

고초균을 이용한 볶은 콩과 곡류 혼합 발효물의 물성 및 기능성 평가

손세진 · 이삼빈[†]

계명대학교 식품가공학과, 전통 미생물자원개발 및 산업화 연구센터

Evaluation of Rheological and Functional Properties of Roasted Soybean Flour and Mixed Cereals Fermented by *Bacillus* sp.

Se-Jin Son and Sam-Pin Lee[†]

Dept. of Food Science and Technology and The Center for Traditional Microorganism Resources (TMR),
Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

Roasted soybean flour (RSF) and mixed cereals were fermented by the solid state fermentation using *Bacillus subtilis* HA to optimize the production of biologically active compounds. The RFS fermented with 52.7% moisture content showed higher production with protease activity of 42.6 unit/g and 10% mucilage content after fermentation for 24 hr. Tyrosine content and protease activity after 48 hr fermentation time were the highest values with 445.5 mg% and 55.1 unit/g, respectively. However, the wholesome fermented RSF (FRSF) was obtained by fermentation for 24 hr because of the production of unpleasant flavors after fermentation for 48 hr. The RSF fermented with various types and contents of cereals has no effects on tyrosine content and protease activity. However, the addition of brown rice significantly increased mucilage content, especially indicating 24.55% at the addition of 80% (w/w). For addition of barley, fibrinolytic activity was increased to 11.82 unit/g by the fortification of 60% barley. It is concluded that biologically active compounds including fibrinolytic activity and mucilage content in FRSF were dependent upon the type and content of various cereals.

Key words: *Bacillus* sp., roasted soybean, barley, brown rice, fibrinolytic activity, mucilage

서 론

대두는 동양에서 간장, 된장, 고추장, 청국장 등의 발효식품의 형태로 널리 이용되어 왔으며, 대두에는 isoflavone, lecithin, 식이섬유 등과 같은 생리활성물질이 풍부하고 식물성 고단백 식품으로 영양학적으로 아주 우수한 소재이다. 특히 볶은 콩은 생 대두에 비해 고온에서 볶는 과정을 거치면서 살균 작용으로 이물질이 제거되고 소화·흡수가 용이해지며 콩 비린내가 제거됨과 동시에 콩의 고소한 풍미가 향상되는 등 여러 장점을 가진다.

탄수화물이 풍부한 곡류는 두류와 혼합함으로써 상호 영양 보완 및 각종 필수영양소와 생리활성물질들을 다양하게 얻을 수 있는 장점이 있다(1). 특히 보리는 밀, 벼, 옥수수보다 더불어 세계 4위의 중요한 식량 작물이며(2), 보리의 페놀성 화합물은 내부 배유조직보다 껍질을 포함하는 외층부 및 배아 부위에 더 많이 집적되어 있고 우수한 항산화성 및 활성산소 소거능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다(3). 현미는 미강, 배아 및 배유로 이루어져 있고, 풍부한 식이섬유와 아미노산, 비타민, 무기질 등의 영양성분들이 다량 함유되어 있

다(4-6).

대두 발효식품 중 청국장은 단기간에 고초균을 통해 발효되고 독특한 풍미를 갖는 전통 콩 발효식품이다. 일반적으로 전통 청국장은 자연발효과정에서 고초균 외 다양한 미생물이 관여할 수 있어 발효제품의 품질관리에 어려운 점이 있다. 반면에 우량 고초균 스타터를 접종하여 콩 원료를 고체 발효한 일본식 생청국장(natto)은 제조과정 중 잡균의 오염을 줄이면서 위생적인 발효제품을 생산할 수 있다. 최근에 국내에서 생산되는 청국장은 일본식 생청국장 방법을 이용하며, 생산되는 생청국장은 사용되는 고초균 및 발효원료에 따라 최종 발효제품의 대사산물인 점질물, 가수분해효소, 혈전분해효소 생산 등에 차이가 있으며, 품질에 영향을 미친다(7). 청국장의 효능 중 가장 연구가 활발하며 관심이 높아진 분야는 혈전용해효소에 관한 것이다(8). 혈전의 생성은 활성화된 thrombin에 의하여 혈장 단백질인 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 유도되며(9), 혈전용해효소 활성을 가진 물질들은 혈액응고의 기질인 피브리린을 가수분해하여 가용화시켜 혈전증을 치료할 수 있다(10). 현재까지 혈전증 치료제로는 urokinase, streptokinase, tPA 등 다양한 약품이 개

[†]Corresponding author. E-mail: splee@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5554, Fax: 82-53-580-5554

발되어 사용되거나 값이 비싸고 부작용이 나타나는 단점을 가지고 있다(11). 최근 각종 천연물 및 된장, 청국장과 같은 대두 발효식품에서 혈전용해 활성 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다(12,13). 특히 발효식품의 기능강화를 위해서 고초균과 발효조건에 따른 혈전분해효소 생산을 최적화하는 연구가 필요한 실정이다.

청국장이 건강식품소재로 이용가능성이 높아지는 반면에 심근경색, 뇌출혈 등 항응고제를 투여하고 있는 환자에게는 청국장의 섭취를 제한하고 있는데, 그 이유는 청국장에 다량 함유된 비타민 K이다. 비타민 K는 혈전용해효소 활성화와 반대의 기능을 하면서 혈액 응고 시 프로트롬빈과 그 밖의 혈액응고 인자내의 glutamic acid를 카복실화(carboxylation)시킨다(14). 따라서 청국장의 기능성소재로 활용을 높이기 위해서는 혈전용해효소 활성화는 증진되고 비타민 K 함량은 감소된 대두 발효식품을 제조하는 것이 필요하다.

