

간장태 신속 대두발효 종균으로의 *Enterococcus faecium*

이 영 덕 · † 박 종 현
가천대학교 식품생물공학과

Rapid Fermentation Starter *Enterococcus faecium* of Soybean for Soy-Sauce Like Product

Young-Duck Lee and †Jong-Hyun Park

Dept. of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea

Abstract

To produce rapidly the traditional *Kanjang* soy sauce-like product with rich flavors, lactic acid bacteria of *Enterococcus* spp. isolated from *Chungkukjang* was used as one of starter cultures. Among 119 *Enterococcus* spp., eight strains were selected by protease-secreting activities and identified as four *E. faecium*, three *E. faecalis*, and one *E. gallinarium*. The strains showed low resistances toward eight antibiotics and had no resistant genes to the vancomycin. Especially, *E. faecium* O24 was cultivated well on 5% NaCl medium that was selected for further study as the starter. *E. faecium* O24 grew well on the steamed soybean and the counts increased by ten times overnight, which produced mostly 80 mg% glutamic acid and aspartic acid as the seasoning amino acids on the product. Various organic acids including principal lactic acid were also produced. Flavors of maltol and guaiacol, typical soy-sauce flavor, were produced in the mixed cultures of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida versatilis*. Therefore, *E. faecium* O24 could be a starter of soybean fermentation for soy sauce-like product with rich flavors rapidly.

Key words: soy-sauce, fermentation, *Enterococcus* spp., flavor, amino acid

서 론

국내의 조미료에 대한 소비자의 선호 경향은 1960년대 초반에는 발효에 의한 글루타민산의 제조방법이 산업화된 이후 식품의 맛을 크게 증진시켜 주는 MSG나 핵산조미료의 소비가 급증하였다. 그러나 국민의 경제적인 수준이 향상되고 식품의 안전성과 영양적인 면에 대한 소비자의 인식이 높아지면서 식품의 고유한 맛을 향상시키기 위해 천연 조미료를 이용하고자 하는 움직임이 높아지게 되었다. 이러한 천연조미료에 대한 관심은 우리나라뿐 아니라 경제적인 여유가 있는 서구 선진국에서도 일어나고 있어 천연 조미료에 대한 개발이 식품산업에 요구되고 있다. 더불어 식생활의 양상이 변화되고 다양화됨에 따라 소비자의 식품소비 형태가 건강 지향적인 식생활에 관심이 모아지고 있다.

현재 발효에 의하여 생산되고 있는 천연조미료 양조간장은 분해 펩타이드, 알코올, 유기산들이 비교적 많이 함유되어 있고, 향이 좋은 특징을 보여 주고 있다(Choi 등 1998). 그러나 이를 생산하기 위한 시설 장치에 대한 비용이 많이 들고, 6개월에 이르는 발효기간이 산업적 대량 생산의 장애요인이 되고 있다. 특히 재래식 간장도 양조간장의 형태라고 볼 수 있는데, 우리 간장맛은 현재 양조간장과는 또 다르게 염미, 감미, 고미, 신미, 지미에 의해 이루어지고 있으며, 이들 맛의 조화에 의해 간장맛의 좋고 나쁨이 좌우된다고 한다. 이러한 다섯 가지 맛들은 다양한 16~21종의 맛성분들의 함량 변동에 의해 좌우된다고 한다. 특히 lactic acid, NaCl, fumaric acid, succinic acid, tyrosine, tartaric acid, glycine, malonic acid, malic acid, tryptophan의 순서로 기여하고 있다고 한다(Kim 등 1895). 이와 같이 재래식 간장은 발효기간이 길어지므로 복잡한 발

† Corresponding author: Jong-Hyun Park, Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea. Tel: 82-31-750-5523, E-mail: p5062@gachon.ac.kr

효 과정에서 많은 미생물이 관여되어 풍부한 풍미가 발현되지만, 원료, 발효 조건 등에 의하여 품질이 일정하지 못하는 단점이 있다. 이 균주들은 *Staphylococcus vitulus*, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Lactobacillus fermentum* 등이 우점종인 것으로 보고하였다(Yoo 등 1999; Kim JK 2002). 최근에는 재래식 간장의 이러한 맛이 나오기까지는 발효기간이 장기간 걸리므로 발효기간을 단축하려는 연구가 다방면으로 이루어지고 있다. *Bacillus* 등 세균을 이용한 간장을 제조(Ju 등 1972)하거나 간장발효에 관여하는 lactic acid bacteria, *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Candida versatilis*를 고정화 시켜 column형 발효조를 이용하여 간장 발효를 단축하려는 노력이 있었다(Kwon 등 1994). 이러한 *Z. rouxii*와 *C. versatilis*의 균체를 고정화한 bead를 bioreactor에 사용하였고, 그리고 ceramic 담체를 이용한 bioreactor의 간장 발효에서 *Z. rouxii*의 알코올 생성 및 *C. versatilis*에서 간장 특유의 향기성분인 4-ethylguaiacol의 생성도 가능하였고, 단시간에 간장 발효가 가능하다고 보고하였다(Ryu 등 1993). 그러나 현재 재래식 전통 간장에 대한 연구는 단편적으로 이루어져 왔고, 우리 기호성에 적합한 균주를 이용하여 간장을 제조하는 기술 및 연구가 많이 이루어져 있지 않아, 우리 고유의 전통 맛을 상업적으로 제조하기 어려운 상태이다. 따라서 발효과정 중에 사용 가능한 우수 균주의 활용과 공정을 개발하여 숙성기간을 단축하고 풍미를 향상시켜 우리 고유의 양질 천연조미료를 생산하는 것이 시급하다.

