

청국장의 제조방법에 따른 향미 증진 효과

고한수 · 조대희 · 황성연 · 김영만

안성산업대학교

The Effect of Quality Improvement by Chungkuk-jang's Processing Methods

Han-Soo Ko, Dae-Hee Cho, Seong-Yun Hwang and Young-Man Kim

Anсung National University, Anсung 456-800, Korea

Abstract

The strain isolated for making chungkuk-jang was *Bacillus subtilis*, which formed spore with 98% ratio. Logarithmical culture was inoculated (1,000 CFU /g) to the steamed soybeans and at the optimum fermentation conditions(40°C, RH 90%), fermentation progressed very rapidly and synchronously. Fermentation time was 24 hours on the optimum fermentation conditions. During activated fermentation, chungkuk-jang's aroma and flavor created. After finishing the fermentation, the spore forming ratio was 95% and replenishment was not occurred easily during aging at the below 5°C.

Key words : chungkuk-jang, *Bacillus subtilis*, soybean.

서 론

청국장은 곡류를 주식으로 하여온 우리 민족에게 부족하기 쉬운 단백질 식품으로, 된장이나 고추장보다 단백질과 지방함량이 높은 식물성 고영양 식품이다. 된장과 간장은 공업화되면서 많은 연구와 발전이 이루어져 개량식 된장과 간장이 자리를 차지하게 된 반면 청국장만은 제조 이용이 불편함은 물론 청국장 특유의 냄새는 많은 사람들에게 외면 당하면서 수요가 점차 줄고 있다. 청국장은 발효과정 중에 생성되는 각종 생리 활성물질 등이 고혈압 방지효과^{1,2)}, 항암성^{3~4)}, 혈전용해^{5~6)}, 골다공증 예방⁷⁾, 혈중 알콜농도의 저하⁸⁾ 및 철분흡수⁹⁾ 등의 효과가 밝혀져 기능성 식품으로서 재조명되고 있다. 일본의 낫또(納豆:natto)는 삶은 콩에 *Bacillus subtilis natto* 단일 균을 이용하여 발효한 것으로 밥과 같이 섞어 그대로 먹는 경향이 있다. 낫또에서는 혈전증에 탁월한 약리효과가 있는 nattokinase를 분리, 확인, 정제하여 치료약으로 개발하였다^{10,11)}. 청국장도 낫또와 같이 발효시키므로 우수한 영양과 생리학적인 특성을 가졌을 것으로 생

각 되지만 청국장이 식품으로서의 자리 매김을 못하는 이유는 도시 생활에서 자가 제조 이용이 적합하지 않고 공장에서 생산된 제품도 그 맛이 각각이며, 불쾌취가 있어 냉장고에 청국장을 넣어두었을 때 다른 식품에 냄새가 스며들고, 장기간의 보존이 힘든 점 등의 이유로 점점 외면 당하고 있다. 본 연구는 냄새의 원인과 생성과정을 규명하고자 우수한 균주의 선택과 관리 방법의 체계화와 기본적인 발효 기법의 표준화, 불쾌취 발생 원인과 이에 대한 억제 방법의 검토, 소비자 기호에 맞는 풍미 향상 방법의 연구 및 유통 중에 변질 억제 등을 연구 검토한 결과이다.

재료 및 방법

1. 재료

콩은 국내에서 생산되는 대립, 중립, 소립콩을 종류별로 사용하였다. 발효 용기는 스티로폼으로 성형된 도시락 모양 4각 용기를 100°C 끓는 물에 30분간 살균 후 사용하였다. 공기를 잘 유통시키기 위하여 밀바닥에 여러 개의 공기 구멍을 뚫어 주었다. 덮개는 살

Corresponding author : Han-Soo Ko

균된 폴리에틸렌 필름으로 덮어 공기 유통은 원활히 되도록 하였으나 수분 증발은 많이 억제되도록 하였다. 균주분리원은 국내에서 시판되는 청국장과 일본 낫또제품 및 벗짚을 사용하였다.

2. 배 지

균주 분리용 배지 및 중균 배지는 Table 1과 Table 2의 성분으로 조성된 배지를 사용하였다.