대두 및 곡류 분말을 이용한 연구에는 볶은 콩가루를 이용한 식빵 특성 연구(15), 보리의 유산발효(16) 등에 관한 연구는 수행되어있으나 대두와 곡류를 혼합물을 이용하여 고초균에 의한 고체 발효 연구는 이루어지지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 볶은 콩과 곡류를 혼합한 분말을 이용하여 고초균에 의한 고체 발효조건을 최적화함으로써 혈전용해효소 활성화와 점질물 등의 생리활성물질을 향상시키고자 하였다. 또한 고초균 특유의 발효취가 감소되고 기능성 물질이 강화된 발효물을 제조하고 다양한 식품 소재로 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

볶은 콩(roasted soybean flour, RSF)과 곡류 분말은 천호식품(Daegu, Korea)으로부터 구입하여 밀봉한 후 암소에서 보관하여 사용하였으며, 곡물의 탄수화물, 단백질, 조지방, 식이섬유와 같은 일반성분 분석 결과는 볶은 콩이 각각 37.1%, 35%, 19.3%, 37.63%이고, 현미는 87.4%, 7% 2.3%, 8.10%, 보리는 84.9%, 10%, 2.1%, 15.07%인 것을 사용하였다. 혈전용해효소 활성 측정에 필요한 fibrinogen, thrombin 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. HPLC에 사용된 water와 acetonitrile은 HPLC 등급용 용매(J.T Baker, Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였으며, 그 외의 시약들은 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였다.

Starter 제조

고초균은 한국종균협회로부터 분양받은 *Bacillus subtilis* HA(KCCM 10775P) 이외에 전통청국장에서 분리된 *Bacillus subtilis* KU-A(17), PUL-A 및 *Bacillus amyloliquefaciens* MJ-3(18)을 이용하였다.

스타터 배양액은 탈지대두분말 5% 용액(w/v)을 homog-

enizer(TH220, Omni International, Waterbury, CT, USA)를 이용하여 10,000 rpm에서 1분간 균질화한 후 autoclave(MLS-3020, Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균한 액체 배지 50 mL에 MRS agar plate에서 배양(42°C, 24 hr)한 균주를 1회 접종한 뒤 진탕배양기(SI-900R, JEIO TECH Co., Daejeon, Korea)에서 42°C, 24시간 동안 배양(180 rpm)하여 스타터(6.5×10^8 CFU/mL)로 사용하였다

발효물 제조

250 mL 비커에 볶은 콩 25 g과 볶은 콩 대비 곡류 분말을 농도별(0~80%)로 첨가하여 혼합한 후 혼합된 시료는 autoclave(MLS-3020, Sanyo Electric Co. Ltd.)를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균시킨 후 실온(27~30°C)에서 충분히 식히고, 고형분 기준으로 1부피 증류수를 첨가한 후 고초균 *B. subtilis* HA starter를 고형분 무게의 1%씩 접종하여 42°C, 24시간 동안 발효하였다. 수분함량 및 발효시간에 따른 실험은 최적조건을 설정하기 위하여 먼저 실시하고, 그 후 곡물 종류에 따른 생리활성물질 변화를 알아보았다.

Tyrosine 함량 측정

발효물의 peptide 함량을 측정하기 위하여 Folin phenol 시약을 이용하여 발효물 추출액 중에 존재하는 tyrosine 함량을 측정하였다(19). 발효물 2 g에 증류수 18 mL을 희석하여 균질화 한 시료를 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액 0.7 mL에 0.44 M TCA(trichloroacetic acid) 0.7 mL을 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na_2CO_3 2.5 mL와 phenol reagent 0.5 mL를 차례로 넣고 혼합한 후 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 반응액의 흡광도를 spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron Instruments, Milan, Italy)로 660 nm에서 측정하였다.

Protease 활성 측정

Protease 활성은 발효물 2 g에 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) 18 mL을 첨가한 뒤 실온에서 진탕 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min)하여 상등액으로부터 조효소액을 조제한 다음 protease 활성은 Anson의 방법을 변형하여 측정하였다(20). 0.6% casein solution 0.35 mL을 기질로 하여 검액과 37°C에서 10분간 반응시킨 후 시험용과 공시험용 각각의 e-tube에 10배 희석한 효소액을 0.35 mL 넣은 후 37°C에서 10분간 반응시킨다. 0.44 M TCA 0.7 mL을 첨가하여 반응을 정지시키고, 단백질을 침전시킨 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na_2CO_3 2.5 mL과 Folin 시약(원액을 3배 희석한 액) 0.5 mL을 혼합한 후 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 반응 조건하에서

1분 동안 tyrosine 1 µg을 유리하는 효소량을 1 unit로 하였다. 공시험은 조효소액을 첨가하기 전에 0.44 M TCA를 넣은 후 동일하게 실시하였다.

점질물 함량 측정

발효물 5 g에 증류수 45 mL를 첨가하여 점질물을 용출한 후 원심분리 하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 2배 부피의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 형성된 점질물은 95% ethyl alcohol에 세척하여 얻어진 점질물을 건조하여 실험에 사용하였다. 상기에서 회수된 건조 점질물을 50°C에서 항량이 될 때까지 감압건조기를 이용하여 건조 후, 건조중량으로 측정하였다(21).