우리의 고유식품 중의 하나인 청국장은 2~3일 내의 짧은 시간에 발효가 이루어지는 식품이다. 그런데 지금까지는 *Bacillus* spp.가 주요 발효세균인 것으로 알려져 왔으나, 최근의 보고에 의하면 이 식품의 주점종의 하나가 *Enterococcus* spp.인 것으로 보고되었다(Yoon MY 2008; Kang TM 2008). 전통적인 청국장의 경우 간장, 된장보다도 총 균수가 9~10 log CFU/g의 높은 균수를 보여주고 있는데, 이 중 유산균이 8 log CFU/g으로 많은 수의 유산균이 존재하였다. 그 중 *Enterococcus* spp.가 30% 이상의 최대 우점종인 것이며, 이들은 주로 *E. faecium*, *E. faecalis* 등으로 보고되었다. 이러한 *Enterococcus* spp.는 현재 식품산업에서 논란이 되어온 유산균으로 지중해 지역의 전통치즈, 소시지, 올리브유 발효에 중요한 역할을 해온 것으로 알려져 있다(Foulquie Moreno 등 2006; Manolopoulou 등 2003; Ben Omar 등 2004). 특히 전통치즈에서 proteolysis, lipolysis, citrate 분해 등으로 독특한 풍미를 주고 있는 것으로 알려져 있다. 더욱이 최근에는 이 균에 의한 bacteriocin이 관심의 대상이고 아울러 probiotic으로도 사용되고 있다(Franz 등 2003). 그러나 *E. faecium*은 기회감염균으로 많은 항생제에 내성을 쉽게 가지는 특성을 가지게 되어 관심의 대상이 되고 있는 균주이기도 하다(Moellering 등 1995). 특히 이 균종은 최고로 강력한 vancomycin 등의 glycopeptides 항생제에 내성을 plasmid

나 transposon, bacteriophage 등으로 내성유전자를 얻게 되는 것으로 알려져 있다(Jett 등 1994). 그러므로 본 연구에서는 풍미가 강하고 신속하게 발효되는 청국장의 우점종인 *Enterococcus* spp.를 대두백태에 적용한 controlled fermentation에 의하여 전통 재래간장 제조용의 발효 종균으로 사용 가능한지에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배양

대두콩 발효연구를 위해 사용하였던 균주는 청국장으로부터 분리하여 보관 중인 119종의 *Enterococcus* spp.를 사용하였다(Kang TM 2008). 또한 후발효를 위해 사용된 균주는 *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM12066, *Candida versatilis* KCCM11312 등을 한국종균협회에서 구입하여 사용하였다. 분리된 *Enterococcus* spp.는 Tryptic soy media(Difco Laboratory, Detroit, MI, USA), 젖산균은 MRS 배지(Difco), *Z. rouxii*와 *C. versatilis*는 YM 배지(Difco)에서 배양하였다.

2. Enterococcus spp.의 Protease 활성과 동정

분리된 *Enterococcus* spp.를 Tryptic Soy broth 및 agar(TSA)(Difco)에서 2번 계대 배양을 통해 활성화 시킨 후 protease 활성에 사용하였다. 배양된 *Enterococcus* spp.를 skim milk와 NaCl이 첨가된 TSA에서 희석한 후 37°C에서 24시간 배양 후 분해환을 측정하여 확인하였다. 그리고 NaCl이 첨가되었을 때 protease 활성이 확인된 균주를 대상으로 효소 활성을 측정하기 위해 *Enterococcus* spp.를 37°C에서 배양한 후 분해환을 측정하였으며, Nutrient broth(Difco)에 NaCl을 1~15% 농도로 첨가한 후 생육 정도를 흡광도를 통해 확인하였다. 일차적으로 선별된 protease 활성이 우수한 *Enterococcus* spp.를 Vitek II(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)와 PCR을 수행하여 동정하였다. 이때 *Enterococcus* spp.의 elongation factor EF-Tu를 암호화하는 *tuf* gene을 목표로 하는 Ent1(5'-TACTGACAAA CCAITCAATGATG-3')과 Ent2(5'-AACTTCGTCAACGCGAAC-3')를 사용하였으며(Ke 등 1999), PCR을 위해 TSA(Difco)에 희석 도말한 *Enterococcus* spp.를 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양된 *Enterococcus* spp.를 한백금이를 취하여 1 mL의 멸균 증류수에 현탁한 후 10,000 rpm에서 5분간 원심침전하고 멸균증류수로 2회 세척한 다음, Accuprep® genomic DNA extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)로 genomic DNA를 정제하였다. 정제된 DNA 중 2 μ l를 취하여 template DNA로 사용하였다. 2.5 U Tag DNA polymerase, 250 μ M의 dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂에 template DNA를 첨가하였으며, 총 반응액을 20 μ l로 하여 Gene cycler(Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 94°C에서 2분간 pre-denaturation하고 이어서 30회 증폭을 반복(94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분)한 다음 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 증폭산물은 0.5 µg/ml ethidium bromide를 포함하는 1% agarose를 0.5×TAE(Tris-acetate EDTA) 완충용액에서 10 V/cm로 전기영동한 후, UV transilluminator(Seolnbiotech, Suwon, Korea)에서 결과를 확인하였다.

