J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
31(2), 204~210(2002)

*Bacillus natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 Starter로 제조된 청국장의 품질특성

연규춘 · 김동호* · 김정옥** · 박병준* · 육홍선* · 조재민 · 변명우*†

충주대학교 식품공학과
*한국원자력연구소 방사선식품 · 생명공학연구팀
**세종대학교 가정학과

Quality Characteristics of the *Chungkookjang* Fermented by the Mixed Culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*

Kyu-Chun Youn, Dong-Ho Kim*, Jung-Ok Kim, Byung-Jun Park*, Hong-Sun Yook*, Jae-Min Cho and Myung-Woo Byun*†**

Dept. of Food Science, Chungju University, Chungju 380-702, Korea
**Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea*
***Dept. of Home Economics, Sejong University, Seoul 143-747, Korea*

Abstract

The quality characteristics and sensory evaluation of *chungkookjang* were investigated. The samples were prepared and fermented by the inoculation of *Bacillus* strains; *B. subtilis*, *B. natto* and *B. licheniformis* as a single starter, and mixed culture of *B. natto* and *B. licheniformis* on the industrialized model system. It was shown that microbial growth, protease activity, contents of amino- and ammonia-nitrogen and contents of organic acid were higher in *B. subtilis* inoculated sample, and were lower in *B. licheniformis* inoculated one. General quality characteristics of sample inoculated by mixed culture of *B. natto* and *B. licheniformis* took a middle position between each *B. natto* and *B. licheniformis* inoculated one. Fifty eight species of odor components were identified. Ethanol, 3-methyl-1-butanol, acetic acid, benzaldehyde and alkyl pyrazines were identified in all samples and most of other flavor components were strain specific. The contents of unpleasant smell components, alkyl pyrazines and benzaldehyde, were lower in *B. licheniformis* inoculated sample. The sensory evaluations showed that *chungkookjang* manufactured from mixed culture of *B. natto* and *B. licheniformis* was most acceptable. Therefore, results indicated that *chungkookjang* manufactured from mixed culture of *B. natto* and *B. licheniformis* induced better sensory quality than that of the control.

Key words: *chungkookjang*, quality characteristics, *Bacillus*, mixed culture

서 론

청국장은 *Bacillus* 계통의 미생물을 이용하여 40°C 정도에서 2~5일간 발효시킨 우리나라의 전통 대두 발효식품이다(1). 청국장은 영양뿐만 아니라 혈전용해능(2), 면역기능 강화(3), 항산화효과(4), 생리효과(5) 등의 기능성도 매우 우수한 것으로 밝혀지고 있어 한 때 자가제조의 어려움과 청국장 특유의 냄새로 인하여 소비가 감소하였다가 산업적인 대량생산 제품의 판매와 더불어 점차 소비가 증가하는 추세에 있다. 전통적인 청국장의 제조는 콩을 삶아 볏짚을 깔고 따뜻한 곳에서 띄우는 형태로 이루어진다. 이 때 볏짚에서 유래한 *B. subtilis* 등의 *Bacillus*속 미생물이 서식하여 청국장 특유의 성상과 맛, 영양성분 등을 형성한다(6). 그러나 청국장은 제품의 조리특성상 3~5% 이상의 소금을 첨가하기 힘들고 수분도 50% 내외로 높다. 따라서 염에 의한 삼투압 및 수분활성도의 조절로 부패미생물의 생육을 억제하는 다른 장류 제품과는 달리 청국장은 상품으로서의 보존 및 유통이 어려운 문제점이 있다(7,8).

Choe 등(9)의 조사에 의하면 시중에서 유통되는 청국장의 사용경험이 있는 소비자의 약 50%가 제품에 대한 불만족을 나타내었으며 가장 주된 불만족의 요인으로 불쾌취(52.3%)와 보존 중의 품질저하(30.7%)를 지적하였다. 청국장의 불쾌취는 주로 *Bacillus*에 의하여 생성되는 alkylpyrazine류나 함sulfide 화합물, 암모니아 화합물 등에서 유래하는 것으로

†Corresponding author. E-mail: mwbyun@kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8060. Fax: 82-42-868-8043

알려져 있으며(10-13) 이러한 화합물들은 소량일 경우에는 우리나라 장류 제품 특유의 향으로 작용하나 과량으로 생성되면 불쾌취의 원인이 되는데 불쾌취의 생성 정도는 미생물의 종류와 수분, 염도, 온도 등의 미생물 서식환경에 따라 결정된다(10,11). 따라서 불쾌취 원인물질의 생성 정도가 낮은 미생물을 starter로 접종하거나 발효 또는 보존 조건을 조정해 준다면 청국장 소비의 기피요인인 불쾌취를 낮추어줌으로써 제품의 안정적인 품질확보가 가능하다. 그러나 청국장의 제조공정 연구(14,15), 생리활성 특성(2), 영양물질의 변화(16-18), 점질물(19), 향기성분의 검출(11) 등에 관한 연구는 여러 방면에서 진행되고 있으나 청국장 불쾌취의 제거나 관능개선을 위한 산업적인 연구는 아직까지 미흡하다.

