

보 문

전통 발효 청국장으로부터 분리한 *Bacillus* 균주들의 특성 및 기능 분석

문지영 · 권순우 · 홍승범 · 석순자 · 김정선 · 김수진*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

Characteristics and functional analysis of *Bacillus* strains from the fermented soybean products, Cheonggukjang

Ji-Young Moon, Soon-Wo Kwon, Seung-Beom Hong, Soon-Ja Seok, Jeong-Seon Kim, and Soo-Jin Kim*

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea

(Received September 4, 2015; Accepted September 23, 2015)

ABSTRACT: For selecting *Bacillus* strains producing high-quality Cheonggukjang, 8 strains were isolated from the different Cheonggukjang samples. Seven of them exhibited the highest 16S rRNA gene sequence similarity value of over 99.9% to *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and one of them showed the similarity to *B. licheniformis*. All the strains showed positive activities for amylase, cellulase, protease and lipase, and 6 strains are positive for fibrinolytic activity. To confirm the safety of the strains isolated from the samples of Cheonggukjang which are manufactured by traditional method, strains were analyzed for the presence of seven toxin genes of *Bacillus cereus* and results were found negative. And 7 strains did not produce at all or merely produce both histamine and tyramine, the representative biogenic amines. Biogenic amine degradation analysis by HPLC revealed that, most of them exhibited tyramine degradation activity. For Cheonggukjang fermented by artificial inoculation of selected strains, fermentation property, sensory test, volatile basic nitrogen production and metabolic profiles by ¹H-NMR were tested. Seven strains were confirmed to make high-quality Cheonggukjang.

Key words: *Bacillus*, biogenic amine, Cheonggukjang, enzyme activity, fibrinolysis

한국의 장류 식품인 청국장, 된장 및 간장은 오랫동안 한국인이 섭취해온 음식으로써 특별한 부작용이 없는 식품이며, 항산화 효과, 혈전용해 효과, 혈압강하 효과 등을 유발하는 각종 유익한 생리활성 물질들이 포함된 것으로 알려져 있다(Yoo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007, 2008; Back *et al.*, 2011). 미생물은 다양한 발효식품의 맛과 품질을 결정하는 인자로서 그 기능이 높게 평가되고 있다. 발효 미생물에 관한 연구는 아주 오래전부터 국내외에서 활발히 진행되어 오고 있다. 특히 최근에는 ¹H-NMR 기술을 이용한 발효 대사산물의 변화를 관찰하는 등의 신기술을 이용한 과학적인 접근이 시도 되고 있다. Jung 등(2013)은 한국의 새우젓을 183일 동안 세균의 군집과 수를 관찰하고 그 기간 동안 ¹H-NMR을 이용하여 아미노산, 질소화합물 등을 포함하는 대사산물을 분석하였다.

청국장은 콩으로 만든 한국의 대표적인 발효식품으로서 간장, 된장, 고추장 보다 그 발효기간이 짧은 특징을 가지고 있으며, 곡류를 주식으로 하는 한국인이 결핍되기 쉬운 필수아미노산 및 지방산의 급원식품으로서 중요한 역할을 담당하여 왔다(Kim *et al.*, 1998). 그렇지만 전통제조방법으로 발효시킨 청국장의 경우 공기나 짚에 있는 *Bacillus* 균주에 의해 발효가 되기 때문에 지역에 따라서 제조방법이나 이용 미생물이 동일하지 않아 균일한 품질을 가지는 제품의 수는 적다. 특히, 청국장 발효 시 이용되는 균주의 종류에 따라 품질이 달라지기 때문에 고품질의 청국장 생산을 위해서는 고기능의 미생물을 선별하여 사용하는 것이 무엇보다 중요하다(Park *et al.*, 2013).

청국장은 영양학적·생리학적 면에서 우수한 기능을 갖지만 발효 시 생성되는 이취와 바이오제닉 아민의 함량으로 인하여 그 소비가 제한되어지고 있다. 청국장의 이취는 단백질 함량이 높은 식품에서 발효미생물과 같은 미생물의 작용에 의

*For correspondence. E-mail: sinhye@korea.kr;
Tel.: +82-63-238-3027; Fax: +82-63-238-3845

해 생성되는 휘발성아민에 의해 야기되고, 바이오제닉 아민은 염기성 질소화합물로 일반적으로 아미노산을 전구체로 하여 탈카르복실화 되어 형성된다(Halász *et al.*, 1994; Silla Santos, 1996). 식품에서의 바이오제닉 아민의 형성은 냄새뿐만 아니라 건강에 영향을 끼친다(Suzzi and Gardini, 2003). 또한 혈압에 영향을 미치며 식품에 일정하고 이상이 있을 때 민간한 사람에게 알려지 반응을 일으키며, 편두통 및 장과 위에 문제를 일으킬 수 있다(Smith, 1980; Taylor, 1985; Stratton *et al.*, 1991). 최근 식품의 미생물에 의해 생성되는 바이오제닉 아민에 대한 연구(Bermúdez *et al.*, 2012)와 전통 장의 바이오제닉 아민의 저감화를 위한 연구(Kim *et al.*, 2012) 등이 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구를 통하여 청국장에서 균주를 분리하여 산업체에 제공할 수 있는 우수한 기능의 미생물을 선발하고자 하였다. 특히 전통발효방법으로 제조한 청국장에서 분리한 균주들의 안전성을 확보하기 위해 *B. cereus* 독소 유전자 유무 판별을 수행하였다. 또한 혈전용해능, 바이오제닉 아민 생성·분해능, 발효능, 관능평가, 휘발성아민 테스트를 진행하였다. 또한 발효한 청국장 대사물질을 확인하여 아미노산, 당, 유기산 등의 생성물질을 측정하였다.

