KOREAN J. FOOD SCI. TCHNOL.
Vol. 15, *No.* 4 (1983)

菌株를 달리한 청국장 製造에 關한 硏究

第三報 : 청국장의 遊離 아미노酸 含量과 窒素成分

徐正淑 柳明基* 許允行**

서울保健專門大學 食品營養學科 *샘표食品工業株式會社 硏究室 **서울保健專門大学 食品加工学科

(1983년 6월 15일 수리)

Effect of *Bacillus* Strains on the *Chungkookjang* Processing Ⅲ, Changes of the Free Amino Acid Contents and Nitrogen Compounds during *Chungkookjang Koji* Preparation

Jeong-Sook Suh, *Myung-Ki Ryu and **Yun-Hang Hur

Det. of Food science and Nutrition, Seoul College of Health

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

***Dept. of Food processing Technology, Seoul College of Health*

(Recieved June 15, 1983)

Abstract

The change of free amino acid contents and nitrogen compounds in the course of the *Chungkookjang* fermentation that occurred by utilizing *Bacillus natto* and *Bacillus subtilis* are to the following effects. pH, during the growth period, that is 6.35 in pH at the first stage of fermentation, were turned into 8.2 after 72 hours. Crude protein content increased irregularly from 16.82%-18% and total sugar decreased. Increasing with the progress of fermentation time, protease activity showed the maximum value between 48-60 hours, but *Bacillus natto* activated a little than *Bacillus subtilis*. Amino nitrogen and water soluble nitrogen content increased but difference was found that is, *Bacillus natto* increased more than *Bacillus subtilis*. Glutamic acid content was the highest among the contents of free amino acid between both *Bacillus* sp. and the order of the next contents showed as leucine, phenylalanine, histidine alanine. arginine, but difference was found between *Bacillus* sp., that is, *Bacillus natto* was higher than *Bacillus subtilis*. In view of the results as above, *Bacillus natto* was excellent than *Bacillus subtilis* as *Bacillus* strains of *Chungkookjang koji* production.

序 論

大豆醱酵食品의 重要性은 營養상 植物性 蛋白質의 供給源으로서 이미 널리 알려져 있다. 大豆醱酵食品중에 특히 청국장은 우리 食生活중에 결핍되기 쉬운 蛋白質 供給源으로서 各種 必須아미노酸이 된장 고추장보다도 많이 含有하며 또한 消化率이 높은 食品이다.

청국장에 関한 硏究로는 金[1] 朴[2,3] 李와 鄭[4]의 nitrogen compound 및 一般成分의 変化와 청국장의 醱酵 및 熟成過程中의 成分 및 酵素力価의 変化[5,6], 벗짚을 利用한 在来式 청국장의 一般成分과 遊離 아미노酸[7]이 最近에 発表된바 있고 林右布[8-13]의 大豆原料와 添加物 또는 温度를 달리했을때 製造한 納豆의 製造에 関

한 硏究가 있다.

따라서 本著者는 前報[5-6]에 이어 청국장 製造에 関한 硏究를 계속 수행코자 Bacillus natto와 Bacillus subtilis 菌株를 使用하여 製造한 청국장의 一般成分의 変化와 窒素成分 및 遊離아미노酸 含量을 調査 分析하므로서 청국장이 갖는 営養学的인 面을 検討하였으며 그 結果를 発表한다.

材料 및 方法

実験材料

(1) 原料大豆

청국장메주 製造에 使用한 大豆는 美国産 Yellow 2 (1981年産)로서 그 成分含量은 Table 1과 같다.

Table. 1. The chemical component of soy bean

Crude protein	37.82 %
Moisture	8.96 〃
Crude fat	18.4 〃
Crude fiber	3.92 〃
Total sugar	14.82 〃

(2) 使用菌株

청국장 製造에 使用한 菌株인 *Bacillus natto*와 *Bacillus subtilis*는 韓国種菌協会(KFCC) 에서 분양받은 것으로 使用하였다.

