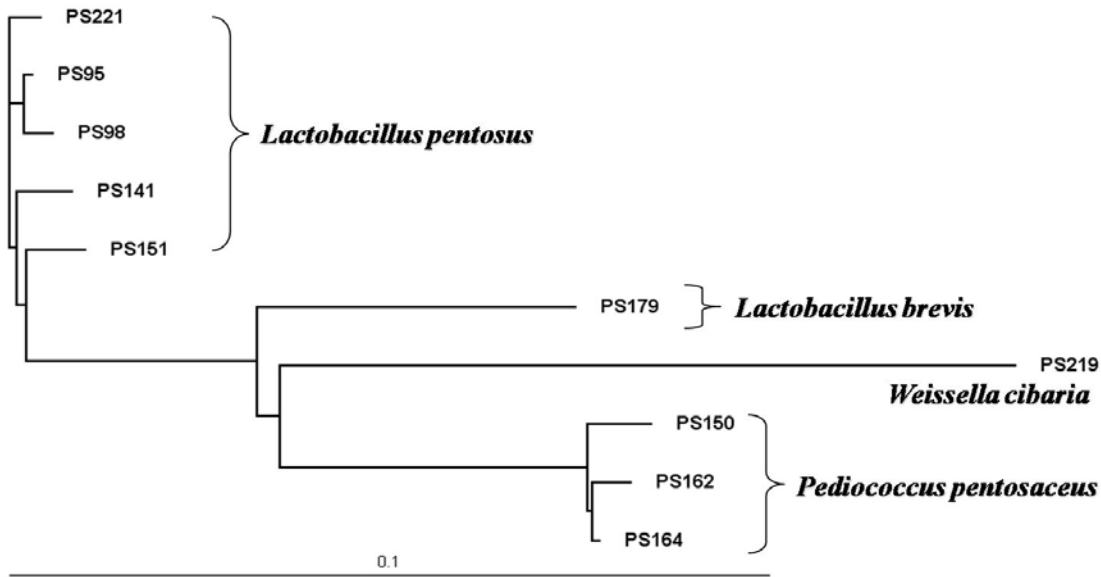


Fig. 1. phylogenetic tree of Lactic acid bacteria having anti *Listeria monocytogene* activity

Fig. 1에서 볼 수 있듯이 *L.monocytogene*에 항균활성을 보이는 유산균들은 4개의 그룹으로 묶을 수 있었다. 먼저 *Lactobacillus pentosus* 와 *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* 그리고 *Weissella cibaria*로 나누어 질 수 있었다. 물론 많은 균주에 대해 균 동정이 되어 지지는 않았지만 이 균에 집중되는 것을 알 수 있었다.

유산균 이외에 *Bacillus*균을 대상으로 *L.monocytogene*에 항균 활성능을 조사하였다. 유산균보다는 적은 수의 바실러스 균을 선별 하였다. 총 9종의 바실러스 균을 선별하였으며 전체적으로 저해능도 강하지는 않았다. 그러나 발효식품에서 이러한 유해한 균에 대한 강력한 저해능이 좋은 것만은 아니라고 생각된다. 항균활성이 강하다고 하면 유해균뿐만 아니라 유익한 균까지 저해능을 보일 수 있으므로 서로 잘 보완 할 수 있는 저해능을 가진 균을 선별하는 것도 의미 있다.

Table 4.*L.monocytogene*에 항균활성을 갖는 *Bacillus* 균주

Stock No.	Source	Sequencing	BU
CB070082	토양		
CB070098	토양		
CB070102	토양		
CB070103	토양		
CB070109	토양		
CB070122	새우젓		
CB070124	섞어젓		
CB070130	집고추장		
CB070137	김장속		

나. *B. cereus*에 대한 항균활성을 갖는 유용 미생물 선별

우리나라 식품 가운데 세계화 할 수 있는 발효식품인 고추장, 된장을 중심으로 현재 식품공 전상 문제가 되고 있는 *Bacillus cereus*의 분포정도 조사를 바탕으로 객관적인 오염실태 자료로 제시하고, 장류의 발효 중 *Bacillus cereus*에 대한 항균활성도를 분석하여 장류가 *Bacillus cereus*에 안전식품임을 입증하여, 국제적 경쟁력을 강화하고 *Bacillus cereus* 가이드라인 마련을 위한 기초 자료 제공하고 있다.

Hauge(1950년)가 *Bacillus cereus*에 의한 식중독을 보고한 이래 일본, 유럽을 중심으로 이 균에 의한 식중독 발생보고 및 연구가 진행되고 1971년 *Bacillus cereus*의 enterotoxin이 분리되어 독소의 물리, 화학적 성질을 밝히는 연구가 진행되고 있다. *Bacillus cereus*의 증식억제를 위한 화학적인 방법으로는 차아염소산, hydrogen peroxide, potassium sorbate, genzoic acid, propionic acid 등 유기산과 NaCl 및 기타 보존제를 단독으로 또는 병용한 실험결과가 많이 보고되고 있다.

미국 FDA에서 식중독을 일으켜 건강에 해를 끼칠 수 있는 *Bacillus cereus*의 수를  $10^6$  cell/g 이상이라고 밝히고 있으며, 쌀 등 농산물에  $10^3$ - $10^4$  cell/g 정도 존재하는 것으로 보고하고 있어 쌀, 고춧가루, 대두 등을 주원료로 사용하는 고추장, 된장에 *Bacillus cereus*의 상존 및 위해의 위험성이 있을 것으로 판단되나 국내에서 이에 대한 연구는 부진한 상태이다. 전통장류에 있어 *Bacillus cereus*에 관한 연구는 미진하여 국내산 약용자원의 추출물을 사용하여 이들 *Bacillus* sp.의 생육제어에 관한 연구가 있으나 아직 초보적인 탐색단계이고, 관능적으로 문제가 없어 산업적으로 활용 가능한 물질을 제시하지 못해 보다 많은 연구가 요망되고 있다. 유용 미생물에 의한 *Bacillus cereus*의 생장을 억제하기 위하여 균주 분리 작업을 하게 되었다. 유산균과 바실러스중에서 *Bacillus cereus*의 생육을 억제함으로써 식품 발효를 하면서 동시에 식품부패에 관여하는 병원균의 생육을 억제하기 위함이었다. 2차에 걸쳐 유용미생물을 탐색하고 그중에서 실제로 *Bacillus cereus*의 생육을 효과적으로 억제하는 젖산균과 바실러스 균을 선별하였다.

Table 5에서 보듯이 *Bacillus cereus*의 생육억제에 효과 갖는 유산균은 최종적으로 18종을 선별할 수 있었다. 이중에서 PS160과 SY 99에서 가장 좋은 억제효과를 보였다. test tube에서 배양을 했기 때문에 배양상의 문제 일 수도 있지만 그래도 이들 균에서 강한 항균활성을 갖는 물질이 나올 확률도 높을 수 있다. 또한 이러한 생육저해가 단지 항균활성 물질 뿐만 아니라 유기산과 같은 물질에 의해서도 저해를 받으며 *Bacillus cereus*가 낮은 pH에서 민감하게 생육 억제를 받는 것으로 보아 pH에 의해서도 생육 저해를 받을 수 있다. 최대한 이러한 작용을 제한하기 위하여 상등액을 pH 4.5에서 희석하여 생육억제 조건을 찾았다. 전체적으로 *Weissella* sp.와 *Leuconostoc* sp.가 주종을 이루었다.

Fig. 2에서는 *Bacillus cereus*에 항균활성을 갖는 유산균을 대상으로 phylogenetic tree를 그려보았다. 이들은 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus plantarum*, *Weissella halotolerans*, *Weissella cibaria* 그리고 *Weissella confusa*로 나누어졌다. 지금까지 *L.mesenteroides*와 *L.plantarum*에서 항균활성 물질에 대한 연구는 어느 정도 진행되었으나 나머지 균에서의 항균활성 물질에 대한 연구는 미미하다. 그 중에서 *W. halotolerans*에서 항균활성 물질에 대한 연구는 전무하다. 또한 장류의 발효에서 많은 염분이 첨가되는데 항염성을 갖추고 있어 장류의 발효에 장점을 갖추고 있을 것으로 고려되었다.

Table 5. *Bacillus cereus* 에 항균활성을 갖는 유산균 균주

stock No.	source	Sequencing	BU(8.6)
PS070012	전주-감장아찌	<i>Weissella cibaria</i>	80
PS070040	전주-천혜명칭국장	<i>Weissella confusa</i>	80
PS070041	전주-천혜명칭국장	<i>Weissella confusa</i>	80
PS070050	전주-장류샘플	<i>Weissella halotolerans</i>	80
PS070117	강경-자리비젓	<i>Weissella cibaria</i>	160
PS070120	강경-자리비젓	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80
PS070123	강경-어리굴젓	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80
PS070160	곰소-꼴뚜기젓	<i>Weissella cibaria</i>	240
PS070173	곰소-낙지젓	<i>Leuconostoc citreum</i>	80
PS070174	곰소-낙지젓	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80
PS070180	곰소-뽕맹이젓	<i>Weissella confusa</i>	80
PS070187	곰소-아가미젓	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80
PS070188	곰소-아가미젓	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80
PS070189	곰소-오징어젓	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80
PS070198	곰소-청어알젓	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	120
PS070199	곰소-청어알젓	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
PS070217	곰소-낙지젓	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80
PS070222	곰소-고추젓갈	<i>Lactobacillus plantarum</i>	240

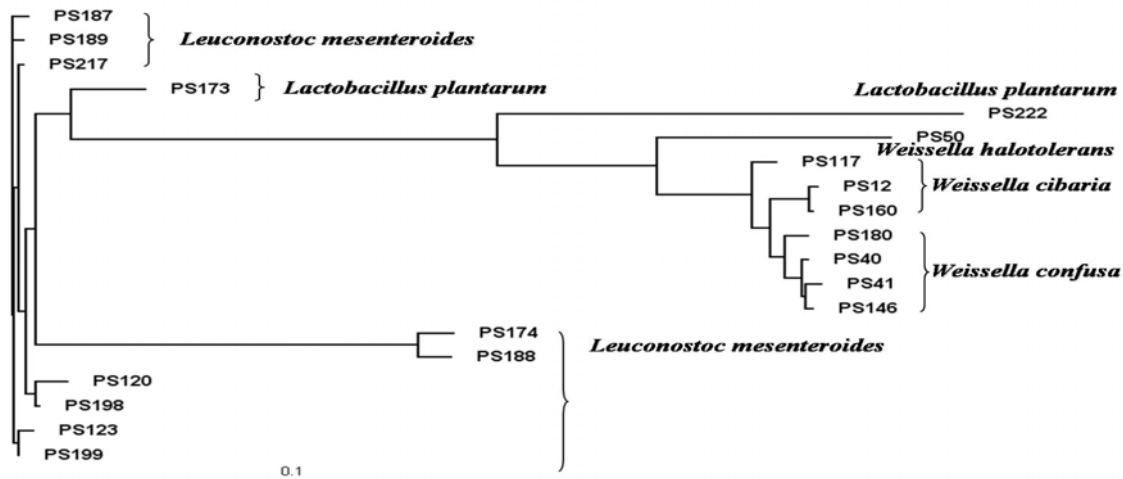


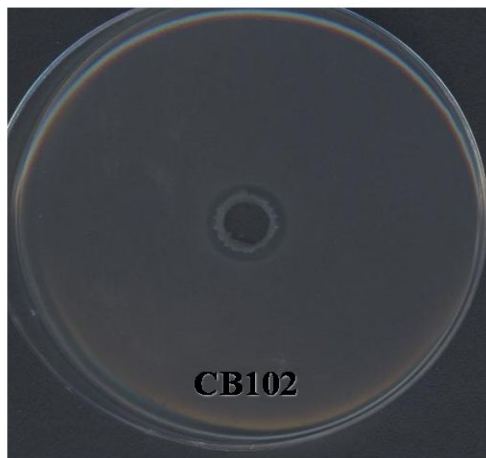
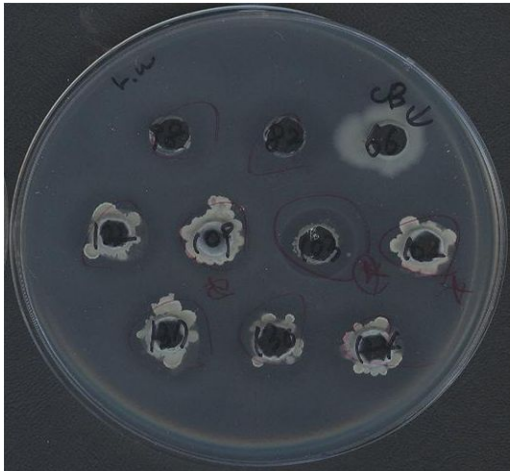
Fig. 2. phylogenetic tree of Lactic acid bacteria having anti *Bacillus cereus* activity

유산균 이외에도 바실러스균을 대상으로 *Bacillus cereus*에 항균능력을 조사하여 보았다. 유산균으로 발효를 했을 때 고유의 향과 시큼한 맛으로 인해 장류의 발효에 문제를 야기 할 수 있다는 가정하에 바실러스로 인해 *Bacillus cereus*를 저해할 수 있다면 메주의 발효를 효과적으로 진행하면서 *Bacillus cereus*의 생육을 동시에 억제할 수 있을 것으로 고려하였다. *Bacillus cereus* 에 항균활성 능력을 갖는 바실러스 균의 총 16종을 선별하였다. 대체로 항균 활성은 높았으며 발효식품에서는 선별되지 않았고 모두 토양에서 선별된 바실러스 균이었다. 16종 중에서 거의가 *B.subtilis*로 동정되었고 나머지에서 *B.amyloliquefaciens*와 *Paenibacillus*

*elgii*로 동정되었다. 이들 바실러스 균에서 발효식품에 중요한 다양한 효소들이 분비되는 것을 알 수 있었다. 장류의 맛은 콩 단백질이 가수분해되어 콩 펩타이드로 변하면서 깊은 맛과 이들 펩타이드의 작용으로 인해 인체에 유용한 작용을 나타내는 것으로 보고되었다. protease와 같은 효소 작용으로 장류의 발효에 도움을 주며 장 발효에 문제가 되는 *Bacillus cereus* 의 생육까지 저해 할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 이들 바실러스 균이 발효식품에서 선별되지 않고 토양에서 분리되었기 때문에 식품발효에 쓰이기 위해서는 안정성 문제에 좀 더 깊은 연구가 필요 할 것이다.

Table 6. 토양으로부터 *Bacillus cereus* 에 항균활성을 갖는 바실러스 균주

Stock No.	source	Sequencing	BU
CB070020	어류 조피뿔락3 위	<i>Bacillus subtilis</i>	>160
CB070095	장성대 신정리 101(장해있는 곳)	<i>Paenibacillus elgii</i>	>160
CB070096	신창호 봉양읍 분토리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	80
CB070097	신창호 봉양읍 분토리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	>160
CB070098	신일연 봉양읍 분토리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	>160
CB070099	신일연 봉양읍 분토리(마늘) 토양	<i>B.amyloliquefaciens</i>	>160
CB070101	김창규 안평읍 석탑리(마늘) 토양		>160
CB070102	김창규 안평읍 석탑리(마늘) 토양		>160
CB070106	오사수 안평읍 석탑리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	>160
CB070107	김종수 안평읍 창길리(마늘) 토양	<i>B.amyloliquefaciens</i>	>160
CB070108	김종수 안평읍 창길리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	>160
CB070109	김종수 안평읍 창길리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	>160
CB070110	옥창유 안평읍 마전리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	80
CB070111	옥창유 안평읍 마전리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	>160
CB070112	옥창유 안평읍 마전리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	>160
CB070113	오은희 안평읍 기도리(마늘) 토양	<i>Bacillus subtilis</i>	>160



다. *E.coli* 대한 항균활성을 갖는 유용 미생물 선별

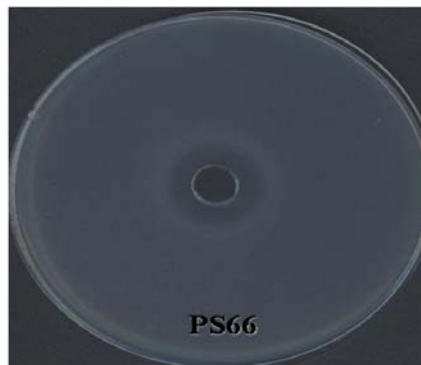
대장균은 장 속에서는 병원성을 나타내지 않는 것이 보통이지만, 장 이외의 부위에 들어가면 방광염 · 신우염 · 복막염 · 패혈증 등을 일으키고, 또한 장 속에서도 O의 26, O의 55, O의 111 등과 같은 항원형 대장균은 젓먹이에서 성인에 이르기까지 전염성 설사를 일으키는 경우가 있으므로 특히 병원성대장균이라고 한다. 대장균은 열에 대한 저항성이 약하여 60℃에서 약 20분간 가열하면 멸균된다. 그러므로 여름철에 물을 끓여 마시면 설사를 예방할 수 있다. 대장균은 양쪽 끝이 둥글고 길이 2~4μm, 나비 0.4~0.7μm의 간균으로 편모를 가지고 있어 운동성이 있다. 포자를 만들지 않으며, 그람음성균이다. 형태학적으로 적리균(赤痢菌)과 구별하기 어렵지만, 생물학적으로 대장균은 젓당 및 포도당을 분해하여 산과 가스를 생성시키고 우유를 응

고시켜 인돌(indole)을 만든다. 또한, 대장균의 존재 여부는 분변에 의한 오염 유무가 지표가 되며, 수질검사 등에 종종 응용되는 수단으로 위생학상 중요하다. 그래서 식품의 위생여부를 판가름 할 때 대장균이 거의 지표 세균으로 이용되고 있다. 이러한 대장균을 저해하는 유용 미생물을 위의 방법으로 탐색을 실시하였으며 표 8에서 보여 주듯이 대장균에 항균활성을 갖는 유산균은 총 7종을 선별하였다.

이 중에서 항균활성이 강하게 나오는 종에 대해서 동정을 하였으며 이들 균은 *Lactobacillus plantarum*과 *Pediococcus pentosaceus*로 밝혀졌다. 이 때 이용되었던 대장균은 요로 감염을 일으키는 종이였으며 일반 대장균의 억제 뿐 아니라 요로 감염에 문제가 되는 대장균의 억제에도 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 대장균을 억제하는 바실러스 균은 선별하지 못하였다. 이것은 활성 조사 방법에 문제가 있는 것으로 추정된다. 정확한 방법이 정립되면 충분히 바실러스균에서 대장균의 생육을 억제할 수 있을 것이다.

Table 7. *E.coli*에 항균활성을 갖는 바실러스 균주

Stock No.	Source	Sequencing	BU
PS070005	꽃게장		
PS070016	양파장아찌		
PS070052	전주발효식품		
PS070066	에전김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
PS070164	쫄뚜기젓갈	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	
PS070176	낙지젓갈		
PS070222	고추젓갈	<i>Lactobacillus plantarum</i>	



라. *Staphylococcus aureus* 대한 항균활성을 갖는 유용 미생물 선별

*Staphylococcus aureus*는 그람 양성균으로 자연계에서 흔히 존재하는 미생물로 식중독 등 여러 질환을 일으키고 있다고 보고되었다. *S. aureus*는 여러 독소를 생성해서 인체에 미치는 영향이 많은데 여기에 사람들이 항생제를 남용함으로써 이균의 변이인 MRSA가 나타났으며 이 MRSA는 병원원내감염의 중요균이고 감염증의 증상도 다양한 것을 알 수 있다. 그리고 이 MRSA는 치료할 수 있는 항균제가 한정되어 있어서 치료가 힘들다. 만약 이 항균제들에 대해서도 내성인 균이 나타나게 되어서 여기에 감염이 된다면 치료가 거의 힘들어 질 거라고 생각



된다. 우리 의학도 이에 발 맞추어 새로운 항균제가 만들어진다면 말은 달라지겠지만 그 항균제에 내성을 나타내는 균이 또 나오지 말라는 법은 없다. 따라서 우리들이 항생제(항균제)를 남용하는 일을 자제함으로써 이러한 균들이 나타나는 것을 미연에 방지하는 것이 최선의 방법이라고 생각된다.

*S. aureus* 생육 억제 균을 선별하기 위하여 유산균과 바실러스를 대상으로 탐색을 실시하였으며 Table 8에서와 같이 총 17 종의 유산균을 선별 할 수 있었다. 이 중에서 6종에 대해서 16S rRNA을 이용한 동정을 실시하였다. *Lactobacillus*가 주종을 이루었으며 *Pediococcus* 속과 *Weissella* 속도 포함되었다.

다양한 발효 식품중에 *Staphylococcus aureus*에 저해능을 갖는 유용미생물을 선별 할 수 있었다. 또한 바실러스에서 *Staphylococcus aureus*에 저해능을 갖는 균을 선별하는 실험을 동시에 실시하였다.

Table 8. *Staphylococcus aureus*에 항균활성을 갖는 유산균

Stock No.	Source	Sequencing	BU
PS070005	꽃게장		
PS070025	명란젓갈		
PS070026	명란젓갈		
PS070029	매실고추장	<i>Lactobacillus brevis</i>	
PS070047	청국장완		
PS070050	전주장류샘플	<i>Weissella halotolerans</i>	
PS070063	에전김치		
PS070064	에전김치	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
PS070065	에전김치	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
PS070068	에전김치	<i>Lactobacillus brevis</i>	
PS070105	강경-조개젓갈		
PS070162	곰소-꼴뚜기젓갈		
PS070164	곰소-꼴뚜기젓갈	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	
PS070181	곰소-밴댕이젓갈		
PS070225	갯김치		
PS070226	갯김치		
PS070229	갯김치		

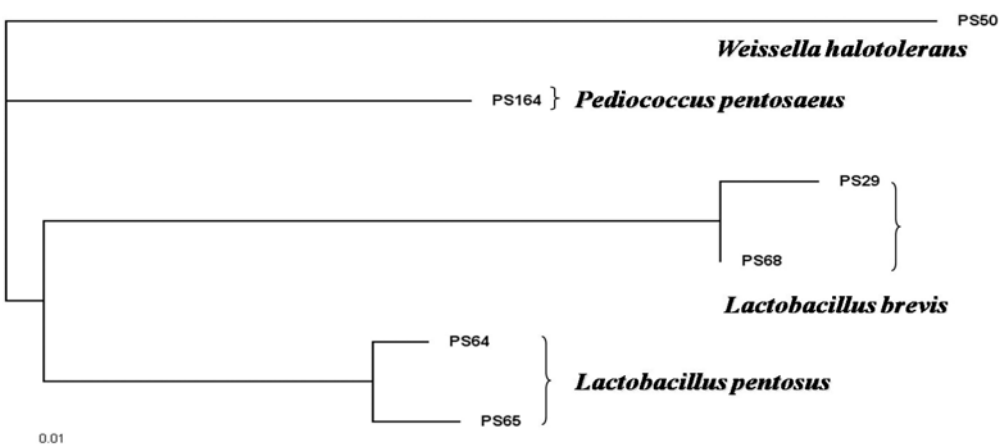
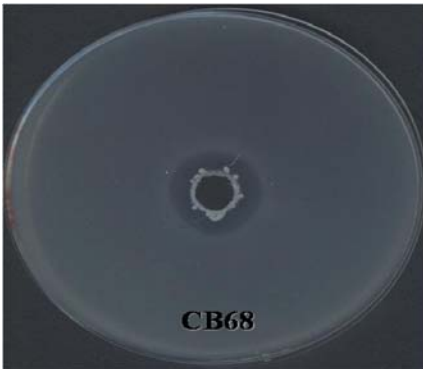


Fig. 3. phylogenetic tree of Lactic acid bacteria having anti *Staphylococcus aureus* activity

Table 9. *Staphylococcus aureus*에 항균활성을 갖는 *Bacillus* sp.균주

Stock No.	Source	Sequencing	BU
<b>CB070036</b>	이류-감성돔		
<b>CB070068</b>	전주발효식품		
<b>CB070103</b>	토양		



마. *Erwinia rhapsoditici* 대한 항균활성을 갖는 유용 미생물 선별

식물병원균으로 식물 조직을 분해시켜 병을 일으킨다. 곰팡이와는 달리 이 병은 뿌리나 땅의 접지면 부위에 생긴 난의 상처를 통해 침입하며, 식물 세포벽의 구성성분을 분해하는 펙틴 분해효소와 섬유분해 효소를 분비하기 때문에 세포를 물렁하게 썩혀 병든 조직은 물렁하고 악취를 풍기는 것이 특징이다. 발병의 최적온도는 28도에서 30도 사이이다. 유산균이나 바실러스를 이용하여 식물 병원균을 억제할 때 쓰일 수 있을 것이다. Table 10에서 보듯이 총 5종의 유산균을 선별 할 수 있었다. 여기서도 탐색 조건이 잘 아직 잘 갖추어지지 않아 많은 균을 선별하지 못하였다. 지금까지 탐색 결과를 보면 김치 시료에서만 활성을 갖는 유용을 선별할 수 있었다.

Table 9. *Erwinia rhapsoditici*에 항균활성을 갖는 유산균

Stock No.	Source	Sequencing	BU
<b>PS070059</b>	예전김치		
<b>PS070060</b>	예전김치		
<b>PS070062</b>	예전김치		
<b>PS070065</b>	예전김치	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
<b>PS070066</b>	예전김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	

Table 10. 발효식품에서 분리한 미생물 자원의 항균활성 및 효소활성

<i>Bacillus</i>		Bot	Fusa	Rhizoc	Scle	L.m	E.coli	B.c	S.A		EPS	Skim	CMC
CB070043	1	++	++						++ w		0	0	++++
CB070044	4		++			+					0	0	
CB070045	9		+		+				+		0	0	+++
CB070046	10		+		+			+	++		0	0	+++
CB070047	13				+			+	++ <sup>s</sup>			0	
CB070048	14	+	++++		++			+				0	
CB070049	18		+					+	+++			OB	
CB070050	19	+	++		++++						0	0	++++
CB070051	20	++++		++	++++		++ <sup>s</sup>	++ <sup>s</sup>	+++ <sup>s</sup>	15,16,24 저해		0	++++
CB070052	22	++++		++	++++		++ <sup>s</sup>	++	+++	19저해	0	0	++++
CB070053	23	++++	+	++	++++	++	++ <sup>s</sup>	++ <sup>s</sup>	+++	19저해	0	0	++++
CB070054	26	+++	+++					+			0	0	+++
CB070055	30		++		++			+			0	0	++++
CB070056	36	+	+		+++						0	0	FULL
CB070057	38				+++		++ <sup>s</sup>	+	+++		0	0	++++
CB070058	41			+	+				+		0	0	FULL
CB070059	43	++++	++		++++						0	0	+++
CB070060	44	++++	++		++++				+		0	0	+++
CB070061	52				++						53저해	0	+
CB070062	53	+++					++ <sup>s</sup>	++	+		0	0	++++
CB070063	54	+	+		++++						0	0	++++
CB070064	57	+++	++++		++++					53,62저해		0	+++
CB070065	58	++++	++++		++++	+	++ <sup>s</sup>	+	+++ <sup>s</sup>		0	0	+++
CB070066	59	+	+		+	++++	++ <sup>s</sup>	++	++		0	0	FULL
CB070067	65	++		++	+++		++ <sup>s</sup>	+	++		0	0	++++
CB070068	67	+++	++++	+++	++++		++ <sup>s</sup>	++ <sup>s</sup>	FULL <sup>s</sup>		0	0	++++
CB070069	68			+	+		++ <sup>s</sup>	+	+		0	0	++++
CB070070	69	+++	++++	+	+		++ <sup>s</sup>	++ <sup>s</sup>	+++ <sup>s</sup>		0	0	+++
CB070071	86				++				++ w			+	++
CB070072	81	+			++++				++ <sup>s</sup>				+++
CB070073	89	++	+++	+	+++		+		+++ <sup>s</sup>		0	+++	+++

바. 한국중균협회로부터 분양받은 균주의 항균활성 및 효소활성 분석

효소활성을 측정한 이유는 주재료가 식물성 소재에 미생물이 발효를 통하여 고분자의 물질을 저분자화 하면서 생기는 펩타이드 성분에 의해 깊은 맛이 생기고 또한 미생물이 갖는 특성에 의해 기능성이 첨가되는데 이러한 식물성 주재료를 잘 발효시키려면 여러가지 효소를 생산하는 미생물이 유리하기 때문에 이러한 효소의 활성을 조사하였다.

항균활성을 조사한 이유는 된장이나 고추장 발효에서 문제가되는 잡균으로 *Bacillus cereus* 균이있는데이러한균의생장을억제하는균주가있다면바실러스시리우스균을통제하는데유용하게쓰일수있을수있다. 또한 식품을 통한 식중독 등의 문제를 일으킬 수 있는 미생물에 대해 성장 억제능력을 가지는 유산균이나 바실러스 균주로 발효를 수행한다면 식중독과 같은 식품의 부패를 억제하는 효과를 얻기 때문이다.

(사) 한국중균협회[KCCM]에서 분리 한 균주를 사용하여 콩 발효 식품 숙성시 생산되는 유해 미생물인 *Bacillus cereus*에 대한 항균력(Fig. 4)과 효소활성에 대하여 실험한 결과를 Table 11.에 나타내었다.

Table 11. 분리균주에 대한 효소생산성확인 및 항균력확인

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)				<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	Lipase	
KCCM 100650	Bacter ia	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100651	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100652	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100653	Bacteria	Nutr ientAgar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100654	Bacter ia	Nutr ient Agar	30℃	+	+	+	-	+
KCCM 100655	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100656	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100657	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100658	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100659	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100660	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100661	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100662	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100663	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100664	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100665	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100666	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100667	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100668	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	-	+	-	-	-
KCCM 100669	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100670	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100671	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100672	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100673	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100674	Bacteria	Nutr ient Agar	30℃	+	-	-	-	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100334	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100355	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100356	Fungi	PDA	26℃	+	-	+	-
KCCM 100357	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100358	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100359	Fungi	PDA	26℃	+	-	+	-
KCCM 100390	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100391	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	+
KCCM 100392	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100393	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100394	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	+
KCCM 100405	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100406	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100407	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100408	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100409	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100440	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	+
KCCM 100441	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100442	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100443	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	+
KCCM 100444	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	+
KCCM 100465	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100466	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100467	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100468	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100469	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100490	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100491	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100492	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100493	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100494	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100525	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100526	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100527	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100528	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	+
KCCM 100529	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100560	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100561	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100562	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100563	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100564	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100585	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100586	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100587	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100588	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100589	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100620	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100621	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100622	Fungi	PDA	26℃	+	-	+	+
KCCM 100623	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100624	Fungi	PDA	26℃	-	-	-	-
KCCM 100635	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100636	Fungi	PDA	26℃	-	-	+	+
KCCM 100637	Fungi	PDA	26℃	+	-	+	+
KCCM 100638	Fungi	PDA	26℃	+	-	+	-
KCCM 100639	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-
KCCM 100621	Fungi	PDA	26℃	+	-	-	-

+ : Positive , - :Negative



Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100360	Yeast	YM AGAR	26℃	+	-	-	-
KCCM 100361	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100362	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100363	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100364	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100365	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100366	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100367	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100368	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100369	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100410	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100411	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100412	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100413	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100414	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100415	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100416	Yeast	YM AGAR	26℃	+	-	-	-
KCCM 100417	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100418	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100419	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100495	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100496	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100497	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100498	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100499	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100500	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100501	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100502	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100503	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100504	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100530	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100531	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100532	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100533	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100534	Yeast	YM AGAR	26℃	+	-	-	-
KCCM 100535	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100536	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100537	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100538	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100539	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100590	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100591	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100592	Yeast	YM AGAR	26℃	+	-	-	-
KCCM 100593	Yeast	YM AGAR	26℃	+	-	-	-
KCCM 100594	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100595	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100596	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100597	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100598	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-
KCCM 100599	Yeast	YM AGAR	26℃	-	-	-	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100220	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100221	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100222	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100223	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100224	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100225	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100226	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100227	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100228	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100229	Bacter ia	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100245	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100246	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100247	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100248	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100249	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100250	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100251	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100252	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100253	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100254	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100270	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100271	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100272	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100273	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100274	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100275	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100276	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100277	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100278	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100279	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100295	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100296	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100297	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100298	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100299	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100300	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100301	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100302	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100303	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100304	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100320	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100321	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100322	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100323	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100324	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100325	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100326	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100327	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100328	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100329	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100345	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100346	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100347	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100348	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100349	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100350	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100351	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100352	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100353	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100354	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100380	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100381	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100382	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100383	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100384	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100385	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100386	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100387	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100388	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100389	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100395	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100396	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100397	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100398	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100399	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100400	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100401	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100402	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100403	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100404	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100430	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	+
KCCM 100431	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100432	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100433	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100434	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100435	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100436	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100437	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100438	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100439	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100455	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100456	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100457	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100458	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100459	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100460	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100461	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100462	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100463	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100464	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100480	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100481	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100482	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100483	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	+	-
KCCM 100484	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100485	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100486	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100487	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100488	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100489	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100515	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100516	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100517	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100518	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100519	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100520	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100521	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100522	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100523	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100524	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	+

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100550	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100551	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100552	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100553	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100554	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100555	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100556	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100557	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100558	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100559	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100575	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100576	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100577	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100578	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100579	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100580	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100581	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100582	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100583	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100584	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100610	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100611	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100612	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100613	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-

+ : Positive , - :Negative



Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100614	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	+
KCCM 100615	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100616	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100617	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100618	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100619	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100625	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100626	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	-	-	-	-
KCCM 100627	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100628	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100629	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100630	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100631	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100632	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-
KCCM 100633	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	-	-
KCCM 100634	Bacteria	NUTRIENT AGAR	30℃	+	-	+	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100235	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100236	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM10 0237	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100238	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100239	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100240	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100241	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100242	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100243	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100244	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100260	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100261	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100262	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100263	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100264	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100265	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100266	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100267	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100268	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100269	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100285	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100286	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100287	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100288	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100289	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100290	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100291	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100292	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100293	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100294	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100310	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100311	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100312	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100313	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100314	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100315	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100316	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100317	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100318	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100319	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100335	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100336	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100337	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100338	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100339	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100340	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100341	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100342	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100343	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100344	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100370	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100371	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100372	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100373	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100374	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100375	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100376	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100377	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100378	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100379	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100420	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	-
KCCM 100421	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	-
KCCM 100422	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	-
KCCM 100423	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	-
KCCM 100424	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100425	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100426	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100427	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100428	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100429	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100445	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100446	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100447	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100448	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100449	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100450	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100451	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100452	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100453	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100454	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100470	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100471	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100472	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100473	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100474	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100475	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100476	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100477	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100478	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100479	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100505	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100506	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100507	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100508	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100509	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+
KCCM 100510	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37°C	-	-	-	+

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100511	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100512	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100513	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100514	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100540	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100541	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100542	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100543	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100544	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100545	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100546	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100547	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100548	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100549	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100565	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100566	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100567	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100568	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100569	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100570	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100571	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100572	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100573	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100574	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)			<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	
KCCM 100600	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100601	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100602	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100603	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100604	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100605	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100606	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100607	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100608	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100609	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100640	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	-
KCCM 100641	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100642	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100643	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100644	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100645	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100646	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100647	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100648	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+
KCCM 100649	Lactobacilli	LACTOBACILLI MRS AGAR	37℃	-	-	-	+

+

: Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)				<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	Lipase	
KCCM 100675	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	+
KCCM 100676	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100677	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100678	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100679	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	+	-	-	-
KCCM 100680	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100681	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100682	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100683	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100684	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100685	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100686	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100687	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100688	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100689	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100690	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100691	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100692	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100693	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100694	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100695	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100696	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100697	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100698	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100699	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-

+ : Positive , - :Negative



Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)				<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	Lipase	
KCCM 100700	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100701	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100702	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100703	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100704	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	+
KCCM 100705	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	+
KCCM 100706	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100707	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100708	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100709	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100710	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100711	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM10 0712	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100713	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100714	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100715	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100716	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100717	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100718	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	+	-	-
KCCM 100719	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100720	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100721	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100722	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	+	-	-	-
KCCM 100723	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100724	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)				<i>Bacillus cereus</i> activity
				Protease	Cellulase	Amylase	Lipase	
KCCM 100725	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100726	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100727	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100728	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100729	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100730	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100731	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100732	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	+	-	-
KCCM 100733	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100734	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100735	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100736	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100737	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100738	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100739	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100740	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100741	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100742	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100743	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100744	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-
KCCM 100745	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	-
KCCM 100746	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100747	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	-
KCCM 100748	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	-
KCCM 100749	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	-

+ : Positive , - :Negative

Strain No	Strain	배양배지	온도	정성분석(생산성확인)				<i>Bacillus cereus</i> activity (진행중)
				Protease	Cellulase	Amylase	Lipase	
KCCM 100776	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	+	
KCCM 100777	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	+	-	-	
KCCM 100778	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	
KCCM 100779	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	
KCCM 100780	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	+	-	
KCCM 100781	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	
KCCM 100782	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	
KCCM 100783	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	
KCCM 100784	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	
KCCM 100785	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	
KCCM 100786	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	
KCCM 100787	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	-	-	-	-	
KCCM 100788	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	
KCCM 100789	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	
KCCM 100790	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	-	-	-	
KCCM 100791	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	
KCCM 100792	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	
KCCM 100793	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	
KCCM 100794	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	-	
KCCM 100795	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	
KCCM 100796	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	-	
KCCM 100797	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	+	
KCCM 100798	Bacteria	Nutrient Agar	30℃	+	+	+	+	
KCCM 100799	Bacter ia	Nutrient Agar	30℃	+	+	-	+	

+ : Positive , - :Negative

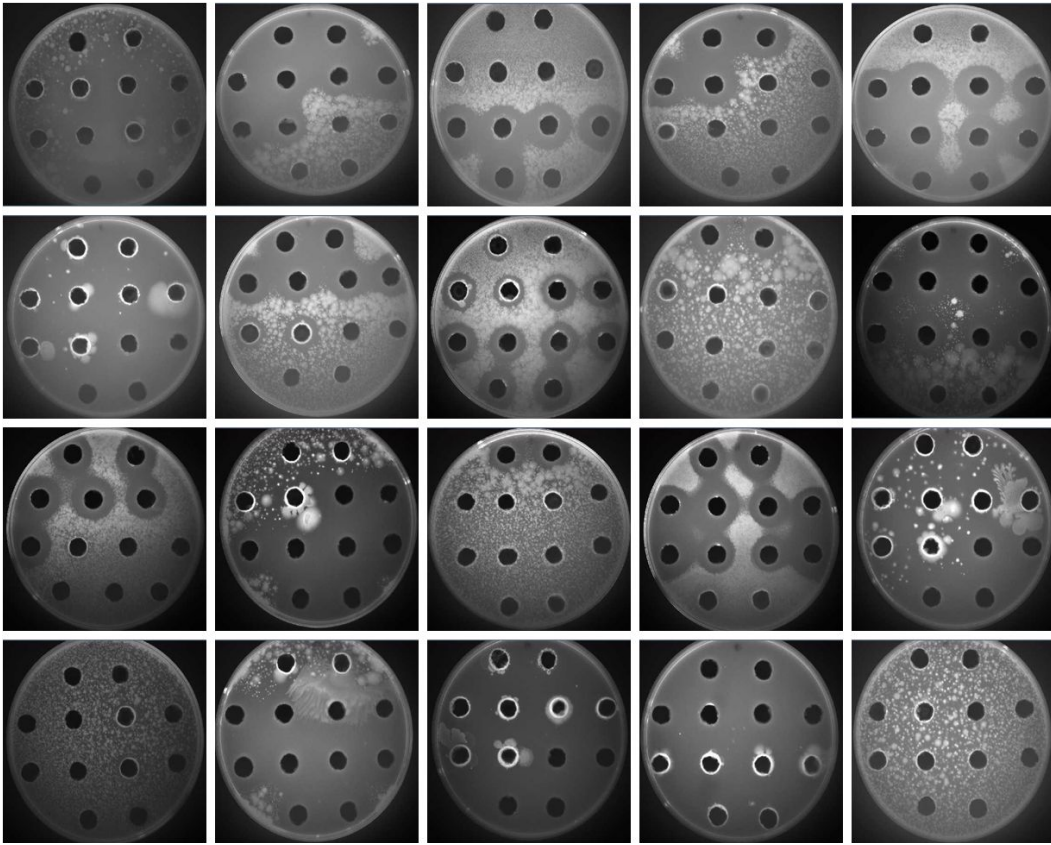


Fig. 4 *Bacillus cereus* 에 대한 항균력 확인

## 제 2절 발효식품으로부터 분리된 유용미생물 자원의 특성 분석

식품에 있어 오염지표 세균은 식품의 위생상태를 나타내며 이러한 세균들은 식품의 부패 및 변질을 일으켜 식품의 유통기간을 결정하는데 중요한 지표로 이용된다. 식중독은 식품이나 물을 매개로 하여 발생하는 급성 위장염 및 신경장애 등의 중독증상의 총칭으로 우리나라의 경우 식중독 발생의 대부분은 세균성 식중독에 기인하며, 세균성 식중독은 살모넬라, 장염 비브리오, 대장균 O157:H7, 캄프로박터, 여시니아 등을 포함하는 감염형, 황색 포도상 구균, 보툴리누스균을 포함하는 독소형, 클로스트리디움, 세레우스균을 포함하는 감염 독소형, 세균성 이질, 리스테리아, 연쇄상 구균, 슈도모나스 등을 포함하는 기타로 구분된다. 우리나라의 경우 식중독 세균은 감염형인 살모넬라, 장염 비브리오와 독소형인 황색 포도상 구균이 대표적이다 특히, *Bacillus cereus* 균은 자연계에 널리 분포하고 있어 원료단계에서 많은 오염이 이루어지기 때문에 현실적으로 차단이 쉽지 않은 식품유해미생물로 보고되어 있다.

현재 식품산업에서는 식품의 장기간 보존과 위생적 제조를 위한 천연보존제의 개발이 주요 문제로 제시되고 있다. 수년전까지만 해도 저온저장을 통한 식품저장 및 유통이 최선책인 것으로 알려져 있었다. 그러나, 저온성 병원균인 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 등의 발견으로 인하여, 저온저장이 식품저장을 위한 완전한 수단이 아닌 것으로 밝혀졌다. 이에 따라, 식품의 위생학적 안전성을 보장하기 위한 수단으로서, 저온저장 이외에도 식중독균 및 식품오염 미생물에 대해 항균효과가 큰 식품보존제의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 식품보존제는 주로 화학적 합성 보존제가 널리 사용되고 있으며, 현재 한국에서도 나프톨 유도체 등을 포함한 14 종의 화합물들이 식품에 사용할 수 있는 것으로 허용되고 있다. 그밖에도, 테트라사이클린(tetracycline)과 같은 일부 항생물질들을 식품에 사용하는 것이 검토되고 있으나, 이들 화학 식품보존제나 독성이 큰 항생물질의 사용은 소비자가 원하지 않고 있다. 따라서, 인체에 무해하고 식품과 함께 섭취시 소화효소에 의해 쉽게 분해되는 항균성 펩타이드 계열의 천연보존제에 대한 관심이 증대되고 있다. 예를 들면, 니신(nisin)과 같은 항균성 펩타이드는 현재 47 개국에서 식품에 사용 가능한 것으로 허용되고 있다.

발효 미생물의 항균효과는 발효시 미생물이 성장하면서 생성하는 대사물질에 의한 것으로서, 항생제, 박테리옌(bacteriocin), 디아세틸, 아세트산, 젖산 등이 주요물질이다. 항균성 펩타이드 생산 균주로는 락토바실러스(*Lactobacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 페디오코커스(*Pediococcus*), 류코노스톡 (*Leuconostoc*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 및 할로박테리움 (*Halobacterium*) 등이 있다. 이들이 생산하는 항균성 펩타이드들은 항균물질 생산균주 자신과 계통 분류학적으로 근접한 균종으로 제한되거나 광범위한 항균 스펙트럼을 나타낸다. 현재 이들은 일부 제품화되어 상용되고 있으며, 우유제품, 육제품, 사료제품, 곡류 등 여러 가지 식품 및 사료의 저장성 향상 및 위생화제 제조과정에도 사용될 수 있다.

박테리옌은 미생물 유래 천연 단백질 또는 펩타이드계 항균물질로서 단백질로 구성되어 있기 때문에 일반적으로 인체에 무독성이고 잔류성이 없을 뿐만 아니라, pH와 열에 대한 안정성이 높으며, 인체에 섭취시 소화효소에 의하여 분해되므로, 새로운 생물학적 보존제 또는 발효식품의 생물제어제로서 중요한 가치를 가지고 있다.

유산균(*Lactobacillus*)은 젖산, 아세트산 등의 유기산, 박테리옌 등 여러 가지 항균물질을 생

산한다고 알려지고 있으며 이들은 식품이나 사료의 중요한 생물학적 보존제가 될 수 있다고 알려지고 있다. 또한 각종의 생리활성물질, 항균물질, 항암물질을 생산함으로써 식물체의 자기 방어능력을 향상시키며, 가축의 경우 장내 미생물의 안정화, 사료 효율증가, 내병성의 증가 효과를 나타낸다. 또한, 유산균이 특별한 관심을 끄는 이유는 동서양을 막론하고 식품에서 널리 이용되어 섭취되어왔으므로 일반적으로 안전하다고 인식하는 'GRAS'(generally regarded as safe) 미생물이기 때문이다. 그러나, 유산균을 산업적으로 올바르게 사용하기 위해서는 일반적으로 긍정적인 효과의 나열에 의한 판단보다는 사용용도가 무엇이며 용도에 적합한 특성이 무엇인지를 과학적인 입장에서 명확하게 이해하고 평가하는 절차를 반드시 거쳐야 한다. 이와 같은 절차를 통해서만이 제품의 균일성과 효과의 재현성을 보장할 수 있기 때문이다.

이에 본 연구에서는 전통 발효식품 중 젓갈 식품으로부터 식품유해미생물 중 특히 바실러스 세레우스에 대한 우수한 항균활성을 나타내는 유산균인 락토바실러스 플란타룸 SY99를 선별하였고, 상기 균주 및 상기 균주의 배양액에 의해 바실러스 세레우스 및 시겔라(Shigella) 등을 포함하는 병원성균의 성장이 저해됨을 확인하였다.

## 1. 발효식품으로부터 분리된 *Lactobacillus plantarum* SY 99

### 가. 시료 채취

균주 분리를 위하여 시료에 0.85% 생리 식염수를 이용하여 적정 농도로 희석하고 선택 배지에 도말 하여 1차 선별을 하였다. 전통 식품으로부터 활성을 갖는 유산균 및 활성균주를 1차 선별하기 위하여 MRS 혹은 LBS 평판배지에 각 각  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ 으로 희석한 시료를 도말 하고 30°C 항온 배양기에서 20시간 이상 배양하였다.

*L. plantarum* SY99는 젓갈에서 분리 되었으며 *B.cereus*에 강한 항균활성을 갖고 있었다. 선별된 균주의 동정을 위하여 균체를 genomic DNA purification kit(ZYMO research, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하여 PCR 반응을 위한 주형으로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭을 위하여 E9F (5'- GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'), E1541R (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 COSMO(Custom Oligonucleotide Synthesis Manufacture Office, Seoul)사로부터 주문 제작하여 이용하였다. PCR 반응은 100 ng의 주형 DNA, 2  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Buffer (20mM Tris-HCl(pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 % Tween 20, 0.5 % Nonidet P-40, 50 % Glycerol, 20 mM Mg<sup>2+</sup>), 1 $\mu$ l의 2.5 mM dNTP Mixture, 10 pM forward, reverse primer와 1 unit의 Ex Taq polymerase(TAKARA)를 첨가하여 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 하였다.

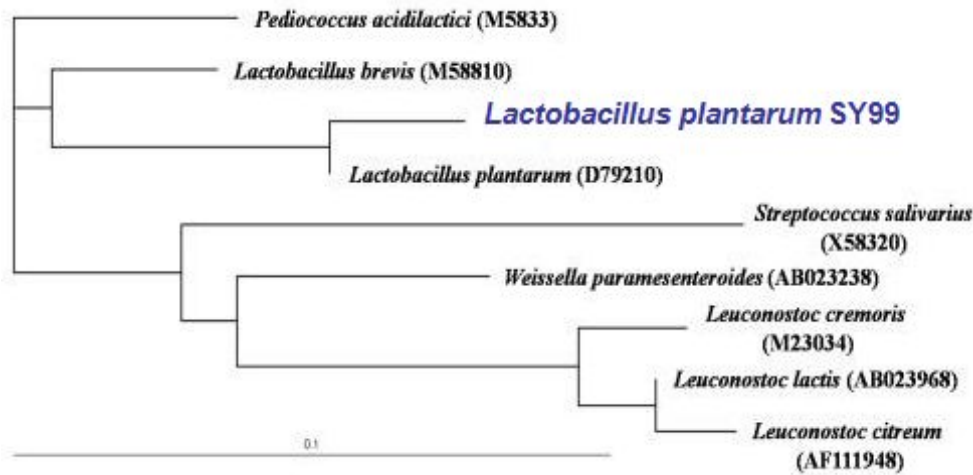


Fig. 5 16S rRNA sequencing of PS222 and phylogenetic tree

#### 나. 락토바실러스 플란타룸 SY99 항균활성 확인

락토바실러스 플란타룸 SY99가 생산하는 항균활성을 나타내는 물질이 박테리오신인지 확인하기 위하여 상기 물질의 분자량을 tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 방법을 통하여 확인하였다. 황산암모늄 침전법을 이용하여 배양 상등액을 부분 정제한 샘플을 사용하였다. 우선 멸균한 MRS 액체배지 1 L에 액체 배양한 락토바실러스 플란타룸 SY99 균주 10 ml를 접종하고 30°C에서 18시간 동안 배양한 후 배양액을 원심분리(12000rpm, 4°C, 15분)하여 상등액을 얻었다. 이어, 상기 배양액을 매우 천천히 교반하면서 황산암모늄 561g을 천천히 가하여 80%까지 포화시킨 후 3시간 동안 4°C에서 교반하였다. 그런 다음, 상기 용액을 원심분리 (6000rpm, 4°C, 20분)하여 단백질을 회수하고, DW에 용해 한 후 분자량 1000이상을 거르는 투석 튜브(spectra-por사)에 넣어 4°C에서 완충용액(0.1 M Citrate buffer, pH 3.0) 5ℓ에서 3시간 투석 후 다시 완충용액 5ℓ에서 하룻밤 투석시켰다. 그리고 나서, 원심분리 (12000 rpm, 4°C, 15분) 하여 전기영동 샘플로 사용하였다. 조제한 샘플용액 30 μℓ tricine-SDS-PAGE 샘플 완충용액 30 μℓ을 vortex mix 및 spin down하여 준비하였다. 5% stacking gel과 16% separating gel을 조제한 후 전기영동 장치에 장착 후 전개 완충용액 (running buffer)을 붓고, 겔의 웰에 폴리펩티드 SDS-PAGE 표준 마커와 준비된 시료 30 μℓ을 로딩한 뒤 40 mA, 2시간 동안 전기영동을 수행하였다. Silver stain 방법을 통하여 겔을 염색 하였다. 단백질 분자량 측정을 위한 표준물질로는 fermentas사의 Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder SM1861을 사용하였다. 나머지 하나의 겔은 30분마다 교체하면서 2시간 30분 세척하였다. 세척한 겔을 gel overlay assay 방법을 이용하여 플레이트에 올려 UV로 10 분간 건조시킨 후 감수성 균주(B. cereus KCTC 3624)가 접종된 0.8% NB 아가를 중층하여 30°C에서 24시간 동안 배양하여 항균 활성을 확인하였다.

Fig 6에서 보는 바와 같이 부분 정제된 물질을 분자량 표준시료와 비교한 결과, 약 1.5 kDa의 분자량을 갖는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 전기영동한 겔을 증류수로 30분간 4회 세척한 후 지시균주를 중층하여 박테리오신의 활성을 조사한 결과 위의 염색한 겔의 밴드와 일치하는 곳에 강한 억제환을 확인함으로써 상기 부분 정제된 물질이 박테리오신을 확인할 수 있었다.

식중독을 일으키는 병원성 균을 생물자원센터(KCTC)로부터 분양받아 사용하였다. 젓갈로

부터 분리한 100여종의 젓산균의 배양 상등액의 항균 활성을 확인 하기 위하여 플레이트 위에 NB(nutrient broth) 연한천배지(0.8% agar, *Bacillus cereus* 1%(v/v)) 25ml를 굳히고 살균된 땀으로 배지 상에 웰을 만들었다. 준비해 놓은 배지의 웰에 상기 유산균의 배양 상등액을 100  $\mu$ m씩 분주하여 지시균주(*Bacillus cereus*)의 최적 배양 온도에서 배양하여 NB 플레이트 상에 억제환 생성 여부를 관찰함으로써 항균활성을 갖는 균주를 선별하였고, 그 중 항균활성이 강한 균주를 선별하였다(Fig. 6). 한편, 상기 억제환이 항균성 단백질 혹은 펩타이드인 박테리옴에 의한 것임을 확인하기 위하여 단백질분해효소인 프로테이나아제 K [proteinase K (20 mg/ml)]를 처리하여 단백질성 또는 펩타이드성 여부를 확인하였다.

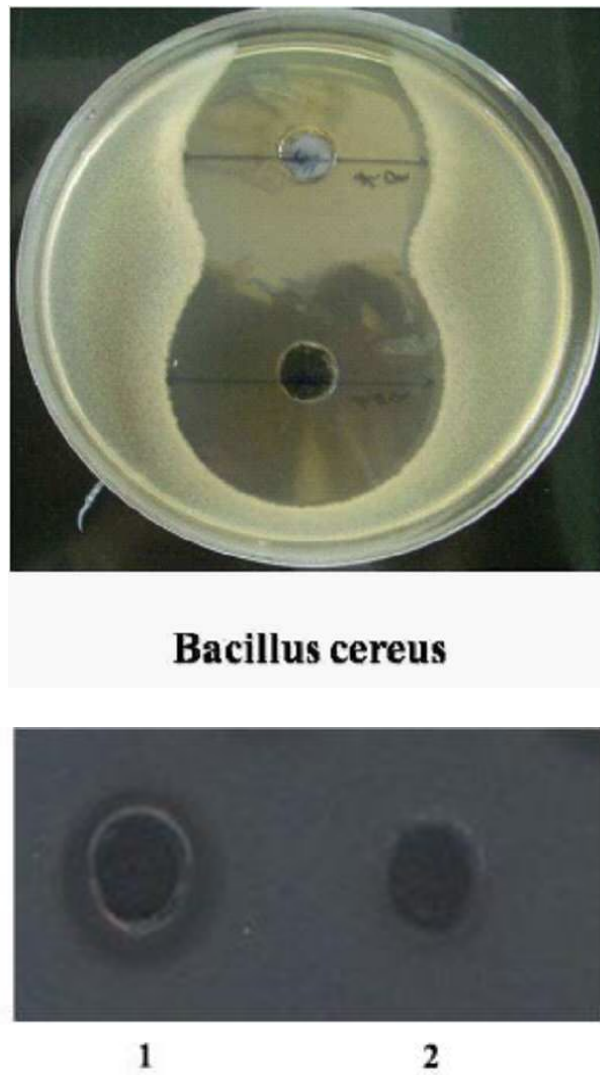


Fig. 6 *B. cereus*에 대한 *L. plantarum*의 항균활성 및 단백질 분해효소 처리



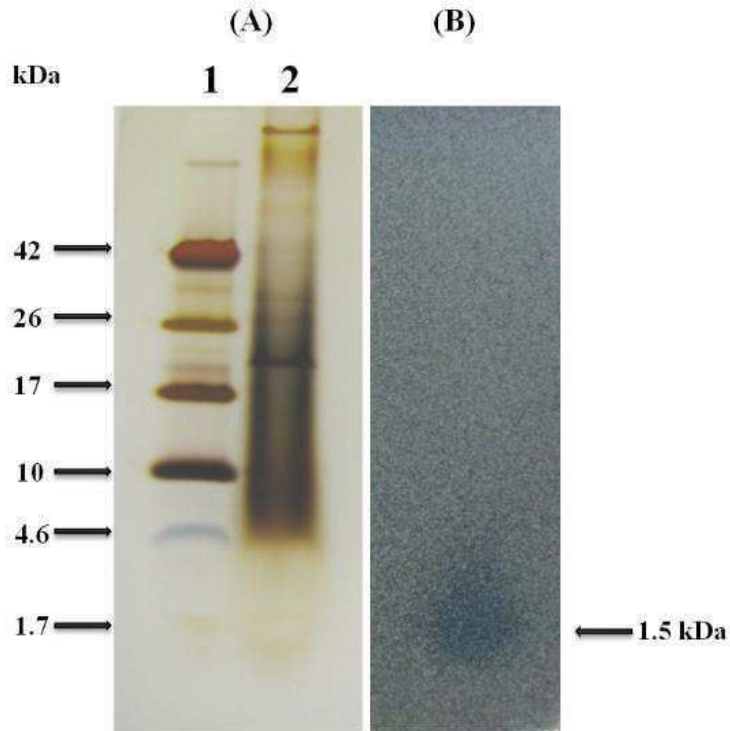


Fig. 7 SDS PAGE를 통한 항균활성 단백질 분자량 확인

다. 젓갈로부터 분리한 박테리옌 생산 젓산균의 분류학적 성질 및 유전학적 동정

선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Determinative bacteriology의 방법에 따라 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였으며, 최적 생육온도, 그람염색, 운동성, catalase test, CO<sub>2</sub> 생성 유무 및 API 50 CHI Kit(Bio-Merieux, France)를 이용하여 당 이용성을 확인하였고, 유전학적 동정을 위해서 16S rRNA의 염기서열을 분석하였다.

그 결과 Fig 7 ~ 9에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의해 분리된 균주는 간균으로서 포자를 형성하지 않고 운동성이 없었으며, 그람양성균으로서 카탈라제 및 옥시다제를 생산하지 않았다. 결과적으로 선별된 락토바실러스 플라타룸 SY99 균주는 락토바실러스 플라타룸과 99% 이상의 상동성을 가지는 것으로 확인 되었으며, 상기 락토바실러스 플라타룸 SY99 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2010.09.29자로 기탁하였다(기탁번호 KCTC 11766BP).

Table 12. *L. plantarum*의 생화학적 특성

특징	SY99 균주	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Gran/Shape	+ / R <sup>1)</sup>	+ / R
Spores	- <sup>1)</sup>	-
Motility	-	-
Growth in air	+	+
Growth anaerobically	+	+
Catalase	-	-
Oxidase	-	-
Glucose (acid)	+	+
O/F test	F <sup>3)</sup>	F
Gas from glucose	-	-
Growth at 15 °C	+	+
Growth at 45 °C	-	-
Voges-Proskauer test	-	-
Nitrate reduction	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-
Aesculin hydrolysis	+	+
Arginine hydrolysis	-	-
Carbohydrates, acid from: Amygdalin	+	+
L-arabinose	+	D <sup>2)</sup>
Cellobiose	+	+
Esculin	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Gluconate	+	+
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Mannitol	+	+
Mannose	+	+
Melezitose	+	D
Melibiose	+	+
Raffinose	+	+
Rhamnose	-	-
Ribose	+	+
Salicin	+	+
Sorbitol	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+
Xylose	-	D

1) 음성: -, 양성: +

2) D: different reactions in different strain.

3) O/F : Oxidation / Fermentation

Table 13. API kit을 이용한 *L. plantarum*의 생화학적 특성

API 50 CHL			
Control	- <sup>1)</sup>	Esculin	+
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-xylose	-	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	+
Methyl-B-D-Xylopyranoside	-	Melezitose	+
Galactose	+	Raffinose	+
Glucose	+	Starch	-
Fructose	+	Glycogen	-
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fructose	-
Sorbitol	+	L-Fructose	-
Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranoside	+	D-Arabitol	+
Methyl- $\alpha$ -D-Glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acethyl-Glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdalin	+	2-keto-Gluconate	-
Arbutin	+	5-keto-Gluconate	-

동정결과: *Lactobacillus plantarum* (99.9%)

1) API 50 CHL kit 동정, + : 양성, - : 음성

라. 락토바실러스 플라타룸 SY99가 생산하는 박테리오신의 특성

락토바실러스 플라타룸 SY99가 생산하는 박테리오신의 특성을 확인하기 위하여 pH, 열, 유기용매, 가수 분해효소 처리 조건 하에서 안정성을 확인하였다.

### (1) pH 안정성

락토바실러스 플라타룸 SY99가 생산하는 박테리오신의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH 3.0 (0.1 M citrate buffer), pH 5.0 (0.1 M acetate buffer), pH 7.0 (0.1 M phosphate buffer), pH 9.0 (0.1 M borate buffer) 및 pH 11.0 (0.1 M carbonate buffer)의 완충용액과 확보된 박테리오신 용액을 1:1의 비율로 혼합하여 24시간 상온(25°C)에서 반응시킨 후 병원성균인 바실러스 세레우스를 접종한 고체배지에 락토바실러스 플라타룸 SY99의 배양 상등액을 pH별로 처리한 샘플을 분주하여 상기 병원성 균에 대해 항균활성이 관찰되는지를 확인하였다. 대조군으로 pH 처리를 하지 않은 배양 상등액을 사용하였다. 항균활성의 역가는 activity unit(AU)/mL로 표기하였고 상등액을 순차적으로 2배씩 희석하여 억제환을 형성하는 최대 희석배수의 역수를 취하고, 이 값에 1ml에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 나타내었다. 그 결과 Table 14에 나타난 바와 같이, 모든 샘플에서 항균활성이 관찰되었다. 상기 결과를 근거로 락토바실러스 플라타룸 SY99가 생산하는 박테리오신은 넓은 범위의 pH에 걸쳐 높은 안정성을 나타내었다.

### (2) 열 안정성

락토바실러스 플라타룸 SY99가 생산하는 박테리오신의 열에 대한 안정성의 조사는 박테리오신 용액을 20°C, 40°C, 60°C, 80°C, 100°C 및 121°C에서 각각 30분 또는 60분간 열처리 한 후 병원성균인 바실러스 세레우스를 접종한 고체배지에 락토바실러스 플라타룸 SY99의 배양 상등액을 온도별로 열처리한 샘플을 분주하여 상기 병원성 균에 대해 항균활성이 관찰되는지를 확인함으로써 수행하였다. 대조군으로 열처리를 하지 않은 배양 상등액을 사용하였다. 항균활성의 역가는 activity unit(AU)/mL로 표기하였고 상등액을 순차적으로 2배씩 희석하여 억제환을 형성하는 최대 희석배수의 역수를 취하고, 이 값에 1ml에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 나타내었다.

그 결과 Table 14에 나타난 바와 같이 모든 샘플에서 항균활성이 관찰되었다. 상기 결과를 근거로 락토바실러스 플라타룸 SY99가 생산하는 박테리오신은 121°C에서도 항균활성이 일정하게 나타나는 바, 열 안정성이 높다는 것을 알 수 있었다.

### (3) 유기용매 안정성

락토바실러스 플라타룸 SY99가 생산하는 박테리오신의 유기용매에 대한 내성 실험은 chloroform, isopropanol, hexane, ethanol, acetone 및 acetonitrile 등을 제조된 박테리오신 용액과 같은 부피 비율로 혼합(1:1)하여 상온(25°C)에서 1시간 배양한 후, 병원성균인 바실러스 세레우스를 접종한 고체배지에 락토바실러스 플라타룸 SY99의 배양 상등액을 유기용매별로 처리한 샘플을 분주하여 상기 병원성균에 대해 항균활성이 관찰되는지를 확인함으로써 수행하였다. 대조군으로 유기용매 처리를 하지 않은 배양 상등액을 사용하였다. 항균활성의 역가는 activity unit(AU)/mL로 표기하였고 상등액을 순차적으로 2배씩 희석하여 억제환을 형성하는 최대 희석배수의 역수를 취하고, 이 값에 1ml에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 나타내

었다.

그 결과 Table 14에 나타난 바와 같이 모든 샘플에서 항균활성이 관찰되었다. 상기 결과를 근거로 락토바실러스 플란타룸 SY99가 생산하는 박테리오신은 각종 유기용매에 대해서 항균활성이 나타내어 유기용매에도 안정함을 알 수 있었다.

#### (4) 가수분해효소 안정성

락토바실러스 플란타룸 SY99가 생산하는 박테리오신의 각종 가수분해효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 단백질, 탄수화물 등의 가수분해효소를 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 제조사의 지침에 따라 사용하였다. Trypsin (13,500 U/mg), protease (1.0 U/mg)는 50 mM tris-HCl 완충액 (pH 7.5),  $\alpha$ -chymotrypsin (83.9 U/mg)은 50 mM tris-HCl 완충액 (pH 8.0), pepsin (800~2500 U/mg)은 10 mM citrate 완충액 (pH 6.0),  $\alpha$ -amylase (519 U/mg)는 0.1 M sodium phosphate 완충액 (pH 7.0), subtilisin A (12 U/mg)와 proteinase K (30 U/mg)는 0.01 M tris-HCl 완충액 (pH 7.9), 0.005M EDTA 및 0.5% SDS 완충액으로 20 mg/ml이 되도록 준비하였다. 배양 상등액에 준비된 각종 효소를 2 mg/ml의 농도로 첨가하고 37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. proteinase K는 45°C에서 12시간 반응시켰다. 남아있는 박테리오신 활성은 바실러스 세레우스 KCTC 3624에 대한 억제환의 생성 유무로 확인하였다. 또한 동일한 조건에서 효소액만을 처리하지 않은 것을 음성 대조구로 사용하였다.

그 결과 Table 14에 나타난 바와 같이 락토바실러스 플란타룸 SY99가 생산하는 박테리오신은 proteinase K에 의해서만 항균활성이 완전히 소실되었으며 trypsin, chymotrypsin, pepsin, subtilisin A 및 protease에 의해서는 항균활성이 소실되지 않음으로써 기존에 알려진 단백질성 박테리오신과는 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

Table 14. 락토바실러스 플란타룸 SY99가 생산하는 박테리오신의 특성

처리	activity unit (AU/ml)
대조군	264
열처리	
20 °C, 30min	264
20 °C, 60min	264
40 °C, 30min	264
40 °C, 60min	264
60 °C, 30min	264
60 °C, 60min	264
80 °C, 30min	264
80 °C, 60min	264
100 °C, 30min	264
100 °C, 60min	264
121 °C, 30min	264
121 °C, 60min	264
용매 <sup>1)</sup>	
Hexane	264
Chloroform	264
Acetonitrile	132
Ethanol	132
Acetone	132
Isopropanol	132
pH <sup>2)</sup>	
3	264
5	264
7	132
9	132
11	132
효소	
Control <sup>3)</sup>	+
Proteinase K	-
Trypsin	+
Chymotrypsin	+
Pepsin	+
$\alpha$ -Amylase	+
Subtilisin A	+
Protease	+

1) 최종농도 50%(w/v)

2) 박테리오신 샘플에 각 pH의 완충용액 처리 (25°C, 24시간)

3) 효소 비처리군

억제환: + : 양성, - : 음성

최종농도 2 mg/ml로 배양 상등액을 효소액과 혼합

마. 락토바실러스 플란타룸 SY99의 병원성 균에 대한 항균활성

락토바실러스 플란타룸 SY99 배양 상등액을 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, 한국생명공학연구원 생물자원센터, KCTC 1928)과 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*, 한국생명공학연구원 생물자원센터 KCTC 3624) 등 Table 15에 나타난 병원성 균주가 접종된 고체배지에 분주하고, 각 지시균주의 최적 생육 온도에서 24시간 이상 배양하여 억제환의 생성 여부를 확인하였다. 박테리오신 역가는 배양 상등액을 순차적으로 2배씩 희석하여 억제환을 형성하는 최대 희석배수의 역수를 취하고, 이 값에 1ml에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 bacteriocin activity unit (AU/ml)으로 나타내었다.

그 결과 Table. 15에 나타난 바와 같이, 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enteric*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코쿠스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 시겔라 손네이(*Shigella sonnei*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 및 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*)에 대하여 성장저해 효과가 있음을 확인하였다.

Table. 15 *L. plantarum*의 항균활성 스펙트럼

지시균주	항균 활성	
	박테리오신	억제환 지름
	activity unit (AU/ml)	(mm)
<i>Escherichia coli</i> CFT073 ATCC 700928	66	22
<i>Erwinia rhapontici</i> KCTC 2567	-	-
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	264	45
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3710	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	132	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 3958	132	31
<i>Salmonella enterica</i> KCTC 1925	132	27
<i>Salmonella enterica</i> KCTC 1926	132	29
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2517	132	24
<i>Shigella sonnei</i> KCTC 2518	66	22

## 2. 김치로부터 분리된 *Lactococcus lactis* ET45가 생산하는 박테리오신의 특성

유산균 (lactic acid bacteria)은 자연계에 널리 존재하며, 탄수화물을 이용하여 젖산을 생성하는 미생물로서 유제품, 육류, 채소 등의 발효가공에 종균으로 널리 사용되고 있으며, 식품의 보존성 향상, 향기 등의 관능적 특성과 영양 가치에도 기여하고 있다(48,56). 이러한 유산균이 생산하는 박테리오신은 세포표면의 특정 혹은 비특정 수용체에 부착하여 항균작용을 나타내며 1차 표적인 세포질 막의 투과성을 변화시켜 막 수송을 방해하거나 PMF(proton motive force)에 영향을 줌으로써 에너지 생산과 단백질이나 핵산의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다(27).

박테리오신은 리보솜에서 합성되는 단백질 또는 펩타이드 계통의 항균성물질로서 특정 생육 환경에서 박테리오신 생산균주들이 비슷한 종류의 다른 균의 생육을 저해할 목적으로 생산 및 분비하는 것으로 알려져 있다(40,42,43).

박테리오신은 인체내의 단백질 가수분해효소들에 의해 쉽게 분해되어, 잔류성이 없기 때문에 안전하다. 따라서, 지난 수 십 년 동안 신규 박테리오신의 탐색, 특성분석, 작용 기작, 구조 유전자 클로닝 및 박테리오신 구조 변경을 통한 항균효과 개선, 대량 생산 기술 개발과 같은 식품에서의 응용에 필요한 연구들이 지속적으로 이루어 지고 있다(33,55).

지금까지 밝혀진 박테리오신 중에서 식품보존제로서 산업적으로 실용화되고 있는 박테리오신은 Mattick and Hirsch가 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*균주에서 발견한 nisin이다(50). Nisin은 자체 독성이 없고, 장내세균이나 소화효소에 의해 쉽게 분해되고, 생리적 pH 범위 내에서 안정하며, 독성 시험 결과에 의해 안전한 물질임이 입증되었다, 또한 미국 FDA(food and drug administration)로부터 GRAS(generally recognized as safe)로 인정되어 현재 약 50개국에서 가공치즈, 야채, 과일, 통조림, 발효유 제품, 육류가공품 등에 식품보존제로서 사용되고 있다(34,36,39,58).

최근 소비자들의 건강 및 식품 안정성에 대한 관심이 증가되면서 식품 중의 유해균 증식을 억제할 목적으로 식품에 첨가되는 인공합성 식품보존제 보다는 천연 식품보존제를 선호하고 경향이 높다. 현재 천연 식품보존제로 개발이 유망한 화합물들 중에는 유산균이 생산하는 박테리오신이 있으며(29,46,47), 우리나라의 경우 김치, 장류 등과 같이 전통적으로 자연 미생물을 이용한 발효식품이 풍부할 뿐만 아니라 이들 식품이 국민건강을 좌우하는 기초식품이라고 할 수 있다. 특히, 전통발효식품 중 김치는 밥과 더불어 한국인의 식생활에 있어서 중요한 위치를 차지하고 있는 음식으로 배추, 무 등의 여러 가지 채소류를 소금에 절인 다른 여러 가지 부재료를 혼합하여 발효시켜 만든 전통발효식품이다(28,45) 이러한 김치는 숙성과정 중 미생물 상호작용에 의하여 자연적으로 발효되는 식품으로서, 이러한 김치 중에는 유산균을 많이 포함하고 있다(60).

본 연구에서는 전통발효식품인 김치로부터 식품유해균중의 하나인 *Bacillus cereus*에 대한 항균활성이 우수한 유산균을 분리 및 동정하였으며, 분리균주인 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신을 부분 정제하여 저해범위와 안정성 그리고 분자량을 조사하였다.



#### 가. 김치로부터 유산균 분리 및 동정

본 연구에 사용된 항균활성 물질 생산균주는 가정용 및 시판용 김치 등으로부터 분리하였으며, 항균활성의 측정에 사용된 감수성균주는 미생물자원 센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받은 표준균주를 사용하였다. 유산균 배양배지는 MRS Broth (Difco, U.S.A)와 세균의 배양은 nutrient broth (NB, Difco, U.S.A.)를 이용하여 배양하였다. 각종 김치시료를 단계적으로 희석하여 MRS 고체배지에 도말하였다. 30°C에서 48시간 배양하여 자란 colony 중에서 모양, 크기에 따라 상이한 균주를 임의적으로 선택한 뒤 MRS 고체배지에서 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 원심분리(15,000 rpm, 25 min, 4°C) 및 membrane filter (0.2  $\mu$ m, Dismic, Advantec)로써 여과 멸균하여, 배양상등액을 회수하였다. 25 ml NB soft agar (0.8%, w/v)에 감수성 균주 (*B.cereus*KCTC3624,  $1 \times 10^6$ CFU)를 같이 혼합하여 고체배지 상에서 저해환 형성을 조사하였다. 저해환을 형성하는 분리 균주를 선별하여 박테리오신 실험에 사용하였다. 김치 시료로부터 형태학적인 특성에 따라 상이한 200균주의 유산균을 분리 하였으며, well diffusion method를 이용하여 *B. cereus* KCTC 3624에 대한 항균활성을 측정하였다. *B.cereus*의 생육 저해활성이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선택하여 ET45로 명명하고 본 실험에 사용하였다. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 따라 *L. lactis* 표준균주와 생화학적 특성 비교 분석 결과, mannitol과 raffinose 이용 여부 및 arginine hydrolysis 제외한 대부분은 표준균주와 동일한 특성을 나타냄을 확인하였다(Table 16). 최종적으로, NCBI의 BLAST program을 이용하여 ET45의 16S rRNA 염기서열에 대한 상동성을 분석한 결과, 99%의 신뢰도로 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*로 동정되었다

#### 나. 배양 조건에 따른 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신 특성 분석

분리균주 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신을 부분정제하기 위하여 200 ml의 MRS 액체배지에서 30°C에서 12시간 동안 중 배양한 후, MRS 배지 2 L에 1%(v/v)를 접종하여 30°C에서 24시간 분 배양을 수행하였다. 배양액을 원심분리(15,000 rpm, 30 min, 4°C) 및 0.2  $\mu$ m 여과막을 이용하여 제균 하였다. 제균한 상등액과 차가운 아세톤 용매를 1:3의 비율로 혼합하여 -80°C에서 10분간 방치한 후 원심분리 및 감압 농축하였다. 농축된 시료를 동결 건조하여 -70°C에서 보관하면서 필요 시 3차 증류수에 용해하여 추후 실험의 시료로 사용하였다. 분리균주 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신의 특성을 확인하기 위하여 pH, 열, 유기용매, 가수분해 효소처리 조건하에서 안정성을 확인하였다. pH에 대한 박테리오신의 안정성을 조사하기 위하여 pH 3.0 (0.1 M citrate buffer), pH 5.0 (0.1 M acetate buffer), pH 7.0 (0.1 M phosphate buffer), pH 9.0 (0.1 M borate buffer) 및 pH 11.0 (0.1 M carbonate buffer)의 완충용액과 확보된 박테리오신 용액을 1:1의 비율로 혼합하여 상온 (25°C)에서 24시간 방치 한 후 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정하였다. 열에 대한 안정성의 조사는 제조된 박테리오신 용액을 40°C, 60°C, 80°C, 100°C 및 121°C에서 각각 30분 또는 60분간 열처리 한 후 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정하였다. 유기용매에 대한 내성 실험은 chloroform, isopropanol, hexane, ethanol, acetone 및 acetonitrile 등을 제조된 박테리오신 용액과 같은 부피 비율로 혼합 (1:1)하여 상온 (25°C)에서 1시간 방치한 후, 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정함으로써 여러 유기용매에 대한 박테리오신의 안정성을 조사하였다. 또한 각각의 buffer에 녹여 최종 농도 2 mg/ml로 맞춘 trypsin (13,500 U/mg, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5), protease (1.0 U/mg, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5),  $\alpha$ -chymotrypsin (83.9 U/mg, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), pepsin (800~2500

U/mg, 10 mM citrate, pH 6.0),  $\alpha$ -amylase (519 U/mg, 0.1 M sodium phosphate, pH 7.0), subtilisin A (12 U/mg, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 )에 그리고 proteinase K (30 U/mg, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.9, 0.005M EDTA, 0.5% SDS)를 배양상등액과 37°C에서 3시간 반응 시킨 다음 80°C에서 2분간 가열하여 효소를 불활성화 시켰다. 그리고, proteinase K는 45°C에서 12시간 반응시켰다. 박테리오신 활성은 *B. cereus* KCTC 3624에 대한 저해환의 생성 유무로 확인하였다. 또한 동일한 조건에서 효소액만을 처리하지 않은 것을 대조구로 사용하였다.

분리균주 *L. lactis* ET45가 생산하는 항균활성 물질의 단백질성 여부를 확인하기 위하여 용액에 각종 단백질분해효소를 2mg/ml의 농도가 되도록 첨가하여 반응시킨 후 잔존활성을 측정된 결과, proteinase K, trypsin, chymotrypsin, 및 subtilisin A에 의해서는 항균활성이 소실되었으며, pepsin, protease,  $\alpha$ -amylase에 의해서는 항균활성이 소실되지 않았다(Table. 16). 대부분의 박테리오신은 단백질이거나 단백질성이기 때문에 단백질 분해효소에 의해 분해되는데 ET45가 생산하는 박테리오신은 pepsin, protease에 대해서 안정한 성질을 나타내었다. 그리고  $\alpha$ -amylase는 활성에 전혀 영향을 주지 않는 것으로 보아 탄수화물 부분이 박테리오신 분자 내에는 없거나 활성과는 무관한 것으로 생각된다. *Lactococcus* sp. J-105가 생산하는 박테리오신의 경우에는 peptide분해효소 중 pepsin에 의해서만 항균활성이 소실된다고 하였으며(18), *L. lactis* WNC20이 생산하는 박테리오신은 papain, pepsin, trypsin, lipase,  $\alpha$ -amylase에 의해서는 항균활성이 영향을 받지 않지만 proteinase K,  $\alpha$ -chymotrypsin에 의해서 항균활성이 소실된다고 하였다(26). 또한 *L. lactis* NK34가 생산하는 박테리오신의 경우도 비교적 peptide 분해효소에 비교적 안정하였다. pH에 대한 안정성 여부를 조사하기 위하여 부분 정제된 항균물질 용액에 완충용액을 가하여 pH를 조절한 뒤 잔존활성을 측정된 결과, 분리 균주가 생산하는 박테리오신은 pH 3.0-5.0에서 어떠한 활성의 소실없이 안정하였고 그 밖의 범위에서는 점차 활성이 감소하는 경향을 나타내었으나 그 활성이 완전하게 소실되지는 않았다(Table 17). Choi 등이 보고한 *L. Lactis* YH-10가 생산하는 박테리오신의 경우 pH 2.0-11.0까지 넓은 범위에서도 안정하다고 보고하였다(30). 반면 *L. lactis* WNC 20가 생산하는 박테리오신의 경우 pH 2.0-7.0까지는 안정하였으나 pH 8.0-10.0에서는 박테리오신 활성이 불안정하고 보고된 바 있다(52) 따라서, 본 연구에서 선발된 박테리오신은 다른 연구자들에 의해 보고된 박테리오신들에 비해 비교적 pH 안정성이 우수한 것으로 나타났다.

Table 16 Morphological and biochemical characteristics of strain ET45 from *Kimchi*.

Characteristics	Strain ET45	<i>Lactococcus lactis subsplactis</i>
Gram stain/Shape	+ / C <sup>1)</sup>	+ / C
Spores	- <sup>2)</sup>	-
Motility	-	-
Growth in air	+	+
Growth anaerobically	+	+
Catalase	-	-
Oxidase	-	-
Glucose (acid)	+	+
O/F <sup>3)</sup> test	F	F
Growth at 40 °C	+	+
Growth with 4% NaCl	+	+
Arginine hydrolysis	D <sup>4)</sup>	+
Carbohydrates, acid from		
Lactose	+	+
Mannitol	W <sup>5)</sup>	-
Raffinose	D	-

1) C: Coccus.

2) Negative: -, positive: +

3) O/F: Oxidation / Fermentation

4) D: Different reactions in different strain.

5) W: Weak reaction.

Table 17. Stability of bacteriocin against various treatments.

Treatment	Residual activity unit (AU/ml)
Control	160
Heat treatment	
40 °C, 30min	160
40 °C, 60min	160
60 °C, 30min	160
60 °C, 60min	160
80 °C, 30min	160
80 °C, 60min	160
100 °C, 30min	160
100 °C, 60min	160
121 °C, 30min	160
121 °C, 60min	160
Solvents <sup>1)</sup>	
Hexane	160
Chloroform	160
Acetonitrile	160
Ethanol	160
Acetone	160
Isopropanol	160
pH <sup>2)</sup>	
3	160
5	160
7	80
9	80
11	80

1) Final concentration of solvent was 50% (v/v)

2) No pH treatment; 160AU/ml, Bacteriocin samples were treated with buffers at each pH, 25 °C for 24 h.

일반적으로 각종 유산균이 생산하는 박테리오신의 열안정성은 그 종류에 따라 상이한 것으로 알려져 있는데 Noonpakdee 등이 보고한 *L. lactis* WNC 20 균주가 생산하는 박테리오신의 경우, 121℃, 15분 열처리시에도 그 항균활성이 안정하였다고 보고되었으나(52), *L.Lactis*YH-10가 생산하는 박테리오신의 경우 100℃, 60분간 열 처리시 약 50%의 항균활성을 나타낸다고 보고하였다(30). 본 연구에서 분리한 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신은 40℃-121℃에서 열처리시에도 어떠한 활성의 소실없이 매우 안정하였다(Table 16). 그러나 박테리오신의 구조를 포함한 분자 생물학적 특성을 알기 위해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. 유기용매에 대한 안정성의 경우 hexane, chloroform, acetone, acetonitrile, isopropanol, ethanol을 최종 농도 50% (v/v)로 처리할 경우 항균활성에 변화가 없는 것으로 보아 유기 용매에 매우 안정함을 확인 할 수 있었다(Table 17).

#### 다. *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신의 항균활성

분리균주 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신의 항균범위를 알아보기 위해 식품유래 병원성균 및 다양한 표준균주 *L. mesenteroides* KCTC 3100, *L.carnosum* KCTC3525, *L.lactis* KCTC3528, *L.plantarum* KCTC3099, *L.plantarum* KCTC3104, *L.confusus* KCTC3499, *L.parabuchneri* KCTC3503, *L.viridescens* KCTC3504, *P.dextrinicus* KCTC3506, *P.pentosaceus* KCTC3507, *E.faecium* KCTC3095, *L.monocytogenes* KCTC3444, *B.cereus* KCTC1013, *B.cereus* KCTC1014, *B.cereus* KCTC3624, *S.aureus*209 KCTC1916, *S.aureus* R209 KCTC1928, *S.typhimurium* KCTC1926, *E.coli* KCTC1924, *E.coli* KCTC2191 및 *C. albicans* KCTC 1940 등 총 21 개의 표준균주를 이용하여 항균 활성을 확인한 결과, Table 18과 같이 *L. monocytogenes* KCTC 3444, *S.aureus*209 KCTC1916 *S.aureus* R209 KCTC1928, *S.typhimurium* KCTC1926, *E.coli* KCTC1924, *E.coli* KCTC2191 및 *C. albicans* KCTC 1940을 제외한 다양한 미생물에 대한 항균활성을 나타내었다. 특히 발효식품의 주요 식품유해균으로 알려진 *B. cereus*에 대해서는 강한 항균활성을 나타냄으로써 향후 식품산업의 천연식품보존제로서의 활용 가능성도 기대할 수 있을 것이다.

Table 18. Stability of bacteriocin against various treatments.

Treatment	Residual activity unit (AU/ml)
Control	160
<b>Heat treatment</b>	
40 °C, 30min	160
40 °C, 60min	160
60 °C, 30min	160
60 °C, 60min	160
80 °C, 30min	160
80 °C, 60min	160
100 °C, 30min	160
100 °C, 60min	160
121 °C, 30min	160
121 °C, 60min	160
<b>Solvents<sup>1)</sup></b>	
Hexane	160
Chloroform	160
Acetonitrile	160
Ethanol	160
Acetone	160
Isopropanol	160
<b>pH<sup>2)</sup></b>	
3	160
5	160
7	80
9	80
11	80

1) Final concentration of solvent was 50% (v/v)

2) No pH treatment; 160AU/ml, Bacteriocin samples were treated with buffers at each pH, 25°C for 24 h.

Table 19. Antibacterial spectrum of bacteriocin produced by *L.lactis* ET45.

Indicator	Antimicrobial activity
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	+
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC 3525	+
<i>Leuconostoc lactis</i> KCTC 3528	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3099	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	+
<i>Lactobacillus confusus</i> KCTC 3499	+
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> KCTC 3503	+
<i>Lactobacillus viridescens</i> KCTC 3504	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC 3101	-
<i>Pediococcus dextrinicus</i> KCTC 3506	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC 3507	+
<i>Enterococcus faecium</i> KCTC 3095	+
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3444	-
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1013	+
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1014	+
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 KCTC 1916	-
<i>Staphylococcus aureus</i> R209 KCTC 1928	-
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1926	-
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1924	-
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2191	-
<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	-

Degree of clear zone by growth inhibition; +: positive, - : negative

Table 20 Effect of various enzyme treatments on the bacteriocin activity of the bacteriocin partially purified from by *L.lactis*ET45.

Treatment	Residual bacteriocin activity
Control <sup>1)</sup>	+
Proteinase K	-
Trypsin	-
Chymotrypsin	-
Pepsin	+
$\alpha$ -Amylase	+
Subtilisin A	-
Protease	+

1) Non enzyme treated sample

*B. cereus* KCTC 3624 was used as an indicator.

Degree of clear zone by growth inhibition; +: positive, - : negative

Culture supernatant was mixed with enzyme solutions at a final concentration of 2 mg/ml.

#### 라. Tricine-SDS-PAGE

부분 정제한 박테리오신 시료로부터 항균활성을 나타내는 물질의 분자량을 Tricine-SDS-PAGE 방법을 통하여 확인하였다(54). 정제한 박테리오신 용액 30  $\mu$ l Tricine-SDS-PAGE sample buffer 30  $\mu$ l을 vortex mix 및 spin down하여 준비하였다. 5% stacking gel과 16% separating gel을 조제한 후 전기영동 장치에 장착 후 전개 완충용액 (running buffer)을 붓고, gel의 well에 SDS-PAGE standards marker와 준비된 시료 30  $\mu$ l을 loading한 뒤 40 mA, 2시간 동안 전기영동을 수행하였다. Silver stain방법을 통하여 gel을 염색하였다. 단백질 분자량 측정을 위한 표준물질로는 fermentas사의 Spectra™ MulticolorLowRangeProteinLadderSM1861을 사용하였다. 나머지 하나의 gel은 30분마다 교체하면서 2시간 30분 세척하였다. 세척한 gel을 gel overlay assay 방법을 이용하여 plate에 올려 UV로 10분간 건조시킨 후 감수성균주 (*B.cereus* KCTC 3624)가 접종된 0.8% NB agar를 중층하여 30°C에서 24시간 동안 배양하여 항균 활성을 확인하였다. 부분 정제된 박테리오신의 분자량을 추정하기 위하여 전기영동을 실시하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이, 부분 정제된 박테리오신을 분자량 표준시료와 비교한 결과 약 3.4 kDa의 분자량을 가지는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 전기영동한 gel위에 감수성균주를 접종한 NB soft agar를 중층하여



박테리오신의 활성을 조사한 결과 위의 band와 일치하는 곳에 강한 억제환이 생겨 박테리오신임을 확인 할 수 있었다. 본 분리균주가 생산하는 박테리오신은 유산균이 생산하는 박테리오신 중 열에 안정하며, 분자량이 5kDa이하의 박테리오신이 속하는 Class I에 해당하는 박테리오신으로 추정되며, 생산균주가 *Lactococcus* sp이며 분자량이 3.3kDa 가량인 박테리오신이 *L. lactis*의 일부 균주가 생산하는 Nisin과 비슷한 것으로 생각된다.

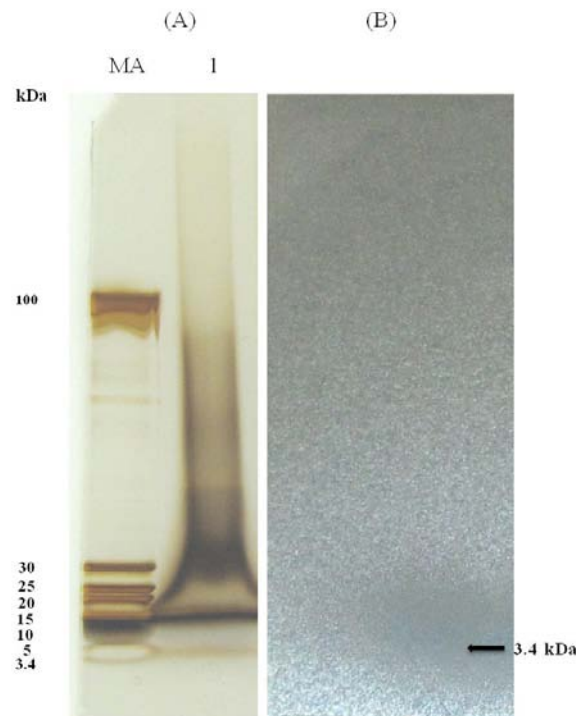


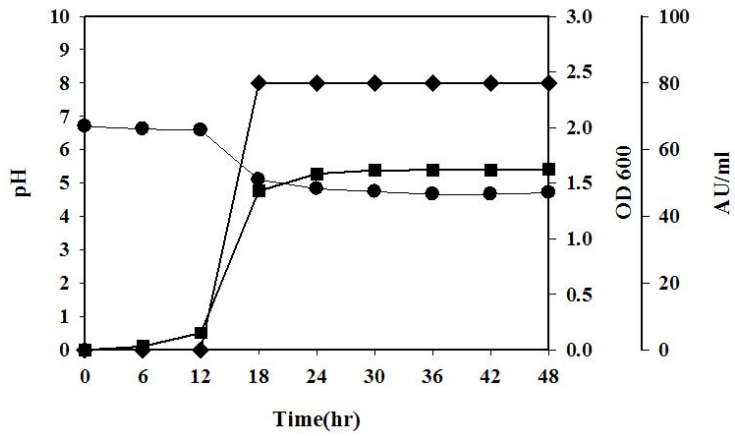
Figure 8. Tricine SDS-PAGE for detection of antibacterial activity of the partially purified bacteriocin from *L.lactis*ET45.

#### 라. 배양 조건에 따른 박테리오신 활성

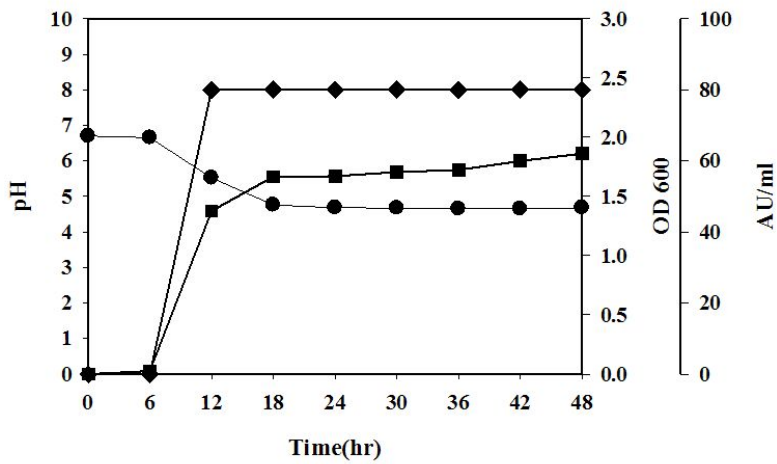
박테리오신의 항균활성에 대한 배양온도의 영향을 알아보기 위하여 전 배양된 균주를 MRS broth 배지에 1.0%(v/v)되게 접종한 다음 25°C, 30°C, 및 37°C 에서 48시간 동안 배양하는 동안 배양액으로부터 상등액을 회수하여 박테리오신 활성과 흡광도 (OD 600)를 측정하여 균의 생육 곡선과 최대 항균활성을 나타내는 배양 온도를 결정하였다. 또한 박테리오신의 항균 활성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 MRS 액체배지를 1 N HCl과 1 M NaOH으로 pH 3.5-9.5으로 조정하고, 난 후 전 배양한 균주를 접종하고 최적의 온도에서 배양 한 후 배양액으로부터 상등액을 회수하여 박테리오신 활성과 흡광도 (OD 600)를 측정하여 균의 생육곡선과 최대 항균활성을 나타내는 배지의 pH를 결정하였다. 분리균주 *L. lactis* ET45의 생육 및 박테리오신 생산에 대한 최적 배양온도를 결정하기 위하여, 배양 온도를 25°C, 30°C, 37°C로 하여 48시간 진탕 배양하였다. 그 결과를 Fig. 19에 나타내었다. 25°C, 30°C에서 배양하였을 때에는 18시간 이후부터 항균활성이 나타나기 시작하여 48시간 때까지 일정한 활성을 유지하였다. 37°C에서는 12시간부터 항균활성이 나타나기 시작하여 49시간 때까지 일정한 활성을 유지하였지만, 25°C, 30°C에서의 박테리오신 최대역가의 약 50%수준을 나타내었다.

Moonchai 등이 보고한 *L. lactis* C7균주가 생산하는 박테리오신의 경우 22°C가 최적 온도인 것으로 나타나 비교적 낮은 온도에서 박테리오신 최대활성을 나타내었다고 보고하였고(25), *L. lactis* YH-10이 생산하는 박테리오신의 경우에는 25°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다(4). 여러 결과와 비교해 볼 때 박테리오신의 종류에 따라 최적 배양온도가 상이하였다. 이렇게 차이가 나는 이유는 박테리오신의 분자량과 구성성분 및 구조 등 생화학적 특성의 다르기 때문인 것으로 알려져 있다(49). 분리균주 *L. lactis* ET45의 생육 및 박테리오신 생산에 대한 최적의 초기 pH를 결정하기 위하여, MRS를 기본배지로 하여 배지의 초기 pH를 각각 pH 3.5-9.5로 조절하고, 30°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 균체의 증식은 pH 9.5에서 가장 높았으며, 다음으로 pH 8.5, 7.5순으로 나타났다. 박테리오신의 활성은 pH 7.5에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 10). 따라서 *L. lactis* ET45의 박테리오신의 최대 활성은 MRS 액체배지 초기 pH 7.5으로 조정하여 30°C에서 18-24시간 배양하는 동안 나타나는 것으로 확인하였다.

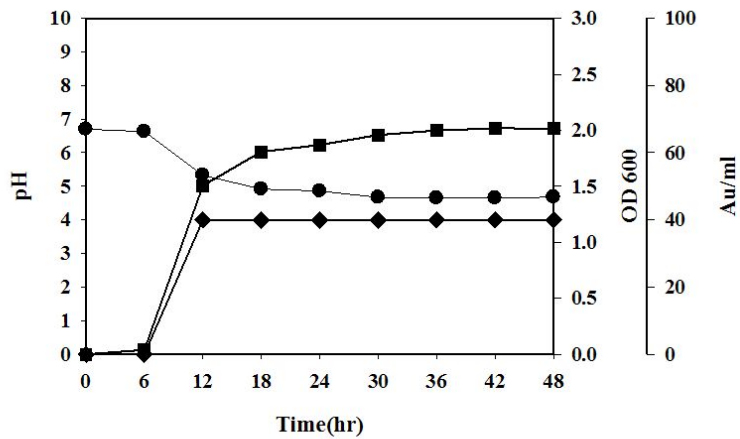
Parante 등이 보고한 *L. Lactis* 140NWC균주가 생산하는 박테리오신의 경우에는 pH 5.5에서 최대 활성을 가진다고 보고하여 본 실험의 균주와는 다소 차이가 있었다(53). 또한, *L. Lactis* A164가 생산하는 박테리오신은 pH 6.0에서 가장 높은 활성이 나타났다고 하였고(31), *Lactococcus*.sp. J-105이 생산하는 박테리오신 활성은 pH 8.0 부근에서 가장 높았다고 보고하였다(34). 이와 같이 박테리오신을 생산하는 균주들의 최적 pH는 세균마다 다양하게 나타나는 것으로 보고 되어있다.



(A)



(B)



(C)

Fig. 9. Cell growth and bacteriocin production of *L. lactis* ET45 at different temperatures. One milliliter of culture was sampled at 6 h interval. Optical density at 600 nm was measured and the rest was centrifuged to recover supernatant from cell culture. The symbols: -■- cell growth; -◆-bacteriocin activity unit (AU/ml); -●-final pH. The temperatures: (A) 25°C; (B) 30°C; (C) 37°C

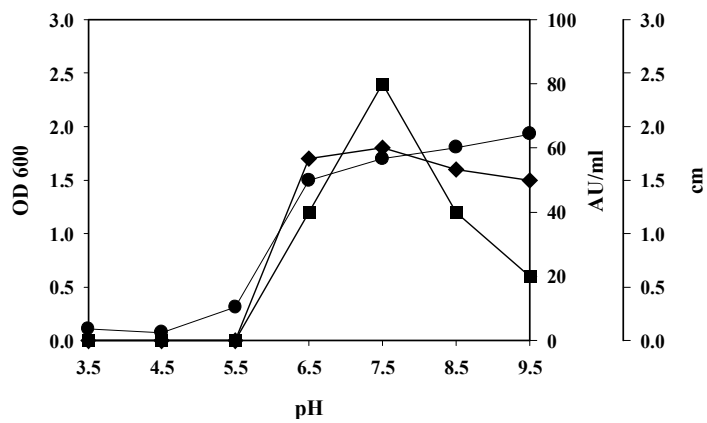


Figure 10. Effects of pH on cell growth and bacteriocin production of *L. lactis*.

One milliliter of culture was sampled. Optical density at 600 nm was measured and the rest was centrifuged to recover supernatant from cell culture.

The symbols: ●- cell growth; ◆- inhibition activity; ■-bacteriocin activity unit (AU/ml).

### 3. *L. plantarum* *L.plantarum* SY99 첨가에 의한 메주 발효 균집 변화

메주성형을 위하여 2kg의 메주콩은 수돗물로 2회 세척한 후 콩의 무게가 2배가 될 때까지 수침한 후, 두껍을 덮지 않고 100℃에서 껍질이 벗겨질 정도로 4시간 이상 끓였다. 다 익은 콩은 체에 걸러 물기를 뺀 후 으깨어 0.7kg의 4개의 덩어리로 만들어 메주 성형을 준비하였다. 메주 성형에 첨가되는 *Bacillus cereus* KCTC 3624는 LB broth에 접종하여 18시간 교반하여 배양하였고 *Lactobacillus plantarum* SY99는 MRS broth에 접종하여 37℃ 항온기에서 24시간 이상 정치 배양하였다. 4개의 덩어리는 각각 20 ml의 *B. cereus* 첨가하였고, 두번째에는 20 ml의 *L. plantarum* SY99를 첨가하였으며, 세번째에는 20 ml의 *B. cereus*와 20 ml의 *L. plantarum* SY99를 모두 첨가하였다. 마지막 덩어리는 아무것도 첨가하지 않은 상태로 5cm x 5cm x 10cm 크기의 메주로 성형하였다. 성형한 메주는 서늘한 그늘에서 2주 동안 말린 다음 짚을 깔아주어 자연 발효하였다. 시료 채취는 1주 2주 4주 그리고 8주된 발효 메주를 각각 하나씩 분석하였다. 메주의 겉표면 시료와 안쪽 시료로 나누어 plate assay를 위하여 MRS 배지와 LB 배지에 plating하였다. 메주 발효 시 유산균 분석을 위하여 MRS배지를 이용하였으며, 총 균의 변화를 분석하기 위하여 LB 배지를 이용하였다. 각각의 시료를 plating하였고, 남은 시료는 total DNA를 분리하여 분자학적 시료 분석을 위해 사용되었다.



