

*Bacillus subtilis*와 *Lactobacillus plantarum*의 혼합배양이 청국장 품질에 미치는 영향

주경은 · 오남순*
공주대학교 식품공학과

Effect of the Mixed Culture of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on the Quality of *Cheonggukjang*

Kyung-Eun Ju and Nam-Soon Oh*

Department of Food Science and Technology, Kongju National University

Abstract The goal of this study was to improve the quality of *cheonggukjang* by the optimization of the inoculation methods of the *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) and *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) strains. In order to optimize the mixed cultivation of *B. subtilis* and *L. plantarum*, the *B. subtilis* strain was inoculated into steamed soybeans after cultivation of *L. plantarum*. Inoculation size of *B. subtilis* was changed to the simultaneous inoculation method in order to stimulate the growth of the *L. plantarum* in *cheonggukjang*. The viable cell count of *L. plantarum* increased from 2×10^7 CFU/g to $2-6 \times 10^8$ CFU/g and *B. subtilis* grew to 9×10^8 CFU/g. These results showed that 2 strains were successfully able to grow in the steamed soybean for good quality of *cheonggukjang* by optimization of the inoculation methods. The sensory evaluation indicated that a favorable aroma and overall acceptance of *cheonggukjang* by the optimized mixed cultivation of *B. subtilis* and *L. plantarum*, which was relatively higher than those of *cheonggukjang* by single strain inoculation of *B. subtilis*.

Key words: *cheonggukjang*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, mixed culture, product quality

서 론

청국장은 증자한 콩에 *Bacillus subtilis*(*B. subtilis*)를 배양시켜 만든 우리나라 고유의 전통장류식품으로 다른 장류와는 달리 단기간에 제조하여 식용할 수 있으며, 단백질, 필수 아미노산 및 지방산 등이 풍부한 식품성 고영양식품이다.

청국장은 혈전용해효소능(1,2), 고혈압방지효과(3), 콜레스테롤 저감능(4), 항돌연변이성(5), 항암성(6) 등의 생리적 기능성들을 가지고 있으나, 식생활의 변화와 주거문화의 서구화로 인하여 청국장의 소비는 점차 감소되고 있다. 특히, 발효 또는 조리과정 중에 발생하는 특유한 이취는 청국장에 대한 소비감소의 주요 원인 중 하나이며, 이러한 청국장의 이취를 제거하고 품질을 개선하기 위하여, 녹차, 유카추출물, 홍삼 등을 첨가한 청국장 제조에 대한 연구(7,8)와 썩 추출물을 사용하여 청국장의 향을 개선(9)하고자 하는 노력이 있었다. 본 연구는 이러한 청국장의 품질적 단점을 보완할 목적으로 청국장의 제조에 유산균주를 도입하고자 하였다. 유산균은 인간이 오랫동안 이용해온 유익한 미생물로 김치, 발효 유제품 등의 식품에서 중요한 발효작용을 수행한다. 이러한 유산

균은 또한 유당불내증의 완화(10), 병원성 세균의 억제(11), 콜레스테롤 저하(12), 항암성(13) 등의 효과를 가지고 있다. 장류 제품의 품질개선을 목적으로 *B. subtilis*와 *Rhizopus oryzae koji*의 혼합균주를 이용한 연구(14)와 *Pediococcus halophilus*를 혼합균주로 활용한 간장의 품질개선(15)에 관한 연구들이 있다. 특히, 청국장의 제조에 유산균을 활용한 연구로는 *B. subtilis*와 *Lactobacilli*의 혼합배양으로 청국장의 불쾌취의 개선에 관한 연구 결과(16)가 보고된 바 있으나, 단지 향기 성분을 비교하여 청국장의 이취개선 가능성을 제시하고 있을 뿐이며, 유산균을 적용한 청국장의 품질 개선에 관한 연구는 실질적으로 찾아보기 힘들다. 유산균종 중 *Lactobacilli*속 균주들은 동서양의 발효식품에서 발견되는 주요한 발효균주로 잘 알려져 있다. 따라서, 우리나라의 대표적인 발효식품인 김치 등 채소류의 주발효 균주로 많이 알려진 *Lactobacillus plantarum*(*L. plantarum*) 균주를 청국장의 품질개선용 균주로 활용하고자 하였다. 즉, *B. subtilis* 균주와 *L. plantarum* 균주를 청국장의 혼합배양에 이용하였으며, 배양방법을 달리한 청국장의 제조 중에 일어나는 두 균종의 분포변화와 이에 따른 청국장의 화학적, 관능적 품질에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

청국장용 균주는 본 실험실에서 분리하여 보관중인 *B. subtilis* CKB 균주(이하 *B. subtilis*)를 사용하였으며, nutrient broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)배지에서 30°C, 약 24시간 동안 배양하여 종균으로 사용하였다. 유산균은 *L. plantarum* ATCC

*Corresponding author: Nam-Soon Oh, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan, Chungnam 340-702, Korea
Tel: 82-41-330-1485
Fax: 82-41-333-9610
E-mail: nsoh@kongju.ac.kr
Received May 13, 2009; revised June 29, 2009;
accepted June 29, 2009

8014 균주(이하 *L. plantarum*)를 사용하였으며, 0.05%의 L-cysteine(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 MRS (Difco Laboratories)배지에서 37°C, 24시간 동안 배양하여 종균으로 사용하였다.

