

(옆면)

(앞면)

320014-
2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
농림축산식품 연구개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004002-01

토종
발효미생
물 기반
건강지향
형
장류를
활용한
천연조미
·향미소
재 개발

토종 발효미생물 기반 건강지향형 장류를 활용한 천연 조미·향미소재 개발

2021

2022.04.01

주관연구기관 / 농업회사법인 순창장류(주)
협동연구기관 / (재)발효미생물산업진흥원
/ 경상대학교

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “토종 발효미생물 기반 건강지향형 장류를 활용한 천연 조미·향미소재 개발”(개발기간 : 2020.04.20 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 04. 01

주관연구기관명 : 농업회사법인 순창장류(주) (대표자)

협동연구기관명 : (재)발효미생물산업진흥원 (대표자)

협동연구기관명 : 경상국립대학교 산학협력단 (대표자)



주관연구책임자 : 이정미

협동연구책임자 : 조승화

협동연구책임자 : 김현진

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

사업명	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)			연구개발과제번호		320014-2
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB	100%		
	농림식품 과학기술분류	PA	100%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)					
연구개발과제명 토종 발효미생물 기반 건강지향형 장류를 활용한 천연 조미·향미소재 개발					
전체 연구개발기간 2020. 04. 20 - 2021. 12. 31 (1년 9개월)					
총 연구개발비 총 968,800 천원 (정부지원연구개발비: 775,000 천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 193,800 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[O] 기타 (위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)	착수시점 기준() 종료시점 목표()
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)					
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)					
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		토종 발효미생물 기반 저염된장 발효공정 확립 및 발효식품의 대사체 분석 및 기능성 펩타이드 발굴		
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> - 정미성, 안전성 지향 발효미생물 3종 확보 - 발효미생물 기반 저염된장 및 발효장류 개발 및 대량 생산 기술 확보 - 기능성 지향 저염된장 및 발효장류를 기반으로 한 조미·향미소재 개발 - 조미·향미 소재를 활용한 응용식품 개발 및 상품화, 제품 출시 - 개발 조미·향미 소재의 향미특성 규명 및 대사체 분석 기술 확립 		
	1단계 (해당 시 작성)	목표	토종 발효미생물 기반 저염된장 발효공정 확립 및 발효식품의 대사체 분석 및 기능성 펩타이드 발굴		
		내용	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 정미성, 안전성 지향 장류용 토종 발효 미생물 3종 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 천연 발효조미소재 풍미 타깃 우량 미생물 분리, 동정 및 발효특성 조사 - 천연 발효조미소재 우량 발효미생물 3종 확보(효소활성 고 Glutamic acid(GA), 기능성) - 선발균주의 기질특이성 분석을 통한 최적 발효조건 확립 ◦ 발효미생물 기반 저염된장 및 발효장류 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 선발균주별 고체발효/액체발효 특이적 발효조건 확립 및 <i>koji</i> 최적화(쌀/대두) - 저염발효공정(액상/고상)개발 및 특성(이화학적, 관능적, 안전성)분석 <ul style="list-style-type: none"> - 조미·향미 소재 개발을 위한 발효장류 제법 확립 및 품질 factor 도출 ◦ 발효조건에 따른 대사체 분석 및 기능성 펩타이드 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - 종균별, 발효조건별, 발효공정별 발효대사체 분석 및 다변량 통계분석 - 기능성 펩타이드 분리 및 동정 		

			<ul style="list-style-type: none"> 발효장류 기반 조미·향미 소재 발굴 및 발효조건과의 상관관계 규명 <ul style="list-style-type: none"> 조미·향미 펩타이드 발굴 및 분석조건 최적화 조미·향미 펩타이드와 발효와의 상관관계 규명 펩타이드 분석 조건 최적화 및 대사표현형 모델 구축
	n단계 (해당 시 작성)	목표	발효장류 조미, 향미소재 개발 및 발효식품의 향미특성 규명 및 대사체 분석 기술 정립
		내용	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 지향 발효장류 기반 천연 조미·향미 소재 개발 및 상품화, 제품 출시 <ul style="list-style-type: none"> 발효장류 기반 고상, 액상형 조미·향미 소재 개발 조미·향미 소재의 제형화 연구 및 특성 분석 조미·향미 소재의 조리 및 가공 적성 검증 연구 조미·향미 소재를 활용한 용용식품(Home Meal Replacement(HMR), 소스 등) 상품화 연구진행, 제품출시 조미·향미 소재 개발을 위한 발효장류 및 조미·향미 소재 대량 생산 체계 구축 <ul style="list-style-type: none"> 공정별 특이성 적용 최적공정 확보 및 공정 안정성 확립 이화학적 성분 및 기호도 분석을 통한 품질 지표 규격 설정 장류 및 조미·향미 소재 제조공정 Scale-up 및 process 표준화 장류 및 조미·향미 소재 작업표준서 및 QC공정도 제작 장류 및 조미·향미 소재 시제품 제작 및 소비자 관능분석 유통안전성 확보(Q₁₀ value, 포재 선정), 제품 마케팅 영업 및 매출발생

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> 정미성, 안전성 지향 발효미생물 3종 확보 발효미생물 기반 저염된장 및 발효장류 개발 및 대량 생산 기술 확보 기능성 지향 저염된장 및 발효장류를 기반으로 한 조미·향미소재 개발 2건 조미·향미 소재를 활용한 응용식품 개발 및 상품화, 제품 출시 4건 개발 조미·향미 소재의 향미특성 규명 및 대사체 분석 기술 확립
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> 장류기반 천연 발효 조미소재 기술 개발로 장류산업의 블루오션 시장 창출 기능성 발효 조미·향미 소재 개발로 관련 식품산업 활용 가능 향미 시너지 factor 기반 맞춤형 식품 제조 가능 기능성 토종 발효미생물을 이용한 한국형 식품소재의 개발 다양화로 글로벌 시장 진출 확보
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	2	4	1						3			
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	향미소재		조미소재		기능성펩타이드		대사체		발효미생물			
영문핵심어 (5개 이내)	Flavoring material		seasoning material		functional peptide		metabolomics		fermentation starters			

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구개발과제의 수행과정 및 수행내용	11
3. 연구개발과제의 수행결과 및 목표 달성 정도	226
4. 목표 미달시 원인분석(해당 시 작성)	233
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	233
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	233

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 토종 발효미생물 기반의 발효장류의 발효조건 및 향미성분 지표 및 기호도 인자에 대한 프로파일링을 구축하고, 이를 통한 천연 조미·향미 소재 및 응용제품의 상품화를 최종목표로 함
 - 발효미생물 기반의 저염된장, 발효장류 개발 및 대량 생산 기술 확보
 - 기능성 지향 저염된장 및 발효장류 기반 천연 조미·향미 소재 개발
 - 발효식품 기반 천연 조미·향미 소재의 향미특성 규명 및 대사체 분석 기술 정립
 - 발효 소재를 활용한 응용제품의 상품화를 통하여 한식의 가치를 증대하고 관련 사업의 고부가가치화를 이루고자 함

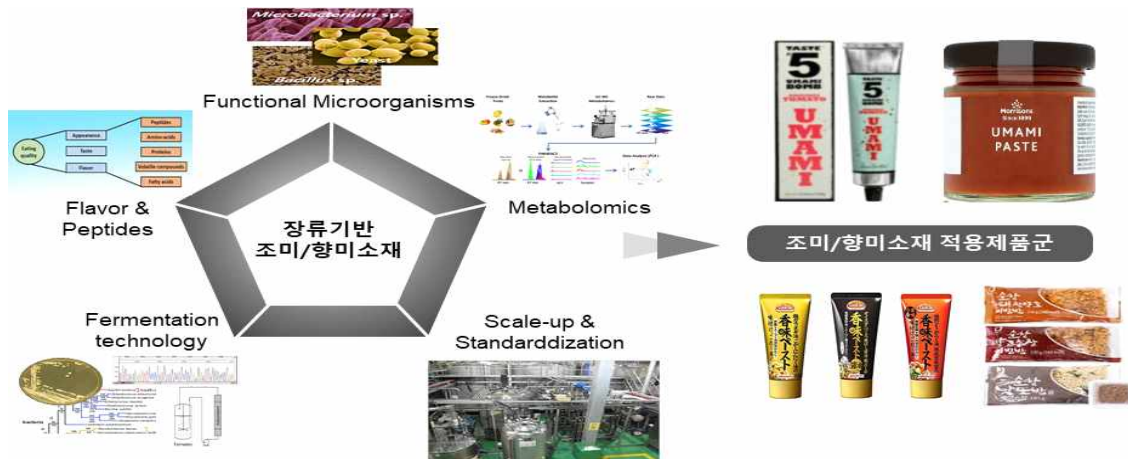


그림 1. 장류기반 조미·향미 소재 연구개요

- **(제품의 차별성)** 우리나라 전통 발효식품인 장류와 동일하나 전통장류는 자연유래 발효미생물에 의한 통제되지 않은 발효로 품질의 균일화가 어렵고 풍미와 품질을 표준화하는데 애로사항이 있음. 또한 가장 중요한 해결점으로써 장류는 고염발효에 의해 발효의 안전성을 유지하는 공법을 취함으로써 유익균주의 다양한 바이오컨버전을 통해 많은 기능성이 있음이 밝혀졌음에도 불구하고 건강기능식품으로 인증을 받는 것이 불가능하고 저염이 필요한 영 유아 및 특수계층이 이용하는데 문제점이 존재하며 다양한 식품소재로의 이용에 걸림돌이 되고 있음. 본 연구에서는 우량 기능성 미생물의 발효와 더불어 저염발효공법을 개발 적용함으로써 다양한 식품소재로의 이용이 가능하며 토종미생물의 발효에 의한 기능성이 소비자에게 건강지향적인 이익을 줌으로써 관련 시장의 성장을 견인할 수 있을 것으로 판단됨.

표 1. 천연 발효조미소재의 개발 및 기존 제품과의 차별성

구분	기존(화학조미소재)	개선(천연발효조미소재)
OUTPUT	MSG,HVP,Yeast extract	천연발효조미액,농축액,분말
생산방식	화학분해, 염산분해, 효모배양	미생물 발효
관능특징	단일맛(감칠맛)	복합미
사용범위	지미를 내기 위한 용도	지미, 풍미를 내기 위한 용도
사용제한	고염, 짙은 색상, 고가격	색상의 차별화(짙은색, 옅은색)가능
제품특징	저가격, 강한 맛	Animal-free, Gluten-free
단점	느끼하고 질리기 쉬움	고가격

1-2. 연구개발의 필요성

- **(장류산업의 위기)** 장류산업은 1990년대 최대 산업부흥기를 거쳐 최근 성숙기에 들어섰다고 할 수 있으며 1조원 규모의 출하량과 한식 및 가내수공업형태 등을 포함하면 1조5천억 원 규모를 유지할 것으로 파악되고 있음. 이는 단일 식품시장규모로써 큰 편이라고 할 수 있으며 다만 성장률에 있어서는 점차 감소하고 있으며 최근의 장류시장은 대기업이 전체 시장의 80%이상을 점하고 있는바 장류를 제조하는 업체의 경우 장류를 소재로 한 제품의 다양화 등으로 산업의 범위를 확장할 필요성이 꾸준히 대두되고 있다고 할 수 있음. 또한 높은 염도로 인해 대량 섭취 시 건강에 바람직하지 못하다는 선입견이 있음.
- **(조미료 시장)** 가공식품 등에 많이 사용되는 감칠맛은 “짠맛, “단맛” 등과 함께 식품의 풍미를 증진시키기 위한 대표적인 식품조미료의 맛임. 최근 Fortune Business Insights에 따르면 전 세계 조미·향미 시장규모는 2018년도 기준 159.3억 달러에 달한다고 보고하였으며 향후 성장가능성에 대해서도 2026년에 228억7,000만 달러까지 성장할 것으로 예측함. 다만 대표적인 감칠맛 조미료로써의 Mono Sodium Glutamic acid(MSG)는 한꺼번에 대량 섭취하지 않을 시 무해하다는 식약처의 공식적인 설명이 있음에도 불구하고 많은 소비자들은 합성조미료를 여전히 꺼리는 실정임. 그에 반해 발효 천연 조미에 대한 관심이 높아지면서 최근 발효조미료 시장의 급속한 증가가 이루어지고 있으며 거기에서 더 나아가 자연재료를 활용한 조미료로 변화해 가고 있으며 최근까지의 시장에서는 합성조미료에 비해 맛의 강도가 높지 못해 시장규모가 B2C단계에 머물고 있으나 향후에는 B2B시장으로까지 시장규모가 확대되고 이와 연관된 신제품 개발이 지속적으로 진행되어야 할 것으로 판단됨.
- **(조미·향미소재란)** 조미소재란 식품에 특정 풍미를 돋우기 위한 목적으로 사용하는 식품소재로 짠맛을 내기위한 소금류, 매운맛을 내기 위한 고춧가루, 신맛을 내기 위한 식초 등의 모든 맛내기 성분을 아우르는 말이며 감칠맛으로 일컬어지는 아미노산계 조미소재로는 MSG와 Hydrolyzed Vegetable Protein(HVP)가 대표적임. 기존의 조미소재는 정미성 물질인 아미노산 함량의 증대에만 단순히 그쳐 있어 단순히 맛 자체만을 향상시키는 방향으로 개발되었으나 이제는 향미성분이 다른 기본미에 영향을 주고 맛의 다양화 및 향기와의 조화를 갖춘 다양한 응용제품 개발이 필요함.

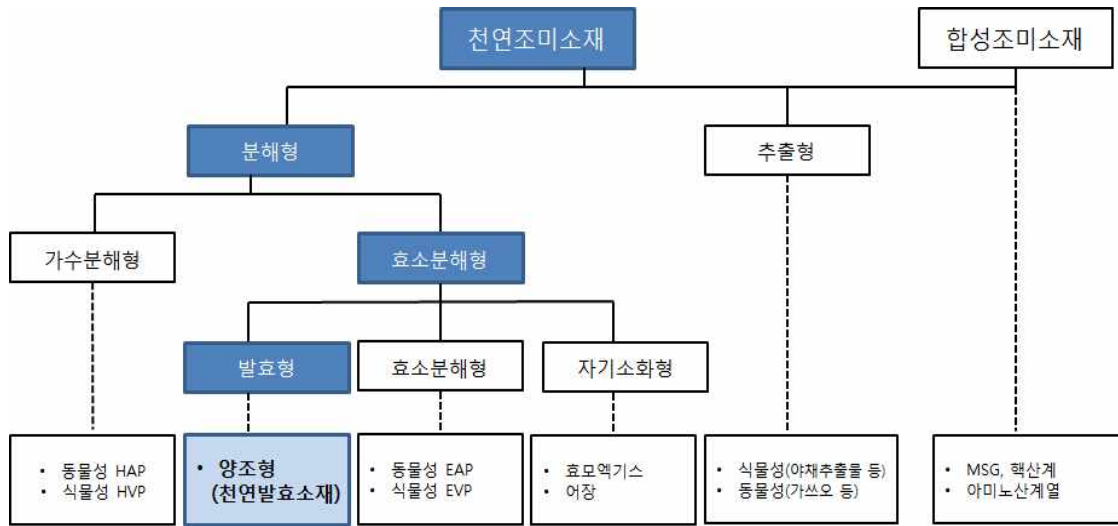


그림 2. 감칠맛계 조미소재 분류도

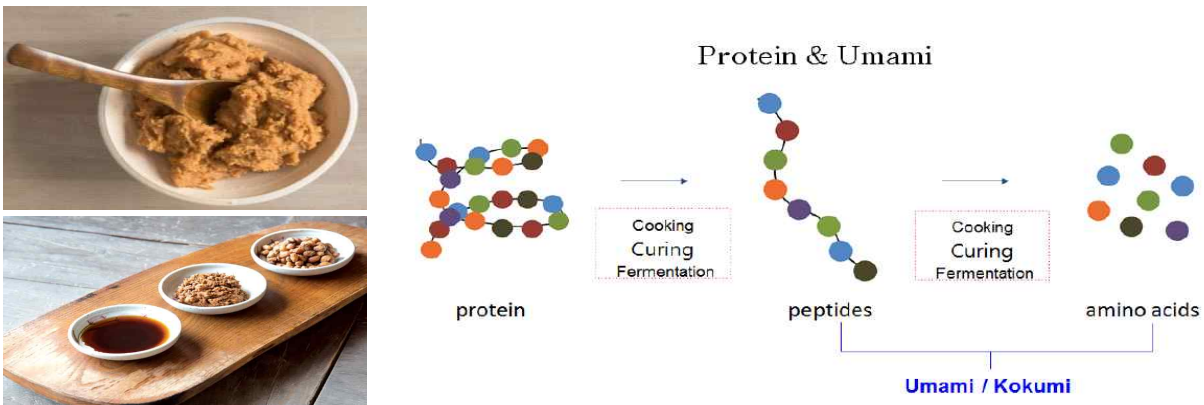


그림 3. 대두의 단백질 분해작용에 의해 생성되는 umami/kokumi성분

- **(천연 조미·향미 소재)** 조미와 향미는 주로 umami(감칠맛)과 kokumi(농후미)가 관여함. 감칠맛과는 달리 분류되는 kokumi는 그 자체로는 맛이 없지만 실제로는 혀의 칼슘채널을 통해 유발되어 단맛, 짠맛, 감칠맛을 향상시키는 것으로 알려져 제6의 맛으로 분류되고 있음. Kokumi는 음식의 전반적인 풍미를 향상시켜줌. 감칠맛은 주로 아미노산, glutamate, ribonucleotides (insinuate, guanylate 등) 등이 관여하며 kokumi는 주로 칼슘, protamine, glutathione, L-histidine 등의 화학물질이 관여하는 것으로 알려지고 있음. 특히, 대두에 함유된 탄수화물, 단백질 및 지방질은 미생물이 분비한 효소로 인하여 유기산, 유리당, 아미노산, 핵산, 알데하이드, 케톤 및 알콜 등과 저분자 물질로 가수분해되면서 독특한 풍미가 생성되며 이로 인하여 다양한 음식의 조미소재로 사용되는데 대두 분해산물의 가장 특징은 kokumi임. 따라서 전통 콩 발효식품들로부터 umami와 kokumi생성에 관여하는 우수 미생물 선발 및 최적 발효조건을 규명하고 이를 활용한 새로운 제품들이 출시할 필요가 있음.

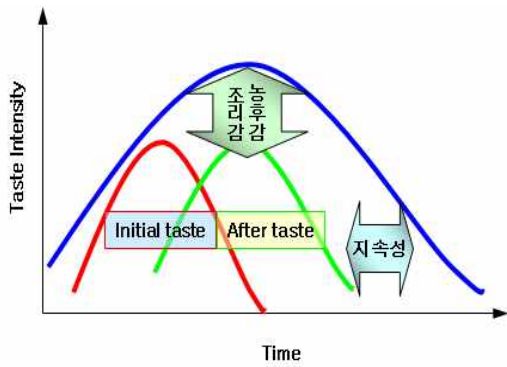


그림 4. 조리시간에 따른 농후미 강도

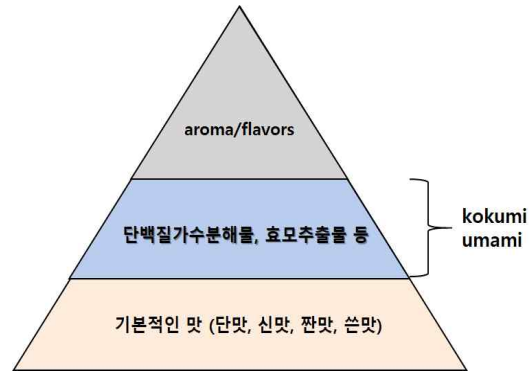


그림 5. Flavor pyramid (출처: 아지노모도)

- **(대사체 연구)** 대사체학은 생체 시스템에서 다양한 유전적, 생리적, 병리적 또는 환경적인 조건에서 일어나는 저분자 대사체군(metabolome)(분자량 1000 Da 이하)의 패턴과 농도 등의 분석을 통해 생명현상의 변화와 원인을 규명해 나가는 연구 분야로 미생물, 식물, 동물 및 인간을 대상으로 한 기초연구뿐만 아니라, 의약품, 질병진단, 식품, 농업, 환경에 이르기까지 다양한 분야에 적용되고 있으며 Nature지의 2020 visions 중 하나로 선정된 연구분야임.

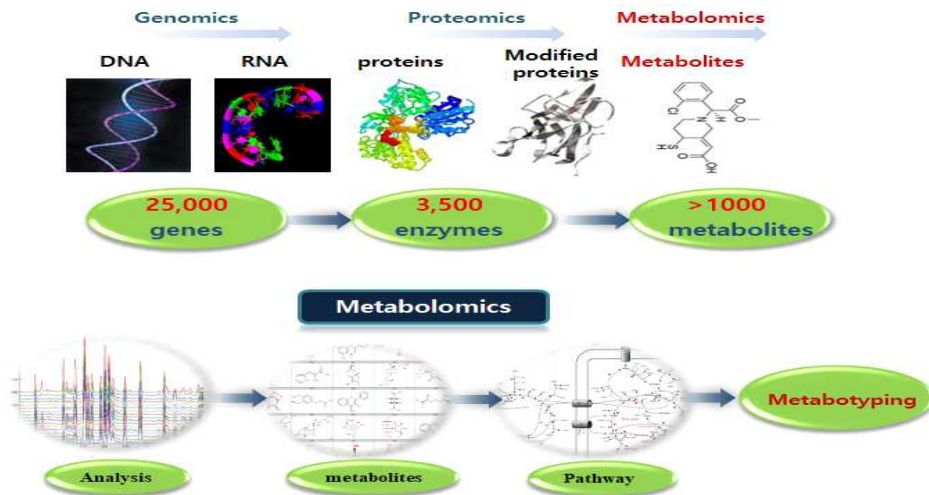


그림 6. 대사체학 개요

- 식품(영양)대사체 분야는 식품의 성분분석, 성분의 진위판별, 식이한 식품 주요 성분의 체내 추적 및 식품 식이 후 체내에서 일어나는 대사체의 변화 모니터링에 주로 활용되고 있으며 이를 통해 식품의 체내 역할을 이해하는데 많은 도움이 되고 있음.
- 발효대사체 분석에서는 우수 균주의 선발 및 발효식품의 품질평가, 맛과의 상관관계 연구, 발효 대사경로 도출에도 활용되고 있음.

- (기능성 펩타이드 발굴) 발효미생물을 이용한 발효식품은 미생물이 낸 효소에 의해 특유의 맛과 향이 생기고 바이오 컨버전에 의한 기능성을 높여줌. 특히 단순하지 않고 복잡한 특유의 향미는 다종다양의 성분이 함유되어 있을 것으로 예상되나 그 중 펩타이드가 가장 중요한 성분으로 생각되어지고 있음. 펩타이드는 단백질성 발효식품의 발효, 숙성과정에서 생성되는 주요 구성성분으로 저분자 펩타이드의 경우 양성전해질 성질이 강해 Na⁺, Cl⁻ 등의 이온과 결합, 식품염류에 작용, 짠맛 완화로 맛 형성에 중요한 역할(Ogawa, T 등 2004)을 하며 펩타이드의 경우 특히 항고지혈 활성, 항노화 효과 등 다양한 기능성을 가지고 있어 기능성 소재 및 미래형 식품으로 개발 및 활용가치가 높을 것으로 판단됨.

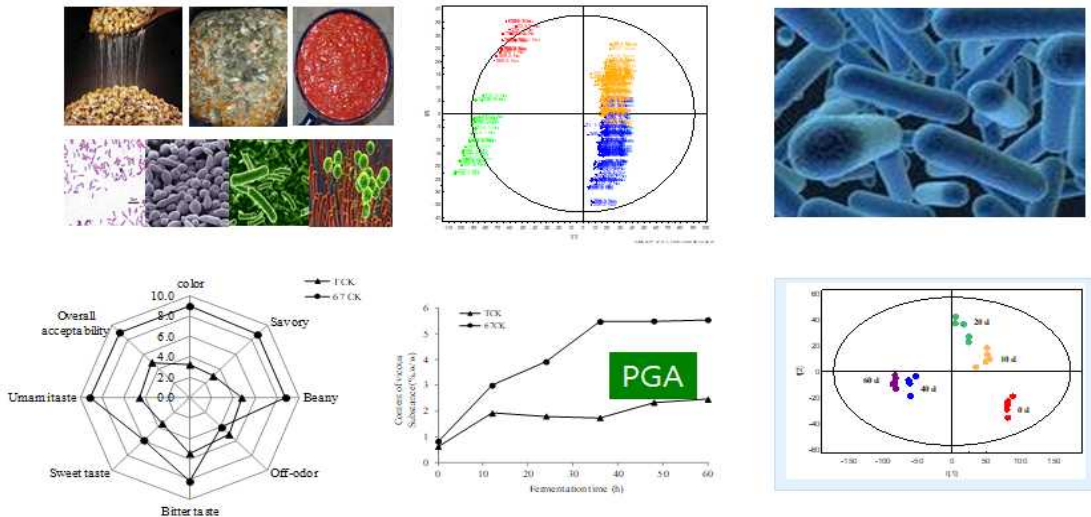


그림 7. 발효 대사체 분석 (선행연구: Food Chem.2011, 127, 1056-1064)

- 발효과정에서 생성되는 펩타이드인 경우 다양한 기능성이 있는 것으로 보고되고 있으며 특히, 콩 발효식품에는 혈압을 억제하는 것으로 알려진 angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor가 다량 함유되어있는 것으로 알려지고 있음. 특히 기능성 펩타이드인 경우 비만, 당뇨와 같은 대사질환과 항암제 분야에서 각광을 받고 있으며 이외 면역치료제, 호르몬치료제 등 다양한 적응증에서 연구되고 있음. 이외에도 혈중 코티솔 과잉 상태가 지속되는 쿠싱증후군, 단장증후군 치료제 등 희귀 질환에서도 치료제 개발 중임. 또한, 향후 시장성이 확대될 것이라 꼽히는 시장은 향균 펩타이드와 화장품 펩타이드 분야임. 향균 펩타이드는 미생물, 세균, 동식물이 갖는 선천성 면역의 일종으로 향균 활성을 가지며 기존 항생제에 비해 향균력이 뛰어나고 내성이 거의 없다는 특징을 가지고 있어 차세대 항생제로 관심을 받고 있음.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

가. 1차년도 연구수행 및 결과

주관연구기관 [농업회사법인순창장류(주)] : 대두 기능성 미생물을 활용한 발효장류 공
정확립

1) 연구재료 및 연구방법

가) 재료

- 대두는 국내산(전북 순창군) 대두를 사용하였으며, 볶음대두분은 외주를 통해 전처리과정을 거친 후 사용하였다. 천일염은 신안산을 사용하였으며 밀은 국내산을 사용하였다. 여기에 보존성을 높이기 위해 식품용 발효주정을 구입하여 사용하였으며 이외 배합용 원·부재료는 해당업체에서 구입하여 사용하였다.
- 본 실험에 사용한 장류용 발효 균주로써 (재)발효미생물산업진흥원으로부터 당해연도 연구를 통해 최종 선정된 곰팡이와 고초균을 각각 1종씩 분양받아 사용하였다. 곰팡이는 *Aspergillus oryzae* SRCM102487균주를 사용하였고 이와 비교할 곰팡이는 시판 종균으로 충무발효(주)로부터 장류용 *Aspergillus oryzae* 균주를 구매하여 사용하였다. 고초균은 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM104466균주를 사용하였고 이와 비교할 고초균으로는 당사에서 장류 제조에 사용 중인 *Bacillus subtilis*를 사용하였다.

나) 실험방법

(1) 선발미생물의 최적 koji제조

- 본 제국에 사용한 탄수화물원으로는 밀을 사용하였으며, (재)발효미생물산업진흥원으로부터 분양받은 *Aspergillus oryzae* 균주를 접종하고 발효조건별(수분함량, 발효온도, 발효시간) 탄수화물분해활성도를 분석하여 효소활성을 고함량 획득하기 위한 고제발효조건을 확립하고자 하였다. 이후 탄수화물분해활성도가 가장 높은 최적의 조건을 선정하여 소맥koji를 제조하였다.

(2) 종균을 활용한 저염발효물 pilot scale 제조

- 저염발효물에 사용하기 위해 탄수화물분해활성도가 가장 높은 조건으로 제국한 소맥koji를 염수와 혼합한 후 각 발효조건별(염농도, 발효온도, 발효시간) pH, 아미노태질소함량, 수분, 염도, L값을 분석하여 목적인 저염발효물의 발효상태를 확인하고 제조조건을 확립하였다.

(3) 종균을 활용한 저염된장발효물 pilot scale 제조 조건 확립

- 저염된장발효물에 사용하는 된장용 메주를 만들기 위해 대두는 국내산을 사용토록 하며 (재) 발효미생물산업진흥원으로부터 분양받은 *Bacillus amyloliquefaciens*를 접종한 후 45°C에서 36 시간 발효하였다. 발효가 완료된 된장용 메주는 상기와 같이 발효된 소맥koji 그리고 증자대 두 및 엽을 투입 고루 혼합하여 저염된장발효물을 제조하였다. 이후 발효속성조건별(염농도, 발효온도, 발효시간) 염도, pH, 아미노태질소함량, 수분, L값을 분석·비교함으로써 목적인 저염된장발효물의 발효상태를 확인하고 최적의 발효제조조건을 확립하였다.

(4) 저염된장 최적 배합비 설계

- 발효가 완료된 저염발효물과 저염된장발효물은 목적하는 저염된장으로써의 관능풍미를 위하여 다양한 원료 및 함량별로 혼합 후 숙성하며 또한 저염된장의 특성상 유통품질의 안정성을 확보하는 것은 중요한 품질 factor로써 염도 대비 최종 수분함량별로 혼합하여 pH의 변화양상의 분석을 통하여 맛있으면서 품질이 안정적인 최적의 저염된장 배합비를 도출하였다.

(5) 저염된장 관능 측정

- 본 실험에 의한 저염된장의 출시 가능성을 최종 점검하기 위해 관능특성 분석을 실시하였다. 풍미기호도 분석은 평점법에서 항목척도를 사용하여 9점 척도로 평가토록 하며 상기의 발효 조건별 관능특성의 분석과 관련하여 관능평가인원은 농업회사법인 순창장류(주)의 전 직원을 대상으로 짠맛과 감칠맛 농도별 미맹테스트를 진행한 후 선발된 인원인 12명을 대상으로 실시하였다. 시료는 된장 50 g을 물에 풀어서 끓인 된장국을 시험체로 하였다.

(6) 수분함량 및 pH 측정

- 수분함량은 시료를 믹서기로 마쇄 후 적외선 수분측정기(FD-720, Kett Co., Japan)를 이용하여 측정하였고, pH는 무게 5 g을 취하고 증류수에 녹여 45 ml에 희석하여 진탕 시킨 후 pH meter(Mettler Toledo GmbH, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

(7) 탄수화물분해활성도(α -Amylase)측정

- 소맥koji의 품질지표로써 탄수화물분해활성도(α -Amylase)를 현장에서의 품질지표로 사용하고 있다. α -Amylase 활성은 30분간 10 mg의 전분을 분해시켰을 때를 1 U(unit)으로 하여 1 g으로 환산하였다. 검체 약 1 g을 정밀히 달아 증류수에 녹여 1000 ml로 정용한 다음 여과하여 검액으로 하고 1.0% 전분용액을 기질용액으로 사용하였다. 효소시험용 시험관에는 1.0%기질용액 5 ml와 초산염완충액(pH 5.0) 3 ml, 0.1% CaCl₂ 1 ml를 첨가하고 항온수조(37°C)에서 10분간 예열 후 검액 1 ml를 첨가하였고 효소공시험용으로 다른 시험관에 1.0% 기질용액 5 ml와 초산염완충액(pH 5.0) 3 ml, 0.1% CaCl₂ 1 ml를 첨가하고 항온수조(37°C)에서 10분간 예열 후 미리 121°C에서 15분 가열처리한 검액 1 ml를 첨가하였다. 또 효소표준용액 용 시험관에 1.0%기질용액 5 ml와 초산염완충액(pH 5.0) 3 ml, 0.1% CaCl₂ 1 ml를 첨가하고 항온수조(37°C)에서 10분간 예열 후 증류수 1 ml를 첨가하였다. 각 시험관을 잘 흔든 후 정확히 30분간 항온수조(37°C) 내에서 반응시켰다. 반응완료 후 즉시 얼음물로 냉각시키고 시험관에 반응액 0.2 ml를 취하고 0.00025N I₂ solution 10 ml를 첨가한 후 660 nm의 파장에서

흡광도를 측정하였다.

(8) 아미노태 질소(amino-type nitrogen) 측정

- 아미노태 질소는 Formol법으로 측정하였다. 시료 1 g을 비커에 취하고 증류수 50 ml를 가하고 240초 동안 진탕 혼합하여 충분히 용해한 다음 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4로 한다. 여기에 중성 formalin 20 ml를 가하고 20초 동안 진탕 혼합한 뒤 다시 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화·적정하였다.

$$\text{아미노태 질소(mg\%)} = \frac{0.1N \text{ NaOH 적정량} \times 1.401 \times F \times \text{희석배수} \times 100}{\text{시료량(g)}}$$

(9) 염도 측정

- 시료 10 g에 증류수 90 ml를 가하여 1분 동안 교반 후 염도계(ATAGO, TM-30D)로 측정한다.

(10) L값(L-value)

- 색차계를 백색 교정판을 이용하여 계산하고 시료를 측정기에 평평하게 편 다음 유리를 덮는다. 유리를 고정된 후 L값을 측정하였다.

(11) 유리아미노산 분석

- 유리아미노산 자동분석기(L-8900, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)를 이용하였으며, 시료 2 g을 취한 후 여기에 3차 증류수 50 ml를 첨가하여 초음파(WUC-D22H, Daehan Scientific Co., Ltd) 처리로 20분간 추출한 후 970×g 에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액 2 ml에 5% trichloroacetic acid(TCA) 2 ml를 첨가한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 다음 0.02N-HCl로 희석해 0.2 μm syringe filter로 여과하여 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

Table 1. 유리아미노산 분석을 위한 아미노산 자동분석기 조건

Instrument	Hitachi L-8900
Column	Hitachi 4.6 × 60 mm (separation) Hitachi 4.6 × 40 mm (ammonia filtering)
Detector	UV/Vis (440nm-570nm)
Ninhydrin flow rate	0.35 ml/min
Buffer flow rate	0.40 ml/min
Temperature	50°C
Mobile phase	Column Buffer set (PH-SET KANTO)
Injection volume	20 μl

2) 연구수행 결과

가) 저염된장용 최적화 발효미생물자원 확보

- (재)발효미생물산업진흥원으로부터 최종선발된 *Aspergillus oryzae* 1종과 *Bacillus amyloliquefaciens* 1종을 분양받아 저염된장을 제조하기 위한 최적의 발효조건 실험을 진행하였다.

Table 2. (재)발효미생물산업진흥원 분양 균주 List

구분	균주명
1	<i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM104466

나) 선발미생물의 최적 koji제조

- 소맥koji는 저염된장 발효를 위한 starter culture로써의 역할을 수행하며 미생물이 이용하기 용이하도록 호화시킨 즉, 증자된 밀가루에 적당한 온도와 적당한 습도조건을 도출하여 *Aspergillus oryzae*를 접종, 번식시킴으로써 목적하는 효소함량이 풍부한 질 좋은 koji를 다량으로 제조토록 하고 이를 위한 최적의 제조조건을 도출하였다. koji의 효소활성을 측정하는 것은 효소의 유효량을 규명하는 것이라고 할 수 있으며 주 원료인 밀가루를 증자하여 미생물이 이용하기에 용이한 호화상태로 만들어주고 (재)발효미생물산업진흥원으로부터 분양받은 *Aspergillus oryzae* SRCM102487 균주를 접종하고 발효조건별(수분함량, 발효온도, 발효시간) 품질을 측정하기 위한 지표로써 탄수화물분해활성도(α -Amylase activity)를 분석하여 최적의 고체 배양조건을 확립하고자 하였다. 여기에 중균을 접종하지 않은 증자된 밀가루(‘C1’)와 시판 중균으로 접종한 koji(‘C2’)와의 비교를 통해 탄수화물분해활성도가 가장 높은 발효조건을 선정하였다.

(1) 수분함량

- koji제조시 사용하는 항온항습기의 조건으로써 발효온도는 30℃, 발효습도는 80%로 하여 36 시간동안 발효하였으며 수분함량은 35%와 40% 그리고 45%로 구분하여 미생물로 하여금 목적하는 효소함량이 가장 많이 나오는 구간을 결정하기 위한 실험을 진행하였고 발효진행에 따라 품온 상승 시 뒤집기를 실시하여 품온을 유지하고자 하였다. 그 결과 시판 곰팡이(C2)와 선정 곰팡이(*Aspergillus oryzae* SRCM102487)로 제조한 koji 모두 수분함량 40%조건에서 발효하였을 때 각 688.53 ± 0.72 u/g과 1981.15 ± 0.30 u/g의 높은 탄수화물분해활성을 나타내며 균사가 적절하게 분포되고 곰팡이 특유의 발효향이 나타나 적절히 발효가 되었다고 판단되어 최종적인 koji제조의 수분조건을 본 실험에서는 40%로 최종 확정하였다. 한편 koji의 수분함량을 35%로 조정하여 제조한 구간의 경우 곰팡이의 균사가 골고루 소맥에 번식되지

않았으며 곰팡이의 발효향이 40%조건보다는 미흡하였으나 잡균의 향이 있지는 않은 보통의 상태로써 목적하는 고함량의 탄수화물분해활성을 얻기에 부족하였으며 수분함량 45% 제조 조건의 경우 수분함량이 과하여 소맥이 뭉쳐지는 현상이 관찰되었으며 이를 통해 현장에서 자동 생산시 대량화에 애로사항이 있을 수도 있을 것으로 추측되며 고습도의 상황에서 잘 자라는 세균의 번식이 함께 관찰되어 곰팡이의 *koji*로써의 수분함량으로써는 부적절할 것으로 판단하였다.

Table 3. 수분함량에 따른 koji의 탄수화물분해활성도(u/g)

구분	35%	40%	45%
C1	0	0	0
C2	612.92±0.86	688.53±0.72	574.24±0.19
<i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487	1745.61±0.92	1981.15±0.30	1522.82±0.98

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 1. 수분함량에 따른 koji의 사진

(2) 발효온도

- 상기 실험에서 각 곰팡이별 koji제조시 탄수화물분해활성도가 가장 높았던 수분함량 40%로 수분함량을 고정하고 발효습도 80%에서 36시간 발효하였으며, 발효온도는 25℃와 30℃ 그리고 35℃로 구분하여 실험을 진행하였다. 본 실험을 진행함에 있어 koji제조시 미생물의 번식 과정에서 품온이 상승하는 경우 뒤집기를 진행하여 목적하는 품온을 유지코자 하였다. 그 결과 시판 곰팡이(C2)와 선정 곰팡이(*Aspergillus oryzae* SRCM102487)로 제조한 koji 모두 발효온도 30℃ 조건에서 발효하였을 때 각 692.68±1.36 u/g과 2028.41±1.41 u/g의 높은 탄수화물분해활성을 나타내었으며 이에 따라 최종적인 발효온도는 30℃로 선정하였다. 한편 발효온도가 35℃일때는 일정 품온을 유지하는 것에 어려움이 따랐으며 발효가 끝날 무렵에는 고온성 잡균이 번식하여 끈적끈적한 점질물이 형성됨으로써 고릿한 향이 있으며 탄수화물분해활성이 떨어지는 것으로 나타났다. 본 실험에서 제조하는 곰팡이 koji는 저염으로 발효를 속성으로 진행함으로써 저염된장을 완성하는 것을 목적으로 하는 바 오염되지 않으면서 높은

효소활성을 갖는 것이 중요한 품질 factor이며 따라서 40%이상의 제조조건은 오염에 의한 리스크로 바람직하지 않은 것으로 판단하였다.

Table 4. 발효온도에 따른 koji의 탄수화물분해활성도(u/g)

구분	25℃	30℃	35℃
C1	0	0	0
C2	607.47±0.66	692.68±1.36	305.25±0.77
<i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487	1874.12±0.94	2028.41±1.41	1008.85±0.36

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 2. 발효온도에 따른 koji의 사진

(3) 발효시간

- 각 곰팡이별 koji제조 시 수분함량은 40%, 발효습도는 80%로 하였으며, 발효온도는 상기 실험에서 가장 뛰어난 활성을 보인 30℃로 설정하였다. 여기에 발효시간을 24시간, 36시간, 48시간으로 구분하여 탄수화물분해활성도를 관찰하였다. 그 결과 시판 곰팡이(C2)와 선정 곰팡이(*Aspergillus oryzae* SRCM102487)로 제조한 koji 모두 발효 48시간에서 각 758.55±0.91 u/g 과 2253.36±0.51 u/g의 높은 활성을 나타내었으며 발효 24시간 이전에는 곰팡이의 발아가 충분하지 못하여 얻어지는 koji가 충분한 amylase 역가를 나타내지 못하는 것으로 판단되어 지며 이에 따라 최종적인 발효시간은 48시간으로 선정하였다.

Table 5. 발효시간에 따른 koji의 탄수화물분해활성도(u/g)

구분	24시간	36시간	48시간
C1	0	0	0
C2	388.46±0.76	718.89±0.31	758.55±0.91
<i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487	1328.67±0.15	2057.75±1.03	2253.36±0.51

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 3. 발효시간에 따른 koji의 사진

- 결과적으로 *Aspergillus oryzae* SRCM102487의 고체발효를 위한 조건으로는 수분함량 40%, 발효온도 30℃, 발효시간 48시간이 가장 최적임을 알 수 있으며, 이렇게 고체발효 조건을 확립함으로써 제조시마다 얻어지는 koji효소 역가의 큰 편차를 줄이고 최종적으로 얻어지는 저염된장의 품질을 일정 수준으로 유지 관리하고자 하였다.



Fig 4. 최종 조건으로 제조한 koji의 사진

다) 종균을 활용한 저염발효물 pilot scale 제조

- 당사에서 저염된장을 발효하는데 사용하는 발효균주는 크게 탄수화물 분해능과 단백질 분해능이 우수한 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus amyloliquefaciens*를 사용토록 하며 각각의 균주를 통해 전분질 원료인 밀과 단백질 원료인 대두를 분해하여 장류 제품에 맞는 풍미를 생성하도록 설계하였다. 다만 본 연구의 목적이 저염된장의 개발인 점에 착안하여 전분질원료인 밀을 분해하는 단계와 대두를 분해하는 단계를 구분하여 발효를 진행하고 분해속도가 비교적 빨라 단시간에 탱크 내 발효 균질화가 용이한 밀발효물을 된장의 통상적인 염농도보다 낮은 염도에서 발효하는 제법을 적용함으로써 최종적으로 저염된장 개발의 목적을 달성코자

하였다. 본 실험에서는 탄수화물분해활성도가 가장 높은 조건으로 *Aspergillus oryzae* SRCM102487을 사용하여 제국한 소맥koji와 최종된장의 저염농도를 충족시켜줄 수 있는 염 농도로 조절된 염수를 잘 혼합하여 전분질원료를 신속히 분해하고 목적하는 발효물(이하, 저염발효물)을 제조하였다. 이를 위해 pilot scale로 저염발효물을 제조하기 위한 발효조건별(염 농도, 발효온도, 발효시간) 실험을 진행하였다.

(1) 염 농도

- 염 농도별에 따른 저염발효물 제조시 발효온도는 45℃로 하여 7일동안 발효하였으며 염 농도는 0%와 3% 그리고 5%로 구분하여 실험을 진행하였고 발효종료일인 7일째에 샘플링을 하여 수분함량, 염도, pH, 아미노태질소함량(AN), L값(L-value)을 측정하였다. 염 농도별 분해정도를 분석한 결과 염 3%와 염 5%에서 안정적인 pH가 나왔으며 염농도 0%의 경우 유기산 발효에 의해 7일차 이후 이상발효가 일부 진행되기 시작하는 것으로 판단되었다. AN함량의 경우 염 농도 3~5%에서 공히 안정적으로 측정되었으며 L값의 경우 염을 추가하지 않았을 때가 가장 낮았으며 염 3%일 때 40.93 ± 0.02 , 염 5%의 경우는 43.94 ± 0.02 로 염 5% 저염발효물이 낮게 측정되었다. 본 실험의 결과 염 3%, 5%로 45℃, 7일동안 발효진행시 모두 저염된장에 사용하기 위한 적절한 풍미를 갖춘 발효물이 제조될 수 있었다. 다만 대량생산을 최종 목적으로 한 바 두 구간 사이의 품질차이가 크지 않을 경우 염농도 5%로 조건을 설정하여 대량생산시 안정적으로 품질을 관리할 수 있는 표준화조건을 선택하는 것이 보다 더 바람직할 것으로 판단하였다.

Table 6. 염 농도에 따른 저염발효물 분석결과

염 농도 \ 분석항목	수분(%)	염도(%)	pH	AN(mg%)	L-value
0%	51.78 ± 0.03	0.11 ± 0.01	3.91 ± 0.01	228.42 ± 0.39	47.34 ± 0.02
3%	51.86 ± 0.02	3.13 ± 0.01	4.70 ± 0.01	242.20 ± 0.05	40.93 ± 0.02
5%	51.66 ± 0.07	5.22 ± 0.02	4.62 ± 0.01	273.42 ± 0.08	43.94 ± 0.02

* Value are mean \pm SD (n=3)



Fig 5. 염농도에 따른 저염발효물의 사진

(2) 발효온도

- 상기 실험 결과에 따라 염 농도는 5%로 설정하고 발효온도를 달리하여 7일동안 발효하였다. 장류의 제조에 관여하는 미생물은 염농도하에서 잘 자라는 미생물로써 대부분의 잡균 및 병원성 미생물은 염농도하에서 생육에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 장류의 제조에 소금을 혼합하는 것은 음식에 간을 주는 목적과 더불어 정상발효를 진행하기 위한 중요한 과정이라고 할 수 있으며 본 연구의 목적과 같이 저염하에서 발효를 진행코자 할 경우 초기 우점되는 미생물에 의한 원료의 발효를 신속히 진행함으로써 품질을 control할 수 있다. 본 연구에서는 통상적인 장류 발효온도인 30℃보다 높은 온도에서 신속하게 원하는 수준까지 발효를 진행할 수 있는 최적의 발효온도를 도출토록 하였다. 발효온도별 분해정도를 분석한 결과 35℃와 45℃에서 발효한 저염발효물의 pH가 안정적으로 나타났으며 특히 45℃에서 발효한 저염발효물의 AN함량이 247.06±0.22 mg%으로 가장 높게 나타났다. 한편 55℃에서 발효한 저염발효물의 경우 pH와 AN함량의 차이는 크지 않았으나 고온발효에 의해 발효종료일에는 춘장의 색과 비슷하게 보여 L값의 경우가 확연히 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 최종제품의 저염된장의 관능품질에 열화를 의미하는 것으로 따라서 저염발효물의 최적 발효온도는 45℃가 적합할 것으로 판단된다.

Table 7. 발효온도에 따른 저염발효물 분석결과

발효온도 \ 분석항목	수분(%)	염도(%)	pH	AN(mg%)	L-value
35℃	50.59±0.04	5.00±0.02	4.54±0.01	202.40±0.79	51.48±0.05
45℃	50.99±0.09	5.12±0.01	4.65±0.01	247.06±0.22	43.76±0.01
55℃	50.79±0.04	5.21±0.02	4.30±0.02	187.06±0.44	25.21±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 6. 발효온도에 따른 저염발효물의 사진

(3) 발효시간

- 발효시간 설정을 위해 염농도 5%, 발효온도 45°C로 동일하게 설정하고 총 7일에 거쳐 2일 간격으로 샘플링하여 성분에 대한 품질변화를 분석하였다. 발효기간별 수분함량과 염도는 평균적으로 각각 51%와 5%로 나타났으며 pH의 경우 4.56±0.01~4.74±0.01로 발효기간별 비교적 품질이 안정하게 유지되는 것으로 나타났다. AN은 발효 5일째부터 높은 함량을 나타내 248.54±0.84 mg%로 분석되었으며 L값은 발효시간이 경과됨에 따라 점차 낮아지는 경향을 보였으나 발효 7일까지는 비교적 밝은 색상을 띄었다. 전체적으로 발효시간이 지남에 따라 저염발효물의 물성은 부드러워지고 당화되었으며 색상에 영향을 미치므로 저염발효물의 발효시간은 5일 정도가 적절할 것으로 판단하였다.

Table 8. 발효시간에 따른 저염발효물 분석결과

Days	분석항목	수분(%)	염도(%)	pH	AN(mg%)	L-value
1		51.53±0.04	5.11±0.01	4.56±0.01	153.30±0.42	52.27±0.02
3		50.63±0.06	5.13±0.01	4.74±0.01	198.62±0.44	49.00±0.02
5		51.30±0.01	5.20±0.02	4.68±0.01	248.54±0.84	47.22±0.03
7		50.91±0.05	5.22±0.01	4.62±0.01	227.36±0.43	45.35±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 7. 발효시간에 따른 저염발효물의 사진

- 결과적으로 저염발효물의 pilot scale제조를 위한 조건으로는 염 5%, 발효온도 45°C, 발효시간 5일이 가장 최적임을 알 수 있으며, 저염된장을 제조하기 위한 1차 발효물으로써의 조건을 최종적으로 확립할 수 있었다.

(4) 볶음콩가루 첨가여부/균주별 비교실험

- 상기 실험에서 최종적으로 확립한 저염발효물 제조조건에 조미소재로써 풍미를 주기위하여 볶음콩가루를 저염발효물에 첨가여부에 따른 일반성분분석 및 유리아미노산 성분 조성의 차이를 보고자 하였다. 실험구간은 Control구간, 실험구, 변경구로 하여 Control구간은 충무발

효(주) *Aspergillus oryzae*를 사용하여 볶은 콩가루를 첨가하지 않은 저염발효물로 하고 볶은 콩가루를 첨가하지 않은 저염발효물(이하, NRSF)를 실험구, 볶은콩가루를 10% 첨가한 저염발효물(이하, RSF)을 변경구로 하여 저염발효물을 제조하였다. 일반성분 분석결과 볶음콩가루를 첨가하지 않은 실험구인 NRSF는 pH가 4.80이었으나 볶음콩가루를 10% 첨가한 저염발효물인 변경구, RSF일때 pH 5.14로 약간 높아져 저염발효물으로써 더 안정적인 pH였으며, AN의 경우 Control구간이 156.80 mg%을 나타낸 반면 볶음콩가루 첨가구인 RSF일 때 192.78 mg%이었으며 NRSF는 177.24 mg%로 기존 균주를 사용한 Control구간보다 분양받은 균주를 사용하고 볶음콩가루를 첨가하는 등의 개선 실험을 통하여 감칠맛의 지표인 AN함량이 모두 높게 나타났다. L값은 NRSF일 때 가장 밝아 46.86 ± 0.01 을 나타내었고 RSF의 경우 44.56 ± 0.01 이었으며 Control의 L값은 42.84 ± 0.01 로 가장 낮아 당 연구를 통해 분양받은 미생물을 발효미생물로 하고 볶음콩가루를 추가한 구간이 AN함량이 높고 또한 L값이 된장의 맛있는 색상을 표현하기에 가장 적당한 것으로 판단되었다.

- 총 유리아미노산 함량은 증무종균을 사용한 Control의 경우 $31,482.40 \pm 1.78$ mg/kg으로 나타났으며 개선된 종균을 사용하면서 볶음콩가루를 추가한 RSF구간과 개선된 종균을 사용한 NRSF구간이 각각 $32,737.11 \pm 1.93$ mg/kg, $28,381.95 \pm 0.77$ mg/kg로 나타났다. 이 중 긍정적인 맛을 주는 aspartic acid, glutamic acid, lysine, alanine, glycine의 비율은 개선된 종균을 사용하면서 볶음콩가루를 추가한 구간인 RSF가 26.63%으로 가장 높게 나타났으며 개선된 종균을 사용한 NRSF의 경우 23.80%, 기존 증무종균을 사용한 Control구간이 20.92%로 나타났다. 또한 쓴 맛을 주는 아미노산인 valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylethylamine의 비율은 RSF 경우 전체 비율의 20.23%를 보여 긍정적인 맛의 비율이 더 높았으며 NRSF는 23.55%를 나타내 긍정적인 맛을 나타내는 아미노산의 비율과 쓴맛을 나타내는 아미노산의 비율의 차이가 없음을 보였다. 특히 Control의 경우 긍정적인 맛을 주는 아미노산에 비해 쓴맛을 형성하는 아미노산의 비율이 더 높았음을 알 수 있었다. 결과적으로 (재)발효미생물산업진흥원으로부터 분양받은 미생물자원으로 제조된 실험구가 추후 저염된장을 제조하였을 때 된장의 맛을 좌우하는 pH나 아미노태질소함량과 유리아미노산 성분에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보이며 그 중에서도 볶음콩가루를 첨가하는 경우 감칠맛을 형성하는 유리아미노산의 함량에 큰 영향을 미칠 것으로 예상된다.

Table 9. 볶음콩가루 첨가 유무 저염발효물 / 균주별 비교실험 구간

구분	배합물
Control	시판 균주로 제조한 저염발효물
NRSF	최종 선발 균주로 제조한 저염발효물
RSF	최종 선발 균주로 제조한 저염발효물 + <u>볶음콩가루 10%</u>

Table 10. 볶음콩가루 첨가여부에 따른 저염발효물 일반성분 분석결과

구분 \ 분석항목	수분(%)	염도(%)	pH	AN(mg%)	L-value
Control	51.14±0.02	5.21±0.02	5.02±0.01	156.80±0.35	42.84±0.01
**RSF	51.39±0.03	5.13±0.01	5.14±0.01	192.78±0.55	44.56±0.01
***NRSF	51.48±0.15	5.22±0.03	4.80±0.04	177.24±0.32	46.86±0.01

*Value are mean ± SD (n=3)

*RSF : Addition of roasted soybean flour

**NRSF : Non-addition roasted soybean flour



Fig 8. 볶음콩가루 첨가여부에 따른 저염발효물의 사진

Table 11. 볶음콩가루 첨가여부에 따른 저염발효물 유리아미노산 함량

Free Amino Acid	Low salt Fermented product Free Amino Acid content (mg/kg)			Low salt Fermented product Free Amino Acid content (%)		
	Control	**RSF	***NRSF	Control	**RSF	***NRSF
Aspartic acid	1,571.18±1.98	2,367.92±0.99	1,692.07±0.17	4.99±0.01	7.23±0.00	5.96±0.00
Glutamic acid	2,134.00±0.09	3,247.01±0.15	2,224.82±0.11	6.78±0.00	9.92±0.00	7.84±0.00
Lysine	482.80±0.16	525.02±0.14	499.43±0.10	1.53±0.00	1.60±0.00	1.76±0.00
Alanine	1,547.00±0.43	1,672.07±0.71	1,527.67±0.06	4.91±0.00	5.11±0.00	5.38±0.00
Proline	2,677.02±0.20	2,084.16±0.10	2,537.34±0.07	8.50±0.00	6.37±0.00	8.94±0.00
Glycine	851.53±0.25	907.49±0.38	812.22±0.07	2.70±0.00	2.77±0.00	2.86±0.00
Serine	2,157.03±0.14	2,001.58±0.43	1,824.32±0.02	6.85±0.00	6.11±0.00	6.43±0.00
Valine	2,142.08±0.24	1,892.18±0.33	1,980.83±0.40	6.80±0.00	5.78±0.00	6.98±0.00
Methionine	659.04±0.04	628.72±0.28	621.79±0.04	2.09±0.00	1.92±0.00	2.19±0.00
Isoleucine	1,364.26.±0.06	1,274.55±0.09	1,255.80±0.05	4.33±0.00	3.89±0.00	4.42±0.00
Leucine	3,033.18±0.03	2,826.67±0.11	2,826.70±0.05	9.64±0.00	8.63±0.00	9.96±0.00
Threonine	1,201.09±0.22	1,231.53±0.92	1,126.30±0.02	3.82±0.00	3.76±0.00	3.97±0.00
Sarcosine	1,190.03±0.18	641.03±0.13	669.11±0.05	3.78±0.00	1.96±0.00	2.36±0.00
α-Aminoadipicacid	-	187.67±0.31	-	-	0.57±0.00	-
α-AminobutyricAcid	62.78±0.04	40.89±0.04	27.78±0.13	0.20±0.00	0.12±0.00	0.10±0.00
Tyrosine	1,114.25±0.04	1,213.86±0.12	863.54±0.23	3.54±0.00	3.71±0.00	3.04±0.00
Phenylalanine	1,934.87±0.29	1,780.21±0.05	1,738.79±0.05	6.15±0.00	5.44±0.00	6.13±0.00
β-Alaine	925.88±0.05	1,011.32±0.09	701.19±0.04	2.94±0.00	3.09±0.00	2.47±0.00
γ-AminobutricAcid	233.69±0.04	311,91±.05	264.31±0.04	0.74±0.00	0.95±0.00	0.93±0.00
Ammonia	964.52±0.05	571.12±0.04	575.42±0.24	3.06±0.00	1.74±0.00	2.03±0.00
Ornithine	63.09±0.85	62.79±0.06	76.53±0.12	0.20±0.01	0.19±0.00	0.27±0.00
Carnosine	282.79±0.05	173.43±0.40	-	0.90±0.00	0.53±0.00	-
Histidine	1,020.81±0.05	1,688.47±0.09	1,177.72±0.11	3.24±0.00	5.16±0.00	4.15±0.00
L-Anserine	548.10±0.23	646.07±0.03	317.52±0.25	1.74±0.00	1.97±0.00	1.12±0.00
Arginine	1,774.80±0.02	2,306.02±0.01	1,718.62±0.08	5.64±0.00	7.04±0.00	6.06±0.00
Hydroxylysine	214.23±0.09	96.23±0.07	96.51±0.09	0.68±0.00	0.29±0.00	0.34±0.00
Hydroxyproline	1,330.34±0.11	1,347.21±0.03	1,225.63±0.19	4.23±0.00	4.12±0.00	4.32±0.00
Total	31,482.40±1.78	32,737.11±1.93	28,381.95±0.77	100.00±0.01	100.00±0.00	100.00±0.00

* Value are mean ± SD (n=3)

**RSF : Addition of roasted soybean flour

***NRSF : Non-addition roasted soybean flour

라) 종균을 활용한 저염 된장발효물 pilot scale 제조 조건 확립

- 저염된장을 발효하는데 사용하는 발효균주 중 단백질 분해능이 우수한 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주를 이용하여 대두를 분해함으로써 장류 제품에 맞는 풍미를 생성하기 위한 2차 된장발효물 제조 단계를 실시하였다. 본 실험에서는 (재)발효미생물산업진흥원으로부터 분양받은 *Bacillus amyloliquefaciens*를 대두에 접종한 후 45°C에서 36시간 발효시킨 대두와 상기에서 최종조건으로 제국한 소맥 *koji*, 그리고 증자대두 및 염을 잘 혼합하여 된장발효물을 제조하였다. 된장발효물의 제조에는 장시간의 발효숙성시간이 소요되는 바 염농도와 발효온도 선정실험에서는 model system 개념으로 7일의 단기숙성을 진행하여 실험기간을 단축하였으며 발효기간의 실험 시에는 통상적인 발효숙성시간을 지켜 연구를 진행하였다.

(1) 염 농도

- 염 농도별에 따른 된장발효물 제조 시 발효온도는 기본적인 장류 발효온도인 30°C를 기준으로 하여 7일동안 발효하였으며 염농도는 8%와 10%로 구분하여 실험을 진행하였고 발효종료일인 7일째에 샘플링을 하여 수분함량, 염도, pH, 아미노태질소함량(AN), L값(L-value)을 측정하였다. 염 농도별에 따른 발효상태에 대한 일반성분을 분석한 결과 염 8%에 비해 염 10%에서 일반적인 된장의 안정적인 pH를 보였으며 AN함량은 염 8%가 263.48±0.05 mg%로 염 10%에 비해 약간 높았으나 큰 유의적 차이는 보이지 않았다. 또한 염 8%와 염 10%의 된장 발효물 색상은 두 구간 모두 L값 45로 나타나 큰 차이는 없었다. 따라서 pilot scale로 된장발효물을 제조하였을 때 AN이나 L값 항목에서 큰 유의적 차이를 보이지 않았고 염 8%보다 염 10%의 pH가 더 안정적인 것으로 판단되어 된장발효물 제조시 염농도는 10%로 확립하였다.

Table 12. 염 농도에 따른 된장발효물 일반성분 분석결과

염 농도 \ 분석항목	수분(%)	염도(%)	pH	AN(mg%)	L-value
8%	51.69±0.02	8.24±0.01	5.62±0.01	263.48±0.05	45.09±0.01
10%	51.67±0.05	10.32±0.01	5.34±0.03	257.48±0.17	45.72±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 9. 염 농도에 따른 된장발효물의 사진

(2) 발효온도

- 상기 실험 결과에 따라 염 농도는 10%로 동일하게 설정하였으며, 발효온도를 30℃와 35℃로 설정하여 7일동안 발효하였다. 발효온도별 일반성분 분석 결과 30℃에서 발효한 된장발효물의 경우 pH 5.56 ± 0.01 으로 35℃에서 발효한 된장발효물의 pH 5.74 ± 0.02 보다 안정적으로 나타났으며 발효온도별 된장발효물의 AN함량은 큰 유의적 차이는 보이지 않았다. 다만 L값의 경우 30℃로 발효한 된장발효물이 L값 46.08 ± 0.02 로 35℃로 발효한 된장발효물에 비해 밝은 색상을 띠었으며 추후 발효기간을 고려하였을 때 30℃의 발효온도가 최종 된장의 pH 또는 색상에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 판단하여 pilot scale로 제조한 된장발효물의 최종 발효온도는 30℃로 선정하였다.

Table 13. 발효온도에 따른 된장발효물 일반성분 분석결과

발효온도	분석항목	수분(%)	염도(%)	pH	AN(mg%)	L-value
30℃		51.28 ± 0.04	10.34 ± 0.01	5.56 ± 0.01	259.48 ± 0.08	46.08 ± 0.02
35℃		51.22 ± 0.03	10.32 ± 0.02	5.74 ± 0.02	267.96 ± 0.57	44.82 ± 0.01

* Value are mean \pm SD (n=3)



Fig 10. 발효온도에 따른 된장발효물의 사진

(3) 발효시간

- 발효시간 설정을 위해 염 농도 10%, 발효온도 30℃로 동일하게 설정하고 발효시간을 30일과 45일로 하여 발효가 끝나는 시점에 샘플링하여 일반성분을 분석하였다. 수분과 염도, pH의 경우 큰 유의적 차이를 보이지 않았고 AN은 발효 30일일 때 480.76 ± 0.13 mg%, 발효 45일에 526.40 ± 0.04 mg%을 나타냈으며 이는 발효기간이 길수록 높아지는 경향을 보였다. L값은 발효30일에 44.50 ± 0.01 으로 밝은 색을 띠었으며 발효45일에는 39.14 ± 0.01 로 발효기간이 길수록 어두워지는 것을 확인하였다. 된장의 L값은 제품의 기호도에 큰 영향을 미치는 중요한 품질관리 항목으로 발효기간 중 L값 변화 결과는 시간이 지남에 따라 유통 중에도 감소하는 경향을 보이므로 발효 45일보다 발효 30일이 적절한 것으로 판단하였다.

Table 14. 발효시간에 따른 된장발효물 일반성분 분석결과

Days	분석항목	수분(%)	염도(%)	pH	AN(mg%)	L-value
30		51.02±0.12	10.23±0.01	5.41±0.02	480.76±0.13	44.50±0.01
45		51.27±0.03	10.41±0.01	5.31±0.01	526.40±0.04	39.14±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 11. 발효시간에 따른 된장발효물의 사진

(4) 된장발효물 최종 발효조건 확립

- 상기 실험에서 최종적으로 확립한 조건으로 제조된 된장발효물의 일반성분 비교를 위해 증 무발효(주) *Aspergillus oryzae*와 당사에서 장류제조에 사용 중인 *Bacillus subtilis*를 사용하여 동일한 조건으로 만든 된장발효물을 대조구로 하여 비교분석하였다. 염 농도 10%, 발효온도 30℃, 발효시간 30일로 동일하게 설정하여 발효가 끝나는 시점에 샘플링을 하여 분석한 pH의 경우 대조구는 5.24±0.01로 최종 발효조건으로 제조한 된장발효물의 pH 5.38±0.01에 비해 약간 낮았으며 AN은 대조구 427.56±0.10 mg%, 최종 된장발효물은 485.42±0.04 mg%로 최종 발효조건으로 제조한 된장발효물의 AN함량이 더 높았고 L값의 경우 대조구가 43.45±0.01, 최종 된장발효물은 44.74±0.01로 대조구에 비해 약간 밝은 색상을 띠었다.

Table 15. 최종 발효조건으로 제조된 된장발효물 일반성분 분석결과

구분	분석항목	수분(%)	염도(%)	pH	AN(mg%)	L-value
대조구		51.16±0.04	10.22±0.01	5.24±0.01	427.56±0.10	43.45±0.01
최종 된장발효물		51.07±0.03	10.20±0.01	5.38±0.01	485.42±0.04	44.74±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 12. 최종 발효조건으로 제조된 된장발효물과 대조구 비교

마) 저염된장 최적 배합비 설계

- 최종 확립된 조건으로 제조된 저염발효물과 된장발효물을 저염된장으로 제품화하기 위하여 최종 수분함량별로 혼합하고 실제 제품화가 가능한 수분함량을 설정한 후 pH 분석을 통하여 최적의 배합비를 설계하였다. 배합비 설계 후 한식된장 첨가여부가 저염된장 관능에 어떠한 영향을 미치는지 보기 위하여 한식된장 첨가구, 미첨가구로 나누어 일반성분 및 유리 아미노산 함량 분석을 실시하였다.

(1) 수분 조정 배합비 설계

- 수분함량별로 저염된장 배합비를 설계하여 혼합한 후 물성상태를 육안으로 확인한 결과 제품의 수분함량 50%일 때 물성이 질었으며 이는 일반적인 된장의 수분함량에 비해 낮은 수분임에도 불구하고 저염발효물의 물성으로 인해 육안으로 확인한 물성이 더 질어 보이는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 수분함량을 그 이상으로 배합하는 것은 의미가 없을 것으로 판단되어 저염된장 제품의 최종 수분함량을 48%, 46%로 조정하여 물성상태를 확인하였다. 수분함량 46%로 배합비를 설계한 저염된장이 48%로 설계한 된장에 비해 육안으로 보았을 때는 약간 되직한 상태를 보였으나 된장 물성으로써 크게 벗어나지 않았으며 수분함량에 따른 저염된장의 안정적인 pH 결과를 확인 분석한 결과 수분함량별 큰 유의적 차이를 보이지 않았다. 본 연구에서는 저염된장의 염 농도를 약 8.5~9.0%로 맞출 예정이므로 유통 중 품질이 안정적인 대수식염농도를 생각하였을 때 수분함량이 낮은 편이 유통 중에 안전할 것으로 판단되어 최종적으로 수분함량을 46%로 맞추어 배합비를 설계하였다.

Table 16. 수분함량에 따른 저염된장의 pH 분석 결과

수분함량	분석항목	pH
50%		5.18±0.01
48%		5.21±0.03
46%		5.20±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 13. 수분함량 조정에 따른 최종 저염된장 제품

(2) 한식된장 첨가 유무/ 균주별 비교실험

◦ 저염된장의 물성개선실험을 통해 수분함량을 46%로 조정한 후 한식된장의 첨가 유무와 종균 설발 및 적용에 따른 제조 저염된장의 일반성분 함량을 비교 분석하였다. 실험구간은 총 3 가지 구간으로 Control구간, 실험구, 변경구간이며 Control구간은 기존에 장류 발효에 가장 많이 사용되는 시판 충무발효(주) *Aspergillus oryzae*로 제조한 소맥koji와 당사에서 장류제조에 사용 중인 *Bacillus subtilis*를 사용하여 제조한 된장발효물을 동일한 조건으로 만든 저염된장을 대조구(이하, Control)로 하였다. 실험구는 최종 선발된 *Aspergillus oryzae*로 제조된 소맥koji와 *Bacillus amyloliquefaciens*로 제조된 된장발효물에 당사에서 12개월간 발효한 한식된장을 8% 첨가한 저염된장(이하, SD) 및 변경구로써 한식된장을 첨가하지 않은 저염된장(이하, NSD)으로 나누었으며 발효완료시점의 이화학적 품질 분석결과 수분함량은 46.01±0.07~46.27±0.03%, 염 8.8±0.01~8.9±0.01%, 그리고 pH의 경우 5.60±0.01~5.66±0.01으로 모든 실험구별 유의적 차이는 보이지 않았고 감칠맛의 지표가 되는 AN은 한식된장을 첨가한 SD구간이 513.25±0.70 mg%를 보여 가장 높은 결과를 보였다. 반대로 L값은 한식된장을 첨가한 SD구간이 40.68±0.01로 가장 낮았으며 이는 재래식 한식된장의 경우 장기숙성으로 어두운 색상을 띄므로 한식된장의 첨가에 따라 L값이 낮아진 것으로 판단된다.

Table 17. 한식된장 첨가 유무 저염된장/ 균주별 비교실험 구간

구분	배합물
Control	시판 균주로 제조한 저염발효물 및 된장발효물
NSD	최종 선발 균주로 제조한 저염발효물 및 된장발효물
SD	최종 선발 균주로 제조한 저염발효물 및 된장발효물 + <u>한식된장 8%</u>

Table 18. 한식된장 첨가여부에 따른 저염된장의 일반성분 분석결과

구분 \ 분석항목	수분(%)	염도(%)	pH	AN(mg%)	L-value
Control	46.27±0.03	8.9±0.01	5.60±0.01	429.71±0.63	42.53±0.01
**SD	46.09±0.02	8.8±0.01	5.66±0.01	513.25±0.70	40.68±0.01
***NSD	46.01±0.07	8.8±0.01	5.60±0.01	480.32±0.16	44.10±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)

**SD : Addition of soybean Doenjang

***NSD : Non-addition soybean Doenjang



Fig 14. 한식된장 첨가여부에 따른 저염된장의 사진

- 결과적으로 (재)발효미생물산업진흥원으로부터 선발된 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus amyloliquefaciens*로 제조된 저염된장이 유리아미노산 성분에 영향을 미치는 것으로 보이며 그 중에서도 한식된장을 첨가하였을 때 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 된장에 있어 아미노태질소 함량은 된장의 고유한 맛인 구수한 맛 성분과도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며 여러 장류 식품에 있어서 그 숙성도를 판단하는 지표로 사용되는데, 이렇게 된장 특유의 맛을 내는데 중요한 역할을 하는 아미노태 질소 함량이 가장 높고 긍정적인 맛을 주는 유리아미노산 함량이 높은 한식된장을 첨가한 저염된장을 최종 제품으로 선정하였다.

바) 저염된장 대량생산 공정 설계

(1) 저염된장 대량생산 체계 구축

본 연구는 최종적으로 대량 생산을 통한 출시 및 판매와 이를 통한 맞춤형혁신식품 및 천연 안심소재 산업화기술개발사업의 경쟁력 강화를 목적으로 하며 따라서 개발 제품의 대량 생산체계의 구축을 위한 실험생산을 실시하였다. 선정된 최적발효조건은 대량 생산공정에 적용하기 전에 1차 pilot scale을 통해 발효조건을 테스트 하였으며 발효제품의 특성상 대량 생산에 따른 품질편차가 큰 바 총 2차에 걸쳐 현장 실험생산을 통해 대량생산에 따른 품질에 대한 점검을 완료함으로써 제조프로세스를 확립하고 대량 생산체계를 갖추도록 하였다.

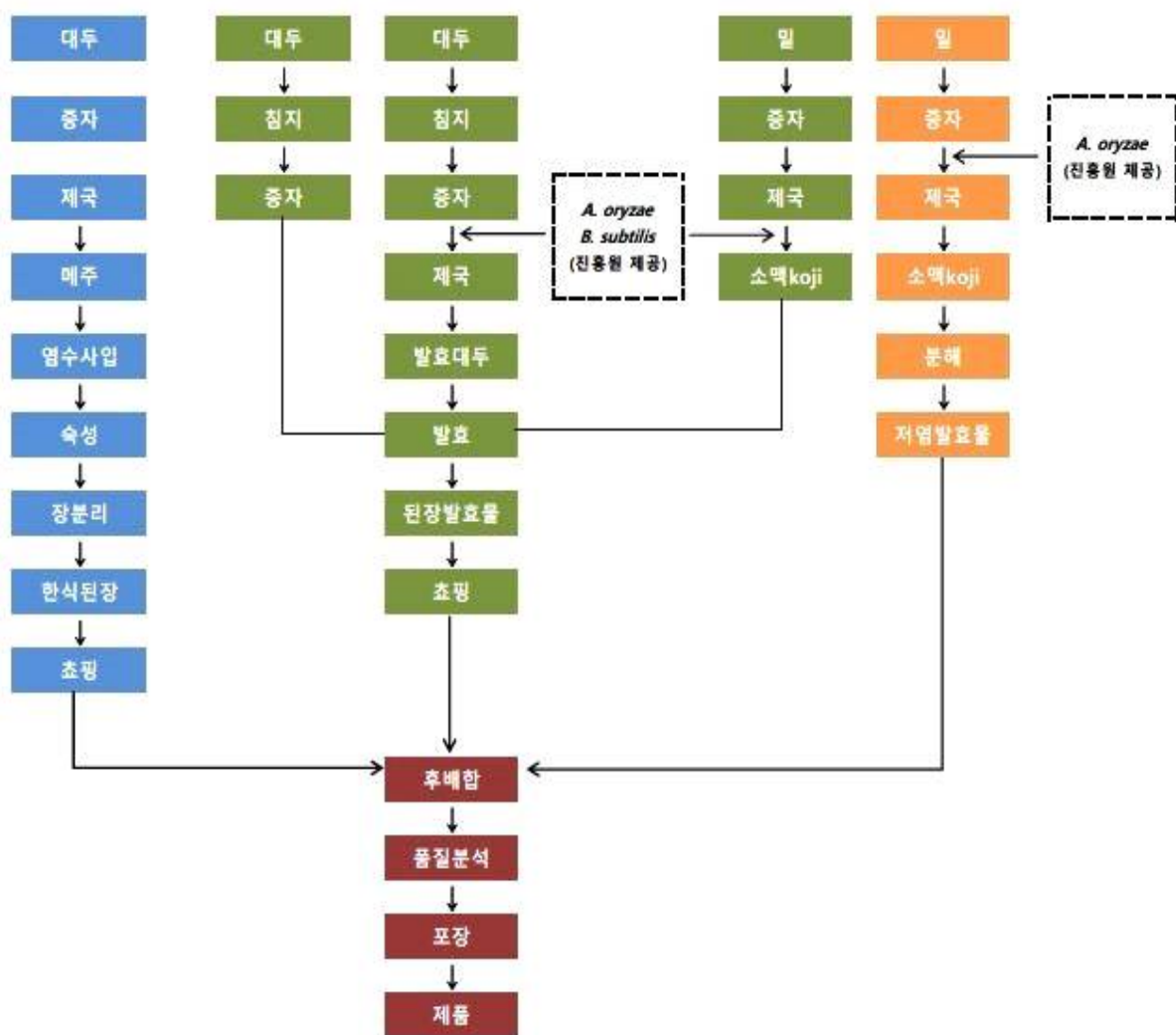


Fig 15. 저염된장 제조공정도



Fig 16. 저염된장 scale up 실험생산

(2) 저염된장 최적 작업표준서, QC공정도 설계

- 저염된장의 최적화된 조건을 확립하고 대량 생산 공정을 표준화하기 위한 작업표준안과 QC공정도를 아래와 같이 설계하여 대량 pilot scale을 통한 저염된장 시제품을 제작하였다.

순장장류 주식회사		작업표준안				문 제 표		QC-MS-2024		
		순매달 순장 된장				제 목 명		2020.10.20		
						제 목 목		1		
						제 목 목		1		
1. 목적 이 문서는 당사에서 제조하는 순매달 순장 된장에 적용한다.										
항목	순장	공정명	사용설비	공정 내용	관 리 명	단위	입력	출력	기준	담당
원재료	1	원료지정	원료지정	농장에서 수확한 콩 고고	관 리 명	가용량	수분 14% 이하	입고시	품질검사	입고담당자
	2	원료선정	원료선정	원료지정 품종에 따른 다른 선종 제거	관 리 명	가용량	이물	이물 제거	대부분 선종 작업일	작업자
	3	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	4	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	5	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	6	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	7	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	8	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	9	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	10	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	11	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	12	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	13	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	14	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자
	15	원료선정	원료선정	대부분 선종에 따른 이물 제거	관 리 명	가용량	세척	세척	세척, 찌기 작업일	작업자

Fig 17. 저염된장 작업표준안

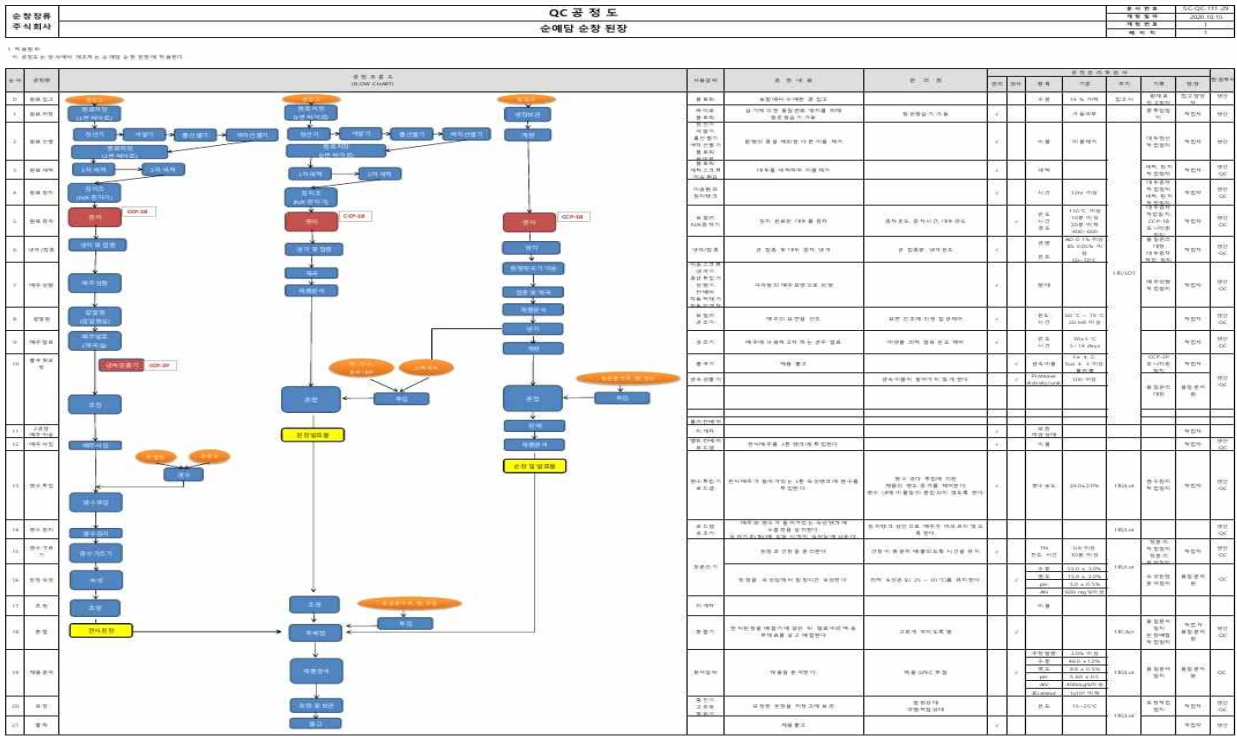


Fig 18. 저염된장 QC공정도

사) 시제품 개발 및 관능 특성 분석

◦ 대량 pilot scale로 시제품을 제작하여 풍미기호도분석 평정법에서 항목척도를 사용하여 9점 척도로 평가하도록 하였다. 우선 시제품에 대한 풍미기호도를 분석함으로써 안정적인 시장 장악을 위한 완제품 개발로 가기 위한 기초자료로써 활용한다. 관능을 비교할 대조구는 현재 시중에 판매되고 있는 개량식된장으로 선별하였으며 샘플 제시는 각 된장 50 g을 물에 풀어서 끓인 된장국을 시험체로 하였다. 의견을 종합해본 결과 전체적인 기호도에서 개발된 저염된장의 기호도가 시중개량된장보다 높았음을 알 수 있었다. 시중개량된장의 경우 된장 국의 색이 연하고 향이 약하다라는 의견이 가장 많았으며 저염된장은 짜지 않고 고소하며 향이 풍부하다라는 의견이 많았다. 전반적으로 점수를 살펴보았을 때 외관과 향에서 차이가 많이 났으며 이는 저염된장에서 한식된장의 첨가가 맛과 향에 큰 영향을 준 것으로 판단되어진다. 이를 토대로 본 실험을 통해 개발된 저염된장에 대한 품질 및 관능에 대한 점검을 완료함으로써 대량 프로세스를 적용하여 대량 생산 체계를 갖추었다.

Table 19. 시중개량된장과 개발저염된장의 관능비교 결과

종류	전체기호도	기호도*		
		외관	맛	향
시중개량된장(대조구)	4.0	3.8	5.2	4.0
저염된장	6.5	6.7	6.8	6.7

* 9: 매우좋음, 5: 보통, 1: 좋지않음

아) 시제품 품질안정성 테스트

(1) 저염된장제품 안정성 실험

- 본 과제를 통해 저염된장 제품 개발에 따른 유통 안정성 여부를 판단하기 위해 미생물 안정성 테스트를 아래와 같이 실시하였다. 실험샘플은 개발 저염된장 제품을 본 실험에 시료로 사용하였으며 효모를 접종하지 않은 대조구와 임의로 유통 중 오염에 의한 방부력을 측정하기 위해 효모(*Zygo. rouxii* : 가스발생균)를 최종 균수가 10^5 그리고 10^6 CFU/ml 수준이 되도록 접종한 저염된장을 각각 50 g씩 PE(Polyethylene) Film에 담아 밀봉 후 30°C에서 일정기간 동안 부피 팽창을 관찰하였다. 실험결과 개발된 저염된장 제품의 실험결과는 다음과 같이 주정함량 3%(v/w) 첨가 효모접종구 및 효모 비접종구 모두에서 가스발생에 의한 팽창은 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구에 의해 개발된 저염 된장 제품은 가스 발생이 관찰되지 않아 제품으로써 안전한 것으로 사료된다.