Fig. 11. Meju fermentation with *L.plantarum* SY99

메주 발효 1주일이 되었을 때 시료를 채취하여 각각 plate counting을 실시하였다. 아무런 균주를 첨가하지 않았을 때 많은 균주가 있었으며 균종도 대단히 다양하였다. *L.plantarum* SY99 첨가한 메주에서는 균종은 단순하였으며 잡균들이 보이지 않았다. 이와 반대로 *B.cereus*만 접종하였을 때 잡균과 함께 바실러스 균이 보였다. 그리고 *L.plantarum* SY99와 *B.cereus*를 같이 접종했을 때 잡균도 거의 보이지 않았으며 *L.plantarum* v에 의해서 *B.cereus*의 생육이 저해되는지 균총이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 4주일이 지난 후에도 비슷한 양상을 보여 주고 있었다. 메주만 발효시켰을 때 유산균 뿐만 아니라 다양한 균이 있었다. 붉은 색을 띤 균도 있었으며 이를 동정해 본 결과 *Pantoea* sp.나 *Exiguobacterium*. sp.와 같은 식품 발효에서 많이 나오는 잡균들이 있었다. 또한 *L.plantarum* SY99만 스타터로 넣어줬을 때 이 균에서 생성되는 박테리오신과 같은 항균물질에 의해서 다른 균의 생육이 저해되는지 균총 변화가 현저히 달랐다. 그리고 *B.cereus*만 스타터로 첨가했을 때는 시리우스뿐만 아니라 여러 균종이 보였다. 이것은 박테리오신이 안 만들어지기 때문에 잡균이 나오는 것으로 생각 할 수 있었다. 또한 *L.plantarum* SY99와 *B.cereus*를 같이 첨가했을 때 시리우스종이 확실히 줄어드는 것을 볼 수 있으며 잡균들도 볼 수 없었다. 이것은 *L.plantarum* SY99가 생성하는 박테리오신에 의

해 잡균과 시리우스종이 저해를 받고 있으리라 생각할 수 있었다. MRS배지에서 유산균총의 변화는 4개 대조군에서 변화는 보이지 않았다. 전체적으로 유산균이 배양 일주일부터 꾸준히 유지 되고 있었으며 8주까지 많은 변화는 없었다. 다만 8주가 되었을 때 메주가 단단히 말라서 총 유산균은 줄어들었으나 대조군간의 차이는 보이지 않았다.

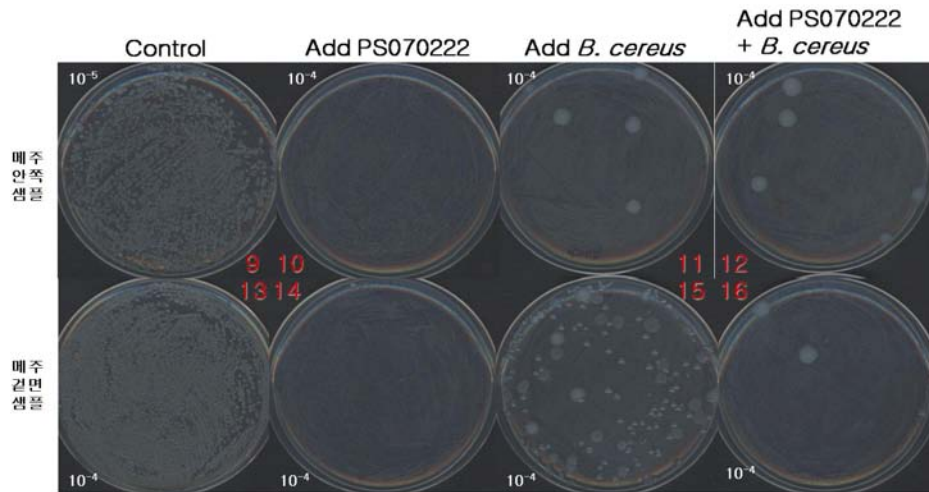


Fig. 12. Monitoring of the change of community after 7 days fermentation by colony counting.

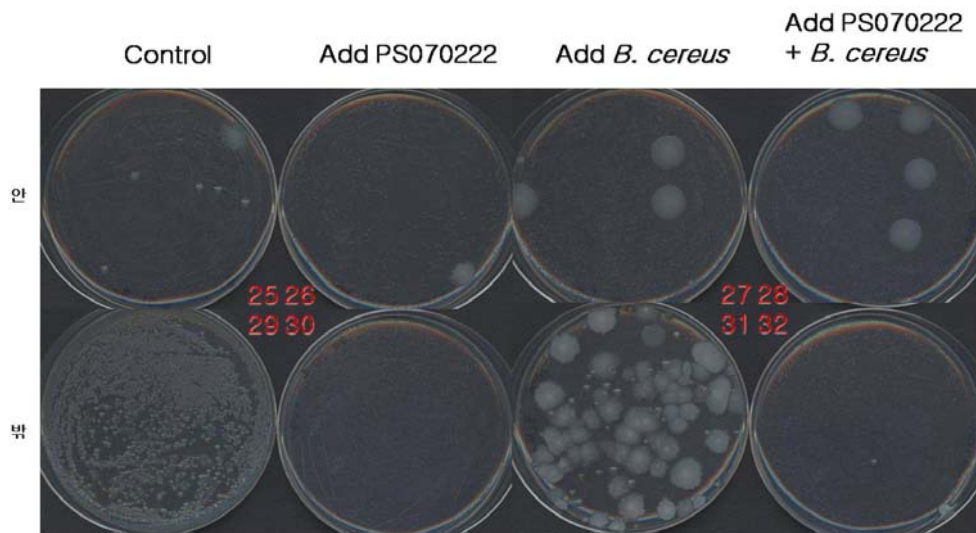


Fig. 13. Monitoring of the change of community after 4 weeks fermentation by colony counting

## 2. 분자생물학적 방법을 이용한 미생물 군집의 모니터링

원하는 생물환경공정의 목적을 달성하기 위해서는 공정 내에 충분한 양의 바람직한 미생물 종으로 구성된 군집 구조가 형성되도록 하고, 미생물 군집이 원하는 생화학적 기능을 장기간에 걸쳐 안정되게 수행할 수 있도록 운전하여야 한다. 이에 따라 다양한 미생물로 구성된 군집 내에서 원하는 기능을 가진 미생물 개체군이 잘 유지되고 있는지를 관찰하는 연구들이 필요하게

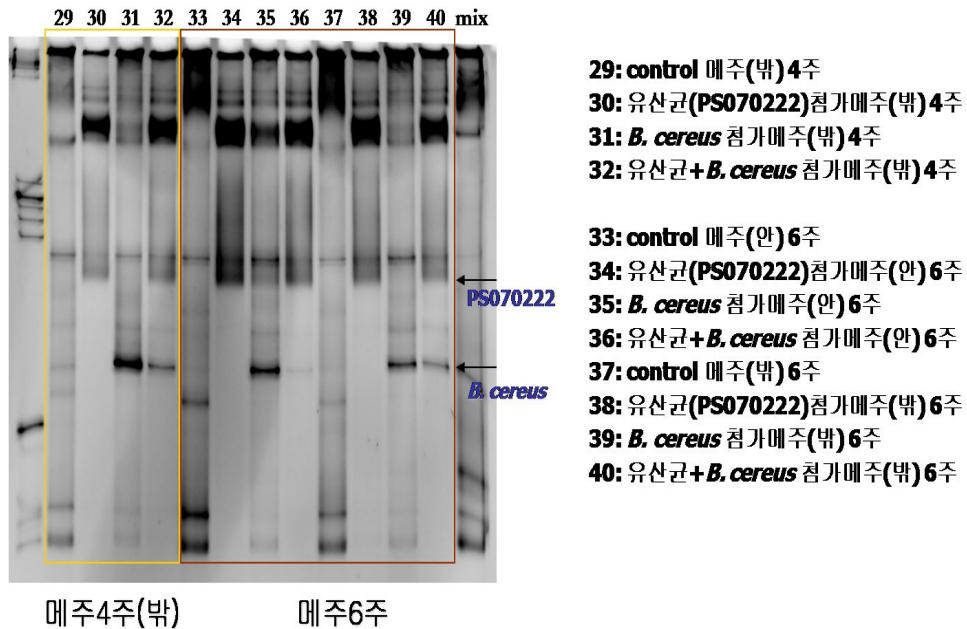
되었다. 그러나 생물환경공정에 존재하는 미생물을 연구하기 위하여 과거 수십 년 동안에는 특정 선택배지에 미생물을 배양시켜, 생성된 콜로니를 순수 분리하고 동정하는 배양법을 주로 사용해 왔다. 이러한 배양법은 순수 분리된 미생물 균주를 보관할 수 있으며, 그 균주의 표현형질(phenotype)과 유전형질(genotype)을 같이 연구할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 배양법에 의해 동정할 수 있는 미생물은 전체 원핵생물 수의 0.5~10% 이내라고 알려져 있으며, 질산화 미생물과 같은 경우에는 배양에 수 주일이 소모되기도 한다. 따라서 배양법만을 사용하여 환경에 존재하는 다양한 미생물들을 조사하는 것에는 한계가 있다. 그래서 분자생물학적 방법을 이용하여 환경 중의 미생물 생태를 연구하는 기법(이하 분자생태학적 기법)의 등장으로 미생물의 종 다양성에 대한 우리의 지식과 견해가 크게 변화하였다. 지금도 특정 환경이나 환경 조건의 변화에 따른 미생물 군집의 구조와 변화를 조사하고 해석하기 위하여 새롭게 다양한 분자생물학적 방법들이 개발되고 있다. 분자생태학적 기법을 적용한 연구의 경우 대부분이 특정 자연환경의 미생물군집 구조를 조사한 것이며, 생물환경공정의 미생물 군집 해석에 분자 생태학적 기법을 적용하기 시작한 것은 약 10년 정도의 짧은 연구 역사를 지닌다.

PCR-DGGE법은 원래 의학 분야에서 돌연변이 유전자의 검출을 위하여 사용되어 오던 방법이었으나, Muyzer et al.(1993)가 처음으로 16S rDNA의 V3 region(16S rDNA 가운데 미생물 종에 따라 가장 변이가 심한 부분)을 대상으로 미생물 생태분야에 적용하였다. DGGE 분석법에서는 5'말단에 GC-clamp(약 40개 정도의 G와 C로 구성된 DNA단편)를 붙여 놓은 primer를 사용하여 미생물군집에서 추출한 전체 DNA로부터 16S rDNA를 PCR증폭 시킨 후, 증폭된 PCR 산물을 urea나 formamide와 같은 DNA변성제의 농도 구배가 존재하는 gel상에서 전기영동 한다. 증폭된 16S rDNA는 군집 내의 박테리아 종에 따른 염기서열의 차이에 의해 단일가닥(한쪽 끝은 GC-clamp로 인해 묶여진 상태)으로 변성되는 정도가 달라지고, 이에 따라 gel상에서의 이동거리가 달라지는 점을 이용한 방법이다. 결국, gel상의 특정 위치에서 특정 16S rDNA 염기서열을 가진 DNA가 band 형태로 나타나게 된다. 따라서 샘플 내에 미생물의 개체 수가 다양할수록 band의 수는 늘어나게 되고 동일한 염기서열의 DNA가 많을수록 나타나는 band의 선명도는 증가하게 된다.

PCR-DGGE법은 많은 샘플에서의 전체적인 미생물 종의 수 그리고 양적 변화를 하나의 gel상에서 관찰할 수 있다는 장점이 있다. 또한 중요도가 높은 band의 경우에는 band로부터 직접 DNA를 회수한 후, sequencing을 통해 종을 확인할 수 있기 때문에 cloning 분석법에 비해 시간, 노력 및 비용을 최소화할 수 있다. 그러나 gel의 제작과 최적 농도 구배의 범위를 설정하는 과정이 번거롭고, 샘플 내에 분포도가 낮은 종의 경우에는 증폭산물이 적어 검출되지 않을 수 있으며, band의 수가 너무 많이 발생하는 경우에는 군집의 변화를 해석하는데 어려움이 따른다. 게다가, 비교해야 할 샘플의 수가 많은 경우, 여러 장의 gel을 사용하여 전기영동을 실시해야 하며, 샘플의 조합을 달리하여 군집을 비교하고자 할 경우에는 추가적으로 전기영동을 실시해야 한다는 단점이 있다. 또한 서로 다른 염기서열의 band들이 뒤엉켜서 같이 이동하는 경우도 발생하며, PCR과정에서 mismatch로 생성된 산물도 군집의 구성 개체로 인식되어 버리는 오류가 발생할 수 있다.

Q-biogene사의 fast DNA spin kit의 purification한 메주 DNA sample을 이용하여 1차 PCR과 2차 PCR를 수행하였다. PCR 증폭 조건은 95°C에서 5분간 1회 수행한 후 95°C 45초간 60°C에서 50°C 매 cycle당 0.5°C 감소하며 45초간 72°C에서 45초간 20 cycle을 수행한 후 95°C에서 45초간 50°C에서 45초 72°C에서 45초간 을 10 cycle 수행한 후 마지막으로 72°C에서 5분

간 1회 수행하였다. 4주와 6주가 된 메주에서 유전자를 분리하여 DGGE를 실시하였을 때 plate counting에 의한 분석과 유사하게 아무것도 넣지 않은 시료에서 다양한 band가 보였다. 이것은 잡균이 많이 자라고 있는 것을 보여주고 있다. 또한 *L.plantarum* PS222를 넣어줬을 때 항균활성 물질에 의해 잡균이 저해를 받아 DGGE에서도 거의 band가 보이지 않았다. 또한 *B. cereus*를 첨가 하였을 때 시리우스 band가 진하게 나타났다.



**DGGE was performed with an acrylamide gel containing a denaturant urea-formamide gradient range 40 to 70% and electrophoresis at constant temperature(60 °C) for 22h at 90V. DGGE profiles of Meju samples during fermentation: lane 1, A; lane 2, B; lane 3, C; lane 4, D.**

Fig. 14. Monitoring of the change of community during fermentation by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

#### 4. Real-Time Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)을 이용한 *Bacillus cereus* 균주의 detection 및 정량

미국 FDA에서 식중독을 일으켜 건강에 해를 끼칠 수 있는 *Bacillus cereus* 의 수를  $10^6$  cell/g 이상이라고 밝히고 있으며, 쌀 등 농산물에  $10^3$ - $10^4$  cell/g 정도 존재하는 것으로 보고하고 있어 쌀, 고춧가루, 대두 등을 주원료로 사용하는 고추장, 된장에 *Bacillus cereus* 의 상존 및 위해의 위험성이 있을 것으로 판단되나 국내에서 이에 대한 연구는 부진한 상태이다. 전통장류에 있어 *Bacillus cereus* 에 관한 연구는 미진하여 국내산 약용자원의 추출물을 사용하여 이들 *Bacillus* sp.의 생육제어에 관한 연구가 있으나 아직 초보적인 탐색단계이고, 관능적으로 문제가 없어 산업적으로 활용 가능한 물질을 제시하지 못해 보다 많은 연구가 요망된다. 전통장류 발효에서 *Bacillus cereus*의 정량적으로 분석함으로써 위해성 평가와 함께 발효식품에서 분리한 유용미생물을 이용하여 식중독 원인 균인 *Bacillus cereus* 에 대한 억제 기능을 강화함으로써 보다 안전한 발효식품을 만듦으로써 국민의 식생활 안전에 큰 기여를 할 수 있을 것이다.

지난 수년간 다양한 원핵생물 및 진핵생물의 게놈(genome)에 대하여 DNA 염기서열의 정



보가 막대하게 증가하여 왔다. 이러한 개념의 구조 및 조직에 대한 지식이 늘어감에 따라 점차 개별적인 유전자의 기능 및 그들의 발현 조절에 대한 연구에 대한 관심이 커져가고 있다. 특히 전사 수준에서의 유전자 발현을 분석하기 위하여 northern blotting, in situ hybridization, ribonuclease protection assay, cDNA array 등과 같은 방법들이 개발되고 또 이용되어져 왔다. 그러나 이러한 방법들로부터 mRNA transcript를 정량하는 것은 종종 민감도가 떨어진다는 거나 많은 수의 시료를 분석하기 위해 적용할 경우 비용과 노력이 너무 많이 들어간다는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하여 mRNA 수준에서의 유전자 발현을 분석하는데 가장 널리 이용되고 있는 방법은 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)이다.

PCR은 특정한 염기서열에 붙는 한 쌍의 DNA primer를 사용하여 원하는 부위를 DNA중합효소라는 효소를 이용하여 증폭하는 기술이다. 1980년대 중반에 개발된 이 기술은 DNA중합효소로서 초기에는 열에 약한 Klenow fragment를 이용하였으나 점차 *Thermus aquaticus*와 같이 고온에서 번식하는 세균의 옴 중합효소(Taq DNA polymerase)를 이용하게 되면서 반응의 특이성 및 효율이 크게 향상되어 현대 분자생물학 연구에서 가장 중요한 기술의 하나로서 지금까지 널리 이용되고 있다. PCR 기술은 reverse transcription(RT) 기법과 조합할 경우 세포 내의 RNA를 증폭할 수 있으므로 message copy 수가 매우 작을 경우 또는 시료의 크기가 매우 작을 경우에도 유전자 발현을 측정 할 수 있다.

#### 가. *Bacillus cereus* specific primer와 사용 균주

*Bacillus cereus* specific primer는 1997년 Wang등이 보고한 논문을 참고로 하여 제작하였다. 이때 사용된 primer는 *Bacillus cereus* 의 hemolysin 유전자를 대상으로 하였으며 BC-1; 5'-CTGTACGGAATCGTACGTATC-3'와 BC-2; 5'-TACTGCTCCAGCCACATTAC-3'으로 PCR product size는 185bp이었다(Fig. 15). 이들 primer가 *Bacillus cereus* 에 대하여 특이성이 있는지 확인하기 위하여 특이성 조사를 실시하였다.

- *Bacillus cereus* gene for hemolysin(D21270), 1728bp DNA linear
- **BC-1; 5'-CTGTAGCGAATCGTACGTATC-3' (583-603)**
- **BC-2; 5'-TACTGCTCCAGCCACATTAC-3' (748-766)**
- PCR product size 185bp

```

541 atcaactaca acgtcaccag tcgatatttc gattattgga ttctgtagcg aatcgtacgt
601 atcaggagc tgtacaactt gccaaataag cttttgcaga caatcaaccg agtttattag
661 tggctaagag aaagcctttg aatattagta tagacttacc tggtatgaga aaagaaaata
721 caatcactgt ccaaaatccg acatattgta atgtggctgg agcagtagat gatttagtat
  
```

Fig. 15. Primer set of *Bacillus cereus* homolysin gene for RT-PCR

디자인한 primer를 이용하여 *B. cereus* 에 대한 RT-PCR 반응 특이성을 확인하기 위하여 *B. cereus* KCTC 3624, *B. cereus* KCTC 1021, *B. cereus* KCTC 13153, *B. cereus* KCTC 1661, *B. thuringiensis* KCTC 3452, *B. subtilis* KCTC 3135, *Staphylococcus epidermidis*

KCTC 3958, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* TV 119 KCTC 1925, , *Listeria monocytogenes* KCTC 3710, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Vibrio fischeri* KCTC 12386, , UPEC (uropathogenic *Escherichia coli*) CFT 073 ATCC 700928, *E. coli* DH5a KCTC 12386을 대상으로 특이성을 확인하였다. Table 21에서와 같이 BC-1과 BC-2를 이용하여 PCR를 실시한 결과 *B. cereus* 에 특이적인 반응이 일어났으며 나머지 균인 그람 양성균과 그람 음성균에서 반응이 일어나지 않았다. 또한 *Bacillus subtilis*에 대한 특이성 조사 결과 *B. subtilis*에서 반응이 일어나지 않는 것으로 보아 *B. subtilis*에서는 homolysin 유전자가 없는 듯하였다. 그러나, *B. thuringiensis*에서는 반응이 일어났다. *B. thuringiensis* , *B. cereus*, *B. licheniformis* 이들 세 균은 매우 유사한 계통을 가지고 있는 것으로 지금까지 보고 된 것으로 보아 세 균주를 정확히 구분하여 정량화 하기는 아직까지 어려운 점이 있다. 이 BC1-, BC-2 primer로 RT-PCR를 실시하였을 때 나오는 값은 정확히 *B. cereus* 에 특이적인 것으로 보기는 힘들 것이다. 이러한 이유로 앞으로 *B. cereus*에만 특이적인 primer를 만드는 것도 중요한 연구 분야가 될 것이다.

#### 나. 검출감도 시험

*Bacillus cereus* 균체를 검출하기 위하여 먼저 시료에서 genomic DNA purification kit(ZYMO research, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하여 PCR 반응을 위한 주형으로 사용하였다. RT-PCR의 반응액은 TaqMan Universal Master Mix 10 ul, 각 primer(10 pmol) 0.5ul, template DNA 1ul, 증류수 8ul로 총량을 20ul로 하였다. 반응 조건은 95℃에서 10분간 반응시킨 후 95℃에서 30초, 58℃에서 1분, 72℃에서 1분을 1회로 하여 35회를 반응시켰다(Fig. 14). RT-PCR은 Mx3005P QPCR system(STRATAGENE)을 이용하였다.

Table 21. Primer BC-1, BC-2의 바실러스 시리우스에 대한 특이성 조사

<b>Bacterial strain (gene)</b>	<b>Type strain</b>	<b>PCR result</b>
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	<b>KCTC 3624</b>	<b>+</b>
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	<b>KCTC 1012</b>	<b>+</b>
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	<b>KCTC 13153</b>	<b>+</b>
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	<b>KCTC 1661</b>	<b>+</b>
<b><i>Bacillus thuringiensis</i></b>	<b>KCTC 3452</b>	<b>+</b>
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>KCTC 3135</b>	<b>-</b>
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>	<b>KCTC 3958</b>	<b>-</b>
<b><i>Streptococcus suis</i></b>	<b>KCTC 3557</b>	<b>-</b>
<b><i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> TV 119</b>	<b>KCTC 1925</b>	<b>-</b>
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>KCTC 3710</b>	<b>-</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>KCTC 1928</b>	<b>-</b>
<b><i>Vibrio fischeri</i></b>	<b>KCTC 12386</b>	<b>-</b>
<b>UPEC (uropathogenic <i>Escherichia coli</i> CFT 073)</b>	<b>ATCC 700928</b>	<b>-</b>
<b><i>E. coli</i> DH5a</b>	<b>KCTC 12386</b>	<b>-</b>

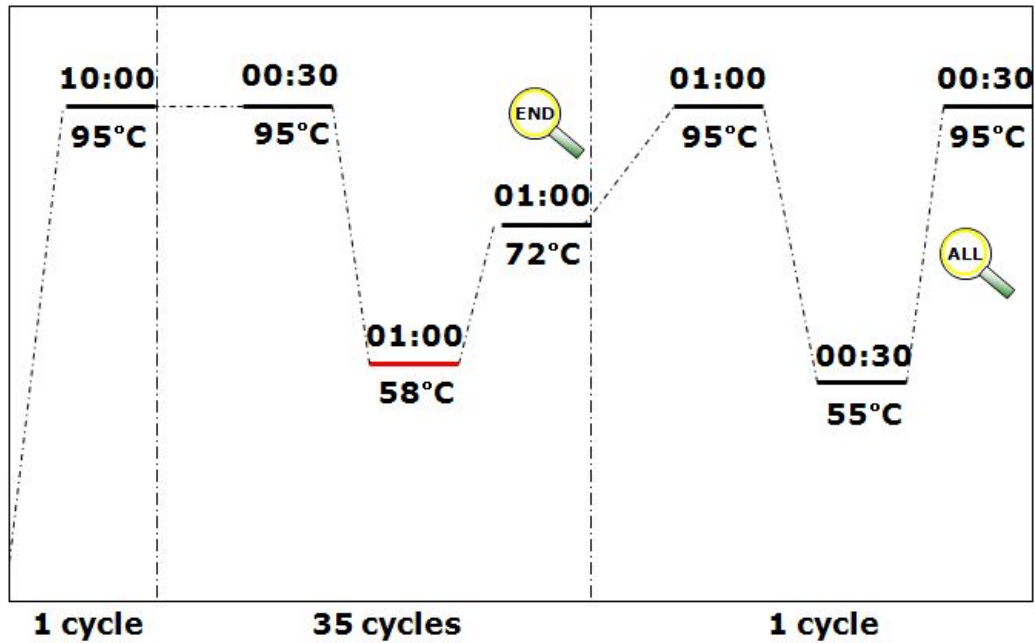


Fig. 21. Thermal profile of real-time PCR

먼저 검량선 작성을 위하여 *Bacillus cereus* KCTC 3624의 genomic DNA를 정제한 후 10 ng/ul에서  $10^{-1}$ 씩 serial dilution을 하여서 RT-PCR를 실시하였다. 이때 나온 값을 근거로 하여 정량선을 다음과 같이 작성 할 수 있었다(Fig 22).

그리고 이때 real-time PCR에 의해 만들어진 product가 단일 유전자인지 알아보기 위하여 확인 작업을 실시하였다. Double-strand DNA에 열을 점점 올리면 single-strand DNA를 바뀌는데 이때 온도를 melting temperature( $T_m$ )이라 한다. 단일 band 일 때  $T_m$ 값은 한가지 온도로 고정 된다. 이러한 원리를 이용하여 확인 작업을 하였다.

Fig. 23을 통하여 알 수 있는 것은 위 실험에서 쓰였던 primer BC-1과 BC-2에 의해 한가지의 product의 유전자만 증폭되었다는 것을 알 수 있으며, 위의 primer로 다음 실험을 실시하는데 타당성을 제공하였다.

위의 실험을 근거로 하여 검량선을 작성할 수 있었다. Fig. 17에서 볼 수 있듯이 이때 correlation coefficient는 0.996으로 높은 신뢰도를 보이고 있으며 slope은 -3.383이었다. 위 검량선을 근거로 시료에서 *B. cereus*를 RT-PCR를 통하여 정량화 할 수 있게 되었다.

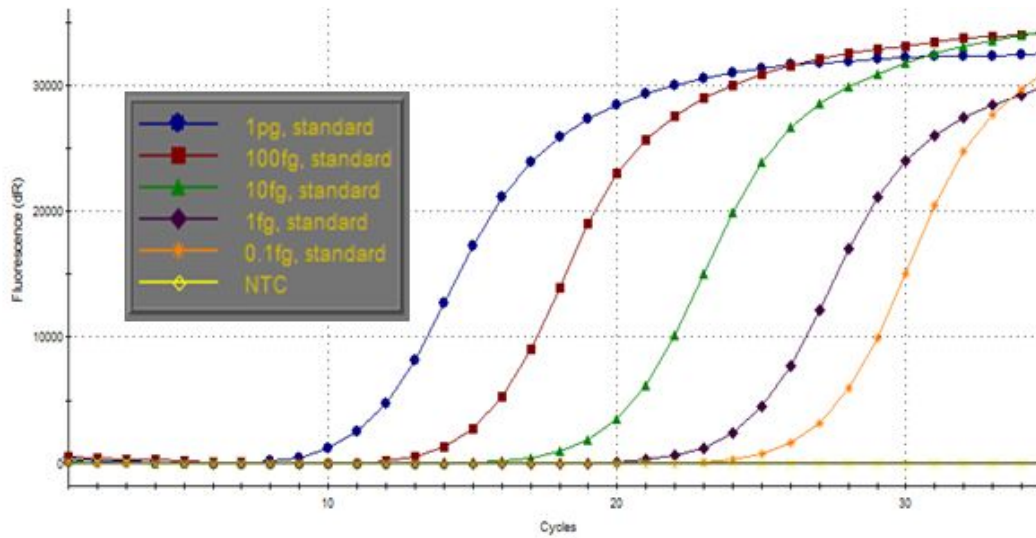


Fig. 22. Amplification curves for serial 10-fold genomic DNA concentration for real-time PCR

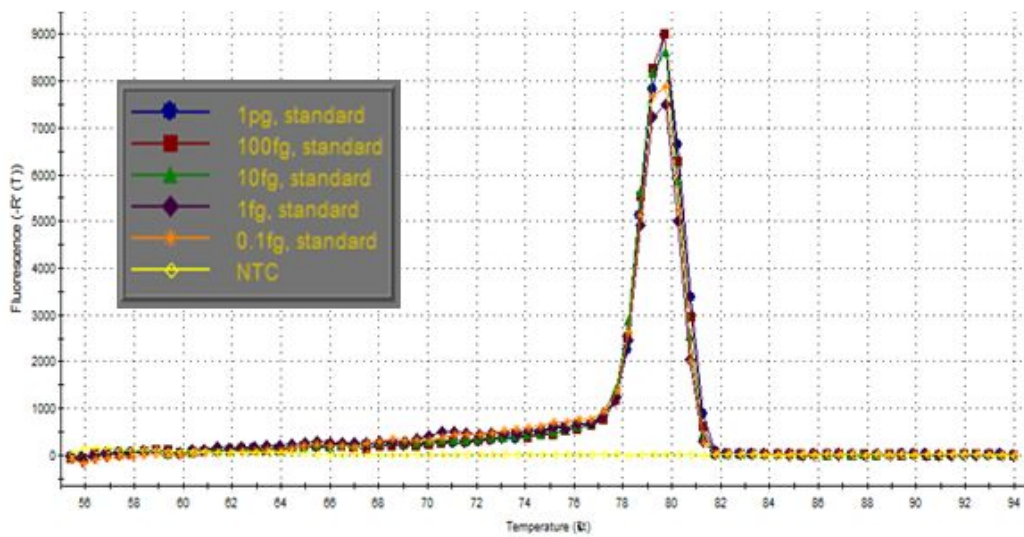


Fig. 23. Melt curve analysis for 10-fold serial dilution of *B. cereus* KCTC 3624 genomic DNA

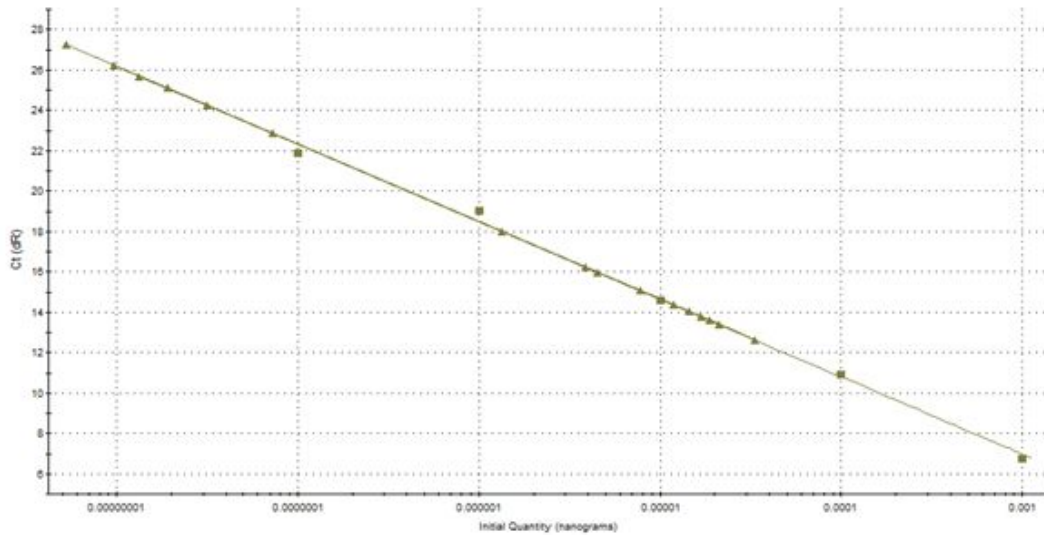


Fig. 23. Standard curve for serial 10-fold dilution of *B. cereus* DNA  
The correlation coefficient( $r^2$ ) was 0.996 and the slope was -3.838

다. 메주 시료에서 RT-PCR를 통한 *B. cereus*의 정량화

우리나라 식품 가운데 세계화 할 수 있는 발효식품인 고추장, 된장을 중심으로 현재 식품공 전상 문제가 되고 있는 *Bacillus cereus*의 분포정도 조사를 바탕으로 객관적인 오염실태 자료로 제시하고, 장류의 발효 중 *Bacillus cereus*에 대한 항균활성도를 분석하여 장류가 *Bacillus cereus*에 안전식품임을 입증하여, 국제적 경쟁력을 강화하고 *Bacillus cereus* 가이드라인 마련을 위한 기초 자료 제공하고 있다.

Hauge(1950년)가 *Bacillus cereus*에 의한 식중독을 보고한 이래 일본, 유럽을 중심으로 이 균에 의한 식중독 발생보고 및 연구가 진행되고 1971년 *Bacillus cereus*의 enterotoxin이 분리되어 독소의 물리, 화학적 성질을 밝히는 연구가 진행되고 있다. 앞선 실험에서 메주의 발효과정중에 미생물 군집이 변화하는 것을 DGGE 분석을 통하여 확인할 수 있었으며 군집의 변화뿐만 아니라 메주 발효의 오염균인 *Bacillus cereus*의 정량 분석이 같이 병행되어야 한다는 것을 알 수 있었다. 이를 위하여 지금까지는 plate assay를 통하여 확인하였으나 시간이 많이 필요로 하며, 다량의 시료를 처리하는데 문제점을 갖으며, 정확한 측정이 어렵다는 단점을 가지고 있다. 이를 보완하기 위하여 최근에는 분자생물학적인 분석 방법을 이용하는데 그중 한가지로 real-time PCR 방법을 통하여 정량화를 시도하고 있다. 앞에서 DGGE 분석을 위하여 total DNA를 정제한 시료를 real-time PCR 분석을 통하여 같이 분석하고자 한다. 메주 시료는 메주 발효후 6주째 시료에서 DNA를 정제한 후 template로 사용하였다.

Table 22. RT-PCR를 통한 *B. cereus* 정량을 위한 메주 시료

**Added 1% indicator strain *B. cereus* or *L. plantarum* PS0222 or both to steamed soybean and then made Meju blocks.**

	meju37	meju38	meju39	meju40
<b><i>L. brevis</i> PS070222</b>	-	<b>Added</b>	-	<b>Added</b>
<b><i>B. cereus</i> KCTC 3624</b>	-	-	<b>Added</b>	<b>Added</b>

이때 DGGE 분석 자료를 비교해보면 Fig. 24에서와 같이 아무런 균을 첨가 하지 않았을 때 (meju37)는 여러 가지 균주가 존재하는 것을 확인 할 수 있었으며 DGGE에서도 다양한 band 가 존재하는 것을 확인 할 수 있었으며, 여기에 *B. cereus*에 저해능을 갖는 *L. brevis* PS070222를 첨가했을 때는(meju38) 이 균에서 생성되어 나오는 박테리오신과 같은 항균활성을 갖는 물질에 의해 여러 균주의 생육이 저해를 받아서 거의 유산균만 확인 할 수 있었다. 또한 메주에 *B. cereus*를 첨가했을 때는(meju39) 어떤 것보다 *B. cereus*의 점유율이 높았으나, *B. cereus*와 함께 *L. brevis* PS070222를 함께 첨가 했을 때(meju40) *B. cereus*만 첨가 했을 때 보다는 *B. cereus*의 농도가 낮았다. 어느 정도 메주 발효과정에서 스타터로 첨가한 유산균이 *B. cereus*의 생육을 저해 한다는 것을 DGGE 분석을 통하여 확인 할 수 있었다.

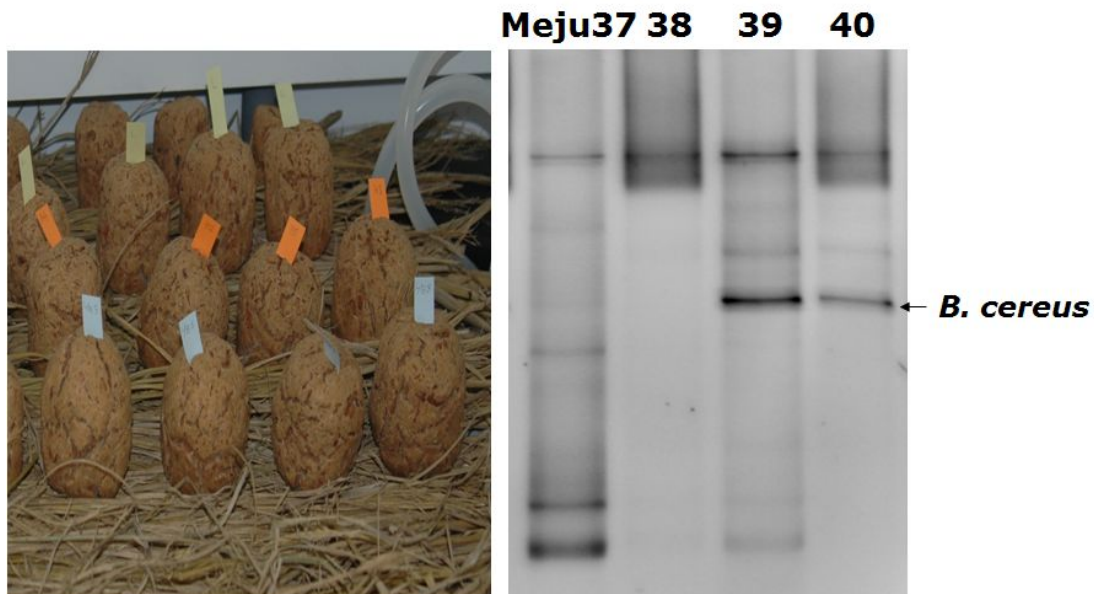
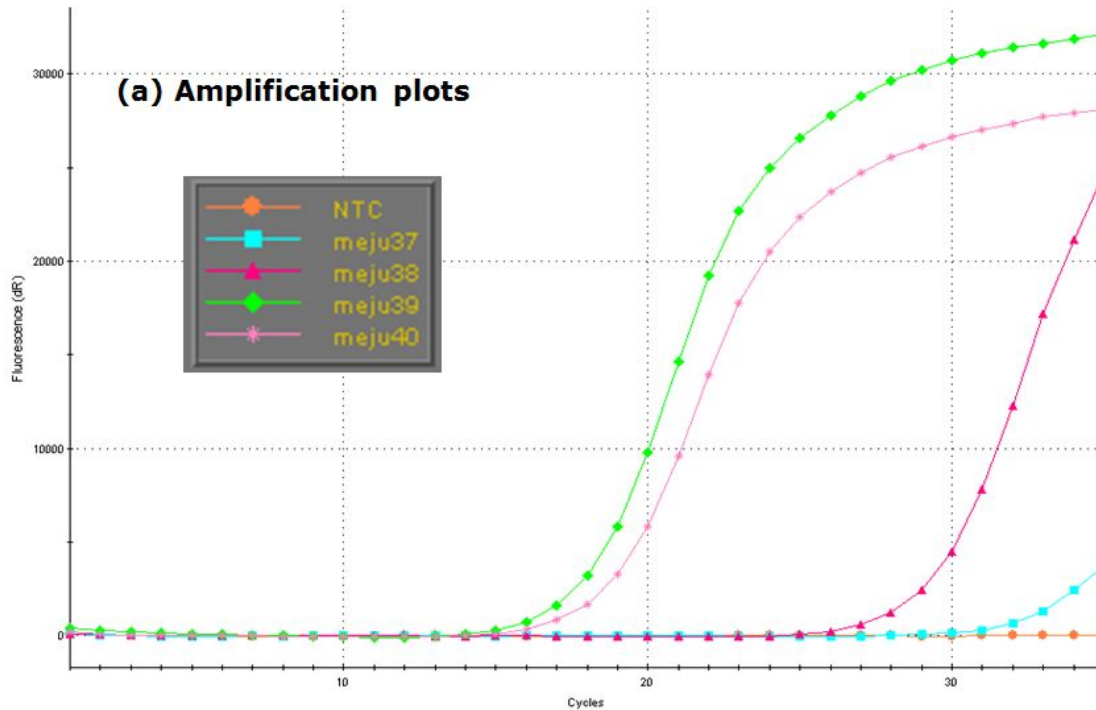


Fig. 24. Monitoring of the change of community during fermentation of meju  
DGGE was performed with an acrylamide gel containing a denaturant urea-formamide gradient range 40 to 70% and electrophoresis at constant temperature(60°C) for 22h at 90V

위의 시료를 RT-PCR를 통한 *B. cereus*의 정량화를 시도 하였다. Fig. 25에서 보는 바와 같이 메주 발효시 *B. cereus*만 첨가한 메주에서 가장 높은 농도로 존재하는 것을 알 수 있으며, 이때 DGGE에서도 meju39에서 가장 진한 band로 *B. cereus*가 존재하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 *B. cereus*에 저해능을 갖는 *L. brevis* PS070222를 *B. cereus*와 같이 첨가 했을 때 유산균에 의해 *B. cereus*가 완전히는 아니지만 어느 정도 저해되는 것을 정량적으로 확인 할

수 있었다. 그리고 나머지 두 시료인 아무것도 첨가하지 시료와 유산균만 첨가한 시료에서는 *B. cereus*가 거의 확인되지 않았다. 정량곡선에서 후반부에 PCR 반응이 일어나는 것을 확인할 수 있었지만 이것은 아마 비특이적 반응으로 추정할 수 있었다. 왜냐하면 다른 실험에서 약간의 비 특이적 반응이 유산균 DNA에서 일어나는 것을 확인할 수 있었기 때문이다. plate assay와 DGGE 분석에서 또한 *B. cereus*로 추정되는 콜로니는 확인할 수 없었기 때문이다. 위 실험을 통해서 지금까지 DGGE 분석 방법과 RT-PCR를 통한 메주의 발효 과정에서 미생물 군집의 변화와 *B. cereus*의 정량을 분석할 수 있는 기술을 확립할 수 있었다.

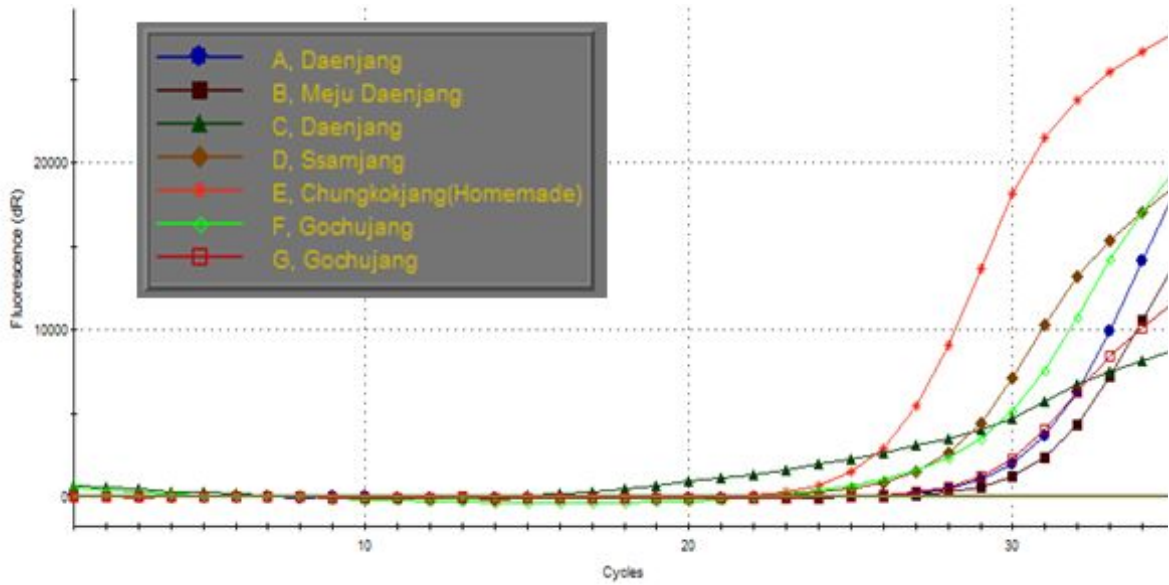


	Ct (dR)	Quantity (ng)
meju37	27.23	$5.246 \times 10^{-9}$
meju38	24.22	$3.177 \times 10^{-8}$
meju39	13.38	$2.124 \times 10^{-5}$
meju40	13.78	$1.676 \times 10^{-5}$

Fig. 25. Real-time PCR analysis of lab-scale fermented meju

라. 시중에서 판매되는 장류에서 *B. cereus*의 정량화

시중에 판매되는 장류에서 *B. cereus*가 어느 정도 농도로 존재하는지 확인 하기 위하여 지금까지 실험실에서 실시한 RT-PCR 방법을 통하여 정량화 하는 실험을 실시 하였다. 대상 시료로는 된장, 찜장, 고추장 청국장 등으로 한정하였다. 시료의 수가 한정적이어서 위 실험으로 대표성을 갖기는 부족하다. 그러나 시중에 판매되는 장류에서 *B. cereus*가 얼마나 오염되었는지 또는 위 실험이 얼마나 타당성을 갖는지 확인하는 실험이라 할 수 있겠다. 시료는 7개로 된장 2개 시료, 메주, 찜장, 청국장, 고추장 2개 시료 이었다. 이때 사용한 Primer는 지금까지 사용한 BC-1과 BC-2를 사용하였으며, 위 시료에서 total DNA를 분리하여 template로 사용하였다.



	Ct(dR)	Quantity(ng)
A - 된장	24.58	$5.664 \times 10^{-11}$
B - 매주	24.78	$4.893 \times 10^{-11}$
C - 된장	13.12	$2.863 \times 10^{-7}$
D - 쌈장	21.24	$6.800 \times 10^{-10}$
E - 청국장	21.05	$7.865 \times 10^{-10}$
F - 고추장1	21.98	$3.936 \times 10^{-10}$
G - 고추장2	23.30	$1.467 \times 10^{-12}$

Fig. 26. Detection of *B. cereus* by real-time PCR for the consumed soy bean sauce

전체적으로 시중에서 판매되는 장류에서는 *B. cereus*가 고 농도로 존재하지는 않아 보였으며 단지 C-된장에서는 Ct 값이 높게 잡혔으나 유전자의 증폭이 강력하게 증가하지 않는 것으로 보아서 비 특이적 반응일 수 있을 것이다. 단지 real-time PCR 방법으로 정량화 하기는 아직은 미흡한 부분은 존재하다는 것을 알 수 있었다. 두 가지 이상 방법을 활용했을 때 데이터의 신뢰도가 더 높아질 것으로 보였다. 위 실험을 통해서 확인 할 수 있었던 것은 먼저 시중에 판매되는 장류에서는 *B. cereus*의 오염도가 그리 심각하지 않다. 그리고 real-time PCR 방법을 통한 정량화 기법을 더욱 보완 발전시키는 후속 실험이 필요하다는 것을 알 수 있었다.



## 5. 최적 pH 겔을 이용한 새로운 항균 활성 측정법의 개발

일반적으로 자이모그래피 법(zymography)은 SDS 겔 전기영동 상에서 효소 활성을 직접적으로 검출이 가능한 기술로서 전기영동을 수행한 후 gel 상에 전개된 단백질에 의해 효소 활성을 확인하는 방법이다. Zymography 기술은 아주 높은 민감도 (ng 수준)를 가질 뿐만 아니라 gel 상에서 효소 활성을 지닌 단백질의 분자량 또한 측정이 가능하여 효소 스크리닝 및 정제 등 효소 공학연구에 많이 이용되어지고 있다. 항균활성 측정을 위해 현재 많이 사용되어지고 있는 자이모그래피 법은 전기영동을 수행하는 조건 (pH 8.0-9.0)에서 수행되어지기 때문에 염기적 조건에서 활성을 지닌 항균 단백질의 경우 쉽게 확인이 가능하였다.

### 가. 니신 (nisin)의 *Bacillus cereus*에 대한 항균 활성 측정

대표적인 항균 단백질인 니신을 이용하여 *Bacillus cereus*에 대한 항균 활성을 측정하였다. Fig. 27의 A에서 보는 바와 같이 니신의 *B. cereus*에 대한 항균 활성의 최적 pH는 4.0였으며, pH 6.0 이상에서는 활성이 완전히 사라졌다. 그리고 항균 활성을 지닌 단백질을 전기영동 겔 상에서 측정하기 위하여 기존의 방법대로 자이모그래피법을 수행하였다. Fig. 27 B에서 보는 바와 같이 전기영동 겔 상에서 약 3.8 kDa의 분자량을 지닌 니신 단백질을 확인하였다. 하지만, 겔 상에서는 항균활성을 확인할 수 없었다 (Fig. 27의 C).

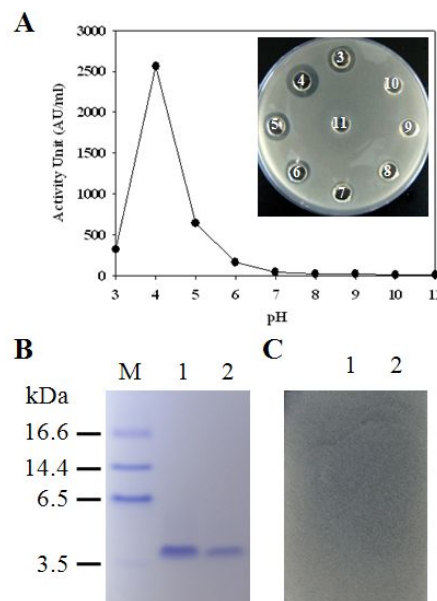


Fig. 27. 니신의 *Bacillus cereus*에 대한 항균활성

M: molecular weight standards; lane 1: 니신 (3 µg) lane 2: 니신 (1.5 µg) (B). Gel overlaid with *B. cereus* (C).

### 나. 최적 pH 겔을 이용한 새로운 항균 활성 측정법의 개발

니신과 같이 산성 조건에서만 활성을 지니는 단백질의 항균활성 측정을 위한 자이모그래피법을 개발하기 위해 최적 pH 조건의 겔 기질 (optimal pH-conditioned gel matrix, OP-CGM, pH 4.0)의 제조 및 전기영동 겔의 OP-CGM로의 전기적 이동법 (electro-transfer)을 도입하였다.

(1) 최적 pH 조건 겔 기질 (OP-CGM, pH 4.0)의 제조

Table 23에 기재된 바와 같이, 최적 pH 조건 겔 기질 (OP-CGM, pH 4.0) 겔을 제조하였다.

Table 23. 최적 pH 조건 겔 기질 (OP-CGM, pH 4.0)

Component	OP-CGM
Acrylamide/bis-acrylamide, 30%:0.8%	2 ml
0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.0) <sup>a</sup>	3 ml
Distilled water	0.94 ml
10% (w/v) APS	60 ul
TEMED	3 ul
Total volume	6 ml

Note. APS, ammonium persulfate; TEMED, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine.

<sup>a</sup> Final 50 mM OP-CGM

다. 전기영동 (SDS-PAGE) 수행

니신을 자이모그램 샘플 버퍼 (0.5 M Tris-HCl, 10% [w/v] SDS, 20% [v/v] glycerol, and 0.03% [w/v] bromophenol blue; pH 6.8)로 5 배 희석한 후, Laemmli 방법(U.K. Laemmli, *Nature*, 227:680, 1970)에 의하여 Bi SRad Mini-PROTEAN 키트를 사용하여 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔(두께 1.0 mm)에 시료를 로딩(loading)하여 전기영동을 수행하였다.

전기영동을 수행한 후 SDS를 제거하기 위하여, 겔은 2.5% (v/v) Triton X-100와 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)에서 회전진탕기(rotary shaker)로 실온에서 30분동안 인큐베이션하였다. 그리고 나서, Triton X-100를 제거하기 위하여, 겔은 30분 동안 증류수로 씻었다.

(1) 전기이동 (electro-transfer) 수행

표 23에 따라 제조된 기질 겔을 Fig. 28에 나타난 바와 같이, 샌드위치 형태로 겹쳐서 기질 겔 및 전기영동을 수행한 SDS 겔을 적층한 후 전압을 가하였다 (electro-transfer). 전기-이동은 TRANS-BLOT apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 10분 동안 15V로 수행하였다.

그 결과, 그림 4에 나타난 바와 같이, 약 3.8 kDa의 분자량을 지닌 니신 SDS 겔 상에서 단백질 (A) 및 항균활성 (B)을 확인하였다.

본 실험실에서 새롭게 개발된 OP-CGM을 이용한 자이모그래피법을 이용하여 된장으로부터 분리한 항균활성을 지닌 4종의 *Bacillus* 균주에 직접 적용해 보았다. 시료는 4종의 *Bacillus* sp.로부터 수득한 4개의 원배양상등액(crude culture supernats) 300 $\mu$ l에 세 배 부피의 콜드 아세톤(900 $\mu$ l)을 가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 농축하여 준비하였다. 각-20는 자이모그램 샘플 버퍼로 5 배 희석한 후 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔(두께 1.0 mm)을 제작한 후 겔 상에 시료를 로딩(loading)하여 전기영동을 수행하였다. 전기영동을 수행한 후 SDS를 제거하기 위하여, 겔은 2.5% (v/v) Triton X-100와 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)에서 회전진탕기(rotary shaker)로 실온에서 30분동안 인큐베이션 하였다. 30분 동안 증류수로 세척한 후 상기의 방법

대로 겔 상의 단백질을 OP-CGM으로 전기이동을 실시하였다. 그 결과, Fig. 30에 나타난 바와 같이, 약 3-5 kDa의 분자량의 항균활성을 지닌 단백질을 SDS 겔 상에서 확인할 수 있었다.

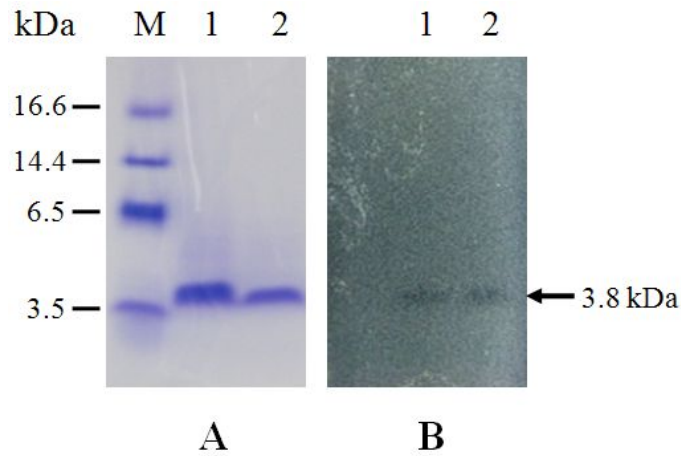


Fig. 29 자이모그래피법을 이용한 니신의 항균활성 측정

M: molecular weight standards; lane 1: 니신 (3 µg) lane 2: 니신 (1.5 µg) (A). Gel overlaid with *B. cereus* (B).

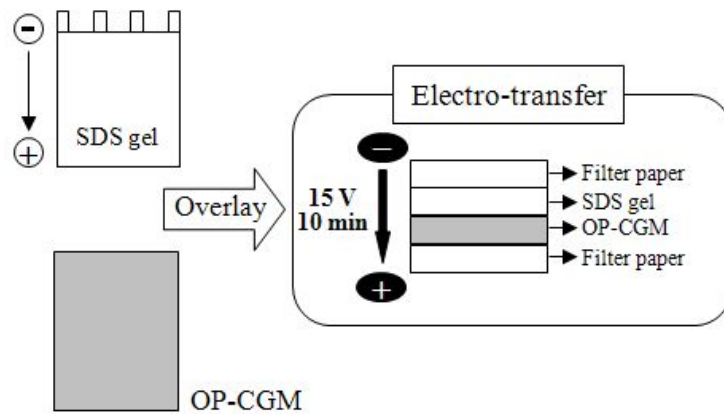


Fig. 28 전기이동 (electro-transfer)을 이용한 단백질의 OP-CGM으로 이동

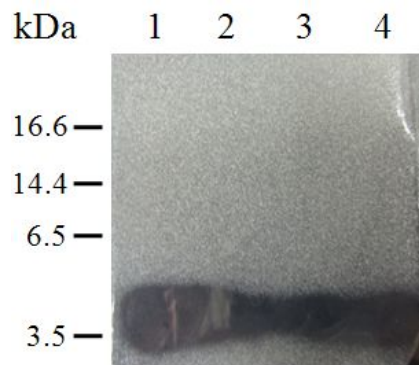


Fig. 30. 자이모그래피법을 이용한 니신의 항균활성 측정

M: molecular weight standards; lanes 1-4: *Bacillus* 균주 배양 상등액

## 제 3절 글루타미나아제 생산 균주의 탐색 기술 확립

### 1. 실험 방법

(사) 한국중균협회[KCCM]에서 분리 한 균주 중 Lactic acid bacteria(LAB) 균주를 사용하여 글루타미나아제(Glutaminase, GLN) 활성 측정 실험을 진행하였다. 각 젓산균을 5mL의 MRS 액체배지에 접종하여 30°C에서 24 시간 동안 혐기적 조건으로 진탕배양한 다음 원심분리(15,000 rpm, 25 min, 4°C) 한 후 분리 한 cell을 PBS완충액으로 현탁하여, 2회 세척하였다. 다시 원심분리 후 상등액을 제거하고 1.2ml의 0.75M의 생리식염수(NaCl)로 현탁한 후, 10초 간격의 펄스를 주어 2분간 소니케이터로 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄 과정은 얼음 상에서 수행하였다. 원심분리후 상등액을 회수하여 글루타미네이즈 활성 측정의 시료로 사용하였다.

#### 가. 글루타미나아제 활성 측정

각각의 Test tube에 L-글루타민 용액(L-Glutamine solution, 2.0%) 0.2mL과 아세테이트 완충액(Acetate buffer, 0.2M) 0.4mL을 첨가 한 후 37°C에서 5분간 반응시킨 후 0.2mL의 시료를 첨가한 후 다시 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 0.2mL의 과염소산(perchloric acid solution, 0.75N)을 첨가하여 반응을 정지시키고 다시 여기에 0.1mL의 소듐 아세테이트(sodium hydroxide solution, 1.5N)을 첨가하여 중화 시켰다. 8,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 , 상등액 50ul를 취해서 1.0mL의 하이드록실아민(Hydroxylamine buffer, 0.25M), 10mM의 NAD<sup>+</sup> solution 0.5mL, 1.0mL DW, 0.025mL GLDH solution(770U/mL)을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 340nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 부피 활성으로 글루타미나아제 활성을 계산하였다.

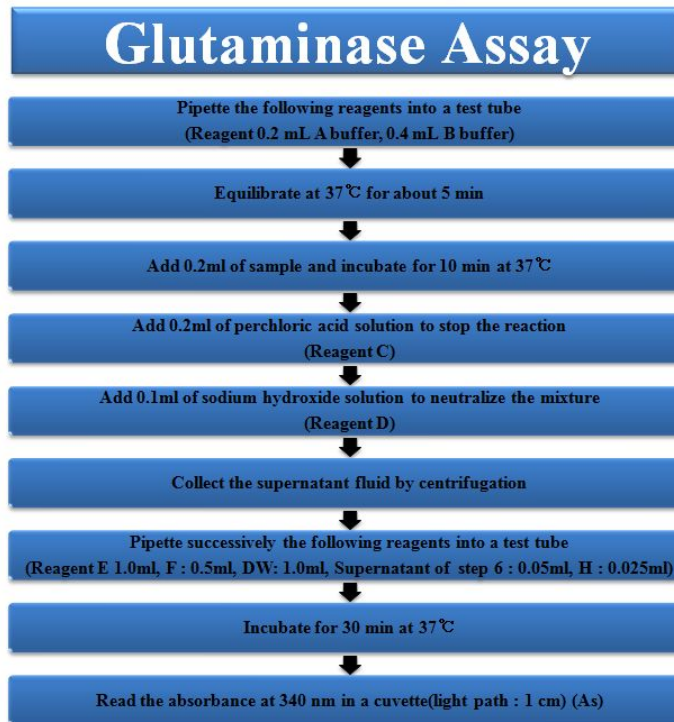
A<sub>s</sub>는 상기의 방법에 의해 측정된 흡광도를 의미하고, A<sub>0</sub>는 상기 방법에서 시료의 투입과 과염소산의 투입 순서를 바꾸어서 측정한 대조군의 흡광도를 의미한다.

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{(A_s - A_0) \times 1.1 (\text{ml}) \times 2.575 (\text{ml}) \times df}{6.2 \times 0.2 (\text{ml}) \times 0.05 (\text{ml}) \times 10 (\text{min})} = \Delta A \times 4.57 \times df$$

**Glutaminase 활성 계산 공식** (Nahisa M. and M. Moriguchi. 2005)

부피활성(U/mL)은 위의 식에 따라서 계산하였다.

df는 시료의 희석배수를 의미 한다.



GLN(CD : 60463)

Reagent A : L-Glutamine solution 2.0 %  
 Reagent B : Acetate buffer, 0.2 M  
 Reagent C : Perchloric acid solution 0.75 N  
 Reagent D : Sodium hydroxide solution, 1.5 N  
 Reagent E : Hydroxylamine buffer, 0.25 M  
 Reagent F : NAD<sup>+</sup> solution, 10 mM  
 Reagent G : Tris-HCl buffer, 50 mM  
 Reagent H : Glutamate dehydrogenase solution, 770 U/ml  
 Reagent I : Enzyme dilution buffer

The blank solution is prepared by reversing the sequence of sample and perchloric acid solution (Reagent C) (A0)

Fig. 27. Glutaminase 활성 측정 방법

## 2. 실험 결과

글루타미나아제 활성을 확인한 이유는 글루타미네이즈는 L-글루타민을 L-글루타민산염으로 탈아민화시키는 촉매역할을 하며, 식품에 첨가하였을 때 맛을 증진시키는 효과를 가지고 있으며, 대체로 온도나 열에 대한 안정성을 보이며, 염에 대한 내성이 높아 식품가공과정에서의 환경 변화 조건에 도 견딜 수 있기 때문에 식품첨가제로서 사용이 가능하다. 일반적으로 간장과 같은 발효식품에 맛과 풍미 등을 제공하는 중요한 효소로 알려져 있다, 따라서 본 연구자들은 메주의 산업화에 유리한 글루타미나아제를 생산하는 젖산균을 분리하고자 본 연구를 수행하였다.

Table 23. 분리균주의 Glutaminase 활성 측정

균주번호	Glutaminase activity (U/mL)	균주번호	Glutaminase activity (U/mL)	균주번호	Glutaminase activity (U/mL)
KCCM100235	0.16452	KCCM100285	0.0457	KCCM100376	0.00457
KCCM100236	0.03656	KCCM100286	0.02285	KCCM100377	0.03199
KCCM100237	0.05027	KCCM100287	0.02742	KCCM100378	0.05484
KCCM100238	0.17366	KCCM100288	0.03656	KCCM100379	0.07312
KCCM100239	0.02285	KCCM100289	0.03199	KCCM100420	0.05484
KCCM100240	0.02742	KCCM100290	0.0457	KCCM100421	0.05484
KCCM100241	0.02285	KCCM100291	0.10511	KCCM100422	0.02742
KCCM100242	0.02285	KCCM100292	0.06855	KCCM100423	0.01828
KCCM100243	0.06398	KCCM100293	0.01371	KCCM100424	0.01828
KCCM100244	0.05027	KCCM100294	0.1371	KCCM100425	0.06855
KCCM100260	0.03656	KCCM100339	0.04113	KCCM100426	0.02285
KCCM100261	0.05484	KCCM100340	0.06398	KCCM100427	0.07769
KCCM100262	0.02742	KCCM100341	0.2285	KCCM100428	0.10511
KCCM100263	0.05027	KCCM100342	0.05484	KCCM100429	0.05484
KCCM100264	0.05027	KCCM100343	0.05027	KCCM100445	0.06855
KCCM100265	0.04113	KCCM100344	0.01371	KCCM100446	0.0914
KCCM100266	0.0457	KCCM100371	0.03656	KCCM100447	0.0457
KCCM100267	0.06855	KCCM100372	0.00457	KCCM100448	0.0242
KCCM100268	0.30619	KCCM100373	0.00457	KCCM100449	0.02285
KCCM100269	0.05484	KCCM100374	0.0457	KCCM100450	0.03199

균주번호	Glutaminase activity (U/mL)	균주번호	Glutaminase activity (U/mL)	균주번호	Glutaminase activity (U/mL)
KCCM100451	0.03656	KCCM100546	0.05027	S1	0.02285
KCCM100452	0.02742	KCCM100547	0.05941	S2	0.01371
KCCM100453	0.06398	KCCM100548	0.01371	S3	0.21936
KCCM100454	0.01828	KCCM100549	0.01828	S4	0.01371
KCCM100470	0.09597	KCCM100568	0.07312	S5	0.01828
KCCM100471	0.02285	KCCM100569	0.0457	S6	0.00914
KCCM100472	0.01371	KCCM100570	-	S7	0
KCCM100473	0.02742	KCCM100572	0.01371	S8	0.041113
KCCM100474	0.16452	KCCM100573	0.01371	S9	0.02285
KCCM100475	0.02285	KCCM100574	0.02285	S10	0.01828
KCCM100511	0.04113	KCCM100601	0.05941	S11	0.05027
KCCM100512	0.20108	KCCM100602	0.01371	S12	0.00457
KCCM100513	0.04113	KCCM100603	0.10968	S13	0.01371
KCCM100514	0.03199	KCCM100604	0.11425	S14	0.00914
KCCM100540	0.08226	KCCM100605	0.01371	S15	0.02742
KCCM100541	0.05484	KCCM100606	0.01371	S16	0.04113
KCCM100542	0.01371	KCCM100607	0.00914	S17	0.05027
KCCM100543	0.05027	KCCM100608	0.00457	S18	0.0457
KCCM100544	0.02285	KCCM100609	0.01828	S19	0.01828
KCCM100545	0.05484			S20	0.00914

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 목표달성도

목 표	달성도(%)	내 용
전통 발효식품으로부터 분리된 발효용 미생물들의 생리적, 발효학적 특성 규명 및 우수 균주의 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 전통 발효식품으로 2,170 종의 유용미생물 자원을 확보</li> <li>- <i>B. cereus</i> 등 병원성미생물에 대한 항균활성 균주 220점 확보</li> <li>- 발효용 미생물들의 단백질 분해능 78종, 섬유소분해능 32종, 탄수화물 분해능 미생물 210종 확보</li> <li>- 항균활성 우수 미생물의 특성 분석</li> <li>- 분리 미생물의 생리학적, 발효학적 특성 분석을 통한 장류제조용 유용미생물의 확보</li> </ul>
발효식품용 유용미생물 및 유용 물질의 대량 생산 기술 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 확보된 유용미생물로부터 병원상 미생물에 대한 항균활성 스펙트럼 분석</li> <li>- zymography 법을 이용한 유산균 유래 항균물질의 분석 신기술 개발</li> <li>- 확보된 유용미생물의 배양학적 특성 분석</li> </ul>
유용미생물의 활용 기술 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항균활성 및 항균스펙트럼이 우수한 유용미생물제의 항생제 대체용 기술 개발 및 기술이전</li> <li>- 섬유소 발효용 및 발향 유산균 등을 활용한 축산용 조사료 발효제 활용 기술 개발 및 기술이전</li> </ul>

### 제2절 관련분야에의 기여도

평가의 착안점	관련분야에의 기여도
국내 전통 발효식품으로부터 유용미생물 자원의 확보 및 산업화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 전통 발효식품으로 항균활성 및 효소 활성이 우수한 균주 확보</li> <li>- zymography법을 이용한 항균물질의 분석 신기술 개발을 통해 보다 높은 수준의 농도에서도 분석 가능</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항균활성 및 항균스펙트럼이 우수한 유용미생물제의 항생제 대체용 기술 및 기술이전을 통한 산업화 기술 기반 확보</li> <li>- 섬유소 발효용 및 발향 유산균 등을 활용한 축산용 조사료 발효제 활용 기술 개발 및 기술이전을 통한 신시장 개척</li> </ul>



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제1절 성과

1. 국내 전통 발효식품으로 2,170 종의 유용미생물 자원을 확보하였으며, 이 중에서 *B. cereus* 등 병원성미생물에 대한 항균활성 균주 220점, 발효용 미생물들의 단백질 분해능 균주 782종, 섬유소분해능 균주 325종, 탄수화물 분해능 미생물 210종 확보
2. 본 연구결과 관련 특허 5건, SCI 논문 4건, 국내 비SCI 논문 2편을 게재하였으며, 기술이전 2건 추진하였음

### 제2절 성과활용 계획

1. 본 연구에서 발효식품으로부터 확보된 다양한 활성을 갖는 유용미생물자원은 농업용, 축산용 및 식품용으로 활용이 가능함
2. 특히 발효식품 유래 항균활성을 갖는 유산균 자원의 경우, 항생제 대체제로 상당히 각광을 받고 있으며, 본 연구 사업에서 확보된 우수 유산균자원을 기업에 기술 이전하였음
3. 또한, 섬유소 발효용 및 발향 유산균 등은 축산용 조사료 발효제로서의 활용도가 우수하며, 본 연구에서 발굴된 *L. plantarum* 및 *B. subtilis* 등은 조사료 발효제로서 기술이전 하였음
3. 또한 다양한 항균활성을 갖는 유산균이 분비하는 생리활성소제는 천연 식품보존제로서의 활용이 가능함

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 국내에 식품에 관한 법률로 안전에 관한 법률로 ‘식품위생법’이 있고, 기능에 관한 법으로 ‘건강기능식품법’이 있으며, 종합적인 관리를 위하여 ‘식품안전법’이 제정단계에 있으며, 종합적인 식품안전 관리를 위하여 ‘식품안전처’ 설립에 관한 법률이 국회에 계류 중임
- 식품위생법의 식품기준 및 규격개정 사항의 장류미생물 기준규격 개정 (제2005-210호)에 의하면 장류식품에서 유해미생물인 *Bacillus cereus* 균의 경우  $10^4$ cfu/g로 제한하고 있음
- 물론 된장 고추장을 수천년 동안 먹어왔지만 *Bacillus cereus* 균주가  $10^4$ cfu/g이하로 잘 관리되어 왔다는 보고도 없으며, 여태까지 된장 고추장 먹고 죽었다는 보고도 없음. 물론 *Bacillus cereus* 균주가 일부(거의 대부분) 제품에서  $10^5$ cfu/g 정도 또는 그 이상의 경우도 발견됨
- 그렇다고 국제화 시대에 우리 식품의 경쟁력을 높이기 위하여서는 안전성이 필수조건이므로 현재로서 식품위생법을 따르지 않을 방법은 없음. 국제화 시대에 우리나라 전통 발효식품을 수출하려면 국제화에 필요한 미생물관리가 필요함
- 현행법대로라면 장류식품에서 위해미생물 수가 그 일정 수 이상(가능성있음)으로 나온다는 것이 알려지면 (물론 현재까지 안전에 문제가 없다는 것이 수천년 동안 먹어온 결과 증명되었지만), 전체적으로 전통식품에 대한 안전에 문제가 있는 것으로 소비자(소비자 단체)에게 알려지어 전통 산업의 기반이 붕괴되어 산업적으로 큰 타격을 받을 것으로 예측
- 동시에 건강기능식품에서 요구되는 원료와 성분 관련 법과 건강기능표시를 위하여서도 발효식품에 대한 기능성에 관한 연구가 과학적으로 연구가 시작되어야 함
- 20년 이상 경력이 있는 식품가공 전문가 23인을 대상으로 별첨 1과 같은 설문을 통하여 장류의 가공 기술 및 상품화 수준에 대한 설문 내용을 종합한 결과는 그림 1과 같음
- 아래그림에서 보면 장류 제조 역사에 비례하여 가공기술은 84% 정도로 평가했고 기계화를 78%로 조금 낮게 제시하였음

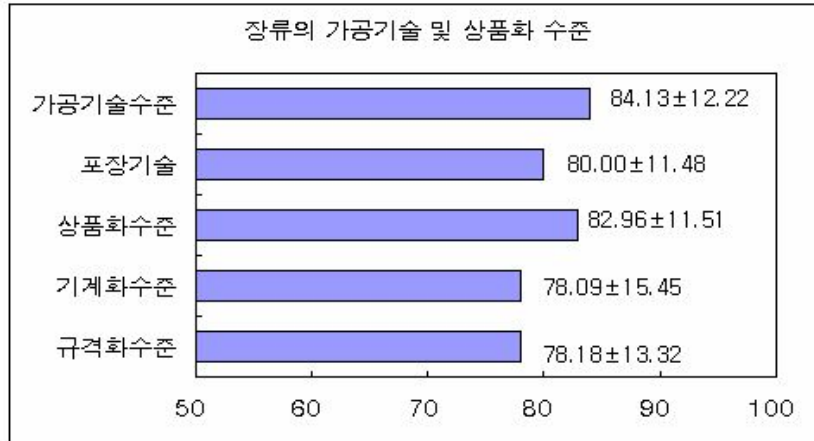


그림 장류의 가공기술 및 상품화 수준

- 21세기의 장류시장은 해찬들, 대상식품, 샘표식품, 진미식품, 신송식품,몽고식품, 오복식품, 삼화식품, 대경식품, 사조산업 등 10여 개 업체가 전체의 90%이상을 차지하고 최근 소비자들이 안전성에 관심이 높아지면서 HACCP 관련 시설과 미생물관리, 전사적 품질관리 등이 이루어지고 있음
- 전통장류 연구는 실험실 규모의 제조 및 품질평가에 치중되어 있으므로, 산업적으로 적용하기에는 어려움이 있음
- 식품의약품안전청 지역특화연구과제(2006, 순창군) 결과 고추장에 대한 2006년도 제품의 경우 *B. cereus* 검출율이 전통고추장은 100%, 공장고추장은 84.7%였으며, *B. cereus*에 오염 정도는  $10^3$  CFU/g 이상인 비율도 각각 32%와 37%로 위험 수준으로 추정되었음(2007년도 제품의 경우에도 32%가 부적합율)
- 된장에 대한 모니터링 결과, 2006년도 제품의 경우 *B. cereus* 검출율이 전통 된장은 85.7%, 공장된장은 93.8%였으며, *B. cereus* 균수는  $10^3$  CFU/g 이상인 비율도 각각 31%와 19%로 전통된장이 공장된장보다 높았음(2007년도 제품의 경우에는 45%가 부적합율)

○ 발효식품 세부기술내용 및 국내외현황 비교분석

세부 기술 내용	국외현황	국내 개발 현황	수준 (국외대비)
우수 종균 분리/생산/배양 (장류, 술 관련 미생물)	세계유전자 은행(ATCC)	KCCM(한국종균협회)	30
소스제조기술 및 현지 상품화 기술	미국 타바스코 소스 중국 이금기 소스	한국식품연구원, 오뚜기, 문옥례가	40
간장의 저염화 및 우수 미생물 이용 생산기술	일본 기꼬망간장, 오노간장	청정원, 해찬들, 샘표	80
간장 발효기술의 최적화 및 기능별 제품생산기술	(재)일본간장기술센터 기꼬망간장 야마사 간장(주) 훈드킨 간장(주)	몽고식품(주) 샘표, 청정원	70
장류에 맞는 균주개발 기술 및 배양	유아사 간장(유) 마루카와 된장(주) 가미코치(주)	청정원, 해찬들	70
숙성제어기술(장류,술)	나가노현 종합기술센터 아키타현종합기술센터	한국식품연구원 한성테크, 대울산업	70
발효부산물의 이용기술 (장류,술)	도쿄 도립식품기술센터	한국식품연구원	50
미생물 안전성&기능성	아키타현종합기술센터 FDA	한국식품연구원 한국생명공학연구원 KFDA	70

※ 국외현황은 최고기술을 보유한 기관 또는 연구자를 기재하고, 국내 개발현황에는 국내 최고수준의 연구 또는 기관을 기재하며, 수준은 국외대비 비율로 동일수준은 100%로 최저를 0%로 평가

○ *B. cereus*에 대한 오염원을 조사한 결과, 공장 장류의 경우는 혼합양념과 당화물에  $4.2 \sim 5.7 \times 10^4$  CFU/g 수준으로 주 오염원 이었고, 전통 장류의 경우는 메주가루에 *B. cereus*가  $9.2 \times 10^4 \sim 4.9 \times 10^5$  CFU/g 수준으로 주 오염원이었음(발효미생물 관리를 통한 저감화 기술개발이 필요함)

## 제 7 장   참고문헌

1. Arnesen, L. P. S., A. Fagerlund and P. E. Granum. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol.* **32**, 579-606.
2. Atrih, A., N. Rekhif, M. Michel and G. Lefebvre. 1993. Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbios.* **75**, 117-123.
3. Cho, Y. S., E. Y. Jung, K. M. Lee, C. H. Yang and D. B. Shin. 2008. Survival, isolation and characterization of *Bacillus cereus* from *Sunshik*. *J. Fd Hyg. Safety.* **23**, 343-347.
4. Cleveland, J., T. J. Montville, F. L. Nes and M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 1-20.
5. Delve, B. J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food. Technol.* **44**, 100-117.
6. Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2000. Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 85-106.
7. FDA. Nisin preparation. 1988. Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Foodand Drug Admin., Fed Reg.* **53**, 11247.
8. Felske. A and A. D. L. Akkermans. 1998. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. *Microb.Ecol.***36**,31-36.
9. Ham, H. J and M. S. Kim. 2006. *Bacillus sp.* & *B. cereus* isolated in dried marine products. *J. Fd Hyg .Safety.* **21**, 159-163.
10. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. Regular, nonsparing gram-positive rods. pp. 565-570. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup>ed. Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
11. Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl.Microbial.* **27**,85-123.
12. Joo, K. S., S. J. Oh, K. S. Han, W. M. Jeon and S. H. Kim. 2002. Characterization and inhibitory activity on *Staphylococcus aureus* of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* KU107. *Kor. J. Food. Sci. Ani. Resour.* **22**, 81-86.

13. Kim, D. S. 2002. Characteristics of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. Oh-B3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 184-188.
14. Kim, M., S. J. Lee, K. J. Seul, Y. M. Park and S. Y. Ghim. 2009. Characterization of antimicrobial substance produced by *Lactobacillus paraplantarum* KNUC25 isolated from Kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 24-32.
15. Klaenhammer, T. R. 1998. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie*.**70**, 337-349.
16. Lee, K. H., Y. P. Jae, J. J. Seon, H. K. Gun, J. L. Hyong, C. C. Hae, K. C. Dae, H. L. Jong and H. K. Jeong. 2007. Characterization of paraplantaricin C7, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paraplantarum* C7 isolated from *Kimchi*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 287-296.
17. Lee, N. K., J. W. Park, I. J. Cho, B. Y. Kim, K. O. Kwon and Y. T. Hahm. 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from *Cheonggukjang* and Its antagonistic effect against *Bacillus cereus*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **40**, 669-673.
18. Lim, S. M and D. S. Im. 2007. Bactericidal effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from *Dongchimi* on *Escherichiacoli*O157. *J. Food. Hyg. Safety* .**22**, 151-158.
19. Lim, S. M., G. J. Lee, S. M. Park and D. S. Im. 2008. Incubation conditions affecting bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from *Dongchimi*. *J. food. Hyg. Safety*. **23**, 113-120.
20. Mattick, A. T. R and A. Hirsch. 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic *streptococci*. *Lancet* **2**, 5-8.
21. Monk, M. and R. C. Clowes. 1964. The regulation of colicin synthesis and colicin factor transfer in *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.*, **36**, 385-392.
22. Schägger, H. and G. V. Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
23. Schoeni, J. L. and A. C. Wong. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J. Food. Protect* .**68** ,636-648.
24. Tagg, J. R. and A. R. McGiven. 1971. Assay systems for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*,

21, 943.

25. U. S. Food and Drug Administration. 1999. Nisin preparation, Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient, Food & Drug Admin Fed Reg. **54**, 6120-6123.
26. Walter, J., G. W. Tannock, T. Tilsala, A. Isjarvi, S. Rodtong, D. M. Loach, K. Munro and T. Alatosava. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 297-303.
27. Atrih, A., N. Rekhif, M. Michel, and G. Lefebvre. 1993. Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbios* **75**, 117-123.
28. Bang, B.H., J.S. Seo, and E.J. Jeong. 2008. A method for maintaining good *Kimchi* quality during fermentation. *Kor. J. Food Nutr.* **21**, 51-55.
29. Cho, M., E.K. Bae, S.D. Ha, and J. Park. 2005. Application of natural antimicrobials to food industry. *Food. Sci. Indus.* **38**, 36-45.
30. Choi, E.M., Y.H. Kim, S.J. Park, Y.I. Kim, Y.M. Ha, and S.K. Kim. 2004. Characterization of bacteriocin, lacticin YH-10, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YH-10 isolated from *Kimchi*. *J. Life Science.* **14**, 683-688.
31. Choi, H.J., C.I. Cheigh, S.B. Kim, and Y.R. Pyun. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from *Kimchi*. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 563-571.
32. Choi, H.J., H.S. Lee, S. Her, D.H. Oh, and S.S. Yoon. 1999. Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable *Kimchi*. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 175-181.
33. Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes, and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 1-20.
34. Delve, B.J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food. Technol.* **44**, 100-117.
35. Dodd, H.M., N. Horn, Z. Hao, and M.J. Gasson. 1992. A lactococcal expression system for engineered nisins. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3683-3693.

36. FDA. Nisin preparation. 1988. Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Food and Drug Admin. Fed. Reg.* **53**, 11247.
37. Felske. A. and A.D.L. Akkermans. 1998. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. *Microb. Ecol.* **36**, 31-36.
38. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. Regular, nonsporing gram-positive rods. pp. 565-570. *In* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup>ed. Williams and Wilkins. Baltimore, U.S.A
39. Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbial.* **27**, 85-123.
40. Jack, R.W., J.R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 171-200.
41. Kim, D.S. 2002. Characteristics of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. Oh-B3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 184-188.
42. Klaenhammer, T.R. 1998. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**, 337-349.
43. Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.* **12**, 39-86.
44. Kwark, K.S., J.G. Cu, K.M. Bae, and H.K. Jun. 1999. Characterization of bacteriocin production by *Lactococcus* sp.J-105 isolated from *Kimchi*. *Kor. J. Life Science.* **9**, 111-120.
45. Lee, M.K., K.K. Rhee, J.K. Kim, S.M. Kim, J.W. Jeong, and D.J. Jang. 2007. A survey of research papers on Korean *Kimchi* and R&D trends. *Kor.J.Food.Culture.* **22**,1 04-114.
46. Lim, S.M. and D.S. Im. 2007. Bactericidal effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from *Dongchimi* on *Escherichiacoli* O157. *J .Food Hyg. Safety.* **22**, 151-158.
47. Lind, H., H. Jonsson, and J. Schnurer. 2005. Antifungal effect of dairy propionibacteria – contribution of organic acids. *Int. J. Food Microbiol.* **98**, 157 - 165.
48. Lingren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS. Microbiol. Rev.* **87**, 149-163.
49. Maisnier, P.S., E. Forni, and J. Richard. 1996. Purification, partial characterization and



mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a Cheese. *Int. J. Food. Microbiol.* **30**, 255-270.

50. Mattick, A.T.R. and A. Hirsch. 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet.* **2**, 5-8.

51. Moonchai, S., W. Madlhoo, K. Jariyachavalit, H. Shimizu, S. Shioya, and S. Chauvatcharin. 2005. Application of a mathematical model and differential evolution algorithm approach to optimization of bacteriocin production by *Lactococcus lactis* C7. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **28**, 15-26.

52. Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. sonomoto, and S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 strain from nham, a traditional Thai fermented Sausage. *Int. J. FoodMicrobiol.* **81**, 137-145.

53. Parente, E., A. Ricciardi, and G. Addario. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 388-394.

54. Schägger, H. and G.V. Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

55. Settanni, L. and A. Corsetti. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food. Microbiol.* **121**, 123-138.

56. Steiles, M.E. and J.W. Hastings. 1991. Bacteriocin producing by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends. Food. Sci. Technol.* **2**, 247-251.

57. Tagg, J.R. and A.R. McGiven. 1971. Assay systems for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, **21**, 943.

58. U. S. Food and Drug Administration. 1999. Nisin preparation, Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Food&Drug Admin Fed Reg.* **54**, 6120-6123.

59. Walter, J., G.W. Tannock, T. Tilsala, A. isjarvi, S. Rodtong, D.M. Loach, K. Munro, and T. Alatosava. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 297-303.

60. Yang, E.J., J.Y. Chang, H.J. Lee, J.H. Kim, D.K. Chung, J.H. Lee, and H.C. Chang. 2002. Characterization of the antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum* and induction of bacteriocin production. *Korean. J. Food. Sci. Technol.* **42**, 311-318.

**제4협동 : 발효미생물 분리 및 동정, 동정 분리된 미생물  
특허 및 보존**

협동연구기관명 : (사)한국종균협회

협동연구책임자 : 박 정 민



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 목표

전통 발효식품의 유용 미생물에 관한 원천기술의 개발로서 전통 발효 식품의 유용미생물의 분리 및 Microflora map에 관한 연구를 수행하고, 전통발효의 원인 미생물을 장기적으로 안전하게 보존함으로써 전통 발효 식품의 효율적 유지 관리를 목표로 하며, 각기 보존된 유용 발효미생물의 효율적인 이용을 위하여 적절한 분양 시스템의 구축 및 발효미생물자원의 영구적인 보존을 위한 정보관리 시스템의 개발을 목표로 함.

## 제2절. 연구개발의 내용

- 전통 식품 시료로부터 발효 미생물의 Microflora를 확인.
- 전통 식품 시료의 microflora를 확립 함으로 인하여 다양한 전통 메주의 발효에 관여하는 각종 발효 미생물의 정보를 확인 함.
- 분리된 유용 미생물을 특히 기탁에 의한 보존을 수행 함.
- 전통 식품 시료의 microflora중 다수를 차지하는 중요한 미생물을 분리 하며 또한 분리된 미생물의 안전한 보존을 위하여 장기 보존을 수행 함.
- 전통 식품 시료로부터 분리된 발효 미생물의 이용을 원활하게 하기위한 분양시스템을 구축 하며, 이에 따라 우수한 발효 미생물의 활용을 통하여 전통 장류의 과학적 기반을 마련 함

### 1. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

가. 우리나라는 오래전부터 기능성식품으로서 전통발효식품인 된장, 고추장 및 청국장 등이 있으며 이러한 전통 발효식품의 건강기능성이 세계적으로 알려졌음에도 불구하고 제조공정에 대한 과학화, 안전성, 건강기능성에 강화 등 종합적인 연구가 미흡하며 특히 발효식품에 중요한 역할을 담당하는 미생물에 관한 연구는 수년 동안 이루어 졌음에도 불구하고 개별적인 연구에 머물러 있는 상태이기에 전통발효과정에 영향을 미치며 변화하는 미생물의 전체적인 지도가 밝혀지지 않은 실정임.

나. 우리나라의 대표적인 전통발효식품 중 된장, 고추장, 청국장의 원료로 사용되는 전통메주의 미생물의 변화를 관찰하기 위하여 전통메주의 Metagenome 및 미생물을 분리하고 각각의 미생물을 동정하여 국내에서 생산되는 전통메주의 Microflora map에 관한 연구를 수행하여 전통메주의 발효에 영향을 미치는 미생물에 관한 Microflora map을 완성함으로써 국내 전통메주의 과학화에 목적을 둠.

다. 전통 발효 식품은 전 국민의 주요 식품으로서 식탁에서 빼놓을 수 없는 가장 기본이 되는 식품으로서 역사적 배경 및 다양한 과정을 통하여 정립이 된 식품이지만 이에 반하여 그 과학적인 근거를 제시하는데 미흡한 실정으로서 우리 전통식품의 세계화를 위하여 꼭 해결을 해야

할 과제 임.

라. 현재 국내 전통식품에 관한 과학적 연구는 많은 부분이 이루어지고 있지만 현실적으로 전통발효 식품의 그 원인균 이라고 할 수 있는 전통발효 미생물에 관한 정확한 연구 및 그 미생물의 분리 및 보존이 이루어 지지 않은 실정으로서 국내 전통 식품의 과학적 기반 및 전통식품의 안정적인 유지 관리를 위하여 매우 중요한 연구 과제라 판단 됨.

마. 본 과제에서는 전통발효식품의 발효과정에서 microflora를 연구하며 그 과정에서 발생하는 다양한 미생물을 분리 보존함으로써 전통식품에 관여하는 미생물에 관한 연구의 기반 및 중요한 종균을 분리 동정 및 관리하여 전통식품의 과학적 입증을 위한 연구를 수행 함.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내기술현황

1. 현재 국내에서 연구된 연구결과를 참고하면 전통된장 및 간장의 숙성기간별 생육 미생물의 분리에 대한 결과 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *Lactobacillus fermentum* 등 4종이 발효과정에서 발견되는 주요 균주로 탐색되었으나 전체적인 미생물 지도와는 많은 차이가 있을 것으로 예상된다.

2. 개량식 및 재래식 고추장의 세균 분포의 결과에서는 숙성초기에는 7속 14종이 분리되었고 숙성말기에는 3속 6종만이 분리되었으며 그중에서 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis*가 우세 균종으로 분리되었다고 보고된 바 있으나 관련된 미생물을 보존하거나 적절한 관리를 통하여 전통메주 유래 미생물의 자원 관리가 이루어지고 있지는 않음.

3. 국내에서 많은 연구가 진행이 되어진 김치의 경우 발효 중 미생물의 변화양상에 대해서는 기존의 우점종인 *Leu.mesenteroides* 결과와 상이한 아직까지 보고되지 않았던 *W. koreensis* 균주가 새로운 우점종이라는 사실을 알게 되었으며, 이와 같이 미생물의 발효 과정 중에 발생하는 우점종의 변화에 따라서 식품의 상품성이 좌우 되는 것으로 예상이 되며 이에 따르는 관련 미생물의 적절한 연구가 진행되어야 할 시점임.

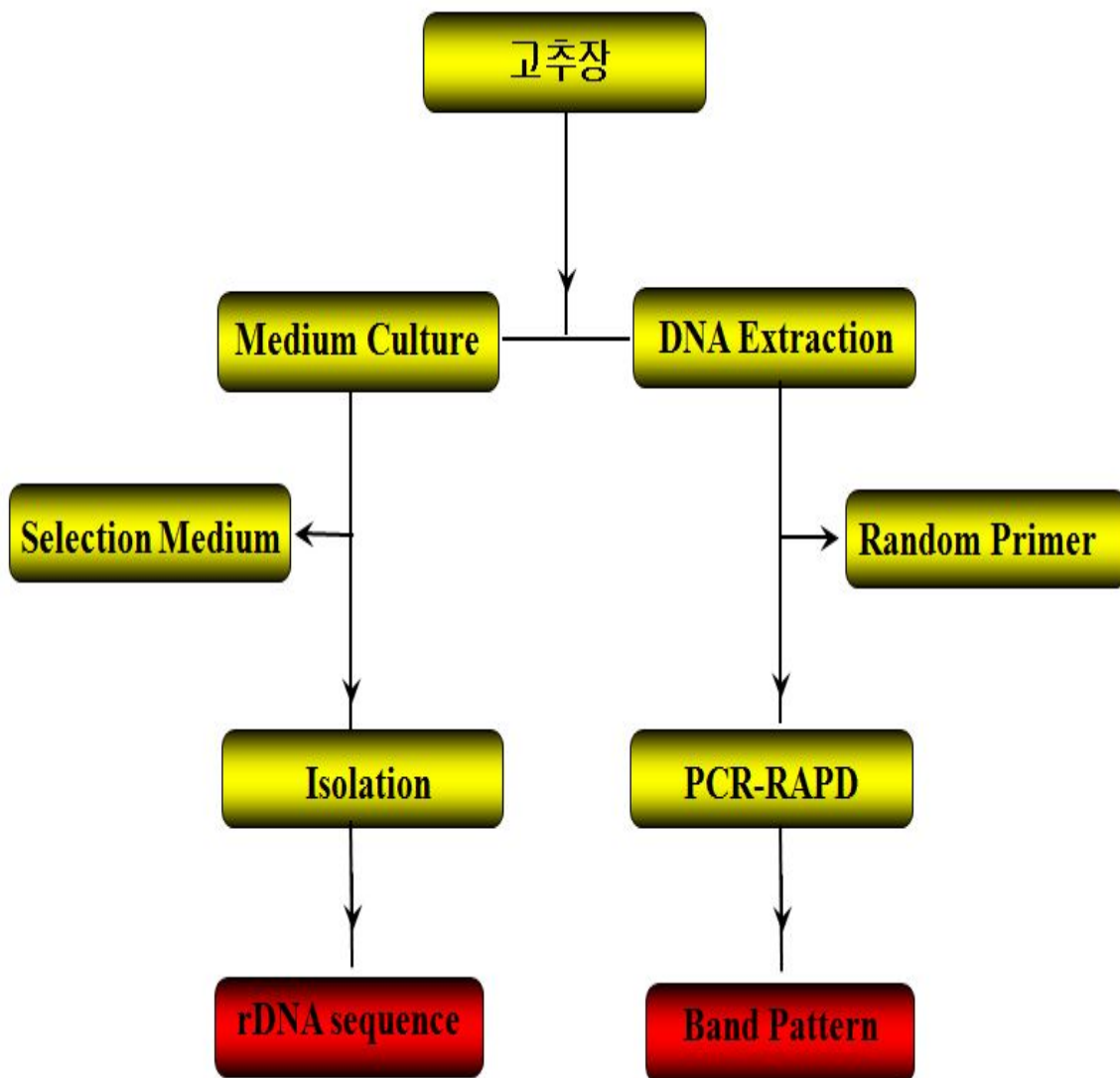
### 2절 국외기술개발현황

1. Raw milk 와 Cheese 에서의 Bacterial community를 culture dependent 와 culture independent 두개의 방법으로 나누어 비교해 monitoring 한 결과에서는 두 방법에서 공통적으로 유산균이 우점종으로 차지하고 있었다는 미생물 지도가 작성이 되어진 상태이며, culture independent 방법에서는 culture dependent 결과에서 볼 수 없었던 uncultured bacteria 가 많이 분리 되었으며 *Clostridiaceae*, *Aerococcaceae*, *Betaproteobacteria* 등 다양한 미생물이 발견되었다고 보고되고 있음.

2. 일본의 낫또의 경우 발효과정에 관여하는 미생물이 모두 밝혀져 있는 상황이며 이에 따라서 지역에 따른 적절한 종균을 활용하여 각 지역의 특색에 맞는 적절한 발효 산물을 생산하고 있는 실정임.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

전통발효식품의 발효과정에서 microflora를 연구하며 그 과정에서 발생하는 다양한 미생물을 분리 보존함으로써 전통식품에 관여하는 미생물에 관한 연구의 기반 및 중요한 종균을 분리 동정 및 관리하여 전통식품의 과학적 입증을 위한 연구를 수행하였다. 본 연구에서는 재래식 및 개량식 고추장의 품질을 좌우하는 여러 인자 중에서도 고추장의 맛, 향미, 질감에 가장 큰 영향을 끼치는 미생물의 패턴을 각 미생물이 잘 자랄 수 있는 배지를 사용하여 분리 후 DNA sequencing을 통해 동정하고 또한 분자생물학적인 방법인 PCR-RAPD로 밴드의 패턴을 비교함으로써 고추장내 미생물의 패턴을 알아보하고자 한다 .





## 1절 1차년도 과제 결과 요약

본 과제는 전통발효식품의 발효과정에서 microflora를 연구하며 그 과정에서 발생하는 다양한 미생물을 분리 보존함으로써 전통식품에 관여하는 미생물에 관한 연구의 기반 및 중요한 종균을 분리 동정 및 관리하여 전통식품의 과학적 입증을 위한 연구를 수행 함.

순창군에서 생산되는 전통고추장의 발효표준미생물을 분리하기 위한 시료 7개 확보

국내에서 생산된 다양한 업체의 개량식 고추장 시료 5개를 확보하여 본 연구의 시료로서 사용을 함.

개량식 및 재래식 고추장 시료로부터 발효미생물의 microflora의 확인을 위하여 각각의 시료로부터 전체 미생물의 cfu값을 확인하며 동시에 각 시료로부터 대표성이 있는 colony를 분리하여 동정함으로써 전통 메주 시료의 미생물 microflora를 확인 함.

평판배지 상에 나타난 집락을 각각의 종류에 따라 계수 한 후 선별 배지를 통해 배양 분리된 미생물은 colony의 색과 형상, 현미경 관찰하여 각 시료당 호기성 세균은 30개, 호염성 세균은 30개, 아포 생성균의 경우 10개씩 분리하였고, 호모와 호염성 호모의 경우 각각 30개씩 분리하였으며 총 분리한 미생물은 958개의 미생물이 분리되었으며 그 중 호기성 세균은 360개, 호염성 세균은 359개, 호모는 120개 호염성 호모는 119개의 미생물을 확보하였음

각각의 시료로부터 전체 미생물의 cfu값은 몇 개의 시료에서 검출이 되지 않았지만 호기성 세균은 평균 7.13 logCFU/g, 호염성 세균은 평균 6.12 logCFU/g, 아포 생성균의 경우 평균 4.67 logCFU/g, 의 값을 나타내었고 호모는 평균 4.80 logCFU/g, 호염성 호모의 경우 평균 3.52 logCFU/g 의 값을 확인 함

개량식 및 재래식 고추장의 세균 분포의 결과는 총 4속 24종이 분리되었고 *Bacillus velezensis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cohnii*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus acidovorans*, *Bacillus aerius*, *Bacillus benzoborans*, *Bacillus axarquiensis*, *Oceanobacillus sp*, *Serratia marcescens*, *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Virgibacillus carmonensis* 등이 확인되었으며 그중에서 우세 균종으로 *Bacillus velezensis*가 새롭게 확인되었음

개량식 및 재래식 고추장의 효모 분포의 결과는 3속 6종만이 분리되었으며 *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces sp*, *Candida lactis*, *Starmerella sp*, *Candida apicola* 가 확인되었으며 그중에서 우세 균종으로 *Zygosaccharomyces rouxii* 가 확인되었음

호염성 조건의 배양을 통해 *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Oceanobacillus sp*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Virgibacillus carmonensis*, *Oceanobacillus soja*의 호염성 세균을 새로 확인함

아직 균주명이 밝혀지지 않은 Unidentified bacterium을 확인함

개량식 및 재래식 고추장 시료로부터 확인 된 발효미생물의 microflora로부터 대표성이 있는 발효 미생물을 안전하게 보존함으로써 전통 메주의 과학적 접근을 위해 기본적인 발효미생물을 안전하게 보존함.

분리된 미생물의 동정 실험을 통하여 다양한 미생물의 종류를 확인함으로써 전통장류의 발효에 영향을 미치는 미생물을 확인 함.

분리 및 동정된 발효표준미생물의 장기적이고 안정적인 보존을 수행함.

전통발효 식품을 생산하는 대부분의 업체들은 아직까지도 비과학적인 방법에 의한 제품의 생산을 하며, 발효에 중요한 종균의 관리가 이루어지고 있지 못하는 실정이므로 전통발효 식품 생산업체에게 발효표준미생물을 분양을 함으로서 전통장류의 안정적인 품질을 유지하기 위한 시스템을 구축하도록 함.

## 2절 2차년도 결과

### 1. 16S rDNA gene 염기서열분석에 의한 고추장 미생물의 분포

고추장내 존재하는 미생물의 패턴을 culture-dependent(16S rDNA sequencing)을 통해 비교하고자 하였다

#### 가. 실험 방법

##### (1) 고추장 시료 수집

고추장 시료의 구입은 전통형과 공장형 고추장 제조방법을 확인하여 구입하였다. 전통형 고추장(Table 1)은 순창 민속마을에 입주한 업체에서 전통방식으로 제조하여 1~2 년간 숙성시킨 후 판매용으로 포장된 7개 업체의 고추장을 구입하여 4℃ 냉장고에 보관하였다. 공장형 고추장(Table 2)은 대형 마트에서 판매되는 5개 업체의 제품을 구입하여 4℃ 냉장고에 보관하였다.

**Table 1. Screening from the 7 different traditional *kochujang* of folk village in Sunchang-gun.**

No.	Name of company	Location
TK1	Myongsung	Jeonbuk/Sunchang
TK2	Negohyang	Jeonbuk/Sunchang
TK3	Kimyoungsun	Jeonbuk/Sunchang
TK4	Moonokrae	Jeonbuk/Sunchang
TK5	Dongbaig	Jeonbuk/Sunchang
TK6 <sup>1)</sup>	Kipeonsam	Jeonbuk/Sunchang
TK7 <sup>2)</sup>	Sunchanggol	Jeonbuk/Sunchang

TK : Traditional *Kochujang*

<sup>1,2)</sup> Mixed of traditional and commercial method

Table 2. Screening from the 5 different commercial *kochujang* produced by major company.

No.	Company	Location
IK1	Sh	Chungnam/chonan
IK2	J	Daejeon/yuseong
IK3	S	chungbuk/yeongdong
IK4	D	Jeonbuk/Sunchang
IK5	C	Chungnam/nonsan

IK : Industry *Kochujang*

## (2) 선발 균주의 동정 및 분석

### (가) Genomic DNA 추출

순수 분리된 세균 및 곰팡이, 효모의 genomic DNA를 Varmanen 등의 방법을 변형하여 추출하였다. 각각 해당 평판배지에서 1~3일간 배양하여 대수기에 도달한 미량의 colony를 50 mM EDTA buffer에 넣고 잘 풀어준 후 50 mg/ml lysozyme(Sigma)을 넣어 37°C 항온 수조에서 하룻밤 반응시켰다. 그 후 Wizard genomic DNA purification kit(Promega)를 사용하여 제조사의 사용지침에 따라 DNA를 추출한 후 -20°C에 보관하면서 DNA 증폭에 사용하였다.