(3) 種菌의 製造

生大豆 一定量을 24時間 물에 수침하여 물빼기를 한 후 300㎖ 삼각flask에 넣고 常法으로 殺菌하여 *Bac. natto*와 *Bac. subtilis* 菌을 各各 접종하고 40°C 에서 48時間 培養하여 種菌으로 사용하였다.

(4) 청국장 메주의 製造方法

선별한 大豆를 試験区別로 2㎏씩 秤量하여 24時間 침적하여 물을 뺀 후 stainless steel 상자(34.5×22.5×5.9㎝)에 담아 뚜껑을 덮어 加圧蒸煮缶에서 (2.0㎏/㎠) 70分間 蒸煮하였다.

이것을 50°C로 冷却하고 삼각flask에 전배양한 *Bac. natto*와 *Bac. subtilis*의 種菌을 접종하여 40°C의 항온기에서 72時間 培養하였다.

実験方法

(1) 一般成分의 分析

水分, 粗蛋白, 粗脂肪, 粗繊維, 總糖, 窒素化合物등은 基準味噌分析法[14]에 依해 分析하였으며 pH는 Horiba pH meter (F-7Ⅱ)로 測定하였다.

(2) protease 力価의 測定

청국장 10g씩을 取하여 유발로 파쇄시키고 증류수를 加해 100㎖로 한후 1時間동안 진탕, 추출, 여과하여 粗酵素液으로 하였다.

청국장 메주 製造 과정중의 protease活性은 Anson[15] 萩原[16-17]등의 方法에 따라 粗酵素液 1㎖에 0.6% casein 용액(pH7.2) 5㎖를 넣고 30°C 수욕상에서 10分間 反応시켜 spectrophoto meter (Beckman Model 34/35)로 660nm에서 吸光度를 測定하고 별도로 作成한 tyrosine standard curve에서 tyrosine(㎍/㎖)으로 환산하여 희석배수를 곱한 값으로 산출하였다.[18]

(3) 遊離아미노酸의 定量分析

1) 시료액의 調製[19-20]

청국장 메주를 유발에 넣고 곱게 마쇄한후 1g을 정확히 평량하여 Fig 1과 같이 삼각flask에 넣고 증류수 30㎖를 加한 후 100°C water bath에서 30分間 抽出시킨 다음 이 추출액을 경사법으로 모으고 잔사에 증류수 30㎖를 再抽出하고 冷却하여 잔사를 다시 증류수 10㎖로 세척하고 여과하여 전부 합한것을 抽出液으로 하였다.

이 용액에 1% picric acid를 加한 후 원심분리하여 沈澱物을 제거하고 이온교환수지(Dowex 2×8 Cl^-) column을 통과한 후 picric acid를 제거하고 감압 농축시켜 pH 2.2의 citric acid 완충용액으로 희석하여 amino acid analyzer에 주입하는 시료로 하였다.

2) 標準아미노酸 용액의 調製

각 아미노酸 표준試薬을 2.5mMole에 해당하도록 調製하였고 機器分析時 pH 2.2 citrate buff solution 으로 희석하여 사용하였다.

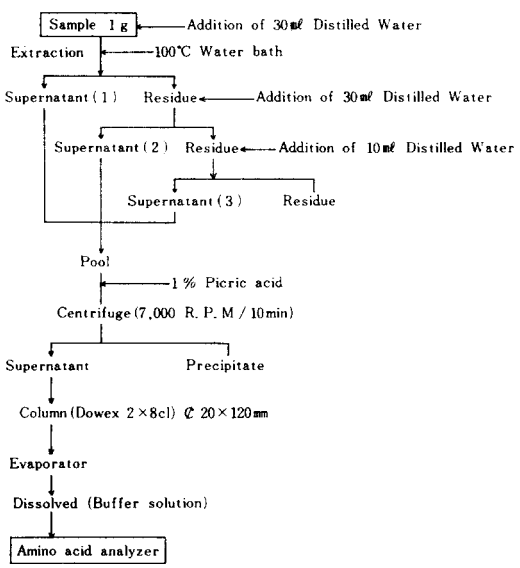

Fig. 1. Extraction and separation of amino acids of Chung Kookjang Meju.