Table 20. 저염된장의 안정성 실험 결과

보존기간(일)	비접종	효모접종구	
		10^5	10^6
5	N.D	N.D	N.D
10	N.D	N.D	N.D
15	N.D	N.D	N.D
20	N.D	N.D	N.D
25	N.D	N.D	N.D
30	N.D	N.D	N.D

(+ : 가스발생(소), ++ : 가스발생(중), +++ : 가스발생(대), N.D : Not Detect)

(2) 저염된장제품 유통기한 예측 실험

- 개발된 저염 된장의 품질안정성을 측정함으로써 유통과정 중 품질변화를 추측함과 동시에 실험을 통해 분석하고 이를 통해 Q10 value를 도출함으로써 실제 유통기한을 산정하는 데 기초자료로써 활용하고자 하였다. 사용된 샘플은 개발된 저염 된장에 유통안정성을 위하여 주정함량을 3%(v/w) 첨가한 저염 된장을 본 실험에 시료로 사용하였으며 제품을 50 g씩 PE(Polyethylene) Film에 담아 40°C, 30°C 인큐베이터 내에서 일정기간 저장 후 색도변화를 측정하였다. 색도측정은 밝기색도인 L-Value를 기준으로 값이 낮을수록 색상이 어두어지며 색차계(Chromameter, CR-410, KONICA MINOLTA, JAPAN)를 이용하여 측정하였다. 실험결과 40°C에서 56일, 30°C에서 148일간 품질이 유지되었으며 이를 토대로 Q10값 0.379를 적용 시 실온인 15°C에서 개봉하지 않을 경우 약 23개월의 장기간 품질 유지가 가능할 것으로 추정되며 이 기간에는 제품의 식이가 가능하다고 판단하였다. 다만 염이 낮은 것과 별개로 소포장 된장 제품의 경우 기간이 길수록 색상 등이 갈색화될 수 있으므로 최적화 제품의 유통을

위하여 본 제품의 유통기한은 12개월로 설정하였다.

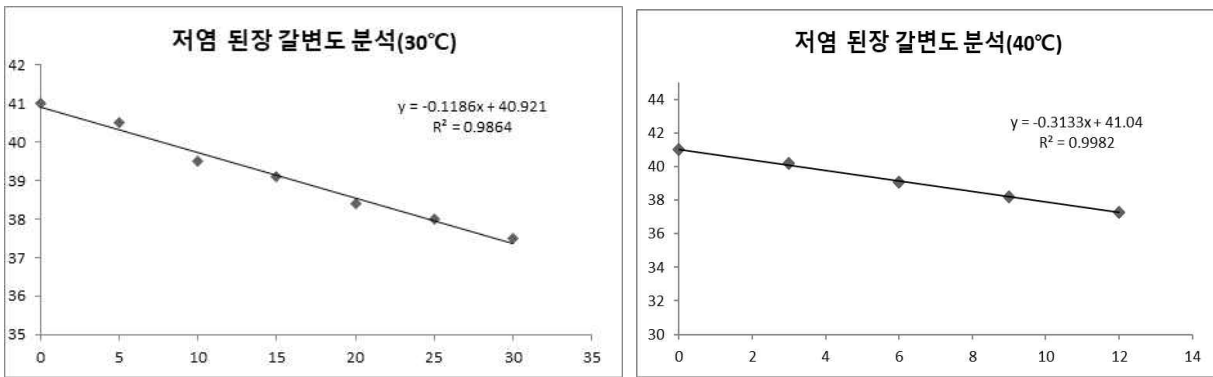


Fig 19. 40°C/30°C에서의 저염 된장 L-Value 변화

Table 21. 저염된장의 품질유지기한 예측 실험 결과

온도	R constant	L-value 23.5 도달시점
40°C	-0.313	약 56일
30°C	-0.119	약 148일
15°C (실온)	-0.031	약 710일

- 저염 된장 초기 L값은 41을 기준으로 함
- Q10값 = 30°C에서의 R constant/40°C에서의 R constant=0.379

자) 개발 제품 공인기관검사의뢰

- 본 실험에 의해 최종개발된 저염된장제품은 최종적으로 공인분석기관에 염도, 아미노태질소 (amino-type nitrogen)함량, 안정성(*Bacillus cereus* 및 대장균군)을 의뢰·분석하여 개발제품으로써의 최종개발목표 성능지표를 확보하였고, 목표달성을 객관화하기 위해 시중에서 판매 중인 개량식된장과의 성분을 비교하였다. 그 결과 저염된장의 염도는 8.7%로 시중개량된장염 10.9%에 비해 20%이하 낮은 것으로 확인되었으며, 아미노태질소함량의 경우 저염된장은 464.8 mg%로 시중개량된장 358.0 mg%보다 높은 것으로 나타났다. 또한 된장의 안정성 품질 지표인 *Bacillus cereus* 및 대장균군을 검사한 결과 저염된장은 60 CFU/g 및 0 CFU/g으로 측정되어 본 연구의 목표를 달성하였다.

검사 성적서		주무관	주무관	장학사/검사원
		신대권	김현영	김재권
우) 56048 전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 61 / 전화 063-650-5426 / 전송 063-650-5426				
문서번호	장류시험소-5591	시험일자:	(2020. 11. 12.)	
수신:	농업회사법인 순창농류(주)	수신:	농업회사법인 순창농류(주)	
제 목:	품질검사신청서(서-299)	제 목:	품질검사신청서(서-299)	
검체번호:	서-299	유통기한 또는 제조일자:		
제조회사:	농업회사법인 순창농류(주)	식품유형:	음료	
검 체 명:	저염 된장	검사항목:	염도, 방실리스 세균수, 대장균, 이리노테질소함량	
의뢰일자:	2020. 10. 30.	의뢰목적:	품질검사	
■ 검사결과				
검사항목	결과	검사항목	결과	
염도	8.7 %	이리노테질소	464.8 mg/kg	
방실리스 세균수	60 CFU/g	대장균	0 CFU/g	
- 이	하	에	백 -	
■ 판 권 (결과): - (자기품질검사용으로 사용할 수 있음)				
위와 같이 검사결과를 통보합니다. 2020년 11월 12일				
순창군장류사업소장				

검사 성적서		주무관	주무관	장학사/검사원
		신대권	김현영	김재권
우) 56048 전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 61 / 전화 063-650-5426 / 전송 063-650-5426				
문서번호	장류시험소-5590	시험일자:	(2020. 11. 12.)	
수신:	농업회사법인 순창농류(주)	수신:	농업회사법인 순창농류(주)	
제 목:	품질검사신청서(서-290)	제 목:	품질검사신청서(서-290)	
검체번호:	서-290	유통기한 또는 제조일자:		
제조회사:	농업회사법인 순창농류(주)	식품유형:	음료	
검 체 명:	시중개량된장	검사항목:	염도, 방실리스 세균수, 대장균, 이리노테질소	
의뢰일자:	2020. 10. 30.	의뢰목적:	품질검사	
■ 검사결과				
검사항목	결과	검사항목	결과	
염도	10.9 %	이리노테질소	358.0 mg/kg	
방실리스 세균수	4,200 CFU/g	대장균	0 CFU/g	
- 이	하	에	백 -	
■ 판 권 (결과): - (자기품질검사용으로 사용할 수 없음)				
위와 같이 검사결과를 통보합니다. 2020년 11월 12일				
순창군장류사업소장				

Fig 20. 개발저염된장제품 및 시중개량된장 공인기관성적서

차) 상품화를 위한 품목제조보고신고

- 개발된 저염된장의 상품화를 위해 순예담 순창 된장의 제품명으로 품목제조보고를 완료하였다. 또한 저염된장(제품명: 순예담 순창 된장)의 후배합물 중 하나인 전분질원료를 분해하는 저염발효물의 경우 장류의 맛을 좌우하는 아미노테질소함량과 유리아미노산 성분에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보여 된장 뿐만 아니라 여러 장류에 후배합물로 사용할 가치가 있다고 판단되므로 순창 밀 발효물의 제품명으로 품목제조보고를 완료하였다.

식품(식품첨가물) 품목제조보고서	
신고인	순창군장류사업소
영양소	순창군장류사업소
식품의 유형	저염된장
제조명	순예담 순창 된장
유통기한	제조일로부터 24개월
품질유지기반	제조일로부터 24개월
부패 또는 변질된 경우	변질에 기인
제조방법	제조일로부터 24개월
포장방법	제조일로부터 24개월
포장량	제조일로부터 24개월
포장단위	제조일로부터 24개월
비고	제조일로부터 24개월
기타	제조일로부터 24개월

식품(식품첨가물) 품목제조보고서	
신고인	순창군장류사업소
영양소	순창군장류사업소
식품의 유형	저염된장
제조명	순예담 순창 된장
유통기한	제조일로부터 24개월
품질유지기반	제조일로부터 24개월
부패 또는 변질된 경우	변질에 기인
제조방법	제조일로부터 24개월
포장방법	제조일로부터 24개월
포장량	제조일로부터 24개월
포장단위	제조일로부터 24개월
비고	제조일로부터 24개월
기타	제조일로부터 24개월

Fig 21. 저염된장(제품명: 순예담 순창 된장) 및 저염발효물(순창 밀발효물) 품목제조보고서

- 제품 디자인 확정 및 출시
 - 저염된장 시제품 출시를 위해 순예담 순창 된장의 제품명으로 디자인을 확정하고 출시하였다. 또한 홍보브로셔 제작을 통해 순예담 순창 된장의 소비자 접근성을 향상시키고자 하였다

으며 정보를 보다 쉽게 제공함으로써 효과적으로 제품 홍보가 가능할 것으로 예상되어진다.



Fig 22. 저염된장 개발 제품 라벨 디자인 및 홍보브로서

타) 개발제품의 홍보

- 본 과제를 통해 개발된 저염된장(제품명 : 순예담 순창 된장)제품에 대한 홍보브로셔를 제작 하였으나 COVID-19로 인해 축제 및 박람회에 참석이 어려운 바, 현재 당사 홈페이지에 게시하여 홍보를 진행 중에 있으며, 12월 초 열리는 수원메가쇼에 참석하여 개발제품을 홍보 할 예정이다.
- 본 과제를 통해 개발된 저염된장은 기존의 저염된장이 단순히 염도만을 낮춘 것에 비해 관능풍미가 높은 선별균주를 사용함으로써 염도가 낮으며 감칠맛은 높혀 적은 양으로도 된장의 맛과 풍미를 낼 수 있는 바 선별균주를 사용한 제품 강점을 중심으로 인터넷 홈페이지 및 팸플릿 제작 배포 등을 통하여 개발 제품을 홍보하고 판매에 적극 활용하도록 하였다.

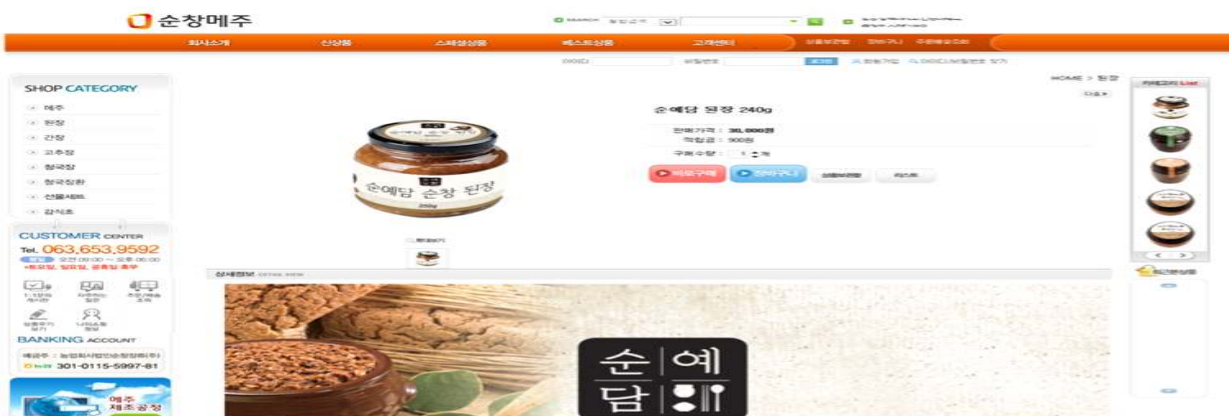


Fig 23. 당사 홈페이지를 통한 저염된장 개발 제품 홍보

파) 지적재산권 확보

- 본 과제와 관련 기술에 대한 특허출원신청을 통해 지적재산권을 확보하였다. (특허출원번호: 10-2020-0162948)

협동연구기관1 [(재)발효미생물산업진흥원] : 발효식품 유래 미생물 발굴 확보

1) 연구재료 및 방법

가) 연구 재료

(1) 사용 미생물

- 발효미생물산업진흥원에서 전통발효식품으로부터 분리하여 보관중인 황국균, 고초균, 효모를 이용하였다. 각 균주별 100종에서 황국균과 고초균은 효소활성 및 안전성 특성에 준하여 각 10종, 효모는 알콜 생성능 및 유해 억제 특성에 준하여 6종을 선별하여 대두발효용 균주로 이용하였다.

(2) 사용 원료

- 실험에 사용하는 대두와 쌀은 국산으로 순창에서 구입하여 사용하였고, 소금은 정제염을 이용하였다.

나) 발효물 및 된장 제조

(1) 쌀 발효 적용/황국균

- 10종 선별된 황국균을 쌀 발효에 적용하기 위해 상기 조건으로 배양하고 쌀을 수세하여 동량의 물로 2시간 침지한 후 물을 거르고, 121°C에서 증자하여 방냉한 후 상기 방법의 곰팡이 배양방법과 동일하게 배양하여 균주를 쌀 무게의 0.1%의 비율로 접종하여 30°C, 80% 습도에서 1-3일간 발효하였다.

(2) 대두발효 적용

- 고초균과 황국균은 각 10종 선별된 균주를 각 고체배지(고초균 : TSA(Tryptic Soy Agar, Oxoid, 황국균 : YM(Yeast Mold) agar, Oxoid)에 접종하여 준비하였다. 배양된 각 균주를 액체배지에 접종하여 대두 발효 적용 균주로 이용하였다. 대두 발효 조건은 기존 순창장류의 방법에 준하여 발효하였다. 각 균주의 농도는 고초균은 O.D_{600nm} 값 0.6으로 하여 접종하였으며, 곰팡이는 O.D_{600nm} 값 0.4로 하여 접종하였다. 대두는 동량의 증류수(v/w)에 12시간 침지하여 물을 뺀 후 121°C에서 30분간 증자한 후 50°C까지 식힌 후 사용하였다. 콩 무게의 0.05~0.1%의 비율로 균주를 접종하고 고초균은 40°C, 80%습도에서 1-5일간 발효하고 황국균은 30°C, 80% 습도에서 1-3일간 발효하였다. 각 대두 발효 중 효소활성, 감칠맛 등을 평가하여 균주 3종을 선별하였다.

(3) 선별 효모 내염성 평가

- YM 기본 액체 배지에 5, 10, 15%(w/v)의 비율로 정제염을 첨가하여 확인하였다. 즉, 균주는 5-15%(w/v)의 소금이 함유된 YM 액체배지에 2%(v/v) 비율로 접종하여 30°C, 180 rpm에서 2일 동안 발효하여 탁도를 측정하여 O.D₆₀₀ 값으로 나타내었다,

(4) 발효물 제조

- 선별된 균주를 이용하여 쌀 발효물 및 대두 발효물을 제조하여 된장제조에 이용하고자 하였다. 황국균은 쌀에 적용하고, 고초균은 대두에 적용하여 평가하였다. 각 발효물 제조방법은 순창장류 기존의 일반적인 방법에 준하여 제조하였다. 쌀 발효물은 쌀을 동량의 증류수에 2시간 침지한 후 물을 거르고 121°C에 15min 증자하여 방냉한 후 상기 방법의 곰팡이 배양방법과 동일하게 배양하여 균주를 접종하고 발효한 후 최종 염농도를 5%로 하여 소금과 물을 배합하고 마쇄하여 1-6일간 숙성한 후 특성을 평가하였다. 대두 발효물은 상기 방법과 동일하게 대두 및 균주를 처리하여 발효한 후 최종 염농도가 11%가 되게 염을 첨가하고 배합한 후 21일간 40°C에서 숙성한 후 특성을 평가하였다. 이 중 최종 균주를 선발하였다.

(5) 효모첨가에 따른 평가

- 각 발효물을 배합하여 된장으로 제조하기 전에 선발된 효모 배양액을 첨가하여 관능특성을 확인하였다. 관능평가는 된장에 선발된 효모배양액을 첨가하여 30°C에서 7일간 숙성하고 관능평가를 실시하였다. 관능평가는 발효미생물산업진흥원 및 장류사업소 직원 20명을 대상으로 실시하였으며, 된장의 단맛, 짠맛, 구수한맛, 전체적인 기호도 항목을 5점 채점법으로 평가하였다. 기호도는 아주 좋다가 5점, 보통 이다가 3점, 아주 나쁘다가 1점으로 평가하였고 특성은 강도에 따라 강하면 5점, 중간이면 3점, 약하면 1점으로 평가하였다.

다) 실험방법

(1) 미생물학적 특성 분석

(가) 분리균주 보관 및 활성화

- 고초균은 TSB를 곰팡이 및 효모는 YM배지에 접종하여 glycerol에 stock하여 제조하였으며, -70°C 냉동고에서 보관하였다. 사용전 각 균주는 최적 배지에서 2차 이상 계대배양하여 충분히 활성화하여 사용하였다.

(나) 미생물 특성 분석

- 선별된 미생물의 특성의 발효미생물산업진흥원의 각 균주별 특성분석방법에 준하여 분석하였다.

(다) 미생물 동정

- 선발된 균주 3종을 Macrogen (Seoul, Korea)에 16S rRNA sequence, 18S rRNA sequence 분석을 의뢰하였다. 염기서열의 chromatogram을 이용하여 gap을 최소화한 후 NCBI에서 서열 일치도가 높은 표준 균주들의 16S rRNA, 18S rRNA 유전자 염기서열을 확보하여 계통도를 작성하였다. 계통도 분석은 Tamura-Nei 모델에 기초한 Maximum Likelihood 방법을 사용하여 분석하였고(1) 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 산출하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며, 분석은 MEGA 7.0.26 program을 사용하였다.

(2) 이화학적 특성 분석

(가) 수분

- 수분함량은 적외선수분기(Kett)를 이용하여 3회 측정 후 평균값으로 나타내었다.

(나) 염도

- 염도는 시료 10 g을 취해 증류수 90 mL을 가하여 충분히 혼합한 후 디지털 염도계 (TM-30D, Takemura Electric works Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정된 값에 희석배수를 곱하여 나타내었다.

(다) pH 및 산도

- 시료 1~5 g을 적정기(Mettler Toledo CH/MPC227, Switzerland)를 사용하여 증류수로 시료를 최대 10배 희석하여 3회 반복측정 한 후 평균값을 구한다.

(라) 아미노산성 질소 함량

- 아미노산성 질소 함량은 (Mettler Toledo CH/MPC227, Switzerland)으로 측정하였다. 시료 1 g을 비커에 취하고 증류수 50 mL를 가하고 240초 동안 진탕 혼합하여 충분히 용해한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4로 한다. 여기에 중성 formalin 20 mL를 가하고 20초 동안 진탕 혼합한 뒤 다시 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화·적정하였다.

$$\text{아미노산성 질소(mg\%)} = 0.1\text{N NaOH적정량} \times 1.401 \times F \times \text{희석배수} \times 100 / \text{시료량(g)}$$

(마) 유리당, 유기산

- 유리당과 유기산의 분석은 시료 5 g을 증류수 45 mL를 가하여 1시간 동안 균질화시킨 후 0.45 μm membrane filter에 통과시킨 후 table 1의 분석조건으로 HPLC로 분석하였다.

Table 1. HPLC condition for analysis organic acid, free sugar

Conditions	
Instrument	Agilent
Detector	RID, DAD 210 nm
Column	Aminex column HPX-87P(300×7.8mm)
Temperature	50°C
Injection volume	20 μL
Flow rate	0.6 mL/min
Mobile phase	0.005 N H ₂ SO ₄

(바) 유리아미노산

- 유리아미노산 분석을 위하여 시료 2 g을 취하여 3차 증류수 30 mL넣고 교반한 후 50 mL로 정용하였다. 이후 초음파를 이용하여 20분간 추출한 후 원심분리(3000rpm, 10분)한 다음 상등액 2 mL에 5% TCA 2 mL를 넣은 후 원심분리(10,000 rpm, 10분)한 후 상등액을 취하여 0.02

N-HCl로 희석한 후 0.2 μm syringe filter에 통과시킨 후 표 11의 분석조건으로 아미노산 분석기로 분석하였다.

Table 2. Amino acid analyzer condition for analysis free amino acid

Conditions	
Instrument	Amino acid analysis (Hitachi L-8900)
Detector	UV/Vis (440nm-570nm)
Column	Hitachi 4.6 \times 60mm (separation) Hitachi 4.6 \times 40mm (Ammonia filtering)
Buffer flow rate	0.40 mL/min
Ninhydrin flow rate	0.35 mL/min
Temperature	50 $^{\circ}$ C
Injection volume	20 μL
Mobile phase	Buffer set (PH-SET KANTO)

(사) 핵산관련물질

- 핵산관련물질은 시료 5 g에 20 mL의 0.6M perchloric acid를 첨가하여 균질한 후 원심분리 (3,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 여과지(Whatman No. 1)를 이용하여 여과하였다. 여과액에 1M KOH를 첨가하여 pH 5.5로 적정한 다음 0.6 M perchloric acid를 이용하여 50 mL로 정량하였다. 그 다음 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 0.2 μm syringe filter에 통과시킨 후 표 3의 분석조건으로 HPLC로 분석하였다.

Table 3. HPLC condition for analysis nucleotide.

Conditions	
Instrument	Agilent
Detector	DAD 254 nm
Column	CAPCELL PAK C18 (250 \times 4.6 mm, 5 μm)
Temperature	30 $^{\circ}$ C
Injection volume	10 μL
Flow rate	1 mL/min
Mobile phase	20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5)

(3) 생리활성 측정

- 시료 전처리 방법으로는 시료 1 g에 10 mL 증류수를 첨가하여 30분 동안 초음파 추출을 한 후 원심 분리 (10,000 rpm, 10 min) 하여 얻은 상등액을 0.20 μ m syringe filter에 여과 한 후 사용하였다

(가) ACE 억제 활성

- ACE 억제 활성은 50 mM Tris-Cl buffer (pH 8.3, containing 300 mM NaCl) 125 μ L에 시료와 ACE enzyme (0.1U/mL)를 각각 10 μ L 첨가한 다음 37°C 에서 10분 동안 prewarm 시킨 후 6 mM hippuryl-histidyl-leucine(HHL) 50 μ L을 첨가하여 37°C 에서 30분 동안 반응시켰다. 그 다음 1M HCl 75 μ L 첨가하여 반응을 정지시킨 후 Pyridine 150 μ L와 Benzenesulfonyl chloride 75 μ L를 첨가하여 1분 동안 혼합한 후 냉각하여 410 nm에서 흡광도 측정하였고, 아래 식에 따라 활성도를 나타내었다.

$$\text{ACE inhibition (\%)} = [(B-A)/(B-C)] \times 100$$

A : 시료 첨가 시 흡광도

B : 시료 대신 증류수 첨가 시 흡광도

C : 반응정지 후 시료 첨가 시 흡광도

(나) DPPH 라디칼 소거능

- DPPH 라디칼 소거능은 시료 50 μ L에 100 μ M DPPH 용액 150 μ L를 첨가하여 암소에서 20분간 반응 시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며 양성대조구로는 ascorbic acid를 사용하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식으로 산출하여 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity (%) =

$$[(\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}})/\text{Absorbance}_{\text{control}}] \times 100$$

(다) ABTS 라디칼 소거능

- DPPH 라디칼 소거능은 시료 20 μ L에 ABTS 용액 180 μ L를 첨가하여 암소에서 2분간 반응 시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성대조구로는 ascorbic acid를 사용하였다. ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식으로 산출하여 나타내었다.

ABTS radical scavenging activity (%) =

$$[(\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}})/\text{Absorbance}_{\text{control}}] \times 100$$

(라) 항당뇨 활성 측정

- α -glucosidase 저해활성을 측정하기 위해 α -glucosidase (sigma, G3651-50UN)을 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 용액에 녹여 효소액(0.5 unit/mL)로 조제하였고, 5 mM *p*-nitro-phenyl- α -glucopyranoside (*p*-NPG, sigma, N1377-5G)도 동일한 buffer에 용해하여 기질용액으로 하였다. 기질용액 40 μ L를 96 well plate 에 분주하고 시료액 20 μ L를 첨가하여 혼합하였고, 대조구로 buffer, 양성대조구로 acarbose (6 mg/mL)용액도 각각 같은 방법으로 첨가

한 후 효소액 40 μ L를 첨가하여 혼합한 후 30분 동안 37°C incubator에서 반응시켰다. 반응을 정지하기 위해 0.25 M sodium carbonate 0.1 mL을 첨가하여 혼합한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 계산식으로 저해활성을 평가하였다.

[AGI 활성평가를 위한 계산식]

$$AGI \text{ activity } (\%) = \left(1 - \frac{Abs_{\cdot sample} - Abs_{\cdot blank}}{Abs_{\cdot NC} - Abs_{\cdot blank}}\right) \times 100$$

Abs.NC; 시료 대신 buffer를 첨가하여 반응한 경우의 흡광도

Abs.blank ; 시료와 효소 대신 buffer를 첨가해 반응한 한 경우의 흡광도

Abs.Sample ; 시료 또는 acarbose를 buffer로 일정농도 희석한 후 반응한 경우의 흡광도

(4) 관능적 특성 분석

(가) 향기성분 분석

- 향기성분 분석을 위하여 시료 2 g을 취하여 3차 증류수 10 mL로 희석하여 준비한 후 stir bar (PDMS, 0.5 mm film thickness, 10 mm length, 24 μ L, Gerstel)와 함께 vial에 담아 50°C 에서 450 rpm으로 2.5시간동안 교반하여 향기성분을 흡착한 다음 stir bar를 향기성분용 튜브에 넣어 포 12의 분석조건 GC-MS를 이용하여 향기성분을 분석하였다. 휘발성 화합물 동정은 mass spectrum library(NIST05A)을 이용하였고, 동정된 휘발성 화합물의 정량적 분석은 내부표준물질은 Methyl cinnamate (200 ppm (w/v) in ethanol)을 이용하여 area %로 계산하였다.

Table 4. GC-MS condition for analysis volatile flavor compound




		Conditions
Analytical conditions	GC	Agilent HP 6980
	Detector	Agilent HP 5973
	Column	60-m DB WAX
	Carrier gas	He, 1.4 mL/min
	Transfer line	250°C
	Ion source	230°C
	Quadrupole	150°C
	Mass spectra range	35-400 m/z
	EM voltage	70eV
	Initial temperature	50°C (1 min)
Oven conditions	Rate	3 mL/min
	Final temperature	210°C
	Final time	15 min
TDU conditions	Initial temperature	50°C
	Rate	60°C/min
	Final temperature	220°C
CIS conditions	Final time	5 min
	Initial temperature	-20°C
	Rate	12°C/s
	Final temperature	220°C
	Final time	2 min

(나) 묘사분석

- 묘사분석은 된장 3종에 대한 감각과학적 향미 평가를 통해 된장의 향미를 프로파일링을 목적으로 전북대 식품영양학과 김미나교수팀과 공동으로 진행하였다.

① 시료

- 시료는 된장3종을 밀봉하여 전북대학교로 송부하였으며, 시료 수령 후 공기와의 접촉을 차단한 상태로 밀봉하여 냉장 온도(4±1℃)에 보관하였다.

No	제품정보	사진	비고
1	대조구		주관기관 군주를 이용한 저염된장 (저염쌀발효물+대두발효물)
2	혼합된장		선발된 군주를 이용한 저염된장 (저염쌀발효물+대두발효물)
3	시판된장		아이베넷(주) 저염된장

② 조사에 참여한 묘사분석 전문패널 요원의 구성

- 된장 3종의 향미평가를 위하여 전문적으로 훈련받은 향미평가 전문패널을 사용하였다. 전문가 패널의 구성은 전북대학교 감각과학연구실 소속 연구원(N=7)으로 구성되었으며, 이 연구원들은 2018년 전북대학교 링크사업단과 연계한 맛평가 전문가 양성과정에 참석하여 80시간 이상의 집중 훈련을 통하여 양성된 맛평가 전문가 패널이다. 기 진행된 전문패널 훈련에서는 향 구별능력, 기본맛(단맛, 신맛, 짠맛, 쓴맛, 감칠맛)의 구별능력에 대한 테스트, 그리고 미맹평가를 통과한 인원내 대하여 훈련을 진행하여 향미평가의 전문성을 확보하였다. 본 연구에 참석한 맛평가 전문패널 요원들은 기본맛 인지력, 향미 평가 시 유의사항 및 향미 인지, 및 강도의 평가 기법에 대하여 훈련이 완료되어 전문 패널로서의 전문성을 확보하고 있다. 2018년 집중훈련 이후 다양한 식품군(예로서, 된장, 간장, 김치 등의 전통발효식품, 요거트, 오디, 오미자 등의 과일류, 루이보스티를 포함한 다류 등)에 대한 맛평가에 참석, 평가하여 SpectrumTM묘사분석의 방법으로 식품평가관련 200시간 이상의 경험을 보유하고 있어 동 분야의 전문성을 확보 및 유지하고 있으며, 특히 된장에 대한 묘사분석은 정기적으로 수행하여 된장의 향미평가 관련 전문성을 유지하고 있어 해당제품의 평가에 최적화된 전문 패널이라 볼 수 있다.

③ 된장에 대한 평가를 위한 훈련(Calibration)

- 된장의 평가를 위하여 총 4주에 걸쳐 20시간의 훈련을 진행하였으며, 평가 전 전문패널 훈련은 다음과 같이 3단계로 나누어 진행되었다.

- 1단계의 5시간은 Calibration session으로, 패널요원들의 기본맛 인지 및 강도평가, 향미 인지 및 평가를 위한 척도사용에 집중하여 강도평가 척도사용에 대한 재훈련을 진행하였다.
 - 2단계 5시간은 된장의 평가 방법 세팅 및 각 속성의 강도 평가에 대한 훈련을 진행하였다.
 - 3단계 10시간은 된장 내에 존재하는 다양한 향미에 대한 인지, 용어 도출 등을 위주로 진행하였다.
- 된장에 대한 평가는 위의 20시간의 훈련이 진행된 후 평가를 진행하였다.

④ 된장 평가를 위한 용어 도출(Sensory Lexicon Development)

- 패널의 훈련이 완료된 후, 본 연구에서 평가할 된장의 향미특성을 묘사하기 위한 용어를 도출 및 확정하였다. 용어의 도출은 묘사분석의 용어 도출 및 취합 - 논의 - 용어 확정의 3단계를 거쳐 묘사분석용 용어를 확정하였다. 묘사분석의 용어는 패널 요원 간 동일한 언어를 사용하여 특정 향을 평가할 수 있도록 하는 객관적인 지표이기 때문에 각 용어별로 향미 Reference를 함께 제시하며, 패널 요원 간 용어 사용을 통제 및 통일하였다(3). 된장의 평가를 위하여 총 14개의 대표성을 지닌 용어를 도출하였다(Table 5).

Table 5. List of lexicon for evaluating soybean paste

No	용어 (Lexicon)	용어의 정의(Definition)	참고대상(Reference)
1	청국장	청국장에서 나는 특유의 향미	(주)고려전통식품 기준도 청국장
2	메주	메주에서 나는 특유의 향미	오곡식품 메주가루
3	액젓	건어물 창고에서 나는 특유의 비린 향미	기장물산(주) 우림 다시팩(해물맛)
4	간장 짠내	간장에서 나는 특유의 짠 향미	샘표 양조간장 701
5	콩가루	쌀가루에서 나는 특유의 고수한 향미	(주)대두식품 콩가루
6	쌀가루	쌀가루에서 나는 특유의 텁텁한 향미	(주)대두식품 쌀가루
7	초콜릿	초콜릿에서 나는 특유의 씹쓸한 향미	(주)이마트 노브랜드 다크초콜릿
8	삶은 콩	콩을 삶았을 때 나는 특유의 향미	대두 100 g을 1 L의 물에 넣고 20분간 삶은 콩
9	버터크래커	버터크래커에서 느껴지는 특유의 고소한 향미	(주)해태 버터링 소프트
10	치즈	치즈에서 나는 특유의 고소한 향미	(주)브래드가든 황치즈가루
11	알코올	알코올에서 느껴지는 특유의 향미	10% Ethyl alcohol (v/v)
12	과숙 포도	포도가 상했을 때 느껴지는 특유의 향미	상온, 햇빛에 48시간 이상 방치된 포도
13	탄내	탄 나무에서 나는 특유의 향미	탄 나무
14	쇠 향	쇠에서 느껴지는 특유의 향	10원짜리 동전
15	단맛	설탕을 물에 일정 농도로 희석한 용액 특유의 맛	단맛 2: 2% 설탕수용액 단맛 5: 5% 설탕수용액 단맛 8: 8% 설탕수용액
16	짠맛	소금을 물에 일정 농도로 희석한 용액 특유의 맛	짠맛 2: 0.35% 소금수용액 짠맛 3: 0.52% 소금수용액 짠맛 4: 0.7% 소금수용액
17	쓴맛	카페인(cafein)을 물에 일정 농도로 희석한 용액 특유의 맛	쓴맛 2: 0.05% 카페인수용액 쓴맛 3.5: 0.065% 카페인수용액 쓴맛 5: 0.08% 카페인수용액
18	신맛	구연산(citric acid)을 물에 일정 농도로 희석한 용액 특유의 맛	신맛 2: 0.05% 구연산수용액 신맛 3.5: 0.065% 구연산수용액 신맛 5: 0.08% 구연산수용액
19	감칠맛	MSG를 물에 일정 농도로 희석한 용액 특유의 맛	감칠맛 3: 0.5% MSG수용액 감칠맛 6: 1% MSG수용액

⑤ 시료의 제시

- 된장 시료의 제시는 원물 그대로 패널들에게 제공되었으며, 이는 이전 연구논문의 자료를 참고하였다(4). 패널 요원에게 된장 시료를 제시할 때에는 된장 약 5 g을 30 mL 플라스틱 컵에 담은 후, 뚜껑을 닫은 채로 제시하였고, 각각의 플라스틱 컵은 3자리수의 난수로 표시하여 패널들이 시료에 대한 정보를 알지 못한 채로 시료의 특성을 평가하였다. 된장 시료는 평가 전 날 준비되었으며 냉장온도인 $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한 뒤, 평가 2시간 전 냉장고에서 꺼내서 상온에 보관하였으며 실제로 패널에게 제공할 때에는 된장 시료의 온도는 상온($20\pm 1^{\circ}\text{C}$)에 제공하였다. 시료의 제시순서는 각 패널마다 다르게 무작위로 제시하되, Latin square design의 무작위랜덤설계법을 따라 설계하여 제시하였다.



⑥ 시료의 평가

- 묘사분석에서 사용한 강도의 평가는 Spectrum™묘사분석기법을 활용하였고, 이는 모든 제품군에서 범용적으로 사용가능한 15점 척도의 Universal scale(0=전혀 느껴지지 않음, 15=아주 강함)을 사용하여 강도를 평가하였다. 평가 당일, 패널 요원들은 평가 전 2시간 전부터 물 이외의 다른 음식(껌, 커피, 자극성 있는 음식, 및 담배를 포함한 기호식품)의 섭취를 제한하여, 미각의 민감도를 최상의 상태로 유지하였다.
- 된장의 평가는 각 회 차마다 3개의 시료를 평가하되 시료와 시료 사이에는 5분간의 휴식시간(resting period)을 가지도록 하여 패널들의 미각 및 후각 피로도를 최소화할 수 있도록 하였다. 휴식시간에는 크래커(참크래커, 해태제과)를 이용해 입 안의 잔여 향미 및 맛을 제거하여 앞 시료의 잔여물이 다음 시료의 평가에 영향을 주지 않도록 하였다. 15분의 휴식시간동안 패널 요원들은 크래커와 물을 활용하여 자유롭게 입을 씻을 수 있도록 하였다.
- 시료의 평가 중 향미특성평가는 된장의 뚜껑을 살짝 열고 냄새를 강하게 3회 들이마시면서(Bunny Sniff) 느껴지는 향(Aroma)을 평가하고, 이후 된장을 입에 머금고 입안에서 느껴지는 총체적인 향(Flavor)를 평가하였으며, 후각(Aroma)과 미각+후각(Flavor)에서 느껴지는 향의 강도 중 가장 강할 때의 강도를 기준으로 강도를 기록하도록 하였다.

<p>원장의 향미 평가용 척도 (15점 척도 사용) 이름: _____</p> <p>h1</p> <p>(청국장)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(매주)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(비타민(영양))</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(건강 관념)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(콩가루)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(쌀가루)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(조물료)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(삶은 콩)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(베타크레틴)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(치즈)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p>	<p>원장의 향미 평가용 척도 (15점 척도 사용) 이름: _____</p> <p>(말로올)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(상한 포도)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(만나)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(metallic)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(기타:)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(단맛)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(짠맛)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(신맛)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(쓴맛)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>(감칠맛)</p> <p>0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p>
---	--

< 된장 묘사분석에 대한 설문지 예시 >

(라) 통계처리

- SPSS program(SPSS 12.0 for windows, SPSS Inc.)을 이용하여 분산분석(ANOVA)와 Duncan's multiple range test로 유의성 검증 및 군집분석을 실시하였다.

2) 결과 및 고찰

가) 균주의 선발

(1) 균주 특성 DB의 균주 선발

- 발효식품으로부터 분리하여 보관중인 균주 중 황국균, 고초균, 효모의 특성 DB를 바탕으로 GRAS균주에 한해 각 10종(고초균, 황국균) 및 6종(씩) 선발하였다. 황국균과 고초균은 전분 및 단백질 분해 효소활성을 기준으로 선발하였으며, 효모는 알콜생성능을 기준으로 선발하였다. 고초균은 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* 등 10종으로 효소활성이 2 cm 이상 및 바이오제닉 아민이 생성하지 않는 균주로 선발하였다(Table 6).
- 황국균은 보관된 균주 중 아플라톡신을 생성하지 않는 균주를 기준으로 선발하였으며, 황국균 역시 효소활성이 높은 균주를 선발하였다(Table 7). 효모는 알콜생성능이 10% 이상인 것으로 선발하고 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 균주로 선발하였다(Table 8).

Table 6 . Characteristics of sorted *Bacillus* sp.

No.	균주명 (SRCM)	동정명	용혈성	유해대사산물			효소활성(cm)					Biogenic amines				항균활성(cm)				항혈전	항산화활성
				phenylalanine	urease	β NDglucuronidase (TBX)	amylase	protease	β -glucosidase	cellulase	lipase	ctrl	Tyramine	Histamine	<i>B. cereus</i> KCC M40935	<i>S. aureus</i> KCC M11335	<i>L. monocytogenes</i> KCC M43155	<i>E. faecalis</i> KCC M11814	fibrinolytic activity		
1	103775	<i>B. subtilis</i>	α	ND	ND	ND	2.5	2.5	+	2.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13.67 \pm 3.15	
2	103778	<i>B. subtilis</i>	α	ND	ND	ND	2.4	2.5	+	1.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.5	10.88 \pm 0.09	
3	103904	<i>B. subtilis</i>	α	ND	ND	ND	2.1	2.6	+	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.5	7.40 \pm 0.87	
4	104104	<i>B. subtilis</i>	α	ND	ND	ND	2.3	2.1	-	2.2	ND	ND	ND	1.2	-	1.6	ND	1.6	1.6	11.41 \pm 0.71	
5	104150	<i>B. subtilis</i>	γ	ND	ND	ND	2.3	2.2	-	2.1	ND	ND	ND	-	-	1.4	ND	1.6	1.6	10.53 \pm 1.07	
6	104168	<i>B. velezensis</i>	γ	ND	ND	ND	2.4	2.3	+	2.7	ND	ND	ND	-	1.1	1.4	ND	1.4	1.4	11.26 \pm 0.42	
7	104198	<i>B. velezensis</i>	γ	ND	ND	ND	2.5	2.4	+	2.6	ND	ND	ND	1.0	-	1.0	ND	1.5	1.5	16.05 \pm 1.03	
8	104361	<i>B. subtilis</i>	β	ND	ND	ND	2.3	2.4	+	2.6	ND	ND	ND	-	-	0.9	ND	1.9	1.9	9.10 \pm 0.98	
9	104466	<i>B. amyloliquefaciens</i>	γ	ND	ND	ND	2.3	2.4	+	2.5	ND	ND	ND	1.8	1.1	1.6	ND	2.3	2.3	0.69 \pm 0.14	
10	104576	<i>B. amyloliquefaciens</i>	γ	ND	ND	ND	2.0	2.5	+	2.4	ND	ND	ND	1.7	1.2	1.5	ND	1.5	1.5	10.04 \pm 0.25	

Table 7 . Characteristics of sorted *Aspergillus oryzae*

No.	균주명 (SRCM)	등정명	효소활성 생성능				Aflatoxine 생성능
			protease	amylase	cellulase	lipase	
1	101975	<i>A. oryzae</i>	++	+	-	-	ND
2	101978	<i>A. oryzae</i>	+	-	-	-	ND
3	101982	<i>A. oryzae</i>	++	+++	-	+	ND
4	101989	<i>A. oryzae</i>	++	+	-	-	ND
5	101990	<i>A. oryzae</i>	++	++	-	+	ND
6	102016	<i>A. oryzae</i>	++	+	-	-	ND
7	102017	<i>A. oryzae</i>	++	+	-	-	ND
8	102021	<i>A. oryzae</i>	++	++	-	-	ND
9	102448	<i>A. oryzae</i>	+	+	-	-	ND
10	102487	<i>A. oryzae</i>	+++	+	-	+	ND

Table 8. Characteristics of sorted *Saccharomyces cerevisiae*

No.	균주명 (SRCM)	동정명	Alcohol (%)	Ethanol production (%)	Alcohol tolerance												Biogenic amine production			
					0%			10%			12.5%			15%			Histamine	Tyramine	Cadaverine	Putrescine
					24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h				
1	102556	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	10.0	1.34±0.29	1.61±0.08	1.62±0.12	0.50±0.10	1.21±0.00	1.33±0.07	0.45±0.14	1.25±0.07	1.53±0.18	0.22±0.06	0.22±0.07	0.55±0.41	ND	ND	ND	ND
2	102533	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	10.0	1.24±0.02	1.47±0.11	1.52±0.04	0.54±0.35	1.20±0.08	1.34±0.03	0.28±0.26	0.91±0.29	1.22±0.12	0.20±0.01	0.20±0.07	0.63±0.68	ND	ND	ND	ND
3	102566	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	11.4	1.35±0.09	1.53±0.05	1.59±0.06	0.48±0.09	1.33±0.12	1.27±0.15	0.23±0.04	0.62±0.54	0.93±0.56	0.20±0.02	0.19±0.02	0.18±0.02	ND	ND	ND	ND
4	102565	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	11.8	1.47±0.06	1.55±0.01	1.69±0.04	0.44±0.22	1.30±0.15	1.19±0.06	0.25±0.02	0.82±0.48	1.21±0.16	0.34±0.12	0.33±0.10	0.25±0.09	ND	ND	ND	ND
5	102569	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	13.4	1.48±0.07	1.53±0.09	1.53±0.01	0.84±0.43	1.38±0.18	1.38±0.17	0.42±0.30	0.85±0.27	1.16±0.01	0.22±0.10	0.78±0.33	0.98±0.20	ND	ND	ND	ND
6	102595	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6.5	16.6	1.45±0.21	1.65±0.11	1.66±0.09	1.30±0.12	1.70±0.01	1.87±0.01	0.12±0.01	1.55±0.04	1.79±0.05	0.11±0.01	0.17±0.07	1.55±0.18	ND	ND	ND	ND

(2) 장류 원료 적용 평가

(가) 쌀 발효 적용 평가

- 황국균은 전분 분해 활성이 강한 균주로 쌀이나 밀에서 당화력이 높아 발효에 따라 단맛이 부여 되거나 단맛에서 오는 향미를 준다. 선발된 10종의 황국균을 쌀에 접종하여 3일간 발효하여 α -amylase 활성을 분석한 결과는 table 9 과 같다. 균주 10종 중 SRCM102017균주가 가장 높은 활성을 보여주었으며, 그 다음은 SRCM102021, 그 다음은 SRCM102487균주의 순으로 나타났다.

Table 9. α -amylase activity of fermented rice products by sorted *Aspergillus oryzae*

Unit : unit/g

No.	균주명 (SRCM)	Fermentation days(3)
1	101975	1659.63±3.24 ^b
2	101978	1476.38±11.21 ^c
3	101982	1425.20±10.21 ^c
4	101989	1680.16±7.54 ^b
5	101990	1661.95±4.92 ^b
6	102016	1554.63±14.23 ^b
7	102017	2553.21±15.21 ^a
8	102021	2123.10±5.21 ^a
9	102448	1540.61±1.32 ^b
10	102487	1667.68±2.31 ^b

(나) 대두발효 적용 평가

- 된장 제조에 앞서 대두에 황국균과 고초균을 접종하여 발효한 후 적용평가를 실시하였다. 각 균주 10종을 대두에 접종하여 발효 전과 발효 후의 효소활성 및 아미노산성 질소를 평가한 결과는 아래 표와 같다. 황국균을 대두에 접종하여 3일간 발효하여 효소활성을 평가한 결과 protease 활성은 SRCM102487과 SRCM102021균주가 월등하게 높은 활성을 나타내었고, α -amylase 활성은 쌀 발효와는 상이한 결과를 나타내어 SRCM101989 균주가 가장 높은 활성을 나타내었다. 아미노태 질소 함량은 모든 균주에 있어 발효 전에 비해 발효 후에 높아지는 경향을 나타내었으며, SRCM102017 균주를 제외하고 모든 균주가 300 mg%이상의 값을 나타내었다. 그 중 SRCM102487 균주가 가장 높은 값을 나타내어 protease 활성이 높은 값과 유사한 경향을 나타내었다. 위 결과를 미루어 볼 때 선발된 균주 황국균은 전분분해활성도 높지만 단백질 분해 활성이 월등한 것으로 판단되어 된장 제조용 균주로 사용 시 적절할 것으로 판단되었다.
- 고초균을 대두에 접종하여 5일간 발효하여 효소활성을 평가한 결과 protease 활성은 8.82±0.39 ~ 10.04±0.09로 균주별로 큰 차이는 보이지 않았다. α -amylase 활성은 SRCM104168이 가장 높은 활성을 나타내었으며, 그 다음은 SRCM104156, SRCM104466순으로 나타났다. 아미노산성 질소 함량은 SRCM104168이 가장 높은 값을 나타내었으며, 그 다음은 SRCM104466으로 나타났다.

Table 10. Characteristics of fermented soybean products by sorted *Aspergillus oryzae*

No.	Strain (SRCM)	Enzyme activity after fermentation(3days)		Amino type nitrogen(mg%)	
		Protease activity(unit/g)	α -amylase activity(unit/g)	Fermentation days	
				0	3
1	101975	16.23±0.64 ^{1)e2)}	1093.75±26.69 ^c	105.89±4.14 ^a	122.32±2.77 ^g
2	101978	25.65±1.71 ^{bc}	967.20±3.12 ^e	110.44±6.68 ^a	378.05±14.72 ^{de}
3	101982	22.70±1.18 ^{cd}	1195.79±10.89 ^a	105.57±0.61 ^a	363.76±18.77 ^{de}
4	101989	11.55±2.87 ^f	1208.13±4.90 ^a	105.57±0.61 ^a	365.75±10.94 ^{de}
5	101990	18.81±1.92 ^{de}	1188.06±7.96 ^a	108.28±3.02 ^a	353.85±6.04 ^e
6	102016	11.97±0.11 ^f	1150.57±12.44 ^b	112.14±9.02 ^a	455.49±4.65 ^c
7	102017	7.74±0.25 ^g	507.7±8.91 ^g	106.07±0.10 ^a	393.05±19.70 ^d
8	102021	41.45±2.87 ^a	1056.59±14.59 ^d	112.24±3.00 ^a	272.19±16.19 ^f
9	102448	28.63±1.90 ^b	979.17±2.46 ^e	103.90±0.74 ^a	488.87±11.50 ^b
10	102487	42.36±2.30 ^a	762.70±7.06 ^f	106.38±1.22 ^a	468.86±4.75 ^{bc}

¹⁾Value are mean ± SD (n=3).

²⁾Different small letters (a, b, c, etc.) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

Table 11. Characteristics of fermented soybean products by sorted *Bacillus* sp.

No.	Strain (SRCM)	Enzyme activity after fermentation(3days)		Amino type nitrogen(mg%)	
		Protease activity(unit/g)	α -amylase activity(unit/g)	Fermentation days	
				0	3
1	103775	8.82±0.39 ^{1)d2)}	151.40±12.92 ^{2)ef3)}	115.06±3.34 ^{ab}	206.35±1.62 ^c
2	103778	8.98±0.17 ^{cd}	139.11±17.19 ^f	109.93±7.17 ^{ab}	354.04±14.48 ^b
3	103904	9.32±0.18 ^{bcd}	168.21±5.45 ^{def}	119.04±0.85 ^a	214.33±16.05 ^c
4	104104	9.73±0.19 ^{ab}	249.40±19.75 ^c	112.9±3.28 ^{ab}	363.70±8.94 ^b
5	104156	9.48±0.24 ^{bc}	289.43±23.73 ^b	114.57±4.79 ^{ab}	183.18±5.86 ^c
6	104168	9.83±0.32 ^{ab}	357.63±11.58 ^a	118.34±1.92 ^a	402.71±21.28 ^a
7	104198	9.34±0.21 ^{bcd}	173.70±6.96 ^{de}	106.94±6.7 ^b	201.36±26.68 ^c
8	104361	10.04±0.09 ^a	187.40±6.80 ^d	115.74±2.86 ^{ab}	180.53±0.30 ^c
9	104466	9.58±0.12 ^{ab}	254.09±10.15 ^c	118.25±6.41 ^a	384.80±8.99 ^{ab}
10	104576	9.29±0.13 ^{cd}	152.02±5.86 ^{ef}	113.89±4.26 ^{ab}	199.57±20.89 ^c

¹⁾Value are mean ± SD (n=3).

²⁾Different small letters (a, b, c, etc.) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(3) 효모 적용을 위한 내염성 평가

- 장류에서의 효모의 생성은 발효 숙성 6개월 정도의 시간이 소요되는 것으로 알려져 있으며, 또한 염도가 높을 때 효모의 효소 활성이 줄어들기 때문에 효모의 선발에 앞서 염에 대한 내성은 필수적이다. 최적의 효모를 선발하기 위하여 상기 선별된 효모 6종을 소금을 5%, 10%, 15%로 넣은 YM배지에서 30℃에서 2일간 배양 후 탁도를 측정된 결과는 아래와 같다. 효모는 소금 농도가 높아짐에 따라 탁도가 낮아지는 결과를 보여 균체 성장률이 감소하는 것으로 나타났다. 이 중 15%의 염농도에서도 잘 생육되는 균주 2종 SRCM102595, SRCM102569를 선발하였다.

Table 12. Evaluation of the endotropic properties of sorted *Saccharomyces cerevisiae*.

No.	Strain (SRCM)	Salt concentration(%)		
		5	10	15
1	102556	1.24±0.07	0.88±0.07	0.57±0.01
2	102533	0.92±0.05	0.73±0.04	0.31±0.02
3	102566	1.02±0.01	0.80±0.06	0.42±0.02
4	102565	1.12±0.07	0.92±0.06	0.42±0.07
5	102569	1.04±0.09	0.78±0.05	0.47±0.09
6	102595	1.24±0.09	0.90±0.08	0.62±0.07

(4) 발효물 제조에 따른 평가

- 장류제조에 있어 이전의 선행연구를 바탕으로 된장을 제조하기 위해 균주의 복합발효는 lab scale에서는 적용이 가능하나 100 kg이상의 pilot scale로 확대 적용 시 시제품 생산에만 그쳐있다. 또한 저염 된장을 제조하기 위해서는 복합발효는 염도로 인해 균주의 적정 생육이 이루어지지 않는다. 따라서 본 연구에서는 생산적용 및 상품화를 용이하게 하기 위해 선별된 균주들을 각각 쌀과 대두에 발효하고 이를 이용한 각 발효물을 제조하고 숙성기간 중의 평가를 통하여 최종 숙성기간 및 균주를 선발하고 된장을 제조하고자 하였다.
- 황국균 3종을 쌀에 적용하여 발효하고 쌀 *koji*를 제조하고 최종 5%의 염도로 조정하여 제조한 후 적정 균주를 선발하고자 숙성 0일부터 7일까지의 특성을 평가한 결과 pH는 숙성기간이 지남에 따라 낮아지는 경향을 보였고, 산도는 높아지는 경향을 보였다. 염도와 수분함량은 숙성기간에 따라 균주별, 숙성기간별로 유의차를 보이지 않았다. 발효과정 중, 원료의 전분이 미생물이 분비하는 효소의 작용으로 가수분해되어 단맛 성분의 주체인 당류가 생성되는데 이의 양을 측정하기 위해 환원당과 총당 함량을 평가하였다. 총당 함량은 숙성기간에 따라 증가하는 경향을 보였으며, SRCM102487균주가 가장 높은 함량을 나타내었다. 환원당 함량 역시 숙성기간에 따라 증가하는 경향을 보였으며, SRCM102487균주가 가장 높은 함량을 나타내었다. 또한 당 함량에 있어 SRCM102487균주는 숙성 5일까지는 증가하다가 숙성 6일차에는 감소하는 경향을 나타내었다. 글루탐산 함량은 숙성기간에 따라 증가하는 경향을 나타내었고, 숙성 6일차에 SRCM102487 균주가 17.77±0.39 mg/100g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 아미노산성 질소

역시 숙성기간에 따라 증가하는 경향을 나타내었고, 숙성 6일차에 SRCM102487 균주가 가장 높은 함량을 나타내었다. 본 연구결과를 바탕으로 쌀 발효물 제조용 균주로는 SRCM102487 균주로 선발하고 숙성적정기간은 6일로 결정하였다.

- 선별된 고초균 3종을 대두에 발효하고 이를 최종 11%의 염도로 조정하여 제조한 후 0일부터 21일까지 숙성하면서 특성을 평가하였다. pH는 숙성기간에 따라 낮아지고 산도는 높아지는 경향을 나타내었다. 염도와 수분함량은 숙성기간에 따라 균주별, 숙성기간별로 유의차를 보이지 않았다. 총당 및 환원당 함량은 숙성기간이 지남에 따라 초기보다 증가하는 경향을 보였으며, SRCM104168이 가장 높은 값을 나타내었다. 글루탐산 함량 및 아미노산성 질소 함량은 숙성기간에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 균주별로는 SRCM104466균주가 가장 높은 함량을 나타내었다. 또한 SRCM104466균주는 숙성기간 14일까지는 증가하다가 21일에 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 대두 발효물 제조용 균주로는 SRCM104466 균주로 선발하고 숙성적정기간은 14일로 결정하였다. 이전 실험에서 황국균과 고초균을 대두에 발효하여 평가하였을 때 결과와 소금을 첨가하여 제조한 발효물에서의 균주별 특성은 다르게 나타났으며, 염에 따라 미생물의 생육 및 효소활성으로 인하여 특성이 달라지고 추후 단맛 및 감칠맛에도 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

Table 13. Quality characteristics of fermented rice products by selected *Aspergillus oryzae*

Quality characteristics	Strain	Aging period(day)						
		0	1	2	3	4	5	6
pH	SRCM101990	6.38 ± 0.00 ^{2)a3)A4)}	6.37 ± 0.02 ^{aAB}	6.35 ± 0.00 ^{aABC}	6.34 ± 0.00 ^{aBC}	6.34 ± 0.01 ^{aBC}	6.34 ± 0.01 ^{aC}	6.29 ± 0.00 ^{aD}
	SRCM102021	6.15 ± 0.04 ^{CA}	6.16 ± 0.07 ^{bAB}	6.10 ± 0.00 ^{cBC}	6.05 ± 0.00 ^{cBCD}	6.01 ± 0.07 ^{cBCD}	5.99 ± 0.00 ^{cD}	5.99 ± 0.01 ^{cD}
	SRCM102487	6.27 ± 0.01 ^{bA}	6.27 ± 0.01 ^{aA}	6.24 ± 0.00 ^{bB}	6.22 ± 0.01 ^{bC}	6.18 ± 0.00 ^{bD}	6.17 ± 0.01 ^{bDE}	6.15 ± 0.00 ^{bE}
Titratable acidity ¹⁾	SRCM101990	0.11 ± 0.00 ^{cD}	0.11 ± 0.00 ^{cC}	0.12 ± 0.00 ^{cC}	0.13 ± 0.00 ^{cB}	0.14 ± 0.01 ^{bB}	0.16 ± 0.00 ^{CA}	0.17 ± 0.00 ^{bA}
	SRCM102021	0.17 ± 0.00 ^{aE}	0.17 ± 0.00 ^{aDE}	0.18 ± 0.00 ^{aCDE}	0.18 ± 0.00 ^{aBCD}	0.19 ± 0.00 ^{aBC}	0.19 ± 0.00 ^{aAB}	0.19 ± 0.00 ^{aA}
	SRCM102487	0.14 ± 0.00 ^{bE}	0.15 ± 0.00 ^{bDE}	0.15 ± 0.00 ^{bD}	0.17 ± 0.00 ^{bC}	0.18 ± 0.00 ^{aBC}	0.18 ± 0.00 ^{bB}	0.19 ± 0.00 ^{aA}
Salt content (%)	SRCM101990	5.45 ± 0.07 ^{aA}	5.50 ± 0.00	5.20 ± 0.00 ^{aA}	5.05 ± 0.07	5.15 ± 0.07 ^{aA}	5.45 ± 0.07	5.35 ± 0.05 ^{aA}
	SRCM102021	5.50 ± 0.14 ^{aA}	5.25 ± 0.07	5.25 ± 0.07 ^{aA}	5.35 ± 0.07	5.25 ± 0.07 ^{aA}	5.35 ± 0.07	5.31 ± 0.11 ^{aA}
	SRCM102487	5.45 ± 0.07 ^{aA}	5.25 ± 0.07	5.30 ± 0.00 ^{aA}	5.30 ± 0.14	5.25 ± 0.07 ^{aA}	5.25 ± 0.07	5.35 ± 0.04 ^{aA}
Moisture content (%)	SRCM101990	48.63 ± 0.60 ^{aA}	49.96 ± 0.08	48.84 ± 0.25 ^{aA}	50.01 ± 0.04	49.20 ± 1.00 ^{aA}	49.09 ± 0.50	48.63 ± 0.33 ^{aA}
	SRCM102021	49.89 ± 0.86 ^{aA}	49.11 ± 0.11	49.00 ± 0.33 ^{aA}	48.95 ± 1.03	49.66 ± 0.12 ^{aA}	49.14 ± 0.48	48.94 ± 0.71 ^{aA}
	SRCM102487	49.01 ± 1.12 ^{aA}	48.83 ± 0.71	49.97 ± 0.36 ^{aA}	49.09 ± 0.41	48.75 ± 0.58 ^{aA}	48.59 ± 0.35	49.14 ± 0.70 ^{aA}
Total sugar content (%)	SRCM101990	7.40 ± 0.03 ^{cF}	11.71 ± 0.08 ^{bE}	15.76 ± 0.01 ^{bD}	17.55 ± 0.30 ^{bC}	18.15 ± 0.27 ^{bC}	18.97 ± 0.66 ^{bB}	19.90 ± 0.30 ^{aA}
	SRCM102021	7.88 ± 0.04 ^{bG}	12.37 ± 0.03 ^{bF}	14.43 ± 0.05 ^{bE}	16.81 ± 0.11 ^{cD}	17.21 ± 0.06 ^{cC}	17.93 ± 0.17 ^{bB}	19.12 ± 0.15 ^{bA}
	SRCM102487	11.66 ± 0.05 ^{aF}	16.05 ± 0.61 ^{aE}	17.95 ± 0.73 ^{aD}	20.73 ± 0.62 ^{aC}	21.46 ± 0.19 ^{aCD}	22.58 ± 0.03 ^{aAB}	21.92 ± 0.18 ^{aA}
Reducing sugar (%)	SRCM101990	6.48 ± 0.04 ^{cF}	10.52 ± 0.07 ^{bE}	12.00 ± 0.23 ^{bD}	13.10 ± 0.13 ^{bC}	13.97 ± 0.18 ^{bB}	14.84 ± 0.03 ^{bA}	15.14 ± 0.17 ^{CA}
	SRCM102021	6.88 ± 0.03 ^{bG}	10.40 ± 0.10 ^{bF}	12.33 ± 0.05 ^{bE}	12.87 ± 0.04 ^{cD}	14.28 ± 0.13 ^{bC}	14.67 ± 0.17 ^{bB}	15.84 ± 0.17 ^{bA}
	SRCM102487	9.56 ± 0.00 ^{aF}	12.07 ± 0.55 ^{aE}	13.70 ± 0.14 ^{aD}	15.29 ± 0.17 ^{aC}	16.00 ± 0.19 ^{aB}	16.91 ± 0.00 ^{aA}	16.78 ± 0.07 ^{aA}
Glutamate content (mg/100 g)	SRCM101990	7.78 ± 0.04 ^{aG}	8.99 ± 0.09 ^{bF}	10.36 ± 0.14 ^{aE}	11.21 ± 0.12 ^{aD}	12.20 ± 0.04 ^{cC}	13.31 ± 0.21 ^{cB}	13.84 ± 0.11 ^{CA}
	SRCM102021	7.95 ± 0.15 ^{aF}	7.94 ± 0.08 ^{cF}	8.84 ± 0.08 ^{bE}	11.26 ± 0.16 ^{aD}	12.82 ± 0.03 ^{bC}	14.02 ± 0.01 ^{bB}	14.76 ± 0.13 ^{bA}
	SRCM102487	8.09 ± 0.34 ^{aF}	9.79 ± 0.32 ^{aE}	10.4 ± 0.12 ^{aDE}	10.99 ± 0.24 ^{aD}	13.69 ± 0.25 ^{aC}	15.27 ± 0.14 ^{aB}	17.77 ± 0.39 ^{aA}
Amino type nitrogen content (mg/100g)	SRCM101990	51.15 ± 8.98 ^{aG}	76.71 ± 4.96 ^{bF}	108.55 ± 6.10 ^{bE}	127.09 ± 7.71 ^{bD}	153.48 ± 0.42 ^{bC}	169.56 ± 8.03 ^{bB}	191.83 ± 0.61 ^{CA}
	SRCM102021	56.68 ± 9.28 ^{aG}	81.24 ± 8.97 ^{bF}	119.02 ± 7.95 ^{abE}	141.33 ± 0.27 ^{bD}	160.88 ± 2.21 ^{abC}	179.89 ± 5.81 ^{abB}	211.83 ± 1.57 ^{bA}
	SRCM102487	66.65 ± 1.94 ^{aG}	112.53 ± 4.79 ^{aF}	139.70 ± 7.72 ^{aE}	163.82 ± 3.54 ^{aD}	179.47 ± 10.85 ^{aC}	197.73 ± 5.02 ^{aB}	231.24 ± 5.20 ^{aA}

¹⁾Titratable acidity was calculated from 0.1N NaOH required to neutralize to pH 8.3.

²⁾Value are mean ± SD (n=3).

³⁾Different small letters (a, b, c, etc.) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test ($P < 0.05$).

⁴⁾Different capital letters (A, B, C, etc.) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test ($P < 0.05$).

Table 14. Quality characteristics of fermented soybean products by selected *Bacillus* sp.

Quality characteristics	Strain	Aging period(day)			
		0	7	14	21
pH	SRCM104104	6.92±0.00 ^{2)a3)A4)}	6.90±0.01 ^{aB}	6.82±0.01 ^{aB}	6.79±0.01 ^{aC}
	SRCM104168	6.83±0.01 ^{cA}	6.75±0.00 ^{cA}	6.61±0.00 ^{bA}	6.58±0.00 ^{cB}
	SRCM104466	6.84±0.01 ^{bA}	6.71±0.01 ^{bB}	6.69±0.01 ^{bC}	6.68±0.00 ^{bD}
Titratable acidity ¹⁾	SRCM104104	0.12±0.01 ^{cD}	0.13±0.00 ^{cC}	0.17±0.01 ^{bB}	0.19±0.00 ^{bA}
	SRCM104168	0.14±0.00 ^{aC}	0.18±0.00 ^{aB}	0.19±0.01 ^{aAB}	0.20±0.00 ^{aA}
	SRCM104466	0.14±0.01 ^{bD}	0.15±0.00 ^{bC}	0.17±0.01 ^{bB}	0.18±0.00 ^{cA}
Salt content (%)	SRCM104104	12.15±0.07 ^{aA}	12.25±0.07 ^{aA}	12.20±0.14 ^{aA}	12.20±0.14 ^{aA}
	SRCM104168	11.35±0.07 ^{aA}	11.40±0.14 ^{aA}	11.15±0.07 ^{aA}	11.10±0.00 ^{aA}
	SRCM104466	12.25±0.07 ^{aA}	12.35±0.07 ^{aA}	12.40±0.14 ^{aA}	12.30±0.14 ^{aA}
Moisture content (%)	SRCM104104	52.75±0.09 ^{aA}	51.45±0.38 ^{aA}	52.11±0.52 ^{aA}	52.20±0.35 ^{aA}
	SRCM104168	53.80±0.57 ^{aA}	53.02±0.34 ^{aA}	53.37±0.21 ^{aA}	52.63±0.18 ^{aA}
	SRCM104466	52.89±1.23 ^{aA}	52.13±0.58 ^{aA}	52.04±0.56 ^{aA}	52.25±0.42 ^{aA}
Total sugar content (%)	SRCM104104	3.39±0.05 ^{bD}	4.34±0.10 ^{bC}	4.80±0.01 ^{bB}	5.12±0.11 ^{bA}
	SRCM104168	3.56±0.23 ^{bD}	4.82±0.14 ^{bC}	5.09±0.10 ^{aB}	5.37±0.01 ^{aA}
	SRCM104466	4.14±0.12 ^{aB}	4.30±0.11 ^{aAB}	4.29±0.10 ^{cAB}	4.50±0.01 ^{cA}
Reducing sugar (%)	SRCM104104	1.59±0.01 ^{bD}	1.86±0.01 ^{bC}	2.02±0.03 ^{bB}	2.13±0.01 ^{bA}
	SRCM104168	2.12±0.01 ^{aD}	2.53±0.00 ^{aC}	2.79±0.02 ^{aB}	2.90±0.00 ^{aA}
	SRCM104466	1.35±0.01 ^{cC}	1.83±0.00 ^{cB}	1.91±0.03 ^{cAB}	1.97±0.05 ^{cA}
Glutamate content (mg/100g)	SRCM104104	27.46±1.51 ^{aD}	50.23±0.87 ^{bC}	59.85±1.09 ^{bB}	66.13±0.48 ^{bA}
	SRCM104168	27.82±0.63 ^{aD}	43.43±1.33 ^{cC}	52.74±0.37 ^{cB}	58.87±1.61 ^{cA}
	SRCM104466	30.58±1.02 ^{bC}	56.79±1.34 ^{aB}	69.03±1.54 ^{aA}	69.05±1.21 ^{aA}
Amino type nitrogen content (mg/100g)	SRCM104104	196.92±2.26 ^{cD}	432.95±8.22 ^{cC}	545.54±13.52 ^{bB}	608.88±3.17 ^{bA}
	SRCM104168	162.61±9.01 ^{aD}	333.93±9.26 ^{aC}	399.94±11.34 ^{cB}	503.67±15.77 ^{cA}
	SRCM104466	247.69±7.51 ^{aD}	590.10±5.74 ^{aC}	679.60±5.69 ^{aA}	623.51±3.49 ^{aB}

¹⁾Titratable acidity was calculated from 0.1N NaOH required to neutralize to pH 8.3.

²⁾Value are mean ± SD (n=3).

³⁾Different small letters (a, b, c, etc.) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test ($P<0.05$).

⁴⁾Different capital letters (A, B, C, etc.) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test ($P<0.05$).

(5) 선발된 균주를 이용한 쌀, 대두 발효물 제조 및 특성 분석

(가) 선발된 균주를 이용한 쌀, 대두발효물의 품질특성 비교

- 기존 주관기관에서 사용중인 균주를 대조구로 하고 선발된 균주를 시험구로 하여 각각의 쌀, 대두 발효물을 제조하여 특성을 비교하였다. 각각의 균주를 사용하여 쌀 *koji*를 제조하고 상기 방법에 따라 발효물을 제조하고 숙성 6일을 진행하였고, 대두는 각 고초균을 이용하여 대두발효물을 제조하고 숙성 3주 후 품질특성을 비교하였다. pH 및 산도, 수분함량, 염도에서는 차이를 보이지 않았으나 아미노산성 질소 함량은 유의적인 차이를 나타내었다. 이 결과로 미루어 볼 때 선발된 균주는 기존 균주에 비하여 효소활성이 높아 장류를 제조함에 있어 같은 숙성기간일지라도 더 높은 숙성도를 나타낼 수 있다고 판단되었다.

Table 15. Quality characteristics of fermented products by selected strain.

Quality characteristics	Fermented products	Control	Sample
pH	Rice	6.18±0.08	6.20±0.07
	Soybean	6.20±0.03	6.12±0.04
Titratable acidity	Rice	0.24±0.01	0.20±0.04
	Soybean	0.25±0.02	0.27±0.04
Salt content (%)	Rice	5.55±0.07	5.45±0.07
	Soybean	11.55±0.07	11.45±0.07
Moisture content (%)	Rice	50.16±0.49	49.89±0.45
	Soybean	51.61±0.30	52.02±0.16
Amino type nitrogen content (mg/100g)	Rice	215.93±6.73	240.42±4.52 ^{*1)}
	Soybean	628.60±7.92	672.41±9.10 [*]

¹⁾Significant differences were compared with the control at *P<0.05 in the same row by Levene's t-test

(나) 선발된 균주를 이용한 쌀, 대두 발효물의 유리아미노산 함량

- 선발된 균주를 이용한 쌀, 대두발효물의 유리아미노산 함량을 측정한 결과는 아래 표와 같다. 쌀발효물은 26종의 유리아미노산이 분석되었는데, 대조구에 비해 선발된 균주를 이용한 발효물의 총 유리아미노산 함량이 2896.09 mg%로 더 높은 함량을 보여주었다. 특히 감칠맛을 나타내는 aspartic Acid와 glutamic Acid가 더 높은 함량을 나타내었으며, 단맛을 나타내는 alanine, arginine 역시 높은 함량을 나타내었다. 대두 발효물은 총 28종의 유리아미노산이 분석되었으며, 대두 발효물 역시 대조구에 비해 선발된 균주를 이용한 발효물의 총 유리아미노산 함량이 높을 함량을 보여주었다. 특히 감칠맛을 나타내는 aspartic Acid와 glutamic Acid가 높은 함량을 나타내었으며, 쓴맛을 나타내는 leucine, isoleucine은 더 낮은 함량을 나타내었다. 이를 통해 선발된 균주는 감칠맛과 단맛 등 복합적인 맛을 나타낼 수 있는 장류의 선발균주로 사용이 가능할 것으로 판단되었다.

Table 16. Free amino acid contents of fermented products by selected strain.

No.	Amino acids	Rice		Soybean	
		Control	Sample	Control	Sample
1	Phosphoserine	30.83	36.71	80.64	77.86
2	Aspartic Acid	156.12	174.65	277.26	303.07
3	Threonine	81.58	123.07	171.27	133.82
4	Serine	77.84	73.31	94.25	89.07
5	Glutamic Acid	226.47	292.31	366.31	427.23
6	a-Aminoadipic Acid	9.99	21.91	41.94	55.48
7	Glycine	125.71	213.16	167.55	165.57
8	Alanine	246.34	388.17	477.53	452.72
9	Valine	150.62	180.16	334.23	337.22
10	Cystine	34.68	41.03	12.87	14.81
11	Methionine	60.13	68.31	115.26	112.86
12	Isoleucine	175.67	138.39	383.89	331.54
13	Leucine	288.26	241.24	426.13	390.43
14	Tyrosine	129.01	160.31	239.92	294.60
15	Phenylalanine	95.11	154.90	289.01	297.72
16	b-Alanine	24.78	33.54	8.90	23.60
17	b-Aminoisobutyric Acid	29.93	25.88	42.94	56.35
18	r-Aminobutyric Acid	41.69	43.82	9.45	29.06
19	Tryptamine	12.56	13.82	29.42	38.18
20	Ethanol amine	2.99	4.28	1.87	8.86
21	Ammonia	53.96	58.05	52.26	43.54
22	Hyls	15.66	17.63	11.51	8.97
23	Ornithin	7.45	15.29	52.39	47.88
24	Histidine	106.56	111.79	195.76	299.27
25	Lysine	27.16	50.71	53.86	58.25
26	3-Methylhistidine	-	-	1.17	5.14
27	Anserine	-	-	18.08	-
28	Arginine	181.90	213.65	174.49	199.88
Total		2,393.00	2,896.09	4,130.16	4,302.98

¹⁾Significant differences were compared with the control at *P<0.05 in the same row by Levene's t-test

(다) 선발된 균주를 이용한 쌀, 대두발효물의 핵산관련 물질

- 선발균주를 이용한 각 발효물의 핵산관련물질을 분석한 결과 Hypoxanthine의 함량이 가장 많았고 그 다음은 IMP순으로 나타났으며, 선발균주를 이용한 발효물의 물질 함량이 대조구에 비해 높은 함량을 나타내었다. 핵산 관련 성분의 분해과정에서 생성되는 정미성분인 IMP는 AMP가 AMP 탈아미노 효소의 작용에 의하여 생성된 성분으로 향미 강화기능을 한다. 일본 간장 및 장(5)의 연구에 따르면 Hypoxanthine의 함량이 가장 높고, IMP, Inosine의 순으로 본 연구결과와 일치하는 결과를 보여주었다. 일반적으로 장류 중의 핵산관련물질은 원료 대두나 보리속의 RNA가 효소작용에 의해 RNA-AMP-IMP-inosine-Hypoxanthine으로의 분해 경로에 따라 생성되고 IMP는 aspartic Acid와 glutamic Acid에 대하여 맛난 맛의 상승제로 작용한다는 보고가 있는데(6), 상기 분석결과와 동일한 결과로 감칠맛을 내는 유리아미노산과 핵산물질로 인해 장류 제조 시 장의 고유의 맛인 맛난 맛, 구수한 맛을 나타낼 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 17. Nucleotides Related Compound contents of fermented products by selected strain.

No.	Nucleotides Related Compounds	Rice		Soybean	
		Control	Sample	Control	Sample
1	IMP (mg/100g)	5.14±0.13	11.58±0.24** ¹⁾	4.44±0.03	8.60±0.06**
2	Hypoxanthine (mg/100g)	12.15±0.12	19.09±0.17**	11.78±0.16	22.47±0.03**
3	AMP (mg/100g)	3.22±0.05	4.46±0.02**	3.91±0.03	4.06±0.05
4	Inosine (mg/100g)	6.94±0.15	7.12±0.03	10.22±0.36*	6.65±0.03

¹⁾Significant differences were compared with the control at *P<0.05 in the same row by Levene's t-test

(라) 선발된 균주를 이용한 쌀, 대두 발효물의 향기성분 분석

○ 선발균주를 이용한 각 발효물의 향기성분을 분석한 결과를 아래 표에 나타내었다. 발효물의 휘발성 성분을 분석한 결과, 총 65종의 화합물이 동정되었다. 이 중에서 알데히드류 9종, 알코올류 5종, 산류 2종, 에스테르류 22종, 탄화수소류 15종, 질소 함유 화합물 2종, 기타 화합물 10종이 동정되었다. Peng 등, 정 의 보고(7)(8)에 따르면 알데히드류가 발효 중 지방 산화 또는 분해산물로 생성되며 이러한 대사는 된장의 과일향, 너트향, 로스팅향에 기여한다고 보고하였다. 선정된 균주를 이용한 쌀 발효물과 대두 발효물은 각각의 대조구에 비해 과일향, 아몬드향, 오렌지향 등을 가진 알데히드류 함량이 증가하였는데, 이는 미생물의 높은 효소활성으로 인한 분해산물로 증가한 것으로 판단되어진다. Park 등의 연구(9)에서는 퓨란 유도체는 된장 제조 과정 중 생성되는 당의 가열에 따른 마이야르 반응으로 생성되고, 된장에서의 구수한 향과 쿵쿵한 향의 주성분이라고 보고하였다. 실제로 본 연구에서 가열에 따라 퓨란 유도체인 2-phenylfuran 함량이 증가됨을 확인할 수 있었다. 피라진류는 주로 식품이나 원료의 가열조작에 의해 생성되는 갈변 flavor의 대표적 물질로 가열식품의 향기에 중요한 역할을 하는 물질로 이 대부분은 단백질, 아미노산의 열분해, 당과 단백질 혹은 아미노산과의 반응에서 생성되는 것으로 알려졌다(10). 피라진류는 대개 고소한 견과류의 향을 내는 것으로 된장의 풍미에 긍정적인 작용하는 것으로 알려졌으며, 다른 대두 발효식품인 미소에서 중요한 향기성분으로 확인된 바 있다(11). 실제로 본 연구에서 선정된 균주를 이용한 대두 발효물은 대조구에 비해 함량이 증가한 것으로 나타났다. 탄화수소류는 총 15종이 검출되었는데, 대조구에 비해 선발된 균주를 이용한 각 발효물에서 검출되었었다. 이는 각 원료가 가지는 당단백질이 미생물의 주요 효소에 의해 고분자물질이 끊어진 분해산물로 추정되었다. 본 연구 결과 된장의 고소한 향을 지니는 피라진류가 높게 나타나고, 된장의 고린내로 특정 지어지는 3-methyl butanoic acid는 검출되지 않은 것으로 보아 선정된 균주는 된장의 향미에 있어 긍정적인 역할을 할 것으로 판단되었다.

Table 18. Volatile flavor compound analysis of fermented products by selected strain using Gas-Chromatography-Mass Spectrometry.

No.	Compounds	MW	CAS no	Area (%)				Odor description	Reference
				Control		Sample			
				Rice	Soybean	Rice	Soybean		
Aldehydes									
1	Hexanal	100.16	66-25-1	0.08±0.03	0.23±0.01	3.20±4.10	8.59±0.50	fresh green fatty aldehydic grass leafy fruity sweaty	Mosciano, Gerar P&F 22, No. 6, 41, (1997)
2	heptanal	114.18	111-71-7	-	-	-	1.00±0.01	fresh aldehydic fatty green herbal wine-lee ozone	Luebke, William tgsc, (1984)
3	Benzaldehyde	106.21	100-52-7	-	-	-	0.26±0.01	almond, fruity, powdery, nutty and benzaldehyde-like	Mosciano, Gerar P&F 19, No. 5, 79, (1994)
4	oct-2-enal	126.19	2363-89-5	-	-	0.78±0.14	-	fatty green herbal	
5	(E)-non-4-enal	140.22	2277-16-9	-	-	-	2.99±0.16	fruity	
6	Nonanal	142.24	124-19-6	0.08±0.01	0.11±0.01	5.67±7.22	21.39±1.27	Waxy, aldehydic, citrus, with a fresh slightly green lemon peel like nuance, and a cucumber fattiness	Mosciano, Gerar P&F 26, No. 3, 80, (2001)
7	(E)-non-2-enal	140.22	18829-56-6	-	-	-	0.41±0.2	Green, cucumber, aldehydic, fatty with a citrus nuance	Mosciano, Gerar P&F 16, No. 3, 79, (1991)
8	Decanal	156.26	112-31-2	-	-	-	0.53±0.09	sweet aldehydic waxy orange peel citrus floral	Luebke, William tgsc, (1981)
9	4-propylbenzaldehyde	148.2	28785-06-0	0.13±0.03	-	0.63±0.02	-		
Ketones									
1	dairy lactone	196.28	15456-69-6	0.17±0.16	-	-	-		
Alcohols									
1	dimethylsilanediol	92.17	1066-42-8	-	-	0.15±0.05	-		
2	oct-1-en-3-ol	128.21	3391-86-4	-	0.05±0.01	0.69±0.19	0.70±0.06	mushroom earthy green oily fungal raw chicken	Luebke, William tgsc, (1986)
3	2-Propyl-1-pentanol	111.14	58175-57-8	-	-	-	0.19±0.03		
4	2-ethylhexan-1-ol	130.23	104-76-7	-	-	0.11±0.00	-	citrus fresh floral oily sweet	
5	2-phenylethanol	122.16	60-12-8	0.13±0.01	0.08±0.01	-	-	Sweet, floral, fresh and bready with a rosey honey nuance	Mosciano, Gerar P&F 18, No. 4, 51, (1993)
Acids									
1	Nonanoic acid	158.24	112-05-0	-	-	-	3.45±2.04	Waxy, dirty and cheesy with a cultured dairy nuance	Mosciano, Gerar P&F 14, No. 6, 47, (1989)
2	9,12-Octadecadienoic acid	280.4	2197-37-7	15.01±12.08	-	-	-		
Esters									
1	ethyl 2-methylpropanoate	116.16	97-62-1	-	0.10±0.01	-	-	Sweet, etherial and fruity with pungent, alcoholic, fusel and rummy nuances	Mosciano, Gerar P&F 22, No. 2, 69, (1997)

2	ethyl 2-methylbutanoate	130.18	7452-79-1	-	0.12±0.00	-	-	Fruity, estery and berry with fresh tropical nuances	Mosciano, Gerar P&F 22, No. 1, 57, (1997)
3	ethyl 3-cyano-5-methylhexanoate	183.25	181289-17-8	-	0.07±0.01	-	-		
4	octyl formate	158.24	112-32-3	-	-	-	0.31±0.01	fruity rose orange waxy cucumber	Luebke, William tgsc, (1988)
5	methyl 2-hydroxybenzoate	152.14	119-36-8	-	1.46±0.02	1.24±0.24	-	Sweet, salicylate, root beer, wintergreen, aromatic, slightly phenolic and camphoreous	Mosciano, Gerar P&F 20, No. 6, 49, (1995)
6	methyl 2-hydroxybenzoate	152.14	119-36-8	-	-	-	4.42±2.24	wintergreen mint	Luebke, William tgsc, (1983)
7	ethyl 2-phenylacetate	164.2	101-97-3	-	0.05±0.02	-	-	sweet floral honey rose balsam cocoa	Luebke, William tgsc, (1995)
8	ethyl 3-phenylprop-2-enoate	176.21	103-36-6	0.88±0.03	0.22±0.00	-	-	Sweet, balsamic, spice, cinnamon, fruity and powdery	Mosciano, Gerar P&F 23, No. 2, 43, (1998)
9	ethyl tetradecanoate	256.42	124-06-1	0.16±0.12	0.27±0.01	0.55±0.18	-	sweet waxy violet orris	Luebke, William tgsc, (1989)
10	ethyl pentadecanoate	270.45	41114-00-5	-	0.70±0.04	-	-	honey sweet	
11	methyl hexadecanoate	270.45	112-39-0	-	0.42±0.07	-	-	oily waxy fatty orris	
12	2-Methoxyethyl phthalate	282.29	117-82-8	-	-	1.49±0.16	-		
13	Ethyl 9-tetradecanoate	254.41	24880-50-0	-	0.93±0.08	-	-		
14	Ethyl 9-hexadecanoate	282.46	54546-22-4	0.53±0.16	-	-	-		
15	ethyl hexadecanoate	284.48	628-97-7	10.39±6.03	27.8±4.96	10.32±3.84	-	Waxy, fruity, creamy and milky with a balsamic nuance	Mosciano, Gerar P&F 22, No. 2, 69, (1997)
16	methyl (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoate	294.47	112-63-0	-	3.36±0.74	-	-	oily fatty woody	
17	methyl (Z)-octadec-9-enoate	296.49	112-62-9	-	2.14±0.03	-	-	mild fatty	
18	9,12-Octadecadienoic acid	280.4	2197-37-7	15.01±12.08	-	-	-		
19	ethyl octadeca-9,12-dienoate	308.5	7619-08-01	-	12.82±0.38	-	-		
20	Linoleic acid ethyl ester	308.5	544-35-4	45.01±5.12	-	35.39±10.82	-	mild fatty fruity oily	
21	Ethyl elaidate	310.5	6114-18-7	27.73±10.67	39.91±4.82	20.73±5.85	-		
22	ethyl	310.52	6512-99	-	5.57±0.	-	-		

	oleate		-8		91					
Phenols										
1	4-ethenyl-2-methoxyphenol	150.17	7786-61-0	4.37±0.71	2.83±0.09	6.63±0.87	-		dry woody fresh amber cedar roasted peanut	
Pyrazines										
1	2,5-dimethylpyrazine	108.14	123-32-0	-	-	-	0.37±0.02		Nutty, peanut, musty, earthy, powdery and slightly roasted with a cocoa powder nuance	Mosciano, Gerar P&F 21, No. 6, 49, (1996)
2	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	136.19	13360-65-1	-	-	-	0.12±0.04		potato cocoa roasted nutty	
3	2,3,5,6-tetramethylparazine	136.2	1124-11-4	-	-	-	9.25±1.68		Nutty, musty and vanilla with dry, brown cocoa nuances	Mosciano, Gerar P&F 22, No. 2, 69, (1997)
Hydrocarbons										
1	oct-1-ene	112.21	111-66-0	-	-	-	1.19±0.23		gasoline	
2	(E)-oct-4-ene	112.21	14850-23-8	-	-	-	1.52±0.35			
3	hexamethylcyclotrisiloxane	222.46	541-05-9	0.21±0.01	0.18±0.03	0.79±0.06	1.07±0.23			
4	octa-1,3-diene	110.19	1002-33-1	-	-	-	0.84±0.14			
5	octamethylcyclotetrasiloxane	296.62	556-67-2	0.13±0.01	0.30±0.02	0.73±0.32	-			
6	Decamethylcyclopentasiloxane	370.77	541-02-6	-	0.05±0.00	0.32±0.07	-			
7	6-methyldeca-1,3-diene	184.36	6044-71-9	-	-	0.23±0.00	-			
8	2,4-Dimethyldodecane	198.39	6117-99-3	-	-	0.41±0.13	-			
9	Tetradecane	198.39	629-59-4	-	-	1.06±0.75	1.89±0.30			
10	Hexadecane	226.44	544-76-3	-	-	5.61±6.33	10.98±0.61			
11	Octadecane	254.5	593-45-3	-	-	-	10.41±3.02			
12	2,6,10-Trimethyltetradecane	240.5	14905-56-7	-	-	-	5.09±3.50			
13	2,6,11,15-Tetramethylhexadecane	282.5	504-44-9	-	-	2.00±2.07	3.40±0.52			
14	11-n-Decyldocosane	450.9	55401-53-3	-	-	-	5.75±1.21			
15	pentatriacontane	492.95	630-07-9	-	-	-	2.16±1.09			
N-containing compound										
1	2-Methylazetidine	71.12	19812-49-8	0.13±0.00	0.16±0.03	-	-			
2	N-n-Butylbenzenesulfonamide	213.3	3622-84-2	0.67±0.31	-	-	-			
Benzenes										
1	ethenylbenzene	104.15	100-42-5	-	-	0.51±0.06	-		sweet balsam floral plastic	Luebke, William tgsc, (1981)

2	1,3-Di-tert-butylbenzene	190.32	1014-60-4	0.09±0.03	-	-	-		
3	2,4-Di-tert-butylanisole	220.35	17177-98-9	0.54±0.04	-	-	-		
Furans									
1	2-pentylfuran	138.21	3777-69-3	-	0.07±0.01	-	1.22±1.15	Fruity, green, earthy beany with vegetable like nuances	Mosciano, Gerard P&F 16, No. 2, 49, (1991)
Others									
1	2,4,5-trimethyl-1,3-oxazole	111.14	20662-84-4	-	-	-	0.51±0.09	nutty nut skin roasted wasabi shellfish mustard vegetable	Luebke, William tgsc, (2008)

(6) 효모첨가에 따른 평가

- 장류에 있어서 염은 미생물에 대한 식품 부패를 예방할 뿐만 아니라 식품의 발효를 조절하고 결국 텍스처와 향미 등에 영향을 미친다. 따라서 콩발효 제품의 저염화시 식품의 발효 양상이 변함에 따라서 향미 개선 및 식품의 품질 저하를 막기 위해서는 효모의 첨가가 필수적이다. 따라서 상기 내염성이 강한 효모 3종을 된장 제조에 앞서 각 발효물에 첨가하여 14일간 숙성하면서 특성을 살펴보았다. 그 결과 기간별로 pH가 증가되고 산도는 큰 차이를 보이지 않았다. 환원당과 아미노태 질소 함량은 기간별로 증가되는 경향을 보였으며, 균주별 차이는 보이지 않았다. 알콜 생성능을 평가한 결과 효모를 첨가하지 않은 처리구에 비하여 효모를 첨가한 처리구가 더 높은 생성능을 보여주었다. 특히 SRCM102595균주를 접종한 처리구에서 2.44%의 알콜생성능을 보여주었는데 일반적으로 부패 미생물은 알콜 2~3%농도에서 그 생육이 저하된다고 알려져 있어 품질저하를 막는데 있어 도움이 될 수 있을 것이라고 판단되어졌다.