### (나) 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)

분리된 genomic DNA를 증폭하기 위해 사용한 primer를 Table 3에 나타내었다. 세균과 유산균은 16S rDNA에 사용하는 27F와 1492R primer, 효모는 18S rDNA에 사용하는 NS1과 NS8 primer, 곰팡이는 ITS-5.8S rDNA에 사용하는 ITS1과 ITS4 primer를 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 20 mM ×10 reaction buffer, 2.5 mM dNTP Mixture, Ex-Taq polymerase(TaKaRa)를 사용하였으며 반응에 사용한 primer 농도는 20 pmol이었고 template DNA의 농도는 20~80 ng이었으며 최종 반응 부피는 50 ul였다. PCR 반응은 95°C에서 30초간 DNA를 변성시킨 후, 60°C에서 1분간 신장과정을 거쳐 72°C에서 45초간 증폭을 시키는 방법으로 수행하였으며 40회 반복하였다. PCR은 Bio-Rad사의 MyCycler Thermal Cycler System을 사용하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동(×0.5 TBE buffer)하여 Ethidium bromide(0.5 µg/ml)에 염색한 후 반응 산물을 확인하였다. PCR 반응이 완료된 뒤 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega)을 사용하여 PCR 반응산물을 정제한 후 DNA 염기서열 분석을 수행하였다.

**Table 3. Sequences of universal primers used in this study**

Specificity	Nucleotide sequence	Size(kb) <sup>1)</sup>
Bacteria	27F : 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 1492R : 5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3'	ca. 1.5
Yeast	NS1 : 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' NS8 : 5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'	ca. 1.8
Fungi	ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ca. 0.5

<sup>1)</sup> Size in kb of PCR product

F : Forward, R : Reverse

(다) 염기서열 분석

정제된 PCR 반응산물을 염기서열을 결정하기 위해 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits(Applied Biosystems Co.)을 사용하여 수행하였다. MJ Research사의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler를 사용하여 PCR에서 사용한 동일한 primer(Table 3)로 염기서열을 분석하였으며 반응이 완료되면 에탄올을 이용하여 반응에 참여하지 않은 dNTP와 반응물을 분리하였고 정제된 PCR 반응산물은 다시 3차 증류수에 녹여 ABI PRISM 3730XL Analyzer(96 capillary type)를 통해 염기서열을 결정하였다.

(라) 계통학적 분석

DNA 염기서열 분석이 완료된 후 미국 NCBI의 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 염기서열과 비교하였다. 검색 결과를 기초로 유사도가 높은 미생물의 결과를 분리균의 염기서열과 함께 염기서열 정렬 프로그램인 Clustal X를 이용하여 multiple alignment를 수행하였고 이때 gap과 5' 말단 과 3' 말단의 일치되지 않는 염기를 삭제하였다. 정렬된 염기서열은 phylip format 파일로 저장하여 ribosomal database project-II(<http://rdp.cme.msu.edu;RDP-II>)에 upload시킨 뒤 온라인 프로그램인 similarity matrix를 사용하여 DNA 유사도를 분석하였다. 계통적인 유연관계를 비교하기 위해 MEGA 2.1 package를 사용하여 neighbor-joining으로 phylogenetic tree를 작성 하였다.

## 나. 실험결과

### (1) 세균군의 분포

전통형과 공장형 고추장 12개 시료에서 분리하여 동정된 세균군의 분포 결과는 Table 4에 나타내었다. 모든 시료에서 3속 19종 동정되었으며 *B. velezensis*가 모든 전통형 시료에서 확인되었고 *B. subtilis* subsp. *subtilis*는 모든 공장형 시료에서 확인할 수 있었다. *B. acidovorans*, *B. benzoborans*, *B. cereus*, *B. cohnii*, *B. megaterium*, *B. safensis*, *S. sp*은 각 고추장 시료 한가지에서만 발견되었는데 분포율이 매우 낮아 고추장의 주요 미생물인지 확인할 수 없었다.

전통형 고추장인 TK 1시료에서 *B. velezensis* 50% 이상을 차지하였으며 다음으로 *B. amyloliquefaciens* 24%이며 그 외 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *B. atrophaeus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. aerius*, *B. axarquiensis*, *B. safensis*가 동정되었다. TK 2시료에서는 *B. velezensis* 53% 이상을 차지하였으며 다음으로 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 17%이며 그 외 *B. licheniformis*, *B. nematocita*, *B. sonorensis*, *B. aerius*가 동정되었다. TK 3시료에서는 *B. velezensis* 43% 이상을 차지하였으며 다음으로 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 27%이며 그 외 *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. sonorensis*, *B. atrophaeus*, *B. pumilus*가 동정되었다. TK 4시료에서는 *B. licheniformis* 43% 이상을 차지하였으며 다음으로 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 20%이며 그 외 *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. acidovorans*가 동정되었다. TK 5시료에서는 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 37% 이상을 차지하였으며 다음으로 *B. licheniformis* 23%이며 그 외 *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. sonorensis*, *Serratia sp*, *S. marcescens*가 동정되었다. TK 6 시료에서는 *B. velezensis* 63% 이상을 차지하였으며 다음으로 *B. amyloliquefaciens* 37%로 전체 미생물의 분포가 단 2종의 미생물로 이루어진 단순한 분포를 확인할 수 있었다. TK 7시료에서는 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 53% 이상을 차지하였으며 다음으로 *B. velezensis* 40%이며 그 외 *B. cereus*가 동정되었다.

공장형 고추장인 IK 1시료에서 *B. velezensis* 20%, *B. subtilis* subsp. *subtilis* 20%, *B. pumilus* 20%이며 그 외 *B. nematocita*, *B. licheniformis*, *S. marcescens*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cohnii*, *B. benzoborans*, *B. atrophaeus*, *B. sonorensis*로 전체 미생물의 분포가 11종의 미생물로 이루어진 다양한 분포를 확인할 수 있었다. IK 2시료에서 *B. velezensis* 57% 이상을 차지하였으며 다음으로 *B. amyloliquefaciens* 27%이며 그 외 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *B. nematocita*, *B. pumilus*가 동정되었다. IK 3시료에서 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 93% 이상을 차지하였으며 그 외에 *B. licheniformis*로 전체 미생물의 분포가 단 2종의 미생물로 이루어진 단순한 분포를 확인할 수 있었다. IK 4시료에서 *B. velezensis* 80% 이상을 차지하였으며 그 외 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *B. licheniformis*가 동정되었다. IK 5시료에서 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 47% 차지하였으며 그 외 *B. licheniformis*, *B. velezensis*가 동정되었다.

이러한 결과는 전통형 고추장에서 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *B. licheniformis*가 주요 균주로 동정되었고 그 외 *Pasteurella* 속이 높은 분포율을 보였으며 공장형 고추장에서는 *B. licheniformis*가 숙성 말기 76% 이상을 나타내었다는 Lee 등의 보고와 순창 전통 고추장 총 29종의 고추장 표본 중 *B. licheniformis*가 주요 미생물이라는 Jin 등의 보고와 상이하였으며 전통형과 공장형 고추장의 발효숙성 시기별 *Bacillus* 속의 분포율을 보고한 한 등<sup>1)</sup>의 연구에서

숙성 12개월 후에 *B. subtilis* 46%를 차지하는 전통형 고추장과 *B. licheniformis*가 40% 이상을 보이는 공장형 고추장의 보고와도 상이하였다. DNA 염기서열 분석을 통하여 동정한 본 연구는 *B. velezensis*가 고추장내에서 주요 균주임을 확인하였다.

**Table 4. Distribution pattern of the identified bacteria from traditional and commercial *kochujang*.**

Identified Bacteria	Traditional							Commercial				
	TK1 <sup>1)</sup>	TK2	TK3	TK4	TK5	TK6	TK7	IK1	IK2	IK3	IK4	IK5
<i>B. acidovorans</i>	-	-	-	1 <sup>2)</sup> (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. aerius</i>	1 (3)	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i>	7 (24)	-	1 (3)	-	-	11 (37)	-	1 (3)	8 (27)	-	-	-
<i>B. atropheus</i>	1 (3)	-	1 (3)	-	-	-	-	1 (3)	-	-	-	-
<i>B. axarquiensis</i>	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. benzoborans</i>	-	-	-	-	-	-	-	1 (3)	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	1 (3)	-	-	-	-	-
<i>B. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	2 (7)	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	-	4 (13)	2 (7)	13 (43)	7 (23)	-	-	3 (10)	-	2 (7)	1 (3)	2 (7)
<i>B. megaterium</i>	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. nematocita</i>	-	1 (3)	-	-	-	-	1 (3)	1 (3)	1 (3)	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	1 (3)	-	4 (13)	5 (17)	1 (3)	-	-	6 (20)	1 (3)	-	-	5 (17)
<i>B. safensis</i>	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. sonorensis</i>	-	3 (10)	1 (3)	-	3 (10)	-	-	2 (7)	-	-	-	1 (3)
<i>B. subtilis</i>	2 (7)	5 (17)	8 (27)	6 (20)	11 (37)	-	16 (53)	6 (20)	3 (10)	28 (93)	5 (17)	14 (47)
<i>B. velezensis</i>	15 (50)	16 (53)	13 (43)	5 (17)	5 (17)	19 (63)	12 (40)	6 (20)	17 (57)	-	24 (80)	7 (23)
<i>S. sp</i>	-	-	-	-	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	2 (7)	-	-	1 (3)	-	-	-	-
Uncultured bacterium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (3)

<sup>1)</sup> Sample of isolated were shown in Table 1, Table 2.

<sup>2)</sup> Identified numbers, ( ): isolation frequency(%) B: *Bacillus*, S: *Serratia*

## (2) 호염성 세균균의 분포

전통형과 공장형 고추장 12개 시료에서 분리하여 동정된 호염성 세균균의 분포 결과는 Table 5에 나타내었다. 모든 시료에서 4속 15종으로 동정되었으며 *B. licheniformis*가 모든 전통형 시료에서 확인되었고 *B. velezensis*는 분포율이 낮지만 모든 공장형 시료에서 확인할 수 있었다. *B. alcalophilus*, *B. megaterium*, *Oceanobacillus iheyensis*, *O. soja*, *Virgibacillus*

*carmonensis*은 각 고추장 시료 한가지에서만 발견되었는데 분포율이 매우 낮아 고추장의 주요 미생물인지 확인할 수 없었다.

전통형 고추장인 TK 1시료에서 *O. oncorhynchi* 60% 이상을 차지하였으며 다음으로 *B. velezensis* 이며 그 외 *B. licheniformis*, *B. alcalophilus*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*가 동정되었다. TK 2시료에서는 *B. licheniformis* 77% 이상을 차지하였으며 그 외 *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*가 동정되었다. TK 3시료에서는 *B. licheniformis* 87% 이상을 차지하였으며 그 외 *B. pumilus*, *B. velezensis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*가 동정되었다. TK 4시료에서는 *B. licheniformis* 73% 이상을 차지하였으며 그 외 *B. subtilis* subsp. *subtilis*가 동정되었다. TK 5시료에서는 *B. licheniformis* 53% 이상을 차지하였으며 그 외 *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. pumilus*가 동정되었다. TK 6시료에서는 *O. sp.* 73% 이상을 차지하였으며 그 외 *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*가 동정되었다. TK 7시료에서 *B. licheniformis* 80% 이상을 차지하였으며 그 외 *B. velezensis*, *O. oncorhynchi* subsp. *oncorhynchi*, *O. sp.* 가 동정되었다.

공장형 고추장인 IK 1시료에서 *B. licheniformis* 23%이며 그 외 *O. oncorhynchi*, *B. cohnii*, *B. megaterium*, *V. carmonensis*, *B. atrophaeus*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *O. iheyensis*, *B. pumilus* 로 전체 미생물의 분포가 12종의 미생물로 이루어진 다양한 분포를 확인할 수 있었다. IK 2시료에서 *B. amyloliquefaciens* 48% 이상을 차지하였으며 그 외 *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. cohnii*, *B. velezensis*, *O. soja* 가 동정되었다. IK 3시료에서 *B. licheniformis* 67% 이상을 차지하였으며 그 외에 *B. velezensis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. pumilus*가 동정되었다. IK 4시료에서 *B. licheniformis* 60% 이상을 차지하였으며 그 외 *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*가 동정되었다. IK 5시료에서 *B. licheniformis* 70% 차지하였으며 그 외 *B. velezensis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. pumilus*가 동정되었다. 이러한 결과는 전통형 고추장에서 *B. subtilis* 와 *B. licheniformis*가 주요 균주로 동정되었으며 공장형 고추장에서는 *B. licheniformis* 가 숙성 말기 76% 이상을 나타내었다는 Lee 등의 보고와 일치하였다.



Table 5. Distribution pattern of the identified halophilic bacteria from traditional and commercial *kochujang*.

Identified Halophilic bacteria	Traditional							Commercial				
	TK1 <sup>1)</sup>	TK2	TK3	TK4	TK5	TK6	TK7	IK1	IK2	IK3	IK4	IK5
<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	1 <sup>2)</sup> (3)	-	-	-	7 (23)	-	2 (7)	14 (48)	2 (7)	11 (37)	-
<i>B. alcalophilus</i>	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. atrophaeus</i>	-	-	-	-	1 (3)	-	-	2 (7)	-	-	-	-
<i>B. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	1 (3)	1 (3)	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	2 (7)	23 (77)	26 (87)	22 (73)	16 (53)	1 (3)	24 (80)	7 (23)	-	20 (67)	18 (60)	21 (70)
<i>B. megaterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	1 (3)	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	-	-	1 (3)	-	1 (3)	-	-	3 (10)	-	1 (3)	-	1 (3)
<i>B. subtilis</i>	3 (10)	2 (7)	1 (3)	7 (23)	12 (40)	-	-	3 (10)	9 (31)	6 (20)	-	5 (17)
<i>B. velezensis</i>	6 (20)	4 (13)	2 (7)	-	-	-	2 (7)	3 (10)	2 (7)	1 (3)	1 (3)	3 (10)
<i>O. iheyensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	2 (7)	-	-	-	-
<i>O. oncorhynchi</i>	18 (60)	-	-	-	-	-	2 (7)	2 (7)	-	-	-	-
<i>O. sp</i>	-	-	-	-	-	22 (73)	2 (7)	-	-	-	-	-
<i>O. soja</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (3)	-	-	-
<i>V. carmonensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	1 (3)	-	-	-	-
Uncultured bacterium	-	-	-	1 (3)	-	-	-	3 (10)	2 (7)	-	-	-

<sup>1)</sup> Sample of isolated were shown in Table 1, Table 2.

<sup>2)</sup> Identified numbers, ( ) : isolation frequency(%)

B: *Bacillus*, O: *Oceanobacillus*, V: *Virgibacillus*

### (3) 효모군의 분포

전통형과 공장형 고추장 12개 시료에서 분리하여 동정된 효모군의 분포 결과는 Table 6에 나타내었다. 효모가 확인된 모든 시료에서 3속 6종으로 동정되었으며 4개의 전통형 고추장에서 *Zygosaccharomyces rouxii*를 확인할 수 있었다. *Candida apicola*, *Z. bailii*, *Starmerella sp*은 TK 3시료에서만 발견되었는데 분포율이 매우 다양하여 고추장의 주요 미생물인지 확인할 수 없었다.

전통형 고추장인 TK 1시료에서 *Z. rouxii* 87% 이상을 차지하였으며 다음으로 *C. lactis*, *Z. sp*가 동정되었다. TK 2시료에서 *Z. rouxii* 97% 이상을 차지하였으며 다음으로 *Z. sp*가 동정되었다. TK 3시료에서 *C. lactis* 34% 이상을 차지하였으며 다음으로 *Z. bailii*, *S. sp*, *C. apicola*, *Z. rouxii*로 전체 미생물의 분포가 5종의 미생물로 이루어진 다양한 분포를 확인할 수 있었다. TK 5 시료에서 *Z. rouxii* 93% 이상을 차지하였으며 다음으로 *Z. sp*가 동정되었다. 이런 결과는 전통형 고추장에서 *Z. rouxii*가 가장 높은 분리 빈도수를 보였다는 Jung 등의 보고와는 일

치 하지만 *Pichia* 속, *Cryptococcus* 속, *Rhodotorula* 속 등이 분석되었다는 보고와는 상이하였고 전통 고추장의 숙성 중 *Hansenula anomala*가 주요 우점종이라는 보고와 상이하였다.

**Table 6. Distribution pattern of the identified yeast from traditional and commercial *kochujang*.**

Identified Yeast	Traditional							Commercial				
	TK1 <sup>1)</sup>	TK2	TK3	TK4	TK5	TK6	TK7	IK1	IK2	IK3	IK4	IK5
<i>C. apicola</i>	-	-	9 (30)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lactis</i>	1 <sup>2)</sup> (3)	-	10 (34)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sp</i>	-	-	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Z. bailii</i>	-	-	6 (20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Z. rouxii</i>	26 (87)	29 (97)	4 (13)	-	28 (93)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Z. sp</i>	3 (10)	1 (3)	-	-	2 (7)	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup> Sample of isolated were shown in **Table 1, Table 2.**

<sup>2)</sup> Identified numbers, ( ) : isolation frequency(%)

C: *Candida*, S: *Starmerella*, Z: *Zygosaccharomyces*

#### (4) 호염성 효모균의 분포

전통형과 공장형 고추장 12개 시료에서 분리하여 동정된 호염성 효모균의 분포 결과는 Table 7에 나타내었다. 호염성 효모가 확인된 모든 시료에서 2속 3종으로 동정되었으며 TK 1, TK2, TK 5시료에서 *Z. rouxii*가 주요 미생물로 확인할 수 있었고 TK 3시료에서는 *C. lactis*가 주요 미생물로 확인할 수 있었다.

전통형 고추장인 TK 1시료에서 *Z. rouxii* 97% 이상을 차지하였으며 다음으로 *Z. sp*가 동정되었다. TK 2시료에서 분리한 효모가 모두 *Z. rouxii*로 동정되었다. TK 3시료에서는 분리한 효모가 모두 *C. lactis*로 동정되었다. TK 5시료에서 분리한 효모가 모두 *Z. rouxii*로 동정되었다. 이런 결과는 순창 지역내 고추장 25표본 중 23표본에서 *Z. psedorouxii*가 지배균으로 동정되었다는 Jin 등의 보고와 상이하였다. 이전의 효모균의 분포에서보다 좀 더 단순한 미생물 패턴을 확인할 수 있었다.

**Table 7. Distribution pattern of the identified halophilic yeast from traditional and commercial *kochujang*.**

Identified Halophilic yeast	Traditional							Commercial				
	TK1 <sup>1)</sup>	TK2	TK3	TK4	TK5	TK6	TK7	IK1	IK2	IK3	IK4	IK5
<i>C. lactis</i>	-	-	29 <sup>2)</sup> (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Z. rouxii</i>	29 (97)	30 (100)	-	-	30 (100)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Z. sp</i>	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup> Sample of isolated were shown in **Table 1, Table 2.**

<sup>2)</sup> Identified numbers, ( ) : isolation frequency(%)

C: *Candida*, Z: *Zygosaccharomyces*

#### (5) 전통형 고추장의 미생물 균총

전통형 고추장내 존재하는 모든 미생물의 균총을 확인하기 위해 고추장 시료에서 각 미생물별 총 균수를 확인한 후 각각 30 균주씩 분리하여 총 659개의 균주를 ribosomal DNA 염기서열 분석을 수행하였으며 총 균수와 동정된 빈도수를 바탕으로 전체 미생물의 균총을 분석한 결과 총 7속 26종의 미생물이 확인되었고 그 결과는 Fig. 1에서 나타내었다. 전체 미생물중 95.1%가 *Bacillus* 속임을 확인하여 순창 고추장내 97% 이상이 *Bacillus* 속이 지배균이라는 Jin 등의 보고와 일치하였으며 그 다음으로 *Oceanobacillus* 속이 1.9%를 차지하였고 *Serratia* 속이 1.4%, *Candida* 속이 0.9%, *Zygosaccharomyces* 속이 0.5%였으며 또한 아직 균주명이 밝혀지지 않은 Unidentified bacterium이 확인되었다. 그 중에서 전체 고추장 미생물 중 34%를 *B. velezensis*가 차지하고 있었으며 다음으로 *B. licheniformis* 21%, *B. subtilis* subsp. *subtilis* 18%로 확인되어 고추장 발효 후 숙성에 영향을 주는 주요 균주로 사료되며 이런 결과는 기존에 알려진 고추장내 주요 미생물로 *B. licheniformis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis* 외에도 새로운 *B. velezensis* 균주가 고추장내 주요 미생물임을 확인할 수 있었다. 이것은 전통 고추장 숙성 중의 미생물상의 변화로 세균으로는 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*가 주로 관여한다고 보고한 연구와 고추장의 주요 미생물원을 보고한 Lee 등과 이 등의 보고와 재래식 고추장 중 *Z. rouxii*가 총 50주 중 4주만 동정되어 분포가 미미하다는 이 등과 *Candida* 속이 가장 많이 분리되었다는 Lee 등과 상이하였다. 다음 Fig. 2에서는 전통형 고추장의 미생물을 일반 조건에서 분리했을 때와 호염성 조건에서 분리했을 때의 미생물의 분포가 어떻게 차이가 나는지를 확인하였다. *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. nematocita*, *C. lactis*, *Z. rouxii*, *Z. sp*는 일반 조건과 호염성 조건에서도 분리가 되었으며 또한 일반 조건에서는 분리되었던 *B. sonorensis*, *B. aerius*, *B. axarquiensis*, *B. megaterium*, *B. safensis*, *B. acidovorans*, *B. cereus*, *S. marcescens*, *S. sp*, *C. apicola*, *Z. bailii*, *Starmerella sp*가 호염 조건에서는 확인되지 않았으며 반대로 일반 조건에서 분리되지 않았던 *O. oncorhynchi*, *O. sp*, *B. alcalophilus* 가 호염 조건에서 새로 발견되었다.

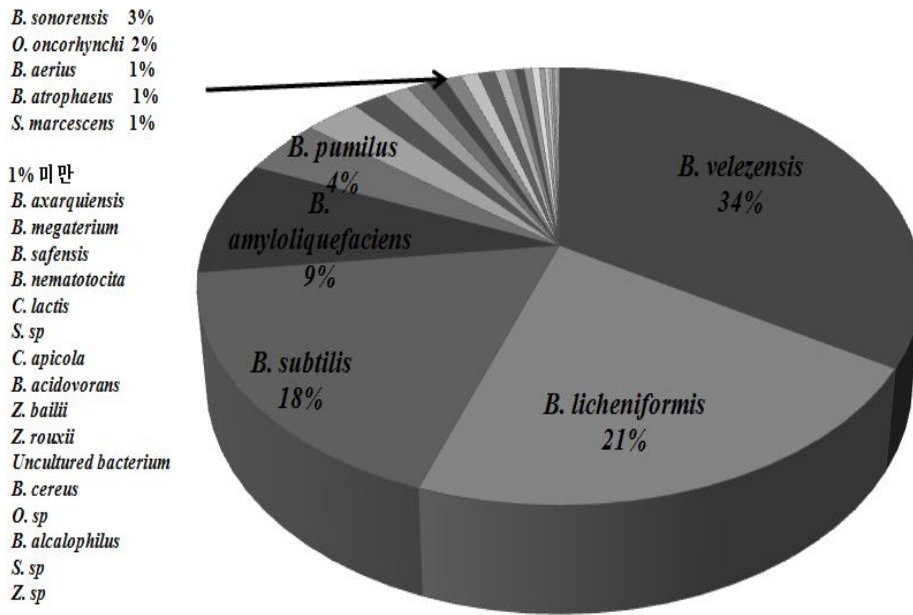


Fig. 1. Microflora of traditional *kochujang*.

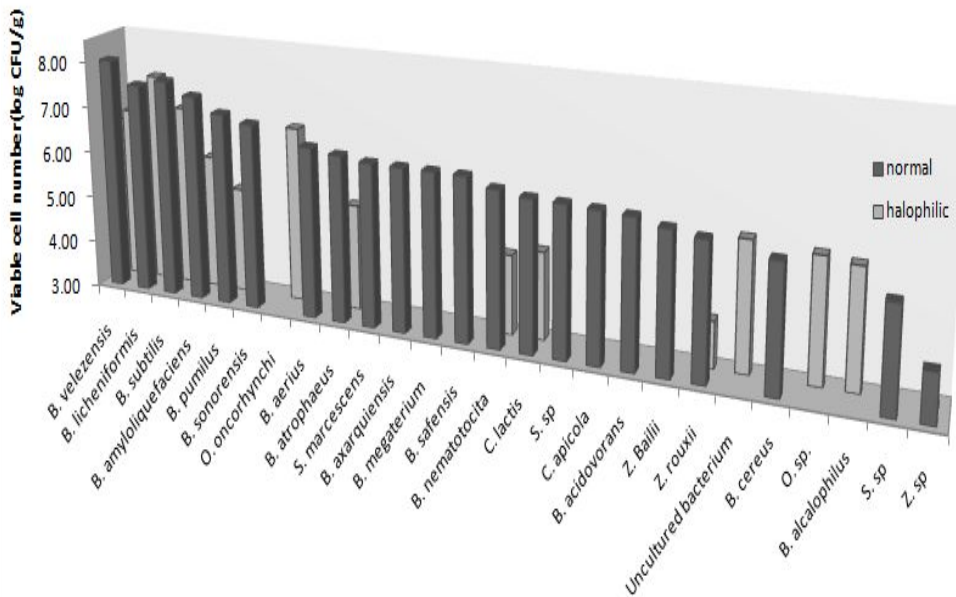


Fig. 2. Comparison of normal with halophilic microorganisms in the traditional *kochujang*.

(6) 공장형 고추장의 미생물 균총

공장형 고추장내 존재하는 모든 미생물의 균총을 확인하기 위해 고추장 시료에서 각 미생물별 총 균수를 확인한 후 각각 30 균주씩 분리하여 총 299개의 균주를 ribosomal DNA 염기서열 분석을 수행하였으며 총 균수와 동정된 빈도수를 바탕으로 전체 미생물의 균총을 분석한 결과 총 5속 17종의 미생물의 확인되었으며 그 결과는 Fig. 3에서 나타내었다. 전체 미생물중 99.3%가 *Bacillus* 속 확인하였으며 이 결과는 순창 고추장내 97% 이상이 *Bacillus* 속이 지배균이라는 Jin 등의 보고와 일치하였으며 그 다음으로 *Oceanobacillus* 속, *Serratia* 속, *Virgibacillus* 속이 0.5% 미만으로 차지하고 있었다. 그중에서 전체 고추장 미생물 중 69%를 *B. subtilis* subsp. *subtilis*가 차지하고 있었으며 다음으로 *B. licheniformis* 10%, *B. velezensis* 9%로 확인되어 고추장 숙성에 영향을 주는 우수 균주로 생각되며 이런 결과는 기존에 알려진 공장형 고추장내 주요 미생물로 *B. licheniformis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*임을 확인할 수 있었다. 이것은 공장형 고추장 숙성중의 미생물상의 변화로 세균으로는 *B. subtilis* 와 *B. licheniformis*가 주요 균주로 주로 관여한다는 연구 Lee 등의 보고와 한 등의 보고와 일치하였지만 공장형 고추장에서 *Zygosaccharomyces* 속이나 *Candida* 속이 발효 숙성 말기 주요 균종으로 확인 되었다는 정 등 보고와 상이하였다. Fig. 4에서는 공장형 고추장의 미생물을 일반 조건에서 분리했을 때와 호염성 조건에서 분리했을 때의 미생물의 분포가 어떻게 차이가 나는지를 확인하였다. *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cohnii*, *B. atrophaeus*는 일반 조건과 호염성 조건에서도 분리가 되었으며 또한 일반 조건에서는 분리되었던 *B. sonorensis*, *B. nematocita*, *B. benzoborans*, *S. marcescens*가 호염 조건에서는 확인되지 않았으며 반대로 일반 조건에서는 분리되지 않았던 *O. iheyensis*, *O. oncorhynchi*, *B. megaterium*, *Virgibacillus carmonensis*, *O. soja*가 호염 조건에서 새로 발견되었다.

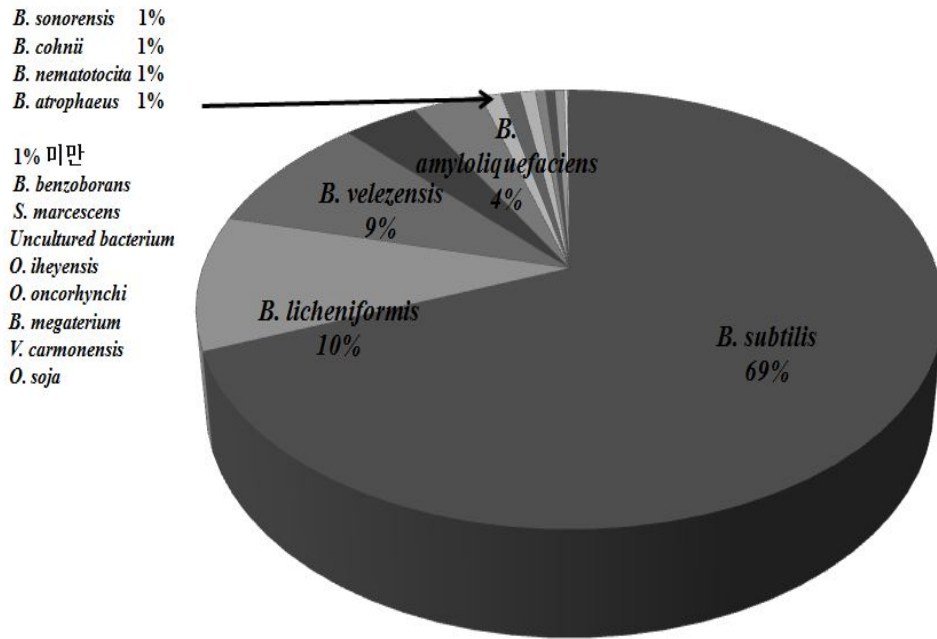


Fig. 3. Microflora of commercial *kochujang*.

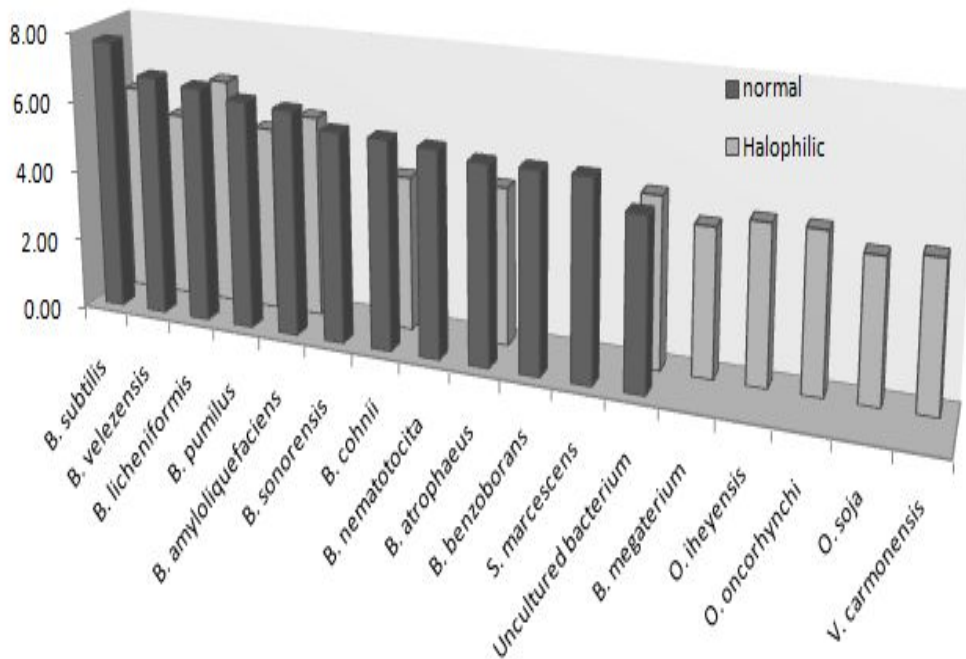


Fig. 4. Comparison of normal with halophilic microorganisms in the commercial *kochujang*.

## 2. PCR-RAPD 에 의한 고추장 미생물의 분포

고추장내 존재하는 미생물의 패턴을 culture-independent(PCR-PAPD)을 통해 비교하고자 하였다

### 가. 실험 방법

#### (1) 고추장 DNA 추출

고추장 10g 20ml의 DNA 추출용 완충용액 (10mM Tris-HCl[pH8.0] 100mM EDTA[pH8.0], 150mM NaCl, 4% SDS, 1% CTAB)에 현탁시킨 후 65°C, 1시간 반응하고 100 $\mu$ l lysozyme(10mg/ml)을 넣고 37°C, 1시간 반응 후 8,000rpm에서 10분간 원심 분리 후 supernatant 취한다. proteinase K (10mg/ml) 20 $\mu$ l 를 넣고 37°C, 1시간 반응시킨다. 동량의 phenol-chloroform( 25:25, vol/vol ) 처리 후 8,000rpm, 10분간 원심분리 후 수용액층을 취한 후 50 $\mu$ l의 1M NaCl 를 넣고 5분간 vortexing 한다. 동량의 Isopropanol 첨가하여 -20°C에서 1시간 DNA를 침전시킨다 침전된 DNA를 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 모은 후 70% ethanol로 세척하여 상온에서 건조한다 침전물은 TE Buffer에 녹인 다음 0.2mg/ml RNase A 처리하여 37°C, 1시간 반응 후 -20°C 보관한다.

#### (2) PCR- RAPD 분석

PCR에 사용된 Primer는 (주)코스모진텍에서 합성한 10mer random primer 40개(Table 8.)를 구입하여 사용하였다. 분리한 DNA 시료에 10X Taq buffer, 10mM dNTP, EX -Taq polymerase와 random primer를 넣어 PCR을 실시하였고 증폭 반응에는 Mini Cycler (MJ Research, INC)가 사용되었으며 초기 94°C에서 2분간 denaturation 시킨 후, 94°C에서 1분, 36°C에서 1분, 72°C에서 2분으로 구성된 프로그램을 40 cycle 반복 수행하였고 마지막으로 72°C에서 5분간 extension하였다. PCR product을 0.8% agarose gel에 loading 한 후 100V로 전기영동한 다음 ethidium bromide로 염색하여 Gel Doc EQ System(Bio-Rad)로 결과를 확인하였다.

Table 8 Random primer list of PCR-RAPD

KIT A			KIT B		
	A-01	CAGGCCCTTC		B-01	GTTTCGCTCC
	A-02	TGCCGAGCTG		B-02	TGATCCCTGG
	A-03	AGTCAGCCAC		B-03	CATCCCCCTG
	A-04	AATCGGGCTG		B-04	GGACTGGAGT
	A-05	AGGGGTCTTG		B-05	TGCGCCCTTC
	A-06	GGTCCCTGAC		B-06	TGCTCTGCCC
	A-07	GAAACGGGTG		B-07	GGTGACGCAG
	A-08	GTGACGTAGG		B-08	GTCCACACGG
	A-09	GGGTAACGCC		B-09	TGGGGGACTC
	A-10	GTGATCGCAG		B-10	CTGCTGGGAC
	A-11	CAATCGCCGT		B-11	GTAGACCCGT
	A-12	TCGGCGATAG		B-12	CCTTGACGCA
	A-13	CAGCACCCAC		B-13	TTCCCCGCT
	A-14	TCTGTGCTGG		B-14	TCCGCTCTGG
	A-15	TTCCGAACCC		B-15	GGAGGGTGTT
	A-16	AGCCAGCGAA		B-16	TTTGCCCGGA
	A-17	GACCGCTTGT		B-17	AGGGAACGAG
	A-18	AGGTGACCGT		B-18	CCACAGCAGT
	A-19	CAAACGTCGG		B-19	ACCCCCGAAG
	A-20	GTTGCGATCC		B-20	GGACCCTTAC

(3) Data 분석

각 시료의 DNA 및 각 primer를 사용하여 증폭된 DNA 절편을 1Kb standard marker와 비교하여 균집 분석에 사용하였으며 분석은 Bio-Rad 사의 Fingerprinting II Informatix Software를 이용하여 UPGMA방법을 이용하여 dendrogram으로 작성하였다.

나. 실험결과

(1) DNA 농도측정

고추장에서 추출한 DNA의 농도측정결과는 Table 9와 같다. TK3, TK6, IK1, IK2를 제외한 모든 시료에서는 높은 농도의 DNA를 추출할 수 있었다



**Table 9** The concentration of DNA extracted from traditional and commercial *kochujang*.

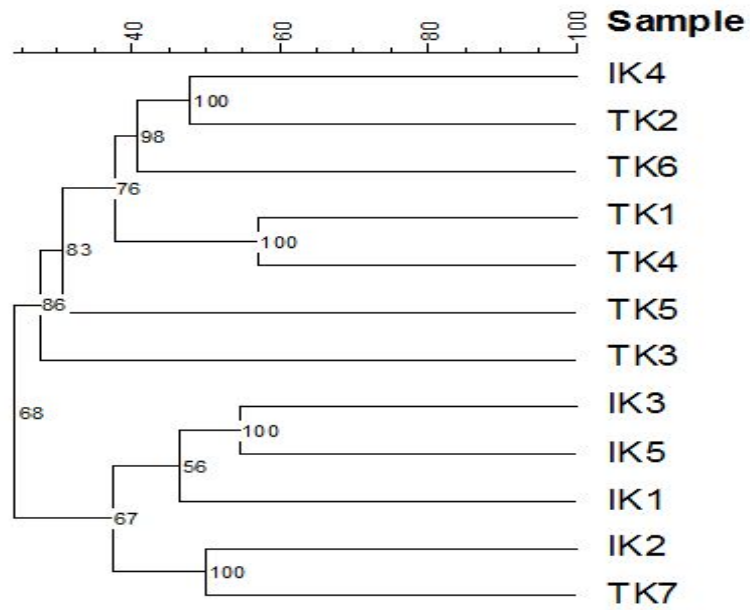
sample	260nm	280nm	순도	농도( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	농도( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
TK1	0.484	0.295	1.6	2,420	2.4
TK2	0.260	0.160	1.6	1,300	1.3
TK3	0.598	0.353	1.7	2,990	3.0
TK4	0.115	0.071	1.6	575	0.6
TK5	0.518	0.310	1.7	2,590	2.6
TK6	0.166	0.104	1.6	830	0.8
TK7	0.220	0.151	1.5	1,100	1.1
IK1	0.122	0.076	1.6	610	0.6
IK2	0.062	0.040	1.5	310	0.3
IK3	0.576	0.345	1.6	2,880	2.9
IK4	0.464	0.274	1.7	2,320	2.3
IK5	0.527	0.308	1.7	2,635	2.6

(2) PCR-RAPD

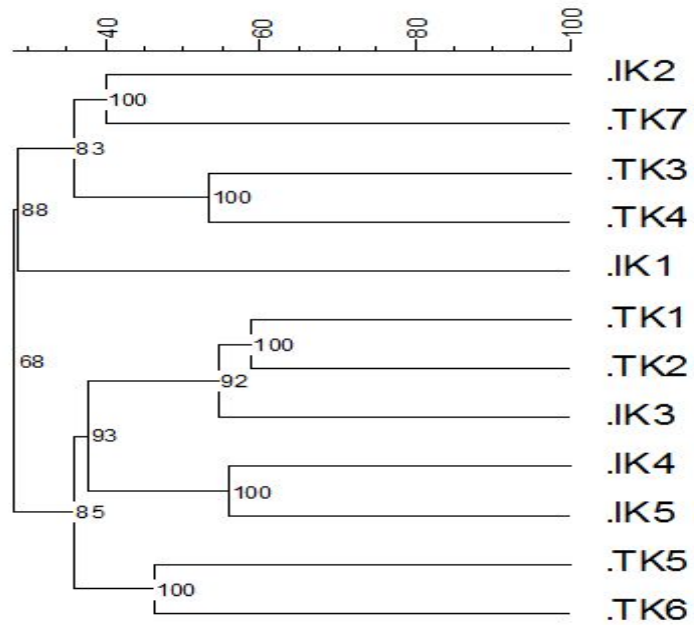
고추장에서 바로 추출한 DNA를 Table 8의 Primer를 사용하여 PCR-RAPD를 분석한 결과는 아래와 같다. Primer를 통해 다수의 고추장 DNA를 한꺼번에 비교 분석할 수 있으므로 신속하고 경제적으로 분석을 할 수 있었다. 40여개의 primer를 사용하여 전통형 고추장과 공장형 고추장의 신속한 분리가 가능한지 비교 분석한 결과 primer A-01 등 여러 primer에서 전통형 고추장과 공장형 고추장을 쉽게 구분할 수 있는 가능성을 볼 수 있었다 또한 위의 16s rDNA의 결과를 통해 확인된 다양한 미생물의 패턴과 PCR-RAPD의 결과를 비교함으로써 16s rDNA의 결과에서는 확인할 수 없었던 다양성을 분석할 수 있기를 기대하였다.

PCR-RAPD의 실험 결과는 각각 다른 맛을 내는 고추장의 유전자 분석에 있어서 각각의 제품별로 고유의 형태를 보이는 것이 확인 되었으며 이러한 실험 결과는 각각의 제품 비교나 제품의 유형을 다른 제품과 구분을 짓는데 중요한 실험 결과라고 판단된다.

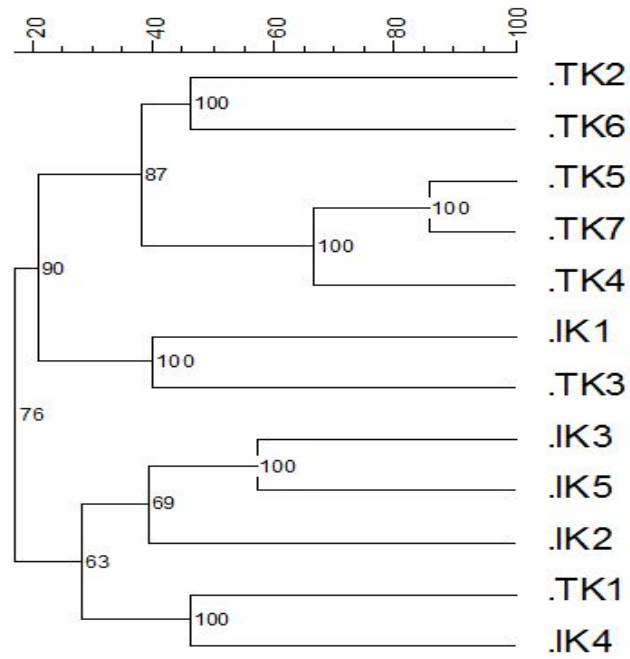
primer A-01



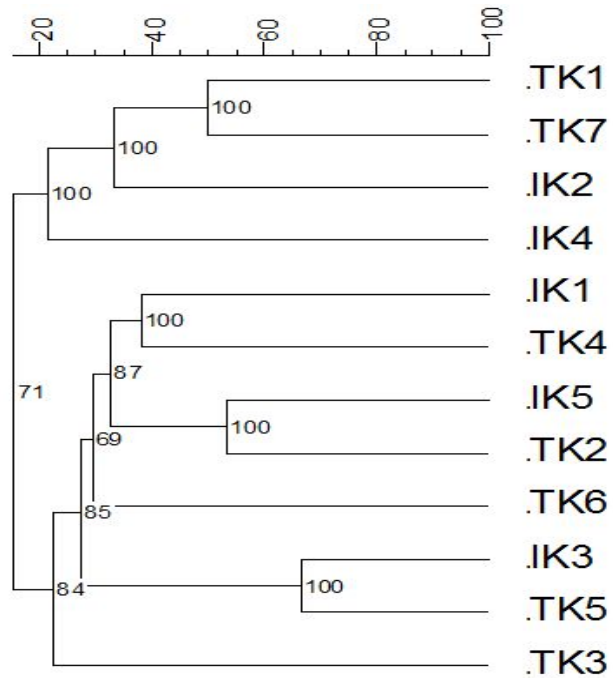
primer A-02



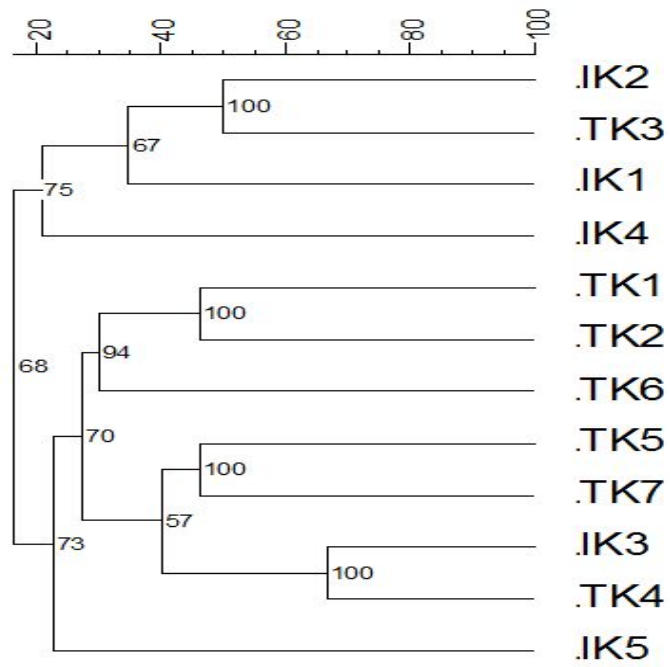
primer A-03



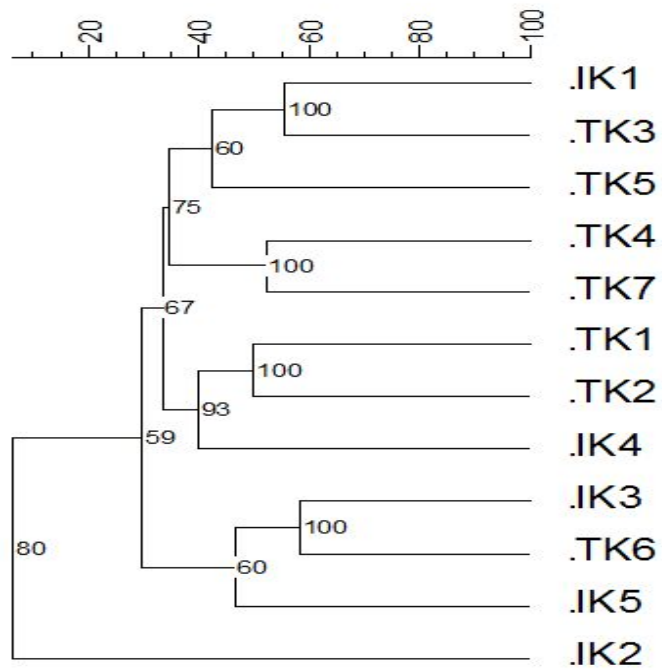
primer A-04



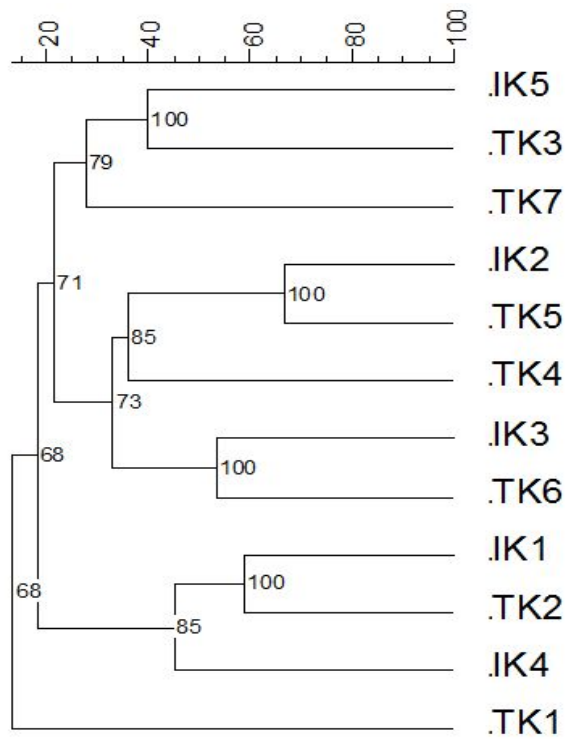
primer A-05



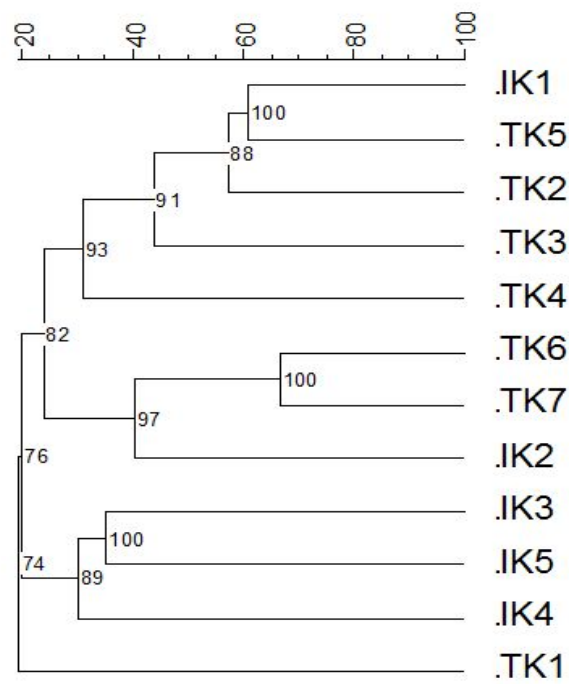
primer A-06



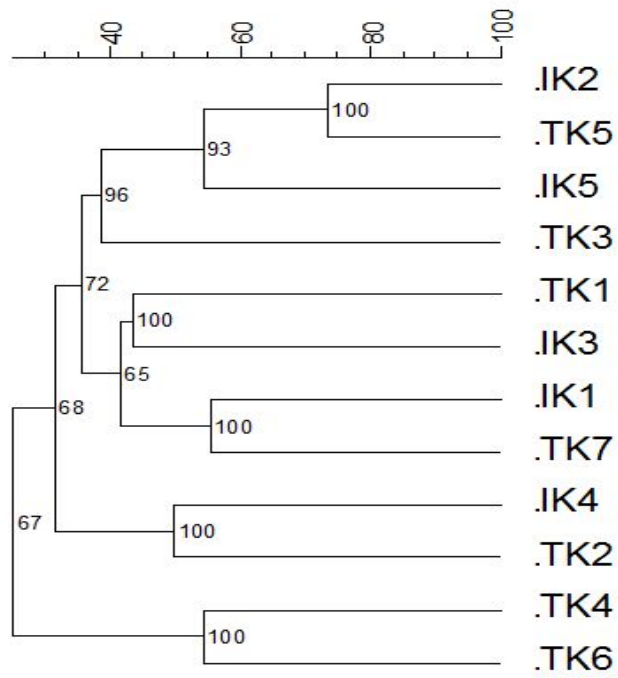
primer A-07



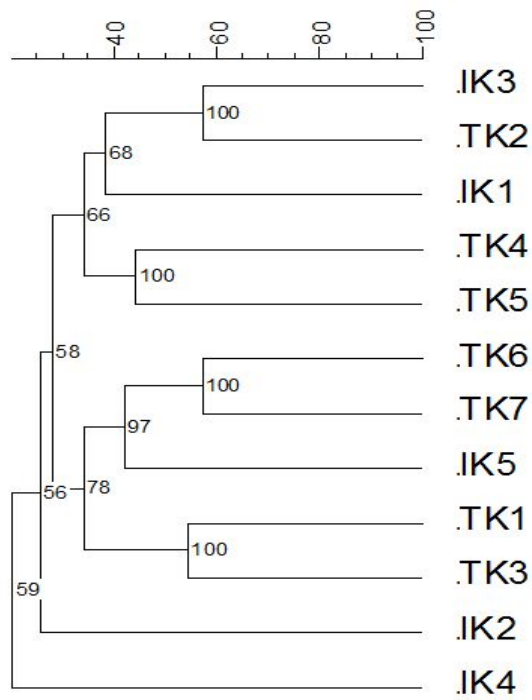
primer A-08



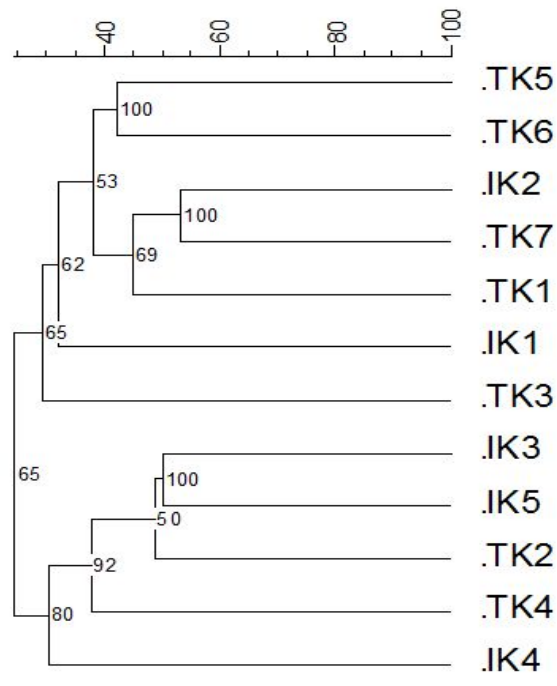
primer A-09



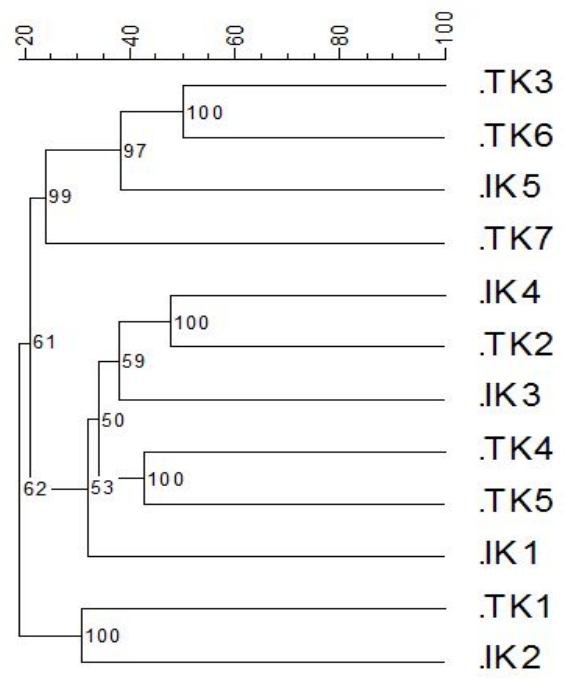
primer A-10



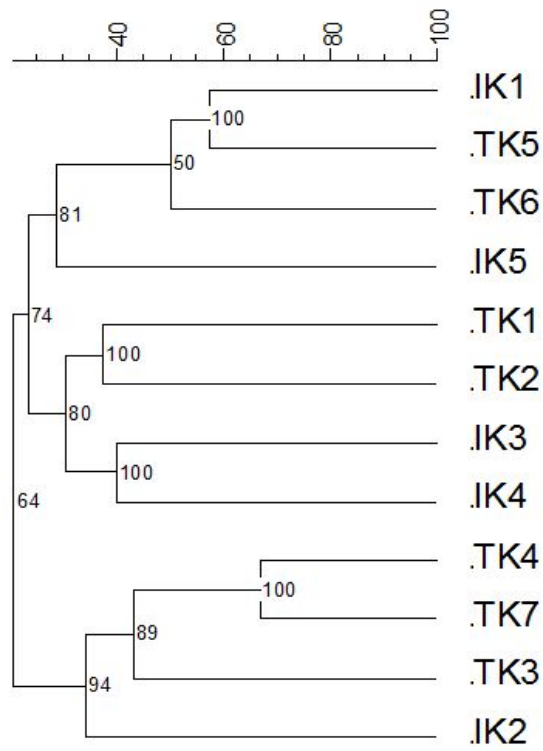
primer A-11



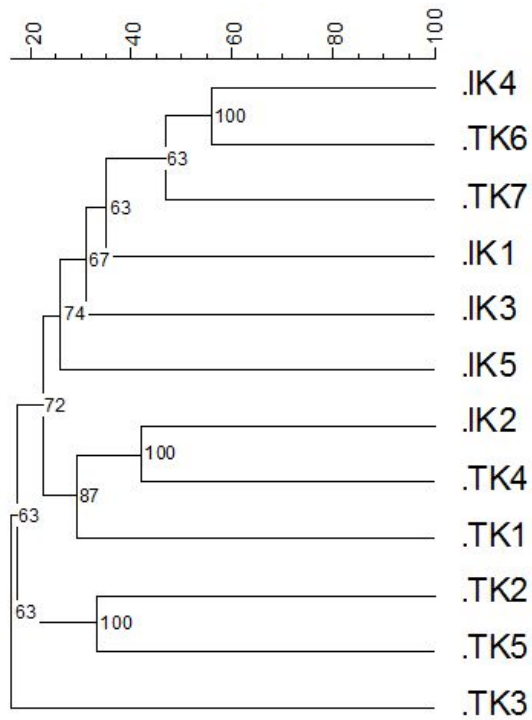
primer A-12



primer A-13

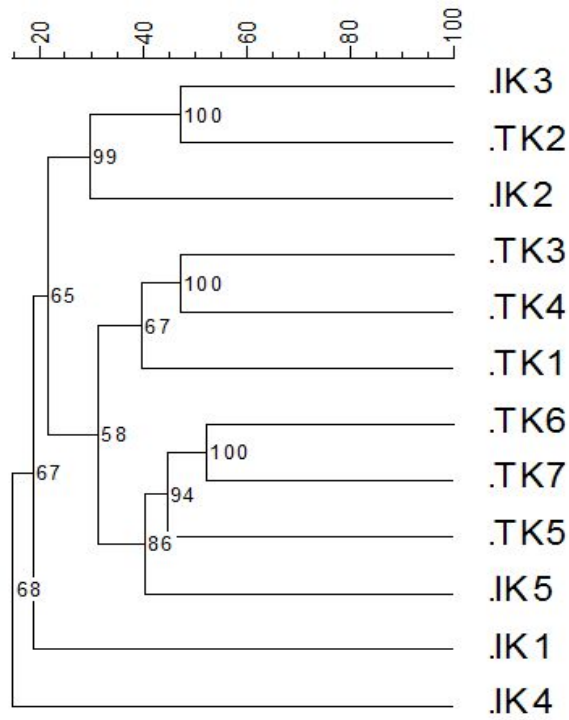


primer A-14

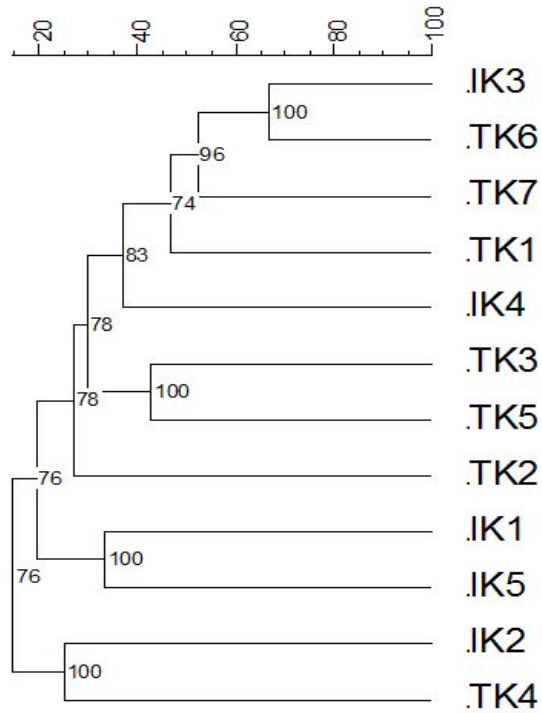




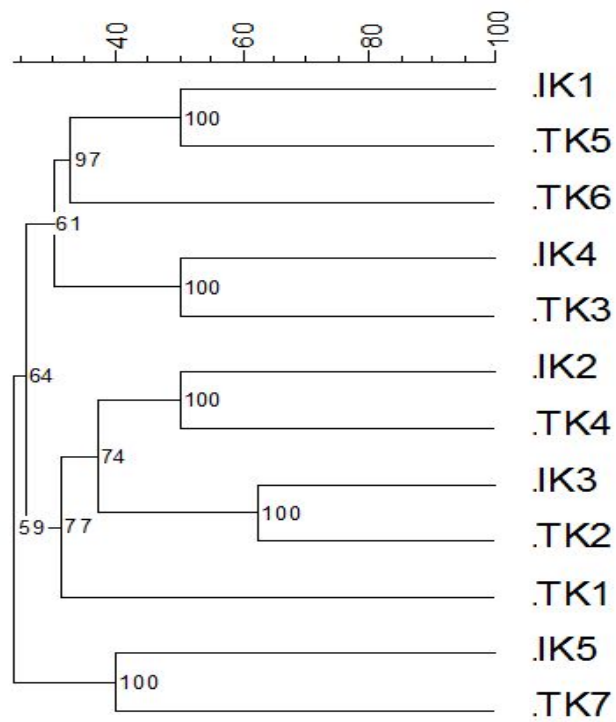
primer A-15



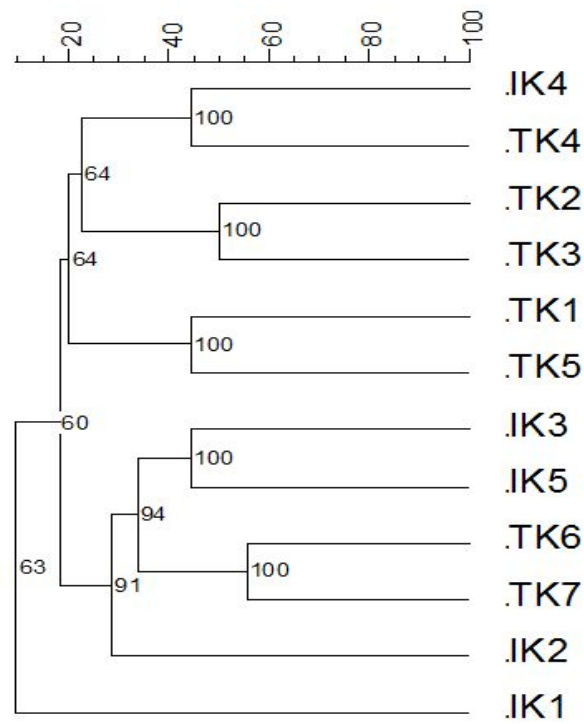
primer A-16



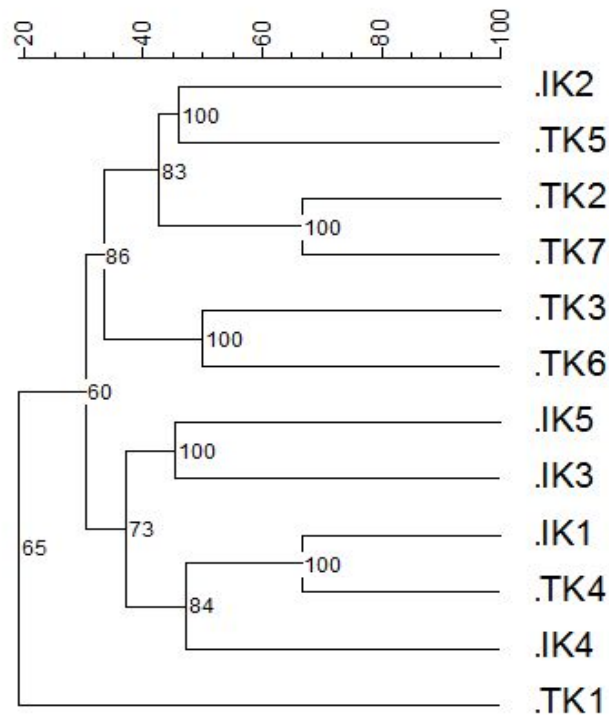
primer A-17



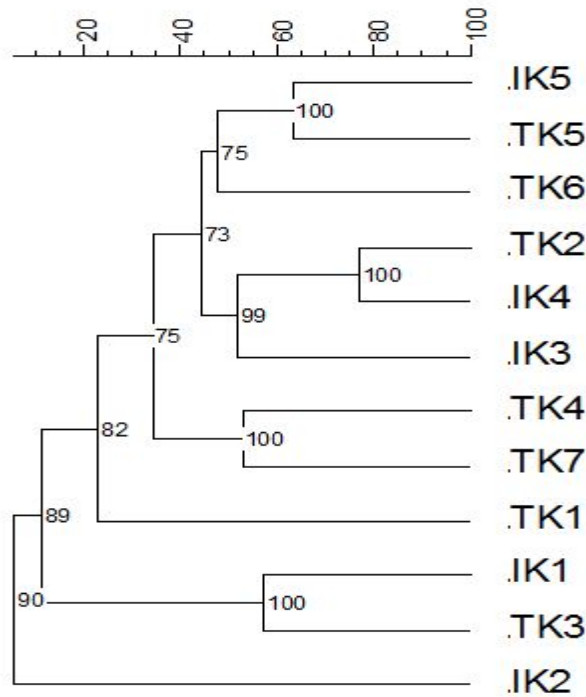
primer A-18



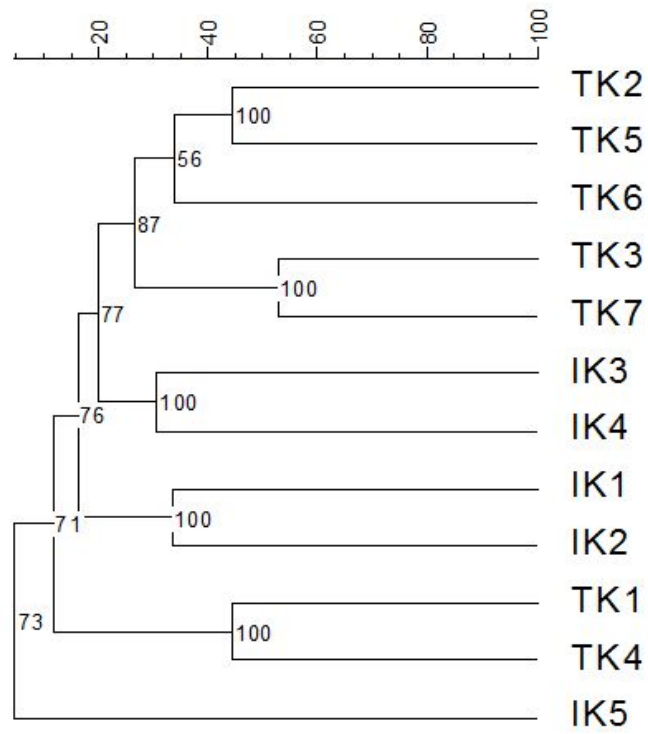
primer A-19



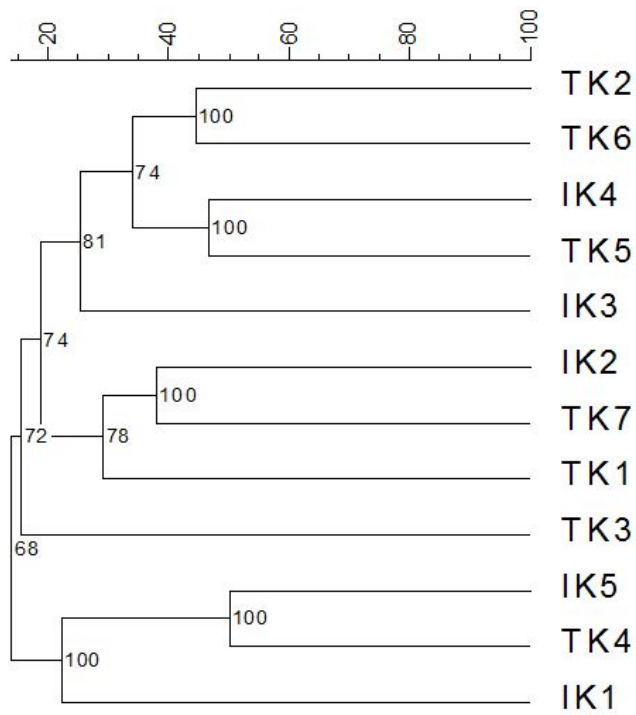
primer A-20



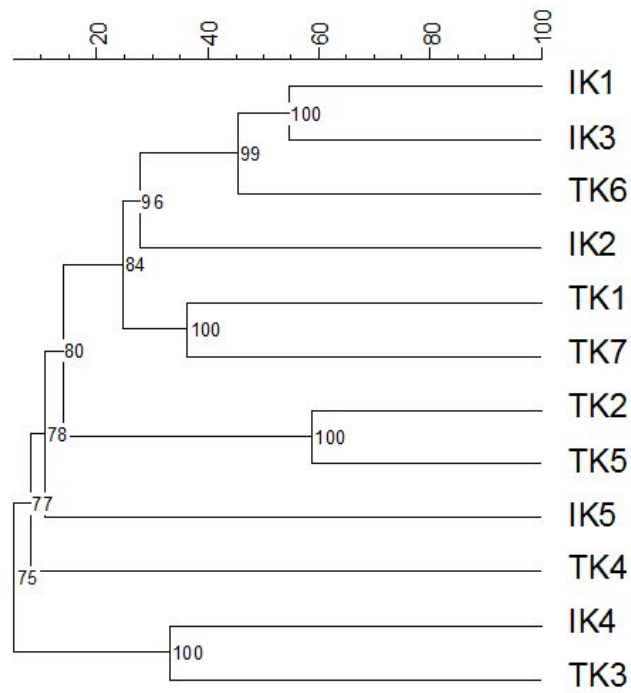
primer B-01



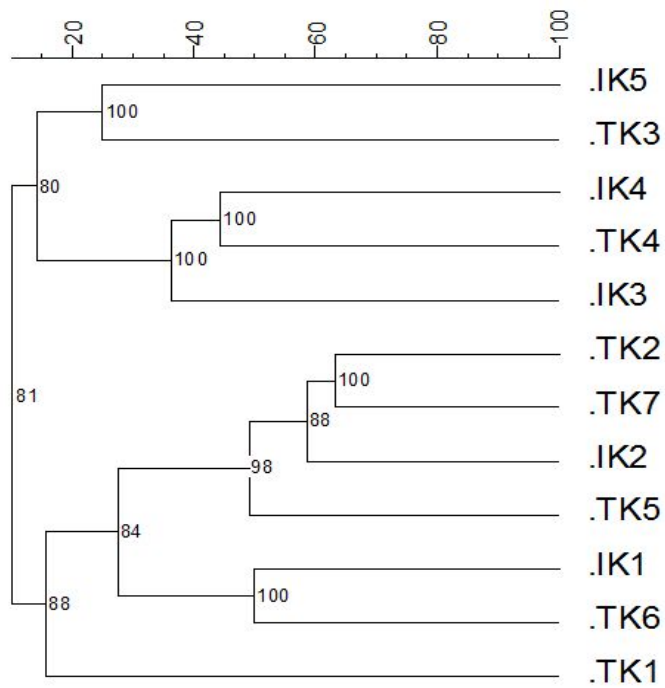
primer B-02



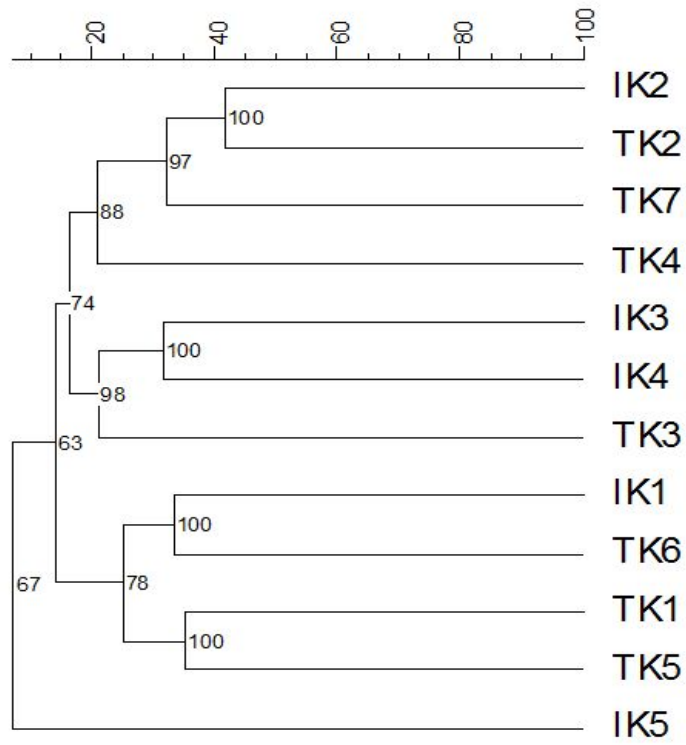
primer B-03



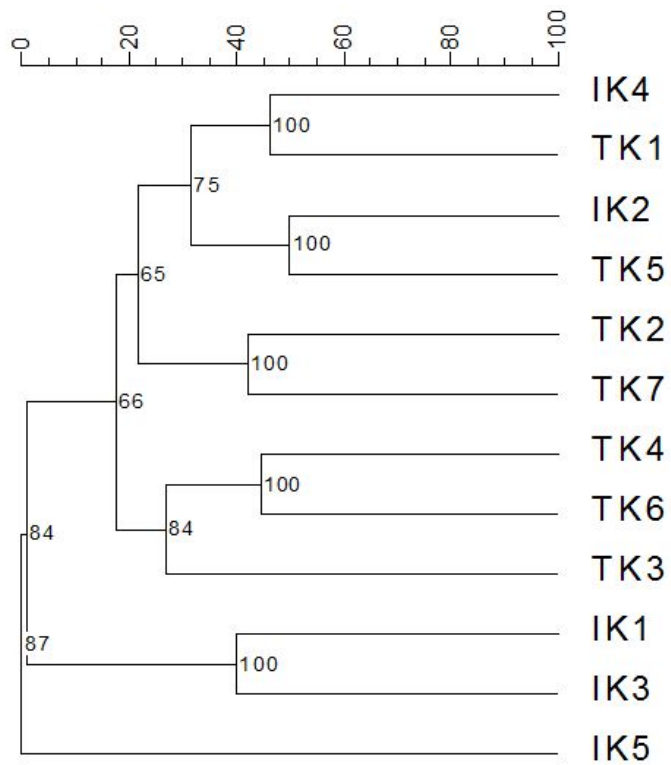
primer B-04



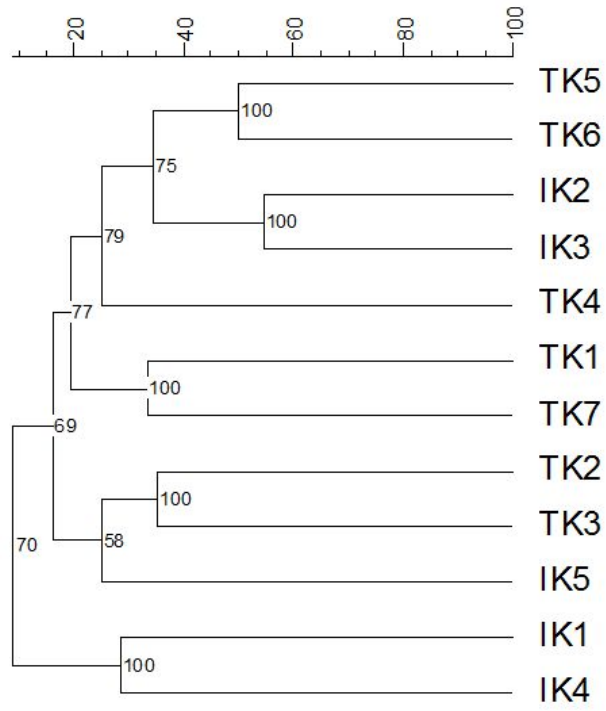
primer B-05



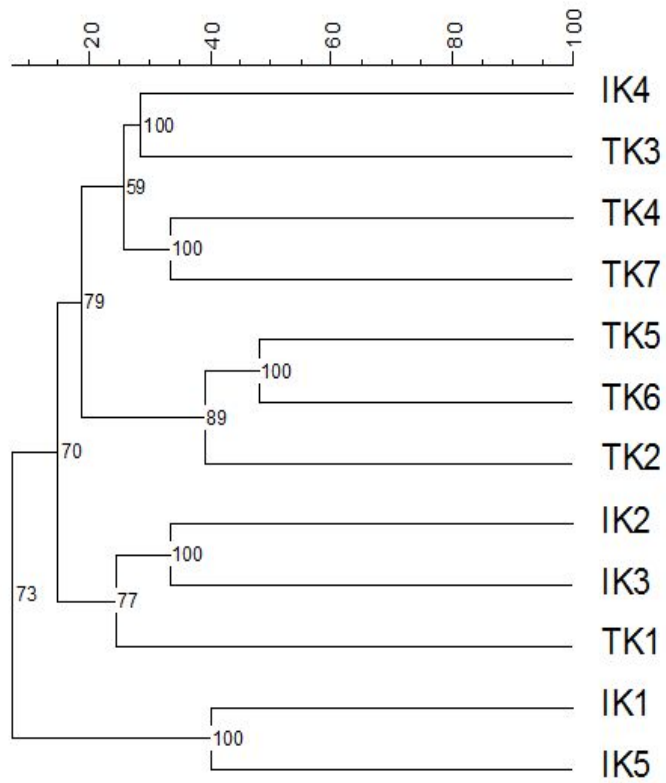
primer B-06



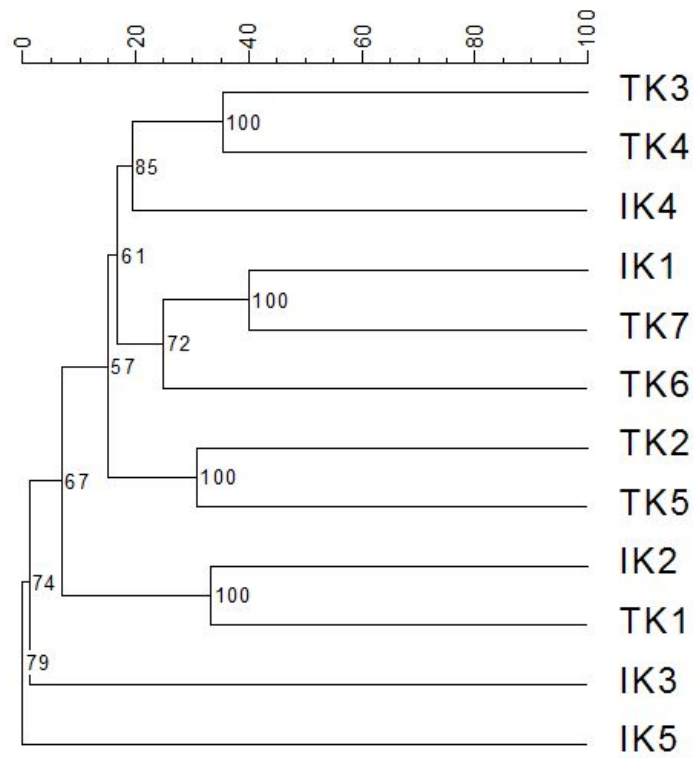
primer B-07



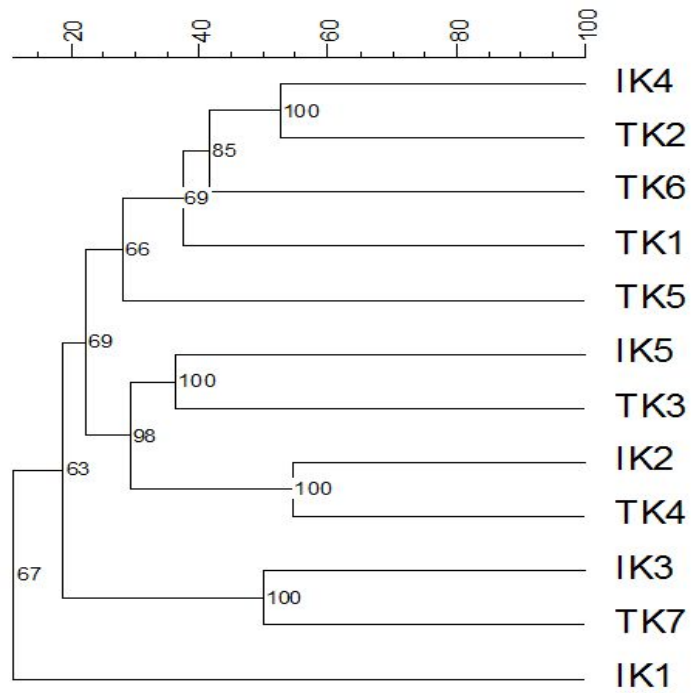
primer B-08



primer B-09

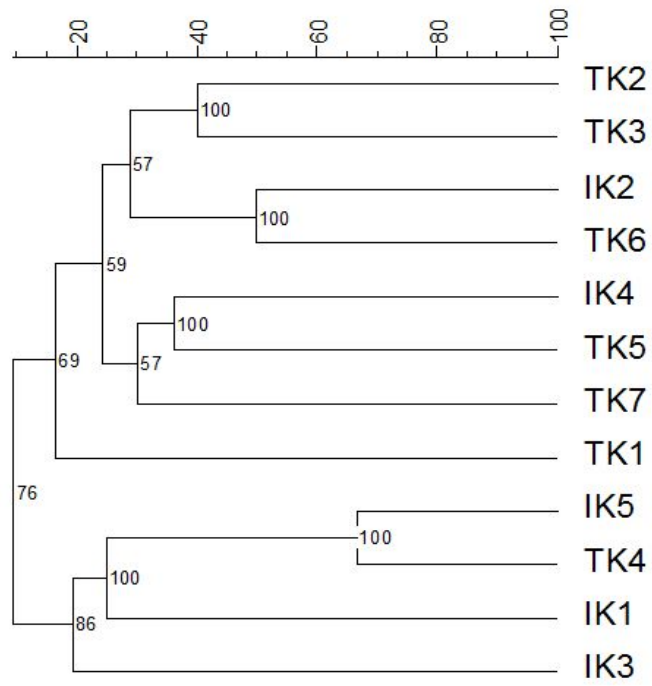


primer B-10

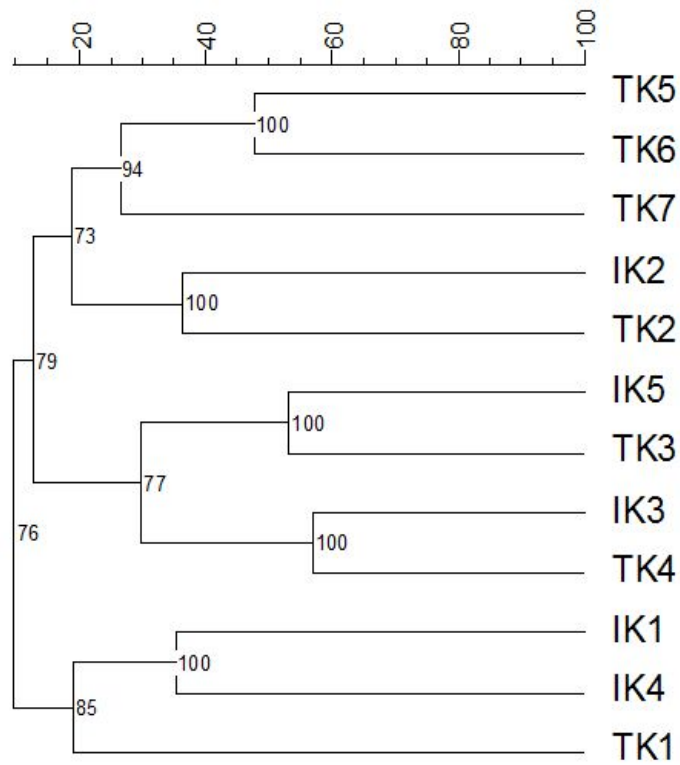




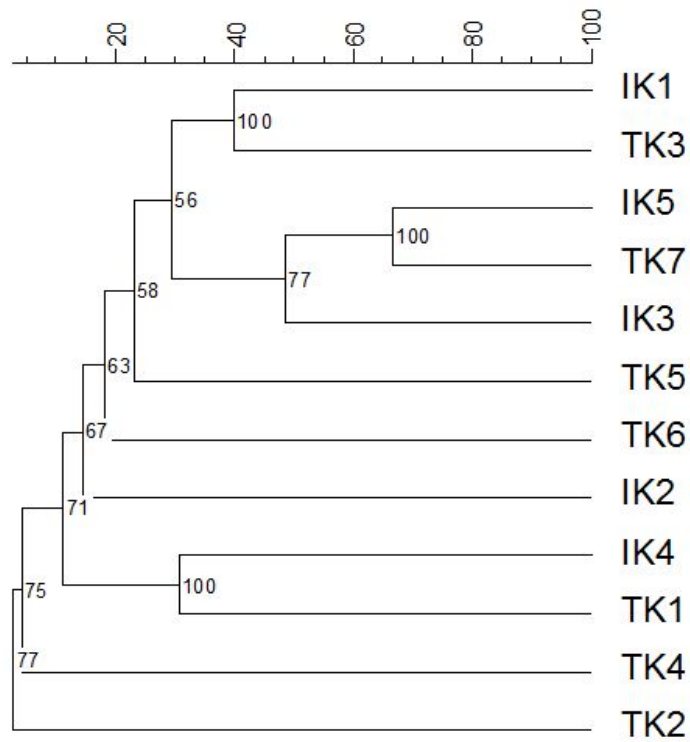
primer B-11



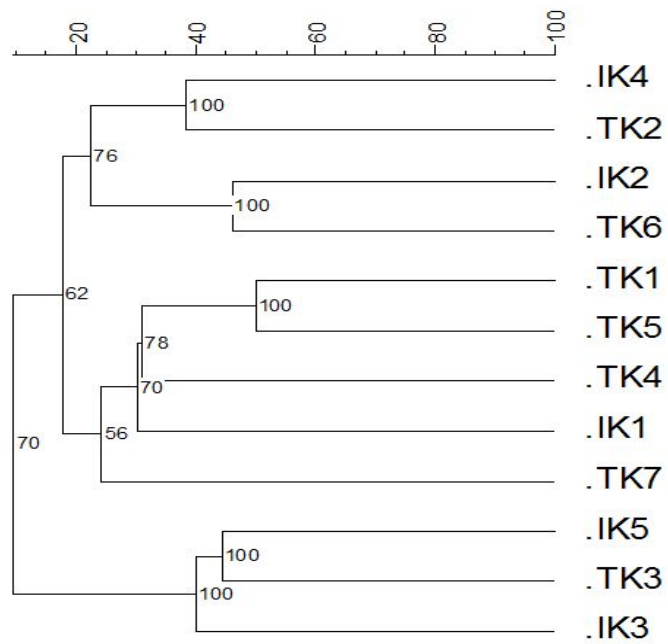
primer B-12



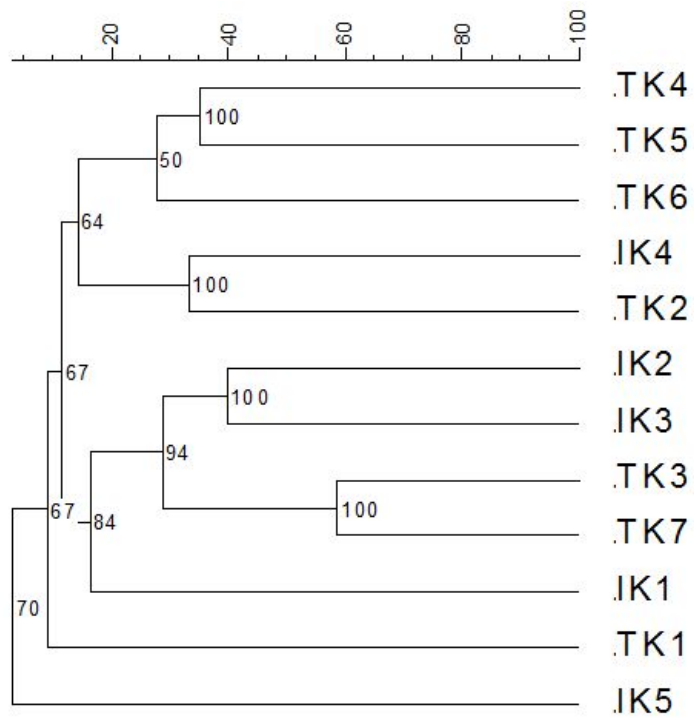
primer B-13



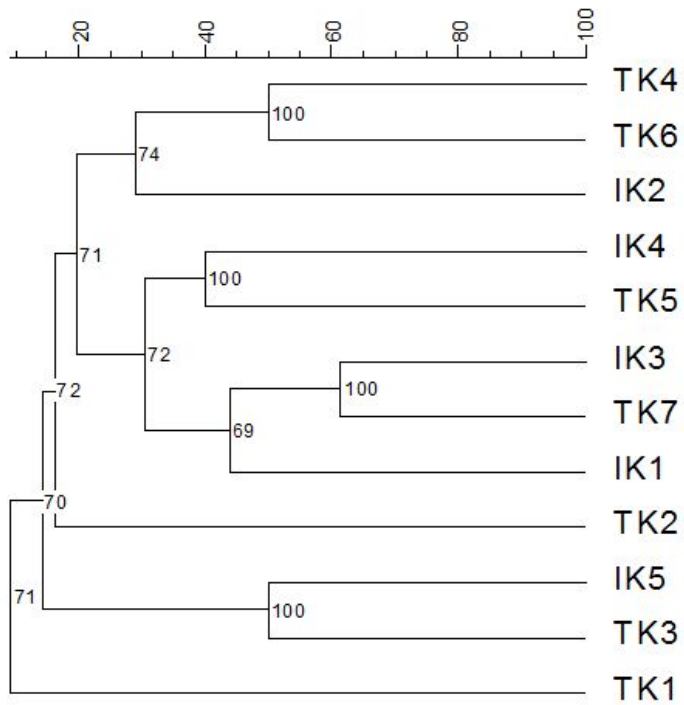
primer B-14



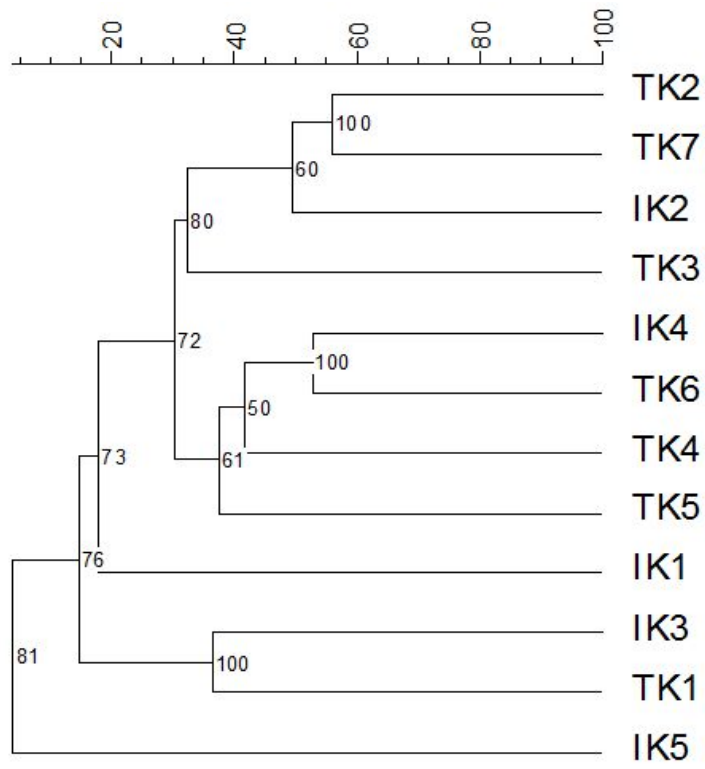
primer B-15



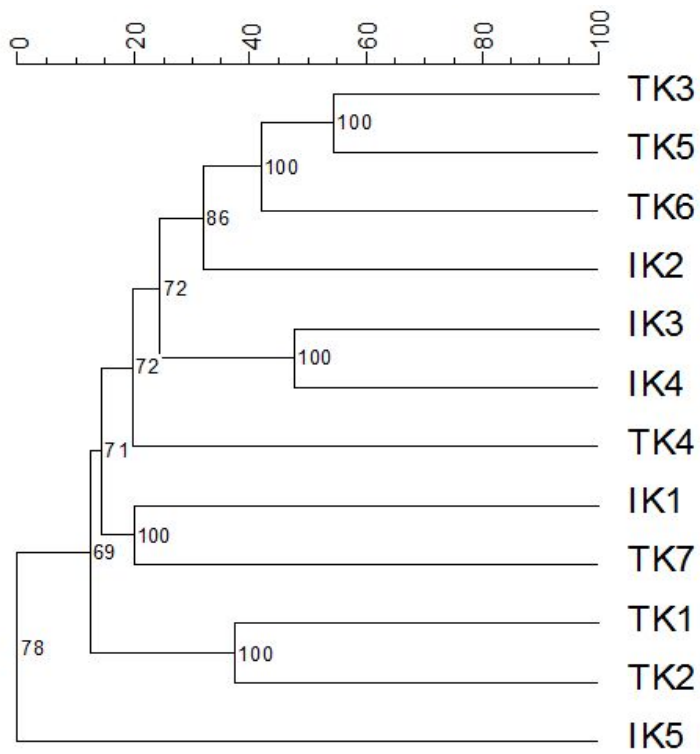
primer B-16



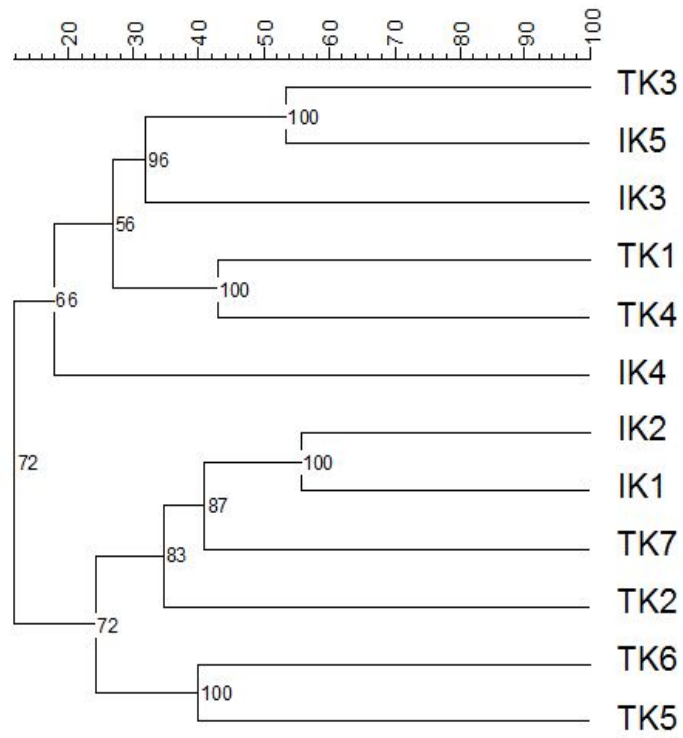
primer B-17



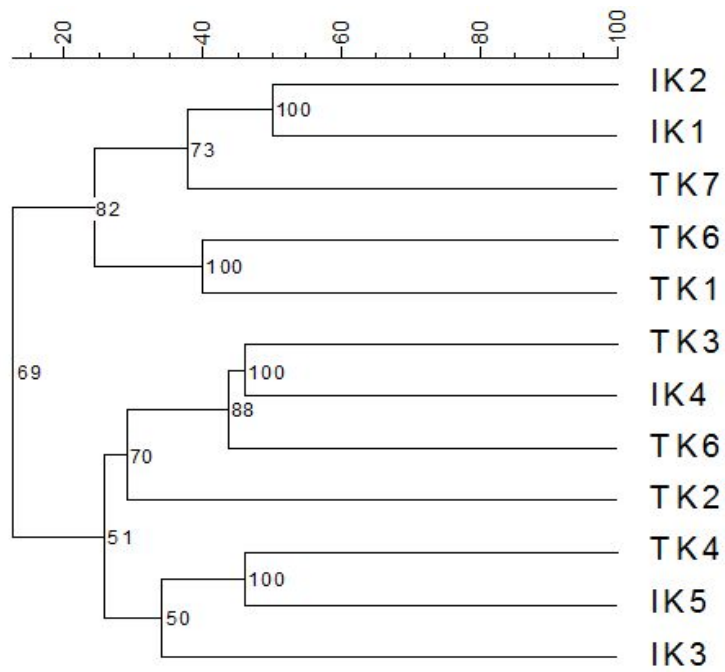
primer B-18



primer B-19



primer B-20



### 3. 전통형 고추장의 미생물 다양성 확인

전통형 고추장의 미생물의 다양성을 비교하기 위해 전통형으로 제조된 순창지역의 다른 업체의 고추장을 구입하여 미생물 분리, 동정을 실시하였다.

#### 가. 실험방법

##### (1) 전통형 고추장의 시료 수집

고추장 시료의 구입은 전통형 고추장 제조방법을 확인하여 구입하였다. 전통형 고추장 (Table 10)은 순창 민속마을에 입주한 업체에서 전통방식으로 제조하여 1~2 년간 숙성시킨 후 판매용으로 포장된 7개 업체의 고추장을 구입하여 4℃ 냉장고에 보관하였다.

Table 10. Screening from the 7 different *kochujang* produced by traditional method

No.	Company name	Location
A	김정례할머니	전라북도 순창
B	순창이조전통식품	전라북도 순창
C	문옥례식품	전라북도 순창
D	성도집전통식품	전라북도 순창
E	태광전통고추장<서영순>	전라북도 순창
F	성가정식품	전라북도 순창
G	문정희할머니	전라북도 순창

##### (2) 미생물수 측정

고추장 시료로부터 발효미생물의 microflora의 확인을 위하여 각각의 시료로부터 전체 미생물의 cfu값을 확인하였다.

##### (가) 호기성 세균수 측정

호기성 세균수의 측정은 고추장 10 g을 멸균 생리 식염수 100 ml에 넣고 2시간 균질화하여 시료액을 만들었다. 시료액을 상온에 5분간 방치한 후 상등액 1 ml을 취해 9 ml 멸균수에  $10^1 \sim 10^{10}$ 까지 연속적으로 희석한 다음  $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$ 의 희석액 1 ml을 Nutrien agar (beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 15 g, distilled water 1.0 L) 배지를 사용하여 30℃에서 2일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다.

##### (나) 호염성 세균수 측정

호염성 세균수의 측정은 고추장 10 g을 멸균 생리 식염수 100 ml에 넣고 2시간 균질화하여 시료액을 만들었다. 시료액을 상온에 5분간 방치한 후 상등액 1 ml을 취해 9 ml 멸균수에

$10^1 \sim 10^{10}$ 까지 연속적으로 희석한 다음  $10^1, 10^3, 10^5, 10^7, 10^9$ 의 희석액 1 ml을 Nutrient agar +10 % NaCl(beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 15 g, NaCl 100 g, distilled water 1.0 L) 배지를 사용하여 30℃에서 4일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다.

(다) 곰팡이 균수 측정

곰팡이 균수의 측정은 고추장 10 g을 멸균 생리 식염수 100 ml에 넣고 2시간 균질화하여 시료액을 만들었다. 시료액을 상온에 5분간 방치한 후 상등액 1 ml을 취해 9 ml 멸균수에  $10^1 \sim 10^{10}$ 까지 연속적으로 희석한 다음  $10^1, 10^3, 10^5, 10^7, 10^9$ 의 희석액 1 ml을 Potato Dextrose Agar + 20  $\mu$ g/ml chloramphenicol(potato extract 200 g, glucose 20 g, agar 15 g, distilled water 1.0 L, chloramphenicol 1 ml) 배지를 사용하여 25℃에서 4일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다.

(라) 효모 균수 측정

효모 균수의 측정은 고추장 10 g을 멸균 생리 식염수 100 ml에 넣고 2시간 균질화하여 시료액을 만들었다. 시료액을 상온에 5분간 방치한 후 상등액 1 ml을 취해 9 ml 멸균수에  $10^1 \sim 10^{10}$ 까지 연속적으로 희석한 다음  $10^1, 10^3, 10^5, 10^7, 10^9$ 의 희석액 1 ml을 Yeast Mold agar + 20  $\mu$ g/ml chloramphenicol(yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, dextrose 10 g, agar 20 g, distilled water 1.0 L, chloramphenicol 1 ml) 배지를 사용하여 25℃에서 4일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다.

(마) 유산균수 측정

유산균수의 측정은 고추장 10 g을 멸균 생리 식염수 100 ml에 넣고 2시간 균질화하여 시료액을 만들었다. 시료액을 상온에 5분간 방치한 후 상등액 1 ml을 취해 9 ml 멸균수에  $10^1 \sim 10^{10}$ 까지 연속적으로 희석한 다음  $10^1, 10^3, 10^5, 10^7, 10^9$ 의 희석액 1 ml을 MRS agar(beef extract 15.5 g, pancreatic digest of casein 7.5 g, proteose peptone No.3 12.5 g, dextrose 32.5 g, sodium chloride 7.5 g,  $K_2HPO_4$  4 g, tween 80 2 g, agar 15 g, distilled water 1.0 L) 배지에 anaerobic system gas pak(BBL, Becton Dickinson)을 이용하여 혐기 조건을 만든 후 37℃에서 3일간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다.

