

균주를 달리한 된장의 발효기간에 따른 대두의 조직학적 변화에 관한 연구

박 정 숙

조선대학교 식품영양학과

Histological Changes of *Doenjang* during the Fermentation with Different Strains

Jung-suk, Park

Department of Food and Nutrition, Chosun University

Abstract

As a series of fundamental research projects to produce *doenjang* (Korean fermented soy paste) of better quality, two kinds of *doenjang* were manufactured from a traditional *meju* (Korean soy bean koji) and the mixed with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus natto*, and histological changes in the cell structures of soy bean of the two were reported *doenjang* samples were observed and compared during the entire period of fermentation processes. Cell walls of the soy bean were ruptured by pressure and heat during the pressure cooking process and some of them were observed to have the ghost-like shapes. Remarkable differences in the plasmolysis of the cytoplasm were observed between the seed coat and the inner part of soy bean. Small vacuoles resulting from the fusion of the glycoprotein globules by protease and from the hydrolysis of the starch granules by amylase were also observed. Penetration of microorganisms was transferred from the seed coat to the inside of soy bean as the fermentation proceeded. Slimy substances were observed on the seed coat and the parenchyma cells of soy bean fermented with the mixed with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus natto*. Cell walls of soy bean became difficult to stain and they showed unusual, polygonal shapes as the fermentation proceeded. Samples fermented with the mixed with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus natto* showed more remarkable tendencies than traditional *meju*.

Key words: *doenjang*, different strains, soybean, histological changes

서 론

대두를 원료로 한 식품은 한국을 위시하여 중국, 일본, 동남아시아 지역에 비슷한 형태로 존재한다. 대두단백질은 식물성 단백질로서 각종 필수아미노산을 풍부하게 함유하고 있어 영양가치가 비교적 높아 동물성 단백질에 필적할 수 있는 유일한 것으로 알려져 있다. 그러나 이 대두는 조직이 견고하고 비교적 소화되기 어려운 단백질일 뿐 아니라 대두중에 존재하는 단백질 분해효소인 trypsin의 작용을 억제하는 trypsin inhibitor와 적혈구 응집요소(hemagglutinin) 등이 있어 소화에 불리한 점이 있다. 따라서 이것을 가열처리 등의 가공으로 단백질의 열변성이 일어나게 될 뿐 아니라 trypsin inhibitor와 hemagglutinin(적혈구응집요소)이 파괴되어 영양가를 높일 수 있다¹⁾.

우리나라는 옛부터 간장, 된장, 고추장 및 청국장 등 장류를 제조하여 사용하여 왔다. 장류의 고유한 맛은 소균에서 오는 짠맛, 탄수화물이 알코올로 발효되므로 나타나는 tangy flavor, 단백질의 가수분해 산물인 아미노산에서 오는 구수한 맛, 고추장은 고추에서 오는 매운맛들이 조화를 이루고 향미 생성과 색이 생성된다²⁾. 장류는 이처럼 미생물 효소에 의해 원료의 단백질과 탄수화물을 가수분해하여 분해하는 것이므로 따라서 강력한 활력을 갖는 protease나 amylase를 다량 분비하는 미생물로 제조되어야 할 것이다. 된장은 메주에 번식한 각종 세균과 곰팡이류의 α -amylase, β -amylase, protease 등의 효소작용에 의하여 제조되는 재래식과 순수한 균(*Aspergillus oryzae*)의 효소작용을 이용하여 제조되는 개량식이 있는데 이들의 차이는 재래식에서는 여러 종류의 미생물이 작용하는 것이고 개량식은 1~2종의 미생물을 이용하는 점이 다르다.

일본의 된장에 대한 연구는 많지만 우리나라의 된장에 대한 연구로는 된장의 품질에 대한 연구^{3) 4)}, 유지성분^{5) 6)}, 향기성분^{10) 11)}, 대두가공의 조직변화에 대한 연

Corresponding author: Jung-suk Park, Department of Food & Nutrition, Chosun University, 375 Seo Seok-Dong, Dong-gu, Kwangju 501-759, Korea

구⁽¹¹⁵⁾가 있을 뿐이다.