청국장 제조방법

대두를 수세한 후 4°C에서 24시간 동안 수침하였다. 증류수에 불린 대두는 물을 뺀 후 250 mL의 삼각플라스크에 50 g씩 담고 autoclave(DA-AC-60, Dong-A Scientific Corp., Shiheung, Korea)를 이용하여 121°C에서 30분간 증자하였다. 증자된 대두는 clean bench에서 50°C로 냉각시킨 후 종균으로 배양된 *B. subtilis* 균주의 접종량은 3.9×10^5 CFU/g이 되도록 접종하고 37°C에서 48시간 동안 진탕배양(Shaking incubator, SI-600R, Jeio Tech Co., Ltd. Daejeon, Korea)하였다. 종균으로 배양된 *L. plantarum* 유산균주는 실험방법에 따라서 접종하였다.

생균수 측정

청국장에 접종한 *B. subtilis* 균주와 *L. plantarum* 실험균주의 생균수 측정은 청국장 1 g을 멸균된 생리식염수(0.8% NaCl)로 희석하여 측정하였다. *B. subtilis* 균주의 생균수는 희석액을 plate count agar 배지에 도말한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하였으며, *L. plantarum*의 생균수는 TOS propionate agar medium (Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 도말한 후 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 나타난 colony는 계수하여 증자대두 단위 질량당 생균수(CFU/g)로 나타내었다.

Protease 활성도

Azocasein을 이용한 중성 protease의 분석은 Prestidge 등(17)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시료 5 g을 증류수로 혼합한 후 거즈로 여액과 대두를 분리하였고 분리된 여액을 최종적으로 25 mL가 되도록 증류수로 정용하였다. 거즈로 거른 여액은 10,000 rpm에서 20분 동안 원심분리(Centrifuge, Mega-17R, Hanil Science Industrial, Daejeon, Korea)하였으며 상정액을 분석시료로 사용하였다. 분석시료 0.15 mL에 1 M MES-NaOH Buffer(pH 6.5) 0.05 mL, 증류수 0.05 mL, azocasein(2%(w/v)) 0.25 mL를 시험관에서 혼합한 후 37°C의 항온기에서 30분 동안 반응시킨 후 7% perchloric acid 1 mL를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 반응 종료 후 시료를 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상정액 1 mL에 10 N NaOH 0.15 mL를 첨가한 후 430 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease 1 unit는 1시간 동안의 효소반응에서 변화된 흡광도로 나타내었다.

γ -GTP(γ -glutamyltranspeptidase)

γ -GTP 측정용 키트(AM-158, Asan Pharmaceutical Co., Ltd. Seoul, Korea)로 γ -GTP 활성도를 측정하였다(Protocol sheet 05-03-25, Asan Pharmaceutical Co., Ltd.). 시료 5 g을 증류수로 5배 희석한 후 진탕추출 후 거즈로 여액을 분리하였다. 분리한 여액을 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하였고, 상정액을 효소반응의 조효소액으로 사용하였다. 37°C에서 5분간 예열된 기질 1 mL에 조효소액 0.02 mL를 첨가한 후 37°C 항온기에서 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료에 정색시액 3 mL를 가한 후 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 대조구는 시료 대신 증류수 0.02 mL를 넣고 상기와 같은 방법으로 반응시켰다. 10분 후 시료를 잘 혼합하여 60분 이내에 635 nm에서 흡광도(Spectrophotometer, V-570, Jasco, Tokyo, Japan)를 측정하였으며, 주어진 검량선과 비교하여 γ -GTP의 활성도(U/g)로 나타내었다.

pH

청국장의 pH는 시료 1 g을 증류수 10 mL에 현탁시켜 잘 혼합한 후 pH meter(915PDC, Istek, Seoul, Korea)로 측정하였다.

아미노태 질소 및 암모니아태 질소 정량

청국장의 아미노태 질소는 Formol 적정법(18)으로 측정하였다. 청국장 5 g을 취하여 증류수 250 mL에 현탁시킨 후 여과액 10 mL를 100 mL 삼각플라스크에 취하고, 0.1% phenolphthalein 지시약을 2-3방울 첨가한 후 0.1 N NaOH 표준용액으로 연분홍색이 될 때까지 적정하였다. 다시 포르말린용액(35-40%) 5.4 mL를 첨가하여 적정하여 연분홍색이 될 때까지 소요된 0.1 N NaOH 표준용액의 양으로 아미노태 질소 함량을 계산하였다.

