

## 영주 부석태 청국장시료의 이소플라본 배당체 탐색과 청국장의 품질 표준화

최 은 영<sup>1)</sup> · 유 진 현<sup>2)</sup> · 안 희 정<sup>3)¶</sup>

경북전문대학교 식품영양조리과<sup>1)</sup> · 신한대학교 식품조리과<sup>2)</sup> · 경북전문대학교 식품산업연구소<sup>3)¶</sup>

### Quality Standardization and Isoflavone Glycoside Research of in Buseoktae(Yeongju bean) *Cheonggukjang* for Business Use from Yeongju Bean

Eun-Young Choi<sup>1)</sup> · Jin-Hyeon Yu<sup>2)</sup> · Hui-Jeong An<sup>3)¶</sup>

Dept. of Food Nutrition and Cooking, Gyeongbuk College<sup>1)</sup>

Dept. of Food and Cookery Science, Shinhan University<sup>2)</sup>

Food Industry Research Institute, Gyeongbuk College<sup>3)¶</sup>

#### Abstract

This study performed quantitative analysis of isoflavone glycoside contents on Buseoktae, Daewon, Wooram beans and *cheonggukjang* made of Buseoktae beans from the LC/MS/MS. Also, the experiment carried out by means of RSM(response surface methodology), which included 10 experimental points for the two independent variables addition(40, 55, 70 g) and time(2, 3, 4 min) from the beginning point to boil of *cheonggukjang*. These were optimized using a Face-centered central composite design. Daidzein contents were 212.16  $\mu\text{g/mL}$  in Buseoktae, 212.21  $\mu\text{g/mL}$  in daewon, 158.54  $\mu\text{g/mL}$  in wooram beans. Genistein contents were 318.84  $\mu\text{g/mL}$  in Buseoktae, 310.50  $\mu\text{g/mL}$  in daewon, 262.71  $\mu\text{g/mL}$  in wooram beans. Total isoflavone contents were 532.50  $\mu\text{g/mL}$  in Buseoktae, 524.19  $\mu\text{g/mL}$  in Daewon, 422.71  $\mu\text{g/mL}$  in Wooram beans. Isoflavone contents of Buseoktae and Daewon were quite similar, relatively contents of Wooram beans were low. Total isoflavone contents of Buseoktae *cheonggukjang* (for business use) was 430.10  $\mu\text{g/mL}$  in A (32°C, 96 h fermentation), 460.09  $\mu\text{g/mL}$  in B (36~40°C, 30 h fermentation), 417.46  $\mu\text{g/mL}$  in C *cheonggukjang*(36~38°C, 72 h fermentation), B *cheonggukjang* was just a bit more than A, C *cheonggukjang*. The estimated response surfaces confirmed that the amount and time had significant effects on taste. The optimum condition of Buseoktae *cheonggukjang* taste was predicted to be 55.20 g addition at 2.92 min.

**Key words:** isoflavone, liquid chromatography mass spectrometry, response surface methodology, bean, *cheonggukjang*

#### I. 서 론

대두(*Glycine max*)는 된장, 간장, 고추장, 청국장 등 한국 전통 장류의 대표적인 재료이다. 장류

및 두부용의 주요 품종은 정보보급용(태광콩·대원콩), 특산단지조성콩(대풍콩·새단백), 그 외 황금콩, 단백콩, 진품콩 2호, 선유콩, 천상, 우람, 부석태 등이 있다. 부석태는 영주 부석면을 중심으

¶: 안희정, hui2018@naver.com, 경북 영주시 대학로 77, 경북전문대학교 식품산업연구소

로 농가에서 자율교환으로 재배되어 오던 재래종으로부터 순계 분리하여 육성되었으며, 2006년 수집종은 유전적 특성이 다양한 혼종 집단이었으나 2007년 하계 포장에서 선발하여 고정된 후대이다(Yeongju city 2012). 부석태 1호는 2년간의 재배시험 결과, 이형주의 발생이 없어 균일성과 안전성을 구비하였고, 2012년 국립종자원에 품종출원(2012-367)한 후 2015년 5월 15일 품종등록(제 5535 호)하였으며, 2035년 5월 14일까지 품종보호권을 보유하게 되었다(Yeongju city 2012). 한국 재래종 유전자원 특성집(Gang JH et al 2009)에 의하면, 부석태의 단백질 함량은 40.9%, 지방함량 13.0%, 당함량 중 oligosaccharide는 10.2%, sucrose는 8.2%로 나타났으며, 아미노산 함량 중 cystine은 1.8 mg/g, methionine은 1.2 mg/g으로 콩알 크기가 일반 콩의 1.5~2배로 굵은 것이 특징이다.

## II. 이론적 배경

### 1. 이소플라본

오래전에 Walter ED (1941)는 콩의 주요 isoflavone인 daidzein 및 genistein과 이들의 aglycone을 분리하였으며, Ohta N 등(1979), Kudou S 등(1991)에 의해 acetyl 유도체와 malonyl 유도체가 분리, 동정되었다. 콩 제품에서의 isoflavone은 혈중 콜레스테롤을 낮추고, 심혈관 질환, 골다공증을 예방할 뿐만 아니라, 폐경기 이후의 각종 증후군을 완화하고, 유방암, 전립선암, 난소암, 대장암 예방 효과를 보인다(Messina M 1994). Naim M 등(1996)은 genistein이 약한 estrogen 활성을 발휘하여 노인과 여성의 골다공증 방지에도 효과적이라고 하였으며, 항산화효과와 심혈관 질환 및 심부전에서의 genistein의 효용성을 검토하였다. 또한, genistein은 estrogen receptor와 약하게 결합하여 estrogen 활성을 필요로 하는 유방암 세포의 발생을 억제한다고 하였다(Barnes S 1990 ; Peterson G 1991).

### 2. 콩 발효식품

세계의 콩 발효식품으로 한국의 된장, 간장, 청국장, 고추장, 중국의 쑤푸, 두반장, 두시가 있으며, 일본의 낫도, 쇼유, 미소, 네팰의 키네마, 인도의 스자체, 태국에는 말린 토아나오, 인도네시아에는 템페, 케첩 등이 있다. 이들 중, 청국장은 삶은 콩을 벗짚에 깔아 벗짚에 붙어 있는 *Bacillus*속 미생물에 의해 40~42°C에서 2~3일간 발효시킨 것으로, 발효과정 중 미생물이 생산하는 효소에 의해 그 특유의 맛과 향, 점질물질이 생성된다(Son DH 2000). 또한, 전통대두 발효식품 중 가장 짧은 기일에 제조하여 영양적, 경제적으로 가장 효과적이며 그 풍미가 독특하다. Kim SH 등(1999)에 의하면 원료인 증자대두의 단백질 함량은 16.0%, 지질은 9.0%, 당질은 7.6%, 식이섬유는 2.1%이며, 청국장의 단백질 함량은 16.5%, 지질은 10.0%, 당질은 9.8%, 식이섬유는 2.3%로 발효과정 중 청국장균이 생성하는 효소들에 의해 콩 껍질이나 세포막을 구성하고 있는 섬유소 및 세포내에 있는 당질이나 단백질이 분해되면서 소화율이 향상되며, 유리 아미노산이 월등히 많아진다고 하였다. 청국장은 정장효과, 혈액순환개선 효과 등이 알려져 있어 대두 단백질 가수분해물은 흰쥐에서 카제인보다도 혈액중성지질, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤과 동맥경화지표를 낮추어 심혈관 질환 예방에도 유효한 것으로 보고되었다(Han YH 2008). 또한, Sohn BH와 Oh KH(2006)의 Fibrin 분해 세균의 분리 및 동정과 Lee DG 등(2006)의 Fibrin 분해 세균을 이용한 발효 청국장의 생리활성에서 혈전분해 활성이 증가하는 것으로 보고되어 고혈압의 예방식품(Matusi T et al 2004)으로 알려져 있다.

