

## 전통 청국장으로부터 protease 분비능이 우수한 *Bacillus* sp. 균주의 분리 동정 및 발효 특성

안용선 · 김용석<sup>1</sup> · 신동화<sup>2,\*</sup>

순창 장류개발사업소, <sup>1</sup>전북대학교 바이오식품 소재개발 및 산업화 연구센터,  
<sup>2</sup>전북대학교 응용생물공학부(식품공학 전공)

### Isolation, Identification, and Fermentation Characteristics of *Bacillus* sp. with High Protease Activity from Traditional *Cheonggukjang*

Yong-Sun Ahn, Yong-Suk Kim<sup>1</sup>, and Dong-Hwa Shin<sup>2,\*</sup>

Sunchang Food and Science Institute

<sup>1</sup>Research Center for Industrial Development of BioFood Materials, Chonbuk National University,

<sup>2</sup>Faculty of Biotechnology (Food Science & Technology Major), Chonbuk National University

**Abstract** Twenty one strains strongly producing protease were isolated from Korean traditional *Cheonggukjang*. Eight strains selected by sensory evaluation on *Cheonggukjang* prepared with isolated strains were identified with based on biochemical properties and 16S rDNA sequencing. Identified strains were *Bacillus subtilis* MB4, and *Bacillus amyloliquefaciens* A1, A2, B1, MC1, SB2, SC1, and SD1. Protease activities, important strain selection factor, were higher in *Cheonggukjang* prepared with *B. subtilis* MB4 (179.6 Unit) and *B. amyloliquefaciens* SB2 (201.9 Unit) than commercial traditional *Cheonggukjang* (97.9 Unit). Sensory evaluation revealed *Cheonggukjang* prepared with *B. subtilis* MB4 had flavor very similar to commercial traditional *Cheonggukjang*. *Cheonggukjang* prepared with *B. subtilis* MB4 (0.0006 Pa·s) and commercial traditional *Cheonggukjang* (0.0002 Pa·s) revealed lower viscosities than those of *Cheonggukjang* prepared with *B. amyloliquefaciens* SB2, MC1, B1, A1, SD1, A2, and SC1 (0.006 to 0.008 Pa·s at 1001/s). Results show *Cheonggukjang* could be prepared using single strain of *B. subtilis* MB4, maintaining high protease activity and very similar sensory and viscosity qualities with those of commercial traditional *Cheonggukjang*.

**Key words:** *Cheonggukjang*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*

## 서 론

청국장은 삶은 콩을 볶기에 갈아 볶기에 붙어있는 *Bacillus*속 미생물에 의해 40-42°C에서 2-3일간 발효시킨 것으로, 발효과정 중 미생물이 생산하는 효소에 의해 그 특유의 맛과 향, 점질물질이 생성된다. 청국장은 오래 전부터 우리가 섭취해왔던 식품임에도 불구하고, *Bacillus*속 미생물로부터 생성되는 암모니아 화합물의 특이한 냄새(1,2)로 인해 소비자들이 기피하는 경향이 있었다(3). 그러나 최근에 항산화 효과(4), 혈압강하 효과(5), 항균효과(6) 등 각종 유용한 생리활성 기능이 보고됨에 따라 기능성 식품으로 관심이 증가하고 있는 추세이며, 또한 청국장으로부터 혈전 용해 활성이 우수한 균주를 분리(7,8)하여 향후 의약품 또는 식품 첨가물의 기초 원료로 이용하려는 시도가 매우 활발하게 진행되고 있다.

청국장은 1970년대 초반부터 제조 방법 및 성분 등에 관한 연구가 진행되어 왔으며(9), 최근에는 청국장의 제조방법과 품질개

선 등이 이루어지면서 청국장의 점질물질(10), 향기성분(11), 영양 성분(12), 고기능성 건강 발효 식품(13) 등 여러 분야에서 상당한 연구가 진행되어 왔다. 하지만 청국장은 각 지방 또는 가정마다 제조 방법이 일정하지 않으며, 또한 발효 미생물의 종류에 따라 품질의 재현성이 좋지 않으므로 균일하고 위생적인 청국장을 제조하기 위해서는 우수 균주의 필요성이 대두 되고 있는 실정이다. 청국장의 품질은 주로 발효 과정에 관여하는 미생물에 의해 달라지기 때문에 청국장 발효 종균으로 복합 균주를 이용하거나(2), 청국장 발효에 관여되는 미생물을 규명하려는 연구가 진행되어 왔으며, *Bacillus subtilis*(14), *B. licheniformis*(15), *B. pumilus*(16), *B. amyloliquefaciens*(17) 등이 청국장에서 분리되었다.

