

## 청국장 제조과정에서의 Bacterial Phytase 에 의한 Phytic Acid 의 분해

정지훈 · 강성국 · 김용순 · 정희종\*

전남대학교 식품공학과

### Degradation of Phytic acid in Chungkookjang Fermented with Phytase-producing Bacteria

Jung, Ji-Heun, Seoung-Guk Kang, Yong-Soon Kim and Hee-Jong Chung\*

Department of Food Science & Technology, Chonnam National University

Three strains among 8 isolates from the fermented chungkookjang were shown the strong phytase productivities. The phytase activities in manufacturing chungkookjang with thrse bacteria were maximized after incubating at 35-40°C, pH 7.0 for 5 day. The contents of same amino acids and riboflavin were increased in chungkookjang manufactured with these phytase-producing bacteria and the rate of phytic acid degradation was much higher in chungkookjang manufactured with a single or mixed cultures of these bacteria than in traditional chungkookjang.

곡물류 중 대두는 필수 아미노산을 함유하고 있기 때문에 비교적 영양가 높은 식물성 단백질로 평가되고 있지만 동시에 anti-nutritional factors 를 함유하고 있는 것이 문제점이다(1, 2). 대두를 포함한 식물성 식품 중에 약 1-2% 존재하는 phytic acid(myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis)는 단백질과 결합하여 단백질에 대한 효소 반응을 억제하고 식품 중의 칼슘, 철, 아연 등의 금속이온과도 결합하여 불용성 화합물을 형성하기 때문에 이들 중요한 무기염류의 흡수를 저해한다고 알려져 있다(3). 이와 같은 phytic acid 의 저해작용을 방지하기 위하여 많은 연구가 진행되어 왔으나, phytic acid 의 효소적 분해에 의해 함량을 줄이는 것이 효과적 방법으로 대두되었다(4).

이와 같이 anti-nutritional factor 로서 많은 문제점을 가진 대두는 우리나라에서 청국장, 간장, 된장 등 장류 식품의 주원료로 널리 사용되고 있는 반면에 단백질 분해효소의 작용을 억제하고 minerals 의 흡수력을 크게 감소시키는 phytic acid 를 감소 또는 제거하는 방법의 확립에 관한 연구가 거의 없다. 게다가, 청국장 제조에 관

한 연구는 주로 일반성분의 변화(5-9)에 국한되어 있으며 대두 중에 함유되어 있는 phytic acid 가 청국장 제조에 미치는 영향과 그에 따른 영향성분 이용성에 대한 연구가 절실히 요구된다. 따라서 본 연구에서는 phytic acid 를 가수분해하는 효소인 phytase 활성을 갖는 균주의 청국장 제조과정에서 역할을 규명하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험재료

본 실험에 사용된 청국장 제조용 대두는 1987년 가을에 수확한 것을 광주직할시 북구 신안동 평화시장에서 구입하여 사용하였으며, 대두 20kg을 파손된 것과 이물질을 제거하여 수세한 후 air drying oven 을 이용하여 50-52°C에서 48시간 동안 건조하였다. 건조한 시료는 밀폐된 용기에 넣어 상온의 어두운 곳에 저장하면서 사용했다.

##### Phytase 생산균의 분리 및 동정

벼짚을 이용한 재래식 전통 청국장 제조과정에 관련된 미생물을 순수분리하여 citrate-phytate 배지, phytate 배지 및 phytate agar 배지를 이용하여 phytase 생산균

Key words: phytase-producing bacteria, Phytase production, Phytic acid degradation.

\*Corresponding author

주만을 선별하고 분리된 세균은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (10)와 The Manual of Method for General Bacteriology (11)에 의해 동정했다.

#### Phytase activity의 측정

Phytase 활성은 myo-inositol hexaphosphate로부터 유리된 orthophosphate를 Fiske와 Subbarow 방법 (12)에 의하여 측정했다.

#### Phytase 생산을 위한 최적조건

분리동정한 균주 중 phytase 생산성이 우수한 세 균주를 단독 또는 혼합으로 이용하여 청국장을 발효시켰을 때 온도, 초기 pH 및 배양시간이 bacterial phytase에 의한 원료대두 중의 phytic acid 분해에 미치는 영향을 검토하였다.

