

## Bacillus cereus가 선택적으로 제거된 볏짚유래 스타터를 이용한 청국장의 제조 및 품질특성

이은실<sup>1</sup> · 송예지<sup>2</sup> · 김광표<sup>3</sup> · 임은정<sup>1</sup> · 정도연<sup>1</sup> · 조성호<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(재)발효미생물산업진흥원, <sup>2</sup>농업회사법인순창장류(주), <sup>3</sup>전북대학교 식품공학과

### Manufacturing and Quality Characteristics of the Cheonggukjang Fermented Using Starter Derived from Rice Straw Removed *Bacillus cereus* Selectively

Eun-Sil Lee<sup>1</sup>, Ye-Ji Song<sup>2</sup>, Kwang-Pyo Kim<sup>3</sup>, Eun-Jung Yim<sup>1</sup>, Do-Yeon Jeong<sup>1</sup>, and Sung-Ho Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microbial Institute for Fermentation Industry, 61-27, Minsokmaeul-gil, Sunchang-eup, Sunchang-gun, Jeonbuk, Korea

<sup>2</sup>Sunchang Jangryu Corp.

<sup>3</sup>Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University

(Received September 2, 2014/Revised November 3, 2014/Accepted February 11, 2015)

**ABSTRACT** - The purpose of this study is to evaluate quality characteristics of the *Cheonggukjang* produced using rice straw-derived *Bacillus cereus* free starter culture (RiBS1). The *Cheonggukjang* was prepared in 0.1 and 1.0% inoculum concentrations of starter culture and fermented from 12 hr to 72 hr at 40 and 50°C. Amino-nitrogen contents after 48 hr fermentation were 559.6~590.2 mg% and 393.8~494.0 mg% at 40 and 50°C, respectively. Sensory evaluation showed that the *Cheonggukjang* fermented using RiBS1 starter for 48 hr at 50°C was better than the control. And we inspected on *B. cereus* and biogenic amine in the *Cheonggukjang* produced using RiBS1 starter. As a results, *B. cereus* was not detected and histamine and tyramine of biogenic amine were  $5.53 \pm 0.13 \sim 39.96 \pm 0.62$  mg/kg. This research results showed that rice straw-derived *B. cereus* free starter culture (RiBS1) will be produce the *Cheonggukjang* with good flavour and taste.

**Key words** : *Cheonggukjang*, *Bacillus cereus*, rice straw, starter culture

우리나라의 전통 대두발효식품 중 하나인 청국장은 짧은 기간 안에 발효가 가능한 장류로서 발효과정 동안에 콩단백질이 분해되어 구수한 맛과 향을 내며, 혈전용해능<sup>1)</sup>, 항산화 효과<sup>2)</sup>, 콜레스테롤 저하<sup>3)</sup>, 고혈압 예방<sup>4)</sup> 등 다양한 생리활성기능을 나타낸다.

볶짚을 이용한 자연발효 방식으로 만들어진 청국장은 토양과 공기 중의 다양한 세균들이 복합적으로 작용하므로 제품의 표준화가 어렵고, *Bacillus cereus* 검출 등의 위생적인 문제도 제기되고 있는 실정이다. 반면, 위생적 시설을 갖춘 공장형 생산제품은 외부에서 구입한 종균을 이용하여 발효시키기 때문에 품질균일화와 위생적인 제품 생산이 가능하지만 관능적인 면에 있어서 소비자들이 추구하는 전통적인 맛과 향을 재현하기는 어렵다.

지금까지의 청국장의 제조와 관련된 연구는 장류에서 분리한 단일 종균을 이용한 제조가 대부분을 차지하고 있고, 볏짚에서 분리한 청국장에 이용 가능한 균주의 생리적 특성을 확인하는 연구<sup>5)</sup> 및 볏짚에서 분리한 단일 균종을 이용한 청국장의 제조 연구<sup>6)</sup>가 진행되었다. 그러나 볏짚을 산업적으로 전통장류 발효에 직접 이용하는 것은 많은 제약이 따르는데 그 중의 하나가 유해미생물인 *B. cereus*의 오염 문제이다<sup>7)</sup>. *B. cereus*는 설사와 구토를 유발할 수 있는 토양유래병원균으로 알려져 있으며 유럽연합에서는 유제품 및 즉석편이식품에서 각각  $10^4$ 과  $10^5$  CFU/g의 미생물 기준규격을 정하고 있고<sup>8)</sup>, 국내에서도 2007년 전통장류의 *B. cereus* 기준치를  $10^4$  CFU/g 이하로 제한하는 법령을 고시하였다<sup>9)</sup>.

따라서 본 연구에서는 전통적인 생산방식과 공장형 생산방식을 상호 보완하기 위하여 *B. cereus*만이 특이적으로 제거된 볏짚유래 starter를 이용하여 청국장을 제조하였다. 또한 볏짚유래 starter를 이용하여 제조된 청국장 제품과 기존 공장형 제품의 발효패턴을 비교분석하여 볏짚유래

\*Correspondence to: Sung-Ho Cho, Microbial Institute for Fermentation Industry, 61-27, Minsokmaeul-gil, Sunchang-eup, Sunchang-gun, Jeonbuk, Korea  
Tel: 82-63-653-9578; Fax: 82-63-653-9590  
E-mail: sunghyej3@nate.com

starter로 제조된 청국장장이 장류제품으로서의 활용이 가능한지 여부에 대해 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 벗짚유래 starter 제조

벗짚유래 starter (RiBS1)는 순창지역에서 수거된 벗짚 (10%)에 5% 콩 같은 물과 *B. cereus* 특이 박테리오파지 BCP8-2 ( $10^7$  PFU/mL)를 첨가한 후 37°C에서 10시간 배양하였다. 이후 새로운 배지에 배양액을 첨가(1% inoculum)한 후 같은 방법으로 배양하였고, 이러한 과정을 한 차례 더 진행하여 *B. cereus*가 제거된 벗짚유래 starter를 제조하였다.<sup>7)</sup>

### 벗짚유래 starter 이용 청국장 제조

국산 대두(백태)를 구입하여 제조하였으며, 구입한 대두를 선별 후 세척하여 물에 6시간 동안 수침시킨 후, 30분 동안 탈수하였다. 121°C에서 20분 동안 증자하여 벗짚유래 starter인 RiBS1을 증자 전 대두 무게의 0.1% 접종하였다. 또 다른 시험구로 RiBS1과 *Bacillus licheniformis* SRCM100027을 혼합한 starter culture를 증자 전 대두 무게의 0.1% 접종하였다. 청국장 발효온도는 40°C와 50°C 두가지 경우의 수로 제조하였다. 대조구로는 SRCM100027만을 증자 전 대두 무게의 0.1% 접종하고 40°C에서 발효하여 비교하였다. 대조구 및 시험구의 종균 접종시 콩의 품온은 60°C로 하였고, 발효습도는 80%로 72시간 동안 배양하였다.

