

Bacillus속 세균 4종을 이용한 콩알메주 Model System의 발효특성

김동호 · 임대원 · 배석* · 전순배*
(주)풀무원, *전남대학교 미생물학과

Fermentation Characteristics of Whole Soybean Meju Model System Inoculated with 4 *Bacillus* Strains

Dong-Ho Kim, Dae-Won Lim, Suk Bai* and Soon-Bai Chun*

Pulmuone Co., Ltd.

*Department of Microbiology, Chonnam National University

Abstract

Whole soybean meju was fermented with four *Bacillus* strains for 45 hr in its model system. The pH range of the product was 7.98~8.68, the contents of amino nitrogen and ammoniacal nitrogen were 286~439 mg%, 0.11~0.23%, respectively and that of reducing sugar ranged 0.65~2.24%. During fermentation, the enzyme activities increased up to 30~40 hr of fermentation and slightly decreased after 45 hr. Stachyose was special sugar components for *B. licheniformis* and raffinose was for *B. natto*. The components of the organic acid showed distinctive patterns among four products and the patterns of amino acids and fatty acids were almost similar to those of other reports. The main and common odor concentrates of meju were pyrazine components, 3-methyl-1-butanol, acetic acid and ethanol. Chunggukjang, mixed with *B. natto* and *B. licheniformis* showed more acceptabilities than other combinations. Soybean paste, mixed with *B. megaterium* and *B. subtilis*, soy-sauce, mixed with *B. megaterium* and *A. oryzae* showed excellent acceptability, respectively.

Key words: *Bacillus*, meju, chunggukjang, model system.

서 론

간장, 된장, 청국장 등의 대두발효식품은 우리나라의 전통발효식품으로 식문화적 관점에서 뿐 아니라 영양학적으로 매우 우수한 식품으로 인정되고 있다. 대두를 원료로 한 우리나라 장류의 제조기원은 삼국시대 이전으로 추정될 만큼 긴 역사를 가지고 있으며 1970년대까지만 해도 대부분의 장류는 각 가정에서의 자가 제조로 충당되어졌다. 그러나 산업화, 도시화, 핵가족화가 진행되면서 현재 우리나라 장류 총수요량의 50% 이상이 공장제조 장류로 공급되고 있으며⁽¹⁾ 향후 몇 년 안에 대부분의 장류가 산업화된 대량생산 체제의 소위 일본식 개량장류로 대체될 것으로 보여진다. 그러나 개량장류의 제조공정은 사용균주, 원료의 구성 등에 있어 전통장류와 다른 점이 많으며 그에 따라 제품의 맛, 영양학적 특성도 다르다. 일본식 장류공정

을 정형화한 개량장류의 제조에는 상당량의 탈지대두와 전분질 원료가 첨가되며 메주의 제조에도 *Aspergillus oryzae*나 *Aspergillus sojae*를 중심으로 한 1~2종의 곰팡이 균을 사용하는 것이 일반적이다. 이에 비하여 전통장류는 대두만을 사용하는 것이 일반적이며 메주의 발효에도 자연에서 유래한 수십 종의 곰팡이와 세균이 복합적으로 작용한다고 알려져 있다. 따라서 영양학적인 측면 뿐 아니라 항암효과 등의 임상효과가 일본식장류보다 우수하다고 알려져⁽²⁾ 우리의 전통장류를 과학화하고 산업화 시키기 위해서는 전통 메주의 다양한 미생물들을 산업화가 가능한 모델 시스템에 적용하는 연구가 진행되어야 한다. 그러나 지금까지 발표된 메주미생물의 연구는 전통메주균주를 자연 상태에서 분리하고 이들의 생화학적 특성을 검토하거나 실험 조건에서의 장류제조로 관능을 평가한 결과를 제시하는 것⁽³⁻⁵⁾이 일반적이었다. 또한 메주균주를 산업화된 생산공정에 적용하는 연구도 일본식 장류의 제조균주인 *Aspergillus oryzae*⁽⁶⁻⁸⁾나 *Aspergillus sojae*⁽⁹⁾, *Bacillus natto*^(9,10) 등을 이용한 연구가 주를 이루

Corresponding author: Dong-Ho Kim, R & D Team, Pulmuone Co., Ltd., 457-13 Gwangduk-ri, Doan-myun, Keisan-gun, Chungbuk 367-810, Korea

있고 우리나라의 전통메주에서 분리한 균주를 이용하여 산업화된 모델을 제시한 연구는 찾아보기 어려웠다. 따라서 본 연구에서는 우리나라의 전통장류를 산업화하기 위하여 공장식 대량생산체제의 콩알메주 model system을 적용하기로 하고 전통메주의 제조공정에 관여하는 다양한 미생물들 중 1차적으로 메주 발효과정에서의 출현빈도가 높고 전통장류의 독특한 맛에 관여한다고 알려진 *Bacillus*속 세균류 4종⁽¹⁾을 이용하여 메주를 제조한 다음 이 메주로 된장, 간장 또는 청국장을 생산하여 전통장류의 산업화에 따른 콩알메주 model system의 적용 예를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

지금까지 보고된 메주발효 *Bacillus*속 세균 중 출현 빈도가 비교적 높고 메주발효의 유용균주로 알려진 *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. natto*, *B. subtilis* 4종의 균주를 선발하고⁽¹⁾ 이를 한국중균협회로부터 분양 받아 실험균주로 사용하였다. 실험균주는 soy-tone broth (Difco, 5%)에 배양한 후 그 배양액을 실험에 사용하였으며 균주의 보관은 glycerol stock 배지에 접종하여 냉동 보관하였다.

