한국산학기술학회논문지
Vol. 5, No. 4, pp. 345-349, 2004

녹차 추출물을 함유하는 청국장의 제조

인만진* · 김동원** · 김동청***

Production of Green Tea Extract-containing Chungkook-jang

Man-Jin In*, Dong Won Kim and Dong Chung Kim*****

요 약 본 연구는 녹차추출물을 함유하는 녹차청국장의 제조방법에 관한 것이다. 단백질 분해효소 활성이 높은 균주를 분리 동정하여 *Bacillus* sp. B1으로 명명하고 이를 청국장 제조에 사용하였다. *Bacillus* sp. B1를 사용하여 청국장을 제조함에 있어서 0.2% 농도의 녹차추출액을 대두중량 대비 1.25%, 2.5%, 5% 첨가하여 청국장을 발효시켰다. 녹차추출액(TS 0.2%)을 1.25% 첨가하여 청국장을 발효시키는 것이 미생물 생육과 관능평가에 있어서 가장 우수한 것으로 나타났다. 휘발성 향기성분 분석에서 청국장 발효에 녹차추출물의 첨가는 불쾌취 발생을 억제하는 데 효과를 보였다.

Abstract This study was carried out to establish the manufacturing method of green tea extract-containing chungkook-jang. One strain showed the highest protease activity was isolated, and subsequently identified as *Bacillus* species. The strain was designated as *Bacillus* sp. B1, and applied to chungkook-jang fermentation. Green tea extract (TS 0.2%) was added to chungkook-jang fermentation in the quantities of 1.25%, 2.5% and 5%. Results of bacterial growth and sensory evaluation showed that chungkook-jang manufactured from addition of 1.25% quantity of green tea extract (TS 0.2%) was most acceptable. In investigation of volatile compounds, addition of green tea extract was effective for repression of off-odor from chungkook-jang.

Key Words: Chungkook-jang, Green tea extract, *Bacillus* sp. B1

1. 서 론

청국장은 콩을 자연발효시켜 상식해 온 우리나라 고유의 전통적인 발효식품으로서, 삶은 콩을 고초균(*Bacillus subtilis*)으로 발효시킨 특유의 맛과 향을 가지는 식품이다[1]. 청국장은 발효과정에서 바실러스균이 만들어내는 가수분해 효소에 의해 콩에 있는 단백질, 탄수화물 및 지방질이 소화되기 쉬운 상태로 분해되므로 소화흡수율이 뛰어나 영양적으로 매우 우수한 식품이고, 원료인 콩이 가지는 영양성분 이외에도 식이섬유, 인지질, 이소플라본, 페놀린산, 사포닌, 트립신 저해제, 피틴산 등을 포함하고, 비타민, 미네랄, 필수아미노산 등의 필수 영양소가 다량 함유되어 있다[2]. 또한, 청국장은 혈압억제작용[3], 혈전용해작용[4], 항산화 효과[5] 등의 성인병 예방효과를 가지는 것으로 보고되면서 건강지향의 이유로 그 소비가 점차 늘어나고 있다. 그러나 청국장의 독특한 향을 싫어하는 사람이 많기 때문에 그 우수성에도 불구하고 수요가 한정되어 있는 형편이다[6]. 따라서 불쾌취를 개선한 청국장의 개발은 청국장 소비층의 확대 및 수요의 증대에 매우 중요한 과제이나 이를 위한 산업적인 연구는 미흡한 실정이다.

한편, 녹차는 동백나무과의 *Camellia sinensis*의 싹이나 잎을 열처리함으로써 차잎에 존재하는 산화효소를 실활시켜 제조한 것이다. 녹차는 기원전부터 널리 음용되어 왔을 뿐만 아니라 녹차에 다량 함유된 카테킨, 테아닌, 비타민 C, 카로티노이드, 비타민 E 등의 성분들에 의한 항산화[7], 항암[8], 항돌연변이[9], 혈압강하[10]에 효과가 있는 것으로 알려져 있고 각종 음료, 차류, 주류 및 기타 다양한 식품에 응용되고 있으나, 아직까지 녹차 추출물을 이용한 청국장 제조에 대한 보고는 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구는 녹차추출물을 함유하는 청국장의 제조방법을 확립하고 품질특성을 확인함으로써 풍미와 기능성이 향상된 새로운 청국장의 제조 가능성을 확인하고자 하였다.