따라서 본 연구에서는 *Bacillus*를 이용한 콩알메주 제조 연구에 관한 Kim 등(12)의 연구를 기초로 하여 청국장 불쾌취의 원인물질인 alkylpyrazine류나 함sulfide 화합물, 암모니아성 화합물의 생성정도가 낮은 *B. natto*와 *B. licheniformis*(20)를 주 발효균주로 하여 청국장의 불쾌취를 감소시키면서도 풍미를 향상시킬 수 있는 새로운 청국장의 제조 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

청국장의 제조

원료 대두는 2000년에 수확된 강원도산 백태를 시중에서 구입하여 사용하였다. 청국장 발효 균주는 *B. subtilis* KCCM 11314와 *B. licheniformis* KCCM 35409는 한국종균협회에서 구입하였으며 *B. natto* M-1002는 일본의 Natto 제품에서 분리한 (주)명가식품(Chungbuk, Korea)의 보관균주를 사용하였다. 실험에 사용한 *B. natto*는 *B. subtilis*와 생리적 특성이 같으나 생장가능 최대온도(55°C), 영양요구성(biotin 요구성) 등의 특성이 *B. subtilis*와 달라 *B. natto*로 구분한 것이었다.

원료대두는 20°C의 물에 10시간 동안 침지하여 건져낸 후 NK증자기(Samsung Eng. Co., NK-Ⅱ, Korea)로 105°C에서 20분, 121°C에서 20분간 증자하였다. 통기성이 좋은 천을 댄 40×60×10 cm의 다공상 플라스틱 용기에 약 80°C까지 냉각시킨 10 kg의 증자대두를 투입하고 nutrient broth(Difco, USA)에서 휴지기까지 배양(40°C, 48 hr)한 후 10^8 cells/mL 되게 희석한 균주 배양액을 대두량의 0.01%(w/w)되게 접종하여 starter로 사용하였다. 청국장의 발효는 약 2톤 규모의 산업적인 생산시설(10 kg×200 EA)에서 실시하였으며 이 때 시료는 *B. subtilis*만 접종한 것을 대조구로 하였고 *B. natto*나 *B. licheniformis*만을 starter로 사용한 것, 그리고 *B. natto*와 *B. licheniformis*를 1:1로 혼합하여 starter로 사용한 것을 시험구로 하였다. 청국장 발효실의 온도는 입국초기에는 증자대두의 잔열로 70±1°C이었으며 약 5시간 후 자연냉각에 의하여 40°C를 유지하였고, 이후의 발효조건은 온도 40±1°C, 습도는 포화습도를 유지하도록 조절하였다. 청국장의 발효시간은 입국 이후 45시간으로 하였다.

미생물 검사

청국장 10 g에 멸균 증류수 90 mL를 가하여 mixer(Hanil, FM 680T, Korea)에 60초간 마쇄하고 4°C에서 30분간 교반하여 *Bacillus*의 생육측정을 위한 시료를 제조하였다. 제조된 시험액을 1/10씩 연속 희석하여 *Bacillus*의 선택배지(dextrose tryptone agar, Difco)에 1 mL씩 pour plating 방법으로 접종하고, 50°C에서 3일간 배양하여 생성된 총 colony의 수를 colony counter(IPI Inc., Microcount 1008, USA)를 사용하여 계수하였다. 청국장의 미생물 밀도는 청국장 1 g당 colony 생성비율(colony formation unit/g)로 나타내었다.

이화학적 품질 검사

청국장의 수분과 pH는 AOAC법(21)에 준하여 측정하였으며 pH는 미생물 시험용으로 제조된 시료를 여과지(Whatman No. 2)에 여과하여 pH meter(Orion 520A, USA)로 측정하였다. 청국장의 단백질 분해효소 활성은 청국장 발효 중의 pH 변화 영역인 중성단백질 분해효소의 활성을 Kim 등(12)의 방법에 따라 측정하였다. 효소활성 측정을 위한 기질은 0.5% casein(dissolved in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0) 용액을 사용하였으며 효소반응 후 생성된 tyrosine을 정량하여 효소활성을 비교하였고 효소의 1 unit은 1분당 1 μmole의 tyrosine을 유리시키는 효소의 양으로 하였다. 아미노태질소와 암모니아태질소 측정은 미생물 분리를 위하여 제조된 시험액을 여과(Whatmann paper, No. 2)하여 각각 AOAC(21)에 명시된 Formol 적정법과 Folin법으로 측정하였다.

기기분석

청국장의 향기성분은 Kim 등(12)의 연구와 동일한 system으로 Head space autosampler(Tekmar 7,000)가 연결된 GC/MS(HP 5890, Hewlett Packard Co., USA)에서 HP FFAP (50 mL×0.2 mm i.d×0.51 μm thickness) Capillary column으로 분석하였다. 유기산 분석 또한 Kim 등(12)의 방법에 따라 Novapak C18(L: 15 cm, id 3.9 mm)을 사용하여 HPLC로 분석하였다.