본 연구에서는 한국 전통식품인 청국장에서 protease 활성이 우수한 균주를 선별하여 동정하였으며, 선별된 균주로 청국장을 제조하여 균주에 따른 청국장의 향기, protease 활성 및 점도를 조사, 비교하였다. 이는 향후 단일 균주가 가지는 청국장 발효 특성을 각각 조합하여 위생적이고 품질관리가 용이한 대량 생산체 제조 공정 수립 및 새로운 청국장 개발을 위한 기초 자료로 삼고자 하였다.

## 재료 및 방법

### Protease 활성 균주 검색

균주 분리를 위한 시료는 순창 지역 전통식품 제조업체로부터

\*Corresponding author: Dong-Hwa Shin, Faculty of Biotechnology (Food Science & Technology Major), Chonbuk National University, Dukjin-dong, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Republic of Korea

Tel: 82-63-270-2570

Fax: 82-63-270-2572

E-mail: dhshin@chonbuk.ac.kr

Received October 18, 2005; accepted December 20, 2005

구입한 청국장을 사용하였다. 시료 10 g을 멸균증류수 100 mL에 현탁한 후 2% isolated soybean protein (ISP) 고체 배지에 도말하여 37°C에서 72 hr 배양하였다. 이때 형성된 집락 중 집락주변에 투명환(clear zone)이 나타나는 미생물을 선별한 다음, 재차 tooth pick 방법(18)으로 1% ISP 고체배지에 배양하여 투명환 형성이 우수한 미생물을 선별하였다.

### 균주 선별 및 protease 활성 측정

1% ISP 고체배지에서 투명환이 크게 나타난 23개 균주를 선정하여, 1% ISP 액체배지에 접종하여 37°C에서 72 hr 동안 배양하면서 protease 활성을 측정하였으며, 조효소액은 1% ISP 액체 배양액을 1,159×g에서 20분간 원심분리 후 얻어진 상정액을 조효소액으로 사용하였다. 0.2 M phosphate buffer(pH 7.2)를 이용하여 조효소 추출액 및 0.6% casein 기질용액을 각각 제조한 후 30°C에서 10분간 반응시키고, 0.4 M trichloroacetic acid를 가하여 반응을 중단시킨 후 여과한 여액에 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>와 phenol시약으로 발색시키고, 660 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 tyrosine의 양으로 환산하여 표시하였다(19). 동일한 방법으로 표준 균주인 *Bacillus subtilis* KCCM 32835의 protease 활성을 대조군으로 비교하였다.

### 청국장 제조

1% ISP 액체배지에서 protease 효소 활성이 높게 나타난 21개 균주를 선정하여 순창지역 전통 청국장 제조 방법에 따라 제조하였다. 종균 배지로는 1% glucose를 첨가한 1% ISP 고체 배지를 사용하여 분리 균주를 접종 후 24 hr 배양한 다음, 600 nm에서 혼탁도(optical density)가 0.5가 되도록 멸균희석용액으로 10<sup>7</sup> CFU/mL 수준으로 조정하여 종균으로 사용하였다. 원료 대두는 순창군에서 한국산 백태를 구입하여 20°C의 물에 18시간 침지하여 건져낸 후 121°C에서 30분간 증자하였다. 증자된 대두 콩은 100 g씩 500 mL 삼각플라스크에 분주하고 면진하였다. 면진된 시료는 121°C에서 15분간 멸균하여 50°C 정도로 냉각 후 각각의 균주를 대두량의 1%(w/w)가 되게 접종하였다. 이때 대조군으로 *B. subtilis* KCCM 32835를 동일한 방법으로 접종하였으며 각각의 시료는 42°C에서 48 hr 발효시킨 다음 15°C에서 24 hr 후숙시켰다. Protease 활성은 발효된 청국장 100 g에 멸균 증류수 100 mL를 넣어 잘 흔든 다음 1시간 정도 실온에 방치 후 상정액을 조효소액으로 사용하여 측정 하였다.

### 점도 측정

48 hr 발효한 청국장 100 g에 멸균 증류수 100 mL를 첨가하여 손으로 격렬하게 혼합한 다음 실온에 1 hr 방치 후 상정액을 점도 측정용 시료로 사용 하였다. 청국장의 점액성물질의 정상유동 특성은 회전점도계(Haake viscometer VT 550, Germany)의 원추 평판형(cone and plate geometry)인 PK 5-1(각도 1°, 직경 5 cm, zero gap: 500 μm)을 이용하여 20°C에서 측정 하였다(20).

