

안 명 수 교수지도

박사학위논문

청국장외 품질개선에 관한 연구

2004

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

장 영 미

청국장외 품질개선에 관한 연구

안 명 수 교수지도

이 논문을 박사논문으로 제출함

2004년 7월

성신여자대학교

식품영양학과

장 영 미

인 준 서

장영미의 박사학위논문으로 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

성신여자대학교 대학원

논문개요

대두는 조직이 치밀하고 단백질의 소화흡수를 저해하는 trypsin inhibitor와 적혈구 응집소인 hemagglutinin 등이 함유되어 있어서 조리·가공하여 각 민족의 기호에 맞는 독특한 대두가공식품으로 식용되어 왔다. 청국장은 콩 자체에 비해 필수아미노산, 비타민 B₁, B₂, 나이아신, 판토텐산 및 각종 효소가 많이 함유되어 있고 소화흡수율도 높으며 변비개선에도 유효하다. 또한, 인체에 유익한 *Bacillus. sp.*가 장내에서 부패균의 활동을 억제하여 이에 의한 발암물질이나 암모니아, 인돌, 아민 등 발암촉진물질의 생성을 감소시키는 동시에 이들 유해물질을 흡착하고 배설시키는 작용을 한다. 그 외에도 여러 가지 질병에 대한 예방과 치료효과가 있는 것으로도 알려져 있다.

청국장은 대두발효식품 중 콩을 수확하는 가을부터 겨울철에 고온에서 단시간에 발효, 숙성시켜 제조할 수 있고, 그 풍미가 독특하고 영양적, 경제적으로도 가장 효과적인 콩의 섭취형태의 하나라고 할 수 있다. 원료인 콩이 가지는 영양성 이외에도 인체의 건강증진을 위한 생리활성물질로 알려진 식이섬유, 인지질, isoflavones, phenolic acids, saponins, phytic acid 등의 성분이 들어있어 혈압상승 억제효과 및 지질대사 개선효과, 혈전용해능, 항돌연변이성 및 항암성, 항균작용 등에 관한 청국장의 기능성이 알려짐에 따라 그 소비량이 점차 증가하는 추세에 있다. 일본에서도 우리나라의 청국장과 유사한 대두발효식품인 낫또(納豆, Natto)에 nattokinase 라는 혈전용해효소가 존재함이 알려지면서 현재 건강식품으로서 판매량이 급증하고 있다.

이러한 측면에서 우리나라의 청국장에도 관심이 증가하고 있으나 대두의 단백질이 아미노산으로 분해될 때 생성되는 암모니아 등의 불쾌취로 인해 소비자들의 입맛을 충족하지 못하여 청국장의 산업화가 저조한 실정이다.

이에 본 연구에서는 전통청국장에서 우수한 발효균을 선발하고, 선발된

Bacillus licheniformis JYM-025 균주를 이용하여 청국장을 제조할 때의 최적발효조건을 탐색하였다. 또한, JYM-025을 이용한 청국장 발효과정 중 현미를 맥아즙으로 당화한 현미를 청국장 발효 중에 첨가하여 불쾌취 저감화 가능성을 탐색하고, 당화현미 청국장의 품질 및 관능적 특성 그리고 암세포 억제효과 등의 생리활성효과를 조사하고자 하였다. 또한, 청국장의 소비촉진을 위하여 이를 이용한 쌈장, 볶음고추장 및 고기소스 등을 제조하고 품질 및 관능검사를 통하여 이용가능성을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 청국장 제조 우수균 분리 및 선발

전통적인 방법으로 벧짚을 사용하여 제조한 청국장에서 17종의 균주를 분리하고 그 중에서 전분 분해력과 단백질 분해력이 우수한 A, B, C, D, E 5개 균주를 선발하여 형태학적 특성을 측정하였다. 그 결과 5개 균주 모두가 간균, 호기성, 포자를 형성하는 그람양성인 *Bacillus* 속들이므로 추정되었다.

이들 A, B, C, D, E 균주를 증자한 콩에 각각 접종하여 50°C, 48시간 동안 발효시켜 제조한 청국장(이하 C_A, C_B, C_C, C_D, C_E 로 약칭함)의 일반성분, 유리아미노산, 휘발성유기산, 향기성분 및 관능검사를 측정한 결과는 다음과 같았다.

점질물 함량은 C_C를 제외한 나머지 모든 구에서 4.72~4.82%로 대조구 7.70%보다 높은 값을 보였으며, 수용성 질소량은 모든 구에서 대조구보다 높은 값을 보였고, 색도는 C_E 청국장이 색소생성능이 우수하여 어두운 색을 나타냈다.

유리아미노산 함량은 C_C 1224.79, C_B 1069.11, C_E 947.49 mg%로 대조구 769.80 mg%보다 높았으며, 총 유리아미노산 함량에 대한 glutamic acid의 비율도 높게 나타나 단백질 분해력도 우수하였으며, 단맛을 내는 Thr, Ser, Gly, Ala, Lys은 335.42mg%, 구수한 맛을 내는 Asp, Glu, Cys는

198.82mg%로 C_C의 아미노산 함량이 가장 높았다. 그러나, 관능검사를 실시한 결과 C_E가 가장 높은 점수를 보였다.

이 E균주를 세균동정기(Vitek)를 이용하여 동정한 결과 *Bacillus licheniformis*로 판명되어 *Bacillus licheniformis* JYM-025(이하 JYM-025로 약칭함)로 명명하였다.

2. *Bacillus licheniformis* JYM-025 청국장 발효의 최적발효조건 결정

1) 최적발효온도

JYM-025 분리균주를 이용하여 실제 청국장 제조시 최적발효온도를 결정하기 위하여 각각 40, 45, 50 및 55℃에서 48시간 동안 발효시켜 제조하고 일반성분, 색도, 유리아미노산, 휘발성 유기산함량 측정 및 관능검사를 실시하였다.

점질물 함량, 수용성질소, TCA 가용성질소 및 유리아미노산 함량은 50℃에서 발효한 것이 가장 높았으며 lactic acid는 온도의 상승과 더불어 감소되어 55℃에서 가장 낮은 반면 glucose의 함량은 그 반대로 나타났다.

색도는 55℃에서 가장 어두운 색을 보였으나 바람직하지 못한 냄새에 기여하는 propionic acid의 함량은 50℃에서 가장 낮았고, 관능검사 결과도 50℃에서 발효한 것이 가장 우수한 것으로 나타나 JYM-025를 이용한 청국장의 최적발효온도를 50℃로 결정하였다.

2) 최적발효기간

JYM-025를 이용하여 실제 청국장 제조시 최적발효기간을 결정하기 위하여 최적온도 50℃에서 24, 36, 48, 60, 72 및 96시간 동안 발효시키면서 최적온도 결정 때와 같은 실험을 하였다.

점질성 물질, 수용성질소, 및 TCA 가용성질소의 함량과 pH는 발효기간 60시간까지는 증가한 반면, glucose의 함량은 감소하는 경향을 보였다. 색도

는 48시간까지는 모두 일정한 값을 유지하나 그 이후 떨어졌다.

또한, 총 아미노산 함량은 발효시간이 24시간에서 60시간 경과시 2배로 증가되었으며, 각 개별아미노산 함량은 Glu, Gly, Leu, Phe, His, Lys의 함량이 전체적으로 높은 양을 보였다. 그리고 관능검사 결과, 종합적인 기호도가 48시간과 72시간일 때 가장 우수하게 나타났으며 그 중 72시간 발효구에서 60시간인 것보다 저조한 관능검사 평가를 보여 60시간을 최적 발효시간으로 결정하였다. 따라서, JYM-025를 이용하여 청국장을 제조하는 경우 50°C에서 60시간 발효하는 것이 가장 적당한 것으로 판단되었다.

3. 청국장 품질개선을 위한 당화현미 첨가효과

1) 당화현미 첨가량 결정

JYM-025를 이용하여 최적조건으로 청국장을 제조한 것에서 되도록이면 바람직하지 못한 냄새를 감소시키려는 목적으로 맥아로 당화시킨 증자현미와 볶음처리한 당화현미를 청국장에 각각 0, 10, 30 및 50%(w/w)를 첨가한 후 amylase의 전분의 분해를 촉진해 주기 위하여 60°C로 승온하여 12시간 더 발효시켜 제조하고 이들 당화현미 청국장의 품질특성을 비교하였다.

수분함량은 현미첨가구에서 현미무첨가구인 대조구보다 높아 수분보수력이 향상되었고, 총질소와 아미노산 함량은 현미의 비율이 증가할수록 감소하였으나 총 유리아미노산에 대한 glutamic acid 함량 비율은 반대로 증가하였다.

향기성분은 trimethyl pyrazine의 함량이 대조구보다 볶음현미첨가구가 45.22, 증자현미첨가구가 256.68로 월등히 높았으며, 2, 5-dimethyl pyrazine의 경우도 control보다 증자현미첨가구가 훨씬 증가하는 것으로 나타난 반면, 불쾌취인 2,3,5,6-tetramethyl pyrazine, butyric acid나 propionic acid도 크게 감소되어 풍미가 향상되는 효과를 보였다.

당화현미는 관능평가 결과 볶음처리한 것보다 증자처리한 당화현미를 첨가했을 때가 우수하였으며 첨가비율은 30%인 때 청국장의 품질 및 기호성이 가장 우수하였다.

2) 당화현미 첨가시기 결정

당화현미의 첨가시기를 결정하기 위하여 JYM-025를 증자콩에 접종 후 50℃의 항온기에서 24, 36, 48 및 60시간 경과 후에 각각 당화현미 30%를 첨가하여 똑같은 방법으로 발효시키면서 청국장의 품질을 측정하였다.

총질소와 TCA 가용성질소의 함량이 60시간에 첨가한 때에 가장 높은 반면, 유기산과 pH의 분석결과는 발효초기에 당화현미를 첨가할 경우 유기산의 함량이 높아지고 pH가 낮아지면서 단백질 분해를 저해하는 것으로 나타났다.

또한, 유리아미노산 함량도 60시간 첨가구에서 695.19 mg%로 가장 높았고 종합적인 기호도를 비롯한 모든 관능검사 항목에서도 우수한 점수를 획득하였다. 따라서, 당화현미를 60시간에 첨가하고 12시간 더 발효시키는 방법이 가장 적절한 것임을 알 수 있었다.

4. 당화현미 청국장의 생리활성

품질특성과 기호도가 가장 우수한 당화현미 청국장을 제조하고 생체활성 시험을 시행하였다. 이때 시료는 당화현미 30% 첨가한 청국장과 무첨가 청국장 100g을 각각 잘 마쇄하고 초순수로 12시간 교반추출한 후 원심분리하여 상정액을 동결건조한 다음 공시하였다.

1) 항산화효과

전통청국장과 현미청국장의 항산화효과를 시료농도를 달리하여 수정된 Blois의 방법으로 측정한 결과, 청국장 추출물의 농도가 증가함에 따라 전자

공여능과 SOD유사활성은 증가하였고 현미첨가 청국장은 전통청국장보다 높은 항산화효과를 나타냈다.

2) 암세포증식 억제효과

SK-MEL-31, MDA-MB-231의 세포를 10% fetal bovine serum과 RPMI 1640배지를 사용하여 37℃에서 배양하여 Charmichael 등의 방법에 따라 이들 추출물을 MDA-MB-231(유선암 세포), SK-MEL-31(악성 피부암세포), G361(피부암세포) 및 A549(폐암세포)주 4종의 암세포에 투여하고 각각의 암세포주의 증식억제 효과를 측정하였다

당화현미청국장 추출물의 MDA-MB-231(유선암 세포) 암세포주에 대한 증식억제효과는 각각 500, 1000 및 2000ppm의 농도에서 15.68, 17.20, 21.81%로 전통청국장의 11.86, 15.55, 18.07%인 것보다 높은 저해율을 나타내었다.

SK-MEL 31(악성 피부암세포) 암세포주와 G361(피부암세포)와 A549(폐암세포) 암세포주에 대하여도 당화현미 청국장추출물이 전통청국장의 것보다 2배 정도의 높은 증식억제 효과를 보였다. 따라서, 어느 청국장에서든 이들 암세포의 증식억제효과가 있었으며 특히 당화현미첨가 청국장에서 더 높은 것으로 나타났다.

5. 당화현미 청국장 이용 제품제조

생청국장을 그대로 섭취할 때 특유의 불쾌취와 점질물의 맛으로 인한 거부감을 줄이기 위한 방법의 일환으로 당화현미를 첨가한 청국장을 이용하여 쌈장, 볶음고추장, 고기소스 3품목을 제조하고 또한 기존의 장류와 소스류에 당화현미 청국장을 혼합하여 관능검사를 실시한 결과, 전통청국장보다 더 좋은 기호도를 보임으로서 청국장의 활용도를 높일 수 있는 것으로 판단되었다.

목 차

논문개요

I. 서 론	1
II. 문헌적 배경	9
1. 청국장의 제조방법과 품질개선에 관련된 연구	9
1) 청국장의 제조 분야에 관한 연구	9
2) 미생물을 이용한 품질개선	10
3) 부재료 첨가 등에 의한 품질개선	11
2. 저장 및 이용 분야	12
3. 청국장의 생리활성 분야	13
1) 혈전용해작용	13
2) 항돌연변이 및 항암효과	15
3) 항고혈압	15
4) 기타 생리활성	16
III. 실험재료 및 방법	18
1. 공시재료	18
2. 시료 청국장 제조방법	18
1) 전통청국장 제조방법	18

2) <i>Bacillus licheniformis</i> 를 이용한 청국장 제조방법	18
3) 당화현미 첨가 청국장 제조방법	20
4) 당화현미 첨가 청국장 제조	20
(1) 청국장첨가 쌈장	20
(2) 청국장첨가 볶음고추장	21
(3) 청국장첨가 고기소스	21
3. 우수균주 선발을 위한 실험방법	21
1) Amylase 활성 측정	21
2) Protease 활성 측정	22
3) 점질물의 분리 및 함량 측정	24
4) 불쾌취의 발생유무 측정	24
5) 선발된 균주의 동정	24
6) 선발된 균주로 제조된 청국장의 특성조사	24
4. 이화학적 특성 측정방법	25
1) 일반성분 함량 측정	25
2) 총질소 함량 측정	25
3) TCA 가용성질소량 측정	25
4) 색도 측정	25
5) pH 측정	26
6) 휘발성 유기산 함량 측정	26
7) 유리아미노산 함량 측정	26
8) 갈색도 측정	26
9) 젖산 및 포도당(Glucose)량 측정	30
10) 향기성분 분석	30

5. 청국장의 생리활성 측정	32
1) 시료 전처리	32
2) 전자공여능(DPPH) 측정	32
3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정	32
4) 청국장의 암세포 증식억제효과 측정	33
(1) 세포배양	33
(2) MTT assay	33
6. 관능검사	34
7. 통계처리 방법	34
IV. 결과 및 고찰	35
1. 청국장 제조 우수균 분리 및 선발	35
1) 균주 분리	35
2) 일반성분 함량	39
3) 유리아미노산 함량	42
4) 휘발성 유기산, 향기성분 및 관능특성	46
5) 청국장 제조시 최적균주 선발	52
2. <i>Bacillus licheniformis</i> JYM-025 청국장의 최적발효조건 결정	54
1) 최적발효온도	54
(1) 일반성분 함량	54
(2) 유리아미노산 함량	59
(3) 휘발성 유기산 함량 및 관능적 특성	62

2) 최적발효기간	68
(1) 일반성분	68
(2) 색도	72
(3) 휘발성 유기산, 유리아미노산 함량 및 관능검사	76
3. 청국장 품질개선을 위한 당화현미 첨가효과	83
1) 현미당화방법 및 당화현미 첨가량	83
(1) 일반성분 함량 및 색도	83
(2) 유리아미노산 함량	87
(3) 향기성분 및 휘발성 유기산 함량	90
(4) 관능검사	94
2) 당화현미 첨가시기 결정	96
(1) 일반성분 및 색도	96
(2) 유리아미노산 함량	100
(3) 관능검사	103
4. 청국장의 생리활성	106
1) 전자공여능(DPPH)	106
2) SOD 유사활성	109
3) 청국장의 암세포 증식억제 효과	112
5. 당화 현미를 첨가한 청국장을 이용한 제품 제조	122
1) 청국장첨가 쌈장	123
2) 청국장첨가 볶음고추장	126
3) 청국장첨가 고기소스	129

V. 결 론 132

REFERENCE 145

ABSTRACT

APPENDIX GC-MSD Fragment of Flavor components

List of Table

Table 1. Operating conditions of Gas Chromatography for volatile organic acid analysis	28
Table 2. Operating conditions of Amino acid analyzer for free amino acid analysis	29
Table 3. Operating conditions of GC-MSD for flavor compounds analysis	31
Table 4. The enzyme activities of protease and amylase in isolated strains from traditional <i>Chungkookjang</i>	37
Table 5. Morphological Characteristics of 5 kinds of <i>Bacillus sp.</i> isolated from traditional <i>Chungkookjang</i> during 2 days at 50°C fermentation	38
Table 6. Comparison of chemical components among 5 kinds of <i>Chung-kookjangs</i> prepared by 5 kinds of <i>Bacillus</i> strains during 2 days at 50°C fermentation	40
Table 7. Hunter color values of <i>Chungkookjangs</i> prepared by 5 kinds of <i>Bacillus</i> strains during 2 days at 50°C fermentation	41
Table 8. Free amino acid contents of <i>Chungkookjangs</i> prepared by 5 kinds of <i>Bacillus</i> strains during 2 days at 50°C fermentation	44
Table 9. Relative ratio of Free amino acid content in <i>Chungkookjangs</i> cultivated 5 kinds of <i>Bacillus</i> strains	

.....	45
Table 10. Volatile organic acids content of <i>Chungkookjangs</i> prepared by 5 kinds of <i>Bacillus</i> strains during 2 days at 50°C fermentation	47
Table 11. Flavor components of <i>Chungkookjangs</i> prepared 5 kinds of <i>Bacillus</i> strains during 2 days at 50°C fermentation	48
Table 12. The sensory evaluations of <i>Chungkookjangs</i> prepared by cultivated 5 kinds of <i>Bacillus</i> strains during 2 days at 50°C fermentation	50
Table 13. Total points calculated by each experimental value	53
Table 14. The changes of chemical components of <i>Chungkookjang</i> fermented at different temperature during 48 hours	57
Table 15. Hunter color values of <i>Chungkookjang</i> fermented with different temperature during 48 hours	58
Table 16. Free amino acid contents of <i>Chungkookjang</i> fermented with different temperature during 48 hours	60
Table 17. Relative ratio of Free amino acid content in <i>Chungkookjang</i> fermented with different temperature during 48 hours	61
Table 18. Volatile organic acids contents of <i>Chungkookjang</i> fermented with different temperature during 48 hours	64
Table 19. The sensory evaluations of <i>Chungkookjang</i> fermented	

	with different temperature during 48 hours	65
Table 20.	The Total points calculated by each value obtained from experimental determination	67
Table 21.	The amounts of chemical components of <i>Chungkookjang</i> by different fermented period at 50°C	70
Table 22.	The changes of color values of <i>Chungkookjang</i> by different fermented period at 50°C	73
Table 23.	The changes of volatile organic acids contents of <i>Chungkookjang</i> by different fermented period at 50°C	78
Table 24.	The sensory evaluations of <i>Chungkookjang</i> by different fermented period at 50°C	79
Table 25.	The changes of Free amino acid contents of <i>Chungkookjang</i> by different fermentation period at 50°C	81
Table 26.	The total points calculated by each value obtained from experimental determination	82
Table 27.	The changes of chemical components of <i>Chungkookjang</i> added steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours	85
Table 28.	Hunter color values of <i>Chungkookjang</i> added steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours at 50°C	86
Table 29.	The changes of Free amino acid contents of <i>Chungkookjang</i> added and roasted brown rice	

saccharified with malt juice fermenting during 60 hours at 50°C	88
Table 30. Relative ratios of Free amino acid content in <i>Chungkookjang</i> added brown rice saccharified with malt juice fermenting during 60 hours at 50°C	89
Table 31. Flavor components of <i>Chungkookjang</i> added 30% of steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermenting during 60 hours at 50°C	91
Table 32. Volatile organic acid contents of <i>Chungkookjang</i> added steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours at 50°C	93
Table 33. The sensory evaluations of <i>Chungkookjang</i> added steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermenting during 60 hours at 50°C	95
Table 34. Comparison of chemical components of <i>Chungkookjang</i> by made with saccharified brown rice during various fermenting time	98
Table 35. Hunter color value of <i>Chungkookjang</i> by the addition time of saccharificated brown rice	99
Table 36. Free amino acid content of <i>Chungkookjang</i> by the addition time of saccharificated brown rice	101
Table 37. Relative ratio of Free amino acid content in <i>Chungkookjang</i> by the addition time of saccharificated brown rice	102

Table 38. The sensory characteristics of <i>Chungkookjang</i> by the addition time of saccharification brown rice	104
Table 39. Electron donating ability of <i>Chungkookjang</i>	107
Table 40. SOD-like ability of <i>Chungkookjang</i>	110
Table 41. Growth inhibitory effect of <i>Chungkookjang</i> on MDA-MB-231.	114
Table 42. Growth inhibitory effect of <i>Chungkookjang</i> on SK-MEL 31.	116
Table 43. Growth inhibitory effect of <i>Chungkookjang</i> on G361.	118
Table 44. Growth inhibitory effect of <i>Chungkookjang</i> on A549.	120
Table 45. The sensory characteristics of <i>Samjang</i> by using <i>Chungkookjang</i> with saccharificated brown rice	125
Table 46. The sensory characteristics of roasted <i>kochujang</i> by using <i>Chungkookjang</i> with saccharificated brown rice	128
Table 47. The sensory characteristics of Meat Sauce by using <i>Chungkookjang</i> with saccharificated brown rice	131

List of Figure

Fig. 1. Making process chart of traditional and improved <i>Chungkookjang</i>	19
Fig. 2. The standard curve of tyrosine concentration	23
Fig. 3. The sensory characteristics of <i>ChungKookjang</i> cultivated 5 kinds of <i>Bacillus</i> strains	51
Fig. 4. Effect of temperature on the growth of <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> JYM-025.	56
Fig. 5. The sensory evaluations of <i>Chungkookjang</i> fermented with different temperature during 48 hours	66
Fig. 6. The Changes of Water soluble nitrogen and TCA soluble nitrogen contents of <i>Chungkookjang</i> by different fermented period at 50°C.	71
Fig. 7. The changes of L-values <i>Chungkookjang</i> during different fermented period at 50°C.	74
Fig. 8. The changes of a-values and b-values of <i>Chungkookjang</i> during different fermented period at 50°C.	75
Fig. 9. The sensory evaluations of <i>Chungkookjang</i> by different fermented period at 50°C	80
Fig. 10. The sensory characteristics of <i>Chungkookjang</i> by the addition time of saccharification brown rice	105
Fig. 11. Electron donating ability of <i>Chungkookjang</i>	108
Fig. 12. SOD-like ability of <i>Chungkookjang</i>	111

Fig. 13. Growth inhibitory effect of <i>Chungkookjang</i> on MDA-MB-231.	115
Fig. 14. Growth inhibitory effect of <i>Chungkookjang</i> on SK-MEL 31.	117
Fig. 15. Growth inhibitory effect of <i>Chungkookjang</i> on G361.	119
Fig. 16. Growth inhibitory effect of <i>Chungkookjang</i> on A549.	121
Fig. 17. <i>Samjang</i> by using <i>Chungkookjang</i> with saccharificated brown rice.	124
Fig. 18. Roasted <i>kochujang</i> by using <i>Chungkookjang</i> with saccharificated brown rice.	127
Fig. 19. Meat Sauce by using <i>Chungkookjang</i> with saccharificated brown rice.	130

I. 서 론

대두를 이용한 한국의 대표적인 발효식품인 청국장은 된장, 간장, 고추장 등과 함께 오래전부터 발효조미식품으로 상용되어 왔다. 대두는 조직이 치밀하고 단백질의 소화흡수를 저해하는 trypsin inhibitor와 적혈구 응집소인 hemagglutinin 등이 함유되어 있어서 조리·가공하여 각 민족의 기호에 맞는 독특한 대두가공식품들로 제조되어 식용되어 왔다.¹⁾

청국장은 영양학적으로 볼 때 가장 유익한 방법으로 이용한 발효식품 중의 하나이며 단백질과 지방이 많고 또한 소화성이 좋으며 그 외에도 여러 가지 질병에 대한 예방과 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다. 콩 자체에 비해 필수아미노산, 비타민 B₁, B₂, 나이아신, 판토텐산, 각종 효소가 더 많이 함유되어 있고 소화흡수율도 높으며 변비개선에도 유효하다. 또한, 인체에 유익한 *Bacillus. sp.*를 공급함으로써 부패균의 활동을 억제하여 이에 의한 발암물질이나 암모니아, 인돌, 아민 등 발암촉진물질의 생성을 감소시키는 동시에 이들 유해물질을 흡착하고 배설시키는 작용을 한다.

우리나라에서는 대두를 발효시킨 메주를 염수에 넣어 다시 발효시킨 된장과 간장을 가정에서 직접 제조하여 섭취해 왔다. 이들 식품들은 제조하는데 1년 이라는 긴 기간이 소요되는데 비하여 청국장은 콩을 수확하는 가을부터 겨울철에 고온에서 단시간 발효 숙성시켜 제조되므로 일반가정에서 널리 이용되어 왔다.

청국장의 제조방법에 관한 기록은 농상집요(農桑輯要), 산림경제(山林經濟), 증보산림경제(增補山林經濟), 규합총서(閩閩叢書) 등에 잘 나타나 있는 바와 같이 우리 민족의 식생활에서 중요한 위치를 차지하면서 계승, 발전되어 온 사실을 알 수 있다²⁾. 고서에서의 이름은 ‘전국장(戰國醬)’이라 하여 전시에 필요할 때 빨리 제조, 사용할 수 있으므로 이러한 용어를 사용했던 것

으로 추정되며 청나라에서 유래되었다는 의미에서 청국장(淸麴醬)이라고도 부르게 되었다고 한다³⁾. 청국장의 전통적인 제조방법은 콩을 삶아 깨끗한 벗짚에 싸서 따뜻한 곳에서 2~3일 동안 발효시킨 후에 점질물질에 의해 실이 발생하게 되면 각종 양념을 첨가하여 제조를 완성하는 것이다. 일본에서는 순수하게 분리된 낫또(natto, 納豆)균을 삶은 콩에 접종하여 일정한 온도에서 발효시켜 그대로 식용하고 있다. 우리나라에서는 청국장은 벗짚에 붙어 있는 고초균(枯草菌)이라 하는 *Bacillus subtilis* 균을 이용하며, 이 균은 콩에 있는 다양한 영양소를 이용하여 자연발효과정을 통해 새로운 독특한 향과 맛을 나타낼 뿐 아니라 새로운 영양소를 만들어 내기도 한다. 즉, 콩이 가지고 있는 단백질을 아미노산으로, 올리고당을 단당류로, 지방을 지방산으로 다양하게 분해하여 독특한 향미를 발휘하며 각종 비타민을 생성하게 된다. 청국장의 발효시 생성되는 독특한 향기는 butyric acid, valeric acid, tetra-methylpyrazine 등과 같은 휘발성물질과 아미노산의 분해시에 생성되는 암모니아 성분에 기인하는 것으로 알려져 있다^{4,5)}. 또한, 된장이나 고추장보다 단백질과 지방함량이 높은 고영양 식품⁶⁾으로 발효과정 중에 *B. subtilis*가 생산하는 효소에 의해서 그 특유의 맛과 냄새를 내는 동시에 원료 콩의 당질과 단백질에서 유래된 끈적끈적한 점질물⁷⁾을 생산하는 기능성 식품으로 각광받고 있다.

청국장은 전통 대두발효식품 중 가장 짧은 기간에 제조할 수 있고, 그 풍미가 독특하고 영양적, 경제적으로도 가장 효과적인 콩의 섭취방법으로 인정되고 있다.⁸⁾ 원료인 콩이 가지는 영양성 이외에도 인체의 건강증진을 위한 생리활성물질로 알려진 식이섬유, 인지질, isoflavones(genistein, daidzein etc.), phenolic acids, saponins, phytic acid 등의 성분이 들어있으며, 이 성분들은 동맥경화, 심장병, 당뇨병 예방효과, 노인성치매 예방효과, 항암효과(유방암, 대장암, 폐암 등), 골다공증 억제 등의 성인병 예방에 효과가 있음이 발표되고 있다.⁹⁾ 이와 같이 혈압상승 억제효과 및 지질대사 개선효과, 혈

전용해능, 항돌연변이성 및 항암성, 항균작용 등에 관한 청국장의 기능성이 알려짐에 따라 그 소비량이 점차 증가하는 추세에 있다. 일본에서도 우리나라의 청국장과 유사한 대두발효식품인 낫또에 nattokinase라는 혈전용해효소가 존재함이 알려지면서¹⁰⁾ 현재 기능성 식품으로서 그 중요성이 재조명되고 있다¹¹⁾.

Sumi 등¹⁰⁾은 낫또로부터 nattokinase라는 혈전용해효소를 분리, 명명하고, 청국장으로부터 혈전용해 균주를 분리하여 혈전용해능을 조사하였으며^(12~14), 이 등¹⁵⁾은 청국장으로부터 분리한 체내혈액의 응고기작에 의해 생성된 단백질인 fibrin을 분해할 수 있는 효소를 분비하는 최적배지조건은 0.5% peptone, 0.3% beef extracts, 0.5% cellobiose, 5% soluble starch, 2% soybean meal, 0.02% Na₂HPO₄인 것을 지적한 바 있다. 본 배지를 효소 생산용 배지로 사용할 때 배양 48시간에 효소생성이 가장 높았다고 하였다.

龜田¹⁶⁾은 암을 유발시킨 쥐에 나토균(*Bacillus natto*)을 주입하는 실험으로 암을 억제한다는 결과를 보고하였으며, 윤 등¹⁷⁾ 정 등¹⁸⁾은 간장, 된장, 고추장, 청국장의 용매추출물을 대상으로 항돌연변이성을 측정된 결과, 청국장과 된장의 메탄올추출물이 Aflatoxin B₁의 돌연변이성을 억제한다고 하였다. 최 등¹⁹⁾은 두부, 콩나물, 두유, 간장, 된장, 청국장, 춘장을 대상으로 대두 가공식품 중의 isoflavone 함량을 조사한 결과, 청국장과 된장이 생체에서 이용성이 우수한 형태인 isoflavone aglycone의 좋은 공급원이라고 보고하였다. 손 등²⁰⁾은 청국장의 발효기간이 길어질수록 isoflavone의 함량이 계속적으로 증가하며, isoflavone 중 genistein의 함량이 daidzein함량 보다 2배 정도 높게 나타났다고 보고하였다.

조 등²¹⁾은 청국장 발효 중에 angiotensin converting enzyme (ACE) 저해 peptide를 분리하고 저해효과를 검토한 바, 청국장은 40℃, 60시간 발효시에 ACE 저해율이 최대이었으며 정제한 peptide의 첨가량이 높아질수록 저해활성은 높았으며 0.5 mg정도의 peptide함량으로 94.3%의 저해율을 나타낸다고

보고하였다.

그리고, 윤 등²²⁾이 청국장 점질물의 생리활성기능을 확인하기 위하여 점질물을 첨가하여 유해미생물의 성장곡선을 관찰한 결과 그람양성세균, 그람 음성세균, 효모 등에 항균작용을 나타내었다고 보고하였다. 손 등²⁰⁾이 *Bacillus* 균주를 이용하여 42℃에서 72시간 동안 발효된 검정콩 청국장을 이용한 항균활성시험에서 *B. subtilis*보다는 분리균주 *B. mefaterium* SMY-212균주를 첨가한 구가, 대립 검정콩의 메탄올 추출물이 소립 검정콩의 것보다 항균효과가 우수하였다고 보고하였다. 청국장의 수소공여능은 대립 및 소립 검정콩 청국장에서 각각 76.4 및 75.5%이었으며, *B. subtilis* 및 SMY-212를 첨가한 것은 무첨가보다 높았고 아질산염 소거능에서도 대립 검정콩이 소립 검정콩보다 그 효과가 크게 높았다고 보고하였다.

그리고, 김 은²³⁾ 인체에 이로운 *B. subtilis*가 부패균의 억제작용으로 부패균이 만드는 암모니아, 인돌, 아민 등 발암물질을 감소시켜주는 효과가 있고 *Bacillus* 균은 유기산도 생성하므로 장을 자극해 소화활동을 활발히 해주기도 하여 변비개선과 다이어트에 탁월한 효과가 있다고 하였다.

청국장의 품질개선에 관한 연구로는 김 등²⁴⁾이 볏짚을 이용한 발효온도와 시간의 변화에 따라 수분과 조단백질 함량은 모두 변화가 없었으며, pH는 초기 6.4 에서 7.46, 7.82로서 완만하게 증가하였고 아미노태 질소 및 수용성 질소함량은 모두 증가하고, protease의 역가는 발효 48시간까지는 증가하여 최고에 도달한 후 감소 하였으며, 청국장의 최적 발효조건은 40℃에서 72시간이라 하였다. 또한 김 등²⁵⁾은 전통 청국장의 기초자료를 얻고자 전국 9대 도시의 가정단위에서 제조되어 판매되고 있는 청국장을 수거하여 이화학적 특성인 일반성분, 지방산, 유리아미노산, 유리당, 유기산, 색도 및 물성을 조사하고, 청국장 발효과정 중 단백질의 변화와 아미노산의 변화양상을 조사하여 발표하였다^{26,27)}. 유 등²⁸⁾은 농촌진흥청 작물시험장에서 육성 보급한 콩 품종별로 청국장을 제조하고 청국장의 이화학적, 관능적 특성을 조사하여 신팔달콩 2호와 단엽콩 등이 청국장 제

조에 적합하다고 하였다. 한편, 고 등²⁹⁾은 청국장 제조를 위한 분리균은 포자형 성율이 높은 *B. subtilis*로 대사력이 활발한 대수증식기의 것을 콩에 1,000 CFU/g 이상의 균수를 접종하고 40°C와 상대습도 90%에서 배양하면 발효가 빠르게 진행되며, 발효가 종료되면 포자형성율이 95% 이상인 때 저온의 후숙과정에서 재번식이 쉽게 일어나지 않았으며, 발효취는 발효 중에만 생성되고, 5°C에서 1~2일간의 후숙기간중에 종균은 증식되지 않고 발효취도 소멸되므로 저온의 유통과정을 거쳐야 불쾌취가 없는 구수한 청국장의 맛을 유지할 수 있다고 하였다.