3. 선발 균주의 항생제 내성 특성 및 항생제 내성 유전자 분석

분리된 *Enterococcus* spp.의 항생제 감수성은 디스크 확산법을 사용하여 수행하였다(NCCLS 2008). 디스크 확산법을 위한 대상 항생제는 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)에서 *Enterococcus* spp.의 항생제 검사로 추천된 vancomycin, penicillin, chloramphenicol, tetracycline, rifampin, streptomycin, ampicillin과 erythromycin을 사용하였다(National Committee for Clinical Laboratory Standards 2008). 디스크 확산법에 의한 항생제 내성 특성은 Muller-Hilton agar(Difco)에 배양된 *Enterococcus* spp.를 도말한 후 분주기를 이용하여 표면에 disk를 놓고, 37°C에서 24시간 동안 배양 후 억제환을 비교하였다. 또한 *Enterococcus* spp.의 항생제 내성에 관여하는 vancomycin resistant gene의 유전자 유무를 PCR을 통해 확인하였으며, 사용된 primer는 Table 1과 같다(Dukta-Malen 등 1995).

4. 대두에서의 *E. faecium*의 배양학적 특성

본 연구에 사용될 *E. faecium* O24, *Z. rouxii*, *C. versatilis*들은 각각의 최적 배양 조건에서 2회 계대 배양한 후 사용하였다. 대형 마트에서 시판 중인 대두를 구매하여 깨끗하게 수세한 후 24시간 동안 수침하고 물기를 제거한 후 autoclave를 이용하여 100°C에서 30분간 증자하였다. 그리고 증자된 대두에 *E. faecium* O24를 접종하여 상대 습도 90%, 37°C에서 48시간 동안 발효를 진행하였다. 이때 amylolytic activity를 높혀 주기

위하여 효소 제조사의 권장량인 0.5% alpha-amylase(Novo)를 첨가하였다. 그리고 48시간 후 5% NaCl을 첨가한 후 동일한 조건에서 48시간 동안 숙성을 진행하였다.

E. faecium O24로 발효 후 숙성과정을 거친 발효물을 8,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 0.45 µm syringe filter를 사용하여 제공하였다. 그리고 *Z. rouxii*를 제공액에 5% 접종한 후 48시간 동안 발효를 진행하였다. 발효가 끝난 발효물을 8,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리한 후 상등액을 0.2 µm syringe filter를 이용하여 제공하고, *C. versatilis*를 5% 접종하고 48시간 동안 발효하고, 원심 분리 후 제공하여 최종 발효물을 제조하였다. 각각의 단계에 따른 미생물의 생육을 확인하기 위해, 발효 시간에 따라 시료를 취해 10배 희석하고 평판 도말한 후 배양하여 집락수를 계수하였으며, 모든 실험은 3반복 실험을 수행하였다.

5. 대두 발효물의 기기분석

유기산(Shiseido HPLC, Kyoto, Japan), 유리 아미노산(Agilent 1100 HPLC, Santa Clara, CA, USA)을 위한 시료는 각각의 발효 단계에서 나온 제공액을 사용하였으며, 건강기능식품 공전에서 제시하고 있는 방법에 준하여 수행하였다(Korea Food & Drug Administration 2010). 각각의 성분 분석을 위한 조건은 Table 2와 같다. 또한 최종 발효물에 향기 성분분석(Agilent 6890 GC, Santa Clara, CA, USA)을 수행하였으며, 향기 성분분석은 건강기능식품 공전에서 제시하고 있는 방법에 준하여 수행하였으며, 기기 분석을 위한 조건은 Table 2와 같다(Korea Food & Drug Administration 2010).

결과 및 고찰

1. *Enterococcus* spp.의 Protease 활성과 동정

청국장으로부터 분리, 동정된 *Enterococcus* spp.를 skim milk가 첨가된 TSA배지 상에서 skim milk를 분해하여 생성되는 환의 크기를 확인하여 protease 활성이 높은 균주를 선발하였다. 사용된 총 119개의 *Enterococcus* spp. 중에서 protease 활성을 나타내는 *Enterococcus* spp. 8균주를 선발하였다(Fig. 1). 이들 선발 균주를 NaCl이 첨가된 skim milk-TSA배지에서 protease 분비를 측정하였다. 장류 제조에 사용되는 메주에는 모두 protease가 존재하고, 일반적으로 장류의 고유의 맛과 향기는 세균과 곰팡이가 분비하는 protease가 중요하게 관여하는 것으로 보고되었다(Lee 등 1997; Lee 등 1996). *Enterococcus* spp.의 NaCl 농도에 따른 protease 활성을 확인한 결과, 3% NaCl이 첨가되었을 경우 proteolytic activity가 나타나지만 일부 *Enterococcus* spp.는 활성을 잃었으며, NaCl 농도가 높아짐에 *Enterococcus* spp.는 생육은 하였으나, protease 활성이 없어지