점도 및 점탄성 분석

발효물의 점조도는 Rheometer System(HAAKE Rheo Stress 1, Karlsruhe, Germany)에 cone plate device(Platte PP35 Ti, 3.5 cm diameter)를 장착하여 측정하였다. 시료 1.2 mL plate에 올려 구간 당 10초 동안의 평균값이 측정되어 얻은 값을 shear rate(1/s)와 shear stress(Pa)로 나타내어 점조도가 높아짐에 따라 층밀립 변형력이 높아지는 효과를 측정하였다. 측정온도 20°C에서 전단속도($\dot{\gamma}$)는 1~100 s⁻¹의 범위로 유동특성을 알아보고, 점조도지수와 유동지수 값은 Power law model($\tau = ar^b$)로 측정하였다(17).

$$\text{Power law model: } \sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

동적 점탄성(dynamic viscoelasticity) 측정은 변형력과 변형을 사이에 선형관계가 나타나는 구간을 결정하기 위하여 frequency sweep로부터 결정된 진동수(frequency, ω) 6.2832 rad/s에서 측정하여 탄성률(elastic modulus G')과 점성률(viscous modulus G'')을 측정하였다.

혈전용해효소 활성 측정

혈전용해효소 활성은 fibrin plate method의 일종인 Astrup과 Müllerz의 방법(22)을 사용하여 측정하였다. Fibrin plate는 0.5% fibrinogen을 67 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5)에 용해시켜서 직경 9 cm인 petri dish에 10 mL을 가하였다. 여기에 67 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)에 용해된 thrombin 효소(100 unit/mL) 0.1 mL을 가하고 신속하게 혼합한 후 실온에서 30분간 방치하여 고형화 시켰다. 혈전용해효소 활성 측정 시료는 발효물 1 g에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.5) 9 mL을 혼합한 후 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 이용하였다. Fibrin plate에 sample을 20 µL씩 점적하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 용해 면적으로 효소 활성을 구하였다. 표준 plasmin 효소 활성의 표준곡선을 작성한 후 표준곡선과 비교하여 plasmin unit로 환산하여 혈전용해효소 활성(%)을 나타내었다. 대조구로는 정제된 혈전용해효소인 plasmin(5 unit/mL)을 사용하여 계산하였다.

비타민 K₂ 함량 분석

발효물의 비타민 K₂ 함량 분석은 발효물 15 g에 isopropanol 60 mL를 첨가하여 혼합한 후 homogenizer를 이용하여 10,000 rpm에서 5분간 분쇄 후 균질화 하였다. 균질화한 시료를 원심분리 하여 상등액을 회수하여 추출에 이용하였다. 상등액 20 mL에 증류수 40 mL과 isopropanol 40 mL를 각각 가한 후 hexane 250 mL를 가하여 강하게 흔들어진 후 상등액을 비커에 취하였다. 잔류물에 다시 동일 용매를 가하여 같은 조작을 3회 반복한 후 추출된 용액을 모두 합하였다. 추출된 용액을 증류 flask에 놓은 후 감압 증류하여 용제를 제거시킨 후 ethanol에 용해시켜 전량을 2 mL로 하였다. Ethanol에 용해시킨 시료를 여과지로 여과한 후 0.45 µm syringe filter(Minisart RC 15, Sartorius, Goettingen, Germany)로 여과하여 사용하였으며, 같은 조작을 3회 반복하여 측정수치의 평균을 취하였다. 이때 HPLC 분석 조건은 column(ZORBAX ODS, Shodex, Kawasaki, Japan)을 이용하여 이동상을 95% ethanol로 유속 0.8 mL/min의 속도로 흘려주었고, 굴절률(refractive index)에 의해 검출하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 결과를 얻어 SPSS 12.0을 사용하여 통계처리 하였으며, 각각의 시료에 대해 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 시료군에 대한 유의차 검정은 분산분석을 한 후 p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

수분 첨가에 따른 발효 시 품질변화

발효의 품질 특성을 결정짓는 중요 요인 중 하나가 발효 원료의 초기 수분함량 차이에 있으며, 고초균 생육 및 대사산물의 효과적인 생산을 위해서는 콩 또는 곡류 분말원료에 수분함량의 첨가가 필요하다. 따라서 볶은 콩 25 g 대비 수분함량을 각각 0.75, 1.0, 1.25, 1.5배 첨가하여 42°C에서 24시간 동안 고체 발효시켰다. 이때 볶은 콩 분말의 초기 수분함량은 5.72%이었으며, 수분 첨가량에 따라서 초기발효물의 수분함량은 각각 44.8%, 52.6%, 57.9% 및 62.9%를 나타내었다.

발효물의 tyrosine 함량, 가수분해효소 활성(proteolytic activity), 점조도 및 점질물 함량을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. Tyrosine 함량은 원료분말 대비 수분이 많이 첨가될수록 감소하는 경향을 나타냈으며, protease 활성은 수분 1배 첨가에서 초기 수분함량이 52.6%이며 42.6 unit/g으로 조금 증가하였다가 수분이 더 첨가될수록 다시 감소하였다. 이는 수분함량이 고형분 대비 1배 이하로 첨가될 경우 수분함량이 부족하여 일부 분말이 수분과 혼합되지 못하고 분말 자체로 남아있는 것을 볼 수 있기 때문에 발효가 원활히 이루어지지 않아 효소 활성이 낮은 것으로 생각되며, 수분이 필요 이상으로 첨가될 경우 오히려 고초균의 효소 생합성

Table 1. Effect of moisture content on the physicochemical properties of fermented RSF

Moisture content (%)	Tyrosine content (mg%)	Proteolytic activity (unit/g)	Consistency index (Pa·s ⁿ)	Mucilage content (%)
0.75	486.21±14.96	15.09±7.48	33.27±0.48	9.38±0.83
1.0	437.45±4.77	42.64±4.43**	32.82±0.14	10.60±0.80
1.25	403.98±22.12*	34.12±9.06*	28.34±0.53	9.24±0.36*
1.5	349.06±13.25**	31.37±6.63	12.55±0.38**	7.81±0.65

Mean±SD (n=3); Compared to control (0.75%) as determined by Tukey's studentized range (HSD) test (*p<0.05, **p<0.01). Fermentation is performed at 42°C for 24 hr.

