

고품질의 청국장 생산 발효균주 선별 및 최적화

황현애 · 이남근¹ · 조일재¹ · 함영태¹ · 권기옥² · 김병용*

경희대학교 식품공학과 및 생명자원연구소, ¹중앙대학교 생명공학과, ²(주)상촌식품

Selection of Microorganisms and Optimization of Manufacture Process for *Cheonggukjang*

Hyun-Ae Hwang, Nam-Kuen Lee¹, Il-Jae Cho¹, Young-Tae Hahm¹, Ki-Ok Kwon², and Byung-Yong Kim*

Department of Food Science & Biotechnology, Institute of Life Science and Resource, Kyung Hee University

¹Department of Biotechnology, Chung Ang University

²Sangchon Food

Abstract This study was conducted to examine the quality enhancement of fermented soybean pastes (*cheonggukjang*) using microorganisms with high enzyme activities and proper experimental design. The microorganisms for soybean paste fermentation were selected from a specific area of Gyeonggi and were identified by 16S rDNA sequence analysis. To prepare the *cheonggukjang*, an optimum mixing ratio of selected microorganisms was determined using contour plots and numerical optimization methods. A total of 39 microorganisms were isolated from the soybean paste, consisting primarily of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, and no mold was found. Three microorganisms showing high enzyme activities were selected and used to formulate an optimum mixing ratio for *cheonggukjang* preparation. Based on levels of amino-nitrogen, ammonium-nitrogen, antioxidant activity values, and sensory preference results, the optimum mixing ratio of 50% of *Bacillus* sp. SC-1 and 50% SC-3 was suggested for the manufacture of high quality of *cheonggukjang*.

Keywords: *cheonggukjang*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, mixture design, optimization, contour map

서 론

된장, 청국장, 간장 및 고추장 등의 장류 등은 삼국사기에도 나타났듯이 콩을 발효시킨 제품으로서 여러 기능성 생리활성 작용을 하는 고단백 건강식품으로 알려지고 있다(1-3). 그 중 청국장은 *Bacillus natto*나 *Bacillus subtilis* 등에 의해 발효숙성과정 중 대두단백질을 분해시키며 특유한 맛과 향을 내는 식품이다(4-5). 이러한 청국장은 혈전용해효소(1)를 가지고 있고, 항암효과(6)와 높은 isoflavone의 함량을 가지고 있다. Isoflavone은 골다공증예방과 항산화활성작용을 하는 것으로 알려져 있다(7). 그러나 국내의 전역에 걸쳐 많은 청국장이 만들어져 판매되고 있고, 제조방법, 균주, 기능성 물질에 대한 연구가 다양한 연구진에 의해 연구되고 있으나 지역마다 달리 제조되고 있고 표준화가 잘 이루어지지 않고 있다.

장류에서 영양과 품질을 결정하는 가장 중요한 원인중의 하나는 균주의 종류이며, 따라서 이 균주들의 분리 및 동정은 매우 중요한 작업이다. 장류는 균주 및 발효조건에 따라 다양한 생리활성물질이 생성되고 기능성이 달리 나타나므로(8-9) 최적 균주를 분리·동정하고 대량화하여 고품질의 장류를 제조할 필요가

있다. 또한, 고품질의 장류를 제조하기 위해서는 적절한 실험 디자인과 통계처리에 의한 최적화 기법을 도입하여 선택한 균주의 최적 배합비를 산출하고 맛이나 영양성분 뿐만 아니라 생리활성 물질이 최대 효율을 이끌어 내어야 한다. 복합물질에서의 공정 및 성분비의 최적화 방법은 최근 가공(10), 압출성형을 이용한 건조제품(11) 및 생선단백질과 전분류의 혼합제조(12)와 같은 식품 공정분야에서 다양하게 이용되고 있다. 최적 혼합비 혹은 결합효과를 관찰하기 위해서는 일반적으로 반응표면방법이 사용되며 최적효과를 나타내는 영역을 contour map을 이용하여 성분들의 효과를 나타내고 있다(13).

따라서 본 연구에서는 생산 장류의 품질 균일화를 위한 우수 균주를 확보하고, 실험 mixture의 최적화 기법을 이용하여 그 균주들의 최적 배합비를 창출하여 고품질의 장류를 제조하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

장류제조 주 원료인 대두는 정협농협(Suwon, Korea)에서 구입하였으며, 장류발효균주의 분리에 필요한 장류는 (주)상촌식품(Yongin, Korea)에서 제조된 장류를 사용하였다.

