

Quality characteristics of popped rice *Doenjang* prepared with *Bacillus subtilis* strains

Kyung Ha Lee, Eun Ju Kim, Hye Sun Choi, Shin Young Park, Jae Hyun Kim, Jin Song*
Department of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

Bacillus subtilis 균주를 이용하여 제조한 팥화미 된장의 품질 특성

이경하 · 김은주 · 최혜선 · 박신영 · 김재현 · 송진*
농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Abstract

This study investigated the quality characteristics of popped rice *Doenjang* prepared with different *Bacillus* strains (*Bacillus subtilis* KACC 15935, and *Bacillus subtilis* HJ18-9). The changes in the enzyme activity (protease, cellulase, and α -amylase), amino-type nitrogen and ammonia-type nitrogen contents, and the reducing sugar were investigated during the fermentation period. Enzymes such as protease, cellulase, and α -amylase plays an important role in the changes in composition of nutrients, and in flavor and taste of popped rice *Doenjang*. Protease activities of the popped rice *doenjang* fermented with different *Bacillus* strains (control, *B. subtilis* KACC 15935, and *B. subtilis* HJ18-9) was in the range of 171.77-185.97 unit/g at the beginning of fermentation, and there were no significant differences among the samples. On the other hand, the protease activity in popped rice *Doenjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-9 increased significantly up to 248.77 \pm 4.53 unit/g at the end of fermentation ($p<0.05$). Cellulase activity and α -amylase activity of popped rice *Doenjang* in HJ18-9 was higher than these of other samples. After 56 days of fermentation, amino-type nitrogen in popped rice *doenjang* fermented with control, *B. subtilis* KACC 15935, and *B. subtilis* HJ18-9 increased significantly up to 174.99 \pm 3.70, 166.59 \pm 1.40, 225.39 \pm 3.70 mg%, respectively ($p<0.05$). These results suggested that *B. subtilis* HJ18-9 was a suitable starter for the preparation of soybean paste.

Key words : soybean, popped rice, *Doenjang*, *Bacillus subtilis*

서 론

재래식 된장은 대두만을 사용하여 메주를 만들고 이것을 소금물에 담구어 발효가 끝나면 메주덩어리를 걸러내어 액체부분은 간장으로 만들고, 남은 고형물은 소금을 더 첨가하여 재래식 된장을 만든다. 이와 같이 재래식 된장은 초기에 콩을 원료로 하여 제조된 메주를 사용한 콩된장이 주를 이루었으나, 조선 명종조(明宗朝)에 이르러 콩과 콩

이외의 전분질을 이용하여 메주 및 된장이 제조되었으며, 이때 사용된 전분질 원료에 따라 쌀된장, 보리된장 등으로 구분되었다(1). 된장의 중요 맛 성분인 아미노산은 총량에서 큰 차이가 없으나 개량식 된장은 재래식 된장보다 aspartic acid, glutamic acid, proline, arginine, serine 등의 함량이 높은 것으로 보고되고 있다(2). 주재료가 콩으로 이루어진 일반 된장의 연구 및 산업화가 이루어진 반면 쌀된장 관련 연구는 매우 미흡한 실정이다. 쌀된장은 국내 대기업을 중심으로 한 3~4 업체에서 생산되며, 일본의 미소가 국내 쌀된장 시장을 상당히 점유하고 있는 실정이다(3). 팥화미는 쌀을 가열하여 전분을 알파화 시킨 상태로 가공한 것을 말하며, 일반적으로 고두밥을 만든 채로 가만히 두면 원활한 발효를 위해 알파(α)화한 전분이 원래의 베타전분으로 되돌아가는데, 팥화미는 이것을 방지할 수 있는 처리법

*Corresponding author. E-mail : songjin@korea.kr
Phone : 82-63-238-3671, Fax : 82-63-238-3844
Received 22 July 2015; Revised 11 August 2015; Accepted 18 August 2015.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

이다. 팽화미는 최근 원료처리 공정의 간소화, 세미 폐수의 절감 등 이점이 많아서 점차 사용량이 늘고 있다. 이러한 개량식 된장을 제조하는데 있어 쌀을 기질로 이용하는 미생물이 이용할 수 있도록 고두밥을 찌서 가공과정을 거치는 대신 팽화미를 사용하여 누구나 손쉽게 개량식 된장을 제조하고자 하였다. Kim 등은 전분질 대신 α 화율(호화도)이 높아 발효가 잘 진행되므로 발효기일을 단축시킬 수 있다고 하였다(4).

장류의 기능성은 콩이나 부재료 자체가 갖는 기능성뿐만 아니라 메주나 장류 발효에 관여하는 미생물이 생산하는 다양한 2차 대사산물과 효소에 의한 것으로 알려져 있다(5,6). 된장의 품질에 영향을 끼칠 수 있는 미생물 유래 효소로는 protease, amylase, lipase가 있으며, 이러한 효소에 의해 원료의 단백질과 탄수화물 그리고 지방 등이 가용성으로 분해되어 된장의 맛과 향이 결정된다. 즉, 된장 고유의 맛과 향은 소금에서 오는 짠맛, 탄수화물이 알코올로 발효과정 중 생성되는 다양한 향, 단백질의 가수분해 산물인 아미노산에서 오는 구수한 맛 등이 조화를 이루면서 또한 향미와 색이 생성 된다(7). 발효 후 완성된 된장은 아미노산, 유기산, 미네랄 및 비타민류 등을 풍부히 함유하고 있어 영양원으로서 매우 중요하다(8). 최근에는 발효된장에서 항산화능, 항돌연변이성, ACE저해물질, 혈전 용해성 등 여러 가지 생리활성 물질의 기능성이 확인되면서 관심이 증대되고 있다(9).