### 3. 부석태 청국장의 최적조건 제시

본 연구는 영주의 대표 향토 음식으로 실제 영주에서 판매되고 있는 청국장을 사용하여 부석태 청국장 품질 표준화의 최적 조건을 제시하고자 하였다. 또한, 현대사회가 100세 시대로 수명이

길어짐에 따라 여성들이 좀 더 젊고 활기차게 살고 싶은 마음과 함께 갱년기를 슬기롭게 극복하는데 도움을 주는 여성호르몬 유사물질인 이소플라본 배당체에 대하여 연구하고자 하였다. 따라서 LC-MS/MS를 이용하여 시중에서 유통되고 있는 부석태로 만든 청국장과 부석태, 대원콩, 우람콩에서 여성호르몬과 유사한 물질로 알려진 성분들, 즉 이소플라본 배당체인 daidzein과 genistein, biochanin A(4'-O-methylgenistein), formononetin(4'-O-methyl daidzein)의 정량분석과 부석태청국장의 관능검사를 통한 반응표면분석으로 청국장 맛의 최적 조건을 제시하여 관련 종사자들에게 전반적인 메뉴 컨설팅을 함으로써 부석태청국장 음식문화에 기초자료로 활용할 것이다.

### III. 연구방법

#### 1. 실험재료

본 연구에 사용된 콩은 2014년 재배된 콩으로, 부석태콩은 경북 영주시 평은 농협지소에서 구입하였고, 대원콩과 우람콩은 영주시 인근의 농가에서 구입하였다. 이들을 각각 분쇄하고 생콩 분말을 50 mesh 체에 통과시켜 실험에 사용하였다. 청국장은 각 업체에서 부석태를 원료로 하여 재래식 방법으로 제조된 것으로, 영주시에서 인증 받은 업체인 A 청국장(32°C, 96시간 발효), B 청국장(36~40°C, 30시간 발효), C 청국장(36~38°C, 72시간 발효)의 각 업체에서 발효 후, 즉시 냉동시킨 제품을 구입하여 동결건조하여 실험에 사용하였다. 예비실험 결과, B 청국장이 isoflavone 함량이 월등하고 값도 저렴하여 관능검사를 위한 시료는 B 청국장을 선택하였고, 냉동 보관하며 실험에 사용하였다. 수분함량은 자동수분 측정기(MB45, Ohaus Korea, Seoul, Korea)로 105°C에서 측정하였다. 각 업체의 청국장 균주는 대부분 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*이었다.

#### 2. Isoflavone 표준품

표준품 daidzein과 biochanin A는 analytical standard(Sigma-Fluka Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)용을 사용하였고, genistein은 순도 98.0%, formononetin은 순도 99.0% Sigma-Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, USA) 제품을 사용하였다. 표준품의 농도는 0.1~100 ug/mL가 되도록 조정하여 표준용액으로 하였고, 기기에서 측정할 수 있는 피크의 측정한계를 파악할 수 있는 신호대 잡음비(S/N)는 3을 검출한계(Limit of detection), 10을 정량한계(Limit of quantification)로 하였을 때의 농도로 구하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균값과 표준편차를 구하였다.

#### 3. LC-MS/MS 분석조건

물질 추출에 사용한 아세트니트릴과 메탄올은 HPLC급 고순도 용매로 Merck KGaA(Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 시료분석을 위한 LC-MS/MS는 Ultimate 3000 LC System(Dionex, San Francisco, CA, USA)와 질량분석기(API-3200, AB SCIEX, Framingham, MA, USA)로 구성된 것을 사용하였다. LC-MS/MS는 2개의 MS가 존재하여서 더 정확하고 세밀한 분석을 위해 물질들을 작게 쪼개서 고유의 특성을 확인 후, FIA (Flow Injection Analysis)로 물질을 흘려 보내 특정 물질만을 분석해준다. 또한, 물질은 Q1, Q2, Q3를 통과하면서 분자가 높은 에너지 전자살로 충돌되어 이온화되며, 조각 분자이온 분리, m/z 조합정성, 구조 데이터베이스 활용으로 모이온에서 특화되어 발생하는 딸이온을 검색하여 정확한 분석 결과물을 얻을 수 있다. LC-MS/MS의 분석조건은 <Table 1~3>과 같으며, isoflavone 각 물질의 compound optimization으로 최적조건을 설정하였다(Fig. 1, 2). Isoflavone의 함량 분석은 Jung JB 등(2012)의 방법에 따라 시료 0.5 g에 1N HCl 7.5 mL를 첨가하고, 100°C에서 90분 가수분해하여 aglycon으로 전환시킨 후, 상온에서 냉각시키고 methanol을 첨가하여 50 mL로 정용하였다. 이를 6시간 교반하고 10분간(5,000×g) 원심분리(Mega-

**<Table 1> Experimented conditions of LC and LC-MS/MS**

LC condition			
HPLC	Ultimate <sup>®</sup> 3000 Rapid Separation LC		
Column	YMC-Ultra HT hydrosphere C18, 12 nm, 2 $\mu$ m(75 $\times$ 2.0 mm ID)		
Column oven	25 $^{\circ}$ C		
Flow rate	0.2 mL/min or 0.4 mL/min		
Injection	5 $\mu$ L		
Mobile phase	A: 0.1% acetic acid in water, B: 0.1% acetic acid in acetonitrile		
	Daidzein, Genistein, Formononetin gradient: B (35%)		
	A: water, B: acetonitrile		
	Biochanin A gradient: B (80%), refer to <Table 2>		
MS/MS condition			
MS/MS	API 3200	Curtain gas (psi)	20
Ion source	ESI	Collision gas (psi)	5
Detection mode	Positive negative	Ion spray voltage (V)	5,500* -3,500
Source temperature ( $^{\circ}$ C)	400	Declustering potential (V)	refer to <Table 2>
Dwell time (ms)	200	Entrance potential (V)	
Ion source gas(GS1) (psi)	50	Collision energy (V)	
Ion source gas(GS2) (psi)	50	Collision cell exit potential (V)	

\* Positive ion 1,500 to 5,500 V, Negative ion is -1,500 to -3,500 V.