#### 청국장의 제조

분리동정한 균주 중 phytase 생산성이 우수한 균주를 최적 조건하에서 단일 또는 혼합균주로 하여 phytase 배지에서 전배양한 접종균을 침지, 증자한 대두 100g에 접종하여 phytase 생산균에 의한 청국장을 제조하였다.

#### 일반성분의 분석

청국장 중의 수분, 단백질, 탄수화물, 지질 및 회분의 함량은 AOAC 방법 (13)에 의해 정량했다.

#### 구성 아미노산의 정량

Spackman의 방법 (14)에 따라 시료 0.5g을 6N HCl 10ml에 가한 후 ampule에 질소 gas로 봉입하여 110°C에서 24시간 가수분해시킨 후 염산을 제거하고 0.2N 구연산 완충액 (pH 2.2)을 사용하여 25ml로 만들어 분석용 시료로 하였고 이 시료를 아미노산 자동분석기 (LKB 4150)에 의하여 정량하였다.

#### 무기성분의 정량

인 (P)은 몰리브덴 비색법 (13)에 의해 정량했으며 Ca, Mg, Fe 및 Zn은 원자흡광광도계 (Pye Unicomp 9000)를 이용하여 정량했다.

#### Riboflavin 정량

청국장 중의 riboflavin 함량은 AOAC 방법 (13)에 따라 형광광도계 (Turner Model 110)를 사용하여 산출했다.

#### Phytic acid의 정량

Phytic acid는 Early와 Deturk의 변법 (15)에 의하여 추출했으며 Bartlett 방법 (16)으로 정량했다.

### 결과 및 고찰

#### Phytase 생산균의 분리 및 동정

벗짚을 이용해서 만든 청국장 제조과정에 관여하는 미생물을 순수분리한 결과 8균주를 얻었으며, 이들 균주 중 phytase 생산성이 우수한 균주를 선별하기 위하여 1.0% sodium phytase를 함유한 배지에 접종하여 30°C에서 5일 동안 배양한 후 phytase productivity를 측정 한 결과 Table 1에서와 같이 C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> 및 C<sub>7</sub> 균주가 비교적 우수한 균주로 판명되었으며, 이들 균주를 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (10)와 The Manual of Method for General Bacteriology (11)에 준하여 형태, 배양 및 생리학적 제성질을 검토한 결과 Table 2에서와 같이 C<sub>2</sub>는 *Bacillus subtilis*, C<sub>3</sub>는 *Bacillus licheniformis* 그리고 C<sub>7</sub>은 *Staphylococcus epidermidis*로 동정되었다.

#### Phytase 생산을 위한 최적 배양조건

청국장 제조과정 중 phytase 생산을 위한 최적 조건을 검토하기 위하여 대두를 침지, 증자하고 phytase 생산성이 우수한 균주를 단일 또는 혼합균주로 하여 온도, 초기 pH 및 배양시간을 검토한 후 phytic acid 함량변화를 측정 한 결과 Fig. 1-3에 나타난 바와 같이 *B. subtilis* 단일균주로 제조한 청국장에서는 초기 pH 7.0, 온도 40°C에서 5일 동안 발효시켰을 때 원료대두의 phytic acid

**Table 1. Relative phytase productivity of the strains isolated from traditionally manufactured chungkook-jang.**

Strains	Released phosphorus ( $\mu\text{g/ml}$ )	Relative productivity (%)
C <sub>1</sub>	1.52	12
C <sub>2</sub>	9.80	79
C <sub>3</sub>	10.04	84
C <sub>4</sub>	3.40	27
C <sub>5</sub>	N.D.*	-
C <sub>6</sub>	1.00	8
C <sub>7</sub>	12.40	100
C <sub>8</sub>	N.D.*	-