### 균주 동정

선발된 균주는 tryptic soy agar(Difco, USA)에서 37°C에서 24 hr 배양 후 균주 동정에 사용 하였다. 1차적으로 Bergey's manual of systematic bacteriology 방법(21)에 의하여, 형태학적 및 생화학적 특성을 조사한 후, API 50CHB kit(bioMerieux Co., France)를 이용한 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하여 간이 동정 하였다. 최종적으로 분리 균주의 chromosomal DNA을 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용해 분리한

후 16S rDNA sequencing에 사용하는 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCT-TGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR 증폭(22)한 다음, 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석 하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였으며, sequence의 상동성은 Clustal X 와 Mega 2 program을 이용하여 비교분석하였다(23).

### 관능평가

분리된 21개 균주를 이용하여 제조한 각각의 청국장 100 g에 동량의 증류수를 혼합하여 액상으로 한 다음, 대학원생 10명을 대상으로 청국장 특유의 향을 가진 시료를 선별하였다. 검사항목에 대해 5점 평점법(1: 아주 나쁘다, 2: 약간 나쁘다, 3: 보통이다, 4: 비교적 좋다, 5: 매우 좋다)으로 실시하였으며, 유의성 검정은 통계프로그램인 SAS(Release 8.1, SAS Institute Inc., Cary, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후에, 유의성이 인정된 경우  $p=0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 시료별 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 청국장으로부터 대두 단백질분해효소 생산능이 우수한 균주의 분리 및 선별

1% ISP 고체 배지에 도말 후 투명환이 나타난 균주 중에서 protease 활성이 우수한 23균주와 대조군인 *B. subtilis* KCCM 32835를 1% ISP 액체 배지에 접종하여 37°C에서 72 hr 배양 후 protease 활성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. B1을 제외한 모든 균주에서 배양 24-48 hr에 protease 활성이 가장 강하게 나타났으며, 특히 LA2가 13.34(Unit/mL/min)로 가장 높았으며 대조구가 2.40(Unit/mL/min)으로 가장 낮게 나타났다. 0-24 hr의 경우 4균주(LC2, LE1, SB3, SG1)를 제외하고는 48-72 hr에서 보다 높게 나타났으며, 48-72 hr에서 효소 활성이 전반적으로 가장 미미한 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 1% ISP배지에서 protease 활성은 배양 24-48 hr에서 가장 높은 것으로 나타났으며, 따라서 최적 배양기간은 0-48 hr이 적합한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Lee 등(24)이 청국장에서 분리한 *B. subtilis* KCK-7가 배양 48 hr에서 protease 활성이 최고였다는 보고와 유사한 결과였다. 0-24 hr 동안 protease 활성이 상대적으로 낮았던 LC2(0.46 Unit/mL/min)와 LE1(0.77 Unit/mL/min)을 제외한 21균주를 선별하여 청국장 제조에 이용하였다.

### 관능평가

1차 선별된 21균주의 종균 배양액 1 mL를 증자 대두 100 g에 접종하여 42°C에서 48 hr 배양 후 시판 전통 청국장 향과 가장 유사한 시료를 관능평가에 의해 선별하였다(Table 1). 각 시료의 유의적인 차이가 인정되었으며, 이 중 MB4, SB2, MC1, B1, A1, SD1, A2, SC1로 제조된 시료는 향기의 선호도 평가 결과 보통 이상의 평점을 받았으며(3.1-3.6), MB4 > SC1 = B1 > MC1 = SB2 > A1 = SD1 > A2 순의 선호도를 보였다. SB3과 SE1은 각각 2.1과 2.2의 평점으로 선호도가 가장 낮은 것으로 나타났다.

