

Bacillus subtilis BC-P1 균주를 이용하여 제조한 청국장의 발효 및 품질 특성분석

박성용^{1†} · 방미애^{2†} · 오병준³ · 박정훈³ · 송원섭⁴ · 최경민⁵ · 정의수⁶ · 부희옥⁷ · 조승식^{1*}

¹목포대학교 약학과, ²전남식품산업연구센터, ³전남생물방제센터,
⁴순천대학교 원예학과, ⁵진안홍삼연구소, ⁶단정바이오, ⁷㈜파이토 M&F

Fermentation and Quality Characteristics of *Cheonggukjang* Fermented with *Bacillus subtilis* BC-P1

Sung-Yong Park^{1†}, Mi-Ae Bang^{2†}, Boung-Jun Oh³, Jeong-Hoon Park³, Won-Seob Song⁴,
Kyung-Min Choi⁵, Eui-Su Choung⁶, Hee-Ock Boo⁷, and Seung-Sik Cho^{1*}

¹Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Mokpo National University, Muan 534-729, Republic of Korea

²Jeonnam Biofood Technology Center, Naju 520-330, Republic of Korea

³Jeonnam Bio Control Center, Gokseong-gun 516-942, Republic of Korea

⁴Department of Horticulture, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Republic of Korea

⁵Institute of Jin An Red Ginseng, Jinahn 529-821, Republic of Korea

⁶Danjoung Co. Ltd, Wonju 220-122, Republic of Korea

⁷PHYTO M&F Co. Ltd, Gwangju 501-759, Republic of Korea

(Received July 5, 2013 / Accepted September 4, 2013)

The object of this study was to improve the quality of Cheonggukjang with new starter, *Bacillus subtilis* BC-P1. Twenty strains were isolated from the commercial cheonggukjang and 1 *Bacillus* strain (BC-P1) with protease activity was selected. The 16S rRNA gene sequence revealed that the BC-P1 was closely related to *B. subtilis* with 99% homology. The quality characteristics of chunggukjang fermented with *B. subtilis* BC-P1, *Bacillus nato* (PC) and commercial chunggukjang (NC) were investigated. The characteristics of fermentation were determined by protease, lipase, xylanase, chitinase, and fibrinolytic activities, reducing sugar, nutrient composition and amino acid contents of cheonggukjang sample. Cheonggukjang fermented with *B. subtilis* BC-P1 showed the strongest fibrinolytic, xylanase, and chitinase activities. Reducing sugar contents of Cheonggukjang samples were 30.16±2.11 mg/g (NC), 28.56±1.52 mg/g (PC), 32.39±1.87 mg/g (BC-P1). And their total amino acid contents were 338.99 mg% (NC), 445.19 mg% (PC), 741.35 mg% (BC-P1). These results suggested that *B. subtilis* BC-P1 was suitable to be used as a starter to enhance the quality and effects of cheonggukjang.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Cheonggukjang*, fermentation

청국장은 고초균인 *Bacillus subtilis*를 삶은 콩에 접종하여 발효 숙성시킨 한국 전통 식품으로 단백질, 필수 아미노산, 지방산, 비타민 등이 풍부한 고영양 식품이다. 청국장의 기능성은 널리 연구되어 왔는데 청국장의 효능으로써 콜레스테롤 저하, 항산화, 고혈압 저하, 항균, 항암 효과 등이 보고되어 있다(Yoo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007, 2008; Back *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2011). 청국장은 지방마다 제조방법이나 이용 미생물이 동일하지 않아 균일한 품질을 가지는 제품의 수는 적다. 특히, 청국장 발효 시 이용되는 균주의 종류에 따라 품질이 달라지기 때문에

고품질의 청국장 생산을 위해서는 고기능의 미생물을 선별하여 사용하는 것이 무엇보다 중요하다. 청국장에 starter로써 이용되는 *Bacillus* 속 미생물은 포자 형성균으로 토양이나 물 등에서 자라며 대부분이 유기물을 분해하는 특성을 가지고 그 유용성과 안전성이 널리 인정되어 있다. *Bacillus* 속 미생물은 다양한 소화효소를 분비하거나 생리활성을 가지는 펩타이드를 생산할 수 있는데, 대표적인 소화효소에는 protease와 xylanase가 있으며, 펩타이드류에는 bacteriocin이나 bacteriocin like substances (BLS)가 있다(Wu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Giri *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012; Wise *et al.*, 2012; Irfan *et al.*, 2013). 소화효소로써 protease는 카제인 분해능, 혈전용해능, 젤라틴 분해능의 특성을 지니며, 특히 혈전 용해 효소는 fibrin으로 구성되는 혈전

[†]These authors contributed equally to this work

*For correspondence. E-mail: ssocho@mokpo.ac.kr; Tel.: +82-61-450-2687; Fax: +82-62-450-2689

을 용해할 수 있어, 혈전 용해효소를 분비하는 *Bacillus* 속 미생물을 이용한 청국장은 심혈관계 질환을 예방할 수 있는 기능성 식품으로써 적합하다고 할 수 있다(Kim *et al.*, 2006). 또한 xylanase는 소화 효소 중 하나로써 이용되는데, 이는 protease, cellulase, beta-glucosidase 등과 함께 분해되지 않는 음식물에 의한 내장안의 독소 발생을 억제하는 기능을 한다(Gollnisch *et al.*, 1999; Hirsch *et al.*, 2006). 따라서 다양한 소화 효소를 분비하는 미생물을 청국장 발효에 사용할 경우 청국장내 영양물질을 아미노산, 당으로 분해하여 흡수하기 좋은 영양원을 제공하고 혈전 분해능에 의한 혈행개선 등의 효과를 기대할 수 있다.

