

생물 공정을 이용한 된장의 향미 향상 및 보존성 연장 방법 개발

유진영
생물공학연구부

세계 어느나라에서나 고유의 음식이 있으면 주식과 부식에도 그 나라 국민의 식성에 따라 종류가 천차 만별이다. 서양에는 햄 소세지, 피클등이 있는 가하면 동양에는 절임류 및 장류가 그 특색이라 할 수 있다. 동양의 전통식품 중 큰 비중을 차지하는 것은 발효 식품으로서 장류를 들 수가 있는데 일본에는 미소(Miso)와 장유(Chiungyu) 및 소유(Shoyu)를 들 수가 있으며 한국의 경우는 간장, 고추장 및 된장이 대표적으로 이는 주로 조미를 목적으로 우리 가정에서 옛부터 널리 애용되어져 온 전통 대두 발효식품으로서 장내의 균총을 개선시키며 항산화성으로서 가능성을 인정 받고 있다.

이와 같은 장류는 원래 가정에서 메주를 만들어 제조되었으나 주거환경의 급격한 변천으로 공장산 장류가 시판되기 시작하였으며 대량생산의 영향으로 고유의 장 맛은 조금씩 허물어져 가는 형편이었다.

따라서 수요를 충족시키기 위하여 대량생산을 하되 우리 고유의 전통장류를 보호하고 육성하는 것이 절실히 요구되고 있다.

일반적으로 전통 장류의 맛은 짠맛이 강하여 다른 맛등이 상대적으로 상쇄되어 향미가 미약한 것으로 나타나 짠맛을 줄이고 동시에 전통 장류의 향미를 어느 정도는 현대 감각에 맞추어 줄 필요가 있다고 사료 된다. 그러나 짠맛을 줄이면 상대적으로 보존

성이 떨어지므로 현재 식품 위생법상에서는 안식향산류 및 소르빈산류를 첨가하여 보존성을 높힐 수 있도록 허가하고 있다. 그러나 식품 위해 또는 건강에 대한 국민의식 수준의 변화로 인해 장류의 보존을 위해 사용되고 있는 화학 합성 보존제의 인체에 대한 유해여부 논란이 있어 이를 대체할 수 있는 제조기법이나 물질등이 요구되고 있는데 일부 기업체에서는 장류 품목에 대하여 주정을 사용하고 있으며 이 또한 인위적으로 첨가하기 때문에 제조단가의 상승요인으로 지적되어 이에 대한 해결책이 요구되고 있다.

따라서 본 연구팀은 장류의 품질개선과 저장성을 연장시킬 수 있는 생물공정 개발의 일환으로 생물학적 처리 방안을 고안하여 실험실적으로 그 효과를 얻었고 이 연구 결과의 일부를 소개하고자 한다.

1. 천연보존제의 종류 및 농도 확정

된장의 보존용 천연 첨가제는 식품 첨가물 용질산, 호박산, 주정(이들은 미생물에 의하여 발효 중에 생성될 수 있으므로 선정함)을 구입하여 사용하였으며 별도로 소르빈산 카리롤 효능의 비교를 위하여 사용하였다. 된장은 상법에 따라 밀과 쌀로

만든 코오지(*Aspergillus oryzae*)를 증자한 탈지 대두에 소금과 함께 섞어 발효 시켰다. 발효된 된장은 적정 천연 첨가물의 종류 및 농도를 결정하기 위하여 이들의 한가지 또는 두가지를 함께 혼합하여 80 g 씩 포장하여 저장하였다. 저장시험은 20, 30°C에서 실시하였으며 저장중 효모 및 포장의 부피의 변화를 측정하여 반응속도 상수를 이용 저장 수명을 예측하였다.

저장중 된장 포장의 부피변화(즉 가스 발생)를 보면 (그림 1)과 같은 천연 보존제제를 사용시 현저히 억제할 수 있음을 알 수 있다. 아울러 효모의 변화는 (그림 2)와 같이 천연보존제 첨가시 솔빈산카리의 이용 때와 같이 보존효과를 보였으며 주

정을 사용하였을 때는 효모의 증식을 현저하게 억제할 수 있었다.

이들 그림으로 부터 반응 상수를 구하고 이로부터 품질 저하에 관한 Q_{10} 값을 구하여 평균 상온에서의 대표적인 처리구의 저장 수명(Shelf-life)를 계산하여 (표 1)에 나타내었다. 표에서 보는 와 같이 대조구(무첨가구)는 17일의 저장 수명을 보이는 반면 주정, 호박산, 주정 + 호박산, 주정 + 젖산의 경우 소르빈산 카리 보다 많은 455일(1.3 배), 396일(1.1배), 394(1.1배) 및 461일(1.3 배)의 저장 수명을 보여 바람직한 보존제로 판단되었다 (특허출원중).

