

## *Bacillus subtilis* S.N.U 816 균주를 이용한 Natto 제조중 유리당 및 유리아미노산의 변화

金福蘭·韓龍鳳·朴昌熙\*

고려대학교 가정학과, \*샘표식품공업주식회사 연구실

(1987년 3월 25일 수리)

### Changes of Free Sugar and Free Amino Acid during the Natto Fermentation used by *Bacillus subtilis* S.N.U 816

Bok-Ran Kim, Yong-Bong Han and Chang-Hee Park\*

Department of Home Economics Education, Korea University, \*Sampyo Foods Co.,  
Ltd. Lab., Seoul, Korea

#### Abstract

Natto was produced by fermenting local soybeans *Bacillus subtilis* S.N.U. 816. The changes of chemical composition, enzyme activity and texture of NATTO during the fermentation were investigated. The amount of amino type and water soluble nitrogens were increased as the fermentation progressed, although the former seemed to reach a plateau at about 20 hours of the fermentation, of the protease activity were increased until 16 hours of fermentation at which time they tended to reach plateaus. Among the inspected free sugars (fructose, glucose, sucrose, maltose), remarkable increases in the levels of fructose and glucose were observed after 4 hours of the fermentation. Since then their contents, however, were reduced very low as the processing went on, and sucrose contents dropped drastically to about 10% level and stayed low thereafter. Free amino acid contents of natto during 20 hours of the fermentation were or 2 times greater than those of the unfermented steamed soybean, the 24 hours ferment, respectively. Sensory evaluation revealed that 20 hours of fermentation produced the best quality products based on taste, odor, and color, considering all the data, it seems possible to conclude that the optimum of time for fermentation of natto at 42°C is 20 hours.

#### 서론

대두의 발효식품은 옛날부터 주로 식물성식품을 섭취하는 우리나라를 비롯하여 동양의 여러나라에서 중요한 단백질 공급식품으로 이용되어 왔다. 우리나라에서는 간장, 된장, 고추장, 청국장 등을 제조하여 조미식품으로 이용되고 있으며, 일본에서는 주로 간장, miso, natto, 인도네시아에서는

temph 등의 형태로 식용하고 있다.

natto에 관한 연구로는 1894년 처음으로 세균 및 효소에 관한 失部<sup>1)</sup>의 보고가 있으며, 그 후 須田<sup>2)</sup>과 澤村<sup>3)</sup>은 natto 제조에 관여하는 미생물을 분리동정하여 *Bacillus natto* 라고 명명하였고, natto의 성분연구<sup>4-7)</sup>, 미생물에 관한 연구<sup>8-12)</sup>, 효소에 관한 연구<sup>3,4)</sup>, 향기성분의 연구<sup>13)</sup>, 영양성분에 관한 보고<sup>16-19)</sup>, natto 첨가식과 spontaneously hypertensive rat의 혈압과의 관련에 대한 보고<sup>20)</sup>

등이 있으며, 국내 연구로는 natto 중의 효소 및 영양성분<sup>27-12)</sup>에 관한 다수의 보고만 있을 뿐이다.

우리의 식생활이 점차 서구화됨에 따라 동물성 식품의 섭취량이 증가하여 동물성 지방의 과다섭취로 잉여열량이 많아지고, 체액의 산성화 위험이 따를 뿐만 아니라 atherosclerosis, myocardial infarction, stroke, hypertension 과 같은 성인병 유발이 날로 증가하고 있으므로 이것의 치료와 예방의 한 방법으로 체내 cholesterol 저하대책이 연구되고 있는 이때, 식물성 고단백식품으로 cholesterol 이 전혀 없고 체내의 cholesterol 의 농도를 저하시키는 linoleic acid 를 함유하고 있는 natto 는 성인병의 예방과 치료에 적합한 식품으로 보고<sup>29)</sup>되어 있는바, 필자등은 한국인의 기호에 맞는 natto 를 제조코자, 그 일차적인 연구로 *Bacillus subtilis S.N.U 816* 균주를 이용하여 natto 제조중 발효시간에 따른 성분 및 효소력 변화, 관능검사 등을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 조제

#### 1) 재료

1985년도 한국산 중립의 태백종 대두를 시료로 사용하였으며, 그 일반성분은 총질소 5.99%, 총당 11.83%, 조단백질 37.44%, 조지방 19.33%, 조섬유 4.37%, 조회분 5.14%, 수분 8.48% 이었다.

#### 2) 사용균주

서울대학교 미생물학과에서 분양받은 *Bacillus subtilis S.N.U 816*<sup>29)</sup>을 공시균주로 하였다.

