

발아대두 청국장의 발효 중 미생물과 효소활성도의 변화

오훈일* · 엄상미

세종대학교 식품공학과

Changes in Microflora and Enzyme Activities of *Cheonggukjang* Prepared with Germinated Soybeans during Fermentation

Hoon-Il Oh* and Sang-Mi Eom

Department of Food Science and Technology, Sejong University

Abstract This study was carried out to investigate the changes in microflora, enzyme activity and sensory quality of four kinds of *cheonggukjang* during fermentation. Three different kinds of *cheonggukjang* were prepared with germinated soybeans using rice straw, *Bacillus natto*, *B. natto* plus *Aspergillus oryzae*, and the last one was prepared with non-germinated soybeans using rice straw. The pH values of *cheonggukjang* prepared with germinated or non-germinated soybeans increased up to 36 hr of fermentation and then decreased. The number of bacteria and molds increased significantly up to 24 hr of fermentation and then leveled off during fermentation. Acidic and neutral protease activities of all *cheonggukjang* continuously increased significantly during fermentation. α - and β -Amylase activities of *cheonggukjang* decreased slightly during fermentation except *cheonggukjang* prepared with germinated soybeans using the mixed culture. The number of microflora, protease and α -amylase activities were highest in *cheonggukjang* prepared with germinated soybeans using *B. natto* plus *A. oryzae*. The results of the sensory evaluation revealed that for overall acceptability, the *cheonggukjang* prepared with germinated soybeans using *B. natto* plus *A. oryzae* was similar to the *cheonggukjang* prepared with non-germinated soybeans using rice straw.

Keywords: *cheonggukjang*, germinated soybean, microflora, enzyme activities, sensory evaluation

서 론

대두는 우리나라 전통 콩 발효식품의 주된 원료 및 중요한 식물 유래의 기능성 소재로서 매우 다양하게 이용되어져 왔다(1). 대두에 관한 그동안의 연구는 영양성분들에 대한 것에 초점이 맞추어져 왔으나 근래 들어 식품의 생체조절기능에 대한 연구가 활성화되고, 다양한 형태의 대두 제품을 지속적으로 섭취해온 일본인들에게서 성인병의 발병률이 낮았다는 것이 보고되면서 대두의 생물학적 활성에 관심이 집중되고 있다(2). 식물종자는 알맞은 물, 산소, 온도가 주어지면 발아하며, 발아가 진행됨에 따라 생리적 활성이 증대되고 여러 가지 성분의 변화가 일어난다. 따라서 식물 종자의 발아에 의한 생리활성 물질 및 구성성분들의 유효도를 극대화하기 위한 연구들이 곡류 및 두류를 중심으로 활발하게 진행되었으며 특히 대두는 발아 시 trypsin inhibitor의 활성이 저해되고 phytic acid의 함량이 감소되어 무기질의 이용성을 증가시키며(3,4) isoflavone의 함량이 증가한다고 보고되었다(5).

최근 들어 전통식품에 대한 새로운 인식과 관심이 되살아남에 따라 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 장류에서 생

리활성 물질이 검출되고 항암효과에 대한 많은 연구결과가 발표되면서 장류에 대한 인식이 새롭게 변화하고 있다(6). 그 중 청국장은 콩 발효식품으로서 발효 숙성과정 중에 각종 효소작용으로 콩 안의 모든 성분들이 상당히 분해되어 있어 소화성이 우수하며 발효과정 중 구수한 맛을 형성하는 동시에 끈끈한 흰색의 점질물이 생성된다(7). 그밖에 인체에 유익한 *Bacillus* sp.균이 부패균의 활동을 억제함으로써 부패균이 만드는 발암물질을 감소시키고, 이러한 유해물질을 흡착하고 배설시키는 작용을 한다(8). 그러나 청국장은 각 지방 또는 가정마다 제조 방법이 일정하지 않으며 미생물을 이용하기 때문에 원료의 종류, 사용균주, 발효 온도 및 시간 등 발효 조건의 차이에 따른 특유의 풍미가 청국장의 품질에 큰 영향을 미치는 요인이 되고 있다(9).

따라서 본 연구에서는 대두 발아 시 여러 가지 생리활성 물질이 증가한다는 보고들(5,10,11)을 바탕으로 청국장의 기능성을 향상 시키고자 25°C에서 48시간 발아시킨 콩을 원료로 벧젤, *B. natto* 및 *B. natto*와 *Aspergillus oryzae* 복합균주를 이용한 3가지 청국장과 비발아콩을 이용한 청국장을 제조 하여 이들 청국장의 발효 중 미생물과 효소활성도 변화를 조사하고 관능평가를 실시하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

청국장 제조에 사용된 백태는 수분함량 4.41%, 조단백질 함량 37.54%, 회분함량 5.01%로 2004년 강화도에서 수확된 것을 시장에서 구입하여 형태, 색, 크기가 비슷한 것을 선별하여 사용하였

*Corresponding author: Hoon-Il Oh, Department of Food Science and Technology, Sejong University, 98 Kunja-dong, Kwangjin-gu, Seoul 143-747, Korea
Tel : 82-2-3408-3229
Fax : 82-2-3408-3319
E-mail : ohhi@sejong.ac.kr
Received August 1, 2007; accepted November 19, 2007

다. 본 실험에 사용된 분석 시약은 특급 시약을 사용하였으며 청국장 제조 시 사용한 *B. natto* 및 *A. oryzae* 균주는 (주)해찬들 (Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

콩의 발아

청국장 제조에 사용되는 원료 콩을 부직포(두께 1mm)를 가로 20 cm, 세로 19 cm의 사각형 모양으로 절단하여 원통형의 콩나물 재배용 플라스틱 통에 얹은 후 그 위에 콩 60 g을 단층으로 놓은 다음 증류수 300 mL를 넣어 25°C에서 48시간 발아시켰다. 이때 부직포를 가로 2 cm, 세로 20 cm의 직사각형 모양으로 잘라 플라스틱 통과 아래의 물통에 연결시켜 모세관 현상에 의해 수분이 지속적으로 공급되도록 하였다.

