



Physicochemical properties and isoflavone content of *Chaga Cheonggukjang* with *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3925 starter

Ha Gyoon Na¹, Eun Ho Jang¹, Dong Hun Nam¹, Min-Ah Kim¹, Mi-Ja Kim¹,
 Eun Hwa Sohn², Hyun Dong Kim³, Ki-Hyo Jang^{1*}

¹Department of Food and Nutrition, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea

²Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea

³Bari Co., Ltd., Donghae 25800, Korea

Lactobacillus acidophilus KCTC 3925균을 종균으로 사용한 차가버섯 청국장의 품질특성 및 isoflavone 함량 변화

나하균¹ · 장은호¹ · 남동훈¹ · 김민아¹ · 김미자¹ · 손은화² · 김현동³ · 장기효^{1*}

¹강원대학교 식품영양학과, ²강원대학교 생약자원개발학과, ³(주)바리의꿈

Abstract

This study was conducted to investigate the quality characteristics and changes in isoflavone content of *Cheonggukjang* with added *Chaga* mushroom by secondary fermentation at 40°C for 48 h with or without a starter, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3925. *Cheonggukjang* samples were divided into three groups: Control (unsterilized *Cheonggukjang* fermented without a starter), NS (unsterilized *Cheonggukjang* inoculated with *L. acidophilus* KCTC 3925), and YS (heat-sterilized *Cheonggukjang* inoculated with *L. acidophilus* KCTC 3925). The approximate composition of the three types of *Cheonggukjang* was 49.79-51.44% moisture, 4.54-4.72% crude ash, 43.21-44.37% crude protein, 11.58-13.65% crude fat, 37.41-40.07% carbohydrate, 31.92-33.82% dietary fiber. The mineral content included 5.43-9.64 mg% Na, 1,792.86-1,824.39 mg% K, 253.69-326.09 mg% Ca, 619.37-691.20 mg% P, 92.59-110.59 mg% Fe, and 0.01-0.02 mg% Cd. Free amino acid contents of NS (2,520.92 mg%) and YS (2,421.94 mg%) were significantly higher than that of the control (2,236.76 mg%). Amino-type nitrogen content for the three types of *Cheonggukjang* ranged from 837.20-920.27 mg% with no significant difference. Ammonia-type nitrogen content ranged from 137.09-169.36 mg%. Supplement of *Cheonggukjang* with *L. acidophilus* KCTC 3925 increased production of aglycone isoflavons compared to that of control. Therefore, our results show that fermenting *Chaga Cheonggukjang* with *L. acidophilus* KCTC 3925 leads to improved quality characteristics and increased isoflavone aglycone content.

Key words : *Chaga Cheonggukjang*, *Lactobacillus acidophilus*, physicochemical properties, isoflavone aglycone

서 론

청국장은 콩을 주원료로 하여 종균의 사용 없이도 자연 발효법에 의해 제조되는 발효식품으로 단백질, 탄수화물,

지방 등의 필수 영양소의 함량이 높고, 이 외에 생리활성 물질도 다량 함유되어 있다(1,2). 청국장은 대두발효 식품류 중 가장 짧은 기일에 완성할 수 있으면서 원료 대두가 갖는 영양기능, 감각기능이외에도 여러가지 생체조절기능을 나타내는 이유로 청국장의 기능성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(3). 현재 알려진 청국장의 기능성으로는 혈전 용해능, 혈압 및 지질대사 개선효과, 항암효과, 항산화효과(4) 등 다양한 보고가 있다. 청국장은 발효되면서 대두의 단백질, 탄수화물 및 지방질이 소화되기 쉬운 상태로 분해되어 소화 흡수율이 증가하고(5), 특히 대두에 존재하

*Corresponding author. E-mail : kihyojang@kangwon.ac.kr
 Phone : 82-33-540-3312, Fax : 82-33-540-3319
 Received 13 March 2018; Revised 2 April 2018; Accepted 4 April 2018.
 Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

는 isoflavone은 유방암, 대장암, 자궁암 등의 억제효과가 탁월하고 동맥경화 및 LDL 콜레스테롤 감소, 골다공증 등 만성 질환의 예방효과가 높다고 보고되었지만, 대부분 배당체로 존재하여 체내흡수율이 매우 낮아 식품으로 섭취하기 위해서는 장내세균에 의해 비배당체로 전환된 후 체내에 흡수되어야 한다. 하지만 대두를 발효시킨 청국장에서는 발효과정 중 미생물의 β -glucosidase에 의해 비배당체 형태로 전환되어 체내에서 배당체 형태보다 빠르게 흡수된다. 일부 유산균들도 이소플라본 배당체를 비배당체로 전환하는 것으로 알려져 있다. Kiyosawa 등(6)은 *Bifidobacterium longum*을 이용하여 제조한 대두 요구르트 이소플라본의 대부분이 aglycone으로 전환되었다고 보고하고 있으며, Donkor와 Shah(7)의 보고에서는 *Lactobacillus acidophilus*를 넣어 36시간 발효시킨 두유에서 가장 이소플라본 비배당체 함량이 많았다고 보고하고 있다. 이처럼 이소플라본의 낮은 체내 흡수율을 보완하기 위해서는 이소플라본을 비배당체 형태로 전환하는 생물전환 공정 기술 및 가공기술이 필요하다(8). 본 연구실에서는 식품에 사용이 허가된 Generally Recognized As Safe(GRAS) 미생물 중에서 된장 제조 시 비배당체 이소플라본 함량을 높여주는 β -glucosidase 활성이 높은 유산균을 선별한 바가 있다(9). 최근 품질 및 기능성의 향상을 위해 식물성 천연소재인 배추(10), 다시마(11), 감초(12), 녹차(13), 키토산(2) 등을 첨가한 청국장들이 보고되고 있다. 차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 소나무 비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*)에 속하는 약용 버섯으로, 주로 북위 45도 이상의 러시아를 비롯한 한랭지역에서 자생하는 검은 자작나무, 오리나무, 물푸레나무 등에 기생하는 균핵이다. 주로 약용으로 이용되며, 주요 성분으로는 triterpene, polysaccharides, isoprenoid, polyphenol, lignin, magnesium, lanosterol, obliquol 등이 있다(14). 차가버섯은 비만 및 지질대사 개선, 콜레스테롤 저하효과를 보이기도 하며, 항산화 작용, 혈전용해 및 혈소판 응집억제, 항당뇨, 항 바이러스 등과 같은 기능성을 가지고 있어 이를 활용하여 주류 및 음료류, 과자 및 빵류, 국수류, 두부 등을 제조하고 있다(15).

