

Bacillus subtilis에 의한 발아 및 미발아 황태 청국장 발효

이나리¹, 고태훈¹, 박성보¹, 이상미¹, 황대연¹, 김동섭¹, 박근태², 손홍주^{1*}

¹부산대학교 생명자원과학대학

²부산대학교 산학협력단

Received : November 28, 2012 / Revised : January 17, 2013 / Accepted : February 5, 2013

Fermentation of Germinated- and Nongerminated-Yellow Soybean *Chungkookjang* Using *Bacillus subtilis*. Lee, Na-Ri¹, Tae-Hun Go¹, Sung-Bo Park¹, Sang-Mee Lee¹, Dae-Youn Hwang¹, Dong-Seob Kim¹, Geun-Tae Park², and Hong-Joo Son^{1*}. ¹College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea, ²Research and University-Industry Cooperation, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

In order to investigate changes in quality and enzyme activity during *Chungkookjang* fermentation, germinated- and nongerminated yellow soybeans were fermented by *Bacillus subtilis* and traditional methods. When the soybean was soaked for 6 h and then watered for 4 days with 2 h-interval at 25°C, the highest germination rate was obtained. The germinated soybeans had a higher total isoflavone (988.4 µg/g) than that of the nongerminated soybeans (859.5 µg/g). Amino type nitrogen contents, protease and amylase activities were higher in germinated soybean *Chungkookjang*, which was fermented with *B. subtilis*, than nongerminated soybean *Chungkookjang*, which was fermented with *B. subtilis* and traditional methods. Reducing sugar and amino type nitrogen contents, the number of viable cells and protease and amylase activities, were higher for *Chungkookjang* fermented with *B. subtilis*, than *Chungkookjang* fermented by traditional methods. ALP and SOD activities in the *Chungkookjang* diet group were considerably higher than in the control group. AST activity in the germinated soybean *Chungkookjang* diet group was higher than in the nongerminated soybean *Chungkookjang* diet group. In conclusion, it is suggested that *Chungkookjang* prepared with germinated soybeans using *B. subtilis* D7 could be practically used as a functional product.

Keywords: *Chungkookjang*, germinated soybean, fermentation, *B. subtilis*

서 론

콩은 동양 전통 식품의 주단백질 공급원으로써 오랜 기간 동안 널리 이용되어 왔다[9]. 특히 옛날부터 곡류 위주의 생활을 해온 우리나라는 단백질 공급원으로써 콩 발효식품을 많이 섭취하여 왔다. 콩에는 단백질(38%), 탄수화물(30%), 지방(18%) 등 필수 영양소뿐만 무기질, 비타민 B₁와 E가 대량 함유되어 있고, saponin, isoflavone, phytic acid 등의 다양한 생리활성 성분들도 함유되어 있는데 항암효과, 심혈관 질환이나 골다공증 예방효과 등이 속속 밝혀지고 있다[5, 14].

한편, 콩은 발아과정 동안 호흡과 대사작용에 따른 기능성 물질을 포함한 다양한 영양원의 변화가 발생한다. Yoo[30]는 고 함량 isoflavone 생산을 위한 대두의 침지, 발아조건 및 청국장 발효 최적조건을 확립한 바 있으며, Kim 등[10]은

24시간 동안 발아시킨 콩을 이용하여 제조한 청국장의 발효 기간에 따른 품질변화를 확인한 바 있다.

청국장은 콩을 원료로 한 우리나라의 대표적인 발효식품이다. 청국장은 증자한 콩을 볏짚에 깔아 2-3일간 발효시킨 것으로, 발효과정 중 *Bacillus* spp.가 생산하는 각종 효소에 의해 특유의 맛과 향, 점질물질 등이 생성된다[26]. 현재 많은 연구자들의 의해 청국장은 항산화능[17], 고혈압과 동맥경화 예방[3], 항균능[31], 혈전용해능[15] 등 다양한 효능을 가지는 것으로 밝혀졌으며, 이에 따라 기능성 식품으로서 그 우수성이 인정됨에 따라 소비가 급격히 증가하고 있는 추세에 있다.

그러나 이러한 많은 기능과 연구가 있음에도 불구하고 아직까지 청국장 제조는 관습적인 방법을 통해 생산되고 있는 실정이다. 재래식 청국장은 콩과 볏짚을 이용하여 제조되고 있는데 이 과정은 비위생적이고, 균일한 품질을 지닌 청국장을 제조할 수 없다는 한계를 가지고 있다[12]. 청국장은 제조방법, 콩의 종류 및 발효균주에 따라 품질, 맛과 기능성의 차이가 있다[7]. 그러므로 청국장의 과학화를 위해서

*Corresponding author

Tel: +82-55-350-5544, Fax: +82-55-350-5549

E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

는 제조법의 표준화와 품질 균일화가 선행되어야 할 것이다.

본 연구에서는 시판되고 있는 대부분의 청국장이 벗짚을 이용하여 제조되고 있기 때문에 품질의 일관성 없다는 사실과 발아시킨 콩에는 이전에 존재하던 성분이 대폭 강화된다는 사실에 착안하여 콩의 발아조건 및 기능성 성분 분석, 순수분리된 발효균주를 이용한 청국장 발효조건을 확립하였다. 또한 청국장이 간세포에 미치는 영향을 실험동물을 이용하여 조사함으로써 인체에 유의한 효능을 간접적으로 확인하였다.

재료 및 방법

청국장 발효균주 및 원료콩

본 실험에서 청국장 발효를 위하여 사용된 균주는 Lee 등 [18]에 의하여 한국의 전통식품인 된장으로부터 분리, 동정된 *Bacillus subtilis* D7이었으며, 콩은 재배농가에서 직접 구입한 노랑콩(황태, *Glycine max* L. Merr)이었다.

