

*Bacillus amyloliquefaciens*로 제조한 콩 발효물의 발효시간에 따른 품질 변화

신동선 · 최인덕* · 박지영* · 김남걸* · 이석기* · 정광호** · 박장환** · †최혜선*

농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부 전문연구원,
*농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부 농업연구사, **농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부 농업연구관

Changes in Quality of according to Fermentation Time of Fermented Soybean Produced Made with *Bacillus amyloliquefaciens*

Dong Sun Shin, In Duck Choi*, Ji Young Park*, Nam Geol Kim*, Seuk Ki Lee*,
Kwang-Ho Jeong**, Chang Hwan Park** and †Hye Sun Choi*

Post-Doctor, Dept. of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16429, Korea

*Researcher, Dept. of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16429, Korea

**Senior Researcher, Dept. of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16429, Korea

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the appearance, physicochemical, physical, and fermentation properties of the fermented soybean produced by manufacturing with inoculation the different types of microbial strains. The strains were inoculated by the NSI (natural strains inoculation), and the SSI (selective strain inoculation) were treatments. The appearance showed differences in color, viscous substance, and hardness depending on strains inoculation and fermentation duration. The pH, and total acidity were 6.40~7.26%, and 0.10~0.39% respectively with differences depending on the samples. The moisture content as the fermentation duration increased, the NSI (56.03~57.66%) decreased and the SSI (56.71~58.63%) increased. The physical characteristics of the hardness increased as the fermentation duration increased for the NSI and the SSI decreased. The color values for the L, a, and b values were 47.64~58.56, 7.15~9.08, and 12.41~17.30, respectively. The α -amylase and protease activities of the SSI were the highest among all treatments. The total viable cell counts of the fermented soybean products by strains were 5.02 to 9.77 log CFU/g, and SSI (fermentation, 48 hours) was the highest. The amino-type nitrogen contents of all samples were 301.62~746.97 mg% and the SSI showed the highest content. The amino acid had the highest glutamic acid content.

Key words: soybean, fermented soybean products, strains inoculation, quality

서 론

우리나라의 콩은 오래전부터 단백질 공급원으로서 두부, 두유, 장류 등 다양한 형태로 식생활에 이용해 왔으며, 영양적으로 가치가 높아 질병예방 및 치료 등 의학적 가치까지 알려지면서 그 이용도가 확대되고 있다(Jung 등 2016; Jayachandran & Xu 2019). 콩은 영양적 측면 이외에도 생리기능성 물질로 식물성 sterol, phenol 화합물, phytic acid, saponins,

isoflavones 등과 식이섬유, 올리고당 등이 보고되었다(Anderson & Wolf 1995). 콩 발효는 발효과정에서 미생물이 생성하는 여러 가지 효소들에 의해서 콩 껍질이나 세포막을 구성하는 식이섬유 및 세포 내의 당질이나 단백질이 분해되어 소화율이 향상되며, 유리아미노산의 함량이 증가한다(Kim & Hahn 2003). 이러한 콩 발효제품은 면역기능이 강화되고, 항산화, 혈전용해, 항돌연변이, 항암 등에 효과적인 것으로 알려져 있다(Cho 등 2000; Kwon 등 2004; Joo & Park 2010; Han

† Corresponding author: Hye Sun Choi, Researcher, Dept. of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16429, Korea. Tel: +82-31-695-0623, Fax: +82-31-695-0609, E-mail: choih9587@korea.kr

등 2015).

콩 발효제품으로는 우리나라의 경우, 청국장, 된장, 간장 등 장류가 대표적으로 원료 콩, 발효균의 종류 및 접종방법, 발효조건 등에 따라 발효특성이 다르게 나타나므로 품질을 결정하는데 중요한 요소가 되고 있다(Woo 등 2006; Lee 등 2015; Shin 등 2020). 발효 균주의 접종은 자연균 또는 발효 특성이 우수한 균주를 선택하여 접종하여 이용하고 있는데, 자연균 접종은 자연적으로 유래된 수십 종의 곰팡이와 세균들이 복합적으로 작용하기 때문에 표준화 및 산업화의 어려운 문제가 발생한다(Kwon 등 2004). 이에 따라 산업체에서는 균일한 품질로 대량생산하기 위하여 자연균 접종보다는 선택균 접종 방법을 이용하고 있으며, 이로 인해 대량생산 균주의 스타터 개발에 대한 연구도 지속적으로 이루어지고 있다(Woo 등 2006; Lee 등 2016).

콩 발효용 균주에 대한 연구로는 청국장 제조에 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* 및 *Bacillus megaterium* 등 *Bacillus*속의 균주를 단독으로 선택 접종한 연구(Seok 등 1994; Choi 등 1998; Kim 등 2003; Sasithorn 등 2017)와 두 균주 또는 여러 가지 균주를 혼합하여 접종한 연구(Youn 등 2002; Stein T 2005; Lee 등 2015; Cho 등 2016), 장류 유래 효소활성(amylase, protease activity)이 높은 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주를 이용한 콩 발효물의 품질특성 연구(Lee 등 2014) 등이 보고되었지만, 콩 발효에 이용되는 균주 접종 방법 및 발효 조건에 대한 다양한 연구가 더 필요하다.