발아콩 청국장의 제조

청국장은 벧ջ을 이용한 청국장, *B. natto*를 접종한 청국장 및 *A. oryzae* 와 *B. natto* 혼합균주를 이용한 청국장 4가지 종류로 (주)엔씨 가정용 청국장 기기(Daegu, Korea)를 사용하여 제조하였다. 4가지 종류의 청국장은 모두 25°C에서 48시간 발아시킨 콩 1 kg을 110°C에서 50분간 autoclave로 증자하여 냉각시킨 후 50°C에서 72시간 동안 발효시켰다. 벧ջ 청국장은 청국장 제조기에 벧ջ을 단층으로 깔고 그 위에 50°C로 냉각시킨 증자 대두를 단층으로 깔고 다시 벧ջ을 얹어 72시간 동안 발효시켰다. *B. natto*를 이용한 청국장은 *B. natto*를 nutrient broth 배지(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 30°C, 24시간 배양시켜 멸균 증류수로 포자농도 10^7 ~ 10^8 CFU/mL이 되도록 조절한 균주를 증자대두 무게의 1%(w/w) 수준으로 접종하였다. *A. oryzae* 와 *B. natto* 복합균주를 이용한 청국장은 *B. natto*를 멸균증류수로 포자농도 10^7 ~ 10^8 CFU/mL이 되도록 조절한 균주에 *A. oryzae*를 10^7 ~ 10^8 CFU/mL 농도가 되도록 접종시켜 충분히 교반시킨 후 증자대두 1 kg에 두 균주가 혼합된 배양액을 증자대두 무게의 1%(w/w) 수준으로 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양시켜 *A. oryzae*의 증식을 유도시킨 후, 배양온도를 50°C로 증가시켜 나머지 24시간 동안은 *B. natto*의 증식을 유도하여 복합균주를 이용한 청국장을 제조하였다.

각 청국장은 총 72시간 발효 중 12시간 간격으로 시료를 채취하여 동결 건조시킨 후 Waring blender(Dynamics Corp., Hartford, CT, USA)로 마쇄하여 30 mesh 체를 통과시켜 실험에 사용하였다.

pH

시료 0.5 g에 증류수 20 mL를 넣고 1시간 동안 교반하여 충분히 혼합한 후 여과지(Whatman filter paper No. 41)로 여과한 여액을 50 mL로 정용하고 그 중 10 mL를 취하여 pH-meter(DMP 600, Dongwoo Medical System, Daegu, Korea)로 측정하였다.

미생물 생육 변화

미생물은 시료 10 g에 멸균 증류수 90 mL를 가하여 homogenizer로 파쇄한 액을 세균의 경우 nutrient agar 배지(Difco Laboratories), 곰팡이의 경우 potato dextrose agar 배지(Difco Laboratories)에 평판배양 하여 호기성 세균은 35°C에서 24시간, 곰팡이는 27°C 3~4일 배양한 후에 나타나는 colony를 계수하였다(12).

효소활성도 측정

가. Protease 활성도 측정

시료 1 g에 증류수 20 mL를 가하여 밀봉한 후 30°C에서 4시간 진탕한 후 여과하여 이를 조효소액으로 사용하였으며 Seok 등(13) 및 Park와 Oh(12)의 방법을 변형하여 protease 활성을 측정하였다. Protease 활성도 측정은 기질로 1.5%(w/v) sodium casein을 사용하였으며 이들 기질은 protease 종류에 따라 산성 protease는 0.4 M lactic acid 완충용액(pH 3.0)을, 중성 protease는 McIvaline 완충용액(0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 0.1 M citric acid, pH 7.0)를 사용하였다. 각 protease 종류에 따라 각기 다른 완충용액에 녹인 1.5% casein 1 mL와 증류수 1 mL (중성 protease의 경우 0.0015 M disodium EDTA 1 mL 첨가)를 시험관에 넣고 항온수조에서 30°C로 조정된 효소액 1 mL를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 0.4 M trichloroacetic acid(TCA) 3 mL를 넣어 반응을 정지시키고 30분간 정치하였다. 이 반응액을 여과한 후 여액 2 mL에 0.55 M sodium carbonate 5 mL와 3배로 희석한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Merck, Darmstadt, Germany) 3 mL를 넣어 30°C에서 30분간 반응시킨 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 반응조건하에서 1분간 tyrosine 1 μmol 을 유리하는 효소량을 1 unit로 하였으며 바탕시험은 조효소액 대신 증류수 1 mL를 첨가하여 0.4 M TCA를 넣은 후 동일하게 실시하였다.

나. Amylase 활성도 측정

Amylase 활성도는 α -amylase와 β -amylase로 나누어 Park와 Oh(12)의 방법에 따라 시료 1 g에 증류수 20 mL를 첨가하여 30°C에서 3시간 진탕한 후 여과하여 이를 조효소액으로 하여 효소활성도를 측정하였다.

α -Amylase는 1% soluble starch 용액(0.2 M phosphate 완충용액, pH 6.8) 2 mL에 미리 조제한 효소액 1 mL를 첨가하여 40°C에서 20분간 반응시킨 후, 0.4 M TCA 용액(w/v) 3 mL로 반응을 정지시킨 후 30분간 정치하였다. 이 반응액을 여과지(Whatman filter paper No. 2)로 여과시켜 얻은 여액 1 mL에 1/3000N 요오드화 용액 10 mL를 넣고 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 blank의 흡광도값을 10% 감소시키는 것을 1 unit으로 하여 시료 1 g로 환산시킨 후 표시하였다.