### 분리 균주의 특성

관능이 우수한 것으로 선별된 MB4, SB2, MC1, B1, A1, SD1,

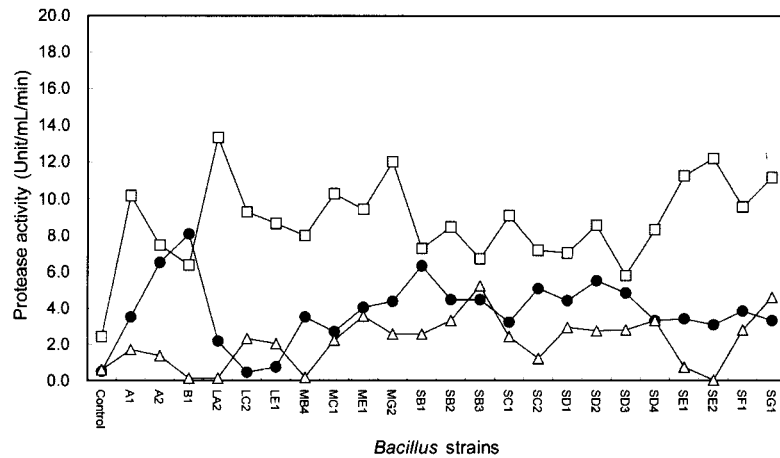


Fig. 1. Protease activities of *Bacillus* strains cultivated in isolated soybean protein (ISP) broth. Control: *B. subtilis* KCCM 32835, -●-: Change of protease activity on 0-24 hr, -□-: Change of protease activity on 24-48 hr, -△-: Change of protease activity on 48-72 hr.

Table 1. Sensory evaluations on *Cheonggukjang* fermented with isolated *Bacillus* strains

| Sample | Flavor              | Sample | Flavor              | Sample | Flavor              |
|--------|---------------------|--------|---------------------|--------|---------------------|
| A1     | 3.2 <sup>abc</sup>  | MG2    | 2.8 <sup>abcd</sup> | SD2    | 2.9 <sup>abcd</sup> |
| A2     | 3.1 <sup>abc</sup>  | SB1    | 2.4 <sup>bcd</sup>  | SD3    | 2.8 <sup>abcd</sup> |
| B1     | 3.4 <sup>a</sup>    | SB2    | 3.3 <sup>ab</sup>   | SD4    | 2.9 <sup>abcd</sup> |
| LA2    | 2.3 <sup>cd</sup>   | SB3    | 2.1 <sup>d</sup>    | SE1    | 2.2 <sup>d</sup>    |
| MB4    | 3.6 <sup>a</sup>    | SC1    | 3.4 <sup>a</sup>    | SE2    | 2.4 <sup>bcd</sup>  |
| MC1    | 3.3 <sup>ab</sup>   | SC2    | 2.9 <sup>abcd</sup> | SF1    | 2.9 <sup>abcd</sup> |
| ME1    | 2.7 <sup>abcd</sup> | SD1    | 3.2 <sup>abc</sup>  | SG1    | 2.7 <sup>abcd</sup> |

<sup>a-d</sup> Same superscripts are not significantly different by Duncan's multiple comparison ( $p < 0.05$ ).

A2, SC1 균주에 대해 Bergey's manual of systematic bacteriology 방법(21)에 의하여, 형태학적 및 생리학적 특성을 조사 한 결과는 Table 2와 같다. 청국장에서 분리한 8개 균주는 Gram 양성인 간균으로, 호기성이며 spore를 형성하며, catalase test에서 양성으로 나타나 *Bacillus*속 세균임을 추정 할 수 있었다. 8균주 각각의 특성을 살펴보면 A1, A2, B1, MC1, SB2, SC1, SD1은 citrate를 이용하지 못하는 그룹으로서 *B. polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans* 등으로 추정되었으며(18,21), citrate를 이용하는 MB4는 *B. subtilis*(21) 등으로 추정되었다. 위의 결과로 볼 때 선발된 균주들은 대부분 동일한 균주로 추정되었으며 보다 자세한 결과를 확인하기 위해 49개 탄소원의 이용성을 조사한 결과는 Table

3과 같다. A1, A2, B1, MC1, SB2, SC1, SD1은 각각 95.1%, 95.5%, 97.1%, 97.4%, 92.0%, 97.1%, 96.3%의 유사율로 *B. amyloliquefaciens*로 간이 동정 되었으며, MB4는 97.2% 유사율로 *B. subtilis*로 간이 동정되었다. 청국장 발효용 균주와 청국장에서 분리된 *Bacillus* sp.는 *B. subtilis*(14), *B. pumilus* JB-1(16), *B. amyloliquefaciens* D4-7(17) 등이 보고되었으며, Lee 등(15)은 청국장에서 *B. circulans*, *Brevibacillus brevis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. stearotheophilus* 등 6 균주를 분리 동정 하였다. 본 실험에서는 청국장 특유의 향과 비슷한 향을 생성하는 8균주의 특성을 조사한 결과, 1 균주는 *B. subtilis*, 나머지 7 균주는 *B. amyloliquefaciens*로 간이 동정되었으며, *B. subtilis*

