

## *Bacillus licheniformis* B1을 이용한 검은콩 청국장 발효

황재성<sup>2</sup> · 김재영<sup>1</sup> · 성대일<sup>2</sup> · 이용섭<sup>1</sup> · 김한복<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>호서대학교 한방화장품학과

<sup>2</sup>호서대학교 생명공학과, 기초과학연구

### Fermentation of Black-soybean Chungkookjang Using *Bacillus licheniformis* B1

Jae Sung Hwang<sup>2</sup>, Jae Young Kim<sup>1</sup>, Dae Il Sung<sup>2</sup>, Yong Sub Yi<sup>1</sup>, and Han Bok Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Department of Herbal Cosmetic Science,

<sup>2</sup>The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea

(Received August 23, 2012 / Accepted September 13, 2012)

Chungkookjang, fermented soybean, is high in microorganism, enzymes, daidzein, and peptides. Using yellow, black, Seoritae, small-black soybeans and *Bacillus licheniformis* B1, each Chungkookjang (YC, BC, SC, SBC) was prepared, and their fermentation patterns were compared. Changes of pH and browning material formation were taken as an indicative of fermentation. YC had a high pH increase at an early stage of fermentation, and a low change at a late stage. BC, SC, and SBC showed different patterns with a low pH increase at an early stage and a high pH increase at a late stage. Formation rate of browning material was fastest in YC and slow in the rest of BC, SC, and SMC. SC showed the highest value of browning material formation 1 d after fermentation. Anthocyanin in black soybeans seems to suppress the growth of bacteria at an early stage of fermentation. When anti-inflammatory daidzein contents were analyzed by HPLC, BC, SC, SBC showed higher values than YC. It was demonstrated that black soybeans can be fermented with *B. licheniformis* B1.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, browning material, Chungkookjang, daidzein, fermentation

청국장은 대두발효식품으로 미생물, 효소, 다양한 생리활성 물질을 지니고 있고, 성인병 예방과 건강증진에 우수한 항산화, 혈압강하, 면역조절, 신호전달 조절 효과 등이 보고되어 있다 (Hong *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2011). 기존의 대부분의 시판 청국장은 다량의 염분을 포함하고 있는데, 이는 한국인의 높은 위압, 고혈압의 예방에 도움이 되지 않는다. 또한 찌개용 청국장으로서는 청국장에 있는 혈전용해효소의 효과를 얻을 수 없다. 무염 생청국장은 미생물과 효소가 살아 있어, 인체에 매우 유익하나 특유의 맛으로 인해 일반인이 섭취하기에는 다소 어려운 점이 있다. 청국장의 맛과 품질은 사용하는 대두의 종류와 발효균주, 발효온도, 습도 등에 의해 큰 영향을 받는다. 본 연구에서는 청국장 발효균주 *Bacillus licheniformis* B1균주와 검은 콩을 포함한 다양한 품종을 이용하여 청국장 발효를 진행하였다. 청국장은 그동안 주로 백태를 이용하여 제조하였으며, 검은 콩을 이용하여 제조한 청국장에 관한 연구는 드문 편이다(Shon *et*

*al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005). 검은콩의 종류를 달리하여 발효시켰을 때, pH, 갈변물질 등을 지표로 하여 발효양상의 차이를 알아 보았다. 또한 청국장에는 genistein, daidzein, glycyetin 등의 isoflavone이 존재한다(Kim *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2007). 청국장에는 daidzein이 다량 함유되어 있고, 인체에서 중요한 생리활성물질로 알려져 있어(Atkinson *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007), 본 연구에서는 daidzein을 청국장의 또 다른 중요 지표물질로 선정하고, *B. licheniformis* B1으로 발효시킨 검은 청국장에서의 daidzein 함량을 비교·확인하였다.