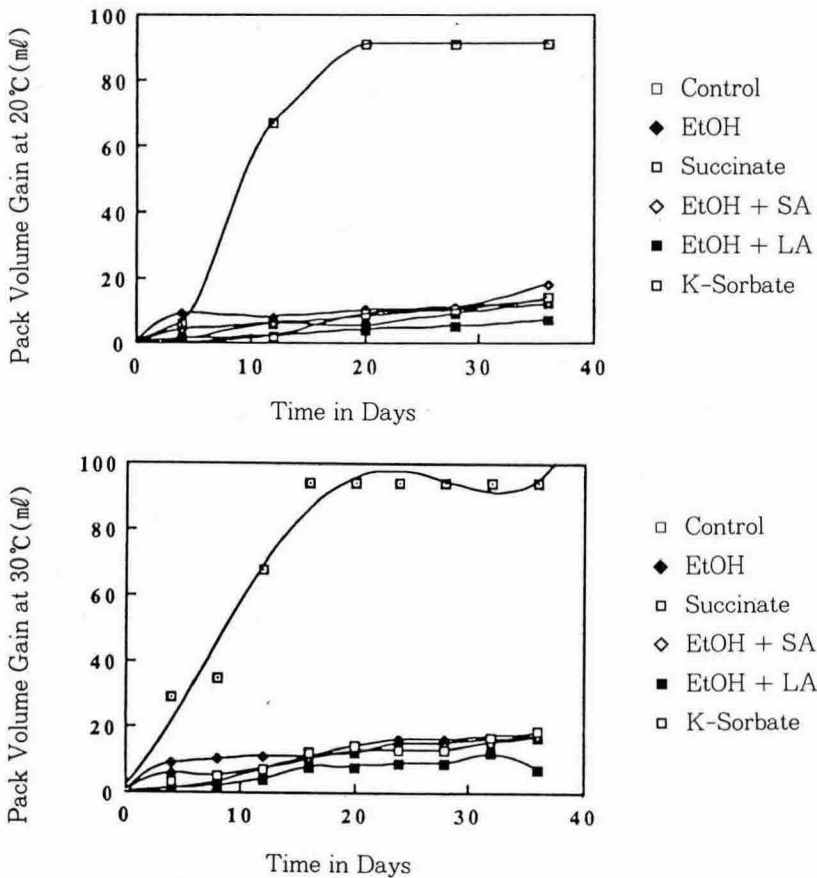


Fig .1 Pack Volume Gains at 20 and 30°C

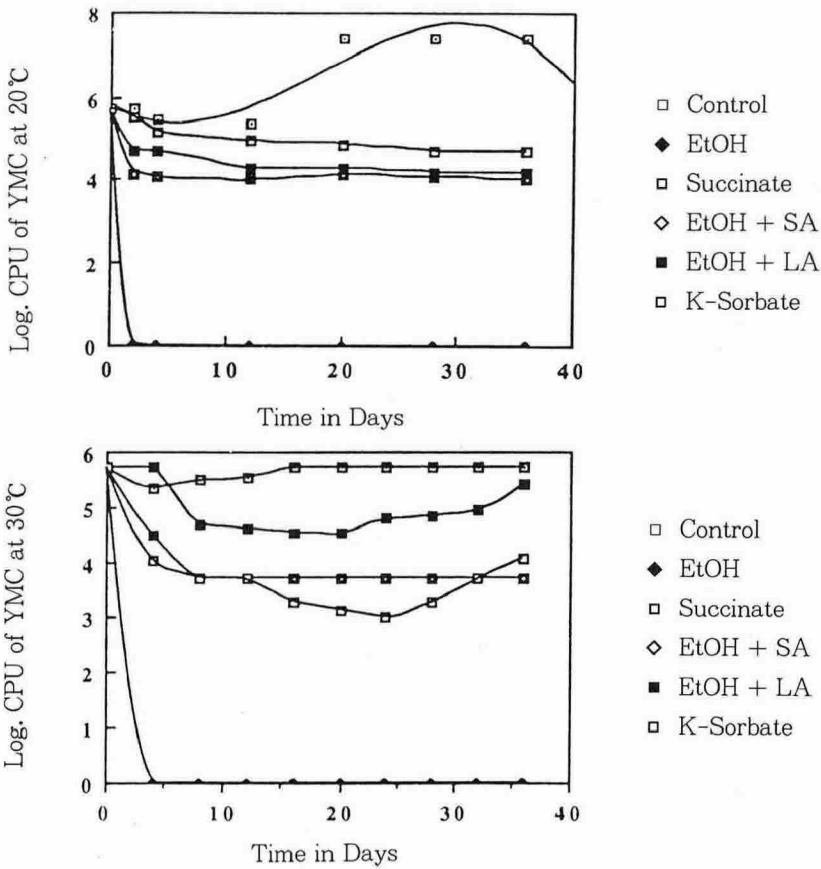


Fig. 2 Yeast & Mold Count during Storage at 20 and 30°C

Table 1. Shelf-life of various Doenjang products with different kinds and concentration of preservatives

Products	Shelf-life
Control	17 days
Potassium sorbate(0.1%)	360 days
Ethyl alcohol(2.5%)	455 days
Succinic acid(2.5%)	396 days
Ethylalcohol(2.5%)+ Succinic acid(0.5%)	394 days
Ethylalcohol(2.5%)+ Lactic acid(0.5%)	461 days

Table 2. Ethyl alcohol production of various salt tolerant *Saccharomyces cerevisiae*

Strain	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-6	N-7	N-8	N-9
EtOH(%)	3.7	4.2	4.0	3.9	3.9	3.8	3.7	3.9	4.0
O. D. _{660nm}	2.0	2.5	2.3	2.1	2.0	1.9	2.2	2.4	2.1

5 days of fermentation in 10% NaCl medium.

이와 같은 결과로 볼때 주정과 유기산이 매우 좋은 효과를 보였지만 이들의 첨가는 된장의 생산시 가격의 상승 요인이 되므로 이들의 효과적인 생산 방안이 고안되어야 될 것으로 사료되어 우선 내염

성 알코올 생성 효모의 개발을 시도하였다.

2. 내염성 알코올 효모의 개발

