

발간등록번호

11-1541000-001052-01

보안과제(), 일반과제(○)

과제번호 109122-2

청국장 종균 개발 및 보급

(Development and Dissemination of
Chungkukjang Starter)

한국 청국장 품질 표준화 연구(세부)

(A Study on the Standardization of Korean *Chungkukjang*)

청국장 발효용 우수 균주의 실용화 기술 개발(협동)

(Development of Practical Use Technique of
Chungkukjang Fermenting Strains)

주관연구기관 : 한국장류협동조합

협동연구기관 : 경상대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “청국장 종균 개발 및 보급에 관한 연구” 과제(세부과제 “한국 청국장 품질 표준화 연구”, “청국장 발효용 우수 균주의 실용화 기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2011 년 4 월 8 일

주관연구기관명 : 한국장류협동조합

주관연구책임자 : 김 동 현

세부연구책임자 : 김 동 현

연 구 원 : 조 인 상

연 구 원 : 고 유 진

연 구 원 : 이 효 형

연 구 원 : 하 선 영

연 구 원 : 이 슬 기

연 구 원 : 송 재 성

연 구 원 : 이 정 석

연 구 원 : 오 경 근

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 류 충 호

요 약 문

I. 제 목 : 청국장 종균 개발 및 보급

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 청국장은 한국 고유의 콩 발효식품으로 영양이 풍부하며, 최근에는 혈전용해능, 면역기능 강화, 항산화 효과, 생리효과 등의 기능성이 매우 우수한 것으로 알려지고 있어 그 소비량이 증가하는 추세에 있다. 이러한 변화를 반영하고 국내 발효식품의 안전성을 도모하는 한편, 연 중 균일한 제품을 생산할 수 있는 방안의 확보가 절실한 상황이다.

○ 현재 우리나라의 청국장의 경우 야생균주를 사용하여 경험에 의존해 제조되고 있어 잡균오염이 심하고 품질관리가 잘 되지 않는 단점이 있다. 안전한 청국장 제품을 생산하기 위해서는 우수한 종균 개발이 필요하다.

○ 종균의 우수 특성을 유지한 종균을 생물제어 및 무균조작 시설이 없는 제조 현장에 적용하여 균일한 제품을 생산할 수 있는 공정개선 시스템도 구축되어야 한다.

○ 뿐만 아니라 포화상태의 재래식 찌개 위주 청국장 시장을 잠식중인 일본 낫토균을 대체할 제품 개발이 요구되고 있다. 따라서 종균 사용에 의한 잡균 오염의 근본적인 방지를 통해, 한국 고유의 풍미를 가진 생청국장을 개발함으로써 획일화된 일본 낫토와는 차별화된 청국장 시장의 활성화 및 수출 상품화를 도모할 수 있을 것이다.

○ 청국장 종균의 보급시스템 구축

- 청국장 제품의 세계화를 위해서는 일부 한국인은 물론 서구인들에게 거부감을 일으킬 수 있는 불쾌취를 최소화하고 독특한 기능적 특성을 규명하여 균일한 제품을 안정적으로 생산할 수 있는 시스템 구축이 시급함.
- 한국 청국장의 우수성과 기능성을 찾고 홍보하며 시장이 구축되면 다양하게 개발된 종균을 바탕으로 기존 시장이 형성된 낫토 시장과 차별화하여 다양한 맛과 향, 기능성을 가미한 소

비자의 기호에 맞는 다양한 제품개발로 시장 규모를 확대할 수 있음

- 일본산 낫토 제조용 종균을 증두에 접종하여 제조된 것을 생청국(풀무원), 이것을 건조시킨 다음 분쇄시킨 가루를 생청국장 분말 혹은 청국장 가루로 판매하고 있지만 가까운 장래에 딸기나 장미처럼 품종 개발국의 특허권 주장으로 막대한 로열티를 지불해야 하는 불상사가 일어날 수 있음. 청국장 고유의 향과 맛을 내고 기능성을 가진 차별화된 균주 선발, 우수한 특성을 인위적으로 향상시키는 육종, 보존 혹은 계대 배양시 수반되는 유전적 특성의 감소, 탈락을 예방하는 기술 개발이 꾸준히 진행되어야 함

○ 국내 시판되고 있는 청국장 제품으로부터 우수한 발효용 균주를 분리·동정하고 균주별 특성을 조사하여 기능성이 우수하며 소비자 기호에 맞는 균주를 선발하고, 선발된 균주의 생화학적 성상을 원래 상태로 유지시키고 저장 및 유통 중 균수 변화나 변이가 적은 형태의 종균을 개발하고 제조 현장에 적용하여 균일한 청국장 제품을 대량 생산할 수 있는 시스템을 구축해야 한다.

○ 청국장 발효균주인 *B. subtilis* 균주를 반복적으로 계대배양 하게 되면 각종 효소 활성이 감소하여 청국장의 품질이 저하되게 된다. 또한 단순 동결건조 혹은 동결저온보관 등의 방법은 돌연변이가 심한 발효균주(*B. subtilis*)의 특성유지 및 관리에 적합하지 않다. 그러므로 우수하고 균일한 품질의 청국장 생산을 위해서 종균의 활성유지 및 회복에 적합한 기술 개발이 요구되고 있다.

○ 청국장 관련 유해 미생물 저감화 기술 개발을 통한 안전성 확보를 통해 우수 종균을 이용한 생물방제(biological preservation)로 유해균을 억제시킴으로써 잡균 오염에 따른 이상 발효로 인한 제품 폐기량을 최소화하여 장류 제조업체의 리스크를 감소시켜야 한다.

○ 일본의 경우는 규격화된 단일종균의 사용에 따른 제품의 획일화·단순화로 인해 더 이상의 발전에 한계점에 이르렀다고 사료되며, 우리나라 실정에 맞는 다양한 균주의 확보 및 종균화 연구를 지속함으로써 한국식 콩발효 제품의 우수성을 홍보하고 발효식품의 종주국이라는 입지를 굳혀 한식의 세계화에 기여할 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 한국 청국장 품질 표준화 연구

1) 한국 청국장 수집 및 품질특성 조사

- ① 청국장 제품의 수집
- ② 수집된 청국장의 수분함량 및 염도 측정
- (2) 수집된 청국장의 총질소 및 아미노태 질소 함량
- (3) 수집된 청국장의 히스타민 및 티라민 함량
- (4) 수집된 청국장의 생균수

2) 청국장 제품에서의 대두 발효용 우수 균주 분리

- ① 청국장 제품에서 우수 균주의 분리
- ② 단백질 분해능과 점질물 생성능이 우수한 발효 균주의 선발
- ③ 특허 등록 및 기탁 균주의 수집
- ④ 청국장 분리 균주의 생화학적 특성 조사
- ⑤ 청국장 분리 균주의 내열성