청국장발효에 사용한 균주는 *Bacillus licheniformis* B1 (Lee *et al.*, 1999)이었고, 대두의 종류는 백태(*Glycine max* (L.) Merrill, yellow soybean), 흑태(*Glycine max* (L.) Merr., black soybean), 서리태(*Glycine max* (L.) Merr., Seoritae soybean), 약콩(*Rhynchosia nulubilis*, small-black soybean)이었다. 각각의 콩을 12시간 물에 불린 다음 121°C에서 30분간 삶았다. 위의 발효 균주 배양액을 각각의 대두에 1% 되게끔 접종 후 40°C에서 3일간 배양하였다(Lee *et al.*, 1999). 청국장을 동결 건조하고 분쇄기를 이용해 분말을 제조했다. 분말을 80% ethanol (분말:ethanol=1:2.5 (w/v))로 추출하고, 추출물을 감압증류, 동결건

\*For correspondence. E-mail: hbkim@hoseo.edu; Tel.: +82-41-540-5624; Fax: +82-41-548-6231

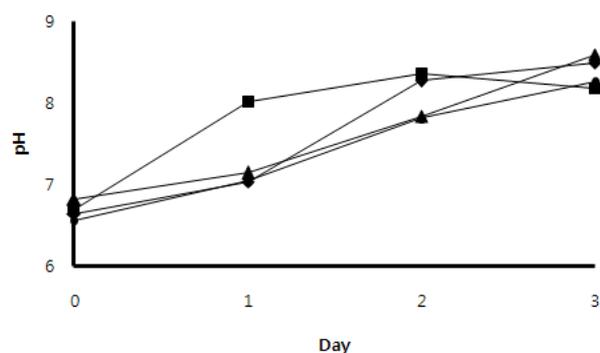
**Table 1.** pH value of Chungkookjang fermented 3 d

Type of soybean	pH
Yellow soybean	8.18±0.01
Black soybean	8.26±0.03
Seoritae	8.49±0.07
Small-black soybean	8.59±0.03

ANOVA was performed and values are expressed as mean±SD.  $p < 0.01$

조하였다(Kim *et al.*, 2007). 동결 건조한 청국장 분말을 물에 녹인 후(청국장분말:증류수=1:2.5 (w/v)) 원심분리하여(10,000×g) 상등액을 얻고 pH meter로 pH값을 결정하였다. 동결 건조한 청국장 분말을 물에 녹인 후(청국장분말:증류수=1:2.5 (w/v)) 원심분리하여 상등액을 얻고 100배 희석 후 390, 500 nm에서 흡광도를 결정하였다. 동결 건조한 청국장 분말의 ethanol 추출물을 methanol (0.1 mg/ml)에 녹인 후, HPLC (410 model, Agilent, USA)을 이용하여 daidzein 함량을 분석하였다. Column은 Polaris C18-A (250×4.6 mm, Agilent, USA)을 사용했고 용매는 A용액(0.1% acetic acid / DW)과 B용액(0.1% acetic acid / acetonitrile)를 사용하였다. 추출조건은 다음과 같다. 0-5.00 min간은 A:B=85:15, 5.00-31.00 min간은 A:B=71:29, 31.00-40.00 min간은 A:B=65:35, 40.00-45.00 min간은 A:B=85:15으로, 유속은 1 ml/min으로 하였다. 표준 daidzein은 본 실험조건에서 30분 38초에 방출됨을 확인하였다.

청국장은 균주에 의해 대두가 분해되면서 아미노산, 암모니아가 연차적으로 생성되면서 염기성 pH를 띤다(Lee *et al.*, 1999). 청국장의 발효 진행상태를 확인하기 위하여 청국장의 pH를 측정하였다. 발효되지 않은 콩의 pH는 약산성인 pH 6.40정도였다. 반면에, *B. licheniformis* B1과 4종류의 검은콩을 이용하여 청국장을 제조하고 3일 발효시킨 후 pH를 측정해 보면, 약콩이 pH 8.59로 가장 높은 수치를 보였으며, 백태가 pH 8.18, 흑태가 pH 8.26, 서리태가 pH 8.49의 pH값을 보였다(Table 1). 발효시간에 따른 청국장의 pH 변화에서는, 2일까지는 백태의 pH가 가장 높았으나 3일로 넘어가면서 백태의 pH가 다소 낮아졌다. 흑태, 서리태, 약콩의 경우는 발효 개시 1일 까지는 pH 변화가 적었으나 2, 3일 지나면서 pH가 급격히 상승하는 등, 백태와는 다른



**Fig. 1.** pH change during Chungkookjang fermentation. Change in pH of yellow (■), Seoritae (◆), black (▲), small-black soybean (●).

