

## *Bacillus subtilis* SRCM100757를 이용하여 접종농도와 발효기간을 달리하여 제조한 청국장 품질 특성 및 Vitamin K<sub>2</sub>(MK-7) 생성능 평가

정민홍<sup>1</sup> · 방선옥<sup>2</sup> · 김금숙<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>국방기술품질원, <sup>2</sup>(주)참고을

### Quality Characteristics and Vitamin K<sub>2</sub> (MK-7) Productivity of *Cheonggukjang* fermented by *Bacillus subtilis* SRCM100757 with Different Inoculum Concentrations and Fermentation Time

Min-Hong Jeong<sup>1</sup>, Seon-Ok Bang<sup>2</sup> and Kum-Suk Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Defence Agency for Technology and Quality, Busan 48250, Korea

<sup>2</sup>Chamgoeul Co., Ltd, Gimje 54368, Korea

#### ABSTRACT

This study was carried out to investigate the characteristics and Vitamin K<sub>2</sub> (MK-7) productivity of *Cheonggukjang* fermented by *Bacillus subtilis* SRCM100757 depending on the inoculum concentration 0.5% (v/w), 1% (v/w) and 2% (v/w). The lowest moisture content and water activity were 53.7±0.6% and 8.39±0.09 after fermentation for 72 hours at 2% (v/w). pH slowly became alkalized during fermentation, but there was no significant difference. Amino nitrogen content increased with time and the highest content was 580.8±1.9 mg% after fermentation for 72 hours at 2% (v/w). Lightness (L value) and yellowness (b value) decreased with time, whereas redness (a value) hardly changed. MK-7 contents increased with time at each inoculum concentration. The highest content was 20.47±1.53 after fermentation for 72 hours at 2%(v/w) and there were no significant differences between 1%(v/w) and 2%(v/w) inoculum concentrations.

**Key words :** *Cheonggukjang*, menaquinone-7, quality characteristics, fermentation time, *Bacillus subtilis* SRCM100757 (KCCM11969P)

#### 서 론

콩은 동양권에서 일상생활에 중요한 영양공급원으로 이용되어 왔으며, 다량의 생리활성물질을 함유하여 아시아 및 서구 문화권에서도 건강식품으로 알려져 있다(Kenedy AR 1995). 우리나라에서는 콩을 식생활에 그대로 이용하거나, 두부나 두유 등으로 가공하여 이용되기도 하며, 발효시켜 간장, 된장, 청국장 등의 장류로 이용되어 왔다(Lee KH 등 2005).

콩을 이용한 장류 중 청국장은 *Bacillus subtilis* 등의 발효균을 이용해 약 40℃에서 2~3일간 콩을 발효시킨 것으로, 단백질을 분해하여 가용성 질소화합물인 펩톤, 펩타이드, 아미노산 등을 생성하여 소화되기 쉽고 끈적한 점질물을 생성하며, 특유의 향 및 구수한 맛을 나타내는 우리나라의 전통 발효식품이다(Kim KJ 등 1982). 쌀 등의 곡류를 주식으로 하여 단백질 섭취량이 비교적 부족한 우리나라에서 청국장은

예부터 중요한 단백질 공급원이었으며, 된장이나 고추장보다 단백질 및 지방함량이 높은 고영양 식품이다.

청국장에는 인체의 건강증진에 도움이 되는 생리 활성 물질로 알려진 isoflavones, phenolic acids, saponins, trypsin inhibitor, phytic acid 등이 함유되어 동맥경화, 심장병, 당뇨병 예방효과, 노인성치매 예방효과, 항암효과(유방암, 대장암, 폐암 등), 골다공증 억제 등 성인병 예방효과가 있으며(Kim SH 등 1999), 특히 발효 중에는 비타민 B<sub>2</sub>가 현저하게 증가하여 원료상태일 때의 찐 대두에 비해 5~10배가 되며, 청국장균에 의해서 생성되는 물질에는 비타민 K도 있다(Kim KY & Hahm YT 2003).

