

된장 제조를 위한 바로 사용 종균의 개발

이은진¹, 허병석², 이인형^{1*}

¹국민대학교 바이오발효융합학과, BK21 Plus Project

²(주)샘표식품, 우리발효중심연구소

Received: March 5, 2019 / Revised: March 18, 2019 / Accepted: March 19, 2019

Development of Ready-to-use Starters for the Production of *doenjang*

Eun Jin Lee¹, Byung-Serk Hurh², and Inhyung Lee^{1*}

¹Department of Bio and Fermentation Convergence Technology, BK21 Plus Project, Kookmin University, Seoul 02702, Republic of Korea

²Sempio Fermentation Research Center, Sempio Foods Company, Chungcheongbukdo 28156, Republic of Korea

In Korea, traditional *doenjang* is manufactured using the conventional method at home and by small-scale enterprises. Because this age-old process depends on natural inoculation of various microorganisms, it is difficult to reproduce or maintain consistency in the final product quality across batches. Moreover, *doenjang* occasionally prepared by this method raises safety concerns related to aflatoxin, biogenic amine, and *Bacillus cereus* contamination. To develop starters that can be conveniently used at home or in small industry settings for the manufacturing of safe and flavor-improved *doenjang*, autochthonous microbe starters were developed in dried forms as ready-to-use starters. Each starter powder prepared by heat- or freeze-drying methods remained stable even after 24-week storage. These ready-to-use starter powders were successfully applied to lab-scale fermentation for the production of safe and flavor-improved *doenjang*. We believe that these ready-to-use starter powders will benefit small-scale enterprises in the manufacturing of *doenjang* of good reproducible quality.

Keywords: Ready-to-use starter, whole soybean *meju*, *doenjang* fermentation, *doenjang* safety, flavor-improved *doenjang*

서 론

된장은 오랫동안 조미식품으로 애용되어온 대표적인 한국의 콩 발효식품이다. 된장은 독특한 풍미와 향을 가지며 다른 콩 발효식품인 청국장이나 간장과는 구별된다. 된장은 영양적으로도 풍부하며 최근에 건강기능성이 밝혀지면서 건강식품으로 주목을 받고 있다[1–7]. 된장의 대표적인 기능성은 항암, angiotensin converting enzyme (ACE) 억제, tyrosinase 억제 및 면역증강 효과이며, 이러한 기능성은 콩 유래의 아이소플라본(isoflavone)이나 발효과정에 작용하는 미생물이 생산한 이차대사물질에 기인하는 것으로 알려지고 있다[4, 5]. 최근에도 된장의 기능성 평가에 대한 연구가 지속적으로 보고되고 있으며 특정 미생물을 이용한 된장의 기능성을 개

선하려는 연구도 보고되고 있다[2, 6].

된장은 제조방법에 따라 전통된장과 개량된장으로 구분된다. 전통된장은 메주를 이용하여 제조되며 다양한 미생물의 발효에 의해 생산된다. 전통메주는 삶은 콩을 으갠 후 사각이나 원형으로 성형 후 일정기간 저장함으로써 자연접종에 의한 다양한 미생물에 의해 발효된다. 메주 발효에는 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, 또는 *Penicillium* 속 곰팡이 및 *Bacillus* 속 세균 등 다양한 미생물이 작용한다[8–12]. 메주는 소금물에서 이차 발효과정을 거쳐 최종 된장으로 생산되는데 주로 내염성 젖산균 및 효모 등에 의한 추가적인 발효가 일어난다. 전통된장의 독특하고 풍부한 풍미 및 다양한 기능성은 이러한 다양한 미생물의 발효에 기인한 것이라 할 수 있다. 그러나, 전통된장은 발효기간 동안 미생물의 제어 가 어렵기 때문에 종종 곰팡이 독소, 바이오제닉 아민(biogenic amine) 및 식중독세균인 *Bacillus cereus* 오염 등 안전성 문제가 제기되고 있다. 한편, 개량된장은 산업적으로 생산되며 특정 미생물 종균을 이용하여 제조된 코오지(*koji*)

*Corresponding author

Tel: +82-2-910-4771, Fax: +82-2-910-5739

E-mail: leei@kookmin.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

를 삶은 콩에 혼합하고 일차 발효 후 소금물 첨가 후 이차 발효 과정을 거쳐 생산된다. 이는 일본 된장(miso)과 제조 방법이 유사하며 특정 종균을 이용하기 때문에 표준화가 용이하여 일정한 품질의 빠른 된장생산이 가능하고 안전성 제어에 장점이 있다[5]. 개량된장의 종균으로는 *Aspergillus oryzae*와 같은 단일 미생물이 주로 이용되기 때문에 다양한 미생물에 의해 발효되는 전통된장의 풍미 및 기능성과는 차별된다.

