

Changes of physicochemical properties of *Cheonggukjang* prepared with various soybean cultivars and *Bacillus subtilis* HJ18-9

Na-Young Gil, Jin Song, Jeong Seon Eom, Shin-Young Park, Hye-Sun Choi*
Fermented Food Science Division, Department of Agrofood Resources, NAAS, RDA, Wanju 55365, Korea

장류용 주요 콩품종 및 *Bacillus subtilis* HJ18-9 균주에 따른 청국장의 품질특성 변화

길나영 · 송진 · 엄정선 · 박신영 · 최혜선*
농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과

Abstract

The purpose of this study was to investigate changes in the amino acid content and physicochemical properties of *Cheonggukjang* prepared by using various soybean cultivars (*Daewon*, *Deapung*, *Seadanbeak*, and *Taekwang*) and a functional microorganism (*Bacillus subtilis* HJ18-9). These soybeans were conventional *Cheonggukjang* (control) and *Cheonggukjang* fermented with *Bacillus subtilis* HJ18-9 (treated). The moisture contents of steamed, control, and treated soybean were 62.45~67.12%, 63.28~67.14%, and 64.50~66.87%; amino-type nitrogen contents were 6.53~24.25 mg%, 27.63~122.09 mg%, and 37.29~133.48 mg%; and ammonia-type nitrogen contents were 26.92~47.95 mg%, 45.45~156.36 mg%, and 28.02~121.13 mg%, respectively. The umami taste associated with several amino acids (aspartic acid and glutamic acid) in *Cheonggukjang* was lower than that for steamed soybeans, while the bitter taste from amino acids (methionine, valine, isoleucine, leucine, and phenylalanine) was higher than that for steamed soybeans. The result of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis showed that the molecular weight of steamed soybeans was less than 100 kDa, while control and treated groups showed low molecular weights below 34 kDa, confirming their protein hydrolysis to small molecular weight. These results are information for developing functional fermented soybean paste and diversification using soybean cultivars.

Key words : soybean cultivars, *Cheonggukjang*, amino acid, fermentation

서론

대두는 단백질을 40%정도 함유하고 있어, 오랜 세월동안 쌀 위주의 식생활을 해온 한국인의 식생활에 양질의 단백질 공급원으로 이용되어져 왔다(1). 탄수화물과 지방함량은 각각 30, 20%정도로 아미노산 및 지방산의 조성이 우수한 것으로 알려져 있으며, 기능성 물질로 isoflavones, phytic acid, saponins, trypsin inhibitor 등이 있다(2). 이러한

대두는 소화흡수율과 영양을 높이기 위해 두부나 장류처럼 가공하거나 발효하여 섭취해 왔으며(3), 콩의 품종에 따른 청국장에 관한 연구는 발효방법 및 대두품종을 달리한 청국장의 향기성분(4), 검은 콩 품종에 따른 청국장의 항산화능 및 혈전용해능(5), 콩 품종별 청국장의 가공적성 구명(6) 등 다양한 연구가 진행되어져 왔다.

청국장은 콩을 원료로 한 발효식품으로 *Bacillus* 속 등의 미생물 유래 효소작용으로 고분자의 단백질이 펩타이드 그리고 아미노산으로 분해되어 특유의 풍미를 갖게 되며, 소금을 첨가하지 않은 상태로 단기간 발효하기 때문에 소금의 과잉섭취를 줄일 수 있는 식품이다(7). 청국장의 기능성 연구는 고혈압 방지, 지질대사 개선, 혈전 용해능, 항돌연변이, 항암성, 항산화성 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(8,9). 청국장 이용 상품화 기반연구는 청국장 첨가 카

*Corresponding author. E-mail : choih9587@korea.kr
Phone : 82-63-238-3624, Fax : 82-63-238-3843
Received 26 September 2016; Revised 11 November 2016;
Accepted 16 November 2016.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

스텔라(10), 청국장 분말 첨가 두부(11), 울무 청국장 분말 첨가 쿠키(12) 등이 있으며, 당귀·지황·홍삼을 첨가한 청국장(13), 홍삼을 이용한 청국장(14)과 같이 청국장에 기능성 소재를 첨가 하여 효능을 강조한 연구가 진행되고 있다. 또한 청국장 점질물에 관한 연구(15), 숙성중의 향기성분에 관한 연구(16), 균주를 달리한 청국장 제조(17,18)에 관한 연구 등 많은 연구가 진행되고 있다. 청국장의 일반적인 품질특성 연구는 많이 진행된 반면 품종별 청국장 가공적성이나 맛에 관여하는 요소에 대한 연구가 부족한 실정이다. 대풍, 태광, 대원콩은 장류용으로 이용되고 있으며, 새단백은 두부와 같은 가공용으로 사용되고 있다. 본 연구는 장류 및 가공용 주요 콩품종 및 유용발효미생물인 *Bacillus subtilis* HJ18-9를 starter로 사용한 청국장의 이화학적 특성과 맛에 관여하는 아미노산 및 유기산 구성을 비교하여 청국장의 품질을 향상시키는데 필요한 기초자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 청국장제조

본 실험에서 사용한 콩은 장류용으로 대원콩, 대풍콩, 새단백콩 및 태광콩(농협하나로마트, 수원) 4개 품종을 사용하였고, 발효 균주로는 선행연구에서 선발된 메밀 속성장 유래 혈전 용해능과 항균활성이 뛰어난 저염양성 *B. subtilis* HJ18-9를 starter로 사용하였다(19).

청국장은 콩을 정선, 선별 및 세척 후 실온에서 24시간 침지하였고, autoclave(VS-1321-100, Vision Sci. Co., Seoul, Korea)를 이용하여 증자(121°C, 50 min) 하였다. 증자된 콩을 40°C이하의 온도로 방냉 한 후, 액체배지에 전배양된 *B. subtilis* HJ18-9(600 nm, OD 0.5)를 원심분리(8,000 rpm, 10 min)하여 동일한 양의 saline용액으로 재현탁 한 후, 1% (w/w, 10⁶ CFU/mL)의 농도로 접종하여 발효(37°C, 48 hr) 하였다.