Table. 2. Operation condition of Amino acid analyzer

Column	6.3 ㎜ ID×140㎝
Temperature	60℃ Constant
Ion exchange resin	Chromobeads-A
Flow rate of buffer sol'n	0.5㎖ / min
Flow rate of ninhydrin sol'n	0.5㎖ / min
Buffer solution	0.2 M Sodium citrate buffer
	pH 2.875, 3.8, 5.0
Changes of buffer solution	Gradient elution device (Auto gradate)
	A) 15㎜ tubular flow cell 570nm (red)
	B) 8 ㎜ tubular flow cell 570nm (yellow)
	C) 15㎜ tubular flow cell 440nm (green)
Operation time	21 hr's
Chart speed	inch / 10 min

3) 遊離아미노酸의 定量分析

① 試料濃度

試液 1.0㎖를 試驗管에 取하여 증류수 1.0㎖와 ninhydrin試液 1.0㎖를加하여 100℃에서 15分間 加熱反応하여 発色시킨 후 냉각하고 증류수를 加하여 전량을 25㎖로 한후 570nm에서 吸光度를 測定하였다.

吸光度가 0.8이 될때가 아미노산 含量이 1㎛M에 해당되어 分析機에서 分析可能한 濃度로 추정되었으며 同時에 1㎛M[21]에 상당하는 leucine을 증류수에 対하여 発色한 후 試料中의 量을 leueine치로 환산하고 아미노酸 自動分析機에 注入量이 1.0㎖가 되도록 희석하여 使用하였다.

② 使用機器 및 分析條件

아미노酸의 分析은 自動아미노酸分析機(Technicon PNC-1)을 使用하였으며 分析條件은 Table 2와 같다.

③ 아미노산의 定量

試液 1㎖를 正確히 取하여 Ion exchange resin column 上面에 注入, N_2-gas로 吸着시킨 후 pH 2.875 0.2M citric acid 완충용액으로 Column 上部空間을 충진하여 作動시켰으며 아미노酸 定量은 chromatogram을 標準아미노산 chromatogram과 比較하여 peak height와 비례하는 면적비를 H. W 法인 半値幅法[22-23] 에 의하여 定量計算하였다.

結果 및 考察

1. 청국장 메주 醱酵中의 pH의 変化

청국장메주 醱酵過程中의 pH의 変化는 Fig 2와 같다.

청국장 메주 醱酵初期에는 pH가 6.37 이었고 醱酵時間이 경과함에 따라 서서히 增加하여 *Bac. natto*区는 48時間에 8.32 72時間 後에는 pH가 8.19를 나타내었다.

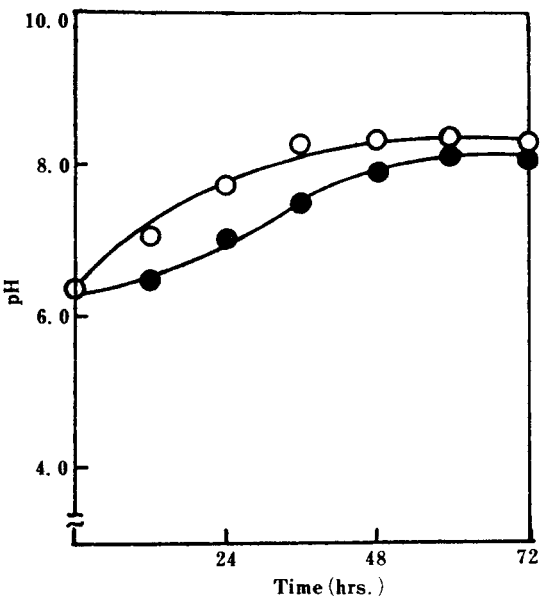

Fig. 2. Changes of pH during the *Chungkookjang Koji* preparation

—○— ***Bacillus natto***

—●— ***Bacilllus subtilis***

Bac. subtilis 試驗区는 72時間까지는 계속 增加하여 pH 8.23이었는데 이것은 청국장 메주 醱酵過程중 菌의 增殖이 活発하여 pH가 上昇되는 것으로 보인다.