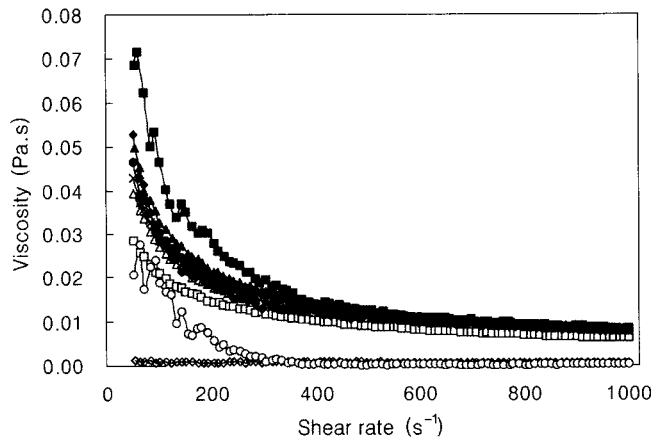
Table 2. Morphological and physiological properties of the strains isolated from *Cheonggukjang*

| Characteristics            | Strains         |    |    |                 |     |     |     |     |
|----------------------------|-----------------|----|----|-----------------|-----|-----|-----|-----|
|                            | A1              | A2 | B1 | MB4             | MC1 | SB2 | SC1 | SD1 |
| Rod-shaped                 | + <sup>1)</sup> | +  | +  | +               | +   | +   | +   | +   |
| Gram stain                 | +               | +  | +  | +               | +   | +   | +   | +   |
| Spore formation            | +               | +  | +  | +               | +   | +   | +   | +   |
| Catalase                   | +               | +  | +  | +               | +   | +   | +   | +   |
| Acid from D-mannitol       | +               | +  | +  | +               | +   | +   | +   | +   |
| Acid from D-glucose        | +               | +  | +  | +               | +   | +   | +   | +   |
| Utilization of citrate     | - <sup>2)</sup> | -  | -  | +               | ?   | -   | -   | -   |
| Utilization of propionate  | -               | -  | -  | -               | -   | -   | -   | -   |
| Nitrate reduced to nitrite | +               | +  | +  | ? <sup>3)</sup> | +   | +   | +   | +   |
| Voges proskauer (VP) test  | +               | +  | +  | +               | +   | +   | +   | +   |

<sup>1)</sup>Positive, <sup>2)</sup>Negative, <sup>3)</sup>?: Unknown.

**Table 3. Identification results of the strains isolated from Cheonggukjang on based on biochemical properties**

| Strains | Significant taxa                  | % ID | T    |
|---------|-----------------------------------|------|------|
| A1      | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 95.0 | 0.62 |
| A2      | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 95.5 | 0.60 |
| B1      | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 97.1 | 0.88 |
| MB4     | <i>Bacillus subtilis</i>          | 97.2 | 0.89 |
| MC1     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 97.4 | 0.79 |
| SB2     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 92.0 | 0.62 |
| SC1     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 97.1 | 0.88 |
| SD1     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 96.3 | 0.78 |

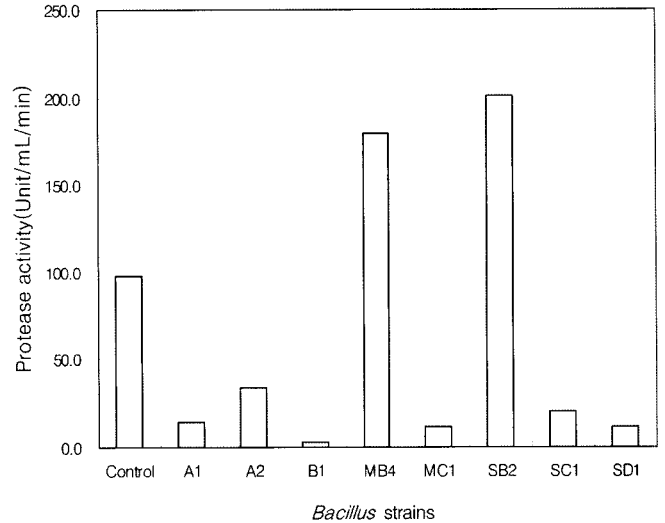


**Fig. 2. Viscosity of viscous substances extracted from Cheonggukjang fermented with isolated *Bacillus* strains.** -◆-: A1, -□-: A2, -▲-: B1, -◇-: MB4, -■-: MC1, -●-: SB2, -△-: SD1, -×-: SC1, -○-: Control (Commercial traditional *Cheonggukjang*).

MB4와 *B. amyloliquefaciens* A1, A2, B1, MC1, SB2, SC1, SD1로 각각 명명하였다.