재료 및 방법

청국장 시료로부터 균주 분리

전국 각지의 전통 발효방식을 사용하는 청국장 판매업체의 청국장을 수집하였으며, 비교균주를 얻기 위하여 특정 균주에 의해 발효된 시판 청국장 시료도 수집하였다. 또한 추가 비교 균주로서 KACC 16749 균주를 사용하였다. 청국장 시료에서 균주를 분리하기 위하여 청국장 시료를 0.85% saline buffer에 단계 희석한 다음, R2A agar (Difco)와 RAKA-RAY medium [77.1 g RAKA-RAY (OXOID), 10 mg Tween 80, 17 g Bacto agar (Difco), 1 L distilled water, 멸균 후 3 ml 2-phenyl ethanol, 1 ml cycloheximide 첨가]에 도말하여 28°C에서 1-2일 동안 배양하였다.

배양 후 육안으로 색과 형태가 다른 양상을 띠는 콜로니들을 R2A agar에서 28°C에서 1-2일간 배양하여 순수분리 하였다. 분리한 균주들을 TSA (Trypticase soy agar)[30 g trypticase soy broth (TSB; Difco), 15 g Bacto agar와 GSP [10 g sodium L-glutamate, 20 g soluble starch, 2 g potassium dehydrogen phosphate, 0.5 g magnesium sulfate, 0.36 g phenol red, 12 g Bacto agar에 균주를 접종하고 28°C에서 2일 동안 배양하여

점진물의 양, 끈적임, 냄새 등을 확인하여 균주를 선발하였다.

16S rRNA염기서열 분석

분리한 균주의 16S rRNA 염기서열을 증폭하기 위하여 genomic DNA를 추출(DNA purification kit, Promega)하여 Geno Tech Corp. (Genotech)사에 의뢰하여 일반 세균용 primer (Universal PCR primer) 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCT CAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 이용하였다. 16S rRNA 염기서열 분석을 위하여 ChunLab, Inc.에서 제공하는 Ezbiocloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)의 Blast Search 프로그램을 이용하여 분리균주 상동성을 비교하였다.

효소 생성능

Amylase 생성능 유무를 확인하기 위하여 R2A agar에 0.5% 가용성 전분(soluble starch)을 첨가하여 만든 평판배지에 균주를 접종한 다음 28°C에서 24시간 동안 배양하였다. Iodine 용액(3.3 g iodine crystal, 2.8 g potassium iodine, 1,000 ml distilled water)으로 배지를 염색 한 다음 starch 분해정도를 저지환(clear zone)을 통해 확인하였다. Cellulase의 경우 0.4% CMC (carboxymethyl cellulose)를 첨가한 R2A agar를 제조하여 균을 접종시킨 후 28°C에서 24시간 배양 후, 0.1% congo red 용액으로 염색하고 1 M NaCl로 세척 후 저지환을 확인하였다(Baek *et al.*, 2010). Protease 생성능은 2% Skim milk (Difco)와 3% Bacto agar를 멸균 후 섞어 배지를 제조한 후, 균주를 접종하여 28°C에서 24시간 배양 후 저지환을 확인하였다. Lipase의 경우 R2A agar 450 ml에 50 ml 혼합물[5 ml TBN (glycerol tributyrate), 1 ml 0.5 M CaCl₂, 2 ml 5 M NaCl, 2.5 g gum arabic (from acacia tree)]을 믹서를 이용하여 잘 섞어 준 후 121°C에 15분간 고압증기멸균기를 이용하여 멸균 후 섞어 고체배지를 만들고 균을 대치배양법으로 접종하여 저지환을 확인하였다(Baek *et al.*, 2010). Fibrinolytic능을 관찰하기 위하여 fibrin plate method법을 변형하여 측정하였다. 0.5% fibrinogen (0.067 M sodium phosphaste buffer)을 만든 후 37°C에서 30분간 완전히 녹인 후 1% thrombin을 첨가하여 분주하였다. 균은 배지에 균주를 접종하여 8시간 후 배지의 fibrin의 용해성을 확인하였다(Astrup and Mullertz, 1952).

