

Bacillus subtilis K-20에 의한 청국장의 향미성분 및 기능성식품에 관한 연구

김영숙* · 정혁준¹ · 박영숙 · 유대식¹
대구대학교 식품영양학과, ¹계명대학교 미생물학과

Characteristics of Flavor and Functionality of Bacillus subtilis K-20 Chunggukjang

Young-Sook Kim*, Hyuck-Jun Jung¹, Young-Sook Park and Tae-shick Yu¹

Department of Food and Nutrition, University of Taegu
¹Department of Microbiology, Keimyung University

Bacillus subtilis K-20 chunggukjang is widely used in making soy sauces and bean pastes which are Korean traditional fermented foods. *Bacillus subtilis* K-20 chunggukjang was cultured, and fermented at 40°C and 90% humidity for 96 hr after homogenizing with garlic, garlic and onion, and garlic, onion, and ginger. As a result, a product with pizza flavor and taste was obtained from *Bacillus subtilis* K-20. This product could be used as a functional food to promote immunity.

Key words: *Bacillus subtilis* K-20, chunggukjang, regular onion, flavor determination

서 론

식생활이 서구화로 진행되면서 성인병이 많이 발생되고 있으며, 순환기계통 질환의 사망요인이 증가되고 있다. 그중 뇌혈관 질환은 상처 발생시 생긴 fibrin이 뇌혈관 등에 분해되지 않고 축적되어 fibrin clots이 혈액순환을 차단함으로써 발생하는 질환이다⁽¹⁾. 최근 이들 질환의 예방 및 치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그의 일환으로 혈전의 생성을 억제하는 항혈전제의 개발과 생성된 혈전을 용해시키는 혈전용해제의 개발이 연구되고 있다. *Bacillus subtilis*가 증식하면 protease가 생성되며, 이 효소는 혈전용해능이 있어 심근경색, 뇌혈전 등을 예방하는 것으로 보고되었다⁽²⁾. 혈전용해제로는 urokinase, streptokinase가 보고되고 있으며^(3,4). 일본에서는 사용되는 *Bacillus natto*는 우리나라 장류의 제조에 사용되는 *Bacillus subtilis*와 유사한 균이다. Natto의 제조과정 중에 생성되는 단백질 분해효소 중에서 혈전의 주성분인 fibrin을 용해시키는 혈전용해효소 nattokinase(NK)가 효소의 특성과 납두의 임상적 효과⁽⁵⁾를 나타낸다. 청국장에 대한 효능은 면역기능강화 및 항산화 효과의 기능성도 우수한 것으로 보고되었다^(6,7).

재래식 청국장은 증자대두에 볶짚으로부터 균을 얻어서 발효되는 방법으로 제조된 청국장은 비위생적이고 재현성도 좋지 않으며, 또한 균일한 품질을 지닌 청국장을 제조할 수 없다. 그러므로 산업적으로 대량의 청국장을 생산하기 위해서는 위생적인 방법으로 우량 균주를 연구할 필요성이 있다. 청국장에 관한 연구는 청국장의 점질물⁽⁸⁾, 제조공법^(9,10), 생리활성의 특성⁽¹¹⁾, 향기성분의 검출⁽¹²⁾, 영양성분에 대한 변화^(13,14)은 많은 연구가 있었으나 청국장의 냄새 억제방법은 연구가 부족하다. 청국장은 우수한 식품이며 약용성이 보고되어 있지만, 특유의 냄새성분 때문에 기피하는 경우가 소비자의 약 50% 정도로 조사되었다⁽¹⁵⁾. 이러한 청국장의 이취는 *Bacillus*로부터 alkylpyrazine, 암모니아 화합물, 함sulfide 화합물로부터 생성된다^(12,16).

본 연구에서는 *Bacillus subtilis* K-20로부터 재료성분을 변화시켜서 강한 불쾌취를 억제시키는 것에 중점을 두었으며, 청국장에 열을 가하지 않고 섭취할 수 있는 기능성식품 및 나아가서 의약품의 기초자료에 연구 목적을 두었다.

