

일반과제

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001335-01

**된장으로부터 기능성 균주의 분리 및
이를 이용한 고기능성 된장의 제조에 관한 연구**

(Isolation of strains with functionality from *doenjang*
and preparation of functional *doenjang*
using the isolated strains)

경희대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “된장으로부터 기능성 균주의 분리 및 이를 이용한 고기능성 된장의 제조에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 7 월 23 일

주관연구기관명 : 경희대학교

주관연구책임자 : 김 해 영

연 구 원 : 김 영 훈

연 구 원 : 김 태 운

연 구 원 : 류 지 오

연 구 원 : 박 민 희

연 구 원 : 유 명 렬

연 구 원 : 유 상 진

연 구 원 : 이 준 화

연 구 원 : 이 형 재

연 구 원 : 정 다 운

연 구 원 : 조 은 정

요 약 문

I. 제목

된장으로부터 기능성 균주의 분리 및 이를 이용한 고기능성 된장의 제조에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

된장의 CODEX 규격화에 따른 글로벌 수출상품을 위한 이취가 적고 기능성을 지닌 고품질의 된장을 산업화하기 위해 우리나라, 일본, 중국의 발효콩 페이스트(fermented soybean paste)에 존재하는 미생물상의 차이점을 분석하고 전통된장으로부터 차별성이 있는 기능성 미생물을 분리하고 또한 이들을 이용하여 이취가 적고 풍미가 우수하며 항산화능, 혈전용해효소 분비 등의 기능성이 강화된 고기능성 된장을 제조하는 것이 본 연구과제의 목적이다.

2. 연구개발의 필요성

- 우리나라 재래된장의 경우, 메주 제조시 또는 발효 중 유입되는 많은 균에 의한 제품의 맛, 향 등의 규격화가 어려우며, 특유의 콧냄새가 심하여 세계적으로 널리 이용되기 어려운 점이 있다. 그러므로, 전통식품의 계승·보급화 및 세계화를 위해서는 이취가 낮은 한국전통식 된장을 제조할 수 있는 기술개발이 절실히 필요하다.
- 위생적으로 안전하게 무균적인 환경에서 우수한 콩 발효 미생물에 의한 장류의 제조법, 동시에 일본식 된장 맛이 아닌, 우리나라 고유의 맛을 살린 전통 장맛을 지닌 된장의 제조, 토속적 한국인 입맛에 맞는 된장 및 세계인의 입맛에 맞는 다양한 맛의 된장 개발이 절실히 요구된다.
- 된장의 이취를 제거하여 풍미를 개선시키고 항산화 작용, 혈전용해 활성화 같은 기능성이 있는 새로운 고기능성의 된장을 제조할 목적으로 각각의 기능을 지닌 균주를 분리 동정하고 이들 균주를 이용한 된장을 제조하고 이를 산업화시키기 위해 산업적 기반기술을 확보하는 것은 된장을 국제적 식품으로 만들기 위하여 반드시 필요하다.
- 우리나라는 2001년 아시아에서 최초로 김치를 국제식품규격으로 통과시켜 김치가 세계 5

대 건강식품으로 발돋움하는 발판을 마련한 바 있다. 2009년 7월에 제32차 국제식품규격위원회(CODEX)에서 고추장(*Gochujang*), 된장(*Fermented Soybean Paste*), 인삼(*Ginseng Products*) 등록되었다. Codex 규격 제정을 계기로 다른 국가의 유사제품과 차별화되고 한층 더 국제 경쟁력을 높일 수 있는 제품의 개발이 필요하다.

- 장류는 제조 방법상 전통식과 개량식으로 구분되어 시장이 형성되어 있는데 개량식의 경우 일본식 장류와 비슷하여 국내외 시장에서 그 차별성을 부각시키기 어려운 점이 있고 아직도 많은 소비자는 전통식 장류를 선호하는 경향이 뚜렷하므로 이 분야에 대한 과학적 연구와 대량 생산체제 구축에 따른 기술 축적이 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. Culture-dependent method와 culture-independent method (DGGE법)를 사용하여 우리나라, 일본, 중국 발효콩 페이스트에 존재하는 미생물상 및 향과 관능적 특성 비교·분석

Nested-PCR denaturing gradient gel electrophoresis 법을 이용하여 된장에 존재하는 미생물의 분포를 조사한다. 또한 한국, 일본, 중국의 생된장과 끓인된장 시료들의 향특성과 관능특성을 비교한다.

2. 된장에 존재하는 미생물 중 항산화, 혈전용해활성, ACE 저해활성 기능을 지닌 균주 분리 및 동정

한국의 된장으로부터 단백질분해능이 있는 균주들을 분리하여 이들 중 항산화능, 혈전용해활성, ACE 저해활성이 우수한 균주들을 체계적으로 선발한다. 또한 이들을 culture-dependent method인 SDS-PAGE whole cell protein pattern 분석과 16S-rRNA sequence 분석을 통하여 동정한다. 이 균주들의 내염성도 조사한다.

3. 이취가 없고 풍미가 우수한 균주 선정

기능성이 우수한 균주들로 된장을 제조한 후 그 된장의 향 및 품질특성을 분석하여 이취가 없는 균주를 선정한다.

4. 분리 균주를 이용한 관능적으로 우수한 고기능성 된장의 제조 및 발효기법 개발

기능성이 우수하고 이취를 생성하지 않는 균주들로 된장을 제조하여 그 품질특성을 시판 콩 발효식품들과 비교한다.

5. 최적 발효 조건 및 산업적 기반 기술 확립

기능성이 우수한 된장제조용 균주들을 산업적으로 사용할 수 있도록 하고 이들의 최적 발효조건을 기업체와 협동하여 찾도록 한다.

IV. 연구개발결과

1. Culture-dependent method와 culture-independent method (DGGE법)를 사용하여 우리나라, 일본, 중국 발효콩 페이스트에 존재하는 미생물상 및 향과 관능적 특성 비교·분석

가. 미생물상 분석

실험에 사용한 한국된장 14종, 일본미소 14종, 중국된장 5종 내의 미생물상을 DGGE로 분석한 결과를 종합적으로 정리해 보면 Bacteria의 경우 한국된장에서는 *Tetragenococcus halophilus*, *Enterococcus faecium/durans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*가 우점종으로 나타났고 일본미소에서는 *Staphylococcus gallinarum*, *Tetragenococcus halophilus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*가 우점종으로 나타났다. 그리고 중국된장에서는 *Weissella cibaria*, *Lactobacillus* sp.가 우점종으로 나타났다. Fungi와 yeast의 경우 한국된장에서는 *Mucor plumbeus*와 *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점종으로 나타났고 일본미소에서는 *Aspergillus oryzae*, *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점종으로 나타났고 중국된장에서는 특별한 우점종이 존재하지 않고 각 시료별로 다양하게 나타났다. 이와 같이 각 나라별로 서로 다른 미생물상을 나타내는 것은 제조원료, 제조방법, 발효방법 그리고 기후, 토양 등의 여러 환경적인 조건에 영향을 받기 때문이라고 사료된다.

나. 한국, 중국, 일본 시판된장의 향 및 관능특성 비교분석

관능특성의 경우 생된장 중에서는 순창 문옥례 우리콩 된장, 광주 특산 된장, 묘관스님 된장이 색과 향이 우수한 것으로 나타났다. 끓인 된장의 경우, 색은 물맑은 양평 재래식된장이 가장 높은 점수를 받았고 향은 맑은 손맛 쌈된장이 가장 좋은 향을 나타내었다. 맛은 순창 문옥례 우리콩된장, 물 맑은 양평 재래식 된장, 맑은 손맛 쌈된장이 높은 점수를 받았다, 전체적인 기호도에서는 맑은 손맛 쌈된장, 순창 문옥례 우리콩된장, 물 맑은 양평 재래식 된장 순으로 높은 점수를 나타내었다.

향특성의 경우는 재래된장 특유의 구수한 향으로 알려진 2,3,5-trimethyl pyrazine은 시료들 중 재래식으로 제조한 시료들에서만 검출되었고 산패취의 성분으로 알려진 2-pentyl furan은 관능검사결과 기호성이 나쁜 시료에서 검출되었다. 그러나 전체적으로 관능평가에서 기호성이 좋은 것으로 나타났던 된장에서만 검출되는 특징적인 성분은 찾아지지 않았으나 관능평가에서 기호성이 좋지 않은 시료들의 특징적인 향은 확인할 수 있었다.

2. 된장에 존재하는 미생물 중 항산화, 혈전용해활성, ACE 저해활성 기능을 지닌 균주 분리 및 동정

단백질 분해능이 우수하다고 선발된 113개의 전통 재래 된장 유래 균주들의 항산화능, 혈전용해능, ACE 저해활성을 비교하여 4개의 균주를 선발하였고 이들을 동정한 결과 모두 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었다. 이 네 균주의 내염성을 조사한 결과 모두 생육곡선의 유도기간이 10% 소금농도에서 24시간 이상으로 길어졌음을 알 수 있었다.

3. 이취가 없고 풍미가 우수한 균주 선정

기능성이 우수한 네 균주들로 된장을 제조한 후 그 된장의 향 및 품질특성을 분석하여 이취가 없는 균주인 *B. amyloliquefaciens* KHG19 를 최종 선정하였다.

4. 분리 균주를 이용한 관능적으로 우수한 고기능성 된장의 제조 및 발효기법 개발

당초 혼합배양으로 발효조건 수립을 계획했으나 *B. amyloliquefaciens* KHG19가 기능성이 가장 뛰어나면서도 이취성분을 생성하지 않으므로 이 균주를 사용하여 된장을 제조하기로 하였다. 기능성이 우수하고 이취를 생성하지 않는 *B.*

amyloliquefaciens KHG19 균주로 된장을 제조하여 그 품질특성을 시판 재래된장, 개량된장, 청국장과 비교하였다. 그 결과 제조한 된장의 발효는 3개월 전까지는 접종한 균이 주도하였으며 품질특성, 향특성, 관능 특성이 모두 시판 청국장과 유사함을 알 수 있었다. 또한 제조된장의 기능성도 시판된장보다 우수하였다. 특히 혈전용해능이 시판 제품들보다 크게 우수하였다. 균주 자체가 가진 기능성과도 비교하였는데 제조된 된장 내에서도 균주의 기능성이 같은 수준으로 유지되었다. 따라서 혼합배양 없이도 이취가 없는 기능성 된장 제조가 가능하다고 판단된다.

5. 최적 발효 조건 및 산업적 기반 기술 확립

제조된장의 품질특성을 검토한 결과 제조 후 2-3 개월째의 기능성이 가장 우수하며 3개월 이후에는 접종한 균의 우점율이 저하되므로 차후 된장 제조시 이를 기준으로 발효를 진행함이 옳다고 본다. 기능성이 우수한 된장제조용 균주를 특허신청 예정이고 이를 산업적으로 사용할 수 있도록 세부적인 최적 발효조건을 기업체와 협동하여 찾을 계획으로 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 관련분야의 기술발전예의 기여도

우리나라에서는 이취가 적고 기능성을 지닌 고품질의 된장이 산업적으로 제조된 경우가 거의 없으며, 본 연구과제를 통해 개발한 제품을 기업체를 통해 제품화로 연결할 수 있을 것으로 기대된다. 된장의 기능성 및 관능성을 향상시킴으로서 전통식품의 계승·발전 및 소비 증진을 꾀할 수 있다. 또한, 한국 전통 된장의 수출장애 요인인 이취문제를 해결함으로써 수출 증진에 크게 기여 할 수 있으며 CODEX에 된장의 규격화와 더불어 국제적 식품으로 격상시킬 수 있는 계기가 될 것으로 본다. 된장 품질의 고급화에 필요한 연구결과를냄으로써 세계에 우리 식문화를 알리는 매체역할을 함과 동시에 한국식품 문화의 이미지를 개선할 수 있다. 된장의 소비 증진으로 생산자 농민의 소득에도 크게 기여할 뿐만 아니라 생산자가 2차 산업에 참여하여 소득을 향상시킬 수 있는 좋은 기회를 마련해 줄 수 있다. 본 연구의 성과로 고기능성 된장 제조 균주 및 방법의 특허를 출원할 예정이고 확보된 발효 조건 및 관련 기술 등을 산업체에 이전하여 제품개발 및 수출 증대 효과가 기대된

다. 본 과제에서 연구된 자료를 기반으로 향후 청국장, 고추장, 간장 등의 대두 발효식품 뿐만 아니라, 콩발효물을 활용한 화장품 산업에도 응용할 수 있다.

2. 연구성과

당초 목표했던 연구 성과물을 성취하여 SCI 급 논문 2편이 이미 발간되었고 현재 SCI급 논문 2편을 투고 준비 중에 있다. 또한 고기능성 된장 제조용 균주를 특허출원예정 및 유전체분석을 통한 기능분석과 이 균주를 활용한 된장 및 콩 발효제품을 시제할 예정이다. 또한, 해외과학기술정보 사이트에서 미생물유전체 정보와 된장 연구 정보를 획득하여 연구에 활용하였다.

SUMMARY

Microflora in soybean products of Korea, Japan, and China were investigated by nested PCR and DGGE analysis. *Bacillus*, *Enterococcus*, and *Tetragenococcus* were major bacteria in Korean *doenjang*. *Staphylococcus*, *Tetragenococcus*, and *Leuconostoc* were major bacteria in Japanese *miso*. *Weissella*, and *Lactobacillus* were major bacteria in Chinese soybean paste. *Mucor* and *Zygosaccharomyces* were major fungi in Korean *doenjang*. *Aspergillus* and *Zygosaccharomyces* were major fungi in *miso*. Only Korean *doenjang* had *Bacillus* as major bacteria. Among strains with high proteolytic activity that were isolated from *doenjang* samples, 4 out of 113 strains were selected as functional strains through fibrinolytic activity and ACE inhibitory activity tests. They were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* through SDS-PAGE whole cell protein pattern analysis and 16S rRNA sequence analysis. Physicochemical properties of *doenjang* made with these 4 strains were same across the 4 *Bacillus-koji* samples and were similar to those results in previous report. Among 4 strains, the KHG 19 strain did not produce volatile compounds reported as off-flavor of *doenjang* and demonstrated the highest protease, fibrinolytic, and ACE inhibitory activities. The functionality and the volatile compound profile of KHG 19 strain suggest possibility of producing functional *doenjang* with positive flavor by using this strain. This result provides the possibility of commercial production of functional *doenjang* made with *Bacillus amyloliquefaciens-koji* and related products with more acceptable flavor. When the flavor characteristics of KHG19-*koji doenjang* was compared with *cheonggukjang*, modified *doenjang*, and traditional *doenjang* by HS-SPME-GC-MS and sensory tests, the flavor properties of KHG 19 *koji doenjang* were similar to those of *cheonggukjang*. The functionalities, especially fibrinolytic activity were relatively high when they were compared to those commercial products. The functionalities of KHG 19 itself were maintained well enough in the *doenjang*. The genomic DNA of KHG 19 was extracted and purified and the full sequencing of genomic DNA was performed. The genome assembly processes were successfully finished and total 7 scaffolds were obtained with average size of 0.56 Mb. The gaps will be filled and the completed full sequence will be available to public database.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of the project -----	16
Chapter 2. Backgrounds -----	22
Chapter 3. Contents of study and the results -----	29
Section 1. Microflora of Korean, Japanese, and Chinese soybean products by culture-independent method -----	29
Section 2. Isolation and selection of functional strains from Korean soybean pastes -----	41
1. Proteolytic activity -----	42
2. Fibrinolytic activity -----	45
3. Antioxidative activity -----	50
4. ACE inhibitory activity -----	52
Section 3. Identification of functional strains -----	57
Section 4. Flavor and sensory characteristics of Korean, Japanese, Chinese soybean paste -----	63
Section 5. Quality characteristics of functional <i>doenjang</i> made with the selected strains -----	70
Section 6. Full sequencing of the selected functional strain, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -----	112
Section 7. Method development for large production of functional <i>doenjang</i> -----	121
Chapter 4. Achievement and Contribution -----	122
Chapter 5. Research products and their application -----	124
Chapter 6. Informations on technology outside of Korea collected through the study -----	130

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	16
제 1 절 연구개발의 목적 -----	16
제 2 절 연구개발의 필요성 -----	16
1. 기술적 측면 -----	16
2. 경제 · 산업적 측면 -----	18
3. 사회 · 문화적 측면 -----	19
제 3 절 연구개발의 범위 -----	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	22
제 1 절 국내외 관련분야에 대한 기술개발 현황 -----	22
1. 국내 제품생산 및 시장 현황 -----	22
2. 국외 제품생산 및 시장 현황 -----	24
3. 국내외 관련분야 환경변화 -----	25
제 2 절 된장 제조 기술현황 및 연구동향 -----	26
1. 된장의 미생물 -----	26
2. 된장의 품질특성 -----	26
3. 된장의 기능성 -----	27
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	29
제 1 절 Culture-independent 방법에 의한 한, 중, 일 된장의 미생물상 비교분석 -----	29
1. 실험방법 -----	29
가. DNA 추출 -----	29
나. Nested PCR -----	29
다. DGGE 분석 -----	29

2. 실험결과 -----	30
가. 한국된장내의 미생물상 분석 -----	30
나. 일본 미소 내의 미생물상 분석 -----	35
다. 중국 된장 내의 미생물상 분석 -----	38
라. 한국, 일본, 중국 된장 내 미생물상의 비교 요약 -----	40
제 2 절 한국 된장으로부터 기능성이 우수한 균주의 분리 및 기능성 된장 제조용 균주의 선발 -----	41
1. 단백질 분해능 -----	42
가. 실험방법 -----	42
나. 실험결과 -----	43
2. 혈전용해능 -----	45
가. 실험방법 -----	45
나. 실험결과 -----	45
3. 항산화능 -----	50
가. 실험방법 -----	50
나. 실험결과 -----	51
4. ACE저해활성 -----	52
가. 실험방법 -----	52
나. 실험결과 -----	53
제 3 절 기능성 된장 제조용 선발균주의 동정 및 내염성 -----	57
1. SDS-PAGE whole cell protein 분석 -----	57
가. 실험방법 -----	57
나. 실험결과 -----	57
2. 16S rRNA sequence 분석 -----	59
가. 실험방법 -----	59
나. 실험결과 -----	59
3. 내염성 검토 -----	60
제 4 절 한국, 중국, 일본 된장의 향 및 관능적 특성 분석 -----	63
1. 관능적 특성 -----	63
가. 실험방법 -----	63

(1) 관능검사 시료 -----	63
(2) 관능검사 항목 및 방법 -----	63
나. 실험결과 -----	63
(1) 한국된장 중 관능적 품질이 우수한 된장의 선별 -----	63
(2) 한국, 중국, 일본 된장의 관능적 특성 비교 -----	66
2. 향 특성 -----	67
가. 실험방법 -----	67
나. 실험 결과 -----	67
제 5 절 된장으로부터 분리된 기능성 균주를 이용하여 제조된 된장의 품질특성-----	70
1. 된장으로부터 분리된 기능성 균주를 이용한 된장의 제조 -----	70
가. 스타터 제조 -----	70
나. 된장의 제조 -----	70
2. 단백질분해능, 혈전용해능, 항산화능, ACE 저해활성이 우수한 네 개 균주를 이용하여 제조한 된장의 품질 특성 비교 -----	70
가. <i>Bacillus</i> 코지 된장의 pH와 수분함량, 세균수, 색도 측정 -----	71
나. <i>Bacillus</i> 코지 된장과 시판 된장의 HS-SPME-GC-MS 에 의한 향 분석-----	73
다. <i>Bacillus</i> 코지 된장과 시판 된장의 관능검사 -----	82
라. 결론 -----	85
3. <i>B. amyloliquefaciens</i> KHG 19를 사용하여 제조된 된장과 시판 된장의 기능성 및 품질특성 비교 -----	86
가. <i>Bacillus</i> 코지 된장의 pH와 수분함량, 세균수, 색도 측정 -----	86
나. 된장 발효 중 접종한 균의 우점을 측정 -----	90
다. HS-SPME-GC-MS에 의한 <i>Bacillus</i> 코지 된장 및 시판 된장의 향 분석 -----	92
라. <i>Bacillus</i> 코지 된장과 시판 된장의 관능검사 -----	97
마. <i>Bacillus</i> 코지 된장과 시판 된장의 기능성 비교 -----	106
제 6 절 기능성 된장 제조용 균주 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 의 유전체 분석 --	112
1. 실험방법 -----	112
가. Genomic DNA의 분리 및 정제 -----	112
나. 분리정제된 genomic DNA의 염기서열분석 -----	112

다. Gap filling을 통한 유전체 염기서열의 완성 -----	115
2. 실험결과 -----	116
가. GS-FLX pyrosequencing 방법 -----	116
(1) Random genome sequencing을 통한 유전체 library 염기분석 결과 ---	116
(2) Mate-pair genome sequencing을 통한 유전체 library 염기분석 결과 --	117
(3) 두가지 genome sequencing으로부터 얻어진 short read들의 genome assembly 결과 -----	118
(4) Advanced genome assembly를 통한 scaffold의 생성 -----	120
 제 7 절 대량생산을 위한 산업적 기반기술 개발 -----	121
1. 참여기업 연구소를 통한 기능성 된장의 산업화 기반 기술 개발 -----	121
 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	122
제 1 절 연구개발목표의 달성도 -----	122
제 2 절 관련분야의 기술발전에의 기여도 -----	123
 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	124
제 1 절 연구성과 목표 -----	124
1. 논문게재 -----	124
2. 특허출원 -----	125
3. 기타 -----	125
제 2 절 연구성과 활용 목표 -----	126
1. 고기능성된장 특성을 이용한 제품화 -----	126
2. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 에 처리된 콩 발효물의 제품화 -----	126
제 3 절 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 를 사용한 콩 발효물 제품화 실험 결과 및 화장 품 원료 시험 제작 -----	126

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	130
제 1 절 해외과학기술정보 사이트에서 미생물 유전체 정보 확인 -----	130
제 2 절 해외과학기술정보 사이트에서 된장 연구 정보 -----	131
제 7 장 참고문헌 -----	132

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

된장의 CODEX 규격화에 따른 글로벌 수출상품을 위한 이취가 적고 기능성을 지닌 고품질의 된장을 산업화하기 위해 우리나라, 일본, 중국의 발효콩 페이스트(fermented soybean paste)에 존재하는 미생물상의 차이점을 분석하고 전통된장으로부터 차별성이 있는 기능성 미생물을 분리하고 또한 이들을 이용하여 이취가 적고 풍미가 우수하며 향산화능, 혈전용해효소 분비 등의 기능성이 강화된 고품질 된장을 제조하는 것이 본 연구과제의 목적이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 된장은 예로부터 내려오는 전통발효식품으로 우리식탁에 없어서는 안 될 대표적 조미식품이다. 된장은 아미노산, 지방산, 비타민, 무기질 등이 풍부하며 특수성분인 피토에스트로겐류가 들어있고 향산화, 항돌연변이 항암, 혈전용해 등의 기능성이 우수한 것으로 밝혀지고 있다.

나. 현재 국내에서 제조되고 있는 된장은 메주를 사용하여 만든 재래식 된장과 *Aspergillus oryzae* 등의 국균을 사용하여 만드는 개량식 된장으로 대별된다.

다. 재래식 된장을 제조하기 위해서는 늦은 가을 대두를 삶아 찜어 육면체나 낮은 원기둥 형태로 성형하여 일정기간 말린 후 제조한다. 이 과정 중 벧짚내의 고초균과 공기 중의 곰팡이들이 자연적으로 접종되어 메주 내외에서 증식하게 되고 이 균체증식과 함께 생성된 단백분해 효소에 의해 제조된 메주는 다량의 단백분해효소를 함유한다. 제조된 메주는 이듬해 봄 표면의 곰팡이를 물로 씻은 후 된장을 만드는데 사용된다.

라. 개량식 된장은 일본의 국(麴) 제조법(Koji법)을 도입한 것으로서 삶은 쌀, 보리, 콩 등에 황곡균(*Aspergillus oryzae*) 곰팡이를 인위적으로 접종하여 30℃ 정도에서 3일간 배양하여 된장 코오지를 만든 후 이를 메주 대신에 사용하여

된장을 담그는데 사용한다.

마. 된장 발효에 관련이 있는 국균으로는 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus* 속 등 수많은 곰팡이가 된장 숙성에 관련이 있고 유산균으로는 *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. 등이 관여하며 세균으로서는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* 그리고 효모로는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulopsis versatilis* 등에 대한 연구가 있다.

바. 된장은 오랜 기간 숙성으로 인하여 색, 맛, 냄새 등 품질관리가 용이하지 않아 된장 제조공정의 새로운 공정 개선이 요구된다. 재래된장의 경우, 메주 제조시 또는 발효 중 유입되는 많은 균에 의한 제품의 맛, 향 등의 규격화가 어렵다. 또한 특유의 쿼퀴한 냄새가 심하여 세계적으로 널리 이용되기 어려운 점이 있다. 전통식품의 계승·보급화 및 세계화를 위해서는 이취가 낮은 한국전통식 된장을 제조할 수 있는 기술개발이 절실히 필요하다.

사. 재래된장의 경우 무균적 상태에서 종균을 접하는 방식의 제조법이 아닌 일반 조리환경에서 특정종균이 아닌 혼합 미생물이 혼재된 메주로 발효를 진행함으로써 콩이라는 환경에서 잘 자랄 수 있는 *Aspergillus flavus* 나 *Bacillus cereus* 등과 같은 유해 미생물이 같이 성장할 수 있어 이들이 최종 제품의 안전성을 위협할 수 있다.

아. 위생적으로 안전하게 무균적인 환경에서 우수한 콩 발효 미생물에 의한 장류의 제조법, 동시에 일본식 된장 맛이 아닌, 우리나라 고유의 맛을 살린 전통 장 맛을 지닌 된장의 제조, 토속적 한국인 입맛에 맞는 된장 및 세계인의 입맛에 맞는 다양한 맛의 된장 개발이 절실히 요구된다.

자. 혈전의 형성은 혈관의 손상 등과 같은 요인으로 인하여 혈액이 응고되는 현상으로 체외의 혈전은 지혈에 절대적으로 중요한 역할을 하지만 이러한 혈전이 혈관에 축적될 경우 뇌졸중, 심장마비 등과 같은 심각한 순환계 질환을 유발하는 요인이 된다. 이러한 혈전증을 치료하기 위한 목적으로 다양한 치료제들이 개발되어 있으나 대부분 고가이며 체내에서의 흡수, 내산성 등의 문제로 urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능한 것으로 알려져 있어 새로운 제재 개발의 필요성이 대두되고 있다.

차. 일본의 *natto*와 우리나라의 청국장에서 유용한 혈전용해효소 생산균주를 분리하였다는 보고와 더불어 된장에서도 혈전용해효소 생산균주의 분리가 가능할 것으로 보인다.

카. 본 연구는 된장의 이취를 제거하여 풍미를 개선시키고 항산화 작용, 혈전용해 활성과 같은 기능성이 있는 새로운 고기능성의 된장을 제조할 목적으로 각각의 기능을 지닌 균주를 분리 동정하고 이들 균주를 이용한 된장을 제조하고 이를 산업화시키기 위해 산업적 기반기술을 확보하는 것은 된장을 국제적 식품으로 만들기 위하여 반드시 필요한 연구 과제라 할 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

가. 된장의 경우는 타 장류에 비하여 공장생산품의 사용률이 낮은 편인데 이는 재래식 전통 된장의 구수한 맛이 벗짚이나 공기중의 세균인 *Bacillus* sp.에 의하여 결정되는 특성으로 인하여 대량으로 생산하기 어렵기도 하고, 발효 숙성과정에서 적정온도와 습도에 따라 호기성 세균인 *Bacillus*의 생육 조건이 달라져 이의 표준화가 어렵다.

나. 농수산물유통공사 및 장류업계에 따르면 2007년 12월말 기준으로 수출된 장류(고추장, 된장, 간장)는 금액에서는 2,927만 달러로 지난해 같은 기간의 2,947만 달러에 비해서 소량 감소했으며, 물량은 1,633여만 톤으로 2006년 같은 기간의 1,780여 만톤에 비해 8.2%가 감소하였다. 된장은 2007년의 수출물량이 4,660천 톤으로 지난해 4,753천톤에 비해 소폭 감소하였으며 금액 면에서도 894천 달러에서 908천 달러로 큰 변화가 없었다. 이처럼 장류 수출이 정체 및 감소를 보이는 것은 과자나 음료와 달리 장류는 그 나라 음식에 좌우되어 아직 우리 음식이 세계화 되지 못했음을 반증하는 것이라 할 수 있겠다.

다. 세계적으로 slow food 열풍이 일고 있는 시점에서 대표적인 slow food인 된장이야말로 전통식품으로서 독창적 제조기술을 바탕으로 하는 세계화 상품에 안성맞춤일 것이다.

라. 한국 음식의 저변이 약해 한국음식에 대한 선호도가 높은 미국, 일본 등 몇몇 국가를 제외하고는 아직 동포 위주의 판매가 주로 이루어지고 있기 때문에

우리나라의 장류제품이 세계화 되어 수출을 많이 하려면 해외 소비자의 입맛에 맞는 장류를 개발하여야 할 것이다.

다. 농림수산물식품부는 우리 전통식품의 우수성을 국제사회에 알리고 세계시장을 대상으로 수출상품화를 촉진하기 위해 Codex 규격화 사업을 추진하고 있다. 우리나라는 2001년 아시아에서 최초로 김치를 국제식품규격으로 통과시켜 김치가 세계 5대 건강식품으로 발돋움하는 발판을 마련한 바 있다. 2009년 7월에 제32차 국제식품규격위원회(CODEX)에서 고추장(*Gochujang*), 된장(*Fermented Soybean Paste*), 인삼(*Ginseng Products*) 등록되었다. Codex 규격 제정을 계기로 다른 국가의 유사제품과 차별화되고 한층 더 국제 경쟁력을 높일 수 있는 기회로 활용하여야 할 것이다.

