ISSN(Print) : 1738-7248, ISSN(Online) : 2287-7428
Korean J Food Preserv
21(1), 121-128 (2014)
http://dx.doi.org/10.11002/kjfp.2014.21.1.121

사단법인 한국식품저장유통학회
The Korean Society of Food Preservation

Changes in isoflavone content and quality characteristics of *Cheonggukjang* prepared with *Bacillus subtilis* HJ18-3 and KACC 15935

Kyung ha Lee, Hye Sun Choi, Yoon Hee Choi, Shin Young Park, Jin Song*
Fermentated Food Science Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

Bacillus subtilis HJ18-3과 *KACC* 15935를 이용하여 제조한 청국장의 품질특성과 isoflavone 함량의 변화

이경하 · 최혜선 · 최윤희 · 박신영 · 송진*
농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과

Abstract

This study was conducted in order to investigate the change of isoflavone composition (glycoside and bio-active aglycone), and to evaluate the quality characteristics of *Cheonggukjang*, which was prepared by different *bacillus* strains. After the 48-hour fermentation, the contents of daidzein, genistein, and glycitein in the *Bacillus subtilis* HJ18-3 have significantly increased up to approximately 89.06±3.59, 10.36±0.28, and 101.37±3.67 ug/g, respectively. The contents of daidzein, genistein, and glycitein in the *Bacillus subtilis* KACC 15935 were 38.88±5.39, 12.58±2.14, and 80.13±0.71 ug/g, respectively. The original content of daidzein was 3.96 ug/g, while genistein and glycitein were not measured. However, the contents of daidzen and genistein in HJ18-3 and in KACC 15935 were decreased. The α-Amylase and cellulase activities of *Chungkookjang* in HJ18-3 were higher than in the KACC 15935. The contents of *Chungkookjang* in HJ18-3 were 29.70±11.66 and 4861.3±388.07 unit/g, respectively. The amino type nitrogen contents and ammonia type nitrogen contents of *Chungkookjang* in KACC 15935 were higher than in the HJ18-3. These results suggested that it could be used to increase the bioactivity via fermentation with the *Bacillus subtilis* possessing a β-glucosidase activity with a view towards the development of functional foods.

Key words : soybean, *Cheonggukjang*, isoflavone, protease

서 론

대두는 분리단백질 제품, 대두유의 제조 원료로 사용되는 외에 우리나라에서는 간장, 두부, 된장, 청국장 등이 있으며 콩나물, 콩자반 등으로 널리 이용되어온 매우 유용한 작물이다.

대두에는 단백질함량이 34~42%, linoleic acid, oleic acid, linolenic acid, arachidonic acid 등의 지방함량이 19~22%, 자당 등의 당류형태의 탄수화물 20%을 비롯한 여러 영양소가 저장되어있는 있다. 또한 4~5%의 섬유소, lecithin, cephalin 등의 인지질이 약 1.5%, sterol, 카로틴, 클로로필, 토코페롤 등의 비검화 물질을 약 1% 함유하며, K, P, Ca 등의 무기질과 비타민 B_1을 비롯한 비타민류가 함유되어 있다.

이외에도 isoflavone류, soyasaponin등의 기능성 물질을 함유하는데 특히 isoflavone류는 콩의 이소플라본은 C6-C3-C6를 기본으로 하는 폐놀계 화합물로 여성 호르몬인 estrogen과 유사한 구조를 가지며(1-3), 여성호르몬 유사작용을 가지기 때문에 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)이라 부른다. 이는 혈중 콜레스테롤을 낮추고 심혈관질환, 골다공증을 예방할 뿐만 아니라 폐경기 이후의 각종 증후군을 완화하고, 유방암, 전립선암, 난소암, 대장암등의 예방효과를 보이는 등 이소플라본의 생리적 활성이 활발하게 보고되고 있다(4). 이소플라본은 식품 중에서 배당체 형태로 존재

*Corresponding author. E-mail : songjin@korea kr
Phone : 031-299-0570, Fax : 031-299-0554

하므로 체내에 흡수되기 위해서는 장내균총에 의해 대사된 후 체내에 흡수되지만, 체내 흡수율이 매우 낮아 이를 보완하기 위해 배당체 형태의 이소플라본을 비배당체형태로 전환하는 생물전환(bioconversion) 공정 기술 및 가공기술이 절실히 필요한 상태이다(5). 또한 배당체 형태의 이소플라본은 용해도가 비배당체에 비하여 높으나 이소플라본은 nonionic passive diffusion 기작에 의하여 흡수되므로 비배당체 형태가 이러한 흡수 메커니즘에 유리하다고 보고되었다(6). 배당체는 발효, 산가수분해, 발아, 열처리 등에 의해 aglycone으로 일부 전환된다(7-10). 또한 대두에는 β-glucosidase가 함유되어 있어 대부분의 대두 가공식품제조 중 행해지는 침지과정에서 이 효소에 의해 genistin이나 daidzin이 가수분해 되어 당이 제거된 aglycone의 함량이 증가한다고 보고되어 있다(11).