자연계에 비타민 K는 주로 식물에 의해 합성된 K<sub>1</sub>(phyloquinone)과 미생물에 의해 생성되는 비타민 K<sub>2</sub>(menaquinone) 두 가지 형태가 있다(Tsukamoto Y 등 2001). 비타민 K<sub>2</sub>는 주로 육류와 생선, 발효식품에 존재하며(Vermeer C 등 1996), isoprenyl기 측쇄 길이에 따라 동족체가 존재하여 menaquinone(MK) 1-14로 분류된다(Shearer MJ 1990). 비타민 K<sub>2</sub>는 골 형성을 돕고, 골 흡수를 막아주는 역할을 하며(Koshihara Y

\* Corresponding author : Kum-Suk Kim, Tel: +82-63-542-3972, Fax: +82-63-542-4065, E-mail: kks1522@hanmail.net

등 2003), 그 기작은 뼈에 존재하는 osteocalcin이라는 단백질의 glutamine acid residue를  $\gamma$ -carboxyl glutamic acid를 갖는  $\gamma$ -carboxylated osteocalcin로 만들고, 이것이 hydroxyapatite와 결합하여 뼈의 석회화를 촉진한다(Shearer MJ 1995).

콩에는 비타민  $K_1$ 이 미량이지만,  $K_2$ 는 거의 존재하지 않는 반면, 청국장에는  $K_1$ 은 적으나,  $K_2$ 는 다른 채소류보다 5~10배나 증가된다(Lee JO 등 2005). Sato T 등(2001)은 natto를 제조하는데 이용되는 *Bacillus subtilis*가 식품에서 비타민  $K_2$ 를 섭취하는데 가장 효과적인 방법이라고 하였는데, 청국장 역시 콩을 발효시키는 주발효 균주가 *Bacillus*이므로 동일한 효과를 기대할 수 있다.

일반적으로 청국장 제조는 재래식 방법을 이용하여 벗짚을 증자대두에 접종하여 제조되고 있으나, 제조방법, 사용원료 및 사용종균, 종균 접종량에 따라 청국장 품질에 큰 영향을 미치는 요인이 되고 있다(Cheong DH & Shim SK 1994). 이에, 청국장 산업화를 위한 효율적인 공정개발 및 산업적 범용화를 위한 가격 경쟁력이 필수적으로 요구되며, 제조방법 및 발효조건을 달리하여 다양한 연구가 진행되어 왔지만(Suh JS 등 1983; Kim KJ 등 1982; Lee BY 등 1991; Kim KM 등 2006; Lee NR 등 2013), 발효조건에 따른 비타민  $K_2$  함량변화에 대한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 (재)발효미생물산업진흥원에서 전통 장류로부터 분리한 균주들 중 비타민  $K_2$  생성능이 우수한 *Bacillus subtilis* SRCM100757를 이용하여 발효조건에 따라 청국장을 제조하고, 품질 특성과 비타민  $K_2$ (MK-7) 함량을 비교함으로써 청국장의 발효시간과 접종량이 청국장의 품질 특성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

대두는 한국농수산물유통공사에서 수입대두(미국산)를 공급받아 사용하였고, 사용균주는 전통장류로부터 분리된 (재)발효미생물산업진흥원의 보유 균주인 *B. subtilis* SRCM100757를 사용하였다.

비타민  $K_2$ (Menaquinone-7; MK-7)의 표준품은 순도 97.6%의 Sigma Co.(Japan) 제품을 사용하였고, 0.3125~20 ppm 농도로 조제하여 HPLC 분석에 사용하였다. 추출용매인 2-propanol (J. T. Baker, U.S.A)은 hexane, ethanol, methanol(Burdick & Jackson Co, Ltd, Korea)은 HPLC 등급을 구입하여 사용하였다.

### 2. 청국장 제조

선별한 대두를 3회 수세한 후, 실온에서 16시간 침지하여 탈수를 한 다음, 121°C에서 30분간 증자하여, 60°C로 냉각하

였다. 배양한 *B. subtilis* SRCM100757(KCCM11969P)의 배양액을 3,000 rpm, 15분간 원심분리하여, 멸균수로 희석하고, O.D<sub>600</sub> 값이 0.4가 되도록 농도를 조절하였다. 희석한 배양액은 불린 대두 무게의 0.5%(v/w), 1%(v/w), 2%(v/w)로 균일하게 접종한 후 40°C에서 24~72시간 동안 발효시켰다.

발효조건에 따른 청국장의 특성변화를 확인하기 위하여 72시간까지 24시간 단위로 측정하였다. 시료는 실온 암실에서 막자사발로 마쇄하여 시험분석 시료로 사용하였다.