수분 측정

수분함량은 AOAC 법(20)에 따라 105°C 상압건조법에 의해 분석하였다. 시료 2 g을 105°C Dry oven(MOV-112, Sanyo Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 함량이 될 때까지 건조시켜 백분율로 나타내었다.

아미노태 질소(NO₃-N) 측정

원료콩 및 청국장의 아미노태 질소함량은 Fomol 적정법(21)을 이용하여 측정하였다. 시료 10 g에 증류수를 10배 가하여 1분 동안 균질화(Homogenizer, Polytron PT-MR 2100, Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) 한 후, 1시간동안 교반하여 원심분리(8,000 rpm, 10 min, supra 25k, Hanil

Co., Ltd., Incheon, Korea)한 상층액을 시료로 사용하였다. 시료 5 mL에 중성 formalin 용액 10 mL과 증류수 10 mL을 넣은 본 시험과 시료액 5 mL에 증류수 20 mL을 넣은 공시험에 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 8.4로 중화적정하여 아미노태 질소 함량을 산출하였다.

암모니아태 질소(NH₄-N) 측정

원료 콩 및 청국장의 암모니아태 질소함량은 Lee 등(22)의 방법에 따라 측정하였다. 시료액의 0.1 mL에 A용액과 B용액을 각각 2 mL씩 넣고 반응(37°C, 20 min) 한 후, microplate reader(Biotek Synergy Mx, Biotek Instruments, Winooski, VT)를 사용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였으며, (NH₄)₂SO₄를 사용하여 작성한 표준곡선을 이용 암모니아태 질소함량을 산출하였다.

A solution: phenol 10 g and sodium nitroprusside dehydrate 0.05 g in distilled water 1,000 mL

B solution: Na₂HPO₄·12H₂O 9 g, NaOH 6 g and NaOCl 10 mL in distilled water 1,000 mL

유리아미노산 함량 측정

유리아미노산은 Kim 등(23)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 5 g에 70% 에탄올 100 mL을 가하여 균질화한 후, 진탕추출(180 rpm, 30 min, SK-71 Shaker, Jeio Tech, Kimpo, Korea) 하였다. 추출액은 원심분리(8,000 rpm, 10 min)하여 상등액을 취하고 남은 잔사에 70% 에탄올 50 mL을 넣어 재추출한 후 진탕, 원심분리를 반복하여 상층액 모두 합하여 rotary vacuum evaporator(Rotavapor R-205, BUCHI, Flawil, Switzerland)로 감압농축하였다. 농축액은 70% 에탄올을 첨가하여 50 mL로 정용하여 시료 용액으로 사용하였다. 시료 용액은 0.45 µm의 syringe filter로 여과하여 Waters사의 AccQ-Tag Amino Acid Analysis 방법에 따라 유도체화하였다. 여과액 10 µL에 AccQ-Fluor Borate Buffer 70 µL를 넣고 잘 혼합한 후, AccQ-Fluor Reagent 20 µL를 가하여 혼합한 다음에 상온에서 1분간 방치하였다. 이를 Heating Block을 이용하여 55°C에서 10분간 가열한 후에 Acquity UPLC® system(Waters, Milford, MA, USA)에 주입하여 Column(AccQ-TagTM UltraColumn 2.1×100 mm), Column temp.(55°C), Injection volume(1.0 µL), Flow rate(0.7 mL/min), Mobile phase(A, Eluent A; B, Eluent B), Detection (UV 260 nm)의 조건으로 분석하였다.

유기산 측정

유기산은 In 등(24)의 방법에 따라 측정하였다. 시료액을 취해 0.45 µm membrane filter를 이용하여 여과한 후 여액을 HPLC(NANOSPACE SI-2, Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 column(Unison UK-C18(250×4.6 mm, 3 µm)),

detector(PDA 214 nm), mobile phase(25 mM KH₂PO₄ pH 2.5), flow rate(700 μ L/min), injectin volume(20 μ L) 와 같은 조건으로 분석하였다.

단백질 분해 패턴 분석

단백질 분해 패턴 분석은 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide(SDS-PAGE)분석을 실시하였다. 시료액에 SDS-PAGE용 sample buffer(0.05 M Tris-HCl [pH 6.8], 10% glycerol, 0.2% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 0.1% bromophenolblue)를 첨가한 후, 가열(100°C, 5 min)하여 단백질 변성을 유도한 후 전기영동을 하였다. Sample buffer에 녹은 단백질을 12% separating gel로 이루어진 disc SDS-PAGE mini-gel(BioRad, Hercules, CA, USA)에 시료를 넣고 전기영동(100 V, 90 min) 하였다. 전기영동이 끝나면 gel에 분리된 단백질 bands를 coomassie brilliant blue(CBB)로 염색하고 coomassie brilliant blue destaining 용액으로 탈색하여 단백질 분해 패턴을 분석하였다.

총균수 측정

생균수 측정은 청국장 1 g을 멸균생리식염수로 단계 희석하고 plate count agar(Difco Lab. Detroit, MI, USA) 평판배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양시킨 후 나타난 colony를 계수하여 총균수를 측정하였다.

통계 분석

실험결과는 3회 반복으로 측정하였으며, 평균치간의 유의성 검증은 SPSS system(Statistical Pack-age for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) soft-ware package (version 12)를 이용, p<0.05수준으로 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

수분함량

수분함량은 Table 1에 나타내었다. 원료콩의 경우 62.45~67.12%의 범위였으며, 품종별 수분함량은 대풍, 태

Table 1. Moisture content of soybean and *Chunggukjang* prepared with various soybean cultivars

%	A ¹⁾	B	C	D
a ²⁾	64.04±0.23 ^{Bb3)}	67.12±0.11 ^{Aa}	62.45±0.29 ^{Cb}	67.00±0.67 ^{Aa}
c	66.34±0.48 ^{ABa}	64.94±0.87 ^{Bb}	63.28±0.77 ^{Cab}	67.14±0.95 ^{Aa}
t	66.87±0.61 ^{Aa}	64.57±0.30 ^{Bb}	64.50±0.89 ^{Ba}	64.67±0.29 ^{Bb}

¹⁾A, Daewon; B, Deapung; C, Seadanbeak; D, Taekwang.