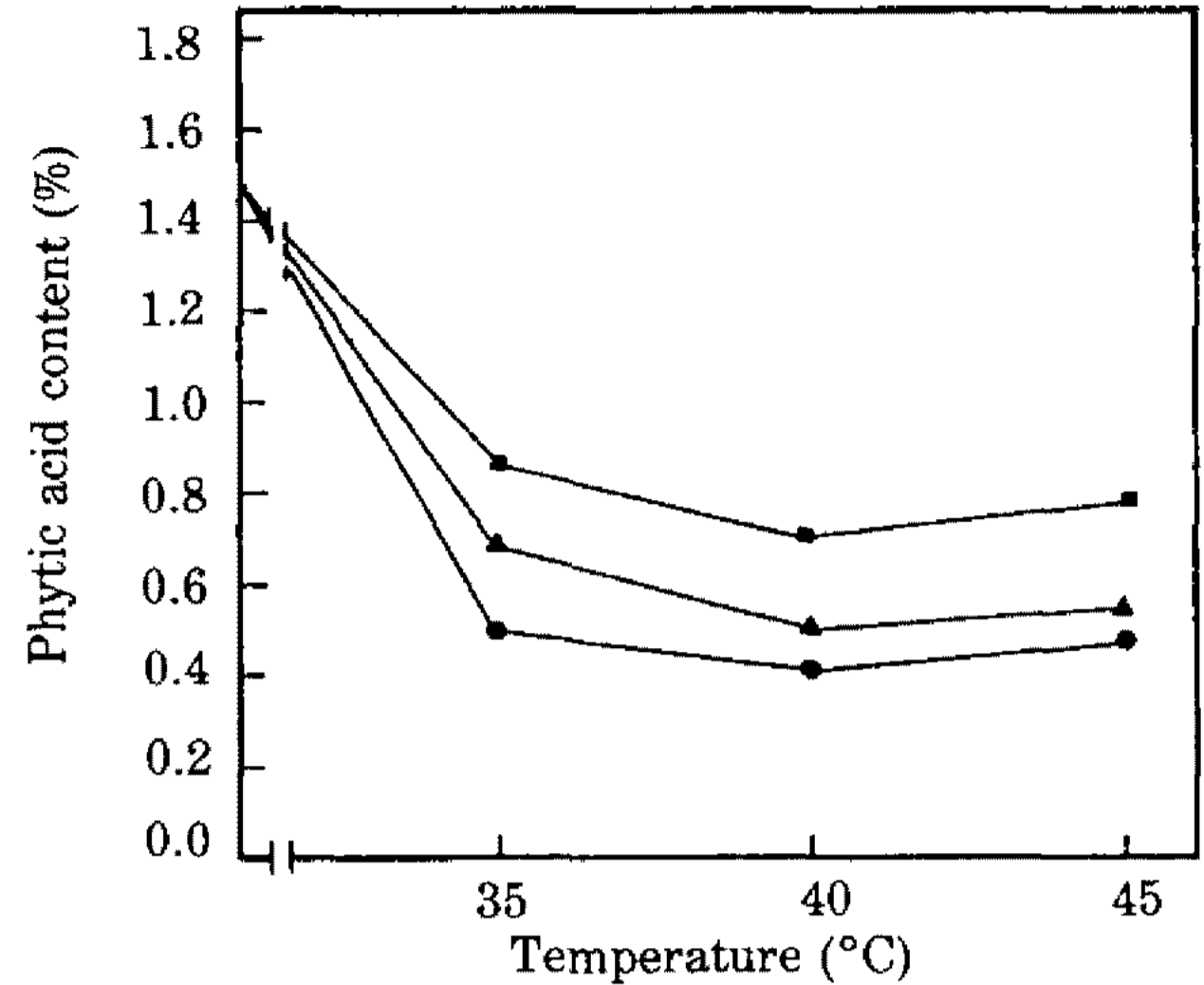
\*N.D; Not detected

**Table 2. Characteristics of the phytase-producing bacteria from traditional chungkookjang.**

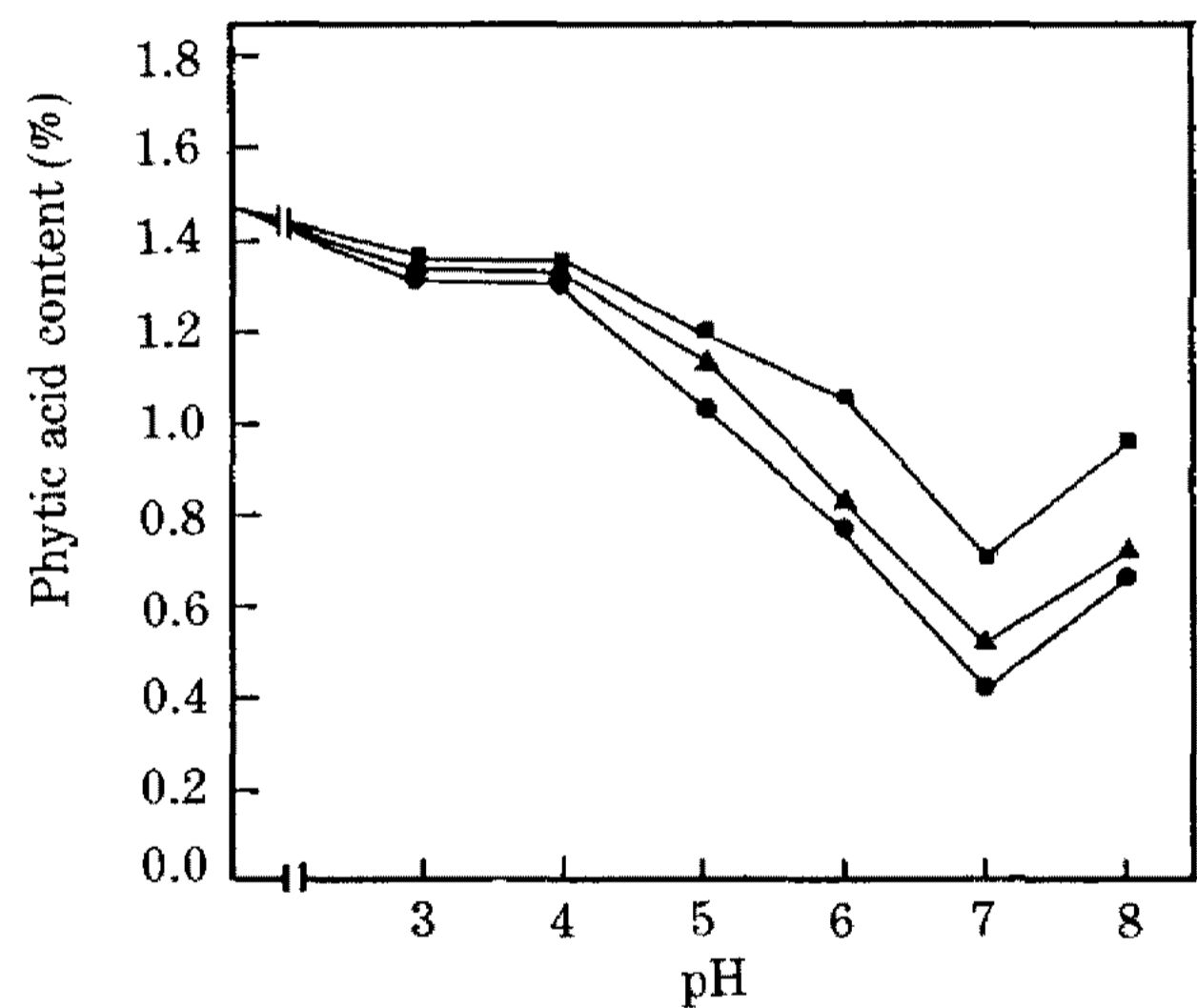
Characteristics	Bacterial isolates		
	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>7</sub>
Gram stain	+	+	+
Cell shape	rod	rod	coccus
Fecultative anaerobic	-	+	+
Spore stain	+	+	-
Nitrate reduction	+	+	+
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Motility	+	+	-
Utilization of Propionate	-	+	+
Citrate	+	+	-
Indol produced	-	-	-
Growth in 3% NaCl	+	+	+
7% NaCl	+	+	+
10% NaCl	-	-	w
15% NaCl	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+
45°C	+	+	+
50°C	+	+	+
55°C	-	+	-
60°C	-	w	-
Lipase	+	+	+
Hydrolysis of starch	+	+	+
gelatin	+	+	+
casein	+	+	-
M.R test	-	-	+
V.P test	+	+	-
O.F test	+	+	+
Acid from D-glucose	+	+	
L-arabinose	+	+	-
D-xylose	+	+	-
D-manitol	+	+	-
maltase	+		
sucrose	+		
D-trehalose	-		

