

(72) 발명자

문송희

광주광역시 북구 신흥로 42-1 (중흥동)

류은혜

광주광역시 북구 송월로50번길 8-2 (오치동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B0009747

부처명 지식경제부

연구사업명 지방기술혁신사업

연구과제명 천일염 및 염생식물의 산업화 연구

주관기관 목포대학교 산학협력단

연구기간 2010.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

된장에서 분리되고, 단백분해활성이 우수하며 기탁번호 KFCC 11352P를 갖는 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P) 및 간장에서 분리되고, 내염성이 있으며, 단백분해활성 및 전분분해활성이 있고, 기탁번호 KFCC 11513P를 갖는 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주(*Bacillus velezensis* SS360-1 KFCC 11513P)를 이용하는 것을 특징으로 하는 간장 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 간장을 제조하는 방법은 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P)를 이용하여 코오지를 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 간장 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 코오지를 제조하는 단계는 콩, 쌀, 보리 및 밀가루로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상의 곡류에 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P)를 접종하고 배양하는 과정을 포함하는 방법으로 수행하는 것인 간장 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 간장을 제조하는 방법은 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P)를 이용하여 코오지를 제조하는 단계 및 상기 코오지 및 쌀, 보리 및 밀가루로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상의 곡류를 혼합한 혼합물에 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주(*Bacillus velezensis* SS360-1 KFCC 11513P)를 발효용 스타터로 접종하는 단계를 포함하는 방법으로 수행하는 것인 간장 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제조방법은 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P) 균주를 이용하여 코오지를 제조하는 단계; 상기 코오지와 마쇄된 곡류를 혼합하는 단계; 상기 혼합된 코오지와 마쇄된 소맥의 혼합물에 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주(*Bacillus velezensis* SS360-1 KFCC 11513P)를 접종하는 단계; 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주(*Bacillus velezensis* SS360-1 KFCC 11513P)를 접종시킨 혼합물의 염농도를 조절하는 간장덧 제조단계; 및 상기 간장덧을 숙성시키는 단계

를 포함하는 간장 제조방법.

청구항 6

제1항의 방법으로 제조된 간장.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 균주를 이용한 간장의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 우리나라의 대표적인 조미료는 간장, 된장 또는 고추장 등의 장류가 있으며, 이러한 장류는 우리나라의 전통 발효식품으로 콩을 이용한 발효식품 즉, 대두발효식품에 해당된다. 이러한 장류는 조미를 목적으로 사용되었을 뿐만 아니라 농경을 주로하여 육류 등 단백질 섭취가 용이하지 않았던 우리민족에게 단백질 공급원 특히, 곡류의 섭취만으로는 부족하기 쉬운 필수아미노산 및 필수 지방산 등의 영양성분을 공급해주는 식품으로서 중요한 역할을 하여 영양학적으로 중요한 의미를 가지고 있다.

[0003] 이 중, 간장은 음식의 간을 맞추는데 쓰는 짠맛이 있는 액체 조미료로, 우리나라를 포함하여 중국 및 일본 등지

에서 사용된다. 고농도의 염분을 함유하고, 콩을 주원료로 하여 콩 단백질 등의 분해에 따른 아미노산 등에 의한 독특한 맛이 난다. 우리나라에서는 옛날부터 간장 맛이 좋아야 음식맛을 낼 수 있다고 할 정도로 식생활에서 중요한 조미료로 사용되었고, 과거에는 종가집의 씨장을 대대로 만며느리에게 전달하고 따로 보관할 정도로 가장 중요한 조미료로 받아들여 지고 있다.

[0004] 상기 간장을 제조하는 방법에 따라 재래식 간장과 개량식 간장으로 구분된다.

[0005] 상기 재래식 간장은 메주를 사용하는 재래식 간장 제조방법으로 제조되므로, 상기 재래식 간장을 제조하기 위해 우선적으로 메주를 제조하여야 한다. 상기 메주는 늦은 가을 대두를 삶아 찢어 육면체나 낮은 원기둥 형태로 성형하고 일정기간 말리는 1차 건조단계 및 상기 1차 건조단계를 수행한 대두 덩어리를 벧짚으로 묶어 겨우내 벽에 매달아 건조하는 2차 건조단계를 포함하는 방법으로 제조한다. 상기 메주의 제조방법 중, 벧짚으로 묶어 건조하는 2차 건조단계에서 상기 벧짚에 존재하는 고초균과 공기 중의 곰팡이들이 자연적으로 대두 덩어리에 접종되어 상기 대두 덩어리 내외에서 증식하게 되고, 상기 균체의 증식과정에서 생성된 단백질 분해 효소에 의해 상기 제조방법에 의해 제조된 메주는 다량의 단백질 분해효소를 함유하게 된다. 상기 제조된 메주는 이듬해 봄 표면의 곰팡이를 물로 씻은 후, 간장을 담그는데 사용된다.

[0006] 상기 개량식 간장은 일본의 국(코오지, koji) 제조법을 도입하여 제조된 것으로서, 삶은 쌀, 보리 또는 콩 등에 누룩곰팡이인 황국균(*Aspergillus oryzae*)을 인위적으로 접종하고, 30℃ 정도에서 3일간 배양하여 코오지를 제조한 후, 이를 메주대신 사용하여 발효 및 숙성시키는 방법으로 제조될 수 있다. 상기 개량식 간장의 경우, 황국균만을 사용하는 경우 제품의 규격화가 가능하고 특유의 콧맛 등의 이취가 감소되는 장점은 있으나, 재래식 간장의 제조 과정에서 자연적으로 접종되는 고초균에 의한 장류 고유의 구수한 향미가 생성되지 않는다는 단점과 외국 유래 균주를 사용하여야 한다는 단점이 지적되고 있다.

[0007] 상기 코오지를 제조하는 과정은 보다 구체적으로 원료 물질을 선별 및 전처리하는 과정, 균주를 선택하고 활성화하는 과정, 상기 활성화된 균주를 전처리한 원료 물질에 접종하는 과정 및 숙성하는 과정을 포함하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 원료 물질은 쌀, 보리 또는 콩 등일 수 있고, 상기 원료 물질의 전처리 과정은 상기 선별된 균주가 원활하게 성장하거나 원하는 효소를 잘 생성할 수 있도록 상기 원료 물질을 세척, 침지 및/또는 증자하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 균주를 선택하고 활성화하는 과정은 균주가 원료물질에 접종된 후 잘 성장하거나 원하는 효소를 잘 생성하기 위하여 수행한다. 상기 숙성하는 과정은 상기 원료물질에 균주를 접종한 후, 성장 또는 효소 생성에 적합한 온도와 습도를 유지하면서 숙성(incubation)시키는 방법으로 수행할 수 있다.

[0008] 최근에는 간장의 품질을 향상시키기 위하여, 특정 균주를 이용하는 방법이 제안되고 있으며, 개량식 간장 제조 방법과 관련하여 특정 종균 미생물을 접종시켜 간장을 제조하는 방법이 산업적으로 관심을 받고 있다. 상기 종균은 코오지 또는 발효용 스타터의 제조에 사용되거나 간장의 숙성 즉 발효과정을 진행하기 전에 별도로 첨가하여 접종시키는 방법으로 사용될 수 있다. 특히, 간장의 품질을 향상시켜 우수한 간장을 제조하기 위해서, 가장 중요한 것 중 하나는 품질이 우수한 코오지 또는 발효용 스타터를 이용하는 것인데, 상기 품질이 좋은 코오지 또는 발효용 스타터를 생산하기 위해서는, 콩을 가수분해하여 목적하는 성분을 생산할 수 있는 가수분해효소를 빠르고 많이 생산하는 균주를 선별하여 사용하는 것이 요구된다.