암모니아태 질소 함량은 수질오염 공정 시험방법(19)의 암모니아태 질소 중화적정법으로 측정하였다. 시료 5 g을 증류수와 혼합 진탕한 후 거즈로 여액과 대두를 분리하였다. 분리된 여액을 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상정액을 20 mL로 정용하고, 적정 시료로 사용하였다. 상정액 진량에 4% NaOH 용액을 0.7 mL 첨가한 후 증류플라스크로 옮긴다. 증류플라스크에 산화마그네슘 0.3 g과 비등성을 넣고 증류수로 약 150 mL로 맞춘 후 증류하였다. 100 mL의 수기에 미리 0.05 N 황산용액 25 mL를 넣고 증류액이 70 mL 정도에 이르도록 받은 후 증류수로 100 mL로 맞추었다. 증류한 시료 100 mL를 500 mL 삼각플라스크에 옮기고 메틸레드-브롬크레졸그린 혼합지시액 3-4방울을 넣은 다음 용액의 색이 자회색(pH 4.8)이 나타날 때까지 소요된 0.05 N NaOH 용액의 양으로부터 암모니아태 질소의 농도를 계산하였다.

적정산도

청국장 5 g을 증류수를 이용하여 혼합 진탕한 후 거즈를 이용하여 대두를 걸러낸 후 잔류여액의 최종량을 50 mL가 되도록 맞추었다. 정용한 시료액에 0.1% phenolphthalein을 2-3방울 넣은 후 적정하여 0.1 N NaOH의 소요량으로 측정하였다.

관능검사 및 통계분석

관능검사는 식품공학과 학생 15명을 선발하여 관능검사 요령을 교육시킨 후 실시 하였다. 관능검사 항목은 구수한 향, 암모니아취, 요구르트 향, 전체적 기호도 등을 5점 척도법으로 실시하였다. 각 시험구별로 1점은 '매우 나쁘다', 2점은 '나쁘다', 3점은 '보통이다', 4점은 '좋다', 5점은 '매우 좋다'로 평가하였다. 시료들 사이의 통계적 유의성은 Student's two tail *t*-test로 분석하였다.

결과 및 고찰

청국장의 생균수 및 pH 변화

증자대두에 *B. subtilis* 균주와 *L. plantarum* 균주를 접종하여 청국장을 제조하였다. *B. subtilis* 균주의 접종량은 3.9×10^5 CFU/g이었으며, *L. plantarum*은 5×10^7 CFU/g으로 조절하여 접종하였다. 접종방법은 증자대두에 *B. subtilis* 균주를 단독 접종하거나(Fig. 1), *B. subtilis* 균주와 *L. plantarum* 균주를 동시접종(Fig. 2)하여 배양 실험을 수행하였다.

B. subtilis 균주를 단독으로 접종하였을 때, *B. subtilis* 균주의 생육은 초기 접종량 3.9×10^5 CFU/g에서 12시간 배양 후 1.1×10^9 CFU/g으로 빠른 증식을 보였으며, pH는 초기 6.5에서 시작하여 24시간 후 급격히 증가한 후 96시간째는 pH 7.7에 이르렀다(Fig. 1).

B. subtilis 균주와 *L. plantarum*을 동시에 접종하여 혼합배양한

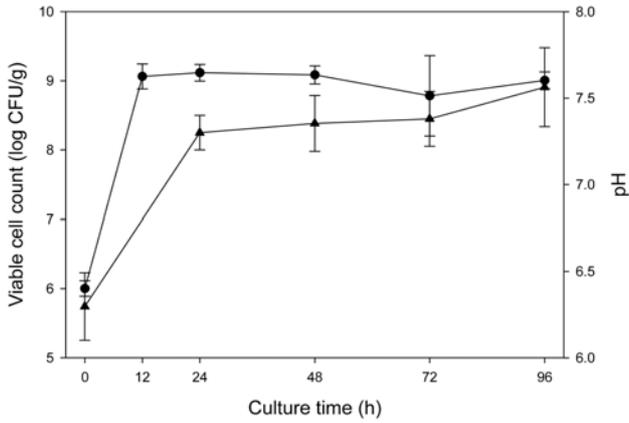


Fig. 1. Growth (●) and pH (▲) during cultivation of *B. subtilis* strain in cooked soybean.

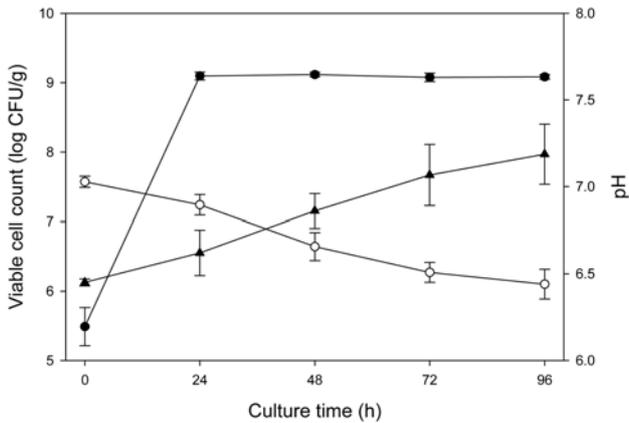


Fig. 2. Growth of *B. subtilis* (●) and *L. plantarum* (○) and the pH (▲) in cooked soybean by mixed culture. Inoculum size of *B. subtilis* was 3.9×10^5 CFU/g and *L. plantarum* was 5×10^7 CFU/g