## 3. 이화학적 특성

### 1) 수분, 아미노태 질소 함량, pH 측정

수분함량은 105°C 상압가열건조법, 아미노태 질소 함량은 Formol 적정법(AOAC 1990)에 준하여 측정하였고, pH는 마쇄한 청국장을 동량의 증류수를 가하고, 교반한 다음 pH meter(pH/mV/TEMP Meter P25, (주)이스텍, 한국)를 이용하여 측정하였다.

### 2) 수분활성도와 색도 측정

수분활성도는 Novasina(LabTouch-aw, Novasina, Swiss)를 이용하여 일회용 전용 샘플 용기 안에 샘플 제품을 넣고 측정하였다. 청국장의 색도는 Chromameter CR-410(Monolta, Japan)를 이용하여 petridish(35×10 mm)에 시료를 넣고 Hunter의 L, a, b값을 측정하였다. 이때 사용한 백판값은 L=98.71 a=-0.04, b=1.81이었다.

## 4. 비타민 $K_2$ (Menaquinone-7) 분석

청국장에 함유된 비타민  $K_2$ (MK-7) 성분 추출을 위해서 Sato T 등(2001)의 방법을 인용하여 분석하였다.

### 1) 표준용액 제조

표준용액은 비타민  $K_2$ (Menaquinone-7)의 표준품을 ethanol에 녹여 1,000  $\mu$ g/mL의 농도로 만들어 -20°C 이하에서 보관하여 사용하였으며, 이를 ethanol로 희석하여 0.3125~20  $\mu$ g/mL의 범위의 농도로 희석하여 표준용액을 제조하였다.

### 2) 시료용액 제조

균질화 한 청국장 시료 약 2 g을 50 mL conical tube에 취한 다음, 2-propanol 4.8 mL와 n-hexane 9.6 mL를 혼합하고, 1시간 동안 암소에서 방치하였다. 이후 원심분리(3,500 rpm, 10 min) 후, 상층액 2 mL를 취하여 질소농축한 후 ethanol 2 mL를 첨가하여 녹였다. 0.50  $\mu$ m PTPE membrane Syringe filter로 여과하여 HPLC 바이알에 취하였다.

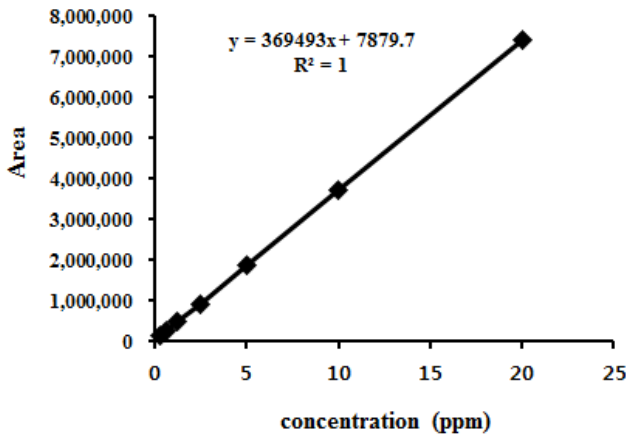


Fig. 1. Standard curve of vitamin K<sub>2</sub> (MK-7).

3) 기기 및 분석 조건

비타민 K<sub>2</sub>을 분석하기 위하여 HPLC(high performance liquid chromatography-fluorometric detector, Waters Co, U.S.A)을 사용하였으며, 분석에 사용한 컬럼은 Waters사(U.S.A)의 xBridge column C18(2.1×150 mm, 5 um)이며, 이동상은 100% methanol을 사용하였다. 이동상의 유속은 0.5 mL/min, 컬럼온도는 40℃, 시료 주입량은 10 μL로 설정하였다(Table 1). 청국장 비타민 K<sub>2</sub> 함량은 표준용액의 면적과 시료의 면적의 비를 이용하여 평가하였고, 비타민 K<sub>2</sub>의 정량은  $y=369,493x+7,879.7$  ( $R_2=1$ ) 표준검량선을 이용하였다(Fig. 1).