최근에는 전통된장과 개량식 된장제조 방법의 장점을 살리기 위해 다양한 종균을 이용한 개량식 발효 방법에 따른 전통된장과 유사한 안전하고 일정한 품질의 된장을 생산하려는 많은 연구가 진행되고 있다[6]. 그렇지만 대부분의 된장제조업체는 소규모로서 종균관리 및 종균의 된장 발효 적용에 어려움이 따르고 있다[5]. 따라서, 영세 장류업체나 가정에서 바로 사용할 수 있는 형태의 종균 개발이 중요하다. 현재 분말형태의 *Bacillus* sp, 요거트용 젖산균, 누룩과 같은 곰팡이, 효모 종균 등이 상업화되어 식품첨가제로 시판되고 있다. 현재까지 된장발효를 위한 종균은 많이 개발되었지만 가정이나 영세장류업체에서 용이하게 사용될 수 있는 형태의 “바로 사용 종균(ready-to-use starter)”은 개발되어 있지 않은 실정이다. 본 연구진은 최근에 안전하고 전통된장의 풍미를 재현한 된장 생산을 위해 메주 및 장류에서 분리한 미생물로부터 *A. oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Tetragenococcus halophilus* 및 *Zygosaccharomyces rouxii* 등의 종균을 개발하고 이들을 이용한 시험공장(pilot plant) 수준의 된장 생산을 위한 발효 공정을 개발한 바 있다[13]. 본 연구에서는 시험공장 수준에서 검증된 종균을 분말형태의 바로 사용 종균으로 개발하고 이를 적용하여 안전하고 우수한 풍미의 된장 생산의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구 그룹은 선행 연구에서 안전성이 검증되고 전통된장 풍미를 재현할 수 있는 곰팡이, bacilli, 젖산균, 효모 종균을 개발하였고, 이들 종균은 시험공장 수준에서 된장 발효에 성공적으로 적용한 바 있다[13]. 본 연구에서는 된장 발

효용 바로 사용 종균 형태로 개발하기 위해 선행연구에서 검증된 동일한 종균을 사용하였다. *Aspergillus oryzae* MJS14은 전통메주로부터 분리한 곰팡이로 곰팡이독소를 생산하지 않는 균주로서[14], 일반적인 배양을 위해서는 potato dextrose agar (PDA) (Acumedia, Neogen, USA) 배지를 사용하였다. 메주 및 된장에서 콩알메주 및 된장에서의 *A. oryzae* 수 분석을 위해서는 Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) (Acumedia) 배지를 사용하였다. *Bacillus subtilis* D119C는 전통된장으로부터 분리된 균주로서[15] 단백질 및 전분 분해효소능이 높고 아미노산 탈탄산 효소 능이 낮으며 *Bacillus cereus* 억제능이 높은 균주로서[13] nutrient agar (NA) (Acumedia) 배지에 배양하였다. 유산균 종균인 *Tetragenococcus halophilus* 7BDE22 또한 된장으로부터 분리된 균주로서[8, 16], 3% NaCl과 0.1% biotin을 함유한 MRS broth (Acumedia) 배지에 배양하였다. 효모성 *Zygosaccharomyces rouxii* SMY045는 알코올 생산능이 높고 생물막을 형성하지 않는 효모[13]로 10% NaCl을 포함한 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)에 배양하였다.

건조 종균의 제조

각 종균은 건조 분말형태로 개발하였다. 곰팡이 종균을 위해 *A. oryzae* MJS14를 1×10^6 spore/g 수준으로 콩, 쌀 및 보리에 접종 후 2일 동안 30°C에서 배양한 후 80°C에서 24시간 동안 열 건조하거나 -80°C에서 동결 후 3일간 동결 건조한 후 믹서기를 이용 분말화하였다(Table 1). 각 시료의 포자는 hemocytometer를 이용하여 계수하였다. *Bacillus* 건조 종균을 위해서 *B. subtilis* D119C를 1×10^7 CFU/g 수준으로 콩에 접종 후 1일간 30°C에서 배양 후 80°C에서 24시간

Table 2. Viability of a dried *Bacillus* starter powder.

Drying method	log CFU/g	Viability (%)
Before drying	8.48 ± 0.03 ^a	-
Heat drying	8.47 ± 0.02 ^a	99.9
Freeze drying	9.90 ± 0.03 ^b	116.7

The values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 1. Viability of *A. oryzae* grown on each substrate.

Substrate	Before drying	Heat-drying		Freeze-drying	
	log spore/g	log CFU/g	Viability (%)	log CFU/g	Viability (%)
Soybean	8.05 ± 0.08 ^a	7.94 ± 0.04 ^a	98.6	6.34 ± 0.04 ^b	78.5
Rice	6.76 ± 0.40 ^a	6.92 ± 0.11 ^a	102	4.61 ± 0.02 ^b	68.2
Barley	7.08 ± 0.05 ^a	7.02 ± 0.03 ^a	99.2	5.51 ± 0.12 ^b	77.8

The values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 3. Viability of *T. halophilus* after the freeze-drying process with different cryoprotectants.

Cryoprotectant	log CFU/g	Viability (%)
Before drying	7.67 ± 0.17 ^a	-
No cryoprotectant	7.12 ± 0.23 ^b	29.93
Cryoprotectant 1 (5% trehalose, 5% mannitol, 5% maltodextrin)	7.17 ± 0.1 ^b	30.98
Cryoprotectant 2 (10% dextrin, 10% sorbitol, 20% sodium glutamate)	7.44 ± 0.47 ^a	82.92
Cryoprotectant 3 (1% proline)	7.04 ± 0.14 ^b	23.02

The values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 4. Viability of *Z. rouxii* after the freeze-drying process with different cryoprotectants.

Cryoprotectant	log CFU/g	Viability (%)
Before drying	7.49 ± 0.14 ^a	-
No cryoprotectant	ND*	0
S20 (20% sucrose)	6.57 ± 0.01 ^b	12.04
S30 (30% sucrose)	6.58 ± 0.01 ^b	12.25
MD (10% maltodextrin)	ND	0
Lac (10% lactose)	6.46 ± 0.16 ^b	9.46

ND*: Countable colony was not detected.

