

菌株을 달리한 청국장 製造에 관한 研究

제 2 보 : 청국장의 貯藏中의 成分 및 酵素力의 變化

徐正淑·李尙建·柳明基*

서울보건전문대학, *생표식품공업(주) 연구실

(1982년 5월 31일 수리)

Effect of *Bacillus* Strains on the *Chungkook-jang* Processing

II. Changes of the Components and Enzyme Activities During the Storage of Chungkook-jang

Jeong-Sook Suh, Sang-Gun Lee and Myung-Ki Ryu*

Seoul Health Junior College, Seoul 100

*Lab. of Sampyo Food Ind. Co., Ltd., Seoul 132

(Received May 31, 1982)

Abstract

The growth process of the *Chungkook-jang* that occurred by utilizing such traditional methods as *Bacillus natto* and *Bacillus subtilis* method has been examined. The results of the experiment in which the changing process of elements during the storage period had been measured are as follows:

1. During the growth period, concerning any change in pH, the storage period had been declined and after 18 days pH rose above 7.0. Salt content was between 5.28~6.40% and *Bacillus subtilis* fungus showed the highest titrable acidity.
2. Moisture content was between 50.94~56.74% and crude protein content range was 14.44~18.60% indicating irregularity in pattern resulting from the testing equipment groups, whereas crude fat and crude fiber tend to decrease in general.
3. During the storage, total sugar and ethyl alcohol content in all of groups tended to decrease and after 18 days *Bacillus subtilis* total sugar content was the lowest.
4. Amino nitrogen and water soluble nitrogen content increased with days, but no difference was found between groups.
5. Amylase and protease activity showed irregular pattern with time, but no significant difference between groups was found.

序 論

청국장은 다른 醬類에 비해 製造期間이 짧으며 蛋白

質含量이 높고 消化率이 높은 高蛋白 食品이다.

청국장製造에 관한 研究로는 朱^(1,2), 李等⁽³⁾, 朴^(4,5)

林⁽⁶⁻⁹⁾, 草野^(10,11), 金^(12,13), 李等⁽¹⁴⁾의 研究報告가

있으나 이들의 報告는 주로 메주醱酵過程中的 一般成分과 窒素化合物, 製造方法에 關한 研究일뿐 메주醱酵過程이나 貯藏中の 一般成分의 變化 및 有機酸, 糖類, 알콜類 等에 關한 研究는 거의 報告된 바 없다.

따라서 著者 等은 청국장의 品質을 改善할 目的으로 일단계로 第1報⁽¹⁵⁾에서 菌株을 달리하여 製造한 청국장 메주醱酵過程中的 各種 成分變化를 發表한 바 있는데 여기에서는 第1報에 이어 35~40°C에서 72時間 醱酵시킨 청국장메주에 6%의 食鹽을 添加하여 常溫(18~20°C)에서 貯藏 熟成시키면서 2~18日間의 貯藏期間中 成分變化와 酵素力에 대하여 實驗한 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

實驗材料

가. 原料大豆

原料大豆는 1980年 美國產 大豆(粗蛋白 35.91%, 總糖 15.58%, 水分 5.67%, 粗纖維 4.21%, 粗脂肪 18.72%)를 使用하였다.

나. 使用菌株

*Bacillus natto*와 *Bacillus subtilis*를 韓國種菌協會로부터 分讓받아 使用하였으며 在來式 청국장 製造時에는 蓼靛을 使用하였다.

다. 種菌의 製造

原料大豆 一定量을 24時間 浸漬하여 물빼기를 한 후 50 g씩 測量하여 300 ml 살자후라스크에 넣어 autoclave에서 加壓, 殺菌하여 40°C로 冷却시킨 후 *B. natto*와 *B. subtilis* 菌을 각각 接種하여 36~37°C에서 3日間 培養하여 種菌으로 하였다.

다. 청국장의 製造

精選한 大豆를 各 試驗區別로 3 kg씩 취하여 浸漬한 후 물빼기를 하여 스테인리스 스틸製 상자(34.5×22.5×5.9 cm)에 담아 뚜껑을 덮어 autoclave에서 1.8~2.0 kg/cm²의 압력으로 75분간 蒸煮한 후 50°C 정도로 냉각하고 여기에 *B. natto*와 *B. subtilis*의 배양액을 원료의 약 2%(150 g) 정도로 각각 接種하였으며 在來式 청국장은 蓼靛을 麴상자 밑바닥에 깔고 그 위에 蒸煮한 大豆를 담고 蓼靛을 덮어 35~40°C의 恒溫기에서 72時間 醱酵시킨 후 各 試驗區에 食鹽 6%를 넣어 chopper로 혼합시켜 플라스틱용기(20×15×10 cm)에 넣어 뚜껑을 덮어서 常溫에서 18日間 貯藏시켰다.

