

면역증강물질 강화 청국장 발효

홍성욱 · 김주영¹ · 이봉기¹ · 정진섭*

연세대학교 생물자원공학과, ¹연세대학교 의과대학 미생물학교실

The Bacterial Biological Response Modifier Enriched Chungkookjang Fermentation

Sung Wook Hong, Joo Young Kim¹, Bong Ki Lee¹, and Kun Sub Chung*

Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University

Abstract The aim of this study was to produce *Chungkookjang*-a food produced through fermentation with *Bacillus licheniformis* E1-that contains an increased concentration of a bacterial biological response modifier (B-BRM). Unfortunately, sensory studies have indicated that *B. licheniformis* E1-fermented *Chungkookjang* is unacceptable for commercial use. We isolated another bacterial strain from this food product: *B. subtilis* S2. The optimum time and temperature for *Chungkookjang* fermentation with *B. licheniformis* E1 and *B. subtilis* S2 were 48 hr and 40°C, respectively. Sensory studies showed that *Chungkookjang* fermented by both *B. licheniformis* E1 and *B. subtilis* S2 was more acceptable than *B. licheniformis* E1 only. The amino nitrogen and crude protein content of the product were 359 mg% and 45.6%, respectively. Additionally, it was confirmed that the proliferation of mouse splenic lymphocytes increased significantly, when the cells were treated with the BRM from *Chungkookjang* fermented using the mixture of bacterial strains *in vitro*. These results suggest that the enriched *Chungkookjang* may help patients who are medically in need of potentiation of lymphocytes proliferation.

Key words: *Chungkookjang*, *Bacillus licheniformis* E1, biological response modifier

서 론

대두 발효 식품인 청국장(*Chungkookjang*)은 자연계의 복잡한 미생물을 통하여 가장 짧은 기간(2-3일)에 발효가 완성되는 우리나라의 고유한 전통발효 식품이다. 청국장은 미생물의 효소작용에 의해 콩단백질이 분해되어 특유의 구수한 맛과 향을 내고 끈적한 점질물을 생성한다. 쌀을 주식으로 하는 아시아에서 청국장은 부족하기 쉬운 단백질과 지방의 중요한 공급원이며 소화율이 높고 영양학적 측면에서도 우수한 식품으로서 일본의 *Natto*, 인도네시아의 *Temphe* 등과 함께 식물성 단백질의 원료인 콩을 발효시킨 식품으로 알려져 있다.

수행된 청국장 연구로는 제조공정(1,2), 일반성분 변화(3,4), 풍미개선(5,6) 등이 보고되었고 최근에는 혈압상승 억제 효과(7), 혈전용해능(8,9,10), 항돌연변이 효과(11,12), 항암 효과(13,14), 항균 효과(15), 항산화 효과(16), 골다공증예방 효과(17), 면역증강활성(18) 등과 같은 청국장의 기능성에 관한 연구 결과가 활발하게 발표되고 있다. 한편 우리 나라의 청국장과 유사한 일본의 *Natto*

에서 *nattokinase*라는 혈전 용해효소가 발견되어 그 효능의 우수성이 보고되었다(19). 청국장은 미확인된 많은 종류의 미생물들에 의해서 발효가 되기 때문에 다양한 미생물 효소에 의해 분해된 대두의 각종 성분들과 미생물의 대사산물에 의한 생체반응 조절 기능성에 대한 연구가 더 필요한 실정이다.

앞선 연구에서는 한국 전통된장에서 면역증강 물질의 발견을 보고하였다(20,21). 전통된장에서 면역증강 물질을 생산하는 미생물을 분리하여 면역증강 물질의 특성을 확인하였다(22). 따라서 본 연구에서는 면역증강 물질을 생산하는 미생물을 이용하여 면역활성이 강화된 청국장을 제조하여 면역증강의 효능과 기호성 등을 검토하여 보고자한다.

재료 및 방법

청국장 발효 미생물

본 실험에 사용된 미생물은 전통된장에서 분리한 면역증강 물질을 생산하는 *Bacillus licheniformis* E1을 사용하였다(22). 혼합 starter로 청국장을 발효하기 위한 미생물은 시판 청국장(서일농원, 경기도 일죽면)으로부터 미생물을 분리하였다. 청국장 1g을 멸균 생리식염수에 1/10씩 연속 희석한 후 선택배지(tryptic soy broth 30g, agar 15g, 청국장 마쇄 여과액 0.5L, 증류수 0.5L)에 100 µL씩 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후에 미생물 집락의 형태에 따라 서로 다른 미생물을 분리하였다. 분리한 미생물은 단백질 분해효소 활성측정과 청국장 제조에 사용하였다.