장류발효균주 분리

장류발효균주를 분리하기 위하여 전통장류로 제조된 된장류 및 속성장(청국장) 1g에 멸균수를 가한 후 80°C에서 15분간 물중탕하고, LB(Difco™ Luria Bertani, BD, Sparks, Maryland, USA) 한 천고체배지에 10⁶-10⁷로 희석하여 도말 후 37°C에서 24-48시간

*Corresponding author: Byung-Yong Kim, Department of Food Science and Technology, Institute of Life Science and Resource, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi-do 449-701, Korea
Tel: 82-31-201-2627

Fax: 82-31-202-0540

E-mail: bykim@khu.ac.kr

Received June 2, 2008; revised June 26, 2008;

accepted July 11, 2008

배양하여 colony 형태로 균을 분리하였다.

16S rDNA 염기서열 분석에 따른 분리 균주 동정

장류들로부터 분리된 각 균주들을 동정하기 위하여, 16S rDNA 염기서열 분석을 실시하였다. 16S rDNA 염기서열 분석을 위한 PCR 반응은 각 균의 single colony를 이용하여 실시하였으며, primer는 Weisburg 등(14)이 제안한 primer를 기초로 제작된 forward primer인 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'와 reverse primer인 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'을 사용하였다. PCR 반응 조건은 97°C에서 5분 동안 변성시키고, 각 단계 94°C에서 1분, 56°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초 동안 DNA 증폭 반응을 30회 실시하고 마지막으로 72°C에서 4분 동안 반응을 실시하였다. PCR 증폭된 DNA band를 gene clean kit(WelPrep™ gel extraction kit, Daegu, Korea)를 이용하여 정제한 후, 염기서열 분석을 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에서 실시하였다. 염기서열 분석을 통하여 얻은 각 균주의 염기서열은 Blast Network Service를 이용하여 NCBI GenBank database의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. Chromas lite(version 2.01)를 이용하여 분석된 염기서열을 확인하고, 유연관계가 있는 database와 비교분석 후, 비교된 서열을 Jphydit version 1.0(phylogenetic sequence editor for JAVA)을 사용하여 염기서열을 재작성하고, NCBI GenBank database를 이용하여 최종적으로 계통분류학적 유사도를 분석하였다.

장류발효균주의 효소활성 측정

분리·동정된 장류 발효균주로부터 protease, cellulase, amylase 및 lipase의 효소 활성이 우수한 균주를 최종 선별하기위하여, 각 효소활성을 측정할 수 있는 1% skim milk(protease 활성측정용), 0.5% carboxymethyl cellulose(cellulase 활성측정용), 3% soluble starch(amylase 활성측정용) 및 0.5% tri-butyrin(lipase 활성측정용)을 첨가한 고체 LB배지의 0.6 mm 종이 디스크 위에 37°C에서 24시간 동안 전배양된 각 균의 0.45 μL 여과막을 이용하여 제균한 상등액 10 μL를 접종하고 37°C에서 12시간 배양한 후 배지상의 투명 환을 비교하여 효소의 활성이 우수한 균주를 최종 선별하였다. Cellulase 및 amylase의 활성에 따른 투명 환을 관찰하기 위해서 각각 0.1% congo red와 iodine 용액을 사용하였다.

선별된 효소활성 우수균주를 이용한 장류 제조

장류생산 최적화 공정 확립을 위한 모델 장류로써 속성 장류인 청국장을 제조하였다. 속성장류 제조는 대두를 상온에서 20시간 동안 물에 침지하여 건져낸 후 121°C에서 30분간 증자하고, 증자된 대두 콩 80g에 1×10⁷ cells/g이 되도록 전배양한 선별균주 *Bacillus* sp. SC-1, SC-3, SC-5, 그리고 SC-20을 접종하여 42°C에서 24시간 동안 발효시킨 후 4°C에서 3일간 후숙시켜 제조하고, 최적화 공정을 확립을 위한 일반분석에 사용하였다.