The values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

동안 열 건조 및 -80°C에서 동결 후 3일간 동결건조한 후 미서기를 이용 분말화하였다(Table 2). 유산균 종균인 *T. halophilus* 7BDE22는 MRS (3% NaCl, 0.1% biotin 함유) 배지에 접종 후 37°C에서 3일간 배양하였고 효모 종균인 *Z. rouxii* SMY045는 YPD(10% NaCl 함유)에 접종 후 30°C에서 3일간 배양 후, 각각 30 ml의 배양액을 2,000 ×g, 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 회수된 종균에 30 ml의 동결보호제를 첨가 후 동결건조하였으며 사용된 동결보호제는 각각 Table 3, 4와 같다. 세균, 유산균, 효모의 계수는 평판배지를 이용 집락수로 계수하였다. 모든 종균은 상온, 4°C 및 -20°C에서 24주 동안 저장하면서 처음 4주간은 매주 생존율을 측정하였으며 4주차 이후부터는 4주 단위로 생존율을 측정하여 안정성을 평가하였다.

바로 사용 종균을 이용한 된장 발효

된장 발효는 기존에 개발된 시험공장 공정에 따라 콩알메주 발효와 소금용액에서의 이차발효 두 단계로 진행하였다[13]. 단지 삼각 플라스크 및 비이커를 이용하여 실험실 수준으로 진행하였다. 콩(500 g)을 물에 16시간 동안 침지한 후 121°C에서 8분 동안 증자 하였다. 증자된 콩에 30 g의 *A.*

oryzae 종균 분말(2×10^7 spore/g)과 0.3 g의 *B. subtilis* 종균 분말(1×10^6 CFU/g)을 혼합한 후 2일 동안 30°C에 배양하여 콩알메주를 제조하였다. 콩알메주에 천일염만 첨가한 된장(AB), 천일염 및 *T. halophilus* 종균 분말 첨가 된장(ABT), 천일염 및 *Z. rouxii* 종균 분말 첨가 된장(ABZ), 천일염 및 *T. halophilus*와 *Z. rouxii* 종균 동량 첨가 된장(ABTZ) 등 총 4종류의 된장을 제조하였다. 발효된 콩알메주를 으갠 후 62 g의 천일염을 첨가하여 수분함량 50% 및 염 농도 11%가 되게 한 후 시료에 따라 5.6 g의 *T. halophilus* 종균 분말(1×10^5 CFU/g) 및/또는 3.8 g의 *Z. rouxii* 종균 분말(1×10^5 CFU/g)을 첨가한 후 4주 동안 30°C에서 이차발효를 진행하였다. 천일염은 전라남도 신안군에서 제조된 시판 천일염 제품(누리원)을 멸균 후 사용하였다.

바로 사용 종균 발효 된장의 특성 분석

바로 사용 종균을 이용 제조된 된장의 bacilli, 곰팡이 및 젖산균의 수는 각각의 선택배지를 이용하여 30°C에서 24시간 동안 배양 후 집락수 계수에 의해 모니터링 하였다[8, 16]. 효모 종균은 hemocytometer를 이용하여 연속 희석 후 직접 계수하였다.

바로 사용 종균을 이용 제조된 된장의 된장의 물리화학적 특성(pH, 아미노태 질소 함량, 산도, 아미노산 함량, 바이오제닉 아민 함량 등)은 선행연구와 동일한 방법으로 진행하였다[13].

Protease 및 amylase 효소 활성은 Kum 등의 방법에 따라 수행하였다[17].

관능 평가 또한 시험공장 수준에서 제조된 된장의 평가에 적용된 동일한 방법으로 진행하였다[13]. 시중 된장과 비교하기 위해 C 회사 제품(재래식 콩된장)을 구입하여 관능평가에 포함하였다.

통계 처리

모든 분석실험으로 3 반복으로 진행되었으며 데이터는 (평균값 ± 표준편차)로 나타내었다. 관능평가 결과를 제외한 데이터의 p -value는 student t-test를 수행하여 계산되었으며, 0.05 이하의 값이 검출되었을 때 유의적으로 다르다고 정의하였다. 관능평가 결과는 ANOVA를 이용하여 분석하였고 Duncan's multiple range test를 수행하여 다중 비교하였다. p -value는 0.05 이하일 때 유의적으로 다르다고 정의하였다.

결과 및 고찰

바로 사용 종균 제조

본 연구그룹은 안전하고 전통된장 풍미를 갖는 개량형 된

장을 생산하기 위해 곰팡이, bacilli, 유산균 및 효모 종균을 개발하고, 이들 종균을 이용하여 시험 공장 규모의 된장 발효공정을 개발한 바 있다[13]. 그러나 종균을 효율적으로 사용하기 위해서는 미생물 배양 시설과 기술이 필요하다. 미생물 배양시설이나 전문 인력이 없는 가정이나 영세 장류업체에서 쉽게 사용할 수 있는 형태의 종균으로 개발하기 위해 선행연구에서 안전하고 전통풍미를 갖는 된장을 생산하는 것으로 검증된 종균을 바로 사용 종균 형태로 개발하였다.

곰팡이 바로 이용 종균 개발을 위해 *A. oryzae* MJS14을 쌀, 보리, 콩 기질에서의 포자 형성능을 비교하였다. 일반적으로 곰팡이는 코오지(*koji*) 제조를 위해 곡류가 사용되나 된장 발효를 위한 종균이기 때문에 콩 또한 기질로 검토하였다. 포자는 모든 기질에서 모두 빠르게 형성되었으며 배양 2일 후 콩에서 약 10^8 spore/g로 가장 우수하였다(Table 1). 2일간 배양된 콩의 열건조 및 동결건조 후 *A. oryzae* MJS14의 생존율은 열건조가 98.6%로 동결건조보다 우수하였다(Table 1). 동결 건조 시 낮은 생존율은 동결 과정에서의 균

사의 사멸에 기인한 것으로 생각된다. 본 연구에서는 열 건조방법이 경제적이고 우수한 생존율을 보여 열건조 하였고 믹서기를 이용 분말화 하였다.

