

혈전용해효소함유 기능성 청국장제조에 관한 연구

김익조 · 김형갑¹ · 정종화² · 정영기³ · 류충호*

경상대학교 응용생명과학부
¹진주산업대학교 환경공학과
²경남보건환경연구원 동의대학교 미생물학과

Study of Functional *Chungkukjang* contain Fibrinolytic Enzyme

Ig-Jo Kim, Hyoung-Kab Kim¹, Jong-Hwa Chung², Young-Kee Jeong³ and Chung-Ho Ryu*

Division of Life Science, Gyeongsang National University.
¹Dept. of Environmental Engineering, Jinju National University.
²Gyeongsangnam-do Provincial Government Public Health and Environmental Research Institute
³Dept. of Microbiology, Dong-Eui University

Abstract

A bacterial strain showing the fibrinolytic activity was screened from korean traditional soybean products. For the identification, the strain was investigated morphology and biochemical characteristics and it was classified to *Bacillus subtilis*. The strain had high fibrinolytic activity in *Chungkukjang*. The optimum fermentation condition of temperature and time were 37°C and 24hour. The pH in *Chungkukjang* was gradually alkalized during fermentation. The fibrinolytic enzyme in *Chungkukjang* was stable at heat treatment; After heating at 60°C and 80°C for 30 min, the fibrinolytic activity remained 75% and 40%, respectively.

Key words – Fibrinolytic enzyme, *Chungkukjang*, *Bacillus subtilis*

서 론

전분질을 주식으로 섭취해왔던 극동 아시아에서는 단백질 함량이 높은 콩을 발효시킨 된장, 간장, 쌈장, 청국장 등을 부식으로 이용하여 부족한 영양가를 보충하였다. 특히 청국장 제조기간이 짧고, 독특한 맛, 향과 빛깔을 띠고 있으며 각종 유기산 및 비타민 함량이 높아 영양학적 가치가 높은 식품으로 알려져 있다. 최근 고혈압, 뇌출혈 등의 원인이

되는 혈전을 분해하는 효소를 생산하는 *Bacillus* 속 균을 사용하여 발효시킨 청국장이 성인병을 예방기능이 있는 건강식으로 인기가 높아지고 있다. 급진적 서구화로 인해 식물성 식품의 소비는 줄어들고 요리하기 간단한 가공식품이나 육류의 소비가 증가함으로써 비만, 당뇨병, 고혈압 등 각종 성인병의 발생이 증가하고 있다. 이러한 현상은 급진적인 식생활 패턴 변화에 의해 발생하는 현상으로 사료된다. 채식문화권에 속하는 동양인들은 예로부터 쌀, 콩, 옥수수 등 식물성원료를 발효시켜 술, 식초, 장류를 제조하여 섭취해왔다. 특히 콩이나 식물성 발효식품을 많이 섭취하는 지역의 사람들이 육류를 주식으로 하는 사람들보다 수명이 길다

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 055-751-5482, Fax : 055-753-4630
E-mail : ryu@nongae.gsnu.ac.kr

는 것은 잘 알려진 사실이다. 40대 이상의 연령층이면 대부분 성인병을 예방하여 건강하게 살고 싶어 육류보다 생선이나 신선한 야채 섭취를 선호하고 한다. 따라서 성인병예방 기능성 식품으로 알려진 청국장에 관한 관심이 증가하고 있다. 청국장 관련보고는 균주에 따른 성분변화[19,20], 아미노산[20], 전통청국장의 이화학적 특성 연구[8,10], 유기산[8], 단백질[17], 이소플라본[16], 유지성분[13], 점질물[12], 색소 생성균을 이용한 항균활성[17,18] 등이 있다. 종래의 청국장은 자연계의 여러 균주들이 발효에 관여함으로써 심한 암모니아취가 발생하므로 젊은 세대의 기호에 맞지 않아 식탁에서 인기 있는 식품이라고 할 수 없는 실정이다. 여러 연구자들에 의해 각종 첨가물, 발효균주의 선발 등 다각적인 방법으로 냄새가 없는 청국장을 개발하고 있으나 효과적인 보고는 없었다. 청국장에서 혈전용해효소생성 균주 분리[5,7,11]와 효소정제[5,6,21]에 관한 논문이 다수 발표되었으나 청국장을 직접 제조, 저장, 숙성 중의 기능성물질인 혈전용해효소에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 암모니아취가 거의 나지 않으면서 기능성 물질인 혈전용해효소가 다른 청국장에 비하여 많이 포함된 청국장을 제조하고자 본 연구실에서 기능성 청국장 균주를 분리하고 분리된 균주를 이용한 기능성 청국장의 발효조건 및 식염첨가의 영향에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

원료대두

경남 남해군 서면 농협에서 2001년 가을 수확한 백태를 구입 사용하였다.