경우(Fig. 2)에 *B. subtilis*의 생균수는 *B. subtilis* 단일배양의 생균수 변화 경향과 유사하여, *B. subtilis*의 생육에 큰 영향을 미치는 것으로 보이지 않았다. *L. plantarum*의 생육은 초기 접종량인 5×10^7 CFU/g에서 혼합배양한 48시간 후 $2.8-6.5 \times 10^6$ CFU/g, 96시간째는 $9 \times 10^5-2.1 \times 10^6$ CFU/g으로 배양시간의 경과에 따라서 생균수가 오히려 감소하였다. 이는 *B. subtilis*의 생육에 증가대두는 영양소를 섭취하기에 유리한 형태이며 생육에 필요한 영양소를 많이 함유하고 있어 증가대두 내에서 *B. subtilis*가 단시간에 성장하기 때문인 것으로 보인다. 이와 같은 *B. subtilis*의 빠른 생육이 *L. plantarum*의 생육을 억제(11,20)시키는 것으로 보인다. 그러나, pH의 변화는 *B. subtilis*를 단독으로 접종한 경우와 달리 *B. subtilis*와 *L. plantarum* 균주를 혼합배양했을 때는 초기 pH가 6.2에서 배양 96시간 동안 pH 7.2까지 매우 완만한 증가를 보여 유산균의 생육 진행을 간접적으로 분석할 수 있었다.

혼합배양 균주의 접종시점에 따른 생육 특성

*B. subtilis*와 *L. plantarum*의 혼합배양으로 청국장을 제조할 때 *L. plantarum*의 생육도를 증가시킬 수 있는 방법을 모색하기 위하여 먼저 증가대두에 *L. plantarum*을 접종하여 배양을 시작하고, 일정시간이 지난 다음 *B. subtilis*를 접종하여 실험하였다(Fig. 3). *L. plantarum*의 접종량을 2×10^7 CFU/g으로 하여 증가대두에 접종하고 4, 8, 12시간 동안 배양한 후 *B. subtilis*를 3.9×10^5 CFU/

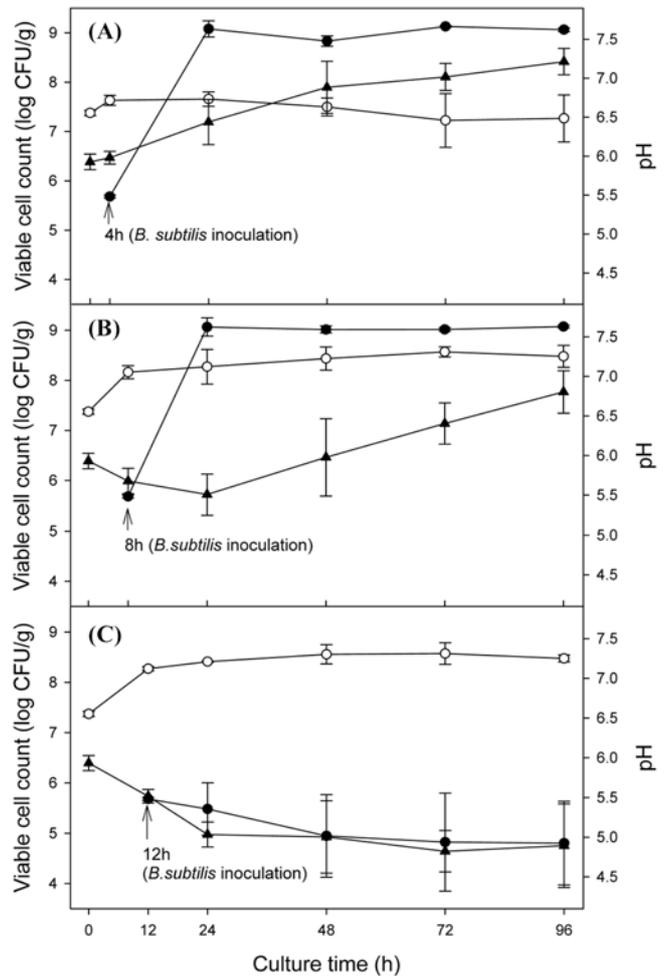


Fig. 3. Growth of *B. subtilis* (●) and *L. plantarum* (○) and the pH (▲) in cooked soybean by various inoculation time. (A) Inoculation of *B. subtilis* after 4 h cultivation of *L. plantarum*, (B) Inoculation of *B. subtilis* after 8 h cultivation of *L. plantarum*, (C) Inoculation of *B. subtilis* after 12 h cultivation of *L. plantarum*. Inoculum size of *B. subtilis* was 3.9×10^5 CFU/g and that of *L. plantarum* was 2×10^7 CFU/g.

