Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 35, No. 4, 325–333(2007)

Bacillus subtilis DJI을 이용하여 제조된 세균형 코지와 속성된장의 특성

장 미 · 장해춘*
조선대학교 식품영양학과

Characteristics of Bacterial-Koji and Doenjang(soybean paste) Made by using *Bacillus subtilis* DJI. Chang, Mi and Hae Choon Chang*. *Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea* – One bacterium with high proteinase production and spore-forming ability was isolated from korean traditional soybean paste(doenjang). The isolated strain was identified as *Bacillus subtilis,* based on gram-staining, biochemical properties and 16S rRNA gene sequencing, and designated as *B. subtilis* DJI. Its growth rate was very fast, and it reached its stationary phase within 9 h, and then started to form spores. Bacterial-koji and doenjang were prepared using *B. subtilis* DJI. Chemical components of the doenjang were determined after 2 months of aging period: amino nitrogen 507 mg%, crude protein 14.3%, crude fat 4.8% and water 54.9%. The composition of total and free amino acids and their ratios of doenjang were changed during the aging period. Among total amino acids in DJI doenjang, glutamic acid, aspartic acid, leucine and arginine were the major amino acids. The fibrinolytic activities of DJI doenjang and traditional doenjangs were 909.7 units/ml and 363.3~618.6 units/ml, respectively. Flavor compounds of DJI doenjang and traditional doenjang were extracted by SDE(simultaneous steam distillation and extraction), and analyzed by GC/MS; DJI doenjang possessed the typically favorable flavor compounds in traditional korean doenjang, with reduced off-flavor compounds.

Key words: *B. subtilis* DJI, bacterial-koji, doenjang, soybean paste, fibrinolytic activity

서 론

전통된장은 콩을 주원료로 하여 발효, 숙성시킨 대표적인 발효식품으로서 저장성이 뛰어나며, 그 특유의 향미를 지니고 있어 조상들의 식생활에 널리 애용되어 왔다[15]. 특히 필수 아미노산, 지방산, 유기산, 미네랄, 비타민 등을 보충해 줌으로서 우수한 영양원일 뿐만 아니라 사람이 섭취할 경우 여러 가지 생리 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 된장의 생리활성으로는 혈압강하 효과[9, 28], 항산화능[21], 혈전용해능[10, 19, 23, 27], 항돌연변이성[32], 항암성[6, 7] 등이 보고되고 있다. 특히 서구화된 식문화로 인해 발병하는 성인병의 하나인 혈전증(thrombosis)은 혈관에 혈전이 축적되어 심각한 순환계 질환을 유발하는 병으로서, 된장의 강력한 혈전용해능이 입증 되면서 고가의 혈전용해제를 대신해 혈전을 예방하거나 치료하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

현재 국내에서 제조되는 된장은 메주를 사용하여 만든 재래식 된장과 *Aspergillus oryzae* 등의 국균을 사용하여 만드는 개량식 된장으로 대별된다. 재래식 된장을 제조하기 위해서는 늦은 가을 대두를 삶아 찧어 육면체나 낮은 원기둥 형태로 성형하여 일정기간 말린 후 이 메주 덩어리를 볏짚으로 묶어 겨우내 벽에 매달아 말려 메주를 제조한다. 이 과정 중 볏짚내의 고초균과 공기중의 곰팡이들이 자연적으로 접종되어 메주 내외에서 증식하게 되고 이 균체 증식과 함께 생성된 단백분해효소에 의해 제조된 메주는 다량의 단백분해효소를 함유한다. 제조된 메주는 이듬해 봄에 표면의 곰팡이를 물로 씻은 후 간장과 된장을 담그는데 사용된다. 개량식 된장은 국(麴, koji)제조법을 도입한 것으로서, 삶은 쌀, 보리, 콩 등에 *A. oryzae*를 인위적으로 접종하여 30°C 정도에서 3일간 배양하여 된장 코지를 만든 후 이를 메주대신 사용하여 된장을 담그는데 사용하는 것이다. 즉 메주나 된장 코지 내에 다량 형성된 단백분해효소 작용으로 콩 단백질을 가수분해하여 특정 풍미를 지닌 된장이 제조된다.

종래의 된장제조의 문제점은 다음과 같이 정리할 수 있다. 첫째, 종래의 된장 제조방법에 따르면 상기의 메주 또는 코지로 숙성된 된장을 담그기까지 약 6개월이 소요된다. 둘째, 재래된장의 경우 메주 제조 시 또는 발효 중 유입되는 잡균들에 의한 제품의 맛, 향 등의 품질 규격화가 어려울 뿐만 아니라 위생적으로도 문제가 될 수 있다. 셋째 재래된장은 특유의 쿰쿰한 냄새가 심하여 신세대나 외국인 등 다양한 계층의 소비자에게 널리 이용되기 어렵다. 넷째 개량형 된장의 경우는 재래된장의 결점인 둘째, 셋째 요인은 상대

*Corresponding author
Tel: 82-62-230-7345, Fax: 82-62-234-7452
E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

적으로 덜하지만 코지 제조에 곰팡이인 *A. oryzae*만을 사용하여 된장을 발효시키므로 재래된장 제조 시 자연적으로 증식하는 *Bacillus subtilis*에 의한 재래된장의 고유한 풍미가 생성되지 않는다[29]. 최근 재래식 된장 제조방법(메주 사용법)과 개량식 된장 제조방법(코지 사용법)의 단점을 해결하기 위하여 개발된 방법으로, 재래식 메주의 풍미를 생성하는 균주로 알려진 *B. subtilis*를 인위적으로 접종시켜 얻어진 메주와 종래의 개량식 된장용 코지인 *A. oryzae*를 혼합사용하거나[25, 33], 저장성과 향미를 증진시키기 위하여 *A. oryzae*와 *B. subtilis* 혼합메주에 *Zymomonas mobilis* 배양액을 첨가하여 된장을 제조하는 방법 등이 시도되었다[20]. 그러나 개선된 방법에서도 코지 제조 시 장시간이 소요되며 대부분의 *Bacillus* 속은 강한 protease를 생성하여 대두단백질을 잘 분해하나 amylase 생성이 낮은 단점을 지니므로 이를 보완하기 위해 곰팡이나 효모 등을 배양시켜 얻어진 메주를 혼합하여 사용해 왔다.