이에 본 연구는 품질이 좋은 된장을 제조하기 위한 연구의 일환으로 재래식과 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus natto*를 혼합한 된장을 제조해서 된장의 미생물 발효에 따른 대두 조직의 미세구조와 그것의 상태변화를 보기 위하여 기본 세포구조, 단백질, 다당류, 미생물산재 정도를 조직화학적으로 검토하였기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험 재료

원료 대두는 1990년도 미국에서 수입된 대두(soy bean, Yellow No.1)이며 소맥분은 시판용 중력분이고 식염은 순도 97%인 정제염이다. 균주는 *Aspergillus oryzae* ATCC 22788과 *Bacillus natto* IFO 3013을 한국생물학회로부터 분양받아 사용하였다.

제국

김⁽¹⁶⁾의 방법에 의하여 쌀 3kg을 수세, 찹지, 증자한 후 *Aspergillus oryzae*를 접종하여 48시간 제국하고 3배량의 물을 넣어 60°C에서 6시간 당화한 후 여과하여 얻은 여액(Brix, 24)을 Brix, 10으로 조절한 koji extract에 *Aspergillus oryzae*를 접종한 후 48시간 배양하여 이를 종균으로 사용하였다.

Bacillus natto IFO 3013균을 계대하여 종균으로 사용하였으며 100°C에서 1시간 가열, 침출시킨 여액에 glucose 5%, yeast extract 0.25%, soybean percolate 0.5%를 첨가하여 제조하였으며 배양조건은 37°C에서 24시간, 통기방법은 reciprocal stroke water bath shaker(45 Recip./min.), pH 7.3으로 조절하여 종균 배양배지로 사용하여 24시간 배양후 전배양 용액으로 하였다⁽¹⁷⁾. 대두 5kg을 수세하여 30l의 물을 가해 20°C의 실온에서 12시간 방치한 다음 찹지 대두를 1.2 kg/cm²에서 50분간 증자한 후 증자대두를 30°C로 냉각시켜서 1/2을 파쇄하고 1/2은 파쇄하지 않은 상태로 이들을 혼합하여 1kg 메주로 제조해서 3일간 1/2 정도 건조시킨 뒤 볏짚에 매달아 2개월간 자연 발효시켰다.

소맥분 원료에 25%의 물을 첨가하여 혼합하고 stainless steel 세장자에 닭아 스팀증자기에서 1.2 kg/cm²로 30분 증자한 후 냉각하고 여기에 종균을 0.5% 접종하여 30°C 항온실에서 48시간 배양한 후 남금용세균으로 사용하였으며 Natto는 증자 대두를 30°C로 냉각한 후 파쇄하지 않은 상태로 전배양 용액을 접종하여 37°C 항온실에서 48시간 배양하여 사용하였다.

재래식 및 개량식 된장 제조

재래식 메주를 사용하였으며 소금을 첨가하여 염농도가 10% 되도록 조절하였고 수분함량은 50% 되도록 조절하였다. Koji와 Natto 전배양 용액은 1:1로 접종하여

시험구에 소금을 첨가하여 염농도가 10% 되도록 조절하였고 수분함량은 50% 되도록 조절하였다. 각각의 된장은 70% ethanol로 소독한 15l 용기에 넣어 실온에서 40일간 숙성시키면서 10일 간격으로 시료를 채취하였다.

Preparad 제작 및 염색

공시원료를 2~3개씩 한 묶음으로 하여 10% buffered neutral formalin(특급 KANTO CHEMICAL) 용액으로 고정시켰다⁽¹⁷⁾. 고정이 끝난 시료를 butanol에서 탈수한 후 paraffin embedding한 것을 slide microtome에서 6 μm로 microtoming한 후 deparaffin하여 염색하고 canada balsam으로 봉입하여 영구표본으로 제작하였다⁽¹⁷⁾.

일반조직은 Hematoxylin Eosin 염색⁽¹⁷⁾, 다당류는 Alcian blue-PAS⁽¹⁷⁾ 염색, Gram 양성세균은 GMS법⁽¹⁷⁾으로 염색하였다. 염색시약은 E. Merck 제품을 사용하였다.

된장숙성 중의 미생물 효소에 의한 조직변화를 위와 같이 조작하여 세포벽, 세포질, Gram 양성세균을 횡단면 별로 현미경 관찰하여 조직 촬영을 실시하였다. Hematoxylin Eosin 염색에서 핵은 검푸른 색, 세포질은 연분홍-적색으로 염색되며 Alcian blue-PAS 염색에서 Glycogen은 적색, 핵은 청색을 나타내며 GMS 법에서 균은 흑색으로 염색이 된다.

