

## Characteristics of *Chungkookjang* Produced by *Bacillus subtilis* MC31

So-Yon Mann<sup>1</sup>, Eun-Ah Kim<sup>1</sup>, Ga-Young Lee<sup>1</sup>, Ro-Ui Kim<sup>1</sup>, Dae-Youn Hwang<sup>2</sup>, Hong-Joo Son<sup>3</sup>, Byong-Won Lee<sup>4</sup>, Chung-Yeol Lee<sup>5</sup> and Dong-Seob Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

<sup>2</sup>Department of Biomaterial Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

<sup>3</sup>Department of Life Science & Environmental Biochemistry, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

<sup>4</sup>Department of Functional Crop Nat'l Institute of Crop Science, RDA, Milyang 627-803, Korea

<sup>5</sup>Miryang Well-Being Industry Association, Miryang Korea 627-881

Received January 21, 2013 / Revised April 13, 2013 / Accepted April 18, 2013

*Chungkookjang* was fermented by *B. subtilis* MC31, a  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) producing microorganism. The characteristics of *Chungkookjang* were investigated while fermenting. Twenty four amino acids were detected in *Chungkookjang*, leucine was the highest of them all. Total cell populations of *B. subtilis* MC31 phase were between  $\log 9.52 \pm 0.5 \sim \log 9.049 \pm 0.5$  CFU/g at stationary phase. Contents of moisture, crude ash, crude protein, crude lipid and crude fiber are  $61.07 \pm 0.01\%$ ,  $1.52 \pm 0.01\%$ ,  $17.66 \pm 0.04\%$ ,  $8.96 \pm 0.03\%$  and  $2.61\%$ , respectively. Contents of ammonia type nitrogen, amino type nitrogen and reducing sugar were increased during fermentation at  $40^\circ\text{C}$  for 72 hr, however those of titratable acidity and total sugar were decreased. pH was slowly alkalized during fermentation. Viscous substance and protease contents in *Chungkookjang* were  $4.7 \pm 0.05\%$  and  $0.519 \pm 7.36$  g/l, apiece. When the fibrin plate and Robbin method for fibrinolytic activity were applied, *B. subtilis* MC31 showed high activity. These results suggested that *B. subtilis* MC31 is suitable to be used as a starter to enhance the quality of *Chungkookjang*.

**Key words** : Characteristic, *Chungkookjang*, *Bacillus subtilis* MC31

### 서 론

대두는 훌륭한 단백질 공급원으로서 isoflavone, saponin, lecithin, phytic acid, trypsin inhibitor, 식이섬유 등 여러 생리활성물질이 풍부하다. 그러나 콩은 그대로 섭취하기 힘들어 가공하거나 발효를 통해 소화흡수율과 영양을 높일 수 있도록 발전해 왔다. 그 중에서도 청국장은 대두를 단시간에 발효 숙성시켜 된장보다 단백질과 지방함유량이 높으며, 그 외에 각종 무기성분과 비타민류의 공급원으로서 한국의 정통발효식품이다[1]. 다른 나라에서도 대두를 이용하여 그 나라의 기호에 맞는 발효식품들이 발전하였는데, 그 예로 중국의 간장, 된장 및 청국장과 일본의 natto, 인도네시아의 tempeh을 들 수 있다[17]. 청 국장은 발효가 진행됨에 따라 숙성 과정 중 균으로부터 각종 효소가 생성이 되고 그 효소들이 청국장에 작용하여 대두 성분들을 분해해 독특한 향미와 맛을 형성하는 동시에 끈끈한 점질물을 생성시킨다[36]. 청국장의 발효과정

에서 생산되는 여러 가지 생리활성 물질들은 혈전용해능[26], 당뇨병[19], 항암 및 항산화[33, 40]의 효능을 가진다. 그 밖에 고혈압 예방, 섬유질의 변비예방, 발암물질과 혈중 콜레스테롤의 체외 배출, 점질물의 알코올 흡수에 의한 해장효과, 사포닌의 혈관강화와 혈액순환 촉진 및 젖산분해, 레시틴의 뇌 노화와 치매예방, 비타민 K 생성 그리고 항돌연변이 등의 활성이 있는 것으로 알려져 있다[6, 11, 22, 25, 28, 29].

청국장 제조로는 일반적으로 볶짚을 이용한 자연발효법과 일본의 natto와 같이 단일 청국장 미생물을 이용하는 방법이 제조·판매되고 있으나 균일한 품질을 갖는 청국장을 제조하기란 어려운 실정이다. 청국장은 다양한 생리활성이 있는 우수한 발효식품임에도 불구하고 각 지방 또는 가정마다 제조 방법이 다양하여 품질이 일정하지 않고, 발효 과정 혹은 조리 중에 발생하는 butyric acid, valeric acid류, 암모니아, 각종 alkylpyrazine류 등에 기인한 특유한 냄새, 곰팡이류의 오염 등의 이유로 소비자들에게 기피되고 있는 실정이다[7]. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 종균으로 사용할 우수 균주를 이용하여 균일한 품질의 청국장 제조와 특성을 조사할 필요가 있다.

최근 들어 전통식품과 다양한 생리활성 물질에 대한 새로운 인식과 관심이 되살아남에 따라 우리나라의 전통발효식품인 청국장의 소비가 급증하고 뇌·신경 전달에 우수한 GABA와 청국장 관련 발효식품들의 다양한 연구 및 새로운 제품들이 계속해서 나오고 있다. *B. subtilis* MC 31에 의해 발효된 청국장

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5356, Fax : +82-55-350-5359

E-mail : kds@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 특성 분석이 다른 발효식품의 보고에 비해 미약한 점을 고려하여 본 연구에서는 청국장을 기능성 식품으로 활용하기 위한 연구로 GABA함량이 높은 청국장을 발효하는 *B. subtilis* MC 31의 특성과 그 품질을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 사용 균주

청국장 제조에 사용된 대두는 2011년 국내에서 수확되는 국산 대두를 구입하여 사용하였다. 균주는 본 연구실에서 대두를 청국장이나 된장으로 발효 시 GABA가 증가한다는 다양한 보고들을 바탕으로 청국장 발효능이 뛰어난 종균을 찾기 위해 여러 가지 청국장들로부터 발효 균주들을 분리하고, 분리된 균주들 가운데 GABA의 함량이 높은 청국장을 생산하는 실험균주 *B. subtilis* MC 31을 사용하였다[34]. 미생물 배양용 배지로는 Luria-Bertani media (LB)를 사용하였으며 구성시약은 Difco Lab. (Detroit, MI, USA)사의 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 시약들은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA), Junsei Co. (Tokyo, Japan), 그리고 Yakuri Co. (Kyoto, Japan)의 제품을 구입하여 사용하였다.