分析方法

가. 一般成分의 分析

水分, 粗蛋白, 粗脂肪, 粗纖維, pH, 滴定酸度, 窒素化合物, 總糖, 食鹽, 에틸알콜 等의 分析法은 基準味

噌分析法⁽¹⁶⁾에 準하여 하였다.

나. 酵素의 力價測定

1) 粗酵素液의 調製:

각각의 試料 10 g씩을 mortar로 파쇄시키고 물을 가해 100 ml로 한 후 reciprocal shaker에서 1時間동안 진탕, 추출, 여과하여 粗酵素液으로 하였다. 力價는 酵素液 1 ml當의 力價로 換算하여 表示하였다.

2) 蛋白質 分解 酵素의 力價測定:

청국장의 貯藏過程 中 protease 活性은 Anson⁽¹⁷⁾, 萩原^(18,19) 等의 方法에 따라 粗酵素液 1 ml에 0.6% casein용액 5 ml를 넣고 기질(pH 7.2)로 하여 30°C water bath에서 10분간 반응시켜 蛋白質活性을 測定하였다.

力價는 Hitachi spectrophotometer 100-60으로 660 nm에서 吸光度를 測定하고 별도로 작성한 tyrosine standard curve⁽²⁰⁾에서 tyrosine(μg/ml)으로 換算하여 회석倍數를 곱한 값으로 算出하였다.

3) 澱粉 液化力의 測定

片倉과 畑中⁽²¹⁾의 方法에 따라 1% 可溶性澱粉液을 基質(pH 5.2)로 하여 40°C에서 30분간 반응시켰을 때 나타나는 660 nm의 O.D를 測定하고 blank value를 減한 후 회석배수를 곱하여 酵素液 1 ml當의 力價로 換算 表示하였다.

結果 및 考察

청국장의 貯藏 過程 中的 pH, 總酸 및 鹽度

청국장의 貯藏 과정중 pH, 總酸, 鹽度의 變化를 隨時的으로 測定한 結果는 Table 1과 같다.

貯藏 初期에는 pH가 8.25~8.36의 범위를 나타냈으나 貯藏期間이 경과할수록 시험구 모두 대체로 低下한 경향을 보여 貯藏 18일에 *B. natto* 區가 7.41, *B. subtilis* 區가 7.0, 재래식區가 7.55를 나타내었다. 前報⁽¹⁵⁾에서 청국장메주 醱酵 과정중 菌의 증식이 활발한 관계로 pH가 급격히 상승되는 것과는 달리 貯藏 과정중 減少되는 것은 酸生成이 높으므로 pH가 低下된 것으로 생각된다. 食鹽의 농도는 貯藏 과정중 형성 되었거나 소비된 것이 아니라 시료의 채취방법에 따른 것으로 5.28~6.4% 범위로 各 시험구 모두 불규칙적 인 증감현상을 보였으며 朱⁽¹⁾의 논문에서도 總酸의 變化는 食鹽量의 반비례로 增加하며, 總酸으로 보아 6~12%의 食鹽이 적합하다고 하였다.

滴定酸도는 貯藏기간이 경과함에 따라 서서히 增加되었으며 貯藏 18일에는 *B.natto* 區가 3.30, *B.subtilis* 區가 5.2로서 타 시험구보다 높았으며 재래식區는 2.5로 가장 낮게 나타났다. 특히 *B. subtilis* 의 滴定酸

Table 1. Changes of pH, salt content and titrable acidity during the storage of Chungkook-jang

	Experimental group*	Storage days							
		0	2	4	6	8	10	12	18
pH	A	8.33	7.78	7.54	7.76	7.43	7.46	7.56	7.41
	B	8.36	7.88	7.65	7.77	7.47	7.60	7.14	7.00
	C	8.25	7.66	7.34	7.84	7.40	7.78	7.32	7.55
Salt content(%)	A	—	5.75	5.85	5.45	6.00	6.10	5.90	6.00
	B	—	5.28	5.26	5.98	5.85	6.00	6.01	6.01
	C	—	6.40	5.64	5.75	5.97	5.70	5.98	6.00
Titrable acidity	A	1.32	3.60	3.42	4.35	4.21	4.30	3.01	3.30
	B	0.36	2.43	2.60	4.50	4.23	4.70	4.04	5.20
	C	1.77	3.37	3.41	3.95	3.80	3.81	3.22	2.50

*A : *Bacillus natto* B : *Bacillus subtilis* C : Traditional method

도가 他 시험구에 비해 높은 것은 貯藏 과정중에 pH 가 급강하한 때문인 것 같다.