#### 3) natto의 제조

선별한 대두 3kg을 15°C의 물에 15시간 침수 후 1시간 동안 물빼기를 하여 stainless steel 계 용기 (35cm×23cm×6cm)에 담아 가압증자판(1.8kg/cm<sup>2</sup>)에서 60분간 증자하여 냉각한 다음, 종균수<sup>26)</sup> (*Bacillus subtilis S.N.U 816* 균주의 현탁액 0.5cc를 100ml의 무균수에 희석한 액)를 접종하여 3l 들이 재래식 독에 담아 42°C의 항온실에서 24시간 발효숙성 하여 제조하였다.

### 2. 정량방법

#### 1) 일반성분

시료의 아미노태질소, 수용성질소, 암모니아태

질소, 수분, 조단백, pH, 적정산도, 조지방, 조섬유, 조회분 등의 정량은 基準味噌分析法<sup>27)</sup>에 따라 실시하였다.

#### 2) 단백질 분해 효소력

시료 10g을 취하고 증류수를 가하여 100ml로 한 후 실온에서 1시간 진탕 추출하고 여과한 액을 효소액으로 하여 Anson<sup>28-29)</sup>, 荻原變法으로 protease 활성을 측정하였다.

#### 3) 유리당

시료 100g을 정확히 취하여 80% ethyl alcohol 500ml를 가하여 3회 water bath 상서 환류냉각하여 추출한 후 원심분리하여 분리 여과하고 50°C 이하에서 감압농축 후 상법<sup>30)</sup>에 따라 분석하였다.

#### 4) 유리 아미노산

마쇄한 시료 50g에 75% ethylalcohol 30ml를 가하고 100°C에서 2시간 추출한 다음, 상층액을 취하였다. 이 조작을 3회 반복하여 취해진 액에 ethyl ether 30ml를 가하여 지방을 제거한 후 농축하였으며, 여기에 0.1N NaOH 3~4ml를 가하여 4시간 방치한 다음, citric acid buffer solution (pH 2.2)으로 희석한 시료를 amino acid analyzer (Hitachi KLA-5)를 이용하여 유리아미노산을 정량하였다.

#### 5) 관능검사

16시간, 20시간, 24시간 발효시킨 natto 를 시료로 하여 24명의 심사원에게 맛, 향, 색상에 관한 관능검사를 채점법(scoring method)<sup>31)</sup>에 의해 실시하였다. 대단히 싫다 1점, 보통으로 싫다 2점, 약간 싫다 3점, 좋지도 싫지도 않다 4점, 약간 좋다 5점, 보통으로 좋다 6점, 대단히 좋다 7점으로 하였고, 검사결과는 one way analysis에 의하여 분산 분석하였으며, 평균간 유의성은 Tukey's test에 의하였다<sup>32)</sup>.

## 결과 및 고찰

### 1. 일반성분 및 질소화합물의 변화

natto 발효과정 중의 수분함량, 조단백질, 조지방, 조섬유, 조회분, 아미노태질소, 수용성질소, 암모니아태 질소를 분석한 결과는 Table 1 과 같다 수분함량은 증자 직후 54.33%에서 발효시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타냈지만, 큰 차이를 보이지는 않았다. 이는 金等<sup>33)</sup>의 청국장 발효에 있어서 각 시험구의 수분함량에 큰 변화를

**Table 1.** Changes in chemical components and nitrogen compounds during the natto fermentation (Unit : %)

Chemical component	Fermentation time (hours)						
	0	4	8	12	16	20	24
Moisture	54.33	54.08	54.12	54.13	53.81	53.26	52.08
Crude protein	17.21	17.77	17.56	17.25	17.81	17.81	18.69
Crude fat	8.21	8.49	8.07	8.54	8.34	8.48	8.51
Crude fiber	6.47	6.86	6.51	6.77	6.81	6.90	7.21
Crude ash	2.43	2.27	2.34	2.37	2.29	2.36	2.30
Amino type nitrogen	0.25	0.28	0.44	0.79	1.39	2.83	2.53
Water soluble nitrogen	0.42	0.48	0.91	0.99	1.18	1.18	1.21
Ammonia type nitrogen	0.12	0.20	0.12	0.19	0.39	0.98	0.89

보이지 않은 것과 같은 경향을 보였다.

조단백질, 조지방, 조섬유 및 조회분은 발효시간이 경과함에 따라 각 시험구간의 큰 차이가 없었다.