콩의 발아조건 검토

원료 콩 150 g을 각각 1-7시간 동안 증류수에 수침시킨 후, 20-30°C의 범위에서 2-6시간마다 물을 충분히 공급하면서 발아를 유도하였다. 발아율(germination rate)은 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Germination rate (\%)} = \left(\frac{\text{No. of germinated soybean}}{\text{No. of total soybean}} \right) \times 100$$

콩의 isoflavone 함량

콩의 isoflavone (Sigma, USA) 함량은 HPLC (PerkinElmer, USA)를 사용하여 다음과 같이 분석하였다[29]. 분쇄한 시료 1 g에 0.1 N HCl 2 ml 및 acetonitrile 10 ml를 첨가하여 30°C에서 3시간 동안 교반한 후, Whatman no. 4 filter paper로 여과한 여액을 진공농축하였다. 농축된 시료를 80% methanol 10 ml에 용해시킨 후, 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 사용된 컬럼은 µ-Bondapak C18 컬럼(Agilent Technologies, USA) 이었고, UV detector를 이용하여 254 nm에서 분석하였다. 이동상은 시작 시 20% methanol 100에서 50분 후 60% methanol 100이 되도록 하였고, 유속은 1 ml/분이었다. Isoflavone 함량은 표준물질의 농도에 대한 피크의 면적을 표준정량곡선으로부터 계산하였다.

청국장 제조

Luria-Bertani 배지에서 30°C, 200 rpm으로 20시간동안 배양한 *B. subtilis* D7 배양액을 발효 starter로 이용하였

다. 발아 및 미발아된 각 콩을 121°C에서 30분간 증자한 후, 상기 균주 배양액을 1%(v/w) 접종하여 40°C에서 48시간 동안 발효시켰다.

발효변수 조사

청국장과 증류수를 1 : 6 (w/v)의 비율로 혼합하여 분쇄하였다. 원심분리한 후, 상등액을 회수하여 각종 발효변수 분석에 사용하였다. 대조구로는 미발아콩에 *B. subtilis* D7을 접종한 것과 미발아콩에 벗짚 끓인 물(100°C, 20분)을 접종한 것을 사용하였다.

생균수는 청국장 1 g을 멸균수 9 ml에 첨가하여 계단희석한 후, 표준평판법에 의하여 배양하여 계수하였다. 환원당은 dinitrosalicylic acid (DNS; Sigma, USA) method [20]을 사용하여 정량하였다.

아미노태 질소는 Formol 적정법[1]으로 측정된 후, 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Amino nitrogen (mg\%/g)} = \frac{[(A - B) \times 1.4 \times F \times 100]}{\text{sample (g)}}$$

A : 0.1 N NaOH 용액의 시료 적정량(ml)

B : 0.1 N NaOH 용액의 blank 적정량(ml)

F : 0.1 N NaOH 용액의 factor

암모니아태 질소는 Indophenol blue method [1]에 의하여 측정하였으며, NH₄Cl을 표준물질로 사용하여 Indophenol법으로 작성된 표준곡선으로부터 환산하였다.

Protease 활성[24]은 다음과 같이 조사하였다. 기질용액은 0.6% Hammerstern casein (Calbiochem, Germany)을 sodium phosphate buffer (pH 7.2)에 용해시켜 조제하였다. 기질용액 1 ml와 조효소액 1 ml를 혼합하여 30°C, 10분간 반응시킨 후, 0.4 M trichloroacetic acid (TCA) 1 ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 반응 중지액을 원심분리한 후, 상등액을 취하여 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 unit는 0.01/ml/분의 증가로 하였다.

α-Amylase 활성 측정[25]을 위하여 기질용액 0.5% soluble starch 용액(0.4 M acetate buffer, pH 4.8) 2 ml와 조효소액 1 ml를 혼합하여 30°C, 10분간 반응시켰다. 0.4 M TCA 1 ml를 첨가하여 반응을 중지시킨 후, 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 반응액 1 ml에 [0.005% I₂ + 0.05% KI] 용액 10 ml를 첨가하였다. 600 nm에서 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer (Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 측정하였다. 효소 1 unit는 상기 조건에서 blank 흡광도가 10% 감소되는 효소량으로 정의하였다. β-Amylase 활성 측정[21]은 α-amylase 활성 측정법과 동일한 과정을 거

친 반응 중지액 100 μ l를 대상으로 DNS법으로 maltose의 양을 측정하였다. 이때 표준곡선은 maltose를 이용하여 작성하였다. 효소 1 unit는 상기 조건에서 1 mg의 maltose를 유리시킬 때의 효소량으로 정의하였다.

청국장 발효의 동물 실험

본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACAU)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인을 받아 수행되었다. 식이실험에 사용된 동물은 8주령의 ICR 마우스이며, 샘타코(Korea)로부터 구입하였다. ICR 마우스는 방사선 조사된 사료(Purina Mills Inc, Korea)를 자유 급식하였으며, 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 specified pathogen-free 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$)에서 사육하였다. ICR 마우스를 4개 군으로 분류하여 군당 5마리의 실험동물을 임의적으로 배정하였으며, 증류수 음용군(대조군), *B. subtilis* D7-발아콩 청국장 음용군, *B. subtilis* D7-미발아콩 청국장 음용군, 벃질-미발아콩 청국장 음용군으로 구분하여 실험하였다. 이때 청국장 시료는 다음과 같이 조제하였다. 동결건조된 청국장 20 g을 증류수 200 ml에 첨가하여 진탕(200 rpm, 20분)한 후, 원심분리(580 \times g, 20분)로 잔여물을 제거하고, 상등액을 회수하여 다시 동결건조함으로써 청국장 추출물을 조제하였다. 최종적으로 얻어진 추출물을 증류수에 70 mg/ml의 농도로 희석하여 존데를 통하여 1일 1회 투여하였다. 7일 후에 CO₂ 가스를 이용하여 마우스를 안락사시킨 후, 부검을 실시하였다.