독성유전자 검출

*B. cereus*의 독소유전자 non-hemolytic enterotoxin의 유전자 3종(*nheA*, *nheB*, *nheC*), hemolytic enterotoxin 유전자 2종

Table 1. The list of PCR primers (toxic genes of *B. cereus*) in this study

Primer pair	Sequence	Target sequence (GenBank accession no.)	Size (bp)	Annealing temp.
nheAF nheAR	ATATGCGCAAATGTAATTGCTCCA TGCCTTCTTCAACATTTGTTTGAATTT	Non-hemolytic enterotoxin, <i>nheA</i> (AY835995)	935	56°C
nheBF nheBR	GACCAGCAGGATCCCAGATGTAAT CCACGCCTTCATGTAATTTTTCTGT	Non-hemolytic enterotoxin, <i>nheB</i> (AY835995)	972	62°C
nheCF nheCR	ACCAGTAGCGACTTTTGCAAGTGAA TTTTGAGCTGCATTCTCAATATGCC	Non-hemolytic enterotoxin, <i>nheC</i> (AY835995)	930	62°C
hblAF hblAF	ACCAGTAGCGACTTTTGCAAGTGAA TTTTGAGCTGCATTCTCAATATGCC	Hemolytic enterotoxin, <i>hblA</i> (AY822584)	909	56°C
hblCF hblCR	ATCAATACTCTCGCAACACCAACTG ATGTGCTCGTTGCTCTGCTGTTAAT	Hemolytic enterotoxin, <i>hblC</i> (AY822584)	957	62°C
cytKF cytKR	CCGCTGTTTTTGCTAGTAGTGCTGT ACGCTCTTTACGTTGTTTCCAACCC	Cytotoxin K, <i>cytK</i> (DQ019311)	901	58°C
plcRF plcRR	CRGGYGCRGTATACCCAAGT TGAAATACCCCATGYCATYG	Phospholipase C regulatory protein <i>plcRpapR</i> (DQ153391)	888	58°C

(*hblA*, *hblC*), Cytotoxin K 유전자(*cytK*), 설사독소발현 전사 조절 단백질인 phospholipase C regulatory protein 의 유전자 (*plcRpapR*)를 이용하였다(Table 1). PCR의 조건은 94°C에서 2분간 초기변성 후, 94°C에서 1분간 변성, 56°C (*nheA*, *hblA*), 58°C (*cytK*, *plcRpapR*), 62°C (*nheB*, *nheC*, *hblC*)에서 각각 1분간 결합, 72°C 1분간 증폭과정을 30회 반복하고 마지막으로 72°C에서 5분간 증폭을 실시하였다(Kim et al., 2012). 증폭된 DNA 확인을 위하여 PCR 반응액 5 µl를 1.7% 아가로즈 젤을 이용하여 120 V에서 40분간 0.5× TAE 완충용액(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 전기영동하였다.

바이오제닉 아민 생성능 및 분해능 측정

바이오제닉 아민 생성능을 관찰하기 위하여 0.5% Histidine, 0.5% tyrosine, 0.006% cresol red을 첨가한 pH 5.3 Nutrient agar medium [Nutrient Broth (Difco), Bacto agar, distilled water]에 균주를 접종하여 28°C에서 24시간 후 합성배지색의 변화를 확인하였다(Kim et al., 2012). 바이오제닉 아민 분해능 측정하기 위하여 1% tyramine이 포함된 Nutrient broth에 균주를 접종한 다음 38°C에서 20일간 배양하였다. 배양 후, 1,300 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액 200 µl에 내부표준용액 2 M diaminoctane을 2 µl 첨가하였다. 300 µl Na₂CO₃ solution (100 mg/ml in water)와 800 µl dansyl chloride solution (7.5 mg/ml in acetone)을 첨가한 후 60°C에서 20분 동안 단실화하였다. 100 µl proline solution (50 mg/ml in water)을 첨가한 후 60°C에서 10분간 둔 후 5°C에서 냉각하였다. 마지막으로 100 µl toluene을 첨가하여 혼합한 후, 5분간 원심분리 한다

음 상층액을 이용하여 HPLC 분석을 수행하였다. Alliance e2695 HPLC system (Waters Co.)과 474 fluorescence detector (Waters Co.)를 사용하여 tyramine을 측정하였다. 칼럼은 X Bridge™ C18 (4.6 × 250 mm, 3.5 µm, Waters Co.) 사용하였다. 이동상은 A용매(water)와 B용매(acetonitrile)로 A:B=60:40, 0~35분; A:B=15:85, 35~54분; A:B=0:100, 54분; A:B=60:40, 55~60분과 같은 농도경사 조건과 유속 1 ml/min으로 수행하였다.

발효 청국장 이취 및 관능평가

청국장을 제조하기 위하여 수세한 국내산 대두(백태, 원주 신희농업협동조합) 200 g, 300 ml distilled water (대두의 1.5 배)를 121°C에서 20분 동안 증자시켰다. 품온 40°C를 유지시킨 10 g의 삶은 콩에 균주 배양액(1×10^9 CFU/ml) 250 µl을 혼합하여 40°C에서 72시간 배양 하였다. 상기의 방법으로 띄운 균주별 청국장의 발효상태, 이취, 맛 및 poly gamma glutamic acid (γ -PGA) 생성 정도를 확인하였다. 청국장을 실리콘 용기에 옮겨 1분간 진탕, 5분 대기 후, 검지관식 기체 측정기 (GASTEC, GV-100S)을 이용하여 실리콘 용기 내부 기체 50 ml 중 암모니아와 아민의 함량을 측정하기 위해 암모니아 검지관 (Ammonia; NH₃, No. 3L), 아민 검지관[Amines (Methylamine); R·NH₂ No.180]을 이용하였다.

