

유카(*Yucca shidigera*) 추출물 첨가에 의한 청국장의 풍미 개선에 관한 연구

인재평 · 이시경* · 안병권 · 정일민¹ · 장진혁²
건국대학교 응용생물화학과, ¹건국대학교 식량자원학과, ²셀텍스(주)

Flavor Improvement of Chungkookjang by Addition of Yucca (*Yucca shidigera*) Extract

Jae-Pyung In, Si-Kyung Lee*, Byung-Kwoun Ahn, Ill-Min Chung¹ and Chin-Hyuk Jang²

Department of Applied Biology & Chemistry, Konkuk University

¹Department of Crop Science, Konkuk University

²Celltechs Co. Ltd

This study was carried out to investigate the effect of yucca extract on the flavor development in Chungkookjang fermented by *Bacillus* sp. b01. The changes in the contents of amino-type N, ammonia type N, volatile compounds and organic acids, and those in the activities of α -amylase and protease were also determined with aging period. The amount of amino-type N increased gradually with time and was slightly higher in Chungkookjang containing yucca extract than in control. The content of ammonia-type N in Chungkookjang decreased by the addition of yucca extract. During aging, a little higher amylase activity was detected in Chungkookjang containing yucca extract. However, the amylase activity was the lowest in Chungkookjang containing 1 mg/g of yucca extract. The protease activity was slightly higher in Chungkookjang containing yucca extract. The organic acids, such as citrate, acetate, malate, fumarate, and succinate, were detected. The yucca extract reduced the production of tetramethylpyrazine which was responsible for the unpleasant odor, but enhanced the production of 2,5-dimethylpyrazine and 2,6-dimethylpyrazine which contributed to the taste. Sensory evaluation showed that the addition of yucca extract of 0.5 mg/g significantly improved the flavor and taste of products.

Key words: Chungkookjang, yucca, flavor

서 론

청국장은 메주콩을 삶아서 식기 전에 벗겨낸 간 시루에 담은 뒤 40~45°C에서 2~3일간 보온하여 벗겨내 붙어 있는 야생 고초균의 일종인 *Bacillus subtilis*를 번식시켜 발효시킨 후⁽¹⁾ 식염과 양념을 첨가하여 숙성시켜 제조한다. 이는 대두 발효 식품으로서 발효 숙성과정 중에 *B. subtilis*, *B. natto* 등이 생산하는 효소작용으로 대두의 단백질이 분해되고 끈끈한 점질물이 생성되어 그 특유의 맛과 향을 낸다. 일반 장류와 달리 증자한 대두에 청국장 균을 접종해서 숙성 발효한 후 가미해서 식용 할수 있기 때문에 제조기간이 짧은 장점이 있으며, 소화율이 높고 영양학적 측면에서도 된장이나 고추장

보다 단백질과 지방 함량이 높은 고 영양 식품이며, 청국장은 기능성에 있어서도 항암효과, 혈압강하 활성, 혈청 콜레스테롤 저하 등에도 효과가 있다고 인정되고 있다⁽²⁾. 특히 *Bacillus subtilis*가 증식하면서 protease가 생성되는데 이 효소는 혈전 용해작용이 있어 심근경색, 뇌혈전 등을 예방하는 효과가 보고되었다⁽³⁾. 청국장은 콩 자체 성분과 비교해 보면 필수 아미노산, 비타민 B₁, B₂, 나이아신, 판토텐산, 각종 효소가 더 많이 들어 있기 때문에, 소화흡수율이 매우 높으며, 변비 개선에도 유효하다. 또한 인체에 유익한 *Bacillus* sp.가 장내에서 부패균의 활동을 억제함으로써 부패균이 만드는 발암물질이나 암모니아, 인돌, 아민 등 발암 촉진물질을 감소시키며, 이러한 유해물질을 흡착하고 배설시키는 작용을 한다.

청국장에 대한 연구로서는 청국장의 제조방법, 청국장에 관한 미생물, 그리고 청국장과 질병과의 관련 연구 등에 관한 많은 보고가 있다. 그러나 청국장은 조리시에 발생하는 특유의 이취로 말미암아 소비자의 선택에 제한적인 요인으로 작용하기 때문에 개선을 위한 연구가 이루어져 왔다. 이러한 연구로서 Joo 등⁽⁴⁾은 청국장 제조시 동결처리된 콩과 썩 추출물

*Corresponding author : Si-Kyung Lee, Department of Appl. Biol. & Chem., Konkuk University, 93-1 Mojin Dong Kwangjinku, Seoul, Korea 143-701

Tel: 82-2-450-3759

Fax: 82-2-456-7183

E-mail: lesikyung@kkucc.konkuk.ac.kr

을 이용하여 풍미를 향상 시켰으며, Yoo⁽⁵⁾는 썩의 물 추출물이 적은 농도로 첨가될 때 청국장의 관능적 특성이 향상되었고, 썩의 에탄올 추출물보다 물 추출물의 첨가가 청국장의 냄새 성분 변화에 더 큰 영향을 준다고 하였다. 이러한 실험 결과는 청국장의 불쾌취 문제를 해결할 수 있는 가능성을 보여 주었으며, 이에 병행하여 맛의 증진을 위한 청국장의 대증화와 고급화 연구 또한 필요한 과제이다. 유카(*Yucca shidigera*)는 미국의 남부지방과 멕시코에 서식하는 식물로서 꽃, 줄기, 뿌리를 포함하는 yucca 식물의 모든 부분이 다방면에서 식품에 이용되고 있고, 또한 다양한 종류의 steroidal sarsaponin과 polysaccharide 등을 함유하고 있으며⁽⁶⁾, 이를 일정농도 이상 첨가시 항진균제, 항세균제, 항원충제의 가능성을 나타내고 있다^(7,8). Yucca 추출물은 관절염, 당뇨 등의 치료제로도 사용되며, 또한 혈압과 혈중 콜레스테롤도 저하시키고 두통을 완화시키며, 순환계 질환도 향상시키는 것으로 알려져 있다⁽⁹⁾. 특히 yucca 추출물을 투여한 그룹에서 혈중 콜레스테롤이 평균 22%나 감소된 것으로 보고 되었으며, 축산 폐수 처리 시 미생물 활성제로 사용되어지고, 병원성 세균을 억제하는 기능도 있다고 보고되었다. 또한 yucca가 첨가된 사료 투여시 가축의 분뇨에서의 암모니아 감소 효과가 있다는 보고와 이에 따른 가금류에서의 계란 생산량 증가⁽¹⁰⁾가 보고되었다. 이상에서와 같이 건강 증진에 도움을 주는 yucca를 청국장 제조시에 첨가함으로써 제품의 이취 억제 효과가 있다면, 이는 불쾌취로 인하여 청국장을 기피하는 현대인들에게 매우 유용할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 청국장의 저장 중에 발생하는 이취와 풍미저하의 문제점을 개선하고 기능성을 강화하기 위하여 steroidal sarsaponin이 풍부한 *Yucca shidigera* 추출물의 첨가량을 달리하여 청국장을 제조하고 저장 기간에 따른 암모니아태 질소, 아미노태 질소, 비휘발성 유기산, 그리고 숙성 기간 중의 amylase와 protease 효소활성, 향기성분의 변화를 조사하였으며 관능평가를 실시하였다.