2. 청국장 발효용 우수 균주의 분리 및 실용화 기술 개발

1) 선발된 청국장 발효용 우수균주의 액체 배양액의 특성 조사

2) 선발된 균주를 이용한 청국장 제조 및 품질특성 조사

- ① 선발된 균주로 발효시킨 청국장 제조
- ② 선발된 균주로 발효시킨 청국장의 아미노태 질소 함량
- ③ 선발된 균주로 발효시킨 청국장 총질소 함량
- ④ 선발된 균주로 발효시킨 청국장의 점질물의 길이
- ⑤ 선발된 균주로 발효시킨 청국장의 수분 함량
- ⑥ 선발된 균주로 발효시킨 청국장의 혈전용해능 확인
- ⑦ 선발된 균주로 발효시킨 청국장의 지역특성 조사

3) 청국장 발효용 후보균주 선발

4) 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장 제조 및 품질특성 조사

- ① 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 환원당 함량
- ② 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 색도
- ③ 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 관능평가
- ④ 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 pH
- ⑤ 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 DPPH 자유라디칼 소거능
- ⑥ 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 아미노태 질소 및 총질소 함량

3. 우수 종균을 이용한 국내 청국장 품질 표준화 연구

1) 종균 제품의 안정적인 장기 저장 기술 개발

- ① 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 청국장 점질물의 변화
- ② 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 수분 및 pH의 변화
- ③ 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 총질소 및 아미노태 질소의 변화
- ④ 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 혈전용해능의 변화

2) 청국장 발효과정 중 바이오제닉 아민 생성량 조사

3) 혼합배양에 의한 발효 중 *Bacillus cereus*의 생육 저해 효과

- ① 업체별 *B. cereus*의 검출
- ② Nutrient 배지에서 *B. subtilis* P-L2에 의한 *B. cereus* KCCM 12142의 생육 저해 효과
- ③ Soymilk 배지에서 *B. subtilis* P-L2에 의한 *B. cereus* KCCM 12142의 생육 저해 효과
- ④ 청국장 제조 시 *B. subtilis* P-L2에 의한 *B. cereus* KCCM 12142의 생육 저해 효과

4) 고품질 청국장 대량 생산 실증 실험

5) 청국장 종균 제품의 보급 시스템 구축 및 산업화 기반 조성

4. 청국장 우수 균주의 분리 및 보관 기술 개발

1) 계대 배양 횟수별 청국장 제조 및 종균의 특성 변화조사

- ① 종균 계대 횟수에 따른 청국장의 pH 및 수분 함량 측정
- ② 종균 계대 횟수에 따른 청국장의 조단백질 함량 측정
- ③ 종균 계대 횟수에 따른 청국장의 점질물 길이 측정
- ④ 종균 계대 횟수에 따른 청국장의 아미노태 질소 함량 측정
- ⑤ 종균 계대 횟수에 따른 청국장의 혈전용해효소의 활성과 gelatinase 활성 측정

2) 안정적인 종균의 우수 특성 유지 기술 개발

- ① 혼합배양에 의한 균주 특성 회복
- ② 혼합배양에 따른 pH 함량 및 조단백질 함량 측정
- ③ 혼합배양에 따른 점질물 길이 측정
- ④ 혼합배양에 따른 아미노태 질소 함량 측정
- ⑤ 혈전용해효소의 활성과 gelatinolytic 측정

3) 장기 저장형 종균 보급 및 사용법 개발

- ① 영양세포형 종균의 문제점
- ② 아포형 종균의 제조
- ③ 아포화 수율
- ④ 영양세포와 아포의 발효 효율
- ⑤ 영양세포와 아포의 형태 비교
- ⑥ 종균제품을 이용한 청국장의 제조
- ⑦ 종균제품의 최적 사용량 확립

4) 종균 제품의 개발

5) 균일한 청국장 제조를 위한 매뉴얼 확립

6) 청국장의 체계적인 관능평가 방법 확립

IV. 연구개발결과

1. 한국 청국장 품질 표준화 연구

가. 우수한 청국장발효 균주를 분리하기 위하여 국내 시판 중인 청국장 제품 또는 농가에서 제조된 청국장 102건을 수집하였다. 경기도 포천시, 파주시, 광주시, 남양주시, 충남 논산시, 금산군, 충북 제천시, 전북 순창군, 대구광역시 등에 소재하는 한국장류협동조합 회원사와 산지에서 생산한 콩을 청국장으로 가공하는 농가로부터 수집하였다

나. 전국에서 시판 또는 농가 제조·판매중인 청국장을 수집하고 제품의 총질소, 아미노태 질소 함량, 질소분해율 및 티라민과 히스타민 함량 등을 분석하여 청국장의 품질특성을 규명하였다.

다. 분리된 균주의 생화학적 특성과 한천배지 상의 증식 유무를 확인한 조사하여 기능성이 우수하며 소비자 기호에 맞는 균주 선발하고 동정하여 신 균주를 확보하였다.

라. 단백질 분해능과 점질물 생성능의 차이를 토대로 수집된 청국장 제품에서 523종의 단일 콜로니를 분리하였다.

마. 대부분이 *Bacillus subtilis*로서 대부분 52℃의 고온에서도 생육가능한 몇몇 균주는 62℃에서도 생육하는 강한 내열성을 보였다.

2. 청국장 발효용 우수 균주의 분리 및 실용화 기술 개발

가. 분리된 균주를 특성별로 분류하고 대표적인 후보 균주를 선택하여 증자콩에 접종해서 직접 청국장을 제조하여 점질물의 생성정도나 양, 풍미, 단백질 분해효소, 혈전용해효소 등을 측정하여 후보 및 우수 균주를 선발하였다.

나. 각각의 균주를 메주콩에 적용한 결과를 바탕으로 후보균주를 선발하고 발효시간, 온도 등의 환경변화에 따른 2차 제조실험을 실시하였다.

다. 종균용 균주의 선발은 개인적 기호도 차이를 존중하여 청국장의 냄새, 맛, 점질물, 혈전용

해능 등을 고려하여 다수의 종균을 선발하였다.

라. 선발된 균주는 단독 또는 복합 사용을 통하여 보다 다양한 맛과 향을 가진 청국장을 제조할 수 있다.

3. 우수 종균을 이용한 국내 청국장 품질 표준화 연구

가. 선발된 우수균주인 *B. subtilis* P-L2를 이용하여 국내 장류 제품의 유해균으로 지정된 *B. cereus*의 효과적인 제어 방법을 제시함으로써 우수 종균을 이용한 *B. cereus* 및 유해균의 성장 억제 효과를 가져올 수 있다.

나. 제조된 *B. subtilis* P-L2 종균의 최적 저장 온도 및 저장 기간을 제시함으로써, 종균제품의 효율적인 국내 보급을 위한 중요한 자료로 활용될 것으로 평가된다.

다. 개발된 청국장 종균은 아포형태로 제조되어 보관온도 및 저장기간에 의한 영향을 크게 받지 않는다. 종균의 생산은 물론 유통과정 중 상품성 유지 및 비용 절감을 위해서 실온에서 보관하며 최대 6개월 이상 보관·유통할 수 있다.

라. 본 연구에서 사용된 종균에 의한 청국장 발효 중 시간이 경과함에 따라 바이오제닉 아민 함량은 서서히 증가하는 경향을 보였지만, 이를 이전에 검색한 타사의 시판 청국장 제품과 비교하였을 때는 낮은 수준으로 관찰되었기 때문에, 우수 발효 균주의 선별을 통해 바이오제닉 아민의 생산을 충분히 제어할 수 있는 요소로 사료된다.

