

## *Bacillus amyloliquefaciens*를 이용하여 콩 종류와 발효온도를 달리하여 제조한 청국장의 특성

이나리<sup>1</sup> · 고태훈<sup>1</sup> · 이상미<sup>1</sup> · 홍창오<sup>1</sup> · 박규민<sup>2</sup> · 박근태<sup>3</sup> · 황대연<sup>1</sup> · 손홍주<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 생명자원과학대학, <sup>2</sup>장마을, <sup>3</sup>부산대학교 산학협력단

### Characteristics of Chungkookjang Prepared by *Bacillus amyloliquefaciens* with Different Soybeans and Fermentation Temperatures

Na-Ri Lee<sup>1</sup>, Tae-Hun Go<sup>1</sup>, Sang-Mee Lee<sup>1</sup>, Chang-Oh Hong<sup>1</sup>, Kyu-Min Park<sup>2</sup>,  
Geun-Tae Park<sup>3</sup>, Dae-Youn Hwang<sup>1</sup>, and Hong-Joo Son<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Republic of Korea

<sup>2</sup>Jangmaeul Co., Miryang 627-882, Republic of Korea

<sup>3</sup>Research and University-Industry Cooperation, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea

(Received February 4, 2013 / Accepted March 7, 2013)

This study was carried out to investigate the characteristics of Chungkookjang depending on different soybeans and fermentation temperatures using *Bacillus amyloliquefaciens* C2 isolated from homemade Chungkookjang. The highest protease activity was 854 U/g in yellow soybean Chungkookjang and 847 U/g in black soybean Chungkookjang at 35°C. The highest amylase activity was 3.87 U/g at 40°C in yellow soybean Chungkookjang and 4.96 U/g at 45°C in black soybean Chungkookjang. The highest reducing sugar content was 16.11 mg/g at 40°C in yellow soybean Chungkookjang and 19.08 mg/g at 45°C in black soybean Chungkookjang. The highest amino type nitrogen content was 420 mg%/g in yellow soybean Chungkookjang and 194 mg%/g in black soybean Chungkookjang at 40°C. The highest pH was 7.92 at 40°C in yellow soybean Chungkookjang and 7.59 at 45°C in black soybean Chungkookjang. The highest number of viable cell was 9.3 log CFU/g at 40°C in yellow soybean Chungkookjang and at 35°C in black soybean Chungkookjang. On the other hand, the lowest ammonia type nitrogen content was 225 mg%/g at 45°C in yellow soybean Chungkookjang and 80 mg%/g at 40°C in black soybean Chungkookjang. Yellow soybean Chungkookjang showed high protease activity, pH and amino type nitrogen, whereas black soybean Chungkookjang showed high amylase activity and reducing sugar.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*, chungkookjang, fermentation, soybean cultivar

청국장은 고초균인 *Bacillus subtilis*를 이용하여 40°C에서 2-3일 정도 발효시킨 전통식품으로서, 발효 과정 중에 각종 효소가 작용하여 소화성이 우수하며, 특유의 구수한 맛과 냄새를 형성하는 동시에 끈끈한 흰색의 점질물을 생성하는 특성을 가지고 있다(Eom *et al.*, 2009).

청국장의 제조 방법 및 성분에 관한 연구는 많이 이루어져 있으며, 최근에는 혈전용해활성이 우수한 균주로 제조한 청국장 발효(Hwang, 2010), 발아한 대두를 이용한 청국장 발효(Jeong *et al.*, 2012), 초의 차 첨가로 청국장의 이취개선(Lee *et al.*, 2008), 청국장의 혈당 강화 및 혈청 지질대사 개선효과(Kim *et al.*, 2012b) 등 청국장의 다양한 기능성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

청국장 발효는 대두의 종류, 사용균주, 발효온도, 습도 등에 의해 큰 영향을 받는 것으로 보고되어 있다(Kim *et al.*, 2006). 일반적으로 청국장은 40-42°C에서 발효시킨다고 알려져 있지만, 발효온도를 달리하여 제조한 청국장에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

청국장의 맛과 품질을 좌우하는 콩은 오랫동안 쌀 다음으로 많이 사용되고 있는데 필수아미노산과 필수지방산의 함량이 높아 단백질과 지방의 공급원으로 이용되어 왔으며, isoflavone, saponin, phytic acid, oligosaccharides 등 다양한 생리활성을 가진 기능성 물질들을 함유하고 있다(Eom *et al.*, 2009; Yoo, 2012).