재료 및 방법

재료 및 균주

미국 Desert King International사(Chula Vista, CA 91911, USA)의 yucca ultra를 첨가제로 사용하였다. 원료 대두(*Glycine max. L.*)는 1998년 수확된 영광산 메주 제조용 황대두를 시장에서 시료로 구입하였다. 실험에 사용한 균주는 건국대학교 응용생물화학과 식품발효화학 연구실에 분리하여 보관 중인 *Bacillus subtilis* b01균주를 사용하였다.

시약 및 기기

전처리 및 분석용으로 사용한 시약은 Merck, Sigma, Aldrich, Junsei제 특급 시약을 사용하였다. 시료의 전처리에서는 원심분리기(Hanil Supra 21K, Korea)와 진탕기(Vision KMC 1205S, Korea), 그리고 ultra sonicator(Branson sonifier 250, USA)를 사용하였다. 흡광도 측정에는 UV-Visible spectrophotometer(P. General TU-1800S, USA)를, 유기산 분석은 liquid chromatography(Sisedo, Japan)를, 향기 성분 분석은 gas chromatography(Hewlett Packard 5890 series II, USA)를 사용하였다.

종균 배양

대두 분말 10g과 nutrient broth 8g를 증류수 150 mL에 녹여 300 mL erlenmeyer flask에 넣어 autoclave(1.5 kg/cm² 121°C 15분간)에서 살균시킨 후 *Bacillus subtilis* b01을 접종하고, 40°C의 incubator에서 48시간 배양한 것을 종균으로 하였다.

청국장 제조

선별한 대두 1kg을 수세하여 12시간 동안 물에 침지하고 약 1시간 동안 수절한 후 autoclave에서 1.5 kg/cm²로 50분간 증자하였다. 이를 발효용기에 담고 증자 콩을 50°C까지 냉각한 후 미리 배양한 *Bacillus subtilis* b01종균을 균일하게 접종하고 40°C(습도 80~90%)에서 48시간 배양하였다.

발효된 청국장 메주에 식염을 각각 6%되게 넣고 절구로 마쇄하여 청국장에서 청국장 메주콩 비율이 50% 수준으로 만든다. 만들어진 청국장에 yucca 추출물을 0 mg/g, 0.2 mg/g, 0.3 mg/g, 0.4 mg/g, 0.5 mg/g, 1 mg/g씩 첨가하여 균일하게 혼합한 후 숙성용기에 400g씩 담아 20°C에서 숙성시키면서 일정 기간별로 청국장 시료를 채취하여 분석하였다.

아미노태 질소 측정

시료 10g을 100 mL의 열수로 용해한 후 1분간 약하게 가열하고 250 mL가 되도록 증류수로 세척하고 이를 잘 혼합하여 여지(Whatman No. 2)로 여과한 후, 그 여액 250 mL를 취하고, 0.5% phenolphthalein을 2~3방울 넣은 후 0.1 N NaOH 용액으로 미홍색이 될 때까지 적정하여 A용액으로 하였다. 중성 formalin 용액(35%)에 0.5% phenolphthalein을 2~3방울 넣은 후 0.1 N NaOH로 미홍색이 될 때까지 적정하여 B용액으로 하였다. 위 A용액과 B용액을 20 mL씩 정확히 취하여 잘 혼합한 후 0.1 N NaOH용액으로 적정하여 아미노태 질소 함량을 산출하였다.

암모니아태 질소(NH₃-N) 측정

아미노태 질소측정과 동일한 시료액 0.1 mL 취한 후 phenol-hypochloride 반응에 의하여 A용액과 B용액을 각각 2 mL씩 넣어 37°C에서 20분간 반응시켜 630 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽¹¹⁾. 표준곡선은 (NH₄)₂SO₄를 사용하였다.

A solution: phenol 10 g and sodium nitroprusside dihydrate 0.05 g in distilled water 1,000 mL

B solution: Na₂HPO₄ · 12H₂O 9 g, NaOH 6 g and NaOCl 10 mL in distilled water 1,000 mL

효소활성 측정

Amylase, protease 활성 측정용 효소액은 시료중량의 12배가 되도록 증류수를 넣고 상온에서 3시간 동안 진탕, 추출한 후 여과(Toyo 여과지 No. 2)시켜 그 여액을 표준 효소액으로 사용하였다.

Amylase효소 활성은 Dextrinogenic Unit of Nagase (D.U.N.)법⁽¹²⁾에 준하여 측정하였다. 1% 전분기질액(pH 4.8) 3 mL에 효소액 1 mL를 넣고 40°C 항온수조에서 정확히 10분간 반응시킨 후 반응액 1 mL에 0.1 M HCl 10 mL를 넣어 정지시켰다. 이 반응 정지액 1 mL에 0.005% I₂-0.05% KI액

10 mL를 넣어 발색시킨 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease 활성 측정은 0.6% casein 기질액(pH 7.0)을 사용한 Anson 변법⁽¹³⁾으로 측정하였다.

유기산 정량

유기산 정량은 liquid chromatography를 이용하여 분석하였다⁽¹⁴⁾. 시료 5 g을 취하여 50 mL 증류수를 가한 후 상온에서 20분간 200 rpm으로 진탕한 후, ultra sonicator를 이용하여 2 분간 조직을 파괴시켰다. 시료를 원심분리기로 60,000×g에서 30분간 원심분리 후에 Whatman No. 2를 사용하여 여과한 후 여액을 취하여 0.45 µm membrane filter를 이용하여 여과하여 5 mL를 취한 후 황산을 carrier로 하는 Bio-rad 87H+ 칼럼으로 분석하였다.