본 연구에서는 산업체에서 균일하고 표준화된 콩 발효제품을 개발하는데 기초 자료로 사용하고자 자연균과 선택된 단일균인 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주를 이용하여 콩 발효물을 제조하여 발효 시간별 품질 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 콩 발효물 제조 및 사용 균주

실험에 사용된 균주는 장류 유래 *Bacillus amyloliquefaciens* HJ5-2 균주(한국농업미생물자원센터, Korean Agricultural Culture Collection, KACC, Jeonju, Korean)를 분양받아 실험에 사용하였다. 균주는 LB broth(Difco, Sparks, MD, USA)에 18시간 배양된 배양액을 사용하였다. 실험에 사용된 콩은 대원콩(Miryang, Korea)으로 국립식량과학원(밀양 소재)에서 2018년 재배 및 수확한 것을 제공받아 콩 발효물 제조는 Lee 등(2014)의 방법으로 하였다. 콩 300 g을 수세하여 15시간 동안 23±2℃의 물에 침지시킨 후 30분 물 빼기를 하였다. 수침된 콩을 고압증기멸균기(BF-60AC autoclave, Biofree Co., Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 증자하였다(121℃, 30 min). 균주 접종은 증자된 콩을 자연균(NSI)

접종과 선택균(SSI) 접종으로 나누어 실험을 진행하였다. 자연균(NSI) 접종은 실험실에서 1시간 공기 중에 노출시켜 접종하였으며, 선택균(SSI) 접종은 증자된 콩을 무균 조건하에 40℃ 이하로 식힌 다음 전 배양된 균주(*Bacillus amyloliquefaciens* HJ5-2, OD: 0.5, 1.7×10⁸ CFU/g)를 1%(v/w) 접종하였다. 이것을 각각 스티로폼 상자(21×27×14 cm³)에 담아 온도가 37℃, 습도가 70%인 발효실에서 시료에 따라 0, 12, 24 및 48시간 배양하여 콩 발효물을 제조하였다. 추출물은 일정량의 시료를 채취한 다음 증류수를 첨가하여 homogenizer(HG-15A, Daihan Scientific Co., Ltd., Wonju, Korea)로 균질화한 다음 진탕배양기(WiseCube WIS-RL010, Daihan Scientific Co., Ltd.)에서 150 rpm에서 1시간 동안 교반하여 10분간 원심분리(10,000×g, 4℃)한 상층액을 시료로 하여 추출물을 제조하였다.

2. 콩 발효물의 발효 시간별 이화학적 특성 변화

콩 발효물의 이화학적으로 pH, 총산도 및 수분함량을 측정하였다. pH는 시료를 10배 희석한 후 pH meter(Metrohm 691, Metrohm, Herisau, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며, 총산도 측정은 시료 10 mL에 0.1 N NaOH 용액을 넣은 다음 pH가 8.3이 될 때까지 NaOH의 소비 mL를 측정하여 젖산함량(% w/w)으로 나타내었다. 수분함량은 시료 1 g을 취하여 적외선 수분측정기(FD-600, Kett, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

3. 콩 발효물의 발효 시간별 경도 및 색도 측정

콩 발효물의 저장 중 경도(hardiness)는 각각 콩 발효물의 크기가 비슷한 것으로 하여 Texture analyzer(Zwick Roell, Ulm, Germany)를 사용하여 측정하였다. 분석을 위하여 probe는 diameter 4 mm를 이용하였고, pre-test speed 2 mm/s, post-test speed 2 mm/s, strain 50% 조건으로 중앙을 눌렀을 때 얻어지는 force graph로 부터 산출한 다음 최고 peak 값으로 표기하였고, 30회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다. 색도는 색차계(CM-3500d, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 일정한 양의 시료를 Hunter's color value인 L값(lightness), a값(redness) 및 b값(yellowness)으로 하였다. 이때 사용된 표준 백색판(standardplate)의 값은 L값 98.45, a값 -0.02, b값 0.02이었다.

4. 콩 발효물의 발효 시간별 효소, 점질물질, 총균수 측정

콩 발효물의 효소활성도는 α-amylase와 protease를 Von Worthington(1993)과 Lee 등(2014)의 방법에 준하여 측정하였다. α-Amylase 활성도는 시료 추출물 1 mL에 1%(v/w) soluble starch(0.02 M phosphate buffer, pH 7.0)를 3 mL 첨

가하여 40°C에서 10분 동안 반응시켰다. 여기에 1 M HCl 10 mL를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음, 요오드 용액(0.005% I₂+0.05% KI)을 10 mL를 넣어 발색시켰다. 이를 분광광도계(T80+ UVNIS Spectrophotometer, PG, Instruments, Alma Park, UK)를 이용하여 660 nm에서 측정하였다. 이것을 조효소액 1 mL가 1분 동안 starch 0.1 mg을 분해하는 양을 1 unit로 계산하였다. Protease 활성도는 시료 추출물 1 mL에 0.6%(v/w) casein 기질용액(0.2 M phosphate buffer, pH 7.0)에 반응(37°C, 10 min)시킨 다음 0.44 M TCA(trichloroacetic acid) 5 mL를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이후 실온에서 30분 방치한 다음 여과(No.2, Whatman, Buckinghamshire, UK)한 후 여액 2 mL에 0.55 M sodium carbonate(Na₂CO₃) 5 mL와 Folin reagent 용액(4배 희석)을 1 mL를 넣어 30분 반응시킨 후 660 nm에서 측정하였다. 표준물질은 tyrosine(Sigma Aldrich)으로 하여 동일하게 분석한 후 검량선을 작성하여 1 unit은 1분 동안 tyrosine 1 µg을 유리시키는 효소의 양으로 하였다.

