

유해균 억제능을 지닌 복합종균을 접종하여 제조한 된장에서 *Bacillus cereus* 억제

이재용¹, 심재민¹, 이강욱¹, 조계만², 김경민³, 신정혜³, 김정상⁴, 김정환^{1,5*}

¹경상대학교 대학원 응용생명과학부(BK21 Plus)

²경남과학기술대학교 식품과학부

³남해마늘연구소

⁴경북대학교 식품공학부(BK21 Plus)

⁵경상대학교 농업생명과학연구원

Received: June 14, 2016 / Revised: July 15, 2016 / Accepted: July 15, 2016

Inhibition of *Bacillus cereus* in Doenjang Fermented with Multiple Starters Showing Inhibitory Activity against Pathogens

Jae Yong Lee¹, Jae Min Shim¹, Kang Wook Lee¹, Kye Man Cho², Gyoung Min Kim³, Jung-Hye Shin³, Jong-Sang Kim⁴, and Jeong Hwan Kim^{1,5*}

¹Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

²Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea

³Namhae Garlic Research Institute, Namhae 52430, Republic of Korea

⁴School of Food Science and Biotechnology (BK21 Plus), Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

⁵Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

Doenjang samples were prepared by inoculation of multiple starters consisting of two *Bacillus* spp., one yeast, and one fungus. Doenjang A was fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *Pichia farinosa* SY80, and *Rhizopus oryzae*. Doenjang B and C were fermented with the same yeast and fungus but different *Bacillus* strains; namely, *B. amyloliquefaciens* EMD17 and *B. subtilis* CH3-5 for doenjang B, and *B. amyloliquefaciens* MJ1-4 and *B. subtilis* CH3-5 for doenjang C. Doenjang D was fermented with microorganisms present in rice straw (control). The doenjang samples were spiked with *B. cereus* ATCC14579 at two different levels, 10^4 CFU/g doenjang (I) and 10^7 CFU/g doenjang (II). All eight doenjang samples were fermented for 70 days at 25°C. Growth of *B. cereus* was inhibited in doenjang A, B, and C, with the bacterial cell count after 70 days being less than the initial 10^4 CFU/g added, whereas *B. cereus* was not inhibited in doenjang D. Doenjang B showed the strongest inhibitory activity against *B. cereus*, with a cell count of less than 10^3 CFU/g after 42 days, even when *B. cereus* was initially added at 10^7 CFU/g. Some properties of the doenjang samples, such as pH, TA, and amino-type nitrogen content, were similar to those of doenjang fermented with starters only. The results indicate that carefully selected starters can effectively prevent the growth of *B. cereus* during doenjang fermentation.

Keywords: Doenjang, multiple starters, microbial safety, *Bacillus cereus*

서 론

된장은 각종 식품들 조리에 조미를 위해 널리 사용되는 전

통대두발효식품으로 여러 식품들의 풍미 증진과 함께 아미노산 급원으로 중요하게 활용되어 왔다[3]. 또 연구들을 통해 된장은 항산화, 항비만, 혈전용해능, 항암, 항고혈압 등의 다양한 기능성들을 지닌 것이 알려졌다[2, 5, 7, 8]. 하지만 최근 된장을 비롯한 간장, 고추장 등 전통장류의 소비는 정채기대지는 쇠퇴기에 접어들어서 소비촉진을 위한 다양한 방안 마련이 요구되고 있다. 청소년과 외국인 기호에 맞는 다양한 장류제품들 개발과 함께 기능성이 향상된 고품질 제

*Corresponding author

Tel: +82-55-772-1904, Fax: +82-55-772-1909

E-mail: jeonghkm@gnu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

품 개발이 요구되며 동시에 장류의 안전성 제고를 위한 제조방법 개선도 요구된다. 전통방식으로 제조되는 장류의 경우 제조 및 발효과정에서 주위 환경에 존재하는 독소생성 미생물들 오염 가능성이 지속적으로 제기되어서 안전성 확보는 장류 소비촉진과 세계화를 위해 반드시 해결해야 할 과제이다[18]. 장류의 대표적인 유해균들로는 aflatoxin이나 ochratoxin 등 진균독소를 생성하는 곰팡이들과 설사형 혹은 구토형 독소를 생성하는 *Bacillus cereus*를 들 수 있다[1, 12]. *B. cereus*의 경우 식품공전에는 메주를 제외한 장류에서 10^4 CFU/g 이하로만 검출되어야 한다[10]. 하지만 실제 오염되는 숫자는 알려져 있지 않고 위생적으로는 허용치보다 적을수록 바람직하다 된장에서 유해곰팡이나 *B. cereus* 증식을 억제하는 효과적 방법중 하나는 이들을 억제하는 능력을 지닌 bacilli 균주들을 선발하여 된장 제조시 종균으로 사용하는 것이다. 유해균 증식 억제능력외에 혈전용해능과 같은 기능성을 지닌 균주들을 종균으로 함께 사용한다면 장류 안전성 확보와 함께 기능성 개선도 기대할 수 있다[4, 6]. 저자들은 이전 연구에서 복합종균을 사용하여 된장을 제조하고 20°C에서 10주간 숙성하면서 품질 변화를 측정된 결과 된장의 안전성과 기능성 개선을 보고한 바 있다[5]. 본 실험에서는 *Bacillus* 2 균주와 효모와 곰팡이 각각 1 균주씩 총 4종 균주들로 구성된 복합종균을 사용하여 된장을 제조하고 여기에 *B. cereus*를 된장 시료 1 g 당 각각 10^4 과 10^7 CFU (colony forming unit)으로 오염시켰다. 된장들을 10주간 25°C에서 숙성시키면서 *B. cereus* 균수를 측정된 결과 종균에 의해 효과적으로 *B. cereus* 증식이 저해되었기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