또한 최 등³⁰⁾은 증자대두에 *B. subtilis*와 *B. natto* 균을 각각 접종시켜 청국장을 제조하여 향기물질을 분석 동정한 결과, 증자대두의 중요한 성분으로 3-methyl-1-butanol, 2-methylpropanoic acid 및 1-octen-3-ol 등 인 것을 밝혔고, *B. subtilis* 균을 접종한 청국장은 숙성 중에 이들 화합물들이 대체로 남아 있었으나, trimethylpyrazine, tetramethylpyrazine 등 7종류의 alkylpyrazine류가 현저히 증가했다고 하였으며, 주³¹⁾는 *B. natto* 균을 이용한 청국장 제조시 protease의 활성은 54시간 발효시 가장 높았고 유리아미노태 질소는 36~42시간에서 가장 많이 유리되었으며 총산은 24시간에 가장 많았고 청국장의 수분함량은 55%정도가 우수하다고 하였다. 최 등³²⁾은 *B. subtilis*에 젖산균과 곰팡이를 이용하여 복발효시켜 제조한 청국장과 여러 품종의 대두 중 싹발달콩을 원료로 한 청국장에서 불쾌취가 현저히 감소되었다고 보고한 바 있다. 그리고, 서 등³³⁾은 *B. subtilis*와 *B. natto*균을 이용한 청국장메주 발효과정 중의 유리 아미노산함량은 두 시험구 모두 glutamic acid가 가장 높았고 그 다음이 leucine, phenylalanine, histidine, alanine, arginine 순이었으며 *B. natto*구가 *B. subtilis*구에 비하여 다소 높았으며 청국장 제조 균주로서 *B. subtilis* 보다 *B. natto*가 더욱 우수하였다고 보고하였다.

최 등³⁴⁾은 *B. licheniformis* CN-115균주를 대두에 발효시켜 제조한 청국장의 일반성분, 단백질, 아미노산 등의 변화는 일반성분은 발효진행 동안 다소 불규

칙한 증감현상을 보였고 아미노테질소의 함량은 발효 36시간 이후 급격히 증가하였으며 발효 60시간에는 18.072 mg/g으로 최고치가 되었고 pH는 상승하여 60시간에 8.39, 산성과 중성 protease는 48시간에 활성이 가장 높았으며, 최적 pH는 6.5, 온도는 35℃였으며 주단백질 분자량은 19,000 정도이었고, 수용성 아미노산 조성은 총 16종으로 그 중 proline이 가장 많았으며 그 다음이 glutamic acid, serine 순이라고 하였다.

연 등³⁵⁾은 불쾌취의 저감화 방안으로 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 starter 청국장의 품질과 단일균주로 제조한 청국장을 비교하였을 때 관능평가 결과 색, 향, 맛 그리고 전체적인 선호도의 모든 항목에서 *B. natto*와 *B. licheniformis*를 혼합한 시료가 가장 높은 선호도를 나타내어 청국장의 불쾌취를 감소시키면서도 풍미를 향상시킬 수 있다고 하였다. 그리고, 항산화 및 항암효과를 갖는 genistein과 daidzein 함량이 높은 검정콩을 원료로 한 청국장이 대두를 사용한 것 보다 유리 아미노산 함량이 적었지만, 향기성분 등의 개선을 위하여 키위와 무를 첨가한 때에는 검정콩 청국장이 우수하다고 하였다^{36,37)}.

Bacillus sp. b01균주를 사용한 청국장 제조시 유카(*yucca shidigera*) 추출물³⁸⁾의 첨가로 아미노테 질소 함량, protease 활성 및 유기산의 함량이 증가하였으며, 유카추출물 0.5 mg/g을 첨가시 무첨가구 보다 유의적으로 맛과 향이 우수하다고 하였다. 주는³⁹⁾ 시판 청국장의 일반성분과 쑥 또는 고추기름을 첨가한 청국장은 수분, 조단백질, 아미노테질소, 조지방, pH, 염도, 순수용성 추출물 및 단백질 분해율의 함량이 각각 17.7~54.0%, 11.99~22.54%, 121.1~642.1mg%, 1.287~5.554%, 6.40~7.27%, 4.1~7.9%, 38.10~76.40% 및 3.70~26.50%이었고, 쑥추출물을 첨가한 구에서 4-methyl pyrimidine과 2-methyl pyrazine의 함량이 특히 높았으며, 아미노테 질소 함량에는 영향을 주지 않은 반면 고추기름을 첨가한 구에서는 첨가량이 증가할수록 NH₂-N함량은 증가하고 NH₃-N의 생성은 현저하게 억제된다고 하였다. 항염증 치료 등의 약리효과를 가진 작두콩을 청국장 발

효에 첨가한 경우 불쾌취가 감소되고 향기성분이 개선된 기호성이 높은 제품을 개발하였다고 보고하였다⁴⁰⁾.

그 외에 최 등⁴¹⁾이 청국장의 갈변억제 및 호기성 세균의 포자수를 감소시키는 가열살균조건을 설정하여 장기간 보존을 위한 연구를 실시하였으며, 김 등⁴²⁾은 청국장의 보존성 향상을 위하여 감마선을 이용한 연구를 실시하였다. 그리고 이 등⁴³⁾은 청국장을 소재로 spread 형태의 가공식품을 제조하기 위하여 온도에 따른 수분함량, 유지의 종류 및 함량조절을 통하여 물성변환을 시도하여 전통식품의 변화를 시도하는 등 많은 연구들이 진행되었으나 대부분의 연구가 단편적인 연구로 산업적 생산과 소비촉진을 위한 제품화에 대한 연구로는 연결되지 못하였다.

청국장은 다른 장류와는 달리 상품으로서의 보존, 유통의 어려운 문제들에 의한 품질열화로 소비자들의 만족도가 저하되는 것으로 본다. 최 등⁴⁴⁾은 시중에서 유통되는 청국장의 사용경험이 있는 소비자의 약 50%가 제품에 대해 만족하지 못하였고, 불만족의 가장 큰 요인으로 불쾌취(52.3%)를 지적하여 우수한 식품임에도 불구하고 청국장의 독특한 향기로 인하여 외면당하고 있으나 생리활성물질이 알려지면서 소비자들의 관심이 증가하는 추세에 있다. 따라서, 영양이 풍부하고 우수한 기능성 식품인 청국장의 섭취를 늘리고 이를 계승 발전시키기 위해 청국장의 제조기술을 개발하여 품질을 고급화하는 노력과 산업화가 지속적으로 이루어져야 한다고 본다. 청국장은 고추장, 된장, 간장과는 달리 소비기반이 약하여 생산하는 업체의 수가 적고 규모도 비교적 영세하여 제조공정의 자동화율이 저조하고 품질, 포장, 위생면에서 문제점이 있으며 품질의 규격화 · 고급화를 위한 다양한 연구노력이 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 전통청국장에서 우수한 균주를 선발하고 이를 청국장의 산업화에 직접 적용할 수 있는 최적발효조건을 탐색하고자 하였다. 그리고, 선발된 우수균주를 이용한 청국장 발효과정 중 당화현미를 첨가하여 불

패취 저감화의 여부와 그 효과가 있을 때는 첨가조건을 탐색하고, 품질 및 관능적 특성을 측정하여 비교하고자 하였다.

또한, 전통청국장과 당화현미 청국장의 항산화효과와 유선암, 악성피부암, 피부암, 폐암의 세포억제 효과 등의 생리활성을 측정하여 비교하였다. 그리고, 당화현미청국장을 이용한 쌈장, 볶음 고추장 및 고기 소스 등을 제조하고 품질 및 관능검사를 통하여 이용가능성을 검토하여 청국장의 소비촉진과 확대를 위한 방법을 제시하고자 하였다.

II. 문헌적 배경

영양이 풍부하고 우수한 기능성 성분을 지닌 청국장의 섭취를 늘리고 이를 계승 발전시키기 위해 청국장의 제조기술을 개발하여 품질을 고급화하기 위하여 진행된 연구를 바탕으로 청국장의 제조 방법과 품질개선에 관한 연구, 청국장의 저장 및 이용에 관한 연구, 청국장의 생리활성에 관한 연구로 분류하여 다음과 같은 문헌적 연구 배경을 정리할 수 있었다.

1. 청국장의 제조방법과 품질개선에 관련된 연구

1) 청국장의 제조 분야에 관한 연구

청국장의 제조에 관한 연구로 김 등²⁵⁾은 전통 청국장의 기초자료를 얻고자 전국 9대 도시의 가정단위에서 전통적으로 제조되어 판매되고 있는 청국장의 이화학적 특성을 비교·분석한 결과, 전통청국장의 지역평균함량은 수분 55.0% 조단백질 17.6%, 조지방 3.3%, 당질 13.3%, 조섬유 4.9%, 회분 5.8%, 아미노산성질소 0.23% 및 pH는 7.21을 나타냈다. 아미노산은 총 17종이 검출되었으며, 그 중 glutamic acid의 함량이 가장 높았으며, 그 다음은 aspartic acid, leucine의 순서로 조사되었다. 유리당은 평균 3.3%로 glucose(1.1%)와 fructose(0.6%)가 주성분으로, 유기산은 882.9 mg%로 함량은 citric, acetic, lactic acid 순으로, 색도는 L(lightness)값 49.1, a(redness)값 6.7, b(yellowness)값 19.2로 조사되었다고 보고하였다. 김 등²⁴⁾은 볏짚을 이용하여 전통적인 방법으로 청국장을 제조하면서, 발효온도를 40℃ 및 50℃로 하여 발효기간 중 변화를 조사한 결과, 아미노산성 질소 및 수용성 질소의 함량이 60시간까지는 증가되나 72시간 발효 후에는 감소된다는 결과를 얻었고 결론적으로, 40℃에서 72시간 발효시킨 구에서 가장 우수한 결과를 보였다고 보고하였다. 서 등^{45,46)}은 균주를 달리한 청국장의 제조에 관한 연구에서 균주에 따라 청국장의 아미노질소와 수용성 질소함량은 경시적

으로 증가하는 경향으로서 *B. natto*균, 재래식균, *B. subtilis*균의 순으로 높았으며, amylase와 protease 활성은 시험구간의 차이가 없었으나, 효소활성은 대체로 미약함으로 *B. natto*균이 청국장 메주 제조 균주로서 성분과 기능 면에서 우수하다고 보고하였다. 박^{26,27)}은 청국장 발효메주 발효과정 중 일반성분의 변화 및 대두단백질 중의 질소 성분변화에 대한 연구 중 펩타이드, 아미노태 및 암모니아태 질소, 총질소 함량은 초기 0.25%에서 72시간 발효 후 4~7%로 증가되는 결과를 밝혀서 이 분야 연구의 밑거름이 되었다.

유 등²⁸⁾은 콩 품종별 청국장의 가공적성에 대하여 검토한 결과, 유리당, 유리아미노산, 아미노태 질소 함량을 비교하여 신탄달 콩 2호와 단엽콩이 가장 우수한 것으로 나타났다. 고 등²⁹⁾이 청국장의 냄새원인과 생성과정을 규명하고자 우수한 균주의 선택과 관리방법의 체계화와 기본적인 발효 기법의 표준화, 불쾌취 발생 원인과 이에 대한 억제 방법의 검토, 소비자 기호에 맞는 풍미 향상 방법의 연구 및 유통 중에 변질 억제 등을 연구 검토하여 *B. subtilis*균을 이용하여 중립콩과 대립콩에 접종하여 40℃ 90% 습도에서 배양한 후 5℃의 저온으로 1-2일 후숙시켜 세균의 번식을 억제하면 불쾌취가 감소된다고 발표하였다.

2) 미생물을 이용한 품질개선

일반적으로 사용하는 청국장의 제조법은 전통적으로 볏짚을 이용하던 것에서부터 *B. subtilis*, *B. natto* 균을 이용한 단일균주접종법이 사용되고 있으며 일부연구에서는 *B. licheniformis*를 이용한 청국장에 관한 연구도 행해지고 있다. 그 외 짚에서 청국장 자체의 Nutrient agar medium이나 T. S. B. 배지에 접종하여 균주를 분리, 사용하는 방법들이 사용되고 있다.

최 등³⁰⁾은 고초균(*B. subtilis*)으로 제조한 청국장에서 dimethyl pyrazine과 tetramethyl pyrazine류, 낫또(*B. natto*)균을 사용한 구는 tetramethyl

pyrazine류가 향기에 기여한다고 하였다.

여러 연구자들에 의하여 시도된 제조방법과 향기의 개선을 위한 연구 중에서 *B. natto* 균을 이용하여 청국장 제조시 36~42시간 경과시에 최적 유리 아미노산의 생성을 보였고, 수분함량이 55%일 때 가장 좋은 품질을 나타내었으므로 이에 의한 발효조건을 확립하였다.³¹⁾ 최 등³²⁾의 연구에서는 *B. subtilis*에 젓산균과 곰팡이를 이용하여 복발효시켜 제조한 청국장과 여러 품종의 대두 중 싹발달콩을 원료로 한 청국장에서 불쾌취가 현저히 감소되었다고 보고하였고, 서 등^{33,45,46)}은 *B. subtilis*와 *B. natto*를 대두에 발효시켜 청국장을 제조한 결과, *B. natto* 청국장에서 아미노산성 질소와 아미노산 함량이 높게 나타났고, 에탄올 함량은 초기에는 높게 나타났으나 60시간 경과후 *B. subtilis* 청국장과 차이를 보이지 않았으며, 전반적으로 *B. natto* 청국장이 우수한 결과를 보였다는 일련의 연구들이 발표되었다.

최 등³⁴⁾은 *B. licheniformis* 균을 대두에 발효시켜서 일반성분, 단백질, 아미노산 등의 변화를 규명하여 최적조건을 검토하였으며, 연 등³⁵⁾은 불쾌취의 감소를 위하여 *B. natto*와 *B. licheniformis*의 혼합 starter 청국장의 질소 성분 등은 단일균주 보다 낮은 편이었지만, 색, 향기, 맛 등의 관능검사에서 우수한 결과임을 지적하였다.

3) 부재료 첨가 등에 의한 품질개선

앞서 설명하였듯이 청국장은 식품 자체가 가지고 있는 수많은 장점들에도 불구하고 관능성이 낮고 보관성이 떨어지는 등의 이유로 다른 부재료나 첨가물을 사용함으로써 영양성과 관능성 등을 높이려는 연구가 이루어져 왔다. 항산화 및 항암효과를 갖는 genistein과 daidzein 함량이 높은 검정콩을 원료로 하여 청국장을 제조비교한 결과, 흰 대두를 사용한 구 보다 흑대두를 사용한 구에서 유리 아미노산 함량이 다소 적었으나, 향기성분 등의 개선을 위하여 키위와 무를 첨가한 구에서는 검정콩 청국장이 성분과 관능검

사에서 우수한 결과를 보였다^{36,37)}.

인 등³⁸⁾은 관절염, 당뇨 등의 치료효과를 나타내는 동시에 혈압과 혈 중 콜레스테롤 농도를 저하시키고 가축분뇨의 암모니아 생성을 억제시키는 유카(*Yucca shidigera*) 추출물을 청국장 발효에 첨가한 결과, 아미노산성 질소 함량은 증가한 반면에 암모니아성질소는 감소하였다. 그리고, 당과 아미노산의 분해 축합 등으로 생성되는 2, 5- dimethyl pyrazine과 2, 6-dimethyl pyrazine의 함량은 증가한 반면 불쾌취를 내는 tetramethyl pyrazine은 감소하였고 또 관능검사에서도 유카 추출물을 첨가한 청국장의 맛과 향이 우수한 것으로 나타났다. 주³⁹⁾는 썩 추출물과 고추기름을 청국장 발효에 첨가하여 불쾌취를 감소시킴으로서 향기성분을 개선하고 기호성을 높이는 결과를 보고하였다.

김 등⁴⁷⁾은 분자내부에 특정 소수성 영역이 있어 포집 화합물을 형성할 수 있는 능력에 의해 물성개선효과가 있는 β -cyclodextrin을 발효시에 첨가하여 불쾌취를 억제하고자 하는 시도로 20% 정도 첨가했을 때 구수한 향, 짠 맛 및 이취의 관능검사 결과에서 좋은 결과를 얻었다. 김 등⁴⁰⁾은 항염증 치료 등의 약리효과를 가진 작두콩을 첨가하여 제조한 청국장의 기호성과 기능성을 높였으며, 특히 작두콩을 30% 첨가한 때 향기와 품질이 가장 우수한 결과를 얻었다.

2. 저장 및 이용 분야

최 등⁴¹⁾은 국장의 갈변 억제 및 호기성 세균의 포자수를 감소시켜 장기간 보존하기 위하여 가열살균조건을 조사한 결과 115℃에서 18분간 가열로 멸균되었으며, 그 포자수를 1/10로 감소시키는데 필요한 시간(D-value)은 2.1-2.2분이었다. 김 등⁴²⁾은 청국장의 보존성향상을 위하여 감마선을 이용한 때 1.78 kGY 조사하여 D₁₀값을 보였으며, 품질열화요소인 암모니아성 질소 함량과 갈색화도 증가도 억제되어서 유용한 것으로 보고하였다.

또한, 정 등⁴⁸⁾은 대두에 함유된 영양저해인자인 phytic acid를 감소시키기 위하여 phytase 활성을 갖는 균주인 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*를 분리하여 단독 또는 혼합 균주로 35-40℃에서 5일 동안 발효시킬 경우 phytase 생산성이 최대였으며, 아미노산의 함량도 높았다고 하였다.

이 등⁴³⁾은 청국장을 소재로 spread 형태의 가공식품을 제조하기 위하여 온도에 따른 수분함량, 유지의 종류 및 함량조절을 통하여 물성변환을 시도하여 전통 식품을 변화시키기 위하여 수행한 연구 결과, *B. subtilis*와 *B. natto* 균주를 단독 또는 혼합으로 접종하여 발효시킨 청국장에서 점성의 경우는 *B. subtilis*구, *B. subtilis* + *B. natto* 혼합균주구, *B. natto*구의 순으로 낮아졌으며, 퍼짐성은 이와 반대의 결과를 보였다. 특히, 수분함량이 65%인 *B. natto* 균주구가 퍼짐성이 우수하였다. 또한, 청국장에 팜올레인을 30% 첨가한 *B. subtilis* + *B. natto* 혼합균주구는 4℃에서 2개월간 저장하여도 유지층이 분리되지 않는 우수한 결과를 보고하였다.

3. 청국장의 생리활성 분야

1) 혈전용해작용

혈전(blood cascade)은 생체내에서 상처복구시 복잡한 혈전기작에 의해 활성화된 thrombin에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 불용성의 입체적 구조를 가진 3차원의 격자 중합체를 형성함으로써 생성된다. 생체내에서는 혈액의 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루도록 하고 있으나 여러 가지 원인 등으로 균형이 깨지면 혈전들이 미세한 혈관, 특히 뇌혈관 등에 축적되어 혈액순환을 차단하여 각 조직으로 원활한 영양분 및 산소공급이 중단되고 혈압이 증가되는 현상이 나타난다. 즉, 뇌혈관에 혈전이 생성되면 뇌혈전증이 일어나 반신불수가 되고, 뇌 속에 있는 혈관이 막혀서 생긴 것이 뇌혈관성 치매이고 치매의 60% 정도가 이 혈전 때문이라고 한다.

뇌혈관이 파괴되면 뇌출혈이 일어나 생명에 치명적인 상태가 되며, 심장혈관이 막히면 심부전증이나 심장마비가 되어 사망의 원인이 된다. 최근 현대인의 사망률 추세 보고에 의하면 혈관내 장애에 의한 사망자수가 전체 사망자수의 40%를 차지함에 따라 이들 질환의 예방 및 치료에 활발한 연구가 진행되고 있으며 주로 혈전의 생성을 억제하는 항혈전제의 개발과 생성된 혈전을 용해시키는 혈전용해제의 개발 등에 초점을 두고 있다.

청국장과 비슷한 natto의 혈전용해에 대해서는 Sumi 등¹⁰⁾이 natto를 섭취할 때 콩이나 고초균이 갖고 있는 urokinase에 비해 생체내의 혈전 용해능이 증가됨을 발견하고, 이 natto로부터 nattokinase라는 혈전용해효소를 분리, 명명하여 8일간 장내 투여한 결과, 혈전용해능이 점차 증가하여 4일째 가장 높은 수치를 나타내었으며, 혈중 fibrin분해산물의 항원량은 2일째 가장 높은 수치를 나타내다가 점차 감소하였으며, tPA의 항원량은 4일째까지 점차 증가하다가 8일째에는 다소 감소한다고 보고하여 natto를 섭취함으로써 여러 혈관질환을 치료, 예방할 수 있다고 하였고, Urokinase라는 혈전용해제를 투약하는데 1회 투약 량하고 같은 양의 작용효과가 natto 100 g으로 얻을 수 있다고 하였다.

청국장의 혈전용해효소에 대한 연구로는 김 등¹²⁾이 청국장과 natto로부터 혈전용해 균주를 분리하여 혈전용해능을 조사한 결과 청국장에서 분리된 균주가 가장 우수한 혈전용해능을 나타내었고 그 활성은 1.84 pasmin unit였고 이 균주의 형태학적, 생활학적 특성을 조사한 결과 분리균주는 간균으로 운동성이 있으며 포자를 형성하는 것으로 관찰되어 *Bacillus*속에 속하는 미생물로 동정되었다고 하였다.

허 등¹³⁾이 체내 혈액의 응고기작에 의해 생성된 단백질인 fibrin을 분해할 수 있는 효소를 생산하는 *Bacillus* 속의 균을 분리, 정제하여 이 효소의 최적생성조건을 확립한 바 있고 길 등¹⁴⁾과 이 등¹⁵⁾은 청국장에서 혈전을 용해시키는 혈전용해효소를 세포외로 분비하는 *Bacillus*속의 세균 등을 분리하

여 이 효소의 최적생성조건을 확립한 바 있다. 그리고 이 등⁴⁹⁾이 청국장에서 분리한 점질물질의 fibrinolytic activity를 조사하여 *B. natto*가 0.438 unit/mg protein, *B. subtilis*가 0.163 unit/mg protein이었고, 이 효소는 10 0℃에서 5분간 열처리를 하여도 90%의 활성을 유지하고 30분간 열처리하였을 때도 45% 정도의 효소활성을 유지한다고 보고하였다.

2) 항돌연변이 및 항암효과

장류의 항암효과는 원료인 콩에서 유래하는 것과 발효과정에서 분해되거나 새롭게 합성되는 성분에 의해서 나타나는 것으로 여겨진다. 콩에서 유래하는 항암물질로는 protease inhibitor, phytic acid, isoflavones 등이 보고되어 있으며 특히, genistein을 비롯한 대두 isoflavone 성분의 항암효과에 대한 연구는 지속적으로 진행되고 있다. 일본의 龜田¹⁶⁾은 암을 유발시킨 쥐에 낫또(*B. natto*)균을 주입하면 암을 억제한다는 결과를 보고하였으나 그 후의 기작구명에 대한 연구는 수행하지 않았다. 윤 등¹⁷⁾과 정 등¹⁸⁾은 간장, 된장, 고추장, 청국장의 용매추출물을 대상으로 항돌연변이성을 측정된 결과 청국장과 된장의 메탄올추출물이 Aflatoxin B₁의 돌연변이성을 거의 억제함을 확인하였다. 최 등¹⁹⁾은 두부, 콩나물, 두유, 간장, 된장, 청국장, 춘장을 대상으로 대두 가공식품 중의 isoflavone 함량을 조사한 결과 청국장과 된장이 생체 이용성이 우수한 형태인 isoflavone aglycone의 좋은 공급원이라고 보고하였다. 그리고, 손 등²⁰⁾은 청국장의 발효기간이 길어질수록 isoflavone의 함량은 계속적으로 증가하는 경향을 보이고 isoflavone 중 genistein의 함량이 daidzein함량보다 2배 정도 높았음을 보고하였다.

3) 항고혈압

Angiotensin converting enzyme(ACE)은 고혈압 발생기작에서 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I로부터 강력한 혈관수축작용을 갖

는 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효소이다. 또한, ACE는 혈관이완작용이 있는 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다. ACE 저해작용을 갖는 물질에 관해서는 고renin증 환자뿐 만 아니라 정상인에게도 혈압강하작용이 있는 peptide 등이 발견되어 ACE 억제제들이 고혈압 치료제로 개발된 후 ACE 저해제에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 조 등²¹⁾이 청국장 발효 중에 ACE 저해 peptide를 분리, 저해효과를 검토한 바 청국장은 40℃, 60시간 발효시에 ACE 저해율이 최대를 나타냈으며 정제한 peptide의 첨가량이 높아질수록 저해활성이 높았고 0.5 mg정도의 peptide함량으로 94.3%의 저해율을 나타내었음을 보고하였다.

4) 기타 생리활성

대두를 원료로 청국장을 제조하는 경우 발효시 100 g 당 1천억 마리 이상의 양질의 소화효소균(*Bacillus subtilis*)이 생겨 소화흡수율이 높아질 뿐만 아니라 발효과정을 거치면서 본래 콩이 가지고 있는 좋은 성분과 아울러 기존 콩에 없던 다른 유익한 생리활성물질이 더해진다. 청국장 발효의 주역인 *B. subtilis*균은 장내 부패균의 활동을 약화시키고 병원균에 대한 항균작용이 인정되고 있다. 윤 등²²⁾이 청국장 점질물의 생리활성기능을 확인하기 위하여 점질물을 첨가하여 유해미생물의 성장곡선을 관찰한 결과 그람양성세균, 그람음성세균, 효모 등에서 항균작용을 보였다고 하였다. 손 등²⁰⁾이 *Bacillus* 균주를 이용하여 42℃에서 72시간 동안 발효된 검정콩 청국장을 이용한 항균활성시험에서 *B. subtilis*보다는 분리균주 *B. mefaterium* SMY-212균주 첨가구가, 대립 검정콩의 메탄올 추출물이 소립 검정콩의 것보다 항균효과가 우수하였다고 하였다. 또한, 청국장의 수소공여능은 대립 및 소립 검정콩 청국장에서 각각 76.4 및 75.5%를 나타내어 좋은 항산화효과를 보였으며, *B. subtilis* 및 *B. mefaterium* SMY-212를 첨가한 것에서

무첨가인 것보다 보다 수소공여능이 높았고, 아질산염 소거능에서도 대립 검정콩이 소립 검정콩보다 그 효과가 컸다고 보고하였다.

그리고 김 은²³⁾ 인체에 이로운 *B. subtilis*가 부패균의 억제작용으로 부패균에 의해 생성되는 암모니아, 인돌, 아민 등과 같은 발암물질을 감소시켜주는 효과가 있는 동시에 유기산도 생성하므로 장을 자극해 소화활동을 활발하게 해 주며 변비개선과 다이어트에도 탁월한 효과가 있다고 하였다.

III. 실험재료 및 방법

1. 공시재료

본 실험에 사용된 대두는 2001년도 생산 경북농산물원종장 의성분장 생산의 다장콩을 사용하였다. 실험에 사용된 대두의 일반성분은 수분 12.3%, 조단백질 38.1%, 조지방 16.9%, 조섬유 4.8%, 조회분 4.8% 및 가용성 무질소물 23.2%였다.

2. 시료 청국장 제조방법

1) 전통청국장 제조방법

전통적인 방법으로 대두를 세척 후 실온에서 20℃의 수돗물에 12시간 침지하여 물을 빼고 삼각 flask에 넣고 autoclave에서 30분간 증자하여 3~5 cm로 절단한 벧짚을 칸칸이 덮어서 50℃, 72시간 발효시켜 청국장을 제조하였다. 그 과정은 Fig. 1의 I 과 같았다.

2) *Bacillus licheniformis*를 이용한 청국장 제조방법

Bacillus licheniformis JYM-025을 증자한 콩 추출액에 접종하여 40℃, 45℃, 50℃ 및 55℃의 온도별로 24시간 동안 액체배양하여 균의 최적증식온도를 예비실험으로 측정하였다. 실제 청국장 제조시 최적조건 설정을 위하여 증자된 콩에 분리균을 접종한 후 40℃, 45℃, 50℃ 및 55℃로 나누어 48시간 동안 발효시켰으며, 또한 50℃에서 24, 36, 48, 60, 72, 96시간 각각 발효시켜 청국장을 제조하였다. 이들 청국장의 수분, 점질물, 총질소, 수용성질소, TCA 가용성질소, 젖산, 포도당, pH, 갈색도, 색도, 유리아미노산, 휘발성유기산 및 관능검사를 실시하여 이들 중 품질에 영향을 미치는 항목을 선택하여 순위별로 채점하고, 이 점수를 합산하여 청국장 제조시 최적발효조건으로 결정하였다.

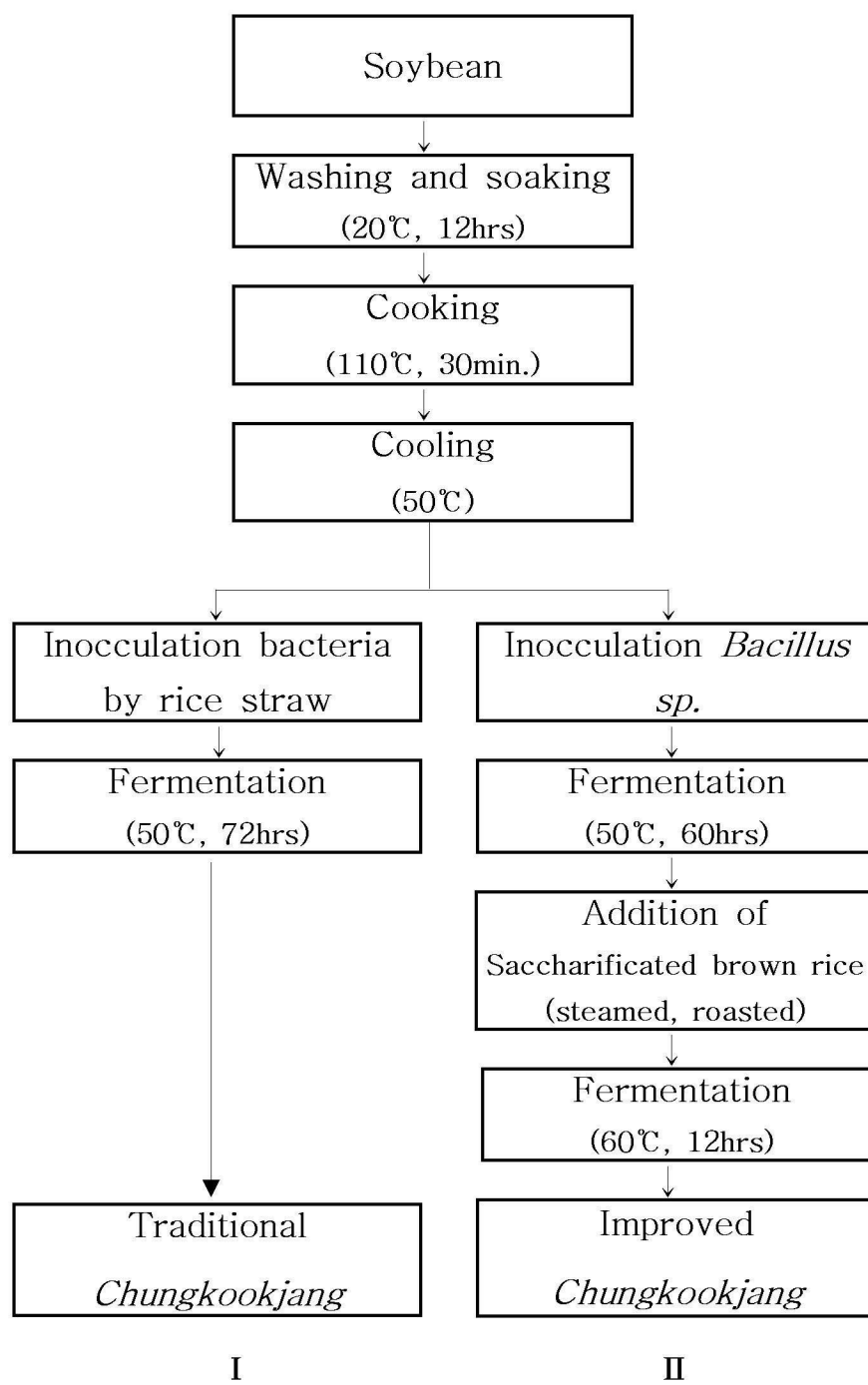


Fig. 1. Making process chart of traditional and improved *Chungkookjang*.

3) 당화현미 첨가 청국장 제조방법

대두를 세척, 수침 후 500 ml 삼각플라스크에 200 g을 투입하고, 고압멸균기에서 110℃에서 30분 동안 증자한 후 50℃로 냉각한 후 분리된 *Bacillus licheniformis* JYM-025균주를 접종하여 50℃로 유지된 항온기에서 60시간 동안 발효시킨 다음 당화시킨 현미를 각각 0, 10, 30, 50% 가하고 60℃에서 12시간 더 발효하여 당화현미 청국장을 제조하였다.

당화현미제로는 엿기름 100 g에 물 900 ml로 상온에서 1시간 추출한 엿기름추출액을 증자현미와 후라이팬에 갈색으로 볶은 현미에 각각 2배 양(v/g)을 첨가하여 water bath상에서 60℃, 12시간 동안 당화시킨 것을 각각 증자당화현미, 볶음당화현미로 하였다. 증자한 콩에 분리한 JYM-025를 접종 후 50℃로 유지된 항온기에서 60시간 발효 후 증자당화현미와 볶음당화현미를 각각의 원료 콩 대비 0, 10, 30 및 50%로 나누어 첨가하고 amylase에 의한 전분의 충분한 분해를 돕기 위하여 60℃로 승온시켜 12시간 더 발효시켜 당화현미 청국장을 제조하였다.

또한, JYM-025를 증자한 콩에 접종한 후 50℃에서 발효시키면서 24시간, 36시간, 48시간 및 60시간 경과 후 각각 증자당화현미를 30% 첨가하고 60℃까지 승온하여 12시간 동안 더 발효하여 청국장을 제조하였다.

4) 당화현미 첨가 청국장 제조

(1) 청국장첨가 찜장

당화현미 청국장 500 g, 참치통조림 60 g, 고추장 25 g, 다진 양파 120 g, 깨소금 30 g, 참기름 30 g, 멸치국물 2컵을 냄비에 모두 넣고 끓여 청국장첨가 찜장을 제조하였으며 제조된 찜장의 관능검사는 오이로 직접 찍어 먹는 방법으로 실시하였다.