마 개발된 종균을 산업체의 대량생산 공정에 직접 적용시켜보기 위하여 종균제품을 이용한 대량 생산 실증 실험을 거침으로써 산업화 가능성을 확인하였다.

4. 청국장 우수 균주의 분리 및 보관 기술 개발

가. 청국장 제조에 사용되는 *B. subtilis* 균주는 반복적으로 계대배양 하게 되면 각종 효소활성이 낮아져 청국장 제조 시 품질 저하의 요인이 된다. 우수한 품질의 청국장을 생산하기 위해서는 균주의 활성을 유지 혹은 회복시키는 기술을 탐색할 필요가 있다. 계대배양에 따른 *Bacillus subtilis*의 활성 상실을 방지하기 위하여 제한된 환경 하에서 상호 경쟁을 통해 강한 균주를 선발하였다.

나. 경쟁배양을 통해 청국장 제조 종균의 활성을 회복시켜 고품질의 청국장 제조를 위한 우수 균주의 보관 기술 방법을 확립하였다. 경쟁배양에 사용가능한 균주는 *B.subtilis*와 같은 온도에서 생육가능한 호기성 균주일 것이며 독성물질을 생성하지 않아 *B.subtilis*의 변이를 유발할 위험이 없는 균주여야 한다.

다. 종균의 우수한 특성을 유지하는 colony를 선택하여 한천배지에 증균 배양시킨 영양세포를 환경 스트레스에 내성이 강하고 장기 보존 가능한 아포형태로 변환시킨 후 종균화 하였다.

라. 아포화된 *B.subtilis* 종균은 고온에서도 생육가능하므로 원료콩의 증자 직후 80℃ 가량의 고온상태에 접종하여 접종조각 중 발생할 수 있는 잡균의 오염을 고열로 제어할 뿐만 아니라, 고온의 증자콩에서 방출되는 고온의 증기로 인해 작업장에 산재하는 잡균이 증자콩으로 낙하하여 발생하는 오염도 제어될 수 있다. 뿐만 아니라 콩의 원료단계에서부터 증자후 및 청국장 완성단계에 이르기까지 동일한 제조설비 및 용기를 사용하는 업체의 제조 특성상 발생할 수 있는 교차오염을 고열로서 제어할 수 있는 효과가 있다.

마. 분리, 동정된 종균을 소비자에게 안정적이고 지속적으로 공급하기 위해 아포 동결건조 기술을 이용하여 장기간 보관. 소비자로 공급되는 종균 제품의 경우 파우더 타입으로 소포장으로 제품화함으로써 유통기한을 설정하고 청국장의 대량 생산이 필요한 업체에는 액상형의 앰플 타입으로 생산량에 따라 다양한 용량으로 제품화하여 공급함으로써 보다 효율적인 종균의 보급이 가능하다.

바. 최적 생육기간을 지나 장기간 보관한 영양세포와 비교하였을 때 종균 제품의 발효능은 정상적인 영양세포의 발효 효율과 유사하게 나타나, 종균제품의 활성이 유지되고 장기 보존이 가능함을 확인하였다.

사. 소비자나 청국장 제조업체는 제조 공정이 체계적으로 이루어 지지 못해 연중 균일한 제품을 생산 할 수 없어 종균 사용의 장점을 100% 활용하기 힘들다. 따라서 본 개발 종균제품이 가장 우수한 청국장 제품을 생산 할 수 있도록 과학적이고 정보체계적인 메뉴얼을 제공하였다.

아. 청국장 제품의 관능적 특성을 과학적으로 제시할 수 있는 관능평가와 앙케이트의 조사방법 및 판정기준을 체계화하여 확립하여 제시하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구성과

1. 학술발표

가. 2009. 10. 15. YJ Ko, YH Son, DH Kim, CH Ryu, Isolation, identification and characterization of *Bacillus spp.* from the chungkukjang in the various regions of Korea, *Korean Society of Life Science*

나. 2009. 10. 15, YH Son, BS Gu, YJ Ko, CH Ryu, Quality characteristics of chungkukjang fermented by isolated strains from commercial product, , *Korean Society of Life Science*

다. 2010. 06. 24, YH Son, YJ Ko, EJ Kim, EJ Kim, DH Kim, CH Ryu, Isolation superior strains from commercial chungkukjang and Its quality characteristics, *The Korean Society for Microbiology and Biotechnology*

라. 2010. 10. 21, YH Son, HS Je, CH Ryu, Competitive culture of *B.subtilis* and *B.cereus* in soymilk and nutrient broth, *Korean Society of Life Science*

마. 2010. 10. 21, YH Son, DH Kim, HS Choi, CH Ryu, Quality characteristics of chungkukjang fermented by isolated strains from commercial chungkukjang, *Korean Society of Life Science*

2. 인력양성 및 활용 결과

가. 학위논문

1) 손용휘 석사학위 논문, 2011. 02. 28.

Bacillus subtilis P-L2균의 활성회복을 위한 *Micrococcus luteus*와 혼합배양

2) 김진용 석사학위 논문, 2011. 02. 28.

Bacillus subtilis P-L2 의 항염증 효과

3) 제해수 석사학위 논문, 2011. 02. 28.

청국장 제조 중 *Bacillus subtilis* 혼합배양에 의한 *Bacillus cereus*의 생육 저해 효과

3. 기술컨설팅

가. 계약일 : 09.08.05, 업체 : 한국맥꾸름 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

나. 계약일 : 09.08.06, 업체 : 고방 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

다. 계약일 : 09.08.06, 업체 : 장마을 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

라. 계약일 : 09.08.06, 업체 : 창녕식품 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

마. 계약일 : 09.08.07, 업체 : 삼상식품 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

바. 계약일 : 09.08.07, 업체 : 상주식품 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

4.. 언론 홍보

가. '청국장 종균 개발. 세계화 눈앞'. 식품음료신문.2011.3.28.

나. '우리 고유맛 살리는 종균개발로 산업 판도 바뀌야', 한국농어민신문 2011.04.11

다. 청국장 산업화 성공, 종균개발, KBS 뉴스, 2011.04.20

5. 기술 실시 이전

가. 업체 : 산청덕산곶감고추장 영농조합법인

실시기간 : 2011.10~2012.10

내용 : 청국장 종균의 활용 및 제품생산기술

나. 업체 : 산청기능성콩 영농조합법인

실시기간 : 2011.10~2012.10

내용 : 청국장 종균의 활용 및 제품생산기술

제 2절 성과활용 계획

1. 식중독 유발 *Bacillus cereus*를 저감화시켜 안전한 **생산기술 확보**
2. 소비자 기호에 맞는 다양한 **장류 제품 개발지표 설정**
3. 개발 기술을 장류업체에 기술이전 하여 **안전한 제품의 생산에 활용**
4. 탐색 미생물 및 개발된 기술은 특허출원 후 산업체에 **기술 이전**하고자 함
5. 수입에 의존하고 있는 일본산 낫토 **중균의 수입 대체 효과**
6. 청국장에 대한 이미지 개선으로 신수요 창출을 통해 **대두소비 촉진**
7. 청국장의 안전성 확보에 의한 **소비자 건강 보호**
8. 전통발효식품의 **우수성 홍보용 자료** 제공
9. 청국장 외에 기타 발효식품 **고품질화의 표본** 제시
10. 세부과제간의 연구 흐름을 파악하여 연구 실적 및 결과물 **초과달성**
11. 과학적 검증 없이 생산·소비하는 청국장 제품의 기능성을 검증하여 소비자가 안심하고 소비하게 하여 청국장 가공품의 소비를 촉진시켜 국민건강 향상에 기여함
12. 전통발효식품 산업의 활성화를 통한 **농민소득 증대**
13. 한국 전통발효식품의 세계화를 위한 **초석이** 됨
14. 고부가가치 청국장 소재 건강기능식품들에 대한 국민적 관심과 지식을 높임
15. 연구 수행을 위하여 얻어진 결과들을 전문 SCI급 논문집에의 게재 및 특허권 조기 설정에 따른 **독점적 지위의 확보**