*Corresponding author: Kun Sub Chung, Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Maejiri 234, Heung-gup-myun, Wonju, Gangwon-do 220-710, Korea
Tel: 82-33-760-2252

Fax: 82-33-760-2186

E-mail: kschung@yonsei.ac.kr

Received March 9, 2006; accepted May 25, 2006

단백질 분해효소의 활성측정

분리 미생물의 단백질 분해력 측정은 isolated soy protein(ISP)을 기질로 하는 Anson 개량법을 사용하여 측정하였다(23). 분리 미생물은 액체배지(1% sucrose, 1% soytone, 0.5% NaCl)에서 32°C, 16시간 동안 배양하고 원심분리(10,000×g/10 min)한 후, 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 0.6% ISP 기질용액(0.1 M citric acid buffer(pH 7.2)) 3 mL에 조효소액 1 mL을 첨가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후, 0.4 M trichloroacetic acid를 가하여 반응을 중지시키고 원심분리(10,000×g/10 min)하여 상등액(1 mL)을 취하였다. 0.4 M Na₂CO₃(5 mL)와 phenol reagent(1 mL)를 넣고 상온에서 30분간 방치하여 발색시킨 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 tyrosine을 사용하여 작성하였으며 이때 효소단위는 조효소액 1 mL가 1분동안 1 µg의 tyrosine을 유리시키는 것을 1 unit로 하였다.

청국장의 제조

원료 대두는 2003년에 수확된 충주산 백태를 구입하여 사용하였고 청국장은 Lee 등(24)의 방법에 따라 제조하였다. 원료 대두를 10°C에서 24시간 동안 침지한 후 물빼기를 하여 121°C에서 30분간 증자하였다. 증자한 후 50°C로 냉각시키고 brain heart infusion(Difco Lab., Sparks, MD, USA) 액체배지에서 배양(40°C, 24 hr)한 미생물 배양액을 starter로 대두량의 1%(v/w)를 접종하였다. 발효조건은 40°C에서 48시간 동안 발효하였고 이때 항온기 내부의 습도는 70%를 유지하였다. 대조구로 사용된 시판청국장(생청국장)은 시장에서 구입하여 실험재료로 사용하였다.

이화학적 특성조사

미생물 검사는 청국장 시료를 멸균증류수로 1/10씩 연속 희석하여 BHI agar에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하여 생성된 colony의 수를 계수하였다. 청국장의 생균수는 청국장 1 g당 colony 생성비율(colony formation unit/g)을 log로 나타내었다. 청국장의 아미노태 질소와 조단백질 함량은 각각 Formol 적정법과 Kjeldahl 법으로 측정하였다(25). 면역증강 물질은 청국장에 증류수를 가하고 현탁(180 rpm, 15 min)한 후 여과망을 이용하여 여과액을 분리하였다. 여과분리액을 원심분리(10,000×g/30 min)하여 균체를 취하였다. 증류수로 3회 세척을 한 후 균체는 50 mL 증류수에 현탁시켜 100°C 수조에서 30분동안 열처리하고 원심분리(14,000×g/20 min)하였다. 상등액을 취하여 3배 용량의 cold ethanol을 첨가하여 서서히 교반하고 원심분리(14,000×g/15 min)한 후 침전물을 동결건조하였다.

관능평가

청국장의 관능검사는 훈련된 8명의 관능요원을 대상으로 외관, 향, 쓴맛, 구수한 맛, 전체적인 기호도의 5개 검사항목에 대하여 5점 평점법(청국장으로서의 특성이 1: 매우 나쁘다, 2: 비교적 나쁘다, 3: 보통이다, 4: 비교적 좋다, 5: 매우 좋다)으로 실시하였으며 관능검사 결과의 통계처리는 ANOVA test를 이용하였고 Duncan's Multiple Range test로 유의성을 검정하였다(26).