### 아미노산 함량의 측정

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 정확한 GABA 함량과 아미노산을 조사하기 위해 최적 생육조건과 발효조건을 바탕으로 청국장을 제조하여 아미노산 분석기를 이용해 측정하였다. 간단하게 실험방법을 기술하면, 시료 100 mg을 50 ml 튜브에 취하고 6 N HCl을 시료 30 mg당 5 ml씩 가해 약 5분간  $N_2$  gas를 충전한 후 뚜껑을 닫아 110°C oven에서 24시간 동안 가수분해 시킨다. 가수분해 시킨 시료를 50°C 감압농축기에서 감압농축 하여 HCl을 제거한 후 증발 플라스크에 옮겨 2회 정도 반복하여 증발 건조 시킨 뒤 시료회석 완충액을 가하여 아미노산을 용해시켰다. 용해시킨 용액을 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 아미노산 자동분석기(L-8800 Amino Acid Analyzer, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

### 청국장 제조

청국장은 대두 15 g을 24시간 동안 초순수에 침지하여 충분히 불린 후 체로 걸러 물기를 제거한 뒤 발효용기에 넣고 호일로 감싸 autoclave로 121°C에 50분간 증자하였다. 증자된 대두는 clean bench 안에서 45~50°C로 냉각한 후 Luria-Bertani (LB)배지(0.5% NaCl, 0.5% Yeast extract, 1% Tryptone)에서 24시간 동안 종배양하고 6시간 동안 주 배양한 1차 선별균주를 2% 접종하여 37°C에서 72시간 동안 발효시켜 제조하였다.

### 미생물 생육변화

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 미생물의 생육 변화를 조사하기 위하여 72시간까지 12시간 단위로 청국장을 만들어 10 g을 멸균 증류수 90 ml가해 Clean bench에서 멸균된 시약스폰으로 파쇄하여 희석한 후 LB배지(2% Agar 포함)에 도말 하였다. 이를 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 colony가 25~250 colony 사이의 plate를 계수하여 SPC법에 의해 구한 뒤 log N CFU/g으로 나타내었다.

### 일반성분 분석

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 규격, 순도 검사 및 영양가를 평가하기 위하여 식품 중에 일반적으로 함유되어 있는 성분을 조사하였다. 분석방법은 AOAC [2]의 방법에 따라 수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 조섬유를 사용하였다. 즉 수분은 105~110°C 상압가열건조법, 조회분은 600°C의 전기로에서 회화시키는 직접 회화법, 조단백질은 kjedahl법, 조지방 분석은 Soxhlet추출법, 조섬유는 산, 알칼리 분해법을 사용하여 측정하였다.

### 탄수화물 분석

#### 총당

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 총당 함량을 조사하기 위하여 Dubois [8]의 phenol-sulfuric acid법을 변형하여 실험하였다. 청국장 분말 0.5 g에 25% HCl (v/v in water) 1 ml와 증류수 9 ml를 첨가하여 95~100°C의 수욕상에서 2시간 동안 산 분해시킨 후 10,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 0.2  $\mu$ m microfilter (Pall corporation, USA)를 거쳐 여과하였다. 이 여액 1 ml에 5% phenol 1 ml와 진한 황산 5 ml를 가하여 혼합한 후 15분간 반응하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준용액으로는 glucose를 사용하여 당의 양과 흡광도 사이의 표준곡선을 작성한 후 그 곡선에 따라 시료 중의 총 당을 결정하였다.

#### 환원당

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 환원당 함량을 조사하기 위하여 Park [36]의 방법에 따라 실험하였다. 청국장 분말 1 g에 증류수 200 ml로 맞춘 다음 30°C에서 120 rpm으로 2시간 교반한 후 10% TCA (v/v in water)를 0.1 ml 첨가하여 단백질을 침전시킨 다음 15분간 방치시켜 10,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 0.2  $\mu$ m microfilter를 거쳐 여과하였다. 이들 여액 1 ml에 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 시약 3 ml를 넣고 끓는 수욕 상에서 10분간 발색시킨 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 측정에 사용된 DNS 시약은 NaOH 10 g과 DNS 10 g을 소량의 증류수로 완전히 녹인 후 phenol 2 g, sodium bisulfate 0.5 g, Rochlle salt 200 g을 순서대로 증류수에 녹인 후 1,000 ml로 맞춘 후 압소에

저장하면서 사용하였다. 표준용액으로는 glucose를 사용하여 당의 양과 흡광도 사이의 표준곡선을 작성한 후 그 곡선에 따라 시료중의 환원당을 결정하였다.

#### 질소화합물 분석

##### 암모니아태 질소

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 암모니아태 함량을 조사하기 위하여 Kjeldahl 방법으로 측정하였다. 삼각 플라스크에 동결건조 시킨 청국장 분말 1 g을 채취 후 10% KCl용액을 100 ml가하여 1시간 진탕 침출한 뒤 Whatman filter paper No.2 여과지로 여과 후 MgO 200 mg을 가해 시료액으로 사용했다. 켈달 자동 적정기(FOSS 2200 system, Japan)를 이용하여 적정분석 하였다.

##### 아미노태 질소

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 아미노태 함량을 조사하기 위하여 Formal적정법으로 측정하였다[22]. 청국장 분말 0.5 g에 증류수 50 ml를 가하여 30°C에 30분간 진탕 용해한 후 10,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 0.2 µm microfilter를 거쳐 여과하여 20 ml를 취하였다. 이 여액을 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.4가 될 때까지 적정 한 뒤, 중성 formalin용액(35%, pH 8.3)에 20 ml를 가하고 다시 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.4가 될 때까지 적정하여 아미노태 질소함량을 산출하였다.