제조된 청국장의 일반분석

수분함량은 105°C의 dry oven(HK-D0135F, Korea General Mechanics, Yongin, Korea)에 24시간 넣고 측정된 중량을 이용하여 구하였다. 조단백질은 Kjeldahl법을 이용하였고, 아미노태질소는 중성 formalin을 이용한 적정법을 이용하였다. 암모니아태질소는 In 등(15)을 토대로 아미노태질소 측정 시 감압 여과한 여액 0.1 mL phenol-hypochloride 반응에 의하여 phenol 10g과 sodium nitroprusside dihydrate 0.05 g, 1,000 mL 증류수를 섞은 용액(A)와 Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.9 g과 NaOH 6g과 NaOCl 10 mL와 1,000 mL

증류수를 섞은 용액(B)을 각각 2 mL씩 넣어 37°C에서 20분간 반응 시킨 후, 630 nm에서 spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하여, ammonia sulfate를 이용하여 표준곡선을 토대로 암모니아태질소량을 계산하였다.

항산화 활성 측정

분리된 각각의 분획들을 전자공여에 의해 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)의 유리 라디칼이 소거되어 hydrazine 형태로 환원되고 이에 따라 색이 보라색에서 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 DPPH의 전자 공여능을 측정하였다. DPPH를 이용한 전자 공여능 측정은 Lee 등(16)의 방법을 토대로 70% MeOH 추출한 청국장 추출물 50 μL와 0.04% DPPH 용액 200 μL을 혼합 후 70% MeOH로 1 mL 맞춘 후 실온에 방치하면서 10분 간격으로 517 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

관능평가

경희대 식품공학과 대학원생 10명을 선발하여 관능검사원으로 활용하였다. 마쇄한 청국장 10g에 소금을 1g 첨가하여 상온에서 1시간 동안을 끓여 준비하였으며 평가항목은 향, 색상, 이취, 맛(선호도)에 대하여 9점 척도법을 사용하였다. 또한 통계분석은 SAS(version 8.0, 1999, Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA)를 사용하였고, 시료 간의 차이를 검증하기 위하여 유의차 0.05 수준에서 Duncan의 다중비교를 수행하였다.

모델 청국장류 제조의 최적화

상호 균주들 간 혼합물 design, data 분석 및 혼합 최적화는 design expert 7(Stat-Easy Co., Minneapolis, MN, USA)을 이용하였고, constraint 값으로는 아미노태질소, 암모니아태질소, 선호도, 항산화 활성으로 정하였다. 세 균주 총 함량 100% 내에서 각 물질의 최소 및 최대비율은 0-100%로 정하고 각 조성에 따른 성분들의 반응을 보기 위하여 contour plot을 이용하였다. 최적화는 canonical 모형의 수치 최적화(numerical optimization)를 통하여 성분비를 선정하고, 그때의 점을 예측하였다. 수치 최적화는 canonical 모형을 근간으로 하는 모델의 수에 각 반응에 대한 목표(goal area)를 설정하고 다음 식에 의하여 구하였다(17).

$$D = (d \times d \times \dots \times d_n)^{1/n} = \{\prod_{d_i}\}^{1/n}$$

D: overall desirability, d: desirability, n: number of responses

결과 및 고찰

장류로부터 발효 균주 분리·동정 및 효소활성 우수균주 선별

전통적으로 제조된 된장류 및 속성장인 청국장으로부터 분리된 발효균주는 colony 형태에 따라 총 39종(된장류 19종, 속성장인 청국장 20종) 분리되었으며, 형태학상 및 16S rDNA 염기서열 분석 등을 통해 수집된 장류로부터 균주는 대부분 *Bacillus* sp.으로 *Bacillus licheniformis*와 *B. subtilis*와 높은 상동성을 갖는 균주 20종을 확인하였다(Table 1). 된장류에서의 곰팡이류는 분리되지 않았으며, 이는 속성 단계인 된장에서는 메주 띄우는 단계에서와는 달리 곰팡이가 아닌 *Bacillus* sp. 균주가 관여하기(18) 때문인 것으로 사료된다. 고품질의 장류생산 및 최적화 공정을 확립하기 위한 수집된 장류로부터 효소활성이 우수한 균주를 선별하기 위하여 발효 시 장류의 품질 및 기능성에 매우 중요한 진분분해효소, 단백질분해효소, 지방분해효소, 섬유소분해효소의 활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다. 분리된 29종의 발