g 접종하여 배양을 계속하였다. *L. plantarum*을 접종하여 배양을 시작한 후 4시간째 또는 8시간째 *B. subtilis*를 접종하였을 경우 (Fig. 3(A), (B))에는 *B. subtilis*의 생육은 초기 접종량인 3.9×10^5 CFU/g에서 $1.2-1.8 \times 10^9$ CFU/g로 증가하였으나, 12시간째 *B. subtilis*를 접종하였을 때(Fig. 3(C))는 *B. subtilis*의 생육은 잘 이루어지지 못하여 초기 접종량 대비 1/10 정도인 $1.6-6.2 \times 10^4$ CFU/g으로 오히려 감소하였다. 이는 유산균의 생육중에 생산하는 젖산과 초산, hydrogen peroxide 및 bacteriocins 등이 타 미생물의 생육을 억제(11,20)하기 때문으로 생각된다. 즉, *L. plantarum*을 먼저 배양함으로써 유산균에 의한 상기와 같은 억제물질의 분비로 *B. subtilis*의 생육이 억제된 것으로 보인다.

한편, *L. plantarum*의 생육은 초기 접종량인 2×10^7 CFU/g에서 배양 4시간 후에 $4-6 \times 10^7$ CFU/g으로 증가하였으나, *B. subtilis*를 접종(Fig. 3(A))한 4시간 이후에는 더 이상 생육되지 않고 다소 감소하는 경향을 보였다. *L. plantarum*을 8시간 배양(Fig. 3(B))후 균수는 $1.3-1.5 \times 10^8$ CFU/g으로 증가하였으며, *B. subtilis*를 접종한 이후에도 *L. plantarum*의 생균수는 감소하지 않고 증가하는 경향으로 48시간째 2.4×10^8 CFU/g까지 증가하였다. *L. plantarum*을

12시간 배양(Fig. 3(C))하면 *L. plantarum*의 생균수는 2×10^8 CFU/g으로 증가하여 8시간 배양한 경우와 유사한 증가 경향을 보였으며, *B. subtilis*를 접종한 이후의 생육은 Fig. 3(B)에서 나타난 *L. plantarum*의 생육보다 양호하게 이루어져 48시간째는 6×10^8 CFU/g까지 증가하였다.

혼합배양시 *B. subtilis*의 접종시점에 따른 변화는 pH 변화에서 보다 잘 나타났는데, *L. plantarum*을 배양한 후 4시간째 *B. subtilis*를 접종하였을 경우(Fig. 3(A)) 초기 pH가 5.8에서 배양시간이 경과에 따라서 서서히 증가하여 96시간째 pH 7.2에 도달하였다. *L. plantarum*을 8시간 배양한 후 *B. subtilis*를 접종하였을 경우(Fig. 3(B))는 초기 pH 5.8에서 24시간까지 감소하는 경향을 보인 후 다시 서서히 증가하여 96시간째 pH 6.7에 이르렀다. 그러나, *L. plantarum*을 먼저 배양한 후 12시간째 *B. subtilis*를 접종한 경우(Fig. 3(C))는 초기 pH 5.8에서 계속 감소하였으며, *B. subtilis*를 접종한 이후에도 pH는 점차 감소하여 96시간째 pH가 4.9까지 감소하였다. 이와같이 *B. subtilis*의 생육과 pH 변화가 유산균의 생육으로 인하여 극도로 억제되는 극단적인 경우(Fig. 3(C))는 청국장 상태에 이르지 못하게 된다. 따라서 혼합배양으로 청국장의 품질개선하기 위하여 먼저 *L. plantarum*을 일정시간 동안 배양한 후에 *B. subtilis*를 접종하는 방법으로 특정의 배양 목표를 달성할 수 있을 것으로 생각되었다.

접종비율에 따른 혼합균주의 생육특성

*L. plantarum*과 *B. subtilis* 균주의 혼합배양시 *L. plantarum*의 생육을 증가시키기 위한 다른 방법으로 *B. subtilis* 균주의 접종량을 매우 낮게 조절하는 방법이다. 즉, *B. subtilis*의 접종량을 3.9×10^3 CFU/g 및 3.9×10^2 CFU/g 정도로 매우 낮게 조절하여 *L. plantarum*과 증자대두에 동시에 접종하여 혼합배양하였다(Fig. 4). 이 때 *L. plantarum*의 접종량은 2×10^7 CFU/g으로 일정하게 유지하였다.

*B. subtilis*의 접종량을 3.9×10^3 CFU/g으로 접종한 후 *L. plantarum*과 동시에 접종하였을 때(Fig. 4(B)), *B. subtilis*의 생육은 24시간 배양 후 초기 접종균수인 3.9×10^3 CFU/g에서 9×10^8 CFU/g으로 증가하였으며, 96시간째는 1.2×10^9 CFU/g에 이르렀다. *L. plantarum*의 생육은 초기 접종량인 2×10^7 CFU/g에서 24시간 배양 후 1.3×10^8 CFU/g으로 증가하였으나, 그 후 점차 감소하여 96시간째 2.2×10^7 CFU/g으로 감소하였다. 초기 pH는 6.0에서 96시간째 약 7.2로 배양시간의 경과에 따라 서서히 증가하는 경향을 볼 수 있었으나, *B. subtilis*를 단독배양한 경우의 pH(pH 7.6)보다는 낮게 나타났다.