콩의 종류에 따라 기능성 물질의 함량과 단백질, 지방, 탄수화물 등 영양성분의 함량에서 큰 차이가 있다. Moon 등(2011)은 시중에서 유통되고 있는 콩, 강낭콩, 서목태, 서리태, 작두콩, 청대, 팔의 이화학적 특성을 비교하였고, Yoo와 Chang (1999)은 농촌진흥청 작물시험장에서 육성 보급한 콩 8개 품종의 이화학

\*For correspondence. E-mail: shjoo@pusan.ac.kr; Tel.: +82-55-350-5544; Fax: +82-55-350-5549

적 특성을 비교하였으며, 이들 콩 종류에 따라 유기산, 유리당, 아미노산 등의 함량 및 일반화학적분에서 차이가 있는 것으로 보고하였다. 따라서 청국장지의 품질 또한 콩의 종류에 따라 좌우될 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 순수분리된 발효균주를 이용하여 발효 온도(35°C, 40°C, 45°C)를 달리하여 제조한 황태 및 흑태 청국장지의 발효 중 이화학적 성분 및 효소활성 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리 및 동정

청국장 발효균주를 분리하기 위하여 사용한 시료는 밀양지역 각 가정에서 전통적으로 제조된 청국장 20점, 된장 23점 및 밀양의 논에서 수집한 벚짚 47점이었으며, 각 시료는 멸균수를 이용하여 단계별로 희석하였다. 이때, *Bacillus* 균주만을 선별하기 위해 항온수조를 이용하여 90°C에서 5분 동안 방치했다. 각 희석 시료를 skim milk 배지(3% skim milk, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.8% agar, pH 7.5)에 접종하여 30°C에서 1-2일 동안 배양하였다. Clear zone의 크기가 크고, 명확하고, 성장속도가 빠른 colony만을 1차 선별하여 순수분리하였다. 순수분리된 각 균주를 skim milk 액체배지에서 배양하면서 일정 시간 간격으로 protease 활성을 측정하여 높은 protease 활성을 보인 균주를 공시균주로 선택하였다.

분리균주는 16S rRNA gene 염기서열을 분석하여 동정하였다. 16S rRNA gene을 증폭하는데 사용된 primer는 *E. coli* 16S rRNA gene의 보존염기순서에 근거하여 합성된 27F (5'-AGAGTTT GATCMTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-TACGGYTAC CTGTGTTACGACTT-3') primer였다. 분석된 염기서열을 NCBI GenBank의 데이터베이스를 이용하여 유사균주와 상동성을 비교하였다. 또한 염기서열을 Clustal X program을 이용하여 정렬한 후, MEGA 5 프로그램을 이용하여 분리균주의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

### 청국장 제조

*Bacillus amyloliquefaciens* C2를 Luria-Bertani 배지를 이용하여 30°C에서 200 rpm으로 20시간 동안 배양한 배양액을 starter로 이용하였다. 대두(황태 및 흑태)는 autoclave를 이용하여 121°C에서 30분간 증자하였다. 증자한 대두에 상기 균주 배양액을 1% (w/v) 접종했다. 접종 후, 35°C, 40°C, 45°C에서 48시간 동안 발효시켜 청국장을 제조하였다. 청국장과 증류수를 1:6 (w/v)의 비율로 혼합하여 분쇄 및 원심분리(10,000×g, 15분)한 후, 상등액을 회수하여 효소활성 및 이화학적 특성 분석에 사용하였다.

### 효소 활성 측정

Protease 활성 측정을 위하여 기질용액 0.6% casein 용액 (sodium phosphate buffer, pH 7.2) 1 ml와 조효소액 1 ml를 시험관에 넣고 30°C, 10분간 반응시켰다. 0.4 M trichloroacetic acid (TCA) 용액 1 ml를 가하여 30분간 방치하여 반응을 중지시켰다. 반응 중지액을 원심분리한 후, 상등액을 취하여 UV/VIS

spectrophotometer를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Shon et al., 2001). 효소 1 unit는 0.01/ml/min의 증가로 정의하였다.

Amylase 활성 측정을 위하여 기질용액 0.5% soluble starch 용액(0.4 M acetate buffer, pH 4.8) 2 ml와 조효소액 1 ml를 시험관에 넣고 30°C, 10분간 반응시켰다. 0.4 M TCA 1 ml를 첨가하여 30분간 방치하여 반응을 중지시켰다(Oh and Eom, 2008). 반응 중지액을 원심분리하여 회수한 상등액을 dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 maltose의 양을 측정하였다(Miller, 1959). 이때 표준곡선은 maltose를 이용하여 작성하였다. 효소 1 unit는 상기조건에서 효소액 1 ml가 1 mg의 maltose를 유리시킬 때의 효소량으로 정의하였다.

### 이화학적 특성

아미노산 질소 함량(AOAC, 1990)은 formol 적정법을 사용하여 정량하였고, 암모니아태 질소 함량(AOAC, 1990)은 indophenol blue법을 사용하여 정량하였으며, NH<sub>4</sub>Cl을 표준물질로 사용하였다. 환원당은 DNS법을 사용하여 정량하였으며, glucose를 표준물질로 사용하였다. pH 측정은 pH meter를 이용하여 측정하였다.

### 생균수 측정

생균수는 청국장 1 g을 멸균수 9 ml에 첨가하여 계단희석한 후, 표준평판법에 의하여 배양하여 계수하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주 분리 및 동정

청국장의 기능성을 강화하고 발효를 촉진시킬 수 있는 균주를 분리할 목적으로 가정에서 제조한 청국장, 된장 및 벚짚을 수거하여 균주 분리를 수행하였다. 청국장 발효과정 중에서 단백질의 분해속도가 가장 중요한 발효 인자로 보고되어 있기 때문에 protease의 활성을 중심으로 균주 분리를 실시하였다. Skim milk 배지상에서 clear zone의 크기가 크고, 성장속도가 빠른 26 균주를 선정하였다(자료 미제시). 이들의 protease 활성을 측정하여 protease 생성능과 점질물 생성능이 우수한 C2를 최종 선정하여 분류학적 위치를 조사하였다.