미생물의 동정

분리 미생물은 tryptic soy agar(Difco Lab., Detroit, MI, USA)에서 37°C, 24시간 동안 배양한 후 동정에 사용하였다. 현미경 관찰을 통한 미생물의 형태학적 특성 및 생화학적 특성을 규명하고 이 결과를 토대로 Bergey's manual of determinative bacteriology에 준하여 동정하였다(27). API 50 CHB kit(bioMerieux Co.,

Many l'Etoile, France)으로 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하고 이 결과를 API 50 CHB database V3.0 (<http://api-web.biomerieux.com>)을 이용하여 동정하였다.

립프구 증식 측정

마우스(BALB/c)의 비장을 채취한 후 림프구를 유리시켜 RPMI 1640(500 mg/mL L-glutinin, 5 mg/mL sodium bicarbonate, 100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 10 mmol HEPES buffer)으로 세척하였다. 분리한 림프구는 10% 우태아 혈청이 함유된 RPMI 1640 배지에 2×10⁶ cells/mL로 부유시켰다. 마우스의 림프구 부유액 100 µL을 96 well round-bottomed microtiter plate(Corning, Rochester, NY, USA)에 넣고 정제된 면역증강 물질을 각각 100 µL씩 첨가하였다. 이 plate는 37°C, 5% CO₂ 항온항습기에서 3일간 배양하고 tritiated thymidine(³H-thymidine)(New England Nuclear, Boston, MA, USA) 10 µL(0.1 mCi)를 각각의 well에 첨가하여 6시간 연장 배양하였다. Liquid scintillation counter(1450 Microbeta TriLux, PerkinElmer, Shelton, CT, USA)에 의해 세포내에 흡수된 ³H-thymidine(³H-TdR)의 양을 count per minute(cpm)으로 나타내어 균체분획 물질들에 의한 림프구의 증식 및 억제 현상을 측정하였다(21). 이때 최대 ³H-TdR 조사량의 50%를 나타내는 면역증강 물질의 농도를 1 unit으로 정하였다.

결과 및 고찰

미생물의 분리와 선발

전통된장에서 분리한 면역증강 물질을 생산하는 *B. licheniformis* E1을 접종하여 청국장을 발효제조한 결과, 향과 맛에 있어 기호도가 좋지 않아 시판 청국장으로부터 발효 미생물을 분리하여 혼합배양을 통한 면역증강 물질 강화 청국장을 제조하고자 하였다. 시판 청국장을 멸균 생리식염수로 희석하여 선택배지에 도말하고 37°C에서 24시간 동안 배양하여 생육이 우수한 콜로니를 순수 분리하였다. 우수한 분리미생물을 선발하기 위해서 단백질 분해력, 청국장의 이화학적 특성조사와 관능검사를 실시하였다. 시판 청국장으로부터 분리한 7종 균주(S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7)와 *B. licheniformis* E1의 단백질 분해효소 활성을 비교한 결과, 분리균주 S2가 15.6 unit/mL로 단백질 분해력이 가장 높았다(Fig. 1).

분리한 발효미생물들을 청국장에 각각 접종하여 발효제조한 후 생균수를 조사한 결과, 분리균주들의 생균수 차이는 거의 없었다. 아미노태 질소는 장류의 품질지표로 사용되고 있으며 우리나라 식품공전의 규격에는 청국장의 아미노태 질소함량을 280 mg% 이상으로 규정하고 있다(28). 이와 같이 청국장의 질소성분 변화는 아미노태 질소의 함량을 이용하여 측정하였는데, 분리균주 S2를 접종하여 발효제조한 청국장에서 571 mg%으로 가장 높은 함량을 나타내었으나 *B. licheniformis* E1을 접종하여 제조한 청국장은 220 mg%으로 식품공전의 규격에 적합하지 않았다. 조단백질 함량은 모든 시험구에서 47.0-48.2%의 범위로 식품공전의 규격(10% 이상)에 적합하였다. Youn 등(4)에 의하면 아미노태 질소 함량은 발효미생물의 단백질 분해효소의 활성과 비례한다고 보고하였는데 이는 본 연구와도 유사하였다.