5. 통계 분석

본 연구 결과의 통계 분석은 SAS(9.4 version) 통계 프로그램으로 각각의 결과에 대한 ANOVA test를 이용하여 분산분석한 후 평균 및 표준편차를 구하고, Duncan의 다중비교(Duncan's multiple range test)로  $p<0.05$  유의수준에서 유의차 검

Table 1. Condition of HPLC for analyzing vitamin K<sub>2</sub> (MK-7) content

Instrument	HPLC (Waters CO., 2695 eAlliance)
Detector	Waters 2475 Fluorescence Detector
Detection	Excitation 320 nm Emission 430 nm
Column	xBridge column C <sub>18</sub> (2.1×150 mm, 5 μm)
Mobile phase	100% methanol
Flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	10 μL
Oven temperature	40℃

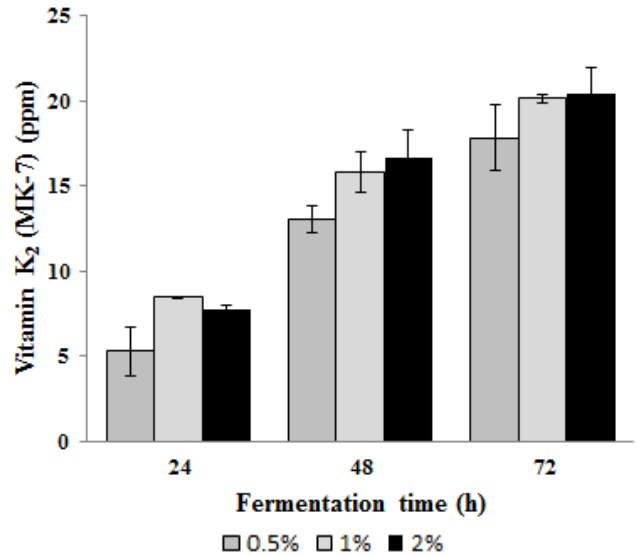


Fig. 2. Change of vitamin K<sub>2</sub> (MK-7) content during Cheonggukjang fermentation.

정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 발효조건에 따른 수분, pH, 수분활성도, 아미노태 질소 함량

분리된 *B. subtilis* SRCM100757 균주를 이용하여 제조된 청국장의 수분, pH, 수분활성도를 측정하여 Table 2에 나타내었다.

발효 24시간에서 *B. subtilis* SRCM100757 균주를 0.5% 접종한 청국장의 수분함량은 56.4~56.8%, 1% 접종한 청국장에서는 55.4~56.4%, 2% 접종한 청국장에서는 55.6~56.8%로 유의적인 차이는 없었다. 48시간, 72시간 발효 시 각 접종 농도별 제조 청국장의 수분함량은 54.3~55.8%, 53.7~54.7%로 시판 청국장을 분석하여 수분함량 47.6~59.8%로 보고한 Kim JS 등(1998)과 50.3~62.2%로 보고한 Kim JW 등(2006)의 수분함량 범위에 포함되어 시판 청국장과 차이가 없었으며, 발효시간이 지남에 따라 수분이 감소하여 발효 72시간에서 모든 접종 농도별 제조 청국장의 수분함량이 발효 24시간차의 측정결과와 유의적인 차이를 보였다( $p<0.05$ ).

pH는 발효 24시간차의 각 균 접종 농도별 0.5%(v/w), 1%(v/w), 2%(v/w) 제조 청국장에서 pH 7.93, pH 7.94, pH 7.89로 유의적인 차이는 없었다. 각 동일 발효 시간에서 균의 접종 농도별 제조 청국장의 pH의 유의적인 차이는 없었지만, 발효시간 경과에 따라 pH가 증가하여 발효 48시간차에서는 pH 8.35~8.43으로 증가하였으며, 발효 72시간차에서는 pH 8.39

**Table 2. Moisture, pH, Aw, amino nitrogen of *Cheonggukjang* prepared by *B. subtilis* SCRM100757 on the different inoculum levels and fermentation time**

Fermentation time (hours)	Inoculation (%)	Item			
		Moisture (%)	pH	Aw	Amino nitrogen (mg%)
24	0.5	56.6±0.2 <sup>a1)</sup>	7.93±0.18	0.824±0.036 <sup>bc</sup>	129.8±7.7 <sup>f</sup>
	1	55.9±0.5 <sup>a</sup>	7.94±0.13	0.851±0.055 <sup>abc</sup>	127.9±1.0 <sup>f</sup>
	2	56.2±0.6 <sup>a</sup>	7.89±0.42	0.865±0.023 <sup>ab</sup>	136.8±2.1 <sup>c</sup>
48	0.5	55.6±1.0 <sup>ab</sup>	8.43±0.17	0.867±0.009 <sup>ab</sup>	466.7±1.2 <sup>d</sup>
	1	54.3±0.6 <sup>cd</sup>	8.35±0.40	0.899±0.014 <sup>a</sup>	470.5±2.4 <sup>d</sup>
	2	55.8±0.3 <sup>a</sup>	8.41±0.53	0.878±0.009 <sup>ab</sup>	486.7±3.4 <sup>c</sup>
72	0.5	54.7±0.2 <sup>bc</sup>	8.42±0.43	0.805±0.043 <sup>c</sup>	550.9±1.1 <sup>b</sup>
	1	53.8±0.4 <sup>cd</sup>	8.43±0.34	0.846±0.015 <sup>abc</sup>	545.9±1.1 <sup>b</sup>
	2	53.7±0.6 <sup>d</sup>	8.39±0.09	0.806±0.038 <sup>c</sup>	580.8±1.9 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Mean±standard deviation.