Bacilli 종균 분말화를 위해 *B. subtilis* D119C를 콩에 배양한 결과 1일 배양 후 충분한 성장이 관찰되었다(Table 2). 열건조 및 동결건조 방법에 따른 생존율에는 거의 차이가 없었으며 거의 100%의 생존율을 보였다(Table 2). 일부 시료에서의 건조 후 균수의 증가는 건조 동안 증식에 기인한다기 보다는 건조 전 시료의 계수 시 poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) 생산에 따른 점성으로 생긴 희석 시 오차에 기인한 것으로 여겨진다. *B. subtilis* D119C는 된장에서 분리한 균주로 높은 수준의 γ -PGA를 생산하는 것으로 알려져 있다[15]. 따라서 경제성을 고려하여 *Bacillus* 종균 또한 열건조 하였고 믹서기를 이용 분말화 하였다.

젖산균은 일반적으로 건조 동안 거의 사멸하는 것으로 알려져 있어 동결보호제 첨가 후 동결건조에 의해 분말화 한다. 이전 연구에 따르면 젖산균의 동결건조 시 동결보호제의

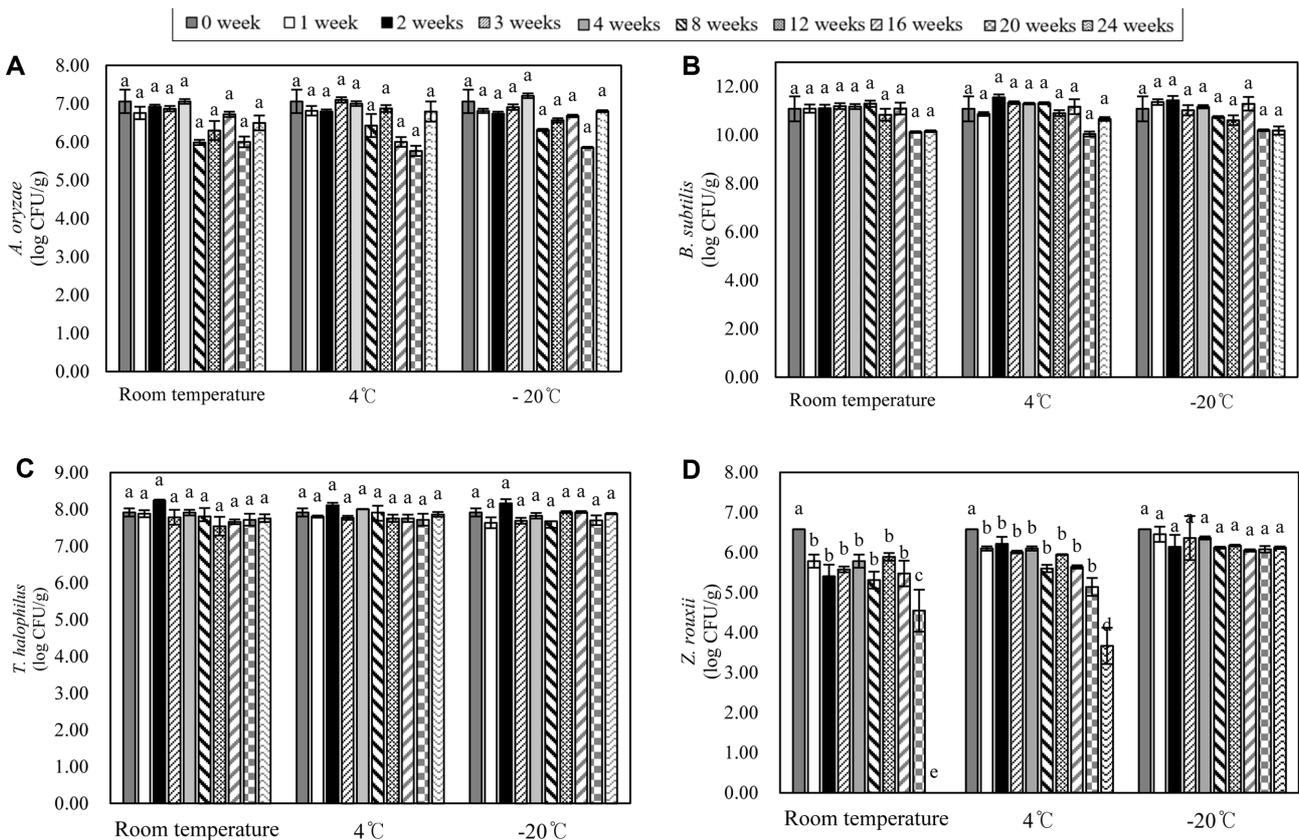


Fig. 1. Stability of ready-to-use starter powders. The starter powders of *A. oryzae* (A), *B. subtilis* (B), *T. halophilus* (C), and *Z. rouxii* (D) were stored at room temperature and at 4°C or -20°C for up to 24 weeks. Each starter was enumerated every week for the first 4 weeks and then at every 4 weeks for the rest of the storage period using the plate-counting method. The values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

종류에 따라 69–78% 정도의 생존율을 보이는 것으로 알려져 있다[18–20]. *T. halophilus* 7BDE22의 경우 동결보호제(10% dextrin, 10% sorbitol, 20% sodium glutamate) 첨가 후 동결건조 시 83%의 가장 높은 생존율을 보였다(Table 3). 동결 건조 후 믹서기를 이용 분말화 하였다.

효모의 경우 동결보호제를 사용해도 일반적으로 비교적 낮은 생존율(9–12%)을 보인다[21–23]. *Z. rouxii* SMY045는 30% sucrose을 동결보호제로 사용했을 경우 12%의 가장 높은 생존율을 보였다(Table 4). 동결 건조 후 비교적 낮은 생존율이었지만 발효에 충분할 것으로 판단되어 동결 건조 후 분말화 하여 바로 사용 효모 종균으로 사용하였다.

