

## *Bacillus licheniformis*와 *Saccharomyces rouxii* 첨가에 의한 된장의 풍미향상

申順英 · 金永培 · 劉太鍾

고려대학교 식품공학과

## Flavour Improvement of Soybean Pastes by the Addition of *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces rouxii*

Soon-Young Shin, Young-Bae Kim and Tae-Jong Yu

Department of Food Engineering, Korea University, Seoul

### Abstract

In order to give the unique flavour of traditional Doenjang (Korean-style soybean paste) to commercially manufactured soybean paste, the addition of *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces rouxii* was tried and their influences were investigated. The addition of *B. licheniformis* and *S. rouxii* in soybean paste decreased the content of reducing sugars. By the addition of *B. licheniformis*, the contents of amino type nitrogen and titrable acidity were increased. The content of ammoniacal nitrogen was reduced and ethyl alcohol production was increased by the addition of *S. rouxii*. The viable counts of molds showed the decreasing tendency during the aging and it was accelerated by the addition of *B. licheniformis* and *S. rouxii*. Acetaldehyde, acetone, ethylacetate, methyl alcohol, ethyl alcohol, propyl alcohol, isopropyl alcohol and isoamyl alcohol were detected from the vapor of all tested ripen soybean pastes, while in a traditional Doenjang, isoamyl alcohol and isobutyl alcohol were not. The *B. licheniformis* and *S. rouxii* added sample showed richest free amino acid content. In organoleptic test the *B. licheniformis* and *S. rouxii* added sample showed the most excellent overall acceptability.

### 서 론

된장은 대두를 원료로한 발효식품으로 한국인의 전통적인 조미료로서 그 의의가 크며 가정단위에서 고유한 풍미를 지키며 제조되어왔다. 그러나 최근에는 공업적 생산 또한 증가추세이나 그제품은 전통장류의 풍미와 완전히 일치하지 못한다고 생각되어 제조방법의 개선이 요구되고 있다.<sup>(1)</sup>

재래식장류의 발효속성은 *Bacillus spp.*에 의한 것이며 재래식장장에서 분리된 주요 미생물들은 *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* 등 뿐만 아니라 *Pediococcus halophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* 등의 유산균, *Toruopsis datila* 및 *Saccharomyces rouxii* 등의 효모이다.<sup>(2,3)</sup> 발효식품에 있어 미생물이 생성하는 향기는 큰 비중을 차지하고 있으며 이러한 관점에서 송등<sup>(4)</sup>은 된장에 관여하는 발효미생물들을 분리배양하여 이들이 생성하는 향기를 재래식된장과 비교하였다. 한편 이들 미생물들을 장류제조시 첨가하여 풍미향상을 시도하였다.<sup>(5-7)</sup> 그러나 이들은 세균이나 효모등을 단용한 것이었으며 세균과 효모등을 혼용하여 특히 된장제

조시 첨가하여 재래식된장 특유의 풍미와 관련된 연구는 아직 없다. 따라서 본실험은 공장제조 된장의 풍미향상을 목적으로 된장 제조시 국균으로 사용한 *Aspergillus oryzae* 외에 재래식 메주에서 분리한 *Bacillus sp.*와 *Saccharomyces rouxii*를 첨가하여 된장품질에 미치는 효과를 고찰하기 위하여, 각성분의 변화 및 미생물의 소장을 조사하였으며 관능검사를 실시하여 풍미에 미치는 효과를 고찰하였다.

### 재료 및 방법

#### 원료

콩, 보리, 밀은 1983년 6월 경동시장에서 구입했으며 소금은 식탁염(주식회사 한주, 순도 99%)를 사용하였다.