재료 및 방법

사용균주 및 종균제조

시중 M-청국장 10 g을 증류수 90 mL에 용해하여 20분간 균질화를 거쳐 filtration한 후 4000 rpm에서 15분 원심분리하였다. 배양은 nutrient broth(Czappek-Dox Broth Difco, USA)를 사용하여 37°C에서 24 hr 배양하였다. 배양은 10⁸ cell/mL 되

*Corresponding author : Young-Sook Kim, Department of Food and Nutrition, University of Daegu, Kyungsan 712-701, Korea
Tel: 82-53-850-6830
Fax: 82-53-850-6839
E-mail: yskim@webmail.taegu.ac.kr

도록 1/10씩 연속 희석하여 고체배지(Czapek solution agar, Difco, USA)에 pour plating 한 후 37°C에서 48 hr 배양하였다. 생성된 colony를 4°C에 보관하면서, M-청국장으로부터 재료를 달리하여 *Bacillus subtilis* K-20을 분리배양 하였다. 배지 조성은 Bacto saccharose 30 g, sodium nitrate 3 g, dipotassium phosphate 1 g, magnesium sulfate 0.5 g, potassium chloride 0.5 g, ferrous sulfate 0.01 g을 사용하였다.

청국장 제조방법

원료대두는 2000년도 한국산 백태를 시중에서 구입하여 정선한 후 18시간 동안 침지하고 물기를 제거한 다음 121°C에서 50분간 가압살균하여 50°C 정도로 냉각시킨 후 *Bacillus subtilis* K-20 균주를 10^8 cell/mL 되도록 희석하여 대두량의 2% 중균을 접종^(14,17)하여 chopper를 사용하여 마늘, 양파, 생강, 고춧가루, 설탕, 소금 등의 재료를 균질화시켜 40°C, 습도 90%에서 96 hr까지 발효한 후 4°C에서 후숙시켰다.

미생물검사

청국장 10 g을 멸균 증류수 90 mL에 용해하여 20분간 교반하였다. 균주 생성을 위하여 1/10씩 희석하여 petri dish (Czapek solution agar, Difco, USA)에 접종하였다. 균주가 접종된 petri dish를 40°C에서 96 hr 배양하여, 생성된 생균수를 측정하였다.

관능검사

관능 평가원은 대구대학교 식품영양학과 4학년 학생들을 훈련하여 8구름으로 나누어 41명이 관능검사에 응하였다. 시중 M청국장과 대조균을 기준으로 향기, 맛, 색, 기호성을 평가하였다. 41명이 관능평가 한 것을 종합하여 같은 향과 맛이 관능평가원 97-100% 이상 일치한 것을 Table 2에 나타내었다.

순수 colony 정제 및 균사형태

순수 colony의 실험은 재료를 달리한 *Bacillus subtilis* K-20 청국장 균주를 nutrient broth(Czapek-Dox Broth Difco, USA)를 사용하여 37°C에서 24 hr 배양하였다. 배양은 10^8 cell/mL 되도록 1/10씩 연속 희석하여 고체배지(Czapek solu-

Table 1. Time course studies of the effect of *Bacillus subtilis* K-20 chunggugjang on the viable cell count determination

Additive content ¹⁾	Viable cell count (hr)	
	72	96
Control	8.9×10^7	8.8×10^9
M	3.5×10^6	5.6×10^8
K-20a ²⁾	3.5×10^6	9.5×10^9
K-20b	4.2×10^7	9.2×10^9
K-20c	8.4×10^7	4.8×10^9
K-20d	4.5×10^7	5.5×10^9
K-20e	5.3×10^7	6.5×10^9
K-20f	9.6×10^7	5.2×10^9

¹⁾C: control

K-20a: garlic

K-20b: garlic, onion

K-20c: garlic, onion, ginger

M: M-chunggugjang

K-20d: garlic

K-20e: garlic, onion

K-20f: garlic, onion, ginger

²⁾K-20a: chunggugjang fermented with *Bacillus subtilis* K-20 added with live and regular material.

K-20a, K-20b, and K-20c are live materials.

K-20d, K-20e, and K-20f are regular materials.

tion agar, Difco, USA)에 pour plating 한 후 37°C에서 48 hr 배양하였다. 생성된 colony를 계대배양 하였다(Fig. 1).

Bacillus subtilis K-20 청국장 균주가 부재료에 의한 균사의 성장 및 형태를 관찰하기 위하여 고체배지에 48 hr 배양한 균주를 crude 형태로 현미경하에서 균사형태를 관찰하였다(Fig. 2).