바로 사용 종균의 안정성

가정이나 영세장류업체에서 바로 사용 종균을 경제적으로 활용하기 위해서는 일정기간 생존율(viability)의 유지가 중요하다. 건조 분말화 된 바로 이용 종균 각각을 상온, 4°C, 및 -20°C에서 저장하면서 저장기간 동안 생존율을 평가하였다. *A. oryzae* MJS14, *B. subtilis* D119C 및 *T. halophilus* 7BDE22 바로 사용 종균은 24주 동안 저장 중 저장온도에 관계없이 91.1% 이상의 높은 생존율이 유지되었다(Fig. 1A–C). 반면에, *Z. rouxii* SMY045는 상온과 4°C에서 저장한 경우 생존율이 빠르게 감소하였지만 -20°C에 저장한 경우 24주차까지 93.0%의 비교적 높은 수준으로 유지되었다(Fig. 1D). 따라서 분말형태의 바로 사용 종균은 생산현장에서 적절히 보관된다면 최소 6개월간 사용될 수 있을 것이다.

바로 사용 종균을 이용 제조된 된장 특성

산업체에서 콩알메주는 증자된 으깨지 않은 콩에 특정 종균을 접종하여 제조된다. 본 연구에서도 유사한 방법으로 *A. oryzae* MJS14와 *B. subtilis* D119C 바로 사용 종균 분말을 이용해 콩알메주를 제조하였고, 제조된 콩알메주의 특성은 Table 5와 같다. *A. oryzae* MJS14와 *B. subtilis* D119C 수는 각각 10⁶ 및 10⁸ CFU/g 수준으로 증가하였다(Table 5). 시험공장 수준의 선행연구의 결과와 비교해서 *A. oryzae* 수는 낮았고(10⁶ vs 10⁷ CFU/g), *B. subtilis* 수 또한 낮았다

Table 5. Characteristics of whole soybean meju fermented with ready-to-use starter powders.

Characteristics	Whole soybean meju
Number of <i>A. oryzae</i> (log CFU/g)	6.46 ± 0.05
Number of <i>B. subtilis</i> (log CFU/g)	8.32 ± 0.09
Water contents (%)	53.9 ± 0.4
Protease activity (U/g IDS)	134.89 ± 38.22
Amylase activity (U/g IDS)	480.00 ± 11.64

Values represent the mean ± standard deviation.

(10⁸ vs 10⁹ CFU/g) [13]. 바로 사용 종균을 사용해 제조된 콩알메주에서의 낮은 *A. oryzae* MJS14와 *B. subtilis* D119C 수는 포자 발아에 따른 성장의 지체에 기인하는 것으로 생각된다. 수분 함량은 53.9%로 보통 메주보다 훨씬 높은 것으로 분석되었는데, 이는 용기로 삼각플라스크를 사용했기 때문으로 생각된다(Table 5). Protease 및 amylase 활성은 각각 135 및 480 U/gIDS으로 측정되어, protease 활성은 시험공장 수준의 선행연구보다 훨씬 낮은 수준으로 amylase 활성은 시험공장 수준의 선행연구보다 높은 수준으로 분석되었다(135 vs 458 U/g IDS for protease, 480 vs 122 U/g IDS for amylase) (Table 5). 낮은 protease 활성은 포자 발아에 따른 성장 지체로 인한 *A. oryzae* 및 *B. subtilis*의 성장이 시험공장 수준의 콩알메주에서 보다 낮았기 때문으로 생각된다. Amylase 활성 또한 종균의 성장 수준에 기인한 것으로 보인다. *B. subtilis* 경우 접종량이 적은 경우 오히려 높은 amylase 활성을 보인 사례가 보고된 바 있다[24].

콩알메주에 유산균 및 효모 바로 사용 종균을 이용하여 4 종류의 된장을 제조하였다. 천일염만 첨가한 시료(AB), 천일염 및 유산균 종균 분말 첨가 시료(ABT), 천일염 및 효모 종균 분말 첨가 시료(ABZ), 천일염 및 유산균과 효모 종균 동량 첨가 시료(ABTZ)를 4주간 이차 발효 후 제조된 된장의 종균 성장과 물리화학적 특성은 각각 Table 6과 Table 7에 정리하였다. *A. oryzae*의 수는 모든 시료에서 10³ CFU/g 이하로 감소하였는데 이는 고염에 따른 결과라 생각되며 기존 연구에서도 유사한 결과가 보고되었다[13, 25]. *B. subtilis* 수는 모든 시료에서 콩알메주 수준을 유지하였는데, 이 결과는 시험공장 규모의 선행연구와 유사한 것으로서 *B. subtilis* D119C는 내염성 세균으로 이차발효조건에서 생존하는 것으로 판단된다[13]. 일부 *B. subtilis*에서 trimethylamine이 삼

Table 6. Number of starter strains in doenjang prepared using ready-to-use starter powders.

Batch *	Number of starter strain (log CFU/g)			
	<i>A. oryzae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>T. halophilus</i>	<i>Z. rouxii</i>
AB	≤ 3.00	8.67 ± 0.05 ^b	-**	-
ABT	≤ 3.00	8.84 ± 0.03 ^a	8.84 ± 0.03 ^a	-
ABZ	≤ 3.00	8.62 ± 0.03 ^b	-	5.23 ± 0.12 ^a
ABTZ	≤ 3.00	8.58 ± 0.07 ^b	7.04 ± 0.01 ^b	5.22 ± 0.07 ^a

*Each batch of doenjang was fermented for 4 weeks after adding either salt only (batch AB); salt and *T. halophilus* 7BDE22 starter powder (batch ABT); salt and *Z. rouxii* SMY045 starter powder (batch ABZ); and salt, *T. halophilus* 7BDE22, and *Z. rouxii* SMY045 starter powders (batch ABTZ) to whole soybean meju. -**, Starter powders were not used.