2. 一般成分의 変化

청국장메주 醱酵中 一般成分의 変化를 測定한 結果는 Table 3과 같다.

水分은 蒸煮직후 58.21%였으나 醱酵時間이 경과함에 따라 서서히 감소하여 試驗区間에 큰 변화없이 54%

Table. 3. Changes of moisture, crude protein, total sugar and reducing sugar during the *Chungkookjang Meju* fermentation

	Experimental group	0 hr	12hr	24hr	36hr	48hr	60hr	72hr
Moisture %	*B. natto*	58.21	58.32	57.09	56.94	57.82	55.92	55.16
	B. subtilis		57.94	58.37	57.16	56.02	56.07	54.73
Crude protein %	*B. natto*	16.82	16.47	16.99	17.97	18.09	17.66	18.17
	B. subtilis		17.02	17.83	17.64	17.96	17.97	17.76
Total sugar %	*B. natto*	6.63	6.12	5.88	3.64	4.47	3.82	3.54
	B. subtilis		5.94	5.09	4.48	4.14	3.92	3.67
Reducing sugar %	*B. natto*	0.04	0.61	0.72	0.65	0.47	0.45	0.38
	B. subtilis		0.54	0.58	0.55	0.43	0.36	0.39

정도를 보인것은 醱酵過程中에 水分이 증발된 관계로 生覚된다.

粗蛋白質은 蒸煮직후 16.82%에서 醱酵後에는 18%내외였으며 이는 水分감소에 따른 蛋白質量의 增加로 실제적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

청국장메주의 粗蛋白質 含量이 고추장, 된장의 蛋白質含量[24-26] 보다 높은것은 原料 자체를 純大豆로만 使用하였기 때문이며 總糖은 蒸煮직후 6.63%에서 経時的으로 감소하여 72시간 후에는 각각 3.54, 3.67%를 보였고 환원당은 0.04%에서 서서히 增加하여 醱酵 24時間後에 *Bae. natto*区는 0.72%, *Bac. subtilis*区가 0.58% 로서 최대치를 나타내었다가 72時間 後에는 감소하여 0.38%와 0.39%를 나타내었다.

3. Protease 力価의 変化

청국장메주 製造過程中의 protease活性을 経時的으로 測定한 結果는 Fig 3과 같다.

두 試験区 모두 醱酵時間이 경과함에 따라 protease 活性이 增加하여 48時間에서 60時間에 最大活性을 나타내었고 그 이후는 서서히 감소하였다.

*Bac. natto*区가 *Bac. subtilis*区보다 強한 酵素活性을 나타내었고 또 볏짚을 使用한 在来式 청국장[7] 보다 높은 것은 純粋分離培養한 菌株를 使用했기 때문이며 Cin

