

在來式 고추장 熟成에 미치는 微生物 및 그 酵素에 關한 研究

李啓瑚 · 李妙淑 · 朴性五*

서울대학교 農科大學 食品工學科

(1976년 6월 1일 수리)

Studies on the Microflora and Enzymes Influencing on Korea Native Kochuzang (Red Pepper Soybean Paste) Aging

Ke-Ho, Lee · Myo-Sook, Lee and Sung-O, Park*

Dept. of Food Technology, College of Agriculture, Seoul National University.

(Received June 1, 1976)

SUMMARY

The study was carried out to investigate the changes of the various chemical components and the microflora during the the aging period of Korean native Kochuzang. (Red pepper soybean paste)

Korean native maeju loaves were separated into surface and inner parts.

Three kinds of Korean native Kochuzang were prepared from surface part, inner part, and ordinary of maeju.

The selection and the identification of the high enzyme producing strains from the microflora and characteristics of their enzymes were studied.

I. The changes of the various chemical components during the aging period of Kochuzang.

1) The changes of pH in the 3 kinds of Kochuzang displayed rapid decrease for the first 10 days after preparing and gradual curve of decrease until 60 days, but slight increase for the next 30 days.

The pH of the surface part Kochuzang was lower than that of inner part or ordinary Kochuzang.

2) The total acid contents in the 3 kinds of Kochuzang showed gradual increase until the 60 days but it slowly reduced after this time.

3) The total nitrogen contents in the 3 kind of Kochuzang showed gradual increase up to the 60 days, but slight decrease after this time.

4) The changes of trichloroacetic acid soluble nitrogen in the 3 kinds of Kochuzang showed a remarkable increase for the first 10 days, however gradual increase after this

* 서울女子大學 食品科學科(Dep. of Food Science, Seoul Woman's College)

time.

5) The increase of amino nitrogen contents in the 3 kinds of Kochuzang seemed to be remarkable until the first 30 days, however to be less remarkable after this time.

6) The contents of reducing sugar in the 3 kinds of Kochuzang showed remarkable increase until the first 50 days and it slowly reduced after this time.

II. The changes of microflora during the aging period of Kochuzang.

1) Aerobic, anaerobic bacteria and mold in the 3 kinds of Kochuzang were increased until the first 30 to 40 days, but they were reduced after this time.

2) No yeast in the three kinds of Kochuzang appeared until the first 20 days. Yeast were proved to grow, when the pH value was decreased below 5.4 after the 30 days.

Yeasts in the surface part and ordinary Kochuzang were gradually increased and those in the inner part Kochuzang were decreased as aging.

III. The selection and identification of high amylase and protease producing strains from the microflora during the aging period of Kochuzang.

1) The amylase and protease highly producing strains from microflora were identified as *Bacillus subtilis*-P, *Bacillus subtilis*-G, *Bacillus licheniformis*-K, *Aspergillus oryzae*-B.

2) Amylase activity of *Aspergillus oryzae*-B was highest among the strains and the strains in order of the higher activity to the lower one were *Bacillus subtilis*-P *Bacillus licheniformis*-K, *Bacillus subtilis*-G.

Protease activities of *Aspergillus oryzae*-B and *Bacillus subtilis*-P were about the same and the strains in order of the higher activity to the lower one were *Bacillus licheniformis*-K, *Bacillus subtilis*-G.

3) Amylase activity was inhibited more than protease activity was with NaCl concentration.

Amylase activity was inhibited by 45 to 65 percent and protease activity by 40 to 46 percent at the concentration of 15 percent NaCl, which was the average concentration of NaCl in Kochuzang.

緒 論

우리나라 고유의 특유한 조미식품이자 기호식품인 고추장은 옛부터 각 가정에서 제래의 方法으로 담구어온 간장, 된장과 함께 대표적인 발효식품으로서 탄수화물의 가수분해로된 당으로 부터의 단맛과 단백질분해로된 amino acid의 구수한 맛, 고추가루의 매운맛, 소금의 짠 맛등이 잘 조화를 이루고 있어 우리나라 日常 食생활과 떨어질 수 없는 중요한 위치를 차지하고 있다. 그 제조원리는 각 가정에서 제래식으로 제조한 메주의 뜨는 過程에 자연제에서 부터오는 microflora가 분비하는 효소들을 利用하여 고추장을 숙성시키는 것이다.

이에 대한 과학적인 연구는 아직 미미하여 1963년 鄭⁽¹⁾등이 전라북도의 이미숙성된 10種類의 제

래식 고추장에 대한 일반성분의 분석보고가 있고 1970년 李^(2,3)등이 개량식 고추장의 효모에 대한 연구보고가 있고 다만 1960년 이후 제래식간장에 대한 연구가 진행되었는데 조⁽⁴⁾등의 간장분석에 관한 보고 李⁽⁵⁾등의 간장의 부패에 관하여는 pellicle forming yeast의 분리에 대한보고, 1967년 장^(6,7,8,9,10)의 한국 제래식간장의 생화학적 연구보고, 1970년 李^(11,12)등이 제래식 메주와 제래식간장중의 미생물 분류 및 생태학적인 연구보고가 있을 뿐 제래식고추장 숙성중에 관여하는 미생물의 動態 및 효소학적인 연구는 찾아 볼 수 없다. 따라서 본 연구는 제래식고추장 숙성이 제래식메주와 밀접한 관계가 있음을 고려하여 제래식메주중 microflora의 서식상태가 部位別로 다른 外部와 內部, 그리고 外部와 內부를 혼합한 3區로 나누어 제래식고추장을 담그고 숙성 과정중의 제성분 변

화 및 그들의 미생물 動態를 조사하고 숙성과정중 에 관여하는 미생물을 순수분리하고 이들의 효소 활성을 screening하여 우수균주를 선정하고 동정 하였으며 그의 효소적 특성을 비교하여 몇가지 결과를 얻었기 이에 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 試料의 調製

(1) 실험재료

재래식메주, 가추가루, 찹쌀, 식염
재래식메주는 서울—民家의 것을 사용하였고 고 추가루, 찹쌀, 식염은 시판용을 구입하였다.