청국장의 SOD 및 효소활성 측정

간세포 내 superoxide dismutase (SOD) 활성은 microplate WST-1 assay를 이용하여 조사하였다[33]. 실험동물에서 적출한 간 100 mg을 sucrose buffer 600 μ l에 넣고 homogenizer를 이용하여 마쇄하였다. 실온에 30분간 방치한 후, 4°C , 5000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 100 μ l를 새 튜브에 넣었다. 여기에 WST working solution, enzyme working solution, ddH₂O, dilution buffer를 넣고 37°C 에서 20분간 배양한 후, microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용해서 흡광도 450 nm를 측정했다.

청국장 섭취가 혈청 내 유전자의 발현에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 24시간 동안 절식하여 CO₂ 가스를 이용하여 마우스를 안락사시킨 후, 혈액을 채취하였다. 혈액을 실온에서 30분 동안 방치한 후, 원심분리하여 혈청을 수거하였으며, 혈청 내 효소의 변화는 혈청분석기(HITACHI 7080 Automatic Analyzer, Japan)를 이용하여 ALP (alkaline phosphatase)는 Tietze 방법[28], AST (aspartate aminotransferase) 및 ALT (alanine aminotransferase)는 Reitman과 Frankel의 방법[23]으로 분석하였다.

통계처리

실험결과는 mean \pm SD로 제시하였으며, 평균값간의 유의성은 SPSS (Statistical Package Inc., USA) version 18을 이용하여 one-way ANOVA 분석(Turkey method)을 실시하여 검증하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

콩의 발아

콩을 1-7시간동안 증류수에 수침시킨 후 2-6시간마다 물을 공급하여 조사한 결과, 6시간 침지 및 2시간마다 4일 동안 물을 공급했을 때 발아율이 가장 높았다(Table 1). 이 조건에서 온도에 따른 발아율을 검토한 결과, 25°C 에서 발아율이 72%로 가장 높았지만 통계학적으로 20°C 와 25°C 사이에는 유의성은 없었다. 이상의 결과로 콩의 발아는 $20\text{--}25^\circ\text{C}$ 에서 유도하는 것이 가장 좋을 것으로 판단되지만 10°C , 18°C , 25°C 및 35°C 에서 각각 2%, 미만, 95%, 75% 및 68%의 발아율을 나타내었고, 25°C 보다 18°C 에서 높은 발아율을 보였다는 Park 등[22]의 보고와는 상이하였다.

콩의 isoflavone 함량

콩의 발아 전후 isoflavone 함량을 조사한 결과, 발아 전 ($859.5 \mu\text{g/g}$)보다 발아 후($988.4 \mu\text{g/g}$)의 총 isoflavone 함량이 높았다(Table 2). 일반적으로 콩을 발아시키면 isoflavone의 총함량이 증가하며, 특히 발아 싹의 길이가 증가할수록 isoflavone의 함량은 증가[11]한다는 사실에 잘 부합하였다. 콩을 발효시키면 대부분의 isoflavone은 비배당체로 전환되어 콜레스테롤 수치를 감소시키는 등 생리활성이 증가되는 것으로 보고되어 있다[11]. Isoflavone은 체내 이용률이 낮은 배당체인 genistin, daidzin, glycitin 등과 체내 이용률이 높은 비배당체인 genistein, daidzein, glycitein 등의 형태로 존재하므로 향후 청국장 발효에 따른 비배당체 함량 변화를 보다 구체적으로 조사할 필요가 있음을 알 수 있었다.

청국장 발효

당류는 청국장 발효과정 중에 원료콩의 전분질이 *Bacillus* 등의 미생물이 생산한 효소의 작용으로 분해되어 생성되며, 청국장 감미의 주성분이다. 콩에 있는 전분이 glucose로 전

Table 1. Germination condition of yellow soybean.

Optimal soaking time	Optimal water supply	Temperature ($^\circ\text{C}$)	Germination rate (%)
3-6 h	Once per 2 h for 4 days	20	69 ± 2
		25	72 ± 3
		30	$60 \pm 3^*$

An asterisk (*) denotes statistical difference at $p < 0.05$.

Table 2. Isoflavone contents of non-germinated and germinated soybean.

Non-germinated soybean (µg/g)				Germinated soybean (µg/g)			
Daidzin	Glacitin	Genistin	Total	Daidzin	Glacitin	Genistin	Total
409.7	97.8	352.0	859.5	465.9	128.0	394.5	988.4

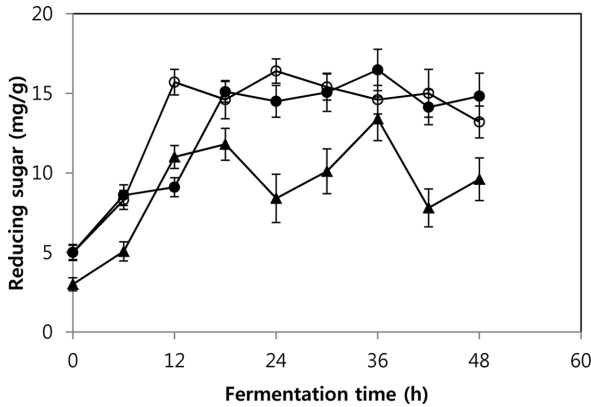


Fig. 1. Variation of reducing sugar in *Chungkookjang* during fermentation.

●, germinated soybean; ○ non-germinated soybean; ▲ rice straw soybean.

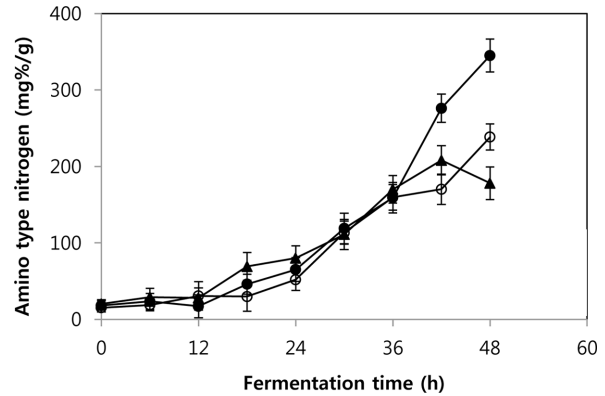


Fig. 2. Variation of Amino type nitrogen in *Chungkookjang* during fermentation.

