

최 중
연구보고서

한국 전통식 간장 및 된장의 異臭(쿰쿰한
냄새) 제거용 균주 및 발효기법 개발

Development of novel method for the
fermentation and isolation of molds strains that
decompose butyric acid, abnormal odor
compound, in Korean traditional soy sauce and
soybean paste.

영남대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본보고서를 “한국 전통식 간장 및 된장의 異臭(큼큼한 냄새) 제거용 균주 및 발효기법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 10월 일

주관연구기관명 : 영남대학교

총괄연구책임자 : 김 중 규

연 구 원 : 박 혜 경

연 구 원 : 이 은 주

연 구 보 조 원 : 강 경 은

연 구 보 조 원 : 김 현 주

위탁연구기관명 : (주) 샘표식품

부설연구소

위탁연구책임자 : 서 병 철

요 약 문

I. 제 목

한국 전통식 간장 및 된장의 異臭(쿵쿵한 냄새) 제거용 균주 및 발효기법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

이취(異臭 : 한국 전통 장류의 쿵쿵한 냄새) 성분(주로 butyric acid)을 분해하는 균주의 선정 및 이취가 없고 풍미가 우수한 한국식 간장 및 된장(주로 *Bacillus subtilis* group strain에 의해 제조 되는)의 발효 기법 개발

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 전통식으로 제조되는 간장과 된장의 특유한 이취를 우리나라의 젊은 세대에서는 불쾌취로 느끼는 경향으로 바뀌고 있다.
- 일본식 간장과 된장 제조에 이용하는 麴(우리나라의 메주에 해당)의 제조는 *Bacillus subtilis* group의 균주가 혼입되어 생육하게 되면, 異臭 문제가 발생하기 때문에 주로 *Aspergillus oryzae* 만 생육할 수 있는 조건에서 제조한다.

- 우리나라의 간장, 된장의 제조에 이용되는 메주는 약 99% 이상의 *Bacillus subtilis* group의 균주와 소수의 사상균에 의해 만들어 진다. 이러한 메주에 의해 제조된 간장과 된장에는 한국 장류 고유의 맛과 향이 생성되지만 이취 성분도 많이 생성된다.
- 각 가정에서 제조한 간장, 된장 중에는 이취가 거의 없는 것에서부터 매우 많은 경우까지 다양하다. 이는 메주가 만들어질 때 관여하는 사상균 때문이라 사료되어지고 있다..
- 한국에서는 아직까지 이취가 없는 제품을 규격화하여 산업적으로 제조할 수 있는 기술이 개발된 적이 없다.
- 전통식품의 계승·보급화 및 세계 식품화를 위해 이취가 없는 한국전통식 간장과 된장을 제조할 수 있는 기술 개발이 절실히 필요한 실정이다.

나. 경제·산업적 측면

- 일본과 우리나라가 공동 작성한 간장의 Codex규격 초안 (Proposed Draft Codex Standard for Soy Sauce, June, 2000)의 천연 양조간장의 제법 중 일본식 간장은 *Aspergillus oryzae*를 종균으로 이용한다고 되어있다
- 우리나라 간장의 경우 bacteria and/or molds and/or yeasts가 이용되어 제조된다고 명기하고 있다.(여기의 bacteria는 앞으로 *Bacillus subtilis* group strain으로 바뀌어야 하리라 본다.)
- 전통된장도 수출증대를 위하여 앞으로 codex 규격화하여 제품을 생산하여야만 한다.
- 일본식 간장, 된장을 제조하여 수출할 때에는 이취문제가 제기되지 않지만 한국식 간장과 된장은 이취 때문에 수출에 어려움이 있다.(한국전통식 간장·된장의 수출이 거의 없다. 장류협동조합 자료. 2002)

- 본 연구의 성공적인 수행은 한국의 전통간장 및 된장의 세계 식품화의 수출장애 요인인 이취문제를 해결함으로써 수출 증진 및 소비 확산에 따라 경제적·산업적으로 큰 이익을 가져올 수 있으리라 사료된다.

다. 사회·문화적 측면

- 우리나라 국민들의 식생활 변화에 따라 국민들 중 나이가 어린 신세대들은 간장, 된장의 이취 때문에 섭취를 꺼리는 경향이 있다.
- 영양적으로 우수한 전통장류(간장 및 된장)의 섭취에 마이너스 요인으로 작용하는 이취성분을 제거하는 균주와 발효기법의 개발은 전통장류의 계승과 발전을 위해 필요한 연구라 사료된다.
- 또한 *Bacillus subtilis* group의 균주로 제조되는 한국식 간장과 된장을 국제적 식품으로 격상하기위해 외국인이 불쾌하게 느끼는 이취의 제거가 필요하리라 본다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

연구 목표	연구 내용 및 범위
○ 이취제거용균주의 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 이취 성분제거 사상균의 분리 및 확인 - 장류의 맛과 향을 개선할 수 있는 우수한 이취 제거용 균주 선정 - 선정 균주 동정 및 우수균주 확정
○ 이취 제거 사상균을 이용한 최적 메주 제조 조건 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 조건에서 메주와 간장 및 된장 제조 - 제조 간장 및 된장의 품질평가 - 최적 메주제조 조건 규명
○ 이취제거 간장과 된장의 최적 발효기법개발	<ul style="list-style-type: none"> - 이취 제거용 사상균으로 메주 제조 - 세균으로 메주 제조 - 간장과 된장 제조 - 간장과 된장의 관능검사에 의한 품질평가 - 이취 성분 정량 - 최적 발효 기법 확정
○ 이취 제거와 맛과 향을 증진할 수 있는 최적 발효기법으로 제조한 간장과 된장의 맛과 향의 개량확인	<ul style="list-style-type: none"> - 최적 발효 조건에서 간장제조 - 최적 발효 조건에서 된장제조 - 맛성분 분석 - 향기 성분 분석 - 관능검사 - 맛과 향의 개량 확인
○ 전통메주로 제조하는 간장 및 된장의 이취를 이취제거 균주를 이용하여 제거하는 방법 개발	
○ 이취발생 저하 균주의 육종	<ul style="list-style-type: none"> - 간장 및 된장 제조용 <i>Bacillus subtilis</i> 를 돌연변이시켜 이취의 발생 감소

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구 개발 결과

- *Penicillium polonicum*과 *Aspergillus oryzae*는 장류에 존재하는 이취성분인 butyric acid를 분해하여 장류의 향을 개량하고 풍미도 개량한다. 단지 *Penicillium polonicum*은 mycotoxin을 생산하기 때문에 이 균의 배양물 전체를 이용하지 못하고 이 균이 생산하는 butyric acid 분해 효소를 조정제하여 이용할 수 있다.
- *Aspergillus oryzae*를 삶은 대두에 접종하여 30℃, 7일간 배양한 배양물을 재래식 간장 및 된장이나 *Bacillus subtilis* 로 제조한 메주에 20%의 비율로 첨가하여 30℃에서 1개월 이상 숙성시키면 이취가 없고 풍미가 우수한 장류를 얻을 수 있다.
- 재래식 메주 제조에 가장 많이 관여하는 균인 *Bacillus subtilis*를 돌연변이시켜 butyric acid를 생산하지 않는 균을 육종하였다.

2. 활용방안

- 한·일간에 확정된 Codex 규격초안 중 한국 간장 제조용 균으로 등록된 bacteria and/or molds and/or yeast의 이름 중 molds 대신에, 여기서 발견된 사상균의 균명을 사용할 수 있는 터전을 마련
 - 특허 출원
 - 산업체 기술이전
 - 현장 애로 해결
 - 전국 독농가에 기술 이전 : 영남대학교 부설 장류연구소나 농촌진흥원 주최로 전국 독농가에 개발된 기술을 이론과 실습교육으로 전수
- 관련 학회에서 발표를 통해 새로이 개발된 이론과 기술을 공개

3. 추가 기술 개발

- 이취 제거균에서 이취 제거 효소 분리 및 성질 규명과 대량 생산법 확립
- 이취성분을 다량 함유한 간장과 된장에서 이취 성분을 제거할 수 있는 기술개발

Summary

I . Title of Research

Development of novel method for the fermentation and isolation of molds strains that decompose butyric acid, abnormal odor compound, in Korean traditional soy sauce and soybean paste.

II . The Objective and Importance of Research

1. The Objective of Research

This research aims to develop new methods for the fermentation that produce only good fragrance but not bad fragrance, and to identify/isolate unknown molds strains that degrade butyric acid, a major compound of bad fragrance.

2. The Importance of Research

1) Technical aspects

The rate of people who feel uncomfortable for the bad fragrance in Korean soy sauce and soybean paste is increasing.

Japanese make Koji which is used for Japanese soy sauce and soybean paste, in the optimal condition for *Aspergillus oryzae* but not for *Bacillus subtilis* group strains because the contamination of *Bacillus*

subtilis group can lead to the bad fragrance.

Korean Meju for Korean soy sauce and soybean paste are made by ~ 99% of *Bacillus subtilis* group strains and few molds. Thus, Korean soy sauce and soybean paste can contain many compounds of bad fragrance; mainly butyric acid.

Soy sauces and soybean pastes from many different families in Korea contain different levels of bad fragrance. This should be the different contamination of molds involved in the making of Meju.

There is no technique to produce a commercial brand, which contains no bad fragrance.

For the succession and spread of Korean traditional foods and for making Korean soy sauce and soybean paste as international foods, it is necessary to develop a new technique, which remove bad fragrance.

2) Economic and industrial aspects

Japanese soy sauce is mainly made by *Aspergillus oryzae*, and it was drafted in the Codex rule: standard for making soy sauce was drafted in June, 2000).

Korean soy sauce was proposed as being mainly made by bacteria and/or molds and/or yeasts (the bacteria in this rule has to be changed to *Bacillus subtilis* strain groups).

For increasing exportation, Korean traditional soybean paste also has to be standardized and has to be produced by the rule.

There are little troubles when Japanese export their soy sauce and soybean paste because there is little bad fragrance, but Korean do (there is few export of Korean traditional soy sauce and soybean paste, soy sauce cooperation, 2002).

This research will greatly contribute for the increase of exportation and consumption, and will leads to the great growth of Korean economy and industry.

3) Sociological and cultural aspects

The population of young generation who do not like Korean traditional soy sauce and soybean paste is increasing because of the change in the dietary life.

Bad fragrance is one factor to reduce the consumption of soy sauce and soybean paste that possess lots of nutrient and bioactive compounds. Thus, this research to develop new fermentation method and to isolate/identify bacterial strains for improving the fragrance of Korean soy sauce and soybean paste is very important.

In addition, to make Korean traditional soy sauce and soybean paste as international foods, it is very critical to remove the bad fragrance since those make foreigners feel uncomfortable.

III. Research Contents and Scope

Contents	Scope
<ul style="list-style-type: none"> ◦ Isolation and selection of the strains that decompose abnormal odor compound, butyric acid 	<ul style="list-style-type: none"> • Isolation/seletion of the strains that decompose abnormal odor compound, butyric acid • Identification of the strains that improve the taste and smell of the soy sauce and soybean paste • Characterization of the strains
<ul style="list-style-type: none"> ◦ Establishment of the optimal condition for making Meju by using the new isolated strains 	<ul style="list-style-type: none"> • Production of mea-ju, soy sauce and soybean Meju by paste in several conditions • Estimate of the quality • Examination of the proper condition of the traditional Meju
<ul style="list-style-type: none"> ◦ Development of the optimal fermentation methods for soy sauce and soybean paste by using the newly isolated strains 	<ul style="list-style-type: none"> • Production of Meju by the newly isolated molds • Production of the Meju by bacteria • Examination of the quality by tasting • Quantitative analysis of bad fragrance • Establishment of the optimal fermentation method
<ul style="list-style-type: none"> ◦ Establishment of the new fermentation optimal methods: verification of the improved taste and smell 	<ul style="list-style-type: none"> • Production of soy saybean paste in the optimal condition • Production of soy sauce in the optimal condition • Analysis of the flavor compounds • Analysis of the aroma compounds • Tasting • Verification of the improved taste and smell
<ul style="list-style-type: none"> ◦ Development of the proper fermentation methods for making Korean traditional Meju by using the isolated strains 	
<ul style="list-style-type: none"> ◦ Breeding of the isolated strains 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation of <i>Bacillus subtilis</i> for making soy sauce and soybean paste and reduction of bad fragrance

IV. Result of Study and Application Plan

1. Result of Study

Penicillium polonicum and *Aspergillus oryzae* produce enzymes that degrade butyric acid, one major compound for bad fragrance, and lead to the improvement of the taste and fragrance of soy sauce and soybean paste. However, because *Penicillium polonicum* also produce mycotoxin, which is harmful for human, only the enzyme from *Penicillium polonicum* degrades butyric acid is applicable.

We succeeded to produce improved fragrant and tasty soy sauce and soybean paste by the following method: Culture *Aspergillus oryzae* with boiled beans at 30 degrees for 7 days, and isolate the compounds from the culture and reseed those to traditional soy sauce, soybean paste, or Meju, which is made by *Bacillus subtilis* at 20 %, and culture at 30 degrees over 1 month.

We mutated *Bacillus subtilis*, mainly involved in the fermentation of Korean traditional Meju, and isolated *Bacillus* strains which do not produce butyric acid.

2. Application Plan of Research Results

Instead of using bacteria and/or molds and/or yeasts, we can use the name of isolated bacteria that we newly identified for the Codex rule.

Application for a patent

Transfer of the techniques

Solving of the industrial problems

Transfer of the techniques to the farmhouses on a national scale through the lectures of an annex institute for soy sauce and soybean paste of the university of younngnam and of a development of an agricultural community

Open the new theories and techniques by presentations in related conferences

3. Development of additional Techniques

Purification of the enzymes that degrade the compounds of bad fragrance, analysis of the enzymatic activities, and establishment of the production in a large-scale

Development of new techniques to remove already existed bad fragrance in soy sauce and soybean paste

Contents

Presentation note	1
Abstract(in Korean)	3
Summary(in English)	9
Contents(in English)	15
Contents(in Korean)	17
Chapter 1. Summary of research	19
1. The objective and importance of research	19
2. Scope and research	21
Chapter 2. Contents and results of research	23
1. Technical development of our study on the domestic and foreign researches	23
2. Present situation of our study on the domestic and foreign researches	24
Chapter 3. Contents and results of research	25
1. Introduction	25
2. Isolation and selection of strains that secrete lytic enzyme of the butyric acid, abnormal odor compound, and establishment of optimal for making soy sauce and soybean paste by the strain	27

3. Characterization of isolated strains	51
4. Identification of the strains	58
5. Examination of the taste and fragrant of the soy sauce and soybean paste the are produced in the optimal condition for the fermentation	63
6. Breeding of the strains (<i>B. subtilis</i>) that do not produce butyric acid	90
Chapter 4. Achievement of study and contribution	94
1. Achievement of study	94
2. Contribution	96
Chapter 5. Application plan of research results	97
1. Application plan	97
2. Development of additional techniques	97
3. The necessity of additinal techniques and industrialization	97
Chapter 6. Information of foreign scientific techniques	99
Chapter 7. References	100

목 차

제출문	1
요약문	3
Summary	9
Contents	15
목차	17
제 1 장 연구개발과제의 개요	19
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	19
제 2 절 연구의 범위	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술 개발현황	23
제 2 절 국내·외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치	24
제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과	25
제 1 절 서 론	25
제 2 절 이취제거용 균주의 분리 및 선정과 이취제거 장류 의 최적 제조 조건	27
제 3 절 선정 균주의 동정	51
제 4 절 우수 균주의 확정	58
제 5 절 이취 제거와 맛과 향을 증진 할 수 있는 최적 발효	

기법으로 제조한 간장과 된장의 맛과 향의 개량 확 인	63
제 6 절 Butyric acid를 생산하지 않는 균(<i>B. subtilis</i>)의 육 종	90
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	94
제 1 절 연구 개발 목표 달성도	95
제 2 절 관련 분야에의 기여도	96
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	97
제 1 절 활용방안	97
제 2 절 추가 기술 개발	97
제 3 절 추가 연구의 필요성 및 기업화	97
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학 기술정보	99
제 7 장 참고문헌	100

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

이취 (異臭 : 전통장류의 콧냄새, 성분 : butyric acid, 3-methyl butanoic acid) 제거능이 있는 균주의 선정 및 이취가 없는 한국식 간장 및 된장 (주로 *Bacillus subtilis* group strain에 의해 제조 되는)의 발효 기법 개발

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 전통식으로 제조되는 간장과 된장의 특유한 이취를 우리나라의 젊은 세대에서는 불쾌취로 느끼는 경향으로 바뀌고 있다.
- 일본식 간장과 된장 제조에 이용하는 麴(우리나라의 메주에 해당)의 제조는 *Bacillus subtilis* group의 균주가 혼입되어 생육하게 되면, 이취 문제가 제기되기 때문에 주로 *Aspergillus oryzae* 만 생육할 수 있는 조건에서 제조한다.
- 우리나라의 간장, 된장의 제조에 이용되는 메주는 약 99% 이상의 *Bacillus subtilis* group의 균주와 소수의 사상균에 의해 만들어 진다.^{1~6)} 이러한 메주에 의해 제조된 간장과 된장에는 이취 성분이 많이 함유 될 수 있다.^{7~16)}
- 각 가정에서 제조한 간장, 된장 중에는 이취가 거의 없는 것에서부터 매우 많은 경우까지 다양하다. 이는 메주가 만들어질 때 관여하는 사상

균 때문이라 사료된다.^{17~24)}

- 한국에서는 아직까지 이취가 없는 제품을 규격화하여 산업적으로 제조할 수 있는 기술이 개발된 적이 없다.
- 전통식품의 계승·보급화 및 세계 식품화를 위해 이취가 없는 한국식 전통 간장과 된장 (주로 *Bacillus subtilis* group의 strain으로 제조되므로)을 제조할 수 있는 기술개발이 필요하다.

나. 경제·산업적 측면

- 일본과 우리나라가 공동 작성한 간장의 Codex규격 초안 (Proposed Draft Codex Standard for Soy Sauce, June, 2000)의 천연 양조간장의 제법 중 일본식 간장은 *Aspergillus oryzae*나 *Aspergillus sojae*를 종균으로 이용한다고 되어있다.
- 우리나라 간장의 경우 bacteria and/or molds and/or yeasts가 이용되어 제조된다고 명기하고 있다. (여기의 bacteria는 앞으로 *Bacillus subtilis* group strain으로 바뀌어야 하리라 본다)
- 전통된장도 수출증대를 위하여 앞으로 codex 규격화하여 제품을 생산하여야만 한다.
- 일본식 간장, 된장을 제조하여 수출할 때에는 이취문제가 제기되지 않지만 한국식 간장과 된장은 이취 때문에 수출에 어려움이 있다.(한국전통식 간장·된장의 수출이 거의 없다. 장류협동조합 자료. 2002)
- 본 연구의 성공적인 수행은 전통간장 및 된장의 세계 식품화와 수출장에 요인인 이취문제를 해결함으로써 수출 증진 및 소비 확산에 따라 경제적·산업적으로 큰 이익을 가져올 수 있으리라 사료된다.

다. 사회·문화적 측면

- 우리나라 국민들의 식생활 변화에 따라 국민들 중 나이가 어린 신세대들은 간장, 된장의 이취 때문에 섭취를 꺼리는 경향이 있다.

- 영양적으로 우수한 전통장류(간장 및 된장)의 섭취에 마이너스 요인으로 작용하는 이취성분의 제거용 균주와 발효기법의 개발은 전통장류의 계승과 발전을 위해 필요한 연구라 사료된다.
- 또한 *Bacillus subtilis* group의 균주로 제조되는 한국식 간장과 된장의 고유한 맛과 향을 살리고 국제적 식품으로 격상하기위해 외국인이 불쾌하게 느끼는 이취의 제거가 필요하리라 본다.

제 2 절 연구의 범위

- 이취 성분을 다른 성분으로 transformation(변형) 하는 사상균 분리
- *Bacillus subtilis* 와 분리 사상균을 종균으로 된장을 제조하여 맛과 향을 관능 검사한 후 우수한 사상균을 선별하고 동정함
- 동정 결과로 mycotoxin 생산 가능균 사용배제
- 이취 제거를 위한 분리 사상균의 최적 배양 조건(온도, 기간)규명
- 이취 제거 간장의 최적 발효 기법 개발
(온도, *Bacillus subtilis*로 제조한 메주에 분리 사상균으로 제조한 메주의 첨가 비율, 관능검사에 의한 품질 평가, butyric acid, 3-methyl butanoic acid의 GC 정량)
- 이취 제거 된장의 최적 발효 기법 개발
(온도, *Bacillus subtilis*로 제조한 메주에 분리 사상균으로 제조한 메주의 첨가 비율, 관능검사에 의한 품질 평가, butyric acid, 3-methyl butanoic acid의 GC 정량)
- 이취 제거 및 맛과 향을 증진할 수 있는 최적 발효기법으로 제조된 간장과 된장의 맛 성분과 향기 성분 분석 및 고찰에 의해 개발된 이취제거 균과 최적발효기법의 평가
- 전통 메주로 제조하는 간장 및 된장의 이취를 이취제거 균주를 이용하여 제거하는 방법 개발

- *Bacillus subtilis*의 이취발생 저하 균주 육종 : 간장 및 된장 제조용 *Bacillus subtilis*를 돌연변이시켜 이취의 발생 감소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술 개발현황

1. 국 내

- 간장의 Codex 규격초안에서 우리나라 간장제조에 이용되는 균을 bacteria and/or molds and/or yeasts로 표시하고 있으나, 앞으로 세균과 사상균은 균명으로 표시되어야 한다.
- 현재 bacteria는 *Bacillus subtilis* group strain (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*등)으로 표시가 가능하나 molds는 대표균을 표시하기가 어렵다.
- 이를 해결하기 위해 본 연구실에서는 수년전부터 우리나라 여러 지역의 많은 메주에서 사상균들을 분리하여 *Bacillus subtilis* group strain과 분리한 각 사상균을 종균으로 사용하여 메주를 만들어 된장을 제조한 후 품질을 조사하였다.^{17~24)}
- 그 결과 사상균에 따라 품질(맛, 향)이 매우 다양하였고, 맛과 향이 좋은 된장 중에는 이취성분(butyric acid, 3-methyl butanoic acid)이 소실되는 경향을 발견하였다.^{7~24)}
- 이취성분의 소실은 특정의 사상균 때문이었다.^{7~24)}
- 이취성분인 butyric acid와 3-methyl butanoic acid를 다른 성분으로 transformation(변형)시켜 이취를 제거하는 사상균의 확정(동정포함), 이러한 사상균들 중 한국식 간장과 된장의 맛, 향을 증진시킬 수 있는 균의 선별과 이 균을 이용한 발효 기법등에 대한 구체적 연구가 더 필요하다.

2. 국 외

- 麴 (일본식 간장 및 된장제조용)을 제조할 때 이취발생을 억제하기 위해 *Bacillus subtilis*의 생육을 억제하고 *Aspergillus oryzae*의 생육을 증진시키는 배양조건을 이용하고 있다.
- Natto는 익힌 대두에 *Bacillus natto* (*Bacillus subtilis*로 분류됨)를 이취 발생 전단계인 18시간 이내에 배양을 완료한 후 4℃ 이하에서 저장하고 식용화한다. 저장기간이 길어지면 이취가 발생하고 그렇게 되면 natto를 폐기한다. 또 natto를 실온에 두면 수시간 내에 이취가 발생하여 식용으로 사용할 수 없게 된다.

