Microbiol. Biotechnol. Lett. (2016), 44(2), 109–116
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1512.12009
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

복합종균을 접종하여 발효한 메주의 특성

조민정[1], 심재민[1], 이재용[1], 이강욱[1], 야오좡[1], 류샤오밍[1], 김정환[1,2]*
[1]경상대학교 대학원 응용생명과학부(BK21 Plus)
[2]경상대학교 농업생명과학연구원

Received: December 21, 2015 / Revised: March 1, 2016 / Accepted: March 13, 2016

Properties of Meju Fermented with Multiple Starters

Min Jeong Cho[1], Jae Min Shim[1], Jae Yong Lee[1], Kang Wook Lee[1], Zhuang Yao[1], Xiaoming Liu[1], and Jeong Hwan Kim[1,2]*
[1]Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Graduate School, [2]Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

A test meju (meju 1) was prepared by inoculating two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* (EMD17, MJ1-4), *Pichia farinosa* SY80, and *Rhizopus oryzae* into cooked soybeans. A control (meju 2) was prepared by inoculating *Bacillus subtilis* KACC16450 and *Aspergillus oryzae*. Another control (meju 3) was prepared using rice straw as the source of microorganisms. Three different mejus were fermented for 56 days outdoors. Meju 1 and meju 2 showed higher pH values than meju 3, whereas meju 3 showed higher titratable acidity than meju 1 and meju 2. Meju 1 showed the highest fibrinolytic activity. *Bacillus cereus* was not detected in any mejus, but various microorganisms were detected in meju 2 and 3. Histamine was detected in meju 2 and tyramine in meju 3 at lower concentration, which were not detected in meju 1. It was concluded that microbially safe, fermented soybean products could be produced from meju fermented with starters such as *B. amyloliquefaciens* EMD17 and *B. amyloliquefaciens* MJ1-4.

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

서 론

전통 장류인 간장, 된장, 고추장의 생산과 소비는 최근 들어 계속 감소하여 정체기내지는 쇠퇴기에 있다[1]. 전통장류들의 소비 촉진과 세계화를 위해서는 청소년을 포함하는 소비자들이 선호하는 풍미를 지닌 다양한 제품들 개발과 함께 장류제품의 안전성 개선이 필수적이다[13]. 전통방식의 간장과 된장 제조를 위해서는 하룻밤 물에 불린 콩을 삶은 후 벽돌 모양의 메주로 성형하고 볏짚을 이용해 여러 달 공중에 매달아 자연발효를 일으킨다. 그 후 메주를 소금물에 담가 장을 담게 된다. 메주는 발효과정 중 외부환경에 노출되어 *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus oryzae*로 대표되는 유익 균들이 각각 메주 내부와 표면에서 증식하고 그 결과 단백질 분해와 풍미성분들을 생성한다. 하지만 이 과정에서 aflatoxin 같은 독소를 생성하는 곰팡이나 *Bacillus cereus* 같은 식중독균 오염도 일어날 수 있어 전통 장류의 미생물학적 안전성 확보는 해결해야 할 중요 문제로 인식되고 있다[7]. 장류의 미생물학적 안전성을 높이기 위해서는 우수한 품질의 원료 사용과 효과적인 살균 공정 도입, 외부와 격리된 발효실 운영 및 작업종사자들에 대한 교육이 필요하다. 이런 측면에서 현대적 생산설비를 갖춘 공장식 장류 생산 시스템이 전통방식보다 장점을 지닌다. 미생물학적 안전성 개선 방법 중 하나는 유해균 증식 억제능력이 우수한 식품용 균주들을 선발하여 종균으로 사용하는 것이다[8]. 장류제조에서 bacilli들을 종균으로 접종하는 사례는 아직 많이 보고되어 있지 않다. 항진균, 항균 물질들을 생성하는 bacilli 들이 알려져 있고 일부 균주들은 이미 생물농약으로 활용되는 점을 고려할 때 bacilli 들을 장류 제조용 종균으로 적극 활용하는 방안은 연구 필요성이 크다[4, 14]. 발효식품에서 유래했고 사람에게 병을 유발할 위험성이 적어 안전한, 소위 GRAS (generally recognized as safe)로 간주되는 bacilli들 중에서

***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

독소생성 곰팡이나 *B. cereus*를 억제하는 균주들이 종균으로 검토 대상이 된다. 이런 균주들을 선발하여 청국장이나 된장 제조용 종균으로 가능성을 조사한 연구결과가 보고되었다[2, 3]. 종균들이 발효과정을 통해서 우점 종으로 유지된다면 발효 중 유해균 증식은 크게 감소될 것이다. 본 연구에서는 항진균력과 항균력이 우수한 *B. amyloliqufaciens* MJ1-4와 *B. amyloliquefaciens* EMD17 그리고 간장에서 분리한 *Pichia farinosa* SY80과 *Rhizopus oryzae* 4종의 균주를 함께 접종한 메주를 제조하고 총 56일간 발효시켰다. 발효 기간중 메주의 품질 변화를 측정하여 복합종균 사용이 메주 품질 특히 미생물학적 안전성에 미치는 영향을 조사하였다. *B. amyloliquefaciens* MJ1-4는 메주에서 분리한 균주로 aflatoxin B1을 생성하는 *Aspergillus* 균주와 ochratoxin을 생성하는 *Penicillium* 균주 증식을 억제한다[11]. *B. amyloliquefaciens* EMD17은 간장에서 분리된 균주로 *B. cereus*와 *Listeria monocytogenes* 증식을 강하게 억제한다[12]. *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 EMD17은 surfactin 같은 lipopeptide들을 분비하여 항진균 활성을 나타낸다[12]. *P. farinosa* SY80과 *R. oryzae*는 bacilli 균주들에 의해 증식이 억제되지 않으며 *P. farinosa* SY80은 발효 중 향기성분들을 생성하여 장류 품질에 좋은 영향을 주고 *R. oryzae*는 가수분해효소 활성이 우수하다.