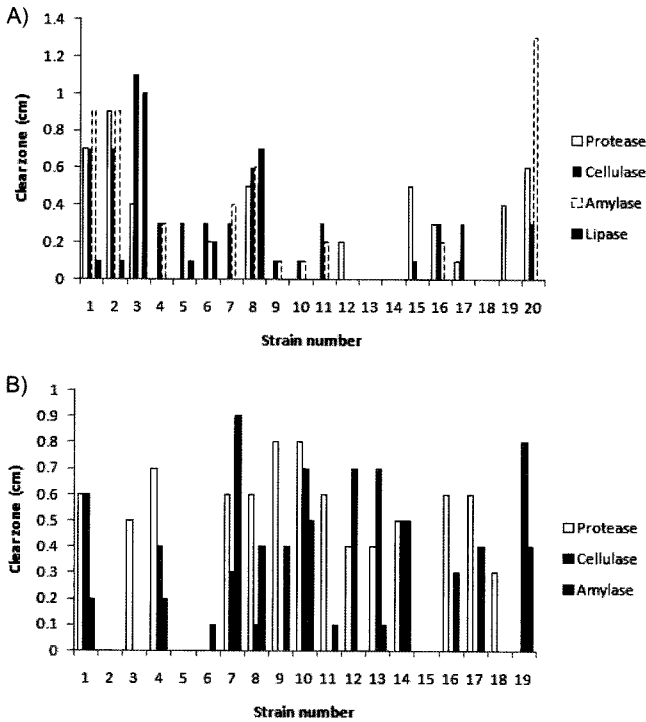


Fig. 1. Analysis of enzyme activity of the isolated fermentation strains from soybean pastes. A, isolated fermentation strains from cheonnggukjangs; B, isolated fermentation strains from 19 different doenjangs.

효균마다 효소활성은 많은 차이가 났으며, 이 중 전반적인 청국장류에서는 효소활성이 우수한 5균주(*Bacillus* sp. SC-1, SC-2, SC-3, SC-8, SC-20)를 확인할 수 있었고, 된장액류에서는 lipase 활성이 선별 배지상에서 분리된 균의 모든 상등액에서 거의 검출이 되지 않을 정도로 매우 약한점을 제외하고는, 전반적으로 모든 효소활성이 궁중장이라는 된장(Fig. 1B의 strain number 7-13)에서 분리된 균주들의 상등액에서 효소활성이 우수하였다(Table 1).

효소활성이 우수한 균주들로 제조된 청국장의 일반특성분석

장류 생산 최적화하기 위해 제조한 장류로부터 분리된 효소활성이 우수한 균주를 이용하여 청국장을 제조 후 이에 따른 결과물들을 일반특성 분석하여 완성하였다. 청국장류 생산 최적화에 이용된 균은 총 4종으로 *Bacillus* sp. SC-1, SC-3, SC-20번 균주

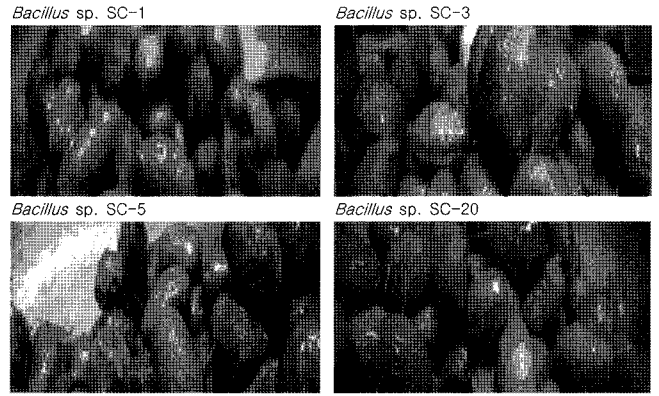


Fig. 2. Cheonoggukjangs fermented by the strains isolated from traditional soybean pastes.