3. 사회·문화적 측면

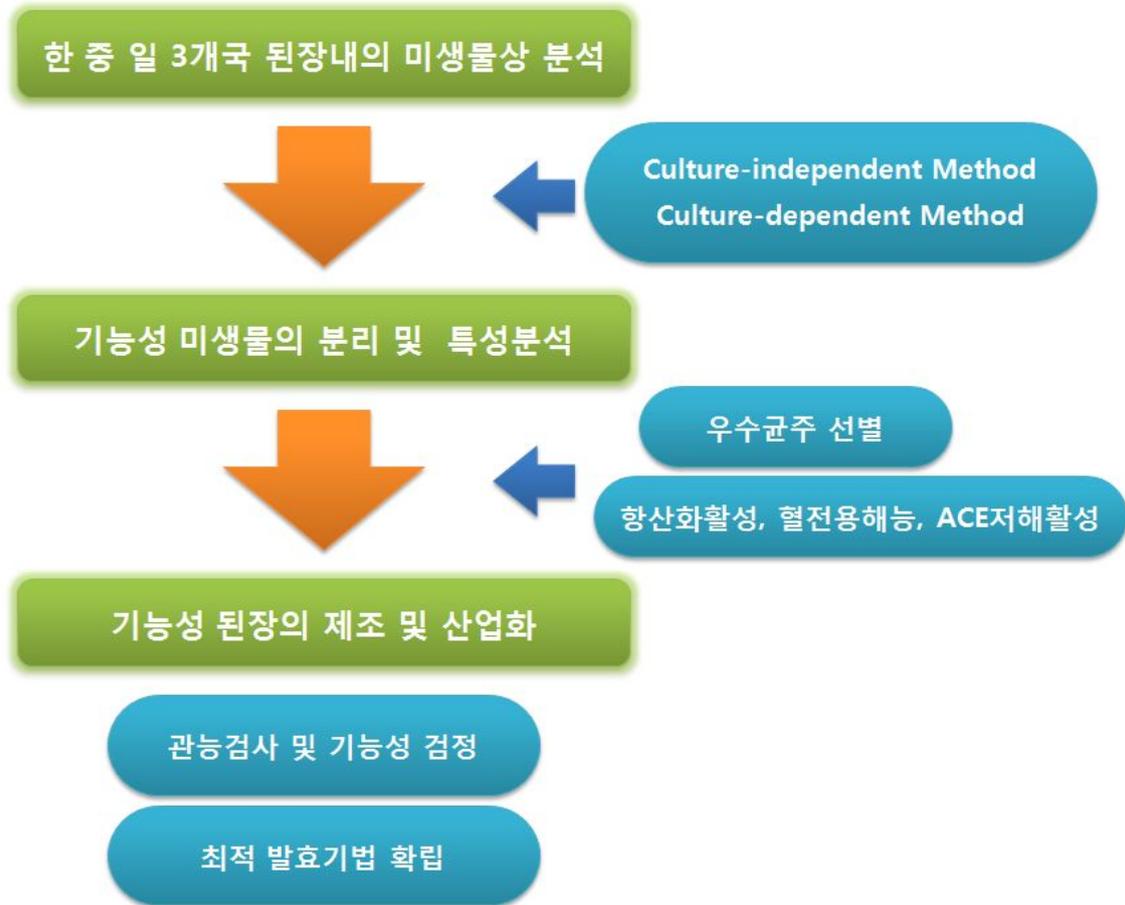
가. 근래 식품은 단순한 굶주림의 해결수단을 넘어 건강을 지키고 먹는 즐거움과 정신적 의미를 부여하는 경향이 뚜렷하게 나타나고 있다. 이런 이유로 역사가 있는 나라나 민족은 자국의 전통식품을 국내뿐만 아니라 외국에 적극적으로 알려 경제적 이익과 함께 독특한 자기 식문화를 알림으로써 국가의 자긍심을 높이고 있다.

나. 각 나라마다 전통적인 발효문화가 있다. 우유 단백질원을 활용한 유럽의 치즈, 중동의 요쿠르트 등의 발효제품, 한국과 동남아시아의 생선을 이용한 fish sauce (젓갈류), 중국의 두반장, 인도네시아의 템페, 일본의 낫또와 미소 등은 콩과 쌀 등의 곡물 원료를 주원료로 하여 고유의 미생물을 이용한 발효식품들이 있다. 특히 한국의 전통 발효식품인 된장은 김치와 더불어 세계화를 위해서 맛, 가공성, 품질의 표준화 등 많은 장애물을 극복하여야만 한다.

다. 전반적으로 국내의 장류시장은 핵가족화, 아파트 등의 공동주택 거주, 식생활의 간편화 등 사회 환경의 급격한 변화로 인하여 직접 장을 담그는 가정이 감소되어 어느 정도까지는 꾸준히 성장을 하겠지만 국내 시장의 제한으로 임계점에 이르면 그 생산량과 시장의 확대는 정체상태를 보일 것으로 예상된다. 이러한 한계를 극복하기 위해서는 세계시장으로 된장의 수출이 이루어져야만 한다.

라. 장류는 제조 방법상 전통식과 개량식으로 구분되어 시장이 형성되어 있는데 개량식의 경우 일본식 장류와 비슷하여 국내외 시장에서 그 차별성을 부각시키기 어려운 점이 있고 아직도 많은 소비자는 전통식 장류를 선호하는 경향이 뚜렷하므로 이 분야에 대한 과학적 연구와 대량 생산체제 구축에 따른 기술 축적이 필요한 시점이다.

제 3 절 연구개발의 범위



1. Culture-dependent method와 culture-independent method (DGGE법)를 사용하여 우리나라, 일본, 중국 발효콩 페이스트에 존재하는 미생물상 비교·분석
2. 된장에 존재하는 미생물 중 항산화, 혈전용해활성, ACE 저해활성 기능을 지닌 균주 분리 및 동정
3. 이취가 없고 풍미가 우수한 균주 선정
4. 분리 균주를 이용한 관능적으로 우수한 고기능성 된장의 제조 및 발효기법 개발
5. 최적 발효 조건 및 산업적 기반 기술 확립

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

가. 된장의 추정 소요량과 상품화 비율은 Table 1에 나타난 바와 같으며 총수요에 대한 공장제품의 비율은 조금씩 증가하고 있는 추세이다. 사회구조와 가족구성원의 역할이 급격히 달라지는 상황에서 시간의 절약, 그리고 편의화 추세는 계속될 것이며 식품에서 그 변화는 더욱 두드러질 것으로 예상된다. 따라서 우리의 전통 된장제품의 산업화에 더 많은 노력을 기울여야 하고 관련 기술 개발에 박차를 가해야 할 것이다. 이에 따라 상품화 수요에 부응하기 위해서는 고품질의 된장을 생산하기 위한 각별한 노력이 요구되는 실정이다.

나. 수출의 경우 한국 음식에 대한 선호도가 높은 미국, 일본 등 몇몇 국가를 제외하고는 아직 동포 위주의 판매가 주를 이루기 때문에 우리나라의 된장이 세계화 되어 수출을 많이 하려면 해외 소비자의 입맛에 맞추어 된장을 개발하는 것이 중요하다. 된장 수출이 정체 및 감소를 빚는 것은 아직 우리 된장 제품이 세계화 되지 못했음을 반증하는 것이라 하겠다 (Table 2).

다. 전통식으로 제조된 된장에서 나는 특유의 이취를 젊은 세대에서는 불쾌취로 느끼는 경향이 있다. 우리나라에서는 아직까지 전통 된장을 이취가 없는 제품으로 규격화하여 산업적으로 생산할 수 있는 기술이 개발, 보급된 적이 없다. 전통식품의 계승·보급화 및 세계화를 위해서는 기호성이 우수하고 기능성이 있는 한국식 전통 된장을 제조할 수 있는 기술 개발이 필요하다.

Table 1. 연도별 된장의 추정소요량과 제품 생산 실적

연 도	추정소요량 (톤)	공장생산량 (톤)	비 율 (%)
2007	287,500	163,871	57
2006	286,000	159,518	56
2005	288,500	162,694	56
2004	285,000	155,000	54
2003	283,000	149,359	53
2002	280,000	153,948	55
2001	276,400	151,060	55
2000	266,300	133,476	50

출처: 한국장류협동조합

Table 2. 연도별 된장의 제품 수출실적

연 도	용 량 (톤)	금 액 (천\$)
2007	5,176	10,144
2006	4,753	8,943
2005	3,940	7,750
2004	2,833	4,384
2003	2,542	4,071
2002	1,706	2,528
2001	1,726	2,504
2000	1,365	2,239

출처: 한국장류협동조합

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

가. 국균으로 제조하는 미소는 麵의 원료 (쌀, 보리, 콩), 맛 및 색깔에 따라 종류를 구분하며 이러한 종류의 제품을 대량 생산할 수 있는 기술은 오래전에 개발되어 있고 지역에 따라 독특한 미소 요리가 발전되고 있다.

나. 된장의 연도별 수입실적을 보면 저가의 제품들이 해외에서 제조되어 많은 양이 수입됨을 알 수 있다 (Table 3). 이는 품질 저하로 인해 소비자의 우리 전통 된장 제품에 대한 부정적인 영향을 초래함으로써 전통식품의 계승 · 발전에 큰 걸림돌로 작용할 수 있다. 이러한 점을 극복하기 위해서는 우수한 품질의 전통 된장을 개발, 산업화시킴으로써 품질 차별화로 시장에서 우위를 점해야 할 것이다.

Table 3. 된장의 연도별 수입실적

연 도	용 량 (톤)	금 액 (천\$)
2007	5,005	3,443
2006	5,247	3,309
2005	3,974	2,636
2004	2,238	1,874
2003	2,553	1,747
2002	1,356	1,178
2001	1,055	1,066
2000	825	985
1999	497	676
1998	306	366

출처: 한국장류협동조합

3. 국내외 관련분야 환경변화

가. 식품산업은 시장규모가 지속적으로 성장하는 한편, 경제·기술발전에 따라 고부가가치 상품화가 가능한 분야이다. 세계 식품시장의 규모는 약 4조 달러에 달하여 자동차 시장이나 IT 시장보다도 큰 규모를 나타내고 있다.

또한 앞으로 인구 증가에 따라 그 시장 규모는 지속적으로 성장할 것으로 전망되고 있다. 특히 고급화, well-being·건강지향, 안전성 중시 등의 식품 선택 기준이 변화하면서 유기농식품, 기능성 식품 등의 고부가 식품의 수요가 늘어나고 있는 추세이다.

나. 고부가가치 식품이라고 하는 것은 식품산업 분야에 있어 기존의 영양공급원으로서의 전통적 개념의 식품이 새로운 아이디어와 첨단기술 등을 통해 새로운 가치를 창출하여 부가가치를 높일 수 있는 식품을 총칭한다. 된장으로부터 기능성 균주를 분리하고 이를 이용하여 고기능성 된장을 제조하는 것은 고부가 식품의 수요가 늘어나고 있는 시대적 흐름에 잘 부응하는 연구과제 라고 생각된다.

제 2 절 된장 제조 기술현황 및 연구동향

1. 된장의 미생물

전통 메주를 사용한 된장은 1-2종의 단일 곰팡이를 이용하여 제조한 개량식 메주로 제조한 된장에 비해 맛과 영양학적 측면에서 우수하고 그 원인은 메주의 발효과정에 관여하는 균주의 차이에서 비롯된다. (Kim과 Kim, 1999). 그러나 전통메주를 사용할 경우 제조기간이 길고 제조의 표준화가 어려워 과학화, 산업화가 힘들다. 따라서 전통 메주나 된장의 다양한 미생물들을 산업화에 적용하려는 연구가 활발하다. 특히 전통메주의 주 발효균주가 세균임을 고려하여 *Bacillus*를 사용하여 된장을 제조하는 시도도 있다 (Yang et al., 1994). *Bacillus*의 경우, 곰팡이나 효모에 비해 많은 수가 메주의 표면과 내부에 골고루 존재하면서 protease와 amylase 등 각종 효소를 생성하여 주도적인 발효를 행하여서 전통된장 특유의 맛과 향을 부여하는 것으로 알려져 있다 (Yoo와 Kim, 1998). 따라서 메주와 전통 장류는 재래 된장의 산업화를 위한 중요한 starter pool이다. 다만 장류 시료로부터 발효 공정에서 나타나는 미생물의 변화를 검토해야 하고 이들 미생물의 활용을 통한 장류의 제조와 공정개발을 하는 것이 필요하다 (Yoo et al., 1999). 재래 된장의 긴 발효기간 중 초기에는 호기성 세균의 증가가 두드러지고 효모는 좀더 빠른 생육을 보였으며 혐기성 세균은 발효, 숙성 기간 동안 일정하게 유지되는 것으로 보고되었다 (Lee et al., 1996). 전통 장류에 분포하는 균주의 확보와 균주들의 특성을 파악하여 산업화에 이용하는 응용연구가 필요하다.

2. 된장의 품질특성

된장의 품질은 맛과 향, 색, 물성, 아미노산, 유기산 등 여러 가지가 복합적으로 결정한다. 된장의 맛은 짠맛과 단맛, 구수한맛 등의 조화로 이루어지며 peptide로 인해 쓴맛을 갖기도 한다. 향 성분은 사용 원재료에서 유래하는 성분과 발효에 관여하는 미생물의 대사산물, 이화학적인 반응생성물로 구분할 수 있다. 한국 재래 된장의 주 향기성분은 *Bacillus* 속에 의한 것이라는 보고가 있으며 (Song et al., 1984) 각 이취성분의 원인이 되는 화합물들을 밝히는 연구도 이루어지고 있다 (Choi et al., 1997).

된장 제조시 각종 부재료를 이용하여 기능성 및 영양성분을 강화한 된장제조 또한

시도되고 있다. 이를 위해 사용되는 부재료로 해산물 (Seo와 Jeong, 2001), 표고버섯 (Rhee et al., 2000), 녹차 (Jung과 Roh, 2004) 등이 있고 미생물로는 홍국 (Kim과 Rhyu, 2000)이나 chitosan을 세포벽에 함유하는 *Rhizopus oryzae* 균 (Eum et al., 1987) 등이 있다. 또한 된장 제조시 소금은 된장의 부패를 억제하고 내염성의 발효미생물이 선택적으로 성장할 수 있도록 조절해 주는 역할을 한다. 재래된장의 경우 20% 정도 (Park et al., 2002) 까지도 염 농도가 높다. 현대 식생활의 흐름과 성인병 예방 측면에서 저염 된장 개발의 필요성이 제기 되었고, 이를 위해 보존효과가 있는 주정 (Lee et al., 1985)을 첨가하거나 nicin 생성 유산균을 된장 발효에 적용 (Lee와 Ryu, 2002)하기도 하였다. 또한, 저염된장을 제조한 후 감마선을 조사하여 보존 효과를 높이는 연구도 이루어졌다 (Park et al., 2002).

3. 된장의 기능성

가. 콩과 콩 가공식품에는 단백질과 지방이 풍부하며 칼슘, 인, 마그네슘, 철, 아연, 구리 등 무기질도 풍부한 영양학적으로 우수한 식품원료이다. 또한 isoflavone, saponin, lecithin, phytic acid, trypsin inhibitor, dietary fiber, oligosaccharide 등 여러 생리활성물질이 함유되어 있음이 밝혀지면서 기능성 식품 소재로 관심과 연구의 대상이 되고 있다 (Kim, 2003). 대표적인 콩 발효식품인 된장은 원료인 콩의 기능적 특성과 발효과정 중 변화되는 성분들에 의해 다양한 생리활성을 지니고 있다.

나. 다양한 형태의 콩 발효제품을 섭취해온 동양인의 식단과 성인병 발병률과의 연관성이 밝혀지면서 세계적으로 콩 식품의 섭취에 지대한 관심을 보이고 있다 (Kim, 2003). 콜레스테롤 농도를 저하시켜주는 성분들로 콩의 식이섬유, lecithin, saponin, phytic acid 등이 알려져 있다 (Kim et al., 2002; Sohn et al., 2000).

다. 콩의 trypsin inhibitor는 항산화 보조활성으로인해 항암활성물질로 여겨지고 있다 (St. Clair와 St. Clair, 1991, Witz et al., 1980). Isoflavone은 배당체 형태로 존재하며 estrogen 길항제의 역할을 체내에서 함으로써 (Setchell과 Cassidy, 1999) 골다공증 및 폐경기 증후군 완화효과가 있다고 알려져 있다 (Adlercreutz et al., 1992, Messina et al., 1994). 특히 콩 발효식품에는 발효를 통해 배당체가 활성을 갖는 aglycone 형태로 전환되므로 발효된 상태의 콩을 섭취하는 경우 isoflavone을 더 효과적으로 이용할 수 있다 (Choi와 Sohn, 1998).

라. 일본 콩 발효 식품인 *natto*에서 nattokinase는 혈전용해효소를 분리, 정제하여 제품으로 활용하고 있다 (Harlan과 Harker, 1981). 우리나라 재래된장의 *Bacillus* 균의 혈전용해능 또한 매우 높은 것으로 검토되고 있으며 (Kim, 1998) 혈전용해 효소의 생산에 관한 연구도 진행되었다 (Choi, 2003, Hyun et al., 2005).

마. 불포화지방질이 많은 콩의 지방은 산패에 취약할 것으로 생각되지만 콩에 함께 함유된 페놀화합물과 갈변물질의 항산화 작용으로 유지안정성이 유지되는 것으로 밝혀졌다 (Lee et al., 1991). 또한 tocopherol, isoflavone, phytic acid 역시 항산화 활성이 있다 (Graf et al., 1997).

바. 된장의 biogenic amine은 발효과정 중 미생물에 의해 유리아미노산이 탈탄산 반응을 통해 생물학적 활성을 지닌 저분자 물질로 변화된 것을 말한다 (Brink et al., 1990). Putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, serotonin 등이 있는데 체 내에서 성장조절 및 염증조절, 신경전달 등의 생리적 기능을 담당하지만 (Tabor와 Tabor, 1984) 독성도 함께 가지고 있어 과량 섭취시 두통유발 등 독성을 나타내기도 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 Culture-independent 방법에 의한 한, 중, 일 된장의 미생물상 비교 분석

Nested-PCR denaturing gradient gel electrophoresis법을 이용하여 된장에 존재하는 미생물의 분포를 culture-independent method로 조사하였다.

1. 실험방법

가. DNA 추출

된장 속에 존재하는 미생물의 DNA를 추출하기 위해 된장샘플 5g을 멸균증류수 45ml에 넣고 약 3~4시간동안 shaking하여 풀어주었다. 그 후 멸균된 거즈를 이용하여 된장속의 콩 등의 고형분을 걸러낸 후 걸러낸 액을 원심분리 하여 균체를 모은다. 모아진 균체는 DNA 추출용 kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. DNA 추출시 포자 등으로 존재하는 균을 효과적으로 lysis 시키기 위해 중간과정에서 RNase 처리 전에 glass beads를 넣고 vortex를 하여 포자를 파괴시켰다.

나. Nested PCR

추출한 DNA는 분석하고자 하는 균에 따라 우선 16S rDNA(세균), 18S rDNA(곰팡이, 효모)을 target 으로 하여 PCR을 수행하였다. 1차 PCR에서 얻어진 PCR 산물을 template로 하여 다시 nested PCR을 수행하였다. 여기에 사용된 primer는 27f와 1492r(16S rDNA), 338f와 518r(세균, V3 region), pB (*Bacillus*에 특이적인 primer), NSI와 FR1(18S rDNA), FF390와 FR1(곰팡이) 또는 NS3과 YM951r (곰팡이)를 사용하였다. 위의 두 단계의 PCR을 수행하여 얻어진 PCR 증폭 산물을 DGGE를 이용하여 분석하였다. Nested PCR을 할 때 gc-clamp가 첨가된 primer를 사용하였다.

다. DGGE 분석

DGGE gel 변성제의 농도구배는 세균과 곰팡이의 경우 20~50%를, *Bacillus* species의 경우는 35~70%를 사용하였다. 여기에 사용되는 변성제의 농도는 100%

의 경우 7M urea와 40% formamide의 농도를 나타낸다. DGGE의 조건은 60℃에서 40V로 30분간 전기영동을 한 후 60V에서 15시간 30분간 수행하였다. 여기서 분리되어 나온 밴드를 잘라내어 잘게 부수어 멸균 증류수에 하루 동안 침지시킨 후 물에 녹아 나온 DNA를 회수하여 GC-clamp가 없는 primer를 이용하여 PCR을 수행하고 이를 purification 하여 sequencing에 이용하였다.

2. 실험결과

가. 한국된장내의 미생물상 분석

실험에 사용한 한국된장 14종 내의 미생물상을 DGGE로 분석한 결과를 Fig. 1, 2, 3와 Table 1, 2에 나타내었다. 각 시료별로 서로 다른 양상의 DGGE 패턴과 군 분포를 나타내었다. Bacteria의 경우 *Tetragenococcus halophilus*, *Enterococcus faecium/durans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*가 우점종으로 나타났다. 그리고 일부 시료에 있어서 *Weissella cibaria*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus* 등도 존재하는 것으로 밝혀졌다. Fungi와 yeast의 경우 *Mucor plumbeus*와 *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점종으로 나타났고 그 외 *Aspergillus* sp. *Pichia* sp. *Candida* sp. 등이 일부 시료에 존재하였다.

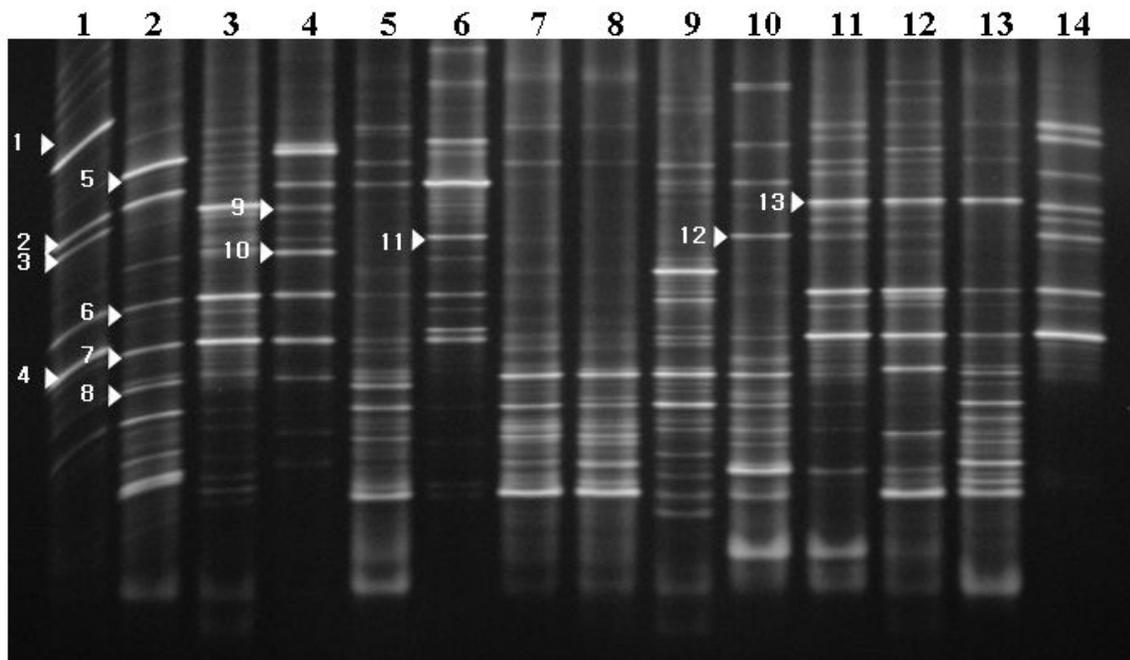


Fig. 1. DGGE profiles of bacterial V3 16S rRNA gene fragments amplified from *doenjang* samples. Lanes 1-14; *Doenjang* samples. The results of the DNA sequence analyses of the bands are summarized in Table 1.

Table 1. Sequencing results of selected DGGE bands from bacterial DGGE fingerprint in Fig. 1

Band no.	Closest relative	Identity (%)
1	<i>Weissella cibaria</i>	99
2	<i>Enterococcus faecium/durans</i>	99
3, 13	<i>Streptococcus epidermidis/gallinarum</i>	99
4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98
6, 7	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	99
8	<i>Bacillus</i> sp.	98
9	<i>Lactobacillus sakei</i>	99
10	<i>Carnobacterium</i> sp.	99
11, 12	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99

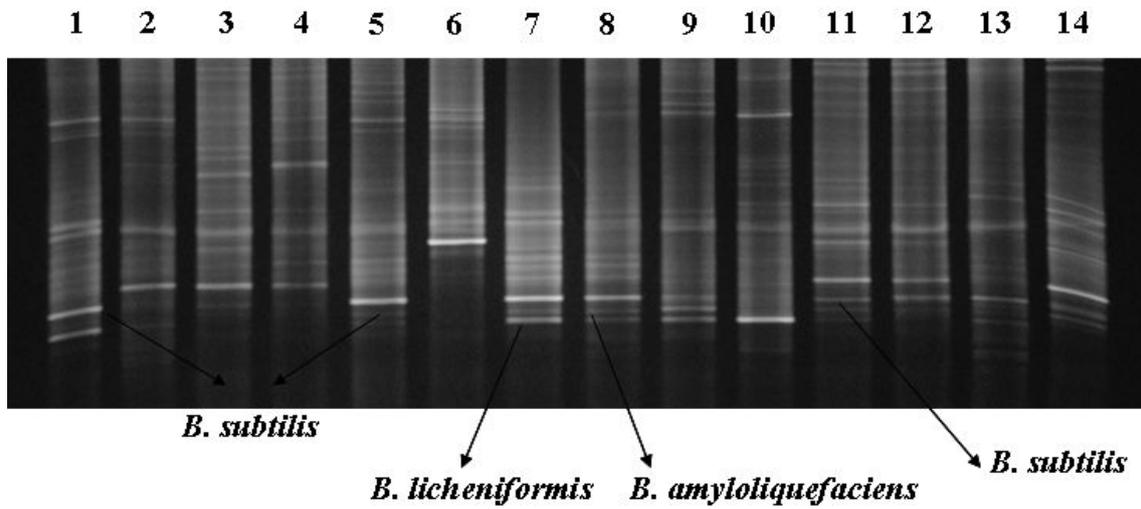


Figure 2. *Bacillus* species-specific PCR-DGGE fingerprints of *doenjang* samples.

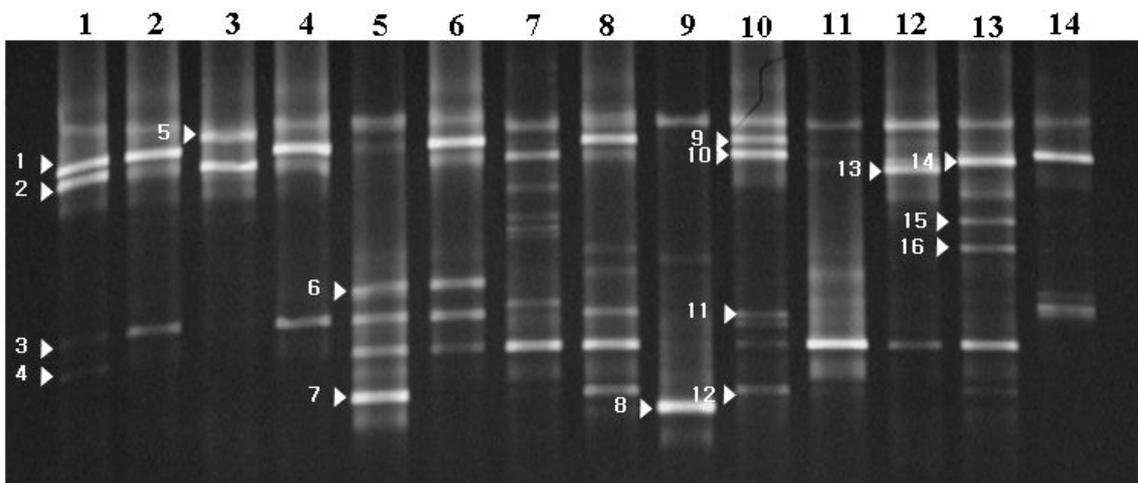


Figure 3. DGGE profiles of fungal partial 18S rRNA gene fragments amplified from *doenjang* samples. The results of the DNA sequence analyses of the bands are summarized in Table 2.

Table 2. Sequencing results of selected DGGE bands from fungal DGGE fingerprint in Fig. 3

Band no.	Closest relative	Identity (%)
1, 9	<i>Mucor plumbeus</i>	99
2, 10	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	99
3	<i>Penicillium freii</i>	99
4	<i>Aspergillus oryzae</i>	99
5	<i>Pichia farinosa</i>	97
6	<i>Candida crusei</i>	99
7	<i>Absidia corymbifera</i>	98
8	<i>Rhodotorula glutinis</i>	99
11	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	99
12	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99
13	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99
14	<i>Capronia coronata</i>	100
15	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99
16	<i>Flammulina velutipes</i>	99

나. 일본 미소 내의 미생물상 분석

실험에 사용한 일본미소 14종 내의 미생물상을 DGGE로 분석한 결과를 Fig. 4, 5과 Table 3, 4에 나타내었다. 일본미소의 경우도 한국 된장과 마찬가지로 각 시료별로 서로 다른 양상의 DGGE 패턴과 균 분포를 나타내었다. Bacteria의 경우 *Staphylococcus gallinarum*, *Tetragenococcus halophilus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*가 우점종으로 나타났다. 그리고 일부 시료에 있어서 *Weissella cibaria*, *Leuconostoc citreum* 등도 존재하는 것으로 밝혀졌다. Fungi와 yeast의 경우 *Aspergillus oryzae*, *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점종으로 나타났고 그 외 *Pichia guilliermondii*, *Clavispora lusitaniae* 등이 일부 시료에 존재하였다.

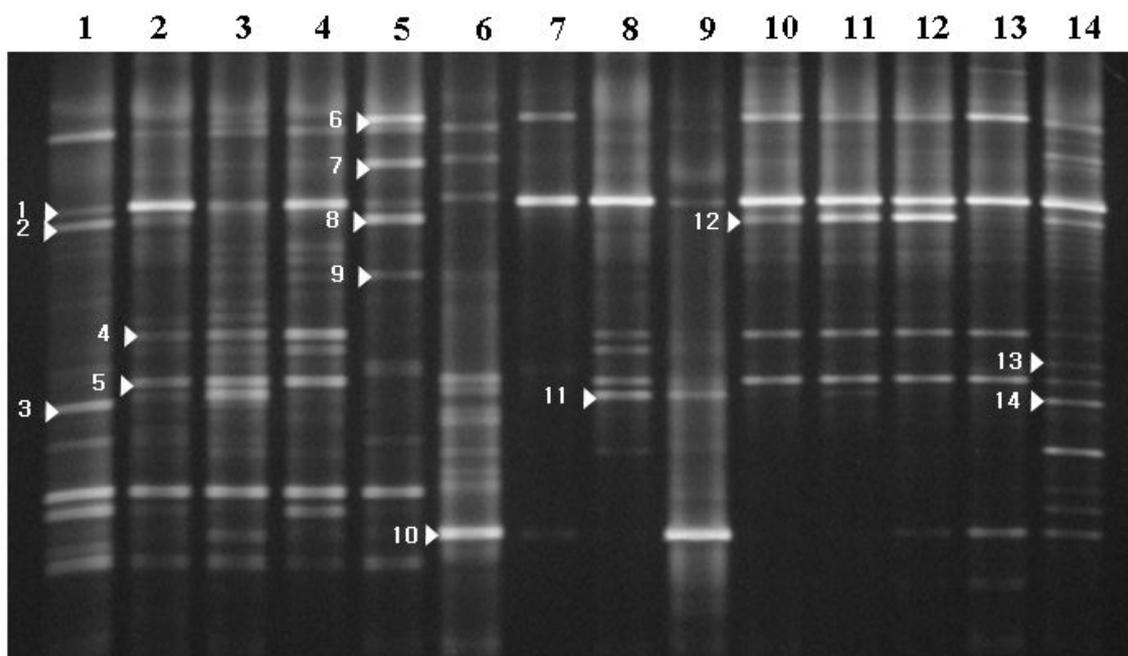


Fig. 4. DGGE profiles of bacterial V3 16S rRNA gene fragments amplified from Japanese fermented soybean paste samples. The results of the DNA sequence analyses of the bands are summarized in Table 3.

