

Bacillus subtilis var. *globigii*와 *Scopulariopsis brevicaulis* 접종메주로 단기숙성 저염생간장의 젖산 및 알콜발효

최광수* · 정영건 · 최 청 · 정현채 · 임무혁 · 최종동 · 이춘우¹

영남대학교 식품가공학과, ¹경상북도 환경보건연구원

초 록 : 본 연구는 재래간장의 원료 대두로부터 자숙과 메주제조 과정중의 당류의 행동을 추적하고 가당에 의한 젖산발효와 알콜발효의 효과를 조사하기 위하여 실시되었다. G8메주와 SB메주 제조과정 중 수용성 당류함량이 대폭 감소하였다. G8메주와 SB메주로 만든 저염간장 소화액에 젖산균 *Pediococcus halophilus*와 효모 *Zygosaccharomyces rouxii* 및 *Candida versatilis*의 종모배양액을 접종한 결과, 5% glucose를 첨가한 G8간장과 SB간장에서는 모두 급속히 젖산발효와 알콜발효가 일어났으나 당 무첨가 간장에서는 발효가 일어나지 않았다. 종모배양액 접종 후 160시간 후 가당 G8간장과 가당 SB간장에서 각각 0.46%, 0.88%의 젖산과 1% 및 약 2%의 알콜을 함유하고 있었다.(1998년 7월 21일 접수, 1998년 9월 28일 수리)

서 론

콩만으로 만들어지는 우리나라 재래식 간장은 구수한 맛과 짠맛이 강하며 콩과 밀을 사용하여 담금한 일본 간장이나 양조 간장에 비하여 맛과 향이 떨어진다.¹⁾ 간장의 맛은 구수한 맛과 짠 맛 이외에 젖산과 같은 유기산 등의 신 맛과 단 맛이 조화롭게 이루어져야 맛과 향이 우수한 간장이 되나 재래식 간장은 맛 성분의 함량이 매우 낮다. 이러한 재래식 간장이 일본식 간장 보다 맛이 떨어지는 원인 중에 하나는 간장의 잔당이 적으며 젖산함량이 낮아 조화로운 맛이 떨어지는 것이다.²⁾ 재래식 간장에 젖산균과 효모를 혼합배양시켜 젖산발효와 알콜발효를 통해 간장의 맛과 향을 개선하기 위한 연구가 진행되었으나,^{3,4)} 아직도 미진한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 재래식 간장에서 젖산과 알콜함량이 낮은 원인을 밝히고, 재래식 간장에서 젖산발효와 알콜발효를 일으킬 수 있는 방법을 모색하기 위해서 *Bacillus subtilis* var. *globigii* 접종메주(이하 G8메주)와 *Scopulariopsis brevicaulis* 접종메주(이하 SB메주)로 단기간 숙성시킨 저염간장으로 젖산발효 및 알콜발효를 연구하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 및 공시균주

본 실험에서 사용한 대두는 대구시에 소재하는 의성상회에서 구입한 1995년 한국산 태백종 대두를 사용하였다. 대두의 일반성분은 수분 12.35%, 조지방 6.87%, 조단백 37.61%, 조지방 15.88%, 조섬유 4.78%이었다.

찾는말 : 재래식 간장, 젖산발효, 알콜발효

*연락처자

실험에 사용한 공시균주는 본 실험실에서 분리한 세균(이하 G8)을 nutrient agar에 사면 배양시켜 냉장고에 보존하며 사용하였고, 젖산균은 *Pediococcus halophilus*(KCCM 11377)를 Lactobacilli MRS agar(Difco, USA)배지에 천자 배양시켜 한달씩 계대하며 사용하였으며, 효모류는 *Candida versatilis*(KCCM 11312), *Zygosaccharomyces rouxii*(KCCM 11301)로써 yeast mold agar에 사면배양시켜 냉장고에 보관하며 사용하였다. 곰팡이는 한국교원대학 이상선 박사로부터 분양 받은 *Scopulariopsis brevicaulis*(이하 SB)로 potato dextrose agar에 사면배양시켜 냉장고에 보관하며 사용하였다.