메주의 제조

원료 대두는 1996년에 수확된 강원도산 백태를 사용하였으며 메주의 형태는 완전립의 콩알메주로 하였다. 실험용 콩알메주는 대두를 20°C의 물에 10시간 동안 침지하여 건조된 후 수증기압 1.2 kg/cm²의 NK증자기에 20분간 증자한 다음 100×100×30 cm의 실험용 메주발효조에 50 kg의 대두를 넣고 stationary phase까지 배양한 종균을 직접 대두량의 0.1%되게 접종하여 제조하였다. 메주제조 중 발효실의 온도는 40°C±1°C로, 습도는 상대습도 90%이상으로 관리하였으며 메주발효 시간은 2일국을 기준으로 45시간까지 진행하였다.

장류의 제조

위의 콩알 메주를 이용하여 청국장,된장,간장을 제조하였다. 청국장은 단일균주, 또는 몇 가지로 조합된 콩알메주에 정제염과 다진 마늘을 혼합하고 ribbon mixer에 30분 교반하여 제조 하였다. 된장은 콩알메주에 제국소맥분, 증자대두, 정제염, 정제수를 혼합하여 조분쇄한 다음 30°C의 숙성실에서 50일간 숙성한 것을 실험제품으로 하였다. 간장은 콩알메주를 수분

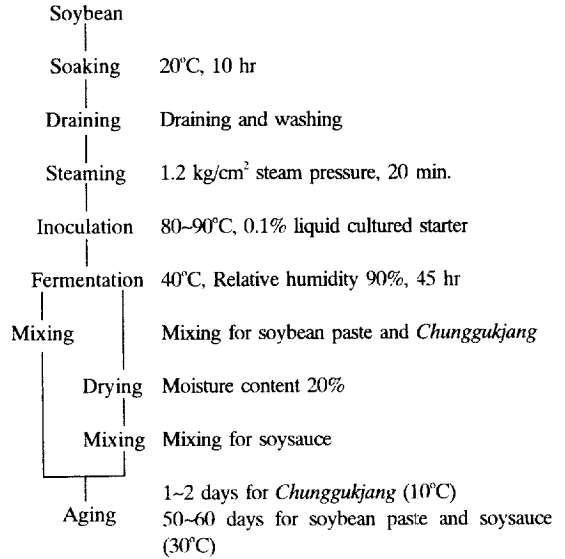


Fig. 1. Procedure of whole soybean meju fermentation model system.

20%정도로 건조한 후 메주:정제염:물을 약 1:1:4의 비율로 혼합하여 30°C의 숙성실에서 50일간 숙성하고 상등액을 분리하여 100°C에서 30분간 달인 후 ultrafiltration (Sunkyoung, M.W. cut-off 100,000 kDa) 하였다. 된장과 청국장은 각 실험구별로 10 kg씩을 제조하였으며 간장은 20 kg을 담구어 여과공정을 거친 10 kg을 실험제품으로 하였다. 콩알메주와 이를 이용한 장류제품 제조의 모식도를 Fig. 1에 나타내었다.

관능검사

청국장, 된장, 간장 시제품의 관능검사는 20인의 주부 panel을 대상으로 하여 5점평점법으로 실시하였으며 결과는 분산분석으로 처리하여 유의성을 검증하였다. 제품의 조리는 된장과 청국장은 찌개로, 간장은 미역국으로 하였다.

효소활성 측정

효소활성 측정을 위한 조효소액은 메주 10 g을 막자사발에 갈아 mass flask에 담은 후 증류수를 100 mL까지 채워 30분간 교반하고 냉장상태에서 2시간 정지한 다음 10분간 원심분리 (12,000×g, 4°C)하여 그 상등액을 조효소로 하였다.

Amylase활성은 α-amylase, β-amylase, glucoamylase의 amylase 효소군에 의하여 생성된 총 환원당의 정량 분석을 통하여 측정하였다. 효소활성의 측정은 1% soluble starch 용액(in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5)

0.9 mL에 적량 희석한 0.1 mL의 조효소액을 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 생성된 총 환원당량을 변형된 Somogyi법⁽¹²⁾으로 측정하였다. 환원당의 표준곡선은 glucose를 이용하여 계산하였으며 효소의 1 unit는 1분당 1 μ mole의 환원당을 유리시키는 효소의 양으로 하였다.

Protease활성의 측정은 0.5% casein 용액(50 mM phosphate buffer, pH 7.5) 0.9 mL에 적량 희석한 0.1 mL의 조효소액을 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 생성된 tyrosine량을 Folin's법⁽¹³⁾으로 측정하였다. 효소의 1 unit는 1분당 1 μ mole의 tyrosine을 유리시키는 효소의 양으로 하였다.

Lipase활성의 측정은 10% 대두유 용액(50 mM phosphate buffer, pH 7.5, Tween20 0.01%, calcium chloride 1 mM, sodium chloride 5 mM) 0.9 mL에 0.1 mL의 조효소액을 첨가하여 30°C에서 60분간 반응시킨 후 생성된 유리지방산량을 김 등⁽¹⁴⁾의 방법으로 정량하였다. 유리지방산의 표준곡선은 linoleic acid를 이용하여 계산하였으며 효소의 1 unit는 1분당 1 μ mole의 지방산을 유리시키는 효소의 양으로 하였다.

당류의 분석

조효소 시험액의 일부를 취하여 변형된 Somogyi법⁽¹²⁾으로 시험액의 총 환원당량을 측정하였다. 환원당의 표준곡선은 glucose를 이용하여 계산하였다. 환원당을 측정하고 남은 여액 10 mL를 hexane과 benzene으로 1회씩 세척하여 유리당측정용 시험액을 제조하였다. 제조된 시험액을 membrane filter (0.45 μ m)에 여과한 다음 10 μ L를 HPLC (Waters RI)에 injection하여 유리당의 성분별 분석을 실시하였다. 기기분석 조건은 column은 sugar Pak (0.4 mm \times 30 cm), detector는 RI, mobile phase는 증류수, flow rate는 0.6 mL/min, column 온도는 80°C이었다.