아미노태 질소는 natto의 구수한 맛 성분으로서 중요한 인자로 증자 직후에는 그 함량이 0.25%에서 발효가 진행됨에 따라 20시간에는 2.83%로 약 11배 이상 증가하다가 24시간에는 2.53%로 약간 감소하였다. 수용성질소 함량이 발효시간의 경과에 따라 계속 증가하는 경향은 金<sup>33)</sup>, 徐<sup>34)</sup>, 朴<sup>35)</sup>의 보고와 일치하였다. 암모니아태 질소는 증자 직후 0.12%에서 발효시간이 경과함에 따라 증가하여 발효 20시간에서는 0.98%로 최고치가 되었으나 그후 감소하는 경향을 나타냈다.

**2. pH 및 적정산도의 변화**

natto 발효과정 중의 pH와 적정산도의 경시적 변화는 Table 2와 같다.

증자 직후 pH는 6.23이었고 발효가 진행됨에 따라 pH가 상승하여 24시간에는 7.93으로 청국장 제조시와 pH 상승경향은 일치하였다<sup>33,36,37)</sup>. 또한 적정산도도 증자 직후 3.90에서 발효시간이 경과함에 따라 증가하여 16시간에는 7.90까지 상승하

였고 그 이후에는 점차 감소하였다. 그러나 청국장에서 발효시간이 경과함에 따라 적정산도가 감소했다는 보고<sup>33,37)</sup>와는 반대결과 이었다.

**3. 유리당의 변화**

HPLC에 의해 동정해 본 결과 fructose, glucose, sucrose, maltose가 검출되었으며 분석결과는 Table 3과 같다.

Fructose, glucose는 발효 4시간에서 최대치를 보인 후 차츰 감소하였고, sucrose는 증자 직후 946.6 mg%으로 최고치 였으나 발효됨에 따라 10% 수준까지 급격하게 감소하였다.

Fructose와 glucose가 발효 4시간에서 최대치를 나타낸 것은 invertase에 의해 sucrose가 가수분해되어 fructose와 glucose가 생성되었기 때문이라고 생각된다. 또한 발효시 유리당의 함량이 감소한 이유는 다소의 알콜발효 및 미생물의 영양원으로 소실되었기 때문이라고 사료된다.

한편 菅野<sup>38)</sup>은 natto 발효 중 sucrose, raffinose, stachyose, melibiose, mannitriose, glucose, fructose 및 myo-inositol을 동정하였으며, 그 중 sucrose, raffinose, stachyose는 증자 직후, glucose, fructose, mannitriose는 발효 8시간에 최대치를

**Table 2.** Changes in pH and total acidity during the natto fermentation

	Fermentation time (hours)						
	0	4	8	12	16	20	24
pH	6.23	6.22	6.23	6.58	6.81	7.68	7.93
Total acidity(0.1N NaOH/ml)	3.90	3.95	4.98	5.11	7.90	6.30	4.55

**Table 3.** Changes in free sugar contents during the natto fermentation

(Unit : mg%)

Free sugar	Fermentation time (hours)						
	0	4	8	12	16	20	24
Fructose	95.0	372.0	314.0	200.0	56.5	55.6	40.0
Glucose	25.4	663.0	60.0	44.5	44.5	44.5	33.5
Sucrose	946.6	95.0	100.0	113.0	160.0	186.0	165.0
Maltose	trace	—	—	—	—	—	—

**Table 4.** Changes in Free amino acid contents during the natto fermentation.

(Unit : mg%)

Amino acid	Fermentation time (hours)			
	0	16	20	24
Lysine	4.73	10.25	139.10	68.63
Histicidine	7.35	54.45	64.90	40.03
Ammonia	10.35	11.35	192.86	110.17
Arginine	23.34	9.31	19.52	23.40
Aspartic acid	6.00	41.64	39.82	24.21
Threonine	4.15	38.55	32.65	29.59
Serine	15.60	37.74	50.93	22.84
Glutamic acid	16.58	195.98	191.52	119.58
Proline	3.91	—	—	—
Glycine	2.78	47.63	49.25	31.99
Alanine	16.98	56.96	64.12	48.09
Cystine	—	—	—	—
Valine	5.45	87.87	92.29	40.17
Methionine	2.61	43.91	65.49	24.45
Isoleucine	1.68	76.40	52.67	46.64
Leucine	2.90	120.25	92.40	64.44
Tyrosine	5.11	51.91	145.35	68.64
Phenylalanine	3.69	114.51	162.48	112.34
Total	133.31	998.71	1,454.35	775.21

나타내었고, maltose는 검출되지 않았다고 보고하였다. 본 실험에서菅野<sup>30)</sup>와는 달리 fructose, glucose, sucrose, maltose 이외의 성분이 동정되지 않은 이유는 원료와 발효 및 분석조건 등의 차이 때문이라 생각된다.