(바) Protease 생산 균수 측정

Protease 생산 균수의 측정은 고추장 10 g을 멸균 생리 식염수 100 ml에 넣고 2시간 균질화하여 시료액을 만들었다. 시료액을 상온에 5분간 방치한 후 상등액 1 ml을 취해 9 ml 멸균수에  $10^1 \sim 10^{10}$ 까지 연속적으로 희석한 다음  $10^1, 10^3, 10^5, 10^7, 10^9$ 의 희석액 1 ml을 LB+2% skim milk (tryptone 5.0 g, yeast extract 2.5 g, sodium chloride 5.0 g, skim milk 20g, agar 15 g, distilled water 1.0 L) 배지를 이용하여 30℃에서 2일간 배양한 후 형성된 colony의 주변에 clear zone이 형성된 colony를 계수하였다.

(사) Amylase 생산 균수 측정

Amylase 생산 균수의 측정은 고추장 10 g을 멸균 생리 식염수 100 ml에 넣고 2시간 균질화하여 시료액을 만들었다. 시료액을 상온에 5분간 방치한 후 상등액 1 ml을 취해 9 ml 멸균수에  $10^1 \sim 10^{10}$ 까지 연속적으로 희석한 다음  $10^1, 10^3, 10^5, 10^7, 10^9$ 의 희석액 1 ml을 NA+2% Soluble Starch(beef extract 3 g, peptone 5 g, soluble starch 20g agar 15 g, distilled water 1.0 L) 배지를 이용하여 30℃에서 2일간 배양한 후 형성된 colony에  $K_2I$ 를 뿌려 colony의 주변에 clear zone이 형성된 colony를 계수하였다.

나. 실험결과

(1) 전통형 고추장의 균수측정

고추장의 미생물 균총을 확인하기 위하여 순창 민속마을에 입주한 업체에서 전통형으로 제조된 7 개 고추장을 구입하여 평판배지 상에 나타난 집락을 각각의 종류에 따라 총 균수를 측정한 결과를 Table 11에서 나타내었다. 선별 배지를 통해 배양 분리된 미생물은 colony의 색과 형상, 현미경 검경을 통하여 각 시료당 호기성 세균 105종, 호염성 세균 105종, 효모 90종, amylase 생산균주 105종, protease 생산균주 105종을 각각 분리하여 총 510종을 분리하였으며 유산균과 곰팡이는 검출되지 않았다.

Table 11. Viable cell numbers of the traditional *kochujang* at different selective medium.

Sample <sup>2)</sup>	Viable cell (CFU/10 g)							No of isolates
	Bacteria	Halo bacteria	Fungi	Yeast	LAB	Amylase	Protease	
A	7.8*10 <sup>8</sup>	4.3*10 <sup>6</sup>	-	5.3*10 <sup>5</sup>	-	5.4*10 <sup>8</sup>	5.0*10 <sup>8</sup>	75
B	1.7*10 <sup>7</sup>	3.6*10 <sup>5</sup>	-	5.4*10 <sup>4</sup>	-	8.6*10 <sup>6</sup>	5.4*10 <sup>6</sup>	75
C	8.0*10 <sup>6</sup>	5.0*10 <sup>5</sup>	-	-	-	3.2*10 <sup>6</sup>	2.8*10 <sup>6</sup>	60
D	1.4*10 <sup>7</sup>	1.7*10 <sup>5</sup>	-	7.0*10 <sup>4</sup>	-	1.0*10 <sup>7</sup>	5.2*10 <sup>6</sup>	75
E	1.5*10 <sup>7</sup>	4.0*10 <sup>5</sup>	-	9.8*10 <sup>5</sup>	-	2.0*10 <sup>6</sup>	2.4*10 <sup>6</sup>	75
F	1.2*10 <sup>7</sup>	8.2*10 <sup>5</sup>	-	2.2*10 <sup>4</sup>	-	9.2*10 <sup>6</sup>	5.6*10 <sup>6</sup>	75
G	6.4*10 <sup>6</sup>	1.1*10 <sup>6</sup>	-	1.3*10 <sup>6</sup>	-	1.0*10 <sup>7</sup>	4.0*10 <sup>6</sup>	75
Total	105	105	-	90	-	105	105	510

(2) 고추장에서 분리된 amylase activity 측정

고추장 시료로부터 amylase를 생산하는 미생물을 분리하여 activity를 측정한 결과 Table 12에서 나타내었다.



**Table 12. The amylase activity of isolation microorganisms from traditional and commercial *kochujang*.**

Strain No.	Amylase activity	Strain No.	Amylase activity	Strain No.	Amylase activity
KCCM101720	+++	KCCM101800	+	KCCM101865	+
KCCM101721	+++	KCCM101801	+++	KCCM101866	++
KCCM101722	++	KCCM101802	+++	KCCM101867	+++
KCCM101723	++	KCCM101803	+++	KCCM101868	+++
KCCM101724	+++	KCCM101804	+	KCCM101869	++
KCCM101725	+++	KCCM101805	++	KCCM101930	++
KCCM101726	+++	KCCM101806	+++	KCCM101931	+++
KCCM101727	++	KCCM101807	+++	KCCM101932	+++
KCCM101728	+++	KCCM101808	++	KCCM101933	++
KCCM101729	+++	KCCM101809	+++	KCCM101934	++
KCCM101730	++	KCCM101855	++	KCCM101935	+++
KCCM101731	+	KCCM101856	+++	KCCM101936	+++
KCCM101732	+++	KCCM101857	++	KCCM101937	+++
KCCM101733	+++	KCCM101858	++	KCCM101938	++
KCCM101734	+++	KCCM101859	+++	KCCM101939	+
KCCM101795	+++	KCCM101860	+++	KCCM101940	+
KCCM101796	++	KCCM101861	+++	KCCM101941	+++
KCCM101797	++	KCCM101862	+++	KCCM101942	+++
KCCM101798	++	KCCM101863	+++	KCCM101943	++
KCCM101799	+++	KCCM101864	++	KCCM101944	++

+: clear zone 3cm 이하

++ : clear zone 5cm 이하

+++ : clear zone 7cm 이하

continued..

Strain No.	Amylase activity	Strain No.	Amylase activity	Strain No.	Amylase activity
KCCM102005	++	KCCM102085	+++	KCCM102165	+++
KCCM102006	++	KCCM102086	+++	KCCM102166	++
KCCM102007	+++	KCCM102087	++	KCCM102167	++
KCCM102008	++	KCCM102088	++	KCCM102168	++
KCCM102009	+	KCCM102089	+++	KCCM102169	+++
KCCM102010	+++	KCCM102090	++		
KCCM102011	+++	KCCM102091	+		
KCCM102012	++	KCCM102092	+++		
KCCM102013	+++	KCCM102093	+++		
KCCM102014	+	KCCM102094	++		
KCCM102015	+++	KCCM102155	++		
KCCM102016	++	KCCM102156	+++		
KCCM102017	++	KCCM102157	++		
KCCM102018	+++	KCCM102158	+++		
KCCM102019	++	KCCM102159	+++		
KCCM102080	+++	KCCM102160	+++		
KCCM102081	+++	KCCM102161	+++		
KCCM102082	++	KCCM102162	+++		
KCCM102083	+++	KCCM102163	++		
KCCM102084	++	KCCM102164	++		

+: clear zone 3cm 이하

++ : clear zone 5cm 이하

+++ : clear zone 7cm 이하

(3) 고추장에서 분리된 protease activity 측정

고추장 시료로부터 protease를 생산하는 미생물을 분리하여 activity를 측정한 결과 Table 13에서 나타내었다.

**Table 13. The protease activity of isolation microorganisms from traditional and commercial *kochujang*.**

strain No.	Protease activity	strain No.	Protease activity	strain No.	Protease activity
KCCM101705	+++	KCCM101785	+++	KCCM101850	+++
KCCM101706	+++	KCCM101786	+	KCCM101851	+++
KCCM101707	++	KCCM101787	+++	KCCM101852	+++
KCCM101708	+++	KCCM101788	+++	KCCM101853	+++
KCCM101709	+++	KCCM101789	++	KCCM101854	++
KCCM101710	+++	KCCM101790	+++	KCCM101915	+++
KCCM101711	++	KCCM101791	+++	KCCM101916	+++
KCCM101712	+++	KCCM101792	+	KCCM101917	+++
KCCM101713	+++	KCCM101793	+++	KCCM101918	+++
KCCM101714	++	KCCM101794	++	KCCM101919	++
KCCM101715	+++	KCCM101840	++	KCCM101920	+++
KCCM101716	+++	KCCM101841	+++	KCCM101921	+++
KCCM101717	+++	KCCM101842	+++	KCCM101922	++
KCCM101718	++	KCCM101843	+++	KCCM101923	+++
KCCM101719	+++	KCCM101844	+++	KCCM101924	+++
KCCM101780	++	KCCM101845	++	KCCM101925	++
KCCM101781	+++	KCCM101846	++	KCCM101926	++
KCCM101782	++	KCCM101847	+++	KCCM101927	++
KCCM101783	+++	KCCM101848	+	KCCM101928	+++
KCCM101784	++	KCCM101849	+++	KCCM101929	+++

+: clear zone 3cm 이하

++ : clear zone 5cm 이하

+++ : clear zone 7cm 이하

continued..

strain No.	Protease activity	strain No.	Protease activity	strain No.	Protease activity
KCCM101990	+++	KCCM102070	+++	KCCM102150	++
KCCM101991	++	KCCM102071	+++	KCCM102151	+++
KCCM101992	++	KCCM102072	+++	KCCM102152	+++
KCCM101993	+++	KCCM102073	+++	KCCM102153	+++
KCCM101994	+++	KCCM102074	+	KCCM102154	+++
KCCM101995	+	KCCM102075	+++		
KCCM101996	++	KCCM102076	++		
KCCM101997	+++	KCCM102077	+++		
KCCM101998	+++	KCCM102078	+++		
KCCM101999	+++	KCCM102079	+++		
KCCM102000	++	KCCM102140	+++		
KCCM102001	+++	KCCM102141	++		
KCCM102002	++	KCCM102142	+		
KCCM102003	+++	KCCM102143	+++		
KCCM102004	++	KCCM102144	+++		
KCCM102065	+++	KCCM102145	+++		
KCCM102066	+++	KCCM102146	++		
KCCM102067	++	KCCM102147	+++		
KCCM102068	++	KCCM102148	++		
KCCM102069	++	KCCM102149	+++		

+: clear zone 3cm 이하

++ : clear zone 5cm 이하

+++ : clear zone 7cm 이하

(4) 고추장의 16S rDNA 분석에 의한 microflora 분석.

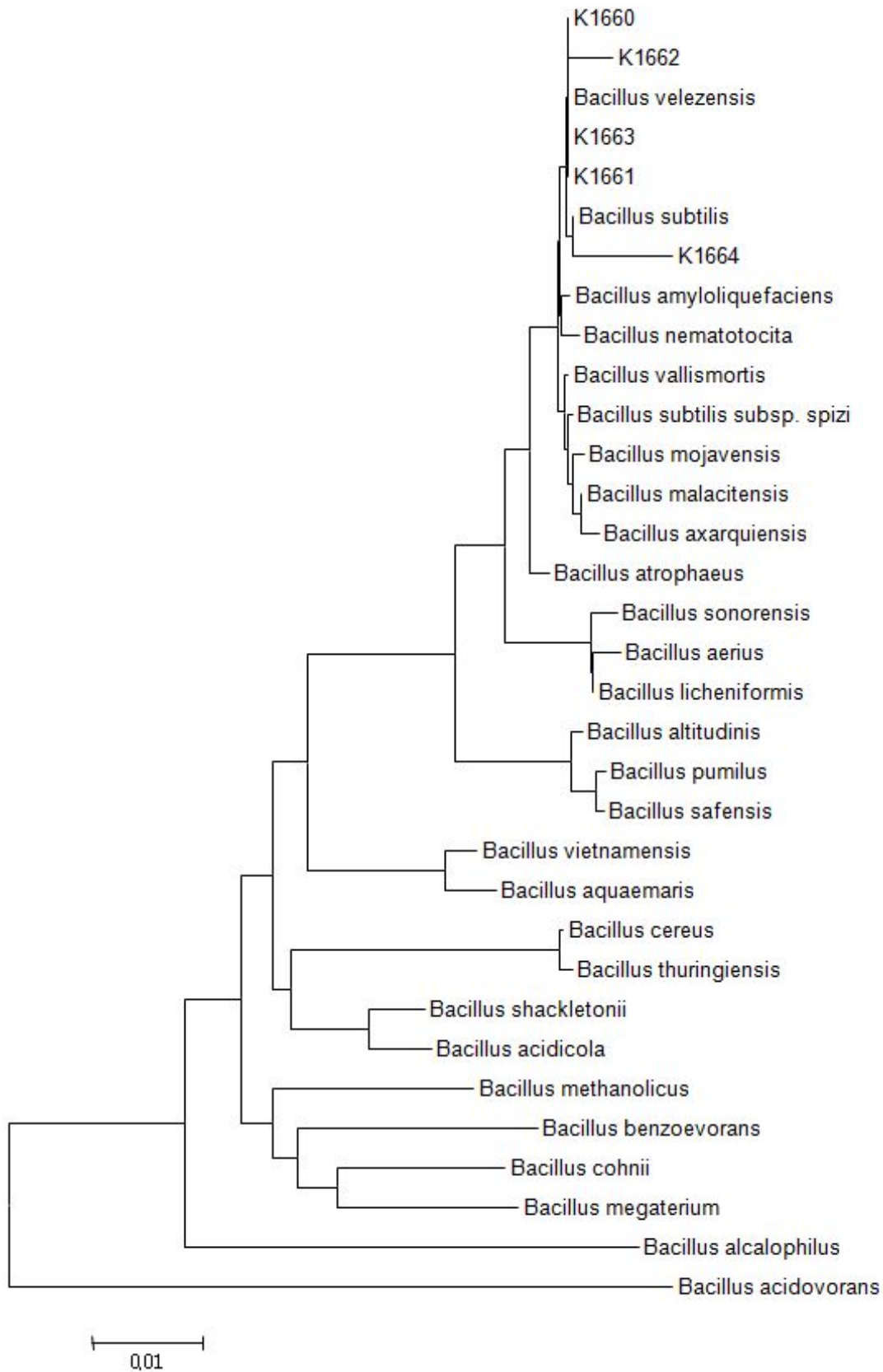


Fig. 5. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

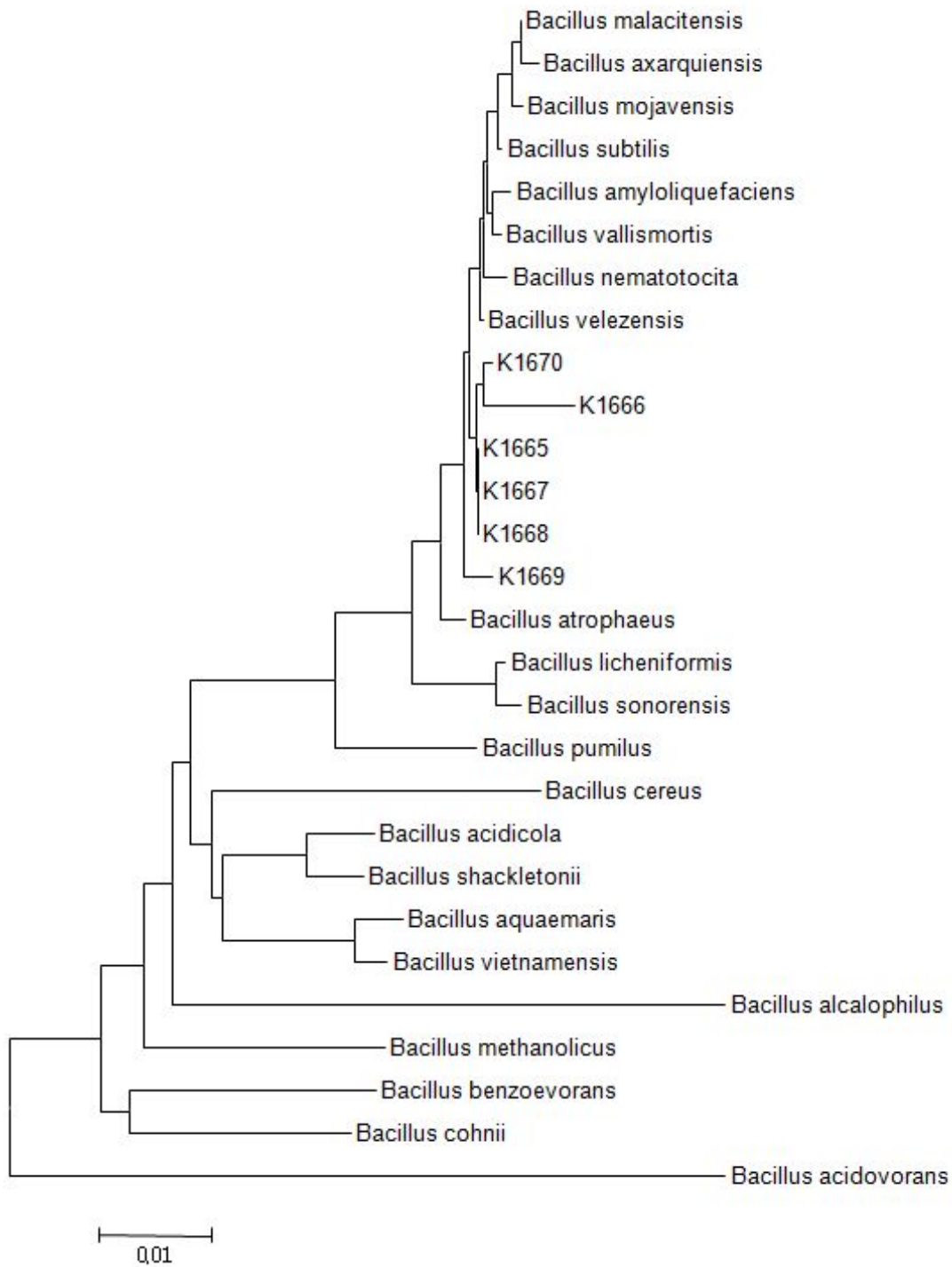


Fig.6. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

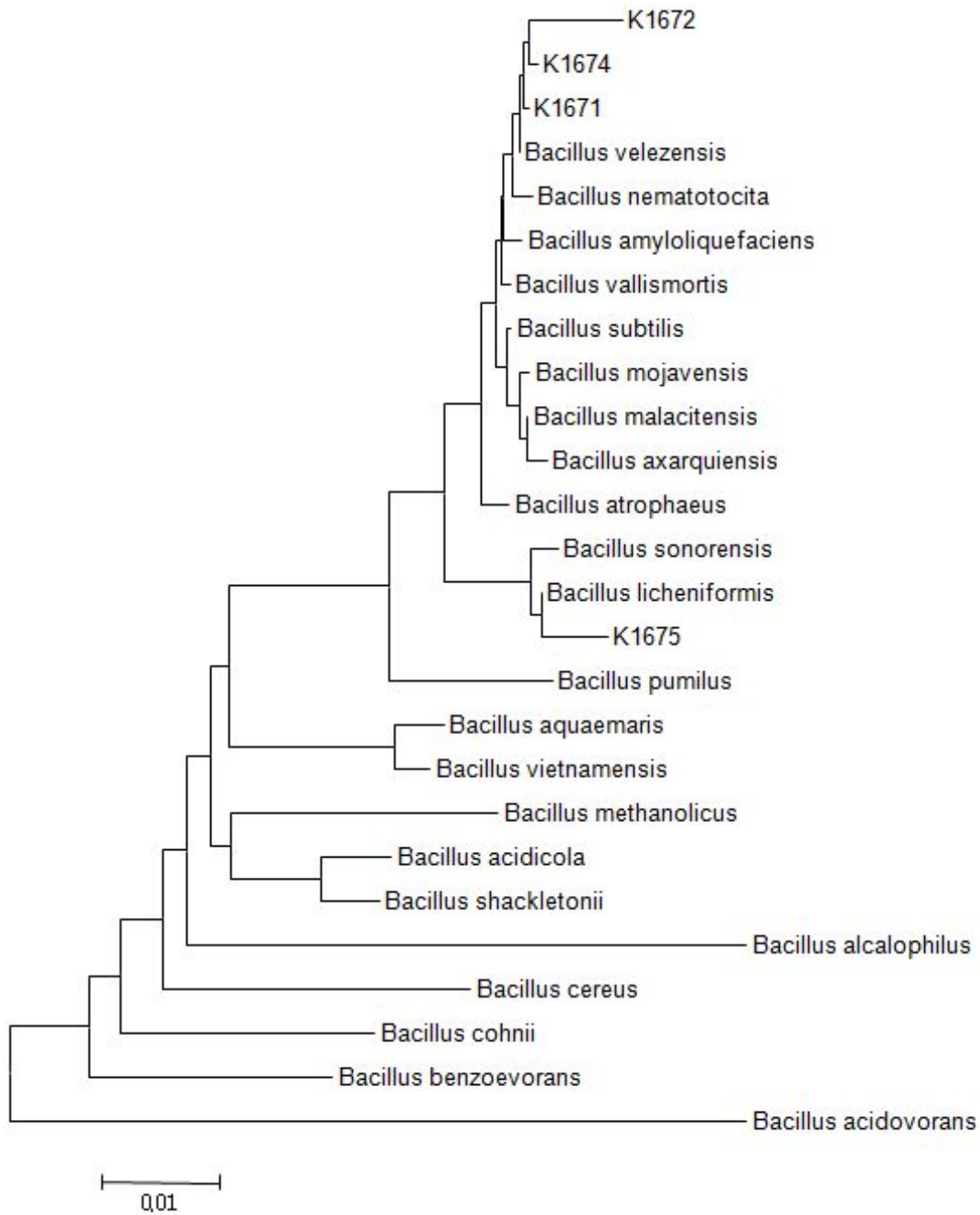


Fig. 7. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

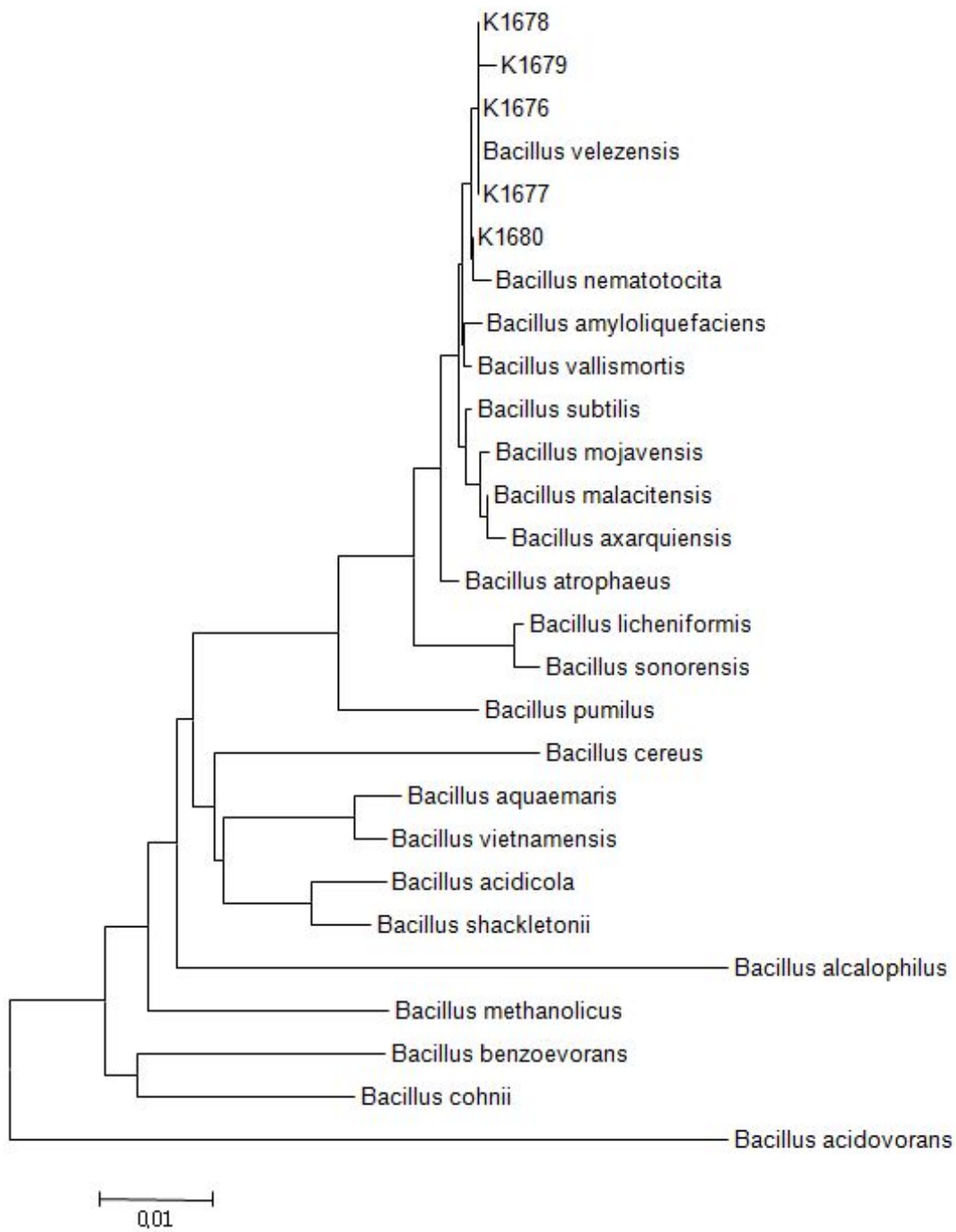


Fig. 8. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.



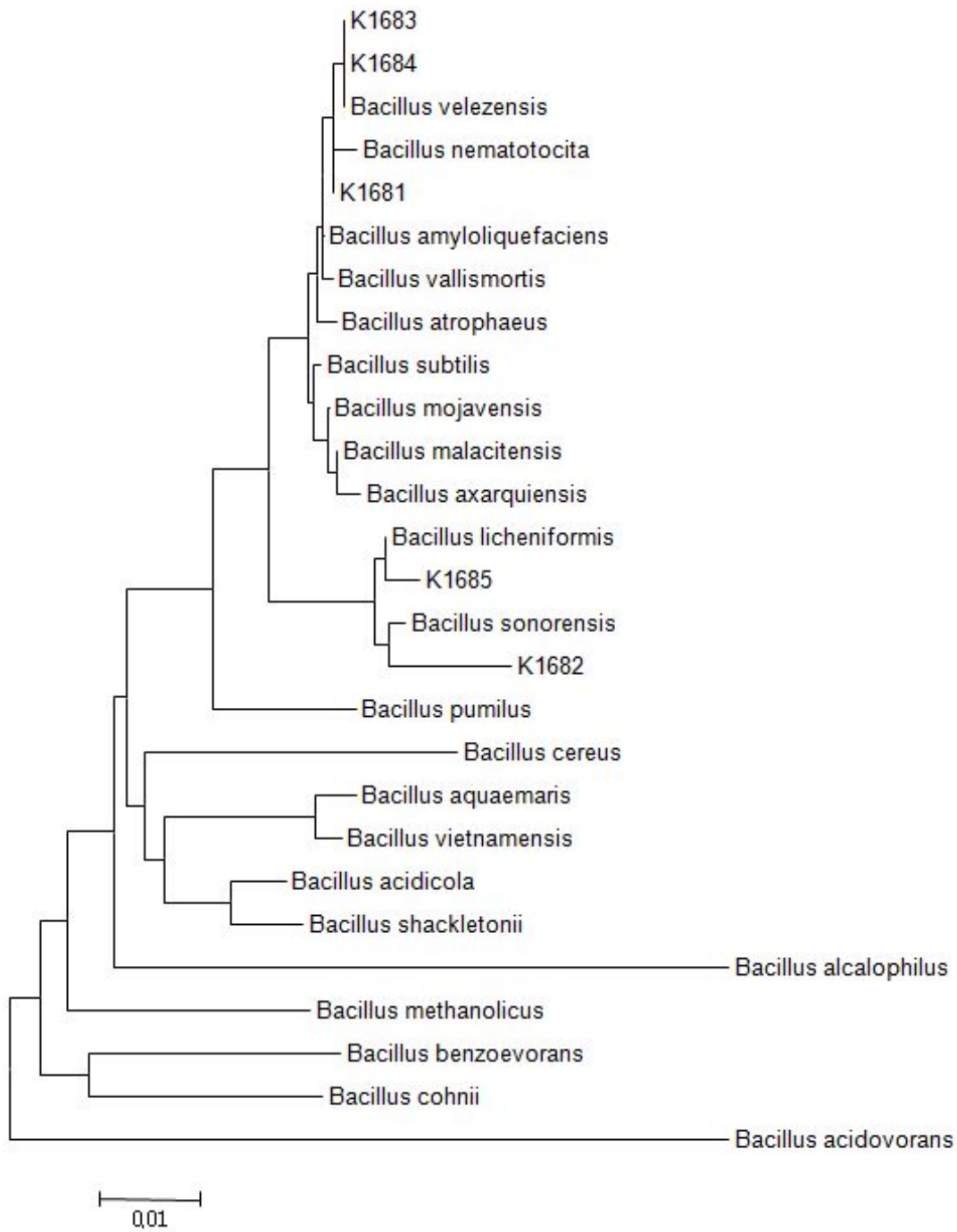


Fig. 9. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

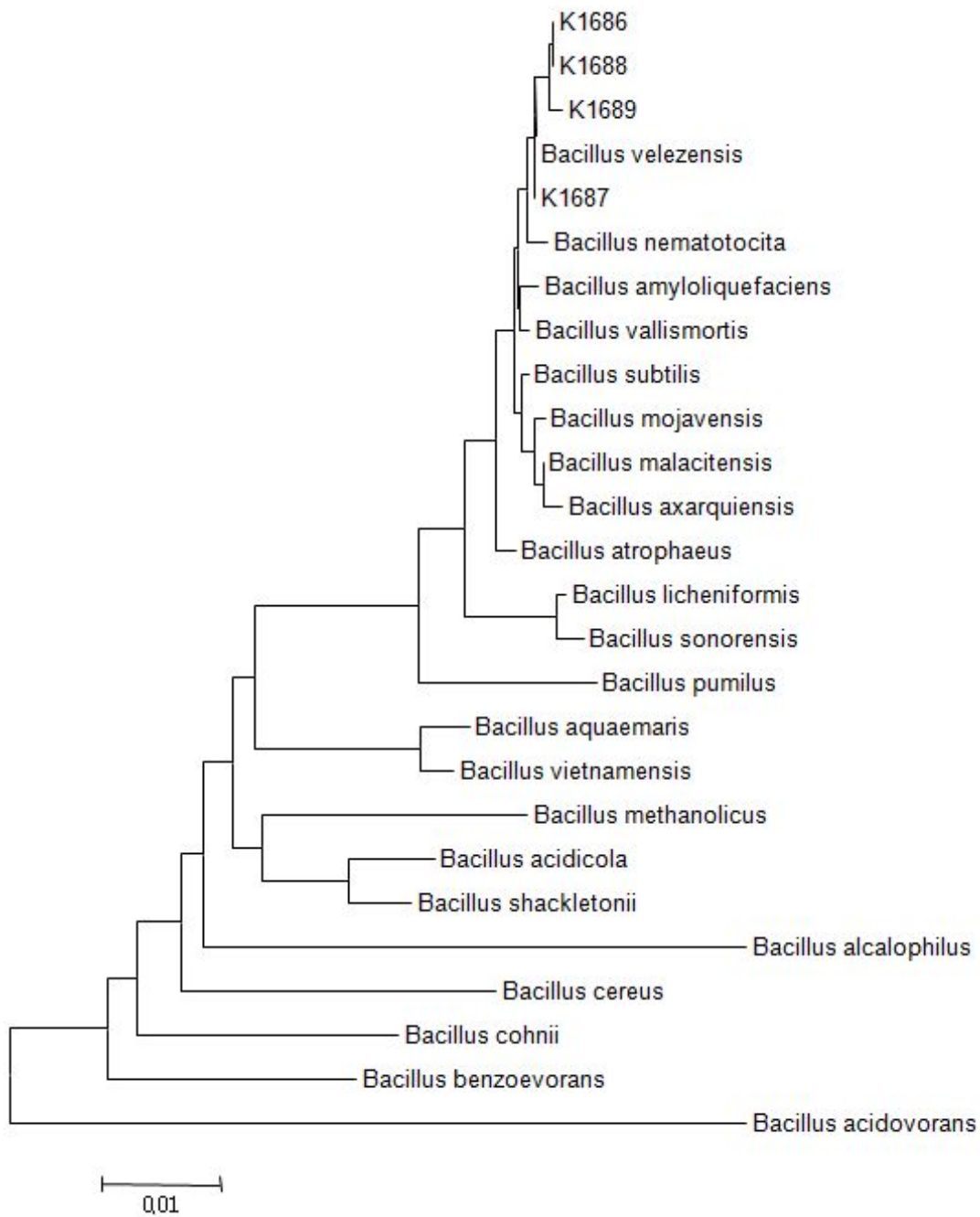


Fig. 10. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

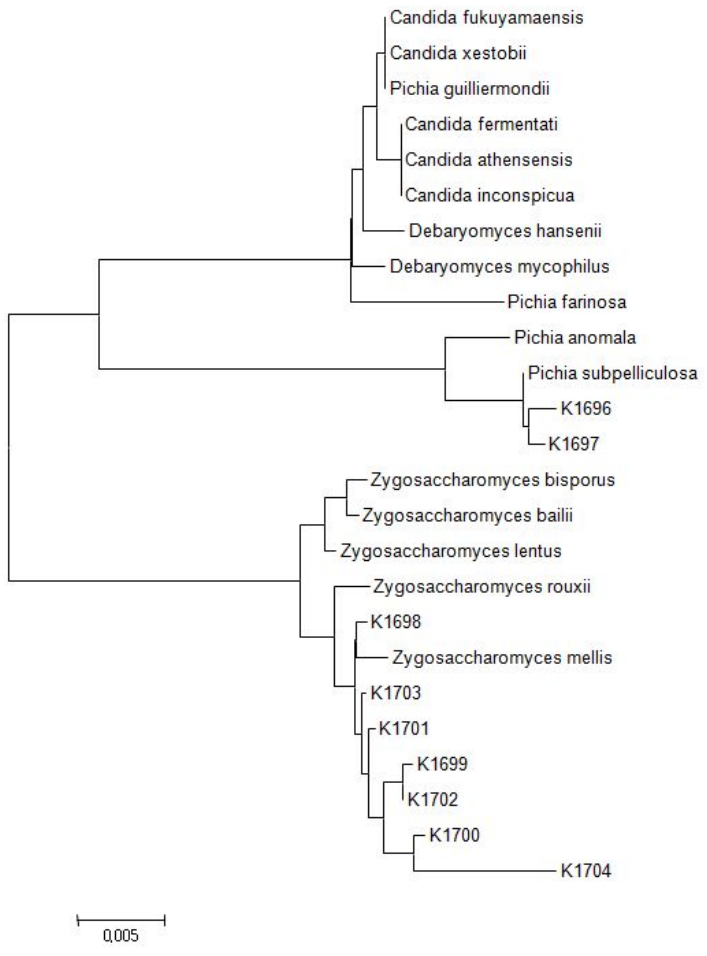
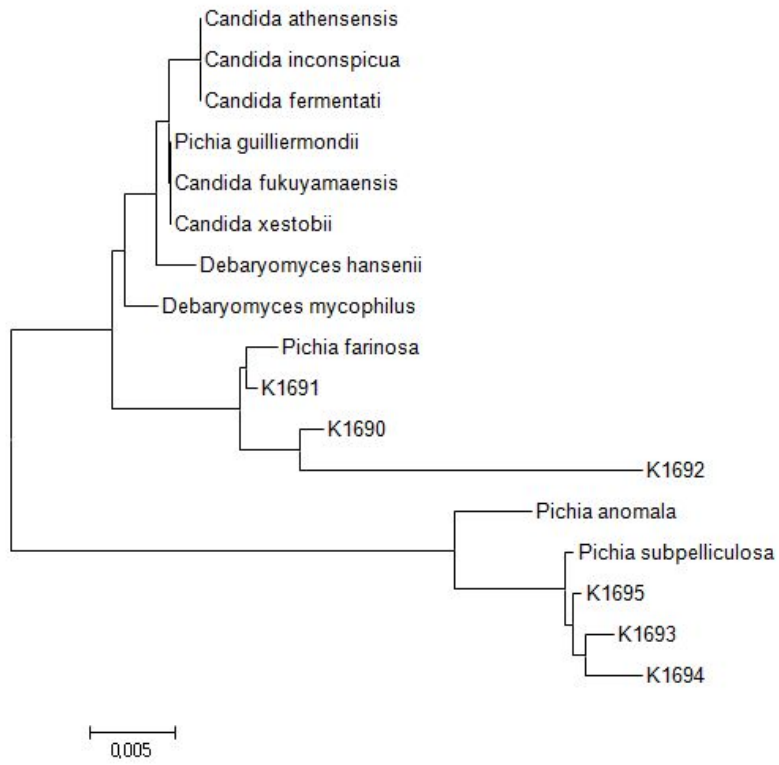


Fig. 11. Analysis of phylogenetic tree with 18S rDNA sequence.

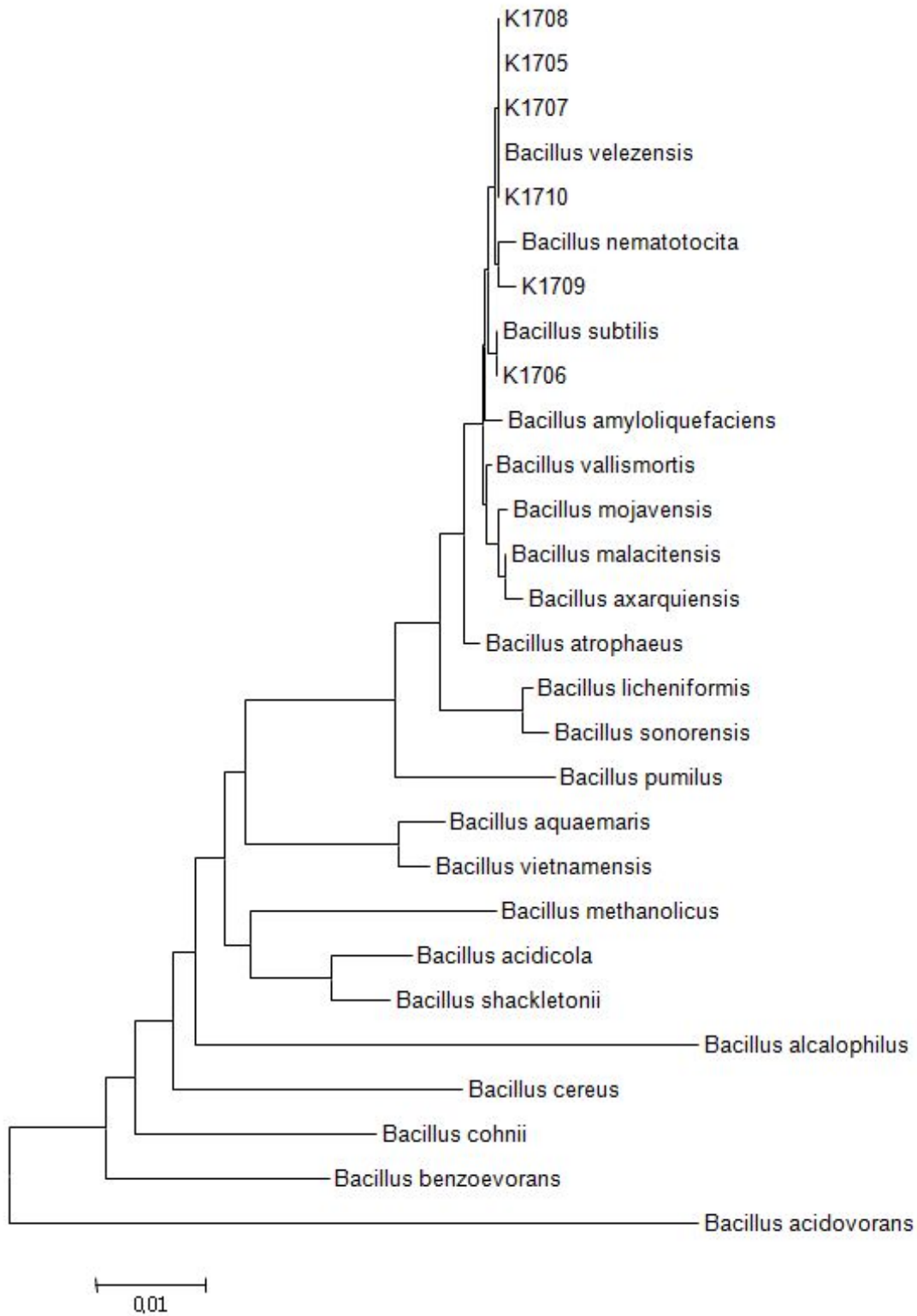


Fig. 12. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

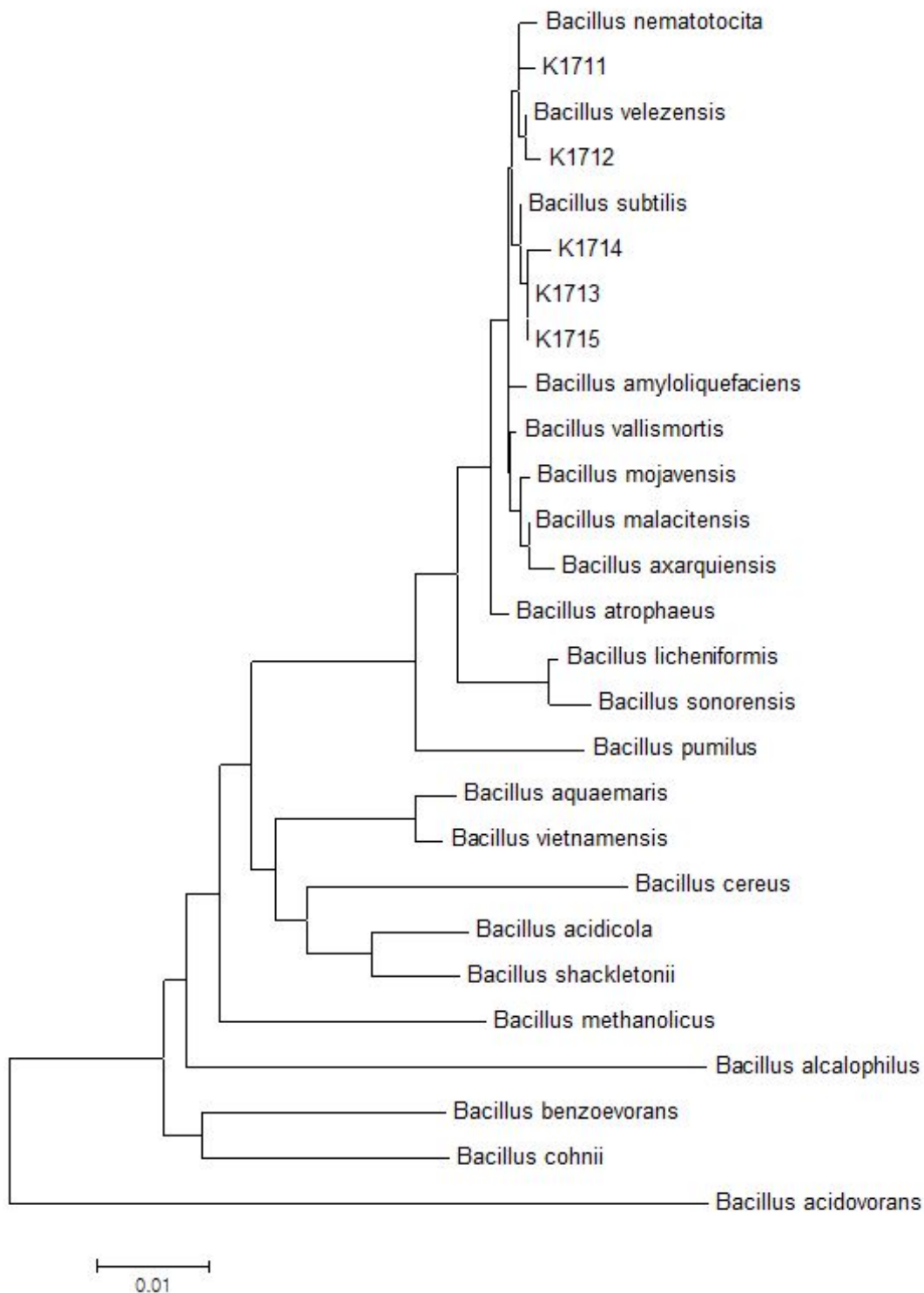


Fig. 13. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

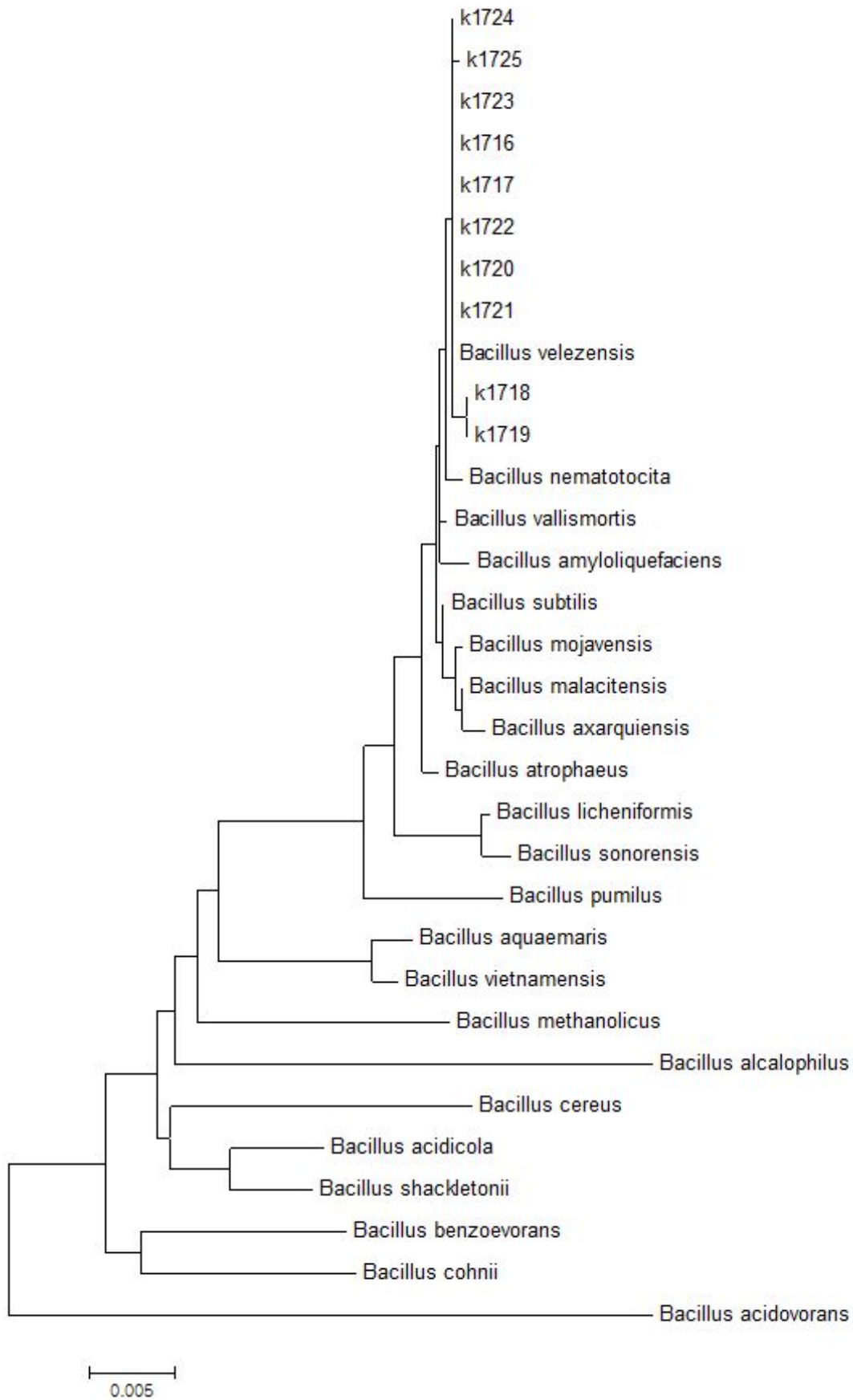


Fig. 14. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

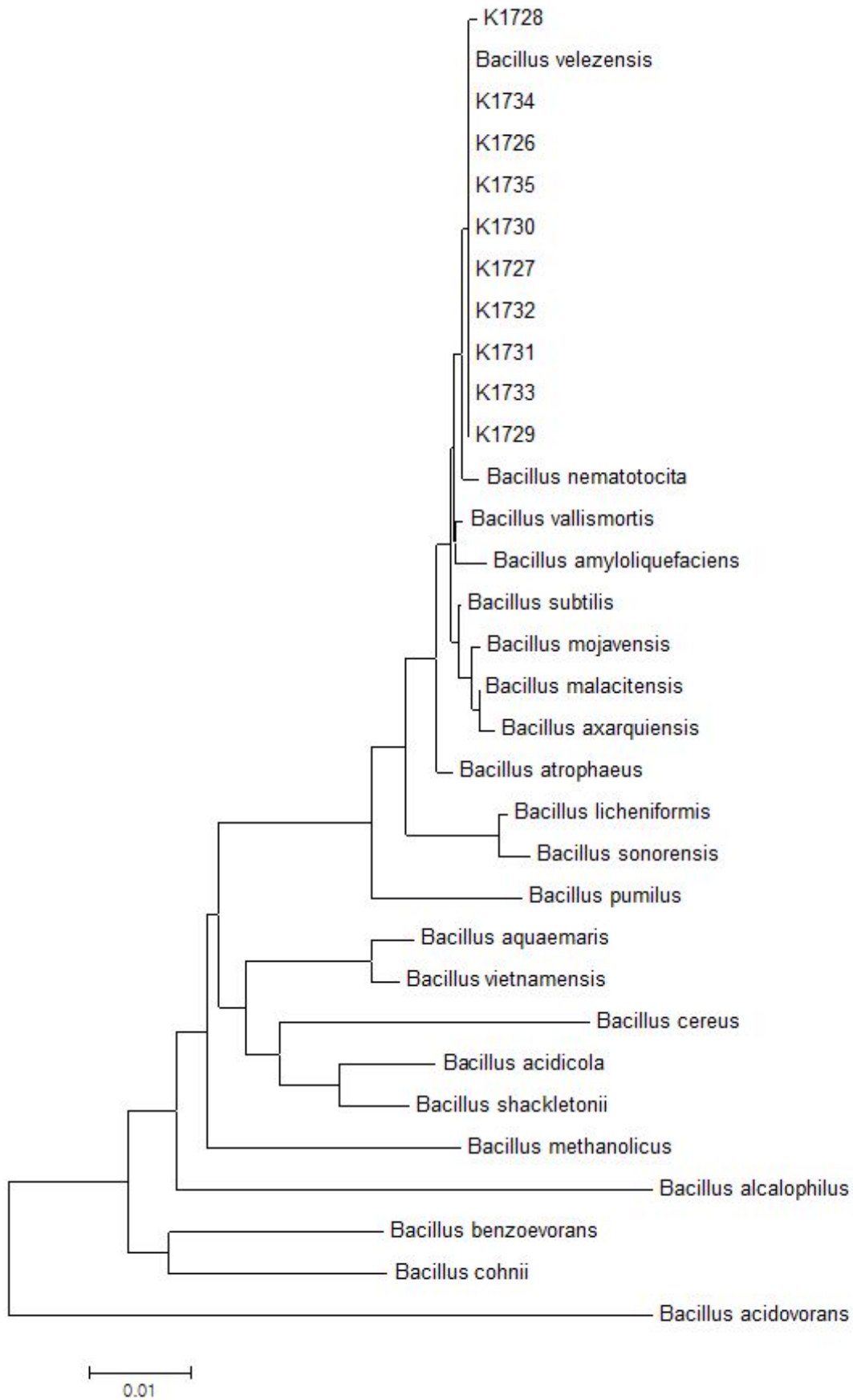


Fig. 15. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

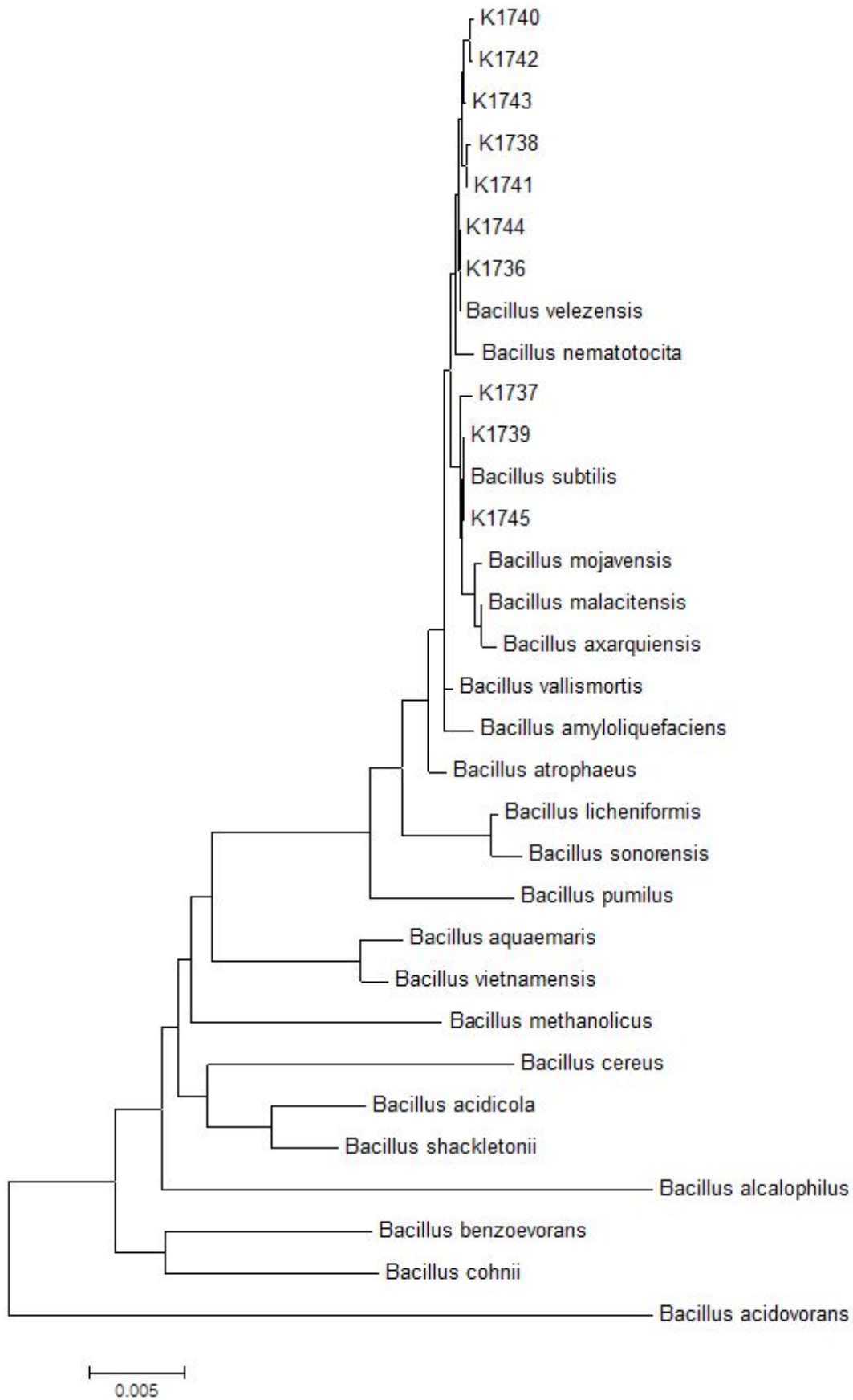


Fig. 16. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.



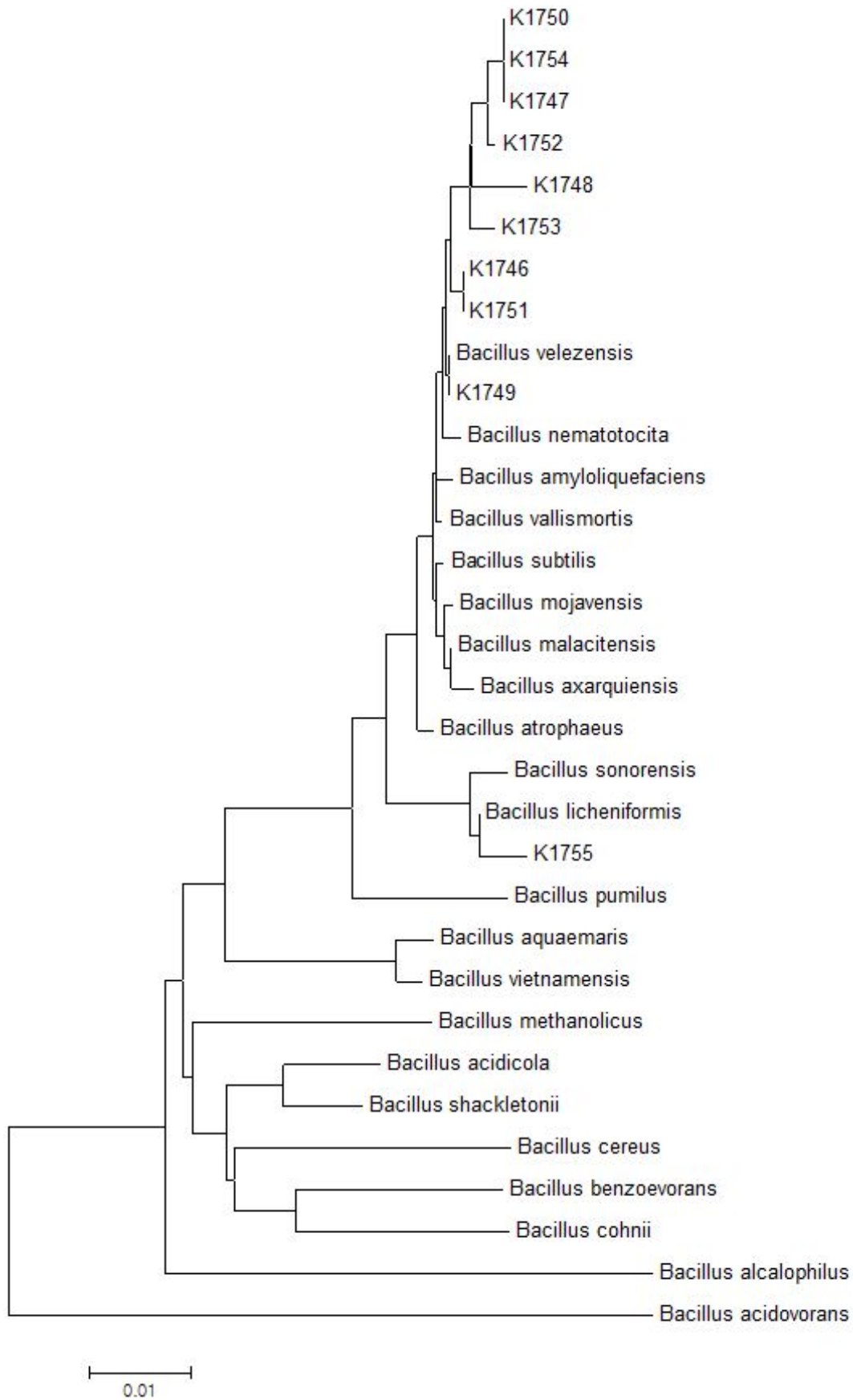


Fig. 17. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

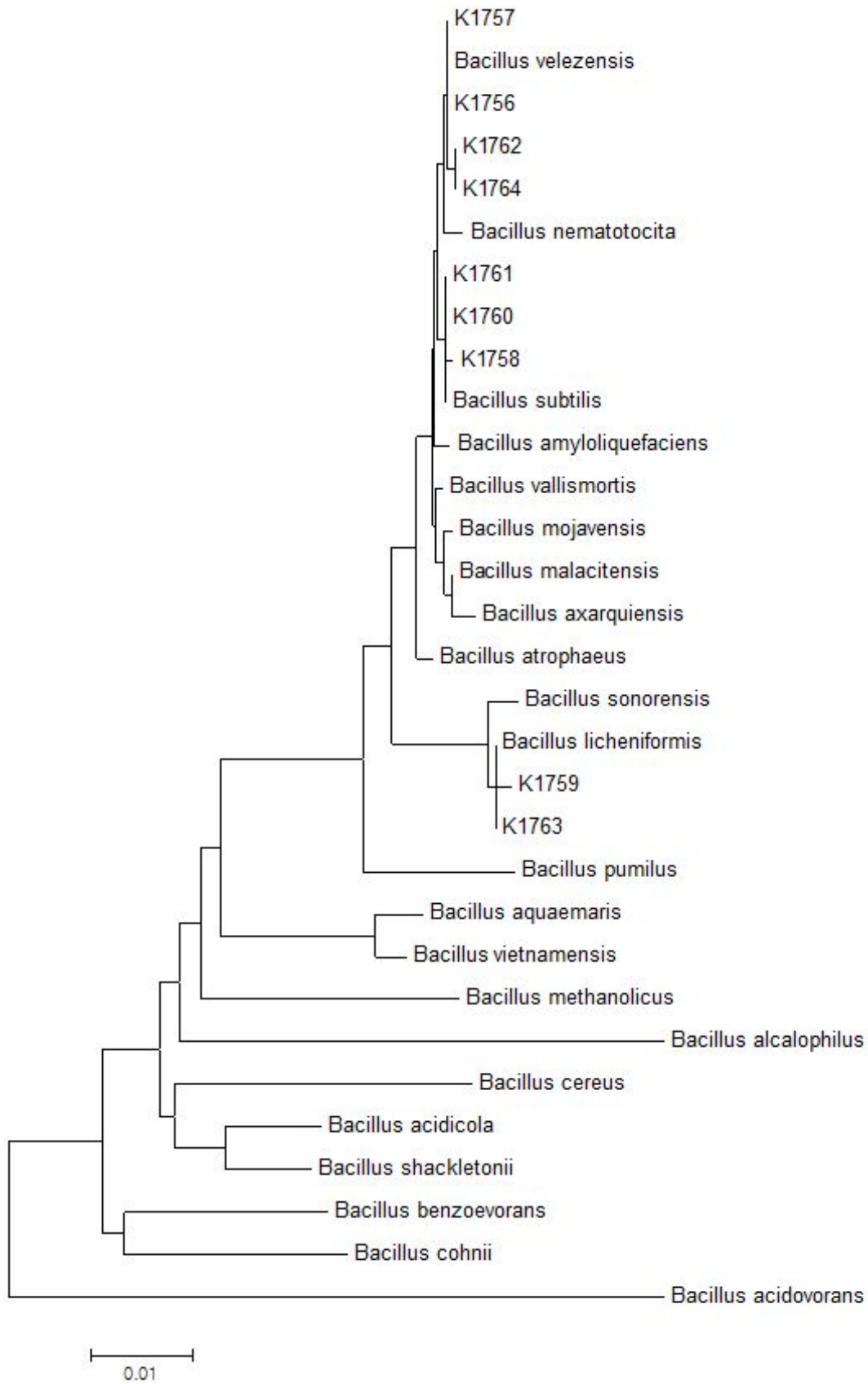


Fig. 18. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

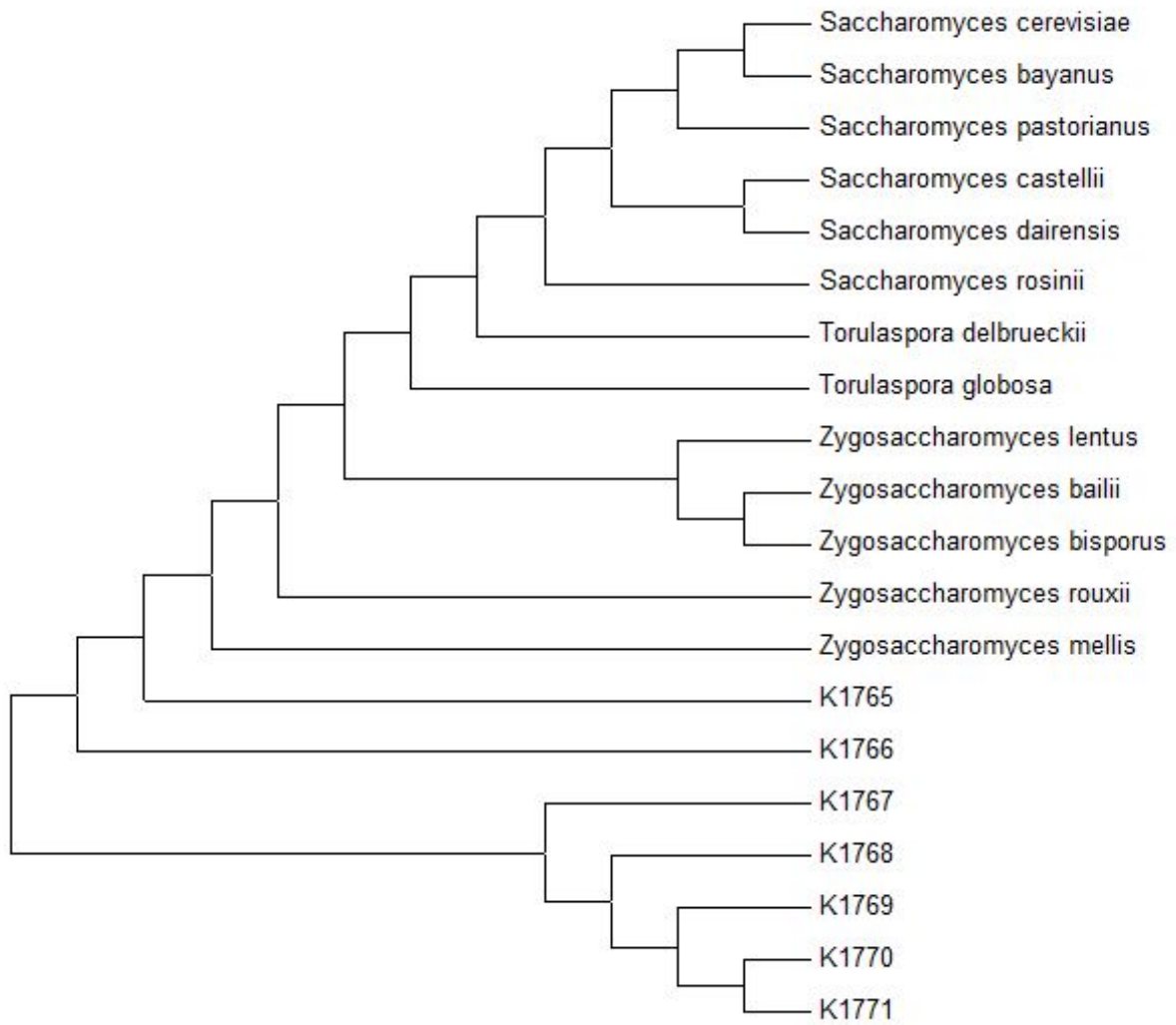


Fig. 19. Analysis of phylogenic tree with 18S rDNA sequence.

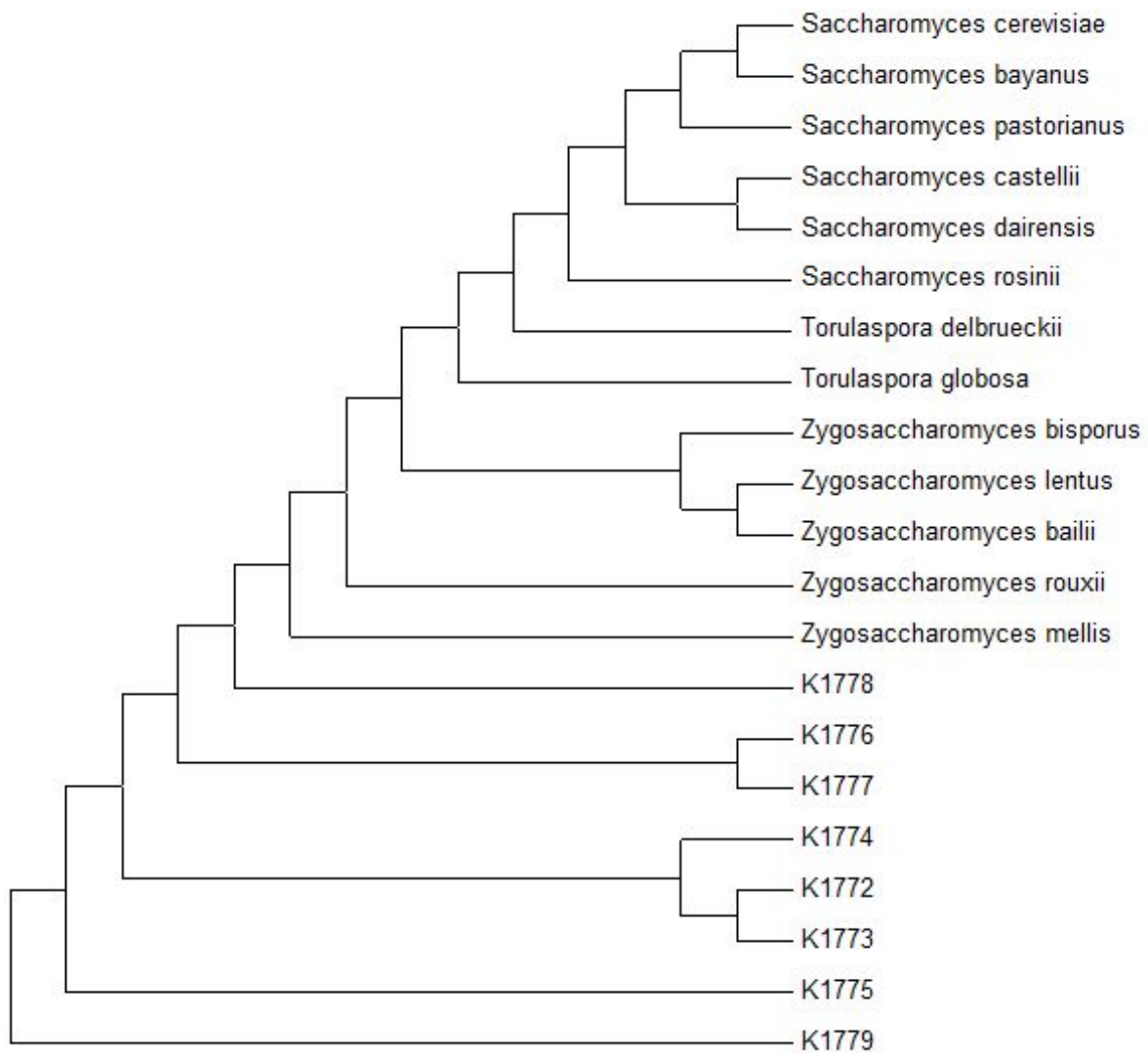


Fig. 20. Analysis of phylogenetic tree with 18S rDNA sequence.

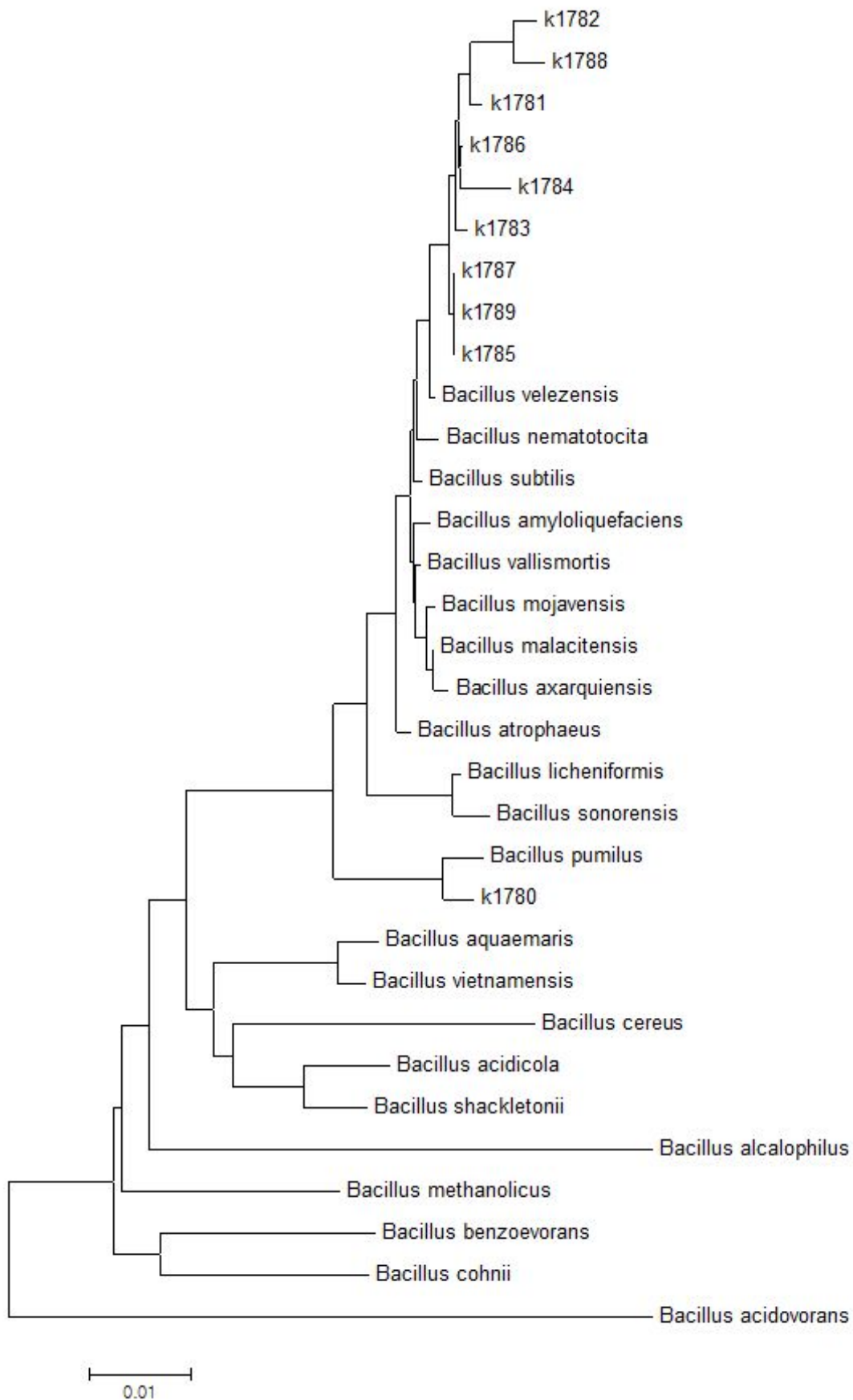


Fig. 21. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

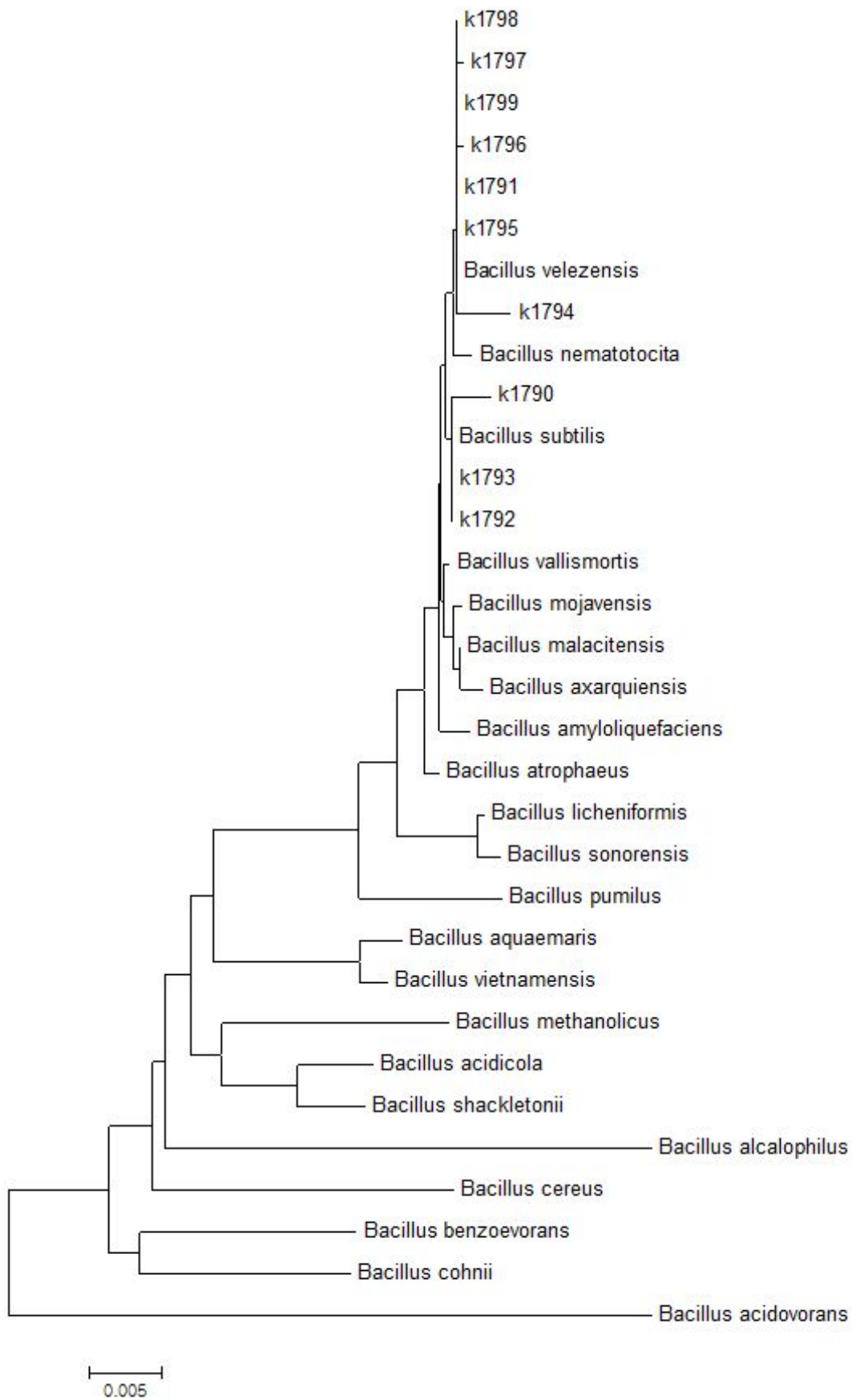


Fig. 22. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

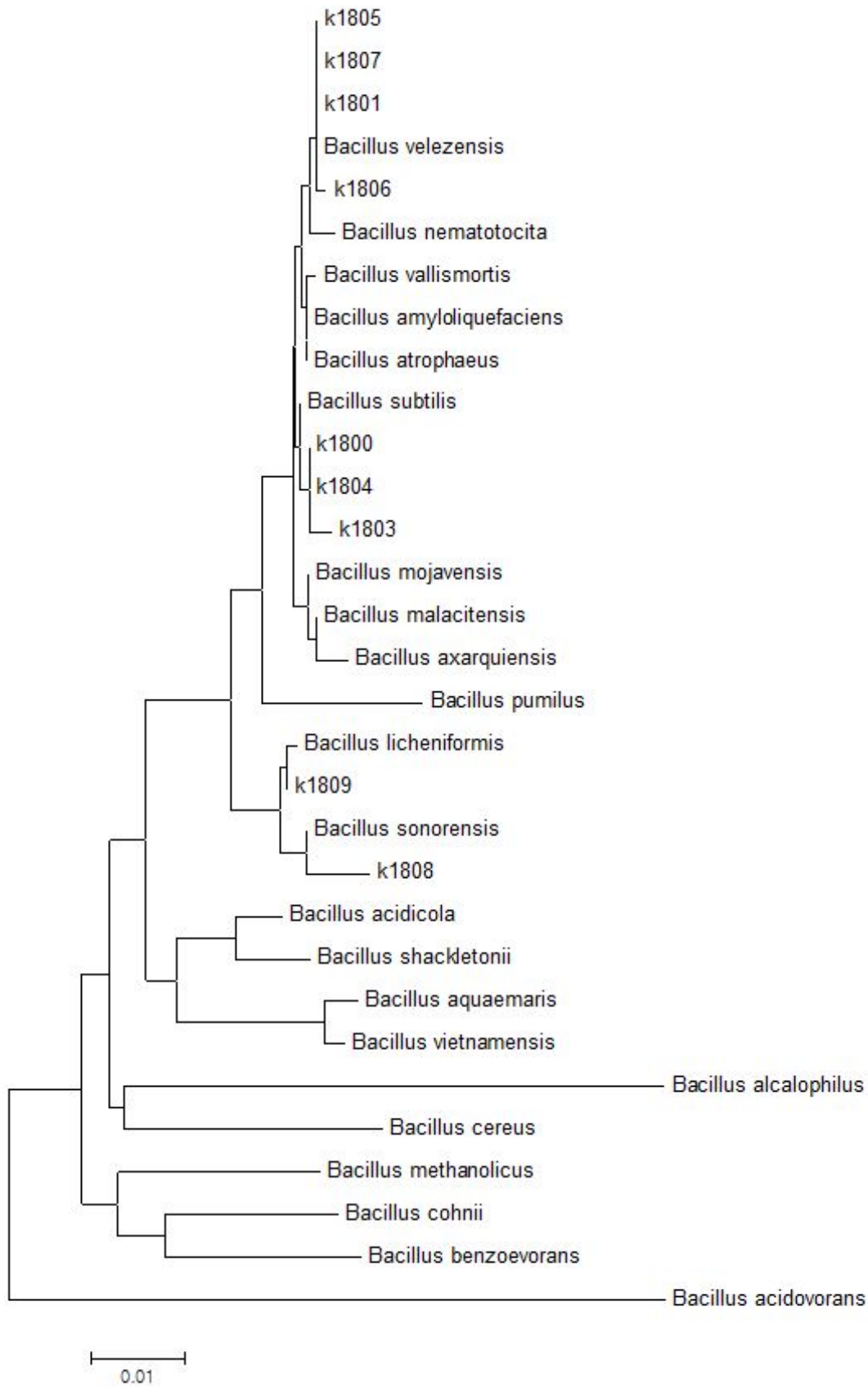


Fig. 23. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

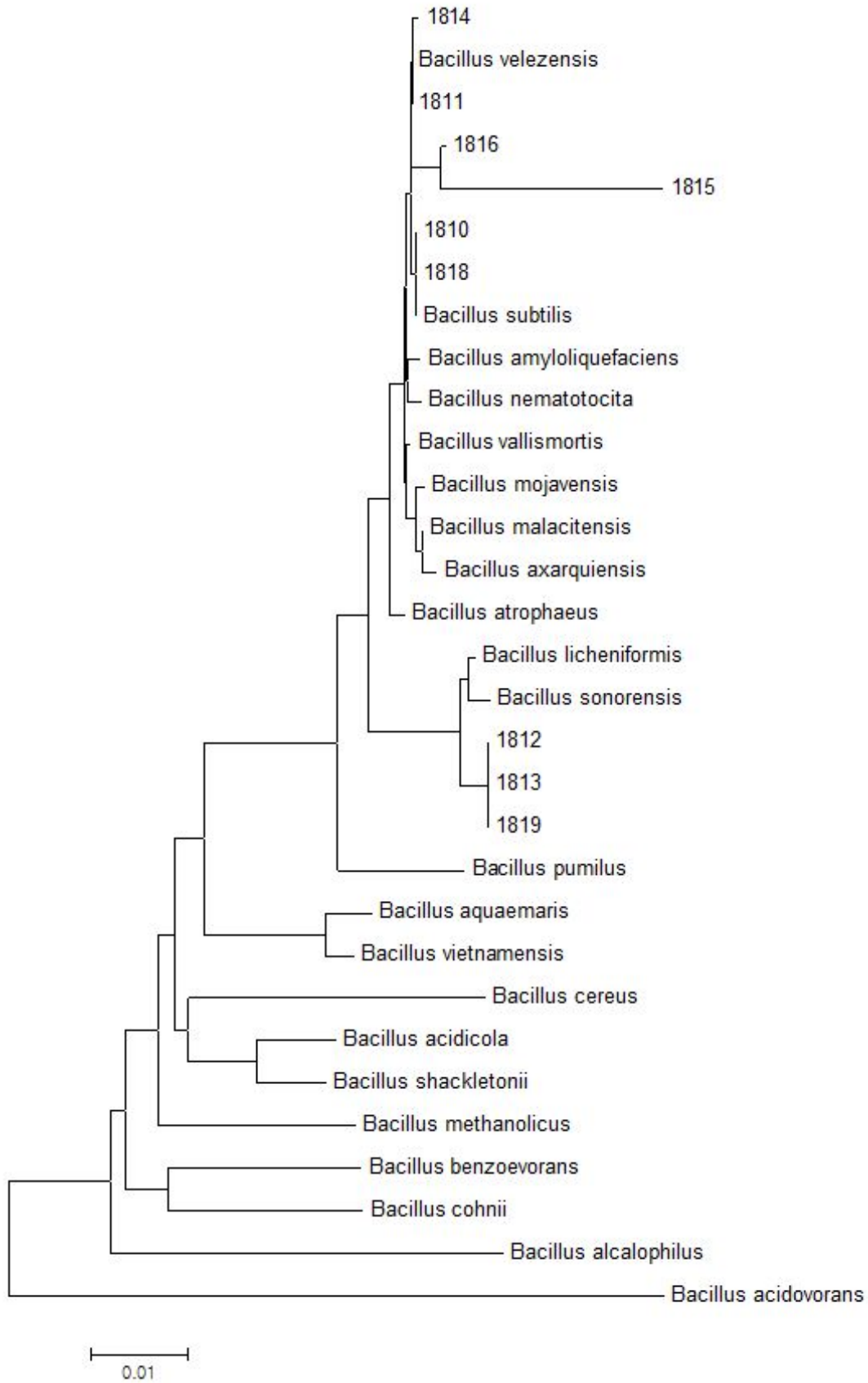


Fig. 24. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.



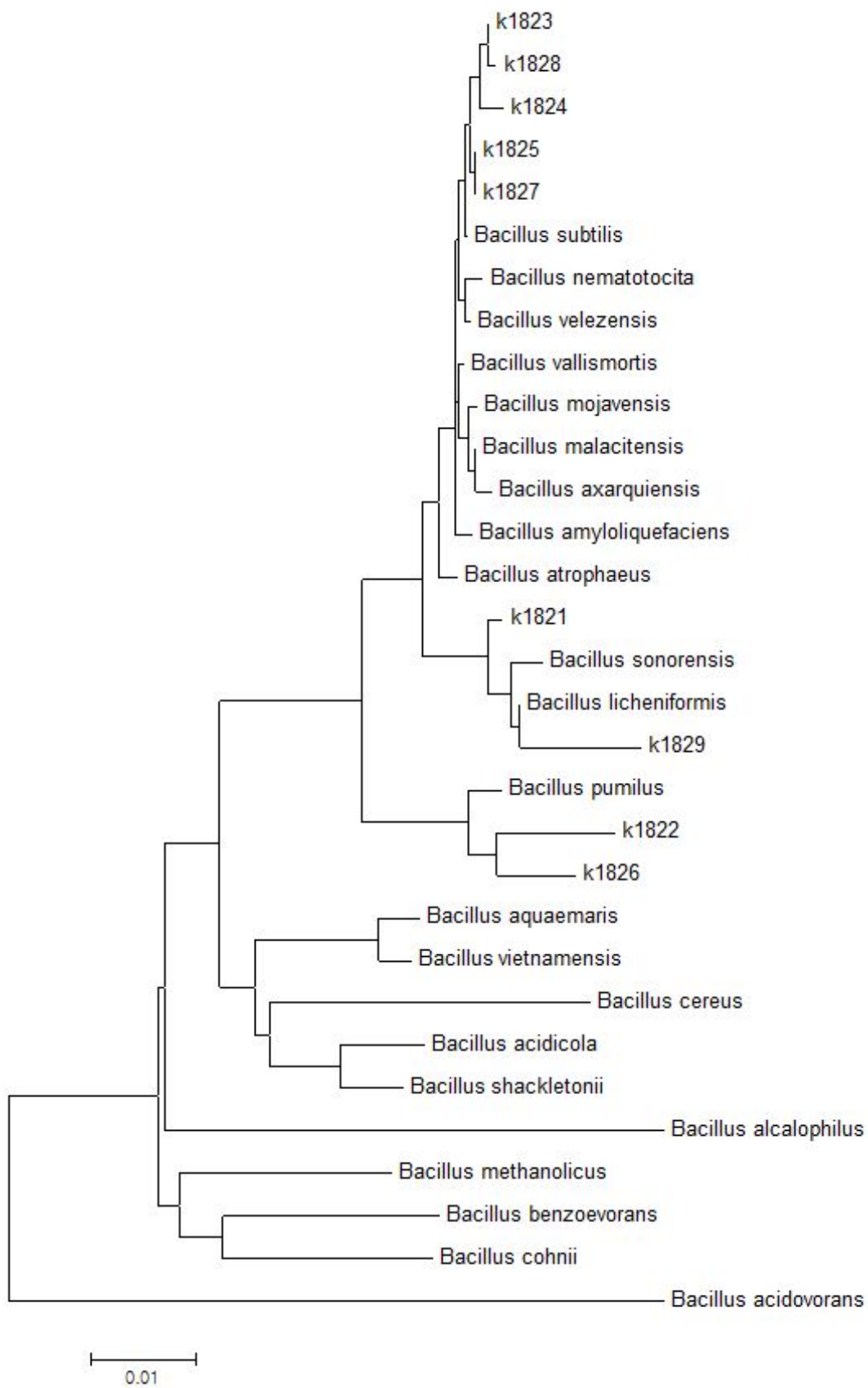


Fig. 25. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

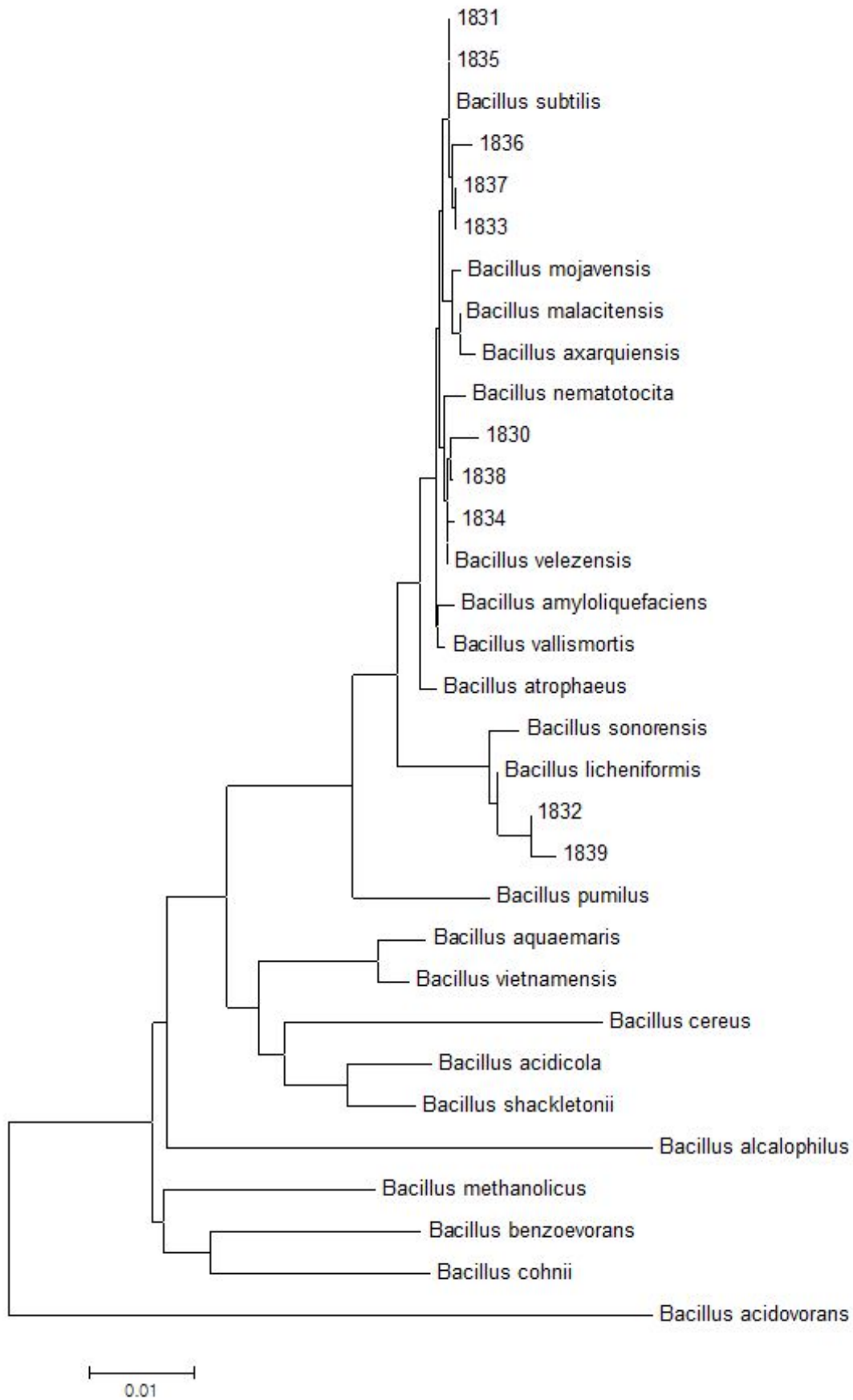


Fig. 26. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

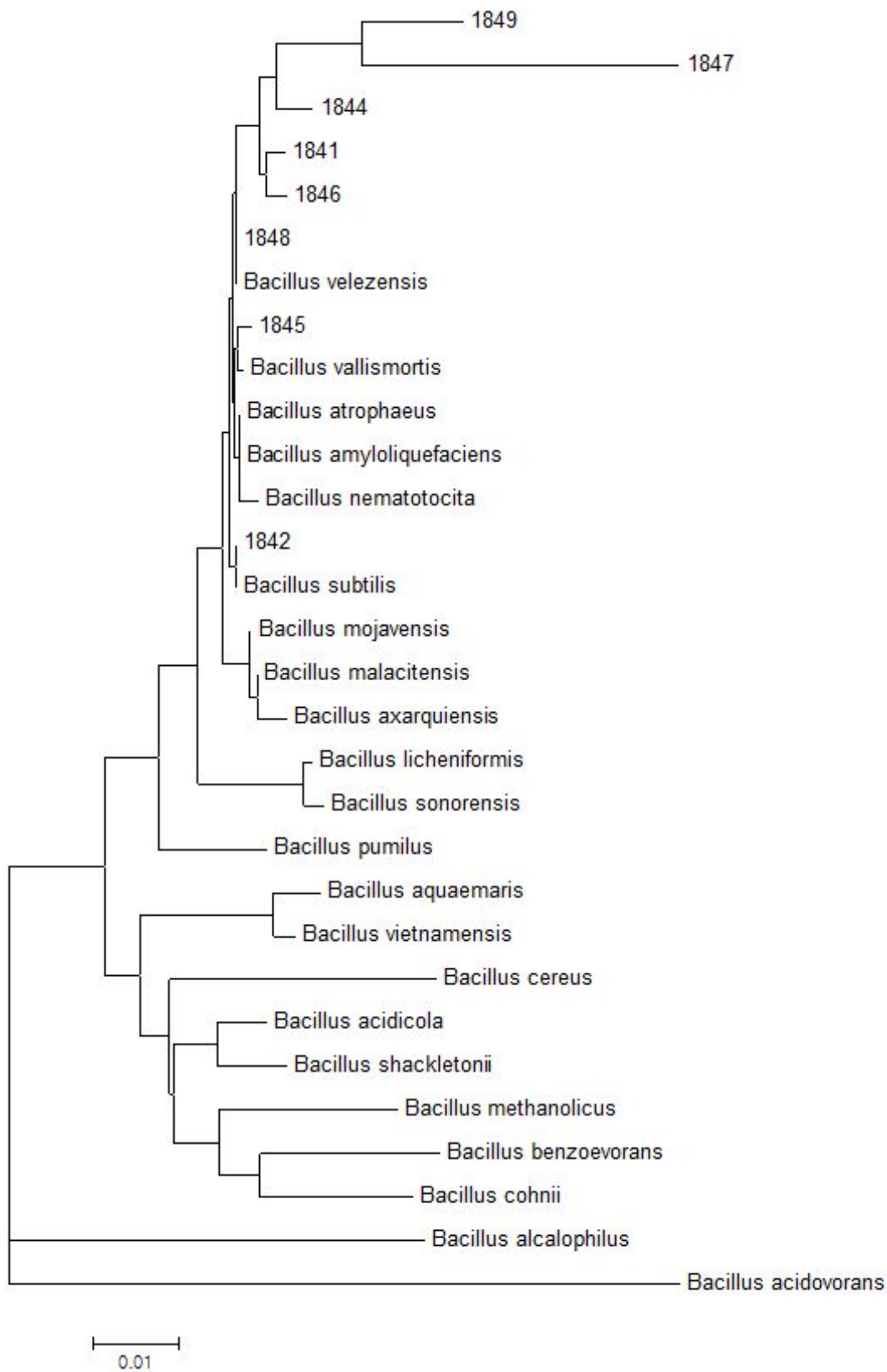


Fig. 27. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

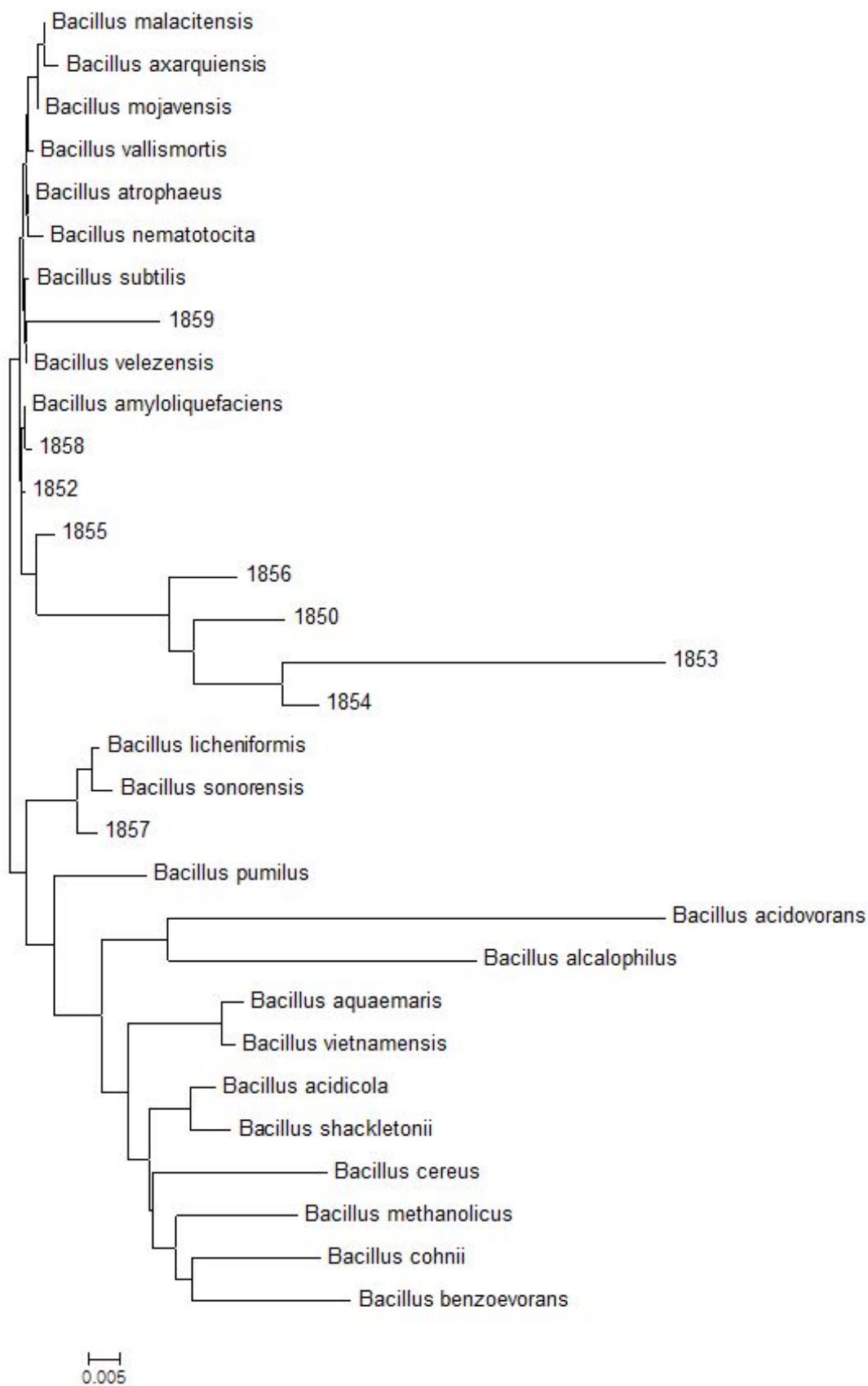


Fig. 28. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

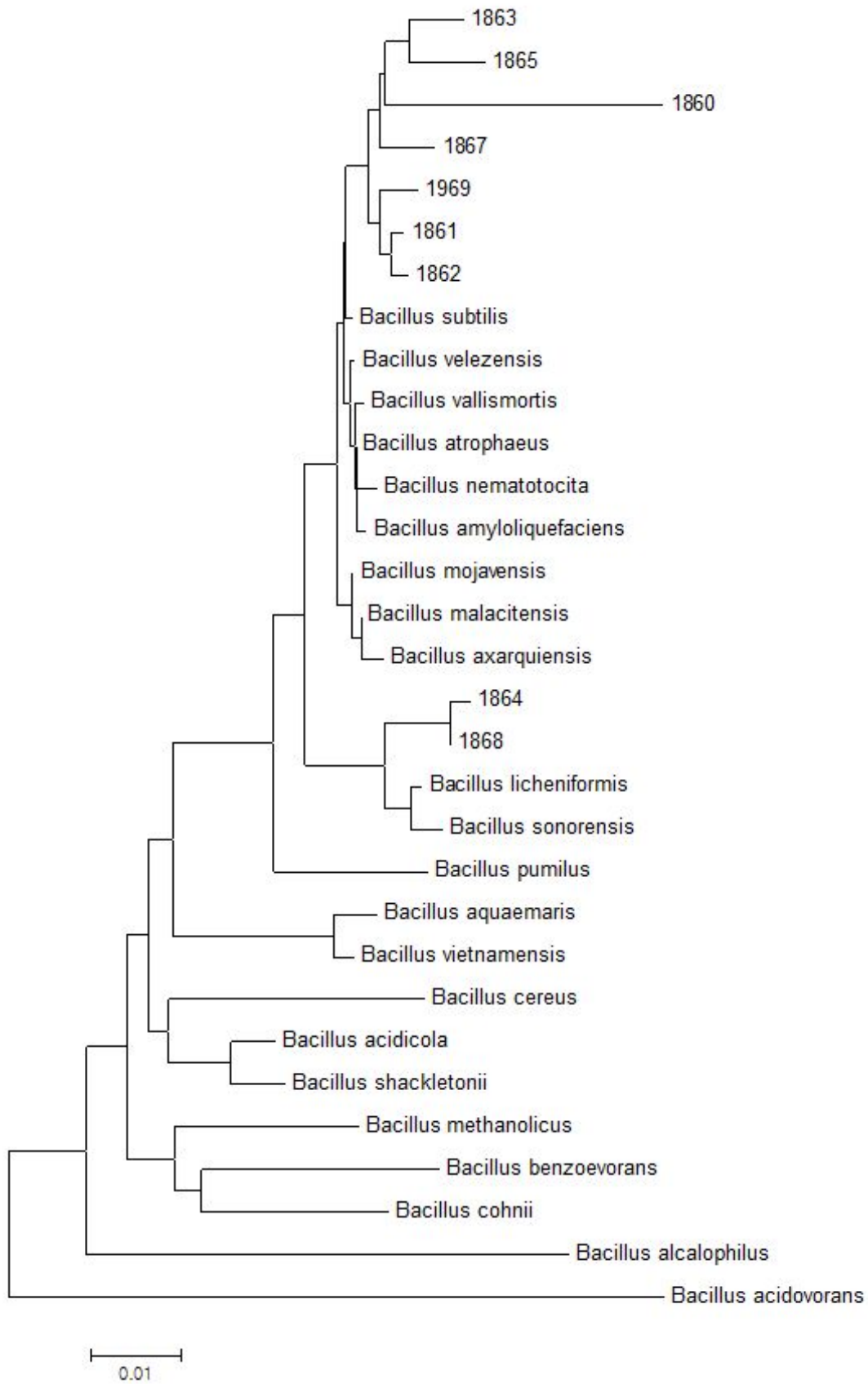


Fig. 29. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

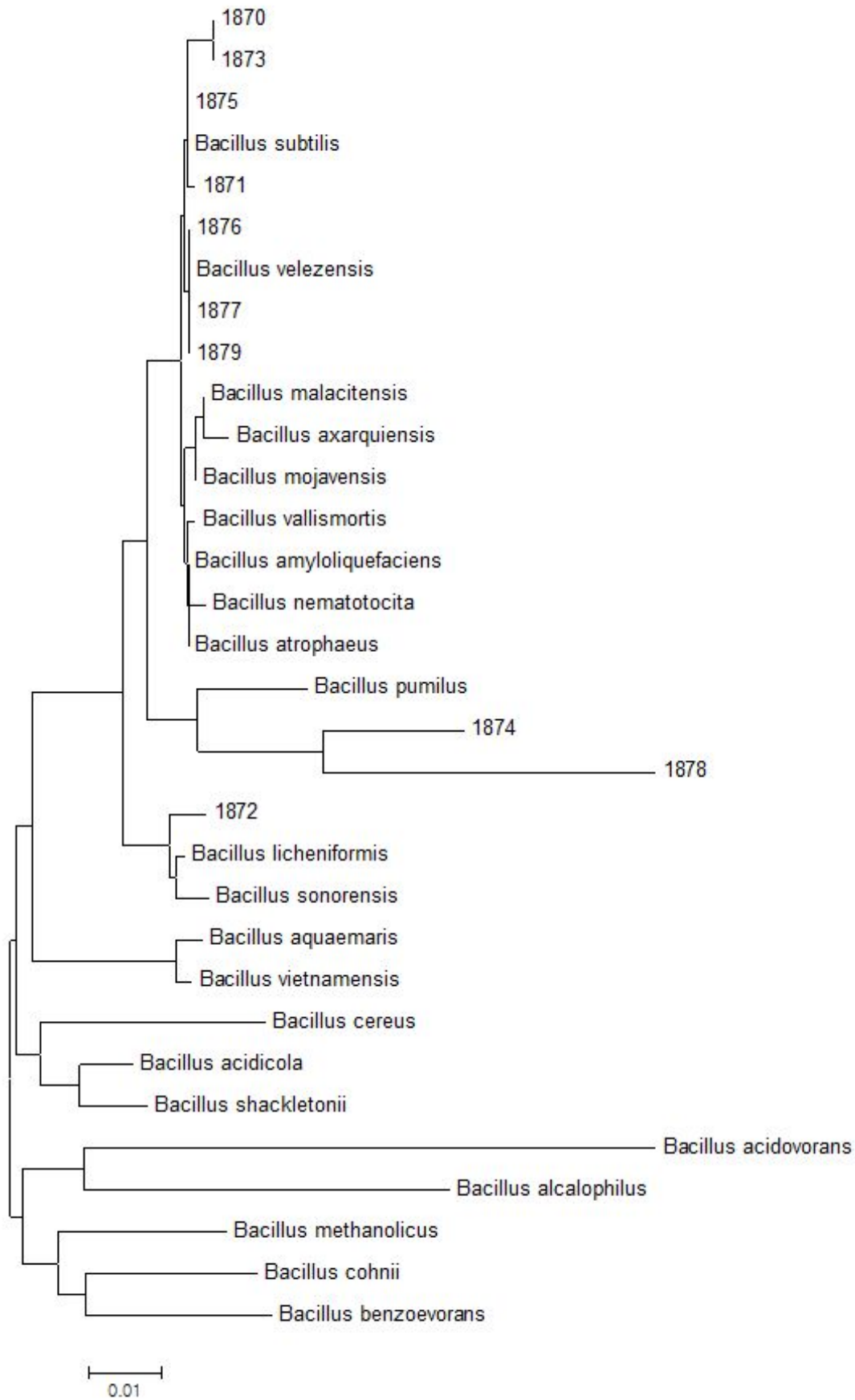


Fig. 30. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

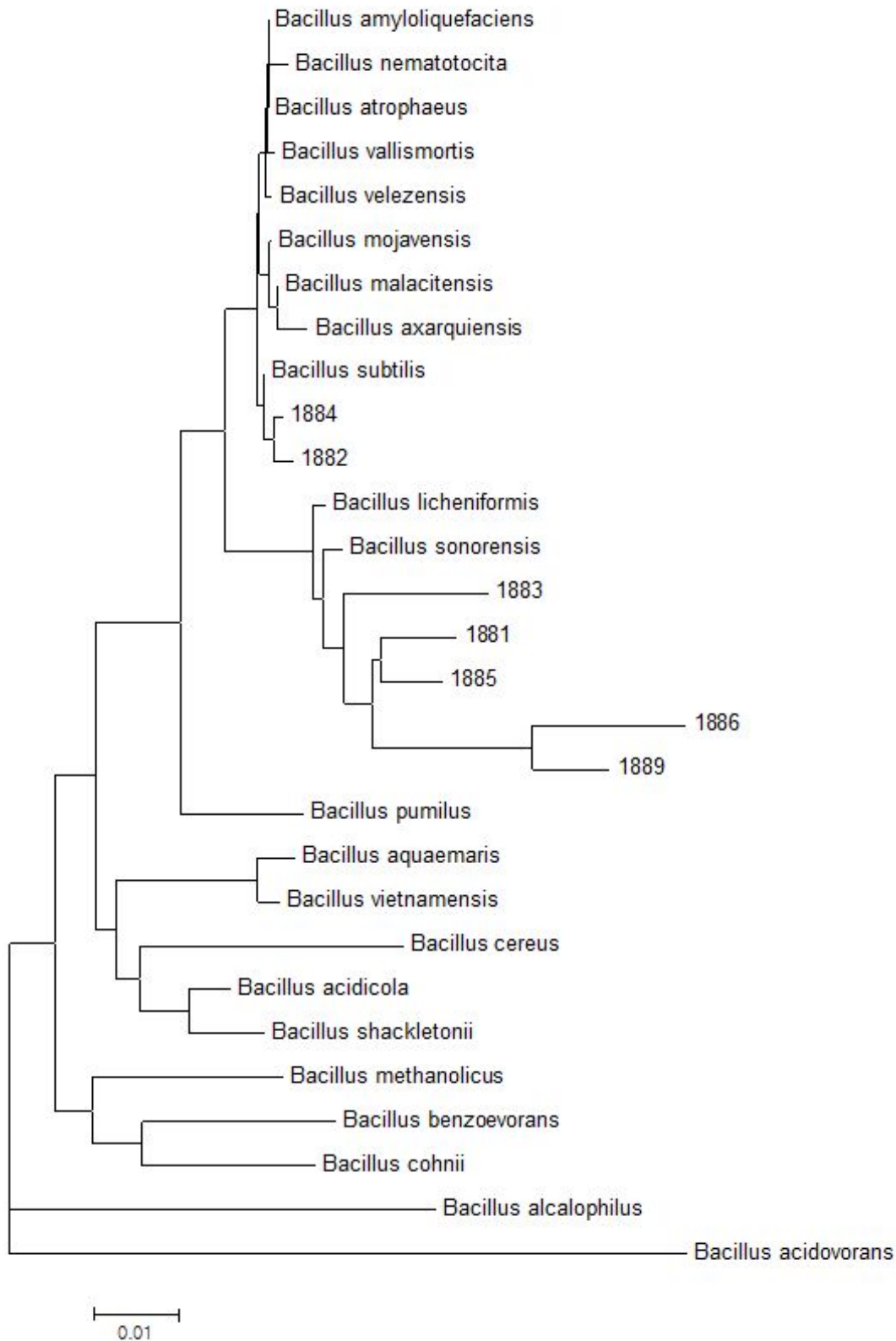


Fig. 31. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

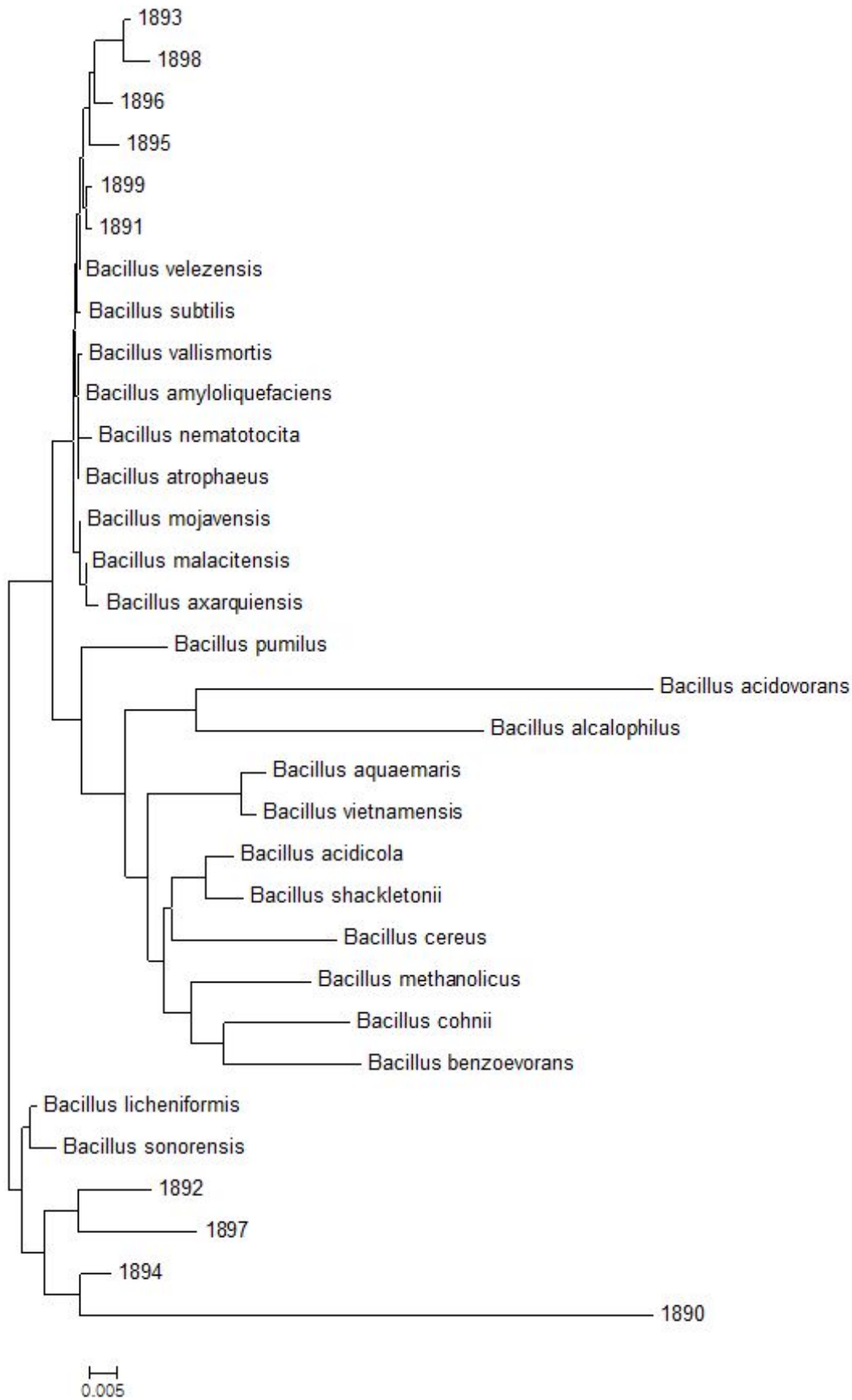


Fig. 32. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.