[0009] 상기 균주는 특히, 단백질분해능을 가진 가수분해효소 및 전분분해능을 가진 가수분해효소를 생성할 수 있는 것이 바람직하다. 장류에서 중요한 맛으로 여겨지는 것은 구수한 맛과 단맛으로서, 상기 구수한 맛은 단백질이 단백질 가수분해효소인 프로테아제(protease) 등에 의해 아미노산으로 분해됨으로써 발생되고, 상기 단맛은 전분 가수분해효소인 아밀라아제(α-amylase) 등에 의해 전분이 당으로 분해됨으로써 발생된다. 그러므로, 코오지 제조 등, 간장 제조 과정에서 사용되는 종균용 미생물은 단백질과 전분질을 잘 분해할 수 있는 가수분해효소를 잘 생산할 수 있어야하며, 또한, 숙성과정 및 장류 제조과정에 균주의 생장이 용이할 것이 요구된다. 즉, 일반 미생물의 생육환경에 비하여 고염도인 장류 원료물질에서도 용이하게 성장 및 생육하고, 상기 가수분해효소를 생성할 수 있을 것이 요구되므로, 상기 균주는 내염성 균주가 바람직하다.

[0010] 상기와 같은 종균을 이용한 간장의 제조방법과 관련하여, 기존 개량식 간장 제조방법에 사용되는 균인 황국균(*Aspergillus oryzae*)이 갖는 문제점을 해결하기 위하여, 우리나라 전통 장류의 우점종으로 확인되는 고초균(*Bacillus subtilis*)을 사용하여 코오지를 제조하고, 우리나라 전통 장류의 문제점인 이취미를 제어하면서도 간장에 단맛과 고소한 맛 등 우수한 식감을 부여할 수 있는 제조방법에 대한 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명의 목적은 종래 코오지 제조 등에 사용되는 황국균(*Aspergillus oryzae*)이 아닌 우리나라 전통 장류의 제조에 사용되는 고초균(*Bacillus* sp.) 중에서 이취미를 제어하고, 우리나라 전통 장류가 갖는 구수한 맛과 단맛을 생성할 수 있는 균주를 이용하여 간장을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 된장에서 분리되고, 단백분해활성이 우수하며 기탁번호 KFCC 11352P를 갖는 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P) 및 간장에서 분리되고, 내염성이 있으며, 단백분해활성 및 전분분해활성이 있고, 기탁번호 KFCC 11513P를 갖는 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주(*Bacillus velezensis* SS360-1 KFCC 11513P)를 이용하는 것을 특징으로 하는 간장 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 간장 제조방법에 의해 제조된 간장을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 본 발명에 있어서, 장류란 콩, 쌀 및 보리 등을 포함한 곡물을 발효시켜서 만드는 곡물 조미료를 의미하며, 일 예로, 된장, 고추장, 간장, 청국장 또는 혼합장일 수 있다. 상기 간장이란 음식의 간을 맞추는데 쓰는 짠맛이 있는 우리나라 전통 액체 조미료로, 메주를 이용하는 재래식 간장, 코오지를 이용하는 개량식 간장, 화학적 방법에 의한 아미노산 간장, 양조 간장 및 혼합간장을 모두 포함하는 개념이나, 본 발명의 특징을 고려하면 바람직하게는 개량식 간장일 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 이취란 식품으로 바람직하지 못한 풍미로서, 지방이 산화 또는 가수분해되어 산패하는 경우나 단백질이 분해하는 경우처럼 식품성분의 화학적 변화에 의해 생기는 바람직하지 못한 풍미를 의미하고, 보다 구체적으로 한국의 전통 장류인 간장, 된장, 청국장 또는 고추장에서 풍기는 쿼퀴한 냄새를 의미한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 상기 배양물은 상기 특정 미생물을 포함하는 것일 수 있다. 상기 배양물 또는 배양물의 농축물은 그 제형이 한정되지 아니하고, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다.

[0017] 상기 배지는 특정 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉, 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로, 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다. 상기 천연배지와 관련하여, 콩, 쌀 및 보리 등을 포함한 곡물이나 상기 곡물에서 미생물이 배양하기 용이하도록 상기 곡물을 삶거나 으깨는 등의 방법으로 가공한 것도 이에 포함된다.

[0018] 본 발명의 발명자들은 우리나라 전통 장류의 발효균주인 바실러스 속 균주로서, 장류의 품질을 개선할 수 있는 균주에 관해 연구하던 중, 본 발명의 발명자들이 등록특허 제0661707호에서 종래 바실러스 속에 해당되면서도 생육활성이 우수하고, 내염성과 단백분해활성이 뛰어나, 황국균과 같이 코오지를 제조하기 위한 종균으로 사용될 수 있는 것으로 보고하였던 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P) 및 본 발명의 발명자들이 종가집의 씨장으로 360년 동안 숙성시킨 전통 재래식 간장으로부터 분리되었고, 내염성이 강하며, 우수한 단백분해활성 및 전분분해활성이 우수하고, 일반적인 바실러스 속 균주가 생산하지 않는 물질, 구체적으로 과일 또는 과일을 발효시킬 때 나타나는 달콤하고 상큼한 향기의 원인물질인 3-methyl-butanol 및 2-heptanone을 생산할 수 있는 단백분해활성 및 전분분해활성이 있고, 기탁번호 KFCC 11513P를 갖는 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주(*Bacillus velezensis* SS360-1 KFCC 11513P)을 함께 이용하는 경우, 우리나라 전통 장류의 우점종으로 보고된 고초균(*Bacillus* sp.)만을 이용하여 우수한 품질의 간장을 제조할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0019] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 된장에서 분리되고, 단백분해활성이 우수하며 기탁번호 KFCC 11352P를 갖는 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P) 및 간장에서 분리되고, 내염성이 있으며, 단백분해활성 및 전분분해활성이 있고, 기탁번호 KFCC 11513P를 갖는 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주(*Bacillus velezensis* SS360-1 KFCC 11513P)를 이용하는 것을 특징으로 하는 간장 제조방법에 관한 것이다. 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주 및 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주는 모두 발효용 스타터 즉, 종균으로 사용될 수 있으며, 일 예로

상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주는 코오지 제조를 위해 사용되고, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주는 제조된 코오지를 이용하여 간장을 제조하는 단계에 집중되는 방법으로 이용될 수 있다.