(2) 청국장침가 볶음고추장

당화현미 청국장 50 g, 고추장 105 g, 설탕 45 g, 참기름 15 g, 양파 다진 것 50 g, 맛술 30 g, 간장 5 g, 소고기 100 g, 물엿 15 g 소고기를 아주 곱게 갈아서 양파 다진 것과 설탕, 맛술을 조금 넣고 냉장고에 30분쯤 방치하였다. 한편 참기름을 두르고 소고기를 볶다가 고추장을 넣어 계속 볶아주며 후에 간장과 물엿을 넣어 주고 불을 끈 후에 청국장을 넣어 함께 섞어 제품을 완성하였다. 당화현미 청국장침가 볶음고추장의 관능검사는 청국장을 첨가하지 않은 것과 상호비교하기 위하여 직접 찍어 먹는 방법으로 관능검사를 실시하였다

(3) 청국장침가 고기소스

당화현미 청국장 50 g, 버터 15 g, 양파 1/2개, 샐러리 다진 것, 핫소스, 토마토페이스트, 케첩, 우스타소스, 월계수 잎, 흑설탕, 육수 500 ml을 준비하였다. 팬에 버터를 녹인 후에 다진 양파, 샐러리를 넣고 볶다가 토마토 페이스트와 케첩을 넣고 신맛이 사라질 때까지 볶아준 다음 육수를 넣고 가열하여 팔팔 끓으면 우스타 소스와 핫소스, 월계수잎을 넣어주었다. 계속 졸이다가 청국장을 넣어 고기 소스를 완성하였으며 돈가스에 이 소스를 직접 묻혀 먹는 방법으로 관능검사를 실시하였다.

3. 우수균주 선발을 위한 실험방법

전통식 청국장에서 17종의 균주를 분리한 후, protease 활성⁵⁰⁾, amylase 활성⁵¹⁾ 및 관능검사에 의한 불쾌취의 발생유무 등을 측정하여 우수한 균주를 선발하였다.

1) Amylase 활성 측정

효소활성 측정용 효소액은 시료중량의 12배가 되도록 증류수를 넣고 상온

에서 3시간 동안 진탕, 추출한 후 여과(Whatman No. 2)시켜 그 여액을 표준 효소액으로 사용하였다.

Amylase 효소 활성은 Dextrinogenic Unit of Nagase(D.U.N.)법⁵⁰⁾에 준하여 측정하였다. 1% 전분기질액(pH 4.8) 3 mL에 효소액 1 mL를 넣고 40°C 항온수조에서 정확히 10분간 반응시킨 후 반응액 1 mL에 0.1 M HCl 10 mL를 넣어 정지 시켰다. 이 반응 정지액 1 mL에 0.005% I₂-0.05% KI액 10 mL를 넣어 발색시킨 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다

2) Protease 활성 측정

Protease 활성 측정은 Anson⁵¹⁾의 방법을 변형하여 청국장 시료추출액(조 효소액) 1 mL(100 µg/mL)와 0.6% casein 1 mL를 혼합하여 37°C의 항온수조에서 30분간 반응시키고 5% TCA 2.5 mL를 넣어 효소반응을 정지시켰다. 효소활성의 측정은 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 mL, 증류수 3배로 희석한 Folin-ciocalteau 시약 0.5 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응시키고 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 반응액 및 대조구 차이를 Fig. 2의 표준곡선에서 tyrosine 함량으로 환산하여 표시하였다. 활성단위는 효소액 1 mL가 1분간, 1 mg에 상당하는 tyrosine을 생성하는 양을 1 unit로 정의하였다.

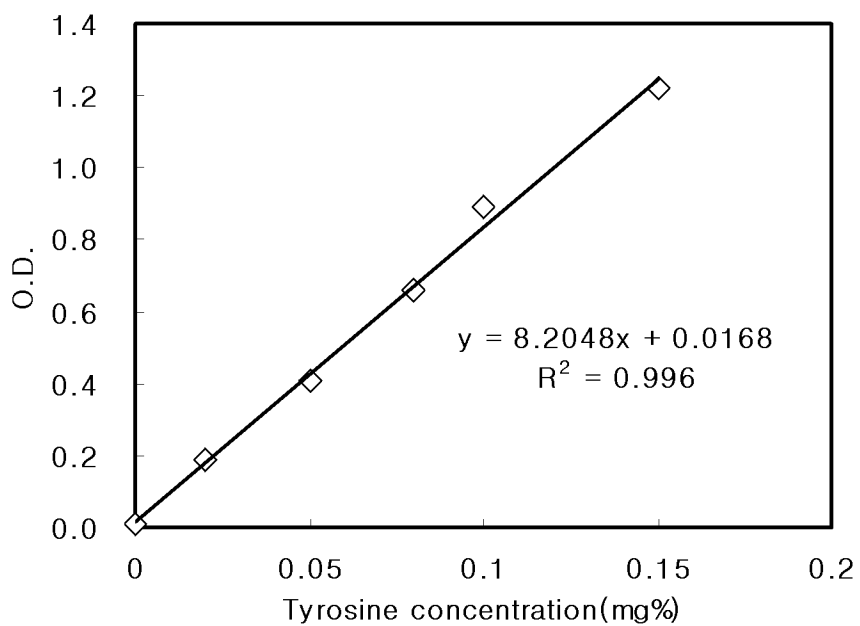


Fig. 2. The standard curve of tyrosine concentration

3) 점질물의 분리 및 함량 측정

점질물의 분리는 이 등⁵²⁾의 방법에 의해 청국장 300 g을 증류수 2 L와 혼합하여 30분간 진탕하고, 여과 및 원심분리(10,000 rpm)하여 상정액을 냉동건조시켜 점질물의 함량으로 하였다.

4) 불쾌취의 발생유무 측정

분리된 균주로 제조한 청국장의 불쾌취 발생유무에 대한 검사는 휘발성유기산의 함량과 선발된 식품가공학과 대학원생 검사요원 10명이 직접 냄새를 맡아보는 관능검사방법으로 불쾌취의 발생유무를 측정하였다.

5) 선발된 균주의 동정

분리된 균은 Bergey's manual of systematic bacteriology⁵³⁾의 방법에 따라 colony의 형태, 색, 크기 등의 형태학적 특성 및 생화학적 특성을 조사하였으며, 동정은 bioMerieux Vitek(France)를 이용하였다.

6) 선발된 균주로 제조된 청국장의 특성조사

분리된 균주를 증자 콩에 접종하여 50℃로 48시간동안 발효시켜 청국장을 제조하였고, 이들 제품의 수분, 점질물, 총질소, 수용성질소, TCA 수용성질소, 젖산, 포도당, pH, 갈색도, 색도, 유리아미노산, 휘발성유기산, 향기성분 및 관능검사 결과를 종합하여 가장 우수한 균주를 선발하여 본 연구의 청국장제조에 이용하였다. 관능검사 요원은 식품가공학과 대학원생 20명을 선발하여 청국장에 대한 관능검사를 실시하였다.

4. 이화학적 특성 측정방법

1) 일반성분 함량 측정

시료의 일반성분 분석은 AOAC⁵⁴⁾법에 따라 수분함량은 105°C 건조법, 조단백질 함량은 *Kjeldahl*법, 조지방 함량은 Soxhlet법, 조회분 함량은 550°C 직접회화법, 조섬유는 원료를 1.25% H₂SO₄와 1.25% NaOH로 분해시킨 후 건조 및 회화시켜 함량을 측정하였다.

2) 총질소량 측정⁵⁴⁾

AOAC법에 따라 Digestion system 1007 Digester(Foss Tecator AB)로 시료 약 5 g을 취하여 황산 25 mL를 가하여 분해시키고 *Kjeldahl* system 1026 Distilling Unit(Foss Tecator AB)를 사용하여 증류한 후 적정하여 소비된 0.1 N NaOH의 mL수를 총질소로 환산하여 양을 구하였다.

3) TCA 가용성질소 함량 측정

청국장 5 g을 증류수 25 mL에 넣은 후 약 5분간 가열 후 10,000 rpm, 30분간 원심분리하여 상층액을 얻고 잔사를 2회 반복하여 추출하고 합한 후 시료를 조제하여 김과 Olson⁵⁵⁾의 방법에 따라 24% trichloroacetic acid(TCA) 10 mL와 시료 10 mL를 혼합한 후 실온에서 30분간 방치하고 원심분리기로 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 상층액을 총질소 실험방법과 동일하게 실험하여 TCA 가용성 질소함량을 측정하였다.

4) 색도 측정

청국장의 색도는 Chromameter CR 300(Minolta, Japan)을 사용하여 직경 5cm의 petridish에 paste상으로 만든 시료를 넣고 Hunter의 L값, a값, b값을

측정하였다. 이 때 사용한 표준판은 $L=97.51$, $a=-0.18$, $b=+1.67$ 의 값을 가진 백색판을 사용하였다.

5) pH 측정

청국장 10 g을 분쇄기로 파쇄하여 초순수 90 mL를 넣어 상온에서 진탕 (200 rpm, 20 min)한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 pH meter(Hanna, U.S.A.)로 pH를 측정하였다.

6) 휘발성 유기산 함량 측정

청국장 10 g을 유발로 파쇄하여 초순수 90 mL를 넣어 상온에서 진탕 (200 rpm, 20 min)한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 membrane filter($0.45 \mu\text{m}$)로 여과한 시료 5.7mL에 2% H_2SO_4 0.3mL를 첨가하여 이 용액 $3 \mu\text{L}$ 를 GC에 주입하였다. 표준물질은 acetic acid, propionic acid, butyric acid를 각각 사용하여 0.1, 0.2, 0.3%로 조제한 후 이 용액 5.7mL와 2% H_2SO_4 0.3mL를 첨가한 후 이 용액 $3 \mu\text{L}$ 를 GC에 주입하여 시험하였으며⁵⁶⁾, 이 때의 분석조건은 Table 1과 같았다.

7) 유리아미노산 함량 측정

청국장 시료 10g을 칭량하여 200mL의 80% ethanol로 85°C에서 환류추출한 후 여과하였다. 이 여액을 감압건고시킨 후 초순수를 첨가하여 100mL로 정용하였다. 청국장 추출액을 아미노산 분석용 Lithium citrate buffer로 20배 희석한 다음 $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter로 여과한 후 아미노산 자동분석기로 Table 2와 같은 조건으로 분리 정량하였다⁵⁷⁾.

8) 갈색도 측정

청국장의 갈색도는 시료 청국장 10g을 유발로 파쇄하여 초순수 90mL를 넣

어 상온에서 진탕(200 rpm, 20 min)한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상정액을 취한 다음 분광광도계(Spectrophotometer, shimadzu co., Japan)를 이용하여 500 nm에서 측정하였다⁵⁸⁾.

Table 1. Operating conditions of Gas Chromatography for volatile organic acid analysis

Instrument	Agilent 6890(Agilant co., USA)
Column packing material	10% PEG 6,000, 60/80
Oven temp.	150 °C
Detector	FID
Injector temp.	200 °C
Detector temp.	220 °C
Carrier gas	N ₂ (20 ml/min.)
Column size	3 mm×2 m(stainless)
Injection volume	1 μ l

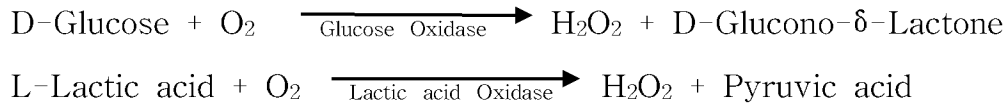
Table 2. Operating conditions of Amino acid analyzer for free amino acid analysis

Instrument	Bio chrom 20 amino acid analyzer
Flow rate	Buffer 20 mL/hr., ninhydrin 20 mL/hr.
Wavelength	440 nm, 570 nm
Column length	4.6×250 mm
Buffer solution	pH2.80-pH3.00-pH3.15-pH3.50-pH3.55
Oven temp.	35°C -74°C -80°C -37°C
Injection volume	20 $\mu\ell$

9) 젓산 및 포도당(Glucose) 함량 측정

Yoda 등⁵⁹⁾의 방법에 따라 청국장 10g을 유발로 파쇄하여 초순수 90ml를 넣어 상온에서 진탕(200 rpm, 20 min)한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 효소막을 이용한 YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer(YSI Inc., U.S.A.)를 이용하여 분석하였다.

이 분석기는 특정성분을 선택적으로 투과하는 효소막을 이용하여 일정농도의 glucose와 lactic acid 성분이 투과하였을 때 생성되는 D-Glucono-Lactone와 Pyruvic acid의 량으로서 나타내 주는 것으로 투과도와 농도와의 관계로부터 시료 농도를 측정하는 기기이다.



10) 향기성분 분석

휘발성 향기성분의 추출은 Schultz 등⁶⁰⁾의 방법에 따라 개량된 Nikerson 형의 연속수증기증류 추출장치를 사용하였다. 청국장 시료 100 g에 초순수 900 mL를 혼합하여 용기에 넣고 상압하에서 2시간 동안 추출하였다. 추출용매는 n-pentane과 ethyl ether의 동량 혼합액 100 mL를 사용하였고, 내부 표준물질은 hydrocarbon 중 청국장 향기성분의 peak와 일치하지 않은 C₂₈을 사용하였다. 무수황산나트륨을 가해 5°C에서 24시간 동안 방치하여 수분을 제거한 다음 회전농축기로 상압하에서 농축하고 GC용 vial에 옮긴 후 질소가스로 100 μ l가 되도록 농축하여 GC/MSD의 분석시료로 사용하였으며 이때의 분석조건은 Table 3과 같았다.

Table 3. Operating conditions of GC-MSD for flavor compounds analysis

Gas Chromatography	
Instrument	Agilent 6890 GC(Agilant co., USA)
Carrier gas	Helium
Column	HP-FFAP(0.20 mm× 50 m)
Oven temp.	50°C(10 min.) - 5°C/min - 200°C - 10°C/min - 245°C(30 min.)
Flow rate	1.0 ml/min.

Mass Selective Detector	
Instrument	Agilent 5973 MSD (Agilant co., USA)
Ion mode	EI (Electron impact ionization)
Source temp.	190°C
Electron energy	70 eV
Library	Wiley 275

5. 청국장의 생리활성 측정

1) 시료 전처리

지금까지의 청국장의 제조방법을 통한 실험을 종합하여 품질특성과 기호도가 가장 우수한 당화현미 청국장을 이용하여 생리활성시험을 아래와 같이 실시하였다. 당화현미를 30% 첨가한 후 제조한 청국장과 무첨가 전통청국장 100g을 유발로 잘 마쇄한 후, 초순수로 상온에서 12시간 교반추출하였다. 이를 원심분리(10,000 rpm, 30 min)한 후 상등액을 동결건조시켜 생리활성 측정용 시료로 사용하였다.

2) 전자공여능(DPPH) 측정

청국장의 항산화작용을 비교하기 위해 전자공여능을 측정하였다. 전자공여작용은 Blois⁶¹⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 각 시료 2ml에 0.2 nM DPPH(1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 1.0ml를 넣고 골고루 혼합한 후 30분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{전자 공여능} = \left(100 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법⁶²⁾에 따라 각 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane + 10 mM EDTA) 3ml와 7.2mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 2.5°C에서 10분간 방치한 후 1 N HCl 0.1ml로 반응을 정지시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의하여 SOD 유사활성을 계산하였다.

$$\text{SOD} = \left(100 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

4) 청국장의 암세포 증식억제효과 측정

(1) 세포배양

본 실험에 이용한 세포 SK-MEL-31 (Malignant melanoma), G361(Melanoma), MDA-MB-231(breast cancer), A549(lung cancer)은 Korean Cell Line Bank(KCLB) 로부터 구입하였다. 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum과 100 units/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 37°C에서 5% CO₂ incubator에 적응시켜 배양하였다.

(2) MTT assay

청국장의 암세포주에 대한 증식억제 효과는 Charmichael 등⁶³⁾의 방법에 준해 N-methylthiotetrazol(MTT) 시험을 실시하였다. 암세포 주를 96 well plate에 1×10⁴ cells/ well이 되게 180 μl 분주하고 각각의 청국장 시료를 2배 희석하여 20 μl 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 48시간 배양하였고, 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT용액 20μl를 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 배양을 종료한 후 각각의 배양액에 well 당 DMSO 150μl를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포주의 성장억제효과를 측정하였다. 세포증식 억제효과는 다음과 같은 계산식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Growth inhibition effect(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

6. 관능검사

청국장 기호도를 조사하기 위하여 청국장 80g, 두부 20g, 마늘 10g, 파 20g, 고춧가루 1g 및 물 500ml를 넣고 가열하여 제조한 청국장 찌개를 시료로 하여 식품가공학과 대학원생 20명을 대상으로 하여, 각 구별로 색, 향기, 구수한 맛, 단맛, 신맛, 종합적 기호도로 항목을 나누고 “아주 좋다(10점), 좋다(8점), 보통이다(6점), 나쁘다(4점), 아주 나쁘다(2점)”으로 구분한 채점 척도 시험법을 이용한 관능검사를 실시하였다⁶⁴⁾.

7. 통계처리 방법

분석된 결과의 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하였으며, 분산분석과 Duncan의 다중검증법으로 유의성을 검증하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. 청국장 제조 우수균 분리 및 선발

1) 균주 분리

전통적인 방법으로 벗짚을 사용하여 제조한 청국장 중 관능적 특성이 우수한 청국장 시료 6점을 대상으로 10배 희석법으로 nutrient agar 배지에 도말한 후 형성된 colony들을 순수분리하고 colony의 형태, 색, 크기 등의 형태적 특징에 따라 균주 17종을 분리하였다. 분리된 17종 균주에 대하여 단백질 및 전분분해력을 측정한 결과 Table 4와 같이 단백질 분해력은 C 419.74 > B 403.36 > E 391.07 > A 370.60 > D는 296.89로 C가 가장 높았고, 전분분해력은 A 7.86 > C 5.66 > E 4.09 > B 2.04 > D는 1.97로 A가 가장 높은 반면 D가 가장 낮아 단백질 분해력과는 다른 양상을 보였다. 단백질 분해력이 우수한 4균(A), 7균(B), 9균(C), 12균(D), 13균(E) 5개의 우수 균주를 선발하였다.

또한, 이들 선정된 5개 균주에 대한 형태학적 특성을 측정한 결과는 Table 5와 같았다. 시험한 5개 균주는 호기적 조건에서 배양하였고 순수분리한 균주를 Gram 염색한 후 oil immersion하여 1,000배 확대하여 그 형태를 관찰한 결과 시료의 종류에 관계없이 모두 Gram 양성균의 간균으로 밝혀졌으며 5개 균주 모두 중앙부분에 아포를 형성하였다. 시각적으로 관찰한 colony의 질감은 C, D 및 E균주는 조면형 집락을 나타내었고 A균주는 섬유상의 형태를 가졌으며 B균주는 점조성의 colony를 나타내었다.

Colony의 고도는 A균주가 약간 평평하면서 융기된 형태였으며 B와 C균주는 flat형으로 완전히 평면에 붙은 상태였고 C와 D균주는 약간 평평하게 융기된 colony의 형태를 나타내었으며 colony의 가장자리 형태는 A균주가 섬유상, B와 C균주는 파동형, D와 E균주는 엽상의 형태를 보였다. 5개 균주

의 형태학적 결과는 전형적인 *Bacillus*속 특징을 보였고 이는 김 등¹²⁾의 연구에서 시판 청국장에서 분리 균주는 *Bacillus sp.*로 동정되었다고 한 결과와 유사한 결과를 보였다.

Table 4. The enzyme activities of protease and amylase in isolated strains from traditional *Chungkookjang*

Group of Strains	protease activity	amylase activity
1	22.36	1.64
2	67.20	6.64
3	171.9	3.56
4(A)	370.60	7.86
5	65.0	2.34
6	74.70	1.65
7(B)	403.36	2.04
8	126.64	4.50
9(C)	419.74	5.66
10	178.46	6.48
11	221.46	3.50
12(D)	296.89	1.97
13(E)	391.07	4.09
14	231.37	5.58
15	244.20	2.85
16	254.22	2.67
17	178.13	3.91

Table 5. Morphological Characteristics of 5 kinds of *Bacillus sp.* isolated from traditional *Chungkookjang* during 2 days at 50°C fermentation

	A	B	C	D	E
Gram stain	+	+	+	+	+
Characteristics	Rod-shape	Rod-shape	Rod-shape	Rod-shape (Pairs or Chains)	Rod-shape (Pairs or Chains)
Formation of spore	+	+	+	+	+
	(center)	(center)	(center)	(center)	(center)
Colony Consistency and Form	Filamentous (Irregular)	Mucosal (Irregular)	Rough and Smooth (Irregular)	Rough (Irregular)	Rough (Irregular)
Colony Elevation	Flat and Raised	Flat	Flat	Raised	Raised
Colony Margin	Filamentous	Undulate	Undulate	Lobate	Lobate

2) 일반성분 함량

선발된 균주 A, B, C, D, E 5개 균주로 제조한 청국장(이하 C_A, C_B, C_C, C_D, C_E 로 약칭함)의 점질성물질 등의 일반성분을 조사한 결과는 Table 6과 같았다.

점질성물질은 혈전용해 등 기능성물질로 최근 들어 활발하게 연구되고 있다⁶⁵⁾. 분리된 각각의 균주로 제조된 청국장의 점질물 함량에 있어서 C_C를 제외한 나머지 모든 구에서 4.72~4.82%로 대조구 4.70%보다 높았고 수용성 질소는 모든 청국장에서 Control 0.90%보다 높은 1.00~1.54%의 함량을 나타냈다. 이 결과는 서³³⁾ 등이 발표한 수용성질소 함량과 비슷한 경향을 보였고, TCA 가용성질소도 수용성질소와 비슷한 결과를 보였으나, C_D 청국장에서는 젖산의 함량이 가장 높고 pH도 낮아 청국장 제조에 적합하지 않은 것으로 판단되었다. .OD값은 C_E가 7.87로 가장 높은 값을 보이므로서 다른 균주들에 비해 색소생성능이 우수하였고, Table 7에서 색차계를 이용한 C_E의 색도는 명도값의 척도를 나타내는 L값이 48.50으로 다른 균주로 제조된 청국장보다 어두운 값을 보여 갈색도의 결과와 동일한 경향으로 C_E균주의 높은 색소생성능을 확인할 수 있었다.

Table 6. Comparison of chemical components among 5 kinds of *Chung-kookjangs* prepared by 5 kinds of *Bacillus* strains during 2 days at 50°C fermentation

(unit : %)

Chemical components	Control ¹⁾	C _A *	C _B *	C _C *	C _D *	C _E *
Moisture	59.77	59.20	59.69	60.27	60.79	60.73
Viscosity substances	4.70	4.72	4.77	4.63	4.82	4.79
Total nitrogen	2.98	3.16	3.10	3.07	2.81	2.78
Water soluble nitrogen	0.90	1.00	1.24	1.54	0.96	0.98
TCA soluble nitrogen	0.82	0.95	1.16	1.33	0.90	0.96
Lactic acid	0.150	0.024	0.015	0.013	0.510	0.051
Glucose	0.008	0.007	0.006	0.005	0.005	0.007
pH	6.33	7.93	7.97	7.59	5.52	7.08
O.D. ²⁾	1.63	6.69	7.27	5.21	1.89	7.87

¹⁾ : *Chungkookjang* made using rice straw, ²⁾ : Optical density

* : *Chungkookjang* prepared made by each strain A, B, C, D, E

Table 7. Hunter's color values of *Chungkookjangs* prepared by 5 kinds of *Bacillus* strains during 2 days at 50°C fermentation

	Control ¹⁾	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E	F-Value
L value	60.13 ^a	51.88 ^d	54.20 ^c	56.97 ^b	55.04 ^{ab}	48.50 ^e	48.82*
a value	5.40 ^a	5.02 ^{abc}	4.24 ^c	4.84 ^{abc}	4.45 ^{bc}	5.12 ^{ab}	2.96*
b value	16.35 ^a	13.06 ^c	14.18 ^b	14.18 ^b	14.52 ^b	15.73 ^a	11.56*

¹⁾ : *Chungkookjang* made using rice straw

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean, n=5, *p < 0.05.

3) 유리아미노산 함량

전통청국장에서 선발한 A, B, C, D, E 5개의 우수균주로 제조된 청국장 (이하 C_A, C_B, C_C, C_D, C_E 로 약칭함)의 유리아미노산 함량은 Table 8과 같이 총 유리아미노산 함량은 C_C균주 1224.79 > C_B균주 1069.11 > C_E균주 947.50 > C_A균주 943.53 > C_D균주 818.41 > Control 769.79 mg%로 Table 4의 단백질 분해력과 같은 경향을 나타냈다. 총 유리아미노산 함량과 총 유리아미노산 함량에 대한 glutamic acid의 비율은 Control 보다 높게 나타나 선발된 균주들의 단백질 분해력이 우수한 결과를 보인다는 것을 입증해 주었다.

유리아미노산의 조성은 Control 에서 Arg > Glu > His > Phe, C_A 에서는 Glu > Phe > Lys > His, C_B와 C_C 에서는 Glu > Phe > His > Lys, C_D 에서는 His > Lys > Phe > Glu, C_E 에서는 Phe > Lys > Glu > His의 순의 결과를 보여 균주별로 발효과정 중 분해되는 아미노산의 조성에 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다.

상기 결과를 비교해 볼 때, control에서는 Arg이 다량 존재하는 것에 비하여 C_A~C_E에서는 함량의 순서는 달라도 Glu, Phe, His, Lys이 공통적으로 높은 경향을 보였다. 권⁶⁶⁾에 의한 아미노산을 맛에 따라 분류해 본 결과, 청국장의 유리아미노산 중 단맛을 내는 아미노산인 Thr, Ser, Gly, Ala, Lys은 C_C가 335.42 mg%로 그 함량이 가장 높았으며, C_D 304.16, C_B 291.46, C_E 233.08, C_A 217.47, control 184.44 mg% 였다. 구수한 맛을 내는 아미노산인 Asp, Glu, Cys의 경우에도 C_C가 198.82, C_A 188.05, C_B와 174.25, control 129.85, C_E 125.93, C_D 118.49 mg%, 쓴맛을 내는 아미노산의 함량은 C_B와 C_C에서 높은 것으로 나타났다.

청국장에 함유된 필수아미노산 중 Thr, Ileu, Leu, Met, Phe, Val, His, Lys의 총 함량은 C_C가 641.8, C_B와 557.66, C_E 473.78, C_A 448.72, C_D 429.02, control이 269.59 mg%로 조사되었다.

Table 9는 총 유리아미노산 함량에 대한 유리아미노산 각각의 비율을 나타낸 것으로 Control의 아미노산 상대비율은 Arg > Glu > His > Phe, C_A는 Glu > Phe > Lys > His, C_B와 C_C는 Glu > Phe > His > Lys, C_D는 His > Lys > Phe > Glu, C_E는 Phe > Lys > Glu > His의 순의 결과를 보여 균주별로 발효과정 중 분해되는 아미노산의 상대적 비율은 상당한 차이를 보였다.

단맛을 내는 아미노산인 Thr은 1.08~7.85% 범위에서 control은 3.31이었고, C_D가 7.85로 가장 높았으며 C_A는 1.08%로 낮았다. Ser은 1.30~3.21%의 범위로 각 구간의 큰 차이를 보이지 않았으나, Gly는 control 5.60%, 각 처리구는 3.16~8.13%의 범위에서 C_B, C_C, C_E가 8.08, 8.13, 7.77%로 다른 구에 비하여 높은 경향을 보였다. Ala은 C_E가 4.66%로 Lys은 C_D가 19.49%로 가장 높은 비율의 결과를 보였다.

구수한 맛의 Glu는 control 15.35%에 비하여 C_A의 비율의 18.22%로 가장 높았으며, Cys는 모든 처리구에서 낮은 비율을 보였다. 쓴맛을 내는 Leu은 C_B 및 C_C가 각각 11.12%, 11.09%로 높게 나타났다. 그 외 아미노산 중 His의 비율은 C_D가 23.28%로 control 및 다른 구에서 8.83~12.26%에 비하여 상당히 높게 나타났다.

필수아미노산 총 함량의 상대비율은 C_A, C_B, C_C, C_D, C_E 각각 47.55, 52.16, 52.41, 52.42, 50.01%로 control 38.53%보다 높은 경향을 보여, 선발된 5균주로 제조한 청국장 중 필수아미노산의 비율이 control에 비하여 높은 경향을 보여 영양적인 면에서 우수함을 알 수 있었다.

Table 8. Free amino acid contents of *Chungkookjangs* prepared by 5 kinds of *Bacillus* strains during 2 days at 50°C fermentation

(unit : mg%)

Taste	Amino acid	Control ¹⁾	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E
Sweet	Thr*	25.50	10.18	50.73	58.07	64.28	30.66
	Ser	24.73	17.22	18.07	20.53	25.36	12.27
	Gly	43.09	29.84	86.4	99.62	33.8	73.6
	Ala	11.25	36.06	31.68	36.6	21.23	44.12
	Lys*	79.87	124.17	104.58	120.6	159.49	116.55
	Total	184.44	217.47	291.46	335.42	304.16	233.08
Savory	Asp	11.67	8.99	22.69	25.53	31.23	17.33
	Glu	118.18	171.87	139.68	159.43	87.26	101.94
	Cys	-	7.19	11.88	13.86	-	6.66
	Total	129.85	188.05	174.25	198.82	118.49	125.93
Bitter	Met*	10.13	25.04	25.94	30.09	12.42	24.22
	Ileu*	12.97	35.02	54.88	63.51	13.1	36.47
	Leu*	54.51	79.95	118.9	135.82	42.79	87.18
	Total	77.61	140.01	199.72	229.42	68.31	147.87
Other	Pro	-	37.15	3.82	2.48	-	57.19
	Val*	26.09	42.96	67.63	77.91	27.84	50.52
	Try	41.98	74.48	83.82	94.85	-	74.35
	Phe*	87.52	128.49	133.24	153.67	108.06	126.40
	His	94.38	107.30	108.74	124.72	190.51	83.65
	Arg	127.93	4.73	4.67	5.37	-	2.6
	Trp*	-	2.91	1.76	2.13	1.04	1.78
	Total	377.9	398.02	403.68	461.13	327.45	396.49
	GA/TA ²⁾ (%)	15.35	18.22	13.07	13.02	10.66	10.76
	Total Essential amino acid	269.59	448.72	557.66	641.8	429.02	473.78
	Total amino acid	769.80	943.53	1,069.11	1,224.79	818.41	947.49

¹⁾ : *Chungkookjang* made using rice straw, ²⁾ : (Glutamic acid/Total amino acid)×100

* : Essential amino acid

Table 9. Relative ratio of Free amino acid content in *Chungkookjangs* cultivated 5 kinds of *Bacillus* strains

(unit : %)

Taste	Amino acid	Control ¹⁾	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E
Sweet	Thr*	3.31	1.08	4.75	4.74	7.85	3.24
	Ser	3.21	1.83	1.69	1.68	3.10	1.30
	Gly	5.60	3.16	8.08	8.13	4.13	7.77
	Ala	1.46	3.82	2.96	2.99	2.59	4.66
	Lys*	10.38	13.16	9.78	9.85	19.49	12.30
	Total	23.96	23.05	27.26	27.39	37.16	29.27
Savory	Asp	1.52	0.95	2.12	2.08	3.82	1.83
	Glu	15.35	18.22	13.07	13.02	10.66	10.76
	Cys	-	0.76	1.11	1.13	-	0.70
	Total	16.87	19.93	16.30	16.23	14.48	13.29
Bitter	Met*	1.32	2.65	2.43	2.46	1.52	2.56
	Ileu*	1.68	3.71	5.13	5.19	1.60	3.85
	Leu*	7.08	8.47	11.12	11.09	5.23	9.20
	Total	10.08	14.83	18.68	18.74	8.35	15.61
Other	Pro	-	3.94	0.36	0.20	-	6.04
	Val*	3.39	4.55	6.33	6.36	3.40	5.33
	Try	5.45	7.89	7.84	7.74	-	7.85
	Phe*	11.37	13.62	12.46	12.55	13.20	13.34
	His	12.26	11.37	10.17	10.18	23.28	8.83
	Arg	16.62	0.50	0.44	0.44	-	0.27
	Trp*	-	0.31	0.16	0.17	0.13	0.19
	Total	39.09	42.18	37.76	37.64	40.01	41.85
Total Essential amino acid		38.53	47.55	52.16	52.41	52.42	50.01
Total		100	100	100	100	100	100

¹⁾ : *Chungkookjang* made using rice straw, * : Essential amino acid

4) 휘발성 유기산, 향기성분과 관능특성

선발된 우수균주 A, B, C, D, E 균주를 증자한 콩에 접종하여 제조한 청국장 시료(이하 C_A, C_B, C_C, C_D, C_E 로 약칭함) 및 전통청국장(Control)의 휘발성 유기산함량 측정결과는 Table 10과 같았다.

총휘발성 유기산함량은 control에서 583.60 mg%로 월등히 높는데 비하여 C_A~C_E는 Control의 1/4~1/10 정도로 총 휘발성 유기산의 함량이 낮게 나타나 전통식 방법에 의한 청국장에서의 바람직하지 못한 냄새가 우수균주 접종으로 개선되었음을 알 수 있었다. 특히, C_D 와 C_E에서는 butyric acid가 거의 검출되지 않은 것으로 나타나 D와 E 균주가 청국장 제조시 가장 우수한 균주인 것으로 판단되었다.

한편, 각종 청국장의 향기성분을 분석한 결과는 다음의 Table 11과 같이 특히, 구수한 향기의 성분으로 밝혀진^{30,32)} trimethyl pyrazine(No. 24)의 함량은 C_E와 C_A에서 가장 높은 경향을 나타내는 한편, 불쾌취를 발생하는 성분인 2, 3, 5, 6-tetramethyl pyrazine(No. 27)의 함량은 C_E와 C_A에서 가장 낮은 결과를 보였다.

또한, Control 과 5종류의 청국장에 있어서 끈적끈적한 성질, 색깔, 풍미, 전체적인 기호도 등에 대한 관능검사의 결과는 Table 12(Fig 3)와 같았다. E 균주로 제조된 청국장의 관능검사 항목 모두에서 청국장간에 유의적으로 가장 우수하게 나타났고, 점질성, 향기 및 종합적 기호도 점수에서 높게 나타나 E 균주로 제조한 청국장 C_E 가 가장 뛰어났다.