²⁾a, soybean; c, conventional *Chunggukjang*; t, *Chunggukjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-9.

³⁾Any means in the same column (A-B) or row (a-d) followed by different letters are significantly (p<0.05) different by Duncan's multiple range test.

광, 대원, 새단백 순으로 높게 나타났다. stater를 첨가하지 않은 전통방법으로 제조한 청국장(청국장c)과 starter를 첨가하여 제조한 청국장(청국장t)의 수분함량은 63.28~67.14%와 64.50~66.87%로 나타났다. 전통청국장(25)의 수분함량은 평균 57.0±3.1%로 보고된 바 있으며, 발아시킨 콩으로 제조한 청국장(26)의 경우 64.2%, 65.0%로 본 시료와 유사하였다. 이는 청국장의 증자 후, 방냉과정과 발효조건에 따라 차이를 보이는 것으로 보인다.

아미노태 질소 함량

아미노태 질소함량은 Table 2에 나타내었다. 원료콩(a)의 경우 6.53~24.25 mg%로 대원, 새단백, 대풍, 태광의 순서로 나타났다. 청국장 c는 27.63~122.09 mg%, 청국장 t는 37.29~133.48 mg% 범위를 나타내었다. 그 중 새단백으로 제조한 청국장의 아미노태 질소함량이 가장 높은 값을 나타내었고 태광, 대풍, 대원으로 제조한 청국장 순서로 나타났다. 새단백은 단백질 함량이 48%이상으로 일반 콩(40%)보다 많은 단백질을 함유하고 있다. 청국장(t)의 경우 청국장(c)보다 높은 아미노태 질소 값을 나타내어, 미생물 유래 단백질 분해효소로 인해 대두 단백질이 가수분해 되어 아미노산으로 더 많이 분해된 것을 알 수 있었다(27). 볏짚을 이용한 청국장 연구(28)에 따르면 48시간 발효한 청국장의 경우 169.8 mg%로 본 시료와 차이를 보였다. 이는 보통 볏짚에는 *Bacillus* 뿐만 아니라 다양한 유산균 등 다양한 균이 분포되어 있고, 존재하는 미생물의 양에 따라 다른 발효양상을 보인 것으로 생각된다. 우수한 starter가 단백질이 풍부한 발효원이 접종되면, 발효효율 및 유용성분이 많아질 것으로 사료된다.

Table 2. Amino-type nitrogen content of soybean and *Chunggukjang* prepared with various soybean cultivars and *B. subtilis* HJ18-9

mg%	A ¹⁾	B	C	D
a ²⁾	7.46±4.27 ^{Bc3)}	24.25±1.61 ^{Ac}	12.13±4.28 ^{Bc}	6.53±4.27 ^{Bc}
c	27.63±5.53 ^{Cb}	36.16±2.80 ^{Cb}	122.09±4.94 ^{Ab}	47.45±5.51 ^{Bb}
t	37.29±1.33 ^{Da}	45.66±7.19 ^{Ca}	133.48±2.78 ^{Aa}	74.64±0.18 ^{Ba}

¹⁾A, Daewon; B, Deapung; C, Seadanbeak; D, Taekwang.

²⁾a, soybean; c, conventional *Chunggukjang*; t, *Chunggukjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-9.

³⁾Any means in the same column (A-B) or row (a-d) followed by different letters are significantly (p<0.05) different by Duncan's multiple range test.

암모니아태 질소 함량

암모니아태 질소함량은 Table 3와 같다. 원료콩의 경우 26.92~47.95 mg%의 범위였으며, 대원, 새단백, 태광, 대풍 순이었다. 청국장 c는 45.45~156.36 mg%, 청국장 t는 28.02~121.13 mg%로 나타났다. 그 중 새단백이 가장 높은 값을 나타내었고 대원, 태광, 대풍으로 제조한 청국장순으로 낮은 값을 나타내었다. 아미노태 질소와는 반대로 청국

장 c의 경우, 청국장 t보다 낮은 암모니아태 질소함량을 나타내어, 청국장 c는 단백질의 과도한 분해로 인해 더 많은 암모니아태질소를 생성하여 품질을 저하시킨 것을 알 수 있었다(29). 장류발효 균주를 이용한 청국장(30)에 따르면 암모니아태가 63~154 mg%를 나타내어 본 실험과 유사한 것을 알 수 있었다. 자연발효에 의한 발효의 경우, 다양한 미생물이 발효에 관여하게 되는 반면, 균을 접종한 경우, 접종된 균주가 우점종이 되어 단일 미생물분포를 나타내고, 이러한 미생물분포는 청국장 품질특성에 각각 다른 영향을 미치게 된다.

Table 3. Ammonia-type nitrogen content of soybean and Chungjukjang prepared with various soybean cultivars and *B. subtilis* HJ18-9

mg%	A ¹⁾	B	C	D
a ²⁾	47.95±8.91 ^{Ac3)}	26.92±1.12 ^{Cb}	47.36±0.99 ^{Ac}	36.44±1.75 ^{Bb}
c	117.79±7.43 ^{Ba}	45.45±1.86 ^{Ca}	156.36±6.45 ^{Aa}	54.57±4.48 ^{Ca}
t	67.18±4.73 ^{Bb}	28.02±0.91 ^{Db}	121.13±6.43 ^{Ab}	40.19±1.26 ^{Cb}

¹⁾A, Daewon; B, Deapung; C, Seadanbeak; D, Taekwang.

²⁾a, soybean; c, conventional Chungjukjang; t, Chungjukjang fermented with *B. subtilis* HJ18-9.