- [0021] 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P)는 서울특별시 서대문구 홍제 1동 361-221번지 유림빌딩에 위치한 한국미생물보존센터에 2005년 3월 28일자로 기탁되어, 수탁번호 KFCC 11352P를 부여받은 균주로, 생육활성이 우수하여, 균을 접종하여 배양한 후, 약 9시간 만에 생육 정지기에 도달하면서 바로 포자를 형성하여 세포 외로 방출할 수 있고, NaCl 함량이 15%(w/v) 농도에서 생육할 수 있어서 우수한 내염성이 인정되며, 단백분해활성이 우수한 균주이다.
- [0022] 상기 균주는 다른 바실러스 속 균주에 비하여 빠른 시간 내에 포자 형성이 가능하고, 상기 형성된 포자를 통하여 다량의 단백 분해 효소를 세포 외로 방출할 수 있으므로, 콩단백의 발효 숙성을 촉진시켜, 간장의 숙성시간을 단축시킬 수 있다는 장점이 있다.
- [0023] 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주(*Bacillus velezensis* SS360-1 KFCC 11513P)는 간장에서 분리되고, 내염성이 있으며, 단백분해활성 및 전분분해활성이 있는 균주이다. 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1은 균주 배양, 구체적으로 바실러스 속 균주의 일반 배양배지인 LB 배지(Luria-Bertani broth medium)를 이용한 배양을 통해 확인한 결과, 과일 발효시에 나는 달콤한 향 또는 복숭아 향의 향기 성분인 3-메틸-부타날(3-methylbutanal) 및 과일향 또는 계피(cinnamon) 향의 향기 성분인 2-헵타논(2-heptanone)을 생성할 수 있고, 이 외에 1-부타놀(1-butanol), 고소한 아몬드와 같은 향의 향기성분으로 구수한 향을 나타내기도 하는 벤즈알데하이드(benzaldehyde) 및 2-메틸-벤즈알데하이드(2-methyl-benzaldehyde)를 생성할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0024] 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1은 내염성이 있으며, 일반적으로 바실러스 속(*Bacillus* sp) 균주가 전혀 생육할 수 없는 농도인 NaCl 함량이 12%(w/v) 농도에서도 생육할 수 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1을 종균으로 사용하여 장류를 제조하는 경우, 장류 제조 과정에서 요구되는 소금의 첨가에 따른 고염도의 생육 조건에 따라 일반적인 바실러스 속 균주는 사멸하게 될 것이므로, 내염성을 갖는 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1은 우점종이 될 수 있을 것으로 예상된다.
- [0025] 또한, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1은 현재 된장의 제조에 산업적으로 이용되고 있는 종균인 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)나 다른 바실러스 속 균주에 비하여 현저하게 우수한 단백분해활성 및 전분분해활성을 갖고 있다.
- [0026] 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1은 서울특별시 서대문구 홍제 1동 361-221번지 유림빌딩에 위치한 한국미생물보존센터에 2011년 4월 1일자로 기탁되어, 수탁번호 KFCC 11513P를 부여받았다.
- [0027] 상기 간장 제조방법은 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용하여 코오지를 제조하는 단계를 포함하는 것으로 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 상기 코오지를 제조하는 단계는 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용하여 제조될 수 있다.
- [0029] 보다 구체적으로 코오지를 제조하는 단계는 곡류, 바람직하게는 콩, 쌀, 보리 및 밀가루로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상의 곡류, 더욱 바람직하게는 콩에 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 접종하고 배양하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0030] 상기 균주의 접종은 균주 자체를 접종하거나 또는 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상을 접종하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0031] 상기 배양은 25℃ 내지 35℃, 또는 27℃ 내지 32℃, 또는 30℃에서 10시간 내지 20시간, 또는 12시간 내지 18시간 동안 배양하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0032] 구체적으로, 상기 코오지는 콩, 쌀, 보리 및 밀가루로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상의 곡류, 바람직하게는 콩을 삶는 과정; 상기 삶은 곡류를 냉각시키는 과정; 상기 냉각시킨 곡류에 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 접종하는 과정; 상기 곡류에 접종한 균주를 배양하는 과정; 및 상기 균주가 배양된 곡류를 건조하는 과정을 포함하는 방법으로 제조될 수 있다.
- [0033] 구체적으로, 상기 코오지는 개량식 장류 제조시 사용되는 코오지의 제조 방법 또는 세균성 코오지의 제조 방법으로 제조될 수 있다. 일 예로, 상기 코오지는 콩, 쌀, 보리 및 밀가루로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상의 곡류를 10℃ 내지 25℃ 또는 15℃ 내지 20℃ 또는 16℃ 내지 19℃의 물에서 1시간 내지 50시간 또는 5시간

내지 40시간 또는 10시간 내지 30시간 동안 침지시키는 과정; 상기 침지시킨 곡류를 80℃ 내지 140℃ 또는 100℃ 내지 130℃ 또는 110℃ 내지 125℃에서 10분 내지 120분 또는 20분 내지 90분 30 내지 60분 동안 찌서 증자시키는 과정; 상기 증자시킨 곡류를 20℃ 내지 50℃ 또는 30℃ 내지 45℃ 또는 35℃ 내지 42℃로 냉각시키는 과정; 상기 냉각시킨 곡류에 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 접종하는 과정; 상기 콩에 접종한 균주를 25℃ 내지 60℃, 바람직하게는 30℃ 내지 55℃, 더욱 바람직하게는 39℃ 내지 50℃에서 6시간 내지 30시간, 바람직하게는 10시간 내지 20시간, 더욱 바람직하게는 12시간 내지 14시간 동안 배양하는 과정; 및 상기 균주가 배양된 콩을 10℃ 내지 20℃ 또는 15℃ 내지 20℃ 또는 15℃ 내지 25℃에서 20시간 내지 80시간 또는 30시간 내지 70시간 또는 40시간 내지 60시간 또는 45시간 내지 55시간 동안 건조하는 과정을 포함하는 방법으로 제조될 수 있다. 상기 건조하는 과정은 통상의 건조 방법으로 수행될 수 있으며, 일 예로 동결건조기를 이용한 동결건조법이나 통풍건조법 등으로 수행될 수 있다.

[0034] 상기 코오지의 제조과정에서 상기 접종되는 균주의 접종량, 상기 배양단계에서 상기 균주의 배양 온도 및 배양 시간과 상기 건조단계에서 건조 시간 등은 상기 코오지의 용도, 최종 생산되는 제품이 요구되는 품질 및 생산조건 등에 따라 변경될 수 있으며, 상기 구체예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0035] 상기 제조방법은 구체적으로 다음과 같은 방법일 수 있다.

[0036] 상기 제조방법은 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용하여 코오지를 제조하는 단계; 상기 코오지와 마쇄된 곡류를 혼합하는 단계; 상기 혼합된 코오지와 마쇄된 소맥의 혼합물에 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주를 접종하고, 염농도를 조절하는 간장덧 제조단계; 및 상기 간장덧을 숙성시키는 단계일 수 있다.

[0037] 상기 제조방법은 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주 균주를 이용하여 코오지를 제조하는 단계; 상기 코오지와 마쇄된 곡류를 혼합하는 단계; 상기 혼합된 코오지와 마쇄된 소맥의 혼합물에 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주를 접종하는 단계; 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주를 접종시킨 혼합물의 염농도를 조절하는 간장덧 제조단계; 및 상기 간장덧을 숙성시키는 단계일 수 있다.

[0038] 상기 제조방법은 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용하여 코오지를 제조하는 단계; 상기 코오지와 마쇄된 소맥을 혼합하는 단계; 상기 혼합된 코오지와 마쇄된 소맥의 혼합물에 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주를 발효용 스타터 또는 종균, 구체적으로 향기 및 맛의 증진 효과를 목적으로 간장 발효 보조 스타터로 활용하기 위하여 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주를 발효용 스타터 또는 종균으로 접종하는 단계; 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주를 접종시킨 혼합물의 염농도를 조절하는 간장덧 제조단계; 및 상기 간장덧을 숙성시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0039] 기존 고초균을 익힌 콩 등에 접종시키는 경우, 상기 고초균의 생육활성 등 특성으로 인하여, 코오지가 제조되지 않고, 청국장과 같은 형태로 제조됨에 따라 현재 바실러스 속 균주를 이용한 코오지를 제조하는 방법이 산업적으로 이용되지 못하고 있는 실정이었다. 이에 반해, 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주는 우수한 내염성과 생육활성으로 인하여, 기존 다른 바실러스 속 균주와 달리 콩에 접종되어 상기 황국균과 같이 코오지를 제조될 수 있으며, 우수한 생육활성과 단백분해효소 생성능으로 인해 간장의 숙성시간을 줄여 간장 제조기간을 단축할 수 있다는 장점을 갖는다.