과정이 억제되어 효소활성이 감소된 것으로 판단된다. Lee 등(23)은 protease 활성에 영향을 미칠 수 있는 인자로 발효 및 숙성 온도, 수분, 소금, 무기 금속이온 등의 성분 조성의 차이 등이 있다고 보고하였다.

발효물의 점조도 측정 결과 수분 0.75배 첨가는 33.27 Pa·sⁿ으로 나타났으나 수분함량이 증가할수록 감소하는 경향을 나타냈으며, 점질물 함량 역시 점조도와 유사한 경향을 나타내었고 수분 1배 첨가에서 10.60%로 가장 최대치에 이르렀다가 수분이 더 첨가될수록 감소하는 경향을 나타냈다. 따라서 발효물의 효소활성과 물성 특성을 고려해 볼 때 수분은 원료 분말 대비 1배 첨가될 경우 초기 분말 원료의 수분함량이 52.6%이었으며, 이때 고초균에 의한 고체발효가 가장 잘 이루어져 발효물의 점질물을 포함한 물성 특성이 양호함을 확인하였다.

수분 첨가에 따른 발효 시 물성변화

볶은 콩 분말에 수분 첨가 비율에 따라 발효물의 점조도 차이에 따른 물성 변화를 확인하기 위하여 각각 발효물의 점탄성을 측정하였다. 점탄성은 물체에 힘을 가했을 때 탄성 변형과 점성을 지닌 흐름이 동시에 나타나는 현상을 나타낸다. 수분 첨가량에 따른 발효물의 탄성률(elastic modulus G')을 측정해 본 결과 수분이 가장 적게 첨가된 발효물의 탄성률(G')이 285 Pa, 수분이 가장 많이 첨가된 발효물의 탄성률(G')이 47 Pa로 두 발효물은 상반된 탄성 값을 나타내었으며, 수분 첨가량이 증가될수록 탄성률이 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

점성률(viscosity G'')에 대한 결과 역시 수분이 가장 적게 첨가된 발효물과 수분이 가장 많이 첨가된 발효물에서 각각 190 Pa, 37 Pa 값을 나타냈다. 탄성률에 비해 점성률에서는 확연한 차이를 볼 수 없었으며, 수분첨가에 따른 점탄성률이 감소하는 유사한 경향을 나타냈다. 또한 수분 첨가량에 따른 발효물은 탄성률이 점성률에 비해 약 1.5배 높은 특성을 가지는 것으로 나타났다. 높은 탄성률을 가질 경우 고분자 물질로 구성되어 다당류를 많이 함유하고 있다고 추측할 수 있다.

발효 시간에 따른 발효 시 품질변화

고체발효를 위한 수분함량의 최적 첨가조건으로 원료 분말 대비 1배 수분을 첨가하고, 42°C에서 발효 시간(8~48 hr)에 따라 배양하였다. 배양된 FRSF의 tyrosine 함량, 가수

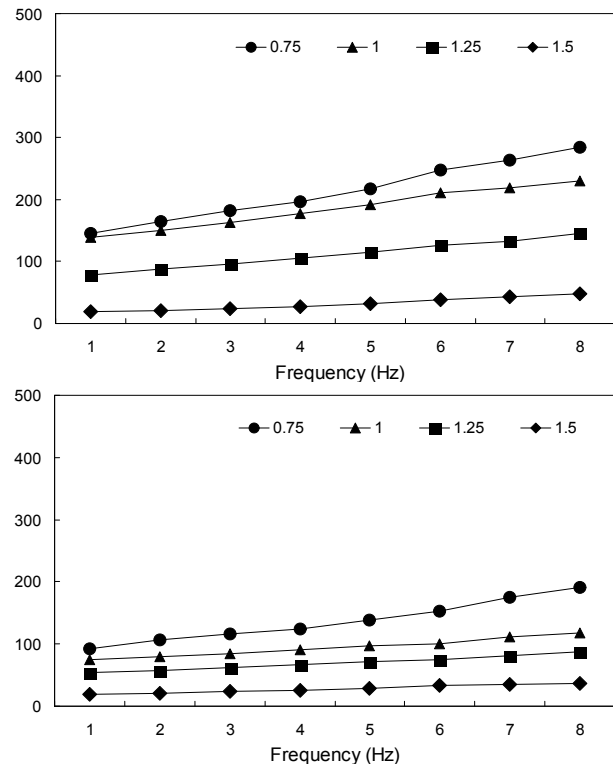


Fig. 1. Comparison of elasticity (G') and viscosity (G'') in the RSF fermented by water content.

분해효소 활성, 점조도 및 점질물 함량을 측정하였다.

Tyrosine 함량 및 protease 활성은 발효 시간이 길어질수록 비례적으로 증가함을 알 수 있었다. 특히 protease 활성은 발효 12시간에서 급격히 증가 후 48시간까지 55.1 unit/g으로 조금씩 증가하는 경향을 나타냈으나 큰 차이는 없으므로 나타났다(Table 2). Choi 등(24)은 *B. subtilis* 균주를 이용한 청국장 메주 제조 시 protease 활성이 숙성 7일까지 급격한 증가를 보인 후 14일 후부터 급격히 감소하였다고 보고하였으며, Lee와 Bai(25)는 발효 12시간 이후부터 증가하기 시작하여 32시간에 최대의 효소생산을 보였다고 보고하였다.