<sup>a-f</sup> Different superscripts within a same column are significantly different by Duncan's multiple range at  $p<0.05$ .

~8.43으로 48시간과 유의적으로 차이가 없었다. pH 증가는 청국장 발효 시 단백질이 분해됨에 따라 암모니아가 생성되어 pH가 증가한다는 기존의 보고들과 부합하였으며(Lee JJ 등 1999), 발효 36시간까지 급격히 pH가 증가하다 이후 큰 변화 없이 72시간까지 일정하게 나타난 Mann SY 등(2013)의 연구결과와 비슷한 경향을 보였다. 이는 발효 초기 많은 단백질원이 분해되며 생성된 많은 양의 암모니아로 인해 pH가 급격히 증가했으며, 이후 분해되는 단백질원의 양이 줄어들며 완만한 증가로 이어진 것으로 사료된다.

청국장의 수분활성도는 발효기간 24시간 동안 0.824~0.865의 범위로 접종 농도 및 발효시간에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 수분활성도는 48시간 발효 시 증가하다가 발효 72시간에 0.805~0.846 범위로 감소하였다. 보통 세균이 자랄 수 있는 최소한의 수분활성도는 0.91이며, 효모와 곰팡이는 각각 0.88, 0.80으로(Kang MY 등 1999), Kim JW 등(2006)의 연구에서 조사한 시판 고추장 및 된장의 수분활성도 0.659~0.821과는 비슷한 수준이며, 시판 청국장의 수분활성도 결과보다는 낮았다.

아미노태 질소 함량은 protease의 작용에 의하여 단백질이 아미노산의 형태로 분해되는 정도를 나타낸 것으로 청국장의 발효도 평가 및 장류 발효식품의 품질과 구수한 맛의 지표로 사용되고 있다(Eom SM 등 2009). 아미노태 질소를 분석한 결과, 24시간 발효구간에서 균 접종 농도 0.5%, 1%로 제조한 청국장의 함량은 각 129.8 mg%, 127.9 mg%로 유의적인 차이는 없었으며, 균 접종 농도 2% 제조 청국장에서는 136.8 mg%로 다소 높게 나타났다( $p<0.05$ ). 발효 48시간차에

서는 466.7~486.7 mg%으로 증가하였으며( $p<0.05$ ), 72시간차에서는 550.9~580.8 mg%로 증가하였다( $p<0.05$ ). 발효 72시간차에서의 아미노태 질소 함량은 Kim JW 등(2006)이 조사한 시판 청국장의 350~870 mg%와 유사하였으며, 다른 *Bacillus subtilis* 균을 이용하여 제조한 청국장의 아미노태 질소 함량보다 다소 높게 나타났다(Choi UK 등 1998; Mann SY 등 2013). 발효 48시간차까지 아미노태 질소 함량이 급격히 증가하다 72시간차에서 완만한 증가를 보인 것은 pH의 증가와 동일한 원인에 의한 것으로 사료된다.

## 2. 발효조건에 따른 색도

*B. subtilis* SCRM100757 균주를 이용하여 제조된 청국장의 발효시간 및 균 접종 농도별 색도를 L, a, b값으로 나타낸 결과는 Table 3에 나타내었다. 명도값을 나타내는 L값은 흑색인 0에서 백색인 100까지의 범위를 가지는 것으로, 발효 24시간차에서 58.90~60.73으로 각 시료별로 유의적인 차이가 나타났다( $p<0.05$ ). 발효 48시간차에서는 57.26~58.61, 72시간차에서는 55.58~57.58로 각 접종 농도별 제조 청국장에서 발효가 진행됨에 따라 지속적으로 낮아졌다( $p<0.05$ ). a값은 녹색인 -80에서 적색인 +100까지의 범위를 가지는 것으로 발효 24시간차에서 5.41~5.60으로 나타났으며, 48시간차와 72시간차에서 각 5.34~5.66, 5.45~5.74로 발효가 진행됨에 따라 유사한 수준을 보였다. b값은 황색이 진해질수록 0에서 +70으로 증가하는데, 발효 24시간차에서는 6.84~7.49, 발효 72시간차에서는 4.47~4.93으로 발효 시간이 경과함에 따라 황색 정도가 유의적으로 낮게 나타났으며( $p<0.05$ ), 이