제 2 절 국내 · 외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치

- 신세대들의 소비형태의 변화로 앞으로는 이취가 없는 간장과 된장의 소비가 점점 증가하리라 예상됨
- 이취의 조절로 소비자의 다양한 욕구를 충족시킬 수 있는 다양한 제품 개발이 가능
- 외국인들이 불쾌하게 느끼는 이취의 제거로 간장, 된장의 수출증대 및 세계 식품화에 기여
- 세계적으로 간장과 된장의 이취제거용 균과 그 균을 이용한 발효기법이 개발된 적이 없으므로 기술도입이 불가능함

제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과

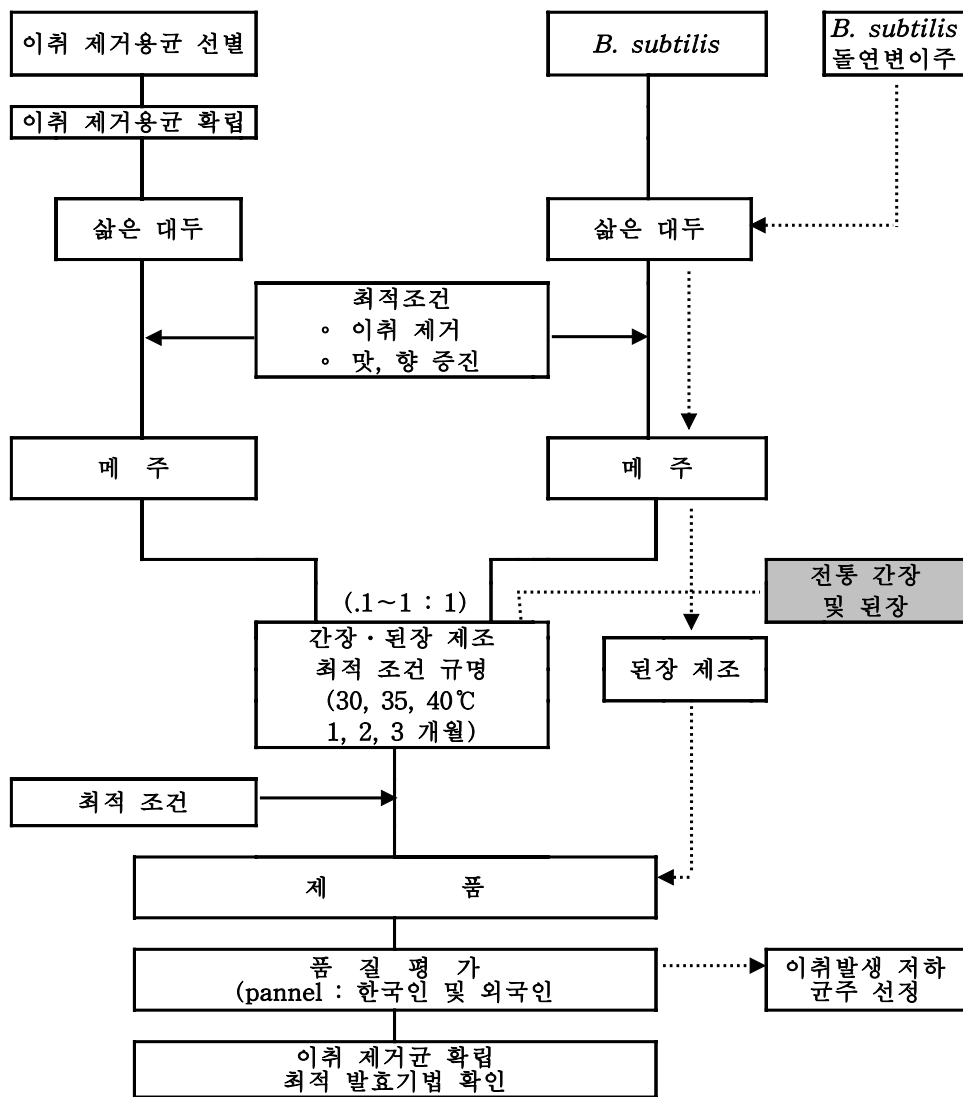
제 1 절 서 론

1. 연구개발 방법 및 설계

- 메주에 서식하는 사상균 중에서 이취성분인 butyric acid와 3-methyl butanoic acid를 변형(transformation, bioconversion) 시키는 사상균을 선별(이취성분 제거용 사상균)
- 이취성분 제거용 사상균 중에서 한국 전통식 간장과 된장의 풍미를 개량할 수 있고, 위생적으로 안정성이 있는 균을 선정(이취제거용 선정균 확립)
- 풍미가 우수하고 이취가 제거된 간장과 된장의 발효 방법을 확립하기 위하여 다음과 같이 연구를 진행함
 - 선정된 이취제거용 사상균을 종균으로 이취 제거능과 풍미가 우수한 메주(麴)제조 최적 조건을 조사 한 후 최적조건에서 메주(麴)를 제조함(사상균 메주<麴>)
 - *Bacillus subtilis*를 종균으로 메주(麴)제조(세균메주<麴>)
 - 사상균 메주(麴)와 세균메주(麴), 전통 간장 및 된장을 다양한 비율로 혼합하여 여러 온도에서 발효·제조된 간장과 된장의 품질을 비교하여 최적발효 조건을 규명함
- 관능평가 : 한국인 및 외국인 panel 이용
- 전통메주로 제조하는 간장과 된장의 이취를 이취제거 균주를 이용하여 제거하는 방법개발
- *Bacillus subtilis*의 이취발생 저하 균주 육종 : 간장 및 된장 제조용 *Bacillus subtilis*를 돌연변이 시켜 이취의 발생 감소
- 최적 발효조건으로 제조한 간장과 된장의 이취성분제거 확인은 물론 맛

과 향등을 관능검사하고 각 성분을 분석하여 전통식 간장과 된장의 data와 비교 고찰하여 품질을 평가하고 우수한 이취 제거균과 최적발효 기법을 확립

2. 연구 개발 추진체계



제 2 절 이취제거용 균주의 분리 및 선정과 이취제거 장류의 최적 제조 조건

채래식 간장이나 된장 중에는 이취 성분이 없는 제품이 존재한다. 채래식 간장과 된장을 제조하는 우리나라 전통식 메주는 주로 butyric acid를 생성하는 *Bacillus subtilis*와 소수의 사상균에 의해 자연 상태에서 제조 되고 있는 점에서, 명백히 소수의 사상균 중에는 butyric acid를 분해하는 균이 있음을 추론할 수 있다.

이러한 점에서 많은 전통식 메주에서 10^6 cells/g 이상 생존하는 균을 1차로 선정하였다. 1차 선별균은 butyric acid 분해능을 메주 제조 조건에 따라 더 자세히 검토하여 2차로 균을 선별하였다. 균의 3차 선별조건은 이취 제거균을 사용하여 제조한 메주와 일반 간장 및 된장과 혼합하여 이취를 제거한 후 맛과 향의 개량 효과를 기준으로 하였다. 이 때에는 분리균이 독성을 생성하는 균일지도 모르기 때문에 일본에서는 간장(J)과 미소(M)의 Koji(麴)제조에 이용되는 *Aspergillus oryzae* J, M 2종을 함께 실험에 이용하였다. *Aspergillus oryzae*는 Koji(麴) 제조 중 *Bacillus subtilis*와 함께 생육하면 오히려 butyric acid를 생성함이 밝혀져 있으므로 이를 고려하여 배양을 별도로 시켰다.²⁵⁾

1. 재료 및 방법

가. 사상균 분리용 메주

경북 영덕, 경주 및 의성지역의 각 가정에서 전통식으로 메주를 제조한 45개의 메주와 경북 안동, 자인 및 청송농협에서 제조 판매되고 있는 총 48개의 메주를 사용하였다.

나. 사상균 분리용 배지 및 분리

Potato dextrose broth(Difco 사) 24g을 증류수 1ℓ에 용해한 배지를 사용하였으며, pH는 5.1이었다. 사상균 분리는 메주를 분말화 하여 10⁶배 이상 희석한 후 상법에 준하여 분리하였다.

다. 1차 선별

분리한 사상균을 삶은 대두에 일정기간(각 균의 균사가 충분히 자라는 기간) 배양한 배양물과 *Bacillus subtilis* PM3는 삶은 파쇄대두에 3일간 배양한 배양물을 1 : 1의 비율로 혼합하고 여기에 NaCl을 배양물의 수분함량에 12%되도록 첨가하여 혼합한 후 30℃에서 1개월 이상 숙성시켰다. 이러한 방법으로 제조하여 숙성시킨 된장 중 butyric acid의 함량을 제 5 절의 방법과 같이 측정된 data와 관능검사결과를 합하여 이취성분 제거균 7균주를 선별하였다.

라. 2차 선별

1차로 선별된 7균주를 대상으로 삶은 대두 배지에서 배양온도를 달리 배양하여 *Bacillus subtilis* PM3의 배양물과 혼합한 후 NaCl을 첨가하여 30℃에서 각각 1개월 및 2개월간 된장을 제조한 후 butyric acid의 제거능과 관능검사서 향과 맛의 증진효과를 고려하여 2균주를 선별하였다.

마. 3차 선별

2차로 선별된 2균주와 현재 일본에서 간장(J)과 미소(M)용 Koji(麹)제조에 이용되고 있는 *Aspergillus oryzae* J와 M 2균주를 함께 이용하였다. 2차 선별된 상기 2가지 사상균은 25℃, 7일간, *Aspergillus oryzae* J와 M 2균주는 30℃, 7일간 삶은 대두에 배양한 배양물과 *Bacillus subtilis* PM3로 제조한 메주, 재래식 간장 및 된장을 여러 가지 비율로 혼합하고 균 배양물에는 수분 함량당 NaCl을 15%되도록 첨가하여 일정기간 숙성시켰다. 숙성된 제품 중에서 butyric acid(이취성분)는 Gas Chromatography로 함량의 변화를 측정하였고, 풍

미의 양부는 관능검사로 측정하였다.

바. 관능검사 및 유의성 검사

한국공업규격 관능검사일반법(한국공업규격. KSA-7001 관능검사일반법 1976, 한국공업규격. 관능에 의한 풍미검사법. KSA-7002 1977)에 준하여 관능패널을 선발하였다. 건강과 의욕, 참여가능성, 성별 등을 고려하여 영남대학교 응용미생물학과 학생 40명을 대상으로 맛의 4원미인 감미, 고미, 신미, 산미의 감도시험을 실시하여 최소감미량과 최소감각량이 너무 낮거나 높은 사람은 제외하였으며 한 물질의 특정성분에 대하여 3점 시험법으로 패널에 대한 식별능력을 시험하여 정답비율이 60% 이상인 남자 3명 여자 9명 총 12명을 선발하였다. 패널 훈련은 장(장건형:식품의 기호성과 관능검사 개문사 1977)의 기법에 따라 맛과 향 등에 대한 기본지식을 훈련시켰으며, 관능검사 방법과 합리적이고 안정된 판정요령 및 기준을 숙지시키고 수차례 반복된 시도를 통하여 패널 자신이 된장의 풍미 검사에 익숙 될 수 있도록 한 후 판정에 임하게 하였다. 이 중 2명은 총괄을 하고 10명은 관능검사를 시행하게 하였다. 채점은 훈련된 패널 10명으로 하여금 5점 척도 즉 매우 나쁨 1점, 조금 나쁨 2점, 보통임 3점, 좋음 4점, 매우 좋음 5점으로 시료의 풍미를 채점하도록 하였다.

유의성은 2004년 SPSS program을 이용하여 T-test와 Duncan test로 검정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 재래식 메주 중 사상균의 분리

재래식 메주 제조균은 butyric acid를 생성하는 *Bacillus subtilis*가 주체이지만 이 외 여러 종의 사상균이 메주 제조에 관여하고 있다.²⁵⁾ 재래식 메주로 제조한 간장이나 된장 중에는 이취 성분(butyric acid)이 없는 것들이 있다. 이것은 재래식 메주 중에 서식하고 있는 사상균 중에 butyric acid를 분해하는 균이 있음을 추론할 수 있다. 동일 지역, 동일 가정에서 매년 제조하는 간장이나 된장의 풍미가 항상 일정하지 않는 현상에서 butyric acid를 분해하는 균을 좀 더 쉽게 선별

하기 위하여 48개의 메주에서 10^6 cells/g 이상 존재하는 사상균을 200여종 분리하였다.

나. butyric acid를 분해하는 우수한 사상균의 선별

재래식 메주에서 분리한 사상균에서 butyric acid를 분해하는 7종의 균을 1차로 선별할 수 있었다. 1차로 선별된 7종의 균주를 삶은 대두에 15~30℃, 3~9일간 배양하여 제조한 메주와 *Bacillus subtilis* PM3로 제조한 메주를 1 : 1의 비율로 혼합하여 30일간 숙성하여 제조한 된장의 품질은 Table 1 및 2와 같으며, 60일간 숙성하여 제조한 된장의 품질은 Table 3, 4와 같다.

30일간 숙성하여 제조한 된장의 경우 butyric acid의 제거능(Table 1)과 관능검 사상 풍미(Table 2)는 사상균 241 및 301의 메주를 이용한 경우가 우수하였다. 메주 제조기간은 5~9일간, 메주 배양온도는 약 25℃가 최적이었으며, 60일간 숙성하여 제조한 된장의 경우(Table 3, 4)도 butyric acid의 제거능과 풍미가 사상균 241 및 301의 메주를 이용한 경우가 다른 사상균보다 더 우수하였으므로 사상균 241 및 301이 2차로 선별되었다.

30일간 숙성한 된장과 60일간 숙성한 된장과의 butyric acid의 잔존 함량과 풍미의 결과가 일률적이지 않은 점은 butyric acid를 분해하는 효소의 성질 때문이라 사료된다. 이에 대한 좀 더 자세한 고찰은 제 4절 우수 균주의 확정에서 볼 수 있다.

다. 장류의 풍미를 개선 할 수 있는 선별 사상균 배양물의 혼합비율

Table 5에서와 같이 *Bacillus subtilis* PM3로 제조한 메주와 2차 선별된 사상균 241과 301로 제조한 메주는 1 : 0.2의 혼합비율로 제조한 된장의 butyric acid의 제거율과 풍미가 가장 좋았으며, 사상균 241과 301(Table 6)을 1 : 0.2의 비율로 혼합하여 30℃에서 30일간 숙성시켜 제조한 된장의 품질이 가장 우수하였다.

Table 7과 8에서와 같이 전통식 메주로 제조한 재래식 간장에서 상균 241과 301(Table 9)의 배양물을 1 : 0.2의 비율로 혼합하여 30일간 숙성시켰을 때 butyric acid의 제거능과 풍미가 가장 좋았음을 알 수 있었으며, 전통식 메주로 제조한 재래식 된장에서 사상균 241과 301(Table 9, 10)의 배양물을 1 : 0.2의 비율로 혼합하여 30일간 숙성시켰을 때 butyric acid의 제거능과 풍미가 가장 좋았

음을 알 수 있었다.

Bacillus subtilis PM3과 *Aspergillus oryzae*의 배양물을 1 : 1로 혼합하여 제조한 된장의 경우는 Table 11 및 12과 같이 butyric acid의 함량의 최소치와 관능검사상 풍미는 숙성기간이 5주째일 때가 가장 좋은 것으로 나타났다. Table 11에서 5주째의 *Bacillus subtilis* PM3 배양물 단독으로 5주간 숙성시킨 된장의 경우 butyric acid의 함량이 “0”인데 비해서 약간의 *Aspergillus oryzae* 배양물을 혼합했을 때 약간의 butyric acid가 남아있는 경우는 butyric acid의 분해 효소는 butyric acid만 분해하는 것이 아니라 butyric acid보다 탄소 수가 더 많은 지방산을 저급의 지방산으로 분해함으로 butyric acid를 분해했으나 탄소수가 더 많은 지방산이 분해 되면서 butyric acid를 거쳐 더 저급으로 분해 되는 과정에서 butyric acid가 일시적으로 잔존하기 때문이라 사료된다. (제 4절 2항을 참조 바람)

재래식 간장(Table 13, 14)과 재래식 된장(Table 15, 16)에는 간장용 Koji 제조균인 *Aspergillus oryzae* J를 삶은 대두에 접종하여 30℃에서 7일간 배양한 배양물을 3 : 1로 혼합하여 30℃에서 2주간 숙성시킬 때 butyric acid의 함량이 가장 적었으며, 풍미도 가장 좋았다. 그러나 *Aspergillus oryzae* J의 배양물을 이용한 재래식 간장의 이취제거는 Table 17에서와 같이 재래식 간장에 *Aspergillus oryzae* J의 배양물의 혼합비율이 낮을수록 품질에 좋은 영향을 미친다. *Aspergillus oryzae* J의 배양물의 혼합비율이 높아지면 이 배양물 자체의 숙성기간이 필요해 진다. 그러나 butyric acid의 분해나 타 맛성분의 생성에 필요한 효소반응은 짧은 기간 내에 이루어진다. *Aspergillus oryzae* J 배양물을 효소원으로만 이용할 것인지, 배양물 자체가 장류(간장 혹은 된장)로 숙성되기를 원하는지에 따라 숙성기간이 다르게 되고 배양물의 혼합비가 다르게 되리라 사료된다.

효소원으로만 볼 때 Table 17에서와 같이 혼합비율이 낮을수록(20% 이하) 좋은 결과가 얻어진다. 재래식 된장의 경우에는 Table 18과 19에서와 같이 *Aspergillus oryzae* J 배양물을 효소의 급원으로만 볼 때는 재래식 된장에 *Aspergillus oryzae* J 배양물의 혼합비가 낮을 경우가 품질이 우수하였다. 혼합비가 높고 *Aspergillus oryzae* J 배양물의 숙성을 고려하면 혼합비가 높고 숙성기간이 수개월 필요하게 되리라 사료되며, *Aspergillus oryzae* J 배양물 때문에 재래식 장류와는 풍미가 다르게 되리라 사료된다.

Table 1. *Bacillus subtilis* PM3와 선별 사상균의 배양물(7종)을 1:1의 비율로 혼합하여 30일간 숙성시켜 제조한 된장의 유기산의 분포¹⁾

(mg/100g)

메주 종류	메주 제조 기간 (일)	메주 제조 온도 (°C)	butyric acid	3-methyl butanoic acid	메주 종류	메주 제조 기간 (일)	메주 제조 온도 (°C)	butyric acid	3-methyl butanoic acid
PM3 ²⁾	3	30	1.45	4.43	PM3 : 사상균 24	3	25	0.02	1.42
	5		0.87	8.19		5		0.00	1.29
	7		0.92	3.24		7		0.00	3.44
	9		0.40	7.80		9		0.19	1.02
PM3 : 사상균 30	3	25	0.00	3.46	PM3 : 사상균 162	3	25	0.20	2.48
	5		0.59	2.68		5		4.53	9.31
	7		0.22	5.46		7		0.31	3.01
	9		2.16	2.35		9		1.23	4.22
PM3 : 사상균 1	3	15	0.14	1.92	PM3 : 사상균 241	3	15	0.03	1.07
		20	0.27	2.20			20	1.41	1.74
		25	0.48	3.16			25	1.68	3.19
		30	2.50	4.10			30	0.05	1.78
	5	15	2.69	3.90		5	15	0.00	0.64
		20	2.17	3.68			20	0.00	0.98
		25	1.99	2.70			25	0.00	0.92
		30	0.73	3.10			30	2.46	4.38
	7	15	0.11	1.87		7	15	0.00	0.78
		20	0.59	3.24			20	0.02	1.02
		25	0.00	2.57			25	0.33	3.55
		30	3.09	4.96			30	1.92	5.32
9	15	4.42	5.61	9	15	0.00	1.31		
	20	3.26	6.01		20	0.00	0.98		
	25	3.32	5.15		25	2.13	7.10		
	30	0.78	3.86		30	0.00	0.40		
PM3 : 사상균 180	3	15	0.00	1.55	PM3 : 사상균 301	3	15	0.47	2.53
		20	3.33	6.08			20	1.38	2.09
		25	1.08	0.81			25	1.95	4.22
		30	0.58	2.78			30	2.11	4.48
	5	15	0.25	1.96		5	15	0.18	1.95
		20	0.25	1.97			20	0.12	1.42
		25	0.30	2.57			25	0.20	3.73
		30	2.25	12.28			30	0.85	9.36
	7	15	0.57	3.45		7	15	0.01	1.38
		20	0.99	6.21			20	0.26	2.79
		25	3.91	11.31			25	0.00	1.16
		30	0.22	3.78			30	0.29	4.86
9	15	1.33	8.97	9	15	0.00	1.18		
	20	0.93	6.49		20	0.19	3.36		
	25	2.40	7.81		25	0.10	2.85		
	30	0.83	10.33		30	0.15	2.30		

¹⁾ : 제품의 제조온도 : 30°C

²⁾ : *Bacillus subtilis* PM3

Table 2. *Bacillus subtilis* PM3와 선별 사상균의 배양물(7종)을 1 : 1의 비율로 혼합하여 30일간 숙성시켜 제조한 된장의 관능검사 결과¹⁾