본 실험은 선행 연구에서 메밀속성장으로 부터 cellulase, protease, amylase, lipase와 같은 세포의 효소 분비능이 우수한 *Bacillus subtilis* HJ18-9 균주를 분리 동정하였고(10), *B. subtilis* HJ18-9는 우수한 효소 활성뿐만 병원성균에 대한 항균 활성이 있음을 확인하였다.

따라서 본 연구에서는 산업적으로 표준화가 용이하고 기능이 있는 장류의 starter 표준화를 위해, 자연 발효시키기 위해 균을 넣지 않고 제조한 control과 *B. subtilis* KACC 15935, 그리고 다양한 효소활성을 지니는 *B. subtilis* HJ18-9를 starter로 사용하여 콩알 메주를 제조하여 팽화미 된장을 제조하고 품질특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에서 사용된 콩은 대원콩은 재배농가에서 구입하여 사용하였다. 스타터로 사용된 KACC15935는 국립 유전 자원센터에서 분양받은 균으로, 전통장에서 분리한 *B. subtilis*이다. *B. subtilis* HJ18-9는 선행연구를 통해 메밀 속성장으로 부터 분리된 균으로 amylase, protease, cellulase 등의 세포의 효소분비능이 우수하며, *S. enterica*, *S. aureus*, *C. albicans* 등에 대한 항균활성이 있는 균이다(10).

제 조

콩알메주 제조

장류용인 대원콩을 재료로 사용하였으며, 대원콩은 세척하여 25°C에서 24시간 수침하고 autoclave를 이용하여 증자(121°C, 30 min)하였다. 증자된 콩을 40°C 이하로 clean bench에서 냉각한다. 실험은 자연 발효시키기 위해 균을 넣지않고 제조한 control과 *B. subtilis* KACC 15935, *B. subtilis* HJ18-9를 첨가한 균으로 나누어 진행하였다. 각 균주를 10⁶ CFU/mL 이상의 농도가 되도록 배양하여 시료량의 1%(w/w)가 되도록 첨가 하였다. 균을 접종한 콩을 스티로폼 박스에 담아 37°C, 24시간 발효시킨다. 발효 시킨 콩을 50°C 송풍건조기에서 약 8시간 건조시킨(건조된 콩의 수분 : 8.5~9.5%) 후 건조하여 완성된 콩알메주로 된장제조에 사용하였다.

팽화미 된장 제조

균별 콩알메주 : 팽화미 : 소금 : 물 = 29 : 19 : 15 : 36의 비율로 3.4 kg 된장을 밀폐용기에 담고 소금이 약간 녹을 수 있게 저어주고 30°C에서 하루밤 수침하여 안정화시킨다. 안정화시킨 된장을 0일차로 sampling한다. 각 시료는 28°C에서 56 days 발효하였다.

추출물 제조

된장 시료 20 g에 80 mL의 증류수를 첨가하고(w/v) 균질화한(POLYTRON® PT 2100 Homogenizers, Kinematica AG, Switzerland) 후 이를 원심분리(8,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 분석 시료로 사용하였다.

α -Amylase 활성 측정

α -Amylase 활성 측정은 D.U.N(Dextrinogenic Unit of Nagase)법(11)에 의하여 측정하였다. 1% 전분 기질액(pH 7.0) 3 mL에 시료추출액 1 mL를 넣고 반응(40°C, 10 min)시킨 후 반응액 1 mL에 0.1 M HCl 10 mL를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액 1 mL에 0.005% I2-0.05% KI 용액 10 mL를 넣어 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 위와 같은 방법으로 측정하여 다음 식에 의해 효소활성을 계산하였다.

$$D.U.N = [(D - D') / D] \times 10 / 100 \times n$$

D : Absorbance of control

D' : Absorbance of sample

n : Dilution ratio of sample

Protease 활성 측정

Protease 활성 측정은 식품공전(12)에 따라 측정하였다. 0.2 M phosphate buffer에 0.6% casein을 용해한 후 pH를 7.0으로 보정하여 기질용액을 제조하였다. 이 기질용액 1.5

mL에 시료추출액 0.5 mL를 넣어 반응(37°C, 10 min) 시킨 후, 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 2 mL을 가하여 반응을 정지시켰다. 25분간 37°C water bath에서 방치시킨 후 여과(Whatman No. 2)하였다. 여액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 5 mL를 첨가한 후, Folin 시약 1 mL를 첨가하여 발색(37°C, 20 min)시켜서 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 후 분해물의 tyrosine 양은 tyrosine 표준곡선으로부터 계산하였으며, 효소 활성은 시료 1 g에 의해 1분간 tyrosine 1 µg을 생성하는 능력을 1 unit으로 하였다.

Cellulase 활성 측정

Cellulase 활성 측정은 carboxymethyl cellulose sodium salt(CMC)를 기질로 하여 효소와 반응 시킨 후, 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)방법으로 다음과 같이 측정하였다. 1% CMC(pH 7.0) 용액 0.5 mL와 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.25 mL를 넣은 후, 효소액 0.25 mL을 첨가하여, 50°C에서 15분간 반응시킨 후, DNS 시약을 3 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후, 5분간 끓는 물에 중탕시켜 발색시킨 다음, 위와 같은 방법으로 측정하였다. 대조구는 반응 정지를 먼저 시킨 다음, 위와 같은 방법으로 측정하였다. 효소활성을 시료 1 g에 의해 1분간 1 µg을 glucose을 생성하는 효소의 양을 1 unit으로 정의 하였다.