점질물질 측정은 시료에 일정량의 증류수를 첨가하여 30분 동안 진탕한 후 여과 및 원심분리(4,000×g, 4°C)하여 얻은 상등액 5 mL를 105°C에서 증발 및 건조하여 무게를 측정 후 시료에 대한 건물량(%)으로 나타내었다(Lee 등 2014). 총균수 측정은 시료를 일정량을 멸균 생리식염수로 단계별로 희석한 다음 미리 준비된 PCA(plate count agar, Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)배지에 접종한 후 도말하였다. 이것을 배양실(37°C)에서 24시간 동안 배양한 다음, 생성된 colony수를 계수하여 log(CFU/g)으로 나타내었다.

5. 콩 발효물의 발효 시간별 아미노태질소 측정

아미노태 질소 함량은 Formol 적정법으로 Choi 등(2007)의 방법을 참고하여 측정하였다. 시료 추출물 5 mL에 중성 formalin 용액 10 mL와 증류수 10 mL를 혼합한 후 0.5% (v/w) phenolphthalein 용액 2~3방울을 첨가하였다. 여기에 0.1 N sodium hydroxide(NaOH)를 첨가하여 미홍색이 될 때까지 적정량을 측정하였고, 공시험도 동일한 방법으로 적정한 후 아미노태질소 함량을 산출하였다.

6. 콩 발효물의 발효 시간별 유리아미노산 분석

콩 발효물의 발효시간별 유리아미노산 분석은 동결건조 시료 0.2 g에 에탄올을 5 mL 첨가하여 1시간 동안 균질화하였다. 균질화된 시료를 원심분리(10,000×g, 10 min, Hanil; ULTRA 4.0, Seoul South Korea)한 후 감압농축기(rotary evaporator, EYELA A-3S, Rikakikai Co., Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였다. 이것을 0.02 N HCl 20 mL에 녹여 10배 희석한 다음 0.22 µm membrane filter(Merck Millipore,

Darmstadt, Germany)로 여과하여 아미노산 자동분석기(HITACH L-8900, Post-reaction type)에 주입하여 분석하였다(Lee 등 2014).

7. 통계처리

실험결과 data는 SPSS 시스템(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) soft-ware package(version 12.0)를 이용하여 평균과 표준편차를 산출하였다. 평균값은 one-way analysis of variance(ANOVA)로 비교 분석하였으며, Duncan's multiple range test에 의하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 평균 간 다중비교를 실시하여 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 콩 발효물의 발효 시간별 외관특성 변화

콩 발효물의 발효 시간별 외관을 살펴보면 Fig. 1에서 보듯이 균 접종 및 발효시간에 따라 다른 양상을 보였다. 콩 발효물의 색은 외관상 두 처리군 모두에서 시간이 경과할수록 색의 더 짙어지는 변화를 보였다. 자연균(NSI) 접종은 경우 발효시간이 경과할수록 콩이 더 단단하였으며, 발효 48 시간에는 약간의 점질물질이 형성되었음을 확인하였다(Fig. 1a). 선택균(SSI) 접종은 발효시간이 경과할수록 콩이 덜 단단하였으며, 발효 12시간에도 많은 점질물질이 생성되었다(Fig. 1b). Lee 등(2014)은 청국장 제조 시 균주를 자연균과 선택균 접종으로 유산균을 이용하였는데, 외관상 자연균 접종이 유산균을 단독 접종한 것보다 점질물질이 더 많이 형성되었다고 보고하였다. 이러한 보고와 본 실험결과, 콩 발효물의 외관은 반대 양상으로 선택균(SSI) 접종이 점질물질이 더 많이 형성되는 차이를 보였다. 이러한 차이는 자연균(NSI) 접종은 여러 가지 미생물이 존재하여 발효양상이 다를 것으로 예측되며, 선택균(SSI) 접종은 선택한 균의 종류와 접종방법 등 특성이 다르기 때문으로 사료된다. 한편, 발효 60시간에는 자연균(NSI) 접종은 발효 정도는 잘 이루어졌으나, 반면에 선택균(SSI) 접종은 암모니아 냄새가 더 많이 나고 색이 더 짙어진 것이 확인되었다(자료 미제시). 따라서, 콩 발효물 제조 시 균주 접종방법은 물론 최적 발효시간이 함께 결정되어야 할 것으로 보인다.