관능평가

청국장 시제품의 관능검사는 (주)명가식품의 장류 관능검사 panel 20명을 대상으로 색, 맛, 향, 전체적인 기호도의 4개 검사항목에 대하여 5점 평점법(청국장으로서의 특성이 1: 매우 나쁘다, 2: 비교적 나쁘다, 3: 보통이다, 4: 비교적 좋다, 5: 매우 좋다)으로 실시하였으며 시험결과는 분산분석과 다중범위 시험법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검증하였다(22). 관능평가를 위한 시료는 청국장 100 g, 소금 5 g, 두부 100 g(2×2×2 cm), 다진 마늘 2 g을 끓는 물 400 mL에 넣은 다음 5분간 끓여 제조하였다.

결과 및 고찰

pH 및 수분의 변화

청국장 발효 과정 중의 pH와 수분의 변화를 Table 1에 나타내었다. 증자대두의 pH는 6.18~6.21의 범위였으며 발효 5~10시간 이후부터 pH가 증가하기 시작하여 발효 후기에는 모든 시험구에서 pH 8.0을 넘어섰다. 발효 45시간 이후 각 시험구의 pH는 *B. licheniformis*를 *starter*로 한 청국장이 8.68로 가장 높았으며 *B. natto*는 8.28, *B. subtilis*는 8.13이었고 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합시료는 8.37에 이르렀다. 한편, 이러한 경향은 Kim 등(12)의 *Bacillus*속 균주를 이용한 콩알메주 model system의 결과와는 비슷하였고 Kim 등(6)의 볏짚을 이용한 청국장 제조의 결과보다는 높은 것이었다.

청국장 발효 과정에서 제품의 수율 및 물성을 결정하는 중요한 품질관리 요소인 수분의 변화를 측정하였다. 증자대두의 수분은 58.3~58.6%의 범위였으며 발효 기간을 통하여 수분 증발과 함께 점차 수분이 감소하였다. 발효 45시간 이후 각 시료의 수분은 *B. licheniformis*를 starter로 한 청국장이 53.2%로 가장 낮았으며 *B. subtilis*는 54.8%, *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합시료는 55.1%였고 *B. natto*가 55.9%로 가장 높았다. 온도와 습도가 모두 같은 발효 조건에서 이처럼 starter의 종류에 따라 수분 분포가 다른 것은 청국장 발효에 관여하는 *Bacillus*속 균주의 점질물 형성(19)과 관련이 있는 것으로 사료된다. 즉, 점질물이 많은 *B. natto* 접종구는 점질물의 피막 형성으로 수분의 증발이 억제되었으며 상대적으로 점질물의 형성이 낮은 *B. licheniformis* 접종구는 수분의 증발이 많았기 때문에 발효 후 청국장의 수분 함량에 차이가 있는 것으로 해석되었다.

미생물의 생육 변화

청국장 발효 중 각 시험구의 초기 미생물 밀도는 10^4 CFU/g 수준으로 비슷하였으나 청국장 발효 기간 중의 미생물 생장률은 starter에 따라 각기 다른 양상을 보였다(Fig. 1-A). 즉, *B. subtilis*를 starter로 접종한 경우 발효 10시간째부터 증식이 시작되었으며 35시간 이후에는 10^9 CFU/g까지 증식하여 4개의 시험구 가운데 증식속도와 증식률이 가장 높았다. *B. natto*의 증식개시 시간은 *B. subtilis*에 비하여 다소 늦어 15시간대에 증식이 시작되었으나 최대 증식 밀도는 *B. subtilis*와 마찬가지로 10^9 CFU/g 수준에 이르렀다. *B. licheniformis*의 증식개시 시간은 발효 15시간째였으며 최대 증식밀도는 10^8 CFU/g의 수준으로 나타나 증식속도와 증식률이 *B. subtilis*나 *B. natto*에 비하여 상대적으로 낮았다. 한편,

Table 1. Changes of pH and water contents in different *Bacillus* strain inoculated *chungkookjang* during fermentation

	Fermentation time (hr)	Inoculated strains[1)]			
		BS	BN	BL	BN+BL
pH	0	6.19[2)]	6.18	6.21	6.21
	5	6.29	6.19	6.23	6.25
	10	6.45	6.33	6.47	6.56
	15	6.71	6.69	6.55	6.84
	20	7.16	7.05	7.18	7.22
	25	7.52	7.54	7.60	7.59
	30	7.77	7.68	7.81	7.73
	35	7.93	8.09	8.18	7.95
	40	8.05	8.20	8.52	8.24
	45	8.13	8.28	8.68	8.37
Water content (%)	0	58.5	58.3	58.5	58.6
	5	58.2	58.2	58.3	58.3
	10	57.8	57.9	57.7	58.0
	15	57.2	57.4	57.0	57.5
	20	56.6	57.1	56.9	57.3
	25	56.4	56.9	55.7	56.8
	30	56.2	56.7	54.9	56.4
	35	55.9	56.3	54.4	56.2
	40	55.0	56.2	53.7	55.8
	45	54.8	55.9	53.2	55.1

[1)]BS: *Bacillus subtilis*, BN: *Bacillus natto*, BL: *Bacillus licheniformis*.
[2)]Values are mean of three measurements.