메주 제조 및 간장소화액 제조

대두를 흐르는 물에 12시간 실온에서 수침한 후 일정량을 채취하여 flask에 넣고 autoclave에 121°C, 60분 증자한다. 미리 nutrient broth배지에 전 배양시킨 G8 종모배양액 2%를 삶은 대두에 접종하여 30°C에서 7일간 배양하여 G8메주를 만들었다. SB메주는 삶은 대두에 사면배양시킨 SB균을 멸균수에 현탁시켜 2% 접종하여 28°C에서 7일간 배양시켜 SB메주를 만들었다. 간장 제조는 위에서 제조된 메주에 10% 소금물을 원석(수침전 대두)무게에 대하여 4배(원석:소금물=1:4)비율로 각각 담금하고 메주 배양때와 같은 온도에서 7일간 숙성시켰다. 7일간의 숙성이 끝난 후 3000 rpm에서 한시간 원심분리한 후 filter paper(Whatman, England)로 여과하여 각각의 공시 간장(소화액)을 얻었다.

젖산발효 및 알콜발효 실험

젖산균의 배양은 천자배양된 *P. halophilus*를 Lactobacilli MRS broth에 5% NaCl을 첨가한 배지에 예비증균시킨 후 간장배지(생간장 100 ml+5% glucose)에 접종한 후 pH가

4.8~5.3 정도일 때($10^7 \sim 10^8$ CFU/ml) 미리 준비해 둔 G8 및 SB간장에 2%씩 접종한다. 이후 효모가 가장 잘 생육할 수 있는 pH인 5.3이하까지 pH의 경시적인 변화를 측정하고, pH가 5.3이하 일 때 yeast mold broth(10% NaCl 첨가된)에서 48시간 증균된 *C. versatilis*, *Z. rouxii*를 각 1%씩 접종한다. 다음 호기성인 효모 생육을 돕기 위해 48시간 진탕배양을 하고 난 후, 혐기적 알콜발효를 위해 4일간 정지 배양시킨다.

젖산균의 생육 측정

젖산균의 생육도는 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 이용하여 660 nm에서 흡광도로 나타내었다.

유리당 및 젖산 분석

간장 시료 중의 식염을 제거하기 위하여 간장과 100% methanol을 1:9로 혼합하고 여과한 다음 감압 건조 시켰다. 여기에 methanol을 다시 가하여 녹이고 여과 후 건조시키는 처리를 3회 반복하여 초순수로 녹여서 탈염시료를 제조하였다. 젖산 분석은 탈염시료를 감압건고 시키고 BF₃/methanol로 methylation 시킨 후 GC에 주입하였고 칼럼은 DB-FFAP(0.53 mm×30 m), 칼럼 온도는 100°C(5 min.)-4°C/min.-220°C(5 min.), 주입부 온도 230°C, 검출기(FID) 온도 250°C, 운반 기체는 질소(2 ml/min.)로 분석하였다.⁹⁾ 유리당은 탈염시료를 mixed bed resin TMD-8(Sigma, U.S.A.)로 이온성 물질을 제거한 다음 HPLC(Young-In HPLC 930 pump, Korea)에 주입하였고 분리 칼럼은 Rezex RNM과 RPM(7.8×300 mm, Phenomenex, U.S.A.), 이동상은 초순수, 유속은 분당 0.6 ml, 칼럼 온도는 75°C, 검출기는 RI(Shimadzu RID-6A, Japan)를 사용하여 분리 정량 하였다.¹⁰⁾

알콜 분석

알콜 분석은 ethanol을 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 g씩 취하여 10 ml volumetric flask에 넣고 탈이온수로 정용하여 조제한 표준물질을 diethyl ether 5 ml로 2회 추출한 후, 추출액의 0.2 μl를 GC에 주입하여 표준물질의 크로마토그램을 구하였다. n-butanol 0.02 g을 내부 표준물질로 가한 시료 2 ml를 diethyl ether 2 ml로 2회 추출한 후 추출액의 0.2 μl를 GC에 주입하여 크로마토그램을 구하여 미량의 알콜성분을 정량하였다. GC의 분석조건은 carrier gas는 N₂ 14 psi, 분리 칼럼은 DB-FFAP(25×0.53 mm), 주입부 온도는 210°C, 검출기(FID) 온도는 230°C로 분리 정량하였다.