균주의 분리 및 동정

서부경남 일대의 재래시장에서 유통되는 청국장과 장류 공장에서 분리한 균주 중 혈전용해능이 있는 균주를 분리하였다. 분리한 균주로 청국장을 제조하여 청국장의 냄새와 맛, 색택, 점질물 생성량, 암모니아취가 등을 조사하였다. 특히 혈전용해효소를 많이 생산(Fig. 1)하는 기능성 청국장제조에 적합한 균주를 선택하였다. 분리된 균주의 생화학적 특성을 Bergey's의 방법[2]에 준하여 동정하였다. 형태학적 특성은 gram 염색법으로 염색 후 현미경으로 검정하였으며, 운동성과 아포형성 유무를 확인하였다.

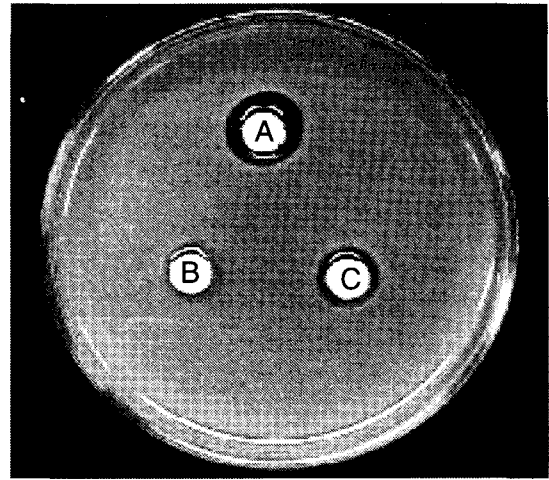


Fig. 1. Fibrinolytic activity of fermented *Chungkukjang*.
A; *Bacillus subtilis* GSK3580, B; *Bacillus subtilis* GSK2457,
C; Commercial *Chungkukjang*.

청국장제조 및 발효조건

분리균주를 TSA (Trypticase Soy Agar, Difco, France)에 계대 후 TSB (Trypticase Soy Broth, Difco, France)에 37°C, 24시간, 진탕 배양한 것을 종균으로 이용하였다. 남해산 대두를 정선하여 이물을 제거하고 3회 세척 후 실온에서 12시간 침치 하였다. 물빼기는 1시간 실시하여 과잉의 수분을 제거하였다. 121°C에서 50분간 증자 한 후 45°C까지 방냉하여 전배양한 종균을 원료 g당 10⁶되게 접종하여 통기 가능한 용기에 넣어 발효시켰다. 최적 발효온도와 시간을 검토하기 위해 선발된 종균을 접종한 증자 대두를 25에서 50°C까지 범위의 여러 온도별 항온기에서 발효 72시간까지 6시간마다 시료를 채취하였다. 각 발효조건별로 제조한 청국장의 pH는 시간별로 채취한 시료를 동량의 증류수에 현탁하여 pH meter(ORION 420A, USA)로 측정하였다. 청국장 발효 중 균수변화는 직접도말법으로 측정하였다. 즉, 각 시간별 시료 10g을 멸균증류수 90ml에 넣고 30분간 교반하여 시험액으로 사용하였다. 시험액을 10배씩 희석하여 NA (Nutrient Agar, Difco, France)에 도말하여 37°C에서 12시간배양 후 생성된 colony를 계수하였다.

혈전용해효소활성 측정 및 그 안정성

혈전용해효소의 활성은 fibrin plate 법[1]을 변형하여 lysed zone으로 측정하였다. fibrin plate는 0.06% fibrinogen (Sigma, USA)을 0.01M PBS buffer (pH 7.25)에 용해시킨 후