The values with different letters indicate significant differences (*p* < 0.05).

Table 7. Physicochemical characteristics of *doenjang* prepared using ready-to-use starter powders.

Batch*	pH	Titrateable acidity	Water contents (%)	Salinity (%)	Amino-type nitrogen (mg%)	Free amino acid (%)	Total amino acid (%)
AB	5.85 ± 0.01 ^a	19.6 ± 1.13 ^b	52.7	11.5	791.0 ± 19.80 ^b	4.46	14.53
ABT	5.35 ± 0.01 ^c	25.2 ± 0.28 ^a	55.0	11.0	805.0 ± 9.90 ^a	5.44	14.87
ABZ	5.90 ± 0.01 ^a	19.8 ± 0.28 ^b	55.0	10.5	749.0 ± 9.90 ^c	4.59	14.80
ABTZ	5.81 ± 0.01 ^b	19.6 ± 0.57 ^b	56.0	11.0	738.5 ± 24.75 ^c	4.91	14.60

*Each *doenjang* was fermented with the combination of ready-to-use starter powders as described in Table 6.

Values represent the mean ± standard deviation.

The values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

투보호물질로 작용하여 내염성을 갖는 것으로 보고된 바 있다[26]. *T. halophilus*는 접종량(10^5 CFU/g)에서 ABT ($10^{8.4}$ CFU/g) 및 ABTZ (10^7 CFU/g)으로 이차발효기간 동안 성장하나 효모와 동시 첨가(ABTZ 시료) 시 시험공장 규모의 선행연구에서처럼 성장이 저해됨이 관찰되었다 [13]. *Z. rouxii*는 단독 첨가(ABZ 시료)나 *T. halophilus*와 동시 첨가(ABTZ 시료) 후 같은 수준으로 관찰되어 *T. halophilus*에 의해 성장저해는 없는 것으로 보인다(Table 6).

바로 사용 종균 조합에 따른 된장시료의 이화학적 특성은 유사하였고 수분 함량 및 염도는 각각 55% 및 11.5%로 목표로 한 된장이 제조되었다(Table 7). 예상대로 유산균 첨가 시료의 산도가 가장 높고 pH는 낮았는데, 이는 젖산균에 의한 유기산 생성에 기인하는 것으로 기존 연구결과와 일치한다(Table 7) [27]. 반면에 젖산균과 효모를 동시에 첨가한 경우 산도가 높지 않았는데 이는 효모에 의한 유산균의 성장이 억제된 결과로 보인다. 된장의 숙성 지표인 아미노태 질소 함량은 시료 별로 유사하였지만 *T. halophilus* 사용 된장(ABT 시료)에서 약간 높게 나타났는데(Table 7), 이는 이차발효 시 *T. halophilus*에 의한 단백질 또는 펩타이드 분해가

더 진행됐음을 알 수 있다. 총 아미노산 함량은 시료간 큰 차이를 보이지 않았으나 유리아미노산의 함량이 *T. halophilus* 사용 된장(ABT 시료)에서 비교적 높게 나타나 발효 및 숙성이 더 진행되었음을 알 수 있었다(Table 7). 대부분의 아미노산 함량이 상업용 전통된장보다는 높게 측정되었으며, 특히 glutamate 함량이 젖산균 첨가 발효 된장에서 매우 높게 나타났다(Fig. 2). Glutamate는 감칠 맛의 주요성분으로 소비자 선호도에 중요한 아미노산이다[28, 29]. 바로 사용 종균을 이용하여 제조된 된장시료의 관능평가 결과는 Table 8에 나타내었다. 모든 시료는 시판 상업된장보다는 높은 선호도 평가를 받았으며, 특히 유산균 바로 사용 종균을 사용한 ABT 및 ABTZ 시료에서 높은 선호도를 보였다. ABT 및 ABTZ 시료에서의 높은 단맛 및 감칠맛은 유산균의 발효작용에 따른 높은 유리아미노산 및 glutamate 함량에 기인한 것으로 판단된다. 따라서 바로 사용 종균을 이용하여 제조된 시료에서의 미생물 군집 및 이화학적 특성 분석 결과로 볼 때 이차발효 동안 효모보다는 유산균이 발효 및 풍미형성에 더 큰 영향을 미칠 것으로 판단된다. 이차발효 기간 동안 유산균의 성장과 발효는 적용된 이차 발효공정을 밀봉된 상태