Tyrosine 함량과 가수분해효소 활성 결과에서 48시간에서 활성이 좋았으나, 24시간에서는 발효취가 미비하였던 것이 발효 시간이 48시간 이상으로 길어지면서 발효물에서 발효취가 강하게 나타나 발효물의 관능적 기호성에 부정적 영향을 주기 때문에 발효기간이 길어질수록 발효물의 품질이 떨어지는 것으로 생각된다. 또한 발효온도 42°C에서 26시간

Table 2. Effect of fermentation time on the physicochemical properties of fermented RSF

Fermentation time (hr)	Tyrosine content (mg%)	Proteolytic activity (unit/g)	Consistency index (Pa·s ⁿ)	Mucilage content (%)
8	138.1±14.4	ND	1.75±0.31	ND
12	209.5±7.7***	30.4±4.1	4.24±0.34	4.81±0.8***
16	250.5±16.7**	35.7±3.0***	8.56±0.97*	7.37±0.8***
20	382.6±15.0**	40.4±6.5***	16.32±0.47***	8.36±0.7***
24	437.5±4.8***	42.6±4.4***	32.82±0.14***	10.60±0.8***
48	445.5±17.3***	55.1±6.7***	33.84±0.74***	10.24±1.2***

Mean±SD (n=3); Compared to control (8 hr) as determined by Tukey's studentized range (HSD) test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Fermentation is performed at 42°C with moisture content of 52.6%.

발효 이후에는 발효 비지로부터 암모니아취가 심해진다고 보고된 것과 비교할 때 유사한 경향이 나오는 것을 확인하였다(26).

점조도 측정 결과 발효 시간이 증가할수록 효소 활성과 같이 비례적으로 증가하였으며, 점질물 함량은 발효 시간에 따라 비례적으로 증가하였다가 24시간에서 10.60%로 가장 많이 생성되었으며 48시간에서 조금 감소하는 경향을 나타냈다.

따라서 전반적인 결과를 종합해 볼 때 고초균에 의한 고체 발효 시 24시간 발효한 발효물의 특성이 가장 좋음을 확인하였다.

발효 시간에 따른 발효 시 물성변화

볶은 콩 분말 대비 1배의 수분을 첨가하여 발효 시간에 따른 발효물의 점조도 차이를 확인하기 위하여 각각 발효물의 점탄성을 측정하였다.

발효 시간에 따른 발효물의 탄성률을 측정해 본 결과 발효 8시간에서 16시간까지는 확연한 차이를 볼 수 없었으나 발효 20시간 이후 급격하게 탄성률이 증가하였다. 발효 48시간에서 G'값 333 Pa로 가장 높은 탄성값을 나타내었으며 발효 시간이 길어질수록 탄성값이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

점성률에 대한 결과 발효 시간이 길어질수록 높은 점성값을 나타냈으며 발효 20시간 이후 급격하게 증가한 것으로 나타났으며 발효 48시간에서 G'' 값 163 Pa를 나타냈고, 이는 탄성률과 점성률의 경향이 동일한 것을 확인하였으며, 발효 시간에 따른 발효물은 탄성률이 점성률에 비해 약 2배 이상 높은 특성을 가지는 것으로 나타났다.

곡물 종류별 tyrosine 함량 및 protease 활성 변화

볶은 콩 25 g 대비 보리, 현미를 농도별로(0~80%) 각각

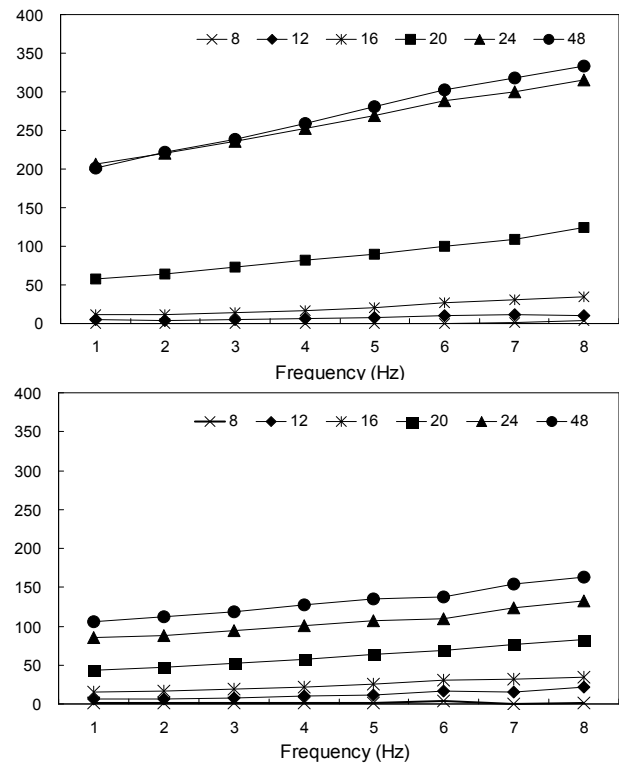


Fig. 2. Comparison of elasticity (G') and viscosity (G'') in the RSF fermented during fermentation time.

첨가하여 42°C, 24시간 배양 후 배양된 발효물의 tyrosine 함량 및 가수분해효소 활성 변화를 알아보았다. 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 볶은 보리 및 현미의 수분함량은 각각 3.5% 및 3.9%이었으며, 콩 분말 기준으로 곡류가 농도별로 0, 20, 40, 60, 80% 수준으로 첨가된 초기 원료의 수분함량은 50~53% 수준으로 측정되었다. 곡류 분말 종류 및 농도

Table 3. Comparison of tyrosine content and protease activity of RSF fermented with addition of various cereals

	Sample	Cereal contents (%)				
		Control ¹⁾	20	40	60	80
Tyrosine content (mg%)	Barley	437±5	453±26	448±25	433±16	447±41
	Brown rice	437±5	471±22	445±15	440±41	406±42
Protease activity (unit/g)	Barley	42.6±4	52±2*	46±4*	44±3	42±3
	Brown rice	42.6±4	33±5	37±5	39±3	38±5

¹⁾Control: Roasted soybean flour (not add to cereals).