따라서 본 연구에서는 쿰쿰한 냄새가 적고 재래된장 특유의 맛과 향을 지닌 맛있는 된장이라 입소문이 난 전남 구례 박씨가의 전통된장으로부터 발효미생물을 분리하였다. 된장 시료 중 단백질 분해활성이 뛰어나며, 분리배지상에서 우점종으로 나타난 미생물을 분리·동정하고 그 특성 규명과 함께 이를 이용한 세균형 코지제조와 이 세균형 코지를 이용하여 된장을 제조하였다. 본 세균형 코지를 이용한 된장 제조 방법은 제조기간의 단축과 더불어 고유한 재래된장 맛과 향을 재현할 수 있었기에 이를 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

수집된 재래된장 1 g을 멸균증류수 10 ml에 희석하여 균질화 시킨 후 여과한 다음 순차적으로 희석하고, 희석액을 2% skim milk(Difco Co., USA)와 3% NaCl이 첨가된 LB 고체배지에 접종하여 37°C에서 24시간 평판배양 하였다. 균주가 생성하는 단백분해효소에 의해 동배지에서 투명환을 형성하는 콜로니를 선별하였다. 선별된 균은 그람염색 kit (BD Co., USA)을 사용하여 염색한 후 현미경하에서 형태학적 특성을 관찰하였고, 위상차현미경을 통하여 포자를 확인하였다. 또한 API 50 CHB kit(Biomerieux Co., France)을 이용한 생화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 최종 동정하였다.

균주의 생육 및 NaCl 농도에 따른 영향조사

분리균주의 생육을 측정하기 위해 37°C에서 24시간 전배양한 균주를 40 ml LB 액체배지에 1%(v/v) 접종한 후, 24시간 동안 배양하면서 3시간 간격으로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 *B. subtilis* ATCC6633[31], *B. subtilis* cx1[18] 그리고 *B. licheniformis* cy2[18]를 사용하여 분리균주와 동일한 조건에서 실험하였다. 생육에 있어서 배지 내 NaCl의 농도에 따른 영향을 조사하기 위해 NaCl을 0~20%(w/v)까지 농도별로 첨가한 LB 액체배지에 37°C에서 24시간 전배양한 균주를 1% 접종하여 12시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 활성측정

분리균주에 의해 생산된 효소의 활성을 측정하기 위한 조효소액으로는 37°C에서 24시간 전배양한 균주를 LB 액체배지에 1% 접종하여 24시간 동안 배양한 다음 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4°C)하여 균체를 제거하고, 회수한 배양상징액을 membrane filter(0.45 μm pore size, Milipore, Beverly, USA)로 제균하여 사용하였다.

Protease 활성측정: 단백분해효소의 활성은 Boonyaras 등[30]에 의한 azocasein법을 변형하여 측정하였다. 기질용액은 azocasein(Sigma Co., USA) 0.2 g을 20 mM Tris-HCl-5 mM $CaCl_2$(pH 7.0) 100 ml에 현탁하여 사용하였다. 기질용액 1 ml에 조효소액 0.1 ml를 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시키고 12%(w/v) trichloroacetic acid(Sigma Co., USA) 2 ml를 첨가하여 반응되지 않은 azocasein을 침전시켜 반응을 정지시키고 4°C에서 30분 동안 방치한 후 원심분리(9,950 × g, 10 min, 4°C) 하였다. 원심분리 후 상징액을 취하여 동량의 0.5 M NaOH를 혼합한 후 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 1시간 동안 조효소액 1 ml가 효소 반응액을 440 nm에서 0.01을 증가시켰을 때 1 unit/ml로 규정하였다.

α-amylase 활성측정: α-amylase의 기질로는 0.5% soluble starch를 사용하였으며 기질용액 2 ml에 조효소액 1 ml를 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액 0.3 ml에 0.01 N I_2 solution을 첨가한 후 증류수로 10 ml가 되도록 정용하고 660 nm에서 흡광도를 측정하였다[14]. 효소활성은 30분 동안 조효소액 1 ml가 효소반응액을 660 nm에서 blue color density를 50% 감소시켰을 때 1 unit/ml로 규정하였다.

분리균주를 이용한 된장의 제조

세균형 코지의 제조: *B. subtilis* DJI은 37°C에서 24시간 전배양하여 LB 액체배지에 1% 접종한 후 9시간 배양한 것을 사용하였다. 준비된 *B. subtilis* DJI을 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4°C)하여 균체를 회수하고 회수된 균체를 멸균된 3차 증류수로 2회 수세하였다. 콩은 국내에서 생산되는 소립종을 사용하였고, 정선한 콩 1 kg을 15~20°C에서 20시간 침지 후 121°C에서 50분간 증자하였다. 증자 후 40°C로 냉각시키고 미리 준비해둔 *B. subtilis* DJI을 가수하기 전 원료콩의 1%(w/w) 비율로 접종하였으며, 접종 후 39~50°C 온도에서 12~14시간 배양하였다. 이를 20°C, 30% 습도로 항온항습 장치(Han Baek Scientific Co. Korea)를 사용하여 24시간 풍건시켜 건조되면 이를 세균형 코지로 사용하였다.

된장의 제조: 제조된 세균형 코지에 삶은 콩(원료콩을 기준으로 코지와 같은 양)을 가하고 99% NaCl 소금(Chunilsalt, Korea)으로 소금물을 만들어 함께 섞었다. 이때 소금의 농도는 최종 제조된장의 소금 농도가 12%(w/w)가 되도록 하였다. 이와 같이 제조된 된장을 20°C에서 2개월간 숙성시켰다.

된장의 일반성분 분석

된장의 수분은 105°C 상압가열건조법, 조지방은 Rose-Gottlieb법으로 측정하였으며 조단백은 Kjeldahl 분해 장치로 분해하여 단백질자동분석기(Buchi K-370, Switzerland)로 측정하였다[1]. 아미노태 질소는 된장에 증류수 100 ml를 가하여 초음파 추출 후 여과하여 아미노산 질소분석기(Costech Int. Turbo N4040, Italy)로 측정하였다.