2. 콩 발효물의 발효 시간별 이화학적 특성 변화

발효 시간별 콩 발효물의 이화학적 특성으로 pH, 총산도 및 수분함량을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. pH의 경우 자연균(NSI) 접종은 pH 6.40~6.74, 선택균(SSI) 접종은 pH 6.41~7.26으로 발효시간이 경과할수록 증가하는 변

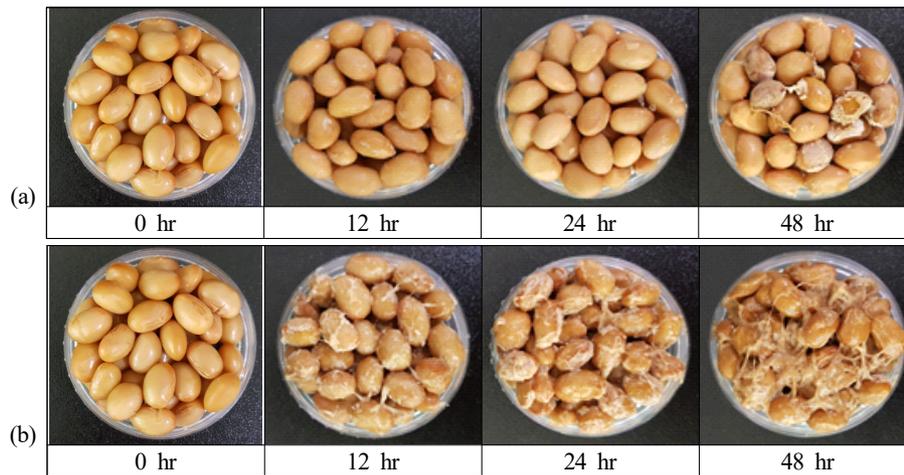


Fig. 1. Images of fermented soybean products which were produced with the inoculation of microbial strains. (a) NSI: natural strains inoculation, (b) SSI: selective strain inoculation (*B. amyloliquefaciens* HJ5-2).

Table 1. Physicochemical properties of fermented soybean products which were produced with the inoculation of microbial strains

Strains ¹⁾	Fermentation time (hr)	pH	Total acidity (%)	Moisture (%)
NSI	0	6.40±0.02 ^{b2)}	0.10±0.01 ^b	57.50±0.10 ^a
	12	6.44±0.03 ^b	0.10±0.02 ^b	57.48±0.10 ^a
	24	6.70±0.02 ^a	0.12±0.01 ^b	57.66±0.42 ^a
	48	6.74±0.01 ^a	0.27±0.01 ^a	56.03±0.20 ^b
SSI	0	6.41±0.01 ^c	0.10±0.01 ^c	56.98±0.16 ^c
	12	6.80±0.01 ^b	0.39±0.01 ^a	56.71±0.16 ^c
	24	6.87±0.03 ^b	0.39±0.03 ^a	58.15±0.05 ^b
	48	7.26±0.01 ^a	0.37±0.01 ^{ab}	58.63±0.33 ^a

¹⁾ NSI: natural strains inoculation, SSI: selective strain inoculation (*B. amyloliquefaciens* HJ5-2).

²⁾ Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

화를 보였다. 총산도는 발효시간에 따라 자연균(NSI) 접종은 0.10~0.27로 다소 증가하였고, 선택균(SSI) 접종은 변화가 없거나 다소 감소하는 경향을 보였다. 이러한 pH와 총산도의 차이는 콩의 발효과정 중 단백질이 아미노산으로 분해되어 생성되는 암모니아 정도에 따라 pH와 총산도가 다르게 나타나는데(Lee 등 1999), 이에 따라 본 연구에서는 콩 발효물의 균주 접종 및 발효시간에 따른 발효된 정도가 다르기 때문에 사료된다(Shin 등 2020). Table 1에서 보듯이 수분함량을 측정된 결과, 균주 접종에 따라 다르게 나타났다. 자연균(NSI) 접종인 경우 57.50~57.48%로 발효시간이 증가함에 따라 감소하였고, 선택균(SSI) 접종은 56.71~

58.63%로 증가하였다. 이러한 결과는 앞서 Fig. 1의 외관에서 보듯이 선택균(SSI) 접종이 수분함량이 높은 것과 관련이 있을 것으로 보인다. 일반적으로 콩 발효물의 수분함량은 38.66~65.79% 범위로 발효조건에 따라 다른 것으로 알려져 있으며, Choi 등(2007)은 균의 종류 및 발효시간을 달리하여 제조한 청국장 수분함량이 다르게 나타났다고 보고한 것과 본 실험의 결과와 유사하였다. 따라서, 미생물의 종류 및 접종방법, 온도, 습도, 시간 등의 발효조건에 따라 수분함량이 다르며, 발효정도를 알 수 있는 점질물질 생성량이 많으면 수분증발 방지효과가 있어 수분함량의 변화를 적게 할 것으로 사료된다.

3. 콩 발효물의 발효 시간별 경도 및 색도 변화

Table 2에서 보는 바와 같이 콩 발효물의 경도(hardness)와 색도를 측정하였다. 자연균(NSI) 접종은 발효시간이 증가할수록 증가하였고, 선택균(SSI) 접종은 감소하는 경향으로 앞서 외관특성(Fig. 1)과 수분함량(Table 1)에서 보듯이 비슷한 경향이였다. 전반적으로 자연균(NSI) 접종(202.00~236.73 g)보다 선택균(SSI) 접종(131.50~153.40 g)이 더 단단한 것으로 나타났다. 또한, 콩 발효식품의 색은 발효과정에서 발효균주가 지닌 단백질 분해효소와 당 분해효소에 의해 각각 생성된 아미노산과 당 성분에 의해 갈색색소가 생성되며, 초기에 비해 8배 이상 증가하고, 관능적 기호도에 영향을 주는 중요한 품질지표로 알려져 있다(Lee 등 1999). 색도를 측정된 결과, L값의 경우 자연균(NSI) 접종은 발효 24시간이 58.56으로 가장 높았으며, 선택균(SSI) 접종은 발효 12시간이 55.42로 가장 높았다. a값은 발효 48시간에 자연균(NSI) 접종은 9.08로 가장 높은 반면, 선택균(SSI) 접종