**Table 2.** The browning material of Chungkookjang fermented 3 d

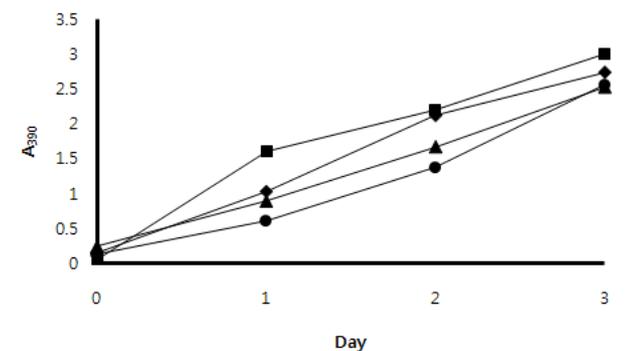
Type of soybean	390 nm	500 nm
Yellow soybean	3.00±0.14	2.03±0.03
Black soybean	2.55±0.04	1.91±0.02
Seoritae	2.73±0.04	2.09±0.03
Small-black soybean	2.52±0.03	1.98±0.03

ANOVA was performed and values are expressed as mean±SD.  $p < 0.05$  at 390 and 500 nm, respectively.

양상을 보였다(Fig. 1).

청국장의 갈변물질은 amino-carbonyl기의 반응에 의해 생성되는 melanoidin에 의해 생성되며 강력한 항산화물질로 알려져 있다(Lee *et al.*, 1999). 청국장 발효가 진행되면서 발효균주가 지니고 있는 단백질 분해효소와 당분해효소에 의해서 각각 생성된 아미노산과 당 성분으로부터 갈변물질이 만들어지며, 발효가 진행되면서 갈변물질의 생성은 초기에 비해 8배 이상 급격히 증가한다(Lee *et al.*, 1999). 갈변물질은 발효가 잘 이루어졌는지 판단할 수 있는 지표가 될 수 있다. 청국장의 갈변도는 390 nm와 500 nm의 파장에서 확인하였다. 3일 발효시킨 후, 갈변도를 측정해 보면, 백태, 서리태의 갈변도가 높았으며 흑태, 약콩의 갈변도는 약간 낮은 편이었다(Table 2). 발효 1일 후 갈변도는 백태가 가장 높았으며, 나머지 검정콩의 경우 그보다 낮은 값을 보여 주었다(Figs. 2 and 3). 서리태의 경우 발효 개시 1일 후 부터 다른 검은콩에 비해 갈변도가 급격히 증가하였다(Figs. 2 and 3).

Isoflavone과 peptide류는 청국장에 존재하는 대표적인 생리활성물질이다(Yoo *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2011). Isoflavone의 일종인 daidzein은 항염효과를 지니고 있으며 다양한 세포내 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있다(Atkinson *et al.*, 2005; Hämäläinen *et al.*, 2007; Kao *et al.*, 2007). 청국장 발효 중 daidzein의 양이 원래 대두에 비해 크게 증가하는 것이 확인된 바 있다(Kim *et al.*, 2007). 본 연구에서는 백태 및 검은콩을 재료로 *B. licheniformis* B1 의해 제조된 청국장에서 각각 daidzein 함량을 결정하였다. 흑태로 제조한 청국장이 가장 많은 양의 daidzein을 포함하고 있었으며(4.36 mg/g sample), 그 뒤로 서리



**Fig. 2.** Browning material change during Chungkookjang fermentation at 390 nm. Change in browning material of yellow (■), Seoritae (◆), black (▲), small-black soybean (●).