향기성분의 추출 및 분석

시료 10 g을 취하여 50 mL의 diethyl ether에 넣고 ISTD (n-hexadecane) 1 mg을 넣은 후 상온에서 진탕(150 rpm, 2hr) 추출 한 후 여과(Toyo NO. 5A)했다. 위 여과액에 2g의 무수 MgSO₄를 넣고 진탕하여 8시간 동안 정치시킨 후 다시 여과했다. 위 여과액을 질소 기류 하에 1 mL까지 농축한 후 gas chromatography를 이용해서 휘발성 향기성분을 측정하였다. 각 미지 성분의 확인은 표준물질의 retention time과 library searching, EPA/NIH spectra data와 fragmentation pattern을 상호 비교하여 확인하였다. GC 분석 조건은 detector 온도가 250°C이고 column은 SE-54, fused silica capillary 30 m×0.25 mm를 사용하였다.

관능검사

관능검사는 24일간 숙성한 청국장을 청국장 80 g, 두부 20 g, 마늘 10 g, 파 20 g, 고춧가루 1g을 넣고 20분간 가열하여 만든 것을 시료로 하여 검사요원 20명이 7점 평가 비교법으로 평가하였다. 실험결과는 Duncan's multiple range test에 의해 통계처리하였다.

결과 및 고찰

아미노태 질소 생성에 미치는 영향

청국장은 원료인 대두 단백질이 미생물에 의해 분해되어 구수한 맛을 내는 아미노산 성분인 아미노태 질소를 생성한다. Yucca 추출물 첨가 시 *Bacillus* sp. b01로 제조된 청국장의 숙성 기간 중 아미노태 질소함량의 변화에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 청국장 숙성중 아미노태 질소함량 증가는 대조구보다 yucca 추출물 첨가구에서 높았으며 특히 0.4 및 0.5 mg/g 첨가 시 가장 높았다. 1.0 mg/g 첨가구의 아미노태 질소함량은 대조구보다 높았으나 0.4 mg/g 첨가구 보다는 낮게 나타나, yucca 추출물을 일정 농도까지 첨가 시에는 아미노태 질소 함량이 증가하였으나 적정 농도 이상에서는 증가 효과가 감소하는 것으로 나타났다. Lee 등⁽¹⁵⁾은 *B. subtilis*와 *B. natto*의 혼합 균주를 이용하여 청국장을 제조 시 모든 시험구에서 발효 72시간 까지 아미노태 질소 함량이 계속 증가하였고 *B. natto*를 이용한 청국장에서 가장 높은 증가를 보여 사용 균주에 따라 아미노태 질소의 생성

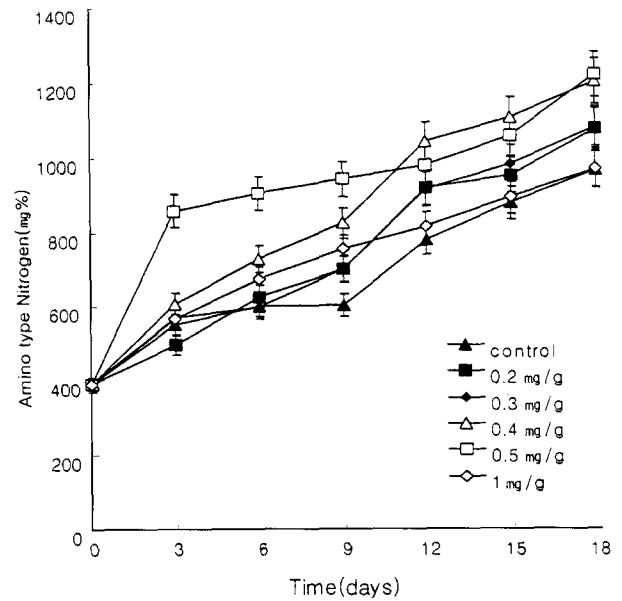


Fig. 1. Effect of Yucca extract on the change of amino-type nitrogen content in Chungkookjang fermented by *Bacillus* sp. b01 at 20°C

에 차이가 있음을 보고하였다. Choi 등⁽¹⁶⁾도 *B. subtilis*를 이용한 청국장을 40°C에서 숙성 시 아미노태 질소함량이 숙성 60시간에 576 mg%까지 증가하였으나 그 이후 감소 하였고 하였다. 또한 Suh 등⁽¹⁷⁾도 *B. natto*를 이용한 청국장의 경우 생성된 아미노태 질소 함량이 높았으나, *B. subtilis*를 이용 시에는 숙성 18일 후 996.2 mg%가 생성되어 *B. natto*를 이용한 청국장에서 보다 월등히 낮은 결과를 보고하여 청국장 제조 균주에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다. In⁽¹⁸⁾은 *Bacillus* sp. p01 균주로 제조된 청국장에서 yucca 첨가량이 0.4 mg/g 첨가한 청국장에서 높은 아미노태 질소함량을 보여 yucca 첨가구들이 무 첨가구보다 아미노태 질소함량이 증가하였다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치 하였다.

이상에서와 같이 숙성 기간에 따른 아미노태 질소량의 변화는 청국장 제조 시 yucca 추출물 첨가량에 따라 차이가 있었으며, yucca 추출물 첨가에 의해 아미노태 질소함량이 증가하여 청국장 제조시 yucca의 첨가는 청국장 맛의 증진에 효과가 있을 것으로 생각된다.

암모니아태 질소 생성에 미치는 영향

Yucca 추출물 첨가에 따른 청국장 숙성 중 암모니아태 질소 생성에 미치는 효과를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. *Bacillus* sp. b01균주를 이용하여 제조한 모든 청국장은 숙성 기간이 경과함에 따라 암모니아태 질소함량이 증가하였다. 그러나 yucca 추출물을 첨가한 청국장의 경우 무 첨가구 보다는 암모니아 태 질소함량의 증가가 적었다. 특히 0.4 mg/g 이상 첨가한 청국장에서는 숙성 3일 이후에 암모니아태 질소의 증가가 거의 없었으며 숙성 12일 이후에는 오히려 감소하였고, 대조구에서 생성된 암모니아태 질소량보다 적었다. 이상의 청국장 제조 시 yucca 추출물 첨가에 의한 암모니아태 질소의 변화에 관한 실험에서 yucca 추출물의 첨가량이 증가할수록 암모니아태 질소량이 현저히 감소함을 보였다.