된장의 구성아미노산 분석

단백질 구성아미노산은 식품공전에 준하여 측정하였다[12]. 시료 0.1 g을 취하여 6 N HCl 10 ml를 가한 후 110°C에서 22시간동안 가수분해 시켰다. 이를 여과하고 rotary vacuum evaporator(Eyela N-1000SW, Japan)로 55°C에서 감압 농축하여 염산을 제거하였다. 여기에 0.02 N HCl 10 ml를 가해 녹이고 10배 희석한 다음 0.45 μm syringe filter로 여과 후 아미노산 자동분석기(Hitach L-8800, Japan)에 주입하여 분석하였다.

된장의 유리아미노산 분석

유리아미노산은 식품공전에 준하여 측정하였다[12]. 시료 3 g을 취하여 70% ethanol 30 ml를 가하고 1시간동안 균질화 한 후 원심분리(21,000 × g, 15 min)하였다. 상징액을 70% ethanol 25 ml로 2회 반복 추출하고 추출액을 합하여 rotary vacuum evaporator로 감압농축 하였다. 이 농축물을 0.02 N HCl 20 ml에 녹이고 10배 희석하여 0.45 μm syringe filter로 여과한 후 아미노산 자동분석기에 주입하여 분석하였다.

된장의 혈전용해효소 활성 측정

된장 5 g을 동결건조한 후 멸균증류수 20 ml를 가하여 현탁하였다. 현탁액을 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4°C)한 상징액을 혈전용해효소 활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다.

Fibrin plate를 이용한 활성측정: Astrup 방법[2]을 변형하여, 10 mM phosphate buffer(pH 7.8, 0.15 M NaCl)에 human fibrinogen(Sigma Co., USA)을 0.6%가 되도록 용해시켰다. 완전히 용해된 fibrinogen 용액 10 ml에 동일한 완충용액에 녹인 2% agarose 용액 10 ml를 넣어 잘 혼합하였다. 여기에 100 units/ml의 thrombin(Sigma Co., USA) 100 μl를 첨가한 후 즉시 petri dish에 붓고 실온에서 30분간 방치하여 최종적으로 0.3% fibrin plate를 제조하였다. 그 위에 조효소액을 20 μl씩 점적하고 37°C에서 24시간 반응시킨 후 용해된 환의 면적을 측정하였다. 이때 일반 가정에서 재래식방법으로 제조한 된장 6종을 시료로 채취하여 이를 *B. subtilis* DJI을 사용하여 제조된 된장과 동일한 방법으로 혈전용해능을 측정하여 이를 대조구로 삼았다. 또 다른 대조구로 정제된 혈전용해제인 plasmin(1 unit/ml)을 사용하여 동일한 fibrin plate 상에서 실험구(DJI 된장, 재래된장)와 함께 혈전용해능을 측정하고 이때 형성된 plasmin의 투명환을 100% 혈전용해 활성으로 표시하고, 다른 시료의 용해 활성은 다음식과 같이 plasmin에 대한 상대 활성값(%)으로 표시하였다.

$$\text{혈전용해활성}(\%) = \frac{\text{시료의 용해면적}}{\text{plasmin의 용해면적}} \times 100$$

Fibrin solution을 이용한 활성측정: Ehrlich 방법[8]을 변형하여, fibrin(Sigma Co., USA) 0.6 g을 1 N NaOH 80 ml에 녹이고 pH 7.8로 조정한 후 증류수에서 24시간 동안 투석하여 염을 제거하였다. 염이 제거된 용액을 증류수로 100 ml가 되게 맞추어 0.6% fibrin 용액을 제조하였다. Fibrin 용액 3 ml에 조효소액 0.5 ml를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.4 M trichloroacetic acid로 반응을 정지시키고 4°C에서 30분간 방치하였다. 반응액을 Whatman paper No. 2로 여과한 후 그 여액 1 ml에 0.4 M Na_2CO_3 5 ml와 1 N-folin reagent(Sigma Co., USA) 1 ml을 넣어 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 일반 가정에서 재래식방법으로 제조한 된장 6종을 시료로 채취하여 동일한 방법으로 실험하였으며, 효소활성 1 unit는 조효소액 1 ml가 1분 동안 tyrosine 1 μM을 생성하는 능력으로 규정하였다.

된장의 향기성분 분석

된장의 향기성분은 Nickerson-Likens의 연속증류 추출장치(simultaneous steam distillation and extraction: SDE)를 이용하여 추출하였다[24]. 된장 200 g을 3차 증류수 1 L에 현탁 시킨 후 증류된 diethyl ether 100 ml를 용매로 사용하여 상압하에서 2시간동안 100°C로 가열하여 향기성분을 추출하였다. 추출액은 암소에서 하룻밤 동안 무수 황산나트륨을 넣고 정치하여 수분을 완전히 제거한 후 vigreux column을 이용하여 1 ml까지 농축하였다. 대조구로는 가정에서 재래식 방법으로 제조된 된장을 동일한 조건에서 추출하여 향기성분을 비교 분석하였다. 추출된 된장의 향기 성분은 GC/MS(HP 6890 GC/HP 5973 MSD, Hewlett packard, USA)를 이용하여 분석하였으며, 컬럼은 J&W DB-5 MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)를 사용하였다. GC/MS 분석조건은 오븐온도 50°C에서 5분 유지한 후 1분마다 5°C로 250°C까지 상승시켰으며 250°C에서 25분간 유지하였다. 운반 기체는 헬륨을 사용하였고 주입기 온도는 250°C, split ratio 15:1

로 2 μl를 주입하였다. GC/MS를 사용하여 얻은 mass spectrum은 wiley 7N data base로 분석한 결과를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

재래된장으로부터 균주의 분리 및 동정

Skim milk 2%와 3% NaCl이 첨가된 LB 고체배지에 된장 희석액을 도말하여 평판 배양한 결과, 생성된 집락(colony) 주변으로 투명환 형성과 함께 확연한 차이로 우점 미생물이 관찰되었으며, 이 중 동배지에서 상대적으로 큰 투명환을 형성하는 3종의 집락을 분리하였다. 분리균주는 2~3차례의 계대배양을 통한 순수분리의 확인 및 단백분해 활성을 측정하고, 이 중 단백분해능이 가장 우수한 균주 1종을 최종 선별하였다. 그람염색 및 위상차 현미경을 통한 형태학적 관찰을 한 결과, 분리균주는 그람양성 간균의 형태를 지니며 고초균의 대표적인 특징 중 하나인 포자를 형성함을 알 수 있었다(Fig. 1). 또한 API 50CHB kit에 의한 생화학적 특성과 16S rRNA 염기서열 분석결과(1,407 bp) *Bacillus subtilis* DSM 10과 99% 상동성을 나타내어 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며, 최종 분리균주는 *Bacillus subtilis* DJI으로 명명하였다.