샤레에 10ml를 분주하고 thrombin (Mochida, Japan) 20unit를 가하여 균일한 두께의fibrin clot을 형성시킨 후 실온에서 30분방치 후 혈전용해효소 활성 측정에 사용하였다. 시료 중의 혈전용해효소를 0.01M PBS buffer에 용출시킨 후 여과(Whatman No. 2)하여 여액을 조효소로 사용하였다. 활성 측정은 조효소액 20 μ l를 paper disc (ϕ 8mm, Toyo Roshi, Japan)에 흡수시킨 후 제조한 fibrin plate 올려 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 반응 후 생성된 투명한 부위의 직경을 측정하였다. 혈전용해효소의 열안정성을 조사하기위해 제조한 청국장을 증류수 현탁(1:1, w/v)하여 30 $^{\circ}$ C에서 80 $^{\circ}$ C범위의 항온수조에서 30분간 중탕처리 후 잔존하는 혈전용해활성을 측정하여 열안정성을 확인하였다. 또 청국장 중의 혈전용해효소활성에 식염의 영향을 조사하기 위해 발효가 끝난 청국장을 멸균식염수(2%~20%)에 용출(1:4, w/v)하여 혈전용해활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

재래시장 및 상점에서 구입한 청국장에서 분리한 124균주, 장류공장에서 분리한 59균주를 TSB (Trypticase Soy Broth, Difco, France)에서 40 $^{\circ}$ C, 48시간 진탕배양한 결과 각각 42균주, 28균주가 혈전용해효소생산 균주로 확인되었다. 이들 균주의 혈전용해활성은 50 unit/ml이하가 138균주, 51~100 unit/ml가 29균주, 100 unit/ml이상이 16균주로 나타났다. 혈전용해효소 역가 100 unit/ml이상인 균주로 청국장을 제조하여 암모니아취 및 이취를 거의 생성하지 않는 3균주를 획득하였고 혈전용해효소생산량과 이취생성, 점질물, 설탕 등이 가장 우수한GSK3580균주를 선택하였다. 기능성 청국장제조에 적합한 균주의 형태학적, 생화학적 특성 등을 Table 1에 나타내었다. 분리된 균은 호기성, 간균으로 gram 양성이며 아포를 형성하는 것으로 밝혀졌다. 탄소원으로 glucose, fructose, mannitol, arabinose, cellulose 등을 이용하여 산을 생성하였으며 rhamnase와 lactose는 이용하지 못하였다. Casein과 gelatin을 이용하여 빠른 생육을 보였으며 catalase, oxidase는 양성 urease는 음성이었고 tryptophane을 이용해 indol생성능이 없었다(Table 1). 이상의 특성을 근거로 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며 최종적으로 *Bacillus subtilis* GSK3580로 명명하였다.

Table 1. Morphological, physiological and biochemical characteristics of isolated *Bacillus subtilis* GSK3580

1. Morphological characteristics	
Form	: rod
Mobility	: +
Gram stain	: +
Spores	: +
2. Cultural characteristics	
Growth pH	: 6.0~8.5
Growth temperature	: 20~55 $^{\circ}$ C
Aerobic growth	: +
Growth NaCl	: 0~12%
3. Physiological characteristics	
Starch	: +(slowly)
Casein	: +(quickly)
Gelatin	: +(quickly)
Pectin	: +(slowly)
Pullulan	: -
Catalase	: +
Oxidase	: +
Citrate	: +
Nitrate reduction	: -
Urease	: +
Acetoin	: +
Indol	: -
Lysine decarboxylase	: +
Arginine decarboxylase	: +
Ornithine decarboxylase	: +
H ₂ S	: -
4. Carbon Utilization	
Glucose	: +
Cellobiose	: +
Fructose	: +
Lactose	: -
Salicin	: +
Inositol	: -
Sorbitol	: +
Sucrose	: +
Melibiose	: -
Amygdalin	: +
Xylose	: -
Arabinose	: +
Rhamnase	: -
Mannitol	: -

최적온도

증자시킨 콩에 분리균주인 *B. subtilis* GSK3580를 접종하여 25~50℃범위에 10개 구로 나누어 청국장을 제조하였다. 본 연구에서 청국장의 품질은 기본적인 청국장의 물성 외에 기능성물질인 혈전용해효소의 생산량이 중점이 된다. 각각의 온도에서 제조한 청국장의 혈전용해효소 활성을 측정할 결과 37℃에서 가장 높았다(Fig. 2). 40℃ 이상에서도 효소 활성은 나타났으나 37℃보다 상대적으로 낮았고, 암모니아취의 형성속도가 빠른 것으로 나타났다. 청국장 제조 시 최적발효온도에 관한 보고로는 석 등[15]의 증자한 대두에 *B. licheniformis*를 접종하고 37℃에, 손 등[17]은 *Bacillus* sp.를 40℃에 발효시켰다. 김 등[9]의 볏짚을 이용한 청국장은 각각 40℃와 50℃ 발효 등이 있다. 길 등[7]은 35℃에서 발효시킨 청국장에서 혈전용해효소가 가장 많이 생산된다고 하였으나, 본 실험의 결과는 37℃에서 발효시킨 청국장에서 혈전용해효소활성이 더 높았다. 이는 발효 균주에 따른 차이로 사료된다. 또한 37℃에서 발효한 청국장에서 생성되는 효소와 당, 아미노산류의 생산[18]이 가장 적합하다는 보고가 있다.