貯藏 過程中 一般成分

청국장 貯藏 과정중 水分, 粗蛋白, 粗脂肪, 粗纖維 등 一般成分의 變化는 Table 2와 같다.

水分含量은 각 시험구 간에 차이가 있어 50.94~56.74%를 나타내었는데 朱⁽²⁾의 논문에서도 청국장의 水分含量은 50~55%가 좋다고 한 것으로 보아 별 차이가 없었다. 粗蛋白含量은 14.44~18.60%로서 시험구에 따라 다소의 차이가 있어 貯藏과정 중 불규칙적

인 증감현상을 나타내었다. 粗脂肪의 含量은 청국장 메주醱酵 과정 중 水分含量의 감소에 따라 증가하는 경향을 보이는데 반하여 貯藏과정 중에는 서서히 감소하는 경향을 보여 貯藏 18일경에 각각 *B. natto* 區는 6.53%, *B. subtilis* 區는 6.42%, 재래식區는 5.75%로 감소하였다.

粗纖維는 각 시험구에 있어 대체로 감소하는 경향을 보여 *B. natto* 區는 貯藏 2일 후에 4.38%이던 것이 3.03%로, *B. subtilis* 區는 4.36%에서 2.37%로, 재래식區는 4.63%이던 것이 2.3%로 감소되었다.

Table 2. Changes of moisture, crude protein, crude fat and crude fiber during the storage of Chungkook-jang

	Experimental group*	Storage days							
		0	2	4	6	8	10	12	18
Moisture(%)	A	50.94	52.78	52.79	51.72	50.84	52.77	52.92	52.46
	B	56.74	55.90	55.16	55.07	57.03	55.15	56.77	56.45
	C	51.05	48.75	48.87	49.19	50.46	50.09	52.95	51.21
Crude protein(%)	A	18.47	17.87	17.06	17.33	16.94	16.70	17.38	17.12
	B	14.44	16.05	17.58	17.05	16.39	16.45	16.95	16.37
	C	18.60	19.87	17.49	17.43	18.54	18.38	16.57	18.01
Crude fat(%)	A	11.19	8.61	9.67	8.92	7.04	7.46	7.62	6.53
	B	10.10	9.49	8.75	7.72	6.94	7.01	6.1	6.42
	C	10.34	8.23	7.68	7.57	5.28	5.32	5.94	5.75
Crude fiber(%)	A	—	4.38	4.14	3.54	4.62	6.80	4.37	3.03
	B	—	4.36	3.94	3.1	4.83	3.87	4.00	2.37
	C	—	4.63	4.42	3.77	5.03	4.30	4.38	2.3

*A : *Bacillus natto* B : *Bacillus subtilis* C : Traditional method

이는 貯藏 중에 cellulase가 작용한 때문이라 생각된다.

청국장 貯藏 過程 中 總糖 및 ethyl alcohol 含量
청국장의 貯藏 과정 中 總糖의 變化는 Fig.1과 같았으며
경시적으로 측정한 ethyl alcohol의 含量 變化는 Fig.2와 같다.