청국장은 볏짚 유래의 고초균인 *Bacillus subtilis*를 이용하여 40~42℃에서 2~3일간 발효 숙성한 한국의 전통발효식품으로 단백질, 필수아미노산 및 지방산, 비타민 B_1, B_2, 나이아신, 판토텐산 등이 풍부한 식물성 고영양 식품이다(12). 또한 발효과정 중에 효소의 작용으로 섬유소 및 세포내의 당질, 단백질이 분해되어 소화율의 향상과 변비개선 효과가 있고 콜레스테롤 저하, 고혈압방지효과, 항산화효과, 항균효과, 항암효과와 혈전용해 활성 등 기능성에 관련된 연구가 많이 발표되었다(13-15). 그러나 아직 청국장의 생리활성 기능을 나타내는 isoflavone aglycone함량을 늘이는데 관련된 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 체내 이용률이 높은 이소플라본 비배당체를 많이 생성할 수 있는 우수한 균을 이용하여 청국장을 제조하고 품질특성을 확인하고자 이소플라본 비배당체 함량을 늘릴 수 있는 β-glucosidase 활성을 지니는 *B. subtilis* HJ18-3를 starter로 사용하여 청국장을 제조하고 품질특성과 이소플라본 함량을 규명하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에서 사용된 대원콩은 재배농가에서 구입하여 사용하였다. 스타터로 사용된 *Bacillus subtilis* HJ18-3은 선행연구를 통해 메밀속성장으로부터 분리된 균으로 amylase, protease, cellulase등의 세포의 효소분비능이 우수한 균이며(16), 기타 전통장류에서 분리된 농업유전자원센타에서 분양받은 *B. subtilis* KACC 15935을 starter로 사용하였다.

제 조

장류콩인 대원콩은 세척 후 실온에서 침지(25℃, 24 hr)하고 autoclave를 이용하여 증자(121℃, 30 min)하였다. 콩이 40℃이하로 냉각되었을 때 각 분리균주의 배양액을 접종하여 37℃에서 48 hr 발효하였다.

실험은 배양액을 첨가하지 않은 control과 *B. subtilis* HJ18-3, *B. subtilis* KACC15935를 첨가한 treat군으로 나누어 진행하였다. 각균주를 10^6 CFU/mL 이상의 농도가 되도록 배양하여 시료량의 1%(w/w)가 되도록 첨가 하였다.

추출물 제조

청국장 시료 20 g에 80 mL의 증류수를 첨가하고 균질화한 후 이를 원심분리 (8,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 분석 시료로 사용하였다.

α-Amylase 활성 측정

α-Amylase 활성 측정은 DUN(Dextrinogenic Unit of Nagase)법(17)에 의하여 측정하였다. 1% 전분 기질액(pH 7.0) 3 mL에 시료추출액 1 mL를 넣고 반응(40℃, 10 min)시킨 후 반응액 1 mL에 0.1 M HCl 10 mL를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액 1 mL에 0.005% I_2-0.05% KI 용액 10 mL를 넣어 발색시킨 후 660 nm에 서 흡광도를 측정하였다. 위와 같은 방법으로 측정하여 다음 식에 의해 효소활성을 계산하였다.

D.U.N=[(D-D')/D]×10/100×n
D : Absorbance of control
D': Absorbance of sample
n : Dilution ratio of sample

Protease 활성 측정

Protease 활성 측정은 식품공전(18)에 따라 측정하였다. 0.2 M phosphate buffer에 0.6% casein을 용해한 후 pH를 7.0으로 보정하여 기질용액을 제조하였다. 이 기질용액 1.5 mL에 시료추출액 0.5 mL를 넣어 반응(37℃, 10 min) 시킨 후, 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 2 mL을 가하여 반응을 정지시켰다. 25분간 37℃ water bath에서 방치시킨 후 여과(Whatman No. 2)하였다. 여액 1 mL에 0.55 M Na_2CO_3 용액 5 mL를 첨가한 후, folin 시약 1 mL를 첨가하여 발색(37℃, 20 min)시켜서 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 후 분해물의 tyrosine 양은 tyrosine 표준곡선으로부터 계산하였으며, 효소 활성은 시료 1 g 에 의해 1분간 tyrosine 1 ug을 생성하는 능력을 1 unit으로 하였다.

Cellulase 활성 측정

Cellulase 활성 측정은 carboxymetyl cellulose sodium salt(CMC)를 기질로 하여 효소와 반응 시킨 후, 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid acid(DNS)방법으로 다음과 같이 측정하였다. 1% CMC(pH 7.0) 용액 0.5 mL와 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.25 mL를 넣은 후, 효소액 0.25 mL 을 첨가하여, 50℃에서 15분간 반응시킨 후,

3,5-dinitrosalicylic acid acid(DNS)를 3 mL 가하여 반응을 정지시킨 후, 5분간 끓는 물에 중탕시켜 발색시킨 다음, 위와 같은 방법으로 측정하였다. 대조구는 반응정지를 먼저 시킨 다음, 위와 같은 방법으로 측정하였다. 효소활성을 시료 1 g 의해 1분간 1 ug을 glucose을 생성하는 효소의 양을 1 unit으로 정의 하였다.