Table 2. Hardness and color values of fermented soybean products which were produced with the inoculation of microbial strains

Strains ¹⁾	Fermentation time (hr)	Hardness (g)	Color properties		
			L	a	b
NSI	0	158.80±17.40 ^{d2)}	57.97±0.46 ^{b2)}	8.13±0.04 ^d	17.28±0.45 ^a
	12	202.00±26.30 ^c	57.37±0.37 ^{b2)}	8.92±0.03 ^b	17.20±0.22 ^b
	24	219.67±30.71 ^b	58.56±0.33 ^a	8.74±0.01 ^c	17.12±0.14 ^b
	48	236.73±29.32 ^a	55.78±0.22 ^c	9.08±0.11 ^a	14.87±0.36 ^c
SSI	0	158.20±10.23 ^a	57.84±0.64 ^a	8.15±0.03 ^a	17.30±0.57 ^a
	12	153.40±9.46 ^b	55.42±1.12 ^a	7.86±0.09 ^b	15.89±0.10 ^b
	24	146.27±21.42 ^c	54.01±0.46 ^b	7.48±0.10 ^c	15.24±0.15 ^c
	48	131.50±22.19 ^d	47.64±0.03 ^c	7.15±0.35 ^d	12.41±0.58 ^d

¹⁾ NSI: natural strains inoculation, SSI: selective strain inoculation (*B. amyloliquefaciens* HJ5-2).

²⁾ Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

은 7.15로 가장 낮은 값을 나타내었다. b값은 자연균(NSI) 접종이 14.87~17.28, 선택균(SSI) 접종이 12.41~17.30 수준으로 나타나 선택균(SSI) 접종이 더 낮았다. 따라서 균주의 접종 방법 및 발효시간에 따라 콩 발효물의 색은 발효숙성 과정에서 분해된 당과 아미노산의 양에 의해 색이 다르게 나타난 것으로 사료된다.

4. 콩 발효물의 발효 시간별 효소, 점질물질, 총균수 변화

콩 발효물의 효소, 점질물질 및 총균수의 변화를 측정된 결과, 시료에 따라 차이를 보였다(Table 3). α -Amylase의 활성은 당의 감미성분으로 관여하여 품질에 영향을 미치는 중요한 효소로 알려져 있다(Lee 등 2014). α -Amylase의 효소 활성은 자연균(NSI) 접종이 2.18~12.71 unit/g보다 선택균

(SSI) 접종이 2.25~45.39 unit/g 범위로 더 높았다. Shin 등 (2020)의 연구에서 *B. amyloliquefaciens*를 스타터로 이용하여 24시간 발효하여 제조한 품종별 콩 발효물의 α -amylase 활성은 6.63~21.56 unit/g이었다고 보고한 것과 본 연구에서 콩 발효물의 선택균(SSI)을 접종한 시료의 발효 24시간을 비교해 보면 21.83 unit/g으로 비슷한 수준이었다. Protease 효소활성은 polypeptide와 아미노산 등을 생성하여 맛에 영향을 주며 소화흡수율을 높인다(Jung 등 2009). 콩 발효물의 protease 효소활성을 측정된 결과, 발효 시간에 따라 자연균(NSI) 접종이 128.38~244.63 unit/g, 선택균(SSI) 접종이 130.25~965.25 unit/g으로 나타났다. 이는 Choi 등(2007)과 Lee 등(2014)의 연구에서 균의 종류에 따른 콩 발효물의 protease 활성은 발효 시간에 따라 차이를 보였다는 것과 본

Table 3. EA, VS and TVC of fermented soybean products which were produced with the inoculation of microbial strains

Strains ¹⁾	Fermentation time (hr)	EA ²⁾ (unit/g)		VS ³⁾ (%)	TVC ⁴⁾ (log CFU/g)
		α -Amylase	Protease		
NSI	0	2.18±0.06 ^{d5)}	128.38±2.86 ^d	0.15±0.03 ^d	5.02±0.07 ^d
	12	2.38±0.32 ^c	155.25±1.88 ^c	2.56±0.33 ^c	5.51±0.09 ^c
	24	6.68±0.43 ^b	197.75±3.90 ^b	3.59±0.49 ^b	6.84±0.08 ^b
	48	12.71±0.79 ^a	244.63±5.73 ^a	5.75±0.13 ^a	8.88±0.02 ^a
SSI	0	2.25±0.10 ^d	130.25±2.17 ^d	0.18±0.01 ^d	8.07±0.06 ^c
	12	14.31±1.02 ^c	395.88±2.86 ^c	6.94±0.01 ^c	9.11±0.02 ^b
	24	21.83±1.14 ^b	595.25±4.33 ^b	7.91±0.17 ^b	9.03±0.01 ^b
	48	45.39±4.07 ^a	965.25±3.75 ^a	8.67±0.02 ^a	9.77±0.03 ^a

¹⁾ NSI: natural strains inoculation, SSI: selective strain inoculation (*B. amyloliquefaciens* HJ5-2).

²⁾ EA: enzymatic activity.

³⁾ VS: viscous substance.