3. 균주분리 방법

보통 청국장과 벗짚 등의 시료에 존재하는 균형태는 spore 형태로 존재하므로 spore를 분리하기 위하여 각 시료 소량씩을 멸균된 10ml의 peptone water (peptone 1%, NaCl 0.5%)를 넣은 cap tube에 주입하고 70°C에서 30분간 열처리하였다. 다음에 분리용 배지(15~20ml)가 들어 있는 시험관 10개 정도를 멸균하여 60°C로 보온된 배지에 열처리한 시료의 1 백금이를 취하여 혼화 희석하고 순차로 새로운 배지에 1 백금이씩을 가하여 혼화 희석하였다. 40°C에서 2일 배양한 후 평판배지 위에 적당히 독립된 접락을 백금선으로 조준하여 사면배지에 이식한 다음

Table 1. Composition of isolation plate medium and slant medium

Ingredients	Content(g)
Soluble starch	15
Peptone	1
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
MnSO ₄ · 5H ₂ O	1 ml(1% stock solution)
CaCl ₂	1 ml(1% stock solution)
H ₂ O	1 l

Sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes after pH adjusting to 6.8

Table 2. Composition of culture medium

Ingredients	Content(g)
SEH	150 ml(10% soybean enzymatic hydrolyzate)
Peptone	7.5
K ₂ HPO ₄	0.25
KH ₂ PO ₄	0.25
MnSO ₄ · 5H ₂ O	1 ml(1% stock solution)
CaCl ₂	1 ml(1% stock solution)
H ₂ O	1 l

Sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes after pH adjusting to 5.6

다시 40°C에서 2일 배양한 후 4°C에 보존하면서 분리 균주별로 배양시험과 청국장 제조에 사용하였다.

4. 배양 방법

청국장을 제조하기 위하여 사용하는 분리균주의 배양방법은 사면 배양한 분리균 1백금이를 전배양용 PGY(peptone glucose yeast extract) 배지 100ml (배지주입량 100ml / 500ml용 진탕플라스크)에 접종하여 40°C에서 6시간 진탕배양(진탕속도 : 140 strokes/min, 진폭 : 10cm)의 조건에서 전배양하였다. 이 전배양액 5ml를 중균용배지(Table 2) 100ml(배지 주입량 : 100ml / 500 ml용 진탕플라스크)에 접종(접종량 5%)하고 동일한 진탕배양조건에서 중균 배양하면서 중균상태(생육곡선)별로 찐 콩에 접종하고 청국장 제조 공정에 따라 발효 및 후숙시켰다.

5. 생균수 및 포자 형성율

생균수 측정은 Table 1의 분리용 배지(가용성 전분은 0.5%만 첨가)를 이용한 평판배양법에 의하여 peptone water로 단계 희석하여 만든 평판을 40°C에서 2일 배양하고 0.1N-I₂액으로 전분을 액화시킨 무색 투명한 콜로니를 계측하여 생균수(CFU, colony forming unit)를 구하였다. 포자수는 최종희석 액을 70°C에서 30분간 열처리한 후 동일하게 평판 배양하여 열내성 spore수를 측정하고 생균수에 대한 포자 형성을 구하였다.

6. 청국장 제조

콩원료를 정선·세척하고 실온에서 1일 정도 침지한 후 오토클레이브에서 121°C, 1시간 충분히 졌다. 다음, 콩이 60°C로 냉각되었을 때 각 분리 균주의 대수증식기 상태의 배양액 일정량(1,000 CFU/g)을 콩에 접종하여 40°C와 상대습도 90%의 발효조건에서 1일간 발효시켰다. 다음에 5°C 이하의 저온에서 1일 정도 후숙시킨 후 포장하여 제품으로 유통시켰다.

7. 환원당 정량

Somogyi법¹²⁾에 따라 시료 10g에 중류수를 가한 후 여과지로 걸러 전량을 200ml로 만들어 시료액으로 사용하였다. 삼각 플라스크에 시료액 20ml와 시약 A 및 B 용액을 각각 20 ml씩 가하여 혼합한 후 정확히 3분간 끓인 후 즉시 흐르는 물에 냉각하여 상징액만을 glass filter로 여과하였다. 침전물이 남아 있는 플라스크에 더운 물 50ml를 가하고 흔들어 침전물을

현탁시킨 후 잠시 방치하여 침전되면 상정액만을 glass filter로 여과하는 과정을 수회 반복하였다. 침전이 있는 플라스크에 glass filter를 연결한 후 시약 C용액 20ml를 3~4회 나누어 부으며 여과하였다. 10ml의 더운 물로 glass filter를 세척한 후 0.1N-Na₂S₂O₃ 액으로 적정하였다.

8. 수용성 질소정량

Kjeldahl법¹³⁾에 따라 시료 40g를 적당량의 증류수와 함께 균질기로 마쇄한 후 마쇄액을 3,000rpm으로 3분간 원심분리하여 상정액을 3g 취해 단백질·질소정량법에 따라 수용성 질소량을 측정하였다.