내염성 효모 개발을 위한 모균주는 American Type Culture Collection에서 구입한 ATCC 42940을 사용하였다. 이 모균주는 염도 10%에서 거의 생육치 못하는 것이다. 변이주 유도방법은 다음과 같다. 즉 효모를 미리 살균한 YEPD 5ml에 접종하여 30℃에서 1일간 진탕 배양한후 원심분리하여 멸균수로 세척한 다음 0.1M인산완충 용액에 현탁한다. 여기에 Ethylmethanesulfonate를 3% 되게 넣어 30℃에서 1시간 방치하고 10% NaCl 배지에 도포하여 내염성 균주를 선발하였다. 10% 염도에서 생육한 집락을 선정 하여 10 ~ 21%까지 단계별로 배지를 조제하여 18% 염도에서 건디는 8개의 집락을 선발하였다.

한편 이들 분리 효모를 10% 염도의 YM배지에서 4일간 증식시켜 알코올 생성능을 조사한 결과는 (표 2)와 같다. 내염성 변이주는 3.7~4.2%의 알코올을 생성하여 숙성 효모와의 Co-culture 또는 단독배양으로 장류 발효시 이용될 수 있으리라 사료되었다.

3. 향미개선을 위한 돌연변이주 개발

장류의 향미 성분인 에틸 알코올 및 아밀 알코올과 그 아세테이트류의 생성도가 높혀진 변이주를 얻고자 시도하였으며 모균주는 장류에서 분리한 *Zygosaccharomyces rouxii*를 이용하여 “가”향의 방법으로 변이처리하였으며 (그림 3)의 가설 아래에서 leucine feedback inhibition이 풀린 H-62를 선발하였다. H-62 균주는 에틸알코올 1.57%, isopropylalcohol 8.7 ppm, 2-butylalcohol 80.64ppm, 2-methyl-1-propanol 44.29ppm, isoamylalcohol 164.33ppm, n-amylalcohol 19.82ppm, isoamyl alcohol 10.18ppm을 생성하여 이 또한 장류의 풍미 향상에 효과가 있으리라 사료되어 된장 제조 시험에 착수 하였다.