가정에서 제조된 청국장으로부터 순수분리된 C2 균주는 그람양성의 포자를 형성하는 호기성 간균(0.6-0.8 μm × 2.2-2.6 μm)이었고, 운동성이 있었다. 또한, catalase를 생성하였으나 oxidase는 생성하지 않았으며, glucose로부터 가스를 생성하지 않았다. Nutrient agar plate에서 부정형(irregular)의 불룩한 콜로니를 형성하였으며, 콜로니의 색깔은 흰색이었다. 16S rRNA gene 염기서열 분석 결과, 실험균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 98%의 상동성을 나타내었다. 또한 16S rRNA gene의 구조에 근거하여 기존 균주들과의 분자계통학적 유연관계를 파악하기 위하여 계통수를 작성한 결과, C2 균주는 *B. amyloliquefaciens*와 가장 가깝게 나타났다(Fig. 1). 따라서 실험균주는 *Bacillus amyloliquefaciens* C2로 명명하였다.

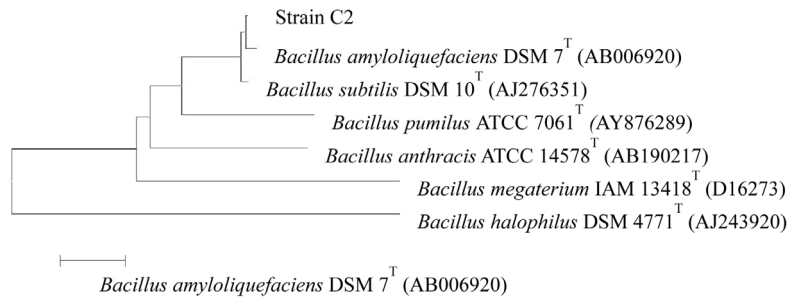


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed using 16S rRNA gene sequences, available in the GenBank database, employing the Neighbour-joining method. The bar indicates a Jukes-Cantor distance of 0.02.

**청국장 발효에 따른 protease 활성**

청국장 발효에 따른 각 변수의 해석은 얻어진 결과 중 가장 높은 활성을 기준으로 비교하였으며, 또한 배양시간 경과에 따른 활성의 변화 패턴도 비교하였다.

발효온도 및 콩의 종류에 따른 청국장의 구수한 맛 성분인 아미노산과 polypeptide 등을 생성하는 protease 활성을 측정하였다(Fig. 2). 황태 청국장은 35°C에서 배양했을 경우, 42시간에 854 U/g로 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한 40°C에서 배양했을 때는 48시간에 824 U/g, 45°C에서는 24시간에 810 U/g의 활성을 나타내었다. 흑태 청국장의 경우, 35°C에서 배양했을 때 48시간에 847 U/g로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 40°C에서는 48시간에 796 U/g, 45°C에서는 36시간에 778 U/g의 활성을 나타내었다. 발효온도에 따라서는 낮은 온도에서 높은 protease 활

성을 나타내었고, 콩 종류에 따라서는 황태가 흑태보다 높은 활성을 나타내었지만, 발효온도 및 콩 종류에 따라 최고함량에서 큰 차이는 나타나지 않았다.

**청국장 발효에 따른 amylase 활성**

청국장 발효에서는 단백질 뿐만 아니라 전분의 분해도 중요한 인자인 것으로 알려져 있어 청국장 발효 중 amylase 활성을 측정하였다(Fig. 3). 황태 청국장은 40°C에서 배양했을 때 6시간에 3.87 U/g로 가장 높은 활성을 나타내었다. 35°C 및 45°C에서 배양했을 경우, 36시간 및 6시간에 각각 3.74 U/g 및 3.23 U/g의 활성을 나타내었다. 40°C와 45°C에서 발효한 황태 청국장은 amylase 활성과 환원당 함량(다음에 제시)이 발효 초기인 6시간에 높은 값을 나타내어 전분분해가 초기에 이루어짐을 알 수 있

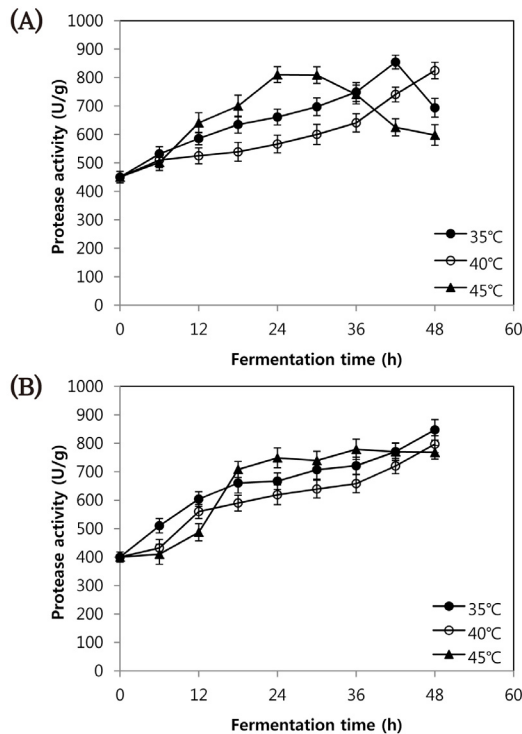


Fig. 2. Changes in protease activity of Chungkookjang during fermentation. (A) yellow soybean, (B) black soybean.