재료 및 방법

종균 배양

B. amyloliquefaciens EMD17과 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4는 Luria Bertani (LB, MB Cell, CA, USA) 배지에 접종하여 37°C 진탕 배양하였다. *P. farinosa* SY80, *R. oryzae* 그리고 *Aspergillus oryzae*는 Yeast Mold (YM, Neogen, MI, USA) 배지에 접종하여 30°C에서 배양하였다. *Bacillus*와 효모 균수는 배양액을 0.1% 펩톤수를 이용하여 10배씩 단계 희석한 희석액 100 µl씩을 각각 LB 한천배지와 YM 한천배지(chloramphenicol 150 µg 첨가)에 도말하여 37°C와 30°C에서 각각 배양하여 구하였다. 곰팡이들은 YM 한천배지에 접종하여 30°C에서 배지 전면이 충분히 균사로 덮힐 때까지 배양한 후 멸균 젓가락을 사용하여 균사를 회수하여 멸균수에 현탁하였다. 거즈로 여과하여 얻은 여액 중의 포자들은 haemacytometer (Marienfeld, Germany)를 사용하여 계수하였다.

메주 제조

함양농협에서 구입한 국산콩(2012년산) 9 kg을 세척하고 15시간 증류수에 담가 불린 후 물을 따라낸 다음 121°C에서 50분간 증자한 후 냉각하였다. 콩 1.5 kg에 미리 배양한 *B. amyloliquefaciens* EMD17과 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4 균주를 대두 중량비로 각각 0.5% (v/w) 첨가하였다. *P. farinosa* SY80은 1% (v/w) 접종하였고 *R. oryzae*의 경우 0.5% (v/w)를 먼저 증자대두에 접종하고 메주를 성형한 후 메주 표면에 0.5% (v/w)를 추가로 접종하였다. 메주 1개당 (1.5 kg) 접종된 *B. amyloliquefaciens* 균수는 4×10^9 CFU (MJ1-4와 EMD17 각각 2×10^9 CFU), *P. farinosa* SY80는 4×10^9 CFU이고 *R. oryzae*는 4×10^8 spores이다. 균주들을 접종 후 대두를 파쇄하여 골고루 혼합한 후, 15 × 10 × 20 cm 크기로 성형하였다. 이런 방식으로 *Bacillus* 2종과 효모와 곰팡이 각 1종 도합 4종을 접종한 메주(메주 1) 2개를 제조하였다. 대조구로는 *B. subtilis* KACC16450 (natto 균주)와 *A. oryzae* KCCM 60166을 각각 4×10^9 CFU, 4×10^8 spore 접종한 메주(메주 2) 2개를 제조하였다. 또 다른 대조구로는 증자대두 표면을 잘게 자른 볏짚으로 둘러싸는 방식으로(볏짚을 균원 시료로 사용한) 제조한 메주(메주 3)가 있다. 3종류의 메주들은 3일간 자연건조한 뒤 온도 25°C, 습도 80% 배양기에서 7일간 두어 일차 발효를 시킨 후 실외(12, 1월)에서 약 두 달간 공중에 매달아 두는 방식으로 2차 발효를 수행하였다.

메주 발효 중 pH, titratable acidity (TA) 측정

메주 발효 중 7일 간격으로 시료를 취하여 pH와 TA를 측정하였다. 메주 10 g을 취하고 여기에 0.1% peptone 수 90 ml을 넣어 stomacher (Seward, UK)를 사용하여 2분간 균질화하였다. 균질액의 pH는 pH meter로 측정하고, 적정산도는 0.1 N NaOH로 pH 8.3을 종말점으로 하여 적정한 후 젖산 함량(%, w/w)으로 환산하였다.

메주 발효 중 생균수 변화 측정

앞서 얻은 균질 액을 0.1% peptone 수로 단계적으로 10배씩 희석한 희석 액을 얻은 후 생균수(CFU/g)를 측정하였다. 100 µl씩을 LB 한천배지(bacilli), YM 한천배지(곰팡이, 효모) 그리고 Mannitol Egg York Polymyxin (MYP, Neogen, *Bacillus cereus*) 한천 배지에 각각 도말하고 16시간 동안 37°C, 30°C, 37°C에서 각각 배양한 후 얻은 균락수에 희석배율을 곱하여 생균수를 구하였다. 시료당 3회 반복하고 평균치를 구하여 나타내었다.