Table 1. Oligonucleotide primers used in PCR

Genes	Primers	Sequence of oligonucleotide	Position	Product size(bp)
VanA	VanA1	GGGAAAACGACAATTGC	175~191	732
	VanA2	GTACAATGCGGCCGITA	907~891	
VanB	VanB1	ATGGGAAGCCGATAGTC	174~190	635
	VanB2	GATTTCGTTCTCGACC	808~792	
VanC1	VanC1-1	GGTATCAAGGAAACCTC	246~272	822
	VacC1-2	CTTCCGCCATCATAGCT	1067~1051	
VanC2	VanC2-1	CTCCTACGATTCTCTTG	455~486	439
	VanC2-2	CGAGCAAGACCTTTAAG	885~869	

Table 2. Instrument and operating conditions for HPLC and GC for analysis of fermented soybean product

HPLC for organic acid	
Instrument	Shiseido HPLC
Column	Prevail Organic Acid(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)
Detector	PDA detector 210 nm
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Flow	0.5(ml/min)
Injection volume	10 μ l
Mobile phase	25 mM KH ₂ PO ₄ , pH 2.5
HPLC for free amino acid	
Instrument	Agilent 1100 HPLC
Column	Capcellpak UG120 C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)
Detector	DAD detector 262 nm, 338 nm
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Flow	1.5(ml/min)
Injection volume	10 μ l
Mobile phase	A- 40 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7.8) B- ACN:MeOH:DW(45:45:10)
GC for volatile component	
Instrument	Agilent 6890 GC
Detector	5973 i MSD
Column	HP-INNOWAX(25 m×0.25 mm, 0.25 μ m)
Injection temp.	250 $^{\circ}$ C
Oven temp.	50 $^{\circ}$ C(2 min)→3 $^{\circ}$ C/min→200 $^{\circ}$ C(8 min)
Carrier gas	He
Column flow	1(ml/min)
Injection volume	2.0 μ l
Ionization voltage	70 eV
Scan range	50~550

**Fig. 1. Halo detection of protease activity for Enterococcus spp. on skim milk-TSA media.****Table 3. Protease production of Enterococcus spp. on skim milk-TSA media at different NaCl concentration**

Strain	Protease production at different NaCl concentration		
	3%	5%	9%
<i>E. gallinarum</i> O88	+	-	-
<i>E. faecium</i> O11	+	-	-
<i>E. faecium</i> O14	-	-	-
<i>E. faecium</i> O24	+	+	-
<i>E. faecium</i> O40	-	-	-
<i>E. faecalis</i> O36	+	-	-
<i>E. faecalis</i> O73	-	-	-
<i>E. faecalis</i> O83	-	-	-

Symbols: +, protease production; -, protease non-production.

는 것을 확인하였다(Table 3). 이는 세균이 높은 염 농도에서 생육하기 위해 생리 특성이 변화한 것으로 보여진다. 또한 Nutrient broth에 1~15% NaCl 첨가에 따른 생육 정도를 확인한 결과, 1차 발효에 수행할 조건인 5% NaCl 첨가 후 숙성 과정에서 *E. faecium*의 생육에는 영향을 크게 미치지 않으므로 1차 발효에 이용이 가능할 것으로 판단되었다(자료 미제시). Protease 활성이 우수한 *Enterococcus* spp.를 PCR과 Vitek II(bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) 로 동정한 결과, 이 균주는 *E. faecium* O11, O14, O24, O40, *E. faecalis* O36, O73, O83, *E. gallinarum* O88 등으로 동정하였다(Kang TM 2008)(자료 미제시).

2. 항생제 내성 분석

Enterococcus spp.는 발효 및 숙성시에 우수한 풍미를 제공하고 bacteriocin인 enterocin을 생산하여 probiotics로 각광받고 있다. 하지만 최근 들어 pathogenesis에 대한 문제가 부각되고 있으며, 특히 의학계에서는 antibiotic resistant *Enterococcus* spp. 중 vancomycin에 대한 항생제 내성 유전자가 장내 세균들에게 쉽게 전이가 되는 것으로 알려져 있어 probiotics로서의 문제점이 제기되고 있다(Foulque Moreno 등 2006). 따라서 항생제 내성 유전자의 결손 또는 높은 항생제 감수성이 있는 *Enterococcus* spp.를 starter culture로써 안전하게 사용할 필요가 있을 것이다. 본 발효에 사용될 다양한 *Enterococcus* spp.의 항생제 내성 특성과 vancomycin 내성 유전자 보유 여부를 확인하고자 하였다. 본 연구를 위해 사용될 protease 역가가 우수한 8주에 *Enterococcus* spp.의 항생제 내성을 확인하기 위해 디스크 확산법에 따른 다양한 항생제들에 대한 내성 특성을 비교한 결과와 vancomycin 내성 관련 유전자를 검출한 결과는 Table 4와 같다. 일반적으로 vancomycin resistant *Enterococcus*