Table 19. Quality characteristics of fermented products with selected *saccharomyces cerevisia*

Quality characteristics	Strain	Aging period (day)		
		0	7	14
pH	102487+104466 ¹⁾	5.02±0.12 ^{a2)}	5.14±0.21 ^a	5.24±0.32 ^a
	102487+104466+102595 ²⁾	5.10±0.24 ^a	5.24±0.02 ^a	5.43±0.31 ^a
	102487+104466+102569 ³⁾	5.12±0.25 ^a	5.34±0.10 ^a	5.51±0.10 ^a
Titratable acidity ¹⁾	102487+104466	1.42±0.21 ^a	1.49±0.25 ^a	1.56±1.52 ^a
	102487+104466+102595	1.40±1.23 ^a	1.45±2.14 ^a	1.49±0.50 ^a
	102487+104466+102569	1.48±2.21 ^a	1.50±1.24 ^a	1.55±1.01 ^a
Reducing sugar (%)	102487+104466	2.07±1.24 ^a	4.52±0.56 ^{ab}	6.69±0.16 ^b
	102487+104466+102595	2.10±1.52 ^a	5.24±2.42 ^a	7.49±1.40 ^a
	102487+104466+102569	2.08±1.66 ^a	5.32±1.51 ^a	7.95±0.42 ^a
Amino type nitrogen content (mg/100g)	102487+104466	452.24±0.21 ^a	475.05±0.24 ^a	480.05±0.12 ^a
	102487+104466+102595	461.05±0.05 ^a	478.42±0.02 ^a	485.45±0.43 ^a
	102487+104466+102569	459.42±0.44 ^a	471.05±0.12 ^a	487.02±0.25 ^a
Alcohol production (%)	102487+104466	0	0.42±0.02 ^a	1.02±0.24 ^b
	102487+104466+102595	0	0.65±0.12 ^a	2.44±0.45 ^a
	102487+104466+102569	0	0.54±0.05 ^a	1.75±0.81 ^{ab}

¹⁾Selected strains.

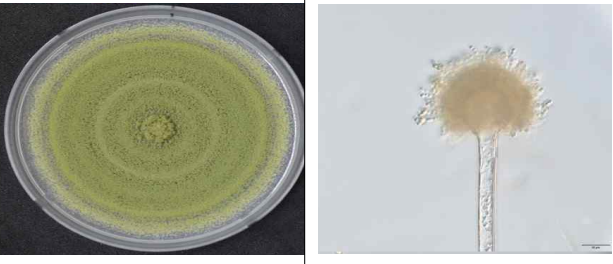
²⁾Value are mean ± SD (n=3).

³⁾Different small letters (a, b, c, etc.) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(7) 균주의 동정

- 최종 선발된 곰팡이에 대해 형태학적 특징을 분석하였으며, 유전학적 동정을 위해서 선정된 3종의 유전자서열 분석 결과를 이용하여 NCBI nucleotide BLAST search를 수행하였고, GenBank에 등록된 타 균주와의 상동성을 분석하였다. 이들의 염기서열을 바탕으로

phylogenetic tree 를 작성하기 위해 evolutionary distance 추론은 Maximum Likelihood method 를 사용하였고, bootstrap 분석 1,000회를 시행하여 계통수의 신뢰도를 확보하여 동정하였다. 선발된 균주는 한국미생물보존센터에 유전자원 등록을 하였으며 등록번호는 각각 *Aspergillus oryzae* (KCCM12804P), *Bacillus amyloliquefaciens*(KCCM12803P), *Saccharomyces cerevisia*(KCCM12802P)로 기탁되었다.

	정낭(μm)	32-38
	단균사(μm)	350-700
	분생자(μm)	3.0-5.0
형태학적 동정결과		

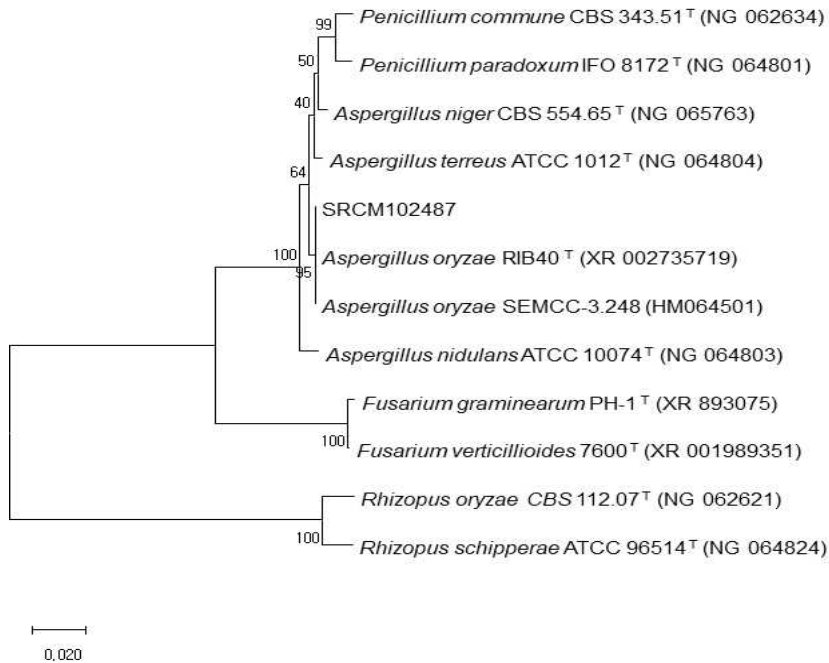


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequence of SRCM102487 and *Aspergillus* type strains. SRCM 102487 showed the phylogenetic position similar to *Aspergillus oryzae* type strains. GenBank accession numbers are given in parentheses. The branching pattern was generated by maximum likelihood method. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values are expressed as percentages of 1,000 replicates.

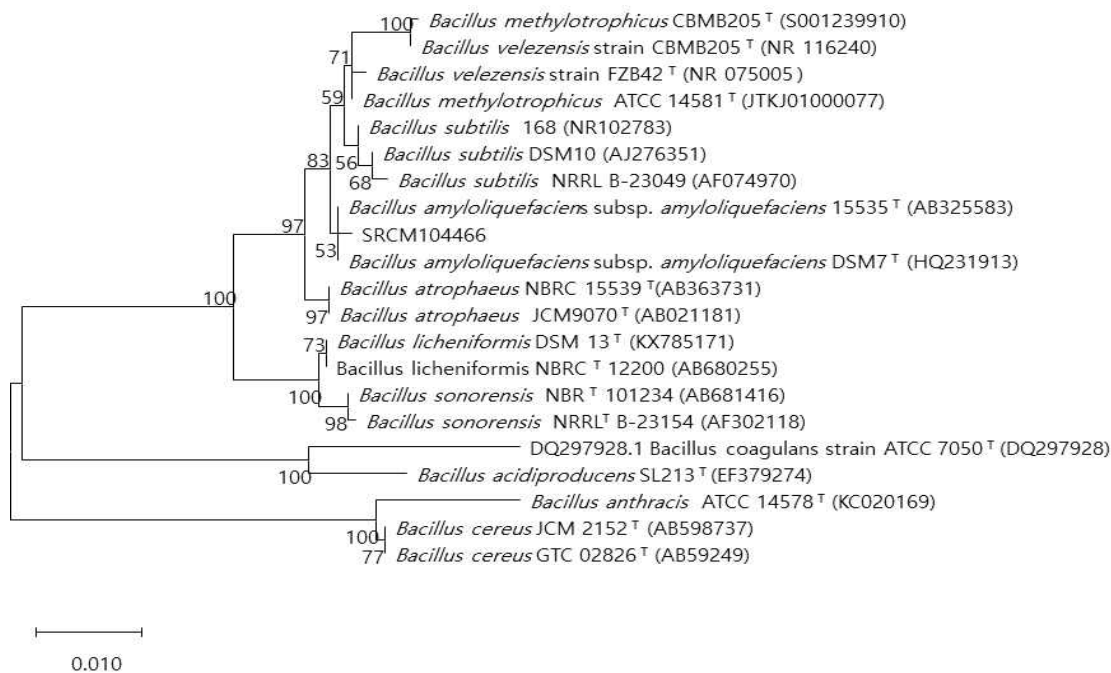


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of SRCM104466 and *Bacillus* type strains. SRCM 104466 showed the phylogenetic position similar to *B. amyloliquefaciens* type strains. GenBank accession numbers are given in parentheses. The branching pattern was generated by maximum likelihood method. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values are expressed as percentages of 1,000 replicates.

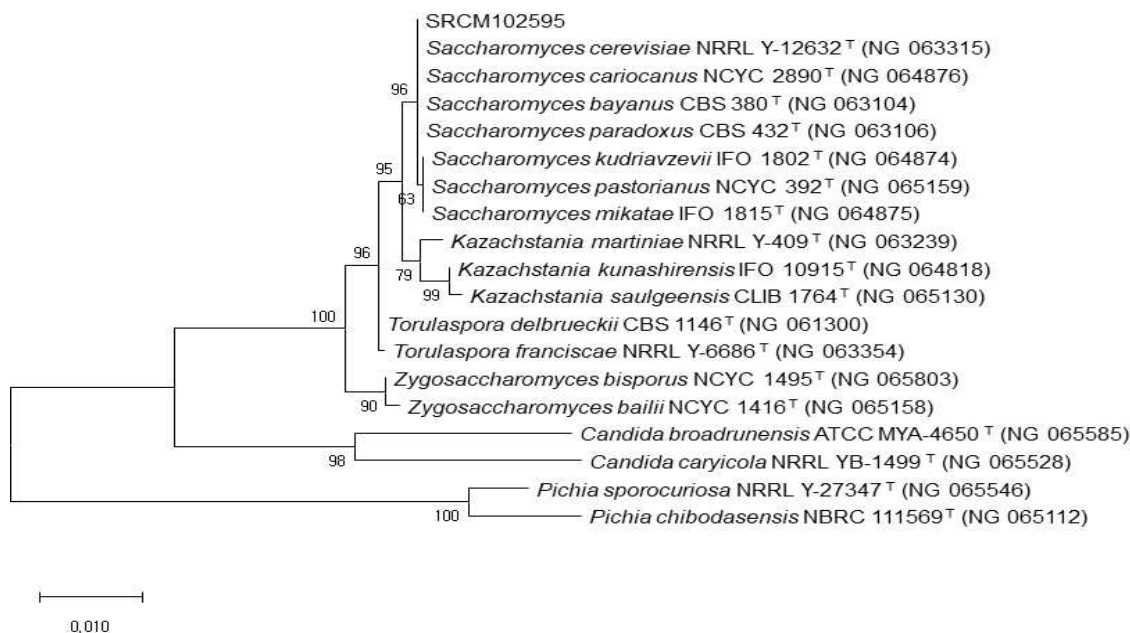


Fig. 3. Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequence of SRCM102595 and *Saccharomyces* type strains. SRCM102595 showed the phylogenetic position similar to *S. cerevisiae* type strains. GenBank accession numbers are given in parentheses. The branching pattern was generated by maximum likelihood method. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values are expressed as percentages of 1,000 replicates.

나) 된장의 제조

(1) 된장 배합비 확정

- 상기 제조된 각 쌀, 대두 발효물을 이용하여 저염된장으로 제조하고자 하였으며, 이의 배합비를 확정하고자 하였다. 각 발효물의 수분 및 염도를 고려하여 1:1로 배합하고 선발된 효모배양액을 첨가하여 30℃에서 7일간 숙성하고 관능평가를 실시하였다. 선정된 효모를 첨가한 된장에서 단맛, 쓴맛 등의 특성강도가 높은 것으로 나타났으며, 효모를 첨가하지 않는 된장에서 더 높은 선호도를 나타내었다. 효모 첨가를 통하여 품질저하 및 부패를 줄일 수 있는 장점도 있지만 기호도에서는 좋지 않은 반응을 나타내었다.

Table 20. Sensory characteristics of fermented products with selected *saccharomyces cerevisia*

No.	Sensory characteristics	효모무첨가	효모첨가
1	Sweet taste	3.69±0.63	4.08±0.38
2	Salt taste	2.76±0.62	2.35±0.77
3	Bitter taste	3.46±0.66	3.54±0.66
4	Umami taste	4.20±0.73 ^{*1)}	3.04±0.66
5	Overall preference	4.94±0.56 [*]	3.70±0.45

¹⁾Significant differences were compared with the control at *P<0.05 in the same row by Levene's t-test

(2) 저염된장의 제조 및 특성 분석

- 상기 대조구 발효물과 처리구 발효물을 이용한 각 된장 및 시판된장의 이화학적 특성항기성분, 묘사분석을 실시하였다.

(가) 저염된장의 이화학적 특성

- 상기 대조구 발효물과 처리구 발효물을 이용한 각 된장 및 시판된장(기존 주관기관 유아용 된장) 등 3가지 된장의 품질특성을 분석한 결과는 아래 표와 같다. pH는 시판된장이 가장 낮았으며, 산도는 가장 높은 값을 보여주었다. 염도는 시판된장이 11.25%로 가장 높았으며, 수분 함량 역시 가장 높은 함량을 나타내었다. 아미노산성 질소 함량은 선발된 균주를 이용한 된장이 가장 높은 함량을 나타내었다.

Table 21. Quality characteristics of three *Doenjang*

	Quality characteristics	Control	Sample	Commercial
1	pH	6.68±0.04 ^{1)a2)}	6.67±0.01 ^a	6.10±0.02 ^b
2	Titrateable acidity	0.33±0.01 ^b	0.34±0.00 ^b	0.54±0.00 ^a
3	Salt content (%)	8.95±0.07 ^b	9.05±0.07 ^b	11.25±0.07 ^a
4	Moisture content (%)	49.91±0.33 ^b	50.87±0.58 ^b	53.51±0.39 ^a
5	Amino type nitrogen content (mg/100g)	438.02±7.83 ^b	469.71±1.92 ^a	462.00±1.85 ^a

¹⁾Value are mean ± SD (n=3).

²⁾Different capital letters (a, b, c, etc.) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(나) 저염된장의 향미특성

① 저염된장의 유기산, 유리당

- 된장 3종의 유기산 및 유리당을 분석한 결과는 아래 표와 같다. 유기산은 된장의 풍미 형성에 영향을 주며, 적당량은 보존성에도 관여하는 중요한 성분으로 본 연구결과 4종의 유기산이 검출되었다. 선발된 균주를 이용한 된장은 유기산은 citric acid와 lactic acid의 함량이 높은 결과를 보였으며, citric acid와 lactic acid는 원료인 콩과 된장의 숙성과정 중 생육하는 내염성 젖산균의 작용에 의해 생성된 것으로 보고된 바 있는데(12), 본 연구에서는 선정된 균주인 고초균 및 황국균이 높은 효소활성으로 인해 원료 유래 lactate를 많이 생성된 것으로 판단되었다.
- 장류의 유리당은 메주의 각종 미생물에 의해 생성되는 효소가 전분질원인 찹쌀이나 멥쌀을 가수분해하여 단맛에 관여하는 유리당을 생성한 것으로(13) 발효조건 및 미생물이 서로 상이하면 균주에 따라 검출되는 당의 양 및 종류에 차이가 있다고 보고되고 있다(14). 본 연구결과 선정된 균주를 이용한 된장에서는 glucose가 가장 높은 함량을 보였으며, 각 된장별 유리당의 차이는 발효에 사용된 균주 및 제조방법의 차이에 의한 결과라고 판단되었다.

Table 22. Organic acid and free sugar contents of three *Doenjang*

		Control	Sample	Commercial
Organic acid	oxalic acid	632.00 ± 5.09 ^{1)a2)}	244.9 ± 3.63 ^b	119.15 ± 3.08 ^b
	citric acid	187.14 ± 4.94 ^b	515.50 ± 2.25 ^a	149.42 ± 4.31 ^c
	succinic acid	761.77 ± 5.06 ^a	425.88 ± 14.85 ^b	236.71 ± 8.43 ^c
	lactic acid	233.32 ± 14.06 ^c	516.95 ± 14.71 ^b	503.19 ± 12.01 ^a
Free sugar	maltose	427.55 ± 12.23 ^b	598.54 ± 1.04 ^a	15.04 ± 4.33 ^c
	glucose	2658.92 ± 43.06 ^b	3787.64 ± 6.93 ^a	173.25 ± 16.73 ^c
	fructose	454.07 ± 7.39 ^a	412.99 ± 6.63 ^b	333.14 ± 4.93 ^c

¹⁾Value are mean ± SD (n=3).

²⁾Different capital letters (A, B, C, etc.) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

② 저염된장의 유리아미노산

- 된장 3종의 유리아미노산 함량을 측정한 결과는 아래 표와 같다. 선정된 균주를 이용한 된장의 총 유리아미노산 함량이 4,030.41 mg%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그 다음은 시판, 대조구순의 결과를 나타내었다. 지미성분 강화를 위해서는 glutamic acid 분해를 유도하는 것이 좋고 쓴맛은 methionine, isoleucine, leucine 등의 유리아미노산과 peptide에 의해 주로 좌우되므로 맛의 조화면에서 적당한 고미를 유지할 필요가 있다. 본 연구결과 선정된 균주를 이용한 된장의 glutamic acid와 aspartic Acid 함량이 높은 결과를 나타내었으며, 쓴맛을 나타내는 methionine, isoleucine, leucine 은 2번째로 높은 결과를 나타내었다. 감미를 나타내는 Glycine, Alanine, Lysine은 선정된 균주를 이용한 된장이 높은 함량을 나타내었다.

Table 23. Free amino acid contents of three *Doenjang*

No.	Amino acids	Control	Sample	Commercial
1	Phosphoserine	55.71	65.36	52.28
2	Aspartic Acid	213.21	320.06	170.57
3	Threonine	82.99	130.70	104.56
4	Serine	78.45	83.82	67.05
5	Glutamic Acid	414.37	510.53	385.49
6	α -Aminoadipic Acid	42.26	45.48	36.38
7	Glycine	80.89	95.25	76.20
8	Alanine	255.21	339.78	271.83
9	Valine	175.99	236.03	188.82
10	Cystine	28.94	34.78	27.82
11	Methionine	126.67	161.38	129.10
12	Isoleucine	260.53	271.96	314.95
13	Leucine	286.97	304.54	380.68
14	Tyrosine	122.19	176.57	141.26
15	Phenylalanine	184.63	281.61	225.29
16	β -Alanine	61.96	52.93	42.34
17	β -Aminoisobutyric Acid	60.31	63.81	51.05
18	γ -Aminobutyric Acid	22.77	30.23	24.19
19	Tryptamine	34.18	36.61	29.29
20	Ethanol amine	15.67	16.44	13.15
21	Ammonia	77.01	86.67	77.34
22	Hyls	2.29	29.06	13.24
23	Ornithin	42.34	89.23	51.38
24	Histidine	231.33	276.43	221.15
25	Lysine	45.56	68.66	44.93
26	3-Methylhistidine	10.57	12.48	8.24
27	Arginine	129.93	210.01	168.01
	Total	3,142.93	4,030.41	3,316.59

③ 저염된장의 핵산관련물질

- 된장 3종의 핵산관련물질을 분석한 결과는 아래 표와 같다. 핵산관련물질은 aspartic acid, glutamic acid와 함께 umami taste를 증진시키는 효과가 있으며, kokumi의 맛을 내는데 중요한 역할을 한다. 본 연구결과 핵산관련물질은 선정된 균주를 이용한 된장이 Hypoxanthine, Inosine, IMP, AMP 순으로 높게 나타났는데, 이 결과는 상기 발효물의 분석결과와 유사한 결과를 보여주었다. AMP는 AMP deaminase에 의한 탈 아미노 반응을 거쳐 IMP로 분해되고, IMP는 시간이 지남에 따라 효소적 작용에 의해 inosine또는 hypoxanthine 분해되며, inosine 또한 최종

적으로 hypoxanthine으로 분해된다고 하였는데(15) 본 연구결과와 비슷한 양상을 나타내었다.

Table 24. Nucleotides related Compound contents in three *Doenjang*

No.	Nucleotides Related Compounds	Control	Sample	Commercial
1	IMP (mg/100g)	4.20±0.05 ^b	4.28±0.04 ^{ab}	4.34±0.02 ^a
2	Hypoxanthine (mg/100g)	16.31±0.26 ^c	21.41±0.30 ^a	19.19±0.18 ^b
3	AMP (mg/100g)	3.16±0.04 ^c	3.36±0.01 ^a	3.06±0.02 ^b
4	Inosine (mg/100g)	8.06±0.03 ^b	13.06±0.11 ^a	5.81±0.03 ^c

¹Value are mean ± SD (n=3).

²Different capital letters (a, b, c, etc.) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

④ 저염된장의 향기성분분석

- 쌀 발효물과 콩 발효물을 혼합하여 저염 혼합된장을 만들어 숙성 시킨 후 휘발성 성분 분석 결과를 아래 표에 나타내었고, 비교를 위해 시판된장과 대조구를 함께 분석하였다. 저염된장, 대조구 및 시판된장의 휘발성 성분을 분석한 결과, 총 77종의 화합물이 동정되었다. 이 중에서 알데히드류 8종, 에스테르류 34종, 탄화수소류 14종, 기타 화합물 21종이 동정되었다. 에스테르류는 식품의 좋은 향기성분에 기여하는 가장 바람직한 성분으로 알려져 있고, 숙성된 된장의 구수한 냄새에 기여한다고 보고되어 있다. 에스테르 화합물의 종류나 함량은 된장의 제조 방법에 따라 차이가 크고, 미생물상(microflora)의 차이에 중요한 역할을 한다고 많은 논문에서 보고되었고, 또한 향미특성 뿐만 아니라 낮은 역치를 가지고 있기 때문에 된장의 향미특성에서의 차이를 보인다. 향기 성분 분석 결과, 에스테르류 함량이 모든 된장에서 약 90% 이상을 차지하였다. 시판된장은 저염 혼합된장에 비해 유리지방산과 에탄올의 에스테르화로 인해 생성된 ethyl esters 화합물들이 대부분 동정되었다.
- Peng 등(7)에서는 알데히드류가 발효 중 지방 산화나 발효 중 분해산물로 생성되며 이러한 대사는 된장의 fruity, nutty, roasting 향에 기여한다고 보고하였다. 저염 혼합된장에서는 장미향을 가진 Nonanal, 과일향을 가진 hexanal이 대조구와 시판된장에 비해 많은 함량을 나타냈다. 방향족 aldehyde 중 구조가 가장 간단하고 아몬드와 유사한 향미 특성이 있으며 공기 중에서 쉽게 산화 되는 benzaldehyde는 모두 검출되었으며, 저염 혼합된장에서는 함량이 0.23%로 가장 높았다. 또한 특징적으로 저염 혼합된장에서 탄화수소류가 많이 검출되었다. Pentacosane, Octadecane 등의 화합물이 높은 함량을 나타내었다. 이 화합물은 당단백질과 같이 탄화수소류의 branch를 가진 고분자물질들의 분해산물로 추정되는데, 이는 콩 발효물에서 기인한 것으로 추정된다. 피라진류 중 trimethylpyrazine은 가열한 된장의 향기성분으로 알려져 있으며(16), 2, 5-dimethyl -pyrazine과 2, 3, 5-trimethylpyrazine는 감칠맛에 기여하는 향기성분으로 선정된 균주를 이용한 된장에서 검출된 것으로 나타났다.

- 김미나경민(17)에 따르면 2-ethyl furan, 1,2-dimethyl benzene, 2-pentyl furna 등을 된장의 구수한 향을 내는 향미물질로 정하여 된장 모델을 구축하였는데, 이는 전통된장과 가장 유사한 구수한 향을 나타내는 향미들 중의 하나로 본 연구결과에서 선정된 균주를 이용한 된장에서도 검출된 물질로 나타났다. 본 연구결과 3가지 된장의 향기성분을 분석하였을 때, 선정된 균주를 이용한 된장은 감칠맛 및 구수한 맛에 영향을 주는 향미물질 들의 다양한 검출로 인하여 선정된 균주는 장류 제조시 향미에 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단되었다. 하지만 후속 연구를 통하여 향미발현 메커니즘에 대한 심층적인 연구는 더 필요할 것으로 사료된다.

Table 25. Volatile flavor compound analysis of three *Doenjang* using Gas-Chromatography-Mass Spectrometry.

com poun ds	compounds	CAS no.	MW	Area %			odor description	Reference
				Sample	Contr ol	Com merci al		
Aldehydes								
1	3-methylbutanal	590-86-3	86.13	0.26± 0.15	0.13± 0.02	0.59 ±0.3 9	ethereal aldehydic chocolate peach fatty	
2	2-methylbutanal	96-17-3	86.13	-	-	0.25 ±0.1 2	musty cocoa coffee nutty	Luebke, William tgsc, (1986)
3	Hexanal	66-25-1	45.04	0.35± 0.43	0.09± 0.05	-	fresh green fatty aldehydic grass leafy fruity sweaty	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 6, 41, (1997)
4	Benzaldehyde	100-52-7	106.21	0.23± 0.10	0.05± 0.01	0.21 ±0.0 8	almond, fruity, powdery, nutty and benzaldehyde-like	Mosciano, Gerard P&F 19, No. 5, 79, (1994)
5	2-phenyl acetaldehyde	122-78-1	120.15	0.10± 0.06	0.05± 0.01 ^b	0.25 ±0.1 3	Honey, floral rose, sweet, powdery, fermented, chocolate with a slight earthy nuance	Mosciano, Gerard P&F 23, No. 5, 49, (1998)
6	Nonanal	124-19-6	142.24	0.49± 0.74	-	0.21 ±0.1 3	waxy aldehydic rose fresh orris orange peel fatty peely	Luebke, William tgsc, (1982)
7	2-phenylbut-2-enal	4411-89-6	146.19	-	-	0.60 ±0.3 9	Musty, floral, honey, powdery and cocoa	Mosciano, Gerard P&F 21, No. 5, 49, (1996)
8	5-methyl-2-phenylhex -2-enal	21834-92-4	188.26	-	-	0.52 ±0.0 9	Bitter cocoa, nutty, brown and green	Mosciano, Gerard P&F 23, No. 1, 33, (1998)
ketones								
1	3-hydroxybutan-2-one	513-86-0	88.10	-	0.09± 0.02	-	sweet buttery creamy dairy milky fatty	
2	Megastigmatrienone	13215-88-8	190.28	-	0.12± 0.02	0.39 ±0.2 3	sweet acorn nut skin tobacco spicy	Luebke, William tgsc, (2009)
Alcohols								
1	oct-1-en-3-ol	3391-86-4	128.21	-	0.04± 0.01	0.36 ±0.1 6	mushroom earthy green oily fungal raw chicken	Luebke, William tgsc, (1986)
Acids								
1	ethyl acetate	141-78-6	88.10	-	-	0.57 ±0.3	Etherial, fruity, sweet, grape and rum-like	Mosciano, Gerard P&F 19, No. 5, 79,

						7		(1994)
2	cis-5-Dodecenoic acid	2430 -94- 6	198.30	-	-	1.04 ±0.3 8		
ketones								
1	3-hydroxy butan-2-one	513- 86-0	88.10	-	0.09± 0.02	-	sweet buttery creamy dairy milky fatty	
2	Megastigmatrienone	1321 5-88 -8	190.28	-	0.12± 0.02	0.39 ±0.2 3	sweet acorn nut skin tobacco spicy	Luebke, William tgsc, (2009)
Esters								
1	ethyl 2-methylpropanoate	97-6 2-1	116.16	-	-	0.39 ±0.2 2	Sweet, ethereal and fruity with pungent, alcoholic, fusel and rummy nuances	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 2, 69, (1997)
2	ethyl butanoate	105- 54-4	116.16	-	-	1.70 ±1.0 5	Sweet, fruity, tutti frutti, lifting and diffusive	Mosciano, Gerard P&F 19, No. 4, 45, (1994)
3	ethyl 2-methylbutanoate	7452 -79- 1	130.18	-	-	0.84 ±0.4 4	Fruity, estry and berry with fresh tropical nuances	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 1, 57, (1997)
4	ethyl 3-methylbutanoate	108- 64-5	130.18	-	-	0.59 ±0.3 3	Sweet, diffusive, estry, fruity, sharp, pineapple, apple, green and orange	Mosciano, Gerard P&F 23, No. 2, 43, (1998)
5	ethyl 4-methylpentanoate	2541 5-67 -2	144.21	-	-	0.21 ±0.1 1	fruity	
6	ethyl 3-cyano-5-methylhex anoate	1812 89-1 7-8	183.25	-	-	0.15 ±0.0 8		
7	ethyl heptanoate	106- 30-9	158.24	-	-	0.25 ±0.1 4	fruity pineapple cognac rum wine	Luebke, William tgsc, (1983)
8	7-Octenoic acid ethyl ester	3519 4-38 -8	170.25	-	-	0.14 ±0.0 7		
9	ethyl benzoate	93-8 9-0	150.17				Sweet, wintergreen, fruity, medicinal, cherry, grape	Luebke, William tgsc, (1994)
10	methyl 2-hydroxybenzoate	119- 36-8	152.14	0.41± 0.41	0.11± 0.02	-	Sweet, salicylate, root beer, wintergreen, aromatic, slightly phenolic and camphoreous	Mosciano, Gerard P&F 20, No. 6, 49, (1995)
11	ethyl octanoate	106- 32-1	172.26	-	-	0.99 ±0.3 6	fruity wine waxy sweet apricot banana brandy pear	Luebke, William tgsc, (1986)
12	Benzeneacetic acid, ethyl ester	101- 97-3	164.20	-	-	0.72 ±0.3 2		
13	ethyl nonanoate	123- 29-5	186.29	-	-	0.31 ±0.1 9	fruity rose waxy rum wine natural tropical	Luebke, William tgsc, (1984)
14	ethyl 3-phenylpropanoate	2021 -28- 5	178.23	-	-	0.55 ±0.2 7	hyacinth rose honey fruity rum	Luebke, William tgsc, (1988)
15	ethyl decanoate	110- 38-3	200.32	-	-	0.42 ±0.0 6	sweet waxy fruity apple grape oily brandy	Luebke, William tgsc, (1987)
16	ethyl dodecanoate	106- 33-2	228.37	-	-	1.04 ±0.3 8	Sweet, waxy, soapy and rummy with a creamy, floral nuance	Mosciano, Gerard P&F 20, No. 4, 23, (1995)

17	ethyl tridecanoate	2826 7-29 -0	242.40	-	-	0.39 ±0.2 3			
18	Ethyl 3-hydroxydodecanoate	1836 13-1 5-2	244.37	-	-	0.16 ±0.1			
19	Ethyl 9-tetradecenoate	2488 0-50 -0	254.41	-	-	1.78 ±0.7 3			
20	methyl pentadecanoate	7132 -64- 1	256.42	0.95 ± 0.30	0.22 ± 0.01	-			
21	diethyl decanedioate	110- 40-7	258.35	-	-	0.28 ±0.0 5	mild melon fruity quince wine	Luebke, William tgsc, (1995)	
22	ethyl tetradecanoate	124- 06-1	256.42	-	0.24 ± 0.12	15.89 ±5.1 2	sweet waxy violet orris	Luebke, William tgsc, (1989)	
23	ethyl pentadecanoate	4111 4-00 -5	270.45	1.55 ± 0.38	-	33.71 ±8.3 4	honey sweet		
24	methyl hexadecanoate	112- 39-0	270.45	4.53 ± 0.57	1.44 ± 0.05	4.61 ±1.5 5	oily waxy fatty orris		
25	ethyl hexadecanoate	628- 97-7	284.48	9.20 ± 2.78	4.41 ± 0.35	11.79 ±5.0 8	Waxy, fruity, creamy and milky with a balsamic nuance	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 2, 69, (1997)	
26	Ethyl 9-hexadecenoate	5454 6-22 -4	282.46	-	-	13.98 ±4.2 7			
27	methyl (9Z,12Z)-octadeca-9,1 2-dienoate	112- 63-0	294.47	14.85 ±1.31	13.75 ±0.42	-	oily fatty woody		
28	methyl (Z)-octadec-6-enoate	2777 -58- 4	296.49	9.59 ± 1.11	-	-			
29	methyl (Z)-octadec-9-enoate	112- 62-9	296.49	-	13.18 ±0.14	-	mild fatty		
30	methyl octadecanoate	112- 61-8	298.51	4.64 ± 1.75	-	-	oily waxy		
31	Linoleic acid ethyl ester	544- 35-4	308.50	22.36 ±9.56	-	-	mild fatty fruity oily		
32	ethyl octadeca-9,12-dienoat e	7619 -08- 01	308.50	-	32.31 ±0.19	-	mild fatty fruity oily		
33	Ethyl elaidate	6114 -18- 7	310.50	21.28 ±4.14	27.68 ±0.34	-			
34	ethyl (Z)-octadec-9-enoate	111- 62-6	310.52	-	3.01 ± 0.06	-	atty oily dairy milky waxy tallow	Luebke, William tgsc, (2009)	
Phenols									
1	4-ethyl phenol	123- 07-9	122.16	-	-	0.18 ±0.0 6	Smoke, phenolic, creosote and savory	Mosciano, Gerard P&F 23, No. 3, 55, (1998)	
2	4-ethyl-2-methoxyphenol	2785 -89- 9	152.19	-	-	0.73 ±0.3 4	spicy smoky bacon phenolic clove	Luebke, William tgsc, (1996)	
3	4-ethenyl-2-methoxyphenol	7786 -61- 0	150.17	0.15 ± 0.04	0.20 ± 0.05	-	dry woody fresh amber cedar roasted peanut		
4	2,6-ditert-butyl-4-methylphenol	128- 37-0	220.35	-	-	0.16 ±0.0 6	mild phenolic camphor		
5	2,4-Di-tert-butylphenol	96-7 6-4	206.32	-	0.04 ± 0.01	-			

Pyrazines

1	2,5-dimethyl pyrazine	123-32-0	108.14	0.23 ± 0.12 ^{ad}	0.07 ± 0.01 ^a	-	Nutty, peanut, musty, earthy, powdery and slightly roasted with a cocoa powder nuance	Mosciano, Gerard P&F 21, No. 6, 49, (1996)
2	trimethylpyrazine	55138-71-1	162.24	0.40 ± 0.49	-	-		
3	2,3,5,6-tetramethyl pyrazine	1124-11-4	136.20	1.39 ± 0.31	0.34 ± 0.18	0.31 ± 0.19	Nutty, musty and vanilla with dry, brown cocoa nuances	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 2, 69, (1997)
4	2-ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine	17398-16-2	150.22	-	0.3 ± 0.06	-		
5	2-Isobutyl-3,5,6-trimethylpyrazine	46187-37-5	178.27	-	0.06 ± 0.01	-		

Hydrocarbons

1	hexamethylcyclotrisiloxane	541-05-9	222.46	0.36 ± 0.14	0.22 ± 0.04	0.47 ± 0.28		
2	decane	124-18-5	142.29	0.48 ± 0.69	-	-		
3	octamethyl cyclotetrasiloxane	556-67-2	296.62	0.46 ± 0.51	0.33 ± 0.23	-		
4	2,4,6-trimethyloctane	62016-37-9	156.31	0.08 ± 0.03	-	-		
5	3,3-Dimethyloctane	4110-44-5	142.28	0.08 ± 0.02	-	-		
6	Dodecane	112-40-3	170.34	0.18 ± 0.12	-	-		
7	2,6-Dimethyl undecane	17301-23-4	184.36	0.08 ± 0.02	-	-		
8	4,6-Dimethyldodecane	61141-72-8	198.39	0.23 ± 0.12	-	-		
9	4-ethenyl-2-methoxyphenol	7786-61-0	150.17	0.15 ± 0.04	0.20 ± 0.05	-	dry woody fresh amber cedar roasted peanut	
10	Tetradecane	629-59-4	198.39	0.12 ± 0.03	-	-	mild waxy	
11	Hexadecane	544-76-3	226.44	1.00 ± 0.17	0.05 ± 0.01	-		
12	Pentacosane	629-99-2	352.68	1.86 ± 0.52	-	-		
13	11-n-Decyldocosane	55401-55-3	450.90	1.14 ± 1.4	-	-		
14	Octadecane	593-45-3	254.50	1.23 ± 0.33	-	-		

N-containing compounds

1	N-n-Butylbenzenesulfonamide	3622-84-2	213.30	-	0.13 ± 0.06	-		
---	-----------------------------	-----------	--------	---	-------------	---	--	--

Benzenes

1	1,2-dimethyl benzene	95-47-6	106.16	0.12 ± 0.09	-	-		
2	1,3-Di-tert-butylbenzene	1014-60-4	190.32	0.21 ± 0.06	0.04 ± 0.01	-		

Furans

1	2-pentyl furan	3777-69-3	138.21	0.37 ± 0.27	0.10 ± 0.01	0.38 ± 0.17	Fruity, green, earthy beany with vegetable like nuances	Mosciano, Gerard P&F 16, No. 2, 49, (1991)
---	----------------	-----------	--------	-------------	-------------	-------------	---	--

(다) 저염된장의 묘사분석

① 된장 3종에 대한 향미특성

- 된장 3종에 대한 향미특성의 평가한 결과는 아래 표에서 확인할 수 있었다. 된장 시료에 대한 향미평가 결과, 시료간의 유의미한 향미특성의 차이를 확인하였다($p < 0.05$).

Table 26. 된장 3종에 대한 향미평가 결과

Attributes	대조구	혼합된장	시판된장	p-value
청국장	2.6 a	0.5 b	0.1 b	<0.0001
메주	2.4 a	2.9 a	1.0 b	<0.0001
액젓	1.4 a	1.5 a	1.3 a	0.76
간장짬내	1.1 b	0.5 c	1.8 a	<0.0001
콩가루	1.6 a	0.5 b	0.3 b	<0.0001
쌀가루	0.1 b	1.0 a	0.0 b	<0.0001
초콜릿	1.3 a	0.9 a	0.2 b	0.002
삶은 콩	0.8 a	0.9 a	0.0 b	0.000
버터크래커	0.0 b	2.4 a	0.0 b	<0.0001
치즈	0.0 b	0.7 a	0.0 b	<0.0001
알코올	0.0 b	0.0 b	2.2 a	<0.0001
과속포도	0.0 b	0.0 b	3.1 a	<0.0001
탄내	0.0 b	0.1 b	1.4 a	<0.0001
쇠향	0.0 b	0.1 b	1.3 a	<0.0001
단맛	1.7 a	1.8 a	1.2 b	0.006
짬맛	2.3 b	2.3 b	3.1 a	0.03
신맛	0.5 a	0.7 a	1.0 a	0.05
쓴맛	0.6 c	1.3 b	2.1 a	<0.0001
감칠맛	2.1 a	1.9 a	1.7 a	0.36

Means in a row that does not share same alphabetical letter represent significant differences at $\alpha=0.05$

㉠ “전통된장”의 특징적인 향미 : 메주, 액젓, 간장 짬내, 초콜릿 향미

- 전북대학교 연구팀에서 수행한 이전 연구에서는 전통적인 방식으로 만들어진 “전통된장”의 특징적인 향미로 “메주, 액젓, 간장짬내, 발사믹 식초 향미, 초콜릿” 향미 등이 나타난다고 보고한 바 있으며, 이러한 전통된장의 향미는 개량식 된장과 구분되는 특징으로 볼 수 있다(18). 본 연구에서 평가한 된장 3종에서도 메주, 액젓, 간장 짬내, 초콜릿 향미가 나타났으며, 시료간의 강도 차이가 나타났다($p < 0.05$)
- [메주 향미]의 경우, 모든 된장에서 1.0-2.9 수준의 강도로 나타났다. 대조구(2.4)와 혼합된장(2.9)의 경우 시판된장(1.0) 시료에 비해 메주향미가 강하게 나타나는 것으로 확인하였다($p < 0.0001$).

- [액젓향미]의 경우, 모든 시료에서 각각 1.4, 1.5, 1.3 수준으로 나타났고 시료간의 유의적인 차이는 보이지 않았다($p>0.05$).
- [간장 짙내]의 경우, 시판된장에서 1.8수준으로 평가되었으며, 이는 타 시료대비 높은 수준으로 나타났다. 대조구 된장에서는 간장짙내가 1.1, 혼합된장에서는 0.5 수준으로 비교적 낮은 수준의 간장짙내가 나타났으며 시료 간 강도의 차이는 통계적으로 유의미한 수준으로 나타났다($p<0.0001$).
- [초콜릿 향미]는 0.2-1.3의 범위 내에서 모든 시료에서 향미가 확인되었고 특히, 대조구(1.3)와 혼합된장(0.9) 대비 시판된장에서 0.2수준으로 낮은 특성을 보였다. 초콜릿 향미의 경우, 2-methyl butanal, 3-methyl butanal, 2-methyl propanal 등의 알데하이드기에서 유래한 향미로 보고되고 있으며(19), 된장뿐만 아니라 다른 발효식품(예로서 치즈, 와인 등)에서도 자주 나타나는 아미노산 발효산물에서 유래한 특징적인 향미로 보인다(20).

㉞ 된장의 주원료인 “콩” 과 관련된 향미특성 : 청국장, 콩가루, 삶은콩 향미

- 된장은 “콩” 발효식품이기 때문에 필연적으로 주원료인 “콩” 과 관련된 향미가 나타날 수밖에 없다. 콩과 관련 향미특성으로 청국장향미, 콩가루, 삶은 콩 향미를 향미용어로 도출하였다.
청국장 향미는 콩을 속성 발효시킨 청국장에서 나는 특유의 쿼퀴한 향미로, 메주의 쿼퀴한 향미와 구분되는 청국장만의 특유의 향미로 정의한다. 콩가루 향미의 경우 볶은콩을 가루로 내었을 때에 나는 특유의 고소한 향미로 정의하였고, 삶은 콩향미는 콩을 찢 후 나는 특유의 찢콩 냄새로 정의하였다.
- [청국장 향미]의 경우 대조구 시료에서 2.6으로 타 시료 대비(혼합된장; 0.5, 시판된장; 0.1) 높은 강도의 청국장 향미가 나타났으며 이는 통계적으로 유의미하게 높은 강도였다($p<0.0001$). 대조구 시료는 주관기관 균주를 이용한 저염된장으로 해당 균주를 이용하여 발효하였을 경우 타 시료대비 높은 강도의 청국장 향미는 된장의 발효균주에 따른 향미의 차이일 가능성이 있다.
- [콩가루 향미]의 경우, 대조구 시료에서 1.6수준으로 타 시료(혼합된장; 0.5, 시판된장;0.3) 대비 유의적으로 강하게 나타났다($p<0.0001$).
- [삶은 콩 향미]는 대조구와 혼합된장에서 각각 0.8, 0.9수준으로 나타났으며 시판된장에서는 나타나지 않았다.
- 콩가루 향미(roasted bean)와 삶은콩 향미(Nutty)는 이전 연구에서 전통된장에서 나타나는 특징적인 향미로 지목된 바 있다(18). 이러한 콩 관련 향미들은 아미노산 분해산물로 생성되는 Pyrazine 계열의 향미 화합물(예로서, tetra methyl pyrazine 등)에서 유래하는 것으로 보고되고 있다(21).

㉟ “쌀된장” 과 관련된 향미특성 : 쌀가루, 버터크래커

- 전북대학교 연구팀에서 수행한 쌀 코지에 대한 향미특성 분석 결과에서 쌀로 만든 코지의 특징적인 향미 중 하나로 “쌀가루 향미” 를 지목한 바 있다(22). 또한 후속 연구로 진행된 쌀된장에 대한 향미특성 분석 연구결과, 쌀된장의 특징적인 향미로 “버터 크래커” 가 지목된 바 있음(unpublihsed data). 이전 연구를 바탕으로 판단하였을 때에, 쌀가루, 버터크래커 향미는 쌀을 활용한 된장의 특징적인 향미일 것으로 보인다.
- [쌀가루 향미]의 경우, 혼합된장 시료에서만 1.0 수준으로 나타났으며 타 시료에서는 관련 향미

나타나지 않았다.

- [버터크래커 향미]의 경우도 혼합된장 시료에서만 2.4 수준으로 나타났으며, 타 시료에서는 관련향이 나타나지 않았다.
- 혼합된장 시료는 대조구 시료와 동일하게 쌀과 콩 발효물을 함유하고 있는 된장이나 혼합된장 시료는 선발된 균주를 이용하여 저염된장을 제조하였으며, 타 시료대비 높은 수준의 쌀가루, 버터 크래커 향미는 된장 발효에 관여하는 선발된 균주에서 나오는 발효산물에서 유래한 것일 가능성이 있다.

㉔ 그 외 향미 : 알코올, 과숙 포도, 탄내, 쇠향 등

- 위에서 언급된 향미 외에도 분류되지 않는 향미특성으로 알코올, 과숙포도, 탄내, 쇠향 등이 나타났다.
- [알코올 향미]의 경우, 이전 연구 결과들에서 개량식 된장에서 지속적으로 나타나고 있는 향미로, 개량식 된장의 제조 과정 중, 품질 유지를 위하여 첨가되는 에탄올에 의해 개량식 된장에서 높은 농도의 알코올 취가 특징적인 향미로 지목되고 있다(23, 24, 25).
- [과숙포도 향미]의 경우, 과숙성된 과일에서 나는 특유의 향미로 정의할 수 있으며, 특히 알코올과 유기산이 반응하여 ester화합물 등을 형성하면서 과숙성된 과일 향미로 나타나는 사례가 있으며, 연구팀의 이전 연구에서도 쌀 코지에서 숙성과정 중 발생하는 알코올로 인하여 생성되는 에스터 화합물로 과숙성된 바나나향미가 나타난 사례가 있었다(22).
- [알코올 향미]와 [과숙포도 향미]의 경우 모두 시판된장에서만 각각 2.2, 3.1 수준으로 나타났으며 다른 시료에서는 해당 향미가 나타나지 않았다. 알코올 향미와 과숙포도의 높은 상관관계를 바탕으로 판단하건데, 본 연구에서 나타난 “과숙포도 향미” 는 알코올과 유기산이 만나 반응한 에스터 화합물에서 유래한 것으로 보인다. 이에 대한 검증은 기기(GC-MS)를 활용한 향기성분 분석 등으로 확인해볼 필요가 있다. 이와 더불어 [탄내] 와 [쇠향]도 또한 시판된장의 특징적인 향미로 나타났으며 타 시료에서는 나타나지 않았다.

㉕ 기본맛

- 기본맛은 입안의 미각에 의해 감지되는 특성으로 크게 5가지 맛: 단맛, 짠맛, 신맛, 쓴맛, 감칠맛으로 나눌 수 있다. 5가지 기본 맛 성분 중 신맛을 제외한 모든 맛에서 시료 간 차이가 나타났다.
- [단맛]의 경우, 대조구와 혼합된장에서 각각 1.7, 1.8 수준으로 시판된장(1.2) 대비 유의적으로 강하게 평가되었다($p < 0.05$).
- [짠맛]의 경우 대조구 2.3, 혼합된장 2.3, 그리고 시판된장에서 3.1 수준으로 나타났다. 시판된장의 경우 “저염된장” 으로 판매되고 있는 제품이나, 실제로 사람이 평가하였을 시에는 시판된장의 짠맛이 타 시료대비 가장 높게 평가되었다($p < 0.05$). 시판된장과 타 시료의 실제 나트륨 함량과 본 연구에서 확인한 짠맛 강도를 비교해볼 필요가 있다.
- [신맛]의 경우 시료 간 강도 차이가 나타나지 않았으며, 신맛의 강도는 0.5-1.0 수준으로 평가되었다.
- [쓴맛]의 경우 시판된장에서 2.1 수준으로 가장 높게 평가되었으며, 혼합된장 1.3, 대조구에서 0.6 수준으로 나타났으며 이는 통계적으로 유의미한 수준이었다($p < 0.0001$).
- [감칠맛]의 경우 시료 간 강도 차이가 나타나지 않았으며, 감칠맛의 강도는 1.7-2.1 수준으로 평가되었다.

② 된장 3종의 시료별 향미특성

㉠ 대조구

- 대조구 시료는 향미 특성 전통된장 관련 속성(메주, 액젓, 초콜릿 향미) 및 콩과 관련된 속성(청국장, 콩가루, 삶은 콩 향미)가 강한 특징을 가지고 있다. 특히 대조구 시료는 주관기관 균주를 이용한 저염된장으로 해당 균주를 이용하여 발효하였을 경우 타 시료대비 높은 강도의 콩과 관련된 향미(청국장, 콩가루, 삶은콩 향미)는 된장의 발효균주에 따른 향미의 차이일 가능성이 있다.

㉡ 혼합된장

- 혼합된장 시료는 메주 향미가 가장 강하게 나타났고, 초콜릿, 삶은 콩 향미도 강하게 나타났으며, 쌀과 관련된 속성(쌀가루, 버터 크래커 향미)이 강하게 나타나는 특징을 가지고 보였다. 또한 기본 맛 중 단맛과 감칠맛이 강하게 느껴지는 것을 확인할 수 있었다. 혼합된장 시료는 선발된 균주를 이용하여 저염된장을 제조하였으며, 타 시료대비 높은 수준의 쌀가루, 버터 크래커 향미는 된장 발효에 관여하는 선발된 균주에서 나오는 발효산물에서 유래한 것일 가능성이 있다.

㉢ 시판된장

- 시판된장 시료는 향미 특성 중 알코올과 관련된 속성, 즉, 알코올 향미와 과숙포도향, 그리고 기타 탄내, 쇠향 등이 강하게 나타났으며 이는 시판된장만의 고유의 특징으로 볼 수 있다. 특히 시판된장은 “저염된장”으로 판매되고 있는 제품으로 소금함량이 줄면서 발효의 양상이 타 제품대비 다르게 진행되면서 발효과정 중 나타나는 산물에 변화가 생기면서 일반적인 된장의 향미와 다른 특성이 나타났을 가능성이 있다.
- 또한 시판된장은 저염된장으로 판매되고 있음에도 불구하고 전문가 패널이 평가한 짠맛의 강도는 타 시료대비 높게(3.1) 평가되었다.

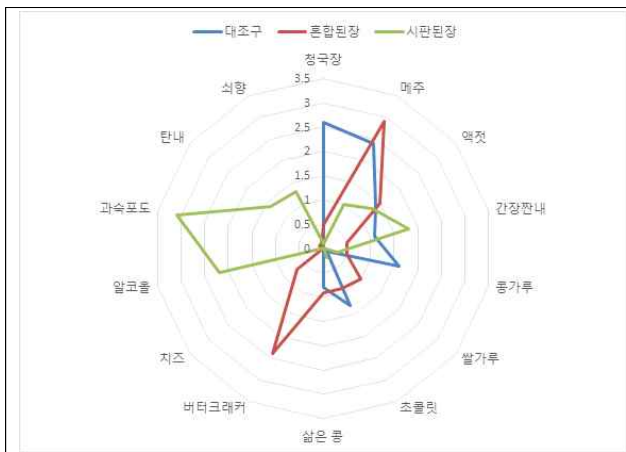


그림 1. 된장3종의 향미특성 강도의 비교

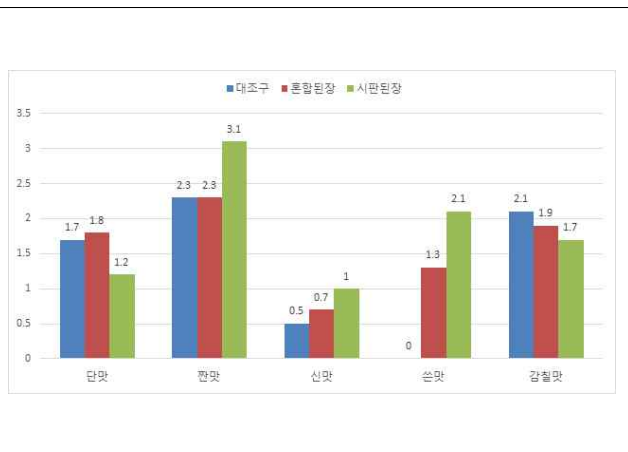


그림 2. 된장3종의 기본맛 강도의 비교

③ 결론

- 된장 3종의 향미특성을 평가하기 위하여 된장의 향미를 평가할 수 있는 용어 14종(청국장, 메주, 액젓, 간장 짠내, 콩가루, 쌀가루, 초콜릿, 삶은 콩, 버터크래커, 치즈, 알코올, 과숙 포도, 탄내, 쇠향 그리고 단맛, 짠맛, 신맛, 쓴맛, 감칠맛)을 도출하였다.

된장 향미평가 용어를 기반으로 된장 3종의 향미특성을 프로파일링한 결과 각 시료별 다음과 같은 특징이 나타났다.

㉓ 대조구

- 대조구 시료에는 전통된장 관련 속성(메주, 액젓, 초콜릿 향미) 및 콩과 관련된 속성(청국장, 콩가루, 삶은 콩 향미)가 강한 특징을 가지고 있었다. 특히 대조구 시료는 청국장이 함유되어 있어 원재료에서 유래한 청국장 향미와 콩과 관련된 속성이 강하게 나타났다.

㉔ 혼합된장

- 혼합된장 시료는 쌀과 관련된 속성(쌀가루, 버터 크래커 향미)이 강하게 나타나는 특징을 가지고 있었다. 특히 혼합된장 시료는 쌀과 콩 발효물을 함유하고 있어 쌀 발효물에서 유래한 쌀 관련 향미가 강하게 나타나는 것으로 보였다.

㉕ 시판된장

- 시판된장 시료는 향미 특성 중 알코올과 관련된 속성, 즉, 알코올 향미와 과숙포도향, 그리고 기타 탄내, 쇠향 등이 강하게 나타났으며 이는 시판된장만의 고유의 특징으로 볼 수 있다. 특히 시판된장은 “저염된장”으로 판매되고 있는 제품으로 소금함량이 줄면서 발효의 양상이 타 제품대비 다르게 진행되면서 발효과정 중 나타나는 산물에 변화가 생기면서 일반적인 된장의 향미와 다른 특성이 나타났을 가능성이 있다. 또한 시판된장은 저염된장으로 판매되고 있음에도 불구하고 전문가 패널이 평가한 짠맛의 강도는 타 시료대비 높게(3.1) 평가되었다.

- 된장 3종에 대한 묘사분석 결과 선정된 균주를 이용한 된장은 대조구와 비교했을 때 청국장 향미 및 콩의 향미는 낮았으나, 초콜릿 향미, 삶은 콩 향미 등이 시판된장과 비교하여 강하게 나타났으며, 단맛과 감칠맛이 강하게 느껴지는 것을 확인할 수 있었다. 특히 메주향미는 전통된장에서 느껴지는 특징적인 향미로 선정된 균주를 이용한 된장에서 가장 강하게 나타나는 결과를 보여주었다. 이를 통해 상기의 본 관능묘사분석 실험결과를 토대로 전통메주의 발효균주으로써 본 선별균주를 사용함으로써 전통풍미가 강화된 메주 및 한식된장, 한식간장의 판매가 가능할 것으로 판단되며 연매출 70억이 넘는 홈쇼핑 한식메주제품 시장에 순창메주제품을 적용하여 판매하기로 하였음.

(라) 된장의 생리활성

- 된장 3종의 생리활성을 분석한 결과는 표 과 같다. 먼저 ACE 효소는 angiotensin I의 C-말단 dipeptide (His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin II 로 전환시키는 것을 촉매하는 효소로 혈압을 상승시킴과 동시에 생체내에서 혈압 강하 작용을 갖는 bradykinin을 분해하는 작용으로 인해 생체내에서 고혈압을 일으키는 중요한 효소로 알려져 있다. 뿐만 아니라 지방산의 산화를 촉진시키고 과산화기를 증가시킴으로 동맥 경화의 위험을 높이는 것으로도 알려져 있다(26,

27). 된장 3종의 Angiotensin-converting enzyme(ACE) 활성은 62.41~67.20%를 나타내었다. 선별된 균주를 이용한 된장이 67.20(0.01 mg/mL)으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 그러나 양성대조구로 이용된 Captopril 0.25 mg/mL에 비해 농도대비 활성은 낮은 결과를 보여주었다.

- 된장 3종의 AGI 활성을 측정한 결과 각각 39.63%, 57.79%, 54.98%로 유의적인 차이를 나타내었다. 양성 대조구로 이용된 acarbose (2.5 mg/mL : 57.0%)에 비해 저염된장(100 mg/mL : 57.79%)의 농도 대비 활성은 낮았지만 대조구, 시판된장에 비하여 높은 활성을 나타내었다.
- 항산화활성 중 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 각각 38.77%, 55.55%, 26.87%로 유의적인 차이를 보였다. 양성 대조구로 이용된 ascorbic acid (62.5 µg/mL : 62.78%)에 비해 선별된 균주를 이용한 된장(50 mg/mL : 57.79%)은 농도 대비 활성은 낮았지만 대조구, 시판된장에 비하여 가장 높은 활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 각각 , 62.63%, 71.45%, 46.17%로 유의적인 차이를 보였다. 양성 대조구로 이용된 ascorbic acid (0.13 mg/mL : 74.95%)에 비해 저염 혼합된장(50 mg/mL : 71.45%)은 농도 대비 활성은 낮았지만 대조구, 시판된장에 비하여 가장 높은 활성을 나타내었다. 라디칼 측면에서 보면, DPPH는 주로 지용성 물질의 항산화능을 측정하는데 반해 ABTS는 수용성과 지용성 물질의 항산화능을 모두 측정할 수 있다 (28). 이를 고려하여, 라디칼 특성에 따라 같은 시료 농도라도 소거능 차이를 보인다고 사료된다. 본 연구결과 선정된 균주를 이용한 된장은 생리활성면에서도 우수한 결과를 보여 조미, 향미 뿐만 아닌 기능적으로도 우수한 것으로 사료되었다.

Table 2. Biological Activity in three *Doenjang*

No.	Biological Activity	Control	Sample	Commercial	Positive control
1	ACE inhibition(%)	65.22 ± 1.06 ^{1)ab2)}	67.20 ± 2.67 ^a	62.40 ± 1.94 ^b	57.29 ± 0.72 (Captopril 0.25 mg/mL)
2	AGI activity(%)	39.63 ± 0.87 ^c	57.79 ± 0.64 ^a	54.98 ± 0.38 ^b	57.30 ± 0.72 (Acarbose 2.5 mg/mL)
3	DPPH radical scavenging activity	38.77 ± 0.67 ^b	55.55 ± 1.62 ^a	26.87 ± 0.47 ^c	62.78 ± 0.09 (Ascorbic acid 0.06 mg/mL)
4	ABTS scavenging activity	62.63 ± 0.96 ^b	71.45 ± 0.99 ^a	46.17 ± 0.68 ^c	74.95 ± 4.72 (Ascorbic acid 0.13 mg/mL)

¹⁾Value are mean ± SD (n=3).

²⁾Different capital letters (a, b, c, etc.) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

3) 결론

- 발효식품으로부터 분리하여 보관중인 균주 중 황국균, 고초균, 효모의 특성 DB를 바탕으로 GRAS균주에 한해 각 10종(고초균, 황국균) 및 6종(효모)을 선발하였다. 황국균과 고초균은 전분 및 단백질 분해 효소활성을 기준으로 선발하였으며, 효모는 알콜생성능을 기준으로 선발하였다. 고초균은 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* 등 10종으로 효소활성이 2 cm 이상 및 바이오제닉 아민이 생성하지 않는 균주로 선발하였다. 황국균은 보관된 균주 중 아플라톡신을 생성하지 않는 균주를 기준으로 선발하였으며, 황국균 역시 효소활성이 높은 균주를 선발하였다. 효모는 알콜생성능이 10% 이상인 것으로 선발하고 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 균주로 선발하였다. 선발된 각 균주를 장류의 원료인 쌀과 대두에 발효하여 발효특성 등을 살펴본 결과 *A. oryzae* SRCM102487, *B. amyloliquefaciens* SRCM104466, *S. cerevisiae* SRCM102595가 선정되었다. 이 균주를 이용한 저염된장을 제조한 결과 유리아미노산(단맛, 감칠맛 등), 핵산관련물질 등의 함량이 다른 된장에 비하여 높은 함량을 보여주었으며, 생리활성에서도 다른 2종 된장에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 선정된 균주를 이용한 된장의 묘사분석결과 대조구에 비하여 삶은 콩, 청국장 향미는 낮게 나타났으나 초콜릿 향미, 삶은 콩 향미 등이 시판된장과 비교하여 강하게 나타났으며, 단맛과 감칠맛이 강하게 느껴지는 것을 확인할 수 있었다. 특히 메주향미는 전통 된장에서 느껴지는 특징적인 향미로 선정된 균주를 이용한 된장에서 가장 강하게 나타나는 결과를 보여주었다. 본 연구결과 선정된 균주는 장류를 제조함에 있어 감칠맛 및 구수한 맛에 영향을 주는 아미노산 및 향미물질들로 인하여 장류 제조 시 조미, 향미에 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단되었다.

4) 참고문헌

1. Tamura K. and Nei M(1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512-526.].
2. Kumar S., Stecher G., and Tamura K(2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.].
3. Drake M.A., Civille G.V(2002). Flavor Lexicons. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 33-40
4. Jo, Y., & Kim, M. K(2020). Influences of appearance characteristics on consumer acceptance and perception of “gu-soo” in fermented soybean paste (doenjang). *Journal of Sensory Studies*, 35(5), e12597.
5. 장재희(1995). 재래식 조선간장의 무기질 및 질소화합물과 관능특성에 관한 연구
6. 김미정 & 이해수(1990). 된장 숙성중 정미성분의 변화에 관한 연구 (1)-유리아미노산과 핵산관련물질. *한국식품조리과학회지*, 6(4), 1-8.
7. Peng X, Li X, Shi X, Guo S(2014) Evaluation of the aroma quality of Chinese traditional soy paste during storage based on principal component analysis. *Food Chem* 151: 532-538.
8. 정은정, 조우진, 차용준 (2008). 가열조리한 오만둥이된장찌개의 휘발성 향기성분. *생명과학*

회지, 18(11), 1570-1577

9. Park JS, Lee MY, Kim KS, Lee TS(1994). Volatile flavor components of soybean paste (doenjang) prepared from different types of strains. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 255-260
10. Fors S.(1983) Sensory properties of volatile Maillard reaction products and related compounds: A literature review. The Maillard Reaction in Foods and Nutrition. 185-286.
11. Ku KL, Chen TP, Chiou RY(2000) Apparatus used for small-scale volatile extraction from ethanol-supplemented low-salt miso and GCMS characterization of the extracted flavors. J. Agr. Food Chem. 48: 3507-3511
12. An HS, Bae JS, Lee TS (1987). Comparison of free amino acids, sugars, and organic acids in soy bean paste prepared with various organisms. J Korean Agric Chem Sci 30:345-350
13. Park JS, Lee MY, Lee TS (1995) Compositions of sugars and fatty acids in soy bean paste prepared with different microbial sources. Korean J Food Sci Technol 24: 917-924)
14. (Kim DH, Kim SH (1999) Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Mucor* and *Rhizopus* strains. Korean J Food Sci Technol 31: 176-182).
15. Pyun JW, Hwang IK (1988). Study on free amino acids (glutamic acid) and nucleotide relating substances of various foods. *Korean J Soc Food Sci* 4-1:33-40)
16. Lee & Ahn (2008) Thermal changes of aroma components in soybean paste (doenjang). Korean J Food Sci Technol 40:271-276
17. 김미나경민 (2017). 전통 된장의 맛 구현을 위한 분자관능학 기반 향미분석의 신기술 연구. 한국연구재단
18. Lee, J.H., Jeong, D.W., Kim, M.K. (2019). Influence of bacterial starter cultures on the sensory characteristics of *doenjang*, a fermented soybean paste and their impact on consumer hedonic perception. Journal of Sensory Studies, e12508
19. Counet, C., Callemien, D., Ouwerx, C., Collin, S. (2002). Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. comparison of samples before and after conching. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(8): 2385-2391
20. Smit, B.A., Engels, W.J.M., Smit, G. (2009) Branched chain aldehydes: Production and breakdown pathway and relevance for flavour in foods. Applied microbiology and Biotechnology, 81: 987-999.
21. Jo, Y.J., Cho, I.H., Song, C.K., Shin, H.W., Kim, Y.S. (2011). Comparison of fermented soybean paste (*Doenjang*) prepared by different methods based on profiling of volatile compounds. Journal of Food Science, 76(3): C368-379.
22. Hong, H.H., Kim, M.K. (2020). Physiochemical quality and sensory characteristics of koji made with soybean, rice, and wheat for commercial *doenjang* production. Foods, 9, 975.
23. Kim, H. G., Hong, J. H., Song, C. K., Shin, H. W., & Kim, K. O. (2010). Sensory characteristics and consumer acceptability of fermented soybean paste (*Doenjang*). Journal of food science, 75(7), S375-S383.
24. Kim, M.K., Kwak, H.S., Kim, M.J., & Kim, S.S. (2018). Identification of sensory characteristics that drive consumer preferences of commercially mass-produced *doenjang* in

Korea. Journal of Sensory Studies, 33, e12323

25. Kwak, H.S., Jung, H.Y., Kim, M.J., & Kim, S.S. (2017). Differences in consumer perception of Korean traditional soybean paste (*doenjang*) between younger and older consumers by blind and informed tests. Journal of Sensory Studies, 32, e12302

26. Kim, S.H, Lee, Y.J, Kwon, D.Y.(1999) Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from Doenjang. Korean J. Food Sci. Technol. 31(3), 848-854

27. Rhee, C.H, Lee, J.B, Jang, S.M.(2000) Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the traditional Doenjang with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 43(4), 277-284

28. Baltrušaitytė, V., P. R. Venskutonis and V. Čeksterytė. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. Food Chem. 101: 502-514.

협동연구기관2 [경상대학교] : 발효조건(균, 발효공정)에 따른 발효식품의 대사체 분석 및 기능성 펩타이드 발굴

1) 기능성 펩타이드 분리 및 동정

- Sephadex G-15 resin과 HPLC를 이용하여 ACE 저해활성을 나타내는 펩타이드를 분리.
- UPLC Q-TOF-MS/MS를 이용하여 기능성 펩타이드 동정.
- 분리된 펩타이드의 ACE 저해활성 평가.

가) 쌀 발효물과 콩발효물의 ACE 저해활성 측정

- 발효미생물산업진흥원에서 제공받은 발효 전 후의 쌀과 콩발효물 총 12종 샘플의 ACE 저해활성을 측정하였으며, 그림 1에 나타내었음.
- 쌀발효물의 ACE 저해 활성은 발효 전 23.2~26.1%로 낮았지만, 6일 발효 후 34.6~45.0%로 증가하였음.
- 콩발효물의 ACE 저해활성은 발효여부와 관계없이 85.3% 이상으로 매우 높게 나타남.
- 발효물에서 높은 ACE저해활성이 나타나는 것으로 보아 펩타이드가 ACE 저해 활성을 보이는 것으로 추정되었음.

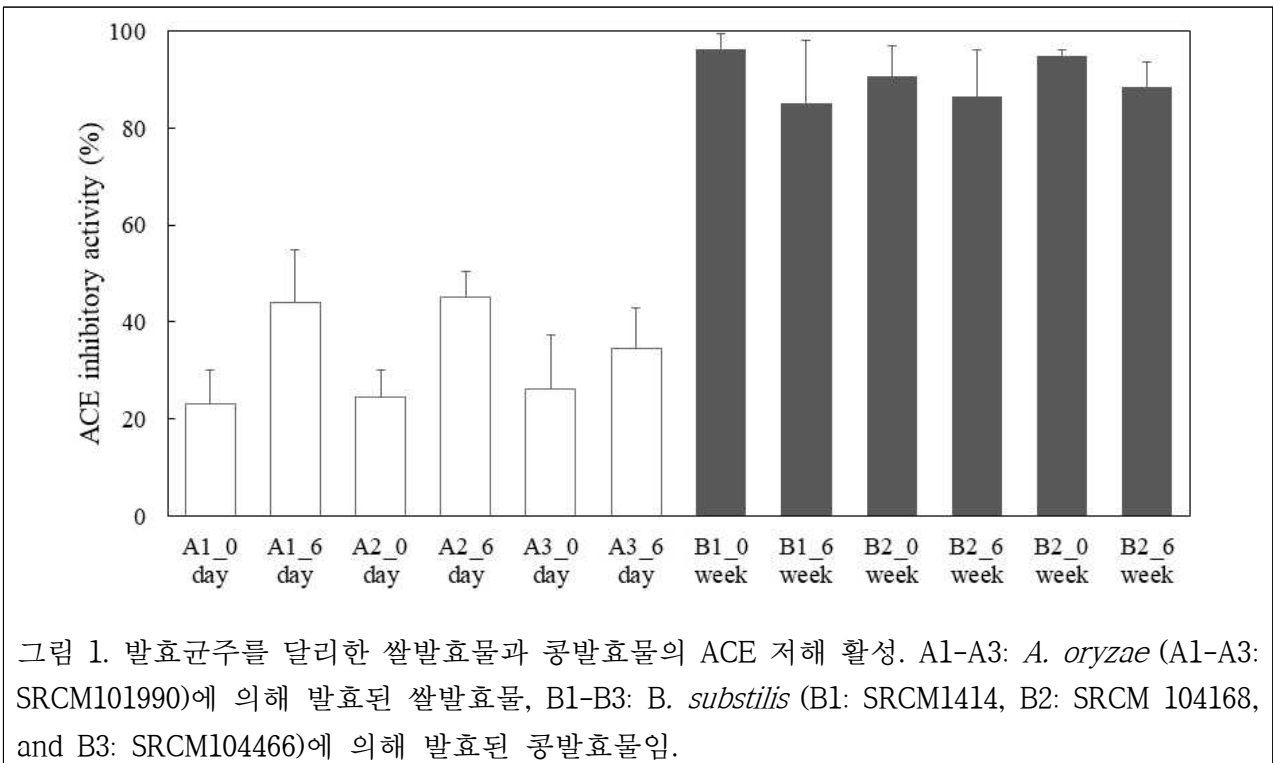


그림 1. 발효균주를 달리한 쌀발효물과 콩발효물의 ACE 저해 활성. A1-A3: *A. oryzae* (A1-A3: SRCM101990)에 의해 발효된 쌀발효물, B1-B3: *B. subtilis* (B1: SRCM1414, B2: SRCM 104168, and B3: SRCM104466)에 의해 발효된 콩발효물임.

나) Sephadex G-15 gel filtration chromatography를 이용한 ACE 저해 물질 분리

- 발효미생물산업진흥원에서 2차로 제공받은 5종의 샘플(쌀발효물(발효0일), 쌀발효물(발효 6일), 콩발효물(발효0주), 콩발효물(발효3주), 발효혼합물(쌀발효물 6일+ 콩발효물 3주) 중 발효혼합물 열수추출물을 Sephadex G-15 resin column을 이용하여 1차로 분리하였음.
- 그림 2a와 2b는 발효혼합물 열수추출물을 Sephadex G-15 resin column을 이용하여 분리한 분획물들을 220 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 나타낸 크로마토그램이며, 크로마토그램 중 6개의 peak를 선택한 뒤 해당 분획물의 ACE 저해활성을 측정하였음.
- 그림 2c는 6개의 분획물에 대한 ACE저해활성을 나타내었으며, 2번(F2)과 3번(F3) 분획물에서 $52.9 \pm 3.4\%$ 와 $54.8 \pm 2.2\%$ 의 높은 ACE 저해활성을 나타내었음.

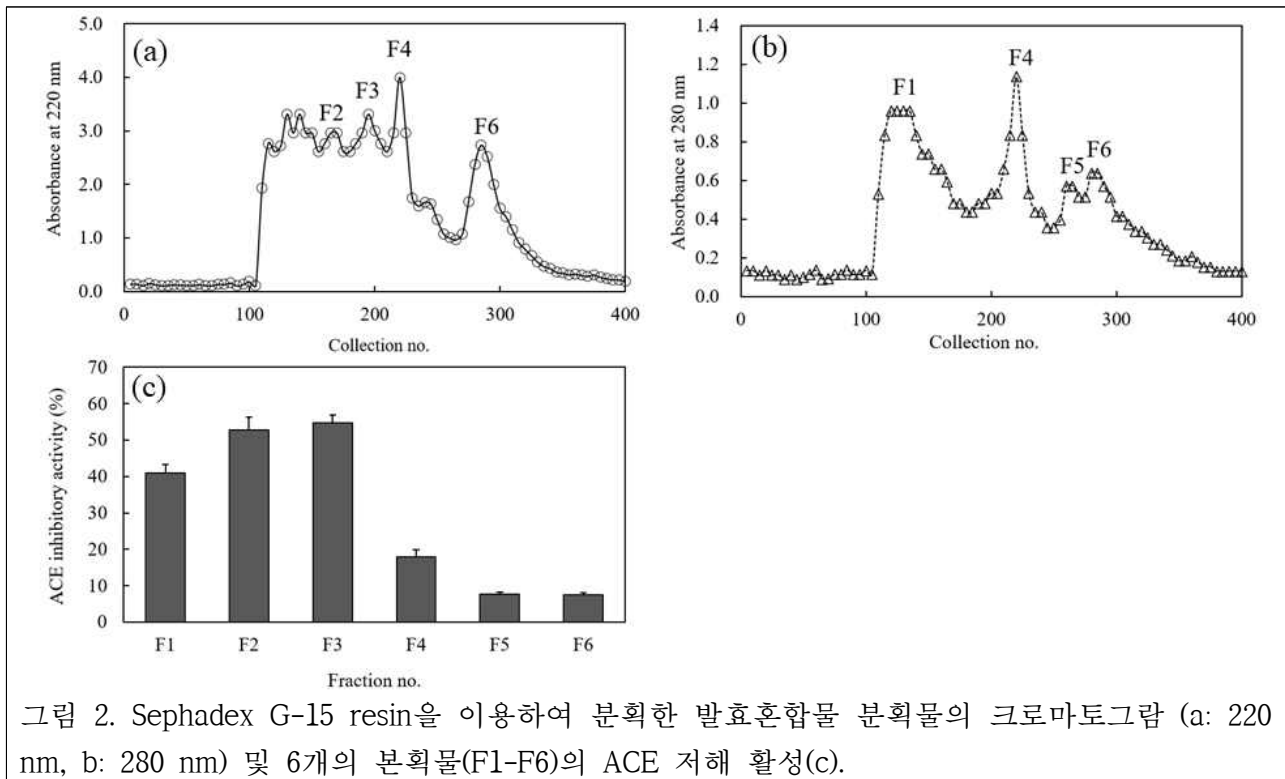


그림 2. Sephadex G-15 resin을 이용하여 분획한 발효혼합물 분획물의 크로마토그램 (a: 220 nm, b: 280 nm) 및 6개의 분획물(F1-F6)의 ACE 저해 활성(c).

다) HPLC를 이용한 ACE 저해 물질 분리

- Sephadex G-15 분획물 중 ACE 저해활성이 가장 높았던 분획물 F3를 HPLC를 이용하여 분리하였음.
- 컬럼은 Triart Diol-HILIC column(250×4.6 mm, 5 μm)을 이용하였으며 크로마토그램은 그림 3a에 나타내었음.
- 크로마토그램에 나타난 peak 중 7개의 peak를 선택하여 분획하였으며, 분획된 7종의 peak에 대한 ACE 저해활성을 측정하였으며, 그림 3b에 나타내었음.
- 7개의 peak에 대한 ACE 저해활성을 측정한 결과, 6번 peak에서 $67.1 \pm 3.1\%$ 로 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내었음.

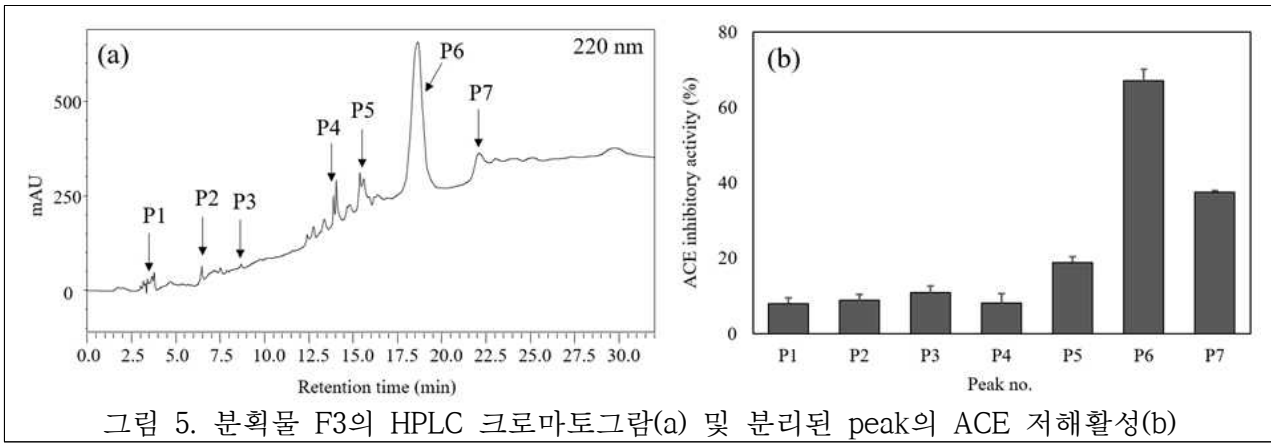


그림 5. 분획물 F3의 HPLC 크로마토그램(a) 및 분리된 peak의 ACE 저해활성(b)

라) UPLC Q-TOF-MS/MS를 이용한 ACE 저해 펩타이드의 동정 및 분리된 펩타이드의 ACE 저해활성 평가

- HPLC를 통해 분리된 P6을 UPLC-Q-TOF-MS/MS(Xevo G2-S, Waters)를 이용하여 성분동정을 진행하였음.
- MS/MS를 통하여 peptide sequencing을 진행하였고(그림 6), glutamine과 glycine 그리고 asparagine으로 구성된 peptide(Gln-Gly-Asn)가 관찰되었으며, m/z(M+H)는 318.14였음.
- 분리·동정된 펩타이드를 동결건조한 후 ACE 저해활성을 측정하였으며, IC₅₀은 167.41±3.65 μM로 나타남.