유기산의 분석

조효소 시험액의 일부를 취한 후 김 등⁽¹⁵⁾의 방법을 적용하여 HPLC (Waters 994)로 유기산을 분석하였다. 기기분석 조건은 column은 Cap cell Pak C18, detector는 UV 214 nm, mobile phase는 0.2% phosphoric acid, flow rate는 1,000 psi에서 0.6 mL/min 이었다.

질소성분의 분석

질소성분의 분석은 일반식품 시험법⁽¹⁵⁾에 따라 실시하였다. 분말화한 메주 1g을 칭량하여 micro-kjeldahl 법으로 조단백을 측정하고 이를 총질소량으로 하였다.

며 조효소시험액의 일부를 formol titration법으로 정량하여 암모니아태 질소를 뺀 값을 아미노태질소로 계산하였다⁽¹⁵⁾. 아미노태질소를 측정하고 남은 여액을 hexane과 benzene으로 1회씩 세척하여 유리아미노산 측정용 시험액을 제조하였다. 제조된 시험액을 membrane filter (0.45 μ m)에 여과한 다음 10 μ L를 취한 후 PICOTAG System을 이용한 PITC (Phenyl isothiocyanate)아미노산 유도체화 분석법으로 아미노산의 성분별 정량분석을 하였다.

지질의 분석

Privett 등⁽¹⁶⁾의 방법에 따라 건조분말시료 10 g에 200 mL의 지질추출 용매(chloroform:methanol=1:1, v/v)를 부어 3시간씩 3회 반복 추출한 다음 감압농축하여 얻어진 것을 총 지질로 하였으며 유리지방산은 Lee 등^(17,18)의 방법에 따라 GC로 정량분석하였다.

향기성분 분석

GC/MSD (HP GC/MSD)로 메주의 향기성분을 분석하였다. 시료 2 g을 분쇄하여 head space vial에 넣고 증류수 10 mL를 첨가한 다음 Head space autosampler가 연결된 GC/MSD에서 HP-FFAP column으로 분획한 후 Willey library로 검정하였다.

결과 및 고찰

일반성분 및 효소활성

실험균주 4종을 접종하여 발효시킨 콩알메주의 외관 및 향의 관찰결과는 Table 1과 같다. *B. megaterium* 구간은 암모니아취가 약하고 덩어리 형태 진통메주의 중심부에서 나는 약간의 시큼한 향을 느낄 수 있었으며 다른 구간은 청국장 제조시에 발생하는 암모니아취가 강하게 느껴졌다. 메주발효 기간 중의 pH, 수분 및 일반성분의 변화는 Table 2와 같다. 메주발효 기간 중 pH는 발효초기 6.36~6.57의 범위에서 지속적으로 상승하여 *B. licheniformis*는 8.68까지, *B. subtilis*는 7.98까지 상승하였고 수분의 경우는 증자후 60%에서 발효후기에 이르러 55.4~57.1%의 수준을 유지하였다. 아미노태질소는 발효 20시간대부터 증가하여 발효후기에 이르러 BS, BN, BL, BM 실험구의 순으로 각각 439, 331, 295, 286 mg%의 결과를 보였으며 암모니아태질소는 발효 30시간대부터 증가하여 BM실험구에서 0.11%로 가장 낮은 수치를 보였고 다른 실험구는 0.17~0.23%의 수준을 보였다. 총 환원당은 발효 30시간대에 증가하였다가 발효후기에 다시

Table 1. Observation of whole soybean meju inoculated with 4 *Bacillus* strains

Strain	Colour	Odor	Microbiol growth
BL	light brown, no glossy	high ammonia odor, foul smelling from 40 hr	uniformly coating over the soybean grain
BM	cooking soybean color, glossy	low ammonia odor, acidic smelling	colony-like growth, about 1 mm diameter.
BN	dark red-brown, white-flabby coating after 40 hr	some ammonia odor, pleasant odor	uniformly coating over the soybean grain, mucus formation from 30 hr
BS	gray-brown, white spot after 40 hr	some ammonia odor, pleasant odor	uniformly coating over the soybean grain, some wrinkles over the soybean grain

BL: *Bacillus licheniformis*.BM: *Bacillus megaterium*.BN: *Bacillus natto*.BS: *Bacillus subtilis*.**Table 2. Changes in pH, moisture, amino nitrogen, ammoniacal nitrogen, reducing sugar and free fatty acid during the fermentation of *Bacillus* inoculating whole soybean meju**

	Group	fermentation time (hr)						
		10	20	25	30	35	40	45
pH	BL	6.48	7.02	7.26	7.84	8.20	8.55	8.68
	BM	6.36	7.22	7.31	7.59	7.87	8.05	8.00
	BN	6.57	7.03	7.15	7.33	7.68	7.94	8.21
	BS	6.42	6.83	7.29	7.46	7.51	7.78	7.98
Moisture (%)	BL	58.2	57.6	57.8	56.6	56.7	55.9	55.4
	BM	59.3	59.5	58.4	58.1	58.2	57.4	57.1
	BN	58.6	58.2	58.3	57.4	57.5	56.6	56.5
	BS	58.8	58.4	57.3	57.7	57.3	56.2	55.8
Amino nitrogen (mg%)	BL	51	48	69	121	208	264	295
	BM	47	63	79	95	175	250	286
	BN	88	85	92	143	212	298	331
	BS	75	77	86	138	263	371	439
Ammoniacal nitrogen (%)	BL	0.01	0.01	0.02	0.04	0.06	0.12	0.18
	BM	0.00	0.01	0.01	0.02	0.03	0.09	0.11
	BN	0.02	0.02	0.03	0.03	0.12	0.17	0.23
	BS	0.01	0.01	0.02	0.05	0.08	0.13	0.17
Reducing sugar (%)	BL	0.06	0.08	0.22	0.84	1.23	0.57	0.65
	BM	0.08	0.14	0.47	0.92	1.12	1.37	1.08
	BN	0.08	0.35	1.23	2.87	2.02	2.42	1.32
	BS	0.04	0.06	0.24	0.36	1.48	2.36	2.24
Free fatty acid (%)	BL	0.15	0.17	0.14	0.20	0.35	0.40	0.42
	BM	0.17	0.14	0.15	0.22	0.25	0.37	0.33
	BN	0.18	0.18	0.24	0.39	0.78	0.95	1.10
	BS	0.11	0.08	0.13	0.19	0.15	0.26	0.35