균주의 생육 및 NaCl 농도에 따른 영향

분리균주 *B. subtilis* DJI은 다른 *Bacillus* 속보다 균체 생육이 매우 빠르므로, 상대적으로 다른 *Bacillus* 속에 비해 일찍 정지기(stationary phase)에 도달하였다. Fig. 2에서 보는바와 같이 공시균주 *B. subtilis* ATCC6633[31]이나 *B. subtilis* cx1[18], *B. licheniformis* cy2[18]와 달리, *B. subtilis* DJI은 9시간 만에 생육이 최대값에 이르며, 그 이후 사멸기에 접어들면서 자기소화에 의한 세포파쇄와 함께 포자가 세포외로 방출되어 세포엉김현상 및 급격한 세포 현탁도 감소 현상이 관찰되었다. 단백분해 활성은 생육 6시간대인 대수기(204 units/ml)에 비하여 생육 21시간인 사멸기(350 units/ml)에 더 높게 나타나, 이 시기에 포자형성과 함께 다량의 단백분해효소가 세포밖으로 방출됨을 알 수 있다.

B. subtilis DJI의 생육에 있어서 배지 내 NaCl 농도의 영향을 조사하기 위해 LB 액체배지에 0에서 20%(w/v) NaCl을 첨가하여 배양한 결과, Fig. 3과 같이 NaCl 농도 15%까지 600 nm에서 2.0 이상의 생육을 나타내어 균주가 염에 대한 내성이 높은 것으로 확인되었다.

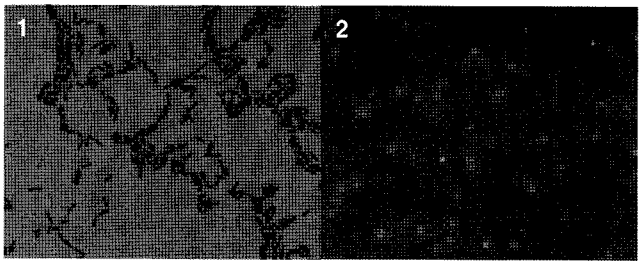

Fig. 1. Gram staining (1) and phase-contrast microscopy (2) of the isolated *B. subtilis* DJI.

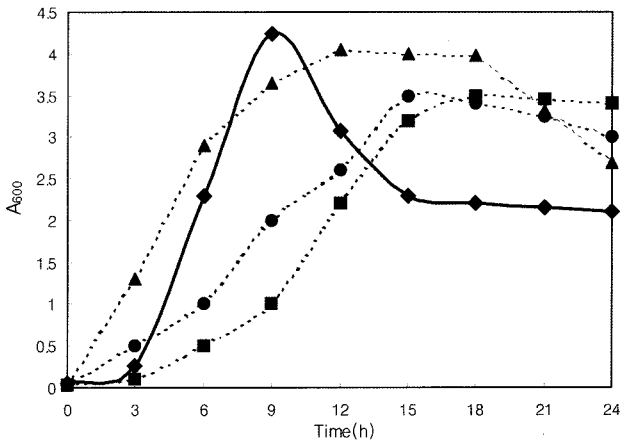

Fig. 2. Growth curves of *B. subtilis* DJI, *B. subtilis* ATCC6633, *B. subtilis* cx1 and *B. licheniformis* cy2. A 1%(v/v) inoculum strains were incubated for 24 h at 37°C. -◆-: *B. subtilis* DJI, ···▲···: *B. subtilis* ATCC6633, ···●···: *B. subtilis* cx1, ···■···: *B. licheniformis* cy2.

분리균주의 효소활성

Protease 활성 측정: 2%(w/v) skim milk가 첨가된 LB 평판배지위에 제균된 *B. subtilis* DJI의 24시간 배양상징액을 가하여 생성된 투명환을 측정하여 세포외 단백분해 활성을 측정하였다. 대조구로는 동조건에서 *B. subtilis* ATCC6633의 배양상징액을 떨어뜨려 효소활성을 비교하였다. Fig. 4에서와 같이 *B. subtilis* DJI은 *B. subtilis* ATCC6633보다 확연히 높은 단백분해 활성을 나타내었다. 또한 단백분해 활성을 정확한 효소활성 단위로 표시하기 위해 azocasein을 기

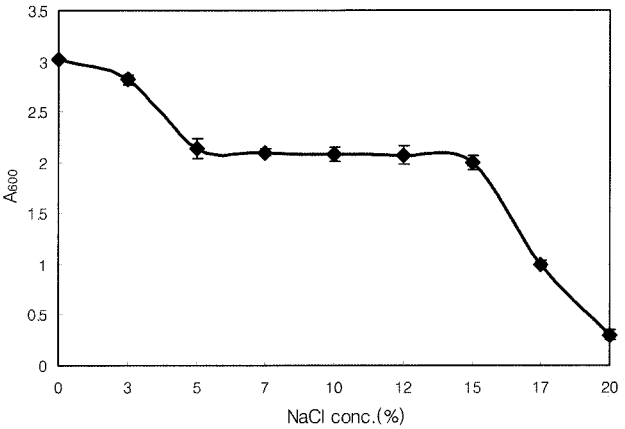

Fig. 3. Effect of NaCl on the cell growth of *B. subtilis* DJI. *B. subtilis* DJI was inoculated (1%(v/v)) and cultivated for 12 h in LB broth containing 0~20%(w/v) NaCl. Cell growth was measured by absorbance of culture broth at 660 nm.