●, germinated soybean; ○ non-germinated soybean; ▲ rice straw soybean.

환되는 양을 조사하기 위하여 발효 경과에 따른 환원당의 양을 측정하였고, 그 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. *B. subtilis* D7-발아콩의 경우 발효 36시간에 16.5 mg/g으로 최고함량을 나타낸 이후 감소하였고, *B. subtilis* D7-미발아콩의 경우 발효 24시간에 16.4 mg/g으로 최고 함량을 보이다가 그 이후 감소하는 경향을 보였다. 벵짚-미발아콩의 경우도 발효 36시간까지 14.5 mg/g으로 증가하였다가 그 이후 감소하였다. 벵짚을 접종한 경우, *B. subtilis* D7을 접종한 것에 비해 낮은 환원당 함량을 나타내었으며, 일정한 패턴이 나타나지 않았고, 반복적인 증감현상이 있었다. 이와 같이 모든 청국장에서 발효 24시간 내에 환원당 함량이 급증하는 이유는 미생물의 생육에 따른 amylase의 작용에 의한 것으로 보이며[21], 특히 환원당 함량 변화 패턴과 β-amylase 활성의 변화 패턴(다음에 제시)이 유사한 것으로 보아 상관관계가 있는 것으로 판단된다. Kwon 등[13]의 보고에 의하면 순수분리된 *B. pumilus* JB-1의 경우 8.5 mg/g의 환원당 함량을 나타내었지만 본 실험군주는 16.5 mg/g의 환원당 함량을 나타내어 본 실험군주를 접종한 청국장이 보다 높은 환원당 함량을 나타냄을 알 수 있었다.

청국장이 가지는 구수한 맛의 척도인 아미노태 질소는 청국장 발효속성 중 단백질이 분해되어 생성되는 물질로서, 장류 발효의 중요한 품질 지표이다. 현재 우리나라의 식품공전에는 청국장의 아미노태 질소의 함량을 280 mg%/g 이상으로 규정하고 있다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 모든 실험구에서 발효시간 경과에 대체로 비례하여 아미노태 질소의 함

량이 증가하였고, 발효 24시간 이후에 급격하게 증가하였다. 발효 48시간에 *B. subtilis* D7-발아콩, *B. subtilis* D7-미발아콩, 벵짚-미발아콩의 아미노태 함량은 각각 345 mg%/g, 238 mg%/g, 208 mg%/g를 나타내었다. 발아콩을 이용한 경우와 미발아콩을 이용한 경우의 생성 패턴은 비슷하였으나 발아콩을 이용했을 때 함량이 높았다. 벵짚을 이용한 경우는 *B. subtilis* D7-발아콩을 이용한 경우보다는 낮은 값을 나타내었으나 *B. subtilis* D7-미발아콩을 이용한 경우와 비슷한 값을 나타내었다. *B. subtilis* D7-미발아콩과 벵짚-미발아콩의 경우, 각각 238 mg%/g, 208 mg%/g에 그쳐 식품공전 규격인 280 mg%에 미치지 못했다. Eom 등[4]은 종균과 발아 대두로 제조한 청국장의 아미노태 함량은 발효 48시간까지 증가하였고, 벵짚과 미발아 대두를 이용한 경우 발효 36시간까지 증가하다가 이후 약간 감소하는 경향이 있다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 아미노태 질소 함량의 증가는 단백질이 분해되어 아미노산이 생성된다는 것을 의미한다. 따라서 조미 성분인 아미노산의 증가로 인하여 관능검사를 하지 않아도 청국장의 감칠맛이 뛰어날 것으로 사료되지만 추후 관능검사를 해 볼 필요가 있음을 알 수 있었다.

암모니아태 질소는 단백질이 탈아민됨으로써 생성되는데, 이 물질이 식품 내에 대량 축적되면 부패취가 발생하므로 식품의 변패 또는 이상발효를 나타내는 지표로 사용된다. 따라서 암모니아태 질소 함량을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 발아콩을 이용한 경우, 발효 18시간에서

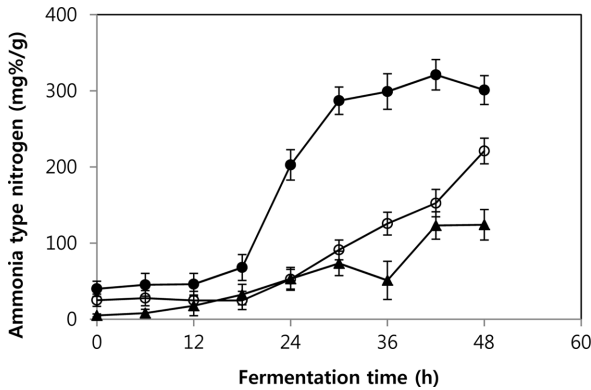


Fig. 3. Variation of Ammonia type nitrogen in *Chungkookjang* during fermentation.
 ●, germinated soybean; ○ non-germinated soybean; ▲ rice straw soybean.