메주 발효 중 아미노태 질소 함량 변화 측정

메주시료의 아미노태 질소함량은 formol 적정 법으로 측정하였다[10]. 시료 5 g에 증류수 100 ml를 가한 후, 37°C 수조에서 1시간 교반하였다. 원심분리한 후 얻은 상등 액에 0.1 N NaOH를 가하여 pH 8.4로 적정하였다. 적정한 상등액 10 ml과 중성 formalin 10 ml, 증류수 10 ml를 혼합한

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1512.12009

후 10분 정치한 후 다시 0.1 N NaOH를 가하여 pH 8.4가 되도록 적정하였다.

$$\text{Amino-type nitrogen (mg\%)} = \frac{(V1 - V0) \times F \times 0.0014 \times D}{S} \times 100$$

$V1$: 본시험 적정소비량(ml), $V0$: 공시험 적정소비량(ml), F: 0.1 N-NaOH 용액 역가, D: 희석배수, S: 시료 채취량(g), 0.0014: 0.1 N-NaOH 용액 1 ml에 상당하는 질소량(g).

메주 발효 중 혈전용해 역가 변화 측정

메주의 혈전용해 역가는 fibrin plate법을 변형하여 측정하였다[5]. 혈전용해제인 plasmin (P1867; Sigma, MO, USA, 1 mU)을 사용하여 fibrin plate상에서 plasmin에 의해 형성된 분해환 면적을 100% 혈전용해 활성으로 표시하였다. 동일한 fibrin plate에서 메주 시료들(5 μl)에서 얻은 분해환 면적을 구한 다음 이를 plasmin에 대한 상대적인 활성값(%)으로 표시하였다.

메주 발효 중 효소 역가 변화 측정

메주 시료들을 동결건조(FDU-1200; Eyela, Japan)한 다음 분말 1 g을 증류수 20 ml에 현탁한 후 30°C 수조에서 4시간 진탕하였다. 4°C에서 11,000 × *g*, 30분간 원심분리한 후 (Supra 22K, Hanil Sci. Indus., Korea) 얻은 상등액을 Whatman No. 2 filter paper (Waters, MA, USA)로 여과한 여액을 효소측정용 시료로 하였다. α-, β-amylase와 산성, 중성, 염기성 protease 활성 측정은 Cho 등이 기술한 방법에 준해 측정하였다[2]. Amylase 활성 측정용 기질로는 가용성 전분(S9765, Sigma)을 사용하였고 protease 활성 측정용 기질로는 casein (C3400, Sigma)을 사용하였다.

메주 발효 중 Biogenic amines 함량 변화 측정

메주의 histamine과 tyramine 함량은 HPLC를 이용하여 측정하였다. Dansyl chloride로 유도체화하여 분석하였고 HPLC 분석은 Agillent 1100 series (Agilent Technologies, Germany)를 사용하였다. 칼럼으로는 YMC-Pack ODS-AM C_{18} (YMC Co., Ltd., Japan) (4.6 mm × 250 mm)를 사용하였다. 유속은 1 ml/min으로 칼럼온도는 40°C를 유지시켰다. 이동상으로 70% acetonitrilie을 사용하고 UV detector를 이용하여 254 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

메주 발효 중 pH와 TA 변화

제조한 메주를 56일간 발효시키면서 7일 간격으로 시료를 채취하여 pH와 산도를 측정하였다(Fig. 1). 메주 1의 pH는

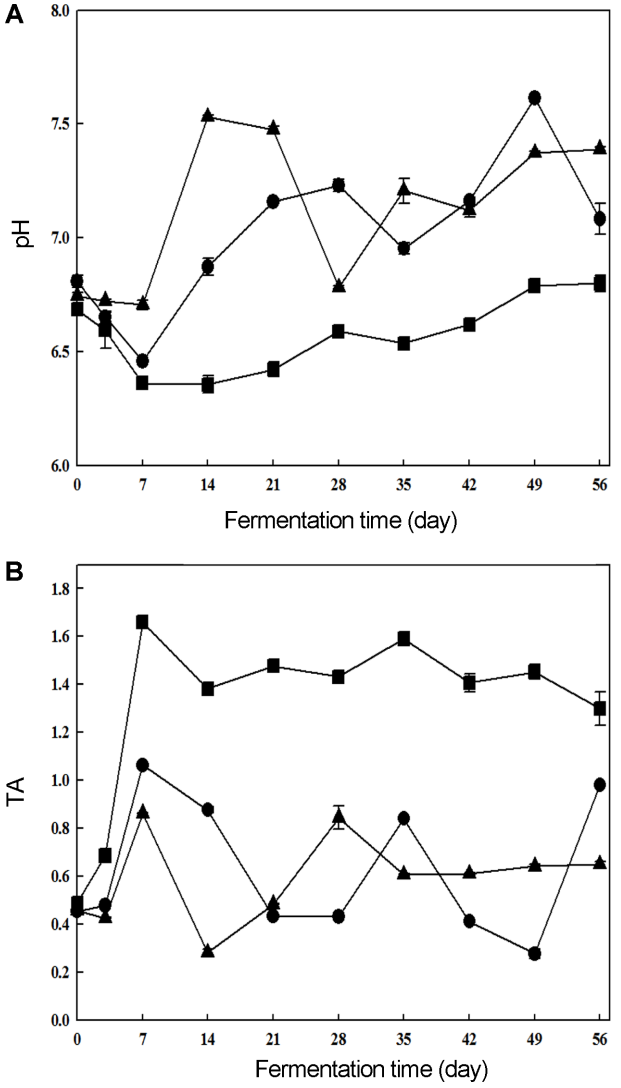

Fig. 1. Changes in pH (A) and TA (B) of meju during fermentation. -●-, meju 1; -▲-, meju 2; -■-, meju 3.

