J East Asian Soc Diet Life
26(2): 163~170 (2016)
http://dx.doi.org/10.17495/easdl.2016.4.26.2.163

Bacillus subtilis HJ18-9를 이용하여 제조한 콩알메주 된장의 발효숙성 중 특성

이경하 · 최혜선 · 황경아 · 송 진†

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Quality Changes in *Doenjang* upon Fermentation with Two Different *Bacillus subtilis* Strains

Kyung-Ha Lee, Hye-Sun Choi, Kyung-A Hwang and Jin Song†

National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

ABSTRACT

This study investigated the quality characteristics of *doenjang* prepared with different *Bacillus* strains (*Bacillus subtilis* KACC 15935 and *Bacillus subtilis* HJ18-9). Changes in enzyme activities (protease, cellulase, and α-amylase), amino-type nitrogen and ammonia-type nitrogen contents, and reducing sugar were investigated during the fermentation period. Enzymes such as protease, cellulase, and α-amylase play important roles in the composition of nutrients, as well as in the flavor and taste of *doenjang*. After 60 days of fermentation, protease activities in control *doenjang*, and *doenjang* fermented with *B. subtilis* KACC 15935, and *B. subtilis* HJ18-9 increased significantly up to 382.58±4.02, 342.58±7.94, and 392.58±1.91 unit/g, respectively (p<0.05). At the beginning of fermentation, protease activities were in the range of 156.88~182.71 unit/g. Cellulase and α-amylase activities of *doenjang* in HJ18-9 were higher than those in other samples. After fermentation, amino-type nitrogen in *doenjang* fermented with control, *B. subtilis* KACC 15935, and *B. subtilis* HJ18-9 increased significantly up to 143.25±1.62, 141.86±2.14, and 150.23±1.62 mg%, respectively (p<0.05). These results suggest that *B. subtilis* HJ18-9 is a suitable starter for the preparation of *doenjang*.

Key words: Soybean, *Doenjang*, *Bacillus subtilis*

서 론

콩(*Glycine max* L.)에는 단백질함량이 34~42%, linoleic acid, oleic acid, linolenic acid, arachidonic acid 등의 지방산 함량이 19~22%, 자당 등의 당류형태의 탄수화물 20%를 비롯한 여러 영양소가 저장되어 있다. 또한 4~5%의 섬유소, lecithin, cephalin 등의 인지질이 약 1.5%, sterol, 카로틴, 클로로필, 토코페롤 등의 비검화 물질을 약 1% 함유하며, K, P 및 Ca 등의 무기질과 비타민 B_1을 비롯한 비타민류가 함유되어 있다(Setchell KD & Cassidy A 1999).

콩을 이용하여 제조된 장류의 기능성은 콩이나 부재료 자체가 갖는 기능성뿐만 아니라, 메주나 장류 발효에 관여하는 미생물이 생산하는 다양한 2차 대사산물과 효소에 의한 것으로 알려져 있으며, 발효 과정 중에 단백질과 탄수화물이 아미노산, 당, 유기산 및 휘발성 물질 등으로 전환되어 풍미에도 기여한다(Kim BS *et al* 2007; Kim DH & Kim SH 1999). 콩 숙성에 관여하는 미생물로는 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus natto*, *B. subtilis* 등이 있으며, 이와 같은 곰팡이와 각종 세균 등의 여러 미생물이 복합적으로 작용하여 이들이 내는 효소에 의해 된장의 맛과 향에 영향을 끼친다. 된장 품질에 영향을 끼칠 수 있는 미생물 효소로는 protease, amylase, lipase 등을 들 수 있으며, 이러한 미생물 효소에 의해 원료의 단백질과 탄수화물 그리고 지방 등이 가용성으로 분해되어 된장의 맛과 향이 결정된다(Park JS 1992). 이처럼 된장은 숙성 과정 중 미생물의 작용에 따라 그 맛과 향 등이 결정되므로, 작용하는 미생물이 가장 중요하다고 할 수 있다.

오늘날 우리나라 장류의 제조형태를 살펴보면, 국내 전역에 걸쳐 청국장을 비롯한 고추장, 된장이 만들어져 판매되고 있고, 제조방법, 균주 및 기능성 물질 등에 대한 다양한 연구가 발표되고 있으나, 지역마다 다양한 방법으로 제조되고 있어 표준화가 잘 이루어지지 않고 있다. 따라서 제조장소, 방법 및 시기에 따라 전통메주의 품질이 균일하지 못하는 문제점을 지닌다(Kwon DJ 2002).