환원당 측정

환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(19)에 의하여 측정하였다. 시료 추출액 1 mL에 DNS 3 mL를 혼합한 후 5분 동안 중탕가열하고 냉각한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하며 glucose standard curve를 통해 환원당 값을 구하였다.

Reducing sugar(%)=A×D×1/S×100/1000
A : Reducing sugar content in sample solution(mg)
D : Dilution ratio
S : Mass of sample(g)

아미노태($NO3^-$-N) 질소 함량 측정

시료추출액 5 mL, 중성 formalin 용액 10 mL, 증류수 10 mL를 넣은 플라스크에 0.5% phenolphthalein 용액 2-3방울을 가한 후, 0.1 N NaOH로 미홍색이 될 때까지의 적정양과 시료 5 mL, 증류수 20 mL을 넣은 플라스크에 0.5% phenolphthalein 용액을 2~3방울을 가한 후, 0.1 N NaOH로 미홍색이 될 때까지 적정양을 이용하여 아미노태 질소 함량을 산출하였다(20).

Amino type nitrogen(%)=(V1－V0)×F×0.0014×D×100/S
V1 : Titration value of sample(mL)
V0 : Titration value of blank treat(mL)
F : Facter of 0.1 N NaOH
D : Dilution ratio
S : Mass of sample(g)
0.0014 : Nitrogen weight in 1 mL of 0.1N NaOH(g)

암모니아태(NH_4^+-N) 질소함량 측정

아미노태 질소함량 측정 때와 동일한 시료액 0.1 mL 취한 후 phenol-hypochloride 반응에 의하여 시료 추출액 0.1 mL에 A용액(phenol 10 g과 sodium nitroprusside dihydrate 0.05 g/distilled water 1 L)과 B용액($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9 g, NaOH 6 g과 NaOCl 10 mL/distilled water 1 L)을 각각 2 mL씩 넣고 37℃에서 20분간 반응시켜 630 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준곡선은 $(NH_4)_2SO_4$ 를 사용하여 암모니아태 질소함량을 측정하였다(21).

호기적 균 및 혐기적 균 측정

청국장 시료를 10배 단계 희석한 후, 호기적 균수는 plate count agar(Difco™, Laboratories, Detroit, MI, USA)에 호기 조건에서 37℃, 24시간 동안 배양하였으며, 혐기성 총균수는 MRS agar(Difco Laboratories)를 이용하여 혐기 조건에서 37℃, 48시간 동안 배양하여 계수하였다.

Isoflavone 분석

청국장은 동결건조 시킨 후 곱게 분쇄하여 40 mesh sieve를 통과시켜 사용 하였다. 이소플라본 분석을 Wang의 방법을 사용하였다(22). 즉, 동결건조 분말 2 g에 acetonitrile 24 mL 과 1 mol HCl 6 mL로 실온에서 1시간 추출하였으며 filtration(Whatman No. 2) 시켜 3차 증류수로 2배 희석 하여 0.2 μM membrane filter로 filtration시켜 UPLC(Waters, MA, USA)로 분석하였다. UPLC는 Waters Acquity system을 사용하였으며, column은 Acquity UPLCⓇHSS C18 1.8 um×2.1×75 mm column, 이동상은 0.1% acetic acid를 함유한 10% MeOH(용매A)와 0.1% acetic acid를 함유한 MeOH(용매B)을 사용하였다. 용매 gradient는 용매 B의 농도를 17분간 26%에서 50%로 증가시켰고, 유속은 0.3 mL/min, injection volume은 0.8 μL, UV detector파장은 254 nm로 분석하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 자료 처리는 SPSS program (12.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용하여 실시하였으며, 각 항목에 대한 평균(mean) 및 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. 각 청국장간 차이는 $p<0.05$ 수준에서 one-way ANOVA를 실시하였으며, Duncan's multiple range test로 그 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

α-amylase

전분을 분해하는 효소인 α-amylase 활성은 Table 1과 같다. Control과 *B. subtilis* HJ18-3 접종 청국장의 활성은 각각 29.40±8.73, 29.70±11.66 unit/g 으로 *B. subtilis* KACC15935 접종 청국장의 활성 11.45±0.27 unit/g 보다 높은 결과를 나타내었다.

Oh등(23)은 *B. natto*및 *Aspergillus oryzae* 와 *B. natto* 혼합 균주를 접종한 발아콩 청국장의 α-amylase 활성은 10.51~12.75 unit이라고 보고 하였는데 본 실험에서는 이 보다 높은 결과를 나타내었다. Amylase 활성은 pH는 온도의 영향을 받는데 Jana와 Pati(24)의 보고에 의하면 α-amylase 활성의 최적 pH가 6.0 정도였고 숙성기간이 경과되면서 pH나 염 등의 농도에 의해 효소의 활성도가 저해되었다고 보고하였다. 또한 일반적으로 된장의 경우 α-amylase 활성은 담금 초기에 높았다가 발효가 진행되면서 서서히 낮아진

다고 보고되었으며, 이는 원료에 함유되어 있던 탄수화물이 α-amylase의 기질이 되어 효소 활성이 높았다가 전분질 기질이 고갈되어감에 따라 점차 활성이 낮아지는 것으로 보았다(25). 따라서 본 연구에 사용된 청국장의 경우 그 값이 균에 따른 차이를 나타내는 것은 균의 특성의 차 뿐 아니라 발효시간이 경과함에 따라 알칼리화 되어 α-amylase 활성을 감소시키는 원인이 된 것으로 사료된다.