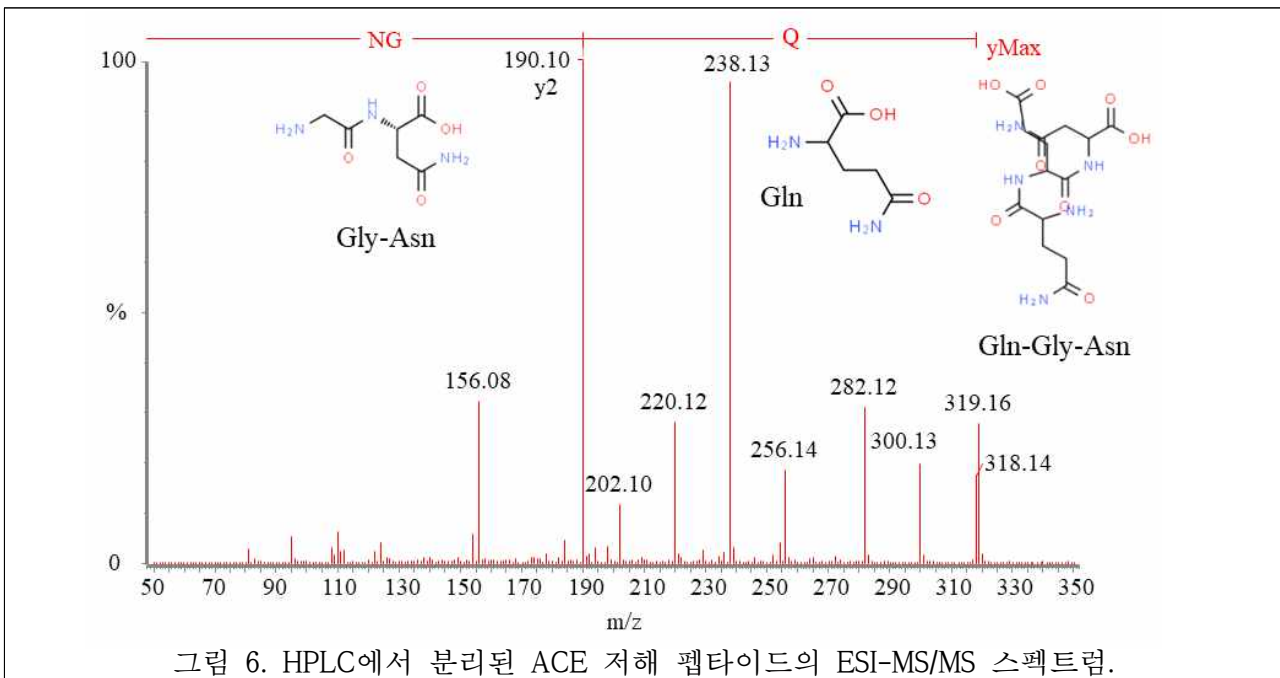


그림 6. HPLC에서 분리된 ACE 저해 펩타이드의 ESI-MS/MS 스펙트럼.

표 1. 분리·동정된 펩타이드의 ACE 저해 활성

	ACE inhibitory activity (IC ₅₀ , μM)
Gln-Gly-Asn	167.41±3.65
Captopril (positive control)	0.04±0.00

2) 발효식품의 대사체 분석 및 다변량 통계분석

가) 실험재료 및 장비

- 발효미생물산업진흥원에서 5종 및 농업회사법인순창장류(주)에서 2종의 샘플을 제공받음.
- UPLC-Q-TOF-MS/MS(Xevo G2-S, Waters)와 GC-MS-TQ 8030 MS(Shimadzu) 2가지 장비를 활용하여 대사체 분석을 진행하였음.
- 다변량 통계분석은 SIMCA-P* (ver. 12.0.1, Umetrics)프로그램을 이용하여 분석하였음.

나) 발효미생물산업진흥원 5종 샘플의 대한 색차 측정

- 그림 7은 발효미생물산업진흥원에서 제공받은 5종 샘플(쌀 발효물(발효0일), 쌀 발효물(발효 6일), 콩 발효물(발효 0주), 콩 발효물(발효 3주), 발효혼합물)의 동결건조 후 사진이며 에서 육안으로 색의 차이가 뚜렷하게 비교되어 색차를 측정하였음(표2).
- 색차 측정 결과, 모든 샘플에서 발효 후 명도(L*)가 감소하고, 적-녹도(a*)와 황-청도(b*)값은 증가하였음.
- 또한 쌀발효물과 콩발효물을 혼합(발효혼합물, A2B2)한 경우에도 명도(L*)가 감소하고, 적-녹도(a*)와 황-청도(b*)값은 증가하는 경향이 나타남.
- 위 색차값을 토대로 하여 갈변도(browning index, BI)값을 계산하였으며, 발효가 진행될수록, 그리고 발효물을 혼합하였을 때 갈변이 더욱 진행된 BI값이 증가함
- BI값의 증가는 발효과정 중 그리고 발효물을 혼합하였을 시 Maillard reaction 등의 갈변반응이 발생하였다는 것을 의미하며, 향후 갈변반응 생성물이 발효식품의 풍미에 영향을 조사할 계획임.

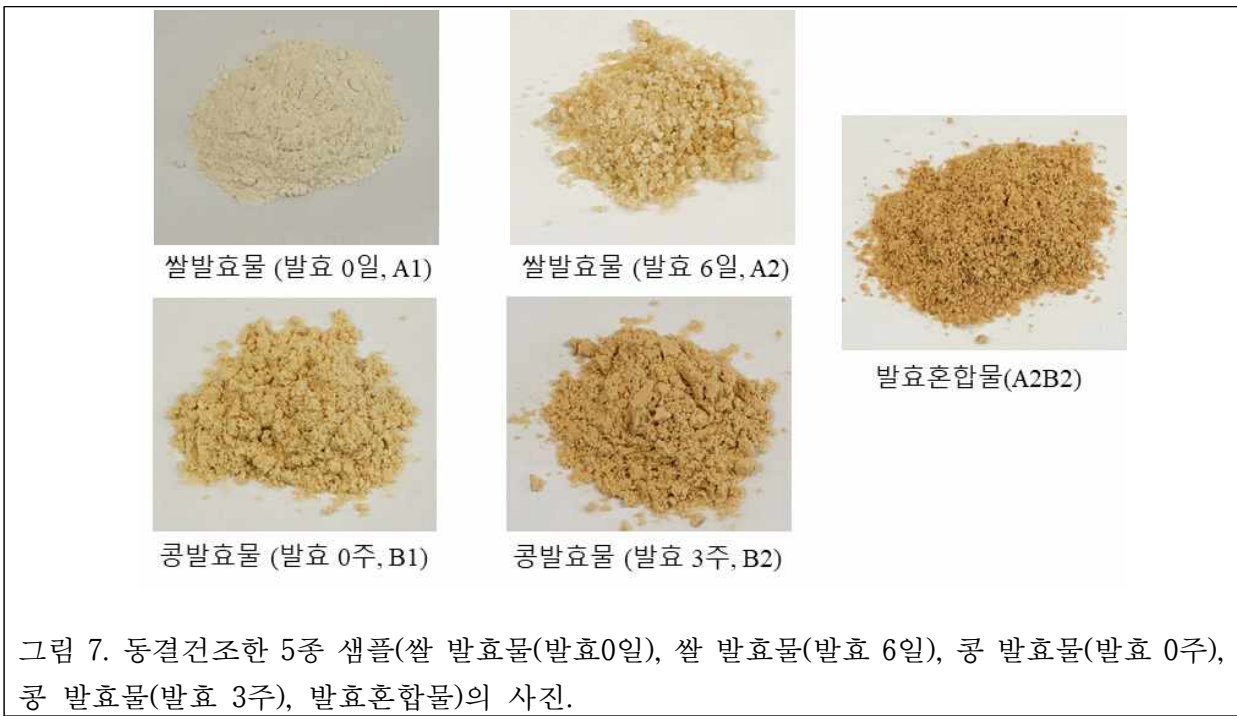


표 2. 5종 샘플(쌀 발효물(발효0일), 쌀 발효물(발효 6일), 콩 발효물(발효 0주), 콩 발효물(발효 3주), 발효혼합물)에 대한 색차 값(L^* , a^* , b^*) 및 갈변도(browning index, BI).

	L^*	a^*	b^*	ΔE^1	BI ²⁾
A1	89.16 ± 0.12 ^a	0.17 ± 0.01 ^d	9.24 ± 0.08 ^e		10.82 ± 0.11 ^e
A2	69.66 ± 0.78 ^d	1.62 ± 0.07 ^c	18.33 ± 0.25 ^d	21.56 ± 0.64 ^b	31.60 ± 0.44 ^d
B1	80.82 ± 0.26 ^b	1.64 ± 0.03 ^c	20.47 ± 0.22 ^c	14.06 ± 0.33 ^d	30.06 ± 0.49 ^c
B2	77.10 ± 0.39 ^c	3.30 ± 0.10 ^b	22.09 ± 0.07 ^b	17.89 ± 0.33 ^c	35.22 ± 0.44 ^b
A2B2	64.81 ± 0.38 ^e	6.27 ± 0.07 ^a	23.35 ± 0.32 ^a	24.78 ± 0.16 ^a	50.93 ± 0.46 ^a

Data are given as mean ± standard deviation (n=3).

A1 and A2: fermented rice after fermentation for 0 and 6 days, respectively. B1 and B2: fermented soybean after fermentation for 0 and 3 weeks, respectively. A2B2: A2+B2.

$$^1\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2}$$

$$^2BI = (100 - (x - 0.31))/0.17, \text{ where } x = ((a^* + 1.75L^*) / (5.645L^* + a^* - 3.012b^*))$$

다) 발효미생물산업진흥원 5종 샘플에 대한 대사체 및 다변량 통계분석

(1) 발효미생물산업진흥원 5종 샘플의 다변량 통계분석 결과

- 발효미생물산업진흥원에서 5종 샘플 (쌀 발효물(발효0일), 쌀 발효물(발효 6일), 콩 발효물(발효 0주), 콩 발효물(발효 3주), 발효혼합물)에 대한 대사체분석을 LC-MS와 GC-MS를 이용하여 진행하였고, 샘플간의 차이를 PLS-DA로 시각화함(그림 7).
- PLS-DA plot결과 쌀, 된장 발효물들의 발효 전과 후 그리고 혼합 발효물간의 대사체 조성에 차이가 있음을 확인함.

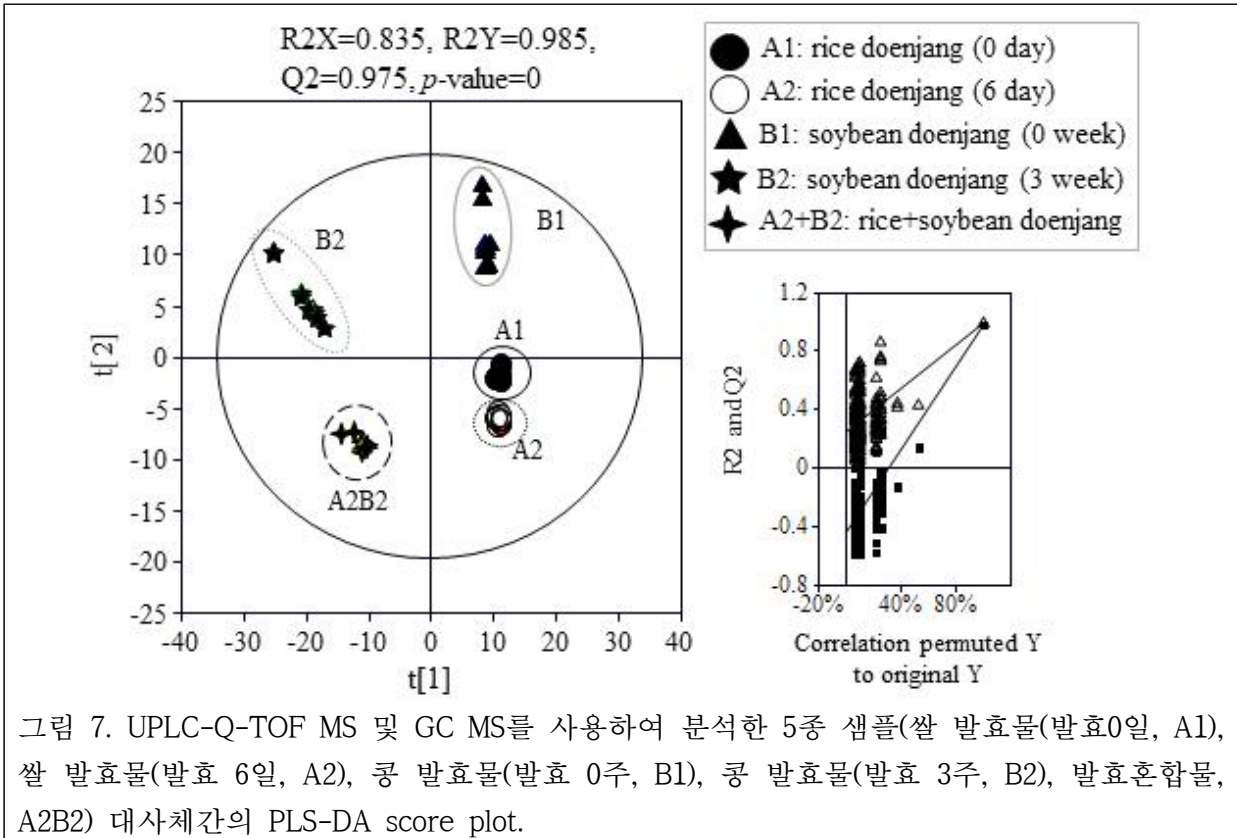


그림 7. UPLC-Q-TOF MS 및 GC MS를 사용하여 분석한 5종 샘플(쌀 발효물(발효0일, A1), 쌀 발효물(발효 6일, A2), 콩 발효물(발효 0주, B1), 콩 발효물(발효 3주, B2), 발효혼합물, A2B2) 대사체간의 PLS-DA score plot.

(2) 발효미생물산업진흥원 5종 샘플의 주요 대사체 동정 결과

- 다변량 통계분석 결과를 기반으로 샘플간의 차이를 나타내는 주요 대사체를 동정하였음(표 3, 표 4).
- 표 3은 UPLC-Q-TOF-MS분석 상에 나타난 주요 대사체를 동정한 결과이며, 아미노산(arginine 외 3종), 당(glucose), 펩타이드(Val-Glu 외 11종), isoflavone(daidzin 외 8종), saponin(soyasaponin Bb 외 3종), LPC 계열 등이 확인되었음.
- 특히, 갈변반응인 Maillard reaction 생성물로 추정되는 fructosyl valine과 fructosyl phenylalanine이 확인되었음.

표 3. UPLC-Q-TOF-MS 분석으로 검출된 5종 샘플 중 주요 대사체

RT	Identified compounds	VIP ¹⁾	<i>p</i> -value ²⁾
0.67	Arginine	1.43	6.15E-21
0.69	Glucose	1.05	2.94E-25
1.06	Fuctosyl valine	1.92	2.19E-10
1.08	Hypoxanthine	1.23	1.42E-11
1.40	Tyrosine	1.05	1.75E-25
2.55	Phenylalanine	1.11	7.79E-20
2.60	Fructosyl phenylalnine	1.69	7.56E-12
2.74	Val-Glu	1.10	3.51E-20
2.77	Pro-Glu-Ile	1.16	4.32E-11
2.80	Leu-Pro	1.23	3.02E-10
2.88	Tryptophan	1.33	7.16E-14
2.89	Ala-Pro-Glu-Ile	0.88	3.40E-24
3.05	Glu-Phe-Ala	1.06	6.16E-18
3.06	Glu-Leu-Val-Ile-Ser	1.08	3.94E-16
3.07	N-Acetyl-Ala-Ala-Ala-NHMe	1.03	2.53E-11
3.14	Phe-Ser-Arg	1.03	1.08E-11
3.16	Lys-Thr-Ser-Pro	1.10	8.82E-18
3.23	Ser-Gln-Trp-Ala	0.80	1.25E-11
3.37	Daidzin	0.88	4.61E-15
3.44	Ile-Phe	0.95	7.93E-18
3.58	Ile-Phe-Glu	1.01	1.08E-10
3.67	Malonyldaidzin	1.04	1.55E-12
3.69	Genistein-4'-glucoside	0.93	4.85E-13
3.74	Formononetin 7-O-glucoside -6''-O-malonate	1.11	5.13E-18
3.95	Malonylgenistin	1.08	1.44E-15
4.03	Malonylglycitin	1.03	3.49E-08
4.28	Daidzein	1.25	4.40E-26
4.37	Glycitein	1.32	5.92E-10
4.73	Genistein	1.26	5.09E-18
5.42	Soyasaponin I	0.83	1.42E-08
5.54	Soyasaponin II	0.72	1.06E-05
5.56	Soyasaponin III	0.72	8.62E-06
5.76	Soyasaponin β g	0.89	7.97E-08
5.81	Phytosphingosine	1.80	5.32E-07
6.48	LPC(C14:0)	1.54	7.90E-14
6.50	LPC(C18:3)	0.92	4.23E-20
6.89	LPE(C18:2)	0.90	2.25E-24
6.89	LPE(C18:1)	0.83	2.74E-13
6.91	LPC(C18:2)	1.05	3.80E-20
6.91	LPC(C18:1)	0.87	9.32E-07
7.23	LPE(C16:2)	1.35	4.32E-15
7.25	LPC(C16:0)	1.29	4.40E-21
7.42	LPC(C18:1)	1.32	5.06E-11

¹⁾VIP: variable importance in the projection; ²⁾*p*-values were analyzed by Duncan's test.

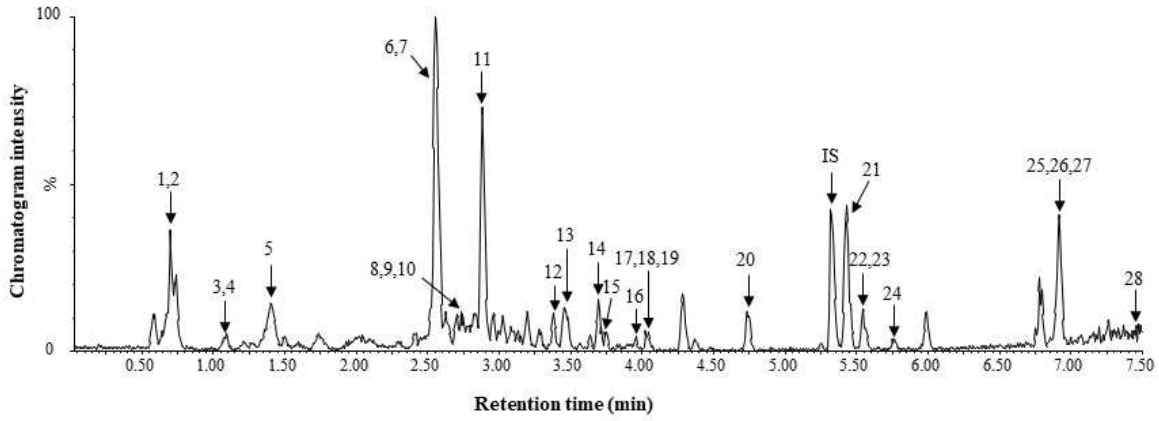


그림 8. UPLC-Q-TOF-MS분석에 의한 혼합발효물의 주요 대사체 크로마토그램. 1, arginine; 2, glucose; 3, fructosyl valine; 4, hypoxanthine; 5, tyrosine; 6, phenylalanine; 7, fructosyl phenylalanine, 8, Val-Glu; 9, Pro-Glu-Ile; 10, Leu-Pro, 11, tryptophan; 12, daidzin 13, Ile-Phe 14, genistein-4'-glucoside; 15, formononetin 7-O-glucoside-6''-O-malonate; 16, malonylgenistin 17, malonylglycitin 18, daidzein; 19, glyciten 20, genistein; 21, soyasaponin I ; 22, soyasaponin II ; 23, soyasaponin III; 24, soyasaponin β g; 25, LPE(C18:2); 26, LPE(C18:1); 27, LPC(C18:2); 28, LPC(C18:1).

○ 표 4는 GC-MS분석 상에 나타난 주요 대사체를 동정한 결과이며, 당, 아미노산, 유기산, 지방산 계열 등이 확인되었음.

표 4. GC-MS 분석으로 검출된 5종 샘플 중 주요 대사체

RT	VIP ¹⁾	<i>p</i> -value ²⁾	Identified compounds
6.67	0.93	5.85E-10	Hydroxylamine
6.72	4.44	1.91E-36	Unknown 1
7.10	1.96	5.53E-35	Oxalic acid
10.42	2.65	5.21E-48	Unknown 2
12.55	0.87	6.20E-52	Unknown 3
17.08	6.14	4.94E-56	Glucose
17.29	1.40	7.36E-57	Galactose
17.40	1.21	2.69E-24	Pipecolic acid
17.59	1.58	4.64E-40	Tyrosine
18.73	1.70	9.76E-34	Palmitic acid
20.63	2.82	5.59E-09	Stearic acid
22.88	1.10	9.37E-22	Oleanitrile
24.45	1.61	1.23E-47	Unknown 4
25.39	2.53	1.90E-05	Oleamide
25.92	1.37	2.93E-08	Unknown 5
26.50	5.35	3.46E-46	Unknown 6

¹⁾VIP: variable importance in the projection; ²⁾*p*-values were analyzed by Duncan's test.

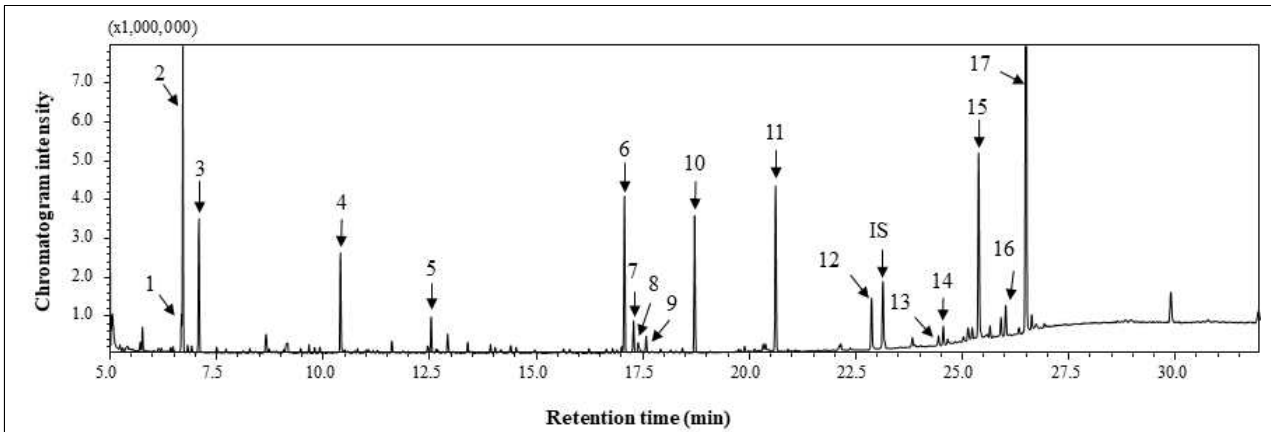


그림 9. GC-MS분석에 의한 혼합발효물의 주요 대사체 크로마토그램. 1: hydroxylamine, 2: unknown 1, 3: oxalic acid, 4: unknown 2, 5: unknown 3, 6: glucose, 7: galactose, 8: pipercolic acid, 9: tyrosine, 10: palmitic acid, 11: stearic acid, 12: oleanitrile, 13: unknown 4, 14: oleamide, 15: unknown 5, 16: unknown 6.

(3) 발효미생물산업진흥원 5종 샘플의 발효 전·후, 그리고 혼합 후의 주요 대사체 변화

- 5종 샘플(쌀 발효물(발효0일, A1), 쌀 발효물(발효 6일, A2), 콩 발효물(발효 0주, B1), 콩 발효물(발효 3주, B2), 발효혼합물, A2B2)중 UPLC-Q-TOF-MS와 GC-MS에서 확인된 주요 대사체의 변화(상대적 함량)를 그림 9와 10에 나타내었음.
- 검출된 4종의 아미노산(arginine, tyrosine, phenylalanine, tryptophan)은 발효가 진행될수록 증가하였으며, 또한 발효혼합물에서도 증가하였음.
- 콩의 주요 기능성 물질인 isoflavone 중 manoyl isoflavone은 발효 후 감소하였으며, 비배당체인 daidzein과 genistein은 발효 전 후 차이가 없었음.
- Soyasaponin의 경우 발효 전과 후의 차이가 없었음.
- 쌀발효물중의 LPC계열 화합물은 발효 후 감소하였지만, 반면 콩발효물의 경우 발효 후 LPC계열 화합물이 증가하였음.
- 또한, 발효물을 혼합 하였을 시 LPC계열 화합물이 감소하였음.
- 지방산 계열 화합물 또한 쌀발효물의 발효 후 증가하였으나, 콩발효물의 발효 후에는 감소하였음.
- Maillard reaction 생성물로 추정되는 fructosyl valine과 fructosyl phenylalanine은 쌀발효물의 발효 후 생성되었음.

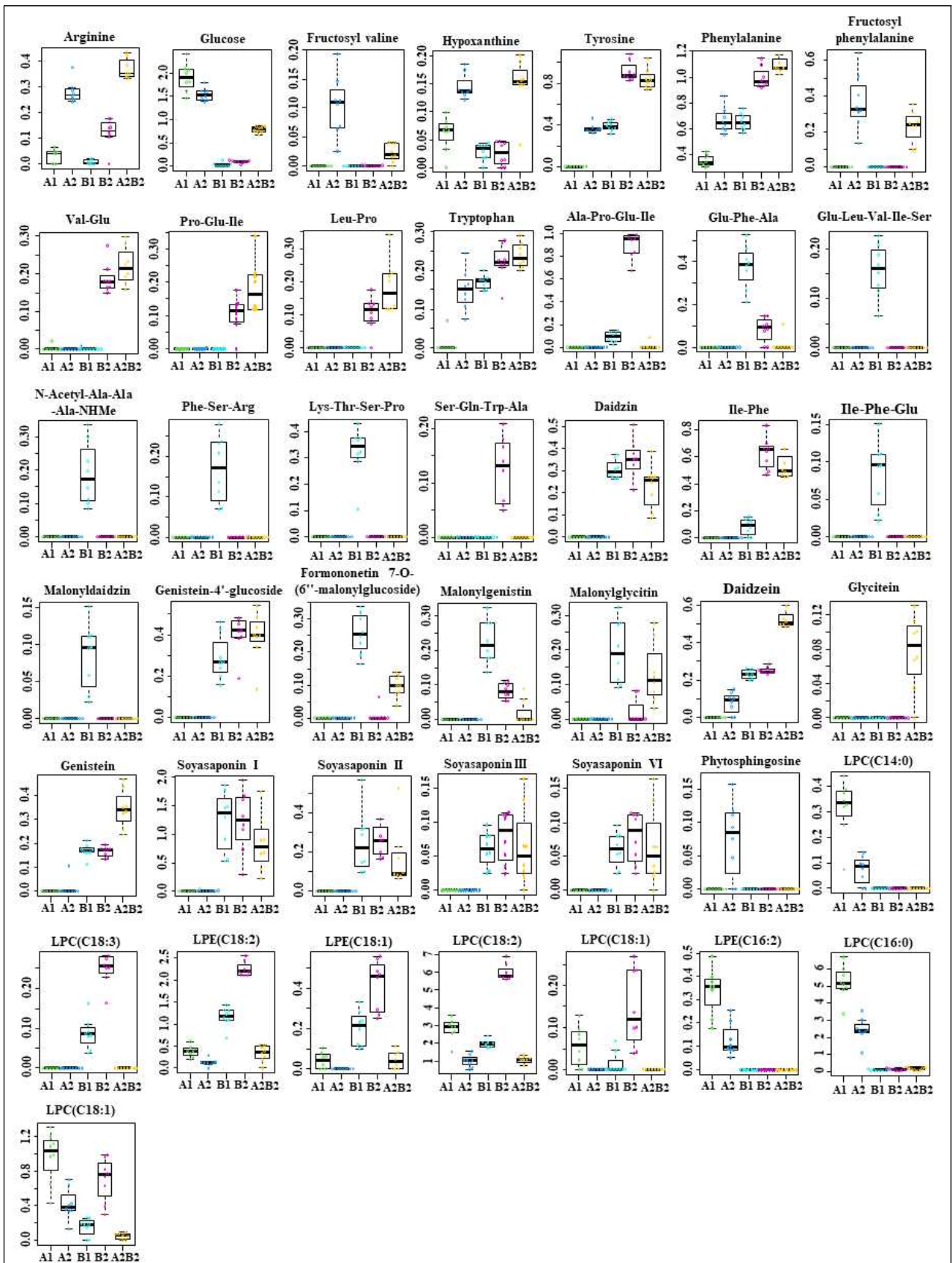


그림 11. UPLC-Q-TOF-MS분석에서 확인된 5종 샘플(쌀 발효물(발효0일, A1), 쌀 발효물(발효 6일, A2), 콩 발효물(발효 0주, B1), 콩 발효물(발효 3주, B2), 발효혼합물, A2B2)중 주요 대사체의 변화.

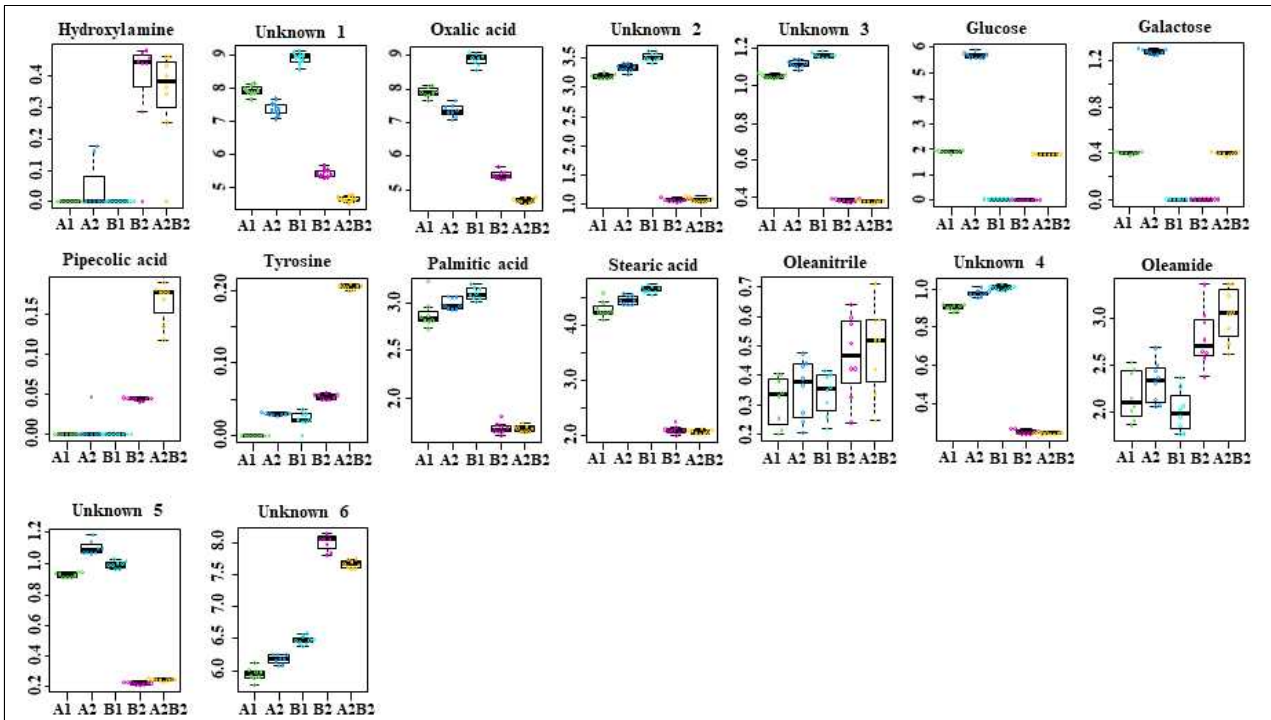


그림 10. GC-MS분석에서 확인된 5종 샘플(쌀 발효물(발효0일, A1), 쌀 발효물(발효 6일, A2), 콩 발효물(발효 0주, B1), 콩 발효물(발효 3주, B2), 발효혼합물, A2B2)중 주요 대사체의 변화.

라) 농업회사법인순창장류(주) 2종 샘플에 대한 대사체 및 다변량 통계분석

(1) 농업회사법인순창장류(주) 2종 샘플의 다변량 통계분석 결과

- 농업회사법인순창장류(주) 2종 샘플(기존 된장 제품, 시작품(최종제품))에 대한 대사체분석을 LC-MS와 GC-MS를 이용하여 진행하였고, 샘플간의 차이를 PLS-DA로 시각화함(그림 12).
- PLS-DA plot결과 기존 된장제품과 시작품의 대사체 조성에 차이가 있음을 확인함.

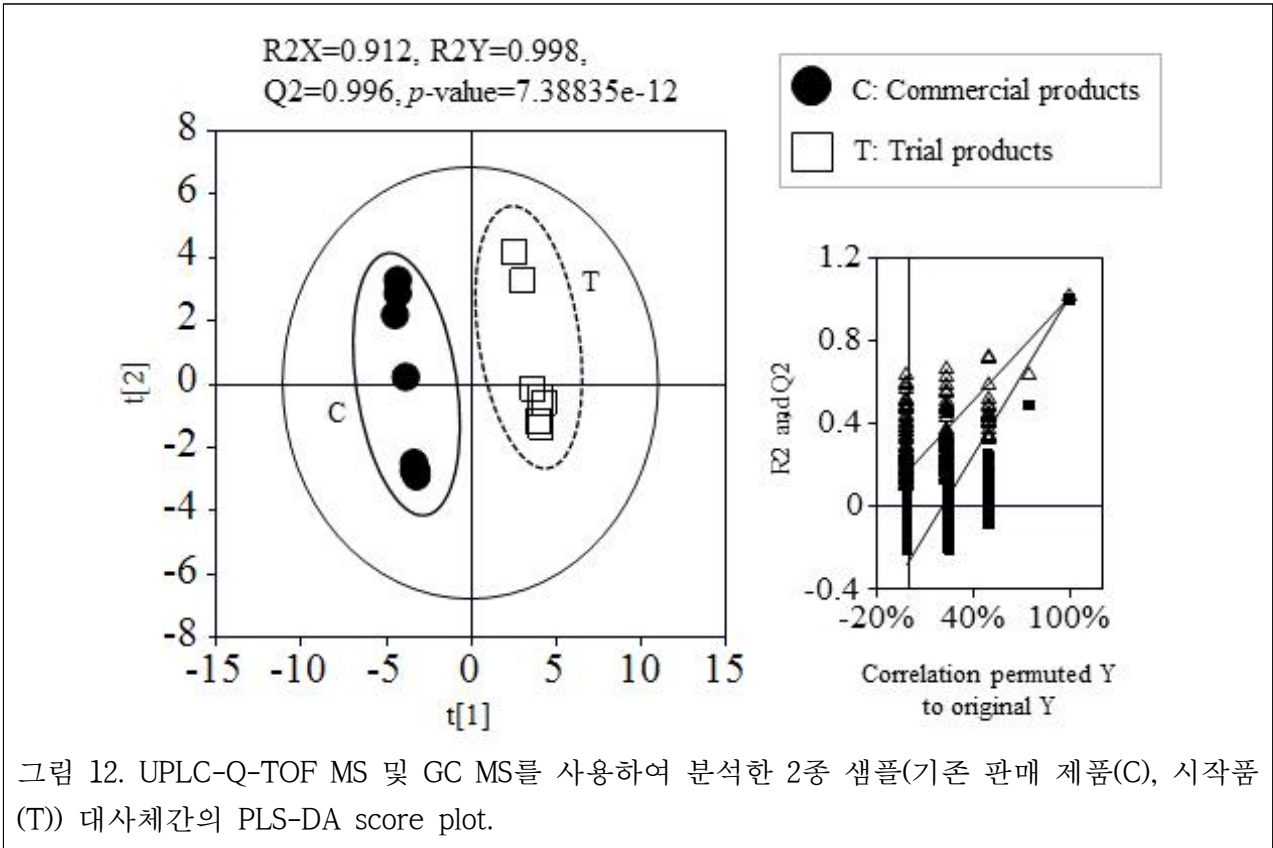


그림 12. UPLC-Q-TOF MS 및 GC MS를 사용하여 분석한 2종 샘플(기존 판매 제품(C), 시작품(T)) 대사체간의 PLS-DA score plot.

(2) 농업회사법인순창장류(주) 2종 샘플의 주요 대사체 동정 결과

- 다변량 통계분석 결과와 chromatogram intensity를 기반으로 2종 샘플(기존 된장 제품, 시작품(최종제품))의 차이를 나타내는 주요 대사체 및 주요 화합물들을 동정하였음(표 5, 표 6).
- 표 3은 UPLC-Q-TOF-MS분석 상에 나타난 주요 대사체를 동정한 결과이며, 아미노산(arginine 외 3종), 당(glucose), 펩타이드(Leu-Pro 외 1종), isoflavone(malonyldaidzin 외 5종), saponin(soyasaponin Bb 외 1종), LPC 계열, amino lipid(linoleoyl phenylalanine 외5종) 등이 확인되었음.

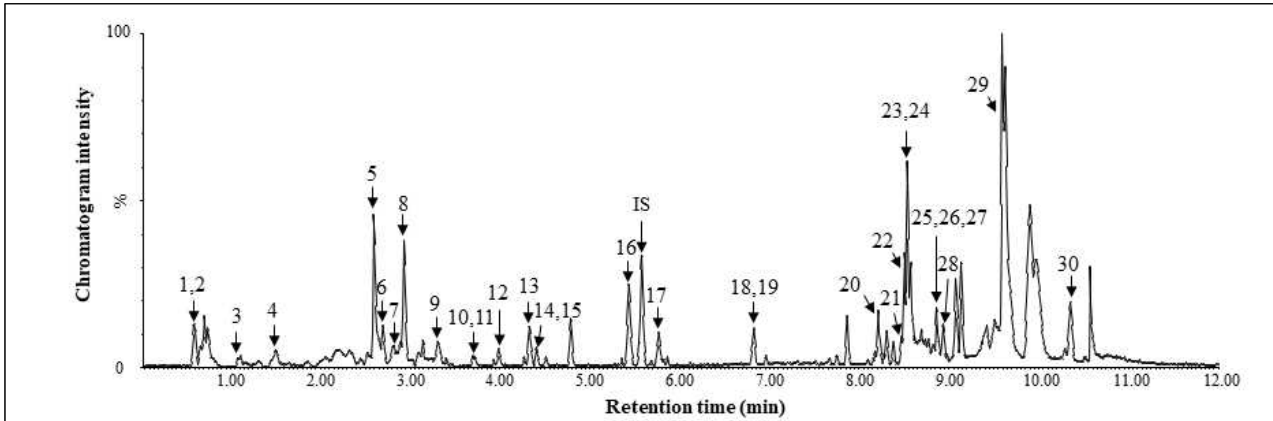


그림 13. UPLC-Q-TOF-MS분석에 의한 시작품 중 주요 대사체 크로마토그램. 1, arginine; 2, glucose; 3, hypoxanthine; 4, tyrosine; 5, phenylalanine; 6, fructosyl phenylalanine, 7, Leu-Pro, 8, tryptophan; 9, Phe-Pro; 10, malonyldaidzin 11, genistein-4'-glucoside; 12, malonylgenistin 13, daidzein; 14, glycitein 15, genistein; 16, soyasaponin I; 17, soyasaponin β g; 18, LPE(C18:2); 19, LPC(C18:2); 20, linoleic acid; 21, linoleoyl phenylalanine; 22, ethyl linoleate; 23, dodecanoyl-Lys-Ser; 24, octadecadienoyl leucine; 25, linoleamide 26, palmitoyl isoleucine; 27, oleoyl phenylalanine; 28, oleoyl leucine; 29, 13-docosenamide; 30, docosanamide.

표 5. UPLC-Q-TOF-MS 분석으로 검출된 2종 샘플 중 주요 대사체

RT	Identified compounds	VIP ¹⁾	<i>p</i> -value ²⁾
0.68	Arginine	0.96	3.89.E-15
0.69	Glucose	0.54	1.77.E-05
1.10	Hypoxanthine	0.24	1.01.E-07
1.49	Tyrosine	1.39	3.09.E-07
1.64	Coumarin	1.02	8.92.E-10
2.59	Phenylalanine	0.44	2.21.E-04
2.62	Fructosyl phenylalnine	0.22	1.22.E-02
2.86	Leu-Pro	1.23	5.80.E-02
2.93	Tryptophan	3.06	5.21.E-15
3.32	Phe-Pro	0.76	1.48.E-04
3.69	Malonyldaidzin	0.10	1.05.E-01
3.71	Genistein-4'-glucoside	0.18	1.17.E-03
3.98	Malonylgenistin	0.22	2.45.E-03
4.32	Daidzein	1.48	9.61.E-14
4.40	Glycitein	0.24	5.57.E-06
4.78	Genistein	1.61	1.28.E-14
5.42	Soyasaponin I	0.76	1.08.E-05
5.76	Soyasaponin β g	0.94	1.43.E-06
6.80	LPE(C18:2)	0.31	1.94.E-03

6.82	LPC(C18:2)	0.20	7.13.E-04
8.20	Linolenic Acid	1.38	1.38.E-13
8.49	Linoleoyl phenylalanine	4.45	1.07.E-17
8.50	Ethyl Linoleate	1.04	1.72.E-17
8.52	Dodecanoyl-Lys-Ser	2.12	2.57.E-20
8.52	Octadecadienoyl leucine	8.51	4.99.E-19
8.85	Linoleamide	2.22	2.46.E-18
8.86	Palmitoyl isoleucine	1.08	7.01.E-15
8.87	Oleoyl phenylalanine	1.10	9.10.E-12
8.92	Oleoyl leucine	2.37	1.27.E-22
9.61	13-Docosenamide	3.28	2.64.E-01
10.34	Docosanamide	0.64	1.96.E-04

¹VIP: variable importance in the projection; ²*p*-values were analyzed by Duncan's test.

- 표 6는 GC-MS분석 상에 나타난 주요 대사체를 동정한 결과이며, 당, 아미노산, 유기산, 지방산 계열 등이 확인되었음.

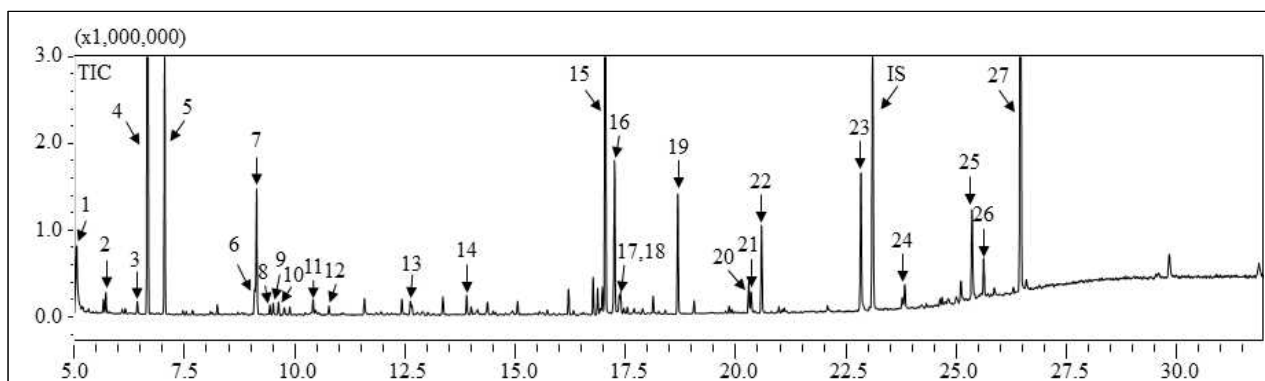


그림 14. GC-MS분석에 의한 시작품 중 주요 대사체 크로마토그램. 1, acetamide; 2, lactic acid; 3, alanine; 4, diethylene glycol; 5, oxalic acid; 6, phosphate; 7, glycerol; 8, isoleucine; 9, proline; 10, glycine; 11, serine; 12, threonine; 13, aspartic acid; 14, glutamic acid; 15, glucose; 16, galactose; 17, proline; 18, mannitol; 19, palmitic acid; 20, linoleic acid; 21, oleic acid; 22, stearic acid; 23, oleanitrile 24, oleic acid; 25, oleamide; 26, maltose; 27, unknown.

표 6. GC-MS 분석으로 검출된 2종 샘플 중 주요 대사체

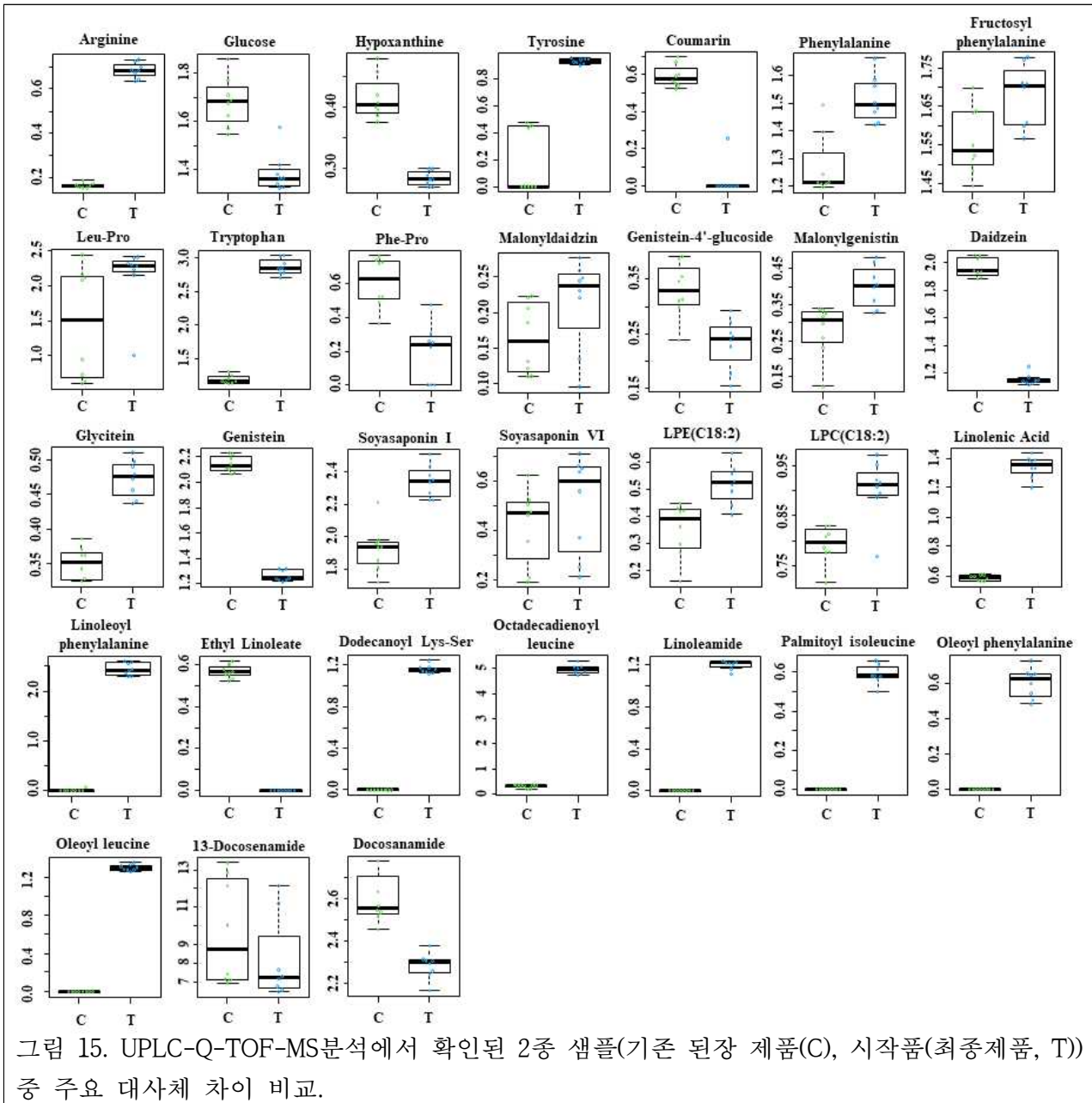
RT	Identified compounds	VIP ¹⁾	<i>p</i> -value ²⁾
5.06	Acetamide	1.33	5.16.E-01
5.74	Lactic acid	2.11	1.28.E-03
6.45	Alanine	0.09	2.71.E-05
6.68	Diethylene glycol	3.41	2.88.E-05
9.10	Phosphate	0.09	1.41.E-01
9.15	Glycerol	1.25	1.21.E-12
9.45	Isoleucine	0.09	1.27.E-08
9.52	Proline	0.05	1.42.E-05
9.64	Glycine	0.09	2.54.E-03
10.42	Serine	0.09	1.55.E-07
10.78	Threonine	0.07	8.50.E-07
12.63	Aspartic acid	0.14	1.06.E-07
13.90	Glutamic acid	0.16	4.48.E-10
17.05	Glucose	5.29	7.66.E-09
17.26	Galactose	1.26	2.12.E-08
17.36	Proline	0.64	3.79.E-04
17.39	Mannitol	0.84	4.24.E-06
18.69	Palmitic acid	0.31	9.70.E-01
20.30	Linoleic acid	0.50	5.08.E-02
20.35	Oleic acid	0.47	2.97.E-01
20.59	Stearic acid	0.21	6.70.E-01
22.84	Oleanitrile	4.31	3.36.E-06
23.83	Oleic acid	0.82	3.81.E-17
25.35	Oleamide	3.44	2.27.E-01
25.62	Maltose	0.39	1.70.E-05
26.46	Unknown.	1.30	2.90.E-01

¹⁾VIP: variable importance in the projection; ²⁾*p*-values were analyzed by Duncan's test.

(3) 농업회사법인순창장류(주) 2종 샘플의 주요 대사체 차이 비교

- 2종 샘플(기존 된장 제품, 시작품(최종제품))의 UPLC-Q-TOF-MS와 GC-MS에서 확인된 주요 대사체의 차이(상대적 함량)를 그림 15와 16에 나타내었음.
- 시작품 중 당류(glucose, galactose, maltose 등)의 함량은 기존 된장보다 낮았음.
- 주요 기능성 성분인 isoflavone 중 malonylgenistin과 glycitein함량은 시작품에서 높았으나, daidzein과 genistein함량은 기존 된장제품에서 높았음.
- 반면, 유리아미노산 10종의 함량은 시작품에서 높게 나타났음.
- 또한, amino lipid와 불포화지방산(oleic acid, linoleic acid)함량 또한 시작품이 기존 된장제품보다 높게 확인되었음.
- 따라서, 감칠맛을 나타내는 주요 성분인 아미노산이 시작품에 높게 나타난 것으로 보아 두 제

품의 맛의 차이가 있을 것으로 예상됨.



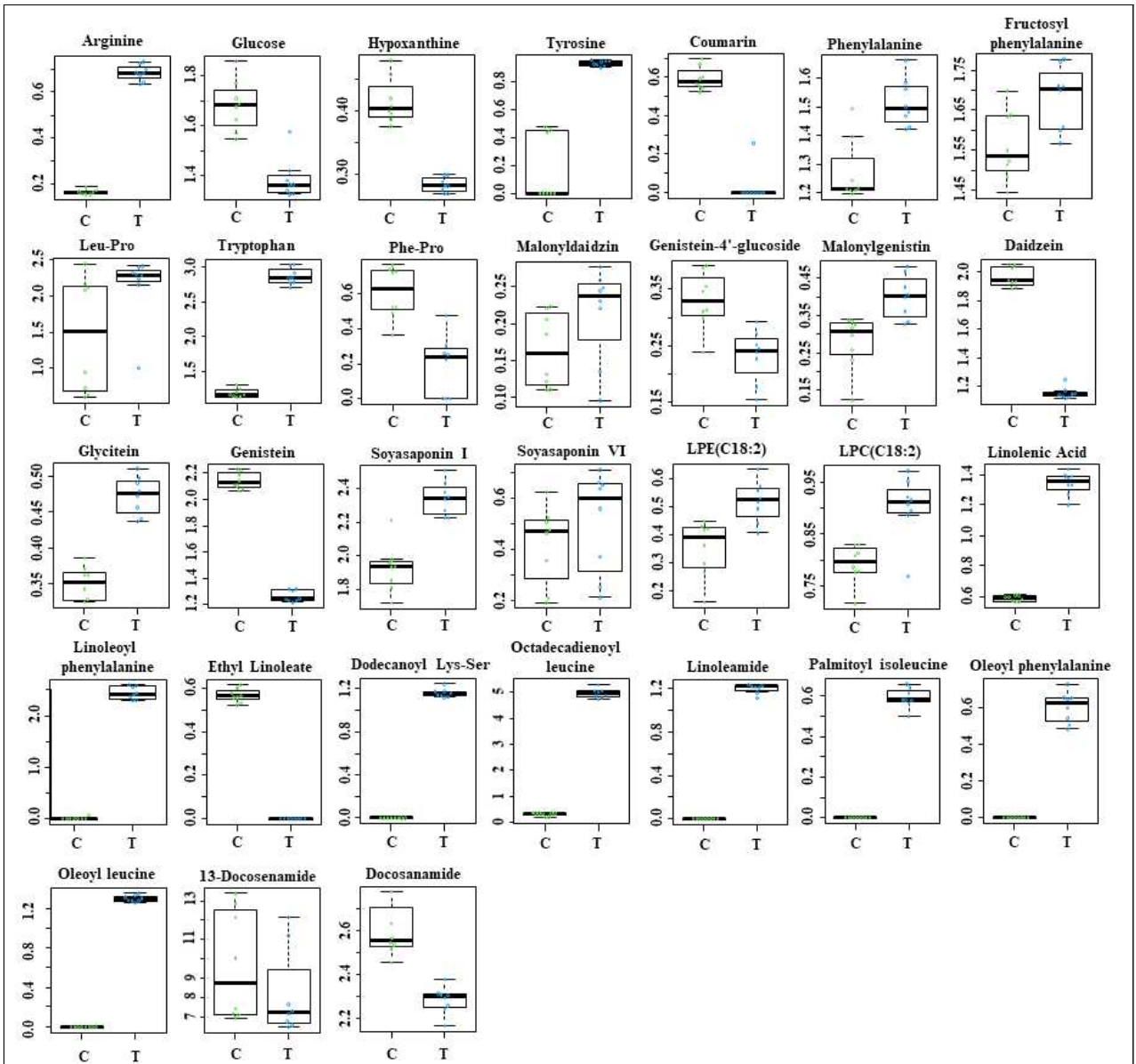


그림 16. GC-MS분석에서 확인된 2종 샘플(기준 된장 제품(C), 시작품(최종제품, T))중 주요 대사체 차이 비교.

3) 대사경로 도출

- 발효미생물산업진흥원과 농업회사법인순창장류에서의 대사체 및 다변량통계분석 결과를 기반으로 하여 발효미생물산업진흥원 샘플에 대한 대사경로를 도출하였으며, 그림 17에 나타내었음.
- 발효에 의해 주로 펩타이드 계열, 지방관련 물질들, saponins 및 콩 2차대사산물들(glycitein, genistein, daidzein 관련물질)의 프로파일이 변한 것으로 확인되었음.

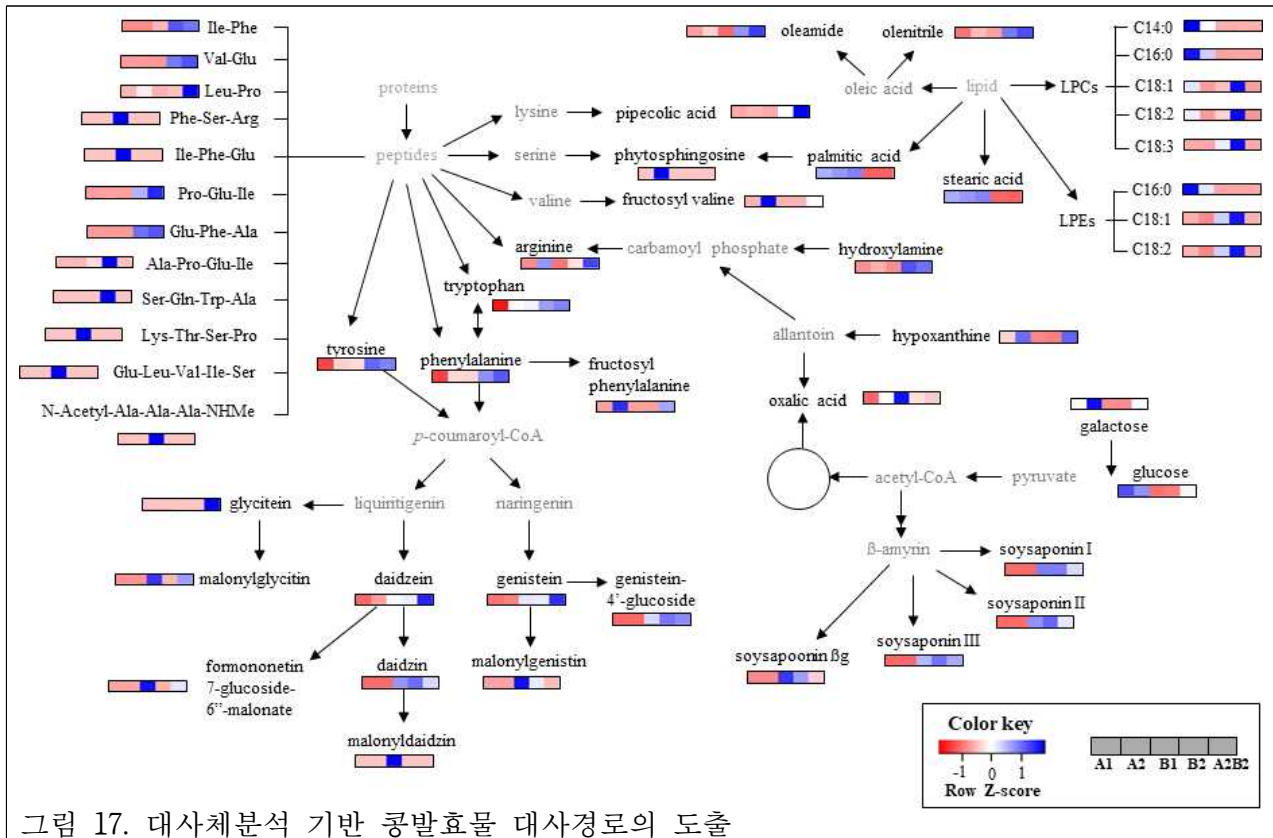


그림 17. 대사체분석 기반 콩발효물 대사경로의 도출

4) 된장 시판 제품과 시작품(최종제품)의 관능평가

- 농업회사법인순창장류(주)에서 2종의 샘플에 대한 정량적 묘사분석을 진행하였음.
- 짠맛, 단맛, 쓴맛, 감칠맛, kokumi 총 5개의 맛 항목을 평가함.
- 두가지 된장샘플의 관능평가는 된장 샘플 100 g을 물 300 mL로 열수추출한 추출물로 평가되었음.
- 6명의 훈련된 패널들이 평가를 진행하였으며, 15 cm line scale test를 이용하여 맛의 강도를 평가하였음.

가) 농업회사법인순창장류(주) 2종 샘플의 정량적 묘사분석 결과

- 정량적 묘사분석 결과는 그림 18에 나타내었음
- 두 제품간의 감칠맛과 kokumi에 대한 차이는 없었음
- 반면, 시작품이 기존 제품보다 짠맛과 쓴맛은 더 낮으며, 단맛은 높은 경향을 보임.
- 추후 샘플을 column chromatography로 분획, 그리고 정량적 묘사분석과 및 UPLC-Q-TOF-MS 와 GC-MS 분석을 병행하여 각 맛에 직접적으로 연관된 화합물을 찾아낼 계획임.

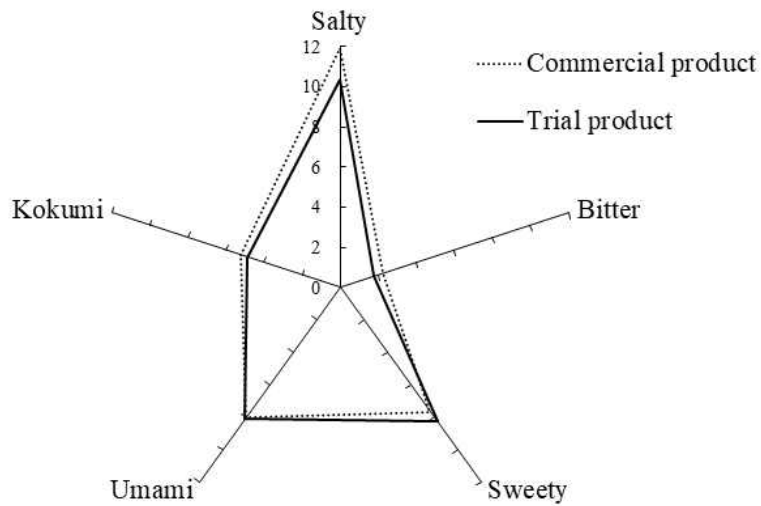


그림 18. 농업회사법인순창장류(주) 2종 샘플(기존 된장 제품(commercial product), 시작품(최종 제품, trial product))의 정량적 묘사분석 결과.

나. 2차년도 연구수행 및 결과

주관연구기관 [농업회사법인순창장류(주)] : 양조 base 저염 발효장류 개발 및 발효장류 기반 천연 조미, 향미소재 개발

1) 연구재료 및 연구방법

가) 재료

- 대두는 국내산 대두를 구입하여 사용하였으며, 볶음대두분은 구입한 콩을 외주를 통해 전처리과정을 거쳐 분쇄 및 볶아서 호화상태로 제작한 후 사용하였다. 천연염은 국내산 신안천 일염을 사용하였으며 여기에 개발제품의 보존성을 높이기 위해 솔빈산 등의 합성 보존료가 아닌 프리미엄 제품의 특성에 맞게 가격은 높으나 소비자의 거부감이 없는 식품용 천연 발효주정을 구입하여 사용하였다. 이외 각종 소스화를 위한 배합용 원부재료는 각각 해당업체에서 구입하여 테스트 후 이 중 적합한 제품을 선택 사용하였다. 또한 저염 발효장류 및 발효장류 기반 천연발효 조미소재, 소스류에 대한 제품 출시를 위한 Scale up 실험을 함에 있어 식약처로부터 정식허가를 받은 네오케미칼 바이오스팟을 구매한 후 현장설비를 살균 소독하고 위생적인 제조환경에서 제품을 생산테스트 하고자 하였다.
- 본 실험에 사용한 장류용 발효 균주는 (재)발효미생물산업진흥원으로부터 1차년도 연구를 통해 최종 선정된 곰팡이 *Aspergillus oryzae* SRCM102487균주를 사용하였으며 이와 비교할 곰팡이는 시판 평균으로 충무발효(주)로부터 장류용 *Aspergillus oryzae* 균주를 구매하여 사용하였다.

나) 실험방법

(1) 균주 특이성 적용 최적 koji제조

- 본 제국에 사용한 단백질원으로는 대두를 사용하였으며 가공에 적합하도록 외주를 통해 대두를 가공한 볶음대두분을 사용하였다. 실험에 사용한 볶음대두분은 적절히 전처리한 후 (재)발효미생물산업진흥원으로부터 분양받은 *Aspergillus oryzae* SRCM102487균주를 0.3% 접종하고 발효조건별(수분함량, 발효온도, 발효시간) 단백질분해활성도를 분석하여 효소활성을 고함량 획득하기 위한 고체발효조건을 확립하고자 하였다. 이후 단백질분해활성도가 가장 높은 최적의 조건으로 대두koji를 제조하였다.

(2) 저염 액상 발효장류 제조 조건 확립

- 본 연구를 위한 저염 액상발효장류는 상기와 같이 확립된 최적의 조건으로 대두koji를 제조한 후 제조된 대두koji에 정수를 넣어 기본 베이스로 하고 목적에 맞게 천연염을 넣어 각각의 발효조건별(고형분함량, 발효온도, 발효시간, 염농도, 염투입시기)로 균질 혼합하고 pH, 아미노태질소함량(AN), 총질소함량(TN), glutamate함량(GA)분석을 통해 효율적인 제법을 확

립하고자 하였다.

(3) 저염 액상 발효장류 제조공정 Scale-up 및 process 표준화

- 본 연구를 통해 조미성분의 용출이 극대화된 저염 액상 발효장류는 1차적으로 본 생산전에 lab-scale을 통하여 최적화 조건을 도출하고 2차적으로 대량 생산화 및 제품 출시를 위하여 현장에 적합한 pilot-scale 연구를 실시함으로써 제조공정에 대한 대량 process를 확립하며 3차적으로 대량 scale-up 실험을 통해 생산된 제품에 대한 품질과 관능을 최종적으로 확인하고 QC공정도를 정립함으로써 최종적으로 원하는 품질과 관능수준이 표준화되어 생산되도록 대량생산체계를 갖추고자 하였다.

(4) 액상발효장류 기반 천연발효 조미소재 최적 배합비 설계

- 저염 액상발효장류를 base로 하여 다양한 식품 및 요리에 적용이 가능한 천연발효 조미소재를 개발하도록 하고 배합조건별로 총 질소(TN)와 Glutamate(GA)를 분석하였으며 또한 관능 특성에 대한 분석을 실시하도록 하여 이를 바탕으로 최종 배합비를 선정하였음. 선정된 제품은 최종 출시 가능성을 점검하기 위해 당사의 자체 연구원을 대상으로 1단계로 풍미, 기호도에 대한 간이 실험을 진행하였으며 2단계로는 보다 상세한 기호도 분석을 진행하도록 하였다. 풍미기호도 분석은 평점법에서 항목척도를 사용하여 9점 척도로 평가토록 하였으며 관능특성 분석과 관련하여 관능 평가인은 농업회사법인 순창장류(주)의 전 직원을 대상으로 짠맛과 감칠맛에 대한 농도별 미맹테스트를 진행한 후 선발된 11명을 대상으로 실시하였다. 시료는 개발된 조미소재 10 g을 물에 풀어서 끓인 맑은 국을 시험체로 하였다.

(5) 액상 발효장류 기반 천연발효 조미소재 제조공정 Scale-up 및 process 표준화

- 본 연구의 개발 완성을 위해 우선 액상 발효장류에 1차 실험생산과 2차 Scale-up을 통한 공정을 확립하고 이를 통해 개발된 천연 조미소재의 배합비에 근거한 제조공정을 1차 실험생산과 2차 Scale-up을 통해 천연 조미소재의 제품화를 완료하였다. 또한 연구과제의 성공도를 높이기 위해 액상형 발효장류를 기반으로 한 다양한 소스류의 Scale-up 실험 및 process 표준화를 위한 연구를 추가로 진행하였다.

(6) 간편형 발효조미소재 기반 응용 소스 식품 개발

- 액상형 발효장류 즉 본 연구 결과를 통한 발효조미소재를 적용한 간편형 소스류는 액상 발효장류 base를 주 원료로 하여 발효조미소재 및 다양한 식품소재를 배합비율별로 적절히 혼합하고 살균처리 하여 유통품질을 갖추고 제품화 완료하였으며 품목제조보고서를 제출함으로써 정식 제품으로 출시토록 하였다.

(7) 단백질분해활성도(Protease활성) 측정

- 시료 10 g을 취하고 증류수를 가하여 100 ml로 한 후 30℃에서 150 rpm으로 1시간 진탕 혼합하여 추출한 여과액을 조효소액으로 하여 효소액 0.5 ml, McIlvaine씨 완충액 1 ml, 2% Milk casein 0.5 ml를 첨가한 후 항온수조에 38℃, 1시간 중탕 반응시킨 후 0.4M TCA 3 ml를 첨가하여 38℃, 20분간 중탕 반응시켰다. 이를 여과하여 얻은 여액 1 ml과 0.4M Na₂CO₃

5 ml, Phenol Reagent 2배 희석한 액을 1 ml 반응시켜 38°C에서 30분간 반응시킨 후 660 nm 흡광도를 측정하였다.

(8) pH 측정

- pH는 무게 5 g을 취하고 증류수를 45 ml에 희석하여 진탕 시킨 후 pH meter(Mettler Toledo GmbH, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

(9) 아미노태 질소(amino-type nitrogen) 측정

- 아미노태 질소는 Formol법으로 측정하였다. 시료 1g을 비커에 취하고 증류수 50 ml를 가하고 240초 동안 진탕 혼합하여 충분히 용해한 다음 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4로 한다. 여기에 중성 formalin 20 ml를 가하고 20초 동안 진탕 혼합한 뒤 다시 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화·적정하였다.

$$\text{아미노태 질소(mg\%)} = \frac{0.1\text{N NaOH 적정량} \times 1.401 \times F \times \text{희석배수} \times 100}{\text{시료량(g)}}$$

(10) 총질소 (Total Nitrogen) 측정

- 총질소 함량은 시료 1 g을 분해장치(Foss Digester 2020)로 분해시키고 켈텍 장치(Foss Kjeltel System 2400)를 이용하여 증류 한 후 적정하여 0.1N-HCl의 ml수를 총질소로 환산하여 양을 구하였다.

(11) Glutamate 함량 측정

- Glutamate 측정은 유리아미노산 자동분석기(L-8900, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)를 이용하여 glutamate 함량을 산출하였으며, 시료 2 g을 취한 후 여기에 3차 증류수 50 ml를 첨가하여 초음파(WUC-D22H, Daehan Scientific Co., Ltd) 처리로 20분간 추출한 후 970×g 에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액 2 ml에 5% trichloroacetic acid(TCA) 2 ml를 첨가한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 다음 0.02N-HCl로 희석해 0.2 μm syringe filter로 여과하여 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

Table 1. 유리아미노산 분석을 위한 아미노산 자동분석기 조건

Instrument	Hitachi L-8900
Column	Hitachi 4.6 × 60 mm (speration) Hitachi 4.6 × 40 mm (ammonia filtering)
Detector	UV/Vis (440nm-570nm)
Ninhydrin flow rate	0.35 ml/min
Buffer flow rate	0.40 ml/min
Temperature	50°C
Mobile phase	Column Buffer set (PH-SET KANTO)
Injection volume	20 µl

2) 연구수행 결과

가) 균주 특이성 적용 최적 koji제조

- koji는 천연발효 조미소재 제조를 위한 발효를 시작하는 starter culture라고 할 수 있으며 키우고자 하는 *Aspergillus oryzae*가 잘 자라도록 하기 위해 적당한 온도와 습도조건을 도출함으로써 질 좋은 koji를 다량으로 제조하는 것을 본 실험의 목적으로 한다. 주 원료인 대두는 알콩 자체를 사용하는 것보다도 호화를 위해 볶은 후 분쇄하여 미생물이 활동할 수 있는 적용면적을 넓혀줌으로써 발효효소의 획득에 유리하다는 것을 선행연구를 통해 확인하였으며 본 실험에서는 이러한 볶음대두분 (재)발효미생물산업진흥원으로부터 1차년도에 분양받은 *Aspergillus oryzae* SRCM102487 균주를 접종하고, 발효조건별(수분함량, 발효온도, 발효시간) 품질을 측정하기 위한 지표로써 단백질분해활성도(Protease activity)를 분석하여 최적의 고체배양조건을 확립하였다. 여기에 시판 곰팡이로 접종한 koji('C')와의 비교를 통해 단백질분해활성도가 가장 높은 조건을 최종 선정하여 이후 저염 액상발효장류 제조 조건 확립 실험을 진행하였다.

(1) 수분함량

- 수분함량은 37%, 42% 그리고 47%로 구간을 나누어 koji의 수분함량에 따른 단백질분해활성의 차이를 보고자 하였다. 발효온도는 30°C, 발효습도는 80%로 하였으며, 발효시간은 48시간으로 동일하게 설정하였고 발효진행에 따라 발효품온이 상승할 때마다 뒤집기를 실시하여 원하는 품온을 유지하고자 하였다. 실험 결과 *Aspergillus oryzae* SRCM102487 균주를 접종한 koji의 수분함량이 42%조건일 때 395.77 ± 8.39 u/g으로 가장 높은 단백질분해활성을 보였으며 이는 시판 곰팡이로 42%조건일 때 제조한 koji(Control)의 단백질분해활성 결과인 366.57 ± 9.35 u/g보다 높은 활성을 보였음을 알 수 있다. koji의 수분함량을 37%로 제조한 경우 세균의 오염없이 koji의 제조는 가능하나 곰팡이가 활발하게 자랄 수 있는 환경에는

상대적으로 부족한 것으로 판단되며 수분함량이 47%인 구간에서는 높은 수분함량에 따라 바실러스 계열의 다른 잡균이 함께 자라면서 암모니아 취를 형성하는 것으로 관찰되었다. 특히 수분함량이 높을수록 미생물의 발효가 활발한 것은 맞으나 잡균으로부터 발효환경의 관리가 실험실에 비해 상대적으로 힘든 대량 현장 생산체계하에서는 koji의 품질을 일정하게 관리하는 것이 어렵기 때문에 일정수준 이상의 수분 전처리를 거친 제국 조건은 잡균이 억제되면서 효소활성이 높은 koji의 생산으로써는 부적절하다고 판단되어 졌다. 따라서 본 실험결과를 통해 개발된 *Aspergillus oryzae* SRCM102487 균주를 적용함에 있어 단백질분해 활성이 뛰어나면서 koji의 품질을 일정하게 유지시키는 적당한 수분함량은 42%임을 결론적으로 알 수 있었다.

Table 2. 수분함량에 따른 koji의 단백질분해활성도(u/g)

수분함량(%)	Control	<i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487
37	197.03±6.32	205.07±6.05
42	366.57±9.35	395.77±8.39
47	306.37±9.70	336.20±7.78

* Value are mean ± SD (n=3)

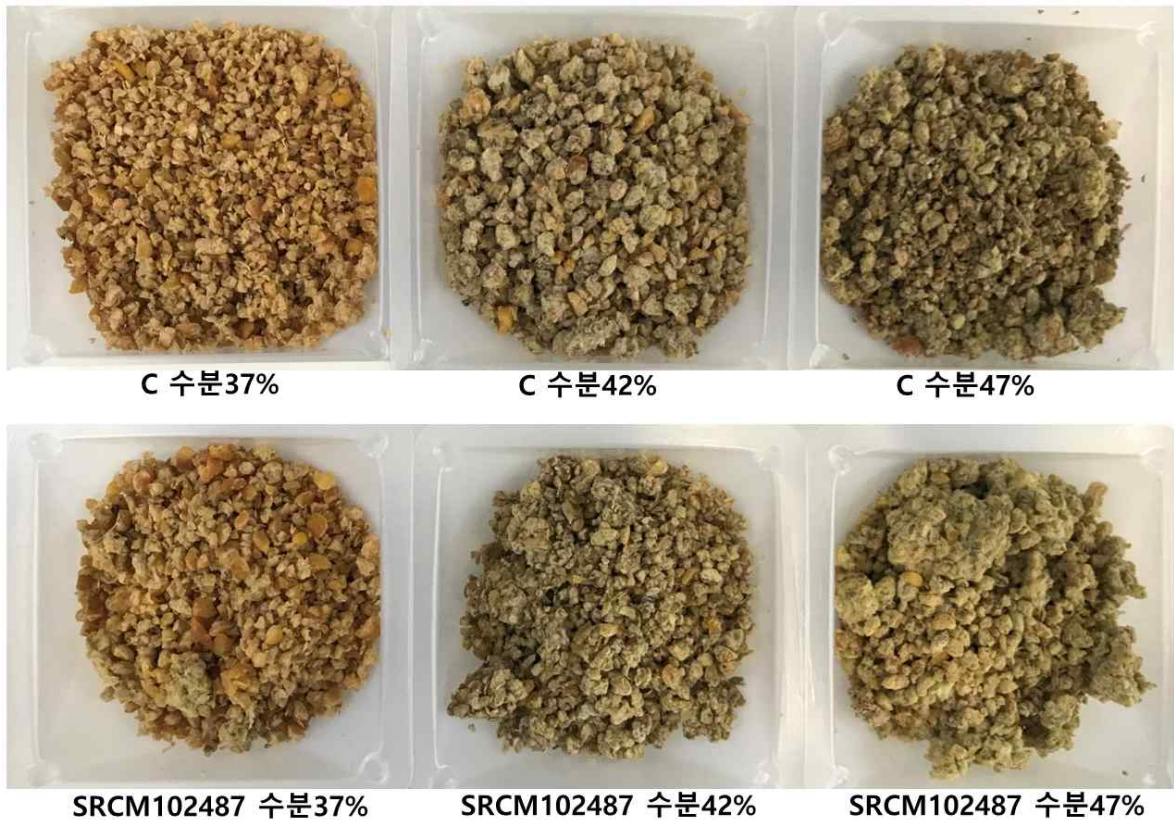


Fig 1. 수분함량에 따른 대두 koji의 사진

(2) 발효온도

- 상기 실험에서 koji제조시 단백질 분해활성도가 가장 높았던 제국시 수분 조건은 42%였으며 최적의 발효온도 구간을 도출하기 위하여 최적의 수분조건 42%, 발효습도 80%하에서 48시간 발효를 진행토록 하고 이때의 발효온도 실험구간으로써 25℃와 30℃ 그리고 35℃로 구분하여 실험을 진행하였다. 본 실험을 진행함에 있어 품온 상승시 뒤집기를 진행하여 품온을 유지하고자 하였으며 그 결과 *Aspergillus oryzae* SRCM102487 균주를 접종한 koji의 경우 발효온도 30℃ 조건에서 404.83 ± 5.86 u/g으로 가장 높은 단백질분해활성을 나타냈으며, 시판 곰팡이로 제조한 koji보다 높은 단백질 분해활성을 나타내었다. 발효온도 25℃ 조건으로 제조한 koji의 경우 곰팡이의 생육이 활발해지는 품온까지 올라오는 시간이 길어지고 이로써 아무리 항습조건을 유지한다 하더라도 곰팡이 생육이 활발해지기 전에 표면의 수분이 증발하여 koji로써의 가치가 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 제국온도를 35℃로 하여 진행할 경우 초반 미생물 증식이 활발하게 이루어 질 수 있으나 미생물의 증식이 활발해짐에 따라 발효품온이 40℃ 이상 올라가면서 온도의 제어가 힘들고 단백질 특히 콩을 배지로 하여 40℃ 이상에서 잘 자라는 고온성 잡균이 자라기 쉬운 것으로 관찰되었으며 이로 인해 주요 단백질 효소원인 곰팡이 균주의 생육에 간섭을 받아 단백질분해활성도가 낮게 측정되는 것으로 판단되었다. 특히 lab환경이 아닌 현장 대량 생산에 적용시 품온 유지나 잡균의 관리상 어려움이 많은 바 균일화된 품질의 koji를 대량 획득하기 위해서도 높은 온도에서의 제국이 바람직하지는 않은 것으로 판단하였다.

Table 3. 발효온도에 따른 koji의 단백질분해활성도(u/g)

발효온도(℃)	Control	<i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487
25	193.13 ± 4.74	198.27 ± 2.80
30	378.07 ± 3.37	404.83 ± 5.86
35	231.77 ± 6.14	293.83 ± 4.99

* Value are mean \pm SD (n=3)



Fig 2. 발효온도에 따른 대두koji의 사진

(3) 발효시간

- 상기 실험에서 koji제조 시 단백질분해활성도가 가장 높았던 수분함량은 42%, 발효온도 30°C 이었으며 최적의 수분 및 온도조건으로 고정하고 발효습도는 80%로 하였으며, 여기에 발효 시간을 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 48시간으로 구분하여 최적의 단백질분해활성도를 관찰하였다. 그 결과 발효 42시간에 단백질 분해활성도가 가장 높게 나타났으며 그 이후로 시간 연장에 따른 protease효소활성도의 상승은 없는 것으로 나타났다. *Aspergillus oryzae* SRCM102487 균주로 제조한 koji의 경우 발효 42시간에서 392.50 u/g을 보여 시판 곰팡이로 제조한 koji보다 높은 활성을 나타냈으며 발효 48시간 이후에는 곰팡이가 포자를 형성하여 특유의 진녹색이 진해지며 포자가 공기중에 쉽게 날리게 됨에 따라 연구 환경의 조성에 해가 되었다. 또한 포자를 생성하고난 후 효소활성도의 상승 또한 크게 눈에 띄지 않는 바 발효시간을 연장하는 것은 의미가 없는 것으로 판단하였다. 특히 영리목적 관점에서 최적의 효소활성도를 나타내는 발효시간이 길어짐에 따라 유틸리티 비용이나 재고비용이 상승하는 바 발효를 42시간까지 유지하고 그 이후로는 발효를 중지시키는 것이 경제적인 면에서도 효율적인 것으로 판단하였다.

Table 4. 발효시간에 따른 koji의 단백질분해활성도(u/g)

발효시간(hr)	Control	<i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487
24	149.27±5.05	142.92±6.99
30	193.60±2.10	196.97±2.32
36	283.80±7.78	306.23±4.76
42	370.27±6.58	392.50±5.38
48	369.05±7.59	383.70±4.42

* Value are mean ± SD (n=3)



Fig 3. 발효시간에 따른 대두koji의 사진

- 결과적으로 *Aspergillus oryzae* SRCM102487균주를 적용한 대두koji 제조의 최적 조건은 수분 함량 42%, 발효온도 30℃, 발효시간 42시간이 발효효율 및 대량 현장화 생산 시의 경제적인 면에서도 가장 최적임을 알 수 있었으며, 이렇게 최적발효조건을 확립하고 이러한 조건을 준수하여 생산자는 제품을 제조함으로써 koji제조시 마다 얻어지는 효소 역가의 편차를 줄이고 최종적으로 얻어지는 천연발효 조미소재의 품질을 일정 수준으로 유지 관리할 수 있겠다고 하겠다.



Fig 4. 최적 조건으로 제조한 대두koji의 발효전/발효후 사진

나) 저염 액상 발효장류 제조 조건 확립

- 식품에 있어 완제품의 품질을 제어하기 위한 방법에는 보편적으로 특히 가공식품의 경우 보존료를 사용하거나 당을 활용한 brix의 상승, 염 첨가에 의한 병원성 미생물의 활동 제어, 혹은 pH저하를 위한 초절임 등의 천연제법이 존재한다고 알려져 있다. 우리나라의 액상 발효장류로써는 간장이 있는데 간장은 이 중에서 염첨가에 의해 그 품질을 유지하는 대표적인 발효식품으로 한식발효제법의 경우 18~22%, 양조발효제법의 경우 16~18%정도의 염 농도하에서 제조함으로써 이상발효를 억제하고 원하는 풍미의 발효를 진행한다. 본 연구에서는 저염 하에서 이상발효가 되지 않고 조미기능이 극대화된 액상 발효장류의 제조조건을 도출하는 것이 가장 중요한 과제의 목표라고 할 수 있으며 본 연구를 위한 저염 액상 발효장류는 상기와 같이 확립된 최적 대두koji에 정수를 넣어 액상화하고 목적에 맞게 천일염을 투입하여 각 발효조건별(고형분함량, 발효온도, 발효시간, 염농도, 염투입시기) 균질 혼합하여 저염 액상 발효장류의 제조조건을 확립하였다. 또한 시판 곰팡이인 충무발효균주를 본 연구결과를 통해 확립된 제조조건에 적용하여 저염 액상 발효장류(이하 'Control')를 제조하여 대조구로 설정하고 *Aspergillus oryzae* SRCM102487를 적용한 대두koji로 제조한 저염 액상 발효장류(이하 'Sample')와의 이화학적 분석을 통하여 결과를 확인함으로써 본 과제의 목표를 완성코자 하였다.