결과 및 고찰

침지 대두

종피를 제거한 대두립의 유세포는 사각형의 약간 가늘고 긴 세포가 존재하며(Plate 1) 내부쪽으로 가면 영양분의 통로인 유관속(vascular bundle)이 발달하여 산재하고 이 주위는 둥글거나 부정형의 세포가 많이 존재하며 이러한 세포 중에는 영양물질이 소실된 공포도 많이 보이고 또한 개개의 세포는 세포막으로 둘러 쌓여 있으며 동물의 조직과는 달리 두껍게 세포막이 발달되었다(Plate 2). 이 내부의 세포질에는 김계 염색된 핵이 소량 존재하며 특히 세포막과 표피조직에 산재되어 있고 소량의 단백질 단백질 주변에 산재해 있다(Plate 3). 이것은 紫崎⁽¹⁸⁾에 의하면 미숙 대두에서 많이 보이다가 성숙함에 따라 감소된다고 하였다. 또한 세포내에서는 작은 것도 있지만 약하게 염색된 커다란 구상체(3~8 μm)로 중단되어 있으며 다당류도 함께 인정되었다. 이러한 구상체는 단백질이 주성분이며 자연 주변부의 유세포 내부에는 강하게 염색된 단백질이 중단되었다. 공포는 수용성 단백질 물에 용해되었거나 또는 조직 절편 제조시 내용물이 탈락된 것으로 보인다⁽¹⁸⁾.

증자대두의 미세구조

증자대두는 침지대두에 비해서 세포막이 팽화되는 현상을 보이며 전분은 감소하고 가열 및 가열에 의한 열면성에 의하여 세포질은 원형질 분리현상(plasmolysis)이 현시하며 2~3개의 유세포 내용이 융합한 것으로

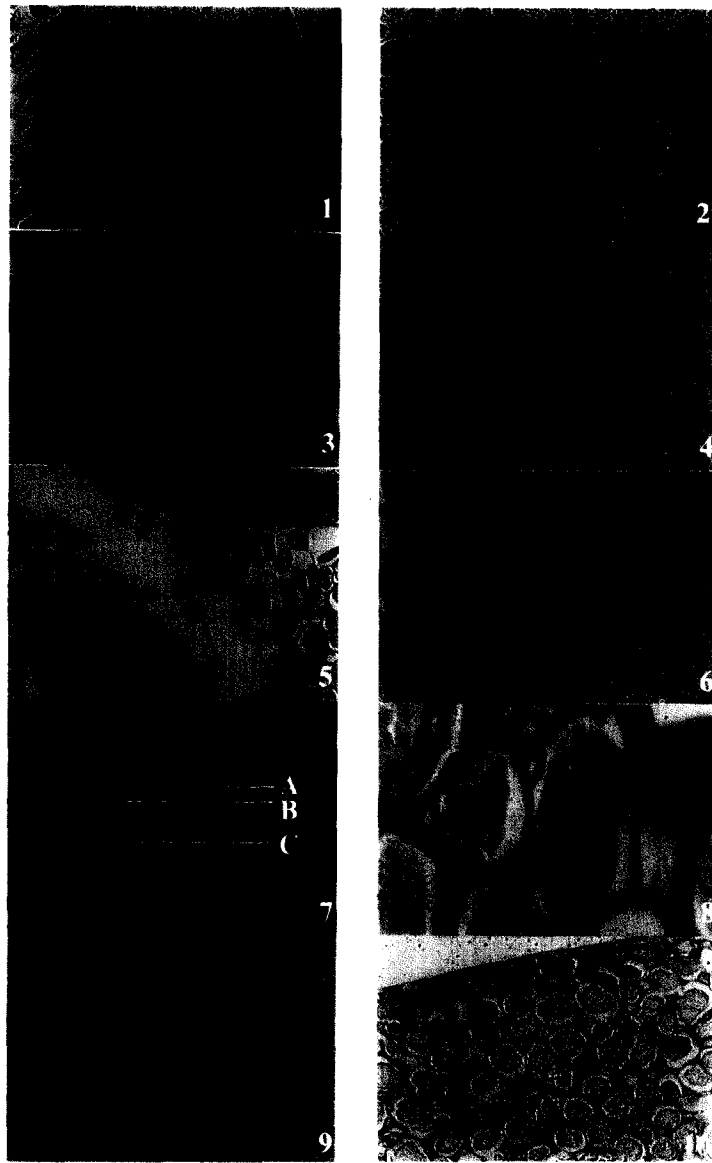


Fig. 1. Photographs of cotyledon cells of samples

Plate 1. Cotyledon cells and parenchyma cells of the soaked soybean (H.E. stain, 150X)