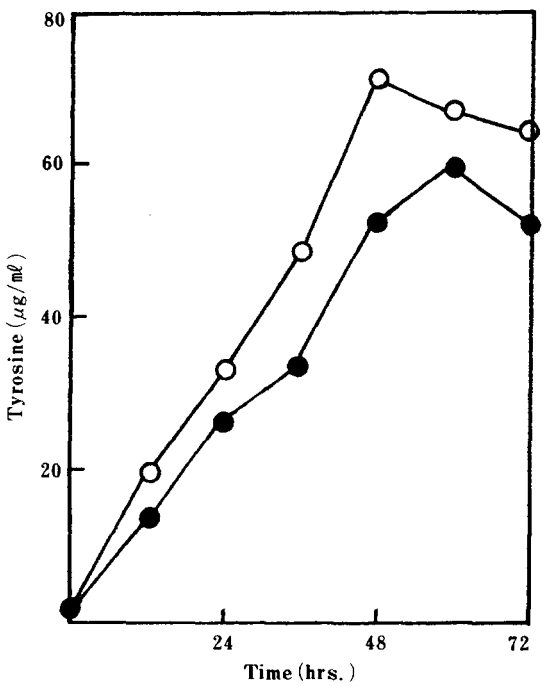

Fig. 3. Changes of protease activity duning the *Chungkookjang Meju* preparation
—○— : ***Bacillus natto***
—●— : ***Bacillus subtills***

Table. 4. Changes of nitrogen compounds during *Chugkookjang Meju* fermentation

Unit : %

Nitrogen Compound	Experimental group	Fermentation Time (hours) 0	12	24	36	48	60	72
Water soluble nitrogen	*B. natto*	0.31	0.68	0.84	0.96	1.41	1.49	1.52
	B. subtilis		0.39	0.61	0.73	1.00	1.17	1.19
Ammonia nitrogen	*B. natto*	0.0019	0.012	0.022	0.068	0.124	0.157	0.168
	B. subtilis		0.014	0.022	0.054	0.118	0.149	0.147

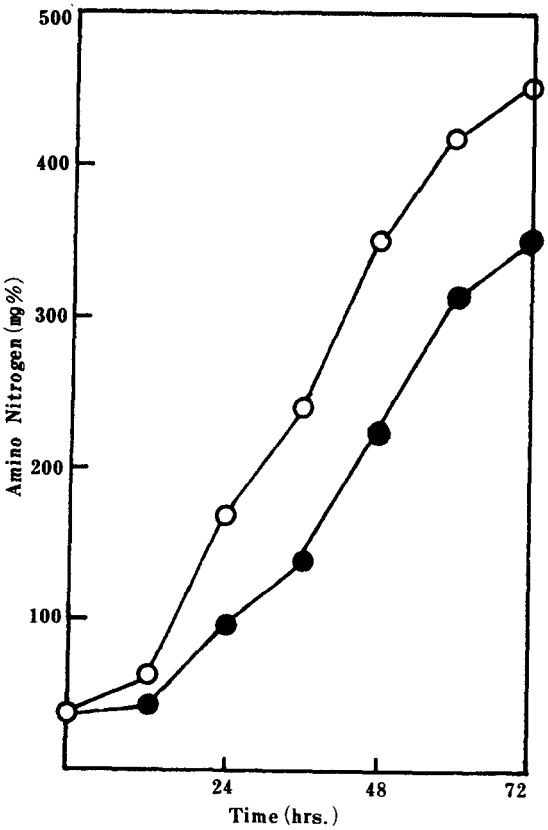

Fig. 4. Changes of amino type nitrogen during the *Chungkookjang Meju* preparation
－○－ : *Bacillus natto*
－●－ : *Bacillus subtilis*

:N率이 높은 大豆만을 使用한 関係로 보아진다.

청국장의 protease 活性은 된장이나 고추장[26] 보다 약하게 나타났다. 那復과 小原의[27] 報告에서는 48~60 時間에서 protease 活性이 最大値를 보인다고 했는데 이는 本 実験의 結果와 대체적으로 일치 하였다.

4. 청국장메주 醱酵中 窒素成分의 変化

청국장 메주 醱酵中의 窒素成分의 変化를 経時的으로 測定한 結果는 Fig 4, Table 4 와 같다.

청국장은 醱酵過程中에 微生物이 분비하는 蛋白分解酵素(protease)에 의하여 大豆의 蛋白質이 分解되는데 먼저 水溶性으로 되고 이어서 peptide, 아미노酸으로 分解되어 청국장 특유의 구수한맛 성분으로 重要時되고 있다.