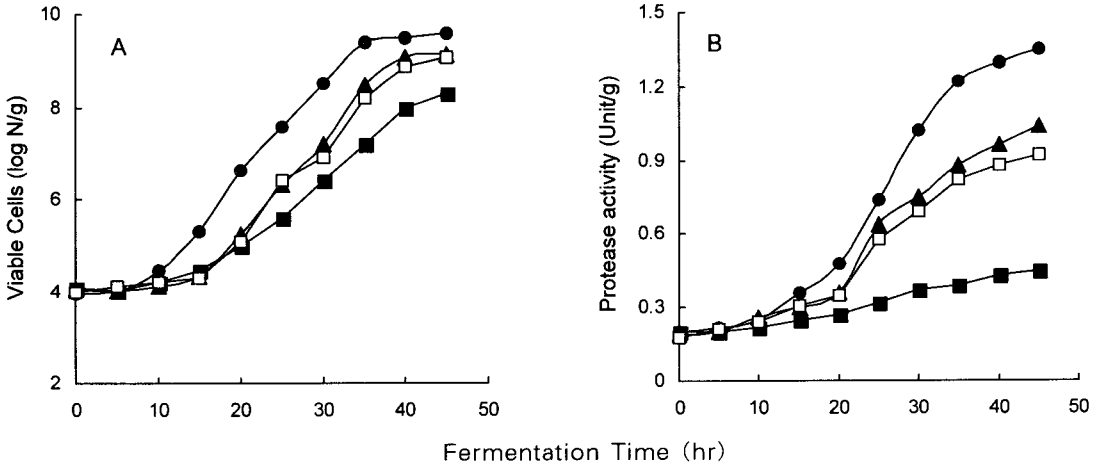

Fig. 1. Growth of *Bacillus* sp. cells (A) and changes of protease activity (B) during the *chungkookjang* fermentation (45 hr). Inoculated microbes are, ●: *B. subtilis*, ▲: *B. natto*, ■: *B. licheniformis*, □: *B. natto* and *B. licheniformis*.

*B. natto*와 *B. licheniformis*를 1:1로 혼합하여 starter로 접종한 청국장의 증식개시 시간은 *B. licheniformis*와 비슷한 15시간째였으나 최대 증식밀도는 *B. natto*와 유사하여 발효 40시간 이후에 10^9 CFU/g의 수준에 도달하였다. 전체적으로 보아, 본 실험조건에서 청국장 발효미생물의 증식 개시시간은 10~15시간대였으며 *B. subtilis*의 증식밀도가 가장 높았고 *B. licheniformis*의 증식밀도가 가장 낮았다.

단백질 분해 효소활성의 변화

Protease는 대두의 단백질을 분해하여 청국장의 맛을 형성하는데 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로(23,24) 단백질 분해효소 활성은 청국장의 품질에 매우 중요하다. 청국장의 protease 활성은 발효 5~10시간 이후부터 증가하기 시작하여 35~40시간 이후에는 거의 최대활성에 도달하였으나 각 시험구의 protease의 활성은 starter에 따라 상당한 차이를 나타내었다(Fig. 1-B). 발효 45시간 이후 각 시험구의 중성 protease 활성은 *B. subtilis*를 starter로 한 청국장이 1.35 unit/g으로 가장 높았으며 *B. natto*는 1.04 unit/g이었다. 이에 비하여 *B. licheniformis*를 starter로 한 청국장은 0.45 unit/g의 protease 활성을 나타내어 *B. subtilis*나 *B. natto*에 비하여 현저히 낮았다. 그러나 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 시험구는 0.92 unit/g의 효소활성을 보였다. 이러한 결과는 *Bacillus*를 이용한 콩알메주의 제조과정에서 각 균주의 protease 활성을 비교한 Kim 등(12)의 보고와 유사한 것이었다.