β -Amylase 활성은 dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 사용하여 측정하였으며(14) 0.5% soluble starch (0.4 M acetic acid 완충용액, pH 4.8) 1 mL를 기질로 사용하여 효소액 1 mL와 혼합하여 30°C에서 30분간 충분히 반응시킨 후, 0.4 M TCA 용액(w/v) 2 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 고속원심분리기(HMR-2201V, Hanil Centrifuge Corp., Incheon, Korea)를 이용하여 12,000×g에서 15분간 원심분리한 뒤 상등액 1 mL와 DNS 시약 3 mL를 첨가하여 끓는 수욕 상에서 10분간 반응시킨 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 maltose를 이용하여 작성하였고 효소액 1 mL가 1 mg의 maltose를 유리시킬 때의 효소량을 1 unit으로 하여 시료 1 g로 환산시킨 후 표시하였다.

관능검사

발효 72시간이 끝난 청국장의 관능검사는 세종대학교 식품공학과 대학원생 10명을 패널로 선정하여 시료의 색, 냄새, 맛 및 종합적 기호도에 대해 5점 평점법(매우 좋다 : 5점, 좋다 : 4점, 보통이다 : 3점, 좋지 않다 : 2점, 매우 좋지 않다 : 1점)으로 실시하였다. 관능검사결과는 SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 분산분석한 후 유의차가 있는 항목에 대하여는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 시료간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

발아콩 청국장의 pH 변화

Fig. 1은 발효시간에 따른 발아콩 청국장의 pH 변화를 나타낸 것으로, 비발아콩 볶짚 청국장의 경우 발효 0시간에 pH 6.36을 나타내었으나 발효시간이 증가함에 따라 pH가 증가하여 발효 48시간에 pH 7.42를 나타내었다. 이와 대조적으로 발아콩 볶짚 청국장의 경우 발효 12시간 이후부터 pH가 증가하기 시작하여 발효 36시간에 pH 7.65를 나타낸 후 다시 감소하였다. *B. natto*를 이용한 발아콩 청국장은 다른 청국장보다 낮은 pH값을 보였으나 유사한 경향의 pH 변화를 나타내었고 발효에 따른 큰 차이를 보이지 않았다. *A. oryzae*와 *B. natto* 혼합균주를 이용한 청국장도 발효 12시간 이후부터 pH가 증가하기 시작하여 발효 36시간에 pH 7.40으로 최대값을 나타낸 이후 감소하여 발효 72시간에 pH 6.86으로 나타났다.

4 종류의 청국장 모두 발효 12시간 이후부터 pH가 서서히 증가하다가 최대 pH를 보인 이후 다시 감소하여 발효 72시간에는 비발아콩 볶짚 청국장>발아콩 볶짚 청국장>혼합균주를 이용한 발아콩 청국장>*B. natto*를 이용한 발아콩 청국장 순으로 높은 pH를 나타내었다. Sung 등(15)은 청국장의 pH는 발효가 진행됨에 따라 증가하다가 최대 pH를 보인 이후 다시 감소하는 경향을 나타내며 pH 6.6-8.0의 중성 및 알칼리 영역의 pH를 보인다고 보고하여 본 실험 결과와 유사하였다. Kim 등(16)은 증자대두의 경우 pH는 6.8을 나타내었고, 발효가 진행됨에 따라 점차 알칼리화하여 발효 96시간째에는 pH 8.9를 나타내었다고 보고하였으며, Suh 등(17)도 증자대두(pH 6.25-6.84)에 *B. subtilis*를 접종하여 40°C 내외에서 72시간 발효시킨 청국장의 pH는 8.26으로 알칼리화 하였다고 보고하였다. 청국장 발효과정 중의 pH 변화에 관한 보고는 상당히 많은 편으로 pH 6.25에서 6.84사이의 증자한 대두에 *B. subtilis*를 접종하여 40°C 내외에서 72시간 동안 발효시

켜 청국장 메주를 제조하였을 때 pH는 7.25에서 8.26의 범위를 나타내어 알칼리화 되는 것으로 나타났으며 그 원인은 발효 시 생성되는 암모니아 등의 가스 때문인 것으로 사료 된다(18-20).

청국장 발효 중 미생물의 변화

Fig. 2와 3은 청국장 발효과정 중 미생물 생육의 변화를 나타낸 것으로 각 시험구의 초기 미생물은 세균의 경우 10^5 CFU/g, 곰팡이의 경우 10^4 CFU/g 수준으로 세균이 곰팡이에 약 10배 정도 높게 나타났으며, 청국장 발효 기간 중 청국장의 종류에 따라 각기 다른 성장 양상을 보였다. 세균의 경우(Fig. 2) 4종류 청국장 모두 발효가 진행됨에 따라 급격히 증가하여 발효 12시간에 10^7 - 10^8 CFU/g로 나타났으며, 이때 볶짚을 이용한 발아콩 청국장>비발아콩 볶짚 청국장>혼합균주를 이용한 발아콩 청국장>*B. natto*를 접종한 발아콩 청국장 순으로 세균수가 높게 나타났다. 발효 24시간 이후에는 모든 종류의 청국장에서 10^8 - 10^9 CFU/g 수준으로 발효 0시간에 비해 세균수가 약 10^3 - 10^4 배 증가하였으나 그 이후에는 발효시간에 따라 큰 변화를 나타내지 않았다. 또한 발효 72시간에는 발효 12시간과는 달리 혼합균주를 이용한 발아콩 청국장>*B. natto*를 접종한 발아콩 청국장>발아콩 볶짚 청국장>비발아콩 볶짚 청국장 순으로 세균수가 높게 나타났다. 볶짚의 경우 발효 초기에 세균이 급격히 증가하는 반면 균을 접종한 경우 발효 72시간까지 세균이 서서히 증가하는 것으로 사료된다.