¹H-NMR을 이용한 발효 청국장의 metabolite 분석

각 균주별 청국장의 동결건조분말 1 g을 600 µl deuterium oxide (D₂O, 99.9%)와 5 mM sodium-2,2-dimethyl-2silapentane-

5-sulfonate (DDS, 97%)에 용해시켰다. 원심분리 후 상층액을 NMR-용 tube에 옮겨 600 MHz NMR spectrometer (Avance 600, Bruker)를 사용하여 측정하였다. 대사산물의 동정과 농도는 Chenomx NMR suite program (ver. 7.7, Chenomx)를 이용하여 분석하였다(Jung *et al.*, 2011).

결과 및 고찰

청국장 시료로부터 분리된 균주의 효소활성

전국 각지의 전통 발효방식을 사용하는 청국장 판매업체의 청국장 시료로부터 균주를 분리하여 점진물의 양, 끈적임, 냄새 등 다양한 특성을 나타내는 균주 8균주(2RL2-3, JP-5, KJ-21, PJ-7, YD-6, SSJ-1, MH-1, KJ-10)를 선발하였고, 특정 균주로 발효시킨 시판 청국장시료로부터 비교균주로 사용할 1균주(Mpul-4)를 선발하였다(Table 2). 이들 분리 균주의 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 대부분이 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*인 것으로 나타났고 KJ-10 균주의 경우 *B. licheniformis*인 것으로 나타났다. 선발된 모든 균주는 amylase, cellulose, protease, lipase 분비능이 있는 것으로 관찰되었다. Amylase의 경우 발효시 장류의 단맛에, protease의 경우 대두의 단백질을 분해하여 체내 흡수를 용이하게 할 뿐만 아니라 청국장 특유의 감칠맛을 내는 아미노산으로 만들어 주는 역할을 한다. 피브린 플레이트에 균주를 놓고 37°C를 유지하면서 혈전분해능을 측정한 결과, SSJ-1과 MH-1을 제외한 모든 균주가 혈전용해능을 가지고 있는 것으로 나타났다. 특히 KJ-10과 KJ-21의 경우 환을 크게 형성하여 뛰어난 혈전용해능을 보였다(Fig. 1).

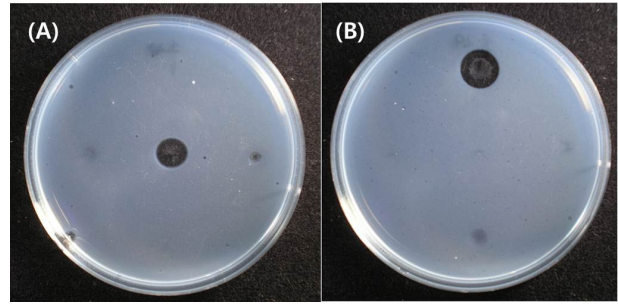


Fig. 1. Fibrinolysis activity of strains isolated from Cheonggukjang. Strains: (A) KJ-10; (B) KJ-21.

독성유전자 검출 결과

본 연구의 *Bacillus* 균주들은 식중독을 유발하는 *B. cereus*와 계통학적으로 가까울 뿐만 아니라 균주를 접종하는 방법이 아닌 전통발효방법으로 제조한 청국장에서 분리된 균주이므로, *B. cereus*의 독소유전자의 유무를 확인함으로써 실험균주의 안전성을 확보하고자 하였다. *B. cereus* 표준균주 KACC 11240를 대조균주로 사용하였다. 청국장에서 분리된 균주들에서 *B. cereus* 독소 유전자 7종(*nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *cytK*, *plcRpapR*) 모두 발견되지 않았다. 독소유전자 검출 유무 실험결과는 Fig. 2와 같다.

바이오제닉 아민 생성 및 분해능 결과

바이오제닉 아민의 생성이 적거나 없으며, 분해능이 높은 균주를 선발하기 위하여 histidine과 tyrosine, cresol red를 첨가한 검출배지를 이용하여 생성능을 확인하였다. 접종 균주가 amino acid decarboxylase를 생산할 경우 histidine과 tyrosine

Table 2. Enzyme activities, and production and degradation of biogenic amines of strains isolated from Cheonggukjang

Strain	Blast		Enzyme activity					Biogenic amine	
	Closest match	Similarity (%)	Amy.	Cel	Pro	Lip.	Fibrin.	Production	Degradation
Mpul-4	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610(T)	99.93	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)
KACC16749	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	99.93	+	(+)	(+)	+	-	(+)	(+)
2RL2-3	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610(T)	99.93	+	(+)	+	+	+	(+)	+
JP-5	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610(T)	99.92	+	-	+	+	+	-	+
KJ-21	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610(T)	99.93	+	(+)	+	+	+	(+)	+
PJ-7	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610(T)	99.92	+	(+)	+	+	(+)	(+)	+
YD-6	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610(T)	99.93	+	(+)	+	+	(+)	(+)	+
SSJ-1	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610(T)	99.86	+	+	+	+	-	+	(+)
MH-1	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610(T)	99.93	+	+	+	+	-	(+)	(+)
KJ-10	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580(T)	99.86	+	+	+	+	+	(+)	+

Symbols: -, negative activity; (+), weak activity; +, positive activity; Amy., amylase; Cel, cellulase; Pro., protease; Lip., lipase; Fibrin., fibrinolysis