*청운대학교 식품영양학과
**㈜명설차
***교신저자 : 순천제일대학 식생활과
E-mail : kimdc@suncheon.ac.kr
TEL : 061-740-1368 FAX : 061-740-1335

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 시약

청국장 제조용의 백태(*Glycine max*)와 균주 분리에 사용한 재래식 청국장은 전라남도 순천시 재래시장에서 구입하였고, 녹차는 ㈜명설차에서 생산되는 것을 사용하였다. Nutrient agar 는 Difco사(Detroit, MI)의 제품을, skim milk와 Folin & Ciocalteu's Phenol 시약은 Sigma사(St. Louis, MO)의 제품을 사용하였다.

2.2. 균주의 분리

청국장을 멸균한 0.9% NaCl 용액에 현탁시키고 10진법으로 적절하게 희석한 후 5% skim milk를 함유한 Nutrient agar plate (3 g/L Bacto beef extract, 5 g/L Bacto peptone, 15 g/L Bacto agar)에 0.1 ml를 도말하고, 30°C에서 24시간 배양하여 투명환 (clear zone)이 넓은 균주를 분리하였다. 분리한 균주를 Nutrient agar plate에 옮기고 5회의 계대배양을 실시하여 단일 균주로 분리하였다.

2.3. 단백질 분해 효소 활성 측정법

단백질 분해효소의 역가 측정은 조효소액 1 ml에 인산 완충액 (pH 7.0)으로 용해시킨 0.6% casein 용액 5 ml를 넣고 30°C의 수조에서 10분간 반응시킨 뒤 10% TCA 용액 5 ml를 넣어 반응을 정지시키고, 30분간 방치하였다가 여과한 액 2 ml에 0.5 M Na_2CO_3 5 ml과 Folin & Ciocalteu's Phenol 시약을 3배 희석한 용액 1 ml를 가하여 30°C의 수조에서 30분간 발색시키고, spectrophotometer를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하고, 티로신 함량으로 환산하여 표시하였다[11].

2.4. 균주의 동정

분리 균주에 대한 현미경 관찰을 통한 형태학적 특징 및 각종 배지에서의 배양상의 특징을 검토하였으며, 균주의 생리적 및 생화학적 특성을 규명하고 이들 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology [12]에 준하여 분리균주를 동정하였다.

2.5. 녹차 추출물의 제조

(주)명설차의 녹차 제조공장에서 녹차를 가공한 후 이를 추출하여 녹차추출물을 제조하였다. 녹차 가공공정은 채취한 녹차잎을 세척한 후 압력 95 kgf/cm^{2}의 증기로 45초 동안 증제하여 냉풍건조로 1분간 식히는 증제공정, 증제된 녹차잎을 열풍온도 95°C로 45분간 조유하는 조유공정, 조유된 녹차잎을 30분간 유념하는 유념공정, 유념된 녹차잎을 열풍온도 34°C에서 40분간 중유하는 중유공정, 중유된 녹차잎을 90°C의 열풍으로 40분간 덖어 재건하는 재건공정, 재건된 녹차잎을 건조기에서 80°C에서 30분간 열풍으로 건조하는 건조공정, 건조된 녹차잎을 가향기에서 90°C, 30분간 덖은 후 냉각하여 가향 처리하고 포장하는 가향공정을 순차적으로 적용시켜 녹차를 제조하였다. 제조된 녹차에 중량 대비 50배의 물을 첨가하고 75°C에서 10분간 추출하여 약 0.2%(w/w) 농도의 녹차추출액을 얻었다.