#### 사용균주 및 제균

*Aspergillus oryzae* OUT 5048과 *Saccharomyces rouxii*는 고려대학교 농과대학 식품미생물학 연구실에 보관된 것을 사용하였고 *Bacillus sp.*는 재래식 메주에

**Table 1. The composition of raw materials of soybean paste preparation**

Raw materials (g)	Soybean pastes			
	Control	Y	B	BY
Koji*	600	600	420	420
Napdu*	—	—	180	180
Soybean	300	300	300	300
Barley	300	300	300	300
Sodium Chloride	220	220	220	200
Water (ml)	220	—	200	—
Yeast Culture Broth (ml)	—	220	—	200

Control : *Aspergillus oryzae*

Y : *A. oryzae* + *Saccharomyces rouxii*, B : *A. oryzae* + *Bacillus licheniformis*

BY : *A. oryzae* + *B. licheniformis* + *S. rouxii*

\* Koji and Napdu were prepared with the mixture of soybean, barley and wheat (50:50:20 W/W/W), cultured with *A. oryzae* and *B. licheniformis*, respectively.

서 저자가 직접 분리하여 protease가 높은 것을 선택하여 Bergey's manual of determinative bacteriology<sup>4</sup>에 의해 동정한 *Bacillus licheniformis*를 사용하였다.

제국을 위하여, *Aspergillus oryzae*는 가압살균한 밀기울에 접종하여 27°C에서 72시간 배양한 것을 원료에 0.1% (건물 중량당) 첨가하여 상법<sup>5</sup>에 따라 제조하였다. *Bacillus* sp.는 가압살균한 콩에 접종한 후 37°C에서 30시간 배양하여 살균수를 넣고 흔들어 원료에 10 ml 가하여 37°C에서 30시간 배양하였다.

*Saccharomyces rouxii*는 된장추출물 100g, 포도당 20g, 효모추출물 10g, NaCl 50g, 증류수 1l로 만들어 pH를 5.0으로 조절한 배지에 27°C에서 72시간 배양하여 사용하였다.<sup>6)</sup>

**된장제조**

원료배합은 Table 1 과 같이 대조구(C)는 *A. oryzae*

만을 이용하였으며, 효모첨가구(Y)는 *A. oryzae* 로만 제조한 고오지에 담금시 *S. rouxii* 배양액을 첨가하였으며, 세균첨가구(B)는 *A. oryzae*로 제조한 고오지에 *B. licheniformis*로 제조한 납두를 첨가하여 제조하였으며, 혼용구(BY)는 *A. oryzae*고오지에 *B. licheniformis* 납두를 더한 것이다 *S. rouxii* 배양액을 첨가하여 제조하였다.

상법에 따라 조제된 시료는 27°C ± 1 의 항온기에서 40일간 발효시키면서 정기적으로 분석에 사용하였다.

**미생물 균수 측정**

시료를 단계희석한 후, 평판배양하여 세균은 37°C에서 1~2 일, 효모와 곰팡이는 27°C에서 3~4 일 후에 나타나는 콜로니의 수를 세어 균수를 측정하였다.

사용한 배지의 조성은 Table 2 와 같다.<sup>7</sup>

**Table 2. The media compositions for determination of viable number of microorganisms**

Bacteria		Molds		Yeasts	
Nutrient agar		Peptone-dextrose agar		Malt extract agar	
Beef extract	3g	Dextrose	10g	Malt extract	30g
Peptone	5g	Peptone	5g	Peptone	5g
NaCl	100g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g	Sodium propionate	2.5g
Agar	20g	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5g	NaCl	100g
Distilled water	1l	Rose bengal	0.035g	Agar	15g
		Agar	20g	Distilled water	1l
		Distilled water	1l		

화학적분 분석

환원당, 에틸 알콜, 아미노태질소, 적정산도는 基準 味噌分析法<sup>10)</sup>에 의하여 측정하였으며, 암모니아태 질소는 A. O. A. C<sup>11)</sup>의 MgO법에 의하여 측정하였다.

유리아미노산은 이등<sup>12)</sup>의방법에 따라 high speed amino acid analyzer (Hitach model 835)를 사용하여 분석하였으며 휘발성 성분은 Äyräpää<sup>13)</sup>의 방법에 따라 전처리한 시료를 gas chromatograph (Pachard model 419)를 사용하여 column : 20% PEG 1500 on chromosorb W (60/80 mesh) 3mm × 2 m, glass, detector : FID, column temperature : 100°C isotherm의 조건하에서 분석하였다.

관능검사

숙성 40일된 시료를 재래식 가내된장 1점을 대조구로 하여 색, 향기, 맛등의 유사정도를 panel 20명을 대상으로 순위시험<sup>14)</sup>에 의하여 실시하였다. 또한 본실험의 4개의 시료를 대상으로 전체적인 풍미의 선호도를 조사하였다.