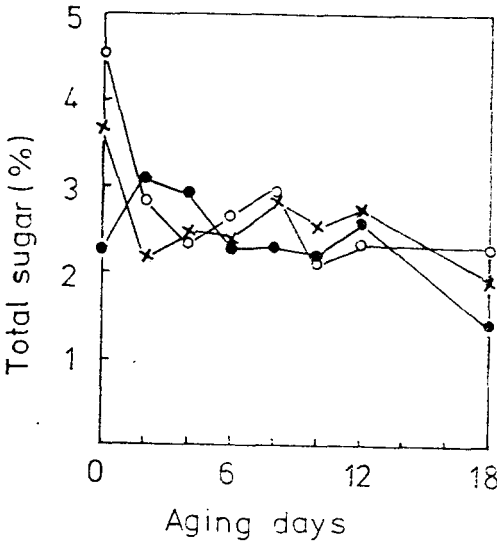


Fig. 1. Changes of total sugar content during the aging of Chungkook-jang

- *Bacillus natto*
- *Bacillus subtilis*
- ×— Traditional method

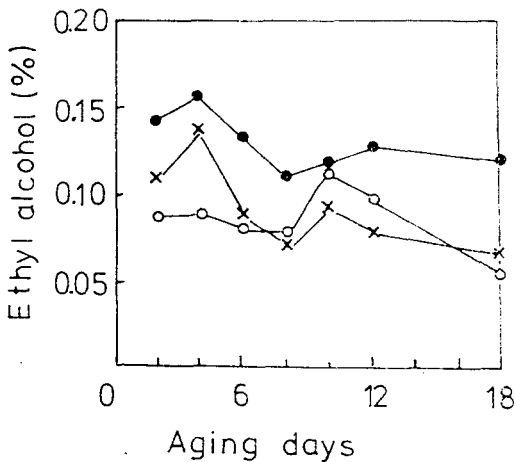


Fig. 2. Changes of ethyl alcohol content during the aging of Chungkook-jang

- *Bacillus natto*
- *Bacillus subtilis*
- ×— Traditional method

總糖 含量은 *B. natto* 區와 耑래식區는 貯藏 초기에 각각 4.51%, 3.72%이던 것이 貯藏 2일후에는 2.81%, 2.19%로서 급격히 감소하였으며 그 이후에는 불규칙적인 증감현상을 보여 貯藏 18일경에는 *B. natto* 區는 2.21%, 耑래식區는 1.95%를 나타냈다. 또 *B. subtilis* 區는 貯藏 18일경에 1.42%로서 他 시험區보다 다소 낮은 含量을 보였다.

청국장 배주 醱酵 中에 糖分이 微生物의 營養源으로 사용되므로 微量이었지만 貯藏期間 中에도 이들 菌의 대사작용에 이용되어 계속 감소된 것으로 본다.

청국장의 醱酵 과정 中에는 ethyl alcohol 含量이 초기 0.2% 미만으로 나타났으나 貯藏期間 中에는 그 含量이 대체로 감소하여 *B. natto* 區가 貯藏 초기에 0.087%에서 貯藏 18일경에는 0.053%로, *B. subtilis* 區는 0.147%에서 0.123%로, 耑래식區는 0.155%에서 0.068%를 나타냈다.

Ethyl alcohol의 含量은 된장이나 고추장에 비해 훨씬 적은데 이는 醱酵微生物의 營養源인 糖質 含量이 적고, 청국장 醱酵과정 中에 品溫이 上昇되고 貯藏 과정 中에는 食鹽을 첨가하므로 乳酸菌과 酵母의 生育이 억제되었기 때문이라 생각된다.

청국장의 貯藏 過程 中 窒素成分의 含量

청국장 貯藏과정 中의 각종 질소(아미노態 窒素, 水溶性 窒素, 암모니아態 窒素) 성분의 變化를 경시적으로 측정된 결과는 Fig. 3 및 Table 3과 같다.

아미노態 질소의 성분 變化는 시험구 모두가 貯藏 일수가 경과함에 따라 증가하는 경향을 보여 *B. natto* 區의 경우 貯藏 직후 498 mg%에서 18일경에는 1,019, 17 mg%로 시험구 中에서 가장 높은 含量을 나타내었고