**<Table 2> Optimized parameters of LC-MS/MS**

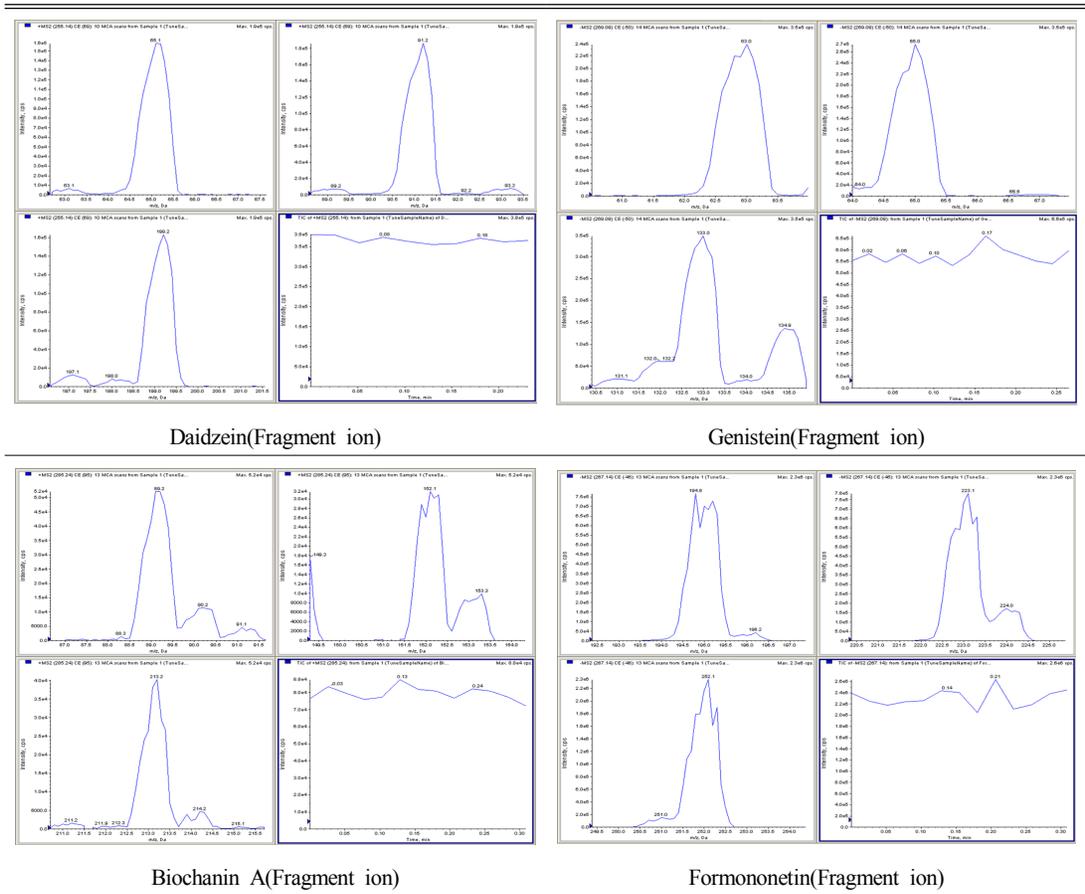
Compound	Flow rate (mL/min)	Gradient B(%)	DP*	EP*	CE*	CXP*
Daidzein	0.4	35	56	4.5	49	4
Genistein	0.4	35	-75	-6	-38	0
Biochanin A	0.4	80	91	4	95	4
Formononetin	0.2	35	-50	-5	-18	-2

\*DP : declustering potential, EP : entrance potential, CE : collision energy, CXP : collision cell exit potential.

21R, Hanil Corp., Seoul, Korea)하여 상정액을 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하고, isoflavone의 함량을 질량분석기 API-3200(AB SCIEX, Fra-

mingham, MA, USA)으로 측정하였다.

#### 4. 반응표면분석법 설계



<Fig. 1> Total ion current of +MS2 tune from isoflavone final product[x-axis is m/z(Da) and y-axis is intensity(cps)].

<Table 3> MS/MS parameters for detection of isoflavone

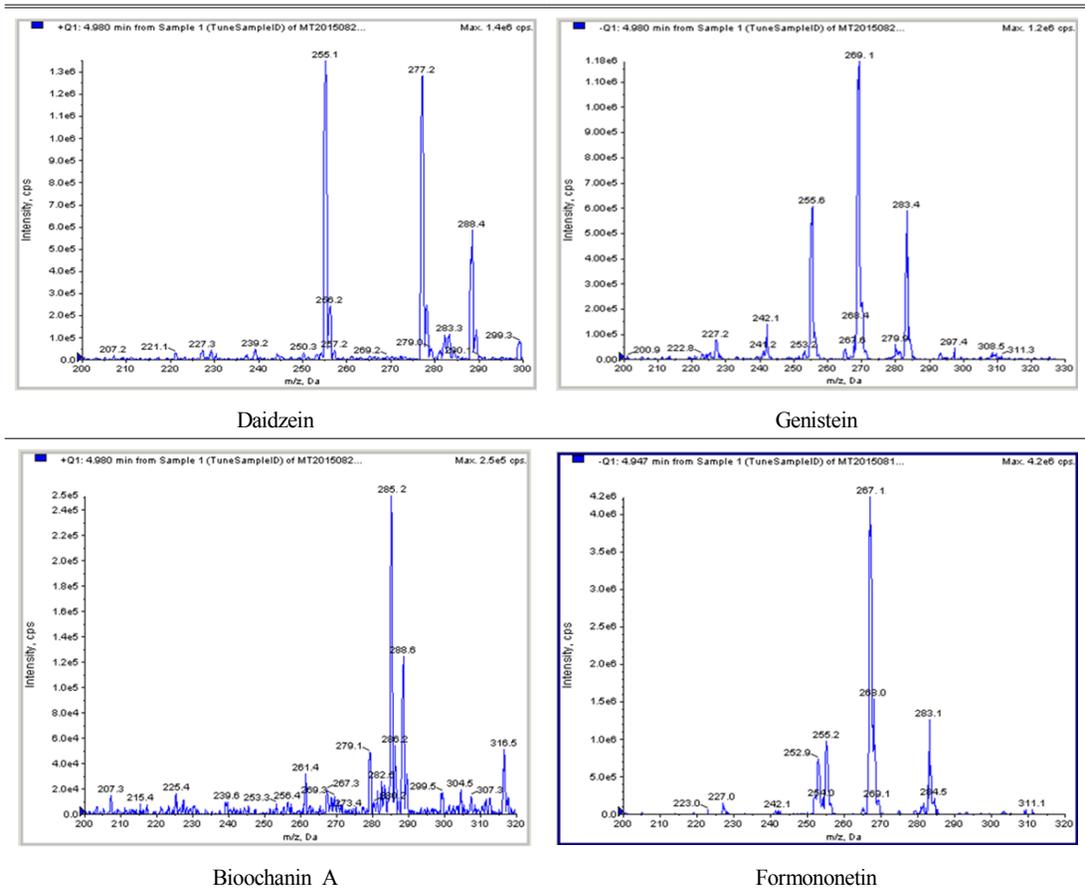
Compound	Ion fragment <sup>1)</sup>	Parent ions (m/z)	Fragment ions (m/z)	Retention time (min)
Daidzein	[M+H] <sup>+</sup>	255.136	<b>91</b> <sup>2)</sup> /199/65	1.45
Genistein	[M-H] <sup>-</sup>	269.086	<b>133</b> /65/63	2.66
Biochanin A	[M+H] <sup>+</sup>	285.226	<b>89</b> /213/152	0.9
Formononetin	[M-H] <sup>-</sup>	267.139	<b>251</b> /223/194	1.11

<sup>1)</sup> Ion fragmentation monitored using electro-spray ionization mode and optimized by multiple reaction monitoring(MRM) by fluid infusion analysis.

<sup>2)</sup> Bold number corresponds to the most intense and most stable fragmented ion and used for quantification of residual concentration.

청국장은 부석태를 원료로 하여 재래식 방법으로 제조된 것으로 영주시에서 인증 받은 업소

인 A청국장(32℃, 96시간 발효), B청국장(36~40℃, 30시간 발효), C청국장(36~38℃, 72시간 발



<Fig. 2> +Q2 tune from isoflavone final product[x-axis is m/z(Da) and y-axis is intensity(cps)].