### 미생물학적 특성

위해미생물은 식품공전법(고시 제2013-204호)에 의거하여 *B. cereus*, *Salmonella* spp. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringenes*을 검사하였다.

### 수분, pH, 산도

수분함량은 적외선 수분측정기(FD-720, kett, Japan)로 측정하였고<sup>10)</sup>, pH는 시료를 10배 희석하여 직접 pH meter (Mettler Toledo GmbH, Switzerland)를 이용하여 측정하였다<sup>11)</sup>. 적정산도는 0.1 N NaOH를 가하여 pH가 8.4가 될 때까지 적정한 후 젖산(lactic acid)으로 환산하였다<sup>11)</sup>.

적정산도(%) = 
$$\frac{0.1 \text{ N NaOH 적정량(mL)} \times 0.009(\text{젖산}) \times F \times \text{희석배수} \times 100}{\text{시료량(g)}}$$

### Protease 활성

Protease 활성의 측정은 Anson의 방법을 변형하여 측정하였다<sup>12)</sup>. 시료 10 g을 취하고 증류수를 가하여 100 mL로 정용한 후, 30°C에서 150 rpm으로 1시간 진탕하여 추출한

여과액을 조효소액으로 하였다. 효소액 0.5 mL, mcllivine 씨 완충액 1 mL, 2% milk casein 0.5 mL를 첨가한 후 38°C에서 1시간 반응시킨 다음, 0.4 M trichloro acetic acid (TCA) 3 mL를 가하고 38°C에서 20분간 방치하여 반응을 중지시켰다. 반응 중지액을 여과하여 얻은 여액 1 mL에 0.4 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5 mL와 2배 희석한 Folin phenol 시약 1 mL를 가하여 반응시켜 38°C 항온수조에서 30분간 발색시킨 후, 660 nm에서의 흡광도(U-5100, Hitachi, Japan)를 측정하였다. 표준곡선은 L-tyrosine용액을 사용하였으며, 이때 효소활성은 1분 동안 생성되는 1  $\mu\text{g}$ 의 tyrosine의 양을 1 unit으로 하였다.

### $\beta$ -amylase 활성

청국장 5 g에 증류수 45 mL를 첨가하고 3시간 진탕한 후 원심분리(10,000  $\times$  g, 10 min)하여 얻은 상등액을 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과한 것을 조효소액으로 사용하였다. 0.5% soluble starch 용액 1 mL에 조효소액 1 mL를 가하여 반응(30°C, 30 min)시킨 뒤, DNS 시약 1 mL를 넣고 끓는 물에 5분간 반응 시킨 후 증류수 10 mL를 넣어 희석한 다음 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-maltose를 이용하였고, 효소활성도는 효소액 1 mL에서 1 mg의 maltose를 유리할 때를 1 unit으로 하여 청국장 1 g당으로 환산하여 표시하였다.

### 아미노태질소(AN)

Formol법에 의거하여 측정하였다<sup>13)</sup>. 시료 1 g을 취하고 증류수 50 mL를 가한 후 4분 동안 진탕 혼합하여 용해한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4가 되도록 하였다. 여기에 중성 formalin 20 mL를 가하고 20초 동안 진탕 혼합한 뒤 다시 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화·적정하였다.

아미노태질소(mg%) = 
$$\frac{0.1 \text{ N NaOH 적정량(mL)} \times 1.401 \times F \times \text{희석배수} \times 100}{\text{시료량(g)}}$$

### 유리아미노산

청국장 5 g에 증류수 30 mL를 가하여 교반한 후 50 mL로 정용하여 30분 간 진탕한 후 원심분리(5,000  $\times$  g, 10 min)한 후 얻어진 상등액을 시험용액으로 사용하였다. 시험용액 2 mL에 5% TCA 2 mL를 첨가하고 원심분리(15,000  $\times$  g, 10 min)하여 얻어진 상등액과 0.02 N HCl을 동량으로 희석한 후 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과하였다. 여과액은 아미노산자동분석기(Hitachi L-8900, Japan)을 이용하여 분석하였다.

### Biogenic amine

Biogenic amine (BA) 분석은 일본위생시험법<sup>14)</sup>의 불휘

발성부패아민 분석법을 변형하여 사용하였다. 시료 5 g에 0.1 N HCl 45 mL를 가한 후 균질화하고 원심분리(15,000 × g, 30 min) 한 상층액을 취하여 시험용액으로 사용하였다. 표준용액 및 시험용액 각각 1 mL를 취한 다음 내부표준용액(1,7-diaminoheptane, SIGMA) 100 µL를 가한 후 포화탄산나트륨용액 0.5 mL와 1% 염화단실아세톤용액(dansyl chloride, SIGMA) 0.8 mL를 가하여 혼합한 후 마개를 하여 45°C에서 1시간 유도체화시켰다. 유도체화 시킨 표준용액 및 시험용액에 10% 프롤린용액 0.5 mL 및 에테르 5 mL를 가하여 10분간 50°C 항온수조에서 진탕하고, 상층액을 취하여 다시 50°C 항온수조에서 증발·건조된 검체에 아세토니트릴 1 mL를 가하여 여과한 것을 HPLC로 분석하였다. HPLC의 분석으로 역상칼럼은 C18 (Capcellpak, 4.6 mm × 250 mm, 5 µm), 이동상은 H<sub>2</sub>O에 녹인 0.1% formic acid (A) 와 acetonitrile에 녹인 0.1% formic acid (B), 농도 경사는 0-10분, A:B = 45:55; 11-15분, A:B = 35:65; 16-25분, A:B = 20:80; 26-30분, A:B = 10:90, 30분 유속은 분당 1 mL이었으며 10 µL 시료를 주입하였다.

#### 점질물 함량

청국장에 4배의 증류수를 첨가하여 30분 간 진탕하고 여과 후 원심분리(10,000 × g, 15 min)하여 상등액을 건조하여 함량을 측정하였다<sup>15)</sup>.

#### 관능검사

대조구 및 시험구에 대하여 참여연구원 4명을 대상으로 1차 선별을 거친 후 선택된 4개의 시험구만을 가지고 참여연구원 16명을 대상으로 하여 기호도 조사를 실시하였다. 향, 맛, 전반적 기호도에 대해 9점 척도법을 이용하였다. 시료는 청국장 60 g에 동일량 가열한 후 물에 끓인 청국장을 시험체로 하였다.