w; weak

함량에 비하여 64%의 감소율을 보였으며 *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 혼합균주도 같은 조건하에서 71%의 감소율을 보였다. 그러나 *B. subtilis*, *B. licheniformis* 및 *S. epidermidis* 혼합균주의 경우는 초기 pH7.0, 배



**Fig. 1. Effect of temperature on the change of phytic acid content in chungkookjang manufactured with a single and mixed cultures of phytase-producing bacteria.**  
 -▲- : *B. subtilis* -●- : *B. subtilis* and *B. licheniformis*  
 -■- : *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *S. epidermidis*

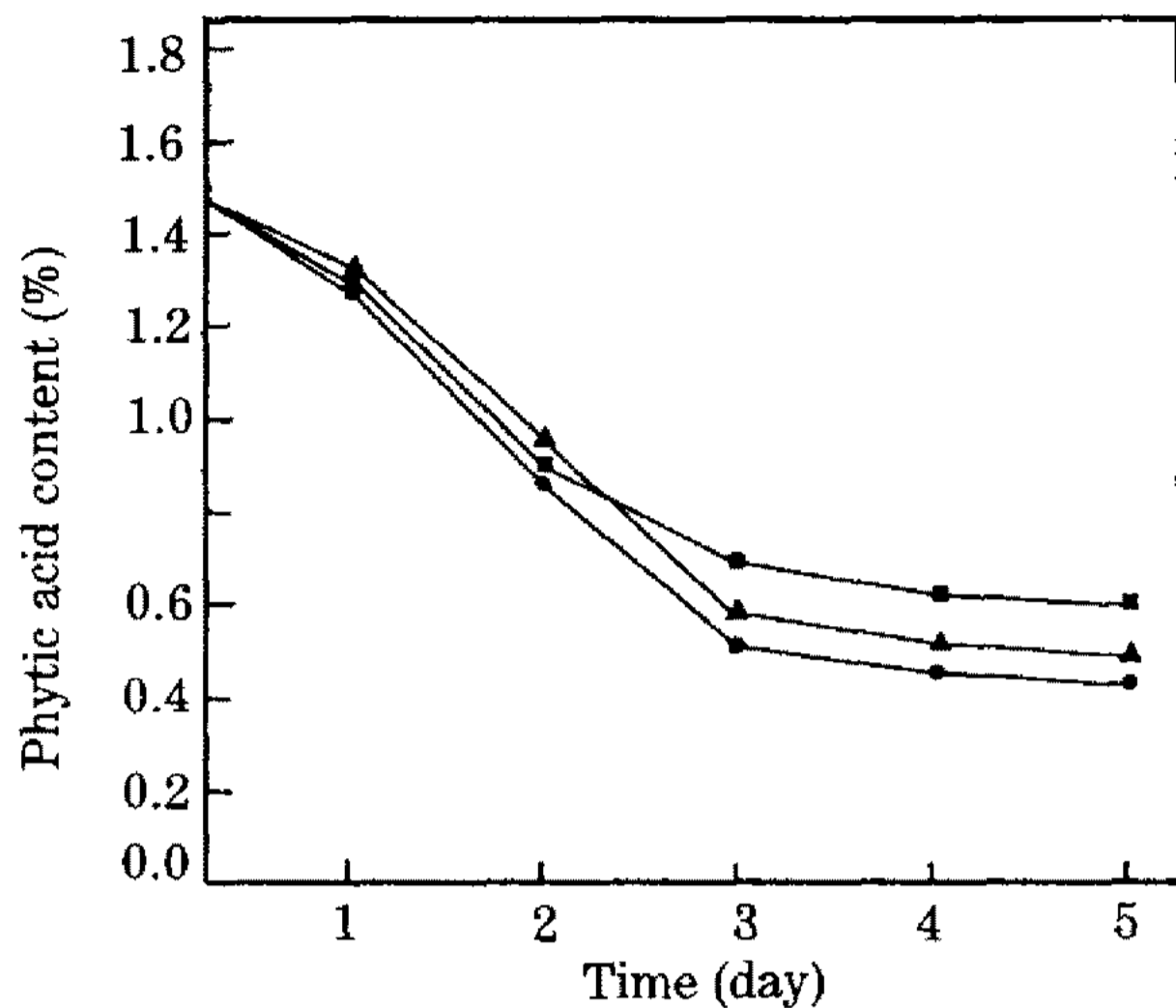


**Fig. 2. Effect of initial pH on the change of the phytic acid content in chungkookjang manufactured with a single and mixed cultures of phytase-producing bacteria.**  
 -▲- : *B. subtilis* -●- : *B. subtilis* and *B. licheniformis*  
 -■- : *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *S. epidermidis*

양온도 35°C에서 5일 동안 배양했을 때 52%로 다른 경우에 비하여 감소율이 떨어지는 경향을 보였다.

**Phytase 생산균에 의하여 제조된 청국장의 성분**

전통적으로 제조한 청국장과 phytase 생산성이 우수한 균주를 단일 또는 혼합균주로 하여 제조한 청국장의 일반성분을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 단백질과 회분을 제외한 수분, 탄수화물 및 지질성분 함량은 원료대두, 전통 청국장 그리고 phytase 생산성이 우수한 균주



**Fig. 3 Effect of time on the change of phytic acid content in chungkookjang manufactured with a single and mixed cultures of phytase-producing bacteria.**

—▲— : *B. subtilis*, —●— : *B. subtilis* and *B. licheniformis*  
—■— : *B. licheniformis* and *S. epidermidis*.