이에 본 연구에서는 청국장의 기능성 향상을 위해 차가버섯을 첨가한 청국장에 선행연구에서 β -glucosidase 활성이 가장 우수하였던 유산균을 접종하여 2차 발효시켜 이러한 첨가물들이 청국장의 품질특성에 미치는 영향을 조사하였고, isoflavone 비배당체 함량 증가여부를 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 청국장 제조

본 연구에서 사용된 청국장은 강원도 동해시에 위치한 (주)바리의 꿈으로부터 말린 차가버섯 청국장을 제공받아

사용하였고, 선행연구(9)에서 β -glucosidase 활성이 우수한 균으로 확인된 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3925균(이하 *L. acidophilus*)을 MRS Broth(Difco, Sparks, MD, USA)를 이용하여 37°C에서 24시간 정치배양한 후 종균으로 사용하였다. 제공 받은 차가버섯 청국장 20 g에 증류수 10 mL, 50배 희석된 lactic acid를 7 mL, 설탕물(50%)을 최종농도가 2.5%가 되게끔 혼합된 차가버섯 첨가 청국장 시료 조성을 조절하였다. 이 시점에서 혼합된 차가버섯 첨가 청국장 시료를 3개군(control, NS, YS)으로 분배하였다. 3개군에서 YS균은 접종하기 전 시료를 열처리(100°C, 15 min)하였으며, control군과 NS군에서는 열 살균공정을 적용하지 않았다. YS균과 NS균은 배양한 *L. acidophilus*균을 배양액 총량 대비 5% 수준으로 종균을 접종하였으며, control군에서는 종균을 사용하지 않았다. 이상과 같이 발효액 조성 및 열처리 살균 공정을 달리한 3개 시료들을 40°C로 설정된 배양기(SI-4000R Jeio Tech, Daejeon, Korea)에서 48시간 동안 2차 발효하였으며, 발효 후 동결건조하여 분석에 사용하였다.

물 추출물 제조

2차 발효한 청국장 분말 5 g에 증류수 45 mL를 첨가하고 균질화한 후 1시간 정치추출 하였다. 이를 원심분리기(5816R, Eppendorf, Hamburg, Germany)로 2,800 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였다.

일반성분 분석

수분은 동결건조 전과 후의 무게 차이로 분석하였으며, 수분을 제외한 나머지 청국장의 일반성분은 동결건조된 시료로 AOAC(16) 방법에 따라 측정하였다. 조회분은 건식 회화법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백질은 micro-Kjeldahl 질소 정량법에 따라 측정하였다. 탄수화물은 100-(조단백+조지방+조회분)의 식을 이용하여 값을 표시하였다. 식이섬유 함량 측정을 위하여 동결 건조된 청국장 시료에 효소들(amylase, protease, amyloglucosidase)을 처리하여 전분과 단백질을 제거하고 ethanol을 사용한 침전, 여과, 건조 후 함량 측정 등의 공정을 실시하였으며, 잔존하는 조회분과 조단백질을 측정된 값을 차감하여 식이섬유 함량을 분석하였다. pH 측정을 위하여 청국장 시료에 증류수를 1:9의 비율로 가하여 희석한 후 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액에 pH meter(model 725p, Istek, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

무기질 함량 측정

무기질 함량 측정은 Koh 등(17)의 방법에 따라 측정하였다. 동결 건조된 시료에 H₂O₂ 2 mL와 HNO₃ 7 mL를 가한 후 Microwave Digestion System(Ethos Touch control, Milestone Inc, Sorisole, Italy)을 사용하여 최대 1,000 W로 산 가수분해 하였다(200°C까지 10분→200°C에서 20분→

20℃까지 70분). 분해된 시료를 ICP-AES(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, Vista-PRO, Varian, Belrose, Australia)에 주입하여 무기질 함량을 분석하였다. 분석조건은 다음과 같다. Reflected power 1.2 kW, 이동상 argon, plasma flow 15 L/min, auxiliary gas flow 1.5 L/min, nebulizer gas flow 0.7 L/min의 조건으로 측정하였으며, 각 원소 별 측정 파장은 Na(588.995-589.592 nm), K(766.491-769.897 nm), Ca(393.366-396.847 nm), P(177.434-213.618 nm), Fe(238.204-259.940 nm), Cd(214.439-226.502 nm)로 설정하였다.

유리아미노산 분석

청국장 시료의 유리아미노산 분석은 Koh 등(17)의 방법에 따라 측정하였다. 유리아미노산 분석을 위해서는 시료 0.5 g에 70% ethanol 50 mL를 가하여 30분 동안 추출하여 10분간 방치하였다. 추출 후 1,500 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 진공농축 하고 0.02 N HCl 20 mL로 용해시켜 여과하였다. 유리아미노산 분석을 위해 여과액을 Ion exchange column(4.6 mm×60 mm, Hitachi-2622PF, Hitachi, Tokyo, Japan)이 장착된 아미노산 분석기(Hitachi L-8800 Amino acid, Hitachi)에 주입하였다. 이동상은 다양한 pH를 가진 buffer(pH-SET, Kanto Chemicals INC, Tokyo, Japan)를 사용하여 아미노산을 분리한 뒤 반응코일에서 ninhydrin과 반응시켜 440 nm, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 칼럼 온도는 30-70℃, 반응코일 온도는 135℃로 설정하였고 유리아미노산의 시료주입량은 20 µL, 유속 0.35 mL/min, 0.3 mL/min을 사용하였다.