2.6. 녹차추출물 함유 청국장 제조

원료 대두는 20°C의 물에 15시간 동안 침지하여 건져낸 후 고압멸균기로 105°C에서 20분, 121°C에서 20분간 증자하였다. 통기성이 좋은 천을 댄 다공성 플라스틱 용기에 약 70°C까지 냉각시킨 증자 대두를 투입하고 nutrient broth에서 배양한 분리 균주를 접종하였다. 이때 분리 균주는 40°C에서 48시간 동안 휴지기까지 배양한 후 10^8 cells/ml 되게 희석한 균주 배양액을 대두량의 0.01%(w/w) 되게 접종하여 starter로 사용하였다. 이때 시료는 녹차추출물을 전혀 첨가하지 않은 것을 대조구로 하였고, 녹차추출물을 대두중량 대비 1.25, 2.5, 5.0%(w/w) 첨가한 것을 시험구로 하였다. 청국장의 발효조건은 온도 43°C, 습도는 포화습도를 유지하도록 조절하였다. 청국장의 발효시간은 입국 후 45시간으로 하였다.

2.7. 미생물 검사

청국장 10 g에 증류수 90 ml을 가하여 믹서에서 60초간 마쇄하고 4°C에서 30분간 교반하여 *Bacillus*의 생육측정을 위한 시료를 제조하였다. 제조된 시험액을 10배씩 연속 희석하여 dextrose tryptone agar 플레이트에 1 ml씩 pour plating 방법으로 접종하고 50°C에서 3일간 배양하여 생성된 총 colony의 수를 colony counter를 사용하여 계수하였다. 청국장의 미생물 밀도는 청국장 1 g당 colony 생성비율 (CFU/g)로 표시하였다.

2.8. 관능평가

청국장의 관능검사는 담배를 피지 않는 여성 패널 10명을 대상으로 색, 맛, 향, 전체적인 기호도의 4개 검사항목에 대하여 5점 평점법으로 실시하였으며 시험결과는 분산분석과 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다. 관능평가를 위한 시료는 청국장 100 g, 소금 5 g, 두부 100 g, 다진 마늘 2 g을 끓는 물 400 ml에 넣은 다음 5분간 끓여 제조하였다.

2.9. 향기성분 분석

청국장의 향기성분은 Likens와 Nikerson의 연구[13]와 동일한 방법으로 SDE (simultaneous steam distillation-

extraction) 장치를 이용하여 추출하였고, 청국장의 향기 성분은 Kim 등의 연구[14]와 동일한 system으로 분석하였다. 이때 휘발성 향기 성분의 추출 용매로 재증류한 diethyl ether를 넣고 40°C에서 2시간 동안 추출하여 휘발성성분을 포집하였다. 추출 시료는 무수황산나트륨으로 4°C에서 하룻밤 탈수, 여과하고 35°C의 회전진공농축기로 농축한 것을 FFAP capillary column이 장착된 GC-mass spectrometer (HP 5890, Hewlet Packard, USA)로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주의 분리

재래식 청국장으로부터 얻은 추출액을 nutrient agar plate에 접종하고 37°C에서 24시간 배양 후 단일 균락을 분리한 결과, 우수한 단백질 분해 효소활성을 가지는 4종의 균주를 분리하여 각각 A1, A2, B1, B2로 명명하였다. 이 4주의 균주를 skim milk-nutrient agar plate에 접종하여 배양한 후 단백질 분해효소활성 능력을 측정하여 본 결과는 Figure 1에서 나타낸 바와 같이 B1 균주가 가장 넓은 투명환(clear zone) 면적을 가지는 것으로 나타나 B1 균주가 단백질 분해능력이 가장 우수함을 알 수 있었다. 그 결과 B1 균주가 청국장 제조를 위한 균주로 선발되었다.