Table 3. Sequencing results of selected DGGE bands from bacterial DGGE fingerprint in Fig. 4

Band no.	Closest relative	Identity (%)
1	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	99
2, 8, 12	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99
3, 14	<i>Staphylococcus kloosii</i>	99
4	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	99
5	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	97
6	<i>Weissella cibaria</i>	99
7	<i>Leuconostoc citreum</i>	98
9	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99
10	<i>Bacillus</i> sp.	99
11	<i>Tetragenococcus muriaticus</i>	99
13	<i>Lactococcus lactis</i>	100

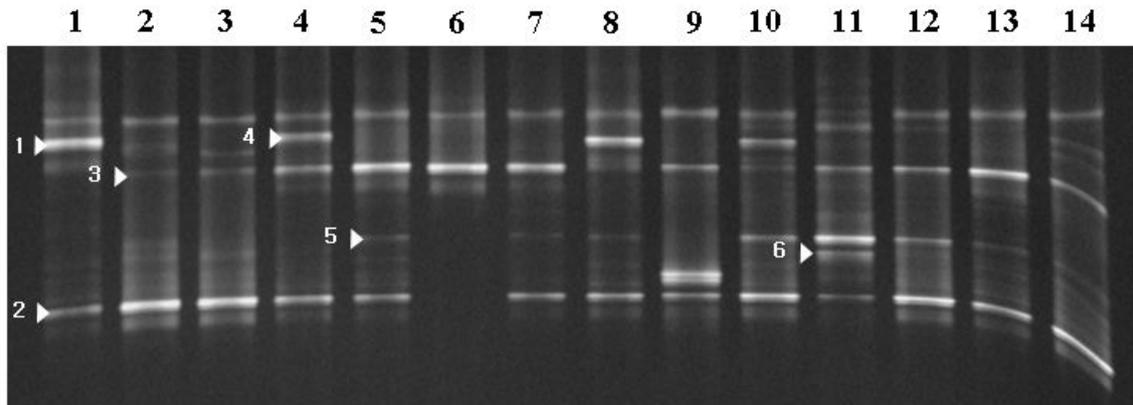


Figure 5. DGGE profiles of fungal partial 18S rRNA gene fragments amplified from Japanese fermented soybean paste samples. The results of the DNA sequence analyses of the bands are summarized in Table 4.

Table 4. Sequencing results of selected DGGE bands from fungal DGGE fingerprint in Fig. 5

Band no.	Closest relative	Identity (%)
1, 4	<i>Pichia guilliermondii</i>	99
2	<i>Aspergillus oryzae</i>	99
3	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	99
5	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99
6	<i>Candida kusei/Issatchenkia orientalis</i>	98

다. 중국 된장 내의 미생물상 분석

실험에 사용한 중국된장 5종 내의 미생물상을 DGGE로 분석한 결과를 Fig. 6, 7과 Table 5, 6에 나타내었다. 각 시료별로 bacteria의 경우는 유사한 경향을 나타내었으나 fungi의 경우는 서로 다른 양상의 DGGE 패턴을 나타내었다. Bacteria의 경우 *Weissella cibaria*, *Lactobacillus* sp.가 우점종으로 나타났다. 그리고 일부 시료에 있어서 *Stapylococcus* sp. *Tetragenococcus* sp. 등도 존재하는 것으로 밝혀졌다. Fungi와 yeast의 경우 *Herpotrichiellaceae* sp. *Hyphodontia rimosissima*, *Kodamaea ohmeri*, *Absidia corymbifera*, *Aspergillus* sp. 등이 일부 시료에 존재하였다.

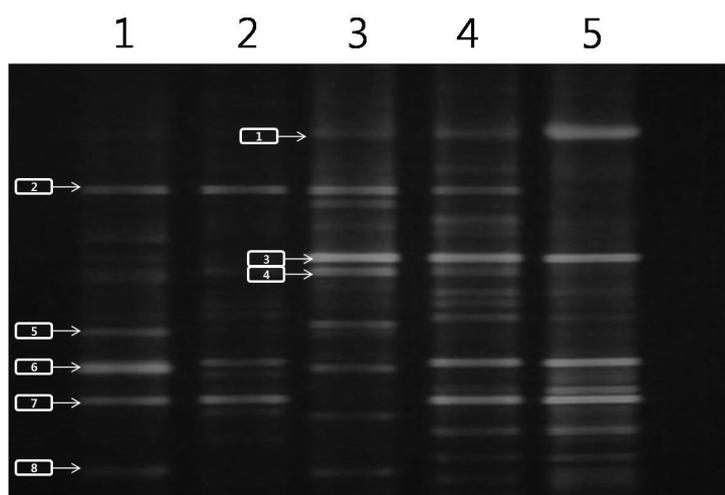


Fig. 6. DGGE profiles of bacterial V3 16S rRNA gene fragments amplified from Chinese soybean paste. The results of the DNA sequence analyses of the bands are summarized in Table 5.

Table 5. Sequencing results of selected DGGE bands from bacterial DGGE fingerprint in Fig. 6

Band no.	Closet relative (NCBI accession no.)	Identity (%)
1, 2	<i>Weissella cibaria</i> (AB510757)	100
3, 4	<i>Staphylococcus</i> sp. (AM268423)	98
5	<i>Tetragenococcus</i> sp. (GQ150511)	98
6, 7	<i>Lactobacillus</i> sp. (AF316587)	98
8	<i>Bacillus subtilis</i> (GQ392045)	98

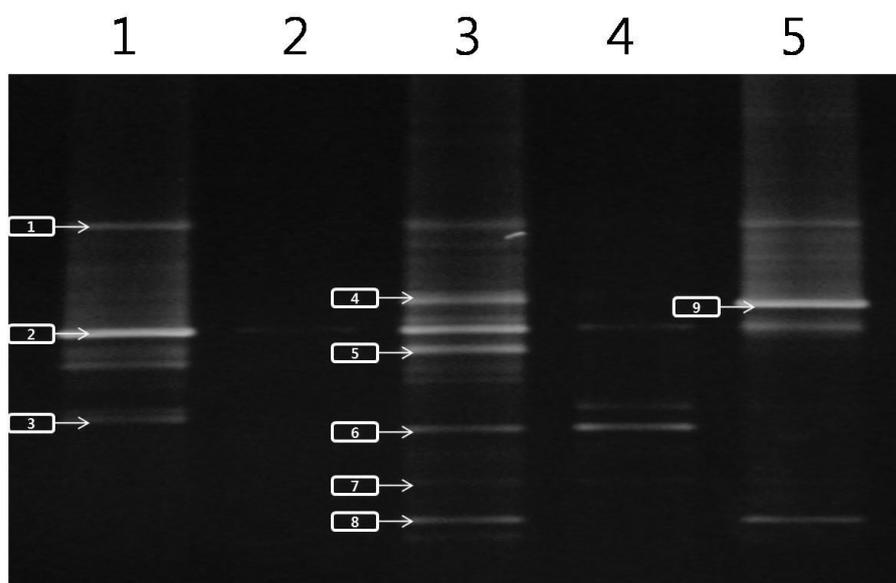


Figure 7. DGGE profiles of fungal partial 18S rRNA gene fragments amplified from Chinese fermented soybean paste samples. The results of the DNA sequence analyses of the bands are summarized in Table 6.

Table 6. Sequencing results of selected DGGE bands from bacterial DGGE fingerprint in Fig. 7

Band no.	Closet relative (NCBI accession no.)	Identity (%)
1, 2, 4, 8	<i>Herpotrichiellaceae</i> sp. (EU090194)	95
3	<i>Hyphodontia rimosissima</i> (DQ873626)	96
5	<i>Kodamaea ohmeri</i> (EF428131)	95
6	<i>Absidia corymbifera</i> (AF113408)	95
7	<i>Aspergillus</i> sp. (FJ610441)	97
9	<i>Pichia farinosa</i> (EU106163)	96

라. 한국, 일본, 중국 된장 내 미생물상의 비교 요약

실험에 사용한 한국된장 14종, 일본미소 14종, 중국된장 5종 내의 미생물상을 DGGE로 분석한 결과를 종합적으로 정리해 보면 Bacteria의 경우 한국된장에서는 *Tetragenococcus halophilus*, *Enterococcus faecium/durans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*가 우점종으로 나타났고 일본미소에서는 *Staphylococcus gallinarum*, *Tetragenococcus halophilus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*가 우점종으로 나타났다. 그리고 중국된장에서는 *Weissella cibaria*, *Lactobacillus* sp.가 우점종으로 나타났다. Fungi와 yeast의 경우 한국된장에서는 *Mucor plumbeus*와 *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점종으로 나타났고 일본미소에서는 *Aspergillus oryzae*, *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점종으로 나타났고 중국된장에서는 특별한 우점종이 존재하지 않고 각 시료별로 다양하게 나타났다. 이와 같이 각 나라별로 서로 다른 미생물상을 나타내는 것은 제조원료, 제조방법, 발효방법 그리고 기후, 토양 등의 여러 환경적인 조건에 영향을 받기 때문이라고 사료된다.

제 2 절 한국 된장으로부터 기능성이 우수한 균주의 분리 및 기능성 된장 제조용 균주의 선발

기능성 된장 제조를 위한 균주를 찾기위해 국내에서 맛있는 제품으로 추천되어 판매중인 한국된장 14종에서 분리된 균주들의 전분 및 단백질 분해능, 혈전용해능, 항산화능, ACE 저해활성을 측정하였다. 사용한 된장의 종류는 Fig. 8과 같다.



메주와 쉐리스트

수경산청

순창별미 조선된장

순창문육례 우리콩된장



순창문정희할머니 된장

민속촌 된장

도립원 꽃감 된장

묘관스님 된장



계룡산 궁골된장

평양특산 모란봉된장

물맑은 양평재래 된장

맑은손맛 쌈된장



영평죽염 조선된장

광주특산된장

Fig. 8. 실험에 사용한 된장 시료들.

1. 단백질 분해능

가. 실험방법

(1) 시료 및 콜로니의 분리

선별된 한국된장 14종의 각 된장 1g을 멸균 증류수 10ml에 희석하여 균질화 시킨 후 여과한다음 순차적으로 희석하여 단백질 분해능 측정용 평판 배지에 도말하였다.

(2) 단백질 분해능이 있는 콜로니 분리 및 보관

시료 희석액을 2% skim milk와 3% NaCl이 첨가된 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 24시간 평판 배양한 후 균주가 생성하는 단백질 분해효소에 의해 배지에서 투명환을 형성하는 콜로니를 선별하였고. 선별된 균은 LB 액체배지에서 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 50% (w/v) glycerol stock으로 -70°C에서 보관하였다. 된장으로부터 분리된 단백질 분해능이 있는 균주들을 삶은 콩에 접종, 발효 시킨 다음 관능적으로 우수하다고 판단되는 균주들을 선별하였다.

(3) 시료 중의 전분 분해능 측정

각각의 시료에 증류수와 buffer를 첨가하여 균일하게 현탁시키고 원심분리한 후 조효소액을 얻은 다음 이 조효소액의 전분분해능을 측정하였다. β -amylase 활성은 시료 10g에 증류수 100ml을 가한 후 실온에서 3시간 추출하고 여과한 액을 조효소액으로 하여 dinitrosalicylic acid reagent법으로 측정하며 효소액 1ml가 maltose 1mg을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다 α -galactosidase 활성은 시료 10g에 0.2M phosphate buffer (pH 7.0) 100ml를 첨가하여 밀봉한 후 실온에서 4시간 추출하고 여과한 액을 조효소액으로 하여 측정하였다. 효소활성 1 unit은 1분 동안 1 μ mole의 p-nitrophenol을 유리시키는 효소의 양으로 정하였고, protease 활성은 β -amylase 활성과 동일하게 조효소액을 조제한 후 Anson (1983)의 방법으로 측정하며 효소액 1ml가 1분 동안에 tyrosine 1 μ g을 유리하는 효소량을 1 unit으로 하였다

나. 실험결과

각 시료로부터 분리한 단백질분해능이 있는 균주들의 단백질 분해능을 skim milk 10% + Agar 2% 배지를 사용하여 비교하였다 (Fig. 9). 이때 분리균주들은 SDS-PAGE whole cell protein pattern 분석을 통해 총 264개를 사전 선발 하였다. 264개의 분리균주 중 단백질 분해능이 우수한 균주 113개를 선발하였다. 그 결과는 Table 7과 같다. 채래식 된장은 코지를 사용한 개량식 된장에 비해 유리아미노산 함량이 높고 그 조성이 뛰어나다 (Kim, 2004). 채래식 된장에 존재하는 미생물의 단백질분해능은 최종 제품에 매우 중요하게 작용하며 단백질 분해능이 우수한 미생물들은 된장 제조시 평균으로 활용 가치가 있다.



Fig. 9. Skim milk 10%, Agar 2% 배지에서 proteolytic activity를 보이는 분리균주.

Table 7. Selection of isolates exhibiting proteolytic activity

Samples	Number of Isolates
매주와 첼리스트	5
수경산청	9
순창별미 조선된장	5
순창문옥례 우리콩된장	11
순창문정희할머니 된장	5
광주특산된장	6
민속촌 옛날된장	10
도립원 꽃감된장	5
묘관스님 된장	18
계룡산 궁골된장	13
평양특산 모란봉된장	14
물맑은 양평재래된장	5
맑은 손맛 찜된장	3
영평죽염 조선된장	4
Total	113

2. 혈전용해능

단백질분해능 분석을 통하여 선발된 113개의 균주들의 혈전 용해능을 비교하였다.

가. 실험방법

(1) Fibrin plate의 제조

멸균된 10mM phosphate buffer 10ml에 fibrinogen을 0.6%가 되도록 (fibrinogen 0.06g) 용해시켰다. 완전히 용해된 fibrinogen 용액 10ml에 동일한 완충용액 PBS에 2% agar를 넣고 멸균시킨 용액 10ml를 넣어 잘 혼합하였다. 이때 거품이 많이 생기므로 16ml 만을 따서 새 falcon tube에 옮긴 후, 여기에 250U/ml의 thrombin 20 μ l 을 첨가한 후 즉시 petridish에 붓고 천천히 잘 돌려서 섞어준 다음 실온에서 30분간 방치하여 최종적으로 0.3% fibrin plate를 제조하였다.

(2) 혈전용해능의 측정

0.3% fibrin plate위에 배양 상층액을 분주한 (20 μ l) paper disk (작은 것)를 올려놓은 다음 30 $^{\circ}$ C에서 18시간 방치한 후 용해된 환의 면적을 측정하였다. 대조구로 정제된 혈전 용해제인 plasmin (1U/ml)을 사용하여 동일한 fibrin plate상에서 실험구와 함께 혈전용해능을 측정하고 이때 형성된 plasmin의 투명환을 100% 혈전 용해 활성으로 표시하고 다른 시료의 용해 활성은 다음식과 같이 plasmin에 대한 상대 활성값(%)으로 표시하였다.

$$\text{혈전용해활성 (\%)} = \frac{\text{시료의 용해면적}}{\text{plasmin의 용해면적}} \times 100$$

나. 실험결과

단백질 분해능력이 있는 113개의 균주를 0.3% fibrin plate에 분주하여 용해된 환의 면적을 측정하였으며, 대조구로 정제된 혈전 용해제인 plasmin (1U/ml)를 사용하여 비교하였다 (Fig. 10). 형성된 plasmin의 투명환을 100% 혈전 용해 활성으로 표시하고 다른 균주의 용해 활성은 다음식과 같이 plasmin에 대한 상대 활성값(%)으로 나타낸 결과는 Table 8와 같다. 이를 통해 혈전용해능이 우수한 73 개의 균주

들을 선발하였으며 이들 중 20개의 균주가 plasmin (1 NIH unit/mL)보다 더 높은 혈전용해능을 나타내었다. 혈전용해 효소들은 fibrin clot을 용해시키는 효소들로 현재 urokinase와 streptokinase, genetically engineered tissue plasminogen activator가 사용되고 있다. 이 효소들은 가격이 비싸고 소화관 출혈이나 알레르기 반응 등 부작용을 나타내기도 한다. 따라서 최근에는 식품유래의 혈전용해 효소에 대해 연구된 바 있다 (Choi et al., 2009).

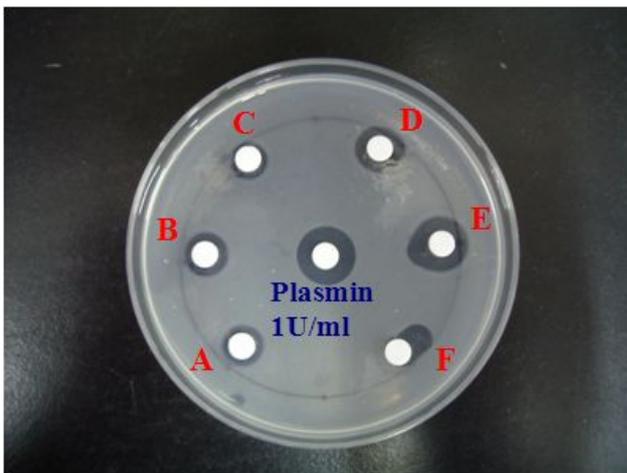


Fig. 10. Selection of isolates exhibiting fibrinolytic activity

Table 8. Fibrinolytic activity of isolates from *doenjang*

Strain	Fibrinolytic activity (100%)
Plasmin (1U/ml)	100
문옥례 5	96.3
문옥례 12	70.4
문옥례 13	74.1
문옥례 16	63.0
문옥례 18	88.9
문옥례 22	81.5
문옥례 24	66.7
문옥례 25	66.7
문옥례 27	77.8
문옥례 29	51.9
묘관 3	68.9
묘관 13	100
묘관 14	73.3
묘관 15	93.3
묘관 19	85.7
묘관 29	96.4
묘관 30	82.1

Strain	Fibrinolytic activity (100%)
Plasmin (1U/ml)	100
별미 5	80
꽃감 9	93.3
꽃감 12	66.6
매첼 30	60
민속촌 1	103.5
민속촌 2	92.8
민속촌 8	89.3
민속촌 15	92.8
민속촌 22	82.1
민속촌 27	85.7
죽염 3	67.9
광주 5	69.2
광주 6	84.6
광주 9	76.9
수경 2	92.3
수경 3	100
수경 6	93.3
수경 7	100
수경 9	93.3
수경 29	86.6

Strain	Fibrinolytic activity (100%)
Plasmin (1U/ml)	100
쌈 3	107
쌈 5	110
궁골 2	121
궁골 3	85
궁골 5	85
궁골 6	114
궁골 11	82
궁골 12	114
궁골 14	92
궁골 17	92
궁골 18	96
궁골 19	125
궁골 26	117
궁골 27	89

3. 항산화능

가. 실험방법

된장을 멸균 증류수로 10배 희석한 후 0.1ml를 액체배지에 접종한 후 30℃에서 24시간 진탕 배양한 배양액을 멸균 증류수로 100배 희석하여 한천배지에 도말한 후 30℃에 2일간 방치한다. 여지를 건조 한 후 DPPH (8.0mg/ethanol 50ml)를 분무하여 자주색이 무색으로 탈색되는 균주를 1차 선별한다. 선별된 균주를 액체배지에 접종한 후 30℃에서 24시간 배양하면서 균의 성장을 측정하고, 여액을 membrane filter로 여과한 후 thiocaynate법으로 측정한다 (Fig. 11).

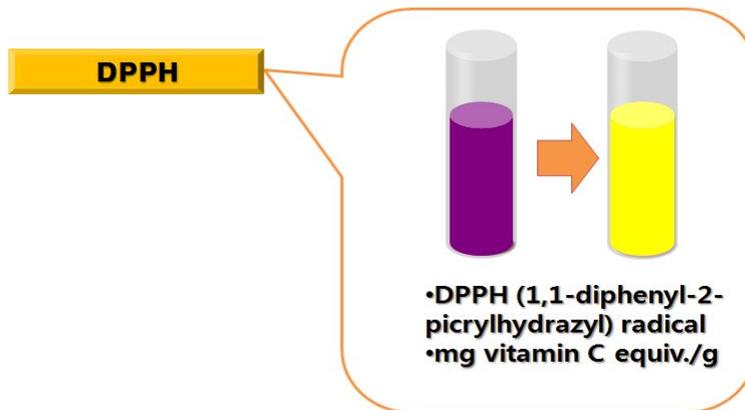


Fig. 11. DPPH radical scavenging activity measurement.

Bacillus amyloliquefaciens KCTC 1660

Bacillus licheniformis KCTC 1030

Bacillus subtilis KCTC 3014

나. 실험결과

채래된장으로부터 분리한 균주들의 항산화능은 대조군에 비해서 크게 더 우수한 것으로 나타났다 (Fig. 12).

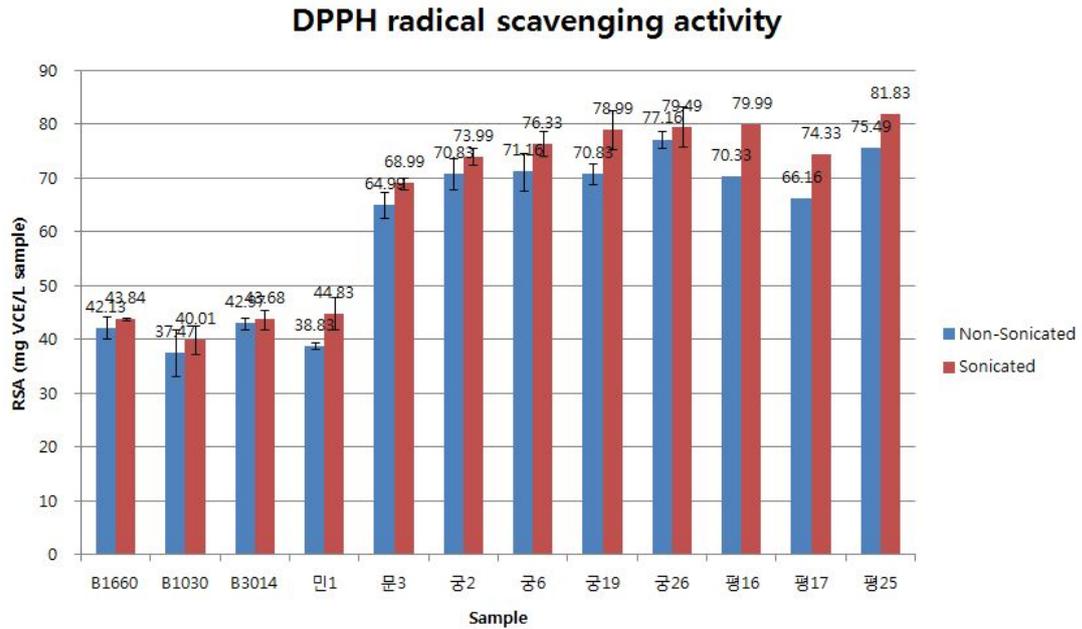


Fig. 12. DPPH radical scavenging activity.

4. ACE 저해활성

단백질 분해능과 혈진용해능이 우수한 73개의 균주로 angiotensin-converting-enzyme (ACE) 저해 활성을 측정하였다.

가. 실험방법

(1) 조효소액의 제조

0.3M NaCl을 함유한 0.1M sodium borate buffer(pH 8.3)에 rabbit lung acetone powder를 1g/10ml의 농도로 4℃에서 24시간 동안 추출한 후 30분간 원심분리(12,000rpm)하여 ACE 조효소액을 얻었다. 이를 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

(2) 균주 배양배지

균주의 ACE 활성 측정은 skim milk 배지와 soybean powder 배지를 둘 다 사용하여 각 균주들을 배양한 후 그 활성을 각각 측정하였다.

(3) ACE 저해활성의 측정

분리 선발된 균주의 배양상층액 30 μ l에 0.1M sodium borate buffer 40 μ l와 ACE 조효소액 30 μ l를 가한 다음 37℃에서 5분간 예비반응 시킨 후 0.3M NaCl이 함유된 0.1M sodium borate buffer (pH 8.3)에 10mM의 농도로 제조한 HHL(hippuryl-histidyl-leucine) 기질용액 200 μ l를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이에 1N HCl 250 μ l를 가하여 반응을 정지시킨 후 ethyl acetate 1.5ml를 가해 2분간 교반한 후 원심분리 (900 \times g, 5min)하여 상등액 1ml를 얻었다. 이 상등액을 95℃ thermo block에서 30분간 완전히 건조시킨 후 증류수 1ml을 넣고 228nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 측정하였다. 대조구로서는 균주 배양액 대신 배지용액을 가해 실험했으며 효소원을 첨가하기 전에 먼저 1N HCl 250 μ l를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 효소원을 첨가하였다.

ACE 저해활성효과는 다음 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ACE inhibition rate (\%)} = [1 - (S - SB) / (C - CB)] \times 100$$

S: absorbance of sample SB : absorbance of sample blank

C : absorbance of control CB : absorbance of control blank

나. 실험결과

혈전 용해능이 plasmin보다 우수한 20개의 분리균주들의 ACE 저해활성을 비교한 결과 (Table 9) 가장 저해활성이 높은 4개의 균주가 선발되었다. 이들 궁골19, 궁골26, 평양16, 평양25 균주를 기능성 된장 제조용 균주로 선발하였다. 분리균주들의 ACE 저해활성을 기존의 된장 유래 균주들과 비교하기 위해 5개의 *Bacillus* 균주들을 대조균으로 사용하였고 이들 대조균주들의 두 가지 배지에서의 ACE 저해활성을 Table 10에 나타내었다. 선발된 네 개의 균주들의 ACE 저해활성은 표준 균주로 사용한 *B. subtilis* KCTC 3014 (0.5±0.3%), *B. subtilis* KCTC6633 (17.2±2.1%), *B. licheniformis* KCTC1918 (0.8±0.5%), *B. licheniformis* KCTC1030 (22.5±1.5%), *B. amyloliquefaciens* KCTC1660 (69.4±1.1%)에 비해 더 높은 값이었다. ACE 저해활성이 있는 peptide는 인체의 항상성 유지를 목표로 하는 기능성 식품의 개발을 위해 크게 주목 받고 있다 (Ariyoshi, 1993). 본 연구에서 찾아낸 ACE 저해제의 특성에 관한 추가 연구가 필요하다. Soybean powder 액체배지는 ACE 저해활성 측정에 적합하다. 그 이유는 LB나 nutrient broth를 사용했을 경우 배지 자체로서 ACE 저해활성을 나타내었는데 soybean powder 액체배지는 그 자체로는 활성이 없었기 때문이다. *Bacillus*속의 alkaline serine protease에 의해 콩단백질을 가수분해하여 얻어진 peptide는 ACE 저해활성을 나타내었다는 보고가 있다 (Cha et al., 2005). 된장에서 분리한 균주들이 분비하는 단백질분해효소를 활용하여 ACE 저해활성이 있는 peptide제조도 가능하다고 본다.

Table 9. Comparison of the ACE inhibition rate

In skim milk broth

Strains	Inhibition %	Strains	Inhibition %
궁골 2	86.2	문정희 1	79.1
궁골 6	87.4	문정희 3	79.4
궁골 12	85.2	문정희 7	81.7
궁골 19	78.5	문정희 12	80.2
궁골 26	87.0	쌈 3	72.1
평양 16	83.5	쌈 5	87.3
평양 17	66.7	수경 3	84.6
평양 25	80.2	수경 7	74.6
평양 26	80.7	민속촌 1	86.5
평양 28	81.2	묘관 13	85.1

IC₅₀ : Protein concentration in sample (mg/ml) required to inhibit 50% of the ACE activity in soybean powder broth

In soybean powder broth

Strains	Inhibition %	Strains	Inhibition %
궁골 2	60.7	문정희 1	69.2
궁골 6	67.4	문정희 3	65.6
궁골 12	71.7	문정희 7	61.1
궁골 19	82.5	문정희 12	72.3
궁골 26	78.7	쌈 3	46.7
평양 16	74.5	쌈 5	68.7
평양 17	55.2	수경 3	48.4
평양 25	75.6	수경 7	59.3
평양 26	35.8	민속촌 1	48.0
평양 28	48.6	묘관 13	55.9

IC₅₀ : Protein concentration in sample (mg/ml) required to inhibit 50% of the ACE activity

Table 10. Comparison of the ACE inhibition rate

In skim milk broth

Strains	Inhibition %	Strains	Inhibition %
<i>B. subtilis</i> KCTC 3014	36.3	<i>B. subtilis</i> KCTC 6633	35.1
<i>B. licheniformis</i> KCTC 1918	23.5	<i>B. licheniformis</i> KCTC 1030	13.3
<i>B. amyloliquefaciens</i> KCTC 1660	87.3		

In soybean powder broth

Strains	Inhibition %	Strains	Inhibition %
<i>B. subtilis</i> KCTC 3014	-	<i>B. subtilis</i> KCTC 6633	17.2
<i>B. licheniformis</i> KCTC 1918	-	<i>B. licheniformis</i> KCTC 1030	22.5
<i>B. amyloliquefaciens</i> KCTC 1660	69.4		

제 3 절 기능성 된장 제조용 선발균주의 동정 및 내염성

균주의 단백질분해능, 혈전용해능, 항산화능, ACE 저해활성이 가장 우수한 4균주 (궁골 19, 궁골 26, 평양 16, 평양 25)를 SDS-PAGE whole cell protein pattern 분석과 16S rRNA sequence 분석을 통하여 동정하였다. 이 때 대조구로 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660, *B. subtilis* KCTC 3014, *B. licheniformis* KCTC 1030를 사용하였다. 또한, 이들 균주의 소금 10%에 대한 내성을 검토하였다.

1. SDS-PAGE whole cell protein 분석

가. 실험방법

된장으로부터 분리한 균주와 표준균주를 10 ml의 LB 배지에서 30℃에서 18시간 동안 배양한 후, 13,000g, 4℃에서 2분간 원심분리를 수행한다. 3차 증류수로 세척한 후, 원심분리를 수행하고 pellet에 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 50 μ l를 넣는다. 50mg의 glass beads (직경 425~600 micron; Sigma)를 첨가한 후 5분 동안 vortex를 실시하고, 동량의 sample buffer [2 x SDS sample buffer; 1M Tris-HCl/SDS (pH 6.8) 5%, glycerol 20%, 10 % sodium dodecyl sulfate 40%, 2-mercaptoethanol 4%, bromophenol blue 0.3%, H₂O 30.7%]를 넣고, 단백질 denaturation을 위해 95℃에서 7분간 boiling해 준다. 원심분리를 통해 cell debris를 down 시키고 상층액을 취하여 12% SDS-PAGE gel에 loading하여 전기영동을 실시한다. 전기영동 후, gel을 0.05% Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad)로 2시간 동안 staining하였고, 10% acetic acid, 30% methanol solution 으로 30분간 destaining을 수행한 후 비교 분석을 실시한다.

나. 실험결과

SDS-PAGE whole cell protein pattern을 분석한 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 표준 균주들의 SDS-PAGE 단백질 패턴을 비교한 결과 네 균주의 패턴이 모두 *Bacillus amyloliquefaciens* KCTC 1660와 유사하였다.

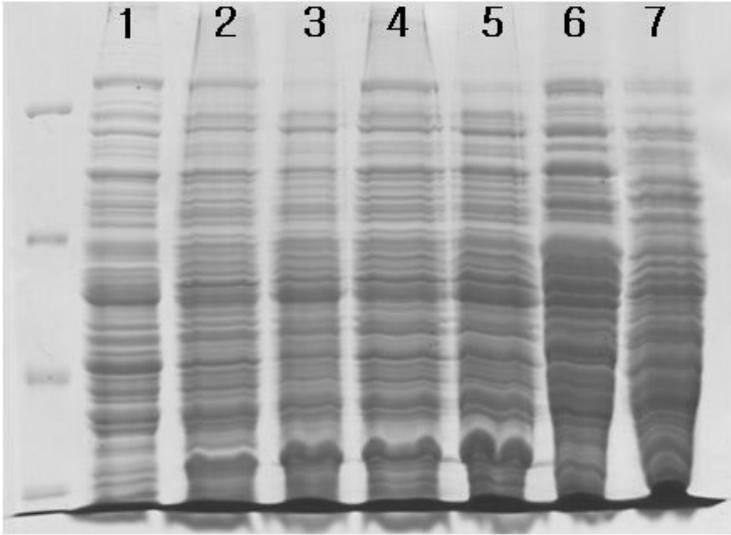


Fig. 13. 1 line : *B. amyloliquefaciens* 1660, 2 line : 궁골 19, 3 line : 궁골 26, 4 line : 평양 16, 5 line : 평양 25, 6 line : *B. subtilis* KCTC 3014, 7 line : *B. licheniformis* KCTC 1030.