결과 및 고찰

된장 숙성 중 미생물 수의 변화

곰팡이, 세균, 효모의 변화는 Fig. 1, 2, 3 과 같다.

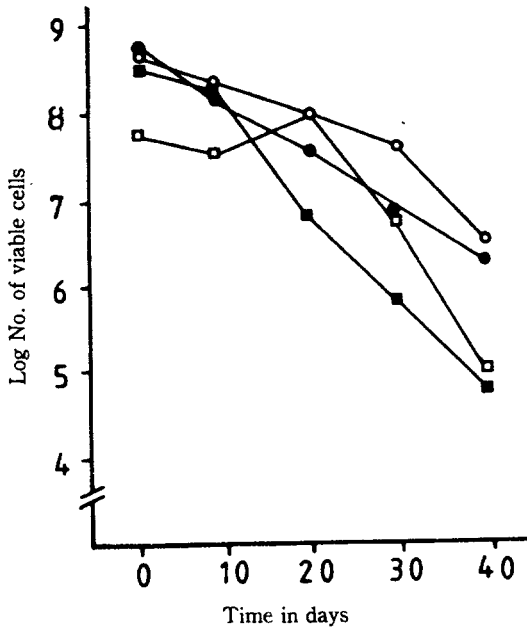


Fig. 1. Changes of viable count of molds during the aging of soybean pastes

○—○ Control ●—● B □—□ Y ■—■ BY

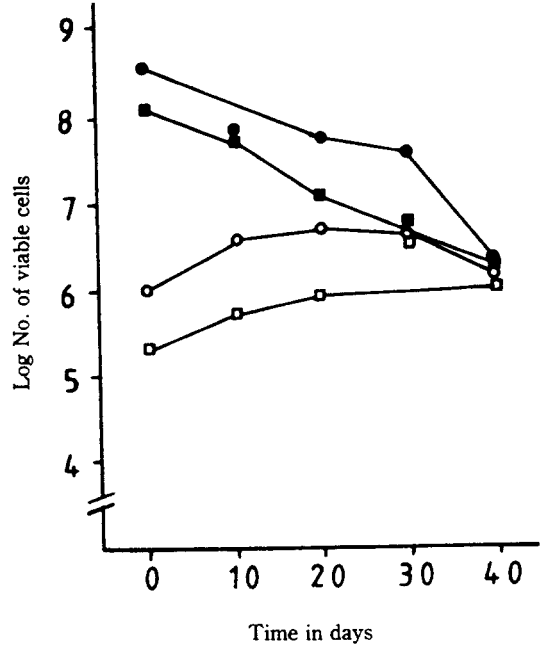


Fig. 2. Changes of viable count of bacteria during the aging of soybean pastes

○—○ Control ●—● B □—□ Y ■—■ BY

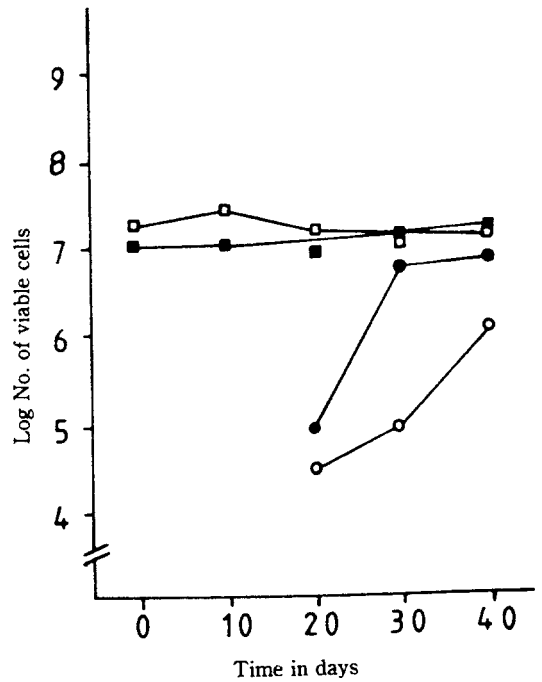


Fig. 3. Changes of viable count of yeasts during the aging of soybean pastes

○—○ Control ●—● B □—□ Y ■—■ BY

곰팡이는 담금직후  $10^6$ 수준에서 40일 경과 후  $10^4 \sim 10^7$  수준으로 감소하였고 효모는 첨가한 시료들에서는 거의 변화하지 않고 일정하였으나, 첨가하지 않은 시료에서도 숙성 20일부터 생육이 전개되었으며, 40일 후에는 세균첨가구의 경우, 효모첨가구와 비슷한 수준까지 이르렀다. 