최적발효시간

발효시간을 설정하기 위해 혈전용해효소 생산량과 암모니아취 형성 유무를 확인하였다. 혈전용해효소는 발효 6시간 이후부터 12시간까지 급격히 증가하여 24시간에 최대활성을 나타내었으나 24시간 이후에는 서서히 감소하였다(Fig. 3). 또 암모니아취는 발효 30시간이후부터 후각으로 느

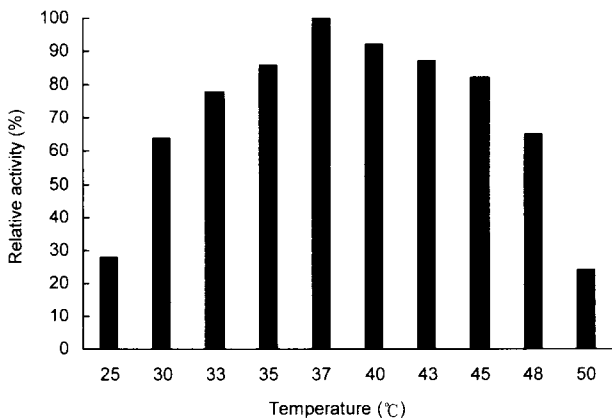


Fig. 2. Effect of fermentation temperature on fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* GSK3580.

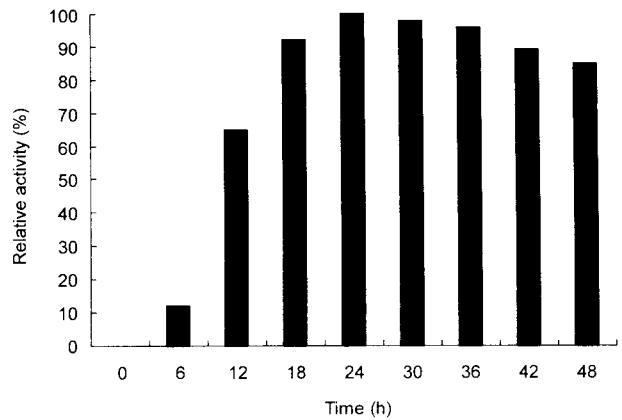


Fig. 3. Production of fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* GSK3580 during fermentation.

낄 수 있었으며 발효 48시간이후에는 자극적이어서 부패취로 인식될 만큼 증가하였다. 따라서 혈전용해효소의 활성이 가장 높고, 자극적인 암모니아취를 거의 형성하지 않으며, 집질물 생성량도 충분한 24시간을 최적 발효시간으로 설정하였다. 길 등[7]도 혈전용해효소생성에 관한 보고에서도 발효 24시간 후 활성이 최대라고 보고하였고, 김 등[8]은 *B. subtilis*를 42℃로 24시간 동안 발효시킨 청국장중의 glutamic acid와 phenylalanine이 가장 많다고 보고한 바 있다. 또 손 등[17]의 보고에 의하면 휘발성 유기산은 48시간에서 최대, 비휘발성 유기산은 24시간에서 최대라고 동일한 결과를 보고 한 바 있다.

pH의 변화

증자 직후 대두는 pH 6.3이었으나 발효 중 점차 증가하여 12시간에 pH 7.24, 24시간에는 pH 7.54, 48시간 발효 후에는 pH 7.81로 증가하여 약알칼리성화 되었다(Fig. 4). 청국장 발효과정 중의 pH 변화에 관한 연구는 김 등[9]의 전통 청국장 발효 시 초기 pH 6.46에서 발효 24시간에 pH 7.12로, 서 등[19]은 *B. subtilis*를 접종하여 40℃에서 72시간 발효 후 pH 8.26가 되었으며, 손 등[17]의 *Bacillus* sp. CS-17균주로 제조한 청국장은 초기 pH 6.8에서 96시간 후에는 pH가 8.9, 석 등[15]의 *B. licheniformis*균주를 이용한 경우도 초기 pH 6.23에서 24시간에는 pH 6.83, 60시간에서는 pH 8.39로 상승한다고 보고하였다. 본 실험에서 제조한 청국장의 발효 중 pH는 약간 상승하였는데, 이는 청국장 발효균인 *B. subtilis* GSK3580균에 의하여 콩 단백질이 분해되어 알칼리