콩알메주를 이용한 된장 제조

콩(2013년산, 함양농협 구매) 300 g을 18시간 20°C에서 수침한 다음 121°C에서 15분간 증자한 후 식힌 콩 100 g 씩에 각각 *Bacillus* 2 균주, 곰팡이, 효모를 접종하여 발효시켰다. *Bacillus*는 *B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. subtilis* CH3-5 3 균주들중에서 2 균주씩 조합을 달리하여 콩 100 g에 1% (v/w, 각 균주 0.5%) 접종(5 log CFU/g) 한 후 37°C, 45시간 발효시켰다. 곰팡이는 *Rhizopus oryzae*를 1% (v/w) 접종하여(6 log spores/g) 25°C에서 48시간 두어 포자 증식을 유도한 후 45시간 더 발효시켰다. 효모는 *Pichia farinosa* SY80 균주를 1% (v/w) 접종하여(5 log CFU/g) 30°C에서 45시간 발효시켰다. *B. amyloliquefaciens* EMD 17은 청국장장에서 분리한 균주로 lipopeptides들을 생산하여 *B. cereus*와 *Listeria monocytogenes*

증식을 억제하고 또 ochratoxin을 생성하는 *Penicillium* 속 곰팡이와 여러 식물들에서 병을 유발하는 병원성 곰팡이들 4종을 억제한다[16]. *B. amyloliquefaciens* MJ1-4는 메주에서 분리된 균으로 aflatoxin B1 (AFB1) 생산균인 *Aspergillus*와 ochratoxin 생성 *Penicillium* 증식을 억제한다[13]. *B. subtilis* CH3-5는 청국장장에서 분리한 균주로 혈전용해능이 우수한 균주이다[9]. *R. oryzae*와 *P. farinosa* SY80들은 간장에서 분리되었고 각각 단백분해능과 발효시 향미증진 특성이 우수하다[6].

발효 후 콩들을 섞은 후 55°C에서 48시간 건조시켜서 콩알메주를 얻었다. 콩알메주에 증자 후 냉각한 콩을 동량(300 g) 첨가하고 물과 소금(정제염, 한주소금, 울산, 한국)을 첨가하고 섞어서 최종 염도 12%인 된장들을 제조하였다. 콩알메주 제조와 된장 제조의 상세한 과정들은 앞서 보고한 바와 같다[5]. 된장 시료들을 정리하면 다음과 같다. 된장 A (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80), 된장 B (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80), 된장 C (*B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80), 된장 D (벗짚을 균원 시료로 접종). 된장 D는 콩알메주 제조시 증자한 콩 300 g을 잘게 썰은 벗짚으로 둘러싼 후 발효시켜 얻은, 즉 벗짚에 존재하는 미생물들을 접종하여 얻은 것이다. 된장을 제조할 때 LB 배지에서 미리 배양한 *Bacillus cereus* ATCC14579를 4 log CFU/g과 7 log CFU/g로 첨가량을 각각 달리하여 된장 시료들에 첨가하여, 인위적으로 오염시킨 된장들을 얻었다. *B. cereus*를 4 log CFU/g 접종한 된장들을 A-I, B-I, C-I, D-I으로 7 log CFU/g 접종한 된장들은 A-II, B-II, C-II, D-II로 명명하였다. 총 8종류의 된장 시료들을 25°C에서 70일간 숙성하면서 7일 간격으로 *B. cereus* 생균수 변화와 품질 변화를 조사하였다.

된장 발효중 생균수 변화

된장시료 10 g을 취해서 0.1% peptone 수 90 ml와 섞은 후 stomacher (stomacher®80, Seward, USA)를 사용하여 균질화하고 단계희석 하였다. 희석액 0.1 ml를 LB 한천배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양하여 얻은 균수에 희석배율을 곱하여 bacilli 생균수를 구하였다. *B. cereus*는 MYP (mannitol-egg york-polymixin B) 선택배지를 이용하여 계수하였다[14]. MYP 평판배지에 도말하여 37°C에서 배양 후 혼탁한 환을 보이는 분홍색 집락을 계수하고 여기에 희석배수를 곱하여 *B. cereus* 균수를 측정하였다. 효모 균수는 희석액 0.1 ml씩을 YM 한천배지(chloramphenicol, 10 µg/ml)에 도말하여 30°C, 48시간 배양한 후 동일한 방법으로 계수하였다.

발효 중 된장시료들의 특성 변화

된장 시료의 pH는 된장 시료 균질액을 pH meter (DP-215M; DMS, Korea)를 사용하여 조사하였고 적정산도 (Titratable acidity)는 시료액을 pH 8.3이 될때까지 0.1 N NaOH로 적정하고 사용된 NaOH 부피(ml)로부터 계산하여 이를 젖산(%)으로 나타내었다. 된장의 아미노태질소는 Formol 법을 이용하여 측정하였다[11].