³⁾Any means in the same column (A-B) or row (a-d) followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

유리 아미노산 함량

유리아미노산 함량 측정결과는 Table 4에 나타내었다. 원료콩과 청국장 c에서는 glutamic acid가 높은 함량을 보였고, 청국장 t 중에서 대원콩(7.85±0.51 mg%)과 대풍콩(11.14±0.63 mg%)으로 제조한 청국장에서는 phenylalanine, 새단백(20.21±0.56 mg%)과 태광콩(10.04±0.49 mg%)으로 제조한 청국장에서는 glutamic acid이 높은 함량을 나타내었다. 감칠맛과 쓴맛에 관여하는 주요 아미노산의 프로파일을 Fig. 1 및 Fig. 2에 나타내었다. 감칠맛(glutamic acid 및 aspartic acid)의 양은 새단백의 경우, 원료콩(13.82±0.34 mg%), 청국장c(31.83±0.31 mg%), 청국장 t(20.71±0.60 mg%)으로 원료콩 보다 발효 시, 감칠맛 성분이 증가하였으며, 대원, 대풍, 태광의 경우, 원료콩 및 청국장 상태에서 큰 차이를 보이지 않았다. 쓴맛(valine, methionine, isoleucine, leucine 및 phenylalanine)은 콩보다 청국장에서 많은 양이 검출되어 균이 생성하는 단백질 분해 효소에 의해 단백질이 분해되면서 단맛을 내는 아미노산에 비해 쓴맛 아미노산이 더 유리된 것을 알 수 있었다(31). *Bacillus* sp. CS-17을 이용한 청국장(32)에서는 발효 48시간 후 phenylalanine이 가장 많이 함유되었고, leucine, lysine 순이었다고 보고하였고, *Bacillus* sp. DC-2균을 이용하여 제조한 청국장(33)에서는 glutamic acid가 가장 많이 검출되었고, phenylalanine, alanine 순으로 나타났다고 하였으며, 이는

Table 4. Free amino acid content of soybean and Chungjukjang prepared with various soybean cultivars and *B. subtilis* HJ18-9

mg%	Aa ¹⁾	Ac	At	Ba	Bc	Bt	Ca	Cc	Ct	Da	Dc	Dt
His	0.63±0.06 ^{Cb2)}	0.47±0.02 ^{Bc}	0.81±0.01 ^{Ba}	0.30±0.02 ^{Dc}	0.57±0.04 ^{Bb}	0.90±0.06 ^{Ba}	2.70±0.19 ^{Aa}	1.35±0.16 ^{Ab}	1.43±0.24 ^{Ab}	1.70±0.23 ^{Ba}	0.03±0.00 ^{Cb}	0.01±0.00 ^{Cb}
Ser	0.60±0.01 ^{Cb}	0.62±0.02 ^{Cb}	1.12±0.02 ^{Ca}	0.26±0.04 ^{Dc}	0.85±0.03 ^{Bb}	1.59±0.05 ^{Ba}	1.04±0.10 ^{Bb}	2.13±0.17 ^{Aa}	2.03±0.03 ^{Aa}	1.24±0.04 ^{Aa}	0.11±0.01 ^{Db}	0.14±0.00 ^{Db}
Arg	5.29±0.01 ^{Aa}	0.34±0.07 ^{Bc}	0.65±0.11 ^{Cb}	2.51±0.04 ^{Ba}	0.45±0.02 ^{Bc}	0.93±0.00 ^{Bb}	2.15±0.18 ^{Ca}	1.59±0.15 ^{Ab}	1.13±0.03 ^{Ac}	5.51±0.22 ^{Aa}	0.17±0.02 ^{Cc}	0.47±0.04 ^{Db}
Gly	0.70±0.01 ^{Ba}	0.65±0.04 ^{Bb}	0.71±0.01 ^{Ba}	0.40±0.03 ^{Cc}	0.71±0.05 ^{Bb}	0.98±0.02 ^{Aa}	0.86±0.09 ^{Aa}	0.78±0.04 ^{Ab}	0.67±0.07 ^{Bb}	0.96±0.06 ^{Aa}	0.04±0.00 ^{Cc}	0.34±0.03 ^{Cb}
Asp	4.21±0.02 ^{Ba}	0.84±0.02 ^{Ab}	0.76±0.05 ^{Bc}	3.56±0.02 ^{Da}	0.63±0.03 ^{Cc}	1.06±0.11 ^{Ab}	5.91±0.11 ^{Aa}	0.78±0.04 ^{Bb}	0.50±0.03 ^{Cc}	3.92±0.10 ^{Ca}	0.13±0.02 ^{Db}	0.04±0.00 ^{Da}
Glu	5.96±0.00 ^{Bc}	6.15±0.02 ^{Db}	7.31±0.03 ^{Ca}	5.05±0.06 ^{Bc}	8.28±0.03 ^{Ca}	6.80±0.03 ^{Cb}	7.90±0.24 ^{Ac}	31.05±0.35 ^{Aa}	20.21±0.56 ^{Ab}	5.74±0.36 ^{Bb}	9.79±0.02 ^{Ba}	10.04±0.49 ^{Ba}
Thr	0.62±0.00 ^{Cc}	0.66±0.00 ^{Db}	1.03±0.00 ^{Ca}	0.34±0.02 ^{Dc}	0.84±0.01 ^{Cb}	1.48±0.02 ^{Aa}	0.86±0.07 ^{Ac}	1.37±0.12 ^{Aa}	1.18±0.06 ^{Bb}	0.76±0.05 ^{Bc}	1.11±0.04 ^{Bb}	1.30±0.12 ^{Bc}
Ala	3.06±0.09 ^{Cb}	2.88±0.11 ^{Cc}	3.75±0.04 ^{Ba}	1.66±0.03 ^{Dc}	4.08±0.10 ^{Bb}	4.61±0.16 ^{Aa}	3.58±0.25 ^{Bb}	4.45±0.38 ^{Ba}	3.73±0.39 ^{Bb}	4.07±0.18 ^{Ab}	5.10±0.04 ^{Aa}	3.55±0.37 ^{Ba}
Pro	1.08±0.02 ^{Ac}	1.36±0.04 ^{Bc}	1.69±0.07 ^{Aa}	0.68±0.04 ^{Bb}	1.55±0.06 ^{ABa}	1.63±0.21 ^{Aa}	1.20±0.16 ^{Aa}	1.34±0.10 ^{Ca}	1.34±0.14 ^{Ba}	1.12±0.06 ^{Ab}	1.71±0.16 ^{Aa}	1.53±0.12 ^{ABa}
Cys	0.10±0.02 ^{Aa}	0.04±0.01 ^{Bb}	0.09±0.02 ^{Ba}	0.00±0.00 ^{Bb}	0.00±0.00 ^{Cb}	0.30±0.18 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Bb}	0.10±0.01 ^{Aa}	0.10±0.02 ^{Ba}	0.00±0.00 ^{Cb}	0.10±0.02 ^{Aa}	0.10±0.02 ^{Ba}
Lys	4.57±0.07 ^{Aa}	2.52±0.06 ^{Ac}	2.90±0.12 ^{Bb}	4.25±0.02 ^{Aa}	2.77±0.10 ^{Ac}	3.74±0.35 ^{Ab}	3.54±0.14 ^{Ba}	1.92±0.00 ^{Bb}	1.86±0.01 ^{Cb}	4.30±0.34 ^{Aa}	2.17±0.32 ^{Bc}	3.62±0.03 ^{Ab}
Tyr	1.59±0.03 ^{Ba}	0.67±0.00 ^{Bb}	0.68±0.02 ^{Cb}	1.16±0.02 ^{Ca}	0.50±0.02 ^{Cc}	0.86±0.02 ^{Bb}	2.02±0.08 ^{Ab}	3.14±0.00 ^{Aa}	1.46±0.10 ^{Ac}	1.60±0.08 ^{Ca}	0.49±0.05 ^{Cb}	0.59±0.08 ^{Cb}
Met	0.32±0.00 ^{Ac}	0.37±0.02 ^{Cb}	1.03±0.03 ^{Ba}	0.13±0.01 ^{Bc}	0.86±0.02 ^{Bb}	1.62±0.14 ^{Aa}	0.34±0.03 ^{Ab}	1.09±0.06 ^{Aa}	1.13±0.10 ^{Ba}	0.34±0.08 ^{Ac}	1.06±0.04 ^{Ab}	1.49±0.07 ^{Aa}
Val	1.64±0.18 ^{Ac}	2.63±0.52 ^{Cb}	4.85±0.00 ^{Ba}	0.61±0.09 ^{Bc}	3.97±0.32 ^{Bb}	5.80±0.16 ^{Aa}	1.50±0.08 ^{Ab}	4.62±0.16 ^{Aa}	4.61±0.16 ^{Ba}	1.40±0.15 ^{Ac}	2.56±0.24 ^{Cb}	4.47±0.21 ^{Ca}
Ile	0.83±0.00 ^{Ac}	1.44±0.04 ^{Db}	2.57±0.18 ^{Ba}	0.32±0.02 ^{Bc}	2.08±0.19 ^{Bb}	3.24±0.13 ^{Aa}	0.78±0.11 ^{Ab}	2.98±0.21 ^{Aa}	3.03±0.20 ^{Aa}	0.84±0.05 ^{Ac}	1.75±0.08 ^{Cb}	2.59±0.23 ^{Ba}
Leu	1.19±0.06 ^{Bc}	4.26±0.32 ^{Db}	7.15±0.56 ^{Ba}	0.48±0.01 ^{Dc}	6.77±0.30 ^{Bb}	10.51±0.54 ^{Aa}	0.91±0.00 ^{Cc}	8.38±0.19 ^{Aa}	7.63±0.12 ^{Bb}	1.38±0.05 ^{Ac}	5.60±0.15 ^{Cb}	7.25±0.24 ^{Ba}
Phe	1.96±0.15 ^{Bc}	5.11±0.37 ^{Cb}	7.85±0.51 ^{Ca}	1.26±0.08 ^{Cc}	7.61±0.58 ^{Bb}	11.14±0.63 ^{Aa}	2.27±0.04 ^{Ac}	9.42±0.17 ^{Ab}	9.86±0.00 ^{Ba}	2.43±0.04 ^{Ab}	7.87±0.03 ^{Ba}	7.98±0.12 ^{Ca}
Total	35.35	31.01	44.95	22.97	42.52	57.19	37.56	76.49	61.9	37.31	39.79	45.51