결과 및 고찰

원료 대두, 증자 대두 및 메주의 유리당 함량

30°C에서 7일간 SB메주와 G8메주(알알이형)를 배양한 후 메주내의 잔당함량을 조사한 결과(Table 1) 증자된 대두 속에는 wet basis(수분 59.2%)로 sucrose 0.96%, stachyose 0.67%를 위시하여 raffinose, fructose 및 미확인 당이 함유

Table 1. Free sugars content of raw soybean, steamed soybean, SB and G8 meju unit: % (wet basis)

	Raw soybean	Steamed soybean	SB meju	G8 meju
Stachyose	3.88	0.67 (1.64)*	-	-
Raffinose	1.20	0.18 (0.43)	0.003 (0.008)	0.01 (0.03)
Glucose	0.10	-	0.12 (0.27)	0.04 (0.11)
Sucrose	7.30	0.96 (2.36)	-	-
Free sugars	Fructose	0.04 (0.21)	0.03 (0.07)	-
Galactose	-	-	0.09 (0.20)	-
Unidentified sugars	-	0.05 (0.12)	0.02 (0.05)	0.05 (0.11)
Inositol	-	-	0.02 (0.05)	-
Moisture (%)	12.4	59.2	54.1	59.9

*: Figures in the () are data on dry basis.

되어 있었으나 SB메주와 G8메주에서는 모두 sucrose와 stachyose는 소실되어 없어지고 삶은 대두에 없었던 glucose(SB, G8)와 galactose(SB) 및 inositol(SB)이 소량 나타났고 G8메주에서는 fructose까지 소실되어 잔당의 총량이 감소되었으며 특히, G8메주에서는 현저한 감소를 보였다. SB메주에서는 galactose와 inositol이 약간 생성되어 있었지만 그 양은 미량이었고 간장덧 담금할 때 소금물을 대두에 대하여(원석으로) 1:4로 급수되었을 때는 잔당 농도는 더욱 낮아 SB메주나 G8메주만으로는 젖산발효나 알콜발효가 일어날 수 없게 되어 있음을 확인할 수 있었다.

젖산균 생육에 따른 pH와 균수와와의 관계

상기 메주를 10% 소금액에 30°C, 7일간 담금한 다음 원심분리하여 얻은 상침액인 G8간장(소화액)과 SB간장(소화액)에 *P. halophilus* 배양액을 접종한 후 당첨가와 무첨가 소화액에서의 젖산균 생육 및 pH를 조사한 결과(Fig. 1) SB간장이나 G8간장은 5%의 glucose를 첨가해주면 12시간 이후부터 젖산균의 생육과 pH가 급격히 떨어져서 당첨가 및 균접종 25~30시간 이내에 효모생육에 적당한 pH 5.3~5.0 범위로 되었으나 당을 첨가하지 않으면 젖산균 생육과 pH 강하가 아주 완만하고 pH는 중성-약알칼리성 영역에 머물러 있어서 SB간장 소화액이나 G8간장 소화액만으로는 *P. halophilus*의 생육이나 간장의 젖산발효를 시킬 수 없으며 G8간장 소화액이 SB간장 소화액 보다 더욱 현저한 것을 알 수 있었다. 이것은 G8세균의 내염성에 주로 기인하며 SB간장은 메주에 잔당함량이 더 높았던 것(Table 1)과도 관련이 있는 것 같았다. 이 결과는 대두의 잔당만으로는 젖산발효가 어렵고 당을 첨가함으로써 젖산발효가 가능하다는 유¹¹⁾ 등의 보고와 일치하였다.