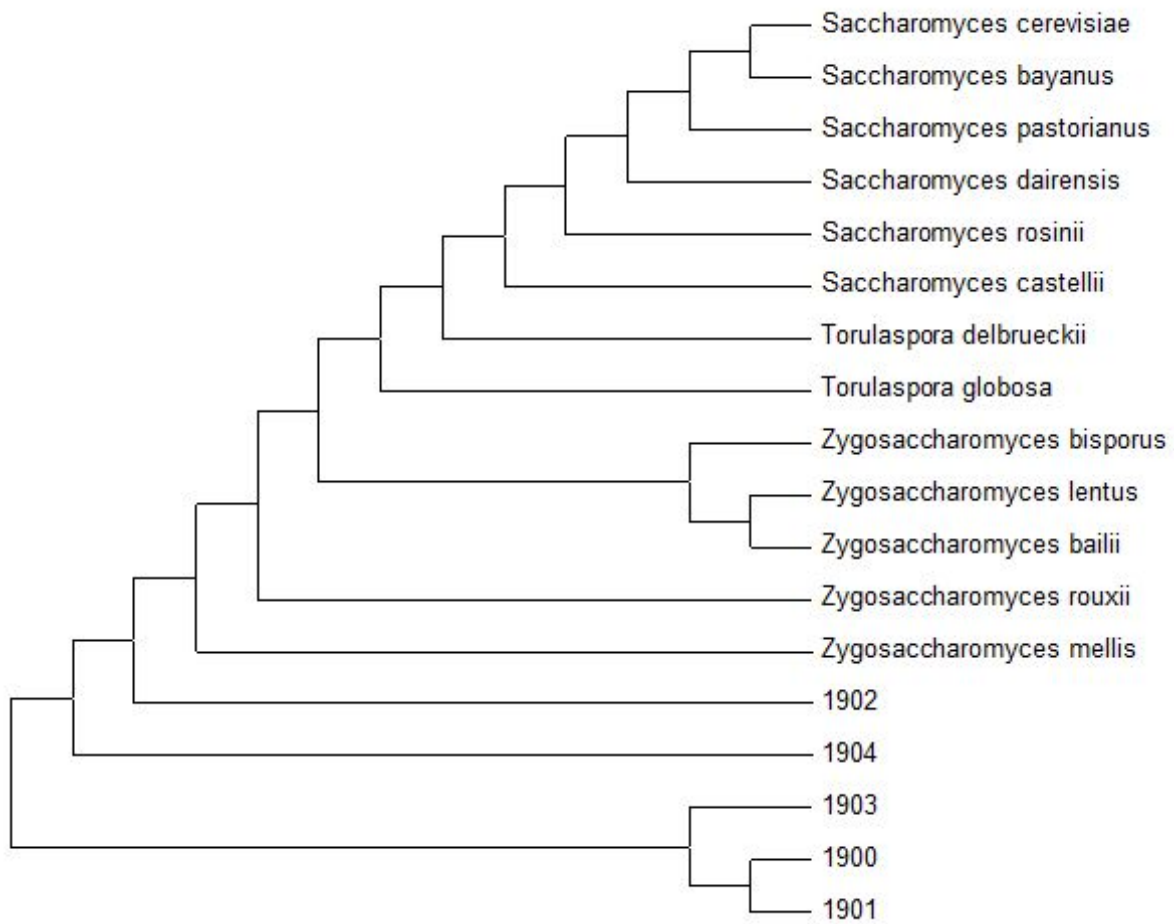


Fig. 33. Analysis of phylogenetic tree with 18S rDNA sequence.

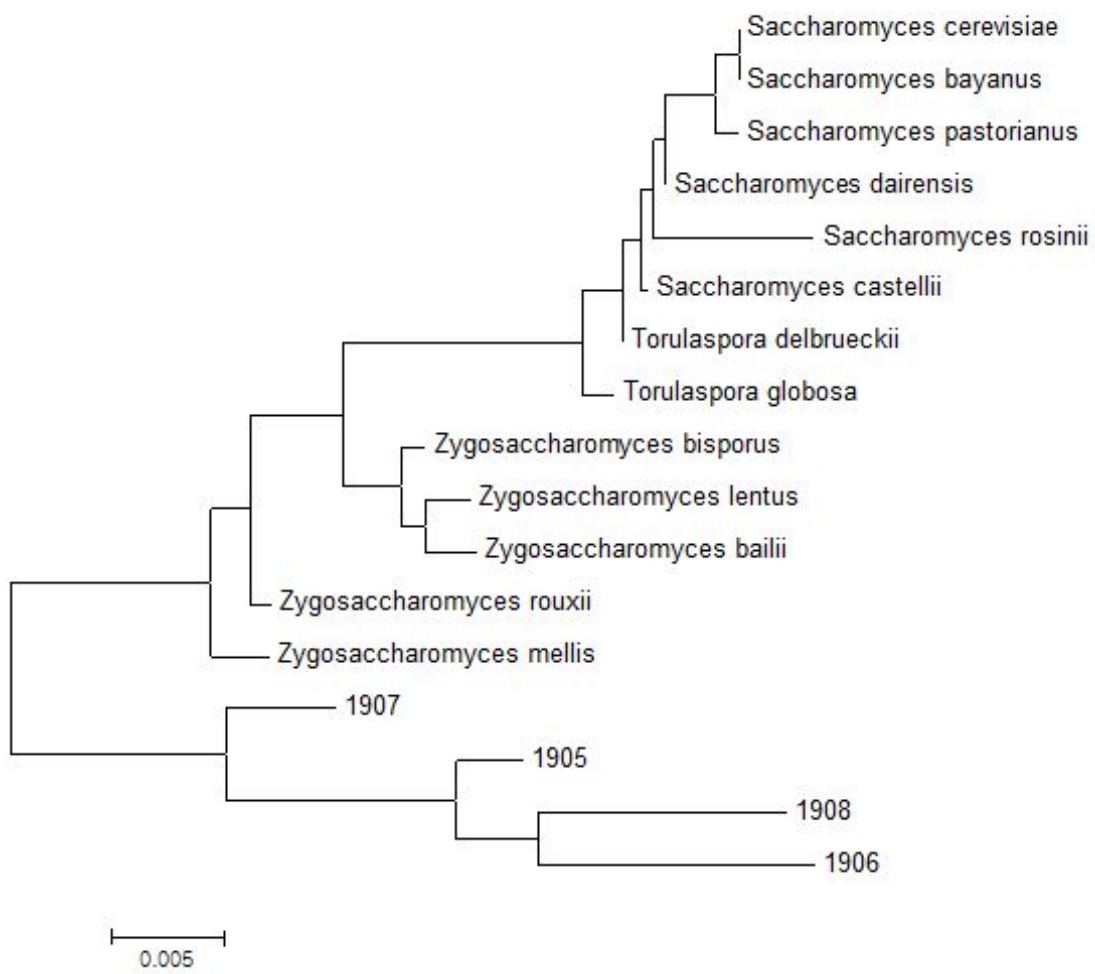


Fig. 34. Analysis of phylogenetic tree with 18S rDNA sequence.

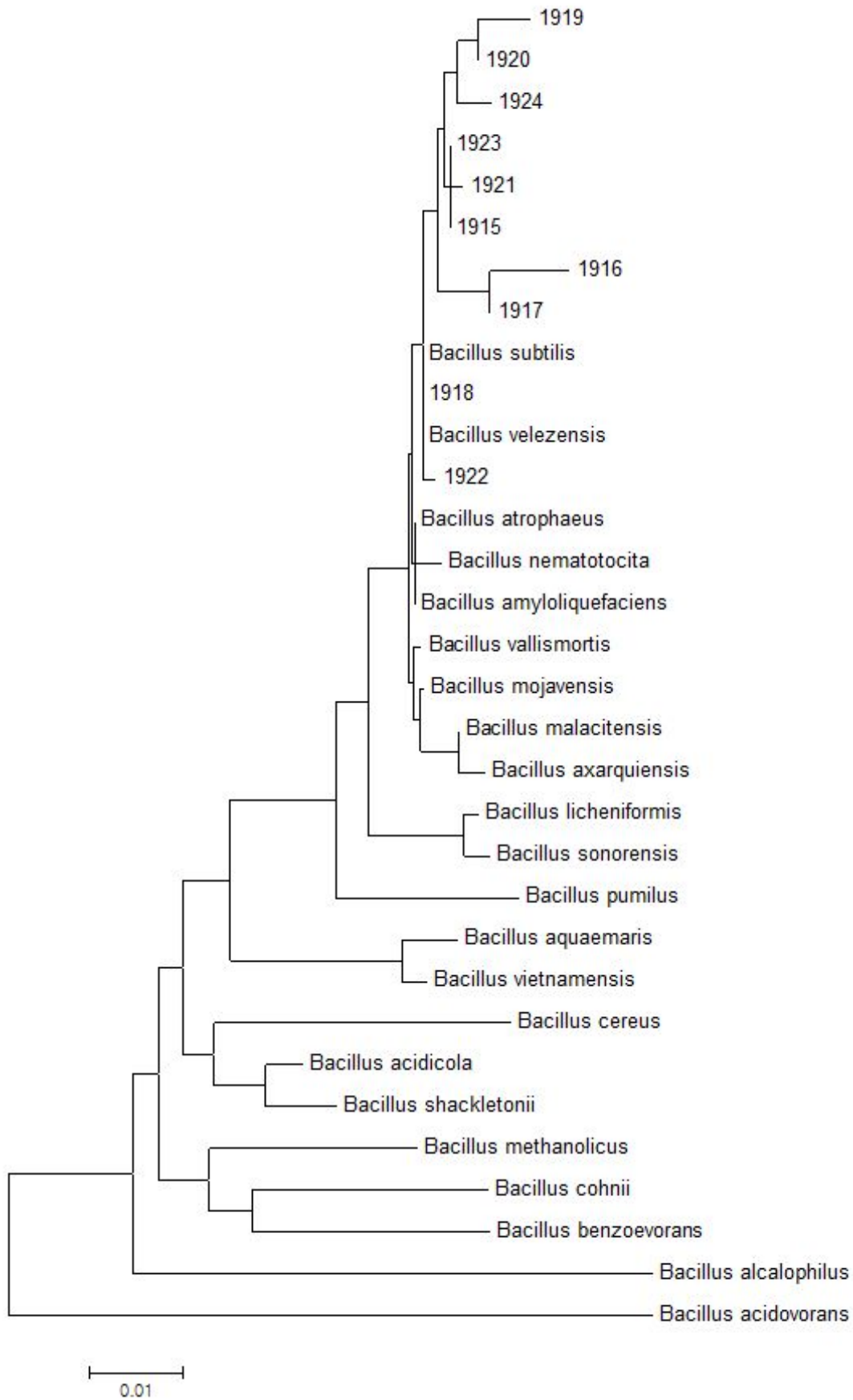


Fig. 36. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

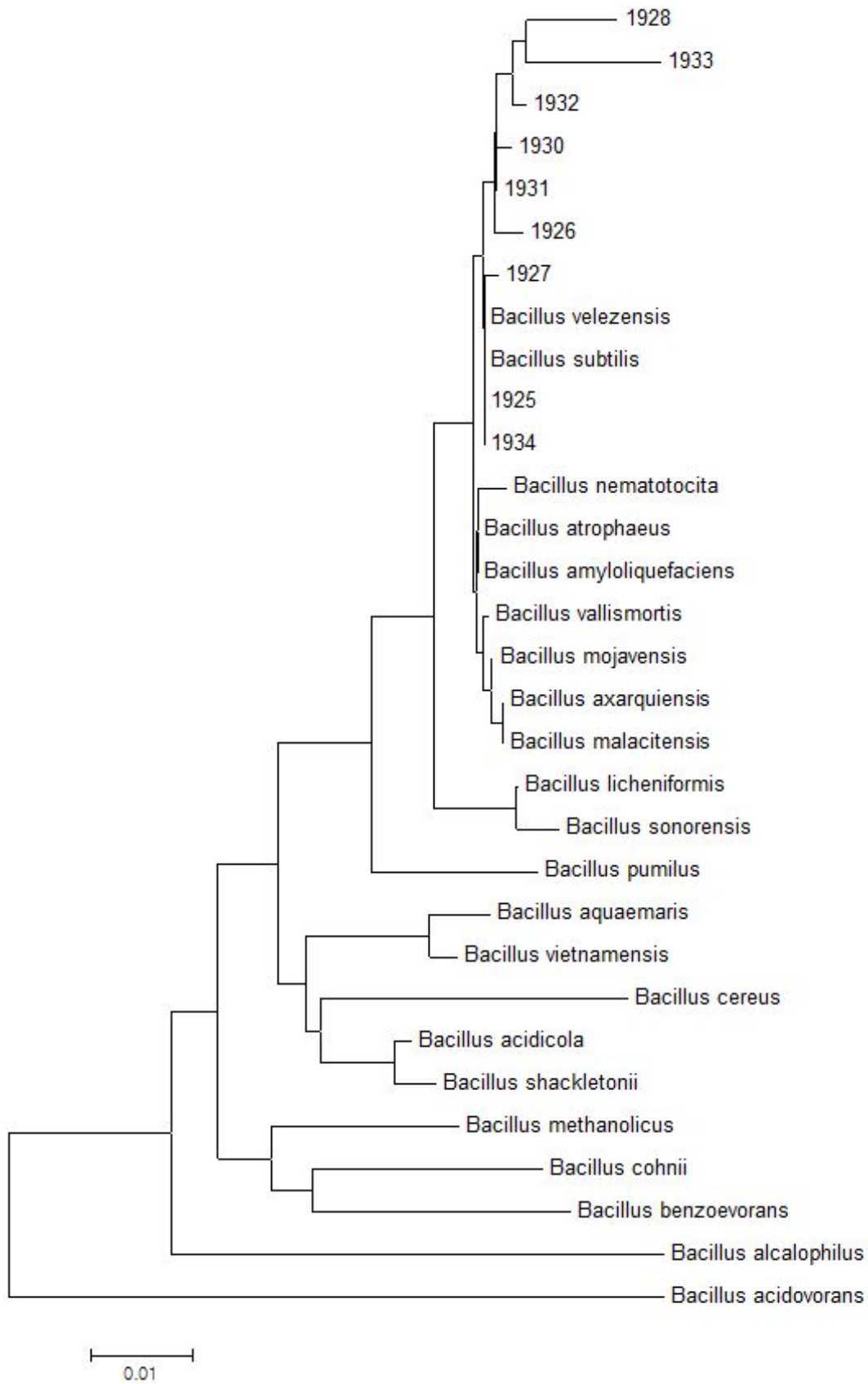


Fig. 37. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

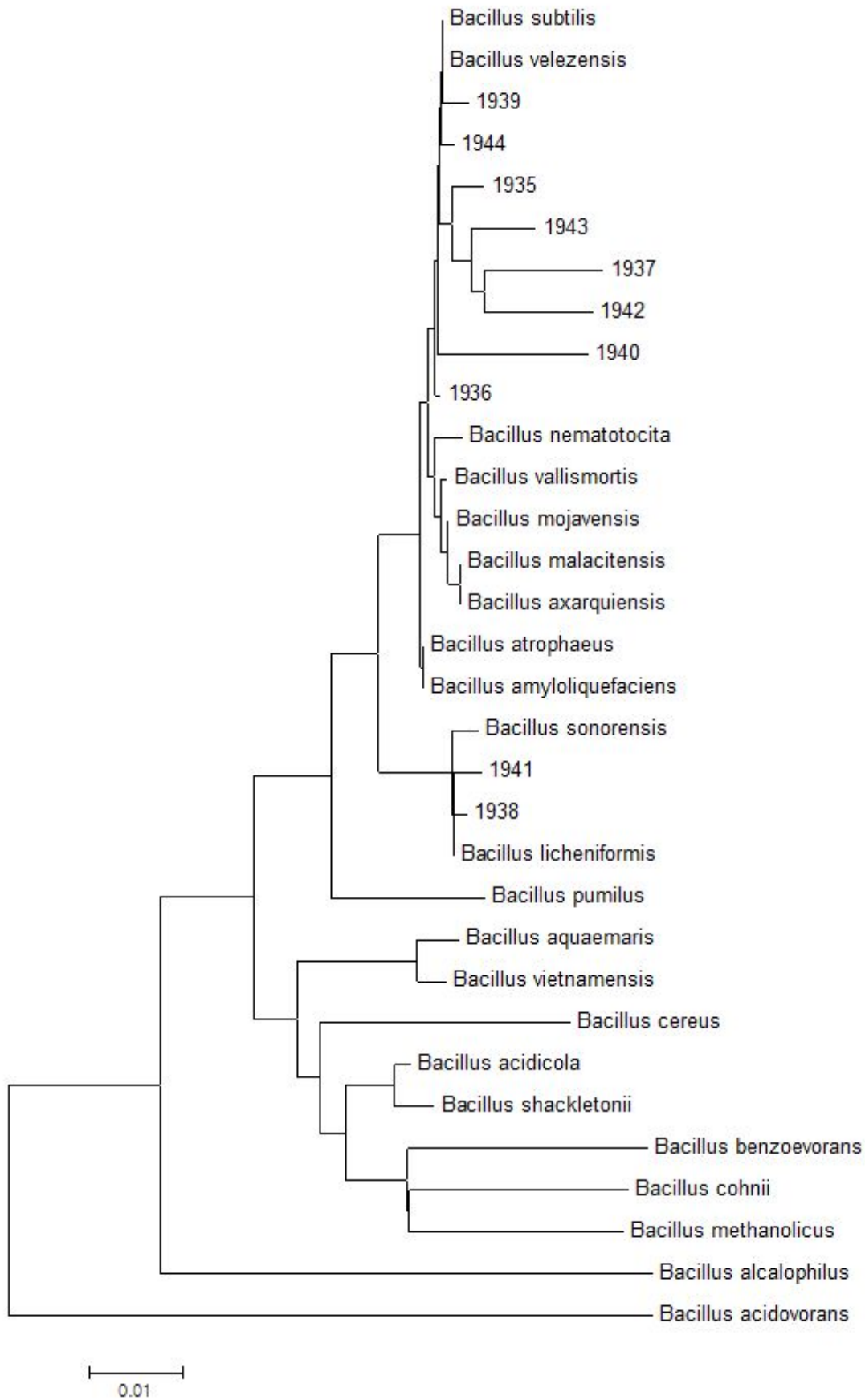


Fig. 38. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

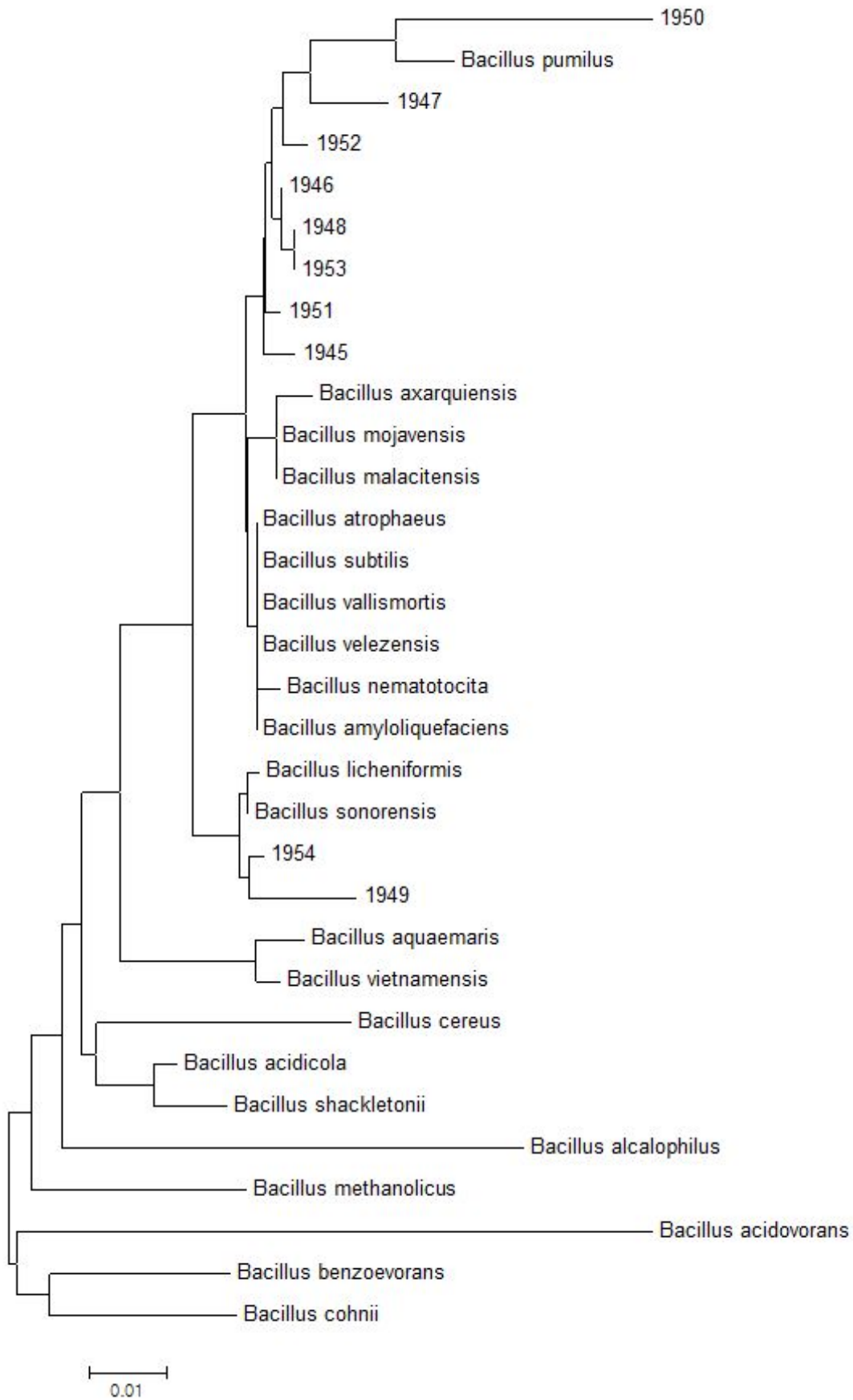


Fig. 39. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

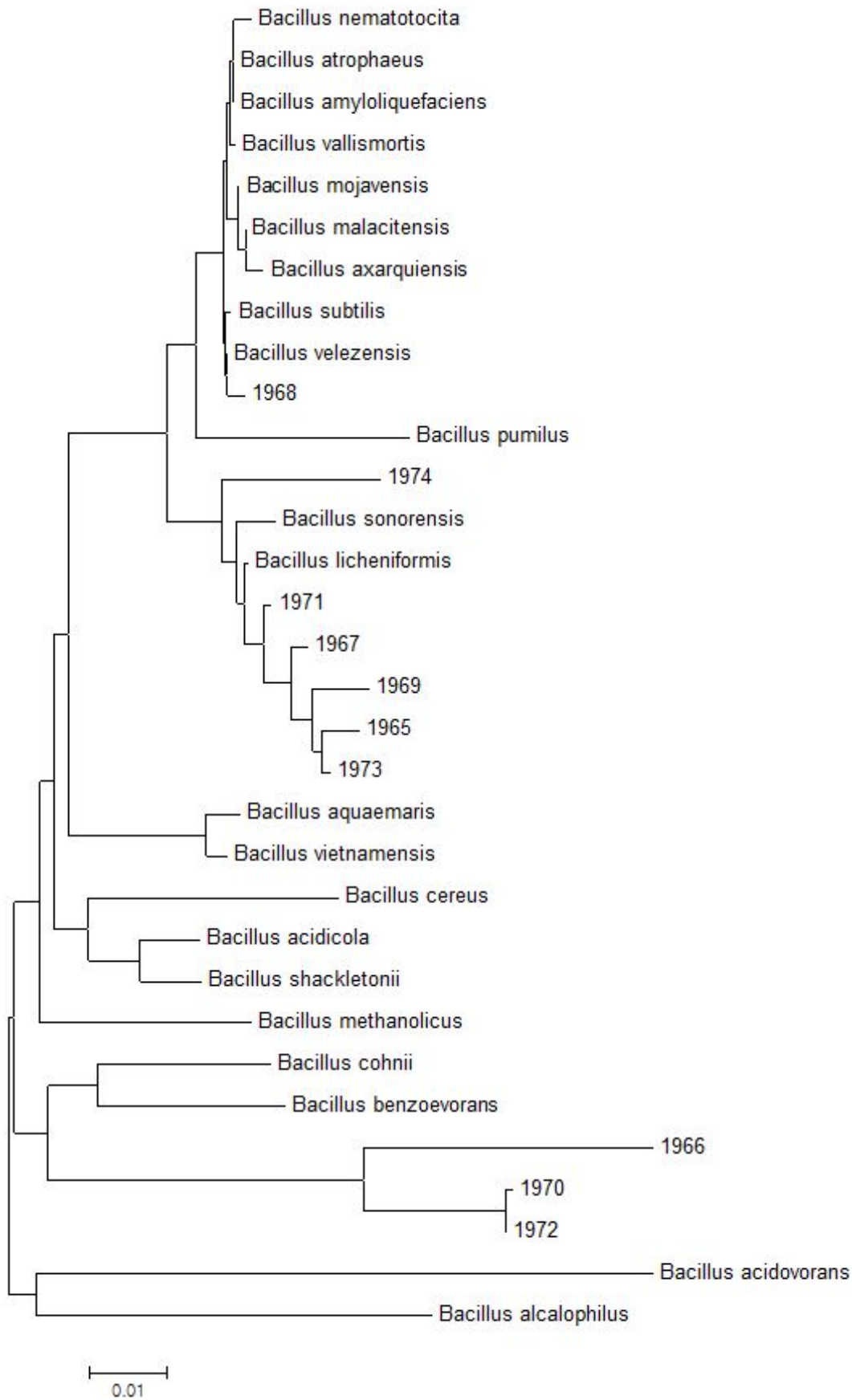


Fig. 40. Analysis of phylogenetic tree with 16S rDNA sequence.

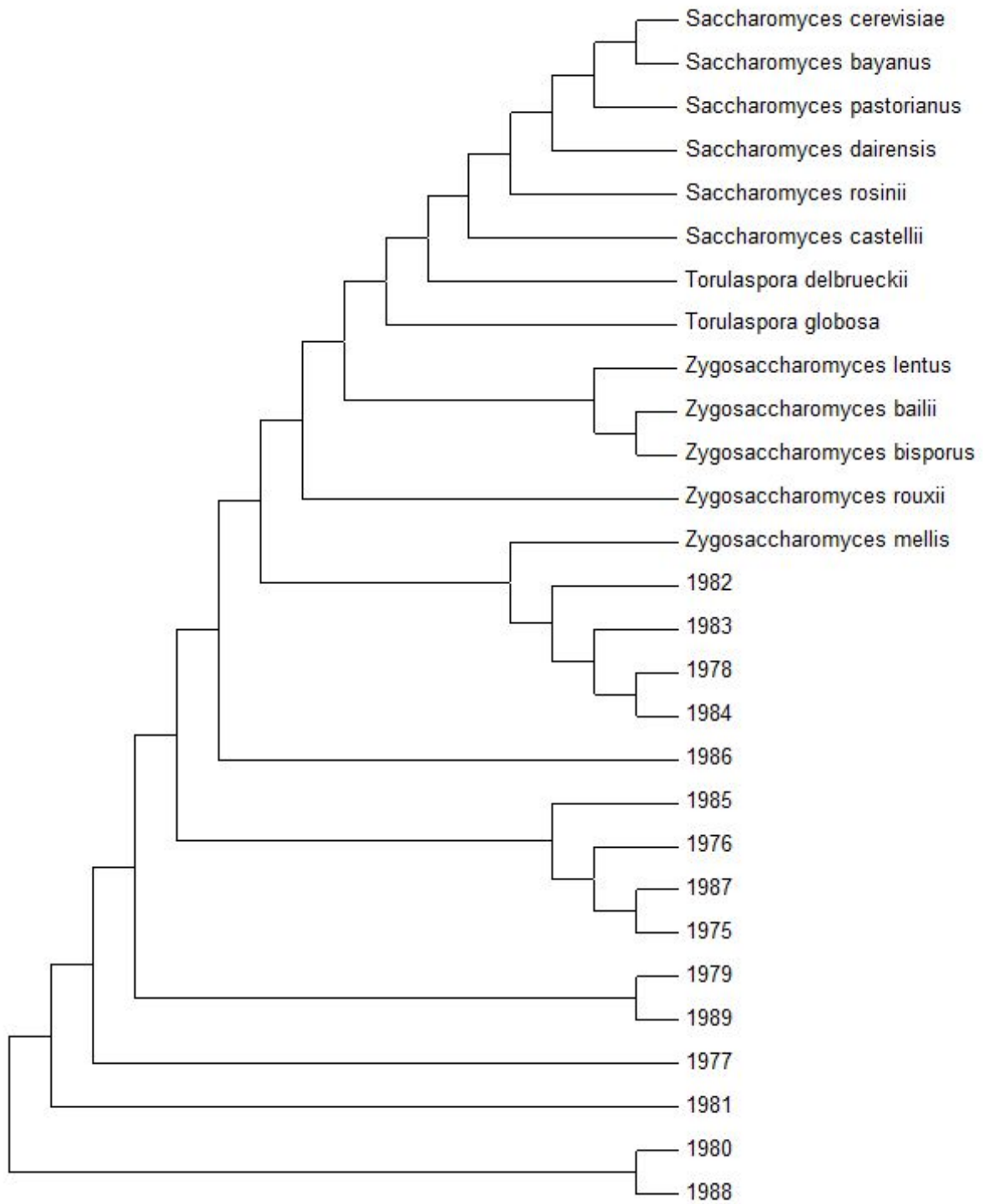


Fig. 41. Analysis of phylogenetic tree with 18S rDNA sequence.



### 3절 3차년도 결과

#### 1. 16S rDNA gene 염기서열분석에 의한 고추장 미생물의 분포

고추장내 존재하는 미생물의 패턴을 culture-dependent(16S rDNA sequencing)을 통해 비교하고자 하였다

#### 가. 실험 방법

##### (1)고추장 시료 수집

고추장 시료의 구입은 전통형 고추장 제조방법을 확인하여 구입하였다. 전통형 고추장 (Table 14)은 순창 민속마을에 입주한 업체에서 전통방식으로 제조하여 1~2 년간 숙성시킨 후 판매용으로 포장된 7개 업체의 고추장을 구입하여 4℃ 냉장고에 보관하였다.

**Table 14. Screening from the 7 different traditional *kochujang* of folk village in Sunchang-gun.**

No.	Company name	Location
A	김정례할머니	전라북도 순창
B	순창이조전통식품	전라북도 순창
C	문옥례식품	전라북도 순창
D	성도집전통식품	전라북도 순창
E	태광전통고추장<서영순>	전라북도 순창
F	성가정식품	전라북도 순창
G	문정희할머니	전라북도 순창

##### (2) 선발 균주의 동정 및 분석

##### (가) Genomic DNA 추출

순수 분리된 세균 및 곰팡이, 효모의 genomic DNA를 Varmanen 등의 방법을 변형하여 추출하였다. 각각 해당 평판배지에서 1~3일간 배양하여 대수기에 도달한 미량의 colony를 50 mM EDTA buffer에 넣고 잘 풀어준 후 50 mg/ml lysozyme(Sigma)을 넣어 37℃ 항온 수조에서 하룻밤 반응시켰다. 그 후 Wizard genomic DNA purification kit(Promega)를 사용하여 제조사의 사용지침에 따라 DNA를 추출한 후 -20℃에 보관하면서 DNA 증폭에 사용하였다.

##### (나) 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)

분리된 genomic DNA를 증폭하기 위해 사용한 primer를 Table 15에 나타내었다. 세균과

유산균은 16S rDNA에 사용하는 27F와 1492R primer, 효모는 18S rDNA에 사용하는 NS1과 NS8 primer, 곰팡이는 ITS-5.8S rDNA에 사용하는 ITS1과 ITS4 primer를 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 20 mM ×10 reaction buffer, 2.5 mM dNTP Mixture, Ex-Taq polymerase(TaKaRa)를 사용하였으며 반응에 사용한 primer 농도는 20 pmol이었고 template DNA의 농도는 20~80 ng이었으며 최종 반응 부피는 50 ul였다. PCR 반응은 95°C에서 30초간 DNA를 변성시킨 후, 60°C에서 1분간 신장과정을 거쳐 72°C에서 45초간 증폭을 시키는 방법으로 수행하였으며 40회 반복하였다. PCR은 Bio-Rad사의 MyCycler Thermal Cycler System을 사용하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동(×0.5 TBE buffer)하여 Ethidium bromide(0.5 µg/ml)에 염색한 후 반응 산물을 확인하였다. PCR 반응이 완료된 뒤 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega)을 사용하여 PCR 반응산물을 정제한 후 DNA 염기서열 분석을 수행하였다.

**Table 15. Sequences of universal primers used in this study**

Specificity	Nucleotide sequence	Size(kb) <sup>1)</sup>
Bacteria	27F : 5'-AGAGTTTGGATCATGGCTCAG-3' 1492R : 5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3'	ca. 1.5
Yeast	NS1 : 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' NS8 : 5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'	ca. 1.8
Fungi	ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ca. 0.5

<sup>1)</sup> Size in kb of PCR product

F : Forward, R : Reverse

#### (다) 염기서열 분석

정제된 PCR 반응산물을 염기서열을 결정하기 위해 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits(Applied Biosystems Co.)을 사용하여 수행하였다. MJ Research사의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler를 사용하여 PCR에서 사용한 동일한 primer(Table 3)로 염기서열을 분석하였으며 반응이 완료되면 에탄올을 이용하여 반응에 참여하지 않은 dNTP와 반응물을 분리하였고 정제된 PCR 반응산물은 다시 3차 증류수에 녹여 ABI PRISM 3730XL Analyzer(96 capillary type)를 통해 염기서열을 결정하였다.

#### (라) 계통학적 분석

DNA 염기서열 분석이 완료된 후 미국 NCBI의 BLAST(Basic Local Alignment Search

Tool) 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 염기서열과 비교하였다. 검색 결과를 기초로 유사도가 높은 미생물의 결과를 분리균의 염기서열과 함께 염기서열 정렬 프로그램인 Clustal X를 이용하여 multiple alignment를 수행하였고 이때 gap과 5' 말단 과 3' 말단의 일치되지 않는 염기를 삭제하였다. 정렬된 염기서열은 phylip format 파일로 저장하여 ribosomal database project-II (<http://rdp.cme.msu.edu;RDP-II>)에 upload시킨 뒤 온라인 프로그램인 similarity matrix를 사용하여 DNA 유사도를 분석하였다. 계통적인 유연관계를 비교하기 위해 MEGA 2.1 package를 사용하여 neighbor-joining으로 phylogenetic tree를 작성 하였다.

## 나. 실험결과

### (1) 세균군의 분포

순창지역의 전통 고추장을 대상으로 세균의 분포도를 조사한 결과 아래 표에서와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 지역적으로 매우 근접한 곳에서의 시료라서 대부분이 비슷한 균총을 지니고 있을 것으로 예상을 하였으나 예상과는 다른 결과를 얻을 수 있었다. 김정례할머니 고추장은 *B. subtilis* 와 *B. velezensis* 가 주종이었으며 순창이조전통식품도 이와 유사한 형태를 보이는 것이 관찰되었다. 이에 비하여 문옥례식품과 성도집전통식품은 *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. sonorensis*, *B. subtilis* 그리고 *B. velezensis* 가 관찰되었다. 태광전통고추장 과 성가정식품의 세균 분포는 *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. methylotrophicus*, *B. pumilus*, *B. sonorensis* 그리고 *B. subtilis* 가 관찰이 되었다. 문정희할머니 고추장에서는 *B. amyloliquefaciens*, *B. aerophilus* 그리고 *B. subtilis*가 관찰이 되었다. 이러한 결과는 지역적으로 매우 근접한 곳이라 하여도 미생물의 분포도는 전혀 다른 양상을 보일 수 있는 것으로 연구 되었으며 이러한 미생물 분포도에 따라서 각각의 고추장의 맛에 영향을 줄 것으로 생각되어 진다.

**Table 17.** Distribution pattern of the identified bacteria from traditional Sunchang *kochujang*.

Identified Bacteria	Traditional						
	김정례할머니	순창이조건 통식품	문옥례식품	성도집전통 식품	태광전통고 추자	성가정식품	문정희할머니
<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	4 (29)
<i>B. aerophilus</i>	-	-	-	-	-	-	1 (7)
<i>B. licheniformis</i>	-	-	1 (7)	2 (13)	5 (33)	3 (20)	-
<i>B. mojavensis</i>	-	-	-	-	-	1 (7)	-
<i>B. methylotrophicus</i>	-	-	-	-	-	2 (13)	-
<i>B. pumilus</i>	-	-	1 (7)	2 (13)	8 (54)	1 (7)	-
<i>B. sonorensis</i>	-	-	3 (20)	2 (13)	2 (13)	-	-
<i>B. subtilis</i>	1 (7)	13 (20)	6 (40)	6 (40)	-	8 (53)	9 (64)
<i>B. velezensis</i>	13 (93)	12 (80)	4 (27)	3 (20)	-	-	-

<sup>1)</sup> Identified numbers, ( ) : isolation frequency(%) B: *Bacillus*, S: *Serratia*

(2) 호염성 세균군의 분포

**Table 18.** Distribution pattern of the identified halophilic bacteria from traditional Sunchang *kochujang*.

Identified Halophilic bacteria	Traditional						
	김정례할머니	순창이조건 통식품	문옥례식품	성도집전통 식품	태광전통고 추자	성가정식품	문정희할머니
<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	-	-	-	-	4 (27)	1 (7)
<i>B. benzoborans</i>	-	-	-	-	3 (20)	-	-
<i>B. licheniformis</i>	2 (13)	3 (20)	3 (20)	-	11 (73)	8 (52)	14 (93)
<i>B. nematocita</i>	1 (7)	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	-	-	1 (7)	-	-	1 (7)	-
<i>B. sonorensis</i>	1 (7)	-	-	7 (47)	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	3 (20)	8 (53)	2 (13)	1 (7)	1 (7)	-
<i>B. tequilensis</i>	-	-	-	-	-	1 (7)	-
<i>B. velezensis</i>	11 (73)	9 (60)	3 (20)	6 (40)	-	-	-

전통형과 공장형 고추장 12개 시료에서 분리하여 동정된 호염성 세균군의 분포 결과는 8종으로 동정되었으며 *B. licheniformis*가 거의 모든 전통형 시료에서 확인되었고 *B. velezensis*는 과반수 이상의 업체에서 관찰이 되어 졌다.

(3) 효모군의 분포

동정된 효모군의 분포 결과 거의 대부분의 시료에서 *Zygosaccharomyces rouxii*를 확인할 수 있었다.

**Table 19.** Distribution pattern of the identified yeast from traditional Sunchang *kochujang*.

Identified Yeast	Traditional						
	김정례할머니	순창이조전 통식품	문옥례식품	성도집전통 식품	태광전통고 추자	성가정식품	문정희할머니
<i>P. farinosa</i>	3 <sup>1)</sup> (20)	-	-	-	-	-	-
<i>P. subpelliculosa</i>	5 (33)	-	-	-	-	-	-
<i>Z. mellis</i>	7 (47)	15 (100)	-	15 (100)	15 (100)	-	-
<i>Z. rouxii</i>	-	-	-	-	-	15 (100)	15 (100)

<sup>1)</sup> Identified numbers, ( ) : isolation frequency(%)

P: *Pichia*, S: *Starmerella*, Z: *Zygosaccharomyces*

(4) Protease bacteria의 분포

**Table 20.** Distribution pattern of the identified protease bacteria from traditional Sunchang *kochujang*.

Identified protease bacteria	Traditional						
	김정례할머니	순창이조전 통식품	문옥례식품	성도집전통 식품	태광전통고 추자	성가정식품	문정희할머니
<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	-	5 (36)	-	5 (33)	5 (33)	5 (46)
<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-	-	-	1 (9)
<i>B. methylotrophicus</i>	-	-	-	-	-	-	1 (9)
<i>B. mojavensis</i>	-	-	-	-	1 (7)	-	-
<i>B. nematocita</i>	1 (7)	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	-	1 (7)	-	-	1 (7)	-	-
<i>B. subtilis</i>	4 (26)	3 (20)	1 (7)	9 (60)	8 (53)	9 (60)	2 (18)
<i>B. vallismortis</i>	-	-	1 (7)	-	-	1 (7)	2 (18)
<i>B. velezensis</i>	10 (67)	11 (73)	7 (50)	6 (40)	-	-	-

(5) Amylasee bacteria의 분포

**Table 21.** Distribution pattern of the identified amylase bacteria from traditional Sunchang *kochujang*.

Identified amylase bacteria	Traditional						
	김정례할머니	순창이조건 통식품	문옥례식품	성도집전통 식품	태광전통고 추자	성가정식품	문정희할머니
<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	-	3 (21)	-	2 (14)	6 (50)	3 (22)
<i>B. licheniformis</i>	-	1 (7)	3 (21)	2 (13)	2 (14)	-	-
<i>B. methylotrophicus</i>	-	-	-	-	1 (7)	-	5 (38)
<i>B. sonorensis</i>	-	1 (7)	-	-	3 (21)	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	3 (20)	7 (50)	1 (7)	5 (37)	4 (33)	1 (9)
<i>B. vallismortis</i>	-	-	-	-	1 (7)	2 (17)	4 (31)
<i>B. velezensis</i>	15 (100)	10 (66)	1 (7)	12 (80)	-	-	-

(6) 순창 지역 전통형 고추장의 미생물 균총

\*BN: Bacteria, BH: Halophile bacteria, YN: Yeast, PR: Protease bacteria, AM: Amylase bacteria

김정례할머니 고추장			
	균주명	빈도수	%
BN	B.velezensis	13	92.86
	B.subtilis subsp. subtilis	1	7.14
		14	100.00
BH	B.velezensis	11	73.33
	B.licheniformis	2	13.33
	B.nematocita	1	6.67
	Bacillus sonorensis	1	6.67
		15	100.00
YN	Pichia farinosa	3	20.00
	Pichia subpelliculosa	5	33.33
	Zygosaccharomyces mellis	7	46.67
		15	100.00
PR	B.velezensis	10	66.67
	B.subtilis subsp. subtilis	4	26.67
	Bacillus nematocita	1	6.67
		15	100.00
AM	B.velezensis	15	100.00
		15	100.00

순창이조전통식품			
	균주명	빈도수	%
BN	B.velezensis	12	80.00
	B.subtilis subsp. subtilis	3	20.00
		15	100.00
BH	B.velezensis	9	60.00
	B.licheniformis	3	20.00
	B.subtilis subsp. subtilis	3	20.00
		15	100.00
YN	Zygosaccharomyces mellis	15	100.00
		15	100.00
PR	B.pumilus	1	6.67
	B.subtilis subsp. subtilis	3	20.00
	B.velezensis	11	73.33
		15	100.00
AM	B.subtilis subsp. subtilis	3	20.00
	B.velezensis	10	66.67
	B.sonorensis	1	6.67
	B.licheniformis	1	6.67
		15	100.00

문옥레식품			
	균주명	빈도수	%
BN	<i>B.velezensis</i>	4	26.67
	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	6	40.00
	<i>B.licheniformis</i>	1	6.67
	<i>B.pumilus</i>	1	6.67
	<i>B.sonorensis</i>	3	20.00
			15
BH	<i>B.licheniformis</i>	3	20.00
	<i>B.pumilus</i>	1	6.67
	<i>B.velezensis</i>	3	20.00
	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	8	53.33
			15
PR	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1	7.14
	<i>B.velezensis</i>	7	50.00
	<i>B.amyloliquefaciens</i>	5	35.71
	<i>Bacillusvallismortis</i>	1	7.14
			14
AM	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	7	50.00
	<i>B.velezensis</i>	1	7.14
	<i>B.amyloliquefaciens</i>	3	21.43
	<i>B.licheniformis</i>	3	21.43
			14

성도집전통식품			
	균주명	빈도수	%
BN	<i>B.sonorensis</i>	2	13.33
	<i>B.velezensis</i>	3	20.00
	<i>B.licheniformis</i>	2	13.33
	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	6	40.00
	<i>B.pumilus</i>	2	13.33
			15
BH	<i>B.sonorensis</i>	7	46.67
	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	2	13.33
	<i>B.velezensis</i>	6	40.00
			15
YN	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	15	100.00
			15
PR	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	9	60.00
	<i>B.velezensis</i>	6	40.00
			15
AM	<i>B.velezensis</i>	12	80.00
	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1	6.67
	<i>B.licheniformis</i>	2	13.33
			15



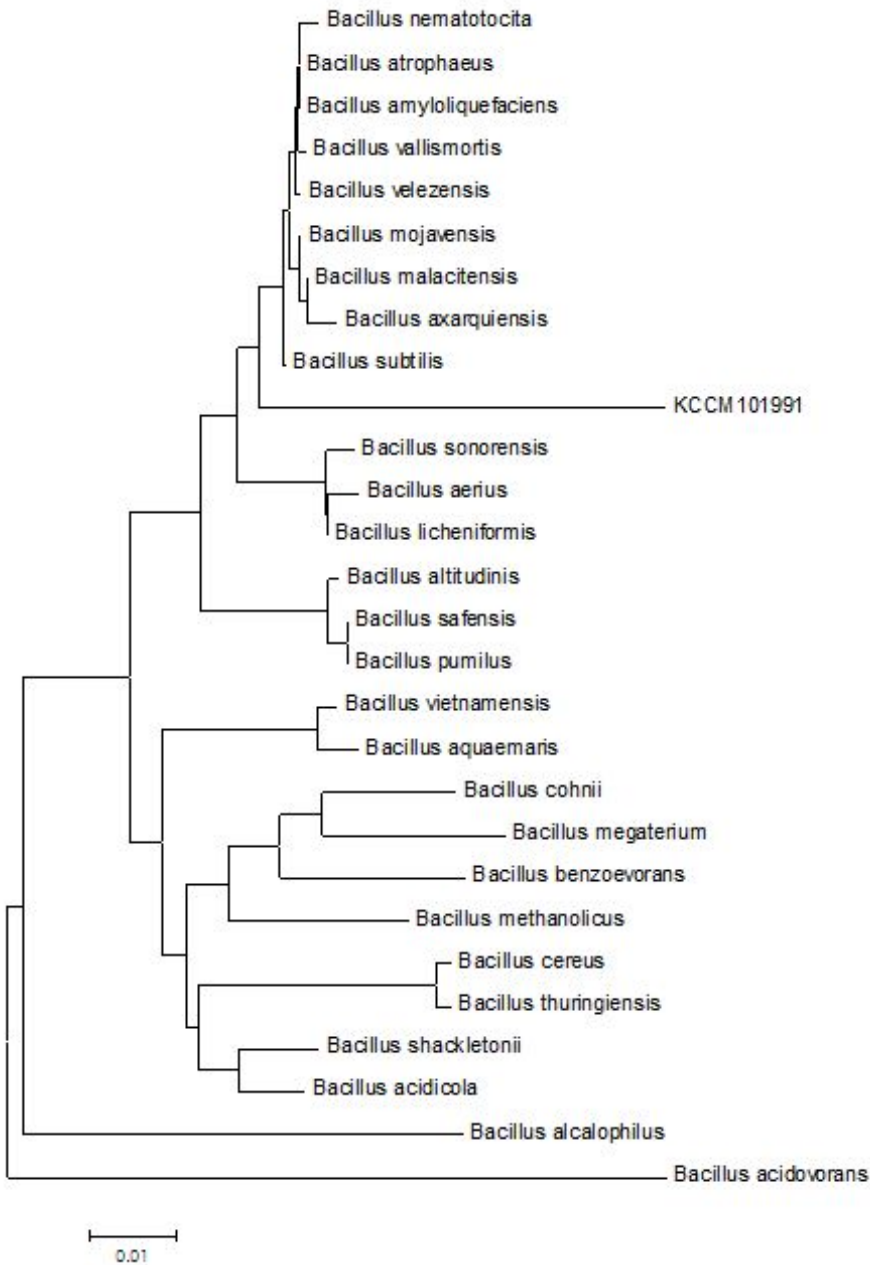
태광전통고추장			
	균주명	빈도수	%
BN	<i>B.licheniformis</i>	5	33.33
	<i>B.pumilus</i>	8	53.33
	<i>B.sonorensis</i>	2	13.33
		15	100.00
BH	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1	6.67
	Bacillus benzoovorans	3	20.00
	B.licheniformis	11	73.33
		15	100.00
YN	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	15	100.00
		15	100.00
PR	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	8	53.33
	<i>B.amyloliquefaciens</i>	5	33.33
	<i>Bacillus mojavensis</i>	1	6.67
	B.pumilus	1	6.67
		15	100.00
AM	<i>Bacillus vallismortis</i>	1	7.14
	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1	7.14
	<i>B.amyloliquefaciens</i>	2	14.29
	<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	5	35.71
	<i>B.sonorensis</i>	3	21.43
	B.licheniformis	2	14.29
		14	100.00

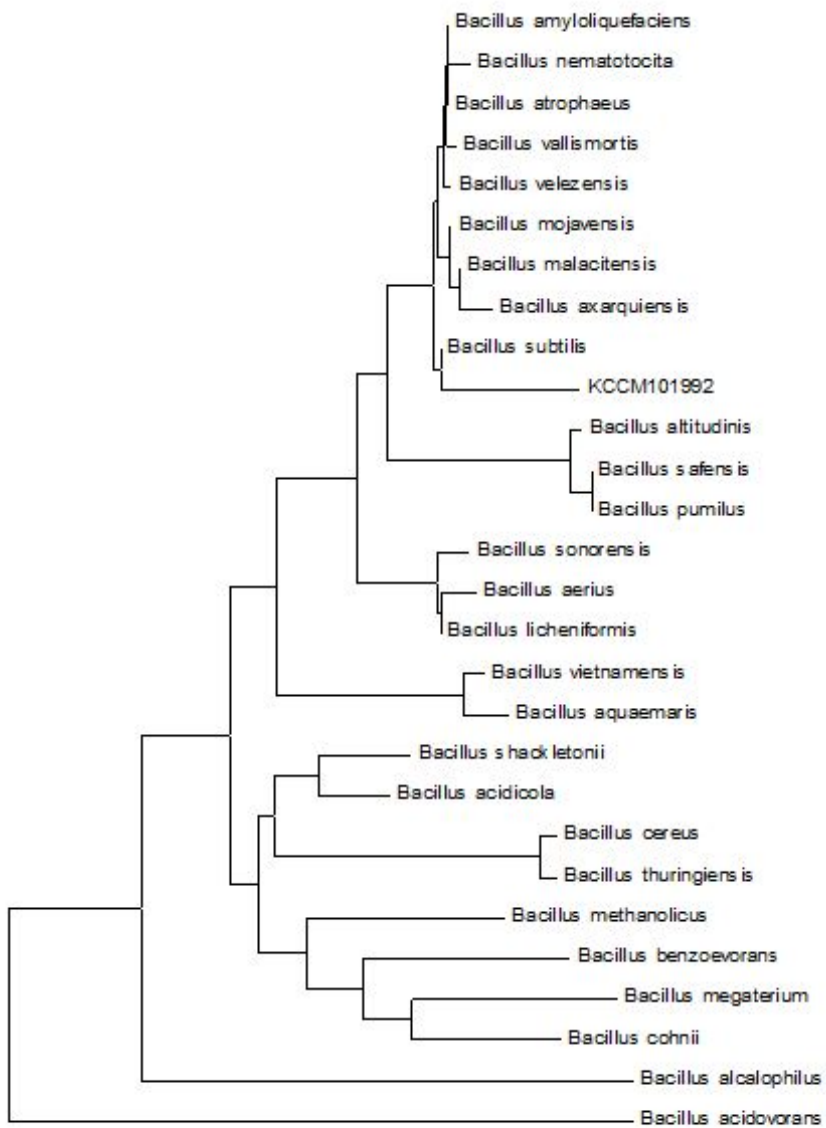
문정희할머니			
	균주명	빈도수	%
BN	Bacillus amyloliquefaciens	4	28.57
	Bacillus subtilis subsp. <i>subtilis</i>	9	64.29
	Bacillus aerophilus	1	7.14
		14	100.00
BH	Bacillus licheniformis	14	93.33
	Bacillus amyloliquefaciens	1	6.67
		15	100.00
YN	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	15	100.00
		15	100.00
PR	Bacillus licheniformis	1	9.09
	Bacillus amyloliquefaciens	5	45.45
	Bacillus methylotrophicus	1	9.09
	Bacillus vallismortis	2	18.18
	Bacillus subtilis subsp. <i>subtilis</i>	2	18.18
		11	100.00
AM	Bacillus vallismortis	4	30.77
	Bacillus methylotrophicus	1	7.69
	Bacillus amyloliquefaciens	3	23.08
	Bacillus subtilis subsp. <i>subtilis</i>	5	38.46
		13	100.00

성가정식품			
	균주명	빈도수	%
BN	B.pumilus	1	6.67
	Bacillus licheniformis	3	20.00
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	8	53.33
	Bacillus mojavensis	1	6.67
	Bacillus methylotrophicus	2	13.33
		15	100.00
BH	Bacillus licheniformis	8	53.33
	Bacillus tequilensis	1	6.67
	B.pumilus	1	6.67
	<i>B.amyloliquefaciens</i>	4	26.67
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	1	6.67
		15	100.00
YN	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	15	100.00
		15	100.00
PR	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	9	60.00
	<i>B.amyloliquefaciens</i>	5	33.33
	Bacillus vallismortis	1	6.67
		15	100.00
AM	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	4	33.33
	Bacillus amyloliquefaciens	6	50.00
	Bacillus vallismortis	2	16.67
		12	100.00

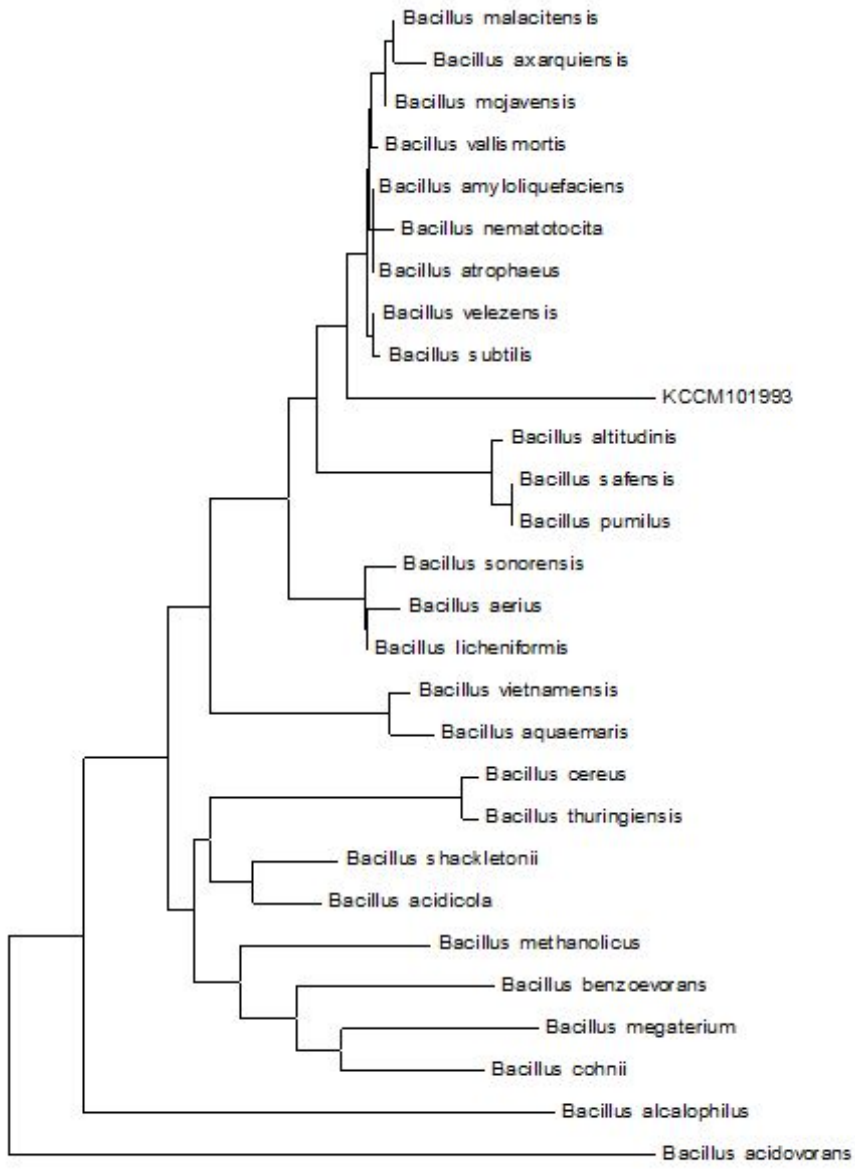
(7) 순창 지역 전통형 고추장의 미생물의 계통학적 분석 결과

본 연구에서는 각각의 분리 미생물을 16S rRNA 혹은 18S rRNA 유전자 분석을 통하여 계통학적인 동정을 수행하였으며, 이에 따르는 결과의 일부를 표시하면 다음 그림과 같다.

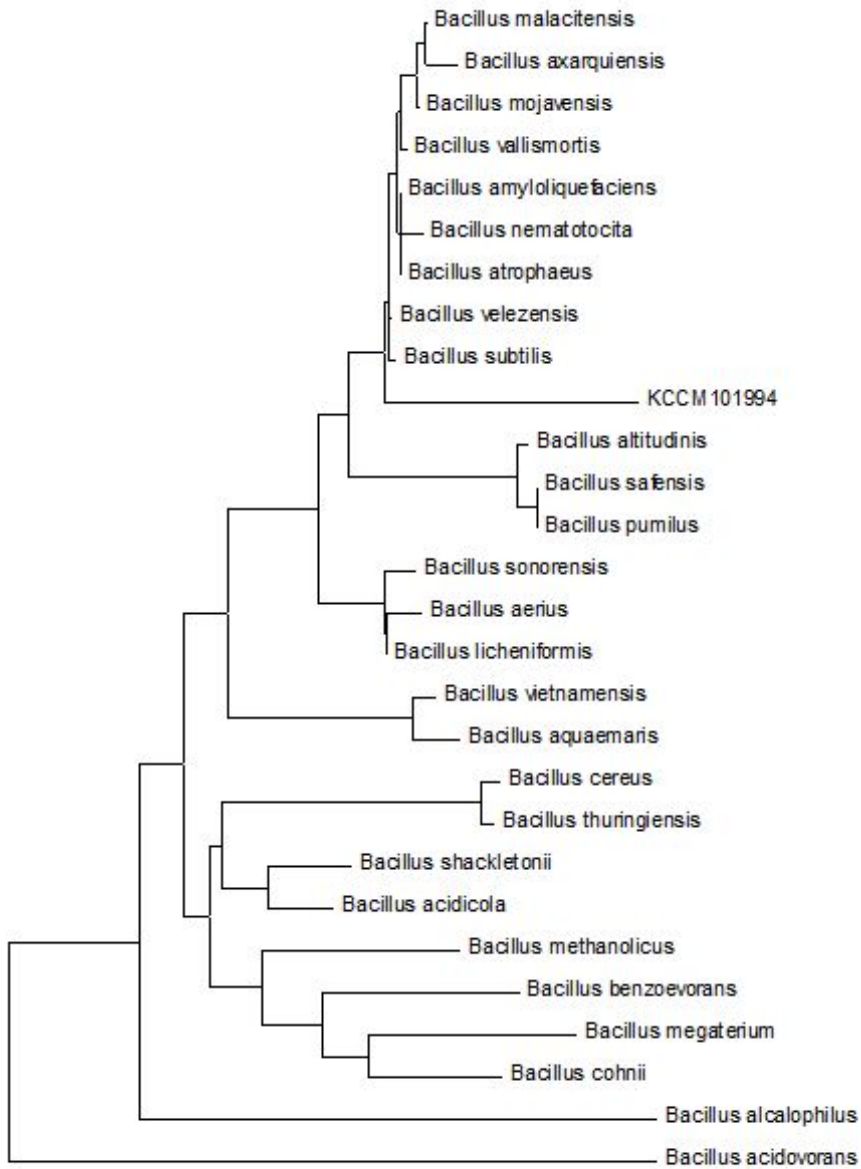


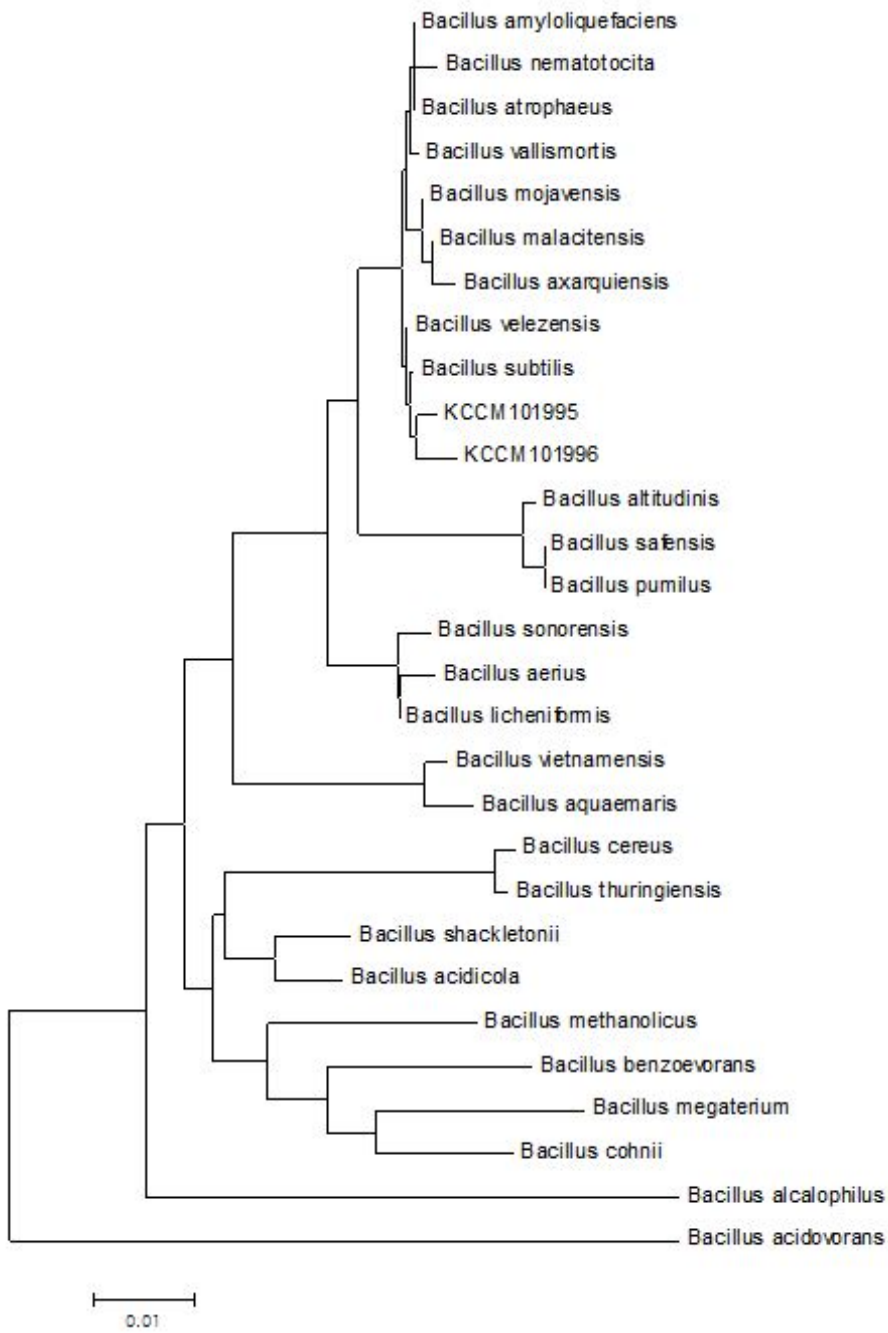


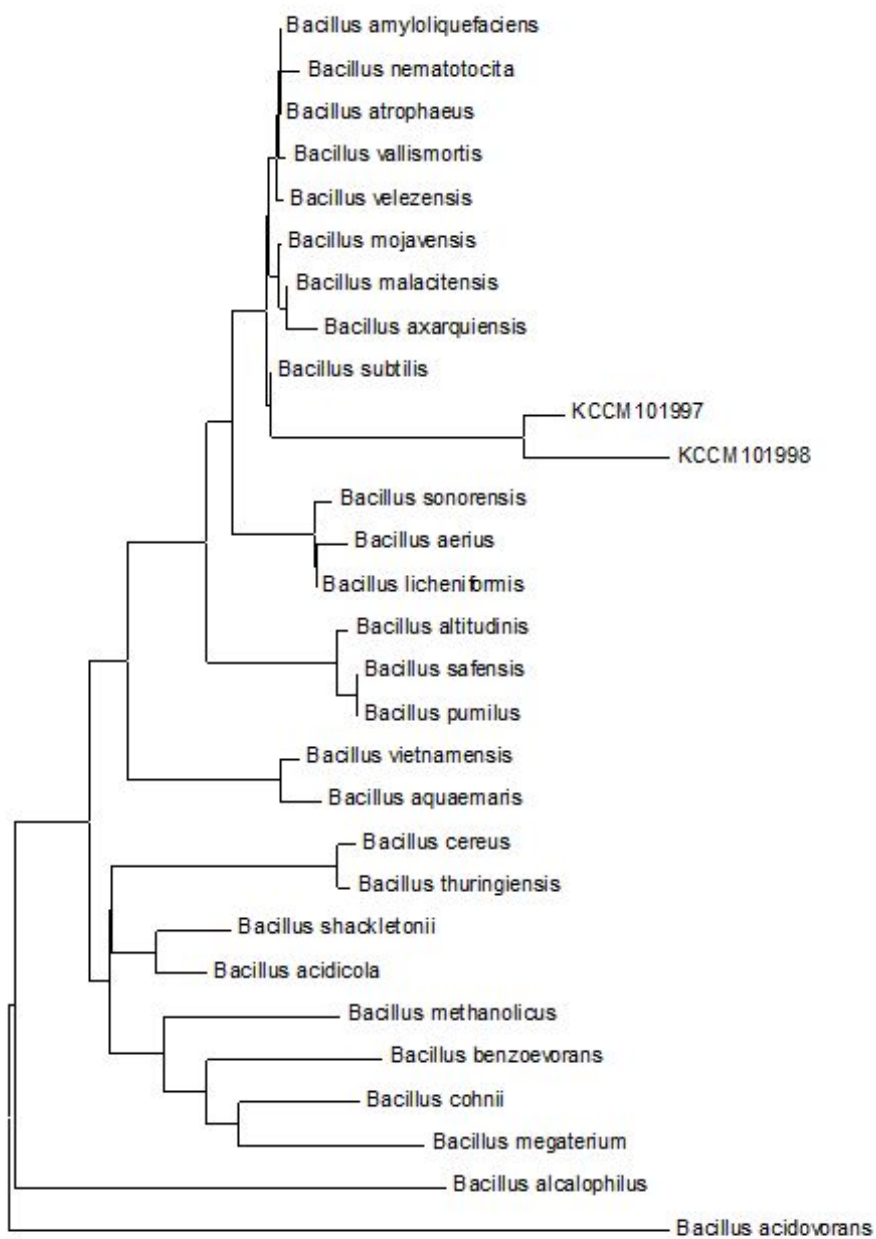
0.01



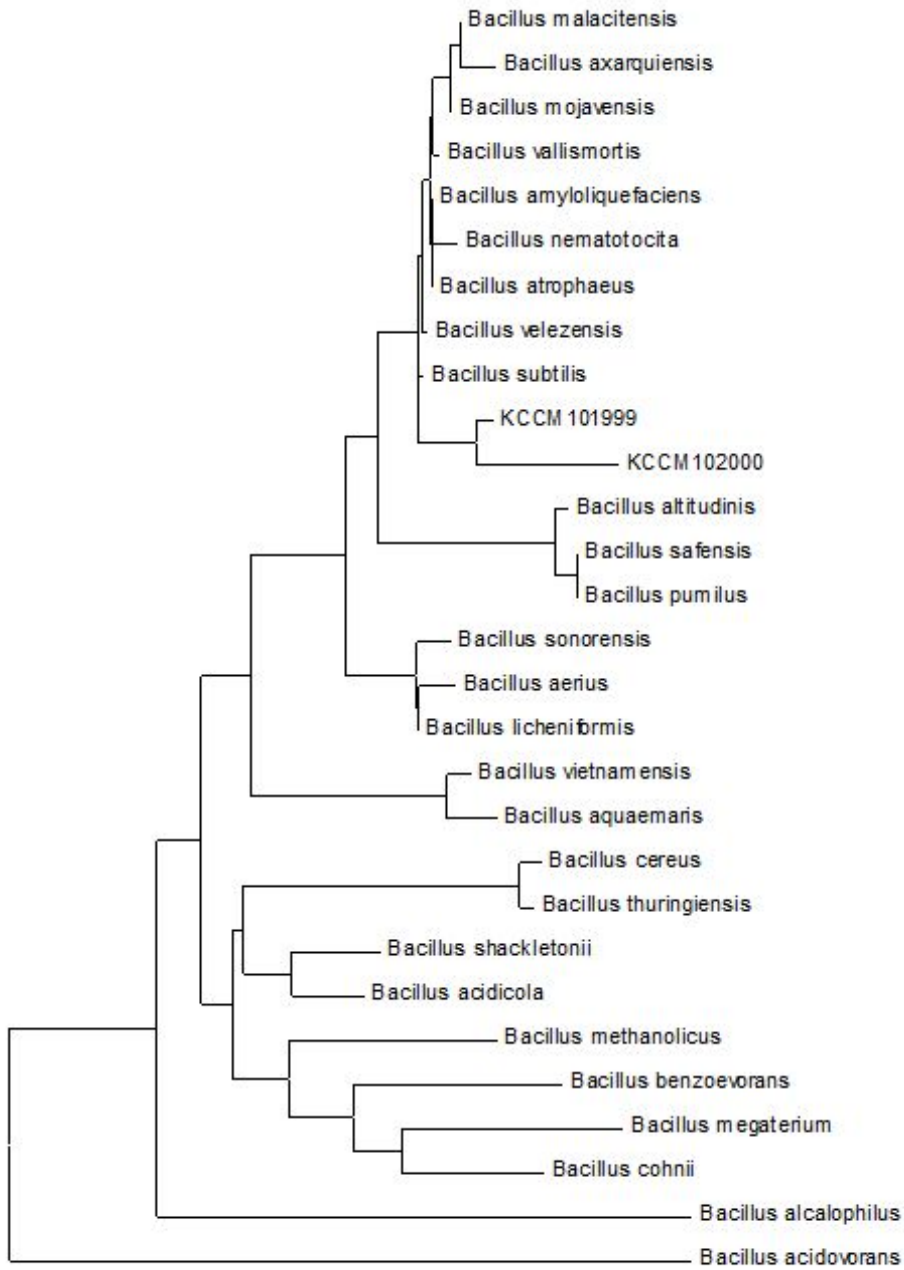
0.01



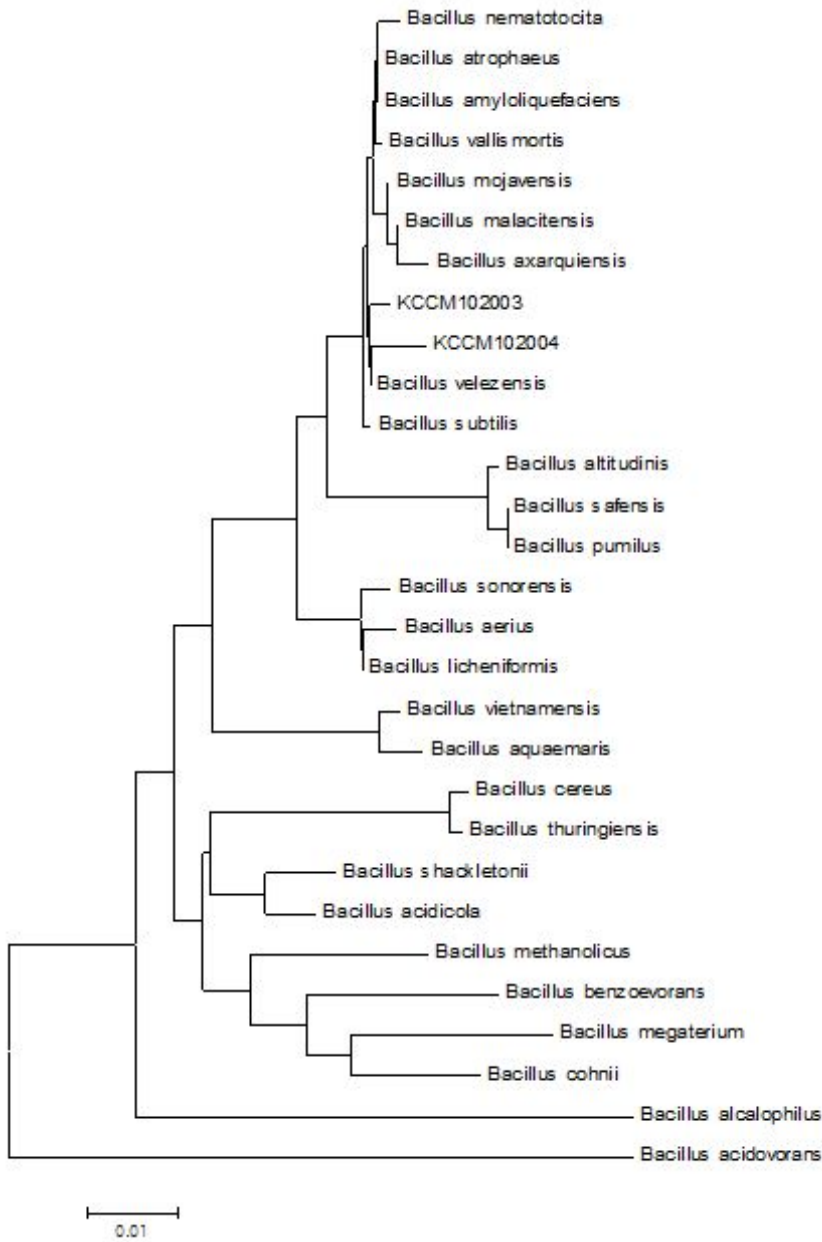








0.01



현재까지 본 과제를 수행하는 동안 분리균주 2,131주의 전통 발효미생물을 분리하였으며 분리균들은 모두 분자생물학적 동정이 완료 되었다. 분리된 미생물은 모두 동결건조를 수행하여 각각의 균주당 5 바 이얼의 종균을 보존하였으며 이에 따라서 총 10,600여 종균 앰플은 안전하게 보존 중에 있다.

(8) 전통 고추장의 미생물의 정보관리를 위한 표준 데이터 형태 및 데이터 베이스 확립

분리 보존된 전통발효미생물의 효율적인 활용을 위하여 각각의 미생물 동정 정보 및 추후 연구되어질 연구정보에 관한 기본적인 데이터 형태 및 기본 데이터베이스 확립을 위하여 MySQL을 이용한 데이터 관리 프로그램을 구축하였다.

데이터 프로그램은 다음과 같은 형식으로 구축을 하였다.

**순창군주관리 시스템**

로그 이미지 | 미생물 관리 | 미생물분양관리 | 관리자 | Home | 로그인

미생물 검색

① KCCM 60143 검색 등록

KCCM NO	균주명	타센터번호	배지	배양온도	배양조건
60143	Aspergillus		52	29	

클릭시

KCCM번호 :  
 균주명 :  
 가격 :  
 균주정보 :  
 배양정보 :  
 배양온도/PH:  
 AM수 :  DF:  NT:   
 기타 :

저장 수정 닫기

**Description:**  
 - 미생물검색 화면

**요구사항**  
 - 검색조건에 의한 데이터 검출

**· 추가항목**  
 - ① 폼보박스에 kccm,균주명,균주정보,atcc,nbrc,kctc,기타 등이 보여지게 된다.  
 - 등록버튼을 클릭하면 미생물을 등록할 수 있는 팝업창이 뜬다.등록하는 팝업창은 저장버튼이 보인다.  
 - 균주명을 클릭하면 상세정보 팝업창이 뜬다. 상세화면 팝업창은 수정버튼이 보인다.

순창군주관리 시스템

미생물 관리 | **미생물 분양** | 관리자 | Home | 로그아웃

미생물분양 검색 | 접수전건적서발송 | 결제서류발송

접수기간: 2011.10.01 ~ 2011.10.20 이름: 홍길동  
 균주번호: 601421 [검색] [출력] [엑셀]

접수번호	접수날짜	회원번호	영양	소속	균주번호	균주명	AM	DF/NT	생균	가격	결제날짜	분양날짜	비고
11-01	2011.11.00.5	1	미생물	미생물연구원	60143	Aspergillus niger	1			40,000	무미생물	2011.11.00.5	미생물

**Description:**  
 - 미생물검색 화면

**요구사항**  
 - 검색조건에 의한 데이터 검색

**· 추가항목**  
 -1. 폼보박스에는 kccm,균주명,균주정보,atcc,nbrc,kctc,기타 등이 보여지게 된다.

순창군주관리 시스템

미생물 관리 | **미생물 분양** | 관리자 | Home | 로그아웃

미생물분양 검색 | 접수전건적서발송 | 결제서류발송

회원번호: 1234 [검색]  
 이름: 홍길동 소속: 한국중군협회 [추가]

균주번호	균주명	AM	DF/NT	생균	가격	등급
11-01	2011.10.05	1	홍길동	한국중군협회	60143	

정회원할인 [ ]    합계 [ ]    부가세 [ ]  
 총액 [ ]    [건적서 보기]

**Description:**  
 - 건적서발송 화면

**요구사항**  
 - 검색조건에 의한 데이터 검색

**· 추가항목**  
 - 추가버튼 클릭시 ROW가 생김  
 - 건적서보기 버튼 클릭시 출력할 수 있는 화면이 나타남.

ROW추가

순창군주권리 시스템

미생물 관리 | **미생물분양관리** | 관리자 | home | 로그인

미생물분양 검색 | 접수전건적서발송 | 결제서류발송 | 분양실적

접수기간 2011.10.01 ~ 2011.10.20 이름 홍길동

군주명 601421

접수번호	접수날짜	이름	소속	군주번호	군주명	AM	DF/NT	생관	가격	결제날짜	발송날짜	판매
11-01	2011.11.00.5	홍길동	순창군농업기술센터	60143	60143	1			40,000	미발송	2011.11.00.5	판매

총개수  총가격

**Description:**  
 - 미생물검색 화면  
**요구사항**  
 - 검색조건에 의한 데이터 검색

**추가항목**  
 -

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

전통 발효식품의 유용 미생물에 관한 원천기술의 개발로서 전통 발효 식품인 전통고추장 및 공장형 고추장의 유용미생물의 분리 및 Microflora map에 관한 연구를 수행을 완료함으로써 국내 전통고추장 및 공장형 고추장의 미생물 주요 발효 미생물을 확인 및 분리 보존함으로써 목표대비 달성도는 100% 달성함.

전통발효의 원인 미생물을 장기적으로 안전하게 보존함으로써 전통발효식품의 효율적인 유지관리를 목표로 함에 있어서 본 실험에서 분리한 다양한 미생물 자원을 각각 동결건조 보존을 함으로 Microflora map연구 결과와 병행 하여 그 성과물을 보존하였으며, 보존된 미생물 자원은 생명자원으로서 국가적인 이용을 할 수 있도록 안전 보존함으로써 당초 목표인 1,500 유전자원 확보에 비하여 2,131 균주의 유전자원을 확보함으로써 목표치 대비 140%의 목표를 달성하였음.

각기 보존된 유용 발효미생물의 효율적인 이용을 위한 적절한 분양시스템 구축에 있어서는 본 연구로 분리된 미생물의 동정 결과 및 유전자 정보를 data base화 하기위한 기본적인 정보를 확보 구축하였으며 한국미생물보존센터의 미생물 분양 시스템에 적용하여 분리된 2,000여 균주를 국내 연구진에게 자유롭게 분양 할 수 있도록 운영관리 하였음, 이에 목표치 대비 100%의 목표를 달성 하였음.

본 연구는 국내 전통장류의 Microflora map연구를 통하여 소중한 국가적인 미생물 자원을 확보 하였으며 이는 국가적인 생물자원확보에 일조를 하였으며 또한 전통장류 중에 전통고추장의 Microflora map연구를 완료하여 SCI급 논문에 발표함으로써 전통고추장의 발효에 중요한 미생물을 확인 할 수 있는 결과를 얻었으며 이러한 결과는 전통고추장의 제조 및 품질 확보에 중요한 학술적인 자료를 제공하였음.

국내 전통 고추장으로부터 발효관련 미생물을 분리하는 과정에서 본 연구진은 현재까지 알려지지 않은 신규한 미생물을 발견하였으며 이 미생물의 신종 등록을 위하여 지속적인 연구를 진행함으로써 고추장 유래 신종 미생물을 학계에 발표 할 수 있을 것으로 예상이 되며 이러한 성과는 전통 발효식품으로부터 현재까지 알려지지 않은 신규 미생물의 발견 가능성을 제시 할 수 있을 것으로 판단되며 국가적인 생물자원의 확보에 있어서 전통식품으로부터 신규한 신종 미생물 자원의 확보 가능성이 있음을 제시하는 결과를 얻었음.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구 결과에 의하여 확보된 2,000여 균주의 전통발효 식품 유래 미생물 자원은 국가적인 생물자원으로서 관련 연구에 지속적인 활용이 가능 할 것으로 판단되며 분리된 미생물을 바탕으로 각 종 효소 개발 및 Probiotics의 개발에 활용 함.

본 연구의 결과인 전통 고추장의 미생물 지도를 바탕으로 전통장류 생산업체의 제품생산에 있어서 발효의 중요한 원인 균의 관리 및 발효제품의 생산에 있어서 품질관리의 미생물 지표로서 활용이 가능함으로 본 연구의 결과를 전통장류업체에 지속적인 교육지도를 통하여 본 연구의 결과를 실제 산업현장에서 최대한 활용을 할 수 있도록 유도 함.

신종가능성이 있는 후보 미생물을 추후 지속적인 연구를 통하여 신종등록을 완료 할 계획 이며 특허출원 및 등록을 함으로서 본 연구 결과를 국가적인 생물자원으로서 가치를 높이며 그 활용도를 산업화 하기위한 기반을 구축 함.





**제5협동 : 박테리오파지 (Bacteriophage)를 이용한  
유해균의 제어**

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 김 광 표



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

### 1. 박테리오파지(Bacteriophage)

(1) 박테리오파지는 박테리아를 숙주로 살아가는 obligate parasite인 (그림 1).

(2) 주로 double stranded DNA와 genetic material을 감싸고 있는 (주로) 단백질로 이루어진 capsid로 구성되어 있고, 많은 박테리오파지는 tail structure를 가지고 있으며 이는 박테리오파지의 host infection에 매우 중요한 역할을 함.

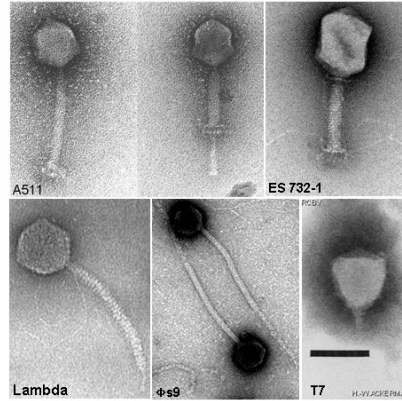


그림 1. 식품유래병원균에서의 박테리오파지를. 박테리오파지는 자연계에서 host bacteria보다 10배수 정도 더 존재하며 지구상에서 가장 많은 개체수를 가지는 self-replicating unit이다. 이러한 박테리오파지들은 host bacteria에 대한 높은 특이성을 가지며, 이러한 특이성은 발효식품과 같은 유용한 미생물의 지속적인 성장이 요구되는 제품에서 antimicrobial agent로서 특히 유용하게 이용될 수 있을 것이다. A511, *Listeria monocytogenes* specific; ES732-1, *Enterobacter sakazakii* specific; Lambda, Enterobacteria specific; φs9, *Clostridium perfringens* specific; T7, Enterobacteria specific.

(3) 박테리오파지는 1915에서 1920년 사이에 처음으로 그 존재의 가능성이 보고 됐고, 전자현미경의 개발로 확인되었으며(그림 1), 초기 발견 때부터 병원균을 사멸시키는 능력이 그 관심의 대상이 되어 많은 미생물 병원균의 감염에 대한 치료제로 이용되었음.

(4) 그러나 몇몇의 동유럽국가(러시아, 폴란드, 그루지아)를 제외한 서구에서 박테리오파지의 연구는 1940년대에 항생제의 발견으로 쇠퇴하였고, 이후의 연구는 주로 기초과학에서 다루기 쉬운 gene manipulation의 도구로써만 이용되어왔음.

(5) 이러한 박테리오파지의 연구는 1990년대 항생제에 내성을 가지는 병원성 미생물의 증가와 소비에트연합의 붕괴로 인한 동유럽국가 연구인력의 유출로 서구에서 다시 유해한 미생물의 조절 (Bacteriophage biocontrol, Bacteriophage therapy)을 위한 유용한 자원으로 새롭게 인식되기 시작했음.

(6) 박테리오파지는 자연계에 가장 많이 존재하는 self-replicating unit임(그림 2).



그림 2. 자연환경에서 박테리오파지 자원의 풍부함. 박테리오파지는 자연계에 가장 많이 존재하는 ( $10^{20-32}$ ) self-replicating unit이지만 2002년 현재까지 약 5000개 정도만이 분리되고 분류되었다. 그러므로 앞으로도 무궁무진한 유용한 유전자원의 발견과 획득이 기대된다.

(7) 많은 보고서들에 따르면, 토양 1g중에는  $10^7$ , fresh water에는  $10^{8-9}$ , salt water에는  $10^7$  정도의 박테리오파지가 존재하는 것으로 추정되었고, 온천에서도 약  $10^6$  정도가 존재하는 것으로 보고되었으며. 또한 1g의 굴(oyster)에서는 *Vibrio*에 특이적으로 작용하는  $10^{1-6}$  정도

의 박테리오파지가 있는 것으로도 보고되었음.