[0040] 또한, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주는 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주에 비해서 단백분해활성이 우수하고, 특히 전분분해활성이 현저하게 우수할 뿐만 아니라, 배지에서 배양한 실험을 통하여 확인한 결과, 장류에 달콤하고 구수한 향을 부여할 수 있는 향기 성분인 3-메틸-부타날(3-methyl-butanol) 및 2-헵타논(2-heptanone)에 대한 생산능을 가지고 있으므로, 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주로 간장을 제조할 경우 어느 정도 해결되기는 하나 여전히 문제점으로 지적될 수 있는 이취미와 관련된 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 달콤하고 구수한 향을 부여하여 우수한 식감을 부여할 수 있다는 장점이 있다.

[0041] 이러한 측면에서 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주는 간장 제조방법에 있어서, 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주가 이용되는 코오지와 마쇄된 곡류를 혼합하는 혼합 단계 또는 상기 혼합된 코오지와 마쇄된 곡류를 혼합물에 염농도를 조절하는 단계 즉, 상기 혼합물에 염수를 첨가하는 단계 등 간장을 숙성시키기 위하여 발효가 진행되는 전 어느 단계에서 첨가되어 사용되더라도 본 발명의 효과가 유지될 수 있다.

[0042] 상기 곡류는 당화 물질 및 아미노산을 생산할 수 있는 원료, 구체적으로 단백질 및 전분 성분을 포함하는 것을 의미하고, 구체적으로 백미, 보리, 밀, 밀가루, 쌀보리, 밀쌀, 밀기울, 정맥, 압맥, 소맥, 나맥, 파쇄미, 찹쌀 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 바람직하게는 밀 또는 소맥일 수 있다.

- [0043] 상기 곡류는 발효 효율 등을 고려하여 마쇄기 또는 분쇄기 등을 이용하여 마쇄된 것일 수 있다.
- [0044] 상기 코오지와 마쇄된 곡류를 혼합하는 단계에 있어서, 상기 코오지와 곡류의 혼합비율은 중량비를 기준으로 1:2(코오지:곡류) 내지 1:4(코오지:곡류)일 수 있다.
- [0045] 상기 코오지와 마쇄된 곡류를 혼합한 후, 염농도를 조절하는 단계 즉, 상기 혼합물에 염수를 첨가하는 단계 전에 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주를 접종하고, 종배양하는 단계를 더욱 수행할 수 있다.
- [0046] 상기 염농도를 조절하는 경우, 즉, 간장덧을 제조하는 경우 간장덧의 염농도는 최소 15%(w/v) 이상이고, 첨가되는 염수의 염농도는 20%(w/v) 내지 30%(w/v) 또는 23%(w/v) 내지 27%(w/v)일 수 있으므로, 내염성이 강한 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주의 경우에도 균의 생육이 용이하지 아니하므로, 상기 베레첸시스 SS360-1 균주가 충분히 생육할 수 있도록 종배양을 수행할 수 있으며, 상기 종배양은 6시간 내지 48시간 또는 12시간 내지 36시간 동안 수행할 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 종배양을 수행하는 경우, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주의 최적 생육 조건을 형성하기 위하여, 상기 코오지와 마쇄된 곡류를 혼합하는 단계에 추가로 소금물 또는 증수는 물에 소금을 첨가하는 과정이 더욱 포함될 수 있으며, 상기 첨가된 소금물의 농도는 2%(w/v) 내지 6%(w/v) 또는 2%(w/v) 내지 5%(w/v)일 수 있으나, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주의 최적 생육 조건인 즉 최적 생육 NaCl 농도인 3%(w/v)로 조절하기 위한다는 목적을 수행한다는 측면에서 상기 첨가된 소금물의 농도는 적절하게 조절될 수 있다.
- [0048] 상기 코오지와 곡류의 혼합비율 및 소금물의 농도는 상기 기재에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 상기 간장덧 제조단계는 소금물 또는 염수를 첨가하여 염농도를 조절하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 소금물 또는 염수의 염농도는 20%(w/v) 내지 30%(w/v) 또는 23%(w/v) 내지 27%(w/v)일 수 있으며, 상기 염농도를 조절하여 제조된 간장덧의 염농도는 15%(w/v) 내지 20%(w/v) 또는 17%(w/v) 내지 19%(w/v)일 수 있다. 또한, 상기 첨가되는 소금물 또는 염수의 첨가량은 상기 담금원료 100중량부를 기준으로 200 중량부 내지 300 중량부 또는 230 중량부 내지 270 중량부일 수 있다.
- [0050] 상기 간장덧을 숙성시키는 단계는 상기 간장덧의 온도를 15℃ 내지 20℃ 또는 17℃ 내지 19℃를 유지하면서, 1개월 내지 12개월 또는 3개월 내지 9개월 또는 5개월 내지 7개월 동안 발효시키는 방법으로 수행할 수 있으며, 2일에 1회 또는 3회 정도 교반하는 과정을 더욱 수행할 수 있다.
- [0051] 상기 간장 제조방법은 상기 숙성된 간장덧을 여과하는 여과단계를 더욱 포함하거나 상기 간장덧을 여과하여 여액을 회수하는 단계 및 상기 회수된 여액을 가공하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 여과단계 또는 여액을 회수하는 단계는 여과포를 이용하거나 압착여과기를 이용할 수 있고, 간장의 품질 향상을 위하여, 여과포를 이용하여 여과한 후, 압착여과기를 이용하여 미세 고형물을 제거하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0053] 상기 여액을 가공하는 단계는 상기 여액을 가열한 뒤, 냉각하고 정치하여, 침전물을 제거하는 방법으로 수행할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 여액을 110℃ 내지 90℃ 또는 105℃ 내지 95℃에서 1분 내지 10분 또는 3분 내지 7분간 가열한 후, 70℃ 내지 90℃ 또는 75℃ 내지 87℃에서 5분 내지 60분 또는 10분 내지 30분간 가열하는 과정; 5℃ 내지 30℃ 또는 10℃ 내지 25℃ 또는 15℃ 내지 20℃로 냉각하는 과정 및 상기 냉각된 여액을 정치한 후, 침전물을 제거하는 과정을 포함하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 여액을 정치하는 과정은 침전물이 충분히 침전될 수 있는 기간 동안 수행할 수 있으며, 일 예로 1일 내지 10일 또는 3일 내지 7일 정도 수행할 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 간장일 수 있다.
- [0055] 상기 간장은 상기 균주에 의하여 이취미가 거의 인식되지 아니할 뿐만 아니라, 3-메틸-부타날(3-methyl-butanol) 또는 2-헵타논(2-heptanone)에 의해 달콤하고 구수한 맛이 느껴져 식감이 우수한 것으로 확인되었다.
- [0056] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P)는 다른 바실러스 속 균주에 비하여 빠른 시간 내에 포자 형성이 가능하고, 상기 형성된 포자를 통하여 다량의 단백 분해 효소를 세포 외로 방출할 수 있으므로, 콩단백의 발효 숙성을 촉진시켜, 간장의 숙성시간을 단축시킬 수 있으며, 본 발명의 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주(*Bacillus velezensis* SS360-1 KFCC 11513P)는 배양 과정 즉, 간장의 제조과정에서 과일 발효시에 나는 달콤한 향 또는 복숭아 향의 향기 성분인 3-메틸-부타날(3-methyl-butanol) 및 과일향 또는 계피(cinnamon) 향의 향기 성분인 2-헵타논(2-heptanone)을 생성할 수 있고, 이 외에 1-부타놀(1-butanol), 고

소한 아몬드와 같은 향의 향기성분으로 구수한 향을 나타내기도 하는 벤즈알데하이드(benzaldehyde) 및 2-메틸-벤즈알데하이드(2-methyl- benzaldehyde)를 생성할 수 있으며, 종래 개량식 장류 제조방법에서 종균으로 사용되는 아스퍼질러스 오리제와 달리 우리나라 전통 간장의 구수한 향 및 맛이 그대로 유지되므로, 상기 균주를 이용한 본 발명의 간장 제조방법은 기존 전통식 방법에 의해 생산된 장류가 가지는 기호상의 문제점 즉, 이취를 효과적으로 제어할 수 없다는 점과 기존 황국균을 이용한 개량식 간장 제조방법이 갖는 문제점인 고초균이 갖는 구수한 맛을 유지할 수 없다는 문제점을 모두 해결하였을 뿐만 아니라, 상기 우수한 품질의 간장을 품질의 동등성을 보장하면서 대량 생산할 수 있다는 점에서 산업적인 효과가 매우 클 것으로 예상된다.