결과 및 고찰

발효시간경과에 의한 생균수 측정 및 정제

Bacillus subtilis K-20에 의한 청국장을 분리 배양하여 청국장 들어가는 부재료를 볶지않는 구름(마늘, 마늘+양파, 마늘+양파+생강), 볶은구름(마늘, 마늘+양파, 마늘+양파, 생강)을 첨가하여 96시간 발효한 후 후숙하였을때 생균수에는 별다른 차가 없었다. 시중에 상품화되고 있는 M제품과 *Bacillus subtilis* K-20에 대하여 생균수 측정은 M-청국장 보다 분리 정제한 *Bacillus subtilis* K-20의 청국장이 전반적으로 10배이

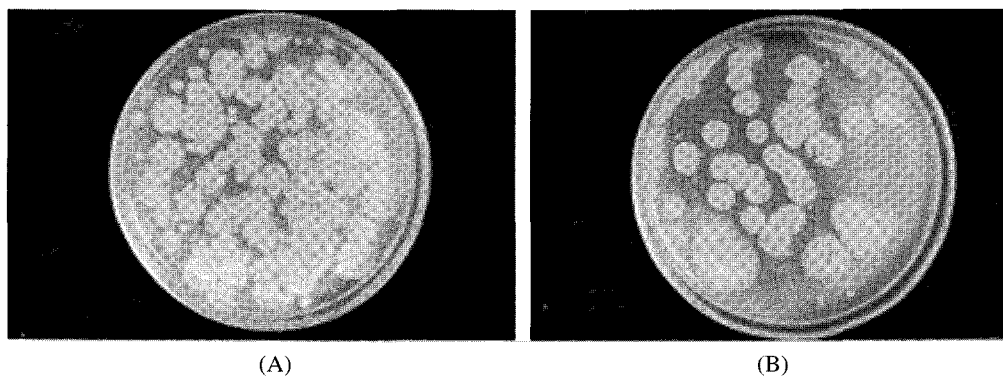


Fig. 1. Colonies of M-chunggugjang and *Bacillus subtilis* K-20dz chunggugjang on the Czapek solution agar. (A) M-chunggugjang, (B) *Bacillus subtilis* K-20dz chunggugjang.

Table 2. Flavor determination of *Bacillus subtilis* K-20 chunggugjang on the various material properties

Additive content ¹⁾	Live material			Regular material			Flavor determination ⁴⁾
	Garlic	Garlic onion	Garlic onion ginger	Garlic	Garlic onion	Garlic onion ginger	
Control	-	-	-	-	-	-	Foul odor
M chunggugjang	?	?	?	?	?	?	Strong foul order
K-20a	+ ²⁾	- ³⁾	-	-	-	-	Soy sauce-like aroma
K-20b	+	+	-	-	-	-	Spice flavor
K-20c	+	+	+	-	-	-	Spice odor (ginger)
K-20d	-	-	-	+	-	-	Weak foul odor
K-20e	-	-	-	+	+	-	Pizza flavor
K-20f	-	-	-	+	+	+	Weak pizza flavor

¹⁾See foot note in Table 1.

²⁾+: addition. ³⁾-: nonaddition.

⁴⁾Flavor determination: sensory evaluation measure, concordance rate 97-100%.

상 높은 균주를 얻을 수 있었다(Table 1). 미생물 생육변화에 최대증식 밀도는 10⁹ cfu/g 수준⁽¹⁷⁾에 의한 것과 비교할 때 본 실험에 사용한 균주의 최대증식 밀도 10⁹ cfu/g와 일치한다.

청국장 냄새 성분은 다른 잡균이 정제되지 않아서 냄새 성분이 강하다는 보고도 있으므로 screening하여 살펴보았다. M-청국장은 한국 고유의 특유한 청국장 냄새가 있는 제품이며, 청국장 이외의 다른 잡균이 *Bacillus subtilis* K-20보다 많았다(Fig. 1). *Bacillus subtilis* K-20dp 의한 청국장도 몇 차례 걸쳐 계대배양 할 때 더 좋은 순수균주를 얻을 수 있다.

재료에 대한 생균수의 차이는 없었으며, 발효에 의한 시간 경과에서 3일과 4일의 균수는 10²정도 높은 균수의 차이가 생성되었다. 위생적인 청국장을 생산하기 위해서는 순수 균주 개발이 필요하다. 균주의 정제 실험을 위하여 시중 청국장의 균주와 본 실험에 사용한 균주를 plate에 도말한 후 배양하여서 생성된 colony를 확인하였다. *Bacillus subtilis* K-20에 의한 청국장으로부터 정제한 균으로 조사하였다. *Bacillus subtilis* K-20과 시판 청국장을 time course에서 조사한 결과를 graph상에는 나타내지는 않았으나 Czapek solution agar

배양중에서 5~6배의 contamination이 낮게 나타났다.