##### 점질물 정량

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 점질물 함량을 조사하기 위하여 청국장에 동량의 증류수를 첨가하여 25°C에서 30분간 균질화한 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액 5 ml를 얻는다. 이를 105°C에서 증발 건조시켜 그 무게를 측정하였으며, 시료에 대한 건물량으로 나타내었다.

##### Protease 정량

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 protease함량을 조사하기 위하여 청국장 5 g을 8,000 rpm으로 5분 동안 homogenizer로 마쇄한 뒤 증류수 95 ml를 가하고 150 rpm으로 3시간 교반한 후 시료 액을 10,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 뒤 0.2 µm microfilter를 거쳐 나온 상등액을 조효소액으로 사용하였다. pH 7으로 조절한 0.6% casein용액 3 ml를 30°C에서 예열하여 효소 액 1 ml를 첨가한 후 30°C에서 10분간 반응시킨다. 반응시킨 액에 0.4 M TCA용액 5 ml를 가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 후 시료 액을 10,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 0.2 µm microfilter를 거쳐 여과시켰다. 여액 2 ml에 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 ml와 folin시약 1 ml를 넣고 다시 30°C에서 30분간 발색 시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로는 L-tyrosine을 사용하여 당의 양과 흡광도 사이의 표준곡선을 작성한 후 그 곡선에 따라 시료중의 pro-

tease량을 1unit을 기질 1 ml 당 생성된 tyrosine의 µg 수로 계산하였다.

#### Fibrinolytic activity 측정

##### Fibrin plate 법

*B. subtilis* MC 31의 fibrinolytic activity를 측정하기 위하여 *B. subtilis* MC 31을 37°C, 24시간 배양한 배양액의 혈전용해능을 fibrin plate법을 이용하여 lysed saline의 반경을 측정하였다[3]. 0.01 M phosphate buffered saline (0.15 M NaCl, pH 7.8) 5 ml에 human fibrinogen을 0.6%가 되도록 용해시킨 후 thrombin 0.1 ml (100 U/ml)를 첨가하고 동일한 buffer에 1% agarose를 녹인 용액 5 ml를 첨가하여 혼합한 후 petridish에 붓고 실온에서 5~10분간 방치하여 최종적으로 0.3%의 fibrin plate를 제조하였다. 혈전용해효소 활성 측정 시료는 37°C에서 24시간 LB에서 배양한 배양액을 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 0.2 µm microfilter를 거쳐 제균을 하여 사용한다. Fibrin plate에 sample을 0.02 ml씩 점적하여 37°C에서 5시간 반응시킨 후 용해 면적으로 효소 활성을 조사하였다.

##### α-casein을 이용한 plasmin unit 측정

*B. subtilis* MC 31의 fibrinolytic activity를 측정하기 위하여 α-casein을 이용한 plasmin unit을 측정하는 Robbin방법을 사용하였다[20]. 용해효소 활성 측정 시료는 37°C에서 24시간 LB에서 배양한 균액을 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 0.2 µm microfilter를 거쳐 제균을 한 것으로 사용하였다. 측정하고자 하는 시료 0.2 ml와 0.067 M phosphate buffer를 시료와의 volume을 2 ml로 맞춰주기 위해 1.8 ml넣고 4% α-casein용액 2 ml를 섞어 흔든 후 37°C water bath에서 30분간 반응시킨 다음 바로 4°C 물에 담근다. 이 용액에 15% TCA용액을 6 ml넣고 반응을 정지시킨 후 4°C에서 18시간 방치하여 실온으로 맞춘 뒤 여과를 거쳐 침전물을 제거하고 이 여액을 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 plasmin casein unit (PCU)는 1시간 동안 TCA-soluble tyrosine 0.45 mg을 유리하는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

#### pH 및 총산도 측정

##### pH

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 시간 별 pH를 조사하기 위하여 청국장 0.5 g를 8,000 rpm으로 5분간 homogenizer로 마쇄하고 증류수 50 ml를 가하여 충분히 균질화 시킨 뒤 시료 액을 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 0.2 µm microfilter를 거쳐 나온 상등액 20 ml를 100 ml비커에 취하여 pH-meter (pH meter pH-200L, Istek, Korea)로 측정하였다.

##### 총산도

*B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 시간 별 총산

도를 조사하기 위하여 앞의 여과액 20 ml를 pH-meter로 pH 8.3이 될 때까지 소요되는 0.1 N NaOH의 양을 측정하고 초산 양으로 환산하여 나타내었다.

결과 및 고찰

아미노산 함량

*B. subtilis* MC 31을 이용하여 제조한 청국장의 아미노산 함량은 Table 1 과 같다. 아미노산 중 leucine이 가장 높았고 phenylalanine, lysine, valine, tyrosine순으로 낮아졌다. Son 등[38]은 *B. subtilis* CS-17로 청국장 발효시 phenylalanine이 가장 많이 함유되어 있었고 그 외 lysine, leucine, tyrosine등이 많았다고 보고하여 본 실험 결과와 유사하였고 Kim 등[27]은 청국장 발효숙성 중 *B. subtilis*의 작용으로 원료 콩 단백질을 분해시켜 생성한 구수한 맛을 내는 glutamic acid, aspartic acid, 쓴맛을 지닌 valine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine 및 단맛을 내는 alanine, glycine, lysine 등의 17종의 아미노산이 어우러져 복합적인 청국장 특유의 맛이 형성 된다고

Table 1. Amino acids content in *Chungkookjang* fermented by *B. subtilis* MC31

Amino acids		<i>B. subtilis</i> MC31 (mg%)
Essential amino acid	L-Threonin	141.18±2.15 <sup>1)</sup>
	L-Valine	351.00±0.06
	L-Methionine	161.85±0.55
	L-Isoleucine	308.49±2.70
	L-Leucine	567.45±0.01
	L-Phenylalanine	516.75±0.24
	L-Lysine	382.59±0.01
	L-Tryptophan	118.95±0.09
	L-Alanine	220.74±0.01
	L-Arginine	170.43±0.17
Non-essential amino acid	L-Asparagine	41.34±0.29
	L-Aspartic acid	27.69±0.18
	β-Alanine	ND
	L-Cystein	19.89±0.01
	Ethamin	9.36±0.18
	GABA	20.00±0.01
	L-Glutamic acid	57.33±0.23
	Glycine	81.51±0.06
	L-Histidine	242.19±0.06
	L-Homocystine	13.26±0.01
	δ-Hydroxylysine	12.48±0.07
	L-Ornithine	94.77±0.01
	L-Serine	60.84±0.46
L-Tyrosine	329.94±0.06	

<sup>\*</sup>*Chungkookjang* was fermented at 40°C for 72 hr.