곰팡이 수의 변화는 Fig. 3과 같이 발효 0시간에 10^4 - 10^5 CFU/g에서 발효가 진행됨에 따라 급격히 증식하여 발효 12시간에는 10^6 - 10^8 CFU/g 수준으로 나타났다. *B. natto* 발아콩 청국장을 제외한 나머지 3종류의 청국장들은 발효 48-60시간 사이에 10^8 CFU/g 수준으로 최대값을 나타낸 이후 다시 감소하는 경향을 보였다. 한편 *B. natto* 발아콩 청국장의 경우 발효시간이 증가함에 따라 곰팡이수가 지속적으로 증가하여 발효 72시간에 10^8 CFU/g 수준으로 나타났다. Youn 등(21)은 4 종류의 *Bacillus* 균을 접종

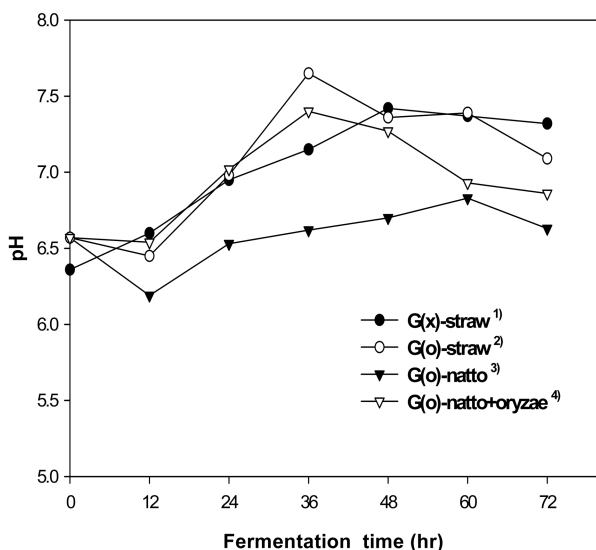


Fig. 1. Changes in pH of cheonggukjang during fermentation.

¹⁾Soybean cheonggukjang prepared with rice straw.

²⁾Germinated soybean cheonggukjang prepared with rice straw.

³⁾Germinated soybean cheonggukjang prepared with *B. natto*.

⁴⁾Germinated soybean cheonggukjang prepared with *A. oryzae* and *B. natto*.

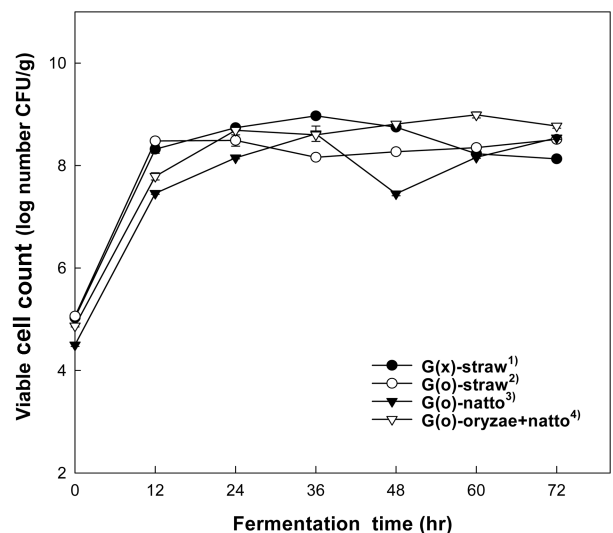


Fig. 2. Changes in the viable cell count of bacteria in cheonggukjang during fermentation.

¹⁾Soybean cheonggukjang prepared with rice straw.

²⁾Germinated soybean cheonggukjang prepared with rice straw.

³⁾Germinated soybean cheonggukjang prepared with *B. natto*.

⁴⁾Germinated soybean cheonggukjang prepared with *A. oryzae* and *B. natto*.

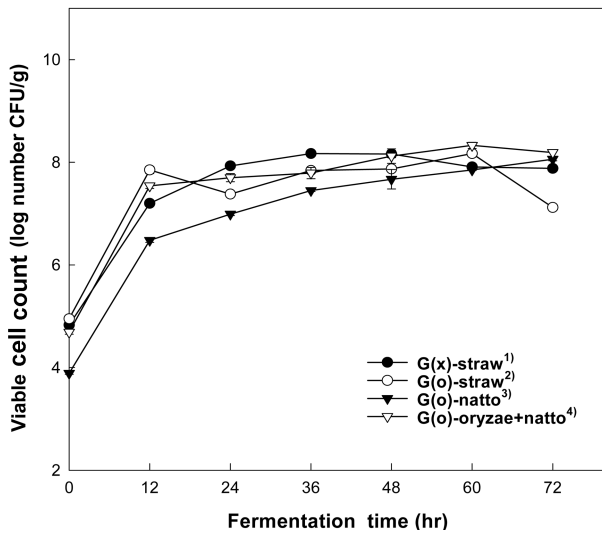


Fig. 3. Changes in the viable cell count of molds in *cheonggukjang* during fermentation.

- ¹⁾Soybean *cheonggukjang* prepared with rice straw.
- ²⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with rice straw.
- ³⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with *B. natto*.
- ⁴⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with *A. oryzae* and *B. natto*.