2. 16S rRNA sequence 분석

가. 실험방법

LB 배지에서 배양한 후 Genomic DNA prep. kit를 이용하여 genomic DNA를 추출한 후 4°C에 보관하면서 사용한다. 추출한 genomic DNA를 universal primer를 이용해 16S rRNA gene 염기서열 부분을 증폭하여 실험에 이용한다.

사용한 primer는 27F 5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3' (16S rDNA position 8-27 of *E. coli*) 와 1492R 5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3' (16S rDNA position 1492-1513 of *E. coli*)이다.

PCR 산물의 DNA 염기서열을 확인하기 위하여 PCR products를 PCR purification kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 정제한 후, DNA sequencing에 이용한다. DNA 염기서열은ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Perkin Elmer, U.S.A.)를 사용하여 염기서열을 결정하며, 이것을 NCBI의 BLAST를 이용하여 GenBank database와 비교하여 분리균주를 동정한다.

나. 실험결과

네 개의 선발된 균주들의 SDS 분석 결과를 확인하기 위해 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과 Table 11에 나타낸 바와 같이 균주 4개 모두 *B. amyloliquefaciens*로 동정이 되었다. 이들은 *Bacillus amyloliquefaciens* HM107809와 99%의 상동성을 보였다. 따라서 분리 균주 네 개는 모두 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정하였다. *Bacillus*는 청국장이나 된장에서 흔히 발견되는 세균이며 특히 청국장에서 분리한 *B. amyloliquefaciens* CH51은 혈전용해능이 우수하고 혈전용해능을 보이는 단백질이 최소한 6개라는 보고가 있다 (Kim et al., 2009). 과거 *Bacillus* 속의 혈전용해능과 ACE 저해활성을 각각 연구한 보고는 있으나 (Kim et al, 2001, Choi et al., 2009) 이 두 가지의 활성을 동시에 고려하여 균주를 선발한 연구는 없다. 본 연구에서는 된장으로부터 단백질분해능과 혈전용해능, ACE 저해활성이 모두 높은 *Bacillus amyloliquefaciens* 네 균주를 분리, 선발 및 동정하였으며 이들 균주에 대한 연구가 좀더 진행된다면 기능성 된장의 개발에 활용할 수 있을 것으로 본다.

Table. 11. Analysis of 16S rRNA gene sequence

분리균주 명	동정된 균주명	유사도(%)
궁골19	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100 %
궁골26	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100 %
평양16	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100 %
평양25	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100 %

3. 내염성 검토

분리, 선발된 네 개의 균주들을 LB 배지와 10% NaCl이 첨가된 LB 배지에 접종하고 배양하면서 두시간 간격으로 흡광도를 측정하여 생육곡선을 비교하였다 (Fig. 14, 15, 16, 17). 10% NaCl이 존재시, 네 균주 모두 유도기간이 24시간 정도로 크게 늘어난 결과를 보였으며 이중 특히 궁골26은 유도기간이 30-32시간으로 가장 길었다. 소금이 첨가된 된장의 제조 조건에서 이들의 생육은 지연될 것으로 예측할 수 있었으며 이를 토대로 된장 제조시 배양기간을 결정하였다. NaCl을 첨가하지 않은 배지에서의 생육곡선은 네균주 모두 유사하였다 (Fig. 18).

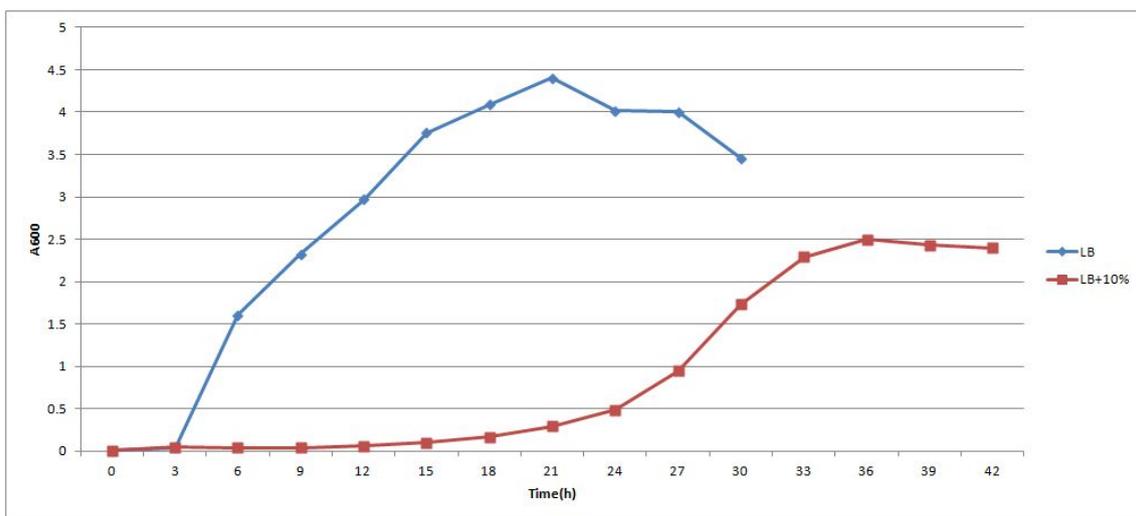


Fig. 14. Growth Curve (궁골19).

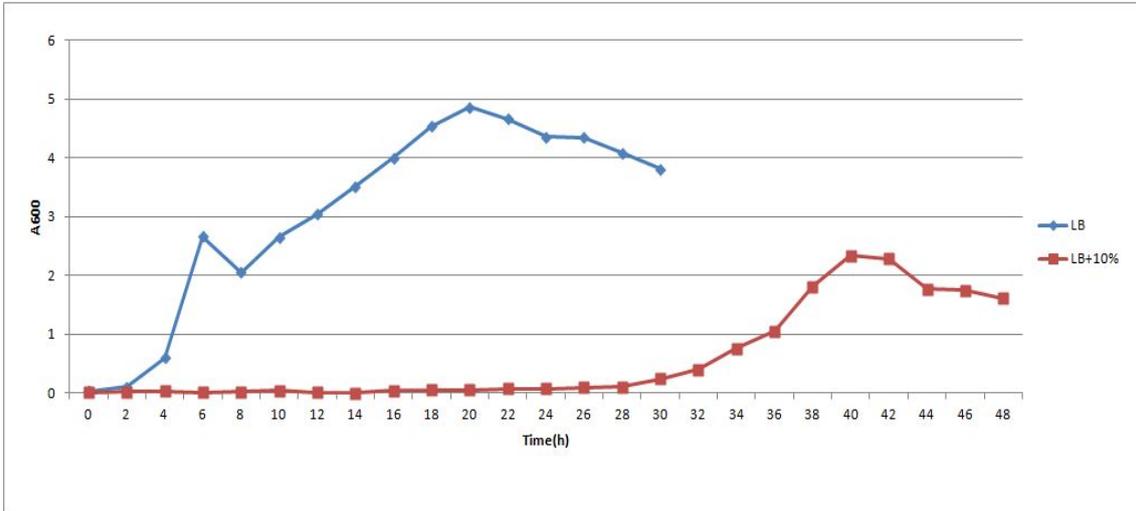


Fig. 15. Growth Curve (궁쿨26).

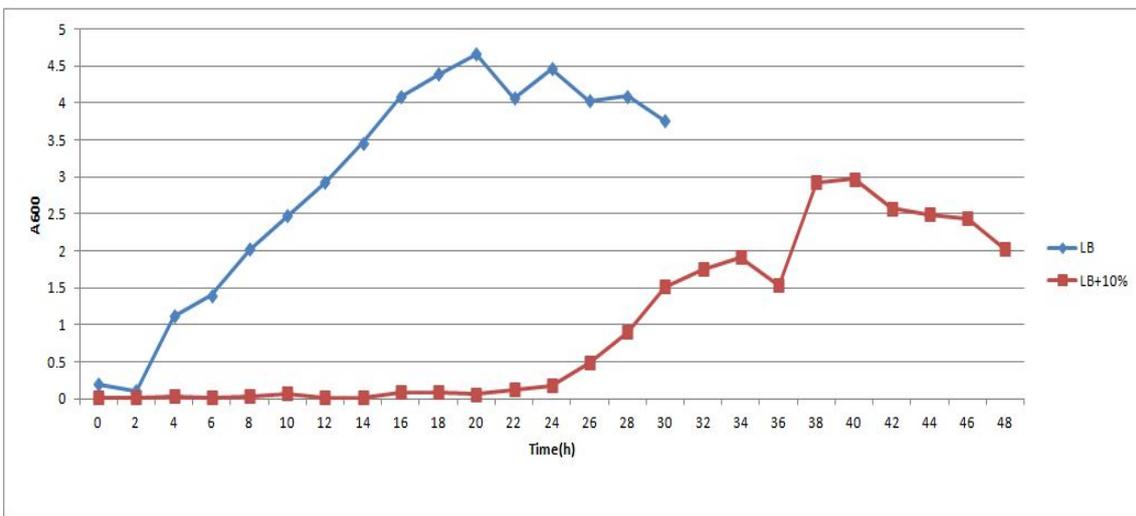


Fig. 16. Growth Curve (평양16).

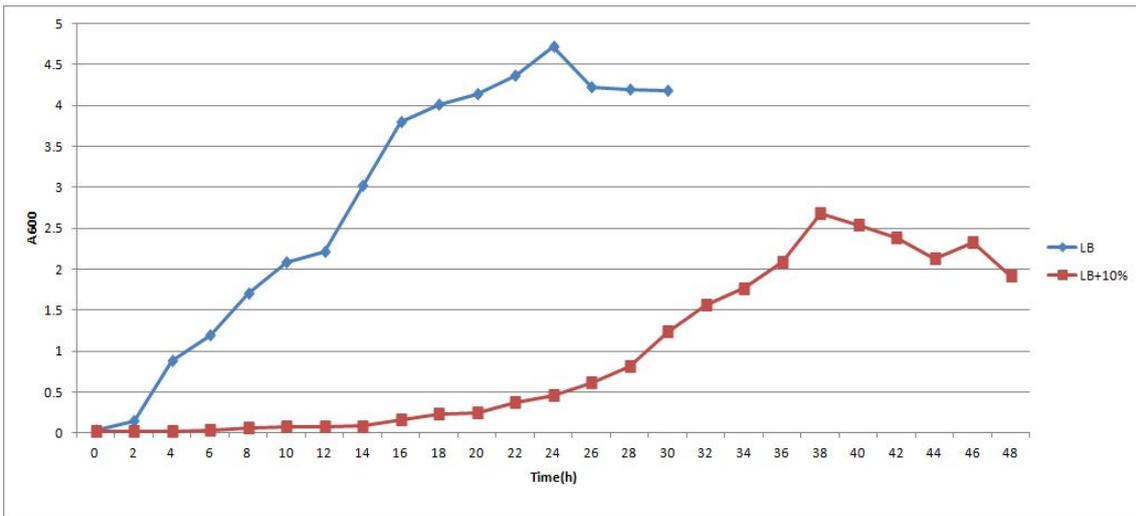


Fig. 17. Growth Curve (평양25).

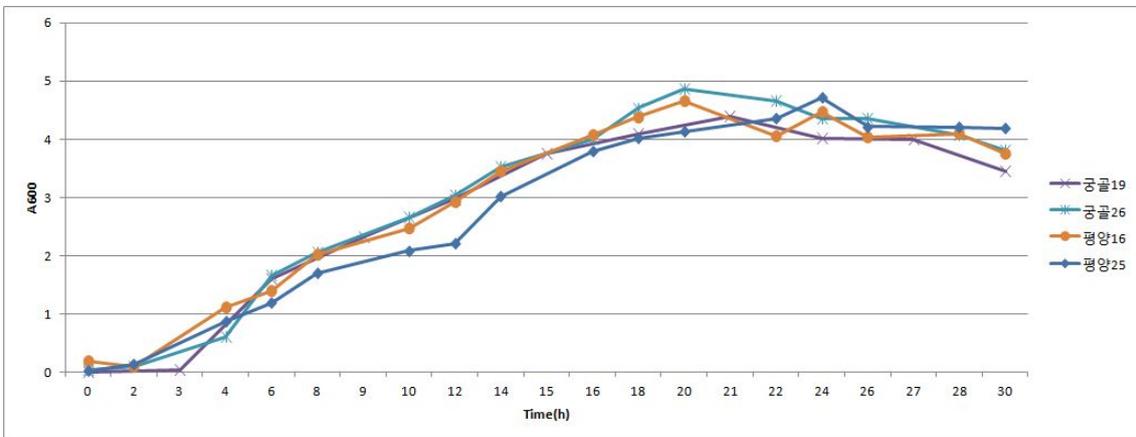


Fig. 18. Growth Curves for all 4 strains (LB).

제 4 절 한국, 중국, 일본 된장의 향 및 관능적 특성 분석

한국, 일본 중국의 생된장과 끓인된장 시료들의 향특성과 관능특성을 비교하였다.

1. 관능적 특성

가. 실험방법

(1) 관능검사 시료

한국 된장 14종과 일본미소, 중국된장을 사용하였다. 생된장의 경우 20g을 뚜껑이 달린 유리 용기에 넣어 제공하였다. 끓인 된장은 물 500ml과 된장 50g을 넣어서 3분 정도 끓인 후 그 된장국물을 뚜껑이 달린 유리 용기에 넣어 제공하였다 .

(2) 관능검사 항목 및 방법

생된장의 경우는 시료의 색, 향을 9점 척도법을 사용하여 평가하였다. 끓인 된장의 경우는 색, 향, 그리고 맛과 전체적인 기호도를 평가하였다. 한 개의 시료 평가 후 물로 입을 헹군 뒤 다른 시료를 수행하였으며 대학원생 30명을 대상으로 관능평가를 실시 한 뒤 그 점수들을 이용하여 각 된장별 평균 점수를 비교하였다. 유의차 분석은 SAS 통계프로그램을 이용하여 분석하였다.

나. 실험결과

(1) 한국된장 중 관능적 품질이 우수한 된장의 선별

(가) 생된장의 관능검사결과

생된장의 경우 순창 문옥례 우리콩 된장, 광주 특산 된장, 묘관스님 된장이 색과 향이 우수한 것으로 나타났다 (Table 12).

Table 12. 생된장의 관능검사 결과

Sample	색	향
수경산청된장	4.4	5.3
메주와 첼리스트	5.2	4.8
순창문옥례 우리콩된장	6.1	6.4
순창별미조선된장	2.8	5.2
순창문정희할머니된장	3.7	4.4
광주특산된장	6.4	5.1
민속촌 옛날된장	2.3	5.2
도림원 꽃감된장	3.6	5.4
묘관스님 된장	5.9	5.8
평양특산모란봉된장	4.9	5.0
물맑은양평 재래식된장	5.7	4.7
맑은손맛 찜된장	4.5	6.1
영평죽염된장	3.4	5.4
계룡산 궁골된장	4.8	3.8

(나) 끓인 된장의 관능검사결과

끓인 된장의 경우, 색은 물맑은 양평 재래식된장이 가장 높은 점수를 받았고 향은 맑은 손맛 쌈된장이 가장 좋은 향을 나타내었다. 맛은 순창 문옥례 우리콩된장, 물맑은 양평 재래식 된장, 맑은 손맛 쌈된장이 높은 점수를 받았다, 전체적인 기호도에서는 맑은 손맛 쌈된장, 순창 문옥례 우리콩된장, 물 맑은 양평 재래식 된장 순으로 높은 점수를 나타내었다 (Table 13).

Table 13. 끓인 된장의 관능검사결과

Sample	색	향	맛	전체적인 기호도
수경산청된장	5.0	3.7	4.1	4.6
메주와 첼리스트	4.5	3.7	3.8	3.9
순창문옥례 우리콩된장	5.8	6.1	6.0	6.4
순창별미조선된장	4.9	4	4.6	4.6
순창문정희할머니된장	4.9	4	4.6	4.6
광주특산된장	5.8	5.1	4.7	4.3
민속촌 옛날된장	4.4	4.0	5.1	5.0
도림원 꽃감된장	3.8	4.1	3.9	3.9
묘관스님 된장	5.9	5.6	5.6	5.0
평양특산모란봉된장	6.0	3.6	3.0	3.6
물맑은양평 재래식된장	6.4	5.9	6.3	6.2
맑은손맛 쌈된장	6.3	7.4	7.3	7.0
영평죽염된장	5.8	4.5	5.1	5.3
계룡산궁골된장	5.9	5.5	5.5	5.5

(2) 한국, 중국, 일본 된장의 관능적 특성 비교

(가) 생된장의 관능검사결과

한, 중, 일 3개국 된장의 일부 시료를 선택하여 관능검사를 실시한 결과 생된장의 경우 색에서는 한국 재래된장이, 향의 경우는 한국재래된장과 일본 된장이 우수하였다 (Table 14).

Table 14. 3개국 생된장시료의 관능검사 결과

된장 Sample	색	향
재래된장(한국)	6.3 ^a	6.8 ^a
시판된장(한국)	4.9 ^a	5.0 ^b
일본된장	5.6 ^a	6.7 ^a
중국된장	4.8 ^a	5.5 ^b

(나) 끓인된장의 관능검사결과

끓인 된장의 경우 색, 향, 맛 등에 있어 한국된장과 일본미소의 경우는 유의차가 거의 없는것으로 나타났으나 중국 된장의 경우 전체적으로 낮은 기호도를 나타내었다. 전체적 기호도에 있어서도 같은 경향을 나타내었다 (Table 15).

Table 15. 3개국 끓인된장의 관능검사 결과

된장 Sample	색	향	맛	전체적 기호도
재래된장(한국)	6.2 ^a	6.2 ^a	6.1 ^a	6.6 ^a
시판된장(한국)	5.4 ^a	5.9 ^{ab}	6.8 ^a	6.8 ^a
일본된장	5.9 ^a	6.5 ^a	6.3 ^a	6.7 ^a
중국된장	5.4 ^a	4.9 ^b	5.8 ^a	5.5 ^a

2. 향 특성

가. 실험방법

한국 된장은 관능검사의 결과를 바탕으로 가장 우수한 된장 3가지와 향이나 맛이 가장 낮은 점수를 받은 3가지 된장을 선택하였다. 그리고 일본미소, 중국된장도 1종씩 선택하여 분석하였다.

실험방법은 향기성분 포집을 위해 20ml의 vial에 2.5g의 된장 시료를 넣은 뒤 증류수 1.75ml과 내부표준용액 0.25ml(2-methyl-1-pentanol 10 µg/ml DW solution), NaCl 0.75g을 넣고 밀봉하였다. Vial은 각각의 가열 온도별(상온, 90°C)조건으로 하여 교반시키면서 10분 동안 fiber를 넣고 휘발성 성분을 흡착시켰다.

SPME fiber에 흡착된 각각의 향기성분은 GC/MS 6890으로 분석하였다. 실험에 사용한 column은 DB-WAX를 사용하였다. 이동상 기체는 Helium으로 유속은 1ml/min을 유지하였다. 오븐 온도는 40°C에서 5분간 유지한 후, 185°C까지 5°C/min의 속도로 상승시킨 후 20분간 유지하였다. 주입구 온도는 220°C였고 splitless model에서 분석하였다. MS의 분석 조건으로는 MS ionization voltage는 70eV, source temperature는 200°C, interface temperature는 280°C, mass spectrum scan range는 40-350m/z로 하였다.

휘발성 향기성분의 정량은 내부표준물질의 peak area와 동정된 휘발성 향기성분의 peak area의 비율로 나타내어 양을 비교하였다.

$$\text{ppm} = \frac{\text{Area of each compound} \times \text{Amount of internal standard}}{\text{Area of internal standard} \times \text{Amount of sample} / 10^6}$$

나. 실험 결과

향기성분을 분석한 결과 관능평가에서 높은 점수를 얻은 맑은 순맛 쌈된장의 경우, 30°C에서 총 40종, 90°C에서 총 72종의 화합물이 검출되었다. 물 맑은 양평 재래식 된장의 경우 30°C에서는 총 29종, 90°C에서는 총 75종의 화합물이 검출되었고, 순창 문옥례 우리콩된장은 30°C에서는 총 29종, 90°C에서는 70종의 화합물이 검출되었다 (Table 16).

반면, 관능평가에서 낮은 점수를 나타낸 세 가지 된장 중 메주와 첼리스트 경우 30℃에서는 총 40종의 화합물, 90℃에서는 총 100종의 화합물이 검출되었다. 수경산청된장의 경우는 30℃에서 총 29종, 90℃에서 총 75종의 화합물이 검출되었다. 그리고 평양특산모란봉된장은 30℃에서는 총 36종, 90℃에서는 총 92종의 화합물이 검출되었다.

그 중 된장의 주요 향기 성분으로 알려진 화합물들을 정리한 결과는 다음의 표에 나타내었다. 아래의 표에 나타난 향기성분들은 된장의 관능적 특성에 좋은 영향을 주는 것과 나쁜 영향을 주는 것들을 위주로 분류하여 나타내었다. 그 결과, 동정된 향기성분 중 재래된장에서 검출되는 좋지 않은 쿵쿵한 냄새의 원인이라 알려진 물질에는 3-methyl-1-butanol, hexanal, 1-octen-3-ol, 2-pentyl furan, benzeneacetaldehyde 등이 있는데 그 중 3-methyl-1-butanol과 benzeneacetaldehyde는 모든 된장에 존재하고 있었고, hexanal은 메주와 첼리스트 된장과 평양특산모란봉된장에 존재하고 있었다. 또한, green and beany odor의 핵심적 역할을 하고 있는 1-octen-3-ol은 메주와 첼리스트, 평양특산모란봉된장, 순창문옥례 우리콩된장, 일본 된장 내에 소량으로 존재하는 것을 확인 할 수 있었다. 산패취를 나타내는 향기성분인 2-pentyl furan은 주로 기호성이 나쁜 된장에 분포하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

이에 반해 재래된장의 고유의 맛과 향을 나타내는 향기성분인 2-furancarboxaldehyde, 2,5-dimethyl pyrazine, benzaldehyde, 2,3,5-trimethyl pyrazine, hexadecanoic acid, 9,12-octadecanoic acid 등은 아래의 된장들에서 검출되었다. 구수한 발효취를 나타내는 2,3,5-trimethyl pyrazine은 재래식으로 제조한 된장들에서만 존재하는 것을 알 수 있었고, 된장 특유의 맛과 향의 중요물질이지만 너무 많이 존재 시 시큼한 맛을 나타내는 hexadecanoic acid의 경우에는 평양특산모란봉된장과 일본된장을 제외하고는 모든 된장 (90℃)에 존재하는 것을 알 수 있었다. Benzaldehyde의 경우 대부분의 된장에 존재하였고, 2,5-dimethyl pyrazine은 기호성이 좋지 않은 메주와 첼리스트, 수경산청된장, 평양특산모란봉된장에서만 확인할 수 있었다. 이상의 결과들을 정리해보면, 관능평가에서 기호성이 좋은 것으로 나타났던 된장의 경우 그 된장들에서만 특별하게 나타나는 향 성분은 없었고 단지 나쁜 향기와 좋은 향기가 모두 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 관능평가에서 기호성이 떨어지는 것으로 나타난 된장들은 그 된장들에서만 나타나는 향을 확인할 수 있었다. 된장의 산패취를 나타내는 2-pentyl furan과 2,5-dimethyl pyrazine의 경우는 기호성이 떨어지는 3가지 된장에서만 확인할 수 있었다. 또한, 구수한 발효취를 나타내는 2,3,5-trimethyl pyrazine의 경우, 발효과정이 거의 없는

맑은 손맛 씹된장, 일본된장과 중국된장에서는 나타나지 않았지만 채래식 제조법으로 만든 된장들에서 검출되는 것을 확인할 수 있었다.

Table 16. 시판 된장의 GC-MS 향분석 결과

된장 및 온도 향기 성분	메주와 켈리스트		수경산청된장		평양특산모란봉된장		순창문옥계우리콩된장		물맑은양평채래식된장		맑은손맛 씹된장		중국된장		일본된장	
	30°C	90°C	30°C	90°C	30°C	90°C	30°C	90°C	30°C	90°C	30°C	90°C	30°C	90°C	30°C	90°C
Ethyl butanoate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ethyl-2-methyl butanoate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ethyl-3-methyl butanoate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetic acid	0.933	10.024	1.74	9.125	0.481	8.607	0.185	3.56	0.79	7.176	—	2.429	0.253	1.702	—	1.833
2-methylbutanoic acid	0.118	0.277	0.172	—	1.222	—	0.709	0.25	0.9	0.618	0.142	—	0.00608	—	—	—
3-methylbutanoic acid	0.73	—	0.189	2.107	1.059	—	0.156	—	0.449	0.441	0.202	—	—	—	—	—
2-furancarboxaldehyde	—	—	0.118	—	—	—	—	1.361	—	3.618	—	3.286	—	0.159	0.123	0.667
Benzaldehyde	0.426	4.951	0.134	3.006	0.336	14.571	—	2	0.226	7.676	—	1.714	0.00949	0.644	0.0784	2.5
5-methyl furfural	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Benzacetaldehyde	—	1.614	—	3.536	—	2.607	—	0.194	—	3.765	—	2	—	0.0385	—	2.833
2-phenyl-2-butenal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5-methyl-2-phenyl-2-hexanal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2-methoxyphenol	—	—	—	0.339	—	0.821	—	0.167	—	2.176	—	—	—	0.163	—	—
4-ethyl-2-methoxyphenol	—	0.289	—	0.179	0.0652	11.25	—	1.75	—	1.441	—	0.143	—	—	—	—
4-ethylphenol	—	0.711	—	—	—	11.857	—	1.056	—	2.176	—	0.429	—	—	—	—
2-methoxy-4-vinylphenol	—	0.265	—	0.387	—	0.536	—	1.583	—	0.882	—	0.714	—	0.817	—	1.667
4-vinylphenol	—	—	—	—	—	—	—	1.639	—	—	—	—	—	0.226	—	1.333
3-methyl-1-butanol	0.0859	—	—	0.125	0.0942	—	0.109	—	0.132	—	0.238	—	0.00997	0.0288	0.254	2.5
1-octen-3-ol	0.289	—	—	—	0.235	—	0.165	—	—	—	—	—	—	—	0.213	—
Phenethyl alcohol	—	—	—	0.631	—	—	—	—	—	1.382	—	0.286	—	—	0.299	—
2-pentyl furan	0.0747	0.108	0.0356	—	0.0724	—	—	—	—	0.235	0.094	—	0.0401	—	—	—
Tetramethyl-pyrazine	0.474	3.771	0.467	7.804	—	0.679	—	0.361	0.184	5.471	—	—	—	—	—	—
2,5-dimethyl pyrazine	0.102	0.928	—	0.851	—	1.214	—	—	—	0.382	—	—	—	—	—	—
2,3,5-trimethyl pyrazine	0.302	1.699	0.123	1.77	0.0551	0.929	—	0.361	0.042	0.882	—	—	—	—	—	—
Hexanal	—	0.179	—	—	—	0.571	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hexadecanoic acid	—	0.0722	—	1.113	—	2.536	—	4.056	—	0.676	—	0.143	—	0.13	—	7.167
9,12-octadecanoic acid	—	1.145	—	3.048	—	—	—	0.944	—	0.941	—	1.143	—	0.284	—	—

제 5 절 된장으로부터 분리된 기능성 균주를 이용하여 제조된 된장의 품질특성

1. 된장으로부터 분리된 기능성 균주를 이용한 된장의 제조

가. 스타터 제조

전통 된장에서 분리 동정하여 얻은 균주를 삶은 콩에 접종하여 스타터를 제조하였다. 균주는 30℃에서 24시간 전 배양하여 TSA 액체 배지에 접종한 후 12시간 배양한 것을 사용하였다. 준비된 균주 배양액을 원심분리(4,300×g, 15min, 4℃)하여 균체를 회수하고 회수된 균체를 멸균된 3차 증류수로 2회 수세하였다. 정선한 콩 1kg은 세척한 후 상온에서 15시간 침지시킨 후 100℃에서 2시간 30분 삶았다. 이를 으깨어 냉각 시키고 미리 준비해 둔 균주를 접종 하였으며, 35℃에서 48시간 배양하여 이를 스타터로 사용하였다.

나. 된장의 제조

제조된 스타터에 삶아서 으갠 콩 4kg을 섞고 소금을 함께 섞은 후 스타터와 마찬가지로 35℃에서 48시간 배양하였다. 이렇게 제조한 5kg의 된장에 동량의 삶아 으갠 콩 5kg과 소금을 섞어 최종 10kg의 된장을 제조하였다. 각 단계에서 넣은 소금의 농도는 최종 제조 된장의 소금농도가 10%가 되도록 첨가 하였다. 이와 같은 단계를 거쳐 제조된 된장을 35℃에서 24시간 배양한 후 20℃ 에 옮겨 4개월 간 숙성 시키면서 1개월 간격으로 시료를 채취하였다.

2. 단백질분해능, 혈전용해능, 항산화능, ACE 저해활성이 우수한 네 개 균주를 이용하여 제조한 된장의 품질 특성 비교

단백질분해능과 혈전용해능, 항산화능, ACE 저해활성이 우수한 네 개의 *B. amyloliquefaciens* 균주를 사용하여 *Bacillus* 코지 된장을 제조한 후 그 향 및 이화학적 특성을 분석, 비교하여 된장 발효 중 이취성분을 적게 생산하는 균주를 선택하고자 하였다. 시판 재래된장과 개량된장을 함께 비교하였다. 4균주로서 공골19, 공골26, 평양16, 평양25를 각각 KHG19, KHG26, KHP16, KHP25로 이름붙였다.

가. *Bacillus* 코지 된장의 pH와 수분함량, 세균수, 색도 측정

(1) 실험방법

된장 숙성 중 1, 2, 3, 6개월째에 시료 5 g을 채취하여 증류수 45 mL로 희석하여 pH meter (Orion Star Series, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)로 pH를 측정하였다. 수분함량은 3 g의 시료를 사용하여 135°C에서 2시간 동안 건조시키고 데시케이터에서 식혀 무게를 측정하는 것을 항량에 도달할 때까지 반복하였다 (AOAC, 1990). TSA (tryptic soy agar) 평판배지에 10배 단위로 희석한 시료 100 mL씩을 도말하여 30°C에서 18시간 배양 후 나타난 콜로니를 계수하였다. 된장의 색도는 투명하고 납작한 용기에 시료를 단단히 눌러 채워 색도계 (Colorimeter JC801, Color Techno System Co., Tokyo, Japan)로 명도 (L value)와 적색도 (a value), 황색도 (b value)를 측정하였다. 모든 분석은 3회 반복 하였다.

(2) *Bacillus* 코지 된장의 pH, 수분함량, 세균수, 색도 변화 결과

Table 17에서 볼 수 있듯이 pH는 전체적으로 5.30-5.75의 범위에 분포하였다. 이는 문헌 (Kim et al., 2006)에 보고된 전통된장들의 값인 4.80-6.11 내에 포함되는 값이었다. 수분함량은 1개월째에 55.8-57.8%로 분석되었고, 3개월째에는 55.1-57.3%로 감소하였으며 6개월째에는 53.1-54.2%로 감소하였다. 수분함량 값은 문헌 (Kim et al., 2006)에 보고된 재래된장들의 값인 56.1-63.3%에 비해 약간 낮았다. 세균수는 네 시료들 간에 차이가 없었고 6개월 숙성기간 중 10^6 - 10^7 CFU/mL를 유지하였다. 명도는 숙성 중 감소하였고 적색도와 황색도는 증가하였다. 이는 문헌 (Kim et al., 2006)에 보고된 전통된장들의 색도와 비교했을 때 모두 더 높은 값이었다. 이화학적 성분들은 네 시료들 간에 큰 차이가 나타나지 않았으며 문헌 (Kim et al., 2006)에 보고된 전통된장의 값들과도 크게 다르지 않았다.