는 효소활성이 우수한 균들이고, *Bacillus* sp. SC-5번은 효소활성이 상대적으로 매우 낮은 효소활성을 갖는 균으로 실험계획법과 통계적인 모델화 및 선형 프로그램을 이용하기 위하여 선별되었다. 이들 균을 이용하여 청국장류를 제조 후 각 제조된 속성장류에 있어서 생성된 점질물로 보았을 때(Fig. 2) *Bacillus* sp. SC-1번 균주로 제조한 청국장이 진득진득한 성질을 가지고 있었고, *Bacillus* sp. SC-20번 균주로 제조한 청국장은 점질물이 묽은 성질을 가지고 있었으나 모든 청국장에서 점질물 형성 정도는 잘 이루어진 것으로 보였다. 수분함량, 단백질, 아미노태질소, 암모니아태질소, 관능 선호도에 대한 결과는 Table 2에 나타내었다. 수분함량은 62.5에서 66.8%, 조 단백질은 6.0에서 6.5 mg%의 범위를 보여 각 균주별로 특별한 유의적 차이를 보이지 않았다. 청국장의 원료인 대두 단백질이 미생물에 의해 분해되어 구수한 맛을 내는 아미노태질소의 생성실험 결과, 아미노태질소의 양은 *Bacillus* sp. SC-1의 41.8%와 SC-2번의 40.2%로서, *Bacillus* sp. SC-5번 균주(10.4%)와 SC-20번(11.3%)에 비해 높은 것으로 측정되었다. 이취에 영향을 미치는 암모니아태질소는 *Bacillus* sp. SC-1, SC-3, SC-20번 균주에 의해 제조된 청국장이 *Bacillus* sp. SC-5번 균주에 의해 제조된 청국장에 비해 높았다. 청국장 발효과정 중의 질소함량의 변화에 있어서, 발효기간 중 주로 미생물이 분비하는 protease가 원료 대두의 단백질에 작용하여 수용성 질소 형태로 가수분해 되고 이어서 peptide를 거쳐 아미노태질소 형태로 가수분해하여 청국장의 구수한 맛을 생성함(19)과 동시에 발효가 계속 진행되면서 암모니아태질소를 형성시킨다(20). Suh 등

Table 1. Identification of strains isolated from soy paste using 16S rDNA sequence analysis

Strain no	Identified species	Similarity (%)	Strain no	Identified species	Similarity (%)
SC-1	<i>B. licheniformis</i>	97	SC-11	<i>B. subtilis</i>	40
SC-2	<i>B. subtilis</i>	97	SC-12	<i>B. subtilis</i>	99
SC-3	<i>B. subtilis</i>	97	SC-13	<i>B. licheniformis</i>	99
SC-4	<i>B. licheniformis</i>	97	SC-14	<i>B. licheniformis</i>	99
SC-5	<i>B. licheniformis</i>	99	SC-15	<i>B. subtilis</i>	99
SC-6	<i>B. licheniformis</i>	96	SC-16	<i>B. subtilis</i>	98
SC-7	<i>B. licheniformis</i>	100	SC-17	<i>B. subtilis</i>	99
SC-8	<i>B. subtilis</i>	98	SC-18	<i>B. licheniformis</i>	98
SC-9	<i>B. subtilis</i>	97	SC-19	<i>B. subtilis</i>	99
SC-10	<i>B. licheniformis</i>	95	SC-20	<i>B. subtilis</i>	99

Table 2. Characteristics of cheonggukjang made by different four strains

	<i>Bacillus</i> sp. SC-1	<i>Bacillus</i> sp. SC-3	<i>Bacillus</i> sp. SC-5	<i>Bacillus</i> sp. SC-20
Moisture content (%)	63.5 ^a	62.5 ^a	62.5 ^a	66.8 ^a
Crude protein (mg%)	6.5 ^a	6.2 ^a	6.0 ^a	6.3 ^a
Ammonia-nitrogen (mg/g)	154 ^a	133 ^{ab}	63 ^c	126 ^b
Amino-nitrogen (%)	41.8 ^a	40.2 ^a	10.4 ^b	11.3 ^b
Preference	5.2 ^a	5.7 ^a	4.6 ^b	5.3 ^a

Means with the same superscript in a row are not significantly different at $p < 0.05$.