아미노태 질소 함량 및 암모니아태 질소 함량 측정

아미노태 질소 함량은 다음과 같이 측정하였다(18). 물 추출물 5 mL에 중성 formalin 용액 20 mL를 넣은 본 시험과 물 추출물 5 mL에 증류수 20 mL를 넣은 공시험에 0.1 N NaOH로 pH 8.3이 될 때까지의 적정한 양을 이용하여 아미노태 질소함량을 측정하였다. 암모니아태 질소 함량은 phenol-hypochloride법(19)으로 측정하였다. 물 추출물 0.1 mL에 용액 A(phenol 10 g and sodium nitroprusside dehydrate 0.05 g in distilled water 1 L)와 용액 B(Na₂HPO₄·12H₂O 9 g, NaOH 6 g and NaOCl 10 mL in distilled water 1 L)를 각각 1 mL씩 넣은 후 37℃에서 20분간 반응시켜 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암모니아태 질소 함량은 (NH₄)₂SO₄를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다.

Isoflavone 분석

청국장 시료의 isoflavone 함량 분석은 Kim 등(9)의 방법에 따라 측정하였다. 동결건조 시킨 청국장 시료 5 g에 80% ethanol 45 mL를 넣어 24시간 정치추출하여 상등액을 0.45

µm 여과막으로 여과한 뒤 Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6×250 mm ID, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)이 장착된 Agilent 1200 HPLC(Agilent Technologies)에 20 µL를 주입하여 254 nm로 설정된 UV detector에 검출된 면적으로 정량분석하였다. 실험에 사용된 비배당체 isoflavone 표준물질들인 daidzein, glycitein, genistein 등은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 유산균을 활용하여 2차 발효한 청국장의 isoflavone 중에서 비배당체 isoflavone 함량을 이들 표준물질들의 retention time과 피크면적을 비교하여 정성 및 정량 분석하였다. 이동상은 용매 A(0.1% acetic acid in H₂O), 용매 B(0.1% acetic acid in acetonitrile)를 사용하였으며 유속 1.2 mL/min에 용매 gradient는 0 min, 25 min, 50 min, 55 min, 70 min, 75 min, 80 min, 90 min에 맞춰 93:7, 93:7, 85:15, 80:20, 75:25, 75:25, 65:35, 65:35(v/v)의 비율로 하였다.

통계처리

본 연구의 결과는 3회 반복하여 얻은 결과를 평균(mean)과 표준편차(SD)로 표시하였으며 SPSS 23.0 통계 프로그램을 사용하여 각 시료군간 차이를 p<0.05 수준에서 one-way ANOVA(analysis of variation)를 실시하고 Duncan's multiple range test로 유의적 차이를 분석하였다.

결과 및 고찰

일반성분 및 pH

*L. acidophilus*를 첨가한 차가버섯 청국장의 일반성분 분석 결과는 Table 1과 같다. *L. acidophilus*균 배양액을 접종하지 않은 대조군(control), *L. acidophilus*균 배양액을 접종한 군(NS), *L. acidophilus*균 배양액을 접종하기 전 열처리(100℃, 15 min)하여 잡균을 제거한 군(YS)의 일반성분을 분석한 결과 동결건조 전 수분함량은 control군이 51.44%, NS군이 49.79%, YS군이 49.83%로 나타났으며 이는 Kim 등(20)이 측정 한 청국장의 수분함량 결과(50.3-62.2%)와 유사하였다. 동결건조 된 시료로 측정한 조지방 함량은 control군이 4.57%, NS군이 4.72%, YS군이 4.54%로 나타났고, 조단백질 함량은 control군이 44.37%, NS군이 43.21%, YS군이 43.82%로 유의적인 차이가 없었다. 조지방 함량은 control군이 13.65%, NS군이 12.60%, YS군이 11.58%로 control군이 유의적으로 높았는데, 유산균으로 2차 발효를 하였을 때 유의적으로 감소함을 관찰할 수 있었다(p<0.05). 탄수화물 함량은 control군이 37.41%, NS군이 39.47%, YS군이 40.07%로 유의적으로 control군이 낮게 관찰되었다(p<0.05). Park 등(21)이 측정 한 동결 건조시킨 청국장의 일반성분과 비교하였을 때 조단백질 함량(50.45%), 조지방

함량(4.66%)은 유사하였으나 조지방 함량(23.47%)과 탄수화물 함량(14.63%)에서 차이가 나타났다. 이는 청국장장의 원료 대두의 차이에 의해 나타난 것으로 사료된다. 식이섬유 함량은 control군이 33.82%, NS군이 31.92%, YS군이 32.63%로 유의적인 차이가 없었다. 3종의 청국장 시료들은 2차 발효전에 유산을 추가적으로 첨가하여 2차 발효하였으므로 일반적인 청국장장에서 보고된 pH인 6.5-7.0과 비교시 상당히 낮은 수준의 pH가 관찰되었다. 인위적인 pH 조절에도 불구하고, 2차 발효후에는 유산균을 사용한 시료들에서 대조군(control) 대비 유의적인 수준에서 pH 감소로 나타났다(Table 1). pH는 NS, YS, control의 순으로 나타났으며, 이러한 결과는 NS와 YS 시료들에서 유산균에 의한 2차 발효가 진행되었음을 나타낸다.