Table 10. Volatile organic acids content of *Chungkookjangs* prepared by 5 kinds of *Bacillus* strains during 2 days at 50°C fermentation

(unit : mg%)

Items	Control ¹⁾	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E
Acetic acid	-	-	-	-	-	-
Propionic acid	482.10	93.59	38.41	85.94	68.25	65.84
Butyric acid	101.50	58.44	68.04	186.03	-	-
Total	583.60	152.03	106.45	271.97	68.25	65.84

¹⁾ : *Chungkookjang* made using rice straw

Table 11. Flavor components of *Chungkookjangs* prepared 5 kinds of *Bacillus* strains during 2 days at 50°C fermentation

NO	RT	Flavor components	straw	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E
1	6.41	decane, 2,2,6-trimethyl-	35.27	10.14	-	-	-	7.20
2	7.36	decane, 2,2-dimethyl-	3.00	7.94	0.98	2.25	4.84	4.32
3	7.56	heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	9.80	9.98	1.51	3.47	6.28	6.47
4	8.59	heptane, 2,2,6,6-tetramethyl-4-methylene	0.53	0.84	0.10	-	2.06	0.40
5	11.02	heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	4.32	5.10	0.76	1.76	3.60	3.06
6	12.55	acetic acid, butyl ester	0.00	4.77	-	-	-	1.10
7	13.04	n-hexanal, caproaldehyde	3.78	4.69	0.60	0.56	1.59	0.72
8	13.67	undecane, 2,2-dimethyl	2.97	1.83	0.23	0.48	1.01	1.69
9	15.11	decane, 2,2,8-trimethyl-	4.44	5.11	0.65	1.57	3.31	2.16
10	15.33	benzene, 1,4-dimethyl-, p-xylene	3.56	2.01	0.28	0.40	0.54	1.40
11	15.46	decane, 2,2,5-trimethyl-	1.75	2.35	0.24	0.53	1.35	0.83
12	15.61	benzene, 1,4-dimethyl-, p-xylene	1.89	4.23	0.34	0.60	1.13	2.10
13	15.90	heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	7.45	5.23	0.55	1.34	2.77	2.09
14	16.96	octane, 2,2,6-trimethyl-	6.55	4.75	1.02	0.23	4.33	4.06
15	17.33	2-heptanone	6.63	5.14	0.63	0.76	0.81	1.85
16	17.85	oxazol trimethyl-, 2,4,5-trimethyloxazol	0.75	5.13	0.50	-	-	1.03
17	19.02	2,2,4-trimethyl-3-pentanol, 3-pentanol	12.42	2.05	0.12	0.23	-	2.29
18	19.12	furan, 2-pentyl, 2-amylfuran	6.50	8.97	0.75	1.68	2.58	1.73
19	20.10	3-octaone, octan-3-one	16.77	70.45	4.03	1.47	9.76	20.69
20	21.36	1-propene, 2-methyl-, tetramer,	30.22	31.43	4.15	10.55	21.54	14.72
21	22.54	pyrazine, 2,5-dimethyl-	23.32	24.73	86.15	58.64	8.87	100.19
22	23.26	1-hexanol	16.42	100.28	11.60	21.64	35.71	36.65

(continued)

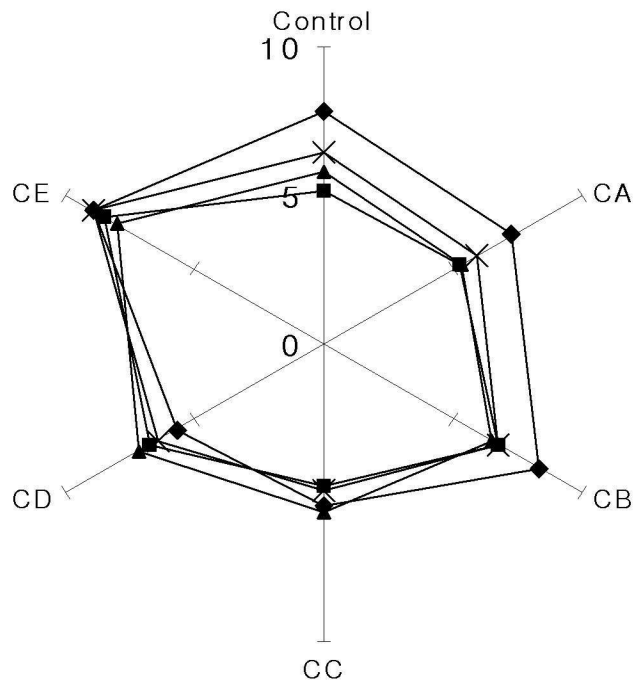
NO	RT	Components	straw	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E
23	24.41	3-octanol, di-3-octanol	1.92	37.31	0.34	0.90	-	2.06
24	25.10	pyrazine, trimethyl-	13.25	45.04	63.00	46.66	14.25	89.81
25	26.27	acetic acid, ethylic acid, vinegar acid	14.73	6.60	2.09	-	0.98	11.69
26	26.68	2,3-dimethyl-5-ethylpyrazine	6.48	2.51	0.49	0.97	0.51	1.42
27	27.11	2,3,5,6 tetramethyl pyrazine	50.80	5.09	31.72	24.83	14.89	3.64
28	28.14	2,3,5-trimethyl-6-ethylpyrazine	5.16	67.29	1.55	5.54	0.54	5.77
29	28.66	benzaldehyde	9.47	4.03	0.06	3.11	0.95	0.58
30	31.10	benzoic acid, methyl ester	1.38	9.80	-	-	-	0.29
31	31.49	7-hexadecene	0.86	3.61	0.09	0.26	0.49	0.48
32	31.67	benzeneacetaldehyde, hyacinthin	1.56	3.43	0.08	2.05	0.68	1.18
33	31.83	butanoic acid, 3-methyl-	2.21	1.96	0.09	0.72	0.66	1.07
34	32.50	cyclopentane, undecylcyclopen	1.06	0.76	-	0.15	-	0.50
35	33.39	1-heptadecene, hyxahydroaplotaxene	4.25	6.28	0.49	0.36	-	0.40
36	34.26	benzeneacetic acid, methyl ester	0.77	3.12	0.10	0.16	-	0.59
37	34.54	octadecane, n-octadecane	2.07	0.50	0.16	0.49	0.82	1.03
38	36.30	2-tetradecanone	2.01	4.83	2.00	1.10	1.04	1.77
39	36.78	benzenemethanol, benzyl alcohol	3.44	1.36	0.15	0.33	0.22	5.01
40	38.77	eicosane, n-eicosane	1.23	1.07	0.11	0.28	0.58	0.71
41	42.06	pentadecanoic acid, 14-methyl-	2.19	2.00	0.21	0.68	1.17	0.89
42	50.55	pentadecanoic acid, pentadecylic acid	17.16	44.48	0.45	1.81	5.33	4.24

Table 12. The sensory evaluations of *Chungkookjangs* prepared by cultivated 5 kinds of *Bacillus* strains during 2 days at 50°C fermentation

	Control	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E	F-value
Viscosity	7.82 ^{bc}	7.29 ^c	8.41 ^{ab}	5.47 ^d	5.71 ^d	8.94 ^a	25.96*
Color	5.12 ^c	5.29 ^c	6.71 ^b	4.76 ^c	6.76 ^b	8.53 ^a	8.34*
Flavor	5.82 ^{cd}	5.35 ^d	6.53 ^{bc}	5.65 ^{cd}	7.18 ^{ab}	8.06 ^a	25.40*
Overall	6.47 ^{bc}	5.94 ^c	6.82 ^b	4.94 ^d	6.47 ^{bc}	8.88 ^a	21.86*

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean, n=20, *p < 0.05.



◆ : Viscosity, ■ : Color, ▲ : Flavor, × : Overall

Fig. 3. The sensory characteristics of *ChungKookjang* cultivated 5 kinds of *Bacillus* strains

5) 청국장 제조시 최적균주 선발

선발된 우수균주 A, B, C, D, E 5개 균주를 사용하여 만든 청국장(이하 C_A , C_B , C_C , C_D , C_E 로 약칭함)을 대상으로 Protease 활성(균주), Amylase 활성(균주), 점질성 물질, 수용성 질소, 유리 아미노산, 휘발성 유기산 함량 및 관능검사를 실시하여 가장 높은 값을 5점으로 하고 가장 낮은 값을 1점으로 하여 총점을 얻은 결과는 Table 13과 같았다. 이 결과에 따라 청국장 제조에 가장 적합한 우수균주를 선발하였다. 여기에서 얻은 총점에 의하여 $C_E > C_B > C_C > C_A > C_D$ 의 순으로 높아 E 균주로 제조한 청국장 C_E 의 품질이 가장 우수한 것으로 판명되었다. 이 E 균주를 세균동정기를 이용하여 판정한 결과 *Bacillus licheniformis*로 판명되어 *Bacillus licheniformis* JYM-025(이하 JYM-025으로 약칭함)로 명명하였다.

Table 13. Total points calculated by each experimental value

Items	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E
Protease activity	2	4	5	1	3
Amylase activity	5	2	4	1	3
Viscous substances	2	3	1	4	5
Water soluble nitrogen	2	4	5	1	3
Free amino acid	2	4	5	1	3
Volatile organic acid	2	3	1	4	5
Sensory	2	4	1	3	5
Total	17	24	22	15	27

The highest level for each experimental value : 5

The lowest level for each experimental value : 1

2. *Bacillus licheniformis* JYM-025 청국장의 최적발효조건 결정

1) 최적발효온도

1) 일반성분 함량

최적 우수균주로 확인된 *Bacillus licheniformis* JYM-025(이하 JYM-025로 약칭함)를 40, 45, 50 및 55°C의 온도별로 액체배지에서 24시간 배양한 다음 세균의 발육상태를 비교하는 예비실험을 실시한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 50°C에서 배양시 균 증식이 가장 왕성한 결과를 보였다.

본 실험으로 JYM-025를 이용하여 실제 청국장 제조시 최적온도를 결정하기 위하여 증자한 콩에 분리한 JYM-025를 접종한 후 40°C, 45°C, 50°C 및 55°C로 나누어 48시간 동안 발효시킨 후 청국장의 일반성분 변화, 색도 및 관능검사를 실시하여 상호비교한 결과는 Table 14와 같았다.

청국장의 점질물 함량은 40°C 4.71%, 45 및 50°C에서는 4.79%로 생성량이 증가하였으나, 55°C로 온도가 상승되면서 4.73%로 감소되는 경향을 보였다. 수용성 질소와 TCA 가용성 질소함량은 40°C에서 각각 0.70%, 0.60%, 45°C에서 1.05%, 0.88%, 50°C에서 1.14%, 1.09%로 증가하였으나, 55°C에서는 0.40%, 0.18%로 감소하여 50°C인 때에 가장 우수한 결과로 나타났다. 이러한 결과는 김 등²⁴⁾과 이 등⁶⁷⁾은 볏짚을 이용하여 청국장을 제조 할 경우 40°C에서 가용성 질소 함량이 높게 나타났다고 보고한 것과 본 연구의 결과는 상이하였으나 분리된 균주 JYM-025는 Fig. 2와 같이 50°C에서 생육이 잘되는 특성 때문인 것으로 추정하였다.

Lactic acid는 온도가 상승할수록 생성량이 감소되어 55°C에서 가장 낮은 함량을 보였고, glucose의 함량은 40~50°C에서는 비슷한 값을 보인 반면 55°C에서 가장 높게 나타났다. 이는 이 온도에서 amylase의 활성이 높아진 때문인 것으로 생각된다.

pH는 온도가 상승하면서 6.87 ~ 7.26으로 알칼리성으로 변화되는 양상을

보였으나 55℃에서는 6.00으로 나타나 오히려 약산성영역이 되었음을 보여 주었다.

또한, 청국장의 발효온도에 따른 색도의 변화는 Table 15와 같이 밝기를 나타내는 L 값은 0(검정색)~100(흰색)으로 표현하는 값으로 55℃에서 61.70으로 가장 높은 것으로 나타나 청국장이 40℃에서 발효시킨 것보다 색이 밝게 나타남을 알 수 있었고, 나머지 발효온도에서는 유사한 값을 보였다. -a(초록), a(붉은색) 값은 40℃ 4.78에서 45℃ 5.23으로 상승하였다가 온도가 50℃, 55℃로 상승하면서 4.23 및 4.72로 감소하는 경향이었고, -b(푸른색), b(노란색) 값은 모든 구에서 유의차가 없는 것으로 나타나, 이들 값을 종합적으로 판단해 볼 때 발효온도가 상승함에 따라 청국장(약간 검정색이 함유된 노란색)의 색은 점점 더 밝게 변해가는 경향을 나타냈다.

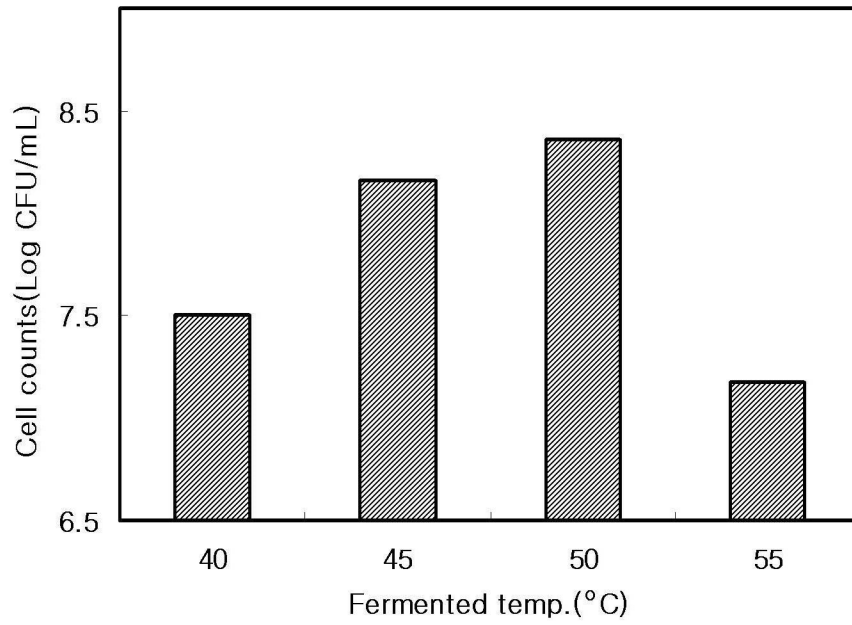


Fig. 4. Effect of temperature on the growth of *Bacillus licheniformis* JYM-025.

Table 14. The changes of chemical components of *Chungkookjang* fermented at different temperature during 48 hours

(unit : %)

Items	40℃	45℃	50℃	55℃
Moisture	62.64	61.07	60.13	61.42
Viscous substances	4.71	4.79	4.79	4.73
Total nitrogen	2.95	3.20	3.18	3.08
Water soluble nitrogen	0.70	1.05	1.14	0.40
TCA soluble nitrogen	0.60	0.88	1.09	0.18
Lactic acid	0.067	0.091	0.054	0.028
Glucose	0.007	0.009	0.007	0.298
pH	6.87	7.13	7.26	6.00
O.D.	5.07	7.93	7.95	2.70

Table 15. Hunter color values of *Chungkookjang* fermented with different temperature during 48 hours

	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C	F-Value
L value	57.64 ^{ab}	56.84 ^b	56.20 ^b	61.70 ^a	3.66*
a value	4.78 ^b	5.23 ^a	4.23 ^c	4.72 ^b	10.24*
b value	15.27 ^a	14.53 ^a	14.90 ^a	15.85 ^a	1.46

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean. n=5, *p < 0.05

2) 유리아미노산 함량

청국장 발효온도에 따른 유리아미노산 함량의 변화는 Table 16에서 보는 바와 같이 총 아미노산 함량은 $50^{\circ}\text{C} > 45^{\circ}\text{C} > 40^{\circ}\text{C} > 55^{\circ}\text{C}$ 의 순서를 보여서 가용성 질소의 변화와 같은 양상을 보였다. 모든 제조구의 아미노산 함량은 phe, lys, leu, his, tyr, glu 및 gly의 함량이 높게 나타났다. 김 등⁸⁾은 벧짚을 이용하여 청국장 발효시간별 아미노산함량 변화를 측정된 결과 40°C , 48시간에서는 phe과 leu의 함량이 높았고, 72시간 발효시킨 구에서는 glu의 함량이 급격히 증가하였고, 50°C 에서는 phe, lys 및 leu 등의 함량이 높았다고 하였다. 성 등⁶⁸⁾은 증자대두에 *Bacillus natto*를 접종하여 36°C 에서 72시간 발효시킨 후 유리아미노산의 변화를 측정된 결과, phe과 leu 등의 함량이 높았다고 한 이들 보고와 유사한 경향을 보여 주었다.

발효온도에 따른 단맛, 구수한 맛, 쓴맛 및 그 외의 아미노산의 함량은 50°C 발효한 청국장에서 가장 높은 결과를 보였으며, 필수아미노산의 함량도 같은 경향을 나타냈으나, 단맛 아미노산인 Lys은 45°C 에서 50°C 보다 높은 함량을 보였다. 총 아미노산에 대한 Glu의 비율은 모든 구에서 비슷한 경향을 보여주었다.

청국장의 발효온도에 따른 총 아미노산에 대한 각 유리아미노산의 상대비율은 Table 17에서 보는 바와 같이 단맛을 나타내는 아미노산의 총 함량 비율은 45°C 및 50°C 에서 각각 28.52 및 28.77%로 다른 구에 비하여 높았으나, Lys의 경우는 40°C 15.11%, 45°C 14.06%로 50°C 의 11.37%보다 높은 경향으로 나타났다. 구수한 맛 아미노산은 모든 구에서 비슷한 경향이었고, 쓴맛 아미노산은 45°C 및 50°C 에서 각각 16.38 및 16.31%로 높은 결과를 보였다. 8종의 필수아미노산의 총 아미노산에 대한 비율은 $40 \sim 55^{\circ}\text{C}$ 발효온도 중 낮은 온도일수록 소폭 높게 나타났고, Phe와 His은 40°C 에서 높은 경향을 보였다.

Table 16. Free amino acid contents of *Chungkookjang* fermented with different temperature during 48 hours

(unit : mg%)

Taste	Amino acid	Fermented temp.(°C)			
		40	45	50	55
Sweet	Thr*	11.79	18.24	35.79	5.68
	Ser	1.91	18.76	29.43	1.86
	Gly	33.86	62.83	76.72	6.57
	Ala	11.77	21.40	46.88	2.56
	Lys*	83.77	128.24	123.31	19.83
	Total	143.1	249.47	312.13	36.5
Savory	Asp	6.90	9.42	16.85	1.39
	Glu	45.24	74.12	88.21	11.81
	Cys	4.56	4.97	8.79	2.45
	Total	56.70	88.51	113.85	15.65
Bitter	Met*	12.74	20.88	28.24	1.81
	Ileu*	12.84	30.43	39.64	10.00
	Leu*	52.34	91.97	109.13	4.96
	Total	77.92	143.28	177.01	16.77
Other	Pro	40.19	48.01	64.39	-
	Val*	24.31	45.44	56.23	3.50
	Try	44.63	70.55	93.50	15.22
	Phe*	88.31	122.30	154.68	25.81
	His	77.42	100.47	106.04	13.46
	Arg	1.62	4.45	3.76	16.11
	Trp*	0.33	2.34	3.24	0.79
Total	276.81	393.56	481.84	74.89	
GA/TA** (%)		8.16	8.47	8.13	8.21
Total Essential amino acid		286.43	459.84	550.26	72.38
Total Amino acid		554.53	874.82	1084.83	143.81

* : Essential amino acid, ** : (Glutamic acid/Total amino acid)×100

Table 17. Relative ratio of Free amino acid content in *Chungkookjang* fermented with different temperature during 48 hours

(unit : %)

Taste	Amino acid	Fermented temp.(°C)			
		40	45	50	55
Sweet	Thr*	2.13	2.09	3.30	3.95
	Ser	0.34	2.14	2.71	1.29
	Gly	6.11	7.18	7.07	4.57
	Ala	2.12	2.45	4.32	1.78
	Lys*	15.11	14.66	11.37	13.79
	Total	25.81	28.52	28.77	25.38
Savory	Asp	1.24	1.08	1.55	0.97
	Glu	8.16	8.47	8.13	8.21
	Cys	0.82	0.57	0.81	1.70
	Total	10.22	10.12	10.49	10.88
Bitter	Met*	2.30	2.39	2.60	1.26
	Ileu*	2.32	3.48	3.65	6.95
	Leu*	9.44	10.51	10.06	3.45
	Total	14.06	16.38	16.31	11.66
Other	Pro	7.25	5.49	5.94	0.00
	Val*	4.38	5.19	5.18	2.43
	Try	8.05	8.06	8.62	10.58
	Phe*	15.93	13.98	14.26	17.95
	His	13.96	11.48	9.77	9.36
	Arg	0.29	0.51	0.35	11.20
	Trp*	0.06	0.27	0.30	0.55
	Total	49.92	44.98	44.42	52.07
Total Essential amino acid		51.67	52.57	50.72	50.33
Total		100	100	100	100

* : Essential amino acid

3) 휘발성 유기산 함량 및 관능적 특성

청국장의 발효온도에 따른 휘발성 유기산 함량 및 관능적 특성을 측정한 결과는 Table 18 및 19(Fig. 5)와 같았다.

Table 18에서는 청국장의 향기성분 중 불쾌취를 나타내는 주성분인 propionic과 butyric acid의 함량을 보면, propionic acid는 40℃에서 605.31 mg%로 대단히 높은 함량을 보였으나, 50℃에서는 크게 떨어져 가장 낮은 36.52 mg% 함량을 보였다. 여기에서 *JYM-025*는 50℃에서 청국장에서 바람직하지 못한 냄새에 기여하는 propionic acid의 함량을 크게 감소시키는 것을 알 수 있었다. 또한, butyric acid는 45℃ 이하에서는 검출되지 않았으나 50℃, 55℃인 때 85mg% 정도가 검출되어 고온에서 미량 생성되는 것으로 나타났으나 청국장의 바람직하지 못한 냄새에 큰 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

각각의 발효온도에서 제조된 청국장의 관능적 특성을 측정한 결과는 Table 19와 같이 점성은 40℃ 5.67에서 45℃ 50℃까지는 각각 8.33, 8.17로 온도가 증가함에 따라 증가하였으나 55℃에서는 3.33으로 크게 감소하였다. 색은 대체로 온도 증가에 따라 증가한 반면 풍미는 50℃까지는 증가하다가 55℃에서는 크게 감소하였다. 전체적인 기호도는 점성, 색 및 풍미와 같이 50℃까지는 증가하다가 55℃에서는 크게 감소하였다. 이로써 청국장 제조시 발효온도를 50℃로 하는 것이 점성, 색, 풍미 및 전체적인 기호도에서 가장 우수한 것으로 나타났다.

위의 결과들을 종합하면 *JYM-025*를 이용하여 청국장을 제조할 때의 최적발효온도를 결정하기 위하여 점질물 함량, 수용성 질소 함량, 유리아미노산 및 휘발성 유기산 함량, 관능검사 결과를 점수화하여 합산한 결과는 Table 20 과 같았다. 이 때 가장 높은 값을 4점으로, 가장 낮은 값을 1점으로 하였다. 그 결과는 50℃일때 총점이 20점으로 가장 높아 *JYM-025*의 최적발효온도로 50℃가 가장 좋다는 결과를 얻을 수 있었다. 이 결과는 Table

16의 유리아미노산 함량, Table 18의 휘발성 유기산 결과 및 Table 19의 관능적 특성과 결과가 일치된 것으로 나타났다.

Table 18. Volatile organic acids contents of *Chungkookjang* fermented with different temperature during 48 hours
(unit : mg%)

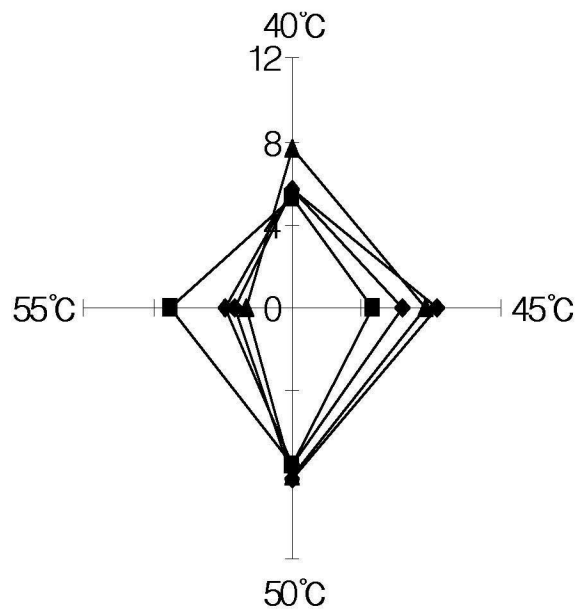
Volatile organic acids	40℃	45℃	50℃	55℃
Acetic acid	-	-	-	321.23
Propionic acid	605.31	363.55	36.52	138.69
Butyric acid	-	-	85.52	85.72
Total	605.31	363.55	122.04	545.64

Table 19. The sensory evaluations of *Chungkookjang* fermented with different temperature during 48 hours

Sensory	40°C	45°C	50°C	55°C	F-value
Viscous	5.67 ^b	8.33 ^a	8.17 ^a	3.33 ^c	76.07
Color	5.33 ^b	4.67 ^b	7.50 ^a	7.00 ^a	21.28
Flavor	7.67 ^a	7.67 ^a	8.00 ^a	2.67 ^b	98.33
Overall	5.67 ^b	6.33 ^b	7.50 ^a	3.83 ^c	31.36

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean. n=5, * p < 0.05



◆ : Viscous, ■ : Color, ▲ : Flavor, × : Overall

Fig. 5. The sensory evaluations of *Chungkookjang* fermented with different temperature during 48 hours

Table 20. The Total points calculated by each value obtained from experimental determination

Items	Fermented Temp.(°C)			
	40	45	50	55
Viscous substance	2	4	4	1
Water soluble nitrogen	2	3	4	1
Free amino acid	2	3	4	1
Volatile organic acid	2	3	4	1
Sensory	2	3	4	1
Total	10	16	20	5

The highest level for each experimental value : 4

The lowest level for each experimental value : 1

2) 최적발효기간

JYM-025를 이용한 청국장 제조 최적발효기간을 결정하기 위하여 JYM-025의 최적온도로 결정된 50℃에서 발효기간을 24, 36, 48, 60, 72 및 96시간으로 각각 발효시키면서 발효시간에 따른 청국장의 품질특성을 측정하였다.

(1) 일반성분 함량

청국장 발효시간에 따른 청국장의 일반성분의 함량변화는 Table 21에서 보는 것과 같았다. 여기에서 나타난 바와 같이 발효기간이 증가함에 따라 점질성 물질의 양은 증가하였으며 특히, 60시간 발효기간인 때에 최대의 값을 보인 후 96시간까지 거의 유사한 값을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 수용성 질소와 TCA 가용성질소의 함량변화는 Fig. 6과 같았다

수용성 질소와 TCA 가용성질소의 함량은 모두 60시간까지는 급격히 증가하나 60시간 이후부터는 완만한 증가추세를 보여주었다. 주발효시간이 24시간인 때 수용성 질소와 TCA 가용성질소의 양이 각각 0.61과 0.46%이던 것이 60시간에서 1.02와 0.84%로 크게 증가하고, 96시간에는 각각 1.05, 0.91%로 나타나 60시간 이후 약간 증가하나 거의 같은 값이 유지되었다. 이와 같은 결과는 서 등³⁴⁾은 35~37℃에서, 서 등³⁵⁾은 40℃에서 72시간 동안 *bacillus subtilis* 와 *natto*을 이용한 청국장 발효기간 중 수용성질소의 함량변화는 36~48시간에 급격하게 상승하고 이후 서서히 증가하였다는 보고와는 조금 차이를 보였다. 이는 균주의 특성과 발효온도의 차이에 의한 것으로 되는 한편 전반적인 수용성질소의 발효기간이 경과함에 따른 증가경향은 유사한 것으로 나타났다.

또한, Glucose 함량은 24시간 발효시 0.018%이던 것이 36시간에 0.005%로 크게 감소하였고 그 후 발효시간이 경과함에 따라 소폭 감소하는 경향으로 나타났으며, pH는 24시간 발효시에 7.45이다가 96시간에서 8.63으로 나타

나 alkaline protease의 작용을 확인할 수 있었다. 이와 같은 발효시간의 경과에 따른 Glucose와 pH 결과의 변화는 서 등³⁵⁾의 결과에서 청국장 메주발효초기에 pH가 6.37에서 시간이 경과함에 따라 48시간에 8.32, 72시간 후에는 8.19를 나타내었고, 환원당은 0.04%에서 서서히 증가하여 발효 24시간 후에 0.72%를 나타낸 결과와 유사한 경향의 양상을 나타냈다. 또한, 젖산은 발효시간에 따른 변화를 거의 나타내지 않았다.

Table 21. The amounts of chemical components of *Chungkookjang* by different fermented period at 50°C

(unit : %)

Items	Fermented time(hrs)					
	24	36	48	60	72	96
Moisture	54.24	55.10	54.26	54.84	54.82	53.83
Viscous substances	4.48	4.63	4.77	4.87	4.85	4.81
Total nitrogen	3.10	3.12	3.27	3.47	3.48	3.42
Water soluble nitrogen	0.61	0.82	0.84	1.02	1.04	1.05
TCA soluble nitrogen	0.46	0.52	0.67	0.84	0.88	0.91
Lactic acid	0.008	0.008	0.008	0.011	0.009	0.01
Glucose	0.018	0.005	0.004	0.003	0.002	0.001
pH	7.45	7.95	8.30	8.33	8.40	8.63

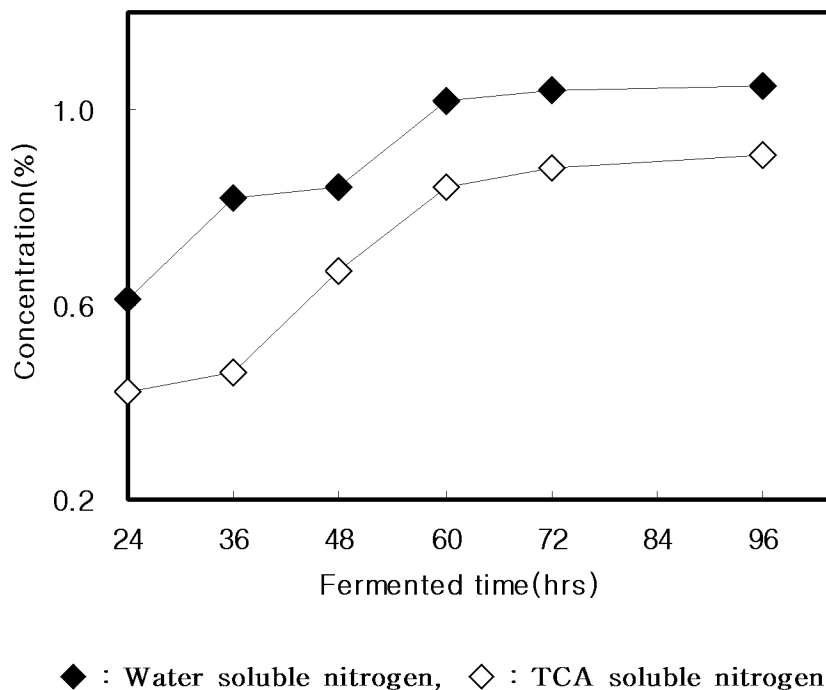


Fig. 6. The Changes of Water soluble nitrogen and TCA soluble nitrogen contents of *Chungkookjang* by different fermented period at 50°C.

(2) 색도

청국장 제조시 50℃에서 발효시간을 달리하여 색도의 변화를 측정한 결과는 Table 22와 같았다.

Fig. 7 및 8을 보면 발효개시에서 48시간까지는 명도를 나타내는 L-value, 적색도를 나타내는 a-value, 황색도를 나타내는 b-value 모두에서 일정한 값을 나타내거나 서서히 감소하는 경향을 보였으나, 60시간 발효된 것에서는 L-value가 크게 떨어져 최소값을 보였으며 60시간 이후에서는 그 값을 거의 유지하는 것으로 나타났다. a-value, b-value는 48시간에서 60시간의 발효시에 급격히 감소한 값을 보였으나 그 이후의 발효시간에서는 서서히 감소하는 양상을 보였다. 이러한 결과에서 발효시간이 길어짐에 따라 황색과 적색이 감소하고 어두운 색을 나타내게 된다는 것을 확인할 수 있었다.

Table 22. The changes of color values of *Chungkookjang* by different fermented period at 50°C

Color values	Fermented time(hrs)						F-Value
	24	36	48	60	72	96	
L value	51.78 ^a	51.77 ^b	52.20 ^c	49.76 ^d	49.88 ^d	49.39 ^e	73.43*
a value	5.87 ^a	5.86 ^c	5.88 ^{bc}	5.78 ^a	5.58 ^a	5.46 ^{bc}	4.43*
b value	14.99 ^a	14.91 ^b	14.78 ^{ab}	13.96 ^{ab}	13.64 ^{ab}	13.20 ^c	8.83*

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean. n=5, *p < 0.05.

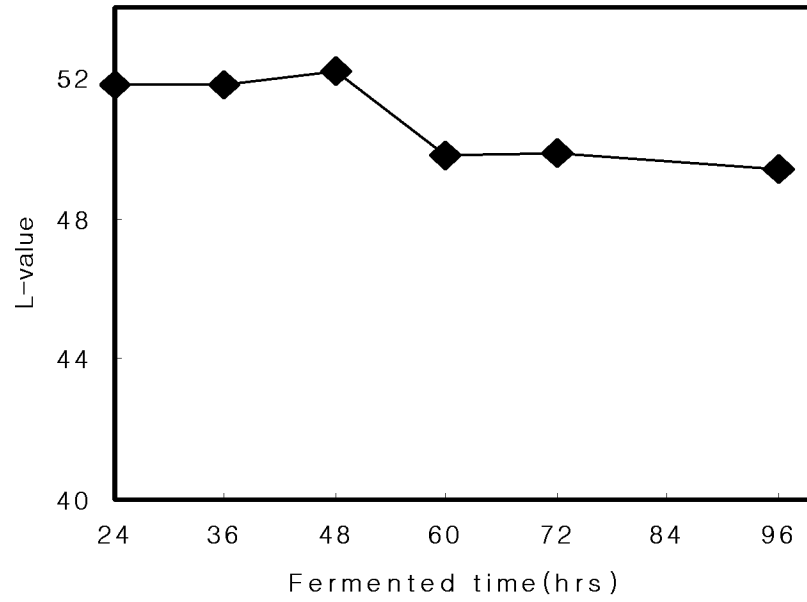


Fig. 7. The changes of L-values *Chungkookjang* during different fermented period at 50°C.