(1) 고형분(Brix) 함량 선정 실험

- 액상 발효장류의 원리는 고형분인 콩을 koji화하고 이의 원활한 발효활동을 통하여 혼합된 물로 수용성 지미성분이 용출되는 과정이라고 할 수 있으며 고형분의 용출효율을 최대한으로 높힐 수 있는 제조조건을 확립하는 것이 본 연구과제의 중요한 관건이라고 하겠다. 이때 고형분 대 물의 혼합비율에서 고형분 함량이 높을수록 액상에 용출되는 지미성분의 함량이 높아질 수 있겠으나 너무 높은 고형분 함량은 용출을 용이하게 하기 위한 교반 등에 부적합함으로써 대량생산에 부적합할 수 있으며 너무 낮은 고형분 함량의 설정은 제조에 있어 압력부하가 낮아 대량생산에는 용이하겠으나 용출되는 성분의 brix의 함량이 낮음으로써 잡균 오염 등에 취약할 수 있으며 또한 액상에 용출되는 성분의 함량이 낮아 지미성분의 함량이 낮고 상대적으로 조미소재화 할 때 염도 등에 비해 지미성분의 함량이 낮으면 배합비율이 한정적일 수 밖에 없는 등, 결론적으로 상품으로써의 가치가 낮아지는 문제점이 있다고 하겠다.

성분의 용출이 용이하도록 하기 위한 교반이 가능한 고형분 함량에 대한 간이실험 결과 20~25brix가 가장 적당하였으며 이에 따라 본 실험구간으로써 보다 세밀하게 20brix와 23brix 그리고 25brix로 설정하고 발효온도를 45℃ 조건으로 하여 무염상태에서 24시간 동안 우선 발효테스트를 진행하였다. 그 결과 *Aspergillus oryzae* SRCM102487 균주를 접종한 koji로 제조한 Sample의 pH는 고형분함량이 높을수록 pH가 다소 하락하였으며 시판 곰팡이로 제조한 Control의 경우 고형분함량이 높을수록 pH가 소폭 높아졌으나 미미하였다. 두 실험구에서 고형분함량이 높을수록 아미노태질소함량(이하 'AN')과 총질소함량(이하 'TN') 그리고 glutamate함량(이하 'GA')은 높아지는 경향을 확인할 수 있었다. 이화학적 결과로 볼 때 25brix가 가장 결과가 좋았던 구간이었지만 균질화부분이나 여과할 때 뽁뽁하여 여과수

율이 굉장히 낮음을 확인하였다. 또한 고형분의 함량이 너무 높으면 대량 현장생산시 교반 압력의 부하로 23brix에 비해 균질화가 어려울 경우 염의 용해나 잡균의 증식 등 대량 생산에 다른 문제점이 발생할 것으로 예상하여 조미소재로의 확장가능성이나 고GA, 고TN생장액을 얻기 위해서는 고형분 함량 23brix가 가장 적합할 것으로 본 실험결과 판단하였다.

Table 5. 고형분(Brix)함량에 따른 저염 액상 발효장류 분석 결과

Quality characteristics	Brix	Control	Sample
pH	20	5.10±0.01	5.40±0.01
	23	5.17±0.01	5.28±0.02
	25	5.27±0.03	5.21±0.02
Amino type nitrogen content (mg%)	20	557.29±2.87	625.11±1.26
	23	642.73±12.88	734.60±3.64
	25	737.19±4.13	783.87±5.46
Total nitrogen content (N%)	20	1.14±0.01	1.38±0.01
	23	1.39±0.01	1.67±0.01
	25	1.61±0.01	1.74±0.01
Glutamate content (%)	20	0.79±0.01	0.92±0.01
	23	0.90±0.01	1.00±0.01
	25	0.98±0.01	1.06±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)

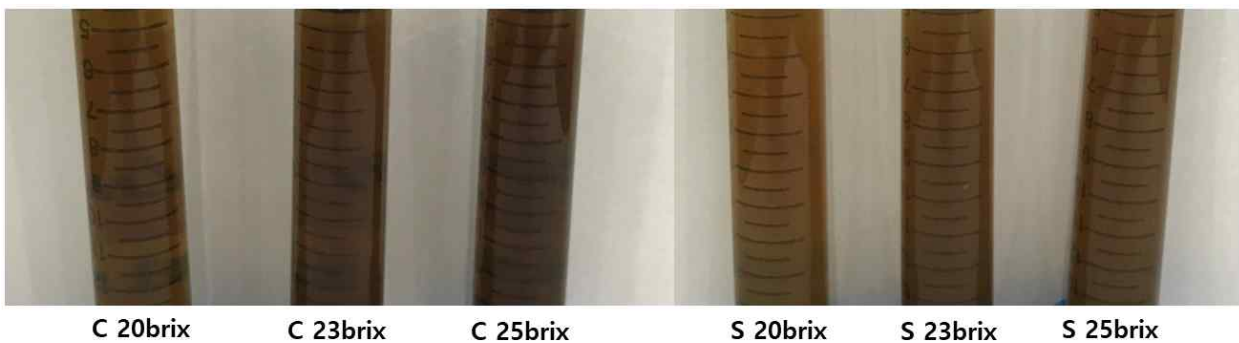


Fig 5. 고형분(Brix)함량에 따른 저염 발효장류의 사진

(2) 발효온도 선정 실험

- 상기 실험 결과에 따라 brix함량은 23brix로 동일한 조건으로 설정하였으며, 발효온도를 35°C, 45°C 그리고 55°C로 구간을 나누어 무염상태에서 24시간동안 발효하였다. 온도별 분해 정도를 분석한 결과 두 처리구 모두 45°C에서 발효하였을 때 AN과 GA가 높게 측정되었으

며 대표적인 간장의 품질지표로 사용되는 TN은 55℃로 발효하였을 때 높은 결과를 보였다. 반면 35℃로 발효하였을 때 이상발효 상태의 향이 관찰되었으며 발효온도 55℃로 분해하였을때도 pH는 높게 측정되었으며 고온발효시 TN의 용출함량이 높더라도 추후 조미소재로 배합하였을 때 색상이 진해질 우려가 있는 것으로 나타나 최적의 발효온도를 45℃로 셋팅하는 것이 바람직할 것으로 판단하였다.

Table 6. 발효온도에 따른 저염 액상 발효장류 분석 결과

Quality characteristics	Fermentation temperature (°C)	Control	Sample
pH	35	5.92±0.01	6.10±0.02
	45	5.17±0.01	5.28±0.02
	55	6.01±0.01	6.03±0.01
Amino type nitrogen content (mg%)	35	592.49±1.54	681.72±17.71
	45	642.73±12.88	734.59±3.65
	55	472.09±6.83	447.79±3.01
Total nitrogen content (N%)	35	1.39±0.01	1.53±0.01
	45	1.39±0.01	1.66±0.01
	55	1.44±0.02	1.86±0.01
Glutamate content (%)	35	0.75±0.01	0.71±0.01
	45	0.90±0.01	1.00±0.01
	55	0.28±0.01	0.53±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)

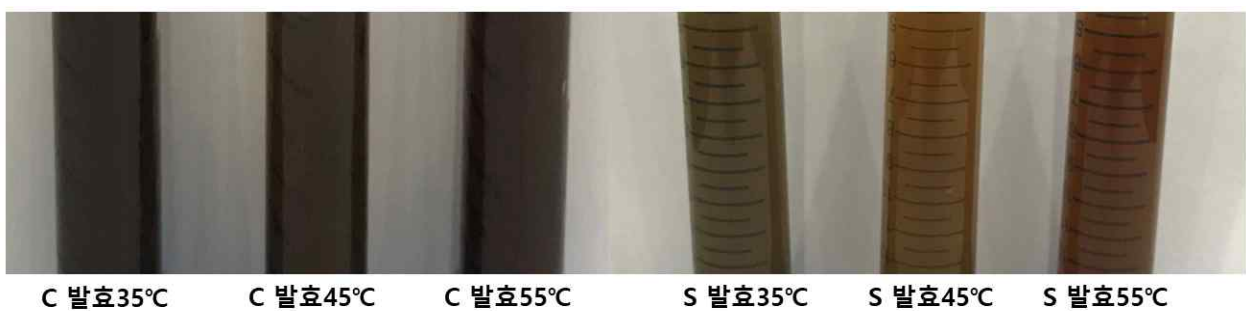


Fig 6. 발효온도에 따른 저염 발효장류의 사진

(3) 발효시간 선정 실험

- 최적의 발효시간 선정을 위해 고형분 23brix, 발효온도 45°C에서 총 7일에 거쳐 분해하고 발효1일, 발효3일, 발효5일, 발효7일로 구간을 나누어 품질변화를 분석하였다. 다음과 같이 3일차에서 GA분해용출이 관찰되었으며 그 이후로 소폭 증가는 하였으나 큰 변화는 없었다. 다만 발효7일차에 AN, TN, GA함량은 높으나 보였으나 pH의 변화 및 자체 관능을 확인했을 때 7일차 이후로 pH의 하락 및 약간 시큼한 향이 시작되어 소량 제조가 아닌 대량 생산시 안정적으로 제조공정을 연장 운영하기에는 무리가 있다고 판단되어 지므로 5일차에 발효를 종료하기로 하였다.

Table 7. 발효시간에 따른 저염 액상 발효장류 분석 결과

Quality characteristics	Fermentation period (day)	Control	Sample
pH	1	5.17±0.01	5.28±0.01
	3	5.09±0.03	5.10±0.02
	5	4.94±0.01	4.93±0.02
	7	4.94±0.01	4.83±0.02
Amino type nitrogen content (mg%)	1	642.73±12.88	734.59±3.64
	3	827.99±9.24	860.30±2.66
	5	889.37±1.47	939.61±2.31
	7	894.48±6.58	959.41±1.82
Total nitrogen content (N%)	1	1.39±0.01	1.57±0.01
	3	1.49±0.01	1.56±0.01
	5	1.58±0.01	1.63±0.01
	7	1.61±0.01	1.62±0.01
Glutamate content (%)	1	0.90±0.01	1.00±0.01
	3	1.29±0.01	1.27±0.01
	5	1.28±0.01	1.30±0.01
	7	1.32±0.01	1.32±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)

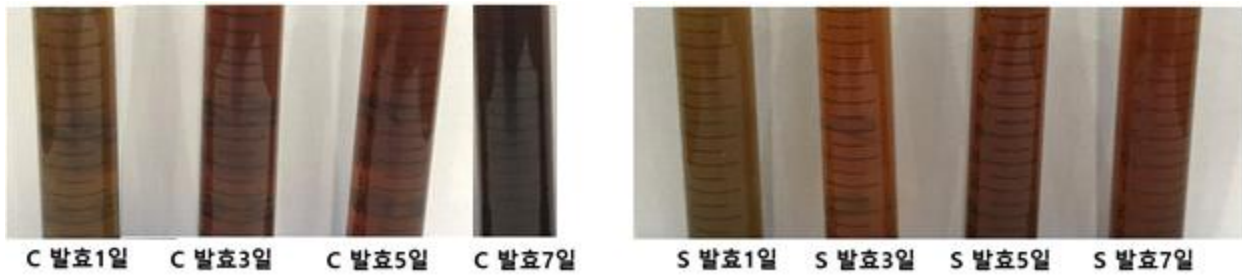


Fig 7. 발효시간에 따른 저염 발효장류의 사진

(4) 염 농도 선정 실험

◦ 염 농도 차이에 따른 액상 발효장류의 이화학적 분석결과는 다음과 같다. 고형분 23brix, 발효온도 45℃, 발효시간 5일 조건 하에서 염 농도는 무염(0%), 5%, 10%, 15%로 설정 후 발효 시작 시점부터 염을 투입하여 실험을 진행하였다. Sample구의 경우 염 농도가 높을수록 pH에서 비교적 안정적인 모습이 관찰되었으나 모든 실험구에서 염 농도가 높을수록 AN, GA 함량은 상대적으로 낮아지는 것이 일관성있게 확인되었다. 따라서 단백질의 분해에 염이 끼치는 영향이 큰 것으로 판단되며 본 실험에서 염 포함구에 비해 무염조건의 분해효율이 월등히 우수한 바 대량생산조건에서 품질열화가 되지 않는 선에서 발효조건을 어떻게 잡을 것인지가 중요한 실험 포인트로 판단되었다. 다만 반복실험을 통해 염 5% 이하구간에서는 발효시간이 경과됨에 따라 pH가 감소되고 잡균취가 나며 TN이 떨어지는 등 품질표준화에 애로사항이 발생하는 것으로 판단되었으며 염 15%에서는 염 농도가 낮은 실험구에 비해 AN, TN, GA함량이 일률적으로 낮게 나타남으로써 조미소재로써의 가치가 떨어지므로 적당한 분해율과 품질에 안정적인 염 농도를 본 실험에서는 10%로 판단하였다. 염 10%는 일반적인 한식방식에서의 염도 18~22% 수준과 양조방식에서의 16~18% 수준과 비교에서 현저히 낮은 염농도 수준이나 본 실험의 목적을 달성하기 위해서는 염농도를 저염화하는 것이 중요한 실험의 목적이 된다고 할 수 있겠으며 발효시작일부터 염을 투입할 경우 조미소재의 가장 중요한 포인트인 GA분해율이 낮아짐에 따라 초기 저염으로 시작하여 염도를 단계별로 상승시키는 등의 염 투입시기 조정을 통해 목적하는 바를 달성하기 위한 추가실험을 진행토록 하였다.

Table 8. 염 농도에 따른 저염 액상 발효장류 분석 결과

Quality characteristics	Salinity	Control	Sample
pH	0	4.94±0.01	4.93±0.02
	5	4.83±0.01	4.88±0.01
	10	4.65±0.02	5.14±0.01
	15	5.03±0.01	5.17±0.03
Amino type nitrogen content (mg%)	0	889.37±1.47	939.62±2.31
	5	619.09±7.14	710.40±1.74
	10	469.63±4.27	532.62±8.05
	15	347.12±5.39	383.40±17.85
Total nitrogen content (N%)	0	1.49±0.02	1.58±0.01
	5	1.71±0.01	1.96±0.01
	10	1.65±0.01	1.64±0.01
	15	1.45±0.01	1.56±0.01
Glutamate content (%)	0	1.27±0.02	1.29±0.02
	5	0.87±0.01	1.04±0.02
	10	0.66±0.01	0.70±0.01
	15	0.42±0.02	0.52±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)

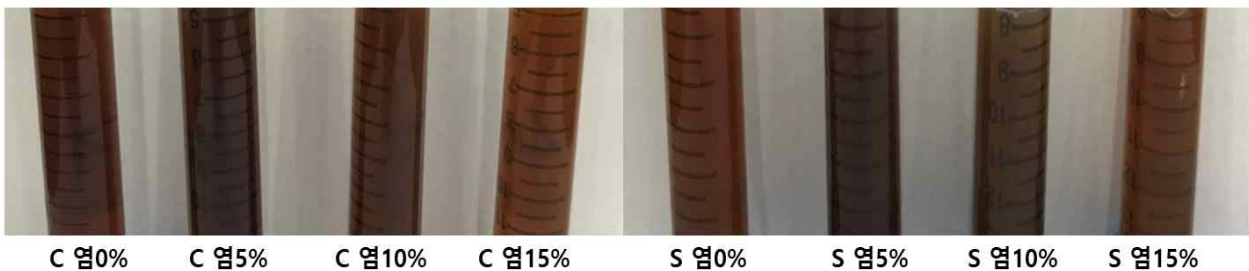


Fig 8. 염 농도에 따른 저염 발효장류의 사진

(5) 염 투입시기 선정 실험

- 상기 실험에서 저염 액상 발효장류의 품질에 안정적인 염 농도는 10%임을 확인하였고 이를 바탕으로 GA분해율이 높으면서 품질을 안정적으로 운영할 수 있는 적당한 염 투입시기를 알아보기 위해 고형분 23brix, 발효온도 45℃, 발효시간 5일, 염 농도 10% 조건 하에서 염 투입시기를 발효1일차, 발효2일차, 발효3일차, 발효4일차, 발효5일차에 각각 염을 투입하여 최종 발효완료일인 5일차에 목적하는 품질수준이 나오는 지를 분석토록 하였다. 그 결과 발

효4일차에 염을 투입한 처리구의 GA함량이 가장 높게 나타났으며 또한 AN과 TN함량도 높은 결과를 보였으나 pH가 약간 저하되는 현상을 보였다. 한편 발효1~2일차에 염을 투입한 처리구의 경우 pH는 안정적이거나 GA, AN, TN함량이 낮았고 발효4일차 이후에는 GA, AN, TN함량은 높으나 pH가 저하되는 현상을 보여 대량생산에서는 통제가 불안정한 모습을 보일 가능성이 있기에 발효 3일차에 염을 투입하여 공정을 안정적으로 운영하는 것이 대량생산화에 유리할 것으로 판단하였다.

Table 9. 염 투입시기에 따른 저염 발효장류 분석 결과

Quality characteristics	Fermentation period (day)	Control	Sample
pH	1	4.77±0.01	5.12±0.01
	2	4.66±0.02	4.86±0.02
	3	4.64±0.01	4.84±0.01
	4	4.62±0.01	4.63±0.01
	5	4.59±0.01	4.57±0.01
Amino type nitrogen content (mg%)	1	617.49±2.31	684.73±1.82
	2	781.50±14.84	708.41±6.86
	3	818.93±11.48	855.00±2.59
	4	832.93±9.31	843.01±5.39
	5	826.38±6.93	830.89±5.44
Total nitrogen content (N%)	1	1.48±0.01	1.61±0.01
	2	1.51±0.01	1.52±0.01
	3	1.54±0.01	1.65±0.01
	4	1.50±0.01	1.67±0.01
	5	1.61±0.01	1.67±0.01
Glutamate content (%)	1	0.87±0.02	0.93±0.01
	2	1.11±0.01	0.96±0.01
	3	1.14±0.01	1.17±0.02
	4	1.14±0.01	1.20±0.01
	5	1.11±0.01	1.18±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)

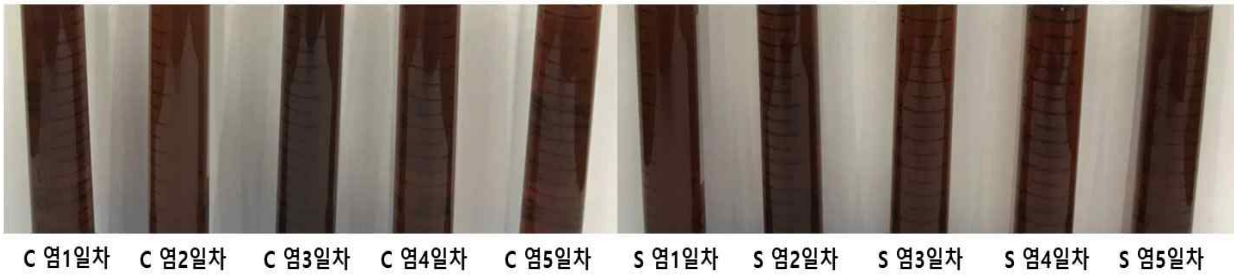


Fig 9. 염 투입시기에 따른 저염 발효장류의 사진

- 최종적으로 개발코자 하는 저염 발효장류는 고형분함량 23brix, 발효온도 45°C, 발효시간 5일, 최종 염 농도 10%, 발효 3일차 염을 투입하는 조건을 최적 발효조건으로 설정하였으며 본 실험에서 도출된 제조조건은 저염하에서 이상발효가 되지 않고 조미기능이 극대화된 저염 액상 발효장류의 제조조건을 도출하였다고 하겠다.

다) 저염 액상 발효장류 제조공정 Scale-up 및 process 표준화

- 본 연구를 통해 조미성분의 용출이 극대화된 저염 액상 발효장류의 최종 제조공정은 본 생산전에 lab-scale을 거쳐 현장에 적합한 제법연구를 실시하고 품질과 관능을 확인함으로써 원하는 품질과 관능조건이 도출된 조건으로 Scale-up을 통해 대량생산체계를 갖추도록 하였다. 표준화된 품질의 제품에 대한 대량 제조공정을 갖추는 것은 신제품의 레시피를 도출하고 개발하는 것 만큼이나 중요한 사항으로 이를 위해서는 대량 실험생산을 통해 process를 표준화하는 것이 필요하다.

Table 10. 최종 조건으로 제조한 Scale-up 저염 발효장류 품질 분석 결과

Quality characteristics	Control	Sample
pH	4.69±0.02	4.88±0.01
Amino type nitrogen content (mg%)	805.50±7.21	830.98±5.53
Total nitrogen content (N%)	1.60±0.01	1.73±0.01
Glutamate content (%)	1.10±0.01	1.21±0.01

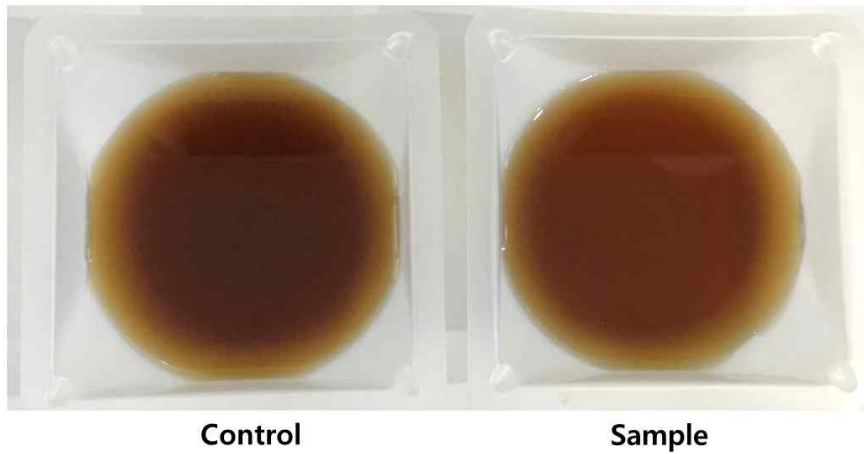


Fig 10. Scale-up 저염 액상 발효장류의 사진

< 저염 발효장류 제조공정도 >

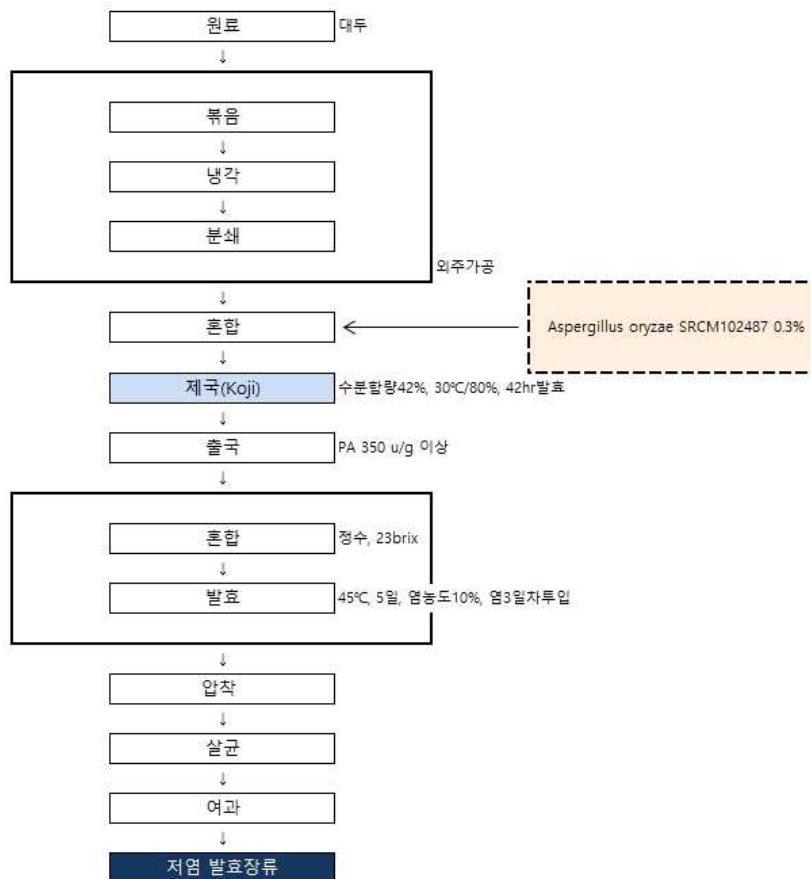


Fig 10. 저염 액상 발효장류 제조공정도

라) 최종 조건으로 제조한 Scale-up 저염 액상 발효장류 안정성 실험

- 본 연구는 천연조미소재의 base로 사용되는 저염 발효장류의 미생물 오염 및 저장, 유통 중 2차 오염에 대한 안정성을 확인하기 위한 것으로 Scale-up을 통해 실험생산된 발효장류를 대상으로 안정성에 대한 검증작업을 진행하였으며 Scale-up 생산된 저염 액상 발효장류에 대한 품질 분석 결과는 다음과 같음

Table 11. Scale-up 저염 발효장류 품질 분석

Quality characteristics	Standard	Result
Salinity (%)	10.0±0.5	10.1±0.15
Alcohol (%)	3.0 이상	3.5±0.06
Brix(%)	32.5 이상	33.5±0.25
Pure-extract (%)	23.0 이상	23.4±0.10

- 본 연구를 통해 생산된 저염 액상 발효장류의 미생물 분석 결과 효모는 불검출되었으며 일반세균 또한 다른 양조간장류와 비슷한 수준으로 실험 생산을 통한 Scale-up을 통한 제법상의 문제는 없는 것으로 판단하였음.

Table 12. Scale-up 저염 발효장류 미생물 분석

microbial distribution	일반세균(cfu/ml)	효모(cfu/ml)
제품화 1일차	7.6 × 10 ¹	-
제품화 3일차	4.3 × 10 ¹	-
제품화 7일차	9.0 × 10 ⁰	-

- 천연발효 조미소재 제품의 base로 사용될 예정인 저염 액상 발효장류의 안정성을 판단하기 위하여 미생물 안정성 테스트를 실시하였다. 주정함량이 3v/w% 함유된 저염 액상 발효장류를 본 실험의 시료로 사용하였으며 효모를 접종하지 않은 대조구와 임의로 유통 중 오염에 의한 방부력을 측정하기 위해 효모(*Zygo. rouxii* : 가스발생균) 및 *Bacillus subtilis*를 최종 균수가 10⁵ CFU/ml 수준이 되도록 활성화한 후 저염 액상 발효장류에 접종하여 개봉한 호기적 상태와 밀봉한 혐기적 상태로 분류하여 30℃/37℃ 인큐베이터에서 일정기간 동안 보관하면서 산막효모와 기포 발생여부를 관찰하였다. 실험결과 본 연구를 통해 개발된 저염 액상 발효장류 제품은 다음과 같이 30℃의 효모접종구 및 효모 비접종구 모두에서 가스 및 산막효모가 발생하지 않았다. 또한 *Bacillus subtilis*를 접종하고 37℃에서 배양한 결과 가스발생은 관찰되지 않아 식품용 소재로써 안전한 것으로 판단하였다.

Table 13. 30°C에서의 저염 액상 발효장류의 안정성 실험 결과

30°C 보존기간(일)	개봉	밀봉
1	N.D	N.D
3	N.D	N.D
5	N.D	N.D
7	N.D	N.D
9	N.D	N.D
12	N.D	N.D
15	N.D	N.D
17	N.D	N.D
20	N.D	N.D

(○: 산막생성, ◎: 산막 다량 생성, +: 가스발생(소), ++: 가스발생(중), +++: 가스발생(대), N.D: Not Detect)

Table 14. 37°C에서의 저염 액상 발효장류의 안정성 실험 결과

37°C 보존기간(일)	개봉	밀봉
1	N.D	N.D
3	N.D	N.D
5	N.D	N.D
7	N.D	N.D
9	N.D	N.D
12	N.D	N.D
15	N.D	N.D
17	N.D	N.D
20	N.D	N.D

(○: 산막생성, ◎: 산막 다량 생성, +: 가스발생(소), ++: 가스발생(중), +++: 가스발생(대), N.D: Not Detect)

- 이상의 실험결과를 통해 Scale-up 생산된 저염 액상 발효장류는 연구소 설계 제품과 동일하게 생산되었으며 식품용 소재로서 안정할 것으로 판단하였으며 생산부에서는 차후 생산시에도 각 공정 중 위생상태를 깨끗이 하여 생산 중 1차 오염이 없도록 철저히 관리하여야 하며 매 생산시마다 철저한 미생물검사를 실시하여 생산 중 오염여부를 확인함은 물론 본 연구를 통해 설계된 작업표준 및 QC공정도에 맞게 관리하여 제품을 생산하여야 함.

마) 저염 액상 발효장류 최적 작업표준안 및 QC공정도 설계

◦ 조미소재 개발을 위한 저염 액상 발효장류는 단순한 원료혼합이 아닌 미생물에 의한 발효과정을 거쳐야하며 발효공법은 소량 발효조와 대량 Scale-up에 따른 발효 품질의 차이가 큰 식품으로 대량 제법의 확립은 매우 중요한 과정이라고 할 수 있다. 본 연구에서도 소량 발효조의 결과를 생산 현장에 적용하는 process 표준화 연구를 진행하고자 하였다. 이를 통해 도출된 표준화 공정을 위해 현장에서 일하는 생산자들이 준수해야 할 작업표준안은 품질의 안정성이 매 생산시마다 확보될 수 있도록 하기 위함이며 또한 품질부서에서는 개발된 제품의 품질이 균일하게 매 생산되는지를 확인하여 생산시마다 매 Lot별 QC공정도에 맞게 반드시 관리를 해야 한다. 따라서 본 연구를 통해 *Aspergillus oryzae* SRCM102487균주를 활용한 최적화 저염 액상 발효장류의 조건 확립 및 대량 생산 공정 설계를 통하여 상기와 같이 제조공정도를 작성 한 후 이를 통해 품질 표준화를 위한 작업표준안과 QC공정도를 아래와 같이 설계하였다.

순차장류 주식회사		작업표준안 저염 발효장류				문서 번호		SC-HP-0815				
						개정 일자	1	개정 번호	1			
						제 이 자	1					
순서	공정명	사용설비	공정내용	관리점	공정관리 및 검사					점검부서		
					관리	검사	항목	기준	주기	기록	담당	
0	원료입고	블로워	수매한 대두를 입고		√				입고시	원재료 입고일지	입고담당자	생산
1	원료저장	싸이로 블로워	습기에 의한 품질변화 방지를 위해 항온항습기 가동		√		가동여부				작업자	생산
2	원료가공		외주를 통해 대두를 볶음, 냉각, 분쇄함									
3	원료입고		볶은대두분 입고	수분함량		√	수분(%)	10~13%	입고시	원재료 입고일지	입고담당자	생산
4	혼합		볶은대두분에 정수 혼합	수분함량	√		수분(%)	42.00%		국가배합 작업일지	작업자	생산 QC
5	접종		<i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487 접종	균 접종량	√		접종량	0.30%		국가배합 작업일지	작업자	생산 QC
6	제국	공조기	온도30°C/습도80% 발효실에서 42시간 제국	발효온도, 발효시간	√		온도 시간	30°C 42hr		국가제국 작업일지	작업자	생산 QC
7	출국			단백질분해 활성도	√		PA	350 u/g 이상		국가제국 작업일지	작업자	생산 QC
8	혼합	혼합기	국자와 정수를 혼합	고형분함량	√		고형분	23 brix		국가제국 작업일지	작업자	생산 QC
9	발효/보염	혼합기	45°C에서 5일 발효	발효온도, 발효 시간	√		온도 시간	45 °C 120hr		국가제국 작업일지	작업자	생산 QC
			발효3일자 10%염투입	염농도	√		염	10±1.0%		국가제국 작업일지	작업자	생산 QC
10	압착								1회/LOT		작업자	생산
11	살균	혼합기	압착액을 가열한 후 주정 투입	80°C이상으로 가열	√	√	살균온도 살균시간 주정투입량	80°C 이상 30분 이내 3%이상		국가제국 작업일지	작업자	생산
12	여과	공프레서 여과기	살균한 발효액을 규조토 여과기로 1차 여과후, 카 트리지 필터여과기로 2차 여과	여과물 오히려 들어가지 않도록 함	√		침강제 투입량 규조토 투입량	0.2% 이상 3kg 이상		국가제국 작업일지	작업자	생산
13	분석	분석설비	제품을 이화학분석	제품 SPEC		√	GA TN 염 pH 알코올 효모 대장균군	1.1%이상 1.6%이상 10±1.0% 5.0±0.3 3.0% 이상 불검출 음성		품질관리 대장	품질분석원	QC
14	포장	수척업 저울	포장	중량 및 제품 확인		√	중량			국가제국 작업일지	작업자	생산

Fig 11. 저염 발효장류 작업표준안

순창장류 주식회사	QC 공정도 저염 발효장류				문서 번호	SC-QC-111-31
					개정 일자	1
					페이지	1

1. 직용명
이 공정은 당사에서 제조하는 저염 발효장류에 적용한다.

순서	공정명	공정 흐름도 (FLOW CHART)	사용설비	공정 내용	관리점	공정 관리 및 검사				담당	담당부서		
						관리	검사	항목	기준				
0	원료 입고	원료 입고	보로워	수매한 대두를 입고		√				입고서	원재료 입고일지	입고담당자	생산
1	원료저장	원료저장 (45일 이하)	비아로 보로워	습기에 의한 품질변화 방지를 위해 양온 저장하기 가능		√			기동여부			직업자	생산
2	원료가공	원료가공		외주를 통해 대두를 볶음, 냉각, 분쇄함									
3	원료 입고	원료 입고		볶음대두분 입고	수분함량	√	수분(%)	10~13%		입고서	원재료 입고일지	입고담당자	생산
4	혼합	혼합		볶음대두분에 질수 혼합	수분함량	√	수분(%)	42.00%			국가제형 작업일지	직업자	생산
5	집중	집중		Aspergillus oryzae 5RC/M102487 집중	균 집중량	√	집중량	0.30%			국가제형 작업일지	직업자	생산
6	제곡	제곡	공조기	온도 30°C/습도 80% 발효실에서 42시간 제곡	발효온도, 발효시간	√	온도 시간	30°C 42hr			국가제곡 작업일지	직업자	생산
7	출력	출력			단백질 분해 함량도	√	FA	350 w/g 이상			국가제곡 작업일지	직업자	생산
8	혼합	혼합	혼합기	국자와 질수를 혼합	고형분 함량	√	고형분	23 brix			국가제곡 작업일지	직업자	생산
9	발효/보열	발효/보열	혼합기	45°C에서 5일 발효	발효온도, 발효시간	√	온도 시간	45°C 120hr			국가제곡 작업일지	직업자	생산
				발효 3일차 열 10% 투입	열농도	√	열	10a 10%					
10	압착	압착											
11	실감	실감	혼합기	압착액을 가열한 후 수증기 투입	80°C 이상으로 가열	√	실감온도 실감시간 수증기 투입량	80°C 이상 30분 이내 3% 이상			국가제곡 작업일지	직업자	생산
12	여과	여과	공조제서 여과기	상관한 저염 발효장류액류 규조토 여과기로 1차 여과 후, 카드러지 필터여과기로 2차 여과	이물 포함 여부	√	최종여과 투입량 규조토 투입량	0.2% 이상 3kg 이상			국가제곡 작업일지	직업자	생산
13	분석	분석	분석설비	최종 저염 발효장류액 제품물 이화학적 분석	제품 SPEC	√	GA, TN, 열, pH, 알코올, 조산소, 대장균군	1.1% 이상, 1.6% 이상, 10a 10%, 5.0a 0.3, 3.0% 이상, 불일종 음성			품질관리 대장	품질분석원	QC
14	포장	포장	수직형 저울	포장	중량 및 제품 확인	√	중량				발효액 포장일지	직업자	생산

Fig 12. 저염 발효장류 QC공정도

발급번호: MAM8-88AL-YHQH-V5ZX-HMFT



식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	장분주	1985년 07월 20일
주소	전라북도 순창군 순창읍 장현로 286, 403호 (대산)	063 6939682
영점(상호)	순창지	영양등록번호
영점주소	전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 41-71	20120499043
식품의 유형	기타장류	품목제조보고번호
제품명	우리콩발효액	20120499043104
유통기한	제조일로부터 12개월	
품질유지기반		
원재료명 또는 성분명 및 첨가물	콩에 기재	
유도 성분	포장에 기재	
보관방법 및 포장재질	포장에 기재	
포장방법 및 포장단위	포장에 기재	
성상	건장 고유의 색채와 향미를 가지고 미미, 이취가 없음	
품목의 특성		
■ 고지방·저염량 식품 해당 여부	[]예 []아니오 []해당 없음	
■ 열·유리병 실험대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부	[]예 []아니오	
■ 고염분식품으로 표시해 판매하는 식품 해당 여부	[]예 []아니오	
■ 알코올 함유 여부	[]비알코올 []알코올	

가) 「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2021년 10월 13일
보고인 장분주

전라북도 순창군수 귀하

품목제조번호: 20120499043104

처리부서: 품질관리과 민원과 | 관리직성명: 최길영 | 처리일자: 2021년 10월 14일



Fig 13. 저염 액상 발효장류 “우리콩발효액” 품목제조보고서

바) 저염 액상 발효장류 기반 천연발효 조미소재 최적 배합비 설계

◦ 본 연구를 통해 제조공정이 확립된 액상 발효장류는 대표적인 액상발효장류인 간장류에 비해 염도가 낮으며 발효시간이 짧음에 의해 색상이 열음으로 다양한 소재에 본연의 색상을 해치지 않는 제품의 개발이 가능하고 높은 지미 풍미를 기반으로 요리의 맛을 돋우는 역할을 할 것으로 기대된다. 본 실험을 통해 개발된 저염 액상 발효장류를 기반으로 하는 천연 발효 조미소재는 다양한 식품 및 요리에 감칠맛과 다양한 풍미의 코쿠미 등을 줌으로써 요리의 질을 한층 높힐 수 있을 것으로 예상되어진다. 본 실험에서는 저염 액상 발효장류의 개발 뿐만 아니라 이러한 저염 발효장류를 base로 다양한 고부가가치 식품소재를 이용한 배합공정을 거치도록 하며 적절한 배합비율별로 혼합 후 살균과 유통품질의 안정성을 확보하기 위한 공정을 포함하여 최적의 배합비를 설계하도록 하였다. 최종적으로 확정된 배합비를 토대로 저염 발효장류 base로 배합한 조미소재(Sample)의 아미노태질소함량(AN)과 총질소함량(TN) 그리고 Glutamate함량(GA)을 여과 전과 여과 후로 나누어 분석을 진행하도록 하였다. 여기에 기존의 액상 발효장류라고 할 수 있는 양조간장을 base로 하여 배합한 조미소재(Control)를 대조구로 설정하여 기존 양조 base 조미소재와 개발 저염 발효장류 base 조미소재 간의 품질특성을 본 연구를 통해 비교토록 하였다. 저염 발효장류 base 조미소재의 경우 양조 base 조미소재에 비해 AN, TN함량이 높았으며 특히 GA함량의 경우 약 2.5배 이상 높은 것을 확인할 수 있었다. 개발된 조미소재는 여과 전/후의 경우 AN, TN, GA함량의 차이가 크지 않았으며 여과 후의 색상이 맑아 외관상에도 좋을 것으로 판단되어 최종적으로 배합한 조미소재의 경우 여과처리를 하는 것이 좋을 것으로 판단하였다.

Table 15. “만능요리 순” 배합비 (양조간장 base 조미소재와 저염 발효장류 base 조미소재)

Raw materials	Control	Sample
Base	55.0	55.0
Vegetable concentrate	0.4	0.4
Yeast powder	4.0	4.0
Glucose	5.0	5.0
Salt	7.0	7.0
Alcohol	4.0	4.0
Water	24.6	24.6
	100	100

Table 16. 양조간장 base 조미소재와 개발 저염 액상 발효장류 base 조미소재 여과 전/여과 후 분석 결과

Quality characteristics	Condition	Control	Sample
Amino type nitrogen content (mg%)	Before filtration	377.78±5.14	583.11±7.14
	After filtration	372.33±5.53	566.30±8.68
Total nitrogen content (N%)	Before filtration	1.44±0.01	1.59±0.01
	After filtration	1.41±0.01	1.53±0.01
Glutamate content (%)	Before filtration	0.46±0.01	1.25±0.01
	After filtration	0.45±0.01	1.19±0.01

* Value are mean ± SD (n=3)

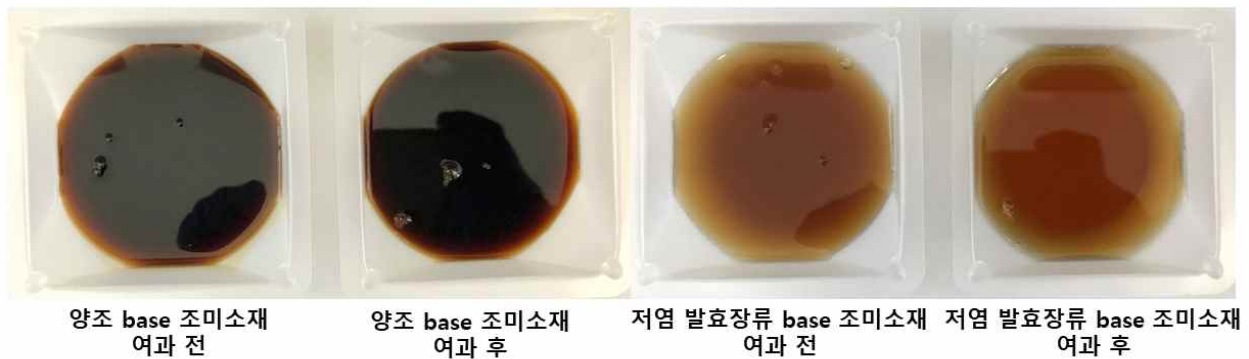


Fig 14. 양조간장 base 조미소재와 개발 저염 액상 발효장류 base 조미소재 여과 전/여과 후

- 또한 저염 발효장류 기반 천연발효 조미소재 최종 개발제품에 대한 출시 가능성을 점검하기 위해 1단계 자체 연구원을 대상으로 풍미, 기호도 분석을 통해 간이 기호도 실험을 실시하고 Scale-up으로 가기 위한 기초자료로써 활용하고자 하였으며 이후 대량 Scale-up으로 시제품을 제작하여 2단계 풍미기호도 분석으로 평점법에서 항목척도를 사용하여 9점 척도로 관능 기호도를 평가하였다. 관능을 비교할 대조구는 양조 base로 배합한 조미소재(Control)로 하였으며, 양조 base조미소재와 저염 발효장류 base 조미소재(Sample)간의 관능특성 비교분석을 실시하여 개발제품에 대한 가치를 판단하고 안정적인 시장정착을 위한 완제품 개발로 가기 위한 기초자료로써 활용하고자 하였다.

상기의 방식으로 풍미, 기호도에 대한 실험을 실시하고 의견을 종합해본 결과 기호도에 있어서 개발된 저염 발효장류 base 조미소재의 기호도가 양조 base 조미소재보다 월등히 높았음을 알 수 있었다. 양조 base 조미소재의 경우 색이 진하고 맛과 향이 강한 간장제품의 느낌이 강하다는 의견이 가장 많았으며 저염 발효장류 base는 감칠맛이 풍부하며 조미소스류의 느낌이 강하다는 의견이 많았다. 전반적으로 점수를 살펴보았을 때 외관과 맛, 향에서 차이가 특히 많이 났으며 이는 저염 발효장류 자체에서 나오는 감칠맛과 다양한 풍미의 코쿠미의 영향으로 판단하였다. 이를 토대로 본 연구를 통해 개발된 저염 발효장류 기반 천연발효 조미소재에 대한 품질과 관능에 대한 점검을 완료함으로써 대량 프로세스를 적용하여 대량 생산 체계를 갖추었다.

Table 17. 양조 base 조미소재와 저염 발효장류 base 조미소재의 1단계 관능비교 결과

Attributes	Control	Sample
Preference	1.5	4.0
Appearance	1.8	3.8
Taste	1.8	4.0
Aroma	1.3	3.8

* 기호도 점수 : 1점~5점으로 점수가 높을수록 관능선호도가 좋음

Table 18. 양조 base 조미소재와 저염 발효장류 base 조미소재의 2단계 관능비교 결과

Attributes	Control	Sample
Preference	4.1	6.8
Appearance	4.5	6.4
Taste	3.5	6.7
Aroma	3.2	5.5

* 9: 매우 좋음, 5: 보통, 1: 좋지 않음

사) 천연발효 조미 소재 제조공정 Scale-up 및 process 표준화

- 개발된 배합비에 근거한 제조공정을 1차 실험생산과 2차 Scale-up을 통해 천연 조미소재의 제품화를 완료하였다. 또한 대량 Scale-up에 따른 품질의 안정성을 위해 작업표준안과 QC공정도를 설계하여 개발된 제품의 품질이 균일하게 매 생산되는지 관리하고자 하였다.



Fig 16. 천연발효 조미소재 scale up 실험생산

순창장류 주식회사		작업표준안				물서 번호		SC-HP-0816								
		천연발효 조미소재				개발 번호		1								
						제 목		1								
순서	공정명	사용설비	공정내용	관리점	관리	검사	항목	기준	주거	기법	담당자	장점부서	1회/LOT	품질관리 대장	품질분석원	QC
0	원료 입고	물포워	수확한 대두를 입고		√				일고사	일고사	일고사	생산				
1	원료 저장	싸이로 발포워	습기에 의한 용질변화 방지를 위해 항온항습기 가동		√		가동여부			일고사	생산					
2	원료 가공		외주를 통해 대두를 부순, 분쇄, 분쇄								생산					
3	원료 입고		부원대부분 입고	수분함량	√	수분(%)	10-13%		일고사	일고사	생산					
4	혼합		부원대부분에 정수 혼합	수분함량	√	수분(%)	42.00%				생산					
5	접종		Aspergillus oryzae SCS31102487 접종	일고사	√	일고사	0.30%				생산					
6	재주	공조기	온도 30°C/습도 60% 발효실에서 4시간 재주	일고사	√	온도/시간	30°C/4hr				생산					
7	종국		단백질분해 활성도	√	PA	350 u/g 이상					생산					
8	혼합	혼합기	국지의 정수를 혼합	고형분함량	√	고형분	23 bmk				생산					
9	발효/냉각	혼합기	45°C에서 5일 발효	발효온도, 발효 시간	√	온도/시간	45°C/120hr				생산					
10	압착		발효3일차 10%생후압	영농도	√	영	10±1.0%				생산					
11	살균	혼합기	압착액을 가열한 후 주정 투입	80°C이상으로 가열	√	살균온도/살균시간	80°C 이상/30분이상				생산					
12	여과	공조에서 여과기	살균한 발효액을 공조로 여과(분 1차 여과후, 카드리지 필터여과) 2차 여과	미용 후 오시가지 들어가지 않도록 막힘	√	미용/유량	0.2% 이상/3kg 이상				생산					

번호	분서	분서설비	제출물	제출물	검정	기준	주거	기법	담당자	장점부서
13	분석	분석설비	제출물	제출물	√	GA, TN, pH, 알코올, 효소, 대장균군				생산
14	포장	수직업	포장	중량 및 제출물	√	중량				생산
15	배합	혼합기	저온 발효정유를 배합기에 넣은 뒤 여제농축액 효 오추중추, 모도담, 소금 정수를 넣고 배합한다.		√					생산
16	살균	혼합기	천연발효 조미소재를 가열	80°C 이상으로 가열하여 효소 제거	√	살균온도	80°C 이상/30분이상			생산
17	냉각	혼합기	살균한 천연발효 조미소재를 냉각	가열이 끝난 조미소재를 30°C 이하로 냉각	√	냉각온도	30°C 이하			생산
18	혼합	혼합기	혼합물과 주정 혼합	고르게 섞이도록 함	√					생산
19	재분	분석설비	제출물	제출물	√	GA, TN, 알코올, (N/W), B.cereus (CFU/ml)				생산
20	포장	소용중전기	포장한 천연발효 조미소재를 생장보관	발효상태 리포트작성상태		온도	15-25°C			생산
21	출하		제출물							생산

Fig 17. 천연발효 조미소재 작업표준안

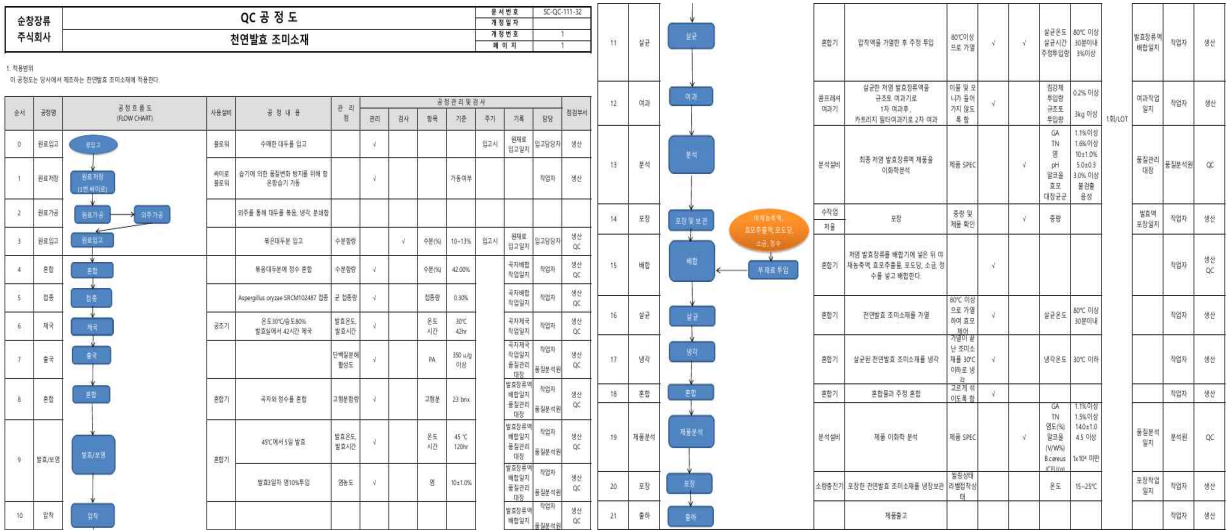


Fig 18. 천연발효 조미소재 QC공정도

아) 발효장류 기반 천연발효 조미소재 상품화

- 본 연구를 통해 개발된 천연발효 조미소재는 안정적인 유통품질의 확보를 위해 시제품을 대상으로 1차적으로 안전성에 대한 테스트가 필요하며 2차적으로 유통기한 설정(Q10 value) 실험을 실시하여 유통 중 품질이 안정적으로 유지되는 기한인 유통기한의 설정과 유통기한 내 소비자의 손에 동일한 품질의 제품이 도달하도록 검증과정을 진행하였다.

(1) 천연발효 조미소재 안정성 실험

- 저염 액상 발효장류 기반 천연발효 조미소재 제품 개발에 따른 유통 안정성 여부를 판단하기 위해 미생물 안정성 테스트를 실시하였다. 주정함량이 5v/w% 함유된 천연발효 조미소재 제품을 본 실험의 시료로 사용하였으며 효모를 접종하지 않은 대조구와 임의로 유통 중 오염에 의한 방부력을 측정하기 위해 효모(*Zygo. rouxii* : 가스발생균) 및 *Bacillus subtilis*를 최종 균수가 10⁵ CFU/ml 수준이 되도록 접종한 천연발효 조미소재를 개봉과 밀봉조건으로 분류하여 30°C/37°C 인큐베이터에서 일정기간 동안 보관하면서 산막효모와 기포 발생여부를 관찰하였다.

실험결과 본 연구를 통해 개발된 천연발효 조미소재 제품은 다음과 같이 30°C의 효모접종구 및 효모 비접종구 모두에서 가스 및 산막효모가 발생하지 않았다. 또한 *Bacillus subtilis*를 접종하고 37°C에서 배양한 결과 가스발생은 관찰되지 않아 제품으로써 유통 중 안전한 것으로 사료되며 결론적으로 본 연구에 의해 개발된 천연발효 조미소재 제품은 살균 처리 후 유통 시 가스 발생 및 산막효모 생성으로부터 안전할 것으로 판단하였다.

Table 19. 30℃에서의 천연발효 조미소재의 안정성 실험 결과

30℃ 보존기간(일)	개봉	밀봉
1	N.D	N.D
3	N.D	N.D
5	N.D	N.D
7	N.D	N.D
9	N.D	N.D
12	N.D	N.D
15	N.D	N.D
17	N.D	N.D
20	N.D	N.D

(○: 산막생성, ◎: 산막 다량 생성, +: 가스발생(소), ++: 가스발생(중), +++: 가스발생(대), N.D: Not Detect)

Table 20. 37℃에서의 천연발효 조미소재의 안정성 실험 결과

37℃ 보존기간(일)	개봉	밀봉
1	N.D	N.D
3	N.D	N.D
5	N.D	N.D
7	N.D	N.D
9	N.D	N.D
12	N.D	N.D
15	N.D	N.D
17	N.D	N.D
20	N.D	N.D

(○: 산막생성, ◎: 산막 다량 생성, +: 가스발생(소), ++: 가스발생(중), +++: 가스발생(대), N.D: Not Detect)

(2) 천연발효 조미소재 유통기한 예측 실험

- 장류는 발효과정 중에 생성되는 당과 아미노산의 반응에 의해 차츰 색상이 진해지는 갈변현상이 수반되며 이러한 갈변현상은 몸에 해로운 것은 아니나 조미소재로 사용시 요리의 원재료 색상을 변화시켜 식감을 저해할 수 있으므로 본 실험에서는 개발 제품의 유통 중 색상 품질 변화를 추측함으로써 유통기한 설정에 참고자료로써 사용하고자 다음과 같은 실험을 진행하였다.

본 실험에서는 조미소재의 OD값을 측정하고 연구원을 대상으로 갈변에 의한 이취 등의 관능품질을 평가하여 관능품미가 초기와 현저히 차이가 나는 다른 시점을 섭취가 불가능한 시점으로 설정토록 하였다. 실험방법으로써는 천연발효 조미소재 제품을 50℃ 그리고 60℃에서 일정기간 동안 보관하면서 OD값과 관능품질과의 연관관계 및 유통기한 설정을 위한 Q₁₀값을 0차 반응식과 1차 반응식을 통해 도출하여 두 수치를 비교토록 하였으며 OD값은 420nm에서 2% 수용액을 제조후 측정하였다.

실험결과 Table 21과 같이 0차 반응 계산 시 저장기간별 일정기간 보관하면서 그때의 관능수치를 분석하여 유통불가능 시점을 결정하였으며 50℃에서 16일 만에, 60℃에서 4일 만에 관능이 변하였다고 판단하였으며 이를 바탕으로 보존일수를 수치화하여 Q₁₀값을 도출한 결과 상온에서는 보존일수가 약 17개월 수준으로 나타났다. 천연발효 조미소재의 유통기한 설정을 위한 1차 반응 계산식은 다음의 표와 같으며 보존기간에 따른 OD값 변화와 그때의 관능편차를 분석하여 유통불가능 시점을 결정하였다. 실험결과 보존일수 변화에 따라 OD값은 상승하였고 관능 선호도는 낮아졌으며 이때 측정한 OD값을 기준으로 Q₁₀값을 도출하였다. 1차 반응을 참조로 유통기한 책정 시 저장기간과 관능과의 관계는 어느정도 비례관계라고 볼 수 있으므로 보존일수로 계산할 때 Q₁₀값은 3.97이었으며 상온(25℃)에서의 보존일수도 약 16개월 이상으로 나타나 실온 16개월 유통에 무리가 없을 것으로 추정되나 다만 염이 낮은 것을 감안하여 기간이 길수록 풍미나 향이 변질될 수 있기에 제조사의 유통환경 등을 고려하여 최종적으로 유통기한을 12개월로 설정하였다.

Table 21. 천연발효 조미소재의 0차 반응 계산식

온도(℃)	보존일수	Q ₁₀ 값
50	16	4.0
60	4	

- 상온(25℃)에서의 보존일수 = 60℃보존일수×Q₁₀^r [r=(60-25)/10]=512일(약 17개월)

Table 22. 천연발효 조미소재의 1차 반응 계산식

<p>가. D value : $\log(N_0/N_m)=(T_m-T_0)/D_T$, $D_{50}=-33.44$, $D_{60}=-8.43$ 나. Z value : $\log(D_{60}/D_{50})=(50-60)/Z$, $Z=16.71$ 다. Q₁₀ value : $10^{10/z}=3.97$ 라. 50℃ 보존실험상에서 상온(25℃) 보존일수 계산 =50℃에서의 보존일수×Q₁₀^r [r=(50-25)/10]=502일(약 16개월) 마. 60℃ 보존실험상에서 상온(25℃) 보존일수 계산 =60℃에서의 보존일수×Q₁₀^r [r=(60-25)/10]=498일(약 16개월)</p>

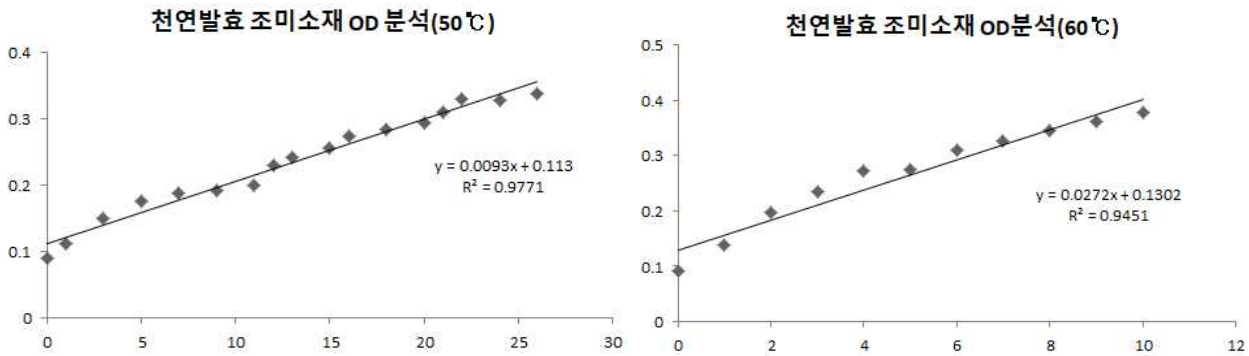


Fig 19. 50°C/60°C 에서의 천연발효 조미소재 OD값 변화

차) 소스 간편식형 발효조미소재 기반 응용식품 개발

(1) 발효조미소재 적용 맛내기 “만능요리 순” 소스시리즈 최적 배합비 설계

- 본 연구를 통해 제조공정이 확립된 발효조미소재는 지미가 강함으로써 기존의 양조간장을 사용한 소스에 비해 풍미가 우수하고 원재료의 색상을 살릴 수 있는 장점을 가지고 있다고 할 수 있으며 저염 액상 발효장류를 base로 한 간편형 제품에 대한 Line extension으로써 다양한 요리에 적합한 발효소스인 요리천사 소스 시리즈를 개발하였다.
- 당사에서는 최근의 소비트렌드에 적합한 소스 시리즈를 개발함에 있어 다양한 식품소재를 구입하여 배합비율별로 적절히 mix처리하고 유통 중 안정성 확보를 위해 살균처리를 하여 제품화를 완료하였으며 도출된 최적비율의 소스제품은 품목제조보고를 통해 상품화를 진행하였다.
 - 해당제품은 저염 액상 발효장류에서 오는 지미 뿐만 아니라 요리에 어울리는 단맛을 위해 설탕, 과당, 올리고당 등의 다양한 당류에 대한 적용 실험과 요리의 미각 증진을 위한 식초류, 다양한 천연 향신료 등의 첨가를 통해 간편하게 가정내에서 조리하는 제품에 맛과 영양을 줌으로써 한식이나 양식을 즐길 수 있다고 하겠다. 개발된 소스류는 양조간장을 사용하는 제품에 비해 염도의 조절이 용이하고 지미가 높았으며 양조간장 베이스에 비해 색상이 짙지 않아 원재료의 색상을 보다 살릴 수 있어 제품으로써의 가치가 있는 것으로 판단되었다. 결론적으로 개발되는 소스 제품은 편의성을 도모한 제품으로 다른 양념이나 지미소재의 첨가 없이 간편하게 원재료만으로써 요리가 완성되거나 맛있는 요리에 도움을 주는 제품이라고 할 수 있으며 해당년도에는 해당제품에 대해 메가쇼 등의 전시회에 출품함으로써 제품화 가능성을 테스트하였으며 향후 매출실적 발생을 통한 회사 이익 실현에 도움이 되고자 하였다.

Table 23. “만능요리 순 무침소스” 배합비 (양조간장 base와 저염 발효장류 base)

Raw materials	양조간장 base	저염 발효장류 base
Base	38	38
Oligosaccharide	26	26
Water	9.94	9.94
Fish sauce	10	10
Alcohol	5	5
Salt	2.5	2.5
Yeast extract	4	4
Sesame	3	3
Thiamine Dilaurylsulfate(TLS)	0.01	0.01
garlic extract	1.5	1.5
Xantan gum	0.05	0.05
	100.0	100.0

Table 24. “만능요리 순 절임소스” 배합비 (양조간장 base와 저염 발효장류 base)

Raw materials	양조간장 base	저염 발효장류 base
Base	19.6	19.6
Oligosaccharide	12	12
Vinegar	15	15
Water	38.09	38.09
Sugar	12	12
Salt	1.4	1.4
Yeast extract	1	1
Citric acid	0.2	0.2
Ginger extract	0.7	0.7
Thiamine Dilaurylsulfate(TLS)	0.01	0.01
	100.0	100.0

Table 25. “만능요리 순 찍어먹는 소스” 배합비 (양조간장 base와 저염 발효장류 base)

Raw materials	양조간장 base	저염 발효장류 base
Base	55	55
Oligosaccharide	5	5
Starch syrup	15	15
Vinegar	1.5	1.5
lemon extract	1	1
Salt	4	4
Citric acid	0.5	0.5
Onion extract	0.3	0.3
Radish extract	0.4	0.4
Ginger extract	0.1	0.1
licorice extract	0.1	0.1
Yeast extract	0.6	0.6
Thiamine Dilaurylsulfate(TLS)	0.01	0.01
Alcohol	4	4
Water	12.49	12.49
	100.0	100.0

- 저염 액상 발효장류를 적용한 소스는 간장시장내에서 성장하고 있는 소스시장으로의 매출진입 카테고리를 정착시키고자 하였으며 소비자 기호도에 맞춘 갖은 양념을 포함하여 프리미엄급 풍미를 강화하였으며 소스의 염도는 양조간장을 활용하였을 때에 비해 염도는 낮으며 색상은 진하지 않아 요리의 색상을 살리기에 적합한 것으로 나타났다.
- 찍어먹는 소스에 대한 기호도 검사는 미맹테스트를 완료하여 선발된 당사 인원 총 11명을 대상으로 물만두를 소스에 찍어먹도록 하였으며 양조간장을 base로 하는 제품에 두 개발 제품 모두 전체기호도가 앞서는 것으로 나타났다. 저염 발효장류를 베이스로 한 소스 제품은 양조간장을 베이스로 한 제품에 비해 향에 있어서 유의차 없는 수준에서 좀 낮은 것으로 나타났으나 맛기호도와 전체기호도에 있어 높은 수준으로 나타났다.

Table 26. 요리천사 찍어먹는 소스 제품 관능 수준 (양조간장 base와 저염 발효장류 base)

Attributes	양조간장 base	저염 발효장류 base
Appearance	4.7	6.1
Taste	4.2	6.9
Aroma	6.1	5.9
Total preference	4.6	6.9

(2) 발효조미소재 응용제품 표준화 공정 개발

- 저염 액상 발효소재를 적용함에 있어 최적화된 발효소스의 제품화 조건을 확립하고 대량 생산 공정을 표준화하기 위한 작업표준안과 QC공정도를 아래와 같이 설계하여 대량 pilot-scale을 통한 간장을 활용한 액상 소스류에 대한 실험생산을 실시하였다.

(3) 발효조미소재 응용 제품 요리천사 찍어먹는 소스 안정성 실험

- 발효장류 기반 천연발효 조미소재 응용 제품인 찍어먹는 소스제품의 유통 안정성 여부를 판단하기 위해 미생물 안정성 테스트를 실시하였다. 실험시료는 효모를 접종하지 않은 대조구와 임의로 유통 중 오염에 의한 방부력을 측정하기 위해 효모(*Zygo. rouxii* : 가스발생균) 및 *Bacillus subtilis*를 최종 균수가 10^5 CFU/ml 수준이 되도록 접종한 천연발효 조미소재를 개봉과 밀봉조건으로 분류하여 30°C/37°C 인큐베이터에서 일정기간 동안 보관하면서 산막효모와 기포 발생여부를 관찰하였다.

실험결과 본 연구를 통해 개발된 천연발효 조미 소스 제품은 다음과 같이 30°C의 효모접종구 및 효모 비접종구 모두에서 가스 및 산막효모가 발생하지 않았다. 또한 *Bacillus subtilis*를 접종하고 37°C에서 배양한 결과 가스발생은 관찰되지 않아 제품으로써 유통 중 안전한 것으로 사료되며 결론적으로 본 연구에 의해 개발된 천연발효 조미소재 응용 소스 제품은 살균 처리 후 유통 시 가스 발생 및 산막효모 생성으로부터 안전할 것으로 판단하였다.

Table 27. 30°C에서의 천연발효 조미소재 응용제품의 안정성 실험 결과(기포발생 및 산막생성)

30°C 보존기간(일)	개봉	밀봉
1	N.D	N.D
3	N.D	N.D
7	N.D	N.D
10	N.D	N.D
12	N.D	N.D
14	N.D	N.D

(○: 산막생성, ◎: 산막 다량 생성, +: 가스발생(소), ++: 가스발생(중), +++: 가스발생(대), N.D: Not Detect)

Table 28. 30°C에서의 천연발효 조미소재 응용제품의 안정성 실험 결과(효모 증감계수)

30°C 보존기간(일)	개봉	밀봉
접종농도	3.9×10^5	3.9×10^5
3	N.D	N.D
4	N.D	N.D
5	N.D	N.D
6	N.D	N.D
7	N.D	N.D

- 효모(*Zygo. rouxii* : 가스발생균)를 10^5 CFU/ml 수준으로 오염시켰을 경우 혐기적, 호기적 조건 모두에서 기포 발생 및 산막 생성이 없었으며 균수를 측정된 결과 모두 사멸한 것으로 나타났다. 상기의 실험결과로 보아 제품 개봉 후 효모에 의해 오염이 되었을 경우 소스 간장제품은 안전할 것으로 판단하였다.

Table 29. 37°C에서의 천연발효 조미소재의 안정성 실험 결과(세균 접종실험)

37°C 보존기간(일)	개봉	밀봉
1	N.D	N.D
8	N.D	N.D
12	N.D	N.D
17	N.D	N.D

(+: 가스발생(소), ++: 가스발생(중), +++: 가스발생(대), N.D: Not Detect)

Table 30. 37°C에서의 천연발효 조미소재 응용제품의 안정성 실험 결과(세균증감계수)

30°C 보존기간(일)	개봉	밀봉
접종농도	4.2×10^5	4.2×10^5
2	2.3×10^2	1.3×10^2
6	3.7×10^1	8.8×10^1

- 세균(*Bacillus subtilis*)를 10^5 CFU/ml 수준으로 오염시켰을 경우 혐기적, 호기적 조건 모두에서 기포 발생이 없었으며 균수를 계수한 결과 $10^1 \sim 10^2$ CFU/ml 수준을 유지하며 더 이상 증식하지 않았다. 일반적으로 일반세균수는 식품의 선도판정의 지표가 되며 식품 1g당 10^5 인 때가 미생물학적 안전 한계이며 10^8 인 때를 초기부패의 단계로 본다. 위의 실험결과 제품의 생산 및 유통 중 세균에 의해 오염이 되었을 경우라고 해당 소스간장제품은 안전할 것으로 판단하였다.

과) 개발 제품 공인기관 검사 의뢰

- 본 실험에 의해 최종개발된 액상 발효조미소재 제품인 “만능요리 순” 제품은 최종적으로 공인분석기관에 총질소(Total nitrogen), 글루탐산(Glutamic acid, GA)함량, 안정성(*Bacillus cereus* 및 대장균군)을 의뢰·분석하여 개발제품으로써의 최종개발목표 성능지표 및 유통 중 제품 안정성을 확보코자 하였다. 그 결과 개발된 액상 발효조미소재 제품의 총질소는 1.7%로 개발 목표치인 1.5%보다 안정적으로 높게 나타났으며 조미소재로써의 가치판단기준인 글루탐산 또한 목표치인 1.0보다 높은 1.24로 나타나 개발 제품의 목표는 달성한 것으로 판단하였다.

검사성적서		주무관	미생물산업계장	장류사업소장												
		신미진	박영수	송정훈												
우) 56048 전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 6 / 전화 063-650-5426 / 전송 063-650-5429		2021. 11. 15.														
문서번호	장류사업소-5378	시행일자: (2021. 11. 15.)														
수 신:	농업회사법인 순창장류 주식회사															
제 목:	품질검사성적서(R-597)	유통기한 또는 제조일자: 2021.11.04.														
검체번호:	R-597															
제조회사:	농업회사법인 순창장류 주식회사	식품유형 : 기타장류														
검 체 명:	만능요리 순	검사항목 : 총질소														
의뢰일자:	2021. 11.08.															
의뢰목적:	품질검사															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>검사항목</th> <th>결과</th> <th>검사항목</th> <th>결과</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>총질소</td> <td>1.7 %</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>- 이</td> <td>하</td> <td>여</td> <td>백 -</td> </tr> </tbody> </table>					검사항목	결과	검사항목	결과	총질소	1.7 %	-	-	- 이	하	여	백 -
검사항목	결과	검사항목	결과													
총질소	1.7 %	-	-													
- 이	하	여	백 -													
<p>판 정(결과): - (자가품질검사용으로 사용할 수 없음)</p> <p>위와 같이 검사결과를 통보합니다. 2021 년 11 월 12 일</p> <p>순창군장류사업소장 </p>																

검사성적서		주무관	미생물산업계장	장류사업소장												
		신미진	박영수	송정훈												
우) 56048 전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 6 / 전화 063-650-5426 / 전송 063-650-5429		2021. 11. 15.														
문서번호	장류사업소-5377	시행일자: (2021. 11. 15.)														
수 신:	농업회사법인 순창장류 주식회사															
제 목:	품질검사성적서(R-598)	유통기한 또는 제조일자: 2021. 11.04.														
검체번호:	R-598															
제조회사:	농업회사법인 순창장류 주식회사	식품유형 : 기타장류														
검 체 명:	만능요리 순	검사항목 : 글루탐산														
의뢰일자:	2021. 11.08.															
의뢰목적:	품질검사															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>검사항목</th> <th>결과</th> <th>검사항목</th> <th>결과</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>글루탐산</td> <td>12 406.2 mg/L</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>- 이</td> <td>하</td> <td>여</td> <td>백 -</td> </tr> </tbody> </table>					검사항목	결과	검사항목	결과	글루탐산	12 406.2 mg/L	-	-	- 이	하	여	백 -
검사항목	결과	검사항목	결과													
글루탐산	12 406.2 mg/L	-	-													
- 이	하	여	백 -													
<p>판 정(결과): - (자가품질검사용으로 사용할 수 없음)</p> <p>위와 같이 검사결과를 통보합니다. 2021 년 11 월 12 일</p> <p>순창군장류사업소장 </p>																

Fig 20. 개발 액상발효조미소재 공인기관성적서

타) 상품화를 위한 품목제조보고 신고

- 개발된 천연 발효 조미소재 제품 및 소스류는 제품명을 “만능요리 순(만능요리 순 씨리즈)” 로 하여 품목제조보고를 완료하였다. 또한 액상 발효조미소재를 만들기 위한 저염 액상 발효장류는 액상 발효조미소재를 만들기 위한 중요한 BASE 공정으로 다양한 제품에 적용이 가능할 것으로 판단되었으므로 “순창 우리콩발효액” 을 제품명으로 하여 품목제조보고를 완료하였다.

발급번호 : MAMB-BBAB-ERDS-BMPB-EJSH

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	장봉주	생년월일	1965년 07월 20일
	주소	전라북도 순창군 순창읍 장류로 296, 403호 (대신)	전화번호	063 8539562
영양소	영양(상호)	영양등록번호	20120499043	
	소재지	전라북도 순창군 순창읍 인척마을길 61-71		
제품정보	식품의 유형	기타장류	품목제조보고번호	20120499043105
	제품명	만능요리 순		
	유통기한	제조일로부터 12개월		
	품질유지기반			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장에 기재		
	용도 용법	맛장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	맛장에 기재		
	성상	건강 고유의 색채와 향미를 가지고 이미, 미취가 없음		
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량·저열량 식품 해당 여부 []에 []아니오 []해당 없음 ■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 []아니오 ■ 고열량식품으로 표시해 판매하는 []에 []아니오 ■ 알코올·알코올 함유의 해당 여부 []비알코올 []알코올 		
기타				

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2021년 10월 27일
보고인 장봉주

전라북도 순창군수 귀하

품목보고번호 : 20120499043105

처리부서	행정복지국 민원과	처리자성명	최길래	처리일자	2021년 10월 28일
------	-----------	-------	-----	------	---------------

발급번호 : MAMB-BBAB-HQXP-JDITY-BIEU

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	장봉주	생년월일	1965년 07월 20일
	주소	전라북도 순창군 순창읍 장류로 296, 403호 (대신)	전화번호	063 8539562
영양소	영양(상호)	영양등록번호	20120499043	
	소재지	전라북도 순창군 순창읍 인척마을길 61-71		
제품정보	식품의 유형	소스	품목제조보고번호	20120499043108
	제품명	만능요리 순 칩어하는 소스		
	유통기한	제조일로부터 12개월		
	품질유지기반			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장에 기재		
	용도 용법	맛장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	맛장에 기재		
	성상	고유의 색채와 향미를 가지고 이미, 미취가 없음		
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량·저열량 식품 해당 여부 []에 []아니오 []해당 없음 ■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 []아니오 ■ 고열량식품으로 표시해 판매하는 []에 []아니오 ■ 알코올·알코올 함유의 해당 여부 []비알코올 []알코올 		
기타				

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2021년 10월 27일
보고인 장봉주

전라북도 순창군수 귀하

품목보고번호 : 20120499043108

처리부서	행정복지국 민원과	처리자성명	최길래	처리일자	2021년 10월 28일
------	-----------	-------	-----	------	---------------

발급번호 : MAMB-BBAB-DHLLH-TRO-UEBR

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	장봉주	생년월일	1965년 07월 20일
	주소	전라북도 순창군 순창읍 장류로 296, 403호 (대신)	전화번호	063 8539562
영양소	영양(상호)	영양등록번호	20120499043	
	소재지	전라북도 순창군 순창읍 인척마을길 61-71		
제품정보	식품의 유형	소스	품목제조보고번호	20120499043106
	제품명	만능요리 순 콜리소스		
	유통기한	제조일로부터 12개월		
	품질유지기반			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장에 기재		
	용도 용법	맛장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	맛장에 기재		
	성상	고유의 색채와 향미를 가지고 이미, 미취가 없음		
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량·저열량 식품 해당 여부 []에 []아니오 []해당 없음 ■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 []아니오 ■ 고열량식품으로 표시해 판매하는 []에 []아니오 ■ 알코올·알코올 함유의 해당 여부 []비알코올 []알코올 		
기타				

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2021년 10월 27일
보고인 장봉주

전라북도 순창군수 귀하

품목보고번호 : 20120499043106

처리부서	행정복지국 민원과	처리자성명	최길래	처리일자	2021년 10월 28일
------	-----------	-------	-----	------	---------------

발급번호 : MAMB-BBAB-ZENJ-GTEZ-IPUP

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	장봉주	생년월일	1965년 07월 20일
	주소	전라북도 순창군 순창읍 장류로 296, 403호 (대신)	전화번호	063 8539562
영양소	영양(상호)	영양등록번호	20120499043	
	소재지	전라북도 순창군 순창읍 인척마을길 61-71		
제품정보	식품의 유형	소스	품목제조보고번호	20120499043107
	제품명	만능요리 순 무침소스		
	유통기한	제조일로부터 12개월		
	품질유지기반			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장에 기재		
	용도 용법	맛장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	맛장에 기재		
	성상	고유의 색채와 향미를 가지고 이미, 미취가 없음		
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량·저열량 식품 해당 여부 []에 []아니오 []해당 없음 ■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 []아니오 ■ 고열량식품으로 표시해 판매하는 []에 []아니오 ■ 알코올·알코올 함유의 해당 여부 []비알코올 []알코올 		
기타				

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2021년 10월 27일
보고인 장봉주

전라북도 순창군수 귀하

품목보고번호 : 20120499043107

처리부서	행정복지국 민원과	처리자성명	최길래	처리일자	2021년 10월 28일
------	-----------	-------	-----	------	---------------

Fig 21. 개발 예상발효 조미소재 및 응용제품 품목제조보고서

과) 제품 디자인 확정 및 출시

- “만능요리 순(만능요리 순 씨리즈)” 제품 출시를 위해 디자인을 확정하고 출시하였다. 또한 홍보브로서 제작을 통해 만능요리 순제품의 소비자 호감도를 상승시키며 제품에 대한 이해도를 향상시키고자 하였으며 정보를 보다 쉽게 제공함으로써 효과적으로 제품 홍보가 가능할 것으로 예상되어진다.



Fig 22. 발효조미소재 개발 응용제품 라벨 디자인 및 홍보브로셔



손예담

만능요리 순 만의 특장점

- 1 손창만의 차별화 제조기술
- 2 한식장류의 토종 발효미생물
- 3 신토불이 순창콩 100%
- 4 갖은 양념으로 사용

제품용량 및 포장단위
200 ml, 420 ml (포재 및 용량은 변경 가능)

유통기한
12개월
서늘한 곳에 보관 및 개봉 후 냉장 보관 권장

맞춤형 혁신식품 및 천연안심소재
기술개발사업 연구개발 제품

농림축산식품부

<만능요리순 씨리즈 홍보 리플렛>

과) 발효조미소재 기반 응용 제품 홍보 마케팅 활동

- 본 과제를 통해 1차년도와 2차년도에 개발된 저염 된장(제품명 : 손예담 순창 된장) 및 발효 조미소재(만능요리 순 씨리즈) 제품에 대한 홍보브로셔를 제작하였으나 COVID-19로 인해 축제 및 박람회 상당수가 축소 진행됨으로써 활발한 참석이 어려운 바, 당사 홈페이지에 해당 제품에 대한 적극 홍보 개시와 더불어 진행되는 다양한 박람회에 적극적으로 참여함으로써 개발제품을 홍보하고자 하였다.
- 본 연구의 주관기관인 농업회사법인 순창장류는 지역거점 중소기업으로 다양한 신제품이 매출로 연계되는데 한계가 있는 기업임. 따라서 1차적으로 기존 영업 시장을 활용한 제품의 판매망 구축과 기존 1등 제품과 연계하여 판매할 수 있는 제품의 개발을 통해 향후 당사 브랜드를 강화할 예정이며 이를 위해 전국 판매 1위를 선점하고 있는 홈쇼핑 매장에 전통풍미와 감칠맛을 강화한 순창메주 제품을 조기 출시하였으며 이를 통해 약 6억4천만원의 매출을 기달성하였음. 당사는 22년 홈쇼핑 시장의 선점 및 준비의 일환으로 순창메주 판매시 감칠맛 강화 저염된장을 추가 제품군으로 구성하여 소비자 선택권을 넓히는 등의 상품구성 협의를 1차 영업밴더와 완료하였으며 본격적인 판매활동을 추진할 예정임.



<2021. 06.17~06.20 MEGA쇼 순예담 순창된장 제품 출품 및 영업마케팅 활동>



<2021.07.09.~07.11 대한민국 대표 축제박람회 순예담 순창된장 제품 출품 및 영업마케팅 활동>



<2021.11.18.~11.21 MEGA쇼 만능요리 순 씨리즈, 감칠맛 강화 순창메주제품 출품 및 영업마케팅 활동>



< 2021.12.09.~12.12

수원MEGA쇼 만능요리 순 씨리즈 제품, 감칠맛 강화 순창메주 출품 및 영업마케팅 활동>



<홈쇼핑을 통한 선별균주 적용 순창메주 제품 홍보 판매 활동>

카) 지적재산권 확보

- 본 과제와 관련한 기술 특허출원신청을 통해 지적재산권을 확보하였다(특허출원번호 : 10-2021-0170929, 액상발효장류를 이용한 천연 조미소재의 제조방법)

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.12.02
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2021-0170929 (접수번호 1-1-2021-1399451-65)
 (DAS접근코드 7E99)
 출원인명칭 농업회사법인 순창장류주식회사(1-2013-020683-4)
 대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
 발명자성명 이정미 송예지 조유빈
 발명의명칭 액상 발효 장류를 이용한 천연 조미 소재의 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호: 0131(기관코드) - 접수번호
 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
 ※ 심사제도 안내: http://www.kipo.go.kr-지식재산제도

협동연구기관1 [(재)발효미생물산업진흥원] : 저염된장을 이용한 발효소재 개발

1) 연구재료 및 방법

가) 연구재료

(1) 사용 미생물

- 사용된 곰팡이는 시중에 판매중인 황국 1종과 진흥원에서 기보유중인 곰팡이 2종 (시중 판매되는 자사균주 및 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM102487)을 확보하여 사용하였다.

시료목록	비고
시판	시중 판매되는 타사 균주 <i>Aspergillus oryzae</i>
자사	시중 판매되는 자사 균주 <i>Aspergillus oryzae</i>
선발	1차년도 선발균주 <i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487

(2) 사용 원료

- 실험에 사용하는 대두는 국산으로 순창에서 구입하여 사용하였고, 소금은 정제염을 이용하였다.

나) 실험방법

(1) 대두발효분말의 제조

- 3종의 곰팡이(시판, 자사, 선발)는 YM(Yeast Mold Agar, BD Difco)에 접종하여 준비하고 배양된 각 균주를 액체배지에 접종하여 대두 발효 적용 균주로 이용하였다. 대두를 수세한 후, 18시간 동안 침지한 후, 수분을 제거하였다. 121°C 에서 30분동안 대두를 증자하였고, 곰팡이 수를 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL 으로 1%(w/v)접종하여 *koji*를 제조하였다. *Koji* 제조 시 발효온도는 30°C, 발효 습도는 80%로 하여 48시간동안 발효하였으며 발효진행에 따라 품온 상승 시 뒤집기를 실시하여 품온을 유지하고자 하였다. 발효가 끝난 후, *koji* 에 1.5배 가수하여 파쇄한 후, 10°C 에서 48시간동안 저온발효를 하였다. 이 후, 정제염을 염도 5%까지 첨가하였고, 55°C 에서 48시간 고온발효를 진행하였다. 고온발효가 끝난 후, 정제염을 첨가하여 염도 8%까지 보정하고 상온에서 3주 동안 숙성하였다. 면포를 이용하여 고형물을 제거하고, 대두발효물을 동결건조기를 이용하여 동결건조 하였다. 시료는 사용 전 까지 밀봉하여 냉동실에 보관하였다. 시료는 균주별 (시판, 자사, 선발) 및 제조공정별(1단계: 가수 및 파쇄, 2단계 : 저온숙성, 3단계 : 보염(5%), 4단계 : 고온숙성, 5단계 : 보염(8%), 6단계 : 상온숙성)으로 시료를 취한 후 분석을 진행하였다.