세균에 있어서는 첨가한 시료들은 점차 감소하는 경향이고 첨가하지 않은 시료들은 서서히 증가하는 경향으로 숙성 40일 경과한 후에는 첨가한 시료와 비슷한 수준을 보였다. 특히 효모와 세균에 의해 곰팡이의 사멸속도가 증가되고 효모첨가는 세균의 성장을 억제하는 경향이었으나 세균과 효모의 상호관계는 확실히 나타내지 못하였다. 즉 *B. licheniformis*는 *Bacillus* sp. 중에서 특별히 혐기적 생장이 가능한 종류이며 또한 포자를 형성하여 계속 생균수로 측정되므로서 그의 된장 중의 활동정도가 생균수와 일치하지 않을 수 있기 때문이다.

된장숙성 중의 화학성분의 변화

된장을 40일간 발효시킨 결과, 환원당과 에틸 알콜의 변화는 Fig. 4, 5와 같다. 환원당의 경우 시료 모두 숙성 20일까지 증가하다가 이후 감소하는 추세로서 시료 간의 큰차이를 보이지 않았다. 무첨가구에서 숙성 20일과 30일에 양이 비교적 많은 것은 세균이나 효모가 첨가된 시료에서는 생성된 환원당이 이들에 의해 이용되고 일부는 에틸 알콜 등의 발효산물로 전환되기 때문에 약간의 감소도 있었으리라 생각된다. 에틸 알콜은 Fig. 5에서와 같이 효모를 첨가한 시료들에서 생성량이 현저하였다. 그러나 숙성 후기에는 효모를 첨가한 시료들에서 에틸 알콜의 양이 감소되는 반면 세균첨가구에서는 서서히 증가하여 숙성 40일에는 효모첨가구와 비슷