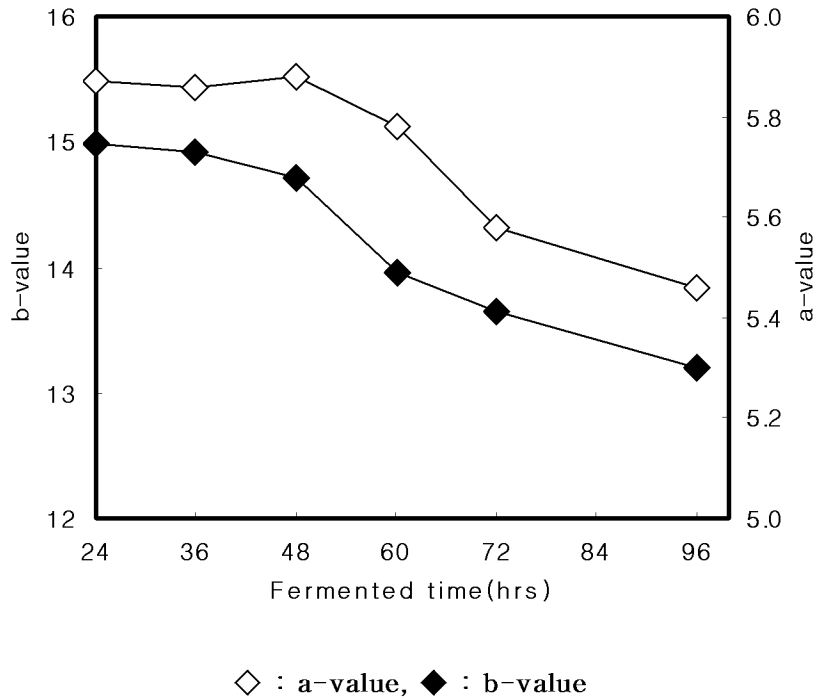


Fig. 8. The changes of a-values and b-values of *Chungkookjang* during different fermented period at 50°C.

(3) 휘발성 유기산, 유리아미노산 함량 및 관능검사

청국장의 불쾌취의 발생정도를 확인하게 위하여 발효시간에 따른 휘발성 유기산의 함량의 변화를 측정 한 결과는 Table 23과 같았다.

청국장의 발효시간이 경과함에 따라 휘발성유기산의 함량은 점차 감소하는 경향으로 나타났다. 발효 개시 24시간에 총 휘발성 유기산 함량이 2668.71 mg% 였던 것이 발효 60시간에는 798.41 mg%로 급격하게 감소되는 현상을 보였고 발효 96시간에서 가장 낮은 192.62 mg%(7.2%)만이 잔존하는 것으로 나타나 발효시간이 길수록 불쾌취가 감소함을 알 수 있었다.

또한, 발효시간을 달리하여 50℃에서 발효하여 제조한 청국장의 관능검사를 실시한 결과는 Table 24와 같이 발효시간이 60시간까지 경과함에 따라 종합적 기호도를 포함한 모든 항목에서 점차적으로 유의적인 수준에서 평점이 올라갔으며 60시간 발효된 청국장에서 가장 우수한 점수를 보였다. 60시간 이후의 발효구에서는 유의적으로 점수가 떨어지는 것으로 72시간 및 96시간 발효 청국장의 수용성질소 함량은 증가되고 기호도도 60시간 발효구보다 낮은 점수로 나타났으며, 특히 향기에 관한 기호도가 급격히 낮아진 것으로 나타났으며 이러한 현상은 발효기간이 길어짐에 따라 암모니아의 생성량이 증가되는 것에 기인한 것으로 사료된다. 최 등⁶⁹⁾은 *Bacillus subtilis*를 이용하여 40℃에서 96시간 발효시키는 동안 성분변화를 조사한 결과 propionic acid의 함량은 발효기간의 증가에 더불어 감소하였다고 한 것과 본 연구결과가 일치하는 것으로 나타났다. 또한, 청국장의 발효시간에 따른 유리아미노산의 함량의 변화는 Table 25와 같았다.

청국장의 발효시간에 따른 총 아미노산 함량의 변화는 발효시간이 24시간에서 60시간 경과시 2배로 증가되었으며, 각 개별아미노산은 Glu, Gly, Leu, Phe, His, Lys의 함량이 전체적으로 높은 비율을 차지하였으며, 총 함량이 24시간과 60시간 발효구간에 2배 정도 차이가 나타난 것은 최 등⁶⁹⁾의 *Bacillus subtilis*를 이용하여 실험한 결과 24~48시간 발효시에 10배 이상

증가하는 양상과는 본 실험결과는 약간 낮게 나타났다. 이러한 현상은 사용 균주 및 발효온도의 차이에 의한 때문인 것으로 사료되며 주된 아미노산이 Phe, Lys 및 Leu 등 이었다는 것과는 일치하였다. 관능검사 결과에서도 종합적 기호도가 48시간과 60시간일 때 가장 우수한 것으로 나타난 것과는 일치하였다. 단맛, 구수한 맛, 쓴맛 및 그 외 아미노산의 함량은 각각 발효시간이 긴 60시간까지는 큰 폭으로 증가하는 경향이었으나, 72시간에서 96시간에서는 소폭의 증가가 이루어졌다. 필수아미노산의 함량은 발효기간이 길어질수록 계속 증가하는 경향으로 나타났다.

*JYM-025*를 이용하여 청국장을 제조할 때의 최적발효기간을 결정하기 위하여 앞에서 측정한 점질물함량, 수용성질소 함량, 유리아미노산 및 휘발성 유기산 함량, 관능검사결과를 점수화 하여 총점을 얻고 이에 의하여 결정하였다. 이때 각 실험측정에서 얻은 최고의 값을 6점으로 하고 가장 낮은 값을 1점으로 하여 환산하였으며 그 결과는 Table 26과 같았다.

Table 26에서 나타난 바와 같이 *JYM-025*로 청국장을 제조하는 경우 적절한 발효기간은 60시간으로 나타났다. 이 결과 *JYM-025*로 청국장을 제조할 때 최적발효조건은 50℃에서 60시간임을 알 수 있었다.

Table 23. The changes of volatile organic acids contents of *Chungkookjang* by different fermented period at 50°C

(unit : mg%)

Items	Fermented time(hrs)					
	24	36	48	60	72	96
Acetic acid	1492.91	1139.07	797.34	554.05	147.13	135.03
Propionic acid	1175.80	625.32	412.65	244.36	120.62	57.59
Buytric acid	-	-	-	-	-	-
Total	2668.71	1764.39	1209.99	798.41	267.75	192.62

Table 24. The sensory evaluations of *Chungkookjang* by different fermented period at 50°C

Items	Fermented time(hrs)						F-Value
	24	36	48	60	72	96	
Viscosity	5.10 ^e	5.70 ^d	7.20 ^c	8.80 ^a	7.80 ^b	7.70 ^b	34.66
Color	7.40 ^b	7.40 ^b	7.90 ^{ab}	8.06 ^a	5.70 ^c	4.70 ^d	65.85
Flavor	6.50 ^b	5.40 ^c	7.80 ^a	8.50 ^a	5.40 ^c	4.70 ^c	32.45
Overall	6.10 ^b	6.50 ^b	7.90 ^a	8.40 ^a	5.90 ^b	5.00 ^c	30.04

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean. n=20, *p < 0.05

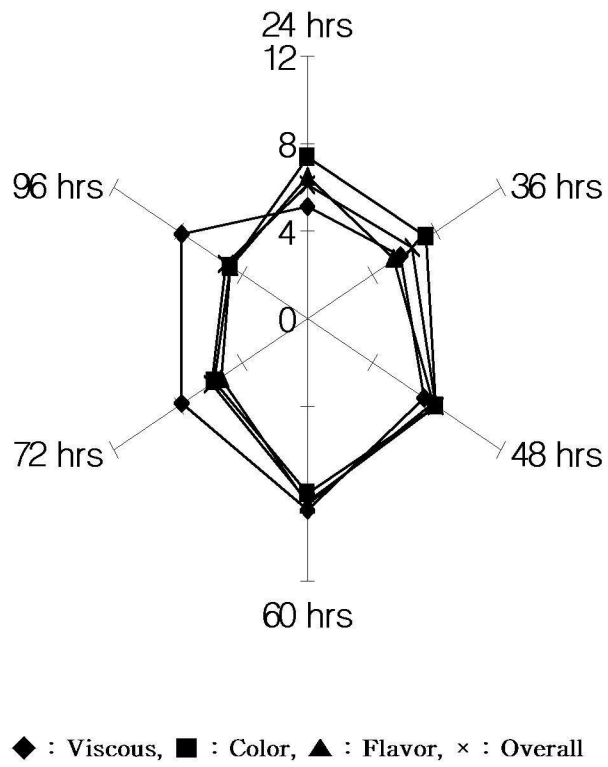


Fig. 9. The sensory evaluations of *Chungkookjang* by different fermented period at 50°C

Table 25. The changes of Free amino acid contents of *Chungkookjang* by different fermentation period at 50°C

(unit : mg%)

Taste	Amino acid	Fermented time(hrs)					
		24	36	48	60	72	96
Sweet	Thr	14.10	15.73	19.82	26.87	27.38	35.79
	Ser	8.16	6.30	11.35	15.25	15.84	19.43
	Gly	48.10	37.77	62.85	78.62	83.39	76.72
	Ala	23.88	22.64	39.44	42.22	46.36	46.88
	Lys	47.92	59.81	75.79	96.49	93.03	93.31
	Total	142.16	142.25	209.25	259.45	266	272.13
Savory	Asp	7.42	8.90	13.16	14.64	14.41	16.85
	Glu	50.05	52.31	79.23	85.06	87.17	88.21
	Cys	2.21	3.42	1.78	4.99	4.29	8.79
	Total	59.68	64.63	94.17	104.69	105.87	113.85
Bitter	Met	9.50	12.43	12.56	19.60	18.45	28.24
	Iso	19.07	18.71	30.54	34.24	37.03	39.64
	Leu	41.28	44.74	52.04	77.56	80.14	79.13
	Total	69.85	75.88	95.14	131.4	135.62	147.01
Other	Prol	17.37	29.35	22.05	41.26	43.72	44.39
	Val	24.77	25.93	38.00	45.79	48.09	56.23
	Try	29.24	38.16	32.64	60.23	56.76	56.50
	Phe	45.87	42.92	67.48	80.63	89.06	84.68
	His	43.65	64.86	80.97	96.40	84.75	96.04
	Arg	10.35	6.98	13.46	11.35	20.09	13.76
	Try	0.87	0.91	1.37	1.61	1.69	3.24
	Total	172.12	209.11	255.97	337.27	344.16	354.84
GA/TA ²⁾ (%)		5.69	5.37	6.11	5.15	5.16	5.02
Total essential amino acid		238.38	221.18	297.6	382.79	394.87	420.26
Total Amino acid		443.80	491.86	654.53	832.78	851.65	887.81

* : Essential amino acid, ** : (Glutamic acid/Total amino acid)×100

Table 26. The total points calculated by each value obtained from experimental determination

Items	Fermented time(hrs)					
	24	36	48	60	72	96
Viscous substances	1	2	3	6	5	4
Water soluble nitrogen	1	2	3	4	5	6
Free amino acid	1	2	3	4	5	6
Volatile organic acid	1	2	3	4	5	6
Sensory	3	4	5	6	2	1
Total	7	12	17	24	22	23

The highest level for each experimental value : 6

The lowest level for each experimental value : 1

3. 청국장 품질개선을 위한 당화현미 첨가효과

앞의 2항의 결과에서 *JYM-025*을 이용하여 청국장을 제조하는 경우 최적 발효온도와 발효기간을 50℃에서 60시간 발효할 때 가장 우수한 것으로 나타났다. 청국장에 여전히 남아있는 바람직하지 못한 냄새가 감소되지 않아 더욱 폭 넓은 청국장의 이용을 유도하기 위하여 제조법을 개발하는 방법의 하나로 맥아로 당화시킨 당화현미를 청국장 발효기간 중에 첨가하여 불쾌취를 감소시키고, 품질특성을 측정하여 품질을 개선하고자 당화현미 첨가효과를 검토하였다.

즉, 현미를 수세·수침한 후 증자한 현미와 후라이팬에서 갈색으로 볶은 현미 각각 2 종류로 분리한다. 이어서 100g의 맥아를 물 900ml로 상온에서 1시간 추출한 맥아즙을 증자현미와 볶은 현미에 대하여 1 : 2의 비율로 첨가하여 60℃ 12시간 당화시킨 증자한 당화현미와 볶은 당화현미를 청국장 제조시 사용하였다. 당화현미의 첨가량은 콩의 무게에 대하여 0, 10, 30 및 50%로 첨가하여 대조구(0%)와 품질특성을 비교하였다.

1) 현미당화방법 및 당화현미 첨가량 결정

(1) 일반성분 함량 및 색도

*JYM-025*를 증자 콩에 접종한 후 50℃로 유지된 항온기에서 60시간동안 발효시키면서 당화현미(증자현미 첨가구 및 볶음현미 첨가구)를 비율별로 첨가하여 제조한 청국장의 품질특성을 비교한 결과는 Table 27과 28과 같았다.

수분 함량은 대조구 보다 당화현미 첨가구에서 높게 나타나 당화현미의 첨가로 수분 보수력이 향상되었으나, 총질소의 함량은 대조구가 3.92%, 증자 현미첨가구에서 당화현미 첨가량이 10%일때 2.57%, 30%는 2.20%, 50%는 1.89%로 감소되었고, 볶음현미 첨가구에서는 첨가량이 10%는 2.61%,

30%는 2.22%, 50%는 1.99%로 비슷한 경향을 나타냈다. 수용성 질소와 TCA 가용성질소의 함량은 각각 대조구 1.15%, 0.98%와 비교할 때 총질소 함량과 유사한 경향으로 감소되었다. 젖산의 함량은 당화현미 첨가량과 반비례하는 경향을 보여서 첨가량이 증가 할수록 젖산 함량은 감소되었다. pH는 대조구의 7.22에서 증자현미 첨가구 및 볶음현미 첨가구에서 첨가량이 증가함에 따라 산성쪽으로 기울어지는 그 현상은 볶음현미 첨가구에서 더 큰 경향을 보였다. 포도당 함량은 볶음처리구에서 당화현미 첨가량 증가와 비례하여 증가하였다.

명도를 나타내는 L-value는 대조구에 비하여 증자 현미첨가구는 거의 변화가 없었지만, 볶은 현미첨가구 첨가량이 증가함에 따라서 청국장의 색이 어둡게 되었으며, 적색도를 나타내는 a-value는 증자현미 첨가구에서는 다소 감소하는 경향이였으나, 볶음현미 첨가구는 첨가량이 증가함에 따라 큰 폭으로 적색이 감소하는 경향을 보였다. 그리고 황색도를 나타내는 b-value에서는 대조구의 14.72보다 다소 높은 결과를 보였으며, 증자현미 첨가구에서 15.98로 유의적으로 높은 값을 보였으나, 이 결과는 당화현미의 첨가로 청국장의 어두운 색을 밝게 개선하는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

Table 27. The changes of chemical components of *Chung-kookjang* added steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours at 50°C

(unit : %)

saccharified brown rice	Control	steamed brown rice			Roasted brown rice		
		adding amounts	0%	10%	30%	50%	10%
Moisture	58.10	62.55	64.37	64.11	61.84	60.69	60.34
Total nitrogen	3.92	2.57	2.20	1.89	2.61	2.22	1.99
Water soluble nitrogen	1.15	1.05	0.80	0.51	1.10	0.88	0.47
TCA soluble nitrogen	0.98	0.75	0.56	0.28	0.7	0.63	0.21
Lactic acid	0.022	0.359	0.089	0.151	0.084	0.028	0.039
Glucose	-	0.003	-	-	0.001	0.125	0.329
pH	7.22	6.74	6.45	6.36	6.79	6.19	5.54

Table 28. Hunter color values of *Chungkookjang* added steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours at 50°C

saccharified brown rice adding amounts	Control	Boiled			Roasted			F-value
	0%	10%	30%	50%	10%	30%	50%	
L value	52.25 ^e	55.47 ^d	55.50 ^d	56.41 ^{cd}	57.23 ^c	60.43 ^b	62.15 ^a	43.29*
a value	5.62 ^a	5.54 ^{ab}	5.13 ^{bc}	5.48 ^{ab}	5.00 ^c	3.80 ^d	3.99 ^d	32.27*
b value	14.72 ^{bc}	14.71 ^{bc}	15.98 ^a	15.15 ^{ab}	15.02 ^{ab}	13.97 ^c	14.72 ^{bc}	3.70*

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean. n=5, *p < 0.05

(2) 유리아미노산 함량

당화현미의 첨가에 따른 청국장의 유리아미노산 함량과 상대비율의 결과는 Table 29, Table 30과 같았다.

Table 29에서 나타난 바와 같이 유리아미노산의 총함량은 총질소의 결과와 비례하여 증가하는 경향을 보였는데, 단맛의 아미노산 함량은 대조구가 314.73mg%, 증자현미 첨가구에서 당화현미의 첨가량이 10%일때 233.13mg%, 30%는 163.99mg%, 50%는 84.79mg%로 감소되었고, 볶음현미 첨가구에서는 첨가량이 10%는 215.33mg%, 30%는 194.14mg%, 50%는 62.01 mg%로 비슷한 경향을 나타냈다. 다른 아미노산 및 필수아미노산의 함량도 비슷한 경향으로 나타났다. 수용성 질소와 TCA 가용성질소의 함량은 대조구 1.15%, 0.98%와 비교할 때 총질소 함량과 유사한 경향으로 감소되었다.

당화현미 첨가량에 따른 아미노산의 상대적 비율은 대조구와 당화현미 첨가구간에 큰 차이를 나타내지 않았고, 필수아미노산의 비율도 차이를 나타내지 않았다.

Table 29. The changes of Free amino acid contents of *Chungkookjang* added steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours at 50°C (unit : mg%)

Taste	Amino acid	Control	Steamed			Roasted		
			10%	30%	50%	10%	30%	50%
Sweet	Thr*	40.23	25.66	21.81	9.20	21.44	20.89	8.05
	Ser	17.49	11.75	12.06	3.86	14.38	13.40	4.28
	Gly	103.11	76.42	47.65	25.43	58.85	58.24	17.27
	Ala	51.19	40.98	28.73	15.68	41.36	30.64	10.23
	Lys*	102.71	78.32	53.74	30.62	79.30	70.97	22.18
	Total	314.73	233.13	163.99	84.79	215.33	194.14	62.01
Savory	Asp	29.91	23.09	25.38	9.54	21.54	19.39	8.45
	Glu	107.29	81.70	81.87	33.42	73.15	69.25	26.99
	Cys	4.74	3.73	1.73	0.62	3.70	4.15	0.92
	Total	141.94	108.52	108.98	43.58	98.39	92.79	36.36
Bitter	Met*	20.37	16.26	11.83	6.56	15.20	11.63	4.21
	Ileu*	40.89	28.94	23.40	10.27	25.17	21.37	7.92
	Leu*	88.48	64.60	50.75	22.45	55.21	46.99	16.82
	Total	149.74	109.8	85.98	39.28	95.58	79.99	28.95
Other	Pro	37.23	24.43	17.95	3.18	23.88	23.79	9.01
	Val*	53.10	39.18	30.57	14.44	33.98	28.16	10.51
	Try	62.67	49.80	29.32	18.60	48.86	38.64	11.95
	Phe*	98.32	81.40	55.79	35.27	81.68	64.73	18.03
	His	93.57	74.82	51.22	31.29	75.25	57.28	18.32
	Arg	22.18	11.84	12.47	5.23	6.38	17.60	5.99
	Trp*	1.86	1.50	1.33	0.94	1.62	1.45	0.47
Total	368.93	282.97	198.65	108.95	271.65	231.65	74.28	
GA/TA**(%)		11.00	11.12	14.68	12.08	10.74	11.57	13.39
Total essential amino acid		445.96	335.86	249.22	129.75	313.6	266.19	88.19
Total Amino acid		975.33	734.42	557.60	276.61	680.95	598.57	201.61

* : Essential amino acid, ** : (Glutamic acid/Total amino acid)×100

Table 30. Relative ratios of Free amino acid content in *Chungkookjang* added brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours at 50°C

(unit : %)

Taste	Amino acid	Control	Steamed			Roasted		
			10%	30%	50%	10%	30%	50%
Sweet	Thr*	4.12	3.49	3.91	3.33	3.15	3.49	3.99
	Ser	1.79	1.60	2.16	1.40	2.11	2.24	2.12
	Gly	10.57	10.41	8.55	9.19	8.64	9.73	8.57
	Ala	5.25	5.58	5.15	5.67	6.07	5.12	5.07
	Lys*	10.53	10.66	9.64	11.07	11.65	11.86	11.00
	Total	32.26	31.74	29.41	30.66	31.62	32.44	30.75
Savory	Asp	3.07	3.14	4.55	3.45	3.16	3.24	4.19
	Glu	11.00	11.12	14.68	12.08	10.74	11.57	13.39
	Cys	0.49	0.51	0.31	0.22	0.54	0.69	0.46
	Total	14.56	14.77	19.54	15.75	14.44	15.5	18.04
Bitter	Met*	2.09	2.21	2.12	2.37	2.23	1.94	2.09
	Ileu*	4.19	3.94	4.20	3.71	3.70	3.57	3.93
	Leu*	9.07	8.80	9.10	8.12	8.11	7.85	8.34
	Total	15.35	14.95	15.42	14.2	14.04	13.36	14.36
Other	Pro	3.82	3.33	3.22	1.15	3.51	3.97	4.47
	Val*	5.44	5.33	5.48	5.22	4.99	4.70	5.21
	Try	0.19	0.20	0.24	0.34	0.24	0.24	0.23
	Phe*	10.08	11.08	10.01	12.75	12.00	10.81	8.94
	His	9.59	10.19	9.19	11.31	11.05	9.57	9.09
	Arg	2.27	1.61	2.24	1.89	0.94	2.94	2.97
	Trp*	6.43	6.78	5.26	6.72	7.18	6.46	5.93
Total	37.82	38.52	35.64	39.38	39.91	38.69	36.84	
Total Essential amino acid		51.95	52.29	49.72	53.29	53.01	50.68	49.43

* : Essential amino acid

(3) 향기성분 및 휘발성 유기산 함량

당화현미 30%를 첨가하여 제조한 청국장 향기성분 및 휘발성 유기산 함량을 측정 한 결과는 Table 31 및 Table 32와 같았다.

Table 31에서 보는 것과 같이 당화현미 청국장의 향기성분은 총 42종이 분석되었으며 구수한 향기성분으로 알려진^{30,32)} trimethyl pyrazine의 함량이 control의 29.81 보다 볶음처리구가 45.22 , 증자 처리구가 256.68 로 월등히 높게 나타났으며, 2, 5-dimethyl pyrazine의 경우도 대조구의 10.19보다 높은 볶음처리구가 32.09로 크게 증가하였으며, 총 유리아미노산에 대한 glutamic acid의 함량비율이 당화현미 첨가구가 대조구1보다 높아 구수한 맛과 단맛이 증가한 것으로 사료되었다. 그리고, 불쾌취를 발생하는 성분인 2, 3, 5, 6-tetramethyl pyrazine의 함량 또한 볶음당화현미와 증자당화현미를 첨가한 것이 대조구1의 256.64보다 낮은 것으로 나타나서, 당화현미를 청국장 발효 중에 첨가함으로써 불쾌취 향기성분을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

또한 휘발성 유기산 함량의 측정결과는 Table 32와 같이 총유기산의 함량은 대조구가 375.11mg%로 가장 높았으나 증자당화현미, 볶음당화현미의 첨가한 양이 30, 50%로 증가할수록 총유기산은 감소하였다. 휘발성 유기산 중 불쾌취의 하나인 butyric acid가 79.34mg%가 검출되었으나 당화현미를 첨가한 구에서는 검출되지 않았으며, propionic acid의 경우 대조구의 206.79 mg%보다 증자 및 볶음처리 현미의 첨가량이 각각 30, 50%로 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 향기성분과 휘발성 유기산함량 결과는 당화현미 첨가로 청국장의 향미를 개선할 수 있을 것으로 기대되었다.

Table 31. Flavor components of *Chungkookjang* added 30% of steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours at 50°C

No.	RT	Components	Soybean 100%	Roasted 30%	Steamed 30%
1	6.41	decane, 2,2,6-trimethyl-	7.20	4.72	3.27
2	7.36	decane, 2,2-dimethyl-	4.32	4.45	8.83
3	7.56	heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	6.47	5.91	10.95
4	8.59	heptane, 2,2,6,6-tetramethyl-4-methylene	0.40	0.38	0.74
5	11.02	heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	3.06	3.40	6.00
6	12.55	acetic acid, butyl ester	1.10	0.54	2.29
7	13.04	n-hexanal, caproaldehyde	0.72	0.52	0.67
8	13.67	undecane, 2,2-dimethyl	1.69	0.92	2.72
9	15.11	decane, 2,2,8-trimethyl-	2.16	2.58	5.29
10	15.33	benzene, 1,4-dimethyl-, p-xylene	1.40	1.03	2.18
11	15.46	decane, 2,2,5-trimethyl-	0.83	0.87	1.50
12	15.61	benzene, 1,4-dimethyl-, p-xylene	2.10	1.89	3.99
13	15.90	heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	2.09	2.57	4.59
14	16.96	octane, 2,2,6-trimethyl-	4.06	4.74	7.04
15	17.33	2-heptanone	1.85	1.09	2.41
16	17.85	oxazol trimethyl-, 2,4,5-trimethyloxazol	1.03	-	36.24
17	19.02	2,2,4-trimethyl-3-pentanol, 3-pentanol	2.29	1.75	1.32
18	19.12	furan, 2-pentyl, 2-amylfuran	1.73	0.78	3.50
19	20.10	3-octaone, octan-3-one	20.69	9.16	51.84
20	21.36	1-propene, 2-methyl-, tetramer,	14.72	20.51	37.09
21	22.54	pyrazine, 2,5-dimethyl-	10.19	7.03	32.09
22	23.26	1-hexanol	36.65	15.46	60.55
23	24.41	3-octanol, di-3-octanol	2.06	2.14	4.17
24	25.10	pyrazine, trimethyl-	29.81	45.22	256.68
25	26.27	acetic acid, ethylic acid, vinegar acid	11.69	13.08	27.50
26	26.68	2,3-dimethyl-5-ethylpyrazine	1.42	2.87	7.66
27	27.11	2,3,5,6 tetramethyl pyrazine	256.64	117.62	95.55
28	28.14	2,3,5-trimethyl-6-ethylpyrazine	5.77	8.90	43.46

(continued)

No.	RT	Components	Soybean 100%	Roasted 30%	Steamed 30%
29	28.66	benzaldehyde	2.58	2.81	1.71
30	31.10	benzoic acid, methyl ester	0.29	0.36	0.65
31	31.49	7-hexadecene	0.48	0.72	3.17
32	31.67	benzeneacetaldehyde, hyacinthin	1.18	1.13	5.54
33	31.83	butanoic acid, 3-methyl-	1.07	1.67	5.00
34	32.50	cyclopentane, undecylcyclopen	0.50	0.38	0.42
35	33.39	1-heptadecene, huxahydroaplotaxene	0.40	0.23	-
36	34.26	benzeneacetic acid, methyl ester	0.59	0.59	4.35
37	34.54	octadecane, n-octadecane	1.03	1.13	1.24
38	36.30	2-tetradecanone	1.77	0.80	0.99
39	36.78	benzenemethanol, benzyl alcohol	5.01	1.27	6.82
40	38.77	eicosane, n-eicosane	0.71	1.02	1.41
41	42.06	pentadecanoic acid, 14-methyl-	0.89	3.81	2.54
42	50.55	pentadecanoic acid, pentadecylic acid	4.24	0.99	53.69

Table 32. Volatile organic acid contents of *Chungkookjang* added steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours at 50°C

(unit : mg%)

Saccharified brown rice	Control	Steamed			Roasted		
	0%	10%	30%	50%	10%	30%	50%
Acetic acid	88.98	170.08	-	-	-	-	-
Propionic acid	206.79	200.55	198.44	151.04	131.38	126.84	100.84
Butyric acid	79.34	-	-	-	-	-	-
Total	375.11	370.63	198.44	151.04	131.38	126.84	100.84

(4) 관능검사

당화현미를 각각 0, 10, 30 및 50%(w/w) 첨가하여 제조한 청국장에 대한 색, 풍미, 향기, 쓴맛, 신맛, 단맛의 관능검사 결과는 Table 33에서와 같이 색은 증자처리 현미 10% 첨가한 구에서, 구수한 맛은 대조구, 증자구 10% 및 30%, 볶음구 10%에서, 향기, 쓴맛, 신맛 및 단맛은 증자구 30% 첨가구에서 우수하게 나타났고, 종합적 기호도에서도 증자한 당화현미의 첨가량이 30% 첨가시 대조구보다 유의적으로 우수하게 나타났다.

*JYM-025*를 이용하여 청국장을 제조할 때 바람직하지 못한 냄새와 맛을 줄이기 위하여 당화한 현미를 첨가하여 바람직한 효과를 볼 수 있었다. 이때 당화현미를 제조하는 방법은 볶음처리보다 증자처리하는 것이 결과가 우수하였으며 첨가비율은 30%인 때가 가장 청국장의 품질과 기호성이 가장 우수한 것임을 알 수 있었다.

Table 33. The sensory evaluations of *Chungkookjang* added steamed and roasted brown rice saccharified with malt juice fermented during 60 hours at 50°C

Saccharified brown rice	Control	Steamed			Roasted			F-value
	Adding amounts	0%	10%	30%	50%	10%	30%	
Color	7.50 ^b	9.00 ^a	9.25 ^a	7.25 ^b	7.75 ^b	7.50 ^b	7.50 ^b	11.41
Flavor	5.00 ^d	6.63 ^b	8.13 ^a	4.88 ^d	6.13 ^{bc}	5.63 ^{cd}	4.88 ^d	17.80
Savory	7.09 ^a	7.13 ^a	7.50 ^a	5.75 ^b	6.88 ^a	6.63 ^{ab}	5.63 ^b	4.53
Bitter	3.13 ^c	6.50 ^{ab}	7.50 ^a	6.63 ^{ab}	6.13 ^b	6.88 ^{ab}	6.25 ^b	16.84
Sour	5.25 ^c	6.25 ^{ab}	6.88 ^a	5.75 ^{bc}	5.13 ^c	5.63 ^{bc}	5.44 ^c	6.49
Sweet	4.63 ^d	7.38 ^b	8.00 ^a	4.63 ^d	6.50 ^c	6.50 ^c	4.50 ^d	69.80
Overall	5.06 ^c	6.56 ^b	7.94 ^a	4.96 ^c	6.63 ^b	5.50 ^c	4.88 ^c	24.02

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean. n=5, *p < 0.05

2) 당화현미 첨가시기 결정

청국장의 기호도를 향상시키기 위한 다른 연구자들의 시도^{36~39)}에서는 발효 초기 또는 발효 후에 불쾌취 제거 또는 맛의 향상을 위하여 키위, 무, 쪽, 고추기름 및 유카 등을 첨가하였지만, 본 연구에서는 청국장의 발효과정 중 단백질의 분해정도에 따른 당화현미의 첨가효과를 확인하고자 발효기간에 따라 당화현미의 최적첨가시기를 결정하고자 하였다.

JYM-025를 증자한 콩에 접종한 후 50℃에서 발효시키면서 24, 36, 48 및 60시간 후 각각 증자한 당화현미를 30% 첨가하고 청국장 발효온도를 60℃로 승온시켜 amylase 효소에 의한 전분질의 분해를 위하여 추가로 12시간 더 발효시킨 후 청국장의 일반성분, 색도 및 관능검사 성적을 비교하여 청국장의 불쾌취가 감소되고 맛이 우수한 청국장 제조시 당화현미의 최적 첨가시기를 결정하고자 하였다.

(1) 일반성분 함량 및 색도

일반성분과 색도의 변화는 Table 34와 같이 총질소 함량은 24시간 2.19%에서 시간경과에 따라 점차 증가하여 60시간에는 2.53%를 나타냈고, 수용성 질소는 60시간에서 0.96%로 가장 높게 나타났으나, TCA 가용성질소는 48시간과 60시간이 각각 0.68%와 0.70%로 비슷한 경향을 보였다. Lactic acid와 propionic acid는 24시간 각각 0.166%, 894.29mg%로 높았으나 시간경과에 따라 감소하여 60시간에는 0.060%, 351.16mg%로 크게 감소하였으나, glucose는 0.070%에서 0.098%로 상승하였고 pH는 알칼리성 쪽으로 상승하였다. 이 결과는 초기에 당화현미를 첨가할 경우 젖산의 함량이 높아지고 pH도 낮은 결과를 보여 단백질 분해에 방해가 되기 때문에 청국장의 품질을 향상시키기 위하여 48시간 또는 60시간에 당화현미를 첨가하는 것이 적당할 것으로 판단되었다. 당화현미의 첨가시기에 따른 청국장의 색도변화는 Table 35와 같이 24, 36, 48 및 60시간에 당화현미를 첨가한 구에서의 황색

도와 적색도를 나타내는 b값과 a값은 5% 유의수준 차이가 없는 것으로 나타나 비슷하였으나, 명도를 나타내는 L값은 5% 유의수준에서 차이가 인정되었으며 첨가시기가 늦어질수록 다소 어두운 색을 띄었다.

손 등^{36,37)}은 청국장 발효 중 키위와 무를 첨가하여 불쾌취를 감소하기 위한 연구에서 42℃에서 72시간 발효기간 동안 24시간 이후에 pH, 질소, 아미노산성질소 및 유리아미노산 등은 급격한 변화를 보인 후 서서히 상승하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 청국장 발효시 유카를 첨가하여 풍미를 개선하기 위한 연구³⁸⁾에서는 대조구보다 yucca 첨가구에서 청국장 숙성시간이 길수록 아미노태질소가 증가하였다고 보고하였고, 썩과 고추기름을 첨가한 청국장의 향기성분 연구³⁹⁾에서도 숙성과정 중의 아미노태질소 함량은 발효가 진행됨에 따라 증가하는 본 연구와 같은 경향을 보였다. 이는 청국장의 미생물이 분비하는 단백분해효소에 의하여 대두의 단백질이 분해되어 분해된 산물로서 먼저 수용성으로 전환된 후 펩타이드, 아미노산으로 분해되어 청국장특유의 구수한 맛이 발효시간이 길수록 증가하는 것을 알 수 있었다.

또한, 색도는 표 35와 같이 당화현미의 첨가시간에 따른 뚜렷한 경향을 보이지 않았다.