본 연구에서는 청국장의 생리활성 증진을 위해 시판하는 청국장에서 수종의 *Bacillus* 속 미생물을 분리하였으며 이중 한 균주를 동정하여 그 신규성 여부를 확인하였고, 이 균주를 청국장 제조용 starter로 사용 가능성을 검토하기 위하여 청국장 발효 후 일어나는 각종 효소활성 변화 및 아미노산 변화를 시판 청국장과 *Bacillus natto*를 이용하여 만든 청국장을 대조군으로 하여 비교하였다.

재료 및 방법

바실러스의 분리 및 단백질분해효소 생산 균주 선별

청국장 약 1 g을 멸균 증류수 10 ml에 현탁시키고, 10⁻¹⁰의 희석배수로 단계 희석하였다. 희석한 시료는 NB (nutrient broth) 평판 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 육안으로 집락의 형태, 색 등의 형태적 특징에 따라 수종의 *Bacillus*를 선별하여 동일 배지에 3회 반복 도말하여 균체를 순수 분리하였다. 분리된 *Bacillus* 중 1차로 단백질분해 활성이 뛰어난 균주를 선별하기 위해 casein 0.5%가 포함된 NB 배지에 반복 도말하여 투명대를 형성하는 *Bacillus*를 후보 균주로 선택하였다.

16S rRNA gene 염기서열 분석

BC-P1 균주의 16S rRNA gene 염기서열분석을 위하여 27F (forward primer: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (reverse primer: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 2개의 primer를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 결정된 16S rRNA 유전자는 GenBank 데이터베이스와 비교 검색하였으며 계통수 작성은 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) 방법을 이용하였으며 진화거리의 Jukes와 Cantor (Jukes, 1969)의 식을 이용하였다. 계통수의 신뢰도는 1,000회 반복을 통한 bootstrap 분석(Felsenstein, 1985)을 실시하여 확인하였다.

재료 및 사용 균주

원료 대두는 2012년 나주시장에서 구입한 국산 콩을 사용하였으며, 청국장 제조에 사용한 균은 전통 발효 균주인 *Bacillus natto*와 시판 청국장에서 분리한 균주인 *Bacillus subtilis* BC-P1을 사용하였다.

청국장 제조

선별한 대두 100 g을 수세한 후 20°C의 물 1 L에 24시간 침지 후 수분을 제거하였다. 이후 121°C에서 40분간 증자 후 50°C로 냉각시켰다. Starter용 균주는 멸균 증류수로 약 10⁸ CFU/ml로 현탁시켜 증자된 콩에 2% (v/w) 수준으로 접종 후 고르게 혼합한 다음 40°C, 상대습도 90%의 조건에서 72시간 발효시켰다. 발효한 청국장은 동결건조 후 분쇄하여 소화효소 활성, 아미노산 분석을 수행하였다. 시판청국장은 전라남도 나주시 영산포 시장에서 재래식 청국장을 구입하여 대조 시료로 사용하였다.

단백분해효소 활성

각 시료는 25 mg/ml의 농도로 멸균 증류수로 현탁하여 원심 분리하여 그 상층액을 효소 시료로 사용하였다. 시료 0.05 ml을 2% azocasein (0.2 M Tris-HCl, pH 7.5) 0.05 ml과 함께 혼합한 뒤 40°C water bath에서 20분간 반응시킨 후 꺼내어 10% TCA (trichloroacetic acid) 0.05 ml과 혼합하여 10분간 ice에서 넣어 유지시켰다. 이후 6,000×g에서 20분간 원심분리시킨 후 상층액 0.15 ml만을 따로 취하여 6배 희석시킨 2 N Folin phenol reagent 0.3 ml과 7.5% Na₂CO₃ 0.45 ml을 차례로 첨가한 후 30°C water bath에서 2차 반응시켜 발색한 sample을 660 nm에서 흡광도를 측정하여 값을 구하였다. 단백질 분해 효소능 1 unit의 정의는 위의 실험 조건에서 1분간 효소 반응시 1 μmol의 tyrosine을 생성할 수 있는 능력으로 하였다(Seong *et al.*, 2004).

혈전용해능 측정

혈전용해능은 fibrin plate법(Simkhada *et al.*, 2012a)을 약간 수정하여 측정하였다. 0.01 M phosphate buffered saline (pH 7.25)에 fibrinogen을 0.5%가 되도록 용해시킨 후 10 ml를 petridish에 분주하고 thrombin 10 unit를 가하여 균일한 두께의 fibrin clot를 형성시킨 후 실온에서 1시간 방치하여 fibrin plate를 제조하였다. 혈전용해 효소활성은 fibrin plate에 직경 8 mm의 punch를 만들고 시료를 40 μl (40 μg 해당량) 가하여 37°C에서 12시간 동안 반응시킨 후, 생성된 투명환 부위의 직경을 측정하여 면적을 계산하였으며, 이때 대조구는 plasmin (Sigma, USA)을 3.75, 7.5, 11.25 U/40 μl이 되도록 조제하여 사용하였다.

Xylanase 활성 측정

Xylanase 활성은 beechwood xylan을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 각 시료는 25 mg/ml의 농도로 멸균 증류수로 현탁 및 원심 분리하여 그 상층액을 효소 시료로 사용하였다. 증류수에 현탁시킨 0.5% (w/v) beechwood xylan 용액 0.1 ml과 효소 용액 0.1 ml을 혼합하여 60°C에서 10분 동안 반응시켰다. DNS 시약 0.3 ml을 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시료로 xylose를 사용하였으며 샘플의 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 xylan으로부터

1 μmol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다(Simkhada et al., 2012b).