Table 1. Proximate composition and pH of *Chaga Cheonggukjang* added with *L. acidophilus* KCTC 3925

Proximate composition	Samples ¹⁾		
	Control	NS	YS
Moisture	51.44±0.36 ^{2)ab3)}	49.79±0.27 ^b	49.83±0.57 ^b
Crude ash	4.57±0.08 ^b	4.72±0.07 ^a	4.54±0.02 ^b
Crude protein	44.37±0.48	43.21±0.54	43.82±1.11
Crude fat	13.65±0.68 ^a	12.60±0.49 ^b	11.58±0.28 ^c
Carbohydrate	37.41±1.01 ^b	39.47±0.86 ^a	40.07±1.19 ^a
Dietary fiber	33.82±1.13	31.92±0.81	32.63±1.49
pH	5.45±0.03 ^a	4.77±0.01 ^c	4.88±0.00 ^b

¹⁾Control, fermented without sterilization process and a starter; NS, fermented without sterilization process but with a starter (*L. acidophilus* KCTC 3925); YS, fermented with *L. acidophilus* KCTC 3925 after sterilization process (at 100°C for 15 min).

²⁾All values are mean±SD (n=3).

^{3)a-c}Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

무기질 함량

Table 2는 무기질 함량을 측정된 결과로 칼슘은 control군이 275.16 mg%, NS군이 326.09 mg%, YS군이 253.69 mg%, 인은 control군이 691.20 mg%, NS군이 676.44 mg%, YS군이 619.37 mg%, 칼륨은 control군이 1,792.86 mg%, NS군이 1,824.39 mg%, YS군이 1,813.09 mg%, 나트륨은 control군이 5.43 mg%, NS군이 9.64 mg%, YS군이 7.75 mg%로 나타났다. 칼슘과 칼륨은 국가표준 식품성분표 제9개정판(22)에서 명시되어 있는 청국장 가루의 칼슘, 칼륨양이 각각 207 mg%, 1,665 mg%인 것에 비해 본 시료들의 칼슘, 칼륨 함량이 높았으며 특히 NS군의 경우 칼슘 1.57배, 칼륨 1.09배 높았다. 이러한 무기질 함량의 차이는 국산콩과 본 과제에서 사용한 러시아 연해주 산 콩의 차이로 판단된다. 칼슘과 인은 1:1의 비율로 섭취하였을 때 체내에서 가장 좋은 흡수율을 나타낸다. 각 시료별 칼슘과 인의 비율은 control

군이 2.51:1, NS군이 2.07:1, YS군이 2.44:1로 나타나 유산균의 첨가는 칼슘과 인의 흡수율을 높여주는 것으로 나타났다. 나트륨 함량은 국가표준 식품성분표 제9개정판(22)에 명시되어 있는 청국장 가루의 나트륨 함량은 2,487 mg%로 나트륨 함량에서 차이가 나는 이유는 시판 청국장의 경우 저장성을 늘리기 위해 1-11%의 소금량을 유지하고 있지만(23), 본 연구에서 시료로 사용된 청국장에는 소금을 첨가하지 않았기 때문이다. 철의 경우 control군은 110.59 mg%, NS군은 98.98 mg%, YS군은 92.59 mg%로 측정되었다. 카드뮴은 control 0.01 mg%, NS 0.01 mg%, YS 0.02 mg%로 농산물의 카드뮴 허용수치인 0.02 mg%(24)를 초과하지 않았다.

Table 2. Mineral contents of *Chaga Cheonggukjang* added with *L. acidophilus* KCTC 3925

Mineral	Samples ¹⁾		
	Control	NS	YS
Ca	275.16±0.28 ^{2)bc3)}	326.09±0.57 ^a	253.69±0.31 ^c
P	691.20±2.84 ^a	676.44±5.67 ^b	619.37±5.37 ^c
K	1,792.86±20.32	1,824.39±21.93	1,813.09±17.38
Na	5.43±0.09 ^c	9.64±0.13 ^a	7.75±0.10 ^b
Fe	110.59±0.15 ^a	98.98±0.05 ^b	92.59±0.17 ^c
Cd	0.01±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b	0.02±0.00 ^a

¹⁾Control, fermented without sterilization process and a starter; NS, fermented without sterilization process but with a starter (*L. acidophilus* KCTC 3925); YS, fermented with *L. acidophilus* KCTC 3925 after sterilization process (at 100°C for 15 min).

²⁾All values are mean±SD (n=3).

^{3)a-c}Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

유리아미노산 함량

청국장장은 발효숙성 중 미생물의 작용으로 인해 원료콩 단백질이 분해되어 생성된 단맛을 내는 alanine, glycine, lysine, 쓴맛을 내는 valine, isoleucine, leucine, methionine 및 구수한 맛을 내는 aspartic acid, glutamic acid 등의 아미노산이 어우러져 복합적인 청국장 특유의 맛을 형성한다고 알려져 있다(25). 본 연구의 유리아미노산 측정 결과는 단맛, 쓴맛, 구수한 맛에 영향을 미치는 아미노산으로 나누어 Table 3에 나타내었다. Control군과 유산균을 접종한 NS군, YS군의 단맛(sweetness)을 내는 아미노산 함량은 각각 518.02 mg%, 612.55 mg%, 592.07 mg%로 나타났고 쓴맛(bitterness)을 내는 아미노산 함량은 각각 566.07 mg%, 604.52 mg%, 603.90 mg%로 나타나서 단맛, 쓴맛 모두 유산균을 접종한 청국장장에서 더 높게 나타났다. 또한 구수한 맛(savory taste)을 나타내는 아미노산 함량은 각각 671.13 mg%, 714.68 mg%, 647.24 mg%로 나타났지만 구수한 맛의 주요 물질인 glutamic acid의 총 아미노산에 대한 비율은

각각 22.86%, 21.95%, 21.09%로 control군이 유산균을 접종한 청국장 보다 유의적으로 높은 비율을 나타냈다(p<0.05). 이외의 맛(others)을 내는 아미노산 함량은 481.53 mg%, 589.17 mg%, 578.73 mg%로 나타나서 단맛, 쓴맛과 마찬가지로 유산균을 접종한 청국장에서 더 높게 나타났다. 본 연구에서는 glutamic acid, leucine, phenylalanine, alanine, aspartic acid 등의 함량이 높게 관찰되었다. Beak 등(26)은 발아 콩으로 제조한 청국장에서 glutamic acid, alanine 등의 함량이 높았으며, 시판 청국장 분말제품에서 유리아미노산을 분석한 Lee 등(27)은 glutamic acid, valine, leucine, phenylalanine 등의 함량이 높았음을 보고하여 본 연구의 아미노산 조성과의 유사한 경향을 나타내었다. 총 유리아미노산 함량은 2,236.76 mg%, 2,520.92 mg%, 2,421.94 mg%로 나타나서 유산균을 접종한 청국장에서 유의적으로 control군, NS군과 YS군에서 각각 더 높게 나타났다(p<0.05).