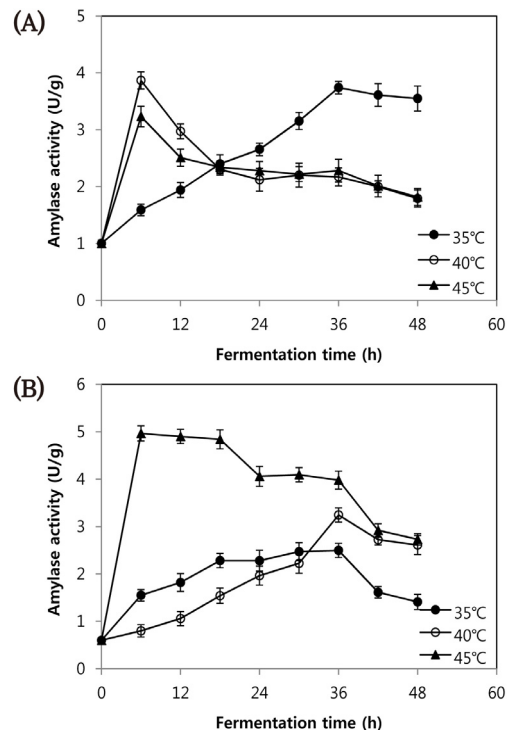
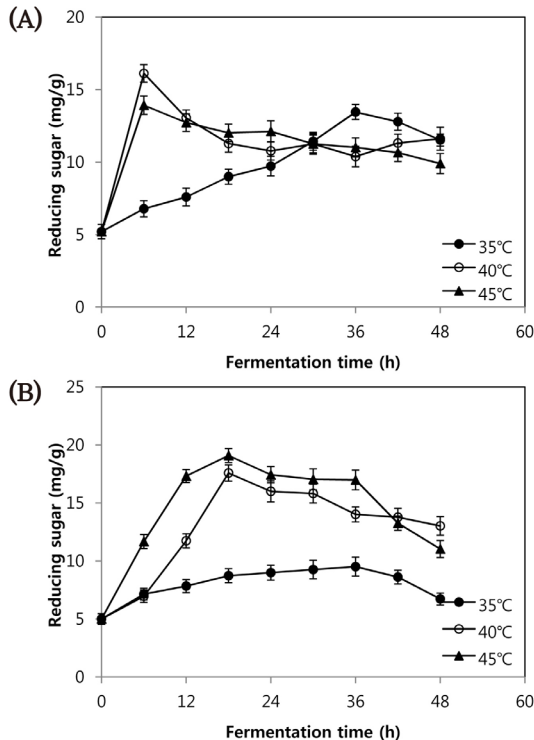


Fig. 3. Changes in amylase activity of Chungkookjang during fermentation. (A) yellow soybean, (B) black soybean.

었다. 흑태 청국장의 경우, 45°C에서 배양했을 때 6시간에 4.96 U/g의 최고활성을 나타내었다. 또한 35°C 및 40°C에서는 36시간 경 각각 2.5 U/g 및 3.24 U/g의 활성을 나타내었다, 황태 청국장은 낮은 온도에서 높은 amylase 활성을 보인 반면, 흑태 청국장은 높은 온도에서 amylase 활성이 높았다.

**청국장 발효에 따른 환원당 함량**

청국장 발효과정 중, 콩의 전분은 *Bacillus* 등이 분비하는 효소의 작용으로 가수분해되어 청국장 단맛 성분의 주체인 당류가 생성된다. 콩에 있는 전분이 glucose로 전환되는 양을 조사하기 위하여 발효시간에 따른 환원당의 양을 측정하였다(Fig. 4). 황태 청국장은 40°C에서 배양했을 경우, 16.11 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 또한 35°C 및 45°C에서는 36시간 및 6시간에 각각 13.45 mg/g 및 13.92 mg/g의 함량을 나타내었다. 흑태 청국장의 경우, 45°C에서 18시간에 19.08 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 35°C 및 40°C에서는 36시간 및 18시간에 각각 9.51 mg/g 및 17.58 mg/g을 나타내었다. 콩 종류에 따라서는 흑태가 황태보다 환원당 함량이 높게 나타났고, 발효온도에 따라서는 황태는 40°C, 흑태는 45°C에서 가장 높게 나타났다. 환원당 함량은 35°C를 제외하고 발효초기에 급격하게 증가하였다가 그 이후에는 감소하는 경향을 보였으며, 이것은 발효초기에 미생물 생육에 따른 amylase의 작용에 의해 환원당 함량이 증가하다가 미생물이 환원당을 기질로 다시 이용함에 따라 환원당 함량이 감소된다는 보고와 비슷하였다(Lee and Suh, 1981).