Plate 2. Cotyledon cells and parenchyma cells of the soaked soybean (H.E. stain, 150X)

Plate 3. Cotyledon cells and parenchyma cells of the soaked soybean (A1-PAS stain, 600X)

Plate 4. Cotyledon cells of the autoclaved soybean (H.E. stain, 150X)

Plate 5. Cotyledon cells of meju soybean (A1-PAS stain, 150X)

Plate 6. Cotyledon cells of 40 days fermented traditional *doenjang* soybean (A1-PAS stain, 600X)

Plate 7. Cotyledon cells of 40 days fermented *Aspergillus oryzae* and *Bacillus natto* *doenjang* soybean (A1-PAS stain, 600X)

A; cell wall, B; glycogen, C; starch

Plate 8. Cotyledon cells of 30 days fermented *Aspergillus oryzae* and *Bacillus natto* *doenjang* soybean (A1-PAS stain, 600X)

Plate 9. Cotyledon cells of meju soybean (GMS stain, 150X)

Plate 10. Cotyledon cells of 40 days fermented *Aspergillus oryzae* and *Bacillus natto* *doenjang* soybean (GMS stain, 150X)

여겨지고 단백질 구상체와 전분은 증가하면 전분은 α 화하여 단백질구상체를 둘러싸고 균등한 다당류로 이루어지며 또한 핵의 공포화(vacuolisation)가 나타난다. 또한 내부에 산재하는 유관속을 보면 영양물질의 통도조직인 작은 사관조직(sieve tissue)이 모여 있으며 내부에는 다량의 다당류가 함유되어 있다(Plate 4).

발효 대두의 미세구조

발효대두의 조직구조는 이미 증가에 의해서 어느 정도 영향을 받았으며 또 미생물이 생산하는 효소로 인하여 어느 정도 분해를 받았는지 검정하였다. 메주나 된장으로 발효시킨 대두는 그 염색성이 침지나 증자대두에 비해 현저하게 나빠지는 것을 볼 수 있다. 이것은 윤 등⁽¹⁾의 실험에서도 같은 현상을 나타냈었다. 메주는 표피 바로 아래부분의 발효, 건조에 따른 세포변형, 세포벽이 파괴되고 원형질 분리가 일어나며 건조에 의해서 공간이 형성되는 것을 볼 수 있었다(Plate 5). 발효시간의 경과에 따른 된장의 유세포의 형태를 관찰한 결과 미생물이 생산하는 효소의 공격을 받아 세포벽이 다각형으로 변하여지고 계속 발효시간이 경과하면 서서히 세포벽이 붕괴되어 plasmoptysis(세포질이 세포막으로 배출됨) 현상이 일어나는데 이것은 숙성이 되어서 대두 조직의 유연성이 높아지는 것을 의미하며 재래식 된장보다는 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus natto* 혼합 된장이 현저하였으며 세포질의 당 단백질구상체도 protease에 의한 용해에 의하여 대형의 것이 1~2개 출현하는데 재래식(Plate 6) 보다는 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus natto* 혼합 된장에서 더 잘 나타났다(Plate 7). 또한 원형질 분리 현상은 표피부와 내측부의 차이가 현저하다. 이것은 미생물에 의한 발효가 표피부에서 시간이 경과함에 따라 점차 내부로 이행되는 것으로 사료되며 단백질구상체의 파괴현상과 amylase에 의해서 전분이 분해되어 작은 공포가 보이며(Plate 7) 세포막이 붕괴되거나 ghost 상태의 느낌도 나타나 보인다(Plate 8).

표피부와 유세포에 번식된 세균의 침투과정은 메주에 균침투에 의해서 세포사이에 균침투 과정이 나타나며(Plate 9) 시간이 경과함에 따라 표피부에서 내부로 이행되어지며 40일째 발효 된장에서는 재래식보다 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus natto* 혼합 된장이 효소의 공격을 더 많이 받아서 세포의 유연성이 높았으며 또한 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus natto* 혼합 된장에서는 표피부와 유세포에 점질물이 보인다(Plate 10). 이러한 결과는 윤⁽¹⁾ 등에 의한 청국장 발효의 실험결과와도 유사함을 보였다. 된장의 발효기간에 따른 대두조직의 구조변화로 봐서 발효가 진행될수록 대두의 세포벽이 터져서 세포질이 바깥으로 빠져나온 현상은 재래식 보다는 개량식으로 만든 된장이 더 빨리 진행되었음을 사진을 통해서 관찰할 수 있었으며 이는 가용성 질소 화합물의 증가와 함께 소화율이 높아지는 것으로 사료된다. 이러한 관계를 다음 실험에서 계속 실험 중이다.