Table 17. Changes in pH, moisture content, bacterial viable cell numbers, and color of *Bacillus-koji doenjang* samples during 6 months of aging

Aging Period (months)	Samples	pH	Moisture content (% w/w)	Bacterial viable cells on TSA(CFU/mL)	Color (L*a*b)
1	KHG 19	5.75	55.8	8.0×10^6	53.7*10.3*26.9
	KHG 26	5.39	56.2	7.1×10^6	53.8*10.3*26.7
	KHP 16	5.46	56.8	7.0×10^6	54.1*9.5*26.9
	KHP 25	5.45	57.8	9.4×10^6	53.3*10.5*27.3
2	KHG 19	5.42	57.7	5.2×10^6	51.2*10.5*27.8
	KHG 26	5.33	55.9	7.1×10^6	51.3*10.0*27.5
	KHP 16	5.33	57.7	5.6×10^6	52.5*9.7*27.2
	KHP 25	5.30	58.5	8.8×10^6	51.0*10.0*26.7
3	KHG 19	5.69	56.3	8.8×10^6	47.8*10.4*27.7
	KHG 26	5.40	55.1	6.9×10^6	48.4*10.2*27.5
	KHP 16	5.51	55.4	9.5×10^6	47.6*10.3*27.7
	KHP 25	5.48	57.3	6.5×10^6	47.3*10.4*27.5
6	KHG 19	5.54	53.1	1.2×10^7	42.3*13.8*32.9
	KHG 26	5.39	53.4	1.0×10^7	42.8*14.0*33.6
	KHP 16	5.38	53.7	1.3×10^7	42.8*14.9*35.4
	KHP 25	5.43	54.2	1.3×10^7	43.4*13.8*32.1

나. *Bacillus* 코지 된장과 시판 된장의 HS-SPME-GC-MS에 의한 휘발성향 분석

(1) 실험방법

된장시료의 휘발성 화합물 분석에는 3개월 숙성된 시료를 사용하였다. SPME 장치는 Supelco 57347-U (Bellefonte, PA, USA)를 사용하였고 fiber는 divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, Supelco 57299-U, with 50/30 μm film thickness)를 사용하였다. Autosampler는 Gerstel MPS2 (Gerstel GmbH & Co., Mulheim an der Ruhr, Germany)를 사용하였다.

시료 2 g을 1.75 mL의 물과 0.75 g의 NaCl과 혼합하여 SPME vial에 넣고 autosampler의 온도를 30°C와 90°C로 각각 조정하여 30분간 정치하였다. SPME fiber에 휘발성 화합물들을 10분간 흡착시킨 후 GC의 주입구에서 220°C로 splitless mode로 2분간 탈착하였다. GC (G1530A)와 MS (HP5973)는 Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) 제품을 사용하였고 컬럼은 DB-Wax capillary column (Agilent 19091X-133, 30 m x 0.25 mm I.D. with 0.25 μm film thickness, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)을 사용하였다. 컬럼 오븐 온도는 40°C에서 5분간 유지한 후 185°C까지 분당 5°C의 속도로 증가시킨 다음 200°C에서 20분간 유지시켰다. Carrier 가스는 헬륨을 분당 1.0 mL의 유속으로 조절하여 흘려주었다. MS의 이온화 온도는 250°C로, interface 온도는 280°C, 이온화 전압은 70 eV였다. MS는 scan mode로 사용하였고 질량스펙트럼 범위는 40-350 m/z였으며 threshold는 15였다. 검출된 peak들은 Wiley library (W8N05ST, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 동정하였다.

(2) GC-MS에 의한 *Bacillus* 코지 된장과 시판 된장의 휘발성 화합물 분석 결과

검출된 휘발성 화합물들을 Table 18에 정리하였다. 30°C 추출 시에는 총 60개의 휘발성 화합물이 검출되었고 90°C 추출 시에는 총 90개의 휘발성 화합물이 검출되었다. 90°C에서 추출한 경우 30°C 추출보다 추가로 더 검출된 물질들은 알데히드, 휘발성 페놀 화합물, 고급 지방산과 그들의 에스테르 화합물들이었으며 가열 처리 시 생성되는 maltol도 검출되었다.

Bacillus 코지 된장과 시판 된장의 휘발성 화합물 분포 차이는 에스테르 화합물에서 가장 뚜렷하였다. 시판 된장, 특히 S 시료는 *Bacillus* 코지 된장들에 비해 훨씬

더 많은 종류의 에스테르 화합물들이 검출되었다. 이들 물질들로는 ethyl acetate, ethyl butanoate, ethyl 2-methyl butanoate, ethyl 3-methyl butanoate, ethyl hexanoate, 4-methyl-ethyl octanoate, ethyl phenylacetate이었으며 이 화합물들은 미소나 *sufu*를 비롯하여 다른 된장들에서도 검출된 바 있다 (Chung et al., 2005, Joo와 Shin, 2004, Ku et al., 2000, Park et al., 1994, Shin과 Joo, 1999). Ethyl ester of tetradecanoic, pentadecanoic, hexadecanoic, octadecanoic, octadecadienoic acid와 같은 고급 지방산의 에스테르들은 S 시료에서만 검출되었다 (Table 18). 고급 지방산의 에스테르는 콩의 지방이 효모나 곰팡이 유래의 lipase에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다 (Chou와 Hwan, 1994).

시판 된장의 제조법은 *Aspergillus oryzae*를 밑에 번식시킨 코지를 사용하거나 또는 공기중의 다양한 미생물이 번식한 메주를 사용하므로 이들 미생물 분포의 차이가 다양한 에스테르 화합물의 전구체를 형성하게 된다고 볼 수 있다. 추출 온도를 90°C로 올렸을 경우 탄소수 12개 이상의 고급지방산 에스테르의 휘발성이 증가함으로써 30°C에서 추출한 경우보다 고급 지방산의 에스테르는 더 많이 흡착되어 검출되었고 반대로 저급 지방산의 에스테르는 30°C 추출 보다 상대적으로 덜 검출되었음을 볼 수 있다 (Table 18). 고급 지방산의 에스테르는 끓인 된장에서 검출되었다는 보고들이 있다 (Joo와 Shin, 2004, Park et al., 1994, Shin과 Joo, 1999, Lee와 Ahn, 2008). *Bacillus* 코지 된장의 경우 90°C 추출의 경우 30°C 추출보다는 좀 더 많은 에스테르 화합물이 검출된 것으로 미루어볼 때 추출온도가 상승하면 에스테르 화합물의 휘발성이 전체적으로 증가함을 알 수 있었다. 그 예로 ethyl hexadecanoate는 30°C에서는 S 시료에서만 검출 되었는데 90°C에서는 모든 시료에서 검출되었다 (Table 18). Ethyl benzoate는 두 온도에서 모두 S 시료에서만 검출된 성분이다 (Table 18).

알코올은 총 14종의 화합물이 검출되었다. 1-Octen-3-ol은 일반적으로는 버섯냄새를 나타내고 *Bacillus*를 사용하여 제조한 된장에서는 삶은 콩 냄새를 나타내는 성분 (Kim et al, 2012, Chang과 Chang, 2007)으로 모든 시료에서 검출되었다 (Table 18). 이 물질은 lipoxygenase나 hydroperoxide lyase의 효소 작용에 의해 리놀렌산이나 리놀렌산으로부터 생성된다고 보고되었다 (Lee와 Ahn, 2009, Tressl et al., 1982, Wurzenberger와 Grosh, 1986, Mosandl et al., 1986, Eng-Leun et al., 1992). Phenylethyl alcohol은 시판 된장들에서만 검출 되었고 1-hexanol과 2, 3-butanediol은 *Bacillus* 코지 된장 시료들에서만 검출되었다 (Table 18). 세균은 pyruvate로부터 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) 등의 중간 물질을 거쳐 2, 3-butanediol을 생성

할 수 있는데 (Madigan과 Martinko, 2006) 이 중간물질인 3-hydroxy-2-butanone도 역시 *Bacillus* 코지 된장들에서 검출되었다 (Table 18). 1-Hexanol은 리놀레산의 산화를 통해 생성된다 (Lee와 Ahn, 2009, Tressl et al., 1982, Wurzenberger와 Grosh, 1986). *Bacillus* 코지 된장에서는 phenylethyl alcohol이 검출되지 않았으며 이 알코올의 에스테르인 ethyl phenylacetate 또한 *Bacillus* 코지 된장 시료에서는 검출되지 않았다. Phenylethyl alcohol은 효모에 의해 phenylalanine으로부터 생성되는데 (Vuralhan et al., 2003) *Bacillus* 코지 된장 발효에는 효모가 관여하지 않으므로 이를 설명할 수 있다. 30°C에서 추출한 경우, 시판 재래 된장인 M 시료가 가장 다양한 알코올이 검출되었다. 3-Methyl-1-butanol은 30°C 추출에서는 거의 모든 시료에서 다 검출되었는데 90°C 추출에서는 한 시료를 제외하고는 검출되지 않았다 (Table 18). 이 물질은 *Bacillus* 코지 된장의 향 성분으로 보고되었는데 (Chang과 Chang, 2007) 끓인 된장에서는 검출되지 않았다는 보고들이 있다 (Park et al., 1994, Shin과 Joo, 1999, Lee와 Ahn, 2008, Jeong et al., 2008). 시판 된장의 경우 추출 온도가 상승하면 검출되는 알코올의 종류가 감소하였으나 *Bacillus* 코지 된장의 경우는 추출 온도가 상승하면 상대적으로 좀 더 많은 종류의 알코올이 검출되었다.

모두 8종의 산이 30°C 추출에서 검출되었다. 저급 지방산들인 butanoic acid, 2/3-methyl butanoic acid, 2-methyl propanoic acid, pentanoic acid, hexanoic acid는 된장의 불쾌한 냄새, 파마산 치즈, 시큼한 냄새, 땀 냄새, 신 과일의 향, 사과 껍질, 산패취, 자극적이고 톡 쏘는 냄새 등으로 묘사된다 (Chang과 Chang, 2007, Chung et al., 2005, Lee와 Ahn, 2009, Zhang et al., 2010, Chen et al., 2011). 3-Methylbutanoic acid (isovaleric acid)는 톡 쏘는 치즈 냄새, 땀 냄새, 양말 고린내로 묘사되는데 이의 에스테르는 과일향을 나타낸다 (Jo et al., 2011). 이 저급 지방산들은 종종 청국장이나 *natto*의 고린내 성분으로 묘사된다 (Chang과 Chang, 2007, Choi와 Ji, 1989, Kim et al., 2010). KHG 19 시료에서는 30°C에서 추출 했을 때 이 성분이 검출되지 않았다 (Table 18). 다른 *Bacillus* 코지 된장 시료들은 90°C에서 추출 했을 때 일부 불쾌취 성분이 검출되었다. KHG 19는 90°C에서도 3-methyl butanoic acid를 이외에는 불쾌취 성분이 검출되지 않았다 (Table 18). 시판 된장 시료들의 불쾌취 성분은 추출 온도와 무관하게 비슷하게 검출되었다.

알데히드 화합물로는 30°C에서 benzaldehyde, 2-furancarboxaldehyde, E-11-hexadecenal이 검출되었고 90°C에서는 benzaldehyde, 2-furancarboxaldehyde, benzacetaldehyde가 모든 시료에서 검출되었다 (Table 18). 이 물질들은 Maillard 반응의 산물로 생각되고 있다 (Kim et al., 2012, Ferreti와 Flanagan, 1971, Yoo,

2001). 90°C 추출에서 대부분의 시료에서 검출된 furfuryl alcohol과 benzyl alcohol 또한 Maillard 반응의 산물이다 (Kim et al., 2012, Ferreti와 Flanagan, 1971, Yoo, 2001). Benzaldehyde와 2-furancarboxaldehyde는 한국 재래 된장 특유의 냄새 (Chang과 Chang, 2007) 또는 *Bacillus subtilis*로 제조한 된장의 향 성분으로 보고되었다 (Kim et al., 2012). 일반적으로 알데히드는 달콤한 향, 견과류 향, 아몬드, 체리, 카라멜 향 등으로 묘사된다 (Kim et al., 2012, Chang과 Chang, 2007, Lee와 Ahn, 2009, Kim et al., 1993, Kim et al., 1993). *Bacillus* 코지 된장의 알데히드 분포는 시판 된장들과 비슷하였다. 케톤류 중 3-hydroxy-2-butanone (acetoin)이 30°C 추출에서 모든 *Bacillus* 코지 된장에 존재하였다 (Table 18). 3-hydroxy-2-butanone은 된장에서 butter향을 나타낸 것으로 보고된 바 있다 (Su et al., 2000). 90°C 추출의 경우, *Bacillus* 코지 된장의 케톤류의 분포가 시판 된장보다 좀 더 다양하였다 (Table 18).

피라진 화합물은 콩 발효 제품의 풍미에 매우 중요한 화합물들이다 (Park et al., 1994, Shin과 Joo, 1999). 된장의 제조는 가열 처리를 동반하며 단백질이 가열 처리에 의해 분해되어 피라진 형성을 유도한다 (Lee와 Ahn, 2009, Mori et al., 1983). 단백질이 풍부한 식품의 경우 일반적으로 피라진이 비효소적으로 생성되기도 하나 발효 도중 미생물의 작용에 의해서도 생성될 수 있다 (Sugawara et al., 1985). 두 추출 온도에서 모두 피라진은 시판 된장에서 주로 검출되었다. *Bacillus* 코지 된장 시료들 중에서는 KHG 19만이 90°C에서 trimethyl pyrazine이 검출되었다 (Table 18). 피라진 화합물은 *Bacillus* 속의 균주를 이용하여 제조한 된장에서 검출되었다고 보고된 바 있으며 (Chang과 Chang, 2007) *Aspergillus* 코지로 제조한 개량 된장 보다는 메주로 제조한 재래 된장에서 좀더 중요한 향 성분으로 여겨진다는 보고도 있다 (Lee와 Ahn, 2008). 본 실험에서 검출된 피라진 화합물들을 비롯한 알킬 피라진들은 일반적으로 견과류, 커피, 진흙, 코코아, 참기름, 구운 감자향으로 묘사된다 (Lee와 Ahn, 2009). 본 실험에서 제한된 수의 피라진이 검출되었는데, 이는 아마도 휘발성 화합물의 추출 방법 때문인 것으로 사료된다. Steam distillation이 피라진 추출에 SPME보다 효율적이라는 보고가 있으며 (Chen et al., 2011) 피라진 정량을 목적으로 하는 연구 보고들에서는 steam distillation이 추출법으로 사용되었다 (Larroche et al., 1999, Zhu et al., 2010). 본 실험의 목적은 *Bacillus* 코지 된장의 휘발성 화합물 분포를 시판 된장과 비교하는 것이므로, 이를 위해서는 SPME가 더 적합한 추출 방법이었다고 본다.

2-Methoxy-phenol (guaiacol), 4-ethyl-2-methoxy-phenol (4-ethyl guaiacol),

4-vinyl phenol, 2-methoxy-4-vinyl phenol은 삶은 콩, 바베큐향, 스모크향, 달콤한 향, 페놀 냄새 등으로 묘사되는 (Lee와 Ahn, 2009, Cullere et al., 2004) 휘발성 페놀 화합물들이며 본 실험에서 시료들로부터 검출되었다. 이 화합물들은 콩의 리그닌에 함유된 페놀 화합물들의 분해 산물로 간주되고 있으며 (Van과 Schutte, 1978), 불쾌한 냄새와 함께 제품에 쓴맛을 부여하는 것으로 보고되었다 (Conterno et al., 2006, Gribin과 Henschke, 2000). 본 실험에서는 시판 된장 시료들이 두 추출 온도에서 모두 더 많은 수의 휘발성 페놀 화합물들이 검출되었다 (Table 18).

Sufu (Chung et al., 2005)와 된장 (Joo와 Shin, 2004, Park et al., 1994, Shin과 Joo, 1999)에서 검출된 것으로 보고된 2-pentyl furan은 시판 된장인 S 시료에서 두 추출 온도에서 모두 검출되었다. 퓨란은 당류의 탈수에 의해 또는 Maillard 반응 산물의 분해, 리놀렌산의 자동산화 과정의 부산물로서 생성된다 (Fors, 1983). Maltol은 90°C 추출에서 모든 시료에서 검출되었고 꿀, 솜사탕, 카라멜, 말트, 견과류빵, 버터스카치 등으로 묘사되는 향 특성을 갖는 물질이다 (Fors, 1983, Ho와 Carlin, 1989). 따라서 maltol은 된장에 구수한 구운향을 부여할 것으로 생각된다. Maltol은 2-pentylfuran과 함께 발효 콩 제품의 주요한 향으로 간주되며 제조 과정 중 수반되는 열처리에 의해 그 함량이 증가된다고 보고되었다 (Fors, 1983). 이들 물질은 고농도로 존재할 경우 콩 발효 제품에 쓴맛을 부여한다고 보고되기도 하였다 (Beaumont, 2002).

Table 18. Volatile compounds identified in *Bacillus-koji* and commercial *doenjang* samples under two different extraction temperatures

Volatile compounds	Samples ¹											
	30°C SPME extraction						90°C SPME extraction					
	K H G 19	K H G 26	K H P 16	K H P 25	M	S	K H G 19	K H G 26	K H P 16	K H P 25	M	S
Esters												
ethyl acetate	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
ethyl butanoate	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
ethyl 2-methyl butanoate	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
ethyl 3-methyl butanoate	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
ethyl 2-methyl pentanoate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
methoxy-ethyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4-methyl-ethyl pentanoate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ethyl hexanoate	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
ethyl 2-hydroxy propanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ethyl 5-methylhexanoate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4-methyl-ethyl octanoate	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
ethyl 2-hydroxypropanoate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ethyl octanoate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
butyl heptadecyl sulfuroate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ethyl benzoate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
hexadecyl trichloroacetate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ethyl phenylacetate	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
ethyl dodecanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2-methyl-hexyl propanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2-methyl-2-methylpropyl propanoate	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
ethyl tridecanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ethyl tetradecanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ethyl tetradecanoate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
ethyl pentadecanoate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
butyl benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2-octyl benzoate	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
methyl hexadecanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ethyl hexadecanoate	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
methyl 14-methylpentadecanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ethyl heptadecanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ethyl E-11-hexadecenoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
methyl 9,12-octadecadienoate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
(z)-methyl9-octadecenoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ethyl octadecanoate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
ethyl 9-octadecenoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

ethyl oleate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ethyl(9z,12z)-9,12-octadecadienoate	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
ethyl linoleate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ethyl 9,12,15-octadecatrienoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Alcohols												
ethanol	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
2-methyl-1-propanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2,2-dimethyl-1-butanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1-butanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3-methyl-1-butanol	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
2-methyl-1-butanol	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1-hexanol	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
3-octanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1-octen-3-ol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2,3-butanediol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
2-pentadecanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2-octanol	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2,3,4-trimethyl-3-pentanol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
furfuryl alcohol	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
benzyl alcohol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
phenylethyl alcohol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Acids												
acetic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
propanoic acid	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2-methyl-propanoic acid	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
butanoic acid	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
3-nitropropanoic acid	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3-methyl-butanoic acid	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
pentanoic acid	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
3-methyl-pentanoic acid	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
hexanoic acid	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
heptanoic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
octanoic acid	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
nonanoic acid	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
(z,z)-9,12-octadecadienoic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
benzenecarboxylic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
14-pentadecenoic acid	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
benzeneacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Aldehydes												
3-methyl-butanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
nonanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2-furancarboxaldehyde	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
benzaldehyde	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
benzacetaldehyde	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3-methyl-benzaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2-methyl-benzaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

(z)-7-hexadecenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
E-11-hexadecenal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-methyl-2-phenyl-2-hexenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ketones												
acetone	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2-propanone	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
2,3-butanedione	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
3-octanone	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3-hydroxy-2-butanone	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
1-phenyl-ethanone	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2-pentadecanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
5-hexyldihydro-2(3H)-furanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Sulfur compounds												
dimethyl disulfide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
methanesulfonic anhydride	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
allyl isothiocyanate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1,3-dimethylthioindole	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ethyl thioisobutyrate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1-docosanethiol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-ethyl-hydrazinecarbothioamide	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Pyrazines												
2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
trimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
2,3,5,7-tetramethyl pyrazine	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Volatile phenol												
2-methyl-phenol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
2-methoxy-phenol	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
phenol	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4-ethyl-2-methoxy-phenol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
2-ethyl-phenol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4-ethyl phenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2-methyl-4-vinylphenol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
2-methoxy-4-vinylphenol	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
2,6-dimethoxy-phenol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
4-vinylphenol	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Miscellaneous												
2-pentyl-furan	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1-octene	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1,2-dimethoxy-benzene	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1,3-dimethoxy-benzene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
6-methyl-2-phenylindole	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
maltol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
4-phenyl-pyridine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2,3-dihydro-benzofuran	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

¹ KHG 19, KHG 26, KHP 16, and KHP 25, *Bacillus-koji doenjang* made with 4 different *Bacillus amyloliquefaciens* strains; M, a traditional commercial *doenjang* made with *meju*; S, a modified commercial *doenjang* made with *Aspergillus-koji*

다. *Bacillus* 코지 된장과 시판 된장의 관능검사

(1) 실험방법

3개월 숙성된 시료 5 g을 뚜껑이 있는 50 mL 용기에 담고 용기에 난수표를 사용하여 세자리 숫자로 표시하여 시료를 구분하였다. *Bacillus* 코지 된장 시료 네 개와 시판 된장 시료 2개를 동시에 제시하였고 시료의 온도는 실온 (25℃)과 90℃ 두 가지로 조절하였다. 90℃ 시료는 뜨거운 물을 15 mL씩 부어 사용하였다. 관능검사 경험이 있는 20명의 패널요원을 경희대학교 식품공학과 대학원생 중 선발하였다. 시료의 맛과 향, 색에 대한 기호도와 전체적인 기호도를 순위법 (Lawless와 Heymann, 1998)으로 평가하였다. 가장 선호하는 시료에 1을, 가장 싫어하는 시료에 6을 주도록 하였다. 단맛과 깔끔한 맛에 대한 기호도 또한 별도로 실시하였다. 순위합계는 Basker표 (Lawless와 Heymann, 1998)의 한계차이값과 비교하여 결과를 분석하였다. 된장의 고린내 (치즈냄새)의 강도는 9점 선척도를 사용하여 채점법 (Lawless와 Heymann, 1998)으로 평가하였다. 표준시료는 2 g의 블루치즈와 6 g의 재래된장시료를 50mL의 물과 혼합하여 제조하였으며 표준시료의 강도를 선척도의 중간 값으로 패널요원에게 제시하였다. 분산분석과 다시료검정을 결과 분석에 사용하였다 (Lawless와 Heymann, 1998).

(2) *Bacillus* 코지 된장과 시판 된장의 관능검사 결과

네 개의 *Bacillus* 코지 된장 시료와 두 개의 시판 된장 시료들은 전체적인 기호도에서는 두 온도에서 모두 차이를 보이지 않았다 (Table 19). 20명의 패널요원을 사용한 경우 6개 시료의 한계차이값은 Basker표에서 33.7이지만 (Lawless와 Heymann, 1998) 각 시료들간의 차이는 이보다 작았다. 향과 맛의 기호도 차이 또한 없었다 (Table 19). 그러나 단맛과 깨끗한 맛의 기호도 검사에서는 통계적 유의한 차이는 아니었으나 시판 된장의 단맛과 *Bacillus* 코지 된장의 깨끗한 맛을 좀 더 선호하는 것으로 나타났다 (Table 19). 색깔의 기호도는 된장 자체를 사용한 실온 (25℃)에서만 유의적인 차이를 보였으며 *Bacillus* 코지 된장 중 KHP 25를 사용하여 제조한 시료가 가장 좋은 기호도를 나타내었다 (Table 19). 유의적이지는 않으나 전반적으로 *Bacillus* 코지 된장의 색을 좀 더 선호함을 알 수 있었다 (Table 19).

치즈 냄새는 종종 된장의 불쾌한 고린내 성분인 2-methyl propanoic acid, butanoic acid, 2/3-methyl butanoic acid, pentanoic acid, 3-methyl pentanoic acid,

hexanoic acid의 향 특성으로 자주 묘사된다 (Kim et al., 1993, Chang과 Chang, 2007, Zhang et al., 2010, Chen et al., 2011). 표 4에서 보듯이 시판 된장 시료들은 두 온도에서 모두 치즈냄새가 *Bacillus* 코지 된장 시료들보다 강하다고 평가되었으며 네 개의 *Bacillus* 코지 된장 시료들 사이에서는 두 온도에서 모두 치즈 냄새에 유의적인 차이는 없었다 (Table 20).

Table 19. Rank sums¹ for preference rank test of 6 *doenjang* samples

Categories of preference	<i>Bacillus-koji</i> samples ²				Commercial samples ³	
	KHG 19	KHG 26	KHP 16	KHP 25	M	S
25°C sample						
Overall	70	65	71	65	74	75
Color	68 ^{ab}	65 ^{ab}	60 ^{ab}	52 ^a	91 ^{bc}	84 ^{ab}
Aroma	65	62	64	65	89	75
Taste	68	72	71	77	66	66
sweetness	98 ^a	76 ^{ab}	83 ^{ab}	84 ^{ab}	55 ^{bc}	24 ^c
clean taste	48 ^a	49 ^a	62 ^{ab}	63 ^{ab}	93 ^{bc}	105 ^c
90°C sample						
Overall	69	73	79	70	72	57
Color	71	68	71	73	70	67
Aroma	79	64	78	61	77	61
Taste	77	74	83	78	54	54
sweetness	90 ^a	79 ^{ab}	85 ^{ab}	78 ^{ab}	54 ^{bc}	34 ^c
clean taste	50 ^a	50 ^a	54 ^a	63 ^a	100 ^b	103 ^b

¹ Rank sums for each sample with the same letter are not significantly different by this test. Significance group was determined by comparing the rank sum to the critical difference value for 20 panelists and 6 samples (33.7) from Basker table (Lawless & Heymann, 1998).

² KHG 19, KHG 26, KHP 16, and KHP 25; *Bacillus-koji doenjang* made with 4 different *Bacillus amyloliquefaciens* strains

³ M, a traditional commercial *doenjang* made with *meju*; S, a modified commercial *doenjang* made with *Aspergillus-koji*

Table 20. Sensory evaluation scores¹ for cheese character of 6 *doenjang* samples (p<0.05)

Temperatures (°C)	<i>Bacillus-koji</i> samples ²				Commercial samples ³	
	KHG 19	KHG 26	KHP 16	KHP 25	M	S
25	3.5±2.1 ^a	3.3±1.7 ^a	3.3±1.5 ^a	3.0±1.7 ^a	7.9±1.6 ^b	7.9±1.2 ^b
90	2.3±1.1 ^a	2.2±1.2 ^a	2.3±1.3 ^a	3.0±1.3 ^a	7.4±1.7 ^b	6.8±1.9 ^b

라. 결론

관능검사 결과와 휘발성 화합물 분석결과, 그리고 기능성 등을 고려할 때 *Bacillus amyloliquefaciens* KHG 19는 된장의 불쾌한 냄새 성분으로 알려진 화합물들을 생성하지 않았으며 동시에 높은 단백질분해능, 혈전용해능, ACE 저해활성을 나타내므로 (Kwon et al., 1986) 이들 결과로 미루어볼 때 별도로 다른 균주를 혼합배양 하지 않고도 이 균주를 활용하여 불쾌취가 없는 기능성 된장의 제조가 가능하다고 생각된다.

3. *B. amyloliquefaciens* KHG 19를 사용하여 제조된 된장과 시판 된장의 기능성 및 품질특성 비교

기능성이 우수하고 된장 발효시 이취성분을 가장 적게 생성하는 *B. amyloliquefaciens* KHG 19 균주를 사용하여 된장을 제조하고 발효과정 중 휘발성 향 성분 분석, 관능검사, 기능성분석 및 이화학적 분석을 실시하여 된장의 기능성 및 품질특성을 시판 재래된장, 개량된장, 청국장과 비교하고 최적 발효기간을 알아 보고자 하였다.

가. *Bacillus* 코지 된장의 pH와 수분함량, 세균수, 색도 측정

(1) 실험방법

된장 숙성 중 0, 1, 2, 3, 4 개월째에 시료 5 g을 채취하여 증류수 45 mL로 희석하여 pH meter (Orion Star Series, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)로 pH를 측정하였다. 수분함량은 3 g의 시료를 사용하여 105°C에서 2시간 동안 건조시키고 데시케이터에서 식혀 무게를 측정하는 것을 항량에 도달할 때까지 반복하였다 (AOAC, 1990). TSA (tryptic soy agar) 평판배지에 10배 단위로 희석한 시료 100 mL씩을 도말하여 30°C에서 18시간 배양 후 나타난 콜로니를 계수하였다. 된장의 색도는 투명하고 납작한 용기에 시료를 단단히 눌러 채워 색도계 (Colorimeter JC801, Color Techno System Co., Tokyo, Japan)로 명도 (L value)와 적색도 (a value), 황색도 (b value)를 측정하였다. 모든 분석은 3회 반복 하였다.

(2) 실험결과

제조 된장의 수분함량은 초기에 비해 약간 감소하는 경향을 보였으나 크게 변화가 없었다 (Table 21, Fig. 19). 시판된장은 재래된장의 수분함량이 51.3%로 가장 낮았고 청국장은 56%, 개량된장은 제조된장과 수분함량이 동일한 수준이었다. 된장의 숙성기간에 따라 수분함량은 약간 감소한다는 보고가 있다 (Hwang, 1997, Kim et al., 2006).

숙성기간에 따른 염도변화는 변화가 없다는 보고가 있으나 (Choi와 Rhee, 1994, Joo et al., 1992) 제조된장의 염도는 증가하였다. 그러나 이는 시판 청국장과 비슷한 수준이며 시판 재래된장의 27.3%나 개량된장의 37.3%보다는 염분이 낮았다 (Table

21, Fig. 20). 제조된장의 초기 pH는 6.06 이었고 4개월째에 5.43까지 감소하였으며 이는 시판 개량된장과 비슷한 값이었다. 재래된장과 청국장의 pH는 이보다 높았다 (Table 21, Fig. 21). 된장 숙성 기간에 따라 pH는 저하된다고 보고되었는데 미살균 된장 내에 존재하는 내염성 유산균, 산생성세균, 효모에 의한 것이며 (Hwang, 1997, Kim et al., 2004, Kim et al., 2000, Yoo et al., 1999) 가열살균하지 않은 상태로 발효시키는 된장의 경우는 이같은 정도의 pH 저하는 일반적이다. 제조된장의 적색도는 증가하고 황색도는 변화가 없었으며 명도는 감소하였다. 명도는 시판된장 세가지 모두에 비해서 훨씬 높은 값을 보였고 적색도는 낮은 값을 보였다. 황색도 역시 시판된장들이 훨씬 높았다 (Table 21). 된장의 갈변이 진행되면 적색도가 증가하게 된다. 또한 숙성이간이 오래되면 색이 어두워져 명도가 감소한다. 된장의 효소적 갈변은 된장의 tyrosine이 여러 반응단계를 거쳐 tyrosinase에 의해 갈색물질인 melanoids를 형성하는 과정이며, 비효소적 갈변은 Maillard reaction에 의한 갈변현상으로 된장의 경우 열처리과정이 없어서 주로 효소적 갈변에 의한 색변화가 주된 원인으로 볼수 있으나 (Kwon et al., 1998, Lee et al., 2002) 시판된장의 경우 열처리를 거치거나 당의 함량이 높아서 Maillard 반응이 유도된다고 볼 수도 있다.