⁴⁾ TVC: total viable cell.

⁵⁾ Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

실험결과와 유사하였다. 이것은 콩 발효물의 제조 조건에 따라 효소활성에 영향을 준 것으로 사료된다.

점질물질은 발효과정에서 생성되는 polypeptide와 과당이 중합된 fructan의 혼합물로 생리기능성 물질로 알려져 있다 (Yang & Kim 2013). 콩 발효물의 점질물질의 변화를 측정 한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 자연균(NSI) 접종이 0.15~5.75%, 선택균(SSI) 접종이 0.18~8.67%이었으며, 발효 시간이 증가할수록 점질물질의 함량이 더 많았다. 자연균(NSI) 접종보다 선택균(SSI) 접종군의 점질물질 함량이 높게 나타나 발효가 더 진행되었음을 알 수 있었다. Baek 등 (2008)은 청국장 발효 24시간 후의 점질물질 함량은 사용균주에 따라 2.84~5.66%이었다고 보고하여 본 실험의 발효 24시간에 비해 각각 3.59% 및 8.67%로 더 높았다. 총균수를 측정 한 결과, 균주 접종방법 및 발효시간에 따라 차이를 보였다(Table 3). 자연균(NSI) 접종군은 5.02~8.88 log CFU/g 이었고, 선택균(SSI) 접종은 8.07~9.77 log CFU/g 수준으로 나타났다. Lee 등(2014)은 24시간 발효한 콩 발효물의 총균수는 9.00 CFU/g 정도라고 보고하여 선택균(SSI) 접종군과 비슷하였으며, 자연균(NSI) 접종은 장소, 노출시간 등 환경조건에 따라 다르고, 균주의 수 및 접종량을 균일하게 하는 것은 어려울 것으로 보인다.

5. 콩 발효물의 발효 시간별 아미노태질소 변화

Fig. 2에서 보는 바와 같이 발효 시간별 콩 발효물의 아미노태질소 함량의 변화는 발효 48시간에 가장 높게 나타났다. 아미노태질소 함량은 발효정도를 알 수 있는 중요한 품질지표로 사용되고 있다. 콩 발효물의 아미노태질소 함량은 자연균(NSI) 접종이 301.62~429.58 mg%이었으며, 선택접

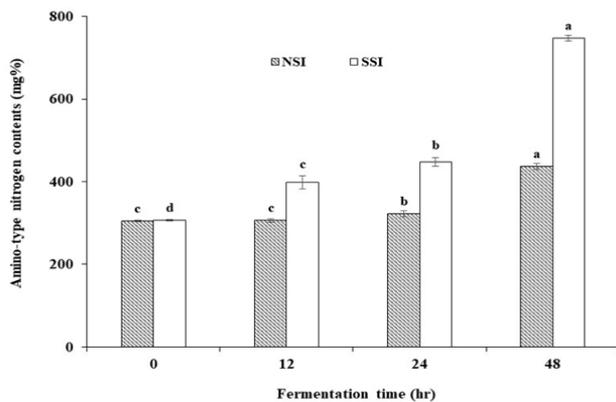


Fig. 2. Amino-type nitrogen contents of fermented soybean products which were produced with the inoculation of microbial strains. NSI: natural strains inoculation, SSI: selective strain inoculation (*B. amyloliquefaciens* HJ5-2).

종(SSI)군이 302.07~746.97 mg% 범위로 발효시간이 증가함에 따라 증가하였다. 이는 앞서 효소활성과 점질물질의 결과(Table 3)와도 비슷한 경향으로 나타났다. 이러한 결과는 균주 접종과 발효시간에 따라 발효과정에서 미생물이 생산하는 효소작용이 다르기 때문에 발효에 영향을 주었을 것으로 사료된다. Shin 등(2019)은 균주 *B. amyloliquefaciens* 를 선택 접종한 콩 발효물의 발효 24시간 후 아미노태질소 함량을 측정 한 결과, 시료에 따라 401.07~524.47 mg%이었다는 보고와 본 실험의 선택균(SSI) 접종군 발효 24시간 결과와 비교해 보면 비슷한 수준으로 나타났다.

6. 콩 발효물의 발효 시간별 유리아미노산 변화

콩 발효물의 발효 시간별 아미노산 함량에 대한 분석 결과는 Table 4에 나타내었다. 총 아미노산은 선택균(SSI)을 접종한 처리군의 발효 48시간에 가장 높은 함량을 나타내었다. 이는 앞서 결과에서 발효의 특성을 알 수 있는 protease의 활성(Table 2)과 아미노태질소 함량(Fig. 2)의 결과와 비슷한 경향이었다. 발효초기에서 발효 48시간까지 아미노산 중 glutamic acid가 가장 많았고, 그 다음으로 lysine, cysteine, arginine 순으로 나타났다. 발효시간이 증가할수록 대부분 증가하였지만 serine, proline, histidine은 감소하는 경향이었다. Methionine은 발효초기부터 극소량이 함유되어 있었는데, 이것은 산에 의해 분해된 것으로 사료된다(Seok 등 1994). 맛에 영향을 주는 주요 아미노산 중 감칠맛(glutamic acid+aspartic acid)이 가장 높게 나타났다. 쓴맛(valine+methionine+isoleucine+leucine+phenylalanine)은 선택균(SSI) 접종군의 경우, 발효초기보다 발효 48시간에 약 1.7배, 단맛(alanine+glycine+lysine)은 약 2.0배 증가하는 경향을 보였다. 이는 기 보고된 연구에서 콩 발효물의 발효 24시간에 아미노산 중 glutamic acid가 가장 높았으며, 감칠맛이 가장 높았다는 결과와 본 실험의 결과와 유사하였다(Gil 등 2016). 이에 따라 콩 발효물의 아미노산 함량은 발효시간이 경과할수록 증가하였지만, 제품의 맛과 향, 성분 등 품질도 함께 고려되어야 산업체의 품질기준이 마련될 것으로 보인다.