Table 1. Degree of enzyme actities of *Cheonggukjang* which prepared by different *Bacillus* strains

Sample	α-amylase (U/g)	cellulase (U/g)	protease (U/g)
Control	29.40±8.73	4471.07±615.07	320.56±39.44
KACC15935	11.45±0.27	3923.61±376.73	379.17±40.31
HJ18-3	29.70±11.66	4861.30±388.07	356.80±193.27

[1)]Control : Naturally fermented *Cheonggukjang*
[2)]KACC 15935 : *Cheonggukjang* fermented with B.subtilis KACC15935
[3)]HJ18-3 : *Cheonggukjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-3

Protease

발효 균주를 달리하여 제조한 청국장의 protease 효소활성은 Table 1 에 나타내었다. 대두 단백질을 가수분해하여 구수한 맛 성분인 아미노산, polypeptide 등을 생성하는 protease는 청국장 제조 시 맛을 결정짓는 중요한 인자이다. 균주의 종류에 따라 protease의 활성은 차이를 나타내었다. 청국장 발효기간 동안 *B. subtilis* KACC15935 379.17±40.31 unit/g으로 control과 *B. subtilis* HJ18-3 접종 청국장의 활성 320.56±39.44, 356.80±193.27 unit/g 보다 비교적 높은 활성을 나타내었다.

Youn등(26)은 청국장의 protease활성은 발효 5~10시간 이후부터 증가하기 시작하여 35~40시간 이후에는 거의 최대 활성에 도달 하였으나 각 시험구의 protease활성은 starter에 따라 상당한 차이를 나타낸다고 하였다. 또한 Lee 등(16)도 *Bacillus*속 균을 이용한 청국장의 단백질분해효소 활성은 재래 청국장에서 분리한 균주를 이용하여 제조한 청국장의 protease활성은 균주에 따라 다르다고 하였다.

Cellulase

발효 균주를 달리하여 제조한 청국장의 cellulase 효소활성은 Table 1과 같다. Cellulase중 특히 CMCase(carboxymethyl cellulase, Endo β-1,4-glucanase)는 exo-β-1,4-glucanase)는 exo-β-glucanase, β-glucanase와 함께 cellulase계 구성효소로서 식물세포벽 구성성분 중 대부분 차지하고 있는 cellulose을 분해할 수 있는 능력을 가지고 있어 장내 이용성 증진을 위해 널리 사용되는 효소이다. Ra등은(27-29) 전통장류인 된장이나 간장은 발효과정에서 미생물의 다 양한 효소(amylase, protease, cellulase 및 lipase)에 의해 콩에 함유된 단백질, 올리고다당류, 이소플라본, 지질 등이 소화되기 쉬운 형태의 아미노산, 유리당, 이소플라본 아글리콘, 지방산 등으로 분해되어 항산화 및 혈전용해 기능을 갖는 2차산물이 생성된다고 하였다. 그러나 아직 전통장류인 청국장에서 cellulase 활성에 대한 연구는 미비한 시점이다. 따라서 본 실험의 결과가 청국장 뿐 아니라, 이들 균이 전통장류의 starter로 사용되는 데 있어 참고자료가 될 수 있을 것으로 사료된다. 본 실험에서는 Table 1의 결과와 같이 control과 *B. subtilis* HJ18-3이 각각 4471.07±615.07, 4861.30±388.07 unit/g 으로 *B. subtilis* KACC15935 3923.61±376.73 unit/g 보다 높은 결과를 나타내었다.

Table 2. Degree of of amino type nitrogen, ammonia type nitrogen and reducing sugar of *Cheonggukjang* which prepared by different *Bacillus* strains

Sample	Amino type nitrogen (mg%)	Ammonia type nitrogen (mg%)	Reducing sugar contents (%)
Control	88.20±13.86	95.09±34.33	1.95±0.72
KACC15935	129.62±1.15	137.56±10.10	2.62±1.17
HJ18-3	118.40±48.65	102.93±63.37	2.59±0.76

[1)]Control : Naturally fermented *Cheonggukjang*
[2)]KACC 15935 : *Cheonggukjang* fermented with *B. subtilis* KACC15935
[3)]HJ18-3 : *Cheonggukjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-3

아미노태 질소

일반적으로 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(30). 아미노태 질소 함량은 protease 활성과 유사한 경향을 나타내는데 본 연구에서도 유사한 경향을 확인할 수 있었다.

본 실험에서는 control과 *B. subtilis* HJ18-3, *B. subtilis* KACC15935의 아미노태 질소 함량은 각각 88.20±13.86, 129.62±1.15, 118.40±48.65 mg%로 나타났으며 control구에 비해 처리구에서 조금 높게 나타났다.