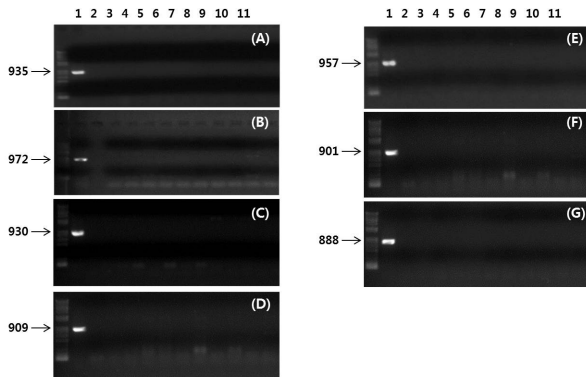


Fig. 2. Gel electrophoresis of PCR products for the detection of *B. cereus* toxin. Toxin primer: (A) *nheA*; (B) *nheB*; (C) *nheC*; (D) *hblA*; (E) *hblC*; (F) *cytK*; (G) *plcR-papR*. Lanes: 1, *B. cereus* KACC 11240; 2, Mpul-4; 3, KACC 16749; 4, 2RL2-3; 5, JP-5; 6, KJ-21; 7, PJ-7; 8, YD-6; 9, SSJ-1; 10, MH-1; 11, KJ-10.

이 각각 염기인 histamine과 tyramine으로 바뀌게 되면서 생기는 pH의 변화를 cresol red의 변색으로 확인 할 수 있다.

Tyramine 분해능을 HPLC를 이용하여 정량분석 하였다. 선발된 대부분의 균주가 tyramine 분해능이 있는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 전통적인 방법에서 제조한 청국장에서 분리된 균주인 YD-6, KJ-21, 2RL2-3, PJ-7, KJ-10 균주의 경우 특히 시판 청국장에서 분리한 균주(Mpul-4)와 비교균주 KACC 16749 균주에 비해 비교적 높은 tyramine 분해능을 보였다.

발효 청국장 이취 및 관능평가

선발균주의 관능평가 결과는 Table 3와 같다. 휘발성 염기 질소(volatile basic nitrogen)은 암모니아질소 트리메틸아민 등의 휘발성 아민의 총칭이다. 미생물의 효소작용에 의해 단백질이 분해되어 아미노산이 되고, 더 나아가 암모니아를 생성시키고, 또한 아미노산으로부터 탈카르복실화에 의하여 휘발성 아민류를 생성한다(Silla Santos, 1996). 휘발성 염기질소의 생성이 적은 청국장을 띄우는 균주를 선발하고자 선발된 균주로 제조한 청국장의 암모니아와 휘발성 아민을 검지관식

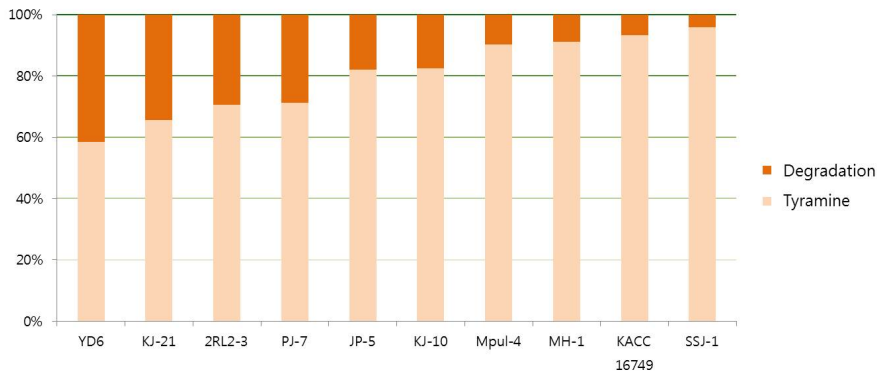


Fig. 3. Degradation of biogenic amine by the isolates.

Table 3. Results of off flavor, sensory test, and volatile basic nitrogen analysis of Cheonggukjang, which was fermented by selected *Bacillus* strains

Strain	Off flavor and sensory test			ppm/50 ml	
	Fermentation state	Flavor (Ammonia) and etc.	Taste (Bitters)	Ammonia	Amines
KACC16749	(+)	medium	low	5	16
Mpul-4	+	low	medium	118	5
2RL2-3	+	medium	medium	80	160
JP-5	+	medium	medium	5	8
KJ-21	+	>medium	medium	27	19
PJ-7	+	low	medium	5	10-15
YD-6	+	low	medium	5	10-15
SSJ-1	+	low	>medium	10	30
MH-1	+	>medium	medium	5	13
KJ-10	+	medium, (+)γ-PGA	low	2	4

Symbols: (+), weak activity; +, positive activity; >, excess

기체 측정기로 분석하였다. 대부분의 균주가 20 ppm/50 ml 이하로 암모니아 가스를 생성하는 것으로 나타났고, Mpul-4와 2RL2-3 균주의 경우 각각 118 ppm/50 ml과 80 ppm/50 ml로 높게 나타났다. 2RL2-3의 경우 아민 가스의 수치도 160 ppm/50 ml로 다른 균주에 비해 높게 나타나서 청국장을 발효하는데 사용하기 어려운 균주로 판단되었다. 실제 암모니아 냄새가 나는 정도와 쓴맛의 정도가 기체 측정기로 분석한 결과와 차이가 있어, 검지판식 기체 측정기의 수치가 낮은 균주를 선택하여 metabolite 분석에 사용하였다.