하여 제조한 청국장의 미생물 생육 변화를 조사한 결과 4종류 모두 초기 미생물 밀도는 10^4 CFU/g 수준으로 비슷하다고 보고하였다. 또한 starter의 종류에 따라 증식속도에 차이는 있으나 청국장 발효미생물의 증식 개시시간은 10-15시간대로 본 실험결과와 유사하였다. Yoo와 Chang(22)은 콩 품종별로 제조한 청국장의 총균수를 측정된 결과 발효 48시간에 10^8 - 10^9 CFU/g 수준으로 나타났다고 보고하였으며 Jung 등(23)도 다시마를 첨가하여 제조한 4종류의 청국장을 48시간 발효 시 10^7 - 10^8 CFU/g 수준으로 미생물이 생육하였다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다.

발아콩 청국장의 protease 활성 변화

Acidic protease 활성은(Fig. 4) 대조구인 비발아콩 볶짚 청국장의 경우 발효 24시간에 67.48 unit/g로 3배 이상 급격히 증가하였으며 24시간 이후에는 발효시간이 증가함에 따라 완만한 증가를 보이다가 최종 발효 72시간에는 53.45 unit/g로 활성도가 감소하였다. 발아콩 볶짚 청국장은 발효시간에 따라 완만히 증가하는 양상을 나타내며 72시간 이후에는 85.46 unit/g로 0시간에 비해 약 4배 정도 활성도가 높았다. 발아콩에 균주를 접종하여 발효시킨 2종류의 청국장은 볶짚을 이용한 청국장보다 더 높은 acidic protease 활성도를 나타내었는데 *B. natto*를 접종한 발아콩 청국장의 경우 발효 60시간까지는 acidic protease 활성이 완만히 증가하여 106.45 unit/g를 나타내었으나 발효 72시간에는 더 이상 증가하지 않고 일정한 활성을 나타내었다. *A. oryzae*와 *B. natto* 혼합균주를 접종한 청국장은 다른 청국장에 비해 월등히 높은 acidic protease 활성을 보였는데 발효 초기 12시간에 약 4배 정도 활성이 증가한 80.10 unit/g를 나타내었으며 발효 시간이 증가함에 따라 acidic protease 활성 또한 지속적으로 증가하여 최대 활성도를 나타낸 이후 *B. natto*를 접종한 발아콩 청국장과 유사하게 더 이상의 활성증가를 보이지는 않았다. Fig. 5는 neutral protease 활성 변화를 나타낸 것으로 비발아콩 볶짚 청국장의 경우 acidic 보다 neutral protease 활성이 더 높은 값을 보였으며 발효 시간이

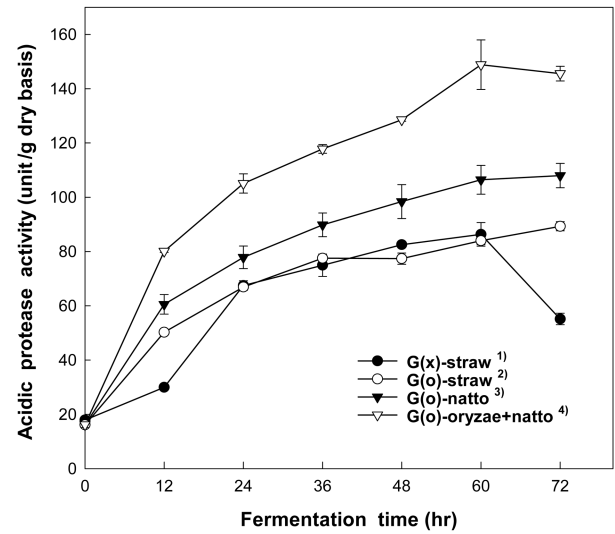


Fig. 4. Changes in acidic protease activity of *cheonggukjang* during fermentation.

- ¹⁾Soybean *cheonggukjang* prepared with rice straw.
- ²⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with rice straw.
- ³⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with *B. natto*.
- ⁴⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with *A. oryzae* and *B. natto*.

증가함에 따라 활성이 증가하여 발효 60시간에 100.39 unit/g로 0시간에 비해 약 5배 증가하여 최대 활성을 나타낸 이후 감소하였다. 발아콩 볶짚 청국장의 neutral protease 활성은 발효시간이 증가함에 따라 완만한 증가추세를 보였으며 최종 발효 72시간에는 85.46 unit/g로 최대 활성을 나타내었다. *B. natto* 접종 발아콩 청국장의 neutral protease는 발효 12시간에 68.06 unit/g의 활성을 보였으며 발효 60시간까지는 지속적인 증가추세를 나타내다가 72

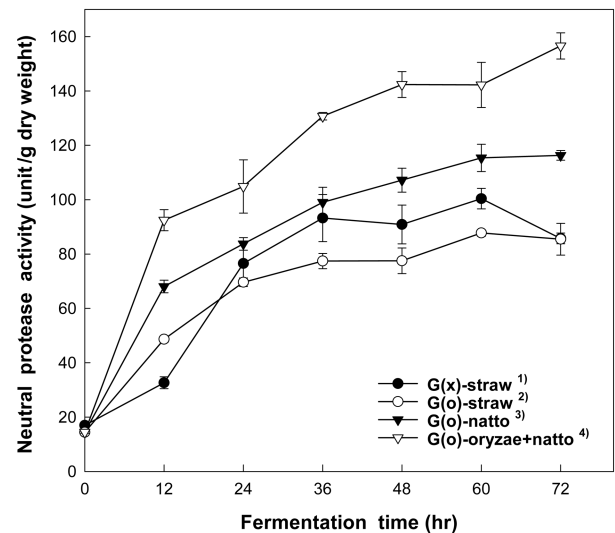


Fig. 5. Changes in neutral protease activity of *cheonggukjang* during fermentation.

- ¹⁾Soybean *cheonggukjang* prepared with rice straw.
- ²⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with rice straw.
- ³⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with *B. natto*.
- ⁴⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with *A. oryzae* and *B. natto*.