**분리 균주로 제조한 청국장의 점도 특성**

*B. subtilis* MB4와 *B. amyloliquefaciens* A1, A2, B1, MC1, SB2, SC1, SD1로 제조한 청국장 및 시판 전통 청국장의 점도 특성을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 모든 시료는 전단속도가 증가함에 따라 겔보기 점도는 감소하는 경향을 보였으며, 이러한 결과는 청국장 점질물의 이화학적 특성을 관찰한 Lee 등(10)의 보고와 유사한 결과였다. 전단속도를 404/s에서 1001/s까지 증가시킬 때 겔보기 점도는 *B. amyloliquefaciens* SB2, MC1, B1, A1,

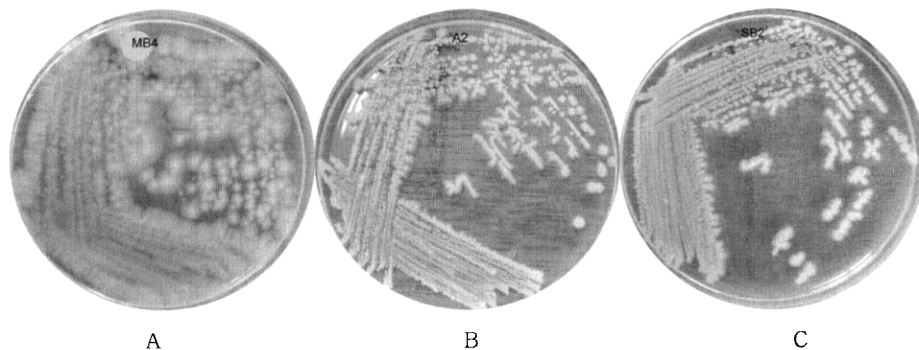


**Fig. 3. Protease activities in Cheonggukjang fermented with isolated *Bacillus* strains.** Control: Commercial traditional *Cheonggukjang*, A1, A2, B1, MB4, MC1, SB2, SC1 and SD1: *Cheonggukjang* fermented with isolated *Bacillus* strains.

SD1, A2, SC1로 제조한 청국장은 각각 0.013, 0.013, 0.013, 0.011, 0.011, 0.010, 0.012 Pa·s에서 0.008, 0.008, 0.007, 0.008, 0.007, 0.006, 0.008 Pa·s로 감소하는 추세를 보였다. *B. subtilis* MB4로 제조된 청국장과 대조구인 전통 청국장의 경우 각각 0.0008, 0.0006 Pa·s(404/s)에서 0.0007, 0.0002 Pa·s(1001/s)로 거의 변화가 없었으며, 이러한 결과는 *B. subtilis* MB4로 제조된 청국장과 대조구인 전통 청국장이 매우 유사한 점도 특성을 가지는 것으로 판단된다.

**분리 균주로 제조한 청국장의 protease 활성 및 동정**

*B. subtilis* MB4와 *B. amyloliquefaciens* A1, A2, B1, MC1, SB2, SC1, SD1로 청국장을 각각 제조 후, 순창 지역 전통 식품 제조업체로부터 구입한 청국장을 대조구로 비교하여 protease 활성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. *B. amyloliquefaciens* A1, A2, B1, MC1, SC1, SD1로 제조한 청국장의 protease활성은 대조구에 비해 낮게 나타났으나, *B. subtilis* MB4 또는 *B. amyloliquefaciens* SB2로 제조한 청국장의 protease활성은 각각 179.6(Unit/mL/min), 201.9(Unit/mL/min)로 대조구의 97.0(Unit/mL/min)보다 월등히 높게 나타났으며, 특히 SB2로 제조한 청국장은 대조구보다 2배 이상 높게 나타났다.



**Fig. 4. Morphological characteristics of *B. subtilis* MB4 (A), *B. amyloliquefaciens* A2 (B), and *B. amyloliquefaciens* SB2 (C) cultured on nutrient agar at 35°C for 24 hr.**