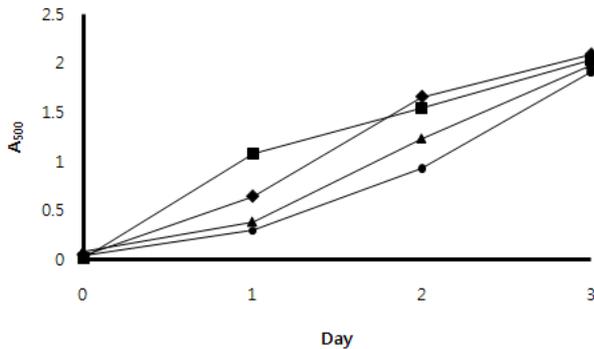
**Table 3.** Daidzein concentration

Type of soybean	Daidzein (mg/g sample)
Yellow soybean	2.63±0.04
Black soybean	4.36±0.04
Seoritae	4.09±0.06
Small-black soybean	2.75±0.04

ANOVA was performed and values are expressed as mean±SD. *p*<0.01

태, 약콩, 백태 순이었다. 검정콩 청국장 모두 백태 청국장 보다는 daidzein 함량이 높았다(Table 3 and Fig. 4).

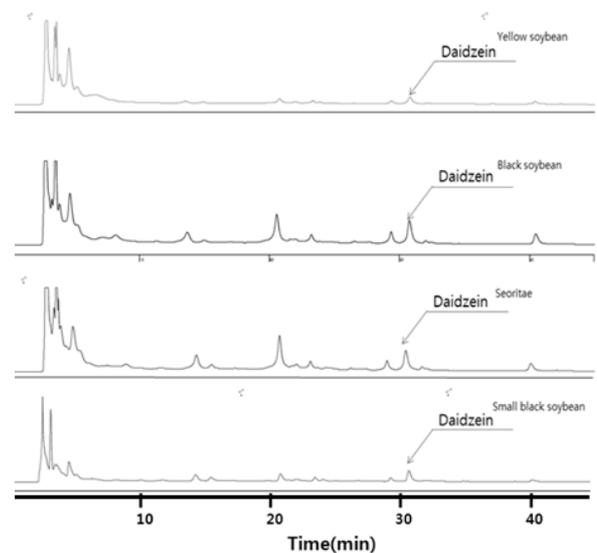
대두는 종류마다 단백질, 지방, 탄수화물 등 많은 성분들이 달라서, 같은 균주로 발효를 시킨 청국장이라도 생산되는 생리활성물질이 다를 수 있다. 본 연구에서는 4가지 종류의 대두와 *B. licheniformis* B1 균주를 이용해서 청국장을 제조하면서 각각의 발효상태를 비교하였다. 검은콩 서리태는 속이 푸른 색을 띄며, 흑태는 속이 누런 색이며 약콩은 서리태와 흑태에 비해 크기가 매우 작은 편이다. 발효의 지표는 미생물의 증식, 효소활성의 증가도 될 수 있지만, pH, 갈변물질의 변화도 그 지표로 이용될 수 있다. 청국장이 발효되면서 갈변물질의 생성에 의해 표면색깔이 바뀌고 점성물질이 생성된다. 4종류의 대두 중 점성 물질이 가장 많이 나온 것은 백태 청국장이었고, 발효속도도 가장 빠른 편이었다. 4종류의 대두가 발효 되면서 pH가 높아지는 것을 확인할 수 있었는데(Fig. 1), 이는 청국장 발효 시 아미노산, 암모니아가 생성되어 pH가 증가한다는 기존의 보고들과 부합하였다(Lee *et al.*, 1999). 백태로 제조한 청국장 발효의 경우, pH가 발효개시 1일 뒤, 가장 크게 증가하였으며 나머지 검은색 청국장 발효에서는 pH 증가 정도가 백태에 비해 적었다. 그러나 2일 뒤에는 나머지 검은콩의 pH도 크게 증가하였다. 이를 보아 청국장 균주가 단백질을 분해하는데 백태가 아닌 경우 시간이 필요한 것으로 보인다. 이전 연구들에서 폐놀성 화합물이 미생물의 생장을 억제한다는 보고가 있다(Shon *et al.*, 2000). 검은콩들은 이소플라본 뿐 아니라 안토시아닌 같은 색소성 성분도 있다(Lee *et al.*, 2009). 이들에 의해 청국장 발효균주의 생장이 억제되어 초반에는 발효 정도가 백태에 비해 약한 것으로 보인다. 청국장 발효지