로 제조한 청국장에 있어서 함량변화가 거의 없거나 약간 감소하는 경향을 보였다. 회분함량은 약간 증가함을 보였으며, 단백질 함량은 원료대두 36.5%에 비하여 전통청국장은 37.1%였고, *B. subtilis* 단일균주로 제조한 청국장은 40.2%, *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 혼합균주로 제조한 청국장은 39.8%, 그리고 *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 및 *S. epidermidis*는 40.8%로 원료대두와 전통 청국장에 비하여 phytase 활성이 우수한 균주로 제조한 청국장에서 그 함량이 약간 증가함을 알 수 있었다. 이 등(5)과 김 등(17)의 보고에 따르면 청국장 제조시 수용성 질소와 암모니아태 질소함량이 증가한다고 보고한 바 있다.

#### 구성 아미노산의 변화

**Table 3. Chemical composition of the non-fermented soybean, traditional chungkookjang and chungkookjang manufactured with a single and mixed cultures of phytase-producing bacteria.**

Samples	Component (%)				
	Moisture	Crude protein	Crude fat	Sugars	Ash
Non-fermented soybean	5.50	36.50	17.07	32.30	5.20
Traditional chungkookjang	5.54	37.10	16.80	30.30	5.25
Chungkookjang manufactured with <i>B. subtilis</i>	5.41	40.20	17.10	31.10	5.29
<i>B. subtilis</i> and <i>B. licheniformis</i>	5.79	39.80	17.60	31.40	5.40
<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> and <i>S. epidermidis</i>	5.75	40.80	17.60	30.60	5.31

Table 4에서와 같이 원료대두에는 glutamic acid, aspartic acid, arginine 및 phenylalanine 함량이 높았고 methionine 과 cysteine 함량이 아주 낮았다. 균을 달리 하여 발효시킨 청국장에서는 구수한 맛의 주체인 glutamic acid와 쓴맛을 가진 leucine은 상당량 증가하고 단맛을 가진 lysine도 약간 증가하는 경향을 보임으로써 김 등(18)의 보고와는 다소의 차이를 보였다. 반면에 arginine, threonine 및 glycine 등의 함량은 불규칙적이긴 하지만 다소 감소함을 나타내 관여 미생물이 생산하는 효소에 의해 단백질이 가수분해됨을 알 수 있었다. 이처럼 청국장 발효에 관여하는 미생물에 따라 생산된 효소의 작용이 상이하어 아미노산의 함량에 차이를 나타낸 것으로 생각된다. 또 원료대두와 발효청국장 중의 cysteine 과 methionine의 함량이 낮은 것은 이 등(5, 6)이 보고한 바와 같이 청국장 제조시 높은 압력에서의 장시간 증자와 산가수분해 과정에서 상당량 파괴되었기 때문으로 생각된다.