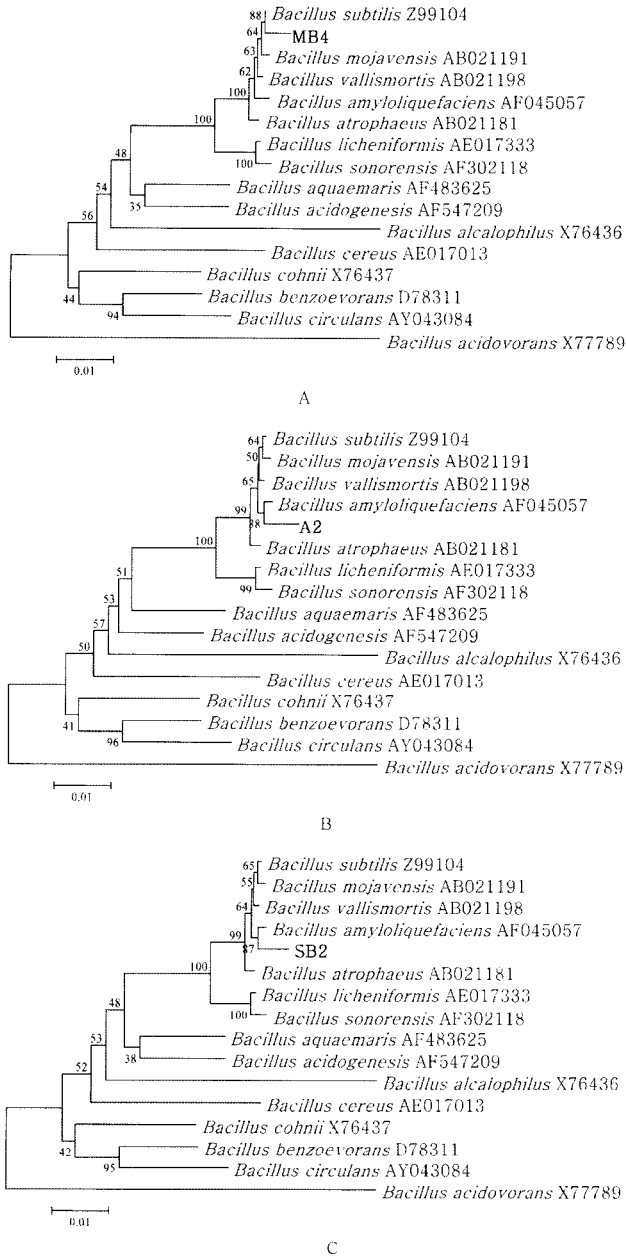


Fig. 5. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of strain MB4 (A), A2 (B), and SB2 (C) isolated from commercial traditional *Cheonggukjang*.

8개의 균주 중 protease 활성이 다른 균주에 비해 상대적으로 우수한 *B. subtilis* MB4, *B. amyloliquefaciens* A2, SB2의 집락을 nutrient agar에서 35°C, 24 hr 배양 후 확인한 결과(Fig. 4) *B. subtilis* MB4와 *B. amyloliquefaciens* A2, SB2가 서로 다른 집락 형태로 증식 하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 16S rDNA 염기서열의 일부분의 상동성을 조사한 결과(Fig. 5) *B. subtilis* MB4는 *B. subtilis*와 99% 상동성을 보였으며, *B. amyloliquefaciens* A2, SB2는 *B. amyloliquefaciens*와 99% 상동성을 보여, 청국장으로부터 protease활성이 우수한 균주 MB4는 *B. subtilis*, A2와 SB2는 *B. amyloliquefaciens*로 최종 확인하였다. Protease는 일반적으로 식품, 제약, 세제 및 환경 등에 다양도로 응용되고 있으며, 특히 단백질 분해능의 탁월한 능력 때문에 활성이 높고, 안정된 성질을 갖는 새로운 균주 선발에 많은 노력을 기울여 왔다. 따라서

본 연구에서 분리된 *B. amyloliquefaciens* SB2의 경우 향후 내열성 및 호알칼리성 특성을 조사하여 세제, 연육가공 등에 응용할 계획이다.