발효 청국장의 metabolite 분석 결과

균주가 청국장의 맛과 향, 영양성분 및 유용성분의 생산 등 청국장의 품질에 미치는 영향을 규명할 목적으로 아미노산, 당, 유기산 등을 비교하였다(Table 4).

단백질을 구성하는 일반 아미노산 중 8개의 필수아미노산에서 식품에 가장 적게 함유된 아미노산을 제한아미노산이라고 한다. 콩의 제한아미노산 즉 부족한 아미노산은 methionine과 cysteine이다. 본 연구에서 사용한 대두의 경우 삶은 콩에서는 methionine과 cysteine이 적은 양이라 확인되지 않았다. 하지만 청국장 발효가 진행된 다음 콩 단백질의 대사가 진행됨에 따라 methionine과 cysteine의 양이 증가되었다. 아미노산 대사 작용을 살펴보면 cysteine과 cystine은 methionine의 생성에, serine과 glycine은 cysteine의 생성에 상호변환이 된다. 삶은 콩에서 235 $\mu\text{mol/g}$ 의 cystine은 대부분의 균주에 의해 줄어들었고 SSJ-1, KJ-10 균주로 발효한 청국장에서는 발견되지 않았다. 삶은 콩에서 serine은 1648.7, glycine은 995.1 $\mu\text{mol/g}$ 의 함량으로 존재했다. 발효 후 serine은 대부분 감소하였다. Glycine도 대부분 줄어들었고 특히, YD-6 균주로 발효시킨 청국장에서는 확인되지 않은 결과를 봤을 때, methionine은 cystine에서, cysteine은 serine과 glycine에서 대사되어진 것으로 사료되어진다. 따라서 청국장은 콩의 제한아미노산을 포함한 필수 아미노산을 모두 포함하고 있어 영양학적으로 중요한 의의가 있다고 생각된다. Arginine의 함량이 삶은 콩보다 청국장에서 감소된 것은 아미노산의 Maillard 반응이 진행되어 감소한 것으로 보인다. 아미노산이 내는 맛들이 어우러져 복합적인 청국장 특유의 맛을 형성하게 되는데, 감칠맛을 내는 주요 아미노산은 aspartate, glutamate, glycine, lysine, tyrosine, betaine이고, 단맛을 내는 성분은 alanine, lysine, glycine, proline, serine, threonine, tyrosine, 쓴맛을 내는 아미노산은 arginine, leucine, isoleucine, valine, histidine으로 알려져 있다(Yang *et al.*, 1992). 본 연구의 청국장에서는 glutamate, leucine, serine의 함량이 높게 측정되었다. 된장 맛에 대한 기

여도는 leucine, isoleucine과 같은 쓴맛 성분이 가장 큰 영향을 미치고, 다음으로 glutamate, cystine, aspartate와 같은 구수한 맛의 아미노산이 영향을 미친다고 보고한 연구(Yang *et al.*, 1992)와 비교했을 때, 구수한 맛을 내는 glutamate와 쓴맛의 leucine이 어우러져 청국장의 주요 맛을 형성하는 것으로 보이고, 청국장의 발효기간이 된장보다 짧다는 점을 고려했을 때, 단맛 또한 청국장의 맛에서는 중요하며 이처럼 다양한 맛의 아미노산이 복합적으로 어우러져 청국장 특유의 맛을 보이는 것으로 사료되어진다.

청국장 중의 유리당은 청국장의 단맛인자로 작용하는데 청국장 발효과정 중에 원료콩의 전분질로부터 *B. subtilis* 등의 미생물이 분비하는 효소작용으로 가수분해되어 생성된다(Kim *et al.*, 1998). 삶은 콩에서 12,010.7 $\mu\text{mol/g}$ 으로 가장 높은 함량을 보인 sucrose가 청국장 발효 후에는 확인이 되지 않거나, 대부분 30 $\mu\text{mol/g}$ 이하의 함량을 보였다. 이처럼 amylase 활성이 높은 균은 발효 초기에 starch와 같은 고분자를 분해하여 당의 함량이 증가하지만, 발효가 진행 될수록 알코올 발효, 유기산 발효의 기질로 당의 이용률이 높아지기 때문에 청국장에 있는 당의 함량이 줄어들게 되고, 발효의 속도는 균주마다 차이를 보여 청국장의 당의 함량에 차이를 보이게 되는 것으로 사료되었다.

유기산 또한 대사작용이나 미생물의 에너지로 이용이 상이하기 때문에 청국장에서 함량에 차이를 보인다. 삶은 콩에서는 비 휘발성 유기산인 citrate가 1831.9 $\mu\text{mol/g}$ 으로 가장 높은 함량을 보였고 그 다음으로 휘발성 유기산인 acetate가 922.5 $\mu\text{mol/g}$ 의 함량을 보였다. 청국장에서 대체로 acetate와 isovalerate가 높은 함량을 보였고, KJ-10에 의한 청국장만 succinate가 가장 높은 함량을 보였다. 삶은 콩에서 높았던 citrate는 청국장에서는 현저히 줄었거나 KJ-21 균주로 발효시킨 청국장에서는 확인할 수 없었다. 일본의 낫토 균주에 대한 연구결과(Sulisttyo *et al.*, 1988)에서 원료콩에서 가장 높은 함유량을 보였던 citrate가 낫토 발효과정 중에 acetate로 대사되어 낫토에는 적은 양이 존재하고 acetate는 iso-butylate, iso-valerate, malate 등의 발효산물로 생성된다는 보고와 비슷한 결과를 보였다.