Kim MH *et al*(2008)은 재래식 청국장은 콩과 볏짚을 이용하여 제조되고 있는데, 이 과정은 균일한 품질을 지닌 청국장을 제조할 수 없다는 한계를 가지고 있다고 하였다. 그리고

† **Corresponding author** : Jin Song, Tel: +82-63-238-3671, Fax: +82-63-238-3844, E-mail: songjin@korea.kr

Hwang HA *et al*(2008)은 장류에서 영양과 품질을 결정하는 가장 중요한 원인 중의 하나는 균주의 종류이며, 이 균주들을 분리 및 동정하고 대량화하여 고품질의 장류를 제조할 필요가 있다고 하였다. 이처럼 청국장, 된장과 같은 장류의 과학화를 위해서는 제조법의 표준화와 품질 균일화가 선행되어야 할 것이다.

본 실험에서 사용된 *B. subtilis* HJ18-9는 메밀 속성장으로부터 cellulase, protease, amylase, lipase와 같은 세포외 효소 분비능이 우수한 균주이며, 병원성 균에 대한 항균 활성이 있는 균주이다(Lee SY *et al* 2011). 따라서 본 연구에서는 된장을 제조하는데 있어서 *B. subtilis* HJ18-9 균주가 산업적으로 starter로서의 이용 가능성을 알아보고자 진행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용된 콩은 대원콩으로 경북에 있는 재배농가에서 구입하여 사용하였다. Starter로 사용된 KACC15935는 국립유전자원센터(Jeonju, Republic of Korea)에서 분양받은 균으로, 전통장에서 분리한 *Bacillus subtilis*이다. *B. subtilis* HJ18-9는 선행연구를 통해 메밀 속성장으로부터 분리된 균으로 amylase, protease 및 cellulase 등의 세포의 효소분비능이 우수하며, *Salmonella enterica*, *Streptococcus aureus* 및 *Candida albicans* 등의 항균활성이 있는 균이다(Lee SY *et al* 2011).

2. 제조

1) 된장 제조

된장을 제조하기 위해 대원콩을 세척하여 25℃에서 24시간 수침하고, autoclave를 이용하여 증자(121℃, 30 min)하였다. 증자된 콩을 대조구는 실험대에서 냉각하여 스티로폼 박스에 담았으며, 처리구는 무균작업대에서 40℃ 이하로 냉각한 후 증자된 콩 무게의 1%의 균을 접종하여 스티로폼 박스에 담았다. 대조구와 처리구 모두 37℃에서 24시간 발효하였다. 발효된 콩을 50℃ 송풍건조기에서 약 8시간 건조(건조된 콩의 수분: 8.5~9.5%)하여 완성된 콩알메주를 제조하고, 콩알메주, 소금 및 물을 각각 34, 15 및 51의 비율로 하여 3.4 kg 된장을 밀폐용기에 담아 28℃에서 60일 동안 발효하였다.

2) 추출물 제조

된장 시료 20 g에 80 mL의 증류수를 첨가하고(w/v), 1분간 균질화(40 rpm, POLYTRON® PT 2100 Homogenizers, Kinematica AG, Switzerland)한 후 이를 원심분리(8,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 분석 시료로 사용하였다.

3. Protease 활성 측정

Protease 활성 측정은 식품공전(2005)에 따라 측정하였다. 0.2 M sodium phosphate buffer에 0.6% casein을 용해한 후 pH를 7.0으로 보정하여 기질용액을 제조하였다. 이 기질용액 1.5 mL에 시료추출액 0.5 mL를 넣어 반응(37℃, 10 min)시킨 후, 0.44 M trichloroacetic acid 2 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 25분간 37℃ water bath에서 방치시킨 후 여과(Whatman No. 2, W. and R. Balston Ltd., Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, UK)하였다. 여액 1 mL에 0.55 M sodium carbonate 용액 5 mL를 첨가한 후, Folin 시약(Folin-Ciocalteu's reagent, Sigma) 1 mL를 첨가하여 발색(37℃, 20 min)시켜서 660 nm에서 흡광도를 측정(BioTek, New Jersey, USA)하였다. 반응 후 분해물의 tyrosine 량은 tyrosine (L-Tyrosine, sigma) 표준곡선으로부터 계산하였으며, 효소 활성은 시료 1 g에 의해 1분간 tyrosine 1 μg을 생성하는 능력을 1 unit으로 하였다.

4. Cellulase 활성 측정

Cellulase 활성 측정은 carboxymetyl cellulose sodium salt (CMC)를 기질로 하여 효소와 반응시킨 후, 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)방법으로 다음과 같이 측정하였다(Chae SK *et al* 2000). 1% CMC(pH 7.0) 용액 0.5 mL와 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.25 mL를 넣은 후, 시료 추출액 0.25 mL를 첨가하여 50℃에서 15분간 반응시켰다. 반응 후에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)를 3 mL 가하여 반응을 정지시킨 후, 5분간 끓는 물에 중탕시켜 발색시킨 다음, 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 대조구는 반응정지를 먼저 시킨 다음, 위와 같은 방법으로 측정하였다. 효소활성을 시료 1 g에 의해 1분간 1 μg의 glucose을 생성하는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다.