**Table 3. Hunter's color value of *Cheonggukjang* prepared by *B. subtilis* SCRM100757 on the different inoculum levels and fermentation time**

Fermentation time (hours)	Inoculation (%)	Hunter's color value		
		L	a	b
24	0.5	59.78±0.08 <sup>b1)</sup>	5.60±0.02 <sup>b</sup>	7.49±0.06 <sup>a</sup>
	1	58.90±0.03 <sup>c</sup>	5.58±0.01 <sup>b</sup>	6.84±0.02 <sup>b</sup>
	2	60.73±0.32 <sup>a</sup>	5.41±0.10 <sup>cd</sup>	7.11±0.10 <sup>c</sup>
48	0.5	58.61±0.10 <sup>c</sup>	5.40±0.02 <sup>cd</sup>	5.48±0.02 <sup>c</sup>
	1	57.26±0.03 <sup>f</sup>	5.66±0.02 <sup>b</sup>	5.67±0.01 <sup>d</sup>
	2	58.12±0.05 <sup>d</sup>	5.34±0.01 <sup>d</sup>	5.28±0.02 <sup>f</sup>
72	0.5	57.58±0.09 <sup>e</sup>	5.45±0.02 <sup>c</sup>	4.93±0.04 <sup>g</sup>
	1	55.58±0.02 <sup>h</sup>	5.74±0.01 <sup>a</sup>	4.47±0.04 <sup>b</sup>
	2	56.77±0.39 <sup>g</sup>	5.59±0.06 <sup>b</sup>	4.87±0.04 <sup>g</sup>

<sup>1)</sup> Mean±standard deviation.

<sup>a-g</sup> Different superscripts within a same column are significantly different by Duncan's multiple range at  $p<0.05$ .

는 발효시간이 높을수록 청국장 색도의 b값이 낮다고 연구 보고한 Jang YM(2004)의 결과와 일치하였다.

### 3. 발효조건에 따른 비타민 K<sub>2</sub>(MK-7) 함량

분리된 *B. subtilis* SRCM100757 균주를 이용하여 제조된 청국장에서의 비타민 K<sub>2</sub> 함량을 분석한 결과를 Fig. 2와 Table 4에 나타내었다. *B. subtilis* SRCM100757 균주를 이용하여 제조된 비타민 K<sub>2</sub> 함량은 발효 24시간차에서 5.29~8.46 ppm으로 0.5%(v/w) 접종 제조 청국장이 1%(v/w), 2%(v/w) 접종 제조 청국장보다 유의적으로 낮게 나타났다( $p<0.05$ ). 발효 48시간차에서는 13.05~16.67 ppm, 72시간 17.83~20.47 ppm으로 발효 시간이 경과함에 따라 비타민 K<sub>2</sub> 함량이 비례하게 증가하였으며, 발효 24시간에서 48시간까지 비타민 K<sub>2</sub> 함량은 상당히 증가하였으나, 48시간에서 72시간차 사이에서는 완만하게 증가하며, pH 및 아미노태 질소와 동일한 경향을 보였다. 각 발효 시간별 구간에서 0.5%(v/w) 접종 제조 청국장이 1%(v/w), 2%(v/w) 접종 제조 청국장보다 유의적으로 낮게 나타났으며( $p<0.05$ ) 1%(v/w), 2%(v/w)는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Woo WJ(2011)의 연구에서는 *B. amyloliquefaciens* BY01 균주에 4%의 글리세롤을 첨가하여 43℃에서 36시간 발효시킨 청국장에서는 12.47 ppm의 메나퀴논이 생성되는 결과를 보여, 본 연구에서 48시간 발효 시 생성되는 메나퀴논 결과와 유사하였다.