Table 3. Free amino acids contents of *Chaga Cheonggukjang* added with *L. acidophilus* KCTC 3925

Free Amino acids	Samples ¹⁾			
	Control	NS	YS	
Sweetness	Alanine	179.11±1.42 ^{2(b)}	201.76±5.43 ^a	210.58±9.97 ^a
	Glycine	83.65±0.70 ^b	89.87±2.47 ^{ab}	95.87±4.77 ^a
	Lysine	148.94±5.58 ^c	198.78±5.08 ^a	169.35±14.32 ^b
	Serine	49.56±0.15 ^b	58.71±1.68 ^a	56.58±3.27 ^a
	Threonine	56.76±0.60 ^b	63.43±1.51 ^a	59.68±3.82 ^{ab}
	Sum	518.02±4.16 ^c	612.55±16.16 ^a	592.07±36.11 ^b
Bitterness	Isoleucine	103.41±3.54	112.28±5.31	113.35±6.31
	Leucine	279.16±10.52 ^a	258.11±5.85 ^b	270.40±12.21 ^{ab}
	Methionine	26.74±0.93 ^b	33.23±1.72 ^a	31.01±0.64 ^a
	Valine	138.22±22.69	178.15±6.50	167.71±27.21
	Histidine	18.55±1.30 ^b	22.74±0.70 ^a	21.43±2.46 ^{ab}
	Sum	566.07±15.41 ^c	604.52±19.98 ^a	603.90±44.54 ^b
Savory taste	Aspartic acid	159.88±1.13 ^a	161.35±4.49 ^a	136.63±13.78 ^b
	Glutamic acid	511.25±3.82 ^b	553.33±15.44 ^a	510.61±24.85 ^b
	Sum	671.13±4.95 ^{ab}	714.68±19.92 ^a	647.24±38.63 ^b
Others	Arginine	4.29±0.07 ^c	44.49±0.83 ^a	35.93±1.67 ^b
	Ammonia	110.56±2.07 ^b	146.97±4.85 ^a	153.48±8.05 ^a
	Proline	58.48±0.83 ^b	78.30±2.40 ^a	80.45±3.18 ^a
	Phenylalanine	247.74±14.97	180.91±8.34	257.64±13.38
	Ornithine	46.87±5.63	46.15±1.35	39.66±7.73
GABA	GABA	13.59±6.80	19.02±6.82	11.57±4.78
	Sum	481.53±12.94 ^b	589.17±11.09 ^a	578.73±33.01 ^a
Total amino acid	2,236.76±14.59 ^b	2,520.92±66.28 ^a	2,421.94±149.40 ^{ab}	

¹⁾Control, fermented without sterilization process and a starter; NS, fermented without sterilization process but with a starter (*L. acidophilus* KCTC 3925); YS, fermented with *L. acidophilus* KCTC 3925 after sterilization process (at 100 °C for 15 min).

²⁾All values are mean±SD (n=3).

³⁾Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

아미노태 질소 및 암모니아태 질소 함량

아미노태 질소함량과 암모니아태 질소함량을 측정 한 결

과는 Table 4와 같다. 청국장의 아미노태 질소함량은 control군에서 920.27 mg%, NS군에서 884.80 mg%, YS군에서 837.20 mg%로 나타나 유의적인 차이가 없었다. Lee 등(28)은 청국장에서 *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 혼합 발효하였을 때 *B. subtilis* MC31을 단일 접종하여 발효하였을 때와 비교시 아미노태 질소함량이 더 낮게 나타났다고 보고하고 있고, Ju와 Oh(29)는 *B. subtilis* 단일 균주로 배양한 청국장과 *Lactobacillus plantarum*과 혼합배양한 청국장의 아미노태 질소함량은 별다른 차이가 없었다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사하였다. 전통장류에서 유래한 유산균주를 접종한 콩 발효물의 아미노태 질소 함량을 측정 한 Lee 등(30)도 유산균을 접종한 발효물 보다 접종하지 않은 대조군이 더 높은 결과를 보였으며, 이는 발효과정 중 생성 또는 분해되는 아미노산 생성량과 연관이 있을 것으로 설명하고 있다. 본 연구에 사용된 청국장의 유리아미노산 중 구수한 맛의 지표인 glutamic acid의 비율을 살펴 보면 총 아미노산에 대한 비율이 control군은 22.86%, NS군은 21.95%, YS군은 21.09%로 나타나서 control군이 유산균을 접종한 청국장보다 유의적으로 높았다. 따라서 위의 선행연구 결과와 마찬가지로 발효에 따른 유리아미노산 변화에 의해 아미노태 질소 함량에 차이가 나는 것으로 보여진다. 아미노태 질소함량은 미생물의 작용에 의하여 단백질이 아미노산의 형태로 분해되는 정도를 나타낸 것으로 된장, 청국장 등의 장류 발효식품의 품질과 구수한 맛의 지표로 사용되고 있다(31). 본 연구에서 유산균을 접종하였을 때 아미노태 질소함량이 감소하여 구수한 맛에 영향을 줄 것으로 예상된다. Lee 등(27)은 시판 청국장 분말제품의 아미노태 질소를 분석하여 2.83-7.35%의 범위를 나타낸다고 보고하였다. 이 범위는 본 연구의 결과보다 낮은 범위를 나타내고 있어 유산균을 접종한 본 연구의 제품은 관능적인 품질 면에서 다른 시판 제품들에 비해 별 차이가 없다고 할 수 있다. 암모니아태 질소는 단백질 분해과정에서 탈아미노반응에 의해 생성되며 함량이 증가할수록 이취와 함께 불쾌감을 주는 물질로 청국장의 변패 또는 이상발효를 나타내는 지표로서 활용된다(32). 암모니아태 질소함량을 측정한 결과 control군 137.09 mg%, NS군 145.31 mg%, YS군 169.36 mg%로 나타났다. Ju와 Oh(29)는 *B. subtilis* 균주와 *L. plantarum*을 혼합 배양한 청국장이 *B. subtilis* 균주로 단독 배양한 청국장보다 암모니아태 질소함량이 낮게 나타났다고 보고하고 있으며, Lee 등(28)도 유산균을 혼합배양하였을 때 암모니아태 질소함량이 낮게 나타났다. 본 연구와 타 연구진들과의 결과의 상이함은 평균으로 사용한 유산균의 차이 또는 발효과정의 차이에서 기인한다고 판단된다. 하지만 타 연구진들이 보고한 암모니아태 질소의 범위는 50.4-213.4 mg%이므로 본 연구 결과(137.09-169.36 mg%)는 범위안에 포함되었다. 본 연구에서 사용된 청국장의 발효 기간은 총 96시간으로 위의 선행연구에 쓰인 청국