감소하는 양상이었고 유리지방산은 발효기간 중 완만하게 증가하였다. 조효소의 효소활성은 amylase와 lipase는 발효초기부터 지속적으로 상승하여 35~40시간대에 최대활성을 나타내다가 약간 감소하는 경향을 보였으며 protease는 메주발효 기간중 계속 증가하였다. 각 균주별로는 BS실험구의 조효소활성이 높아 amylase의 경우 대조군에 비하여 10~20배 정도 높은 효소활성을 보였고 protease에서도 1.5~3배의 효소활

성을 보였으며 lipase효소활성은 BN실험구가 높았고 BM실험구에서 현저하게 낮은 것으로 조사되었다 (Table 3). 한편, 메주발효 시간에 따른 일반성분과 효소활성의 변화는 *B. natto*와 *B. subtilis*도 청국장을 제조한 서와 이 등⁽⁵⁾, 이 등⁽¹⁹⁾의 연구 결과와 비슷한 양상이었으나 아미노태질소, 환원당, 지방산 등의 절대량은 보다 낮게 조사되었으며 *B. natto*만을 사용한 이 등⁽¹⁸⁾의 연구 결과와는 비슷하였다.

Table 3. Amylase, protease and lipase activities in the whole soybean meju filtrates during fermentation process

(Unit: IU)

	Group	fermentation time (hr)						
		10	20	25	30	35	40	45
Amylase	BL	0.24	0.35	0.47	0.74	0.72	0.59	0.62
	BM	0.21	0.78	0.85	0.61	0.93	0.88	0.82
	BN	0.32	0.28	0.35	0.47	0.54	0.57	0.36
	BS	0.36	2.48	6.41	7.25	9.62	7.45	8.51
Protease	BL	0.05	0.06	0.24	0.29	0.37	0.39	0.38
	BM	0.08	0.23	0.46	0.66	0.71	0.65	0.67
	BN	0.05	0.11	0.48	0.65	0.71	0.76	0.89
	BS	0.06	0.22	0.35	0.74	0.82	0.95	1.13
Lipase	BL	0.013	0.025	0.031	0.094	0.165	0.144	0.142
	BM	0.008	0.011	0.015	0.023	0.064	0.068	0.048
	BN	0.015	0.013	0.027	0.102	0.164	0.171	0.202
	BS	0.027	0.022	0.034	0.058	0.147	0.165	0.163

유리성분의 기기분석

메주발효 45시간대에 수용액상으로 유리된 당, 아미노산, 지방산 및 유기산의 조성을 조사하였다. 유리당의 조성에 있어 BL과 BM실험구에서는 특이적으로 stachyose의 함량이 높았고 BN실험구에서는 raffinose와 fructose가, BS실험구에서는 sucrose가 높게 나타났다(Table 4). 이 결과는 각 실험구에서 사용된 세균류의 stachyose나 raffinose 이용율이 낮아 메주발효계에 축적된 때문으로 보여지며 BN실험구에서 fructose가 높게 검출된 것은 fructose의 중합물이며 점질물의 구성 성분인 fructan의 생성과 관련이 있는 것으로 보여진다. 한편, 총환원당의 함량이 가장 높은 것으로 조사된 BS실험구의 당조성에서 단당류성 환원당이 검출되지 않은 것으로 보아 단당류성 환원당은 세균의 물질대사에 즉시 소비되고 α-amylase의 분해산물인 환원성다당류가 총환원당의 대부분을 이루는 것으로 해석된다. 본 model system에서의 당 조성은 natto의 제조과정에서 조사된 것⁽²⁰⁾과 유사하였으나 발효 후기의 당함량은 natto의 경우에 비하여 전반적으로 높은 수준이었다. 유리아미노산의 조성(Table 5)은 BL실험구에서의 Asn 함량이 다른 실험구의 1/10수준이었고 BM실험구의 Met함량은 10여배, ILeu함량은 1/10정도

로 차이를 보였고 다른 아미노산의 조성은 큰 차이가 없었다. 한편, 지미성분으로 알려진 Asp, Glu, Cys의 합은 BL과 BM실험구가 BN이나BS에 비하여 높았고

Table 5. Composition of amino acids in the whole soybean meju filtrates fermented for 45 hr (Unit: mg%)

Amino acid	BL	BM	BN	BS
Asp	87.9	107.0	102.1	111.1
Glu	221.0	181.2	140.1	118.1
Asn	38.0	430.4	486.2	688.3
Ser	17.4	22.7	15.0	14.9
His	72.1	65.6	66.5	82.1
Gly	30.9	57.8	49.9	50.8
Thr	15.0	21.1	19.8	24.2
Ala	19.8	37.5	30.9	31.3
Arg	30.9	57.8	64.9	104.8
Tyr	70.5	86.7	68.9	94.6
Cys	12.7	17.2	11.9	11.7
Val	66.5	96.1	87.9	116.5
Met	15.0	241.3	19.0	26.6
Phe	21.4	39.1	30.9	38.3
ILE	133.1	21.9	191.6	255.8
Leu	107.7	193.7	163.1	178.3
Lys	110.9	129.7	109.3	136.1
Pro	26.9	46.1	66.5	46.9
Total	1097.7	1852.9	1724.5	2130.4