(2) 고추장 담금

재래식메주중 microflora의 서식상태가 다른 걸 부분과 속 부분으로 나누고 두 부분을 혼합한구등 3구의 재래식고추장을 담그고 3개월간 숙성시키면서 2~3일에 1번씩 장독을 열어 햇볕을 보였다.

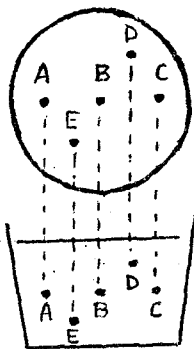
① 매추속부분만으로 담근 고추장—매추내부고 추장區

② 매추겉부분만으로 담근 고추장—매추외부고 추장區

③ 보통재래식 고추장담금과 같이 매추겉부분과 속부분을 혼합하여 담근 고추장—매추혼합고추장 區

(3) 試料의 採取

고추장의 숙성과정중에 10일간격으로 sampling 하였으며 표면, 측면, 밑바닥의 극단적인 부위를 피하여 다음 그림과 같은 부위에서 채취하여 혼합 하였다.



2. 化學成分 分析

고추장 숙성중에 채취한 시료에 대하여 제 화학 성분 분석을 다음과 같은 方法으로 측정하였다.

(1) pH

일정량의 시료에 0.01N-NaOH로 pH 7.0으로 조

절한 증류수를 가해 유리막대로 잘 마쇄, 혼합한 후 pH meter (model TOA HM-5A)를 사용하여 pH를 측정하였다.

(2) Total acid⁽¹³⁾

pH를 측정한 후 0.1N-NaOH로 pH 7.0이 될때 까지 적정하여 이때 소요된 0.1 N-NaOH의 ml수로 산도 I을 나타냈고 산도 II는 산도 I을 측정한 후 다시 적정을 계속하여 pH가 8.3 될때까지 소요된 0.1N-NaOH의 ml수로 표시하였으며 총산은 제 I 산도와 제 II 산도를 합하여 표시하였다.

(3) 食鹽濃度

일정량의 시료에 일정량의 증류수를 가해 3분간 끓인다음 냉각시켜 上澄液을 2% K₂CrO₄를 指示藥으로하여 N/50 AgNO₃로 滴定하여 食鹽含量을 계산한다.

(4) Total nitrogen⁽⁴⁾

micro kjeldahl method에 의하여 total nitrogen을 測定하였다.

(5) T.C.A. (Trichloroacetic acid) soluble nitrogen

시료 5g에 0.4M T.C.A. solution 50ml를 加해 3분간 끓인후 냉각하여 Toyo filter paper를 사용하여 여과한 濾液에 대하여 micro kjeldahl method로 T.C.A. soluble nitrogen을 測定하였다.

(6) Amino nitrogen

Folin phenol試藥⁽¹⁵⁾으로 比色定量하였다.

(7) Reducing sugar

Fohling Lehman Schoorl變法⁽¹⁶⁾에 의하여 환원 당을 定量하였다.

3. 微生物 實驗方法

(1) 微生物의 分離 및 測定

고추장을 담금하여 10일간격으로 sampling하여 microflora를 조사하였다. 시료 1g을 삼각 flask의 100ml살균수에 넣어 충분히 흔들어 suspension을 만든다음 dilution method로 희석하였다.

호기성세균의 viable cell count에는 10⁻⁵, 혐기성세균의 viable cell count에는 10⁻⁵, mold 및 yeast의 viable cell count에는 10⁻²의 희석액을 사용하여 이의 1ml를 호기성세균은 Nutrient broth agar로서 pour plate method, 혐기성세균은 Deep liver infusion agar에서 중층배양法, mold 및 yeast는 peptone dextrose agar에서 spreading method에 의하여 petri dish에서 배양하고 生菌數를 조사하고 순수분리하였다.

(2) 微生物의 分離培地

미생물에 따라 다음 Table 1.에 보인바와 같은

Table 1. The media for viable cell count and isolation of microorganisms in Korean native Kochuzang. (red pepper soybean paste)

Aerobic bacteria		Anaerobic bacteria ⁽¹⁷⁾		Mold & Yeast ⁽¹⁸⁾	
Beef extract	3g	Liver infusion	500ml	Dextrose	10g
Peptone	5g	Tryptone	5g	Peptone	5g
NaCl	2%	Na-thioglycollate	0.1%	KH ₂ PO ₄	1g
Dist. water	1l	K ₂ HPO ₄	0.1%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
Agar	2%	CaCO ₃	3%	NaCl	2%
		NaCl	2%	Rosebengal	1 : 30,000
		Dist. water	500ml	Streptomycin	30 γ /ml
		Agar	2%	Dist. water	1l
				Agar	2%
Incubation: 42hours at 30°C		Incubation: 42 hours at 37°C		Incubation: 3-5 days at 30°C	

배지 및 배양조건으로서 배양하였다.