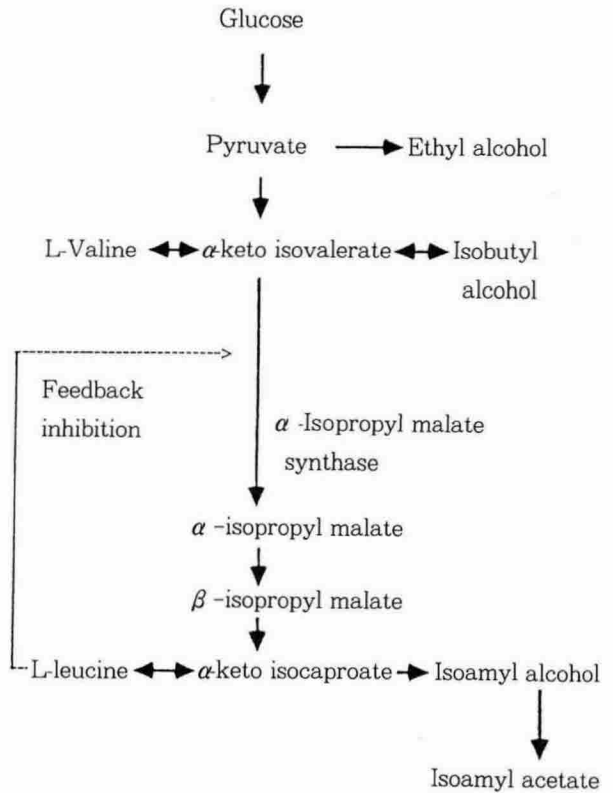


Fig 3. Biosynthetic Pathway to Isoamy Alcohol and Isoamy acetate

4. 향미개선 변이주와 보존물질 생산 균주를 이용한 제품 제조

향미 개선 변이주와 보존물질 생산균주를 이용하여 원료 조성 및 배합비에 따른 된장 제품의 풍미 개선 및 물질 생성 여부를 조사하였다.

가. 향미개선 변이주를 이용한 제품 제조 시험

위에서 장류의 향미 개선을 목적으로 돌연변이시킨 *Zygosaccharomyces rouxii* var. *rouxii* H-62를 된장 제조시험에 이용하여 35일 숙성 시킨 결과 모균주에 비해 에탄올은 약 1.3배 많은 2.42%가 생성되었고 장류의 주된 향기성분인 Isoamylal-

cohol은 30.72ppm이 생성되었으며 Isoamyl acetate는 모균주에서는 검출되지 않은 반면 변이주가 첨가된 처리구에서는 약 1.79ppm이 생성되었다 (표 3, 표 4), 64일이 지난 경우는 에탄올은 점차 감소되는 경향을 보였으며 향미 물질인 isoamylalcohol은 63.17ppm, isoamyl acetate는 3.89ppm으로 많은 량의 향미물질이 생성됨을 알 수 있다 (표 3, 표 4).

Table 3. Ethylalcohol production after 35 days of ripening of Doenjang

Treatment	EtOH (%)	Isoamyl alcohol (ppm)	Isoamyl acetate (ppm)
Control	0.74	15.8	ND
<i>Z. rouxii</i>	1.91	31.3	ND
<i>Sacch. cerevisiae</i>	2.67	35.5	ND
<i>var. + cerevisiae N-2</i>			
<i>Z. rouxii + Glucose</i>	2.38	327.8	40.0
<i>Z. rouxii + P. halophilus</i>	0.42	9.8	ND
<i>Z. rouxii var. + rouxii H-62</i>	2.42	30.7	1.79
<i>Z. rouxii H-62 + Sacch. cerevisiae var. cerevisiae N-2</i>	3.28	30.9	ND

Table 4. Ethylalcohol production after 64 days of ripening of Doenjang

Treatment	EtOH (%)	Isoamylalcohol (ppm)
Control	0.47	23.9
ZRP	1.70	34.8
SC N-2	1.90	56.7
ZRPD	1.90	476.9
ZRP + PH	0.28	24.9
ZR H-62	1.72	63.2
ZR H-62+SC N-2	2.68	11.8

나. 향미개선 변이주 및 보존물질 생성균주와의 혼합 발효시험

향미개선 변이주인 *Zygosaccharomyces rouxii* var. *rouxii* H-62와 보존물질 생성균주인 *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* N-2를 된장에 혼합 배양한 결과 및 여러가지 미생물 및 성분 조합에 의한 시험 결과는 (표 3, 35일) 및 (표 4, 64일)와 같다.