장의 발효기간보다 상대적으로 길었다. Eom 등(33)의 연구에서 청국장장의 발효기간이 늘어날수록 암모니아태 질소함량이 증가하는 결과를 보였는데, 본 연구에서 적용한 상대적으로 긴 발효시간에도 불구하고 다른 청국장들에 비해 본 연구에서 제조한 청국장장의 불쾌취가 심하지 않다는 것을 나타내고 있다.

Table 4. Amino-type nitrogen and ammonia-type nitrogen contents of *Chaga Cheonggukjang* added with *L. acidophilus* KCTC 3925

Samples ¹⁾	(mg%)		
	Control	NS	YS
Amino-type nitrogen	920.27±42.49 ^{2(a3)}	884.80±65.12 ^a	837.20±8.40 ^a
Ammonia-type nitrogen	137.09±11.12 ^b	145.31±3.47 ^b	169.36±17.25 ^a

¹⁾Control, fermented without sterilization process and a starter; NS, fermented without sterilization process but with a starter (*L. acidophilus* KCTC 3925); YS, fermented with *L. acidophilus* KCTC 3925 after sterilization process (at 100°C for 15 min).

²⁾All values are mean±SD (n=3).

^{3a-b)}Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Isoflavone 분석

식물계에 널리 존재하는 diphenol 화합물인 isoflavone은 체내 이용률이 비교적 낮은 배당체인 genistin, daidzin, glycitin과 체내 이용률이 비교적 높은 비배당체인 genistein, daidzein, glycitein 등의 형태로 존재하는데, 대두를 충분히 발효시키면 대부분의 isoflavone은 비배당체로 전환되며 대두에 수침이나 가열 등의 가공처리를 하면 용출된 β-glycosidase의 작용에 의해 배당체에서 비배당체로 전환되는 것으로 알려져 있다(32,34). 다른 콩 발효식품은 발효와 숙성기간이 수 개월 소모되는데 반하여 청국장 제조시에는 2-3일로 매우 단기간 발효되어 비배당체 이소플라본 생성은 제한적으로 나타난다. 따라서, 본 연구에서는 isoflavone 비배당체 함량을 높이고자 Kim 등(9)이 보고한 이소플라본 비배당체 함량을 높이는 것으로 확인된 β-glycosidase 활성이 우수한 *L. acidophilus*를 첨가하여 발효함으로써 비배당체 함량 증가를 유도하였다(Table 5). 비배당체 이소플라본 함량은 control군 666.84 μg/g, NS군 733.36 μg/g, YS군 851.48 μg/g으로 나타나서 YS군이 유의적으로 가장 높게 나타났(p<0.05). Kim 등(9)이 시간별로 *L. acidophilus*를 첨가하지 않은 된장의 이소플라본 비배당체 함량을 측정 한 결과는 120시간 후 daidzein은 156.7 mg/kg, glycitein은 86.7 mg/kg, genistein은 104.3 mg/kg으로 측정된 반면, *L. acidophilus*를 종균으로 첨가한 된장은 120시간 후 daidzein은 3017.7 mg/kg, glycitein은 576.7 mg/kg, genistein은 663.7 mg/kg으로 측정되어 본 연구와 비슷한 경향을 나타내었다. 대두유를 제조할 때 *L. acidophilus*를 종균으로 사용시 배당체 이소플라본이 비배당체 이소플라본으로 전환되는 것으로 보고되었다(7,8). Donkor와 Shah(7)의 보고에서는 *L.*