또한, 청국장의 관능검사를 통하여 우수한 미생물을 선발하였는데, 종합적으로 색, 향, 맛에 있어서 분리균주 S2를 접종하여 발효제조한 청국장의 기호도가 가장 좋았다. 아미노태 질소 함량이 적은 청국장은 관능검사의 결과에서도 기호도가 낮다는 것을 확인할 수 있었다(Table 1). 혼합균주로 청국장을 발효하기 위해

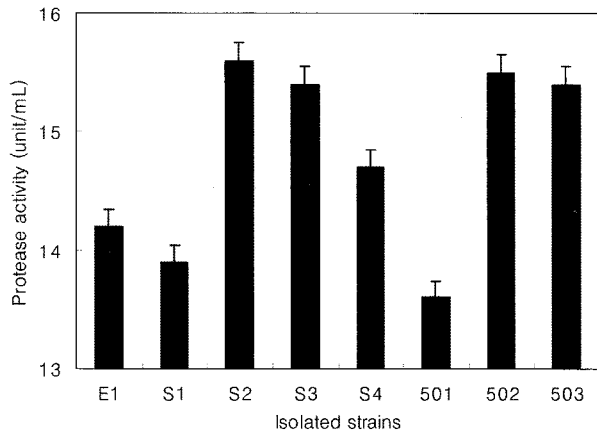


Fig. 1. Protease activity of strains isolated from commercial Chungkookjang. E1 was *Bacillus licheniformis* E1. S1, S2, S3, S4, 501, 502, and 503 strains were isolated from commercial Chungkookjang.

B. licheniformis E1과의 길항성 유무를 확인한바 분리균주 502는 *B. licheniformis* E1의 생육을 억제함으로 나타났다(Data not shown).

따라서 단백질 분해력과 청국장의 기호도에서 가장 우수한 S2 균주를 선발하였고, 면역증강 물질을 생산하는 *B. licheniformis* E1과 우수한 청국장 발효능을 가진 S2 균주를 혼합하여 제조하는 것이 효과적일 것으로 평가되었다.

청국장 선발 미생물의 동정

청국장에서부터 우수한 미생물로 선발된 S2 균주는 현미경을 통해 미생물의 형태를 관찰한 결과, 그람양성 간균으로 운동성이 있고 포자를 형성하였다. 생리적 특성은 catalase test, V-P test, starch와 casein hydrolysis 등이 양성하였고 45°C에서 생육하고 호기성인 것으로 보아 Bergey's manual의 *Bacillus subtilis*의 특징과 유사하였다. 선발미생물의 당이용성 검사를 위해 API 50 CHB kit test를 실시한 후 API 50 CHB database V3.0을 이용하여 동정한 결과, *B. subtilis*와 98.9%의 유사성을 나타내었고 *B. subtilis* S2로 명명하였다(Table 2).

발효온도와 발효시간에 따른 기호도 조사

청국장의 발효온도를 35, 40, 45°C로 설정하여 청국장을 발효한 후 관능평가 결과를 Table 3에 나타내었다. *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주를 접종하여 발효한 청국장의 기호

Table 2. General characteristics and carbohydrate fermentation patterns of S2 strain

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Morphological characterization		Physiological characterization	
Shape	rod	Catalase	+
Gram stain	+	Voges-Proskauer test	+
Mobility	+	Hydrolysis of starch	+
Spore formation	+	Hydrolysis of casein	+
		Growth at 45°C	+
		Growth anaerobically	-
Carbohydrate degradation			
Control	- ¹⁾	Esculine	+
Glycerol	+	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	-
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	-
D-Xylose	+	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
β-Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	-	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	+
D-Fructose	+	Glycogene	+
D-Mannose	-	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β-Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	+	D-Tagatose	-
Mannitol	-	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucosamine	+	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	-	Gluconate	-
Amygdaline	-	2 ceto-gluconate	-
Arbutine	-	5 ceto-gluconate	-

¹⁾+: positive or slow positive; -: negative or weakly positive.