#### 통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치로 나타내었으며, 유의성 검증은 MINITAB 통계프로그램을 이용하여 검증하였다.

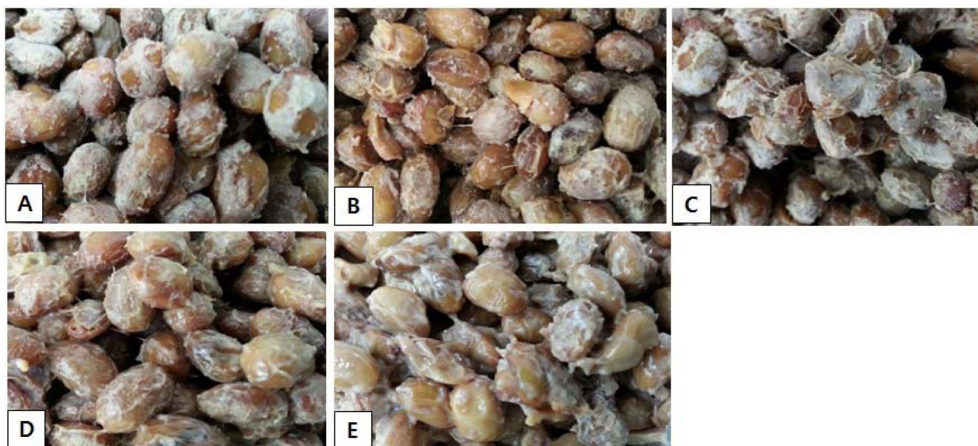
## 결과 및 고찰

#### 발효온도 조건을 달리한 청국장의 형태

RiBS1 starter를 이용하여 제조한 청국장의 발효온도에 따른 차이가 있는지 알아보기 위해 기존 청국장의 발효온도인 40°C와 50°C로 온도 변화를 주었고 단일 starter와의 발효양상을 비교하기 위하여 RiBS1과 SRCM100027을 혼합한 starter를 40°C와 50°C로 발효하였으며, 대조구를 포함한 총 5가지 조건으로 실험을 하였다(Fig. 1). 그 결과, 발효온도에 따라 발효양상이 다른 것을 확인할 수 있었지만 단일starter와 혼합starter 모두 정상적으로 청국장이 제조되었고 육안상 청국장의 형태와 점질물의 양에 있어 큰 차이는 보이지 않은 것으로 판단되었다.

#### 수분함량

청국장 발효 중 수분함량 변화를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 발효 24시간에는 시험구 모두 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 발효 48시간에 40°C로 발효한 40R (RiBS1 0.1% 접종)과 40RB (RiBS1과 *Bacillus*속을 혼합하여 0.1% 접종)는 각각 46.5%, 52.9%를 나타내었으며, 발효72시간에 각각 45.4%, 47.8%로 모든 시험구 중 감소 변화가 가장 적었다. 50°C로 접종한 50R (RiBS1 0.1% 접종)과 50RB (RiBS1과 *Bacillus*속을 혼합하여 0.1% 접종)는 발효 48시간에 각각 37.4%, 38.1%를 나타내었고, 발효 72시간에 각각 21.2%, 29.1%를 나타내어 대조구와 비슷한 경향을 나타내었으며, 이는 국내 시판청국장의 수분함량의 분석<sup>16)</sup> 결과인 56.3~52.1%보다 낮은 결과를 나타내었으며 이러한



**Fig. 1.** Type of the *Cheonggukjang* after fermentation for 48 hours. A, control (SRCM100027, 40°C); B, 40R (RiBS1, 40°C); C, 40RB (RiBS1 + SRCM100027, 40°C); D, 50R (RiBS1, 50°C); E, 50RB (RiBS1 + SRCM100027, 50°C).

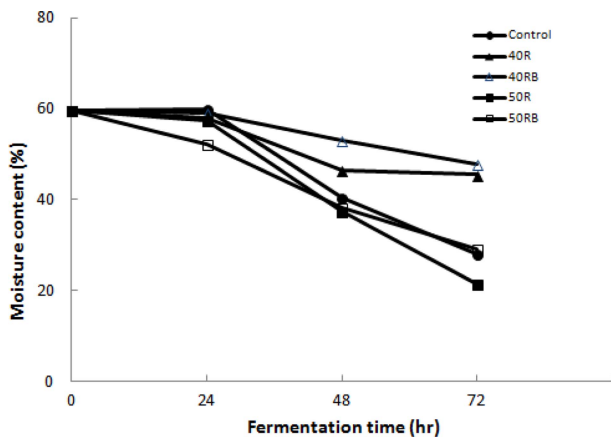


Fig. 2. Moisture contents of the *Cheonggukjang* during fermentation periods. ●, control (SRCM100027, 40°C); ▲, 40R (RiBS1, 40°C); △, 40RB (RiBS1 + SRCM100027, 40°C); ■, 50R (RiBS1, 50°C); □, 50RB (RiBS1 + SRCM100027, 50°C).

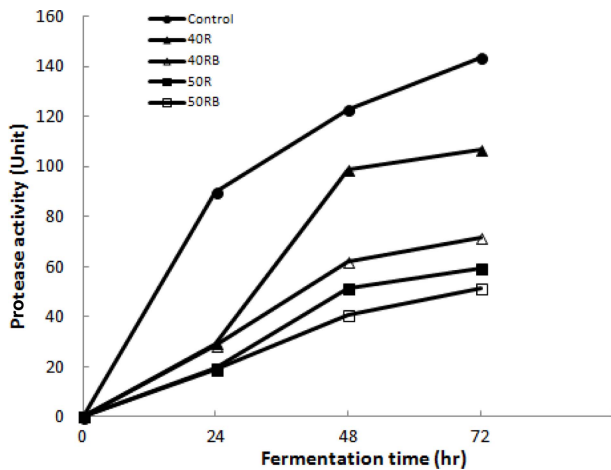


Fig. 3. Protease activities of the *Cheonggukjang* during fermentation periods. ●, control (SRCM100027, 40°C); ▲, 40R (RiBS1, 40°C); △, 40RB (RiBS1 + SRCM100027, 40°C); ■, 50R (RiBS1, 50°C); □, 50RB (RiBS1 + SRCM100027, 50°C).

차이가 나는 이유는 발효시간에 따른 차이로 판단되어진다. 한편 모든 시험구는 발효 48시간 이후 발효온도 별로 수분함량의 차이가 발생하였으며 발효 72시간에는 유의적으로 감소하는 경향을 보였는데 이는 발효 중 수분 증발로 인한 건조가 이루어졌기 때문이라고 사료되어진다. 전반적으로 50°C의 발효 조건에서 수분 감소량이 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었다.