5. α-Amylase 활성 측정

α-Amylase 활성 측정은 D.U.N.(Dextrinogenic Unit of Nagase)법에 의하여 측정하였다(Yoon KS 1998). 1% 전분 기질액(pH 7.0) 3 mL에 시료추출액 1 mL를 넣고 반응(40℃, 10 min)시킨 후 반응액 1 mL에 0.1 M hydrogen chloride 10 mL를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액 1 mL에 0.005% iodine-0.05% potassium iodide 용액 10 mL를 넣어 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음 식에 의해 효소활성을 계산하였다.

$$D.U.N=[(D-D')/D]\times 10/100\times n$$

D : 공시험의 흡광도

D' : 시험구의 흡광도
n : 희석배수

6. 아미노태(NO_3^--N) 질소 함량 측정물 제조

시료추출액 5 mL, 중성 formalin 용액 10 mL, 증류수 10 mL를 넣은 플라스크에 0.5% phenolphthalein 용액 2~3방울을 가한 후, 0.1 N sodium hydroxide로 미홍색이 될 때까지의 적정량(V_1)과 시료 5 mL, 증류수 20 mL를 넣은 플라스크에 0.5 % phenolphthalein 용액을 2~3방울을 가한 후, 0.1 N sodium hydroxide로 미홍색이 될 때까지 적정량(V_0)을 이용하여 아미노태 질소 함량을 산출하였다(Weatherburn MW 1967).

$$\text{Amino type nitrogen}(\%) = (V_1 - V_0) \times F \times 0.0014 \times D \times 100/S$$

V_1 : 시험구의 적정량(mL)
V_0 : 공시험의 적정량(mL)
F : 0.1 N NaOH의 역가
D : 희석배수 농도계수
S : 시료량(g)
0.0014 : NaOH 질소량(g)

7. 암모니아태(NH_4^+-N) 질소함량 측정

상위 실험과 동일한 방법으로 추출한 시료액 0.1 mL를 취한 후 phenol-hypochloride 반응에 의하여 시료 추출액 0.1 mL에 A용액(phenol 10 g과 sodium nitroprusside dihydrate 0.05 g/distilled water 1 L)과 B용액(sodium phosphate 9 g, sodium hydroxide 6 g과 sodium hypochlorite 10 mL/distilled water 1 L)을 각각 2 mL씩 넣고 37℃에서 20분간 반응시켜 630 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준곡선은 Ammonium sulfate를 사용하여 암모니아태 질소함량을 측정하였다(Uzzan M & Labuza TP 2004).

8. 환원당 측정

환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(Chae SK *et al* 2000)에 의하여 측정하였다. 시료 추출액 1 mL에 DNS 3 mL를 혼합한 후 5분 동안 중탕가열하고 냉각한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하며, glucose standard curve를 통해 환원당 값을 구하였다.

$$\text{Reducing sugar}(\%) = A \times D \times 1/S \times 100/1{,}000$$

A : 시료의 환원당 양(mg)
D : 희석배수
S : 시료량(g)

9. 미생물수 측정

된장 시료 1 g에 증류수를 가하여 10 mL로 정용(w/v)하고, 10초간 vortex하여 시료 추출액을 제조하였다. 시료추출액을 0.85% sodium chloride 용액으로 희석하고, plate count agar (Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 37℃, 24시간 동안 배양하여 계수하였다.

10. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과의 자료 처리는 SPSS program 12.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용하여 실시하였으며, 각 항목에 대한 평균 및 표준편차를 산출하였다. 각 된장간 차이는 $p<0.05$ 수준에서 one-way ANOVA를 실시하였으며, Duncan's multiple range test로 그 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. Protease

대두 단백질을 가수분해하여 구수한 맛 성분인 아미노산 및 polypeptide 등을 생성하는 protease는 된장 제조 시 맛을 결정짓는 중요한 인자이다(Jung HK *et al* 2009). 모든 처리구에서 발효가 진행됨에 따라 protease 활성이 증가하는 경향을 보였다. 특히 40일 발효 시 HJ18-9처리구가 가장 높은 활성을 보였으며, 발효 50 및 60일차에서는 대조구와 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다.

Lee SY *et al*(2012)은 메주형태와 starter 첨가에 따른 쌀된장의 품질특성을 살펴보았는데, protease 활성이 숙성기간 초기에 비해 발효 28일째에 약간 감소하는 경향을 보였으나, 다시 증가하여 발효 42일째에 가장 높은 활성을 나타냈다고 하였으며, Lee KH *et al*(2015)은 본 실험과 같은 방법으로 제조된 콩알메주로 팽화미 된장을 제조하여 protease 활성을 살펴보았는데, 21일에 가장 높은 활성을 보였으며, 그 이후에는 감소하는 경향을 나타내어 본 연구결과와는 다소 차이가 있었다. 이는 전분질을 첨가하지 않은 본 연구에서 상대적으로 콩의 함량이 더 많아 protease가 이용할 수 있는 기질의 함량 차이에 의한 것으로 사료된다.