도가 *B. licheniformis* E1만 접종하여 발효한 청국장보다 대체로 높았고 특히 40°C의 온도로 청국장을 발효했을 때 가장 기호도가 좋았다. Ko 등(5)은 30, 37, 40, 50°C의 온도별로 최적 발효온

Table 1. Physico-chemical properties and sensory evaluation scores of Chungkookjang that was inoculated by isolated strains¹⁾

	E1 ²⁾	S1 ³⁾	S2 ⁴⁾	S3 ⁵⁾	S4 ⁶⁾	501 ⁷⁾	502 ⁸⁾	503 ⁹⁾
Viable cell count (Log ₁₀ CFU/g)	9.46	9.33	9.54	9.18	9.47	9.21	9.35	9.16
Amino nitrogen (mg%)	220	343	569	546	471	272	571	565
Crude protein (%)	47.1	48.0	48.2	47.6	47.2	47.0	47.8	47.5
Appearance	1.00 ¹⁰⁾	3.00 ^{bc}	4.57 ^a	3.28 ^b	3.00 ^{bc}	1.71 ^c	3.57 ^{ab}	3.57 ^{ab}
Odor	2.00 ^c	2.28 ^c	3.85 ^a	3.71 ^{ab}	2.85 ^b	2.00 ^c	3.71 ^{ab}	3.14 ^b
Bitter taste	2.00 ^c	3.14 ^b	3.85 ^a	3.28 ^b	3.71 ^{ab}	2.57 ^{bc}	3.85 ^a	3.85 ^a
Savory taste	2.28 ^c	2.71 ^{bc}	3.71 ^a	3.42 ^{ab}	3.14 ^b	2.14 ^c	3.57 ^{ab}	3.42 ^{ab}
Overall acceptance	2.00 ^c	2.85 ^{bc}	3.85 ^a	3.42 ^{ab}	3.28 ^b	2.14 ^c	3.42 ^{ab}	3.42 ^{ab}

¹⁾Each value indicates the average of the sensory scores in the range from 1 (dislike extremely) to 5 (like extremely) that 8 panels recorded. ²⁾E1 was *Bacillus licheniformis* E1, ³⁻⁹⁾S1, S2, S3, S4, 501, 502, and 503 strains were isolated from Chungkookjang. ¹⁰⁾In a column, means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

Table 3. Sensory comparison of *Chungkookjang* that was inoculated by *Bacillus licheniformis* E1 and mixed strains during temperatures and times of fermentation¹⁾

Temperatures	E1			E1 ²⁾ +S2 ³⁾		
	35°C	40°C	45°C	35°C	40°C	45°C
Appearance	2.00 ^{bd4)}	1.86 ^{bc}	1.71 ^{bc}	3.71 ^{ab}	4.19 ^a	4.00 ^a
Odor	2.71 ^b	2.43 ^{bc}	1.71 ^c	3.71 ^{ab}	4.00 ^a	3.86 ^{ab}
Bitter taste	2.71 ^b	2.29 ^{bc}	1.71 ^c	3.57 ^{ab}	4.00 ^a	3.14 ^{ab}
Savory taste	3.00 ^b	3.14 ^b	2.57 ^{bc}	3.43 ^{ab}	4.43 ^a	3.57 ^{ab}
Overall acceptance	3.00 ^b	2.71 ^{bc}	2.14 ^c	3.43 ^{ab}	4.57 ^a	3.43 ^{ab}

Times	E1			E1+S2		
	36 hr	48 hr	60 hr	36 hr	48 hr	60 hr
Appearance	2.00 ^b	2.00 ^b	2.29 ^b	3.86 ^{ab}	4.29 ^a	3.86 ^{ab}
Odor	3.14 ^b	3.14 ^b	2.14 ^{bc}	3.86 ^{ab}	4.00 ^a	2.57 ^{bc}
Bitter taste	3.14 ^b	2.86 ^{ab}	2.42 ^{ab}	3.43 ^a	3.29 ^a	2.29 ^b
Savory taste	2.86 ^{bc}	3.29 ^b	2.29 ^c	3.86 ^{ab}	4.00 ^a	2.14 ^c
Overall acceptance	3.14 ^b	3.14 ^b	2.71 ^{bc}	3.71 ^{ab}	4.14 ^a	2.86 ^{bc}

¹⁾Each value indicates the average of the sensory scores in the range from 1 (dislike extremely) to 5 (like extremely) that 8 panels recorded. ²⁾E1 was *B. licheniformis* E1, ³⁾S2 was *B. subtilis* S2. ⁴⁾In a column, means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

Table 4. Physico-chemical properties and sensory evaluations of *Chungkookjang* that was inoculated by the different *Bacillus* strains¹⁾