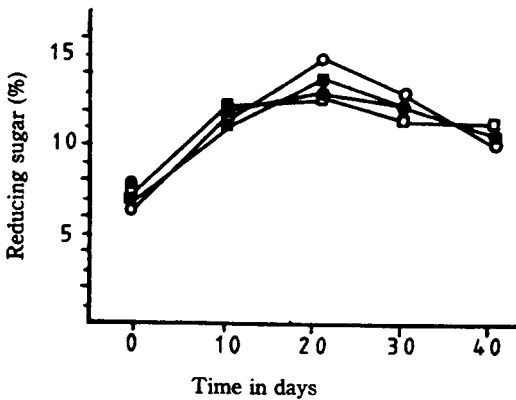


Fig. 4. Changes of reducing sugar contents of soybean pastes during the aging

○—○ Control ●—● B □—□ Y ■—■ BY

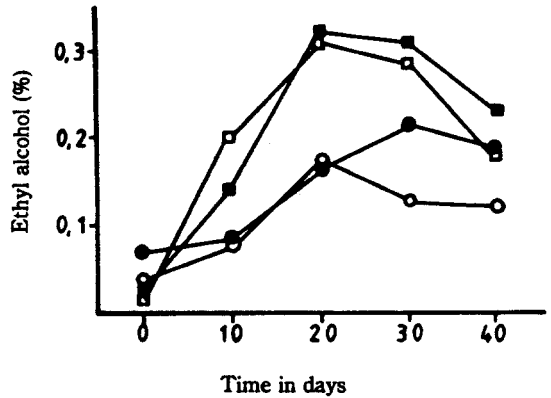


Fig. 5. Changes of ethyl alcohol contents during the aging of soybean pastes

○—○ Control ●—● B □—□ Y ■—■ BY

한 수준을 보이고 있다. 이는 Fig. 3에서 보여주듯이 이때 세균첨가구의 효모수의 증가와 관련이 있으리라 추측된다. 아미노태질소 및 암모니아태질소의 변화는 Fig. 6, 7과 같다. 아미노태질소는 혼용구가 숙성 전 기간 가장 높은 수준이었으며, 세균첨가구, 효모첨가구는 비슷한 수준이며 무첨가구가 가장 낮은 수준이었다. 이등<sup>17)</sup>의 연구에 의하면 납두를 15% 첨가한 된장의 아미노태질소의 증량이 현저했다고 보고하였다. 한편 保披<sup>18)</sup>은 효모첨가로 아미노태 질소의 양이 증가한다고 보고하였다. 이는 본실험 결과와도 일치하며, 효모나 세균의 첨가 및 혼용은 아미노태 질소의 양을 증가시켜 된장숙성 중 구수한 맛을 증가시키는 것으로 생각된다. 아미노태 질소는 Fig. 7에서와 같이 세균을 첨가한 시료들이 무첨가구나 효모첨가구에 비해 각각 높은 경향이 있었으며 최고치를 보인 숙성 30일에서는 효모를 첨가

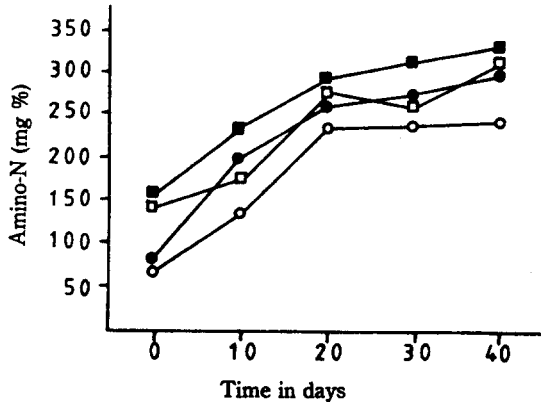


Fig. 6. Changes of amino type nitrogen during the aging of soybean pastes

○—○ Control ●—● B □—□ Y ■—■ BY

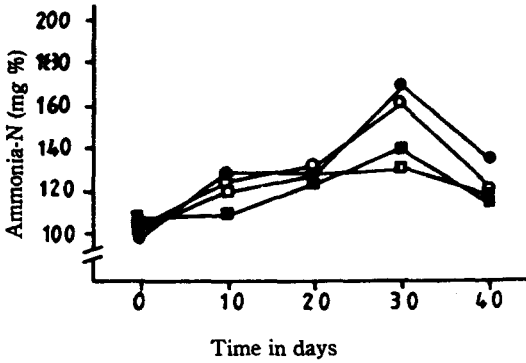


Fig. 7. Changes of ammoniacal nitrogen during the aging of soybean pastes

○—○ Control ●—● B □—□ Y ■—■ BY

한 시료들에서는 그 함량이 감소됨을 보여준다. 이는 保坂等<sup>15)</sup>의 결과와도 일치하였다. 암모니아태 질소의 증가는 된장의 독특한 풍미로 작용하며 특히 단백질 분해력이 강한 세균의 분해력은 된장품질 저하의 요인이기도 하다. 李等<sup>7)</sup>은 납두첨가에 의한 암모니아태 질소의 증량은 소금 첨가량의 증가로 조절 될 수 있다고 보았는데 같은 소금농도에서도 효모의 첨가로 억제 효과가 있음을 보여준다. 된장숙성 중의 적정산도를 측정 한 결과는 Fig. 8 과 같다. 숙성 전기간을 거쳐 세균을 첨가한 시료들이 높은 경향이었고 숙성 20일 이후부터는 효모를 첨가하지 않은 시료-대조구, 세균첨가구와 효모첨가 시료들-효모첨가구, 혼용구에 비해 각각 다소 높은