Chitinase 활성 측정

청국장 동결 건조물을 25 mg/ml의 농도로 멸균 증류수로 현탁 후 원심 분리한 상층액 0.1 ml와 기질용액 0.1 ml (1% colloidal chitin)을 50°C에서 30분간 반응시켰다. 효소반응액에 0.1 ml DNS (dinitrosalicylic acid)를 첨가하고 100°C에서 10분간 처리 후 원심분리한 상층액을 545 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도 1 unit는 위의 조건하에서 30분 동안 1 μmol의 N-acetylglucosamine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다(Saadoun et al., 2009).

환원당 분석

환원당은 DNS법에 의해 측정하였다. 청국장 동결 건조물을 25 mg/ml의 농도로 멸균 증류수로 현탁 후 원심 분리한 상층액 1 ml를 test tube에 넣고 DNS reagent 1 ml를 혼합한 후 100°C에서 10분간 처리하였다. 가온 처리 후 시료는 상온에서 충분히 냉각한 후 증류수 3 ml를 넣어 희석하여 Spectrometer (UV-2101PCS, Shimadzu Corporation, Japan)를 이용하여 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 당 정량은 glucose를 표준물질로 사용하여 상기 방법으로 작성한 표준곡선으로부터 환산하였다.

영양성분분석

일반성분은 AOAC와 식품공전(Korean Food Standards Codex, 2013)의 방법에 따라 분석하였다. 수분 함량은 식품공전에 기재된 건조감량법, 회분은 회화법, 조단백질은 마이크로 켈달법, 조지방은 에틸 에테르를 추출용매로 이용하여 분석하였으며, 탄수화물은 전체에서 수분, 조단백질, 조지방, 회분, 식이섬유 함량을 제한 값으로 계산하여 표시하였다. 식이섬유(dietary fiber) 함량은 AOAC법에 준하여 효소중량법(enzymatic-gravimetric method)으로 측정하였다. 건조시료 0.5 g을 phosphate buffer 50 ml에 현탁시킨 후, Termamyl (Novozyme Nordisk, Denmark) solution 0.1 ml를 첨가하여 95°C의 수욕상에서 5분 간격으로 혼

들어 주면서 30분간 항온을 유지하여 반응시켰다. 0.1 ml protease (50 mg/ml, Sigma) 용액을 가하여 60°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 냉각하여, amyloglucosidase (Sigma) 0.3 ml를 가하고 60°C에서 30분간 반응시켜 전분 및 단백질의 효소적 가수분해과정을 거쳐 감압 여과하여 여액과 잔사를 분리한 후, 잔사는 증류수, 95% ethanol 및 acetone 순으로 세척하여 건조 후 함량을 구하고, 각각 조회분과 조단백질을 측정한 후 감하여 식이섬유 함량을 분석 하였다(AOAC, 2013; Korean Food Standards Codex, 2013).

아미노산 분석

아미노산의 분석은 동결 건조시킨 시료 1 g을 취하여, 6 N HCl을 5 ml 가한 다음 질소 치환하여 밀봉한 후 110°C dry oven에서 24시간 가수분해한 분해액을 적정 희석하여, 여과 후 아미노산 자동 분석기(Biochrom 30 amino analyzer, UK)로 분석하였다.

결과 및 고찰

바실러스의 분리 및 단백질 분해효소 생산 균주 선별

청국장에서 수집한 시료를 멸균 증류수에 현탁시켜 단계 희석법을 이용하여 균주를 NB 배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 육안으로 집락의 형태, 색 등의 형태적 특징에 따라 약 20종의 *Bacillus* 균주를 선별하였다. 순수 분리된 *Bacillus* 균주 중 단백질 분해능이 우수한 균주를 선별하여 BC-P1이라고 명명하였다. 소화효소를 생산하는 *Bacillus* 속 균주는 메주, 김치, 토양 등 다양한 소재에서의 분리가 보고되어 있다(Aunpad and Na-Bangchang, 2007; Zhang et al., 2008; Benitez et al., 2011; Giri et al., 2011; Guo et al., 2012; Liang et al., 2012).

16S rRNA gene 염기서열 분석

분리균주 BC-P1의 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene 염

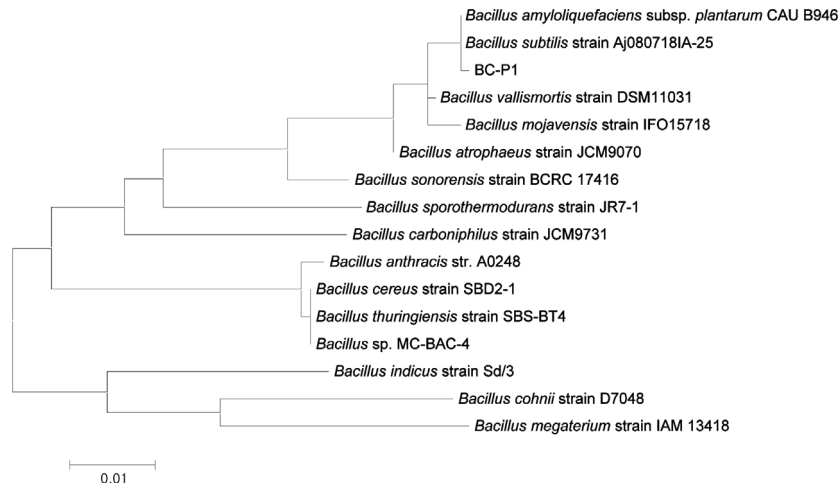


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA nucleotide sequences showing the position of strain BC-P1.