결과 및 고찰

된장 숙성중 생균수 변화

B. cereus 균주를 오염시킨 된장 시료들을 70일 동안 숙성 하면서 매 주 시료를 취하여 *Bacillus*와 효모 생균수 변화를 측정하였다(Fig. 1). 된장 제조 직후 *Bacillus* 총균수(종균 +

B. cereus)는 8.35–8.66 log CFU/g이고 숙성 중 서서히 증가 하여 35–49일 사이 9.12–9.25 log CFU/g로 최고점에 도달하고 숙성 종료 시에는 8.82–9.07 log CFU/g을 나타내었다. 동일한 종균 조합들과 동일한 방법을 사용하여 제조하되 *B. cereus* 오염은 없는 된장 시료들 발효 중 총 bacilli 균수는 숙성 14일 이후 큰 변화없이 90일까지 8–9 log CFU/g (결과 미 제시) 범위여서 *B. cereus* 오염이 일어난 본 실험의 총 bacilli 균수와 차이가 없었다.

효모는 된장 제조 직후 4.74–4.94 log CFU/g에서 숙성 중 서서히 증가하여 35–56일에 5.89–6.33 log CFU/g까지 증가하고 이후 완만히 감소하여 숙성 종료시 5.61–6.28 log CFU/g 범위였다. 된장 D-II의 효모 수가 56일에 6.33 log CFU/g으로 시료들 중 가장 많고 종료시에도 6.28 log CFU/g으로 타 된장들 보다 많다(Fig. 1D). *B. cereus*를 10⁴ CFU/g 오

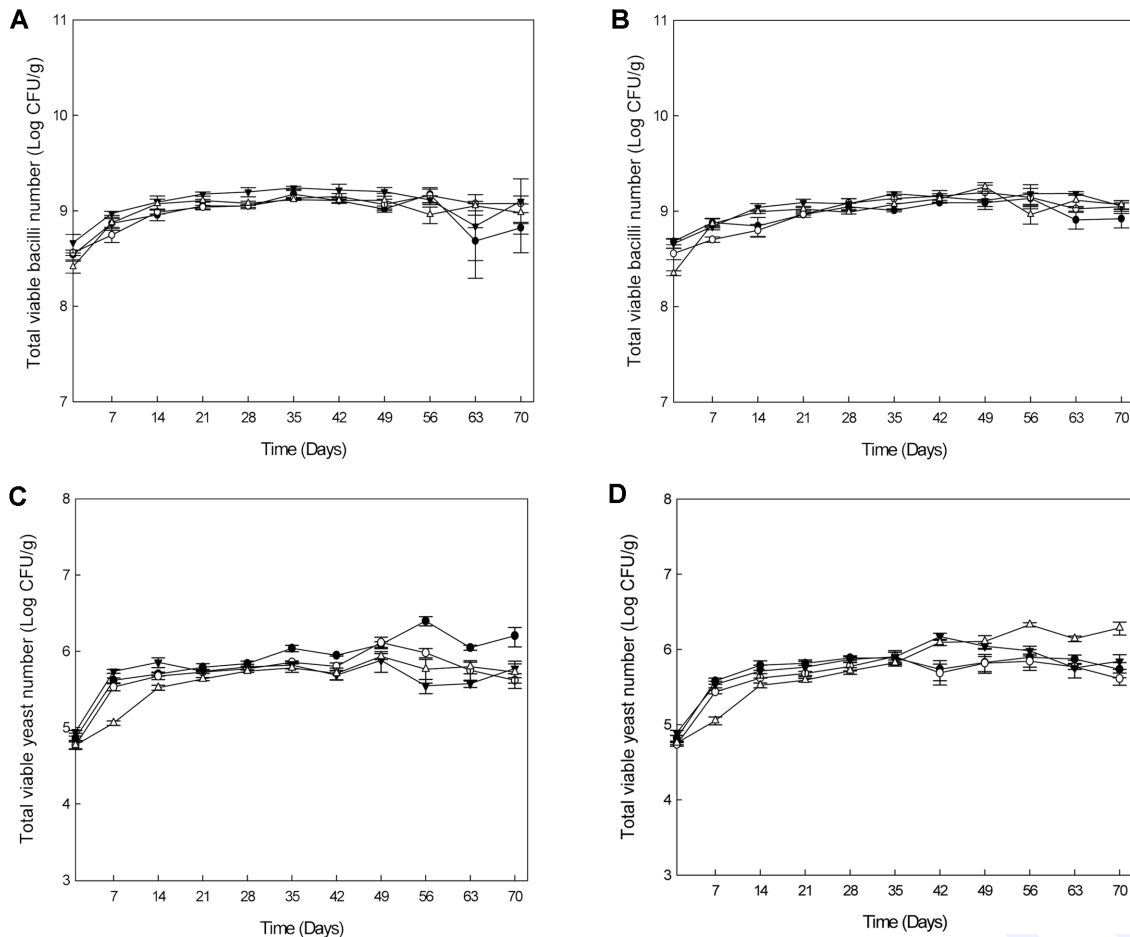


Fig. 1. Changes in the numbers of total bacilli (A, B) and yeasts (C, D) of doenjang samples spiked with *B. cereus* during fermentation. (A, C) *B. cereus* 10⁴ CFU/g; (B, D) *B. cereus* 10⁷ CFU/g. ●, doenjang A (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); ○, doenjang B (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); ▼, doenjang C (*B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); △, doenjang D (rice straw was used as the source for microorganisms).

염시킨 된장 A-I의 숙성 종료 시 효모 수가 $6.19 \log \text{CFU/g}$ 으로 다음으로 많았다. 반면 된장 B-I과 B-II의 효모수는 숙성 종료시 타 된장들 보다 적었다.