SUMMARY

I. Title : Development and Dissemination of *Chungkukjang* Starter

II. Purpose and necessity

○ ‘*Chungkukjang*’ is a Korean traditional bean fermented food with a great amount of various nutrition. Due to the recent news reports of the fermented food to have superb capabilities of thrombolytic function, immune enhancement, antioxidant effects, physiological effects and etc., the consumption of the food is increasing. The measures reflecting the current change, to promote the safety of Korean fermented food production as well as to manufacture *Chungkukjang* food product in the stabilized quality should be urgently secured.

○ The current *Chungkukjang* manufacturing is based on experience using the natural strains. Therefore, the disadvantages are generated developing serious contaminations caused by miscellaneous bacilli and other germs and difficulties in the quality control of the food production. To produce safe *Chungkukjang* products, it is important to develop high quality strains.

○ Also, a process improvement system should be established to apply high quality strains with superb characteristics and produce food products without a bio-control and aseptic manipulation facility.

○ In addition, the product to substitute Japanese *Bacillus natto* eating into the *Chungkukjang* market saturated mostly with *Jjigae* or stew products. Therefore, through the fundamental prevention of the contamination by miscellaneous bacilli and other germs

The development of fresh *Chungkukjang* with the unique Korean flavors, while the contamination by miscellaneous bacilli and other germs is fundamentally prevented, will vitalize differentiated market from the uniformed market with Japanese *Natto* and promote the commercialization for the export market.

○ *Chungkukjang* Strain Distribution System Establishment

- For the glottalization of *Chungkukjang* products, a stabilized manufacturing system is urgently required to produce products in a uniformed quality through accomplishment to minimize uncomfortable flavors which may result rejections by the Westerners as well as some Koreans and to define the unique functional characteristics.

- After the market is established with defining and promoting of the superiority and the functionality of Korean *Chungkukjang*, the market size can be expanded with the variety of product developments for the consumer tastes applying many different tastes, flavors and functions based on various developed strains differentiating from the already formed Japanese *Natto* market.

- Currently, the fresh *Chungkukjang* is produced with the soybeans inoculated with the strains for Japanese *Natto* (Pulmuone). And, the powder products made with drying and grinding the fresh *Chungkukjang* are sold in market. However, in soon, just as happened to strawberry and rose industries, the copyright clam raised by the strain development country may cause the unfortunate events to pay a great amount of royalty. A series of technologies to select the differentiated strains with *Chungkukjang*'s original flavors, tastes and functions, to culture to artificially improve superb characteristics of the selected stains and to preserve the characteristics while the degrade or the elimination of the genetic characteristics occurred during passaged culture process is prevented should be steadily progressed.

○ Superb strains for fermentation should be separated and identified from the products in Korean market. Then, by researching the each strain's characteristics, the strains which have outstanding characteristics and are fit to the consumer tastes should be selected. And, the starters have to be developed to preserve the selected strains' original bio-chemical characteristics during storages and shipping with minimal changes in numbers and/or deformations. Finally, a system should be established to manufacture the *Chungkukjang* products with uniformed qualities using the developed starters.

○ If *B.subtilis*, the strains for *Chungkukjang* fermentation, is repeatedly passaged cultured, various enzyme activities are reduced causing the quality degrade of the

Chungkukjang. Also, the freeze drying or frozen cold storage is not appropriate to preserve and manage the characteristics of the fermentation strains (*B. subtilis*) with the nature of extreme mutations. Therefore, the technology development for preservation and recovery of the starters' activities is required to manufacture *Chungkukjang* products with the uniformed high quality.

○ With biological preservation using the superb starter obtained through the safety secured by the development of harmful microorganism reduction and elimination technology to suppress harmful germs, the product disposal amount caused by the abnormal fermentations of miscellaneous bacilli and other germs should be minimized to reduce the risk of the manufacturer.

○ In Japan, due to the uniformity and simplification caused by using standard single strains, the product development is expected to be reached the limit. By securing various strains for Korean environment and steady researching on the strains, the superiority of Korean soybean fermented products can be promoted and Korea's position as the leading country of fermentation food will be confirmed to contribute to the Korean food's globalization activities.

III. Contents and extend

1. Product Quality Standardization Research for Korean *Chungkukjang*

1) Investigation of quality properties of *Chungkukjang*

① Collection of *Chungkukjang* products

② Moisture contents and salinity in collected *Chungkukjang*

(2) Total and amino nitrogen contents in collected *Chungkukjang*

(3) Histamine and tyramine contents in collected *Chungkukjang*

(4) Viable cell count in collected *Chungkukjang*

2) Isolation of superlative fermentation strains from *Chungkukjang*

① Isolation of fermentation strains from *Chungkukjang* products

② Selection of superb strains according to proteolytic activity and mucilage contents

- ③ Collection of patent registered and donated strains
- ④ Investigation of biological properties of isolated strains from *Chungkukjang*
- ⑤ Heat resistance of isolated strains from *Chungkukjang*

2. Separation and Application Technology Development of Superb Strains for *Chungkukjang* Fermentation

- 1) Characteristic of culture media of selected strains for *Chungkukjang* fermentation
 - 2) Quality properties of *Chungkukjang* fermented by selected strains
 - ① Production of *Chungkukjang* fermented by selected strains
 - ② Amino nitrogen contents of *Chungkukjang* fermented by selected strains
 - ③ Total nitrogen contents of *Chungkukjang* fermented by selected strains
 - ④ Length of mucilage of *Chungkukjang* fermented by selected strains
 - ⑤ Moisture contents of *Chungkukjang* fermented by selected strains
 - ⑥ Fibrinolytic activity of *Chungkukjang* fermented by selected strains
 - ⑦ Properties of *Chungkukjang* fermented by selected strains according to region
- 3) Selection of superlative strains for *Chungkukjang* fermentation
 - 4) Quality properties of *Chungkukjang* fermented by superlative strains and patent strains
 - ① Reducing sugar contents of *Chungkukjang* fermented by candidate strains and donated strains
 - ② Osmotic pressure of *Chungkukjang* fermented by candidate strains and donated strains
 - ③ Sensory evaluation of *Chungkukjang* fermented by candidate strains and donated strains
 - ④ pH of *Chungkukjang* fermented by candidate strains and donated strains
 - ⑤ DPPH free radical scavenging activity of *Chungkukjang* fermented by candidate strains and donated strains
 - ⑥ Total and amino nitrogen contents of *Chungkukjang* fermented by candidate strains and donated strains