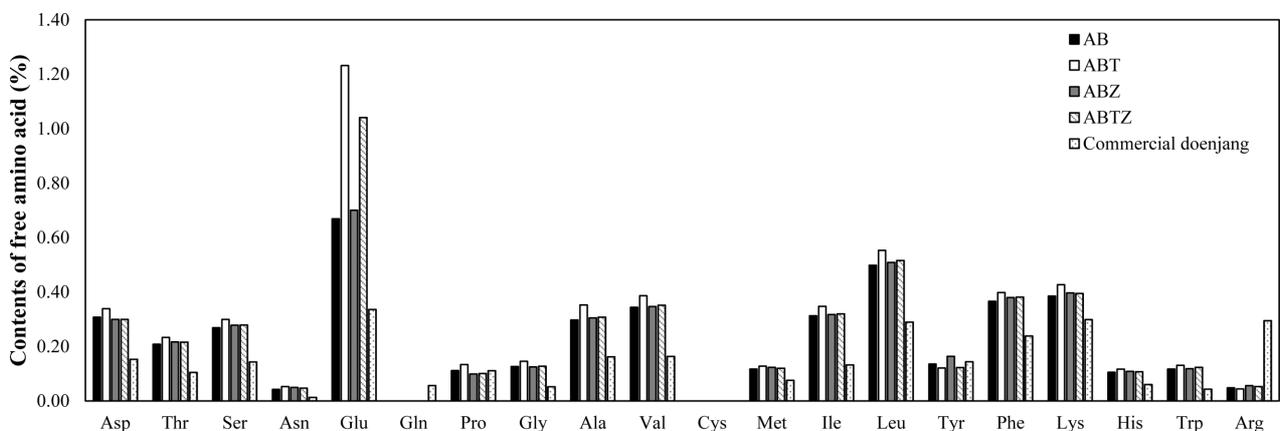


Fig. 2. Composition of free amino acids in *doenjang* samples prepared using ready-to-use starter powders. Each free amino acid content is expressed as a percent of each free amino acid in the total protein content of *doenjang* samples.

Table 8. Sensory characteristics and consumer acceptability of *doenjang* prepared using ready-to-use starter powders.

	Score				
	AB	ABT	ABZ	ABTZ	Commercial <i>doenjang</i>
Sensory attributes (mean intensity score)					
Color	5.1 ^{cd}	6.4 ^b	5.6 ^c	4.6 ^d	7.3 ^a
Odor	Fermented fish	2.1 ^b	1.8 ^b	1.8 ^b	3.1 ^a
	Wild edible greens	2.7 ^b	2.4 ^b	2.6 ^b	3.1 ^b
	Soy sauce	2.9 ^a	3.0 ^a	1.9 ^b	2.1 ^b
	Barn	1.8	2.0	1.6	2.0
Taste	Earthy	3.8 ^{ab}	4.1 ^a	3.1 ^{bc}	3.0 ^{bc}
	Salty	4.8 ^b	5.6 ^a	4.4 ^b	5.8 ^a
	Sweet	3.1 ^b	4.6 ^a	3.2 ^b	4.9 ^a
	Sour	3.2	3.8	2.6	2.7
	Bitter	3.4 ^b	2.9 ^b	4.3 ^a	2.8 ^b
	Umami	3.9 ^c	5.1 ^b	3.8 ^c	6.1 ^a
Texture	Stuffy	4.6 ^a	3.1 ^b	4.7 ^a	3.4 ^b
	Astringent	3.1 ^{bc}	4.6 ^a	3.3 ^b	2.6 ^c
	Body feel	4.7 ^a	3.4 ^b	4.7 ^a	3.4 ^b
Consumer acceptability (mean score)	2.6	3.2	2.2	3.0	2.1

*Each *doenjang* was fermented with the combination of ready-to-use starter powders as described in Table 6. Sensory attribute values are represented as 10-point category scale (“weak” as 1 point and “strong” as 10 point). Consumer acceptability values are represented as 5-point category scale (“bad” as 1 point and “good” as 5 point). The values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

Table 9. Content of biogenic amines in *doenjang* prepared using ready-to-use starter powders.

Batch*	Biogenic amine (μg/g)								
	TRP	PHE	PUT	CAD	HIS	TYR	SPD	SPM	Total
AB	0.13 ± 0.22	ND**	0.08 ± 0.13	0.12 ± 0.20	ND	0.08 ± 0.13	0.23 ± 0.40	0.42 ± 0.73	1.06 ± 0.61
ABT	ND	ND	0.05 ± 0.09	0.04 ± 0.08	ND	0.02 ± 0.04	0.10 ± 0.18	0.15 ± 0.25	0.36 ± 0.21
ABZ	0.13 ± 0.22	ND	0.08 ± 0.14	0.11 ± 0.19	ND	0.06 ± 0.11	0.26 ± 0.44	0.29 ± 0.50	0.93 ± 0.53
ABTZ	ND	ND	0.06 ± 0.13	0.06 ± 0.13	ND	0.03 ± 0.05	0.18 ± 0.30	0.20 ± 0.35	0.53 ± 0.30

*Each *doenjang* was fermented with the combination of ready-to-use starter powders as described in Table 6. ND**: not detected.

의 혐기적 발효에 기인한 것으로 보인다.

바로 사용 종균은 선행연구에서 안전성이 검증된 종균[13] 으로부터 제조되었기 때문에 제조된 된장 또한 안전할 것으로 기대하였다. 다만 *T. halophilus*가 바이오제닉 아민 생성 능력을 보였기 때문에[16], 바로 사용 종균을 이용해 제조된 된장의 바이오제닉 아민 함량을 측정하였다. 시험공장 수준의 선행연구에서와 마찬가지로 모든 시료에서 바이오제닉 아민은 검출되지 않았거나 매우 소량 검출되었다(Table 9). 따라서 바로 사용 종균을 사용하면 일부 된장에서 문제가 되고 있는 바이오제닉 아민 오염 문제가 없는 된장 제조가 가능할 것으로 생각된다.