아미노태(NO³-N) 질소 함량 측정

시료추출액 5 mL, 중성 formalin 용액 10 mL, 증류수 10 mL를 넣은 플라스크에 0.5% phenolphthalein 용액 2~3방울을 가한 후, 0.1 N NaOH로 미홍색이 될 때까지 적정양과 시료 5 mL, 증류수 20 mL를 넣은 플라스크에 0.5% phenolphthalein 용액을 2~3방울을 가한 후, 0.1 N NaOH로 미홍색이 될 때까지 적정양을 이용하여 아미노태 질소 함량을 산출하였다(13).

$$\text{Amino type nitrogen(\%)} = (V_1 - V_0) \times F \times 0.0014 \times D \times 100 / S$$

V₁ : Titration value of sample(mL)

V₀ : Titration value of blank treat(mL)

F : Factor of 0.1 N NaOH

D : Dilution ratio

S : Mass of sample(g)

0.0014 : Nitrogen weight in 1 mL of 0.1 N NaOH(g)

암모니아태(NH⁴⁺-N) 질소함량 측정

아미노태 질소함량 측정 때와 동일한 시료액 0.1 mL 취한 후 phenol-hypochloride 반응에 의하여 시료 추출액 0.1 mL에 A용액(phenol 10 g과 sodium nitroprusside dihydrate 0.05 g/distilled water 1 L)과 B용액(Na₂HPO₄·12H₂O 9 g, NaOH 6 g과 NaOCl 10 mL/distilled water 1 L)을 각각 2 mL씩 넣고 37°C에서 20분간 반응시켜 630 nm에서 흡광도를 측정

하였으며, 표준곡선은 (NH₄)₂SO₄를 사용하여 암모니아태 질소함량을 측정하였다(14).

환원당 측정

환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(15)에 의하여 측정하였다. 시료 추출액 1 mL에 DNS 3 mL를 혼합한 후 5분 동안 중탕 가열하고 냉각한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하며 glucose standard curve를 통해 환원당 값을 구하였다.

$$\text{Reducing sugar(\%)} = A \times D \times 1 / S \times 100 / 1000$$

A : Reducing sugar content in sample solution(mg)

D : Dilution ratio

S : Mass of sample(g)

미생물 수 측정

총균수와 유산균수 측정은 각 시료 1 g을 멸균생리식염수를 이용하여 10진 희석법에 의해 10단계로 희석한 다음, 희석액을 총 균수는 plate count agar(Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 배양(37°C, 24시간)한 후, 결과를 계수하여 측정하였고, 유산균수는 MRS agar(Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 배양(37°C, 48시간)하여 colony forming units(CFU)/g로 나타내었다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 자료 처리는 SPSS program (12.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용하여 실시하였으며, 각 항목에 대한 평균(mean) 및 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. 팽화미 된장의 시료간 차이는 p<0.05 수준에서 one-way ANOVA를 실시하였으며, Duncan's multiple range test로 그 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Protease

발효 균주를 달리하여 제조한 팽화미 된장의 protease 활성 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 대두 단백질을 가수분해하여 구수한 맛 성분인 아미노산, polypeptide등을 생성하는 protease는 된장 제조 시 맛을 결정짓는 중요한 인자이다. 모든 시료에서 protease 활성이 21일에 가장 높은 효소활성을 나타내었고, control과 KACC15935는 발효가 진행됨에 따라 다시 감소하는 경향을 보였으며, HJ18-9는 21일부터 발효 종료일 56일 까지 유사한 protease활성을 나타내었다.

Protease는 된장 발효에 관여하는 미생물이 생산하며 아미노태 질소 함량과도 연관성이 있어 된장 특유의 맛을 내는데 중요한 역할을 하므로 protease 활성이 높은 HJ18-9로 제조한 된장의 품질이 우수한 것으로 판단된다. Yoon

등(16)은 *B. subtilis*로 추정되는 균을 첨가한 된장의 발효과정 중에 protease 활성이 발효 40일까지 증가하나 그 후 감소하는 경향을 보였다고 하였으며, Kim 등(17)은 천일염으로 제조한 된장의 발효특성에서 protease의 활성을 측정 한 결과 발효 기간 동안 점점 증가하다가 그 이후 감소한다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 또한 Mok 등(18)은 저염된장 발효 초기에 완만한 증가를 보이다 제조 2~3주 후부터 약간 감소하는 경향을 보인 후 7~10주 발효 후에 약간 다시 증가하는 경향을 나타내었다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 그 원인에 대해 계속 숙성되어 가면서 가용성 단백질이나 peptide가 아미노산으로 가수 분해되면서 protease 활성도가 증가한 것으로 사료된다고 밝혔는데, 본 연구에서는 그런 현상이 나타나지 않았다. 이는 된장의 효소활성은 사용한 미생물에 따라 큰 차이가 날 수 있어, 사용한 균주의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 된장에서 protease의 분비는 대두 단백질의 소화성과 영양성 개선에 큰 역할을 하며, 아미노태 질소 함량과도 연관성이 있어 된장 특유의 맛을 내는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 protease 활성이 높은 균주를 사용하여 된장을 제조할 경우, 된장의 맛과 영양성에 좋은 영향을 미칠 것으로 사료된다.

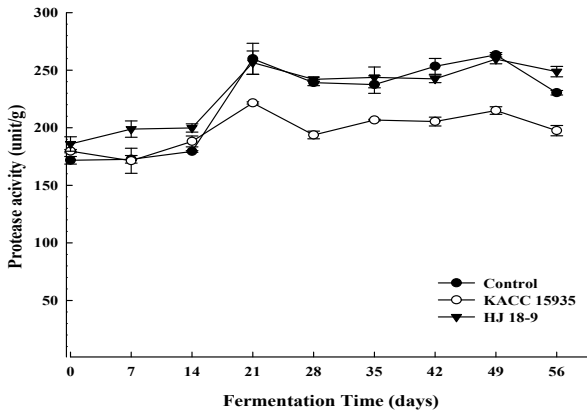


Fig. 1. Change of protease activity during popped rice *Doenjang* fermentation.