적 요

좋은 청국장을 발효하는 균주를 선발하기 위하여 청국장 시료로부터 8개의 균주를 선발하였다. 이들 중 7균주는 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*와 99.9% 이상의 가장 높은 16S

Table 4. Analysis of amino acids, sugar and organic acids of Cheonggukjang, which was fermented by selected *Bacillus* strains

Compound	μmol/g dry Cheonggukjang										
	Control	Mpul-4	KACC 16749	JP-5	KJ-21	PJ-7	YD-6	SSJ-1	MH-1	KJ-10	
Amino acid	alanine	224.7	122.39	84.26	55.67	67.96	28.91	108.32	15.3	40.43	28.93
	arginine	597.7	-	70.56	62.62	80.59	66.32	66.15	62.64	81.52	60.4
	asparagine	89.7	62.14	-	-	61.97	-	-	-	77.16	13.02
	aspartate	320.6	192.51	70.93	104.21	132.28	84.22	46.88	-	190.63	27.98
	cysteine	-	102.4	40.41	119.52	106.6	37.82	55.26	-	95.12	20.16
	glutamate	670.7	780.73	332.04	579.25	801.32	339.48	260.01	114.22	787.89	287.79
	glutamine	121.3	92.75	54.98	59.67	67.95	165.61	114.79	32.74	57.28	37.93
	glycine	995.1	161.51	65.38	101.46	223.87	103.72	-	32.57	176.65	47.34
	histidine	-	23.65	49.2	32.24	224.21	22.97	12.68	1.56	38.93	9.9
	iso-leucine	43.8	206.21	115.78	132.36	354.7	107.57	76.97	13.75	195.51	42.99
	leucine	123.4	547.32	332.8	334.15	815.92	341.56	270.62	35.75	324.78	145.35
	lysine	150.9	407.39	143.45	278.99	472.13	195.26	163.39	9.09	403.63	132.87
	methionine	-	110.65	54.57	76.27	143.78	65.59	51.81	5.9	93.7	23.97
	phenylalanine	41.4	289.43	123.66	278.02	344.29	190.29	74.69	7.87	239.39	59.52
	proline	-	202.35	29.69	180.57	312.38	31.23	33.39	109.4	131.11	23.49
	serine	1648.7	266.85	280.03	256.05	409.59	216.22	335.38	146.23	267.31	302.49
	threonine	181.3	29.27	33.58	60.02	41.32	12.42	24.18	197.16	76.33	34.38
	tryptophane	123.4	47	24.79	53.06	46.99	36.09	15.94	10.27	46.52	1.54
	tyrosine	46.4	212.62	86.68	161.61	297.76	133.52	77.8	11.57	202.5	46.29
	valine	59.5	310.96	199.92	224.14	495.03	141.46	173.86	11.69	304.59	60.85
betaine	9	38.48	17.06	69.94	67.01	31.88	14.8	7.8	88.4	30.4	
cystine	235	23.07	-	42.01	30.26	21.71	2.37	-	31.25	-	
pyroglutamate	-	79.25	76.68	57.83	66.73	121.91	52.95	16.09	78.54	52.47	
saccharopine	375.9	-	28.08	17.95	166.23	131.9	74.61	7.06	140.44	-	
β-alanine	-	-	12.67	25.69	19.35	17.64	14.29	-	16.85	18.04	
Sugar	arabinose	-	-	129.87	114.45	278.02	80.65	114.09	65.2	116.48	60.95
	fructose	-	-	23.45	72.36	84.44	30.49	83.71	141.81	-	81.8
	galactose	-	71.12	122.42	58.04	139.24	-	41.72	-	42.27	70.95
	glucose	94	-	54.11	30.19	30.51	16.15	6.71	14.84	43.33	-
	maltose	475	-	-	45.69	29.47	3.76	-	-	8.7	-
	sucrose	12010.7	9.03	-	26.42	21.78	3.34	22.03	0	7.53	14.11
	lactose	200.1	95.96	20.39	14.55	6.96	23.95	50.33	30.63	47.76	66.22
	mannose	107.1	23.17	8.9	-	35.93	27.09	-	-	17.46	-
	trehalose	14.3	50.24	-	4.48	9.78	-	9.43	9.11	7.09	-
fucose	-	52.79	19.94	38.01	-	13.5	36.92	28.27	31.77	11.55	
Organic acid	formate	49.9	-	1.86	1.55	-	-	1.07	0.83	1.41	1.08
	fumarate	-	1.42	-	-	1.19	-	1.33	2.81	-	1.56
	lactate	-	25.12	60.75	-	121.97	67.29	39.88	-	29.8	19.21
	methylsuccinate	-	-	-	13	20.96	31.69	19.72	3.45	-	4.71
	succinate	10.9	13.06	142.05	33.58	72.03	66.29	111.03	145.4	108.14	271.81
	tartrate	254.2	-	54.54	49.89	65.9	38.41	47.16	32.42	33.71	32.26
	pyruvate	71.3	-	31.22	78.15	164.65	45.56	20.6	24.13	38.56	30.84
	citrate	1831.9	15.06	-	16.85	-	12.71	13.21	48.41	18.71	10.49
	acetate	922.5	774.79	933.2	94.25	79.41	457.88	441.45	266.14	453.17	145.9
	butyrate	-	-	48.5	24.76	30.85	27.27	75.39	14.42	23.46	18.01
	iso-valerate	127.5	258.71	69.4	416.85	233.11	150.87	108.55	16.61	211.36	64.52
	malate	539.3	-	-	50.54	49.63	-	-	-	35.7	42.14
	ferulate	-	-	-	6.62	-	1.93	-	-	65.43	-
	phenylacetate	137.5	23.21	17.48	24.03	22.29	18.49	-	8.06	31.32	9.09
	malonate	535.7	53.34	15.88	45.69	-	32.06	96	39	33.68	11.85