Table 1. Enzyme activities of chunggukjang

Enzyme		Specific activity (U/mg)
Protease	NC	2.65±0.05
	PC	4.71±0.04
	BC-P1	4.66±0.06
Xylanase	NC	0
	PC	75.49±2.12
	BC-P1	199.95±1.14
Chitinase	NC	0
	PC	0
	BC-P1	2165±19.68

^a Commercial Cheonggukjang

^b Cheonggukjang fermented with *B. natto*

^c Cheonggukjang fermented with *B. subtilis* BC-P1

기서열을 분석한 결과 *B. subtilis*와 99% 상동성이 있었으며, 계통학적으로 *B. subtilis*와 유사한 균주로 확인되었다(Fig. 1).

단백분해 효소능 분석

동식물의 조직이나 세포, 미생물에 널리 존재하는 protease는 단백질 혹은 펩티드에 작용하여 펩티드 결합의 가수분해를 촉매할 뿐만 아니라 ester나 amide와 결합반응을 하며 효소에 따라 전이반응을 하거나 효소 교환반응을 하는 등 다양한 화학반응을 하는 효소이다(Ferreira *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2010). Protease는 조미료 제조, 식품의 연화, 맥주, 청주의 혼탁방지, 치즈 숙성 등의 식품공업과 소화제, 소염진통제 등 제약공업, 피혁가공, 세제산업 등 여러 분야에 걸쳐 광범위하게 이용되고 있다. 미생물에서 유래되는 protease는 주로 곰팡이, 세균 등에서 많이 생산되고 있으며 세균 중에서도 *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.,

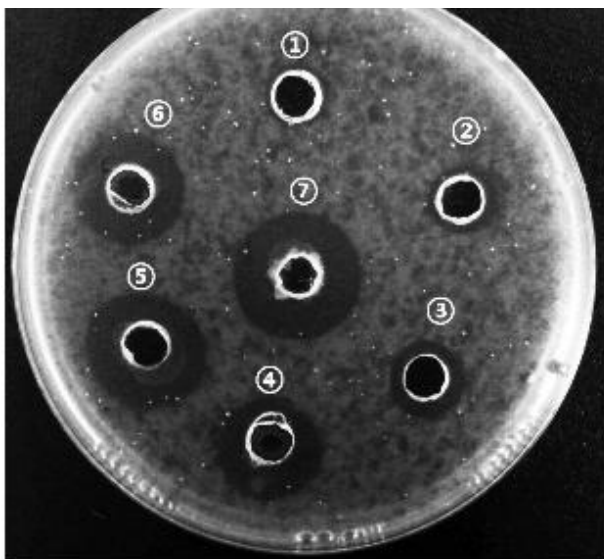


Fig. 2. Fibrinolytic activity of chunggukjang sample. 1, buffer; 2, plasmin 3.75 U; 3, plasmin 7.5 U; 4, plasmin 11.25 U; 5, Commercial Cheonggukjang 40 µg; 6, Cheonggukjang fermented with *B. natto* 40 µg; 7, Cheonggukjang fermented with *B. subtilis* BC-P1 40 µg.

Streptomyces sp. 등이 있다(Lindberg *et al.*, 1981; Charles *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2012; Graminho *et al.*, 2013). 청국장의 *Bacillus* 속 세균 역시 다양한 protease를 분비하며, 지방분해효소와 함께 섭취시 음식물의 소화능을 도와주는 기능을 한다. 따라서 본 시험에서는 청국장 제품들에 포함된 protease 활성을 확인하여 비교하였다. 청국장 동결건조물의 단백질 분해효소능은 Table 1과 같다. 시료들의 단백질 분해 효소능을 측정된 결과 *B. natto*로 제조한 청국장(PC)의 비활성은 4.71 unit/mg protein이었으며, *B. subtilis* BC-P1으로 제조한 청국장은 4.66 unit/mg protein로 *B. natto*로 제조한 청국장 시료에 비해 조금 낮았다.

혈전 분해 효소능 분석

3종의 청국장 동결건조물 시료의 혈전 용해능을 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. 시판품, *B. natto*를 첨가한 청국장 시료, *B. subtilis* BC-P1을 첨가한 시료 모두 혈전분해능을 가지고 있었으며, 혈전 분해능은 fibrin plate에서의 혈전 분해환의 직경으로 비교 하였다. 투명대의 크기는 대조군인 plsmn (3.75 U) 처리시 1 cm의 직경을 나타내었으며 청국장 샘플 40 µg씩 처리시 *B. natto*를 첨가한 청국장 시료는 1.6 cm, *B. subtilis* BC-P1을 첨가한 제품은 2.0 cm의 투명대를 나타내어 본 연구진이 선별한 *B. subtilis* BC-P1을 첨가한 시료가 *B. natto*를 첨가한 청국장 시료와 비교시 혈전 분해능이 우수함을 확인하였다. 본 균주를 청국장 제조시 starter로 활용한다면 우수한 소화능 및 혈전 용해능을 가진 제품으로 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