	E1 ²⁾	E1+S2	S2 ³⁾	C ⁴⁾
Viable cell count (Log ₁₀ CFU/g)	9.67	9.97	10.06	10.01
Amino nitrogen (mg%)	140	359	392	443
Crude protein (%)	43.5	45.6	46.9	48.3
Dry weight polymer (g)	0.033	0.078	0.074	0.036
Appearance	2.25 ^{bc5)}	4.12 ^{ab}	4.25 ^a	3.42 ^b
Odor	2.83 ^b	3.75 ^a	3.33 ^{ab}	3.33 ^{ab}
Bitter taste	2.95 ^b	3.75 ^a	3.38 ^{ab}	3.12 ^{ab}
Savory taste	2.11 ^b	3.55 ^a	3.15 ^{ab}	3.25 ^{ab}
Overall acceptance	2.02 ^b	3.63 ^a	3.25 ^{ab}	3.12 ^{ab}

¹⁾Each value indicates the average of the sensory scores in the range from 1 (dislike extremely) to 5 (like extremely) that 8 panels recorded. ²⁾E1 was *B. licheniformis* E1, ³⁾S2 was *B. subtilis* S2, ⁴⁾C was commercial *Chungkookjang*. ⁵⁾In a column, means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

도 조건을 조사한 결과, 40°C에서 발효속도가 이상적으로 빠르게 진행하였고 40°C와 상대습도 90%에서 1일 이상이면 발효가 충분히 완료되었다고 보고하였는데 이는 본 연구와도 유사하였다.

청국장의 발효온도를 40°C로 설정하고 단일균주 *B. licheniformis* E1과 *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주를 접종한 청국장을 36시간, 48시간, 60시간 조건으로 발효제조하여 관능검사한 결과, *B. licheniformis* E1만 접종하여 발효한 청국장보다 *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주를 접종하여 발효한 청국장의 기호도가 좋았고 발효시간이 적을수록 청국장의 쓴맛은 감소되었으나, 48시간동안 발효하였을 때 대부분의 항목에서의 기호도가 가장 좋은 것으로 평가되어 *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주를 사용하여 40°C에서 48시간 동안 청국장을 발효제조하는 공정이 관능적인 측면에서 효과적일 것으로 평가되었다. Choi 등(3)도 청국장의 발효가 과다하게 진행하였을 때 기호도가 떨어지는 것으로 보고하였으며, 이는 암모니아 취의 생성 때문인 것으로 추측하였다. Youn 등(4)은 40-45시간 청국장을 발효하였을 때, 미생물의 증식속도와 증식률이 가장 높았다고 보고하였다.

면역증강 청국장의 이화학적 특성조사

증자한 대두에 단일균주 *B. licheniformis* E1, *B. subtilis* S2 및 *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주를 각각 starter로 하여 40°C에서 48시간 동안 청국장을 발효제조하였다. 그리고 동일한 양의 시판 청국장을 구입하여 이화학적 특성조사를 비교한 결과, 청국장의 생균수는 거의 차이가 없었다. 아미노태 질소함량은 시판 청국장이 443 mg%로 가장 높았고 *B. licheniformis* E1만 접종한 청국장의 경우 식품공전의 규격인 280 mg%에 미치지 못하였지만 *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주를 접종하여 제조한 청국장은 359 mg%로 식품공전의 규격에 적합하였다. 조단백질 함량은 모든 시험구에서 43.5-48.3%의 범위로 식품공전의 규격(10% 이상)에 적합하였다. 청국장의 관능검사는 대부분의 항목에서 *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주로 발효제조한 청국장의 기호도가 각각의 단일균주로 발효한 청국장 및 시판청국장보다 가장 좋은 것으로 평가되었다(Table 4).