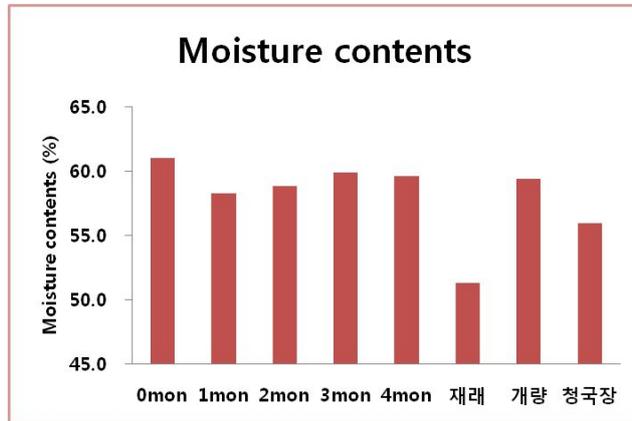


Fig. 19. Moisture content

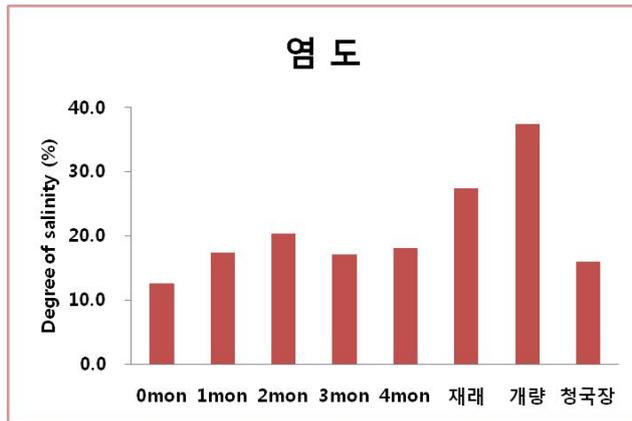


Fig. 20. Salinity

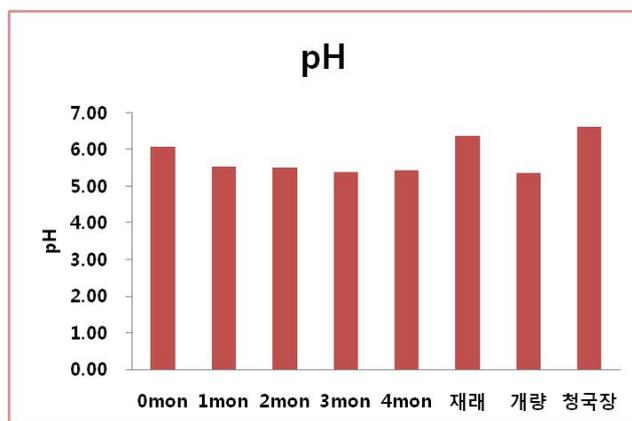


Fig. 21. pH

Table 21. Changes in physicochemical properties of KHG19-*koji doenjang* samples during 4 months of aging and of three types of commercial fermented soybean products

Samples	Aging period (months)	pH	Moisture content (% w/w)	Salinity (% of NaCl)	Color (L*a*b) ¹
<i>KHG19-koji doenjang</i>					
	0	6.06	61.0	12.6	63.1*8.6*30.6
	1	5.52	58.3	17.3	61.9*8.7*31.5
	2	5.50	58.8	20.3	60.1*9.0*30.4
	3	5.39	59.9	17.0	58.1*10.6*29.8
	4	5.43	59.6	18.0	59.2*9.0*32.3
Korean traditional <i>doenjang</i>		6.38	51.3	27.3	30.0*12.0*38.4
Modified <i>doenjang</i>		5.35	59.4	37.3	32.3*15.2*56.8
<i>Cheonggukjang</i>		6.62	55.9	16.0	44.5*12.4*28.1

¹L(lightness), a(redness), b(yellowness)

나. 된장 발효 중 접종한 균의 우점율 측정

(1) 실험방법

된장 발효 도중 접종한 균주가 발효를 주도하는 정도를 알아보기 위하여 시료로부터 콜로니를 분리하여 이들의 단백질패턴을 분석하여 접종균의 분포를 알아보았다. Whole cell protein의 SDS-PAGE는 김 등 (Kim et al., 1993)의 보고를 참고하여 수행하였다. 분리된 균주들을 5 mL LB 액체배지에 접종하여 30°C에서 하루 밤 배양한 후 12,000 x g로 4°C에서 3분간 원심분리 하였다. 균체를 탈이온수로 2회 세척하여 50 mL의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)를 가하여 현탁 시킨 후, 50 mg의 glass bead (425-600 µm diameter, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 넣고 5분간 vortex (G-560, Scientific Industries, Inc., NY, USA)로 교반 하였다. 이에 시료와 동량의 2 x sample buffer (4 × Tris-HCl/SDS (pH 6.8) 25 mL, glycerol 20 mL, SDS 4 g, 2-mercaptoethanol 2 mL, bromophenol blue 1 mg을 혼합하고 물로 부피를 100 mL로 함)를 가하였다. 95°C에서 5분간 가열하고 상온으로 식힌 후, 원심 분리 (12,000 x g, 4°C)하여 상등액을 취해 12% SDS-polyacrylamide vertical slab gel에서 100 V로 전기영동 하였다. Gel을 200 mL의 0.05% Coomassie brilliant blue R-250 (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)으로 2시간 동안 염색하고 10%의 acetic acid와 30% methanol을 함유한 수용액 200 mL로 30분씩 4회 탈색하였다. Gel에 나타난 단백질 band들의 패턴을 스캔하여 접종균주의 단백질 패턴과 비교하였다. 우점율은 분리된 전체 균주수 중 접종한 균의 수로부터 계산하였다.

나. 실험결과

가능성 된장 제조를 위해 접종한 KHG19의 우점율은 2개월째 최대값을 보였고 약 69%였다. 초기에는 51.7%정도의 점유율을 보였었고 3개월째부터는 점유율이 크게 저하되었다. 총 세균수는 10^7 에서 10^5 으로 2개월 이후 부터 감소하였다 (Table 22). 이 결과로 볼 때 2개월까지는 접종균이 된장의 발효를 주도하였으나 그 이후부터는 점유율이 저하되어 된장에 함께 존재하던 다른 균들의 작용에 의해 된장의 숙성이

진행되었을 수도 있다고 본다. 일반적으로 된장 발효 숙성과정 중 원하지 않는 균의 혼입 방지를 위해 주정을 첨가하는데 본 실험에서는 이를 배제하였다. 또한 된장의 상부에 소금을 도포하여 타균의 생육을 억제하지만 이또한 된장의 염도를 크게 증가시키는 결과를 초래하므로 적용하지 않았다. 점유율 검토 과정에서 접종한 균의 whole cell protein pattern과 다른 패턴을 보인 균주들 중 *B. subtilis*로 추측되는 균들이 많았다 (data not shown.).

Table 22. *Bacillus* 코지된장의 총세균수 및 접종균의 우점율

Aging period (months)	Bacterial viable cells on TSA ¹ (CFU / mL)	Ratio of KHG19 (%)
0	4.4×10 ⁷	51.7
1	3.7×10 ⁷	55.6
2	7.9×10 ⁶	68.8
3	5.3×10 ⁵	12.8
4	4.3×10 ⁵	23.5

¹Tryptic soy agar

²Ratio was calculated from the cell number of KHG19 and the total bacterial cell number based on the SDS-PAGE whole cell protein pattern comparison.

다. HS-SPME-GC-MS에 의한 *Bacillus* 코지 된장 및 시판 된장의 향 분석

(1) 실험방법

Bacillus 코지 된장 시료의 휘발성 화합물 분석에는 0, 2, 4개월 숙성된 시료를 사용하였고 시판 청국장과 재래된장, 개량된장 시료를 함께 분석하여 비교하였다. SPME 장치는 Supelco 57347-U (Bellefonte, PA, USA)를 사용하였고 fiber는 divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, Supelco 57299-U, with 50/30 μm film thickness)를 사용하였다. Autosampler는 Gerstel MPS2 (Gerstel GmbH & Co., Mulheim an der Ruhr, Germany)를 사용하였다. 시료 2 g을 1.75 mL의 물과 0.75 g의 NaCl과 혼합하여 SPME vial에 넣고 autosampler의 온도를 30°C와 90°C로 각각 조정하여 30분간 정치하였다. SPME fiber에 휘발성 화합물들을 10분간 흡착시킨 후 GC의 주입구에서 220°C로 splitless mode로 2분간 탈착하였다. GC (G1530A)와 MS (HP5973)는 Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) 제품을 사용하였고 컬럼은 DB-Wax capillary column (Agilent 19091X-133, 30 m x 0.25 mm I.D. with 0.25 μm film thickness, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)을 사용하였다. 컬럼 오븐 온도는 40°C에서 5분간 유지한 후 185°C까지 분당 5°C의 속도로 증가시킨 다음 200°C에서 20분간 유지시켰다. Carrier 가스는 헬륨을 분당 1.0 mL의 유속으로 조절하여 흘려주었다. MS의 이온화 온도는 250°C로, interface 온도는 280°C, 이온화 전압은 70 eV였다. MS는 scan mode로 사용하였고 질량스펙트럼 범위는 40-350 m/z였으며 threshold는 15였다. 검출된 peak들은 Wiley library (W8N05ST, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 동정하였다.

(2) 실험결과

GC-MS 분석결과 (Table 23) 에스테르류는 주로 재래된장과 개량된장에서 많이 검출되었고 제조된장의 경우 0 개월째의 시료에서보다 2, 4 개월째의 시료에서 더 적은 종류의 에스테르가 검출되었다. 같은 고초균류를 사용하여 제조한 청국장의 경우도 에스테르류는 거의 검출되지 않았다. Ethyl acetate만이 모든 시료에서 다 검출되었다. Ethyl 2-methyl butanoate는 2, 4 개월째의 제조된장과 재래된장에서 검출되었다. 이는 과일향은 나타내는 저분자량의 에스테르로 된장 향의 중요한 화합물이라고 알려져 있다.

알코올류는 모든 시료에서 비슷한 수준으로 검출되었는데 이 중 3-methyl-1-butanol과 2,3-butanediol은 모든 시료에서 검출되었고 1-octen-3-ol은 0개월째 시료를 제외하고는 모든 시료에서 검출되었다. 재래된장과 개량된장에서만 ethanol이 검출되었고 benzeneethanol 역시 시판개량된장과 시판재래된장에서만 검출되었다. 1-Octen-3-ol은 일반적으로는 버섯냄새를 나타내고 *Bacillus*를 사용하여 제조한 된장에서는 삶은 콩 냄새를 나타내는 성분이다 (Kim et al, 2012, Chang과 Chang, 2007). 2,3-Butanediol은 세균에 의해 pyruvate로부터 생성되는데 이때 중간물질인 acetoin (3-hydroxy-2-butanone)을 거치며 이 중간물질도 많은 시료에서 검출되었음을 볼 수 있다. 3-Methyl-1-butanol은 된장의 콧냄새의 성분으로 알려져 있다.

Acetic acid는 0개월째 시료를 제외하고는 모든 시료에서 검출되었고, 3-methyl-butanoic acid는 2, 4개월째의 제조된장에서만, 2-methyl-butanoic acid는 시판 재래된장에서만 검출되었다. Acid류는 2개월째의 제조된장에서 가장 많은 성분이 검출되었다. 된장의 고린내 성분 중에서는 3-methyl-butanoic acid와 2-methyl propanoic acid만이 제조된장에서 검출되었다.

알데히드화합물은 개량된장과 재래된장에서 많이 검출되었다. Benzaldehyde는 2, 4개월째의 제조된장과 시판재래 및 개량된장에서만 검출되었다. Benzaldehyde는 한국재래된장 특유의 냄새 (Chang과 Chang, 2007)로 보고된 성분이다. 케톤류 중에서는 3-hydroxy-2-butanone이 개량된장을 제외하고는 모든 시료에서 검출되었다. 개량된장의 경우 상대적으로 세균의 역할이 적기 때문으로 사료된다. 청국장에서 많은 수의 케톤류가 검출되었다.

황화합물은 시판 개량된장에서만 검출되었다. 개량된장의 맛을 내기 위해 부재료 추출물이 첨가되었을 수 있는 가능성을 나타내준다. 피라진류는 재래된장에서 가장 많은 수가, 그 다음으로는 청국장에서 많은 수가 검출되었다. 제조된장에서는 tetramethyl pyrazine을 제외하고는 검출되지 않았다. 단백질이 풍부한 식품의 경우 일반적으로 피라진이 비효소적으로 생성되기도 하나 발효도중 미생물의 작용으로 생성될 수 있다 (Sugawara et al., 1985). 페놀화합물들은 전체적으로 시판된장들에서 많이 검출되었다. 휘발성 페놀 화합물은 콩의 리그닌에 함유된 페놀 화합물의 분해 산물로 간주되고 있으며 (van과 Schutte, 1978), 불쾌한 냄새와 함께 제품의 쓴맛에 관여하는 것으로 보고되었다 (Conterno et al., 2006, Gribin 과 Henschke, 2000). 전체적으로 재래된장에서 가장 많은 수의 화합물이 검출되었고 그 다음이 개량된장이었다. 제조된장은 피라진류가 적은 것을 제외하고는 청국장의 향 패턴과 비슷한 것으로 판단된다.

Table 23. 향 성분 GC-MS 분석 결과

Compounds	CAS#	Samples					
		0 m o n	2 m o n	4 m o n	재 래 된 장	개 량 된 장	청 국 장
Esters							
ethyl acetate	000141-78-6	+	+	+	+	+	+
ethyl propanoate	000105-37-3	-	-	-	+	-	-
ethyl 2-methyl-propanoate	000097-62-1	-	-	-	+	-	-
ethyl 2-methyl-butanoate	007452-79-1	-	+	+	+	-	-
butyl acetate	000123-86-4	+	-	-	-	-	-
ethyl 3-methyl-butanoate	000108-64-5	-	-	-	+	-	-
3-methyl-1-butyl acetate	000123-92-2	-	+	+	-	-	-
propyl butanoate	000105-66-8	-	-	-	+	-	-
ethyl pentanoate	000539-82-2	-	-	-	-	+	-
pentyl 2-methyl-butanoate	068039-26-9	-	-	-	+	-	-
propyl pentanoate	000141-06-0	-	-	-	+	-	-
propyl 3-methyl-butanoate	000557-00-6	-	-	-	+	-	-
ethyl hexanoate	000123-66-0	-	-	-	-	+	-
3-tridecyl methoxyacetate	999049-10-5	+	-	-	-	-	-
ethyl 2-hydroxy-propanoate	000097-64-3	-	-	-	-	+	-
allyl isothiocyanate	000057-06-7	-	-	-	-	+	-
ethyl heptadecanoate	014010-23-2	+	-	-	-	-	-
ethyl octanoate	000106-32-1	-	-	-	-	+	-
ethyl benzoate	000093-89-0	-	-	-	-	+	-
cyclopentyl 4-ethyl benzoate	999275-38-9	+	-	-	-	-	-
ethyl benzeneacetate	000101-97-3	-	-	-	+	-	-
ethyl butanoate	000105-54-4	-	-	-	+	-	-
Alcohols							
3-methyl-2-butanol	000598-75-4	-	-	-	+	-	-
ethanol	000064-14-5	+	-	-	+	+	-
1-butanol	000071-36-3	-	+	-	+	-	-
3-methyl-2-pentanol	000565-60-6	-	-	-	-	-	+
3-methyl-1-butanol	000123-51-3	+	+	+	+	+	+
3-methyl-3-buten-1-ol	000763-32-6	-	-	-	+	-	+
1-pentanol	000071-41-0	-	+	-	+	-	-
2-methyl-1-pentanol	000105-30-6	+	+	+	+	+	+
3-pentanol	000584-02-1	-	-	-	-	-	+

2-heptanol	000543-49-7	-	-	-	+	-	+
2-hexadecanol	014852-31-4	+	-	-	-	-	-
1-hexanol	000111-27-3	-	-	-	-	+	-
3-octanol	000589-98-0	-	-	-	+	+	+
1-octen-3-ol	053907-72-5	-	+	+	+	+	+
2,5-dimethyl-3-hexanol	019550-07-3	-	+	-	-	-	-
2,3-butanediol	000513-85-9	+	+	+	+	+	+
2-furanmethanol	000098-00-0	-	-	-	-	+	-
benzeneethanol	000060-12-8	-	-	-	+	+	-
4-ethyl guaiacol	002785-89-9	-	-	-	+	+	-
Acids							
acetic acid	000064-19-7	-	+	+	+	+	+
cyclopropanecarboxylic acid	001759-53-1	-	-	-	-	-	+
3-methyl-butanoic acid	055557-13-6	-	+	+	-	-	-
2-methyl-butanoic acid	000116-53-0	-	-	-	+	-	-
hexanoic acid	000142-62-1	-	+	-	-	-	-
3-methyl-pentanoic acid	000105-43-1	-	+	-	-	-	-
benzoic acid	000065-85-0	-	-	-	+	-	-
2-methyl-propanoic acid	074381-40-1	-	+	-	-	-	-
Aldehydes							
2,4-hexadienal	000142-83-6	-	+	-	-	-	-
3-methyl-2-butenal	000107-86-8	-	-	-	+	-	-
2-furancarboxaldehyde	000098-01-1	-	-	-	+	+	-
benzaldehyde	000100-52-7	-	+	+	+	+	-
5-methyl-2-furancarboxaldehyde	000620-02-0	-	-	-	-	+	-
benzeneacetaldehyde	000122-78-1	-	-	-	+	+	-
Ketones							
2-butanone	000078-93-3	-	-	+	-	-	+
2,3-butanedione	000431-03-8	+	+	+	-	-	+
2-methyl-3-pentanone	000565-69-5	-	-	-	-	-	+
4-methylhexan-3-one	017042-16-9	-	-	-	-	-	+
2-heptanone	000110-43-0	-	-	-	-	-	+
6-methyl-3-heptanone	000624-42-0	-	-	-	-	-	+
3-hydroxy-2-butanone	000513-86-0	+	+	+	+	-	+
3-octanone	000106-68-3	-	-	-	+	+	+
5-ethyl	000659-06-7	-	-	-	+	-	-
dihydro-2(3H)-furanone							
Sulfur compounds							
dimethyl disulfide	000624-92-0	-	-	-	-	+	-

methyl 2-propenyl disulfide	002179-58-0	-	-	-	-	+	-
diallyl disulphide	002179-57-9	-	-	-	-	+	-
Pyrazines							
methyl-pyrazine	000109-08-0	-	-	-	+	-	-
2,5-dimethyl-pyrazine	000123-32-0	-	-	-	+	-	+
2,6-dimethyl-pyrazine	000108-50-9	-	-	-	+	-	-
trimethyl-pyrazine	014667-55-1	-	-	-	+	-	+
tetramethyl-pyrazine	001124-11-4	-	-	+	+	-	+
Phenols							
2-methoxy-phenol	000090-05-1	-	+	-	+	+	+
4-methyl-phenol	000106-44-5	-	-	-	+	-	-
2-ethyl-phenol	000090-00-6	-	-	-	-	+	-
3-ethyl-phenol	000620-17-7	-	-	-	+	-	-
2-methoxy-4-vinylphenol	007786-61-0	-	-	-	+	-	+
Miscellaneous							
3-methyl-2-butane amine	000598-74-3	-	-	-	-	-	+
2,5-dimethyl-furan	000625-86-5	-	+	-	-	-	-
1,1-diethoxy-2-methyl-propane	001741-41-9	-	-	-	-	+	-
ethyl benzene	000100-41-4	-	-	-	-	-	+
2-pentyl-furan	003777-69-3	-	-	-	-	+	+
1-methyl-4-(1-methylethenyl)- cyclohexene	000138-86-3	+	-	-	-	-	-
2-methyl-1-pentene	000763-29-1	+	-	-	-	-	-
1,2-dimethoxy-benzene	000091-16-7	-	-	-	+	-	-
(E)-1-methoxy-9-octadecene	056847-01-9	+	-	-	-	-	-

라. *Bacillus* 코지 된장과 시판 된장의 관능검사

(1) 실험방법

2개월과 4개월 숙성된 시료 5 g을 뚜껑이 있는 50 mL 용기에 담고 용기에 난수표를 사용하여 세자리 숫자로 표시하여 시료를 구분하였다. 시판 청국장과 재래된장, 개량된장 시료를 동시에 제시하였고 시료의 온도는 실온 (25℃)과 90℃ 두 가지로 조절하였다. 90℃ 시료는 된장과 물을 1:3으로 혼합하여 끓여서 제시하였다. 관능검사 경험이 있는 10명의 패널요원을 경희대학교 식품공학과 대학원생 중 선발하였다. 시료의 맛과 향, 색에 대한 기호도와 전체적인 기호도를 순위법 (Lawless와 Heymann, 1998)으로 평가하였다. 가장 선호하는 시료에 1을, 가장 싫어하는 시료에 6을 주도록 하였다. 단맛과 깔끔한 맛에 대한 기호도 또한 별도로 실시하였다. 순위합계는 Basker표 (Lawless와 Heymann, 1998)의 한계차이값과 비교하여 결과를 분석하였다. 된장의 고린내 (치즈냄새)의 강도는 9점 선척도를 사용하여 채점법 (Lawless와 Heymann, 1998)으로 평가하였다. 표준시료는 2 g의 블루치즈와 6 g의 재래된장시료를 50mL의 물과 혼합하여 제조하였으며 표준시료의 강도를 선척도의 중간 값으로 패널요원에게 제시하였다. 분산분석과 다시료검정을 결과 분석에 사용하였다 (Lawless와 Heymann, 1998). 실험에 사용한 관능검사 설문지는 아래와 같다.

★ 관능검사 평가표 (생된장) ★

성명 : 나이: (만) 세 성별 : 남 여 날짜: 년 월 일

*왼쪽부터 오른쪽으로 제시된 순서대로 평가해주시오.

1. 다음 시료의 냄새를 맡고 된장의 구린내 (썩썩한 냄새)의 강도를 비교해서 표시하시오. 먼저 주어진 표준시료의 냄새를 맡고 시료 중 그 냄새의 강도를 평가하시오. 이때, 제시된 표준 시료의 강도는 5입니다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
266	<input type="checkbox"/>								

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
632	<input type="checkbox"/>								

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
544	<input type="checkbox"/>								

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
265	<input type="checkbox"/>								

2. 다음 시료의 맛을 보고 된장의 단맛의 강도를 비교해서 표시하시오. 먼저 주어진 표준시료의 맛을 보고 시료 중 그 맛의 강도를 평가하시오. 이때, 제시된 표준 시료의 강도는 5입니다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
266	<input type="checkbox"/>								

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
632	<input type="checkbox"/>								

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
544	<input type="checkbox"/>								

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
265	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3. 다음 시료의 맛을 보고 된장의 짠맛의 강도를 비교해서 표시하십시오. 먼저 주어진 표준시료의 맛을 보고 시료 중 그 맛의 강도를 평가하십시오. 이때, 제시된 표준 시료의 강도는 5입니다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
266	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
632	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
544	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
265	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

4. 다음 시료의 맛을 보고 된장의 구수한맛의 강도를 비교해서 표시하십시오. 먼저 주어진 표준시료의 맛을 보고 시료 중 그 맛의 강도를 평가하십시오. 이때, 제시된 표준 시료의 강도는 5입니다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
266	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
632	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
544	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
265	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

5. 다음 시료의 맛, 색, 향, 전체적인 기호도를 제일 좋은 것을 1, 제일 싫은 것은 4로 순위를 매겨주세요.

1) 색 (Color)

시료	266	632	544	265
순위	_____	_____	_____	_____

2) 향 (Flavor)

시료	266	632	544	265
순위	_____	_____	_____	_____

3) 맛 (Taste)

시료	266	632	544	265
순위	_____	_____	_____	_____

4) 전체적인 기호도 (Overall acceptability)

시료	266	632	544	265
순위	_____	_____	_____	_____

(2) 실험결과

관능검사는 실온과 끓인 된장으로 구분하여 실시하였고 2개월째와 4개월째를 따로 시판시료와 비교하였다. 기호도를 조사한 결과 (Table 24, 25) 끓이지 않은 경우 2개월째에는 (Table 24) 시료간의 기호도 차이가 유의적이지 않았고 4개월째 (Table 25)에는 향에 대한 기호도가 재래된장보다는 제조된장이 유의적으로 높음을 알 수 있었다. 끓인 경우에는 2개월째에는 청국장이 재래된장보다 유의적으로 기호도가 높았고 4개월째 시료는 제조된장의 기호도가 재래된장의 기호도보다 유의적으로 높았다 (Table 24, 25).

채점법으로 시료의 구린내와 단맛, 짠맛을 비교하였다. Table 26, 27에서 보듯이 구린내는 실온과 끓인 경우 모두, 2개월째 (Table 26)와 4개월째 (Table 27) 시료 모두 제조된장에서 낮은 값을 보였다. 단맛은 개량된장이 가장 많았고 짠맛은 실온에서는 개량된장이, 끓인 된장에서는 재래된장이 높았다. 짠맛이 제일 적게 느껴진 시료는 청국장이었는데 염도 분석결과에서는 청국장이 시판된장 중에서는 가장 염도가 낮았지만 제조된장 보다는 높았었는데 관능검사 결과와 이 점이 일치하지 않았다.

Table 24. 2개월째 시료와 시판된장의 기호도 비교

Categories of preference	<i>Bacillus-koji</i>	Commercial		
	samples	재래된장	개량된장	청국장
30°C Sample				
Overall	21	31	26	22
Color	23	32	27	18
Aroma	16	31	31	22
Taste	22	31	25	21
90°C Sample				
Overall	24	32	26	18
Color	23	34	23	20
Aroma	20	31	31	18
Taste	27	34	24	15

Table 25. 4개월째의 시료와 시판된장들의 기호도 비교

Categories of preference	<i>Bacillus-koji</i>	Commercial		
	samples	재래된장	개량된장	청국장
30°C Sample				
Overall	20	34	23	23
Color	20	37	26	17
Aroma	15	39	27	19
Taste	24	32	23	21
90°C Sample				
Overall	19	34	29	18
Color	19	39	25	17
Aroma	14	38	30	18
Taste	21	32	30	17

Table 26. 2개월째 시료와 시판 된장 시료들의 구린내, 단맛, 짠맛 비교

Categories of scoring test	<i>Bacillus-koji</i>	Commercial samples		
	<i>i</i> samples	재래된장	개량된장	청국장
30°C Sample				
구린내	3.6±1.1	7.5±1.4	6.0±2.1	6.2±1.7
단 맛	4.5±1.6	6.5±2.0	4.1±1.9	4.6±1.0
짠 맛	6.9±1.2	7.1±1.4	3.0±1.5	5.4±1.9
90°C Sample				
구린내	7.2±1.5	4.8±2.3	6.0±1.5	3.2±1.6
단 맛	4.8±2.0	6.5±2.0	4.4±2.6	5.0±1.1
짠 맛	7.7±1.1	6.2±1.6	2.5±1.1	5.9±1.7

Table 27. 4개월째 시료와 시판 된장 시료들의 구린내, 단맛, 짠맛 비교

Categories of scoring test	<i>Bacillus-koji</i> samples	Commercial samples		
	4 months	재래된장	개량된장	청국장
30°C Sample				
구린내	2.9±1.1	6.8±1.8	5.0±1.7	5.8±2.1
단 맛	5.2±1.4	6.0±1.4	4.7±2.1	4.7±1.5
짠 맛	6.7±2.1	5.2±1.6	2.8±1.3	6.0±2.0
90°C Sample				
구린내	7.4±0.8	5.3±1.9	5.8±1.5	4.0±1.5
단 맛	4.5±1.7	6.3±1.5	4.7±2.0	5.0±1.7
짠 맛	7.0±1.5	5.8±1.6	2.9±1.2	5.5±1.6

마. *Bacillus* 코지 된장과 시판 된장의 기능성 비교

(1) 실험방법

(가) 단백질 분해능 측정

시료 희석액을 2% skim milk와 3% NaCl이 첨가된 LB 고체배지에 도말하여 30°C에서 30시간 평판 배양한 후 균주가 생성하는 단백질 분해효소에 의해 배지에 생성된 투명한 면적을 계산하여 시료 중의 단백질 함량으로 나누어 normalization 하였다. 시료중의 단백질 함량은 Bradford assay를 통해 측정하였다. 먼저 standard curve를 그리기 위해 standard 물질인 Bovine serum albumin (BSA)를 발색시약 (Protein assay dye reagent concentrate)에 넣어 1, 2, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 만든 후 반응 시켜서 595nm에서 흡광도 측정을 하여 표준곡선을 얻었다. 된장 시료 5 μl 와 발색시약 1mL를 혼합한 후 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 단백질 함량을 구하였다.

(나) 혈전용해능 측정

멸균된 10mM phosphate buffer 10mL에 fibrinogen을 0.6%가 되도록 (fibrinogen 0.06g) 용해시켰다. 완전히 용해된 fibrinogen 용액 10mL에 동일한 완충용액 PBS에 2% agar를 넣고 멸균시킨 용액 10mL를 넣어 잘 혼합하였다. 이때 거품이 많이 생기므로 16ml 만을 따서 새 falcon tube에 옮긴 후, 여기에 250U/mL의 thrombin 20 μl 을 첨가한 후 즉시 petridish에 붓고 천천히 잘 돌려서 섞어준 다음 실온에서 30분간 방치하여 최종적으로 0.3% fibrin plate를 제조하였다.

0.3% fibrin plate위에 배양 상층액을 분주한 (20 μl) paper disk (작은 것)를 올려놓은 다음 30°C에서 18시간 방치한 후 용해된 환의 면적을 측정하였다. 대조구로 정제된 혈전 용해제인 plasmin (1U/mL)을 사용하여 동일한 fibrin plate상에서 실험구와 함께 혈전용해능을 측정하고 이때 형성된 plasmin의 투명환을 100% 혈전 용해 활성으로 표시하고 다른 시료의 용해 활성은 다음식과 같이 plasmin에 대한 상대 활성값(%)으로 표시하였다.

$$\text{혈전용해활성 (\%)} = \frac{\text{시료의 용해면적}}{\text{plasmin의 용해면적}} \times 100$$

(다) ACE 저해활성 측정

0.3M NaCl을 함유한 0.1M sodium borate buffer(pH 8.3)에 rabbit lung acetone powder를 1g/10mL의 농도로 4°C에서 24시간 동안 추출한 후 30분간 원심분리 (12,000rpm)하여 ACE 조효소액을 얻었다. 이를 냉동보관하며 실험에 사용하였다. 균주의 ACE 활성 측정은 skim milk 배지와 soybean powder 배지를 둘 다 사용하여 각 균주들을 배양한 후 그 활성을 각각 측정하였다.

분리 선발된 균주의 배양상층액 30 μ l에 0.1M sodium borate buffer 40 μ l와 ACE 조효소액 30 μ l를 가한 다음 37°C에서 5분간 예비반응 시킨 후 0.3M NaCl이 함유된 0.1M sodium borate buffer (pH 8.3)에 10mM의 농도로 제조한 HHL(hippuryl-histidyl-leucine) 기질용액 200 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이에 1N HCl 250 μ l를 가하여 반응을 정지시킨 후 ethyl acetate 1.5mL를 가해 2분간 교반한 후 원심분리 (900 \times g, 5min)하여 상등액 1mL를 얻었다. 이 상등액을 95°C thermo block에서 30분간 완전히 건조시킨 후 증류수 1mL을 넣고 228nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 측정하였다. 대조구로서는 균주 배양액 대신 배지용액을 가해 실험했으며 효소원을 첨가하기 전에 먼저 1N HCl 250 μ l를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 효소원을 첨가하였다.