#### 무기성분의 변화

전통 청국장과 phytase 생산성이 우수한 균주를 단일 또는 혼합균주로 하여 제조한 청국장 중의 인, 칼슘, 마그네슘, 철 및 아연의 함량변화는 Table 5에서와 같이 원료대두와 비교했을 때 발효에 의한 함량변화는 거의 없었다. 다만 인, 칼슘 및 마그네슘의 함량이 다소 차이가 난 것은 실험상의 오차에 기인한 것으로 생각된다.

#### Riboflavin 함량의 변화

원료대두, 침지 및 증자한 대두, 전통 청국장 및 phytase 생산균에 의해 제조된 청국장 중의 riboflavin 함량의 변화를 검토한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같이 청국장 발효에 관여하는 미생물에 의해 상당량의

**Table 4. Amino acid contents (mg%) of the non-fermented soybean and the chungkookjang manufactured with a traditional method and phytase-producing bacteria.**

Samples	Amino acid																	Total
	Essential							None essential										
	Val	Leu	Ile	Thr	Lys	Met	Phe	Asp	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Tyr	His	Arg	
Non-fermented soybean	2004	2003	1935	1352	2091	433	2158	2848	1452	3738	1252	1373	1403	600	1379	1222	2320	32351
Traditional chungkookjang	1886	2689	2111	1456	2169	494	2242	3042	1544	4523	1380	1542	1759	516	1487	1433	1098	32531
Chungkookjang manufactured with <i>B. subtilis</i>	2130	3164	2281	1298	2420	499	2640	2706	1379	4440	1389	1289	1451	421	1674	1249	1789	33650
Chungkookjang manufactured with <i>B. subtilis</i> and <i>B. licheniformis</i>	2635	2625	2285	1287	2341	445	2478	2722	1411	4542	1443	1272	1490	493	1638	937	1488	33975
Chungkookjang manufactured with <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> and <i>S. epidermidis</i>	2182	2947	2370	1370	2493	497	2454	3053	1500	4494	1399	1483	1605	470	1688	1360	1589	34170

Values expressed on a moisture-free basis.

**Table 5. Some minerals contents of the non-fermented soybean, triditional chungkookjang and chungkookjang manufactured with phytase-producing bacteria.**

Samples	Minerals (mg%)				
	p	Ca	Mg	Fe	Zn
Non-fermented soybean	420.0	90.8	183.0	9.2	20.0
Traditional chungkookjang	453.0	92.6	187.0	9.5	23.0
Chungkookjang manufactured with <i>B. subtilis</i>	502.0	114.5	201.0	9.7	25.0
<i>B. subtilis</i> and <i>B. licheniformis</i>	494.0	116.0	193.0	9.5	27.0
<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> and <i>S. epidermidis</i>	501.0	110.3	197.0	9.5	26.0

Values expressed on a moisture-free basis.

**Table 6. Riboflavin contents of manufactured chungkookjang without and with different phytase-producing bacteria.**

Samples	Riboflavin (mg%)
Raw soybean	0.19
After soaking	0.14
After soaking and autoclaving	0.13
Traditional chungkookjang	2.49
Chungkookjang manufactured with <i>B. subtilis</i>	2.08
<i>B. subtilis</i> and <i>B. licheniformis</i>	2.17
<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> and <i>S. epidermidis</i>	1.81

riboflavin이 생성됨을 알 수 있었고 침지 및 증자에 의해 대두 중의 riboflavin이 다소 용출됨을 알 수 있었다. 특히, 분리된 phytase 생산균 중 *S. epidermidis*는 riboflavin 생산균주라기 보다는 생육에 riboflavin을 필요로 함을 알 수 있었다.