¹⁾A, Daewon; B, Deapung; C, Seadanbeak; D, Taekwang; a, soybean; c, conventional Chungjukjang; t, Chungjukjang fermented with *B. subtilis* HJ18-9.

²⁾Any means in the same soybean state (A-B) or soybean cultivars (a-d) followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

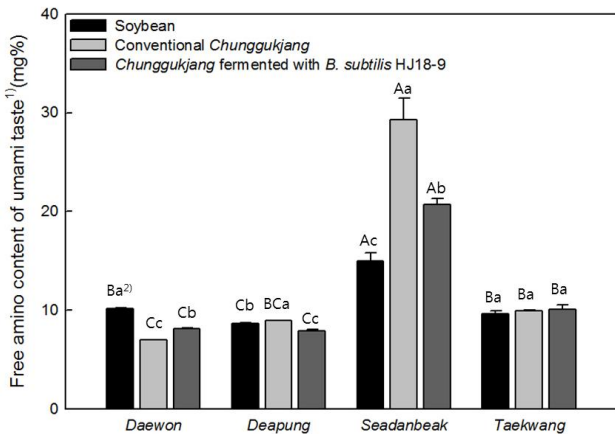


Fig. 1. Free amino acids content in soybean and *Chunggukjang* based on senses of umami taste.

¹⁾Glutamic acid, Aspartic acid.