### Protease 활성

Protease는 콩 단백질을 분해하여 감칠맛 성분인 아미노산과 polypeptide 등을 생성하므로 청국장의 맛을 결정짓는 인자 중의 하나이다<sup>17)</sup>. 청국장의 protease 활성을 조사한 결과, 모든 시험구는 발효기간에 따라 증가하였으나, 발효온도 조건에 따라 대조구와 상당한 차이를 나타내었

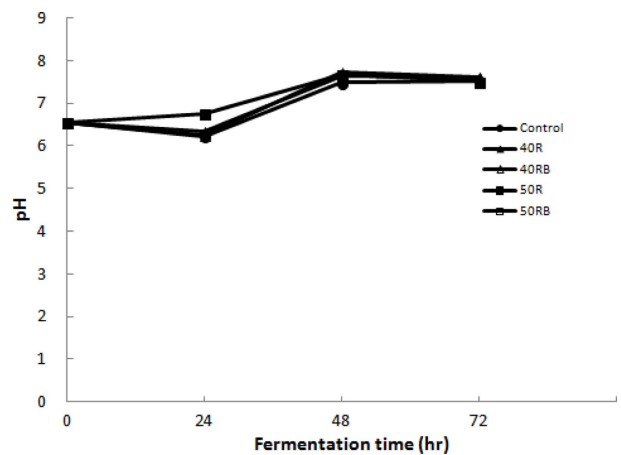


Fig. 4. pH changes of the *Cheonggukjang* during fermentation period. ●, control (SRCM100027, 40°C); ▲, 40R (RiBS1, 40°C); △, 40RB (RiBS1 + SRCM100027, 40°C); ■, 50R (RiBS1, 50°C); □, 50RB (RiBS1 + SRCM100027, 50°C).

다(Fig. 3). 대조구는 발효 24시간 만에 평균 89.9 unit을 나타낸 이후 점차 증가하여 발효 72시간에는 143.5 unit을 나타내었다. 반면 발효 72시간에 40°C 시험구인 40R은 90.7 unit을 나타내었고 40RB는 60.2 unit으로 대조구에 비해 약 50% 가량 낮은 활성을 보였고, 50°C 시험구인 50R은 54.6 unit, 50RB는 51.3 unit으로 대조구에 비해 약 70% 낮은 활성을 보였다. 이러한 결과는 Kim 등<sup>18)</sup>이 벧짚을 이용하여 제조한 청국장의 발효과정 중 protease 활성 변화에서 40°C에서 발효시킨 청국장이 50°C보다 다소 높은 활성을 보인다고 보고한 결과와 유사하였다. 또한 균주를 달리한 청국장의 발효 48시간 쯤 protease 활성이 90.97~117.19 unit이라 보고한 Baek 등<sup>19)</sup>의 결과 보다 다소 낮은 활성을 나타내었다. 대조구에 비해 벧짚유래 starter를 이용하여 제조한 시험구의 protease 활성이 낮은 것은 아마도 다양한 미생물들이 균집을 이루어 증식하기 때문에 protease 생성이 낮은 것으로 사료되어진다.

### pH 변화

발효시간에 따른 pH의 변화를 관찰한 결과, 발효 24시간에는 중성 영역을 나타내다가 발효시간이 경과함에 따라 알칼리 영역으로 전환됨을 알 수 있었다(Fig. 4). 40°C 시험구의 경우 40R과 40RB는 발효 24시간에 pH 6.3으로 약간 감소하였다가 발효 72시간에 pH 7.6의 범위로 급격하게 증가하였으며, 50°C 시험구인 50R과 50RB는 발효 24시간에 pH 6.8에서 발효 72시간에 pH 7.6의 범위를 나타내었다. pH 결과도 마찬가지로 RiBS1 단일 starter와 RiBS1과 *Bacillus*속을 혼합한 starter의 차이보다는 발효온도별 차이가 컸으며, 이는 발효온도가 높을수록 청국장이 알칼리 영역으로 전환되었다는 연구결과<sup>20)</sup>와 유사하였고, Kim 등<sup>18)</sup>이 40°C와 50°C에서 각각 48시간 발효시켰을 때 50°C에서 발효시킨 청국장 시료가 다소 높은 pH를 나타냈다

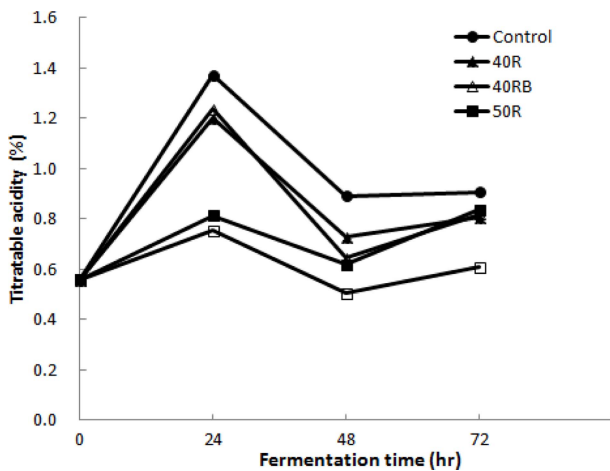
는 결과와 유사하였다. 또한 Sung 등<sup>21)</sup>은  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 발효시킨 청국장 pH가 6.6~8.0의 중성 및 알칼리 영역의 pH를 보인다고 보고하여  $40^\circ\text{C}$ 로 발효시킨 본 실험결과보다 약간 높은 결과를 보였으며  $50^\circ\text{C}$ 로 발효시킨 본 실험결과와 유사하였다. 한편, Youn 등<sup>22)</sup>은 증자한 대두에 *Bacillus* 속 균주를 접종했을 때 발효초기에는 pH 6.13~6.21를 유지하다가 발효 후기에는 pH 8.0을 넘었다고 보고 하였다. 청국장의 pH가 알칼리로 전환되는 것은 콩 단백질이 아미노산으로 분해되고, 탈 아미노화로 암모니아가 생성되기 때문인 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>.

### 적정산도

적정산도는 Fig. 5와 같이  $40^\circ\text{C}$  시험구의 경우 대조구와 비슷한 경향을 보였는데, 발효 24시간에 40R과 40RB는 1.2%로 급속히 증가하다가 발효 48시간에 40R은 0.7%로 약 40% 감소하였고, 40RB도 0.6%로 약 50% 감소하였다가 이후로 큰 변화는 없었다.  $50^\circ\text{C}$  시험구는 이보다 낮은 변화를 나타내었는데, 50R과 50RB는 발효 24시간에 0.8%로 약간 증가하다가 발효 48시간에 50R은 0.6%로 약 25% 감소하였고 50RB는 0.5%로 약 38% 감소하였다가 발효 72시간에 약간 증가하였다. 발효 72시간에 40R과 40RB 그리고 50R은 0.8%를 나타내었으며, 50RB는 이보다 낮은 0.6%를 나타내었는데 이같이 발효가 진행될수록 알칼리성을 나타낸 것은 Joo<sup>24)</sup>와 Suh 등<sup>25)</sup>의 보고에서와 같이 단백질이 아미노산으로 분해되고 탈 아미노화로 암모니아가 생성되어서 pH는 높아지고 산도가 낮아지는 것으로 보인다.<sup>23)</sup>