*acidophilus*를 넣어 시간별로 발효시킨 두유에서 36시간 발효시켰을 때 가장 이소플라본 비배당체 함량이 높았지만 추가적인 발효기간 연장에서는 감소하는 양상을 보였다. 따라서 기능성 향상을 위한 *L. acidophilus*균 접종은 발효기간이 몇 달에서 몇 년이 걸리는 된장, 간장과 같은 대두 발효식품보다는 전통대두발효식품 중 짧은 기간(2-3일)에 발효가 끝나는 청국장장에 적합하다고 생각된다. 따라서 발효시간을 최적화 하는 조건을 적용한다면 더 높은 비배당체 이소플라본 함량을 갖는 청국장장을 얻을 수 있을 것이다. 한편, Yang 등(35)은 대두의 식품 제조과정 중 비배당체 형태를 증가시키기 위해서는 고온처리 과정이나 염산(HCl)에 의한 산 가수분해방법보다는 β-glucosidase 활성을 활용하는 것이 효율적이라고 제안하였다. 이는 고온이나 강산을 이용한 경우 반응산물이 무작위적이고, 부반응에 의해 효율이 저하될 수 있는 반면, 천연물 유래 β-glucosidase를 활용하는 경우 반응산물의 선택성을 증가시킬 수 있으며 유해한 유기용매의 사용을 감소시키는 장점이 있다고 강조하였다. 따라서 *L. acidophilus*균의 높은 β-glucosidase 활성을 이용한다면 대두 발효식품 제조 시 제품의 기능성 향상과 제품의 안정성 확보에 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 5. Isoflavone aglycone contents of *Chaga Cheonggukjang* added with *L. acidophilus* KCTC 3925

Samples ¹⁾	(ppm)			
	Amount of isoflavone aglycone			
	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum
Control	323.22±11.04 ^{2(a3)}	64.04±1.93 ^b	279.57±9.65 ^c	666.84±22.59 ^e
NS	349.62±2.70 ^b	68.02±0.98 ^b	315.72±3.55 ^b	733.36±6.57 ^b
YS	407.19±14.88 ^a	74.79±2.77 ^a	369.49±12.79 ^a	851.48±30.38 ^a

¹⁾Control, fermented without sterilization process and a starter; NS, fermented without sterilization process but with a starter (*L. acidophilus* KCTC 3925); YS, fermented with *L. acidophilus* KCTC 3925 after sterilization process (at 100°C for 15 min).

²⁾All values are mean±SD (n=3).

^{3a-c)}Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

요 약

차가버섯 청국장(control), 멸균된 청국장엔 *L. acidophilus* KCTC 3925균을 접종하여 발효시킨 청국장(NS)과 *L. acidophilus* KCTC 3925를 접종하기 전 유산균주의 활성을 높이기 위해 멸균하여 잡균을 제거한 청국장(YS)의 품질 특성과 이소플라본의 변화를 비교하였다. 수분함량은 control군이 51.44%, NS군이 49.79%, YS군이 49.83%였으며, 조회분은 control 군이 4.57%, NS군이 4.72%, YS군이 4.54%로 나타났고, 수분함량은 control군이, 조회분은 NS군이 유의적으로 높았으며, pH는 control군이 높았다.

조단백은 control군이 44.37%, NS군이 43.21%, YS군이 43.82%로 나타나서 군들 간 유의적인 차이가 없었고, 조지방은 control군이 13.65%, NS군이 12.60%, YS군이 11.58%로 control군이 유의적으로 높았다. 탄수화물은 control군이 37.41%, NS군이 39.47%, YS군이 40.07%로 YS군이 가장 높았고 식이섬유는 control군이 33.82%, NS군이 31.92%, YS군이 32.63%로 유의적인 차이가 없었다. 무기질 함량은 칼슘은 control군이 275.16 mg%, NS군이 326.09 mg%, YS군이 253.69 mg%로 NS군이 높았고, 인은 control군이 691.20 mg%, NS군이 676.44 mg%, YS군이 619.37 mg%로 나타나서 control군이 높았다. 칼륨은 각각 1,792.86 mg%, 1,824.39 mg%, 1,813.09 mg%로 유의적인 차이가 없었으며, 나트륨은 각각 5.43 mg%, 9.64 mg%, 7.75 mg%로 NS군이 유의적으로 높았고, 철은 각각 110.59 mg%, 98.98 mg%, 92.59 mg%로 control군이 높게 나타났다. 카드뮴은 세 가지 청국장 모두 허용수치인 0.02 mg%를 초과하지 않았다. 유리아미노산 함량은 NS군과 YS군이 각각 2,520.92 mg%, 2,421.94 mg%로 control군에 비해 높게 나타났다. 아미노테 질소는 control군이 920.27 mg%, NS군이 884.80 mg%, YS군이 837.20 mg%로 나타나서 control군이 가장 높았으며 암모니아태 질소는 control군이 137.09 mg%, NS군이 145.31 mg%, YS군이 169.36 mg%로 YS군이 가장 높았다. 이소플라본 비배당체 총 함량은 control군이 666.84 µg/g, NS군이 733.36 µg/g, YS군이 851.48 µg/g으로 YS군이 유의적으로 가장 높았다. 따라서 본 연구를 통해 *L. acidophilus* KCTC 3925군을 첨가한 차가버섯 청국장은 다른 청국장들에 비해 품질특성면에서 별 차이가 없었으며, *L. acidophilus* KCTC 3925를 종균으로 이용한 2차 발효시 청국장 제품에서 이소플라본 비배당체 함량을 증가시켜 품질적인 면이나 기능적인 측면에서 우수한 청국장 제조가 가능하였다.

감사의 글

본 논문은 중소벤처기업부에서 지원하는 2016년도 산학협력기술개발사업(No. C0442776)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