Table 4. Detection for vancomycin resistance gene of protease-secreting *Enterococcus* spp. by PCR

Strain	Multiplex PCR			
	<i>VanA</i>	<i>VanB</i>	<i>VanC1</i>	<i>VanC2</i>
<i>E. gallinarium</i> O88	-	-	+	-
<i>E. faecium</i> O11	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> O14	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> O24	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> O40	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> O36	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> O73	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> O83	-	-	-	-

spp.의 내성은 VanA, VanB, VanC, VanD 및 VanE형으로 나누어지며, 각각 *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD* 및 *vanE* 유전자형이 있는 것으로 보고되었다(Van Caesele 등 2001). *VanA*, *VanB* 및 *VanD* 유전자형은 내성 유전자가 전이될 수 있는 유전자형이며, *VanC*와 *VanE* 유전자형은 유전자 전이를 통해 내성이 전달되지 않는다고 알려져 있다(Chow 등 1993, Toye 등 1997). 특히 병원에서는 *Van* 유전자를 검출하는 PCR은 비용, 검사 시간 및 검사효율 등이 좋기 때문에 장구균의 역학조사와 감염을 통제하기 위한 수단으로써 많이 사용되고 있다. 본 연구에서 분리된 *Enterococcus* spp.들의 항생제 내성 특성을 비교 분석한 결과, 항생제 종류에 따라 내성 또는 감수성이 상이하게 나타났으며, *E. gallinarium* O88, *E. faecium* O11, O14, O24, O40, *E. faecalis* O36, O73, O83의 경우, 실험에 사용된 항생제에 대해 내성이 없었으며, 다만 *E. gallinarium* O88에서 낮은 vancomycin 항생제 내성(Van C)을 나타내고 있었다. 본 발효를 위해 사용될 *Enterococcus* spp.는 항생제에 대한 감수성이 높고, 관련 고위험성 유전자인 vancomycin resistant gene을 보유하고 있지 않는 것으로 확인하였다. 그러므로 본 연구에서는 최종적으로 *E. faecium* O24 균주를 선발해서 발효 종균으로의 연구를 수행하였다.

3. *E. faecium* O24의 대두 발효 특성

분리된 *E. faecium* O24를 발효에 이용하기 위한 배양 생리 특성을 분석하였다. 대형 마트에서 시판 중인 대두를 구매하여 깨끗하게 수세한 후 24시간 동안 수침하고 물기를 제거한 후 autoclave를 이용하여 100°C에서 30분간 증자하였다. 그리고 증자된 백태에 *E. faecium* O24를 접종한 후 생육 양상의 확인과 amylase와 5% NaCl을 첨가하고 생육 정도를 비교한 결과는 Fig. 2와 같다.

증자된 백태에서 *E. faecium* O24의 생육을 확인한 결과, 24시간 이후에 약 9 log CFU/g 수준으로 검출되어 약 100배 이

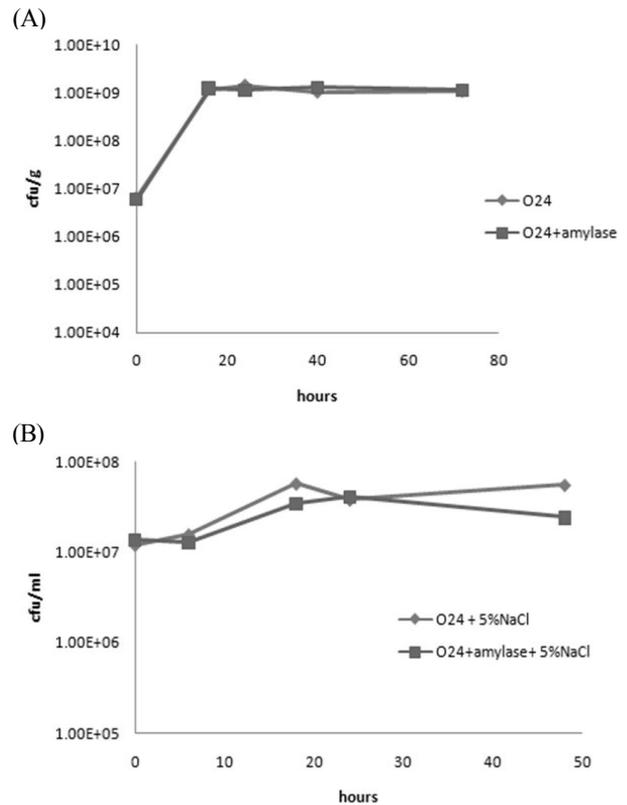


Fig. 2. Growth profiles of *E. faecium* O24 at the steamed soybean (A) and maturation (B).