**Phytic acid 함량변화**

원료대두, 전통 청국장 및 phytase 생산균주에 의한 청국장 중의 phytic acid 함량을 조사한 결과는 Table 7에서와 같이 원료대두 중에 1.46% 함유되어 있는 phytic acid가 발효과정에서 bacterial phytase에 의해 상당량 분해됨을 알 수 있었다. 특히, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 혼합균주에 의해 청국장에서 phytic acid 감소가 현저하였고 *S. epidermidis*와 혼합균주의

**Table 7. Phytic acid contents of non-fermented soybean, traditional chungkookjang and chungkookjang manufactured with phytase-producing bacteria.**

Samples	Phytic acid content (%)	Relative reduction rate (%)
Non-fermented soybean	1.46	-
Traditional chungkookjang	0.87	41.50
Chungkookjang manufactured with <i>B. subtilis</i>	0.49	67.50
<i>B. subtilis</i> and <i>B. licheniformis</i>	0.40	73.60
<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> and <i>S. epidermidis</i>	0.71	52.40

경우는 오히려 전자에 비하여 제한됨을 나타냈는데 이는 phytase 생산균주 상호간의 중간 대사물질에 의해서 phytase 생산성이나 대사에 영향을 미치기 때문으로 생각된다.

### 요 약

재래식 발효 청국장으로부터 분리한 8균주 중 phytase 생산성이 높은 3균주는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis*로 동정되었다. 이들 phytase 생산균주를 단독 또는 혼합균주로 하여 35-40°C와 pH 7.0의 최적조건에서 5일 동안 청국장을 발효시켰을 때 최대의 phytase 생산성을 보였으며 glutamic acid와 leucine 등의 일부 아미노산과 riboflavin의 함량이 증가되고 phytic acid의 분해율도 재래식 청국장에서 보다 훨씬 높았다. 특히 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 혼합균주로 발효시켰을 때 phytic acid 함량의 감소가 현저하였다.

### 감사의 말

본 연구는 1988년도 전남대학교 학술연구조성비에 의하여 이루어졌으며 지원하여 주신 전남대학교에 감사드

립니다.

### 참고문헌

1. Erdman, J.W.: *J. Am. Oil Chem.*, **56**, 736 (1979).
2. Wilcke, H.L.: Conference Summary. In "Soy protein and Human Nutrition". p.379, Academic Press, New York (1979).
3. Reddy, N.R. and D.K. Salunkhe: *J. Food Sci.*, **45**, 1708 (1980).
4. Knorr, D., T.R. Watkins and B.L. Carlson: *J. Food Sci.*, **46**, 1866 (1981).
5. 이재호, 이호지, 정문교: 한국농화학회지, **14**, 191 (1971).
6. 이숙희, 최홍식, 김창식: 한국식품과학회지, **14**(4), 375(1982).
7. 박계인: 한국농화학회지, **15**(2), 111(1972).
8. 서정숙, 이상건, 유명기: 한국식품과학회지, **14**(4), 309(1982).
9. 성낙주, 지영애, 정승용: 한국식품과학회지, **13**(3), 275(1984).
10. Buchanan, R.E., N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, A.W. Niven and R. Y. Stainer, (Eds): "Bergey's Manual of The Determinative Bacteriology", Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. (1974).
11. American Society for Microbiology., "The Manual of Methods for General Bacteriology. (Eds)" P, Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W., Nester, W.A. Wood, N.R. Kereg and G.B. Phillips: American Society for Microbiology. Washington D.C. (1981).
12. Fiske, C.H. and Subarrow: The Colorimetric Determination of Phosphorous, *J. Biol. Chem.*, **66**, 376 (1925).
13. AOAC, "Official Method of Analysis", Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. (1984).
14. Spackman, D.H., W.H. Stein and S. Moore: *Analyt. Chem.*, **30**, 1185 (1958).
15. Earley, E.B. and E.E. Deturk: *J. Am. Soc. Agron.*, **36**, 80 (1944).
16. Bartlett, G.R.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959).
17. 김수영, 김재욱: 농화학회지, **8**, 11(1967).
18. 김경자, 유명기, 김상순: 한국식품과학회지, **14**(4) (1982).

(Received June 1, 1990)