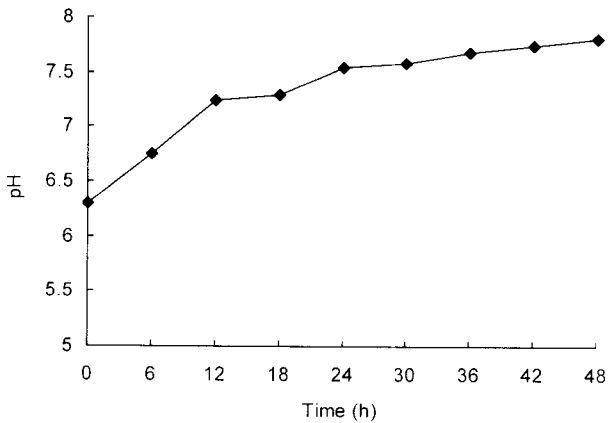


Fig. 4. pH of Chungkukjang by *Bacillus subtilis* GSK3580 during fermentation.

성화합물을 생성하기 때문으로 사료된다.

생균수의 변화

증자대두에 *B. subtilis* GSK3580을 10^6 CFU/g 접종한 후 생육정도를 관찰한 결과 2시간의 유도기를 거친 후 발효 6시간째에 거의 정상기에 도달하였다(Fig. 5). 정상기 균수가 발효 48시간까지 유지되다가 이후에 감소하였다. 균수가 증가할수록 혈전용해효소의 활성도 증가하여 12시간에 최고활성의 65%가 생산되었고, 24시간에는 최고 활성을 보였으나 24시간 이후에는 균수의 변화에 상관없이 활성은 감소하였다.

혈전용해효소의 안정성

일본의 납두와는 달리 한국의 청국장은 가열하여 섭취하

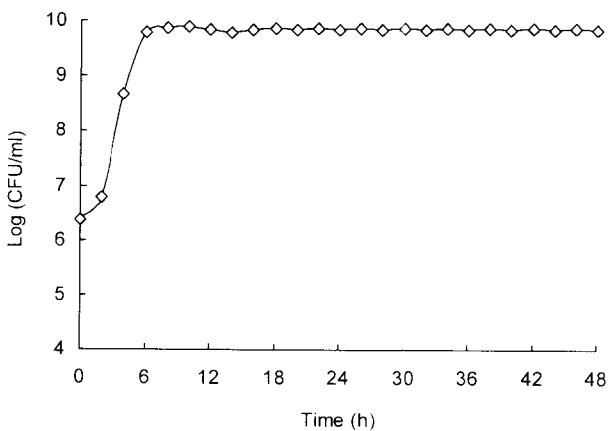


Fig. 5. Growth of *Bacillus subtilis* GSK3580 in during Chungkukjang fermentation.

는 식품이다. 따라서 본 실험에서 제조한 청국장을 증류수에 현탁하여 30분간 열처리하여 혈전용해효소의 열안정성을 조사 한 결과 30℃와 40℃ 처리구에서 대부분 활성이 유지되었으나, 60℃와 80℃에서는 각각 75%, 40%정도 잔존하여 열안정성이 비교적 높았다. 이 등[12]은 청국장을 제조하여 가열처리 하였을 때 100℃에서 5분, 30분간 가열 처리 후 혈전용해 효소의 역가는 각각 90%, 45%를 유지하였다고 보고한 바 본 실험의 결과와 유사하였다. 또한 청국장 관련 보고들에서 식염을 첨가한 후 연구결과나 혈전용해효소와 관련된 보고가 거의 없는 실정으로 발효시킨 청국장을 농도별 식염수에 용출 후 혈전용해효소의 활성을 측정하였다. 그 결과 식염의 농도가 2~20%까지 혈전용해효소의 활성은 거의 감소되지 않았다. 이로서 식염으로 조미한 청국장의 보존 및 섭취 시 식염에 의한 혈전용해효소의 저해는 일어나지 않을 것으로 사료된다.

요 약

전통 콩 발효식품으로부터 혈전용해능이 뛰어난 균주를 분리하였다. 이 균주의 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. 분리된 균주를 이용하여 혈전용해활성이 높은 청국장 제조를 위한 최적발효조건은 37℃에서 24시간이었다. 증자대두는 초기 pH 6.3에서 12, 24 및 48시간동안 발효시킨 각각의 pH는 6.31, 7.24, 7.81로 약 알칼리화 되었다. 본 혈전용해효소는 열안정성이 높아 60℃와 80℃에서 30분 처리하였을 때 혈전용해활성을 각각 75%와 40% 유지하였다.