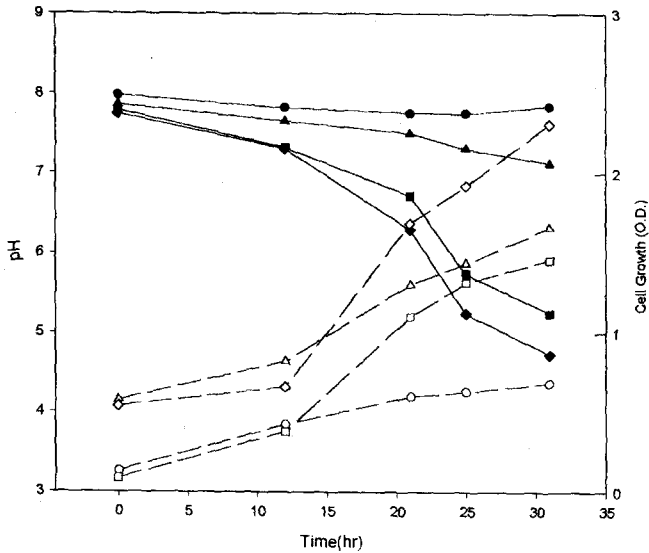


Fig. 1. Changes in the cell growth and pH of the G8 and SB kanjang after inoculation of *P. halophilus* into the raw kanjang made with 10% NaCl solution. ●—●: pH of the G8 kanjang without added glucose, ○—○: Cell growth of the G8 kanjang without added glucose, ■—■: pH of the G8 kanjang with 5% glucose added, □—□: Cell growth of the G8 kanjang with 5% glucose added, ▲—▲: pH of the SB kanjang without added glucose, △—△: Cell growth of the SB kanjang without added glucose, ◆—◆: pH of the SB kanjang with 5% glucose added, ◇—◇: Cell growth of the SB kanjang with 5% glucose added

혼합배양에 의한 간장발효과정 중 pH의 변화

Fig. 2는 Fig. 1에서의 G8간장 소화액과 SB간장 소화액에 젖산균 *P. halophilus*를 접종하여 젖산발효시험에 연이어 젖산발효시험 flask에 계속적으로 *Z. rouxii*와 *C. versatilis* 종모 배양액 1%를 각각 접종하여 알콜 발효실험을 하면서 pH

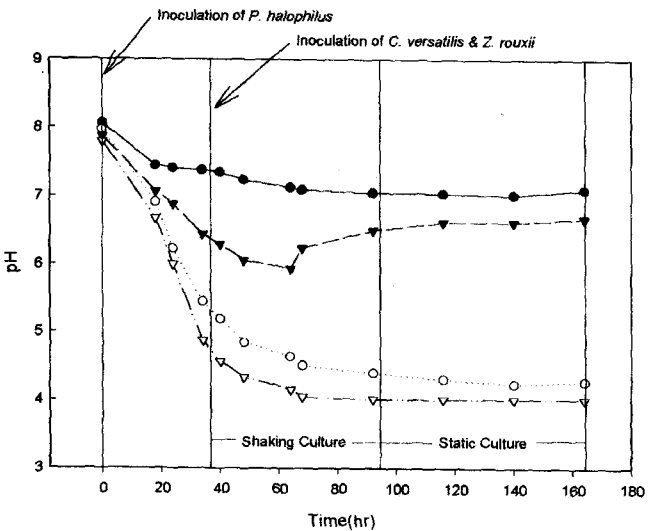


Fig. 2. Changes in pH during lactic acid and alcoholic fermentation. ●—●: pH of the G8 kanjang without added glucose, ○—○: pH of the G8 kanjang with 5% glucose added, ▼—▼: pH of the SB kanjang without added glucose, ▽—▽: pH of the SB kanjang with 5% glucose added

(젖산발효) 변화를 측정한 결과로써 효모접종 시점부터 효모의 균체 생장을 촉진시키기 위하여 2일간은 진탕배양하고 그 후는 알콜발효를 촉진시키기 위하여 정치배양을 4일간 실시하면서 조사한 결과이다. 진탕시키면서부터 모든 구에서 pH 감소속도(즉, 젖산발효속도)가 pH 곡선의 기울기로 명확히 알수 있었고 SB 당 무첨가구에서 특히 현저하여 진탕 1일 후 부터는 pH가 상승되기까지 하였으나 G8 당 무첨가 간장은 pH변화가 거의 없는 것으로 볼 때 잔당이 아주 적은 것 때문으로 판단된다. 이것은 문¹²⁾ 등이 농축대두 단백질로 두유를 만들어 여기에 5종의 젖산균을 접종하여 산생성에 관해 실험한 결과 18시간부터 48시간 사이에 산생성이 가장 높았다고 보고하였는데, 본 실험에서도 젖산발효중 pH가 떨어지는 시간대가 문¹²⁾ 등이 보고한 결과와 같았다.