3.2. 균주의 동정

가장 높은 단백질분해활성을 나타내어 선발된 B1 균주의 형태학적 특성 및 생화학적 특성을 조사한 결과, Table 1에 나타나 듯이 분리된 균주 B1은 그램양성이고, catalase 양성 반응을 보이는 세균이었다. 선별 균주를 최소 배지에서 정지기와 대수기 중기까지 회전진탕 배양하여 얻은 균체를 광학현미경으로 관찰한 결과, 운동성이 있고 외관상으로 내생포자를 가지는 간균으로 나타났다. 따라서 이 균주를 Bergey's Mannual에 의거하여 *Bacillus*속에 속하는 세균으로 동정되었으며 *Bacillus* sp. B1으로 명명하였다. 청국장은 전통적으로 *Bacillus subtilis*에 의하여 발효되어 특이한 맛과 향을 내는 것은 물론 대두의 단백질을 분해시켜 영양학적으로도 소화흡수가 용이하게 해준다. 따라서 본 실험에서 분리한 *Bacillus* sp. B1 균주는 단백질분해활성이 높은 효소를 분비하는 균주이므로 영양학적으로 우수한 청국장을 생산할 수 있는 가능성을 보여주었다.

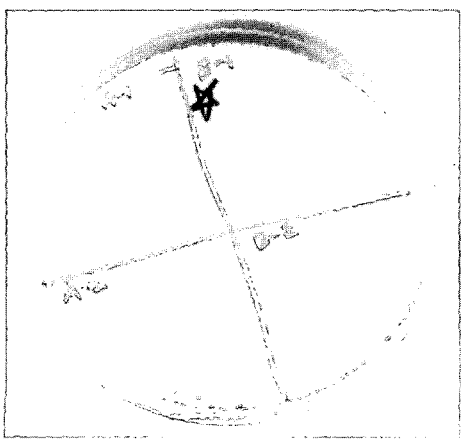

Fig. 1. Protease activities of the A1, A2, B1 and B2 strains.

3.3. 녹차청국장의 미생물 생육 변화

청국장 발효 중 각 실험군의 초기 미생물 균체수는 10^4 CFU/g으로 비슷하였으나 청국장 발효가 진행되는 기간 동안의 미생물 증식은 녹차추출물의 첨가량에 따라 다소 다른 양상을 보였다(Table 2). *Bacillus* sp. B1 균주를 접종하여 배양한 경우, 녹차 추출물을 첨가하지 않은 대조군과 1.25%와 2.5%까지 첨가한 실험군은 세포 증식에 큰 차이를 보이지 않았다. 전체적으로 발효 후 12시간째부터 급격한 증식이 시작되었으며 36시간 이후에는 거의 10^9 CFU/g 까지 도달하였다. 그러나 5.0%를 첨가한 실험군은 미생물 증식이 억제되는 현상

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the strain B1

Shape	Rod(Straight)
Gram stain	Positive
Endospore forming	Positive
Colony color	Opaque, white
Mobility	Positive
Catalase	Positive

Table 2. Growth of *Bacillus* sp. B1 during the fermentation of chungkook-jang containing extract of green tea

Extract (%)	Fermentation times (hrs)				
	0	12	24	36	48
0.00	1.0×10^4	7.0×10^6	2.8×10^7	9.1×10^8	9.7×10^8
1.25	1.0×10^4	7.2×10^6	2.1×10^7	8.7×10^8	9.5×10^8
2.50	1.0×10^4	6.4×10^6	1.9×10^7	8.4×10^8	9.2×10^8
5.00	1.0×10^4	4.3×10^6	1.0×10^7	6.1×10^8	8.4×10^8

을 보여 과량의 녹차 추출물의 첨가는 바람직하지 않은 것으로 조사되었다.

3.4. 관능평가

녹차추출물의 첨가량별로 청국장의 관능평가를 한 결과를 Table 3에 나타내었다. 0.2% 농도의 녹차추출물을 1.25% 및 2.5% 첨가한 녹차 청국장은 녹차추출물을 첨가하지 않은 일반 청국장보다 청국장 특유의 냄새가 제거되었으며, 맛이 우수한 것으로 나타나 전체적인 기호도가 높았다. 색상은 녹차추출물 첨가군과 첨가하지 않은 대조군에서 차이가 나타나지 않았다. 종합적으로 보아 맛, 향, 색 그리고 전체적인 선호도 모든 항목에서 녹차 추출물을 1.25% 첨가한 녹차 청국장은 전통적인 청국장 특유의 구수한 맛은 간직하면서도 불쾌취는 제거됨으로써 가장 우수한 특성을 보였다. 반면에 5.0% 첨가한 경우는 청국장 발효가 제대로 일어나지 않아 전체적인 기호도가 낮게 나타났다.