Cellulase

발효 균주를 달리하여 제조한 팽화미된장의 cellulase 효소활성은 Table 1과 같다. Cellulase중 특히 CMCase (carboxymethyl cellulase, Endo β -1,4-glucanase)는 exo- β -glucanase, β -glucanase와 함께 cellulase계 구성효소로서 식물세포벽 구성성분 중 대부분 차지하고 있는 cellulose를 분해할 수 있는 능력을 가지고 있어 장내 이용성 증진을 위해 널리 사용되는 효소이다. 발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 팽화미 된장의 cellulase 활성 변화는 Table 1에 나타내었다. 본 실험결과 control은 14까지 cellulase 활

성이 증가하다가 다시 감소하는 경향을 보여 42일에 가장 높은 활성을 나타내었으며, KACC15935는 7일까지 증가했다가 발효종료시점까지 감소하는 결과를 보였으며 HJ18-9는 14일에 가장 높은 활성을 나타내었으며, 21일부터 발효종료시점인 56일까지 감소되는 경향을 나타내었다. 56일 발효 후에는 control과 KACC15935에 비해서 HJ18-9 처리구에서 각각 2.15배, 2.63배 더 높게 나타났다.

전통 장류인 된장이나 간장은 발효과정에서 미생물의 다양한 효소(amylose, protease, cellulase 및 lipase)에 의해 콩에 함유된 단백질, 올리고다당류, isoflavone, 지질 등이 소화되기 쉬운 형태의 아미노산, 유리당, isoflavone 아글리콘, 지방산 등으로 분해되어 항산화 및 혈전용해 기능을 갖는 2차산물이 생성된다(19,20). 아직 전통장류에서 cellulase 활성에 대한 연구는 미비한 시점이다. 따라서 본 실험의 결과가 팽화미된장 뿐 아니라, 이들 균이 전통장류의 starter로 사용되는 데 있어 참고자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

α -Amylase

발효 균주를 달리하여 제조한 팽화미 된장의 α -amylase 활성 변화를 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. 각 sample의 α -amylase 활성은 발효초기인 7일에 최대활성을 보였으며 control, KACC15935, HJ18-9 처리구는 각각 $4.19 \pm 1.78 \sim 5.09 \pm 0.63$, $0.64 \pm 0.25 \sim 4.86 \pm 1.11$, $3.28 \pm 0.70 \sim 5.84 \pm 0.52$ unit/g 범위를 나타내었으며, control은 발효가 진행됨에 따라 α -amylase 활성이 점차 증가하였다가 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, *B. subtilis* KACC 15935처리구와 HJ18-9처리구는 14일 기점으로 유의적으로 감소하는 경향을 보였다.

Kim 등(21)은 시료별로는 대조구가 숙성 15일에서 44.80 unit/g으로 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, 시험구에서도 15일에 가장 높은 결과를 나타내었다. 대조구와 시험구의 효소활성은 큰 차이를 보이지는 않았지만, 숙성기간에 따라 amylase 효소활성은 급격히 감소하는 경향을 보였다고 하였다. 또한 된장의 숙성 기간별 amylase 활성을 측정한 결과, 일반적으로 모든 시료의 제품에서 amylase 활성은 매우 낮게 나타났다고 하였다. No 등(22)은 α -amylase 활성은 발효기간이 길어짐에 따라 약간 낮아지는 경향이 있다고 보고하였다.

일반적으로 된장의 α -amylase 활성은 담금 초기에 높았다가 발효가 진행되면서 서서히 낮아진다고 보고되었으며, 이는 원료에 함유되어 있던 탄수화물이 α -amylase의 기질이 되어 효소 활성이 높았다가 전분질 기질이 고갈되어감에 따라 점차 활성이 낮아지는 것으로 사료된다. 스타터의 종류에 따라 발효와 직접적으로 관계가 있는 효소들의 활성에 차이가 있는 것으로 보아 팽화미 된장의 품질 및 관능적인 특성을 향상시키는 데에는 스타터의 선택이 매우 중요한 것으로 사료된다.

아미노태 질소

발효 균주를 달리하여 제조한 팽화미 된장의 아미노태 질소 함량 변화는 Fig. 2에 나타내었다. 발효식품의 구수한 맛의 척도인 아미노태 질소는 팽화미된장의 발효숙성 중 미생물이 생산하는 protease 활성에 의해 생성된 아미노산에 기인한다. 아미노태 질소의 함량은 장류 발효의 품질 지표로서 중요하기 때문에 그 함량을 측정하였다. 아미노태 질소 함량은 protease 활성과 유사한 경향을 나타내는데 본 연구에서도 유사한 경향을 확인할 수 있었다. *B. subtilis* HJ18-9을 접종한 팽화미 된장에서 104.37±4.27-225.39±3.70 mg% 로 높은 함량을 나타냈고, control처리구와 KACC15935처리구는 각각 111.38±0.81-174.99±3.70, 74.19±6.10-166.59±1.40 mg% 함량을 나타내었다. 모든 처리구에서 발효기간 종료지점인 56일에서 아미노태 질소 함량이 가장 높게 나타났다.

Lee 등(23)의 연구결과에 따르면 발효 초기 25.1~34.1 mg% 범위에서, 발효 42일 151.5~200.0 mg%로 모든 시험구의 아미노태 질소 함량은 발효가 진행됨에 따라 증가하였다고 보고 하였으며, 이는 발효미생물에 의해 생성된 단백질 가수분해효소작용으로 대두단백질이 분해된 것으로,

특히 발효 초기에 급격하게 분해되는 것으로 알려져 있다 (24). 식품공전의 된장규격은 아미노태 질소 함량이 160 mg% 이상으로 규정되어 있다. 본 연구결과에 의하면 모든 처리구의 발효종료일 아미노태 질소함량은 160 mg% 이상 함량을 나타내어 가식 가능한 수준으로 발효됨을 알 수 있었다. Lee 등(25)은 밀된장의 발효숙성 과정 중 아미노태 질소 함량 변화를 관찰한 결과 초기 아미노태 질소는 106.48~162.51 mg%으로 나타났으며 이와 같은 값의 차이는 사용한 균주에 따라 그 함량이 다르다고 하였다. 또한 Kim(3)은 국내외 시판 쌀된장 14종의 아미노태 함량을 분석하였는데 시료에 따라 1.01~2.05배 차이가 있다고 하였다. 이는 된장 제조 시 첨가되는 콩과 쌀의 함량 차이에서 기인된 것으로 사료된다. 따라서 본 실험의 모든 시료에서 전체적으로 아미노태 질소 함량이 낮은 것은 발효시간이나 온도나 같은 환경과, 실험 시 첨가되는 재료의 함량, 그리고 사용한 균주 등의 다양한 원인에 의한 영향인 것으로 사료 된다.