초기 7일간의 1 차발효 중 최초 6.81에서 6.45로 감소하였고 적정산도는 0.46에서 1.07로 증가하였다. 실외에서 행한 2차 발효 중 pH는 점진적으로 증가하여 56일에는 7.1을 나타내었다. 적정산도는 감소와 증가를 반복하다 56일에 0.97로 7일째 보다는 다소 감소하였다. 메주 2의 pH와 적정산도 변화 패턴은 메주 1과 비슷하였고 56일에 pH는 7.35 산도는 0.66을 나타내었다. 메주 3은 발효 전 기간을 통해서 가장 낮은 pH와 높은 산도를 유지하였다. 처음 1주일에 가장 큰 폭의 pH 강하와 산도 증가가 일어났고 이후에는 완만하게 pH는 증가하고 산도는 감소하였다. 56일에 메주 3의 pH는 6.75 산도는 1.3을 나타내었다. 볏짚을 균원으로 사용한 메주 3의 산도가 다른 메주들 보다 높은 것은 아마도 볏짚

에 존재한 유기산 생성균들 때문이라 생각된다. 유산균과 같이 유산이나 초산을 생성하는 균들에 의해 초기에 pH가 급히 내려가지만 발효가 진행되면서 bacilli들에 의해 생성되는 암모니아와 아민류에 의해 pH는 상승하고 적정산도는 감소하는 것으로 보인다. 전통방식으로 제조한 메주 3종에 존재하는 미생물들을 조사한 보고에 의하면 유산균은 메주 3종에 최소 10^6 CFU/g 이상 검출되었고 그 숫자로 볼 때 호기성균이나 효모·곰팡이와 함께 메주의 중요 미생물군 위치를 차지한다[6]. 종균을 접종한 메주 1과 2의 경우 잡균들의 오염과 증식이 억제된 결과 메주 3과 비교할 때 pH는 높고 산도는 낮아진 것으로 생각된다. 전국에서 수집한 123점의 전통식 메주들의 pH와 산도를 측정한 결과를 보면 시료들간 차이가 커서 발효가 일어나는 환경이 메주 품질에 중요한 요소임을 알 수 있다[15]. 이들 보고들과 본 연구 결과들을 고려할 때 메주의 pH와 TA는 어떤 균들이 주로 자라는 지에 따라 달라짐을 알 수 있다.

메주 발효 중 생균수 변화 측정

메주 생균수 측정 결과 bacilli들과 효모 생균수는 발효 7일까지 급격히 증가하고 이후로는 일정하게 유지되거나 점진적으로 감소하였다(Fig. 2). 메주 1의 bacilli 균수는 초기 3×10^6 CFU/g에서 7일 후 8×10^8 CFU/g으로 266배 증가하고 효모는 1×10^5 CFU/g에서 2×10^8 CFU/g으로 약 2,000배 증가하였다. 곰팡이는 1×10^4 spores/g에서 56일에는 1×10^5 spores/g 로 10배 증가하였다. 메주 2의 bacilli 균수는 접종 초기 4×10^6 CFU/g에서 7일 후 1×10^9 CFU/g으로 250배 증가한 후 점진적으로 감소하여 56일에는 8×10^6 CFU/g을 나타내었다. *A. oryzae*는 접종 초기 균수에서 큰 변화없이 발효기간 중 일정하게 유지되었다. 메주 3의 bacilli 균수는 처음 7일간 급격히 증가하여 7일에 7×10^8 CFU/g에 도달한 후 이후로는 조금씩 감소하여 56일에는 5×10^7 CFU/g을 나타내었다. 곰팡이는 28일까지 그 수가 증가하여 7×10^5 spores/g에 도달한 후 그 이후에는 비교적 일정하게 유지되었다.

B. cereus 선택배지인 MYP 한천배지를 사용하여 메주의 *B. cereus* 오염 여부를 조사하였으나 모든 메주들에서 발효기간 중 검출되지 않았다. 메주 1과 2는 종균을 접종하였기에 검출되지 않을 것으로 예상되었다. 반면 메주 3은 볏짚을 균원 시료로 사용하여서 *B. cereus* 검출이 예상되었으나 검출되지 않았다. 이는 사용한 볏짚에 *B. cereus*가 존재하지 않았거나 또는 적은 수만 존재하여 다른 bacilli 들과의 경쟁에서 밀렸기 때문일 수 있다.

인위적으로 *B. cereus*와 독소생성 곰팡이를 오염시킨 청국장에서 종균들에 의한 유해균 억제를 조사한 보고가 있다[2]. *B. amyloliquefaciens* MJ1-4와 *B. cereus*를 억제하는