Table 3. Sensory evaluation about chungkook-jang containing extract of green tea

Extract (%)	Flavor	Taste	Color	Overall Taste
0.00	3.3±0.67[1)]	3.5±1.89	3.5±1.89	3.6±0.63
1.25	4.3±2.11	4.4±2.36	3.4±2.36	4.3±2.32
2.50	3.9±1.28	4.1±2.05	3.7±2.05	4.1±1.74
5.00	3.7±2.44	2.5±1.18	3.5±1.18	2.9±1.33

[1)]All values were expressed as mean±standard deviation.

3.5. 단백질분해효소 활성의 변화

단백질분해효소는 대두의 단백질을 분해하여 청국장의 맛과 영양에 가장 중요한 역할을 하는 인자로 알려져 있으므로 단백질분해효소의 활성은 청국장의 품질을 나타내는 중요한 지표가 된다. 0.2% 농도의 녹차추출물을 1.25% 첨가하여 제조한 청국장의 단백질분해효소 활성은 10시간 이후부터 크게 증가하기 시작하여 활성이 시간에 따라 증가하는 양상을 보였다. 이때 녹차추출물 1.25% 첨가 청국장의 최대 단백질분해효소 활성은 1.27 unit/g으로 나타났다. 이러한 결과는 *Bacillus* 속을 이용한 청국장의 단백질분해효소 활성을 측정한 다른 보고들과 유사한 값을 보여주었다[15].

3.6. 향기성분 분석

Table 4에 나타나듯이, 녹차추출물을 1.25% 첨가하여 제조한 청국장의 휘발성 성분으로 3-methyl butanoic acid, 1-pentanol, iso-amyl acetate, butanoic acid, methyl-2-methyl butanoate 등 12종이 검출되었다. 일반적인 경우 청국장의 휘발성 성분이 20종 이상 검출되는 것에 비해 적은 종류가 검출되었고, 청국장의 불쾌취의 주원인으로 알려진 pyrazine류의 화합물과 benzene류 화합물의 함량이 낮게 나타나는 것으로 보아, 본 연구 결과에서 *Bacillus* sp. B1 균주를 사용하고 녹차추출물을

Table 4. Contents of volatile compounds of chungkook-jang containing extract of green tea

번호	RT	Compound	MW	area	area %	quality, %
1	5.87	methyl ethyl propaniate	102	17940275	1.3	64
2	7.44	1-pentanol	188	382239035	27.3	78
3	8.07	methyl benzene	92	15398071	1.1	90
4	8.52	methyl-2-methyl butanoate	116	28738634	2.1	90
5	10.16	butanoic acid	88	40882384	2.9	78
6	12.70	iso-amyl acetate	130	88875341	6.3	78
7	15.36	3-methyl butanoic acid	102	760230394	54.2	78
8	18.00	1-octen-3-ol	128	15188182	1.1	90
9	18.42	2-amyl furan	138	8334984	0.6	90
10	19.60	iso-amy iso-butyrate	158	26956992	1.9	72
11	20.42	limonene	136	5545117	0.4	98
12	24.23	iso-amyl-2-methyl butyrate	192	11541383	0.8	91
		계		1,401,870,792	100	