상의 빠른 증식을 확인할 수 있었다. 또한 분리된 *E. faecium* O24는 amylolytic activity가 매우 낮아 amylase를 첨가한 후 실험했을 때도 *E. faecium* O24의 생육 정도는 미첨가구와 비교했을 때 큰 차이가 나지 않는 결과를 확인하였다. 따라서 분리된 *E. faecium* O24는 백태에서의 생육 정도가 우수하였으며, 1차 발효를 수행할 조건인 5% NaCl 첨가 후 숙성 과정에서 *E. faecium*의 생육에는 영향을 크게 미치지 않으므로 1차 발효에 이용이 가능할 것으로 판단되었다. 또한 증자된 백태에 *E. faecium* O24를 첨가한 후 5% NaCl을 첨가하여 숙성을 하는 동안에 생육 정도를 확인한 결과, 초기에 백태에서 발효 후 약 7 log CFU/ml 수준에서 균수는 크게 증가하지는 않았으나, 향이 보다 풍부해졌음을 확인하였으며, 숙성 후 pH를 확인한 결과, pH 5.0 정도의 수준을 나타내고 있었다. 따라서 다른 영양분의 첨가 없이 5% NaCl이 첨가된 증자 대두에 *E. faecium* O24를 접종하여 대두발효에 이용이 가능할 수 있을 것으로 판단되었다.

대두 발효물과 숙성에 따른 유리 아미노산을 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 현재 제조되고 있는 다양한 간장들의 맛은 많은 수가 아미노산과 펩타이드로부터 기인한다고 알려져 있다. 특히 감칠맛 또는 우마미는 glutamic acid와 aspartic acid

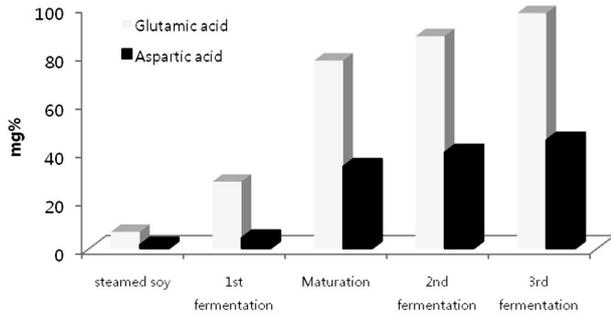


Fig. 3. Production of glutamic acid and aspartic acid of *E. faecium* O24 on the steamed soybean.

에 의한 것으로 보고되고 있다(Kim JG 2004). 본 연구에서 아미노산 분석을 통해 확인된 glutamic acid는 초기에 약 10 mg%에서 발효 후에는 약 30 mg%, 숙성 후에 약 80 mg%로 나타났는데, 이는 보통의 간장함량보다 낮은 약 1/5~1/8 수준으로 나타났다(Chung 등 2006; Choi 등 2000). Aspartic acid는 초기에 약 2 mg%에서 백태 발효 후에는 5 mg%, 2일간 숙성 후에는 약 35 mg%로 두 가지 아미노산 성분 모두 증가하는 것으로 나타났으며, aspartic acid에 비해 glutamic acid가 많이 생성되었음을 확인하였다.

1차 발효와 숙성 동안 유기산 성분을 HPLC를 이용하여 확인한 결과, 초기에 증가한 대두에서의 유기산 함량은 낮은 수준이었다(Fig. 4). 하지만 1차 발효, 숙성후에는 유기산들 중 lactic acid는 초기 증가된 대두에서는 약 27 ppm, 1차 발효 후에는 280 ppm, 숙성 후에는 385 ppm 수준으로 증가하여, 증가된 대두를 젖산균인 *E. faecium* O24 이 1차 발효와 숙성을 진행하면서 많은 양의 유기산을 생산해 내는 것으로 보인다. 또한 다른 유기산들인 acetic acid, malic acid, formic acid들도

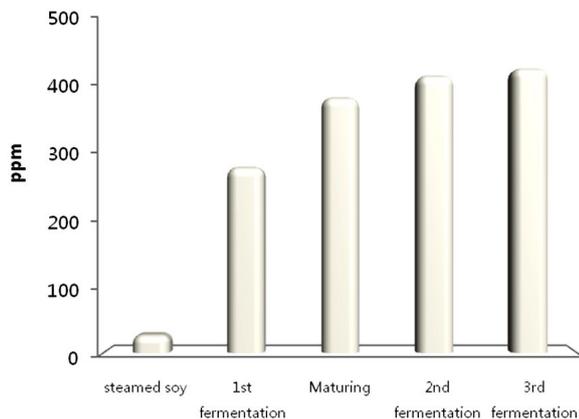


Fig. 4. Production of lactic acid of *E. faecium* O24 on the steamed soybean.

발효 전에 비해 1차 발효, 숙성 모두에서 증가하였다. 발효 전에 많은 양을 나타냈던 citric acid와 succinic acid의 경우는 발효와 숙성을 거치면서 모두 소진된 것으로 나타났다. 숙성 후에 tartaric acid가 새롭게 형성되었음을 확인할 수 있었다.

본 연구에 사용된 *E. faecium*은 젖산균으로 백태 발효 시 젖산 발효를 통해 많은 양의 lactic acid를 생산해 낼 수 있어 향미성분의 발생에 기여할 것으로 보인다. 또한 기존에 장류 제조에 사용되었던 대표적인 세균인 *Bacillus*에 비해 보다 빠르고 많은 양의 유기산의 생성이 가능하리라 판단되어 신속한 발효에 효과적일 것으로 사료된다. 그리고 *Enterococcus* spp.의 경우, enterocin 등의 bacteriocin을 생산하여 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* 등을 효과적으로 저해할 수 있는 것으로 보고되고 있어 이러한 식중독 세균에 보다 안전한 발효물을 생산할 수 있을 것으로 판단된다.