호)에서 구입하고, 물 500 mL, 된장 1/2 Ts, 센 불 사용, 2인분을 기준으로 하여 청국장장의 최적화를 위한 청국장 끓이기 예비실험을 실시한 후, B청국장장을 선택하여 청국장 첨가량과 청국장 끓이는 시간의 한계구간을 결정하였다. 또한, B청국장장으로 청국장 첨가량(40, 55, 70 g)과 청국장

끓기 시작점부터의 시간(2, 3, 4 min)을 2 요인, 3 수준으로 설정하여 각 요인들의 수준을 -1, 0, 1의 3단계로 부호화하여 10군의 실험조건을 <Table 4, 5>와 같이 설계하여 실험하였다.

5. 관능검사

<Table 4> Levels of independent variables in experimental design of Buseoktae cheonggukjang

Independent variable *	Coded-variables level		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> Amount of <i>cheonggukjang</i> (g)	40	55	70
X <sub>2</sub> Time of boiling <i>cheonggukjang</i> (min)	2	3	4

\*X<sub>1</sub>: Amount of *cheonggukjang* (g), X<sub>2</sub>: Time of boiling *cheonggukjang* (min).  
Base is water 500 mL, *Doenjang* 1/2 Ts, Use high heat, 2 servings.

**<Table 5> Experimental design by two factors and three level used for Buseoktae *cheonggukjang***

Experimental number <sup>*</sup>	Preparation conditions	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
	Amount of <i>cheonggukjang</i> (g)	Time of boiling <i>cheonggukjang</i> (min)
1	40 (-1)	2 (-1)
2	70 (1)	2 (-1)
3	40 (-1)	4 (1)
4	70 (1)	4 (1)
5	40 (-1)	3 (0)
6	70 (1)	3 (0)
7	55 (0)	2 (-1)
8	55 (0)	4 (1)
9	55 (0)	3 (0)
10	55 (0)	3 (0)

\*The number of experimental conditions by Face-centered central composite design.

청국장의 최적화를 위한 관능검사는 오후 3~4시에 실시하였으며, 미맹검사를 통과한 식품영양조리과 20명의 학생들을 충분히 훈련시켜서 이들 중에 10 명을 관능검사 요원으로 선정하였다. 무작위로 추출된 3자리 숫자(난수표)를 각각의 시료에 적고, 맛, 색, 조직감, 향기, 전체적인 선호도에 대한 관능항목에 대하여 7점 척도법으로 측정하였고, 기호도가 높을수록 7점에 가까운 점수를 주어 점수가 높을수록 선호도가 좋은 것으로 평가하였다. 또한, 모든 실험은 3회 반복 실시하였다.

## 6. 통계분석

측정값은 Statistical Analysis System(ver. 9.3, SAS Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA 검정을 행하였으며, 평균간의 유의성 비교는 Duncan의 다중비교법( $p < 0.05$ )으로 유의차를 검증하였다. 관능검사 결과는 SAS와 Design export의 다중회귀분석과 분산분석, 정준분석, 반응표면분석을 이용하였다. 반응표면그래프와 등고선도의 정상점(stationary point)을 통하여 최대점(maximum point), 최소점(minimum point), 안장점(saddle po-

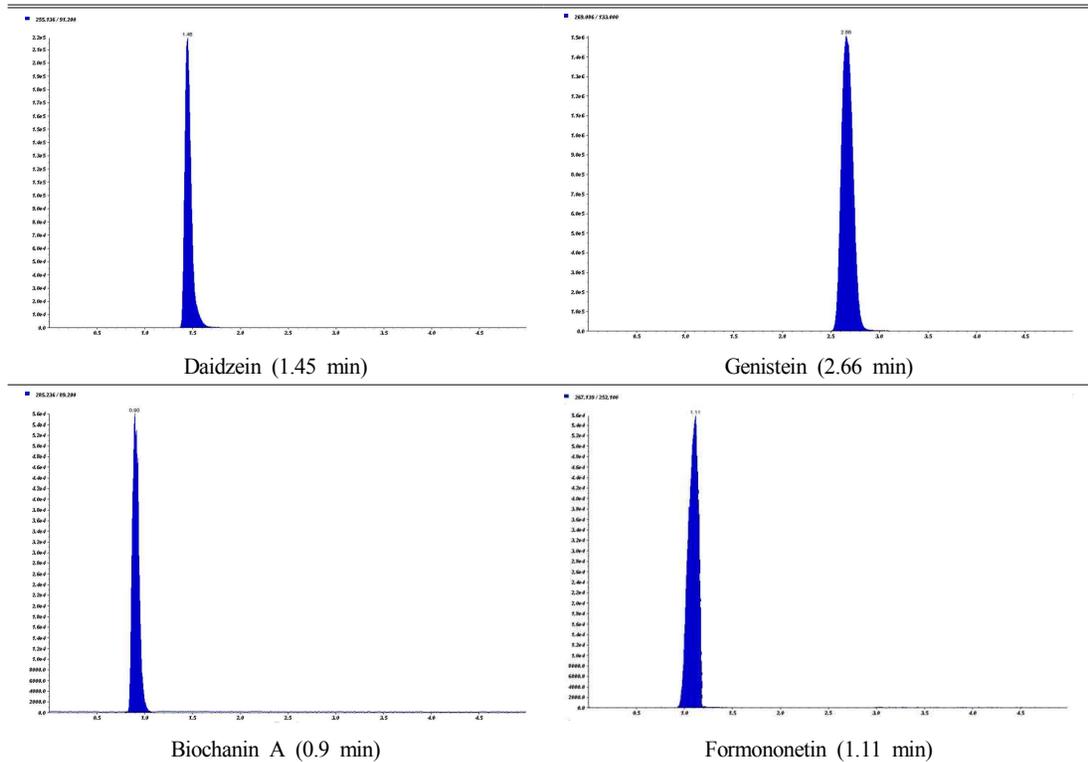
int), 능선(rising ridge) 형태를 판단하였으며, Design export를 사용하여 최적 조건을 예측하였고, 이를 바탕으로 최적조건을 제시하였다.

## IV. 실증분석

### 1. 직선성, 검출한계 및 정량한계

4종의 표준 지표물질에 대한 ion chromatograms을 <Fig. 3>에 나타내었다. 본 실험의 검출한계(LOD)는 0.06~0.64  $\mu\text{g/mL}$ 이고, 정량한계(LOQ)는 0.99~6.42  $\mu\text{g/mL}$  수준으로 나타났다. Daidzein의 각 농도 (0.916, 5.84, 10.5, 14.6, 19.8  $\mu\text{g}$ ), genistein의 각 농도 (1.0, 11.8, 21.8, 30.7, 38.2  $\mu\text{g}$ ), biochanin A의 각 농도 (0.143, 0.993, 2.02, 2.82, 4.13  $\mu\text{g}$ ), formononetin의 각 농도 (0.463, 1.59, 2.52, 3.99, 4.98  $\mu\text{g}$ )를 측정하여 표준검량선에서 1차 회귀식을 얻은  $R^2$ 값은 0.9989, 0.9951, 0.9934, 0.9956으로 양호한 직선성을 나타내었다(Table 6).

### 2. Buseoktae, Daewon, Wooram의 Isoflavone 함량



[Fig. 3] LC-MS/MS chromatogram of isoflavone [x-axis is time(min) and y-axis is intensity(cps)].

[Table 6] LOD and LOQ for component detection of isoflavone

Compound	LOD <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$R^2$
Daidzein	0.59	5.21	0.9989
Genistein	0.64	6.42	0.9951
Biochanin A	0.06	0.99	0.9934
Formononetin	0.07	1.00	0.9956

<sup>1)</sup> Limit of detection at signal to noise ratio of 3 (n=3).

<sup>2)</sup> Limit of quantification at signal to noise ratio of 10 (n=3).