암모니아태 질소

발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 팽화미된장의

Table 1. Change of enzyme activities (unit/g) during popped rice *Doenjang* fermentation

Enzymes Strains	Fermentation time (days)									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
Control	38.75±13.55 ^{Cc1)}	50.00±27.11 ^{Cc}	122.92±8.84 ^{Bab}	97.50±20.08 ^{Bb}	32.50±1.13 ^{Cc}	101.45±23.26 ^{ABb}	164.15±27.08 ^{Aa}	46.05±18.60 ^{Bc}	53.75±15.91 ^{ABc}	
Cellulase KACC15935	112.92±12.37 ^{Bb}	235.42±38.30 ^{Ba}	212.50±41.25 ^{Ba}	85.00±32.95 ^{Bbc}	70.85±5.87 ^{Bbc}	60.40±20.65 ^{Bbc}	62.50±13.01 ^{Bbc}	80.40±17.11 ^{Bbc}	43.75±13.51 ^{Bc}	
HJ 18-9	430.84±29.47 ^{Ab}	485.42±14.73 ^{Ab}	658.34±41.25 ^{Aa}	218.35±18.88 ^{Acd}	223.75±6.43 ^{Acd}	151.70±24.75 ^{Ae}	249.15±41.22 ^{Ae}	158.75±20.58 ^{Ade}	115.45±30.05 ^{Ae}	
Control	4.42±1.35 ^{Aa}	5.09±0.63 ^{Aa}	3.39±0.36 ^{Ba}	5.05±1.51 ^{Aa}	4.19±1.78 ^{Ba}	4.88±0.60 ^{Aa}	5.06±0.53 ^{Aa}	4.20±0.44 ^{Aa}	4.64±0.74 ^{ABa}	
α -amylase KACC15935	0.88±0.82 ^{Bd}	4.86±1.11 ^{Aa}	3.76±0.86 ^{Bab}	3.31±2.94 ^{Aabc}	1.62±0.77 ^{Abcd}	1.42±0.63 ^{Ccd}	0.67±0.28 ^{Cd}	0.64±0.25 ^{Bi}	0.79±0.91 ^{Bi}	
HJ 18-9	3.91±0.78 ^{Abc}	5.37±0.98 ^{Aab}	5.84±0.52 ^{Aa}	4.83±1.72 ^{Aabc}	3.99±0.29 ^{Abc}	3.78±0.11 ^{Bbc}	3.28±0.70 ^{Bc}	4.58±0.91 ^{Aabc}	5.26±1.27 ^{Aab}	

¹⁾Means in the same column ^{A-C} and row ^{a-c} followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

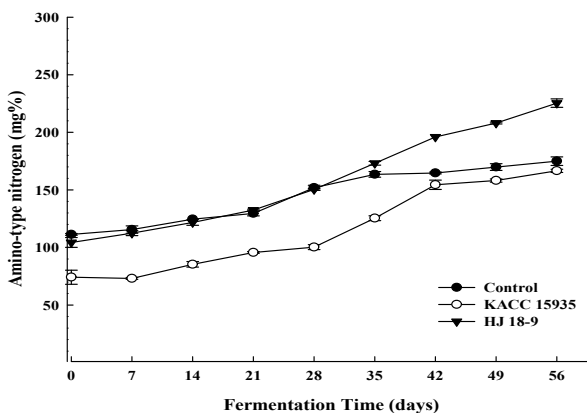


Fig. 2. Change of amino-type nitrogen during popped rice *Doenjang* fermentation.

암모니아태 질소 함량 변화는 Table 2에 나타내었다. 팽화미된장의 암모니아태 질소의 함량은 control에서는 0일차에 가장 높은 함량을 나타내었으며 KACC 처리구에서는 42일차에 HJ18-9 처리구에서는 49일차에 가장 높은 함량을 나타냈다. 전반적으로 *B. subtilis* KACC 15935처리구에서 발효되는 동안 유의적으로 높은 암모니아태 함량을 나타내었다. Kim 등(13)은 암모니아태 질소함량은 대조구 보다는 시험구에서 높은 함량을 나타내었다. 숙성일별로 살펴보면 모든 된장에서 숙성일이 경과함에 따라 암모니아태 질소함량도 증가하는 경향을 나타냈다고 하였으며 Kim 등(26)은 숙성과정 중 protease 작용으로 단백질성 질소가 감소하므로 이에 따른 상대적인 증가라고 할 수 있다라고 하였다. 즉 Hwang 등(27)의 보고에서 발효 기간 중 주로 미생물이 분비하는 protease가 원료대두의 단백질에 작용하여 수용

성 질소형태로 가수분해 되고 이어서 peptide를 거쳐 아미노태 질소형태로 가수분해 하여 된장의 구수한 맛이 생성됨과 동시에 발효가 계속 진행되면서 암모니아태 질소를 형성시킨다고 하였다. 암모니아태 질소는 단백질 분해과정에서 탈아미노반응에 의해 생성되며 함량이 증가할수록 이취와 함께 불쾌감을 준다. 따라서 일반적으로 장류제품의 변패 또는 이상발효의 지표로써 이용된다(28). 이처럼 암모니아태 질소함량이 높은 시료와 숙성 기간에 따라 암모니아태 질소함량이 증가하는 것이 좋지 않은 결과로 해석할 수도 있으나, 된장 품질에 좋은 영향을 끼치는 아미노태 질소와 비교하였을 때, 그 함량이 월등히 낮을 뿐만 아니라, 식품공전상의 규격이 400 mg% 이하인 것을 고려할 때, 본 연구에서 사용한 균주로 제조한 된장의 품질에 나쁜 영향을 미친다고는 볼 수 없다고 생각된다.