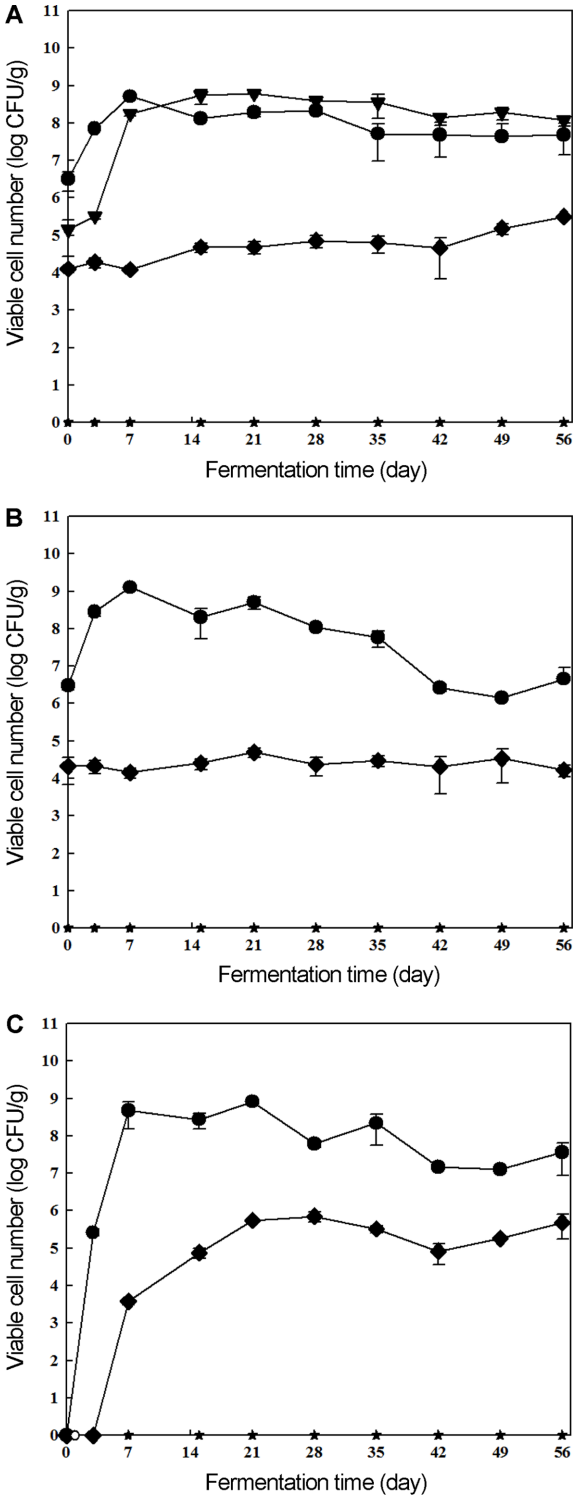

Fig. 2. Changes in the viable cell numbers of meju during fermentation. (A) meju 1. -●-, MJ1-4+EMD17; -▼-, SY80; -◆-, *R. oryzae*; -★-, *B. cereus*. (B) meju 2. -●-, *B. subtilis* (Natto strain); -◆-, *A. oryzae*; -★-, *B. cereus*. (C) meju 3. -●-, total bacilli; -◆-, fungi; -★-, *B. cereus*.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1512.12009

박테리오신 생산균인 *B. subtilis* W42 두 균주가 함께 종균으로 사용되었다[9]. 종균들을 접종한 청국장에 *B. cereus* ATCC11778와 ochratoxin 생성 *Penicillium* sp.를 각각 1×10^5 CFU/g, 1×10^5 spores/g 오염시킨 후 37°C에서 3일간 발효시켰다. 그 결과 *B. cereus*는 최초 10^5 CFU/g에서 6시간 후 10^7 CFU/g으로 증가하나 이후 지속적으로 감소하여 72시간에는 9.5×10^2 CFU/g으로 감소하였고 곰팡이도 24시간 이후로는 검출되지 않았다[2]. 종균을 사용하지 않는 전통방식으로 제조한 청국장을 시장에서 구입하여 일부 떼어서 대두에 접종하여 얻은 청국장을 대조구로 사용하였다. 대조구에서는 오염시킨 *B. cereus*와 곰팡이 숫자가 발효기간 중 크게 줄지 않았다[2].

종균들의 숫자가 높게 유지될 경우 발효과정에서 *B. cereus*나 다른 유해균들의 오염이 일어나더라도 종균에 의해 유해균 증식이 억제되어 결과적으로 미생물학적 안전성을 개선하는 것으로 해석할 수 있다. 메주 1에서는 접종한 bacilli 균락만 관찰되었지만 메주 2와 3에서는 접종 균주들과는 균락 형태가 다른 노란색, 붉은 색을 지닌 여러 오염균들이 고체배지에서 관찰되었다(결과 미제시). 복합종균을 접종할 경우 유해균만 아니라 오염균 증식도 줄일 수 있어 미생물학적으로 안전한 장류 제품들 제조에 적합한 메주를 얻을 수 있음을 확인하였다. 이는 *B. cereus*를 포함한 여러 세균들에 대한 항균력이 우수한 *B. amyloliquefaciens* EMD17을 종균으로 접종한 결과 오염균들 증식이 억제된 것으로 추정된다[12].

메주 발효 중 아미노태 질소 함량 변화

메주 시료들의 아미노태 질소 함량은 발효가 진행되는 동안 증가하였다(Fig. 3). 메주 2 아미노태 질소 함량은 21일까지는 다른 메주들보다 많았지만 28일 이후에는 그 차이가 줄

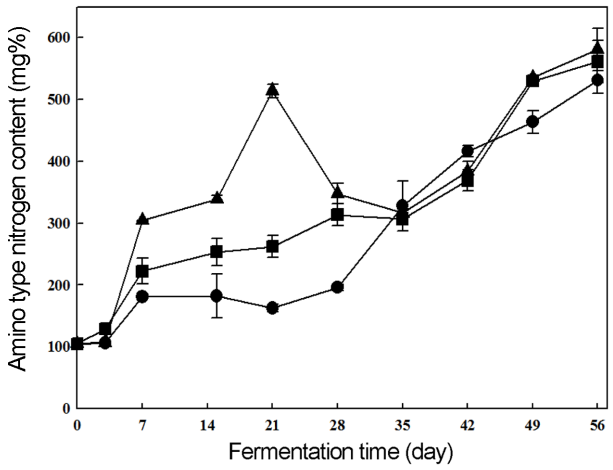

Fig. 3. Changes in the amino type nitrogen contents of meju samples during fermentation. -●-, meju 1; -▲-, meju 2; -■-, meju 3.