Lee 등(23)은 *B. subtilis*와 *B. natto*의 단일균주와 혼합균주를 이용한 청국장 제조시의 아미노태 질소와 조단백질 함량을 비교하였는데, 발효 72시간까지 계속 증가하였고, *B. natto*를 이용하여

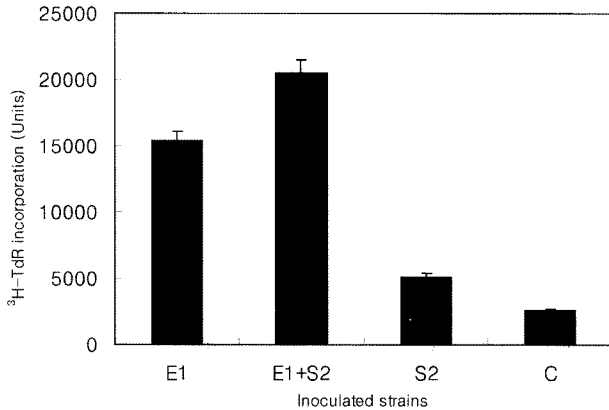


Fig. 2. Comparison of the proliferation of lymphocytes by the BRM. The lymphocytes were obtained from BALB/c mouse spleen and the BRM was extracted from *Chungkookjang* that was inoculated by *B. licheniformis* E1 and mixed strain during fermentation. Splenic lymphocytes were plated in a 96 well round bottomed microtiter plate (2×10^5 cells/100 μ L/well) and the BRM (100 μ L) was added to the wells. The plates were incubated for 48 hr and the cell proliferation was measured using the technique of 3H-TdR incorporation. The one unit was the BRM concentration shown 50% radio activity of maximum 3H-TdR radio activity.

발효한 청국장에서 가장 높은 함량을 보여 사용균주에 따라 차이가 있다고 보고하였다. In 등(6)은 유카(*Yucca shidigera*) 추출물 첨가에 의해 아미노태 질소함량이 증가하였고 청국장 맛의 증진에도 효과가 있었다고 보고하였다.

면역증강 물질의 분리 및 활성비교

단일균주 *B. licheniformis* E1, *B. subtilis* S2 및 *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주를 각각 접종하여 발효제조한 청국장과 시판 청국장을 대조구로 사용하여 면역증강 물질을 분리하고 면역활성을 비교하였다. 청국장으로부터 면역증강 물질을 분리하여 마우스 비장 림프구의 3 H-thymidine(3 H-TdR) 측정방법에 의해 림프구의 증식 및 억제 현상을 측정 한 결과, *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주로 발효한 청국장에서 20,480 unit으로 782% 정도의 림프구 증식율을 나타내 가장 효과적이었다는 알 수 있었다(Fig. 2). Kwon 등(18)은 *B. pumilus* JB-1를 이용하여 제조한 청국장을 열추출한 후 생성된 면역증강물질(2 mg/mL)은 410% 정도의 면역세포 증식율을 나타내었다고 보고한바 있다.

청국장 관능검사를 통한 기호성 뿐만 아니라 이화학적 특성조사를 통해 *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2를 혼합하여 발효 제조한 청국장은 식품 규격에 적합하고 면역증강물질의 생산량과 면역세포의 증식에 있어서도 효과적이었다는 입증하고 면역증강물질 강화 청국장 제조 개발 가능성을 제시해 주었다.

요 약

전통된장에서 B 세포만을 선택적으로 증가시키는 면역증강 물질을 생산하는 *B. licheniformis* E1을 분리한 바 있다(22). 이를 이용하여 면역증강 청국장을 제조하였으나 관능적인 측면에서 기호도가 좋지 않았고 아미노태 질소함량이 식품공전의 규격(280 mg%)에 적합하지 않았다. 이를 보완하기 위해 시판 청국장으로부터 발효미생물을 분리하였다. 단백질 분해효소 활성과 청