Isoflavone은 식물체에 있는 황색색소 성분으로 꽤늘게 화합물이다. 콩 뽀은 맛의 원인물질이며, 콩에는 0.6~3.1 mg% 정도 들어 있다(Han YH et al 2008)고 하였는데, 본 실험의 daidzein의 함량 (Table 7)은 부석태가 216.16  $\mu\text{g/g}$ , 대원콩이 212.21  $\mu\text{g/g}$ , 우람콩이 158.54  $\mu\text{g/g}$ 이었고, genistein 함량은 부석태가 318.84  $\mu\text{g/g}$ , 대원콩이 310.50  $\mu\text{g/g}$ , 우람콩이 262.71  $\mu\text{g/g}$ , biochanin A의 함량은 부석태가 0.93  $\mu\text{g/g}$ , 대원콩 0.91  $\mu\text{g/g}$ ,

우람콩 0.92  $\mu\text{g/g}$ 이었고, formononetin의 함량은 부석태가 0.57  $\mu\text{g/g}$ , 대원콩 0.57  $\mu\text{g/g}$ , 우람콩 0.54  $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 총 isoflavone의 함량은 부석태가 532.50  $\mu\text{g/g}$ , 대원콩 524.19  $\mu\text{g/g}$ , 우람콩은 422.71  $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 부석태와 대원콩의 함량은 유사하였고, 대체적으로 우람콩의 isoflavone 함량이 낮았다. 따라서 biochanin A와 formononetin의 함량은 품종에 따른 통계적 차이가 없는 것으로 나타났으며, daidzein과 genistein

〈Table 7〉 Comparison of isoflavone contents<sup>1)</sup> by soybean variety

Compound	Amount ( $\mu\text{g/g}$ )		
	Buseoktae	Daewon	Wooram
Daidzein	216.16 $\pm$ 1.05 <sup>2)a3)</sup>	212.21 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>	158.54 $\pm$ 1.39 <sup>c</sup>
Genistein	318.84 $\pm$ 3.46 <sup>a</sup>	310.50 $\pm$ 3.87 <sup>b</sup>	262.71 $\pm$ 3.50 <sup>c</sup>
Biochanin A	0.93 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
Formononetin	0.57 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Total isoflavone	532.50	524.19	422.71

<sup>1)</sup> Based on dried sample.

<sup>2)</sup> Mean $\pm$ standard deviation (n=3).

<sup>3)</sup> Mean separation within column by Duncan's multiple range test at  $p<0.05$ .

함량은 품종에 따른 성분함량이 다소 차이를 보여 품종에 따른 유의성이 있는 것으로 판단된다.

장류 및 두부용인 대원콩, 신팔달콩 2호, 진품콩 2호, 태광콩의 isoflavone 함량은 각각 244.46, 344.57, 234.94, 178.09 mg/100 g으로 나타나(Lee S et al 2013), 본 실험 결과와는 차이를 보였다. Wang H와 Murphy PA(1994)는 콩의 isoflavone 함량이 품종과 재배환경에 따라 많은 영향을 받기 때문에 재배지역에 따라서 차이를 보인다고 하였다. 본 실험에서도 각 품종간의 생육조건과 기후환경이 다른 차이가 isoflavone 함량에 큰 영향을 보인(Kitamura K et al 1991 ; Eldrige AC 1983) 것으로 사료된다. 또한, 콩과의 여러해살이 풀로 잎과 줄기에 털이 나 있는 붉은 토끼풀(Red clover: *Trifolium pratense* L., Fabaceae)에는 formononetin, biochanin A, daidzein, genistein의 함량이 5.46%, 1.97%, 0.43%, 0.11%(Beck V et al 2005)로 나타나 formononetin, biochanin A의 함량이 많이 보고되었는데, 본 실험의 부석태, 대원콩, 우람콩에는 콩의 주요 성분인 daidzein, genistein의 함량이 훨씬 더 많았고, O-demethylation된 formononetin, biochanin A의 함량은 미량 존재하였다.

### 3. 부석태(영주콩) 청국장의 Isoflavone 함량

〈Table 8〉의 daidzein의 함량이 A 청국장(32℃, 96시간 발효)은 168.22  $\mu\text{g/g}$ , B 청국장(36~40℃, 30시간 발효)은 179.63  $\mu\text{g/g}$ , C 청국장(36~38℃, 72시간 발효)은 168.91  $\mu\text{g/g}$ , genistein 함량은 A 청국장이 260.61  $\mu\text{g/g}$ , B 청국장이 279.17  $\mu\text{g/g}$ , C 청국장이 247.29  $\mu\text{g/g}$ , biochanin A의 함량은 A 청국장이 0.82  $\mu\text{g/g}$ , B 청국장이 0.83  $\mu\text{g/g}$ , C 청국장이 0.81  $\mu\text{g/g}$ , formononetin의 함량은 A 청국장이 0.45  $\mu\text{g/g}$ , B 청국장이 0.46  $\mu\text{g/g}$ , C 청국장이 0.45  $\mu\text{g/g}$ 이었고, 총 isoflavone의 함량은 A 청국장이 430.10  $\mu\text{g/g}$ , B 청국장이 460.09  $\mu\text{g/g}$ , C 청국장이 417.46  $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 부석태로 만든 청국장의 총 isoflavone 함량은 발효시간이 30시간으로 짧은 B 청국장이 상대적으로 조금 높게 나타났다.

Jung JB 등(2012)에 의하면 42℃, 48시간 발효 후, 15℃에서 24시간 후숙 과정을 거친 발아대두 청국장에서 발아 36시간 처리구의 발효 및 숙성 0, 24, 48, 72시간 중에서 총 isoflavone 함량은 발효 72시간이 839.86  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았으며, 발아 0, 12, 24시간 처리구 사이에는 큰 차이가 없었다고 하였는데, 본 실험에서는 36~40℃, 30시간 발효시킨 B청국장의 isoflavone 함량이 가장 높아 다소 차이를 보였다. Jeong PH 등(2008)은 24시간 발아한 콩으로 제조한 청국장의 총 isoflavone과 genistein 함량이 발효 12시간까지 감소하였다가

〈Table 8〉 Comparison of isoflavone contents<sup>1)</sup> of Buseoktae *Cheonggukjang*

Compound	Buseoktae <i>Cheonggukjang</i> ( $\mu\text{g/g}$ )		
	A*	B*	C*
Daidzein	168.22±2.16 <sup>2)3)</sup>	179.63±1.49 <sup>a</sup>	168.91±2.54 <sup>b</sup>
Genistein	260.61±5.39 <sup>b</sup>	279.17±2.11 <sup>a</sup>	247.29±6.29 <sup>c</sup>
Biochanin A	0.82±0.03 <sup>a</sup>	0.83±0.02 <sup>a</sup>	0.81±0.02 <sup>a</sup>
Formononetin	0.45±0.05 <sup>a</sup>	0.46±0.06 <sup>a</sup>	0.45±0.05 <sup>a</sup>
Total isoflavone	430.10	460.09	417.46

\*A, B, C Buseoktae *Cheonggukjang* is for business use of Yeongju region.

<sup>1)</sup> Based on dried sample.

<sup>2)</sup> Mean±standard deviation (n=3).

<sup>3)</sup> Mean separation within column by Duncan's multiple range test at  $p<0.05$ .

이후에 증가하여 발효 48시간에 가장 높았다고 보고하였다. 본 실험의 청국장장의 총 isoflavone 함량이 처리구에 따라 다른 경향을 보이는 것은 같은 품종이라도 지역마다 발효균주 및 발효 조건이 다르기 때문인 것으로 사료된다.