ACE 저해활성효과는 다음 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ACE inhibition rate (\%)} = [1 - (S - SB) / (C - CB)] \times 100$$

S: absorbance of sample SB : absorbance of sample blank

C : absorbance of control CB : absorbance of control blank

(2) 실험결과

전체적으로 단백질 분해능은 3개월째 시료가 가장 높았고 그 다음이 2개월째 시료가 높았으며, 혈전 용해능은 2개월째 시료가 가장 높고 3개월과 4개월째 시료는 낮은 값을 보였다 (Table 28, Fig. 22, 23). 이는 시판된장들보다 대체적으로 높은 값이며, 시판된장들 중에서는 청국장이나 채래된장의 혈전용해능이 개량된장보다 훨씬 높았다. 단백질분해능의 경우 시판개량된장이 다른 시판된장들보다는 높은 값을

보였지만 제조된장들 보다는 낮은 값이었다. 따라서 제조된장의 단백질분해능과 혈전용해능은 매우 우수하다고 판단된다. 다만 접종한 균주의 점유율이 3개월째부터는 낮은 값을 보여서 3개월째 이후의 높은 기능성 값은 접종한 균주 이외의 다른 *Bacillus*의 작용이 아닌지 고려해봐야 한다고 본다. ACE 저해활성은 제조된장의 경우 전체적으로 시판된장보다 제조된장이 우수하다고 볼 수 있다. 시료 중에 존재하는 단백질 분해 효소에 의해 ACE가 분해되는지의 여부를 알기위해 시료를 열처리하여 그 값을 비교하였는데 약간의 활성 저하가 관찰되었지만 제조된장의 경우는 그 차이가 미미하였다. 그러나 재래된장과 청국장 경우는 값이 차이가 커서 (Table 29) 나타낸 저해 활성의 일부는 단백질분해효소에 의한 것이었을 가능성이 제시되었다. 전통된장의 *Bacillus*는 생육과 사멸이 빠르게 진행된다 (장미, 2009). 균이 사멸시 autolysis가 일어나서 다량의 단백질분해효소가 세포 밖으로 방출된다. 김등은 (Kim et al., 2004) 전통된장과 공장산 된장제품, 메주 및 코지의 미생물과 혈전용해효소의 상관관계를 연구하였는데, 된장의 *Bacillus*분포와 혈전용해효소의 활성이 양의 상관관계를 나타내었다. 따라서 *Bacillus* 코지된장은 우수한 혈전용해능을 지닌 기능성 발효식품으로의 발전 가능성이 크다. 실제 이 실험에서도 다른 기능성보다 혈전용해능이 시판 다른 된장들에 비해 두드러지게 높았다 (Table 28).

Table 28. Proteolytic activity and fibrinolytic activity of KHG19-*koji doenjang* samples during 4 months of aging and of three types of commercial fermented soybean products

Samples	Aging period (months)	단백질 분해능	혈전용해능 (% 상대활성값)
<i>KHG19-koji doenjang</i>	0	0.32±0.07	154.73±66.28
	1	0.28±0.08	214.16±18.82
	2	0.61±0.04	236.11±20.75
	3	0.86±0.20	131.41±76.86
	4	0.45±0.18	81.44±15.89
Korean traditional <i>doenjang</i>		0.17±0.02	142.83±11.07
Modified <i>doenjang</i>		0.3±0.05	68.77±17.37
<i>Cheonggukjang</i>		0.04±0.01	109.99±34.07

Table 29. ACE inhibition rate of KHG19-*koji doenjang* samples during 4 months of aging and of three types of commercial fermented soybean products

Samples	Aging period (months)	ACE 저해활성	
		(%, 25℃)	(%, 95℃)
<i>KHG19-koji doenjang</i>	0	93.27±5.90	91.62±21.72
	1	103.28±10.36	94.47±6.01
	2	97.88±14.42	90.16±9.73
	3	101.97±5.52	103.41±2.04
	4	102.11±1.35	97.56±3.21
Korean traditional <i>doenjang</i>		93.21±5.68	78.21±10.73
Modified <i>doenjang</i>		95.62±1.36	106.91±4.69
<i>Cheonggukjang</i>		102.63±1.50	86.5±20.79

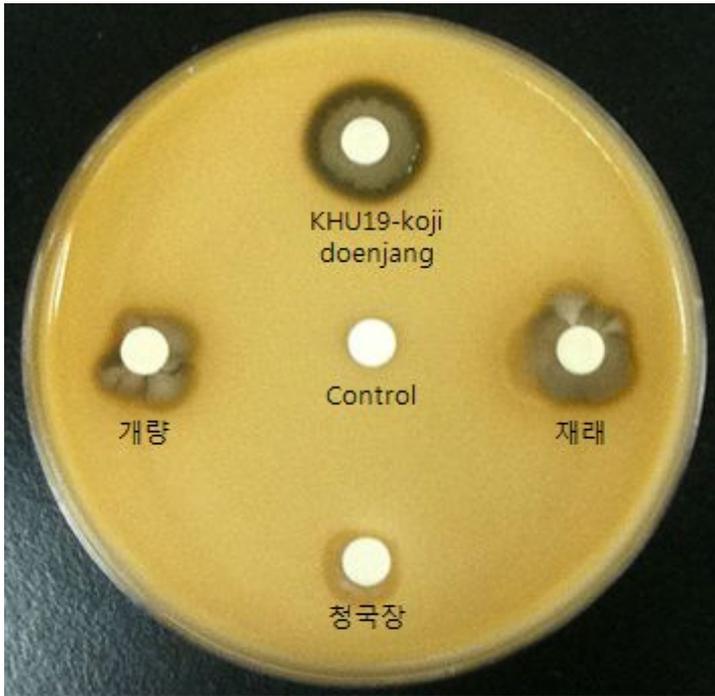


Fig. 22. Proteolytic activity.

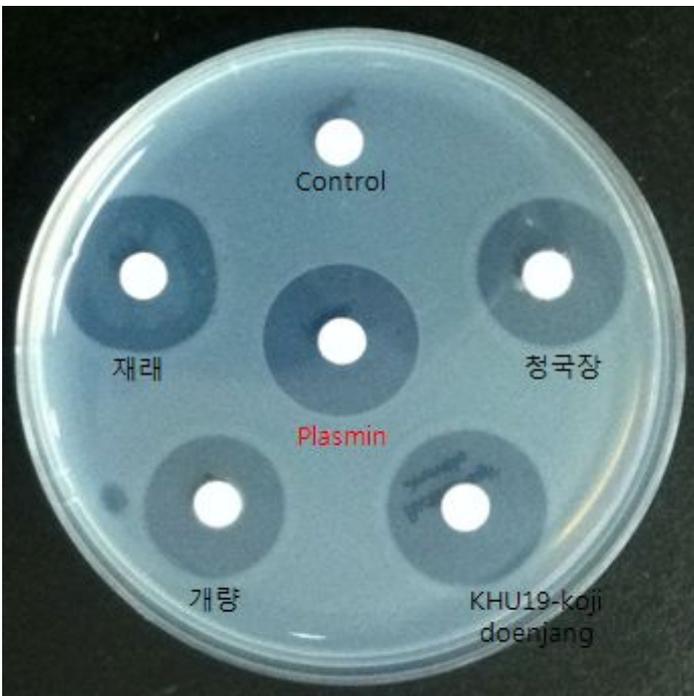


Fig. 23. Fibrinolytic activity.

제 6 절 기능성 된장 제조 분리균주인 *Bacillus amyloliquefaciens*의 유전체분석

1. 실험방법

가. Genomic DNA의 분리 및 정제

분석하고자 하는 *Bacillus amyloliquefaciens*를 LB 액체배지에 최적조건에서 24시간 배양하고 cell pellet을 얻은 후 이를 바탕으로 alkaline lysis method를 이용한 상업용 genomic DNA extraction kit를 이용하여 genomic DNA를 분리 및 정제하였다. 전기영동분석결과 shearing이 적은 양질의 genomic DNA를 확보하였다. 분리된 genomic DNA의 양을 spectrophotometer법을 활용하여 정량하였고 그 중 10 μ g의 genomic DNA 샘플을 DNA sequencing 분석회사인 (주)마크로젠으로 보내 whole genome sequencing을 수행하도록 하였다.

나. 분리정제된 genomic DNA의 염기서열분석

*Bacillus amyloliquefaciens*의 whole genome sequencing을 위해서 최신 Next-generation sequencing 방법인 GS-FLX 454 pyrosequencing 및 Solexa illumina HiSeq2000을 사용하여 동시에 염기서열 분석을 진행하기 위하여 Hybrid genome sequencing 방법을 이용하였다 (Fig. 24). 효과적인 genome sequencing 및 genome assembly를 하기 위하여 pyrosequencing에서는 random genome sequencing 및 mate-pair genome sequencing 방법을 동시에 사용하였다. 또한 gap의 개수를 최소화하고 염기서열이 분석된 DNA read들의 sequencing error를 최소화하기 위하여 Solexa sequencing을 같은 genome DNA 샘플을 가지고 수행하였다. 얻어진 데이터는 이미지형태로 되어있어서 data processing이 진행되었는데 image processing과 signal processing이 동시에 수행되었다 (Fig. 25). 이러한 data processing을 통해서 각각 읽혀진 짧은 read들에 대한 염기서열을 얻어냈다. 이렇게 얻어진 read들은 GS De Nove Assembler v.2.6을 이용하여 genome assembly를 수행하였고 이를 통해서 contig들을 얻어냈다 (Fig. 26).

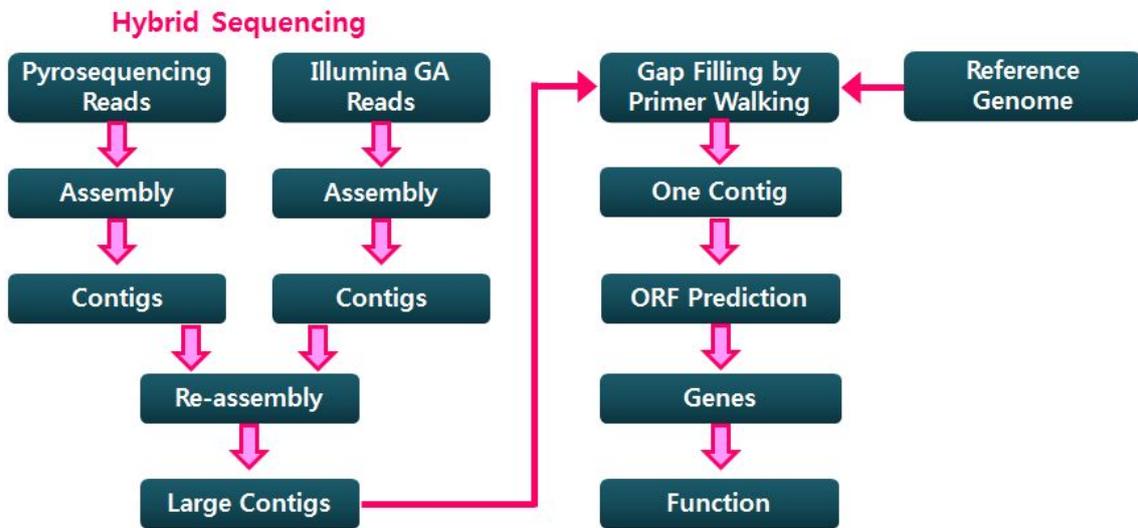


Fig. 24. NGS기술 중 Pyrosequencing 및 Illumina 방법을 이용한 Hybrid genome sequencing 방법 및 분석방법 개요.

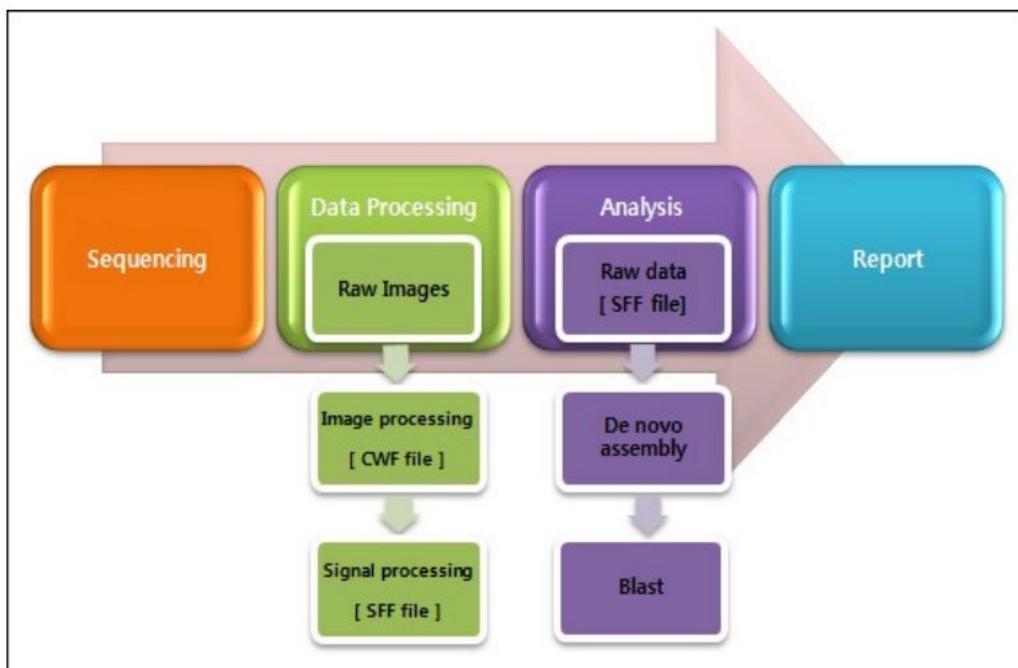


Fig. 25. 유전체 염기서열 분석의 전체 흐름도.

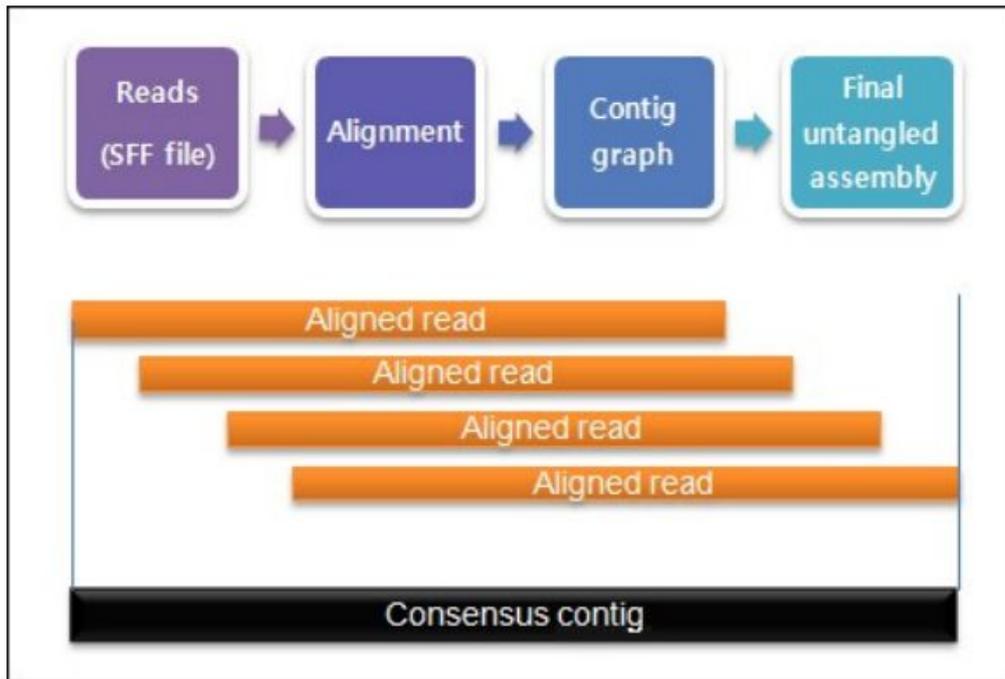


Fig. 26. 유전체 염기서열을 완성하기 위한 genome assembly 방법.

다. Gap filling을 통한 유전체 염기서열의 완성

Genome assembly 방법을 통해서 얻어진 contig들 사이의 gap들을 연결하여 전체 유전체 염기서열을 완성하고자 primer walking 방법을 이용하여 유전체 염기서열을 완성하고자 하였다. Primer walking 방법은 Fig. 27와 같다. 알려진 한쪽 말단에 primer를 만들고 이를 바탕으로 한방향으로의 DNA염기서열을 밝힌다. 그 후 새로 얻은 DNA 염기서열의 정확성을 확인하기 위하여 새로운 말단에 역방향의 primer를 만들고 역방향의 DNA 염기서열을 밝혀내어 얻어진 DNA 염기서열의 정확성을 높인다. 또한 새로 얻은 DNA 염기서열의 말단에 순방향을 새로운 primer를 다시 만들고 다시 순방향으로의 DNA 염기서열을 밝힌다. 이과정을 반복하여 염기서열이 알려지지 않은 gap부분을 메꾸어 전체 유전체 염기서열을 완성한다.

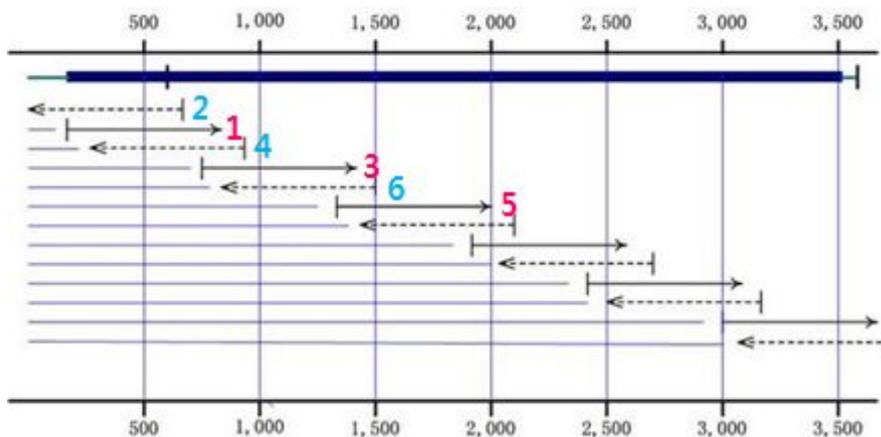


Fig. 27. Primer walking 방법을 활용한 gap-filling 방법.

2. 실험결과

가. GS-FLX pyrosequencing 방법

(1) Random genome sequencing을 통한 유전체 library 염기분석 결과

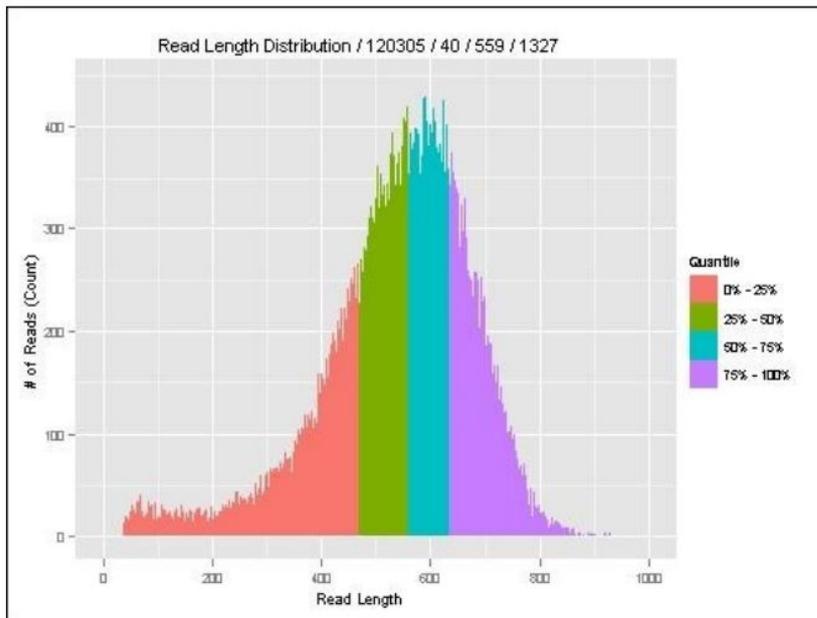


Fig. 28. Read들의 길이에 따른 분포도.

현재 GS-FLX 염기서열 분석을 통한 유전체 library 염기분석결과 120,305개의 짧은 read들이 얻어졌으며 전체 염기수로는 총 65 Mb정도 진행되었다. 또한 얻어진 read들의 평균 염기수는 540 bp였다 (Table 30). 위의 분포도 (Fig. 28)에서 보듯이 대부분의 read들의 길이들이 400-600 bp에 있는 것으로 보아 random genome sequencing이 잘 진행되었다고 볼 수 있다.

Table 30.

Read count	Total bases	Average read length
120,305	64,977,991	540.111

(2) Mate-pair genome sequencing을 통한 유전체 library 염기분석결과

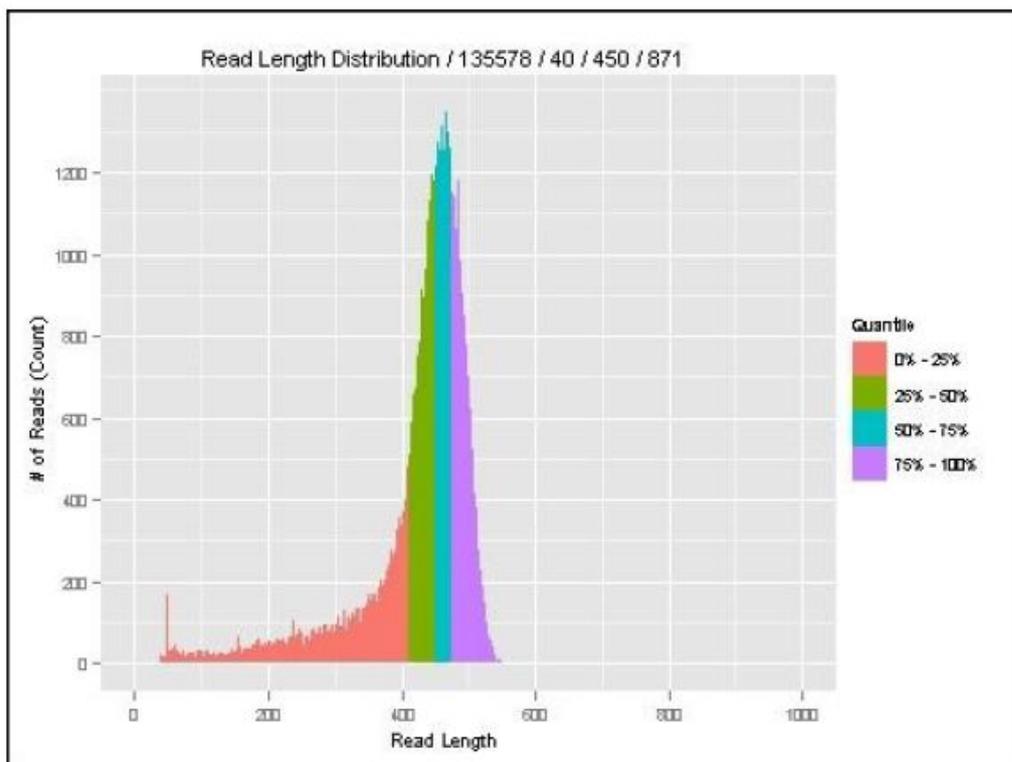


Fig. 29. Mate-pair genome sequencing을 통해 얻어진 read들의 길이에 따른 분포.

현재 Mate-pair genome sequencing 염기서열 분석을 통한 유전체 library 염기분석 결과 135,578개의 짧은 read들이 얻어졌으며 전체 염기수로는 총 58 Mb정도 진행되었다. 또한 얻어진 read들의 평균 염기수는 425 bp였다 (Table 31). 위의 분포도 (Fig. 29)에서 보듯이 대부분의 read들의 길이들이 400-500 bp에 있는 것으로 보아 Mate-pair genome sequencing이 잘 진행되었다고 볼 수 있다.

Table 31.

Read count	Total bases	Average read length
135,578	57,656,024	425.261

(3) 두가지 genome sequencing으로부터 얻어진 short read들의 genome assembly 결과

전체 genome assembly에 사용된 read수는 총 34만 5천여 개로 총 염기수는 117 Mb이며 (Table 32) 그 중 genome assembly에 성공한 read수는 33만 7천여 개로 총 read수의 98%이상에 해당한다. 그러나 genome assembly에서 진행되지 못한 것들은 총 8천여개정도의 read들이 해당되며 이는 전체 read수의 2% 미만이다 (Fig. 30). 이는 GS-FLX pyrosequencing이 잘 진행되었으며 genome assembly에서도 문제없이 잘 진행된 것을 가리킨다.

Table 32.

Number of reads	Number of bases	Assembled	Partial	Singleton	Repeat	Outlier	Too short
345,219	116,967,439	336,760	3,671	3,102	1,189	497	0

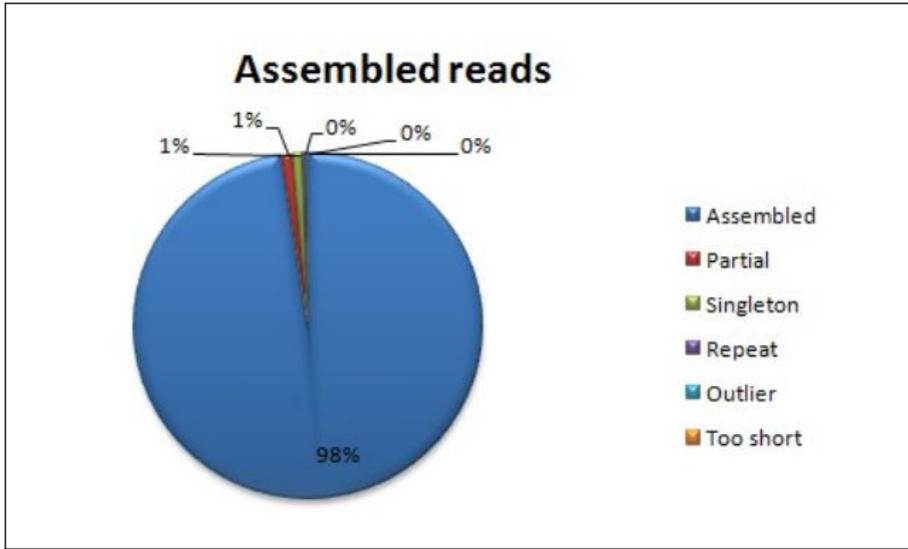


Fig. 30. 두가지 genome sequencing으로부터 얻은 read들의 genome assembly의 결과.

(4) Advanced genome assembly를 통한 scaffold의 생성

길이가 100 bp이상 되는 모든 contig들은 115개가 얻어졌으며 총염기수는 3.92 Mb 정도 되었다 (Table 33).

Table 33.

Number of contigs	Number of bases
115	3,920,944

길이가 500 bp이상 되는 large contig들은 총 45개가 얻어졌으며 총염기수는 3.9 Mb 정도 되었다. 또한 평균 contig 길이는 86 kb정도 되었다 (Table 34).

Table 34.

Num of contigs	Num of bases	Avg. size	N50 size	Largest size	Q40Plus bases	%Q40
45	3,902,125	86,713	154,852	463,902	3,899,106	99.92%

얻어진 large contig들을 다시 genome assembly를 수행하여 scaffold contig들을 얻었고 총 34개의 scaffold contig를 얻었으며 총염기수는 3.89 Mb정도 되었다. 또한 평균 scaffold contig 길이는 114 kb정도 되었다 (Table 35).

Table 35.

Number of contigs	Number of bases	Avg. size	N50 size	Largest size
34	3,892,012	114,470	154,852	463,902

얻어진 scaffold contig들을 다시 genome assembly를 수행하여 최종 scaffold들을 얻었고 총 7개의 scaffold contig를 얻었으며 총 염기수는 3.91 Mb정도 되었다. 또한 평균 scaffold contig 길이는 559 kb정도 되었으며 가장 큰 scaffold의 경우 크기가 2.33 Mb에 이르렀다 (Table 36).

Table 36.

Number of scaffolds	Number of bases	Avg. size	N50 size	Largest size
7	3,910,892	558,698	2,335,019	2,335,019

본 결과를 바탕으로 GS-FLX pyrosequencing이 탁월하게 수행되었으며 이로부터 얻어진 7개의 scaffold 사이의 gap은 Solexa illumina로부터 얻어질 scaffold들과 assembly하거나 primer walking을 통한 gap-filling 방법을 통해서 전체 유전체 염기서열을 완성할 것이다.

제 7 절 대량생산을 위한 산업적 기반기술 개발

확보된 최적발효 조건 및 관련 기술 등을 기업체들에 이전하여 제품개발 및 산업화를 꾀한다.

1. 참여기업 연구소를 통한 기능성 된장의 산업화 기반 기술 개발

가. Scale-up 방법으로 고기능성 된장의 생산

고기능성 된장의 생산규모를 scale-up 할 때 제품의 품질에 영향을 줄 수 있는 요인과 품질에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 기업체들의 시설을 활용하여 된장을 제조한 후, 전문가들의 관능검사와 기기분석을 통한 성분분석을 통해 조사한다.

나. 성분 평가

원료의 가공조건, 발효 tank시설의 상층부와 하층부의 된장간에 미생물분포, 된장의 성분 등 품질의 차이가 있는지를 조사한다.

다. 기업 자체 유통망을 통한 국내외 소비자 반응 조사

기업체에서 제조한 기능성 된장을 해당 기업체의 자체 유통망을 이용하여 관능검사 등을 통하여 소비자의 반응을 실질적으로 조사한다.

라. 기능성 된장 제품의 균일한 제품생산 확립 및 품질 향상에 관한 지속적인 산학협력 관리

기업체들과 경희대학교간의 긴밀한 협력 관리를 통하여 지속적인 품질 향상을 추구한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

연도	연구개발의 목표	평가착안점에 입각한 연구개발목표	기준치 (%)	달성도 (%)
1차년도 2009	한, 중, 일 3개국 된장내의 미생물상 차이분석	나라별, 종류별 된장 시료수집	20	100
		Culture-dependent 법에 의한 미생물 동정	40	100
		Culture-independent 법에 의한 미생물 동정	40	100
2차년도 2010	기능성 미생물 분 리 특성 분석	전통된장으로부터 우리나라 된장에만 존재하는 차별성 있는 미생물의 분리	30	100
		기호성이 우수한 균주 선발	35	100
		항산화 활성, 혈전용해 활성, ACE 저해활성 등의 기능적 특성을 지닌 균주 선발	35	100
3차년도 2011	고기능성 된장의 제조 및 산업화	분리된 균주를 이용하여 된장을 제조하고 이들의 관능적 특성 분석	30	100
		분리균주의 혼합접종으로 제조된 된장의 기능성을 분석하여 그 특성을 조사	30	100
		대량생산을 위한 공정의 적합성 및 품질변화를 분석함	40	100

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 우리나라에서는 이취가 적고 기능성을 지닌 고품질의 된장이 산업적으로 제조된 경우가 거의 없으며, 본 연구과제를 통해 개발한 제품을 기업체를 통해 제품화로 연결할 수 있을 것임
2. 기능성 및 관능성을 향상시킴으로서 전통식품의 계승·발전 및 소비 증진을 꾀할 수 있음
3. 한국 전통 된장의 수출장애 요인인 이취문제를 해결함으로써 수출 증진에 크게 기여할 수 있으며 CODEX에 된장의 규격화와 더불어 국제적 식품으로 격상시킴
4. 품질의 고급화를 꾀할 수 있어 세계에 우리 식문화를 알리는 매체역할을 함과 동시에 한국식품 문화의 이미지를 개선할 수 있음
5. 소비 증진으로 생산자 농민의 소득에도 크게 기여할 뿐만 아니라 생산자가 2차 산업에 참여하여 소득을 향상시킬 수 있는 좋은 기회를 마련해 줄 수 있음
6. 고기능성 된장 제조 균주 및 방법의 특허 출원
7. 확보된 최적 발효 조건 및 관련 기술 등을 기업체에 이전함에 제품개발 및 수출 증대
8. 본 과제에서 연구된 자료를 기반으로 향후 청국장, 고추장, 간장 등의 대두 발효 식품에 응용

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		논문		기타
		출원	등록	SCI	비SCI	
1차년도	목표				1	
	달성			1		2
2차년도	목표				1	
	달성					1
3차년도	목표	1		1		
	달성	(1)		1	(1)	1
계	목표	1		1	2	
	달성			2	(2)	4

1. 논문게재

가. SCI 급 논문

Analysis of bacterial and fungal communities in Japanese and Chinese fermented soybean paste using nested PCR-DGGE. *Curr. Microbiol.* 60(5): 315-320, 2010.