시간에는 116.30 unit/g로 더 이상의 활성 증가를 보이지 않았다.

두 종류의 protease 활성은 모두 발효 60시간 까지 급격히 증가하는 경향을 보이다가 발효 72시간에 감소하거나 발효 60시간과 유사한 경향을 나타내었으며 전반적으로 neutral protease의 활성이 acidic protease에 비해 높게 나타났다. 이 결과는 청국장의 초기 pH가 6.4-6.6에서 발효가 진행됨에 따라 pH 6.7-7.4로 증가하였는데 이 범위가 neutral protease의 최적 pH인 7.0 부근이기 때문인 것으로 사료된다.

Seok 등(13)도 *B. licheniformis* CN-115 균주로 발효시킨 청국장은 산성, 중성 및 알칼리성 protease 활성도가 모두 발효시간에 따라 증가하여 최대 활성을 나타내다가 그 이후 감소하는 경향을 나타낸다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다.

청국장의 발효시간에 따른 amylase 활성 변화

Fig. 6은 발효시간에 따른 청국장의 α -amylase 활성 변화를 나타낸 것으로 대조구인 비발아콩 볶짚 청국장의 경우 발효 24시간에 10.36 unit/g로 활성이 감소하였으며 24시간 이후에는 큰 변화 없이 평균 10.51 unit/g로 일정한 활성을 나타내었다. 발아콩 볶짚 청국장의 경우는 발효 24시간에는 12.75 unit/g로 최대 활성을 나타내었으나 발효 48시간에는 10.63 unit/g로 활성이 감소하였다. *B. natto*를 접종한 발아콩 청국장은 36시간까지는 발효시간이 증가함에 따라 α -amylase 활성이 지속적으로 감소하는 양상을 보이다가 그 이후에는 큰 변화 없이 일정한 활성을 나타내었다. 이와 대조적으로 *A. oryzae*와 *B. natto* 혼합균주를 접종한 발아콩 청국장의 경우 나머지 3종류의 청국장과는 달리 α -amylase 활성이 발효 12시간에 12.03 unit/g로 증가한 이후 거의 일정한 활성을 나타내었다. 또한 이들 처리구는 대체적으로 발효시간 전 구간에서 다른 종류의 청국장보다 월등히 높은 α -amylase 활성을 나타내었다. Amylase 활성은 pH와 온도의 영향을 받는데 Jana와 Pati(24)의 보고에 의하면 α -amylase 활성의 최적 pH가 6.0 정도

였고 숙성기간이 경과되면서 pH나 염 등의 농도에 의해 효소의 활성도가 저해되었다고 보고하였다. 따라서 본 연구에 사용된 청국장의 경우 발효시간이 경과함에 따라 알칼리화 되어 α -amylase 활성을 감소시키는 원인이 된 것으로 사료된다.

발효시간에 따른 청국장의 β -amylase 활성 변화는(Fig. 7) 비발아콩 볶짚 청국장의 경우 발효 초기 12시간에는 β -amylase 활성이 12.70 unit/g로 0시간에 비해 4배 정도 증가하다가 발효 24시간에는 오히려 활성이 50% 감소하였으며 그 이후로는 큰 차이를 보이지 않았다. 발아콩 볶짚 청국장과 비발아콩 볶짚 청국장의 β -amylase 활성 변화와 유사한 경향을 나타내어 발효 0시간에 3.57 unit/g의 활성을 보이다가 발효 12시간에는 8.37 unit/g로 약 2배 정도 활성이 증가하였다. 또한 발효 24시간 이후에는 비발아콩 볶짚 청국장과 같이 감소하는 경향을 보였으나 큰 차이를 나타내지는 않았다. 균을 접종한 두 청국장의 경우 발효시간에 따른 β -amylase 활성에 큰 변화를 나타내지 않았으며 *B. natto*를 이용한 발아콩 청국장의 경우 평균 4.23 unit/g, *A. oryzae*와 *B. natto* 혼합균주를 접종한 발아콩 청국장은 평균 3.12 unit/g의 효소활성을 보였다. Lee와 Suh(25)는 *B. natto*를 접종한 청국장의 α -amylase 활성은 발효 72시간까지 일정한 활성을 보이다가 발효 96시간에는 약 75% 정도 급격히 감소하였으며 β -amylase는 일정한 경향을 나타내지 않았다고 보고하였다. Suh 등(19)도 *B. natto*를 접종한 청국장의 α -amylase 활성은 일정한 경향성을 나타내지 않으며 감소한다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다.

관능검사

서로 다른 균주를 이용하여 72시간 발효시킨 비발아 및 발아콩 청국장의 관능검사 결과는 Table 1과 같다. 청국장의 색상은 비발아콩 볶짚 청국장의 선호도가 가장 높았고, *B. natto*를 접종한 발아콩 청국장의 선호도가 가장 낮았다. 향기의 관능 평가 결과 색상과 마찬가지로 비발아콩 볶짚 청국장이 가장 높은 평점

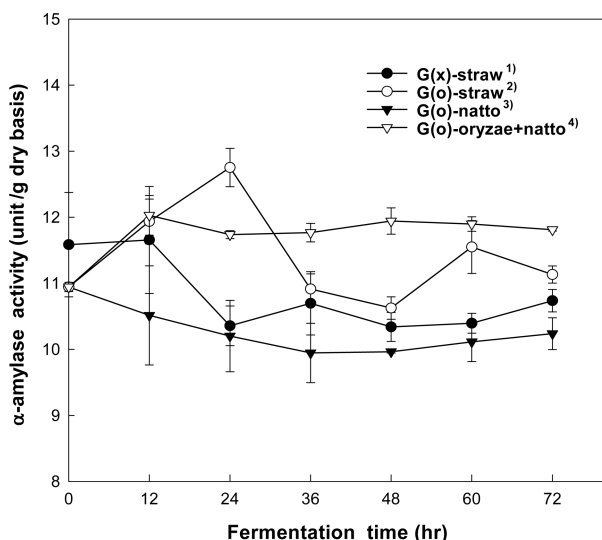


Fig. 6. Changes in α -amylase activity of cheonggukjang during fermentation.