Table 34. Comparison of chemical components of *Chungkookjang* by made with saccharified brown rice during various fermented time

(unit : %)

Items	Addition time(hrs)			
	24	36	48	60
Moisture	62.77	65.05	65.14	63.54
Total nitrogen	2.19	2.17	2.23	2.53
Water soluble nitrogen	0.63	0.71	0.78	0.96
TCA soluble nitrogen	0.53	0.66	0.68	0.70
Lactic acid	0.166	0.150	0.087	0.060
Propionic acid (mg%)	894.29	628.66	483.40	351.16
Glucose	0.070	0.056	0.085	0.098
pH	6.70	7.26	7.45	7.64

Table 35. Hunter color value of *Chungkookjang* by the addition time of saccharificated brown rice

Items	Addition time(hrs)				F-Value
	24	36	48	60	
L value	62.28 ^a	60.72 ^b	58.66 ^c	60.15 ^b	15.69*
a value	4.41 ^a	4.53 ^a	4.80 ^a	4.43 ^a	1.46
b value	15.27 ^a	16.05 ^a	16.34 ^a	15.76 ^a	1.37

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean. n=5, *p < 0.05

(2) 유리아미노산 함량

당화현미 첨가시간에 따른 청국장용 유리아미노산 함량은 Table 36과 같이 24, 36, 48 및 60시간에서 각각 420.39mg%, 555.49mg%, 635.59mg% 및 695.19mg%로 첨가시간이 늦을수록 증가하였으나, Glu의 함량은 큰 변화를 보이지 않았다. 또한, His, Phe, Lys, Tyr, Leu, Val, Gly 및 Ala 등은 증가하는 경향이였으나, Arg은 36시간보다 48시간, 60시간에서 감소한 결과를 보였다. 단맛을 내는 아미노산의 함량은 24시간, 109.74mg%보다 60시간은 180.3mg%로 상당한 함량의 증가를 보였으나, 구수한 맛은 소폭 증가하였다. 필수아미노산의 함량은 24시간 174.53mg%, 36시간 239.98mg%, 48시간 238.01mg%, 60시간 318.14mg%의 경향으로 나타나, 60시간 발효한 후 당화현미를 첨가하는 것이 영양적으로도 우수한 결과를 보였다.

Table 37은 당화현미 첨가시간에 따른 총 유리아미노산에 대한 상대비율을 측정한 것으로 Glu의 비율은 24시간에 16.86%로 36시간, 12.98%, 48시간 11.57%, 60시간 11.70%로 보다 높은 경향을 보였지만 다른 아미노산들은 발효시간에 따라서 함량의 상대 비율은 큰 차이를 나타내지 않았다. 필수아미노산 함량은 24, 36, 48 및 60시간에서 각각 41.5%, 43.21%, 48.0% 및 , 47.28%로 발효시간이 경과함에 따라 소량 증가하는 양상을 보였으나 48시간 이후는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다.

Table 36. Free amino acid content of *Chungkookjang* by the addition time of saccharificated brown rice

(unit : mg%)

Taste	Amino acid	Addition time(hrs)			
		24	36	48	60
Sweet	Thr*	14.98	21.32	26.77	27.57
	Ser	15.25	14.75	17.39	18.62
	Gly	31.07	53.54	51.52	65.52
	Ala	16.05	29.02	31.83	33.40
	Lys*	32.39	55.32	67.36	81.39
	Total	109.74	137.88	150.71	180.31
Savory	Asp	22.10	20.15	21.94	22.81
	Glu	70.86	72.09	73.51	78.52
	Cys	6.64	6.42	7.54	9.14
	Total	99.6	98.66	102.99	110.47
Bitter	Met*	7.62	11.46	14.13	15.84
	Ileu*	13.76	22.65	25.60	24.62
	Leu*	39.55	46.45	59.99	55.48
	Total	60.93	80.56	99.72	95.94
Other	Pro	8.55	17.44	11.81	24.18
	Val*	18.25	26.89	33.06	35.28
	Try	26.92	35.60	40.15	45.14
	Phe*	46.88	54.08	76.08	75.87
	His	39.49	55.87	67.14	73.90
	Arg	8.93	10.63	7.70	5.82
	Trp*	1.10	1.81	2.07	2.09
	Total	150.12	202.32	238.01	262.28
GA/TA** (%)		16.86	12.98	11.57	11.70
Total Essential amino acid		174.53	239.98	305.06	318.14
Total Amino acid		420.39	555.49	635.59	695.19

* : Essential amino acid, ** : (Glutamic acid/Total amino acid)×100

Table 37. Relative ratio of Free amino acid content in *Chungkookjang* by the addition time of saccharificated brown rice

(unit : %)

Taste	Amino acid	Addition time(hrs)			
		24	36	48	60
Sweet	Thr*	3.56	3.84	4.21	4.11
	Ser	3.63	2.66	2.74	2.77
	Gly	7.39	9.64	8.11	9.76
	Ala	3.82	5.22	5.01	4.98
	Lys*	7.70	9.96	10.60	12.13
	Total	26.1	31.32	30.67	33.75
Savory	Asp	5.26	3.63	3.45	3.40
	Glu	16.86	12.98	11.57	11.70
	Cys	1.58	1.16	1.19	1.36
	Total	23.7	17.77	16.21	16.46
Bitter	Met*	1.81	2.06	2.22	2.36
	Ileu*	3.27	4.08	4.03	3.54
	Leu*	9.41	8.36	9.44	8.27
	Total	14.49	14.5	15.69	14.17
Other	Pro	2.03	3.14	1.86	3.60
	Val*	4.34	4.84	5.20	5.26
	Try	6.40	6.41	6.32	6.73
	Phe*	11.15	9.74	11.97	11.30
	His	9.39	10.06	10.56	11.01
	Arg	2.12	1.91	1.21	0.87
	Trp*	0.26	0.33	0.33	0.31
Total	35.69	36.43	37.45	39.08	
Total Essential amino acid		41.5	43.21	48.0	47.28
Total		100	100	100	100

* : Essential amino acid

(3) 관능검사

당화현미를 첨가하여 제조한 청국장의 관능검사 결과는 Table 38과 같이 점성은 24시간에 당화현미를 첨가한 구에 비하여 60시간 첨가구에서 월등히 높은 점수를 얻었고, 색도는 첨가시간이 늦을수록 서서히 증가되었다. 향기에 대한 관능검사 점수는 60시간 구에서 8.08로 높게 나타나 발효 초기에 당화현미를 첨가할 경우 세균이 분해된 당을 이용하여 산을 생성하게 되어 품질을 나쁘게 하는 것으로 사료되었다. 그러나, 발효 후기에 첨가한 구에서는 종합적인 기호도를 비롯하여 전반적으로 우수한 점수를 얻어서 당화현미의 구수한 향과 맛이 청국장의 품질을 향상시키는 것으로 사료되었다.

이와 같이 총질소와 TCA 가용성질소의 경우 60시간 경과한 후 첨가구가 2.53%, 0.70%로 가장 높게 나타났으며, 유기산과 pH의 분석결과는 초기에 당화현미를 첨가할 경우 젖산과 휘발성유기산의 함량이 높아지고 pH도 낮은 결과를 보여 단백질 분해에 방해를 주기 때문에 청국장의 품질을 향상시키기 위하여 60시간에 첨가하는 것이 적당할 것으로 판단되었다. 또한 유리 아미노산 함량도 60시간 발효시에 695.19mg%로 높게 나타났으며 관능검사 결과 종합적인 기호도를 비롯한 모든 항목에서 우수한 점수를 얻어 60시간에 첨가하는 것이 당화현미의 구수한 향과 맛이 청국장의 품질을 향상시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 당화현미 청국장의 산업화에 적용할 수 있는 최적발효조건은 *JYM-025*를 접종하여 50℃의 항온기에서 60시간 경과 후에 증자처리한 당화현미를 30% 첨가하고, 그 후 온도를 60℃에서 12시간 더 발효시켜 전분의 분해를 촉진시켜 제조한 청국장이 가장 품질이 우수한 것으로 나타났다.

Table 38. The sensory characteristics of *Chungkookjang* by the addition time of saccharification brown rice

Items	Addition time(hrs)				F-Value
	24	36	48	60	
Viscosity	2.42 ^d	4.17 ^c	6.33 ^b	8.58 ^a	370.87*
Color	6.25 ^b	7.58 ^a	7.67 ^a	7.83 ^a	13.39*
Flavor	4.92 ^d	6.00 ^c	7.17 ^b	8.08 ^a	57.34*
Overall	4.42 ^d	5.83 ^c	7.25 ^b	8.33 ^a	161.20*

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean. n=20, *p < 0.05

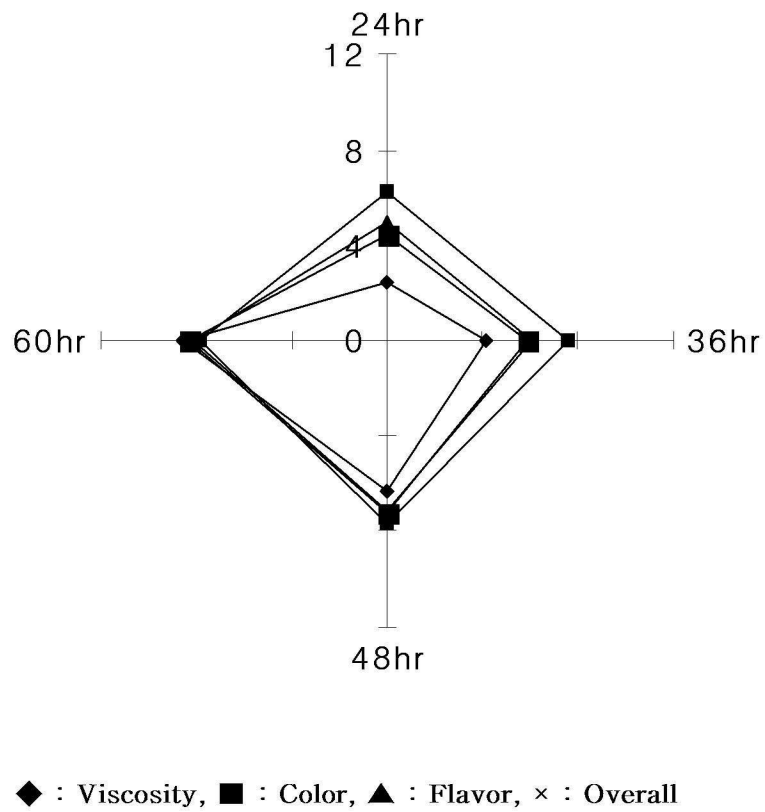


Fig. 10. The sensory characteristics of *Chungkookjang* by the addition time of saccharificated brown rice

4. 청국장의 생리활성

1) 전자 공여능(DPPH)

Free radical scavenger 기능은 중요한 항산화 특성요인의 하나이며 DPPH는 free radical로 항산화제와 반응시킴으로써 항산화제의 free radical scavenger 능력을 측정할 수 있다⁷¹⁾.

본 실험에서는 free radical로 α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 시료 청국장의 전자공여능을 측정한 결과는 Tab.39와 같았다.

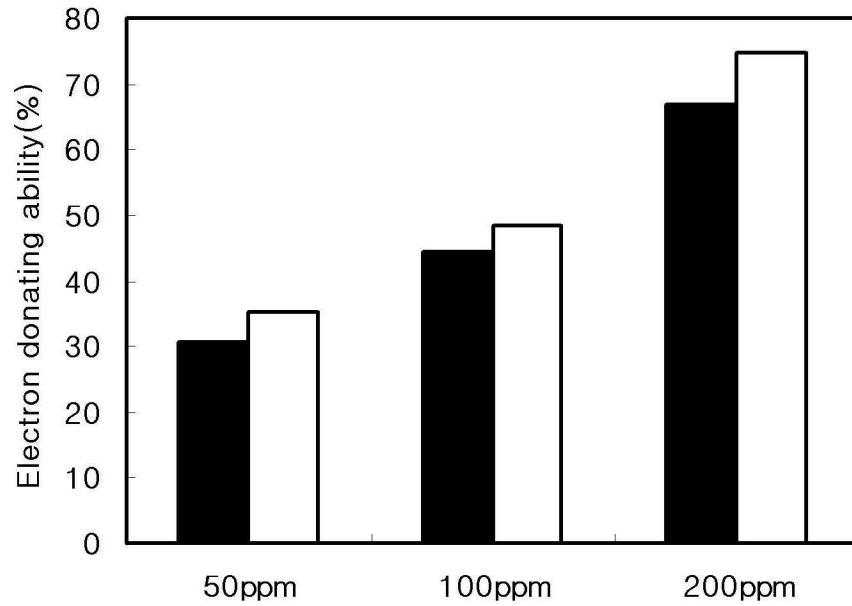
전통청국장과 당화현미 청국장을 물로 추출한 후 동결건조한 시료를 농도를 달리하여 전자공여능을 측정한 결과 대조구에서 50 ppm, 100 ppm 및 200 ppm으로 청국장추출물의 농도가 증가함에 따라 각각 30.74%, 44.37%, 66.70%로 전자공여능이 증가함을 보여주었고 또한 당화현미 청국장추출물의 농도도 증가함에 따라 각각 35.25%, 48.54% 및 74.76%로 전자공여능이 증가함을 보여주었다. 이와 같은 결과는 청국장의 강한 항산화능을 보여주는 결과이며, 대조구 전통청국장에 비해 당화현미가 첨가된 청국장의 경우가 다소 높은 항산화능을 보여주었다.

Table 39. Electron donating ability of *Chungkookjang*

(unit : %)

	Concentration		
	50ppm	100ppm	200ppm
A	30.74	44.37	66.70
B	35.25	48.54	74.76

A : Control *Chungkookjang*, B : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice



■ : Control *Chungkookjang*, □ : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice

Fig. 11. Electron donating ability of *Chungkookjang*.

2) SOD 유사활성

체내의 항산화효소는 활성산소의 산화적 손상으로부터 세포를 방어하는데 중요한 역할을 하며, 활성산소의 유해성으로부터 조직을 방어하는데 가장 중요한 역할을 하는 3가지 항산화효소는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase이다⁷²⁾.

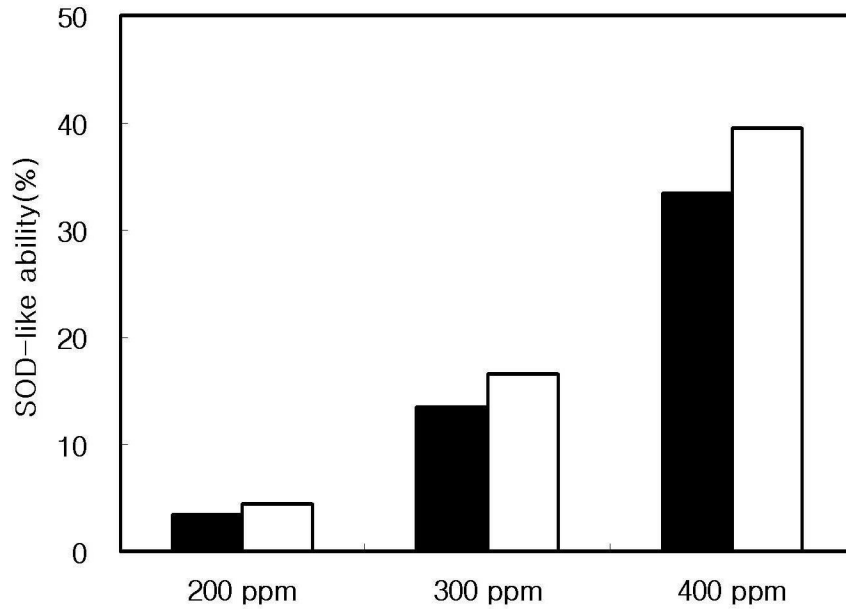
이러한 항산화 효소 중 SOD에 관한 유사활성을 측정한 결과 Tab.40과 같았다. 본 시험에 사용된 청국장 추출물은 200 ppm, 300 ppm 및 400 ppm의 농도로 조정하여 SOD에 관한 유사활성을 측정하였다. 모든 구에서 동일하게 청국장추출물의 농도가 증가함에 따라 SOD 유사활성이 증가하였다. 전통청국장은 3.40, 13.40 및 33.37%의 활성능력을 나타냈으며 당화현미 청국장의 경우는 전통청국장보다 다소 높은 4.40, 16.50 및 39.46%로 SOD 유사활성 능력이 우수함을 나타냈다.

Table 40. SOD-like ability of *Chungkookjang*

(unit : %)

Concentration			
	200 ppm	300 ppm	400 ppm
A	3.40	13.40	33.37
B	4.40	16.50	39.46

A : Control *Chungkookjang*, B : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice



■ : Control *Chungkookjang*, □ : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice

Fig. 12. SOD-like ability of *Chungkookjang*.

3) 청국장의 암세포 증식억제 효과

전통청국장과 당화현미 청국장을 물로 추출한 후 동결건조한 시료를 농도를 달리하여 MDA-MB-231(breast cancer), SK-MEL-31(Malignant melanoma), G361(Melanoma), A549(lung cancer)의 4종의 암세포에 투여하여 각각의 암세포주의 증식억제 효과를 관찰한 결과는 Tab.41 ~ 44에 나타내었다.

청국장추출물의 MDA-MB-231(유선암 세포) 암세포주에 대한 증식억제 시험결과는 Tab. 41과 같이 당화현미 청국장의 증식억제 효과가 500 ppm의 농도에서 15.68%, 1,000 ppm의 농도에서는 17.20%, 2,000 ppm의 농도에서는 21.81%로 전통청국장의 500 ppm의 농도에서 11.86%, 1,000 ppm의 농도에서 15.55%, 2,000 ppm의 농도에서 18.07%의 저해율보다 확연한 차이를 보이며 높은 저해율을 나타내었다.

그리고, Tab. 42는 SK-MEL 31(악성 피부암세포) 암세포주 증식억제 시험 결과를 나타낸 것으로서 당화현미 청국장추출물의 경우에는 500 ppm에서 전통청국장의 9.66%보다 높은 18.10%의 저해율을 보였으며 1,000 ppm과 2,000 ppm의 농도에서도 24.23%, 29.09%의 저해율을 보여 전통청국장의 12.21%와 29.09%의 저해율보다 2배의 높은 증식억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

G361(피부암세포)와 A549(폐암세포) 암세포주의 저해율은 각각 Tab. 43 및 Tab. 44와 같이 청국장의 농도증가와 더불어 암세포주의 증식억제 효과가 증가하였으며 전통청국장 추출물보다 당화현미 청국장추출물을 투여했을 때가 뚜렷한 차이를 보이며 높은 저해율을 보여주었다.

청국장의 암세포 증식억제 시험결과에서 청국장추출물이 4종의 모든 암세포주에서 증식억제효과를 나타내는 것으로 나타났고 전통청국장보다 당화현미청국장 추출물의 농도증가에 따라 암세포주의 높은 증식억제 효과를 보임을 알 수 있었다. 이는 청국장 자체의 암세포주에 대한 증식억제 효과에 당

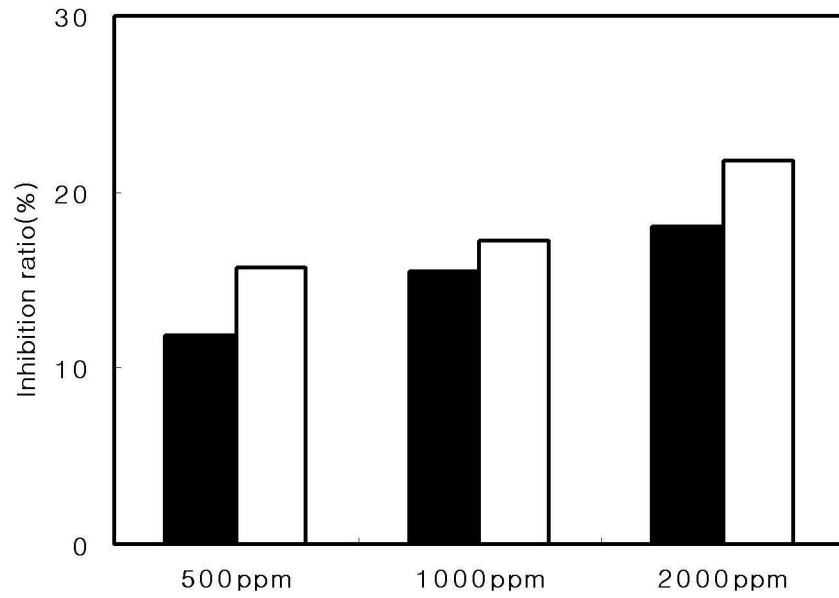
화현미가 첨가됨으로써 암세포주에 대한 증식억제 효과가 상승한 것으로 사료되었다. 아울러, 당화현미 청국장의 우수한 암세포 억제효과를 확인하였으나 어떠한 물질에 의한 영향인지를 확인하고 그 물질을 분리·정제하여 동물실험과 임상실험을 통한 항암성 등의 기능성 확인 연구가 시급하게 진행되어야 할 과제로 사료된다.

Table 41. Growth inhibitory effect of *Chungkookjang* on MDA-MB-231.

(unit : %)

Concentraion			
	500ppm	1000ppm	2000ppm
A	11.86	15.55	18.07
B	15.68	17.20	21.81

A : Control *Chungkookjang*, B : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice



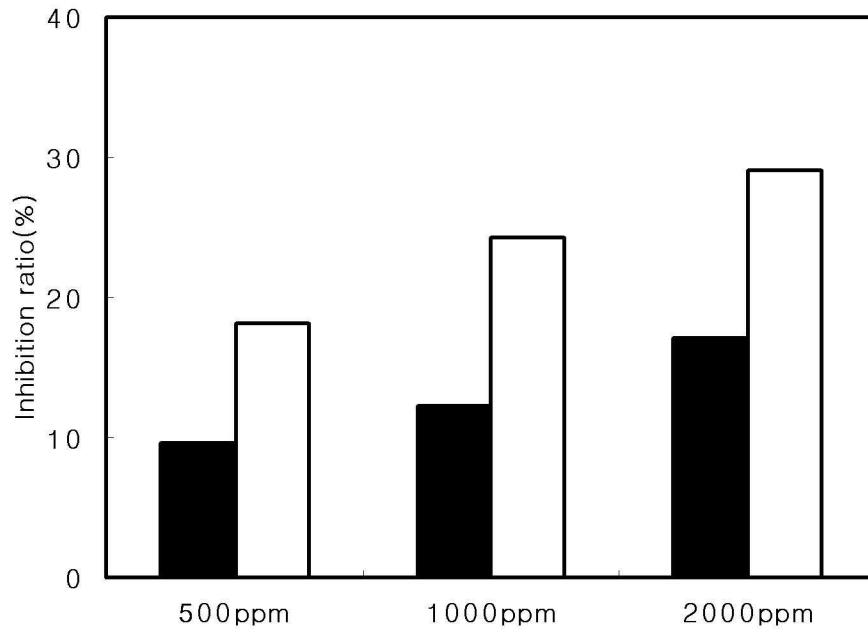
■ : Control *Chungkookjang*, □ : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice

Fig. 13. Growth inhibitory effect of *Chungkookjang* on MDA-MB-231.

Table 42. Growth inhibitory effect of *Chungkookjang* on SK-MEL 31
(unit : %)

	Concentration		
	500ppm	1000ppm	2000ppm
A	9.66	12.21	17.08
B	18.10	24.23	29.09

A : Control *Chungkookjang*, B : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice



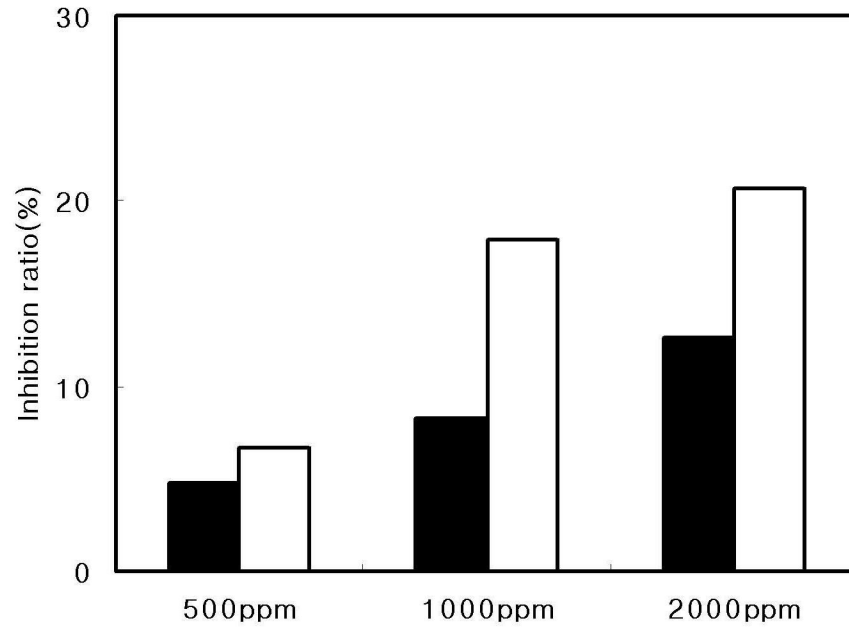
■ : Control *Chungkookjang*, □ : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice

Fig. 14. Growth inhibitory effect of *Chungkookjang* on SK-MEL 31

Table 43. Growth inhibitory effect of *Chungkookjang* on G361.
(unit : %)

	Concentration		
	500ppm	1000ppm	2000ppm
A	4.74	8.27	12.66
B	6.69	17.96	20.63

A : Control *Chungkookjang*, B : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice



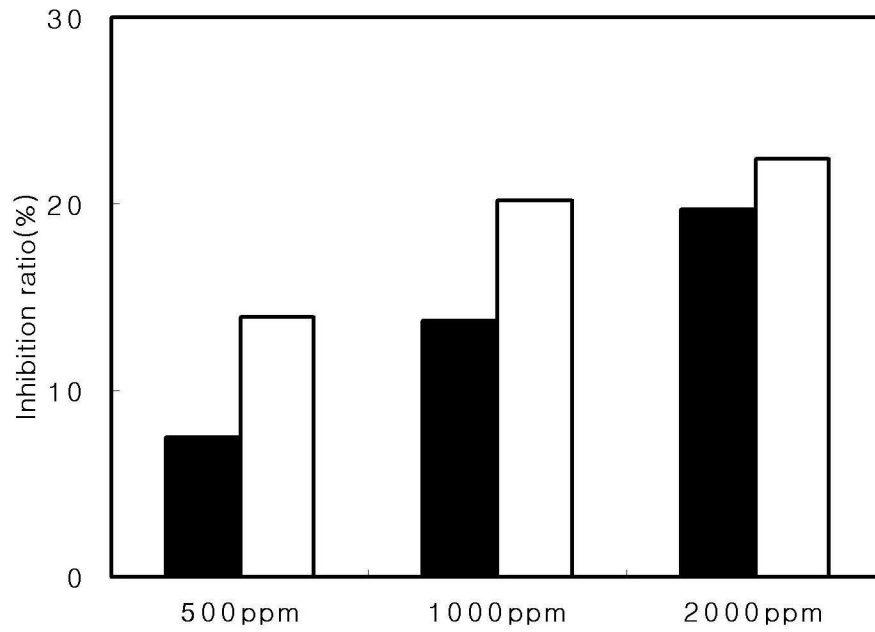
■ : Control *Chungkookjang*, □ : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice

Fig. 15. Growth inhibitory effect of *Chungkookjang* on G361.

Table 44. Growth inhibitory effect of *Chungkookjang* on A549.
(unit : %)

	Concentration		
	500ppm	1000ppm	2000ppm
A	7.49	13.78	19.70
B	13.98	20.24	22.44

A : Control *Chungkookjang*, B : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice



■ : Control *Chungkookjang*, □ : *Chungkookjang* by addition saccharified brown rice

Fig. 16. Growth inhibitory effect of *Chungkookjang* on A549.

5. 당화현미를 첨가한 청국장을 이용한 제품 제조

청국장은 대두발효식품류 중에서 가장 짧은 기간인 2~3일이면 만들어 먹을 수 있고 전통발효식품 중에서 유일하게 소금을 사용하지 않고도 제조할 수 있으며, 콩 단백질의 인체 흡수율을 98%까지 끌어올릴 수 있다²³⁾. 따라서, 청국장은 영양학적인 면뿐만 아니라 경제적인 면에서 가장 효과적으로 콩을 섭취할 수 있는 양질의 단백질식품이라 정의할 수 있다. 청국장과 유사한 일본의 낫또의 발효과정 중에 생성되는 단백질 분해효소 중에는 혈전증을 예방 및 치료할 수 있는 nattokinase가 함유되어 있다고 보고되어 있으며¹⁰⁾, 청국장도 발효시 이와 유사한 생리활성 기능을 갖는 물질이 생성되는 것으로 알려져 있어 소비자등의 관심이 증가하는 추세에 있다. 식용법도 일본의 낫또와는 달리 장류자체로서 끓여먹는 것이 일반적인 이용법이기에 때문에 가열조리시 이러한 생리활성 물질의 파괴가 일어난다.

그리고 최근 매스컴과 인터넷에서 동호회 활동 등으로 활발하게 청국장 먹기 운동을 펼치고 있는 호서대 김한복 교수²³⁾는 변비개선효과와 비만해소 등의 방법으로 생청국장의 섭취를 주장하고 생청국장을 5분 정도 끓이면 청국장의 발효균과 분해효소와 면역증강 효과가 있다고 알려져 있는 핵산(DNA)이 완전 파괴된다고 하였으며 비타민 B₂는 끓인 청국장에서 50%정도 파괴된다고 하였다.

그러나, 청국장을 바로 섭취하는 것은 특유의 불쾌취와 점질물의 식감으로 인한 거부감으로 매우 어려운 일이다. 그래서 영양 및 생리학적 특성이 우수한 청국장의 소비증진을 위해서는 청국장의 제조 및 식용방법의 개선과 청국장을 소재로 한 새로운 가공식품의 개발이 선행되어야 할 것으로 판단되어 당화현미를 첨가한 청국장을 이용한 쌈장, 볶음고추장 및 고기소스 3 품목을 제조하여 관능검사를 실시하였다.

1) 청국장첨가 찜장

당화현미 청국장을 첨가하여 찜장을 Figure 17과 같이 제조하여 관능검사를 실시한 결과는 Table 45와 같았다 기존의 찜장과 당화 현미를 첨가한 청국장을 혼합한 찜장의 관능검사 결과, 색의 경우 기존의 찜장에 관한 기호도가 높았던 반면 향기나 풍미, 맛에 있어서는 당화현미 청국장을 첨가한 것을 더 선호하였으며 전체적인 기호도 또한 높은 것으로 나타났다.



Fig. 17. *Samjang* by using *Chungkookjang* with saccharificated brown rice.

Table 45. The sensory characteristics of *Samjang* by using *Chungkookjang* with saccharificated brown rice

	Control	Added <i>Chungkookjang</i>
Color	8.32±0.60	8.17±0.74
Flavor	7.71±0.77	8.03±0.95
Savory	7.66±0.54	7.97±0.79
Salty	7.69±0.62	7.94±0.47
Sweet	7.55±0.59	8.17±0.55
Overall	7.63±0.56	8.04±0.51

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean±MD. n=20

2) 청국장첨가 볶음고추장

당화현미 청국장을 첨가하여 쌈장을 Figure 18과 같이 제조하여 관능검사를 실시한 결과는 Table 46과 같았다 기존의 볶음 고추장과 당화현미 청국장을 첨가한 볶음 쌈장의 관능검사결과는 색, 향, 풍미, 단맛과 짠맛, 매운맛에 있어 모두 기호도가 높은 것으로 나타났으며 전체적인 관능평가도도 높은 것으로 나타났다.



Fig. 18. Roasted *kochujang* by using *Chungkookjang* with saccharificated brown rice.

Table 46. The sensory characteristics of roasted *kochujang* by using *Chungkookjang* with saccharificated brown rice

	Control	Added <i>Chungkookjang</i>
Color	7.92±0.71	8.13±0.77
Flavor	7.58±0.75	7.69±0.85
Savory	7.48±0.79	7.88±0.88
Salty	7.88±0.70	7.93±0.66
Sweet	7.44±0.55	7.91±0.70
Hot	7.64±0.58	8.12±0.81
Overall	7.55±0.69	7.89±0.69

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean±MD. n=20

3) 청국장첨가 고기소스

당화현미 청국장을 첨가하여 쌈장을 Figure 19와 같이 제조하여 관능검사를 실시한 결과는 Table 47과 같이 일반 고기소스와 당화현미 청국장을 첨가한 고기소스의 관능검사 결과는 향, 단맛, 풍미를 제외하고는 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 차이가 나지 않는 것으로 나타났다. 전체적인 평가에서도 당화현미 청국장을 혼합한 경우 더 높은 기호도를 보이기는 하였으나 다른 관능검사들에 비해 그 차이가 낮은 것으로 나타났다.

청국장의 활용도를 높일 수 있는 방법으로 일반적으로 우리가 섭취하고 있는 기존의 장류와 소스류에 당화현미 청국장을 혼합하여 관능검사를 한 결과, 세 가지 제품 모두에서 기존의 제품들보다 더 좋은 기호도를 보여 청국장의 활용도를 높임과 동시에 기존의 장류 및 소스류의 기호도를 높이는 데 기여할 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다.



Fig. 19. Meat Sauce by using *Chungkookjang* with saccharificated brown rice.

Table 47. The sensory characteristics of Meat Sauce by using *Chungkookjang* with saccharificated brown rice

	Control	Added <i>Chungkookjang</i>
Color	7.69±0.76	7.94±0.77
Flavor	7.76±0.52	7.91±0.53
Savory	7.63±0.67	7.64±0.72
Salty	7.51±0.44	7.46±0.79
Sour	7.52±0.70	7.55±0.76
Sweet	7.38±0.56	7.71±0.71
Overall	7.42±0.72	7.69±0.70

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Each value is Mean±MD. n=20

V. 결 론

전통발효식품인 청국장은 소화흡수율이 매우 높으며 인체에 유익한 생리활성물질이 함유되어 있으나 대두의 단백질이 아미노산으로 분해되면서 생기는 암모니아의 불쾌취로 인해 소비자들의 입맛을 충족하지 못해 산업화가 시급한 실정이다.