Volatile Compounds in Fermented Korean Soybean Paste (*Doenjang*) Produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Food Sci. Biotechnol.* (in press, E2012-03-002)

나. 논문 준비

Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* Khu 19. *J. Bacteriol.* (in preparation)

기능성된장의 향성분 비교분석. *한국식품과학회지* (in preparation)

2. 특허출원

고기능성된장 제조 균주 및 방법 (2012년 8월 특허출원예정)

요약: 기능성 된장의 제조를 위하여 한국의 재래 된장으로부터 단백질분해능, 혈전용해능, angiotensin converting enzyme (ACE) 저해 활성이 있는 균주를 분리 선발하였다. 14개의 된장 시료로부터 단백질분해능이 있는 균주를 264개 분리하였고 이들 중 높은 혈전용해능과 ACE 저해 활성을 보이는 4개 균주가 선발되었다. SDS-PAGE whole cell protein 패턴과 16S rRNA 염기서열 분석 결과 네 균주 모두 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었다. 선발된 균주들은 기능성 된장 제조시 종균으로 사용할 수 있다

3. 기타

국내외 학회 발표 5건

- 1) Identification of *Bacillus* species isolated from doenjang and its functional characteristics. 2011 International Conference on Food Factors, 대만 타이페이, 2011. 11. 20-23.
- 2) Identification of *Bacillus* sp isolated from *doenjang* by SDS-PAGE protein patterns. 2010 International Symposium and Annual Meeting of Korean Society for Microbiology and Biotechnology. 서울교육문화회관. 2010. 6. 24-25.
- 3) Analysis of bacterial and fungal communities in meju using denaturing gradient gel electrophoresis. 2009 International Symposium of the KSABC. 제주 그랜드호텔, 2009. 10. 23-24.
- 4) Analysis of bacterial and fungal communities in Japanese and Chinese fermented soybean paste using DGGE. 2009 International Symposium for KMB. 대전컨벤션센터. 2009. 6. 26
- 5) Volatile Compounds in Fermented Soybean Paste, *Doenjang*, Produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. 2012 International Food Technology. Las Vegas, USA. 2012. 6. 25-29 (예정)

제 2 절 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보
활용건수	목표	1				
	달성					

1. 고기능성 된장 특성을 이용한 제품화 예정

- 고기능성 probiotic 활성을 가진 분리균 *Bacillus amyloliquefaciens*를 이용한 된장제조
: 이취가 적고 풍미가 우수하며 향산화능, 혈전용해활성, ACE 저해활성 등의 기능성이 강화된 고기능성 된장을 제품화

2. *Bacillus amyloliquefaciens*에 처리된 콩 발효물의 제품화 예정

- 고기능성 probiotic에 발효된 콩의 제품화
: 콩의 수용성단백질을 추출하여 *Bacillus amyloliquefaciens*를 반응시켜 향산화, 혈전용해활성, ACE 저해활성 기능을 지닌 가수분해물을 제조한 후, 건조시켜 기능성 식품소재로 활용

제 3 절 *Bacillus amyloliquefaciens*를 사용한 콩 발효물 제품화 실험 결과 및 화장품 원료 시험 제작

균주의 기능성이 된장 이외의 다른 조건에서도 발효되는지 여부를 콩물 발효실험을 통해 검토하였다. 콩물에 전배양하여 세척한 균체를 접종하여 18시간까지 발효하면서 3시간 간격으로 단백질분해능과 혈전용해능을 측정하였다 (Table 37). 시료의 단백질 분해능은 단백질 함량으로 normalization 하였으며 혈전용해능은 plasmin의 활성을 100%로 하였을 때 상대적인 활성을 나타낸 것이다. 동결건조는 9시간 발효 후의 시료를 사용하였고 발효 콩물 그대로 동결건조시킨 경우와 발효콩물을 열처리한 후 동결건조한 경우를 비교하였다 (Table 37). 우선 단백질 함량은 12시간째에 크게 감소하였는데, 이는 Bradford 단백질 정량법의 특성상 저분자량의 펩타이드는 검출되지 않기 때문으로, 12시간 이후에는 단백질이 가수분해 되어 함량이 적게 나타났다고 본다. 12시간 이후의 단백질 분해능의 증가는 이처럼 단백질 함량으로

normalization 했기 때문으로 보이며 normalize하지 않은 경우의 단백질 분해능 값은 9시간이후 유사하게 유지되었다. 혈전용해능은 12시간에 최대치를 보였다. 발효 콩물을 그대로 동결건조한 경우는 활성이 유지되었으나 가열 후 동결건조한 경우는 두가지 활성 모두 나타나지 않았다. 된장이 가지는 기능성들은 된장내에 존재하는 미생물 유래의 효소나 펩타이드가 대부분이므로 살균을 위해 가열하면 그 활성을 잃는 것은 보편적인 결과이다. 따라서 일반적인 된장 또는 청국장과의 경우와 마찬가지로 가열하여 섭취할 경우는 기능성이 유지되지 않으므로 제품화할 때는 다른 된장제품과 마찬가지로 주정 첨가를 통한 정균효과를 기대하여야 할 것으로 본다. 동결건조하여 파우더 형태로 제품화하거나 냉장유통이 가능한 형태의 제품으로 개발하는 데에는 문제가 없을 것으로 생각된다.

Table 37. 콩물 발효 제품 및 동결건조 제품의 기능성

	0hr	3hr	6hr	9hr	12hr	18hr	동결 건조	가열후 동결건조
단백질함량 (mg/mL)	67.51	66.52	69.31	65.62	30.46	27.67	26.02	28.19
단백질 분해능	0.00	0.02	0.02	0.03	0.05	0.06	0.08	0.00
혈전용해능 (relative % to the plasmin)	0.00	184.18	184.18	225.00	246.94	204.08	256.00	0.00

성과물(시제품)

고기능성 된장



고기능성 된장가루



성과물(시제품)

공발효 식품 및 화장품소재



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 해외과학기술정보 사이트에서 미생물 유전체 정보 확인

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject?term=txid1390> [orgn]

☐ [Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum YAU B9601-Y2](#)

1. Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum YAU B9601-Y2 Genome sequencing
Taxonomy: [Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum YAU B9601-Y2](#)
Project data type: Genome sequencing
Attributes : Scope: Monoisolate; Material: Genome; Capture: Whole; Method Type: Sequencing
Center for Biotechnology, Bielefeld University
Accession: PRJEA86121 ID: 86121

☐ [Bacillus amyloliquefaciens](#)

2. Bacillus amyloliquefaciens RefSeq Genome
Taxonomy: [Bacillus amyloliquefaciens](#)
Project data type: RefSeq Genome
Attributes : Scope: Monoisolate; Material: Genome; Capture: Whole; Method Type: Other
NCBI
Accession: PRJNA84215 ID: 84215

☐ [Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum UCMB5036](#)

3. Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum UCMB5036 Genome sequencing
Taxonomy: [Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum UCMB5036](#)
Project data type: Genome sequencing
Attributes : Scope: Monoisolate; Material: Genome; Capture: Whole; Method Type: Sequencing
Swedish Agricultural University (SLU)
Accession: PRJEA82107 ID: 82107

☐ [Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum UCMB5113](#)

4. Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum UCMB5113 Genome sequencing
Taxonomy: [Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum UCMB5113](#)
Project data type: Genome sequencing
Attributes : Scope: Monoisolate; Material: Genome; Capture: Whole; Method Type: Sequencing
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Accession: PRJEA81915 ID: 81915

☐ [Bacillus amyloliquefaciens Y2](#)

5. Bacillus amyloliquefaciens Y2 Genome sequencing
Taxonomy: [Bacillus amyloliquefaciens Y2](#)
Project data type: Genome sequencing
Attributes : Scope: Monoisolate; Material: Genome; Capture: Whole; Method Type: Sequencing
Faculty of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, PR China
Accession: PRJNA78839 ID: 78839

제 2 절 해외과학기술정보 사이트에서 된장 연구 정보

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305887>

2012년 4월 2일에 International Journal of Food Microbiology 155: 36-42에
Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation
sequencing 제목으로 게재된 논문

Taxon name	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	R1	R2
<i>Bacillus licheniformis</i>	1.8%	57.4%	15.4%	0.2%	0.9%	0.2%	26.4%	9.4%	0.0%	1.3%	0.3%
<i>Bacillus subtilis</i>	7.1%	21.9%	23.1%	3.7%	3.9%	1.4%	22.0%	9.7%	0.0%	6.9%	0.9%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1.8%	2.0%	3.2%	0.4%	0.4%	0.1%	1.5%	1.0%	0.0%	0.6%	0.0%
<i>Bacillus sonorensis</i>	2.1%	0.9%	6.1%	0.0%	0.0%	0.2%	0.9%	0.6%	0.0%	1.9%	0.0%
<i>Bacillus</i> sp. BCL23-2	0.0%	4.1%	0.9%	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Bacillus</i> sp. BSS2	1.8%	3.4%	6.0%	0.7%	0.4%	0.3%	1.9%	2.3%	0.0%	0.8%	0.0%
<i>Bacillus</i> sp. R-30903	0.0%	0.1%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%	4.2%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Bacillus</i> sp. YIM KMY7	0.5%	1.8%	3.0%	0.2%	0.4%	0.0%	0.2%	1.5%	0.0%	0.3%	0.0%
<i>Brochothrix</i> sp. NJ-25	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%	3.2%	0.0%	0.1%	0.0%
<i>Enterococcus faecalis</i>	22.4%	0.5%	11.2%	19.0%	8.3%	1.4%	0.2%	0.7%	1.6%	0.0%	0.0%
<i>Enterococcus faecium</i>	24.2%	0.4%	12.3%	20.2%	10.0%	3.1%	1.0%	1.7%	13.3%	0.0%	0.0%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0.0%	0.0%	0.4%	1.2%	0.5%	0.3%	0.2%	0.1%	4.2%	0.0%	0.0%
<i>Lactobacillus halophilus</i>	1.4%	0.0%	0.0%	3.6%	0.0%	0.0%	0.2%	4.0%	23.7%	0.1%	0.0%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	0.0%	4.5%	0.0%	15.3%	0.4%	0.0%
<i>Leuconostoc</i> sp. HBB8	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	4.2%	0.0%	1.6%	0.0%	0.0%
<i>Pediococcus acidilactici</i>	0.0%	0.1%	0.0%	4.4%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	1.0%	0.1%	0.2%	0.0%	0.0%	73.0%	30.8%
<i>Staphylococcus lentus</i>	0.0%	0.3%	5.3%	0.5%	20.4%	0.0%	0.3%	0.0%	3.2%	0.0%	0.0%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.0%	0.1%	1.0%	0.2%	10.3%	0.5%	0.3%	0.0%	5.8%	0.0%	0.0%
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.2%	0.5%	2.2%	0.5%	27.8%	0.5%	0.4%	0.2%	0.3%	0.0%	0.0%
<i>Staphylococcus nepalensis</i>	0.0%	0.0%	0.1%	3.2%	0.2%	1.0%	0.7%	6.1%	5.8%	0.0%	0.0%
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	19.8%	0.0%	0.0%	28.2%	4.4%	69.8%	4.4%	28.3%	9.7%	1.5%	53.9%
<i>Weissella hellenica</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	4.9%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Weissella salipiscis</i>	0.2%	0.0%	0.4%	1.0%	1.3%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	9.7%	0.4%
<i>Pseudomonas</i> sp. NJ-22	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	6.2%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%

논문에 게재된 11개 된장시료의 미생물군 분석에서 3개 시료만이 *Bacillus* sp.가 우점종이며, 대부분 다양한 미생물군이 분포되어 있음.

본 연구에서 *Bacillus amyloliquefaciens* 같은 기능성 균을 주 점종으로 하는 것이 우수한 된장제품을 개발하는 것이 경쟁력이 있을 것임.

제 7 장 참고문헌

- Adlercreutz, H., Y. Mousavi, J. Clark, K. Hockerstedt, E. Hamalainen, K. Wahala, T. Makela, and T. Hase. Dietary Phytoestrogens and Cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41: 331-337 (1992)
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC. 15th ed. Method 930.15. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA (1990)
- Ariyoshi Y. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 4: 139-144 (1993)
- Beaumont M. Flavouring composition prepared by fermentation with *Bacillus* spp. *International J. of Food Microbiol.* 75: 189-196 (2002)
- Brink, B. T., C. Damink, H. M. L. J. Joosten, and J. H. J. Huis in't Veld. Occurrence and Formation of Biologically Active Amines in Foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11: 73-84 (1990)
- Cha M, Park JR, Yoon KY. Purification and characterization of an alkaline serine protease producing angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Bacillus* sp. SS103. *J Med. Food.* 8(4): 462-468 (2005)
- Chang M, Chang HC. Characteristics of bacterial-koji and doenjang (soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35: 325-333 (2007)
- Chen QC, Xu YX, Wu P, Xu XY, Pan SY. Aroma impact compounds in liuyang douchi, a Chinese traditional fermented soya bean product. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46: 1823-1829 (2011)
- Choi, K. S., and H. S. Rhee. Characteristics of Doenjang Made from Different Material and Ratio of Koji. *Kor. J. Soc. Food Sci.* 10: 39-44 (1994)

- Choi, M. K., K. H. Sohn, and H. J. Joen. Changes in Odor Characteristics of Doenjang with Different Preparing Methods and Ripening Periods. *Kor. J. dietary culture*. 12: 265-274 (1997)
- Choi, M. Y. Screening of Fibrinolytic Enzyme Producing from Microorganisms and Optimum conditions of Enzyme Production. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 32: 976-980 (2003)
- Choi NS, Chung DM, Han YJ, Kim SH, Song JJ. Purification and characterization of a subtilisin D5, a fibrinolytic enzyme of *Bacillus amyloliquefaciens* DJ-5 isolated from doenjang. *Food Sci. Biotechnol.* 18: 500-505 (2009)
- Choi SH, Ji YA. Changes in flavor of chungkookjang during fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 21: 229-234 (1989)
- Choi, S. Y., M. J. Cheigh, J. J. Lee, H. J. Kim, S. S. Hong, K. S. Chung, and B. K. Lee. Growth Suppression Effect of Traditional Fermented Soybean Paste(doenjang) on the Various Tumor cells. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 28: 458-463 (1999)
- Chou CC, Hwan CH. Effect of ethanol on the hydrolysis of protein and lipid during the aging of Chinese fermented soya bean curds (sufu). *J. Sci. Food Agr.* 66:393-398 (1994)
- Chung HY, Fung PK, Kim JS. Aroma impact components in commercial plain sufu. *J. Agr. Food Chem.* 53: 1684-1691 (2005)
- Conterno L, Joseph CML, Arvik TJ, Henick-Kling T, Bisson LF. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Viticul.* 57: 139-147 (2006)

- Cullere, L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *J. Agr. Food Chem.* 52: 1653-1660 (2004)

- Eng-Leun Mau J, Obert R, Beelman B, Regory G, Ziegler R. 1-Octen-3-ol in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Food Sci.* 57: 704-706 (1992)

- Eum, B. W., B. Y. Kwak, S. Y. Kim, D. H. Sohn, and K. H. Lee. Enhancement of Chitooligosaccharides in Doenjang(Soybean paste) and Kanjang(Soybean Sauce) using *Bacillus subtilis* Koji and *Rhizopus oryzae* Koji. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 35: 291-296 (2003)

- Ferreti A, Flanagan VP. Non-enzymatic browning in a lactose-casein model system. *J. Agric. Food Chem.* 18: 13-18 (1971)

- Fors S. Sensory properties of volatile Maillard reaction products and related compounds: A literature review. pp. 185-286. In: *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. Waller GR, Feather MS (eds). American Chemical Society, Washington DC, USA (1983)

- Graf. E, K. L. Empson, and J. W. Eaton. Phytic Acid. A Natural Antioxidant. *J. Biol. Chem.* 262: 11647-11650 (1987)

- Grbin PR, Henschke PA. Moussy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 255-262 (2000)

- Han YS, Lucas J, Kunz B. Traditional Korean fermented foods (review). *Chem, Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15: 150-160 (1993)

- Harlan, J. M., and L. A. Harker. Haemostasis, Thrombosis and Thromboembolic Disorder. *Med. Clin. North. Am.* 65: 855-857 (1981)

- Ho CT, Carlin JT. Formation and aroma characteristics of heterocyclic compounds in foods. pp. 92-104. In: Flavor Chemistry, Trends and Developments. Teranish R, Buttery RG, Shahidi F. (eds). American Chemical Society, Washington DC, USA (1989)

- Hwang, J. H. Antiotensin I converting enzyme inhibitory effect of doenjang fermented by *B. subtilis* SCB-3 isolated from meju, Korean traditional food. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 26: 775-783 (1997)

- Hyun, K. W., J. S. Lee, J. H. Ham, and S. Y. Choi. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from Korean traditional deonjang. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 33: 24-28 (1981)

- Jeong EJ, Cho WJ, Cha YJ. Volatile flavor compounds in omandungi (*Styela plicata*)-doenjang (soybean paste) soups and stew by cooking. J. Life Sci. 18: 1570-1577 (2008)

- Ji WD, Lee EJ, Kim JK. Volatile flavor components of soybean pastes manufactured with traditional meju and improved meju. J. Korean Agr. Chem. Soc. 35: 248-253 (1992)

- Ji WD, Yang SH, Choi MR, Kim JK. Volatile components of Korean soybean paste produced by *Bacillus subtilis* PM3. J. Microbiol. Biotechnol. 5: 143-148 (1995)

- Jo YJ, Cho IH, Song CK, Shin HW, Kim YS. Comparison of fermented soybean paste (doenjang) prepared by different methods based on profiling of volatile compounds. J. Food Sci. 76: 368-379 (2011)

- Joo KJ, Shin MR. Flavor components generated from thermally processed soybean paste (doenjang and soondoenjang) soups and characteristics of sensory evaluation. Kor. J. Food Sci. Technol. 36: 202-210 (2004)

- Joo, H. K., D. H. Kim, and K. T. Oh. Chemical Composition Changes in Fermented Doenjang Depend on Doenjang koji and its mixture. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 35: 248-253 (1992)

- Jung, B. M., and H. S. Kim. Physicochemical Quality Comparison of Commercial Doenjang and Traditional Green Tea Doenjang. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 132-139 (2004)

- Kim, C. H., J. S. Park, H. S. Sohn, and C. W. Chung. Determination of Isoflavone, Total Saponin, Dietary Fiber, Soy Oligosaccharides and Lecithins from Commercial Soy Products Based on the One Serving Size -Some bioactive compounds from commercialized soy products-. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34: 96-102 (2002)

- Kim, D. H., H. P. Song, K. Y. Kim, J. O. Kim, and M. W. Byun. A Correlation Between Fibrinolytic Activity and Microflora in Korean Fermented Soybean Products. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 33: 41-46 (2004)

- Kim, D. H., and S. H. Kim. Biochemical Characteristics of Whole Soybean Cereals Fermented with *Mucor* and *Rhizopus* Strains. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31: 176-182 (1999)

- Kim, E. Y., and M. R. Rhyu. The Chemical Properties of Doenjang Prepared by *Monascus Koji*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 32: 1114-1121 (2000)

- Kim HG, Hong JH, Song CK, Shin HW, Kim KO. Sensory characteristics and consumer acceptability of fermented Soybean paste (doenjang). *J. Food Sci.* 75: 375-383 (2010)

- Kim, H. J., J. S. Yoo, C. H. Lee, S. Y. Kim, and S. K. Lee. Quality Properties of Soybean Pastes Made Meju with Mold Producing Protease Isolated from Traditional Meju. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 49: 7-14 (2006)

- Kim GM, Lee AR, Lee KW, Park JY, Chun J, Cha J, Song YS, Kim JH. Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from Cheonggukjang. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 997-1004 (2009)

- Kim JG. Changes of components affection organoleptic quality during the ripening of traditional Korean soybean paste - amino nitrogen, amino acids, and color. *J. Food Hyg. Saf.* 19: 31-37 (2004)

- Kim JK, Chang HG, Seo JS, Lee SJ. Character impact compounds in flavors of Korean soy sauce manufactured with the traditional and the improved meju. *J. Microbiol. Biotech.* 3: 270-276 (1993)

- Kim JK, Seo JS, Chang HG, Lee SJ. Characteristic flavors of Korean soybean paste. *J. Microbiol. Biotech.* 3: 277-284 (1993)

- Kim, J. S., S. H. Choi, S. D. Lee, G. H. Lee, and M. J. Oh. Quality Changes of Sterilized Soybean Paste during its Storage. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 1069-1075 (1999)

- Kim JW, Kim YS, Jeong PH, Kim HE, Shin DH. Physicochemical characteristics of traditional fermented soybean products manufactured in folk villages of Sunchang region. *J. Food Hyg. Safety* 21: 223-230 (2006)

- Kim, S. H. New Trends of Studying on Potential Activities of Doen-jang. *Kor. Soybean Digest.* 15: 8-15 (1998)

- Kim, S. H., S. J. Kim, B. H. Kim, S. G. Kang, and S. T. Jung. Fermented of Doenjang Prepared with Sea Salts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 32: 1365-1370 (2000)

- Kim TW, Kim YH, Jung HJ, Park CS, Kim HY. Screening of strains with fibrinolytic activity and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity from doenjang. *Food Sci. and Biotechnol.* in press (2012)

- Kim, Y. H. Biological Activities of Soysaponins and Their Genetic and Environmental Variations in Soybean. *Kor. J. Crop Sci.* 48: 49-57 (2003)

- Kim, YS, Rhee, CH, Park, HD. Isolation and characterization of a bacterium from Korean soy paste doenjang producing inhibition of angiotensin converting enzyme. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 84-88 (2001)

- Ku KL, Chen TP, Chiou R.Y. Apparatus used for small-scale volatile extraction from ethanol-supplemented low-salt miso and GC-MS characterization of the extracted flavors. *J. Agr. Food Chem.* 48: 3507-3511 (2000)

- Kwon, D. J., Y. J. Kim, H. J. Kim, S. S. Hong, and H. K. Kim. Change of Color in Doenjang by Different Browning Factors. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30: 1000-1005 (1998)

- Kwon OJ, Kim JK, Chung Y.G. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *J. Korean. Agr. Chem. Soc.* 29: 422-428 (1986)

- Larroche C. Besson I, Gros JB. High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochem.* 34: 667-674 (1999)

- Lawless HT, Heymann H. *Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices*, Springer Science Inc., New York, NY, USA. pp. 358-368 (1998)

- Lawless HT, Heymann H. *Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices*, Springer Science Inc., New York, NY, USA. pp. 444-446 (1998)

- Lawless HT, Heymann H. *Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices*, Springer Science Inc., New York, NY, USA. pp. 702-707 (1998)

- Lee, J. H., M. H. Kim, and S. S. Im. Antioxidative Materials in Domestic Meju and Doenjang. 1. Lipid Oxidation and Browning during Fermentation of Meju and Doenjang. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 20: 148-155 (1991)

- Lee JS, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional meju. *Korean J. Appl. Biotechnol.* 25: 448-453 (1997)

- Lee, J. S., S. J. Kwon, S. W. Chung, Y. J. Choi, J. Y. Yoo, and D. H. Chung. Changes of Microorganisms, Enzyme Activities and Major Components during the Fermentation of Korean Traditional Doenjang and Kochujang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 247-253 (1996)

- Lee, J. O., and C. H. Ryu. Preparation of Low Salt Doenjang Using by Nisin-Producing Lactic Acid Bacteria. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 75-80 (2002)

- Lee SJ, Ahn B. Comparison of volatile components in fermented soybean pastes using simultaneous distillation and extraction (SDE) with sensory characterisation. *Food Chemistry* 114: 600-609 (2009)

- Lee SJ, Ahn B. Thermal changes of aroma components in soybean pastes (doenjang). *Korean J. Food Sci. Technol.* 40:271-276 (2008)

- Lee, S. K., N. D. Kim, H. J. Kim, and J. S. Park. Development of Traditional Doenjang Improved in Color. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34: 400-406 (2002)

- Lee, S. W., S. Y. Shin, and T. J. Yu. Effect of the Ethanol Contents on the Preparation of Low Salt Doenzang. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 17: 336-339 (1985)

- Madigan M, Martinko J. Brock's Biology of Microorganisms. 11th ed. Pearson Prentice Hall, NJ, USA. pp. 351-355 (2006)

- Messina, M. J., V. Persky, and K. D. R. Setchell. Soy Intake and Cancer Risk: A Review of the in Vitro and in Vivo Data. *Nutr. Cancer* 21: 113 (1994)

- Mori Y, Kiuchi K, Tabei H. Flavor components of miso: basic fraction. *Agr. Biol. Chem.* 47: 1493-1499 (1983)

- Mosandl A, Heusinger G, Gessner M. Analytical and sensory differentiation of 1-octen-2-ol enantiomers. *J. Agric. Food Chem.* 34: 119-122 (1986)

- Park, B. J., K. S. Jang, D. H. Kim, H. S. Yook, and M. W. Byun. Changes of Microbiological and Physicochemical Characteristics of Doenjang Prepared with Low Salt Content and Gamma Irradiation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34: 79-84 (2002)

- Park JS, Lee MY, Kim KS, Lee TS. Volatile flavor components of soybean paste (doenjang) prepared from different types of strains. *Kor. J. Food Sci. and Technol.* 26: 255-260 (1994)

- Park KY, Hwang KM, Jung KO, Lee KB. Studies on the standardization of doenjang (Korean soybean paste). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 343-350 (2002)

- Park SK, Seo KI. Quality assessment of commercial doenjang prepared by traditional method. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 211-217 (2000)

- Rhee CH, Kim BS, shin MK, Woo CJ, Kim JH, Kwon KY, Park HD. Changes in enzyme activity and physiological functionality of doenjang (soybean paste) prepared with extracts of *Phenillinus linteus*. *Korean J. Food Preserv.* 15: 736-742 (2008)

- Rhee, C. H., J. B. Lee, and S. M. Jang. Changes of Microorganisms, Enzyme activity and Physiological Functionality in the Traditional Doenjang with Various Concentrations of *Lintinus edodes* during Fermentation. *J. Kor. Soc. Agric. Chem.*

Biotechnol. 43: 277-284 (2000)

- Seo, J. H., and Y. J. Jeong. Quality Characteristics for Doenjang Using Squid Internal Organs. Kor. J. Food Sci. Technol. 33: 89-93 (2001)

- Setchell, K. R., and A. Cassidy. Dietary Isoflavone : Biological Effects and Relevance to Human Health. J. Nutr. 129: 758s-767s (1999)

- Shin MR, Joo KJ. Fractionated volatile flavor components of soybean paste by dynamic headspace method. J. Korean Soc. Food Sci. and Nutr. 25: 305-311 (1999)

- Sohn, H. S., Y. S. Lee, H. C. Shin, and H. K. Chung. Recent Research for Physiological Mechanism of Soybean in Preventing and Treating Chronic Diseases. Kor. Soybean Digest 17 : 37-60

- Sohn MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. Some biological activities and isoflavone content of chungkukjang prepared with black beans and Bacillus strains. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 662-667 (2001)

- Song, J. Y., C. W. Ahn, and J. K. Kim. Flavor Components Produced by Microorganism during Fermentation of Korean Ordinary Soybean Paste. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 12: 147-152 (1984)

- St. Clair, W. H., and D. K. St. Clair. Effect of the Bowman-Birk Protease Inhibitor on the Expression of Oncogenes in the Irradiated Rat Colon. Cancer Res. 51: 4539-4543 (1991)

- Su CM, Wang Z, Wu QH. Volatile compounds produced from monosodium glutamate in common food cooking. J. Agric. Food Chem. 48: 2438-2442 (2000)

- Sugawara E, Ito T, Odagiri S. Comparison of composition of odor components of natto and cooked soybeans. Agr. Biol. Chem. 49: 311-317 (1985)

- Tabor, C. W., and H. Tabor. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 749-790 (1984)

- Tressl R, Bahri D, Engel KH. Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushroom. *J. Agr. Food Chem.* 30: 89-93 (1982)

- Van den Ouweland GA, Schutte L. Flavor problems in the application of soy protein materials as meat substitutes. pp. 33-42. In: *Flavor of Foods and Beverages*. Charalambous GL, Inglett GE (eds). Academic, NY, USA. (1978)

- Vuralhan Z, Morais MA, Tai SL, Piper MDW, Pronk JT. Identifications and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4534-4541 (2003)

- Wiz, G., B. D. Goldstein, M. Amoruso, D. S. Stone, and W. Troll. Retinoid inhibition of Superoxide Anion Radical Production by Human Polymorphonuclear Leukocytes Stimulated with Tumor Promoters, *Biochem. Biophys. Res. Commum.* 97: 883-888 (1980)

- Wurzenberger M, Grosh W. Enzymatic oxidation of linolenic acid to 1, Z-5-octadien-3-ol, Z-2, Z-5-octadiene-1-ol and 10-oxo-E-8-decenoic acid by a protein fraction from mushroom. *Lipid* 21:261-266 (1986)

- Yang, S. H., M. R. Choi, W. D. Ji, Yi, Y. G. Chung, and J. K. Kim. The Quality of Doenjang(Soybean Paste) Manufactured with *Bacillus brevis*. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 23: 980-985

- Yoo, J. Y., and H. G. Kim. Characteristics of Traditional Mejus of Nation-Wide Collection. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 259-267 (1998)

- Yoo SK, Kang SM, Noh YS. Quality properties on soy bean pastes made with microorganism isolated from traditional soy bean pastes. *Korean J. Food*

Sci. Technol. 32: 1266-1270 (2000)

- Yoo, S. K., W. H. Cho, S. M. Kang, and S. H. Lee. Isolation and Identification of Microorganism in Korean Traditional Soybean Paste and Soybean Sauce. Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol. 27: 113-117 (1999)

- Yoo SS. Reaction flavor technique for generation of food flavor. Food Industry and Nutrition 6: 27-32 (2001)

- Zhang Y, Li X, Lo CK, Guo ST. Characterization of the volatile substances and aroma components from traditional soypaste. Molecules 15: 3421-3427 (2010)

- Zhu BF, Xu Y, Fan WL. High-yield fermentative preparation of tetramethylpyrazine by Bacillus sp. using an endogenous precursor approach. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37: 179-186 (2010)

- 장미. 조선대학교 대학원 박사학위논문 (2009)

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.