(8) 박테리오파지에 의한 숙주 박테리아의 infection 및 불활성화(그림 3)는 먼저 tail structure를 이용한 숙주 박테리아에의 adsorption으로 시작되고. 박테리오파지 genetic material의 injection 후, 박테리오파지의 gene expression은 종종 숙주 박테리아를 불활성화 시키며, 그 후 남아있는 숙주 박테리아의 DNA 그리고 protein synthesis machinery를 이용하여 박테리오파지의 부품들(genetic material, capsid protein, tail protein)을 생산하고 self-assembly에 의해 새로운 박테리오파지를 조합하게 되며. 이후 박테리오파지가 만드는 lysis에 관여하는 단백질들(endolysin과 holin)의 작용으로 숙주 박테리아의 cell integrity가 붕괴되고, 새로운 박테리오파지는 주변으로 퍼져나감(그림 3).

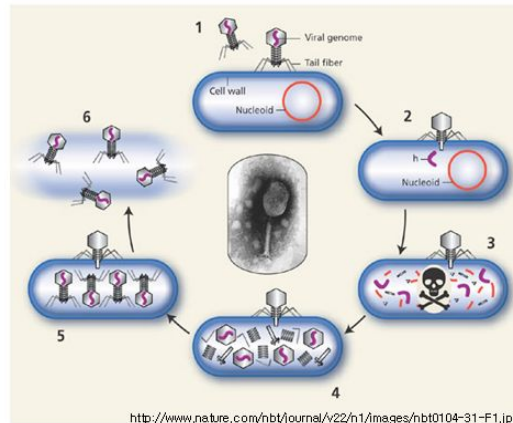


그림 3. 박테리오파지에 의한 병원성 미생물의 불활성화. (1) 박테리오파지의 receptor를 가지는 host bacteria에 attachment, 그리고 (2) 박테리오파지 DNA의 injection. (3) host bacteria의 chromosome의 절단등을 통한 host bacteria의 불활성화, 그리고 (4) host bacteria의 DNA 그리고 protein synthesis machinery를 이용한 박테리오파지의 부품 생산. (5) 새로운 박테리오파지의 조합, 그리고 뒤따르는 (6) host bacteria의 lysis와 박테리오파지의 release. (Graphic courtesy of GangaGen, Bangalore, India; Phage image courtesy of Elizabeth Cutter, Evergreen State University, Olympia, WA, USA)

## 2. 장류식품에서 *B. cereus* 제어기술 개발의 경제적 · 산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

### 가. 장류식품에서 *B. cereus* 제어기술 개발의 필요성

- (1) *Bacillus cereus* species group은 6개의 종들(*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*)로 구성되어 있고 (Ehling-Schulz et al., 2004). 6개의 종들은 다시 각각이 가지고 있는 virulence factor들 (toxins 포함) 에 따라 세분됨.
- (2) 이들 중 *B. cereus*는 식중독(food poisoning)을 일으키는 포자 형성 균으로 두 가지 type의 서로 구별되는 toxin들을 생산하는데 하나는 설사(diarrhoea)를 일으키는 heat-labile enterotoxin이고 다른 하나는 구토(emesis)를 야기하는 heat-stable peptide toxin (cereulide) 임.
- (3) *B. cereus*에 의한 식중독과 관련된 식품으로는 우유제품, 육류제품, 야채류 그리고 전분을 포함하는 식품들, 예를 들면 쌀이나 라면류등이 있으며 성인에게 식중독을 일으키는데 필요한 *B. cereus*의 수는  $10^5 \sim 10^8$  CFU/g of food인 것으로 추정됨.
- (4) 유럽연합은 낙농제품에 대하여  $\leq 10^4$  CFU/g을 그리고 영국은 ready-to-eat 제품에 대하여  $\leq 10^5$  CFU/g 의 *B. cereus*를 규정하고 있음.
- (5) 최근 우리나라에서도 장류식품에 대하여  $\leq 10^4$  CFU/g로 *B. cereus*를 제한함에 따라 다양

한 장류에서의 *B. cereus*의 검출은 식품의 위생을 책임지고 있는 관계당국 뿐 아니라 장류의 세계화를 시도하고 있는 식품업계 등에도 커다란 장애물이 될 것임.

- (6) 유산(lactic acid)과 과산화수소(hydrogen peroxide)의 처리는 액체배지에서 *B. cereus*의 증식을 억제하는데 효과를 나타냈음(Jang et al., 2005)이 보고되었으나 지금까지 제한적으로 시도된 이러한 *B. cereus*의 비활성화 방법들은 병원성 *B. cereus*에만 특이적으로 작용하지 않으며, 유익한 미생물에 의한 장류의 숙성에도 나쁜 영향을 미칠 수 있음.
- (7) 그러므로 제품 본래의 품질을 유지하면서 문제를 일으키는 병원성균만을 선택적으로 제거할 수 있는 방법이 발효제품 등에서 특히 요구되고 있음.

나. 박테리오파지(Bacteriophage), an FDA-Approved Safe Antimicrobial Agent

- (1) 박테리오파지는 지구상에 약  $10^{29-32}$  정도가 존재하는 것으로 추정되며, 이러한 숫자는 지구상의 존재하는 미생물의 수( $5 \times 10^{28}$ ) 과 비교하여 월등히 많이 존재하는 것임.
- (2) 자연계에 널리 그리고 많은 수로 존재하는 박테리오파지의 특성 때문에 개개인의 인간은 하루에  $10^{7-9}$  정도의 박테리오파지를 섭취하고 있는 것으로 추정됨.
- (3) 각각의 박테리오파지는 고유의 숙주 박테리아의 범위(host range)를 가지며 이러한 host range는 *Bacillus*와 같은 그람양성균에서는 주로 species 또는 genus level에서 결정됨.
- (4) Bacteriophage biocontrol은 파지를 이용한 해로운 미생물의 조절을 의미하며. 최근의 많은 보고서들은bacteriophage biocontrol이 성공적으로 유해균들을 제어할 수 있음을 보여주고 있고, 그럼으로써 식품의 안정성과 보존성을 높일 수 있음을 확인해 주었음(표 1).
- (5) 또한 인간은 하루 평균  $10^{7-9}$  정도의 박테리오파지를 섭취하고 있는 것으로 추정되며 최근의 독성실험은 다시 한번 박테리오파지가 인간에 무해함을 확인시켜 주었음.
- (6) 이런 이유들로 최근 FDA에서는 파지에 GRAS (Generally Regarded As Safe)의 지위를 부여하고 식품에서의 이용을 허용했으며(FDA, 2006), EU에서도 이러한 절차가 진행 중임.
- (7) 또한 2007년에는 *E. coli* O157:H7 또는 *Salmonella*에 특이성을 보이는 박테리오파지를 가축에 도살 전 처리하여 병원균을 제어하려는 이용을 또한 허가함.
- (8) 박테리오파지는 항생제를 비롯한 다른 항미생물제제에 비해 높은 특이성을 가지며, 자연계에 무한히 존재하여 새로운 product를 찾는 것이 용이하고, 교차내성이 적으며, 다른 어떤 antimicrobial agent도 가지지 못한 증식성을 보유하고 있음 (표 1).
- (9) 또한 항생제에 저항성을 가지는 병원균과 달리, phage에 저항성을 보이는 병원균은 종종

그 병원성 자체도 감소함이 확인되었고 이는 저항성과 관련된 심각성이 항생제에 비해 상대적으로 낮음을 의미함 (표 1).

표 1. Bacteriophage, phage endolysin 그리고 항생제의 특성 비교

특성	Antibiotics	Bacteriophages	Phage Endolysin
특이성(Specificity)	Low	High to extremely high	High to extremely high
부작용(Side Effects)	High	Very low (if any)	Very low (if any)
새 product 개발 소요시간	Time-consuming	Relatively fast	Relatively fast
증식성(Multiplicity)	No	Yes	No
교차내성(Cross-resistance)	Yes	No ~ (Yes)	No ~ (Yes)
병원성과의 관계 (Relation to pathogenicity)	Not associated with virulence	Often confer LESS virulent phenotype	Might be associated with viability, and thus LESS virulent

(10) 유익한 발효균의 지속적인 역할이 요구되고 최소한의 열처리를 통한 품질의 유지가 필수적인 발효식품등에서 다른 antimicrobial agent들이 하지 못하는 특정유해균(예: *Bacillus cereus*)만을 특이하게 제어할 수 있고 비파괴적인 유해균제어방법인 박테리오파지 및 endolysin을 이용한 유해세균의 제어는 매우 유익한 기술이 될 수 있을 것임.

## 2절 연구개발의 최종목표

1. 최종 목표: 각종 장류에 오염되어 있는 *B. cereus*를 *B. cereus*에만 특이하게 작용하는 파지를 이용하여 적정수준에서 조절할 수 있는 방법을 확립.
  - 가. 1년차 연구목표 (2009년)
    - (1) 장류 및 장류관련 식재료에 존재하는 *B. cereus*에 특이성을 가지고 비활성화시키는 박테리오파지들의 분리 및 분류
  - 나. 2년차 연구목표 (2010년)
    - (1) 분리된 박테리오파지들의 특성분석 및 genome sequencing과 genomic analysis
  - 다. 3년차 연구목표 (2011년)
    - (1) Bacteriophage biocontrol을 다양한 장류에 적용하여 그 효능을 확인
    - (2) *B. subtilis*를 이용한 청국장 발효시 *B. cereus* 증식을 박테리오파지를 이용하여 제어
    - (3) *B. cereus*가 제거된 볏짚유래 starter culture의 가능성 입증

### 3절 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	2009	다양한 장류식품으로부터 박테리오파지의 분리 및 특성분석	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 된장, 고추장, 청국장 그리고 장아찌의 샘플들을 수거</li> <li>2. 10여개의 <i>Bacillus cereus</i> isolates를 indicator strain으로 이용하여 다양한 샘플들로부터 박테리오파지의 유무를 확인하고 single plaque의 분리</li> <li>3. PEG precipitation과 초원심분리기를 이용하여 phage의 대량생산 및 순수분리</li> <li>4. 전자현미경을 이용한 phage의 형태 연구, SDS-PAGE를 이용한 phage의 구조단백질의 연구, 그리고 제한효소처리에 따른 phage genomic DNA의 분석등을 통하여 분리된 박테리오파지의 분류</li> </ol>	시중에 유통 중인 다양한 전통장류 제품들( <i>B. cereus</i> 가 일정수준 오염되었을 것으로 추정되는)에서 박테리오파지를 최대한 많이 분리하고 이들의 기초적인 특성분석들을 통한 분류
2차년도	2010	분리된 박테리오파지의 특성분석 및 genome sequencing과 genomic analysis	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Plaque forming assay를 이용하여 다양한 세균들에서 phage의 host range 결정</li> <li>2. 액체배지에서 single step growth curve를 통한 burst size등의 박테리오파지에 의한 lysis 특성분석</li> <li>3. 액체배지에서 lysis assay를 통한 <i>B. cereus</i> 증식 저해능 평가</li> <li>4. 박테리오파지 genome size의 결정과 genome sequencing</li> <li>5. Blast search 등의 bioinformatics tool을 통한 phage genome의 분석</li> </ol>	Bacteriophage biocontrol에 이용하기에 적합한 박테리오파지의 선정을 위해서 host range와 <i>B. cereus</i> 증식 저해능등의 특성분석, 그리고 genome sequencing과 genomic analysis를 통해 박테리오파지가 독성유전자등의 유해유전자를 가지고 있지 않음을 확인
3차년도	2011	Bacteriophage biocontrol을 다양한 장류에 적용하여 그 효능을 확인	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>B. cereus</i>-free 장류에 박테리오파지에 sensitive한 <i>B. cereus</i> strain을 다양한 농도로 인위적으로 오염시키고 다양한 순수분리된 박테리오파지를 처리한 후 오염균의 증식 및 멸균을 모니터링</li> <li>2. <i>B. cereus</i>가 오염된 볏짚 샘플에 박테리오파지를 처리하여 <i>B. cereus</i>가 제거된 starter culture 개발의 가능성 분석</li> </ol>	<i>B. subtilis</i> 발효 청국장을 모델 시스템으로 하여 <i>B. cereus</i> 오염 후 박테리오파지를 처리하여 <i>B. cereus</i> 의 증식 억제확인하고, 볏짚 유래 <i>B. cereus</i> -free starter culture의 개발 가능성 모색

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절 세계적 수준

#### 1. Bacteriophage 활용에 대한 관심과 연구 부활

(1) 효과적인 세균 제어제인 항생제 개발과 사용으로 한동안 bacteriophage를 이용한 세균 감염 치료에 대한 연구가 거의 잊혀지고 있었으나, 최근 들어 전 세계적으로 폭발적으로 늘고 있는 항생제 내성균에 대한 해결책으로 phage biocontrol에 대한 관심이 고조되었음.

#### 2. Bacteriophage 이용의 안전성 공인 (미국 FDA) (GRAS)

(1) 전 세계적으로 의학과 농업, 식품안전 등 다 방면에 걸친 연구가 진행되고 있으며 특히 2006년 8월에는 미국과 네덜란드의 venture 기업 2곳이 축산물에 도포하여 *Listeria*를 제거할 수 있는 bacteriophage를 개발하여 미국 FDA 허가를 받을 정도로 안전성이 검증되고 실용화가 진전되었음. (Federal Register of August 18, 2006, FDA announced that it had approved the use of a bacteriophage preparation made from six individually purified phages to be used on Ready To Eat meat and poultry products as an antimicrobial agent against *Listeria monocytogenes*)

(2) 최근의 연구들이 보여주는 phage의 안전성(Carlton et al., 2005)과 위해균 조절에서의 효율성으로 FDA는 anti-*Listeria* phage에 GRAS (Generally Regarded As Safe) status를 부여했음 (FDA GRAS Notice No. GRN 000198; FDA, 2006).

(3) 또한 2007년에는 *E. coli* O157:H7 또는 *Salmonella*에 특이성을 보이는 박테리오파지를 가축에 도살 전 처리하여 병원균을 제어하려는 이용을 또한 허가함.

#### 3. Bacteriophage를 이용한 다양한 application

(1) 아직 국제적인 공인이 되지 않았으나 옛 Soviet Georgia에서 기존 항생제에 의해 치료가 안 되는 병원균에 대한 phage therapy가 이용되었음.

(2) 또한, bacteriophage를 이용하여 *E. coli* O157:H7이나 *Salmonella*와 같이 다양한 위해균들을 식품등에서 제어하려는 실험이 다수 보고되었음(표 2).

Bacteria	식품	Contamination Level (Host bacteria)	Minimum Effective Dose (박테리오파지)	Reference
<i>Pseudomonas fragi</i>	Skim milk,	10 <sup>5</sup> CFU/ml	10 <sup>1</sup> PFU/ml	Ellis et al., 1973
<i>Pseudomonas</i>	Beef meat	7 x 10 <sup>6</sup> CFU/sample	10 <sup>8</sup> PFU/sample	Greer, 1986
<i>Listeria monocytogenes</i>	Raw beef	10 <sup>9</sup> CFU/ml	3 x 10 <sup>3</sup> PFU/ml	Dykes and Moorhead, 2002
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fresh-cut produce	5 x 10 <sup>5</sup> CFU/ml	5 x 10 <sup>7</sup> PFU/ml	Leverentz, et al., 2003
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Fresh-cut fruit	25 µl of 10 <sup>6</sup> CFU/ml	25 µl of 2 x 10 <sup>8</sup> PFU/ml	Liao and Sapers, 2000
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Chicken Frankfurters	3 x 10 <sup>2</sup> CFU/sample	5.25 x 10 <sup>6</sup> PFU/sample	Leverentz et al., 2001
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Chicken skin	10 <sup>3</sup> CFU/cm <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	Goode et al., 2003
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Chicken skin	10 <sup>3-4</sup> CFU/cm <sup>2</sup>	10 <sup>7-8</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	Goode et al., 2003
<i>Campylobacter jejuni</i>	Chicken skin	10 <sup>4</sup> CFU/cm <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	Goode et al., 2003
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Steak meat	2 x 10 <sup>2</sup> CFU/ sample	2 x 10 <sup>8</sup> PFU/sample	O'Flynn et al., 2004
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Reconstituted infant formula	10 <sup>2</sup> CFU/ml	10 <sup>7</sup> PFU/ml	Kim et al., 2007

표 2. 다양한 식품에서의 bacteriophage biocontrol. Bacteriophage biocontrol은 박테리오파지를 이용한 식품에서의 유해성균의 조절을 말하며, 다양한 식품에서 그 유효성이 입증되었다. 특히 2006년 FDA는 박테리오파지에 GRAS status를 부여하였고, 현재 EU에서도 식품에 첨가하기 위한 평가가 진행 중이다.



(3) 이외에도 박테리오파지는 기초과학에서 host bacteria의 이해(lysogenic conversion), typing 등을 통한 병의 역학조사등에 이용되고 있고, reporter bacteriophage의 건설 등을 통한 병원균의 신속검출등 매우 다양하게 연구되고 또한 이용되고 있음(그림 5)

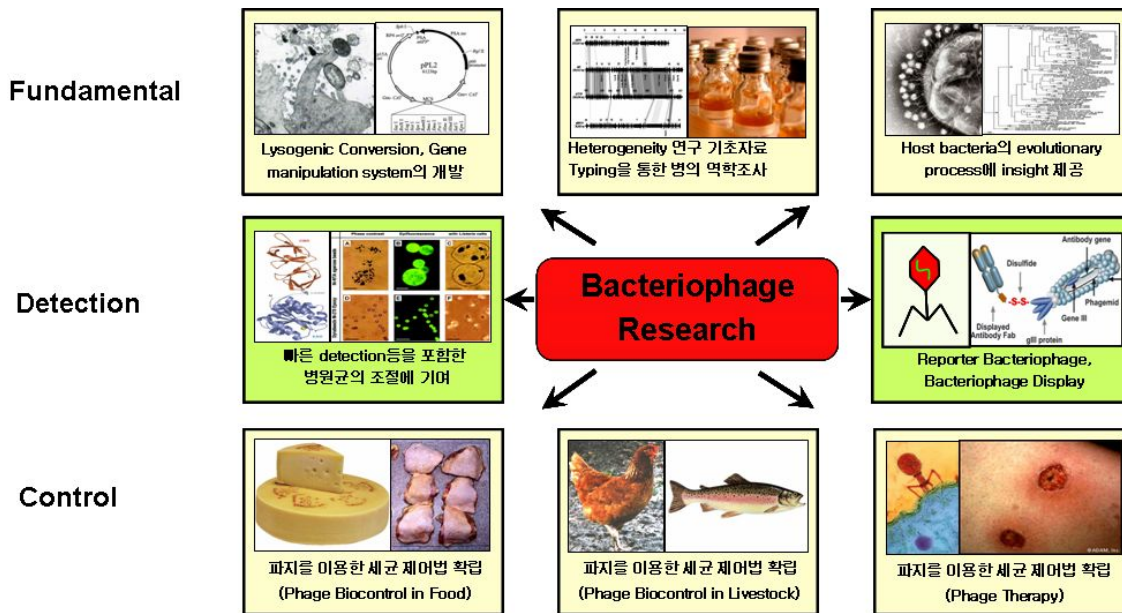


그림 5. 박테리오파지 및 endolysin의 다양한 이용

## 2절 국내수준

1. 장류식품에서 *Bacillus cereus*의 제어에 대한 국내연구위에서 언급된 대로, *B. cereus*의 조절을 위한 유산(lactic acid)과 과산화수소(hydrogen peroxide)등의 이용이 보고되었으나 여전히 액체배지에서 시도되는 등의 매우 제한적인 결과물들이었음. 또한 이러한 *B. cereus*의 비활성화 방법들은 병원성 *B. cereus*에만 특이적으로 작용하지 않으며, 유익한 미생물에 의한 장류의 숙성에도 나쁜 영향을 미칠 수 있음.

2. 시작 단계의 국내 박테리오파지 연구

몇몇 연구자에 의한 소규모 연구가 시작되고, 일부 특히 출원 경우가 있으나 아직 본격적인 phage therapy나 biocontrol 연구는 시작되지 않은 상태이며, 일부 벤처 기업에서 관련 연구를 하고 있지만 아직 제대로 된 실용화 단계에 이르지 못한 실정임.

3. 높은 원천기술 확보 가능성

하지만 이 분야 연구가 다시 세계적인 주목을 받기 시작한 것이 오래되지 않았으므로, 이제 시작해도 원천기술 확보 가능성은 지대하며 특히 박테리오파지의 높은 host-specificity 특성상 각 지역에 특이적으로 존재할 수 있는 세균을 제어할 수 있는 여러 phage를 분리 분석해야 하기 때문에 더 많은 연구자들이 관심을 갖고 연구할 수 있는 여건이 마련돼야 함.

4. 본 연구실의 관련 연구 개발 내용

본 연구실에서는 5년 전부터 phage 관련 연구를 시작하여 다양한 phage를 분리 분석하고 있으며, 여러 환경 sample에서 분리한 *Bacillus cereus* 및 *Salmonella*, *Campylobacter* 등의 증식을 억제하는 bacteriophage들을 분리하고 연구해 오고 있음.

### 3절 국내·외의 연구현황

<박테리오파지를 이용한 유해균의 조절을 위한 국외연구현황>

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
스위스연방공대 (ETH Zurich)	<i>Listeria</i> phage P100의 complete genome sequencing 및 분석과 동물실험등을 통하여 박테리오파지가 안전함을 밝히고 식품에의 처리를 통하여 박테리오파지에 의한 <i>Listeria monocytogenes</i> 제어의 효율성을 확인함.	Regul Toxicol Pharmacol 2005. 43: 301-312 미국 FDA에서 박테리오파지가 GRAS status를 획득하는데 결정적인 역할을 하게 됨.
Dairy Product Research Center, Ireland	세 개의 박테리오파지를 이용하여 <i>E. coli</i> O157:H7을 steak meat에서 저감화 연구	Appl Environ Microbiol 2004 70: 3417-3424
서울대학교 농업생물신소재연구소 , 스위스연방공대	이유식에서 박테리오파지를 이용한 <i>Enterobacter sakazakii</i> 의 효과적인 증식억제 연구	Int J Food Microbiol 2007 115: 195-203
뮌헨기술대학교 (Technische Universitat Muehen)	박테리오파지의 genome sequenc를 기반으로 reporter 박테리오파지를 건설하여 신속하게 <i>Listeria</i> cell들의 검출하는 방법의 개발. <i>Listeria</i> 외에도 <i>B. cereus</i> 와 <i>Clostridium perfringens</i> 에도 적용가능성 제시	Appl Environ Microbiol 1997. 63: 2961-2965 Appl Environ Microbiol 1996. 62: 1133-1140
록펠러대학교 (The Rockefeller University)	Endolysin을 이용하여 group B streptococci에 의한 병을 치료하려는 연구를 수행	Antimicrob Agents Chemother 2005. 49: 111-117 Trends Microbiol 2005. 13: 491-496
스위스연방공대 (ETH Zurich)	박테리오파지 endolysin의 CBD를 이용하여 <i>Listeria monocytogenes</i> 만을 특이하게 신속 검출하는 방법을 개발	Appl Environ Microbiol 2007. 73: 1992-2000 전통적인 <i>L. monocytogenes</i> 의 검출법보다 매우 신속하고 정확한 방법의 개발로 특허가 출원되었고, 이의 상업화가 진행중임
Queensland University of Technology, Australia	<i>Lactobacillus</i> 에 <i>L. monocytogenes</i> 를 불활성화시키는 endolysin을 secretory form으로 클로닝하여 mixed culture에서 유해균인 <i>L. monocytogenes</i> 의 증식억제연구	Syst Appl Microbiol 2007 30: 58-67 Endolysin을 이용한 유해균 조절의 새로운 접근법을 제시함

<B. cereus의 효과적인 제어를 위한 국내 연구현황>

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국식품연구원	Chitosan, lactic acid, fermented pollen 또는 grapefruit extract를 열과 함께 처리함으로써 B. cereus의 포자의 비활성화연구	Food Sci Biotechnol 2008. 17: 603-607
건국대학교 동물생명과학부	콩나물에서 nisin의 처리를 통한 B. cereus의 제어	Food Sci Biotechnol 2008. 17: 166-171
중앙대학교 식품공학과	밥에 100 ppm chlorine, 600 ppm CaO 또는 500 ppm H2O2의 처리로 B. cereus를 제어	J Microbiol Biotechnol 2006. 16:639-642
전북대학교 식품공학과	호장근(Polygonum cuspidatum) 추출액을 이용한 B. cereus의 비활성화	Food Sci Biotechnol 2004: 430-433
경원대학교 식품생물공학과	액체상태에서 ethanol과 NaCl에 의한 B. cereus 생육저해 영향	Korean J Food Sci Technol 2003. 35: 998-1002
이화여대 식품영양학과	B. cereus 포자의 high hydrostatic pressure에 의한 비활성화	Food Sci Biotechnol 2001. 10: 658-662

\* 박테리오파지를 이용한 유해균의 조절에 대한 연구는 국내에서 이루어지지 않고 있음.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1. 연구범위, 이론적/실험적 접근방법과 연구내용

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
다양한 전통 장류 제품에 존재하는 박테리오파지의 prevalence와 순수 분리	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 박테리오파지의 enrichment</li> <li>- Lysis assay(dotting assay)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 된장, 고추장, 청국장, 장아찌 그리고 메주 샘플들의수거</li> <li>- 10여개의 <i>Bacillus cereus</i> isolates를 indicator strain으로 이용하여 다양한 샘플들에서 잠재적인 박테리오파지의 enrichment</li> <li>- Indicator strains를 이용하고 로부터 박테리오파지의 prevalence를 확인하기 위해 dotting assay 시행</li> </ul>
박테리오파지의 순수분리와 TEM 및 genome 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Single plaque isolation</li> <li>- Large scale preparation</li> <li>- TEM</li> <li>- Genome purification</li> <li>- 제한효소 처리</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Single plaque isolation을 이용한 박테리오파지의 순수분리</li> <li>- PEG precipitation과 초원심분리기를 이용하여 phage의 다량생산 및 순수 분리</li> <li>- 전자현미경을 이용한 phage의 형태학적 연구, 그리고 제한효소처리에 따른 phage genomic DNA의 분석등을 통하여 분리된 박테리오파지의 분류</li> </ul>
분리된 박테리오파지의 특성분석 및 genome sequencing과 genomic analysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 파지 genomic DNA 순수분리</li> <li>- Pyrosequencing</li> <li>- Assembly</li> <li>- Gap filling</li> <li>- Bioinformatics</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plaque forming assay를 이용하여 다양한 세균들에서 phage의 host range결정</li> <li>- 액체배지에서 single step growth curve를 통한 burst size등의 박테리오파지에 의한 lysis 특성분석</li> <li>- 액체배지에서 lysis assay를 통한 <i>B. cereus</i> 증식 저해능 평가</li> <li>- 박테리오파지 genome size의 결정과 genome sequencing</li> <li>- Blast search등의 bioinformatics tool을 통한 phage genome의 분석</li> </ul>
Bacteriophage biocontrol을 장류에 적용하여 그 효능을 확인	<i>B. subtilis</i> 를 이용한 청국장 발효에서박테리오파지를 이용한 <i>B. cereus</i> 의 제어	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>B. subtilis</i>를 이용한 청국장의 제조</li> <li>2. 청국장 제조 중 <i>B. cereus</i>의 오염</li> <li>3. 다양한 박테리오파지를 이용한 <i>B. cereus</i>의 제어 확인</li> </ol>
Customized <i>B. cereus</i> -free stater culture의 개발	벗짚에 존재하는 natural microflora의 변함없이 <i>B. cereus</i> -free starter culture의 개발	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 벗짚 샘플에서 natural microflora의 증식</li> <li>2. 박테리오파지의 처리</li> <li>3. <i>B. cereus</i>-free starter culture의 확인</li> <li>4. <i>B. cereus</i>-free starter culture를 이용한 청국장 제조</li> </ol>

## 2. 연구결과

가. 전통 장류에서 *B. cereus*를 사멸시키는 박테리오파지의 prevalence와 분리(1년차)

- (1) 시판 중이 41종의 다양한 장류제품들(된장, 11종류; 고추장, 5종류; 청국장, 3종류; 장아찌, 22종류) 및 메주(6종류) 등에서 12개의 *B. cereus* 균주에 대한 사멸작용을 가지는 물질(박테리오파지, 아래참조)이 생산되는지를 확인
- (2) 결과적으로 64%(7/11샘플)의 된장 샘플, 40%(2/5)의 고추장 샘플, 100%(3/3)의 청국장 샘플 그리고 32%(7/22)의 장아찌 샘플들에서 1개 이상의 *B. cereus*를 사멸시키는 물질이 존재함을 확인(표 1 - 4)
- (3) 이러한 결과들은 다양한 전통 장류에 *B. cereus*를 사멸시키는 물질이 높은 빈도로 존재함을 보여주는 것임
- (4) 이와는 달리 메주(가루)에서는 *B. cereus*를 사멸시키는 물질을 확인할 수 없었음(표 5)

표 1. 된장제품에서 *B. cereus* 사멸물질의 확인

	sample name	<i>Bacillus cereus</i> (Indicator strain)											
		C1	C2	K1	K2	S1	S2	ATCC 27384	ATCC 21768	ATCC 14579	ATCC 1661	ATCC 13061	NRRL 569
된장1	그대로된장 (태광엿맛)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
된장2	문옥례가된장 (순창문옥례가)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
된장3	재래식된장 (하늘마음)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
된장4	순창된장	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)
된장5	재래식된장 (향적원)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)
된장6	순창조선된장 (순창고추장마을)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
된장7	된장 (순창장본가)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)	(++)	(-)	(++)
된장8	찌개된장 (제조일 9.12)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)
된장9	조선된장 (전통별미고추장)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
된장10	쌈장 (순창장본가)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(++)
된장11	우리콩쌈장 (순창문옥례가)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)

표 2. 고추장제품에서 *B. cereus*를 사멸시키는 물질의 확인

	sample name	<i>Bacillus cereus</i> (Indicator strain)											
		C1	C2	K1	K2	S1	S2	ATCC 27384	ATCC 21768	ATCC 14579	ATCC 1661	ATCC 13061	NRRL 569
고추장1	그대로고추장 (태광엿맛)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
고추장2	그대로보리고추장 (태광엿맛)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)
고추장3	태양초고추장 (순창문옥례가)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
고추장4	순창	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

	참쌀고추장												
고추장5	순창고추장 (향적원)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)

표 3. 청국장제품에서 *B. cereus*를 사멸시키는 물질의 확인

		<i>Bacillus cereus</i> (Indicator strain)											
	sample name	C1	C2	K1	K2	S1	S2	ATCC 27384	ATCC 21768	ATCC 14579	ATCC 1661	ATCC 13061	NRRL 569
청국장1	청국장1	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(-)	(++)
청국장2	청국장2	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
청국장3	청국장3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)	(++)	(-)	(++)

표 4. 장아찌 제품에서 *B. cereus*를 사멸시키는 물질의 확인

		<i>Bacillus cereus</i> (Indicator strain)											
	sample name	C1	C2	K1	K2	S1	S2	ATCC 27384	ATCC 21768	ATCC 14579	ATCC 1661	ATCC 13061	NRRL 569
장아찌1	더덕장아찌	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌2	모듬장아찌	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌3	매실장아찌	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌4	더덕장아찌 (영농조합법인)	()	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	()	(++)
장아찌5	마늘장아찌 (영농조합법인)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
장아찌6	양념깻잎장아찌 (영농조합법인)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(++)	(++)	(-)	(++)	(++)	(++)	(++)
장아찌7	감장아찌 (영농조합법인)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌8	감장아찌 (신가네)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)
장아찌9	더덕장아찌 (신가네)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(++)	(++)	(-)	(++)
장아찌10	마늘쫘장아찌 (신가네)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌11	모듬장아찌 (신가네)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌12	오이장아찌 (신가네)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌13	참외장아찌 (신가네)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌14	매실장아찌 (신가네)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌15	옛날모듬장아찌	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌16	마늘쫘 장아찌 (영농조합법인)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
장아찌17	도라지장아찌 (순창 농협)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌18	참가죽장아찌 (미가원)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

장아찌19	산취장아찌 (오순이대덕식품)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
장아찌20	된장깻잎	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
장아찌21	모듬장아찌	(-)	(++)	(++)	(++)	(-)	(++)	(++)	(-)	(++)	(++)	(++)	(-)
장아찌22	가죽잎장아찌	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(-)	(++)

표 5. 메주제품에서 *B. cereus*를 사멸시키는 물질의 확인

	sample name	<i>Bacillus cereus</i> (Indicator strain)											
		C1	C2	K1	K2	S1	S2	ATCC 27384	ATCC 21768	ATCC 14579	ATCC 1661	ATCC 13061	NRRL 569
메주1	강진군동메주	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
메주2	메주와첼리스트	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
메주3	의당손메주	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
메주4	합천우리식품	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
메주5	장류연구소 메주1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
메주6	장류연구소 메주2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

나. 전통 장류에서 *B. cereus*를 사멸시키는 박테리오파지의 분리(2년차)

- (1) 1차 연도에 이어 2차 연도에서도 시판 중인 28종의 장류제품에서 15종의 *B. cereus* 균주에 대한 사멸작용을 가지는 물질 확인
- (2) 6 종의 indicator strain들을 이용(표 6)

표 6. 다양한 장류에서 박테리오파지의 분리(propagation strain)

Sample No.	Product name	ATCC 14579	JCM 2152	ATCC 27348	ATCC 21768	ATCC 13061	ATCC 1611	Isolated phages (BCP #)
1	Josun doenjang	+++ (BCP1-1)	+++ (BCP1-3)	+++	-	+++	+	<b>1-1, 1-2, 1-3, 1-4</b>
2	Traditional doenjang	-	-	++ (BCP2-3)	-	-	++	2-3
3	Traditional doenjang	-	+++	+	-	-	-	3-1
4	Soonchang gol traditional gochujang	-	-	-	-	-	-	-
5	Soonchang traditional josun doenjang	-	-	-	-	-	-	-
6	Soonchang gung jji gae doenjang	-	++	++ (BCP6-1)	-	-	-	6-1, 6-2
7	Doenjang	-	-	-	-	-	-	-
8	Soonchang myeong sung sticky rice gochujang	+++ (BCP8-1)	+++ (BCP8-2)	-	-	-	-	<b>8-1, 8-2</b>
9	Soonchang myeongsung	-	-	-	-	-	-	-

	barley gochujang							
10	Woori wheat gochujang	-	-	-	-	-	-	-
11	Cucumber jangahjji	-	-	-	-	-	-	-
12	Stem of garlic jangahjji	-	-	-	-	-	-	-
13	Chewnamool jangahjji	-	+++ (BCP13-3)	+++	-	-	++	13-3
14	Soonchang gung jung garlic jangahjji	+	+++	+++ (BCP14-2)	-	-	-	14-2
15	Soonchang gung jung cucumber jangahjji	-	-	-	-	-	-	-
16	Maesil jangahjji	-	-	-	-	-	-	-
17	Red vineger garlic jangahjji	-	-	-	-	-	-	-
18	Soonchang gol strawberry cheonggukjang powder	-	-	-	-	-	-	-
19	Sticky rice gochujang	-	-	-	-	-	-	-
20	Korean lettuce jangahjji	-	-	-	-	-	-	-
21	Deodeok jang ah jji	-	-	-	-	-	-	-
22	Maesil gochujang	+++ (BCP22-1)	+++	++				22-1
23	Maesil gochujang	+++ (BCP23-1)	+++	-	-	-	-	23-1
24	Pesticide free traditional gochujang	-	+++ (BCP24-1)	+++	-	-	-	24-1
25	Tae yang cho gochujang	-	-	-	-	-	-	-
26	Maesil gochujang (Different brand)	-	-	-	-	-	-	-
27	Sticky rice gochujang (Different brand)	-	-	-	-	-	-	-
28	Maesil gochujang (Different brand)	-	-	-	-	-	-	-

다. 박테리오파지의 host range 확인

- (1) 표 1-4에 발견된 물질들로부터 single plaque assay 통하여 15종류의 박테리오파지를 분리
- (2) Single Plaque Isolation을 거친 후  $10^{4-6}$  plaque forming unit(PFU)/ml 수준의 박테리오파지를 이용하여 6개의 *B. cereus* type strains에 대한 host range를 확인
- (3) 그 결과 JBP 801, 901, 1001, 1501, 1502가 5개의 *B. cereus*에서 plaque(clear 또는 turbid)을 형성했고, JBP 102, 702, 1101, 1401은 4개의 strain에서, 201, 301, 401, 1201은 3개의 *B. cereus*를 사멸시킬 수 있음을 확인

표 7. 분리된 박테리오파지들의 host range 확인

	Phage (JBP #)	<i>Bacillus cereus</i> (Indicator strain)					
		BC1	BC2	BC4	BC5	BC6	BC8
		ATCC 27348	ATCC 21768	ATCC 13061	ATCC 14579	ATCC 1661	NRRL B-569
모듬 장아찌	101	.	.	.	C	.	.



	102	C	.	.	C	C	C
	103	C	.	.	.	.	C
가죽 장아찌	201	C	.	.	T	.	C
더덕장아찌 (신가네)	301	C	.	.	T	.	C
찌개된장 (제조일 9.12)	401	C	.	.	C	.	C
복분자 장아찌	501	.	.	C	.	.	.
오이 장아찌	601	.	.	T	T	.	.
쌈장 (장분가)	701	C	.	.	.	.	C
	702	C	.	T	.	T	C
우리콩쌈장 (문옥레가)	801	T	.	T	C	T	T
청국장3	901	T	.	C	C	C	C
Sample 11	1001	.	T	T	C	C	C
청국장1	1101	C	.	.	C	T	C
오이 장아찌	1201	C	.	C	.	.	C
순창된장	1301	.	.	T	.	T	.
Sample 7	1401	T	T	T	.	T	.
가죽 장아찌 2	1501	T	T	T	.	T	C
	1502	C	C	C	T	.	C

라. 박테리오파지의 순수분리, 대량생산 및 TEM을 이용한 파지의 형태 연구

(1) 15종의 박테리오파지 중 8개(1-1, 901, 8-2, 22-1, 1-3, 14-2, 8-1, 13-3)를 선정하여 표1에 표시되어 있는 propagation strain 들을 이용하여 대용량으로 증식

(2) PEG precipitation 과 CsCl-gradient ultracentrifuge를 이용하여 순수분리

(3) TEM을 통하여 형태학적 연구 수행

(4) 그 결과 모든 박테리오파지들이 long,

contractile tail을 가지고 있는 Myoviridae에 속하는 것을 확인(그림 1).

(5) Tail의 크기는 160~220 nm까지 다양했고 head의 크기는 주로 95 nm이나 BCP1-3의 경우 약 85 nm정도로 확인됨(표2)

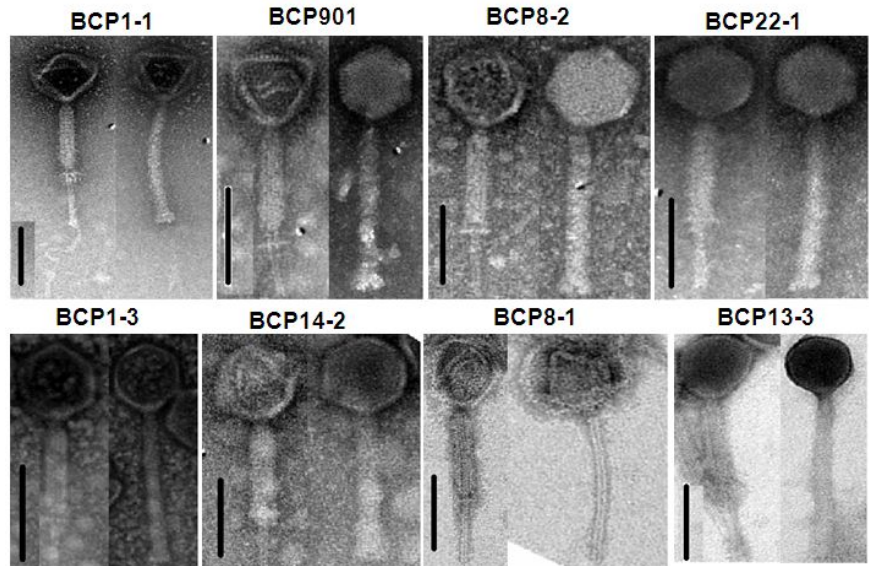


Fig 1. Transmission electron micrographs of *B. cereus* phages. The scale bar corresponds to 100 nm

Table 2. Morphology and dimensions (in nm) of *B. cereus* phages

Phage (BCP #)	Head	Tail		
		Length	Diameter	Contractile
1-1	95±5 nm	220 ± 5 nm	21 ± 1 nm	Yes
1-3	85±5 nm	160 ± 5 nm	22 ± 1 nm	Yes
8-1	95±5 nm	220 ± 5 nm	24 ± 1 nm	Yes
8-2	95±5 nm	210 ± 5 nm	22 ± 1 nm	Yes
901	95±5 nm	175 ± 5 nm	22 ± 1 nm	Yes
13-3	95±5 nm	220 ± 5 nm	24 ± 1 nm	Yes
14-2	95±5 nm	205 ± 5 nm	26 ± 1 nm	Yes
22-1	95±5 nm	210 ± 5 nm	22 ± 1 nm	Yes

마. 박테리오파지의 host range 확인

- (1) 순수 분리된 파지를 이용하여 *B. cereus* group reference strains (16종) (Table 3), non-*B. cereus* group reference strains (21종)(Table 4), 식품에서 분리한 *B. cereus* (37종) (Table 5) 장류에서 분류한 *B. subtilis* 및 *B. licheniformis*(Table 5)에 대해 host range를 확인
- (2) 결과적으로 8 종의 파지들은 *B. cereus* group strain에 대해서만 특이성을 가지고 그 외의 세균에는 영향을 미치지 않음

Table 3. Host range within *B. cereus* group reference strains

Species	Bacteriophages (BCP #)							
	1-1	1-3	8-1	8-2	901	13-3	14-2	22-1
<i>B. cereus</i>	6/7	4/7	5/7	6/7	6/7	5/7	3/7	6/7
<i>B. thuringiensis</i>	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5
<i>B. mycoides</i>	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
<i>B. weihenstephanensis</i>	1/2	0/2	0/2	1/2	1/2	0/2	1/2	1/2
Total	13/16	10/16	11/16	13/16	13/16	11/16	8/16	13/16

- (3) 나아가 장류에서 분류된 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*에 영향을 미치지 않았음(Table 5)

Table 4. Host range on other gram positive/negative reference strains

Species	Bacteriophages (BCP #)							
	1-1	1-3	8-1	8-2	901	13-3	14-2	22-1
<i>B. subtilis</i>	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
<i>B. sphaericus</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>B. pumilus</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>B. licheniformis</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>B. megaterium</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>S. aureus</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>L. monocytogenes</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C. sakazakii</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>E. coli</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>S. Typhimurium</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>V. parahaemolyticus</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Total	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21

Table 5. Host range on *Bacillus* spp. isolates from different foods

	Bacteriophage (BCP #)							
	1-1	1-3	8-1	8-2	901	13-3	14-2	22-1
<i>B. cereus</i> from different foods	20/37	6/37	17/37	19/37	17/37	11/37	5/37	20/37
<i>B. subtilis</i> from Jangryu	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
<i>B. licheniformis</i> from Jangryu	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8

바. 제한효소처리에 따른 phage genomic DNA의 분석

- (1) 순수분리 된 파지를 이용하여 genomic DNA가 순수분리되었고 다양한 제한효소를 이용하여 digestion pattern을 분석
- (2) EcoRV와 KpnI을 이용한 genome 분석을 통하여 첫째, 8 종의 파지들이 서로 다름을 확인하고 둘째 전체 genome size가 약 100 kbp 정도임을 확인(그림 2)
- (3) 모든 파지들은 또 다른 제한 효소인 PstI에 대해 저항성을 나타냈고, EcoRI에 대해서는 선택적으로 digestion이 제한되었음(data not shown)

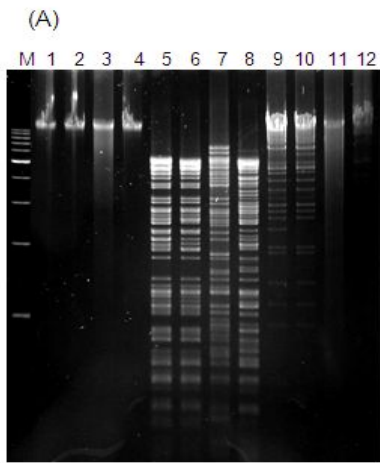
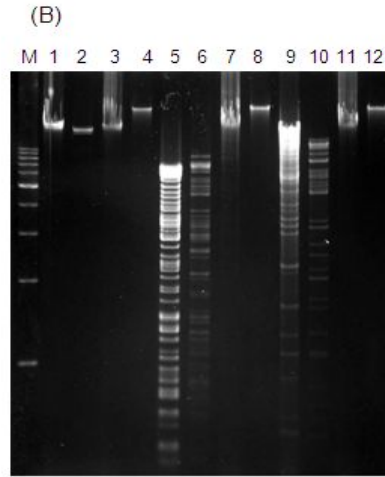


Fig 2. (A) Restriction enzyme digestion patterns of BCP1-1, 901, 8-2 and 22-1. Phage genomic DNA was digested with restriction endonucleases *EcoRV* (lanes 5-8) and *KpnI* (lanes 9-12) and analyzed on a 1% agarose gel. 1 kb DNA size marker was included. Lane M, 1 kb DNA ladder; Lanes 1 to 4, untreated DNA; Lanes 5 to 8, digested DNA of BCP1-1, 901, 8-2 and 22-1, respectively; Lanes 9 to 12, digested DNA of BCP1-1, 901, 8-2 and 22-1, respectively.



(B) Restriction enzyme digestion patterns of BCP8-1, 13-3, 1-3 and 14-2. Phage genomic DNA was digested with restriction endonucleases *EcoRV* (lanes 5-8) and *KpnI* (lanes 9-12) and analyzed on a 1% agarose gel. 1 kb DNA size marker was included. Lane M, 1 kb DNA ladder; Lanes 1 to 4, untreated DNA; Lanes 5 to 8, digested DNA of BCP8-1, 13-3, 1-3 and 14-2, respectively; Lanes 9 to 12, digested DNA of BCP8-1, 13-3, 1-3 and 14-2, respectively.

사. 박테리오파지의 one step growth curve (Fig 3)와 같은 조건하에서 박테리오파지에 의한 *B. cereus*의 증식억제 (Fig 4).

- (1) Propagation strain에서 one step growth curve에 의해 파지들의 burst size가 50-100에 이르는 것을 확인(Fig 3; Table 6)
- (2) 같은 조건에서 분리된 파지들은 *B. cereus*의 증식을 효율적으로 억제(Fig 4; Table 6)

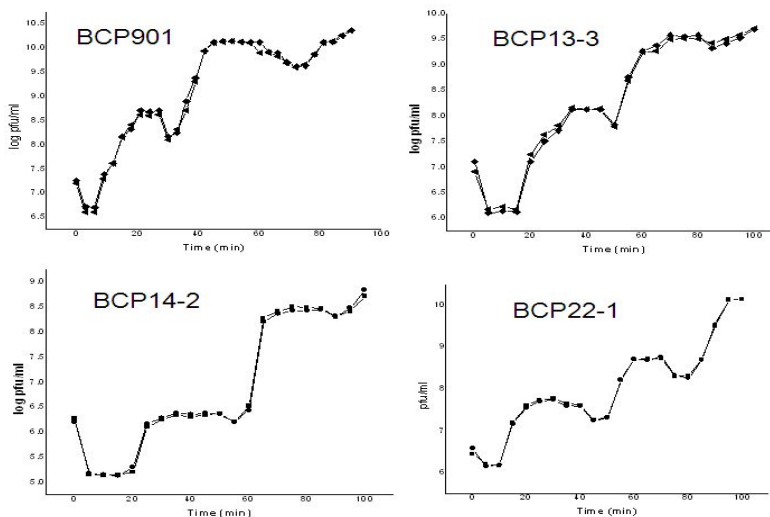
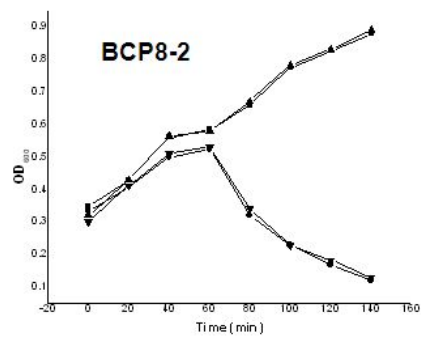
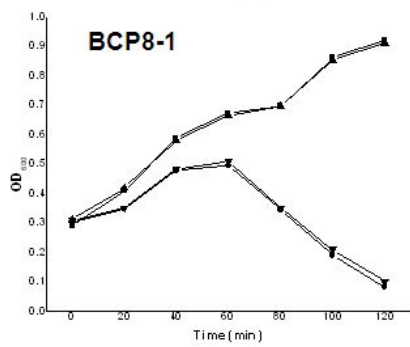
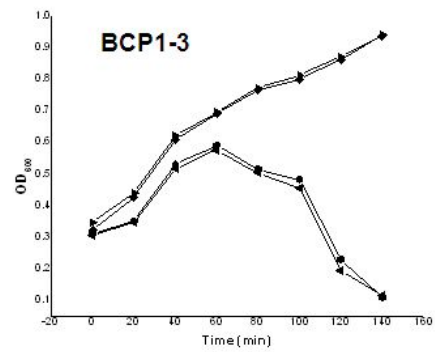
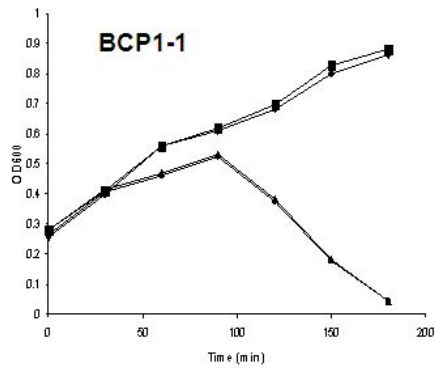
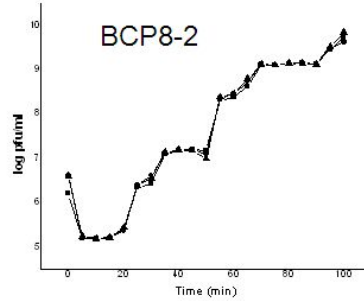
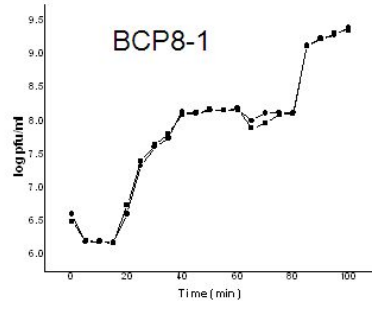
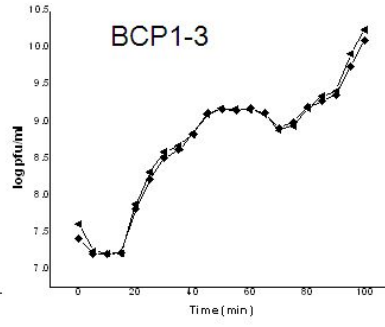
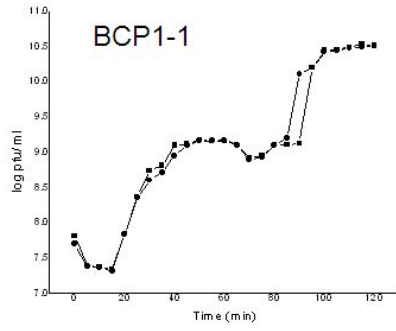


Fig 3. A single step growth curve for *B. cereus* phage was determined using TA broth at 37°C. Phage was added at an MOI 0.1 and allowed to adsorb for 5 min, followed by removal of unabsorbed viral particles, re-suspended in TA broth and PFU counting every 3-5 min. The average burst sizes were in ranges between 50-100.



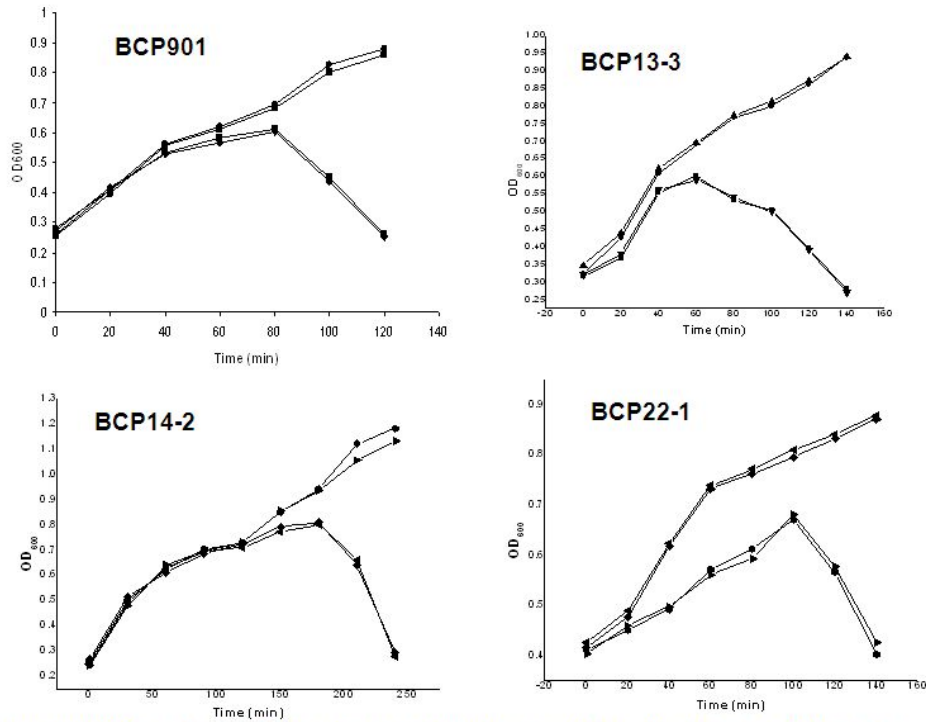


Fig 4. Growth inhibition of *B. cereus* by bacteriophages. After 2h of overnight grown *B. cereus* inoculation (2% inoculums) in to fresh TA medium, phage was added as an MOI 0.1. At time intervals 1 ml, samples were removed optical density was measured at 600 nm ( $OD_{600}$ )

Table 6. Burst sizes and bacterial growth data

Bacteriophage (BCP #)	Burst size pfu/cell	The time point start to drop bacterial growth (min)
1-1	50	After 90 min
1-3	70	After 60 min
8-1	60	After 60 min
8-2	50	After 60 min
901	100	After 80 min
13-3	90	After 60 min
14-2	30	After 180 min
22-1	50	After 100 min

아. 액체배지에서 박테리오파지에 의한 *B. cereus*의 증식 저해

- (1) Propagation에 이용된 *B. cereus*의 overnight culture를 이용하여 2% inoculum을 만들고  $OD_{600}$ 가 0.2가 되었을 때 0.1, 1, 10의 MOI를 가지는 파지를 접종한 후 *B. cereus*의 증식을 모니터링
- (2) BCP14-2를 제외하고 모든 파지들에서 매우 효과적으로 *B. cereus*의 증식을 억제할 수 있음을 확인 (Fig. 5)

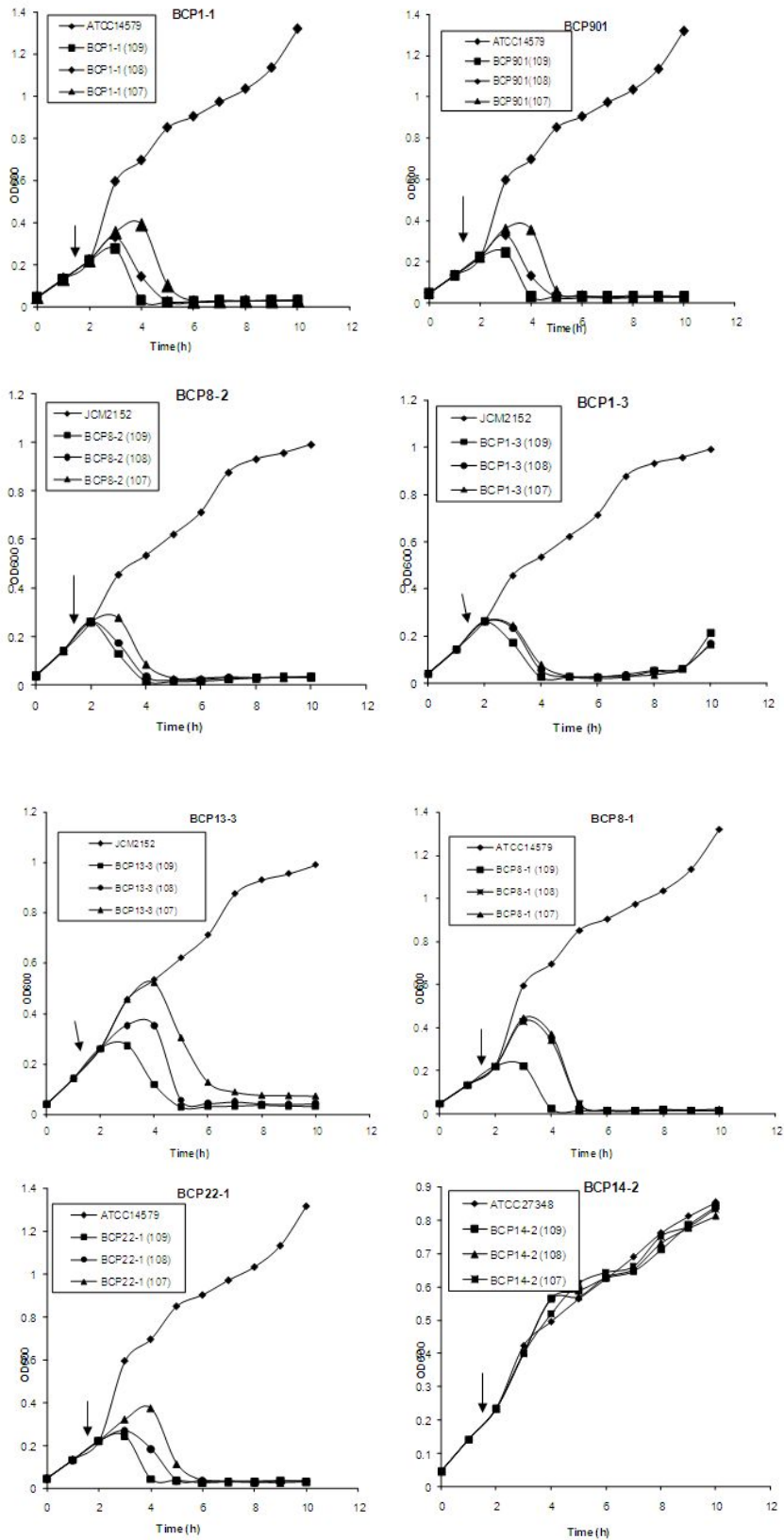


Fig 5. Inhibition of *B. cereus* growth by phages at 37°C with shaking. The arrow point indicate the phage is added

자. 박테리오파지 BCP901의 genomic sequencing and bioinformatics 연구

- (1) Broad host range를 가지는 BCP901을 순수분리하고 이로부터 genomic DNA 순수분리
- (2) Pyrosequencing을 이용한 박테리오파지 genome sequencing, contig assembly 확인
- (3) 다양한 분석 프로그램을 이용하여 phage genome의 sequence 분석(Fig. 1)
- (4) BCP901의 genome의 크기는 159,491 bp dsDNA이고 Bioinformatics analysis에 따르면 190 ORF과 19개의 tRNA 유전자들이 발견됨
- (5) 알레르기 유발 관련 유전자, 병원성 세균 유래 유전자, 항생제 저항성 유전자 또는 독소 성분 유전자는 발견되지 않음
- (6) 유전자원 정보를 GenBank에 등록(GenBank Access Number JF838194)
- (7) 전반적으로 박테리오파지 P100 및 K와 유사성을 보이는 유전자를 보유했다

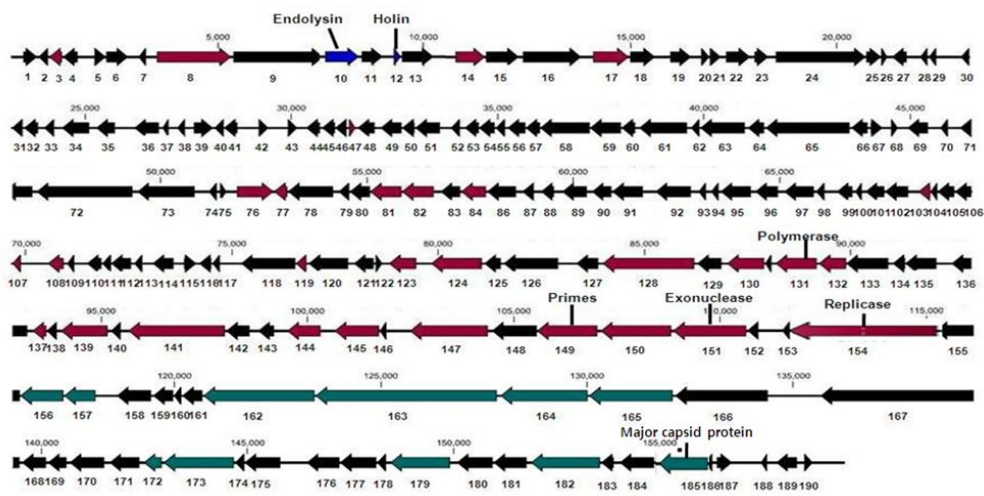


Fig 1: Genome Map of BCP901. ORFs 1 to 190 are indicated by arrows. Blue arrows, putative lysis module; green arrows, structural module; red arrows, DNA replication, transcription and metabolism modules; black arrows, hypothetical proteins.

- (8) BCP901에서 발견된 Exonuclease, primase, helicase 및 replicase의 유사성 분석은 BCP901이 SPO1 Super family에 속한다는 것을 확인시켜줌 (Fig. 2-6)

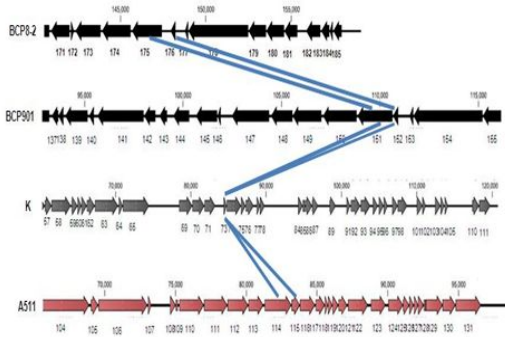


Fig 2: The similarity comparison of exonuclease genes in members of SPO1 super family. Genes are represented by arrows; with each phage's genes indicated by different colors while BCP8-2 and BCP901 indicating same color. Blue lines connect the homologous exonuclease genes

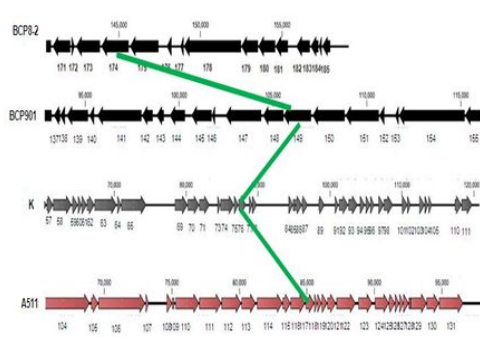


Fig 3: The similarity comparison of primase genes in members of SPO1 super family. Genes are represented by arrows; with each phage's genes indicated by different colors while BCP8-2 and BCP901 indicating same color. Green lines connect the homologous primase genes



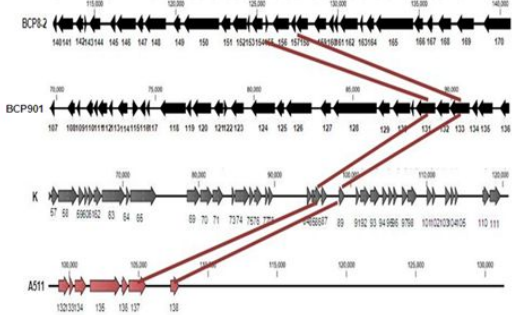


Fig 4: The similarity comparison of polymerase genes in members of SPOI super family . Gens are represented by arrows; with each phage's genes indicated by different colors while BCP8-2 and BCP901 indicating same color. Red lines connect the homologous polymerase genes

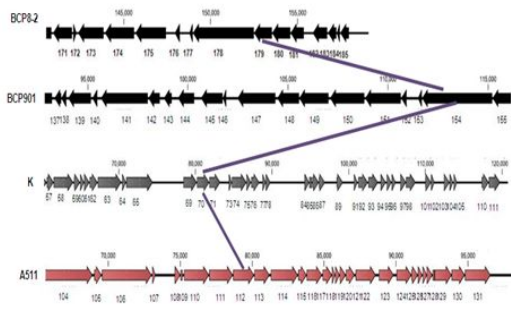


Fig 5: The similarity comparison of replicase genes in members of SPOI super family . Gens are represented by arrows; with each phage's genes indicated by different colors while BCP8-2 and BCP901 indicating same color. Purple lines connect the homologous replicase genes

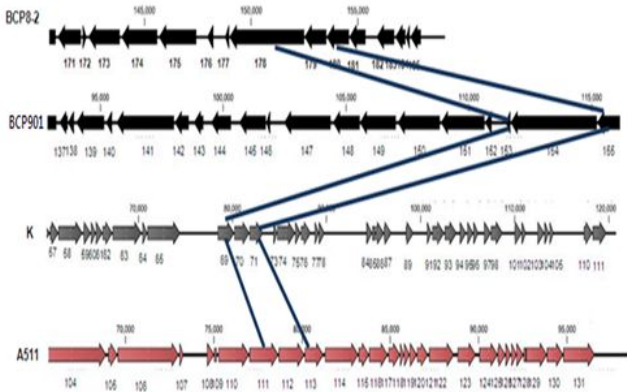


Fig 6: The similarity comparison of helicase genes in members of SPOI super family . Gens are represented by arrows; with each phage's genes indicated by different colors while BCP8-2 and BCP901 indicating same color. Black lines connect the homologous helicase genes

차. *B. subtilis*를 이용한 청국장 발효에서 박테리오파지를 이용한 *B. cereus*의 제어

- (1) *B. subtilis*를 이용한 청국장의 제조
- (2) 청국장 제조 중 *B. cereus*의 오염
- (3) 다양한 박테리오파지를 이용한 *B. cereus*의 제어 확인
- (4) 방법 : (가) 콩 10 g + *B. subtilis*  $10^7$  (1 ml in TA or PW) + *B. cereus*  $10^{1-3}$  CFU/g (1 ml in TA or PW)
  - (나) 박테리오파지 첨가 (0.01 ml of  $10^8$  PFU/g in SM buffer)
  - (다) 37 또는 42도에서 24시간 이상 정치 배양 후 *B. subtilis* 및 *B. cereus* counting
- (5) 결과 : (가) BCP1-1과 BCP8-2는 long contractile tail과 icosahedral head를 가지는 Myovirus임 (Fig. 7)
  - (나) DNA 제한효소 처리에 의한 fragment pattern과 구조 단백질 분석 (Fig. 8)

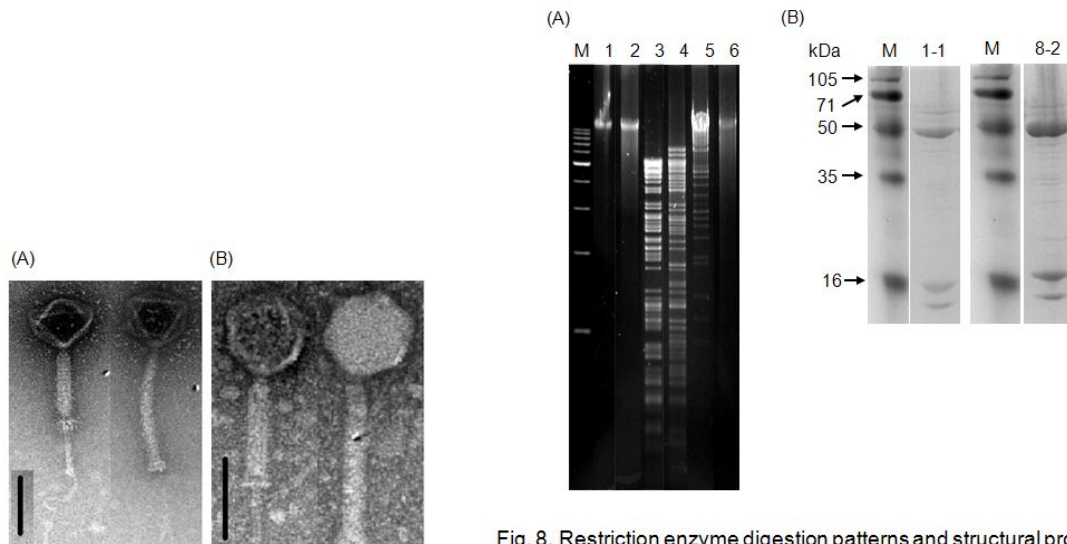


Fig. 7. Transmission electron micrographs of *B. cereus* phages BCP1-1 (A) and BCP8-2 (B). The scale bar corresponds to 100 nm.

Fig. 8. Restriction enzyme digestion patterns and structural protein profiles of BCP1-1 and BCP8-2. (A) Phage genomic DNA was digested with restriction endonucleases EcoRV, and KpnI, and analyzed on a 1% agarose gel. Size markers include a 1 kb DNA marker (Takara). (B) Structural proteins of *B. cereus* phages were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, and stained with Coomassie blue. Molecular mass marker sizes are indicated on the left.

(6) 액체배지(TA)에서 BCP1-1과 BCP8-2는 다양한 온도에서 host *B. cereus*를 매우 효과적으로 제어 (Fig. 10)

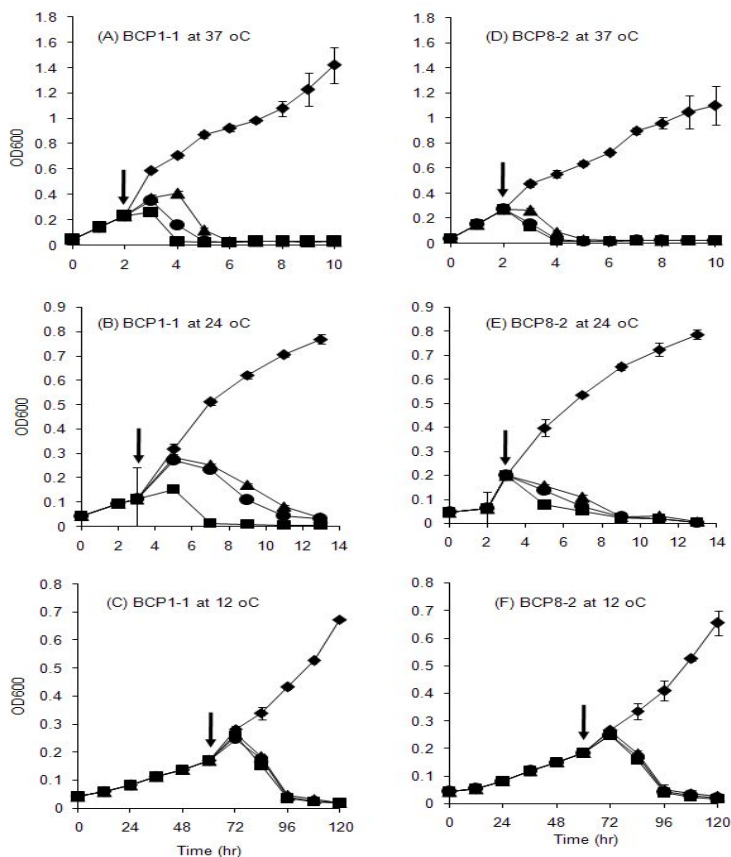


Fig. 10. Inhibition of *B. cereus* growth in liquid medium (TA) by BCP1-1 (A-C) and BCP8-2 (D-F). (A, D) 37°C (B, E) 24°C (C, F) 12°C. The arrow indicates the time point when phages are added. ◆, no phage; ▲,  $1 \times 10^7$  PFU/ml; ●,  $1 \times 10^8$  PFU/ml; ■,  $1 \times 10^9$  PFU/ml.

(7) Peptone water를 이용한 청국장의 제조에서 *B. subtilis*는 박테리오파지 존재의 유무에 상관없이 24시간 후 100배 이상 증식했으나 *B. cereus*는 파지가 없을시  $10^6$  CFU/g까지 파지의 존재하에서는  $10^4$  CFU/g까지 증식 (Fig. 11A)

(8) TA 배지의 이용시 *B. subtilis*는 같은 결과를 나타냈으나, *B. cereus*는 파지에 의해 검출불가 범위( $<10^1$  CFU/g)까지 조절 (Fig. 11B).

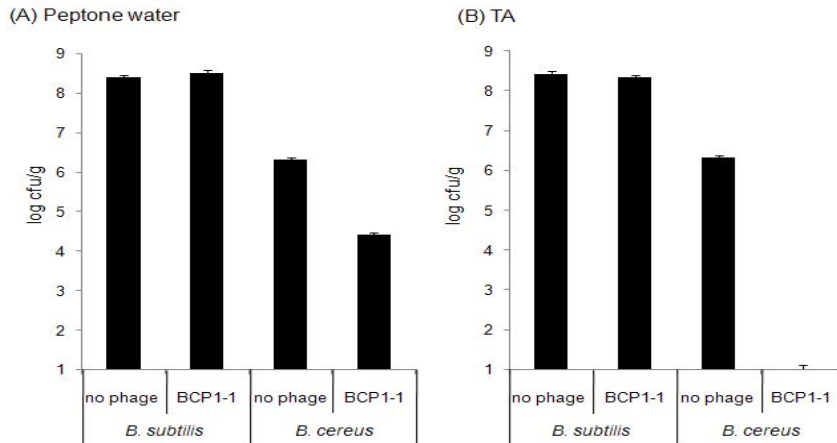


Fig. 11. Inhibition of *B. cereus* JCM2152 with phage BCP1-1 in Cheonggukjang. Cheonggukjang was prepared with *B. subtilis* as described in materials and methods, followed by artificial contamination of *B. cereus* JCM2152 in PW (A) or in TA (B). After phage was added at the concentrations of  $10^8$  PFU/g and both *B. subtilis* and *B. cereus* growth was monitored after 24 hr.

(9) 배지 조성에 의한 *B. cereus* 제어의 효과를 확인하기 위해 peptone water를 기본으로 하고 다양한 금속 양이온이 첨가된 배지를 이용하여 청국장을 제조하고 *B. cereus*의 증식저해를 확인한 결과 divalent cation들이 BCP1-1 및 BCP8-2의 활성화에 큰 영향을 미치는 것을 확인함 (Fig. 12)

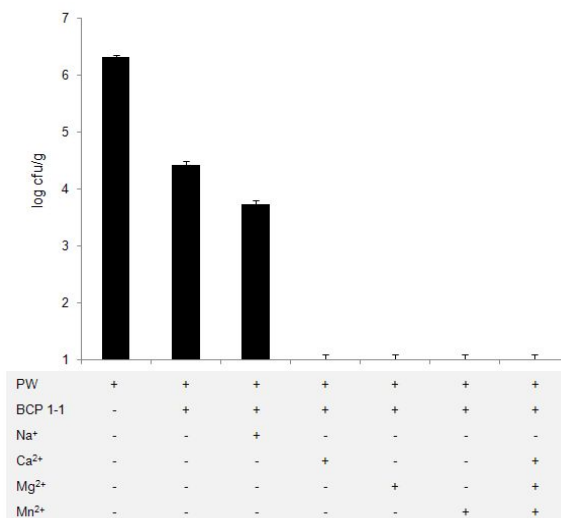


Fig. 12. Inhibition of *B. cereus* JCM2152 growth by BCP1-1 in different suspension media. Cheonggukjang was prepared with *B. subtilis* as described in materials and methods, followed by artificial contamination of *B. cereus* JCM2152 in PW-based media containing different cations. Phage was added at the concentrations of  $10^8$  PFU/g and both *B. subtilis* and *B. cereus* growth was monitored after 24 hr.

(10) Divalent cation이 phage의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 adsorption study를 실시한 결과, divalent cation의 존재하에서 BCP1-1 및 BCP802의 adsorption이 크게 증가하는 것을 확인함 (Fig. 13)

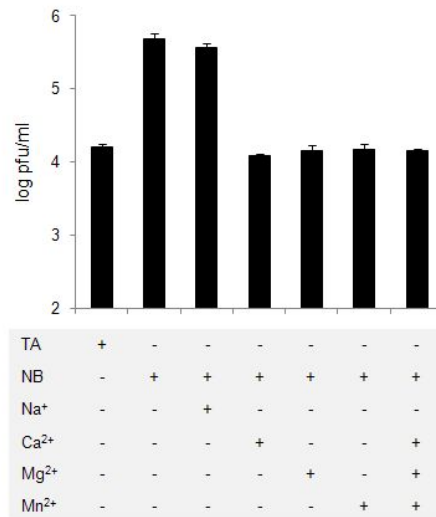
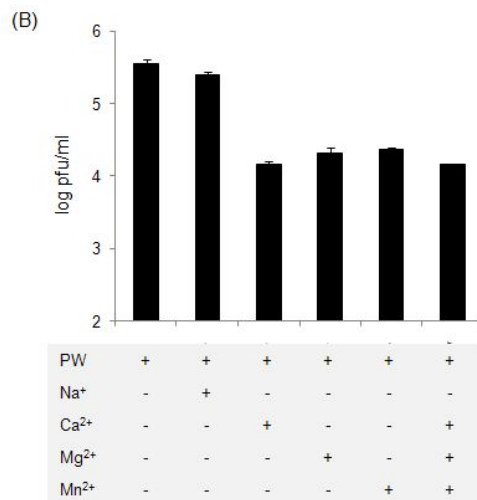


Fig. 13. Effect of cations on BCP1-1 adsorption to the *B. cereus* JCM2152. *B. cereus* ( $10^8$  CFU/ml) and BCP1-1 ( $10^6$  PFU/ml) were incubated in NB- (A) or PW-based media (B) containing different cations, followed by phage (un-adsorbed) counting in the supernatant. PFU in the supernatant was counted.



(11) Divalent cation이 박테리오파지의 post adsorption phase에 미치는 영향을 확인하기 위해 efficiency of plating과 다양한 조성을 가지는 액체배지에서 BCP1-1과 BCP8-2의 *B. cereus* 증식 저해능을 확인한 결과, divalent cation의 post adsorption phase에서의 영향은 미미한 것으로 확인할 수 있었음 (Fig 14)

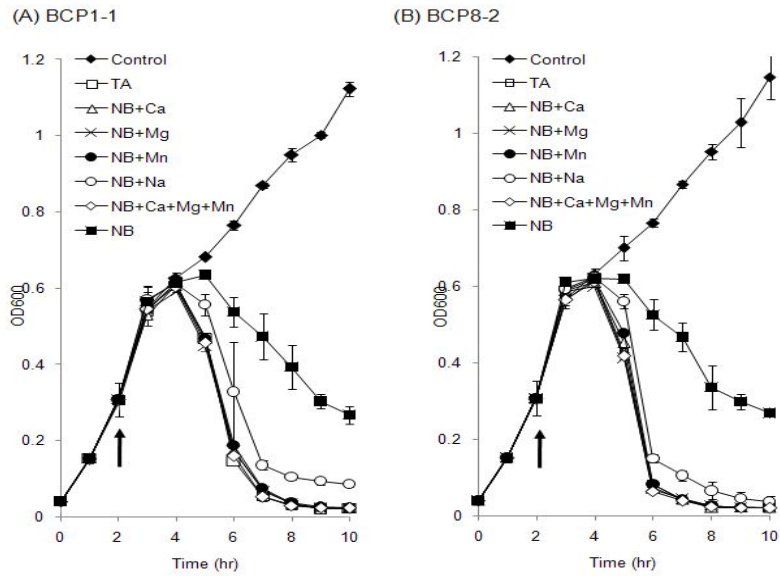


Fig. 14. Inhibition of *B. cereus* JCM2152 growth with BCP1-1 (A) or BCP8-2 (B) in NB-based media containing different cations.

### 카. Customized *B. cereus*-free starter culture의 개발

#### (1) 방법 : (가) *Bacillus cereus*(BC)가 오염된 원재료의 수집

- (나) 적당한 배지(콩국물 및 볶짚 추출물 등)를 이용한 미생물 증식 및 BC의 분리
- (네) 이미 보유하고 있는 broad host range phage를 이용한 BC 저해능 확인
- (다) 제어되지 않는 BC를 대상으로 새로운 phage의 분리 및 특성 분석
- (래) 다양한 phage의 조합을 이용하여 타겟 원재료에서 BC를 사멸
- (마) 파지가 처리된 BC-free 샘플을 대량 증식
- (바) Customized BC-free starter culture의 완성 및 실용화 실험
- (사) Starter culture에 존재하는 microbial community 분석을 위한 DGGE 분석
- (야) Pyrosequencing을 이용한 microflora 분석

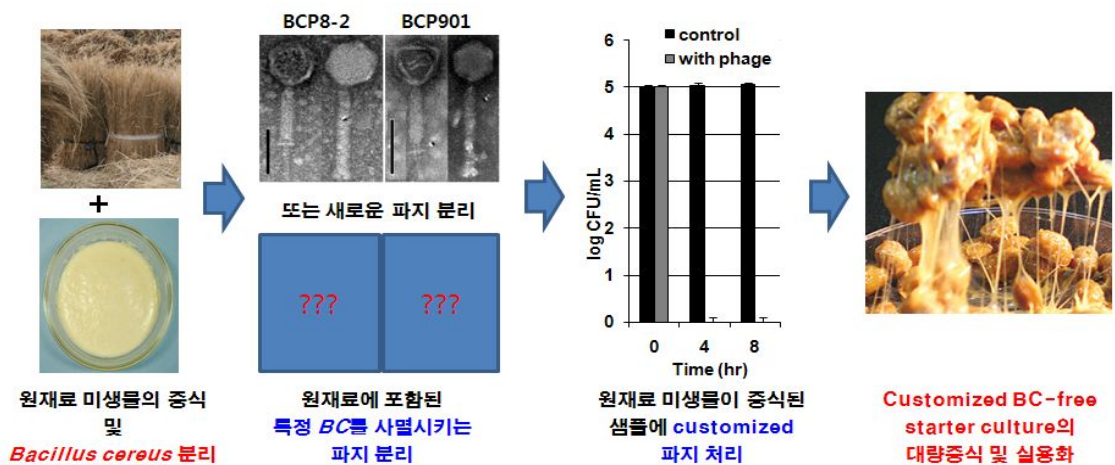


Fig. 15. Concept of customized *B. cereus*-free starter culture의 개발

(2) 결과 1 : 콩국물을 이용한 벗짚 microflora의 증식 및 파지를 이용한 *B. cereus*의 사멸

- (가) 8개 샘플들 중 1개의 벗짚 샘플에서 BCP1-1과 BCP8-2를 이용한 *B. cereus*-free starter culture를 생산하는 것이 가능했음 (Fig. 16A and 16B)
- (나) 이를 이용한 청국장 제조에서 extrapolysaccharide의 양은 파지처리군과 control군에서 비슷했음 (Fig. 16C)
- (다) 박테리오파지의 처리가 starter culture의 microflora에 미치는 영향은 미미한 수준임 (Fig. 16D)

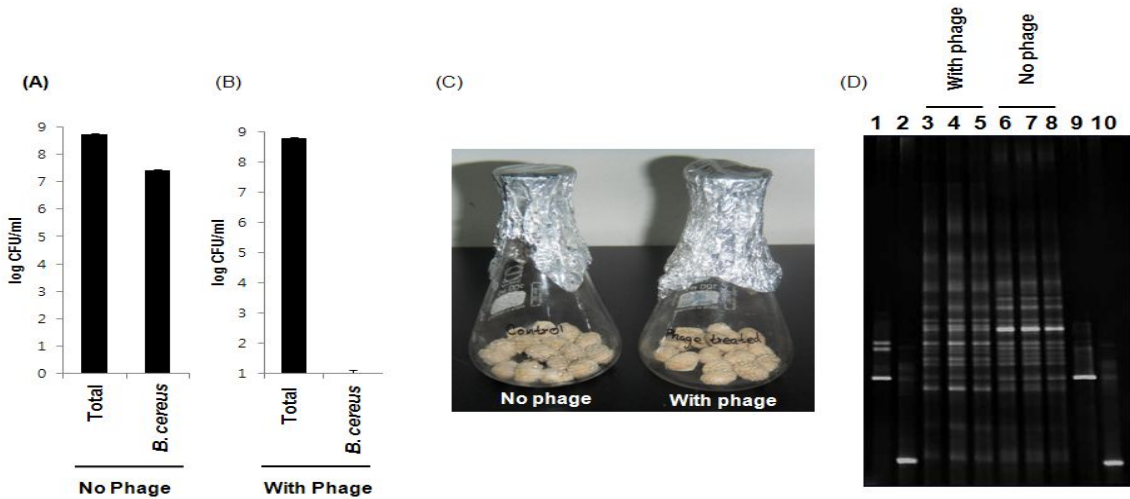


Fig. 16. 콩국물을 이용한 Customized *B. cereus*-free starter culture의 개발. (A) 벗짚으로부터 증식된 microflora에 파지를 넣지 않았을 때 총균수와 *B. cereus*의 수 (B) 벗짚으로부터 증식된 microflora에 파지를 넣었을 때 총균수와 *B. cereus*의 수, (C) 박테리오파지가 처리되지 않은 starter culture와 파지로 처리한 starter culture를 이용한 청국장 제조 (D) 16s rDNA amplification과 DGGE를 이용한 bacterial population study

(3) 결과 2. 벗짚에서 벗짚 추출물을 이용한 *B. cereus*-free natural starter culture의 개발

- (가) 벗짚 추출물 준비를 위하여 벗짚(5%)를 autoclaving 후 원심분리
- (나) 벗짚 추출물에 10% 벗짚을 넣고 10시간 증식하여 natural microflora의 증식

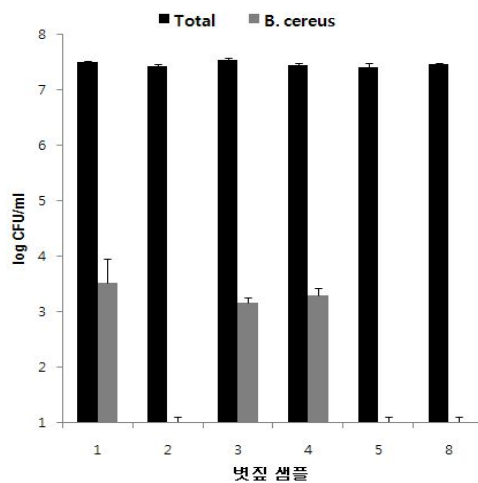


Fig. 17. 벗짚에서 벗짚 추출물을 이용한 natural microflora의 증식 및 파지 처리를 통한 *B. cereus*의 사멸

(다) 이때 박테리오파지를 처리하여 *B. cereus*의 사멸 확인 (Fig. 17)

(라) Fig. 17에서 만들어진 *B. cereus*-free starter culture 2번을 이용하여 청국장을 제조하였는데, 총균수는 영향이 없었으나, TA를 이용한 청국장에서는 *B. cereus*가 발견되지 않음 (Fig. 18)

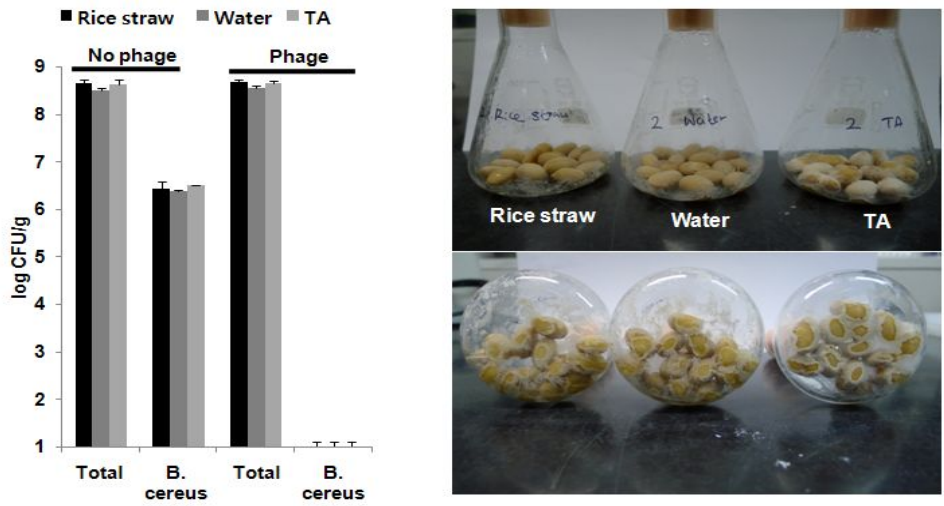


Fig. 18. Fig. 17의 sample 2번의 *B. cereus*-free starter culture를 이용한 청국장 제조 (우) 후 총균수와 *B. cereus*의 counting (좌).

(4) 결과 3. 벗짚유래 starter culture의 pyrosequencing을 통한 microflora 분석

(가) 콩국물을 이용한 starter culture의 배양(그림 16참조)액을 이용하여 microflora 분석

(나) 파지로 처리한 샘플에서 *B. cereus* group들이 제거된 것을 확인함

(다) 실험에 이용된 샘플에서 전체적인 microflora에 변화가 있을 수 있음을 확인했는데 미생물들 간의 길항 작용 등에 대한 연구가 필요할 것으로 사료됨

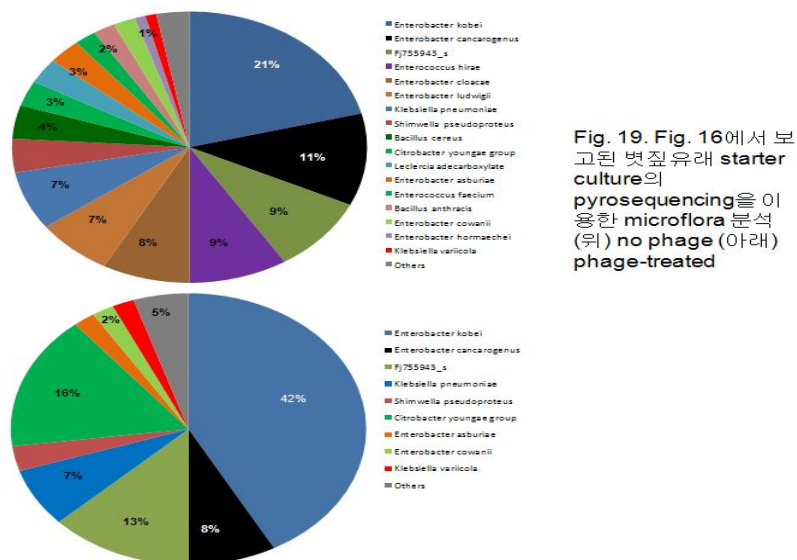


Fig. 19. Fig. 16에서 보고된 벗짚유래 starter culture의 pyrosequencing을 이용한 microflora 분석 (위) no phage (아래) phage-treated

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2009)	박테리오파지를 이용한 유해균의 제어	다양한 장류식품으로부터 박테리오파지의 분리	100	47개의 다양한 장류 샘플들에서 23종류의 박테리오파지 분리
		박테리오파지의 특성분석	100	1. 23종류의 박테리오파지들의 host range 확인 2. JBP201과 JBP701의 TEM 분석에 따른 분류 3. JBP901의 PEG precipitation과 CsCl-gradient 초원심분리를 이용한 순수분리 및 대량생산 4. JBP901 genome의 제한효소 처리에 의한 전체 genome size 분석 5. JBP901의 lysis 능력에 대한 예비실험
2차년도 (2010)	박테리오파지를 이용한 유해균의 제어	다양한 장류에서 박테리오파지 분리(계속)	100	28개의 다양한 장류 샘플들에서 15종류의 박테리오파지 분리
		박테리오파지의 특성분석(계속)	100	1. Plaque forming assay를 이용하여 다양한 세균들에서 phage의 host range 결정 2. TEM과 SDS-PAGE 분석 3. 제한효소처리를 통한 패턴분석 4. 액체배지에서 single step growth curve를 통한 burst size등의 박테리오파지에 의한 lysis 특성분석 5. 액체배지에서 lysis assay를 통한 <i>B. cereus</i> 증식 저해능 평가
		분리된 박테리오파지의 genome sequencing과 genomic analysis	100	1. 박테리오파지 genome size의 결정과 genome sequencing 2. Blast search등의 bioinformatics tool을 통한 phage genome의 분석
3차년도 (2011)	박테리오파지를 이용한 유해균의 제어	Bacteriophage biocontrol을 장류에 적용하여 그 효능을 확인	100	1. <i>B. subtilis</i> 를 이용한 청국장 발효에서 박테리오파지를 이용한 <i>B. cereus</i> 의 제어
		Customized <i>B. cereus</i> -free stater culture의 개발	100	1. 볏짚에 존재하는 natural microflora의 변함없이 <i>B. cereus</i> -free starter culture의 개발



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

#### (1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표										
	달성										
2차 년도	목표									1	
	달성								1		
3차 년도	목표						1	1			
	달성						1	1 (submitted)			
4차 년도	목표										
	달성										
5차 년도	목표										
	달성										
계	목표						1	1	1		
	달성						1	2	0		

#### (2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1			1		
	달성	0			0		

### 나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Prevalence of Bacillus cereus bacteriophages in fermented foods and characterization of phage JBP901	O (신학동, Nadeeka)	O 김광표	신은미, 유상렬	Research in Microbiology	162	국외	SCI
2011	Efficient control of Bacillus cereus by phage BCP1-1 and BCP8-2 requires divalent cations in fermented food	O (Nadeeka)	O (김광표)		Food Microbiology (Submitted)	Submitted	국외	SCI

다. 특히 성과

준비중: 박테리오파지를 이용한 볏짚 유래 starter culture 개발

## 제 6 장   참고문헌

1. Carlton et al., 2005. Regul Toxicol Pharmacol. 43:301-312
2. FDA GRAS Notice No. GRN 000198; FDA, 2006
3. Appl Environ Microbiol 2004 70: 3417-3424
4. Int J Food Microbiol 2007 115: 195-203
5. Appl Environ Microbiol 1997. 63: 2961-2965
6. Appl Environ Microbiol 1996. 62: 1133-1140
7. Antimicrob Agents Chemother 2005. 49: 111-117
9. Trends Microbiol 2005. 13: 491-496
10. Appl Environ Microbiol 2007. 73: 1992-2000
11. Syst Appl Microbiol 2007 30: 58-67
12. Food Sci Biotechnol 2008. 17: 603-607
13. Food Sci Biotechnol 2008. 17: 166-171
14. J Microbiol Biotechnol 2006. 16:639-642
15. Food Sci Biotechnol 2004: 430-433
16. Korean J Food Sci Technol 2003. 35: 998-1002
17. Food Sci Biotechnol 2001. 10: 658-662



**제6협동 : 무독성 발효균주 선발 및 기술 이전에 의한  
현장적용**

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 엄 태 봉



## 제1장 연구개발과제의 개요

식약청의 장류 제품에 대한 *B. cereus*의 정량적인 규제( $10^4$  cfu 이하/g), aflatoxin( $10\mu\text{g/g}$ , 메주)과 함께 앞으로는 biogenic amine에 대한 정량적 규제가 예상된다. 이 때문에 전통 장류 업체들도 전통적 장류 비법은 유지하되 무독소 균주의 도입과 저감화 biogenic amine 생산 균주를 쓰는 공정을 택할 수밖에 없고 이를 위한 균의 선발은 필수적이다. Aflatoxin은 *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. tamarisii*의 일부가 생산하는 2차 대사 물질로서 강한 발암특성을 가진 물질이고 *A. flavus*와 *A. parasiticus*는 *A. oryzae*나 *A. sojae*와 매우 형태적, 유전적 유사성을 가지고 있어 최근 분자 기법에 의한 분류 방법이 도입되고 있지만 아직도 이들 균들을 구별하기는 어렵다. *A. sojae*와 *A. oryzae*의 일부는 비록 실험 배지 상에서 aflatoxin을 생산하지는 않지만 aflatoxin을 합성하는 유전자 cluster를 가지고 있기 때문에 어떤 특정한 상황에서 이들 역시 aflatoxin을 생산할 수 있지 않을까에 대한 논란들이 제기되고 있다. *aflR* 유전자는 aflatoxin합성에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하며 *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. oryzae*에서 그 존재가 확인되어 있고 이들 사이의 서열 유사성은 거의 100%에 가깝기 때문에 발효균인 *A. oryzae*나 *sojae*균들에서 *aflR* 유전자가 결손된 aflatoxin 비생산 균주를 얻을 필요가 있다. 전통 장류제조는 자연 발효 방법상 항상 곰팡이 유해균에 노출되며 이들 균의 성장에 따른 독소 생산 가능성이 높기 때문에 전통 발효 식품도 무독성 균주의 단일 또는 혼합 접종을 통해 aflatoxin 생산 가능성을 없애는 것이 반드시 필요한 실정이다.

Biogenic amine은 인간에 생리적인 약리 효과로 영향을 주기 때문에 장류 제품의 위생적인 관점에서 최소화하는 것이 중요하다. 2006년 부산식약청에서 발표한 우리나라 식품에서 biogenic amine의 함량을 조사한 결과를 보면 전통 된장이 가장 많았고 그 뒤로 멸치 젓갈, 까나리 젓갈, 젓갈, 간장, 김치 순으로서 국민이 하루 섭취하는 biogenic amine양을 따졌을 때 장류로부터 섭취량이 가장 높았다. 이러한 점에서 장류내에 biogenic amine함량의 저감화는 국민 건강에 필수적인 요소로서 이의 저감화를 위한 방법들이 개발될 필요가 있었다. Biogenic amine은 발효 동안 amino acid decarboxylase를 생산하는 발효세균, 발효 효모, 발효 곰팡이로부터 유래하며 이들은 species-specific 이 아닌 strain-specific하다는 것이 알려져 있다. 이를 위해 우리는 strain-specific한 특성을 고려하여 장류에서 이들 biogenic amine을 생산하니 않은 strain을 선발하고 나아가 biogenic amine을 분해까지 하는 strain을 찾고자 하였다.

## 제2장 국내외 기술개발 현황

식품에서 biogenic amine 생성 및 분해에 관한 미생물 연구는 cheese, wine, sausage를 대상으로 수행되었다(1-18). 연구 방향은 biogenic amine의 분석법, biogenic amine생성 균들의 탐색, biogenic amine 분해 균들의 탐색 연구로 나누어 볼 수 있다. 이들 연구를 위해 PCR, colony lift hybridization, real-time PCR들을 이용한 amino acid decarboxylase gene을 가지는 strain들의 확인과 2차원 TLC 및 HPLC, biogenic amine들을 선택적으로 확인할 수 있는 배지의 개발 등과 같은 high throughput screening 기법들이 발표되었다.



### 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1절 재료 및 방법

##### 1. 항 *Bacillus cereus* 증식 억제능을 보이는 균주들의 분리

전국적으로 수집한 150종의 장류로부터 (1)Nutrient agar와 *B. cereus* 선택배지에서 동시 배양 후 1차 선발 (2) (1)에서 분리한 균주들 중 고점도 polyglutamate를 생산하는 균주 확인 (3) (2)에서 선발한 균주들 중 tyramine과 histamine생산하지 않는 균주 분리 (4) (3)에서 분리한 균주들 중 PCR을 통해 무독소 생산 균주의 분리과정을 통해 최종적으로 57종의 균주를 분리하였다. 16S rRNA 서열 분석을 통해 동정된 균들의 발효 균 특성은 아래와 같다.