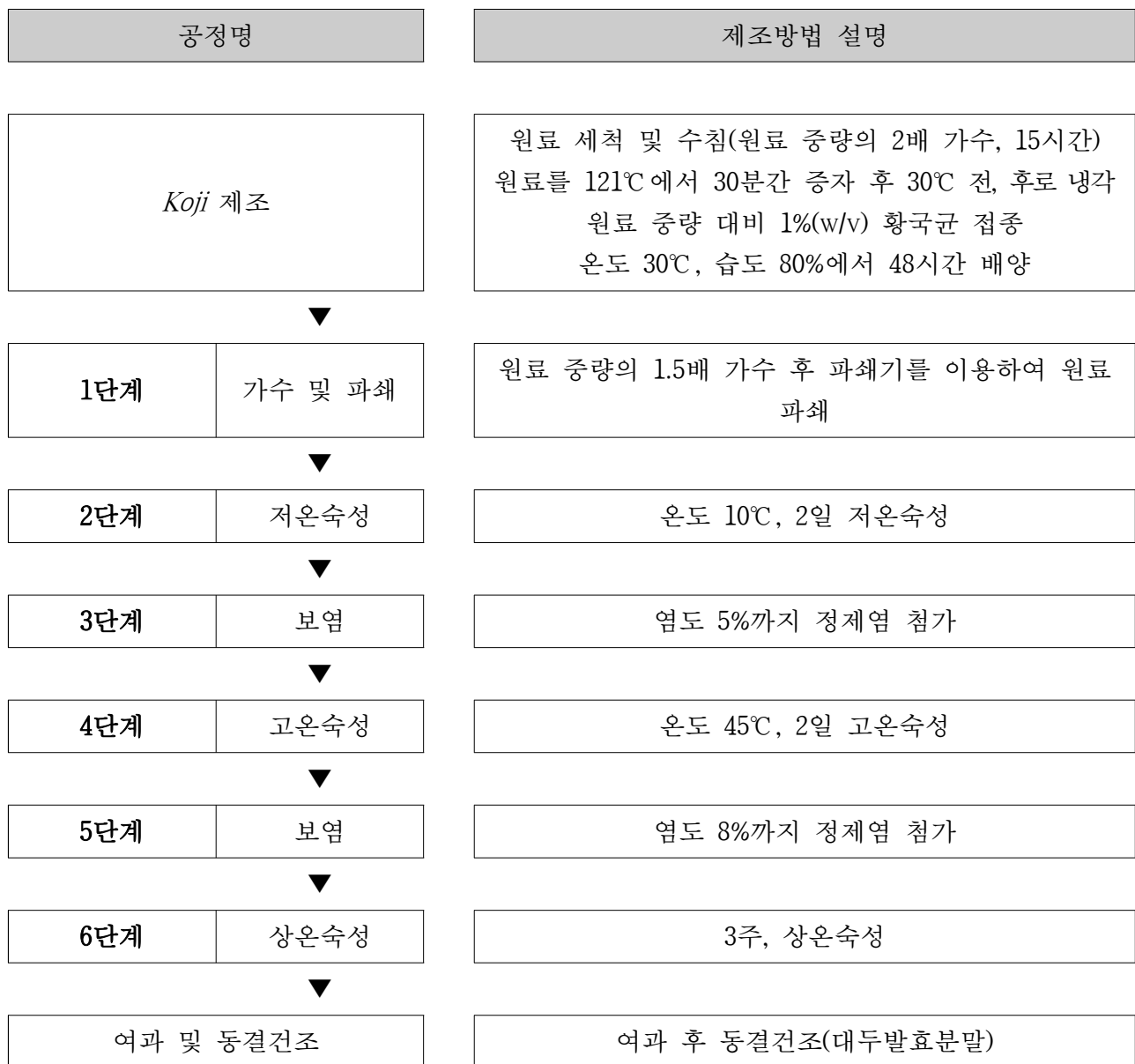


그림 1. 대두발효 숙성액의 제조공정도

(2) 이화학적 분석

(가) pH 및 산도

- pH는 pH meter(SevenMulti, Mettler Toledo GmbH, Germany)를 사용하여 측정하였으며, 총산도는 시료 1 mL에 0.1 N NaOH를 첨가하여 pH 8.3까지 도달할 때까지 소모된 양을 acetic acid 함량으로 산출하였다.

$$\text{총산도 (\%)} = \frac{V \times F \times A \times D}{S} \times 100$$

V: 0.1 N-NaOH 용액의 적정치 소비량 (mL)

F: 0.1 N-NaOH 용액의 역가

A: 0.1 N-NaOH 용액 1 mL에 상당하는 유기산의 양 (g) (초산 : 0.006)

D: 희석배수

S: 시료의 채취량 (g)

(나) 아미노태 질소(amino-type nitrogen, AN) 측정

- 아미노태 질소 함량은 (Mettler Toledo CH/MPC227, Switzerland)으로 측정하였다. 시료 1 g을 비커에 취하고 증류수 49 mL를 가하고 240초 동안 진탕 혼합하여 충분히 용해한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4로 한다. 여기에 중성 formalin 20 mL를 가하고 20초 동안 진탕 혼합한 뒤 다시 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화·적정하였다.

$$\text{아미노태 질소(mg \%)} = 0.1N \text{ NaOH 적정량} \times 1.401 \times F \times \text{희석배수} \times 100 / \text{시료량(g)}$$

(다) 염도

- 염도는 시료 10 g을 취해 증류수 90 mL을 가하여 충분히 혼합한 후 디지털 염도계 (TM-30D, Takemura Electric works Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정한 값에 희석배수를 곱하여 나타내었다.

(라) 수분함량 측정

- 수분함량은 적외선수분측정기(JP/FD-720, Kett engineering, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(마) Glutamate 함량 측정

- Glutamate 함량 측정은 glutamate content assay kit(Biovision, USA) 을 사용하여 진행하였다. 상등액을 취하여 각 kit의 분석방법에 따라 효소적인 방법으로 반응시키고 glutamate 표준곡선을 작성하여 대두발효분말에 함유된 glutamate의 함량을 정량하였다.

(3) 핵산관련물질

- 핵산관련물질은 시료 5 g에 20 mL의 0.6 M perchloric acid를 첨가하여 균질한 후 원심분리 (3,000 rpm, 10min)하여 얻은 상등액을 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 여과하였다. 여과액에 1 M KOH를 첨가하여 pH 5.5로 적정한 다음 0.6 M perchloric acid를 이용하여 50 mL로 정량하였다. 그 다음 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 0.2 μm syringe filter에 통과시킨 후 시료로 사용하였다. 전처리된 시료 10 μL를 DAD detector(254 nm), CAPCELL PAK C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm), 이동상 20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5)를 사용하여 30°C 에서 분당유속 1 mL의 조건으로 HPLC(Agilent 1200 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 동시에 분석하였다. 표준품으로 CMP(cytidine 5'-monophosphate),

UMP(uridine 5'-monophosphate), GMP(guanosine monophosphate), IMP(inosine monophosphate), hypoxanthine, AMP(adenosine monophosphate), inosine(sigma-aldrich, USA) 을 이용하였다.

표 1. 핵산관련물질 분석을 위한 HPLC 분석 조건

	Conditions
Instument	Agilent
Detector	DAD 254 nm
Column	CAPCELL PAK C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)
Temperature	30°C
Injection volume	10 μL
Flow rate	1 mL/min
Mobile phase	20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5)

(4) 유리 아미노산 함량 측정

- 유리아미노산은 시료 2 g을 취하여 3차 증류수 30 mL 넣고 교반한 후 50 mL로 정용한 후 초음파를 이용하여 20분간 추출한 후 원심 분리하여 상등액 2 mL에 5% TCA 2 mL를 넣고 원심 분리한다. 이 후 상등액을 취하여 0.02 N-HCL을 이용하여 2배(v/v) 희석한 후 0.2 μm syringe filter에 통과시킨 후 Amino acid analysis(Hitachi L-8900, Japan), UV/Vis Detector(440 nm-570 nm), Column(Hitachi 4.6×60 mm speration, Hitachi 4.6×40 mm Ammonia filtering)를 사용하여 분석하였다. 시료량은 20 uL, 이동상 Buffer set(PH-SET KANTO, Japan), 분석 온도는 50°C, buffer 유속은 0.40 mL/min, ninhydrin 유속은 0.35 mL/min 으로 분석하였다.

표 2. 유리아미노산 분석 조건

	Conditions
Instument	Amino acid analysis (Hitachi L-8900)
Detector	UV/Vis (440nm-570nm)
Column	Hitachi 4.6×60mm (speration) Hitachi 4.6×40mm (Ammonia filtering)
Buffer flow rate	0.40 mL/min
Ninhydrin flow rate	0.35 mL/min
Temperature	50°C
Injection volume	20 μL
Mobile phase	Buffer set (PH-SET KANTO)

(5) 유기산, 유리당 분석

- 유기산과 유리당의 분석은 시료 5g에 증류수 45 mL를 가하여 1시간 동안 균질화시킨 후 0.45 μ m membrane filter에 통과시킨 후 다음과 같은 분석조건으로 HPLC로 동시에 분석하였다(표 3).

표 3. 유기산, 유리당 HPLC 분석조건

	Conditions
Instrument	Agilent
Detector	RID, DAD 210 nm
Column	Aminex column HPX-87P(300×7.8mm)
Temperature	50°C
Injection volume	20 μ L
Flow rate	0.6 mL/min
Mobile phase	0.009 N H ₂ SO ₄

(6) 항산화 활성

㉞ 시료 전처리

- 시료 1 g에 증류수 9 mL를 가하여 1시간 동안 균질화시킨 후 0.20 μ m membrane filter에 통과시킨 후 사용하였다.

㉟ DPPH 라디칼 소거능

- DPPH 라디칼 소거능은 시료 50 μ L에 100 μ M DPPH 용액 150 μ L를 첨가하여 암소에서 20분간 반응 시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며 양성대조구로는 ascorbic acid를 사용하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식으로 산출하여 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity (%) =

$$[(\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}}) / \text{Absorbance}_{\text{control}}] \times 100$$

㊱ ABTS 라디칼 소거능

- ABTS 라디칼 소거능은 시료 20 μ L에 ABTS 용액 180 μ L를 첨가하여 암소에서 2분간 반응 시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성대조구로는 ascorbic acid를 사용하였다. ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식으로 산출하여 나타내었다.

ABTS radical scavenging activity (%) =

$$[(\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}}) / \text{Absorbance}_{\text{control}}] \times 100$$

(6) 생리활성 측정

㉔ α -glucosidase inhibition(AGI) 활성 측정

- α -glucosidase 저해활성을 측정하기 위해 α -glucosidase (sigma, G3651-50UN)을 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 용액에 녹여 효소액(0.5 unit/mL)로 조제하였고, 5 mM ρ -nitro-phenyl- α -glucopyranoside (ρ -NPG, sigma, N1377-5G)도 동일한 buffer에 용해하여 기질용액으로 하였다. 기질용액 40 μ L를 96 well plate 에 분주하고 시료액 20 μ L를 첨가하여 혼합하였고, 대조구로 buffer, 양성대조구로 acarbose (6 mg/mL)용액도 각각 같은 방법으로 첨가한 후 효소액 40 μ L를 첨가하여 혼합한 후 30분 동안 37°C incubator에서 반응시켰다. 반응을 정지하기 위해 0.25 M sodium carbonate 0.1 mL을 첨가하여 혼합한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 계산식으로 저해활성을 평가하였다.

$$AGI\ activity\ (\%) = \left(1 - \frac{Abs_{\cdot sample} - Abs_{\cdot blank}}{Abs_{\cdot NC} - Abs_{\cdot blank}}\right) \times 100$$

Abs_{·NC} : 시료 대신 buffer를 첨가하여 반응한 경우의 흡광도

Abs_{·blank} : 시료와 효소 대신 buffer를 첨가해 반응한 한 경우의 흡광도

Abs_{·Sample} : 시료 또는 acarbose를 첨가해 반응한 한 경우의 흡광도

㉕ Pancreatic lipase inhibitor(PLI) 활성 측정

- Pancreatic lipase 저해 활성을 측정하기 위해 porcine pancreatic lipase 0.3 mg에 10 mM MOPS 와 1 mM EDTA(pH 6.8)을 포함하는 buffer를 30 μ L를 넣고 tris buffer(100 mM tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)를 850 μ L 첨가하여 enzyme buffer를 준비하였다. Enzyme buffer에 시료 20 μ L를 첨가하여 37°C 에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 10 mM ρ -nitrophenyl butyrate(4-NPB, sigma, N9876-5G) 20 μ L를 첨가하여 37°C 에서 15분 동안 반응시킨 다음 400 nm에서 흡광도를 측정하였고, 아래의 계산식으로 저해 활성을 계산하였다.

$$\text{Pancreatic lipase inhibitor activity (\%)} = [1 - (B - C) / A] \times 100$$

A : 시료 대신 증류수를 첨가하여 반응한 경우의 흡광도

B : 시료를 첨가해 반응한 경우의 흡광도

C : 효소를 첨가하지 않고 반응한 경우의 흡광도

(7) 향기성분분석

- 향기성분 분석을 위하여 시료 2 g을 취하여 3차 증류수 10 mL로 희석하여 준비한 후 stir bar (PDMS, 0.5mm film thickness, 10mm length, 24 μ L, Gerstel)와 함께 vial에 담아 50°C 에서 450rpm으로 3시간동안 교반하여 향기성분을 흡착한 다음 stir bar를 향기성분용 튜브에 넣어 표 3의 분석조건 GC-MS를 이용하여 향기성분을 분석하였다. 휘발성 화합물 동정은 mass spectrum library(NIST05A)을 이용하였고, 동정된 휘발성 화합물의 정량적 분석은 내부표준물질은 Methyl cinnamate (200ppm (w/v) in ethanol)을 이용하여 area %로 계산하였다.

표 4. 향기성분분석을 위한 GC-MS 분석조건

		Conditions
Analytical conditions	GC	Agilent HP 6980
	Detector	Agilent HP 5973
	Column	60-m DB WAX
	Carrier gas	He, 1.4 mL/min
	Transfer line	250°C
	Ion source	230°C
	Quadrupole	150°C
	Mass spectra range	35-400 m/z
	EM voltage	70eV
	Initial temperature	50°C (1 min)
Oven conditions	Rate	3 mL/min
	Final temperature	210°C
	Final time	15 min
	Initial temperature	50°C
TDU conditions	Rate	60°C/min
	Final temperature	220°C
	Final time	5 min
	Initial temperature	-20°C
CIS conditions	Rate	12°C/s
	Final temperature	220°C
	Final time	2 min

다) 부재료 첨가에 따른 관능평가

- 대두발효분말의 부재료를 선정하기 위해, 발효미생물산업진흥원 직원 30명을 대상으로 배합비별 기호도 분석을 실시하였다.

라) 부형제 종류에 따른 수분흡수지수 측정

- 부형제는 발효미생물산업화지원센터에서 제공받아 사용하였으며, 포도당, 말토스, 텍스트린, 말토텍스트린을 대두발효분말에 각각 10%(w/w) 첨가하고 균질화 하였다. 대두발효분말의 수분흡수지수(water absorption index, WAI)와 수분용해지수(water solubility index, WSI)는 Anderson 등 (1982) 의 방법을 참고하여 측정하였다. 수분흡수지수는 대두발효분말 0.5 g과 증류수 30 mL를 혼합한 후 진탕 교반한 후 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm에서 20분 간 원심 분리 하였다. 상등액을 제외한 침전물의 무게를 측정하여 건조시료 g당 흡수된 수분함량으로 표시하였다.

$$\text{수분흡수지수(WAI)} = \text{침전물의 양} / \text{건조 시료량}$$

$$\text{수분용해지수(WSI)} = \text{상등액 고형분의 양} / \text{시료량} \times 100$$

마) 시판 제품과 비교

- 시중 판매되고 있는 조미료 2종(천연액상형, 화학분말형)을 구입하여 본 연구에서 개발된 혼합 대두발효분말과 특성을 비교분석하였다. 품질 및 이화학적 특성의 분석방법은 상기 방법과 동일하게 진행하였다.

바) 관능학적 특성

(1) 묘사분석

- 묘사분석은 균주별 대두발효분말 3종과 혼합발효대두분말 및 시판제품 3종에 대한 감각과학적 향미 평가를 통해 프로파일링을 목적으로 전북대 식품영양학과 김미나교수팀과 공동으로 진행하였다.

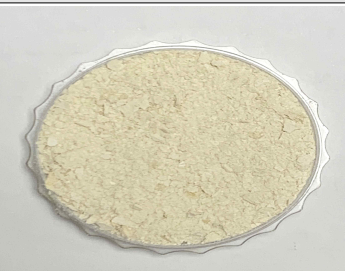


(가) 평가에 사용된 시료

- 시료의 제공은 발효미생물산업진흥원에서 밀봉된 시료를 전북대학교로 송부하였다. 시료 수령 후 공기와의 접촉을 차단한 상태로 밀봉하여 냉장 온도(4±1℃)에 보관하였다.

① 균주별 대두발효분말 묘사분석을 위한 시료




- 시료는 발효미생물산업진흥원에서 제조되었으며 시료에 대한 정보는 다음과 같다(표 5).

표 5. 균주별 대두발효분말 묘사분석 시료

No	제품정보	사진	비고
1	시판		시중 판매되는 타사 균주 <i>Aspergillus oryzae</i>
2	자사		시중 판매되는 자사 균주 <i>Aspergillus oryzae</i>
3	선발		1차년도 선발균주 <i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487

- ② 혼합대두발효분말 및 시판 제품 2종 묘사분석을 위한 시료
 - 시료는 발효미생물산업진흥원에서 제조되었으며 시료에 대한 정보는 표 6와 같다.

표 6. 혼합대두발효분말 및 시판 제품 묘사분석 시료

No	제품정보	사진	비고
1	선발균주		선발균주를 이용한 혼합대두발효분말
2	시판천연		시중 판매되는 액상형 천연조미료
3	시판화학		시중 판매되는 분말형 화학조미료

(나) 조사에 참여한 묘사분석 전문패널 요원의 구성

- 균주별 대두발효분말 3종(시판, 자사, 선발) 및 조미료(혼합대두발효분말, 시판 제품 2종)의 향미평가를 위하여 전문적으로 훈련받은 향미평가 전문패널을 사용하였다. 전문가 패널의 구성은 전북대학교 감각과학연구실 소속 연구원(N=5)으로 구성되었으며, 이 연구원들은 2018년 전북대학교 링크사업단과 연계한 맛평가 전문가 양성과정에 참석하여 100시간 이상의 집중 훈련을 통하여 양성된 맛평가 전문가 패널으로 기 진행된 전문패널 훈련 후 다양한 식품군(예로서, 된장, 간장, 김치 등의 전통발효식품, 요거트, 오디, 오미자 등의 과일류, 루이보스티를 포함한 다류 등)에 대한 맛평가에 참석, 평가하여 Spectrum™묘사분석의 방법으로 식품평가관련 200시간 이상의 경험을 보유하고 있어 동 분야의 전문성을 확보 및 유지하고 있으며, 특히 된장에 대한 묘사분석은 정기적으로 수행하여 발효소재의 향미평가 관련 전문성을 유지하고 있어 해당제품의 평가에 최적화된 전문 패널이라 볼 수 있다.

(다) 평가를 위한 훈련(Calibration)

- 시료의 평가를 위하여 총 4주에 걸쳐 20시간의 훈련을 진행하였으며, 평가 전 전문패널 훈련은 다음과 같이 3단계로 나누어 진행되었다.
- 1단계 : 5시간은 Calibration session으로, 패널요원들의 기본맛 인지 및 강도평가, 향미 인지 및 평가를 위한 척도사용에 집중하여 강도평가 척도사용에 대한 재훈련을 진행하였다.
- 2단계 : 5시간은 조미료 제품의 평가 방법 세팅 및 각 속성의 강도 평가에 대한 훈련을 진행하였다.
- 3단계 : 10시간은 조미료 제품 내에 존재하는 다양한 향미에 대한 인지, 용어 도출 등을 위주로 진행하였다.
- 조미료 제품에 대한 평가는 위의 20시간의 훈련이 진행된 후 평가를 진행하였다.

(라) 용어 도출(Sensory Lexicon Development)

- 패널의 훈련이 완료된 후, 본 연구에서 평가할 조미료 제품의 향미특성을 묘사하기 위한 용어를 도출 및 확정하였다. 용어의 도출은 묘사분석의 용어 도출 및 취합 - 논의 - 용어 확정의 3단계를 거쳐 묘사분석용 용어를 확정하였다.
- 묘사분석의 용어는 패널요원 간 동일한 언어를 사용하여 특정 향을 평가할 수 있도록 하는 객관적인 지표이기 때문에 각 용어별로 향미 Reference를 함께 제시하며, 패널요원 간 용어 사용을 통제 및 통일하였다(Drake and Civille, 2002).
- 군주별 대두발효분말 시료의 평가를 위하여 총 8개 및 조미료 제품(혼합대두발효분말, 시판 제품 2종)의 평가를 위해 12개의 대표성을 지닌 용어를 도출하였다(표 7, 8).

표 7. 군주별 대두발효분말 평가를 위한 용어 List

No	용어 (Lexicon)	용어의 정의(Definition)	참고대상(Reference)
1	쇠향	동전 등의 금속성 물질을 혀에 대었을 때에 느껴지는 알싸한 특유의 향미	동전(100원)
2	갱엿	갱엿에서 나는 특유의 향미	창성당 갱엿
3	고구마말랭이	고구마말랭이에서 나는 특유의 향미	(주)봄날인터내셔널 군고구마말랭이
4	호박죽	호박죽에서 나는 특유의 고소한 향미	짱죽 쌀눈호박죽
5	식혜	식혜에서 나는 특유의 향미	(주)팔도 비락식혜
6	빵	빵에서 나는 특유의 고소한 향미	슬기제과 시몬빵
7	시트러스	시트러스 계열에서 나는 특유의 향미	롯데칠성음료 제주감귤주스
8	나물	나물을 삶았을 때 나는 특유의 향미	삶은 취나물

표 8. 혼합대두발효분말 및 시판 제품 평가를 위한 용어 List

No	용어 (Lexicon)	용어의 정의(Definition)	참고대상(Reference)
1	야채죽	식은 야채죽에서 나는 특유의 향미	동원에프앤비 양반 야채죽
2	쇠고기 다시다	쇠고기 다시다에서 나는 특유의 향미	CJ제일제당 백설 쇠고기다시다
3	나물	나물을 삶았을 때 나는 특유의 향미	삶은 취나물
4	간장	간장에서 나는 특유의 향미	샘표 양조간장 501
5	갱엿	갱엿에서 나는 특유의 단 향미	창성당 갱엿
6	락스	락스에서 나는 특유의 향미	유한양행 유한락스 1% 희석액
7	양파	양파에서 나는 특유의 코를 찌르는 향미	간 양파
8	표고버섯	표고버섯을 물에 불렸을 때 나는 특유의 향미	물에 불린 표고버섯
9	사리곰탕	사리곰탕 스프에서 나는 특유의 향미	농심 사리곰탕 봉지라면의 스프
10	단맛	설탕을 물에 일정 농도로 희석한 용액 특유의 맛	단맛 2: 2% 설탕수용액 단맛 5: 5% 설탕수용액 단맛 8: 8% 설탕수용액
11	짠맛	소금을 물에 일정 농도로 희석한 용액 특유의 맛	짠맛 2: 0.35% 소금수용액 짠맛 3: 0.52% 소금수용액 짠맛 5: 0.7% 소금수용액
12	감칠맛	MSG를 물에 일정 농도로 희석한 용액 특유의 맛	감칠맛 3: 0.5% MSG수용액 감칠맛 6: 1% MSG수용액

(마) 시료의 제시

- 패널 요원에게 시료를 제시할 때에는 시료를 30 mL씩 배분하여 70 mL 플라스틱 컵에 담은 후, 뚜껑을 닫은 채로 제시하였고, 각각의 플라스틱 컵은 3자리수의 난수로 표시하여 패널들이 시료에 대한 정보를 알지 못한 채로 시료의 특성을 평가하였다. 시료는 평가 당일 준비되었으며 냉장온도인 $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한 뒤, 평가 1시간 전 냉장고에서 꺼내서 상온에 보관하였으며 실제로 패널에게 제공할 때, 시료의 온도는 상온($20\pm 1^{\circ}\text{C}$)에 제공하였다. 시료의 제시순서는 각 패널마다 다르게 무작위로 제시하되, Latin square design의 무작위랜덤설계법을 따라 설계하여 제시하였다.

① 균주별 대두발효분말 묘사분석을 위한 시료

- 균주별 대두발효분말 시료의 제시는 10%(w/v)의 비율로 80°C의 물에 희석하여 패널들에게 제공되었으며, 이는 이전 연구논문의 자료를 참고하고, 전북대학교 실험실 내 패널 2인의 예비 실험을 통하여 희석비율을 설정하였다.

② 혼합대두발효분말 및 시판 제품 2종 묘사분석을 위한 시료

- 혼합대두발효분말 및 시판 제품 2종의 제시는 발효미생물산업진흥원에서 제공받은 액상 시료를 희석하지 않고 그대로 패널들에게 제공하였다.



(바) 시료의 평가

- 묘사분석에서 사용한 '강도의 평가는 Spectrum™ 묘사분석기법을 활용하였고, 이는 모든 제품군에서 범용적으로 사용가능한 15점 척도의 Universal scale(0=전혀 느껴지지 않음, 15=아주 강함)을 사용하여 강도를 평가하였다. 평가 당일, 패널 요원들은 평가 전 2시간 전부터 물 이외의 다른 음식(껌, 커피, 자극성 있는 음식, 및 담배를 포함한 기호식품)의 섭취를 제한하여, 미각의 민감도를 최상의 상태로 유지하였다. 조미료 제품의 평가는 각 회 차마다 3개의 시료를 평가하되 시료와 시료 사이에는 5분간의 휴식시간(resting period)을 가지도록 하여 패널들의 미각 및 후각 피로도를 최소화할 수 있도록 하였다.

① 균주별 대두발효분말 시료의 평가

- 균주별 대두발효분말 시료의 예비평가 과정에서 시료를 입에 머금고 맛을 평가하였으나, 10%(w/v)농도로 희석된 시료의 짠맛 강도가 강하여(15점 척도 기준 짠맛강도 10+이상) 조미소재 고유의 향미평가에 영향을 주어 본 조사에서는 후각을 통해 느껴지는 향(Aroma)만을 평가하였다.
- 시료의 평가 중 향미특성평가는 시료의 뚜껑을 살짝 열고 냄새를 강하게 3회 들이마시면서 (Bunny Sniff) 느껴지는 향(Aroma)을 평가하였으며, 향의 강도 중 가장 강할 때의 강도를 기준으로 강도를 기록하도록 하였다.

② 혼합대두발효분말 및 시판 제품 2종 시료의 평가

- 위에서 개발한 묘사분석의 용어를 토대로 감각과학적 향미 특성을 평가하였다. 시료의 평가 중 향미특성평가는 시료의 뚜껑을 살짝 열고 냄새를 강하게 3회 들이마시면서(Bunny Sniff) 느껴지는 향(Aroma)을 평가하였으며, 향의 평가가 끝난 후, 맛을 보고, 기본맛(단맛, 짠맛, 감칠맛)의 강도를 평가하게 하였다. 향미 강도 평가 시, 후각 및 미각을 통해 느껴지는 감각 중 가장 강할 때의 강도를 기준으로 강도를 기록하도록 하였다.

<p>균주별 대두발효분말 묘사분석에 사용된 설문지 예시</p>	<p>혼합대두발효분말 및 시판제품의 묘사분석에 사용된 설문지 예시</p>

바) 조리 적용 테스트 및 관능평가

(1) 비건 굴소스 제조 및 관능평가

- 비건 굴소스는 용기에 대두발효분말, 물, 진간장, 물엿, 설탕, 청주, 마늘농축액, 양파농축액, 대파농축액을 제시된 배합비에 맞게 넣은 후 초기 무게에 약 60%가 될 때까지 늘어붙지 않게 저어주면서 끓여 제조한다. 비건 굴소스의 관능평가는 발효미생물산업진흥원 직원 30명을 대상으로 실시하였으며, 특성강도와 전반적 기호도를 평가하였다. 특성강도는 색, 향, 짠맛, 단맛, 감칠맛을 5점 척도(1점 : 매우 약하다, 2점 : 약하다, 3점 보통이다, 4점 : 강하다, 5점 : 매우 강하다)로 평가하였으며, 전반적 기호도는 순위법을 이용하여 배합비 간의 순위(1순위 3점, 2순위 2점, 3순위 1점)를 매긴 후 순위 총점으로 나타내었다.

(2) 라면스프 제조 및 관능평가

- 실험에 사용한 베이스 라면스프, 된장분말, 고추장 분말은 영에드에프아이, 컵라면 면은 농업법인쿵도우에서 제공받아 사용하였다. 혼합대두발효분말을 이용한 라면스프를 개발하기 위해 상기의 재료들을 활용하여 배합비를 설정하고 관능평가를 진행하였다. 분말 스프의 관능평가는 발효미생물산업진흥원 직원 30명을 대상으로 진행하였으며 특성강도와 전반적 기호도를 평가하였다. 특성강도는 짠맛, 감칠맛, 매운맛, 장맛을 5점 척도(1점 : 매우 약하다, 2점 : 약하다, 3점 : 보통이다, 4점 : 강하다, 5점 : 매우 강하다)로 평가하였다. 전반적 기호도의 경우 순위법을 이용하여 배합비 간의 순위(1순위 3점, 2순위 2점, 3순위 1점)를 매긴 후 순위 총점으로 나타내었다.

사) 개발 소재의 공인검사의뢰

- 본 실험에 의해 선발균주를 이용하여 개발된 대두발효분말은 공인분석기관에 아미노태질소 및 glutamic acid 함량을 의뢰, 분석하였다.

2) 연구결과 및 고찰

가) 균주별 및 제조 공정별 대두발효물 비교

(1) 균주별 및 제조 공정별 대두발효물 제조 및 품질 분석

- 대두발효소재를 제조하기 위해 균주별 및 제조공정별 품질분석 결과를 표 9에 나타내었다. pH의 경우 초기 pH 6.68~6.76에서 숙성기간이 지날수록 pH가 점점 감소하여 6.04~6.25로 유의적인 감소를 보였다. 산도의 경우 초기 0.33~0.34%에서 숙성기간이 지날수록 점점 증가하여 0.63~0.76%의 결과를 보였고 모든 균주에서 산도가 2배이상 증가하는 결과를 보였다. 수분함량은 84.27~84.41%에서 정제염이 첨가됨에 따라 76.75~77.53%로 점점 줄어드는 경향을 보였다. 염도는 저온 발효가 끝난 후 5%, 고온 발효가 끝난 후 8%로 보정하였고, 이후 상온 숙성함에 따라 염도가 8.64~8.78%로 점점 증가하였다. 이는 수분함량이 줄어들어 따라 염도가 증가한 것으로 보인다.
- 아미노태 질소(AN)는 발효식품의 숙성도를 판단하는 성분으로 장류 제조 중 단백질이 효소작용으로 가수분해 되어 맛을 내는 아미노산을 생성하게 된다. AN 함량의 경우 초기 221.47~227.63 mg%에서 숙성기간이 지날수록 461.05~517.72 mg%로 모든 균주에서 2배 이상 증가하였다. 최종 발효물에서 시판균주는 505.54 mg%, 자사균주는 461.05 mg%, 선발균주는 517.72 mg%로 균주별 유의적인 차이를 나타내었다. 선발균주로 대두발효물을 제조하였을 때 AN 함량이 가장 높은 결과를 보였다. 또한, 고온숙성단계 및 상온숙성 중에 AN 함량이 유의적으로 증가하는 결과를 보였다. 온도에 따라 효소분해력이 높아지는 것으로 판단되며, 숙성기간이 지날수록 AN 함량은 높아지는 것으로 보여졌다.
- 유리아미노산의 형태로 감칠맛에 기여하는 glutamate은 단백질을 구성하는 아미노산 성분으로 자연의 다양한 식품에 존재한다(3). 하지만 단백질에 결합된 상태인 glutamate 형태에서는 감칠맛을 직접적으로 감지할 수 없으므로, 발효 및 숙성의 단백질 분해과정을 통해 유리 형태의 glutamate(free glutamate) 양을 증가시킬 수 있다(4, 5, 6). (7)에서는 대두의 아미노산 중 글루탐산의 함량이 가장 높았으며, 생 대두보다 발효시킨 대두의 글루탐산 함량이 더 증가했다고 보고하였다. 본 연구 결과에서 glutamate 함량이 초기 261.87~267.63 nmol/ul에서 숙성 기간이 지날수록 그 함량이 점점 증가하여 최종 발효물에서 507.65~547.87 nmol/ul의 결과를 보였다. 세 균주 중 선발균주는 547.87 nmol/ul, 시판균주는 522.69 nmol/ul, 자사균주는 507.65 nmol/ul로 선발균주에서 가장 보였다. glutamate 함량은 고온숙성단계 중 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이는 균주별 효소활성에 의한 단백질의 분해 속도의 차이의 의한 것으로 판단된다.

표 9. 균주별 및 제조 공정별 대두발효물의 품질 분석

		1단계 ¹⁾	2단계	3단계	4단계	5단계	6단계
pH	시판 ²⁾	6.68±0.04 ^{aA3)4)5)}	6.30±0.03 ^{cB}	6.27±0.05 ^{cB}	6.05±0.03 ^{bC}	6.06±0.01 ^{cC}	6.04±0.01 ^{cC}
	자사	6.76±0.02 ^{aA}	6.52±0.01 ^{aB}	6.55±0.02 ^{aB}	6.25±0.01 ^{aC}	6.27±0.02 ^{aC}	6.25±0.01 ^{aC}
	선발	6.71±0.01 ^{aA}	6.40±0.01 ^{bB}	6.44±0.03 ^{bB}	6.25±0.01 ^{aC}	6.24±0.01 ^{bC}	6.19±0.01 ^{bC}
총 산도 (%)	시판	0.34±0.00 ^{aD}	0.53±0.03 ^{aC}	0.53±0.02 ^{aC}	0.73±0.00 ^{aB}	0.73±0.00 ^{aB}	0.76±0.02 ^{aA}
	자사	0.33±0.01 ^{aC}	0.44±0.01 ^{bB}	0.44±0.01 ^{bB}	0.62±0.02 ^{cA}	0.62±0.01 ^{cA}	0.63±0.02 ^{cA}
	선발	0.33±0.00 ^{aC}	0.52±0.01 ^{aB}	0.53±0.03 ^{aB}	0.67±0.01 ^{bA}	0.67±0.03 ^{bA}	0.68±0.02 ^{bA}
염도 (%)	시판	0.50±0.07 ^{aD}	0.50±0.00 ^{aD}	5.00±0.00 ^{aC}	5.00±0.00 ^{aC}	8.00±0.00 ^{aB}	8.68±0.03 ^{aA}
	자사	0.60±0.07 ^{aD}	0.60±0.00 ^{aD}	5.00±0.00 ^{aC}	5.00±0.00 ^{aC}	8.00±0.00 ^{aB}	8.64±0.06 ^{aA}
	선발	0.55±0.07 ^{aD}	0.55±0.07 ^{aD}	5.00±0.00 ^{aC}	5.00±0.00 ^{aC}	8.00±0.00 ^{aB}	8.78±0.04 ^{aA}
수분함량 (%)	시판	84.41±0.06 ^{aA}	82.80±0.30 ^{aB}	80.17±0.04 ^{aC}	80.04±0.04 ^{aC}	77.30±0.07 ^{aD}	76.75±0.28 ^{aD}
	자사	84.40±0.09 ^{aA}	84.00±0.11 ^{aB}	80.81±0.05 ^{aC}	80.58±0.04 ^{aC}	77.84±0.08 ^{aD}	77.53±0.37 ^{aD}
	선발	84.27±0.04 ^{aA}	83.65±0.13 ^{aB}	80.10±0.04 ^{aC}	80.03±0.03 ^{aC}	77.71±0.12 ^{aD}	77.03±0.21 ^{aD}
아미노태질소 함량 (mg %)	시판	226.38±13.66 ^{aD}	241.65±6.92 ^{aC}	245.29±4.65 ^{aC}	294.04±3.54 ^{abB}	303.18±3.25 ^{bbB}	505.54±10.10 ^{baA}
	자사	221.47±12.29 ^{aD}	232.38±5.94 ^{bcB}	233.69±1.34 ^{bcB}	283.77±7.40 ^{bbB}	287.66±2.77 ^{cbB}	461.05±28.41 ^{caA}
	선발	227.63±7.54 ^{aD}	247.44±6.25 ^{aC}	248.35±1.23 ^{aC}	304.75±11.16 ^{abB}	309.3±3.54 ^{abB}	517.72±7.67 ^{aA}
glutamate 함량 (nmol/uL)	시판	267.63±1.50 ^{aD}	283.90±1.35 ^{bcB}	280.84±0.32 ^{aC}	449.73±2.34 ^{bbB}	448.24±1.94 ^{bbB}	522.69±4.22 ^{abA}
	자사	261.87±4.67 ^{aD}	272.58±0.70 ^{cC}	274.18±0.48 ^{bcB}	424.55±2.98 ^{cbB}	429.87±0.37 ^{cbB}	507.65±0.99 ^{baA}
	선발	262.80±5.40 ^{aD}	289.23±2.62 ^{aC}	285.25±4.51 ^{aC}	454.80±0.09 ^{abB}	456.11±1.96 ^{abB}	547.87±6.14 ^{aA}

¹⁾1단계: 가수 및 파쇄, 2단계 : 저온숙성, 3단계 : 보염(5%), 4단계 : 고온숙성, 5단계 : 보염(8%), 6단계 : 상온숙성

²⁾시판: 시중 판매되는 타사 균주 *Aspergillus oryzae*, 자사: 시중 판매되는 자사 균주 *Aspergillus oryzae*, 선발: 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM102487

³⁾Value are mean ± SD (n=3).

⁴⁾Different capital letters (A, B, C) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

⁵⁾Different small letters (a, b, c) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(2) 균주별 및 제조 공정별 대두발효물 핵산관련물질 분석

- 균주별 및 제조공정별 대두발효물의 핵산관련물질(CMP, UMP, GMP, AMP, IMP, hypoxanthine, inosine)을 분석한 결과를 표 10에 나타내었다. 모든 핵산관련물질에서 숙성기간이 지날수록 유의적으로 증가하였다.
- GMP는 말린 버섯류에 다량 함유되어 있으며, 육류에는 소량 존재하는 것으로 알려져 있는데, 연구에 따르면 표고버섯의 감칠맛이라고 보고되었다(8). 균주별 GMP 함량은 시판균주로 제조한 대두발효물에서는 92.32~132.42 ppm, 자사균주로 제조한 대두발효물에서 240.56~272.60 ppm, 선발균주로 제조한 대두발효물은 153.60~241.35 ppm으로 다른 균주보다 많은 함량을 보였다.
- 또한, AMP는 육류 또는 어패육의 핵산관련물질로 관여하는 것으로 알려져 있으며, AMP는 단독으로는 거의 무미이지만, glutamic acid와 상승효과가 있음이 보고되어 주목되고 있다(9, 10). AMP는 탈 아미노반응을 거쳐 IMP로 분해되고 효소적 작용에 의해 inosine 또는 hypoxanthine으로 분해되며 최종적으로 hypoxanthine으로 분해된다고 보고되어 있다(11). AMP의 경우 시판 및 자사 제조한 *koji*에서는 검출이 되지 않다가, 저온숙성이 되면서 함량이 증가하기 시작하였다. 선발균주로 제조한 대두발효물은 세 균주 중 가장 높은 AMP 함량을 보였고, 최종 발효물에서 자사균주보다 약 5배, 충무균주보다 약 3배 이상 많은 결과를 보였다.
- 한편 Inosine은 모든 처리구에서 검출되지 않았으며, hypoxanthine은 제조공정 단계가 지남에 따라 양이 증가하는 경향을 보여주었으며, 균주별로는 선발 균주가 가장 높은 함량을 나타내었다.
- 핵산관련물질 중 IMP와 GMP는 MSG보다 맛이 강하고 부드러우며, 이 두 성분과 MSG를 혼합, 병용하면 맛의 상승작용이 현저하다고 보고되어 있다. 따라서 본 연구결과의 선발된 균주로 발효 소재를 제조하고 추후 부재료를 혼합하여 제품을 개발한다면 지미 성분에 상승을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

표 10. 균주별 및 제조 공정별 대두발효물 핵산관련물질 분석

단위 : ppm

		1단계 ¹⁾	2단계	3단계	4단계	5단계	6단계
CMP	시판 ²⁾	4.66±0.01 ^{cC}	7.24±0.03 ^{cC}	7.01±0.20 ^{cC}	9.99±0.15 ^{cB}	9.92±0.13 ^{cB}	14.64±0.06 ^{cA}
	자사	21.98±0.03 ^{bC3)4)}	21.50±0.08 ^{bC}	21.00±0.23 ^{bC}	27.89±0.12 ^{bB}	28.81±0.20 ^{bB}	31.55±0.11 ^{bA}
	선발	32.08±0.05 ^{aC}	34.49±1.25 ^{aC}	34.77±0.87 ^{aC}	38.64±0.12 ^{aB}	37.73±0.23 ^{aB}	43.63±0.22 ^{aA}
UMP	시판	10.54±0.10 ^{cD}	12.13±0.23 ^{bC}	12.18±0.02 ^{cC}	12.90±0.02 ^{cB}	13.52±0.05 ^{cB}	16.99±0.12 ^{cA}
	자사	13.09±0.09 ^{bC}	13.93±0.21 ^{bC}	14.03±0.15 ^{bC}	26.49±0.15 ^{bB}	26.15±0.33 ^{bB}	27.58±0.15 ^{bA}
	선발	21.22±0.10 ^{aD}	25.12±0.41 ^{aC}	25.48±0.33 ^{aC}	33.68±0.14 ^{aB}	33.15±0.20 ^{aB}	34.01±0.23 ^{aA}
GMP	시판	92.32±1.45 ^{cC}	92.99±1.21 ^{cC}	92.92±1.00 ^{cC}	100.70±1.52 ^{cB}	99.11±2.12 ^{cB}	132.42±4.44 ^{cA}
	자사	240.56±1.25 ^{aC}	252.44±2.87 ^{aB}	258.10±3.22 ^{aB}	269.33±1.54 ^{aA}	264.51±4.23 ^{aA}	272.60±3.62 ^{aA}
	선발	153.60±2.11 ^{bC}	156.39±3.01 ^{bC}	156.88±2.98 ^{bC}	220.35±2.12 ^{bB}	216.51±3.11 ^{bB}	241.35±3.78 ^{bA}
AMP	시판	-	43.44±0.57 ^{bC}	44.96±1.53 ^{bC}	215.09±2.12 ^{bB}	220.46±3.56 ^{bB}	251.48±1.77 ^{bA}
	자사	-	25.91±0.22 ^{cC}	27.02±2.11 ^{cC}	145.05±2.14 ^{cB}	142.33±2.36 ^{cB}	169.29±3.12 ^{cA}
	선발	455.47±2.23 ^D	463.21±1.55 ^{aC}	465.27±1.63 ^{aC}	620.89±4.25 ^{aB}	615.11±5.63 ^{aB}	860.69±10.25 ^{aA}
IMP	시판	8.25±0.25 ^{bB}	9.00±0.52 ^{bB}	9.96±0.18 ^{aB}	11.23±0.63 ^{aA}	11.34±0.52 ^{aA}	11.88±0.11 ^{bA}
	자사	9.98±0.17 ^{aC}	10.43±0.33 ^{aC}	9.82±0.21 ^{bC}	10.79±0.23 ^{aB}	11.16±0.07 ^{aB}	13.98±0.23 ^{aA}
	선발	10.84±0.35 ^{aB}	10.80±0.29 ^{aB}	10.61±0.31 ^{abB}	11.29±1.25 ^{aB}	10.65±1.45 ^{aB}	13.83±0.78 ^{aA}
Hypoxanthine	시판	60.32±0.41 ^{cD}	70.88±0.22 ^{cC}	69.73±0.35 ^{cC}	81.75±0.44 ^{aB}	81.03±0.71 ^{aB}	83.10±0.36 ^{cA}
	자사	69.13±0.21 ^{bC}	68.21±1.21 ^{bC}	78.36±1.04 ^{bC}	81.47±0.45 ^{aB}	82.88±0.33 ^{aB}	90.28±0.25 ^{bA}
	선발	74.21±1.21 ^{aC}	73.63±0.85 ^{aC}	76.21±2.11 ^{aC}	82.42±1.25 ^{aB}	82.63±1.35 ^{aB}	100.38±1.25 ^{aA}
Inosine	시판	-	-	-	-	-	-
	자사	-	-	-	-	-	-
	선발	-	-	-	-	-	-

¹⁾1단계: 가수 및 파쇄, 2단계 : 저온숙성, 3단계 : 보염(5%), 4단계 : 고온숙성, 5단계 : 보염(8%), 6단계 : 상온숙성

²⁾시판: 시중 판매되는 타사 균주 *Aspergillus oryzae*, 자사: 시중 판매되는 자사 균주 *Aspergillus oryzae*, 선발: 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM102487

³⁾Value are mean ± SD (n=3).

⁴⁾Different capital letters (A, B, C) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

⁵⁾Different small letters (a, b, c) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

나) 균주별 대두발효분말 비교

(1) 균주별 대두발효분말의 이화학적 특성

- 균주별 대두발효물을 동결건조하여 분말화 시킨 후 이화학적 특성을 분석한 결과는 표 11과 같다. 3가지 시료의 pH는 6.17~6.44, 산도는 2.08~2.41%을 나타내었다. 염도와 수분함량은 시료 간 유의차를 보이지 않았으며, 아미노태 질소(AN)는 선발균주로 제조한 대두발효분말이 2,221.47 mg%로 가장 높은 함량을 나타내었다. 이는 선발 균주인 곰팡이가 생성한 효소에 의해 원료인 대두의 단백질이 가수분해되어 유리아미노산이 증가되었을 것으로 추측되는데, 데이터를 제시하지는 않았지만 선발균주를 사용하여 제조한 *koji*에서 단백질 효소활성이 가장 높게 측정되어 이와 유사한 결과를 나타낸 것으로 판단된다. Glutamate 함량 역시 선발균주로 제조한 대두발효분말이 1,168.74 nmol/uL을 나타내어 가장 높은 함량을 나타내었다.

표 11. 균주별 대두발효분말의 이화학적 특성

	시판 ¹⁾	자사	선발
pH	6.41±0.01 ^a	6.44±0.02 ^{a2)3)}	6.17±0.01 ^b
총 산도 (%)	2.08±0.07 ^b	2.39±0.02 ^a	2.41±0.08 ^a
염도 (%)	49.47±0.12 ^a	49.30±0.10 ^a	49.70±0.10 ^a
수분함량 (%)	11.25±0.27 ^a	11.22±0.17 ^a	11.78±0.23 ^a
아미노태 질소 함량 (mg %)	1,175.11±5.44 ^c	2,061.93±14.93 ^b	2,221.47±24.94 ^a
Glutamate 함량 (nmol/uL)	568.74±3.11 ^c	1,023.11±3.73 ^b	1,168.74±1.86 ^a

¹⁾시판; 시중 판매되는 타사 균주 *Aspergillus oryzae*, 자사; 시중 판매되는 자사 균주 *Aspergillus oryzae*, 선발; 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM102487

²⁾Value are mean ± SD (n=3).

³⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(2) 균주별 대두발효분말의 핵산관련물질 분석

- 균주별 대두발효분말의 핵산관련물질을 분석한 결과는 표 12와 같다. 핵산관련물질은 aspartic acid, glutamic acid와 함께 umami taste를 증진시키는 효과가 있으며, kokumi의 맛을 내는데 중요한 역할을 한다. 핵산관련물질 성분은 시료별로 상이한 결과를 나타내었는데, CMP, UMP, IMP, hypoxanthine, AMP는 선발균주로 제조한 대두발효분말이 높은 함량을 나타내었고, GMP는 순창균주로 제조한 대두발효분말이 642.02 ppm으로 가장 높은 값을 보였다. 이 중 IMP와 AMP는 육류에서 주요한 풍미의 인자로 식육의 풍미에 감칠맛과 단맛을 부여하는 역할을 한다 (12, 13). 그리고 GMP는 버섯에서 많이 존재하는 성분으로 알려져 있는데 본 연구에서는 선발균주로 제조한 대두발효분말이 육류에서 많이 함유된 성분이 높게 검출된 것으로 나타났으며, 순창균주로 제조한 대두발효분말이 버섯에서 많이 함유된 성분이 높게 검출되었다. 또한 쓴맛을 지닌 것으로 알려진 hypoxanthine(14) 함량의 경우, 선발균주로 제조한 대두발효분말에서 가장 높은 함량을 보였는데 상기 유리아미노산의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

표 12. 균주별 대두발효분말의 핵산관련물질 분석 결과

Nucleotides Related Compounds	unit : ppm		
	시판 ¹⁾	자사	선발
CMP	34.90 ± 0.35 ^c	126.39 ± 0.83 ^{b2)3)}	228.35 ± 0.77 ^a
UMP	-	27.51 ± 0.26	54.37 ± 0.45
GMP	94.42 ± 0.74 ^c	624.02 ± 0.90 ^a	284.83 ± 0.17 ^b
IMP	25.19 ± 0.39 ^c	31.46 ± 0.13 ^b	34.66 ± 0.20 ^a
Hypoxanthine	172.16 ± 0.27 ^c	193.91 ± 0.27 ^b	217.62 ± 0.28 ^a
AMP	1,218.80 ± 2.28 ^b	428.32 ± 1.81 ^c	1,694.55 ± 1.57 ^a
Inosine	-	-	-

¹⁾시판; 시중 판매되는 타사 균주 *Aspergillus oryzae*, 자사; 시중 판매되는 자사 균주 *Aspergillus oryzae*, 선발; 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM102487

²⁾Value are mean ± SD (n=3).

³⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(3) 균주별 대두발효분말의 유리아미노산 함량

- 발효물의 유리아미노산은 미생물에 의해 분해되는 효소에 의해 대두 원료의 단백질이 펩타이드로 가수분해 되어 생성되며 이를 최종 아미노산으로 생성하여 대두발효물의 다양한 맛과 향에 영향을 주는 것으로 보고되어 있다. 지미성분 강화를 위해서는 glutamic acid 분해를 유도하는 것이 좋고 쓴맛은 methionine, isoleucine, leucine 등의 유리아미노산과 peptide에 의해 주로 좌우되므로 맛의 조화면에서 적당한 고미를 유지할 필요가 있다. 균주별 대두발효분말의 유리아미노산을 측정한 결과는 표 13과 같다. 세 가지 시료 중 선발 균주 시료가 glutamic acid와 aspartic acid 함량이 높은 결과를 나타내었으며, 쓴맛을 나타내는 methionine, isoleucine, leucine의 함량도 높은 결과를 나타내었다. 또한 감미를 나타내는 glycine, alanine, lysine은 선발 시료가 가장 높은 함량을 나타내었다. 따라서 선발균주로 제조한 대두발효분말이 지미성분 강화에 있어 높은 능력을 보일 것으로 사료되며, 추후 소재로 개발 시 제품의 맛을 증진할 것으로 보인다.

표 13. 균주별 대두발효분말의 유리아미노산 함량

				unit: ppm
No.	Amino acids	시판 ¹⁾	자사	선발
1	Aspartic Acid	15,872.19 ± 669.47 ^c	31,033.8 ± 155.71 ^b	39,595.43 ± 298.47 ^a
2	Threonine	2,898.27 ± 114.63 ^b	6,749.25 ± 63.80 ^a	1,559.05 ± 83.44 ^c
3	Serine	5,406.1 ± 227.37 ^c	9,085.63 ± 78.26 ^b	15,910.11 ± 189.15 ^a
4	Glutamic Acid	16,986.61 ± 264.89 ^c	33,825.03 ± 233.2 ^b	42,325.51 ± 232.65 ^a
5	Sarcosine	3,651.98 ± 225.4	-	-
6	α-Aminoadipic Acid	4,428.99 ± 98.62 ^b	6,982.24 ± 63.69 ^a	4,596.04 ± 17.09 ^b
7	Glycine	3,985.31 ± 189.43 ^c	9,467.81 ± 67.58 ^b	14,879.67 ± 246.29 ^a
8	Alanine	11,871.07 ± 619.78 ^c	21,981.33 ± 112.47 ^b	28,910.2 ± 165.48 ^a
9	α-Aminobutyric Acid	1,558.8 ± 12.26 ^b	1,872.99 ± 11.13 ^a	1,617.83 ± 30.64 ^b
10	Valine	13,798.43 ± 351.17 ^c	26,472.91 ± 149.49 ^b	30,985.48 ± 166.94 ^a
11	Methionine	5,642.84 ± 142.55 ^b	8,984.42 ± 50.62 ^a	9,065.42 ± 65.33 ^a
13	Isoleucine	8,036.75 ± 197.59 ^c	17,090.04 ± 830.28 ^b	20,359.86 ± 449.09 ^a
14	Leucine	23,319.62 ± 619.93 ^c	35,026.16 ± 174.73 ^b	38,480.06 ± 501.87 ^a
15	Tyrosine	10,419.43 ± 274.69 ^b	15,917.88 ± 150.56 ^a	11,123.56 ± 111.48 ^b
16	Phenylalanine	13,610.32 ± 364.79 ^c	19,188.11 ± 180.16 ^b	21,243.64 ± 130.81 ^a
17	β-Alanine	583.4 ± 37.16 ^a	472.72 ± 13.44 ^b	318.63 ± 5.96 ^c
18	β-Aminoisobutyric Acid	3,381.73 ± 169.57 ^a	2,842.03 ± 62.18 ^b	806.9 ± 7.21 ^c
19	γ-Aminobutyric Acid	1,045.29 ± 25.54 ^a	654.02 ± 3.36 ^b	1,107.06 ± 16.59 ^a
20	Ammonia	3,465.71 ± 85.17 ^c	8,631.54 ± 115.11 ^a	7,280.31 ± 69.46 ^b
21	Hyls	2,387.02 ± 69.09 ^a	1,207.53 ± 6.71 ^c	1,541.3 ± 46.81 ^b
22	Ornithin	4,023.57 ± 99.47 ^b	6,770.16 ± 49.4 ^a	2,663.73 ± 103.71 ^c
23	Histidine	35,848.1 ± 916.44 ^c	53,491.7 ± 266.6 ^b	61,726.82 ± 542.1 ^a
24	Lysine	12,382.61 ± 323.06 ^c	21,302.6 ± 106.27 ^b	27,448.2 ± 321.95 ^a
25	3-Methylhistidine	546.21 ± 81.72	428.42 ± 15.24	-
26	Anserine	14,238.1 ± 206.03 ^a	12,580.54 ± 69.83 ^b	7,557.45 ± 138.38 ^c
27	Carnosine	1,093.98 ± 178.58 ^a	1,059.85 ± 34.30 ^a	511.33 ± 39.11 ^b
28	Arginine	36,119.37 ± 2444.33 ^c	67,077.16 ± 353.24 ^b	77,862.37 ± 450.49 ^a
Total		256,601.81 ± 7127.05 ^c	420,195.86 ± 2509.1 ^b	469,475.97 ± 2285.34 ^a

¹⁾시판; 시중 판매되는 타사 균주 *Aspergillus oryzae*, 자사; 시중 판매되는 자사 균주 *Aspergillus oryzae*, 선발; 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM102487

²⁾Value are mean ± SD (n=3).

³⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(4) 균주별 대두발효분말의 유기산, 유리당 함량

○ 콩은 단백질 35~40%, 탄수화물 30~35%, 지질 15~20%가 함유되어있으며, 이러한 성분들은 발효 시 미생물이 생성한 효소에 의하여 아미노산, 유리당, 유기산 등으로 가수분해 된다. 균주별 대두발효분말의 유기산 및 유리당 함량 분석 결과를 표 14에 나타내었다. 유기산은 장류에서 산미, 향미 및 감미 성분으로서 함량에 따라 장류의 맛 성분에도 영향을 미치며, 특히 succinic acid 및 lactic acid의 경우 상쾌하며 감미로운 신맛을 내는 것으로 보고된 바 있다(15). 유기산 분석 결과, 모든 균주에서 succinic acid, acetic acid, citric acid 순으로 높은 함량을 보였다. 유기산 함량의 경우 균주별 상이한 결과를 보였는데, 시판균주에서 succinic acid가 가장 높은 함량을 보였고, 자사균주, 선발균주 순으로 나타났다. 이는 균주의 높은 효소 활성으로 인해 콩 원료 유래 succinic acid를 많이 생성된 것으로 보인다. 한편 acetic acid는 된장의 구수함에 영향을 주는 향미성분으로도 알려져 있는데 시판균주가 가장 높은 함량을 보였고, 선발균주가 그 뒤를 이었다. 또한 미생물의 효소활성에 따라 각각의 유기산 함량이 다른 것으로 생각된다. 장류의 유리당은 전분질원을 가수분해하여 단맛에 관여하는 유리당을 생성한 것으로(16) 발효 조건 및 미생물에 따라 검출되는 당의 양 및 종류에 차이가 있다고 보고되고 있다 (17). 유리당 분석 결과, 모든 균주에서 fructose, glucose, maltose 순으로 높은 함량을 보였다. 이는 선발 균주인 곰팡이가 생성한 효소에 의해 원료인 대두의 탄수화물이 가수분해되어 유리당이 증가되었을 것으로 추측된다. 본 연구 결과 선발균주를 이용한 대두발효분말에서 fructose 및 glucose가 각각 3918.14 mg/100g, 2368.10 mg/100g으로 가장 높은 함량을 보였으며, 각 대두발효분말의 유리당 차이는 발효에 사용된 균주 차이에 의한 결과라고 판단된다.

표 14. 대두발효분말 유기산, 유리당 함량

		unit : mg/100g		
		시판 ¹⁾	자사	선발
Free sugar	Maltose	139.66 ± 0.08 ^{c(2)3)}	327.93 ± 0.52 ^a	230.66 ± 1.10 ^b
	Glucose	1009.07 ± 0.35 ^c	2272.42 ± 4.88 ^b	2368.10 ± 0.35 ^a
	Fructose	2212.38 ± 9.85 ^c	3517.75 ± 9.85 ^b	3918.14 ± 1.92 ^a
Organic acid	Oxalic acid	75.29 ± 0.15 ^b	5.41 ± 0.05 ^c	89.92 ± 0.46 ^a
	Citric acid	873.22 ± 1.31 ^b	1325.85 ± 1.31 ^a	481.60 ± 2.62 ^c
	Succinic acid	2766.37 ± 2.49 ^c	6969.16 ± 12.13 ^b	7379.48 ± 17.66 ^a
	Lactic acid	228.49 ± 1.33	-	58.54 ± 0.82
	Acetic acid	2408.58 ± 6.20 ^a	1247.98 ± 1.96 ^b	1839.80 ± 36.80 ^b

¹⁾시판; 시중 판매되는 타사 균주 *Aspergillus oryzae*, 자사; 시중 판매되는 자사 균주 *Aspergillus oryzae*, 선발; 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM1024872

²⁾Value are mean ± SD (n=3).

³⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan' s multiple test (P<0.05).

(5) 균주별 대두발효분말의 항산화 활성 및 생리활성 분석

- 대두발효분말의 항산화 및 생리활성을 측정한 결과는 표 15와 같다. 항산화활성 중 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 시료별 25.75%, 13.43%, 28.20%로 유의적인 차이를 보였다. ABTS 라디칼 소거 활성은 56.72%, 44.36%, 60.89%로 유의적인 차이를 보였으며, 선발균주로 제조한 대두발효분말에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 본 연구결과 선정된 균주를 이용한 된장은 생리활성면에서도 우수한 결과를 보여 조미, 향미 뿐만 아닌 기능적으로도 우수한 것으로 사료되었다. 항당뇨 활성을 나타내는 AGI활성과 항비만 활성을 나타내는 PLI 활성 역시 선발균주 시료에서 가장 높은 활성을 나타내어, 선발균주를 이용한 발효소재는 조미, 향미 뿐만 아닌 기능적으로도 우수한 것으로 사료되었다.

표 15. 균주별 대두발효분말의 항산화 활성 및 생리활성 분석

	시판 ¹⁾	자사	선발	Positive control
DPPH radical scavenging activity(%)	13.43±1.58 ^c	25.75±0.11 ^{b2)3)}	28.20±1.47 ^a	Ascorbic acid IC ₅₀ : 3.45±0.11ug/mL
ABTS radical scavenging activity(%)	44.36±0.04 ^c	56.72±2.15 ^b	60.89±0.17 ^a	Ascorbic acid IC ₅₀ : 8.45±0.20 ug/mL
Pancreatic lipase inhibition activity(%)	13.88±0.99 ^c	16.56±0.55 ^b	28.05±1.23 ^a	Orlistat IC ₅₀ : 1.33 ±0.10ug/mL
α -glucosidase inhibition activity(%)	13.78±0.87 ^c	24.99±1.87 ^b	62.95±0.36 ^a	Acarbose IC ₅₀ : 1.85 ±0.21mg/mL

¹⁾시판: 시중 판매되는 타사 균주 *Aspergillus oryzae*, 자사: 시중 판매되는 자사 균주 *Aspergillus oryzae*, 선발: 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM102487

²⁾Value are mean ± SD (n=3).

³⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(6) 균주별 대두발효분말의 향기성분분석

- 균주별 향기성분을 분석한 결과를 표 16에 나타내었다. 발효물의 휘발성 성분을 분석한 결과 총 33종의 화합물이 동정되었다. 이 중에서 알데히드류 7종, 케톤류 1종, 알코올류 1종, 페놀류 3종, 에스테르류 15종, 피라진류 2종, 탄화수소류 4종이 동정되었다. 선발균주에서 0.55%로 함량이 가장 높았다. Lee 와 Ahn, 2009에서 *A. oryzae* 를 이용하여 발효시킨 된장에서 hexanal, benzaldehyde, 2-phenyl2-butenal, 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal 등 7개의 알데하이드가 검출이 되었다고 보고하였고, 이러한 알데히드류의 경우 달콤하고 과일, 견과류, 카라멜 같은 향을 내어 관능적으로 향미가 좋은 영향을 나타낸다(18). 본 결과에서는 보고된 알데히드류 종류 중 4종류가 검출되었다. 알데히드류 중 선발균주가 nutty, honey 향을 가진 2-methylbutanal, 2-phenylbut-2-enal, benzaldehyde가 다른 균주에 비해 많은 함량을 나타냈다. 방향족 aldehyde 중 구조가 간단하고 아몬드 향미와 유사한 특징이 있으며, 공기 중에서 쉽게 산화되는 benzaldehyde는 모든 균주에서 검출되었다.
- 케톤류 중 sweet buttery 향미를 가지는 3-hydroxybutan-2-one 이 선발균주에서 가장 많이 검출되었으며 (19)에서는 사과의 향미를 가지는 성분 중 하나라고 보고하였다.
- 에스테르류는 발효과정에 유리지방산과 알코올의 에스테르화 반응을 통해 생성된다. 지방산과 아민의 쓰고 자극적인 향을 감소시켜 향기성분에 좋은 성분으로 기여한다고 보고되고 있다. 또한, 간장의 중요한 성분으로 알려져 있으며 그 중 ethyl esters류는 과일향과 honey sweet 향에 관여한다고 보고되어 있다(20). 향기성분 분석 결과 ethyl ester류 화합물인 ethyl 2-methylpropanoate, ethyl 4-methylpentanoate, ethyl pentadecanoate들이 선발균주에서 많이 검출되었다.
- 알코올류는 oct-1-en-3-ol이 모든 대두발효분말에서 검출되었고, 이는 버섯의 향미를 가진다고 보고되어있다. oct-1-en-3-ol은 알코올류 중에서 역치가 1 ng/g으로 매우 낮아 aroma-active 성분으로 보고되어 있고(21), (22)에서는 함량이 많을수록 양조간장의 품질이 우수하다고 보고하였다. oct-1-en-3-ol은 시판균주에서 1.05%, 자사균주에서 1.15%, 선발균주에서 2.35%로 선발균주에서 가장 많이 검출되었다.
- 시판균주 및 자사균주에서 선발균주보다 페놀화합물 중 훈연, 나무향을 나타내는 4-ethyl-2-methoxyphenol(4-ethylguaiacol)이 많이 검출되었다. 페놀성분이 많을 경우 관능적으로 좋지 않다고 보고하였다 Kim, 2006.
- (23)에서는 대두 발효 시 피라진류가 대부분을 차지하였고, 그 중 2,5-dimethylpyrazine이 nutty odor를 갖고 있어 구수한 냄새를 발현한다고 보고 하였다. 본 연구 결과 고소한, 코코아 향을 가지는 피라진류(2,5-dimethylpyrazine, 2,3,5,6-tetramethyl parazine)이 선발균주에서 가장 높게 나타났다.
- 장류의 장기저장이나 숙성 중 미생물 오염 및 적절하지 못한 환경에서 생성되는 불쾌취 화합물을 isovaleric acid 라고 보고하였는데(24), 향기성분 분석 결과 모든 균주에서 검출되지 않았다. 본 연구 결과 선발균주를 이용한 대두발효분말을 조미 소재로 이용 시 향미에 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단되었다.

표 16. 균주별 대두발효분말의 향기성분분석

compounds	CAS no.	M.W.	Area %			odor description	Reference	
			시판 ¹⁾	자사	선발			
Aldehydes								
1	3-methylbutanal	590-86-3	86.13	0.13± 0.01a ²⁾ 0.01a ³⁾	0.12± 0.01a	0.13± 0.01a	ethereal aldehydic chocolate peach fatty	
2	2-methylbutanal	96-17-3	86.13	0.58± 0.05b	0.36± 0.03c	0.85± 0.10a	musty cocoa coffee nutty	Luebke, William tgsc, (1986)
3	Hexanal	66-25-1	45.04	0.20± 0.06a	0.12± 0.01b	0.22± 0.04a	fresh green fatty aldehydic grass leafy fruity sweaty	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 6, 41, (1997)
4	Benzaldehyde	100-52-7	106.21	0.30± 0.03b	0.25± 0.02c	0.55± 0.05a	almond, fruity, powdery, nutty and benzaldehyde-like	Mosciano, Gerard P&F 19, No. 5, 79, (1994)
5	2-phenylbut-2-enal	4411-89-6	146.19	-	-	0.35± 0.06	Musty, floral, honey, powdery and cocoa	Mosciano, Gerard P&F 21, No. 5, 49, (1996)
6	2-phenylacetaldehyde	122-78-1	120.15	1.25± 0.08	-	0.89± 0.10	Honey, floral rose, sweet, powdery, fermented, chocolate with a slight earthy nuance	Mosciano, Gerard P&F 23, No. 5, 49, (1998)
7	5-methyl-2-phenylhex-2-enal	21834-92-4	188.26	0.20± 0.01c	1.05± 0.21a	0.32± 0.02b	Bitter cocoa, nutty, brown and green	Mosciano, Gerard P&F 23, No. 1, 33, (1998)
Ketones								
1	3-hydroxybutan-2-one	513-86-0	88.10	1.23± 0.13b	0.88± 0.12c	1.50± 0.21a	sweet buttery creamy dairy milky fatty	
Alcohols								
1	oct-1-en-3-ol	3391-86-4	128.21	1.15± 0.12b	1.05± 0.08b	2.35± 0.21a	mushroom earthy green oily fungal raw chicken	Luebke, William tgsc, (1986)
Phenol								
1	4-ethylphenol	123-07-9	122.16	0.23± 0.02	-	-	Smoke, phenolic, creosote and savory	Mosciano, Gerard P&F 23, No. 3, 55, (1998)
2	4-ethyl-2-methoxyphenol	2785-89-9	152.19	4.03± 0.42b	6.35± 0.65a	1.38± 0.02c	spicy smoky bacon phenolic clove	Luebke, William tgsc, (1996)
3	4-ethenyl-2-methoxyphenol	7786-61-0	150.17	0.87± 0.02	-	1.25± 0.08	dry woody fresh amber cedar roasted peanut	
Esters								
1	ethyl acetate	141-78-6	88.10	0.10± 0.01a	0.10± 0.01a	0.12± 0.02a	Etherial, fruity, sweet, grape and rum-like	Mosciano, Gerard P&F 19, No. 5, 79, (1994)
2	ethyl 2-methylpropanoate	97-62-1	116.16	0.58± 0.05c	1.23± 0.23a	0.86± 0.08b	Sweet, etherial and fruity with pungent,	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 2,

	te						alcoholic, fusel and rummy nuances	69, (1997)
3	ethyl butanoate	105-54-4	116.16	0.40 ± 0.04a	0.36 ± 0.02a	0.42 ± 0.10a	Sweet, fruity, tutti frutti, lifting and diffusive	Mosciano, Gerard P&F 19, No. 4, 45, (1994)
4	ethyl 2-methylbutanoate	7452-79-1	130.18	-	0.23 ± 0.02	-	Fruity, estry and berry with fresh tropical nuances	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 1, 57, (1997)
5	ethyl 3-methylbutanoate	108-64-5	130.18	0.35 ± 0.05a	0.36 ± 0.03a	0.41 ± 0.09a	Sweet, diffusive, estry, fruity, sharp, pineapple, apple, green and orange	Mosciano, Gerard P&F 23, No. 2, 43, (1998)
6	ethyl 4-methylpentanoate	25415-67-2	144.21	0.52 ± 0.03b	0.45 ± 0.02c	0.92 ± 0.208a	fruity	
7	ethyl heptanoate	106-30-9	158.24	0.21 ± 0.01a	0.25 ± 0.02a	0.22 ± 0.01a	fruity pineapple cognac rum wine	Luebke, William tgsc, (1983)
8	ethyl benzoate	93-89-0	150.17	0.06 ± 0.00	-	-	Sweet, wintergreen, fruity, medicinal, cherry, grape	Luebke, William tgsc, (1994)
9	methyl 2-hydroxybenzoate	119-36-8	152.14	-	1.87 ± 0.23	-	Sweet, salicylate, root beer, wintergreen, aromatic, slightly phenolic and camphoreous	Mosciano, Gerard P&F 20, No. 6, 49, (1995)
10	ethyl nonanoate	123-29-5	186.29	0.23 ± 0.02	-	-	fruity rose waxy rum wine natural tropical	Luebke, William tgsc, (1984)
11	ethyl 3-phenylpropanoate	2021-28-5	178.23	0.52 ± 0.06	-	-	hyacinth rose honey fruity rum	Luebke, William tgsc, (1988)
12	ethyl decanoate	110-38-3	200.32	0.60 ± 0.03	-	-	sweet waxy fruity apple grape oily brandy	Luebke, William tgsc, (1987)
13	ethyl pentadecanoate	41114-00-5	270.45	0.07 ± 0.01b	0.05 ± 0.01c	0.12 ± 0.01a	honey sweet	
14	ethyl hexadecanoate	628-97-7	284.48	0.87 ± 0.01a	0.65 ± 0.07b	0.89 ± 0.01a	Waxy, fruity, creamy and milky with a balsamic nuance	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 2, 69, (1997)
15	methyl (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoate	112-63-0	294.47	30.54 ± 1.52c	72.45 ± 2.32a	56.15 ± 1.53b	oily fatty woody	
Pyrazines								
1	2,5-dimethylpyrazine	123-32-0	108.14	0.52 ± 0.22b	0.35 ± 0.12c	1.25 ± 0.31a	Nutty, peanut, musty, earthy, powdery and slightly roasted with a cocoa powder nuance	Mosciano, Gerard P&F 21, No. 6, 49, (1996)
2	2,3,5,6-tetramethyl parazine	1124-11-4	136.20	0.12 ± 0.01c	0.21 ± 0.04b	0.35 ± 0.03a	Nutty, musty and vanilla with dry, brown cocoa nuances	Mosciano, Gerard P&F 22, No. 2, 69, (1997)
Hydrocarbons								
1	hexamethylcyclotri	541-	222.4	33.17	6.92 ±	17.59		

	siloxane	05-9	6	± 2.36 a	0.23c	± 1.44 b		
2	octamethyl cyclotetrasiloxane	556- 67-2	296.6 2	18.96 ± 2.32 a	$3.48 \pm$ 0.41c	$8.46 \pm$ 1.10b		
3	Tetradecane	629- 59-4	198.3 9	$1.08 \pm$ 0.08	-	-	mild waxy	
4	2-pentylfuran	3777 -69- 3	138.2 1	$0.93 \pm$ 0.04b	$0.86 \pm$ 0.02c	$2.45 \pm$ 0.08a	Fruity, green, earthy beany with vegetable like nuances	Mosciano, Gerard P&F 16, No. 2, 49, (1991)

¹⁾시판; 시중 판매되는 타사 균주 *Aspergillus oryzae*, 자사; 시중 판매되는 자사 균주 *Aspergillus oryzae*, 선발; 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM102487

²⁾Value are mean \pm SD (n=3).

³⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan' s multiple test (P<0.05).

(5) 균주별 대두발효분말의 묘사분석 결과

(가) 균주별 대두발효분말 3종에 대한 향미특성

- 발효균주를 달리한 대두유래 조미소재 3종(시판, 자사, 선발)에 대한 전문가 패널을 활용한 향미 평가를 통해 발효에 사용된 균주에 따른 조미소재의 향미차이를 분석하고자 하였다. 조미소재 3종에 대한 향미특성의 평가한 결과는 표 17에서 확인할 수 있다. 조미소재 시료에 대한 향미평가 결과, 시료간의 유의미한 향미특성의 차이를 확인하였다($p < 0.05$).

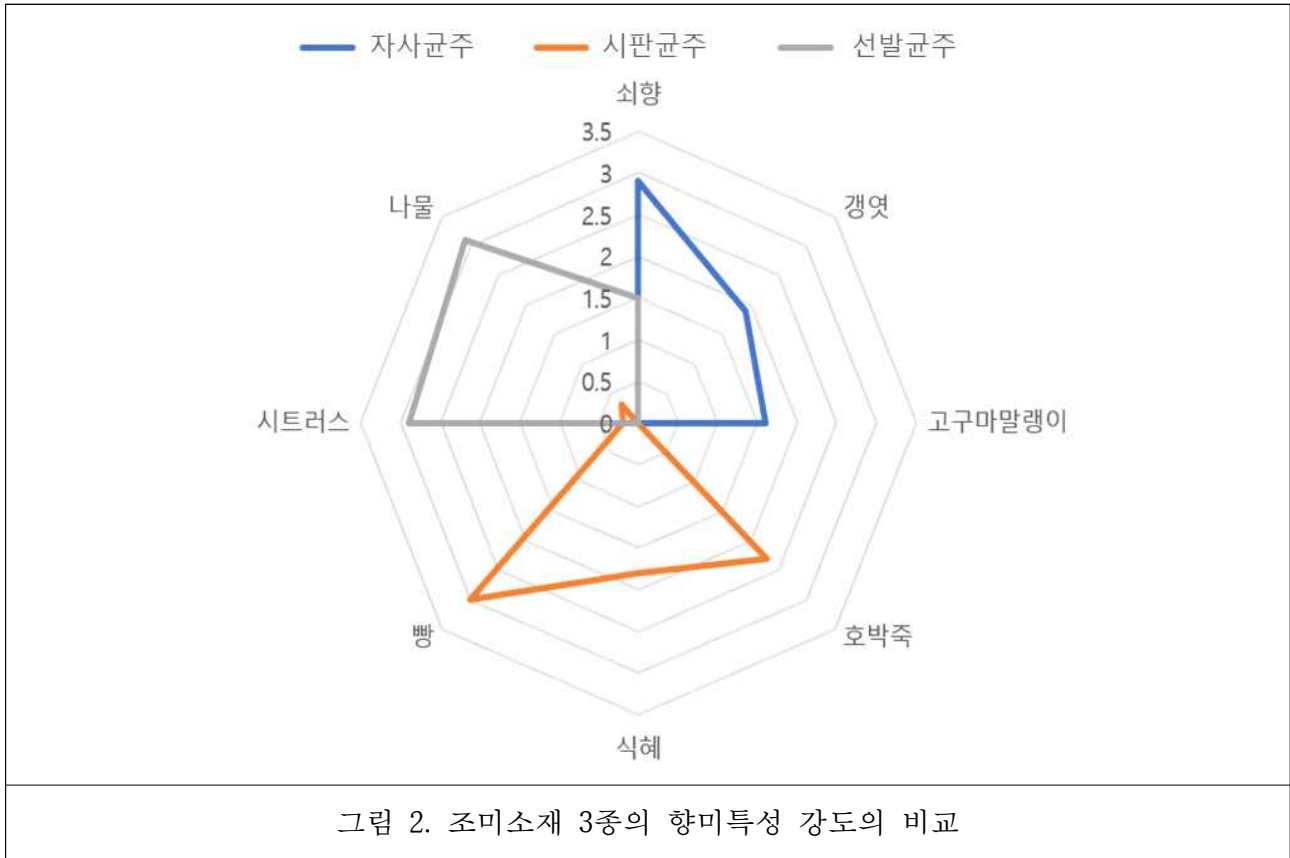
표 17. 균주별 대두발효분말 3종에 대한 향미평가 결과

Attributes	시판 ¹⁾	자사	선발	p-value
Overall aroma intensity	2.9 c	3.3 b	4.1 a	<0.0001
쇠향	0.0 c	2.9 a	1.5 b	<0.0001
깻잎	0.0 b	1.9 a	0.0 b	<0.0001
고구마말랭이	0.0 b	1.6 a	0.0 b	<0.0001
호박죽	2.3 a	0.0 b	0.0 b	<0.0001
식혜	1.8 a	0.0 b	0.0 b	<0.0001
빵	3.0 a	0.0 b	0.0 b	<0.0001
시트러스	0.2 b	0.2 b	2.9 a	<0.0001
나물	0.3 b	0.0 b	3.1 a	<0.0001

¹⁾시판: 시중 판매되는 타사 균주 *Aspergillus oryzae*, 자사: 시중 판매되는 자사 균주 *Aspergillus oryzae*, 선발: 1차년도 선발균주 *Aspergillus oryzae* SRCM102487

²⁾Means in a row that does not share same alphabetical letter represent significant differences at $\alpha = 0.05$

- 각 시료의 종합적인 향미 강도를 나타내는 overall aroma intensity는 선발균주(4.1), 자사균주(3.3), 시판균주(2.9)순으로 강도가 높게 나타났으며, 모든 시료가 약 3.0 이상의 강도로 강한 향미를 가지고 있다. 각 조미소재는 소재마다 특유의 향미특성을 가지고 있었으며 이는 발효에 사용된 균주에서 유래한 것으로 판단된다.



① 쇠향

- 쇠향의 경우, 조미소재 시료의 뚜껑을 열자마자 첫 번째 숨(First sniff)에서 나타나는 향으로, 자사균주 시료에서 2.9로 타 시료대비(시판균주 : 0.0, 선발균주 : 1.5) 높은 강도의 향미가 나타났으며, 이는 통계적으로 유의미하게 높은 강도이다($p < 0.0001$). 이전 연구에서 Dienol (odor threshold 0.07ng/L in air)이 버터밀크에서 쇠향에 영향을 준다는 보고가 있다(25). 본 연구에 포함된 조미소재의 향미성분 분석을 통하여 자사균주 내의 dienol의 포함여부 및 농도 등을 확인 및 검증이 필요할 것으로 보인다.

② 갱엿, 고구마말랭이

- 갱엿과 고구마말랭이 향미의 경우, 자사균주에서만 나타난 특징적인 향미로 나타났다. [갱엿 향미]의 경우, 자사균주 시료에서만 1.9 수준으로 나타났으며 타 시료에서는 관련 향이 나타나지 않았다. [고구마 말랭이 향미]의 경우, 자사균주 시료에서만 1.6 수준으로 나타났으며 타 시료에서는 관련 향이 나타나지 않았다.

- 전북대학교 연구팀에서 수행한 된장에 대한 향미특성 분석 연구결과, 전통된장의 특징적인 향미 중 하나로 “깻잎” 향미가 강한 특징으로 지목된 바 있다(unpublished data). 이 두 가지 향미특성은 단향(sweet aroma)를 좀 더 세분화하여 표현한 향미특성으로 전문가 패널이 다양한 reference 시료를 스크리닝하여 각 향을 대표하는 reference 시료를 선정하고 이를 바탕으로 용어를 확정하였다. 자사균주에서 높게 나타난 깻잎, 고구마말랭이 향미는 자사균주에 의해 생산된 당화효소에 의해 분해된 다양한 당 성분으로부터 유래된 것으로 보이며, 이를 확인하기 위해서는 당화 효소의 유무 및 단당류 성분 분석을 통하여 각 시료간의 당류 함량의 차이에 대한 심층적인 연구를 통하여 확인이 필요할 것으로 보인다.

③ 호박죽, 식혜, 빵

- 호박죽, 식혜, 빵 향미는 시판균주 시료에서만 나타난 특징적인 향미로 각각 2.3, 1.8, 3.0 수준으로 강하게 나타났으며 타 시료에서는 관련 향이 나타나지 않았다. 패널 내부 토의 결과, 세 가지 향미 모두 공통적으로 고소한 향미를 베이스로 가지고 있었으며 이는 발효 균주에서 유래한 향미인 것으로 보인다.