질소성분의 변화

청국장 발효 중의 질소성분 변화로 아미노산성질소(NH_2-nitrogen)와 암모니아성질소(NH_3-nitrogen)의 함량을 측정하였다(Fig. 2). 아미노산성질소는 protease의 작용에 의하여 단백질이 아미노산의 형태로 분해되는 정도를 나타낸 것으로 장류 발효의 품질지표로 사용되고 있으며 현재 우리나라 식품공전의 규격에는 청국장의 아미노산성 질소함량을 280 mg% 이상으로 규정되어 있다. 암모니아성질소는 단백질 분해과정에서 deamination에 의하여 생성되며 암모니아성질소가 식품 내에 과량으로 축적되면 부패취로 작용하므로(10) 일반적으로 장류 제품의 변패 또는 이상발효의 지표로 사용된다. 본 연구에서 청국장의 아미노산성질소 함량은 발효 15~20시간 이후부터 증가하여 45시간 이후에는 *B. subtilis*와 *B. natto*를 접종한 시료에서 각각 422 mg%, 356 mg%의 함량을 나타내었으며 *B. licheniformis*를 접종한 시료는 264 mg%에 그쳐 식품공전의 규격인 280 mg%에 미치지 못하였다(Fig. 2-A). 그러나 *B. natto*와 *B. licheniformis*를 혼합하여 접종한 청국장은 340 mg%의 아미노산성 질소 함량을 나타내어 *B. natto*만을 접종한 경우와 비슷한 수준에 도달하였다. 이러한 아미노산성질소의 변화는 본 연구의 protease 활성 변화(Fig. 1-B)와 유사한 경향이었는데 이는 기존의 보고(12,17,20,23-25)들과 마찬가지로 아미노산성 질소 함량이 단백질분해 효소의 활성에 의하여 결정된다는 것을 확인시켜준 것이라 할 수 있다. 암모니아성 질소는 아미노산성 질소보다는 10시간 정도 늦은 발효 25~30시간 이후부터 점차 증가하여 45시간 이후에는 *B. subtilis*를 접종한 시료에서 0.28%, *B. natto*를 접종한 시료에서는 0.17%, *B. licheniformis*를 접종한 시료는 0.12%에 도달하였으며 *B. natto*와 *B. licheniformis*를 혼합하여 접종한 청국장은 0.14%의 암모니아성 질소 함량을 나타내었다(Fig. 2-B). 따라서 아미노산성질소는 발효초기부터 단백질 분해효소작용에 의하여 생성이 시작되나 암모니아성 질소는 발효 중기 이후에 단백질의 부패작용에 의하여 생성됨을 확인할 수 있었다.

휘발성 향기성분의 변화

발효 균주를 달리하여 제조된 청국장으로부터 총 58종의 향기성분이 검출되었다(Table 2). 검출된 향기성분의 화학적 구성은 ketones 9종, alcohols 11종, aldehyde 6종, heterocyclic compounds 4종, ester 6종, acids 4종, hydrocarbons 4종, 기타 14종이었으며 균주별로는 *B. subtilis*에서 25종, *B. natto*

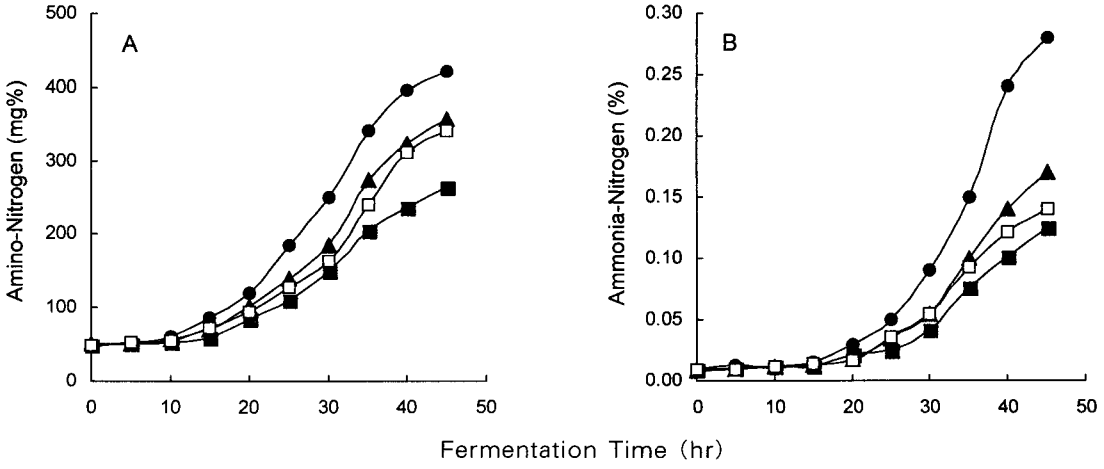

Fig. 2. Changes of the soluble NH_2-nitrogen (A) and NH_3-nitrogen (B) during the *chungkookjang* fermentation (45 hr). Inoculated microbes are, ●: *B. subtilis*, ▲: *B. natto*, ■: *B. licheniformis*, □: *B. natto* and *B. licheniformis*.

Table 2. Compositions of volatile flavor components in different *Bacillus* strain inoculated *chungkookjang* after 45 hour fermentation (unit: peak area%)