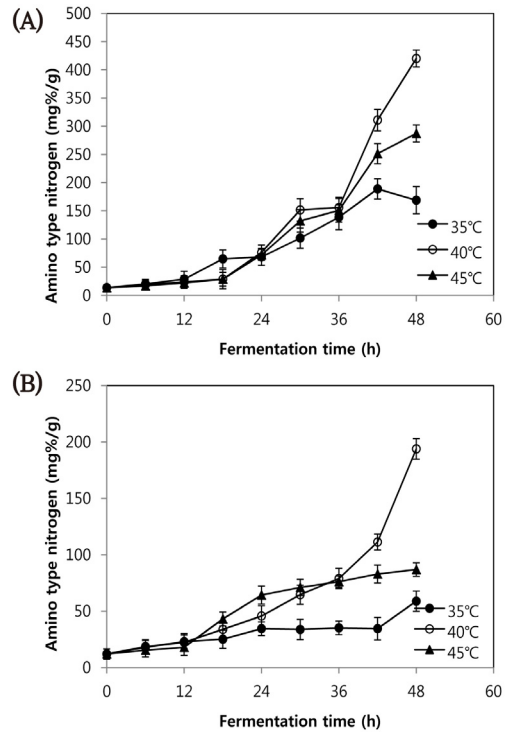


**Fig. 4.** Changes in reducing sugar content of Chungkookjang during fermentation. (A) yellow soybean, (B) black soybean.

**청국장 발효에 따른 아미노태 및 암모니아태 질소 함량**

콩 발효식품의 구수한 맛의 척도인 아미노태 질소는 청국장의 발효속성 중 미생물이 생산하는 protease 활성에 의해 생성된 아미노산에 기인한다. 아미노태 질소의 함량은 장류 발효의 품질 지표로서 중요하기 때문에 그 함량을 측정하였다(Fig. 5). 모든 청국장에서 발효시간이 경과함에 따라 증가하였고, 특히 황태 청국장에서 높은 함량을 나타내었다. 황태 청국장의 경우, 40°C에서 420 mg%/g로 가장 높았고, 45°C, 35°C에서 각각 287 mg%/g, 189 mg%/g의 함량을 나타내었다. 흑태 청국장은 40°C에서 194 mg%/g로 가장 높았고, 45°C, 35°C에서 각각 87 mg%/g, 59 mg%/g의 함량을 나타내었다. 모든 청국장에서 40°C에서 아미노태 질소 함량이 가장 높게 나타났다. Kim 등(2012a)은 작은콩을 이용하여 제조된 청국장의 아미노태 질소함량이 가장 높았으며, 검은 콩에서 가장 낮게 나타났다고 보고하였다. Hwang (2010)은 발효시간 경과에 따라 아미노태 질소함량이 증가하였으며, 40°C가 45°C보다 아미노태 질소함량이 더 높게 나타났다고 하였다. 따라서 본 실험결과는 이들의 보고와 유사하였다. 반면에, Kim 등(2006)은 아미노태 질소 함량이 발효온도가 30°C일 때 가장 높았으며, 35°C, 40°C, 45°C 순으로 감소하는 결과를 나타내어 본 실험의 결과와 다른 경향을 나타내었다.

장류 제품의 발효와 함께 발생하는 불쾌취는 단백질 분해과정에서 탈아민에 의하여 생성되는 암모니아태 질소가 식품내에 과량으로 축적될 때 나타나는 현상이다. 따라서 장류의 소비기 피를 유발하는 물질인 암모니아태 질소 함량을 측정하였다(Fig.



**Fig. 5.** Changes in amino type nitrogen content of Chungkookjang during fermentation. (A) yellow soybean, (B) black soybean.

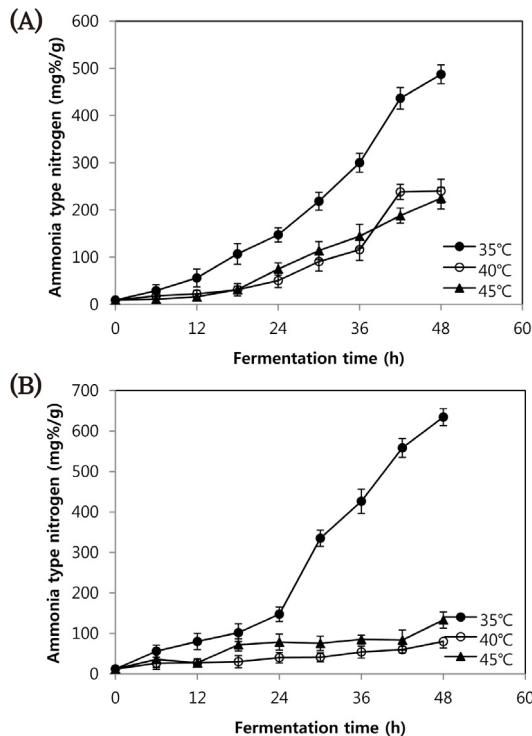
6). 35°C에서는 황태 및 흑태에서 각각 487 mg%/g, 634 mg%/g의 함량을 나타내었으며, 40°C, 45°C와 비교시 2배 이상 차이가 나타났다. 황태의 경우 40°C와 45°C에서 큰 차이를 보이지 않았고, 흑태의 경우 45°C에서 40°C보다 약 50 mg%/g 높은 함량을 나타내었다. 암모니아태 질소 함량만을 고려할 때, 40°C 및 45°C에서 제조된 황태 및 흑태청국장이 불쾌치가 적으므로 소비에 유리할 것으로 판단된다. Kim 등(2006)은 발효온도가 높을수록 암모니아태 질소함량이 감소한다고 보고하여 본 실험결과의 황태와 유사한 경향을 보였다.