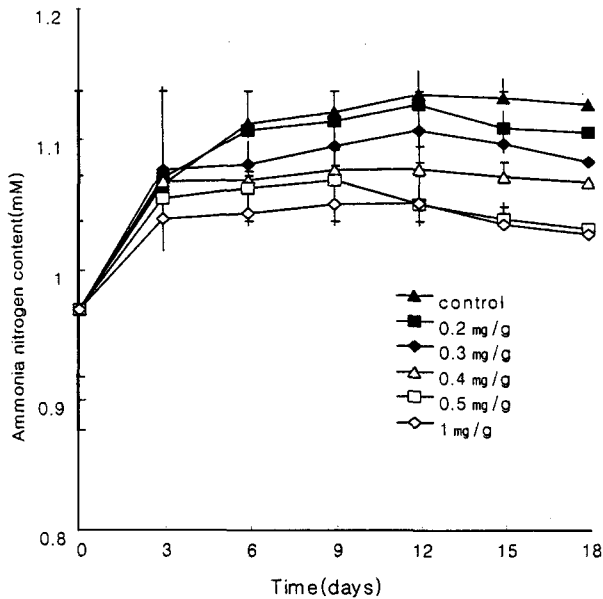


Fig. 2. Effect of Yucca extract on the change of ammonia-type nitrogen content in Chungkookjang fermented by *Bacillus* sp. b01 at 20°C

청국장 숙성중 암모니아태 질소의 감소는 품질에 좋은 영향을 줄것으로 생각된다. Makkar 등⁽¹⁹⁾은 rumen내 yucca steroid saponins를 투여 시 rumen 발효 시 암모니아 가스의 발생이 30~63% 정도의 감소를 보였다고 보고하였다. 또한 Robert 등⁽⁹⁾과 Wang 등⁽²⁰⁾은 yucca saponins이 암모니아와 결합이 가능하여 yucca 첨가 시 rumen 내의 암모니아가 현저하게 감소 하였다고 보고하였는데 청국장에서 암모니아태 질소량의 감소도 yucca 추출물의 성분이 암모니아를 감소시킨 것에 기인하는 것으로 생각된다.

Valdez 등⁽²¹⁾은 yucca의 효능에 대한 연구에서 yucca 첨가 시 젖소 분뇨에서의 암모니아 양을 줄일 수 있었다고 하였으며, In⁽¹⁸⁾도 청국장 균주를 달리하여 *Bacillus* sp. p01 균주를 사용한 청국장 제조 실험에서 yucca 추출물을 첨가 시 숙성기간 중 암모니아태 질소 함량이 감소하였다고 보고하여 본 실험 결과와 일치함을 보였다.

Amylase 활성에 미치는 영향

Yucca 추출물 첨가에 따른 청국장의 amylase 활성에 미치는 효과를 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. *Bacillus* sp. b01 균주를 이용하여 청국장을 제조하였을 때 amylase 활성은 숙성 6일 까지 증가를 보이다가 그 이후 감소함을 보였다. yucca 추출물을 0.4 mg/g 첨가한 청국장이 가장 높은 amylase 활성을 보였고 숙성 6일 까지 무 첨가구의 효소활성보다 높았으나, 1.0 mg/g 첨가한 청국장의 경우 숙성 6일 이후에 급격한 감소를 보였다. 0.2 mg/g 및 0.3 mg/g 첨가한 청국장의 경우 무 첨가구 보다 활성이 다소 높게 나타났지만 효소활성의 패턴은 유사하였다. 이상에서와 같이 청국장 숙성 중 yucca 첨가구에서 높은 효소 활성을 나타내는 것은 yucca 추출물을 적정량 첨가 시 균주의 생육을 촉진시키는 것에 기인하는 것으로 생각된다. Masazumi 등⁽⁶⁾은 yucca에서 추출한 saponin을 사용한 antimicrobial 실험에서 *Bacillus*

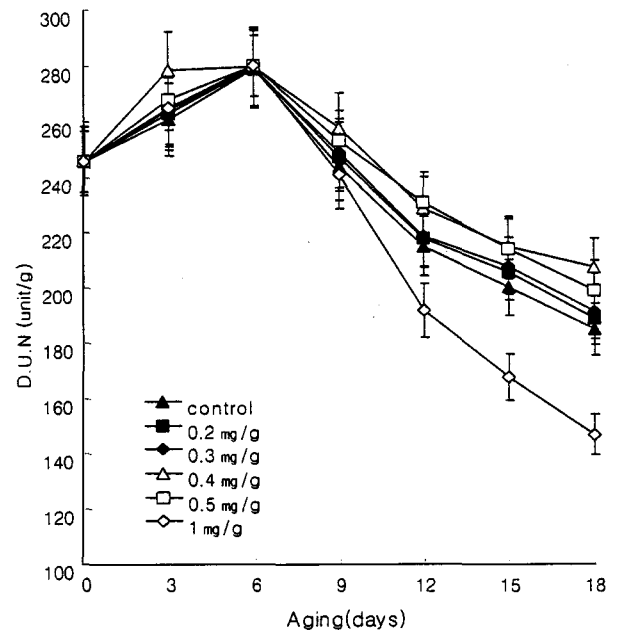


Fig. 3. Effect of Yucca extract on the amylase activity in Chungkookjang fermented by *Bacillus* sp. b01 at 20°C

*subtilis*는 1000 µg/mL일 때 저해를 받았으며, *Staphylococcus aureus*의 그람 양성균과 *Proteus vulgaris* 등 음성균과 관련하여 saponin 농도에 따른 억제력이 다르다고 하였고, steroidal saponin에 의한 antiyeast 효과가 있다고 보고하였다. Segal 등⁽⁷⁾은 saponin이 병원성을 가지는 *Rhizoctonia solani*의 cell membrane을 손상시키고 antifungal 효과가 있다고 보고하였다. Wallace 등⁽⁸⁾은 yucca를 rumen내 투여 시 병원성인 *Streptococcus bovis*의 생육이 억제되며, 장내 혐기 발효 미생물의 생육을 억제한다고 보고하였다. Valdez 등⁽²¹⁾은 *in vitro* 실험에서 yucca의 주요 구성성분인 sarsaponin을 일정농도 첨가 시에 균수가 증가함을 보였으며, 또한 낮은 농도로 첨가 시에는 rumen 내에서 starch 소화력이 증가하지만 높은 농도로 첨가 시에는 소화력이 감소한다고 하였다. 이는 본 실험의 결과와 유사하였으며 yucca 추출물을 일정 농도 첨가 시에는 미생물의 생육을 촉진시키지만, 일정 농도 이상 첨가 시에는 생육을 억제시켜 효소활성이 감소되는 것으로 생각된다. Han⁽²²⁾에 의하면 썩 분말 1.0% 첨가 시에 α -amylase activity가 높았으며, 숙성 7일 이후 감소한다고 보고하였으며, Joo 등⁽⁴⁾도 썩 추출물을 첨가한 청국장에서 amylase 효소 활성이 숙성 7일 까지 증가를 보이다가 점차 감소한다고 보고하였는데 이는 본 실험과 유사한 결과를 보였다.