¹) Soybean cheonggukjang prepared with rice straw.

²) Germinated soybean cheonggukjang prepared with rice straw.

³) Germinated soybean cheonggukjang prepared with *B. natto*.

⁴) Germinated soybean cheonggukjang prepared with *A. oryzae* and *B. natto*.

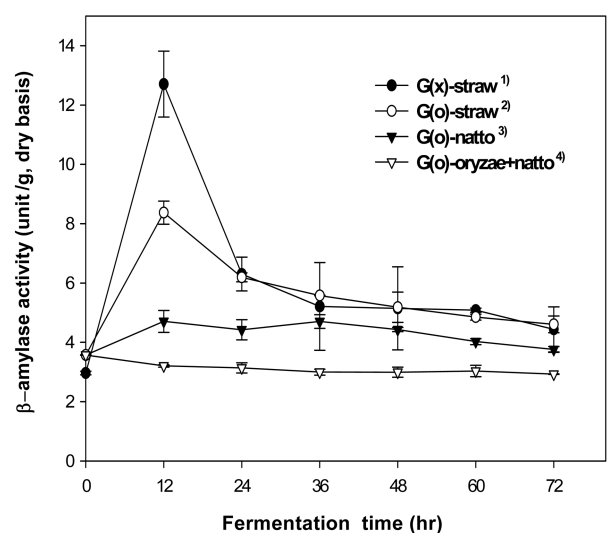


Fig. 7. Changes in β -amylase activity of cheonggukjang during fermentation.

¹) Soybean cheonggukjang prepared with rice straw.

²) Germinated soybean cheonggukjang prepared with rice straw.

³) Germinated soybean cheonggukjang prepared with *B. natto*.

⁴) Germinated soybean cheonggukjang prepared with *A. oryzae* and *B. natto*.

Table 1. Sensory evaluation of *cheonggukjang* prepared with germinated soybean

Treatment	Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
G(x)-starw ²⁾	4.00 ± 0.70 ^{a1)}	4.33 ± 0.71 ^a	3.67 ± 0.71 ^{ab}	4.00 ± 0.87 ^a
G(o)-starw ³⁾	3.67 ± 1.00 ^{ab}	3.76 ± 1.00 ^{ab}	3.89 ± 0.78 ^a	3.67 ± 0.71 ^{ab}
G(o)-natto ⁴⁾	2.89 ± 1.27 ^b	3.11 ± 0.78 ^b	2.89 ± 0.93 ^b	2.78 ± 0.61 ^b
G(o)-oryzae+natto ⁵⁾	3.78 ± 0.67 ^{ab}	3.33 ± 0.87 ^b	3.89 ± 0.93 ^a	4.00 ± 1.00 ^a

¹⁾Means within the same column with same letter are not significantly different at ($p < 0.05$).

²⁾Soybean *cheonggukjang* prepared with rice straw.

³⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with rice straw.

⁴⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with *B. natto*.

⁵⁾Germinated soybean *cheonggukjang* prepared with *A. oryzae* and *B. natto*.

을 받았으며 *B. natto*를 접종한 발아콩 청국장과 혼합균주를 이용한 발아콩 청국장이 가장 낮은 점수를 받았다. 이와 대조적으로 맛에 있어서는 발아콩 볶짚 청국장과 혼합균주를 이용한 발아콩 청국장이 가장 높은 평점을 받았으나 두 시료간의 유의적 차이는 나타나지 않았으며 *B. natto*를 접종한 발아콩 청국장이 가장 나빴다. 전체적인 기호도 조사 결과 비발아콩 볶짚 청국장과 혼합균주를 이용한 발아콩 청국장이 가장 높은 평점을 받았으며 *B. natto*를 접종한 발아콩 청국장의 선호도가 가장 낮은 것으로 나타났다. 따라서 *B. natto*와 *A. oryzae*를 이용한 발아콩 청국장은 protease 및 α -amylase 활성도가 비발아콩 청국장에 비해 상대적으로 높았으며 관능검사 결과에서도 전통적인 청국장 제조 방법인 비발아콩 볶짚 청국장과 유사한 기호도를 나타내었다.