²⁾Any means in the same soybean state (A-B) or soybean cultivars (a-d) followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

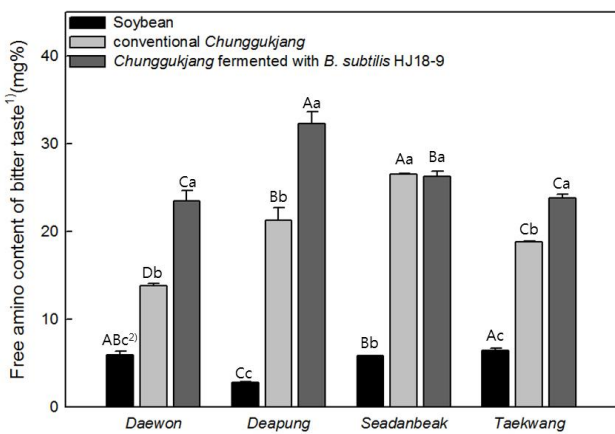


Fig. 2. Free amino acids content in soybean and *Chunggukjang* based on senses of bitter taste.

¹⁾Valine, Methionine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine.

²⁾Any means in the same soybean state (A-B) or soybean cultivars (a-d) followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

본 실험과 일부 유사한 경향을 보였다. Park 등(34)은 청국장에 접종되는 균주에 따라 최종제품의 구수한 맛, 쓴맛, 그리고 단맛을 내는 아미노산의 함량이 변하고 이를 이용하여 청국장의 맛을 조정 할 수 있을 것이라고 보고하였다.

유기산 함량

유기산 함량 측정결과는 Table 5에 나타내었다. 대풍, 새단백, 태광 원료콩의 경우, succinic acid(1,895~2,121 mg%)가 가장 높은 함량을 나타내었고, 다음으로 citric acid(614~822 mg%), acetic acid(156~306 mg%)순이었다. 청국장의 경우 starter 첨가 유무에 상관없이 lactic acid (163~896 mg%)가 가장 높은 함량을 나타내었고, 청국장 t는 청국장 c에 비해 oxalic acid, malic acid, acetic acid가

더 높은 함량을 보였다. 원료 콩에서 청국장으로 발효되면서 oxalic acid, citric acid와 succinic acid의 경우 그 함량이 감소하였고, malic acid, lactic acid와 acetic acid는 그 함량이 증가하였다. citric acid는 원료콩에 많이 함유 되어 있지만 청국장 관련 미생물의 에너지원으로 이용되면서 급격히 감소되고, lactic acid의 경우 내염성 젖산균에 의해 생성되는 것으로 추측되며, acetic acid의 경우 *Bacillus*의 작용으로 증가되는 것으로 보고되었다(35). 생약초를 첨가한 청국장(36)의 경우 lactic acid가 가장 높았으며, acetic acid, succinic acid, citric acid 순으로 나타나 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

Table 5. Organic acid content of soybean and *Chunggukjang* prepared with various soybean cultivars

mg%	Oxalic acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Citric acid	Succinic acid
a ²⁾	51.46	69.72	66.92	117.02	915.76	224.89
A ¹⁾ c	24.04	137.45	896.65	224.37	319.22	455.43
t	30.85	178.31	769.64	245.32	219.41	341.23
a	44.34	108.52	38.86	306.21	822.41	1895.76
B c	27.10	136.45	740.25	355.78	255.84	439.21
t	32.60	139.02	632.19	498.62	87.81	219.26
a	42.82	86.27	38.37	156.26	616.57	2002.37
C c	14.00	154.26	590.79	367.26	239.10	297.55
t	17.14	208.41	577.57	329.32	170.69	222.99
a	19.57	127.58	113.11	213.55	614.94	2121.17
D c	15.19	142.43	660.79	267.18	154.18	261.15
t	22.86	145.46	463.70	283.30	26.99	217.81

¹⁾A, Daewon; B, Deapung; C, Seadanbeak; D, Taekwang.

²⁾a, soybean; c, conventional *Chunggukjang*; t, *Chunggukjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-9.

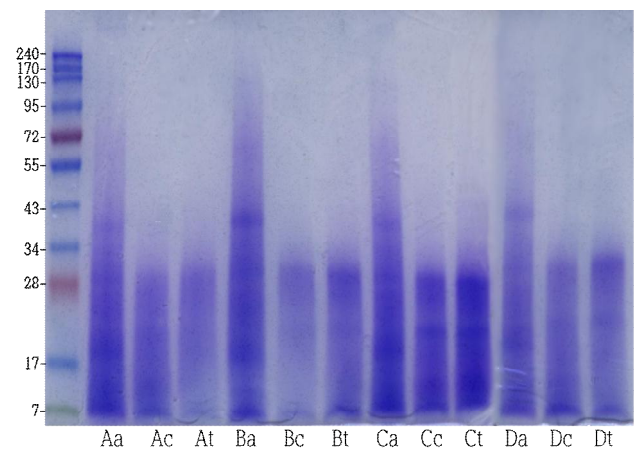


Fig. 3. Analysis of soybean and *Chunggukjang* protein by SDS-page.

A, Daewon; B, Deapung; C, Seadanbeak; D, Taekwang; a, soybean; c, conventional *Chunggukjang*; t, *Chunggukjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-9.

단백질 분해 패턴 분석

콩 품종별 starter첨가 유무에 따른 청국장(의 SDS-PAGE 분석 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 발효전 원료콩의 주된 단백질은 7~43 KDa인 반면 청국장 c와 청국장 t의 주된 단백질은 7~28 KDa로 나타났다. 이는 발효에 의해 고분자의 단백질이 분해되어 작은 분자량의 단백질이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 홍삼을 이용한 청국장(14)의 경우, 33 KDa 이하의 단백질로 분해되었으며, 특히 11 KDa 크기의 단백질이 주를 이루었으며, *B. licheniformis* B1을 이용한 청국장(37)의 경우 증자대두에서는 66 KDa이상의 분자량을 보였지만 발효가 시작되면서 작은 분자량이 증가하여 24시간 후에는 36 KDa이하로 감소하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 새단백 청국장의 경우, 20 KDa에 원료콩에서는 관찰되지 않은 새로운 밴드가 확인되어 추후, 물질동정을 통한 확인이 필요할 것으로 사료된다.