Protease는 된장 발효에 관여하는 미생물이 생산하며, 아미노태 질소 함량과도 연관성이 있어 된장 특유의 맛을 내는데 중요한 역할(Jang *et al* 2000)을 하므로 protease 활성이 높은 대조구와 HJ18-9에서 더 구수한 맛을 기대할 수 있을 것이다.

2. Cellulase

발효 균주를 달리하여 제조한 된장의 cellulase 효소활성은 Fig. 2와 같다. Cellulase 중 특히 CMCase(carboxymethyl cellulase, Endo β-1,4-glucanase)는 exo-β-glucanase, β-glucanase와

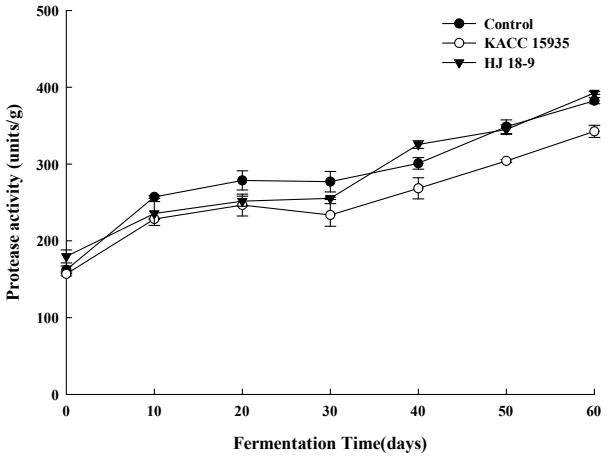

Fig. 1. Change of protease activity during *doenjang* fermentation.

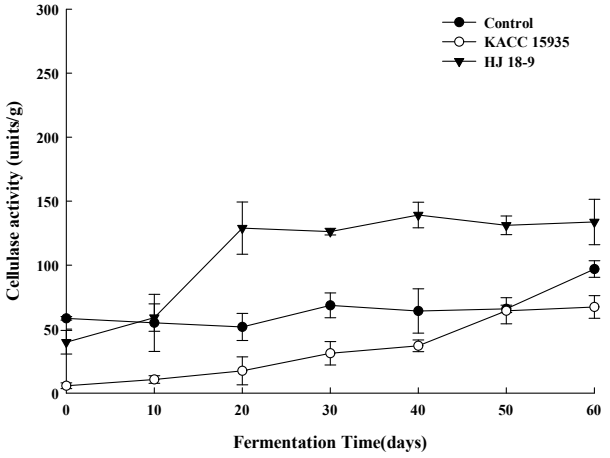

Fig. 2. Change of cellulase activity during *doenjang* fermentation.

함께 cellulase계 구성효소로서 식물세포벽 구성성분 중 대부분을 차지하고 있는 cellulose을 분해할 수 있는 능력을 가지고 있어 장내 이용성 증진을 위해 널리 사용되는 효소이다(Song J *et al* 2015). 그러나 아직 전통장류인 된장의 cellulase 활성에 대한 연구는 미비한 시점이다. 본 실험결과, 모든 처리구에서 발효기간의 경과에 따라 cellulase의 활성이 증가되는 경향을 보였으며, 60일 발효 후에는 HJ18-9 처리구에서 대조구에 비해 1.38배, KACC15935에 비해 1.99배 더 높게 나타났다. Ra KS *et al*(2004)과 Ryu BH(2003), 그리고 Yoo SK *et al*(1999)은 전통 장류인 된장이나 간장은 발효과정에서 미생물의 다양한 효소(amylase, protease, cellulase 및 lipase)에 의해 콩에 함유된 단백질, 올리고다당류, isoflavone, 지질 등이 소화되기 쉬운 형태의 아미노산, 유리당, isoflavone 아글리콘, 지방산 등으로 분해되어 항산화 및 혈전용해능을 갖는 2차산물이 생성된다고 하였다. 본 연구결과 HJ 18-9를 접종한 처리구에서 체내 이용률이 더 높은 기능성 장류를 제조할 수 있을 것으로 기대된다.

3. α-Amylase

발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 된장의 α-amylase 활성 변화를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 각 시료의 α-amylase 활성은 0~4.54 unit/mL 범위를 나타내어, 모든 시료에서 매우 낮게 나타나는 경향을 보였다. 대조구와 HJ18-9 처리구는 20일부터 증가하여 40일차에 가장 높은 효소활성을 보였으며, 그 후로는 감소하는 경향을 보였다. KACC15935 처리구는 발효기간에 따른 뚜렷한 양상을 보이지 않았으며, 발효종료인 60일 차에 가장 높은 효소활성을 나타내었으나, 세 가지 처리구 중에서 가장 낮은 값을 나타내었다.