Zheng등(31)과 Youn(32)등이 제조한 청국장의 아미노태 질소 함량이 각각 112~224 mg%, 264~422 mg%라고 보고하였는데, 본 연구의 결과는 이러한 결과에 다소 미치지 못하는 것으로 나타났다. Eom 등(33)은 볏짚을 이용하여 비발아대두와 발아대두로 제조한 청국장의 아미노태질소 함량이 발효 36시간까지 증가하다가 이후 약간 감소하는 경향이었으며 Youn 등(32)은 사용한 균주에 따라 그 함량이 다르다고 하였다. 따라서 모든 시료에서 전체적으로 아미노태 함량이 낮은 것은 발효시간이나 온도와 같은 환경과 사용한 균주에 의한 영향인 것으로 사료된다.

암모니아태 질소

본 실험의 암모니아태 질소함량은 control과 *B. subtilis* KACC15935, *B. subtilis* HJ18-3의 아미노태 질소 함량은

각각 95.09±34.33, 137.56±10.10, 102.93±63.37 mg%로 나타났다. 여러 선행 연구에서 암모니아태 질소 함량의 변화는 아미노태 함량의 변화와 유사하다고 보고된 바 있다. 본 연구에서도 이와 유사한 경향을 나타내었다. 이는 Hwang등(34)의 보고에서 발효 기간 중 주로 미생물이 분비하는 protease가 원료대두의 단백질에 작용하여 수용성 질소형태로 가수분해 되고 이어서 peptide를 거쳐 아미노태 질소형태로 가수분해 하여 청국장의 구수한 맛이 생성됨과 동시에 발효가 계속 진행되면서 암모니아태 질소를 형성시킨다고 하였다. 암모니아태 질소는 단백질 분해과정에서 deamination에 의하여 생성되며 식품 내에 과량으로 축척되면 부패취로 작용하므로 일반적으로 장류 제품의 변패 또는 이상발효의 지표로 사용된다. 암모니아태 질소의 과잉 생산은 청국장 냄새에 영향을 미쳐 소비기피를 유발하는 중요한 물질로 알려져있다. 암모니아태 질소를 감소시키그 위해 Ju등(35)은 *B. subtilis*와 *Lactobacillus plantarum*를 혼합배양 해여 청국장의 불쾌취를 감소시켰다고 보고 하였다.

환원당 함량

Glucose, fructose, maltose 등의 환원당류들은 단맛을 부여하는 물질로 식품의 관능적인 품질 평가면에서 대단히 중요하며 이러한 환원당류들은 미생물의 대사에 따른 효소력 변화와 밀접한 관계가 있어 미생물이 glucose 대사에 이용하는 정도에 따라 환원당 변화가 생긴다(30).

Kim등(17)은 전통장류 제조업체에서 수집한 제품 18점의 환원당을 분석한 결과 0.51~0.24%의 범위를 나타내며, Baec등(36)은 1.09~1.32%의 범위를 나타낸다고 하였는데, 본 실험에서는 이 보다 다소 높게 측정되었다. Baec 등(36)은 발효 24시간까지 기점으로 환원당이 감소하는 경향이 나타난다고 하였는데 이는 24시간 까지 저분자의 환원당으로 많이 생성되었다가 24시간 이후부터는 발효미생물의 증식에 필요한 영양원과 화학적 반응 등에 이용되었기 때문인 것이라고 하였다. 본 연구에서 발효시간은 48시간으로 발효시간을 24시간으로 하였을 때 더 높은 환원당 값을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

미생물 수의 변화

37℃에서 48시간 동안 발효시킨 청국장의 호기적 총균수는 Fig. 1에 나타내었다. Control과 *B. subtilis* KACC15935, *B. subtilis* HJ18-3의 호기적 총균수는 8.45±0.50, 8.66±0.50, 8.25 ±0.05 log CFU/mL 로 나타났다. 청국장 제조에 첨가한 *B. subtilis* HJ18-3은 메밀 속성장에서 분리한 균주로 *B. cereus*와 *Candida albicans*에 대해 항균력이 우수하다고 보고되었다(37). 발효가 진행 후 control과 *B. subtilis* KACC15935균에 비해 적은 값을 나타낸 것은 이러한 *B. subtilis* HJ18-3의 뛰어난 항균성에 의한 것으로 생각된다. 또한 청국장의 혐기적 총균수는 8.30±0.06, 7.98±0.10, 7.98±0.14 log CFU/mL로 나타났으며 총균수와 비교해 볼 때 0.15~0.68 log CFU/mL이 적은 수로 거의 대부분의 혐기성 균은 유산균으로 예상되며, 호기적 총균수와 비슷한 수준으로 많이 분포함을 알 수 있었다.

Baec 등(36) 총균수의 발효 24시간 이후 각 처리구의 총균수는 109 CFU/mL 이상을 나타낸다고 하였으며, Youn 등(32)은 *B. natto*와 *B. licheniformis*를 이용하여 청국장을 제조하였을 때 청국장발효 40시간 이후 총균수 10^9 CFU/mL이었다는 보고하였으나 본 실험은 결과와는 조금 차이가 있었다.