Xylanase 활성 분석

Xylanase는 oat spelt, birchwood, beechwood와 밀가루 등에 존재하는 다양한 xylans의 β-D-1,4-xylopyranosyl 결합을 무작위로 가수분해하는 효소로서 β-xylosidase와 함께 xylan의 가수분해에 중요한 역할을 하며, 제지의 표백공정, 사료효율 개선, 과일음료의 청징, 제빵, xylo 올리고당 생산뿐 아니라 바이오매스 자원의 당화 등에 활용되는 산업용 효소이다(Engberg *et al.*, 2004; Hirsch *et al.*, 2006; Shrinivas *et al.*, 2010; Irfan *et al.*, 2013). 미생물 유래 xylanase의 경우 사료첨가용 효소로 이용이 되는데 곡물 섭취시 hemicellulose로 인한 가축의 장내 점질도를 저하시켜 소화기 질병을 예방하는 기능을 한다(Polizeli *et al.*, 2005; Francesch *et al.*, 2012). 건강기능식품으로 소화 효소제제에도 xylanase가 들어있는데, 이는 protease, amylase, lipase, cellulase 등과 함께 분해되지 않은 음식물에 의해 내장안의 독소 발생을 억제하는 기능을 한다. Xylanase는 바실러스 속 균주에서도 생성되며, 청국장에 존재하는 *Bacillus*는 protease, β-glucosidase, xylanase를 생산하며, 이들은 청국장내 영양물질을 아미노산, 당으로 분해하여 갈변물질을 생성한다. 본 실험에서는 청국장 시료에 포함된 소화 효소의 종류를 확인하기 위해, xylan 분해효소 활성을 측정하였다. 청국장 동결건조 시료의 xylanase 활성 시험 결과는 Table 1과 같다. *B. subtilis* BC-P1를 starter로 청국장을 제조한 시료의 비활성이 199.65 unit/mg protein으로 가장 높았으며, *B. natto*를 첨가한 청국장 시료는 75.49 unit/mg protein으로 약 3배 활성이 낮았다.

Table 2. Reducing sugar contents of Cheonggukjang

Samples	Reducing sugar (mg/g)
NC	30.16±2.11
PC	28.56±1.52
BC-P1	32.39±1.87

^a Commercial Cheonggukjang^b Cheonggukjang fermented with *B. natto*^c Cheonggukjang fermented with *B. subtilis* BC-P1

Chitinase 활성 분석

Chitin은 새우, 게 등의 갑각류의 껍질에 함유되어 있는 낮은 용해도의 물질이다. Chitin을 탈 아세틸화 하면 chitosan이 되는데, 이 물질은 항균, 제산작용, 콜레스테롤 저하, 종양억제작용 등의 효과를 가진다(Nishimura et al., 1984; Zacour et al., 1992; Cuero, 1999; Salah et al., 2013). Chitinase는 사람 뿐만 아니라 동물의 소화관에서도 존재하지 않아 chitinase의 공급이 장내 소화작용을 돕기 위한 효소원으로 생각되고 있으며, 축산분야에서는 장내 유용미생물과 chitinase를 병용 투여하여 키토산의 항균능을 이용한 항생제 대체효과와 소화능 향상을 통한 사료효율 증가를 동시에 높이는 연구도 일부 수행되고 있다. 현재 chitinase는 인체 경구용으로는 사용하고 있지 않다. 본 실험에서는 chitinase 활성은 chitin agar 배지에서 투명환이 각각 관찰됨으로 활성을 확인하였다(자료 미제시). 또한 청국장 샘플의 chitinase 활성을 측정된 결과, Table 1과 같이 Chitinase 활성은 *B. subtilis* BC-P1를 starter로 청국장을 제조한 시료에서 2165 unit/mg protein로 chitinase 활성이 확인되었으며, *B. natto*를 첨가한 청국장 시료

Table 3. Proximate composition of Cheonggukjang.

	Samples	Composition (%)
Moisture	NC ^a	3.3028±0.4184
	PC ^b	3.1739±0.2518
	BC-P1 ^c	3.3570±0.9517
Crude protein	NC	37.1207±0.5974
	PC	44.4914±0.7071
	BC-P1	37.2719±0.6674
Crude fat	NC	16.9844±0.0079
	PC	19.9801±0.0141
	BC-P1	19.4614±0.0241
Crude ash	NC	5.1756±0.1724
	PC	5.3938±0.2054
	BC-P1	5.9902±0.1957
Carbohydrate	NC	37.4165±0.4197
	PC	26.9608±0.1574
	BC-P1	33.9195±0.7418
Dietary fiber	NC	53.22±0.21
	PC	54.22±0.48
	BC-P1	52.32±0.15

^a Commercial Cheonggukjang^b Cheonggukjang fermented with *B. natto*^c Cheonggukjang fermented with *B. subtilis* BC-P1

는 활성을 보이지 않았다. Chitinase을 생산하는 청국장 유래 바실러스 속 균주에 대한 보고는 없었다. *B. subtilis* BC-P1를 starter로 제조한 청국장은 단백분해능, xylanase, chitinase 활성을 가지고 있어, 장내 소화작용을 돕는데 유용할 것으로 생각되며, *B. subtilis* BC-P1 균주를 활용한 가축건강 증진 생균 제제 또는 생물 방제용 소재 개발도 가능할 것으로 생각된다.

환원당 분석

3종의 청국장 시료의 환원당 함량 측정 결과는 Table 2와 같았다. 환원당의 함량은 32.39 mg/g으로 *B. subtilis* BC-P1를 starter로 청국장을 제조한 시료가 가장 높았으며, *B. natto*를 첨가한 청국장 시료는 시판 청국장에 비해 낮은 함량 수치(28.56 mg/g)를 보였다. *B. subtilis*는 α 또는 β -amylase를 생성하여 청국장 발효 중 대두중의 전분을 당으로 전환 시키며, 생성된 당은 청국장의 단맛에 중요한 인자로 작용한다(Ryu, 2002). 따라서 청국장 발효 중 *B. subtilis* BC-P1가 분비하는 효소에 의해 생성된 당이 환원당 함량에 많은 영향을 끼쳤음을 알 수 있었다.