**Fig. 3.** Browning material change during Chungkookjang fermentation at 500 nm. Change in browning material of yellow (■), Seoritae (◆), black (▲), small-black soybean (●).

표의 하나인 갈변도의 변화도 pH의 경우와 비슷한 양상을 보였다. 백태 청국장의 경우 발효 1일 뒤, 갈변도가 큰 증가를 보였지만 서리태의 경우 2일 뒤에 큰 증가를 보였다. 흑태나 약콩 청국장의 경우에도 갈변도의 증가가 있었지만 백태나 서리태에 비하면 증가 속도가 낮았다. 이러한 pH 변화, 갈변물질 생성 속도, 청국장의 발효정도를 보아 백태와 서리태에서 발효균주의 활성은 활발한 것으로 보인다. 반면에 흑태와 약콩의 청국장 발효 경우에는, 갈변도의 증가 속도가 낮은 것으로 보아, 청국장 발효균주의 활성이 다소 억제되고 있는 것으로 보인다. 흑태와 약콩의 항균물질이 청국장 발효 균주 생장에 어느 정도 영향을 미친 것으로 보인다. 청국장의 맛도 서리태 청국장이 가장 우수하였는데, 이는 서리태 청국장에서의 높은 갈변물질 생성과도 연관이 있을 것으로 사료된다. 추후 *B. licheniformis* B1으로 청국장을 제조할 때, 검은콩의 경우, 흑태나 약콩보다는 서리태를 이용하는 것이 바람직할 것이다.

검은콩에는 delphinidin, cyanidin 등의 anthocyanin이 풍부하게 존재하며 이소플라본과 같이 있으면 항산화력이 크게 증가하는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009). 본 연구를 통해 *B. licheniformis*로 발효시킨 검은콩 청국장에도 daidzein이 다량 존재하는 것이 밝혀졌다. 다른 연구에서도 백태 청국장 보다는 검은콩 청국장에서 daidzein 함량이 더 높음을 보고하였다(Sohn *et al.*, 2000). Daidzein 함량은 흑태, 서리태, 약콩, 백태 청국장 순으로 높았다(Table 3). 그동안 *B. licheniformis* B1으로 백태만을 이용하여 청국장을 제조하였으나(Lee *et al.*, 1999), 본 연구를 통해 서리태, 흑태, 약콩 등 검정콩에 대해서도 *B. licheniformis* B1균주로 청국장 발효가 이루어질 수 있음을 확인하였고, 특히 서리태 청국장이 품질이 우수하였다. 검은콩



**Fig. 4.** Daidzein analysis by HPLC. *B. licheniformis* B1 was inoculated onto yellow, black, Seoritae, and small-black soybean, and each Chungkookjang was prepared. Each daidzein-content was analyzed by HPLC.

청국장에서, daidzein 이외에, 새로운 펩타이드의 분리와 생리활성을 규명하는 연구가 앞으로 필요할 것이다.