*B. cereus*를 각각 10^4 과 10^7CFU/g 으로 오염시킨 된장들 간에는 총 bacilli와 효모 수는 차이를 보이지 않았다.

B. cereus 생균수 변화

된장 A-I, B-I, C-I 제조 직후 *B. cereus* 균수는 접종량과

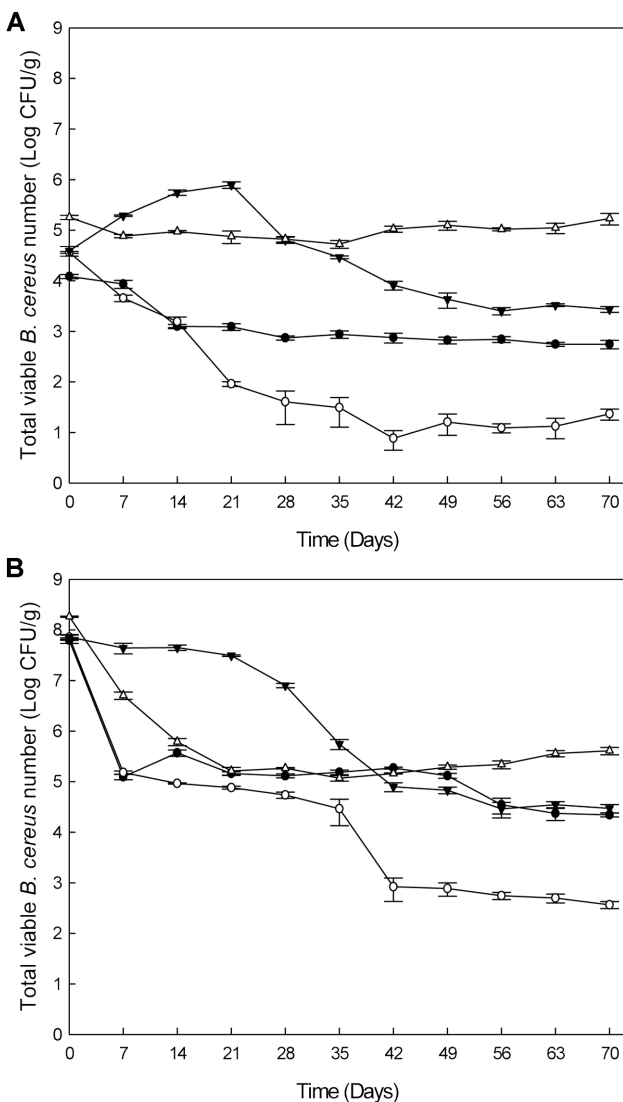


Fig. 2. Changes in the number of *B. cereus* of doenjang samples spiked with *B. cereus* during fermentation. (A) *B. cereus* 10^4CFU/g ; (B) *B. cereus* 10^7CFU/g . ●, doenjang A (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); ○, doenjang B (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); ▼, doenjang C (*B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); △, doenjang D (rice straw was used as the source for microorganisms).

비슷한 $4.08\text{--}4.58 \log \text{CFU/g}$ 이었다(Fig. 2A). 된장 D-I이 $5.25 \log \text{CFU/g}$ 으로 다른 된장들 보다 많았다. 이는 된장 D는 볏짚을 균원 시료로 사용하였기에 볏짚에 존재하던 *B. cereus*로 인해 타 된장들보다 많은 것으로 추정된다. A-II, B-II, C-II 된장의 제조 직후 *B. cereus* 균수는 $7.79\text{--}7.86 \log \text{CFU/g}$ 이지만 D-II는 $8.26 \log \text{CFU/g}$ 으로 많았다(Fig. 2B). *B. cereus* 균수는 숙성이 진행됨에 따라 된장 종류에 따라 큰 차이를 보였다. 된장 D-I은 제조 직후 $5.25 \log \text{CFU/g}$ 에서 숙성 중 처음 35일은 조금씩 감소하다가 이후 서서히 증가하여 숙성 종료 시점에서는 $5.22 \log \text{CFU/g}$ 으로 제조 직후와 비슷하였다. 된장 C-I은 *B. cereus* 균수가 제조 직후 $4.58 \log \text{CFU/g}$ 에서 숙성 21일까지 증가하여 21일에 최대치인 $5.89 \log \text{CFU/g}$ 에 달하고 이후 감소하여 종료 시에는 $3.43 \log \text{CFU/g}$ 이었다. 된장 A-I의 *B. cereus* 균수는 숙성 중 지속적으로 감소하여 종료 시 $2.74 \log \text{CFU/g}$ 까지 감소하였다. *B. cereus* 균수 감소가 가장 큰 된장은 B-I으로 제조 직후 $4.56 \log \text{CFU/g}$ 에서 숙성 중 균수가 크게 감소하여 42일에 $0.85 \log \text{CFU/g}$ 까지 감소하였다. 42일 이후 서서히 증가하여 숙성 종료시에는 $1.36 \log \text{CFU/g}$ 을 나타내었다.