*B. subtilis*의 접종량을 3.9×10^2 CFU/g으로 감소시키고 *L. plantarum*과 동시에 접종한 경우(Fig. 4(B)) *B. subtilis*의 생육은 초기 생균수 3.9×10^2 CFU/g에서 24시간 배양 후 9×10^8 CFU/g으로 증가하여 접종량을 3.9×10^2 CFU/g으로 조절하여 수행한 앞의 실험 결과와 유사한 생육도를 보였다. 그러나 *L. plantarum*의 생육은 초기 2×10^7 CFU/g에서 계속 증식하여 48시간 배양 후 2×10^8 CFU/g으로 72시간 까지 증가하였다. 96시간 후에는 1.1×10^8 CFU/g으로 생균수가 다소 감소하였다. pH는 초기 6.0에서 24시간째까지 거의 증가하지 않았으나, 그 후 점차 증가하여 96시간째 6.8까지 증가하였다. 이러한 낮은 pH는 *B. subtilis* 접종량의 감소와 이로 인한 *L. plantarum*의 양호한 생육에서 기인된다. *B. subtilis*의 접종량을 3.9×10^2 CFU/g 정도로 낮게 조절하여 *L. plantarum*의 접종량을 높게(2×10^7 CFU/g) 조절하여 혼합배양한다면 유산균에 의한 청국장의 품질을 개선시킬 여지가 있는 것으로 판단된다. 고 등(21)은 *B. subtilis*를 단독배양할 경우 접종량은 10^3

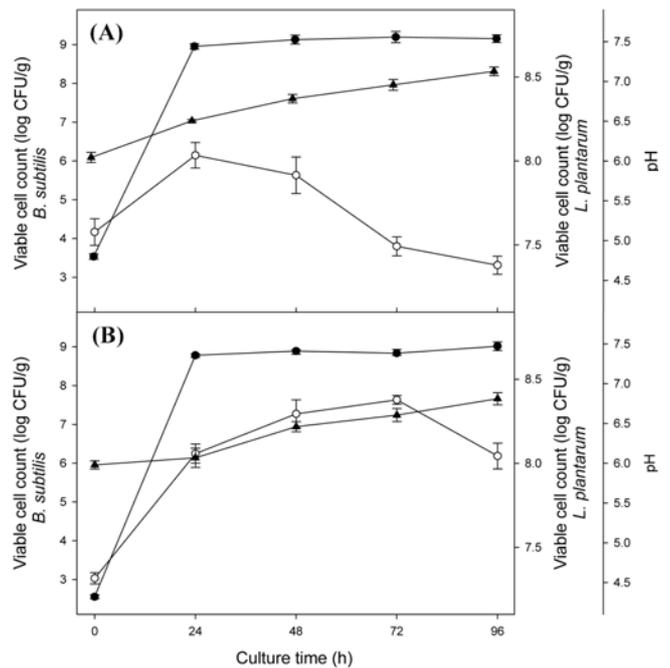


Fig. 4. Effect of inoculum size on the growth of *B. subtilis* (●), *L. plantarum* (○) and pH (▲). (A) Inoculum size of *B. subtilis* was 3.9×10^3 CFU/g, (B) Inoculum size of *B. subtilis* was 3.9×10^2 CFU/g. Inoculum size of *L. plantarum* was 2×10^7 CFU/g.

CFU/g 이상 접종되어야 발효가 이상적으로 빠르게 진행된다고 하였는데, 본 연구의 혼합배양과는 다른 조건이나 비교하여 참조할 필요가 있으리라 생각된다.

일반성분 및 관능평가

B. subtilis 균주와 *L. plantarum* 균주를 혼합배양한 청국장의 이화학적 특성을 조사하였다. 증자대두에 접종하여 48시간 동안 배양한 단일균주에 의한 청국장과 접종방법에 따라서 혼합배양에 의한 청국장의 품질특성을 Table 1에 나타내었다. *B. subtilis* 균주 단독배양에 의한 청국장의 protease의 활성도는 177 U/g으로 In 등(8)의 연구 결과처럼 제일 높게 나타났으며, *L. plantarum*을 8시간 배양한 후 *B. subtilis*를 접종하여 혼합배양한 청국장의 protease의 활성도는 136 U/g *B. subtilis*의 접종량을 3.9×10^2 CFU/g으로 조절하여 *L. plantarum*과 혼합배양한 청국장의 protease의 활성도는 110 U/g으로 유산균주와 혼합배양한 청국장이 *B. subtilis* 균주 단독배양 청국장에 비해 낮게 나타났다. 이는 *L. plantarum*과 혼합배양할 때는 *B. subtilis* 균주의 생육이 다소 억제되기 때문에 상대적으로 protease 활성이 감소한 것으로 보인다.