영양성분 분석

본 연구에서 분석된 청국장 시료들의 영양성분에 대한 분석 결과는 Table 3과 같다. 청국장동결건조 시료 모두 식이섬유의 함량이 가장 높았으며(52.32–54.22%), 조단백질, 탄수화물, 조지방 순으로 높은 함량을 보이는 것을 볼 수 있었다. 수분 함량은 3.1739–3.3570% 사이의 값들로 근소한 차이를 보였고, 조단백의 경우에는 *B. natto*를 이용한 청국장 조단백의 함량이 44.4914%로 가장 높은 조단백 함량을 나타내었고, 나머지 2종의 청국장 동결건조 시료의 경우에는 37.2729–38.7526% 사이의 함량을 나타내었다. 그리고 조지방 함량은 시판 청국장 동결건조 시료가 16.98%로 낮았으며, *B. natto* 및 *B. subtilis* BC-P1 유래 청국장 샘플은 유사한 조지방 함량을 보였다. 회분의 경우에는 모든 샘플들이 5.1759–5.9902%로 근소한 함량차이를 나타내었다. 식품공전의 청국장 규격기준 중 건조제품의 경우 수분 함량이 10.0% 이하로 규정되어 있고, 본 청국장 시료들은 모두 규격기준에 적합한 것으로 나타났다. Lee 등(2007)은 시판청국장 분말제품의 일반성분을 분석한 결과, 수분 함량은 6.07–8.54%, 조단백질은 15.31–27.07%, 조지방은 20.19–24.75%, 회분은 3.69–5.26%였으며, 시료 간 차이를 보이는 것은 청국장 제조에 사용된 원료 콩의 차이에서 기인된 것으로 추정한다고 보고 하였다.

아미노산 분석

최근 식이성 아미노산에 대한 영양적 가치에 대한 연구보고에 의하면, 식품 내 아미노산은 맛의 증진 뿐만 아니라 빠른 흡수 및 근육 단백질의 강화, 그리고 항산화 활성 등에 효과가 있다고 보고되었다(Kawashima et al., 1979; Borsheim et al., 2002; Ryu, 2002; Babizhayev, 2010). 따라서 본 연구에서는 청국장 동결건조물의 아미노산을 분석하였고, 그 결과는 Table 4와 같았으며, 총 26종의 아미노산이 검출되었다. 시판 청국장 샘플의 아미노산 조성은 arginine, glutamic acid, γ -amino-n-butyric acid, valine, tryptophan 등의 순으로 함량이

Table 4. Amino acid contents of Cheonggukjang. (mg/%, dry basis)

Amino acid	Sample		
	NC ^a	PC ^b	BC-P1 ^c
Aspartic acid	10.34	0.00	5.69
Threonine	3.93	3.48	12.20
Serine	3.47	2.79	11.71
Asparagine	19.91	0.00	7.42
Glutamic acid	34.40	37.42	95.82
α-Amino adipic acid	0.00	6.78	8.74
Glycine	10.57	9.51	16.61
Alanine	20.32	13.29	39.42
Citrulline	0.00	5.56	10.81
α-Amino-n-butyric acid	2.72	0.00	6.24
Valine	28.85	23.57	72.66
Methionine	5.80	13.52	20.62
Isoleucine	7.31	23.72	38.90
Leucine	12.89	41.59	72.44
Tyrosine	14.88	64.43	74.49
Phenylalanine	18.65	83.19	104.60
β-Alanine	2.68	0.00	0.00
β-Amino isobutyric acid	0.00	10.49	15.26
γ-Amino-n-butyric acid	28.87	0.75	2.09
Tryptophan	22.00	0.00	0.00
Hydroxylysine	0.00	0.00	4.39
Ornithine	0.00	15.47	18.75
Lysine	11.36	48.36	56.98
Histidine	8.53	26.77	37.30
Arginine	71.52	0.00	8.20
Proline	0.00	14.52	0.00
Total A.A. ^d	338.99	445.19	741.35

^a Commercial Cheonggukjang

^b Cheonggukjang fermented with *B. natto*

^c Cheonggukjang fermented with *B. subtilis* BC-P1

^d Amino acid

높았으며, *B. natto*를 starter로 사용한 청국장 샘플은 phenylalanine, tyrosine, lysine, leucine 등의 순으로 함량이 우수하였다. *B. subtilis* BC-P1 유래 청국장 샘플은 phenylalanine, glutamic acid, tyrosine, valine 순이었다. Son 등(2000)은 phenylalanine, lysine, tyrosine 등이 많이 함유된 것으로 보고하였으며 Suh 등(1982)은 *B. subtilis*를 이용하여 청국장 발효시 glutamic acid, leucine, alanine의 함량이 많은 것으로 보고하였다. 또한 Sung 등(1984)은 *B. natto*를 이용하여 청국장 발효시, phenylalanine, leucine, arginine의 함량이 많은 것으로 보고하였다. 청국장 동결건조 샘플의 총 아미노산 함량은 *B. subtilis* BC-P1를 starter로 사용한 청국장 샘플이 741.35 mg%로 시판 청국장 샘플 및 *B. natto*를 starter로 사용한 청국장 샘플에 비해 월등히 높은 총 아미노산 함량을 보였다. 청국장은 발효숙성 중에 *B. subtilis*의 작용으로 콩의 단백질을 분해시켜 구수한 맛을 내는 glutamic