참 고 문 헌

1. Astrup, T. and S. Müllertz. 1991. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351
2. Butler, J. P. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Vollume II, 1104-1133.
3. Choi, S. H. and Y. A. Ji. 1989. Changes in flavor of Chungkook-jang during fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **21**, 229-234
4. Choi U. K., W. D. Ji, and Y. G. Chung. 1998. Characteristics of Chunggugjang produced by *Bacillus subtilis*

- DC-2. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **27**, 846-851.
5. Heo, S., S. K. Lee and H. K. Joo. 1998. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean Traditional *Chungkookjang*. *Agri. Chem. and Biotech.* **41**, 119-124.
 6. Jang, S. A., M. H. Kim, M. S. Lee, T. K. Oh and C. B. Sohn. 2000. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. S19 from shrimp *Jeot-Gal*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 258-263.
 7. Kil, J. O., G. N. Kim and I. S. Park. 1998. Production and characterization of fibrinolytic enzyme : Optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 Isolated from *Chungkook-jang*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **27**, 51-56.
 8. Kim, J. S., J. S. Choe, H. J. Park, S. P. Hong and C. M. Chang. 1998. Physicochemical properties of traditional *Chonggugjang* produced in different regions. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 377-383.
 9. Kim, K. J., M. K. Ryu and, S. S. Kim. 1982. *Chungkook-jang* koji fermentation with rice straw. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **14**, 301-308.
 10. Kim, S. H., J. L. Yang and Y. S. Song. 1999. Physiological functions of *Chongkukjang*. *Food Industry and Nutrition.* **4**, 40-46.
 11. Kim, Y. T. W. K. Kim and H. I. Oh 1995. Screening and identification of the fibinolytic bacterial strain from *Chungkook-jang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1-5.
 12. Lee, B. Y., D. M. Kim and K. H. Kim. 1991. Physicochemical properties of viscous substance extracted from *Chungkookjang*. *Korean J. Food Sci. technol.* **23**, 599-604.
 13. Lee, S. H., S. K. kim and, H. S. Choi. 1983 Studies on the lipids composition during *Chungjooj-jang* fermentation I. Changes of lipids composition during *Chungkook-jang* fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **15**, 399-403.
 14. Lee. Y. L., S. H. Kim, N. H. Choung, and M. H. Yim. 1992. A study on the production of viscous substance during the *Chungkook-jang* fermentation. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**, 202-209.
 15. Seok, Y. R., Y. H. Kim, S. Kim, H. S. Woo, T. W. Kim, S. H. Lee and C. Choi. 1994. Change of protein and amino acid composition during *Chungkook-jang* fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. *Agri. Chem. Biotech.* **37**, 65-71.
 16. Shon, M. Y., K. I. Seo, S. K. Park, Y. S. Cho and N. J. Sung. 2001. Some biological activities and isoflavone content of *Chungkugjang* prepared with black beans and *Bacillus atrains*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **30**, 662-667.
 17. Son, D. H., O. J. Kwon, U. K. Choi and Y. G. Chung. 1998. Conditions for the pigment productoin by *Bacillus* sp. CS-17 and antibacterial activity of pigment concentrated extracts. *Agri. Chem. Biotech.* **41**, 213-218.
 18. Son, D. H., O. J. Kwon, W. D. Ji, U. K. Choi, O. J. Kwon, Y. Cho, J. Lee, W. S. Cha and Y. G. Chung. 2000. The quality changes of *Chunggugjang* prepared by *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 1-6
 19. Suh, J. S., S. K. Lee and M. K. Ryu. 1982. Effect of *Bacillus* strains on the *Chungkook-jang* processing II. Changes of the components and enzyme activities during the storage of *Chungkook-jang*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **14**, 309-314
 20. Suh. J. S., M. K. Ryu and Y. H. Hur. 1983. Effect of *Bacillus* strains on the *Chungkook-jang* processing III. Changes of the free amino acid contents and nitrogen compounds during *Chungkook-jang* koji preparation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **15**, 385-391.
 21. Yoo. C. K., W. S. Seo, C. S. Lee and S. M. Kang. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *Chung guk jang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 507-514

(Received May 24, 2002; Accepted June 20, 2002)