젖산균과 효모에 의한 간장발효과정 중 pH, 젖산, glucose 및 알콜의 변화

Fig. 3은 Fig. 1과 Fig. 2의 젖산균과 효모의 혼합배양에 의한 젖산발효와 알콜발효 시험과정 중 젖산균 접종 시, 효모 접종하면서 진탕배양개시 시, 정치배양개시 시 및 배양 종료 시에 각각 채취한 시료들의 pH, 젖산, 첨가한 glucose 함량 및 알콜의 함량을 조사하였다. SB간장과 G8간장 모두

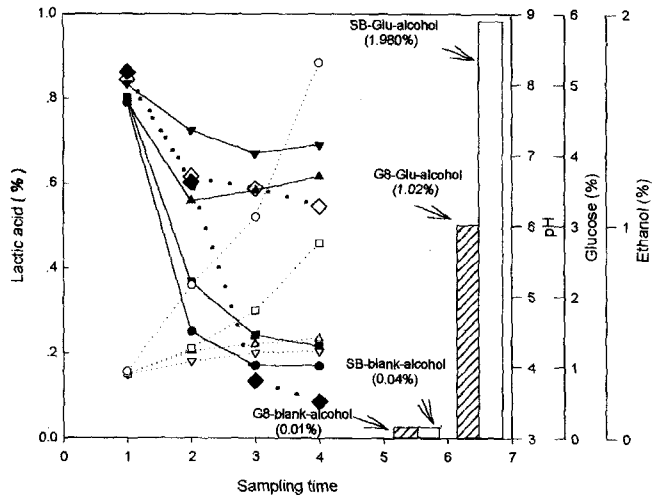


Fig. 3. Changes in pH, lactic acid, glucose and alcohol content during lactic acid and alcoholic fermentation. ▼—▼: pH of the G8 kanjang without added glucose, ▽—▽: Lactic acid contents of the G8 kanjang without added glucose, ■—■: pH of the G8 kanjang with 5% glucose added, □—□: Lactic acid contents of the G8 kanjang with 5% glucose added, ▲—▲: pH of the SB kanjang without added glucose, △—△: Lactic acid contents of the SB kanjang without added glucose, ●—●: pH of the SB kanjang with 5% glucose added, ○—○: Lactic acid contents of the SB kanjang with 5% glucose added, ◇—◇: Glucose contents of the SB kanjang, ◆—◆: Glucose contents of the G8 kanjang, Sampling number 1: The initial medium before the inoculation of lactic acid bacteria starter culture, Sampling number 2: Sample before inoculated in yeast at kanjang, Sampling number 3: Sample after finished shaking culture during alcoholic fermentation, Sampling number 4: The last sample.