H-62와 N-2를 혼합하여 발효 숙성한 된장은 숙성효모를 첨가하지 않은 처리구에 비해 에탄올을 비롯한 고급 알콜류의 생성이 두드러졌으며 특히 에탄올은 대조구에 비하여 35일 숙성시 약 4배 많은 3.28%, isoamylalcohol은 2배 많은 30.93 ppm이 생성되어 향미와 저장성이 개선된 결과를 얻을 수 있었다. 장류의 저장성을 연장하기 위해 에틸알코올 생성용 발효성 당으로 포도당을 5%첨가하여 *Zygosaccharomyces rouxii* (모균주)을 첨가하여 배양한 결과 에탄올은 균주 무첨가구에 비해 약 2.9배 많은 2.38% 생성 되어 저장성이 개선된 결과를 얻을 수 있었다. 한편 장류의 저장성 개선을 목적으로 돌연변이로 유도한 내염성 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* N-2를 첨가한 결과 균주 무첨가구에 비해 약 3.5배 많은 에탄올이 2.8% 생성되어 된장 저장성을 개선시킬 수 있는 결과를 얻었다.

다. 변이주를 이용하여 제조된 된장의 저장수명비교 및 관능적 평가

위에서 언급한 여러가지 된장 제품을 저장하여 저장 수명을 조사한 결과 (표 5)과 같다. 즉 보존제로 이용되고 있는 소르빈산 카리가 첨가된 처리구(control)는 우리나라 년 평균기온인 12.5℃에서 저장가능 기간이 약 360.1일로 예측된 반면 무방부제 이며 변이주 무 처리구는 약 92.3일로 예측되었다. 한편 *Z. rouxii*가 첨가된 첨가구는 control에 못미치는 215.0일로 예측되었으

Table 5. Shelf-life of various Doenjang

Treatment	Shelf-life(days)
Control	92
K-sorbate	360
ZRP	215
SC N-2	803(patent pending)
ZRPD	841(patent pending)
ZRP + PH	645
ZRH62 + SC N2	756(patent pending)

며 *P. halophilus*와 *Z. rouxii*가 혼합 배양된 처리구는 control에 비해 약 1.8배 많은 653.9일로 예

측되었고 *Sacch. cerevisiae var. cerevisiae* N-2가 첨가된 처리구는 control에 비해 약 2.2배 많은 803.7일로 예측되었고 *Sacch. cerevisiae var. cerevisiae* N-2와 *Z. rouxii var. rouxii* H-62가 첨가된 처리구는 약 2.1배 많은 756.1일로 예측되었고 glucose로 가당된 처리구는 가장 많은 약 2.3배로 약 841.2일이 예측되었다.

한편 이들의 품질을 관능적으로 평가한 결과는 (표 6)에 있다. 즉 향미개선 균주인 H-62 및 H-62와 N-2균주를 사용시 우수한 관능적 평가를 받았다.

Table 6. Sensory evaluation of various Doenjang

	Control	ZR(P)	SC N-2	ZRPD	ZRP + PH	ZRH-62	ZRH-62+SCN-2
Taste	5.5	5.3	5.8	5.2	5.3	5.9	6.1
Flavor	5.4	5.2	5.6	4.9	4.9	6.2	6.5
Color	6.6	4.7	5.2	6.3	4.5	6.3	5.8
Overall	5.7	4.8	5.8	5.7	5.0	6.4	6.1

Control : Natural fermentation ZR(P) : parent strain of *Z. rouxii*

SC N-2 : Salt tolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*

ZRPD : *Z. rouxii* + 5% Dextrose, ZRP + PH : *Z. rouxii* + *Pediococcus cerevisiae*

ZRH-62 : feedback inhibition-released mutant of *Z. rouxii*

라. 보존물질 및 향미성분을 동시에 대량 생성하는 균주의 육종

장류의 보존성 개선에 뛰어난 에탄올을 약 2.5% 이상 생성시키기 위한 목적으로 원형질체 융합 방법으로 *Zygosaccharomyces rouxii*과 *Saccharomyces cerevisias* ATCC 42940을 융합시킨 결과 32주의 융합주를 얻을 수 있었으며 이 중 장류의 저장성에 효과가 있는 에탄올을 약 2.5% 이상 생성하는 3주의 융합주를 얻을 수 있었다. 이들을 이용하여 된장을 제조 향미 및 보존성을 조사한 결과 대조구에 비하여 탁월한 품질을 나타내었다.

5. 결 론

본 연구의 결과에서 볼 때 명백히 향미와 보존성이 개선될 수 있는 결과를 얻었으며 세부적인 이용 계획을 보면

가. 내염성 균주로서 알코올 생성 균주의 활용은 과기처 주관 기술보급 사업에 선정되어 산업계에 기술 이전을 위해 현장 적용시험을 하도록(특허출원중)되어 있으며

나. 향미 생성변이주 H-62의 이용, N-2, H-62 변이주의 이용, 포도당의 이용등의 공정은 특허출원을 마치고 현장적용을 위한 산업체를 찾고 있다.