No JD *et al*(2006)은 된장의 α-amylase 활성은 발효 초기에 비해 발효기간이 길어짐에 따라 약간 낮아지는 경향이 있다고 보고하였으며, Kim JH *et al*(2006)의 보고에 따르면 된장의 α-amylase 활성은 발효초기에 높은 활성을 나타내다가 발효가 진행되면서 서서히 낮아지는 것은 콩 원료에 함유되어 있던 탄수화물이 α-amylase의 기질이 되어 효소 활성이 높았다가 전분질 기질이 고갈되어감에 따라 점차 활성이 낮아지는 것이라고 하였다. 이처럼 starter의 종류와 발효조건에 따라 발효와 직접적으로 관계가 있는 효소들의 활성에 차이가 있는 것으로 보아, 된장의 품질 및 관능적인 특성을 향상시키는 데에는 starter의 선택이 매우 중요한 것으로 사료된다.

4. 아미노태 질소

아미노태 질소는 발효식품의 숙성도를 판단하는 성분으로 된장의 제조와 숙성과정 중 콩 단백질이 효소작용(protease)으로 가수분해되어 맛을 내는 아미노산을 생성하게 되며, 유

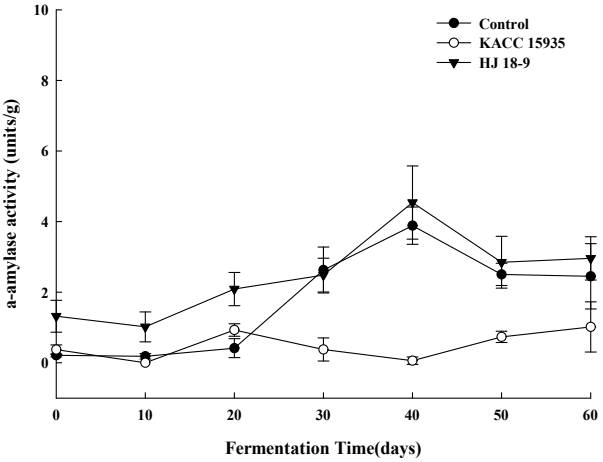

Fig. 3. Change of α-amylase activity during *doenjang* fermentation.

리 아미노산의 아미노기의 질소나 carboxyl group을 측정하는 것으로 유리되는 아미노산이 많으면 증가하게 된다(Koo MS *et al* 2014). 발효식품의 구수한 맛의 척도인 아미노태 질소는 된장의 발효숙성 중 미생물이 생산하는 protease 활성에 의해 생성된 아미노산에 기인한다(Mann SY *et al* 2013). 또한 아미노태 질소의 함량은 장류 발효의 품질 지표로서 중요하기 때문에 그 함량을 측정하였다. *B. subtilis* HJ18-9를 접종한 콩알된장에서 74.15~150.23 mg%로 높은 함량을 나타났고, 대조구와 KACC15935 처리구는 각각 65.76~143.25, 72.29~141.86 mg% 함량을 나타내었다. 모든 처리구에서 발효종료 지점인 60일에서 아미노태 질소 함량이 가장 높게 나타났다.

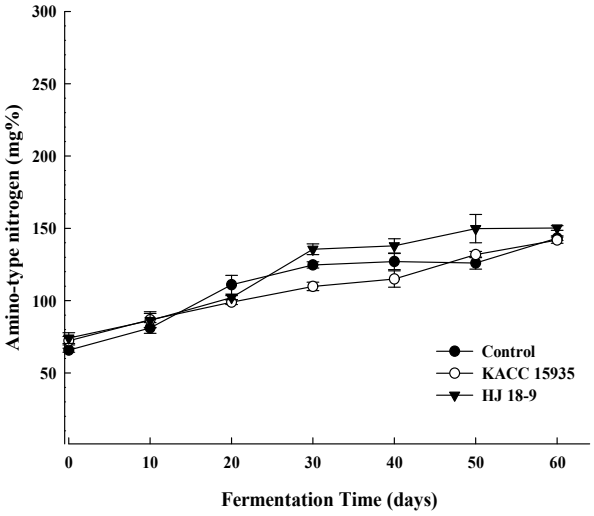

Fig. 4. Change of amino-type nitrogen during *doenjang* fermentation.

그러나 본 연구결과는 식품공전의 된장규격이 아미노태 질소 함량이 160 mg% 이상으로 규정된(Lee KH *et al* 2015) 것에 미치지 못하는 결과를 나타내었다.