4. 효소활성이 우수한 균주의 분리 및 동정과 그의 효소특성

고추장숙성과정중에 순수 분리한 총 140여개의 균주에 대하여 amylase 및 protease 활성을 screening하고 우수 균주를 선발하였다.

1) 1차 Screening

효소액의 조제는 직경 1.8cm의 test tube에 밀기

울과 콩가루를 2 : 1의 비율로 1.5g 넣고 bacteria를 위한 media는 2배량의 수도수를 가하고 mold를 위한 media는 동량의 수도수를 가하여 가압살균한 다음 분리 균수중 80여개의 bacteria와 60여개의 mold를 접종하여 bacteria는 2일, mold는 4일간 배양하고 이에 15ml의 증류수를 가하여 냉장고내에서 一夜 침출한 액을 조효소액으로 하였다.

Table 2. Composition of substrate for screening of enzyme activity.

Composition of substrate Crude enzyme of Microorganisms	Substrate for protease activity		Substrate for amylase activity	
	1% casein agar		1% starch agar	
Bacteria	Casein	1%	Soluble starch	1%
	McIlvaine buffer pH 7.0	20ml	McIlvaine buffer pH 7.0	20ml
	Agar	2%	Agar	2%
	Dist. water	80ml	Dist water	80ml
Mold	Casein	1%	Soluble starch	1%
	McIlvaine buffer pH 5.4	20ml	McIlvaine buffer pH5.4,	20mt
	Agar	2%	Agar	2%
	Dist. water	80ml	Dist water	80ml

Table 2와 같은 기질을 petri dish에 20ml씩 추가한 plate상에 효소액 2백균이를 disk paper⁽¹⁹⁾를 사용하여 작용시켜 37°C에서 20시간 효소반응시킨 후 disk paper를 제거하고 1% casein agar plate에는 10% T.C.A를 5ml가하였고 1% starch agar plate에는 0.01N Iodine을 5ml가하여 투명하고 diameter가 큰 환을 나타내는 균주를 분리하여 1차 screening을 하였다.

2) 2차 Screening⁽¹⁹⁾

Table 2와 같은 기질 plate에 stainless cup

h 1cm× ϕ 0.6cm을 사용하여 효소액 0.2ml씩 작용시켜 37°C에서 5시간 반응시키고 이후과정은 1차 screening과 같은 방법으로 하여 환의 크기가 1.7~2cm정도 되고 환의 투명도가 우수한 균주를 분리하여 2차 screening을 하였다.

3) 優秀菌株의 同定

Bacteria의 同定은 Society of American Bacteriologists의 Manual⁽¹⁷⁾에 의해 실험하였고 Bergey's Manual⁽²⁰⁾에 의거하여 동정하였으며 mold의 동정은 Raper & Fennel⁽²¹⁾의 The Genus Aspergillus

에 의거하여 동정하였다.

4) 優秀菌株의 酵素特性

2차 screening에서 선정된 우수 균주에 대하여 amylase activity 및 protease activity를 측정하였으며 아울러 효소활성에 미치는 식염농도의 영향을 조사하였다.

① 酵素液의 調製

효소액 조제는 효소 screening시에 준하였다.

② Amylase activity

McIlvaine buffer로 bacteria는 pH 7.0, mold는 pH 5.4로 조절한 1.2% soluble starch의 기질 5ml와 효소액 1ml를 40°C water bath에서 30분간 작용시켜 생성된 환원당의 양을 Fehling Lehman Schoorl變法에 의해 定量하여 glucose mg수로 나타내었다.

③ Protease activity

McIlvaine buffer로 Bacteria는 pH 7.0, Mold는 pH 5.4로 조절한 2% casein을 기질로하여 modified Folin's method^(22,27)에 의하여 측정하였다. 즉 기질 2ml에 효소액 1ml를 加하여 35°C water bath에서 30분간 작용시킨 후 0.4M trichloroacetic acid (T.C.A) 5ml를 加하여 반응을 중지시킨 다음 35°C에서 20분간 방치하여 생긴 침전을 Toyo 여지 No. 2로 여과하여 얻은 여액 1ml에 0.4M Na₂CO₃ 5ml와 Folin phenol reagent 1ml를 加하여 35°C water bath에서 25분간 작용시켜 완전 발색시킨 후 실온으로 냉각시켜 Spectrophotometer (B & L Spectronic 20)로 620mu에서 optical density를 측정하여 미리 작성한 tyrosine의 standard curve를 사용하여 tyrosine μ g수로 나타내었다.

④ 酵素活性에 미치는 食鹽濃度の 影響⁽²³⁾

기질 완충액 및 효소액에 NaCl을 10%, 15%, 20%씩 각각 加하며 amylase activity 및 protease activity에 미치는 영향을 검토하였다.

結果 및 考察

재래식메주의 部位別로 나누어 담근 3구의 재래식 고추장 숙성과정 중의 재래식화성분 변화, 미생물群의 변화, 효소활성이 우수한 균주의 분리 및 동정과 그의 효소특성에 대한 결과는 다음과 같다

1. 諸化學成分의 變化

(1) pH

pH의 변화는 Fig. 1에서와 같이 3구 공히 숙성 10일에 급격히 降下하여 그후는 완만히 감소하다가 숙성 후반기인 숙성 70일에는 약간 증가하여

숙성 90일 까지 큰 변화가 없었다.