④ 시트러스, 나물

- 시트러스와 나물향은 선발균주로 발효된 조미소재에서 특징적으로 나타났다. 시트러스 향미의 경우, 2.9 수준으로 강하게 나타난 향미로 타 시료대비(자사균주 : 0.2, 시판균주 : 0.2) 높은 강도의 향미가 나타났음. 나물향의 경우, 3.1 수준으로 높은 강도를 보였으며, 이는 통계적으로 유의미하게 높은 강도이다($p < 0.0001$). 이전에 수행된 상면발효맥주 관련 연구에서 citrus향과 Bitterness Unit (BU; $r^2=0.72$), 와 향산화성을 측정하는 지표인 Total polyphenol함량($r^2=0.63$), DPPH라디칼 소거능($r^2=0.76$) 등과 매우 높은 상관관계를 나타낸 바 있다(26). 또한 오렌지주스에 대한 연구에서 오렌지주스의 citrus 향과 높은 상관관계를 나타내는 휘발성 향기성분으로 1-octanol 과 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-one이 보고된 바 있다(27). 또한 본 연구에서 “나물향” 이라고 표현한 향의 경우 건나물을 약하게 양념하여 제시되는 취나물의 특유의 향미로 정의하였는데, 이는 한약재의 원물 향과 맥을 가치하는 경향을 가지고 있다. 이전 연구에서 한약재 향은 α -terpineol and β -terpineol 등의 휘발성 향기성분이 이러한 향에 영향을 준다고 보고된 바 있는데 이 두가지 화합물은 limonene과 linalool이 분해되면서 발생되는 향기성분으로 보고된 바 있다(28).
- 위의 연구에서 보고된 상관관계가 높은 이화학적, 향기성분 분석 결과는 맥주, 오렌지 주스 등의 다른 식품에서 나타난 결과이며, 식품의 향은 식품에 존재하는 다양한 성분들과의 상호작용으로 동일한 향기성분이라도 향의 특성이나 강도가 다르게 나타나는 경우가 있기 때문에 조미소재에서 나타난 시트러스와 나물 향에 영향을 주는 향기성분 및 이화학적 특성에 대한 연구는 추후 해당 조미소재에 대한 향기성분 분석결과와 연계하여 확인이 필요할 것으로 사료된다.
- 최향을 제외한 모든 향미는 각각의 시료마다 뚜렷한 특징을 보였다. 이러한 특성을 가진 조미소재 중 소비자들이 가장 좋아하는 향을 가진 최적의 발효균을 찾기 위해서는 해당 시료에 대한 소비자 기호도 조사를 진행하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

(나) 결론

- 대두발효 조미소재 3종(시판, 자사, 선발)의 향미특성을 평가하기 위하여 조미소재의 향미를 평가할 수 있는 용어 8종(쇠향, 갱엿, 고구마말랭이, 호박죽, 식혜, 빵, 시트러스, 나물)을 도출하였다.
- 조미소재 향미평가 용어를 기반으로 대두발효 조미소재 3종의 향미특성을 프로파일링한 결과 각 시료별 다음과 같은 특징이 나타났다.
- 시판균주 시료는 고소함과 관련된 속성(호박죽, 식혜, 빵)이 강하게 나타나는 특징을 가지고 있다. 특히 타 시료대비 가장 많은 향미 특성이 나타나는 경향을 확인하였다.
- 자사균주 시료에는 단향 관련 속성(갱엿, 고구마말랭이) 및 쇠향의 강한 향미 특성을 확인하였다. 이는 균주에 의해 생산된 당화효소에 의해 분해된 당 성분으로부터 유래된 것으로 사료된다.
- 선발균주 시료는 플로럴향과 관련된 속성(쇠향, 시트러스, 나물)이 강하게 나타나는 특성을 확인하였다. 또한 전반적인 향 강도가 4.0 이상으로 매우 강한 향미를 가지고 있다. 이는 향기성분 결과와 유사한 결과를 나타내었으며, 식물성 향미 성분이 강한 특징을 가지고 있다. 이는 발효 균주가 다르고 이에 따른 효소활성이 상이하여 원료 유래의 성분이 다른 것으로 판단되었다.

다) 혼합대두발효분말 제조를 위한 부재료 첨가에 따른 관능평가

(1) 1차 배합비 설정

- 분말 조미료 개발 시 들어가는 부재료(표고버섯분말, 다시마분말, 양배추분말, 브로콜리분말, 무분말, 당근분말, 양파분말, 마늘분말, 대파분말, 생강분말, 황태분말, 새우분말, 멸치분말) 종류를 결정하기 위해 발효미생물산업진흥원 직원 20명을 대상으로 관능평가를 진행하였다. 특성강도는 감칠맛, 짠맛, 향, 전반적 기호도를 5점 척도(1점 : 매우 약하다, 2점 : 약하다, 3점 보통이다, 4점 : 강하다, 5점 : 매우 강하다)로 평가하였다. 전반적 기호도의 경우 순위법을 이용하여 배합비 간의 순위(1순위 4점, 2순위 3점, 3순위 2점, 4순위 1점)를 매긴 후 순위 총점으로 나타내었다.

표 18. 1차 배합비 설정

원재료	배합비(%)			
	752	436	189	610
대두발효분말	60	60	60	60
정제염	1	1	1	1
표고버섯분말	15	15	15	15
다시마분말	2	2	2	2
양배추분말	5	5	5	5
브로콜리분말	2	2	2	2
무분말	4	2	2	2
당근분말	1	1	1	1
양파분말	5	5	5	5
마늘분말	2	2	2	2
대파분말	2	2	2	2
생강분말	1	1	1	1
황태분말	0	2	0	0
새우분말	0	0	2	0
멸치분말	0	0	0	2
총합계	852	536	289	710

(2) 1차 배합비 관능평가 결과

- 대두발효분말에 들어갈 부재료 함량을 설정하기 위해 식물성 부재료(표고버섯분말, 다시마 분말 등) 비율을 유지하고 동물성 부재료(황태분말, 새우분말, 멸치분말)함량만 달리하여 1차 배합비를 설정하였으며 관능평가를 통해 특성강도(감칠맛, 짠맛, 향(비린내))와 전반적 기호도를 평가하였다. 관능평가 결과 특성강도인 감칠맛에서는 배합비간 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 짠맛은 멸치분말이 들어간 610 배합비가 가장 강하다는 결과를 보였다. 향(비린내)의 경우 멸치분말이 들어간 배합비가 4.75점으로 가장 강하다는 결과를 보였고, 새우분말, 황태분말도 4점 이상으로 나타났다. 전반적 기호도는 752번 배합비가 61점으로 가장 높게 나타났다. 따라서 전반적 기호도가 가장 높았던 752번을 최종 배합비로 선정하였다.

표 19. 1차 배합비 관능평가 결과

배합비	특성 강도			전반적 기호도 (순위 총점)
	감칠맛	짠맛	향(비린내)	
752	3.35±0.49 ^{a1)}	3.30±0.47 ^b	3.81±0.81 ^c	61
436	3.25±0.44 ^a	3.50±0.51 ^{ab}	4.50±0.51 ^{ab}	47
189	3.40±0.50 ^a	3.55±0.51 ^{ab}	4.20±0.41 ^b	50
610	3.45±0.51 ^a	3.80±0.70 ^a	4.75±0.44 ^a	42

¹⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(3) 2차 배합비 설정

- 대두발효분말 들어가는 식물성 부재료 중 양파분말, 마늘분말, 대파분말, 생강분말의 함량을 결정하기 위해 발효미생물산업진흥원 직원 20명을 대상으로 관능평가를 진행하였다. 특성강도는 단맛, 감칠맛, 향, 전반적 기호도를 5점 척도(1점 : 매우 약하다, 2점 : 약하다, 3점 : 보통이다, 4점 : 강하다, 5점 : 매우 강하다)로 평가하였다. 전반적 기호도의 경우 순위법을 이용하여 배합비 간의 순위(1순위 4점, 2순위 3점, 3순위 2점, 4순위 1점)를 매긴 후 순위 총점으로 나타내었다.

표 20. 2차 배합비 설정

원재료	배합비(%)			
	15	82	36	90
대두발효분말	60	60	60	60
정제염	1	1	1	1
표고버섯분말	15	15	15	15
다시마분말	2	2	2	2
양배추분말	5	5	5	5
브로콜리분말	2	2	2	2
무분말	2	2	2	2
당근분말	1	1	1	1
양파분말	5	4	4	5
대파분말	4	4	4	5
마늘분말	2	2	3	1
생강분말	1	2	1	1
총합계	100	100	100	100

(4) 2차 배합비 관능평가 결과

- 대두발효분말에 들어갈 부재료 함량(양파분말, 대파분말, 마늘분말, 생강분말)을 설정하기 위해 함량을 달리하여 2차 배합비를 설정하였으며 관능평가를 통해 특성강도(단맛, 감칠맛, 향)와 전반적 기호도를 평가하였다. 관능평가 결과 특성강도인 단맛, 감칠맛에서는 90번 배합비가 단맛이 강하다는 결과를 보였다. 특성강도 중 향은 마늘분말과 생강분말 함량이 높았던 82번 및 36번 배합비가 향이 4점이상으로 강하다는 결과를 보였고, 전반적 기호도도 낮은 편에 속하였다. 전반적 기호도는 90번 배합비가 73점으로 가장 높게 나타났다. 따라서 특성강도 결과와 전반적 기호도를 고려하여 90번(양파분말 5%, 대파분말 5%, 마늘분말 1%, 생강분말 1%)을 배합비를 선정하였다.

표 21. 2차 배합비 관능평가 결과

배합비	특성 강도			전반적 기호도 (순위 총점)
	단맛	감칠맛	향	
15	3.35±0.32 ^{b1)}	3.45±0.47 ^b	3.81±0.42 ^b	51
82	2.35±0.44 ^c	2.90±0.47 ^{ab}	4.25±0.35 ^a	40
36	2.50±0.50 ^c	2.84±0.63 ^{ab}	4.34±0.40 ^a	34
90	3.85±0.51 ^a	3.92±0.60 ^a	3.50±0.46 ^b	73

¹⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(5) 3차 배합비 설정

- 대두발효분말에 들어갈 식물성 부재료 중 표고버섯분말 및 다시마 함량을 설정하기 위해 발효 미생물산업진흥원 직원 20명을 대상으로 관능평가를 진행하였다. 특성강도는 색, 감칠맛, 향, 짠맛 전반적 기호도를 5점 척도(1점 : 매우 약하다, 2점 : 약하다, 3점 보통이다, 4점 : 강하다, 5점 : 매우 강하다)로 평가하였다. 전반적 기호도의 경우 순위법을 이용하여 배합비 간의 순위 (1순위 3점, 2순위 2점, 3순위 1점)를 매긴 후 순위 총점으로 나타내었다.

표 22. 3차 배합비 설정

원재료	배합비(%)		
	97	42	61
대두발효분말	60	60	60
정제염	1	1	1
표고버섯분말	12	14	16
다시마분말	5	3	1
양배추분말	5	5	5
브로콜리분말	2	2	2
무분말	2	2	2
당근분말	1	1	1
양파분말	5	5	5
대파분말	5	5	5
마늘분말	1	1	1
생강분말	1	1	1
총합계	100	100	100

(6) 3차 배합비 관능평가 결과

- 대두발효분말에 들어갈 식물성 부재료 중 표고버섯분말 및 다시마분말의 함량을 설정하기 위해 함량을 달리하여 3차 배합비를 설정하였으며 관능평가를 통해 특성강도(색, 감칠맛, 향, 짠맛)와 전반적 기호도를 평가하였다. 관능평가 결과 특성강도인 색과 향은 다시마분말 함량이 가장 많았던 97번 배합비가 가장 강하다는 결과를 보였다. 감칠맛의 경우 42번 배합비가 4점으로 감칠맛이 강하다는 결과를 보였다. 짠맛의 경우 배합비 간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 전반적 기호도는 42번 배합비가 68점으로 가장 높게 나타났다. 따라서 특성강도 결과와 전반적 기호도를 고려하여 42번 배합비(표고버섯분말 14%, 다시마분말 3%)를 선정하였다. 상기의 관능평가 결과를 토대로 혼합대두발효분말을 제조하였다.

표 23. 3차 배합비 관능평가 결과

배합비	특성 강도				전반적 기호도 (순위 총점)
	색	감칠맛	향	짠맛	
97	3.92±0.45 ^{a1)}	3.59±0.53 ^b	3.90±0.42 ^a	3.53±0.45 ^a	38
42	3.52±0.50 ^b	4.00±0.50 ^a	3.30±0.50 ^b	3.60±0.50 ^a	68
61	3.42±0.52 ^b	3.60±0.38 ^b	3.45±0.75 ^b	3.90±0.60 ^a	42

¹⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

라) 부형제 종류에 따른 수분흡수지수 측정

- 부형제 종류에 따른 대두발효분말의 수분흡수지수 결과를 표 24에 나타내었다. 건조 분말의 수분흡수지수와 수분용해지수는 식품산업 측면에서 중요한 가공적성 요인으로 알려져 있다(28). 수분흡수지수는 포도당과 말토덱스트린 첨가구에서 0.30, 말토스 첨가구에서 0.26, 텍스트린 첨가구에서 0.27의 결과를 보였다. 수분용해지수는 말토덱스트린 첨가구가 82.20%의 값으로 가장 높았으며, 다음으로 포도당 첨가구 78.40%, 텍스트린 첨가구 77.80%, 말토스 첨가구 77.0% 순으로 나타났다. 포도당 및 말토덱스트린을 부형제로 활용할 경우 용해도 증가에 유효할 것으로 판단되었다. 추후 대량생산 및 산업적 적용을 위해 단가 및 관능적 특징을 고려하여 포도당을 부형제로 사용하기로 하였다.

표 24. 부형제 종류에 따른 수분흡수지수 및 수분용해지수

부형제	수분흡수지수(WAI)	수분용해지수(WSI, %)
포도당	0.30±0.01 ^{a1)2)}	78.4±0.02 ^b
말토스	0.26±0.01 ^b	77.0±0.03 ^c
텍스트린	0.27±0.01 ^b	77.8±0.02 ^c
말토덱스트린	0.30±0.01 ^a	82.2±0.01 ^a

¹⁾Value are mean ± SD (n=3).

²⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan' s multiple test (P<0.05).

마) 시판 제품과 비교

(1) 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 품질분석

- 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 품질분석 결과를 표 25에 나타내었다. 3가지 시료의 pH는 5.57~6.34, 산도는 0.48~0.76%을 나타내었다. AN 함량은 시판화학이 1,952.36 mg %로 가장 높았고, 그 다음은 선발균주가 1842.32 mg %, 시판 천연이 1,045.32 mg%로 가장 낮았다. 염도는 33.50~37.80%로 시료별로 유의적인 결과를 나타내었다.

표 25. 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 품질분석

	선발균주	시판천연	시판 화학
pH	6.04 ± 0.03 ^{b1)2)}	5.57 ± 0.02 ^c	6.34 ± 0.02 ^a
총 산도 (%)	0.62 ± 0.02 ^b	0.76 ± 0.02 ^a	0.48 ± 0.02 ^c
아미노태 질소 (mg %)	1,842.32 ± 21.52 ^b	1,045.32 ± 9.45 ^c	1,952.36 ± 18.41 ^a
염도 (%)	34.50 ± 0.20 ^b	33.50 ± 0.20 ^c	37.80 ± 0.10 ^a

¹⁾Value are mean ± SD (n=3).

²⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(2) 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 핵산관련물질 분석

- 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 핵산관련물질 분석 결과를 표 26에 나타내었다. 핵산관련물질 성분은 시료별로 상이한 결과를 나타내었는데, 선발균주의 경우 AMP, CMP, GMP, hypoxanthine, IMP, UMP 함량 순서로, 시판 천연의 경우 IMP, AMP, GMP, CMP, UMP, hypoxanthine 함량 순으로, 시판화학의 경우 GMP, IMP, AMP, hypoxanthine, UMP, CMP 함량 순으로 검출되었다. 세가지 시료에서 모두 inosine은 검출되지 않았다. CMP, hypoxanthine, AMP는 선발균주를 이용한 혼합조미료가 각각 189.52 ppm, 158.87 ppm, 1,485.26 ppm으로 높은 함량을 나타내었고, IMP, UMP는 시판천연이 각각 93.61 ppm, 1,441.47 ppm으로 가장 높은 값을 보였다. GMP는 시판화학이 1,090.07 ppm으로 가장 높은 값을 보였다.

표 26. 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 핵산관련물질 분석

Nucleotides Related Compounds	unit : ppm		
	선발균주	시판천연	시판화학
CMP	189.52±3.15 ^a	93.61±0.45 ^b	6.74±0.10 ^c
UMP	42.08±2.98 ^b	67.71±1.52 ^a	8.51±0.09 ^c
GMP	259.14±2.15 ^c	300.75±2.14 ^b	1,090.07±9.91 ^a
IMP	85.12±1.89 ^b	1,441.47±10.35 ^a	890.55±4.18 ^c
Hypoxanthine	158.87±1.85 ^a	15.73±0.25 ^b	9.25±0.36 ^c
AMP	1,485.26±3.45 ^a	447.50±3.09 ^b	23.61±0.18 ^c
Inosine	-	-	-

²Value are mean ± SD (n=3).

³Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan' s multiple test (P<0.05).

(3) 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 유리아미노산 분석

- 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 유리아미노산 분석결과는 표 27와 같다. 선발균주를 이용한 혼합대두발효분말 총 유리아미노산 함량이 31,572.90 ppm으로 가장 높은 함량을 나타냈으며, 그 다음은 시판천연, 시판화학 순의 결과를 나타내었다. 본 연구 결과 감칠맛을 나타내는 aspartic acid는 3,085.20 ppm으로 가장 높은 함량을 나타냈고, glutamic acid는 시판화학이 가장 높았지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. 쓴맛을 나타내는 Isoleucine, histidine은 시판천연이 각각 858. 91 ppm, 3,258.50 ppm 으로 가장 높은 함량을 보였다. 선발균주를 이용한 혼합대두발효분말이 핵산관련물질 중 AMP와 감칠맛 아미노산인 glutamic acid와 상승작용을 통해 지미강화 소재로 사용이 가능할 것으로 판단되었다.

표 27. 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 유리아미노산 분석

				unit : ppm
No.	Amino acids	선발균주	시판천연	시판화학
1	Aspartic Acid	3,085.20±50.36 ^{a1)2)}	609.41±31.02 ^b	362.29±2.77 ^c
2	Threonine	49.80±2.74 ^b	465.02±10.54 ^a	48.88±1.25 ^b
3	Serine	78.30±1.77 ^b	738.58±23.36 ^a	70.30±1.20 ^c
4	Glutamic Acid	21,741.02±252.35 ^a	13,028.88±4.63 ^b	22,534.60±341.35 ^a
5	α-Aminoadipic Acid	-	163.96±10.52	-
6	Glycine	410.80±12.11 ^b	698.44±25.12 ^a	99.60±5.63 ^c
7	Alanine	4,104.60±100.25 ^a	2,594.44±95.22 ^b	292.43±10.42 ^c
8	α-Aminobutyric Acid	41.80±1.02 ^b	231.32±3.87 ^a	44.34±2.22 ^b
9	Valine	161.32±3.25 ^b	1,447.75±12.12 ^a	147.05±24.11 ^c
10	Methionine	20.53±0.78 ^c	217.69±7.83 ^a	59.48±3.23 ^b
11	Isoleucine	96.64±2.68 ^b	858.91±1.52 ^a	96.26±4.11 ^b
13	Leucine	202.79±6.98 ^b	1,539.16±5.33 ^a	208.50±4.52 ^b
14	Tyrosine	52.98±2.04 ^a	45.13±1.02 ^b	53.02±2.88 ^a
15	Phenylalanine	99.16±1.54 ^c	280.12±3.25 ^a	104.92±8.98 ^b
16	β-Alanine	20.78±0.36 ^b	2.81±0.11 ^c	36.03±2.18 ^a
17	β-Aminoisobutyric Acid	102.23±2.55 ^b	134.66±2.15 ^a	107.38±4.05 ^b
18	γ-Aminobutyric Acid	200.86±7.78 ^a	45.83±2.63 ^c	121.07±2.63 ^b
19	Ammonia	129.50±10.01 ^b	408.29±5.25 ^a	77.54±3.21 ^c
20	Hylys	-	54.60±1.15	-
21	Ornithin	287.49±5.63 ^b	1,886.83±31.01 ^a	146.72±2.25 ^c
22	Histidine	329.16±6.33 ^b	3,258.50±56.36 ^a	179.10±6.33 ^c
23	Lysine	30.45±0.39 ^c	133.94±3.00 ^a	97.24±2.78 ^b
24	Anserine	-	233.99±5.63	-
25	Carnosine	-	391.29±5.45	781.46±8.63
26	Arginine	303.35±14.11 ^c	410.44±15.12 ^a	334.46±8.15 ^b
Total		31,572.90±528.95 ^a	29,880.00±412.25 ^b	26,002.68±325.11 ^c

¹⁾Value are mean ± SD (n=3).

²⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan' s multiple test (P<0.05).

(4) 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 관능평가

- 발효미생물산업진흥원 직원 30명을 대상으로 최종 배합비가 설정된 선발균주(혼합대두발효분말)와 시판제품(시판되고 있는 화학 및 천연제품)의 염도를 1%로 보정한 후 관능적 특성과 기호도 분석을 실시하였다. 특성강도는 색, 감칠맛, 향, 짠맛 전반적 기호도를 5점 척도(1점 : 매우 약하다, 2점 : 약하다, 3점 : 보통이다, 4점 : 강하다, 5점 : 매우 강하다)로 평가하였다. 전반적 기호도의 경우 순위법을 이용하여 배합비 간의 순위(1순위 3점, 2순위 2점, 3순위 1점)를 매긴 후 순위 총점으로 나타내었다. 관능평가 결과 짠맛의 경우 같은 염도로 보정하였지만, 시판천연이 4.20로 가장 강하다는 결과를 보였다. 감칠맛의 경우 선발균주가 3.90로 가장 강하다는 결과를 보였고 시판화학, 시판천연 순으로 나타났다. 쓴맛의 경우 선발균주와 시판천연이 강하다는 결과를 보였다. 한편 전반적 기호도는 선발균주가 68점, 시판화학이 64점, 시판천연이 47점으로 선발균주를 이용한 혼합대두발효분말이 기호도가 가장 높은 것으로 나타났다.

표 28. 혼합대두발효분말과 시판제품 시료 목록

시료목록	시료 정보	시료번호
선발균주	선발균주를 이용한 혼합대두발효분말	56
시판천연	시중 판매되는 액상형 천연조미료	17
시판화학	시중 판매되는 분말형 화학조미료	94

표 27. 혼합대두발효분말과 시판 제품의 관능평가 결과

시료번호	특성 강도					전반적 기호도 (순위 총점)
	색	향	감칠맛	짠맛	쓴맛	
56	3.71±0.59 ^a	3.68±0.53 ^a	3.90±0.58 ^a	3.25±0.30 ^b	3.70±0.40 ^a	68
17	3.52±0.42 ^a	3.53±0.70 ^a	2.90±0.33 ^c	4.20±0.41 ^a	3.89±0.52 ^a	47
94	2.40±0.42 ^b	2.13±0.58 ^b	3.75±0.41 ^b	3.20±0.45 ^b	3.20±0.45 ^b	64

¹⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(4) 혼합대두발효분말 및 시판 제품의 묘사분석 결과

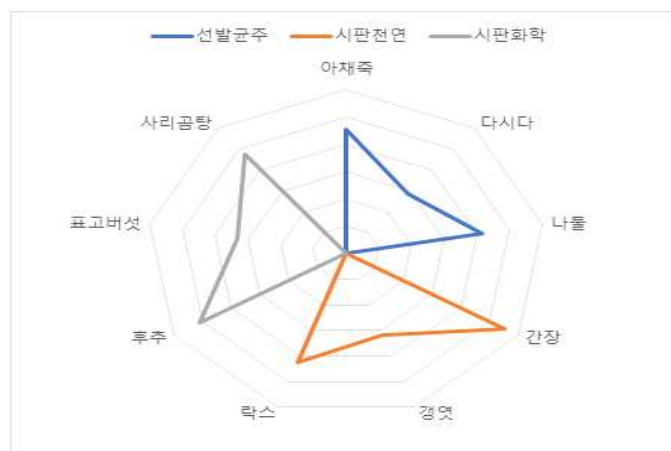
(가) 혼합대두발효분말 및 시판 제품에 대한 향미특성

- 선발균주, 시판천연, 시판화학에 대한 향미특성의 평가한 결과는 표 29에 나타내었다. 조미소재 시료에 대한 향미평가 결과, 시료간의 유의미한 향미특성의 차이를 확인하였다($p < 0.05$). 각 조미소재는 소재마다 특유의 향미특성을 가지고 있었으며 공통적으로 공유하고 있는 향미 특성은 나타나지 않았다.

표 29. 조미료 제품 3종에 대한 향미평가 결과

Attributes	선발균주	시판천연	시판화학	p-value
야채죽	2.3a	0.0b	0.0b	<0.0001
쇠고기 다시다	1.4a	0.0b	0.0b	<0.0001
나물	2.1a	0.0b	0.0b	<0.0001
간장	0.0b	2.7a	0.0b	<0.0001
깻잎	0.0b	1.5a	0.0b	<0.0001
락스	0.0b	2.1a	0.0b	<0.0001
양파	0.0b	0.0b	2.5a	<0.0001
표고버섯	0.0b	0.0b	1.7a	<0.0001
사리곰탕	0.0b	0.0b	2.4a	<0.0001
단맛	1.0b	1.4a	1.0b	<0.0001
짠맛	2.0b	1.3c	2.3a	<0.0001
감칠맛	3.9a	4.1a	3.1b	<0.0001

Means in a row that does not share same alphabetical letter represent significant differences at $\alpha = 0.05$



<그림 3. 조미소재 3종의 향미특성 강도의 비교>

① 선발균주를 적용한 조미료 제품의 특징적인 향미

- 야채죽, 다시다, 나물 향미의 경우, 선발균주 시료에서만 나타난 특징적인 향미로 타 시료에서는 관련향이 나타나지 않았다. 나물 향미의 경우, 이전 연구의 1차년도 선발균주로 발효된 조미소재와 동일한 향미 특성으로 조미소재 자체의 향미가 제품을 적용한 조미료에서도 특징적인 향으로 나타났다.
- [야채죽 향미]의 경우, 식은 시판 야채죽 제품에서 나는 향미로, 선발균주 시료에서만 2.3 수준으로 강하게 나타났다.
- [쇠고기 다시다 향미]의 경우, 소고기 육수에서 나는 특징적인 향미로 쇠고기맛 다시다(CJ 제일제당)를 물에 희석하였을 때 나는 향미로 정의되었다. 선발균주 시료에서만 1.4 수준으로 나타났다.
- [나물 향미]의 경우, 건나물을 약하게 양념하여 제시되는 취나물의 특유의 향미로 정의하였으며, 선발균주 시료에서만 2.1 수준으로 강하게 나타났다. 이전 연구의 1차년도 선발균주로 발효된 조미소재에 비해 나물 향미의 강도가 1.0 정도 낮은 수준을 보였으며, α -terpineol and β -terpineol 등의 휘발성 향기성분의 분석결과와 연계하여 확인이 필요할 것으로 사료된다(Durr et al., 1981).

② 시판천연의 특징적인 향미: 간장, 갯엿, 락스 향미

- 간장, 갯엿, 락스 향미의 경우, 시판천연 시료에서만 나타난 특징적인 향미로 타 시료에서는 관련향이 나타나지 않았다.
- [간장 향미]의 경우, 시판천연 시료에서만 2.7 수준으로 강하게 나타났다. 전북대학교 연구팀에서 수행한 대두 코지에 대한 향미특성 분석 결과에서도 특징적인 향미 중 하나로 “간장 향미”를 지목한 바 있다(29).
- [갯엿 향미]의 경우, 시판천연 시료에서만 1.5 수준으로 나타났다. 전북대학교 연구팀에서 수행한 된장에 대한 향미특성 분석 연구결과, 전통된장의 특징적인 향미 중 하나로 “갯엿 향미”가 강한 특징으로 지목된 바 있다(unpublished data). 이는 당화효소에 의해 분해된 다양한 당 성분으로부터 유래된 것으로 사료된다.
- [락스 향미]의 경우, 클로락스에서 나타나는 염소 성분의 특유의 향으로 정의하였으며, 시료의 뚜껑을 열자마자 첫 번째 숨(First sniff)에서 나타나는 향으로 시판천연 시료에서만 2.1 수준으로 강하게 나타났다.

③ 시판화학의 특징적인 향미: 양파, 표고버섯, 사리곰탕 향미

- 후추, 표고버섯, 사리곰탕 향미의 경우, 시판화학 시료에서만 나타난 특징적인 향미로 타 시료에서는 관련향이 나타나지 않았다.
- [양파 향미]의 경우, 시료의 뚜껑을 열자마자 첫 번째 숨(First sniff)에서 나타나는 향으로 후추의 코를 찌르는 자극적인 향으로 정의하였으며, 시판화학 시료에서만 2.5 수준으로 강하게 나타났다. 이는 원재료에 포함된 양파농축액에 의해 유발된 향으로 사료된다.
- [표고버섯 향미]의 경우, 물에 불린 표고버섯에서 나는 특징적인 향미로 시판화학 시료에서만 1.7 수준으로 나타났다. 이는 시판화학 조미소재의 원재료인 표고버섯과 버섯추출액에 의해

유발된 것으로 사료된다.

- [사리곰탕 향미]의 경우, 사리곰탕 라면(농심) 스프를 물에 희석했을 때 나타나는 특징적인 향으로 시판화학 시료에서만 2.4 수준으로 강하게 나타났다.

④ 기본맛

- 기본맛은 입안의 미각에 의해 감지되는 특성으로 크게 5가지 맛: 단맛, 짠맛, 신맛, 쓴맛, 감칠맛으로 나눌 수 있음. 5가지 기본맛 성분 중 단맛, 짠맛, 감칠맛이 나타났다.
- [단맛]의 경우, 선발균주 1.0, 시판천연 1.4, 시판화학 1.0으로 시판천연 시료가 타 시료대비 0.4 정도 강하게 평가되었다.
- [짠맛]의 경우, 선발균주 2.0, 시판천연 1.3, 시판화학 2.3으로 전문가 패널의 내부 토의 결과 선발균주의 짠맛이 가장 적당하다는 의견이 많았다.
- [감칠맛]의 경우, 선발균주 3.9, 시판천연 4.1, 시판화학 3.1로 시판화학 시료가 타 시료대비 약 1.0 정도 낮게 평가되었다.
- 선발균주 조미소재는 타 시료대비 적당한 단맛과 짠맛을 보였으며, 특히 감칠맛은 시중에서 가장 많이 판매되고 있는 시판천연 조미소재 시료와 비슷한 수준을 보였다.

(나) 결론

- 발효미생물산업진흥원에서 제공 받은 선발균주를 활용한 대두유래 조미소재에 대한 전문가 패널을 활용한 향미 평가를 통해 시판 조미소재와의 향미 차이를 분석하기 위하여 조미소재의 향미를 평가할 수 있는 용어 9종(야채죽, 쇠고기 다시다, 나물, 간장, 갱엿, 락스, 양파, 표고버섯, 사리곰탕)을 도출하였다.
- 조미소재 향미평가 용어를 기반으로 조미소재 3종의 향미특성을 프로파일링한 결과 각 시료별 다음과 같은 특징이 나타났다.
- [선발균주] 시료에는 야채죽, 쇠고기 다시다, 나물 향미가 강하게 나타나는 특징을 가지고 있다. 특히 쇠고기 다시다 향미는 기존의 조미소재와의 비슷한 향미 특성으로 소비자들이 거부감 없이 제품을 수용할 수 있을 것으로 사료된다.
- [시판천연] 시료는 간장, 갱엿, 락스의 향미 특성을 가지고 있다. 갱엿 향미의 경우 이는 균주에 의해 생산된 당화효소에 의해 분해된 당 성분으로부터 유래된 것으로 사료된다.
- [시판화학] 시료는 후루, 표고버섯, 사리곰탕의 자극적인 향미가 강하게 나타나는 특징을 가지고 있다. 이는 시판화학 조미소재의 원재료에서 유발된 향이 다수 나타났다.
- 기본맛은 5가지 기본맛 성분 중 단맛, 짠맛, 감칠맛이 나타났으며, [선발균주] 조미소재는 타 시료대비 적당한 단맛과 짠맛을 보였다. 특히 감칠맛은 시중에서 가장 많이 판매되고 있는 시판천연 조미소재 시료와 비슷한 수준을 보였다.

바) 조리 적용 테스트

1) 비건 굴소스 개발

- 진흥원에서 기개발된 달팽이 굴소스의 배합비를 토대로 대두발효분말, 진간장, 물엿, 설탕 비율을 주요 요인으로 설정하여 배합비를 설정하였다.

(가) 1차 배합비 설정

- 먼저 대두발효분말의 비율을 선정하기 위해 1차 배합비 설정하였고, 연구원을 대상으로 배합비별 기호도 분석을 실시하였다. 그 결과 48번 배합비에서 가장 선호도가 높은 것으로 나타났으며, 이는 대두발효분말의 감칠맛과 진간장의 짠맛이 48번 배합비에서 적절히 어우러진 것으로 판단된다. 따라서 배합비중 가장 선호도가 높았던 대두발효분말10%, 진간장 30%인 48번 배합비를 1차 배합비로 선정하였다.

표 30. 비건 굴소스의 1차 배합비

원재료	배합비(%)		
	65	48	95
대두발효분말	5	10	15
물	30	30	30
진간장	35	30	25
물엿	10	10	10
설탕	8	8	8
청주	3	3	3
마늘농축액	3	3	3
양파농축액	3	3	3
대파농축액	3	3	3
총합계	100	100	100

표 31. 비건 굴소스 1차 배합비의 관능평가 결과

배합비	특성 강도					전반적 기호도 (순위 총점)
	색	향	단맛	짠맛	감칠맛	
65	3.30±0.65 ^a	3.54±0.40 ^a	3.40±0.50 ^a	4.64±0.63 ^a	3.65±0.60 ^b	40
48	3.23±0.55 ^a	3.34±0.32 ^a	3.50±0.40 ^a	3.14±0.45 ^b	4.31±0.32 ^a	62
95	3.43±0.70 ^a	3.20±0.55 ^a	3.64±0.43 ^a	3.56±0.26 ^b	4.12±0.42 ^a	53

¹⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(나) 2차 배합비 설정 및 관능평가

○ 비건 굴소스의 단맛을 결정하기 위해 1차 배합비 결과를 토대로 다음과 같이 2차 배합비를 설정하였고, 관능평가를 통해 특성강도와 전반적 기호도를 평가하였다. 관능평가 결과 비건 굴소스의 특성강도는 색, 향, 짠맛, 감칠맛에서는 유의적인 차이를 보이지 않은 반면 단맛에서는 배합비간의 유의적인 차이를 나타내었다. 한편 전반적 기호도는 21, 60, 3번 배합비 순서로 기호도가 높은 것으로 나타났다. 따라서 최종 비건 굴소스의 배합비로 전반적 기호도가 가장 높았던 21번 배합비를 선정하였다.

표 32. 비건 굴소스의 2차 배합비

원재료	배합비(%)		
	3	60	21
대두발효분말	10	10	10
물	30	30	30
진간장	30	30	30
물엿	7	10	13
설탕	11	8	5
청주	3	3	3
마늘농축액	3	3	3
양파농축액	3	3	3
대파농축액	3	3	3
총합계	100	100	100

표 33. 비건 굴소스 2차 배합비의 관능평가 결과

배합비	특성 강도					전반적 기호도 (순위 총점)
	색	향	단맛	짠맛	감칠맛	
3	3.17±0.59 ^a	3.22±0.54 ^a	4.31±0.32 ^a	2.64±0.63 ^a	3.18±0.62 ^a	55
60	3.30±0.73 ^a	3.43±0.44 ^a	3.70±0.46 ^{ab}	3.14±0.45 ^a	3.44±0.56 ^a	59
21	3.37±0.60 ^a	3.66±0.25 ^a	3.23±0.49 ^b	3.56±0.26 ^a	3.58±0.38 ^a	68

¹⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(다) 비건 굴소스의 최종 배합비

표 34. 비건굴소스의 최종 배합비

원재료	배합비 (%)
대두발효분말	10
물	30
진간장	30
물엿	13
설탕	5
청주	3
마늘농축액	3
양파농축액	3
대파농축액	3
총합계	100

(라) 비건 굴소스의 제조공정도

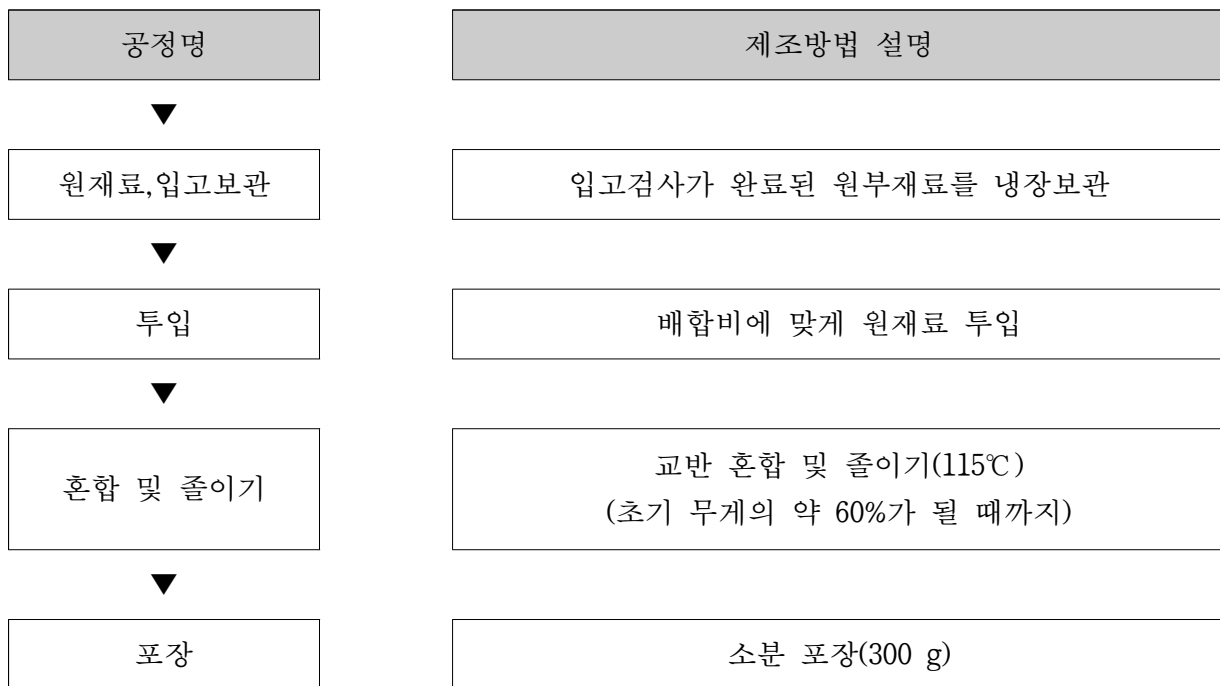


그림 2. 비건 굴소스의 제조공정도

2) 라면스프개발

(가) 스프의 1차 배합비 설정

- 순창 라면스프를 개발하기 위해 베이스 라면스프와 및 혼합대두발효분말 첨가량에 따른 배합비 설정과 관능평가를 진행하였다. 관능평가 결과 혼합대두발효분말의 첨가량이 증가할수록 감칠맛 및 장맛은 유의적으로 증가하는 경향을 보였고, 짠맛은 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며 매운맛은 배합비 간의 차이를 나타내지 않았다. 한편 전반적 기호도는 49번 배합비가 74점으로 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 베이스 라면스프와 혼합대두발효분말 첨가량을 결정하기 위한 배합비로 전반적 기호도가 가장 높았던 49번을 선정하였다.

표 35. 스프 1차 배합비 설정

원재료	배합비 (%)		
	77	49	90
베이스 라면스프	75	74	73
된장 분말	16	16	16
고추장 분말	8	8	8
혼합대두발효분말	1	2	3
총합계	100	100	100

표 36. 스프 1차 배합비의 관능평가 결과

배합비	특성 강도				전반적 기호도 (순위 총점)
	짠맛	감칠맛	매운맛	장맛	
77	3.47±0.61 ^{a1)}	2.55±0.79 ^c	2.38±0.72 ^a	2.86±0.84 ^c	40
49	3.13±0.58 ^b	2.81±0.50 ^b	2.43±0.62 ^a	3.14±0.58 ^b	74
90	2.79±0.55 ^c	3.26±0.82 ^a	2.52±0.74 ^a	3.50±0.82 ^a	52

¹⁾Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

(나) 스프의 2차 배합비 설정

- 2차 배합비 선정 결과를 토대로 스프의 짠맛 및 장맛을 조절하기 위해 된장분말 및 고추장분말 첨가량에 따른 배합비 설정과 관능평가를 진행하였다. 된장분말 첨가량이 증가할수록 특성강도 중 짠맛이 증가하는 경향을 보였고, 고추장분말 첨가량이 증가할수록 특성강도 중 매운맛이 증가하는 경향을 보였다. 한편 전반적 기호도는 53번 배합비가 76점으로 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 분말 스프의 최종 배합비로 53번을 선정하여 라면 스프 개발 시 활용하였다.

표 37. 스프 2차 배합비 설정

원재료	배합비 (%)		
	63	53	61
베이스 라면스프	74	74	74
된장분말	18	16	14
고추장분말	6	8	10
혼합대두발효분말	2	2	2
총합계	100	100	100

표 38. 스프 2차 배합비의 관능평가 결과

배합비	특성 강도				전반적 기호도 (순위 총점)
	짠맛	감칠맛	매운맛	장맛	
63	3.37±0.72 ^{al)}	2.72±0.90 ^b	2.32±0.69 ^c	2.86±0.75 ^b	58
53	2.89±0.55 ^b	3.44±0.63 ^a	2.53±0.84 ^b	3.54±0.87 ^a	76
61	2.82±0.63 ^b	3.32±0.75 ^a	3.76±0.81 ^a	3.50±0.75 ^a	35

^{l)}Different letters (a, b, c) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test (P<0.05).

표 39. 스프의 최종 배합비

원재료	배합비 (%)
베이스 라면스프	74
된장분말	16
고추장분말	8
혼합대두발효분말	2
총합계	100

사) 개발 소재 공인기관검사의뢰

- 본 실험에 의해 최종 개발된 선발균주를 이용한 대두발효분말은 공인분석기관에 아미노태질소 및 glutamic acid 함량을 의뢰, 분석하여 최종개발목표 성능지표를 확보하였다. 그 결과 아미노산성 질소는 2,261mg %, glutamic acid 함량은 43,771.6 mg/kg로 측정되어 연구의 목표를 달성하였다.
- 최종 개발된 대두발효분말(제품명 : 맛내기용대두발효분말), 혼합대두발효분말(제품명 : 순창 요리두), 라면스프(제품명 : 순창 짬라면 스프)는 지미강화 및 조미료로서 사용할 가치가 있다고 판단되므로 품목제조보고를 완료하였다.



맛내기용대두발효분말

발급번호 : MAMB-AHBH-MEHU-DZMX-WGEO

식품 · 식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 홍재길	생년월일 1964년 12월 16일		
	주소 서울특별시 중구 용구로1길 25, 104동 1701호 (신 현대전화)	전화번호 063 6539662		
영업소	명칭(상호) 농업회사법인순창장류(주) 제2공장	영업등록번호 20120499043		
	소재지 전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 61-71			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	품목제조보고번호	20120499043103
	제품명	맛내기용대두발효분말		
	유통기한	제조일로부터 2년		
	품질유지기한			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	원장예 기제		
	용도 용법	원장예 기제		
	보관방법 및 포장재질	원장예 기제		
	포장방법 및 포장단위	원장예 기제		
	결상	고유의 색채와 풍미를 지니고, 이미, 이취가 없는 분말		
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량 · 저열량 식품 해당 여부 []에 []아니오 [O]해당 없음 ■ 영, 유아용 섭취대상으로 표시 만해하는 식품 해당 여부 []에 [O]아니오 ■ 고열량식품으로 표시해 관해하는 식품의 해당 여부 []에 [O]아니오 ■ 알균 · 열균 제품의 해당 여부 [O]비알균 []알균 []열균 		
기타				

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품
(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

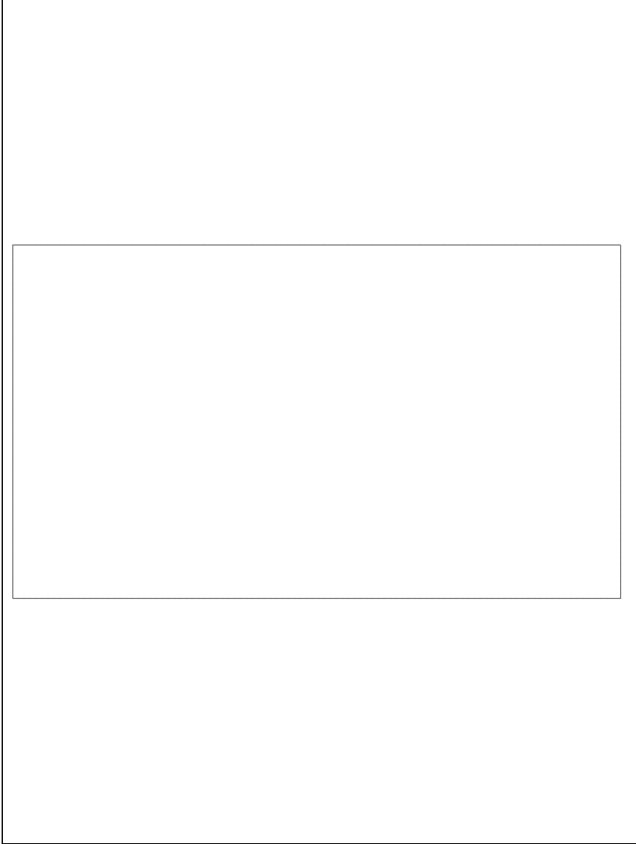
2021년 08월 12일
보고인 홍재길

전라북도 순창군수 귀하

품목보고번호 : 20120499043103

처리부서	행정복지국 민원과	처리자성명	최길래	처리일자	2021년 08월 13일
------	-----------	-------	-----	------	---------------

맛내기용대두발효분말 품목제조보고서



순창 요리두

발급번호 : MAMB-BMAC-VR-Q-QA85-ALYD

식품 · 식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 정병주	생년월일 1965년 07월 20일		
	주소 전라북도 순창군 순창읍 중류로 296, 403호 (대신 현대전화)	전화번호 063 6539662		
영업소	명칭(상호) 농업회사법인순창장류(주) 제2공장	영업등록번호 20120499043		
	소재지 전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 61-71			
제품정보	식품의 유형	복합조미식품	품목제조보고번호	20120499043110
	제품명	순창 요리두		
	유통기한	제조일로부터 2년		
	품질유지기한			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	원장예 기제		
	용도 용법	원장예 기제		
	보관방법 및 포장재질	원장예 기제		
	포장방법 및 포장단위	원장예 기제		
	결상	완칠맛 및 여러가지 야채 고유의 맛이 나는 고체조미료		
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량 · 저열량 식품 해당 여부 []에 []아니오 [O]해당 없음 ■ 영, 유아용 섭취대상으로 표시 만해하는 식품 해당 여부 []에 [O]아니오 ■ 고열량식품으로 표시해 관해하는 식품의 해당 여부 []에 [O]아니오 ■ 알균 · 열균 제품의 해당 여부 [O]비알균 []알균 []열균 		
기타				

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품
(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2021년 11월 25일
보고인 정병주

전라북도 순창군수 귀하

품목보고번호 : 20120499043110

처리부서	행정복지국 민원과	처리자성명	최길래	처리일자	2021년 11월 25일
------	-----------	-------	-----	------	---------------

순창 요리두 품목제조보고서



식품·식품첨가물 품목제조보고서

신청 신고일 주소 경기도 수원시팔달구 고색동 7번지 194호 21층 3	생산일자 2021년 11월 27일 관할관청 경기도 수원시 팔달동 관내도 08-17(1층)
신청(상호) 영미식품(주) 소재지 경기도 수원시 팔달동 관내도 08-17(1층)	영미등록번호 20220064340
식품의 유형 식품명 유통기한 품질유지기간 원재료명 또는 성분명 등 제조방법 용도 용법 보관방법 및 포장방법 품질보증 및 포장방법 성분 품목의 특성	식품제조업종 품목제조보고번호 20220064340/03 신청 관리권 스프 제조방법 제조일로부터 24개월 원재료명 원장에 기재 원장에 기재 원장에 기재 원장에 기재 원장에 기재 분할상으로 고유의 맛과 풍미를 형성 []불 []아니오 []확인할 필요 []예 []아니오 []예 []아니오 []예 []아니오 []예 []아니오

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 보고합니다.

2021년 09월 07일
보고인 김민지

경기도 화성시장 귀하

등록보고번호 : 20220064340/03

관리부서	관리과	관리과	관리과	관리과	관리과
관리부서	관리과	관리과	관리과	관리과	관리과

순창 짬라면 스프

검사 성적서

주무관	미생물산업계장	영유사업소장
신미진	박영수	송정훈

2021. 11. 15.

우) 56048 전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 6 / 전화 063-650-5426 / 전송 063-650-5429

문서번호 장류사업소-5376 시행일자: (2021. 11. 15.)

수 신: 발효미생물산업진흥원

제 목: 품질검사성적서(R-596) 유통기한 또는 제조일자:

검체번호: R-596

제조회사: 발효미생물산업진흥원 식품유형: 기타가공품

검 제 명: 맛내기용 대두발효분말 검사항목: 아미노산상질소, 글루탐산

의뢰일자: 2021. 11. 03.

의뢰목적: 품질검사

■ 검사결과

검사항목	결과	검사항목	결과
아미노산상질소	2.261 mg%	글루탐산	43.771.6 mg/kg
- 이	하	여	백 -

■ 판 정(결과): - (자가품질검사용으로 사용할 수 없음)

위와 같이 검사결과를 통보합니다.
2021년 11월 12일

순창군장류사업소장

맛내기용대두발효분말 검사성적서

순창 짬라면 스프 품목제조보고서

특허증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-2242535 호

Patent Number

제 10-2020-0162952 호

출원번호 Application Number

2020년 11월 27일

출원일 Filing Date

2021년 04월 14일

등록일 Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention
저염맛내기 원장 제조용 바실러스 아밀로리퀴페시엔스 SRCM104466 균주 및 아스파질러스 오리제 SRCM102487 균주의 특성

특허권자 Patentee
재단법인 발효미생물산업진흥원(214522-*****)
전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 61-27

발명자 Inventor
등록사장한테 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2021년 04월 14일

특허청
Korean Intellectual Property Office

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

김 용 래

QR코드로 원제기준
등록사항을 확인하세요

특허증

아) 참고문헌

1. Anderson RA, (1982) Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain products. *Cereal Chem*, 59, 265-26
2. Drake MA, Civille GV. (2002) Flavor Lexicons. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 33-40
3. Ninomiya K. (1998) Natural occurrence. *Food Reviews International*, 14, 177-212
4. Yoshida Y. (1998). Umami taste and traditional seasoning. *Food Reviews International*, 14, 213-246
5. Bellisle F. (1999) Glutamate and the umami taste - sensory, metabolic, nutritional, and behavioral considerations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23, 423-438
6. Populin T, Moret S, Truant S, Conte L. (2007). A survey on the presence of free glutamic acid in foodstuffs, with and without added monosodium glutamate. *Food Chemistry*, 104, 1712-1717
7. Frias J, Song YS, Martínez-Villaluenga C, De Mejia EG, Vidal-Valverde C. (2008). Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(1), 99-105.
8. Kim GY, Jeong HW, Jeong DJ, Song HB, Lee HG. (2013). Effects of Shiitake Mushroom on Anti-platelet Aggregation and Anti-thrombotic. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*, 27(2), 239-245
9. Kuninaka AM, Kibi K, Sakaguchi. (1964) History and development of flavor nucleotides, *Food Tech.*, 18. p.287
10. Kim JS, Jo YJ, Lee NG. (2006). A Study on Preference to Korean Spicy Fish Soups by Questionnaire Methods in Busan and Development of a Standardized Recipe. *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, 18(2), 150-163.
11. Pyun JW, Hwang IK (1988). Study on free amino acids (glutamic acid) and nucleotide relating substances of various foods. *Korean J Soc Food Sci* 4-1, 33-40
12. Halpern BP. (1987). Human judgements of MSG taste: Qualities and reaction times. *Umami: A basic taste*, MR eds, 327-354.
13. Jayasena DD, Ahn DU, Nam KC, Jo C. (2013). Flavour chemistry of chicken meat: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(5), 732.
14. Terasaki M, Kajikawa M, Fujita E, Ishii K. (1965). Studies on the flavor of meats: Part I. Formation and degradation of inosinic acids in meats. *Agricultural and Biological Chemistry*, 29(3), 208-215.
15. Kim MJ, Rhee HS. (1993) Studies on the changes of taste compounds during soy paste fermentation (II). *Korean J Soc Food Sci*, 9, 257-260
16. Park JS, Lee MY, Lee TS. (1995) Compositions of sugars and fatty acids in soybean paste (*doenjang*) prepared with different microbial sources. *Journal of The Korean Society of Food and Nutrition*, 24(6), 917-924
17. Kim DH, Kim SH. (1999) Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Mucor* and *Rhizopus* strains. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 31(1), 176-182
18. Fors S. (1983) Sensory properties of volatile Maillard reaction products and related

- compounds: A literature review. The maillard reaction in foods and nutrition, 185-286
19. Park JD, Hong SI, Park HU, Kim DM (1999). Apple Flavor. *Bulletin of Food Technology*, 12(4), 45-75
 20. Sun SY, Jiang WG, Zhao YP. (2010) Profile of volatile compounds in 12 Chinese soy sauces produced by a high-salt-diluted state fermentation. *J Inst Brew* 116: 316-328
 21. Cha YJ, Kim H, Jang SM, Yoo YJ. (1998) Identification of aroma-active components in salt-fermented big-eyed herring on the market. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1053-1058
 22. Kim ND. (2006) Trend of research papers on the soy sauce flavor in Japan. *Food Industry and Nutrition* 11(2): 66-84
 23. Yoo SM, Kim HR, Kim JS, Chang CM, Choe JS (1999) Volatile Compounds of Chonggugjang Prepared by Different Fermentation Methods and Soybean Cultivars. *Applied Biological Chemistry*, 42(2), 111-115
 24. Lee SJ, Ahn BM. (2008) Thermal changes of aroma components in soybean pastes (doenjang). *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 271-276
 25. Heiler C., Schieberle P. (1996) Studies on the metallic off-flavour in buttermilk: identification of potent aroma compounds. *LWT-Food Science and Technology*. 29(5-6): 460-464
 26. Sung SA, Lee SJ. (2017) Physicochemical and sensory characteristics of commercial top-fermented beers. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49(1): 35-43
 27. MK, Jang HW, Lee KG. (2018). Sensory and instrumental volatile flavor analysis of commercial orange juices prepared by different processing methods. *Food Chemistry*. 267(30): 217-222
 27. Durr P., Chobinger U., Waldvogel R. (1981). Aroma quality of orange juice after filling and storage in soft packages and glass bottles. *Alimenta*, 20(4): 91-93
 28. Moon JH, Kim R, Choi HD, Kim YS. (2010) Nutrient composition and physicochemical properties of Korean taro flours according to cultivars. *Korean J Food Sci Technol.* 42, 613-619
 29. Hong HH, Kim MK. (2020). Physicochemical quality and sensory characteristics of *koji* made with soybean, rice, and wheat for commercial *doenjang* production. *Foods*, 9(8), 975

협동연구기관2 [경상대학교] : 발효장류 기반 조미·향미 소재 발굴 및 발효조건과의 상관관계 규명

1) 발효조미소재의 대사체 분석

가) 실험재료 및 장비

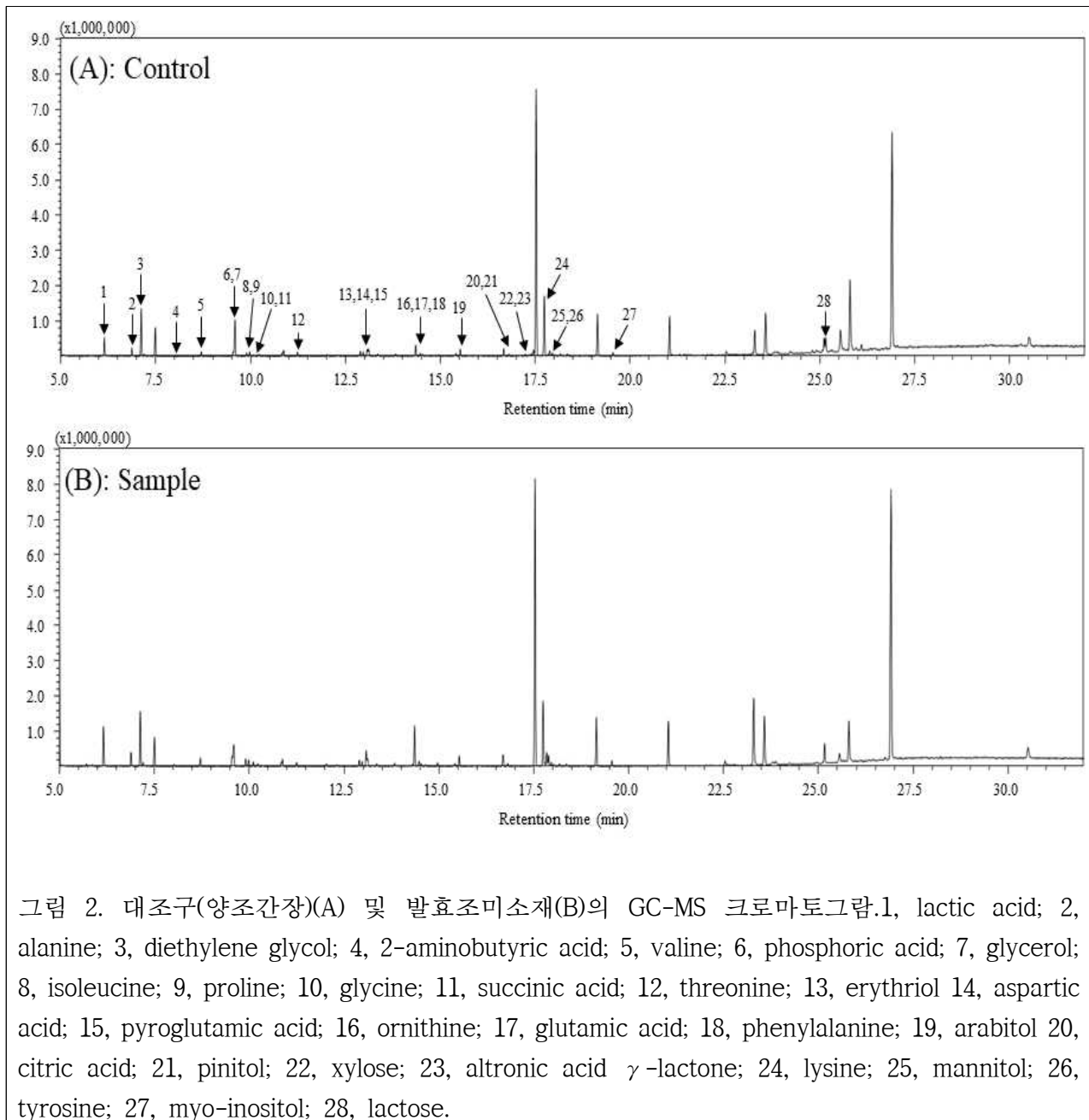
- 실험에 사용된 발효조미소재 및 대조구(양조간장)는 농업회사법인순창장류(주)에서 제공 받음.
- 2종의 샘플을 동결건조후 GC-MS(Shimazu)와 UPLC-Q-TOF-MS/MS(Xevo G2-S, Waters) 2가지 장비를 활용하여 대사체 분석을 진행하였음.
- 다변량 통계분석은 SIMCA-P⁺ (ver. 14.0.1, Umetrics)프로그램을 이용하여 분석함.

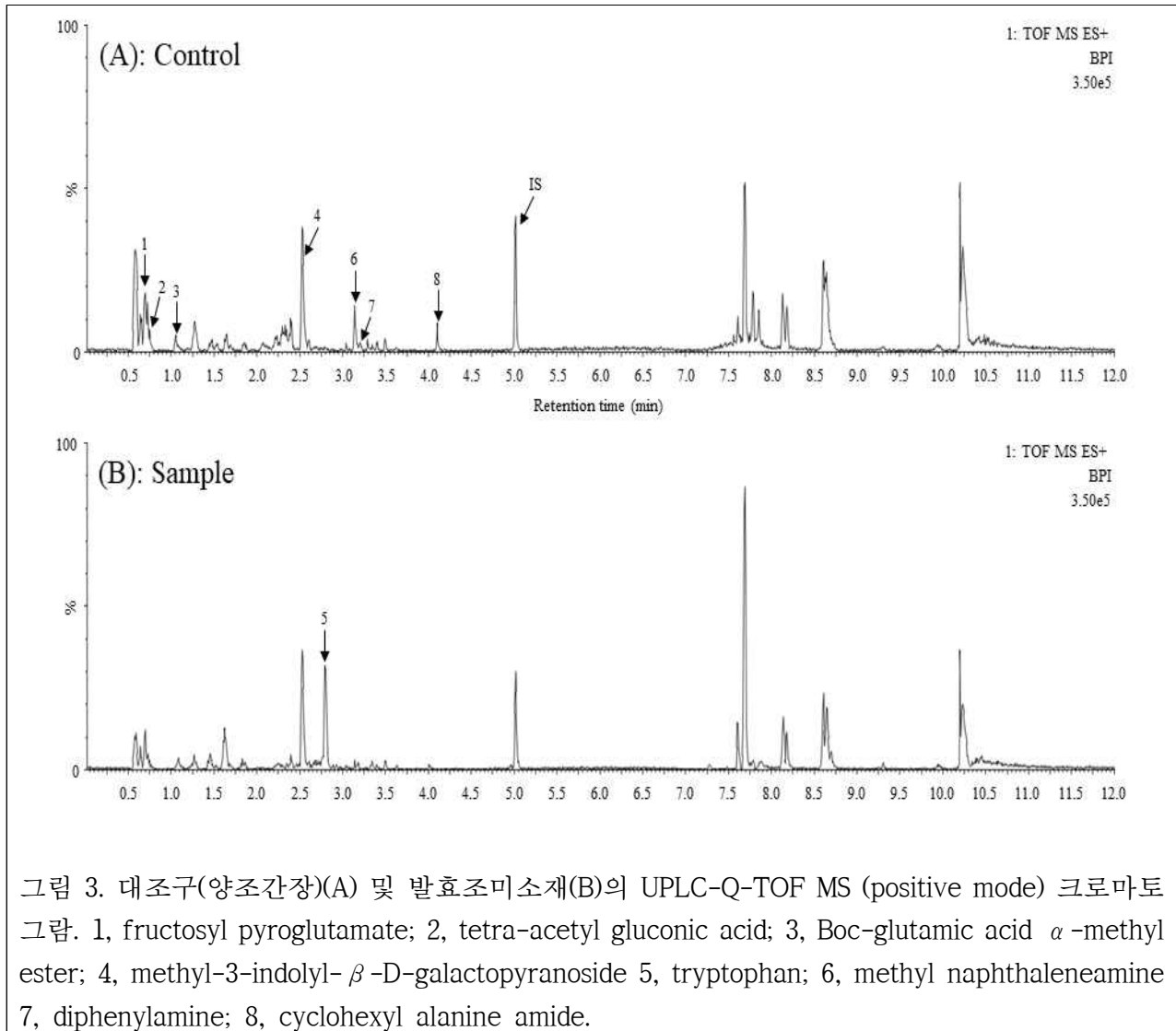


나) 발효조미소재 및 대조구(양조간장) 2종 샘플에 대한 대사체 및 다변량 통계분석

(1) 농업회사법인순창장류(주) 2종 샘플의 대사체 분석 및 다변량 통계 분석

- GC/MS에 의한 대조구(양조간장) 및 발효조미소재의 대사체 분석 크로마토그램을 그림 2에 나타내었으며, UPLC-Q-TOF MS 분석에 의한 대사체 분석 결과는 그림 3과 4에 나타내었음.
- GC-MS 크로마토그램에서 발효조미소재의 대사체 프로파일이 대조군과 차이가 있었음.
- UPLC-Q-TOF MS 분석 결과도 positive, negative mode에서도 두 샘플간의 대사체 프로파일이 차이를 나타내었음.





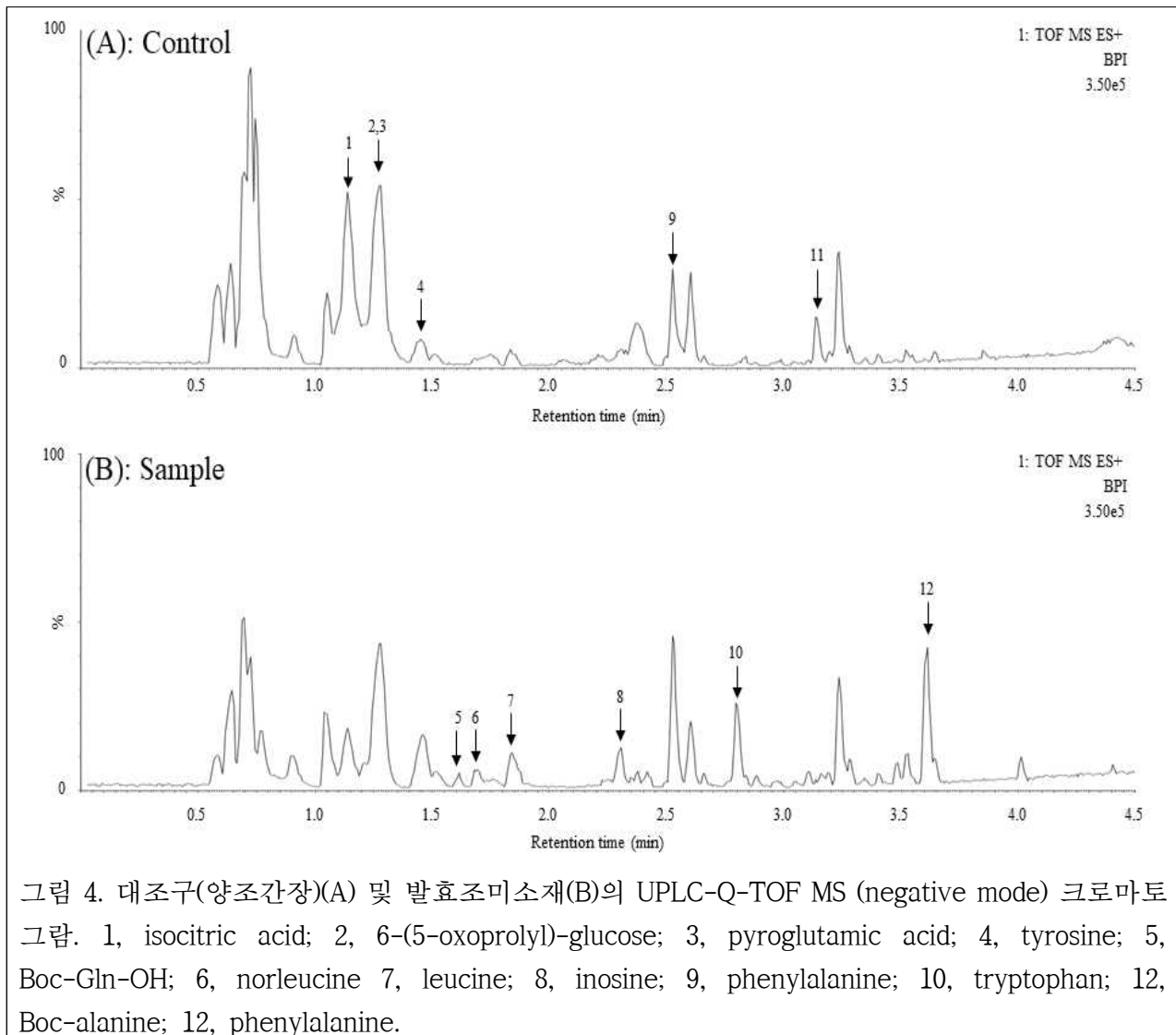
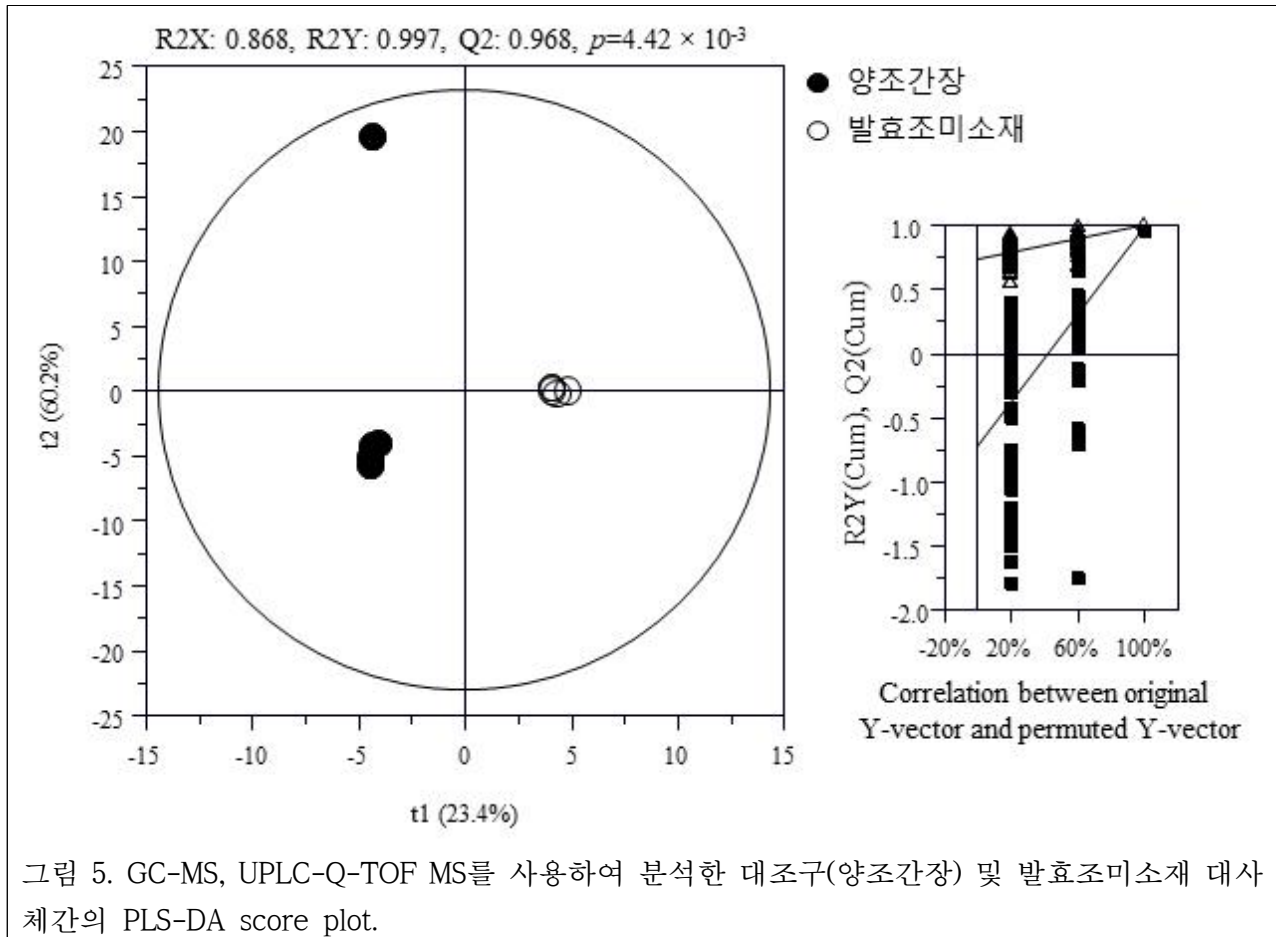


그림 4. 대조군(양조간장)(A) 및 발효조미소재(B)의 UPLC-Q-TOF MS (negative mode) 크로마토그램. 1, isocitric acid; 2, 6-(5-oxoprolyl)-glucose; 3, pyroglutamic acid; 4, tyrosine; 5, Boc-Gln-OH; 6, norleucine 7, leucine; 8, inosine; 9, phenylalanine; 10, tryptophan; 12, Boc-alanine; 12, phenylalanine.

- 대조군과 발효조미소재의 대사체분석 결과를 다변량통계 분석을 통해 PLS-DA로 시각화 하였음 (그림 5).
- PLS-DA plot에서 대조군(양조간장)과 발효조미소재는 t[1]에 의해 뚜렷하게 구분되었음.



(2) 발효미생물산업진흥원 5종 샘플의 주요 대사체 동정 결과

- 다변량 통계분석 결과를 기반으로 발효조미소재와 양조간장 대사체프로파일의 차이에 기여하는 주요 대사체를 동정하였음(표 1, 2, 3).
- 표 1은 GC-MS분석에서 검출된 주요 대사체를 동정한 결과이며, $VIP > 1$, $p < 0.05$ 값을 갖는 29종의 대사체를 동정하였으며, 아미노산(alanine, 2-aminobutyric acid, valine, isoleucine, proline, glycine, threonine, aspartic acid, pyroglutamic acid, ornithine, glutamic acid, phenylalanine, lysine, tyrosine), 당류(erythriol, arabitol, pinitol, xylose, mannitol, myo-inositol), 산(lactic acid, phosphoric acid, succinic acid, citric acid) 등이 확인되었음.

표 1. GC-MS 분석에서 검출된 주요 대사체

RT	ID	VIP ¹⁾	<i>p</i> -value ²⁾
6.15	lactic acid	1.66	9.59×10^{-7}
6.87	alanine	1.65	3.20×10^{-6}
7.12	diethylene glycol	1.38	3.99×10^{-3}
8.02	2-aminobutyric acid	1.69	9.27×10^{-10}
8.70	valine	1.67	4.27×10^{-7}
9.54	phosphoric acid	1.67	1.16×10^{-7}
9.59	glycerol	1.69	1.18×10^{-9}
9.90	isoleucine	1.69	2.95×10^{-9}
9.98	proline	1.63	1.04×10^{-5}
10.11	glycine	1.59	5.99×10^{-5}
10.22	succinic acid	1.54	2.96×10^{-4}
11.24	threonine	1.30	1.03×10^{-2}
12.89	erythriol	1.41	2.92×10^{-3}
13.08	aspartic acid	1.68	2.06×10^{-8}
13.11	pyroglutamic acid	1.62	1.59×10^{-5}
14.30	ornithine	1.28	1.16×10^{-2}
14.35	glutamic acid	1.69	1.89×10^{-9}
14.48	phenylalanine	1.62	1.28×10^{-5}
15.53	arabitol	1.52	4.16×10^{-4}
16.68	citric acid	1.65	2.36×10^{-6}
16.81	pinitol	1.09	4.65×10^{-2}
17.25	xylose	1.68	1.47×10^{-7}
17.34	altronic acid γ -lactone	1.57	1.34×10^{-4}
17.84	lysine	1.67	1.19×10^{-7}
17.89	mannitol	1.63	1.00×10^{-5}
18.02	tyrosine	1.42	2.78×10^{-3}
19.56	myo-inositol	1.18	2.96×10^{-2}
25.12	lactose	1.68	8.86×10^{-8}

¹⁾VIP: variable importance in the projection; ²⁾*p*-values were analyzed by Duncan's test.

○ 표 2은 UPLC-Q_TOF MS positive mode분석에서 검출된 대사체를 동정한 결과이며, VIP>1, $p < 0.05$ 값을 갖는 8종의 대사체 (fructosyl pyroglutamic acid, tetra-acetyl gluconic acid, Boc-L-glutamic acid α -methyl ester, methyl-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, tryptophan, methyl naphthalenamine, diphenylamine, cyclohexyl alanine amide)가 확인되었음.

표 2. UPLC-Q-TOF MS positive mode 분석에서 검출된 주요 대사체

RT	ID	m/z	fragment	VIP ¹⁾	<i>p</i> -value ²⁾
0.69	fructosyl pyroglutamate	292.1011	226, 208, 246	1.28	1.10×10^{-2}
0.72	tetra-acetyl gluconic acid	365.1018	335, 214	1.19	2.87×10^{-2}
1.05	Boc-L-glutamic acid α -methyl ester	262.1303	244, 216	1.34	3.65×10^{-3}
2.55	methyl-3-indolyl- β -D-galactopyranoside	310.1282	292, 264, 132	1.25	1.62×10^{-2}
2.80	tryptophan	188.0715	159, 130	1.53	9.19×10^{-6}
3.22	methyl naphthalenamine	158.0985	143, 128	1.38	1.76×10^{-3}
3.29	diphenylamine	170.0978		1.23	2.61×10^{-2}
4.10	cyclohexyl alanine amide	171.1500	120, 72	1.51	4.12×10^{-5}

¹⁾VIP: variable importance in the projection; ²⁾*p*-values were analyzed by Duncan's test.

○ 표 3은 UPLC-Q_TOF MS negative mode분석에서 검출된 대사체를 동정한 결과이며, VIP>1, $p < 0.05$ 값을 갖는 12종의 대사체 (isocitric acid, 6-(5-oxoprolyl)-glucose, pyroglutamic acid, tyrosine, Boc-Gln-OH, norleucine, leucine, inosine, phenylalanine, tryptophan, Boc-alanine, phenyllactic acid)가 확인되었음.

표 3. UPLC-Q-TOF MS negative mode 분석에서 검출된 주요 대사체

RT	ID	m/z	fragment	VIP ¹⁾	<i>p</i> -value ²⁾
1.15	isocitric acid	191.0153	111	1.32	2.20×10^{-8}
1.25	6-(5-oxoprolyl)-glucose	290.0847	128	1.32	1.59×10^{-10}
1.27	pyroglutamic acid	128.0307		1.20	4.62×10^{-4}
1.46	tyrosine	180.0623	119	1.31	1.53×10^{-8}
1.61	Boc-Gln-OH	245.1113	128	1.30	7.45×10^{-7}
1.69	norleucine	130.0830	80	1.31	1.08×10^{-7}
1.84	leucine	130.0828	112, 86	1.21	1.45×10^{-3}
2.30	inosine	267.0701	135	1.32	7.01×10^{-11}
2.52	phenylalanine	164.0672	147	1.29	1.79×10^{-6}
2.79	tryptophan	203.0785	159	1.32	7.94×10^{-15}
3.10	Boc-alanine	188.0885	130	1.32	2.94×10^{-9}
3.61	phenyllactic acid	165.0514	130	1.32	1.28×10^{-16}

¹⁾VIP: variable importance in the projection; ²⁾*p*-values were analyzed by Duncan's test.

(3) 발효조미소재와 대조구(양조간장)과의 주요 대사체 함량 비교

- 발효조미소재와 대조구(양조간장)에서 확인된 주요 대사체들의 상대적 함량 비교를 위해 box plot으로 나타내었음.
- 그림 6는 GC-MS 분석에서 검출된 주요 대사물질들의 상대적 함량을 box plot으로 나타낸 결과이며, 발효조미소재에서는 몇몇 대사체(glycerol, threonine, pyroglutamic acid, xylose, altronic acid γ -lactone, lactose)를 제외한 나머지 대사물질들의 함량이 대조구보다 높았음.
- 특히 발효조미소재에서 threonine, pyroglutamic acid를 제외한 유리아미노산의 함량이 대조구보다 높았으며, 그 중 glycine과 lysine의 함량은 대조구보다 3배 이상 높았음.
- 또한 발효식품 중 주요 감칠맛 지표 성분인 glutamic acid의 상대적 함량도 발효조미소재가 대조구보다 약 3배 이상 높았음.

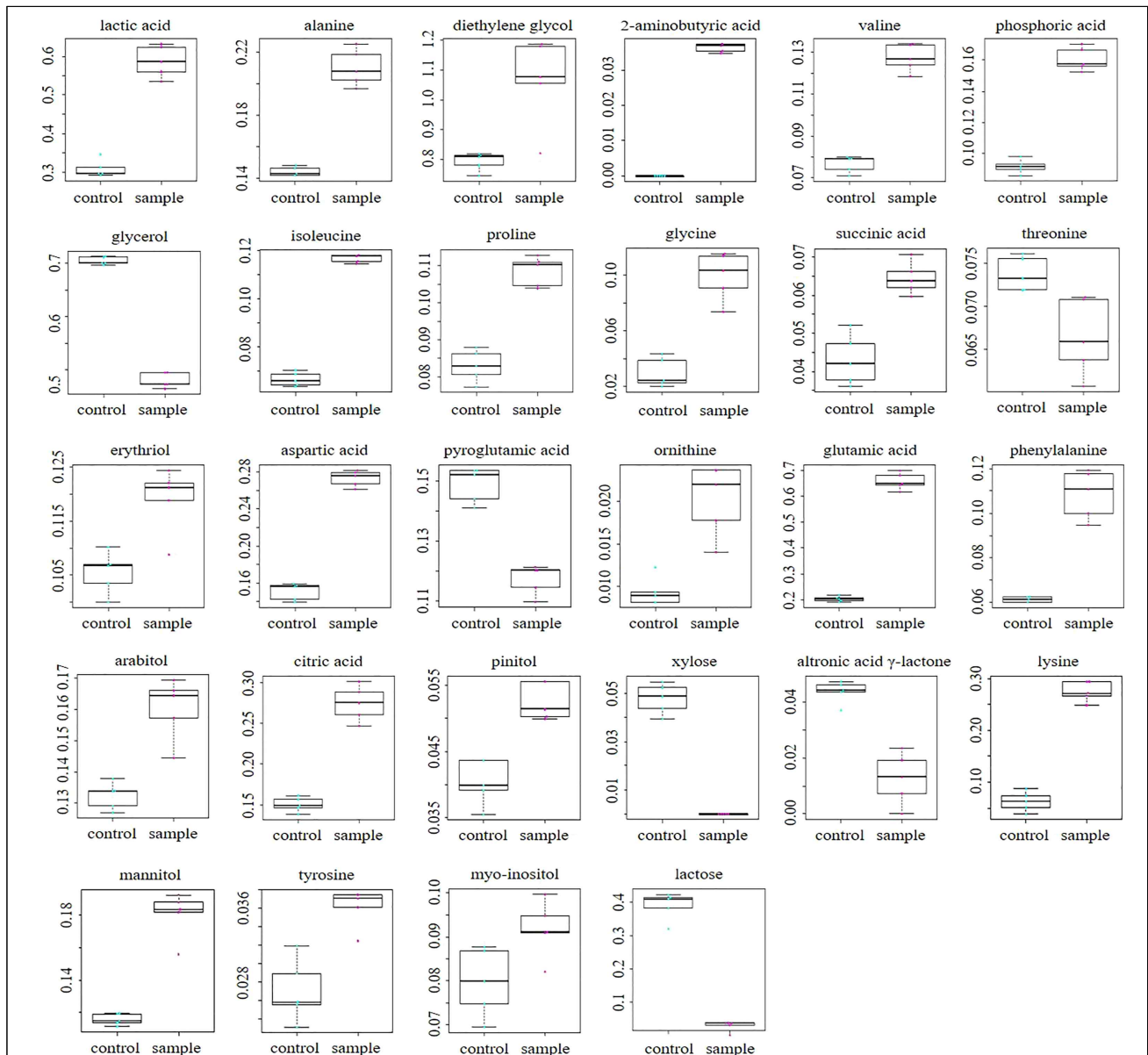


그림 6. GC-MS분석에서 확인된 발효조미소재와 대조구(양조간장) 사이의 대사체 함량 비교.

○ 그림 7는 UPLC-Q-TOF MS 분석에서 검출된 주요 대사물질들의 상대적 함량을 box plot으로 이미지화 한 결과이며, 발효조미소재가 Boc-glutamic acid α -methyl ester, 6-(5-oxoproline)-glucose를 제외한 아미노산 및 아미노산 유도체의 함량이 대조구보다 높게 나타났음.