청국장의 구수한맛을 좌우하는 아미노酸 成分인 아미노태 窒素의 含量은 발효시간이 경과함에 따라 대체로 増加하여 醱酵72時間 後에는 *Bac. natto*区가 457.3㎎%, *Bac. subtilis*区는 310.5㎎%로 나타났다.

수용성질소와 암모니아태 질소도 醱酵時間이 경과함에 따라 서서히 増加하여 수용성질소는 醱酵初期에 0.31%이던 것이 72時間 後에는 *Bac. natto*区가 1.52%, *Bac. subtilis*区가 1.19%였고 암모니아태질소는 발효초기에 0.0019%에서 72시간 후에는 各各 0.168%, 0.147%를 보였다.

이같은 窒素化合物의 変化는 朴[2] 李와 徐[5], 金등[7]의 報告와 일치하는 경향을 보였다.

5. 청국장 메주 醱酵過程中 蛋白分解率

청국장 醱酵過程中의 Total nitrogen量과 Amino nitrogen量에 의하여 計算表示되는 蛋白分解率은 Table5와 같다.

Table 5 에서 보는바와 같이 全醱酵熟成過程中의 蛋白分解率은 増加하는 현상을 나타내었다. 本実験에서 Amino-N ratio는 *Bac. natto*区가 醱酵初期에 1.29% 에서 72時間 後에는 14.37%를 보였고 *Bac. sublilis*区는 1.29%에서 9.98%를 보였다.

6. 청국장 메주 醱酵中의 遊離아미노산 変化

청국장메주 醱酵過程中의 遊離아미노酸의 함량을 測定한 結果는 Fig5, 6, 7, 과 Table 6 과 같다.

Table. 5. Changes of total nitrogen and amino acid nitrogen ratio during the *Chungkookjang Meju fermentation*

Fermentation time (hours)	Total Nitrogen		Amino nitrogen ratio	
	B. natto	*B. subtilis*	*B. natto*	*B. subtilis*
0	2.951	2.951	1.29	1.29
12	2.892	2.986	2.05	1.38
24	2.975	3.122	5.74	2.41
36	3.147	3.089	7.64	4.20
48	3.168	3.145	11.01	7.012
60	3.093	3.148	13.79	8.84
72	3.182	3.110	14.37	9.98

$$\text{Amino nitrogen ratio} = \frac{\text{Amino nitrogen (g\%)} \times 100}{\text{Total nitrogen (g\%)}}$$

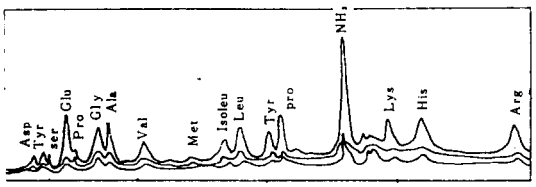

Fig. 5. The amino acid pattern of steamed soy bean

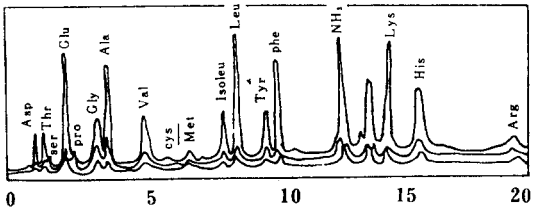

Fig. 6. Amino acid of 72 hours incubation *Chungkookjang Koji* of *Bacillus natto*

大豆를 蒸煮한 직후의 아미노酸은 総 17種으로서 그 含量은 2.3358%이었고, 이중 glutamic acid가 0.47%, alanine이 0.2014%, arginine 0.654%, phenylalanine이 0.1752%를 보였으며 methionine은 극소량 含有되어 있는 것으로 나타났으며 이외 遊離아미노酸은 12種으로서 0.175~0.0017% 로서 적은 含量을 보였다.

72時間 醱酵하여 製造한 청국장의 遊離아미노酸을 測定한 結果는 *Bac. natto*区가 18.6416%, *Bac. subtilis* 区가 12.9363%를 보여 *Bac. natto*区가 5.7053% 더 많은 것으로 나타났는데 이는 菌株의 선택使用에 따른 것이라 생각된다.