Volatile compounds	R.T. (min)	BS	BN	BL	BN+BL
Ketones					
2-butanone	5.71	4.29		1.04	0.31
2-pentanone	7.54	6.22	0.31		0.20
3-methyl-2-butanone	7.94			3.85	2.74
2,3-butanedione	8.13			8.42	4.50
3-methyl-2-pentanone	9.81		0.26		0.31
2-octanone	20.23		0.09		0.21
3-hydroxy-3-methyl-2-butanone	24.36			0.11	
3-hydroxy-2-butanone	26.39			3.28	1.48
2-nonanone	29.20	0.62			
Alcohols					
2-ethenyloxy-ethanol	6.36	0.75		1.60	0.38
2-propanol	6.68		1.48		0.87
ethanol	6.73	1.13	41.76	22.65	31.29
2-propoxy ethanol	8.29			1.33	
1-propanol	10.82		17.32		11.24
2-butanol	13.91			5.43	1.63
3-methyl-1-butanol	22.09	1.42	1.57	0.72	1.12
3-methyl-3-pentanol	25.99			1.82	0.52
1-hexanol	27.93	0.69	0.39		
cyclohexanol	29.89	0.55			
1-hexen-3-ol	31.04			0.58	0.19
Heterocyclic compounds					
2,5-dimethyl pyrazine	27.61	1.64	0.50	0.15	0.22
trimethyl pyrazine	30.47	3.42	2.18	1.16	2.14
tetramethyl pyrazine	32.65	3.59	4.19	2.29	2.69
dihydro-2(3H)-furanone	39.20	0.82			
Esters					
propanoic acid, ethyl ester	7.48		0.12		
acetic acid, ethenyl ester	8.57		1.40		0.88
2-methyl butanoic acid, ethyl ester	11.20	0.17	0.29		0.34
3-methyl butanoic acid, ethyl ester	12.25		0.27		0.42
2-methyl butenoic acid, ethyl ester	22.95		0.76		0.55
formic acid, hexyl ester	27.88			0.38	0.20
Aldehydes					
3-methyl-butanal	5.76	28.56		0.08	
pentanal	6.45		1.27		0.45
heptanal	21.98	0.66	0.15		0.12
2-hexanal	22.38			0.19	0.06
benzaldehyde	34.40	1.54	0.19	0.32	0.56
5-methyl-2-furancarboxyaldehyde	36.19	0.75			
Hydrocarbones					
3-ethoxy-1-propene	5.67	8.27			
2-ethoxy-propane	6.73		0.90		0.96
ethoxy-ethene	9.25			0.05	
1-methoxy-2-methyl-propane	26.60	2.17	0.82		1.21
Acids					
cyano-acetic acid	9.58		0.03		0.14
ethanedioic acid	28.95			0.22	1.06
acetic acid	31.83	11.55	4.41	2.22	4.65
propanoic acid	34.33	0.41			
Others					
2-methyl-benzo quinoline	8.87		1.01		0.87
dimethyl-disulfide	11.80	1.50	0.89		1.39
pentadecylamine	15.23			0.24	0.14
1-octanamine	15.34	0.08		0.51	0.11
pentamethyldisilane	21.29			1.28	1.42
(1-phenylethyl)trimethyl-silane	21.42		1.64		
trimethyloxazole	21.97		1.58	3.75	3.56
styrene	23.57			0.19	
N-(1-methylheptyl)-2-octanamine	29.28		0.10		
1H-pyrrole	33.60	0.74			
ammonium oxalate	33.77		0.64		0.22
dimethylamine	33.82	0.62			
butanamide	33.87		0.32		0.35
1-(trimethyl)-1H-indole-3-acetonitrile	33.95			0.17	0.10

BS: *Bacillus subtilis*. BN: *Bacillus natto*. BL: *Bacillus licheniformis*.

에서 30종, *B. licheniformis*에서 28종의 향기성분이 검출되었고 *B. natto*와 *B. licheniformis*를 혼합하여 접종한 청국장에서는 41종의 향기성분이 검출되었다. 확인된 향기성분 중 세 가지 균주 모두에서 검출된 성분은 ethanol, 3-methyl-1-butanol, bezaldehyde, 2,5-dimethyl pyrazine, trimethyl pyrazine, tetramethyl pyrazine, acetic acid의 7종이었으며 두 가지 균주에서 공통적으로 검출된 성분은 8종이었다. 따라서 본 실험에서 확인된 두 가지 이상의 시험구에서 공통적으로 검출된 성분은 15종이었으며 43종의 향기성분은 각 미생물만의 독특한 향기성분인 것으로 조사되어 접종 균주에 따라 청국장의 향기성분 조성이 크게 달라짐을 알 수 있었다. 한편, Kim 등(12)이 청국장과 natto의 주요 향기성분으로 보고한 benzaldehyde와 pyrazine류 화합물은 네 가지 시료에서 모두 검출되었으나 그 조성비는 상당한 차이가 있어 *B. subtilis* 접종 시료에서는 이들 향기 성분의 합이 10% 내외인 반면, *B. natto*를 접종한 청국장에서는 7% 내외, *B. licheniformis*를 접종한 청국장에서는 4% 내외의 함량을 나타내었고 *B. natto*와 *B. licheniformis*를 혼합하여 접종한 청국장에서는 약 5%의 분포를 나타내었다. Choi 등(11)의 보고에서는 전체 향기성분 중 pyrazine류가 30% 정도였고 Kim 등(12)도 평균 15% 정도였으나 본 연구에서는 pyrazine류의 합이 10% 이하의 분포를 보여 본 연구의 모델 시스템, 특히 *B. licheniformis*의 사용이 청국장의 불쾌취를 줄여주는데 효과가 있을 것으로 기대되었다.