발명의 효과

[0057] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DJI 균주 및 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주를 이용하는 것을 특징으로 하는 간장 제조방법은 외국에서 도입된 균주 즉, 아스퍼질러스 오리제가 아닌 우리 전통 장류의 발효균주인 바실러스 속 균주에 해당하는 균주를 이용하여 재래식 장류의 고유한 풍미를 유지하면서도, 종래 전통 간장이 갖는 문제점인 쿼퀴한 냄새 등의 이취 발생을 최소화하고, 오히려 달고 구수한 향기의 주된 성분인 3-메틸-부타날(3-methyl-butanol) 및 2-헵타논(2-heptanone)이 부여되어 간장의 맛과 향을 개선함으로써 기호도를 향상시킬 수 있으며, 종균을 이용함으로써, 우수한 품질의 간장을 균등한 품질을 유지하면서 대량으로 생산할 수 있다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 베레첸시스 SS360-1의 16S rDNA의 염기서열을 기초로 한 다른 세균(bacteria)과의 계통발생론적 관계를 나타내는 표이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 베레첸시스 SS360-1의 내염성 정도를 확인하기 위하여, 배지의 NaCl 함량(w/v)을 조절하면서 생육활성도를 측정한 그래프로, 세로축은 흡광도를 나타내고, 가로축은 배양시간을 나타내며 각각의 그래프는 색깔 별로 NaCl의 함량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0060] <실시예 1> 바실러스 베레첸시스 SS360-1의 동정 및 활성 측정

[0061] 1-1. 내염성 및 단백분해활성이 우수한 균주의 분리 및 동정

[0062] 전라남도 지역의 종가집 등 가정에서 제조되어 보유하고 있는 전통 재래식 간장을 수집하여, 이 중 1 ml를 증류수를 이용하여 적정배율로 희석한 다음, 2% 탈지분유(skim milk)와 3% NaCl이 첨가된 LB 평판배지에 도말하였다. 상기 도말한 평판배지를 37℃에서 24시간 동안 평판 배양하였다.

[0063] 상기 평판배지를 24시간 동안 배양한 후, 균주가 생성하는 단백분해효소에 의해 상기 평판배지에서 투명환을 형성하는 집락(colony)을 선별하였으며, 상기 평판배지에서 집락 주변으로 투명환을 생성하는 3종의 균주를 분리하였다. 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 3종의 균주는 투명환을 생성함과 동시에 집락의 크기가 확연한 차이로 구분되어, 우점종 즉, 우점 미생물로 확인되었다. 상기 확인된 3종의 우점 미생물을 3차례 계대배양을 하면서 순수 분리하였고, 상기 분리된 3종의 균주 중 단백분해 활성이 가장 우수한 것으로 확인된 SS360-1을 내염성 및 단백분해활성이 가장 우수한 균주로 최종 선별하였다.

[0064] 상기 내염성 및 단백분해활성이 가장 우수한 균주로 최종 선별된 분리균주의 동정을 위하여, 상기 SS360-1 균주의 16S rDNA 염기서열을 결정하고, 이를 GenBank에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교하여 상기 균주에 대한 동정을 수행하였다. 상기 결정된 16S rDNA 염기서열을 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank에 등록된 염기서열들과 비교하고, Clustal X와 Mega 2 program을 이용하여 비교분석하여 상동성을 결정한 결과, 다른 세균과의 계통발생론적 관계를 도 1에 나타내었다.

[0065] 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 SS360-1 균주는 *Bacillus velezensis* CR-502와 99%의 상동성을 보여, 바실러스 베레첸시스로 동정되었으며, 바실러스 베레첸시스 SS360-1이라 명명하였다. 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1은 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1은 서울특별시 서대문구 홍제 1동 361-221번지 유림빌딩에 위치한

한국미생물보존센터에 2011년 4월 1일자로 기탁되어, 수탁번호 KFCC 11513P를 부여받았다.

[0066] 1-2. 균주의 내염성 확인

[0067] 상기 실시예 1-1에서 분리 및 동정된 바실러스 베레첸시스 SS360-1의 내염성을 확인하기 위하여, LB 액체 배지에 NaCl을 0%(w/v) 내지 15%(w/v)의 농도까지 농도별로 첨가하여 제조한 배지에 상기 균주를 접종하고, 균주의 생육 정도를 확인하여, 배지 내 NaCl의 농도가 생육에 미치는 영향을 확인하였다.

[0068] 보다 구체적으로, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1를 37℃에서 24시간 전배양한 후, 상기 LB 액체 배지에 NaCl을 0%(w/v) 내지 15%(w/v)의 농도까지 농도별로 첨가하여 제조한 배지에 상기 전배양한 균주를 1%(v/v) 접종하고, 전배양한 균주를 1% 접종하고 37℃에서 120시간 동안 배양하였다. 상기 배양을 진행하면서, 600 nm에서 흡광도(O.D.)를 측정하면서, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1의 생육 정도를 확인하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0069] 상기 도 2에 나타낸 바와 같이, NaCl을 전혀 첨가하지 않은 경우(0%) 배양 12시간 이후 생육이 급속히 감소하고, 24시간 이후에는 흡광도가 1.0 이하의 생육을 나타내어 생육이 불안정한 것으로 확인하였다. 한편, 배양배지에 3%(w/v) NaCl을 첨가한 경우, 12시간이 경과한 시점에서 최대 흡광도(4.50)를 나타내어 최대 생육을 나타내었다. 또한, 배양배지에 12%(w/v)의 NaCl을 첨가한 경우, 초기 생육속도가 느리지만, 54시간 정도에서 최대 흡광도를 나타내었고, 120시간까지 흡광도 2.0 정도의 생육을 나타내었다. 상기 결과로부터, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1는 일정 정도의 염류가 있는 경우 잘 증식하고, 고농도의 염류가 포함된 배지에서도 일정 수준의 생육이 유지됨이 확인되었고, 이러한 균주의 특징은 균주의 생육에 미량의 염류를 필요로 하고, 저농도의 염류가 포함된 조건에서 가장 잘 증식하며, 고농도의 염류가 포함된 조건에서도 생육할 수 있는 내염성 세균의 특징과 일치하여, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1가 내염성 균주임이 확인되었다. 또한, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1는 NaCl이 6%(w/v) 내지 12%(w/v)의 농도로 첨가된 배지에서도 일정 수준의 생육 수준을 유지하여, 기존의 바실러스 속 균주에 비하여 우수한 내염성을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

[0070] 1-3. 균주의 가수분해활성 확인

[0071] 상기 실시예 1-1에서 분리 및 동정된 바실러스 베레첸시스 SS360-1의 전분 및 단백질에 대한 가수분해활성을 확인하기 위하여, 조효소액을 제조하여 가수분해활성을 확인하였다.

[0072] 먼저 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1와 상기 균주와 함께 상기 실시예 1에서 분리되었던 SS360-3 균주, 기존에 본 발명의 발명자가 발명하여 등록받은 특허등록 제0661707호를 통해 통상의 바실러스 속 균주에 비하여 단백분해활성이나 전분분해활성이 뛰어난 것으로 보고된 바실러스 속 균주(*Bacillus subtilis* DJI) 및 현재 된장의 제조에 산업적으로 이용되고 있는 종균인 곰팡이 즉, 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)를 대조균으로 사용하였다.