## 요 약

전통 청국장에서 protease 활성이 우수한 21개 균주를 ISP 배지를 이용하여 선발하였다. 선발된 21개 균주로 각각 청국장을 제조 후 관능 평가를 통해 청국장 특유의 이취와 비슷한 향을 생성하는 8균주를 선발 및 49개 탄소원의 이용성을 조사하여 *Bacillus subtilis* MB4와 *B. amyloliquefaciens* A1, A2, B1, MC1, SB2, SC1, SD1로 명명하였다. 최종적으로 우수한 균주로 선정된 MB4, A2와 SB2는 PCR sequencing(16S rDNA)에 의한 상동성을 비교하여 *B. subtilis* MB4, *B. amyloliquefaciens* A2, *B. amyloliquefaciens* SB2로 각각 동정되었다. *B. subtilis* MB4 및 *B. amyloliquefaciens* SB2로 제조한 청국장의 protease 활성은 179.6(Unit/mL/min)과 201.9(Unit/mL/min)로, 대조구의 97.0(Unit/mL/min)보다 우수했으며, 관능 평가는 *B. subtilis* MB4로 제조한 청국장이 3.6점의 평점을 얻어 전통 청국장과 가장 비슷한 향을 가진 것으로 평가 되었다. 겉보기 점도는 *B. amyloliquefaciens* SB2, MC1, E1, A1, SD1, A2, SC1로 제조한 청국장은 각각 0.010-0.013 Pa·s (404/s)에서 0.008-0.006 Pa·s(1001/s)로 감소하는 추세를 보였다. *Bacillus subtilis* MB4로 제조된 청국장과 대조구인 전통 청국장의 경우 각각 0.0008, 0.0006 Pa·s(404/s)에서 0.0007, 0.0002 Pa·s (1001/s)로 거의 변화가 없었으며, 이러한 결과는 *B. subtilis* MB4로 제조된 청국장과 대조구인 전통 청국장이 매우 유사한 물성을 가지는 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 연구는 과학기술부 바이오식품소재 기반기술개발 사업(2005-00382)으로 수행한 연구의 일부로 한국과학재단의 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

- Allagheny N, Obanu ZA, Cambell-Platt G, Owens JD. Control of ammonia formation during *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 321-333 (1996)
- Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. Quality characteristics of the *Cheonggukjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 204-210 (2002)
- Choe JS, Kim JS, Yoo SM, Park HJ, Kim TY, Chang CM, Shin SY. Survey on preparation method and consumer response of *Chungkukjang*. *Korean J. Soybean Res.* 13: 29-43 (1996)
- Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Kee DS, Kim HB. Antioxidant activity of substance extracted by alcohol from *Chungkukjang* powder. *Korean J. Microbiol.* 37: 177-181 (2001)
- Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK. Production and separation of anti-hypertensive peptide during *Chungkukjang* fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43: 247-252 (2000)
- Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. Antimicrobial activities of viscous substance from *Chungkukjang* fermented with difference *Bacillus* spp. *J. Fd. Hyg. Safety* 16: 188-193 (2001)
- Chang JH, Shim YY, Kim SH, Chee KM, Cha SK. Fibrinolytic and immunostimulating activities of *Bacillus* spp. strains isolated from *Chungkuk-jang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 255-260 (2005)
- Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the

- fibrinolytic bacterial strain from *Chungkook-jang*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 1-5 (1995)
9. Joo HK. Studies on the manufacturing of *Chungkukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 3: 64-67 (1971)
  10. Lee BY, Lim DH, Kim KH. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *Cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 599-604 (1991)
  11. Choi SH, Ji YA. Changes in flavor of *Cheonggukjang* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 229-234 (1989)
  12. Rhee SH, Kim SK, Cheigh HS. Studies on the lipids on the korean soybean fermentations foods: 1. Changes of lipids composition during fermentation *Cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 15: 399-403 (1983)
  13. Kim JS. Current research trends on bioactive function of soybean. Korean Soybean Dig. 13: 17-24 (1996)
  14. Kim YS, Jung HJ, Park YS, Yu TS. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *Chungkukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 475-478 (2003)
  15. Lee MY, Park SY, Jung KO, Park KY, Kim SD. Quality and functional characteristics of *Chungkukjang* prepared with various *Bacillus* sp. isolated from traditional *Chungkukjang*. J. Food Sci. 70: M191-M196 (2005)
  16. Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY. Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from *Chungkuk-jang* and fermentational characteristics of JB-1. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 32: 291-296 (2004)
  17. Kim SS, Lee JH, Ahn YS, Kim JH, Kang DK. A fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7 isolated from *Chungkook-jang*: It's characterization and influence of additive on thermostability. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 31: 271-276 (2003)
  18. Yun GH, Lee ET, Kim SD. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus amyloliquefaciens* K42 isolated from Korean soy sauce. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 31: 284-291 (2003)
  19. Kim HJ, Lee JJ, Cheigh SY, Choi SY. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of Kimchi ingredients. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 1333-1338 (1998)
  20. Kim JH, Hur JK, Hur CS, Back YJ. Effects of extractants on the characteristic of soluble dietary fiber from apple pomace. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 161-165 (2001)
  21. Sneath PHA, Mair NS, Elisabeth Sharpe M, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1994)
  22. Yoon JH, Lee ST, Park YH. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of genus nocardioidees and related taxa based on 16S rDNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 187-194 (1996)
  23. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680 (1994)
  24. Lee SK, Heo S, Bae DH, Choi KH. Medium optimization for fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated Korean traditional *Cheonggukjang*. Korean Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 226-231 (1998)