30시간까지 68 mg%/g에서 287 mg%/g으로 급격하게 증가하였다가 발효 42시간에 321 mg%/g의 최고함량을 나타내었다. 미발아콩을 이용한 경우 발효 48시간에 221 mg%/g을 나타내었다. 발아콩을 이용한 경우는 미발아콩을 이용한 경우보다 암모니아태 질소의 생성이 월등히 높았다. 벧짚을 접종한 경우, 5-124.1 mg%/g의 범위에 있었으며, 이것은 *B. subtilis*를 접종한 경우보다 낮은 값이었다. 암모니아태 질소 함량만 고려할 때, 청국장 발효는 24-36시간 정도 진행시키는 것이 불쾌취가 없는 청국장 제조에 유리할 것으로 판단된다. 현재 암모니아태 질소에 의한 불쾌취가 청국장 소비의 제한요인으로 작용하여 청국장의 소비량이 감소되는 주요 원인이 되고 있다. 향후 불쾌취를 제거하여 청국장을 제조하는 부분에 대해서 연구할 필요가 있다고 사료된다. Youn 등 [32]은 *B. subtilis*와 *B. natto*를 접종한 청국장 시료에서 발효 45시간 만에 각각 422 mg%, 356 mg%의 암모니아태 질소가 생성되었고, Eom 등[4]은 발효균주를 이용한 청국장이 벧짚을 이용한 청국장에 비해 월등히 높은 암모니아태 질소 함량을 나타내었고, 미발아 벧짚 청국장의 경우 발효 48시간에 162 mg%을 나타내었다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다.

pH는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 청국장 발효 초기에는 중성 영역을 나타내다가 발효시간 경과에 따라 알칼리영역으로 전환되었다. 모든 실험구에 있어 pH는 6.7-7.9의 범위를 나타내어 발효에 따른 큰 차이는 보이지 않았으며, pH가 알칼리로 이동하는 것은 콩 단백질 분해에 기인한 것으로 판단된다. 청국장 발효과정 중의 pH 변화에 관한 보고는 상당히 많은 편으로 Jeong 등[6]은 청국장의 초기 pH 6.3에서 72시간에 pH 8.2로 증가하였다고 보고하였고, Sung 등[27]은 청국장의 pH가 6.6-8.0의 중성 및 알칼리 영역의 pH를 나타내었다고 하였다. Youn 등[32]은 pH 6.13에서 pH 6.21사이

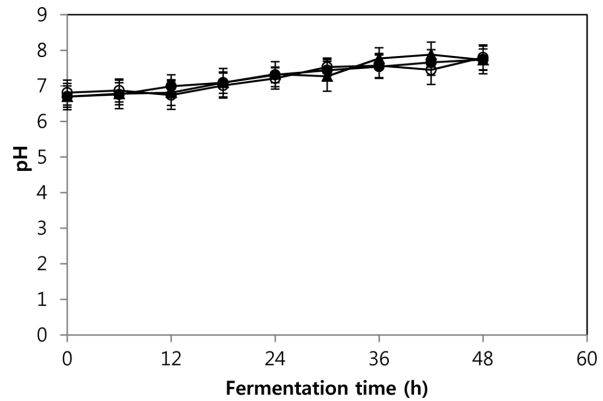


Fig. 4. Variation of pH in *Chungkookjang* during fermentation.
 ●, germinated soybean; ○ non-germinated soybean; ▲ rice straw soybean.

의 증가한 대두에 *Bacillus*를 접종하여 40°C 내외에서 45시간 발효시켰을 때, pH는 8.13에서 8.68의 범위를 나타내어 알칼리영역으로 전환되는 것으로 나타났으며 그 원인은 발효시 생성되는 암모니아 등의 가스 때문인 것으로 보고하였다. 본 실험 결과 또한 pH와 암모니아태 질소의 생성 패턴이 유사한 것으로 나타났다.

청국장에서의 생균수를 측정된 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 발효시간이 경과하면서 생균수는 증가함을 알 수 있었다. *B. subtilis* D7-발아콩의 경우 1.5 log CFU/g에서 9.8 log CFU/g으로 증가하였다. *B. subtilis* D7-미발아콩의 경우 1.5-9.7 log CFU/g의 범위에 있었다. 발아콩과 미발아콩의 경우 비슷한 생균수를 나타내었다. 벧짚-미발아콩의 경우, 1.0-6.6 log CFU/g의 범위에 있었다. 전체적으로 발효시간 경과에 따라 생균수는 증가하였으며, *B. subtilis* D7을 이용한 경우가 벧짚을 이용한 경우보다 높은 생균수를 나타내

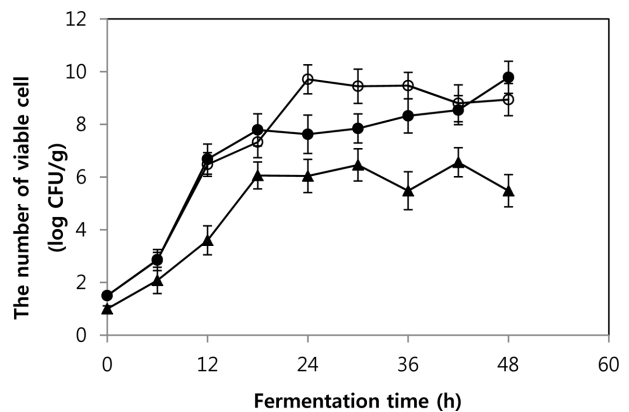


Fig. 5. Variation of viable cell number in *Chungkookjang* during fermentation.
 ●, germinated soybean; ○ non-germinated soybean; ▲ rice straw soybean.

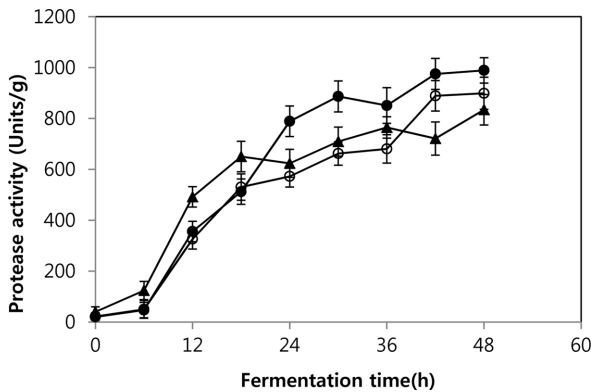


Fig. 6. Variation of protease activity in Chungkookjang during fermentation.

●, germinated soybean; ○ non-germinated soybean; ▲ rice straw soybean.