매주 종류	매주 제조기간 (일)	매주제조온도 관능검사	15℃	20℃	25℃	30℃
PM3 : 사상균 24	3	등수			2	
		이취정도 ²⁾			+	
		관능검사			덜 숙성된 향(암모니아취)	
	5	등수			1	
		이취정도			-	
		관능검사			단 된장향	
	7	등수			1	
		이취정도			-	
		관능검사			단 재래식 된장향	
	9	등수			1	
		이취정도			-	
		관능검사			단 된장향	
PM3 : 사상균 30	3	등수			1	
		이취정도			-	
		관능검사			재래식 된장향(흙냄새)	
	5	등수			2	
		이취정도			-	
		관능검사			약 달고 곱광취 된장향	
	7	등수			2	
		이취정도			-	
		관능검사			약 단 된장향	
	9	등수			1	
		이취정도			+	
		관능검사			약 달고 콧콕한 된장향	
PM3 : 사상균 162	3	등수			2	
		이취정도			+	
		관능검사			덜 숙성된 된장향(암모니아취)	
	5	등수			3	
		이취정도			-	
		관능검사			덜 숙성된 암모니아취	
	7	등수			3	
		이취정도			+	
		관능검사			콧콕하고 덜 숙성 된장향	
	9	등수			3	
		이취정도			+	
		관능검사			덜 숙성되고 콧콕한 된장향(비린향)	

continued Table 2

매주 종류	매주 제조 기간 (일)	매주제조온도 \n관능검사	15℃	20℃	25℃	30℃	
			PM3 : 사상균 1				3
	3	등수	2	1	4	3	
		이취정도	-	-	+		
		관능검사	약 달고 덜 숙성된장향	약 단 된장향	콤콤한 콩 비린내 된장향	덜 숙성 된장향	
	5	등수	4	3	1	2	
		이취정도	+	+	±	+	
		관능검사	약 달고 콤콤한 된장향	약 콤콤하고 덜 숙성한 된장향	단 된장향	약 단 재래식 된장향	
	7	등수	3	1	2	4	
		이취정도	+	±	±	+	
		관능검사	약 달고 비린향	콤콤하고 덜 숙성한 된장향	달고 콤콤한 된장향	콤콤한 압모니아취	
	9	등수	2	1	3	4	
		이취정도	-	-	+	+	
		관능검사	달고 덜 숙성	단 된장향	콤콤한 된장향	짜고 콤콤한 향	
	3	등수	2	3	1	4	
		이취정도	-	+	+	++	
		관능검사	약 단 된장향	약 콤콤하고 비린 된장향	약 콤콤하고 덜 숙성한 된장향	콤콤하고 비린향	
	5	등수	3	1	2	4	
		이취정도	-	-	-	-	
		관능검사	달고 덜 숙성된 된장향 (비린향)	단 된장향	단 된장향	덜 숙성된 된장향	
	7	등수	3	2	1	4	
		이취정도	-	-	-	+	
		관능검사	달고 약 시큼한 된장향	단 된장향	단 된장향	콤콤하고 약 된장향	
	9	등수	3	2	1	4	
		이취정도	-	+	-	+	
		관능검사	덜 숙성된 된장향(부패취)	콤콤하고 단 된장향	단 된장향	시큼한 향	

continued Table 2

매주 종류	매주 제조 기간 (일)	매주제조온도 관능검사	15℃	20℃	25℃	30℃
PM3 : 사상균 241	3	등수	1	1	2	2
		이취정도	-	-	+	+
		관능검사	재래식 된장향	약 재래 된장향	단 된장향	약 달고 재래 된장향
	5	등수	2	1	1	2
		이취정도	-	-	-	-
		관능검사	재래 된장향	향긋한 재래 된장향	향긋한 재래 된장향	약 단 된장향
	7	등수	2	1	2	3
		이취정도	-	-	++	+
		관능검사	맛있는 재래식 된장향	맛있는 재래식 된장향	콕콕한 된장향	덜 숙성한 암모니아취
	9	등수	2	1	1	3
		이취정도	+	-	-	+
		관능검사	약 콕콕한 된장향	달고 향긋한 재래식 된장향	달고 향긋한 재래식 된장향	콕콕한 된장향
PM3 : 사상균 301	3	등수	2	1	3	1
		이취정도	-	-	-	-
		관능검사	흙냄새의 재래식 된장향	재래식 된장향	단 된장향	재래식 된장향
	5	등수	2	1	1	3
		이취정도	-	-	-	+
		관능검사	약 재래식 된장향	재래식 된장향	약 재래식 된장향	덜 숙성된 된장향
	7	등수	2	1	3	4
		이취정도	-	-	-	+
		관능검사	약 달고 덜 숙성된 된장향	재래식 된장향	덜 숙성된 된장향	약 콕콕하고 비린 향
	9	등수	1	3	2	4
		이취정도	-	+	+	+
		관능검사	단 재래식 단장향	약 콕콕한 된장향(흙냄새)	약 콕콕하고 덜 숙성된 된장향	부패취 (암모니아취)

1) : 제조온도 : 30℃, 숙성기간 : 30일

2) : - : 이취가 없음

± : 이취가 약간 나타남

+

++ : 이취가 많이 나타남

Table 3. *Bacillus subtilis* PM3와 선별 사상균의 배양물(7종)을 1:1의 비율로 혼합하여 60일간 숙성시켜 제조한 된장의 유기산의 분포¹⁾

(mg/100g)

메주 종류	메주 제조기간 (일)	메주 제조 온도 (°C)	butyric acid	3-methyl butanoic acid	메주 종류	메주 제조기간 (일)	메주 제조 온도 (°C)	butyric acid	3-methyl butanoic acid
PM3 ²⁾	3	30	0.37	10.18	PM3 : 사상균 24	3	25	0.64	3.49
	5		0.32	9.44		5		0.81	4.43
	7		0.41	3.65		7		0.90	4.58
	9		0.54	3.82		9		0.00	2.87
PM3 : 사상균 30	3	25	0.68	3.48	PM3 : 사상균 162	3	25	0.64	7.84
	5		0.62	7.45		5		0.56	0.00
	7		0.22	2.66		7		0.73	6.45
	9		0.00	57.56		9		0.57	6.28
PM3 : 사상균 1	3	15	0.04	1.02	PM3 : 사상균 241	3	15	0.14	1.49
		20	0.03	0.94			20	0.00	0.00
		25	0.41	3.65			25	0.42	6.13
		30	0.54	3.82			30	0.35	4.61
	5	15	0.84	4.95		5	15	0.51	4.63
		20	0.43	3.44			20	0.47	3.32
		25	1.11	7.09			25	0.61	7.67
		30	0.72	8.51			30	0.87	7.33
	7	15	0.86	4.75		7	15	0.68	8.60
		20	1.28	6.23			20	0.23	2.40
		25	1.34	11.84			25	0.50	3.63
		30	0.39	4.18			30	0.39	3.77
9	15	0.91	8.01	9	15	0.87	8.40		
	20	0.89	6.21		20	0.24	2.19		
	25	0.83	4.58		25	0.52	5.93		
	30	0.30	4.36		30	0.33	7.04		
PM3 : 사상균 180	3	15	1.42	8.30	PM3 : 사상균 301	3	15	0.33	3.14
		20	1.08	6.60			20	0.00	0.53
		25	8.78	57.19			25	0.49	4.00
		30	0.76	6.01			30	0.56	4.54
	5	15	0.93	6.60		5	15	0.44	5.56
		20	0.56	3.05			20	0.59	9.47
		25	0.44	3.25			25	0.84	7.99
		30	2.26	10.63			30	0.71	5.14
	7	15	3.45	8.16		7	15	0.57	2.12
		20	5.65	46.08			20	0.17	1.35
		25	0.45	3.96			25	0.63	6.90
		30	4.39	10.11			30	0.35	4.00
9	15	5.52	13.15	9	15	0.00	10.00		
	20	1.38	4.09		20	0.00	0.00		
	25	1.94	9.20		25	0.60	3.83		
	30	1.74	7.24		30	0.77	9.25		

¹⁾ : 제품의 제조온도 : 30°C

²⁾ : *Bacillus subtilis* PM3

Table 4. *Bacillus subtilis* PM3와 선별 사상균의 배양물(7종)을 1:1의 비율로 혼합하여 60일간 숙성시켜 제조한 된장의 관능검사결과¹⁾

메주 종류	메주 제조기간 (일)	메주제조온도 관능검사	15℃	20℃	25℃	30℃
PM3 : 사상균 24	3	등수			2	
		이취정도 ²⁾			+	
		관능검사			덜 숙성된 향 (암모니아취)	
	5	등수			1	
		이취정도			-	
		관능검사			단 된장향	
	7	등수			1	
		이취정도			-	
		관능검사			단 재래식 된장향	
	9	등수			1	
		이취정도			-	
		관능검사			단 된장향	
PM3 : 사상균 30	3	등수			1	
		이취정도			-	
		관능검사			재래식 된장향 (흙냄새)	
	5	등수			2	
		이취정도			-	
		관능검사			약 달고 곰팡취 된장향	
	7	등수			2	
		이취정도			-	
		관능검사			약 단 된장향	
	9	등수			1	
		이취정도			+	
		관능검사			약 달고 쿵쿵한 된장향	

continued Table 4.

매주 종류	매주 제조 기간 (일)	매주제조온도 \n관능검사	15℃	20℃	25℃	30℃
			PM3 : 사상균 162			
PM3 : 사상균 1	3	등수			2	
		이취정도			+	
		관능검사			덜 숙성된 된장향(암모니아 취)	
	5	등수			3	
		이취정도			-	
		관능검사			덜 숙성된 암모니아취	
	7	등수			3	
		이취정도			+	
		관능검사			콕콕하고 덜 숙성된 된장향	
	9	등수			3	
		이취정도			+	
		관능검사			콕콕하고 덜 숙성된 된장향(비린향)	
PM3 : 사상균 1	3	등수	3	1	2	4
		이취정도	-	-	-	-
		관능검사		달고 고소한 된장향(공장산)	약 달고 고소한 된장향(공장산)	
	5	등수	1	2	4(3)	3(4)
		이취정도	-	±	+	+
		관능검사	매우 단 향	콩 비린향 (콕콕한 향)	약 콕콕한 된장향	콩 비린향 (콕콕한향)
	7	등수	4	2	1	3
		이취정도	-	-	-	-
		관능검사	약 달고 비린향	콩 비린향 (콕콕한 향)	약 단 된장향	비린 향
	9	등수	3	2	1	3
		이취정도	+	±	±	+
		관능검사	약 콕콕한 향	약 달고 콕콕한 된장향	약 달고 콕콕한 된장향	콕콕한 향

continued Table 4.

매주 종류	매주 제조 기간 (일)	매주제조온도 \n관능검사	15℃	20℃	25℃	30℃
PM3 : 사상균 180	3	등수	4	3	1	2
		이취정도	-	+	-	-
		관능검사	약 비린향	새콤하고 비린 된장향	달고 새콤한 된장향	약 콕콕한 된장향
	5	등수	2	1	1	3
		이취정도	-	-	-	-
		관능검사	달고 덜 숙성된 된장향	약 단 전통된장향	단 전통 된장향	콕콕하고 비린 된장향
	7	등수	2	2	1	3
		이취정도	-	-	-	-
		관능검사	달고 훅내 나는 된장향	달고 훅내 나는 된장향	약 새콤한 전통 된장향	콕콕한 된장향
	9	등수	2	1	4	3
		이취정도	-	-	-	-
		관능검사	달고 훅내 나는 된장향	단 전통 된장향		약 단 된장향
PM3 : 사상균 241	3	등수	1	2	3	3
		이취정도	-	-	± ⁴⁾	+
		관능검사	단 전통 된장향	달고 시큼한 된장향	약 콕콕한 된장향	콕콕한 된장향
	5	등수	2	1	3	4
		이취정도	+	-	+	-
		관능검사	약한 된장향	단 된장향	약 비린 콕콕한 향	비린향
	7	등수	3	2	1	2
		이취정도	+	-	-	-
		관능검사	새콤하고 콕콕한 된장향	약 단 된장향	단 된장향	약 단 된장향
	9	등수	1	2	3	4
		이취정도	-	-	++ ⁵⁾	+
		관능검사	약 꼬리한 전통 된장향	단 된장향	콕콕한 향	콕콕한 향

continued Table 4.

메주 종류	메주 제조 기간 (일)	메주제조온도 관능검사	15℃	20℃	25℃	30℃
PM3 : 사상균 301	3	등수	3	1	2	3
		이취정도	+	-	-	+
		관능검사	약 콕콕한 된장향	약 전통 된장향	약한 된장향	약 콕콕한 된장향
	5	등수	3	1	1	2
		이취정도	+	-	-	-
		관능검사	약 콕콕한 된장향	약 달고 새콤한 된장향	단 전통된장향	약 단 된장향
	7	등수	1	3	4	2
		이취정도	-	-	+	-
		관능검사	전통 된장향	약 훈냄새 향	약 콕콕한 된장향	달고 구수하고 약 새콤한 된장향
	9	등수	1	2	1	3
		이취정도	-	-	-	+
		관능검사	단 된장향	새콤한 공장산 된장향	약 단 된장향	콕콕한 암모니아취

1) : 제품의 제조온도 : 30℃

2) : - : 이취가 없음
± : 이취가 약간 나타남
+ : 이취가 나타남
++ : 이취가 많이 나타남

Table 5. *Bacillus subtilis* PM3(PM3)과 2차로 선별된 사상균 241과 301의 배양물을 혼합하여 제조한 1개월 숙성 된장의 휘발성 유기산의 분포

메주 종류	혼합 비율	volatile organic acids (mg/100g)			
		acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid
PM3 : 사상균 241	1 : 0	3.16	0.49	0.09	19.46
	0 : 1	5.72	0.34	0.00	4.51
	1 : 0.1	6.33	0.28	0.00	21.72
	1 : 0.2	12.81	1.56	0.07	19.71
	1 : 0.5	4.69	0.91	0.19	15.49
	1 : 1	1.93	0.31	0.00	15.01
PM3 : 사상균 301	1 : 0	3.16	0.49	0.09	19.46
	0 : 1	3.26	0.42	0.27	11.52
	1 : 0.1	3.01	0.93	0.46	22.33
	1 : 0.2	0.65	1.55	0.36	16.80
	1 : 0.5	105.69	0.60	0.08	3.35
	1 : 1	6.18	1.37	0.18	16.61

Table 6. *Bacillus subtilis* PM3(PM3)과 2차로 선별된 사상균 241과 301의 배양물을 혼합하여 제조한 1개월 숙성 된장의 관능검사 결과

메주 종류	혼합 비율	sensory score ¹		관능검사결과
		맛	향	
PM3 : 사상균 241	1 : 0	3a	4b	단 된장향
	0 : 1	3a	4b	곰팡이취의 메주향
	1 : 0.1	4bc	4b	덜 숙성한 전통 된장맛과 향
	1 : 0.2	4.5c	4.5b	단 전통 된장맛과 향
	1 : 0.5	3a	3a	약 새콤한 된장향
	1 : 1	3.5ab	4.5b	묵은 전통 된장맛과 향
F (P-value)		8.640*** (.000)	7.714*** (.000)	
PM3 : 사상균301	1 : 0	3a	4b	단 된장향
	0 : 1	3a	4b	곰팡이취의 메주향
	1 : 0.1	4b	3.5ab	약 쓴 전통 된장맛과 향
	1 : 0.2	4b	5c	단 전통 된장맛과 향
	1 : 0.5	3a	3.5ab	약 쓴 전통 된장맛과 향
	1 : 1	3a	3a	약 새콤한 전통 된장맛과 향
F (P-value)		5.143** (.001)	10.957*** (.000)	

¹⁾ 5점법 : 관능요원 : 12명 (대학원생 2명, 학부생 10명)
 p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 7. 재래식 간장과 2차 선별균 241 및 301의 사상균 배양물을 혼합하여 제조한 간장의 숙성기간별 휘발성 유기산의 분포 (mg/100g)

메주 종류	숙성 기간 (일)	혼 합 비	acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid	hexanoic acid
재래식 간장 : 사상균 241	10	1 : 0	391.11	0.86	1.59	4.47	0.00
		1 : 0.05	388.21	0.73	1.75	2.63	0.00
		1 : 0.1	618.04	0.49	1.49	1.76	0.00
		1 : 0.2	483.57	0.25	1.19	1.36	0.00
		1 : 0.3	424.64	0.22	0.91	1.11	0.00
		1 : 0.5	356.72	0.57	1.57	1.41	6.67
	20	1 : 0	414.42	5.22	5.14	3.84	0.00
		1 : 0.05	361.35	0.67	1.26	2.56	0.00
		1 : 0.1	435.21	1.56	2.18	13.83	0.00
		1 : 0.2	411.39	0.40	1.19	3.70	0.00
		1 : 0.3	384.21	0.77	1.17	4.45	0.00
		1 : 0.5	422.41	0.66	1.39	6.99	0.00
	30	1 : 0	238.59	0.68	0.81	7.21	0.00
		1 : 0.05	180.10	0.95	1.11	3.69	0.00
		1 : 0.1	106.76	0.47	0.00	3.02	0.00
		1 : 0.2	442.57	0.94	0.00	8.46	0.00
		1 : 0.3	411.43	1.42	0.53	6.43	0.00
		1 : 0.5	522.54	0.72	1.15	3.27	0.00
재래식 간장 : 사상균 301	10	1 : 0	391.11	0.86	1.59	4.47	0.00
		1 : 0.05	423.96	0.80	1.56	3.25	0.00
		1 : 0.1	531.67	0.33	1.25	2.97	0.00
		1 : 0.2	529.18	1.26	1.35	3.35	0.00
		1 : 0.3	494.15	1.26	1.19	3.29	0.00
		1 : 0.5	444.38	1.73	2.32	4.74	1.72
	20	1 : 0	414.42	5.22	5.14	3.84	0.00
		1 : 0.05	442.95	1.14	1.76	2.55	0.00
		1 : 0.1	370.12	0.64	1.48	2.31	0.00
		1 : 0.2	554.78	0.67	1.23	2.70	0.00
		1 : 0.3	288.02	0.66	0.60	1.83	0.00
		1 : 0.5	344.84	0.95	0.56	4.47	0.57
	30	1 : 0	238.59	0.68	0.81	7.21	0.00
		1 : 0.05	222.69	0.54	0.61	5.56	0.00
		1 : 0.1	205.86	0.51	0.40	4.26	0.00
		1 : 0.2	221.02	0.90	0.00	5.39	0.00
		1 : 0.3	253.18	1.13	0.28	6.78	0.00
		1 : 0.5	330.16	1.28	0.76	9.42	0.00

Table 8. 재래식 간장과 2차 선별균 241 및 301의 사상균 배양물을 혼합하여 제조한 간장의 숙성기간별 관능검사 결과

메주 종류	숙성 기간(일)	혼 합 비	sensory score ¹⁾	관능검사 결과
재래식 간장 : 사상균 241	10	1 : 0	3ab	짜고 약 콥콥한 메주향 간장
		1 : 0.05	4cd	약 된장취 간장향
		1 : 0.1	4.5d	재래 된장취 간장향
		1 : 0.2	3ab	단 간장향
		1 : 0.3	3.5bc	단 간장향
		1 : 0.5	4cd	단 간장향
	20	1 : 0	3ab	짜고 약 콥콥한 간장향
		1 : 0.05	4cd	단 전통 간장향
		1 : 0.1	4cd	단 전통 간장향
		1 : 0.2	4cd	약 콥콥한 전통 간장향
		1 : 0.3	3.5bc	전통 간장향
		1 : 0.5	2.5a	된장취 간장향
	30	1 : 0	3ab	짜고 콥콥한 간장향
		1 : 0.05	2.5a	약 콥콥한 간장향
		1 : 0.1	4cd	약 단 재래 간장향
1 : 0.2		3.5bc	달고 콥콥한 간장향	
1 : 0.3		3ab	약 콥콥하고 된장취 간장향	
1 : 0.5	2.5a	약 콥콥한 된장취 간장향		
F (P-value)			7.941*** (.000)	
재래식 간장 : 사상균 301	10	1 : 0	3ab	짜고 약 콥콥한 메주향 간장
		1 : 0.05	3ab	약 단 간장, 약 콥콥
		1 : 0.1	3.5bc	된장취의 간장, 약 콥콥
		1 : 0.2	2.5a	약 꼬리한 메주향 간장
		1 : 0.3	3.5bc	된장취의 간장
		1 : 0.5	3.5bc	된장취의 간장
	20	1 : 0	3ab	짜고 약 콥콥한 간장향
		1 : 0.05	3ab	짜고 약 콥콥한 간장향
		1 : 0.1	4c	약 단 간장향
		1 : 0.2	2.5a	약 콥콥하고 단 간장향
		1 : 0.3	4c	단 전통 간장향
		1 : 0.5	3ab	전통 간장향
	30	1 : 0	3ab	짜고 콥콥한 간장향
		1 : 0.05	3ab	약 달고 콥콥한 간장향
		1 : 0.1	4c	약 단 재래 간장향
1 : 0.2		3ab	약 콥콥한 간장향	
1 : 0.3		4c	약 단 재래 간장향	
1 : 0.5	2.5a	된장취의 짠 간장향		
F (P-value)			5.859*** (.000)	

¹⁾ 5점법 : 관능요원 : 12명 (대학원생 2명, 학부생 10명)
p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 9. 재래식 된장과 2차 선별균 241 및 301의 사상균 배양물을 혼합하여 제조한 된장의 숙성기간별 휘발성 유기산의 분포 (mg/100g)

메주 종류	숙성 기간(주)	혼합비	acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid	
재래식 된장 : 사상균 241	1	1 : 0	47.40	1.15	1.28	4.83	
		0 : 1	5.52	0.00	0.00	0.00	
		1 : 0.1	26.46	0.03	0.32	0.60	
		1 : 0.2	9.18	0.04	0.00	0.10	
		1 : 0.5	17.53	0.08	0.07	0.31	
		1 : 1	22.27	0.06	0.03	3.54	
		2	1 : 0	11.61	0.03	0.00	0.28
	0 : 1		56.65	0.00	0.00	3.59	
	1 : 0.1		5.59	0.21	0.00	0.00	
	1 : 0.2		26.31	0.05	0.00	0.10	
	1 : 0.5		68.61	0.24	0.00	0.22	
	1 : 1		67.88	0.17	0.00	0.32	
	재래식 된장 : 사상균 301		1	1 : 0	47.40	1.15	1.28
		0 : 1		26.79	0.06	0.02	0.24
1 : 0.1		31.51		0.00	0.00	0.95	
1 : 0.2		16.87		0.51	0.52	3.80	
1 : 0.5		8.41		0.14	0.06	0.77	
1 : 1		27.25		0.32	0.00	0.59	
2		1 : 0		11.61	0.03	0.00	0.28
		0 : 1	76.62	0.58	0.00	4.08	
		1 : 0.1	7.98	0.00	0.00	0.00	
		1 : 0.2	17.45	0.30	0.00	0.00	
		1 : 0.5	73.57	0.09	0.00	0.64	
		1 : 1	73.79	0.15	0.06	0.40	

Table 10. 재래식 된장과 2차 선별균 241 및 301의 사상균 배양물을 혼합하여 제조한 된장의 숙성기간별 관능검사 결과

메주 종류	숙성 기간(주)	혼합비	Sensory score ¹⁾		관능검사결과
			맛	향	
재래식 된장 : 사상균 241	1	1 : 0	3.1a	3.1a	약 쿼쿼한 재래된장향
		0 : 1	3.3a	3.1a	곰팡이 냄새나는 된장취
		1 : 0.1	3.1a	4.2c	구수한 전통된장향
		1 : 0.2	3.5ab	4.0bc	구수한 전통된장향
		1 : 0.5	3.5ab	3.5ab	약 구수한 전통된장향
		1 : 1	3.2a	3.4ab	약 구수한 전통된장향
	2	1 : 0	3a	3a	약 쓴 전통된장 맛
		0 : 1	3a	3a	곰팡이 냄새나는 된장취
		1 : 0.1	4b	3.5ab	약 쓴 전통된장맛
		1 : 0.2	4.0b	4.0bc	약 쓴 전통된장맛
		1 : 0.5	3.2a	3.5ab	단 전통된장맛, 향
		1 : 1	3.1a	4.0bc	약 쓴 전통된장맛
F (P-value)			3.176** (.001)	4.677*** (.000)	
재래식 된장 : 사상균301	1	1 : 0	3.1ab	3.1ab	약 쿼쿼한 재래된장향
		0 : 1	3.1ab	3.1ab	곰팡이 냄새나는 된장취
		1 : 0.1	3.1ab	3.1ab	연한 된장향
		1 : 0.2	3.5bc	3.5b	약 쿼쿼하고 연한 된장향
		1 : 0.5	2.5a	3.1ab	약 쿼쿼하고 연한 된장향
		1 : 1	2.5a	3.1ab	시큼한 된장향
	2	1 : 0	3.1ab	3.1ab	약 쓴 전통된장 맛
		0 : 1	3.1ab	3.1ab	곰팡이 냄새나는 된장취
		1 : 0.1	4c	3.1ab	연한 된장맛, 향
		1 : 0.2	3.5bc	3.5b	약 단 전통된장향
		1 : 0.5	3.1ab	3.1ab	약 쿼쿼한 전통된장맛
		1 : 1	3.5bc	2.5a	연한 된장맛, 향
F (P-value)			4.344*** (.000)	1.239 (.270)	

¹⁾ 5점법 : 관능요원 : 12명 (대학원생 2명, 학부생 10명)
 p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 11. *Bacillus subtilis* PM3과 *Aspergillus oryzae* J와 M의 배양물(PM3과 A-J, A-M)을 1 : 1로 혼합하여 제조한 된장의 숙성기간에 따른 휘발성 유기산의 분포