各 아미노酸 함량은 두 試驗区 모두 glutamic acid가 各各 3.0278%, 1.9011%로서 가장 높았으며 그 다음은

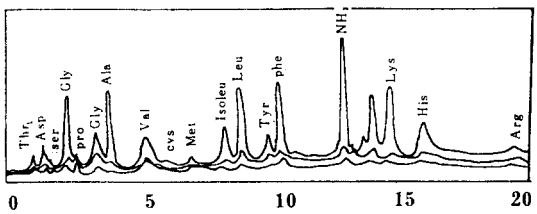

Fig. 7. Amino acid of 72 hours incubation during the *Chungkookjang- Koji* of *Bacillus subtilis*

leucine 含量이 높았다. 그외 必須아미노酸의 含量 비교는 *Bac. natto*区에서 phenylalanine, histidine, alanine isoleucine, lysine順이었고 *Bac. subtilis*区는 isoleucine alanine, phenylalanine, histidine, lysine順으로서 두

Table. 6. Amino acid composition of *Chungkookjagg Meju*

Unit (g amino acid / 100g)

Amino Acids	Steamed Soy bean	*Bacillus natto*	*Bacillus subilis*
DL-Aspartic acid	0.1138	0.3714	0.2668
L-Threonine	0.087	0.4169	0.2971
DL-Serine	0.1454	0.1926	0.2005
DL-Glutamic acid	0.4711	3.0278	1.9011
DL-Proline	0.0751	0.7332	0.6024
Glycinen	0.0327	0.4206	0.4269
DL-Alanine	0.2014	1.4278	1.3336
DL-Valine	0.0218	0.7694	0.8754
L-Cystine	0.0017	trace	trace
DL-Methionine	trace	0.1793	0.1635
L-Isoleucine	0.0514	1.2462	1.4238
L-Leucine	0.0478	2.4238	1.4724
DL-Tyrosine	0.0824	1.0241	0.4258
DL-Phenylalanine	0.1752	1.9925	0.9764
DL-Lysine	0.0617	1.2455	0.9052
DL-Histidine	0.1131	1.9841	0.9706
DL-Arginine	0.6542	1.1864	0.6948
Total	2.3358	18.6416	12.9363

試験区間에 含量의 差異를 보였다. 이것은 金等[7]의 在来式 청국장의 아미노酸 含量과 비슷한 양상을 보였으나 다만 在来式에서 検出되었던 ornitine은 検出되지 않았다.

또한 杉村敬一郎[28]의 報告와 같이 발효初期에 0.65%를 보인 arginine은 醱酵中에 현저히 감소하는 경향을 보였고 日本에서 市販되는 納豆에는 aspartic acid, glutarmic acid, threonine順으로 含量을 보였다는 草野[29-30]의 報告와는 多小 상이하나, glutamic acid 가 가장 많고 그 다음이 phenylalanine順으로 報告한 平春枝등[31] 金等[7]의 報告와는 일치하는 경향을 보였다.

이상의 結果로 미루어 보면 日本에서 市販되는 納豆와는 메주 製造의 原料成分과 熟成過程中에 酵素作用등이 상이하여 아미노산의 含量에 차이가 있는 것으로 생각된다.

청국장 製造時 *Bac. natto*区가 *Bac. subtilis*区에 比하여 活性을 強하게 나타내었고 청국장의 구수한 맛의 主体는 역시 glutamic acid로 보여지며 쓴맛을 갖는 leucine이 多量含有 되어 청국장의 특이한 맛을 형성시키고 단맛을 갖는 lysine 등과 함께 청국장의 복합적인 맛을 형성하는 重要한 인자라고 생각된다.

要 約

Bacillus natto 및 *Bacillus subtilis*菌을 利用한 청국장메주 醱酵過程中의 아미노酸 含量과 窒素成分의 変化는 다음과 같았다.