유기산의 변화

본 실험에서 제조한 청국장의 유기산 함량을 Table 3에 나타내었다. 분석된 유기산의 총량은 *B. subtilis*를 접종한 청국장에서 3.98%로 가장 높았고 *B. natto*는 2.24%, *B. licheniformis*는 1.53%이었으며 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 시험구에서는 1.67%의 함량을 보였다. 각 시험구별로는 *B. subtilis*를 접종한 청국장에서는 acetic acid와 lactic acid의 함량이 특이적으로 높았으며 *B. natto*에서는 citric acid와 succinic acid가, *B. licheniformis*에서는 malic acid가 상대적으로 높은 함량을 나타내었고 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 시험구는 각각의 균주를 단독으로 접종한 청국장의 유기산 성분의 평균치에 가까운 함량을 나타내었다. 한편, 본 실험에서 검출된 유기산의 총 함량과 분포는 Itohiki Natto (14)보다는 평균 3배정도 높았으며 콩알메주의 제조과정에서 유기산을 검출한 Kim 등(12)의 보고와는 비슷한 양상이었다.

Table 3. Compositions of acids in different *Bacillus* strain inoculated *chungkookjang* after 45 hour fermentation

(unit: %)

Acids	Inoculated strains[1)]			
	BS	BN	BL	BN+BL
Tartaric acid	0.73	0.51	0.25	0.38
Malic acid	0.42	0.31	0.69	0.34
Acetic acid	1.37	0.53	0.11	0.42
Lactic acid	1.02	0.12	0.23	0.16
Citric acid	0.15	0.34	0.07	0.13
Succinic acid	0.29	0.43	0.18	0.24
Total	3.98	2.24	1.53	1.67

[1)]BS: *Bacillus subtilis*, BN: *Bacillus natto*, BL: *Bacillus licheniformis*.

Table 4. Sensory evaluations of different *Bacillus* strain inoculated *chungkookjang* after 45 hour fermentation

Sample[1)]	Test			
	Color	Flavor	Taste	Overall acceptance
BS	3.45	2.20[c2)]	3.20[b]	2.65[c]
BN	3.65	3.05[b]	3.45[ab]	3.40[b]
BL	3.70	3.25[ab]	3.25[b]	3.30[b]
BN+BL	3.80	3.45[a]	3.70[a]	3.75[a]

[1)]BS: *Bacillus subtilis*, BN: *Bacillus natto*, BL: *Bacillus licheniformis*.
[2)]Superscript letters indicate significant at $p<0.05$ by Duncan's multiple comparison.

관능평가

본 실험에서 제조된 청국장의 관능평가 결과를 Table 4에 정리하였다. 청국장의 색상은 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 시료의 선호도가 높았고 *B. subtilis*를 starter로 한 시료의 선호도가 낮았으나 각 시료간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 향기의 선호도 평가결과, *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 시료가 가장 높은 평점을 받았으며 각 시료간의 유의적인 차이가 인정되었다. 맛에 있어서도 역시 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 시료가 가장 높은 평점을 받았으며 *B. natto* > *B. licheniformis* > *B. subtilis* 순의 선호도를 보였다. 종합적으로 보아 색, 향, 맛 그리고 전체적인 선호도의 모든 항목에서 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 시료가 가장 높은 평점을 받았고 *B. subtilis*를 starter로 한 시료의 선호도가 가장 낮았다. 따라서 청국장의 제조에 *B. licheniformis*와 *B. natto*를 혼합하여 starter로 사용하는 공정이 관능개선의 측면에서 효과적일 것으로 평가되었다.

요 약

청국장의 산업적인 대량생산 system에 *B. subtilis*, *B. natto*, *B. licheniformis* 그리고 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 균주를 starter로 하여 45시간 동안 청국장을 발효시키면서 각 시험제품의 미생물 생장, 일반성분, 효소활성, 향기성분 등을 분석하고 관능을 평가하였다. 청국장의 수분은 점질물의 형성이 많은 *B. subtilis*와 *B. natto* 시험구에서 다소 높았으며 pH는 *B. licheniformis*에서 8.68로 가장 높았고 *B. subtilis*에서 8.13으로 가장 낮았다. 미생물의 생장정도는 *B. subtilis*가 10^9 CFU/g까지, *B. licheniformis*는 10^8 CFU/g까지 생장하였으며 단백질분해효소의 활성은 *B. subtilis*에서 1.35 unit/g으로 가장 높았고 *B. licheniformis*에서 0.45 unit/g으

로 가장 낮았다. 아미노태질소와 암모니아태 질소의 함량은 미생물의 생장률 및 단백질분해 효소의 활성에 비례하여 *B. subtilis* > *B. natto* > *B. licheniformis*의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 한편, *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합균주를 starter로 하여 제조한 청국장의 일반 품질은 *B. natto*와 *B. licheniformis*를 단독 접종한 제품의 평균치에 해당하는 특성을 보였다. 검출된 향기성분의 화학적 구성은 ketones 9종, alcohols 11종, aldehyde 6종, heterocyclic compounds 4종, ester 6종, acids 4종, hydrocarbons 4종, 기타 14종이었으며 균주별로는 *B. subtilis*에서 25종, *B. natto*에서 30종, *B. licheniformis*에서 28종, *B. natto*와 *B. licheniformis*를 혼합하여 접종한 청국장에서는 41종의 향기성분이 검출되었다. 유기산의 총량은 *B. subtilis*를 접종한 청국장에서 3.98%로 가장 높았고 *B. natto*는 2.24%, *B. licheniformis*는 1.53%이었으며 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 시험구에서는 1.67%의 함량을 보였다. 분석된 향기성분과 유기산은 starter로 접종된 *Bacillus*의 종류에 따라 각각 특징적인 조성을 나타내었다. 관능평가 결과 색, 향, 맛 그리고 전체적인 선호도의 모든 항목에서 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 시료가 가장 높은 선호도를 보였고 *B. subtilis*를 starter로 한 시료의 선호도가 가장 낮았다.