γ -GTP(γ -glutamyltranspeptidase)는 청국장 점질물 형성을 촉진하는 효소로 청국장의 점질물 생성 인자중 하나이다(22). 단일균주에 의한 청국장의 γ -GTP 활성도는 1.11 U/g으로 유산균주 혼합배양 청국장보다 높은 활성도를 나타내었다. 이는 *B. subtilis* 균주를 단독으로 배양하는 경우는 혼용하는 균주에 의한 생육억제가 나타나지 않았기 때문으로 생각된다.

아미노태 질소함량은 장류의 구수한 맛을 나타내는 지표이며, 식품공전에서는 0.28% 이상 함유되도록 명시되어 있다. *B. subtilis* 단일균주로 배양한 청국장의 아미노태 질소 함량은 0.44%이었으며, *L. plantarum*과 혼합배양한 청국장의 아미노태 질소함량은 각각 0.48%와 0.46%로 유산균과의 혼합배양으로 아미노태 질소함량에는 큰 영향을 미치지 않았다. 암모니아태 질소는 청국장을

Table 1. Quality characteristics of cheonggukjang by mixed culture of *B. subtilis* and *L. plantarum*

Inoculation Method	Protease activity (U/g)	γ -GTP activity (U/g)	Amino type nitrogen (%)	Ammonia type nitrogen (mg%)	Titrateable acidity (mL)
Single strain inoculation ¹⁾	177.0±7.01	1.11±0.14	0.44±0.04	75.6±2.31	5.49±0.78
Two stage inoculation ²⁾	136.4±5.57	0.69±0.05	0.48±0.06	56.0±1.92	13.22±0.58
Simultaneous inoculation ³⁾	110.2±4.57	0.67±0.04	0.46±0.03	50.4±1.18	11.58±0.57

¹⁾Single strain inoculation of *B. subtilis*.

²⁾Two stage inoculation of *B. subtilis* after 8 h cultivation of *L. plantarum*.

³⁾Simultaneous inoculation of *B. subtilis* and *L. plantarum*.

Table 2. Sensory evaluation of cheonggukjang by mixed culture of *B. subtilis* and *L. plantarum*

Inoculation Method	Sweet smell	Ammonia smell	Yoghurt smell	Overall acceptance
Single strain inoculation ¹⁾	3.0±0.70	4.0±0.70	1.6±0.54	2.6±0.54
Two stage Inoculation ²⁾	3.2±0.83	3.4±0.89	2.4±1.14	2.4±0.54
Simultaneous inoculation ³⁾	3.4±0.54	3.0±0.70	2.0±1.00	3.5±0.50*

* $p < 0.05$, compared with the control group (by Student's two-tailed t-test)

^{1),2),3)} See Table 1.

기피하게 만드는 청국장의 불쾌취증의 한 성분(23)인데, 단독배양이 75.6 mg%로 혼합배양의 50.4-56.0 mg%보다 높게 나타났다.

청국장의 적정산도는 단일균주에 의한 청국장의 경우가 *L. plantarum*과 혼합배양한 청국장들과 비교하여 적게 나타났다. 이는 유산균주와 혼합배양한 청국장이 다양한 유기산을 생성함으로써 높은 적정산도를 나타낸 것으로 보인다.

*B. subtilis*로 단일배양한 청국장과 *L. plantarum*과 혼합배양한 청국장의 향과 기호성에 대한 관능평가를 실시하였다(Table 2). 관능평가 결과 *L. plantarum*을 혼합배양한 경우가 단일균주 배양에 의한 청국장과 비교할 때 품미에서 높은 점수를 얻었으며, 특히 *B. subtilis* 균주의 접종량을 조절하여 *L. plantarum*과 혼합배양한 청국장의 경우는 전체적인 기호성에서 유의성 있는 높은 점수를 받았다. 이러한 결과로 보아 청국장을 제조할 때 *L. plantarum*의 혼합배양으로 그의 생육을 적절히 조절하고 통제한다면, 청국장의 이취 및 품질개선에 기여할 것으로 생각된다.

요 약

B. subtilis 균주와 *L. plantarum* 균주를 혼합배양하여 청국장을 제조할 때 나타나는 여러 가지 품질에 영향을 주는 인자들을 분석하고 평가하였다. *B. subtilis* 균주와 *L. plantarum*을 혼합배양할 때 *L. plantarum*의 생육은 잘 되지 않는다. 따라서 혼합배양시 *L. plantarum*의 생육을 증가시키기 위하여 먼저 *L. plantarum*을 배양하고, 일정시간이 경과된 후에 *B. subtilis*를 접종하면 *L. plantarum*의 생균수가 2×10^7 CFU/g에서 48시간 후에 6×10^8 CFU/g까지 증가하였다. 혼합배양시 *L. plantarum*의 생육을 촉진시키는 또 다른 방법으로 *B. subtilis*의 초기 접종량을 3.9×10^2 CFU/g, *L. plantarum*의 접종량을 2×10^7 CFU/g으로 조절하여 동시에 접종하였을 때 24시간 배양 후 *B. subtilis*의 생균수는 9×10^8 CFU/g까지 증가하였으며 *L. plantarum*의 생균수도 2×10^7 CFU/g에서 6×10^8 CFU/g으로 증가하였다. 즉, 배양방법의 최적화를 통하여 *B. subtilis* 균주와 *L. plantarum* 균주의 생육을 성공적으로 유도할 수 있었다. 본 연구의 결과로부터 *L. plantarum*의 생균수가 증가된 청국장의 아미노태 질소함량은 단일균주를 사용하여 제조한 청국장과 유사하였으며, 암모니아 불쾌취가 적었으며, 품미와 전체적인 기호도에서 높은 점수를 얻었다. 이러한 결과를 바탕으로 청국장

제조시 *L. plantarum* 균주를 혼합배양함으로써 기존 청국장의 이취 개선과 품질향상에 기여할 것으로 생각된다.