Protease 활성에 미치는 영향

청국장 제조 시 yucca 추출물의 첨가가 protease 활성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 숙성 기간에 따른 protease 활성 변화를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

Bacillus sp. b01 균주를 이용한 청국장에서 protease 효소활성은 숙성 9일 까지 증가를 보였으며 yucca 추출물을 첨가한 청국장의 경우 0.3 mg/g 첨가시까지는 대조구와 효소활성의 차이가 없었으나 0.4 mg/g과 0.5 mg/g 첨가구에서는 무 첨가구 보다 protease 효소활성이 높게 나타났으며 1.0 mg/

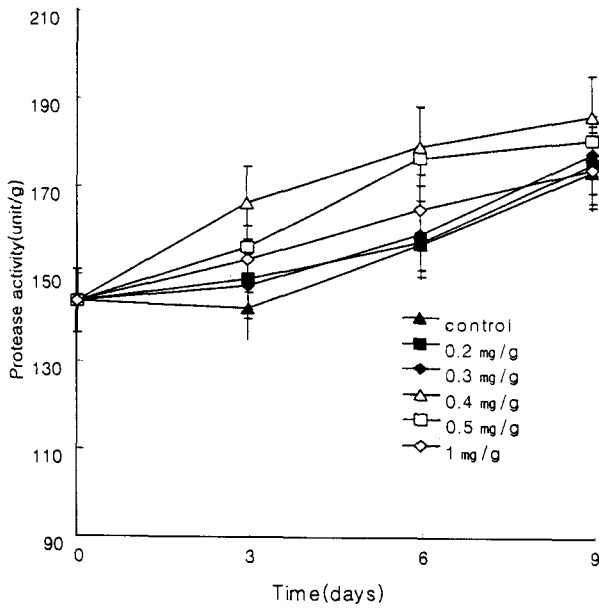


Fig. 4. Effect of Yucca extract on the protease activity in Chungkookjang fermented by *Bacillus* sp. b01 at 20°C

g 첨가한 청국장의 효소활성은 대조구의 효소활성 보다는 높았으나 0.4 mg/g의 추출물을 첨가한 청국장의 효소활성은 낮았다. 이상의 실험에서 *Bacillus* sp. b01 균주를 이용한 실험에서 yucca 추출물 0.4 및 0.5 mg/g 첨가구에서 효소활성의 증가 효과가 있었으나, 다만 yucca 추출물 첨가량이 1.0 mg/g 일 때 다른 첨가구와 달리 protease 활성이 낮은 것으로 나타났으며, 0.3 mg/g 첨가시에는 효소활성의 증가가 없었다. Ko 등⁽²³⁾과 Bae 등⁽²⁴⁾은 사료에 yucca를 첨가하여 투여시 돼지에서의 단백질 소화력이 증가하였다고 보고하였고 yucca의 양을 일정 농도 이상 첨가시 효과가 감소한다고 하여 본 실험의 결과와 유사하였다.

유기산 함량의 변화

Yucca 추출물 첨가 시 청국장의 숙성 기간 중 유기산의 변화는 Table 1과 같다. *Bacillus* sp. b01 균주로 만든 청국장은 숙성 기간 중 citric acid는 제조직 후 389.6 mg%이었는데 숙성 24시간 후에 397.1 mg%이었으나 48시간 후에는 273.8 mg%로 감소함을 보였고 malic acid는 숙성 시간이 0, 24, 48시간에 각각 393.25, 414.9, 423.9 mg%로 증가함을 보였다. Succinic acid 또한 제조직 후 774.3 mg%이었는데 24시간 이후에 1201.4 mg%이었으며 48시간 후에는 1188.8 mg%이었다. Yucca 추출물 첨가구들의 경우 *Bacillus* sp. b01 균주에서의 0.5 mg/g 첨가 시 숙성 48시간 동안 citric acid, fumaric acid, acetic acid, succinic acid가 증가함을 보였다. *Bacillus* sp. b01균를 이용한 경우 yucca 첨가에 따른 유기산의 변화는 yucca 첨가구들이 대조구에 비해 대부분의 유기산 함량이 증가하였다. 각 처리구에 따른 유기산 함량의 변화는 yucca 첨가에 따른 숙성 중에 나타나는 청국장 내의 microflora 차이에서 기인하는 것으로 생각된다. Sulistyo 등⁽²⁵⁾은 natto 발효물에 휘발성 유기산인 acetic acid가 생성되고 그 다음으로 iso-butyric acid, iso-valeric acid, malic acid 등도 발효 산물로 생성되었다고 하였다. Son 등⁽²⁶⁾이 청국장 발효 초기에 비휘발성 유기산인 oxalic acid, citric acid, fumaric acid 등이 포함되어 있었다고 보고하였고 lactic acid는 발효가 진행될수록 증가하다 감소하였다고 보고하였다. 또한 Ji 등⁽²⁷⁾은 *B. subtilis* PM3으로 제조한 된장의 휘발성분 중 중성 휘발성 acetic acid가 존재하는 것으로 보고하였는데, 이 성분은 한국 전통 간장과 된장 및 일본식 간장과 된장에도 존재하는 성분으로 알려졌다. In⁽¹⁸⁾은 *Bacillus* sp. p01 균주를 사용한 yucca 추출물 첨가 청국장에서 yucca 첨가구들의 유기산이 무첨가구보다 높게 나타났고 citric acid, fumaric acid, acetic acid, malic acid, succinic acid가 숙성 과정 중 생성되었다고 하여, 본 실험 결과와 유사함을 나타냈다.