<sup>\*</sup>ND: Not detected

<sup>1)</sup>Data are given as means of values±SD from three independent experiments.

보고하였다. GABA생성의 전구체인 glutamic acid의 함량은 57.33±0.23 mg%이었고, GABA의 함량은 삶은 콩 함량 보다 발효가 진행되어 20±0.01 mg%까지 증가하였다. Jo [13]는 전통된장의 숙성기간에 따른 GABA함량이 숙성기간 1년 경과된 된장의 경우 0.0438 mg/g이었고, 3년 숙성된 된장의 GABA 함량이 0.1206 mg/g으로 증가한다고 보고하였고, 본 실험과 비교하면 *B. subtilis* MC 31로 제조한 청국장의 GABA함량이 20±0.01 mg%로 다소 높은 함량을 나타내었다.

미생물 생육 변화

청국장 발효 과정 중 *B. subtilis* MC 31의 생육 변화는 0시간에 log 4.5±0.31 CFU/g로 시작하여 발효가 진행됨에 따라 급격히 증가하여 12시간에 log 8.1±0.41 CFU/g를 나타내었으며, 24시간에는 log 9.6±0.11 CFU/g, 36시간에는 log 9.92±0.13 CFU/g까지 계속해서 증가하는 모습을 보였지만, 36시간 이후에서 72시간까지 log 9.52±0.5~log 9.049±0.5 CFU/g로 약간의 감소하는 패턴을 보였다(Fig. 1). *B. subtilis* MC 31를 이용하여 청국장을 제조하였을 때 총 균수는 Baek [4]의 연구 결과와 같이 12시간까지 대수증식기를 보이다 그 이후로 정지기에 들어가는 균수와 양상이 유사하였고 Youn 등[42]이 보고한 40시간 이후 총균수 10<sup>9</sup> CFU/g의 결과와 유사하였다.

일반성분 분석

*B. subtilis* MC 31로 발효한 청국장의 일반성분을 분석한 결과는 Table 2에 있다. 수분함량은 61.07±0.01%, 회분은 1.52±0.01%, 조단백 함량은 17.66±0.04%, 조지방 함량은 8.96±0.03%, 조섬유 함량은 2.61%를 나타내었다. 전국의 일반가정에서 전통적인 재래식 방법으로 제조한 청국장을 수집하여 일반성분을 측정된 결과 평균적으로 수분함량은 55.0%, 조단

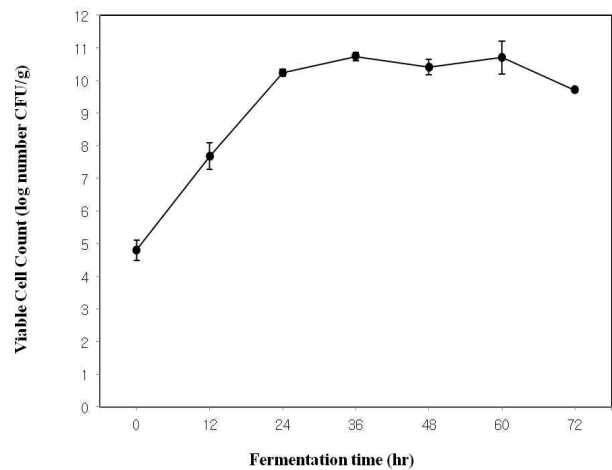


Fig. 1. Changes of viable cell population in *Chungkookjang* fermented by *B. subtilis* MC31. *Chungkookjang* was fermented at 40°C. Data are given as means of values±SD from three independent experiments.

Table 2. Proximate composition in *Chungkookjang* fermented by *B. subtilis* MC31

Proximate composition	<i>Chungkookjang</i> (%)
Moisture	61.07±0.01 <sup>1)</sup>
Crude ash	1.52±0.01
Crude protein	17.66±0.04
Crude lipid	8.96±0.03
Crude fiber	2.61

\*Proximate composition was analyzed by AOAC method.

\**Chungkookjang* was fermented at 40°C for 72 hr.

<sup>1)</sup>Data are given as means of values±SD from three independent experiments.

백질 17.6%, 조지방 3.3%, 당질 13.3%, 조섬유 4.9%, 회분 5.8%으로 보고가 된 Kim 등[23]의 결과에 비해 본 실험의 청국장 일반성분은 수분 함량은 많고 지방이 적은 경향을 보였지만 다른 성분은 유사하였다.

탄수화물 분석

총당 함량

*B. subtilis* MC 31로 발효한 청국장의 총당 함량의 변화는 삶은 콩이 17.55±0.52%에서 발효가 진행되어 72시간에는 11.74±0.22%로 감소하였다(Table 3). Kim 등[24]은 각 지역에서 제조된 재래식 전통 청국장을 분석한 결과 총당 함량은 평균 13.3%로 본 연구결과와 값이 유사하다는 점을 알 수 있었다. Suh 등[39]은 *B. natto*와 *B. subtilis*를 이용하여 제조한 청국장의 발효시간 별 총당 함량이 시간이 지날수록 완만하게 감소하는 경향을 나타낸 것으로 본 실험과 경향이 유사함을 알 수 있었다.