acid, aspartic acid, 쓴맛을 지닌 valine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine 및 단맛을 내는 alanine, glycine, lysine 등의 유리 아미노산들이 어울려져 청국장 특유의 향미를 갖게 해준다. *B. subtilis* BC-P1를 starter로 사용한 청국장 샘플의 경우에는 구수한 맛을 내는 glutamic acid와 단맛을 내는 lysine, 쓴맛을 내는 leucine과 valine의 함량이 시판 청국장 샘플 및 *B. natto*를 starter로 사용한 청국장 샘플에 비하여 현저하게 높음을 알 수 있었다. 이상의 결과로 청국장에 첨가되는 균주의 영향으로 최종발효 제품 속의 구수한 맛과 쓴맛 그리고 단맛을 내는 아미노산의 종류 및 함량이 변화됨을 알 수 있었으며, 이를 이용하여 청국장의 맛을 조정 할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구진은 청국장에서 수종의 미생물을 분리하였으며, 이중 소화 효소능이 뛰어난 균주를 선별하였으며, 유전학적 분석 결과를 통해 본 균주가 *Bacillus* 속 균주임을 확인하고 *Bacillus subtilis* BC-P1이라 명명하였다. *Bacillus subtilis* BC-P1을 starter로 사용하여 청국장을 제조하였으며, protease, xylanase, chitinase activity, 혈전 분해능, 영양성분 분석 및 아미노산 분석을 통하여 *B. subtilis* BC-P1를 starter로 활용한 청국장 제품의 개선 가능성을 타진하였다. *Bacillus subtilis* BC-P1를 starter로 제조한 청국장은 기존 제품에 비해 우수한 소화효소 생성능을 보였으며, 특히 혈전분해효소 생성능이 우수함을 확인하였고, 대조군에 비해 증가된 환원당 및 총 아미노산 함량을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 균주를 starter로 하여 청국장을 제조할 경우 기능성분, 생리활성의 증가, 품질 향상을 기대할 수 있을 것으로 판단되며, 향후 대규모 생산시 균주, 제조 조건에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 2012년도 (재)전라남도생물산업진흥재단 생물방제센터의 연구비 지원에 의한 논문이며, 이에 감사드립니다.

또한 본 연구는 농림축산식품부 2012년 생명산업기술개발 사업(과제번호:311013-03-2-HD110)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

AOAC. 2013. [http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC_Member/Default.aspx?hkey=8fc2171a-6051-4e64-a928-5c47dfa25797&WebsiteKey=2e25ab5a-1f6d-4d78-a498-19b9763d11b4&=404%3bhhttp%3a%2f%2fwww.aoac.org%3a80%2fiMIS15_Prod%2fAOAC.Association of Analytical Communities](http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC_Member/Default.aspx?hkey=8fc2171a-6051-4e64-a928-5c47dfa25797&WebsiteKey=2e25ab5a-1f6d-4d78-a498-19b9763d11b4&=404%3bhhttp%3a%2f%2fwww.aoac.org%3a80%2fiMIS15_Prod%2fAOAC.Association%20of%20Analytical%20Communities).

Aunpad, R. and Na-Bangchang, K. 2007. Pumulicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr. Microbiol.* **55**, 308-313.

Babizhayev, M.A. 2010. New concept in nutrition for the maintenance

- of the aging eye redox regulation and therapeutic treatment of cataract disease; synergism of natural antioxidant imidazole-containing amino acid-based compounds, chaperone, and glutathione boosting agents: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Am. J. Ther.* **17**, 373–389.
- Back, H.L., Kim, S.R., Yang, J.A., Kim, M.G., Chae, S.W., and Cha, Y.S.** 2011. Effects of Chungkookjang supplementation on obesity and atherosclerotic indices in overweight/obese subjects: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Med. Food* **14**, 532–537.
- Benitez, L., Correa, A., Daroit, D., and Brandelli, A.** 2011. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is enhanced in the presence of *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **62**, 1017–1022.
- Borsheim, E., Tipton, K.D., Wolf, S.E., and Wolfe, R.R.** 2002. Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**, E648–657.
- Castillo, B., Delgado, Y., Barletta, G., and Griebenow, K.** 2010. Enantioselective transesterification catalysis by nanosized serine protease subtilisin carlsberg particles in tetrahydrofuran. *Tetrahedron* **66**, 2175–2180.
- Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy, M.N., Kalaichelvan, P.T., and Hur, B.K.** 2008. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *J. Basic Microbiol.* **48**, 347–352.
- Cuero, R.G.** 1999. Antimicrobial action of exogenous chitosan. *EXS.* **87**, 315–333.
- Engberg, R.M., Hedemann, M.S., Steinfeldt, S., and Jensen, B.B.** 2004. Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. *Poult. Sci.* **83**, 925–938.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Ferreira, L., Ramos, M.A., Gil, M.H., and Dordick, J.S.** 2002. Exquisite regioselectivity and increased transesterification activity of an immobilized *Bacillus subtilis* protease. *Biotechnol. Prog.* **18**, 986–993.
- Francesch, M., Perez-Vendrell, A.M., and Broz, J.** 2012. Effects of a mono-component endo-xylanase supplementation on the nutritive value of wheat-based broiler diets. *Br. Poult. Sci.* **53**, 809–816.
- Giri, S.S., Sukumaran, V., Sen, S.S., Oviya, M., Banu, B.N., and Jena, P.K.** 2011. Purification and partial characterization of a detergent and oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. *J. Microbiol.* **49**, 455–461.
- Gollnisch, K., Vahjen, W., Simon, O., and Schulz, E.** 1999. Influence of an antimicrobial (avilamycin) and an enzymatic (xylanase) feed additive alone or in combination on pathogenic microorganisms in the intestine of pigs (*E. coli*, *C. perfringens*). *Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft.* **193**, 337–342.
- Graminho, E.R., da Silva, R.R., de Freitas Cabral, T.P., Arantes, E.C., da Rosa, N.G., Juliano, L., Okamoto, D.N., de Oliveira, L.C., Kondo, M.Y., Juliano, M.A., and *et al.*** 2013. Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**, 201–214.
- Guo, G., Liu, Z., Xu, J., Liu, J., Dai, X., Xie, D., Peng, K., Feng, X., Duan, S., Zheng, K., and *et al.*** 2012. Purification and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis* isolated from the degumming line. *J. Basic Microbiol.* **52**, 419–428.
- Hirsch, K., Simon, O., and Vahjen, W.** 2006. Influence of a xylanase feed additive on *Lactobacillus* species in the jejunum of piglets. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* **119**, 486–492.
- 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 TGFbeta are revealed in the expression profiling of MCF7 cell treated with fermented soybean, chungkookjang. *Nutr. Cancer* **63**, 645–652.
- Irfan, M., Nadeem, M., and Syed, Q.** 2013. Purification and kinetics study of thermostable cellulase free xylanase from *Bacillus subtilis*. *Protein Pept. Lett.* Epub ahead of print.
- Jukes, T.H.a.C.R.C.** 1969. Evolution of protein molecules, Mammalian protein metabolism, pp. 21–132. In Munro, H.M. (eds.). Academic Press, New York, N.Y., USA.
- Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M., and Chibata, I.** 1979. Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **27**, 1912–1916.
- Kim, S.B., Lee, D.W., Cheigh, C.I., Choe, E.A., Lee, S.J., Hong, Y.H., Choi, H.J., and Pyun, Y.R.** 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 436–444.
- 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, N.Y., Song, E.J., Kwon, D.Y., Kim, H.P., and Heo, M.Y.** 2008. Antioxidant and antigenotoxic activities of Korean fermented soybean. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 1184–1189.
- Korean Food Standards Codex.** 2013. http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu_02_01_01.jsp.
- Lee, H.J., Cho, S.A., Shin, J.G., Kim, J.S., Jeong, Y.J., Moon, K.D., and Kwon, J.H.** 2007. Quality and functional components of commercial Chungkookjang powders. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 65–71.
- Liang, T.W., Hsieh, J.L., and Wang, S.L.** 2012. Production and purification of a protease, a chitosanase, and chitin oligosaccharides by *Bacillus cereus* TKU022 fermentation. *Carbohydr. Res.* **362**, 38–46.
- Lindberg, R.A., Eirich, L.D., Price, J.S., Wolfenbarger, L.Jr., and Drucker, H.** 1981. Alkaline protease from *Neurospora crassa*. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* **256**, 811–814.
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S., and Azuma, I.** 1984. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* **2**, 93–99.
- Polizeli, M.L., Rizzatti, A.C., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., and Amorim, D.S.** 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 577–591.
- Ryu, S.H.** 2002. Studies on antioxidative effects and antioxidative components of soybean and Chungkookjang, pp. 23–122. Ph.D Thesis, Inje University.
- Saadoun, I., Al-Omari, R., Jaradat, Z., and Ababneh, Q.** 2009. Influence of culture conditions of *Streptomyces* sp. (strain S242) on chitinase production. *Pol. J. Microbiol.* **58**, 339–345.
- Saitou, N. and Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Salah, R., Michaud, P., Mati, F., Harrat, Z., Lounici, H., Abdi, N., Drouiche, N., and Mameri, N.** 2013. Anticancer activity of chemically prepared shrimp low molecular weight chitin evaluation with the human monocyte leukaemia cell line, THP-1. *Int. J. Biol. Macromol.* **52**, 333–339.