#### 4. 관능평가와 반응변수의 통계분석

〈Table 9〉의 B 청국장장으로 관능평가를 한 결과, 10개의 실험군과 관능평점의 범위는 〈Table 9〉와 같다. 맛은 4.31~6.31, 색은 4.25~6.59, 조직감은 3.93~6.25, 향은 3.35~6.52, 전반적인 선호도는 4.25~6.65의 값을 나타내었다. 맛은 6.31, 색은 6.59, 조직감은 6.25, 향은 6.52, 전반적인 선호도는 6.65에서 최고값을 나타내었다. 맛, 색, 조직감, 전반적인 선호도는 청국장 첨가량 55 g, 청국장 끓이는 시간 3 min에서 선호도가 가장 높았고, 향은 첨가량 40 g, 청국장 끓이는 시간 2 min에서 선호도가 높았다. 향에 대한 선호도는 짧은 시간과 청국장 첨가량이 작을수록 증가하여 실험 참가자들이 전반적으로 청국장 냄새를 불편해 하는 것으로 나타났다. 청국장 첨가량 40 g에서 향에 대한 선호도가 가장 높았고, 맛, 색, 조직감, 전반적인 기호도는 청국장 첨가량 55 g에서 높아 청국장 첨가량에 따른 선호도에 차이가 있는 것으로

사료된다.

부석태 청국장장의 반응표면분석을 통한 회귀식 (Table 10)에서 맛의 결정계수  $R^2$ 은 0.9953,  $p$ -value 0.0001로 1% 이내 수준에서 유의적인 것으로 나타났다. 색의 결정계수  $R^2$ 은 0.9378,  $p$ -value 0.0159로 5% 이내 수준에서 유의적이었고, 조직감의 결정계수  $R^2$ 은 0.9586,  $p$ -value 0.0072로 1% 이내 수준에서 유의적이었고, 향의 결정계수  $R^2$ 은 0.9183,  $p$ -value 0.0268로 5% 이내 수준에서 유의적이었고 전반적인 선호도의  $R^2$ 은 0.9802,  $p$ -value 0.0017로 1% 이내 수준에서 유의적이었다. 〈Fig. 4〉와 〈Table 10〉에서 제시된 반응표면분석에서 요인간의 능선분석을 한 결과, 청국장 맛은 최고점(maximum) 6.32, 색은 안장점(saddle point) 6.19, 조직감은 최고점 6.13, 향은 최고점 6.03, 전반적인 기호도는 안장점 6.22를 나타냈다. 정준분석을 한 결과, 고유치의 값이 모두 안장점을 나타내어 최적점을 구할 수 없었다.

#### 5. 최적조건 선정

SAS의 반응표면분석에서 최고점으로 제시된 맛, 조직감, 향 중에서 Design Expert 반응표면분석으로 최적 조건을 찾고자 하였다. 위 실험조건에 따른 반응변수의 이차회귀식이 유의적일 때

〈Table 9〉 Sensory properties of Buseoktae *cheonggukjang* prepared with different *cheonggukjang* amount and time

Experiment number	Amount (g)	Time (min)	Sensory characteristics				
			Taste	Color	Texture	Flavor	Overall <sup>*</sup>
1	40	2	4.51	4.25	5.35	6.52	4.25
2	70	2	4.53	6.24	4.35	3.35	5.32
3	40	4	5.24	5.23	5.35	6.36	5.11
4	70	4	4.31	6.52	3.93	4.34	5.24
5	40	3	5.37	4.35	5.27	6.15	4.35
6	70	3	4.76	6.53	4.11	4.86	5.36
7	55	2	5.89	6.58	5.69	5.36	6.21
8	55	4	5.94	6.27	5.58	5.35	6.55
9	55	3	6.31	6.54	6.25	5.39	6.36
10	55	3	6.26	6.59	6.23	5.48	6.65

\*Overall quality.

반응표면그래프와 등고선도를 사용하여 이차회귀식 모델을 파악하였고, 각각의 반응변수의 실험값을 통한 Design Expert의 Face-centered 중심합성계획법으로 반응모델의 최적조건을 선정하였다(Table 11~13). 〈Table 12〉와 〈Fig. 5〉에서 맛은

청국장 양과 시간이 교호작용으로 서로 영향을 받아 두 요인 모두 유의성이 있었다. 색, 조직감, 향, 전반적인 기호도에서 시간은 큰 영향이 없었고, 청국장 첨가량이 주요 요인으로 나타나 청국장 첨가량만 유의성이 있는 것으로 나타났다. 향

〈Table 10〉 Polynomial equations calculated by RSM program (SAS) for Buseoktae *cheonggukjang* according to kind of experimental conditions

Responses	Polynomial equations	Model	R <sup>2</sup> 1)	P-value
Taste	=6.298-0.253X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.093X <sub>2</sub> <sup>3</sup> -1.247X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -0.237X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -0.397X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	Quadratic	0.9953	<.0001**
Color	=6.490+0.410X <sub>1</sub> +0.158X <sub>2</sub> -1.476X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -0.175X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> +0.008X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	Quadratic	0.9378	0.0159*
Texture	=6.051-0.596X <sub>1</sub> -0.088X <sub>2</sub> -1.172X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -0.105X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -0.227X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	Quadratic	0.9586	0.0072**
Flavor	=5.515-1.080X <sub>1</sub> +0.136X <sub>2</sub> -0.091X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.287X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> -0.241X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	Linear	0.9183	0.0268*
Overall quality	=6.433+0.368X <sub>1</sub> +0.186X <sub>2</sub> -1.507X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -0.235X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> +0.017X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	Quadratic	0.9802	0.0017**

1) R<sup>2</sup> is coefficient of determination, 2) X<sub>1</sub> : amount of *cheonggukjang*.

3) X<sub>2</sub> : time of boiling *cheonggukjang*, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

〈Table 11〉 Predicted equations of Buseoktae *cheonggukjang* from Face-centered central composite design

Source	Predicted equation	P-value	Lack of fit
Taste	$y=6.30-0.25A+0.093B-0.24AB-1.25A^2-0.40B^2$	<0.0001	0.2848
Color	$y=6.49+0.41A+0.16B-0.18AB-1.48A^2+8.57E^{-003}B^2$	<0.05	0.0685
Texture	$y=6.05-0.60A-0.088B-0.10AB-1.17A^2+0.238B^2$	<0.01	0.0358
Flavor	$y=5.52-1.08A+0.14B+0.29AB-0.091A^2-0.24B^2$	<0.05	0.0983
Overall quality	$y=6.43+0.37A+0.19B-0.24AB-1.51A^2+0.018B^2$	<0.01	0.6726

〈Table 12〉 Significance of regression equations (*F*-value) of Buseoktae *cheonggukjang* from Face-centered central composite design

Source	<i>F</i> -value				
	Taste	Color	Texture	Flavor	Overall quality
Model	168.45**	12.05*	18.53**	9.00*	39.66**
A-amount	62.72**	9.35*	33.73**	41.32**	24.19**
B-time	8.51*	1.39	0.74	0.66	6.21
AB	36.75**	1.14	0.70	1.95	6.56
A <sup>2</sup>	591.17**	47.14**	50.69**	0.12	157.47**
B <sup>2</sup>	59.95**	1.5 <sup>E-003</sup>	1.91	0.80	0.022