이에 본 연구에서는 전통청국장에서 우수균주를 분리, 선발한 *Bacillus licheniformis* JYM-025 균주를 이용하여 제조한 청국장의 최적발효조건을 결정하기 위하여 발효온도 및 기간에 따른 수분, 총질소 등의 일반성분, 유리아미노산, 휘발성 유기산 함량 및 관능적 특성을 측정 한 결과, 50℃에서 60시간 발효하는 것이 품질이 가장 우수한 것으로 나타났다. 그리고, 청국장에 당화현미를 첨가하여 불쾌취 저감화조건을 탐색하기 위하여 JYM-025 균주를 50℃, 60시간 발효시키면서 당화현미의 첨가량 및 첨가시기를 측정 한 결과 증자한 당화현미 30%를 60시간 경과한 후에 첨가하고 그 후 온도를 60℃, 12시간 더 발효시켜 제조한 청국장이 품질과 기호성이 가장 뛰어난 것으로 나타났다.

또한, 전통청국장과 당화현미 청국장의 생리활성을 측정하기 위하여 전자공여능과 SOD 유사활성을 측정 한 결과, 청국장 추출물의 농도가 증가함에 따라 높게 나타났으며 전통청국장에 비해 당화현미 청국장이 다소 높게 나타나 당화현미 청국장이 항산화능력이 우수함을 나타냈다.

청국장의 암세포 증식억제 효과는 청국장추출물이 피부암 등의 4종의 모든 암세포주에서 증식억제 효과를 나타냈고, 전통청국장보다 당화현미 청국장 추출물의 농도증가에 따라 암세포주의 높은 증식억제 효과를 나타냈다. 그리고, 당화현미 청국장의 소비증진을 위해서 당화현미 청국장을 이용한 쌈장, 볶음고추장 및 고기소스 3품목을 제조하였다.

1. 청국장 제조 우수균 분리 및 선발

전통적인 방법으로 벗짚을 사용하여 제조한 청국장에서 17종의 균주를 분리하여 A, B, C, D, E 5개의 우수균주를 선발하여 colony의 크기 등의 형태학적 특징을 측정된 결과 *Bacillus* 속으로 추정되었다.

선발한 5개 균주를 증자한 콩에 접종하여 50°C, 48시간 동안 발효시켜 제조한 청국장(이하 C_A, C_B, C_C, C_D, C_E 로 약칭함)의 일반성분, 유리아미노산, 휘발성 유기산, 향기성분 및 관능검사를 측정된 결과, 점질물 함량은 C_C를 제외한 나머지 모든 구에서 대조구 4.70%보다 높은 4.72~4.82%이며, 수용성 질소는 모든 구에서 대조구 0.90%보다 높은 값을 보였고, 색도는 L값이 C_E 청국장이 48.50로 가장 높은 값을 나타내어 색소생성능이 우수하였고, 어두운 색을 나타냈다.

또한, 유리아미노산 함량은 C_C 1224.79mg%, C_B 1069.11mg% 및 C_E 947.50 mg%로 벗짚으로 제조한 대조구 769.79 mg%보다 높았으며 유리아미노산 함량에 대한 glutamic acid의 비율도 높게 나타나 선발된 균주들의 단백질 분해력은 우수한 결과를 보였으며 아미노산을 맛에 따라 분류해 본 결과, 청국장의 유리아미노산 중 단맛, 구수한 맛을 내는 아미노산은 C_C가 각각 335.42mg%, 198.82mg%로 함량이 가장 높았다.

균주별로 발효과정 중 분해되는 아미노산의 상대적 비율은 상당한 차이를 보였는데 구수한 맛의 Glu.는 대조구 15.35%에 비하여 C_A가 18.22%로 가장 높았으며 Cys는 모든 처리구에서 낮은 비율이었다. 쓴맛을 내는 Leu은 C_B, C_C가 11.12%, 11.09%로 높게 나타났다. 그 외 아미노산 중 His의 비율은 C_D가 23.28%로 대조구 및 다른 구에서 8.83%~12.26%에 비하여 상당히 높게 나타났다. 필수아미노산 총 함량의 상대비율은 모두 대조구 38.53%보다 높은 경향을 보여 선발된 5개 균주로 제조한 청국장 중 필수아미노산의 비율은 대조구에 비하여 높은 경향으로 나타나 영양적인 면에서 우수함을 알 수 있었다. 또한, 단백질 및 전분 분해력, 점질물, 가용성질소, 유리아미노산,

휘발성 유기산 및 관능검사를 종합한 결과 E균주로 제조한 청국장 품질이 가장 우수하였다. 이 균주를 세균동정기(Vitek)로 측정된 결과 *Bacillus licheniformis*로 판명되어 *Bacillus licheniformis* JYM-025(이하 JYM-025로 약칭함)로 명명하였다.

2. *Bacillus licheniformis* JYM-025 청국장의 최적발효조건 결정

1) 최적발효온도

JYM-025 분리균주를 이용하여 실제 청국장 제조시 최적온도조건을 결정하기 위하여 증자된 콩에 JYM-025를 접종한 후 40℃, 45℃, 50℃ 및 55℃로 나누어 48시간 동안 발효시켜 제조한 청국장의 일반성분 변화, 색도, 유리아미노산, 휘발성유기산 함량 및 관능검사를 실시하였다.

(1) 이화학적 성분 함량

온도 변화에 따른 청국장의 점질물 함량은 40℃ 4.71%, 45℃ 및 50℃에서는 4.79%로 생성량이 증가하였으나, 55℃로 온도가 상승되면서 4.73%로 감소되는 경향을 보였다. 수용성 질소와 TCA가용성 질소의 함량은 40℃에서 각각 0.70%, 0.60%에서 50℃까지는 1.14%, 1.09%로 증가하였으나, 55℃에서는 0.40% 및 0.18%로 감소하여 50℃에서 우수한 결과를 나타냈다.

Lactic acid는 온도가 상승할수록 생성량이 감소되고, 55℃에서 가장 낮은 함량을 보였고, glucose의 함량은 40~50℃는 비슷한 경향을 보였으나 55℃에서 가장 높게 나타났다.

pH는 온도가 상승하면서 6.87 ~ 7.26으로 알칼리성으로 변화되었지만 55℃에서는 6.00으로 산성으로 나타났다.

밝기를 나타내는 L 값은 55℃에서 61.70으로 가장 높은 것으로 나타나 발효온도가 증가함에 따라 색이 밝게 나타났고, 그 외의 발효온도에서는 유사

한 값을 보였다. -a(초록), a(붉은색) 값은 40℃ 4.78에서 45℃ 5.23으로 상승하였다가 온도가 50 및 55℃로 상승하면서 4.23 및 4.72로 감소하는 경향이었고, -b(푸른색), b(노란색) 값은 모든 구에서 유의차가 없는 것으로 나타나, 이들 값을 종합적으로 판단해 볼 때 발효온도가 상승함에 따라 청국장(약간 검정색이 함유된 노란색)의 색은 점점 더 어둡게 변해가는 경향을 나타냈다.

(2) 유리아미노산 함량

청국장의 발효온도에 따른 총아미노산 함량은 50℃ > 45℃ > 40℃ > 55℃의 순서를 보여서 가용성 질소의 변화와 같은 양상을 보였다. 모든 제조구의 아미노산 함량은 phe, lys, leu, his, tyr, glu 및 gly의 함량이 높게 나타났다.

발효온도에 따른 단맛, 구수한 맛, 쓴맛 및 다른 아미노산의 함량은 50℃ 발효한 청국장에서 가장 높은 결과를 보였으며, 필수아미노산의 함량도 같은 경향을 나타냈으나, 단맛 아미노산인 Lys은 45℃에서 50℃보다 높은 함량을 보였다. 총 아미노산에 대한 Glu의 비율은 모든 구에서 비슷한 경향을 보여주었다.

(3) 휘발성 유기산 함량 및 관능적 특성

청국장의 향기성분 중 불쾌취를 나타내는 주성분인 propionic acid와 butyric acid의 함량은 40℃에서 가장 높은 함량이었으나, 50℃에서는 가장 낮은 함량을 보였다. JYM-025는 50℃에서 청국장을 발효시킬 경우 바람직하지 못한 냄새에 기여하는 성분인 휘발성 유기산 함량을 상당히 감소시켰다.

각각의 발효온도에서 제조된 청국장의 관능검사 결과 50℃가 가장 높은 점수를 획득하였으며 다른 구에 비하여 유의적으로 우수하였다.

*JYM-025*를 이용하여 청국장의 최적발효온도를 선택하기 위하여 점질물 함량, 가용성 질소 함량, 유리아미노산 및 휘발성유기산 함량, 관능검사 점수를 이용한 결과 50℃에서 발효시킨 청국장의 품질이 가장 우수한 결과를 보였다. 이 결과로 청국장 제조시 발효온도를 50℃로 설정하였다.

2) 최적발효기간

JYM-025 분리균주를 이용하여 실제 청국장 제조시 최적발효기간을 결정하기 위하여 증자된 콩에 *JYM-025*를 접종한 후 최적온도인 50℃에서 24, 36, 48, 60, 72 및 96시간 동안 발효시켜 제조한 청국장의 일반성분 변화, 색도, 유리아미노산, 휘발성유기산 함량 및 관능검사를 실시하였다.

(1) 일반성분 함량

청국장 발효기간에 따른 청국장의 품질특성 결과는 발효가 진행됨에 따라 점질성 물질의 생성량은 60시간 발효구에서 최대를 보였고 발효시간이 진행되면서 점차 감소하는 경향을 보였다. 수용성 질소와 TCA 가용성질소 함량이 모두 60시간까지는 급격히 증가하나 60시간 이후에는 완만한 증가 추세를 보여주고 있다.

Glucose의 함량은 24시간 0.018%에서 36시간 0.005%로 감소하였으나 발효시간이 경과함에 따라 소폭 감소하는 경향으로 나타났으며, pH는 24시간 7.45에서 96시간 8.63으로 시간이 경과함에 따라 강알칼리성을 나타냈다.

(2) 색도

청국장의 발효시간에 따른 색도의 변화는 발효개시에서 48시간까지는 L-value, a-value, b-value 모두에서 일정한 값을 나타내거나 서서히 감소하는 경향을 보였으나 60시간 발효구에서는 L-value가 낮아져서 최소값을 보였으며 60시간 이후의 발효구에서는 일정한 값을 보였다. a-value,

b-value에서는 48시간에서 60시간의 발효구에서는 급격한 감소를 보였으나 그 이후의 발효시간에서는 서서히 감소하였다.

(3) 휘발성 유기산, 유리아미노산 함량 및 관능검사

청국장의 발효시간에 따른 휘발성 유기산 함량은 발효시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 나타냈으며 총 아미노산 함량 변화는 발효시간이 24시간에서 60시간 경과시 2배로 증가되었으며, 각 개별아미노산은 Glu, Gly, Leu, Phe, His, Lys의 함량이 전체적으로 높은 비율을 차지하였다.

단맛, 구수한 맛, 쓴맛 및 그 외 아미노산의 함량은 각각 발효시간이 60시간까지는 큰 폭으로 증가하는 경향이었고, 72시간에서 96시간에서는 소폭 증가하였다. 필수아미노산의 함량은 발효기간이 길어질수록 계속 증가하는 경향으로 나타났다.

관능검사 결과는 종합적 기호도가 48시간과 72시간일 때 가장 우수하였다.

위 실험결과로서 *JYM-025*를 이용하여 제조한 청국장의 최적발효기간을 선택하기 위하여 점질물, 가용성질소, 유리아미노산 및 휘발성유기산 함량 및 관능검사 결과 점수를 종합적으로 합산해 본 결과, 60, 96 및 72시간 발효구에서 비슷한 점수를 보였으나, 실제 청국장의 기호도를 나타내는 관능검사에서 96 및 72시간구에서 60시간 발효구보다 나쁜 결과를 보였으므로, *JYM-025*를 이용하여 50℃, 60시간 발효시켜 제조한 청국장의 품질이 가장 우수하였다.

4. 청국장 품질개선을 위한 당화현미 첨가효과

1) 당화현미 첨가량 결정

JYM-025를 이용하여 최적조건으로 청국장을 제조한 것에서 되도록이면 바람직하지 못한 냄새를 감소시키려는 목적으로 맥아로 당화시킨 당화현미를 첨가하여 불쾌취 저감화조건을 탐색하였다. 즉, JYM-025를 증자콩에 접종한 후 50℃의 항온기에서 60시간 발효시키면서 증자당화현미와 볶음당화현미를 0, 10, 30, 50%(w/w)를 첨가한 후 온도를 60℃, 12시간 더 발효시켜 제조한 청국장의 품질을 비교하였다.

(1) 일반성분 및 색도

수분함량은 당화현미 첨가구가 당화현미 무첨가인 대조구보다 높아 수분보수력이 향상되었고, 총질소 함량은 대조구가 3.92%, 증자현미 첨가구에서 당화현미 첨가량이 10%일 때 2.57%이었으나 첨가량이 증가할 수록 감소되었고, 볶음현미 첨가구에서는 첨가량에 따른 질소함량은 비슷한 경향을 나타냈다. 수용성 질소와 TCA 가용성질소 함량은 대조구와 비교할 때 총질소 함량과 유사한 경향으로 감소되었다.

젖산 함량은 당화현미 첨가량과 반비례하는 경향을 보여서 첨가량이 증가할수록 젖산 함량은 감소되었다. pH는 대조구의 7.22에서 증자현미 첨가구 및 볶음현미 첨가구에서 첨가량이 증가함에 따라 산성쪽으로 기울어지는 현상은 볶음현미 첨가구에서 더 큰 경향을 보였고, 포도당 함량은 볶음처리구에서 당화현미 첨가량 증가와 비례하여 증가하였다.

L-value는 대조구에 비하여 증자현미 첨가구는 거의 변화가 없으나 볶음현미 첨가구의 첨가량이 증가할수록 청국장의 색이 밝게 되었고, 당화현미의 첨가로 청국장의 어두운 색을 밝게 개선하는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

(2) 유리아미노산 함량

현미의 첨가에 따른 유리아미노산의 총함량은 총질소의 결과와 비례하여 증가하는 경향을 보였다. 단맛의 아미노산 함량은 대조구가 314.73mg%, 증자현미 첨가구에서 당화현미 첨가량이 10%일 때 233.13mg%이었으나 50%는 84.79mg%로 크게 감소되었고, 볶음현미 첨가구에서도 비슷한 경향을 나타냈다. 다른 아미노산 및 필수아미노산의 함량도 증자현미의 첨가량이 증가할수록 감소되었다.

당화현미 첨가량에 따른 아미노산의 상대적 비율은 대조구와 당화현미 첨가구간에 큰 차이를 나타내지 않았고, 필수아미노산의 비율도 차이를 나타내지 않았다.

(3) 향기성분 및 휘발성 유기산

향기성분 분석결과를 보면, 총 42종의 향기성분이 분석되었으며 trimethyl pyrazine의 함량이 대조구의 29.81보다 볶음구가 45.22, 증자구가 256.68로 월등히 높게 나타났으며, 2, 5-dimethyl pyrazine의 경우도 대조구의 10.19보다 증자 처리구가 32.09로 크게 증가하는 것으로 나타났고, 불쾌취를 발생하는 성분인 2,3,5,6-tetramethyl pyrazine의 함량은 현미를 첨가한 구에서 모두에서 대조구의 256.64보다 훨씬 낮게 나타났다.

휘발성 유기산 함량은 대조구가 375.11mg%로 가장 높았고 바람직하지 못한 냄새인 butyric acid가 79.34mg%가 검출되었으나 당화현미를 첨가한 구에서는 검출되지 않았다 또한, propionic acid도 대조구 206.79mg%보다 현미의 첨가량이 증가할수록 감소하였다.

(4) 관능검사

관능검사 결과 색은 증자구 10% 첨가구에서 9.25로 대조구 7.50보다 가장 높게 나타났고, 구수한 맛은 대조구, 증자구 10%, 30%, 볶음구 10%에서, 향

기, 쓴맛, 신맛 및 단맛은 증자구 30% 첨가구에서 우수하게 나타났고, 종합적 기호도에서도 증자한 당화현미의 첨가량이 30% 첨가시 대조구보다 유의적으로 우수하였다.

당화현미 제조시 최적 호화방법과 첨가량은 향미의 개선과 관능평가 결과에서 보여주듯 볶음구보다 증자하여 당화시킨 현미를 첨가했을 때가 우수하였으며 증자한 당화현미를 비율별로 첨가한 실험결과에서는 30%를 첨가하여 제조한 청국장의 품질 및 기호성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

2) 당화현미 첨가시기 결정

청국장의 발효과정 중 단백질의 분해정도에 따른 당화현미의 첨가효과를 확인하고자 발효시간에 따라 당화현미를 첨가하여 청국장 발효를 시도하였다. JYM-025를 증자한 콩에 접종하여 50℃의 항온기에서 24, 36, 48 및 60시간 경과 후에 증자한 당화현미를 30% 첨가한 후 온도를 60℃에서 발효시키고, 그 후 12시간 더 발효하여 전분의 분해를 촉진시켜 제조한 청국장의 품질을 비교하였다.

(1) 일반성분 함량 및 색도

발효과정 중 당화현미의 첨가시기에 따른 청국장의 일반성분 변화는 총질은 첨가시기에 따라 큰 차이가 없으나, 가용성 질소는 60시간 0.96%로 가장 높게 나타났고 TCA 가용성질소는 48시간, 60시간이 각각 0.68%, 0.70%으로 비슷한 경향을 보였다.

Lactic과 propionic acid는 24시간 0.166%, 894.29mg%에서 60시간 0.060%, 351.16mg%로 크게 감소하였으나, glucose는 0.07에서 0.098%로 상승하였고, pH는 알칼리성 쪽으로 상승하였다. 이 결과는 초기에 당화현미를 첨가할 경우 젖산과 휘발성유기산의 함량이 높아지고 pH도 낮은 결과를 보여 단백질

분해에 방해가 되기 때문에 청국장의 품질을 향상시키기 위하여 48 또는 60시간에 첨가하는 것이 적당할 것으로 판단되었다. 그리고 당화현미의 첨가 시기에 따른 청국장의 색도변화는 24, 36, 48 및 60시간에 당화현미를 첨가한 구에서의 b값과 a값은 5% 유의수준 차이가 없는 것으로 나타나 비슷하였으나 L값은 5% 유의수준에서 차이가 인정되었으며 첨가시기가 늦어질수록 다소 어두운 색을 띄었다.

(2) 유리아미노산 함량

당화현미 첨가시간에 따른 청국장의 유리아미노산 함량은 24시간 420.39 mg%에서 첨가시기가 늦을수록 증가하여 60시간에는 695.19mg%로 증가하였으나, Glu의 함량은 큰 변화를 보이지 않았다. Arg은 36시간보다 48 및 60시간에서 감소한 결과를 보였으나, His 등 대부분의 아미노산은 첨가시기가 늦을수록 증가하는 경향을 나타냈다. 단맛을 내는 아미노산은 24시간 109.74 mg%이었으나 60시간에서는 180.31mg%으로 증가하였으나 구수한 맛은 소폭 증가하였다. 필수아미노산 함량은 24시간 174.53mg%이었으나 점차 증가하여 60시간에서는 318.14mg%의 경향으로 나타나 60시간 발효 후 당화현미를 첨가하는 것이 영양적으로도 우수한 결과를 보였다.

당화현미 첨가시간에 따른 총 유리아미노산에 대한 상대비율은 Glu는 첨가시간 경과에 따라 감소하는 경향을 보였지만 다른 아미노산들은 큰 차이를 나타내지 않았다. 필수아미노산 함량은 소량 증가하는 양상을 보였으나 48시간 이후는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다.

(3) 관능검사

당화현미가 첨가되어 제조된 청국장의 관능검사 결과 점질성은 24시간에 당화현미를 첨가한 구에 비하여 60시간 첨가구에서 월등히 높은 점수를 얻었고, 색도는 첨가시간이 늦을수록 서서히 증가되었고 향기에 대한 관능검

사 점수는 60시간 구에서 8.06으로 가장 높게 나타났다.

이상의 실험결과로 볼 때 총질소와 TCA 가용성질소의 경우 60시간경과 후 첨가구가 2.53%, 0.70%로 가장 높게 나타났으며, 유기산과 pH의 분석결과는 초기에 당화현미를 첨가할 경우 젖산과 휘발성유기산의 함량이 높아지고 pH도 낮은 결과를 보여 단백질 분해에 방해를 주기 때문에 청국장의 품질을 향상시키기 위하여 50℃에서 발효하면서, 60시간 경과 후에 당화현미를 첨가하여 청국장을 제조하는 것이 가장 품질이 우수한 것으로 나타났다.

유리아미노산 함량도 60시간 발효시에 695.19 mg%로 높게 나타났으며 관능검사결과 종합적인 기호도를 비롯한 모든 항목에서 우수한 점수를 획득하여 60시간에 첨가하는 것이 당화현미의 구수한 향과 맛이 청국장의 품질을 향상시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

4. 청국장의 생리활성

1) 전자공여능(DPPH)

전통청국장과 당화현미 청국장을 물로 추출한 후 동결건조한 시료를 농도를 달리하여 전자공여능을 측정한 결과 50ppm, 100 ppm 및 200 ppm에서 전통청국장은 각각 30.74%, 44.37% 및 66.70%, 당화현미 청국장도 각각 35.25%, 48.54% 및 74.76%로서 청국장의 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 전자공여능이 증가하였고 전통청국장에 비해 당화현미 청국장의 경우가 다소 높은 항산화능을 보여주었다.

2) SOD 유사활성

항산화효소 중 SOD유사활성을 측정한 결과 모든 구에서 동일하게 청국장추출물의 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였다 당화현미 청국장은

SOD유사활성이 200, 300 및 400ppm 농도에서 각각 4.40%, 16.50% 및 39.46%로 전통청국장 3.40%, 13.40%, 33.37% 보다 다소 높아 SOD유사활성 능력이 우수함을 나타냈다.

3) 청국장의 암세포 증식억제 효과

전통청국장과 당화현미 청국장을 물로 추출한 후 동결건조한 시료를 농도를 달리하여 MDA-MB-231(breast cancer), SK-MEL-31(Malignant melanoma), G361(Melanoma), A549(lung cancer)의 4종의 암세포에 투여하여 각각의 암세포주의 증식억제 효과를 관찰하였다.

MDA-MB-231(유선암 세포) 암세포주는 당화현미 청국장이 500ppm, 1,000ppm 및 2,000 ppm의 농도에서 각각 15.68%, 17.20% 및 21.81%로서 전통청국장 11.86%, 15.55% 및 18.07%의 저해율 보다 확연한 차이를 보이며 높은 저해율을 나타내었다.

또한, SK-MEL 31(악성 피부암세포) 암세포주는 현미청국장이 500ppm, 1000ppm 및 2000ppm에서 각각 18.10%, 24.23% 및 29.09%의 저해율을 보여 전통청국장 9.66%, 12.21% 및 29.09%보다 2배의 높은 증식억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

G361(피부암세포)와 A549(폐암세포) 암세포주의 경우 청국장 농도의 증가와 더불어 암세포주의 증식억제 효과가 증가하였으며 전통청국장보다 현미청국장을 투여했을 때가 뚜렷한 차이를 보이며 높은 저해율을 보여주었다.

당화현미 청국장의 암세포 증식억제 시험결과에서 전통청국장이 4종의 모든 암세포주에서 증식억제효과를 나타내는 것으로 나타났고 전통청국장보다 당화현미 청국장 농도의 증가에 따른 암세포주의 높은 증식억제 효과를 보임을 알 수 있었다.

5. 당화현미를 첨가한 청국장을 이용한 제품 제조

청국장은 소금을 사용하지 않고도 가장 짧은 기간인 2~3일이면 제조하여 섭취할 수 있는 발효식품으로 소화흡수율이 매우 높으며²³⁾, 식용방법은 일본의 낫또(natto)와는 달리 장류 자체로서 끓여먹는 것이 일반적인 이용법이 기 때문에 가열조리시 생리활성물질의 파괴가 일어난다. 생청국장을 5분 정도 끓이면 청국장의 발효균과 분해효소와 면역증강 효과가 있다고 알려져 있는 핵산(DNA)이 완전 파괴된다고 하였으며 비타민 B₂는 끓인 청국장에서 50%정도 파괴된다고 하였다²³⁾.

그러나, 생청국장을 바로 섭취하는 것은 특유의 불쾌취와 점질물의 식감으로 인한 거부감으로 매우 어려운 일이다. 그래서 영양 및 생리학적 특성이 우수한 청국장의 소비증진을 위해서는 청국장의 제조 및 식용방법의 개선과 청국장을 소재로 한 새로운 가공식품의 개발이 선행되어야 할 것으로 판단되어 당화현미를 첨가한 청국장을 이용한 쌈장, 볶음고추장, 고기소스 3 품목을 제조하여 관능검사를 실시하였다.

일반적으로 우리가 섭취하고 있는 기존의 장류와 소스류에 청국장의 활용도를 높일 수 있는 방법으로 당화현미 청국장을 혼합하여 관능검사를 한 결과 세 가지 제품 모두에서 기존의 제품들보다 더 좋은 기호도를 보여 청국장의 활용도를 높임과 동시에 기존의 장류 및 소스류의 기호도를 높이는데 기여할 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다.

References

1. 석영란, 김영활, 김성, 우희섭, 김태완, 이선호, 최청 : *Bacillus licheniformis* CN-115 균주를 이용한 청국장 제조 과정에 있어서 단백질 및 아미노산의 변화, 한국농화학회지 37(2), 1994
2. 채홍자, 이효지 : 문헌에 기록된 장류의 분석적 고찰, 1990
3. Yoshi, H. & Inshihara, A. : J. Ferment. Tech. (Japan) 37, 110 (1959)
4. Kanno, A. and Takamatsu. H. : Changes in the volatile components of natto during manufacturing and storage. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 34, 330 (1987)
5. Suguwara, E., Ito, T., Odagiri, S., Kubotu, K. and Kobayashi, A.: Comparison of compositions of odor components of natto and cooked soybean. *Agric. Biol, Chem.*, 49, 311 (1985)
6. National Rural Living Science Institute, R. D. A. Food composition table, p. 324, Fifth revision, 1996
7. Lee, Y. L., Kim, S. H., Choung, N. H. and Yim, M. H. : A study on the production of viscous substance during *Chungkookjang* fermentation. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 35, 202-209, 1992
8. 윤숙자 : 한국의 저장 발효음식, 신광출판사, 1998
9. 김철재 : 전통장류의 생리활성 기능 -콩의 생리활성 물질-, 제 2회 영남대학교 부설 장류연구소 심포지움. 7-50, 1999
10. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H.

- : A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experimentia*. 43, 1110-1111. 1987
11. Kim, J.S., Current research trends on bioactive function of soybean, *Korea soybean digest* .13, 29-43
 12. 김용택, 김원극, 오훈일 : 청국장으로부터 혈전용해균주의 분리 및 동정, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 23(1), 1-5, 1995
 13. 허석, 이시경, 주현규. 청국장으로부터 fibrin용해 세균의 분리 동정, *한국농화학회지*, 41(2), 1998
 14. 길지은, 김기남, 박인식 : 새로운 혈전용해 효소의 생성 및 특성 - 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. KP-6408로부터 효소 생성의 최적조건, *한국영양과학회지* 27(1), 51-56, 1998
 15. 이시경, 허석, 배동호, 최기현 : 청국장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* KCK-7에 의한 fibrin분해 효소 생산 배지 최적화, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26(3), 226-231, 1998
 16. 須見 洋行. 1990. 納豆の 機能性, 日本醸造協會誌, 85:518-524.).
 17. Yoon, K. D., Kwon, D. J., Hong, S. S., Kim, S. I. and Chung, K. S. : Inhibitory effect of soybean and fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24(4), 525-528, 1996
 18. Chung, K. S., Yoon, K. D., Kwon, D. J., Hong, S. S. and Choi, S. Y. : Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumor cells using MTT assay. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25(5), 477-482. 1997

19. Choi, Y. B. and Sohn, H. S. : Isoflavone content in korean fermented and unfermented soybean foods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30, 745-750, 1998
20. 손미예, 서권일, 박석규, 조영숙, 성낙주 : Bacillus 균주를 이용한 검정콩 청국장의 생리활성 및 Isoflavone 함량, 한국식품영양과학회지, 30(4), 662-667, 2001
21. Cho, Y. J., Cha, W. S., Bok, S. K., Kim, M. U., Chun, S. S. and Choi, U. K. : Production and separation of anti-hypertensive peptide during *chunggugjang* fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023, *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43, 247-252, 2000
22. 윤호경, 최희선, 허성호, 홍정화 : 청국장 발효 세균의 종류에 따른 청국장 점질물의 항 미생물 활성에 관한 연구, *J. Fd Hyg. Safety* 16(3), 188-193, 2001
23. 김한복 : 미생물학 박사 김한복 교수의 청국장 다이어트 & 건강법, Human & Book, 2003
24. 김경자, 유명기, 김상순 : 벧짚을 이용한 청국장 제조에 관한 연구, 한국식품과학회지, 14(4), 301-308, 1982
25. 김진숙, 유선미, 최정숙, 박홍주, 홍선표, 장창문 : 전통 청국장의 이화학적 특성, 한국농화학회지, 41(5), 377-383, 1998
26. 박계인 : 청국장 메주 발효과정 중 질소화합물의 소장에 관한 연구 (I), 한국농화학회지, 15, 93, 1972
27. 박계인 : 청국장 메주 발효과정 중 질소화합물의 소장에 관한 연구 (II) 15, 111. 1972
28. 유선미, 장창문 : 콩 품종별 청국장의 가공적성 연구, 한국농화학회

- 지, 42(2), 91-98, 1999
29. 고태수, 조대희, 황성연, 김영만 : 청국장 제조방법에 따른 향기 증진 효과, 한국식품영양학회지. 12(1), 1-6, 1999
 30. 최성희, 지영애 : 청국장 숙성 중의 향기성분 변화, 한국식품과학회지, 21(2), 223, 1989
 31. 주현규 : 청국장 제조에 관한 연구, 한국식품과학회지, 3, 64, 1971
 32. 최정숙, 유선미, 김행란, 김진숙, 장창문 : 발효방법 및 대두품종을 달리한 청국장의 향기성분. 한국농화학회지, 42(2), 111-115, 1999
 33. 서정숙, 유명기, 허유행 : 균주를 달리한 청국장의 제조에 관한 연구 (Ⅲ). 한국식품과학회지, 15, 385-391, 1983
 34. 최청, 석영란, 김영활, 김성, 우희섭, 김태완, 이선호 : *Bacillus licheniformis* CN-115균주를 이용한 청국장 제조 과정에 있어서 단백질 및 아미노산의 변화, 한국농화학회지, 37(2), 65-71, 1994
 35. 연규춘, 김동호, 김정옥, 박병준, 육홍선, 조재민, 변명우 : *Bacillus natto*와 *Bcillus licheniformis*의 혼합 starter로 제조된 청국장의 품질 특성, 한국식품영양과학회지, 31(2), 204-210, 2002
 36. 손미예, 권선화, 박석규, 박정로, 최진상 : 키위와 무를 첨가한 검정콩 청국장의 발효중 화학성분의 변화, 농산물유통학회지, 8(4), 449-455, 2001
 37. 손미예, 김미혜, 박석규, 박정로, 성낙주 : 키위와 무를 첨가한 검정콩 청국장의 맛성분 및 기호도, 한국식품영양과학회지. 3(1), 39-44, 2002
 38. 인재평, 이시경, 안병권, 정일민, 장진혁 : 유카 추출물 첨가에 의한 청국장의 풍미 개선에 관한 연구 , 한국식품과학회지. 34(1), 57-64,

2002

39. 주현규 : 시판청국장 일반성분과 쏙 또는 고추기름을 첨가한 청국장의 향기성분, Korea Soybean Digest 13, 44-56, 1996
40. 김성수, 김정탁, 홍희도 : 작두콩을 첨가한 청국장 개발, 한국식품개발연구원 보고서, 2002
41. 최경호, 조미영 : 시판 청국장 중에 함유된 *Bacillus subtilis* 균 포자의 가열살균 특성, 대구효성카톨릭대논문집, 제5권, 191-198, 1997
42. 김동호, 육홍선, 연규춘, 차보숙, 김정옥, 변명우 : 감마선 조사된 청국장의 미생물 및 일반품질 특성 변화, 한국식품과학회지, 32(4), 896-901, 2000
43. 이부용, 김동만, 김길환 : 청국장의 물성 변환에 대한 연구, 한국식품과학회지, 23(4), 478-484, 1991
44. 최정숙, 김진숙, 유선미, 박홍주, 김태영, 장창문, 신선영 : 청국장의 제조방법과 이용실태에 관한 조사연구, 한국콩연구회지, 3(2), 29-43, 1996
45. 서정숙, 이상건, 유명기 : 균주를 달리한 청국장의 제조에 관한 연구(Ⅱ). 한국식품과학회지, 14, 309, 1982
46. 이현자, 서정숙 : 균주를 달리한 청국장의 제조에 관한연구(Ⅰ) 한국영양학회지, 14, 97, 1981
47. 김혜영, 이인선, 김순미 : 청국장 향미에 미치는 β -cyclodextrin의 포집효과, Korean dietary culture, 16(4), 310-315, 2001
48. 정지훈, 강성국, 김용순, 정희종 : 청국장 제조과정에서의 Bacterial Phytase에 의한 Phytic acid의 분해, 한국산업미생물학회지, 18(4), 423-428, 1990

49. Lee, B. Y., Kim, D. M. and Kim, K. H. : Physico-Chemical properties of viscous substance extracted from *Chungkook-jang*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 23(5), 599-604, 1991
50. Yoon, K.S. : Changes of enzymetic activities during the fermentation of soybean. Master thesis. Konkuk University, 1988
51. Anson, M.L. : The estimation of pepsin, papain, cathepsin with hemoglobin. *J. Physiol.*, 22, 79-84, 1939
52. Lee B. Y., Kim D.M. and Kim K.H. Physico-Chemical properties of viscous substance extracted from *chungkookjang*, *Korean. J. Food Sci. Technol.* 23(5) 599-604, 1991
53. Butler, J. P. : Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2., Williams & Wilkins, 1104-1133 (1986)
54. Official Methods of Analysis, 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 2000
55. Kim, M. S. and Olson, N. F. : Determination of milk protein hydrolysis in cheese by trichloroacetic acid. *Foods and Biotechnology*, 3, 244-248, 1994
56. 陰山藤弘, 森治夫, 左藤郎 : ガスクロマトグラフィーによるサイレジの揮発性脂肪酸と乳酸の同時測定法. *日畜會報*, 44(9), 465-469, 1972
57. Japanese Soy Sauce Research Institute. Methods in Shoyu Experiments, Mitsuosa printing Co, Tokyo, Japan, 1990
58. Yeonsei University : Methods in laboratory experiments of foods. Tamgudang Publishing Co., Seoul, 1975

59. Yoda, K., Urakabe, R. and Tsuchida, T. : Enzyme electrode provided with immobilized enzyme membrane. US Patent 4,240,889, 1980
60. Shultz, T. H., Flath, R. A., Mou, T. R., Egglug, S. H. and Teranishi R. Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 446-449, 1977
61. Blois, M.S.: Antioxidant determiantion by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1198, 19586. Lee, C.H., Chae, K.S., Lee, S.K. and Park, B.S. Quality Managements in Food Industry, Yoorim Munwhasa, Seoul, Korea, 1982
62. Marklund, S. and Marklund, G. : Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismmutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 468-474, 1974
63. Charmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Michell, J.B.: Evaluation of tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47: 963, 1987
64. Lee, C.H., Chae, K.S., Lee, S.K. and Park, B.S. Quality Managements in Food Industry, Yoorim Munhwasa, Seoul, Korea, 1982
65. 이부용, 김동만, 김길환 : 청국장 점질물의 이화학적 특성, 한국식품 과학회지, 23(5), 599-604, 1991
66. 권광일 : Bioreactor system을 이용한 알콜醱酵와 膜法에 의한 韓國 傳統간장의 品質改選에 관한 研究, 영남대학교 일반대학원 박사학위

논문, 2004

67. 이계호, 이효지, 정문교 : 청국장에 관한 연구(I) - 청국장 제조에 있어서 콩단백질의 변화에 관하여, 한국농화학회지, 14(3), 191-200, 1971
68. 성낙주, 지영애, 정승용 : 청국장 발효 중 질소화합물의 변화, 한국식품영양과학회지, 13(3), 275-284, 1994
69. 최용규, 손동화, 지원대, 임무혁, 최종동, 정영건 : *Bacillus subtilis* DC-2를 이용한 청국장 발효과정 중 맛성분 및 기호도 변화, 한국식품영양과학회지, 27(5), 840-845, 1998
70. 김상달, 도재호, 오훈일 : 고려인삼 갈변물질의 항산화 효과, 한국농화학회지, 24(3), 161-166, 1981
71. Ji, L. L. : Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 25, 225-231, 1993

ABSTRACT

Research on Quality Improvement of *Chungkookjang* (fermented soybean pastes) by *Bacillus subtilis*

Jang Young-mi
Department of Food &
Nutrition
The Graduation School
Sungshin Women's
University

Chungkookjang a kind of fermented soybean pastes representing Korea's fermented food using soybeans has been known to be abundant source of proteins and lipids with digestability as fermented seasoning food and to have preventative and therapeutic effects.