#### 4. 유리 아미노산의 변화

natto 발효 중의 유리 아미노산을 정량한 결과

는 Table 4와 같다.

증자 직후의 유리 아미노산은 총 17종으로서 그 함량은 133.31 mg%이며 이 중 arginine (23.34 mg%)이 가장 많았고 다음 alanine(16.98mg%), glutamic acid (16.58 mg%) 순이며 cystine은 극소량이 함유되어 있었다. 金<sup>33)</sup>의 청국장 제조 중 arginine의 감소는 본 natto제조 실험시와 같은 경향을 보였다. 발효 16 시간에 arginine 과 proline

이 감소하였으며, 발효 20 시간에는 glutamic acid, phenylalanine, tyrosine 순으로 그 함량이 많았는데 이는 平春枝<sup>39)</sup>의 보고와 유사하였다.

또한 glutamic acid의 함량은 16 시간과 20 시간 발효 natto에서 가장 높았으며 증자 직후보다 약 12 배로 가장 많이 증가하였고, glycine, alanine, valine, histidine 등의 감미 아미노산의 함량도 발효 20 시간 발효 natto에서 증가하였다.

총 아미노산 함량은 발효 20시간에 1454.35 mg %으로 최대치에 도달하였는데, 이는 16 시간 발효 natto보다 약 1.5배, 24 시간 발효 natto보다는 약 2 배가 되었다.

5. Protease 활성의 변화

natto 발효과정 중의 단백질, 분해효소의 역가는 Fig. 1에서와 같이 산성 protease의 활성은 발효 초에 다소 저하하다가 16시간에는 최대활성을 나타내었고, 중성 및 알칼리성 protease의 활성은 발효초 부터 서서히 증가하여 20시간에서 최대활성을 나타내었다.

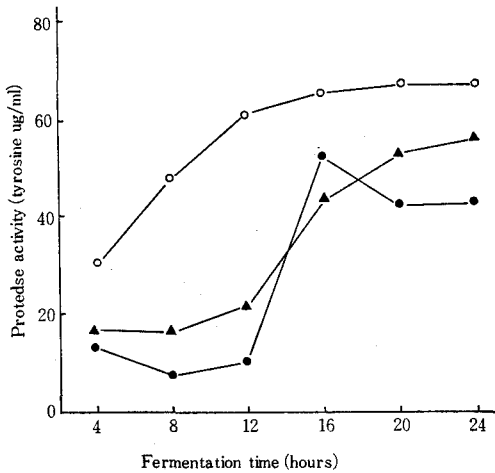


Fig. 1. Changes in protease activity during the natto fermentation.

- : Acid protease activity (pH 3)
- : Neutral protease activity (pH 7)
- ▲—▲ : Alkali protease activity (pH 9)

6. 관능검사

채점법에 의하여 16시간, 20시간, 24시간 발효 시킨 natto의 관능검사를 실시한 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Sensory evaluation of fermented natto by the scoring method

Sample	Sense			
	Taste	Odor	Color	Mean
Natto fermented 16 hours	3.7 a	4.1 a	4.2 a	4.0
Natto fermented 20 hours	4.8 b	4.3 a	4.4 a	4.5
Natto fermented 24 hours	3.6 a	3.6 a	4.1 a	3.8

Means with a common superscript are not significantly different (p < 0.05)

- Grade 1 : dislike very much
- Grade 2 : dislike
- Grade 3 : dislike moderately
- Grade 4 : neither like nor dislike
- Grade 5 : like moderately
- Grade 6 : like
- Grade 7 : like very much

맛, 향기, 색상에 대한 관능검사 결과 16시간과 24시간 발효 natto 보다는 20시간 발효 natto가 우수한 것으로 나타났다. 이는 발효 20시간에 구수한 맛과 단 맛의 아미노산인 glutamic acid, glycine, alanine, valine 등이 현저히 증가한 것과 일치함을 알 수 있다. 관능검사를 실시하여 Tukey's test에 의해 검정해 본 결과 Table 5에서와 같이 5% 수준에서 맛에 있어서는 유의성이 인정되었다.

요 약

*Bacillus subtilis* S.N.U 816 균주를 이용하여 natto 제조 중 발효시간에 따른 성분의 변화를 조사하였다.