\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

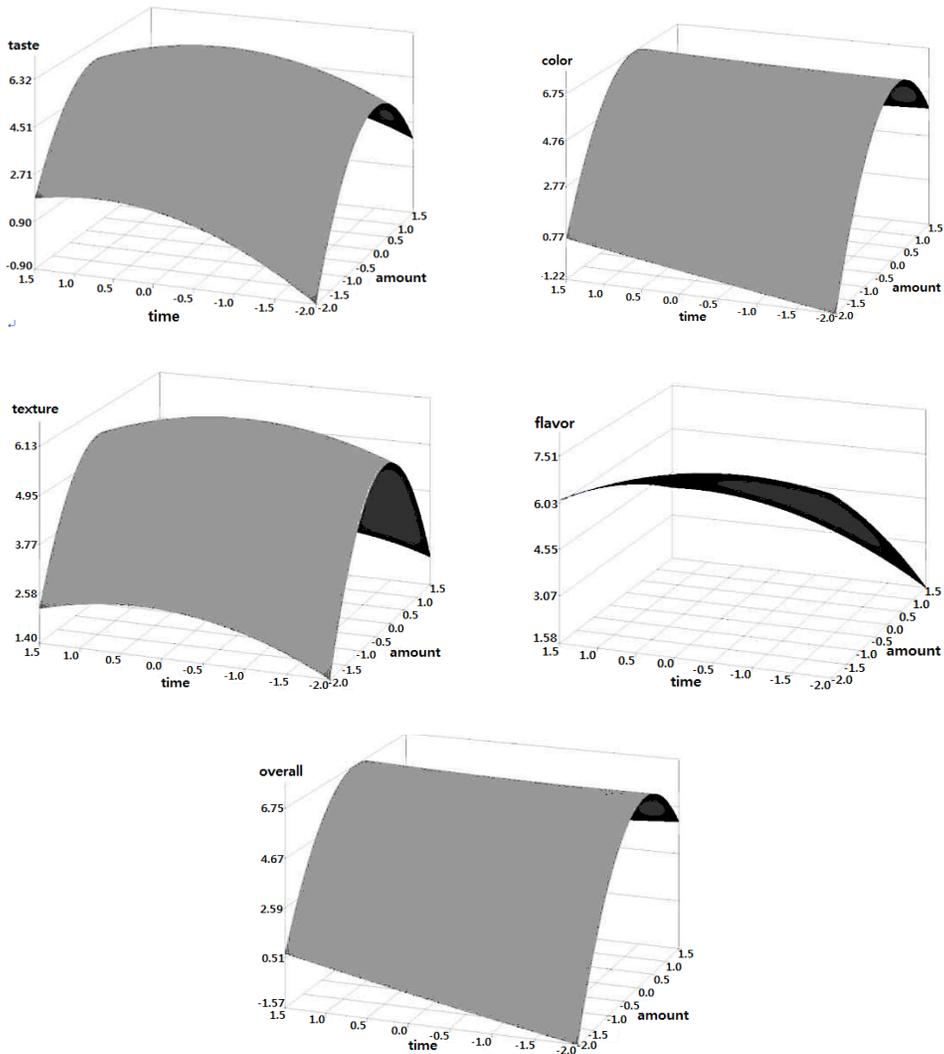
〈Table 13〉 Numerical optimization of Buseoktae *cheonggukjang* from Face-centered central composite design

Source	Constraint	Optimization
Factor	Amount	in range
	Time	in range
Predicted responses	Taste	maximize
	Color	in range
	Texture	in range
	Flavor	in range
	Overall quality	in range

은 직선회귀식으로 나타나 별다른 영향을 주지 못하는 것으로 보였다.

위 결과로 맛을 청국장 최적 조건으로 하였을 때의 실험값을 선택하여 맛은 6.29, 색은 6.48, 조직감은 6.05, 향은 5.49, 전반적인 기호도는 6.42로 청국장 첨가량 55.20 g과 시간 2.92 min이 최적

조건으로 예측되었으며(Table 13), 이를 최적조건으로 제시하였다. Seo BC(2001)는 우리 장류가 국제적인 식품으로 발전하기 위해서는 표준화된 제품의 생산 및 기호성을 증대시켜 소비자 만족도 향상 등 다양한 노력이 필요하다고 하였다. 많은 연구에서 청국장의 기능성(Sohn BH·Oh KH



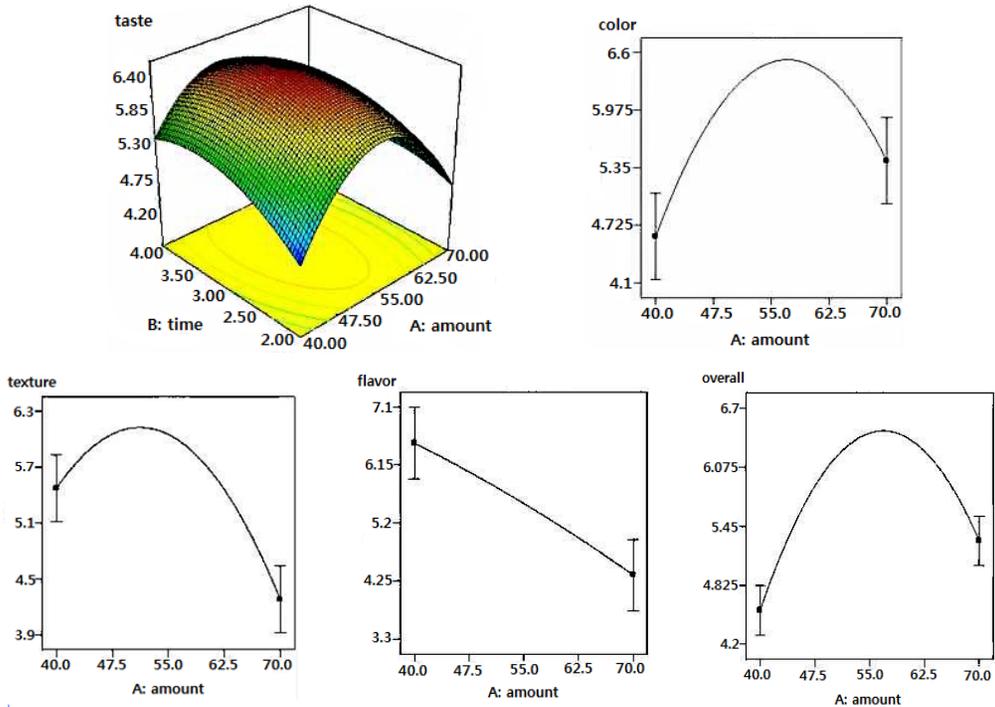
〈Fig. 4〉 Response surface (SAS) for sensory evaluation of Buseoktae *cheonggukjang*.

2006 ; Song YS · Kwon TW 2000)이 인정되고 있으므로 청국장 맛의 최적 조건을 제시하여 관련 종사자들에게 전반적인 메뉴 컨설팅을 함으로써 전통발효 식품인 청국장의 부가가치를 높일 수 있을 것이라 사료된다.

### V. 결 론

본 실험은 부석태, 대원콩, 우람콩과 부석태로 만든 청국장의 여성호르몬과 관련 있는 isoflavone

배당체의 정량분석을 실시하였으며, 반응표면분석으로 청국장 첨가량(40, 55, 70 g)과 청국장 끓기 시작점부터의 시간(2, 3, 4 min)을 요인으로 설정하여 청국장 맛의 최적 조건을 제시하고자 하였다. Daidzein의 함량은 부석태가 212.16  $\mu\text{g/g}$ , 대원콩이 212.21  $\mu\text{g/g}$ , 우람콩이 158.54  $\mu\text{g/g}$ 이었고, genistein 함량은 부석태가 318.84  $\mu\text{g/g}$ , 대원콩이 310.50  $\mu\text{g/g}$ , 우람콩이 262.71  $\mu\text{g/g}$ 이었다. 총 isoflavone의 함량은 부석태가 532.50  $\mu\text{g/g}$ , 대원콩 524.19  $\mu\text{g/g}$ , 우람콩은 422.71  $\mu\text{g/g}$ 으로



〈Fig. 5〉 Contour map response surface for the effect of addition and time on Buseoktae cheonggukjang.