- Hong JY, Kim EJ, Shin SR, Kim TW, Lee IJ, Yoon KY (2008) Physicochemical properties of *Cheonggukjang* containing Korean red ginseng and *Rubus coreanum*. Korean J Food Preserv, 6, 872-877
- Jung YK, Lee YK, No HK, Kim SD (2006) Effect of chitosan on quality characteristics of *Chunggukjang*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 35, 476-481
- Kim SH, Yang JL, Song YS (1999) Physiological functions of *Chonggukjang*. Food Ind Nutr, 4, 40-46
- Lee JO, Ha SD, Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Park SH (2005) Industrial application and physiological functions of *Chonggukjang*. Food Science and Industry, 38, 69-78
- Kim HJ, Lee SG, Ji YJ, Hwangbo MH, Lee EJ, Lee SP, Lee IS (2008) Quality characteristics of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUC1. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 1479-1484
- Kiyosawa I, Matsuyama J, Arai C, Setoguchi T (1995) Suppressive effects of the methanol extracts from soybean products on SOS response of *Salmonella typhimurium* induced by mutagens and their contents of isoflavones. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 42, 835-842
- Donkor ON, Shah NP (2008) Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soy-milk. J Food Sci, 73, M15-M20
- Kim IB, Shin S, Lim BL, Seong GS, Lee YE (2010) Bioconversion of soybean isoflavone by *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum*. Korean J Food Cookery Sci, 26, 214-219
- Kim JS, Lee JH, Surh JH, Kang SA, Jang KH (2016) Aglycone isoflavones and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus acidophilus* in fermented soybean paste. Nutr Food Sci, 21, 177-123
- Kim JH, Park LY, Lee SH (2012) Fermentation and quality characteristics of *Cheonggukjang* with Chinese cabbage. Korean J Food Preserv, 19, 659-664
- Jung YK, Lee YK, No HK, Kim SD (2006) Effect of sea tangle on fermentation and quality characteristics of *Cheonggukjang*. Korean J Food Preserv, 13, 95-101
- Hwang SH, Chung HS, Kim SD, Youn KS (2004) Effect of *Glycyrrhiza uralensis* extract addition on the quality of *Cheonggukjang*. J East Asian Soc Diet Life, 14, 571-575
- Park HY, Cho EJ (2008) Radical scavenging effects and physicochemical properties of *Seolitaе chunggukjang* added with green tea. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 401-404
- Lee SH, Park SH, Lee KH, Park SJ, Kim YH (2011) Effect of *Inonotus obliquus* extract on the expression MMPs and HAS-2. J Soc Cosmet Sci Korea, 37, 237-245
- Park KM (2008) Industrialization of mushroom functional substances. J Mushroom Sci Prod, 6, 1-12
- AOAC (1996) Official methods of analysis. 15th ed,

- Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA, p 210-219
17. Koh EM, Jang KH, Surh JH (2014) Improvement of physicochemical properties of cereal based ready-to-eat *Sunsik* using fermentation with *Bionuruk* and *Bifidobacterium longum*. Food Sci Biotechnol, 23, 1977-1985
 18. Choi HS, Joo SJ, Yoon HS, Kim KS, Song IG, Min KB (2007) Quality characteristics of *Hwangki* (*Astragalus membranaceus*) *cheonggukjang* during fermentation. Korean J Food Preserv, 14, 356-363
 19. Hwang HA, Lee NK, Cho IJ, Hahm YT, Kwon KO, Kim BY (2008) Selection of microorganism and optimization of manufacture process for *Cheonggukjang*. Korean J Food Sci Technol, 40, 406-411
 20. Kim JW, Kim YS, Jeong PH, Kim HE, Shin DH (2006) Physicochemical characteristics of traditional fermented soybean products manufactured in folk villages of Sunchang region. J Food Hyg Saf, 21, 223-230
 21. Park NY, Seong JH, Choi MS, Moon KD, Kwon JH, Jeong YJ (2008) Comparison of functional properties of *Cheonggukjang* by using red ginseng. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 261-268
 22. Food composition table (2017) National standard food composition table. 9th ed, Rural Development Administration, Jeonju, Korea, p 428-429
 23. Kang SJ, Kim SS, Chung HY (2014) Comparison of physicochemical characteristics and consumer perception of *Cheonggukjang*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 43, 1104-1111
 24. Lee SD, Lee YK, Kim MS, Park SK, Kim YS, Chae YZ (2012) The content and risk assessment of heavy metals in herbal pills. J Food Hyg Saf, 27, 375-387
 25. Yoo SM, Choe JS, Park HJ, Hong SP, Chang CM, Kim JS (1998) Physicochemical properties of traditional *Chonggugjang* produced in different regions. Appl Biol Chem, 41, 377-383
 26. Beak LM, Kang KM, Park LY, Lee SH (2012) Fermentation and quality characteristics of *Cheongkookjang* prepared with germinated soybean. Korean J Food Preserv, 19, 547-553
 27. Lee HJ, Cho SA, Shin JG, Kim JS, Jeong YJ, Moon KD, Kwon JH (2007) Quality and functional components of commercial *Chungkukjang* powders. J Korean Soc Food Sci Nutr, 36, 65-71
 28. Lee GY, Kim SI, Jung MG, Seong JH, Lee YG, Kim HS, Chung HS, Lee BW, Kim DS (2014) Characteristics of *Chungkookjang* that enhance the flavor and GABA content in a mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383. J Life Sci, 24, 1102-1109
 29. Ju KE, Oh NS (2009) Effect of the mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on the quality of *Cheonggukjang*. Korean J Food Sci Technol, 41, 399-404
 30. Lee SY, Seo BY, Eom JS, Choi HS (2017) Quality characteristics of fermented soybean products produced by lactic acid bacteria isolated from traditional soybean paste. Korean J Food Preserv, 24, 187-195
 31. 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, 560-568
 32. Lee KH, Choi HS, Hwang KA, Song J (2015) Changes in isoflavone content and quality characteristics of *Cheonggukjang* prepared by some different strains. J Korean Soc Int Agric, 27, 481-488
 33. Eom SM, Jung BY, Oh HI (2009) Changes in chemical components of *Cheonggukjang* prepared with germinated soybeans during fermentation. J Appl Biol Chem, 52, 133-141
 34. Ko HM, Choi SJ, Choi WS, Lee NH, Choi UK (2014) Quality characteristics of *Cheonggukjang* made with the smoked soybeans. J Korean Soc Food Sci Nutr, 27, 274-279
 35. Yang SO, Chang PS, Baek BK, Hong SD, Lee JH (2007) Changes of isoflavone distribution in soybean using almond powder. Korean J Food Sci Technol, 39, 231-236