요약 및 결론

본 연구에서는 균주 및 발효시간을 달리하여 제조한 콩 발효물의 외관, 이화학적 정도, 색도, 효소, 점질물질, 총균수, 아미노태질소 및 아미노산 등의 품질변화를 비교 분석하였다. 콩 발효물의 외관은 균주 및 발효시간에 따라 색, 점질물질, 정도 등의 차이를 보였다. 이화학적 특성으로 pH, 총산도 및 수분함량을 측정 한 결과, 자연균(NSI) 접종은 pH 6.44~6.74, 선택균(SSI) 접종은 pH 6.80~7.26이었으며, 총산

Table 4. Free amino acid contents of fermented soybean products which were produced with the inoculation of microbial strains (Unit: mg/100g, dry basis)

Composition	NSI ¹⁾				SSI ²⁾			
	0	12	24	48	0	12	24	48
Aspartic acid	3.48	3.65	4.02	4.12	3.53	4.67	5.82	4.68
Threonine	7.04	8.43	9.56	12.65	7.28	12.22	14.02	16.74
Serine	5.67	4.15	3.68	3.21	5.81	4.93	4.28	3.84
Glutamic acid	9.12	18.26	31.24	40.48	9.56	38.36	47.24	52.75
Proline	18.56	16.31	15.78	13.89	18.41	16.46	13.85	11.71
Glycine	5.16	5.82	6.43	8.15	5.03	6.68	8.35	9.24
Alanine	20.74	22.36	25.58	27.24	21.35	24.76	27.35	30.54
Cysteine	24.25	26.38	29.45	31.67	24.57	30.22	34.16	36.48
Valine	19.63	20.47	22.06	25.13	20.07	23.84	25.77	28.41
Methionine	1.33	1.54	2.36	2.94	1.36	1.97	3.06	3.65
Isoleucine	4.12	5.39	6.55	6.58	4.09	6.55	7.20	6.98
Leucine	12.03	14.24	15.72	18.25	11.77	15.24	19.96	22.35
Tyrosine	14.41	16.12	17.35	21.96	14.45	17.23	22.81	26.31
Phenylalanine	3.42	3.96	4.34	6.16	3.57	4.68	6.12	8.78
Histidine	27.67	26.88	25.02	23.89	28.25	26.07	23.72	22.13
Lysine	21.23	24.74	28.38	32.94	22.37	26.74	32.46	37.23
Arginine	11.40	14.64	18.69	24.75	11.74	14.95	23.76	26.33
Total ³⁾	209.26	233.34	266.21	304.01	213.21	275.57	319.93	348.15

¹⁾ NSI: natural strains inoculation.

²⁾ SSI: selective strain inoculation (*B. amyloliquefaciens* HJ5-2).

³⁾ Total amino acid.

도는 발효시간에 따라 자연균(NSI) 접종은 0.10~0.27로 다소 증가하였고, 선택균(SSI) 접종은 변화가 없거나 다소 감소하는 경향을 보였다. 수분함량은 자연균(NSI) 접종의 경우 56.03~57.48%로 발효시간이 증가함에 따라 감소하였고, 선택균(SSI) 접종은 56.71~58.63%로 증가하였다. 경도는 자연균(NSI) 접종은 발효시간이 증가할수록 증가하였고, 선택균(SSI) 접종은 감소하는 경향으로 나타났다. 색도는 L값의 경우 자연균(NSI) 접종은 발효 24시간(58.56), 선택균(SSI) 접종은 발효 12시간(55.42)으로 가장 높았다. a값과 b값은 각각 7.15~9.08 및 12.41~17.20 수준으로 나타났다. 효소활성은 선택균(SSI) 접종에서 높은 활성을 보였으며, 발효시간이 증가할수록 증가하는 경향이였다. 점질물질은 균주 및 발효시간에 따라 2.56~8.67% 수준으로 차이를 보였으며, 총균수는 3.54~9.77 CFU/g 범위로 나타났다. 아미노태질소 함량은 자연균(NSI) 접종이 305.71~429.58 mg%이었으며, 선택균(SSI) 접종이 398.27~746.97 mg% 범위로 발효시간이 증가함에 따라 증가하였다. 총 아미노산 함량은 선택균(SSI)을 접종한 처리군의 발효 48시간에 가장 높은 함량을 나타

내었으며, 아미노산 중 glutamic acid가 가장 많이 검출되었다. 이상의 결과로 부터 콩 발효물의 제조 시 균주 및 발효시간에 따라 발효 양상이 다르다는 것을 확인하였다. 적합한 균주 접종 및 발효시간 등 발효 조건이 함께 결정되어 이루어진다면 제품의 품질을 개선하는데 도움이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 AGENDA 연구사업(과제번호: PJ01350803)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Anderson RL, Wolf WJ. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J Nutr* 125:581S-588S
- Baek LM, Park LY, Park KS, Lee SH. 2008. Effect of