청국장 발효과정 중 질소함량의 변화를 보면, 발효기간 중 주로 미생물이 분비하는 protease에 의하여 원료 콩의 단백질이 수용성질소로 분해된 후, 이어서 peptide를 거쳐 아미노태 질소로 분해됨으로써 청국장의 맛을 생성함과 동시에 발효가 계속 진행되면서 암모니아태 질소가 형성된다. 따라서 단백질이 분해되어 아미노태 질소 함량이 증가되는 것은 바람직하나 그 이상의 분해가 진행되어 암모니아태 질소 함량이 증가되는 것은 조절할 필요가 있다고 판단된다. 청국장의 발효과정 중에 생성되는 점질물은 원료 콩의 당질과 단백질에서 유래된 levan form fructan과 polyglutamate의 중합체이다. 콩 단백질 분해산물인 질소성분의 일부는 아미노태, 암모니아태 질소로 전환되고, 나머지는 polyglutamate 대사에 이용되어지는 것으로 보고되어 있다(Kim *et al.*, 2006). 따라서 35°C에서 암모니아태 질소함량이 높으므로 단백질 분해산물인 질소성분은 아미노태 질소보다 암모니아태 질소로 전환이 많이 된 것이고, 40°C에서는 암모니

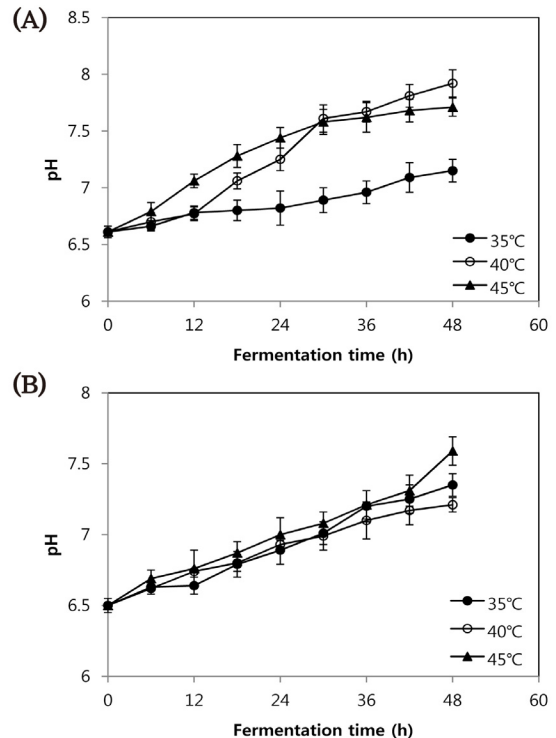
아태 질소보다는 아미노태 질소 함량이 더 높으므로 아미노태 질소로 전환이 많이 된 것으로 보인다. 45°C에서는 암모니아태 질소보다는 아미노태 질소 함량이 더 높으므로 아미노태 질소로 전환이 많이 된 것으로 보이지만, 모든 온도에서 protease 활성에서 큰 차이가 없었기 때문에 단백질이 수용성 질소, peptide를 거쳐 아미노태 질소와 암모니아태 질소로까지 분해되는 과정이 천천히 이루어지거나 polyglutamate 대사에 이용된 것으로 사료된다.

**청국장 발효에 따른 pH**

발효온도 및 콩 종류에 따른 청국장의 pH를 측정하였다(Fig. 7). 황태 청국장은 발효 초기 6.61에서 발효 48시간에 35°C, 40°C, 45°C에서 각각 pH 7.15, 7.92, 7.71로 증가되었고, 흑태 청국장의 경우, 발효 초기 6.5에서 발효 48시간에 35°C, 40°C, 45°C에서 각각 pH 7.35, 7.21, 7.59로 증가하였다. 황태 청국장에서는 40°C, 흑태 청국장에서는 45°C에서 가장 높은 pH를 나타내었다. 즉, 청국장 발효 초기에는 중성 영역을 나타내다가 발효시간 경과에 따라 알칼리영역으로 전환되었다. 청국장의 pH가 알칼리성으로 전환되는 것은 단백질 분해에 따른 결과로 판단된다. 이는 청국장 발효시 아미노산, 암모니아가 생성되어 pH가 증가한다는 기존의 보고들과 일치하였다(Lee *et al.*, 1999). 흑태는 황태보다 pH 증가 정도가 적었음을 알 수 있었는데, 이것은 흑태 청국장의 단백질 분해가 천천히 이루어진 결과와 일치하였다(Fig. 2). Hwang (2010)은 CJJN-4 균주를 접종한 청국장은 40°C와 45°C



**Fig. 6.** Changes in ammonia type nitrogen content of Chungkookjang during fermentation. (A) yellow soybean, (B) black soybean.