Table 1. Changes of organic acid contents in Chungkookjang fermented by *Bacillus* sp. b01 at 20°C

(unit: mg%)

Treatment*	organic acid	Time (hour)		
		0	24	48
Control	citric acid	389.65	397.14	273.8
	fumaric acid	1.61	1.74	1.18
	acetic acid	179.51	228.58	192.86
	malic acid	393.25	414.96	423.92
	succinic acid	774.33	1201.44	1188.8
0.5 mg/g	citric acid	389.65	407.7	639.22
	fumaric acid	1.61	1.85	2.17
	acetic acid	179.52	211.38	246.57
	malic acid	393.25	413.74	440.84
	succinic acid	774.33	1278.04	1440.82
1 mg/g	citric acid	389.65	454.98	453.88
	fumaric acid	1.61	1.82	2.06
	acetic acid	179.51	229.55	249.1
	malic acid	393.25	396.71	401.96
	succinic acid	774.33	1113.23	1349.48

*mg/g: mg of Yucca extract added to 1 g of Chungkookjang

Table 2. Changes of volatile compound contents in Chungkookjang fermented by *Bacillus* sp. b01 at 20°C (unit: ppm)

Treatment*	Flavor compounds	Time (day)				
		0	2	4	5	6
Control	2-Methylpyrazine	0	0.072388	0.086181	0.349455	0.144839
	4-Methylpyrazine	0	0.012065	0.012312	0.01305	0.01704
	2,5-Dimethylpyrazine	0.06912	0.100646	0.103116	0.118452	0.144839
	2,6-Dimethylpyrazine	0.01728	0.060323	0.061558	0.068201	0.075205
	2,3,5-Trimethylpyrazine	0.03456	0.012865	0.012312	0.01205	0.011852
	Tetramethylpyrazine	0.950406	1.049621	1.02186	1.006641	0.920156
0.5 mg/g	2-Methylpyrazine	0	0.062568	0.089342	0.411098	0.180399
	4-Methylpyrazine	0	0.012514	0.012763	0.012541	0.026726
	2,5-Dimethylpyrazine	0.06912	0.105082	0.134868	0.140264	0.143629
	2,6-Dimethylpyrazine	0.01728	0.062514	0.068815	0.072705	0.092044
	2,3,5-Trimethylpyrazine	0.03456	0.011363	0.010279	0.009025	0.009005
	Tetramethylpyrazine	0.950406	1.02628	0.907124	0.902247	0.842363
1 mg/g	2-Methylpyrazine	0	0.067971	0.094295	0.339209	0.177121
	4-Methylpyrazine	0	0.013594	0.014787	0.018279	0.028339
	2,5-Dimethylpyrazine	0.06912	0.095159	0.101082	0.103345	0.127527
	2,6-Dimethylpyrazine	0.01728	0.057971	0.057935	0.071395	0.08417
	2,3,5-Trimethylpyrazine	0.03456	0.011221	0.011159	0.009001	0.008739
	Tetramethylpyrazine	0.950406	0.904675	0.903904	0.895834	0.800605

*mg/g: mg of Yucca extract added to 1 g of Chungkookjang

향기성분에 미치는 영향

Bacillus sp. b01 균주를 사용하여 청국장 제조 시 yucca 추출물 첨가에 따른 향기성분의 변화를 SE-54 column으로 분리하여 얻은 GC chromatogram은 yucca 첨가구와 무 첨가구가 거의 유사하였으며 2-methylpyrazine, 4-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazine, tetramethylpyrazine 등 6개의 peak를 확인 할 수 있었다(자료생략). *Bacillus* sp. b01 균주를 사용한 대조구 청국장에서는 Table 2에서와 같이 2-methylpyrazine은 숙성 초기에 검출되지 않지만 숙성 5일까지 증가를 보이다가 숙성 6일에 감소하였고, 4-methylpyrazine 또한 숙성 초기에 검출되지 않았으나 숙성기간 동안 증가를 보였다. 2,5-Dimethylpyrazine과 2,6-dimethylpyrazine은 숙성 6일까지 증가하였다. 2,3,5-Trimethylpyrazine은 숙성기간동안 계속 감소를 보였고 tetramethylpyrazine은 숙성 2일에 최고치를 보인 후 서서히 감소하였다. Yucca 추출물을 첨가한 청국장에서 2-methylpyrazine은 숙성 초기에 검출되지 않다가 숙성 5일째 최고치를 보인 후 감소하였고, 4-methylpyrazine 또한 숙성기간중 다소 증가하였다. 2,3,5-trimethylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine과 tetramethylpyrazine도 대조구와 유사한 경향을 보였다. 특히 yucca 추출물 0.5 및 1.0 mg/g 첨가구들의 tetramethylpyrazine의 함량이 대조구 보다 낮았다. *Bacillus* sp. 균주를 이용한 yucca 첨가 청국장에서 분자량이 큰 tetramethylpyrazine의 검출이 적은 것은 숙성기간중 제품의 품질에 영향을 줄 것으로 생각된다. 청국장 향기 중에 나타난 pyrazine류는 natto의 향기성분으로 분석된 바 있어, Sugahara 등⁽²⁸⁾은 중국산 대두를 물에 24시간 담근 후 8시간 가열한 대두에 *B. natto* 균을 접종하여 만든 시료를 증류장치를 사용하여 농축한 시료에서 합향 화합물과 pyrazine류를 동정했고 그 중에서 2,5-

dimethylpyrazine 함량이 2,3,5-trimethylpyrazine의 함량보다 높았다고 보고 하였으며, 이는 본 실험 결과와 유사하였다. Choi 등⁽²⁹⁾은 일본 natto의 향기성분 중 하나인 tetramethylpyrazine은 *B. subtilis* 균과 *B. natto* 균의 배양에 의해 생성되는데 배양초기에 당으로 부터 생성되는 acetoin을 그 전구체로 보고 있다고 하였으며 자극성 냄새를 부여하는 tetramethylpyrazine이 자극 취의 원인으로 생각된다고 하였다. 이들은 또한 청국장의 향기 분석에서 *B. subtilis*를 사용한 청국장에서 *B. natto*를 이용한 청국장 보다 3-methyl-1-butanol, 2-methyl propanoic acid, 1-octen-3-ol 등의 주된 콩 비린내 화합물이 많았다고 하였으며, trimethylpyrazine, tetramethylpyrazine 등 7 종류의 alkylpyrazine류를 확인하고 그 증가를 보고하였는데 본 실험에서는 상대적으로 적은 alkylpyrazine류들이 검출된 것은 청국장의 제조방법, 균주특성 및 숙성방법의 차이에 기인한 것으로 생각된다. Choi 등⁽³⁰⁾은 청국장에서 다수의 alkylpyrazine류가 동정되었고 2,5-dimethyl pyrazine과 2,3,5-trimethylpyrazine의 함량이 가장 많았다고 보고하였고 Kim 등⁽³¹⁾은 증자한 대두에 *B. natto*를 접종하여 40°C에서 24시간