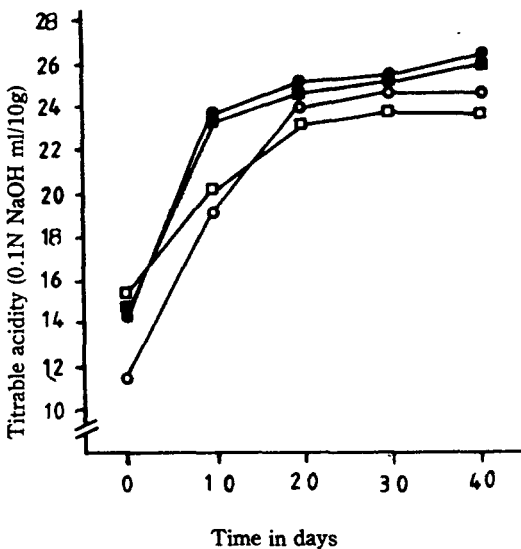


Fig. 8. Changes of titrable acidity of soybean pastes during the aging

○—○ Control ●—● B □—□ Y ■—■ BY

경향들이 관찰되었다.

숙성된장의 유리아미노산

40일간 숙성된 된장의 유리아미노산은 Table 3 과 같았다. 그 함량은 혼용구가 가장 많았다(362.7mg%). 이는 Fig. 6의 아미노태 질소와 비교해보면 혼용구가 타 시료에 비해 함량이 가장 많았다는 점에서는 동일 하였으나 시료간의 양적 비교라는 면에서는 아미노산 분석기를 이용한 결과와 다소 차이가 있었다. 이는 미량(50 μl)를 취급하는 기기분석상의 오차로 생각되어 혼용구의 유리아미노산 양이 비교적 많았다는 점만을 고찰하였다. 혼용구에 유리아미노산 함량이 많은 것은 Table 4의 관능검사 결과 기호도가 높았던 것과 관계가 있으리라 생각된다. 가장 높은 비율을 차지한 것은 각시료 모두 된장의 구수한 맛의 주체로 생각되는 글루탐산이었다. 그외에 시료간의 괄목할만한 차이는 없었다.

숙성된장의 휘발성 성분

본실험의 숙성된장과 재래식으로 제조된 가내제조품 된장의 휘발성 성분을 기체 크로마토 그래피에 의하여 분석한 결과는 Fig. 9와 같다. 본실험에서 제조된 시료들 간에는 특별한 차이를 나타내지 않았다. 이는 각종 성분변화가 완성했던 20~30일 이후 숙성이 완료된 후

Table 3. Free amino acid composition of 40 days fermented soybean pastes

Amino acid	Control	Y	B	BY
	(mg %)	(mg %)	(mg %)	(mg %)
Aspartic acid	16.4	18.1	17.4	24.1
Threonine	9.2	12.4	11.1	14.0
Serine	10.8	13.0	13.0	18.3
Glutamic acid	33.5	39.6	43.6	66.0
Glycine	40.3	7.2	6.1	8.4
Alanine	11.7	13.0	12.0	16.6
Cystine	13.7	16.0	15.7	20.8
Methionine	3.9	5.2	5.1	7.0
Isoleucine	11.7	12.7	12.4	16.6
Lueucine	18.8	21.3	21.0	28.0
Tyrosine	8.8	11.5	9.8	14.2
Phenylalanine	17.9	22.9	22.2	29.9
Lysine	15.3	18.5	17.8	23.6
Histidine	3.2	4.3	4.2	5.8
Arginine	20.6	27.4	26.4	39.2
Proline	22.3	21.5	21.3	30.2
Total	258.1	264.6	259.1	362.7

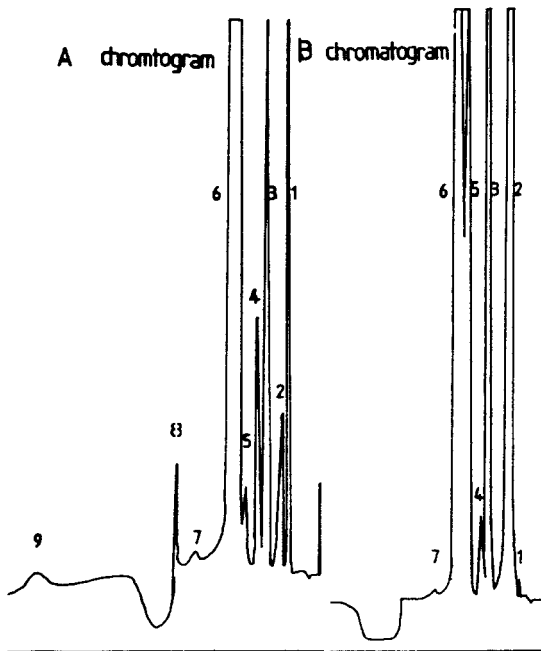


Fig. 9. Gas chromatograms of a typical pattern of all tested ripen soybean pastes (A) and a home making Doenjang in traditional method (B)