9. 아미노태 질소정량

Formol 적정법¹⁴⁾에 따라 5g의 시료를 증류수로 용해하여 50ml로 만든 후 희석시료 5ml에 90% 에틸알콜 20ml를 가하고 1% phenolphthalein용액을 지시약으로 하여 0.1N NaOH로 적정하였다.

10. 암모니아태 질소정량

암모니아태 질소정량법¹⁴⁾에 따라 마쇄시료 3g에 10ml 포화 K₂CO₃ 용액을 가한 후 진공펌프로 흡입하여 얻은 것을 0.1N NaOH로 적정하였다.

11. 암모니아 정량

마쇄시료 1g을 10ml의 증류수로 교반하여 분산시킨후 에틸알콜을 가해 50ml로 정용한 것을 원심분리기를 이용 10,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상정액 5ml를 취해 증류수로 50ml가 되도록 희석하였다. 희석액 0.5ml 중의 암모니아 함량을 모노테스트 암모니아(베링거 만하임 제품)를 사용하여 측정하였다.

12. 관능검사

청국장의 점도는 Visco STAR-L, FungiLab로 측정하였으며, 맛, 향, 색에 대해서 숙련된 관능요원 15명으로 관능검사를 실시하였다. 관능평가의 오차를 줄이기 위하여 일정한 시간(오후 4시)에 10점 평가법으로 산정하여 대단히 좋다 10점, 좋다 7점, 보통이다 5점, 나쁘다 3점, 아주 나쁘다 1점으로 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 사용균주의 생리적 성질

볏짚, 국내 청국장, 일본 낫또 등의 분리원으로부터 분리된 균주의 미생물학적 특성은 Table 3과 같다. 분리균들은 Bergy의 분류¹⁵⁾에 의하면 *Bacillus subtilis*에 속하지만 청국장 제조후 10°C 이상의 숙성과정과 유통과정에서 재번식이 쉽게 일어날 수 있는 영양세포보다 휴면상태의 안정한 포자 형성을 높은 균주를 선택하였다. 포자형성균인 *Bacillus subtilis*는 탄수화물과 단백질을 효소 가수분해하여 발효성 당과 아미노산 등의 저분자 물질을 이용하여 에너지를 얻는 호흡 물질대사를 하는 균종이다. 이 균주의 생육곡선을 조사하기 위하여 초기적인 배양조건에 따라 40°C에서 24시간 진탕배양(140 strokes/min, 진폭 10 cm)한 결과 Fig. 1과 같이 대수증식기를 지나 12시간에 증균이 완료되면서 포자를 형성하여 15시간 이후에 포자수 $51 \times 10^8 / ml$ 로 포자 형성을 96%로 나타났다.

2. 청국장 발효시험

포자형성력이 우수한 균주를 선택하여 진탕배양하

Table 3. Microbiological characteristics of *Bacillus subtilis*

Morphological characteristics		Physiological characteristics	
Vegetative cell			
shape	rod	Gram stain	+
size	2~3×1.0μm	Wxygen demand	+
flagella, motility	+	Methylene blue reduction	+
Spore		Formation of indole	-
shape	oval	H ₂ S forming	-
size	1.2~1.5×1.0μm	Gelatin liquefaction	+
Beef agar cultivation	brown colony	Biotin demand	+
Milk cultivation	coagulation → solution	Optimum temperature	35~45°C

면서 대수증식초기(진탕배양 4시간), 대수증식중기(진탕배양 6시간), spore(진탕배양 20시간) 등의 growth phase(생육 시기)별로 찐콩(중립콩)에 일정량씩 접종(10,000 CFU/g)하여 40°C와 상대습도 90%에서 발효시킨 결과 미생물의 대사력이 가장 활발한 대수증식중기에 접종되어야 동시성으로 발효가 가장 빠르고 완성하게 진행하였다. 발효가 완료되는 점은 이화학적 특성과 관능적 특성으로 표면에 윤기가 나고, 실을 생성하며 접질물 형성 정도로 판단하였다(Table 4). 우수한 균주를 진탕배양하면서 대수증식중기(진탕배양 6시간)에 접종량을 시험하기 위하여 찐콩에 균량을 100 CFU/g, 1,000 CFU/g, 10,000 CFU/g로 접종하여 40°C와 상대습도 90% 조건에서 발효시험한 결과 접종량을 찐콩에 일정한 균수(1,000 CFU/g) 이상 접종되어야 발효가 이상적으로 빠르게 진행하는 것으로 나타났다. 포자형성력이 우수한 균주를 진탕 배양하면서 대수증식증기(진탕배양 6시간)의 균량 1,000 CFU/g를 찐콩에 접종하여 상대습도 90%의 조건으로 30°C, 37°C, 40°C, 50°C의 온도별로 최적 발효온도를 조사한 결과 40°C에서 발효 속도가 이상적으로 빠르게 진행하는 것으로 나타났다. 상기조건과 동일하게 찐콩에 접종한 후 40°C의 최적발효온도에서 최적발효 상대습도를 조사하기 위하여 상대습도 50%, 70%, 90%별로 발효 시험한 결과 40°C와 상대습도 90%의 발효조건에서 가장 빠르게 진행되었다. 상기조건과 동일하게 찐콩에 접종한 후 최적 발효조건인 온도40°C와 상대습도 90%에서 1일, 2일, 3일간 진행하면서 적합한 발효기간을 조사한 결과 최적 발효조건인 40°C와 상대습도 90%에서 1일 이상이면 발효가 충분히 완료되는 것으로 나타났다(Fig. 1).