Table 4. Composition of sugars in the whole soybean meju filtrates fermented for 45 hr (Unit: %)

Sugars	BL	BM	BN	BS
Stachyose	3.751	5.124	-	0.152
Raffinose	0.041	0.608	3.486	-
Sucrose	0.054	0.889	0.900	1.295
Glucose	0.011	0.264	-	-
Fructose	0.009	0.171	0.204	-
Total	3.866	7.056	4.590	1.447

Table 6. Composition of free fatty acids in the whole soybean meju filtrates fermented for 45 hr

(Unit: peak area %)

Fatty acids	BL	BM	BN	BS
C16:0	10.5	10.6	11.2	8.9
C18:0	4.8	3.4	3.4	3.1
C18:1	19.6	20.2	20.5	21.0
C18:2	58.8	59.6	58.0	60.7
C18:3	6.3	6.2	6.9	6.3

Table 7. Composition of organic acids in the whole soybean meju filtrates fermented for 45 hr (Unit : mg%)

	BL	BM	BN	BS
Tartaric acid	65.2	176.5	69.4	82.4
Malic acid	79.6	346.2	33.7	49.7
Acetic acid	40.1	87.1	50.9	81.3
Lactic acid	46.3	129.2	5.2	100.1
Citric acid	13.7	20.7	10.8	22.7
Succinic acid	54.0	63.3	47.1	60.5
Total	298.9	823	217.1	396.7

BM실험구는 단맛 성분의 함은 높고 쓴맛 성분의 함은 낮게 조사되었다. 유리지방산의 조성(Table 6)은 원료대두의 지방산 조성⁽¹⁾과 큰 차이가 없이 linoleic acid가 50% 이상으로 조사되어 이미 보고된 실험결과^(9,17,18)와 비슷하였으며 *B. natto*를 이용한 청국장 발효계에서 대두 triglyceride의 3~5%가 유리지방산으로 분해 되는 것으로 보고한 결과⁽¹⁸⁾와도 일치하였다. 유기산의 함량(Table 7)은 메주에서 신맛이 느껴진 BM 실험구에서 tartaric acid, malic acid, lactic acid 등의 함량이 전반적으로 높게 조사되었으며 BN실험구에서는 특이적으로 lactic acid가 다른 실험구에 비하여 상대적으로 낮게 검출되었다. 본 실험에서 검출된 유기산

의 총 함량은 Itohiki Natto의 결과⁽²⁰⁾보다 2~5배 높았고 natto에서 citric acid와 acetic acid를 분석한 김 등의 결과⁽⁹⁾와는 비슷한 양상이었으며 지방산의 조성에서는 natto에서 조사 되지 않은 tartaric acid와 malic acid가 33~176 mg%로 검출되었다.

향기성분

각 메주로부터 총 81종의 향기성분이 검출되었다 (Table 8). 각 실험구별로는 BL, BM, BN, BS 실험구의 순으로 30, 31, 29, 27종의 향기성분이 검출되었으며 이 중 2개 이상의 실험구에서 공통적으로 검출된 성분은 22종이었고 57종은 각 실험구의 특이한 성분이었으며 모든 실험구에서 검출된 향기성분은 ethanol, 3-methyl-1-butanol, trimethylpyrazine, tetramethylpyrazine, acetic acid의 5종이었다. 이 중 ethanol이 전체 향기성분 중 20%정도를 차지하였으나 BS실험구에서는 1.6%로 현저히 낮았으며 acetic acid는 BS실험구에서 12.3%로 매우 높았다. 청국장과 natto의 특이한 향기성분으로 알려진 pyrazine류 화합물은 di-, tri-, tetramethylpyrazine의 세가지가 검출되었는데 BL 실험구에서는 dimethylpyrazine이 검출되지 않은 반면 tetramethylpyrazine의 함량은 BN, BS실험구에 비하여

Table 8. Volatile compounds of whole soybean meju fermented for 45 hr inoculated with 4 Bacillus strains

Compounds	Peak area (%)			
	BL	BM	BN	BS
2-octanamine, N-(1-methylheptyl)-		1.58	0.12	
2-butanone	2.51	1.70		3.53
butanal, 3-methyl-		0.13		36.36
2-propanol		1.57	0.96	
ethanol	18.32	27.15	27.15	1.61
acetic acid ethenyl ester		0.62	1.15	
1-propanol		1.62	14.90	
oxazole, trimethyl-	2.68		1.40	
disulfide, dimethyl		0.13	1.28	1.23
1-butanol, 3-methyl-	0.45	0.81	1.80	0.59
heptanal			0.14	0.81
2-butanone, 3-hydroxy-3-methyl-	0.30	0.25		
propane, 1-methoxy-2-methyl			0.86	2.05
pyrazine, 2-5-dimethyl		0.30	0.54	1.51
formic acid, hexyl ester	0.41	0.40		1.47
1-hexanol		0.21	0.25	
ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl)	0.42	0.20		
silane, trimethyl-3-penten-2-yl, tra	0.25	4.16		
pyrazine, trimethyl-	1.48	0.66	2.54	3.31
acetic acid	1.89	0.94	3.98	12.31
pyrazine, tetramethyl-	8.29	0.67	4.32	3.93
benzaldehyde	0.27		0.21	1.72