### 아미노태 질소 변화

장류 발효의 품질 지표로서 중요한 역할을 하는 아미노

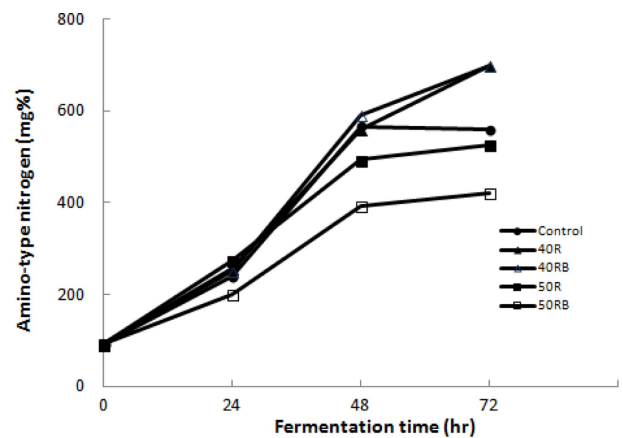


**Fig. 5.** Changes in the contents of acidity of the *Cheonggukjang* during fermentation period. ●, control (SRCM100027,  $40^\circ\text{C}$ ); ▲, 40R (RiBS1,  $40^\circ\text{C}$ ); △, 40RB (RiBS1 + SRCM100027,  $40^\circ\text{C}$ ); ■, 50R (RiBS1,  $50^\circ\text{C}$ ); □, 50RB (RiBS1 + SRCM100027,  $50^\circ\text{C}$ ).

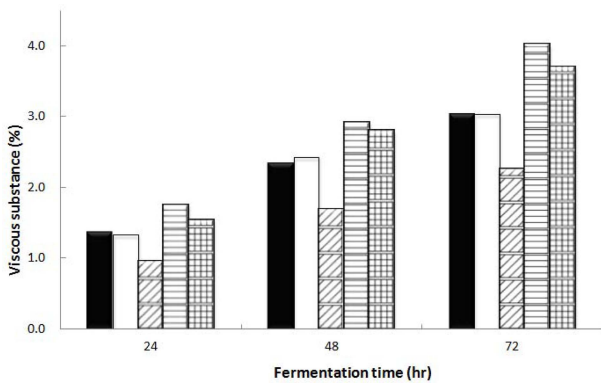
태 질소는 콩 단백질이 분해되어 생성되는 물질로서 청국장의 구수한 맛의 척도로 여겨지며, 이를 측정 한 결과는 Fig. 6과 같다. 증자 직후  $92.0 \text{ mg}\%$ 였으나 발효가 진행됨에 따라  $40^\circ\text{C}$  시험구인 40R과 40RB는 발효 48시간 만에 각각  $559.6 \text{ mg}\%$ ,  $590.2 \text{ mg}\%$ 를 나타내었고, 발효 72시간에  $698.7 \text{ mg}\%$ 함량을 보였다.  $50^\circ\text{C}$  시험구인 50R과 50RB는 발효 48시간에 각각  $494.0 \text{ mg}\%$ ,  $393.8 \text{ mg}\%$ 를 나타내었고 발효 72시간에  $526.9 \text{ mg}\%$ ,  $420.8 \text{ mg}\%$ 함량을 보였다. 발효 48시간 이후에는  $40^\circ\text{C}$  시험구가  $50^\circ\text{C}$  시험구보다 아미노태 질소 함량이 더 높게 나타났으며, 이는 발효시간 경과에 따라 아미노태질소 함량이 증가하고 발효온도  $40^\circ\text{C}$ 가  $45^\circ\text{C}$ 보다 더 높게 나타났다고 보고한 Hwang<sup>26)</sup>의 결과와 거의 비슷한 경향을 보여주었다. 또한 Kim 등<sup>18)</sup>이 보고한 결과에서 72시간 경에  $40^\circ\text{C}$ 에서 발효한 경우  $345.2 \text{ mg}\%$ ,  $50^\circ\text{C}$ 에서 발효한 경우  $278.6 \text{ mg}\%$ 보다 높은 결과를 나타냈으며  $50^\circ\text{C}$ 에서 발효시킨 청국장이  $40^\circ\text{C}$ 에서 발효시킨 청국장보다 아미노태질소 함량이 다소 떨어진 결과를 나타내었는데 이는 청국장의 발효균주인 *Bacillus*의 활성이 온도에 의해 영향을 받은것으로 여겨진다고 하였다. 그러나 본 연구결과는 *Bacillus*의 활성보다는 RiBS1의 활성이 발효온도에 영향을 받은 결과라고 판단되어진다.

### 청국장 점질물 함량

청국장 발효 시 나타나는 생리활성 기능은 *Bacillus*속 균주의 발효대사산물인 점질물에 의한 것으로 추정되어진다. 청국장 점질물은 글루탐산이 한 줄로 약 5,000개가 연결된 폴리펩타이드와 과당으로 구성된 프락탄이라는 성분으로 구성되어 있다<sup>27)</sup>. 청국장 점질물의 여러 가지 기능성에 관한 연구가 다양하게 진행되었으며, 특히 Youn 등<sup>28)</sup>이 연구한 *B. cereus* 등과 같이 제품에 부정적 영향을 미칠 수



**Fig. 6.** Changes in the contents of amino nitrogen of the *Cheonggukjang* during fermentation period. ●, control (SRCM100027,  $40^\circ\text{C}$ ); ▲, 40R (RiBS1,  $40^\circ\text{C}$ ); △, 40RB (RiBS1 + SRCM100027,  $40^\circ\text{C}$ ); ■, 50R (RiBS1,  $50^\circ\text{C}$ ); □, 50RB (RiBS1 + SRCM100027,  $50^\circ\text{C}$ ).



**Fig. 7.** Changes in the contents of viscous substances of the *Cheonggukjang* during fermentation period. ■, control (SRCM1000-27, 40°C); □, 40R (RiBS1, 40°C); ▨, 40RB (RiBS1 + SRCM100027, 40°C); ▩, 50R (RiBS1, 50°C); ▧, 50RB (RiBS1 + SRCM100027, 50°C).