Mean±SD (n=3); Compared to control as determined by Tukey's studentized range (HSD) test (*p<0.05).

에 따른 tyrosine 함량 변화는 대조구에 비해 감소하였으나 농도에 따른 차이는 없었으며, 현미 20% 첨가에서 471 mg%으로 조금 높으나 오차범위를 감안했을 때 대조구와 큰 차이가 없는 것으로 나타나고, 보리 분말은 농도가 높아질수록 tyrosine 함량이 감소되는 것으로 나타났다. Protease 활성 변화는 보리에서 52 unit/g으로 효과가 조금 증가하였으나 미비한 것으로 확인되었다.

결과적으로 tyrosine 함량 및 가수분해효소 활성을 측정 한 결과 곡류 분말 종류 및 첨가 농도에 따른 큰 효과는 얻을 수 없었다. 이는 부 원료로 첨가된 곡류 분말이 탄수화물을 주로 함유하고 있으며, tyrosine 및 효소 활성을 증진시킬 수 있는 단백질을 소량 함유하고 있기 때문에 단백질 가수분해물이 적게 생성되는 것으로 사료된다.

곡물 종류별 점질물 함량 변화

볶은 콩 대비 보리, 현미를 농도별로 첨가하여 배양 후 배양된 발효물의 점질물 함량 변화를 알아보았다.

점질물 함량에 대한 효과는 보리에서 나타났으나 미비하였고, 현미 첨가 발효물에서 점질물 효과가 크게 나타났다. 현미 농도에 따른 첨가 결과 현미 첨가량이 증가할수록 점질물 함량이 비례적으로 증가하였으며, 첨가되지 않은 대조구의 점질물 함량 12.8%에서 현미 80% 첨가 시 최대 24.55%까지 약 2배 증가하였다. 이는 곡물 종류에 따라 발효물의 점질물 함량에 차이가 있었으며, 특히 발효물의 점질물 함량이 첨가된 현미의 농도에 의존성을 보였다(Fig. 3). 보고된 바에 의하면 비지를 *B. subtilis* KU-A와 *B. subtilis* GT-D 균주로 발효한 비지 발효물의 점질물 함량은 각각 4.9%, 2.9%로 알려져 있다(27). 또한 24시간 동안 발아시킨 아가공을 이용하여 제조한 청국장 발효물은 12시간 후 1.11%, 36시간에는 5.56%로 증가하였으며 이후는 점질물 함량의 증가는 다소 미비하여 유의적인 변화가 없었다고 보고되어 있다(28).

이와 비교할 때 현미가 첨가된 볏은 콩 발효물은 점질물 함량이 최대 24.55%까지 증가된 것을 볼 때 현미가 고초균

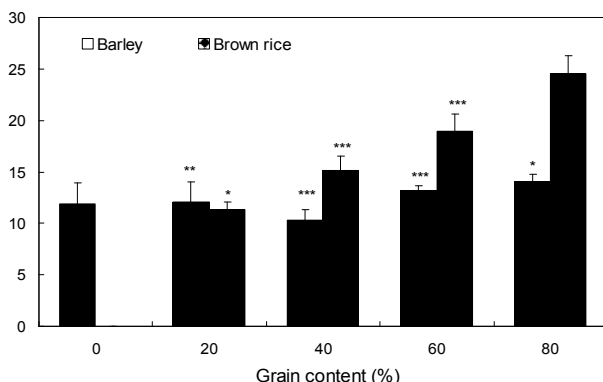


Fig. 3. Comparison of mucilage content of RSF fermented with addition of various cereals. Mean±SD (n=3); Compared to control as determined by Tukey's studentized range (HSD) test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

에 의한 볏은 콩 발효물에서 점질물 증진에 아주 우수한 소재라고 추측된다.

곡물 종류별 혈전용해효소 활성 측정

볶은 콩 대비 보리, 현미를 농도별로 첨가 후 배양된 발효물의 혈전용해효소 활성 변화를 알아보았다.

현재 상업적으로 판매되는 혈전용해제의 부작용을 줄이면서 체내 혈전형성 예방효과가 있는 새로운 혈전용해제 개발이 요구되며 경제적이고 경구투여가 가능한 식품으로의 연구가 필요하다(29).

발효물의 혈전용해효소 활성 측정에서는 볏은 콩 분말에 보리를 첨가한 경우에 효과를 보였으며, 보리 첨가량이 증가할수록 비례적으로 혈전용해효소 활성이 증가하였다. 곡류 분말이 첨가되지 않은 대조구에서 약 6 unit/g의 활성을 나타낸 것과 비교해 볼 때 보리 이외 현미 분말을 첨가할 경우도 활성이 모두 증가하였으나 특히 보리 60% 첨가에서 11.82 unit/g으로 대조구에 비해 약 2배가량 활성이 증가되었으며 보리 80% 첨가에서 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 4). Han 등(30)에 의하면 보리와 현미입국으로 제조한 전통주가 각각 20 U와 18 U로 시판 입국으로 제조한 전통주(15 U)보다 높은 혈전용해 활성을 보였다고 보고하였다. 고초균에 의한