### 요약 및 결론

**Table 4. Vitamin K<sub>2</sub> (MK-7) of *Cheonggukjang* prepared by *B. subtilis* SCRM100757 on the different inoculum levels and fermentation time**

Fermentation time (hours)	Inoculation (%)	Vitamin K <sub>2</sub> (MK-7) (ppm)
24	0.5	5.29±1.43 <sup>1)e</sup>
	1	8.46±0.07 <sup>d</sup>
	2	7.71±0.28 <sup>d</sup>
48	0.5	13.05±0.78 <sup>c</sup>
	1	15.81±1.15 <sup>b</sup>
	2	16.67±1.66 <sup>b</sup>
72	0.5	17.83±1.94 <sup>b</sup>
	1	20.13±0.24 <sup>a</sup>
	2	20.47±1.53 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Mean±standard deviation.

<sup>a-e</sup> Different superscripts within a same column are significantly different by Duncan's multiple range at  $p<0.05$ .

본 연구에서는 전통장류로부터 분리된 *B. subtilis* SRCM-100757 균주를 이용하여 발효시간과 균 접종 농도에 따라 제조한 청국장의 품질 특성 및 비타민 K<sub>2</sub> 함량을 분석하고, 청국장 제조를 위한 자료를 제공하고자 하였다. 청국장의 수분 함량은 발효시간이 길수록 감소하는 경향을 보였고, 수분활성도는 72시간 발효 시 2%(v/w) 접종 제조 청국장에서 가장

낮게 나타났으며, pH는 2%(v/w) 접종 제조 청국장에서 가장 높게 나타났다. 발효식품의 품질 지표로 활용되는 아미노태 질소의 경우, 발효 24시간차에서 2%(v/w) 접종 제조 청국장이 136.8 mg%로 가장 높게 나왔으며, 발효시간에 비례하게 증가하여 발효 72시간차에서도 청국장의 아미노태 질소함량은 2%(v/w) 접종 제조 청국장이 580.8 mg%로 가장 높게 나타났다. 색도는 L값과 b값은 발효시간이 경과함에 따라 감소하였고, a값은 발효시간에 따라 큰 변화를 보이지 않았다. 비타민 K<sub>2</sub> 함량은 발효 24시간에서 0.5%(v/w) 접종 제조 청국장은 5.29 ppm로 가장 낮았고, 발효시간에 비례하게 증가하여 발효 72시간차에서는 0.5%(v/w)는 17.83 ppm, 1%(v/w)는 20.13 ppm, 2%(v/w)는 20.47 ppm으로 0.5%(v/w)에서 가장 낮게 나타났다. 수분, pH, 수분활성도, 색도는 균 접종농도에 받는 영향이 크지 않았으나, 발효식품의 품질 지표인 아미노태 질소는 발효시간이 길수록, 균 접종농도가 높을수록 함량이 높은 것을 확인하였고, 비타민 K<sub>2</sub>의 생성량은 발효시간이 길수록 높아졌으나, 발효 48시간, 72시간차에서 균 접종농도 1%(v/w)와 2%(v/w)는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이와 같은 연구 결과는 비타민 K<sub>2</sub> 생성능이 있는 *B. subtilis* SR-CM100757 균주를 이용하여 청국장을 제조하였을 때, 발효 시간과 균 접종농도에 따른 청국장의 품질 특성 연구에 있어 기초 자료로서 활용될 수 있을 것이다.