따라서 본 실험결과 *B. subtilis* KACC 15935처리구에서 암모니아태 함량 값이 높은 것으로 보아 세가지 처리구에서는 control과 HJ18-9처리구에서 더 좋은 품질의 된장이 제조될 것으로 사료된다.

환원당 함량

발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 팽화미된장의 아미노태 질소 함량 변화는 Table 2에 나타내었다. 환원당은 단맛을 부여하는 물질로 관능적인 품질평가에 중요시되는 지표 중 하나이다. 환원당의 증가는 지속적인 amylase의 작용으로 전분이 dextrin으로 dextrin이 maltose와 glucose로 분해과정을 거쳐 생성되어 증가한다. *B. subtilis*는 α 또는 β -amylase를 생성하여 된장 발효 중 대두중의 전분을 당으로 전환 시키며, 생성된 당은 된장의 단맛에 중요한 인자로 작용한다(29). 발효기간 동안 발효기간이 증가할수록 환원당 함량이 증가하는 경향을 보였으며, *B. subtilis* HJ18-9 처리구에서는 3.31±0.08%~7.10±0.15% 환원당이 가장 높게 나타났다. Control 처리구에서는 2.68±0.04~6.25±0.09%로 나타났으며, *B. subtilis* KACC15935 처리구에서는 1.48±0.01~2.48±0.02%로 나타났다. Control에서는 28일에서 가장 높은 환원당 값을 나타내었으며 KACC15935처리구

와 HJ18-9 처리구에서는 발효종료시점인 56일에서 가장 높은 환원당 값을 나타내었다. 대부분 된장에서 발효 초기에 당 함량이 최대치를 보이고, 그 이후 당이 미생물에 의한 알콜 발효 및 유기산 발효의 기질로 사용됨에 따라 감소하는 것으로 알려져 있다(30). 그러나 본 실험에서는 control을 제외하고 발효기간이 증가할수록 높은 환원당 값을 나타내었다. 이는 된장 발효 시, 코지 등 전분질 원료의 분해에 의해 환원당이 생성되는데 생성속도가 미생물에 의해 이용되는 속도보다 높으면 총 함량이 증가한다고 보고하였다(31).

Kim 등(3)은 14종의 쌀된장 환원당 함량은 0.55% 이하의 값을 나타내었으며, Seo 등(32)은 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus*속으로 만든 된장에서 환원당 함량은 3.5% 미만으로 극히 적었다. 또한 본 실험의 콩과 팽화미 함량의 비율(3:2)의 비율과 비슷한 비율로 쌀된장을 제조한 Lee 등(23)은 발효 후 쌀된장의 환원당의 함량이 0.43~0.50%가 되었다고 보고하였는데, 본 실험의 결과는 이와 비교하여 상당히 높은 환원당 값을 나타내었다. 이는 전분을 a화 하여 첨가한 팽화미를 이용하여 된장을 제조함으로써, 미생물의 효소가 전분기질을 이용하는데 용이할 수 있었을 것으로 사료된다. 본 실험에서 KACC15935와 HJ18-9처리구에서 발효 종료일 까지 환원당 함량은 유의적으로 증가하는 경향을 나타내어 발효 다른 품질특성을 감안하여 발효기간을 더 늘릴 수 있을 것으로 사료된다.

미생물 수의 변화

발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 팽화미된장의 총균수 변화는 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. 발효 초기에 control, KACC15935, *B. subtilis* HJ18-9 처리구의 총균수는 7.52±0.04, 7.96±0.03, 7.99±0.05 log CFU/g로 나타났다. 발효진행 56일 후, 총균수는 7.67±0.06, 7.96±0.01, 8.06±0.04 log CFU/g로 각각 나타났다. 전반적으로 발효기간 동안 총균수는 비슷한 값을 나타내었으며 이러한 결과는 Mok 등(18)의 연구결과와 유사하였다.

Table 2. Change of ammonia-type nitrogen (mg%), reducing sugar (%) contents during popped rice *Doenjang* fermentation