후반기에서 pH가 약간 증가하는 현상은 yeast에 의한 알콜발효의 결과 생성된 알콜과 유기산의 esterification으로 유기산이 감소되는 것이거나 또는 *Bacillus subtilis*가 분비하는 deaminase에 의한 amino acid의 deamination으로 amino acid 감소 때문이 아닌가 생각된다.

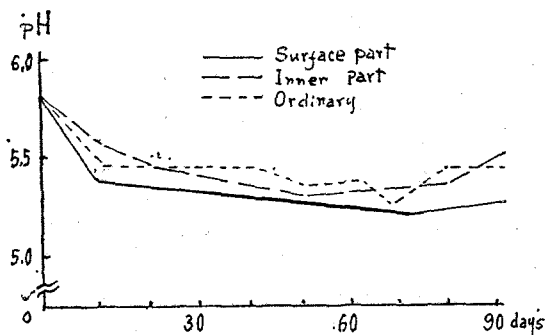


Fig. 1. Changes of pH values during Korean native Kochuzang aging.

(2) Total acid

고추장 희석액을 일정한 pH까지 중화할때 소요되는 0.1N NaOH의 ml수로 각각 제 I, 제 II 산도를 측정하고 그 합계로 총산을 측정된 결과는 Table. 3과 같으며 총산을 Fig. 2로 나타내었다.

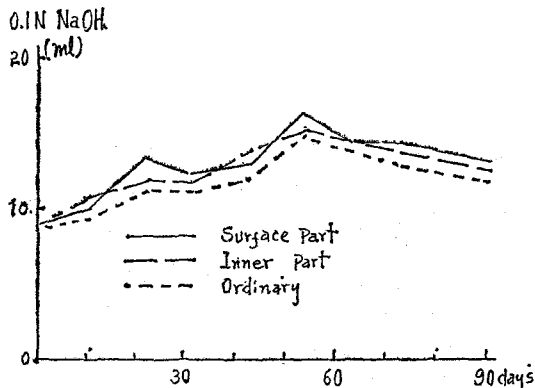


Fig. 2. Changes of total acid contents during Korean native Kochuzang aging.

숙성초기에는 3구 모두가 증가하다가 숙성 60일부터 감소하는 경향이었는데 이는 pH의 변화와 일치하는 면을 보여주고 있다. 담근 즉시 제 2산도가 높은 것은 제메주 과정중 단백질분해결과 생성된 peptides, amino acid등이 고추장으로 용출된 것으로 생각된다.

Tabl. 3. Changes of total acid contents during Korean native Kochuzang.

Sample	Acidity	Days									
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Inner	I	2.5	5.4	5.8	5.8	6.7	8.6	7.7	7.5	7.7	7.4
	II	6.75	5.0	5.6	5.4	5.7	7.6	7.1	6.8	6.3	6.0
	total acid	9.25	10.4	11.4	11.2	12.4	16.2	14.8	14.3	14.0	13.4
Surface	I	2.5	5.9	6.5	6.2	7.2	8.9	8.1	8.1	7.9	7.7
	II	6.75	4.4	6.0	5.1	5.1	7.5	6.7	6.5	6.3	6.1
	total acid	9.25	10.3	12.5	11.3	12.3	16.4	14.8	14.6	14.4	13.8
Ordinary	I	2.5	5.2	6.0	5.2	6.6	8.3	7.6	7.3	7.4	6.6
	II	6.5	4.2	5.7	5.2	4.8	7.1	6.9	6.8	6.5	6.6
	total acid	9.0	9.4	11.7	10.4	11.4	15.4	14.5	14.1	13.9	13.2

Table. 4. Changes of salt concentration during Korean native Kochuzang aging.

Sample	Days	Days									
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Inner		13.2	13.3	13.5	13.7	13.8	13.9	14.1	14.2	14.3	14.3
Surface		12.3	12.5	12.6	12.7	12.9	13.1	13.2	13.2	13.3	13.5
Ordinary		12.7	12.8	12.9	13.0	13.2	13.4	13.5	13.6	13.8	13.9

(3) 食鹽濃度

식염농도의 변화는 Table 4에서와 같이 전 숙성 기간을 통하여 햇볕에 노출로 인한 자연적인 수분 증발의 결과로 서서히 농축되어 증가되는 경향이 있었다. sampling을 고추장 내부에서 행하였으므로 담근 즉시와 숙성말기의 큰 차이는 보이지 않았다

(4) Total nitrogen

총질소의 변화는 Fig. 3에서와 같이 3구모두가 대체로 숙성 60일 까지 완만하게 증가하는 경향이 었으나 그후 약간 감소함을 보였는데 이는 *Bacillus subtilis* group이분비하는 deaminase에 의한 deamination결과 NH₃가 비산하는 것으로 생각된다.

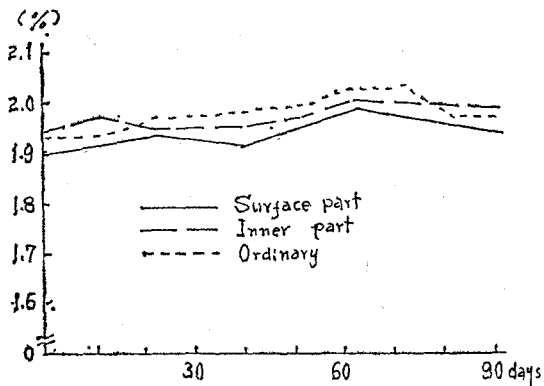


Fig. 3. Changes of total nitrogen contents during Korean native Kochuzang aging.