있는 미생물의 생육억제 효과에 대한 연구가 본 과제와 관련하여 주목할 만하다. 본 연구에서 이러한 가능성을 가지는 청국장 점질물의 생성량이 균의 종류와 발효온도가 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 청국장 점질물 함량은 발효기간과 온도에 의해 차이를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 7). 시험구 모두 발효기간이 경과할수록 점질물의 양은 증가하였으며, 50°C 발효온도로 제조한 50R과 50RB는 발효 24시간에 각각 1.8%와 1.5%를 나타내었고 발효기간이 경과할수록 증가하여 발효 72시간에 각각 4.0%, 3.7% 함량을 보였다. 이는 대조구의 점질물 함량인 3.0%보다 높은 결과였으며 특히, 50R이 높은 함량을 나타내었다. 40°C 발효온도인 40R은 발효 24시간에 1.3%를 나타내었으며 발효 72시간에 3.0%의 함량을 보여 이는 대조구의 점질물 함량과 유사하였다. 40RB는 시험구 중 가장 낮은 함량을 보였으며 발효 24시간에 1.0%에서 발효 72시간에 2.3%로 *Bacillus*속이 발효균으로 이용된 대조구 및 시험구보다 비교적 낮은 함량을 나타내었다. 이런 결과는 청국장 점질물 생성이 단백질 분해효소 활성화 등 다양한 요인이 함께 작용함을 알 수 있으며 RiBS1만을 사용한 단일 starter의 경우 *Bacillus*속을 혼합한 starter에 비해 점질물 생성이 많았다. 이는 *B. cereus*를 박테리오파지를 이용하여 선택적으로 제거한 RiBS1을 starter로 사용하더라도 공정중에 발생할 수 있는 *B. cereus* 오염을 일정정도 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

**관능검사**

16명의 패널을 대상으로 제조한 청국장에 대한 관능검사를 실시한 결과는 Table 1과 같다. 각 시험구간의 향은 유의적인 차이가 없었지만 맛과 종합적 기호도에서는 유의적인 차이를 보였다. 시험구 50R2가 가장 높은 기호도인

**Table 1.** Sensory characteristics of the *Cheonggukjang*

|                                | smell                    | taste                     | overall taste             |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 50R1<br>(50°C, 24 hr, 0.1%)    | 4.50 ± 2.16 <sup>a</sup> | 4.81 ± 2.51 <sup>ab</sup> | 4.44 ± 2.03 <sup>ab</sup> |
| 50RB1<br>(50°C, 24 hr, 0.1%)   | 4.75 ± 2.32 <sup>a</sup> | 4.75 ± 2.59 <sup>ab</sup> | 5.06 ± 2.43 <sup>a</sup>  |
| 50RB2<br>(50°C, 24 hr, 1%)     | 4.94 ± 2.97 <sup>a</sup> | 3.69 ± 2.09 <sup>b</sup>  | 4.31 ± 2.15 <sup>ab</sup> |
| 50R2<br>(50°C, 48 hr, 0.1%)    | 4.62 ± 2.66 <sup>a</sup> | 5.56 ± 2.13 <sup>a</sup>  | 5.31 ± 2.41 <sup>a</sup>  |
| 50B1<br>(50°C, 24 hr, control) | 4.75 ± 1.88 <sup>a</sup> | 4.50 ± 2.22 <sup>ab</sup> | 4.63 ± 2.09 <sup>ab</sup> |
| 50B2<br>(50°C, 48 hr, control) | 3.63 ± 2.73 <sup>a</sup> | 3.63 ± 2.42 <sup>b</sup>  | 3.38 ± 2.47 <sup>b</sup>  |
| P value < 0.05                 |                          |                           |                           |

<sup>1</sup>± value is standard deviations

5.31 ± 2.41을 나타내었고 그 다음으로는 50RB1 시험구가 5.06 ± 2.43을 나타내었다. 이는 대조구인 50B1과 50B2의 기호도 값인 4.63 ± 2.09, 3.38 ± 2.47보다도 높은 수치였다.

**유리아미노산 함량 분석**

콩을 원료로 하여 제조한 청국장 중의 단백질은 발효과정 중 *Bacillus*속 균주가 분비하는 단백질 분해효소의 작용으로 polypeptide-peptide-amino acid로 순차적으로 분해되어 소화흡수 되기 쉬운 상태로 되며 끈적한 점질물이 생성되어 청국장 고유의 맛과 향을 지니게 된다<sup>29)</sup>.

Starter를 달리하여 제조한 청국장의 유리아미노산의 함량은 Table 2와 같다. 50R 시험구에서 48시간 쯤의 유리아미노산의 함량을 보면 glutamic acid의 함량이 1184.46 mg/kg으로 가장 높았으며, 발효시간이 지날수록 증가하는 경향을 보였다. 또한 청국장 특유의 향인 암모니아 함량은 대조구인 50B를 48시간 발효했을 때 397.68 mg/kg으로 가장 높은 값을 보였으며 두 시험구인 50R과 50RB에서는 유사한 값을 보였다. 관능검사 결과와 비교하여 보면 glutamic acid와 aspartic acid의 함량이 높은 50R2의 시험구가 관능검사 1순위였고, 암모니아 함량이 높은 대조구 50B2가 가장 낮은 순위를 보인 것으로 보아, 유리아미노산의 함량에 따라 기호도의 변화가 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 glutamic acid와 aspartic acid의 함량이 높으면 구수한 맛이 강해지며, alanine, glycine 및 lysine의 함량이 높으면 단맛이 강해진다는 보고<sup>30)</sup>와 일치한다.

**위해미생물 분석**

본 연구에 사용한 RiBS1 starter의 위해미생물을 분석한 결과, *B. cereus*를 비롯한 *Salmonella* spp., *E. coli*, *S. aureus*, *Cl. perfringenes*가 모두 불검출이었다. 또한 제조한 청국장 대조구와 시험구별에 대한 위해미생물인 *B. cereus*,