메주 종류	숙성 기간(주)	(mg/100g)			
		acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid
PM3 ¹⁾	1	43.43	0.00	2.94	2.88
	2	31.81	0.00	2.94	2.38
	3	51.14	0.19	3.31	3.05
	5	9.76	0.05	0	2.13
PM3:A-J	1	38.37	0.00	2.42	2.20
	2	42.52	0.00	2.59	2.23
	3	59.83	0.00	2.77	1.58
	5	27.73	0.55	0.76	1.06
PM3:A-M	1	40.03	0.00	1.18	1.61
	2	39.68	0.00	1.91	1.40
	3	61.38	0.22	2.53	0.98
	5	40.38	0	0.75	0.67

¹⁾ PM3 : 200g

Table 12. *Bacillus subtilis* PM3와 *Aspergillus oryzae* J와 M의 배양물(PM3과 A-J, A-M)을 1 : 1로 혼합하여 제조한 된장의 숙성기간에 따른 관능검사 결과

메주종류	숙성 기간(주)	sensory score ²⁾		관능검사결과
		맛	향	
PM3 ¹⁾	1	3.0a	3.5abc	약 달고 시큼한 된장향
	2	3.0a	3.0a	약 새콤한 연한 된장맛과 향
	3	3.4ab	3.3abc	약 새콤한 연한 된장맛과 향
	5	3.8bc	3.7abcd	약 전통된장맛과 향
PM3:A-J	1	4.0bc	4.5e	약 꼬리한 전통 된장맛과 향
	2	4.0bc	4.0cde	약 단 전통 된장맛과 향
	3	4.1bc	4.0cde	약 단 전통 된장맛과 향
	5	4.2c	4.3de	단 전통 된장맛과 향
PM3:A-M	1	4.0bc	3.5abc	약 새콤한 전통 된장향
	2	3.5abc	3.5abc	약 새콤한 전통된장맛과 향
	3	3.4ab	3.2ab	약 새콤한 연한 된장맛과 향
	5	3.8bc	3.9bcde	약 단 전통 된장맛과 향
F (P-value)		3.651*** (.000)	4.165*** (.000)	

¹⁾ PM3 : 200g

²⁾ 관능검사 5점법 ; 관능요원 : 12명 (대학원생 2명, 학부생 10명)

p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 13. 재래식 간장과 *Aspergillus oryzae* 배양물의 혼합비에 따른 휘발성 유기산의 분포

(mg/100g)

숙성 기간(주)	혼합비 (재래식 간장 : <i>A. oryzae</i>)	acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid
1	1 : 0 ¹⁾	114.32	T	3.04	1.72
	0 : 1 ²⁾	44.32	T	6.35	1.55
	0 : 1 ³⁾	119.87	1.31	3.84	T
	3 : 1 ⁴⁾	65.38	0.73	0.70	2.17
	3 : 1 ⁵⁾	43.63	T	3.28	18.21
2	1 : 0	318.87	0.11	6.11	3.52
	0 : 1	28.37	2.44	T	4.98
	0 : 1	127.69	9.29	T	5.99
	3 : 1	174.73	7.70	T	6.19
	3 : 1	275.27	T	3.42	7.60

¹⁾ 재래식 간장 : 300ml,

²⁾ *Aspergillus oryzae* J : 100g, ³⁾ *Aspergillus oryzae* M : 100g

⁴⁾ 재래식 간장 : *Aspergillus oryzae* J = 300ml : 100g

⁵⁾ 재래식 간장 : *Aspergillus oryzae* M = 300ml : 100g

Table 14. 재래식 간장과 *Aspergillus oryzae* 배양물의 혼합비에 따른 관능검사 결과

숙성 기간(주)	혼합비 (재래식 간장 : <i>A. oryzae</i>)	Sensory score ¹⁾		관능검사 결과
		맛	향	
1	1 : 0 ²⁾	3.0 abc	3.2bc	짠 전통 간장맛과 향
	0 : 1 ³⁾	2.8ab	2.5 a	덜 숙성된 된장맛과 향
	0 : 1 ⁴⁾	3.6 cde	4.0 de	약 단 된장맛과 향
	3 : 1 ⁶⁾	4.1 e	4.5 e	약 전통간장 맛과 향
	3 : 1 ⁵⁾	3.3 bcd	2.4 a	약 새콤한 간장맛과 향8.7
2	1 : 0	3.1 abc	3.3 bc	짠 간장맛과 향
	0 : 1	2.4 a	2.7 ab	덜 숙성된 된장맛과 약 새콤한 향
	0 : 1	3.5 bcde	4.0 de	약 단 된장맛과 향
	3 : 1	4.0 de	4.5 e	약 전통간장 향
	3 : 1	3.2 bc	3.5 cd	약 새콤한 맛과 향
F (P-value)		4.861*** (.000)	13.592*** (.000)	

¹⁾ 5점법 : 관능요원 : 12명 (대학원생 2명, 학부생 10명)

²⁾ 재래식 간장 : 300ml

³⁾ *Aspergillus oryzae* J : 100g, ⁴⁾ *Aspergillus oryzae* M : 100g

⁵⁾ 재래식 간장 : *Aspergillus oryzae* J = 300ml : 100g

⁶⁾ 재래식 간장 : *Aspergillus oryzae* M = 300ml : 100g

p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 15. 재래식 된장과 *Aspergillus oryzae* 배양물의 혼합비에 따른 휘발성 유기산의 분포 (mg/100g)

숙성 기간(주)	혼합비 (재래식 간장 : <i>A. oryzae</i>)	acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid
1	1 : 0 ¹⁾	114.32	T	3.04	1.72
	0 : 1 ²⁾	44.32	T	6.35	1.55
	0 : 1 ³⁾	119.87	1.31	3.84	T
	3 : 1 ⁴⁾	65.38	0.73	0.70	2.17
	3 : 1 ⁵⁾	43.63	T	3.28	18.21
2	1 : 0	57.53	0.00	T	7.18
	0 : 1	28.37	2.44	T	4.98
	0 : 1	127.69	9.29	T	5.99
	3 : 1	93.51	0.00	0.53	T
	3 : 1	58.11	T	0.90	1.28

¹⁾ 재래식 된장 : 300g

²⁾ *Aspergillus oryzae* J : 100g, ³⁾ *Aspergillus oryzae* M : 100g

⁴⁾ 재래식 된장 : *Aspergillus oryzae* J = 300g : 100g

⁵⁾ 재래식 된장 : *Aspergillus oryzae* M = 300g : 100g

Table 16. 재래식 된장과 *Aspergillus oryzae* 배양물의 혼합비에 따른 관능검사 결과

숙성 기간 (주)	혼합비 (재래식 된장 : <i>A. oryzae</i>)	생된장			끓인 된장		
		Sensory score ¹⁾		관능검사결과	Sensory score		관능검사결과
		맛	향		맛	향	
1	1 : 0 ²⁾	4.2c	4.3b	전통된장맛과 향	4.0c	4.5e	전통된장맛과 향
	0 : 1 ³⁾	3.1a	2.6a	약 새콤한 향	3.0ab	2.2a	약 새콤한 향
	0 : 1 ⁴⁾	3.6abc	4.1b	단 된장맛과 향	3.5bc	3.7cd	단 된장맛과 향
	3 : 1 ⁶⁾	4.2c	4.5b	약 전통 된장향	4.0c	4.1de	약 전통 된장향
	3 : 1 ⁵⁾	3.3ab	3.0a	약 새콤한 향	3.3c	2.4a	약 새콤한 향
2	1 : 0	3.0a	4.0b	전통된장맛과 향	3.1c	3.3bc	전통된장맛과 향
	0 : 1	3.0a	2.5a	약 새콤한 향	2.4a	2.7ab	약 새콤한 향
	0 : 1	3.5abc	4.0b	단 된장맛과 향	3.5bc	3.9cde	단 된장맛과 향
	3 : 1	4.0bc	4.5b	약 전통 된장향	4.1c	4.2de	약 전통 된장향
	3 : 1	3.0a	3.0a	약 새콤한 향	3.2c	3.3bc	약 새콤한 향
F (P-value)		4.458*** (.000)	13.655*** (.000)		5.633*** (.000)	13.948*** (.000)	

¹⁾ 5점법 : 관능요원 : 12명 (대학원생 2명, 학부생 10명)

²⁾ 재래식 된장 : 300g

³⁾ *Aspergillus oryzae* J : 100g, ⁴⁾ *Aspergillus oryzae* M : 100g

⁵⁾ 재래식 된장 : *Aspergillus oryzae* J = 300g : 100g

⁶⁾ 재래식 된장 : *Aspergillus oryzae* M = 300g : 100g

p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 17. 재래식 간장에 *Aspergillus oryzae* 배양물을 혼합하여 제조한 간장의 관능검사 결과

시 료	숙성 기간(주)	혼합비	sensory score ³⁾		관능검사
			향	맛	
재래식 간장	1	1 : 0	3.0ab	2.9a	쿵쿵한 간장향과 짠맛
	2	1 : 0	3.1ab	3.2ab	쿵쿵한 간장향과 짠맛
재래식 간장 : <i>A. oryzae</i> J ¹⁾	1	1 : 0.2	3.3ab	3.1ab	약 단 간장향과 맛
		1 : 0.5	3.7b	3.1ab	단 전통 간장향과 맛
		1 : 1	3.6b	2.9a	누룩향의 간장향과 맛
	2	1 : 0.2	3.7b	3.3ab	약 단 전통 간장향과 맛
		1 : 0.5	3.6b	3.4ab	약 누룩향의 간장향과 맛
		1 : 1	3.7b	3.3ab	누룩향의 간장향과 맛
재래식 간장 : <i>A. oryzae</i> M ²⁾	1	1 : 0.2	3.0ab	3.7b	약 단 간장향
		1 : 0.5	3.4ab	3.7b	단 간장향
		1 : 1	3.4ab	2.7a	누룩향의 간장향과 맛
	2	1 : 0.2	3.2ab	3.1ab	약 단 전통간장향과 맛
		1 : 0.5	2.7a	3.3ab	약 누룩향과 맛
		1 : 1	3.2ab	3.2ab	누룩향과 맛
F (P-value)			1.803* (.049)	1.644 (.082)	

¹⁾ : *Aspergillus oryzae* J : 장유용, ²⁾ : *Aspergillus oryzae* M : 미소용

³⁾ : 5점법 : 관능요원 12명 - 대학원생 2명, 학부생 10명

p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 18. 재래식 된장에 *Aspergillus oryzae* 배양물을 혼합하여 제조한 된장의 유기산의 분포

시 료	숙성 기간(주)	혼합비	(mg/100g)			
			acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid
재래식 된장	1	1 : 0	64.63	0.00	2.86	0.16
	2	1 : 0	26.32	0.00	2.23	0.08
재래식 된장 : <i>A. oryzae</i> J ¹⁾	1	1 : 0.2	144.48	0.00	T	0.72
		1 : 0.5	47.16	0.00	1.66	0.12
		1 : 1	31.56	0.00	1.25	0.00
	2	1 : 0.2	6.38	0.00	0.63	0.29
		1 : 0.5	18.24	0.00	0.99	0.12
		1 : 1	34.08	0.00	0.58	0.11
재래식 된장 : <i>A. oryzae</i> M ²⁾	1	1 : 0.2	44.43	0.29	2.85	0.26
		1 : 0.5	50.73	0.00	2.50	0.20
		1 : 1	42.74	0.00	2.07	0.14
	2	1 : 0.2	28.97	0.00	1.86	0.22
		1 : 0.5	16.15	0.00	1.09	0.29
		1 : 1	25.58	0.00	1.18	0.00

¹⁾ : *Aspergillus oryzae* J : 장유용

²⁾ : *Aspergillus oryzae* M : 미소용

Table 19. 재래식 된장에 *Aspergillus oryzae* 배양물을 혼합하여 제조한 된장의 관능검사 결과

시 료	숙성 기간 (주)	혼합비	생된장			끓인 된장		
			sensory score ³⁾		관능검사	sensory score		관능검사
			향	맛		향	맛	
재래식 된장	1	1 : 0	3.0ab	3.3abc	전통 된장향과 맛	2.9 bc	2.7ab	전통 된장향과 맛
	2	1 : 0	3.0ab	3.0ab	전통 된장향과 맛	1.8a	3.0abc	짠 맛과 콕콕한 향
재래식 된장: <i>A. oryzae</i> J ¹⁾	1	1 : 0.2	3.5 bc	3.9 c	단 된장향과 맛	3.1 c	3.0abc	약 단 된장향과 맛
		1 : 0.5	3.4 bc	3.9 c	단 된장향과 맛	3.3 c	3.4 bc	약 전통 된장향과 맛
		1 : 1	2.5a	3.3abc	누룩 된장향과 맛	3.0 bc	3.0abc	약 누룩 된장향과 맛
	2	1 : 0.2	3.0ab	3.7 bc	약 단 된장향과 맛	2.3ab	3.3 bc	달콤한 맛과 구수한 향
		1 : 0.5	4.0 c	3.7 c	단 전통된장향과 맛	2.9 bc	3.4 bc	달콤한 맛과 구수한 향
		1 : 1	3.3 b	3.0 ab	밋밋한 향과 맛	2.3ab	3.1abc	밋밋한 향과 맛
재래식 된장: <i>A. oryzae</i> M ²⁾	1	1 : 0.2	3.3 b	3.4abc	누룩 된장향과 맛	3.1 c	3.3 bc	약 단 된장향과 맛
		1 : 0.5	3.4 bc	3.6abc	단 된장향과 맛	3.3 c	2.5a	약 전통 된장향과 맛
		1 : 1	3.6 bc	3.4abc	누룩 된장향과 맛	3.0 bc	3.2abc	약 누룩 된장향과 맛
	2	1 : 0.2	3.3 b	3.3abc	약 새콤한 향	2.3ab	3.0abc	약 느끼한 맛과 향
		1 : 0.5	3.3 b	3.4abc	약 새콤한 향	2.4ab	3.6 bc	달콤한 맛과 구수한 향
		1 : 1	2.6a	2.9a	밋밋한 향과 맛	1.9a	2.9abc	밋밋한 향과 맛
F (p-value)			3.600*** (.000)	2.300** (.009)		5.449*** (.000)	1.712 .066	

¹⁾ : *Aspergillus oryzae* J : 장유용

²⁾ : *Aspergillus oryzae* M : 미소용

³⁾ : 5점법 : 관능요원 12명 - 대학원생 2명, 학부생 10명

p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

3. 결 론

경북 지방에서 구입한 재래식 메주 48개에서 10⁶cells/g이상 존재하는 사상균 200여종을 분리하고, 그 중에서 우리나라 장류 중에 존재하는 이취 성분인 butyric acid를 분해할 수 있는 우수한 사상균 2종이 선별되었으며, 이 균은 사상균 241과 301이었다. 이 균들은 삶은 대두에 접종하여 25℃, 7일간 배양한 배양물을 재래식 간장, 재래식 된장, *Bacillus subtilis* PM3으로 제조한 배양물에 1/5이하의 비율로 혼합하여 숙성시켰을 때 간장과 된장의 풍미를 좋게 하고 이취성분도 잘 분해 되었다.

Koji 제조용균인 *Aspergillus oryzae*는 *Bacillus subtilis*와 함께 생육할 때에는 *Bacillus subtilis*가 생산하는 butyric acid를 효과적으로 분해하지 못하지만 *Bacillus subtilis*가 생산한 butyric acid는 *Aspergillus oryzae*의 배양물이 쉽게

분해시키고, 전통 간장과 된장의 풍미를 개량시킨다.

선별한 사상균 241과 301을 25℃에서 7일간 배양하고 1 : 0.2의 비율로 혼합하여 된장을 제조했을 때 이취제거와 제품(장류)의 풍미가 가장 좋았으며, *Aspergillus oryzae*는 삶은 대두에 접종한 후 30℃, 7일간 배양하여 장류량에 대해 1/5의 비율로 혼합하여 된장을 제조했을 때 이취제거와 제품(장류)의 풍미가 가장 좋았다.

제 3 절 선정 균주의 동정

이취 성분(butyric acid)제거균으로 선정된 균이 독성을 생성하는 균인지를 규명하기 위하여 동정을 시도하였다. 독성을 생성하는 균에 속하면 균의 배양물 전체를 직접 사용하는 이취 제거법은 사용이 불가능하게 되고, 단지, 균 배양물에서 butyric acid를 분해하는 효소를 정제하여 사용할 수 있다. 경우에 따라서는 이 균이 생성하는 butyric acid 분해효소의 gene을 유익균에 transformation 시켜 사용할 수 있다.

1. 재료 및 방법

가. 균주

사상균 241과 301

나. 동정방법

형태동정 및 ITS sequencing

1) ITS DNA 유전자 분석

가) Sequence를 alignment한다.

나) %Similarity 값을 구한다.²⁶⁾

다) 계통수를 분석한다.²⁷⁾

2. 결과 및 고찰

결정된 염기서열의 개수는 461 bp. 이며, 분리 선별된 사상균 241과 301의 ITS DNA 유전자의 염기 서열은

GCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTA
 CTGGCCGCCGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGAC
 ACCCCCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAA
 ATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGA
 TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTC
 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTC
 CGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGC
 TTGTGTGTTGGGCCCGTCCTCCGATTCCGGGGGACGGGCCCGAAA
 GGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGT
 CACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATT
 TTT, 로 동일하며, Similarity 분석결과는

Strain	Accession No	%Similarity	nt differences
<i>Penicillium polonicum</i> NRRL 995	AF033475	100	0/460
<i>Penicillium tricolor</i>	AJ005489	99.78	1/460
<i>Penicillium neoehinulatum</i>	AJ005481	99.78	1/460
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	AJ270765	99.78	1/460
<i>Penicillium albocoremium</i>	AJ004819	99.78	1/460
<i>Penicillium hordei</i>	AJ004817	99.78	1/460
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> NRRL 971	AF033476	99.57	2/460
<i>Penicillium echinulatum</i> NRRL 1151	AF033473	99.57	2/460
<i>Penicillium discolor</i>	AJ004816	99.57	2/460
<i>Penicillium italicum</i>	AJ270766	99.57	2/460
<i>Penicillium camemberti</i>	AJ004814	99.57	2/460
<i>Penicillium commune</i>	AF348419	99.57	2/460
<i>Penicillium expansum</i>	AJ270767	99.57	2/460
<i>Penicillium melanoconidium</i>	AJ005483	99.57	2/460
<i>Penicillium venetum</i>	AJ005485	99.57	2/460
<i>Penicillium cyclopium</i>	AJ005491	99.57	2/460
<i>Penicillium verrucosum</i>	AJ005486	99.56	2/459
<i>Penicillium hirsutum</i>	AJ004818	99.56	2/459
<i>Penicillium freii</i>	AJ005479	99.35	3/460
<i>Penicillium gladioli</i> NRRL 939	AF033480	99.35	3/460
<i>Penicillium coprophilum</i> NRRL 13627	AF033469	98.91	5/460
<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 807	AF033465	98.70	6/460

와 같다.

계통수는 Fig. 1과 같다.

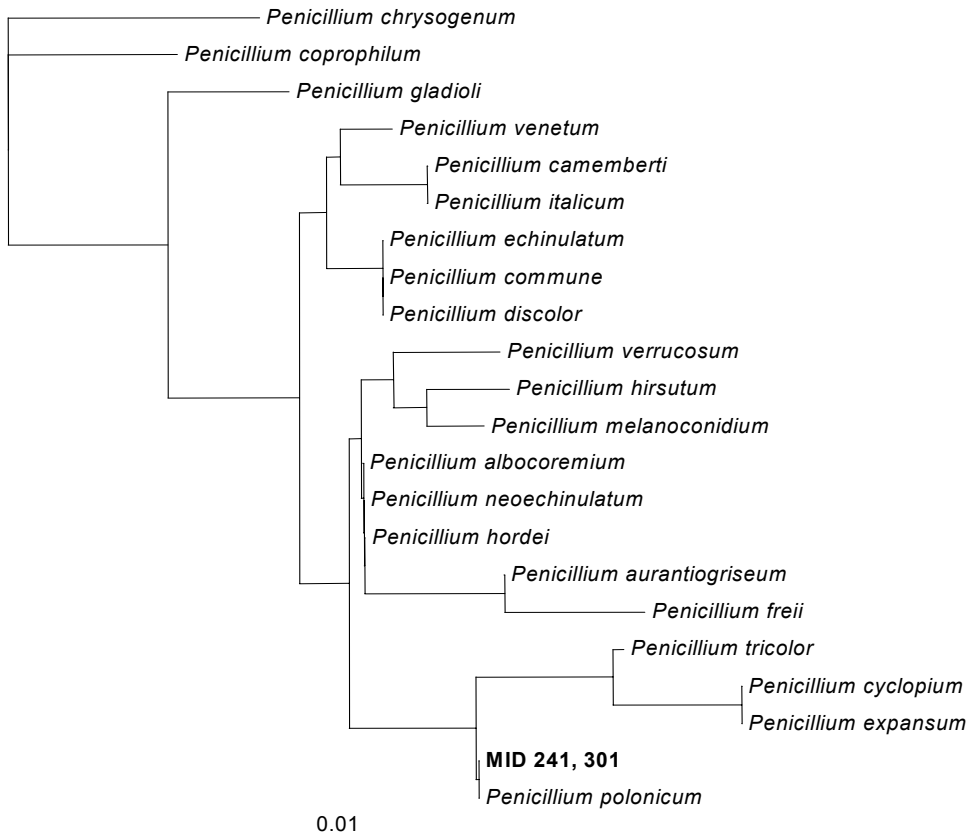


Fig. 1. Pylogenetic tree of isolated and selected strain 241 and 301

사상균 241의 형태는

가. Macroscopic characteristics

1) On MEA (Figure 2)

- Growth: 30mm 35mm in 7days at 24 °C, 20mm at 37 °C
- Colony : plane, central area raised, almost velvety, heavy sporing with surface
- Mycelium : usually subsurface; conidiogenesis typically moderate to heavy

- Conidia: dull green or near blue-green
 - Reverse: beige to pale orange
 - No exudates
- 2) On CYA (Figure 2)
- Growth: 12mm-15mm in 7 days at 24 °C
 - Colony: deeply sulcated, grayish green with blue tint
 - Reverse: beige to light brown

나. Microscopic characteristics (Figure 3)

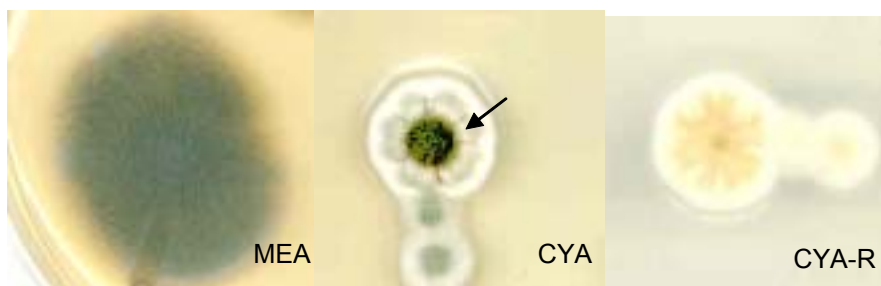


Figure 2. Colonies (7 days on MEA and CYA at 24 °C); arrow; sulcated furrow, R means reverse.

그 형태는 Fig. 3과 같다.