청국장의 이취 저해 성분에 관한 효과

청국장은 우수한 식품이지만 특유의 냄새성분 때문에 기피하는 경우가 있으므로 *Bacillus subtilis* K-20에 의한 청국장을 발효 및 후숙할 때 재료성분을 변화시켜서 강한 냄새를 억제시키고자 하였다. 관능평가는 시판 청국장과의 시중 M제품과 비교하여 향기 검사를 하였다. 관능 평가한 것을 Table 2에 나타내었다. 마늘을 첨가한 K-20a 성분은 시중 청국장보다는 냄새가 약하지만 청국장 고유의 강한 냄새가 있었으며 간장을 끓일때 나는 냄새를 느끼게 하였다. K-20b(마늘, 양파)는 양념향을 느끼게 하였다. K-20c(마늘, 양파, 생강)는 생강냄새가 강한 양념 냄새로 나타났다. 붉은 마늘을 첨가한 K-20d는 청국장의 강한 냄새성분이 아주 약해졌으며, K-20e(붉은 양파, 붉은마늘) 시료에서는 피자향의 우수한 향미 성분을 얻었다. 붉은 생강이 첨가 된 K-20f(붉은재료: 마늘, 양파, 생강)는 약한 피자향을 나타냈다. 재료를 붉은 시료에서는 대체로 냄새성분이 향미로 변화하였다. 특히 K-20e

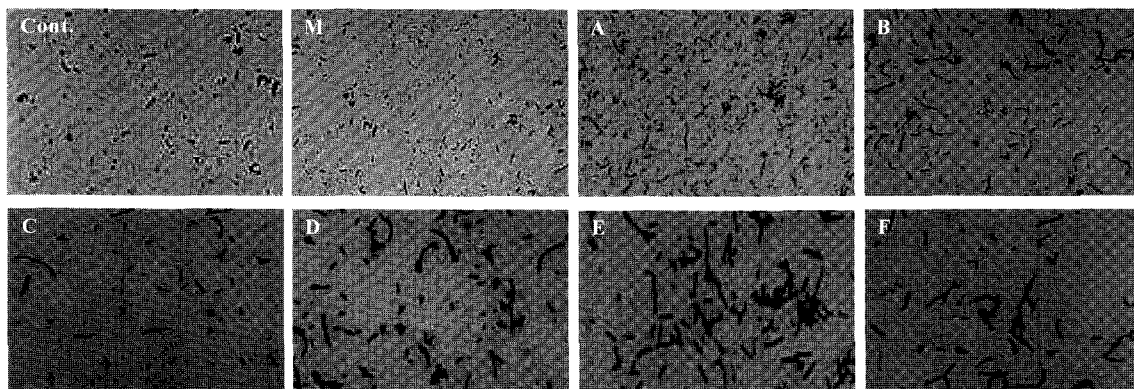


Fig. 2. Morphological characteristics of *Bacillus subtilis* K-20 chunggugjang and M-chunggugjang. *Bacillus subtilis* K-20 chunggugjang morphological normalities induced by crude (Czapek solution agar, Difco, USA) pour plating, incubation 48 hr at 37°C. Olympus Binocular Microscope (×400) BH (Olympus Optical Co. LTD.). Cont: Control, M: M-chunggugjang, A: *Bacillus subtilis* K-20a, B: *Bacillus subtilis* K-20b, C: *Bacillus subtilis* K-20c, D: *Bacillus subtilis* K-20d, E: *Bacillus subtilis* K-20e, F: *Bacillus subtilis* K-20f.

를 첨가한 시료에서는 피자향의 우수한 향미성분을 얻었다. 더 나아가 신세대들이 좋아하는 피자향의 청국장 맛은 끊어서 섭취하기보다는 그자체로 부식으로 대용이 가능하며 단맛을 첨가하면 빵에 발라서 섭취할 수도 있다. 빵에 청국장을 발라서 살짝 구워서 먹을 때 피자빵을 연상케 하였다. 청국장은 면역성에 도움을 주지만 강한 불쾌취로 인하여 선호도가 낮으므로 이러한 부재료를 첨가하여 냄새를 억제한 향미성이 높은 *Bacillus subtilis* K-20에 의한 청국장은 기능성 식품으로 기대할 수 있다고 본다.

재료성분에 의한 *Bacillus subtilis* K-20의 형태변화

재료성분에 의한 어떤 변화 여부를 light micrograph에서 검토한 결과 Control, M-청국장, *Bacillus subtilis* K-20에 의한 청국장에 대하여, 균사형태 및 성장균사를 관찰한 결과 특별한 변화는 보이지 않았다. 이러한 것을 미루어 보면 본 연구의 실험에서 *Bacillus subtilis* K-20에 의한 청국장은 청국장의 기능성을 유지하면서 냄새를 억제시키며 더욱이 좋은 향미를 부여하였으므로 기능성식품으로 기대할 수 있다.