국장 발효제조시 기호도에서도 가장 우수한 청국장 발효미생물이 선발되었고 동정한 결과 *B. subtilis* S2로 명명하였다. 청국장 발효에 있어서 최적 발효온도와 최적 발효시간을 조사한 결과 40°C에서 48시간 동안 발효하였을 때의 기호도가 가장 우수하였다. 단일균주 *B. licheniformis* E1, *B. subtilis* S2 및 *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주를 각각 접종하여 발효제조한 청국장과 시판 청국장을 대조구로 사용하여 청국장의 기호도, 이화학적 특성조사와 면역증강 활성 비교를 조사하였는데, *B. licheniformis* E1과 *B. subtilis* S2의 혼합균주를 접종하여 제조한 청국장에서 기호도가 가장 우수하였고 아미노태 질소함량과 조단백질 함량은 359 mg%와 45.6%로 식품공전의 규격에 적합하였다. 청국장으로부터 면역증강 물질을 분리하여 마우스 비장 림프구의 증식 및 억제 현상을 측정 한 결과, 20,480 unit으로 림프구의 증식에 있어서도 가장 효과적인 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원과 연세대학교 매지학술연구비의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- Joo HK. Studies on the manufacturing of Chungkookjang. Korean J. Food Sci. Technol. 3: 64-67 (1971)
- Kim KJ, Ryu MK, Kim SS. *Chungkookjang* koji fermentation with rice straw. Korean J. Food Sci. Technol. 14: 301-308 (1982)
- Choi UK, Son DH, Ji WD, Im MH, Choi JD, Chung YG. Changes of taste components and palatability during Chungkookjang fermentation by *Bacillus subtilis* DC-2. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 840-845 (1998)
- Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. 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)
- Ko HS, Cho DH, Hwang SY, Kim YM. The effect of quality improvement by chungkook-jang's processing methods. Korean J. Food Nutr. 12: 1-6 (1999)
- In JP, Lee SK, Ahn BK, Chung IM, Jang CH. Flavor improvement of *Chungkookjang* by addition of *Yucca (Yucca shidigera)* extract. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 57-64 (2002)
- Shin ZI, Ahn CW, Nam HS, Lee HJ, Lee HJ, Moon TH. Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 230-234 (1995)
- Paik HD, Lee SK, Heo S, Kim SY, Lee HH, Kwon TJ. Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from *Chungkookjang*. J. Microbiol. Biotechnol. 14: 829-835 (2004)
- Kim SS, Lee JH, Ahn YS, Kim JH, Kang DK. A fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7 isolated from *Chungkookjang*; Its characterization and influence of additives on thermostability. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 31: 271-276 (2003)
- Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *Chungkookjang*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 1-5 (1995)
- Hong SS, Chung KS, Yoon KD, Cho YJ. Antimutagenic effect of solvent extracts of Korean fermented soybean products. Food Biotechnol. 5: 263-267 (1996)
- Yoon KD, Kwon DJ, Hong SS, Kim SI, Chung KS. Inhibitory effect of soybean and fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 525-528 (1996)
- Benjamin H, Storkson J, Nagahara A, Pariza MW. Inhibition of

- benzopyrene-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res.* 51: 2940-2942 (1991)
14. Nagahara A, Benjamin H, Storkson J, Krewson J, Sheng K, Liu W, Pariza MW. Inhibition of benzopyrene-induced mouse forestomach neoplasia by a principal flavor component of Japanese-style fermented soy sauce. *Cancer Res.* 52: 1754-1756 (1992)
 15. Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. Antimicrobial activities of viscous substance from Chongkukjang fermented with different *Bacillus* spp. *J. Food Hyg. Safety* 16: 188-193 (2001)
 16. Shon MY, Seo KI, Lee SW, Choi SH, Sung NJ. Biological activities of Chungkugjang prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 936-941 (2000)
 17. Choi YB, Sohn HS. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 745-750 (1998)
 18. Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY. Isolation of immuno stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from Chungkook-jang and fermentational characteristics of JB-1. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 291-296 (2004)
 19. Sumi H, Sasaki T, Yatagai C, Kozaki Y. Determination and properties of the fibrinolysis accelerating substance(FAS) in Japanese fermented soybean "Natto". *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 74: 1259-1264 (2000)
 20. Lee BK, Jang YS, Yi SY, Chung KS, Choi SY. Immunomodulators extracted from Korean-style fermented soybean paste and their function. *Korean J. Immunol.* 19: 559-569 (1997)
 21. Lee BK, Jang YS, Kwak YS, Kim JD, Chung KS. Characteristics of B cell mitogen isolated from Korean-style fermented soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 143-152 (2001)
 22. Chung KS, Kim JY, Hong SW, Lee BK. Isolation of bacteria producing a B-cell specific biological response modifier found in Korean fermented soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 126-135 (2006)
 23. Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-88 (1939)
 24. Lee BY, Kim DM, Kim KH. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *Chungkookjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 599-604 (1991)
 25. AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1990)
 26. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA (1990)
 27. Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA, pp. 531-550 (1974)
 28. Korean Food and Drug Administration. A Supplement Volume of Food Code. Moonyoung Co., Seoul, Korea, pp. 398-399 (1999)