등록번호	Identification (by 16s rRNA)	BC <sup>1</sup> 선택배지	발효 후 점질물질 생성	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>cytK</i>	<i>cesB</i>	Biogenic amine <sup>2</sup>
SCC 115011	<i>B. subtilis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCC 115012	<i>B. subtilis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 121013	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 111014	<i>B. subtilis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 125015	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 125016	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 123017	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 123018	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 123019	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 123020	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 123021	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 122022	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 112023	<i>B. subtilis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCD 112024	<i>B. subtilis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCC 122025	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCC 122026	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
SCC 122027	<i>B. licheniformis</i>	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	nd

SCD 122028	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 122029	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCD 115030	<i>B. subtilis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 124031	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 123032	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 121033	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 121034	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 121035	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 125036	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 125037	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 125038	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 124039	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 124040	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 124041	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 124042	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 124043	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCD 121044	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCD 121045	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 124046	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 124047	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCD 123048	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCD 123049	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>
SCC 123050	<i>B. licheniformis</i>	—	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>nd</i>

2. *Bacillus cereus* 증식 억제능을 가지는 *Bacillus licheniformis* SCK 121057의 분리 및 특징

*B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*와 함께 *Bacillus* subgroup I 에 속하는 Gram 양성균인 *B. cereus*는 토양 및 공기 부유 미생물로서 전통 장류 제조 시 쉽게 오염되어 구토형 독소인 cereulide와 설사나 장염을 일으키는 독소인 non-hemolytic enterotoxin (Nhe), hemolytic enterotoxin (Hbl), cytotoxin K (CytK)를 분비한다. 이들 중 D-형 아미노산을 함유하며 cyclic peptide의 구조를 가지는 cereulide는 단백질로 구성된 설사 독소들과는 달리 열이

나 단백질 가수분해에 대해 강한 저항성을 가지고 있다. *B.cereus*의 설사 독소 유전자는 염색체 상에 위치하는 반면 구토형 독소 유전자는 플라스미드에 위치하기 때문에 *B. cereus*는 구토 및 설사를 동시에 일으키는 종과 설사만 일으키는 종으로 구분할 수 있다. 설사형 독소 균주의 경우 외부 환경에 따라 전사 조절 단백질인 phospholipase C regulator (PlcR)가 전사인자인 PapR과 결합하여 독소 발현량을 조절 하기 때문에 발효 상태에 따라 독소 분비량은 달라진다(4).

이에 따라 한국식품의약품안전청(KFDA)은 식품 안전성 확보를 위해 2007년부터 된장, 고추장, 청국장, 춘장을 포함하는 모든 시판 장류 제품에서 허용 *B. cereus* 균 수를  $1 \times 10^4$  CFU/g 이하로 고시하였다. 그러나 *B. cereus*는 자연계에 흔할 뿐 아니라 포자를 형성하여 열에 잘 견디고 장류에서 잘 자라기 때문에, 위해 요소 중점 관리 제도(HACCP)가 정착되지 않은 대부분의 전통 장류 제조업체에서는 KFDA가 정한 *B. cereus* 균수 상한선을 맞추기가 어려운 상황이다. *B.subtilis*와 *B. licheniformis*는 장류 발효에서 가장 중요한 역할을 하는 세균이며, 이들 중 일부 균주들은 다양한 종류의 계면 활성제나 향생물질들을 생산하여 경쟁 관계에 있는 주위 균들의 증식을 저해하는 것으로 보고되고 있다(5, 7, 10, 12, 15). *B.subtilis*의 bacitracin, surfactin, iturins, *B.licheniformis*의 lichenysin, lichenicidine 등은 이와 같은 펩타이드계 저분자 물질로서 항세균 또는 항진균 특성을 나타낸다(1, 2, 6, 12, 14, 15). 우리는 전통 장류에서 *B. cereus* 계수 모니터링 동안 일부 제품에서 *B. cereus* 균수가 매우 낮다는 것을 발견했다. 이는 *Bacillus* 속들끼리 서로 길항적으로 작용하여 *B. cereus*에 대한 항균 능력이 있는 균의 우세 때문일 것으로 생각할 수 있기 때문에 이들 장류에서 *B. cereus*를 억제하는 발효균들의 분리를 시도하였다.

본 연구는 전통 장류의 발효 시 문제되는 독소 생산 *B. cereus* 균의 증식을 효율적으로 억제하는 균들을 분리하고 그 특성을 조사한 뒤, 장류 생산에 적용함으로써 *B. cereus*가 없는 무독성 전통 장류를 생산하는데 그 목표를 두었다.

### 3. *B. cereus* 길항균의 분리

전통 방법에 따라 제조한 150종의 된장 고추장, 청국장들을 구입 후 5 g을 취해 0.3 mM 인산 완충액(pH 7.2)으로 희석하였다. Nutrient Agar (NA)와 *B. cereus* 선택 배지(chromogenic polymyxin B-methoprim agar (CPMA)) 표면에 희석된 균액을 각각 200  $\mu$ l씩 도포하고 30°C에서 24시간 배양 후, NA에서 자란 집락수에 비해 CPMA에서 자란 집락수의 비율이 매우 낮았던 12종의 장류를 선발하였다. NA에서 배양한 이 선발 장류의 집락들을 toothpick으로 찍어 미리 만들어둔 NA와 CPMA 배지의 같은 위치에 각각 접종하여 24시간 후 CPMA에 자라지 않은 균들만을 수집하였다. 수집한 균들을 대상으로 윤 등의 방법(16)에 따라 *B. cereus* 독소 유무 검사를 한 뒤, 선발한 균들을 Nutrient broth (NB)에 37°C, 78시간 배양하고 1,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 모아 -20°C에 보관하였다.

표준 균주인 *B. cereus* KACC 11240과 본 실험실에서 분리한 *B. cereus* JBE 0001 (GenBank accession no. FJ 982655), JBE 0002 (FJ 982656), JBE 0004 (FJ 982654), JBE 0005 (FJ 982657), JBE 0006 (FJ 982658) JBE 0008 (FJ 982659), JBE 0011 (FJ 982661)을 NB에서 37°C, 21시간 배양 후 100  $\mu$ l를 각 NA 표면에 골고루 spreading하고 배지 중앙에 4 mm paper disc(3M filter paper)를 올려놓았다. 냉동 보관했던 원심분리 상층액을 녹여 paper disc 중앙에 20  $\mu$ l를 분주하고 21시간 37°C로 배양 뒤 투명한 크기를 측정하여 8 종의 *B. cereus* 모두에 대해 길항 능력을 가진 한 종(SCK 121057)을 분리하였다.

#### 4. 실험균들의 배양과 길항력 측정 방법

*B. cereus*, *B.l. licheniformis*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* 배양은 Nutrient broth (NB) 배지, *B. cereus* 검출은 CPMA, *Lactobacillus brevis*와 *Enterococcus faecalis* 배양은 각각 *Lactobacilli* MRS broth와 Trypticase soy broth, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*는 Potato dextrose broth, *Candida albicans*는 Yeast extract broth를 사용하였다. 사용한 균주들은 *B. cereus* JBE 및 *B. licheniformis* SCD strain들을 제외하고 표준 균주(type strain)이었으며 JBE 및 SCD strain들은 순창장류연구소가 수집하여 16S rRNA 유전자 서열 판독 후 계통도 분석과 46 종류의 생화학적 검사에 의해 동정된 균주들이었다. 배양온도로 *A. ochraceus*는 25°C, *L. brivis* 28°C, *Aspergillus* 및 *C. albicans*는 30°C, 나머지 균주들은 37°C에서 배양하였다. 이들 균주 증식에 대한 SCK 121057 균의 길항력은 각 균의 최적 온도에서 배양한 뒤 paper disc 주변의 투명화 직경으로 표시하였다.

##### 마. *B. cereus* 길항균의 동정

생화학적 동정을 위해 균을 새로운 NA 배지에 접종하고 37°C에서 18 시간 배양하였다. 형성된 집락은 NA 배양액에 희석 후 46종 건조 배지 및 생화학 반응물로 구성된 BCL ID card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, USA)에 주입하였고, 15분 간격으로 결과들이 VITEK 2 Compact software (bioMérieux Vitek)에 통합적으로 저장 분석되면서 14시간 후 동정이 완료되었다.

16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 균 동정을 위해 universal primer로서 518F(5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3')와 800R(5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')을 이용, 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭 후, 동정에 중요한 50-900 bp 염기 서열을 포함하는 1,443 bp를 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하여 해독하였다. 이 염기 서열은 NCBI database로부터 BLASTN program(17)과 Ribosomal Database Project 10.10(RDP)의 Seqmatch program (version 3)을 사용하여 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들과 상동성을 비교하였다. 표준 균주와 함께 16S rRNA 유전자 서열과 높은 서열 일치도를 보인 균주들 중 게놈 프로젝트를 통해 균주 동정에 대한 신뢰성이 확인된 균주들도 함께 사용하였으며 염기 서열들 간의 상호 비교는 CLUSTALW 프로그램(13)을 사용하였다. 계통도는 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 시각적 관찰과 수작업으로 gap이 최소화되도록 보정한 후 Kimura's two-parameter method(8)와 maximum parsimony method를 사용하여 작성하였다. 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 산출하기 위해 Bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며 계통 분석과 bootstrap 분석은 PAUP (version 4.0b)을 사용하였다(11).

#### 5. SCK 121057균의 독소 및 항균물질 유전자 유무

SCK 121057균이 *B. cereus*의 설사독소유전자(*nheABC*, *hblACD*, *cytK*) 또는 구토 독소 합성 효소 유전자(*cesA* 및 *cesB*)를 갖는가를 확인하기 위하여 윤 등의 방법(3)에 따라 multiplex PCR을 실시하였다. Cereulide 합성 효소 유전자 *cesA*, *cesB* 및 설사독소들을 발현시키는 전사 조절 유전자 *plcR*-*papR* 검출용 primer 서열들은 Table 1과 같고, PCR 조건으로 94°C에서 2분간 초기 변성 후, 94°C 1분간 변성, 58°C 1분간 결합, 72°C 1분간 증폭 과정을 30회 반복하고 72°C에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다. 항균물질 유전자 유무를 확인하기 위해 *B.*

*licheniformis*의 lichenysin 합성 효소 유전자인 *lchAA*, *lchAB*, *lchAC*와 lantibiotic 수식 효소 유전자인 *licM1*, *licM2*, *B. subtilis*의 surfactin 합성 효소 유전자 *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*를 선택하여 PCR을 수행하였다. 사용한 primer 서열들은 Table 1과 같고, PCR 조건은 94°C에서 2분간 초기 변성 후, 94°C 1분간 변성, 60°C 1분간 결합, 72°C 1분간 증폭 과정을 30회 반복하고 72°C에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다.

Table 1. The PCR primers used in this study.

Primer pair	Sequence	Target sequence (GenBank accession no)	Size (bp)
cesAF cesAR	GTTGGCGTGTTATGTGATCG GGTGAAACAGCTTCTCCTGC AAAGAATGTTTCACCGAAGAC	Cereulide synthetase A, <i>cesA</i> (AB248763)	662
cesBF cesBR	GGTT ACACACTTCTTTTCCGATTCC ACCT	Cereulide synthetase B, <i>cesB</i> (AB248763)	1161
plcRF plcRR	CRGGYGCRGTATAACCCAAGT TGAAATACCCCATGYCATYG	Phospholipase C regulatory protein, <i>plcRpapR</i> (DQ153391)	888
lchAF lchAR	ACGGCCGATCAGGAGCTTTC TCTCAGCGCCTTCGATCTGC	Lichenysin synthetase, <i>lchAA</i> (AJ005061)	557
lchBF lchBR	TTTGACCCGAGCTCGTTGA CTGAGGGCGGAAAGCAGGAT	Lichenysin synthetase, <i>lchAB</i> (AJ005061)	706
lchCF lchCR	CATGTATACGGGCCGACGGA CTGAAGGCCGAGATGGCTT	Lichenysin synthetase, <i>lchAC</i> (AJ005061)	1173
lanM1F lanM1R	TCGCTGACCACCGAGGAAAA CGCTTTCTGCATGGTCCCAG	Lantibiotic modification enzyme1, <i>licM1</i> (NC006270)	571
lanM2F lanM2R	CGACAGCGCACTACGCTCT TCCCGCATGCTGCAGAAAAT	Lantibiotic modification enzyme2, <i>licM2</i> (NC006270)	776
srfAF srfAR	CAGCGGCAGCGGATTAAATG GGCCTTCAAAAATCGCCTGCT	Surfactin synthetase A, <i>srfAA</i> (NC000964)	1,025
srfBF srfBR	CGGTGTGTCATGGCGGATTT TCGAAAGCGGACGGTTCAAA	Surfactin synthetase AB, <i>srfAB</i> (NC000964)	696
srfCF srfCR	TTCACTGTTCGGAGGCGGAAA ACCGGCAGATAGGCTGCTCC	Surfactin synthetase AC, <i>srfAC</i> (NC000964)	933

## 6. 주사전자현미경(SEM)에 의한 길항 작용의 확인

37°C에서 21시간 배양한 *B. cereus* JBE 0006 배양액 1 ml에 동일 조건에서 배양한 SCK 121057의 원심분리 상층액 2 ml을 넣고 37°C에서 8시간 더 배양시켰다. 배양액을 1,000 rpm에서 3분간 원심 분리 후 상등액을 제거하고 9% NaCl로 2번 pellet을 세척한 뒤 2.5% glutaraldehyde 1차 고정, 1% osmium tetroxide 2차 고정, ethanol 탈수과정을 거쳤다. 고정 탈수된 균을 membrane filter (0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore JG)에 옮기고 80°C에서 10시간 건조시킨 뒤 ion sputter로 20분 간 금(Au)을 코팅시켜 주사전자현미경(Bio-LV SEM, Hitachi, Japan)에서 관찰하였다.

## 7. 장류 적용 실험

37°C, 21시간 배양한 *B. cereus* JBE 0008 배양액 0.1 ml과 동일 조건에서 배양한 SCK 121057 배양액 0.9 ml을 섞어 미리 멸균한 삶은 콩에 접종하고 47°C, 50시간 배양하여 청국장을 제조하였다. 대조군은 *B. cereus* JBE 0008 배양액 0.1 ml과 NB 0.9 ml을 넣고 같은 조건에서 청국장을 제조하였다. 발효한 청국장을 상온(22-24°C)으로 옮겨 날짜 별로 일정량 콩을 꺼내 NB에 희석한 뒤, CPMA 표면에 희석액 100  $\mu\text{l}$ 를 도포하여 *B. cereus* 집락수를 측정하였다.

## 2절 결과 및 고찰

### 1. SCK 121057의 동정 및 특성

NA 에서 배양 후 형태는 백색의 집락 주위로 반투명의 광택 환을 형성하였다(Fig. 1A). 균을 1,500 x 배율의 광학 현미경하에서 관찰하였을 때 움직임이 매우 활발하였고 Gram 염색에서 양성을 나타냈다. 10,000 배로 확대한 주사전자현미경(SEM) 관찰 결과 균의 형태는 간균으로 0.7-0.8  $\mu\text{m}$  x 2.2-4.0  $\mu\text{m}$ 의 크기를 보였으며 편모들을 가진 것이 확인되었다(Fig. 1B). 46 종류의 생화학적 검사 결과를 Vitec 2 Compact Software에서 분석한 결과 91%의 확률로 *B. licheniformis*로 분류되었다(Table 2), 계통도 분석 결과 SCK 121057은 표준 균주인 *B. licheniformis* DSM 13과 가장 가까운 근연 관계로 16S rDNA 유전자 서열 상동성은 99.72%(1439 bp/1443 bp)였다(Fig. 2). 따라서 생화학 분석과 계통학적 분류를 고려하여 SCK 121057을 *B. licheniformis*로 동정하였다.

Table 2. Biochemical characterization for the identification of the strain SCK 121057.

Test	Reaction	Test	Reaction
β-Xylosidase	-	Phenylalanine arylamidase	+
L-Lysine arylamidase	-	L-Proline arylamidase	-
L-Aspartate arylamidase	-	β-Galactosidase	+
D-Mannose	+	L-Pyrrolydonyl arylamidase	+
D-Melezitose	-	α-Galactosidase	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	Alanine arylamidase	+
Palatinose	+	Tyrosine arylamidase	+
L-Rhamnose	-	β-N-Acetyl-glucosaminidase	-
β-Glucosidase	+	Ala-Phe-Pro arylamidase	-
β-Mannosidase	-	Cyclodextrin	+
Phosphorylcholine esterase	+	D-Galactose	-
Pyruvate	-	Glycogen	+
α-Glucosidase	+	Myoinositol	+
D-Tagatose	-	Methyl-α-D-glucofuranose	+
D-Trehalose	+	Ellman	+
Inulin	-	Methyl-D-xylosidase	-
D-Glucose	+	α-Mannosidase	-
D-Ribose	-	Maltotriose	+
Putrescine assimilation	-	Glycine arylamidase	-
Growth in 6.5% NaCl	+	D-Mannitol	+
Kanamycin resistance	+	Esculin hydrolase	+
Oleandomycin resistance	-	Tetrazolium red	+
Leucine arylamidase	+	Polymyxin B resistance	+

<sup>a</sup>NA, Nutrient agar; TSA, Trypticase soy agar; MRS, *Lactobacilli*MRSagar; PDA, Potato dextrose agar; YEA, Yeast extract agar.

<sup>b</sup>The bacteria and fungi were grown on agar plates for 18–21 h and 4 days, respectively.

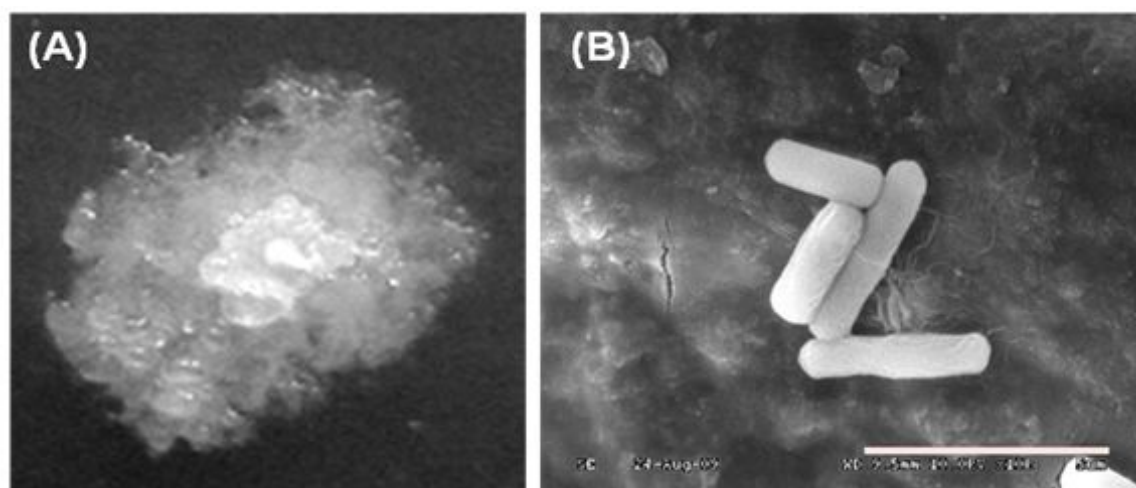


Fig. 1. (A) Colony morphology and (B) scanning electron micrograph of the strain SCK 121057.

NJ

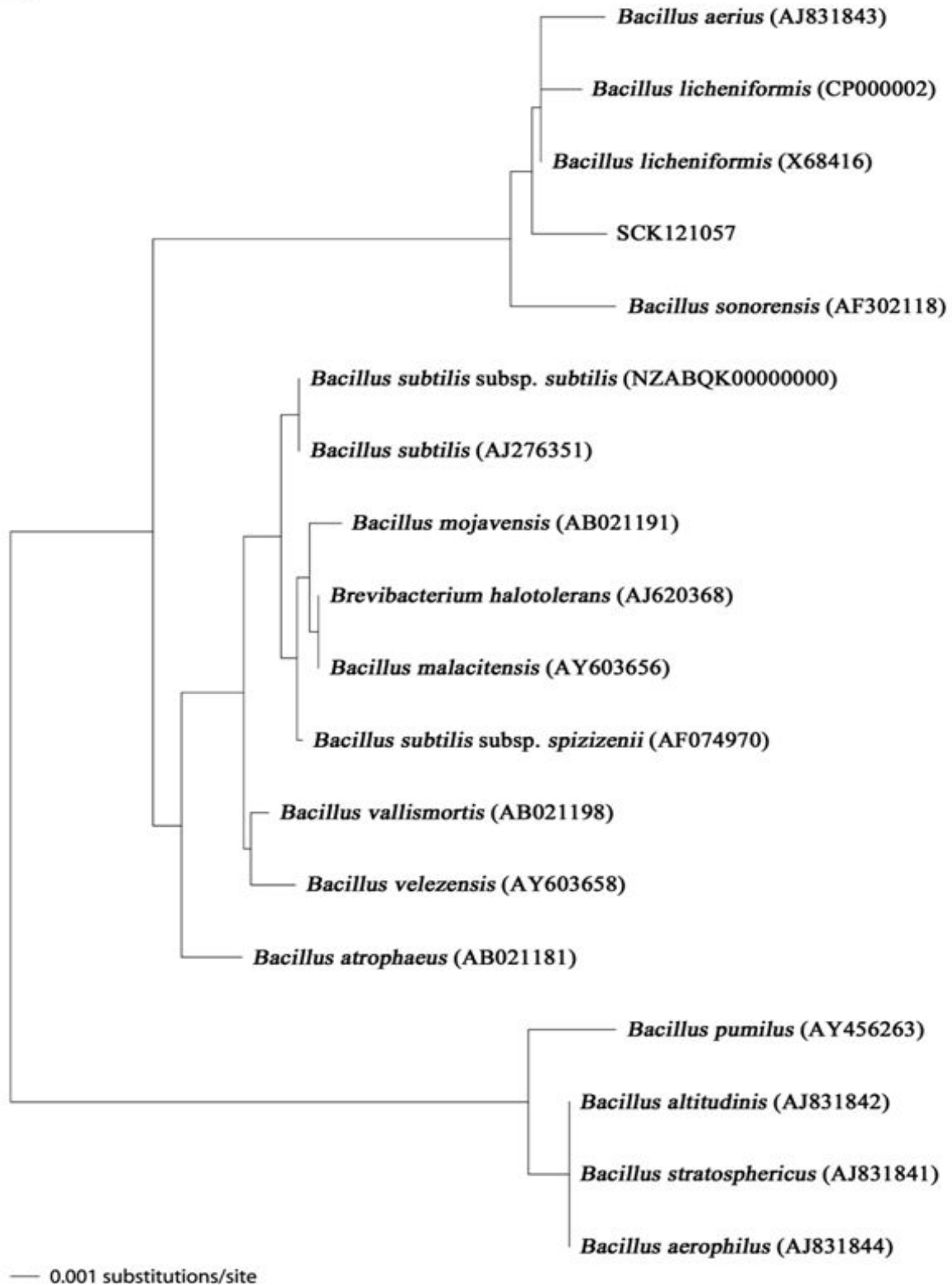


Fig. 2. Neighbour-joining tree based on 16S rRNA sequences (1,443 bp), showing the phylogenetic relationship between the strain SCK 121057 and closely related species of *Bacillus*. Bar, 1 substitution per 1,000 nucleotides.

>121057 1 1443

ACGAACGCGGGCGGCGTGCCTTAATACATGCAAGTCGAGCGGACGGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGG  
TGAGTAACACGTGGGTAAC



CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAA  
 AGGTGGCTTTTAGCTACCAC  
 TTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG  
 GGTGATCGGCCACACTGGGA  
 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCC  
 GCGTGAGTGATGAAGGTTTT  
 CGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAA  
 GCCACGGCTAACTACGTGCCA  
 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT  
 GATGTGAAAGCCCCGGCTC  
 AACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGC  
 GTAGAGATGTGGAGGAACACC  
 AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
 TAGTCCACGCCGTAACGAT  
 GAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCG  
 AAGACTGAAACTCAAAGGAA  
 TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC  
 TCTGACAACCTAGAGATAG  
 GGCTTCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
 CAACGAGCGCAACCCTTGAT  
 CTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC  
 ATCATGCCCTTATGACCTG  
 GGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAG  
 TTCGATCGCAGTCTGCAAC  
 TCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGGCTTGTACACACC  
 GCCCGTCACACCACGAGAGT  
 TTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCC

<Bacillus cereus 성장 저해능을 보인 SKK121057균의 16S rRNA 유전자내 1,443 bp 염기서열>.

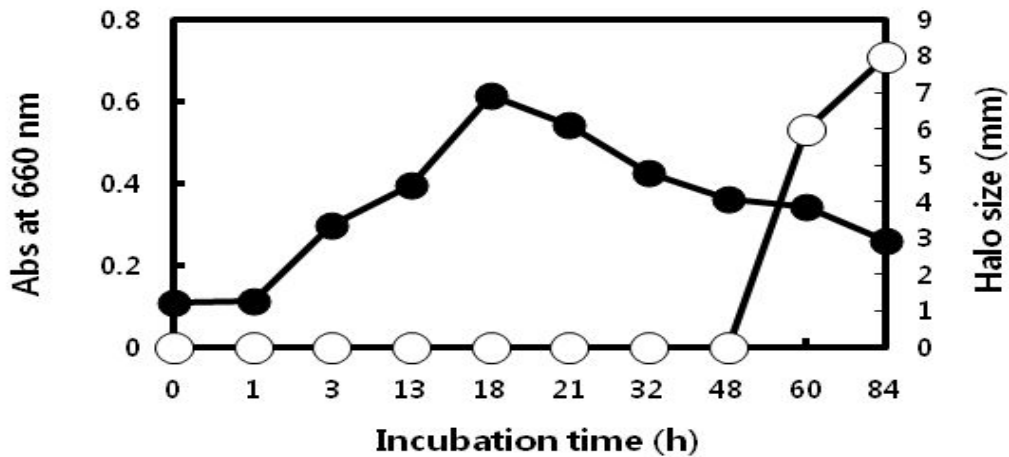
Toxin gene								
<i>NheA</i>	<i>NheB</i>	<i>NheC</i>	<i>HblA</i>	<i>HblC</i>	<i>HblD</i>	<i>BcET</i>	<i>CK</i>	<i>CES</i>
—	—	—	—	—	—	—	—	—

<Bacillus cereus 성장 저해능을 보인 SKK121057균의 B. cereus독소 유전자 함유 유무>

## 2. SKK 121057 배양 중 항균 물질 생성

Fig. 3은 SKK 121057균을 NB 배지에서 37°C로 배양했을 때 배양 시간에 따른 성장 곡선과 항균 물질의 생성을 나타낸 것이다. 균 증식은 배양 후 18시간에 최대에 도달하였지만 항균 물질 생성은 48시간 이후부터 급격히 증가하여 90-100시간 이후부터는 일정한 활성을 보였다. 미생물 증식 과정 중 사멸기에 이르러 항균 물질 방출이 시작된 점과, *B.subtilis*가 생산하는 항균 물질인 surfactin 생성과 포자 형성 개시는 서로 연관이 있다는 보고(9)를 고려할 때, 이 항균 물질 생성은 영양 물질의 고갈 또는 포자 형성과 관련되어 있는 것으로 추정되었다. 항균력을 나타내는 투명한 직경은 27°C에서 82 시간 배양 시 5.5 mm, 37°C에서 8 mm, 47°C에서 4 mm로서 37°C의 배양 조건이 항균 물질 생산에 적합한 온도였다.

Fig. 3 Growth curve of the strain SKK 121057 and the production of antimicrobial agents



at various incubation times. Dark circles and open circles indicate growth curve and halo size indicating antimicrobial activities, respectively.

### 3. 항균 물질의 특징

항균 물질의 물리화학적 특성을 알기 위하여 온도에 의한 영향과 가수분해 효소의 반응성을 조사하였다. 배양액(pH 8.6 $\pm$ 0.2)을 37 $^{\circ}$ C에서 3 개월 간 밀봉 저장한 후 항균 활성력은 밀봉 전과 동일하였다. 또한 배양 상등액을 121 $^{\circ}$ C에서 10 분간 고압 멸균한 뒤 항균 활성은 멸균 전과 차이가 없었고, 배양액 ml 당 400 U의 proteinase K를 넣고 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후의 항균 활성도 비 처리군과 같았다(Fig. 4).

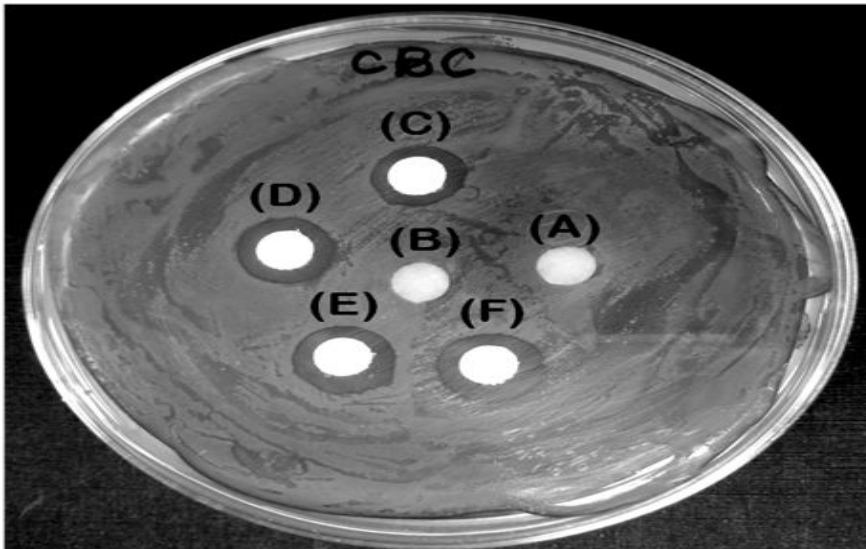


Fig. 4. Antimicrobial activity of culture filtrate of the strain SCK 121057 against *B. cereus* JBE0008. (A) Distilled water; (B) proteinase K solution (8U in 20 $\mu$ l DW) incubated at 50 $^{\circ}$ C for 30 min.; (C) culture filtrate without treatment; (D) culture filtrate incubated at 50 $^{\circ}$ C for 30 min.; (E) culture filtrate treated with proteinase K (8 U in 20  $\mu$ l culture filtrate) at 50 $^{\circ}$ C for 30 min.; (F), culture filtrate autoclaved at 121 $^{\circ}$ C for 10 min. Amount of loaded sample on the paper disc was 20  $\mu$ l.

대표적 장류 발효균인 일부 *B. subtilis*은 200  $\mu$ M의 농도에서 적혈구 용혈 작용을 가지는 계면 활성제인 surfactin을 비롯한 다수의 bacteriocin을 생산하며 일부 *B. licheniformis*는 lichenysin 이외 항진균 및 항세균 특징을 가지는 lichenicidine과 bacteriocin들을 생산한다. Cyclic lipopeptide 구조를 가진 *B. subtilis* surfactin (MW 1.036 kDa)과 *B. licheniformis* lichenysin A(MW 1.006-1.034 kDa)는 구조 내 protease 저항성을 나타내는 D-형 아미노산과 cyclic peptide로 구성되어있어 protease 저항성을 가지며, *B.licheniformis*가 생산하는 peptide 항생제인 lichenicidin의 경우 100°C에서 4시간 저장이나 protease K처리 후에도 활성을 잃지 않았다고 보고되었다(2). 이 물질의 열 저항성과 protease저항성이 *B. licheniformis*가 생산하는 lichenysin이나 lichenicidin, 또는 *B. subtilis*의 surfactin의 물리화학적 특성과 유사하였으므로 SCK 121057균이 이들 합성 효소 유전자나 수식 효소 유전자들을 가지는지 확인하고자 PCR을 수행하였다. 양성 대조균으로 사용한 *B. licheniformis* SCD 112023는 lichenysin A 합성 효소 유전자 *lchAA*, *lchAB*, *lchAC* 및 lichenicidine 수식 효소 유전자인 *licM1*, *licM2*,와 surfactin 합성 효소 유전자 *srfAA*, *srfAb*, *srfAC*를 모두 함유했던 반면(Fig. 5A), SCK 121057에서는 이들 유전자들 어느 것도 검출되지 않았다(Fig. 5C). 또한 SCK 121057은 *B. cereus*의구토독소합성효소유전자 $cesA$ ,  $cesB$ 와 설사독소전사조절유전자인 $plcR$  및  $papR$ 도 함유하지 않아 *B. cereus* 장독소들 역시 생산하지 않음을 알 수 있었다(결과 미제시). SCK 121057의 항균 물질은 앞으로 구조 분석이 필요하지만 저장 보존성과 매우 높은 열 안정성, 비특이적 protease에 의해 분해되지 않는 것으로 볼 때 일반 단백질의 성분이 아닌 D-형 아미노산이 포함되거나 cyclic form으로 된 peptide 계열 물질, 또는 저분자의 비 단백질 계통의 화학 물질로 추정되었다.

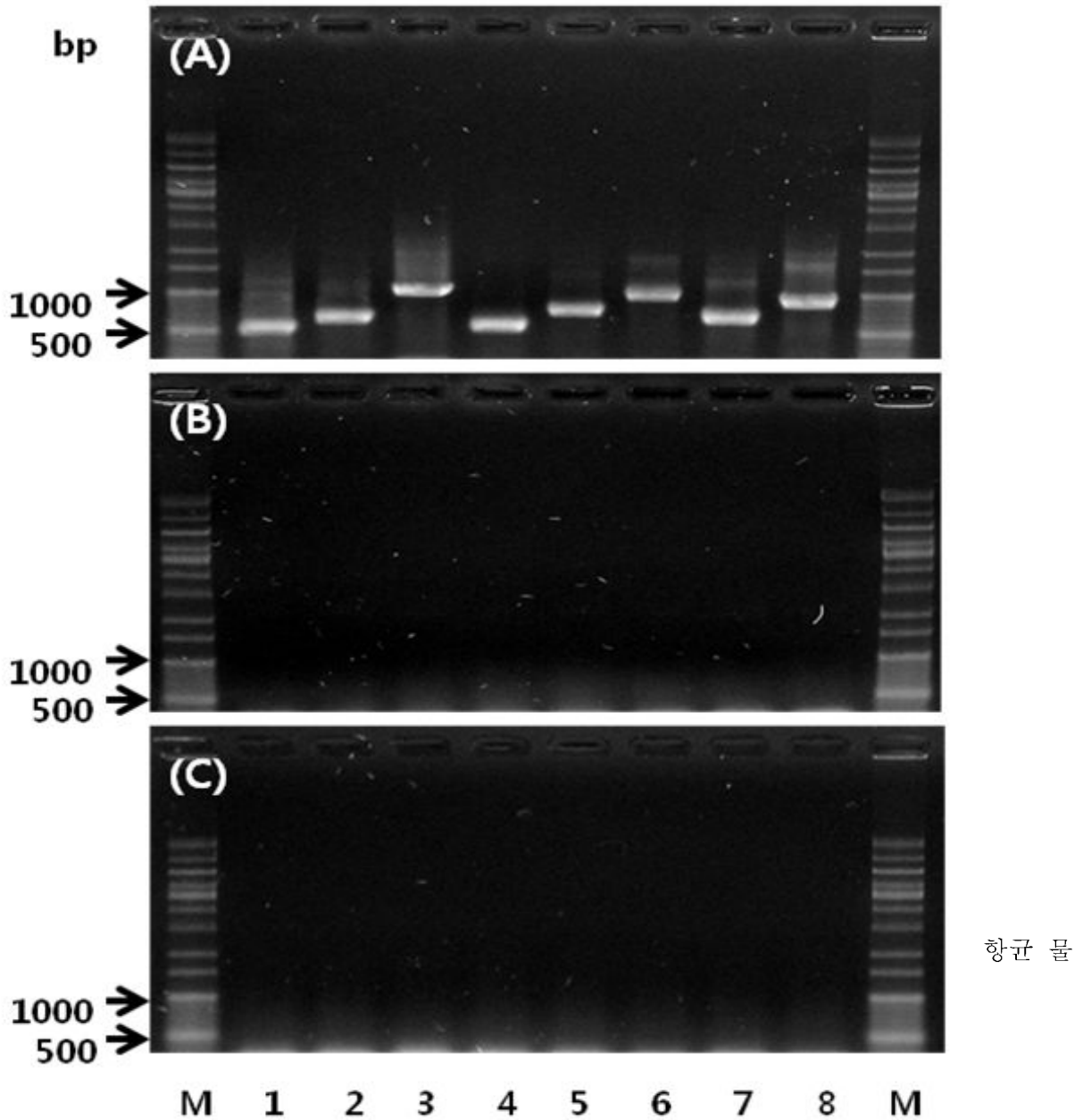


Fig. 5. Gel electrophoresis of PCR products for the detection of lichenysin synthetase A, B, and C genes (lanes 1 to 3), lantibiotic modification enzyme 1 and 2 genes (lanes 4 to 5), and surfactin synthetase A, B, and C genes (lanes 6 to 8). (A) *B. licheniformis* SCD 112023 as a positive control. (B) *B. licheniformis* SCD 112028 as a negative control. (C) The strain SCK 121057.

#### 4. SCK 121057의 항균 spectra

SCK 121057균의 병원성 세균 및 곰팡이에 대한 항균 효과는 Table 3에 요약되어 있다.

Table 3. Antimicrobial activities of the strain SCK 121057 against bacteria and fungi

Test strain	Halo (mm)	Culture condition <sup>a,b</sup>
<i>B. cereus</i> KACC 10001	11-14	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> KACC 10004	10-11	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> KACC 11240	12-14	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> KACC 12672	7-9	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> KACC 12682	12-15	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0001	7-9	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0002	11-13	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0004	15-19	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0005	6-8	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0006	13-17	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0008	7-8	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0011	10-11	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> KCTC 1918	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 121033	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 121035	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 122037	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 123021	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 124031	0	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KCTC 1021	8-9	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KCTC 1107	10-11	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KCTC 1326	9-10	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KACC 11974	9	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KACC 12610	9-10	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KACC 12680	6-7	NA, 37°C
<i>E. coli</i> KACC 13821	11-13	NA, 37°C
<i>E. faecalis</i> KACC 11304	7	TSA, 37°C
<i>M. luteus</i> KACC 13377	10-11	NA, 37°C
<i>L. brevis</i> KACC 11433	7-8	MRS, 28°C
<i>P. aeruginosa</i> KACC 10259	0	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> KACC 10778	11-12	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC1621	10-11	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC1916	10-11	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC1927	11-12	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC3881	8-9	NA, 37°C
<i>A. flavus</i> KACC 41403	14-15	PDA, 30°C
<i>A. flavus</i> KACC 41809	9-10	PDA, 30°C
<i>A. flavus</i> KCTC 6134	16-17	PDA, 30°C
<i>A. flavus</i> KCTC 6905	9-11	PDA, 30°C
<i>A. flavus</i> KCTC 16682	9-10	PDA, 30°C
<i>A. fumigates</i> KACC 41186	0	PDA, 30°C
<i>A. ochraceus</i> KACC 40077	10	PDA, 25°C
<i>A. parasiticus</i> KACC 40074	15-16	PDA, 30°C
<i>A. parasiticus</i> KACC 41862	11-12	PDA, 30°C
<i>A. parasiticus</i> KCTC 6598	15-16	PDA, 30°C
<i>C. albicans</i> KACC 30062	0	YEA, 30°C

표준 균주들과 전통 장류에서 분리한 *B. cereus* 12종을 대상으로 한 증식 억제 효과에서, 저해 정도에 차이는 있었으나 12 종 모두 SCK 121057의 항균 물질에 의해 저해를 받았다.. 이

러한 점을 고려할 때 장류 발효 균으로 SCK 121057과 같은 *B. cereus* 저해균의 사용은, HACCP 시스템의 도입이 어려운 장류 업체에서 오염 문제를 해결할 수 있는 효과적 대안으로 여겨진다. 장류 주요 발효 균주들인 *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 각 6종을 대상으로 저해 효과를 확인한 결과 *B. licheniformis*에 대해서는 전혀 증식저해를 보이지 않았으나 *B. subtilis*들에 대해서는 모두 증식이 억제되었다. 따라서 SCK 121057균을 장류 주 발효균으로 사용할 경우 *B. subtilis*들은 증식 저해 때문에 발효과정에 효과적으로 관여 못할 것으로 예상되었다. 이 항균 물질은 또한 효모인 *Candida albicans*를 제외하고 곰팡이들에 대해 항진균 특성을 나타냈는데, ochratoxin A 생산균인 *A. ochraceus*와 aflatoxin B, G, M을 생산하는 *A. flavus* 및 *A. parasiticus* 균들에 대해 효과적(투명환 직경 9-17 mm)이었다. 전통 장류 발효 시 mycotoxins의 생성은 위생상 중요한 문제이고 이들 독소들은 간암이나 신장 독성을 유발할 수 있기 때문에 항진균 효과를 가진 이 균의 사용은 숙성과정에서 위생 발효를 위해 가치가 있을 것으로 예상된다. 또한 이 항균 물질은 병원성 세균으로서 *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus*에 대한 저해 능력(투명환 직경 10-12 mm)이 있었고 특히 식중독과 염증 반응에 중요한 병원성 균인 *S. aureus*는 5 균주 모두 증식이 확실히 억제되었다. 앞으로 식품 이외 의료나 위생분야에서 사용 가능성을 위해 methicillin 저항 균주(MRSA)를 포함하는 *S. aureus* 균들에 대해 이물질의 항균력을 광범위하게 조사할 필요가 있다.

##### 5. SEM에서 항균 작용의 확인

SCK 121057 배양액의 원심분리 상층액을 *B. cereus* 배양액에 넣고 8시간 추가 배양 후 전자 현미경 결과는 Fig. 6와 같다. Fig. 6A는 원심분리 상층액을 넣지 않은 *B. cereus* 사진으로 표면이 말끔한 간균 형태를 보였다. 그러나 원심분리 상층액을 첨가한 경우 세포막이 터지거나 녹아 내용물이 흘러나온 형태(Fig. 6B)를 보였으며, 세포 껍질만 있는 ghost도 나타냈다(Fig. 6C). 일반적으로 처리 후 균 표면은 대조 군에 비해 거칠며 부분적으로 녹아있는 형태를 나타냈고 전체적으로 균의 크기도 감소되어 있었다. 전자 현미경 관찰로부터 SCK 121057의 항균 성분은 세포막 구조에 직접적으로 작용하거나, 세포막 합성이나 대사에 영향을 주는 것으로 보인다. 이와 함께, 활발하게 증식한 *B. cereus* JBE0006 배양액 0.5 ml에 SCK121057 배양 원심 상층액 0.5 ml를 첨가하고 37°C에서 3시간과 6시간 후에 *B. cereus* 의 운동성을 녹색필터를 장착한 위상차현미경에서 관찰했다. 첨가 직전 *B. cereus* 균들은 매우 활발한 운동성을 보였으나 첨가 3시간 후 움직임은 현저히 감소했고, 6시간 후에는 거의 정지 되었다(결과 미제시).

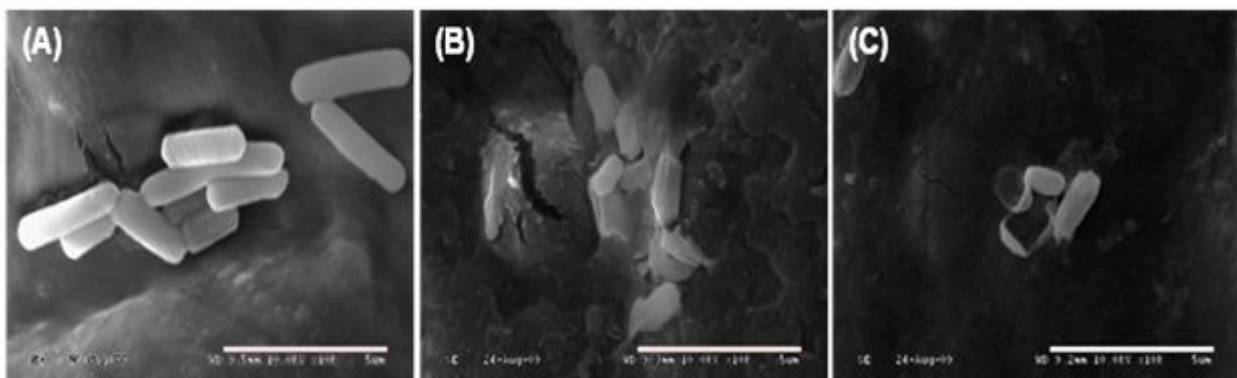


Fig. 6. Scanning electron micrographs of *B. cereus* JBE0006. (A) Intact *B. cereus*; (B)

and(C) *B.cereus* treated with culture filtrate of the strain SCK 121057 for 8h. Bar length is 5  $\mu$ m.

## 6. 제조 적용 실험

한천 배지 상에서 SCK 121057균은 12종의 다른 *B. cereus*들에 대해 모두 증식저지력을 나타냈다. 하지만 실제 장류 발효 과정 중에서도 *B. cereus*에 대한 증식 억제능이 있는지 확인하기 위하여 SCK 121057과 *B. cereus* JBE0008을 삶은 콩 g당 각각  $2.2 \times 10^5$ CFU와  $2.33 \times 10^4$ CFU(약 10:1)로 혼합 접종한 뒤 21-23°C의 조건에서 31일 간 *B. cereus* 균수 변화를 관찰하였다(Table 4). 두 균 사이의 비율 10의 값은 주 발효균인 SCK 121057가 삶은 콩에서 증식하는 동안 1/10 비율로 *B. cereus*가 오염된다는 가정이며 실제 오염 비율은 장류 제조 환경에 따라 달라질 수 있다. *B. cereus*만 접종한 대조균은 배양 시간이 증가함에 따라 꾸준히 증가하여 한달 후  $5.1 \times 10^6$ CFU/g까지 증가한 반면, SCK 121057균과 혼합 접종한 경우 *B. cereus* 균수는  $1.3 \times 10^2$ CFU/g에 머물러 장류 제조에 실제 적용 가능함을 보였다. 따라서 SCK 121057균의 장류 적용 시험에서는 KFDA의 *B. cereus* 허용 기준( $1 \times 10^4$ CFU/g sample)을 충족시켰다.

Table 4. Changes in cell numbers of *B. cereus* JBE0008 during the mixed culture with strain SCK121057.

Incubation (day)	<i>B. cereus</i> cell no( x 10/g)	
	<i>B. cereus</i> only	<i>B. cereus</i> + SCK 121057 1:10 (Mixing ratio as CFU/g)
0	2,330	2,330
2	13,900	1
7	120,000	30
14	310,000	33
21	470,000	42
31	510,000	13

## 7. 식품 적용에 안전성 고찰

미국 식품의약품안전청(FDA)는 *B. licheniformis* 발효로 제조한 6종의 효소 제품(GRAS Notice Inventory No. 22, 24, 72, 79, 265, 277)들을 GRAS로 인증하였고 미국 환경보호청(EPA)은 *B. licheniformis* 균의 인체에 대한 유해성과 안전성을 평가하였다. EPA는 *B. licheniformis*가 인간의 건강과 환경에 위해를 끼친다는 보고 없이 장기간 amylase, protease, 항생제 등의 발효 산업에 주요하게 사용되어왔기 때문에 *B. subtilis*와 동등한 수준에서 이 균의 인체 위험도가 낮다고 평가하였다(3). 최근 우리가 조사한 150여종의 국내 전통 장류에는 *B. licheniformis*, *B. velezensis*, *B. subtilis*가 주 발효 세균이었으며, *B.cereus*를 제외하고 이들 균들에 의한 위생적인 문제들이 현재까지 보고된 바는 없다. 그러나 GRAS로 인식해왔던 *B. subtilis*까지도 24종의 계면활성제와 항생물질들을 생산하며 각 항균 물질들의 독성은 아직까지 정량적으로 평가되지 않았다. PCR에 의한 유전자 확인에서 SCK 121057은 *B. licheniformis*과 *B. subtilis*의 일부 균주가 생산하는 계면활성제 lichenysin, surfactin과 항생제 lichenicidine을 생산하지 않는 것으로 보이지만 *B. cereus*의 세포벽을 붕괴시키는 항균물질의 작용으로 보아 고등동물에서의 세포독

성가능성이었다. 산업적인 장류 제조 관점에서 향균 물질을 생산하는 발효균의 채용은, 향균 물질에 의한 인체 독성 문제를 고려해야 함과 동시에 발효과정 중 병원성 균 증식을 억제 함으로서 병원성 독소 생산을 감소시킬 수 있는 양면적인 특성을 가진다고 할 수 있다. 따라서 SCK 121057균을 장류에 사용하기 위해 향균성 물질들의 구조 규명과 장류 섭취에 대한 인체 안전성 평가가 선행되어야 할 것이고, 이를 위해 이 균으로 제조한 장류 제품을 동물에서 독성 검사를 통해 안전성을 검증 받을 필요가 있다.

#### 8. *B. cereus* 종류별 저해 특성

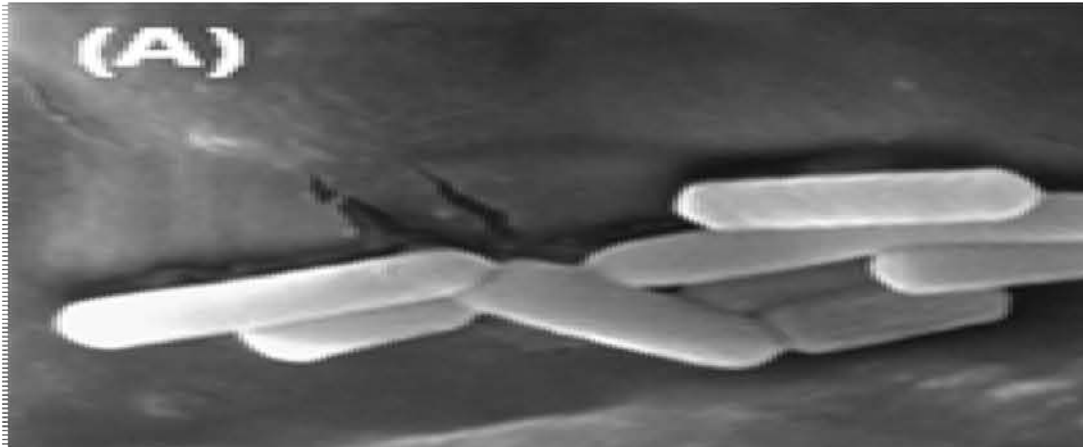
10종류의 서로 다른 *B. cereus* strain들을 함께 배양한 후 petridish에 나타난 환의 직경을 측정하였다. 아래 표의 결과는 *B. cereus*균의 종류에 따라 다른 증식억제 능력을 나타냈으나 사용한 모든 *B. cereus*의 생육을 억제한 것이 관측되었다.

억제 대상 균	환 직경(cm)
Negative control	0.5
<i>B. cereus</i> JBC001	1.5 ± 0.2
<i>B. cereus</i> JBC002	0.7 ± 0.1
<i>B. cereus</i> JBC004	1.1 ± 0.2
<i>B. cereus</i> JBC005	0.8 ± 0.1
<i>B. cereus</i> JBC006	0.9 ± 0.1
<i>B. cereus</i> JBC008	0.6 ± 0.1
<i>B. cereus</i> JBC009	1.1 ± 0.2
<i>B. cereus</i> JBC011	0.8 ± 0.1
<i>B. cereus</i> JBC013	1.5 ± 0.2
<i>B. cereus</i> KACC11240	0.9 ± 0.1

#### 9. 전자현미경상에서 *B. cereus* 억제 확인

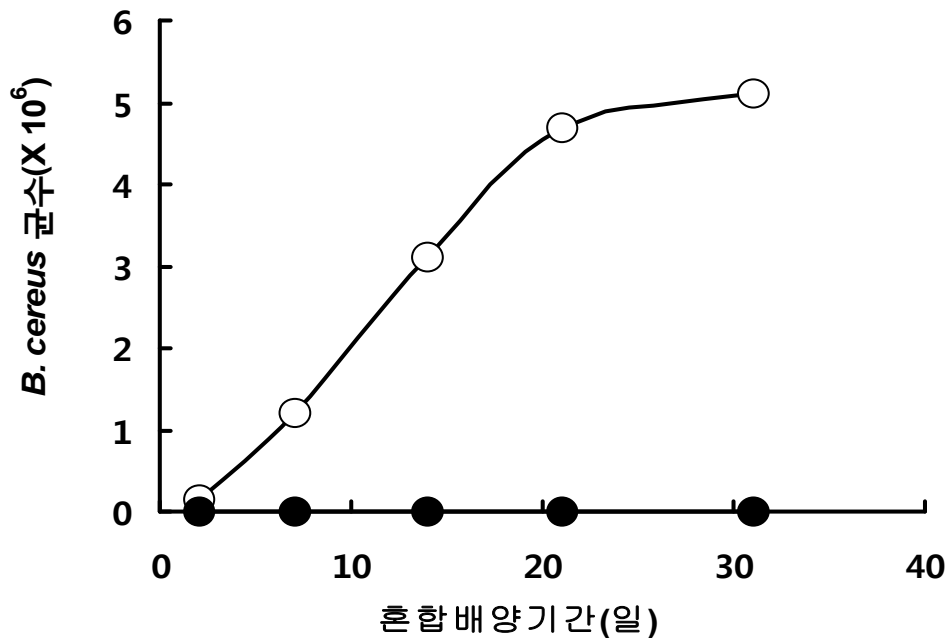
*B. cereus* JBC008 배양액 자체와 *B. licheniformis*의 원심분리 상등액(원심분리 상등액에는 이균이 포함되지 않았음)을 1:1로 섞은 뒤 8시간 37도에서 배양하고 10,000 배 확대한 주사전 전자현미경상에서 관찰하였다. 사진 결과는 *B. licheniformis*가 분비하는 물질이 *B. cereus*의 세포막을 붕괴시키는 것이 관찰되었다.





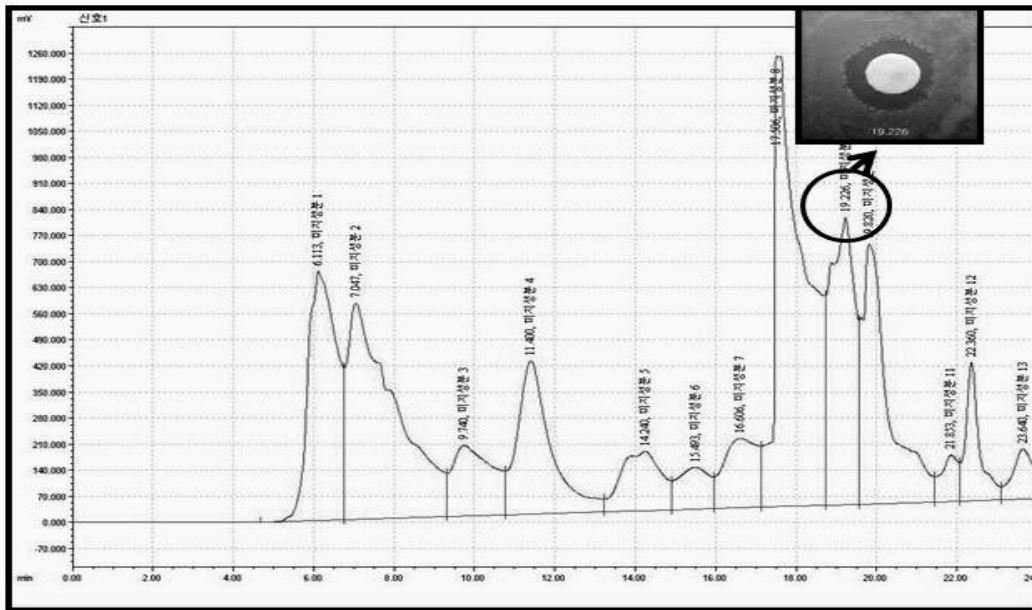
10. 청국장제조에 항 *B. cereus* 증식 억제균(SCK121057) 적용실험

*B. cereus* BE008균과 *B. licheniformis* SCK121057의 균수를 1:10의 비율로 섞은 콩에 접종한 후 31일 까지 *B. cereus*의 증식정도를 측정하였다. 배양 후 31일 후에도 *B. cereus*총 균수는 대조 균주에 비해 약 1/10,000로 감소됨을 보였고 남아있는 총 균수는 식약청의 규제 수준에 비해 훨씬 낮은 값을 보였다.



배양(일)	<i>B. cereus</i> 총균수(CFU/g)	
	<i>B. cereus</i> +nutrient broth 1:10(혼합비)	<i>B. cereus</i> + <i>B. licheniformis</i> 1:10(혼합비)
2	139,000	10
7	1,200,000	300
14	3,100,000	330

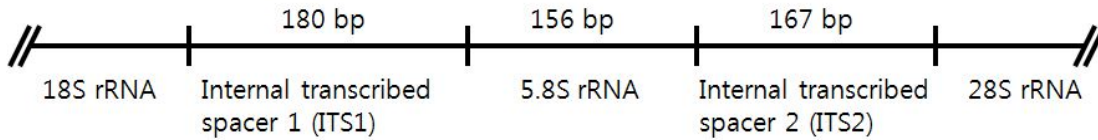
21	4,700,000	420
31	5,100,000	130



### 3절 전통 장류에서 무독성 *Aspergillus oryzae* 균주의 분리

전통 장류로부터 곰팡이를 분리하기 위해 (1) 3M Petrifilm에서 1차 분리 (2) potato dextrose agar에 1차 분리한 colony들을 계대 배양하면서 순수 분리하였다. 분리 균들의 동정을 위하여 *Aspergillus* chromosomal DNA에서 primer를 디자인하였다. *Aspergillus flavi* group은 *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. sojae*가 포함되며 이들 사이의 18S rRNA 유전자 서열은 100% 일치하는 것으로 알려져 있고 ITS1과 ITS2에서도 *A. flavus* 및 *A. oryzae*는 구분되지 않는다. 따라서 이들의 구분은 aflatoxin의 생산 유무에 의해 *A. flavus*와 *A. oryzae*로 나뉘어진다.

Query species	Molecular sibling	Maximum sequence identity(%) (minum nucleotide position difference)		
		18S rRNA	ITS1	ITS2
	<i>A. oryzae</i>	100 (0)	100 (0)	100 (0)
<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	100 (0)	97.8 (4)	97.7 (4)
	<i>A. sojae</i>	100 (0)	97.8 (4)	97.7 (4)



따라서 18S rRNA와 28S rRNA 사이의 ITS1, 5.8S rRNA와 ITSII 공통 영역을 대상으로 PCR primers를 제작하였으며 PCR condition은 아래와 같다.

- Primers

Forward: 5'-GTACCTTAGTTGCTTCGGCG-3' (ITS1 41-60 bp)

Reverse: 5'-AAAGATTGATTTGCGTTCGG-3' (ITS2 511-492 bp)

- Conditions

95°C 5 min, 30 cycles(95 °C 1 min, 54 °C 50 sec, 72 °C 2 min), 72 °C 5 min

최종 우수 균주로 분리한 10종의 곰팡이에 대한 동정결과는 아래와 같았고 BLAST search 결과 이들 모두(100개 Search) *A. flavus* 또는 *A. oryzae*로 각각 동정되었다

Strain	Region	Identification by BLAST search	Maximum identity (%)
SCM 2160011	Jeju	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A. oryzae</i> (9/100)	385/385 (100)
SCM 2150021	Sunchang	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A.oryzae</i> (9/100)	404/411 (98)
SCM 2150032	Sunchang	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A. oryzae</i> (9/100)	404/414 (97)
SCM 2150041	Sunchang	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A. oryzae</i> (9/100)	383/385 (99)
SCM 2150052	Sunchang	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A. oryzae</i> (9/100)	376/381 (98)
SCM 2150061	Sunchang	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A. oryzae</i> (9/100)	383/385 (99)
SCM 2150071	Sunchang	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A. oryzae</i> (9/100)	388/389 (99)
SCM 2150082	Sunchang	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A. oryzae</i> (9/100)	395/399 (98)
SCM 2150091	Sunchang	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A. oryzae</i> (9/100)	393/397 (98)
SCM 2150101	Sunchang	<i>A. flavus</i> (77/100)/ <i>A. oryzae</i> (9/100)	389/391 (99)

*Aspergillus oryzae* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence

GGGGGTTTCTCTCGGGTCTAGCCGCGGAGACACCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAA TGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGC GCCCTTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGTCGCCCTCTCCGGGGGGACGGGC CCCAAAGGCAGCGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCGCTGCCGAACGCAATCAATCTTA CACCTCAAGCGATTACGTTGGATGGCCGATGCCATACGTGGATCTCCATGATGAGCAGTTTGCGCATCTAAACAAAGATTGTTGGATCAACTACGACGAC ATTGCGAACAAGAACCCGACCTGAAAGACAAGGATGAGATCAAGTTTCTTGTATTGGTGGAGGGCATCGGGTCTATCATTGCCACCGCTGTTGAG ACAGGAGTCTCGGGCGTGACATCTGTGTTGATGTTGCCGAGGAGTAGGGGTACGTGGTACTGGAATCGATATCCAGGTCATGTGCGATGTTGAA GGATATATCTACCTGCCTTGTCTGAGGAAACTGGGTACATGCCAAGCATCGATACTCCTATGGTACAGAGATCCGACAGCAGTCCGAACGCAATCAATC TTTATA
TCACTGGGGCTCTCAGACCGGGTCGAGCCGCGGAGACACCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTT CAACAAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA CATTGCGCCCTTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGTCGCCCTCTCCGGGGGG ACGGGCCCAAAGGCAGCGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCGCTGCCGAACGCAATCA ATCTTAGAGCTCAAGCGAGCGTGTGGATGGCCGCGCGCTACGTGGATCTCCATGTAGAGCAGTTTGCGCATCTAAACAAAGATTGTTGGATCAACTACA ACGACATTGCGAACAAGAACCCGACCTGAAAGACAAGGATGAGATCAAGTTTCTTGTATTGGTGGAGGGCATGCGGGTCTATCATTGCCACCGCTGT TTGAGACAGGAGTCTCGGACGTGACATCTGTGTTGATGTTGCCGAGGAGTAGGGGTACGTGGTACTGGAATCGATATCCAGGTCATGTGCGATG TGAAGGATATATCTACCTGCCTTGTCTGAGGAAACTGGGTACATGCCAAGCATCGATACTCCTATGGTACAGAGATCCGACAGCAGTCCGAACGCAAT CAATCTTAAAG
TTACCGGGGCTCTCAGACCGGGTCGCGCGCGGAGAACCCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAA CAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT TGCGCCCTTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGTCGCCCTCTCCGGGGGGACG GGCCCAAAGGCAGCGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCGCTGCCGAACGCAATCAATC TTA
GGGGGGCTCGCTCGGGTCTAGCCGCGGAGAACCCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAA GGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCG CCCCTTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGTCGCCCTCTCCGGGGGGACGGGC CCAAAGGCAGCGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCGCTGCCGAACGCAATCAATCTTAA ACGAAAACCGGATACATTTGAATGAGCCACGCAAAACGTGGATCTATCTTAGGGGGGGGGGGCATCTAAACAAAGATTGTTGGATTAATTATAACAAT ATTGCGAACAAGAACCCGACCTGAAAGACAAGGATGAGATCAAGTTTATTGTATTGGTGGGAGGGATGCGGGTTATCATTTGCCACCGCTGTT TGAGATAGGGGCTT
GGGGGGTTGCCAACCGAGGTCCTAGCTGCCGATAACCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAATCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAA CAATGGATCTCTTGGTACCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT TGCGCCCTTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGTCGCCCTCTCCGGGGGGACG GGCCCAAAGGCAGCGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCGCTGCCGAACGCAATCAATA TGAGATTGCCAATCTAGCCAAAGTAAATGATCACGCACCGAACGCAATCAATCTTTAGGGGGGAAG
CGGGGCTTCAATCGGGTCTACGCCGCGGAGAACCCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAATCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAA TGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGC GCCCTTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGTCGCCCTCTCCGGGGGGACGGGC CCCAAAGGCAGCGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCGCTGCCGAACGCAATCAATCTTA AATGCCAGTAGCCAAGTATGATCACGCACCGAACGCAATCTATCTTGGAGGGGGGGGGCATCTAACGTAGATTGGTGGATCAACTACTAGGATTT TGCGAAAGTGGGAGCGGACTTGAGGATGAGGATGATTAAGTTTCTGGTATTGGGGAGGGCATGGGGTGGATCCTTTGCCAACCGGTGTTGAGAGAG GAGAGTGGGACCTTGACCGCTGCGGTTGTAGAAGTTGTCGGAGGAGTAG
TGGCCCGCGGAGACACCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAAATGGATCTCTTGGTCCG GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCGG GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGTCGCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCAAAGGCAGCGCGG CACCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCGCTGCCGAACGCAATCAATCTTAAATGCTATCTAGCCAA AGTAAATGATCACGCACCGAACGCAATCAATCTTGGGGGGGGGGGGTCCAACTCGACTCCCGGGGTTGGGGAGGGCATGGGGTGGATCCTTTGCCAAC CGGTGTTGAGAGAGGAGTGGGACCTTGACCGCTGCGGTTGTAGAAGTTGTCGGAGGAGTAGG
GGGCCCGACGCCCGGAGACACCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAATCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAAATGGATCTCTT GGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGT ATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGTCGCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCAAAGGC GCGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCGCTGCCGAACGCAATCAATCTTTGAAGCAAT CTAGCCAAAGTAAATGATCACGCACCGAACGCAATCAATCTTTAGGGGGGGGGGGCGG

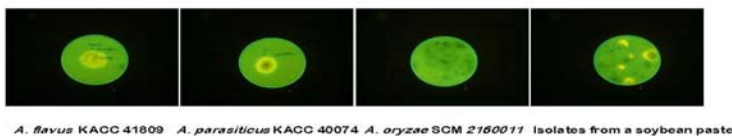
```

GGGGCCGAGCCCGCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGATATCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTT
GGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGT
ATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGGGTGTCGTCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAAGGCA
GCGGGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAAATCAATCTTAGATGCCAATC
TAGCCAAAGTAAATGATCACGCACCGAACGCAAAATCAATCTTTGGGGGGGGGGGGCCT
CGGGTCGCGCCCGCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGATGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGG
TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTAT
TCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGGGTGTCGTCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAAGGCGAGC
GGGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAATCAATCTTT

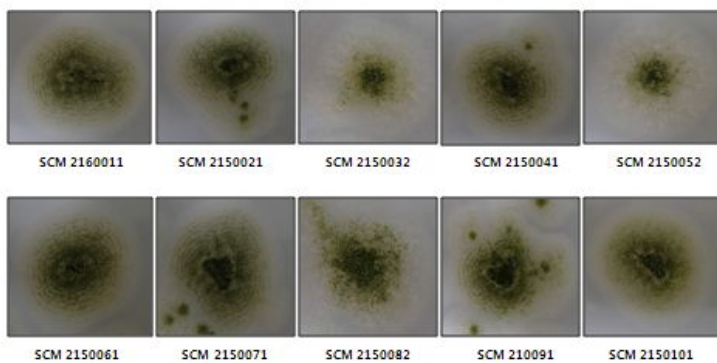
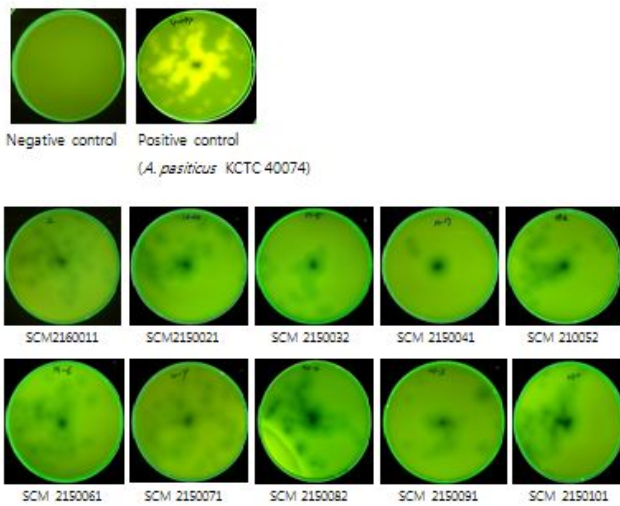
```

*A. flavus*와 *A. oryzae*를 구분하기 위해 아플라톡신 생산 선발 배지인 coconut cream milk agar(Davis, ND., Iyer, SK., and Diener, UL. Improved Method of Screening for Aflatoxin with a Coconut Agar Medium, Appl. Environ. Microbiol. 53, 1593-1595)에서 분리한 균들을 배양하였다. Coconut cream은 C12-C14의 지방산을 많이 함유하여 가수분해 시 땅콩 지방산(C16-C18)보다 더 높은 농도의 glycerol을 생성하여 이것이 aflatoxin을 생산하며 생성된 aflatoxin B1, G1은 365 nm의 자외선을 흡수하여 형광을 생성한다. 실험 배지는 16% coconut cream+2% agar를 사용하였으며, 100 °C 15 분간 살균 후 25 °C에서 4일 배양하였다. 아래 그림은 positive control, negative control, 된장 sample을 coconut cream milk agar에서 4일간 배양 후 UV에서 형광 유무를 확인한 것이다.

Comparison of fluorescence under UV of *Aspergillus* colonies on coconut milk agar plates



최종 우수 균주로 선발한 10종의 곰팡이들은 coconut cream milk agar 배양에서 전혀 형광을 나타내지 않았으며 단일 클론항체 immunoaffinity크로마토그래피와 유도체화 후 형광 detector를 사용한 HPLC 분석에서도 10종 모두 검출되지 않았다. 따라서 최종 우수 균주로 분리한 10종의 곰팡이는 모두 *A. oryzae*인 것으로 동정할 수 있었다.

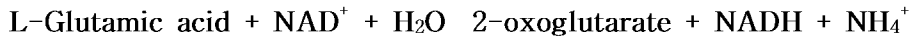


#### 4절 전통 장류에 존재하는 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Bacillus subtilis/licheniformis*, *Lactobacillus*에서 맛에 중요한 고 glutamic acid 생산균의 분리

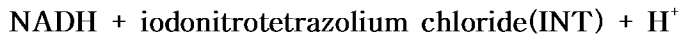
##### 1. 전통 장류에서 glutamic acid 고생산균의 분리

장류에서 맛에 영향을 주는 가장 중요한 소스는 glutamic acid이며(신순영외, 한국식품과학회지, 17, 8-14(1985), 장류에서 glutamic acid를 만드는 주 효소는 gamma-glutamyltransferase로 보고되고 있다(K. Kijima, K., Suzuki, H., Enzyme Microb. Technol., 41, 80-84,(2007). 장류에서 주 발효균은 *Aspergillus*와 *Bacillus*이고 이들 균 모두 gamma glutamyltransferase를 생산하므로 glutamic acid를 많이 함유하는 된장은 이 효소 활성 역시 높을 것으로 가정하였다. glutamic acid의 효소 분석법의 원리는 아래와 같다.

(1) Glutamate dehydrogenase



(2) Diaphorase



장류에서 분리한 무독소 우수 균주들을 대상으로 이들을 각각 삶은 콩에 접종 후 47℃에서 48시간 배양하였다. 배양 후 콩의 희석 상등액을 효소 분석법으로 분석한 결과는 아래 표와 같았다.

<i>A.oryzae</i>	Glu (mg/g)	<i>Rhizopus</i>	Glu (mg/g)	<i>Mucor</i>	Glu (mg/g)
SCM215022	0.05	SCM225002	0.05	SCM235001	0.06
SCM215025	0.07	SCM225003	0.15	SCM235002	0.17
SCM215029	0.22	SCM225005	0.33	SCM235004	0.28
SCM215030	0.21	SCM225006	0.17	SCM235005	0.18
SCM215032	0.28	SCM225007	0.23	SCM235007	0.27
SCM215033	0.47	SCM225008	0.2	SCM235008	0.45
SCM215034	0.22	SCM225010	0.24	SCM235009	0.29
SCM215035	0.31	SCM225012	0.3	SCM235010	0.17
SCM215036	0.25	SCM225014	0.26	SCM235011	0.42
SCM215037	0.21	SCM225015	0.69	SCM235012	0.38
SCM215038	0.13	SCM225016	0.7	SCM235013	0.44
SCM215039	0.13	SCM225017	0.47	SCM235014	0.28
SCM215040	0.1	SCM225018	0.1	SCM235016	0.13
SCM215042	0.03	SCM225019	0.2	SCM235017	0.31
SCM215043	0.14	SCM225020	0.19	SCM235022	0.12
SCM215044	0.1	SCM225021	0.24	SCM235024	0.15

SCM215045	0.24	SCM22501 c	0.21	Control(D.W)	0.02
SCM215046	0.16	SCM22504 c	0.21		
SCM215047	0.26	SCM225011 c	0.28		
SCM215048	0.23	SCM225013 c	0.29		

<i>B. subtilis</i>	Glu (mg/g)	<i>B. licheniformis</i>	Glu (mg/g)	유산균	Glu (mg/g)
S1. SCK115005	0.71	L1. SCD121013	0.91	Lac 1. SCD131001	0.05
S2. SCK115039	1.79	L2. SCD121014	1.4	lac 2. SCD131003	0.03
S3. SCK115040	1.51	L3. SCD121015	1.47	lac 3. SCD131005	0.03
S4. SCK115043	1.88	L4. SCD121016	1.66	lac 4. SCD131006	0.06
S5. SCD112001	1.65	L5. SCD121018	0.27	lac 5. SCD131008	0.05
S6. SCD115038	0.31	L6. SCD101219	0.33	lac 6. SCD131009	0.04
S7. SCC20	0.95	L7. SCC124042	0.57	lac 7. SCD131010	0.03
S8. SCC21	0.28	L8. SCD121044	1.39	lac 8. SCD131011	0.05
S9. SCC23	0.41	L9. SCD123050	2.5	lac 9. SCD131013	0.17
S10. SCC29	0.4	L10. SCD123051	1.3	lac 10. SCD131016	0.1
S11. SCC40	0.89	L11. SCD121056	1.25	lac 13. SCD131019	0.03
S12. SCC43	0.64	L12. SCD121060	0.32	lac 14. SCD131021	0.03
S13. SCD112016	0.39	L13. SCD126065	1.73	lac 15. SCD131034	0.06
S14. SCD112013	0.57	L14. SCD126066	0.39	lac 16. SCD131024	0.03
S15. SCC11	1.12	L15. SCD123020	0.36	lac 17. SCD131026	0.03
S16. SCC12	0.3	L16. SCD122022	1.34	lac 18. SCD131028	0.04
S17. SCK115024	2.38	L17. SCK 122029	1.14	lac 19. SCD131029	0.1
S18. SCC115028	0.45	L18. SCD122030	0.32	lac 20. SCD131030	0.03
S19. SCC115030	1.2	L19. SCD124031	1.2	CONTROL (NB)	0.06
S20. SCC115031	1.26	L20. SCD125038	0.99	CONTROL (MRS)	0.05

이들 결과로부터 장류에서 glutamic acid을 가장 많이 생산하는 균은 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*이었으며 *A. oryzae*는 1/5이하, *Rhizopus*와 *Mucor*는 1/4이하, 유산균은 1/13이하



를 보였다.

## 2. Glutamic acid 고생산 균주의 고속 검색 분리를 위한 *Bacillus gamma glutamyltranspeptidase*(*gamma glutamyltransferase*)의 항체 제조

전통 장류에서 주 발효균인 *Bacillus*가 glutamic acid를 다른 발효균(*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, lactic acid bacteria)에 비해 많이 생산하였으며 glutamic acid 생산에 *gamma glutamyltranspeptidase*가 가장 중요한 효소이다. Glutamic acid 고생산성 장류균을 분리하기 위해 *Bacillus gamma glutamyltranspeptidase*에 대한 항체 제조를 시도하였다. 표준 균주로서 *bacillus glutamyltranspeptidase*의 서열(*B. subtilis* subsp. *subtilis* st. 168 및 *B. licheniformis* ATCC 14580)을 대상으로 적절한 epitope를 찾고, 이들 epitope들에서 *Bacillus* 균 종류간 상동성이 높은 영역을 선정하여 토끼에게 KHL-conjugated 합성 펩타이드를 주사하였다.

>gi|16078902|ref|NP\_389723.1| membrane bound gamma-glutamyltranspeptidase

[*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168]

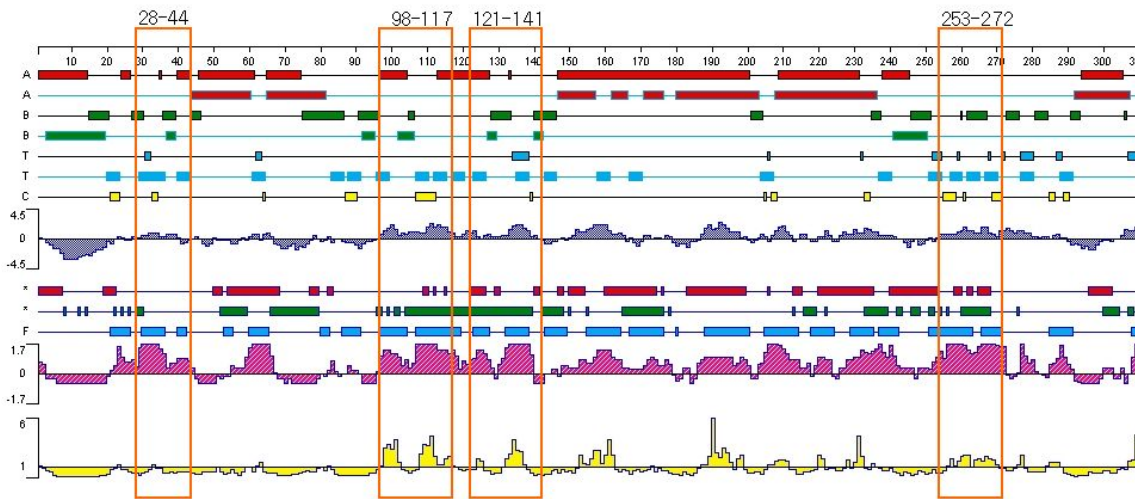
MKRTWNVCLTALLSVLLVAGSVPFHAEAKKPPKSYDEYKQVDVGGKDMVATAHPLASEIGADVLLKGGNA  
IDAAVAIQFALNVTEPMSGIGGGGFMMVYDGTKDTTIIDSRRERAPAGATPDMFLDENGKAIPFSERV  
KGTAVGVPGTLKGLEEALDKWGTRSMKQLITPSIKLAKEGFPIDSVLAEAISDYQEKLSTAAKDVFLPN  
GEPLKEGDTLIQKDLAKTFKLIRSKGTDAFYKKGKFAKTLSDTVQDFGGSMTTEKDLENYDITIDEPIWGDY  
QGYQIATTPPPSSGGIFLLQMLKILDHFNLSQYDVRSWEKYQLLAETMHLASYADRASYAGDPEFVNVPLK  
GLLHPDYIKERQQLINLDQVNNKPKAGDPWKYQEGSANYKQVEQPKDKVEGQTTHTFTVADRWGNVVSYYT  
TIEQLFGTGIMVPDYGVILNNELTDFDAIPGGANEVQPNKRPLSSMTPTILFKDDKPVLTVGSPGGATII  
SSVLQTYLHIEYGMELKAAVEPRIYTNSMSSYRYEDGVPKDVL SKLNGMGHKFGTSPVDIGNVQSISI  
DHENGTFKGVADSSRNGAAIGINLKRK

>gi|52785132|ref|YP\_090961.1| Ggt [*Bacillus licheniformis* ATCC 14580]

MRRLAFLVVAFLAVGCFSPVSKAEGVMSGGDGDKVAVGKDMVATAHPLASKIGAEVLKGGNAIDAA  
IAIQYALNVTEPMSGIGGGGFMMVYDGETKETSINSRERAPAGAKPDMFLDEDGKVIPFSERSRHGNA  
VGVPGTLKGLEAAHKKWGTTKMMEDLISPSIKLAEEGFPIDSVLADAIKDHQDKLSKTAAKDIFLPDGEPL  
KEGDILVQKDLAKTFKLIRKEGSKAFYDGEIGRAIADVQDFGGSMTPTDLSRYEVTTDKPIWGEYHGYD  
IASMPSSGGVFMLQMLKLIDDFHLSQYDPKSFKEYHLLAETMHLASYADRAAYAGDPEFVDVPLRGLLD  
PDYIKERQKLISLDSMNRDVKEGDPWKYEEGEPNVEIVQPEDKTIGETTHFTVTDQWGNVVSYYTTTIEQ  
LFGTGILVPGYGLFNNELTDFDAIPGGANEVQPNKRPLSSMTPTIVFKDEKPVLTVGSPGGTTIISVF  
QTILNYFEYGMSLQDAIEPRIYTNSLTSYRYESGMPEDVRRKLNDFGHKFGSNPVDIGNVQSIFIDREN  
KTFMGVADSSRNGTAVGVNIKTSK

이 서열 내에 적합한 항원영역을 찾기 위해 Pretean(LaserStar) program을 사용하여 항체 생산에 적절한 항원 epitope들을 선정하였다.

Ggt [Bacillus licheniformis], total 585 a.a 중 1~300



<epitope>

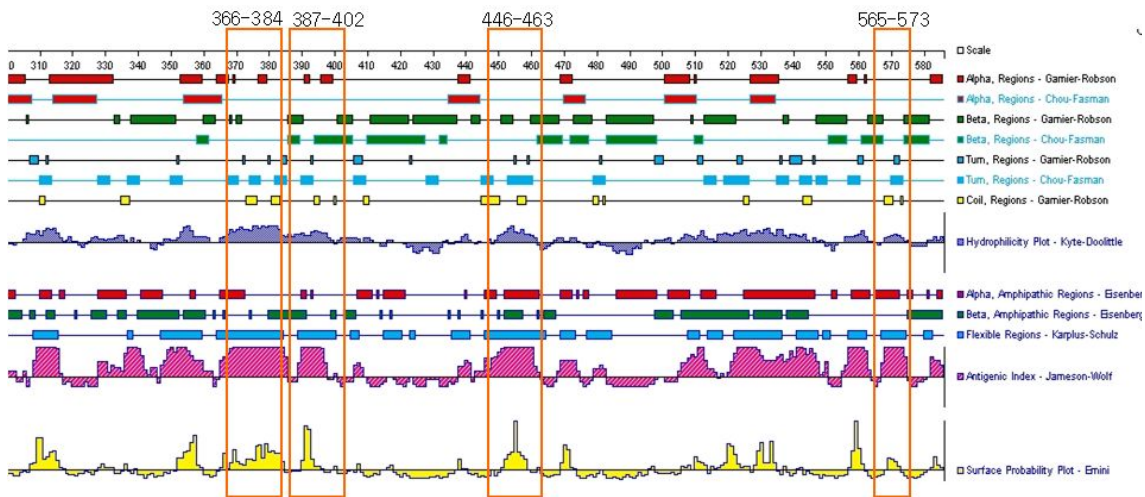
28-44: VMSGG DGDKV AVGKD GM

98-117: GETKE TSIIN SRERA PEGAK

121-141: FLDED GKVIP FSERS RHGNA V

253-272: GGSMT PDDL S RYEV T TDKPI

Ggt [Bacillus licheniformis], total 585 a.a 중 301~585



<epitope>

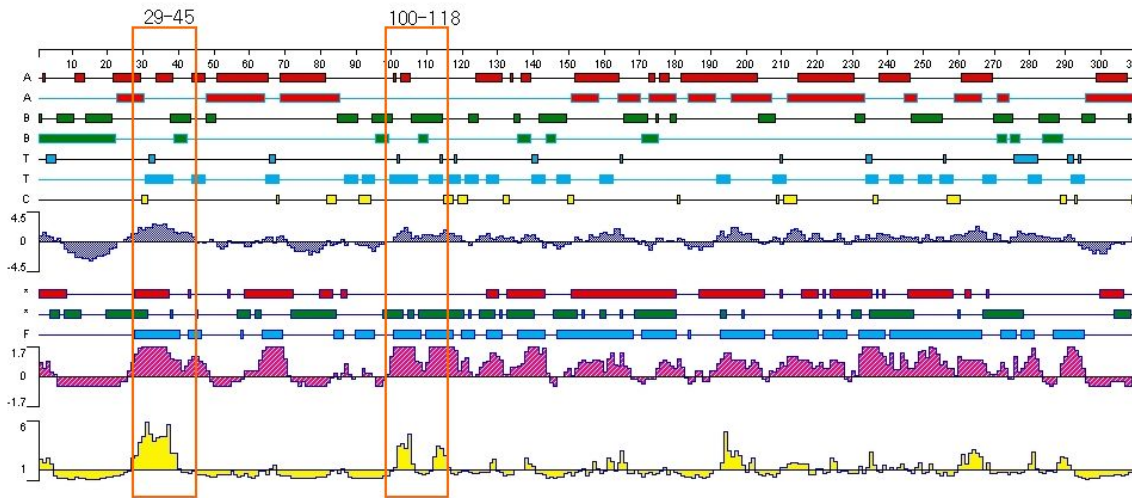
366-384: MNRDV KEGDP WKYEE GEPN

387-402: IVPQP EDKTI GETTH F

446-463: PGGAN EVQPN KRPLS SMT => Ggt [Bacillus S.]와 동일 서열로 추천 1순위

565-573: GVADS SRNG => Ggt [Bacillus S.]와 동일 서열로 추천 2순위

Ggt [Bacillus subtilis], total 587 a.a 중 1~300

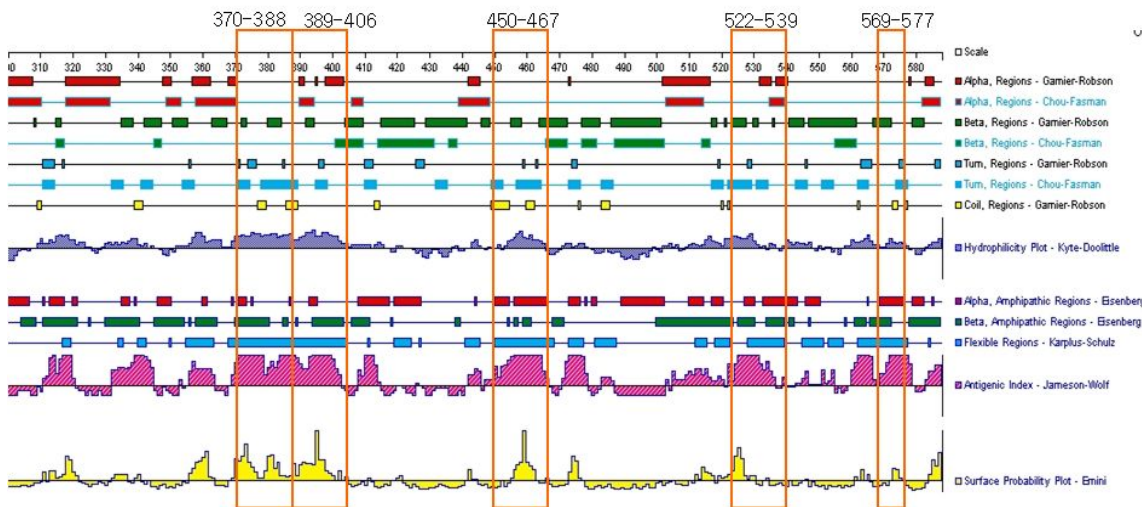


<epitope>

29-45: KKPPK SYDEY KQVDV GK

100-118: YDGKT KDTTI IDSRE RAPA

Ggt [Bacillus subtilis], total 587 a.a 중 301~587



<epitope>

370-388: VNKKP KAGDP WKYQE GSAN

389-406: YKQVE QPKDK VEGQT THF

450-467: PGGAN EVQPN KRPLS SMT => Ggt [Bacillus L.]과 동일서열로 추천 1순위

522-539: SSYRY EDGVP KDVLS KLN

569-577: GVADS SRNG => Ggt [Bacillus L.]과 동일서열로 추천 2순위

## B. subtilis

Query	421	PGGANEVQPNKRPLSSMT	TIILFKDKPMLTVGSPGATIISVYLQITILYHIEYGMELK	480
NP_389723	449	.....	.....	508
BAC76441	449	.....	.....	508
PG3186	449	.....	.....G..	508
YP_001421447	451	V.....	...NNE.....NKY...D..	510
ZP_01168965	448	V.....	...Y.DN.....P...T....IHA...D...	507
YP_090961	445	.....	...V...E.....T...A..F...NYF...S.Q	504
ABY19603	445	.....	...V...E.....T...A..F...NYF...S.Q	504
YP_001486408	443	F.....	...I...NE..M.....T...A..S...NLL..E...Q	502
ZP_03053535	443	F.....	...I...NE..M.....T...A..S...NLL..E...Q	502

## B. licheniformis

Query	421	PGGANEVQPNKRPLSSMT	TIIVFKDEKPYLTVGSPGTTIIASVYFQITILNYFEYGMSLQD	480
ABY19603	446	.....	.....	505
YP_090961	446	.....	.....	505
YP_001486408	444	.....	...I...NE..M.....S...LL..E.E...	503
ZP_03053535	444	.....	...I...NE..M.....S...LL..E.E...	503
BAC76441	450	.....	...L...D.....A...S..L...YHI...E.KA	509
NP_389723	450	.....	...L...D.....A...S..L...YHI...E.KA	509
YP_001421447	452	.....	...L...D.....A...S..L...KY...D.KA	511
PG3186	450	.....	...L...D.....A...S..L...YHI...G.KA	509
ZP_01168965	449	.....	...DND.....P...T..L...IHA...D.E.KA	508
ZP_01170196	429	...I...E.E...V.CKS	...L...GE...L...P.....Y.VIDF...D.K.	488

선정한 epitope 후보들 중 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*에 공통 영역으로 존재하는 영역인 PGGANEVQPNKRPLSSMT을 제 1 후보로 선정하여 이 영역에 대한 *Bacillus*간 서열 유사성을 조사한 결과 1 종류를 제외하고 100% 상동성을 보였다.

이 영역에 해당하는 펩타이드를 합성(conjugation을 위해 N-terminal 영역에 cys 첨가)한 뒤 carrier protein keyhole limpet hemocyanin (KHL)과 conjugation시켜 토끼에 주사하고 3회 boosting하였다. 최종 titer는 1/100,000 희석 배율에서 0.48 abs를 보였다. 앞으로 gamma glutamyltranspeptidase 활성과 glutamic acid 함량사이의 상호 연관성을 조사한 다음 관련성이 높은 경우 Western blot이나 Dot blot를 통해 전통 장류에서 glutamic acid함유 균주를 선발할 예정이다.

5절 전통 장류에서 이플라톡신 또는 오크라톡신을 생산하는 *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*와 장독소 생산 *B. cereus* 저해 특성을 가지는 *B. licheniformis*의 분리

*B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*와 함께 *Bacillus* subgroup I에 속하는 Gram 양성균인 *B. cereus*는 토양 및 공기 부유 미생물로서 전통 장류 제조 시 쉽게 오염되어 구토형 독소인 cereulide와 설사나 장염을 일으키는 독소인 non-hemolytic enterotoxin (Nhe), hemolytic enterotoxin (Hbl), cytotoxin K (CytK)를 분비한다. 이들 중 D-형 아미노산을 함유

하며 cyclic peptide의 구조를 가지는 cereulide는 단백질로 구성된 설사 독소들과는 달리 열이나 단백질 가수분해에 대해 강한 저항성을 가지고 있다. *B.cereus*의 설사 독소 유전자는 염색체 상에 위치하는 반면 구토형 독소 유전자는 플라스미드에 위치하기 때문에 *B. cereus*는 구토 및 설사를 동시에 일으키는 종과 설사만 일으키는 종으로 구분할 수 있다. 설사형 독소 균주의 경우 외부 환경에 따라 전사 조절 단백질인 phospholipase C regulator (PlcR)가 전사인자인 PapR과 결합하여 독소 발현량을 조절 하기 때문에 발효 상태에 따라 독소 분비량은 달라진다.

이에 따라 한국식품의약품안전청(KFDA)은 식품 안전성 확보를 위해 2007년부터 된장, 고추장, 청국장, 춘장을 포함하는 모든 시판 장류 제품에서 허용 *B. cereus* 균 수를  $1 \times 10^4$  CFU/g이하로 고시하였다. 그러나 *B. cereus*는 자연계에 흔할뿐 아니라 포자를 형성하여 열에 잘 견디고 장류에서 잘 자라기 때문에, 위해 요소 중점 관리 제도(HACCP)가 정착되지 않은 대부분의 전통 장류 제조업체에서는 KFDA가 정한 *B. cereus* 균수 상한선을 맞추기가 어려운 상황이다. *B. subtilis*와 *B. licheniformis*는 장류 발효에서 가장 중요한 역할을 하는 세균이며, 이들 중 일부 균주들은 다양한 종류의 계면 활성제나 항생물질들을 생산하여 경쟁 관계에 있는 주위 균들의 증식을 저해하는 것으로 보고되고 있다. *B.subtilis*의 bacitracin, surfactin, iturins, *B.licheniformis*의 lichenysin, lichenicidine 등은 이와 같은 펩타이드계 저분자 물질로서 항세균 또는 항진균 특성을 나타낸다. 우리는 전통 장류에서 *B. cereus* 계수 모니터링 동안 일부 제품에서 *B. cereus* 균수가 매우 낮다는 것을 발견했다. 이는 *Bacillus* 속들끼리 서로 길항적으로 작용하여 *B. cereus*에 대한 항균능력이 있는 균의 우세 때문일 것으로 생각할 수 있기 때문에 이들 장류에서 *B. cereus*를 억제하는 발효균들의 분리를 시도하였다.

## 1. 재료 및 방법

### 가. *B. cereus* 길항균의 분리

전통 방법에 따라 제조한 150종의 된장 고추장, 청국장들을 구입 후 5 g을 취해 0.3 mM 인산 완충액(pH 7.2)으로 희석하였다. Nutrient Agar (NA)와 *B. cereus* 선택 배지(chromogenic polymyxin B-methoprim agar (CPMA)) 표면에 희석된 균액을 각각 200  $\mu$ l씩 도포하고 30°C에서 24시간 배양 후, NA에서 자란 집락수에 비해 CPMA에서 자란 집락수의 비율이 매우 낮았던 12종의 장류를 선발하였다. NA에서 배양한 이 선발 장류의 집락들을 toothpick으로 찍어 미리 만들어둔 NA와 CPMA 배지의 같은 위치에 각각 접종하여 24시간 후 CPMA에 자라지 않은 균들만을 수집하였다. 수집한 균들을 대상으로 윤 등의 방법(16)에 따라 *B. cereus* 독소 유무 검사를 한 뒤, 선발한 균들을 Nutrient broth (NB)에 37°C, 78시간 배양하고 1,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 모아 -20°C에 보관하였다.

표준 균주인 *B. cereus* KACC 11240과 본 실험실에서 분리한 *B. cereus* JBE 0001 (GenBank accession no. FJ 982655), JBE 0002 (FJ 982656), JBE 0004 (FJ 982654), JBE 0005 (FJ 982657), JBE 0006 (FJ 982658) JBE 0008 (FJ 982659), JBE 0011 (FJ 982661)을 NB에서 37°C, 21시간 배양 후 100  $\mu$ l를 각 NA 표면에 골고루 spreading하고 배지 중앙에 4 mm paper disc(3M filter paper)를 올려놓았다. 냉동 보관했던 원심분리 상층액을 녹여 paper disc 중앙에 20  $\mu$ l를 분주하고 21시간 37°C로 배양 뒤 투명한 크기를 측정하여 8 종의 *B. cereus* 모두에 대해 길항 능력을 가진 한 종(SCK 121057)을 분리하였다.

### 나. 실험균들의 배양과 길항력 측정 방법

*B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* 배양은 Nutrient broth (NB) 배지, *B.cereus* 출은 CPMA, *Lactobacillus brevis*와 *Enterococcus faecalis* 배양은 각각 *Lactobacilli* MRS broth와 Trypticase soy broth, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*는 Potato dextrose broth, *Candidaalbicans*는 Yeast extract broth를 사용하였다. 사용 한 균주들은 *B. cereus* JBE 및 *B. licheniformis* SCD strain들을 제외하고 표준 균주(type strain)이었으며 JBE 및 SCD strain들은 순창장류연구소가 수집하여 16S rRNA 유전자 서열 판독 후 계통도 분석과 46 종류의 생화학적 검사에 의해 동정된 균주들이었다. 배양온도로 *A. ochraceus*는 25°C, *L. brivis* 28°C, *Aspergillus* 및 *C. albicans*는 30°C, 나머지 균들은 37°C에서 배양하였다. 이들 균주 증식에 대한 SCK 121057 균의 길항력은 각 균의 최적 온도에서 배양한 뒤 paper disc 주변의 투명한 직경으로 표시하였다.

## 2. 결과

### 가. SCK 121057의 항균 spectra

SCK 121057균의 병원성 세균 및 곰팡이에 대한 항균 효과는 아래 Table에 요약되었다. 표준 균주들과 전통 장류에서 분리한 *B. cereus* 12종을 대상으로 한 증식 억제 효과에서, 저해 정도에 차이는 있었으나 12 종 모두 SCK 121057의 항균 물질에 의해 저해를 받았다.. 이러한 점을 고려할 때 장류 발효균으로 SCK 121057과 같은 *B. cereus* 저해균의 사용은, HACCP 시스템의 도입이 어려운 장류 업체에서 오염 문제를 해결할 수 있는 효과적 대안으로 여겨진다. 장류 주요 발효 균주들인 *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 각 6종을 대상으로 저해 효과를 확인한 결과 *B. licheniformis*에 대해서는 전혀 증식저해를 보이지 않았으나 *B. subtilis*들에 대해서는 모두 증식이 억제되었다. 따라서 SCK 121057균을 장류 주 발효균으로 사용할 경우 *B. subtilis* 들은 증식저해 때문에 발효과정에 효과적으로 관여 못할 것으로 예상되었다. 이 항균 물질은 또한 효모인 *Candida albicans*를 제외하고 곰팡이들에 대해 항진균 특성을 나타냈는데, ochratoxin A 생산균인 *A. ochraceus*와 aflatoxin B, G, M을 생산하는 *A. flavus* 및 *A. parasiticus* 균들에 대해 효과적(투명한 직경 9-17 mm)이었다. 전통 장류 발효 시 mycotoxins의 생성은 위생상 중요한 문제이고 이들 독소들은 간암이나 신장 독성을 유발할 수 있기 때문에 항진균 효과를 가진 이 균의 사용은 숙성과정에서 위생 발효를 위해 가치가 있을 것으로 예상된다. 또한 이 항균 물질은 병원성 세균으로서 *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus*에 대한 저해 능력(투명한 직경 10-12 mm)이 있었고 특히 식중독과 염증 반응에 중요한 병원성 균인 *S. aureus*는 5 균주 모두 증식이 확실히 억제되었다. 앞으로 식품 이외 의료나 위생분야에서 사용 가능성을 위해 methicillin 저항 균주(MRSA)를 포함하는 *S. aureus*균들에 대해 이물질의 항균력을 광범위하게 조사할 필요가 있다.

## 6절 Isolation and characterization of biogenic amine degrading bacteria in fermented soybean products

### 1. Biogenic amines의 일반적 특성

Biogenic amine은 지방족(putricine, cadaverine, spermine, spermidine), 방향족(tyramine, phenylethylamine), 헤테로 방향족(histamine, tryptamine)의 구조를 가진 염기성 질소화합물이다. 식품에서 미생물의 amino acid decarboxylase 작용에 의해 아미노산으로 부터 형성되는 이 물질들은 주로 어류 및 해산물과 청국장, 된장, 치즈, 포도주, 맥주와 같은 발효식품에서 주로 발견되는데 세균에서는 *Acromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiela*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* 속 등이 amino acid decarboxylase를 가지는 것으로 보고되고 있다(1).

### 2. Biogenic amines의 생체내 대사

음식을 통해 소장에서 흡수 후 이들 biogenic amine들은 인체 또는 미생물의 대사 과정이나 콩팥에서 배출을 통해 제거된다. 인간은 monoamine oxidase (MAO, EC 1.4.3.4)와 diamine oxidase (DAO, EC 1.4.3.6)가 biogenic amines 분해에 주 역할을 하는 것으로 알려져 있다(2). histamine의 경우 인체 내에서 histamine N-methyltransferase를 통해 N-methylhistamine으로 전환 후, monoamine oxidase (MAO)에 의해 N-methylimidazolylacetic acid로 분해, 또는 diamine oxidase에 의해 imidazolylacetic acid로 산화된다(3). 또한 콩팥은 혈액내의 histamine을 methyl화 시킨 뒤 오줌으로 배설하며, 소장 내에서는 미생물에 의해 활성이 없는 형태인 acetylhistamine으로 전환된다(1). 그러나 식품을 통해 인체 처리 한도 이상을 섭취하든지, MAO 저해제를 섭취하는 경우, 또는 장 질환이 있는 경우(1)에는 분해되지 않은 biogenic amines의 약리적 특성에 의해 독성이 나타날 수 있다(Table 1). 현재 각국의 식품에서 biogenic amines 전체량에 대한 허용 상한선은 정해 있지 않으나 일부 생선류, 육류 또는 그 통조림에 대한 histamine 가이드라인은 정해 놓고 있다. 예를 들어 유럽 연합에서 고등어, 삼치, 청어과 날 생선은 100 mg/kg 이하, 염장 생선은 200 mg/kg이하의 histamine을 함유해야 한다고 규제하고 있다(1).