Table 8. continued

Group B: Strain specific volatile compounds

Compounds	Peak area (%)			
	BL	BM	BN	BS
ethanol, 2-(ethenyloxy)-	0.62			
2-butanone, 3-methyl-2, 3-butanedione	4.56			
ethanol, 2-propoxy-	11.10			
dibenz(B, F)azepine	1.70			
butanal, 3-methyl-	0.95			
ethene, ethoxy-	0.06			
2-butanol	0.08			
pentadecylamine	4.26			
1-octanamine	0.22			
disilane, pentamethyl-	0.51			
2-hexenal	2.28			
styrene	0.17			
3-pentanol, 3-methyl-	0.25			
2-butanone, 3-hydroxy-	2.10			
2-methyl-2,3-butadienylaminum hydrog	4.06			
1-hexen-3-ol	0.25			
1H-indole-3-acetonitrile, 1-trimethyl	0.28			
acetic acid, ethyl ester	0.37			
propane, 2-(ethenyloxy)-		0.12		
1a, 9b-dihydrophenanthr[9,10-b]azirine		0.10		
6-methylphenathridine		1.33		
acridine, 9-methyl-		4.99		
silanol, 9-methyl-		0.20		
silanol, trimethyl-		0.25		
5-carboxy-2-tert-butoxythiophene		0.10		
bornylene		0.36		
butyric acid-2-D1		0.09		
1-heptanol		0.31		
trisulfide, dimethyl		0.06		
propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)ox		1.96		
hydrazine, 2-ethyl-1, 1-dimethyl-		0.31		
pentanal			1.00	
propane, 2-ethoxy-			0.80	
2-methylbenzo(f)quinoline			1.03	
acetic acid, cyano-			0.09	
2-pentanone, 3-methyl-			0.27	
butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester			0.25	
butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester			0.31	
2-octanone			0.15	
silane, (1-phenylethyl)trimethyl-			1.08	
2-butenic acid, 2-methyl-, ethyl ester			0.69	
2-methylene-1-(4-pentenyl)-1-trimethyl			0.34	
ammonium oxalate			0.41	
butanamide			0.43	
1-propene, 3-ethoxy-				7.10
2-pentanone				4.19
5-methoxy-1(Z), 3(Z), 6(E)-cycloctatrie				0.67
oxiranemethanol				1.02
3,6,9-trioxa-2,10-disilaundecane, 2,2				1.28
2-nonanoun				0.77
cyclohexanol				0.72
1H-pyrrole				0.85
dimethylamine-D1				0.52
ethane, isothiocyanato-				0.79
propanoic acid				0.40
2-furancarboxaldehyde, 5-methyl-				0.69
ethanol, 2-(ethenyloxy)-				0.71
2(3H)-furanone, dihydro-				0.66
unknown compounds	28.91	46.90	31.55	9.20

2배 이상으로 조사되었고 청국장 향이 비교적 약했던 BM실험구는 pyrazine류 화합물의 함계가 1.63%정도로 다른 실험구의 20%수준이었다. 한편, BL실험구에서는 2,3-butanedione (11.10%), 3-methyl-2-butanone (4.56%), 2-butanol (4.26%), 3-hydroxy-2-butanone (4.06%) 등 butane 계열의 화합물이 특이적으로 높게 검출되었으며 BM실험구에서는 6-methylphenathridine이 특이성분으로 나타났다. BN실험구는 butanoic acid와 butenic acid의 ethyl ester유도체가 특이성분으로 검출되었고 BS실험구에서는 propanoic acid가 34.33%로 특이적이면서도 매우 높은 함량을 보였으며 3-ethoxy-1-propene (7.10%)과 2-pentanone (4.19%)도 특이적으로 높게 검출된 향기성분이었다. 본 실험에서 검출된 각 실험구의 향기성분들은 30종 내외로, natto에서 63종의 향기성분을 검출한 김 등⁹⁾과 19종의 향기성분을 보고한 최와 지¹⁰⁾의 중간 정도였다. 각 향기성분의 조성에서는 pyrazine류와 3-methyl-1-butanol, benzaldehyde 등 청국장의 주요 향기성분으로 알려진 화합물이 공통적으로 검출되어 상동성이 있는 것으로 평가되었다. 한편, 김 등⁹⁾과 최와 지¹⁰⁾의 보고에서는 전체 향기성분 중 pyrazine류가 30% 정도로 높은 점유율을 보였으나 본 model system에서는 pyrazine류의 함이 10% 내외를 보여 청국장 향에 대한 다소의 거부감을 줄여 줄 수 있으리라 기대되었다.

관능검사

각 콩알메주와 마늘, 정제염을 90:4:6으로 혼합한 후 10°C에서 2일간 후숙하여 이를 청국장으로 하고 (Table 9) 이를 조리하여 관능평가를 실시하여 그 결과를 Table 10에 나타내었다. 각각의 콩알메주로 제조한 청국장에서는 BL실험구와 BN실험구에서 비교적 높은 선호도를 보였으며 BM, BS실험구는 맛과 향에서 낮은 평가를 받았다. 콩알메주를 조합하여 제조한 청국장에서는 BL과 BN실험구의 메주를 1:1로 혼합한 제품이 유의성 있게 높은 선호도를 보여 청국장의 제조에 *B. licheniformis*와 *B. natto*를 혼합하여 사용하는

Table 9. Specifications of chunggukjang (Unit: %)

	Sample No.							
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8
BL meju	90	-	-	-	45	-	-	25
BM meju	-	90	-	-	-	45	-	20
BN meju	-	-	90	-	45	45	45	25
BS meju	-	-	-	90	-	-	45	20
Galic	4	4	4	4	4	4	4	4
Salt	6	6	6	6	6	6	6	6

Table 10. Sensory evaluation of the chunggukjang

Group A: made with single species of whole soybean meju			
Sample	Taste	Flavor	Remarks
C-1	3.8	3.3	foul smelling, pleasant taste
C-2	2.9	3.4	acidic smelling and taste, light color
C-3	3.6	3.7	pleasant or greasy taste
C-4	3.4	3.1	foul smelling, slightly salty taste
Group B: made with 2-4 species of whole soybean meju			
Sample	Taste	Flavor	Remarks
C-5	4.1	3.8	most pleasant taste
C-6	3.8	3.4	pleasant teaste, slightly acidic smelling
C-7	3.3	3.1	foul smelling and taste
C-8	3.5	3.6	normal

공정이 효과적일 것으로 평가되었다.