아미노태질소 및 수용성질소의 함량은 발효 20 시간 후 감소하는 경향이었고, protease 역가는 16 시간 후 최고치를 나타내었으며 그 후 감소하는 경향이였다. 동정된 유리당 (fructose, glucose, sucrose, maltose) 중 fructose와 glucose는 발효 4시간에 최고치를 나타냈으나, 후에는 차츰 감소하였고 sucrose는 증자 직후 최고치였으나 발효됨에 따라 10% 수준까지 급격하게 감소하였다. 유리 아미노산의 함량은 증자 직후 보다 발효 20 시간후에 11 배에 달하였으며, 24시간 후에는 그 함량이 반

으로 급격히 감소하였다. 관능검사 결과 20시간 발효한 natto가 가장 우수하게 나타나 성분치와 거의 일치하는 경향이였다. 이상의 결과로 볼 때 상기 균주로 제조한 natto의 최적발효조건은 42°C에서 20시간이였다.

참 고 문 헌

1. 矢部規矩治 : 日農學會報, 24 : 3 (1894)
2. 須田, 米城 : 藥學誌, 240 : 321 (1902)
3. 澤村 : 日農學會報, 67 : 1 (1905)
4. 伊藤武男 : 日農化誌, 2 : 32 (1926)
5. 阿部久三 : 日農化誌, 10 : 545 (1934)
6. 中島顯三, 日農化誌, 19 : 155 (1943)
7. 木原芳次郎 : 日農化誌, 38 : 257 (1961)
8. 澤村眞 : 日農學會報, 120 : 1 (1912)
9. 吳祐吉中村清三 : 日農化誌, 13 : 295 (1937)
10. 山本義彦, 田村芳祐 : 日釀造學雜誌, 5 : 589 (1928)
11. 林右市 : 日釀工誌, 37 : 233 (1959)
12. 半澤句, 田村芳祐 : 日農化誌, 10 : 520 (1934)
13. 林右市 : 日釀工誌, 37 : 272 (1959)
14. 井上吉之 : 日營養學誌, 8 : 69 (1951)
15. 小幡彌太郎 : 日釀工誌, 37 : 348 (1959)
16. 野村 : 日神工試報, 4 : 220 (1934)
17. 有働 : 日農化誌, 12 : 386 (1936)
18. 草野愛子 : 日營養と食糧, 22(9) : 615 (1969)
19. 草野愛子 : 日營養と食糧, 24(1) : 8 (1971)
20. 林右市, 長尾和美, 土佐幸代, 吉岡幸映, 日納豆科學研究會誌, 1 : 85 (1977)
21. 鄭泰錫, 金燦祚, 黃圭晟 : 科연회보, 4(3) : 83 (1958)
22. 鄭泰錫 : 科연회보, 1 : 19 (1956)
23. 金洙營, 金載勗 : 韓農化誌, 8 : 11 (1967)
24. 太田輝夫 : アミノサン協會 技術部會報, 1 (1975)
25. 咸昇市, 李周植, 皮在虎, 金福蘭 : 江原大學校 論文集, 19 : 35 (1984)
26. 鈴木敏之 : 日食品と科學, 6 : 87 (1983)
27. 全國味噌技術會編 : 基準味噌分析法, 1 (1968)
28. Anson, M.L. : J. Gen. physiol, 22 (1938)
29. 菽原文二 : 酵素研究法, 末堀編, 2 : 240 (1956)
30. 朴昌熙, 朴允仲 : 忠南大農業技術研究報告, 11 : 1 (1984)
31. 金載勗, 朴啓仁 : 食品加工實驗實習法, 郷文社 95 (1980)
32. Steel, R.G.D and J.H. Torrie: McGraw. Hill Book Co., Inc. New York, NY (1960)
33. 金敬子, 柳明基, 金尙淳 : 韓國食品科學會誌, 14(4) : 301 (1982)
34. 徐正淑, 李尙建, 柳明基 : 韓國食品科學會誌, 14(4) : 309 (1982)
35. 朴啓仁 : 韓農化誌, 15(2) : 111 (1972)
36. 이현자, 서정숙 : 한국영양학회지, 14(2) : 97 (1981)
37. 朴啓仁 : 韓農化誌, 15(2) : 93 (1972)
38. 菅野彰重, 高松晴樹, 高野伸子, 秋本隆司 : Nippon skokuhin kogyo Gakkaishi, 29(2) : 105 (1982)
39. 平春枝, 平宏和, 櫻井芳人 : 日營養と食糧, 17 : 248 (1964)