문 헌

- Lee JO, Ha SD, Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Park SH. Industrial application and physiological functions of *cheonggukjang*. Food Sci. Ind. 38: 69-78 (2005)
- Kim WK, Choi KH, Kim YT, Park HH, Choi JY, Lee YS, Oh HI, Kwon IB, Lee SY. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from *cheonggukjang*. Appl. Environ. Microb. 62: 2482-2488 (1996)
- Heo S, Lee SK, Joo HK. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional *cheonggukjang*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 41: 119-124 (1998)
- Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK. Production and separation of anti-hypertensive peptide during *cheonggukjang* fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 43: 247-252 (2000)
- Park HG, Lee MH, Yoon SH. Effect of *cheonggukjang* on lipid contents in rats fed high cholesterol diet. J. Korean Soc. Hyg. Sci. 12: 1-6 (2006)
- Kim JI, Kang MJ, Kwon TW. Antidiabetic effect of soybean and *cheonggukjang*. Korea Soybean Digest 20: 44-52 (2003)
- Kim JH, Kim SI, Kim JK, Im DK, Park JH, Lee JU, Byun MW. Effect of green tea powder on the improvement of sensorial quality of *cheonggukjang*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35: 482-486 (2006)
- In JP, Lee SK, Ahn BK, Chung IM, Jang CH. Flavor improvement of *cheonggukjang* by addition of *Yucca* (*Yucca shidigera*) extract. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 57-64 (2002)
- Park WJ, Park HY, Yoo JH, Rhee MS. Effect of *Artemisia asiatica* Nakaki extract on the flavor of *cheonggukjang*. Food Eng. Prog. 5: 115-124 (2001)
- Rhee YH, Kang MS. Physico-chemical characteristics and β -galactosidase activity of *Lactobacillus plantarum* from kimchi. Agr. Chem. Biotechnol. 39: 54-59 (1996)
- Ha CG, Cho JK, Chai YG, Heo KC. Isolation and identification of lactic acid bacteria containing superior activity of bile salts deconjugation. Korean J. Food Sci. Anim. Res. 24: 164-170 (2004)
- Rhim KH, Kim JG, Han JH. Effect of fermented milk on rats fed by hypercholesterolemic diet. Kor. J. Env. Hlth. Soc. 19: 77-89 (1993)
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Lee KH, Kwak JH, Baek YJ, Huh

- CS, Kim JB. Fermented extracts of Korean mistletoe with *Lactobacillus* (FKM-110) stimulate macrophage and inhibit tumor metastasis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 838-847 (1999)
14. Eum BW, Kwak BY, Kim SY, Shon DH, Lee KH. Enhancement of chitoooligosaccharides in *doenjang* (soybean paste) and *kanjang* (soy sauce) using *Bacillus subtilis koji* and *Rhizopus oryzae koji*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 291-296 (2003)
15. Choi KS, Chung YG, Choi C, Chung HC, Im MH, Choi JD, Lee CW. Microbiology fermentation biotechnology: Lactic acid and alcoholic fermentation of low-salted raw *kanjang* digestion liquor made from *Bacillus subtilis* var. *globigii* and *Scopulariopsis brevicaulis* inoculated *meju*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 41: 405-409 (1998)
16. Choe JS, Yoo SM, Kim HR, Kim JS, Chang CM. Microbiology fermentation biotechnology: Volatile compounds of *Chonggugjang* prepared by different fermentation method and soybean cultivars. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 42: 111-115 (1999)
17. Prestige L, Gage V, Spizizen J. Protease activities during the course of sporulation on *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 107: 815-823 (1971)
18. Korea Foods Industry Association. Food code. Moonyongsa Co., Seoul, Korea. pp. 319-320 (2009)
19. Official Methods for Determination of Water Contamination. Ministry of Environment. Seoul, Korea. pp. 195-197 (2000)
20. Oh SJ. Characteristics of class II bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* 19: 133-146 (2001)
21. Ko HS, Cho DH, Hwang SY, Kim YM. The effect of quality improvement by *cheonggukjang's* processing methods. *Korean J. Food Nutr.* 12: 1-6 (1999)
22. Lee BY, Kim DM, Kim KH. Physicochemical properties of viscous substance extracted from *cheonggukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 599-604 (1991)
23. Allagheny N, Obanu ZA, Campbell-Platt G, Owens JD. Control of ammonia formation during *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 321-333 (1996)