개량장류의 제조에 일반적으로 사용하는 *A. oryzae*로 제조한 콩알메주와 본 실험에서 제조한 콩알메주, 증자대두, *A. oryzae*로 제조한 소맥분, 소금, 물을 Table 11의 배합비로 혼합한 후 30°C에서 60일간 숙성하여 이를 된장으로 하고 이를 조리하여 관능평가를 실시한 결과를 Table 10에 나타내었다. 각각의 콩알메주로 제조한 된장에서는 BM실험구에서 비교적 높은 선호도를 보였으며 BN실험구는 맛과 향에서 낮은 평가를 받았다. 콩알메주를 조합하여 제조한 된장에서는 BM과 BS실험구의 메주를 1:1로 혼합한 제품이 유의성 있게 높은 선호도를 보였고 우리나라의 전통된장에 가장 가까운 맛으로 평가되었다. 또한 *A. oryzae*를 첨가한 구간은 다른 구간에 비하여 약간의 단맛이 있고 보다 부드러운 맛을 내는 것으로 평가되었으며 BN실험구가 다량 첨가된 제품은 잔존하는 청국장 향과 미끈거리는 질감에 대하여 거부감을 갖는 것으로 조사되었는데 이같은 결과는 메주에 10% 정도의 natto를 첨가하여 된장을 제조하였을 때 양호한 관능평가를 얻었고 natto의 함량이 증가할수록 선호도가 낮아졌다고 보고한 주 등¹²⁾의 결과와 일치하였다. 이상의

Table 11. Specification of soybean paste (Unit: %)

	Sample No.							
	SP-1	SP-2	SP-3	SP-4	SP-5	SP-6	SP-7	SP-8
BL meju	10	-	-	-	-	10	-	-
BM meju	-	10	-	-	-	-	10	-
BN meju	-	-	10	-	-	10	-	-
BS meju	-	-	-	10	-	-	10	10
AO meju	-	-	-	-	10	-	-	10
Flour, fermented	20	20	20	20	20	12	12	12
Soybean, cooked	40	40	40	40	40	40	40	40
Salt	12	12	12	12	12	12	12	12
Water	18	18	18	18	18	16	16	16

Table 12. Sensory evaluation of soybean paste

Group A: made with single species of whole soybean meju			
Sample	Taste	Flavor	Remarks
SP-1	3.1	3.3	half-fermented taste
SP-2	3.4	3.6	pleasant taste and flavor
SP-3	3.1	2.8	<i>chunggukjang</i> taste and flavor
SP-4	3.3	3.2	a dark color
Group B: made with 2 species of whole soybean meju			
Sample	Taste	Flavor	Remarks
SP-6	3.2	3.1	slippery texture, <i>chunggukjang</i> taste
SP-7	3.9	3.8	pleasant taste and flavor for soybean paste, similar in Korean traditional taste
SP-8	3.4	3.6	sweetey taste, some foul smelling

결과로 미루어 된장의 제조에는 *B. megaterium*과 *B. subtilis*를 콩알메주 제조의 주균주로 하고 경우에 따라 *A. oryzae*로 제조한 메주를 적량 혼합하여 사용하는 공정이 효과적일 것으로 평가되었다.

*A. oryzae*로 제조한 콩알메주와 본 실험에서 제조한 콩알메주를 수분 20% 내외로 건조시키고 소금과 물을 Table 13의 배합비로 혼합한 후 60일간 숙성하여 그 여과액을 조신간장으로 하고 이를 조리하여 관능평가를 실시한 결과를 Table 14에 나타내었다. 각각의 콩알메주로 제조한 간장에서는 AO실험구에서 지미는 낮으나 향과 맛에서 보통 이상의 선호도를 보였을 뿐 세균 단독 실험구는 구린 향과 맛에 의하여 전반적으로 보통 이하의 낮은 평가를 받아 세균만으로 간장을 제조하여 좋은 결과를 얻었다고 한 주 등⁽²⁰⁾의 보고와는 상이한 결과를 나타내었다. 콩알메주를 조합하여 제조한 간장에서는 BM과 AO실험구의 메주를 1:1로 혼합한 제품이 유의성 있게 높은 선호도를 보였고 우리나라의 전통간장에 가장 가까운 맛으로 평가되었다. 이상의 결과로 미루어 간장용 메주의 제조에는 세균류보다는 곰팡이류의 역할이 훨씬 중요한 것으로 보여지며 *B. megaterium*과 *A. oryzae*를 콩알메주 제조

Table 13. Specification of soy sauce (Unit: %)

	Sample No.							
	SS-1	SS-2	SS-3	SS-4	SS-5	SS-6	SS-7	SS-8
BL meju, dried	20	-	-	-	-	10	-	-
BM meju, dried	-	20	-	-	-	-	10	-
BN meju, dried	-	-	20	-	-	-	-	-
BS meju, dried	-	-	-	20	-	-	-	10
AO meju, dried	-	-	-	-	20	10	10	10
Salt	15	15	15	15	15	15	15	15
Water	65	65	65	65	65	65	65	65

Table 14. Sensory evaluation of soy sauce

Group A: made with single species of whole soybean meju			
Sample	Taste	Flavor	Remarks
SS-1	2.3	2.8	acidic smelling and taste
SS-2	2.7	3.0	some pleasant flavor
SS-3	2.1	2.2	foul smelling and taste
SS-4	2.4	2.5	foul smelling and taste
SS-5	3.1	3.3	Japanese soy sauce like taste
Group B: made with 2 species of whole soybean meju			
Sample	Taste	Flavor	Remarks
SS-6	2.9	3.0	acidic smelling and taste
SS-7	3.4	3.6	pleasant taste and flavor
SS-8	3.2	3.3	some salty taste

의 주균주로 하고 경우에 따라 다른 곰팡이류로 제조한 메주를 적량 혼합하여 사용하는 공정이 효과적인 것으로 평가되었다.