3. Korean *Chungkukjang* Quality Standardization using the Superb Starter

1) Development of stable storage technique for *Chungkujang* starter

- ① Changes of mucilage contents according to storage temperature and period of *Chungkujang* starter
- ② Changes of moisture contents and pH according to storage temperature and period of *Chungkujang* starter
- ③ Changes of total and amino nitrogen contents according to storage temperature and period of *Chungkujang* starter
- ④ Changes of fibrinolytic activity according to storage temperature and period of *Chungkujang* starter

2) Changes of biogenic amin during fermentation

3) Inhibitory effect of mixed-culture on growth of *Bacillus cereus*

- ① Detection of *B. cereus* from companies
- ② Inhibitory effect of *B. subtilis* P-L2 to *B. cereus* KCCM 12142 on Nutrient agar medium
- ③ Inhibitory effect of *B. subtilis* P-L2 to *B. cereus* KCCM 12142 on soymilk medium
- ④ Inhibitory effect of *B. subtilis* P-L2 to *B. cereus* KCCM 12142 on *Chungkukjang* production

4) Substantiation of *Chungkukjang* fermentation

5) Construction of supply system of starter for *Chungkukjang* fermentation

4. Separation and Storage Technology Development of Superb Strains for *Chungkukjang* Fermentation

1) Changes of properties of *Chungkukjang* starter according subculture times

- ① pH and moisture content of *Chungkukjang* according subculture times of starter

- ② Total nitrogen contents of *Chungkukjang* according subculture times of starter
- ③ Length of mucilage of *Chungkukjang* according subculture times of starter
- ④ Amino nitrogen contents of *Chungkukjang* according subculture times of starter
- ⑤ Fibrinolytic and gelatinolytic activities of *Chungkukjang* according subculture times of starter

2) Development of stable preservation technique for maintain superb characteristics of *Chungkukjang* starter

- ① Recover of characteristics of starter by mixed-culture
- ② pH and total nitrogen content of *Chungkukjang* by mixed-culture
- ③ Mucilage of *Chungkukjang* by mixed-culture
- ④ Amino nitrogen contents of *Chungkukjang* by mixed-culture
- ⑤ Fibrinolytic and gelatinolytic activities of *Chungkukjang* by mixed-culture

3) Dissemination of long-term storing starter and development of its usage

- ① Problem of vegetative cell type of starter
- ② Manufacture of sporulating starter
- ③ Yeild of sporulating of starter
- ④ Fermentation efficiency of vegetative cell type starter and sporulating starter
- ⑤ Comparison of morphology of vegetative cell type starter and sporulating starter
- ⑥ Fermentation of *Chungkukjang* using starter
- ⑦ Establishment of optimum quantity of starter for fermentation

4) Development of surpub starter

5) Supplement of starter and development of its instruction manual

6) Establishment of systematic sensory evaluation for *Chungkukjang*

IV. Results

1. Product Quality Standardization Research for Korean *Chungkukjang*

A. 120 cases has been collected from the *Chungkukjang* products sold in market and homemade *Chungkukjang* to separate superb strains for *Chungkukjang* fermentation. The member companies of Korea Jang Cooperative in Pocheon City, Paju City, Nam Yangju City in Gyeonggi-Do, and Nonsan City and Geumsan-Gun in Chung Nam, Jecheon City in Chung Buk, Sunchang-Gun in Jeon Nam, and Daegu City along with farming households growing their own beans have participated in the collection.

B. From analysis of total nitrogen, content amount of amino nitrogen, nitrogen decomposition efficiency, the content of tyramine and histamine of collected *Chungkukjang* samples, the quality characteristics of *Chungkukjang* is defined.

C. New strains is secured with the selected and identified strains to fit to consumers' favor after the investigation of the biochemical characteristics and the confirmation of the capability to culture on agar medium.

D. Based on the differences in protein decomposition rate and viscose substance creation rate of the collected *Chungkukjang* samples, 523 species of single colonies are separated.

E. The most of strains are *Bacillus subtilis*. And, the most are survived in high temperature of 52°C while some of the tested strains show strong heat resistance to survive the high temperature of 62°C.

2. Separation and Application Technology Development of Superb Strains for *Chungkukjang* Fermentation

A. After categorizing the separated strains, the candidate strains are selected to inoculate to the culturing beans to make *Chungkukjang*. From the produced *Chungkukjang*, viscose substance creation rate, quantity, flavor, protease, and thrombolytic enzyme are measured to select the outstanding and candidate strains.

B. Based on the result of each strains' application to soybeans, the candidate strains are selected for the secondary production experiment under various environment changes including fermentation time and temperature.

C. The multiple of starters are selected respecting the differences in personal favors and considering the smells, the tastes, the viscose substances and thrombus dissolution rates of the *Chungkukjang* samples.

D. By using single or multiple variety of starters, the *Chungkukjang* with more variety of tastes and flavors can be produced.

3. Korean *Chungkukjang* Quality Standardization using the Superb Starter

A. By proposing an effective measure using one of the selected outstanding strains, *B.subtilis* P-L2, to control *B.cereus*, a defined harmful bacillus for fermentation foods, it is showed that the effect to suppress growths of *B.cereus* and other harmful bacilli can be delivered using outstanding starter.

B. The discloser of the optimal temperature and period to store *B.subtilis* P-L2 starter is evaluated to be important data for effective distribution of the starter products within Korea.

C. The developed *Chungkukjang* starters are produced in sporulating forms so that the influence regarding storage temperature and period won't be great to the starter products. The produced *Chungkukjang* starters can be stored and distributed for max. 6 months in the normal temperature resulting advantages both in product quality maintenance and cost reduction not only during the distribution, but also production process.

D. During the fermentation process of the starters used in the research, Biogenic Amines content shows slow increase as time passes. However, since the content is found to be less than other *Chungkukjang* products in the market, it can be considered that the production of Biogenic Amines is fully controllable with selected outstanding strains.

E The possibility of industrialization is confirmed by the demonstrational experiment to apply the developed starter product to for mass production process.

4. Separation and Storage Technology Development of Superb Strains for *Chungkukjang* Fermentation

A. If *B.subtilis* strains used for *Chungkukjang* manufacturing are repeatedly passaged cultured, the activities of various enzymes are reduced causing the produced *Chungkukjang*'s quality degrade. To produce great quality *Chungkukjang*, the technology to maintain or to recover the strains' activity is required to be searched. To prevent loss in the activity of *Bacillus subtilis* caused by the passaged culture process, strong strains are selected by mutual competitions in the limited environment.

B. The technology to preserve the superb strains is established by recovering the activity of the strains for *Chungkukjang* production through the competitive culture. The strains usable in the competitive culture would be aerobic strain which can survive in the same temperature with *B.subtilis*. Also, the strain should be harmless strains not producing any toxic substance.