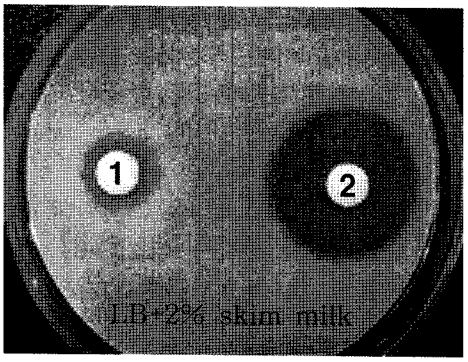

Fig. 4. Extracellular protease activities of *B. subtilis* DJI and *B. subtilis* ATCC6633. 1: cell free extract of *B. subtilis* ATCC6633, 2: cell free extract of *B. subtilis* DJI. 200 μl of cell free extract was added into LB plate with 2%(w/v) skim milk.

질로 하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 반응액을 440 nm에서 측정한 결과 대조구인 *B. subtilis* ATCC6633의 효소활성은 16 units/ml이었으며, *B. subtilis* DJI의 경우는 300 units/ml를 나타내었다.

α-amylase 활성 측정: 0.5% soluble starch를 기질로 하여 α-amylase 활성을 측정한 결과 대조구인 *B. subtilis* ATCC6633의 효소활성은 2.43 units/ml이었으며, *B. subtilis* DJI는 27.6 units/ml의 활성을 나타내었다. *Bacillus* 속을 단용하여 제조한 장류는 강력한 protease에 의해 대두단백질을 잘 분해하나 amylase 생성이 적으므로, 강한 amylase를 생성하는 *Aspergillus* 속을 병용해왔다[22]. 그러나 본 연구에서 사용된 *B. subtilis* DJI의 경우 높은 protease 활성을 지님과 동시에 amylase 활성을 나타내므로 국균의 혼입 없이 단일 균주만으로도 된장을 제조함에 있어서 매우 적합한 균주임을 보여주었다.

세균형 코지의 제조와 된장

B. subtilis DJI을 이용하여 세균형 코지를 제조하였다. 증자된 콩에 종균을 접종하여 배양이 끝난 후의 삶은 콩은 종균의 생육으로 말미암아 약간의 점질물 생성과 함께 하얀색 포자로 둘러싸이게 된다(Fig. 5-①). 이를 항온항습 장치하에서 건조시키면 세균형 코지가 완성되고(Fig. 5-②), 이를 이용하여 제조된 된장을 Fig. 5-③에 나타내었다.

균체생육이 빠르고 일찍 포자를 형성하는 *B. subtilis* DJI의 생육상의 특징은 점질물(γ-poly glutamic acid)을 형성하기 이전에 단백분해효소의 다량 생성 및 방출과 포자형성으로 곰팡이 코지와 유사한 형태의 세균형 코지 제조가 가능한 *B. subtilis* DJI만의 독특한 특성으로 이어진다(Fig. 5-①). 즉 다른 *B. subtilis* strain은 배양 후 약 20시간 경 정지기 및 사멸기에 도달하고 이 무렵 다량의 점질물을 형성하므로 삶은 콩에 균을 접종 시 포자형성은 육안으로 관찰하기 어렵고, 생성된 점질물에 의한 높은 수분 함량은 곰팡이 코지와 같은 형태를 나타내기 어렵게 하고 또한 쉽게 변패되는 것과는 크게 차이 나는 특징이다.

제조된장의 일반성분

B. subtilis DJI을 이용하여 제조한 된장을 숙성 30일, 숙성 60일 후에 일반성분을 분석하였다(Table 1). 된장의 수분함량은 숙성 30일에 55.2%에서 60일에는 54.9%로 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 숙성직후 또는 숙성 15일부터 숙성 90일 이후에 이르러 숙성기간이 경과함에 따라 수분함량이 감소하는 경향을 보인다는 보고[9, 15]와 일치하는 결과이며 이는 숙성과정에서 자연증발된 것으로 추측되어진다.

조단백질은 평균 14.4%로 *Aspergillus* 속과 *Bacillus* 속으로 제조된 된장의 조단백 함량(14.23~16.07%)과 비슷한 결과[33]를 나타내었으며, 조지방 함량은 숙성 30일에는 3.9%를 나타내었고 숙성 60일 이후에는 4.8%로 숙성에 따라 증

Table 1. Change of chemical components in doenjang manufactured by using *B. subtilis* DJI.

Component	Aging time		Standard[1]
	30 days	60 days	
Amino nitrogen (mg%)	463	507	160
Crude protein (%)	14.5	14.3	8.0
Crude fat (%)	3.9	4.8	2.0
Water (%)	55.2	54.9	-

[1]Standard : KFDA, Food code(2005), water content does not included in KFDA standard.

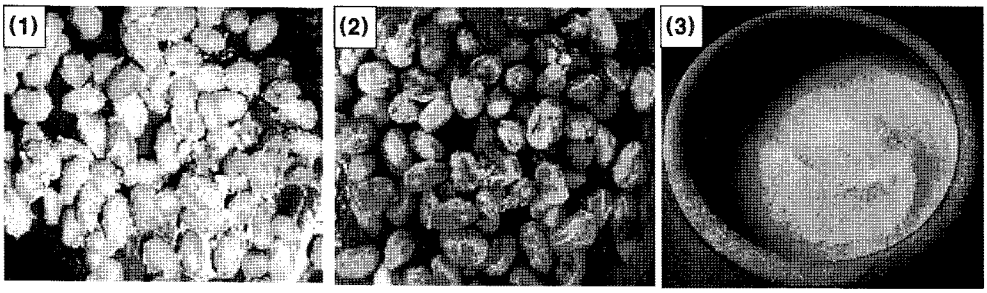

Fig. 5. Manufactured bacterial-koji and doenjang by using *B. subtilis* DJI. (1) : bacterial-koji just after fermentation, (2) : the bacterial-koji (1) after drying at 20°C for 24 h, (3) : DJI doenjang.

가하는 경향을 나타내었다.