요 약

대두를 25°C에서 48시간 발아시킨 콩을 원료로 볶짚, *Bacillus natto*, *B. natto*와 *Aspergillus oryzae* 혼합균을 접종하여 제조한 청국장과 비발아콩 볶짚으로 제조한 청국장의 발효 중 미생물 및 효소활성도 변화를 조사하고 관능평가를 실시하였다. 4종류의 청국장 모두 발효가 진행되면서 pH가 서서히 증가하여 최대 pH를 보인 이후 다시 감소하여 발효 72시간에는 비발아콩 볶짚 청국장>발아콩 볶짚 청국장>혼합균주를 이용한 발아콩 청국장>*B. natto*를 이용한 발아콩 청국장 순으로 높은 pH를 나타내었다. 청국장 발효 중 미생물의 변화는 세균의 경우 모든 청국장에서 발효가 진행됨에 따라 급격히 증가하여 발효 12시간에 10^7 - 10^8 CFU/g를 나타내었으나 그 이후에는 발효시간에 따라 큰 변화를 나타내지 않았다. 곰팡이 수는 *B. natto*를 접종한 발아콩 청국장을 제외하고는 발효 48-60시간에 10^8 CFU/g로 최대값을 나타낸 이후 감소하였으며, *B. natto*를 접종한 청국장은 발효시간에 따라 지속적으로 증가하여 발효 72시간에 10^8 CFU/g를 나타내었다. Protease 활성은 발효가 진행됨에 따라 acidic과 neutral protease 활성 모두 증가하였으며 neutral protease의 활성도가 acidic protease에 비해 높았다. 이는 청국장 발효과정 중 neutral protease의 최적 활성 pH인 7.0 부근으로 청국장의 pH가 변화했기 때문인 것으로 사료된다. α -Amylase 활성도의 경우 혼합균주를 이용한 발아콩 청국장을 제외하고는 발효가 진행됨에 따라 전반적으로 감소하는 경향을 보였으며, β -amylase 활성도는 혼합균주를 이용한 발아콩 청국장을 제외한 다른 3 종류의 청국장에서 발효 12시간에 최대 활성을 나타낸 이후 감소하였다. 관능검사 결과 냄새와 향기에 있어서 비발아콩 볶짚 청국장의 선호도가 높은 것으로 나타났으나 전체적인 기호도는 *B. natto*와 *A. oryzae*를 이용한 발아콩 청국장과 비발아콩 볶짚 청국장이 유사하게 높게 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 세종대학교 교내연구비 지원에 의한 논문이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Kim JS. Current research trends on bioactive function of soybean. Korean Soybean Digest 13: 17-24 (1996)
- Kim CH, Park JS, Sohn HS, Chung CH. Determination of isoflavone, total saponin, dietary fiber, soy oligosaccharides, and lecithins from commercial soy products based on the one serving size - Some bioactive compounds from commercialized soy products. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 96-102 (2002)
- Suaaex I, Clutter M, Walbot V. Benzyladenine reversal of ascorbic acid inhibition of growth and RNA synthesis in the germination bean axis. Plant Physiol. 56: 575-578 (1975)
- Kim WJ, Kim NM, Sung HS. Effect of germination on phytic acid and soluble minerals in soymilk. Korean J. Food Sci. Technol. 16: 358-362 (1984)
- Kim JS, Kim JG, Kim WJ. Changes in isoflavone and oligosaccharides from soybeans during germination. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 294-298 (2004)
- Lee YN, Sin MJ, Kim BN. A study on the present state of traditional food. Korean J. Diet. Culture 6: 71-81 (1991)
- Lee YL, Kim SH, Choung, NH, Yim MH. A study on the production of viscous substance during the *cheonggukjang* fermentation. J. Korean Agr. Chem. Soc. 35: 202-209 (1992)
- In JP, Lee SK. Effect of *Yucca (Yucca shidigera)* extract on quality characteristics of *cheonggukjang* using *Bacillus subtilis* p01. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47: 176-181 (2004)
- Jung DH, Shim SK. Fermented Soy Foods. Spring of Knowledge, Seoul, Korea. pp. 673-686 (1994)
- Oh SH, Cha YS. Changes in gamma-aminobutyric acid synthesis system in developing soybean sprouts. FASEB J. 14: A241 (2000)
- Eom SM. Changes in chemical constituents of soybean during germination and quality characteristics of *cheonggukjang* prepared with germinated soybeans. MS thesis, Sejong University, Seoul, Korea (2006)
- Park JM, Oh HI. Changes in microflora and enzyme activities of traditional *kochojang meju* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 56-62, (1995)
- Seok YR, Kim YH, Kim S, Woo HS, Kim TW, Lee SH, Choi C. Change of protein and amino acid composition during *cheonggukjang* fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. Agr. Chem. Biotechnol. 37: 65-71 (1994)
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-429 (1959)
- Sung NJ, Ji YA, Chung SY. Changes in nitrogenous compounds of soybean during *chungkookjang koji* fermentation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 13: 275-284 (1984)
- Kim DH, Yook HS, Youn KC, Cha BS, Kim JO, Byun MW. Changes of microbiological and general quality characteristics of gamma irradiated *chungkukjang*. Korean J. Food Sci. Technol.

- 32: 896-901 (2000)
17. Suh JS, Ryu MK, Hur YH. Effect of *Bacillus* strains on the *chungkookjang* processing. III. Changes of the free amino acid contents and nitrogen compounds during *chungkookjang koji* preparation. Korean J. Food Sci. Technol. 15: 385-391 (1983)
 18. Kim KJ, Ryu MK, Kim SS. *Chungkook-jang koji* fermentation with rice straw. Korean J. Food Sci. Technol. 14: 301-308 (1982)
 19. Suh JS, Lee SG, Ryu MK. Effect of *Bacillus* strains on the *chungkook-jang* processing. II. Changes of the components and enzyme activities during the storage of *chungkook-jang*. Korean J. Food Sci. Technol. 14: 309-314 (1982)
 20. Choi UK, Ji WD, Chung YG. Characteristics of *chunggukjang* produced by *Bacillus subtilis* DC-2. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 846-851 (1998)
 21. 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)
 22. Yoo SM, Chang CM. Study on the processing adaptability of soybean cultivars for korean traditional *cheonggukjang* preparation. J. Korean Soc. Agr. Chem. Biotechnol. 42: 91-98 (1999)
 23. Jung YK, Lee YK, No HK, Kim SD. Effect of sea tangle on fermentation and quality characteristics of *cheonggukjang*. Korean J. Food Preserv. 13: 95-101 (2006)
 24. Jana M, Pati B. Thermostable, salt-tolerant α -amylase from *Bacillus* sp. MD-124. J. Basic Microbiol. 37: 323-326 (1997)
 25. Lee HJ, Suh JS. Effect of *Bacillus* strains on the *chungkook-jang* processing. (1) Changes of the components and enzyme activities during *chungkookjang-koji* preparation. Korean J. Nutr. 14: 97-104 (1981)