Symbols: -, undetected; Control is boiled soybeans.

rRNA 유사도를 보였고, 한 균주는 *B. licheniformis*와 높은 유사도를 보였다. 선발 균주의 효소 생성을 분석한 결과 모든 균주에서 amylase, cellulase, protease 그리고 lipase 활성을 보였고, 6균주에서 혈전용해능을 보였다. 또한 전통방법으로 제조한 청국장장에서 분리한 균주들의 안전성을 확보하고자 분리균주와 계통학적으로 가까운 *Bacillus cereus*의 독소유전자 7종의 유무를 확인한 결과 모든 선발균주에서 독소유전자 7종을 가지고 있지 않았다. 선발 균주 중 8균주에서 histamine과 tyramine의 생성이 없거나 최소한의 생성을 보였고, HPLC를 이용한 바이오제닉 아민 분해능 분석 결과 대부분의 균주가 tyramine 분해능을 보였다. 선발된 균주로 발효한 청국장의 발효능, 관능, 휘발성염기질소 생성을 확인 하여 7균주가 좋은 품질의 청국장을 만드는 것으로 확인되었고, 이들 선발된 균주로 만든 청국장의 metabolic profile을 분석하였다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01124802)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

References

- Astrup, T. and Mullert, Z. 1952. The fibrin palte method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
- Back, H.I., Kim, S.R., Yang, J.A., Kim, M.G., Chae, S.W., and Cha, Y.S. 2011. Effects of Chungkookjang supplementation on obesity and atherosclerotic indices in overweight/obese subjects: a 12-week, randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *J. Med. Food* **14**, 532-537.
- Baek, S.Y., Yun, H.J., Choi, H.S., Koo, B.S., and Yeo, S.H. 2010. Isolation and physiological characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from Korean traditional soybean sauce and soybean paste. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 379-384.
- Bermúdez, R., Lorenzo, J.M., Fonseca, S., Franco, I., and Carballo, J. 2012. Strains of *Staphylococcus* and *Bacillus* isolated from traditional sausages as producers of biogenic amines. *Front Microbiol.* **3**, 1-6.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., and Holzapfel, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* **5**, 42-49.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.W., Hahn, Y., Madsen, E.L., and Jeon, C.O. 2011. Metagenomic analysis of Kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2264-2274.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Lee, H.J., and Jeon, C.O. 2013. Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot, traditional Korean salted seafood. *Food Microbiol.* **34**, 360-368.
- Kim, H.B., Lee, H.S., Kim, S.J., Yoo, H.J., Hwang, J.S., Chen, G., and Youn, H.J. 2007. Ethanol extract of fermented soybean, Chungkookjang, inhibits the apoptosis of mouse spleen, and thymus cells. *J. Microbiol.* **45**, 256-261.
- Kim, Y.S., Jeong, J.O., Cho, S.H., Jeong, D.Y., and Uhm, T.B. 2012. Antimicrobial and biogenic amine-degrading activity of *Bacillus licheniformis* SCK B11 isolated from traditionally fermented red pepper paste. *J. Microbiol.* **48**, 163-170.
- Kim, N.Y., Song, E.J., Kwon, D.Y., Kim, H.P., and Heo, M.Y. 2008. Antioxidant and antigenotoxic activities of Korean fermented soybean. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 1184-1189.
- 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. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 377-383.
- Park, S.Y., Bang, M.A., Oh, B.J., Park, J.H., Song, W.S., Choi, K.M., Choung, E.S., Boo, H.O., and Cho, S.S. 2013. Fermentation and quality characteristics of *Cheonggukjang* fermented with *Bacillus subtilis* BC-P1. *Kor. J. Microbiol.* **49**, 262-269.
- Silla Santos, M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 231-231.
- Smith, T.A. 1980. Amines in food. *Food Chem.* **6**, 169-200.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W., and Taylor, S.L. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Prot.* **54**, 460-470.
- Sulistyo, J., Taya, N., Funane, K., and Kiuchi, K. 1988. Production of Natto starter. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **35**, 278-283.
- Suzzi, G. and Gardivi, F. 2003. Biogenic amines in fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 41-54.
- Taylor, S.L. 1985. Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. *Geneva: World Health Organization, WPH/FOS.* **85**, 1-47.
- Yang S.H., Choi, M.R., Kim, J.K., and Chung, Y.G. 1992. Characteristics of the taste in traditional Korean soybean paste. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**, 443-448.
- Yoo, H.J., Lee, D.S., and Kim, H.B. 2004. Chungkookjang fermentation of mixture of barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 49-53.