(5) T.C.A. soluble nitrogen

T.C.A 가용성 질소의 변화는 Fig. 4에서와 같이 3구공히 숙성기간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보이고 있는데 숙성 10일에 가장 급격한 상승의 추세를 보이고 있고 그 후는 완만히 증가하였다. 이는 숙성 10일에 고추장內 protease activity가 왕성하였다기 보다 이미 제매추과정중 미생물 효소에 의하여 단백질분해결과 생성된 amino acid 및 peptide들이 고추장으로 용출된 것으로 생각된다.

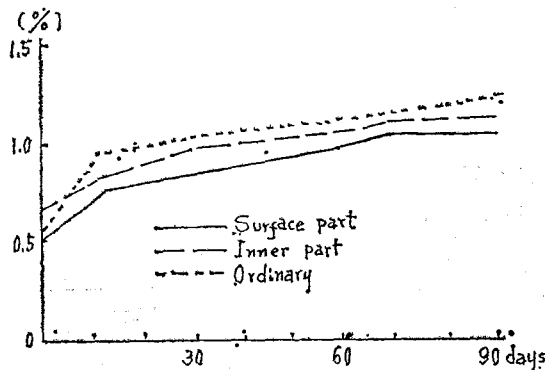


Fig. 4. Changes of T.C.A. soluble nitrogen contents during Korean native Kochuzang aging.

(6) Amino nitrogen

Amino nitrogen의 변화는 Fig. 5에서와 같이 3

구 공히 숙성 30일까지는 급격히 증가하였고 그후 서서히 완만하게 증가하였다. 이러한 결과로 보아 숙성 30일만에 protease activity가 비교적 활발했던 것으로 생각된다.

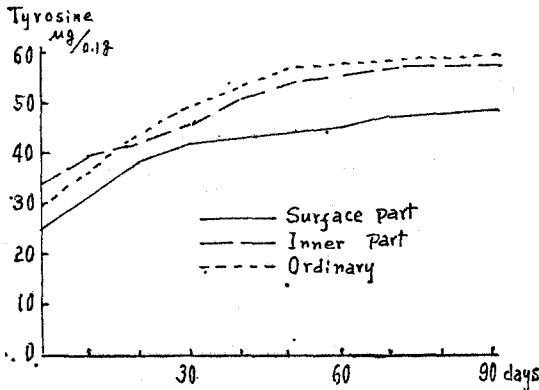


Fig. 5. Changes of amino nitrogen contents during Korean native Kochuzang aging.

(7)還元糖

환원당 변화는 Fig. 6에서와 같이 3구 공히 숙성 50일까지는 증가하였으나 60일 부터 감소하였다. 이와같은 환원당의 감소는 金^(24,26) 金⁽²⁵⁾ 등이 보고한 바와 같이 숙성초기에는 amylase activity에 의하여 환원당량이 증가하다가 유산발효와 더불어 yeast에 의한 알콜발효가 시작되어 糖이 소모되기 때문인 것으로 생각된다. 메주의부고추장區에서 비교적 높은 糖含量을 보였는데 이는 mold amylase에 의한 carbohydrate의 분해가 활발했던 것으로 생각되며 메주의부고추장區와 메주 혼합고추장區의 경우 숙성말기까지 계속 서서히 감소하는데 비하여 메주내부고추장區는 거의 변화가 없었다.

이는 후기(後記)할 yeast群의 변화와 일치하는 面을 보여주고 있다.

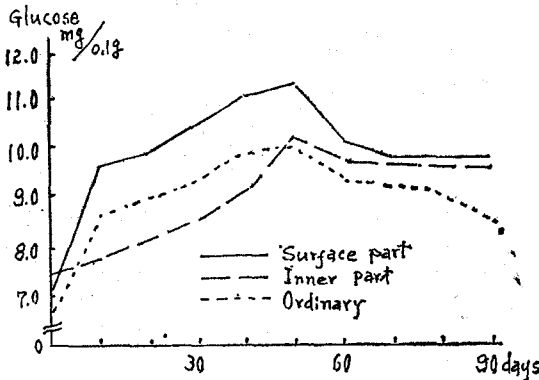


Fig. 6. Changes of reducing sugar contents during Korean native Kochuzang aging.

2. 微生物群의 變化

(1) 好氣性細菌群의 變化

호기성세균群의 변화는 Fig. 7에서와 같이 숙성 30~40일 까지는 증가하다가 후반기에는 감소하는 경향이었고 전 숙성기간을 통해 큰 변화는 없었는데 비교적 메주내부고추장區에서 많이 분리되었다

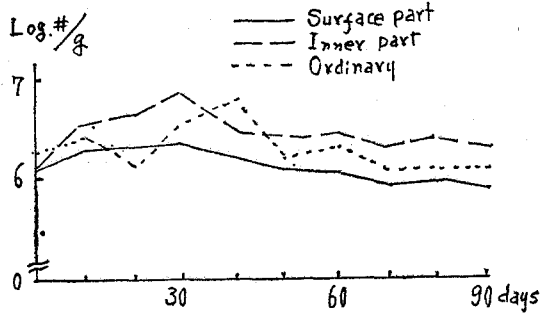


Fig. 7. Flora changes of aerobic bacteria during Korean native Kochuzang aging.