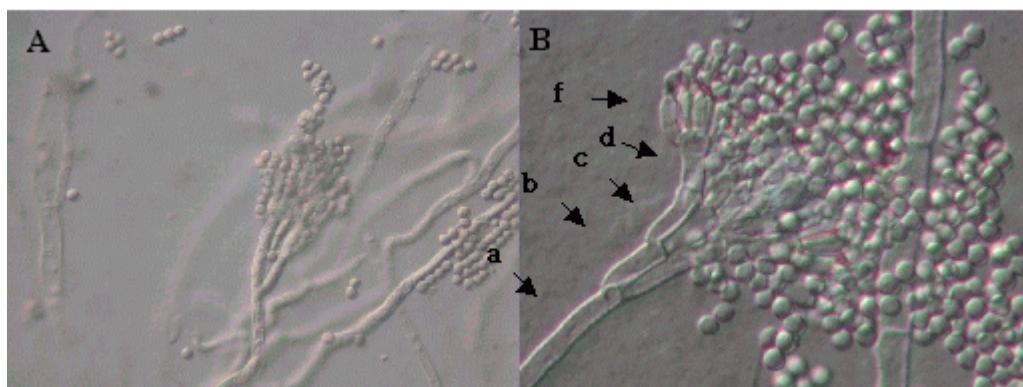


Fig. 3. Microscopic features. A: x200, B: x400, a; stipe, b ; rami, c ; ramuli, d ; metulae, f; phialides

- Conidiophores - borne singly or in fascicles, mostly from subsurface hyphae, with stipes commonly 200-400 x 2.25-4.4 μm , bearing terminal terverticillate penicillin rami 10-11 x 2-3 μm ; metulae in verticils of 3-4, measuring 10-11 x 2-3 μm ; phialides 4-8 per metula, ampulliform, typically 5.6-6.7 x 2.25-3.37 μm . Walls slightly roughened.
- Conidia - subspheroidal to ellipsoidal, commonly 2.6-3.93 x 2.2-3.4 μm , smooth walled.

사상균 301의 형태는

다. Macroscopic characteristics

1) On MEA (Figure 4)

- Growth: 30mm 35mm in 7days at 24 C, 20mm at 37 °C
- Colony : plane, central area raised, almost velvety, heavy sporing with surface texture finely granular, texture sometimes floccose to lanose
- Mycelium : usually subsurface; conidiogenesis typically moderate to heavy
- Conidia: blue-green to deep blue-green
- Reverse: maroon to pale brown
- No exudates

2) On CYA (Figure 4)

- Growth: 25mm-30mm in 7 days at 24 °C
- Colony: deeply sulcated; deep blue-green; heavily sporulated; abundant droplet of clear exudates
- Reverse: maroon to light brown

라. Microscopic characteristics (Figure 5)

- Conidiophores - borne singly or in fascicles, mostly from subsurface hyphae, with stipes commonly 200-400 x 2.25-4.4 μm , bearing terminal terverticillate penicillin rami 10-11 x 2-3 μm ; metulae in verticils of 3-4, measuring 10-11 x 2-3 μm ; phialides 4-8 per metula, ampulliform, typically 5.6-6.7 x 2.32-3.32 μm . Walls slightly roughened.
- Conidia - subspheroidal to ellipsoidal, commonly 2.6-3.93 x 2.2-3.4 μm , smooth walled.

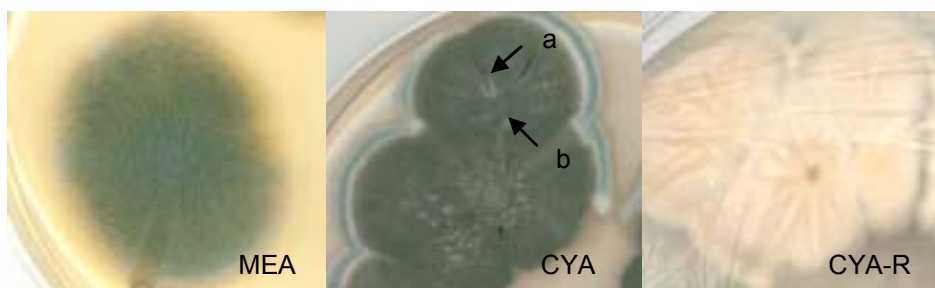


Figure 4. Colonies (7 days on MEA and CYA at 24 °C); a; sulcated furrow, b; exudates droplet, R means reverse.



Figure 5. Microscopic features. x200

본 종은 형태상의 특징으로 *Penicillium aurantiogriseum* complex의 *Penicillium polonicum* Zaleski 1927로 동정되었는데 *Penicillium*

*polonicum*은 그 명칭이 분류학상으로 확정되지 않은 종이다. *Penicillium* 분류의 고전적 참고문헌으로 알려진 Raper, Thom and Fennell의 "A manual of the Penicillia"²⁸⁾의 기술에 의하면 *Penicillium polonicum*은 *Penicillium cyclopium* series의 한 종으로 *P. martensii*와 동일종으로 여겨지고 있다. 한편, 1980년대 여러 분류학자들의 연구에 의해서 *P. cyclopium* series와 *P. aurantiogriseum* series의 일부 균종을 통합하여 *P. aurantiogriseum* complex로 명명하였으며 *P. polonicum*을 이 complex의 한 종으로 포함하였다.^{29,30)}

한편, ITS 염기서열의 분석에 의하면 조사된 461bp의 염기서열이 100% *P. polonicum*의 표준균주와 동일하고, *P. cyclopium*, *P. aurantiogriseum*의 표준균주와는 1-2bp의 차이를 나타내었다. 이들 염기서열의 결과를 바탕으로 한 계통분석의 결과로 나타난 계통수에서도 본 종은 *P. polonicum*의 표준균주와 같은 종으로 확인되었으며, *P. cyclopium*과 동일한 clade에 존재하고 있다.

따라서, 본 종을 *Penicillium aurantiogriseum* complex의 *P. polonicum* zaleski 1927로 동정함이 타당하다.

3. 결 론

본 종은 MEA 배지에서 *Penicillium*의 특징인 dull green or blue-green 색을 띠며 *Penicillium* subgenus *Penicillium*의 특징인 terverticillate penicilli를 형성함을 현미경을 통해 쉽게 관찰할 수 있었다. 배지상에서 colony의 모양과 rami, metula, phialide 와 conidia의 수 및 크기에서 이종을 *Penicillium aurantiogriseum* complex로 분류할 수 있다. 본 종이 MEA 상에서 비교적 빨리 자라고 conidiophore가 약간 거칠며 포자의 형성기 초기에 elliptical conidia를 형성하며 conidia의 색이 blue shade를 나타내는 특징으로부터 *Penicillium polonicum* Zaleski 1927로 동정되었다.

제 4 절 우수 균주의 확정

우리나라의 전통 간장과 된장의 이취 성분인 butyric acid의 제거에 이용할 수 있는 균주는 우선, 독성을 생성하지 않아야 하며, 두 번째로는 장류의 풍미(맛과 향)를 증진할 수 있는 균이라야 바람직하다고 할 수 있다.

독성을 생성하는 균일 때에는 그 균이 butyric acid의 분해효소를 정제하여 사용해야 함으로 정제 과정의 복잡함과 경비 상승의 문제 그리고 기술적인 문제들로 인하여 장류를 소규모로 생산하는 농민들이 직접 제조하여 사용하기에는 매우 어려운 점들이 발생한다.

1. 재료 및 방법

가. 효소 조제

1) 조효소액

분리 선정균(사상균 241과 301)과 *Aspergillus oryzae* J 및 M을 각각 삶은 대두에 접종하여 25℃와 30℃, 7일간 배양한 후 배양물 100g에 4℃ 냉각 증류수 100ml을 가해 진탕하고 4℃에서 1시간 방치한 후 원심분리와 여과(Advantec MFS, Inc., U.S.A. 사, pore size가 0.45 μ m인 membrane filter, mixed cellulose ester, CAT. No. A045A047A)를 한 후 조효소액으로 사용하였다.

2) Dialysis와 동결 건조한 효소

1)번의 조효소액을 regenerated cellulose dialysis membrane(Spectra/Por[®] 6 membrane MWCO Daltons : 2,000)으로 4℃이하에서 24시간 4℃ 증류수를 교환하면서 투석 시킨 후 동결 건조시켜 효소 분말을 얻었다. 효소 반응시에는 조효소액의 농도와 같은 비율로 증류수에 용해하여 하였다.

3) 효소 반응

효소 반응은 pH를 조정한 0.5% butyric acid 0.1 ml + D.W. 0.6 ml + Enzyme solution 0.3 ml을 30°C에서 일정기간 반응시킨 후 2% H₂SO₄를 0.1%되도록 첨가하여 효소 반응을 중단시켰다. Control(대조구)은 30°C에서 효소 반응을 시키지 않는 상태에서 H₂SO₄를 첨가한 것을 사용하였다.

4) 휘발성 유기산의 측정

제 5절의 방법과 같음

5) Protease의 역가

사상균 배지에 milk casein을 1 %되도록 첨가하여 균을 접종한 후 *Penicillium polonicum*은 25°C, *Aspergillus oryzae* J, M은 30°C에서 배양하여 colony가 형성된 후 1N-HCl을 배지상에 가해서 형성된 halo zone의 크기를 분석하였다.

6) Amylase의 역가

사상균 배지에 soluble starch를 0.1 %되도록 첨가하여 배지에 선별균을 배양하여 colony가 형성된 후 I₂ 용액을 가해 형성된 halo zone의 크기를 판별하였다.

2. 결과 및 고찰

*Aspergillus oryzae*의 배양물은 전통 간장과 된장 및 *Bacillus subtilis* PM3의 배양물 중의 butyric acid를 분해함과 동시에 장류의 맛도 함께 증진함을 볼 수 있었다. 그러나 butyric acid의 함량변화가 일률적이지 않은 경우도 나타나는데 이러한 현상은 Fig. 1에서 6까지의 효소 반응 결과에 나타나 있다.

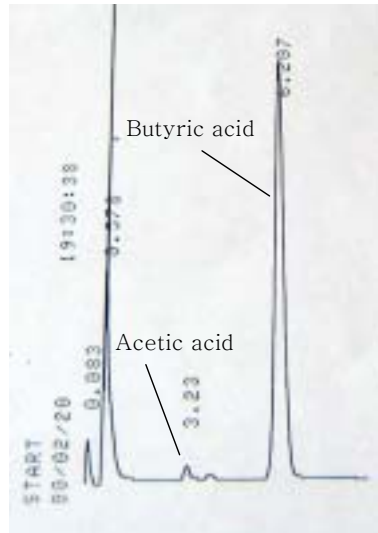


Fig. 1. Butyric acid와 *Aspergillus oryzae* J의 투석효소간의 무반응액의 Gas chromatography

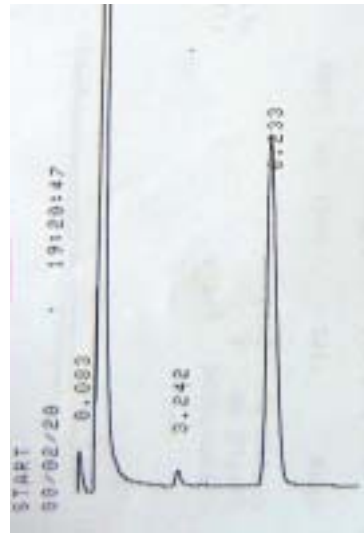


Fig. 2. Butyric acid와 *Aspergillus oryzae* J의 투석효소간의 반응액의 Gas chromatography

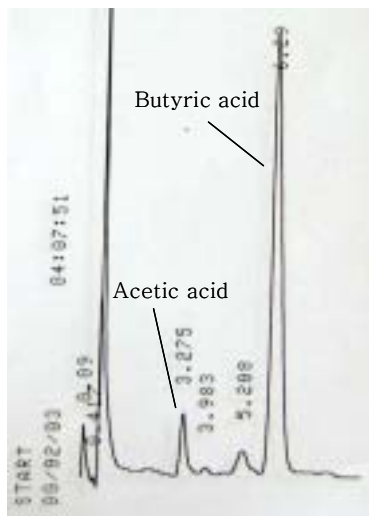


Fig. 3. Butyric acid와 *Aspergillus oryzae* J의 조효소액간의 무반응액의 Gas chromatography



Fig. 4. Butyric acid와 *Aspergillus oryzae* J의 조효소액간의 반응액의 Gas chromatography

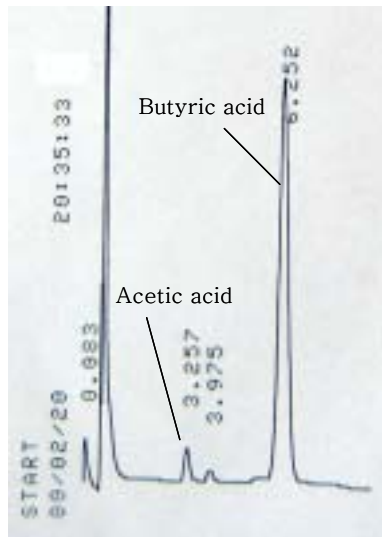


Fig. 5. Butyric acid와 *Aspergillus oryzae* J의 dialysis 시키지 않은 조효소액간의 무반응액의 Gas chromatography

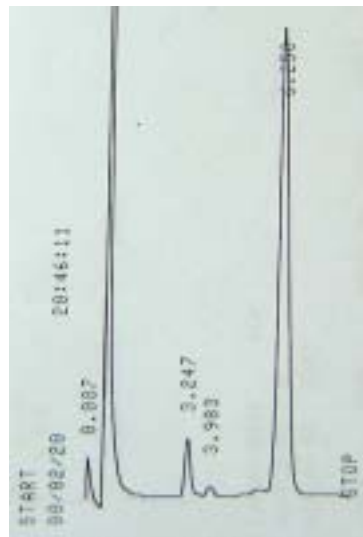


Fig. 6. Butyric acid와 *Aspergillus oryzae* J의 dialysis 시키지 않은 조효소액간의 반응액의 Gas chromatography

Aspergillus oryzae J가 형성한 효소를 dialysis시켜 불순물을 제거하여 butyric acid와 효소 반응을 시킨 결과는 Fig. 2와 같으며, 이 때의 효소 반응을 시키지 않는 결과(control ; 대조구)는 Fig. 1과 같다. 효소 반응의 결과 butyric acid의 감소를 확인할 수 있다. 한편 dialysis시키지 않은 효소액으로 반응시킨 결과는 Fig. 4와 Fig. 6과 같으며, 이 때 효소 반응을 시키지 않은 대조구는 각각 Fig. 3과 Fig. 5와 같다.

대조구 Fig. 3과 효소 반응구 Fig. 4에서는 butyric acid의 함량이 감소하였지만 대조구 Fig. 5와 효소반응구 Fig. 6에서는 역으로 효소반응구에서 butyric acid가 증가함을 나타냈다. 이러한 현상은 dialysis 시키지 않은 조효소액내에서는 불휘발성인 고급 지방산이 많이 포함되어 있기 때문에 반응조건에 따라 이들이 분해되는 과정에 butyric acid를 경유하여 더 저급 지방산으로 분해됨을 추론할 수 있다.

*Penicillium polonicum*은 protease와 amylase의 분해능이 강함을 Fig. 7과 Fig. 9에서 볼 수 있고, *Aspergillus oryzae*의 protease와 amylase의 분

해능은 Fig. 8과 Fig. 10에서 볼 수 있다. 이 2가지 종의 균은 맛성분(고분자 물질이 저분자 물질로 가수분해 되면 맛성분이 됨)의 생산능이 우수한 것으로 사료된다. 그러나 *Penicillium polonicum*은 독성물질을 생성하는 균으로 밝혀져 있으므로 이 균의 배양물을 직접 이용하지는 못하지만 이 균이 생산하는 효소들의 이용이 가능하리라 사료된다.

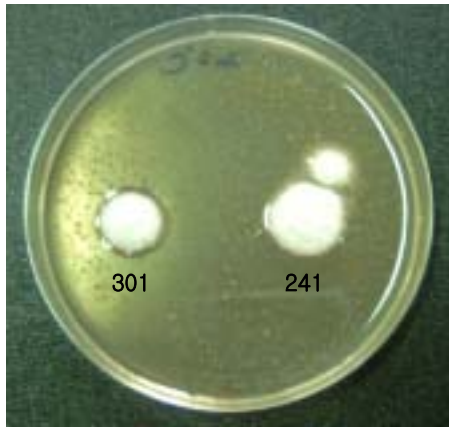


Fig. 7. *P. polonicum*의 exo type protease 생산능

Fig. 8. *A. oryzae*의 exo type protease 생산능

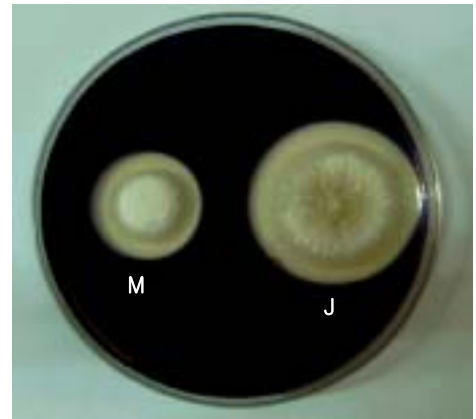


Fig. 9. *P. polonicum* exo type의 amylase 생산능

Fig. 10. *A. oryzae*의 exo type의 amylase 생산능

3. 결 론

butyric acid의 분해능, 맛성분 생산의 향상성과 제 2 절과 제 3 절에서 확인된 실제 butyric acid의 분해와 제조한 간장과 된장의 풍미의 개량효과를 고려할 때 안전균으로 알려진 *Aspergillus oryzae*의 배양물은 직접 이용이 가능하고, *Penicillium polonicum*은 독성을 생성하기 때문에 배양물에서 효소를 추출한 후 투석하여 mycotoxin을 제거한 후 이용할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

제 5 절 이취 제거와 맛과 향을 증진 할 수 있는 최적 발효기법으로 제조한 간장과 된장의 맛과 향의 개량 확인

이취성분(butyric acid)을 분해하여 이취를 제거할 수 있고, 이취를 제거한 간장과 된장의 맛과 향을 증진할 수 있는 선별균은 *Penicillium polonicum* 241과 301 및 *Aspergillus oryzae* J와 M이었다. *Penicillium polonicum*은 독성을 생성하기 때문에 직접 배양물의 이용은 불가능하며, *P. polonicum*이 생성하는 효소를 이용하여 이취성분의 분해는 가능하다. *Aspergillus oryzae*의 경우는 종균으로 제조한 장류를 이미 오래전부터 식용으로 이용해 오고 있기 때문에 안전한 균이라 사료되므로 *A. oryzae*의 배양물 전체를 이용하여 이취제거 및 간장과 된장의 맛과 향의 증진에 사용이 가능하다. 앞의 제 2절에서와 같이 삶은 대두에 *A. oryzae*의 배양기간은 30℃, 7일간이 이취제거와 간장과 된장의 풍미가 가장 좋았으며, *A. oryzae*의 배양물을 간장과 된장의 양에 대하여 20 % 이하의 비율로 혼합했을 때가 관능검사상 가장 좋았다. 이와 같은 조건에서 성분함량의 기준으로 이취성분을 제거한 간장과 된장의 풍미를 재평가할 필요성이 있다.

1. 재료 및 방법

가. 재료

- 1) *Aspergillus oryzae* J 배양물 : 삶은 대두에 *Aspergillus oryzae* J를 접종하여 균사가 충분히 자라는 기간인 30°C에서 7일간 배양
- 2) *Bacillus subtilis* TKSP24 및 PM3 배양물 : 삶은 파쇄대두에 *Bacillus subtilis* TKSP24와 *Bacillus subtilis* PM3을 각각 별개로 접종하여 30°C에서 3일간 각각 배양
- 3) 재래식 간장 및 된장 : 경북 경산시 자인 농협에서 제조한 재래식 간장 및 된장

나. 맛성분

1) 맛성분의 추출

Setsuko등³¹⁾의 방법을 준용하여 Fig. 1과 같이 된장 200 g에 65 % ethanol 300 ml을 첨가한 후 80°C에서 30분간 추출하여 여과하였다.

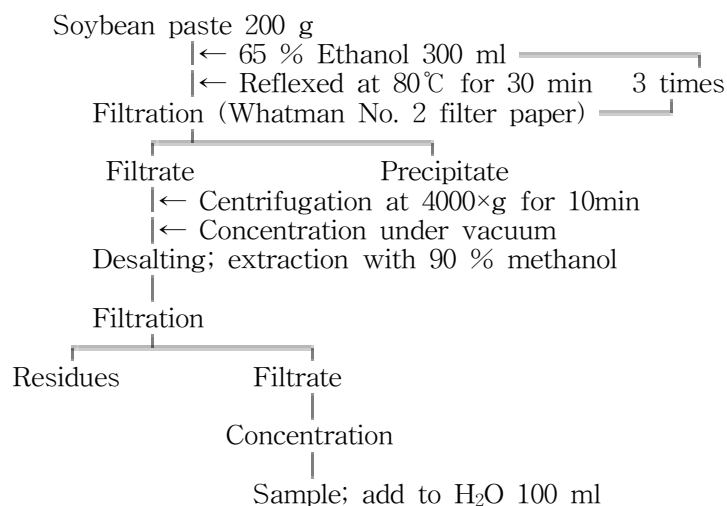


Fig. 1. Procedure for extraction of taste components from fermented soybean paste

여액 잔유물은 다시 65 % ethanol로 2번 더 반복 추출한 다음 그 여액들을 합하여 4000 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리한 상등액은 60°C에서 감압농축한 후 90 % methanol로 완전히 탈염을 시켰다. 탈염 후 여과한 여액은 다시 減壓乾固시켜 물 100 ml로 용해하였다.

2) 맛성분의 정제

추출된 맛성분 시료는 Fig 2와 같이 이온교환수지³²⁻³⁴를 이용하여 分離, 精製하였다.

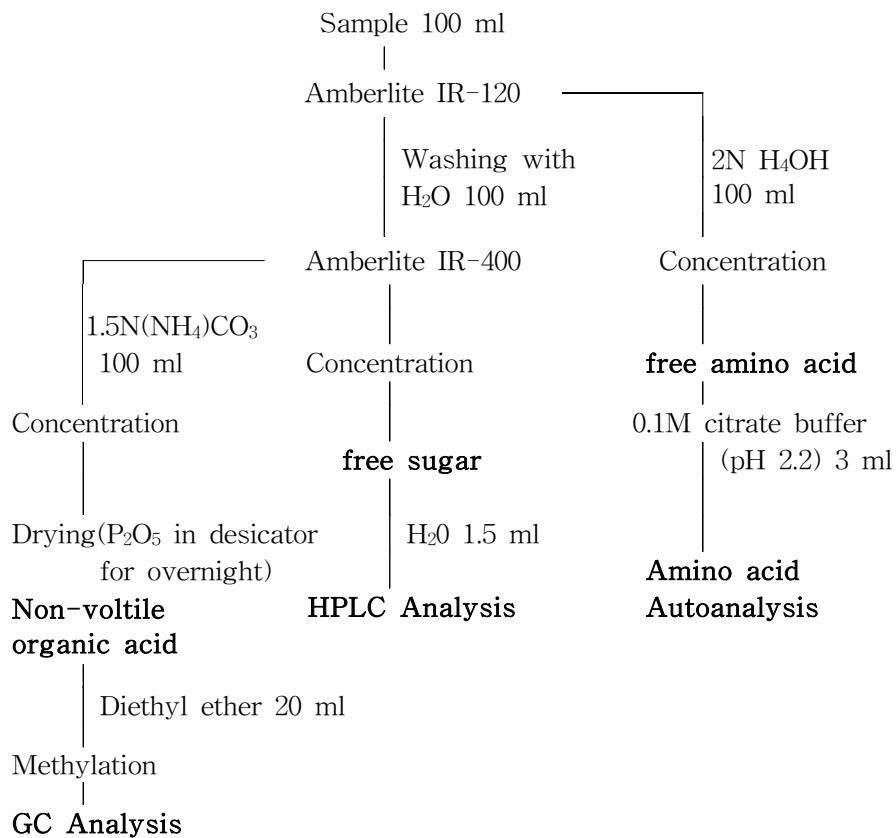


Fig. 2. Procedure for the separation of free amino acids, free sugars and organic acids by ion exchange chromatography.