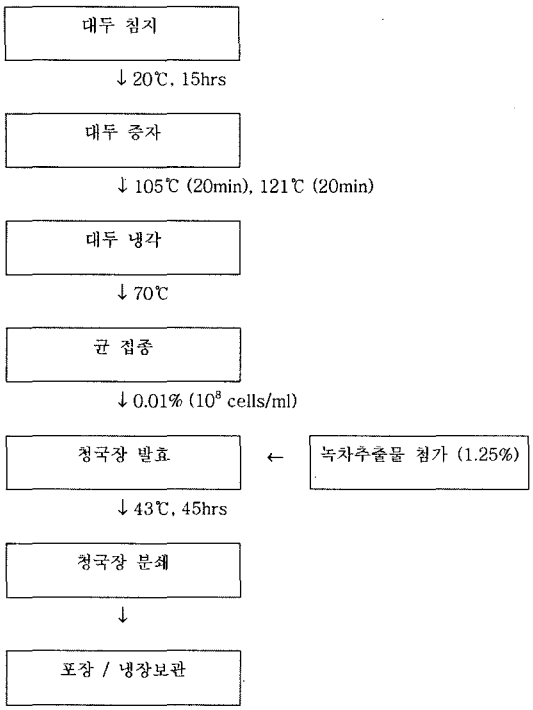

Fig. 2. Production process of chungkook-jang containing extract of green tea.

첨가하여 청국장을 발효시키는 것이 청국장의 이취 성분의 생성을 억제함을 확인할 수 있었다.

결론적으로, Figure 2에 녹차청국장의 제조공정 및 생산 조건을 흐름도로 나타내었다. *Bacillus* sp. B1 균주를 사용하여 청국장을 제조함에 있어서 원료 대두를 20°C의 물에 15시간 동안 침지한 후 고압멸균기로 105 °C에서 20분, 121°C에서 20분간 증자시키고 10^8 cells/ml의 *Bacillus* B1균주를 대두량의 0.01% 되게 접종한 후 0.2% 농도의 녹차추출액을 대두중량 대비 1.25% 첨가하여 온도 43°C, 포화습도에서 45시간 동안 발효시켜 청국장을 얻는 공정을 확립하였다. 제조된 청국장은 불쾌취를 제거하였을 뿐만 아니라 관능적으로도 우수하게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 농촌진흥청의 현장애로기술개발사업 농업인개발과제의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

[1] Y. L. Lee, et al., "A study on the production of viscous substance during the chungkookjang fermentation", J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 35, pp202-209, 1992.

[2] K. J. Kim, et al., "Chungkookjang koji fermentation with rice straw", Korean J. Food Sci. Technol., 14, pp301-308, 1982.

[3] J. L. Yang, et al., "Improving effect of powders of cooked soybean and chungkukjang on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats", J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 32, pp899-905, 2003.

[4] Y. T. Kim, et al., "Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from chungkook-jang", Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, pp1-5, 1995.

[5] H. S. Cheigh, et al., "Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce", J. Korean Soc. Food Nutr., 22, pp570-575, 1993.

[6] J. S. Choe, et al., "Survey on preparation method and consumer response of chungkookjang", Kor. J. Soybean Research, 13, pp29-43, 1996.

[7] M. Serafini, et al., "In vivo antioxidant effect of green and black tea in man", Eur. J. Clin. Nutr., 50, pp28-32, 1996.

[8] G. D. Stoner and H. Mykhtar, "Polyphenols as cancer chemopreventive agents" J. Cell Bio. Chem., 22, pp 169-180, 1995.

[9] C. K. Oh, et al., "Desmutagenic effects of extracts from green tea", Korean J. Soc. Food Sci., 16, pp390-393, 2000.

[10] B. J. An, "Chemical structure and isolated of angiotensin converting enzyme inhibitor from the Korean green tea", Life Resources and Industry, 2, pp67-80, 1998.

[11] Y. O. Kim, et al., "Minor thermostable alkaline protease produced by Thermoactinomyces sp. E79", J. Microbial. Biotechnol., 9, pp469-474, 1999.

[12] Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology, vol 2, Williams and Wilkins Press, pp1105, 1986.

[13] S. T. Linkens and G. B. Nikerson, "Detection of certain hop oil constituents in brewing products", Proc. Am. Soc. Brew. Chem., 5, pp13-18, 1964.

[14] D. H. Kim, et al., "Fermentation characteristics of whole soybean meju model system inoculated four Bacillus strains", Korean J. Food Sci. Technol., 29, pp1006-1015, 1997.

[15] K. C. Youn, et al., "Quality characteristics of the Chungkookjang fermented by the mixed culture of Bacillus natto and B. licheniformis", J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 31, pp204-210, 2002.