(2) 嫌氣性細菌群의 變化

혐기성세균群의 변화는 Fig. 8에서와 같이 메주내부고추장區에서 가장 많이 분리되었다가 감소되었고 3구 공히 숙성 30~40일 사이에 증가하는 경향이었고 후반기에는 감소하여 큰 변화가 없었다. 이러한 결과로 볼때 숙성 30~40일에 lactic acid bacteria가 왕성하여 pH를 강하시키므로써 yeast의 生育조건을 만들어 준다고 생각된다.

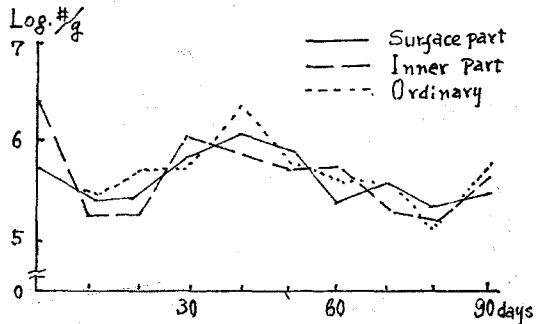


Fig. 8. Flora changes of anaerobic bacteria during Korean native Kochuzang aging.

(3) Mold群의 變化

Mold群의 변화는 Fig. 9에서와 같이 담근 즉시에는 메주의부고추장區에서 가장 많이 나타났으나 그후 감소하였으며 숙성 30~40일 사이에 3구 모두 증가하는 경향이었고 후반에는 감소하여 큰 변화가 없었다. 대체적으로 메주의부고추장區에서

가장 많이 분리되었고 그다음이 메주혼합고추장
區, 메주내부고추장區의 순서였다.

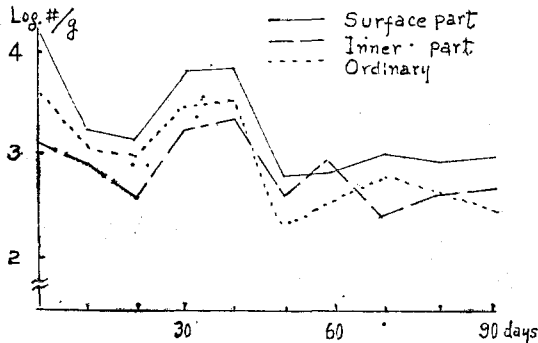


Fig. 9. Flora changes of mold during Korean native Kochuzang aging.

(4) Yeast群의 變化

Yeast群의 변화는 Fig. 10에서와 같이 3구 공히
숙성 20일 까지는 보이지 않다가 pH가 5.4이하로
강화된 숙성 30일 부터 출현하기 시작하였다. 메
주내부고추장區에서는 처음에는 많이 나타났으나
감소하는 경향이었고 메주의부고추장區에서는 처
음에는 적게 나타났으나 점차 증가하였고 메주혼
합고추장區에서는 계속 완만히 증가하였다. 이러
한 결과로 보아 yeast의 발육이 왕성한 메주의부
고추장區, 메주혼합고추장區가 esterification 결과
生成된 芳香性물질이 메주내부고추장區보다 많을
것으로 예상된다.

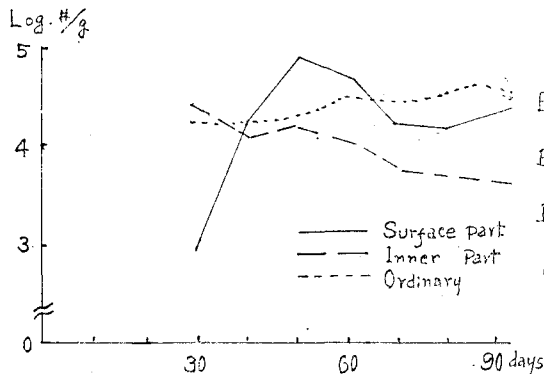


Fig. 10. Flora changes of yeast during Korean native Kochuzang aging.

3. 酵素活性이 優秀한 菌株의 分離 및 同定과 그 酵素特性

(1) 酵素活性이 優秀한 菌株의 分離 및 同定
제레식고추장 숙성과정 중에 순수분리한 총 140

여개의 균주에 대하여 amylase activity 및 protease
activity가 강한 균주를 선발하여 동정하였다.

140여개의 分離균주로부터 효소액을 조제하여
1차 screening한 결과 bacteria 20균주, mold 17균
주를 선발하였으며 이균주들을 다시 2차 screening
한 결과 bacteria 3균주, mold 1균주를 선발하였
다.

선정된 bacteria 3균주의 형태학적 특성(morpho-
logical characteristics), 배양특성 (culturing
characteristics), 생리학적특성(physiological cha-
racteristics)은 Table 5와 같았으며 Bergey's
Manual에 의하여 *Bacillus subtilis*近緣인 *Bacillus
subtilis-P*, *Bacillus subtilis-G*와 *Bacillus licheni-
formis*의 近緣인 *Bacillus licheniformis-K*로 동정
되었다.

이 두 species분류상의 결정적인 Key는 생리학
적 특성에서 혐기적 조건下에 *Bacillus subtilis-P*와
*Bacillus subtilis-G*는 glucose broth에서 전혀 자라
지 못하였으나 *Bacillus licheniformis-K*는 잘자랐
다는 점이다.

또한 선정된 mold 1균주의 형태학적인 특성은
Table 6과 같으며 The Genus *Aspergillus*에 의하여
*Aspergillus oryzae*의 近緣인 *Aspergillus oryzae-B*
로 동정되었다.

(2) 優秀菌株의 酵素特性

선정된 4균주의 amylase activiy 및 protease
activity를 측정된 결과는 Fig. 11와 같다.