① 醱酵過程중에 pH는 試験区 모두 増加되어 醱酵初期에 6.37에서 72時間 後에는 8.2로 나타났으며 粗蛋白質 含量은 16.82%에서 18%로서 不規則的인 증감현상을 보였고 総糖은 試験区 모두 감소한 반면에 Reducing sugar는 醱酵 24時間에 最大値를 나타내다가 多小감소하였으며 protease活性은 醱酵時間이 경과함에 따라 増加하여 48~60時間에서 最大活性을 보였으며 *Bac. subtilis*보다 *Bac. natto*区가 높은 活性을 보였다.

② Amino nitrogen과 수용성질소도 서서히 増加하였으며 *Bac. natto*区가 더 높았다.

蛋白分解率에 있어 *Bac. natto*試験区가 *Bac. subtilis*보다 醱酵 72時間후에 4.4%가 더높은 것으로 나타났다.

③ 遊離아미노酸 含量에 있어 두 試験区 모두 glutamic acid가 가장 높았고 그 다음이 leucine, phenylalanine, histidine, alanine, arginine順 이었으며 *Bac. natto*区가 *Bac. subtilis*区에 比하여 多小 높았다.

이상의 結果로 보아 청국장 製造 菌株로서 *Bac. subtilis*보다 *Bac. natto*가 더욱 우수 하였다.

文 献

1. 金載昺：韓国農化学会誌, 6, 79 (1965)
2. 朴啓仁：韓国農化学会誌, 15, 93 (1972)
3. 朴啓仁：韓国農化学会誌, 15, 111 (1972)
4. 李甲湘, 鄭東孝：韓国食品科学会誌, 5, 163 (1973)
5. 李賢子, 徐正淑：韓国営養学会誌, 14, 97 (1981)
6. 徐正淑, 李尚健, 柳明基：韓国食品科学会誌, 14, 309 (1982)
7. 金敬子, 柳明基, 金尚淳：韓国食品科学会誌, 14, 301 (1982)
8. 林右市：日醱酵工業雑誌, 37, 233 (1959)
9. 林右市： 〃 〃 272 (1959)
10. 林右市： 〃 〃 276 (1959)
11. 林右市： 〃 〃 327 (1959)
12. 林右市： 〃 〃 329 (1959)
13. 林右市： 〃 〃 360 (1959)
14. 日本全国味噌技術会編：基準味噌分析法, p.1~34 (1968)
15. Anson, M. L. : *J. Gen Physiol*, 22, 79 (1938)
16. 萩原文二：(赤堀編), 酵素研究法, 第二巻 p.240 (1956)
17. 萩原文二：(江上編), 標準生化学実験, p.207 (1953)
18. 日本東京大学農化学部編：実験農芸化学, 上巻, p. 283 (1968)
19. 波多野博行：アシノ酸自動分析法. 化学同人, p. 79 (1964)
20. 波多野博行：アツノ酸自動分析法. 化学同人, p. 62 (1964)
21. 波多野博行：アツノ酸自動分析法. 化学同人, p. 21 (1970)
22. 日本分析化学会 近畿支部編：機器分析実験法 (化学同人), p. 702 (1962)
23. 高木徹：油脂 脂質の機器分析, p. 227 辛書房刊 (1967)
24. 李澤守, 趙漢玉, 柳明基：韓国営養学会誌, 13, 43 (1980)
25. 李澤守：韓国農化学会誌, 22, 65 (1979)
26. 이택수, 신보규, 주영하, 유주현：韓国産業微生物学会誌, 1, 79 (1973)
27. 那復野精, 小原彦：調味科学, 19, 32 (1972)
28. 杉村敬一郎, 平宏和, 舎老澤春枝, 根井芳人：営養と食糧, 14, 414 (1969)
29. 草野愛子：営養と食量, 22, 615 (1969)
30. 草野愛子：営養と食量, 24, 8 (1972)
31. 平春枝, 平宏和, 根井芳人：営養と食量, 17, 248 (1964)