(21)도 아미노태질소 함량과 암모니아태질소 함량은 발효시간에 따라 증가하는 것으로 보고하였다. 따라서 단백질이 분해되어 아미노태질소 함량이 증가하는 것은 바람직하나 그 이상의 분해가 되어 암모니아태질소 함량의 증가는 오히려 청국장의 불쾌 취를 주어 품질을 저하시키므로 암모니아태질소의 생성을 조절할 필요성이 있다고 본다. 4개 균주들로 제조한 청국장의 관능검사 결과, 선호도 면에서는 *Bacillus* sp. SC-3번 균주로 제조한 청국장이 높았으며, *Bacillus* sp. SC-5번 균주로 제조한 청국장이 제일 낮은 점수를 받았다. 이것은 *Bacillus* sp. SC-3번 균주로 제조한 청국장의 아미노태질소의 함량이 높아 구수한 맛을 내고 불쾌 취는 적게 발생시킨 결과로 생각되며, 또한 고품질의 장류 제조는 효소활성이 우수한 균으로부터 제조됨을 확인할 수 있었다.

최적화를 위한 design point 설정 및 response

활성이 높은 3균주(SC-1, 3, 20)를 선택하였고, 그 균주들의 제한 범위를 0-100%로 설정하였으며, 그 범위들을 modified distance

design에 적용하여 혼합물 내 실험점을 설정하였다. 총 15개의 실험점 중, 6개의 실험점과, lack of fit의 계산을 위한 5개 실험점, 그리고 4개의 반복점이 설정되었다. 이에 따라 선정된 총 실험점 및 측정결과는 Table 3에 나타내었다. 모든 실험순서(run)는 실제 실험디자인에 의해 배열되는 순서에 대한 구획의 오차를 없애기 위해 무작위로 실행하였다(11). 균주의 배합에 따라 만들어진 청국장들은 혼합비에 따라 아미노태질소의 경우 3.73에서 27.07 mg%, 암모니아태질소는 5.58에서 97.17 mg/g, 항산화제는 0.47에서 1.85, 선호도는 3.73에서 5.73의 범위를 보여주었다.

각 반응의 model화 및 분석에 있어서는 혼합물 내의 각 성분이 미치는 영향을 알아보기 위해 설정된 반응별로 모델링에 필요하고(10) 그 결과는 Table 4에 나타내었다. 분석은 모델에 대한 F-test를 통하여 유의성 검사를 하였다. 또한 contour plot을 이용하여 일정한 비율에서 다른 요소들이 고정되는 동안 각 혼합물 성분변화에 따른 영향을 나타내었다. 아미노태질소와 암모니아태질소, 항산화는 linear model이 선택되었고, 선호도는 비선형 형

Table 3. Quality characteristics of cheonggukjang made with four strains by modified distance design

Standard	Run	Factor			Response			
		<i>Bacillus</i> sp. SC-1	<i>Bacillus</i> sp. SC-3	<i>Bacillus</i> sp. SC-20	Amino-nitrogen (%)	Ammonia-nitrogen (mg/g)	Preference	Antioxidative activity
5	1	0	50	50	23.8	11.83	5.93	1.85
4	2	0	100	0	26.13	97.17	4.87	1.85
7	3	67	17	17	14.7	17.33	5.2	1.8
11	4	100	0	0	22.63	14.33	3.73	0.47
13	5	0	0	100	13.07	5.58	5.13	1.9
8	6	17	67	17	27.07	32.67	5.73	1.85
15	7	50	0	50	22.87	9.92	4.33	1.7
1	8	100	0	0	22.63	21.25	3.73	1.85
10	9	33	33	33	14.7	26.33	5.73	1.85
2	10	50	50	0	22.75	24	5.33	1.75
3	11	50	0	50	7.93	68.56	4.33	0.63
12	12	0	100	0	19.6	20.11	4.87	0.5
6	13	0	0	100	3.73	9	5.13	1.07
9	14	17	17	67	20.3	19.83	5.6	1.8
14	15	50	50	0	22.75	32.89	5.33	0.9

Table 4. Analysis of selected models and regression at polynomial equations for the four responses

Response	Model	Prob>F	Equation in terms of pseudo component
Amino-nitrogen	Linear	0.0224	20.77842A + 25.19545B + 10.77181C
Ammonia-nitrogen	Linear	0.2219	22.2316A + 48.10812B + 12.35357C
Preference	Quadratic	<0.0001	3.757701A + 4.836187B + 5.113687C + 4.629407AB + 0.144407AC + 4.462505BC
Antioxidative activity	Linear	0.7738	1.261382A + 1.477043B + 1635225C