제조된장의 아미노태 질소함량은 숙성 30일에 463 mg%를 나타내었으며, 숙성 60일에는 507 mg%를 나타내었다. 아미노태 질소는 된장을 비롯한 발효식품의 숙성도를 판단하는 지표로 된장의 제조와 숙성 과정 중에 콩 단백질이 효소작용으로 가수분해 되어 맛을 내는 아미노산을 생성하게 된다. 따라서 아미노태 질소의 함량은 된장의 고유한 맛인 구수한 맛 성분과도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다[16, 17]. 현재 아미노태 질소규정은 업체의 요구에 따라 식품공전에 기준값이 삭제되었으나 종래의 된장 아미노태 질소함량의 식품공전상 규격은 160 mg% 이상이었으며[12], 기존에 보고된 연구결과에 따르면 전통 재래된장의 아미노태 질소함량은 평균 약 308.4 mg%로 알려져 있다[26]. 본 연구에서 *B. subtilis* DJI을 사용하여 제조한 된장의 경우 숙성 30일 만에 463 mg%의 아미노태 질소가 검출되어 된장 규격에 만족하였고, 사용된 종균의 왕성한 단백분해효소 작용으로 인해 빠른 숙성도를 보이고 있음을 알 수 있었다.

된장의 구성아미노산, 유리아미노산

된장의 숙성 중 단백질 구성아미노산과 유리아미노산의 함량은 Table 2에서와 같다. 숙성 기간이 경과함에 따라 유리아미노산의 총 함량은 299.255 mg%에서 60일 이후에는 547.784 mg%로 증가하였다. 이는 숙성 기간이 경과함에 따라 세균형 코지의 효소작용으로 콩 단백질의 가수분해가 계속되어 60일 이후에는 유리아미노산의 함량이 증가됨을 알 수 있다. 구성아미노산 중에서 가장 많이 검출된 아미노산은 된장 맛에 크게 관여하는 지미성분의 하나인 glutamic acid(2,696~2,722 mg%)였고, 다음으로 비교적 많이 검출된 아미노산은 aspartic acid, leucine, arginine, lysine 등이었으며, methionine, valine, phosphoserine 등은 비교적 낮게 검출되었다. 이와 같은 결과는 된장의 구성아미노산으로 glutamic acid, aspartic acid, leucine, alanine 등의 함량이 비교적 높았다는 보고[16, 25, 29]와 비슷한 결과를 나타내었다.

Table 2. Change of total and free amino acids in DJI doenjang.
(unit : mg%)

Amino acid	Aging time			
	30 days		60 days	
	Total	Free	Total	Free
Phosphoserine	55	1.892	51	3.571
Aspartic acid	1,594	0	1,563	1.174
Threonine	614	9.236	576	18.845
Serine	782	4.536	746	11.611
Glutamic acid	2,722	8.258	2,696	19.701
Glycine	654	5.890	631	11.987
Alanine	644	15.267	616	23.799
Citrulline	316	1.328	284	10.234
Valine	295	16.549	295	29.479
Methionine	150	11.859	187	19.556
Isoleucine	625	41.043	603	71.805
Leucine	1,196	56.154	1,151	99.026
Tyrosine	600	38.735	589	14.040
Phenylalanine	762	48.700	738	84.709
r-Amino-n-butyric acid	36	2.674	29	10.567
Hydroxylysine	137	2.226	121	5.404
Ornithine	20	1.151	21	1.443
Lysine	948	8.023	910	16.075
Histidine	382	6.458	357	10.788
Carnosine	550	9.119	544	61.144
Arginine	1,077	10.157	1,049	22.826
Total	14,159	299.255	13,757	547.784

된장의 혈전용해 활성

B. subtilis DJI을 이용하여 제조한 된장과 비슷한 시기에 가정에서 재래식 방법으로 제조된 6종의 된장의 혈전용해능을 fibrin plate에서와 수용성 fibrin 용액상에서 각각 비교 측정하였다(Table 3). 우선 fibrinogen에 thrombin을 반응시켜 제조된 fibrin plate 위에 떨어뜨린 조효소액에 의해 fibrin이 용해되면서 생성된 투명환의 크기를 비교하였다. 대표적인 혈전용해제인 plasmin을 동시에 떨어뜨려 생성된 투명환을 100%로 하였을 때, 재래된장은 65~509%(평균 227.4%)의 활성을 나타내었으며, DJI 된장은 852.9%의 혈전용해 활성을 나타내었다. 두 번째로 fibrin 용액을 기질로 하여 조효소액을 직접 반응시켜 효소활성을 측정한 후 unit로 환산하였을 때, 재래된장은 363.3~618.6 units/ml(평균 465.08 units/ml), DJI 된장은 909.7 units/ml의 혈전용해 활성을 나타내었다. Table 3의 실험결과에 따르면 fibrin 용액을 기질로 하여 혈전용해능을 측정 하였을 때 가장 높은 활성(618.6 units/ml)을 나타내었던 재래된장 5의 경우 fibrin plate에서는 높게 측정(65%) 되지 않았고, 재래된장 6의 경우는 fibrin

Table 3. Fibrinolytic activities of DJI doenjang and traditional doenjangs.

Sample	Fibrinolytic activity	
	Fibrin plate (%)	Fibrin solution (units/ml)[1]
Plasmin	100.0	-[2]
DJI doenjang	852.5	909.7
Traditional doenjang 1	249.5	568.3
Traditional doenjang 2	509.5	366.3
Traditional doenjang 3	65.0	363.3
Traditional doenjang 4	164.5	493.3
Traditional doenjang 5	148.5	618.6
Traditional doenjang 6	N.D.[3]	380.7

[1]One unit of the activity was defined as the production of 1 μM of the tyrosine per min by 1 ml of crude enzyme
[2]- : not tested
[3]N.D. : not detected.

용액을 사용한 활성측정에서는 380.7 units/ml의 혈전용해능을 나타내었으나 fibrin plate에서는 전혀 역가를 나타내지 않았다. 이는 fibrin을 수용성 상태로 활성을 측정하는 방법 모두에서 높은 활성을 나타내지만 불용성 상태로 존재하는 fibrin을 분해하는 능력이 떨어질 수 있다는 보고[10]를 통해 그 원인을 알 수 있었다. 따라서 DJI 된장이 두 가지 활성 측정 방법에서 재래된장에 비해 훨씬 높은 혈전용해능을 지님을 확인 할 수 있었으며, 더 나아가 우수한 혈전용해능을 지닌 기능성 발효식품으로서의 발전 가능성이 매우 클 것으로 생각 되어진다.