4. *Z. rouxii*와 *C. versatilis*에 의한 향미 성분 생성

E. faecium O24에 의하여 증자 대두를 발효, 숙성한 발효액을 회수한 후, *Z. rouxii*와 *C. versatilis*로 순차적으로 발효하였으며, 발효물의 lactic acid와 유리 아미노산을 분석하였다. 그 결과 lactic acid는 약 10 ppm 가량 증가하였으며, glutamic acid는 약 10 mg%, aspartic acid는 약 5 mg% 정도로 약간 증가함을 확인하였고, 또한 각각의 단계에서 발효물의 향기 성분 분석한 결과는 Table 5 및 6과 같다.

Table 5. Aromatic compounds produced by *Z. rouxii* at the steamed soybean fermentation

Peak No.	Retention time	Possible compound
2	6.480	Dodecane
5	9.412	Tridecane
11	14.950	Heptadecane
24	30.690	Benzeneethanol
25	32.365	Maltol
26	32.993	1-Dodecanol
28	43.504	2,4-di-t-butylphenol

Table 6. Aromatic compounds produced by *C. versatilis* at the steamed soybean fermentation

Peak No.	Retention time	Possible compound
3	13.531	1,4-bis(1,1-dimethylethyl)-benzene
4	28.958	Guaiacol
5	32.303	Maltol
8	43.137	1,1'-(1,4-phenylene)bis-ethanone
9	43.417	2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol

일반적으로 간장은 매우 많은 수의 향기 성분을 포함하고 있는 것으로 보고되고 있다. 대표적인 예로는 furanone 류의 HEMF(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)franone), pyrone류의 화합물로 maltol(3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one), phenol류에는 4-ethylguaiacol이 있으며, 이 외에도 aldehyde류, 함유황화합물, 알콜류, 아세탈류, 유기산 등 다양하게 존재한다(Ryu 등 1992; Kataoka S 2005). 본 연구에서 수행한 *Z. rouxii*를 이용한 발효 향기 성분들 중 maltol은 HEMF와 더불어 간장의 기본적인 향으로 인식되고 있으며, 추가적으로 바닐린, glutamic acid 및 여러 아미노산 각각의 향미를 개량하거나 감미 증가 효과가 있다고 보고되고 있다(Choi 등 1992). 또한 maltol은 대부분 공업적으로 생산되어 식품 향료로 사용되고 있으며, 카라멜 형태의 향기를 가지는 것으로 알려져 있다. 그리고 benzeneethanol 또는 phenetyl alcohol은 4-ethylguaiacol과 더불어 간장에 중요한 향기 성분으로 flower flavor와 유사한 향을 나타낸다. 1-dodecanol의 경우 카카오나 바나나향의 지방산 향미 성분으로 알려져 있다. 또한 dodecane은 간장과 된장 및 탁주 등의 주요한 향기 성분이며, tridecane은 katuobushi와 홍차 및 민속주 등의 대표적인 향기 성분이다. 그리고 heptadecane은 전통 누룩의 휘발성 향기 성분의 주된 요소 중 하나로 보고되고 있다. 그리고 *C. versatilis*로 최종적으로 발효된 발효물의 향기 성분을 분석한 결과, *Z. rouxii*를 사용해 발효했던 때와 달리 guaiacol이 새롭게 생성됨을 확인하였다. Guaiacol은 간장의 주요한 성분인 4-ethylguaiacol과 유사한 methoxyl-phenol류이다. 그리고 guaiacol은 다양한 flavorants의 전구체이며, 소독제, 마취제 등의 의학 부분에도 응용되는 것으로 알려져 있다. 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol은 산화 방지제로 알려져 있다. 따라서 *E. faecium*과 *Z. rouxii*, *C. versatilis*의 혼합배양으로 다양한 풍미를 갖도록 할 수가 있었다.

요 약

풍미가 강력하고 신속발효가 되는 청국장장의 우점종인 젓산균 *Enterococcus* spp.를 발효종균으로 활용하여 재래식 간장모양의 풍미를 가지는 대두발효물을 제조하고자 하였다. 119종의 *Enterococcus* spp. 중에서 protease 활성이 높은 8종을 선발하여 *E. faecium* 4종, *E. faecalis* 3종, *E. gallinarium* 1종으로 동정하였다. 8종의 향생체에 내성이 낮았고, vancomycin 유전자도 없으며, 5% NaCl 함유 배지에서도 protease 분비가 우수한 *E. faecium* O24를 발효 종균으로 선정하였다. 증자한 대두 배타에서 생육이 우수하였으며, 발효생성 조미 아미노산 중 80 mg% glutamic acid, aspartic acid를 생성시켰으며, lactic acid와 여러 유기산을 생성하였다. *Z. rouxii*와 *C. versatilis*와의 혼합배양으로 간장 고유취인 maltol, guaiacol 등의 향기성분도