[0073] 상기 4종의 균주를 각각 37℃에서 24시간 전배양한 후, 상기 LB 액체 배지에 NaCl을 3%(w/v)의 농도까지 첨가하여 제조한 배지에 상기 전배양한 균주를 1%(v/v) 접종하고, 전배양한 균주를 1% 접종하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 24시간 동안 배양한 후, 9,950 × g 및 4℃의 조건에서 15 분 동안 원심분리하여 균체를 제거하고, 회수한 배양 상정액을 여과 필터(membrane filter, 0.45 μm pore size, Milipore, USA)로 제균하여 사용하였다.

[0074] 상기 제조한 조효소액을 이용하여 단백분해 활성 및 전분분해 활성을 확인하였다.

[0075] 상기 단백분해활성은 azocasein법을 응용하여 측정하였다. 구체적으로, 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 먼저, 기질용액은 azocasein(Sigma Co., USA) 0.2 g을 20 mM Tris-HCl-5 mM CaCl₂ (pH 7.0) 100 ml에 현탁하여 제조하였다. 상기 제조한 기질용액 1 ml에 상기 제조한 각 균주의 조효소액 0.1 ml를 혼합하여 37℃에서 30분 반응시키고, 12%(w/v) trichloroacetic acid(Sigma Co., USA) 2 ml를 첨가하여 반응되지 않은 azocasein을 침전시켜 반응을 정지시킨 후, 4℃에서 30분 동안 방치(incubation)하였다. 상기 30분간 방치한 후, 9,950 × g 및 4℃의 조건에서 10분 동안 원심분리한 후, 상정액을 취하여 동량의 0.5 M NaOH를 혼합한 후 440 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 단백분해활성을 측정하였다. 상기 단백분해활성(효소활성)과 관련하여, 30분 동안 상기 조효소액 1 ml가 효소 반응액을 440 nm에서 0.01을 증가시켰을 때의 효소 활성을 1 unit/ml로 규정하였다.

[0076] 상기 전분분해활성(α -amylase)은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 먼저, 기질용액은 0.5% 수용성 전분(soluble starch) 용액을 사용하였고, 상기 기질용액 2 ml에 상기 제조한 각 균주의 조효소액 1 ml를 첨가하여 50℃에서 30분간 반응시켰다. 상기 반응액 0.3 ml를 분리하고, 상기 분리된 반응액 0.3 ml에 0.01 N I_2 용액을 첨가한 후, 증류수로 10 ml가 되도록 정용하고 660 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 전분분해활성을 측정하였다. 상기 전분분해활성(효소활성)과 관련하여, 30분 동안 상기 조효소액 1 ml가 효소 반응액을 660 nm에서 blue color density를 50% 감소시켰을 때의 효소 활성을 1 unit/ml로 규정하였다.

[0077] 상기 방법에 의해 측정된 단백분해활성 및 전분분해활성을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0078]

Strains	단백분해능(Protease)	전분분해능(Amylase)
SS360-1	373	99.50
SS360-3	388	1.34
<i>Bacillus subtilis</i> DJI	300	21.50
<i>Aspergillus oryzae</i>	70	1.32

[0079] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1는 같은 간장 유래 SS360-3와 유사한 단백분해활성을 나타내었고, 기존 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주에 비해 단백분해능이 우수한 것으로 확인된 *Bacillus subtilis* DJ 1 보다 우수한 단백분해능을 가지는 것으로 확인되었으며, 기존 장류 제조 특히 된장 제조에 종균으로 사용되는 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)에 비해 현저하게 우수한 단백분해능을 가지는 것으로 확인되었다.

[0080] 또한, 전분분해능과 관련하여, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1는 아스퍼질러스 오리제에 비해 현저하게 우수한 전분분해능이 있는 것으로 확인되었고, 기존 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주에 비해 전분분해능이 우수한 것으로 확인된 *Bacillus subtilis* DJ 1 보다도 약 500% 정도 우수한 전분분해능을 가지는 것으로 확인되었다.

[0081] 1-4. 냄새성분 및 향기성분의 확인

[0082] 상기 실시예 1-1에서 분리 및 동정된 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1와 전통 장류 유래 고초균인 *Bacillus subtilis* KCTC 1028가 배양하는 과정에서 생성하는 냄새성분 및 향기성분 즉, 향을 부여하는 화합물을 닉커슨-니켈슨(Nickerson-Likens)의 연속증류 추출장치(simultaneous steam distillation and extraction: SDE)를 이용하여 검출하였다.

[0083] 보다 구체적으로, 상기 실시예 3-1과 같은 방법으로 배양한 각 균주의 배양상징액 500 ml를 3차 증류수 500 ml에 현탁 시킨 후 증류된 디에틸에테르(diethyl ether) 100 ml를 용매로 사용하여 상압 하에서 2시간 동안 100℃로 가열하여 향기성분을 추출하기 위한 추출액을 제조하였다. 상기 추출액은 암소에서 하룻밤 동안 무수 황산나트륨을 넣고 정치하여 수분을 완전히 제거한 후, 비그레우스 컬럼(vigreux column)을 이용하여 1 ml까지 농축하였다. 상기 농축시킨 각 균주 배양상징액의 향기 성분은 GC/MS(Agilent 6890/5973i GC/MSD)를 이용하여 분석하였으며, 컬럼은 Agilent DB-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m)를 사용하였다. 상기 GC/MS 분석은 오븐 온도 30℃에서 5분 유지한 후, 1분마다 10℃로 280℃까지 상승시켰고, 280℃에서 10분간 유지하는 방법으로 수행하였다. 상기 GC/MS를 사용하여 얻은 mass spectrum은 wiley 7N data base로 분석한 결과를 이용하여 분석을 수행하였다.

[0084] 상기 분석을 수행한 결과, 바실러스 베레첸시스 SS360-1의 배양 상징액으로부터 총 46 종의 화합물이 동정되었고, 상기 *Bacillus subtilis* KCTC 1028의 배양 상징액으로부터 총 50 종의 화합물이 동정되었으며, 상기 각각의 동정된 화합물 가운데 배양 상징액의 향기에 영향을 미치는 것으로 추정되는 화합물을 정리하여 표 2에 나타내었다.

표 2

No.	R.T. (min)	향기성분 (Compounds)	SS360-1 (μ g/kg)	KCTC1028 (μ g/kg)	박종
1	1.60	Acetaldehyde	627.3	719.0	pungent, ethereal-nauseating odor
2	3.12	2-Butanol	0.0	107.2	oily-vinous odor
3	3.21	3-Methyl-butanal	65.0	0.0	fruity-fermented, nut, peach-like odor
4	3.32	Acetic acid	0.0	104.2	pungent, stinging sour odor
5	4.24	1-Butanol	980.4	1096.9	fusel-like odor
6	7.46	2-Ethoxy-butane	131.7	141.9	berry, floral woody odor
7	9.39	2-Heptanone	27.5	0.0	fruity, spice, cinnamon
8	10.02	2,5-Dimethyl-pyrazine	35.4	160.1	pungent, musty meaty roast odor
9	11.08	Benzaldehyde	52.1	52.3	almond-like odor
10	11.23	Dimethyl-trisulfide	0.0	27.7	alliaceous, ethereal, onion-like odor
11	13.37	2-Methyl-benzaldehyde	17.0	109.5	bitter-almond-like odor
12	14.11	Benzyl methyl ketone	0.0	18.2	green, sharp, unnatural odor
13	15.62	Dimethyl-tetrasulfide	0.0	25.0	alliaceous, gallic meaty odor
14	16.67	Indole	0.0	20.5	tarry-repulsive and powerful odor
Total			1,936.4	2,582.5	