Type	Strains	Fermentation time (days)									
		0	7	14	21	28	35	42	49	56	
Ammonia-type nitrogen	Control	50.21±0.93 ^{Ba1)}	32.19±0.40 ^{Cf}	45.54±0.55 ^{Bb}	44.80±0.34 ^{Bb}	39.98±1.33 ^{Bd}	42.58±0.16 ^{Bc}	42.03±0.46 ^{Cc}	37.13±0.87 ^{Cc}	12.44±0.99 ^{Cg}	
	KACC15935	59.59±2.37 ^{Abc}	46.17±1.60 ^{Ac}	60.02±2.44 ^{Abc}	60.93±0.19 ^{Ab}	55.07±2.61 ^{Ad}	61.74±1.60 ^{Aab}	63.84±1.67 ^{Aa}	63.84±0.86 ^{Aa}	57.17±1.14 ^{Ad}	
	HJ 18-9	46.65±1.54 ^{Cab}	34.82±0.79 ^{Bc}	43.35±1.40 ^{Bc}	46.15±1.56 ^{Bab}	40.51±1.20 ^{Bd}	44.77±1.09 ^{Bbc}	46.97±0.75 ^{Bab}	48.24±2.54 ^{Ba}	40.66±0.38 ^{Bd}	
Reducing sugar	Control	2.68±0.04 ^{Bg}	3.24±0.06 ^{Bf}	4.63±0.06 ^{Bc}	5.29±0.01 ^{Bd}	6.37±0.02 ^{Ba}	6.32±0.12 ^{Ba}	6.05±0.13 ^{Bbc}	6.17±0.09 ^{Bbc}	6.25±0.09 ^{Bab}	
	KACC15935	1.48±0.01 ^{Cg}	1.68±0.03 ^{Cf}	2.38±0.03 ^{Cb}	2.29±0.04 ^{Cc}	2.08±0.02 ^{Cc}	2.26±0.04 ^{Ccd}	2.20±0.02 ^{Cd}	2.29±0.07 ^{Cc}	2.48±0.02 ^{Ca}	
	HJ 18-9	3.31±0.08 ^{Ag}	4.33±0.01 ^{Af}	5.19±0.08 ^{Ac}	5.75±0.09 ^{Ad}	6.67±0.06 ^{Ab}	6.60±0.11 ^{Ab}	6.34±0.15 ^{Ac}	6.75±0.09 ^{Ab}	7.10±0.15 ^{Aa}	

¹⁾Means in the same column ^{A-C} and row ^{a-c} followed by different letters are significantly different (p<0.05).

또한 콩알된장의 유산균수는 발효초기 6.07 ± 0.03 , 6.73 ± 0.04 , 7.15 ± 0.07 log CFU/g로 나타났다. 발효 진행 60일 후 유산균수는 3.92 ± 0.01 , 3.11 ± 0.09 , 3.70 ± 0.06 log CFU/g로 나타났다. 발효기간에 따라 살펴보면, 발효기간 동안 지속적으로 감소하였다. Lee 등(22)도 연구에서도 발효 초기균수는 $6.86 \sim 8.02$ log CFU/g를 나타내었으며, 발효 42일에는 $2.00 \sim 4.69$ log CFU/g으로 발효기간 동안 지속적으로 감소하였다고 하였다.

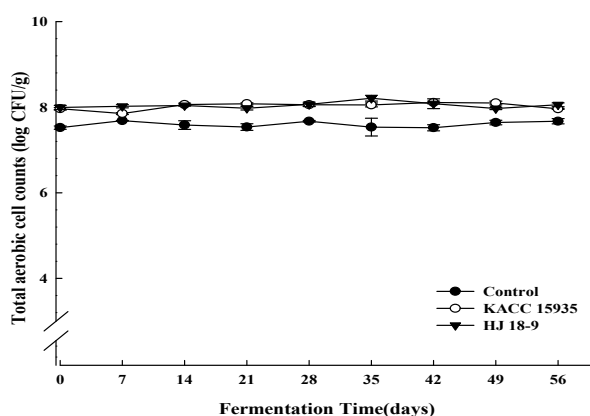


Fig. 3. Change of total aerobic counts during popped rice *Doenjang* fermentation.

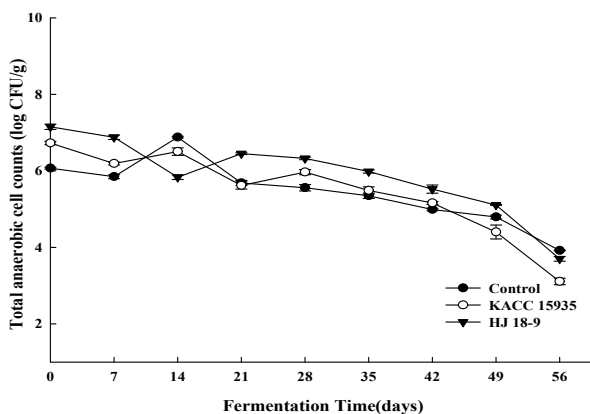


Fig. 4. Change of total anaerobic counts during popped rice *Doenjang* fermentation.

요 약

본 연구는 된장 제조 시 자연발효 시킨 control과, *B. subtilis* KACC15935, *B. subtilis* HJ18-9균주를 starter로 접종하여 발효시킨 팽화미된장의 효소활성과 품질특성을 측정하였다. 환원당을 유리하는데 관여하는 α -amylase 효소활성의 경우 control과 HJ18-9를 접종한 시료에서 높게 나타났

다. 또한 된장의 단백질을 분해하여 특유의 구수한 맛 성분을 유리하는 protease 활성의 경우도 control과 HJ18-9를 접종한 시료에서 높게 나타났으며, 이는 아미노태질소 함량에서도 같은 경향을 나타냈다. 또한 cellulose를 분해할 수 있는 능력을 가지고 있어 유용성분의 장내 이용성 증진을 위해 널리 사용되는 효소인 cellulase활성이 있는 HJ18-9 균주를 처리한 접종구에서 115.45 ± 30.05 unit/g로 control과 *B. subtilis* KACC15935 처리구에서 53.75 ± 15.91 , 43.75 ± 13.51 unit/g 인 것에 비해 높게 나왔다. 이러한 결과로 본 연구를 통해 선별한 균주를 starter로 접종하여 된장 제조에 알맞은 균주를 개발, 평가하여 가공품으로 개발의 기초연구가 되고자 하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술사업 (과제번호PJ010927)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