1. unknown 2. acetaldehyde 3. acetone 4. ethylacetate  
5. methyl alcohol 6. ethyl alcohol 7. propyl alcohol  
8. isobutyl alcohol 9. Isoamyl alcohol

에는 각시료의 미생물의 종류 및 균수 등도 유사한 경향이므로 생각된다. 즉 4개 시료 모두 Fig. 9-A와 같은 형태로서 동정된 물질은 아세트알데히드, 아세톤, 에틸 알콜, 에틸 아세테이트, 메틸 알콜, 프로필 알콜, 이소부틸 알콜, 이소아밀 알콜 등이었으며 이중 가장 현저한 것은 에틸 알콜과 아세톤이었다. 한편 재래식 된장은 Fig. 9-B에서와 같이 Fig. 9-A에 비해 메틸 알콜, 아세트 알데히드의 생성량이 많았던 반면 이소부틸 알콜, 이소아밀 알콜 등은 발견되지 않았다. 伊藤等<sup>16)</sup>은 味噌향기 성분으로, 아세트 알데히드, 에틸 알콜, 아밀 아세테이트, 이소아밀 알콜, n-헥실 알콜 등을 동정하였으며 佐々木等<sup>18)</sup>은 味噌를 종류별로 선택하여 기호와 휘발성 성분과의 관계를 조사한 결과, 발효가 잘된 赤色系 辛口味味噌의 향기는 아세트 알데히드, 에틸 알콜 등이 많았고 이소부틸 알콜, 이소아밀 알콜이 증가하는 경향이였다. 향기가 좋은 보리 味噌는 이소아밀 알콜이 증가하였으나, 몇 가지 시료들은 기호도가 높았으면서도 휘발성 성분은 오히려 적게 나타났다. 즉 이상의 검출된 휘발성 성분과 기호는 반드시 일치하지 않았다. 간장의 경우 일반적으로 재래식보다 개량식 간장 중에 유기산, 환원당, 유리아미노산

함량이 많아<sup>19)</sup> 개량식의 맛이 좋다고도 하지만 임<sup>11)</sup>의 보고에 의하면 재래장류에 대한 전통적인 관념과 독특한 맛에 대한 관습이 제조의 번거로움에도 불구하고 재래 장류를 상용하게 한다고 보고하고 있으며 한국적 장맛의 독특함은 무시할 수 없다는 것이 통념이다. 재래식 된장에 한국인의 기호도가 높음을 생각해 볼때 재래식 “제맛”의 주요성분이 어떤 것인가는 좀더 연구해볼 과제라 생각된다.

#### 숙성된장의 관능검사

숙성 40일된 된장을 재래식 된장과 비교하여 유사성도를 조사하고 별도로 4개 시료 간의 전체적인 기호도를 순위 시험에 의해 조사한 결과는 Table 4와 같다. 이들 성적에 대한 분산분석 결과 무첨가시료가 재래식 된장과 색에 있어 유사한 것으로 나타났다( $p < 0.01$ ). 또한 혼용시료는 맛과 향기면에서 4개 시료 중 가장 재래된장에 유사한 것으로 나타났으나 통계적인 유의차는 인정되지 않았다. 혼용시료에 기호도가 높은 것은 효모나 세균의 동시 첨가로 제조된 결과로 비통제 발효로 각종 미생물이 생육하는 재래된장과 유사한 결과를 가져온 것으로 추측할 수 있다.

한편 Table 5는 각 시료간의 전체적인 풍미를 비교한 결과로서 혼용구 > 효모첨가구 > 무첨가구 > 세균첨가구의 순이었다( $p < 0.05$ ). 혼용구의 기호도가 높은 것은 Table 4에서와 같이 혼용구가 재래장류와 가장 유사했기 때문으로 생각할 수 있으며 혼용구에서 암모니아태 질소의 량도 적고 글루탐산의 량이 많았다는 점도 풍미와 관련이 있었을 것으로 추측된다.