된장의 향기성분

제조된장의 향기성분은 연속증류 추출장치(SDE)를 이용하여 추출하였다. 대조구로는 가정에서 재래식 방법으로 제조된 된장을 동일한 조건에서 추출하여 향기성분을 비교 분석하였다. 그 결과 DJI 된장에서는 총 35종, 재래된장에서는 29종의 화합물이 동정되었으며, 그 중 된장의 주요 향기성분으로 알려진 화합물들을 Table 4에 정리하였다. 검출된 물질의 양은 검출된 peak area로 표시함과 동시에 peak area가 가장 큰 물질인 9,12-octadecadienoic acid의 peak area (363,003,179)를 100으로 하였을 때, 검출되는 물질들의 peak area를 이 100에 대한 상대값으로 환산하여 재정리하였다. 재래된장에서 검출되는 쿰쿰한 냄새의 원인물질이라 알려진[4, 11, 13] 3-methyl-1-butanol, 1-octen-3-ol(증자대두 풋내), butanoic acid(쿰쿰한불쾌취), 2-pentyl furan(산패취), benzeneaectaldehyde(고린향)의 경우, DJI 된장에서 훨씬 적은양이 검출됨을 알 수 있었다. 또한 재래된장 고유의 맛과 향의 원인물질인 benzaldehyde, 2-furancarboxaldehyde, 2,5-dimethyl pyrazine, trimethyl pyrazine, hexadecanoic acid 등은 일정량 이상 검출되어 DJI 된장이 재래된장 특유의 불쾌취는 덜하면서 고유의 된장향을 지님을 확인할 수 있었다. 이 중 여러 연구에서 된장의 향기성분으로 알려진 pyrazine류는 증자대두에 *B. subtilis*(*B. natto*)를 접종하여 발효시키면 많이 생성되고[5, 29], 된장의 숙성 시 갈변반응과 함께 그 함량이 증가하는 것으로 알려져 있다[4]. 또한 hexadecanoic acid는 된장 특유의 맛과 향의 중요물질이지만 너무 많은 양이 존재할 때는 시큼한 맛을 나타낸다[4]. 이 물질이 DJI 된장의 경우 재래된장에 비해 적은양이 검출되어 전체적으로 된장 맛이 구수한 된장 풍미는 있으나 시큼한 맛을 전혀 느낄 수가 없었다. 이와 같이 기존의 메주나 곰팡이를 이용한 코지방식이 아닌 세균형 코지방식에 의하여 콩 100% 된장이 2개월 내 제조 가능함을 제시함으로서 새로운 된장 제조방법을 제안함이 본연구의 큰 의의라 하겠다.

요 약

전통된장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* DJI은 다른 *Bacillus* 속에 비해 균체 생육이 빠르게 진행되어 9시간 만에 생육이 최대값에 이른다. 그 이후 사멸기에 접어들면서 자기소화에 의해 급격한 세포파쇄가 이루어져 포자가 세포 외로 방출됨과 동시에 다량의 단백분해효소가 세포 밖으로 방출된다. 이러한 *B. subtilis* DJI 특유의 생육특징을 이용하여 세균형 코지와 된장을 제조(DJI 된장)하였으며, 제조된장의 숙성 60일 이후 일반성분을 분석한 결과 아미노태 질소 507 mg%, 조단백 14.3%, 조지방 4.8%로 식품공전상의 된장규격에 만족하였다. 또한 단백질 구성아미노산과 유리아미노산의 함량을 분석한 결과 유리아미노산의 총 함량이 숙성 30일에는 299.255 mg%에서 60일 이후에는 547.784 mg%로 증가함을 확인할 수 있었다. DJI 된장과 6종의 가정

Table 4. Flavor compounds identified in DJI doenjang and traditional doenjang.

No.	R.T. (min)	Identified compounds	Peak area		Relative peak area(%)	
			Traditional doenjang	DJI doenjang	Traditional doenjang	DJI doenjang
1	3.2	3-methyl-1-butanol	46,191,864	9,760,236	12.72	2.69
2	4.5	hexanal	N.D.	7,451,952	0	2.05
3	4.6	butanoic acid	166,772,756	N.D.	45.94	0
4	5.5	2-furancarboxaldehyde	24,200,697	6,531,908	6.67	1.80
5	8.3	2,5-dimethyl pyrazine	N.D.	6,545,288	0	1.80
6	10.2	benzaldehyde	8,789,117	6,530,283	2.42	1.80
7	10.9	1-octen-3-ol	14,467,046	7,411,140	3.99	2.04
8	11.2	2-pentyl furan	11,195,512	6,952,765	3.08	1.92
9	11.5	trimethyl pyrazine	N.D.	15,628,295	0	4.31
10	13.1	benzeneaectaldehyde	28,703,043	14,151,467	7.91	3.90
11	37.0	hexadecanoic acid	92,799,924	1,604,758	25.56	0.44
12	38.9	8,11-octadecadienoic acid	5,277,109	N.D.	1.45	0
13	40.1	9,12-octadecadienoic acid	363,003,179	N.D.	100	0

N.D. : not detected.