환원당 함량

Glucose, fructose, maltose 등의 환원당류들은 단맛을 부여하는 물질로 식품의 관능적인 품질 평가면 에서 대단히 중요하며 이러한 환원당류들은 미생물의 대사에 따른 효소력 변화와 밀접한 관계가 있어 미생물이 glucose를 대사에 이용하는 정도에 따라 환원당 함량의 변화가 생긴다. *B. subtilis* MC31로 발효한 청국장의 환원당 함량의 변화는 삶은 콩 1.48±0.03%에서 발효가 진행되어 72시간에는 5.15±0.07%로 3.5배 증가하였다(Table 3). 전통 장류 제조업체에서 수집한 제품 18점의 환원당을 분석하여 0.51~0.24% 범위를 나타낸 Kim [24]의 보고

Table 3. Contents of total and reducing sugar in *Chungkookjang* fermented by *B. subtilis* MC31

	Total sugar (%)	Reducing sugar (%)
Steamed soybean	17.55±0.52 <sup>1)</sup>	1.48±0.03
<i>Chungkookjang</i>	11.74±0.22	5.15±0.07

\**Chungkookjang* was fermented at 40°C for 72 hr.

<sup>1)</sup>Data are given as means of values±SD from three independent experiments.

보다 다소 높게 측정되었고, Lee 등[30]은 청국장 발효 과정 중 환원당의 함량은 발효초기부터 12시간까지 급격히 증가하다가 그 이후에는 서서히 감소하는 경향을 보인다고 보고하였으며 Eom [9]은 그 이유를 발효 초기 균의 급격한 증식에 의한 당 분해 효소인 아밀라아제의 증가와 작용으로 보았으며, 특히 β-amylase활성의 변화패턴과 환원당 함량의 패턴 변화이 유사한 것으로 보아 상관관계가 있는 것으로 보고했다.

질소화합물 분석

암모니아태 질소 함량

암모니아태 질소는 단백질 분해과정에서 deamination에 의하여 생성되며 식품 내에 과량으로 축적되면 부패취로 작용하므로 일반적으로 장류 제품의 변패 또는 이상발효의 지표로 사용된다. 암모니아태 질소의 과잉 생산은 청국장 냄새에 영향을 미쳐 소비기피를 유발하는 중요한 물질로 알려져 있기 때문에 본 연구에서도 이러한 영향을 확인하기 위하여 청국장 발효과정 중 암모니아태 질소 함량을 조사한 결과 Table 4과 같이 삶은 콩이 63.4±0.33 mg%에서 발효가 진행됨에 따라 72 시간에는 238.74±0.18 mg%로 4배 증가하였다. Kim [27]은 군주에 따른 청국장 시료의 암모니아태 질소의 양은 전반적으로 숙성 일이 증가하면서 증가하는 경향을 나타내었다고 보고하였고 본 실험과 실험법은 다르지만 유사한 패턴을 가진 것으로 보여진다. 암모니아태 질소를 감소시키기 위해 Ju 등[16]은 *Bacillus subtilis*와 *Lactobacillus plantarum*를 혼합 배양하여 청국장의 불쾌취를 감소를 시켰고 Park [37]은 녹차를 청국장에 5%를 첨가하여 냄새를 저감하였다고 보고하였다.

아미노태 질소 함량

아미노태 질소 함량은 protease의 작용에 의하여 단백질이 아미노산의 형태로 분해되는 정도를 나타낸 것으로 청국장의 발효도 평가 및 장류 발효식품의 품질과 구수한 맛의 지표로 사용되고 있다. 현재 우리나라 식품공전의 규격에는 청국장의 아미노태 질소 함량을 280 mg% 이상으로 규정하고 있다. 청국장 발효과정 중 아미노태 질소 함량을 조사한 결과 삶은 콩 23.87±0.13 mg%에서 발효가 진행되어 72시간에는 449.25±0.21 mg%로 급격히 증가하여 *B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 아미노태 질소 함량이 식품공전의 규격을

Table 4. Contents of ammonia and amino type nitrogen in *Chungkookjang* fermented by *B. subtilis* MC31

	Ammonia contents (mg %)	Nitrogen contents (mg %)
Steamed soybean	63.4±0.33 <sup>1)</sup>	23.87±0.13
<i>Chungkookjang</i>	238.74±0.18	449.25±0.21

\**Chungkookjang* was fermented at 40°C for 72 hr.

<sup>1)</sup>Data are given as means of values±SD from three independent experiments.

만족시켰다(Table 4). Jung [18]은 청국장 발효함에 따라 72 시간 까지 아미노태 질소 함량이 지속적으로 증가한다고 보고 하였으며 삶은 콩과 72시간 청국장을 비교한 결과 0시간 58.68-92.38 mg%에서 72시간에 336.53-425.03 mg%로 전환이 된 것으로 보아 본 연구의 결과보다 함량과 전환률이 낮았지만 유의적인 차이는 없는 것으로 보인다. *B. subtilis* MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 아미노태질소와 암모니아태 질소를 비교하여 증가 패턴이 유사한 것으로 보아 청국장 발효 시 시간이 경과함에 따라 구수한 맛의 증가와 함께 청국장의 암모니아취가 동시에 증가하는 것을 보여주는 것으로서 나타났다. Hwang 등[10]의 보고에서 발효기간 중 주로 미생물이 분비하는 protease가 원료 대두의 단백질에 작용하여 수용성 질소형태로 가수분해 되고 이어서 peptide를 거쳐 아미노태 질소 형태로 가수분해하여 청국장의 구수한 맛이 생성됨과 동시에 발효가 계속 진행되면서 암모니아태 질소를 형성시킨다고 하였다.

#### 점질물 함량

청국장 발효 시 나타나는 생리활성기능은 *Bacillus*속 균주의 발효대사산물인 청국장의 점질물에 의한 것으로 추정되며, 이는 단백질 분해물 중합체인 polyglutamate와 콩 탄수화물 분해물인 과당으로 구성된 levan form fructan으로 구성되어 있다[12, 30]. 콩을 원료로 하여 제조한 청국장 중의 단백질은 발효과정 중 *Bacillus subtilis*가 분비하는 단백질 분해 효소의 작용으로 polypeptide→peptide→amino acid로 분해되어 소화 흡수되기 쉬운 상태와 끈적한 점질물이 생성되어 고유의 맛과 향을 지니게 된다[15]. 청국장 발효과정 중 점질물 함량을 조사한 결과 4.7±0.05%의 함량을 보여 일반 청국장에는 2.15~6.03%가 함유되어 있다는 다른 보고들의 결과와 유사하였다[32]. 이러한 결과들은 발효 균주와 발효환경에 따라 점질물의 함량과 특성이 다르게 나타나는 것으로 보인다.