*B. cereus*를 $7 \log \text{CFU/g}$ 으로 오염시킨 된장들(A-II, B-II, C-II, D-II)의 숙성 중 *B. cereus* 균수는 $4 \log \text{CFU/g}$ 으로 오염시킨 된장들보다 많게 유지되었다. 된장 D-II는 제조 직후 $8.26 \log \text{CFU/g}$ 에서 숙성 35일에 $5.07 \log \text{CFU/g}$ 까지 감소하고 이후 서서히 증가하여 숙성 종료 시에는 $5.61 \log \text{CFU/g}$ 으로 된장시료들 중 가장 많았다. 된장 C-II는 제조 직후 $7.86 \log \text{CFU/g}$ 에서 숙성 21일까지 비슷한 숫자를 유지하다가 이후 감소하기 시작하여 숙성 42일에 $4.89 \log \text{CFU/g}$ 그리고 숙성 종료 시에는 $4.47 \log \text{CFU/g}$ 이었다. 된장 A-II는 제조 직후 $7.79 \log \text{CFU/g}$ 이고 숙성 7일에 $5.09 \log \text{CFU/g}$ 으로 급격히 감소한 후 숙성 49일까지 비슷한 수준으로 유지되다가, 이후 조금 더 감소하여 숙성 종료 시 $4.34 \log \text{CFU/g}$ 를 나타내었다. 된장 B-II는 $7.85 \log \text{CFU/g}$ 로 시작하여 숙성 7일에 $5.18 \log \text{CFU/g}$ 로 급격히 감소하고 숙성 35일까지 비슷한 숫자를 유지하였다. 숙성 42일에 $2.88 \log \text{CFU/g}$ 로 감소하며 숙성 종료 시에는 $2.56 \log \text{CFU/g}$ 을 보였다. 된장 B-II의 경우 *B. cereus*를 $4 \log \text{CFU/g}$ 보다 1,000배 더 오염시켰지만 숙성 중 *B. cereus* 억제효과는 여전히 뛰어난 것을 알 수 있었다.

*B. cereus*를 $4 \log \text{CFU/g}$ 으로 오염시킨 된장들에서 대조구를 제외한 모든 된장에서 숙성기간 대부분과 숙성 종료 시 *B. cereus* 균수가 식약처 허용기준보다 더 적은 것을 확인하였다. 된장 B-I이 가장 효과적이고 다음이 A-I이고 C-I은 발효 42일 이후로 기준을 충족시켰다. *B. cereus*를 $7 \log \text{CFU/g}$ 수준으로 오염시킨 된장들의 경우 된장 B-II는 숙성 42일 이후에는 *B. cereus* 균수가 허용기준 이하로 감소되었다. 허용

기준 이상이긴 하지만 A-II 그리고 C-II 순서로 저해효과를 보였다. 이상 결과들에서 *Bacillus* 3 균주들 중 *B. cereus* 저해능이 가장 큰 균주는 *B. amyloliquefaciens* EMD17임을 알 수 있었다. *B. amyloliquefaciens* EMD17을 단독으로 혹은 타 *Bacillus* 균주와 함께 종균으로 사용하여 된장을 제조한다면 *B. cereus* 오염 억제에 효과적일 것으로 사료된다. 전 숙성 기간을 통하여 곰팡이 증식은 관찰되지 않았고 이는 된장 숙성 기간이 비교적 짧아서 곰팡이에 비해 생육속도가 빠른 bacilli와 효모들로 인해 접종한 *Rhizopus oryzae* 생육이 억제된 때문이라 추정된다. 마찬가지로 오염을 일으키는 다른 곰팡이들도 된장시료들에서 생육이 억제된 것으로 보인다.

pH 및 적정산도(titratable acidity) 변화

숙성 중 된장들의 pH와 적정산도 변화를 측정하였다(Fig. 3). 된장들(A-I, B-I, C-I, D-I)은 제조 직후 pH 6.62-6.77를

나타내었다(Fig. 3A). 된장 D-I (6.62)가 가장 낮고 C-I (6.77)이 가장 높았다. 이후 숙성 7일까지 pH 6.42-6.58로 조금 감소하고 7일에서 14일 사이 5.27-5.38로 급격히 감소하였다. 14일 이후에는 서서히 감소하거나 비슷한 수준을 유지하여 종료시 pH 5.11-5.20을 나타내었다. 된장 A-II, B-II, C-II, D-II들의 pH 또한 제조 직후 pH 6.47-6.78에서 숙성 14일에 5.16-5.45까지 급격히 감소하고, 이후로는 비슷하거나 조금 감소하여 숙성 종료시 pH 4.99-5.15을 나타내었다(Fig. 3B). *B. cereus*를 인위적으로 오염시킨 된장들의 전체적인 pH 변화는 숙성 중 pH가 감소하다가 일정한 수준으로 유지 되었으며 된장 A-I, B-I, C-I, D-I와 된장 A-II, B-II, C-II, D-II가 이런 경향에서 크게 다르지 않았고, 일반적인 된장 숙성 중 pH 변화와도 다르지 않았다. *B. cereus* 오염없이 제조한 된장들의 제조 직후 pH는 6.1-6.3이고 숙성 70일에 pH 5.7-6.0이며 벧짚을 접종한 된장의 pH가 가장 낮았다(결과