었다. Cho 등[2]은 *B. pumilus*를 접종했을 때 청국장의 생균수는 3.0 log CFU/g에서 11.7 log CFU/g로 증가했다고 보고하였고, Jeong 등[6]은 24시간 이내에 7 log CFU/g에서 9 log CFU/g으로 생균수가 증가하였다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다.

콩 단백질을 가수분해하여 구수한 맛 성분인 아미노산, polypeptide 등을 생성하는 protease는 청국장 발효시 맛을 결정짓는 중요한 인자 중의 하나이다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 청국장의 protease 활성은 발효시간이 경과하면서 지속적으로 증가하였다. *B. subtilis* D7-발아콩의 경우, 발효 42-48시간에 975-989 U/g의 활성을 나타내었다. *B. subtilis* D7-미발아콩은 22-899 U/g의 범위에 있었으며, 벵짚-미발아콩은 40-834 U/g의 범위에 있었다. 본 연구 결과는 청국장 발효시 protease 활성 생성 패턴은 발효 48시간까지 지속적으로 증가한다는 Oh 등[21]과 Youn 등[32]의 결과와 유사하였다.

청국장 발효는 단백질뿐만 아니라 전분의 분해속도도 중요한 인자인 것으로 알려져 있다. α -amylase 활성은 Fig. 7A에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* D7-발아콩의 경우, 발효 6시간에 48 U/g에서 18시간에 64 U/g로 증가한 이후 완만하게 감소하였다. *B. subtilis* D7-미발아콩의 경우, 발효 6시간에 24 U/g에서 18시간에 49 U/g로 증가한 후, 일정하게 유지되었다. 전체적으로 일정한 패턴을 나타내었으며, 발아콩을 이용한 경우 높은 활성을 나타내었다. 벵짚-미발아콩 경우 16-44 U/g의 범위에 있었고, *B. subtilis* D7을 이용한 경우보다 효소활성이 낮았다. Jeong 등[6]은 발효 24시간 동안 α -amylase의 활성이 급격히 증가했다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다. 그러나 Oh 등[21]은 *B. natto*를 접종한 청국장과 벵짚을 이용한 청국장에서 α -amylase 활성이 10-12 U/g였다고 보고하여 본 실험에서 생성된 α -amylase 활성(44-64 U/g)이 더 높은 것으로 나타났다. Fig. 7B에서 보는 바와

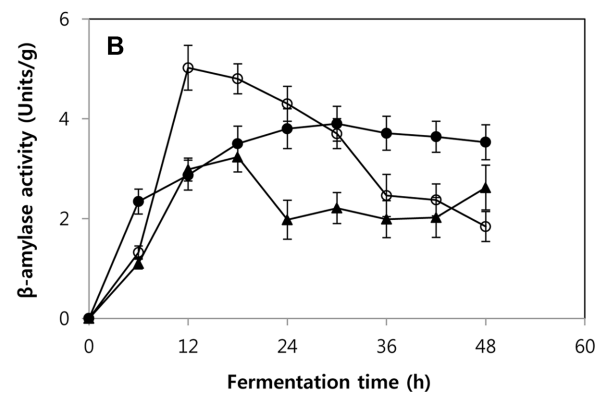
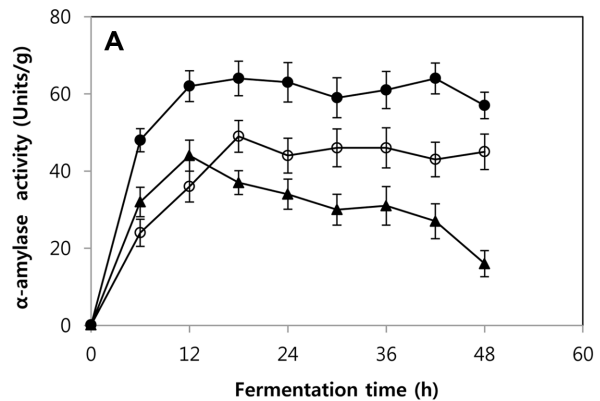


Fig. 7. Variation of amylase activity in Chungkookjang during fermentation.

●, germinated soybean; ○ non-germinated soybean; ▲ rice straw soybean. (A) α -amylase, (B) β -amylase.

같이 실험한 모든 청국장의 β -amylase 활성은 발효가 진행됨에 따라 증가하였다가 감소하는 패턴을 보여주었다. *B. subtilis* D7-발아콩의 경우 2.3-3.9 U/g, *B. subtilis* D7-미발아콩의 경우 1.3-5.0 U/g의 범위에 있어 그렇게 큰 차이는 나타나지 않았다. 벵짚-미발아콩의 경우 1.1-3.2 U/g의 범위에 있어 α -amylase와 마찬가지로 *B. subtilis* D7을 이용한 경우보다 낮은 활성을 나타내었으며, 일정한 효소 활성 패턴은 나타나지 않았다. 발효가 진행되면서 amylase 활성이 높게 유지됨에 따라 콩에 있는 전분이 계속 분해된다고 볼 수 있고, 특히, β -amylase 활성은 환원당 함량과 비교적 잘 일치하였다. Oh 등[21]은 벵짚 청국장에서 발효 12시간에 활성이 급증하였다가 24시간 이후에는 급격하게 감소하는 경향을 보였고, 그 이후로는 큰 차이를 보이지 않았으며, α - 및 β -amylase 활성은 일정한 패턴을 나타내지 않는다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다.

청국장의 SOD 및 각종 효소 활성에 대한 효과

Superoxide dismutase (SOD)는 체내의 과잉 활성산화물

Table 3. Effect of *Chungkookjang* extract on SOD relative activity (%) of mouse liver cell and alkaline phosphatase (ALP) activity, asparatate aminotransferase (AST) activity, alanine aminotransferase (ALT) activity in serum.