Table 1. Changes in the fibrinolytic activities of meju samples.

Time (day)	Fibrin plate (%)		
	Plasmin (1 mU) = 100.0%		
	meju 1	meju 2	meju 3
0	ND[a]	ND	ND
3	ND	ND	ND
7	194.5 ± 19.8	196.7 ± 5.9	110.6 ± 13.8
15	243.0 ± 16.0	181.1 ± 8.8	238.2 ± 20.2
21	343.8 ± 12.1	330.7 ± 18.1	269.3 ± 10.8
28	325.8 ± 18.0	253.3 ± 5.2	221.5 ± 15.0
35	319.9 ± 11.6	238.8 ± 18.0	231.3 ± 15.3
42	302.6 ± 13.2	205.8 ± 23.5	215.0 ± 14.6
49	280.2 ± 11.0	238.2 ± 20.2	209.0 ± 24.7
56	285.6 ± 17.3	265.8 ± 16.3	221.5 ± 15.0

[a]ND: not detected.

어들어서 메주들간 유의적인 차이는 없었다. 종균으로 접종한 *A. oryzae*의 단백질 분해능이 우수하여서 초기에는 메주 2 아미노태질소 함량을 높였지만 시간이 경과할수록 다른 메주들의 함량도 증가하면서 메주들간 차이가 적어진 것으로 추정된다.

메주 발효 중 혈전용해능 변화

메주들의 혈전용해능은 발효 21일까지 증가하다가 이후 서서히 감소하였다(Table 1). 메주 1의 혈전용해능이 21일에 343.8 ± 12.1%로 가장 높았고 메주 2는 330.7 ± 18.1%, 메주 3은 269.3 ± 10.8%로 가장 낮았다. 발효 56일에 메주 1, 2, 3의 혈전용해능은 각각 285.6 ± 17.3%, 265.8 ± 16.3%, 221.5 ± 15.0%를 나타내었다. 종균을 접종한 메주 1과 2의 혈전용해능이 볏짚을 접종한 메주 3 보다 유의적으로 높았고 특히 메주 1의 혈전용해능이 나토균주를 접종한 메주 2 보다 더 높았다. 메주 1에는 항진균력만 아니라 혈전용해능도 우수한 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4를 종균으로 접종한 때문이라 생각된다[11]. 혈전용해능은 전통장류의 대표적인 기능성중 하나이고 이를 높이는 가장 효과적인 방법은 MJ1-4와 같은 균주를 종균으로 접종하는 것임을 알 수 있다.

메주 발효 중 효소 역가 변화

메주 시료들의 발효 중 amylase와 protease 활성을 측정하였다(Fig. 4, 5). 볏짚을 접종한 메주 3의 α-amylase 활성은 처음 3일간 급격히 증가하여 3일에 49 unit/g이고 이후 완만히 증가하여 56일에 55 unit/g을 나타내었다(Fig. 4). 메주 1의 경우 발효 14일까지 급히 증가하다가 이후 서서히 증가하였다. 메주 2의 α-amylase 활성이 가장 낮았다. β-amylase 역가도 메주 3이 가장 높았고 메주 1이 다음이고 메주 2는