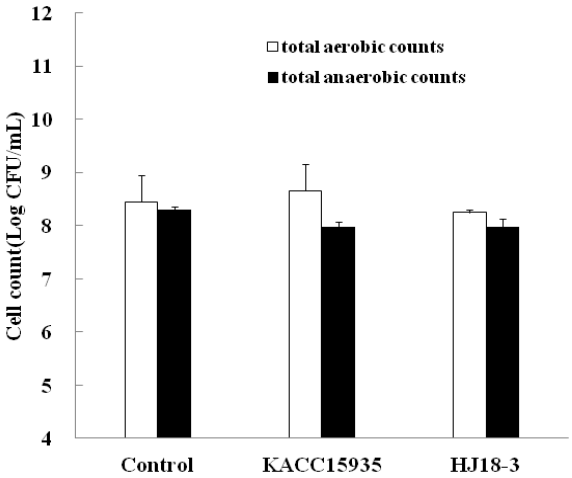

Fig. 1. Change of microbe counts of *Cheonggukjang* which prepared by different *Bacillus* strains.

[1]Control : Naturally fermented *Cheonggukjang*
[2]KACC 15935 : *Cheonggukjang* fermented with *B. subtilis* KACC15935
[3]HJ18-3 : *Cheonggukjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-3

Isoflavone 함량 변화

37℃에서 48시간 동안 발효시킨 청국장의 이소플라본함량은 Table 3에 나타내었다. Control과 *B. subtilis* KACC15935, *B. subtilis* HJ18-3의 isoflavone 비배당체 형태인 daidzein과 genistein, glycitein을 합한 함량은 각각 158.20±6.55, 131.60±4.00, 200.79±7.54 ug/g으로 나타났다. 이는 초기 raw soybean의 aglycone함량이 3.96 ug/g인 것에 비하여 39~50배 전환율을 보인다. 또한 β-glucosidase활성이 있는 *B. subtilis* HJ18-3균을 접종하여 제조한 청국장이 Control과 *B. subtilis* KACC 15935균을 접종하여 제조한 청국장보다 1.27, 1.53배 더 높은($p<0.05$) aglycone 전환율을 보였다.

일반적으로 앞에서 언급한 바와 같이 대두의 isoflavone은 glycosided conjugate(malnonylglycoside, β-glycosides 및 acetylglycosides 형태)의 isoflavone isomer와 aglycone 형태로 존재 하는데 대두의 수침이나 가열 등의 가공처리를 하면 용출된 β-glycosidase의 작용에 의해 aglycone으로 전환되는 것으로 알려져 있다. 따라서 glucoside형태인 daidzin

과 genistin 함량은 열처리, 산가수분해, 발아, 발효 등에 의해 감소되고 aglycone 형태인 daidzein과 genistein 함량은 높아진다고 하였다. 따라서 β-glucosidase 활성이 있는 균주를 첨가하여 발효함으로써 β-glucosidase 활성을 높여주어 aglycone 전환율을 높이는데 기인한 것으로 사료된다. Uzaan 등(37)은 isoflavone은 일상적인 조리 가열처리 조건에서 상대적으로 안정하여 전체함량의 변화는 적은 것으로 알려져 있으나 각각의 화학구조는 가열 조건에 따라 inter-conversion을 통해 변화한다고 하였으며, Coward 등(38)은 온도변화에 의한 isoflavone 함량 변화 시 80℃에서 isoflavone 6″-O-malonyl-β-glucoside와 6″-O-acetyl-β-glucoside 형태가 β-glucoside로 전환되는 intra-conversion을 보고 하였다. 이러한 inter-conversion, intra-conversion의 변화를 통해 12가지 형태의 isoflavone 함량이 변화한 것으로 사료된다.

Yang 등(39)은 대두의 식품 제조공정 중 비배당체 형태를 증가시키기 위해서는 고온에 의한 전환이나 HCl과 같은 산을 이용하는 방법보다는 β-glucosidase효소활성이 높은 천연물질을 활용하는 것이 유리하다고 하였다. 또한 고온이나 강산을 이용한 반응의 경우 반응산물이 무작위적이고 부반응에 의해 효율이 저하될 수 있는 반면, 천연물 유래의 β-glucosidase 효소를 활용하는 경우 반응산물의 선택성을 증가시킬 수 있으며 유해한 유기용매의 사용을 감소시킬 수 있다고 하였다.

Table 3. Isoflavone contents (ug/g dry matter) of *Cheonggukjang* which prepared by different *Bacillus* strains

(ug/g)

Isoflavone	Raw soybean	Control	KACC15935	HJ18-3
daidzin	53.04^{a}	611.48±87.60^{b}	734.02±120.52^{c}	663.95±62.21^{bc}
glycitin	19.50^{a}	246.18±59.90^{c}	170.67±55.90^{b}	269.46±24.38^{c}
genistin	113.49^{a}	1291.32±14.77^{b}	1251.43±73.79^{b}	1220.61±131.06^{b}
M-daidzin	880.16^{a}	47.86± 4.10^{b}	35.37±21.81^{b}	33.67±4.61^{b}
M-glycitin	53.35^{a}	ND^{b}	ND^{b}	ND^{b}
A-daidzin	N.D^{a}	67.02±11.47^{b}	61.46± 4.62^{b}	85.94±5.74^{c}
M-genistin	1141.68^{a}	98.45±13.39^{b}	76.08±42.60^{b}	70.33±28.12^{b}
A-glycitin	N.D^{a}	16.29±1.57^{b}	15.12± 3.10^{b}	10.67±15.10^{b}
daidzein	3.96^{a}	70.42±3.62^{b}	38.88± 5.39^{c}	89.06±3.59^{d}
A-genistin	N.D^{a}	113.27±5.73^{b}	118.25± 7.74^{bc}	122.61±4.98^{c}
glycitein	N.D^{a}	9.38±0.31^{b}	12.58± 2.14^{c}	10.36±0.28^{b}
Genistein	N.D^{a}	78.40±2.62^{b}	80.13± 0.71^{b}	101.37±3.67^{c}
total aglycone	3.96^{a}	158.20±6.55^{c}	131.60±4.00^{b}	200.79±7.54^{d}
total isoflavone	2265.21^{a}	2650.07±157.00^{b}	2594±155.54^{b}	2678.04±238.46^{b}