C. After selecting a colony maintaining the superb characteristic of the starters, the colony is cultured on the agar medium. Then, the cultured feeder cells are converted into the sporulating form with high tolerance against environmental stress and possible long-term preservation to produce the starters.

D. The sporulating formed *B.subtilis* starters are possible to live and grow in high temperatures. Therefore, the starters can be inoculated to the beans in high temperatures of 80°C so that the contamination of misc. germs can be controlled with the high temperature. Also, contamination of the airborne germs which has been dispersed by the high temperature steam released from the high temperature beans controlled as well. Moreover, the cross contamination which can be occurred due to the manufacturer's production characteristics of using the same facility and containers from the initial stages to the completion of *Chungkukjang* production can be controlled with the high temperature.

E. The freezing drying technique is employed for the long-term storage for stabilized

and steady supply of the separated and identified starters to consumers. For the consumer product, the *Chungkukjang* can be made as powder and packed in small quantity packages with specified the shelf-life. For the places requiring *Chungkukjang* in large quantity, liquid ample type packaged products in various sizes can be supplied for more efficient starter product supply.

F. Compared with the feeder cells which has been stored in a long-term after the optimal growth period, the starter product's fermentation rate is showing similar value with the normal feed cells' fermentation efficiency so that it is confirmed that the preservation of the activity and the long term storage of the starter products are possible.

G. Since the manufacturing processes are not established systematically, it is not possible to produce products with a uniformed quality throughout the year to make hard for consumers and *Chungkukjang* manufactures to take the full advantage of the starter application. Therefore, the scientific and information-systematic manual is provided to produce the most outstanding *Chungkukjang* products using the developed starters in the research.

H. The organic evaluation to scientifically show the organoleptic property of the *Chungkukjang* , the survey measure and the determination criteria are established and proposed.

V. Achievement and Application Plan

Paragraph 1. Achievement

1. Scientific publication

A. 2009. 10. 15. YJ Ko, YH Son, DH Kim, CH Ryu, Isolation, identification and characterization of *Bacillus spp.* from the chungkukjang in the various regions of Korea, *Korean Society of Life Science*

B. 2009. 10. 15, YH Son, BS Gu, YJ Ko, CH Ryu, Quality characteristics of chungkukjang

fermented by isolated strains from commercial product, , *Korean Society of Life Science*

C. 2010. 06. 24, YH Son, YJ Ko, EJ Kim, EJ Kim, DH Kim, CH Ryu, Isolation superior strains from commercial chungkukjang and Its quality characteristics, *The Korean Society for Microbiology and Biotechnology*

D. 2010. 10. 21, YH Son, HS Je, CH Ryu, Competitive culture of *B.subtilis* and *B.cereus* in soymilk and nutrient broth, *Korean Society of Life Science*

E. 2010. 10. 21, YH Son, DH Kim, HS Choi, CH Ryu, Quality characteristics of chungkukjang fermented by isolated strains from commercial chungkukjang, *Korean Society of Life Science*

2. Development of human resources and application

A. Thesis for degree

1) Son Yong-hwi, Master degree, 2011. 02. 28.

Study on the Mixed Culture with *Micrococcus luteus* for Recovering Activity of *Bacillus subtilis* P-L2

2) Kim Jin-yong, Master degree, 2011. 02. 28.

A Study of the Anti-inflammatory Effect of *Bacillus subtilis* P-L2

3) Je Hae-su, Master degree, 2011. 02. 28.

Inhibitory Effect of Mixed-culture with *Bacillus subtilis* on Growth of *Bacillus cereus* During the Fermentation of *Chungkukjang*

3. Technique consulting

A. Date : 09.08.05, Company : Korea Macggurm

Contents : Management of *Chungkukjang* fermentation strains, container and temperature

B. Date : 09.08.06, Company : Gobang Food

Contents : Management of *Chungkukjang* fermentation strains, container and temperature

C. Date : 09.08.06, Company : Jangmaul

Contents : Management of *Chungkukjang* fermentation strains, container and temperature

D. Date : 09.08.06, Company : Changnyeong Food

Contents : Management of *Chungkukjang* fermentation strains, container and temperature

E. Date : 09.08.07, Company : Samsang Food

Contents : Management of *Chungkukjang* fermentation strains, container and temperature

F. Date : 09.08.07, Company : Sangju Food

Contents : Management of *Chungkukjang* fermentation strains, container and temperature

4.. Public relations

A. 'Development and globalization of *Chungkukjang* starter'. FNBNEWS. 2011.3.28.

B. 'Development of *Chungkukjang* starter for Korean traditional taste ', KOREA AgraFood, 2011.04.11

D. Industrial development of *Chungkukjang* starter, KBS News, 2011.04.20

Paragraph 2. Achievement Application Plan

1. **Manufacturing technology security** for lower than *Bacillus cereus* standard defined in Korean Food Standards Codex.
2. Various **fermentation food product development indexes** fitting consumer tastes.
3. Technology transfer of the development technology to fermentation food manufactures for the **application to safe product manufacturing**.
4. Technology transfer to the industry of the found microorganisms and the developed technology after the patent application process.
5. **Import replacement and starter export effect** of the *Natto* starters currently dependent to imports.

6. **Soy bean consumption promotion** through new consumption creation through *Chungkukjang*'s new recognition.
7. **Consumer health protection** by safety security of *Chungkukjang*.
8. Data provision for **promotion for superiority** of Korean traditional fermentation food.
9. An example of high quality development of *Chungkukjang* and other fermentation food products.
10. Exceeding achievement of the research performance and result materials by grasp of the research flow between detail tasks.
11. The confirmation of the functionality of *Chungkukjang* products, which has been produced and consumed without a scientific verification, makes consumers to consume with confidence resulting the promotion of *Chungkukjang* products as well as contribution to people's health improvement.
12. Farmers' income increase through traditional fermentation food industry visualization.
13. The cornerstone for the glottalization of Korean traditional fermentation foods.
14. The increase of the citizens' interest and knowledge on the highly value-added health foods based on *Chungkukjang*.
15. Security of the dominant position resulted by publication of the research results on expert SCI level journals and the early copyright establishment.