총 균수

콩 품종별 starter첨가 유무에 따른 청국장의 총 균수의 변화는 Table 6에 나타내었다. 원료콩의 경우 3.80~5.67 log CFU/mL의 범위였으며, 태광, 새단백, 대원, 대풍 순이었다. 청국장(c)은 7.48~8.85 log CFU/mL, 청국장(t)은 7.86~8.46 log CFU/mL로 나타났다. 단백질 분해정도의 주요요소는 미생물의 종류 및 양인데, 청국장 c는 *Bacillus*외에 유산균 등 다양한 세균이 관여하게 되어 단일균으로 제조된 청국장 t와는 다른 발효양상을 보일 수 있다. Ju 등(38)에 따르면 *B. subtilis*를 접종하였을 경우 *B. subtilis*의 빠른 생육이 유산균과 같은 다른 균의 생육을 억제한다고 보고하였으며 발아콩을 이용한 청국장의 총균수는 10^8 ~ 10^9 CFU/mL로 본 연구와 유사한 결과를 보였다(39).

Table 6. Aerobic bacterial counts of soybean and Chunggukjang prepared with various soybean cultivars

Log CFU/mL	A ¹⁾	B	C	D
a ²⁾	5.15±0.25 ^{ABb3)}	5.67±0.30 ^{Ac}	4.49±0.69 ^{Bcb}	3.80±0.17 ^{Cc}
c	8.68±0.07 ^{Ba}	8.85±0.04 ^{Aa}	8.14±0.09 ^{Da}	8.29±0.01 ^{Ca}
t	8.46±0.03 ^{Aa}	8.19±0.03 ^{ABb}	7.48±0.34 ^{Ca}	7.86±0.05 ^{Bb}

¹⁾A, Daewon; B, Deapung; C, Seadanbeak; D, Taekwang.

²⁾a, soybean; c, conventional Chunggukjang; t, Chunggukjang fermented with *B. subtilis* HJ18-9.

³⁾Any means in the same column (A-B) or row (a-d) followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

요 약

본 연구는 장류용 주요 콩 품종별, 유용발효미생물인 *Bacillus subtilis* HJ18-9 첨가 유무에 따른 청국장의 이화학적 특성과 맛에 관여하는 아미노산 및 유기산 구성을

비교하고자 하였다. 원료콩 으로는 대원, 대풍, 새단백, 태광을 사용하였다. 원료콩(원콩), starter를 첨가하지 않은 전통방법으로 제조한 청국장(청국장 c)과 starter를 첨가하여 제조한 청국장(청국장 t)의 수분함량은 62.45~67.12, 63.28~67.14, 64.50~66.87%이었으며, 아미노태 질소는 6.53~24.25, 27.63~122.09, 37.29~133.48 mg%, 암모니아태 질소는 26.92~47.95, 45.45~156.36, 28.02~121.13 mg%로 나타났다. 유리 아미노산 함량은 원료콩이 청국장보다 감칠맛을 내는 glutamic acid, aspartic acid이 더 많은 반면, 쓴맛을 내는 valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine은 starter 첨가 유무에 관계없이 청국장이 원료콩보다 더 많은 양이 검출되었다. 유기산은 원료 콩에서 청국장으로 발효되면서 oxalic acid와 citric acid의 경우 그 함량이 감소하였고, malic acid, lactic acid, acetic acid, succinic acid는 그 함량이 증가하였다. SDS-page 확인 결과 원료콩에서는 넓은 분포로 band가 보였지만 청국장의 경우 분자량이 큰 단백질이 사라지고 작은 분자량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 총 균수는 원료콩, 청국장 c 및 청국장 t의 경우, 각각 3.80~5.67, 8.14~8.85, 7.48~8.46 log CFU/mL의 범위로 나타났다. 이상의 결과로 콩품종에 따라 발효정도에 차이를 보이는 것과, starter첨가에 따른 품종별 발효양상이 다른 것을 확인하게 되었다. 특히, starter첨가 시, 다른 품종에 비해 새단백 청국장의 감칠맛과 연관된 glutamic acid와 aspartic acid의 함량이 증가하는 것으로 보아 주로 두부제조용으로 이용되었던 새단백의 용도다양화가 가능 할 것으로 판단된다. 본 내용은 콩품종 및 starter 첨가에 따른 청국장의 이화학적 특성과 맛에 관여하는 아미노산 및 유기산 구성을 비교하여 청국장의 품질을 향상시키는데 필요한 기초자료로써 향후, 기능성 콩발효식품 및 콩품종 이용 다양화에 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 어젠다사업(과제 번호: PJ010927)의 지원에 의해 이루어진 것임

References

- Kim EB, Kim EJ, Lee HN, Lee MK, Oh JS, Kim SO, Lee SY (2008) The quality characteristics of soy cutlets using textured soy protein treated with different enzymes. Korean J Food Culture, 23, 507-513
- Jeon SH, Lee KA, Byoun KE (2005) Studies on changes of isoflavone and nutrients during germination of soybean varieties. Korean J Human Ecol, 14, 485-489