요 약

콩알메주 model system에 4종의 *Bacillus* 균주를 접종하여 45시간 발효 시킨 후 메주의 일반성분, 효소활성, 향기성분 등을 분석하고 제조된 메주로 청국장, 된장, 간장을 제조하여 제품의 관능을 평가하였다. 발효메주의 pH는 7.98~8.68 이었으며 아미노태질소는 286~439 mg%, 암모니아태질소는 0.11~0.23%, 환원당은 0.65~2.24% 그리고 유리지방산은 0.33~1.10%의 수준이었다. 단백질과 당의 분해율은 *B. subtilis*구간에서 높았으며 암모니아태질소와 유리지방산의 생성율은 *B. natto* 구간에서 높게 조사되었다. 효소활성은 시간에 따라 증가하였다가 발효 40시간대부터 정체되는 양상이었으며 *B. subtilis*구간의 효소활성이 높았다. 각 실험구간별로 유리당 5종, 지방산 5종, 유기산 6종을 검출하였으며 당에서는 stachyose와 raffinose 함량이 많았고 유기산은 각 균주별로 특징적인 구성비를 보였으며 아미노산과 지방산은 보고된 실험 결과들과 유사하였다. 향기성분은 총 81종이 검출되었으며 pyrazine류와 3-methyl-1-butanol, benzaldehyde 등이 *Bacillus* 메주의 공통적인 향기성분으로 분석되었다. 각 메주를 혼합하여 제조한 장류제품의 관능평가를 실시한 결과 청국장은 *B. natto*와 *B. licheniformis*를 혼합한 구간이, 된장에서는 *B. megaterium*과 *B. subtilis*의 혼합구간이, 간장에서는 *B. megaterium*과 *A. oryzae*의 혼합구간이 양호한 평가를 받아 각 제품별로 적절한 균주를 사용할 필요성이 있음을 알 수 있었다.

문헌

1. 농수축산신문 : 한국식품연감. 사조사, p.516 (1996)
2. 박건영 : 재래식 된장의 효능과 산업화 전망. 한국 장류 산업 활성화를 위한 세미나 (1996)
3. 이상선, 박광호, 최경진, 원순애 : 메주에서 분리한 집합균(*Zygomycetes*)에 관한 연구. *The Korean Journal of Mycology*, **21**, 172 (1993)
4. 이철호 : 재래식 간장 및 된장 제조가 대두단백질의 영양가에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, **8**, 12 (1976)
5. 서정숙, 이상건, 유명기 : 균주를 달리한 청국장 제조에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **14**, 309 (1982)
6. 강현주, 박은순, 윤선 : *Aspergillus oryzae*를 이용한 메주 제조중 피트산과 무기질의 상호작용. *한국식품과학회지*, **16**, 403 (1984)
7. 박충균, 남주현, 송형익, 박학용 : 낱알형 개량메주의 품질수명에 관하여. *한국식품과학회지*, **21**, 876 (1989)
8. 김상순 : *Aspergillus oryzae* 및 *Aspergillus sojae*를 이용한 개량메주의 형상에 의한 장류의 품질비교. *한국식품과학회지*, **10**, 63 (1978)
9. 김복란, 박창희, 함승시, 이상영 : 향미성 Natto의 향기 성분, 지방산 및 유기산 함량 분석. *한국영양식량학회지*, **24**, 219 (1995)
10. 최성희, 지영애 : 청국장 숙성 중의 향기성분 변화. *한국식품과학회지*, **21**, 229 (1989)
11. 정동효, 심상국 : 대두발효식품. 지성의 샘, p.783 (1994)
12. Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944)
13. Misaki T., Yamada M., Okazaki T. and Sawada J.: Studies on the protease constitution of *Asp. oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1382 (1970)
14. 김철진, 최홍식, 변시명 : 리파제 활성측정을 위한 간편한 비색정량법. *한국식품과학회지*, **16**, 251 (1984)
15. 유태중, 이종석, 김형수, 권혁인 : 식품학 실험. 수확사 (1979)
16. Privett, O.S., Dougherty, K.A., Erdahl, W.L. and Stolyhwo, A.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 516 (1973)
17. 이숙희, 최홍식, 김창식 : 된장 발효 중 콩 Koji 제조과정에 있어서 지질성분의 변화에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **15**, 375 (1982)
18. 이숙희, 김선기, 최홍식 : 한국장류식품의 유지성분에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **15**, 399 (1983)
19. 이부용, 김동만, 김길환 : 청국장의 물성 변화에 대한 연구. *한국식품과학회지*, **23**, 478 (1991)
20. 정동효, 심상국 : 대두발효식품. 지성의 샘, p.673 (1994)
21. 김중균, 김성곤, 이준식 : 우리나라 콩의 지방산 조성 및 단백질의 전기 영동 패턴. *한국식품과학회지*, **20**, 263 (1988)
22. 주현규, 오균택, 김동현 : 재래 및 개량메주와 남두의 배합이 된장 발효에 미치는 영향. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **35**, 286 (1992)
23. 주현규, 노신규, 임무현 : 세균을 이용한 간장 제조에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **4**, 276 (1972)

(1997년 3월 26일 접수)