요 약

품질이 좋은 된장을 제조하기 위한 연구의 일환으로 재래식 된장과 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus natto*를 혼합한 된장을 제조해서 발효기간에 따른 대두조직의 변화를 조사한 결과 가압, 가열처리에 의하여 세포벽이 붕괴되거나 ghost 상태를 보였고 표피부와 내부의 세포질은 원형질 분리가 현저한 차이가 있으며 protease에 의한 당단백 구상체의 용해와 amylase에 의하여 전분이 분해되어 작은 공포를 보였으며 발효에 의한 균침투 과정이 시일이 경과함에 따라 표피부에서 내부로 이행되어지며 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus natto* 혼합 된장의 표피부와 유세포에서 점질물이 보인다. 또한 발효시간이 경과함에 따라 염색성이 나빠지고 세포벽이 다각형으로 되는데 재래식 보다는 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus natto* 혼합구가 현저하였다.

문 헌

1. 이상건, 윤정의, 이수환: 청국장 발효기간에 따른 조직학적 변화에 관한 연구. 서울보건전문대학 논문집 11, 13(1991)
2. 김미정, 이혜수: 된장 숙성중 정미성분의 변화에 관한 연구(I). 한국조리과학회지, 6, 1(1990)
3. 박성오, 이택수: 제국원료와 양이 된장 품질에 미치는 영향. 서울여자대학 논문집, 14, 437(1985)
4. 안호선, 이택수: 메주균을 달리한 재래식 형태의 메주가 된장의 품질에 미치는 영향. 서울여대 농발연총, 12, 99(1987)
5. 서정숙, 한은미, 이택수: *Bacillus*속과 *Aspergillus oryzae*로 만든 메주가 개량식 된장의 성분과 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 15, 1(1986)
6. 이숙희: 개량식 콩된장 발효중 지질성분의 변화에 관한 연구. 동국대학교 대학원 박사학위논문(1979)
7. 이숙희, 최홍식, 김창재: 된장 발효중 콩 koji 제조과정에 있어서 지질성분의 변화에 관한 연구. 한국식품과학회지, 11, 375(1982)
8. 이명호: 된장의 숙성중 지질성분의 변화. 고려대학교 식량개발 대학원 석사학위논문(1984)
9. 이숙희, 최홍식: 한국 장류식품의 지질성분에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 14, 67(1985)
10. 신순영, 김영배, 유태종: *Bacillus licheniformis*와 *Saccharomyces rouxii* 첨가에 의한 된장의 풍미 향상. 한국식품과학회지, 17, 8(1985)
11. 김수택, 김종규: 개스르모마토그래피 패턴과 관능검사 성적을 이용한 한국 재래식 된장 향기의 주성분 분석. 경상대 논문집, 23, 87(1984)
12. 박성오, 이택수: 효모첨가에 의한 재래식 된장의 향기 개선에 관한 연구. 서울여자대학 논문집, 12, 329(1983)
13. 양성호: 한국 재래식 된장의 향기의 최적화와 *Bacillus brevis*에 의한 된장 발효. 영남대학교 대학원 박사학위논문(1985)
14. 현인환: 한국 재래식 된장의 향기를 생성하는 균 및 그 변이주를 이용한 된장 제조. 영남대학교 대학원 박사학위논문(1985)
15. 윤정의: 대두가공에 따른 조직화학적 변화에 관한 연구

서울보건전문대학 논문집, 6, 43(1986)

16. 김동현 : 된장 Koji 및 그 혼합에 따른 된장 숙성과정
중의 화학성분 변화. 건국대학교 농축개발대학원 석사
학위논문(1992)

17. 오근영 : 조직병리학 실기. 대학서림, p.31, 33, 90, 174,

214(1991)

18. 紫崎 一雄, 淺野三夫 : 日本食品工業. 8, 下(1967)

(1992년 8월 8일 접수)