Lee GR *et al*(2013)의 연구에서는 밀된장의 발효숙성 과정 중 아미노태 질소 함량 변화를 관찰한 결과, 초기 아미노태 질소는 106.48~162.51 mg%로 나타났고, Youn KC *et al*(2002)은 다양한 균주를 처리한 청국장에서 아미노태 질소함량이 많은 차이를 나타냈으며, 이와 같은 값의 차이는 사용한 균주에 따라 그 함량이 다르다고 하였다. 따라서 모든 시료에서 전체적으로 아미노태 함량이 낮은 것은 발효시간이나 온도와 같은 환경과 사용한 균주에 의한 영향인 것으로 사료되며, 다른 품질특성을 감안하여 발효기간을 더 늘렸을 때 아미노태 질소함량의 증가를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

5. 암모니아태 질소

암모니아태 질소는 단백질 분해과정에서 탈아미노반응에 의해 생성되며, 함량이 증가할수록 이취와 함께 불쾌감을 준다. 따라서 일반적으로 장류제품의 변패 또는 이상발효의 지표로써 이용된다(Lee GY *et al* 2014). 콩알된장의 암모니아태 질소의 함량은 발효 20일차에 가장 높은 함량을 나타냈으며, 그 후로는 점차 감소하였다. 전반적으로 KACC 15935처리구에서 유의적으로 높은 암모니아태 함량을 나타내었다. Hwang HA *et al*(2008)의 보고에 따르면 청국장 발효 기간 중 주로 미생물이 분비하는 protease가 원료대두의 단백질에 작용하여 수용성 질소형태로 가수분해되고, 이어서 peptide를 거쳐 아미노태 질소형태로 가수분해하여 된장의 구수한 맛이 생성됨과 동시에 발효가 계속 진행되면서 암모니아태 질소

Table 1. Change in ammonia-type nitrogen (mg%), reducing sugar (%) contents and total aerobic counts (CFU/g) during *doenjang* fermentation (n=χ±S.D.)

Type	Strains	Fermentation time (days)						
		0	10	20	30	40	50	60
Ammonia-type nitrogen	Control	64.20±2.84^{Ad}	61.33±0.72^{Be}	72.87±1.78^{Ba}	68.17±0.32^{Bc}	71.60±0.17^{Bab}	70.07±0.51^{Babc}	69.40±2.41^{Bbc}
	KACC15935	68.17±2.80^{Ad}	66.27±0.91^{Ad}	81.57±0.91^{Aa}	73.50±0.87^{Ac}	75.43±0.32^{Abc}	77.80±1.21^{Ab}	74.67±2.12^{Ac}
	HJ 18-9	57.07±2.45^{Bd}	65.40±1.35^{Abc}	80.30±0.75^{Aa}	68.07±1.42^{Bb}	64.83±0.80^{Cc}	57.43±0.81^{Cd}	45.37±2.59^{Ce}
Reducing sugar	Control	1.63±0.04^{Ae}	2.04±0.02^{Ad}	2.40±0.01^{Ab}	2.49±0.02^{Aa}	2.00±0.03^{Ad}	2.23±0.04^{Ac}	2.48±0.10^{Aa}
	KACC15935	1.60±0.03^{ABg}	1.94±0.03^{Be}	2.14±0.02^{Bc}	2.23±0.02^{Bb}	1.88±0.03^{Bf}	2.10±0.02^{Bd}	2.41±0.01^{Aa}
	HJ 18-9	1.54±0.02^{Bc}	1.92±0.01^{Bb}	1.95±0.03^{Cb}	2.20±0.05^{Ba}	2.02±0.02^{Ab}	2.01±0.03^{Cb}	2.01±0.13^{Bb}
Total aerobic counts	Control	7.99±0.03^{Aa}	7.91±0.05^{Aa}	7.95±0.01^{Aa}	7.80±0.05^{Abc}	7.94±0.10^{Ba}	7.69±0.10^{Bc}	7.89±0.01^{Bab}
	KACC15935	7.91±0.04^{Bc}	7.67±0.06^{Be}	7.77±0.04^{Bd}	7.87±0.03^{Ac}	8.13±0.02^{Aa}	8.07±0.03^{Aa}	8.00±0.02^{Ab}
	HJ 18-9	7.67±0.02^{Ca}	7.41±0.01^{Cd}	7.35±0.05^{Cd}	7.55±0.10^{Bbc}	7.51±0.02^{Cc}	7.63±0.05^{Bab}	7.52±0.03^{Cc}

Means in the same Column $^{A\sim C}$ and Row $^{a\sim c}$ followed by different letters are significantly different (P<0.05).

를 형성시킨다고 하였다.

따라서 본 실험결과, KACC 15935 처리구에서 암모니아태 함량 값이 높은 것으로 보아 세 가지 처리구에서는 대조구와 HJ 18-9 처리구에서 불쾌치가 적은 구수한 맛의 된장이 제조될 것으로 사료된다.