Chungkookjang can be manufactured with unique flavors by high temperature short time fermentation process(50°C, 3days) and it is the most effective foods of soybean intake both nutritionally and economically.

Soybeans contain physiological activation substances known to promote

health of human such as dietary fiber, phospholipids, isoflavones, phenolic acids, saponins, phytic acids having effects for inhibiting blood pressure elevation, improving lipid metabolisms, dissolving a blood clot, anti-mutagenicity, anticancer, antibacterial activities in addition to its nutritional functions and its consumption is increasing recognizing its functionalities. And trypsin inhibitor is contained but it will be losted during heating process.

However, it is a pity that the consumption of *Chungkookjang* is decreasing due to its undesirable flavors despite of its high contents of nutritional and therapeutical materials.

This study was intended to investigate the selection of the most proper starter strain for *chungkookjang* making, the ultimate conditions for its fermentation, adding effects of brown rice saccharifying with barley malt to reduce undesirable flavors produced during fermenting periods. While the quality, organoleptic properties and physiological activities of *chungkookjang* added saccharified brown rice were also researched and developments of various foods using *chungkookjang* added saccharified brown rice were carried out and their acceptances were evaluated by sensory tests for taste, flavor, color etc.

The results were obtained as follows ;

It was known that *Bacillus Lichenformis* was selected as the most proper starter strain for *chungkookjang* among 5 strains detected from traditional *chungkookjang* 17 starter strains. It was named here as *Bacillus*

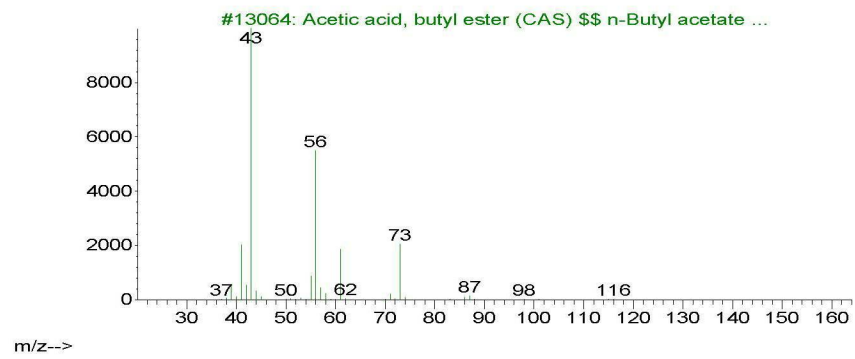
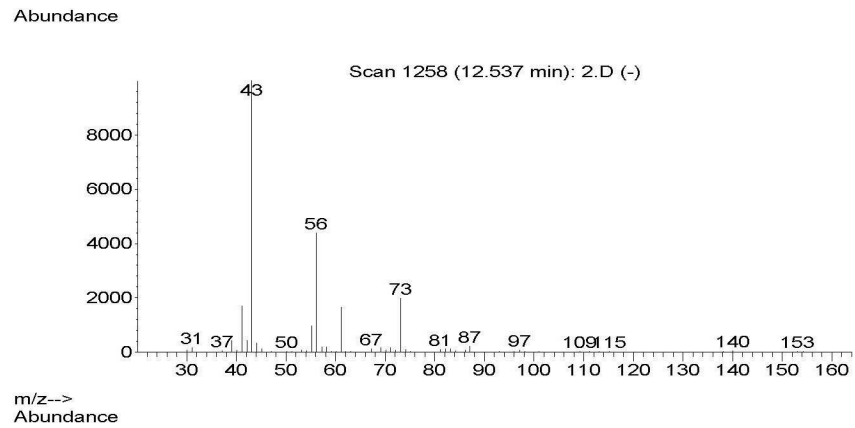
Licheniformis JYM-025 abbreviated as *JYM-025*.

It was found that the best conditions for the fermentation of *Chungkookjang* fermented by *JYM-025* were carried out at 50°C for 60 hours. Under the best condition it was shown that the flavor of *JYM-025 Chungkookjang* fermented with brown rice saccharified with barley malt(abb. saccharified brown rice) was improved better than that of *JYM-025 Chungkookjang* without saccharified brown rice. Specially, the best result were obtained when adding time of saccharified brown rice was after 60 hours fermentation and the adding amounts of saccharified brown rice were 30% for *JYM-025 Chungkookjang* (W/W) and then after adding saccharified brown rice, fermentation was going on more for 12 hours at 50°C.

And also it was found that the water extracts of *JYM-025 Chungkookjang* fermented with saccharified brown rice had higher electron donor ability, higher similar SOD activity, and higher inhibition effects of cancer cell growth than those of none adding *JYM-025 Chungkookjang*.

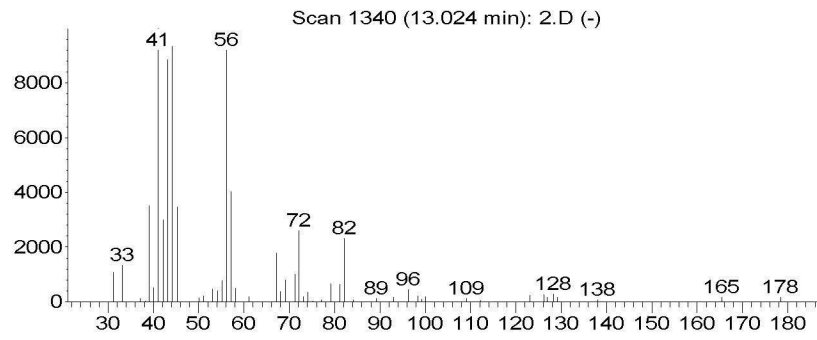
The three kinds of products using *JYM-025 Chungkookjang* such as *Samjang*, roasted *Kochujang*, and meat sauces were developed in order to reduce undesirable flavor and to extend the intake chance for *Chungkookjang*. All of products were accepted favorably by panels with good record about taste, flavor, color etc..

APPENDIX 1. GC-MSD Fragment of Flavor component

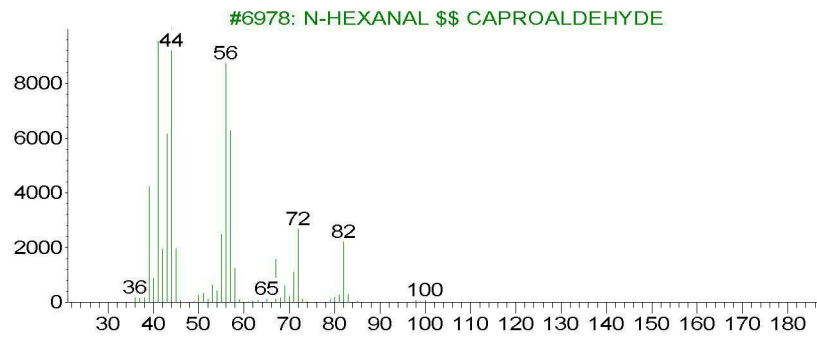


Acetic acid, buthyl ester

Abundance



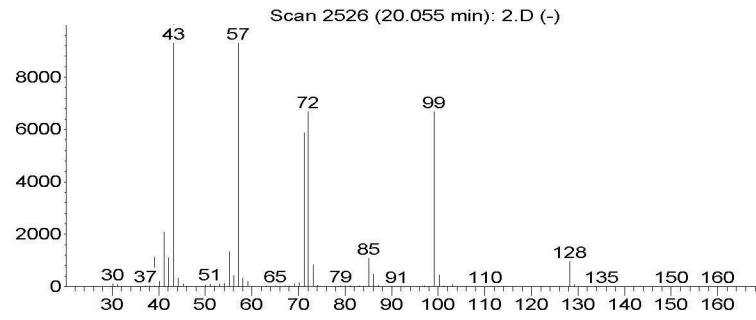
m/z-->
Abundance



m/z-->

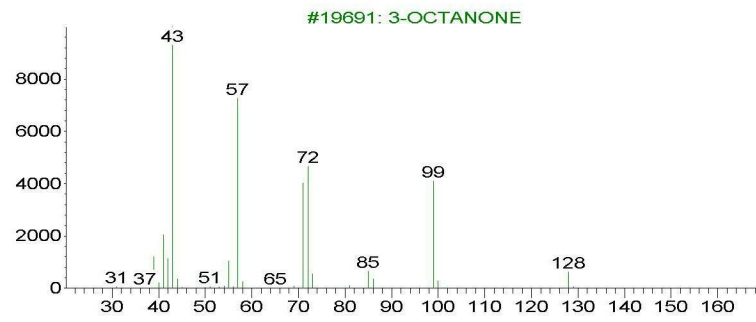
n-Hexanal

Abundance



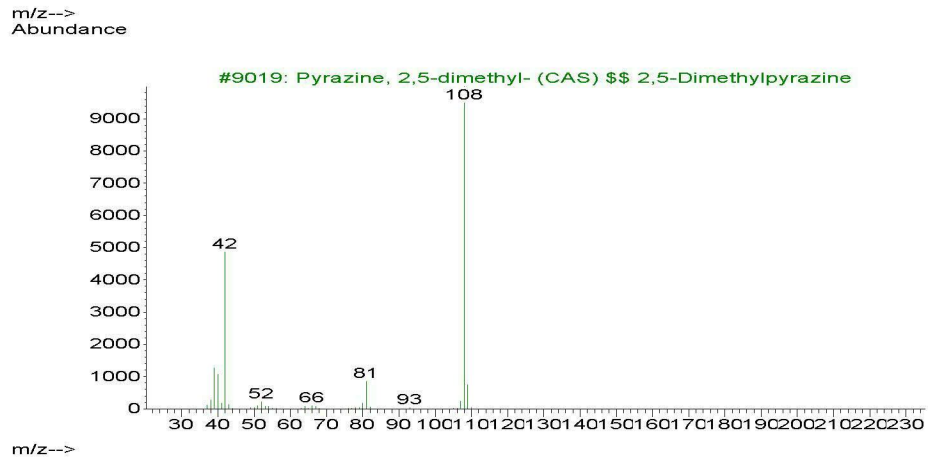
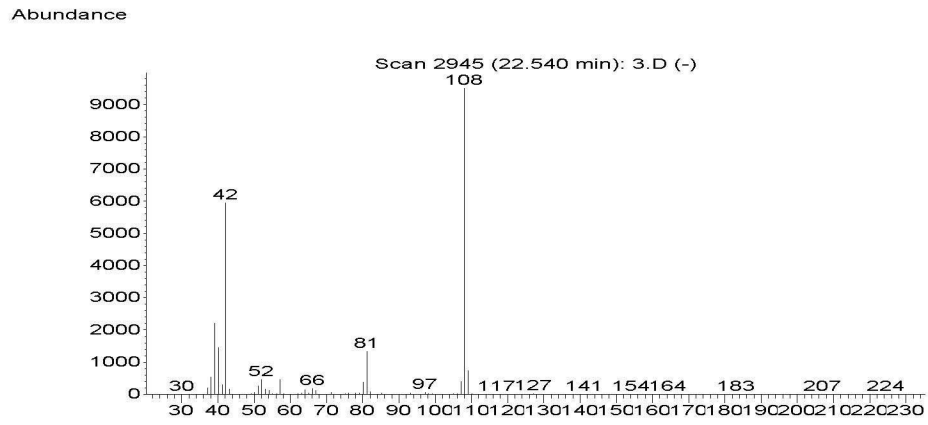
m/z-->

Abundance



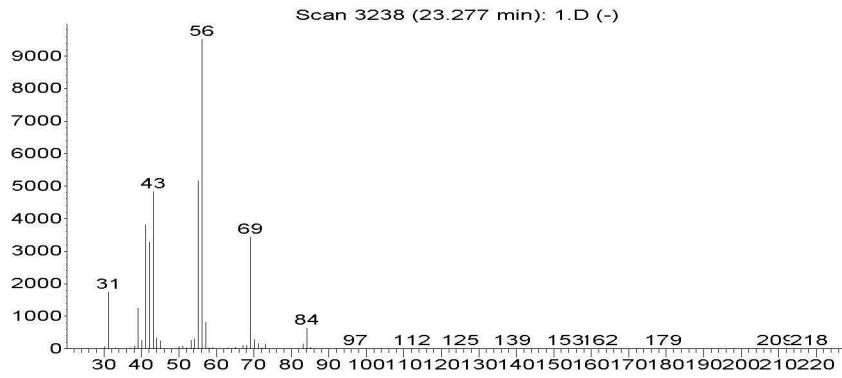
m/z-->

3-Octanone

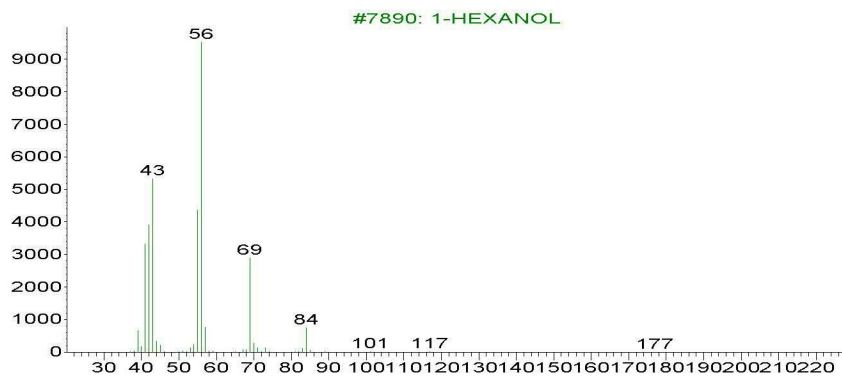


Pyrazine, 2,5-dimethyl-

Abundance

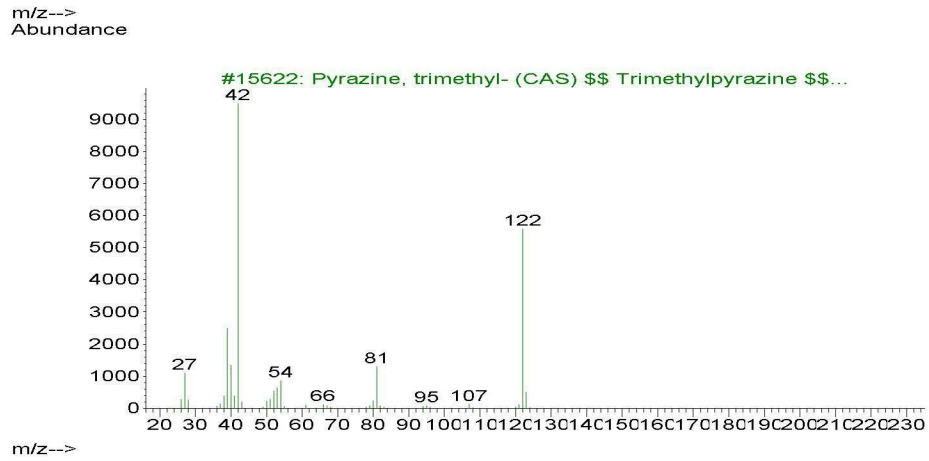
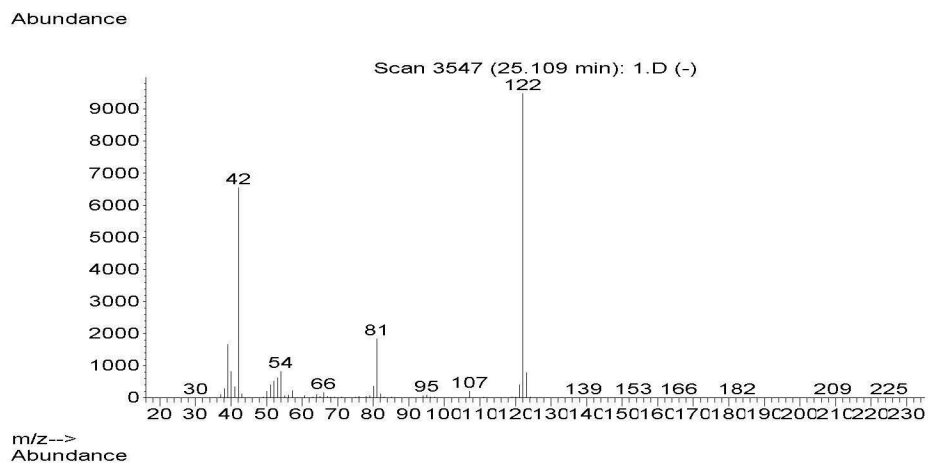


m/z-->
Abundance

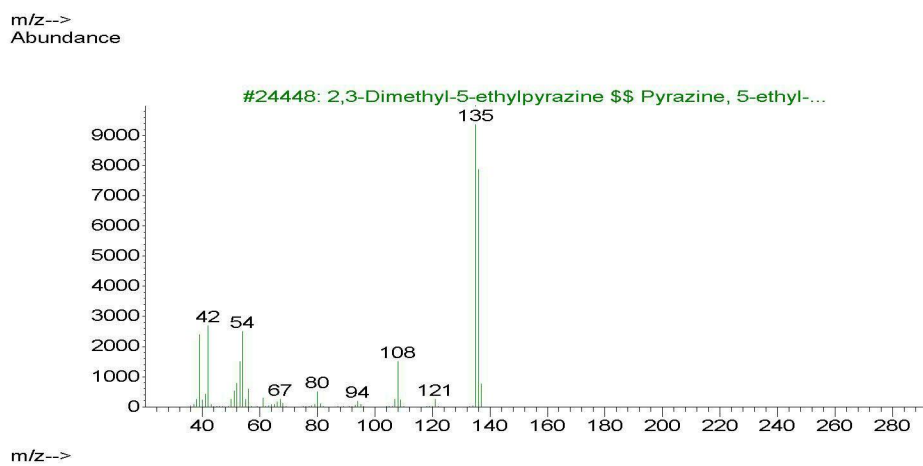
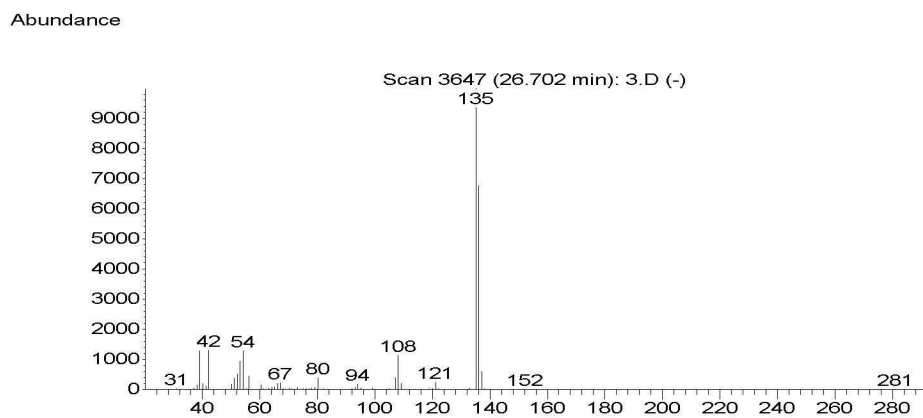


m/z-->

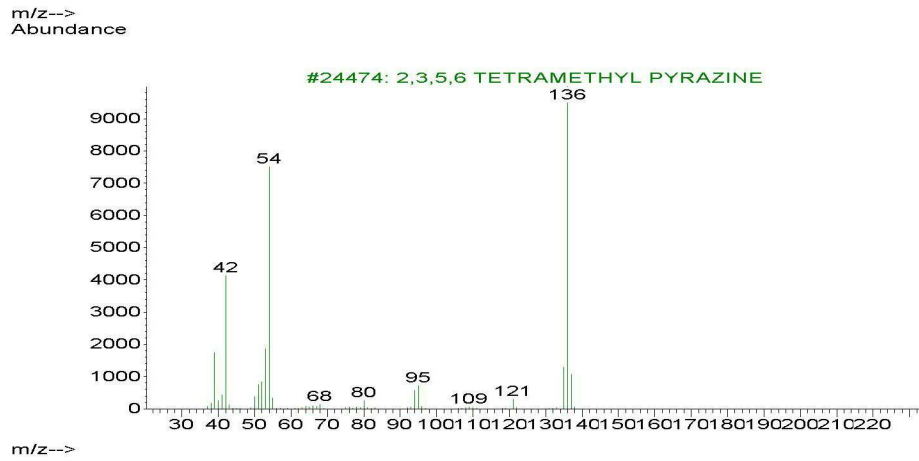
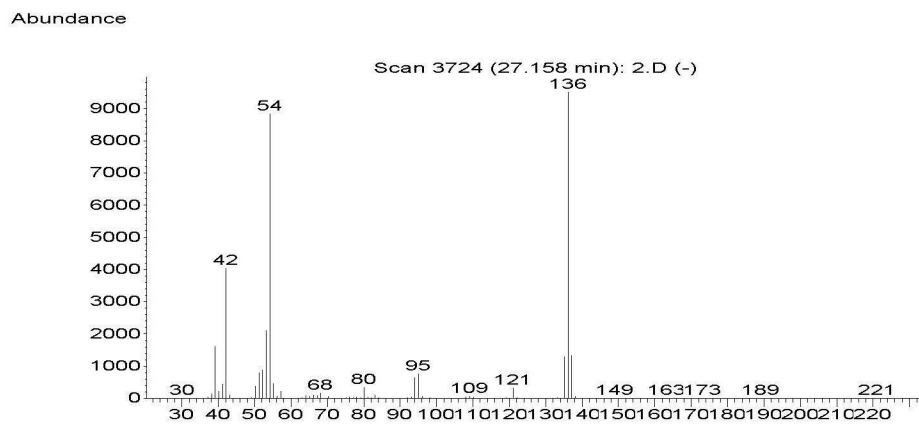
1-Hexanol



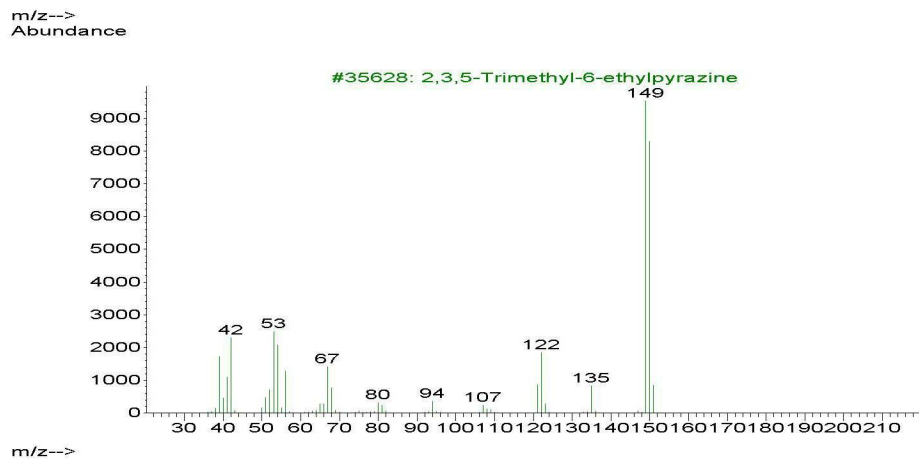
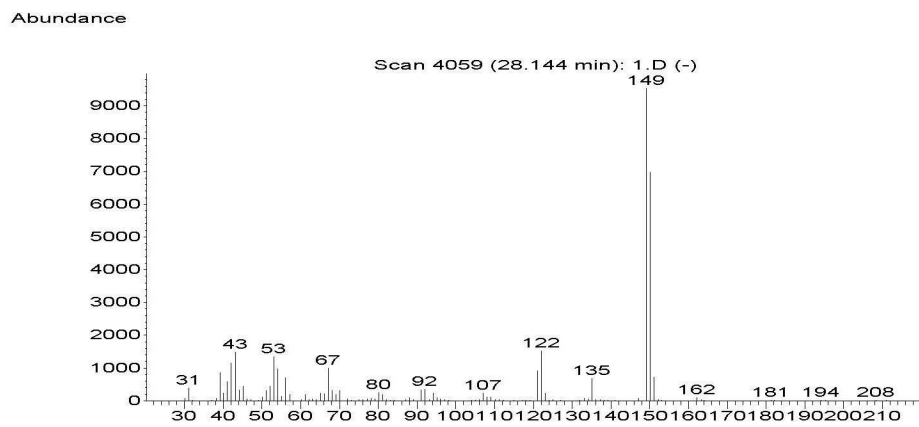
Pyrazine, trimethyl-



2,3-Dimethyl-5-ethyl pyrazine

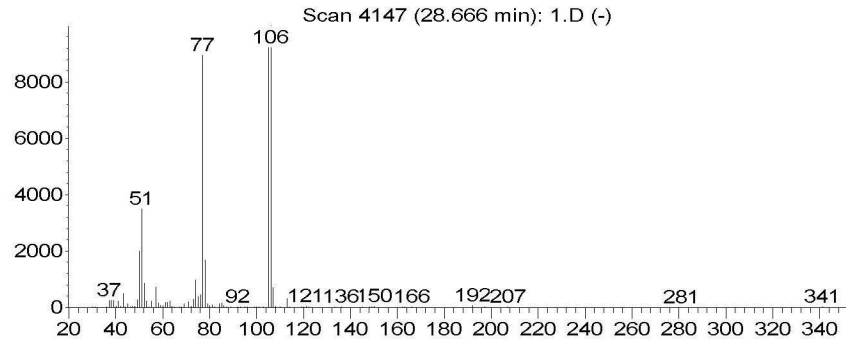


2,3,5,6 Tetramethyl pyrazine

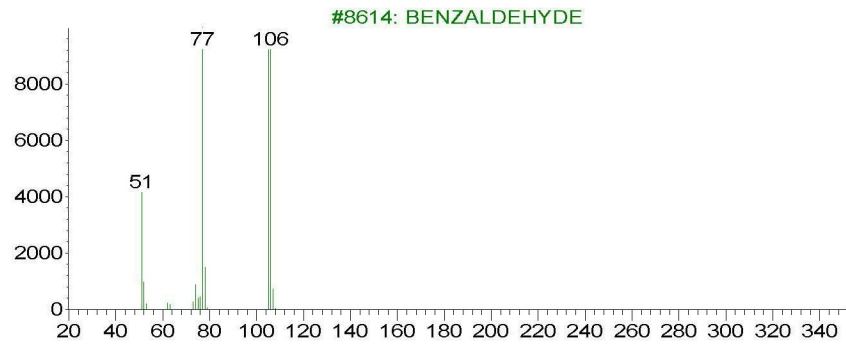


2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine

Abundance



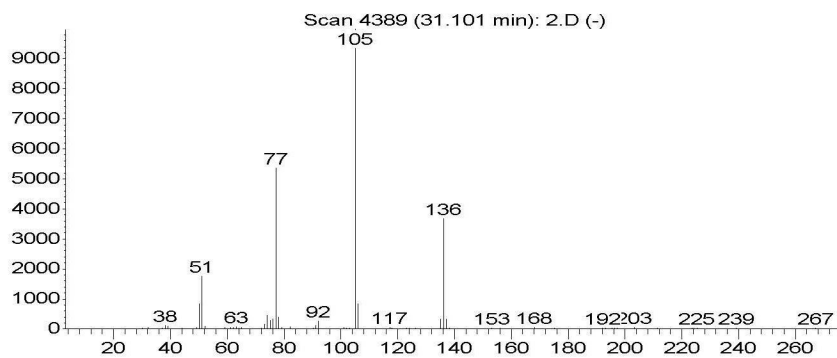
m/z-->
Abundance



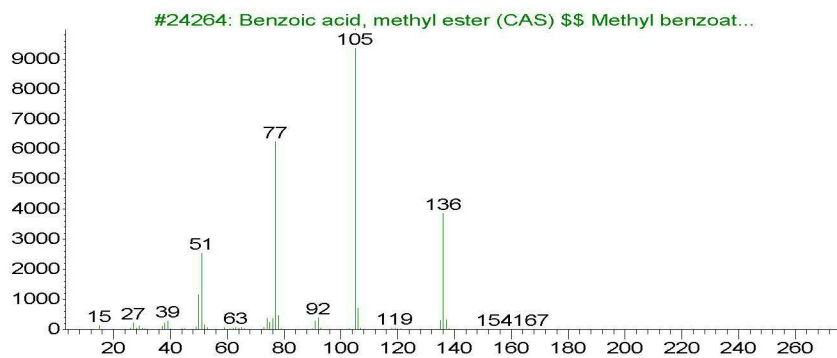
m/z-->

Benzaldehyde

Abundance



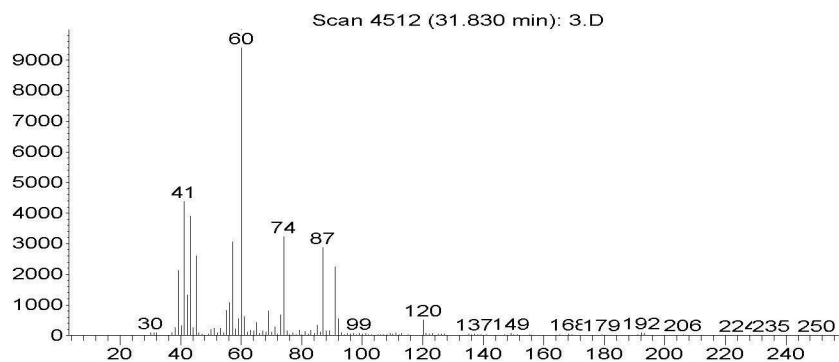
m/z-->
Abundance



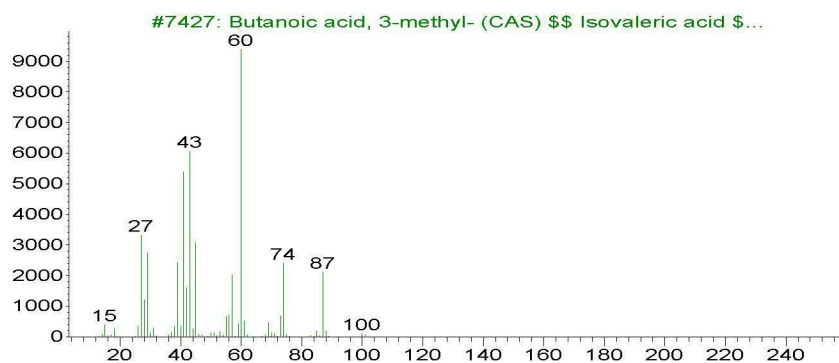
m/z-->

Benzoic acid, methyl ester

Abundance



m/z-->
Abundance



m/z-->

Butanoic acid, 3-methyl-

감사의 글

어려웠던 많은 시간과 아쉬움의 기억조차 이제는 지난 시간이라는 추억으로 남겨 두어야 합니다. 아쉬움을 두고 다시 시작하는 시간 속에는 잘하고 있다는 자신감과 대견함을 남기고 싶습니다.

이 논문이 완성되기까지 처음부터 끝까지 남다른 열정과 세심한 지도와 격려를 아끼지 않으셨던 안명수 교수님께 머리 숙여 감사드리며, 정성을 다해 지도편달해 주신 조은자 교수님, 김혜영 교수님, 김덕숙 교수님께 감사드립니다. 아울러 항상 깊은 관심과 배려로 많은 조언을 해주신 권혁희 과장님께 다시 한번 감사드립니다.

본 논문을 끝마칠 수 있도록 남다른 배려로 여건을 마련해 주시고 격려를 해주신 이달수 과장님, 송인상 평가관님, 김명철 부장님, 김희연 과장님, 이광호 과장님, 식품첨가물과 과직원들과 물심양면으로 실험을 도와준 영남대학교 교수님과 후배들께 깊은 감사를 드립니다.

이 글을 적으면서 주변에서 힘들고 어려웠던 시간을 내 일처럼 걱정하고 위로해 주었던 고마운 사람들이 있었음을 생각하며 항상 가슴 깊이 간직하고, 늦었지만 끝맺음을 할 수 있게 기회를 준 필라델피아에서 즐겁게 영어연수 중인 두 딸 기선이, 민정리와 언제나 인생의 큰 버팀목이 되어주신 언니와 형부에게 고마움을 전합니다.

오늘의 제가 있기까지 묵묵히 지켜보고 건강의 중요성을 일깨워준 멋진 남편, 사랑하는 엄마, 시부모님, 형제자매, 부산에 계신 여러 친지들과 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

생리활성물질이 듬뿍 함유된 청국장을 많이 섭취하여 건강하시기를 기원하면서...