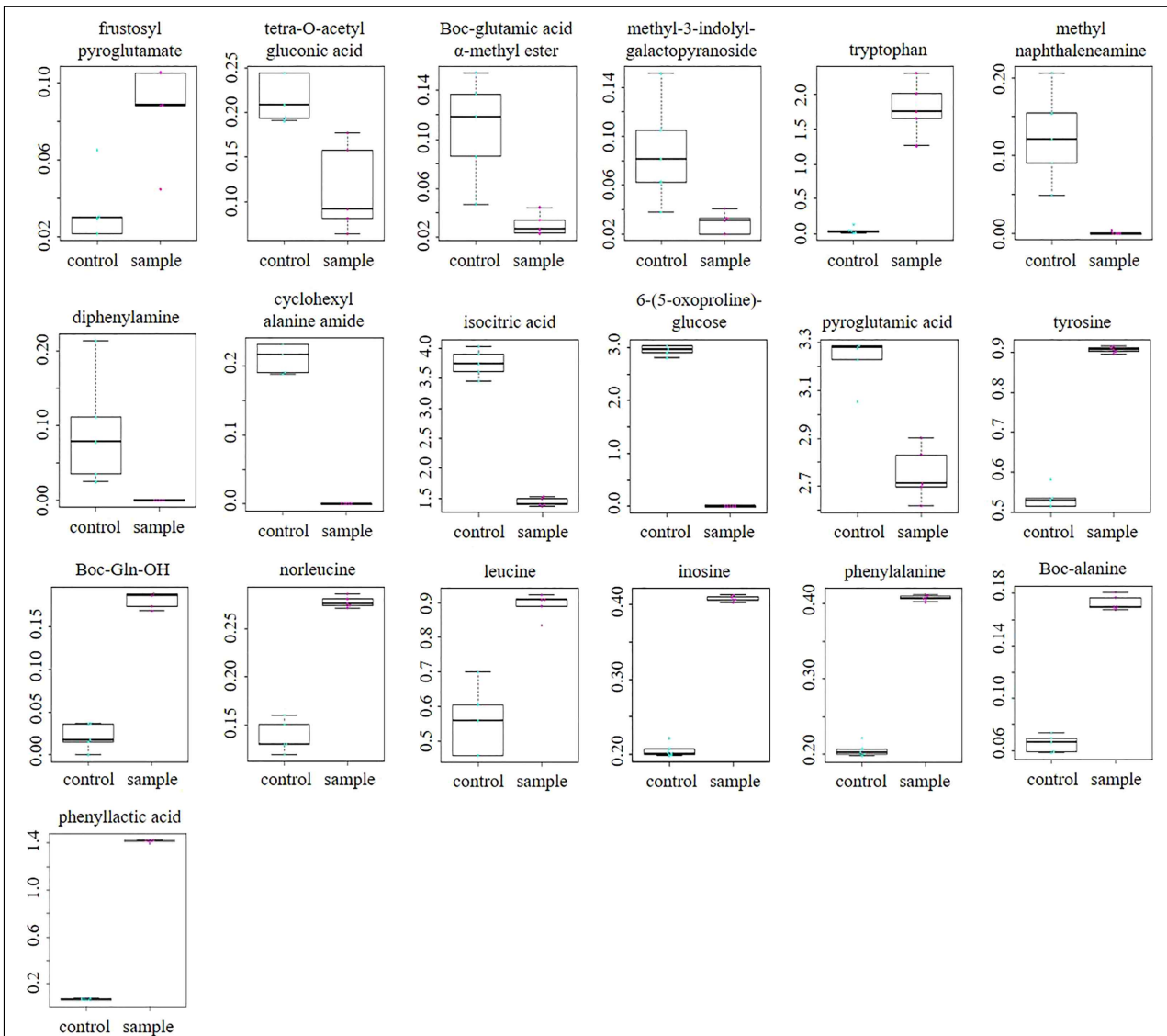


그림 7. UPLC-Q-TOF MS분석에서 확인된 발효조미소재와 대조구(양조간장) 사이의 대사체 함량 비교.

(4) 발효조미소재 대사체의 대사경로 도출

- 발효조미소재와 대조구(양조간장)의 대사체 및 다변량통계분석 결과를 기반으로 하여 발효조미소재 대사체의 대사경로를 도출하였으며, 그림 8에 나타내었음.
- 발효조미소재의 발효 중 단백질 분해에 의한 아미노산 및 아미노산 유도체 생성, 탄수화물 대사에 의한 대사물질 생성, 및 생성된 아미노산과 당 사이의 Maillard reaction경로 등이 확인되었음.

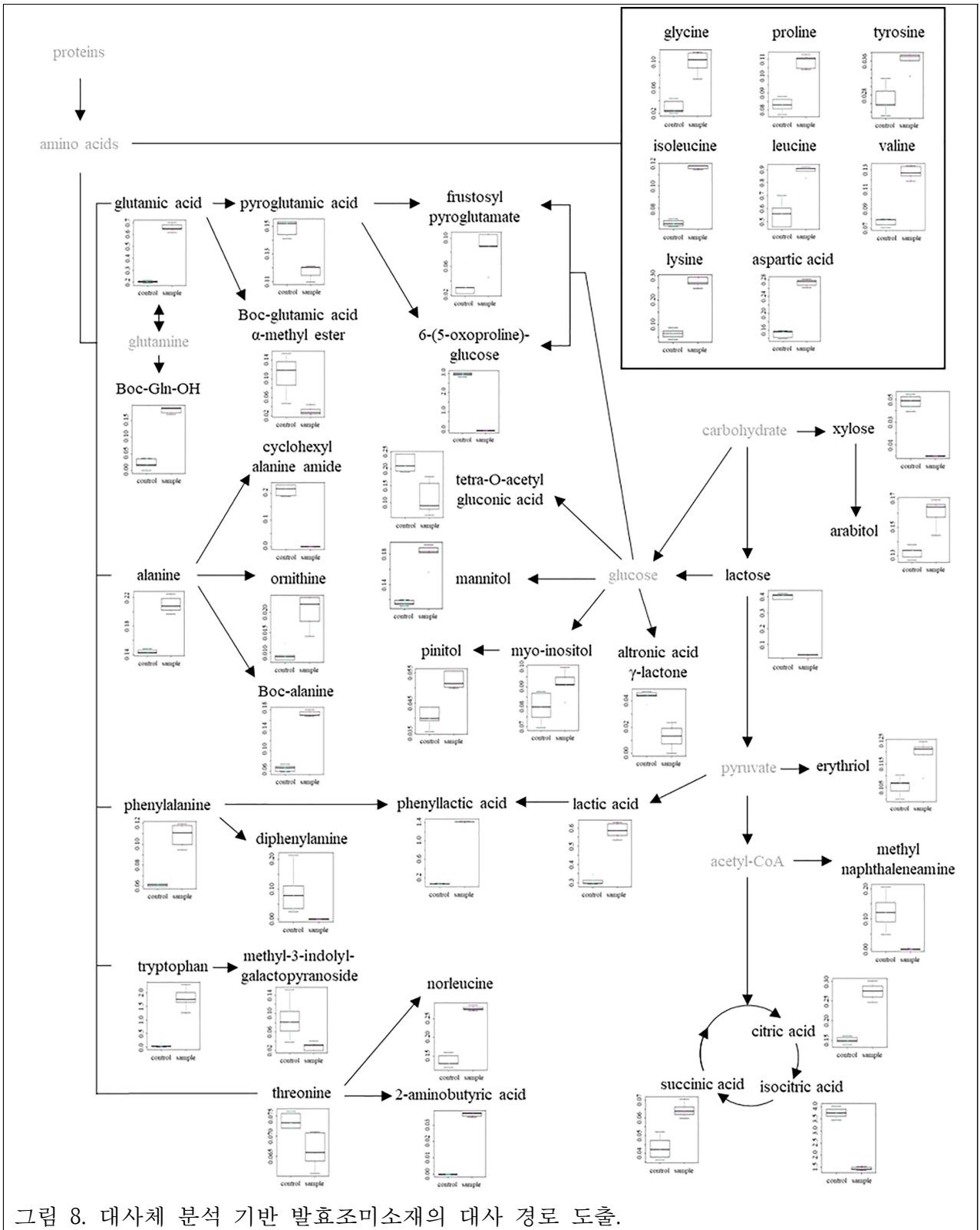


그림 8. 대사체 분석 기반 발효조미소재의 대사 경로 도출.

2) 발효조미소재 중 감칠맛 성분 분리, 동정 및 분석법 확립

가) 실험재료 및 장비

- 농업회사법인순창장류(주)에서 발효조미소재를 제공받음.
- 발효조미소재 중 감칠맛 성분은 용매 분리 (ethyl acetate, n-butanol), Prep LC(Gilson)를 사용하여 감칠맛 성분을 분리하였음.
- UPLC-Q-TOF MS (Waters) 분석을 통해 감칠맛 성분을 동정함.
- 감칠맛 성분의 수율 극대화를 위한 분리는 Amberlite resin과 Charcoal을 사용하였음.

나) 발효조미소재 중 감칠맛 성분의 분리 및 동정

(1) ethyl acetate와 n-butanol에 의한 분리

- 감칠맛 성분 분리 전, 전처리로 발효조미소재를 동량의 ethyl acetate와 n-butanol로 추출하여 비극성 화합물을 제거하였음.
- 전처리 후 발효조미소재의 색의 변화는 없었으나, UPLC-Q-TOF MS 분석 결과 RT 3.5 이후에서 검출되는 중간극성 및 lipid 등의 비극성 성분이 제거되었음을 확인함(그림 9).

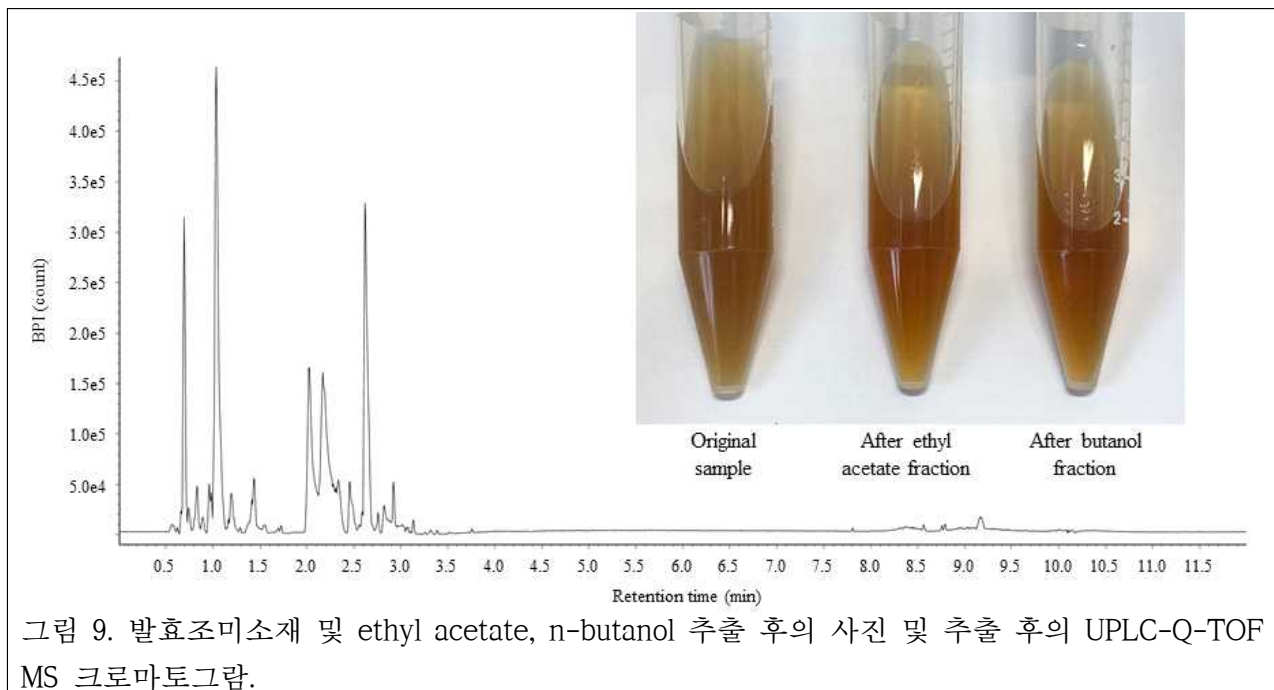


그림 9. 발효조미소재 및 ethyl acetate, n-butanol 추출 후의 사진 및 추출 후의 UPLC-Q-TOF MS 크로마토그램.

(2) Prep LC에 의한 감칠맛 성분의 분리

- 전처리한 발효조미소재를 농축 후 Prep LC를 사용하여 분리하였으며 크로마토그램은 그림 10에 나타내었음.
- 분리에 사용된 컬럼은 YMC-Triart C18 semi-prep column (10 × 250 mm, S-5 μ m, pore size: 12 nm, YMC co. LTD)을 사용하였으며, 검출 파장은 280 nm였음.

- 감칠맛 성분의 분리에 사용된 이동상은 물과 acetonitrile이었으며, 분리 조건은 표 10에 나타내었음.
- 분리 결과, 총 8개의 peak가 관찰되었으며, 분획물(F1~F35)은 매 1분마다 받았으며, peak 1은 F9, peak 2는 F10, peak 3는 F11~13, peak 4는 F14, peak 5는 F15~18, peak 6은 F19~20, peak 7은 F 24~26, peak 8은 F31~32로 구성되어있음.
- 회수한 분획물은 동결건조 후 감칠맛의 강도에 대한 관능평가를 실시하였고, 또한 UPLC-Q-TOF MS를 사용하여 분리된 감칠맛 성분을 동정하였음.

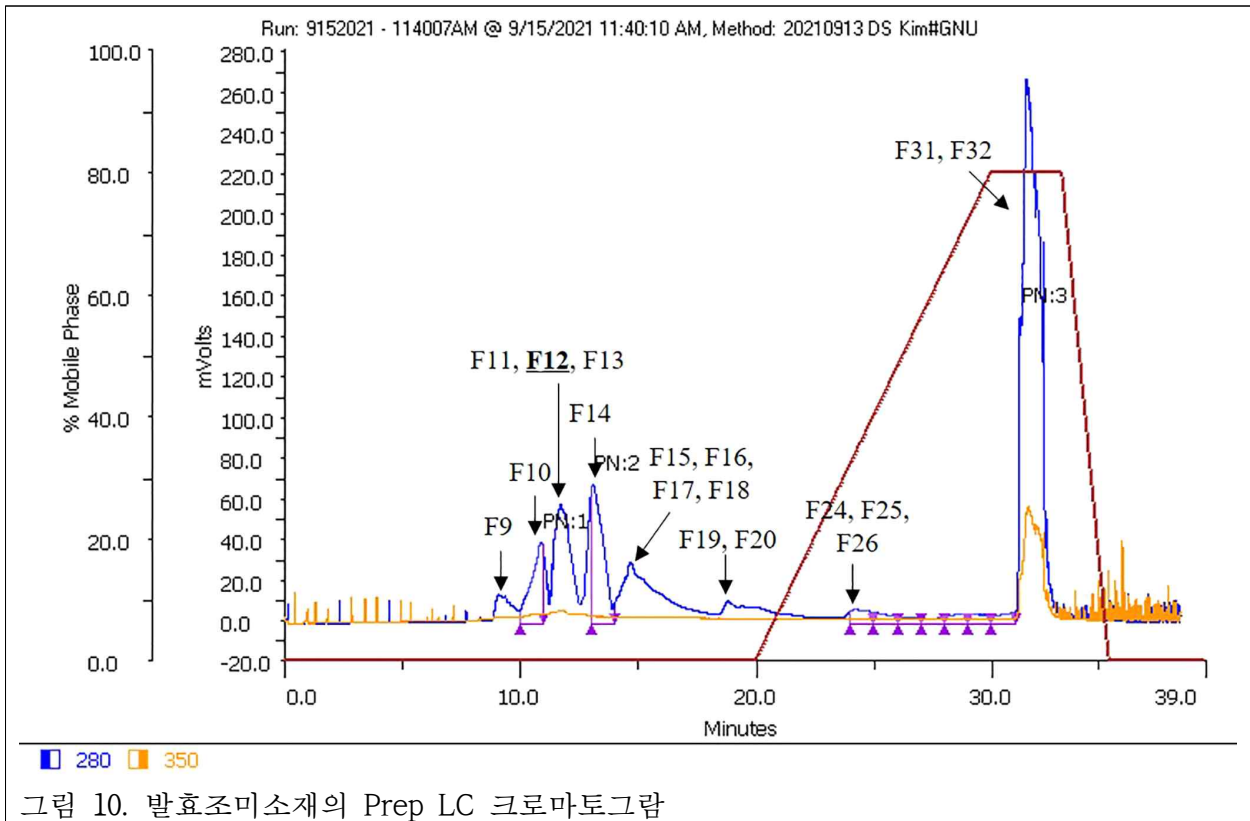
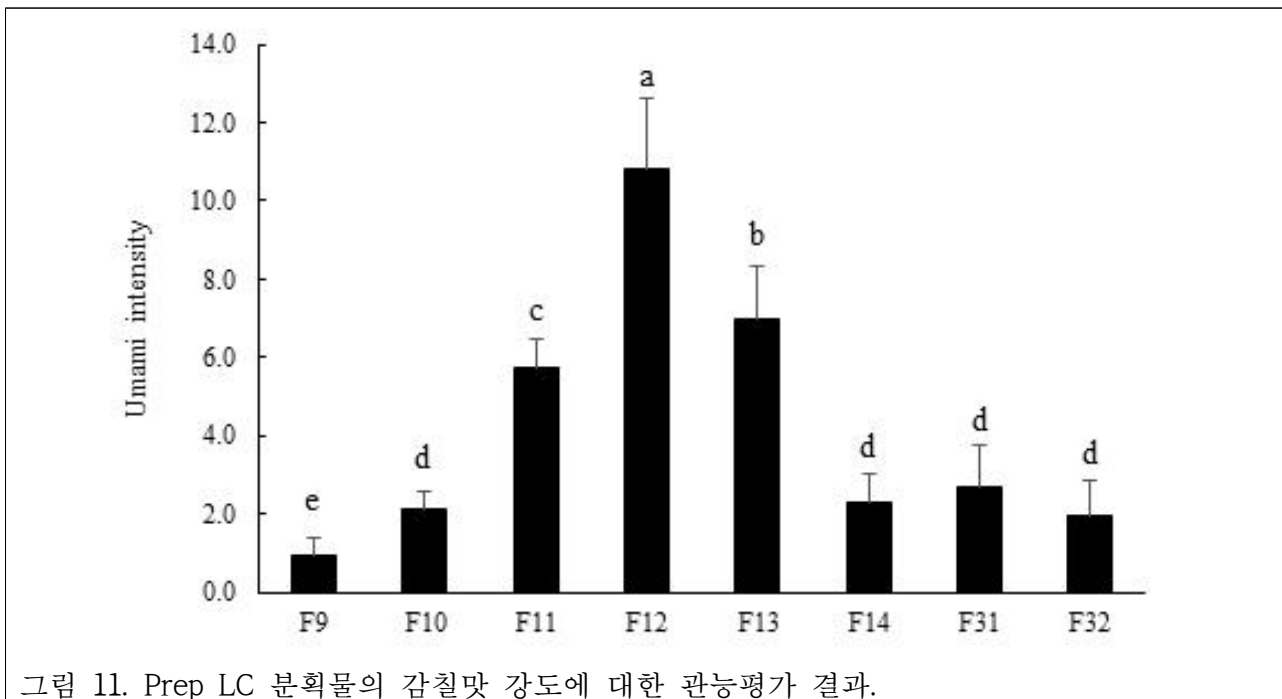


표10. Prep LC의 gradient 조건

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Water (%)	Acetonitrile (%)
0	1	100	0
20	3	100	0
28	3	0	100
33	3	0	100
35	3	100	0

(3) Prep LC 분획물의 관능평가

- 관능평가 전 예비실험을 통해 감칠맛이 느껴지는 분획물을 선정한 뒤, 훈련된 9명의 패널을 통해 관능평가를 실시하였으며, 15 cm line scale test를 이용하여 맛의 강도를 평가하였음.
- 분획물의 관능평가 결과를 그림 11에 나타내었으며, F9, F10, F1, F12, F13, F14, F31, F32 분획물에서 감칠맛이 파악됨.
- 감칠맛이 있던 분획물분획물을 0.6%(w/v) 농도로 제조한 뒤 감칠맛 강도에 대한 관능평가 결과를 진행하였고, F11~F13 분획물의 감칠맛이 다른 분획물보다 상대적으로 높았음.
- 특히 F11~F13 중 F12 분획물은 F11, F13에 비해 감칠맛의 강도가 약 1.5배 이상 높았음.



(4) Prep LC 분획물의 kokumi(감칠맛 시너지)효과

- 발효조미소재 분획물의 감칠맛 시너지 효과(kokumi)를 확인하기 위하여, 0.6% MSG (w/v)에 감칠맛이 강했던 F12 분획물과 약간의 감칠맛을 보였던 F10, F14, F31, F32 분획을 0.6%의 농도 (w/v)만큼 혼합한 후 관능평가를 하였음(그림 12). F11과 F13 분획물은 F12와 겹치는 분획물이기 때문에 제외하였음.
- 관능평가는 훈련된 8명의 패널을 통해 실시하였으며, 15 cm line scale test를 이용하여 맛의 강도를 평가하였음.
- 관능평가 결과, F12 분획물을 혼합 시 감칠맛이 유의적으로 증가하였으나, MSG의 감칠맛 강도의 약 1.3배만 증가하여 kokumi 효과는 없는 것으로 판단됨(그림 29).

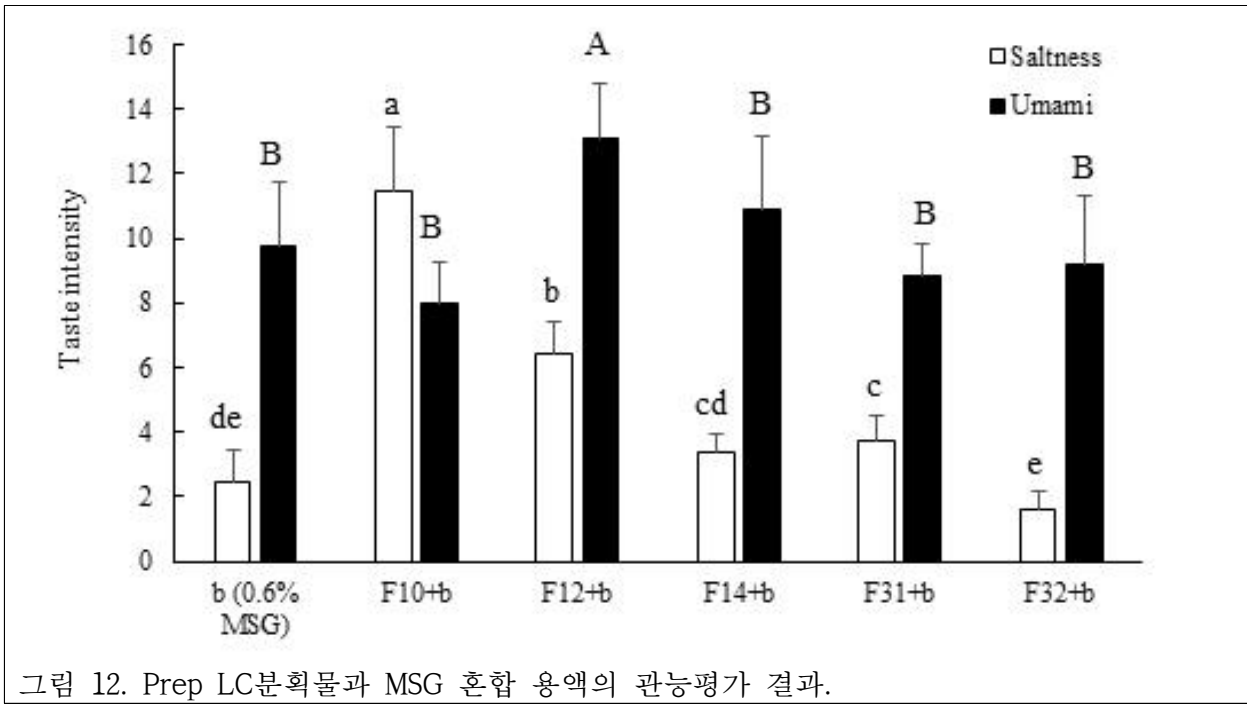


그림 12. Prep LC분획물과 MSG 혼합 용액의 관능평가 결과.

(5) 감칠맛성분의 UPLC-Q-TOF MS 분석 및 구조동정.

- 관능평가를 통해 감칠맛이 가장 강했던 F12 분획물을 UPLC-Q-TOF MS 분석 결과, RT 0.71에서 높은 peak가 관찰되었음 (그림 13)
- MS spectrum 확인 결과 (그림 14) 주요 m/z는 292.1028로 확인되었으며, 그 외 274.0920, 332.0957, 310.1133, 365.1057, 226.0708이 확인되었음.
- 문헌조사 결과, pyroglutamic acid와 fructose의 Maillard reaction 화합물인 fructosyl pyroglutamic acid (Fru-pGlu)로 확인되었음.
- m/z 292.1028은 precursor ion (M+H), m/z 274.0920은 M+H-H₂O, m/z 310.1133은 M+H+H₂O로 확인됨 (Kaneko S. et al., 2011. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75, 1275-1282).

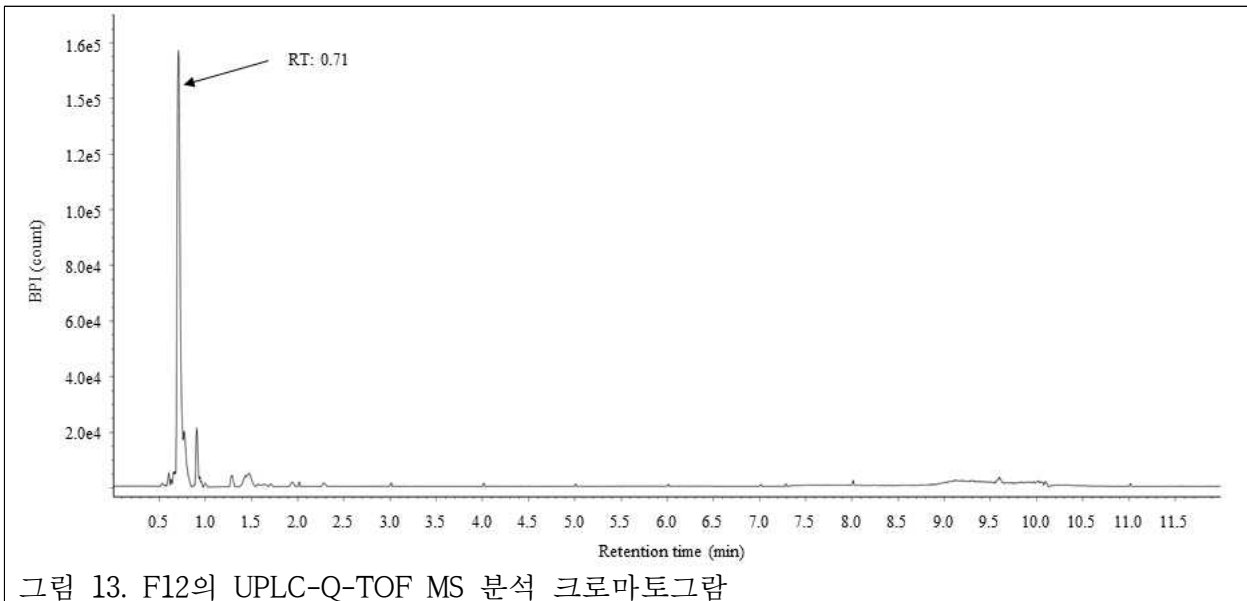
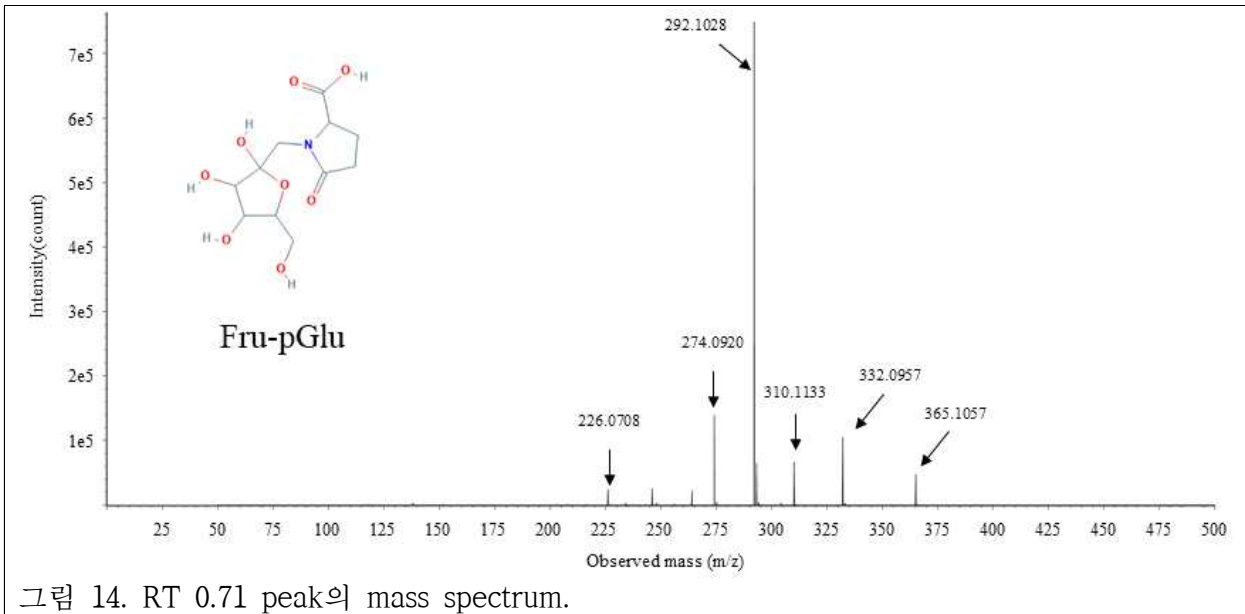


그림 13. F12의 UPLC-Q-TOF MS 분석 크로마토그램



(5) Fru-pGlu의 MS/MS 분석

- Fru-pGlu의 MS/MS fragment 정보를 제공하기 위해 positive 및 negative mode에서 collision energy 조건을 10~30 eV 범위로 다르게 하여 MS/MS spectrum을 얻었음(그림 15, 16).
- positive mode에서의 low energy (10 eV) 조건에서는 precursor ion (m/z 292.1006)의 peak가 가장 높았으며, fragment ion이 거의 관찰되지 않았음.
- 반면에 15 eV 이상의 energy 조건에서는 precursor ion이 쪼개지면서 m/z 84~246 범위의 많은 fragment ion이 관찰되었음(그림 32).
- 15 와 20 eV에서는 m/z 226의 intensity가 가장 높았으며, 그 다음으로 m/z 208, 246 순서로 높았음.
- 25와 30 eV에서는 m/z 84의 intensity가 가장 높았으며, 그 다음으로는 m/z 92, 114 순서로 높았던 반면 precursor ion의 peak는 관찰되지 않았음.
- 반면, negative mode에서의 low energy (10 eV)조건에서는 많은 fragment ion이 관찰되었으며, 20 eV 이상의 energy 조건에서는 fragment ion이 거의 관찰되지 않았음(그림 33).
- 10 eV에서는 precursor ion인 m/z 290.0986이 가장 높았으며, 그 다음으로 m/z 200, 128 순서로 높았음.
- 15 eV에서는 m/z 128이 가장 높았으며, 그 다음으로는 m/z 200이 높았음.
- 20 eV 이상에서의 조건에서는 m/z 128이외의 fragment ion의 intensity가 낮았으며, precursor ion 또한 나타나지 않았음.
- 또한, 15 eV 이상의 collision energy 조건에서 높았던 m/z 128은 pyroglutamic acid이며, online database인 Massbank database(<https://massbank.eu/MassBank/>)에 있는 fru-pGlu의 m/z/mz spectrum과 일치하였음.

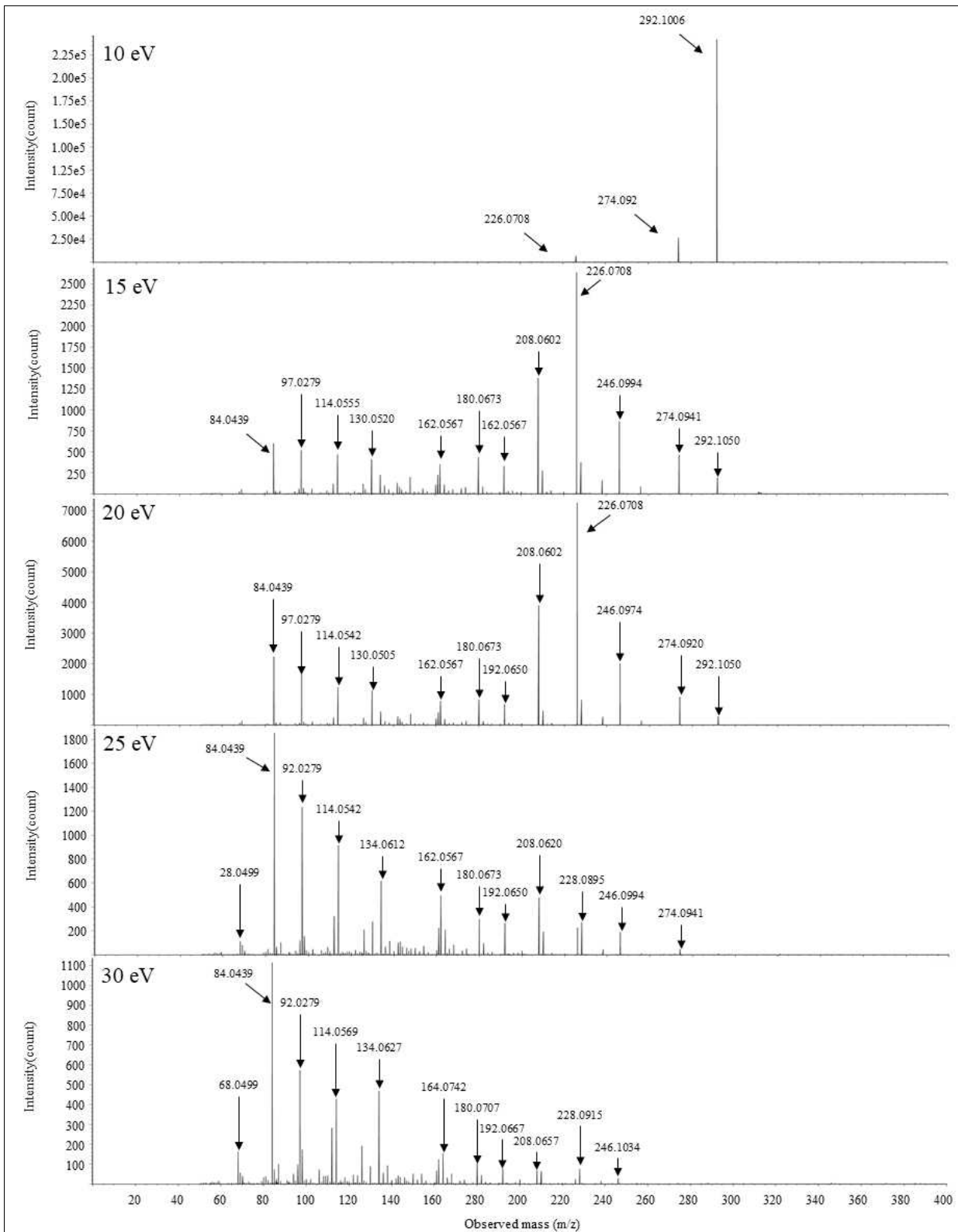


그림 15. Fru-pGlu의 MS/MS spectrum (positive mode)

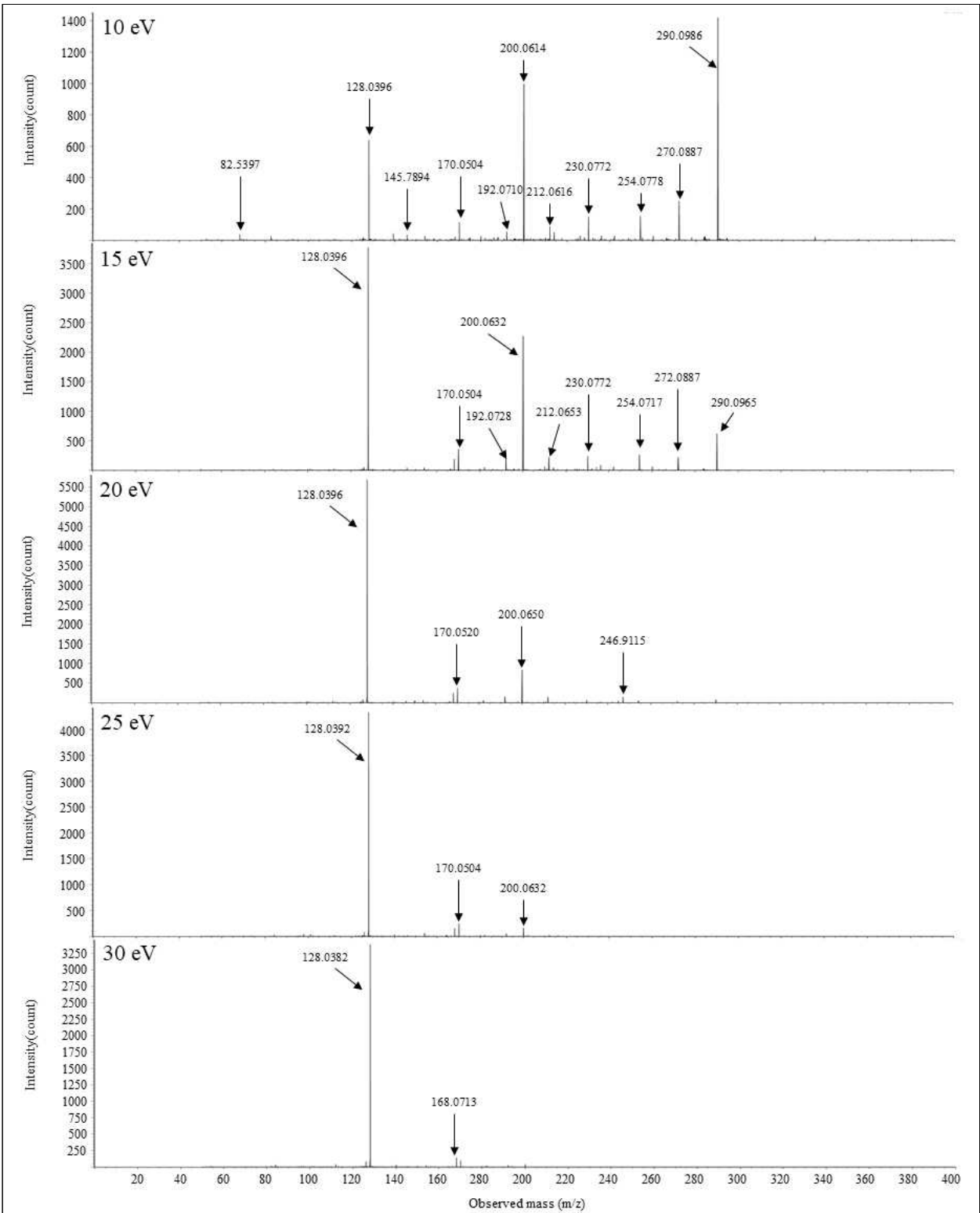


그림 16. Fru-pGlu의 MS/MS spectrum (negative mode)

다) Fru-pGlu의 수율 극대화

(1) Fru-pGlu의 합성

- Fru-pGlu의 합성은 기존에 보고되었던 참고문헌의 방법을 적용 하였음 (Roper H et al., 1983. Car. Res. 116, 183-195.).
- 참고문헌 상에서의 방법은 monosodium-L-glutamate (MSG) 0.08 M, D-glucose 0.35 M, monosodium pyrosulfite 0.04 M와 물 80 mL을 혼합 후 3시간동안 환류조건에서 가열하는 방법이 었으며, 본 연구에서는 MSG와 pyroglutamic acid를 각각 반응하여 합성하였음.
- 그림 17은 합성후의 용액을 UPLC-Q-TOF MS로 분석한 결과이며, p-Glu는 fructose와 거의 반응 하지 않았으며, 크로마토그램 상에 p-Glu의 peak이 높게 나왔음.
- 반면, MSG와 glucose를 반응한 결과, 주요 peak의 m/z는 274.0899였으며 Fru-pGlu의 intensity는 매우 낮았음.
- 따라서 기존에 보고되었던 합성 방법은 높은 수율의 Fru-pGlu를 얻기에 부적절하였고, 발효조 미소재에서 Fru-pGlu의 수율을 극대화하는 방법을 모색 하였음.

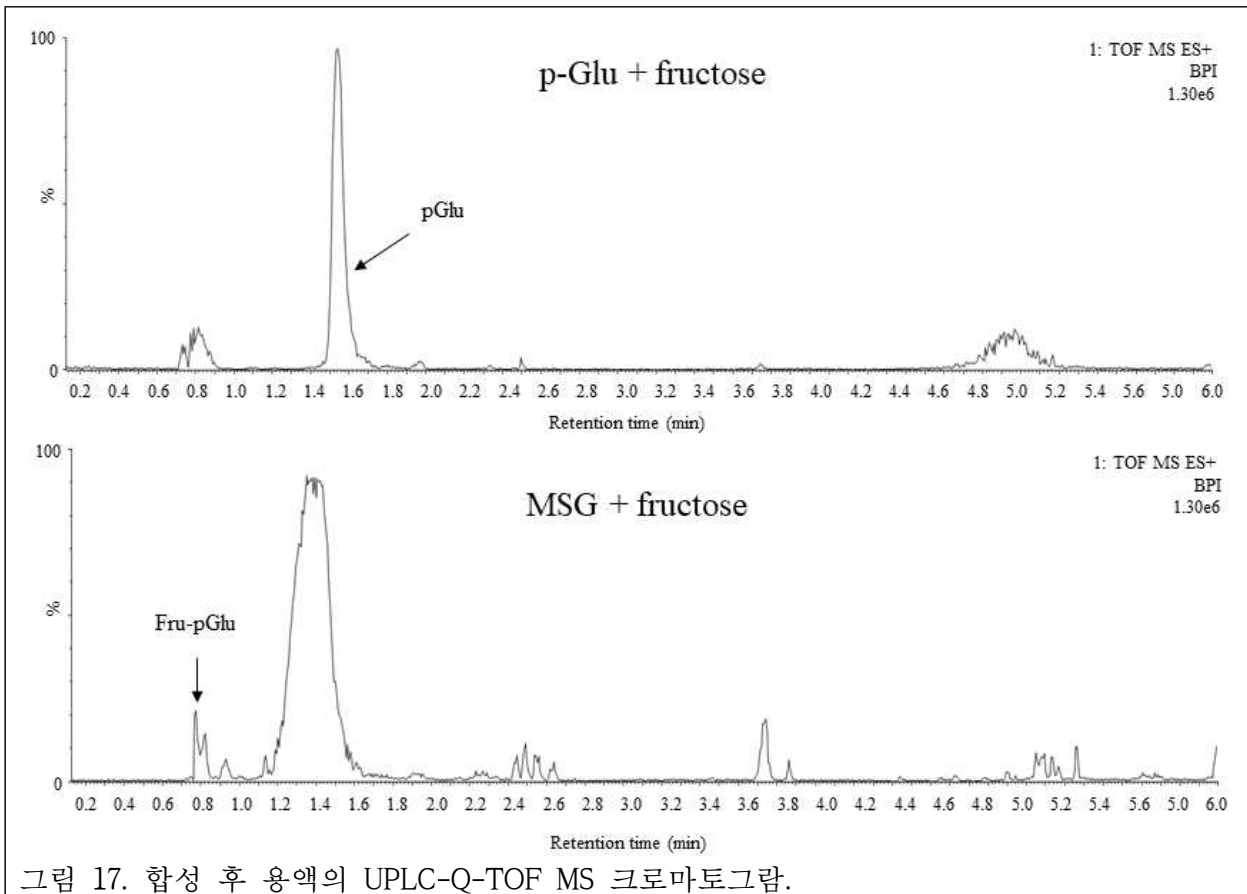


그림 17. 합성 후 용액의 UPLC-Q-TOF MS 크로마토그램.

(2) 원심식필터, 활성탄(charcoal)를 사용한 감칠맛 성분의 분리

- Fru-pGlu의 수율을 극대화하기 위해 원심식 필터를 사용해 분자량 3 kDa 이하의 물질들만 회수하거나, 3 kDa, 활성탄을 통한 여과, 또는 원심필터 후 활성탄 여과(원심필터+활성탄)를 적용하였음.
- 원심식필터는 Amicon Ultea-15 centrifugal filter unit (3 kDa)를 사용하였으며, 활성탄 여과는 바닥에 구멍을 뚫은 50 mL conical tube에 glass wool과 charcoal을 충전 후 발효조미소재를 흘려주는 방법으로 여과하였음.
- 원심식 필터를 적용하여 <3 kDa인 화합물을 회수한 결과 색은 연해졌으나 맛은 발효조미소재와 차이가 없었음(그림 18A).
- 반면, 활성탄 여과 시 조미소재의 색이 연해졌으며, 짠맛만 남아있었음. 이 결과를 토대로 염분(소금)이 활성탄에 결합하지 않고 주요 감칠맛 성분들 활성탄에 결합되어 있음을 확인할 수 있었음.
- 또한 발효조미소재 원액, 원심식필터 여과물, 활성탄 여과물, 원심필터+활성탄 여과물의 고형분 함량을 확인한 결과(그림 18B), 발효조미소재의 고형분함량은 35.8%, 활성탄 여과 후의 고형분 함량은 21.7%로, 활성탄을 사용하면 발효조미소재 중 소금을 포함하는 약 60%의 고형분을 제거할 수 있음을 확인하였음.
- UPLC-Q-TOF MS 분석은 동결건조된 샘플을 0.3% 농도(w/v)로 녹인 후 분석하였으며, 분석 결과에 발효조미소재 원물과 원심식필터(<3 kDa)의 성분 조성은 거의 유사하였으나, 활성탄여과 시 성분 조성이 크게 감소하는 것을 확인하였음(그림 19).
- 따라서 활성탄을 사용하면 염분을 제거함과 동시에 감칠맛 성분을 수율을 높일 수 있을 것이라 판단하였음.

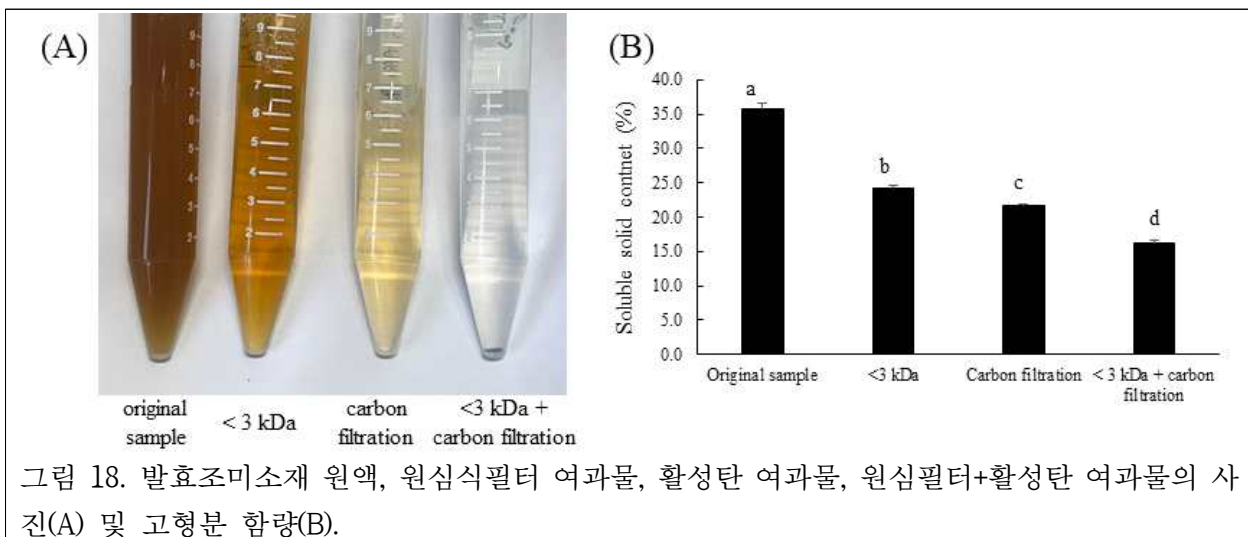
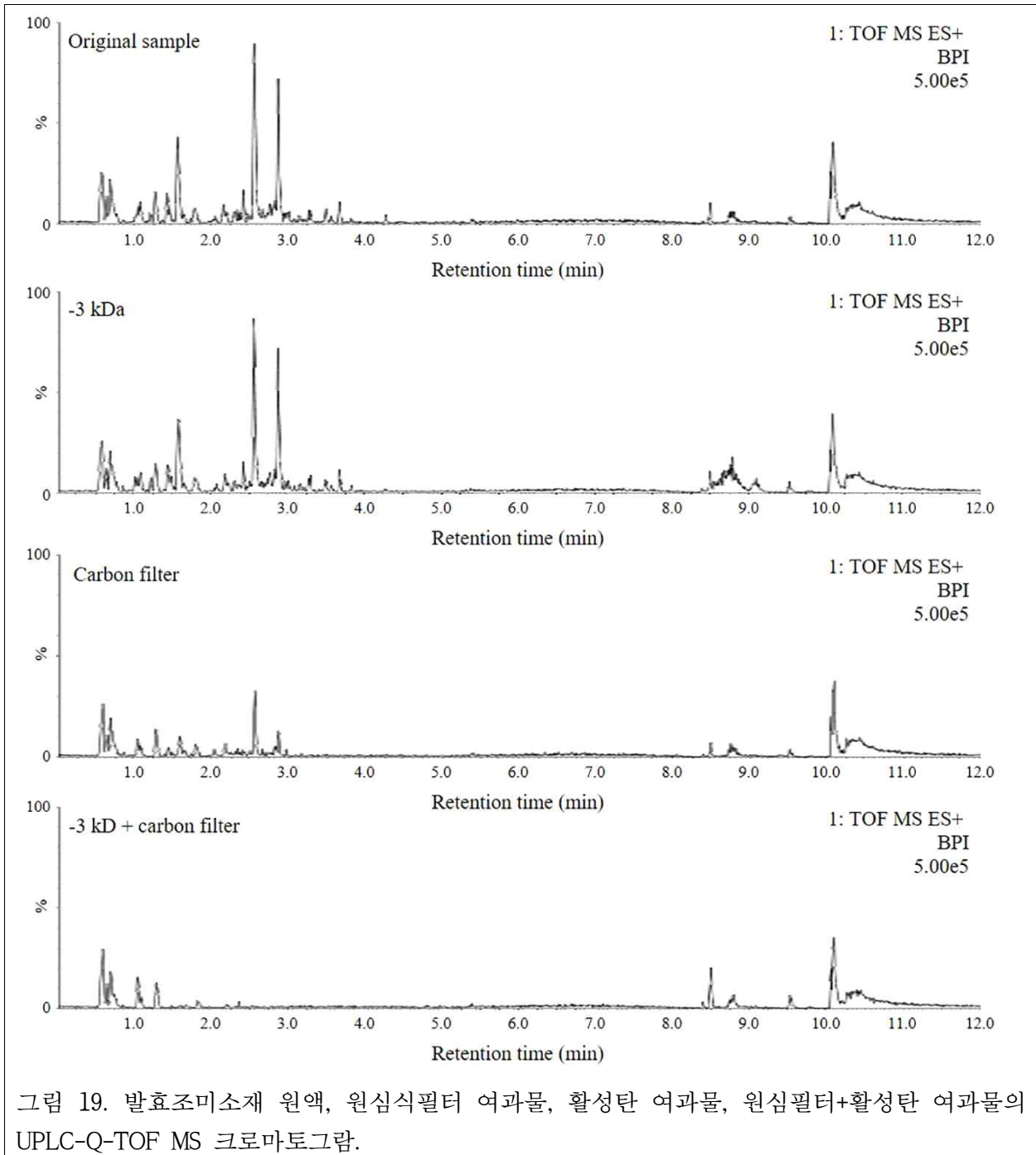


그림 18. 발효조미소재 원액, 원심식필터 여과물, 활성탄 여과물, 원심필터+활성탄 여과물의 사진(A) 및 고형분 함량(B).



(3) Amberlite resin 또는 활성탄(charcoal)을 사용한 감칠맛 성분의 분리.

- 감칠맛 성분의 수율을 극대화 하기 위해 charcoal 또는 Amberlite® XAD®-2 resin을 2 × 50 cm 유리관 컬럼에 충전한 뒤 발효조미소재를 loading한 후 물, 10% 주정, 20% 주정, 100% 주정 순서로 흘려주어 감칠맛 성분을 분리 분리하였음.
- 분획물의 염도(소금농도) 측정 결과, charcoal과 Amberlite resin 모두 물분획물에서 염도가 가장 높았으며, 그 이후의 분획물에서는 감소하였음(그림 20).

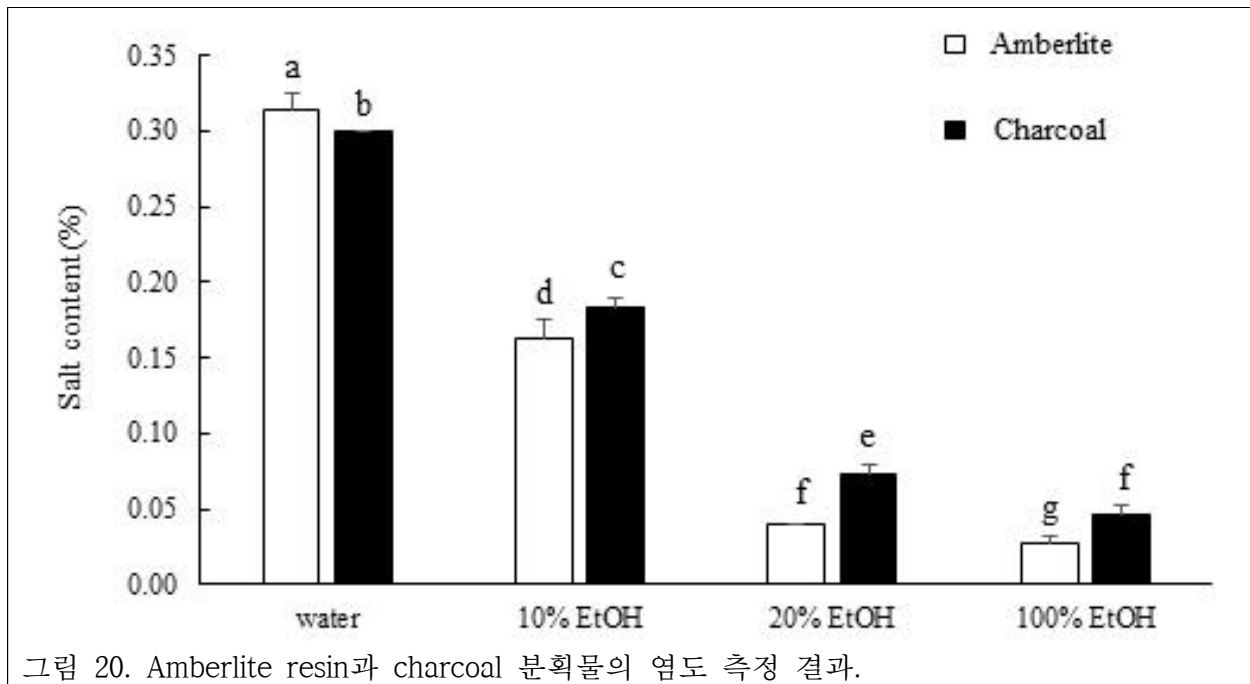


그림 20. Amberlite resin과 charcoal 분획물의 염도 측정 결과.

- Amberlite resin분획물 및 charcoal 분획물을 동결건조한 후 0.3% 농도(w/v)로 제조하여 UPLC-Q-TOF MS를 분석하였으며, 감칠맛 성분의 Fru-pGlu의 함량 비교를 위해 m/z 292.10에 해당하는 peak만 뽑아내어 크로마토그램으로 나타내었음 (그림 21, 22).
- Amberlite resin 분획물에서는 물분획물에서 Fru-pGlu가 가장 높게 나타났으나 intensity가 8.00e3으로 매우 낮았으며, Fru-pGlu가 amberlite resin에 결합되지 않음을 확인하였음 (그림 38).
- 반면 charcoal 분획물에서는 10% 주정에서 Fru-pGlu의 peak가 가장 높았으며, 10% 주정에서의 Fru-pGlu의 함량은 물분획물 대비 약 5배 이상 높았고, intensity 또한 3.00e5로 매우 높게 나타났음.

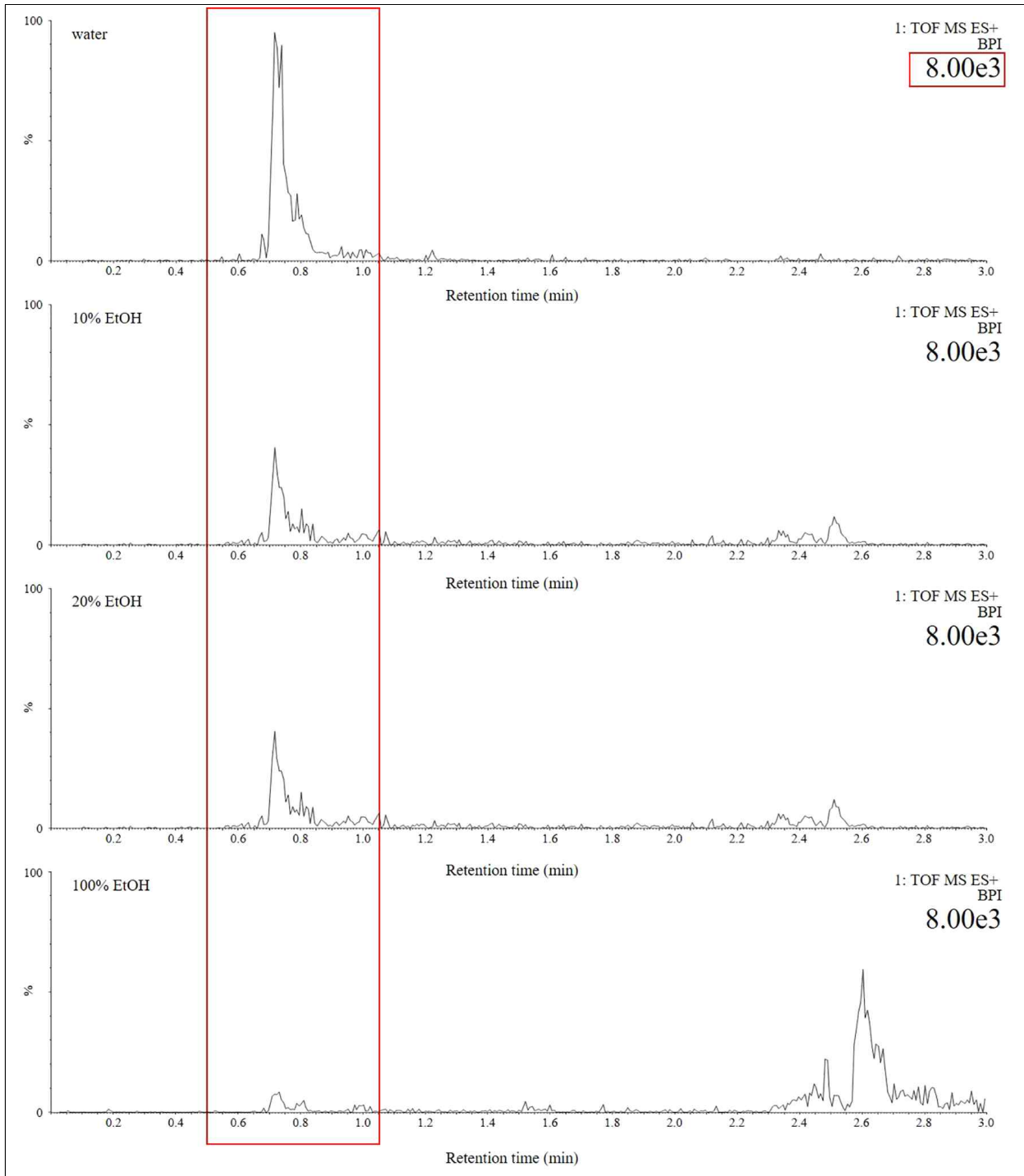


그림 21. Amberlite resin 분획물 중 Fru-pGlu (m/z 292.10) 크로마토그램.

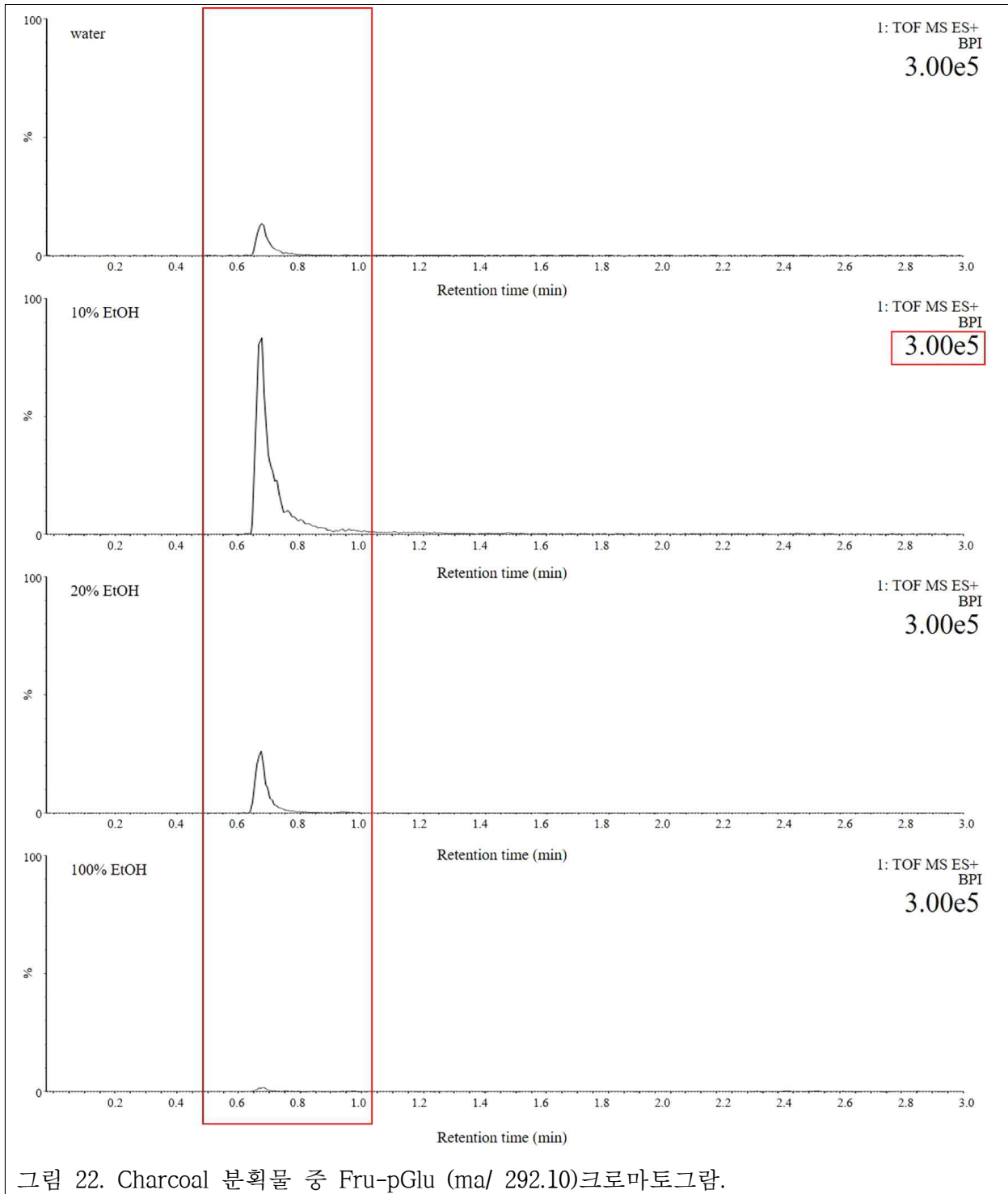
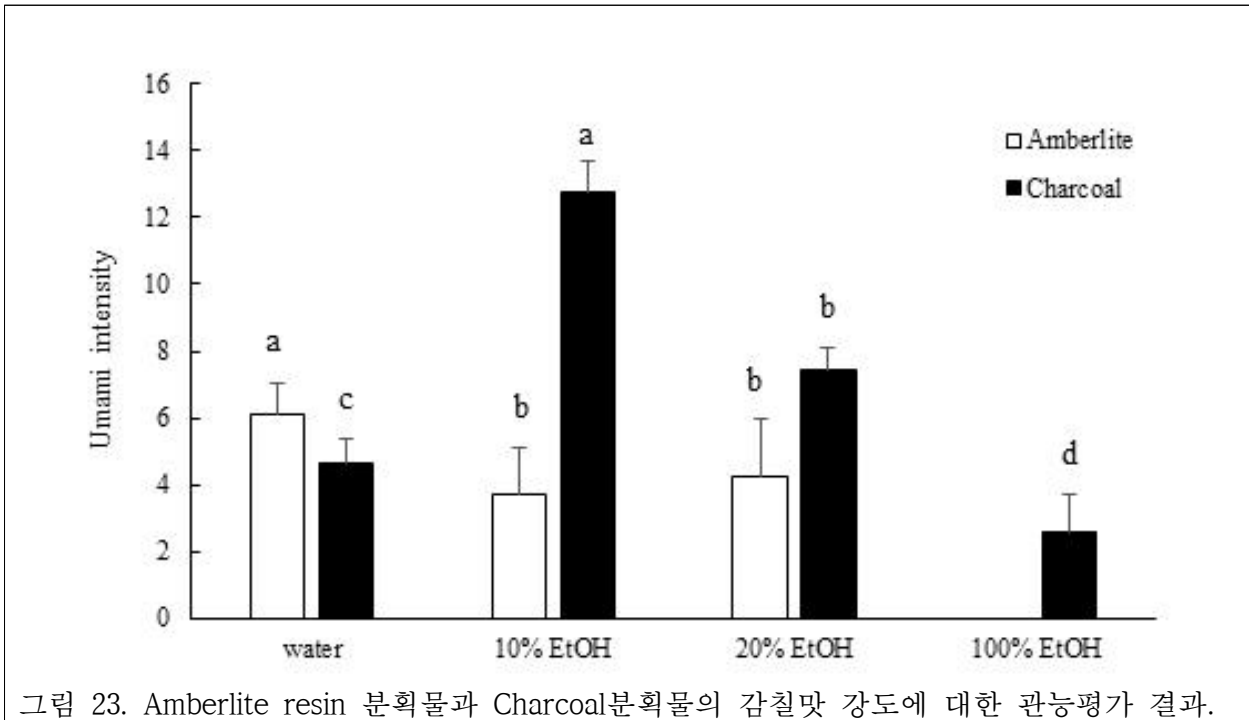


그림 22. Charcoal 분획물 중 Fru-pGlu (m/z 292.10) 크로마토그램.

- Amberlite resin 분획물과 charcoal 분획물의 관능평가는 동결건조된 분획물을 0.6% 농도(w/v)로 물에 녹여 제조한 뒤 훈련된 9명의 패널을 통해 평가되었으며, 감칠맛의 강도는 15 cm line scale tes에 의해 평가되었음 (그림 23).
- Amberlite resin 100% 주정분획물인 경우 쓴맛이 너무 강하여 관능평가를 실시하지 않았음.
- Amberlite resin 분획물 중 물, 10% 주정, 20% 주정 분획물은 약간의 감칠맛을 나타내었음.
- 반면, 감칠맛 성분인 Fru-pGlu의 함량이 가장 높았던 charcoal 10% 주정분획물(C10%)은 다른 분획물들 보다 감칠맛이 매우 높게 나타났음.



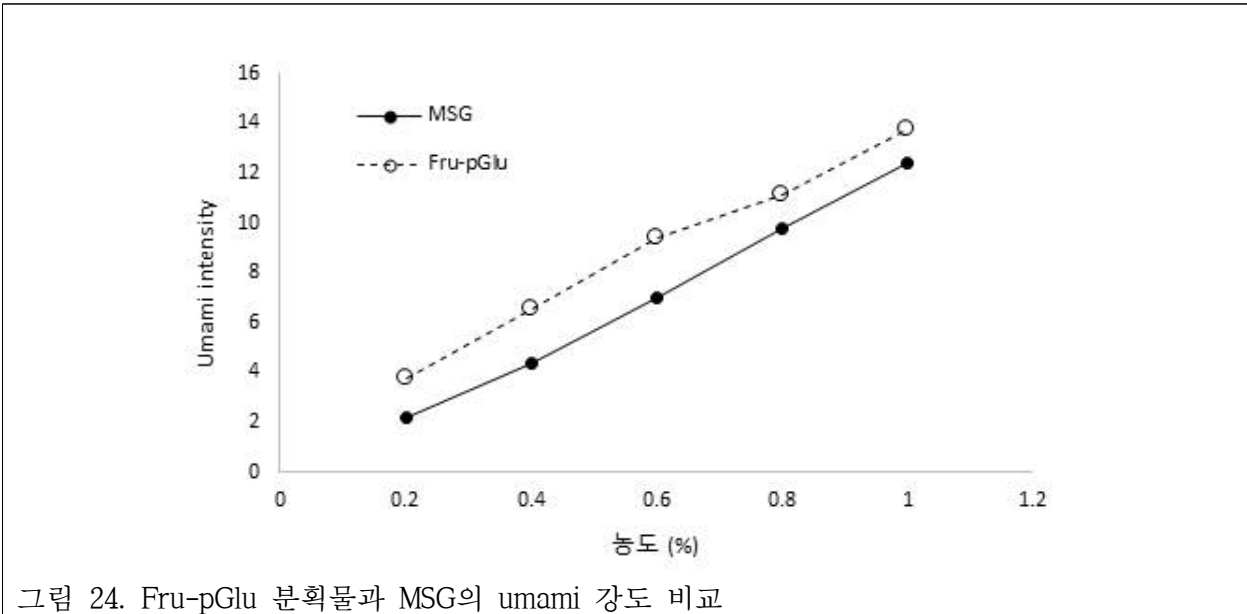
- Fru-pGlu의 수율을 최대화 한 분획물과 MSG의 감칠맛을 비교하기 위해 C10%와 MSG의 절대한계값(threshold concentration, %)과 인식한계값 (recognized threshold concentration, %)을 평가하였음.
- 절대한계값과 인식한계값은 0.01~1.0% (w/v) 농도 범위로 제조된 MSG와 C10% 용액을 훈련된 9명의 패널이 평가하였으며, 낮은 농도에서부터 농도를 증가하는 방향으로 평가하였음
- 감각이 느껴지는 가장 낮은 농도를 의미하는 절대한계값은 C10%와 MSG의 절대 각각 $0.03 \pm 0.01\%$ 와 $0.05 \pm 0.02\%$ 로 C10%가 MSG보다 유의적으로 낮았음($p < 0.01$).
- 또한, 어떤 맛인지 인지할 수 있는 최소 농도인 인식한계값인 경우 C10%와 MSG가 각각 $0.07 \pm 0.01\%$ 와 $0.16 \pm 0.11\%$ 로 Fru-pGlu 분획물이 MSG보다 약 2배 낮았음.

표 11. C10%와 Fru-pGlu의 감칠맛에 대한 threshold concentration과 recognized threshold concentration.

	Threshold concentration (%)	Recognition threshold concentration (%)
MSG	0.05 ± 0.02	0.16 ± 0.11
C10%	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01
<i>p</i> -value	0.033	0.026

p-values were analyzed by student t-test.

- Fru-pGlu 분획물과 MSG의 umami 강도를 비교한 결과, 모든 측정 농도 (0.2-1%)에서 Fru-pGlu 분획물의 umami 강도가 MSG에 비해 높은 것으로 확인되었으며 농도 0.2%에서는 70.5%, 0.4%에서는 50.7%, 0.6%에서는 34.7%, 0.8%에서는 14.5%, 1%에서는 11.0% 높은 것으로 확인됨.
- 따라서 Fru-pGlu를 상업적으로 합성을 할 수 있다면 MSG를 대체할 천연 조미소재 개발이 가능할 것으로 사료됨.
- 국내 발효식품에서 Fru-pGlu를 많이 생산할 수 있는 발효조건을 개발함으로써 감칠맛이 뛰어난 발효식품 생산에 활용될 수 있을 것으로 사료됨.



3) 결론

- UPLC-Q-TOF MS 분석을 통해 저염된장 중 혈압억제활성(angiotensin converting- I enzyme 저해활성)을 갖는 펩타이드인 Gln-Gly-Asn가 확인됨.
- 저염된장의 발효조건에 따른 발효대사체분석 및 대사경로를 도출하였음.
- 발효조미소재 중 감칠맛 성분인 fructosyl-pyroglutamin acid(Fru-pGlu)가 확인되었음.
- LC MS/MS 분석을 통해 Fru-pGlu의 LC/MS 분석에 필요한 MS fragment의 정보를 제공함.
- 대조구인 양조간장과의 대사체비교분석을 통해 Fru-pGlu가 발효 중 발효생성물인 glutamic acid 와 glucose 사이의 Maillard reaction에 의해 생성됨을 확인.
- 활성탄을 사용하여 Fru-pGlu의 수율을 극대화하는 방안 구축.
- Fru-pGlu 분획물의 감칠맛 강도가 MSG보다 약 2배 높음을 확인하였음.

4) 참고문헌

- Choe Jm Seol KH, Kim HJ, Hwang JT, Lee M, Jo C. 2019. Isolation and identification of ngiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides derived from thermolysin-injected beef *M. longissimus*. Asian-Australas J. Aninm. Sci. 32, 430-436.
- Diez-Simon C, Eichelsheim C, Mumm R, Hall RD. 2020. Chemical and sensory characteristics of soy sauce: A review. J. Agric. Food Chem. 68, 11612-11630.

- Kaneko S, Kumazawa K, Nishimura O. 2011. Isolation and identification of the umami enhancing compounds in Japanese soy sauce. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 1275-1282.
- Kim DW, Kim BM, Lee HJ, Jang GJ, Song SH, Lee JI, Lee SB, Shm JM, Lee KW, Kim JH, Ham KS, Chen F, Kim HJ. 2017. Effects of different salt treatments on the fermentation metabolites and bacterial profiles of kimchi. *J. Food Sci.* 82, 1124-1131.
- Kim HJ, Kang SG, Jaiswal L, Li J, Choi JH, Moon SM, Cho JY, Ham KS. 2016. Identification of four new angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides from fermented anchovy sauce. *Appl. Biol. Chem* 59, 25-31.
- Kim SS, Heo JA, Kim Y, Kim MJ, Kwak HS. 2020. Salt contents and aging period effects on the physicochemical properties and sensory quality of Korean traditional fermented soybean paste (doenjang). *Food Biosci.* 2020. 26, 100645.
- Kleekayai T, Harnedy PA, O’Keeffe MB, Poyarkov AA, CunhaNeves A, Suntornsuk W, FitzGerald RJ. 2015. Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes. *Food Chem.* 176, 441-447.
- Roper H, Roper S, Heyns K. 1983. N.N.R, spectroscopy of N-(1-deoxy-F-fructos-1-yl)-L-amino acids (“fructose-amino acids”). *Car. Res.* 116, 183-195.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 정미성, 안전성 지향 발효미생물 3종 확보
- 발효미생물 기반 저염된장 및 발효장류 개발 및 대량 생산 기술 확보
- 기능성 지향 저염된장 및 발효장류를 기반으로 한 조미·향미소재 개발 2건(액상, 분말)
- 조미·향미 소재를 활용한 응용식품 개발(10건) 및 상품화, 제품 출시 8건
- 개발 조미·향미 소재의 향미특성 규명 및 대사체 분석 기술 확립
- 저염된장 중 혈압억제활성(angiotensin converting- I emzyme 저해활성)을 갖는 펩타이드를 분리하였으며, UPLC-Q-TOF MS 분석을 통해 동정하였음 (Gln-Gly-Asn).
- 저염된장의 발효조건에 따른 발효대사체분석 및 대사경로를 도출.
- 발효조미소재 중 감칠맛 성분을 분리하였고, UPLC-Q-TOF MS 분석을 통해 동정하였음 (fructosyl-pyroglutamin acid(Fru-pGlu)).
- LC MS/MS 분석을 통해 Fru-pGlu의 LC/MS 동정 및 분석에 활용될 MS fragment의 정보를 제공함.
- 대조구인 양조간장과의 대사체비교분석을 통해 Fru-pGlu의 대사 경로 제시.
- MSG보다 감칠맛의 강도가 높은 Fru-pGlu의 수율을 극대화하는 방안 구축.

(2) 정량적 연구개발성과

- 국제학술지 논문개제 1건, 국내학술지 논문 1건
- 학술발표 4건 (국제 1건, 국내 3건)

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명			연도	1단계 (2020~2020)	2단계 (2021~2021)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	생물자원	목표(단계별)		3		3	20
		실적(누적)		3		3	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)			1	1	20
		실적(누적)			2	2	
	사업화 (매출액)	목표(단계별)		20,000	100,000	120,000	20
		실적(누적)		4,500	276,040	280,540	
	고용창출	목표(단계별)					20
		실적(누적)			3	3	
	홍보전시	목표(단계별)		1	1	2	20
		실적(누적)		1	4	5	
계							

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Effect of salt treatment to me on the metabolite s, mrocbial compositi on, and quality characteri stics of the soy sauce moromi extract	Foods	Sun Lee, Dong-Shi n Kim	11	Switzerla nd	MDPI	SCIE	2021.12.28	2304-8158	100
2	쌀 및 콩 발효 균주 선발과 이를 적용한 조미용 저염된장의 평가	한국식품 과학회	조승화	심사중	대한민국	한국식품 과학회	비SCI			

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2020한국식품영양과 학회국제학술대회	강현진 외 5명	2020.10.21	제주국제컨벤션센터	대한민국
2	2020한국식품영양과 학회 국제학술대회	박슬기 외 5명	2020.10.21	제주국제컨벤션센터	대한민국
3	2020한국식품영양과 학회국제학술대회	김동신 외 4명	2020.10.22.	제주국제컨벤션센터	대한민국
4	2021한국대사체학회	김동신 외 3명	2021.04.01.	제주국제컨벤션센터	대한민국
5	2021한국식품영양과 학회국제학술대회	박슬기 외 5명	2021.10.29	부산백스코	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM104466	KCCM12803P	한국미생물본존센터	2020
2	<i>Aspergillus oryzae</i> SRCM102487	KCCM12804P	한국미생물본존센터	2020
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SRCM102595	KCCM12802P	한국미생물본존센터	2020

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허	대한민국	발효미생물산업진흥원	2020.11.27	10-2020-0162952		발효미생물산업진흥원	2021.04.14	10-2242535		
2	특허	대한민국	(농)순창장류(주)	2020.11.27	10-2020-0162948						
3	특허	대한민국	(농)순창장류(주)	2021.12.02	10-2021-0170929						

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증어부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
	통상실시권	미생물통상실시권계약서	(농)순창장류(주)	2021.07.01	-	-
	전용실시권	발효기술노하우 실시보고서	(농)순창장류(주)	2021.11.19	-	-

사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자가실시	신제품개발	국내	저염된장	발효미생물 적용 저염발효물을 활용한 저염된장 제조	순창장류	29,732		2020~ 2021	
2	자가실시	신제품개발	국내	만능요리순	발효미생물기 반 액상 발효장류를 이용한 천연조미소재 개발	순창장류	495		2021	
3	자가실시	기존 제품 개선	국내	순창메주	발효미생물기 반 감칠맛 강화 한식메주 개발	순창장류	250,312		2021	

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
저염된장 개발	2020~2021	29,732		29,732	매출계산서 합산
천연조미소재 개발	2021	495		495	매출계산서 합산
발효미생물기발 감칠맛강화 메주 개발	2021	250,312		250,312	매출계산서 합산
합계		280,539		280,539	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		개발 발효미생물기반 저염장류 및 천연안심소재 개발			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(천원)	968,800			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		280,539	420,000	620,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내	2.8%	4.2%
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		발효 천연안심소재의 제형 다양화 및 제품개발			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	yyyy년	
1	맞춤형 혁신식품 및 천연발효소재 개발	순창장류	3		3
합계			3		3

□ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	2명
		생산인력	1명

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도	맞춤형 혁신식품 및 천연발효소재 개발			280,539		3명	
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1		2020		1					1			1		
2		2021		1	1				2			2		

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	인터넷	당사 홈페이지	개발제품 홍보	2020.11.20
2	기타	수원메가쇼박람회	개발제품 전시 및 리플릿 홍보	2020.12.03

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

--

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

--

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 토종 발효미생물을 이용한 발효장류 기반 천연 조미·향미 소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토종 발효미생물을 이용한 발효장류 기반 천연 조미·향미 소재 개발 ○ 정미성, 안전성 지향 발효미생물 3종 확보 ○ 발효미생물 기반 저염된장 및 발효장류 개발 및 대량 생산 기술 확보 ○ 기능성 지향 저염된장 및 발효장류를 기반으로 한 조미·향미소재 개발(조미소재 2건) ○ 조미·향미 소재를 활용한 응용식품 개발 및 상품화, 제품 출시(제품화 5건) ○ 개발 조미·향미 소재의 향미특성 규명 및 대사체 분석 기술 확립 	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석 (해당사항없음)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

- 지역거점 회사로서의 입지상 전문 연구인력의 확보가 어려우며 중소기업으로써 수준높은 품질 표준화 및 시험 평가 분석이 어려운 바 본 연구과제를 통하여 전문 인력 및 장비 등의 한계를 극복하고 신규매출을 발생시키지 위한 기술개발 활동을 참여기관과 협업하여 성실히 수행하였음.
 - 본 과제를 통하여 보유한 발효기술을 활용하여 당사의 장점인 신제품의 개발 및 상품화를 진행코자 다양한 발효조미소재 및 건강 지향형 저염 장류를 상품화하였으며 코로나19상황에서도 각종 전시회에 참여하여 적극적으로 제품을 홍보하고 향후 매출 증대를 위한 발판을 단기간에 마련코자 노력하였음.
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 기존 한식장류 중심의 생산업체로서 당사 보유기술을 한단계 업그레이드함으로써 신규한 저염발효장류 및 조미소재 기술 활용 제품개발로 안정적인 사업화 매출 발생
 - 다양한 발효미생물확보 및 발효제법을 활용한 발효소재의 사업화 시도 및 매출 발생
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 장류기반 천연 발효 조미소재 기술 개발로 장류산업의 블루오션 시장 창출
 - 기능성 발효 조미·향미 소재 개발로 관련 식품산업 활용 가능
 - 향미 시너지 factor 기반 맞춤형 식품제조 및 홍보 마케팅 활용
 - 유아식 및 경계성 성인질환자를 대상으로 소량 사용으로도 풍부한 풍미를 낼 수 있다는 점을 사업적으로 활용할 예정
 - 기능성 토종 발효미생물을 이용한 한국형 식품소재의 개발 다양화로 글로벌 시장 진출 확보
-

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내 매년 목표치	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재산업화 기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재산업화 기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.