6. 환원당 함량

발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 된장의 환원당 함량 변화는 Table 1에 나타내었다. 환원당은 단맛을 부여하는 물질로 관능적인 품질평가에 중요시되는 지표 중 하나이다(Lee KH *et al* 2015). 환원당의 증가는 계속적인 amylase의 작용으로 전분이 dextrin으로, dextrin이 maltose와 glucose로의 분해과정을 거쳐 생성되어 증가한다. *B. subtilis*는 α 및 β-amylase를 생성하여 된장 발효 중 대두 중의 전분을 당으로 전환시키며, 생성된 당은 된장의 단맛에 중요한 인자로 작용한다(Ryu SH 2001). 본 실험결과, 발효기간이 증가할수록 된장의 환원당 함량이 증가하는 경향을 보였으며, 대조구에서 환원당이 가장 높게 나타났다. 모든 처리구에서 30일 발효 시 높은 환원당 값을 나타내었으며, 40일, 50일까지 다시 감소되었다가 60일에서 다시 증가한 환원당 값을 나타내었다. 대부분 된장에서 발효 초기에 당 함량이 최대치를 보이고, 그 이후 당이 미생물에 의한 알콜 발효 및 유기산 발효의 기질로 사용됨에 따라 감소하는 것으로 알려져 있다(Kim HL *et al* 1998). 이는 발효 중반까지는 환원당 함량이 증가하여 미생물의 탄소원으로 이용되는 것으로 사료된다. 발효 후기에는 전분질 원료가 소진되는 반면, 미생물 생육과 Maillard 반응에 의한 갈변이 계속되면서 생성된 당을 소비하므로 당의 소비속도가 생성속도를 상회하여 증가하는 양이 감소하는 것으로 판단된다.

7. 미생물 수의 변화

발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 된장의 미생물 수의 변화는 Table 1에 나타내었다. 대조구, KACC15935 및 HJ18-9 처리구의 총균수는 7.99±0.03, 7.91±0.04 및 7.67±0.02 log CFU/g으로 나타났다. 발효진행 60일 후, 총균수는 7.89±0.01, 8.00±0.02 및 7.52±0.03 log CFU/g으로 각각 나타났다. 전반적으로 발효기간 동안 총균수는 비슷한 값을 나타내었으며, KACC 15935처리구에서 발효된장 기간 동안 가장 높은 값을 나타내었으며, HJ18-9 처리구에서 가장 낮은 값을 나타내었다. *B. subtilis* HJ18-9는 메밀 속성장에서 분리한 균주로 *S. entrerica*, *Stap. aureus*, *C. albicans* 등의 항균력이 우수하다고 보고(Lee SY *et al* 2011)되었는데, 이런 항균성에 의한 것으로 사료된다.

이상의 연구결과를 보았을 때 *B. subtilis* HJ18-9를 starter로 접종하여 발효시킨 된장의 품질특성이 대조구 및 *B. subtilis* KACC 15935로 발효시킨 된장보다 α-amylase, protase, cellulase 활성 및 아미노태 질소 함량이 더 높게 나왔다. 이는 발효된장을 제조하는데 있어 *B. subtilis* HJ18-9 균주가 starter로써 적합할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 된장 제조 시 자연 발효시킨 대조구와 *B. subtilis* KACC15935, *B. subtilis* HJ18-9 균주를 starter로 접종하여 발효시킨 콩알된장의 품질특성을 측정하였다. 된장의 단백질을 분해하여 특유의 구수한 맛 성분을 유리하는 protease 활성의 경우, 대조구와 HJ18-9를 접종한 시료에서 높게 나타났으며, 이는 아미노태 질소 함량에서도 같은 경향을 나타냈다. 식물세포벽 구성성분 중 대부분 차지하고 있는 cellulose을 분해할 수 있는 능력을 가지고 있어 장내 이용성 증진을 위해 널리 사용되는 효소인 cellulase의 활성은 모든 시료에서 발효기간에 따라 증가되는 경향을 보였으며, 60일 발효 후에는 HJ18-9 처리구에서 대조구에 비해 1.38배, KACC15935에 비해서 1.99배 더 높게 나타났다. 환원당을 유리하는데 관여하는 α-amylase 효소활성의 경우 대조구와 HJ18-9를 접종한 시료에서 높게 나타났다. 이러한 결과로 본 연구를 통해 선별한 균주를 starter로 접종하여 된장 제조에 알맞은 균주를 개발, 평가하여 가공품으로 개발할 수 있는 기초연구가 되고자 하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술사업(과제번호: PJ011695)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Barnes S (1998) Evolution of the health benefits of soy isoflavones. Proc Soc Exp Biol Med 217: 386-392.

Chae SK, Kang KS, Ma SJ, Bang GW, Oh MH, Oh SH (2000) In Standard Food Analysis. GiguMunhwasa, Korea. pp 299-301.

Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L (1995) Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. J Nutr 125: 790-797.

Hwang HA, Lee NK, Cho IJ, Hahm YT, Kwon KO, Kim BY

(2008) Selection of microorganisms and optimization of manufacture process for *cheonggukjang*. Korean J Food Sci Technol 40: 406-411.

Jung HK, Jeong YS, Youn KS, Kim DI, Hong JH (2009) Quality characteristics of soybean paste(*Doenjang*) prepared with *Bacillus subtilis* DH3 expressing high protease levels, and deep-sea water. Korean J Food Preserv 16: 348-354.