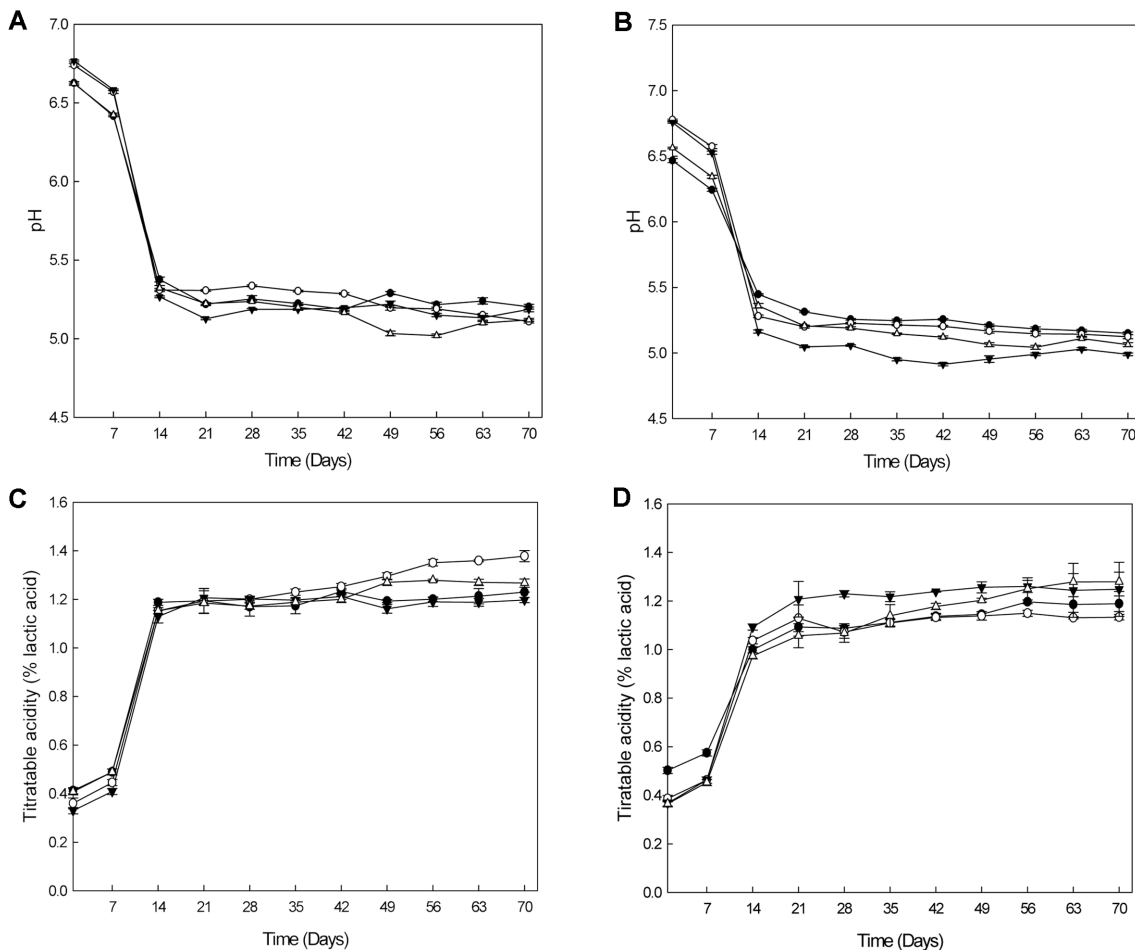


Fig. 3. Changes in pH (A, B) and TA (C, D) of doenjang samples spiked with *B. cereus* during fermentation. (A, C) *B. cereus* 10⁴ CFU/g; (B, D) *B. cereus* 10⁷ CFU/g. ●, doenjang A (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); ○, doenjang B (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); ▼, doenjang C (*B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); △, doenjang D (rice straw was used as the source for microorganisms).

미제시). *B. cereus* 오염 된장들의 pH는 미오염 된장들 보다 초기 pH 값은 높지만 숙성 중 더 많이 감소하였다. 이는 *B. cereus*가 생육하면서 생성하는 유기산들 때문이라 추정된다. 비슷한 결과가 중균 접종 된장들과 벧짚 접종 된장들을 20°C에서 70일간 숙성하면서 pH를 측정한 실험에서 보고된 바 있다[5].

숙성 중 적정산도 변화를 보면 된장 A-I, B-I, C-I, D-I은 제조 직후 0.33–0.41%에서 숙성 7일에 0.41–0.49%로 증가하며 14일에 1.13–1.19%로 급격히 증가하였다(Fig. 3C). 14일 이후 서서히 증가하거나 비슷한 수준을 유지하며 숙성 종료시 1.20–1.27%였다. 된장 B-I이 가장 높고(1.38%) D-I(1.27%), A-I(1.23%) 그리고 C-I(1.20%) 순이었다. 된장 A-II, B-II, C-II, D-II들은 제조 직후 0.36–0.50%에서 숙성 7일에 0.45–0.57%로 증가하고 14일에 0.97–1.09%로 급격히 증가하였다(Fig. 3D). 14일 이후 조금씩 증가하거나 비슷한 수준을 유지하며 종료시 1.13–1.28%를 보였다. D-II가 가장 높았고(1.28%) C-II(1.25%), A-II(1.19%), B-II(1.13%) 순이었다. 된장의 적정산도 증가는 pH 강하와 대체로 병행하여 일어나나 특정 된장에서 pH 감소 정도는 적정산도 증가 정도와 정확히 비례하지는 않는다. 벧짚 접종 된장의 pH와 적정산도 값들은 중균 접종 된장들과 비교할 때 각각 유의적으로 낮고 또 높았다[5]. 하지만 본 실험과 동일한 중균들과 방법들을 사용하되 *B. cereus*는 오염시키지 않은 된장들의 경우 벧짚 접종 된장의 pH는 중균 접종 된장들 보다 숙성기간 내내 유의적으로 낮았지만 적정산도 역시 유의적으로 타 된장들 보다 낮았다[결과 미제시]. 벧짚을 균원으로 사용하더라도 벧짚 종류에 따라 미생물 균총에 차이가 있고 이로 인해 된장의 균총이 달라지고 또 산 생성도 달라지기 때문이라 추정된다. 이런 결과들은 일정한 품질을 지닌 된장을 얻기 위해서는 선별된 중균을 접종할 필요성을 확인시켜주는 것이라 하겠다.