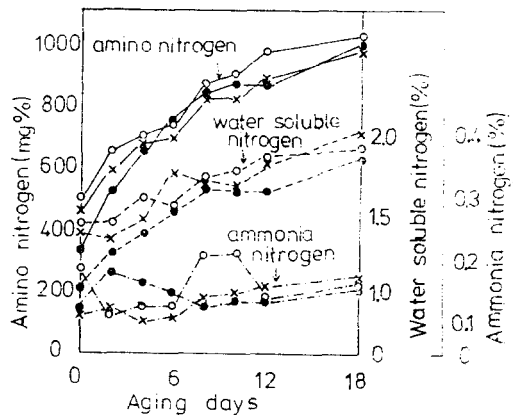


Fig. 3. Changes of nitrogen compound during the aging of Chungkook-jang

- *Bacillus natto*
- *Bacillus subtilis*
- ×— Traditional method

Table 3. Changes of nitrogen compounds during the storage of *Chungkook-jang*

	Experimental group*	Storage days							
		0	2	4	6	8	10	12	18
Amino nitrogen (mg%)	A	498	646.57	693.12	734	862.5	893.4	974.7	1,019.17
	B	327	522.09	651.64	743.8	844.6	859.0	857.7	996.2
	C	456	592.02	664.1	671.7	830.4	817.3	861.8	961.1
Water soluble nitrogen(%)	A	1.45	1.45	1.60	1.57	1.76	1.79	1.86	1.91
	B	1.01	1.24	1.39	1.55	1.72	1.62	1.64	1.85
	C	1.39	1.34	1.47	1.78	1.74	1.70	1.85	2.02
Ammonia nitrogen(%)	A	0.176	0.115	0.132	0.132	0.203	0.211	0.141	0.155
	B	0.125	0.180	0.167	0.149	0.126	0.137	0.138	0.151
	C	0.128	0.126	0.101	0.112	0.145	0.149	0.159	0.162

* A : *Bacillus natto* B : *Bacillus subtilis* C : Traditional method

*B. subtilis*區는 327 mg%에서 996.2 mg%, 재래식區는 456 mg%에서 961.1 mg%를 나타냈다.

청국장은 原料인 大豆 蛋白質이 微生物에 의하여 分解되어 可수한 맛을 내는 중요한 아미노酸의 성분인 아미노酸窒素를 생성한다. 이중에서도 아미노窒素와 水溶性窒素는 熟成度 判定의 한 指標로서 높은 함량을 유지하는 *B. natto* 區가 前報⁽¹⁵⁾와 마찬가지로 가장 우수한 것으로 나타났다.

醱酵 過程 中에는 재래식區가 *B. subtilis* 區보다 높게 나타났는데 貯藏 과정중 다소 떨어진 것은 순수한 菌을 사용하지 않은 관계로 醱酵가 微弱했기 때문이라 고 생각된다.

水溶性 窒素는 貯藏過程중 各 시험구가 대체로 증

가하여 *B. natto* 區가 1.45%에서 1.91%, *B. subtilis* 區가 1.01%에서 1.85%, 재래식區가 1.39%에서 2.02%로 나타났고 암모니아態 窒素는 *B. natto* 區가 0.176%에서 0.155%, *B. subtilis* 區가 0.125%에서 0.151% 재래식區가 0.128%에서 0.162%로서 불규칙적인 증감 현상을 보였다.

암모니아態 窒素의 증가는 오히려 청국장에 불쾌감 을 주어 품질을 저하시키므로 그 生成을 억제할 필요 성이 있다.

李等⁽¹⁴⁾은 *B. natto*와 그냥 *Koji*의 熟成중 암모니아 態 窒素의 측정결과에서 *Koji* 된장보다 *natto* 된장이 암모니아態 窒素가 대체로 많은 편이라고 하고 이것은 *natto* 된장이 protease力價가 높아 된장의 熟成도가 큰

Table 4. Changes of amylase and protease activity during the storage of *Chungkook-jang*

Enzyme	Experimental group*	Storage days							
		0	2	4	6	8	10	12	18
Liquefying amylase	A	4	10	10	4	1	3	2	4
	B	23	12	7	1	4	6	4	6
	C	19	5	5	6	3	9	12	17
Neutral protease	A	0.3	0.4	0.31	0.9	0.4	0.5	0.31	1.05
	B	0.2	0.6	0.44	0.2	0.85	0.23	0.32	0.49
	C	0.2	0.7	0.83	0.9	0.6	0.24	0.33	0.82
Alkaline protease	A	—	0.2	0.72	0.1	0.3	0.6	0.82	0.72
	B	—	0.3	0.04	0.05	0.5	0.56	0.1	1.28
	C	—	0.3	0.32	0.5	1.6	0.88	0.1	1.35

* A : *Bacillus natto* B : *Bacillus subtilis* C : Traditional method

까닭이라고 하였다.

청국장 제조에는 *B. natto* 균을 이용하는 것이 구수한 맛이 있고 단백질을 많이 함유한 제품을 만든다고 하였다.

청국장의 저장 과정에서 효소력(價) 청국장의 저장 과정 중 液化 amylase와 protease(中性, 알칼리性)의 力價를 測定한 결과는 Table 4와 같다.