[0085] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 상기 *Bacillus subtilis* KCTC 1028의 경우 강한 자극을 부여하는 것으로 알려져 있는 시큼한 발효취의 원인성분인 아세트알데하이드(acetaldehyde), 독쏘는 듯한 시큼한 냄새의 원인성분인 아세트산(acetic acid) 및 강한 불쾌취의 원인 성분인 인돌(indole)과 불쾌취를 부여하는 2-부타놀(2-butanol) 및 1-부타놀(1-butanol) 등의 화합물이 높게 검출되었으며, 마늘류 등에서 느껴지는 강하고 자극적인 향기의 원인 물질인 설파이드(sulfide) 류가 검출되었다. 또한, 전통 장류에서 쿼퀴한 냄새 등의 이취미의 원인이 되는 2,5-메틸-피라(2,5-methyl pyrazine) 및 2-메틸-벤즈알데하이드(2-methyl benzaldehyde)이 다량 검출되었다.

[0087] 반면에, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1의 경우, 상기 *Bacillus subtilis* KCTC 1028에서 주로 생산되는 자극적인 냄새의 원인성분들은 적게 검출되거나 검출되지 않는 반면, 신선한 과일 발효취 등을 부여하는 3-메틸 부타날(3-methyl butanal) 및 2-헵타논(2-heptanone) 등이 검출되었다. 또한, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1의 배양 상정액에서는 고소한 아몬드와 같은 향을 부여하는 벤즈알데하이드(benzaldehyde)가 검출되어 구수한 향을 생성됨이 확인되었다.

[0088] 상기 결과로부터, 본 발명의 바실러스 베레첸시스 SS360-1는 종래 장류 유래 바실러스 속 균주의 배양 또는 상기 균주를 이용한 발효 시에 이취를 나타내는 2,5-메틸-피라 및 2-메틸-벤즈알데하이드 또는 강한 불쾌취의 원인이 되는 아세트알데하이드, 아세트산 및 강한 불쾌취의 원인 성분인 인돌은 생산하지 않거나 거의 생산되지 아니한 반면, 달콤하고 구수한 향기의 원인이 되는 3-메틸 부타날, 2-헵타논 및 벤즈알데하이드는 더 많이 생산할 수 있는 것이 확인되었다.

[0089] 상기 불쾌취는 장류의 발효 과정에서 단백질의 분해에 의해 생성되는 물질에 의한 것이고, 상기 달콤하고 구수한 향기의 경우 전분과 같은 다당의 분해 과정에서 발생하는 성분에 의한 것이므로, 단백질 성분 및 전분 성분을 포함하는 LB 배지에 의한 상기 결과로부터, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1는 곡류의 발효에 의한 불쾌취 생성이 최소화되고, 달콤하고 구수한 향기가 생성될 수 있을 것으로 예상된다. 따라서, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1는 장류의 발효를 위한 종균으로 사용되는 경우 이취미를 효과적으로 제어하면서 향미를 개선할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0090] <실시예 2> 종균을 이용한 간장의 제조 및 기호도 확인

[0091] 상기 실시예 1에서 내염성이 우수하고, 단백분해능 및 전분분해능이 우수한 것으로 확인된 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1와 본 발명의 발명자들이 등록특허 제0661707호에서 종래 바실러스 속에 해당되면서도 생육활성이 우수하고, 내염성과 단백분해활성이 뛰어나, 황국균과 같이 코오지를 제조하기 위한 종균으로 사용될 수 있

는 것으로 보고하였던 바실러스 서브틸리스 DJI 균주(*Bacillus subtilis* DJI KFCC 11352P)를 이용하여 간장을 제조하고, 기존 장류 유래 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주인 *Bacillus subtilis* KCTC 1028를 비교하여, 본 발명의 제조방법이 갖는 간장의 품질의 우수성을 확인하였다.

[0092] 2-1. 바실러스 베레첸시스 SS360-1 및 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용한 간장의 제조

[0093] 본 발명의 방법으로 제조되는 간장은 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[0094] 구체적으로, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1와 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 사용하여 개량식 간장 제조방법으로 간장을 제조하였다.

[0095] 우선, 장류 발효용 스타터로 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용하여 코오지를 제조하였다. 상기 코오지의 제조를 위해 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 배양하고 회수하였다. 구체적으로, 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 37℃에서 24시간 동안 전 배양하고, 상기 전 배양한 배양액을 LB 액체배지에 1%(v/v) 접종한 후, 9시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 바실러스 서브틸리스 DJI 균주의 균체 회수를 $9,950 \times g$ 및 4℃의 조건에서 15분 동안 원심분리하였다. 상기 회수된 균체를 멸균된 3차 증류수로 2회 수세하여 종균을 준비하였다.

[0096] 상기 회수된 균체를 이용한 코오지를 제조하기 위하여, 광주광역시 소재 재래시장에서 구입한 국내산 소립종 콩을 사용하였다. 상기 소립종 콩의 일반 성분은 수분 7.96%, 조회분 4.77%, 조단백 33.55% 및 조지방 5.80%이었다.

[0097] 상기 정선된 소립종 콩 1 kg을 18℃의 물에 20시간 동안 침지한 후, 121℃에서 50분간 증자 하였고, 상기 증자 후 40℃로 냉각시킨 다음 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 상기 배양액 10 ml로부터 회수한 균체 즉, 원료콩의 1%(w/v) 비율로 상기 냉각시킨 콩에 접종하고, 43℃에서 12시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 48시간 동안 동결건조기에서 건조시켜 세균형 코오지 즉, 장류 발효용 스타터를 제조하였다.

[0098] 또한, 상기 제조된 코오지와 함께, 간장의 제조에 사용될 바실러스 베레첸시스 SS360-1, 간장 담금용 염수 및 소맥은 하기와 같은 방법으로 제조하였다.

[0099] 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1를 37℃에서 24시간 동안 전 배양하고, 3% 농도로 NaCl이 첨가된 LB 액체배지에 1%(v/v) 접종한 후, 12시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주의 균체 회수를 $9,950 \times g$ 및 4℃의 조건에서 15분 동안 원심분리하였다. 상기 회수된 균체를 멸균된 3차 증류수로 2회 수세하여 종균을 준비하였다.

[0100] 또한, 간장 담금용 염수는 증류수에 전라남도 신안에서 구입한 4년 이상 숙성시킨 천일염을 25%(w/v)농도로 첨가하고, 100℃에서 10분간 가열한 후, 냉각하여 실온(약 25℃)에 이르면 하룻밤 동안 정치하여 침전물을 바닥에 충분히 가라앉히고 상등액만을 수득하는 방법으로 제조하였다.

[0101] 또한, 코오지와 함께 사용될 소맥은 국내산 통밀을 구입하여 사용하였고, 볶음기를 이용하여 타지 않고 갈색이 될 정도로 볶은 다음 밀알이 4쪽 내지 6쪽이 되도록 마쇄하였다.

[0102] 상기 원료를 이용한 간장의 제조과정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0103] 상기 마쇄된 소맥과 상기 세균형 코오지를 중량을 기준으로 3:1로 혼합하고, 증류수에 전라남도 신안에서 입수한 천일염을 3%(w/v)로 첨가하여 제조한 종수 및 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1를 첨가한 후, 37℃에서 24시간 배양하여 담금원료를 제조하였다. 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1는 상기 마쇄된 소맥 및 세균형 코오지의 전체 중량을 기준으로 5%(v/w) 즉, 상기 마쇄된 소맥 및 세균형 코오지의 전체 중량 1kg을 기준으로 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 균주를 배양한 상기 배양액 50 ml로부터 회수한 균체를 첨가하는 농도로 첨가하였다.