Table 3. Changes of cis-3-hexanol compound contents in Chungkookjang fermented by *Bacillus* sp. b01 at 20°C

Treatment	The concentration of cis-3-hexanol compound (ppm)		
	Time (day)		
	0	2	4
Control	0.001728	0.002413	0.003615
Yucca added (1 mg/g)	0.001728	0.00179	0.00308

*mg/g: of Yucca extract added to 1 g of Chungkookjang

Table 4. Duncan's multiple range test for sensory evaluation of Chungkookjang

Time (day)	Treatment Item	The amount of yucca added (mg/g)				
		0	0.3	0.4	0.5	1
0	Taste	4.71 ^A	4.75 ^A	4.96 ^A	4.80 ^A	4.58 ^A
	Flavor	5.13 ^A	5.08 ^A	5.20 ^A	5.16 ^A	5.21 ^A
4	Taste	4.54 ^A	4.85 ^A	4.97 ^A	5.05 ^B	4.26 ^A
	Flavor	4.61 ^A	4.74 ^A	4.75 ^A	5.23 ^B	4.11 ^A
8	Taste	4.06 ^A	4.51 ^A	4.56 ^A	5.47 ^B	4.52 ^A
	Flavor	4.42 ^A	5.01 ^{AB}	5.07 ^{AB}	5.93 ^B	4.84 ^A
12	Taste	4.53 ^A	4.74 ^A	4.96 ^A	4.99 ^A	4.38 ^A
	Flavor	4.80 ^A	5.54 ^B	5.55 ^B	5.67 ^B	4.61 ^A
16	Taste	3.91 ^A	4.07 ^A	5.09 ^{AB}	5.47 ^B	4.02 ^A
	Flavor	4.87 ^A	5.40 ^A	5.4 ^A	5.42 ^A	4.93 ^A
20	Taste	4.16 ^A	4.52 ^A	4.57 ^A	5.53 ^B	4.12 ^A
	Flavor	4.68 ^A	4.90 ^A	4.94 ^A	5.46 ^B	4.82 ^A

A-B: Means with same letter in a row are not significantly different at p>0.05 level by Duncan's multiple test

발효시켰을 때 6종의 alkylpyrazine류가 동정되었으며, 이들 중 당과 아미노산의 분해 축합 등으로 생성된 2,5-dimethylpyrazine, trimethylpyrazine의 함량이 특히 많았으며, tetramethylpyrazine은 자극성 냄새를 부여하는 물질로 알려져 있다고 하였다. 본 실험에서도 2,5-dimethylpyrazine이 2,6-dimethylpyrazine보다 많이 검출되었고 tetramethylpyrazine은 숙성 2일에 가장 많이 검출된 후 숙성 기간이 지날수록 감소하였다. 또한 불쾌취로 작용되는 cis-3-hexenol은 *Bacillus* sp. b01 균주를 사용한 청국장에서 yucca 첨가량이 1.0 mg/g 일 때 무 첨가구와 비교 시 감소함을 보였다(Table 3). 이는 청국장의 문제로 지적된 대두취 향의 거부감을 줄일 수 있는 가능성을 보여주는 것이라 생각된다.

관능검사

Yucca 추출물 첨가량을 달리하여 *Bacillus* sp. b01 청국장 균주로 제조한 청국장을 20°C에서 숙성시키면서 일정 기간 별로 실시한 관능검사 결과는 Table 3과 같다.

청국장을 조리하여 관능검사를 실시한 결과, 맛과 향에 대한 선호도는 숙성기간중 yucca 추출물 1 mg/g을 첨가한 청국장을 제외한 모든 시료에서 대조구 보다 높게 나타나, yucca 추출물 첨가시 맛과 향에 좋은 영향을 준 것으로 나타났다. 특히 0.5 mg/g을 첨가한 청국장에서 높은 선호도를 보였으며, yucca 추출물이 1.0 mg/g 첨가된 청국장의 경우 yucca 자체 향이 증가되고 있어 청국장 자체의 맛이 약해지는 결과를 나타내었다. 이는 yucca 추출물 첨가량이 일정 수준을 넘어서면 yucca 자체의 향이 오히려 불쾌취로 작용하는 것으로 생각된다. 이상의 실험에서 *Bacillus* sp. b01를 이용하여 제조한 yucca 추출물 첨가 청국장은 아미노태 질소, protease 및 amylase 활성검사에서 상대적으로 높은 수치를 보였으며 관능검사 결과에서도 전체적으로 높은 수치를 보였다. 이는 yucca 추출물의 첨가에 의한 아미노태 질소량의 증가와 암모니아태 질소의 감소, protease 활성의 증가에 따른 유리 아미노산 및 각종 정미성분의 증가, tetramethylpyrazine의 감소

에 기인되는 결과로 생각된다. 이러한 실험 결과는 yucca 추출물 첨가에 따른 풍미가 향상된 청국장 생산 가능성을 보여준다.

요 약

Bacillus sp. b01 균주를 사용한 청국장 제조 시 yucca 추출물의 첨가가 청국장의 숙성에 미치는 영향을 검토하고자 청국장 숙성 과정중의 아미노태 질소, 암모니아태 질소, amylase 활성, protease 활성, 유기산 및 향기성분의 변화를 조사하였다. 청국장 숙성 중 yucca 첨가구에서 아미노태 질소 함량은 증가하였으며, 암모니아태 질소는 감소하였다. Amylase 활성은 yucca 첨가구들이 대조구와 비교 시 높게 나타났지만 yucca 추출물을 1 mg/g 첨가 시 감소함을 보였다. Protease 활성은 yucca 추출물 첨가구가 무 첨가구보다 다소 높게 나타났다. 청국장에서의 유기산은 citric acid, acetic acid, malic acid가 검출되었고, yucca 첨가구에서 대조구에 비하여 그 함량이 다소 높았다. 또한 yucca 추출물 첨가 시 2,5-dimethylpyrazine과 2,6-dimethylpyrazine은 증가하였고, tetramethylpyrazine이 숙성 기간 중 감소함을 보였다. 관능검사에서도 yucca 추출물 0.5 mg/g을 첨가시 무 첨가구보다 유의적으로 맛과 향이 우수하였다.