#### Protease 함량

Protease활성은 청국장 단백질 분해 특유의 구수한 맛 성분과 영양을 유리하고 유리아미노산 함량에 많은 영향을 주는 요인으로서 청국장 품질을 나타내는 중요한 지표가 된다[41]. *B. subtilis* MC 31의 protease activity를 확인한 결과 519±7.36 unit의 함량을 보였다. 이러한 결과는 *Bacillus*속의 균을 이용한 청국장의 단백질분해효소 활성은 재래 청국장에서 분리한 균주를 이용하여 제조한 청국장의 protease활성은 균주에 따라 다르며, 그 범위는 32-110 µg/g/hr이라 보고한 Lee [31]와 90.97-117.19 unit이라 보고한 Baek 등[5]의 결과 보다 다소 높은 활성을 나타내었으며 Kim 등[25]의 보고에 따르면 청국장의 발효기간에 차이를 나타내었으며 숙성 3-6일 동안에 활성이 증가하다가 6일 후에는 활성이 감소하였으며, 그 이유를 장류의 미생물의 성장이 감소하는 것에 기인한다고 하였다.

#### Fibrinolytic activity 측정

혈전은 fibrinogen이 활성화된 thrombin에 의해서 전환된 불용성의 중합체인 fibrin을 형성하여 발생하게 되는데 이는 plasminogen이 활성화된 plasmin에 의하여 분해가 가능하다. 하지만 과도한 혈전이 생성되면 혈전용해(fibrinolysis)의 불균형이 일어나 혈관 내에 축적되고 이는 심혈관계 질환을 유발시키는 것으로 알려져 있다[35].

#### Fibrin plate법

청국장에 혈전용해효소가 존재한다는 보고[14]들을 바탕으로 *B. subtilis* MC 31의 혈전용해능을 측정해본 결과 혈전용해 활성을 보였다(Fig. 2). 일반적으로 *Bacillus*속의 청국장 제조 균주들은 혈전용해 활성을 갖는 것으로 보고되었으나 실제로 혈전용해활성이 전혀 없는 균주도 존재한다. 앞의 Fibrin plate의 결과를 바탕으로 혈전용해력을 정확히 조사하기 위해 α-casein을 이용하여 plasmin unit을 측정하였다.

#### α-casein을 이용한 plasmin unit 함량

Fibrin plate방법에서 혈전용해활성이 나타난 *B. subtilis* MC 31의 함량을 알기 위하여 α-casein을 이용하여 plasmin unit을 측정된 결과 *B. subtilis* MC 31의 혈전용해효소가 1시간 동안 TCA-soluble tyrosine 0.45 ml를 32.046±0.07 PCU/ml 유리하는 것으로 나타났다.

#### pH 및 총산도 측정

##### 시간에 따른 pH의 변화

배양 시간 별 청국장의 pH를 측정된 결과 0시간에 pH 6.4±0.1에서 시작하여 36시간까지 지속적으로 증가하다 이후에는 pH 7.01±0.08~pH 7.02±0.08사이로 큰 변화 없이 72시간까지 일정하게 나타났다(Fig. 3A). 발효 후 청국장의 pH는 Baek 등[6]의 연구 결과와 같이 발효 전에 비해 시간이 지남에

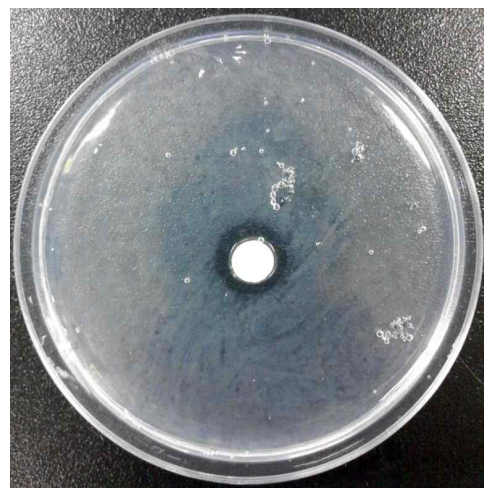


Fig. 2. Clear zone formed by *B. subtilis* MC 31 on fibrin plate. Fibrin plate was incubated at 37°C for 5 hr.

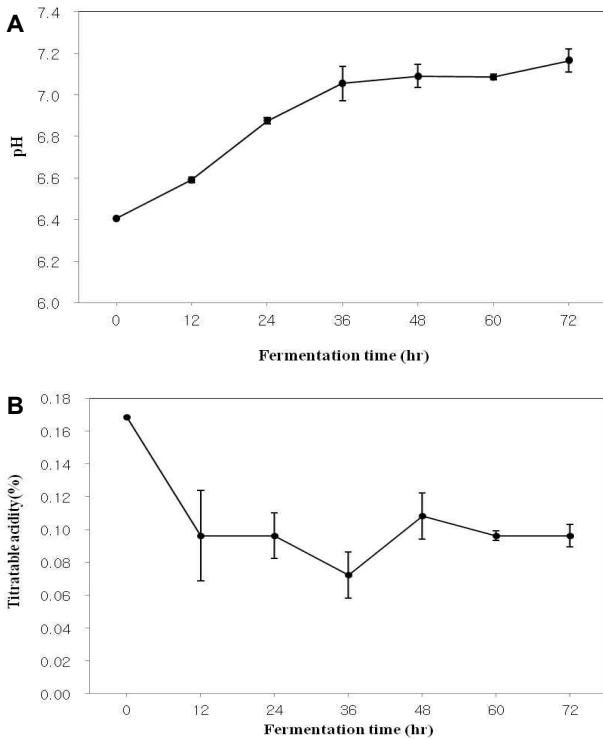


Fig. 3. Changes of pH (A) and titratable acidity (B) in *Chungkookjang* fermented by *B. subtilis* MC31. *Chungkookjang* was fermented at 40°C for 72 hr. Data are given as means of values±SD from three independent experiments.