**Fig. 7.** Changes in pH of Chungkookjang during fermentation. (A) yellow soybean, (B) black soybean.

**Table 1.** Comparison of yellow soybean and black soybean Chungkookjang at the highest levels of each item

	Yellow soybean	Black soybean
Protease activity (U/g)	854 (35°C, 42 h)	847 (35°C, 48 h)
Amylase activity (U/g)	3.87 (40°C, 6 h)	4.96 (45°C, 6 h)
Reducing sugar content (mg/g)	16.11 (40°C, 6 h)	19.08 (45°C, 18 h)
Amino type nitrogen content (mg%/g)	420 (40°C, 48 h)	194 (40°C, 48 h)
Ammonia type nitrogen content (mg%/g)	487 (35°C, 48 h)	634 (35°C, 48 h)
pH	7.92 (40°C, 48 h)	7.59 (45°C, 48 h)
Viable cell number (log CFU/g)	9.30 (40°C, 48 h)	9.30 (35°C, 48 h)

Parenthesis indicated temperature and fermentation time at the highest level of each item

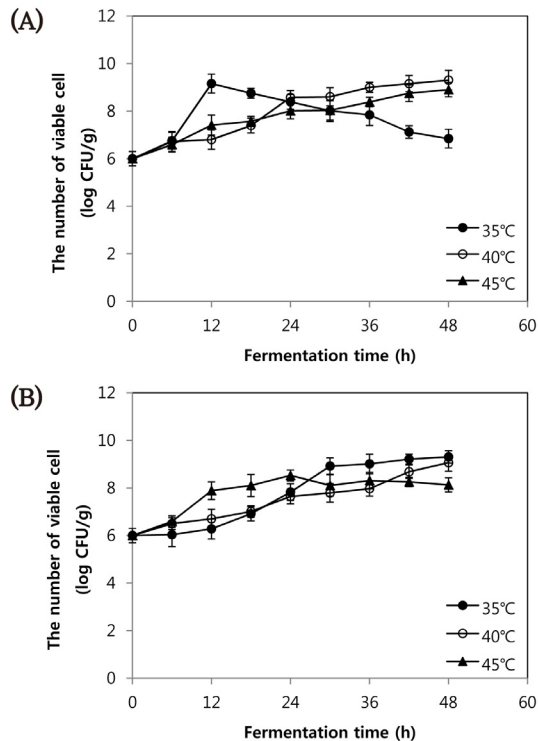
에서 pH에 따라 큰 차이는 없었으며, 발효 36시간까지 pH가 급격하게 증가한 이후, 완만하게 증가하여 본 실험결과의 황태 청국장과 유사한 경향을 나타내었다. Kim 등(2006)은 35°C와 40°C 보다 45°C에서 다소 높은 pH를 나타내었으며, 이것은 발효온도가 높았기 때문이라고 보고하였으며, 본 실험결과의 흑태의 경우와 유사하였다.

#### 청국장 발효에 따른 생균수

청국장의 미생물 생육 정도를 분석하기 위해 생균수를 측정하였다(Fig. 8). 황태 청국장은 35°C에서 발효 12시간까지 급격하게 증가하였다가 감소하였고, 40°C와 45°C에서는 발효시간이 경과함에 따라 꾸준히 증가하였다. 35°C와 40°C에서는 9.16, 9.3 log CFU/g의 최고 균수를 나타내어 유사한 수준을 보였다. 흑태 청국장의 경우, 35°C에서 48시간에 9.3 log CFU/g의 최고 균수

를 나타내었고, 40°C에서는 발효시간이 경과함에 따라 계속 증가하여 9.06 log CFU/g의 균수를 나타내었다. 또한 45°C에서는 발효 24시간까지 8.53 log CFU/g으로 증가하였다가 완만하게 감소하였다. 황태 청국장은 40°C에서, 흑태 청국장은 35°C에서 높은 생균수를 나타내었으며, 콩 종류에 따른 차이는 나타나지 않았다. Kim 등(2006)은 35°C, 40°C에서 가장 많은 생균수를, 45°C에서 가장 적은 생균수를 나타내었다고 보고하였으며, Oh와 Eom (2008)은 발효 21시간 이후에 청국장에서 8-9 log CFU/g 수준으로 미생물이 생육하였다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다.

본 연구에서는 가정에서 제조한 청국장으로부터 protease 활성이 우수하고 점성 콜로니를 형성하는 *Bacillus amyloliquefaciens* C2를 분리 및 동정하였다. 이 균주를 이용하여 청국장을 제조한 결과 황태 청국장은 amylase 활성, 환원당, 아미노태 질소 함량, pH 및 생균수 등이 40°C에서 가장 높게 나타났으며, 발효 최적 조건은 발효 온도 40°C, 발효 시간 48시간이었다(Table 1). 반면, 흑태 청국장은 모든 온도에서 효소 활성 및 이화학적 성분이 높게 나타났으며, 특히 amylase 활성 및 환원당 함량이 황태 청국장보다 높게 나타났다. 흑태 청국장의 발효 최적 조건은 발효 온도 45°C, 발효 시간은 48시간이었다. 또한 40°C와 45°C에서 발효한 황태 및 흑태 청국장은 암모니아태 질소의 생성량이 적어 불쾌취를 감소시키는 측면에서 위에 언급한 발효온도에서 발효하는 것이 적당함을 알 수 있다. 결론적으로 청국장 발효균주의 순수분리 및 사용으로 청국장 제조 최적조건을 확립하였으며, 이러한 결과는 청국장의 품질 향상, 섭취 및 이용에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.