나타나 부석태와 대원콩의 함량은 유사하였고 상대적으로 우람콩의 isoflavone 함량은 낮았다. 부석태청국장의 총 isoflavone의 함량은 A 청국장(32℃, 96시간 발효)이 430.10 μg/g, B 청국장(36~40℃, 30시간 발효)이 460.09 μg/g, C 청국장(36~38℃, 72시간 발효)이 417.46 μg/g으로 부석태청국장의 총 isoflavone 함량은 발효시간이 30시간으로 짧은 B 청국장이 상대적으로 조금 높았다. B부석태청국장 요인간의 맛에 의한 최적조건을 예측한 결과, 청국장 맛은 6.29, 색은 6.48, 조직감은 6.05, 향은 5.49, 전반적인 기호도는 6.42로 청국장 첨가량 55.20 g과 시간 2.92 min을 청국장 품질 표준화를 위한 최적조건으로 제시하였다.

### 한글 초록

이 연구의 목적은 영주에서 재배되고 있는 부석태콩과 부석태청국장의 이소플라본 중에서 여

성호르몬과 관련 있는 배당체 탐색과 영주시에서 유통되고 있는 부석태청국장의 품질표준화를 위한 것이다. 연구 결과는 다음과 같다.

첫째, LC-MS/MS를 통한 이소플라본 배당체를 분석한 결과, Daidzein의 함량은 부석태가 212.16 μg/g, 대원콩이 212.21 μg/g, 우람콩이 158.54 μg/g이었고, genistein 함량은 부석태가 318.84 μg/g, 대원콩이 310.50 μg/g, 우람콩이 262.71 μg/g이었다. 부석태청국장의 총 isoflavone의 함량은 A 청국장(32℃, 96시간 발효)이 430.10 μg/g, B 청국장(36~40℃, 30시간 발효)이 460.09 μg/g, C 청국장(36~38℃, 72시간 발효)이 417.46 μg/g이었다. 둘째, 청국장 맛의 표준화는 양(40, 55, 70 g)과 시간(2, 3, 4 min)을 요인으로 하여 반응표면분석을 한 결과, 청국장 맛은 6.29, 색은 6.48, 조직감은 6.05, 향은 5.49, 전반적인 기호도는 6.42로 청국장 첨가량 55.20 g과 시간 2.92 min을 청국장 품질 표준화의 최적조건으로 제시하였다.

주제어: 이소플라본, LC-MS/MS, 반응표면분석, 콩, 청국장

### 참고문헌

- Barnes ST, Grubbs C, Setchell KDR, Calson J (1990). Soy beans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog Clin Biol Res* 347:239-53.
- Beck V, Rohr U, Jungbauer A (2005). Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? *Journal of steroid Biochem Mol Biol* 94(5):499-518.
- Eldrige AC, Kwolek WF (1983). Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *Journal of Agric Food Chem* 31: 394.
- Gang JH, Gang MJ, Kim HH, Kim HS, Na YW, No NY, Moon JK, Sung JS, Jang SG, Jo GT, Yoon MS, Lee JR, Jang AC, Choi YM (2009). Catalogue of Korean native soybean germplasm preserved in RDA genebook. National Academy of Agricultural Science Rural Development Administration, Suwon, Korea, Vol 633.34-10-1, 235-236.
- Han YH, Park SK, Kim HYP (2008). Effect of soy protein hydrolyzate on lipid metabolism and antioxidant activity in the rat. *Journal of Korean Nutr* 41(2):119-216.
- Jeong PH, Shin DH, Kim YS (2008). Effect of germination and osmopriming treatment on enhancement of isoflavone contents in various soybean cultivars and *Cheonggukjang* (fermented unsalted soybean paste). *Journal of Food Sci* 73:H187-H194.
- Jung JB, Choi SK, Jeong DY, Kim YS, Kim YS (2012). Effects of germination time of soybeans on quality characteristics of *Cheonggukjang* fermented with an isolated bacterial strain. *Journal of Korean Food Sci Technology* 44(1):69-75.
- Kim SH, Yang JL, Song YS (1999). Physiological functions of *chongkukjang*. *Journal of Food Industry and Nutrition* 4(2):40-46.
- Kitamura K, Igita K, Kikuchi K, Kudou S, Okubo K (1991). Low isoflavone content in some early maturing cultivars, so-called "summer-type soybeans". *Japen Journal of Breed* 41: 651.
- Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K (1991). Malonyl isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agaric Biol Chem* 55(9):2227-2233.
- Lee DG, Kim NY, Jang MK, Yoo BH, Kim KY, Kim SG, Jeong YK, Lee SH (2006). Isolation of a fibrinolytic bacterium from *cheongkukjang* and characterization of its bioactivity. *Journal of Microbiol Biotechnol* 34:299-305.
- Lee S, Lee YB, Kim HS (2013). Analysis of the general and functional components of various soybeans. *Journal of Korean Soc Food Soc Nutr* 42(8):1255-1262.
- Matusi T, Yoo HJ, Hwang JS, Lee FS, Kim HB (2004). Isolation of angiotension I-converting enzyme inhibitory peptide from *Cheongkukjang*. *Journal of Korean Microbiology* 40(4): 355-358.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KDR, Bames S (1994). Soy intake and cancer risk: A review of the *vitro* and *in vivo* data. *Journal of Cancer Nutr.* 21:113.
- Naim M, Gestetner B, Bondi A, Birk Y (1996). Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *Journal of Agric Food Chem* 24(6):1174-1177.
- Ohta N, Kuwata G, Akihori H, Watanabe T (1979).

- Isoflavone constituents of soybeans and isolation of new acetyl daidzin. *J Agric Biol Chem* 47(3):1415-1419.
- Peterson G, Barnes S (1991). Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cell: Independence from estrogen receptors and the multidrug resistance gene. *Biochem Biophys Res Comm* 179:661-667.
- Seo BC (2001). The Korean traditional fermented soybean food industry for globalization. *Journal of Food Industry and Nutr* 6(3):28-33.
- Song YS, Kwon TW (2000). Hypocholesterolemic effect of soybean and soy products. *Journal of Food Industry and Nutr* 5(2):36-41.
- Sohn BH, Oh KH (2006). Isolation and characterization of the fibrinolytic enzyme producing bacterium isolated from naturally fermented *cheonggukjang*. *Journal of Korean Academic Industrial Cooperation Society* 7(3):476-482.
- Son DH, Kwon OJ, Ji WD, Choi UK, Kwon OJ, Lee EJ, Cho YJ, Cha WS, Chung YG (2000). The quality changes of *Cheonggukjang* prepared with bacillus sp. CS-17 during fermentation time. *Journal of Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43:1-6.
- Walter ED (1941). Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglycon, genistein, from soybeans. *J Am Chem Soc* 63:3273-3276.
- Wang H, Murphy PA (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 42:1666-1673.
- Yeongju city (2012). Buseoktae No 1. Searching Plant Variety Protection Database. KSVS. (Registration application 2012-367).

---

2015년 11월 11일 접수  
 2015년 12월 18일 1차 논문수정  
 2016년 02월 03일 논문 게재확정