적요

청국장은 대두 발효식품으로 미생물, 효소, daidzein, 펩타이드 등이 풍부하다. 백태, 흑태, 서리태, 약콩 등 4종류의 대두와 *Bacillus licheniformis* B1 균주를 이용해서 청국장을 제조하면서 각각의 발효양상을 비교하였다. pH, 갈변물질의 변화를 청국장 발효의 지표로 이용하였다. 발효시간에 따른 청국장의 pH 변화에서는, 초기에는 백태 청국장의 pH가 가장 높았으나 시간이 지나며 증가속도가 낮아졌다. 흑태, 서리태, 약콩의 경우는 발효 개시 초기에는 pH 변화가 적었으나 시간이 지나면서 pH가 급격히 상승하는 등, 백태와는 다른 양상을 보였다. 발효 1일 후 갈변도는 백태 청국장이 가장 높았으며, 나머지 검은콩의 경우 그보다 낮은 값을 보여 주었다. 서리태의 경우 발효 1일 후부터 갈변도가 급격히 증가하였다. 검은콩에 존재하는 anthocyanin에 의해 청국장 발효균주의 생장이 억제되어 초반에는 발효 정도가 백태에 비해 약한 것으로 보인다. 항염효과를 지니는 daidzein 함량을 HPLC로 분석한 결과, 흑태, 서리태, 약콩 청국장은 백태 청국장보다 높은 값을 보였다. 서리태, 흑태, 약콩 등 검정콩에 대해서도 *B. licheniformis* B1 균주로 청국장 발효가 이루어질 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

Atkinson, C., Frankenfeld, C.L., and Lampe, J.W. 2005. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp. Biol. Med.* **230**, 155–170.

Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., and Moilanen, E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-κB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-κB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2007/45673

Hong, T., Nakagawa, T., Pan, W., Kim, M.Y., Lee Kraus, W., Ikehara, T., Yasui, K., Aihara, H., Takebe, M., Muramatsu, M.,

and et al. 2004. Isoflavons stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 259–264.

Hwang, J.S., Yoo, H.J., Song, H.J., Kim, K.K., Chun, Y.J., Matsui, T., and Kim, H.B. 2011. Inflammation-related signaling pathways implicating TGFβ are revealed in the expression profiling of MCF7 cell treated with fermented soybean, Chungkookjang. *Nutr. Cancer* **63**, 645–652.

Kao, T.H., Wu, W.M., Hung, C.F., Wu, W.B., and Chen, B.H. 2007. Anti-inflammatory effects of isoflavone powder produced from soybean cake. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 11068–11079.

Kim, H.B., Lee, H.S., Kim, S.J., Yoo, H.J., Hwang, J.S., Chen, G., and Youn, H.J. 2007. Ethanol extract of fermented soybean, Chungkookjang inhibits the apoptosis of mouse spleen and thymus cells. *J. Microbiol.* **45**, 256–261.

Kim, S., Kwon, T., Lee, Y., Choung, M., and Moon, G. 2005. A major antioxidative compounds and comparison of antioxidative activities in black soybean. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 73–77.

Lee, H., Choi, E., Sim, Y., Kim, O., Yoo, H., Do, W., and Kim, Y. 2009. Anthocyanin-contents and pigment stability of black soybean by different extract condition and stabilizer. *Kor. J. Food Nutr.* **22**, 150–157.

Lee, J.J., Lee, D.S., and Kim, H.B. 1999. Fermentation patterns of Chungkookjang and Kanjang by *Bacillus licheniformis* B1. *Kor. J. Microbiol.* **35**, 296–301.

Lee, H.H., Park, C., Kim, M.J., Seo, M.J., Choi, S., Jeong, Y.K., and Choi, Y.H. 2010. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity and prostalandin E<sub>2</sub> production through down-regulation of NF-κB activity by the extracts of fermented beans. *J. Life Sci.* **3**, 388–395.

Matsui, T., Yoo, H.J., Hwang, J.S., Lee, D.S., and Kim, H.B. 2004. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitor peptide from Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 355–358.

Shon, M., Seo, K., Lee, S., Choi, S., and Sung, N. 2000. Biological activity of Chungkugiang prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 936–941.

Yoo, H.J., Hwang, J.S., and Kim, H.B. 2007. Mass analysis of isoflavones in Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* **43**, 54–58.