즉 양이온 교환수지 amberlite IR-120과 음이온 교환수지 amberlite IRA-400를 직경 2 cm, 길이 35 cm의 column에 충전시켜 맛성분 정제에 사용하였다. 추출 시료를 amberlite IR-120과 ambertlite IRA-400에 차례로 서서히 통과시킨 후 다시 100 ml의 증류수로 washing을 하여 양쪽을 모두 통과한 용출액은 유리당의 분석시료로 사용하였다.

유리당의 HPLC 분석조건은 : Instruments ; RID-6A(Shimadzu), range ; 8×10^{-6} RIU, Flow rate ; 0.6 ml/min, column ; TSK-Amide 80, mobile phase ; $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 75 : 25$, attenuation ; 34 와 같다. Amberlite IR-120에 흡착된 부분은 2-N NH_4OH 100 ml로 서서히 용출시킨 후 減壓 乾固하여 0.1 M citrate buffer(pH 2.2) 10 ml로 용해시킨 유리아미노산은 아미노산자동분석기(Biochrom 20)로 분석하였다.

Amberlite IRA-400에 흡착된 부분은 1.5 N $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 100 ml로 서서히 용출 후 減壓 乾固하여 P_2O_5 가 든 desiccator에 하루 동안 방치한 다음 diethyl ether 20 ml로 용해하였다. 이 비휘발성 유기산은 Schlenk의 diazomethane법³⁵⁾으로 methylation을 시켰다.

시험관 1에 diethyl ether를 10 ml 넣고, 시험관 2에는 carbitol 2.1 ml, ether 2.1 ml, KOH 3 ml 및 ether 20 ml에 P-toluenesulfonyl-N-nitrosoamide 2 g이 용해된 용액 5 ml을 가하고, 시험관 3에는 ether에 용해되어 있는 유기산 시료를 각각 넣는다. 1번 시험관에 연결된 N_2 gas를 6 ml/min으로 통과시켜 3번 시험관이 등황색을 나타내면 methylation을 종결하고 이를 gas chromatography로 분석하였다.

다. 향기성분

1) 향기성분의 추출 및 분획

휘발성 향기성분의 추출에는 Nikerson과 Nikens형의 개량형인 연속 증기 증류 장치(simultaneous steam distillation-extraction)³⁶⁾를 사용하였다. whole flavor 분석용으로 1000 g에 물 2ℓ를 섞었으며, fraction flavor

분석용으로 1000 g에 물 2ℓ를 섞어 3ℓ의 시료용기에 넣고 2회에 걸쳐 추출하였다. 용매로는 diethyl ether를 사용하였으며 먼저 용매를 용기에 넣어 40℃의 온도에서 순환시킨 후 시료 용기의 온도를 상승시켜 시료가 끓은 후 2시간 이상 휘발성 향기성분들을 추출하였다.

추출된 전체 휘발성 향기성분들을 더 자세히 규명하기 위하여 Fujimaki 등³⁷⁾의 방법에 따라 Fig 3과 같이 fractionation을 행하여 acidic, phenolic, neutral, basic fraction으로 분획하였다.

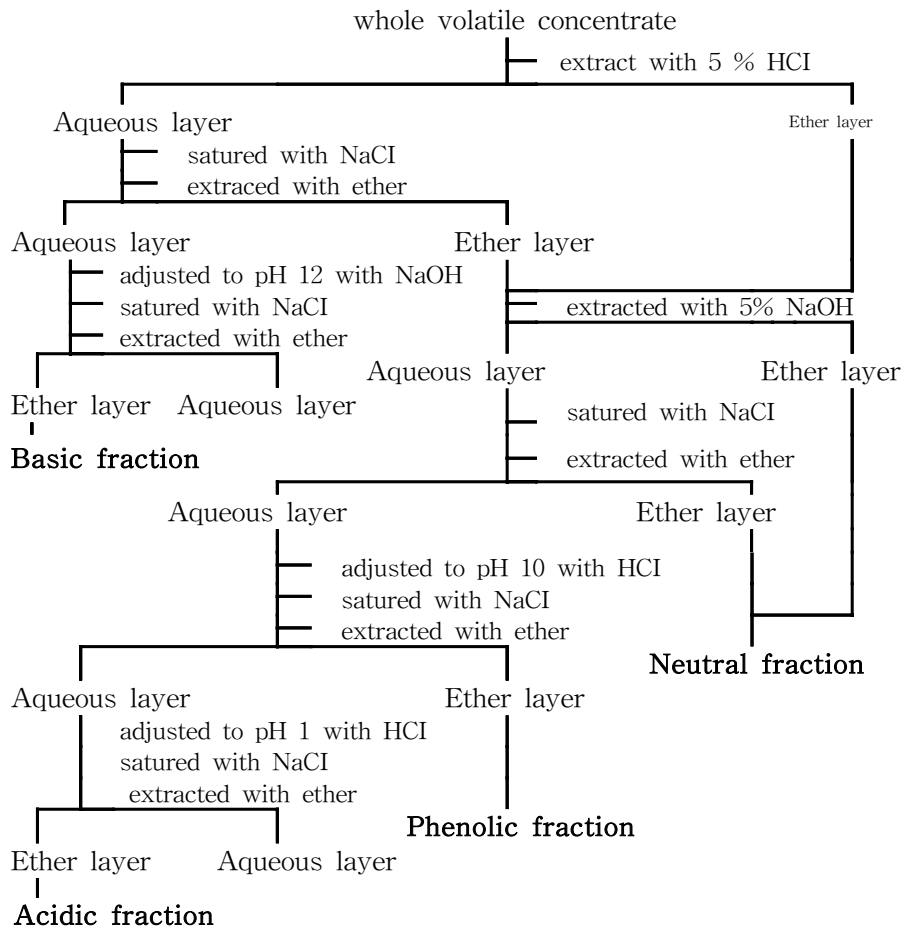


Fig. 3. Fractionation of whole volatile flavor components

Acidic fraction은 diazomethane법으로 methylation을 하였다. Test tube 1에 ether를 10 ml넣고, test tube 2에 carbitol 2.1 ml, KOH 3 ml 및 ether 20 ml에 p-toluene sulfonyl-N-nitrosoamide 2 g이 용해된 용액 5 ml을 가하고 test tube 3에는 methylation시킬 acidic fraction을 취한다.

Test tube 1에 N₂ gas를 6 ml/min의 유속으로 가하여 test tube 3의 acidic fraction이 등황색을 띠면 methylation을 종결시킨다. 분획하여 얻어진 각 fraction별 시료는 Na₂SO₄를 가해 1일 정도 냉장 보관하여 수분을 제거하고 rotary evaporator를 이용하여 38°C에서 약 3 ml로 농축한 후 농축액을 향기농축병에 옮기고 N₂ gas를 농축병의 벽면에 분사하여 30-50 μl 정도로 최종 농축시켜 capillary에 넣어 봉합 후 저장하면서 향기성분 분석용 시료로 사용하였다.

2) 휘발성 유기산의 분석

휘발성 유기산은 Kageyama³⁸⁾ 방법에 준하여 된장 5 g에 물 5 ml를 첨가하여 mixing한 후 filter paper로 여과 후 분석 시료로 사용하였다. 그리고 시료에 2 %의 H₂SO₄를 0.1 %의 농도가 되게 가하여 pore size가 0.45 μm인 membrane filter로 여과 한 후 분석하였다. 이때의 GC의 분석 조건은 ; Instrument : Shimadzu GC-8A, column ; 10% PEG 6000 in glass column 2 m, injector(inj.) & detector(det.) temperature(temp.); 200°C, carrier gas; N₂ (40 ml/min), column temp.; 150°C, range ; 102, attenuation ; 64 와 같다.

3) 향기성분의 동정

Hewlett-packard 5988 GC-Mass를 사용하여 mass spectrum을 얻은 후 computer로 library search한 data와 Kovat's retention index^{39,40)}를 비교하여 각 peak의 향기성분들을 동정하였다. 향기 성분의 함량은 전체 peak 면적당 각 peak의 면적에 최종 농축량을 곱하고, 여기에 다시 100 g중의 함

량으로 계산 후 ppm단위로 환산하여 계산하였다. 8종의 된장 모두를 fractionation하여 narrow bore capillary column을 이용하여 동정하였으며 그 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. The conditions of Gas Chromatography and mass

Instrument : GC-HEWLETT-PACKARD 5980II
HEWLETT-PACKARD 5988 Mass
Column : HP-FFAP 50 m×0.33 μm×0.2 mm
Injector temp. : 230℃
Detector temp. : 230℃
Ionizer temp. : 200℃
Temp. program : 80-200℃(10℃/min)
Carrier gas : He 0.9 ml
Electron voltage : 70 eV
Split ratio : 10:1

라. 관능검사

1) 한국인 관능검사

패널은 훈련을 별도로 시키지 않은 주부들을 이용하였다.

가) 패널 : (주) 샘표 식품 주부 고정 패널 19명(최고연령 40, 최저연령 27, 평균연령 32.4세)

나) 재료 : 간장은 미역국에 넣어서 측정을 하였고, 된장은 된장찌개를 만들어서 측정하였다.

다) 관능평가법 : 5점 척도

1	2	3	4	5
매우 나쁨	조금 나쁨	보통임	좋음	아주 좋음

2) 미국인 관능평가

가) 패널 : 미국인 고객(15명 ~18명)

나) 장소 : 미국 LA Mr. Kimchi 레스토랑

다) 재료 : 간장의 시식은 밥에 뿌린 다음 비빔 후 시식하는 방법을 사용하였으며, 된장의 시식은 된장국으로 시료 2개씩을 평가하게 함

라) 관능평가법 : 5점 척도법

1	2	3	4	5
very bad	bad	moderate	good	very good

2. 결과 및 고찰

가. 관능검사결과

Aspergillus oryzae J 배양물을 재래식 간장 및 된장과 *Bacillus subtilis* TKSP24 및 PM3의 배양물에 각각 1/5의 양으로 혼합하여 30°C, 30일간 숙성시킨 장류의 관능검사결과는 Table 2 및 3과 같으며, 45일간 숙성시킨 장류의 관능검사 결과는 Table 4와 같다. 30일 보다 45일간 숙성시킨 된장의 풍미가 더 좋았다. 그러나 충분한 숙성을 위해서는 더 많은 숙성기간이 요구된다.

Table 2와 3에서 30일간 숙성간장 및 된장의 관능검사결과는 서로 다르다. 이는 panel이 다르고 관능검사를 실시할 때 실험방법에서와 같이 시식용 시료(간장 및 된장)의 처리를 다르게 한 결과라고 보여 진다.

이들 30일간 숙성된 간장 및 된장은 덜 숙성이 되었으나 Table 2에서와 같이 재래식 간장 및 된장과 *Bacillus subtilis* TKSP24 배양물에 *Aspergillus oryzae* J 배양물을 첨가한 구가 첨가하지 않는 구에 비해 더 우수한 품질을 나타내고 있다. 이는 더 숙성시킨 Table 3의 45일간 숙성된

제품에서 더욱 분명해 진다. 단 *Bacillus subtilis* PM3의 경우는 숙성기간이 30일 보다 45일에 *Aspergillus oryzae* J 배양물의 첨가구가 점점 더 좋아지고 있으나 숙성기간이 더 많이 필요함을 알 수 있다.

Table 3에서 보는 바와 같이 덜 숙성된 시료이지만 패넬이 한국인(샘표 식품 주부)의 경우 외국인(미국인)의 경우보다 모든 시료(간장과 된장)에 대해 기호도가 높은 결과를 나타냈다.

위의 panel의 결과는 한국인이 어릴 때부터 우리나라 장류의 맛에 익숙해져 있었기 때문이라 사료된다. 외국인의 기호도에 대해서는 더 많이 숙성된 시료와 더 많은 panel이 요구되며, 우리와 다른 식문화를 가지고 있기 때문에 그들에게 적합한 시식용 시료의 마련이 되어야 하리라 본다

나. 맛성분

Aspergillus oryzae J 배양물을 첨가하여 30℃에서 45일간 숙성된 간장과 된장의 유리아미노산의 분포는 Table 5 및 6과 같고, 유리당의 분포는 Table 7과 같으며, 불휘발성 유기산은 Table 8과 같다.

재래식 간장과 *Bacillus subtilis* TKSP24의 배양물의 경우 *Aspergillus oryzae* J 배양물을 혼합한 구의 맛의 관능검사치는 Table 2와 3에서와 같이 대조구보다 높다. 이러한 현상을 잘 설명해 주듯이 Table 5, 6의 유리아미노산의 함량에서 기호도를 높여주는 단맛, 구수한 맛을 내는 아미노산의 함량과 Table 7의 단맛을 나타내는 유리당의 함량은 높고 기호도를 떨어뜨리는 쓴맛을 내는 유리아미노산의 함량이 낮다.

재래식 된장과 *Bacillus subtilis* PM3 배양물의 경우는 기호도에 영향을 미치는 맛성분의 pattern의 다양성 때문에 관능검사상의 맛의 기호도와 성분 함량사이에 상기와 같이 일치된 결과로 설명하기 어렵다.

다. 향기성분

휘발성 유기산은 Table 9 및 10에서와 같이 간장과 된장 중 함량이 맛

을 나타내기에는 적고 향을 나타내기에는 충분한 수치를 나타내고 있다. acetic acid와 propionic acid는 산취를 나타내고 butyric acid는 이취를, 3-methyl butanoic acid는 양이 많아지면 점점 이취와 비슷하게 되지만 본 장류에 분포하는 함량정도에서는 우리나라의 간장과 된장의 중간 정도(공통)의 독특한 향을 나타낸다.

Aspergillus oryzae J 배양물을 혼합하여 30일간 숙성한 간장과 된장의 휘발성 유기산의 함량은 Table 9와 같고 45일간 숙성시킨 경우는 Table 10과 같다.

휘발성 유기산 중 이취를 나타내는 butyric acid의 함량은 재래식 간장의 경우 검출이 되지 않았고 재래식 된장과 *Bacillus subtilis* PM3 배양물의 경우 *Aspergillus oryzae* J 배양물을 혼합한 구가 더 적었다. 단지 *Bacillus subtilis* TKSP24 배양물과 TKSP24 배양물에 *Aspergillus oryzae* 배양물을 혼합한 구는 30일 숙성 시 0.00 mg/100 g이었다가 45일 숙성 시 0.31 및 0.83 mg/100 g으로 변했다. 이러한 현상의 원인에 대해서는 제 4 절에서 잘 설명되어 있다.

45일간 숙성하여 제조한 각종 간장 및 된장의 향기성분의 분포는 Table 11과 같다. Table 2의 간장, Table 4의 된장의 향의 관능검사치와 관능검사결과에서 나타나듯 재래식 간장 및 된장, *B. subtilis* TKSP24 배양물 및 PM3 배양물구와 이들에 *A. oryzae* J 배양물을 혼합하여 숙성한 간장과 된장의 방향의 특징이 서로 다르다. 이러한 현상은 Table 11 향기성분의 분포에서와 같이 향기성분은 재래식 간장과 재래식 간장 + AJ에서 각각 56개와 101개의 성분이 검출되었고, 그 중 동시에 검출된 성분은 36개 성분 뿐이었다.

방향은 동일한 성분이 같은 함량으로 존재할 때만 가능하므로 관능검사상 방향의 특징이 서로 다를 수 있음을 성분상으로 확인할 수 있다.

Table 11에서 *A. oryzae* J 배양물을 혼합하여 간장과 된장을 제조할 경우 향기성분들의 분포가 다르게 되고, Table 2와 4에서 관능검사 결과 방

향이 전반적으로 개량됨을 알 수 있다.

3. 결 론

우리나라 전통 메주에 가장 많이 존재하는 *Bacillus subtilis* group의 균주의 일종인 *Bacillus subtilis* TKSP24와 PM3의 대두 배양물과 재래식 간장, 재래식 된장 중의 butyric acid(이취성분)는 *A. oryzae* J의 대두 배양물을 혼합하여 30°C에서 숙성함에 따라 잘 분해가 되었다.

A. oryzae J의 대두 배양물을 혼합하여 숙성한 간장과 된장은 우리의 기호도를 좋게 하는 맛성분인 단맛을 내는 아미노산, 구수한 맛을 내는 아미노산과 단맛을 내는 유리당의 함량이 증가하고 기호도를 떨어뜨리는苦味성분인 유리아미노산의 함량은 감소하는 경향을 나타내며 향기성분의 분포의 변화는 관능검사상 개량되는 경향임을 알 수 있었다. 즉 *Aspergillus oryzae* J는 이취성분을 분해(제거)하고, 간장과 된장의 풍미(맛과 향)를 개량하는 경향을 나타내고 있다.

Table 2. 재래식 간장 및 된장, *Bacillus subtilis* TKSP24 및 PM3으로 제조한 메주와 *Aspergillus oryzae* J 배양물을 1 : 0.2로 혼합하여 30일간 숙성한 간장 및 된장의 관능검사 결과

시 료	생된장		끓인 된장		관능검사결과	t (p-value)
	맛	향	맛	향		
재래식 간장	4	-	-	-	밋밋한 간장맛과 향 단 재래식 간장맛과 향	-4.743** (.001)
재래식 간장 + AJ	5	-	-	-		
재래식 된장	2.6a	3.3 c	3.3 b	3.3 b	짠 재래식 된장맛과 밋밋한 된장향 단 재래된장맛과 구수한 된장향	
재래식 된장 + AJ	4.0 b	5.0 d	4.6 c	4.0 c		
TKSP24	2.3a	3.0 bc	2.6a	2.6a	쓴 된장맛과 덜 숙성된 된장향, 재래식 초장맛과 약 단 된장향	
TKSP24 + AJ	3.6 b	2.3a	3.6 b	3.3 b		
PM3	2.7a	2.7ab	2.3a	2.6a	밋밋한 된장맛과 향 시큼한 된장맛과 향	
PM3 + AJ	4.0 b	2.3a	2.3a	2.3a		
F (p-value)	10.651*** (.000)	27.000*** (.000)	25.107*** (.000)	7.924*** (.000)		

* : 패널 : 12명(대학원생 2명, 학부학생 10명)
p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 3. 재래식 간장 및 된장, *Bacillus subtilis* TKSP24 및 PM3으로 제조한 메주와 *Aspergillus oryzae* J 배양물을 1 : 0.2로 혼합하여 30일간 숙성한 간장 및 된장의 관능검사 결과 (외국인과 한국인)

시 료	aroma		flavor				overall	
	외국인	t (p-value)	외국인	t (p-value)	한국인*	t (p-value)	외국인	t (p-value)
재래식 간장	1.8±0.75	-3.227* (.002)	2.4±0.65	2.190** (.035)	3.7±0.99	2.193* (.033)	2.4±0.64	.652 (.517)
재래식 간장+AJ	2.5±0.65		2.0±0.76		3.1±0.74		2.2±0.66	
재래식 된장	1.7±0.49 b		2.4±0.51 c		3.6±0.76 b		2.2±0.41 b	
재래식 된장+AJ	1.6±0.51 b		1.7±0.62 b		2.6±0.84a		1.6±0.51a	
TKSP 24	2.2±0.73 c		1.2±0.43a		2.2±0.63a		1.4±0.49a	
TKSP 24+AJ	1.1±0.32a		1.4±0.62a		3.4±0.60 b		1.3±0.49a	
F (p-value)	12.944*** (.000)		13.698*** (.000)		16.483*** (.000)		10.857*** (.000)	

* : 패널 : 19명(샘표식품 주부패널)

p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 4. 재래식 된장, *Bacillus subtilis* TKSP24 및 PM3으로 제조한 메주와 *Aspergillus oryzae* J 배양물을 1 : 0.2로 혼합하여 45일간 숙성한 된장의 관능검사 결과

시 료	생된장		끓인 된장		관능검사결과
	맛	향	맛	향	
재래식 된장	2.6a	3.3 c	3.3 c	3.3 b	짠 재래식 된장맛과 맛있는 된장향
재래식 된장+AJ	4.0 c	5.0 d	4.6 d	4.0 c	단 재래 된장맛과 구수한 된장향
TKSP24	2.3a	3.0 bc	2.6ab	2.6a	쓴 된장맛과 덜 숙성된 된장향
TKSP24+AJ	3.6 bc	2.3a	3.6 c	3.3 b	재래식 초장맛과 약 단 된장향
PM3	3.0ab	2.5ab	3.0 bc	2.5a	덜 숙성한 맛과 향
PM3+AJ	3.0ab	2.5ab	2.0a	2.5a	약 쓴맛과 많이 쿼퀴한 향
F (p-value)	7.356*** (.000)	23.369*** (.000)	16.940*** (.000)	9.167*** (.000)	

* : 패널 : 12명(대학원생 2명, 학부학생 10명)

p<.05 *, p<.01**, p<.001*** (Duncan a<b<c)

Table 5. *Aspergillus oryzae* J 배양물을 혼합하여 제조한(30℃, 45일간 숙성) 간장 및 된장의 유리 아미노산의 분포 1

(mg/100g)

시 료	아미노산					Total	Sweet			Total	Savory			Total
	Ala.	Ser.	Gly.	Thr.	Lys.		Asp.	Glu.	Cys.					
재래식 간장	681.6	0.0	750.9	1270.4	0.0	2702.9	48.1	0.0	712.6	760.7	0.0	4073.0	808.7	4881.6
재래식 간장 + AJ	690.9	0.0	800.0	1357.5	0.0	2848.4	49.1	1876.0	712.5	2637.6	29.0	1149.1	424.5	1602.6
재래식 된장	642.2	645.2	677.7	406.1	0.0	2371.2	50.8	0.0	371.9	422.7	62.0	2518.1	674.3	3254.3
재래식 된장 + AJ	548.6	0.0	423.0	532.1	0.0	1503.7	0.0	0.0	1087.1	1087.1	74.7	0.0	789.3	864.0
TKSP24	545.8	0.0	369.9	0.0	40.5	956.2	43.2	1142.3	715.2	1723.4	43.2	1142.3	715.2	1723.4
TKSP24 + AJ	241.5	12.3	111.9	127.2	69.0	561.9	43.2	1142.3	715.2	1723.4	43.2	1142.3	715.2	1723.4
PM3	530.2	0.0	370.4	0.0	0.0	900.6	43.2	1142.3	715.2	1723.4	43.2	1142.3	715.2	1723.4
PM3 + AJ	769.7	0.0	443.7	126.8	117.1	1457.3	43.2	1142.3	715.2	1723.4	43.2	1142.3	715.2	1723.4
Means	573.7	73.1	438.6	424.5	25.2	1478.0	43.2	1142.3	715.2	1723.4	43.2	1142.3	715.2	1723.4

Table 6. *Aspergillus oryzae* J 배양물을 혼합하여 제조한(30℃, 45일간 숙성) 간장 및 된장의 유리 아미노산의 분포 2

(mg/100g)