아미노태 질소 함량 변화

*B. cereus*가 오염된 된장들의 숙성 중 아미노태 질소함량을 측정하였다(Fig. 4). 된장 A-I, B-I, C-I, D-I은 제조 직후 145.83 ± 7.89 – 223.31 ± 7.89 mg%로 나타났으며, 된장 B-I(223.31 ± 7.89 mg%)이 가장 높고 된장 D-I(145.83 ± 7.89 mg%)이 가장 낮았다(Fig. 4A). 숙성 중 아미노태 질소함량은 증가하였는데 숙성 14일까지 244.66 ± 13.59 – 296.30 ± 8.02 mg% 빠르게 증가하다가 그 이후로 서서히 증가하였다. 숙성 종료 시 된장 A-I(369.04 ± 6.44 mg%)이 가장 높고 된장 D-I(340.61 ± 9.24 mg%)이 가장 낮았다. 된장 A-II, B-II, C-II, D-II의 경우 제조 직후 149.33 ± 8.08 – 195.96 ± 7.89 mg%로 된장 B-II가 가장 높고 된장 D-II가 가장 낮았으며 숙성이 진행됨에 따라 서서히 증가하였다(Fig. 4B). 특

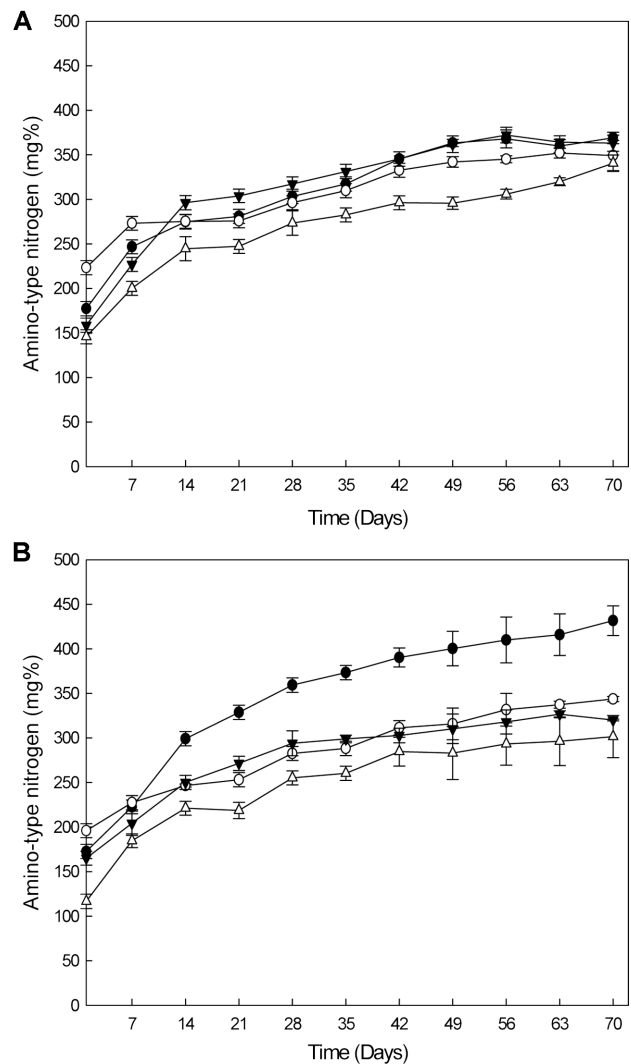


Fig. 4. Changes in the amino-type nitrogen of doenjang samples spiked with *B. cereus* during fermentation. (A) *B. cereus* 10^4 CFU/g; (B) *B. cereus* 10^7 CFU/g. ●, doenjang A (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); ○, doenjang B (*B. amyloliquefaciens* EMD17, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); ▼, doenjang C (*B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *B. subtilis* CH3-5, *R. oryzae*, *P. farinosa* SY80); △, doenjang D (rice straw was used as the source for microorganisms).

히 된장 D-II는 제조 직후 가장 낮았지만 숙성 중 증가하여 14일에 457.33 ± 8.08 mg%로 가장 높고 숙성 종료시 448.06 ± 6.20 mg%로 된장들 중 가장 높았다. 다음이 A-II (431.57 ± 16.56 mg%), A-I (369.04 ± 6.44 mg%) 된장들이었다. 이는 이전 연구에서 보고한 중균 접종 된장들의 20°C, 70일 숙성 후 아미노태 질소 함량들(513.3 ± 8.1 – 707.8 ± 6.9 mg%) 보다는 낮지만 본 실험과 동일한 중균과 방법들을 사용하되 *B. cereus*는 오염시키지 않은 된장들과는 비슷하였다[5]. 단백질

분해활성이 우수한 *B. subtilis* DJ1을 접종한 된장을 20°C에서 60일간 숙성시킨 후 아미노태 질소함량은 507 mg%이고[3] *Aspergillus oryzae*를 배양한 소맥분 코지를 대두에 접종하고 식염농도 12%로 제조한 된장을 20°C에서 70일 발효시킨 경우 아미노태질소 함량이 400 mg%이었다는 보고[15]들을 볼 때 *B. cereus*는 숙성중 대두 단백질 분해에 부정적 영향을 준 것 같지는 않다. 이전 식품공전상 아미노태 질소함량 규격은 160 mg% 이상이었고[3], 전통 재래된장의 아미노태 질소함량은 평균 308.4 mg%라는 보고도 있다[17].