[1)]Control : Naturally fermented *Cheonggukjang*
[2)]KACC 15935 : *Cheonggukjang* fermented with *B. subtilis* KACC15935
[3)]HJ18-3 : *Cheonggukjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-3
Values with the same letter in a column are not different significantly according to DMR test. $p<0.05$

본 연구에서는 청국장 발효에 사용되는 *Bacillus subtilis*를 접종하는데 있어, β-glucosidase 활성이 있는 별미장으로부터 분리된 균주를 접종하여 청국장을 제조함으로써 isoflavone 비배당체 함량을 유의적으로 증가시키는 결과를 얻었다.

요 약

청국장 제조 시 사용되는 균주인 *Bacillus* sp. HJ18-3과 *B. subtilis* KACC 15935균주를 청국장 제조 시 starter로 접종하여 발효시켜 품질특성과 isoflavone 비배당체 함량을 측정하였다. a-amylase와 cellulase활성은 control과 *B. subtilis* HJ18-3 균주를 접종한 청국장이 *B. subtilis* KACC 15935 균주를 접종한 청국장보다 각각 2.56, 2.59배 그리고 1.13, 1.23배 높은 결과를 보였다. 그러나 protease활성은 *B. subtilis* KACC 15935과 *B. subtilis* HJ18-3의 활성이 높은 효소활성을 보였다. 아미노태질소 함량은 Control, *B. subtilis* KACC 15935, *B. subtilis* HJ18-3의 함량이 각각 88.20±13.86, 129.62±1.15, 118.40±48.65 mg%로 나타났으며 이는 protease 효소활성의 결과와 유사한 경향을 보였다. 환원당 함량은 control, KACC 15935, HJ18-3의 함량이 각각 1.95±0.72, 2.62±1.17, 2.59±0.76%로 전반적으로 control에 비해 처리구가 더 높은 경향을 나타냈다. 호기적 총균수와 미비한 차이로 *B. subtilis* HJ18-3의 균수가 적은 경향을 나타낸 것은 *B. cereus*와 *Candida albicans*에 대해 항균력이 우수하다고 보고된 영향으로 해석된다. control과 *B. subtilis* KACC15935, *B. subtilis* HJ18-3의 isoflavone 비배당체 형태인 daidzein과 genistein, glycitein을 합한 함량은 각각 158.20±6.55, 131.60±4.00, 200.79±7.54 ug/g으로 나타났다. 이는 초기 raw soybean의 aglycone함량이 3.96 ug/g인 것에 비하여 39~50배 전 환율을 보인다. 또한 β-glucosidase활성이 있는 *B. subtilis* HJ18-3균을 접종하여 제조한 청국장이 control과 Kacc15935균을 접종하여 제조한 청국장보다 1.27, 1.53배 더 높은 aglycone 전 환율을 보였다. 따라서 본 연구에서 사용한 메밀 속성 장으로부터 분리된 *B. subtilis* HJ18-3 균주는 amylase, protease, cellulase와 같은 세포의 효소분비능이 우수하며, 아미노태질소와 환원당 함량이 높고, isoflavone 비배당체 함량을 증가시키는 기능을 함유한 균주로 확인되었으며, 앞으로도 우리나라 전통 청국장의 세계화를 위해 유용 starter로 찾는 노력이 더 필요할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술사업(과제번호:PJ009070)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