**Table 2.** Changes of free amino acids during fermentation of the *Cheonggukjang* (unit : mg/kg)

| Amino acid | 50B(control) |         |         | 50R(50°C, 0.1%) |         |         | 50RB(50°C, 0.1%) |         |         |
|------------|--------------|---------|---------|-----------------|---------|---------|------------------|---------|---------|
|            | 12h          | 24h     | 48h     | 12h             | 24h     | 48h     | 12h              | 24h     | 48h     |
| P-ser      | 25.91        | -       | -       | 96.25           | -       | -       | 46.28            | -       | -       |
| Urea       | 11.41        | -       | 815.01  | 22.22           | -       | 762.16  | -                | -       | -       |
| Asp        | 3.63         | 35.54   | 69.75   | 13.72           | 34.98   | 106.10  | 10.76            | 1.72    | 3.73    |
| T hr       | 1.96         | 42.09   | 66.18   | 13.14           | 61.41   | 88.27   | 7.80             | 55.00   | 45.08   |
| Ser        | 3.23         | 51.30   | 8.11    | 13.90           | 2.46    | 11.44   | 7.05             | 1.12    | 0.87    |
| Glu        | 14.11        | 317.49  | 737.52  | 194.06          | 422.90  | 1184.46 | 138.38           | 346.49  | 321.23  |
| a-AAA      | 4.46         | 73.86   | 59.38   | 17.51           | 18.52   | 41.53   | 10.69            | 20.11   | 28.54   |
| Gly        | 1.17         | 19.14   | 59.46   | 4.18            | 17.82   | 94.14   | 3.42             | 11.69   | 37.48   |
| Ala        | 20.69        | 140.04  | 169.71  | 40.01           | 94.07   | 163.16  | 18.99            | 83.30   | 73.98   |
| Cit        | 49.25        | 138.30  | 100.06  | 12.51           | 44.63   | 59.11   | 16.31            | 33.43   | 44.03   |
| Met        | 1.49         | 40.29   | 95.49   | 11.94           | 43.27   | 104.45  | 5.97             | 37.30   | 74.61   |
| Ile        | 5.25         | 111.52  | 160.06  | 23.62           | 74.78   | 128.58  | 7.87             | 56.42   | 74.78   |
| Leu        | 26.22        | 190.12  | 326.49  | 94.41           | 243.88  | 381.56  | 39.34            | 215.04  | 275.35  |
| Tyr        | 7.25         | 101.47  | 297.15  | 32.61           | 119.59  | 273.60  | 23.55            | 92.41   | 157.64  |
| Phe        | 39.65        | 251.09  | 459.23  | 54.51           | 175.10  | 409.67  | 36.34            | 142.06  | 254.39  |
| b-Ala      | 81.76        | 31.01   | 66.38   | 24.03           | 43.05   | 46.67   | 21.76            | 64.24   | 54.94   |
| b-AiBA     | 35.76        | 149.78  | 292.35  | 78.78           | 75.81   | 94.42   | 49.49            | 87.87   | 140.04  |
| g-ABA      | 35.88        | 33.20   | 154.67  | 32.94           | 27.44   | 48.70   | 15.37            | 34.89   | 28.86   |
| NH3        | 31.11        | 107.86  | 397.68  | 26.72           | 139.37  | 285.16  | 23.42            | 112.08  | 285.32  |
| Orn        | 81.40        | 141.24  | 151.77  | 43.39           | 53.07   | 180.84  | 47.82            | 14.36   | 27.48   |
| Lys        | -            | 137.53  | 279.86  | 30.27           | 174.95  | 526.37  | 22.32            | 114.06  | 113.78  |
| His        | 7.63         | 52.38   | 84.71   | 20.93           | 91.32   | 297.94  | 14.06            | 60.22   | 127.92  |
| Ans        | -            | 121.80  | 343.74  | 39.63           | 46.14   | 210.00  | 15.52            | 60.20   | 151.24  |
| Arg        | -            | 51.86   | 63.91   | 41.80           | 8.46    | 72.13   | 29.61            | -       | 15.61   |
| TOTAL      | 489.24       | 2338.91 | 5258.69 | 983.07          | 2013.02 | 5570.46 | 612.12           | 1644.00 | 2336.89 |

**Table 3.** Contents in the biogenic amines of the *Cheonggukjang* (unit: mg/kg)

| Fermentation time | Sample            | Putrescine       | Cadaverine | Histamine    | Tyramine    |
|-------------------|-------------------|------------------|------------|--------------|-------------|
| 24h               | control           | ND <sup>1)</sup> | ND         | 18.76 ± 0.45 | 0.31 ± 0.01 |
|                   | 50RB (50°C, 0.1%) | ND               | ND         | 5.53 ± 0.13  | ND          |
| 48h               | control           | ND               | ND         | 39.96 ± 0.62 | ND          |
|                   | 50B (50°C, 0.1%)  | ND               | ND         | 15.42 ± 0.23 | ND          |

<sup>1)</sup>Not detect

Data are expressed as means ± SD of three experiments.

*Salmonella* spp., *E. coli*, *S. aureus*, *Cl. perfringenes*의 시험결과, 모두 불검출되어 개발된 벧짚유래 starter로 *B. cereus*가 제어된 청국장의 제조에 적합함을 확인하였다.

**Biogenic amine 분석**

청국장은 발효 동안 biogenic amine으로 변환될 가능성이 있는 serine, proline, histidine, glutamic acid, aspartic acid, phenylalanine 등의 유리아미노산을 생성한다는 연구결과가 보고되어 있다<sup>31)</sup>. 청국장의 biogenic amine을 분석한 결과는 Table 3과 같다. Biogenic amine중에서 유해성이 알려진 putrescine, cadaverine, histamine, tyramine에 대

하여 분석하였다. Histamine은 모든 시험구에서 검출 되었 으며, 대조구에 비해 시험구에서 낮은 수치를 보였다. 모든 시험구에서 putrescine, cadaverine은 검출되지 않았 으며, 24 시간 발효한 대조구에서만 tyramine이 소량 검출되 었다. 현재 우리나라는 장류에 대한 biogenic amine 잔류 허용기준이 설정되어 있지 않지만, 본 결과는 EU의 어류 에 대한 총 biogenic amine 잔류허용기준인 300 mg/kg, histamine 허용기준인 100 mg/kg과 우리나라 식약처의 수 산물에 대한 잔류허용기준인 histamine 200 mg/kg에도 못 미치는 결과이며, 식약처의 장류의 권장기준인 500 mg/kg 에도 크게 못 미치는 수준이었다.

## 요약 및 고찰

본 연구는 전통장류 제조시에 이용하는 볏짚으로부터 유래하는 *B. cereus*를 제어하기 위하여 개발된 볏짚유래 starter (RiBS1)를 이용하여 청국장을 제조하고 *B. cereus*의 제어효과를 분석하고 제조된 청국장의 품질을 평가하여 장류의 적용 가능성을 검증하고자 하였다. 발효온도에 대한 영향평가를 위해 40°C, 50°C로 제조하여 품질을 분석한 결과, 아미노태질소 함량은 발효 48시간 만에 시험구 각각에 대하여 평균적으로 559.6~590.2 mg%, 393.8~494.0 mg%를 나타내었다. 또한 개발된 청국장은 대조구에 비하여 RiBS1 starter를 적용하여 제조한 청국장이 풍미와 맛 면에서 전통방식의 청국장에 가깝고 기호도 면에서 좋은 결과를 나타내었다. 관능검사 결과, RiBS1 starter를 이용하여 발효온도 50°C에서 48시간 동안 발효한 청국장이 가장 높은 기호도를 나타내었고, 이는 *Bacillus*속 단일균주만 사용한 대조구보다 높은 수치였다. 또한 *B. cereus*를 포함하여 위해물질인 biogenic amine에 대하여 RiBS1 starter와 이를 이용하여 제조한 청국장에서 검사한 결과, *B. cereus*는 불검출되었으며, biogenic amine은 청국장에서 매우 낮은 값인  $5.53 \pm 0.13 \sim 39.96 \pm 0.62$  mg/kg을 나타내었다. 이는 *B. cereus*를 선택적으로 제거한 볏짚유래 starter (RiBS1)가 효과적으로 *B. cereus*를 제어하고 품질이 좋은 청국장을 제조할 수 있음을 보여주는 결과이다. 향후 추가적으로 메주에 적용하여 위생적으로 품질 좋은 된장, 간장을 제조할 수 있을 것으로 사료되며, 개발된 볏짚유래 starter의 안정적인 보존과 활성화 연구를 통하여 위생적인 전통장류 산업에 이바지 할 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치식품개발사업 (과제번호 112108-2)의 지원으로 수행되었습니다.