中性 protease는 저장 중 불규칙적이긴 하나 다소 증가하는 경향을 보였으며 알칼리性 protease의 活性은 불규칙적으로 나타났다. 청국장 저장 중의 효소 活性은 고추장⁽²²⁾, 된장⁽²³⁾에 비하여 대단히 微弱한 것으로 나타났는데 amylase 活性은 大豆만을 사용하였기 때문에 효소의 基質 特異性으로 촉매작용이 이루어지지 않은 점과 암모니아態 窒素의 상승으로 pH의 增加로 인하여 효소作用이 활발하지 못한 것이 그 원인이라고 생각된다.

또한 protease 活性은 C/N比率이 높아 삼투압의 영향 및 醱酵 중의 높은 溫度 등으로 인하여 효소의 力價가 억제 또는 失活된 것이 아닌가 생각된다. 蒸煮 직후 생성되지 않은 液化 amylase는 醱酵 과정 중에 다소 생성은 되었으나 경시적으로는 큰 變化가 없었으며 저장 과정중에도 각 시험구 간에 큰 變化없이 감소하는 경향을 보였다.

청국장의 저장 과정중에도 protease의 작용으로 생성되는 아미노態 窒素는 protease activity가 낮아도 불구하고 그 含量이 높은 것은 흥미있는 사실로서 더욱 研究 檢討되어야 할 것으로 생각된다.

要 約

Bacillus natto 및 *Bacillus subtilis* 균을 이용한 방법 및 變質을 이용한 재래식 방법에 따라 제조한 청국장의 저장과정 중 성분변화를 측정된 결과는 다음과 같다.

1. 저장 중 pH는 대체로 低下하는 경향을 보여 저장 18일 후에는 7.0 이상으로 나타났고 食鹽은 5.28~6.4% 사이였으며 滴定酸度는 *B. subtilis* 區가 最大值를 나타냈다.
2. 水分含量은 50.94~56.74%를 보였고 粗蛋白含量은 14.44~18.60%로서 시험구에 따라 다소 차이가 있

어 불규칙적인 증감현상을 보였다. 이에 반해 粗脂肪과 粗纖維는 대체로 감소하는 경향이였다.

3. 總糖과 ethyl alcohol含量은 시험구 모두 감소하는 경향이었는데 저장 18일후에 總糖은 *B. subtilis* 區가 가장 낮았다.

4. 아미노態 窒素와 水溶性窒素의 含量은 경시적으로 증가하는 경향이였으나 각 시험구간의 차이는 없었다.

5. Amylase와 Protease의 活性은 경시적으로 불규칙적인 變化를 보여 각 시험구간에 큰 차이가 없이 대체로 微弱하였다.

文 獻

1. 朱鉉圭: 전국학술지, 12, 779(1971)
2. 朱鉉圭: 한국식품과학회지, 3, 64(1971)
3. 李孝枝, 정문교: 한국농화학회지 14, 191(1971)
4. 朴啓仁: 한국농화학회지, 15, 93(1972)
5. 朴啓仁: 한국농화학회지, 15, 111(1972)
6. 林石布: 日本醱酵工學雜誌 37, 233(1959)
7. 林石布: 日本醱酵工學雜誌 37, 272(1959)
8. 林石布: 日本醱酵工學雜誌 37, 276(1959)
9. 林石布: 日本醱酵工學雜誌 37, 327(1959)
10. 草野愛子: 榮養と食糧 22, 615(1969)
11. 草野愛子: 榮養と食糧 24, 8(1971)
12. 金載勳: 한국농화학회지 6, 79(1965)
13. 金載勳: 한국농화학회지 6, 89(1965)
14. 李甲湘, 鄭東孝: 한국식품과학회지 5, 163(1973)
15. 이현자, 서정숙: 한국영양학회지, 14, 97(1981).
16. 全國味噌技術會編: 基準味噌分析法, p. 1~34, (1968)
17. Anson, M.L.: J. Gen. Physiol. 22, 79(1938)
18. 萩原文二: 赤堀編, 酵素研究法, 第二卷, p. 240, (1956)
19. 萩原文二: 江上編, 標準生化學實驗, p. 207, (1953)
20. 東京大學農化學部編, 實驗農藝化學 上卷, p. 283 (1968)
21. 片倉健二, 畑中于藏: 日本釀造協會誌 54, 88(1959)
22. 李澤守: 한국농화학회지 22, 65(1979)
23. 李澤守, 신보규, 주영하: 한국미생물학회지, 1, 79 (1973)