KFDA (2005) Food Code. Korea Food & Drug Administration, Cheongwon, Korea.

Kwon DJ (2002) Comparison of characteristics of *koji* manufactured with *Bacillus subtilis* B-4 and *Aspergillus oryzae* F-5. Korean J Food Sci Technol 34: 873-878.

Kim DH, Kim SH (1999) Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Mucor* and *Rhizopus* strains. Korean J Food Sci Technol 31: 176-182.

Kim DH, Kim SH, Choi NS, Bai S, Chun SB (1998) Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Aspergillus* strains. Kor J Appl Microbiol Biotechnol 26: 551-557.

Kim MH, Lee NH and Choi UK (2008) Fermentation characteristics of *Cheonggukjang* made of germinated soybean under light condition. J Life Sci 18: 1420-1425.

Kim HL, Lee TS, Noh BS, Park JS (1998) Characteristics of *Samjangs* prepared with different *doenjangs* as a main material. Korean J Food Sci Technol 30: 54-61.

Kim BS, Rhee CH, Hong YA, Woo CH, Jang CM, Kim YB, Park HD (2007) Changes of enzyme activity and physiological functionality of traditional *doenjang* during fermentation using *Bacillus* sp. SP-KSW3. Korean J Food Preserv 14: 545-551.

Kim JH, Yoo JS, Lee CH, Kim SY, Lee SK (2006) Quality properties of soybean pastes made from *meju* with mold producing protease isolated from traditional *meju*. J Korean Soc Appl Biol Chem 49: 7-14.

Koo MS, Kim YS, Kim HJ, Park KM, Ku KH (2014) Quality characteristics of *doenjang* by aging period. J Korean Soc Food Sci Nutr 43: 720-728.

Lee GR, Ko YJ, Kim EJ, Kim IH, Shin KH, Kim YG, Ryu CH (2013) Quality characteristic of wheat *doenjang* according to mixing ratio of *meju*. Korean J Food Preserv 20: 191-198.

Lee GY, Kim SI, Jung MG, Seong JH, Lee YG, Kim HS (2014) Characteristics of *chungkookjang* that enhance the flavor and GABA content in a mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383. J Life Science 24: 1102-1109.

Lee KH, Kim EJ, Choi HS, Park SY, Kim JH, Song J (2015) Quality characteristic of popped rice *deonjang* prepared with *Bacillus subtilis* strains. Korean J Food Preserv 22: 545-552.

Lee SY, Kim JY, Baek SY, Yeo SH, Koo BS, Park HY, Choi HS (2011) Isolation and identification characteristics of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat *sokseongjang*. Korean J Food Sci Technl 43: 735-741.

Lee SY, Park NY, Kim JY, Choi HS (2012) Quality characteristics of rice-*doenjang* during fermentation by differently shaped *meju* and adding starter. J Korean Soc Food Sci Nutr 25: 505-512.

No JD, Lee DH, Lee DH, Choi SY, Kim NM, Lee JS (2006) Changes of quality and physiological functionality during the fermentation of *doenjangs* made by isolated *nuruk* mold and commercial *nuruk* mold. J Korean Soc Food Sci Nutr 35: 1025-1030.

Park JS (1992) Histological changes of *Doenjang* during the fermentation with different strains. Korean J Food Sci Technol 24: 477-481.

Ryu BH (2003) Development of functional *doenjang* for antioxidative and fibrinolytic activity. J Life Sci 13: 559-568.

Ryu SH (2001) Studies on antioxidative effects and antioxidative components of soybean and *Chungkukjang*. Ph D Dissertation Inje University, Gimhae.

Ra KS, Oh SH, Kim JM, Suh HJ (2004) Isolation of fibrinolytic enzyme and β-glucosidase producing strains from *doenjang* and optimum conditions of enzyme production. J Korean Soc Food Sci Nutr 33: 439-442.

Setchell KD, Cassidy A (1999) Dietary isoflavone: Biological effects and relevance to human health. J Nutr 129: 758-767.

Uzzan M, Labuza TP (2004) Critical issue in R&D of soy isoflavone enriched foods and dietary supplement. J Food Sci 69: 77-86.

Weatherburn MW (1967) Phenol-hypochorite reaction for determination of ammonia. J Anal Chem 39: 971-974.

Yoo SK, Cho WH, Kang SM, Lee SH (1999) Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybean paste and soybean sauce. Kor J Microbiol Biotechnol 27: 113-117.

Yoon KS (1998) Changes of enzymatic activities during the fermentation food soybean-soypaste by *Aspergillus* spp. MS Thesis Konkuk university, Seoul.

Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW (2002) Quality characteristics of the *cheong-gukjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *Bacillus lichenoformis*. J Korean Food Sci Technol 31: 201-210.

Date Received Jan. 14, 2016
Date Revised Apr. 1, 2016
Date Accepted Apr. 4, 2016