에서 첨가된 glucose를 젖산균이 이용하면서 pH가 빠르게 떨어지는 동시에 많은 젖산을 생성하였는데, 이는 두유속에 당류가 부족하여 산 생성이 어렵고 당류를 첨가할 때 충분한 산 생성이 가능하다는 유¹³⁾ 등의 보고와 일치하였다. 혼합배양시 진탕에 의해 배양액 중의 용존산소 증가나 효모와의 당분 이용 경쟁 때문에 pH 변화곡선은 완만하여 젖고 정치배양부터는 젖산함량곡선의 기울기가 커진 것으로 보아서 G8간장 소화액과 SB간장 소화액을 이용한 젖산균과 효모의 혼합배양으로 젖산발효와 알콜발효기간 중 통기량의 조절이 두 발효의 속도조절 변수임을 알 수 있었다. 알콜 발효기간중에 생성된 알콜함량을 조사한 결과로써 당을 첨가하지 않은 G8과 SB간장은 효모에 의한 알콜생산량이 거의 없었다. 반면에 5% 당을 첨가한 SB간장에서는 4%의 당을 소비하여 2%의 알콜을 생성하였고 5% 당을 첨가한 G8간장에서는 약 2%의 당만을 소비하여 1%의 알콜을 생성하고 잔당이 3% 잔존하였다. 따라서 본 실험에서 2일간의 진탕배양 후 정치배양한 SB간장의 경우는 정상적인 알콜 발효가 일어났고 G8간장에서는 알콜발효가 약간 저해되었다. 이것은 채와 최¹⁴⁾가 돼지감자 알콜발효에서 보고한 과도한 산소공급에 의한 pasteur effect나 Noda¹⁵⁾ 등이 보고한 젖산이나 초산에 의한 저해라기 보다 G8간장에서 종모균으로 사용한 *Bacillus subtilis*가 7% 염농도에서 생육하는 세균인 것을 감안할 때 이 세균에 의한 효모생육 저해작용으로 인한 알콜생성량의 감소로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 과학기술처 선도기술개발사업의 연구비에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Kaneko, K., K. Tsuji, C. H. Kim, C. Otaguro, T. Sumino, K. Aida, K. Sahara and T. Kaneda (1994) Contents and compositions of free sugars, organic acids, free amino acids and oligopeptides in soy sauce and soy paste produced in Korea and Japan. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **41**, 148-156.
2. Kim, J. K. and C. S. Kim (1980) The taste components of ordinary Korean soy sauce. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **23**, 89-105.
3. Choi, S. B., O. S. Kwon, H. S. Nam, Z. I. Shin and H. C. Yang (1992) Optimization for the alcohol fermentation of hydrolyzed vegetable protein (HVP) soy sauce by *Saccharomyces rouxii*. *J. Food Sci. Technol.* **24**, 330-334.
4. Ahn, C. W. and N. K. Sung (1988) Identification of flavor components in Korean ordinary kochujang inoculated with *Bacillus* sp. and *Saccharomyces* sp.. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **17**, 1-5.
5. Rhu, B. H., K. D. Nam, H. S. Kim, D. S. Kim, Y. A. Ji and S. J. Jung (1988) Screening of thermotolerant yeast strain for ethanol fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 265-269.
6. Rho, M. J., K. H. Park, U. H. Paik and J. H. Yu (1991) Effect of soybean meal on the alcohol fermentation of sugar-alcohol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **34**, 61-66.
7. Suh, K. H., S. K. Song and S. H. Moon (1986) Continuous ethanol fermentation using immobilized yeasts. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 199-203.
8. Kim, E. Y., S. W. Kim and K. Kim (1993) Ethanol production by a new method of alginate-immobilization. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 373-380.
9. Kim, H. J. (1992) Production of main taste components in traditional Korean soy sauce by *Bacillus licheniformis*. *Korean J. Soc. Food Sci.* **8**, 73-82.
10. Park, H. K., K. H. Sohn and O. J. Park (1997) Analysis of significant factors in the flavor of traditional Korean soy sauce (I). *Korean J. Dietary Culture* **12**, 53-61.
11. Yu, J. H., D. H. Oh, I. S. Kong, Y. S. Park and H. C. Lim (1988) Study on mixed cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* in soymilk. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 131-135.
12. Mun, S. A., Y. B. Kim and Y. T. Ko (1986) Growth of lactic acid bacteria in soy milk and flavor of soy yogurt. *J. Food Sci. Technol.* **18**, 118-123.
13. Yu, J. H., I. D. Lew, C. K. Park and H. C. Lim (1988) Lactic acid fermentation in soymilk by single and mixed Cultures of *Lactobacillus casei* and *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci. Technol.* **20**, 518-525.
14. Chae, E. M. and E. H. Choi (1991) Optimization for alcohol fermentation by *Kluyveromyces marxianus* using Jerusalem artichoke powder. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 265-271.
15. Noda, F., K. Hayashi and T. Mizunuma (1980) Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeasts in brine fermentation of soy sauce. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 452-457.

Lactic acid and alcoholic fermentation of low-salted raw kanjang digestion liquor made from *Bacillus subtilis* var. *globigii* and *Scopulariopsis brevicaulis* inoculated meju

Kwang-Soo Choi*, Yeung-Gun Chung, Choeng Choi, Hyun-Chae Chung, Moo-Hyeog Im, Jong-Dong Choi and Choon-Woo Lee>(*Department of Food Science & Technology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea and ¹Kyungsangbukdo Health and Environment Research Institute, Taegu 702-010, Korea)

Abstract : This work was carried out to investigate the behavior of sugars contained in raw soybean during cooking and *meju* preparation processes, and the effects of sugar addition to the raw *kanjang* digestion liquor made from G8 and SB *meju* on the lactic acid and alcoholic fermentation of *kanjang*. Sharp reduction in sugars content in soybean during cooking and *meju* preparation process was observed. Rapid lactic acid and alcoholic fermentation in the G8 and SB *kanjang* with 5% added glucose was observed but not in the corresponding *kanjang* without sugar addition after inoculation of *Pediococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida versatilis* starter culture to the low-salted raw *kanjang* digestion liquor made respectively from G8 and SB *meju*. 0.46% and 0.88% of lactic acid and 1% and 2% of alcohol content in the G8 and SB *kanjang* respectively was observed 160 hours after the inoculation of the lactic acid bacteria starter culture.

Key words : *kanjang*, Lactic acid fermentation, Alcoholic fermentation

*Corresponding author