3. 후숙조건 시험

포자 형성력이 우수한 균주를 진탕배양 6시간의 대수증식증기의 균량 1,000 CFU/g를 찐콩에 접종한 후 최적발효조건인 40°C와 상대습도 90%에서 1일간

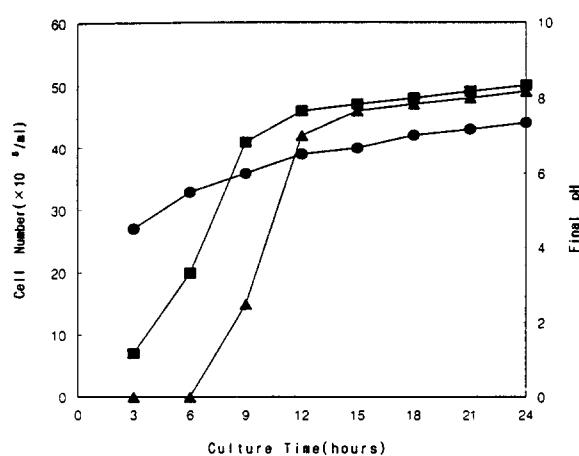


Fig. 1. Time course of the aerobic culture for *Bacillus subtilis*. ■-■ : total cell number, ▲-▲ : spore number, ●-● : final pH.

발효시킨 청국장을 온도별로 1일, 2일, 3일간 저장시험 하였다. Table 4와 같이 삶은 콩에 비해 발효가 끝난 청국장은 pH가 중성을 나타냈다. 단백질이 분해되어 생성된 아미노태 질소 및 암모니아태 질소가 약 5배 정도 증가하였으며, 접도도 3배 정도 증가하였다. 불쾌취는 후숙후 감소하였으며, 이는 암모니아태 질소의 감소와 비례 하는 것으로 나타났다. 생균수에 있어서는 후숙전이나 후에 있어서 차이를 나타내지 않았다(Table 5). 그 결과 5°C의 저온에서 1~2일 경과하면 대사력이 감소된 휴면상태의 포자를 만들기 때문에 후숙과정과 유통과정에서 효소에 의한 단백질의 분해가 정지되었다. 또한 휴면상태의 포자는 발아라는 과정이 일어나지 못하므로 재번식 및 증식이 억제되어 발효과정에서 발생하는 불쾌취가 적어지고 청국장의 구수한 맛을 갖는 것으로 생각된다.

4. 최적 원료콩

우수한 균주를 이용하여 대립콩, 중립콩, 소립콩의 3가지 종류별로 최적발효조건 (40°C와 상대습도

Table 4. Quality properties during fermentation and aging of chungkuk-jang

	pH	Fermentable sugar(%)	NH ₂ -N (%)	NH ₃ -N (mg%)	Ammonia (mg%)	Relative viscosity(Cps)
Cooked soybean	6.4	3.5	0.1	5	20	1.0
Chungkukjang koji ¹⁾	7.3	0.3	0.4	27	150	3.4
Chungkukjang product ²⁾	7.6	0.3	0.5	23	130	3.2

1) : Fermented for 1 day at 40°C with *Bacillus subtilis natto*, 2) : Aging for 1 day at 5°C after 1 day fermentation.

Table 5. Sensory properties and viable cell number during fermentation and aging of chungkuk-jang

	Sensory properties ³⁾		Viable number of microorganisms(CFU/g)
	off flavor	total score	
Cooked soybean	1.2	3.5	1.0×10^3
Chungkukjang koji ¹⁾	3.4	6.8	50.0×10^8
Chungkukjang product ²⁾	2.5	7.5	50.0×10^8

1) : Fermented for 1 day at 40°C with *Bacillus subtilis natto*, 2) : Aging for 1 day at 5°C after 1day fermentation,

3) : very good 10, good 7, fair 5, poor 3, very poor 1.