문 헌

1. Lee HC. 1999. *Fermentation food.* Sinkwang Press Co, Seoul. p 105-117.
2. Kim WK, Choi KH, Kim YT, Park HH, Choi JY, Lee YS, Oh HI, Kwon IB, Lee SY. 1996. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strains CK 11-4 screened from *chungkookjang*. *Appl Environ Microbiol* 62: 2482-2488.
3. Lee BK. 1999. Immunomodulation materials of fermented soybean products. Lecture 3 presented at 2nd Symposium for Soybean Fermentation Foods, The Research Institute of Soybean Fermentation Foods, Yeungnam Univ, Korea.
4. Cheigh HS, Lee JS, Lee CY. 1993. Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 570-575.
5. Shon MY, Seo KI, Lee SW, Choi SH, Sung NJ. 2000. Biological activities of *Chungkookjang* prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 32: 936-941.
6. Kim KJ, Ryu MK, Kim SS. *Chungkookjang koji* fermentation with rice straw. *Korean J Food Sci Technol* 14: 301-308.
7. Ahn BS. 2000. Studies on the volatile compounds in *chungkookjang* irradiated with high-dose gamma irradiation. *Ph D Thesis.* Korea University of Seoul, Korea.
8. Lee OS, Hong DK, Koo MS, Shin DB, Chung KS. 1994. Changes in the quality characteristics of freeze-dried *chungkookjang* soup. *Korean J Food Sci Technol* 26: 250-254.
9. Choe JS, Kim JS, Yoo SM, Park HJ, Kim TY, Chang CM, Shin SY. 1996. Survey on preparation method and consumer response of *chungkukjang*. *Kor J Soybean Research* 13: 29-43.
10. Allagheny N, Obanu ZA, Campbell-Platt G, Owens JD. 1996. Control of ammonia formation during *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. *Int J Food Microbiol* 29: 321-333.
11. Choi SH, Ji YA. 1989. Changes in flavor of *chungkookjang* during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 21: 229-234.
12. Kim DH, Lim DW, Bai S, Chun SB. 1997. Fermentation characteristics of whole soybean *meju* model system inoculated four *Bacillus* strains. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1006-1015.
13. Larroche C, Besson I, Gros JB. 1999. High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochem* 34: 667-674.
14. Joo HK. 1971. Studies on the manufacturing of *chungkookjang*. *Korean J Food Sci Technol* 1: 64-67.
15. Lee BY, Kim DM, Kim KH. 1991. Studies on the change in rheological properties of *chungkookjang*. *Korean J Food Sci Technol* 23: 478-484.
16. Rhee SH, Kim SK, Cheigh HS. 1983. Studies on the lipids on the Korean soybean fermentation foods: Ⅰ. Changes of lipids composition during *chungkookjang* fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 15: 399-403.
17. Suh JS, Lee SG, Ryu MK. 1982. Effect of *Bacillus* strains on the *chungkookjang* processing, Ⅱ. Changes of the components and enzyme activities during the storage of *chungkookjang*. *Korean J Food Sci Technol* 14: 309-314.
18. Suh JS, Ryu MK, Hur YH. 1983. Effect of *Bacillus* strains on the *chungkookjang* processing, Ⅲ. Changes of the free amino acid contents and nitrogen compounds during *chungkookjang koji* preparation. *Korean J Food Sci Technol* 15: 385-391.
19. Lee BY, Kim DM, Kim KH. 1991. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *chungkookjang*. *Korean J Food Sci Technol* 23: 599-604.
20. Seok YR, Kim YH, Woo HS, Kim TW, Lee SH, Choi C. 1994. Change of protein and amino acid composition during *chungkookjang* fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. *J Korean Agric Chem Soc* 37: 65-73.
21. AOAC. 1990. *Official method of analysis.* 15th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC.
22. SAS Institute Inc. 1985. *SAS user's guide.* 5th ed. Statistical analysis system institute, Cary, NC, USA.
23. Lee HJ, Suh JS. 1981. Effect of *Bacillus* strains on the *chungkookjang* processing (1). Changes of the components and enzyme activities during *chungkookjang koji* preparation. *Korean J Nutr* 14: 97-104.
24. Lee KH, Lee HJ, Chung MK. 1971. Studies on *chungkookjang* (Part 1). On the changes of soybean protein in manufacturing *chungkookjang*. *J Korean Agric Chem Soc* 14: 191-200.
25. Sung NJ, Ji YA, Chung SY. 1984. Changes in nitrogenous compounds of soybean during *chungkookjang koji* fermentation. *J Korean Soc Food Nutr* 13: 275-284.

(2002년 1월 4일 접수; 2002년 3월 7일 채택)