	SOD activity (%)	ALP activity (%)	AST activity (%)	ALT activity (%)
Control	71 ± 2.7	92 ± 6.9	93 ± 5.8	29 ± 2.1
Germinated soybean	94 ± 2.3***	68 ± 5.7***	80 ± 5.0**	28 ± 2.5
Non-germinated soybean	95 ± 2.9***	73 ± 2.8***	91 ± 7.5	29 ± 2.0
Rice straw soybean	94 ± 3.5***	79 ± 4.3*	94 ± 3.8	30 ± 2.0

*** $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ and * $p < 0.1$ are the significance level relative to the control in the same column.

을 제거해주는 효소로서 매우 중요하다. 먼저 청국장 추출물이 마우스 간세포의 SOD 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* D7-발아콩의 경우 94%, *B. subtilis* D7-미발아콩의 경우 95%, 벧짚-미발아콩의 경우 94%로 실험한 모든 청국장이 대조군인 증류수(71%)에 비하여 높은 항산화 활성을 나타내었다. 청국장 자체의 SOD 활성에 대한 연구는 일부 이루어져 있지만 청국장이 마우스 간세포의 SOD 활성에 미치는 영향은 거의 조사되어 있지 않다.

혈청 내에 존재하는 alkaline phosphatase (ALP), asparatate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)는 간세포의 necrosis 및 다양한 질병과 연관되어 있는 중요한 단백질로 알려져 있다. 혈청 내의 AST, ALT는 아미노산이나 탄수화물의 대사에 관여하는 효소이다. 다양한 막의 구성 성분인 ALP는 막의 glycosylation, 세포의 분화, 세포내 단백질의 합성과 dephosphorylation에 관계한다. 이러한 단백질들은 간, 근육, 뇌, 태반과 같은 다양한 기관에서 매우 높은 농도로 존재한다. 특히 혈액 내 이러한 효소의 증가는 간세포의 necrosis나 질병을 나타내는 중요한 지표이다. 따라서 청국장이 마우스의 간세포에 미치는 영향을 분석하기 위해 먼저 혈청에서 ALP 활성을 측정 한 결과, *B. subtilis* D7-발아콩, *B. subtilis* D7-미발아콩, 벧짚-미발아콩은 각각 68%, 73%, 79%로서 대조군(92%)에 비해 ALP의 활성을 감소시킬 수 있었는데 특히, *B. subtilis* D7-발아콩은 ALP 활성 감소 효과가 우수하였다(Table 3). 이러한 결과는 청국장이 ALP 감소를 통한 간세포 보호에 매우 우수한 효과가 있음을 나타내는 것이다. 한편 AST 활성의 감소는 *B. subtilis* D7-발아콩에서만 관찰되었고, 그 외 청국장에서는 AST 감소 효과가 거의 관찰되지 않았다. 또한 실험한 모든 청국장은 ALT 활성 감소에 별다른 영향을 미치지 않았다. 벧짚-미발아콩의 경우 ALT 활성을 약간 증가시켰으나 결과의 유의성은 없었다. 한편, Kim 등[8]과 Lee 등[18]은 각각 당뇨가 유발된 흰쥐와 콜레스테롤 식이를 섭취한 흰쥐에게 청국장 및 된장 분말을 급여했을 때 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성이 감소되어 간 보호효과가 있다고 하였다. Lim 등[19]은 고지혈증 흰쥐에게 비배당체 이소플라본 함유 대두분말을 급여한

군에서 ALT 및 AST 활성이 감소되었다고 보고하였다.

요약하면, 콩은 6시간 침치 및 2시간마다 4일 동안 물 공급 및 25°C에서 발아율이 가장 높았다. Isoflavone 함량은 발아 전보다 발아 후에 높게 나타났다. 발아콩-*B. subtilis* D7을 이용하여 발효된 청국장의 경우 아미노태 질소 함량, protease 활성 및 α -amylase 활성 등이 미발아콩-*B. subtilis* D7과 벧짚물-미발아콩을 이용한 경우보다 높게 나타났다. 종균을 이용해 발효된 청국장의 경우 환원당 함량, 아미노태 질소 함량, 생균수, protease 활성 및 amylase 활성 등에서 벧짚을 이용한 경우에 비해 더 높게 나타났다. 동물실험을 통한 생산된 청국장의 유효성을 검증한 결과, 모든 청국장은 간세포의 SOD 활성과 혈청 ALP 활성을 증가시켰으며, 발아콩을 이용한 경우에서만 혈청 AST 활성이 증가되었다. 따라서 종균을 이용해 발효된 청국장(특히, 발아콩을 이용한 경우)은 벧짚을 이용해 발효된 청국장에 비해 여러 가지 화학성분이 우수한 것으로 나타나 기능성 성분의 증가와 더불어 품질 향상을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

This research was supported by High Value-added Food Technology Development, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (111030-03).

References

1. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of official analytical chemists. Washington, DC.
2. Cho, K. M., S. Y. Hong, R. K. Math, J. H. Lee, D. M. Kambiranda, J. M. Kim, S. A. Md. Islam, M. G. Yun, J. J. Cho, W. J. Lim, and H. D. Yun. 2009. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the *Cheonggukjang* by *Bacillus pumilus* HY1. *Food Chem.* **114**: 413-419.
3. Cho, Y. J., W. S. Cha, S. K. Bok, M. U. Kim, S. S. Chun, and U. K. Choi. 2000. Production and separation of anti-hypertensive peptide during *Chungkukjang* fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**: 247-252.
4. Eom, S. M., B. Y. Jung, and H. I. Oh. 2009. Changes in chemical components of *Cheonggukjang* prepared with germinated