CONTENTS

제출문	1
SUMMARY (Korean)	2
SUMMARY (English)	13
CONTENTS	26
Chapter 1. Summary of project	30
Section 1. Purpose	30
Section 2. Necessity	31
Section 3. Objective and contents	35
Chapter 2. Status of technical development inside and outside of nation 	37
Chapter 3. Results and discussion of project	43
Section 1. Product Quality Standardization Research for Korean <i>Chungkukjang</i>	43
1. Introduction	43
2. Materials and method	44
3. Investigation of quality properties of <i>Chungkukjang</i>	49
4. Isolation of superlative fermentation strains from <i>Chungkukjang</i> ..	58
Section 2. Separation and Application Technology Development of Superb Strains for <i>Chungkukjang</i> Fermentation	69
1. Introduction	69
2. Materials and method	69
3. Characteristic of culture media of selected strains for <i>Chungkukjang</i> fermentation	72
4. Quality properties of <i>Chungkukjang</i> fermented by selected strains	

for <i>Chungkukjang</i> fermentation	73
5. Selection of superlative strains for <i>Chungkukjang</i> fermentation	84
6. Quality properties of <i>Chungkukjang</i> fermented by superlative strains and patent strains	85
Section 3. Korean <i>Chungkukjang</i> Quality Standardization using the	
Superb starters	91
1. Introduction	91
2. Materials and method	92
3. Development of long-term storage method	97
4. Changes of biogenic amine during fermentation	102
5. Inhibitory effect of mixed-culture on growth of <i>Bacillus cereus</i>	103
6. Substantiation of <i>Chungkukjang</i> fermentation	110
7. Construction of supply system of starter for <i>Chungkukjang</i> fermentation	111
Section 4. Separation and Storage Technology Development of	
Superb Strains for <i>Chungkukjang</i> Fermentation	118
1. Introduction	118
2. Materials and method	118
3. Maintenance of the characteristic of starter	122
4. Supplement of starter and development of its instruction manual	133
5. Establishment of systematic sensory evaluation for <i>Chungkukjang</i>	201
Chapter 4. The degree of accomplishment of the research	208
Chapter 5. Plan for the application of the result	212
Chapter 6. Information of scientific technique from abroad	217
Chapter 7. References	221

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	13
CONTENTS	26
제 1장 연구개발과제의 개요	30
제 1절 연구개발의 목적	30
제 2절 연구개발의 필요성	31
제 3절 연구개발의 목표 및 내용	35
제 2장 국내·외 기술개발 현황	37
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	43
제 1절 한국 청국장 품질 표준화 연구	43
1. 서론	43
2. 재료 및 방법	44
3. 한국 청국장의 품질특성 조사	49
4. 청국장 제품 유래 대두 발효용 우수 균주 분리	58
제 2절 청국장 발효용 우수 균주의 분리 및 실용화 기술 개발	69
1. 서론	69
2. 재료 및 방법	69
3. 선발된 청국장 발효용 우수균주의 특성	72
4. 선발된 균주를 이용한 청국장의 품질특성 조사	73
5. 청국장 발효용 후보균주 선발	84
6. 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 품질특성 조사	85

제 3절 우수 종균을 이용한 국내 청국장 품질 표준화 연구	91
1. 서론	91
2. 재료 및 방법	92
3. 종균 제품의 안정성 확보를 위한 장기 저장 기술 개발	97
4. 발효 중 바이오제닉 아민 생산량 조사	102
5. 혼합 배양에 의한 발효 중 <i>Bacillus cereus</i> 의 생육 저해 효과	103
6. 고품질 청국장 대량 생산 실증 실험	110
7. 청국장 종균 제품의 보급 시스템 구축 및 산업화 기반 조성	111
제 4절 청국장 우수 균주의 분리 및 보관 기술 개발	118
1. 서론	118
2. 재료 및 방법	118
3. 종균의 우수 특성 유지 및 제품화	122
4. 장기 저장형 종균 보급 및 사용 메뉴얼 개발	136
5. 청국장의 체계적인 관능평가 방법 확립	201
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	208
제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	212
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	217
제 7장 참고문헌	221

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

청국장은 미생물을 이용하여 발효시키는 한국 고유의 콩 발효식품으로 다른 장류에 비해 발효기간이 2~3일 정도로 매우 짧고 식염함량이 매우 낮은 전통장류이다. 관능적인 면에서도 우리 국민들이 선호하는 식품으로 영양도 풍부하며, 최근에는 혈전용해능, 면역기능 강화, 항산화 효과, 생리효과 등에 관한 기능성이 매우 우수한 것으로 알려지고 있어 그 소비량이 다시 증가하는 추세에 있다. 발효과정 중에 고초균이 생산하는 효소류에 의해 원료콩의 당질과 단백질 등이 분해되어 독특한 풍미는 물론 levan form fructan과 polyglutamate의 혼합물질인 점질물이 다량 생성된다. 청국장으로부터 혈전용해 활성이 우수한 균주를 분리하여 향후 의약품 또는 식품 첨가물의 기초 원료로 이용하려는 시도도 활발히 진행되고 있다. 산업체의 대량생산 공정에서는 산업적 표준화의 편이성과 청국장 특유의 냄새를 감소시킬 목적으로 일본의 *Natto* 발효 균주인 *B. subtilis natto*를 starter로 사용하는 경우가 많으며 보존이나 관능향상의 목적으로 소량의 소금, 마늘, 고춧가루, 주정, 보존료 등을 첨가하기도 한다. 그러나 청국장에는 제품의 조리특성상 3~5% 이상의 소금을 첨가하기 힘들고 수분도 50% 내외로 높기 때문에 염에 의한 삼투압 및 수분활성도의 조절로 부패미생물의 생육을 억제하는 다른 장류제품과는 달리 상품으로서의 보존 및 유통이 어려운 문제점이 있다. 현재 우리나라의 청국장의 경우 야생균주를 사용하여 경험에 의존해 제조되고 있어 잡균오염이 심하고 품질관리가 잘 되지 않는 단점이 있다. 청국장 제품을 균일하게 생산하기 위해서는 제조현장에서 쉽게 사용할 수 있는 우수한 종균 개발이 절실히 필요한 상황이다. 그러나 *B. subtilis* 균주를 반복적으로 계대배양 하게 되면 각종 효소 활성이 감소하여 청국장의 품질이 저하되게 된다.

청국장에 대한 소비자 반응은, 몸에 좋다는 것은 들어서 알지만 손이 가지 않는다는 것이다. 그 이유는 향과 맛이 불균일하고 열악한 환경에서 제조하여 위생적이지 못한 제품이라, 끓여서 찌개로 소비된다는 인식 때문이다. 자연발효식품이라 대규모 시설을 갖추어도 대량생산이 어렵고 시장성도 크지 않다. 그러므로 우수 종균의 특성을 유지시키는 방법 개발로 국내 청국장 제조 기업체의 안정적이고 지속적인 고품질 및 안전한 제품을 제조하여 청국장의 안전성과 관련된 유해 미생물·유해물질 저감화 기술 개발을 통한 안전성 확보가 요구된다. 이에 본 연구에서는 국내 시판되고 있는 청국장 제품으로부터 청국장균을 분리하고 생화학적 성상과 기능적 특성을 조사하여 후보균주를 선발, 선발균주의 특성을 유지할 수 있는 기술을 개발하고 제조현장에서 간편하게 사용할 수 있는 청국장 종균제품을 생산·보급함으로써 고품질 청국장의 대

량생산시스템 구축에 필요한 HACCP 시스템의 제한요소였던 발효공정의 과학적 가능성을 제시하고자 한다. 또한 우수 종균을 이용한 유해균의 성장 억제 및 부적합 제품 폐기량의 최소화로 장류 제조업체의 리스크를 최소화할 수 있고, 간편한 형태의 청국장 종균 저장·유통 방법으로 연중 균일한 제품의 생산과 소비자 맞춤형 청국장 제조를 통해 청국장 시장의 활성화 및 수출 기대효과가 있다. 청국장 제품 및 종균의 수출을 위한 보급시스템 구축과 청국장 종균의 세계화를 위해서 서구인들에게 거부감을 일으킬 수 있는 불쾌취를 최소화하면서 기능성이 뛰어난 제품을 생산하여 청국장 시장이 구축될 수 있는 지역에서 식품박람회 등을 통하여 제품의 우수성을 홍보하고 시식회 등을 시행함으로써 소비자들에게 제품을 알려야 한다. 나아가 우리 청국장 제품의 우수성과 기능성을 먼저 홍보하고 시장이 구축되면 다양하게 개발된 종균을 바탕으로 기존 시장이 형성된 낫토 시장과 차별화하여 다양한 맛과 향, 기능성을 가미한 소비자의 기호에 맞는 다양한 제품개발로 시장 규모를 확대할 수 있을 것이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