3. Messina MJ, Persky V, Satchell KD, Barnes S (1994) Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr cancer*, 21, 113-131
4. Choe JS, Yoo SM, Kim HR, Kim JS, Chang CM (1999) Volatile compounds of *Chonggugjang* prepared by different fermentation methods and soybean cultivars. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol*, 42, 111-115
5. Joo EY, Park CS (2010) Antioxidative and fibrinolytic activity of extracts from soybean and *Chungkukjang* (fermented soybeans) prepared from a black soybean cultivar. *Korean J Food Preserv*, 17, 874-880
6. Yoo SM, Chang CM (1999) Study on the processing adaptability of soybean cultivars for Korean traditional *Chonggugjang* preparation. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol*, 42, 91-98
7. Ko YJ, Son YH, Kim EJ, Lee HH, An SR, Kim DH, Ryu CH (2012) Quality properties of commercial *Chungkukjang* in Korea. *J Agric & Life Sci*, 46, 177-187
8. Kim SH, Yang JL, Song YS (1999) Physiological functions of *Chongkukjang*. *Food Ind Nutr*, 4, 40-46
9. Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ (2001) Some biological activities and isoflavone content of *Chungkugjang* prepared with black beans and *Bacillus* strains. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 30, 662-667
10. Lee KA (2006) Quality characteristics of castella with *Chungkukjang*. *Korean J Food Cookery Sci*, 22, 244-249
11. An SH, Lee SH, Park GS (2008) Quality characteristics of tofu prepared with various concentrations of commercial *Chungkukjang* powder. *Korean J Food Cookery Sci*, 24, 258-265
12. Lee HJ, Kim SS, Han CK, Oh HH, Kim HJ, Lee SW, Choi YS, Choi EY, Kim MK, Kim WM (2011) Antioxidative activity and quality characteristics of almond cookies prepared with Job's tears (*Coixlachryma-jobi* L.) *Chungkukjang*. *Korean J Food Cookery Sci*, 27, 43-54
13. Choi EJ, Lee JS, Chang HB, Lee MS, Jang HD, Kwon YI (2010) Changes in the functionality of *Cheonggukjang* during fermentation supplemented with *Angelica gigas*, *Rehmanniae Radix*, and *Red ginseng*. *Kor J Microbiol Biotechnol*, 38, 467-474
14. Park NY, Seong JH, Choi MS, Moon KD, Kwon JH, Jeong YJ (2008) Comparison of functional properties of *Cheonggukjang* by using red ginseng. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37, 261-268
15. Lee YL, Kim SH, Choung NH, Yim MH (1992) A study on the production of viscous substance during the *Cheonggukjang* fermentation. *J Korean Agric Chem Soc*, 35, 202-209
16. Choi SH, Ji YA (1989) Changes in flavor of *Chungkookjang* during fermentation. *Korean J Food Sci Technol*, 21, 229-234
17. Choi UK, Ji WD, Chung YG (1998) Characteristics of *Chonggugjang* produced by *Bacillus subtilis* DC-2. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 27, 846-851
18. Lee JJ, Lee DS, Kim HB (1999) Fermentation patterns of *Chungkookjang* and *Kanjang* by *Bacillus licheniformis* B1. *Korean J Microbiol*, 35, 296-301
19. Lee SY, Kim JY, Baek SY, Yeo SH, Koo BS, Park HY, Choi HS (2011) Isolation and characterization of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat *Sokseongjang*. *Korean J Food Sci Technol*, 43, 735-741
20. AOAC (1995) Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA, p 1-43
21. Shon MY, Kwon SH, Sung CK, Park SK, Choi SD (2001) Changes in chemical components of *Chungkugjang* prepared with small black bean. *Korean J Life Science*, 11, 284-290
22. Lee SY, Park NY, Kim JY, Choi HS (2012) Quality characteristics of rice-*doenjang* during fermentation by differently shaped meju and adding starter. *Korean J Food Nutr*, 25, 505-512
23. Kim HE, Han SY, Jung JB, Ko JM, Klim YS (2011) Quality characteristics of *Doenjang* (Soybean Paste) prepared with germinated regular soybean and black soybean. *Korean J Food Sci Technol*, 43, 361-368
24. In JP, Lee SK, Ahn BK, Chung IM, Jang CH (2002) Flavor improvement of *Chungkookjang* by addition of yucca (*Yucca shidigera*) extract. *Korean J Food Sci Technol*, 34, 57-64
25. Kim JW, Kim YS, Jeong PH, Kim HE, Shin DH (2006) Physicochemical characteristics of traditional fermented soybean products manufactured in folk villages of Sunchang region. *J Fd Hyg Safety*, 21, 223-230
26. Kim MH, Lee NH, Choi UK (2008) Fermentation characteristics of *Cheonggukjang* made of germinated soybean under light condition. *J Life Sci*, 18, 1420-1425
27. Eom SM, Jung BY, Oh HI (2009) Changes in chemical components of *Cheonggukjang* prepared with germinated soybeans during fermentation. *J Appl Biol Chem*, 52, 133-141
28. Kim KJ, Ryu MK, Kim SS (1982) *Chungkook-jang koji*

- fermentation with rice straw. Korean J Food Sci Technol, 14, 301-308
29. Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW (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
 30. Park SI (2006) Preparation of Natto (unripe *Chungkukjang*) using small soybeans and *Bacillus subtilis* KCCM 11315. Korean J Culinary Res, 12, 225-235
 31. Hwang HA, Lee NK, Cho IJ, Hahm YT, Kwon KO, Kim BY (2008) Selection of microorganisms and optimization of manufacture process for *cheonggukjang*. Korean J Food Sci Technol, 40, 406-411
 32. Kim JS, Yoo SM, Choe JS, Park HJ, Hong SP, Chang CM (1998) Physicochemical properties of traditional *Chonggugjang* produced in different regions. Agric Chem Biotech, 41, 377-383
 33. Son DH, Kwon OJ, Ji WD, Choi UK, Kwon OJ, Lee EJ, Cho YJ, Cha WS, Chung YG (2000) The quality changes of *Chungugjang* prepared by *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol, 43, 1-6
 34. Choi UK, Ji WD, Im MH, Choi JD, Chung YG, Son DH (1998) Changes of taste components and palatability during *Chunggugjang* fermentation by *Bacillus subtilis* DC-2. J Korean Soc Food Sci Nutr, 27, 840-845
 35. Oh GS, Kang KJ, Hong YP, An YS, Lee HM (2003) Distribution of organic acids in traditional and modified fermented foods. J Korean Soc Food Sci Nutr, 32, 1177-1185
 36. Park JS, Cho SH, Na HS (2010) Properties of *Cheongkukjang* prepared with admixed medicinal herb powder. Korean J Food Preserv, 17, 343-350
 37. Matsui T, Yoo HJ, Hwang JS, Lee DS, Kim HB (2004) Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Chungkookjang*. Korean J Microbiol, 40, 355-358
 38. Ju KE, Oh NS (2009) Effect of the mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on the quality of *Cheonggukjang*. Korean J Food Sci Technol, 41, 399-404
 39. Beak LM, Kang KM, Park LY, Lee SH (2012) Fermentation and quality characteristics of *Cheongkookjang* prepared with germinated soybean. Korean J Food Preserv, 19, 547-553