합성됨을 확인하였다. 그러므로 청국장 젓산균인 *Enterococcus* spp.는 신속하게 다양한 향미성분을 생산하여 간장태의 대두 발효의 종균으로 사용이 가능할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 가천대학교 교내연구비 지원에 의한 결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NM, Franz CM, Holzapfel WH, Pérez-Pulido R, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Sys Appl Microbiol* 27:118-130
- Choi KS, Choi JD, Chung HC, Kwon KI, Im MH, Kim YH, Kim WS. 2000. Effects of mashing proportion of soybean to salt brine on *Kanjang*(soy sauce) quality. *Korean J Food Sci Technol* 32:174-180
- Choi SB, Kwon OS, Nam HS, Shin ZI, Yang HC. 1992. Optimization for the alcohol fermentation of hydrolyzed vegetable protein(HVP) soy sauce by *Saccharomyces rouxii*. *Korean J Food Sci Technol* 24:330-334
- Choi SH, Kim SH, Hong SS, Kim HY, Lee BG, Jang YS. 1998. A study on the physiological function of traditional *Kanjang* and *Doenjang*, and the development of process for functional food. Korea Food Reserach Institute, Report GA0042-0983
- Chow JW, Kuritza A, Shlase DM, Green M, Sahm DF, Zervos MJ. 1993. Clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals in two states. *J Clin Microbiol* 31:1609-1611
- Chung SK, Lee KS, Lee DS. 2006. Fermentation of *Kanjang*, Korean soy sauce, in porosity-controlled earthenwares with changing the mixing ratio of raw soils. *Korean J Food Sci Technol* 38:215-221
- Dukta-Malen S, Evers S, Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Micribiol* 33:24-27
- Foulquie Moreno MR, sarantinopoulos P, De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 10:1-24
- Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. 2003.

- Enterococci in foods- A conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 88:105-122
- Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. 1994. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7:462-478
- Ju HK, Ro SK, Im MH. 1972. Studies on the fermentation of soy sauce by bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 4:276-284
- Kang TM. 2008. Enterococcus microflora analysis for foods and antibiotic resistance. Master of Science Thesis, Kyungwon Uni. Seongnam. Korea
- Kataoka S. 2005. Functional effects of Japanese style fermented soy sauce(*Shoyu*) and its components. *J Biosci Bioeng* 100: 227-234
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* 37:3497-3503
- Kim JG, Chung YG, Yang SH. 1985. Effective components on the taste of ordinary Korean soy sauce. *Kor J Appl Microbiol Bioeng* 13:285-287
- Kim JG. 2004. Changes of components affecting organoleptic quality during the ripening of Korean traditional soy sauce-amino nitrogen, amino acids and color. *Korean J Environ Health* 30:22-28
- Kim JK. 2002. Biologically active components of soy-fermented foods. *Korea Soybeans Digest* 19:1-7
- Korea Food & Drug Administration. Health Functional Food Code. 2010.
- Kwon DJ, Ha DM. 1994. The effect of salt concentration on the production of volatile organic acids by *Zygosaccharomyces rouxii*, a soy sauce yeast. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 22:120-125
- Lee JS, Kwon SJ, Jung SY, Choi YJ, Yoo JY, Chung DH. 1996. Changes of major components, enzyme activities, and microorganisms during ripening of traditional *Doenjang* and *Gochujang*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 24:247-253
- Lee JS, Yi SH, Ahn C, Yoo JY. 1997. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional *Meju*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25:448-453
- Manolopoulou E, Sarantinopoulos P, Zoidou E, Aktypis A, Kandarakis IG, Anifantakis EM. 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int J Food Microbiol* 82:153-161
- Moellering RC. 1995. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc*. In: GL Mandel, JE Bennett, R Dolin, M Douglas, and K Bennett(eds), *A Principles and Practice of Infectious Disease*, 4th ed., pp. 1826-1835, Churchill Living Stone, New York
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility test; approved standards M2-A9 and M7-A7 8th ed. CLSI document. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA
- Ryu BH, Cho KJ, Chae YJ, Jin SH. 1993. Continuous rapid fermentation of soy sauce by immobilized *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90 and *Candida versatilis* BH-91 using column type reactor. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 21:366-372
- Ryu BH, Kim SJ, Shin DB. 1992. Lactic acid, ethylalcohol and 4-ethylguaiacol contents of rapid fermentation of sardine soy sauce prepared by using immobilized whole cells. *Korean J Food Sci Technol* 24:456-462
- Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. 1997. Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin(possessing the *vanC* genotype). *J Clin Microbiol* 35:3166-3170
- Van Caesele P, Giercke S, Wylie J, Boyd D, Mulvey M, Amin S, Ofner-Agostini M. 2001. Identification of the first vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* harbouring *vanE* in Canada. *Can Commum Dis Rep* 27:101-104
- Yoo SK, Cho WH, Kang SM, Lee SH. 1999. Isolation and identification of microorganisms in Korean soybean paste and soybean sauce. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 113-117
- Yoon MY. 2008. Evaluation of lactic acid bacteria as starter cultures for fermented soymilk. Ph D. Thesis, Korea Uni. Seoul. Korea

접 수 : 2012년 2월 27일
 최종수정 : 2012년 3월 13일
 채 택 : 2012년 3월 14일