문 헌

- Kim, K.J., Ryu, M.K. and Kim, S.S. Chungkookjang koji fermentation with rice straw. Korean J. Food Sci. Technol. 14: 301-308 (1982)
- Yoo, J.Y. Present status of industries and research activities of Korean fermented soybean products. The Microorganism and Industry 23: 13-30 (1997)
- Her, S., Lee, S.K. and Joo, H.K. Isolation and identification of the fibrinolytic bacteria from Korean traditional Chungkookjang. J. Korean. Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 41: 119-124 (1998)
- Joo, H.K. and Yun, S.E. Imprvment on flavor and taste of Chungkookjang by freeze denaturation of soybean. Daesan Nonchong 5: 161-174 (1997)
- Yoo, J.H. Effect of Artemista Nakai extract on the flavor of Chungkookjang. Master thesis, Konkuk University. (1996)
- Masazumi, M., Yukiyoshi, T., Hitoshi, M., Kenji, M., Osamu, T., Takao, I., Kazuhiro, O., Ryoji, K. and Kazuo, Y. Antiyeast steroidal saponins from *Yucca shidigera*(Mohave Yucca), a new anti-food-deteriorating agent. J. Nat. Prod. 63: 332-338(2000)
- Segal, R. and Schlosser, E. Role of glycosidases in the membranolytic, antifungal action of saponins. Arch. Microbiol. 104, 147-150 (1975)
- Wallace, R.J., Arthaud, L. and Newbold, C.J. Influence of *Yucca shidigera* extract on ruminal ammonia concentration and ruminal microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1762-1767 (1994)
- Robert B., Harris, D.H. and Tom, L. Yucca plant saponin in the treatment hypertension and hypercholesterolemia. J. Appl. Nutr. 30: 374-381 (1978)
- Yeo, J. and Kim, K.I. Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. Poultry Sci. 76: 381-385(1997)
- Weatherburn, M.W. Phenol-Hypochorite reaction for determination of ammonia. J. Anal. Chem. 39: 971-974 (1967)
- Yoon, K.S. Changes of enzymetic activities during the fermentation of soybean. Master thesis, Konkuk University (1988)
- Anson, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathe-

- psin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-85 (1939)
14. AOAC Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists. Vol. 2, pp. 11-16 (1995)
 15. Lee, B.Y., Kim, D.M. and Kim, K.H. Studies on the change in rheological properties of Chungkookjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 478-484 (1991)
 16. Choi, U.K., Ji, W.D. and Chung, Y.G. Characteristics of Chungkookjang produced by *B. subtilis* DC-2. *J. Food Sci. Nutr.* 27: 846-856 (1998)
 17. Suh, J.S., Lee, S.G. and Ryu, M.K. Effect of *Bacillus* strains on the Chungkookjang processing II. Change of the components and enzyme activities during the storage of Chungkookjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* 14: 309-314 (1982)
 18. In, Z.P. Flavor enhancement of Chungkookjang by addition of yucca (*Yucca shidigera*) extract. Master thesis, Konkuk University (2000)
 19. Makkar, H.S., Sen, S., Blummel, M. and Becker, K. Effects of fraction containing saponins from *Yucca shidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculoforms* on rumen fermentation. *J. Agri. Food Chem.* 46: 4324-4328 (1998)
 20. Wang, Y., Mcallister, T.A., Newbold, C.J., Rode, L.M., Cheeke, P.R. and Cheng, K.J. Effect of *Yucca shidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique(Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 74: 143-153 (1998)
 21. Valdez, F.R., Bush, L.J., Goetsch, A.L. and Owens, N. Effect of steroidal saponins on ruminal fermentation and on production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69: 1568-1575 (1986)
 22. Han H.S. A study on the change of chemical composition during the ripening process of fermented soybean with mugwort powder. Master thesis, Konkuk University (1994)
 23. Ko, T.G., Kim, J.D., Bae, S.H., Han, Y.K. and Han, I.K. Study for the development antibiotics-free diets for weanling pigs. *Korean J. Anim. Sci.* 42: 37-44 (2000)
 24. Bae, K.H., Ko, T.G., Kim, J.H., Cho, W.T., Han, Y.K. and Han, I.K. Use of metabolically active substance to substitute for antibiotics in finishing pigs. *Korean J. Anim. Sci.* 41: 23-30 (1999)
 25. Sulistyo, J., Naotoshi, T., Kazumi, F. and Kan, K. Production of natto starter. *Nippon Shokuchin Kogyo Gakkaishi*, 35: 280-281 (1988)
 26. Son, D.H., Kwon, O.J., Ji, W.D., Choi, U.K., Kwon, O.J., Lee, E.J., Cho, Y.J., Cha, W.S. and Chung, Y.G. The quality of Chungkookjang prepared by *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43: 1-6 (2000)
 27. Ji, W.D., Yang, S.H., Choi, M.R., and Kim, J.K. Volatile components Korean soybean paste produced by *Bacillus subtilis* PM3. *J. Microbiol. Biotechnol.* 5: 143-147 (1995)
 28. Sugahara, E., Ito, T., Odagiri, S., Kubota, K. and Kobayashi, A. Comparison of odor components of natto and cooked soybean. *Agric. Biol. Chem.* 49: 311-318 (1985)
 29. Choi, S.H. and Ji, Y.A. Change in flavor of Chungkookjang during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 229-234 (1989)
 30. Choi, C., Choi, K.S., Choi, J.S., Lim, S.L., Lee, S.H., Son, J.H., Choi, H.J. and Lee, H.D. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* globigii CCKS-118 in Korean traditional soy sauce. *Agric. Chem. Biotechnol.* 39: 460-465 (1996)
 31. Kim, B.N., Park, C.H., Han, C.H., S.S., and Lee, S.Y. Flavor component, fatty acid and organic acid of natto with spice added. *J. Korean. Soc. Food Nutr.* 24: 219-227 (1995)

(2001년 12월 24일 접수)