## REFERENCES

- AOAC (1990) Official Method of Analysis 15<sup>th</sup> ed. The Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. U.S.A.
- Cheong DH, Shim SK (1994) In Fermented Soy Food. Jisungesaem, Korea. pp 673-686.
- Choi UK, Ji WD, Chung YG (1998) Characteristics of *Chunggugjang* produced by *Bacillus subtilis* DC-2. J Korean Soc food Sci Nutr 27(5): 846-851.
- Eom SM, Jung BY, Oh HI (2009) Changes in chemical components of *Cheonggukjang* prepared with germinated soybeans during fermentation. J Applied Biological Chem 52(3): 133-141.
- Jang YM (2004) Research on quality improvement of *Chungkukjang* by *Bacillus subtilis*. Ph.D. Dissertation. Sungshin Women's University, Seoul, Korea. pp 72-75.
- Kang MY, Chung YM, Eun JB (1999) Manufacturing and physical and chemical characteristics of fruit leathers using flesh and pomace of Japanese apricots (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). Korean J Food Sci Technol 31(6): 1536-1541.
- Kennedy AR (1995) The evidence for soybean products as cancer preventive agents. J Nutr 125(3 Suppl): 733S-743S.
- Kim JS, Yoo SM, Choe JS, Park HJ, Hong SP, Chang CM (1998) Physicochemical properties of traditional *Chunggugjang* produced in different regions. Agricultural Chemistry and Biotechnol 41(5): 377-383.
- Kim JW, Kim YS, Jeong PH, Jeong PH, Kim HE, Shin DH (2006) Physicochemical characteristics of traditional fermented soybean products manufactured in folk villages of Sunchang region. J Food Hygiene and Safety 21(4): 223-230.
- Kim KJ, Ryu MK, Kim SS (1982) *Chungkook-jang* koji fermentation with rice straw. Korean J Food Sci Technol 14 (4): 301-308.
- Kim KM, Kim HR, Yoo SM, Kim JS, Choe JS (2006) Quality characteristics of *Chunggugjang* prepared by *Bacillus subtilis* NRLSI IV with different inoculum levels and fermentation temperatures. Korean J Food Cookery Sci. 22(3): 291-298.
- Kim KY, Hahm YT (2003) Recent studies about physiological functions of *Chungkookjang* and functional enhancement with genetic engineering. J Genetic Engineering Research 16(1): 1-18.
- Kim SH, Yang JL, Song YS (1999) Physiological functions of *Chongkukjang*. Food Industry Nutr 4(2): 40-46.
- Koshihara Y, Hoshi K, Okawara R, Ishibashi H, Yamamoto S (2003) Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. J Endocrinol 176(3): 339-348.
- Lee BY, Kim DM, Kim KH (1991) Studies on the change in rheological properties of *Chungkook-jang*. Korean J Food Sci Technol 23(4): 478-484.
- Lee JJ, Lee DS, Kim HB (1999) Fermentation patterns of *Chungkookjang* and *Kanjang* by *Bacillus licheniformis* B1. Korean J Microbiol 35(4): 296-301.
- Lee JO, Ha SD, Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Park SH (2005) Industrial application and physiological functions of *Chongkukjang*. Food Sci and Industry 38(2): 69-78.
- Lee KH, Ryu SH, Lee YS, Kim YM, Moon GS (2005) Changes of antioxidative activity and related compounds on the *Chungkukjang* preparation by adding drained boiling water. Korean J Food Cookery Sci 21(2): 163-170.
- Lee NR, Go TH, Lee SM, Hong CO, Park KM, Park GT, Hwang DY, Son HJ (2013) Characteristics of *Chungkook-jang* prepared by *Bacillus amyloliquefaciens* with different

- soybeans and fermentation temperatures. Korean J Microbiol 49(1): 71-77.
- Mann SY, Kim EA, Lee GY, Kim RU, Hwang DY, Son HJ, Lee BW, Lee CY, Kim DS (2013) Characteristics of *Chungkookjang* produced by *Bacillus subtilis* MC31. J Life Sci 23(4): 560-568.
- Sato T, Yamada Y, Ohtani Y, Mitsui N, Murasawa H, Araki S (2001) Efficient production of menaquinone (vitamin K<sub>2</sub>) by menadione-resistant mutant of *Bacillus subtilis*. J Ind Microbiol Biotechnol 26(3): 115-120.
- Shearer MJ (1990) Vitamin K and vitamin K-dependent proteins. Br J Haematol 75: 156-162.
- Shearer MJ (1995) Vitamin K. Lancet 345:229-234.
- Suh JS, Ryu MK, Hur YH (1983) Effect of *Bacillus* strains on the *Chungkookjang* processing III, Changes of the free amino acid contents and nitrogen compounds during *Chungkookjang Koji* preparation. Korean J Food Sci Technol 15 (4): 385-391.
- Tsukamoto Y, Kasai M, Kakuda H (2001) Construction of *Bacillus subtilis* (natto) with high productivity of vitamin K<sub>2</sub> (menaquinone-7) by analog resistance. Biosci Biotechnol Biochem 65(9): 2007-2015.
- Vermeer C, Gijsbers BL, Craciun AM, Groenen-van Dooren MM, Knapen MH (1996) Effects of vitamin K on bone mass and bone metabolism. J Nutr 126(4 Suppl): 1187S-1191.
- Woo WJ (2011) Isolation and characterization of a novel strain to improve the content of vitamin K<sub>2</sub> in *Cheonggukjang*. MS Thesis Chonbuk National University. Jeonju. pp 50-53.

---

Date Received	May 18, 2017
Date Revised	Jun. 6, 2017
Date Accepted	Jun. 22, 2017