- starter cultures on the fermentative characteristics of *Cheonggukjang*. *Korean J Food Sci Technol* 40:400-405
- Cho MJ, Shim JM, Lee JY, Lee KW, Yao Z, Liu X, Kim JH. 2016. Properties of *Meju* fermented with multiple starters. *Microbiol Biotechnol Lett* 44:109-116
- Cho YJ, Cha WS, Chun SS, Choi UK, Bok SK, Kim MU. 2000. Production and separation of anti-hypertensive peptide during *chunggugjang* fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43:247-252
- Choi HS, Joo SJ, Song IG, Min KB, Kim KS, Yoon HS. 2007. Quality characteristic of hwangki (*Astragalus membranaceus*) *chungkukjang* during fermentation. *Korean J Food Preserv* 14:356-363
- Choi UK, Ji WD, Chung YG. 1998. Characteristic of *Cheonggukjang* produced by *Bacillus subtilis* DC-2. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27:846-851
- Gil NY, Song J, Eom JS, Park SY, Choi HS. 2016. Changes of physicochemical properties of *Cheonggukjang* prepared with various soybean cultivars and *Bacillus subtilis* HJ18-9. *Korean J Food Preserv* 23:811-818
- Han KH, Kim DH, Song KY, Lee SW, Han SH. 2015. The effects of methanol extract from *Cheonggukjang* in T98G cells and early stage of focal ischemia rodent models. *Korean J Food Nutr* 28:965-972
- Jayachandran M, Xu B. 2019. An insight into the health benefits of fermented soy products. *Food Chem* 271:362-371
- 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
- Jung HK, Jeong YS, Youn KS, Kim DI, Hong JH. 2009. Quality characteristics of soybean paste (*Doenjang*) prepared with *Bacillus subtilis* DH3 expressing high protease levels, and deep-sea water. *Korean J Food Preserv* 16:348-354
- Jung TD, Shin GH, Kim JM, Oh JW, Choi SI, Lee JH, Lee SJ, Heo IY, Park SJ, Kim HT, Kang BK, Lee OH. 2016. Assessment of validation method for bioactive contents of fermented soybean extracts by bioconversion and their antioxidant activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45:680-689
- Kim KY, Hahm YT. 2003. Recent studies about physiological functions of *Cheonggukjang* and functional enhancement with genetic engineering. *J Genet Engin Res* 16:1-18
- Kim YS, Jung HJ, Park YS, Yu TS. 2003. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *Chunggukjang*. *Korean J Food Sci Technol* 35:475-478
- Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY. 2004. Isolation of immune-stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from Chungkook-jang and fermentational characteristics of JB-1. *Korean J Microbiol Biotechnol* 32:291-296
- Lee JJ, Lee DS, Kim HB. 1999. Fermentation patterns of *Chungkookjang* and *Kanjang* by *Bacillus licheniformis* B1. *Korean J Microbiol* 35:296-301
- Lee JY, Chin JE, Bai S. 2016. Construction of the recombinant yeast strain with transformation of rice starch-saccharification enzymes and its alcohol fermentation. *Korean J Microbiol* 52:220-225
- Lee KH, Choi HS, Hwang KA, Song J. 2015. Changes in isoflavone content and quality characteristics of *Cheonggukjang* prepared by some different strains. *Korean J Int Agric* 27:481-488
- Lee SY, Eom JS, Choi HS. 2014. Quality characteristics of fermented soybean products by *Bacillus* sp. isolated from traditional soybean paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43:756-762
- Sasithorn S, Bhagavathi SS, Periyainaina K, Sartjin P, Chaivavat C. 2017. Lactic acid bacteria mediated fermented soybean as a potent nutraceutical candidate. *Asian Pac J Trop Biomed* 7:930-936
- Seok YP, Kim YH, Woo HS, Kim TW, Lee SH, Choi C. 1994. Change of protein and amino acid composition during *Cheongguk-Jang* fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. *Appl Biol Chem* 37:65-71
- Shin SD, Choi ID, Lee SK, Park JY, Kim NG, Park CH, Han SI, Choi HS. 2020. Evaluation of the fermentation properties of different soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Legume Res Int J* 43:75-80
- Shin SD, Park CH, Choi ID, Lee SK, Park JY, Kim NG, Choi HS. 2019. Quality properties of soy-paste soybean cultivar for fermented soybean products. *Korean J Food Nutr* 32:114-121
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56:845-

857

- Von Worthington. 1993. Worthington Enzyme Manual: Enzymes and Related Biochemicals. p.36-44, 339-340. Worthington Biochemical
- Woo SM, Kwon JH, Jeong YJ. 2006. Selection and fermentation characteristics of *Cheongbukjang* strains. *Korean J Food Preserv* 13:77-82
- Yang EI, Kim YS. 2013. Physiological properties of viscous

- substance from *Cheonggukjang*. *J Agric Life Sci* 44:10-14
- Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. 2002. Quality characteristics of the *Cheonggukjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J Korean Food Sci Technol* 31:204-210

Received 09 July, 2020

Revised 16 July, 2020

Accepted 24 July, 2020