References

1. Setchell KD, Cassidy A (1999) Dietary isoflavone: biological effects and relevance to human health. J Nutr, 129, 758-767
2. Barnes S (1998) Evolution of the health benefits of soy isoflavones. Proc Soc Exp Biol Med, 217, 386-392
3. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L (1995) Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. J Nutr, 125, 790-797
4. Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M (1984) Non steroidal estrogens of dietary origin: possible role in hormone dependent disease. Am J Clin Nutr, 40, 569-578
5. 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
6. Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements, J Nutr 131. 1362-1375
7. Choi YB, Sohn HS (1998) Isoflavone content in Korea fermented and unfermented soybean foods. Korean J Food Sci Technol, 30, 745-750
8. Yeo KE, Kim WJ (2002) Effects of acid hydrolysis on isoflavone of defatted soybean flour. Korean J Food Sci Technol, 34, 916-918
9. Choi YB, Woo JG, Noh WS (1999) Hydrolysis of β-glyosidic bonds of isoflavone conjugates in the latic acid fermentation of soy milk. Korean J Food Sci Technol, 31, 189-195
10. Matsuura M, Obata A, Fukushima D (1989) Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. J Food Sci, 54, 602-605
11. Choe JS, Kim JS, Yoo SM, Park HJ, Kim TY, Chang CM, Shin SY (1996) Survey on preparation method and consumer response of Chungkukjang. Korean Soybean Digest, 13, 29-43
12. Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK (2000) Production and separation of anti-hypertensive peptide during Cheonggukjang fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. Appl Biol Chem, 43, 247-252.
13. Iwai K, Nakaya N, Kawasaki Y, Matsue H (2002) Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol fed rats. J Agric Food Chem, 50, 3597-3601.
14. Seo HR, Kim JY, Kim JH, Park KY (2009) Identification of *Bacillus cereus* in a chungkukjang that showed high anticancer effects against AGS human gastric adenocarcinoma cells. J Med Food, 12, 1274-1280.
15. Kim SS, Lee JH, Ahn YS, Kim JH, Kang DK (2003) A fibrinolytic enzyme from Bacillus amyloliquefaciens D4-7 isolated from chunggukjang: its characterization and influence of additives on thermostability. Korean J Microbiol Biotechnol, 31, 271-276.
16. Lee SY, Kim JY, Baek SY, Yeo SH, Koo BS, Park HY, Choi HS (2011) Isolation and identification characteristics of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat sokseongjang. Korean J Food Sci Technol, 43, 735-741
17. Yoon KS (1998) Changes of enzymatic activities during the fermentation food soybean-soypaste by Aspergillus spp. MS Thesis, Konkuk University, Seoul, Korea
18. KFDA (2005) Food Code. Korea Food & Drug Administration, Cheongwon, Korea
19. Chae SK, Kang KS, Ma SJ, Bang GW, Oh MH, Oh SH (2000) In Standard Food Analysis. GiguMunhwasa, Seoul, Korea, p 299-301
20. Weatherburn MW (1967) Phenol-hypochorite reaction for determination of ammonia. J Anal Chem, 39, 971-974
21. Uzzan M, Labuza TP (2004) Critical issue in R&D of soy isoflavone enriched foods and dietary supplement, J Food Sci, 69, 77-86
22. Wang G, Kuan SS, Francis OJ, Ware GM, Carman AS (1990) Simplified HPLC method for determination of phytoestrogens in soybean and its processed product, J Agric Food Chem, 38, 185-190
23. Oh HI and Eom SM (2008) Changes in microflora and enzyme activities of cheonggukjang prepared with germinated soybeans during fermentation, Korean J Food sci Technol, 40, 56-62
24. Jana M, Pati B (1997) Thermostable, salt-tolerant α-amylase from *Bacillus* sp. MD-124. J Basic Microbiol, 37: 323-326
25. Kim JH, Yoo JS, Lee CH, Kim SY, Lee SK (2006) Quality properties of soybean pastes made from meju with mold producing protease isolated from traditional meju. J Korean Soc Appl Biol Chem, 49, 7-14
26. Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM and Byun MW (2002) Quality characteristics of the

chungkookjang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 31, 204-210
27. Ra KS, Oh SH, Kim JM and Suh HJ (2004) Isolation of fibrinolytic enzyme and β-glucosidase producing strains from Doenjang and optimum conditions of enzyme production. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 439-442
28. Ryu BH (2003) Development of functional Doenjang for antioxidative and fibrinolytic activity. J Life Sci, 13, 559-568
29. Yoo SK, Cho WH, Kang SM, and Lee SH (1999) Isolation and identification of microorganisms in korean traditional soybean paste and soybean sauce. Kor J Microbiol Biotechnol, 27, 113-117
30. Mann SY, Kim EA, Lee GY, Kim DY (2013) al. Charateristics of chungkookjang produced by Bacillus subtilius MC31. J Life Sci, 23, 560-568
31. Zheng YF, Jeong JK, Choi HS, Park KY (2011) Increased Quality Characteristics and Physiological Effects of Chunggukjang Fermented with *Bacillus subtilis*-SKm. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 1694-1699
32. Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MY (2002) Quality characteristics of the chungkookjang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 31, 204-210
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. Hwang HA, Lee NK, Choi IJ, Hagm YT, Kwon KO, Kim BY (2008). Selected of microorganisms and optimimization of manufacture process for cheonggukjang. Korean J Food Sci Techol, 40, 406-411
35. Ju KE, Oh NS (2009) Effect of the mixer culture *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on ther quality of Cheonggukjang. Korean J Food Sci Techol, 41, 399-404
36. 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
37. Uzzan M and Labuza TP (2004) Critical issues in R&D of soy isoflavone enriched foods and dietary supplements. J Food Sci 69, 77-86.
38. Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S (1998) Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. Am J Clin Natr, 68, 1486-1491
39. Yang SO, Chang PS, Baek BK, Hong SD, Lee JH (2007) Change of Isoflavone distribution in soybeans using almond powder. Korean J Food Sci Technol, 39, 231-236

(접수 2013년 9월 16일 수정 2013년 12월 20일 채택 2014년 1월 3일)