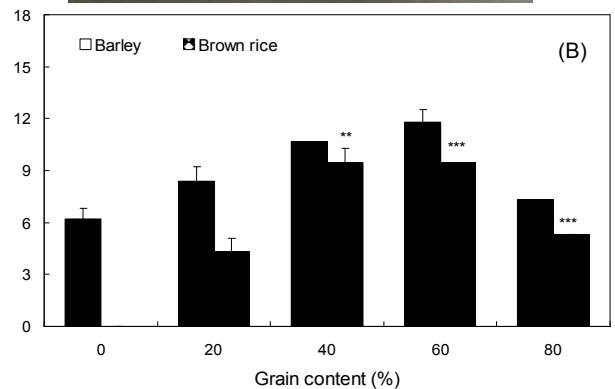
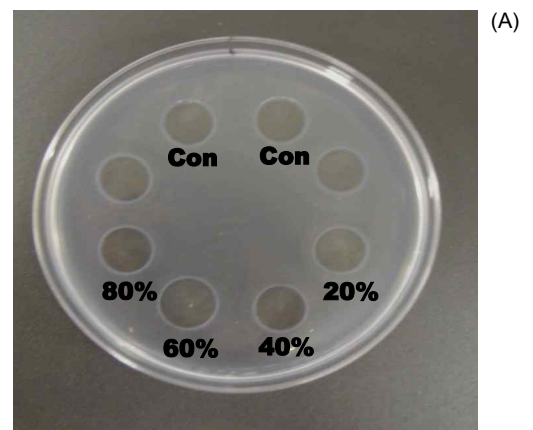


Fig. 4. Comparison of fibrinolytic activity of RSF fermented with addition of various cereals. Mean±SD (n=3); Compared to control as determined by Tukey's studentized range (HSD) test (**p<0.01, ***p<0.001). (A) fibrin plate dissolved by extract of FRSF, (B) comparison of fibrinolytic activity.

고체발효에서 보리, 현미 등의 곡류에 의한 혈전분해효소 활성 증진에 대한 연구 보고는 없는 것으로 사료된다.

결과적으로 보리 분말이 첨가된 볶은 콩 분말을 고초균에 의한 고체 발효시키는 것이 높은 혈전용해효소 활성을 갖는 발효조건으로 판단되며, 볶은 콩 대비 보리 60% 첨가된 원료를 고초균에 의한 최적 고체발효 조건으로 결정하였다.

고초균 종류에 따른 혈전용해효소 활성 및 비타민 K₂ 함량 측정

볶은 콩 대비 보리를 60% 첨가하여 *B. subtilis*를 포함한 총 4종의 균주를 혼합 곡물 발효에 이용하였고, 그 결과 *B. subtilis* HA, KU-A, PUL-A 균주가 높은 혈전용해효소 활성을 나타내었으며, 특히 *B. subtilis* HA가 11 unit/g로 가장 높은 활성을 나타냈다. 이는 Kil 등(31)이 보고한 청국장 배양 시 24시간에 효소활성이 최고치를 보였으며, 배양 후 36시간 이후부터는 효소 활성이 감소하였다는 결과와 유사한 것으로 나타났다.

또한, 혈전용해효소 활성과 반대되는 비타민 K는 카복실화 효소의 조효소로 작용하여 혈액 응고 인자 전구체 단백질의 글루탐산을 감마 카복실 글루탐산으로 전환시켜 혈액 응고 작용에 기인한다. 따라서 혈전용해효소 활성이 뛰어난 청국장은 심근경색, 뇌출혈 등 항응고제를 투여하고 있는 환자는 청국장을 금기시키고 있다(32).

따라서 혈전용해효소 활성이 가장 우수했던 4가지 균주를 이용하여 제조된 발효물의 비타민 K₂를 측정한 결과, *B. subtilis* HA, KU-A, PUL-A 균주를 접종한 발효물에서 *B. amyloliquefaciens* MJ-3에 비해 비타민 K₂가 조금 낮게 나타났다. 특히 *B. subtilis* HA를 접종한 발효물에서 2.36 µg/g로 가장 적게 함유되어 있었다. 비타민 K₂는 필요량이 적고 장관의 박테리아에 의해 인체 내에서 합성되므로 굳이 식품을 통해 섭취하지 않아도 결핍증에 걸리지 않는다. 따라서 비타민 K₂ 함유량이 적은 청국장 발효물 생산이 필요하고, 그 결과 *B. subtilis* HA가 혈전용해효소 활성은 증가시키면서 비타민 K₂ 함량이 적은 발효물을 생성할 수 있는 것으로 확인되었다.

요 약

본 연구에서는 콩 비린내가 감소되고 고소한 풍미가 증진된 볶은 콩에 다양한 볶은 곡류 분말을 혼합하여 *Bacillus subtilis* HA 고초균을 이용한 고체발효를 행하였다. 발효 원료의 수분함량 및 발효 시간에 따른 결과 볶은 콩 분말 대비 수분 1배 첨가된 초기 수분함량 52.6%에서 24시간 발효 후에 protease 활성이 42.6 unit/g으로 높았으며, 점질물 함량 역시 10.60%로 높았다. 발효 48시간째 tyrosine 함량과 protease 활성이 24시간째보다 높게 나타났으나, 발효취가 강하게 생성되어 발효 24시간이 가장 적합한 것으로 나타났다. 곡류 분말(보리, 현미) 종류에 따른 발효조건 최적화를