**Fig. 8.** Changes in viable cell number of Chungkookjang during fermentation. (A) yellow soybean, (B) black soybean.

#### 적요

본 연구에서는 가정에서 제조한 청국장으로부터 순수분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* C2를 이용하여 콩 종류와 발효온도에 따른 청국장의 품질 특성 변화를 조사하였다. Protease 활성은 35°C에서 배양했을 때 황태 청국장에서 854 U/g, 흑태 청국장에서 847 U/g로 가장 높았다. Amylase 활성은 황태 청국장의 경우, 40°C에서 3.87 U/g, 흑태 청국장은 45°C에서 4.96 U/g로 가장 높았다. 환원당 함량은 황태 청국장의 경우, 40°C에서 16.11 mg/g, 흑태 청국장은 45°C에서 19.08 mg/g으로 가장 높았다. 아미노태 질소 함량의 경우, 황태 청국장은 40°C에서 420 mg%/g, 흑태 청국장은 194 mg%/g로 가장 높았다. pH의 경우,

황태 청국장은 40℃에서 7.92, 흑태 청국장은 45℃에서 7.59로 가장 높았다. 황태 및 흑태 청국장의 생균수는 각각 40℃ 및 35℃에서 9.3 log CFU/g로 가장 높았다. 반면에 암모니아태 질소 함량은 황태 청국장의 경우, 45℃에서 225 mg%/g, 흑태 청국장은 40℃에서 80 mg%/g로 가장 낮았다. 황태 청국장은 높은 protease 활성, pH 및 아미노태 질소함량을 나타내었다. 반면에, 흑태 청국장은 높은 amylase 활성과 환원당 함량 및 낮은 암모니아태 질소 함량을 나타내었다.

### 감사의 말

본 연구는 2009년도 중소기업청 산학공동기술개발지원사업에 의하여 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed., p. 145. Association of official analytical chemists, Washington, D.C., USA.
- Eom, S.M., Jung, B.Y., and Oh, H.I. 2009. Changes in chemical components of Cheonggukjang prepared with germinated soybeans during fermentation. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 133–141.
- Hwang, J.H. 2010. The fermentative characteristics of Cheonggukjang prepared by starter culture of *Bacillus* spp. with fibrinolytic activity. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1832–1838.
- Jeong, J.B., Choi, S.K., Jeong, D.Y., Kim, Y.S., and Kim, Y.S. 2012. Effects of germination time of soybeans on quality characteristics of Cheonggukjang fermented with an isolated bacterial strain. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **4**, 69–75.
- Kim, M.H., Han, S.Y., Ko, J.M., and Kim, Y.S. 2012a. Degradation characteristics of proteins in Cheonggukjang (fermented unsalted soybean paste) prepared with various soybean cultivars. *Food Sci. Biotechnol.* **21**, 9–18.
- Kim, K.M., Kim, H.R., Yoo, S.M., Kim, J.S., and Choe, J.S. 2006. Quality characteristics of Chunggugjang prepared by *Bacillus subtilis* NRLSI IV with different inoculum levels and fermentation temperatures. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **22**, 291–298.
- Kim, A.R., Lee, J.I., Cha, S.S., Chang, H.C., and Lee, M.Y. 2012b. Effect of soybeans, Chungkukjang, and Doenjang on blood glucose and serum lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 621–629.
- Lee, H.J., Kim, S.I., Park, J.G., Park, J.N., Han, I.J., Song, B.S., Kim, J.H., Byun, M.W., and Lee, J.W. 2008. Effect of *Choi-cha* on fermentation characteristics and sensory quality of Chungkookjang (Korean fermented soybean). *Korean J. Food Preserv.* **15**, 144–149.
- Lee, J.J., Lee, D.S., and Kim, H.B. 1999. Fermentation patterns of Chungkookjang and Kanjang by *Bacillus licheniformis* B1. *Kor. J. Microbiol.* **35**, 296–301.
- Lee, H.J. and Shu, J.S. 1981. Effect of *Bacillus* strains on the Chungkookjang processing (I). Changes of the components and enzymes activities during Chungkookjang koji preparation. *Kor. J. Nutr.* **14**, 87–104.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–429.
- Moon, H.K., Lee, S.W., Moon, J.N., Kim, D.H., Yoon, W.J., and Kim, G.Y. 2011. Quality characteristics of various beans in distribution. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **21**, 215–221.
- Oh, H.I. and Eom, S.M. 2008. Changes in microflora and enzyme activities of *Cheonggukjang* prepared with germinated soybeans during fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **40**, 56–62.
- Shon, M.Y., Kwon, S.H., Sung, C.K., Lee, S.W., and Park, S.K. 2001. Isolation and microbiological characteristics of *Bacillus megaterium* SMY-212 for preparation of black bean *Chungkugjang*. *J. Life Sci.* **11**, 304–310.
- Yoo, J.S. 2012. Pretreatment of soybean and development of fermentation conditions of Chungkukjang for high contents isoflavone production. *Food Eng. Prog.* **13**, 355–361.
- Yoo, S.M. and Chang, C.M. 1999. Study on the processing adaptability of soybean cultivars for Korean traditional Chonggugjang preparation. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 91–98.