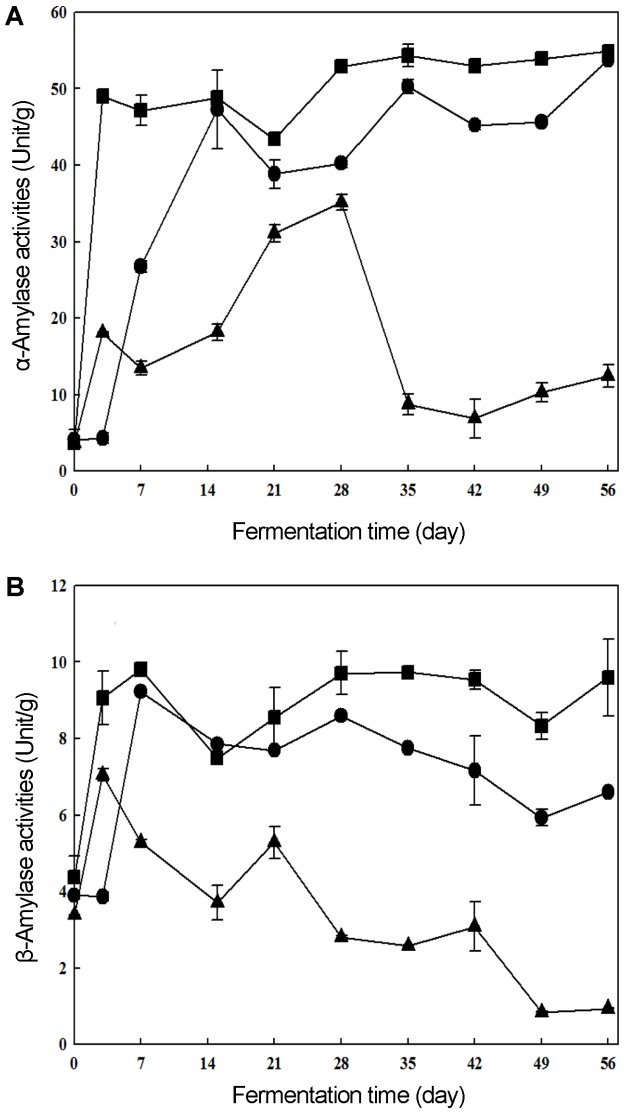

Fig. 4. Changes in the α-amylase (A) and β-amylase (B) activities of meju samples during fermentation. -●-, meju 1; -▲-, meju 2; -■-, meju 3.

가장 낮았다. 이는 종균으로 접종한 bacilli들의 amylase 역가가 높지 않았고 특히 메주 2에 접종한 *B. subtilis* KACC16450의 amylase 역가가 낮았기 때문으로 보인다. 종균 접종 메주들의 amylase 역가가 낮은 이유는 종균 선발 시 항균력과 혈전용해능이 고려되었지만 반면 amylase 역가는 고려되지 않았기 때문이다. 메주 3에는 여러 균들이 혼재하며 이들 중 amylase 역가가 우수한 균들이 메주에서 많이 증식하여 효소역가를 높인 것으로 보인다. 따라서 amylase 활성이 중요한 발효식품들의 경우 종균 선발시 amylase 역가를 우선적으로 고려할 필요가 있다. 균주들 마다 효소 역가들이 다르고 복합종균에 요구되는 특성들을 고려해서 종균

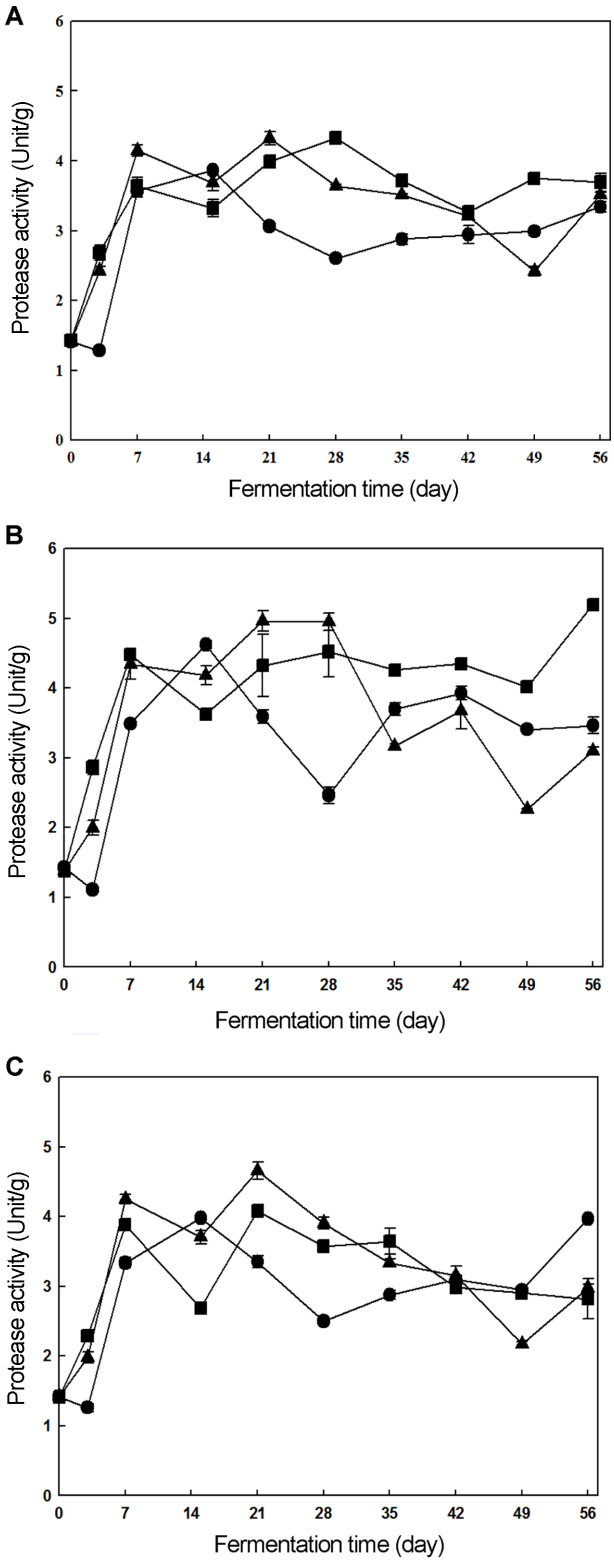

Fig. 5. Changes in the proteases activities of meju samples during fermentation. (A) acid protease, (B) neutral protease, (C) alkaline protease. -●-, meju 1; -▲-, meju 2; -■-, meju 3.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1512.12009

Table 2. Changes in the biogenic amine contents of meju samples.