사 료	아미노산			Total	Others					Total
	Ileu.	Leu.	Met.		Phe.	Tyr.	His.	Val.	Pro.	
재래식 간장	1826.1	63.1	58.4	1947.6	1052.0	73.1	8.5	24.8	1490.1	2648.5
재래식 간장 + AJ	0.0	149.9	62.3	212.2	1278.0	99.4	12.6	46.5	1678.5	3115.1
재래식 된장	1860.5	72.4	145.3	2078.1	1156.5	51.1	0.0	52.8	1329.5	2589.9
재래식 된장 + AJ	1387.3	50.8	35.7	1473.7	886.7	16.3	3.4	10.6	397.3	1314.3
TKSP24	0.0	158.5	71.1	229.6	714.2	46.3	10.7	30.0	116.7	917.9
TKSP24 + AJ	1938.3	0.0	81.8	2020.1	858.3	47.8	15.6	37.1	367.3	1326.1
PM3	2096.9	571.2	114.4	2782.5	1704.3	75.0	18.1	48.5	348.3	2194.2
PM3 + AJ	2122.6	0.0	82.4	2205.0	1301.9	86.6	10.3	36.4	396.0	1831.1
Means	1490.8	182.8	87.7	1438.8	1195.2	66.6	10.8	39.7	730.2	1770.8

Table 7. *Aspergillus oryzae* J 배양물을 혼합하여 제조한(30℃, 45일간 숙성)

간장 및 된장의 유리당의 분포

(mg/100g)

시 료 \ 유리당	Sucrose	Maltose	Glucose	Galactose	Fructose	Total
재래식 간장	0.0	594.4	0.0	234.4	34.1	862.9
재래식 간장 + AJ	0.0	0.0	642.9	0.0	450.5	1093.4
재래식 된장	0.0	360.9	0.0	0.0	3.2	364.1
재래식 된장 + AJ	212.7	0.0	0.0	53.7	44.9	311.3
TKSP24	0.0	36.3	0.0	59.9	0.0	96.2
TKSP24 + AJ	0.0	359.3	0.0	41.7	0.6	401.7
PM3	0.0	237.3	0.0	265.7	0.0	503.0
PM3 + AJ	0.0	105.0	86.8	82.3	33.1	307.2
Means	26.6	211.7	91.2	92.2	70.8	492.5

Table 8. *Aspergillus oryzae* J 배양물을 혼합하여 제조한(30℃, 45일간 숙

성) 간장 및 된장의 불휘발성 유기산의 분포

(mg/100g)

시 료 \ 불휘발성 유기산	Lactic acid	Oxalic acid	Malonic acid	Succinic acid	Citric acid	Total
재래식 간장	5.00	0.34	0.20	0.20	0.72	1.29
재래식 간장 + AJ	2.65	0.25	0.17	0.34	0.63	0.81
재래식 된장	0.23	0.24	0.24	0.50	0.00	0.24
재래식 된장 + AJ	1.50	0.41	0.24	0.15	0.14	0.49
TKSP24	0.22	0.04	2.45	0.06	0.96	0.74
TKSP24 + AJ	2.68	0.15	0.07	0.45	0.47	0.76
PM3	2.34	0.16	0.10	0.60	1.12	0.87
PM3 + AJ	3.25	0.18	0.08	0.89	0.78	1.03
Means	2.23	0.22	0.44	0.40	0.60	0.78

Table 9. 재래식 간장 및 된장, *Bacillus subtilis* TKSP24와 PM3으로 제조한 된장과 *Aspergillus oryzae* J 배양물을 1 : 0.2로 혼합하여 30일간 숙성한 간장 및 된장의 휘발성 유기산의 분포

(mg/100g)

시 료 \ 휘발성 유기산	Acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid
재래식 간장	34.31	0.00	0.00	0.00
재래식 간장 + AJ	24.03	0.00	0.00	0.00
재래식 된장	29.22	0.00	1.60	0.34
재래식 된장 + AJ	24.41	0.00	0.37	0.00
TKSP24	47.76	0.42	0.00	4.70
TKSP24 + AJ	57.67	0.88	3.86	3.10
PM3	32.19	0.06	5.01	3.45
PM3 + AJ	68.46	0.15	0.00	2.97

Table 10. 재래식 간장 및 된장, *Bacillus subtilis* TKSP24와 PM3으로 제조한 된장과 *Aspergillus oryzae* J 배양물을 1 : 0.2로 혼합하여 45일간 숙성한 된장의 휘발성 유기산의 분포

(mg/100g)

시 료 \ 휘발성유기산	Acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid
재래식 된장	9.79	0.00	0.53	0.00
재래식 된장 + AJ	7.51	0.00	0.25	0.00
TKSP24	14.60	0.33	0.31	1.14
TKSP24 + AJ	17.98	0.18	0.83	1.26
PM3	8.71	0.00	1.18	0.70
PM3 + AJ	18.18	0.08	0.00	0.83

Table 11. 재래식 간장 및 된장, *Bacillus subtilis* TKSP24와 PM3으로 제조한 된장과 *Aspergillus oryzae* J 배양물을

1 : 0.2로 혼합하여 45일간 숙성한 간장 및 된장의 향기성분의 분포

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
1	Butane, 1-ethoxy-	5.46	11.03	1.57	6.64	3.74	9.44	4.11	1.68
2	Unknown	-	-	-	0.08	-	-	-	-
3	Acetic acid, ethyl ester	1.68	5.07	2.33	0.44	-	1.99	0.67	0.49
4	Butanal, 2-methyl-	-	1.78	2.37	T	-	T	2.77	-
5	Butanal, 3-methyl-	1.54	0.86	1.10	2.03	0.20	2.40	0.07	0.48
6	Pentanal	T	-	-	-	-	-	-	-
7	Furan, 2,5-dimethyl-	-	-	0.13	-	-	-	-	-
8	Furan, 2-ethyl-	-	-	-	-	-	0.13	-	-
9	Propanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	-	-	-	0.17	-	0.14	-	-
10	Propane, 1,1-diethoxy-2-methyl-	-	0.38	-	-	-	-	-	-
11	Butanoic acid, methyl ester	-	-	T	0.08	-	-	-	-
12	Butanoic acid, 2-methyl-, methyl ester	-	-	-	-	-	0.22	9.61	-
13	Butanoic acid, ethyl ester	-	-	0.54	3.07	-	2.42	0.57	-
14	Toluene	-	-	0.26	0.07	-	-	0.15	-
15	Benzene, methyl-	-	-	-	-	-	-	0.88	-
16	1,3,5-Cycloheptatriene	-	-	-	-	-	0.23	-	-
17	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	-	-	0.15	-	-	0.38	0.00	0.45
18	3-Hexanone	-	-	0.16	-	-	-	-	-

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
19	3-Pentanone, 2-methyl-	-	0.18	-	-	4.27	-	-	-
20	Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	-	-	T	0.32	-	0.16	-	-
21	Acetic acid, butyl ester	-	-	-	-	-	2.08	0.55	-
22	Disulfide, dimethyl	-	-	0.16	-	-	-	-	0.17
23	Butane, 1,1-diethoxy-3-methyl-	-	4.88	1.24	-	-	-	-	-
24	Hexanal	-	-	-	0.10	-	T	-	-
25	1-Propanol, 2-methyl-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	2-Butenal, 2-methyl-	-	-	-	0.09	-	-	-	-
27	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	-	-	-	-	-	0.21	-	-
28	Ethylbenzene	-	-	0.14	-	-	-	-	-
29	Propanoic acid, butyl ester	-	-	-	-	-	0.15	-	-
30	Unknown	-	-	0.75	-	-	3.31	-	-
31	Butanedioic acid, methoxy-, dimethyl ester	-	0.29	-	-	-	-	-	-
32	2-Heptanone	-	-	-	-	-	0.24	0.22	-
33	Pyridine	0.38	0.71	0.39	-	-	-	-	-
34	Cyclopentane, methyl-	-	-	-	-	-	-	0.45	-
35	1-Butanol, 3-methyl-	-	-	1.88	-	T	-	0.80	1.33
36	1-Decene	-	-	-	-	4.06	-	-	-
37	1-Undecene, 9-methyl-	-	-	-	-	3.16	-	-	-
38	Pentane, 1-chloro-	-	0.41	-	-	-	-	-	-

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
39	2-Pentene, (Z)-	-	-	-	0.71	-	-	-	-
40	Pyrazine	0.51	0.59	-	-	-	-	-	-
41	Butanoic acid, butyl ester	-	-	-	-	-	2.73	2.37	-
42	Furan, 2-pentyl-	-	-	0.37	0.17	-	-	-	0.28
43	Butyl 2-methylbutanoate	-	-	-	-	-	1.40	T	-
44	Hexane, 1,1-diethoxy-	-	-	0.08	0.00	-	-	-	-
45	Hexanoic acid, ethyl ester	-	-	0.00	0.14	-	T	-	-
46	2-Heptanone, 6-methyl-	-	-	-	-	-	0.16	4.07	-
47	3-Pyridinamine	-	-	-	-	-	-	0.58	-
48	2,4-Hexadienoic acid, ethyl ester	-	0.25	-	-	1.13	-	-	-
49	Pentane, 1,1-diethoxy-	-	0.29	-	-	-	-	-	-
50	Pentanoic acid, butyl ester	-	-	-	-	-	0.48	-	-
51	Thiazole	-	0.18	-	-	-	-	-	-
52	3-Octanone	-	-	T	-	-	0.37	0.75	-
53	1,3,5,7-Cyclooctatetraene	-	-	-	-	-	0.24	-	-
54	1-Vinylimidazole	-	4.62	-	-	-	-	-	0.99
55	Pyrazine, methyl-	4.88	5.04	0.43	-	-	-	0.37	-
56	Pyrazine, 2,5-dimethyl-	1.78	1.98	0.50	-	-	7.62	8.08	7.94
57	Pyrazine, 2,6-dimethyl	4.11	3.88	0.88	-	-	-	0.90	0.60
58	2-Buten-1-ol, 3-methyl-	-	-	-	-	-	0.11	-	-

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
59	2-Buten-1-ol, 2-methyl-	-	-	0.11	-	-	-	-	-
60	Pyrazine, ethyl-	2.92	2.15	-	-	0.69	-	-	-
61	Butanamide, N-formyl-2-hydroxy-3-methyl-	-	0.29	-	-	-	-	-	-
62	Pyrazine, 2,3-dimethyl-	2.00	1.58	0.48	-	0.58	-	0.00	0.15
63	1-Hexanol	-	-	-	-	-	-	1.51	-
64	Oxirane, (1-methylbutyl)-	-	-	-	-	-	0.20	-	-
65	1H-Pyrrole, 1-(2-furanylmethyl)-	-	0.19	-	-	-	-	-	-
66	Unknown	-	-	0.46	-	-	-	-	-
67	Unknown	-	8.65	-	-	0.16	-	-	-
68	Thiazole, 2,4,5-trimethyl-	5.51	0.42	-	0.68	-	-	3.05	2.89
69	Trisulfide, dimethyl	-	-	0.11	0.21	-	-	0.36	1.45
70	Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-	-	-	0.23	-	-	-	-	-
71	Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl	3.84	3.17	0.54	-	-	-	-	-
72	2-Nonanone	-	-	-	-	-	0.52	-	-
73	1,3-Benzodioxole	-	0.22	-	-	1.03	-	-	-
74	3-Octanol	-	-	0.12	-	-	0.18	0.73	-
75	Pyrazine, trimethyl-	6.37	3.99	5.68	1.73	5.37	14.17	8.24	12.11
76	Heptanoic acid, ethyl ester	-	-	-	0.16	-	-	-	-
77	Pyrazine, ethenyl-	3.96	4.97	-	-	-	-	-	-
78	Thiazole, 2,5-diethyl-	-	-	-	-	-	-	-	0.57

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
79	Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-	-	-	0.65	-	-	-	0.28	-
80	2-Isopropyl-4,5-dimethylthiazole	-	0.45	-	-	0.38	-	-	-
81	1-Octen-3-ol	-	-	2.27	0.96	-	3.74	4.28	5.08
82	Pyrazine, 2,6-diethyl-	1.68	-	0.88	-	-	-	-	-
83	Pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl-	-	0.37	1.45	-	-	-	-	-
84	2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine	-	1.20	-	-	2.16	-	-	-
85	2-Furancarboxaldehyde	1.38	2.09	0.45	0.64	-	2.02	-	-
86	1H-Pyrazole, 3,5-dimethyl-	-	-	-	-	-	-	1.14	-
87	Hydrazine, 1,1-dimethyl-	-	0.13	-	-	0.36	-	-	-
88	Pyrazine, tetramethyl-	6.67	3.55	47.00	8.83	-	13.70	0.92	12.16
89	1-Hexanol, 2-ethyl-	-	-	0.83	0.32	24.99	0.68	0.64	-
90	2-Furanmethanol, acetate	-	0.20	-	-	7.34	-	-	-
91	Pyrazine, 2-ethenyl-6-methyl-	3.55	4.54	-	-	-	-	-	-
92	3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzaldehyde	-	-	-	-	-	-	0.31	-
93	Pyrazine, 3,5-diethyl-2-methyl-	-	-	-	-	-	-	1.59	0.30
94	Ethanone, 1-(2-furanyl)-	-	0.25	-	-	-	T	-	-
95	Benzyl chloride	-	0.37	0.08	-	-	-	-	-
96	2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine	-	-	3.70	1.14	-	-	-	0.73
97	Benzaldehyde	0.62	0.40	1.96	0.69	-	1.18	0.24	T
98	Thiazole, 4,5-dimethyl-2-(2-methylpropyl)-	-	0.98	-	-	-	-	-	1.00

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
99	Unknown	-	81.78	72.23	7.68	0.18	79.57	0.00	34.57
100	Ethanone, 1-(1-cyclohexen-1-yl)-	0.32	-	-	-	-	-	-	-
101	Propanoic acid, 2-methyl-	-	1.90	-	-	7.13	-	-	-
102	2,3,5-Trimethyl-6-propylpyrazine	-	-	7.14	1.50	-	-	0.18	-
103	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	0.79	-	-	-	-	-	-	-
104	Pyridine, 3-methoxy-	0.53	0.32	-	-	-	-	-	-
105	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	2.03	4.62	0.26	0.11	0.58	-	-	-
106	Unknown	0.58	-	-	-	1.06	-	-	-
107	2-n-Butyl furan	-	0.31	-	-	0.40	-	-	-
108	Ethanone, 1-(2-pyridinyl)-	-	0.57	-	-	0.25	-	-	-
109	1,2,4-Trithiolane, 3,5-dimethyl-	-	-	-	-	-	-	-	0.43
110	Butanoic acid	-	3.81	-	-	2.28	1.01	-	-
111	Heptanoic acid	-	-	-	-	-	0.50	-	-
112	1H-Pyrrole-2-acetonitrile, 1-methyl-	-	0.52	-	-	-	-	-	-
113	Benzaldehyde, 4-methyl-	0.80	0.52	-	-	-	-	-	-
114	Benzeneacetaldehyde	-	5.03	6.41	2.25	-	3.83	0.81	-
115	2-Furanmethanol	6.46	21.22	0.87	0.45	0.70	3.35	1.26	0.87
116	Unknown	0.17	2.30	1.22	-	0.57	5.36	0.51	-
117	Unknown	-	-	-	-	-	-	-	0.75
118	Benzoic acid, ethyl ester	-	-	-	0.28	-	0.51	-	-

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
119	Pentane, 2-chloro-2-methyl-	-	-	-	-	-	0.16	-	-
120	2-n-Heptylfuran	-	5.14	-	-	-	-	-	-
121	1-(6-Methyl-2-pyrazinyl)-1-ethanone	10.16	0.56	-	-	-	-	-	-
122	3-Hexanone, 4,4-dimethyl-	-	-	-	-	-	-	1.38	-
123	2-Thiophenecarboxaldehyde	0.27	0.21	-	-	8.08	-	-	-
124	Thiophene, 2,5-dimethyl-	-	0.31	-	-	0.86	-	-	-
125	Ethanamine, 2,2-diethoxy-	-	-	0.75	-	-	-	-	-
126	2-Methyl-5-trans-propenylpyrazine	-	0.78	-	-	-	-	-	-
127	Benzenamine, 3-chloro-2-methyl-	-	-	-	-	-	-	-	0.16
128	Acetic acid, diethoxy-, ethyl ester	-	4.54	-	-	-	-	-	-
129	2-Furancarboxylic acid	0.32	0.23	-	-	10.76	-	-	-
130	Benzyl methyl ketone	-	-	0.11	-	-	-	-	-
131	Benzoic acid, ethyl-	-	0.15	-	-	-	-	-	-
132	Benzeneacetic acid, methyl ester	-	-	-	-	-	-	1.12	-
133	Furan, 2,2'-methylenebis-	-	1.04	-	-	-	-	-	-
134	3-Methyl-4-octanone	-	-	-	-	-	0.31	-	-
135	4-Heptanone, 2,6-dimethyl-	-	-	-	-	-	-	0.62	-
136	Benzaldehyde, 4-propyl-	-	-	T	-	-	-	-	-
137	Benzeneacetic acid, ethyl ester	-	-	-	0.39	-	0.29	-	-
138	2H-1-Benzopyran-2-one, 3,4-dihydro-	-	0.90	0.14	-	-	-	-	-

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
139	1-(3,5-Dimethyl-2-pyrazinyl)-1-ethanone	-	0.43	-	-	-	-	-	-
140	6-Octenal, 3,7-dimethyl-	-	-	-	-	-	-	0.18	-
141	2-Hexene, 2,5-dimethyl-	-	-	-	-	-	-	-	0.43
142	2,6-Octadiene, 4,5-dimethyl-	0.55	-	-	-	-	-	-	-
143	2-Butenoic acid, 2-propenyl ester	-	0.50	-	-	-	-	-	-
144	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	-	0.30	-	-	-	-	-	-
145	3-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	-	0.30	-	-	-	-	-	-
146	4H-Pyran-4-one, 2-methoxy-6-methyl-	1.12	-	-	-	-	-	-	-
147	Furan, 3-phenyl-	-	0.28	-	-	-	-	-	-
148	1,5-Tetramethylenepyrazole	-	-	-	-	-	0.18	-	-
149	Phenol, 2-methoxy-	2.63	2.78	1.10	0.26	-	4.67	0.77	2.45
150	Phenol, 2,4,6-trimethyl-	-	-	-	-	-	0.13	-	-
151	Benzyl Alcohol	-	0.55	0.24	-	-	0.19	0.69	0.38
152	Thiazole, 2-ethyl-4,5-dimethyl-	-	-	0.07	-	-	-	-	-
153	Phenylethyl Alcohol	1.44	1.51	1.80	0.22	-	9.41	T	0.58
154	Benzeneacetonitrile	-	-	0.87	-	-	-	-	-
155	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	1.54	1.70	-	0.67	-	2.51	1.77	-
156	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	1.10	5.17	0.33	0.12	-	-	0.99	-
157	1,2-Benzenediol	0.09	-	-	-	-	-	-	-
158	6-Azabicyclo[3.2.1]octane	0.70	-	-	-	-	-	-	-

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
159	Phenol	0.31	-	0.20	-	-	1.59	1.98	0.77
160	Ethanone, 1-(2,4-dihydroxyphenyl)-	-	-	-	-	-	-	-	0.21
161	1H-Pyrrole-2,5-dione, 3-ethenyl-4-methyl	-	1.90	-	-	-	-	-	-
162	Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	-	-	9.05	10.25	-	-	-	-
163	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	0.53	0.36	-	-	-	-	-	-
164	Thiophene, 3-phenyl-	0.28	-	-	-	-	-	-	-
165	Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-	-	-	-	-	-	-	3.16	-
166	Pyrimidine, 2-methyl-4-phenyl-	0.61	-	-	-	-	-	-	-
167	4-Methyl-5-phenylpyrimidine	-	0.65	-	-	-	-	-	-
168	Benzene, 1-methyl-2-phenoxy-	-	-	-	-	-	-	-	1.55
169	Phenol, 4-ethyl-	-	0.26	2.06	0.46	-	-	-	-
170	DIBENZOFURAN-3-OL	-	1.53	-	-	-	-	-	-
171	1H-Benzimidazole, 2-(2-furanyl)-	6.70	-	-	-	-	-	-	-
172	Phenol, 2,3-dimethyl-	-	-	-	T	-	-	-	-
173	Ethanone, 1-(3-methoxyphenyl)-	19.21	12.00	2.37	-	-	-	9.75	-
174	Benzene, 2-methoxy-1,3,4-trimethyl-	-	-	-	-	-	-	-	1.85
175	Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	0.00	6.38	-	-	-	-	-	-
176	4-Hydroxy-3-methylacetophenone	2.98	-	-	-	-	-	-	-
177	2,4,6-Trimethyl-1,3-benzenediamine	-	-	-	0.56	-	-	-	-
178	Acetophenone, 4'-methoxy-	-	-	-	1.28	-	-	-	-

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
179	2,2'-Bipyridine, 4,4'-dimethyl-	6.23	-	-	-	-	-	-	-
180	1'-Biphenyl, 4-methyl-	-	-	-	-	-	-	2.64	-
181	Hexadecanoic acid, methyl ester	-	-	0.56	-	-	0.52	1.57	-
182	Pyridine, 4-(phenylmethyl)-	2.00	-	-	-	-	-	-	-
183	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	-	-	-	0.18	-	-	-	-
184	Ethanone, 1-(2-aminophenyl)-	-	0.71	-	-	-	-	-	-
185	[1,1'-Biphenyl]-2-amine	-	-	-	-	-	-	0.31	-
186	Pyridine, 3-phenyl-	3.36	1.08	-	-	-	-	-	-
187	Pyridine, 4-phenyl-	-	2.30	-	-	-	-	1.02	-
188	Hexadecanoic acid, ethyl ester	-	6.17	1.59	7.46	-	3.45	0.37	3.76
189	Ethyl 9-hexadecanoate	-	-	-	0.37	-	-	-	-
190	Phenol, 2,6-dimethoxy-	-	0.28	-	-	-	-	-	-
191	Benzoic acid, 4-(methylthio)-	1.01	0.00	-	-	-	-	-	-
192	Benzenamine, 4-(1-methylethyl)-N-phenyl-	-	0.59	-	-	-	-	-	-
193	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	-	-	0.09	-	-	-	-	-
194	Thiazole, 2-(2,4,6-trimethylphenyl)-	-	0.66	-	-	-	-	-	-
195	Furfuryl heptanoate	-	0.19	-	-	-	-	-	-
196	Eugenol	-	0.23	-	-	-	-	-	0.19
197	Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-	1.17	1.78	-	-	-	-	-	-
198	2(3H)-Furanone, dihydro-5-(2-octenyl)-,	-	-	0.32	-	-	-	-	-

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
199	Benzofuran, 2,3-dihydro-	0.89	1.76	0.18	-	-	1.36	3.32	-
200	Octadecanoic acid, methyl ester	-	-	-	-	-	-	0.57	-
201	Butyl hexadecanoate	-	-	-	-	-	0.64	-	-
202	Heptadecane, 2,6-dimethyl-	-	-	-	T	-	-	-	-
203	Benzoic acid	-	2.39	-	3.31	-	-	2.16	-
204	9-Octadecenoic acid, methyl ester	-	-	3.28	1.09	-	0.76	-	-
205	8-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	-	-	-	-	-	-	0.22	-
206	Unknown	3.07	-	-	-	-	-	-	-
207	Indole	0.94	1.25	2.21	0.42	-	0.44	3.07	1.01
208	Octadecanoic acid, ethyl ester	-	-	1.65	0.00	-	0.38	-	-
209	Ethyl Oleate	-	2.38	5.55	7.06	-	8.56	0.91	5.13
210	9,15-Octadecadienoic acid, methyl ester,	-	-	5.82	1.91	-	-	-	-
211	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	-	-	-	-	3.74	1.51	-	0.69
212	Unknown	-	-	-	-	0.69	-	-	-
213	Linoleic acid ethyl ester	-	2.07	10.92	26.43	-	12.50	0.39	8.31
214	Ethyl linoate	-	-	-	16.72	-	-	-	-
215	1,9-Decadiene	-	-	-	11.17	-	-	-	-
216	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester	-	-	0.46	-	-	-	-	-
217	Benzeneacetic acid	-	0.91	-	-	-	-	-	-
218	1, 4-Methyl-2,5-dimethoxybenzaldehyde	-	0.44	-	-	-	-	-	-

continued Table 11

Peak No.	Flavor Components	재래식 간장	재래식 간장 + AJ	재래식 된장	재래식 된장 + AJ	TKSP 24	TKSP 24 + AJ	PM3	PM3 + AJ
219	4-Methyl-2,5-dimethoxybenzaldehyde	1.03	-	-	-	-	-	-	-
220	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester	-	0.30	1.95	3.78	1.84	2.26	-	1.03
221	Tetradecanoic acid	-	-	0.56	-	-	-	-	-
222	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester	-	-	-	-	0.86	-	-	-
223	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl octy	-	-	-	0.27	-	0.18	-	-
224	Hexadecanoic acid	2.36	9.48	44.08	7.21	-	2.81	8.52	6.97
225	Octadecanoic acid	-	-	1.79	-	-	-	2.18	-
226	Oleic acid	-	4.88	11.85	-	-	-	-	-
227	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	-	3.97	5.23	7.47	-	3.71	-	-
228	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	-	9.70	-	7.47	-	6.59	2.19	5.96
229	Benzenedicarboxyl acid, disooctyl ester	-	-	4.27	-	-	-	-	-
	Total	56	101	80	58	33	68	64	43

제 6 절 Butyric acid를 생산하지 않는 균(*B. subtilis*)의 육종

이취 성분의 생산이 적은 간장 및 된장 제조용으로 분리 보존 중인 *Bacillus subtilis*를 돌연변이시켜 이취의 발생을 많이 감소시키는 균주를 육종하였다.