태인 quadratic model이 선택되었다($p < 0.05$). 순수오차와 잉여오차의 비교에 의한 lack of fit test는 아미노태질소는 0.0224의 낮은 probability를 나타내었으며, 선택도는 0.0001 이하의 비교적 낮은 probability 값을 가져 모델에 대한 적합성을 확인하였다(Table 4). 특히, 예측된 canonical 식에서 결정된 계수들은 *Bacillus* sp. SC-3 균주들에 의한 효과가 반응에 미치는 영향을 수치로 보여주고 있는 것으로, 암모니아태질소에서는 모든 혼합성분들이 기여하는 정도는 같은 정도의 기여도 및 linear 모델을 나타내어 각 성분들의 독립적 기여도를 나타내었다.

장류 생산 최적화에 따른 상기 실험값들을 토대로 *Bacillus* sp. SC-1, SC-3, SC-20 세 균주를 사용하여 최적의 생산 배합비를 설정하였다(Table 5). 설정 범위로는 아미노태질소와 선택도 최대로, 암모니아태질소와 항산화는 최소로 예측하였다. 이것을 만족하는 수치점을 예측한 결과 아미노태질소 23.01%, 암모니아태질소 35.297%, 선택도 5.46, 항산화 1.37로 계산되었다. 또한, contour plot을 통한 model 분석에 있어서는 각 성분들이 선택도, 암모니아태질소, 아미노태질소, 항산화에 미치는 영향을 나타내는 것으로 contour plot는 색 변화에 따른 함량 변화 및 그에 따른 모델을 나타내고 있다. 이러한 최적화 방법은 Fig. 3에서도 나타내었다. 이 contour map은 각 성분과 반응에 대한 모형을 이용하여 그래프의 중첩되는 범위를 나타내는데, 그 최적화 정도의 척도로 desirability를 사용한다. 최대의 desirability는 반복 연산도중 계산되어, 여러 결과들 사이에 최적화 되어진 한 값에 수렴하며 이 값은 Fig. 3에서 0.635로 보여 졌으며, 이 값에 해당하는 성분비 및 예측되는 반응치는 Table 5에 나타내었다. 결론적으로 본 연구에서 분리된 발효 우수 균주인 *Bacillus* sp. SC-1, SC-3, SC-

20 균주를 이용한 최적 배합비는 전체 100%로 봤을 때 *Bacillus* sp. SC-1 균주 약 50%와 *Bacillus* sp. SC-3 균주 50%를 혼합하여 청국장을 제조 시 암모니아태질소, 아미노태질소, 선택도 및 항산화능이 최적인 청국장이 생산되었다.

요 약

본 연구는 청국장의 품질을 향상시키고 최적화시키기 위해 경기도 이천에서 높은 효소가를 가진 균주를 분리·동정하며 선택된 균주들을 이용하여 최적배합비를 산출하고자 하였다. 16S rDNA와 PCR을 이용하여 균주를 동정한 결과, 39개의 균주 대부분이 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*이었으며 곰팡이는 검출되지 않았고 그 중 5개의 균주가 높은 역가를 나타내었다. 고품질의 장류생산 및 최적화 공정을 확립하기 위해 분리·동정한 균주 중에서 amylase, protease, lipase와 cellulase의 활성이 높은 균주를 3개 선택하여 최적화 공정작업에 이용하였고 실험법에 의해 청국장을 제조하였다. 암모니아태질소, 선택도, 아미노태질소 및 항산화가에 근거를 두어 contour map과 numerical 최적화를 한 결과, 50%의 *Bacillus* sp. SC-1과 50% SC-3을 섞었을 때 최적의 청국장이 만들어졌다.