## 참고논문

- Kim W.K., Choi K.H., Park H.H., Choi J.Y., Lee Y.S., Oh H.I., Kwon I.B., Lee S.Y.: Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* strain CK11-4 screened from chungkookjang. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2482-2488 (1996).
- Cheigh, H.S., Lee J.S., Lee C.Y.: Antioxidative characteristics of soybean sauce. *Korean J. Soc. Food Nutr.*, **22**, 570-575 (1993).
- Yoo, J.Y.: Present status of industries and research activities of Korean fermented soybean products. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 13-30 (1997).
- Okamoto A, Hanagata H, Matsumoto E, Kawamura T, Koizume Y, Yanagida F.: Angiotensin I converting enzyme inhib-

- itory activities of various fermented foods. *Biosci. Biotech. Bioch.*, **59**, 1147-1149 (1995).
- Lee S.H., Baek L.M., Park L.Y.: Physiological characteristics of *Bacillus spp.* isolated from rice straw as cheonggukjang starter. *Korean J. food sci. technol.*, **40**, 562-567 (2008).
- Baek L.M.: Effect of soybean germination on the quality characteristics of cheongkookjang inoculated with *Bacillus licheniformis* B-59 isolated from rice straw. Catholic University of Daegu, The Graduate School (2009).
- Nadeeca B, Chung S.J., Jeong D.Y., Kim K.P.: The Use of the Pathogen-specific Bacteriophage BCP8-2 to Develop a Rice Straw-derived *Bacillus cereus*-free Starter Culture. *Korean J. food sci. technol.*, **46**, 115-120 (2014).
- Anonymous.: Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* another *Bacillus spp.* in food-stuffs. *The EFSA Journal.*, **175**, 1-48 (2005).
- KFDA.: Common standards & specifications for general foods. Korea (2007).
- 채수규: 기본 식품 분석학. 석학당, pp. 174-278 (2013).
- 유주현: 식품공학실험서(I). 탐구당, pp. 725 (1975).
- Yu, J.H.: Experiments in food science and engineering, Department of food engineering. Yonsei university (Ed.), Tamgudang, Seoul, **2**, 476-478 (1984).
- Shin D.H., Kim D.H., Choi U, Lim D.K., Lim M.S.: Studies on the physicochemical characteristic of traditional kochujang. *Korean J Food Sci Technol.*, **28**, 157-161 (1996).
- The pharmaceutical society of japan. Methods of analysis in health science. Kanehara & Co. Ltd., Tokyo, Japan. pp. 180-182 (2005).
- Lee B.Y., Kim D.M., Kim K.H.: Physico-Chemical Properties of Viscous Substance Extracted from Chungkook-jang, *Korean J Food Sci Technol.*, **23**, 599-604 (1991).
- Ko Y.J., Son Y.H., Kim E.H., Seol H.G., Lee G.R., Kim D.H., Ryu C.H.: Quality properites of commercial chungkukjang in korea. *Journal of Agriculture & Life Science.*, **46**, 1-11 (2012).
- Lee N.R., Park S.B., Lee S. M., Go T.H., Hwang D.Y., Kim D.S., Jeong S.Y., Son H.J.: Characteristics of White Soybean Chungkookjang Fermented by *Bacillus subtilis* D7, *Journal of Life Science.*, **23**, 529-536 (2013).
- Kim K.J., Ryu M.K., Kim S.S.: Chungkook-jang koji fermentation with rice straw, *Korean J. Food sci. Technol.*, **14**, 301-308 (1982).
- Baek L.M., Park L.Y., Park K.S., Lee S.H.: Effect of starter cultures on the fermentative characteristics of Cheongguk-jang. *Korean J Food Sci Technol*, **40**, 400-405 (2008).
- Lee N.R., Lee S.M., Go T.H., Jeong S.Y., Hong C.O., Kim K.K., Park H.C., Lee S.M., Kim Y.G., Son H.J.: Fermentation characteristics of chungkookjang prepared using different soybean. *J. of Environ. Sci. Inter.*, **22**, 723-732 (2013).
- Sung N.J., Ji Y.A. Chung S.Y.: Changes in nitrogenous compounds of soybean during Chungkookjang koji fermentation. *J Korean Soc Food Nutr.*, **13**, 275-284 (1984).
- Youn K.C., Kim D.H., Kim J.O., Park B.J., Yook H.S., Cho J.M. Byun M.W.: Quality characteristics of the Chungkook-jang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B.*



- licheniformis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, **31**, 204-210 (2002).
23. Ann Y.G.: Changes in components and peptides during fermentation of *cheonggukjang*, *Korean J. Food Nutr.*, **24**, 124-131 (2011).
  24. Joo H.K.: Studies on the Manufacturing of Chungkukjang, *Korea J Food sci. Technol.*, **3**, 64-67 (1971).
  25. Suh J.S., Ryu M.K., Hur Y.H.: Effect of *bacillus* strains on the *Chungkookjang* processing, *Korea J Food sci. Technol.*, **15**, 383-391 (1983).
  26. Hwang J.H.: The fermentative characteristics of *Cheonggukjang* prepared by starter culture of *Bacillus* spp. with fibrinolytic activity. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**, 1832-1838 (2010).
  27. Kameda Y., et: All Anti-tumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 938-944 (1974).
  28. Youn, H.K., Choi, H.S., Hur, S.H., Hong, J.H.: Antimicrobial activities of viscous substances from *Chongkukjang* fermented with different *Bacillus* spp, *J. Fd Hyg. Safety*, **16**, 188-193 (2001).
  29. Joo H.K.: Studies on chemical composition of commercial *chungkukjang* and flavor compounds by mugwort (*Artemisia asiatica*) or red pepper seed oil. *J. Korean soybean digest*, **13**, 44-56 (1996).
  30. Kim J.S., Yoon S.M., Choe J.S., Park H.J., Hong S.P., Chang C.M.: Phycochemical properties of traditional *cheonggukjang* produced in different region. *Agric. Chem. Biotech.*, **41**, 377-383 (1998).
  31. Seok Y.R., Kim Y.H., Woo S.H.S., Kim T.W., Lee S.H., Choi C.: Change of protein and amino acid composition during *cheonggukjang* fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **37**, 65-71 (1994).