복합종균을 접종한 된장 숙성 중 *B. cereus* 증식은 효과적으로 억제되었다. 종균 접종 된장들의 경우 4 log CFU/g으로 오염시킨 *B. cereus*를 효과적으로 저해하여 70일 후에는 식약처 기준치 이하로 감소시켰다. 특히 *B. amyloliquefaciens* EMD17과 *B. subtilis* CH3-5를 접종한 된장 B는 7 log CFU/g로 오염시킨 *B. cereus* 증식도 효과적으로 억제하였다. 이 결과들로 볼 때 복합종균의 사용은 된장의 안전성 개선에 도움이 될 것으로 사료된다. 앞으로 복합종균 된장의 기능성과 기호성에 관한 연구들이 필요하다.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from IPET (High Value-added Food Technology Development Program, 2012, 112066-3), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea. Lee JY, Shim JM, and Lee KW were supported by BK21 Plus program from Ministry of Education, Republic of Korea.

References

- Bae SI, Kwak BY, Park YK, Kim YH, Shon DH. 2003. Survey of aflatoxin B1 in domestic doenjang and kochujang determined by enzyme linked-immunosorbent assay. *J. Fd. Hyg. Safety* **18**: 95-100.
- Cha YS, Park YS, Lee MS, Chae SW, Park KM, Kim YS, et al. 2014. Doenjang, a Korean fermented soy food, exerts antiobesity and antioxidative activities in overweight subjects with the PPAR-c2 C1431T polymorphism: 12-week, double-blind randomized clinical trial. *J. Med. Food* **17**: 119-127.
- Chang M, Chang HC. 2007. Characteristics of bacterial-koji and doenjang (soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJ1. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 325-333.
- Cho MJ, Lee JY, Kim JH. 2014. Microbial and physicochemical properties of cheonggukjang fermented using *Bacillus* strains with antibacterial or antifungal activities. *Food Sci. Biotechnol.* **23**: 1525-1532.
- Cho MJ, Lee JY, Lee KW, Cho KM, Lee CK, Kim GM, et al. 2014. Properties of Doenjang (soybean paste) fermented with multiple starters. *J. Agr. Life Sci.* **48**: 291-300.
- Cho MJ, Shim JM, Lee JY, Lee KW, Yao Z, Liu X, et al. 2016. Meju fermentation using multiple starters. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 109-116.
- Choi SY, Cheigh MJ, Lee JJ, Kim HJ, Hong SS, Chung KS, et al. 1999. Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste (doenjang) on the various tumor cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 458-463.
- Hwang JH. 1997. Angiotension I converting enzyme inhibitory effect of doenjang fermented by *B. subtilis* SCB-3 isolated from meju, Korean traditional food. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 775-783.
- Jeong SJ, Kwon GH, Chun JY, Kim JS, Park CS, Kwon DY, et al. 2007. Cloning of a fibrinolytic enzyme gene from a *Bacillus subtilis* isolated from cheonggukjang and its expression in protease deficient *Bacillus subtilis* strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 1018-1023.
- Korea Food and Drug Administration. 2011. *Food standards codex I*. p. 2-VI-6, KFDA, Seoul, Korea.
- Ko BK, Kim KM, Hong YS, Lee CH. 2010. Metabolomic assessment of fermentative capability of soybean starter treated with high pressure. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 8738-8747.
- Lee ES, Kim YS, Ryu MS, Jeong DY, Uhm TB, Cho SH. 2014. Characterization of *Bacillus licheniformis* SCK A08 with antagonistic property against *Bacillus cereus* and degrading capacity of biogenic amines. *J. Fd. Hyg. Safety* **29**: 40-46.
- Lee HA, Kim JH. 2012. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* strains with antifungal activities from meju. *Prev. Nutr. Food Sci.* **17**: 64-70.
- Lee HT, Kim JH, Lee SS. 2009. Analysis of microbiological contamination and biogenic amines content in traditional and commercial doenjang. *J. Fd. Hyg. Safety* **24**: 102-109.
- Lee JY, Mok C. 2010. Changes in physicochemical properties of low salt soybean paste (Doenjang) during fermentation. *Food Eng. Prog.* **14**: 153-158.
- Lee JY, Shim JM, Yao Z, Liu X, Lee KW, Kim HJ, et al. 2016. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17 isolated from cheonggukjang and potential use as a starter for fermented soy foods. *Food Sci. Biotechnol.* **25**: 525-532.
- Park SK, Seo KI, Shon MY, Moon JS, Lee YH. 2000. Quality characteristics of home-made doenjang, a traditional Korean soybean paste. *Korean J. Soc. Food Sci.* **16**: 121-127.
- Shin DH. 2008. Globalization of Korean fermented soybean products. *Food Ind. Nutr.* **11**: 19-24.