90%)에서 1일간 발효후 5°C의 저온에서 1일간 후숙시킨 결과 완전한 콩을 사용하는 경우는 소립콩이 발효 속도가 가장 빠르므로 일본의 낫또같이 완전한 콩을 사용할 때에는 소립콩이 이상적이고, 우리나라의 청국장은 메주 콩같이 조직이 연한 중립과 대립 콩에서 발효 속도가 이상적으로 빠르게 진행되었다.

요 약

청국장 제조를 위한 분리균은 포자형성을 높은 *Bacillus subtilis*로 대사력이 활발한 대수증식기의 것을 콩에 1,000CFU/g 이상의 균수를 접종하여 40°C와 상대습도 90%에서 배양하면 발효가 빠르게 진행되었다. 발효가 종료되면 포자형성을 95% 이상되어야 저온의 후숙과정에서 재번식이 쉽게 일어나지 않았으며 발효취는 발효 중에서만 생성되었다. 중립콩과 대립콩의 발효율이 가장 좋았다. 저온의 후숙과정은 5°C에서 1~2일 후 경과하면 *Bacillus subtilis*는 더 이상의 증식이 일어나지 않고 발효취가 소멸되므로 저온의 유통과정을 거쳐야 불쾌취가 없는 구수한 청국장의 맛을 유지할 수 있었다.

참고문헌

- Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, T., Koizumi, Y. and Yanagida, F. : Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods, *Biosci. Biotechnol. Biocem.*, **59**, 1147~1149(1995).
- Okamoto, A., Hanagata, H., Kawamura, Y. and Yanagida, F. : Anti-hypertensive substance in fermented soybean, natto, *Plant. Foods. Hum. Nutr.*, **47**, 39~47(1995).
- Takahashi, C., Kikuchi, N., Katou, N., Miki, T., Yanagida, F. and Umeda, M. : Possible antitumor-promoting activity of components in Japanese soybean fermented foods, natto : Effect on gap junctional intercellular communication, *Carcinogenesis*, **16**, 471~476(1995).
- Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. : Quantification of genistein and genistin in soybean and soybean products, *Food. Chem. Toxicol.*, **34**, 457~461(1996).
- Kudo, T. : Warfarin antagonism of natto and increase in serum vitamin K by intake of natto, *Artery*, **17**, 189~201(1990).
- Sakata, T., Kario, K., Asada, R., Fuji, S., Matsuo, T., Katayama, Y., Matsuyama, T., Kato, H. and Miyata, T. : Increased activated factor VII levels caused by intake of natto, a Japanese vitamin K-rich food prepared from fermented soybean, *Blood. Coagul. Fibrinolysis.*, **8**, 533~534(1997).
- Hosoi, T. : Recent progress in treatment of osteoporosis, *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, **33**, 240~244(1996).
- Sumi, H., Yatagai, C., Wada, H., Yoshida, E. and Maruyama, M. : Effect of *Bacillus natto*-fermented product on blood alcohol, aldehyde concentrations after whisky drinking in human volunteers, and acute toxicity of acetaldehyde in mice, *Arakorou Kenkyuto Yakubutsu Ison*, **30**, 69~79(1995).
- Macfarlane, B. J., Van der Riet, W. B., Bothwell, T. H., Baynes, R. D., Siegenberry, D., Schmidt, U., Tal, A., Taylor, J. R. and Mayet, F. : Effect of traditional oriental soy products on iron absorption, *Am. J. Clin. Nutr.*, **51**, 873~880(1990).
- Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Fujii, R., Kariya, K. and Nishimuro, S. : Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat, *Biol. Phram. Bull.*, **18**, 1387~11391(1995).
- Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. : Enhancement of the fibrinolytic in plasma by oral administration of nattokinase, *Acta. Haematol.*, **84**, 139~143(1990).
- Somogy, M. : Anew reagent for the determination of sugars, *J. Biol. Chem.*, **160**, 61~68(1945).
- A.O.A.C. : *Official Methods of Analysis*, 15th ed., Association of official Analytical chemists, Washington, (1990).
- 일본약학회 편 : 위생시험법·주해, 금원출판주식회사

- p. 163~171(1980).
15. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sparre, M.E and Holt, J.G. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 10th ed., The william and Wilkans. co., Biotimore(1986).
-
- (1998년 11월 9일 접수)