따라 증가하였고 Kim 등[21]이 보고한 우리나라 전통 청국장의 평균 pH값인 7.21과 유사하였다.

시간에 따른 총산도의 변화

배양 시간 별 청국장의 산도를 측정한 결과 0시간에서 0.17%에서 시작하여 36시간까지 지속적으로 감소하다 이후에는 0.09±0.02%~0.1±0.02% 사이로 큰 변화 없이 72시간까지 일정하게 나타났다(Fig. 3B). 발효 후 청국장의 산도는 Jung 등[15]의 보고에 비해 산도가 낮은 편이었으나 시간이 지남에 따라 감소하다 다시 증가하는 패턴이 유사하였다. 시간에 따른 청국장의 총산 함량이 pH의 변화와 일관된 경향을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원(관리번호 111030-3)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Ahn, Y. S., Kim, Y. S and Shin, D. H. 2006. Isolation, identification, and fermentation characteristics of *Bacillus sp* with

high protease activity from traditional *Cheonggukjang*. *Korean J Food Sci Technol* **38**, 82-87.

2. AOAC, 1990. Official methods of analysis, 15th ed. Association of analytical chemists. Washington. DC.

3. Astru, T. S and Mullertz, S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* **40**, 346-351.

4. Baek, L. M. 2009. Effect of soybean germination on quality characteristics of *Cheongkookjang* inoculated with *Bacillus licheniformis* B-59 isolated from rice straw. M.S. dissertation, Catholic University of Daegu, Daegu, Korea.

5. Baek, L. M., Park, L. Y., Park, K. S and Lee, S. H. 2008. Effect of starter cultures on the fermentative characteristics of *Cheonggukjang*. *Korean J Food Sci Technol* **40**, 400-405.

6. Byun, M. W., Son, J. H., Yook, H. S., Jo, C. and Kim, D. H. 2002. Effect of gamma irradiation on the physiological activity of korean soybean fermented foods, *Chungkookjang* and *Doenjang*. *Radiat Phys Chem* **64**, 245-248.

7. Choe, J. S., Kim, J. S., Yoo, S. M., Park, H. J., Kim, T. Y., Chang, C. M and Shin, S. Y. 1996. Survey on preparation method and consumer response of *Chungkukjang*. *Korea Soybean Digest* **13**, 29-43.

8. Dubois, M., Gillers, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**, 350-352.

9. Eom, S. M., Jung, B. Y and Oh H. I. 2009. Changes in chemical components of *Cheonggukjang* prepared with germinated soybeans during fermentation. *J Appl Bio Chem* **52**, 133-141.

10. Hwang, H. A., Lee, N. K., Cho, I. J., Hagm, Y. T., Kwon, K. O and Kim, B. Y. 2008. Selected of microorganisms and optimization of manufacture process for *Cheonggukjang*. *J Korean Food Sci Technol* **40**, 406-411.

11. Hong, J. Y., Choue, R. W., Baek, J. Y., Cho, H. J. and Song, Y. B. 1999. The study of correlation between serum vitamin K concentration and bone metabolism in postmenopausal women. *Korean J Nutr* **21**, 287-295.

12. In, J. P and Lee, S. K. 2004. Effect of yucca (*Yucca shidigera*) extract on quality characteristics of *Chungkukjang* using *Bacillus subtilis* p01. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **47**, 176-181.

13. Jo, S. J., Hong, C. O., Yang, S. Y., Choi, K. K., Kim, H. K., Yang, H and Lee, K. W. 2011. Changes in contents of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) and isoflavones in traditional korean *Doenjang* by ripening periods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **40**, 557-564.

14. Jong, H. H. 2010. The fermentation characteristics of *Cheonggukjang* prepared by starter culture of *Bacillus spp* with fibrinolytic activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **39**, 1832-1838.

15. Joo, H. K. 1996. Studies on chemical composition of commercial *Chungkukjang* and flavor compounds *Chungkukjang* by mugwort (*Artemisia asiatica*) or red pepper seed oil. *Korea Soybean Digest* **13**, 44-56.

16. Ju, K. E and Oh, N. S. 2009. Effect of the mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on the quality of *Cheonggukjang*. *Korean J Food Sci Tecol* **41**, 399-404.