- soybeans during fermentation. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**: 133-141.
5. In, J. P. and S. K. Lee. 2004. Effect of yucca (*Yucca shidigera*) extract on quality characteristics of *Chungkookjang* using *Bacillus subtilis* p01. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**: 176-181.
 6. Jeong, W. J., A. R. Lee, J. Y. Chun, J. H. Cha, Y. S. Song, and J. H. Kim. 2009. Properties of *Cheonggukjang* fermented with *Bacillus* strains with high fibrinolytic activities. *J. Food Sci. Nutr.* **14**: 252-259.
 7. Jung, D. H. and S. K. Shim. 1994. Fermented Soy Foods. Spring of Knowledge, Seoul, Korea, 673-686.
 8. Kim, A. R., J. J. Lee, S. S. Cha, H. C. Chang, and M. Y. Lee. 2012. Effect of soybeans, *Chungkukjang*, and *Doenjang* on blood glucose and serum lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 621-629.
 9. Kim, J. S. 1996. Current research trends on bioactive function of soybean. *Korean Soybean Digest* **13**: 17-24.
 10. Kim, M. H., W. W. Kang, N. H. Lee, D. J., Kwon, O. J. Kwonm, Y. S. Chung, Y. H. Hwang, and U. K. Choi. 2007. Changes in quality characteristics of *Cheonggukjang* made with germinated soybean. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**: 676-680.
 11. Kim, M. H., Lee, N. H. and Choi, U. K. 2008. Fermentation characteristics of *Cheonggukjang* made of germinated soybean under light condition. *J. Life Sci.* **18**: 1420-1425.
 12. Kim, Y. S., H. J. Jung, Y. S. Park, and T. S. Yu. 2003. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *Chunggukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 475-478.
 13. Kwon, H. Y., Y. S. Kim, G. S. Kwon, C. S. Kwon, and H. Y. Sohn. 2004. Isolation of immune-stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from Chungkook-jang and fermentational characteristics of JB-1. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 290-296.
 14. Kwon, H. Y., H. Y. Ryu, C. S. Kwon, S. H. Lee, and H. Y. Sohn. 2007. Optimization of culture conditions of *Bacillus pumilus* JB-1 for *Chungkook-jang* fermentation in soybean boiling-waste liquor medium. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 304-309.
 15. Lee, D. G., N. Y. Kim, M. K. Jang, B. H. Yoo, K. Y. Kim, S. G. Kim, Y. K. Jeong, and S. H. Lee. 2006. Isolation of a fibrinolytic bacterium from *Cheongkukjang* and characterization of its bioactivity. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 299-305.
 16. Lee, J. J., A. R. Kim, H. Lee, C. H. Kim, H. C. Chang, and M. Y. Lee. 2010. Effects of powders of soybean and *Doenjang* on cholesterol level and antioxidant activities in rats fed with a high cholesterol diet. *J. Life Sci.* **20**: 1134-1142.
 17. Lee, J. J., C. H. Cho, J. Y. Kim, D. S. Kee, and H. B. Kim. 2001. Antioxidant activity of substance extracted by alcohol from *Chungkukjang* power. *Korean J. Microbiol.* **37**: 177-181.
 18. Lee, N. R. 2012. Production and functionality of amino acid biomaterial, poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* D7 isolated from *Doenjang*, a traditional Korean fermented food. M. S. Thesis. Pusan National University, Miryang, Korea.
 19. Lim, A. K., H. K. Jung, J. H. Hong, J. S. Oh, J. H. Kwak, Y. H. Kim, and D. I. Kim. 2008. Effects of the soybean powder with rich aglycone isoflavone on lipid metabolism and antioxidative activities in hyperlipidemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 302-308.
 20. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-429.
 21. Oh, H. I. and S. M. Eom. 2008. Changes in microflora and enzyme activities of *Cheonggukjang* prepared with germinated soybeans during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **40**: 56-62.
 22. Park, S. K., C. Y. Ryu, and S. W. Lee. 2008. Establishment of preparation method of *Dua-chungkukjang*. *J. Life Sci.* **18**: 1758-1763.
 23. Reitman, S. and G. Frankel. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**: 56-63.
 24. Shon, M. Y., S. H. Kwon, S. K. Park, J. R. Park, and J. S. Choi. 2001. Changes in chemical components of black bean *Chungkugjang* added with kiwi and radish during fermentation. *Korean J. Postarvest Sci. Technol.* **8**: 449-445.
 25. Shon, M. Y., S. H. Kwon, C. K. Sung, S. W. Lee, and S. K. Park. 2001. Isolation and microbiological characteristics of *Bacillus megaterium* SMY-212 for preparation of black bean *Chungkugjang*. *J. Life Sci.* **11**: 304-310.
 26. Son, D. H., O. J. Kwon, W. D. Ji, U. K. Choi, O. J. Kwon, E. J. Lee, Y. J. Cho, W. S. Cha, and W. G. Chung. 2000. The quality changes of *Cheonggukjang* prepared with *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**: 1-6.
 27. Sung, N. J., Y. A. Ji, and S. Y. Chung. 1984. Changes in nitrogenous compounds of soybean during *Chungkookjang* koji fermentation. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **13**: 275-284.
 28. Tietze, F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* **27**: 502-522.
 29. Wang, G., S. S. Kuan, O. J. Francis, G. M. Ware, and A. S. Carman. 1990. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agr. Food Chem.* **38**: 185-190.
 30. Yoo, J. S. 2011. Pretreatment of soybean and development of fermentation conditions of *Chungkukjang* for high contents isoflavone production. *Food Eng. Prog.* **15**: 355-361.
 31. Youn, H. K., H. S. Choi, S. H. Hur, and J. H. Hong. 2001. Antimicrobial activities of viscous substance from *Chungkukjang* fermented with difference *Bacillus* spp. *J. Fd. Hyg. Safety* **16**: 188-193.
 32. Youn, K. C., D. H. Kim, J. O. Kim, B. J. Park, H. S. Yook, J. M. Cho, and M. W. Byun. 2002. Quality characteristics of the *Chungkookjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 204-210.
 33. Zhou, J. Y. and P. Prognon. 2006. Raw material enzymatic activity determination: A specific case for validation and comparison of analytical methods-The example of superoxide dismutase(SOD). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**: 1143-1148.