위해 실시한 결과 현미 첨가 시 점질물 함량이 유의적으로 증가되었고 특히 80% 첨가 시 24.55%로 대조구에 비해 약 2배 향상되었고, 보리는 60% 첨가 시 혈전용해효소 활성이 11.8 unit/g으로 대조구에 비해 약 2배 증진된 것을 확인하였다. 혈전용해효소 활성이 가장 우수했던 볶은 콩 대비 보리 60% 첨가 발효물에 청국장에서 분리한 균주 4가지를 접종하여 혈전용해효소 활성 및 비타민 K₂ 함량을 각각 알아 본 결과 *B. subtilis* HA가 11.8 unit/g, 2.36 µg/g으로 가장 효과적이었다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. Lim SB, Kang MS, Jwa MK, Song DJ, Oh YJ. 2003. Characteristics of cooked rice by adding grains and legumes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 52-57.
2. Woo SM, Kim TY, Yeo SW, Kim SB, Jeong YJ. 2007. Properties of alcohol fermentation from barley treated with non-steam and steam. *Korea J Food Preserv* 14: 201-206.
3. Seog HM, Seo MS, Kim HM, Ahn MS, Lee YT. 2002. Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Korean J Food Sci Technol* 34: 889-892.
4. Oh SH, Park KB, Kim BJ. 2002. Changes in the levels of water soluble protein and free amino acids in brown rice germinated in a chitosan/glutamic acid solution. *Korea J Biotechnol Bioeng* 17: 515-519.
5. Park JD, Choi BK, Kum JS, Lee HY. 2006. Physicochemical properties of brown rice flours produced under different drying and milling conditions. *Korean J Food Sci Technol* 38: 495-500.
6. Choi JH. 2001. Quality characteristics of the bread with sprouted brown rice flour. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 17: 323-328.
7. Yoo HJ, Lee DS, Kim HB. 2004. Chungkookjang fermentation of mixture of barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Korean J Microbiol* 40: 49-53.
8. Chang JH, Shim YY, Kim SH, Chee KM, Cha SK. 2005. Fibrinolytic and immunostimulating activities of *Bacillus* spp. strains isolated from *Chungkook-jang*. *Korean J Food Sci Technol* 37: 255-260.
9. Kil JO, Kim GN, Park IS. 1998. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: optimal condition for production of the enzyme form *bacillus* sp. KP-6408 isolated from *Chungkook-jang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 51-56.
10. Kim JH, Lee JH, Kim HJ, Choi SY, Lee JS. 2003. Effects of barley koji and legumes on the quality and fibrinolytic activity of Korean traditional rice wine. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1066-1070.
11. Choi NS, Seo SY, Kim SH. 1999. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. *Korean J Food Sci Technol* 31: 553-557.
12. Kim SH, Choi NS, Lee WY, Lee JW, Kim DH. 1998. Isola-

- tion of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzymes from Doen-jang. *Korean J Microbiol* 34: 87-90.
13. Kim YT. 1995. Characteristics of fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. isolated from Chungkook-jang. *PhD Dissertation*. Sejong University, Seoul, Korea.
 14. Hong JY, Choue RW, Baek JY, Cho HJ, Song YB. 1999. The study of correlation between serum vitamin K concentration and bone metabolism in postmenopausal women. *Korean J Nutr* 21: 287-295.
 15. Jung HO, Lim SS, Jung BM. 1997. A study on the sensory and texture characteristics of bread with roasted soybean powder. *Korean J Soc Food Sci* 13: 266-271.
 16. Lee HC, Park CO, Shin DH. 1998. Lactic fermentation of steamed barley with an enzyme and a *Lactobacillus*. *Korean J Food Nutr* 1: 43-49.
 17. Oh SM. 2006. Optimization of production of bioactive compounds of the fermented soybean curd residue by *Bacillus* sp. *MS Thesis*. Keimyung University, Daegu, Korea.
 18. Ryu MJ. 2007. Study on mucilage (biopolymer) production and flocculating activity of the fermented soybean curd residue by *Bacillus subtilis* PUL-A. *MS Thesis*. Keimyung University, Daegu, Korea.
 19. Oh SM, Kim CS, Lee SP. 2006. Characterization of the functional properties of soy milk cake fermented by *Bacillus* sp. *Food Sci Biotechnol* 15: 704-709.
 20. Kim HJ, Lee JJ, Cheigh MJ, Choi SY. 1998. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of *kim-chi* ingredient. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1333-1338.
 21. Choi SH, Park JS, Whang KS, Yoon MH, Choi WY. 2004. Production of microbial biopolymer, poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* BS 62. *Agric Chem Biotechnol* 47: 60-64.
 22. Astrup T, Müllerz S. 1952. The fibrin plate method for estimation fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40: 346-351.
 23. Lee HT, Lee MJ, Lee SS. 2009. Physicochemical characteristics of soybean pastes containing sword bean. *J Food Engineering Progress* 13: 176-182.
 24. Choi BD, Lee SK, Yun SE, Joo HK. 1998. Effect of mugwort extract on the quality and the changes of chemical compositions of the *Cheongkukjang* prepared with frozen soybean. *Agric Chem Biol* 41: 510-515.
 25. Lee JH, Bai DH. 2004. A thermostable protease produced from *Bacillus* sp. DF 218. *Korea J Food Sci Technol* 34: 105-110.
 26. Oh SM, Kim CS, Lee SP. 2006. Functional properties of soybean curd residue fermented by *Bacillus* sp. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 115-120.
 27. Beleia A, Varriano-Marstion E, Hosoney RC. 1980. Characterization of starch from pearl millets. *Cereal Chem* 57: 300-303.
 28. Kim MH, Kang WW, Lee NH, Kwon DJ, Kwon OJ, Chung YS, Hwang YH, Choi UK. 2007. Changes in quality characteristics of *Cheonggukjang* made with germinated soybean. *Korean J Food Technol* 39: 676-680.
 29. Sohn BH, Song YJ, Oh KH. 2008. Fibrinolytic activity and characterization of *Bacillus licheniformis* HK-12 isolated from Chungkook-jang. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 251-256.
 30. Han KH, Lee JC, Lee GS, Kim JH, Lee JS. 2002. Manufacture and physiological functionality of Korean traditional liquor by using purple-fleshed sweet potato. *Korean J Food Sci Technol* 34: 673-677.
 31. Kil JO, Kim GN, Park IS. 1998. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: Optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from Chungkook-jang. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 51-56.
 32. Son KH, Choue RW. 2006. A study comparison of dietary quality and vitamin k intake of vegetarians with carnivores. *Korean J Nutr* 39: 529-538.

(2010년 12월 17일 접수; 2011년 2월 7일 채택)