요 약

청국장의 이취를 저하시키기 위하여 *Bacillus subtilis* K-20에 의하여 제조된 청국장을 분리 배양하여 마늘, 양파 등의 재료를 균질화시킨 후 재료성분이 다른 조건으로 발효 및 후숙 하였다. 본 실험의 청국장과 시중 M제품의 향미를 관능 평가한 결과 K-20d, K-20e, K-20f로부터 청국장 특유의 냄새가 저해되었다. 특히 볶은 마늘과 양파를 첨가한 시료에서는 피자향의 우수한 향미 성분을 얻었다. 기능성 청국장은 위생적인 균주 개발이 중요한데, 본 실험의 청국장이 시중 M-청국장보다 contamination이 낮게 나타났다. 청국장의 이취를 제거하기 위하여 재료를 볶지않은 구룹, 볶은구룹을 비교한 결과 총균수에는 별다른 형태와 차이가 없었다. 분리정제한 *Bacillus subtilis* K-20의 청국장과 시중 M-청국장을 비교할 때 10배이상 높은 균주를 얻을 수 있었다. 본 연구에 의한 청국장은 기능성을 유지하면서 냄새를 억제시켜 또한 향미를 부여하였으므로 기능성 식품으로 평가할 수 있다. 금후의 연구는 *Bacillus subtilis* K-20이 혈전용해효소인 fibrin과 apoptosis의 생화학적인 특징인 DNA fragmentation를 분석할 필요가 있다. 이상의 좋은 결과를 얻어낼 때 향미성이 높은 *Bacillus subtilis* K-20의 청국장으로 부터 기능성 식품 및 의약품 개발의 기초자료를 얻을 수 있음을 시사한다.

문 헌

1. Kil, J.O., Kim, G.N. and Park, I.S. Production and characteriza-

- tion of fibrinolytic enzyme: optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from chungkookjang. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 51-56 (1998)
2. 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)
3. Esmon, C.T. The regulation of natural anticoagulant pathway. Science 235: 1348 (1987)
4. Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. Acta Aematologica 84: 139 (1990)
5. Sumi, H., Tsushima, H. and Muraki, H. A novel fibrinolytic activity (nattokinase) in the vegetable cheese natto; A typical and popular soybean food in the Japan diet, Experientia. 43: 1110 (1987)
6. Lee, B.K. 1 Immunomodulation material of fermented soybean products. Lecture 3 presented at 2nd Symposium for Soybean Fermentation Foods, The Research Institute of Soybean Fermentation Foods, Yeungnam Univ., Korea (1999)
7. Cheigh, H.S., Lee, J.S. and Lee, C.Y. Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. J. Food Soc. Food Nutr. 22: 570-575 (1993)
8. Lee, B.Y., Lim, D.M. and Kim, K.H. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from chungkookjang. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 599-604 (1991)
9. Joo, H.K. Studies on the manufacturing of. Korean J. Food Sci. Technol. 1: 64-67 (1971)
10. 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)
11. Kim, W.K., Choi, K.H., Kim, Y.T. Park, H.H., Choi, J.Y., Lee, Y.S., Oh, H.I. Kwon, I.B. and Lee, S.Y. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strains CK 11-4 screened from chungkookjang. Appl. Environ Microbiol. 62: 2482-2488 (1996)
12. Choi, S.H. and Ji, Y.A. Changes in flavor of chungkookjang during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 229-234 (1989)
13. Rhee, S.H., Kim, S.K. and Cheigh, H.S. Studies on the lipids on the Korean soybean fermentation foods: 1. Changes of lipids composition during chungkookjang fermentation Korean J. Food Sci. Technol. 15: 399-403 (1983)
14. Suh, J.S., Lee, S.G. and Ryu, M.K. Effect of *Bacillus* strains on the chungkookjang processing, II. Changes of the free components and enzyme activities during the storage of chungkookjang. Korean J. Food Sci. Technol. 14: 309-314 (1982)
15. Choe, J.S., Kim, J.S., Yoo, S.M., Park, H.J., Kim, T.Y., Chang, C.M. and Shin, S.Y. Survey on preparation method and consumer response of chungkookjang. Korean J. Soybean Res. 13: 29-43 (1996)
16. Allagheny, N., Obanu, Z.A., Campbell-platt, G. and Owens, J.D. Control of ammonia formation during, *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. Int. J. Food Microbiol. 29: 321-333 (1996)
17. Youn, K.C., Kim, D.H., Kim, J.O., Park, B.J., Yook, H.S., Cho, J.M. and Byun, M.W. quality characteristics of the chungkookjang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31: 204-210 (2002)

(2003년 3월 28일 접수; 2003년 5월 8일 채택)