Table 1. Pharmacological effects and toxicity of biogenic amines

Biogenic amine	Pharmacological effects	Toxicity
Histamine	Dilatation of periperal blood vessels, capillaries, and arteries; contraction of intestinal smooth muscle; sensory and motor neuron stimulation	Hypotension, flushing, headache, abdominal cramps, diarrhoea, vomiting, pain, itching (urticarial lesion)
	Peripheral vasoconstriction; increase of cardiac output; cause migraine; increase	Hypertension, headache

	of respiration and blood sugar level	
Putrescine & caraverine	Hypotension, bradycardia, paresis of the extremities	Formation of heterocyclic carcinogenic nitrosamines, nitrosopyrrolidine and nitrosopipidine (reaction with nitrite)

### 3. Biogenic amines 형성 조건

Biogenic amines의 형성은 식품 중의 아미노산 함량과 미생물이 분비하는 L-amino acid decarboxylase의 생성 양과 활성도에 의해 결정된다. Decarboxylase 작용에 의해 아미노산 histidine은 histamine, tyrosine은 tyramine, tryptophane은 tryptamine, arginine은 putrescine, lysine은 cadaverine으로 바뀌게 된다. 세균 amino acid decarboxylase의 최적 pH는 일반적으로 산성에서 활성이 높고, 산에 대한 방어 기작으로 산성화 되었을 때 미생물이 이 효소 생성량을 늘리는 것으로 알려져 있다. 환경적 요소로서 온도의 영향이 가장 큰데 세균의 최적 증식 온도에서는 decarboxylase 활성 증가로 biogenic amine 생산량이 크게 증가하는 반면 온도가 낮아져 증식이 멈추게 되면 효소 활성 또한 급격히 감소하였다(4). 이러한 이유로 미생물 증식이 잘되고 biogenic amines 생산 조건을 갖춘 식품들은 cold chain에 의한 유통 과정이 필요하다. NaCl은 tyrosine decarboxylase활성을 증가시키는 반면 histidine decarboxylase 활성을 억제하며(5), 산화환원 전위를 낮춘 혐기 상태의 식품에서 histamine의 생산은 증가하는 것으로 나타났다(1).

### 4. 우리나라 식품에서 biogenic amine들의 분포

조 등(6)은 국내 유통 발효 식품 중에 biogenic amines들의 분포를 체계적으로 조사하였다. 특히 한국인의 주 부식인 전통 된장에서 putrescine은 99.6-1453.7(평균 462.6) mg/kg, histamine은 260.1-952(평균 569.4) mg/kg, tyramine은 284.7-1430.7(평균 669.5) mg/kg으로 분석한 34종의 식품가운데 평균적으로 가장 높았으며, 다음으로 멸치 젓갈(putrescine, histamine, tyramine 각 평균 86.5, 624.5, 330.1 mg/kg, 까나리 젓갈(각 평균 84.9, 584.2, 342.7 mg/kg), 시판 간장(각 평균 56.8, 129.8, 594.5 mg/kg), 전통 간장(각 평균 376.9, 225.9, 241.6 mg/kg)들이 높은 수치를 보였다. 김치의 경우 putrescine, histamine, tyramine의 평균 함량은 장류나 젓갈보다 낮은 수준으로 각각 69.7, 50.0, 49.4 mg/kg이었다. 한국인의 음식 특성 상 일일 섭취량에서 젓갈보다 장류 섭취량이 많다는 것을 고려하면, 이 결과들은 장류가 biogenic amine의 주 공급원이 될 수 있다는 것을 보여주었다. GenBank database를 검색했을 때 콩류 발효에 관여하는 미생물들인 *Bacillus*, *Aspergillus*, Lactic acid bacteria, 효모들은 amino acid decarboxylase 유전자들을 함유하고 있다. 단백질 함량이 높은 콩과 proteases 활성이 매우 높은 *Bacillus* sp.와 *Aspergillus* sp.의 존재, 미혐기적 환경과 적당한 발효 온도를 고려할 때 장류는 biogenic amines을 생산하기 좋은 환경이라 할 수 있다. 그러나 장류에서 biogenic amines을 제어할 수 있는 조건들이 확립되어 있지 않아 공장형 된장까지도 비교적 높은 수준의 biogenic amines을 함유(putrescine, histamine, tyramine 각각 평균 46.4, 83.6, 133 mg/kg)한다는 점에서 저감화를 위한 방법 개발이 필요한 실정이다.



5. 장류에서 biogenic amines 생성 제어 방법

장류의 biogenic amine 함량은 환경적 요인과 함께 발효 미생물의 종류와 특성, 개수에 의해 결정되므로 이들을 제어하는 기술이 필요하다. 그러나 pH, 발효, 숙성, 보관 시 온도, 염도 등의 환경적 요소도 미생물의 증식과 biogenic amine 생산 조건과 관련되어 있으므로 결국은 미생물의 고유 특성이 biogenic 함량을 결정하는 요인이 된다. 장류 발효에서 주요 발효균은 *Bacillus*와 *Aspergillus*이고 이들에 의한 biogenic amines 생산은 종(species) 수준이 아닌 균주(strain) 수준에서 영향을 받는다는 것을 biogenic amine 비생산 균주들의 선발동안 발견했다. 따라서 장류의 biogenic amines 생성 제어를 위해서는 장류 발효, 숙성, 보관 조건하에서 이들 물질을 생성하지 않는 발효 균주 선발과 함께 분해까지 할 수 있는 균주 선발이 가장 효과적인 방법이 될 것이다.

6. 장류 *Bacillus* 균주 선발 전략

83종의 장류 시료들로부터 biogenic amines 비생산 *Bacillus* 균주와 분해 균주의 선발을 위한 flow chart는 Fig. 1과 같았다. 장류에 직접 적용할 수 있는 균주들을 분리하기 위해 biogenic amines 비 생산 및 분해 균주들을 대상으로 *Bacillus cereus* 억제 능력, glutamate 생산능, *Bacillus cereus* 장독소 생산 유무에 대한 선발 과정을 거친 뒤 16S rRNA 유전자 서열 분석과 생화학적 검사(BCL card, Vitec II)로 균주 동정을 수행하였다.

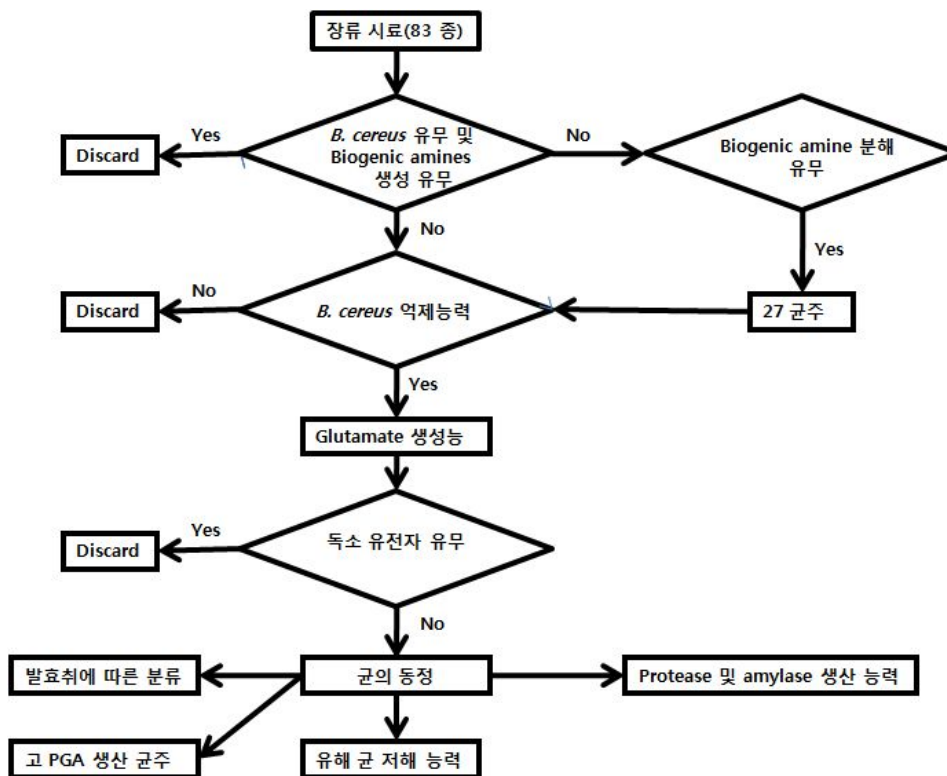


Fig. 1. Flow chart of procedures for the selection of industrially applicable *Bacillus* strains

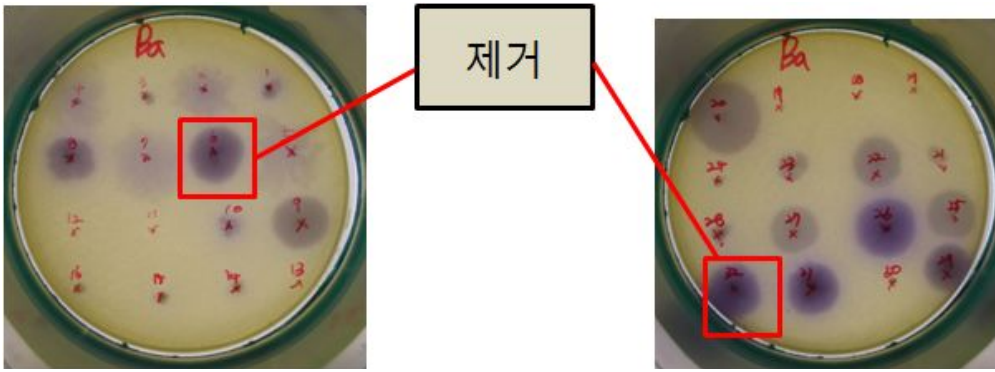
사. Biogenic amines을 생산하지 않는 균주 선발법

장류 시료가 많아 biogenic amines 생산 균주의 선택적 확인을 위한 high throughput screening 검색 방법이 필요했다. Biogenic amine들은 비공유 전자쌍을 내놓을 수 있는 질소 함유 염기이기 때문에 biogenic amine을 생성하는 경우 배지의 pH는 증가될 것이고 이 변화된 pH는 배지에 함유된 indicator에 의해 확인될 수 있다. 즉, 목표 미생물이 amino acid decarboxylase를 생산할 경우 선택 배지에 첨가된 L-histidine 또는 L-tyrosine은 염기인 histamine이나 tyramine로 바뀌며, 이 때 변화된 pH는 cresol red의 변색으로 확인할 수 있다. 이 원리를 적용한 배지(Table 2)를 이용하여 1 차적으로 biogenic amine을 생산하지 않는 Bacillus 균주들을 선별할 수 있었다 (Fig. 2). 보라색이 진할수록 biogenic amines을 많이 생산하는 균주로 생각되었으나 1차적으로는 옅은 색의 집락까지도 다음 선발을 위한 대상 균주에서 제외시켰다.

Table 2. A Bacillus medium for the detection of biogenic amine formation.

Medium composition	Concentration (g/100 ml)
Tryptone	0.5
Yeast extract	0.5
Meat extract	0.5
Sodium chloride	0.25
Glucose	0.05
Tween 80	0.1
MgSO <sub>4</sub>	0.02
MnSO <sub>4</sub>	0.005
FeSO <sub>4</sub>	0.004
Ammonium citrate	0.2
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
CaCO <sub>3</sub>	0.01
Pyridoxal-5-phosphate	0.005
Histidine + tyrosine	1.0
Bromocresol purple	0.006
Agar	2
adjusted to pH 5.3	

Fig. 2. Selective color change around Bacillus colonies that produced biogenic amines.



### 7. Biogenic amines 분해 균주 선발

지금까지 여러 세균들이 biogenic amines을 분해하는 것으로 보고되었다. *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007은 histamine 산화에 특이적으로 관여하는 diamine oxidase를 가지고 있었다(7). 멸치액젓에서 분리한 극도의 호염성 고생물인 *Natrinema gari*는 고염 배지에서 histamine을 분해하는 것으로 보고되었으며 분해 최적의 pH와 온도는 각각 6.5-8.3, 40-55°C이고, NaCl 농도는 3.5-5M 이었다(8). 또한 Tyramine oxidase를 가지고 있는 *Micrococcus varians*는 소시지 숙성 과정 동안 tyramine을 분해시키는 것이 관측되었다(9). 이외에 *Lactobacillus spp.*도 histamine을 분해시키는 능력을 가지고 있었다(10).

Biogenic amine 선택 배지(11)를 이용하여 전국에서 수집한 83종의 장류로부터 biogenic amine을 생산하지 않는 106개의 균주를 분리하였다. 이들 균들 중 biogenic amine을 분해하는 균주를 선발하는 것은 이미 여러 미생물들의 복합적인 발효에 의해 생성된 장류 내 biogenic amine의 제거에 가장 효율적인 방법이라 할 수 있다. 이를 위해 우리는 Satake 방법(12)을 변형하여 유일한 탄소원 및 질소원으로 2% histamine 및 tyramine을 사용한 pH 7의 합성 배지를 개발하였다. 놀랍게도 biogenic amine을 생산하지 않았던 이들 균들 중 절반이 넘는 67개 균주가 이 배지에서 자랐고 이들 가운데 성장이 빨라 콜로니 직경이 컸던 26 종을 분리하였다(Fig. 3). *B. cereus*는 장류 식중독 균으로 발효 동안 증식하기 쉽기 때문에 이 식중독 균에 길항적으로 작용하는 균주의 선발은 장류 발효에 크게 유익하다. 이들 26 균주들 중 어떤 균주가 장류 식중독 균인 *Bacillus cereus*를 억제하는지 확인하기 위해 paper disc 방법을 사용하여 증식억제능력이 있는 18종을 선발하였다(Fig. 4). 이들 중 억제 능력이 뛰어난 14종을 대상으로 각각 biogenic amine을 첨가한 합성 배지에 접종하고 20일 간 배양 후, HPLC 상에서 histamine 또는 tyramine 분해 능력이 높은 균주 6종을 선발하였다(Fig. 5).

Table 3. Medium composition for the culture of Biogenic amine-degrading bacteria

Ingredient	Concentration
Histamine + tyramine	0.2%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2%
NaCl	0.1%
MgSO <sub>4</sub>	0.01%
agar	1.5%
Final pH 7.0	

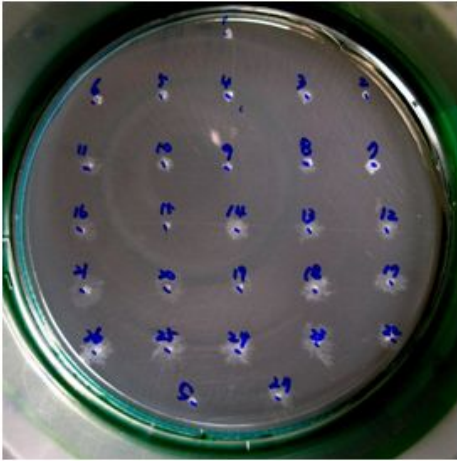


Fig. 3. Growth of *Bacillus* strains with no production of biogenic amines on the minimal synthetic medium containing histamine and tyramine as sole carbon and nitrogen sources

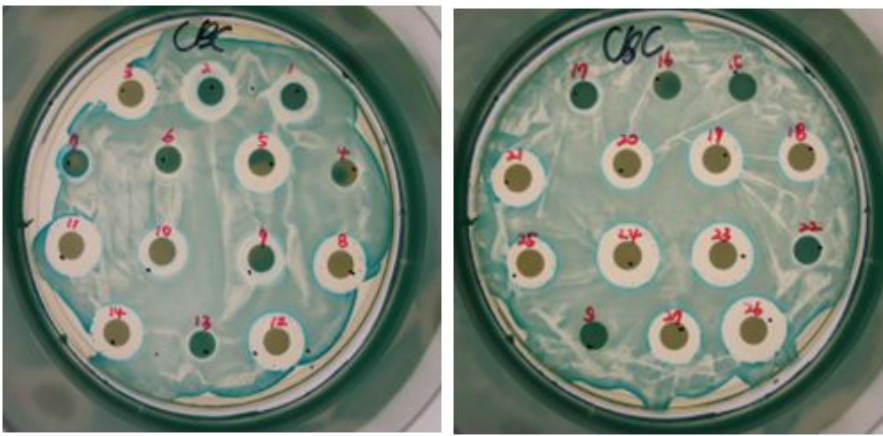


Fig. 4. Selection of antagonistic *Bacillus* species against *Bacillus cereus* by paper disc screening

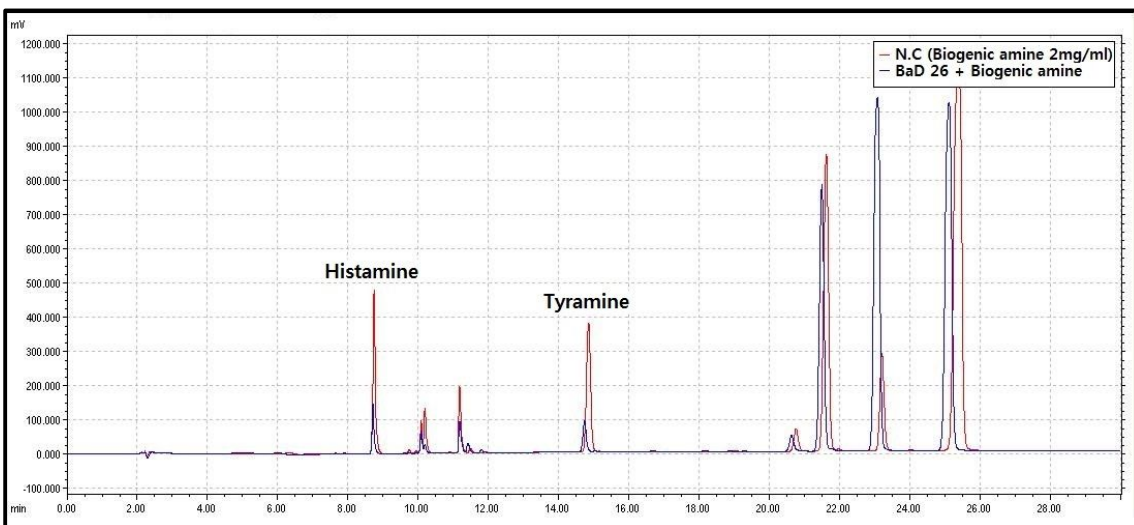


Fig. 5. HPLC chromatogram indicating the degradation of histamine and tyramine after reaction with the culture supernatant of *Bacillus* strain no. 26.

Table 4. Change in residual histamine and tyramine during the reaction with the cell pellet of *Bacillus* strain no 24.

Residual %	N.C	30min	1hr	3hr	6hr	12hr	48hr
Histamine % (mg/ml)	100 (2)	65 (1.3)	73 (1.46)	60 (1.2)	57 (1.14)	55 (1.1)	54 (1.08)
Tyramine % (mg/ml)	100 (2)	33 (0.66)	37 (0.74)	29 (0.58)	29 (0.58)	23 (0.46)	21 (0.42)

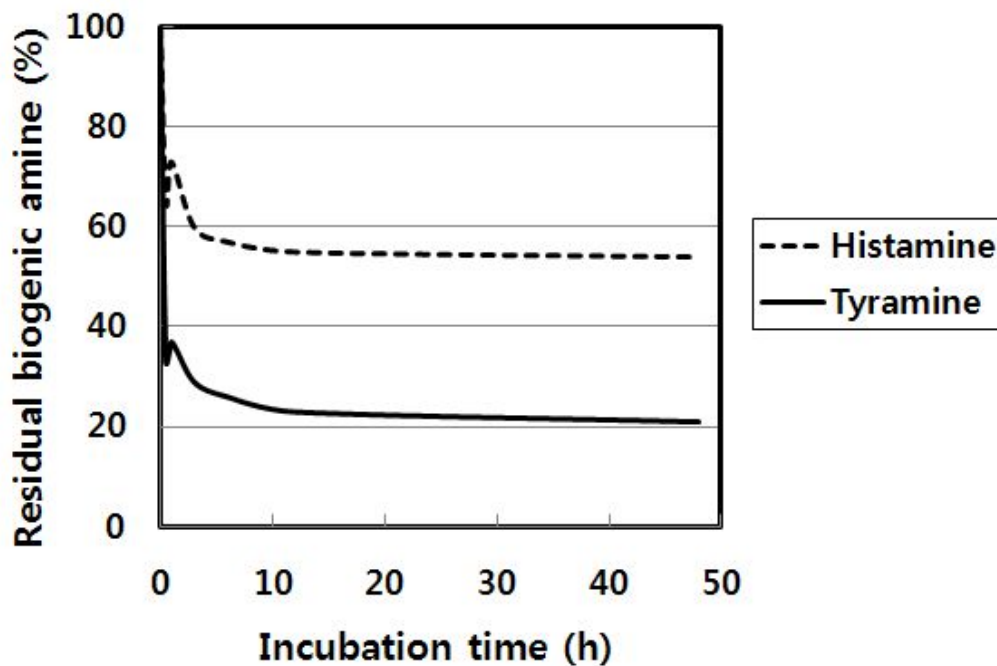


Fig. 3. Change in residual histamine and tyramine during the reaction of biogenic amine-containing buffer with the cell pellet of *Bacillus* strain no 24.

#### 8. Biogenic amines 분해 *Bacillus* 균주들의 동정

분리한 균주들의 동정을 위해 16S rRNA 유전자 서열 분석과 48 종의 생화학 검사를 수행하였다. 16S rRNA 유전자 서열 분석은 27F와 1492R의 universal primers를 이용 PCR을 수행하여 유전자 염기 서열을 분석한 뒤 RDP II database상의 type strain을 대상으로 하여 phylogenetic tree를 작성하였다. 생화학 검사는 Vitec II 장비에서 분석할 수 있는 BCL Card를 사용하였다. 26 종의 Biogenic amine 분해 *Bacillus* 균주들 중 분해 능력이 컸던 5 종의 동정 결과들은 다음과 같았다(Table 5).

Table 5. Identification of biogenic amine degrading *Bacillus* strains

Strain	16S rRNA sequences/BCL card(Vitec II)
--------	---------------------------------------

Strain no 3, 5, 12, 19, 24, 26

*Bacillus* spp.

Table 6. Biogenic amine 분해 주요 *Bacillus* strain들의 16S rRNA 서열과 RDP II SeqMatch에 의한 Type strain과 비교 결과.

Sample no.	16S rRNA 유전자 서열	Type strain들과 비교한 RDP II SeqMatch/BCL Card, Vitec II
Strain no. 3	<p>TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC  GAGCGGACAGATGGGA  GCTTGCTCCCTGATGTCAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGG  GTAACCTGCCTGTAAG  ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTG  ATTGAACCGCATGGTTC  AATTATAAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCC  GCGGCGCATTAGCTAGT  TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCT  GAGAGGGTGATCGGCC  ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  GTAGGAATCTTCCGC  AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA  GGTTTTCGGATCGTAAA  ACTCTGTGTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGG  TACCTTGACGGTACCTA  ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATA  CGTAGGTGGCAAGCGT  TGTCGGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGGCAGGCGGTTTCTTAA  GTCTGATGTGAAAGCC  CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAG  TGCAGAAGAGGAGAGT  GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA  ACACCAGTGGCGAAGGC  GACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  AGCGAACAGGATTAGA  TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTA  GAGGGTTTTCCGCCCTTT  AGTGTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGG  TCGCAAGACTGAAACT  CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  TTAATTCGAAGCAACG  CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAG  ATAGGCTTCCCTTC  GGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT</p>	<p><i>Bacillus</i>  <i>licheniformis</i>/  <i>Bacillus</i>  <i>licheniformis</i></p>

	<p>CGTGAGATGTTGGGTT  AAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT  CAGTTGGGCACTCTAA  GGTACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  AAATCATCATGCCCTT  ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGG  CAGCGAAGCCGCGAGGC  TAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTG  CAACTCGACTGCGTGA  AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA  TACGTTCCCGGGCCTTG  TACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAAACCCCGAAGT  CGGTGAGGTAACCTTT  TGGAGCCAGCCCGCAAG</p>	
Strain no. 5	<p>GATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGC  AAGTCGAGCGGACAGA  TGGGAGCTTGCTCCCTGATGTGACGCGGGACGGGTGAGTAACA  CGTGGGTAACCTGCCT  GTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT  GCTTGATTGAACCGCAT  GGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATG  GACCCGCGGCGCATTAG  CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCC  GACCTGAGAGGGTGAT  CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  CAGCAGTAGGGAATCT  TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGA  TGAAGGTTTTTCGGATC  GTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAG  GGCGGTACCTTGACGGT  ACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG  TAATACGTAGGTGGA  AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAGCCGCGCAGGCGGTTT  CTTAAGTCTGATGTGA  AAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAC  TTGAGTGCAGAAGAGG  AGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG  GAGGAACACCAAGTGGCG  AAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCG  TGGGAGCGAACAGGA  TTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAG  TGTTAGAGGGTTTTCCGC  CCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  TACGGTCGCAAGACTG  AAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA  TGTGTTTTAATTCGAAG  CAACGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCC  TAGAGATAGGGCTTCC  CCTTCGGGGGACAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT  CGTGTGCTGAGATGTT  GGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCA  GCATTCAGTTGGGCAC  TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  ACGTCAAATCATCATGC  CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAA  AGGGCAGCGAAGCCGC  GAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCA  GTCTGCAACTCGACTG  CGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG  TGAATACGTTCCCGGG  CCTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAAACCC  GAAGTCGGTGAGGTAA</p>	<p><i>Bacillus</i>  <i>licheniformis</i>/  <i>Bacillus</i>  <i>licheniformis</i></p>

	CCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG AAGTCGT	
Strain no. 12	<p>CTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGGAGCTTGCTCCCTT AGGTCAGCGCGGACG GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC TCCGGGAAACCGGGGCT AATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAG GTGGCTTTTAGCTACCA CTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC GGCTCACCAAGGCGAC GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG AGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA GTCTGACGGAGCAACGC CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAACTCTGTTGTT AGGGAAGAACAAGTACC GTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCC ACGGCTAACTACGTGCC AGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT ATTGGGCGTAAGCGCGC GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACC GGGGAGGGTCATTGGA AACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACG TGTAGCGGTGAAATGCG TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT CTGTAAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGAT GAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGC AAACGCATTAAGCACTC CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG ACGGGGGCCCGCACAAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCC TCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTG ACAGGTGGTGCAATGGT TGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGAAC GAGCGCAACCCTTGAT CTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG TGACAAAACCGGAGGAA GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT ACACACGTGCTACAAT GGGCGAACAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCC ACAAAATCTGTTCTCAG TTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGC TAGTAATCGCGGATCA GCATGCCCGGTGAATACGTTCCCAGGGCTTGTACACACCGCCC GTCACACCACGAGAGT TTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCG CCGA</p>	<p><i>Bacillus licheniformis/</i> <i>Bacillus licheniformis</i></p>
Strain no. 19	<p>AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTA ATACATGCAAGTCGAGC GGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGGTG AGTAACACGTGGGTAA CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA CCGGATGCTTGATTGA ACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTT ACAGATGGACCCGCGGC GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAT GCGTAGCCGACCTGAGA GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTAG</p>	<p><i>Bacillus licheniformis/</i> <i>Bacillus licheniformis</i></p>



	<p>GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG  TGAGTGATGAAGGTTT  TCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGGAAGAACAAGTACCGTT  CGAATAGGGCGGTACCT  TGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA  GCCGCGTAATACGTA  GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAG  CGGTTTCTTAAGTCT  GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACT  GGGAACTTGAGTGCA  GAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG  AGATGTGGAGGAACACC  AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTGACGTGAGGCGC  GAAAGCGTGGGGAGCG  AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG  TGCTAAGTGTTAGAGGG  TTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCC  TGGGAGTACGGTCCG  AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG  TGGAGCATGTGGTTTAA  TTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTCTG  ACAACCCTAGAGATAG  GGCTTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC  GTCAGCTCGTGTCTG  AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTT  AGTTGCCAGCATTCACT  TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  GGGGATGACGTCAAATC  ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGC  AGAACAAGGGCAGCG  AAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCC  GATCGCAGTCTGCAAC  TCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA  TGCCGCGGTGAATACGT  TCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGGAGAGTTTGT  AACACCCGAAGTCGGT  GAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAG</p>	
Strain no. 24	<p>ATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCTGCCTAATACATGCA  AGTCGAGCGGACCGAC  GGGAGCTTGCTCCCTTAGGTGAGCGGGGACGGGTGAGTAACAC  GTGGGTAACCTGCCTG  TAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATG  CTTGATTGAACCGCATG  GTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCCTGACAGATGG  ACCCGCGGCGCATTAGC  TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGCGACGATGCGTAGCCG  ACCTGAGAGGGTGATC  GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC  AGCAGTAGGGAATCTT  CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT  GAAGGTTTTCGGATCG  TAAAACCTCTGTTGTTAGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGG  CGGTACCTTGACGGTA  CCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  AATACGTAGGTGGCAA  GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTT  CTTAAGTCTGATGTGA  AAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAC  TTGAGTGCAGAAGAGG  AGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG  GAGGAACACCAGTGGCG  AAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCGCGAAAGCG</p>	<p><i>Bacillus</i>  <i>licheniformis</i>/  <i>Bacillus</i>  <i>licheniformis</i></p>

TGGGGAGCGAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG TGTTAGAGGGTTTCCGC CCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG TACGGTCGCAAGACTG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCA TGTGGTTTAATTGGAAG CAACGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCC TAGAGATAGGGCTTCC CCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT CGTGTGAGATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTTGCCA GCATTCAGTTGGGCAC TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG ACGTCAAATCATCATGC CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAA AGGGCAGCGAAGCCGC GAGGTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCCGGATCGCA GTCTGCAACTCGACTG CGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG TGAATACGTTCCCGGG CCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCC GAAGTCGGTGAGGTAA CCTTTTGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG A
---

9. *Bacillus licheniformis* strain no, 24가 생산하는 biogenic amines 분해 효소의 최적 pH

Strain 24를 배양 후 분리한 cell pellet을 사용하여 45°C에서 3시간 동안 pH 4.5, pH 7, pH 8.5에서 각각 기질로서 biogenic amine과 반응 시켰다. HPLC에서 biogenic amine 분해 정도를 측정한 결과 histamine 분해율은 각 pH에서 43%, 45%, 42%였고 tyramine 분해율은 71%, 70%, 68%였다. pH에 의한 활성변화율은 큰 변화가 없었지만 histamine 분해는 중성에 서, tyramine 분해는 산성에서 약간 더 높음을 보였다(Table 6).

Table 6. Optimal pH stability of biogenic amine degrading enzyme produced from *Bacillus* strain no 24.

Biogenic amine	N.C	pH 4.5	pH 7	pH 8.5
Histamine % (mg/ml)	100 (2)	57 (1.14)	55 (1.1)	58 (1.16)
Tyramine % (mg/ml)	100 (2)	29 (0.58)	30 (0.6)	32 (0.64)

10. *Bacillus licheniformis* strain no, 24가 생산하는 biogenic amines 분해 효소의 최적 온도

Strain no 24를 배양한 후 분리한 cell pellet을 사용하여 각 온도에서 3 시간 동안 pH 7에 서 각각 기질로서 biogenic amine과 반응시켰다. HPLC에서 biogenic amine의 분해 정도를 측정한 결과 histamine과 tyramine 모두 45°C에서 각각 44%, 68%의 분해율을 보여 열안정성이 높은 효소임을 보였다(Table 7).

Table 7. Thermal stability of biogenic amine-degrading enzyme produced from *Bacillus* strain no 24.

Biogenic amine	N.C	25°C	30°C	37°C	45°C	60°C
Histamine % (mg/ml)	100 (2)	93 (1.86)	71 (1.42)	67 (1.34)	56 (1.12)	78 (1.56)
Tyramine % (mg/ml)	100 (2)	51 (1.02)	36 (0.72)	35 (0.7)	32 (0.64)	95 (1.9)

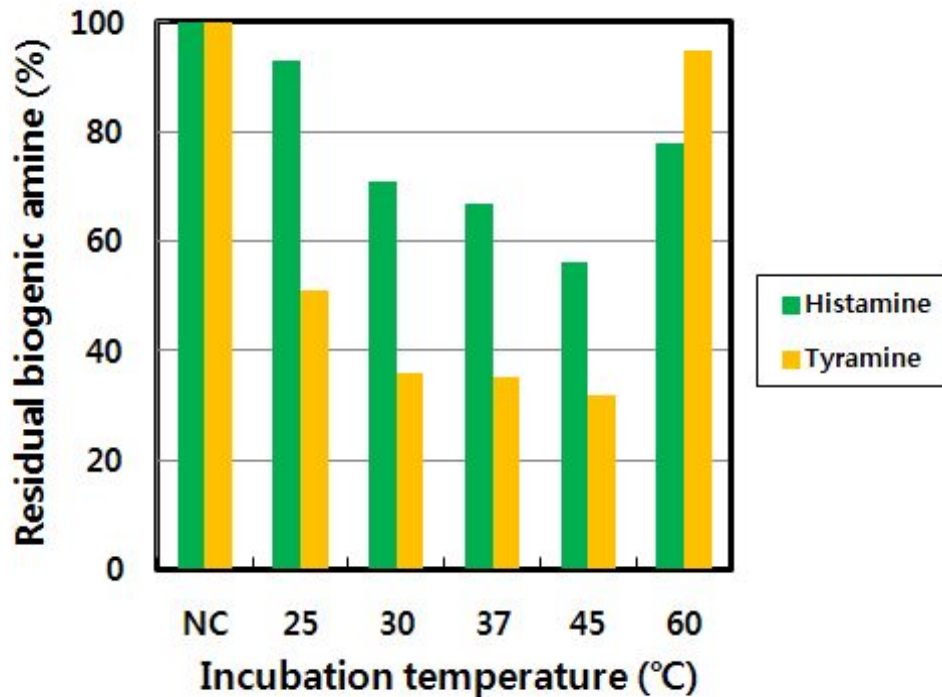


Fig. 4. Change in concentration of residual biogenic amines after 3 h of reaction at various temperature.

## 7절 장류 발효용 우수 lactic acid bacteria의 분리

### 1. 균주 선발 목표

- 가. Biogenic amines 을 최소로 생산할 것
- 나. 다른 공존 발효균들을 저해하지 않을 것

### 2. 선발방법

- 가. 전국적으로 종류별(된장, 간장, 청국장, 고추장, 메주)장류의 수집(총 83종)
- 나. 각 sample 0.1g을 MRS Broth배지 1ml에 현탁
- 다. 각각을 희석 시킨 후 MRS Agar배지에 도말 후 30°C에서 21hr 배양.
- 라. Colony 선별 (각 sample당 20개 colony 분류)

## 균주 선발 방법의 흐름도

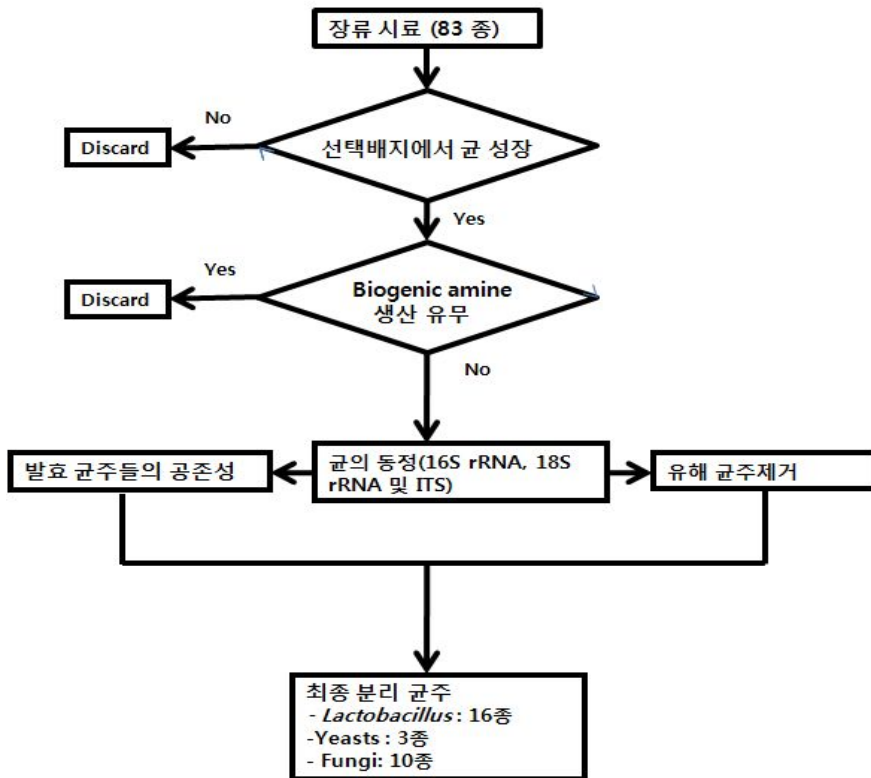
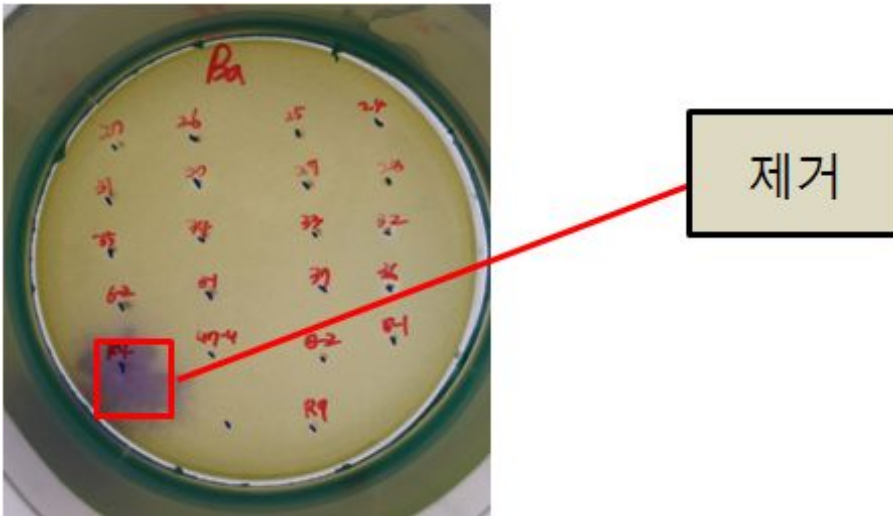


Table 2. *Lactobacillus* medium for the detection of biogenic amine formation.

Medium composition	Concentration (g/100 ml)
Tryptone	0.5
Yeast extract	0.5
Meat extract	0.5
Sodium chloride	0.25
Glucose	0.05
Tween 80	0.1
MgSO <sub>4</sub>	0.02
MnSO <sub>4</sub>	0.005
FeSO <sub>4</sub>	0.004
Ammonium citrate	0.2
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
CaCO <sub>3</sub>	0.01
Pyridoxal-5-phosphate	0.005
Histidine + tyrosine	1.0
Bromocresol purple	0.006
Agar	2

adjusted to pH 5.3



### 3. 다른 선발 발효 균주들과의 길항관계

이미 분리된 발효균주 중 현재 사용 중인 *Bacillus licheniformis* 4개 균주 및 *A. oryzae* (1), *Mucor* (1), 효모(2), *Lactobacillus* (6)를 액체 배양하여 배양 상층액을 이용, 억제 유무를 확인했다. 사용한 배지로는 *Bacillus licheniformis*는 NA(nutrient agar), *A. oryzae*, *Mucor*, 효모는 PDA(potato dextrose agar)를, *Lactobacillus*는 MRS, *B. cereus*는 CBC(chromogenic bacillus cereus) 배지를 사용했다.

		배양상층액(Paper disc)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Plate 배양	<i>P. pentosaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. acidilactici</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. brevis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SDG 1208	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
	SDG 1210	++	++	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-
	SCG 1216	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	SCC 125037	++	++	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-
	<i>B.cereus</i>	+	+	-	-	+	-	++	-	-	-	-	-
	<i>Z. rouxii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pichia anomala</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Mucor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
총무 발효 균주	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

\*젖산균(paper disc)들은 초기 성장 동안 *Bacillus* 성장을 저해하나 21시간 배양 후부터는 halo가 *Bacillus* 성장으로 덮이기 시작하여 48 시간 후에는 halo가 사라짐. 이 저해 효과는 젖산균이 생산한 낮은 pH영향으로 판단됨

4. 균주 선발 과정을 통하여 최종 17 종의 선발 균주의 동정

*Pediococcus pentosaceus* (6종)

- SDL 1401, SCL 1403, SDL 1404, SDL 1409, SDL 1415, SDL 1416

*Pediococcus acidilactici* (7종)

- SDL1402, SDL 1405, SDL 1406, SDL 1407, SDL 1414, SKL 1418, SCL1420

*Lactobacillus plantarum* (1종) - SDL 1413

*Lactobacillus brevis* (2종) - SDL 1408, SDL 1411

*Enterococcus lactis* (1종) - SCL 1421

## 8절 장류 발효용 우수 효모 균주의 분리

### 1. 선발 목표

- 가. Biogenic amines 을 무생산균주
- 나. 다른 발효균을 저해하지 않을 것

### 2. 선발 방법

- 가. Screening: 3M Petrifilm을 이용
- 나. PDA 곰팡이 배지를 이용한 선별

### 3. Biogenic amine 무생산균주 선별

- 가. 18s rRNA 서열 판독

### 4. 2차 분리 방법

- 가. 분리된 colony을 toothpick으로 찍어 미리 만들어둔 PDA와 biogenic amine선별 배지를 같은 위치에 각각 접종.
- 나. 30℃에서 21hr동안 배양.
- 다. Biogenic amine선별 배지에서 보라색을 띄지 않는 균만을 수집하였다(10개 균주)

### 5. 동정 후 최종 선발 균주

- 가. *Zygosaccharomyces rouxii* (2종)- SDY 1501, SCY 1502
- 나. *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) (1종)- SKY 1503

## 9절 장류 발효용 우수 곰팡이 균의 분리

### 1. 선발 목표

가. Biogenic amines을 생산하지 않을 것

나. 발효 중 유해한 성분을 만들지 않을 것

다. 다른 발효균을 저해하지 않을 것

\*식약청 기준령

- 2007년 12월부터 된장, 고추장 및 고춧가루내의 aflatoxin B1함량은 10 $\mu$ g/kg이하, 총 aflatoxin을 15 $\mu$ g/kg 이하로 하는 기준은 2009년 9월부터 시행

### 2. 선발방법

가. 1차 screening

3M Petrifilm을 이용 특이적 colony를 선별

나. 2차 균주 선별

PDA 곰팡이 배지를 이용, *A. oryzae*와 *Rhizopus* 선별

다. 3차 균주 선별

Coconut medium 을 이용 *A. flavus* 및 *A. parasiticus* 분리

라. 4차 균주 선별

Proteinase 및 amylase 활성 측정

마. 5차 균주 동정

ITS 1 & ITS 2 유전자 서열 판독

Coconut medium에 분리된 균 접종

30 $^{\circ}$ C에서 3~4Days 동안 배양.

Coconut medium에 균이 완전히 자라면 UV를 조사하여 형광을 띄는 균주 - aflatoxin 생성균

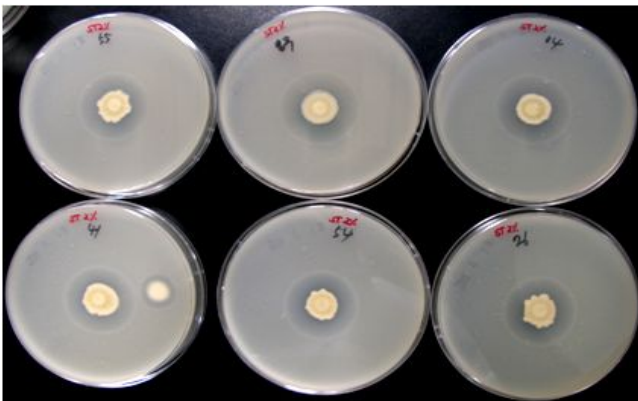
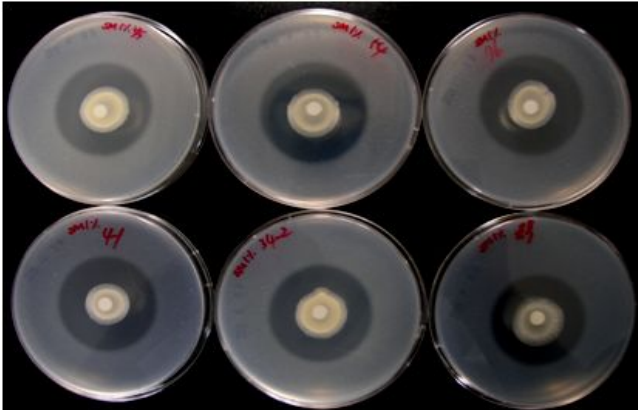
바. Coconut 배지

Coconut powder 100%	5.0 %
---------------------	-------

Agar	1.5 %
------	-------

사. Proteinase 및 amylase 활성 측정

분리된 균주를 Proteinase 및 amylase 활성 측정 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 21hr동안 배양 후 확인되는 투명한 측정 및 비교.



Isolate	Protease activity	Amylase activity	Aflatoxin production	Biogenic amine production	Identification
충무발효균주	1.76	2.1	—	—	<i>A. oryzae</i>
SKO 1101	2.17	2.5	—	—	<i>A. oryzae</i>
SCO 1102	2.22	2.3	—	—	<i>A. oryzae</i>
SCO 1103	2.16	2.7	—	—	<i>A. oryzae</i>
SCO 1104	2	2.4	—	—	<i>A. oryzae</i>
SCO 1105	2.12	1.9	—	—	<i>A. oryzae</i>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>P. pentosaceus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. acidilactici</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>L. brevis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>L. plantarum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. faecium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. lactis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SDG 1208	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—	—
SDG 1210	++	++	+	++	++	++	—	—	—	—	—	—



SCG 1216	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
SCC 125037	++	++	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-
<i>B.cereus</i>	+	+	-	-	+	-	++	-	-	-	-	-
<i>Z. rouxii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia anomala</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. oryzae</i> SKO1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
총무 발효 균주	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 10절 결론

장류에 존재하는 높은 농도의 biogenic amines을 줄이기 위한 방법으로선 전통 장류에 존재하는 발효 세균들을 대상으로 biogenic amines 분해능을 갖는 세균들을 분리하였다. 동정 결과 *Bacillus* 균으로 밝혀졌고 이 균들은 histamine의 경우 약 45%, tyramine의 경우 70% 이상의 분해율을 보여 잠재적으로 장류 제조에 사용할 수 있는 능력을 보였다. 앞으로 이 균들을 실제 장류 제품에 접종하여 사용했을 경우 biogenic amine을 줄일 수 있을지에 대한 검증이 필요하다.

## 11절 Pyrosequencing을 이용한 전통된장 제조과정 중 세균군집구조의 분석

### 1. 적요

전통 방식으로 된장을 만드는 과정 동안 세균군집의 다양성과 변화를 관찰하기 위하여 16S rRNA 유전자 서열을 기반으로 하는 pyrosequencing을 수행하였다. 전통 된장 제조에 가장 중요한 접종원으로서 볏짚에 존재하는 세균 군집을 문 수준에서 확인했을 때, 상대적 군집 비율로 1% 이상의 분포를 보였던 4 종류는 *Proteobacteria* (71%), *Actinobacteria* (20.6%), *Bacteroidetes* (4.2%), *Firmicutes* (1.3%)문이었다. 그러나 볏짚 세균 군집구조 결과와 달리 메주의 군집구조에서는 99.1%가 *Firmicutes* 문이었다. 문 수준에서 숙성 전 된장의 군집분포를 보면 *Firmicutes* 문 비율이 99.85%로 메주와 비슷한 수준이었다. 그러나 종 수준의 군집구조에서는 메주에서 32.54%의 가장 높은 군집빈도를 보였던 *Bacillus siamensis*는 0.1%로 거의 사라진 반면 *B. amyloliquefaciens*가 63.64%로 가장 높은 우점종이 되었다. 숙성 후 된장의 세균 군집구조를 보면 숙성 전에 비해 *Bacillus* 비율이 증가되었으며 이들 중 군집의 상대밀도가 가장 높았던 우점종은 *B. amyloliquefaciens* (67.3%)였고, 5 위까지 모두 *Bacillus* 종들(전체 군집 분포의 92.2%)이 차지했다. 또한 메주 내 상위 11 위까지 우점을 이루던 세균 종들 중 10 종이 숙성 후 된장에서 우점종을 형성하여, 메주 미생물들이 숙성 후 된장 발효까지 영향을 준다는 것을 보였다. 이 결과들로부터 전통 장류에서 발효 주 세균은 *Bacillus* 종이며 이들은 기본적으로 볏짚으로부터 기원되어 메주에서 우점종을 형성한 것으로 추정되었다. 따라서 풍미와 위생성이 동시에 요구되는 전통 장류의 제조를 위해서는 볏짚 표면에 이 기능을 가진 *Bacillus* 종들의 군집 분포가 필요할 것으로 예상되었다.

장류는 한국인의 밥상에 가장 중요한 부식임에도 불구하고, 장류 발효 과정 동안 미생물군집에 대한 연구들(3, 12-14)은 복합적인 발효과정 때문에 제한적으로만 진행되어왔다. 장류 발효에는 기본적으로 여러 미생물 군들이 관여하여 맛과 풍미를 만들어내므로(22) 장류제조 동안 미생물군집 연구는 장류의 발효과정을 이해하고, 발효 동안 생길 수 있는 위생적인 문제와 품질 유지를 위해 필수적으로 요구된다. 최근 장류 재료인 국내 메주들의 미생물군집 구조를 분석하기 위해 16S rRNA 유전자 서열 분석에 기반을 둔 pyrosequencing 연구가 수행되었다(11). 이 연구에서 전국적으로 수집한 18 종 메주의 우점종 세균은 문(phylum) 수준에서 전체 미생물 군집의 평균 93.6%를 차지한 *Firmicutes*였으며다음으로는 *Proteobacteria* (4.5%), *Bacteroidetes*(0.8%)순임을 보였다. 또한 *Firmicutes*의 대부분은 *Bacillus*와, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*속을 포함하는 젖산균들로서 이들 비율은 메주 산지에 따라 다르게 나타났다. 이 연구는 국내산 메주들의 미생물군집구조의 다양성에 초점이 맞추어져 있어 된장의 제조 과정 동안 미생물 군집 구조의 변화는 다루고 있지 않다. 전통 장류는 자연계 여러 미생물들의 혼합 접종에 의한 복합 발효 과정으로 이루어져 있으므로 메주에서 된장의 숙성과정을 통해 미생물 군집구조는 계속 변화될 것으로 예상된다. 따라서 발효과정 동안 이러한 군집 구조의 변화를 추적하는 것은 전통 장류가 미생물들의 상호 작용에 의해 어떻게 발효되고 장류의 풍미와 위생에 어떤 영향을 주는지 예측하는데 매우 중요한 과정이 될 것이다. 메주 제조는 대기나 토양의 미생물이 가장 들어드는 12월 말경 제조를 시작하며 전통적으로 삶은 콩을 직육면체 형태로 성형한 뒤 볏짚으로 묶거나 볏짚 위에서 2달 가량메주를 띄우는 과정을 거친다(32). 따라서 볏짚 표면에 묻어있던 균들이 메주 제조를 위한 주 미생물 공급원이 될 것이고, 이 볏짚 기원 미생물들은 이후 발효와 숙성과정 동안 미생물군집구조 형성에 기본적인 영향을 줄 것으로 예상된다. 그럼에도 불구하고 현재까지 전통 장류 제조에 볏짚의 미생물 분포가 장류의 세균군집구조에 어떤 영향을 주는지에 대한 체계적인 분석은 아직까지 보고된 바가 없다.

전국 전통 장류 시장의 약 40%를 차지하는 순창 지역은 전국적인 장류 주산지(29)로서, 전통 된장의 명맥을 유지하기 위해 미생물군집구조의 추이를 살펴보는 것은 순창 장류의 품질 및 제조 공정 개선에 중요한 자료를 제공할 수 있다. 이런 이유로 최근 미생물 생태의 표준 도구로 이용되고 있는 pyrosequencing 방법(18)을 사용하여 전통된장 제조 중 미생물 군집 구조를 확인할 필요가 있었다. Pyrosequencing은 nucleotide의 결합 동안 방출되는 pyrophosphate 검출에 기반을 둔 next-generation DNA sequencing으로서, 각 시료에 특이적인 barcode system이 pyrosequencing에 도입(21)됨에 따라 국내에서도 간석지(10), 강 오염수(8), 젓갈(23), 메주(11)등의 미생물 군집분석에 이 방법의 이용이 활발해지고 있다. 이 연구는 순창 지역의 한 전통된장업체에서 전통 방식으로 된장을 만드는 과정 동안 볏짚, 메주, 숙성 전과 숙성 후 제조 단계별 전 과정에서 세균군집의 분포와 전이과정을 조사하여 제조 과정 중 발효 세균들의 역할을 이해하는데 그 목표를 두었다.

된장은 전통 방식에 따라 제조하였다. 상온에서 20 시간 침지한 콩을 121°C, 5분 증자 후 12 cm x 20 cm x 10 cm (W x D x H) 크기(약 2.2 kg)로 메주를 성형했다. 선반 위에 볏짚(2010년 11월 채취, 전북 임실 산)을 깔 뒤 그 위에 성형한 메주를 얹고 주기적으로 볏짚 접촉면의 위치를 바꾸면서 25°C에서 60일간 발효시켰다. 발효된 메주는 표면을 세척하여 끓이지 않은 18% 염수에 넣고 45일 간 침지한 후, 메주만 건져 으갠 뒤 혼합하여 살균한 통에 담고, 100일 동안 25°C에서 숙성하였다. Pyrosequencing 분석을 위해 볏짚, 메주, 염수에 침지 후 으

겐 매주(숙성 전 된장), 숙성 후 된장을 각각 시료로 채취하였다.

매주 제조에 사용한 볏짚 표면의 세균군집구조를 분석하기 위하여 건조 볏짚을 25 mesh 크기로 분쇄 후 glass bead beater (MP Bio Laboratories, USA)를 이용하여 토양 용 Fast DNA SPIN Kit (MP Bio Laboratories, USA)로 genomic DNA를 추출하였다. 매주 및 숙성 전 된장과 숙성 후 된장 시료는 각각 stomacher 80 biomaster (Seward, UK)에서 혼합 후 볏짚에서와 같은 방법으로 genomic DNA를 추출하였다. 대장균 16SrRNA의 V1, V2, V3 다변 영역 (27-518)을 사용(16)한 Fusion Forward primer 27F는 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC (adapter)-TCAG (key)-AC (linker)-GAGTTTGATCMTGGCTCAG (27F primer)-3'로 Reverse 518R,은 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC (adapter))-TCAG (key)-Barcode-AC (linker)-WTTACCGCGGCTGCTGG (518R primer)-3'으로 구성 제작되었고, 각 시료의 Barcode는 CACTACGAG(볍짚), AGATGCTAG(매주), CACTATGTG(숙성 전 된장), TACGTAGACAG(숙성 후 된장)였다. DNA 증폭을 위해 20  $\mu$ l tube에 1  $\mu$ l template DNA, 1  $\mu$ l 각 primer(50 pmol), 1  $\mu$ l dNTP(각 100mM), 2  $\mu$ l 10 x PCR buffer, 1  $\mu$ l Taq polymerase (Roche, Germany), 14  $\mu$ l H<sub>2</sub>O의 반응 시약을 넣고 thermal cycler(Bio-Rad, USA)에서 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94°C 5분; 94°C 30초, 60°C 45초, 72°C 1분 30초로 10 cycle; 94°C 30초, 55°C 45초, 72°C 1분 30초로 20 cycle의 조건에서 수행하였다. QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 통해 정제한 PCR 산물은 GS Junior Titanium system (Roche, Germany) 염기서열분석기를 이용하여 pyrosequencing을 진행하였으며 pyrosequencing에 필요한 방법과 반응들은 제조회사(Roche)의 manual에 따라 (주)천연연구소(Chunlab, Korea)에서 수행하였다.

Barcode sorting에 따라 분리된 각 서열들에서, GL FLX software (Roche)를 사용하여 barcode 서열, primer 및 linker를 뺀 뒤 나머지 서열의 길이가 300 bp 이하인 것들은 분석에서 제외했고, Hidden Markov Model (HMMER 3.0; <http://hmmer.janelia.org/>)과 BLASTN search 를 통해 chimera 염기 서열과 16S rRNA가 아닌 서열들도 제거하였다. EzTaxon extended database (4)를 이용하여 BLASTN 탐색 실행결과로 찾은 상위 다섯 개의 hits을 대상으로 pair-wise alignment (20)를 실행한 뒤 얻은 similarity를 기준으로 분류학적 동정을 수행하였다. 3% 서열 불일치 도를 기준으로 CD-HIT program (17)을 이용하여 시료 내에 존재하는 종의 수인 operational taxonomic unit (OTU) 수를 구하였다. 통계분석은 MOTHUR program (27))을 사용해서 rarefaction curve, abundance-based coverage estimator (ACE) index, Chao1 richness index, Shannon 및 Simpson diversity indices들과 Good's coverage index (6)를 구하였다(Table 1).

Table 1. Bacterial diversity indices of each stuff during the manufacturing process of fermented doejang

Sample	Total reads	Average length (bp)	OTUs <sup>a</sup>	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	Goods lib. coverage
Rice straw	5552	433	143	276	215	1.35	0.6	98.9
Meju	2824	488	80	103	106	2.92	0.1	99.3
Young doenjang	1939	505	48	76	63	2.08	0.27	99.2
Mature doenjang	24990	488	221	342	318	3.22	0.08	99.7

<sup>a</sup>The operational taxonomic units (OTUs) were defined by 3% dissimilarity.

문 수준에서 볏짚의 세균군집구조를 본 결과 Proteobacteria 문이 전체 염기서열의 71%로 가장 많이 발견되었고, 다음으로 Actinobacteria (20.6%), Bacteroidetes (4.2%), Firmicutes (1.3%), Armatimonadetes (0.6%), Planctomycetes (0.6%), TM7 (0.4%), Deinococcus-Thermus (0.4%) 순이었으며 볏짚 세균군집의 90% 이상이 Proteobacteria와 Actinobacteria 문으로 구성되어 있었다. 속 수준에서 군집을 상대적으로 비교한 결과 Proteobacteria 문에 속하는 Pantoea (27.1%), Methylobacterium (12.3%), Rhizobium (4.0%), Sphingomonas (3.8%)과 Actinobacteria 문의 Microbacterium (4.2%)과 Mycobacterium (3.6%) 등으로 구성되었으며 이들 중 토양 세균인 Pantoea 및 Methylobacterium 속이 볏짚 군집의 약 40%를 차지했다 (Fig. 1.).

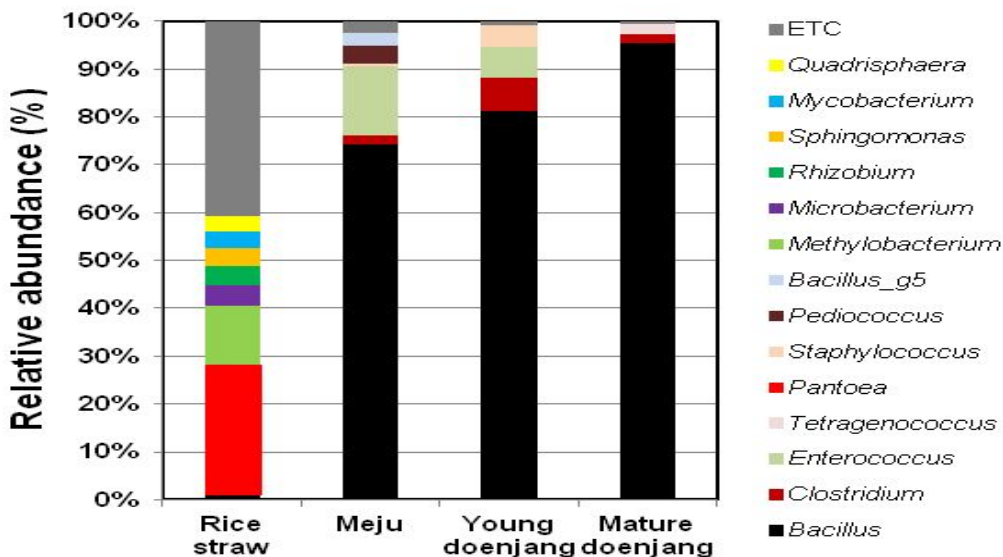


Fig. 1 Genus-level abundance for comparing bacterial communities in rice straw, meju, young doenjang, and mature doenjang samples

종 수준의 세균군집구조를 보면 Pantoea allii, P. ananatis, P. agglomerans, P. vagans가 비슷하게 각 6% 수준의 상대적 서열빈도를 보였고, Methylobacterium persicinum (3.8%), M. aquaticum (3.4%), Quadrisphaera granulorum (3.2%)가 그 뒤를 이었다 (Table 2). 종 수준의 세균 군집분포를 볼 때 볏짚에 주로 존재하는 세균들은 주로 토양과 식물 기원의

세균들이 주류를 이루었고 특히 *Pantoea* 속의 일부는 식물 부착 병원성 균들로 알려져 있다 (19, 24). 한편, 된장 주요 발효균의 하나(2)인 *Bacillus amyloliquefaciens*는 벧짚 전체 균집의 0.21%에 불과해서, 벧짚에서는 상대적으로 장류 발효세균의 분포가 낮았다. 벧 재배 지역의 토양에 따라 미생물 균집분포가 다르다는 것(25)을 고려하면 집종원으로 사용하는 벧짚의 미생물 분포 역시 다를 것으로 예상되었다. 벧짚 세균의 지역적 분포 차이와 토양, 물, 식물들로부터 벧짚 표면에 부착되는 미생물의 다양성을 고려할 때, 벧짚에 장독소 생산 *B. cereus* group 과 같은 위해 미생물의 존재 가능성은 상존한다. 비록 벧짚을 이용하는 전통장류 제조 방식이 품질 관점에서 우수하다 하더라도 장류의 균일한 품질 유지와 식품 위해 요소 중점관리 기준 (HACCP)에 부합하기 위해서는 장류 제조를 위한 집종 원으로서 현재와 같은 벧짚 사용 방식은 개선해야 할 것이다

발효된 메주에서 균집구조는 Firmicutes 문이 99.1%, *Proteobacteria*문이 0.9%로 메주의 미생물 공급원이었던 벧짚의 세균균집구조와는 극적인 변화가 있었다. 벧짚에서 Firmicutes 문은 전체 염기 서열 수의 1.3%에 불과했으나, 메주 세균에서는 99% 이상을 차지하면서 벧짚에서 우점종이던 *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* 문을 완전히 대체하였다. 이 결과는 전국 17곳의 메주 시료에서 Firmicutes 문이 70.6-99.9%의 가장 높은 우점종으로 동정되었다는 보고와 일치했다(11). Firmicutes문의 속 수준에서 비율은 *Bacillus* 77%, *Enterococcus* 14.5%, *Pediococcus* 3.6%, *Clostridium* 1.8%를 나타냈다(Fig. 1.). 특히 *Bacillus* 속은 강력한 protease 활성과 빠른 증식 속도(세대 시간 8-26분)를 가지기 때문에(1) 단백질이 풍부한 콩에서 다른 속에 비해 우점종이 될 수 있다, 그러나 김 등(11)에 의해 수행된 18 종 메주 시료에 대한 pyrosequencing 결과에서 *Bacillus* 속의 균집구조는 1.5-94.1%의 넓은 범위에 걸쳐있어 항상 높지만 낮았다. 일부 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*이 *B. cereus* group, *Staphylococcus*와 같은 Gram 양성균과 *Enterococcus*와 같은 Gram 음성 균들에 대해 항 세균 특성을 지닌 항생물질 또는 계면활성제들을 분비한다는 보고들(5, 7, 9, 12, 15, 26, 28, 30, 31)로 볼 때, 이러한 항균능력을 지닌 *Bacillus*들이 벧짚에 존재했을 경우에는 메주에서 우점종을 형성했을 가능성이 크다.

숙성 전 된장의 문 수준에서 세균 균집구조를 보면 Firmicutes 문이 전체 염기서열빈도의 99.85%, *Proteobacteria*문이 0.15%로 메주 세균의 균집구조분포와 비슷하였다. 한편 종 수준에서 균집구조를 보면 메주에서 32.5%로서 가장 높은 분포를 보였던 *B. siamensis*는 0.1%로 낮아진 반면 두 번째였던 *B. amyloliquefaciens* (19.2%) 가 67.3%로 우점종이 되었고, *B. atrophaeus*는 12.7%로 그 뒤를 이었다(Table 2). 숙성 전 된장이 만들어지기 위해서는 메주를 18% 염수 하에서 45일간 담그는 과정을 거쳐야 하며, 이 때 높은 염 농도와 미 호기적 상태에서 견딜 수 있는 미생물들만이 생존할 수 있기 때문에 이러한 균집 변화가 일어났다고 예측되었다.

Table 2. Changes in the relative percentage of the bacterial species in Meju, young doenjang, and aged doenjang

Bacterial species <sup>a</sup>	% of total sequence			
	Rice straw	Meju	Young doenjang	Mature doenjang
<i>Bacillus siamensis</i>	0.85	32.54	0.1	0.38
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.21	19.19	63.64	67.34
<i>Enterococcus durans</i>	0	11.01	5.98	0.1
<i>Bacillus atrophaeus</i>	0	7.68	8.51	12.71
<i>Bacillus mojavensis</i>	0	6.13	2.99	3.17
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	0	4.39	0.26	6.51
<i>Pediococcus lolii</i>	0	2.3	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	1.77	2.94	2.45
<i>Clostridium arbusti</i>	0	1.74	6.91	1.62
<i>Pediococcus acidilactici</i>	0	1.1	0	0
<i>Pantoea vagans</i>	5.72	0.07	0	0
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	0	0	0	1.98
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	0	0	1.44	0.6
<i>Pantoea ananatis</i>	6.36	0	0	0
<i>Pantoea allii</i>	6.36	0	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	5.93	0	0	0
<i>Methylobacterium persicinum</i>	3.81	0	0	0
<i>Methylobacterium aquaticum</i>	3.39	0	0	0
<i>Quadrisphaera granulorum</i>	3.18	0	0	0
ETC	64.19	12.08	7.23	3.14

숙성 후 된장의 세균군집구조를 보면, 숙성 전 81.3%였던 *Bacillus* 속의 상대적 군집빈도는 숙성 후에 95.5%로 증가되었다. 가장 많았던 우점종은 *B. amyloliquefaciens* (67.3%)였고, 다음으로 *B. atrophaeus* (12.7%), *B. methylotrophicus*(6.5%),*B. mojavensis*(3.2%), *B. subtilis*(2.5%) 순으로 이들 5종 만의 *Bacillus*의 상대적군집빈도는 92.2%에 달했다(Table 2). 내염성 젖산균인 *Tetragenococcus halophilus* (2.0%)이 그 다음 순위였다(Table 2). *B. amyloliquefaciens*의 일부 균주들은 plantazolicin (28) subtilosin (30), Bacillomycin D (15)와 같은 식물 병원균들에 대해 억제 능을 가지는 항균 물질들을 분비한다고 보고되고 있다. 약 18% 염을 포함하는 숙성 전후 과정 동안 *B. amyloliquefaciens*가 우점종을 계속 유지하는 것(Fig. 2.)으로 보아 이 균종 역시 내염 특성을 가지면서 다른 균 증식에 대해 길항작용이 있는 항균 물질들을 생산할 가능성이 높다. 비록 벧짚에서 우점종이었던 *Proteobacteria*, *Actinobacteria* 문들은 메주가공, 숙성 전 후 과정을 거치면서 0.03% 수준까지 떨어졌지만 *Bacillus*와 높은 염도에서 저항성을 지닌 일부종들은 생존해 숙성 후까지 남았을 것으로 추정되었다.(결과 미세시).

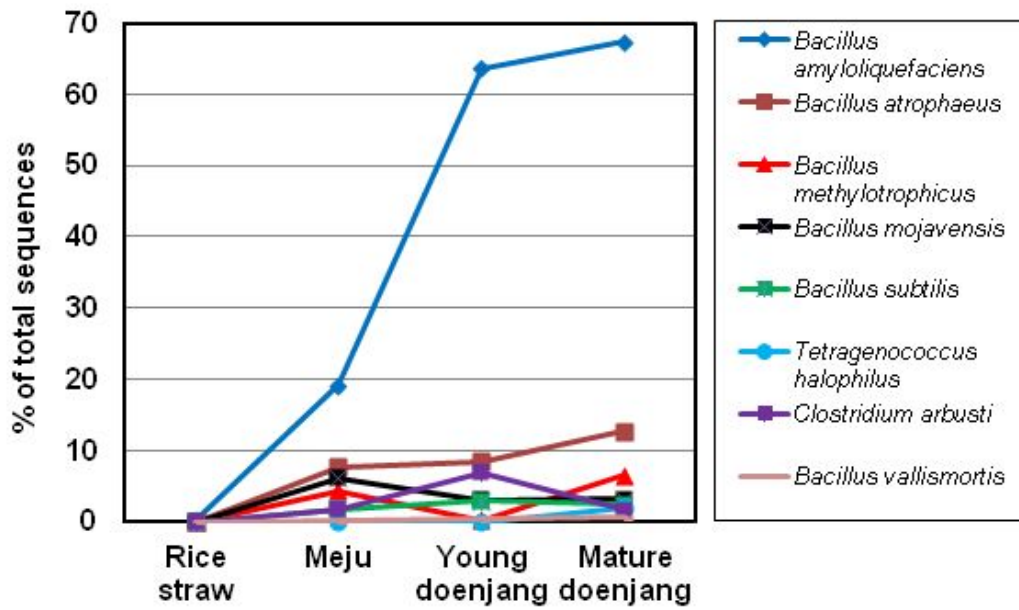


Fig. 2. Species-level abundance for comparing bacterial communities in rice straw, meju, young doenjang, and mature doenjang.

종 수준에서 벧짚의 상대적인 세균군집분포를 보면 *B. siamensis*가 0.85%(29위), *B. amyloliquefaciens* 0.21%(64위)였다(Table 2). 하지만 메주발효 후에는 이들의 세균군집비율이 벧짚에서 순위처럼 각각 1, 2위로 올라갔고, 된장 숙성 후에는 전체 군집의 상위 5위까지 모두 *Bacillus* 종들이 차지했다(Fig. 2). 벧짚의 염기서열들로부터 분석된 143 OTUs 중 *Bacillus* 종은 *B. siamensis*와 *B. amyloliquefaciens* 뿐이었지만 메주에서 확인된 총 80 OTUs 중 *Bacillus*는 17종이 확인되었고 이들의 상대적 군집비율들도 상위(상위 8위 안에 6종 포함)에 속했다(Table 2). 메주에서 추가로 확인된 15종의 *Bacillus*들은, 메주 발효실내의 공기나 삶은 콩, 또는 벧짚으로부터 기원되었을 것으로 추정할 수 있다. 비록 공기나 삶은 콩 표면에 부착된 미생물들이 접종 원일 가능성도 배제할 수 없지만, 60일 간 메주 표면과 직접적이고 연속적인 접촉을 하면서 삶은 콩에 가장 많은 양의 미생물을 접종한 것은 벧짚이다. 벧짚의 세균군집을 Chao1 richness index와 ACE index에 따라 예측했을 때, 215-276의 OTUs를 함유하는 것으로 추정되었고(Table 1), rarefaction curve(Fig. 3.)에서 분석한 5,552개의 염기서열 수에서도 OTUs를 나타내는 곡선이 다른 시료들에 비해 더 가파른 증가로 벧짚시료에 포함된 모든 종을 확인하지 못한 것으로 나타났다.

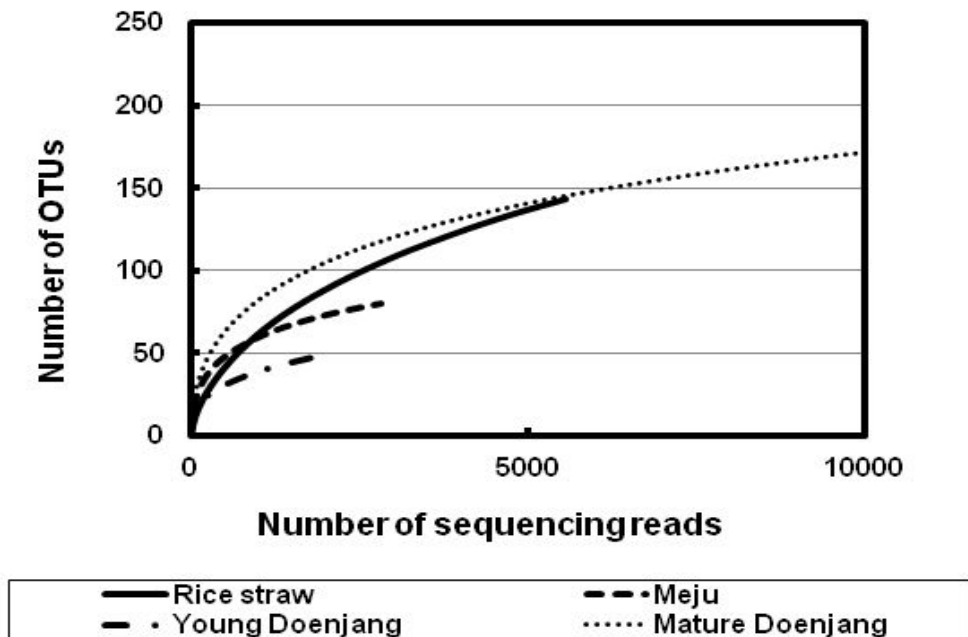


Fig. 3. Rarefaction curves of OTUs defined by 3% dissimilarity for the four different samples.

따라서 볏짚 세균에 대한 pyrosequencing의 결과에서는 나타나지 않았지만 볏짚표면에서 낮은 세균 밀도로 존재했거나 또는 포자 형태로 존재하던 *Bacillus* 종들이 메주 발효과정 동안 증식했을 가능성이 있다. 또한 숙성 후 된장의 상대적 균집비율에 따라서 상위 30위까지 존재하는 종들 중 적어도 22종은 메주에서도 발견되었고, 메주에서 상위 6종이 숙성 후 된장에서 90% 이상의 상대적 우점종을 형성했다(Table 2)는 점에서 메주의 주요 균종들은 숙성 후 된장에서 발견되는 세균 종과 밀접히 관계된다는 것을 보여주었다. 나머지 주요 2종은 아마 염수로 부터 유래했을 가능성이 있는 호염 세균들

(*Tetragenococcus halotolerans*, *Brevibacterium halotolerans*,)이었다(Table 2). 각 시료 간 세균 균집 다양성을 비교하기 위해 UniFrac service를 이용하여 Phylogenetic tree를 작성하였다 (Fig.4.).



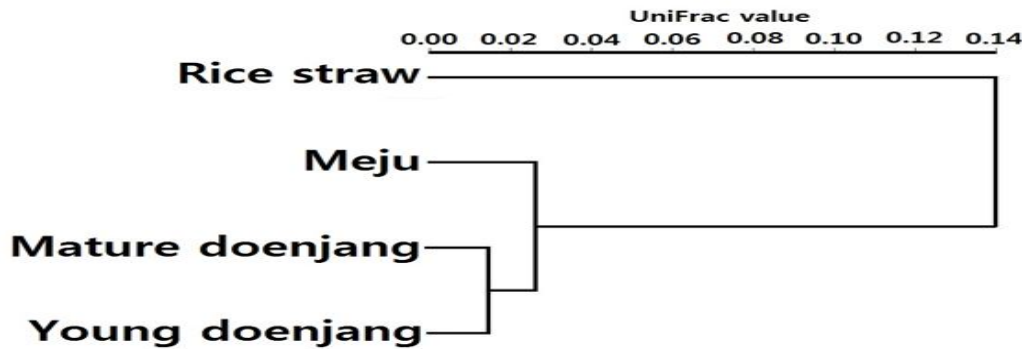


Fig. 4. Clustering analysis for the samples using the UniFrac service after pyrosequencing. The scale indicates the distance between clusters in UniFrac units.

예상대로 균집구조 유사성을 보인 숙성 전과 숙성 후 된장들과 달리, 메주균집에서는 벗짚 으로부터 선택적으로 접종된 미생물들과 내염성이 없는 미생물들이 함께 포함되었기 때문에 숙성 전, 후 된장과 벗짚의 균집구조의 중간위치에 존재했다. 이러한 결과로 볼 때 숙성된 된 장의 주요 미생물들은 메주로부터 기원한 것이며, 메주 세균들 역시 기본적으로 벗짚 세균으 부터 접종되었을 것으로 추정되었다. 이의 검증을 위해 앞으로 삶은 콩, 발효실 공기, 염수의 미생물 균집 분포를 확인할 필요가 있다. 또한 여러 지역에서 수거한 전통 장류용 벗짚들과 최 종 장류의 미생물 균집 분포 사이의 상관관계를 조사하고, 이 상관성에 주 발효균인 *Bacillus* 의 길항능력이 어떤 영향을 주는지 밝혀야 할 것이다.

전통 장류의 품질 우수성을 유지하기 위해서는, 기본적으로 *B. cereus*, *A. flavus* 같은 독소 미 생물들의 증식이 없어야 하고 대량 생산되는 장류에는 부족한 전통 장류만의 풍미를 가진 미 생물의 발효가 필요할 것이다. 이러한 목표를 달성하기 위해서 전통 장류에서 발견되는 독소미 생물들의 증식을 억제하면서 동시에 풍미가 좋은 발효 균주들을 선발할 필요가 있다. 이 연구 는 순창의 한 지역을 대상으로 된장 제조 중 미생물균집과 제조 중 균집의 변화를 관찰하였다. 앞으로 전국적인 조사를 통해 장류 미생물들의 균집 분포를 밝히고 이를 통해 독소 미생물들 에 대해 길항 특성을 가지면서 전통장류의 풍미를 지닌 발효 균주들을 지속적으로 발굴할 예 정이다.

## 2. 결과

전통 방식으로 된장을 만드는 과정 동안 세균균집의 다양성과 변화를 관찰하기 위하여 16S rRNA 유전자 서열을 기반으로 하는 pyrosequencing을 수행하였다. 전통 된장 제조에 가장 중 요한 접종원으로서 벗짚에 존재하는 세균 균집을 문 수준에서 확인했을 때, 상대적 균집 비율 로 1% 이상의 분포를 보였던 4 종류는 *Proteobacteria* (71%), *Actinobacteria*(20.6%), *Bacteroidetes*(4.2%), *Firmicutes*(1.3%) 문이었다. 그러나 벗짚 세균 균집구조 결과와 달리 메 주의 균집구조에서는 99.1%가 *Firmicutes* 문이었다. 문 수준에서 숙성 전 된장의 균집분포를 보면 *Firmicutes* 문 비율이 99.85%로 메주와 비슷한 수준이었다. 그러나 종 수준의 균집구조 에서는 메주에서 32.54%의 가장 높은 균집빈도를 보였던 *Bacillus siamensis*는 0.1%로 거의 사라진 반면 *B. amyloliquefaciens*가 63.64%로 가장 높은 우점종이 되었다. 숙성 후 된장의 세 균균집구조를 보면 숙성 전에 비해 *Bacillus* 비율이 증가되었으며 이들 중 균집의 상대빈도가

가장 높았던 우점종은 *B. amyloliquefaciens* (67.3%)였고, 5 위까지 모두 *Bacillus* 종들(전체 균집분포의 92.2%)이 차지했다. 또한 메주 내 상위 11 위까지 우점을 이루던 세균 종들 중 10 종이 숙성 후 된장에서도 우점종을 형성하여, 메주 미생물들이 숙성 후 된장 발효까지 영향을 준다는 것을 보였다. 이 결과들로부터 전통 장류에서 발효 주 세균은 *Bacillus* 종이며 이들은 기본적으로 벚짚으로부터 기원되어 메주에서 우점종을 형성한 것으로 추정되었다. 따라서 풍미와 위생성이 동시에 요구되는 전통 장류의 제조를 위해서는 벚짚 표면에 이 기능을 가진 *Bacillus* 종들의 균집 분포가 필요할 것으로 예상되었다.

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 목표달성도

목 표	달성도(%)	내 용
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 무독성, 고 점질 물질 합성, 저 histamine 및 tyramine 생산 특성을 가지는 <i>B. subtilis</i> 분리</li> <li>◦ 최소 10종 우수 균주의 분리</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 구토독소 cereulide 합성 효소에 대한 primer 제조</li> <li>◦ Multiplex PCR을 위한 각 primer들 제조</li> <li>◦ 150개의 유명 전통 장류 업체들로 부터 균들의 분리</li> <li>◦ Multiplex PCR 결과들로 부터 독소 비생산 균 선발</li> <li>◦ 선발 균들을 대상으로 <i>B. subtilis</i> 16s rDNA primer를 이용한 PCR 후 <i>B. subtilis</i> 균들의 분리와 Polyglutamate 생산성이 높고 biogenic 아민이 없는 균 57종 선발</li> <li>◦ 청국장등 시제품 생산</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 무독성 <i>A. oryzae</i>/<i>A. sojae</i> 분리</li> <li>◦ 발효 우수 <i>Bacillus</i> sp 균의 분리</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 우수 전통 장류로부터 55종 균주들의 분리</li> <li>◦ Glutamic acid 생산량이 많은 <i>Asp./Rhizopus/Mucor</i> 균주로 14종 분리</li> <li>◦ 장류연구소에 의한 균주 공여</li> <li>◦ 항균성 균주 7종 분리 및 glutamic acid 고 생산균 8종 분리</li> <li>◦ 장류연구소에 의한 균주 공여</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Biogenic amine 저감화 균주의 선발 및 선발과정을 통해 얻어진 균들을 이용하여 장류의 산업적 생산</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 1차, 2차년도를 통해 수집한 균들로부터 Biogenic amine이 저감화된 <i>B. subtilis</i>/<i>B. licheniformis</i> 와 <i>A. oryzae</i>를 각각 최소 10종 이상 분리</li> <li>◦ 메주 제조 공장에 우수 전통 발효 균주로 선발된 균주들의 사용             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산업화 적용</li> </ul> </li> <li>◦ pyrosequencing을 이용한 전통된장의 제조과정 중 세균군집구조 분석</li> </ul>

### 제2절 관련분야에의 기여도

- 무독성 균주 순창장류연구소 및 발효미생물관리센터에 공여
  - 장류제조업체의 장류제조 시 활용
  - 안정성 높은 메주, 청국장, 된장 등 생산
- 유해미생물, 유해물질, 미생물 독소에 대한 안전기술개발
  - 전통장류의 종합적인 품질 및 제조방법 개선에 활용
- 장류 제조과정 중의 세균군집구조변화 분석
  - 전통장류 중 미생물의 상호작용이 장류의 풍미와 위생에 영향 주는 요인 파악
  - 독소미생물들에 대한 길항특성을 가지면서 전통장류의 풍미를 지니는 균주 활용 가능

## 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구는 무독소 균주 및 유해물질 저감화 균주를 전통 장류에서 우리나라 전통장류의 수준을 식품안전성의 관점에서 명품화하는 것을 목표로 수행하였다.

연구수행 결과 항바실러스 세레우스 증식 억제능을 가진 균주를 분리, 무독성 *Aspergillus oryzae/Aspergillus sojae* 균 분리, 저 biogenic amine 생산 *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae/Aspergillus sojae* 균 등을 분리함으로써 전통 장류의 안전성을 높이는데 기여할 수 있었다. 또한 추가 연구로써 순창 지역의 한 전통된장업체에서 전통 방식으로 된장을 만드는 과정 동안 벧짚, 메주, 숙성 전과 숙성 후 제조 단계별 전 과정에서 세균군집의 분포와 전이과정을 조사하여 제조 과정 중 발효 세균들의 역할을 이해할 수 있었다.

연구에서 분리되어진 균주는 순창군 발효미생물관리센터, 장류제조업체에 제공하여 청국장, 쿠키, 위생메주 제조 등에 이용되어지고 있으며, 추후 제공되어지는 균주에 의하여 간장, 된장, 고추장, 장아찌 제조에 aflatoxin을 생산하지 않는 제품을 만들 수 있다.

또한 논문 1편, 균주 등록(GenBank database biogenic amine 무생산균 현 20 strain 등록, 85종 신청 중) 신청 중에 있다.

추후 순창군 장류뿐만 아니라 전국 장류를 대상으로 분해능이 좋은 균주들은 계속적으로 선발할 예정이다.

## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

연구기간동안 수집한 해외과학기술 정보를 연대순으로 다음 표에 요약하였다.

주제어	연도	논문 요약	참고문헌
미생물에서 amino acid decarboxylases	1982	미생물 argine, glutamic acid, histidine, lysine, ornithine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine의 decarboxylation을 2차원 TLC에서 분석하는 방법의 개발	J. Clinical Microbiol. 16, 909-919
포도주에서 biogenic amine: lactic acid bacteria의 역할	1991	같은 지역이라도 biogenic amine을 많이 생산하는 winery가 있는 반면 적게 생산하는 winery가 있는데 이는 lactic acid bacteria에 의해 만들어 지므로 PCR 또는 DNA probe에 의해 확인된 이들을 만들지 않는 균주의 선발이 필요	FEMS Microbiol Lett. 199, 9-13
Biogenic amine을 생산하는 식품 세균들의 동시 검출을 위한 multiplex PCR의 개발	2005	Histamine, tyramine, putrescine을 생산하는 Gram positive 및 Gram negative bacteria를 동시에 검출할 수 있는 PCR primer set의 개발	FEMS Microbiol. Lett. 244, 367-342
Histamine과 tyramine을 생산하는 Gram positive bacteria의 colony multiplex PCR 방법	2005	Histidine decarboxylase gene(hdc)과 tyrosine decarboxylase gene(tyrdc)을 동시에 검출하는 PCR primer쌍의 방법 개발	J. Microbiol. Methods 63, 296-304
Histamine, tyramine, putrescine, cadaverine을 생산하는 식품 유래 세균들의 PCR에 의한 검출	2006	Bacterial histidine, tyrosine, ornithine, lysine decarboxylase를 만드는 유전자 서열에 대해 PCR용 primer 서열을 설계하여 PCR 결과 검출이 성공적인 것을 확인	J. Food Prot. 69, 2509-2514
치즈 생산동안 tyramine생산 세균의 PCR에 의한 검출	2006	치즈 제조와 숙성동안 tyramine 생성 세균의 검출을 위한 PCR 방법	J. Dairy Research, 73, 318-321

		개발과 치즈제조의 초기에 tyramine이 주로 생성된다는 것을 발견	
식품에서 biogenic amine을 생산하는 세균 검출에 분자 기법의 적용	2007	Histamine, tyramine, putrescine, cadaverine을 생산하는 bacteria의 검출법과 동시에 검출하는 방법에 대한 review paper	Int. J. Food. Microbiol. 117, 258-269
cider에서 분리한 lactic acid bacteria에 의한 biogenic amine 생산	2007	Cider에서 분리한 54종의 lactic acid bacteria들에서 biogenic amine 생산균주를 찾기 위해 RP-HPLC에서 분석한 결과 6균주가 histamine과 tyramine을 생산했다.. 이들 중 Lactobacillus diolivorans가 가장 많은 histamine을 생산했고 L. collinoides와 Oenococcus oeni는 tyramine을 생산했다. 한편 Pediococcus parvulus는 이들 아무것도 생산하지 않았다. 따라서 biogenic amine 생산균은 species에 의한 것이 아니라 strain에 의해 그 생산이 달라진다.	Lett. Appl. Microbiol. 45, 473-478
치즈에서 biogenic amine(BA)의 HPLC 정량과 tyramine 생산 미생물의 PCR 검출과의 관계	2007	BA 농도는 장기 숙성치즈보다 단기 숙성 치즈에서, 생우유를 사용한 것 보다 멸균 우유를 사용한 것에서 더 낮았다. 치즈에서 tyramine이 가장 높은 농도였고 PCR의 결과와 HPLC 정량 결과는 상호 의존적이었다.	J. Dairy Research, 74, 276-282
이탈리아 염소 치즈에서 biogenic amine 생산균의 검출	2008	이탈리아 염소치즈인 Robiola di Roccaverano로부터 decarboxylase 활성을 갖는 67종의 세균들을 분리했는데 Enterococcus	J. Food Prot. 71, 205-209

		faecalis가 가장 많은 종이였으며, 이들 모두 tyrosine decarboxylase를 가지고 있었고 tyramine이 가장 높은 농도로, 다음 농도로 histamine이 검출되었다.	
우유 미생물인 Streptococcus thermophilus의 안전성 평가	2008	Streptococcus thermophilus는 요구르트와 치즈 생산에 starter로 사용되는 균으로 기회 감염균들 가운데 유일한 식품 사용균이다. 비교 유전체의 연구에서 이 균은 기능 손실과 수평적 유전자 이동에 의해 진화된 것으로 나타났다.	Int. J. Food Microbiol. 126, 274-277
세균 histamine 생합성의 최근 분자 지식	2008	세균 histamine decarboxylase는 pyridoxal phosphate 의존형 및 pyruvoyl 의존형의 두가지 type으로 분류된다. Pyridoxal phosphate 형은 Gram negative 세균에서 발견되는 반면, pyruvoyl 의존형은 Gram 양성균에서 발견된다.	Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 48, 697-714
발효식품에서 biogenic amine	2010	유산균들은 biogenic amines을 생산할 수 있으며 자주 독성을 일으킬 정도로 많이 생산하며 균주에 따라 그 함량이 달라진다.	Eur. J. Clin. Nutr. 64, S95-100
Wine과 cider에서 biogenic amine 생산 유산균의 검출	2010	Multiplex PCR 을 통해 biogenic 생산 유전자인 <i>hdc</i> , <i>tyrdc</i> , <i>odc</i> , <i>agrdi</i> 유전자들의 유무를 조사했고 TLC와 HPLC로 그 생산을 검증하였다. 158종의 유산균을 분석한 결과 전체의 18%에서	Food Microbiol. 27, 1078-1085

		<p>biogenic amine 생산 유전자를 가지고 있었고, 이들 중 가장 많이 발견되는 유전자는 전체 균주의 14%에서 나타난 <i>agdi</i>였으며 8%는 <i>tyrdc</i>, 2%의 <i>hdc</i>, 0.5%의 <i>odc</i>였다. <i>L. brevis</i>와 <i>L. hilgardii</i>는 2개의 유전자들을 동시에 가지고 있었다.</p>	
물고기에서 histamine 생성 세균의 분자 검출법	2010	<p>고 histamine을 생산하는 세균들에 대해 <i>hdc</i> 유전자의 709 bp probe를 사용하여 colony lift hybridization을 한 결과 신뢰할만한 검출결과를 나타냈다.</p>	Int. J. Food Microbiol. 139, 161-167
Amino acid decarboxylase를 생산하는 세균의 신속 검출법	2011	<p>아미노산을 함유하는 Moller decarboxylase base broth를 사용하여 microplate상에서 증식시킨 결과 신속하게 biogenic amine 생산균들을 확인할 수 있었다.</p>	Tropical Biomed. 28, 351-361
치즈 생산 환경에서 <i>Streptococcus thermophilus</i> 에 의한 histamine 생산과 <i>hdc</i> 유전자 전사의 정량적 분석	2011	<p>치즈 우유의 전체 세균 중 6%가 <i>hdcA</i> 유전자를 가지고 있었으며 이들 중 <i>S. thermophilus</i>가 histidine과 염에 의해 그 유전자 발현량이 증가되었고 가열 후에는 억제되었다.</p>	Appl. Environ. Microbiol. 77, 2817-2822
wine에서 biogenic amine을 분해하는 유산균의 중요성	2011	<p>histamine, tyramine, putricine을 분해하는 세균을 wine에서 찾기 위해 90종을 분석하였더니 25%는 histamine을 분해하였고 18%는 tyramine을, 18%는 putricine을 분해하였다. Biogenic amine을 가장 많이 분해하는 것은 9종으로 <i>Lactobacillus</i>와 <i>Pediococcus</i> group이었다.</p>	Int. J. Food Microbiol. 148, 115-120



## 제7장 참고문헌

1. De Lucca, A.J. and T.J. Walsh. 1999. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3,1-11.
2. Dischinger, J., M. Josten, C. Szekat, H.Sahl, and G. Bierbaum. 2009. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM13. *LosOne* 4, 1-11.
3. Edberg, S.C. 1992. US EPA human health assessment: *Bacillus licheniformis*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.,USA
4. Gohar, M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O. Okstad, M. Gominet, A. Kolste, and D. Lereclus. 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 3,1-9.
5. Grangemard, I., J. Wallach, R. Maget-Dana, and F. Peypoux. 2001. Lichenysin: A more efficient cation chelator than surfactin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 90,199-210.
6. Jung, S.S., J.I. Choi, W.H. Joo, H.H. Suh, A.S. Na, Y.K. Cho, J.Y. Moon, K.C. Ha, D.H. Paik, and D.O. Kang. 2009. Characterization and purification of the bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* isolated from soybean sauce. *J. Life Sci.* 19, 994-1002.
7. Katz, E. and A.L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of Bacillus: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41,449-474.
8. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evolution* 16, 111-120.
9. Nakano, M.M., R. Magnuson, A. Myers, J. Curry, A.D. Grossman, and P. Zuber. 1991. *srfA*isanoperonrequiredforsurfactinproduction,competence development, andefficient sporulationin*Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173,1770-1778.
10. Ryu, H.S., M.Y. Shon, S.J. Cho, S.K. Park, and S.W. Lee. 2007. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional Doenjang. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*50,87-94.
11. Swofford, D.L. 1998. PAUP\*.Phylogenetic Analysis Using Parsimony.4.0ed. Sinauer Associates,Sunderland, MA, USA.
12. Tagg, J.R., A.S. Dajani, and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram-positive

bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40,722-756.

13. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22,4673-4680.

14. Yakimov, M.M., K.N. Timmis, V. Wray, and H.H. Fredrickson. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61,1706-1713.

15. Yang, E.J. and H.C. Chang. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35,339-346.

16. Yun, S.H., Y.S. Kim, S.K. So, D.Y. Jeong, K.S. Hahn, and T.B. Uhm. 2009. Detection of *plcR-papR* genes by PCR in identifying enterotoxin genes-harboring *Bacillus cereus* strains. *Kor. J. Microbiol.* 5,425-429.

17. Zhang, Z., S. Schwarz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7,203-214.

#### **참고문헌(Isolation and characterization of biogenic amine degrading bacteria in fermented soybean products)**

1. Karovicova, J and Z. Kohajdova. 2005. Biogenic amines in food. *Chem Pap.* 59, 70-79.

2. Naila, A., S. Flint, G. Fletcher, P. Bremer, and G. Meerdink. 2010. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *J. Food Sci.* 75, 139-150.

3. Maintz, L and N. Novak. 2007. Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1185-1196.

4. Du, W.X., C.M. Lin, A.T. Phu, J.A. Cornell, M.R. Marshall, C.I. Wei. 2002. Development of biogenic amines in yellowfin tuna(*Thunnus albacarcs*): effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *J. Food Sci.* 67, 292-301.

5. Silla-Santos, M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Sci.* 16, 213-231.

6. Cho, T-Y., G.H. Han, K-N. Bahn, Y-W. Son, M-R. Jang, C-H. Lee, S-H. kim, D-B. Kim, and S-B. Kim. 2006. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented

foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38, 730-737.

7. Sekiguchi, Y., H. Makita, A. Yamamura, and K. Matsumoto. 2004. A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoirtes* KAIT-B-007. *J. Biosci. Bioeng.* 97, 104-110.

8. Tapinkae, W., S. Tanasupawat, K.L. Parkin, S. Benjakul, and W. Visessanguan. 2010. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme Microbial. Technol.* 46, 92-99.

9. Leuschner, R.K.G. and W.P. Hammes. 1998. Tyramine degradation by *Micrococci* during ripening of fermented sausage. *Meat Sci.* 49, 289-296.

10. Dapkevicius, M., M.J.R. Nout, F.M. Romboots, J.H. Houben, and W. Wymenga. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 107-114.

11 Bover-Cid, S. and W.H. Holzapfel. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 53, 33-41.

12. Satake, K., S. Ando, and H. Fugita. 1953. Bacterial oxidation of some primary amines. *J. Biochem.* 49, 299-315.

#### 참고문헌(Pyrosequencing을 이용한 전통된장 제조과정 중 세균군집구조의 분석)

1. Ahn, Y.S., Y.S. Kim, and D.H. Shin. 2006. Isolation, identification, and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional cheonggukjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38, 82-87.

2. Cho, S.J., S.H. Oh, R.D. Pridmore, M.A. Juillerat, and C.H. Lee. 2003. Purification and characterization of proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from traditional soybean fermentation starter. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 7664-7670.

3. Choi, K.K., C.B. Cui, S.S. Han, and D.S. Lee. 2003. Isolation, identification and growth characteristics of main strain related to meju fermentation. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* 32. 818-824.

4. Chun. J., J.H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim, and Y.W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 57, 2259-2261.

5. Dischinger, J., M. Josten, C. Szekat, H.Sahl, and G. Bierbaum. 2009. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM13. *PLos One* 4, 1-11.
6. Good, I.J. 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237-264.
7. Grangemard, I., J. Wallach, R. Maget-Dana, and F. Peypoux. 2001. Lichenysin: A more efficient cation chelator than surfactin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 90, 199-210.
8. Jeong, J.Y., H.D. Park, K.H. Lee, H.W. Weon, and J.O. Ka. Microbial community analysis and identification of alternative host-specific fecal indicators in fecal and river water samples using pyrosequencing. *J. Microbiol.* 49, 585-594.
9. Jung, S.S., J.I. Choi, W.H. Joo, H.H. Suh, A.S. Na, Y.K. Cho, J.Y. Moon, K.C. Ha, D.H. Paik, and D.O. Kang. 2009. Characterization and purification of the bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* isolated from soybean sauce. *J. Life Sci.*19,994-1002.
10. Kim, B.S., B.K. Kim, J.H. Lee, M. Kim, Y.M. Lim, and J. Chun. 2008. Rapid phylogenetic dissection of prokaryotic community structure in tidal flat using pyrosequencing. *J. Microbiol.* 46, 357-363.
11. Kim, Y.S., M.C. Kim, S.W Kwon, S.J Kim, I.C. Park, J.O. Ka, and H.Y. Weon. 2011. Analysis of bacterial communities in meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods. *J. Microbiol.* 49, 340-348.
12. Kim, Y.S., S.H. Yun, D.Y. Jeong, K.S. Hahn, and T.B. Uhm. 2010. Isolation of *Bacillus licheniformis* producing antimicrobial agents against *Bacillus cereus* and its properties. *Kor. J. Microbiol.* 46, 270-277.
13. Kim, T.W., J.H. Lee, M.H. Park, and H.Y. Kim, 2010. Analysis of bacterial and fungal communities in Japanese and Chinese soybean pastes using nested PCR-DGGE. *Curr. Microbiol.* 60, 315-320.
14. Kim, T.W., J.H. Lee, S.E. Kim, M.H. Park, H.C. Chang, and H.Y. Kim. 2009. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 265-271.
15. Koumoutsi, A., X-H. Chen, J. Vater, and R. Borriss. 2007. DegU and YczE positively regulate the synthesis of Bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6953-6964.

16. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp 115-148. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*, John Wiley and Sons, Chister, England.
17. Li, W. and A. Godzik. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658-1659.
18. Margulies, M., M. Egholm, W.E. Altman, S. Attiya, J.S. Bade, L.A. Bemben *etal.* 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picoliter reactors. *Nature* 437, 376-380.
19. Morohoshi, T., Y. Nakamura, G. Yamazaki, A. Ishida, N. Kato, and T. Ikeda. 2007. The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces N-acyl homoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. *J. Bacteriol.* 189, 8333-8338.
20. Myers, E.W. and W. Miller. 1988. Optimal alignments in linear space. *Comput. Appl. Biosci.: CABIOS* 4, 11-17.
21. Parameswaran, P., R. Jalili, L. Tao, S. Shokralla, B. Gharizadeh, M. Ronaghi et al. 2007. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic Acids Res.* 35, e130.
22. Park, H.K., B. Gil., and J.K. Kim. 2003. Characteristics of taste components of commercial kochujang. *Korean J. Food Sci. Technol.* 12, 119-121.
23. Roh, S.W., K.H. Kim, Y.D. Nam, H.W. Chang, E.J. Park, and J.W. Bae. 2010. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISMEJ.* 4, 1-16.
24. Roper, M.C. 2011. *Pantoea astewartii* subsp. *stewartii* :lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. *Mol. Plant Pathol.* 12, 628-637.
25. Ryu, J.C., S.W. Kwon, J.S. Kim, J.S. Suh, B.G. Jung, and S.S. Choi. 2002. Analysis of microbial community structure in soil and crop root system. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 35, 118-126.
26. Ryu, H.S., M.Y. Shon, S.J. Cho, S.K. Park, and S.W. Lee. 2007. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional doenjang. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50, 87-94.

27. Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hallister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. van Horn, and C.F. Weber. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541.
28. Scholz, R., K.J. Molohon, J. Nachyigall, J. Vater, A.L. Markley, R.D. Sussmuth, D.A. Mitchell, and R. Borriss. 2011. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 193, 215-224.
29. Secondary planning report for rural-based industry promotion project. 2008. Ministry of Knowledge Economy. Republic of Korea, pp. 1.
30. Sutyak, K.E., R.E. Wirawan, A.A. Aroutcheva, and M.L. Chikindas. 2008. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1067-1074.
31. Yakimov, M.M., K.N. Timmis, V. Wray, and H.H. Fredrickson. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1706-1713.
32. Yoo, J.Y., H.G. Kim, and W.J. Kim. 1998. Physico-chemical and microbiological changes of traditional meju during fermentation in Kangweondo area. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30, 908-915.