식 된장의 혈전용해능을 비교한 결과 DJI 된장은 909.7 units/ml, 재래된장은 363.3~618.6 units/ml로 나타내었다. DJI 된장은 관능적으로도 쿰쿰한 냄새가 거의 없고 구수한 된장향이 났으며, GC/MS를 통한 DJI 된장의 향기성분을 분석한 결과에서도 재래된장 특유의 쿰쿰한 냄새의 원인물질(3-methyl-1-butanol, 1-octen-3-ol, butanoic acid)은 적은양 검출된 반면 재래된장 고유의 맛과 향의 원인물질(benzaldehyde, 2-furancarboxaldehyde, hexadecanoic acid)은 일정량 이상 검출되었다. 현재 식품공전상 된장은 대두나 곡물에 종국을 섞어 제국하여 발효·숙성 시키거나, 메주를 식염수에 담가 발효하여 여액분리 후 이를 가공한 것으로 정의하고 있다. 즉 현재까지 된장은 주로 곰팡이의 단백분해효소에 의한 발효, 숙성물이었으나 본 연구에서는 *B. subtilis* DJI의 특이한 생육특성에 의하여 이를 사용한 새로운 개념의 세균형 코지제조와 이를 활용하여 재래된장 고유의 구수한 풍미를 지닌 맛있는 된장제조가 2개월 안에 제조 가능함을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신 사업에 의한 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of official analytical chemists, Washington D.C., USA.
2. Astrup, T. and S. Mullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**: 346-351.
3. Choi, K. K., C. B. Cui, S. S. Ham, and D. S. Lee. 2003. Isolation, identification and growth characteristics of main strain related to meju fermentation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 818-824.
4. Choi, M. K., K. H. Sohn, and H. J. Joen. 1997. Changes in odor characteristics of doenjang with different preparing methods and ripening periods. *Kor. J. dietary culture.* **12**: 265-274.
5. Choi, S. H., and Y. A. Ji. 1989. Changes in flavor of chungkookjang during fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **21**: 229-234.
6. Choi, S. Y., M. J. Cheigh, J. J. Lee, H. J. Kim, S. S. Hong, K. S. Chung, and B. K. Lee. 1999. Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste(doenjang) on the various tumor cells. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **28**: 458-463.
7. Chung, K. S., J. D. Yoon, D. J. Kwon, S. S. Hong, and S. Y. Choi. 1997. Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cells using MTT assay. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 477-482.
8. Enrich, H. J., N. U. Bang, S. P. Little, S. R. Jaskunas, B. J. Weigel, L. E. Mattler, and C. S. Harms. 1987. Biological properties of a kringless tissue plasminogen activator mutant. *Fibrionlysis.* **1**: 75-77.
9. Hwang, J. H. 1997. Antiotensin I converting enzyme inhibitory effect of doenjang fermented by *B. subtilis* SCB-3 isolated from meju, Korean traditional food. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 775-783.
10. Hyun, K. W., J. S. Lee, J. H. Ham, and S. Y. Choi. 2005. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from Korean traditional doenjang. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 24-28.
11. Ji, W. D., E. J. Lee, and J. K. Kim. 1992. Volatile flavor components of soybean pastes manufactured with traditional meju and improved meju. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**: 247-253.
12. KFDA. 2005. Food Code.
13. Kim, G. E., M. H. Kim, B. D. Choi, T. S. Kim, and J. H. Lee. 1992. Flavor compounds of domestic meju and doenjang. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**: 557-565.
14. Kim, H. J., Lee J. J., Cheigh M. J., and Choi. S. Y. 1998. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of kimchi ingredients. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**: 1333-1338.
15. Kim, J. H., J. S. Yoo, C. H. Lee, S. Y. Kim, and S. K. Lee. 2006. Quality properties of soybean pastes made meju with mold producing protease isolated from traditional meju. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**: 7-14.
16. Kim, J. K. 2004. Changes of components affecting organoleptic quality during the ripening of traditional Korean soybean paste. *J. Fd. Hyg. Safety.* **19**: 31-37.
17. Kim, J. S., S. H. Choi, S. D. Lee, G. H. Lee, and M. J. Oh. 1999. Quality changes of sterilized soybean paste during its storage. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 1069-1075.
18. Kim, S. I., I. C. Kim, and H. C. Chang. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 526-533.
19. Kim, W. K., K. H. Choi, Y. T. Kim, H. H. Park, J. Y. Choi, Y. S. Lee, H. I. Oh, I. B. Kwon, and S. Y. Lee. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkook-jang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2482-2488.
20. Lee, G. G. 2004. Soybean paste with good storage stability and flavor, and preparation method for the same. *Korean patent.* 10-0457354.
21. Lee, J. H., M. H. Kim, S. S. Im, S. H. Kim, and G. E. Kim. 1994. Antioxidative materials in domestic meju and doenjang. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **23**: 604-613.
22. Lee, K. H., and S. H. Sho. 2003. Effect of the combined fermentation with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus natto* on the quality improvement of doenjang meju. *J. Agri. and Life Sci.* **37**: 9-21.
23. Lee, S. K., D. H. Bae, T. J. Kwon, S. B. Lee, H. H. Lee, J. H. Park, S. Heo, and M. G. Sohnson. 2001. Purification and

characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-10 isolated from soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 845-852.

24. Nickerson, G. B., and S. T. Likens. 1966. Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *J. Chromatogr.* **21**: 1-5.
25. Park, J. S., M. Y. Lee, J. S. Kim, and T. S. Lee. 1994. Compositions of nitrogen compound and amino acid in soybean paste(doenjang) prepared with different microbial sources. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**: 609-615.
26. Park, S. K., K. I. Seo, M. Y. Shon, J. S. Moon, and Y. H. Lee. 2000. Quality characteristics of home-made doenjang, a traditional Korean soybean paste. *Kor. J. Soc. Food Sci.* **16**: 121-127.
27. Ra, K. S., S. H. Oh, J. M. Kim, J. M. Kim, and H. J. Suh. 2004. Isolation of fibrinolytic enzyme and ß-glucosidase producing strains from doenjang and optimum conditions of enzyme production. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **33**: 439-442.
28. Shin, Z. I., C. W. Ahn, H. S. Nam, H. J. Lee, H. J. Lee, and T. H. Moon. 1995. Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**: 230-234.
29. Song, J. Y., C. W. Ahn, and J. K. Kim. 1984. Flavor components produced by microorganism during fermentation of Korean ordinary soybean paste. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**: 147-152.
30. Sookkheo, B., S. Sinchaikul, S. Phutrakul, and S. T. Chen. 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expr. Purif.* **20**: 142-151.
31. Waleh N. S., J. L. Ingraham. 1976. Pyrimidine ribonucleoside monophospho kinase and the mode of RNA turnover in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* **110**: 49-54.
32. Yoon, K. D., D. J. Kwon, S. S. Hong, S. I. Kim, and K. S. Chung. 1996. Inhibitory effect of soybean and fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 525-528.
33. Yoo, S. K., S. M. Kang, and Y. S. Noh. 2000. Quality properties on soy bean pastes made with microorganism isolated from traditional soy bean pastes. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**: 1266-1270.

(Received Oct. 19, 2007/Accepted Nov. 8, 2009)