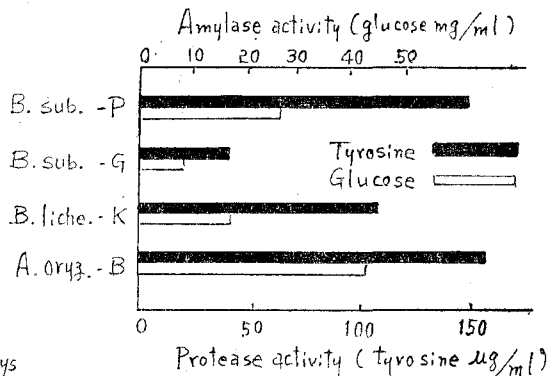


Fig. 11. Amylase and Protease activities of selected bacteria and mold

amylase activity는 Fig. 11에서 보는 바와같이
*Aspergillus oryzae-B*가 가장 강했고 그 다음이
Bacillus subtilis-P, *Bacillus licheniformis-K*, *Bac-
illus subtilis-G*의 순서였으며 protease activity는

Table 5. Description of selected bacteria strains

Morphological characteristics of selected bacteria strains			
	<i>Bac. subtilis-P</i>	<i>Bac. subtilis-G</i>	<i>Bac. licheniformis-K</i>
Vegetative cell form	rod	rod	rod
Size	0.8×2μ	0.7×2—3μ	0.8×1.61—2μ
Spore	central	central	central
Motility	+	+	+
Gram stain	+	+	+
Culturing characteristics of selected bacteria strains			
Agar surface	spreading	rough	rough
Colony elevation	flat	convex	flat
Edge	delicate	lobate	lobate
Color	creamy	thin brown	thick brown
Growing on broth	pellicle	pellicle	pellicle
Glucose agar slants	growth better than on agar	growth better than on agar	growth better than on agar
Growth on soybean agar slants	+	+	+
Growth in 7% NaCl broth	+	+	+
Physiological characteristics selected bacteria strains			
Catalase	+	+	+
NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	+	+	+
Growth in glucose broth under anaerobic condition	-	-	+
Hydrolysis of starch	+	+	+
Hydrolysis of casein	+	+	+

Table 6. Description of selected mold strain

Morphological characteristics of selected mold strain		
Colony	rate of growth	rapidly spreading
Character		loosely velvety
	texture	definitely green
	color above	light brown
	reverse	green
Colonial head	color	radiate
	shape	colorless
Conidiophores	color	10~20μ
	width	2~4.5mm
	length	rough
	marking	substratum
Vesicles	origine	globose or hemispherical
	shape	30~50μ
	size	yellowish
	color	yellowish
Sterigmata	color	single series
	series	10~15μ
	length	3~5μ
	width	

Conidia	color marking shape size	yellowish
Perithecia		smooth
Ascospore		globose or subglobose
		4~5~10 μ
		not produced
		not produced

Modium: Czapek's agar
 Incubation: 6 days at 30°C

*Bacillus subtilis-P*와 *Aspergillus oryzae-B*가 비슷하였으며 그 다음이 *Bacillus licheniformis-K*, *Bacillus subtilis-G*의 순서였다.

이러한 결과로 보아 개량식메주제조時 Koji균주으로써 *Aspergillus sojae*, *Aspergillus oryzae*등을 사용하는 것은 타당한 원리임을 알 수 있다.

장류는 식염농도중에서 숙성됨으로 선정된 균주가 생산하는 효소활성에 대한 식염농도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 12와 같으며 식염농도에 대하여 효소활성의 저해도를 보면 amylase activity가 protease activity보다 많은 저해를 받고 있음을 알 수 있고 고추장의 식염농도인 15%에서 amylase activity는 45~65%의 저해를 받고 protease activity는 40~46%의 저해를 받음을 알 수 있는데 이것은 李²³⁾ 등의 결과와 거의 비슷한 경향을 나타내었다.

이러한 결과로 미루어보아 제래식 고추장 숙성이 식염농도에 의해 상당한 저해를 받음으로써 숙성기간이 지연되는 것이며 또한 T.C.A soluble nitrogen의 변화에서 이미 지적했듯이 T.C.A soluble nitrogen이 숙성초기에 급격히 상승했다는 것은 고추장 자체內的 효소 활성에 기인했다기 보

다 제메주과정중에 단백질이 미생물 효소에 의하여 가수분해 되어 저급 peptide, amino acid들이 고추장에 용출된 것이고 미미하나마 고추장內的 미생물 효소 활성에 의하여 고추장의 숙성을 마무리 짓는 것으로 생각된다.

그러므로 개량식 메주는 protease, amylase活性이 우수한 *Aspergillus sojae*, *Aspergillus oryzae*로써 Koji제조시 효소활성을 최대한으로 이용하는 것임을 알 수 있겠다.

要 約

제래식메주에 있어서 자연서식한 microflora의 상태에 따라 外部·内部·外部와 内部의 혼합으로 각각 3구의 제래식 고추장을 담가 숙성과정중의 제화학적 성분 및 미생물의 動態를 조사하고 숙성과정에서 관여한 미생물을 순수분리하여 이들의 효소 활성을 screening하여 우수균주를 선정 및 동정 하였으며 효소적 특성을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 제화학적 성분 변화

(1) pH의 변화는 숙성 10일에 급격히 강하하였고 숙성 60일까지 점차 완만한 감소를 보이다가 그 이후는 약간 증가하였다.