- Seong, C.N., Jo, J.S., Choi, S.K., Kim, S.W., Kim, S.J., Lee, O.H., Han, J.M., and Yoo, J.C. 2004. Production, purification, and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Lett.* **26**, 907–909.
- Shrinivas, D., Savitha, G., Raviranjani, K., and Naik, G.R. 2010. A highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 suitable for paper and pulp industry: purification and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**, 2049–2057.
- Simkhada, J.R., Cho, S.S., Mander, P., Choi, Y.H., and Yoo, J.C. 2012a. Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel *Streptomyces* enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis model. *Thromb. Res.* **129**, 176–182.
- Simkhada, J.R., Yoo, H.Y., Choi, Y.H., Kim, S.W., and Yoo, J.C. 2012b. An extremely alkaline novel xylanase from a newly isolated *Streptomyces* strain cultivated in corn cob medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **168**, 2017–2027.
- Son, D.H., Kwon, O.J., Ji, W.D., Choi, U.K., Kwon, O.J., Lee, E.J., Cho, Y.J., Cha, W.S., and Chung, Y.G. 2000. The quality changes of chungkookjang prepared by *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. *J. Kor. Soc. Agri. Chem. Biotechnol.* **43**, 1–16.
- Suh, J.S., Lee, S.G., and Ryu, M.K. 1982. Effect of *Bacillus* strains of the chungkookjang processing. Changes of the components and enzyme activities during the storage of chungkookjang. *Kor. Soc. Food Sci. Technol.* **14**, 309–314.
- Sung, N.J., Ji, Y.A., and Chung, S.Y. 1984. Changes in nitrogenous compounds of soybean during chungkookjang koji fermentation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **13**, 275–284.
- Wise, C., Novitsky, L., Tsopmo, A., and Avis, T.J. 2012. Production and antimicrobial activity of 3-hydroxypropionaldehyde from *Bacillus subtilis* strain CU12. *J. Chem. Ecol.* **38**, 1521–1527.
- Wu, S., Jia, S., Sun, D., Chen, M., Chen, X., Zhong, J., and Huan, L. 2005. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. *Curr. Microbiol.* **51**, 292–296.
- Yoo, H.J., Lee, D.S., and Kim, H.B. 2004. Chungkookjang fermentation of mixture of barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 49–53.
- Zacour, A.C., Silva, M.E., Cecon, P.R., Bambirra, E.A., and Vieira, E.C. 1992. Effect of dietary chitin on cholesterol absorption and metabolism in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)* **38**, 609–613.
- Zhang, M., Zhao, C., Du, L., Lu, F., and Gao, C. 2008. Expression, purification, and characterization of a thermophilic neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis*. *Sci. China C. Life Sci.* **51**, 52–59.