감사의 글

본 연구는 2007년 중소기업청의 산학연 공동기술개발사업 연구결과로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrolytic bacterial strain from *cheonggukjang*. Korea J. Appl. Microbiol Biotechnol. 23: 1-5 (1995)
2. Kim YS, Jung HJ, Park YS, Yu TS. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *chunggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 475-478 (2003)
3. Ahn SK, Hong KW. Hyaluronidase inhibitory activity of extracts from *doenjang*, *cheonggukjang*, and *miso*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34: 1119-1123 (2005)
4. Lee BY, Kim DM, Kim KH. Studies on the change in rheological properties of *chunggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 478-484 (1991)
5. Lee BY, Kim DM, Kim KH. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *chunggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 599-604 (1991)
6. Chung KS, Yoon KD, Hong SS, Kwon DJ. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of Korean fermented soybean products. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 75-85 (1996)
7. Choi YB, Shon HS. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 745-750 (1998)
8. Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. Antimicrobial activities of viscous substance from *chunggukjang* fermented with different *Bacillus* spp. J. Fd. Hyg. Safety 16: 188-193 (2001)
9. Yun SH, Lee SS, Jang JE, Noh GW. Sensory evaluation of *chunggukjang* with herbal extracts and clinical evaluation in atopic dermatitis patients. Korean J. Nutr. Soc. 37: 669-674 (2004)
10. Yoon WB, Kim BY, Hahm YT. Study upon the rheological properties and optimization of *tofu* bean products. Agr. Chem. Biotechnol. 40: 225-231 (1997)
11. Han KY, Kim BY, Lee JK. Production of extrudates formulated from pacific sand lance sauce by-product and dried *biji*. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 186-193 (2002)
12. Yoon WB, Park, JW, Kim BY. Linear programming in blending various components of surimi seafood. J. Food Sci. 62: 561-564, 567

Table 5. Optimum constrains values using numerical analytical methods in the object goal

Constraints name	Goal	Numerical optimization solution
<i>Bacillus</i> sp. SC-1	is in range	49.51%
<i>Bacillus</i> sp. SC-3	is in range	50.49%
<i>Bacillus</i> sp. SC-20	is in range	0%
Amino-nitrogen	maximize	23.01%
Ammonia-nitrogen	minimize	35.297 mg/g
Preference	maximize	5.46
Antioxidative activity	minimize	1.37

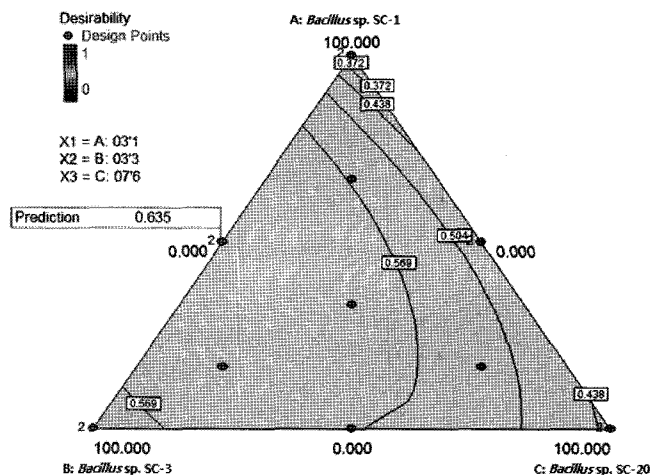


Fig. 3. Contour plot of desirability of the optimum result.

- (1997)
13. Yoon WB, Kim BY, Shin DH. Study upon the optimization and interaction effects for the food mixture product. *Food Eng. Prog.* 1: 47-53 (1997)
 14. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703 (1991)
 15. In JP, Lee SK, Ahn BK, Chung AI, Jang CH. Flavor improvement of *cheonggukjang* by addition of yucca (*Yucca shidigera*) extract. *Korean J. Food. Technol.* 34: 57-64 (2002)
 16. Lee NK, Hahm YT. Antioxidative characteristic of browning reaction products of glucose-poly- γ -glutamate (Glu-PGA) obtained from amino-carbonyl reaction. *Korean J. Food. Technol.* 37: 812-815 (2005)
 17. Derringer G, Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Technol.* 12: 214-219 (1980)
 18. Shin SY, Kim YB, Yu TJ. Flavour improvement of soybean pastes by the addition of *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces rouxii*. *Korean J. Food. Technol.* 17: 8-13 (1985)
 19. Heo S, Le SK, Joo HK. Isolation and identification of fibrinolytic bacterial from Korean traditional *cheonggukjang*. *Agr. Chem. Biotechnol.* 41: 119-124 (1998)
 20. Yeun KC, Kim DH, Kim JO, Park BYJ, 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)
 21. Suh JS, Ryu MK, Hur YH. Effect of *Bacillus* strains on *cheonggukjang* processing. *Korean J. Food Sci. Technol.* 15: 385-391 (1983)