Acknowledgments

Authors thank Prof. J. H. Lee for providing *T. halophilus* 7BDE22 and Ms. H. Kim for her technical assistance. This work was supported by grants from the National Research Foundation of Korea (no. 2017R1A2B4004748), and the Partnership Programs of Strengthening Technological Competency for Small and Medium Enterprise (no. S2483241) funded by the Ministry of SMEs and Startups (MSS, Korea).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Chai C, Ju HK, Kim SC, Park JH, Lim J, Kwon SW, et al. 2012. Determination of bioactive compounds in fermented soybean products using GC/MS and further investigation of correlation of their bioactivities. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **880**: 42-49.
2. Kim B-S, Rhee C-H, Hong Y-A, Woo C-J, Jang C-M, Kim Y-B, et al. 2007. Changes of enzyme activity and physiological functionality of traditional *doenjang* during fermentation using *Bacillus* sp. SP-KSW3. *Korean J. Food Preserv.* **14**: 545-551.
3. Kim SH, Lee Y-J, Kwon DY. 1999. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from *doenjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**: 848-854.
4. Lee S, Lee S, Singh D, Oh JY, Jeon EJ, Ryu HS, et al. 2017. Comparative evaluation of microbial diversity and metabolite profiles in *doenjang*, a fermented soybean paste, during the two different industrial manufacturing processes. *Food Chem.* **221**: 1578-1586.
5. Lee SY, Lee S, Lee S, Oh JY, Jeon EJ, Ryu HS, et al. 2014. Primary and secondary metabolite profiling of *doenjang*, a fermented soybean paste during industrial processing. *Food Chem.* **165**: 157-166.
6. Shukla S, Lee JS, Park HK, Yoo JA, Hong SY, Kim JK, et al. 2015. Effect of novel starter culture on reduction of biogenic amines, quality improvement, and sensory properties of *doenjang*, a traditional Korean soybean fermented sauce variety. *J. Food Sci.* **80**: M1794-M1803.
7. Singh BP, Vij S, Hati S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* **54**: 171-179.
8. Jeong DW, Kim HR, Jung G, Han S, Kim CT, Lee JH. 2014. Bacterial community migration in the ripening of *doenjang*, a traditional Korean fermented soybean food. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 648-660.
9. Jung JY, Lee SH, Jeon CO. 2014. Microbial community dynamics during fermentation of *doenjang-meju*, traditional Korean fermented soybean. *Int. J. Food Microbiol.* **185**: 112-120.
10. Kim DH, Kim SH, Kwon SW, Lee JK, Hong SB. 2013. Mycoflora of soybeans used for *meju* fermentation. *Mycobiology* **41**: 100-107.
11. Lee JH, Kim TW, Lee H, Chang HC, Kim HY. 2010. Determination of microbial diversity in *meju*, fermented cooked soya beans, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* **51**: 388-394.
12. Nam YD, Lee SY, Lim SI. 2012. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* **155**: 36-42.
13. Lee EJ, Hyun J, Choi Y-H, Hurh B-S, Choi S-H, Lee I. 2018. Development of safe and flavor-rich *doenjang* (Korean fermented soybean paste) using autochthonous mixed starters at the pilot plant scale. *J. Food Sci.* **83**: 1723-1732.
14. Lee JH, Jo EH, Kim KM, Lee I. 2014. Safety evaluation of filamentous fungi isolated from industrial *doenjang koji*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 1397-1404.
15. Kang SE, Rhee JH, Park C, Sung M-H, Lee I. 2005. Distribution of poly- γ -glutamate (γ -PGA) producers in Korean fermented foods, *Cheongkukjang*, *Doenjang*, and *Kochujang*. *Food Sci. Biotechnol.* **14**: 704-708.
16. Jeong DW, Heo S, Lee JH. 2017. Safety assessment of *Tetragenococcus halophilus* isolates from *doenjang*, a Korean high-salt-fermented soybean paste. *Food Microbiol.* **62**: 92-98.
17. Kum SJ, Yang SO, Lee SM, Chang PS, Choi YH, Lee JJ, et al. 2015. Effects of *Aspergillus* species inoculation and their enzymatic activities on the formation of volatile components in fermented soybean paste (*doenjang*). *J. Agric. Food Chem.* **63**: 1401-1418.
18. Choi IS, Kim BK, Moon SH, Heo BH, MH S. 2016. Method for increasing viability, storage stability, acid tolerance or oxgall tolerance of lactic acid bacteria. Republic of Korea patent no. 1016055160000.
19. Chung M-J. 2004. Manufacturing method of protein-coated lactic acid bacteria powder. Republic of Korea patent no. 1004294940000.
20. Intrexon Actobiotics NV. 2018. Cryoprotectants for freeze drying of lactic acid bacteria. Republic of Korea patent no. 1018214170000.
21. Beak NS, Lim SH. 2013. Manufacturing method of rice Kefir by using *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Republic of Korea patent no. 1013131200000.
22. Blanquet S, Garrait G, Beyssac E, Perrier C, Denis S, Hebrard G, et al. 2005. Effects of cryoprotectants on the viability and activity of freeze dried recombinant yeasts as novel oral drug delivery systems assessed by an artificial digestive system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **61**: 32-39.
23. Coutinho C, Bernardes E, Félix D, Panek AD. 1988. Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. *J. Biotechnol.* **7**: 23-32.
24. Krishna C, Chandrasekaran M. 1996. Banana waste as substrate for α -amylase by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 106-111.
25. Rhee CH, Lee JB, Jang SM. 2000. Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the traditional *doenjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. *Appl. Biol. Chem.* **43**: 277-284.
26. Kappes RM, Bremer E. 1998. Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and gamma-butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**: 83-90.
27. Jung WY, Jung JY, Lee HJ, Jeon CO. 2016. Functional characterization of bacterial communities responsible for fermentation of *doenjang*: A traditional Korean fermented soybean paste. *Front. Microbiol.* **7**: 827.
28. Kim HG, Hong JH, Song CK, Shin HW, Kim KO. 2010. Sensory characteristics and consumer acceptability of fermented soybean paste (*Doenjang*). *J. Food Sci.* **75**: S375-383.
29. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, et al. 2002. An amino-acid taste receptor. *Nature* **416**: 199-202.