[0104] 상기 담금원료에 건조 전 중량을 기준으로 상기 마쇄된 소맥과 혼합된 세균형 코오지와 동량의 상기 코오지 제조단계의 방법과 균등한 방법으로 증자된 콩을 첨가한 후, 상기 담금원료 및 증자된 콩 전체 중량을 기준으로 상기 간장 담금용 염수를 2.4배가 되도록 첨가하여 최종 염농도가 18%인 간장덧을 제조하였다. 상기 간장덧을 18℃로 유지하면서, 2일에 1회씩 교반하면서 6개월간 숙성하였다.

[0105] 상기 6개월간 숙성시킨 후, 상기 간장덧을 여과포에 쏘 후 손으로 압착하여 박을 분리하고, 추가로 압착여과기를 이용하여 2차 여과하여 미세 고형물을 제거한 후, 여액(생간장)을 회수하였다. 상기 회수한 여액을 100℃에

서 5분간 가열한 다음 85℃에서 20분간 가열한 후, 즉시 냉각하였고, 5일간 정치한 후 침전물을 제거하여 간장을 제조하였다.

[0106] 본 발명인 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1와 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용하는 간장 제조방법에 의해 제조된 간장의 풍미를 확인하기 위하여, 비교예로 3가지를 사용하였다.

[0107] 우선, 본 발명의 방법과 동일한 방법으로 간장을 제조하되, 담금원료 제조단계에서 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1를 사용하지 않고 제조된 간장(비교예 1)을 제조하였고, 상기 담금원료 제조단계에서 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 대신에 기존 전통 장류에서 분리한 대표적 균주인 *Bacillus subtilis* KCTC 1028를 사용하는 것을 제외하고는 본 발명의 방법과 동일한 방법으로 제조된 간장(비교예 2)을 제조하였다. 또한, 비교예 3으로 광주광역시 소재 가정집에서 전통 간장 제조방법으로 제조된 재래식 간장을 사용하였다.

[0108] 2-2. 간장의 관능 확인

[0109] 상기 실시예 2-1에서 제조된 본 발명의 간장 및 비교예 1 내지 비교예 3의 간장에 대해 간장의 맛을 관능평가를 통해 비교하였다.

[0110] 상기 관능평가는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 우선, 실험 전 흡연 및 음주를 하지 않고, 감기가 걸리지 않은 건강한 20대 내지 60대의 각 연령대별로 총 6인씩 선정된 검사단 총 30명에 의해 5점 채점법(아주 좋음=5, 좋음=4, 보통=3, 좋지않음=2, 매우나쁨=1)으로 수행되었으며, 이취미의 정도, 달고 구수한 향의 정도, 맛 및 상기 사항을 모두 고려하여 평가한 종합적 만족도 등에 대한 관능적 특성을 측정하였고 그 결과 얻어진 값을 평균하여 최종 값을 구하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 기재하였다.

표 3

[0111]

	이취미의 정도	달고 구수한 향	맛	종합적 만족도
본 발명	3.3	4.2	3.7	3.6
비교예 1	2.9	2.9	3.0	2.9
비교예 2	1.7	2.0	2.5	2.1
비교예 3	1.3	2.1	2.1	1.9

[0112] 상기 표 3에서 나타난 바와 같이, 재래식 간장의 경우에는 이취미가 매우 강하였고, 이러한 이취미로 인하여 전반적으로 맛 및 종합적 만족도가 낮은 것으로 확인되었다. 한편, 본 발명의 바실러스 베레첸시스 SS360-1 및 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 사용하여 제조한 간장의 경우에는 재래식 간장과 달리 이취미가 거의 느껴지지 않았고, 달고 구수한 향이 느껴졌으며, 맛도 좋아 종합적인 만족도가 매우 우수한 것으로 확인되었다.

[0113] 또한, 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용한 코오지만을 사용한 경우, 재래식 간장에 비하여 이취미가 감소되기는 하였으나, 본 발명과 같이 달고 구수한 향이 느껴지는 정도는 높지 않은 것으로 확인되었다. 또한, 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용한 코오지와 *Bacillus subtilis* KCTC 1028를 이용하여 제조한 비교예 2의 경우, 오히려 이취미가 너무 강하고, 단맛이나 나타나지 아니하여 전반적으로 관능이 좋지 않은 것으로 확인되었다. 상기 결과로부터, 단순히 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용하는 경우, 달콤하고 구수한 관능의 부여가 이루어지지 않고, 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1를 함께 사용한 경우 이취가 효과적으로 감소된 본 발명과 달리 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1가 아닌 다른 바실러스 속 고초균을 사용하는 경우, 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 이용하여 제조한 코오지를 사용하였음에도 오히려 이취가 더 강하게 느껴지는 것으로 확인되었다.

[0114] 상기 관능평가 과정에서 상기 바실러스 베레첸시스 SS360-1 및 상기 바실러스 서브틸리스 DJI 균주를 사용한 경우 이취미가 효과적으로 제어되면서도 달고 구수한 향이 강하여 20대부터 60대의 모든 연령에서 좋은 평가를 받는 것으로 확인되어, 상기 균주를 이용하여 간장을 포함한 장류를 제조하는 경우, 효과적으로 관능 및 품질이 향상된 장류를 제조할 수 있을 것으로 예상되었다.

수탁번호

[0115]

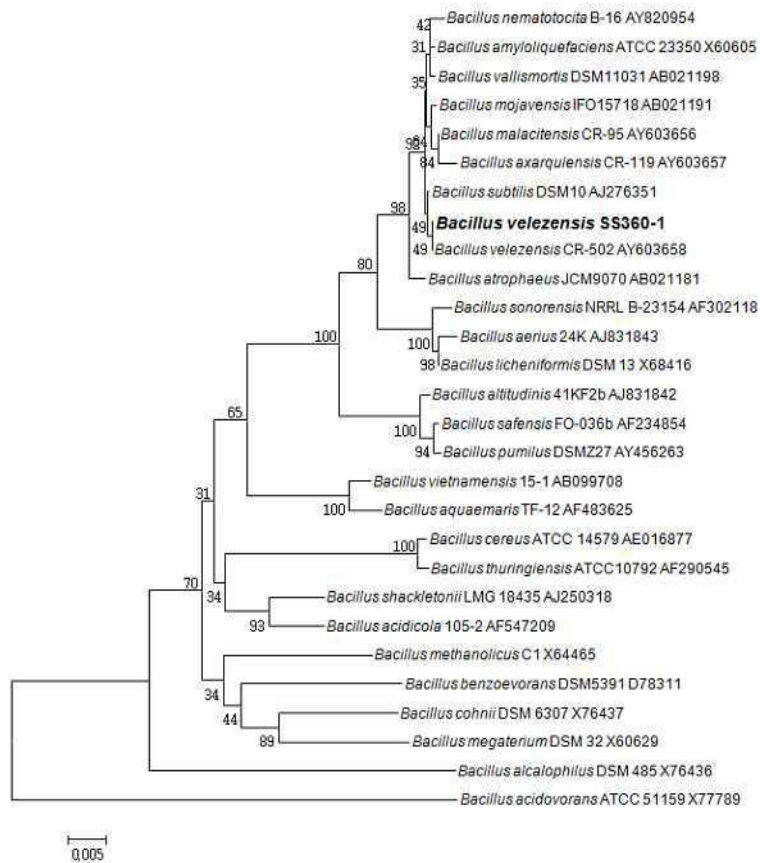
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11513P

수탁일자 : 20110401

도면

도면1



도면2