1. 재료 및 방법

가. 돌연변이를 이용한 균의 육종방법

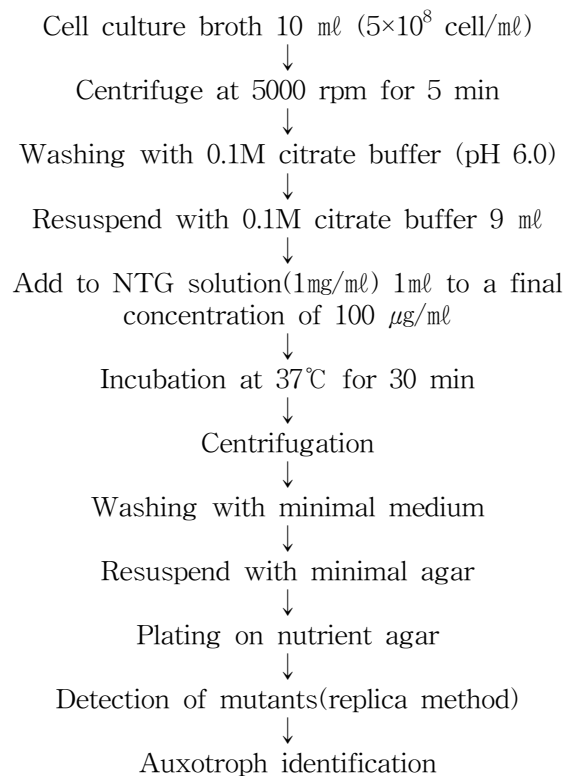


Fig. 1. Method of NTG mutagenesis

전통된장의 맛과 향을 생산하는 *Bacillus subtilis* PM3, *Bacillus subtilis* TKSP21 및 *Bacillus subtilis* TKSP24 3 균주를 강력한 돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine(NTG)로 돌연변이를 시켜 영양요구 변이주를 얻었다.^{41~43} 돌연변이의 과정은 다음 Fig. 1과 같다.

나. 돌연변이주의 선별

돌연변이주로 된장을 제조하여 관능검사로 1 차 선별된 돌연변이주는 *Bacillus subtilis* PM3 균주로부터 3종, TKSP21 균주로부터 8종, TKSP24 균주에서 13종이었다.

1차로 선별된 돌연변이주들을 이용하여 다시 된장을 제조한 후 관능검사를 통하여 이취를 생성하지 않는 돌연변이주 1종씩을 최종적으로 선별하여, 제조한 된장의 butyric acid와 3-methyl butanoic acid의 함량을 측정하였다. Table 1은 야생균주와 돌연변이주를 이용하여 30일간 숙성한 된장의 유기산 함량과 관능검사 결과이고, Table 2는 60일간 숙성한 된장의 유기산 함량과 관능검사 결과이다.

2. 결과 및 고찰

야생균주보다 선별한 돌연변이주로 제조한 된장에서 이취성분인 butyric acid의 함량이 더 적었다. 돌연변이주 중 TKSP24-M4로 제조한 된장에서는 butyric acid가 검출이 되지 않았으므로 이취성분을 거의 생산하지 않는 균주로 육종이 되었다고 사료되었으며, TKSP21-M8도 30일간 숙성된장에서 야생균주보다 butyric acid의 생산이 현저히 감소하였고, 60일간 숙성된장에서는 검출이 되지 않았으므로 TKSP21-M8 균주도 우수한 이취성분의 생산이 감소된 균주로 사료되었다. 육종된 두 균주로 제조한 된장의 맛과 향은 Table 1 및 2와 같이 관능검사 결과 우수한 것으로 나타났다. 이들 균의 분비형 protease와 amylase의 역가(activity)를 halo zone으로 분

결과는 Fig. 2 및 3과 같다. 돌연변이에 의해 분비형 protease와 amlyase의 역가 변동이 거의 없음을 확인 할 수 있었다. 이는 된장 제조시 맛성분 생산에는 차질이 없음을 시사하고 있다.

Table 1. 야생균주와 돌연변이주를 이용하여 30일간 숙성한 된장의 휘발성 유기산의 함량과 관능검사 결과

(mg/100g)

시 료	acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid	관능검사 결과
PM3	2.66	0.71	0.68	11.47	연한 된장(덜숙성), 약콤콤
TKSP21	5.53	0.47	0.51	10.66	덜숙성 된장, 약콤콤
TKSP24	8.64	1.15	0.48	7.85	약쓴 된장
PM2-M2	4.86	0.82	0.43	35.21	단된장
TKSP21-M8	1.24	0	0.09	43.45	단된장
TKSP24-M4	15.08	0	0	7.73	전통된장

Table 2. 야생균주와 돌연변이주를 이용하여 60일간 숙성한 된장의 휘발성 유기산의 함량과 관능검사 결과

(mg/100g)

시 료	acetic acid	propionic acid	butyric acid	3-methyl butanoic acid	관능검사 결과
PM3	6.98	0	0.70	2.01	맛있는 된장맛, 약콤콤
TKSP21	1.67	0	0.99	2.67	연한 된장맛, 약콤콤
TKSP24	2.04	0	0.26	4.01	연한 된장맛, 약콤콤
PM2-M2	1.79	0	0.03	11.64	연한 전통된장맛
TKSP21-M8	0.9	0	0	8.94	전통된장맛
TKSP24-M4	5.64	0	0	2.39	담백한 전통된장맛

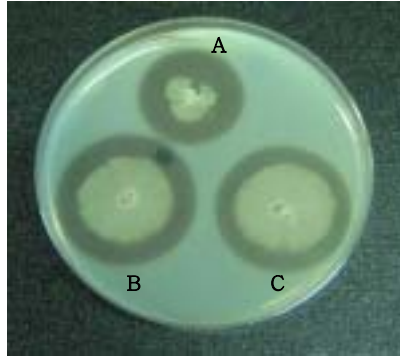


Fig. 2. *Bacillus* sp. mutants의 protease activity
A : PM3, B : TKSP 24, C : TKSP 24-M4

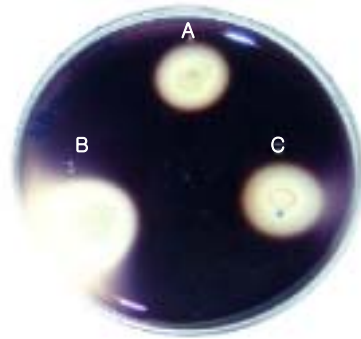


Fig. 3. *Bacillus* sp. mutants의 amylase activity
A : PM3, B : TKSP 24, C : TKSP 24-M4

3. 결론

wild type인 *Bacillus subtilis* TKSP24를 NTG로 돌연변이시켜 butyric acid (이취성분)를 생산하지 않는 돌연변이주 TKSP24-M4를 분리 선별하였다. TKSP24-M4로 제조한 된장은 관능검사상 풍미가 우수하였고 분비형 protease 와 amylase의 역가도 wild type strain과 비슷하여 매우 이상적으로 육종된 균 이라 사료된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구 개발 목표 달성도

1. Butyric acid의 제거(분해)균 확립

48개의 재래식 메주에서 200여종의 사상균을 분리하여 그 중에서 7종의 균주가 butyric acid(이취성분) 분해균이었다. *Aspergillus oryzae*도 butyric acid를 분해하였다.

butyric acid를 분해한 간장과 된장의 풍미를 개량하는 균은 분리 사상균 241과 301 및 *Aspergillus oryzae* J와 M 이었다. 이 4균주 중에서도 분리사상균 241과 *Aspergillus oryzae* J가 더욱 우수하였다. 2균주의 분리 사상균을 동정한 결과 241과 301은 모두 *Penicillium polonicum*이었다.

2. Butyric acid 제거(분해)균의 안전성

Butyric acid를 분해하는 균으로 선별된 균은 *polonicum* 2종과 *Aspergillus oryzae* 2종이었다. *Aspergillus oryzae* 는 이미 우리나라와 일본, 중국 등에서 오래 전부터 일본식 장류 제조에 널리 이용되어 온 균으로 인체에 안전한 균으로 밝혀져 있다. *Penicillium polonicum*은 mycotoxin을 생성하는 균으로 우리나라 전통 메주에서는 처음 분리 확인되었으며, 10^6 cells/g 이상 존재하는 메주가 48개 중 6개나 되었다. mycotoxin을 생성하는 *Penicillium polonicum*의 경우 이 균의 배양물 전체를 butyric acid 분해용으로 이용하기는 어려우나 배양물에서 효소를 추출하여 투석으로 저분자 물질을 제거한 후 조효소(액)로는 이용이 가능하다.

3. 이취성분의 분해(제거)와 우수한 품질의 간장 및 된장을 발효하는 기법 개발

Butyric acid(이취성분)의 분해균인 *Aspergillus oryzae*는 *Bacillus subtilis*와 함께 배양하면 butyric acid(이취성분)가 상당량 잔존함이 보고되어 있다.(참고) 삶은 대두에 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 별개로 배양하여 혼합한 후 숙성시켜 된장을 만들면 *Bacillus subtilis*가 생성한 butyric acid를 잘 분해하며, 재래식 간장과 된장 중의 butyric acid도 잘 분해한다.

삶은 대두에 *Aspergillus oryzae*의 배양조건은 30℃에서 7일간 배양하는 것이 가장 좋고, *Bacillus subtilis* 배양물(메주)과 재래식 간장 및 된장에 1/5 이하의 비율로 혼합한 후 30℃에서 숙성시키는 조건이 간장과 된장의 풍미가 우수하였으며, 숙성기간은 1개월 이상이 소요된다.

*Aspergillus oryzae*의 배양물 자체를 이용하여 간장 및 된장으로 숙성시키고자 할 때는 *Aspergillus oryzae* 배양물을 butyric acid의 분해효소원으로 이용할 때보다 숙성기간이 수개월이 더 소요되리라 사료된다.

4. 이취 제거 간장 및 된장의 품질

우리나라 전통 메주에 가장 많이 존재하는 *Bacillus subtilis* group의 균주의 일종인 *Bacillus subtilis* TKSP24와 PM3의 대두 배양물과 재래식 간장, 재래식 된장 중의 butyric acid(이취성분)는 *A. oryzae* J의 대두 배양물을 혼합하여 30℃에서 숙성함에 따라 잘 분해가 되었다.

A. oryzae J의 대두 배양물을 혼합하여 숙성한 간장과 된장은 우리의 기호도를 좋게 하는 맛성분인 단맛을 내는 아미노산, 구수한 맛을 내는 아미노산과 단맛을 내는 유리당의 함량이 증가하고 기호도를 떨어뜨리는苦味성분인 함량은 감소하는 경향을 나타내면 향기성분의 분포의 변화는 관능

검사상 개량되는 경향임을 알 수 있었다. 즉 *Aspergillus oryzae* J는 이취 성분을 분해(제거)하고, 간장과 된장의 풍미(맛과 향)를 개량하는 경향을 나타내고 있다.

5. 이취성분의 생산을 적게 하는 *Bacillus subtilis*의 육종

간장 및 된장 제조용으로 이용되는 *Bacillus subtilis* TKSP24를 N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine(NTG)로 돌연변이 시켜 얻은 *Bacillus subtilis* TKSP24- M4는 butyric acid(이취성분)를 거의 생성하지 않았다.

Bacillus subtilis TKSP24- M4는 단일 균주로 된장을 제조했을 때 butyric acid는 검출되지 않았으며, 풍미가 우수한 전통 된장과 비슷하였다.

제 2 절 관련 분야에의 기여도

우리나라 전통 간장과 된장은 우수한 기능성을 지닌 반면 대부분 이취(butyric acid 냄새)를 발생한다. 외국인들은 이러한 이취를 부패의 척도로 여기며, 우리나라 사람들 중 이 냄새에 익숙한 사람들도 많지만 싫어하는 젊은이들도 많다.

전통 장류의 이취 성분을 제거함으로써 전통 장류의 수요층을 넓힐 수 있으리라 사료된다.

이취 성분의 제거기술은 타 발효식품의 芳香을 개량하고자 할 때 많은 참고가 되리라 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용방안

- 한·일간에 확정된 Codex 규격초안 중 한국 간장 제조용 균으로 등록된 bacteria and/or molds and/or yeast의 이름 중 molds 대신에, 여기서 발견된 사상균의 균명을 사용할 수 있는 터전의 마련
- 특허 출원
- 산업체 기술이전
- 현장 애로 해결
- 전국 독농가에 기술 이전 : 영남대학교 부설 장류연구소와 농촌진흥원 등의 주최로 전국 독농가에 개발된 기술을 이론과 실습교육으로 전수

제 2 절 추가 기술 개발

- 이취 제거 균에서 이취 제거 효소 분리 및 성질 규명과 대량 생산법 확립
- 이취 성분을 다량 함유한 간장과 된장에서 이취 성분을 제거할 수 있는 기술개발

제 3 절 추가 연구의 필요성 및 기업화

- 본 연구에서 발견한 이취 제거균을 잘 이용하기 어려운 상황일 때에는 독농가가 기업적으로 이취 제거균을 배양하여 공급해야 한다.
- 이취 제거균을 배양하여 독농가에 공급할 때에는 효소의 실활을 방지할

수 있는 저장온도 및 기간이 필요하며, 배양물의 양이 많아서 저장하기 어려운 점이 있다.

- 이취 제거균의 배양물에서 이취 성분(주로 butyric acid)의 분해효소를 추출 후 정제하고(투석 정도), 건조하여 독농가 등에 공급하면 취급물량이 적어지기 때문에 저장, 수송, 공급과 **이취제거 공정** 등이 간편해 진다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학 기술정보

새로이 수집된 기술정보는 없음

제 7 장 참고문헌

1. 박계인, 김기주 : 한국간장제조에 관한 연구(제 1보), 국립공업연구소보고, 20, 89, 1970
2. 권희정, 김미정, 김종규 : 경북 영덕 삼계리 메주의 세균, 곰팡이 및 효모의 분포. 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학위논문집. p. 1~20, 2000
3. 박상규, 김종규 : 경북 안동, 자인, 청송농협 메주의 세균, 곰팡이 및 효모의 분포. 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학위논문집, p. 21~35, 2000
4. 양원희, 황정민, 김종규 : 경북 경주 메주의 세균, 곰팡이 및 효모의 분포. 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학위논문집, p. 36~53, 2000
5. 임하득, 김지나, 김종규 : 경북 의성군 안사리 메주의 세균, 곰팡이 및 효모의 분포. 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학위논문집, p.54~74, 2000
6. 김종규 : 된장 및 간장의 품질의 결정 인자와 대량 생산 방안, 한국 전통 장류의 산업화 중. 제 4회 영남대학교 부설 장류연구소 심포지엄, p.3~41, 2001
7. 金鍾奎, 신갑철, 강대호. 韓國在來式 간장의 맛 成分에 關한 研究, 第5報, 간장 熟成中 有機酸에 關하여”, 慶尙大學校 論文集, 18, 143~146, 1979
8. 金鍾奎, 김창식. 韓國在來式 간장의 맛 成分에 關한 研究, 韓國農化學會誌, 23(2), 89~105, 1980
9. 金鍾奎. 韓國 在來式 간장의 遊離 아미노산, 有機酸 및 遊離糖 組成의 分析資料慶尙大學校 農業研究所報, 18, 85~88, 1984
10. 양성호, 정영진, 金鍾奎. 韓國在來式 된장의 맛 成分 分布, 信一專門大學 論文集, 1, 293~310, 1987

11. 金鍾奎, 장세균, 박선미, 김성영, 김광수. 韓國 在來式 간장 중의 揮發性 有機酸의 分布와 生成菌, 嶺南大學校 資源問題研究論文集, 9(1), 63~69, 1990
12. 지원대, 이은주, 金鍾奎. 재래식 메주와 개량식 메주로 제조한 된장의 휘발성 향기 성분, 韓國農化學會誌, 35(4), 48~253, 1992
13. J. W. Dae, S. H. Yang, M. R. Choi and J. K. Kim. Volatile components of Korean soybean paste produced by *Bacillus subtilis* PM3, *J. Microbiol. Biotechnol.* 5(3), 143~148, 1995
14. Kim, H. J., E. J. lee, O. K. Shin, M. R. Choi, and J. K. Kim. Taste components of soy sauce manufactured by *Bacillus* species SSA3-2M1 and fused ST723-F31, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 6(3), 201~208, 1996
15. Seo, J. S., H. G. Chang, W. D. Ji., E. J. Lee, M. R. Choi, H. J. Kim and J. K. Kim. Aroma components of traditional Korean soy sauce and soybean paste fermented with the same Meju. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 6(4), 278~285, 1996
16. 金鍾奎. 한국 전통된장의 주 발효균, 제 1회 장류심포지움 및 장류전시회, 영남대학교 부설 장류연구소 심포지움, Review, 91~116, 1998
17. 김명수, 김종규. 경북 영덕군 삼계리 농가 메주에서 분리한 사상균의 동정과 이를 이용한 된장의 품질, 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학사졸업논문집, p. 1~17, 2001
18. 김철홍, 김종규. 경북 의성군 안사리 A독농가 메주에서 분리한 사상균의 동정을 이용한 된장의 품질, 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학사졸업논문집, p. 18~34, 2001
19. 도현정, 김종규. 경북 경주 B독농가 메주에서 분리한 사상균의 동정과 이를 이용한 된장의 품질, 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학사졸업논문집, p. 47~56, 2001

20. 이미옥, 김종규. 경북 의성 안사리의 B 독농가 메주에서 분리한 사상균의 동정과 이를 이용한 된장의 품질, 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학사졸업논문집, p. 57~66, 2001
21. 이임호, 김종규. 경북 의성군 B독농가 메주의 사상균 동정 및 된장의 관능검사, 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학사졸업논문집, p. 67~75, 2001
22. 이철근, 김종규. 경북 경주시 A독농가의 메주에 존재하는 사상균의 동정 및 관능검사, 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학사졸업논문집, p. 76~85, 2001
23. 장은정, 김종규. 경북 영덕군 삼계리 C독농가 메주에서 분리한 사상균의 동정과 이를 이용한 된장의 품질, 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학사졸업논문집, p. 86~101, 2001
24. 황수정, 김종규. 경북 경주, 영덕 삼계리의 농가 메주에서 분리한 사상균의 동정과 이를 이용한 된장의 품질, 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과 학사졸업논문집, p. 102~124, 2001
25. 枡倉辰六郎 編著, 増補 醬油の科學と技術, 財團法人 日本釀造協會 p. 112, 平成 6年
26. Jukes, T. H. & Cantor, C. R. Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press. 1969
27. Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425. 1987
28. Kenneth B. Raper, Charles Thom and Dorothy I. Fennel A manual of the penicillia. Hafner Publishing Company: New York & London. 1968
29. John I. Pitt The genus *Penicillium* and its teleomorphic states

- Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press: London, U.K. 1979
30. Robert A. Samson, Ellen S. Hoekstra, Jens C. Frisvad and Ole Filtenborg Introduction to food-borne fungi. CBS, Baarn, The Netherlands 1995
 31. Setsuko I., M. Sato, K. Shibasaki, 1977. Study on the aroma of Miso, *Nippon Shokuhio Kogyo Gakkaishi*, 24(2), 65-71.
 32. 驗農藝化學 下 制 3 版 : 東京大學 農藝化學室, 朝倉書店, 156, 1978
 33. 泰忠夫林力丸, 1971, アミノ酸, ダンパク質の 分析, 請談社 サイエン テイ フイク, 29-30.
 34. Park, Y. H., Koizumi, C. & Nonaka J. 1973. Effect of humid atmosphere upon the chemical constitution of "Mori"-II composition of organic acids, *Bulletin of the Jap.Soci.of Scientific Fisheries*. 39(10), 1051-1054.
 35. Schlenk J. & L. Gellerman, 1960. Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale, *Analytical Chem.*, 32, 142-1412, 36.
 36. Schultz, T. H., R. A. Flath, T. R. Mou, S. H. Egglug and R. Teranishi. 1977. Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food Chem.* 25:446-449.
 37. Fujimaki, M., T. Tsugita and T. Kubota. 1977. Fractionation and identification of volatile acids and phenols in the steam distillate of rice brane. *Agric. Biol. Chem.* 41:1721-1725.
 38. Kim, J. K., S. K. Jang, S. Y. Kim, S. Y. Park, and K. S. Kim. 1990, Distribution of volatile organic acids in traditional Korean soy sauce and microorganisms producing the organic acids. *J. Resource Develop. Yeungnam Univ.* 9: 63-69
 39. Walter, J. and T. Shibamoto, 1980. Qualitative analysis of flavor fragrance volatile by glass capillary gas chromatography retention

- index. Academic press. USA,
40. Sadtler, 1986. The Sadtler standard gas chromatography retention index library. Sadtler Research Lab. 1-4.
 41. E. A. Adelberg, M. Mandel and G.C.C. Chen: Optimal condition for Mutagenesis by N-methyl-N'- nitro-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K 12, Biochem. and Biophys. Res. Comm., 18(5), 788~795, 1995
 42. J. Lederberg and E. M. Lederberg: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. of Bacteriol., 63, 399~407, 1951
 43. R. Holliday: A method for the identification of biochemical mutants of microorganisms, Nature, 4540(3), 987, 1956