17. Jung, D. H. and Sim, S. K. 1994. *Fermented soybean foods*,

- pp. 3, Pond of intellect, Korea.
18. Jung, J. B., Choi, S. K., Jeong, D. Y., Kim, Y. S and Kim, Y. S. 2012. Effects of germination time of soybeans on quality characteristics of *Cheonggukjang* fermented with an isolated bacterial strain. *Korean J Food Sci Tech* **44**, 69-75.
  19. Kang, M. J., Kim, J. I. and Kwon, T. W. 2003. Effect of *Chungkukjang* on blood glucose and lipid profile in neonatal streptozotocin induced diabetic rats. *Food Sci Biotechnol* **12**, 544-547.
  20. Kenneth, C., Robbins and Summaria, L. 1963. Purification of human plasminogen and plasmin by gel filtration on sephadex and chromatography on diethylaminoethyl-sephadex. *J Biological Chem* **3**, 952-962.
  21. Kim, B. N. and Lee, S. Y. 1995. Nattokinase,  $\gamma$ -GTP, protease activity and sensory evaluation of *Natto* added with spice. *J Korean Soc Food Nutr* **24**, 228-233.
  22. Kim, D. H., Kim, S. H., Lee, J. M., Kim, J. E. and Kang, S. C. 2005. Monitoring of quality characteristics of *Chungkookjang* products during storage for shelf-life establishment. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **48**, 132-139.
  23. Kim, J. S., Yoo, S. M., Choe, J. S., Park, H. J., Hong, S. P and Chang, C. M. 1998. Physicochemical Properties of Traditional *Chonggugjang* Produced in Different Regions. *Arricultural Chem Biotechnol* **41**, 377-383.
  24. Kim, J. W., Kim, Y. S., Jeong, P. H., Kim, H. E and Shin D. H. 2006. Physicochemical characteristics of traditional fermented soybean products manufactured in folk villages of *Sunchang* region. *J Fd Hyg Safety* **21**, 223-230.
  25. Kim, S. H., Yang, J. L. and Song, Y. S. 1999. Physiological functions of *Chongkukjang*. *Food Ind Nutri* **4**, 40-46.
  26. Kim, W. K., Choi, K., Kim, Y. T., Park, H. H. and Lee, S. Y. 1996. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* strain CK11-4 screened from *Chungkook-jang*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2482-2488.
  27. Kim, Y. S. 2010. Quality characteristics of *Cheonggukjang* fermented by different starter culture. M.S. dissertation, Kunkuk University, Seoul, Korea.
  28. Kim, Y. T., Kim, W. K. and Oh, H. I. 1995. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *Chungkookjang*. *Korean J Appl Microbial Biotechnol* **23**, 1-5.
  29. Lee, H. C. and Won, M. B. 1995. *Mystery of Chungkookjang*. Shinkwangpub, Korea.
  30. Lee, H. J and Suh, J. S. 1981. 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.
  31. Lee, M. Y., Park, S. Y., Jang, K. O., Park, K. Y and Kim, S. D. 1975. Quality and functional characteristics of *Chungkukjang* prepared with various *Bacillus sp.* isolated from traditional *Chungkukjang*. *J Korean Food Sci* **70**, 191-196.
  32. Lee, T. L., Kim, S. H., Choung, N. H and Yim, M. H. 1992. A study on the production of viscous substance during the *Chungkookjang* fermentation. *J Korean Agric Chem Soc* **35**, 202-209.
  33. Lim, S. Y., Park, K. Y. and Rhee, S. H. 1999. Anticancer effect of *Doenjang* in vitro sulforhodamine B (SRB) assay. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **28**, 240-245.
  34. Mann, S. Y., Kim, E. A., Lee, G. Y., Kim, R. U., Hwang, D. Y., Son, H. J. and Kim, D. S. 2013. Isolation and Identification of GABA-producing Microorganism from *Chungkookjang*. *J Life Sci* **23**, 102-109.
  35. Paik, H. D., Lee, S. K., Heo, S., Kim, S. Y., Lee, H. H and Kwon, T. J. 2004. Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from *Chungkookjang*. *J Microbiol Biotechnol* **14**, 829-835.
  36. Park, J. M., Lee, S. S. and Oh, H. I. 1995. Changes in chemical characteristics of traditional *Kochujang meju* during fermentation. *Korean J Food Nutr* **8**, 184-191.
  37. Shon, M. Y., Seo, K. I., Lee, S. W., Choi, S. H. and Sung, N. J. 2000. Biological activities of *Chungkugjang* prepared with black bean and changes in the phytoestrogen content during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* **32**, 936-941.
  38. Son, D. H., Kwon, O. J., Ji, W. D., Choi, U. K., Kwon, O. J., Lee, E. J., Cho, Y. J., Cha, W. S and Chung, Y. G. 2000. The quality changes of *Chungugjang* prepared by *Bacillus sp* CS-17 during fermentation time. *J Kor Soc Agri Chem Biotechnol* **43**, 1-6.
  39. Suh, J. S., Ryu, M. K. and Hur, Y. H. 1983. 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**, 385-371.
  40. Wei, H., Wei, L., Frenkel, F., Brown, R. and Bames, S. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr Cancer* **20**, 1-12.
  41. Xiao, L. Y. 2011. Identification of three strains isolated from *Cheonggukjang* and characteristics of their crude protease and amylase. M.S. dissertation, Kunkuk University, Seoul, Korea.
  42. Youn, K. C., Kim, D. H., Kim, J. O., Park, B. J., Yook, H. S., Cho, J. M. and Byun, M. W. 2002. Quality characteristics of the *Chungkookjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *Korea J Food Sci Technol* **31**, 201-210.



초록 : *B. subtilis* MC 31를 이용한 청국장의 품질특성

맹소연<sup>1</sup> · 김은아<sup>1</sup> · 이가영<sup>1</sup> · 김로의<sup>1</sup> · 황대연<sup>2</sup> · 손홍주<sup>3</sup> · 이병원<sup>4</sup> · 이충렬<sup>5</sup> · 김동섭<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 식품공학과, <sup>2</sup>바이오소재과학과, <sup>3</sup>생명환경화학과, <sup>4</sup>두류유지작물과, <sup>5</sup>밀양웰빙산업협회)

GABA 함량이 높은 청국장을 발효하는 *Bacillus subtilis* MC 31의 청국장 품질특성을 조사하였다. *B. subtilis* MC 31에 의해 발효된 청국장으로부터 24개의 아미노산이 검출되었고 그 중에서도 leucine이 가장 높은 함량을 나타냈다. *B. subtilis* MC31에 의해 발효가 된 청국장의 미생물의 생육 변화를 조사한 결과 총 균수가 정지기에 들어서면서  $\log 9.52 \pm 0.5 \sim \log 9.049 \pm 0.5$  CFU/g까지 증가하였다. 청국장의 일반성분은 수분  $61.7 \pm 0.01\%$ , 회분  $1.52 \pm 0.01\%$ , 조단백  $17.66 \pm 0.04\%$ , 조지방  $8.96 \pm 0.03\%$ , 조섬유가  $2.61\%$ 를 함유하였다. 암모니아태, 아미노태, 환원당은 모두 삶은 콩보다 청국장의 함량이 높게 조사되었지만 산도와 총 당은 청국장이 삶은 콩보다 함량이 낮았다. 청국장의 pH는 시간이 지날수록 알칼리화되고 점질물은  $4.7 \pm 0.05\%$ , protease activity는  $0.519 \pm 7.36$  g/l로 나타났다. Fibrin plate와 Robbin실험을 통하여 fibrinolytic activity도 높음을 확인하였다. 이상의 결과로 미루어 보아 *B. subtilis* MC 31은 우수한 청국장 품질을 띄어 제조용 균주로 사용이 가능한 것으로 사료된다.