References

- Jung SW, Kwon DJ, Koo MS, Kim YS (1994) Quality characteristics and acceptance for Doenjang prepared with rice. *J Korean Agric Chem Sci*, 37, 266-271
- Park JS, Lee MY, Lee TS (1995) Compositions of sugars and fatty acids in soybean paste (Doenjang) prepared with different microbial sources. *J Korean Soc Food Nutr*, 24, 917-924
- Kim YS, Kim JY, Choi HS (2011) Quality characteristics of commercial rice soybean paste. *Korean J Food Preserv*, 18, 853-858
- Kim YJ, Choi YH, Park SY, Choi HS, Jeong ST, Kim EM (2012) Quality characteristics of Kochujang with different ratios of rice-nuruk. *Korean J Community Living Sci*, 23, 339-346
- Kim JS (1996) Current research trends on bioactive function of soybean Korean soybean digest. *Korean J Food Sci Technol*, 13, 17-24
- Ryun YR, Kook MC, Cho SC, Shin HH, Kim BC, Cho HY, Cho EK (2011) Development of pretreatment and mixed culture processes for plant originated lactic acid to produce a functional lactic acid beverage. *Korean J Food Nutr*, 24, 117-123
- Park JS (1992) Histological changes of Doenjang during the fermentation with different strains. *Korean J Food*

- Sci Technol, 24, 477-481
8. Jeong MW, Jeong JK, Kim SJ, Park KY (2013) Fermentation characteristics and increased functionality of doenjang prepared with bamboo salt. J Korean Soc Food Sci Nutr, 42, 1915-1923
 9. Rho JD, Choi Y, Lee SJ (2008) Quality characteristics of soybean pastes (doenjang) prepared using different types of microorganisms and mixing ratios. Korean J Food Cookery Sci, 24, 243-250
 10. Lee SY, Kim JY, Baek SY, Yeo SH, Koo BS, Park HY, Choi HS (2011) Isolation and identification characteristics of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat sokseongjang. Korean J Food Sci Technol, 43, 735-741
 11. Yoon KS (1998) Changes of enzymatic activities during the fermentation food soybean-soypaste by *Aspergillus* spp. MS Thesis. Konkuk University, Seoul, Korea
 12. KFDA (2005) Food Code. Korea Food & Drug Administration, Cheongwon, Korea
 13. Chae SK, Kang KS, Ma SJ, Bang GW, Oh MH, Oh SH (2000) In Standard Food Analysis. Gigu-Munhwasa, Seoul, Korea, p 299-301
 14. Uzzan M, Labuza TP (2004) Critical issue in R&D of soy isoflavone enriched foods and dietary supplement, J Food Sci, 69, 77-86
 15. Weatherburn MW (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. J Anal Chem, 39, 971-974
 16. Yoon IS, Kim HO, Yoon SE, Lee KS (1977) Studies on the changes of N-compounds during the fermentation process of the Korean Doenjang. Korean J Food Sci Technol, 9, 131-137
 17. Kim SH, Kim SJ, Kim BH, Kang SG, Jung ST (2000) Fermentation of Doenjang prepared with sea salts. Korean J Food Sci Technol, 32, 1365-1370
 18. Mok CK, Song KT, Lee JY, Park YS, Lim SB (2005) Changes in microorganisms and enzyme activity of low salt soybean paste (doenjang) during fermentation. Food Engin Prog, 14, 153-158
 19. Ra KS, Oh SH, Kim JM, Suh HJ (2004) Isolation of fibrinolytic enzyme and β -glucosidase producing strains from Doenjang and optimum conditions of enzyme production. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 439-442
 20. Ryu BH (2003) Development of functional Doenjang for antioxidative and fibrinolytic activity. J Life Sci, 13, 559-568
 21. Kim JH, Yoo JS, Lee CH, Kim SY, Lee SK (2006) Quality properties of soybean pastes made from meju with mold producing protease isolated from traditional meju. J Korean Soc Appl Biol Chem, 49, 7-14
 22. No JD, Lee DH, Lee DH, Choi SY, Kim NM, Lee JS (2006) Changes of quality and physiological functionality during the fermentation of Doenjangs made by isolated Nuruk mold and commercial Nuruk mold. J Korean Soc Food Sci Nutr, 35, 1025-1030
 23. Lee SY, Park NY, Kim JY, Choi HS (2012) Quality characteristics of rice-doenjang during fermentation by differently shaped Meju and adding starter. Korean J Food Nutr, 25, 505-512
 24. Lee JY, Mok CK (2010) Changes in physicochemical properties of low salt soybean paste (doenjang) during fermentation. Food Engin Prog, 14, 153-158
 25. Lee GR, Ko YJ, Kim EJ, Kim IH, Shin KH, Kim YG, Ryu CH (2013) Quality characteristic of wheat Doenjang according to mixing ratio of meju. Korean J Food Preserv, 20, 191-198
 26. Kim DH, Kim SH (1999) Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Mucor* and *Rhizopus* strains. Korean J Food Sci Technol, 31, 176-182
 27. Hwang HA, Lee NK, Choi IJ, Hagnm YT, Kwon KO, Kim BY (2008) Selected of microorganisms and optimization of manufacture process for cheonggukjang. Korean J Food Sci Technol, 40, 406-411
 28. Lee GY, Kim SI, Jung MG, Seong JH, Lee YG, Kim HS (2014) Characteristics of Chungkookjang that enhance the flavor and GABA content in a mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383. J Life Sci, 24, 1102-1109
 29. Hong JS, Park JR, Jeon JR, Cha MH, Kim J, Kim JH (2004) Quality characteristics and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of doenjang prepared with *Bacillus subtilis* SS103. J East Asian Soc Dietary Life, 15, 363-369
 30. Kim HL, Lee TS, Noh BS, Park JS (1998) Characteristics of samjangs prepared with different doenjangs as a main material. Korean J Food Sci Technol, 30, 54-61
 31. Lee JY, Mok CK (2010) Changes in physicochemical properties of low salt soybean pastes (doenjang) during fermentation. Food Engin Prog, 14, 153-158
 32. Seo JS, Han EM, Lee TS (1986) Effect of Meju shapes and strains on the chemical composition of soybean paste. J Korean Soc Food Nutr, 15, 1-9