(ppm)

Time (day)	meju 1		meju 2		meju 3	
	His.	Tyr.	His.	Tyr.	His.	Tyr.
0	ND[a]	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	97.7	ND	ND	ND
21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	ND	ND	145.5	ND	ND	ND
35	ND	ND	ND	ND	ND	ND
42	ND	ND	ND	ND	ND	ND
49	ND	ND	ND	ND	ND	ND
56	ND	ND	ND	ND	ND	10.9

[a]ND: not detected.

조합을 신중히 구성할 필요성이 있다.

메주 숙성 중 protease 활성 변화를 보면 메주 종류에 따른 차이가 크지 않다(Fig. 5). 산성, 중성 및 염기성 protease 활성들은 모든 메주에서 처음 7일간 급격히 증가하고 그 이후에는 완만한 감소와 증가를 반복하며 56일째에는 메주들 간 차이가 줄어드는 경향을 보였다. 56일에 산성과 중성 protease 활성은 메주 3이 높게 나왔고 염기성 protease 활성은 메주 1이 높게 나왔다.

메주 발효 중 바이오제닉 함량 변화 측정

메주의 histamine과 tyramine 함량을 측정한 결과 EU와 Codex의 기준치인 200 ppm을 초과하여 검출된 시료는 없었다(Table 2). 특히 복합종균을 사용한 메주 1에서는 발효 전 기간 동안 검출되지 않았다. 메주 2의 경우 15일 시료에서 histamine이 97.7 ppm 검출되었고 21일 미검출 그리고 28일 시료에서 가장 고농도인 145.5 ppm이 검출되었다. 35일 이후로는 검출되지 않았다. 이런 변동성을 보인 이유는 명확하지 않으나 아마도 시료 채취 과정에서 여러 부위들이 골고루 섞이지 않았기 때문이라 추정된다. Tyramine은 메주 3에서 56일 시료에서만 낮은 농도로 검출되었다. 이 결과 역시도 복합종균을 접종한 메주의 안전성이 우수한 것을 보여준다.

요 약

대두에 *B. amyloliquefaciens* 2 균주들과 *P. farinosa* SY80, 그리고 *R. oryzae* 총 4 균주를 접종한 메주를 만들었다(메주 1). 대조구로 *B. subtilis* KACC16450과 *A. oryzae*를 접종한 메주(메주 2)와 볏짚을 균원시료로 접종한 메주(메주 3)들을 제조하여 총 56일 발효시켰다. 발효 기간중 메주 1과 2의 pH와 적정산도는 메주 3보다 각각 높고 그리고 낮았다. 메주의 혈전용해능은 메주 1이 가장 높았다. 발효 기간중 모든 메주에서 *B. cereus*는 검출되지 않았으나 메주 2와 3에서 여러 모양과 색을 띈 잡균들이 검출되었다. 메주 2에서 histamine이 그리고 메주 3에서 tyramine이 저 농도로 검출되었으나 메주 1에서는 둘 다 검출되지 않았다. *B. amyloliquefaciens* EMD17이나 MJ1-4와 같은 항균력 균주들을 접종하여 메주를 제조하면 미생물학적으로 보다 안전한 장류제품들 생산이 가능할 것이다.

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. Cho MJ, Shim JM, Lee JY, and Lee KW were supported by BK21 Plus program from Ministry of Education, Republic of Korea.

References

1. Chang YI. 2008. Globalization of Korean jang products: focused on the USA market. *Food Sci. Indus.* **41**: 28–46.
2. Cho MJ, Lee JY, Kim JH. 2014. Microbial and physiochemical properties of cheonggukjang fermented using *Bacillus* strains with antibacterial or antifungal activities. *Food Sci. Biotechnol.* **23**: 1525–1532.
3. 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. Agric. Life Sci.* **48**: 291–300.
4. Emmert AB, Handelsman J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**: 1–9.
5. Heo K, Cho KM, Lee CK, Kim GM, Shin JH, Kim JS, *et al.* 2013. Characterization of a fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* CB1 and its gene cloning. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 974–983.
6. Jeong JK, Zheng Y, Choi HS, Han GJ, Park KY. 2010. Catabolic enzyme activities and physiological functionalities of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional meju. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1854–1859.
7. Kim YS, Yun SH, Jeong DY, Hahn KS, Uhm T-B. 2010. Isolation of *Bacillus licheniformis* producing antimicrobial agents against *Bacillus cereus* and its properties. *Korean J. Microbiol.* **46**: 270–277.
8. Kim YS, Jeong JH, Cho SH, Jeong DY, Uhm TB. 2012. Antimicrobial and biogenic amine-degrading activity of *Bacillus licheniformis* SCK B11 isolated from traditionally fermented red pepper paste. *Korean J. Microbiol.* **48**: 163–170.
9. Kindoli S, Lee HA, Kim JH. 2012. Properties of Bac W42, a bacte-

riocin produced by *Bacillus subtilis* W42 isolated from cheonggukjang. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1092–1100.
10. 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.
11. Lee HA, Kim JH. 2012. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* strains with antifungal activities from meju. *Prev. Nutr. Food Sci.* **17**: 64–70.
12. 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 its potential as a starter for fermented soyfoods. *Food Sci. Biotechnol.* **25**: 525–532.
13. Shin DH. 2008. Globalization of Korean fermented soybean products. *Food Indus. Nutr.* **11**: 19–24.
14. Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **56**: 845–857.
15. Yoo JY, Kim HG. 1998. Characteristics of traditional mejus of nation-wide collection. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 259–267.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1512.12009