메주의 부고추장區의 pH가 가장 낮았으며 메주내 부고추장區의 메주혼합고추장區의 pH는 서로 비슷하였다.

(2) 총산의 변화는 숙성 60일까지 3區 공히 서서히 증가하다가 그 이후 점차 감소하였다.

(3) 총질소의 변화는 숙성 60일까지 3區 공히 점진적 증가하다가 그후 약간 감소하였다.

(4) Trichloroacetic acid에 可容인 질소의 변화는 숙성 10일에 3區 공히 급격히 증가하였고 그후는 완만한 증가를 보였다.

(5) amino態 질소의 변화는 숙성 30일까지 3區 공히 크게 증가하다가 그 이후는 완만하게 증가하였다.

(6) 환원당의 변화는 숙성 50일까지 3區 공히

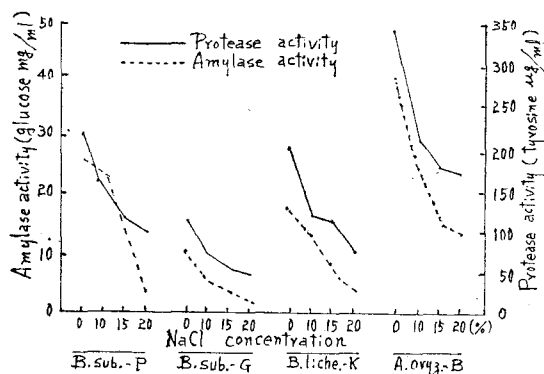


Fig. 13. Effect of sodium chloride concentration on enzyme activities of selected bacteria and mold

증가하다가 그 이후는 서서히 감소하였다.

2. Microflora의 변화

(1) 호기성세균群, 혐기성세균群, mold群의 변화는 숙성 30~40일까지 3구 공히 증가하였으나 그 이후는 감소하는 경향이였다.

(2) Yeast群의 변화는 3구 공히 숙성 20일까지는 보이지 않다가 pH가 5.4이하로 강하된 때 부터 나타나기 시작하여 메주내부 고추장區에서 처음에는 많이 나타났으나 점차로 감소하였고 메주의부고추장區, 메주혼합고추장區는 처음에는 적게 나타났으나 점차로 증가하였다.

3. 효소활성이 우수한 균주 및 그 효소특성

(1) amylase와 protease를 분비하는 우수균주는 *Bacillus subtilis-P*, *Bacillus subtilis-G*, *Bacillus licheniformis-K*, *Aspergillus oryzae-B*로 동정되었다.

(2) amylase activity가 가장 강한 것은 *Aspergillus oryzae-B*였고 그 다음이 *Bacillus subtilis-P*, *Bacillus licheniformis-K*, *Bacillus subtilis-G*의 순서였다. protease activity에 있어서는 *Aspergillus oryzae-B*와 *Bacillus subtilis-P*가 거의 비슷하게 우수하였고 *Bacillus licheniformis-K*, *Bacillus subtilis-G*의 순서였다.

(3) 효소활성에 대한 식염농도 영향은 amylase가 protease보다 식염에 의한 저해를 많이 받고 있어서 고추장 식염농도인 15% NaCl에서 amylase activity는 45~65%, protease activity는 40~46%의 저해를 받았다.

參 考 文 獻

1. 鄭址炘, 趙伯顯, 李春寧: 韓農化 4, 43(1963)
2. 이택수, 이석진, 김상순, 吉田忠: 韓國微生物學會誌 8(4):141(1970)
3. 이택수, 신보규, 이석진, 유주현: 韓國微生物學會誌 9(2):55(1971)
4. Jo Joo Sang: New Med. J. (Seoul. Korea) 7 (10):85(1964)
5. 李啓瑚, 宋錫勳: 기술연구소보고 2. 32(1963)
6. 張智鉉: 서울農業大學論文集, 第一輯. p.212 (1963)
7. 張智鉉: 韓農化 6. 8(1965)
8. 張智鉉: 韓農化 7. 35(1966)
9. 張智鉉: 韓農化 8. 1(1967)
10. 張智鉉: 韓農化 9. 9(1968)
11. 조덕현, 이우진: 韓農化 13. 35(1970)
12. 이우진, 조덕현: 韓農化 14. 137(1971)
13. 東京大學農學部編: 實驗農藝化學 別卷 p.162 (1961)
14. 東京大學農學部編: 實驗農藝化學 上卷 p.283 (1970)
15. Anson. M.L.: Journal of General physiology 22.79(1938)
16. 東京大學農學部編: 實驗農藝化學 下卷 p.587 (1959)
17. Society of American Bacteriologists: Manual of Microbiological Methods. p.44(1967)
18. Martin. J.P.: Soil Sci.,: 69. 215(1950)
19. 赤居四郎: 酵素研究法 I p.3-39(昭和 32年)
20. Buchanan. R.E.& Gibbons. N.E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition. The Williams & Wilkins Co (1974)
21. Raper. K.B.& Fennel D.I.: The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Co. (1965)
22. Colowick S.P. and Kaplan. N.O.: Methods in Enzymology Vol. III. p.469 (1957)
23. 李啓瑚, 張建型: 韓國微生物學會誌 3(2):9 (1965)
24. 金浩植, 李瑞來, 趙漢玉: 韓農化 2.17(1961)
25. 金載屬, 趙成桓: 韓農化 18.1(1975)
26. 金浩植, 李瑞來: 서울大學校 論文集 9.1(1959)
27. 萩原文二: 標準生化學實驗 9.207(1953)