이상의 결과로 보면 본실험에서 시도한 개량식 된장 제조는 세균과 효모를 첨가한 결과로 그 특유의 풍미를 생성하여 곰팡이만을 사용한 시료보다 재래식 된장에

Table 4. Sensory evaluation of the soybean pastes by ranking test in comparison with traditional one

Sample	Ranking score		
	Colour	Taste	Flavour
Control	12.23*	2.35	2.35
Y.	8.58	2.5	-0.26
B	-15.02	3.1	-4.59
BY	- 5.79	2.55	4.59
Significant level	1%	ns**	ns

\* ranks transformed to scores 1 = 1.03, 2 = 0.30  
3 = -0.30, 4 = -1.03

\*\* ns : not significant

근접했으며 개량식 된장제조의 방법으로 풍미향상의 가능성은 긍정적인 것으로 평가된다.

요 약

한국인의 기호에 맞는 상업적 된장의 풍미향상을 위하여 된장제조시 *Bacillus licheniformis*와 *Saccharomyces rouxii*를 첨가하여 27°C ± 1에서 40일간 발효시킨 결과 *B. licheniformis*와 *S. rouxii*의 첨가로 환원당의 증량이 억제되었고, *S. rouxii*는 에틸 알콜의 생산을 증가시키고 암모니아태 질소의 양을 감소시켰다. *B. licheniformis*는 아미노태 질소와 적정산도를 증가시켰다. *A. oryzae*의 생육은 숙성중 감소되었고 *B. licheniformis*와 *S. rouxii*의 첨가로 더욱 촉진되었다. *B. licheniformis*와 *S. rouxii*를 혼용한 시료에 유리아미노산 함량이 가장 많았으며 각시료 모두 휘발성 성분으로 아세트알데히드, 아세톤, 에틸 알콜, 에틸 아세테이트, 메틸 알콜, 프로필 알콜, 이소부틸 알콜, 이소아밀 알콜 등이 검출되었으며 재래식 된장에서는 이소부틸 알콜, 이소아밀 알콜 등이 검출되지 않았다. 시료의 전체적인 풍미는 *B. licheniformis*와 *S. rouxii*를 혼용한 시료가 가장 우수하였다.

Table 5. Sensory evaluation of the soybean pastes by ranking test among samples

Sample	Ranking score
	Overall acceptability
Control	-2.89
Y	-4.25
B	-8.54
BY	7.18
Significant level	5%

문 헌

1. 임원명: 대한가정학회지, 14, 621 (1976)
2. 조덕현, 이우진: 한국농화학회지, 13, 35 (1970)
3. 이우진, 조덕현: 한국농화학회지, 14, 137 (1971)
4. 송재영, 안철우, 김종규: 산업미생물학회지, 12, 147 (1984)
5. 김동인: 고려대학교 대학원 석사학위 논문, (1980)
6. 이택수: 충남대학교 대학원 박사학위 논문, (1979)
7. 이갑상, 정동호: 한국식품과학회지, 5, 163 (1973)
8. Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 529 (1974)
9. 김재욱: 신고 농산가공학, 향문사, p. 146 (1980)
10. 全國味噌技術會編: 基準味噌分析法 (1968)
11. A. O. A. C.: *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C., p. 16 (1980)
12. 이택수, 박성오, 궁성실: 한국식품과학회지, 16, 1 (1984)
13. Äyräpää, To: *J. Inst. Brew.*, 73, 17 (1963)
14. 이철호, 채수규, 이진근, 박봉상: 식품공업 품질관리론, 유림문화사 p. 143 (1983)
15. 保坂弘, 好井夕雄: 日本醸造協會雜誌, 52 (12), 40 (1957)
16. 伊藤寛, 海老根 英雄: 味噌の 科學と技術, 197, 22 (1970)
17. 佐々木博國, 松下善一: 味噌の 科學と技術, 209, 19 (1971)
18. 장지현: 서울농업대학 논문집, 1, 212 (1963)

(1984년 10 월 15 일 접수)