(1) 종균 보급시스템 구축

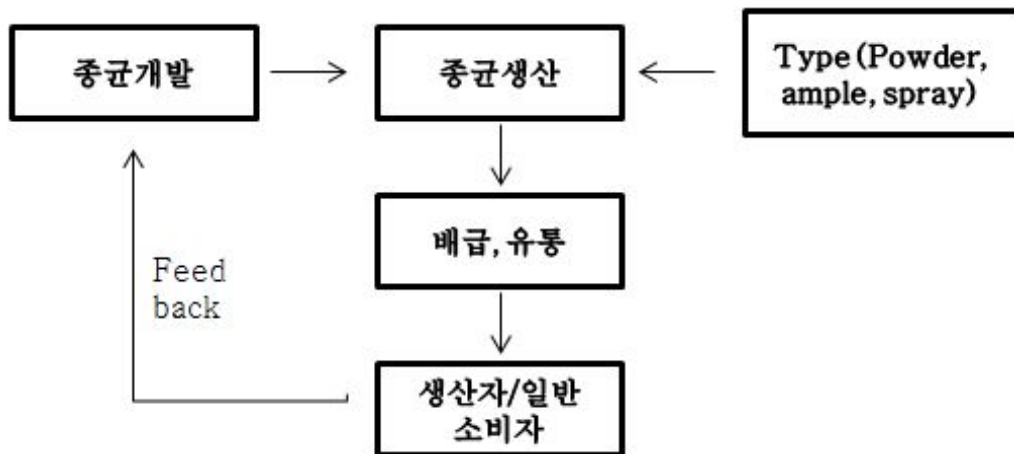
(가) 청국장 시장현황

- ① 우리나라 장류 시장은 2009년도 총 1조원 규모로 추정되며 06년 ‘Health’의 세계건강 6대 식품에 포함되어 있는 콩, 김치 등의 발효식품은 그 기능성과 우수성이 입증되어 있으며, 최근 장류의 항암효과, 된장의 면역증강물질 그리고 청국장의 혈전용해 활성 등과 같은 장류의 건강기능성이 밝혀져 소비자들의 관심이 높아지고 있다.
- ② 대두식품은 영양학적으로 단백질 및 지방을 다량 함유한 우수한 식품으로 이용되어 왔으며, 최근에 들어서는 대두 중의 생리활성 물질인 isoflavone, dietary fiber, oligosaccharide, phytic acid, protease inhibitor, saponin, sterol , phenol compounds 의 기능성이 알려지며 더욱 각광을 받고 있다.
- ③ 대표적인 대두 발효식품에는 우리나라의 청국장, 된장, 간장, 일본의 Natto, Miso, Shoyou, 인도네시아의 Tempe 등이 널리 알려져 있다.
- ③ 근래 청국장 특허출원의 건수를 보면, 2000년부터 2006년까지 7년간 총 288건이 출원되었는데, 2004년 79건, 2005년 67건 그리고 2006년 84건이 출원되어 최근 3년간 출원 건수가 근래

7년간 출원 건수의 대략 80%를 차지하고 있어 청국장 관련 출원이 최근 들어 급격히 증가하고 있음을 알 수 있다. 7년간 청국장 관련 특허출원 288건 중 개인 출원이 233건, 중소기업 출원이 43건 그리고 연구기관에 의한 출원이 12건이다. 이는 청국장 관련 기술의 개발이 주로 개인적 수준에서 많이 이루어지고 있을 뿐 기업 또는 연구기관 수준에서는 아직 청국장 관련 기술에 대한 관심이 낮음을 나타내고 있는 것으로서, 우수한 전통식품인 청국장에 대한 조직적이고 심화된 기술개발이 아쉬운 실정이다.

- ④ 장류시장 중에서 청국장 업계는 450여개가 되며 생산현황은 약 7,000톤 출하시장은 약 6,000톤으로 전체 장류시장의 3%에 불과하며 제품의 안전성, 기능성, 표준화, 유통구조 개선 등과 같은 대외적인 환경변화에 대한 대응이 미흡하여 성장세가 둔화되고 있는 실정이다.
- ⑤ 따라서 이러한 환경변화에 대한 영향을 최소화시키고 유통구조를 개선하여 국내 발효 식품의 안전성을 도모하는 한편, 연중 균일한 제품을 생산 할 수 있는 제품의 생산이 절실한 상황임.

(나) 종균 보급 및 유통 가능성



- ① 종균을 보급함에 있어 유통을 위한 보급시스템을 구축하여 개발된 종균에 의한 청국장의 제품화로 청국장 품질의 혁신을 이루고자 하며 아울러 종균 사용법 및 생산관리 등 제조 매뉴얼도 개발하고자 함
- ② 종균 개념 도입 및 자체 종균 개발
본 연구에 의해 개발된 종균 이외에 청국장 업체에서 사용되고 있는 종균을 분리, 동정하여 그 종균을 제조, 보관, 유통 할 수 있는 시스템의 개발도 청국장 업체에서 요구하고 있음.
- ③ 앰플 및 파우더 형태의 종균 저장방법 개발로 우량 종균을 체계적으로 보급하여 국내 청국장 제품 생산의 과학적인 제조와 연중 균일한 제품을 생산하는 것이 필요함

④ 따라서 개발된 종균을 사용해 본 후 맛, 향, 컬러 대한 장단점을 감안하여 각 업체에 적용 될 수 있는 부분을 검토하고 종균사용에 대한 당위성, 필요성을 이해시키고 적용토록 유도

(2) *Bacillus cereus*에 의한 오염 억제

*B. cereus*가 성장함에 따라 쓴맛이 생겨 제품의 품질을 현저히 저하시키므로 장류식품에서 검출 기준을 도입하여 관리를 실시할 필요가 있다. *B. cereus*의 포자는 5-6 log spores/g의 범위에서 일반적인 감염 수치이며, 과거부터 *B. cereus*의 포자를 비활성화 시키기 위한 여러 가지 방법이 연구되어 오고 있다. 따라서 *B. subtilis*를 이용하여 국내 장류 제품 제조 시 발견되고 있는 *B. cereus*의 효과적인 억제방법을 탐색하여 국내 장류제품의 품질향상을 도모할 필요가 있다.

(3) 우량균주 보존을 위한 활성 회복 기술 필요

우리나라의 대표적인 무식염 건강식품인 청국장이 아직도 세계화 되지 못하고 있는 원인은 야생균주를 사용하여 경험에 의존해서 제조되고 그로인해 잡균오염이 심하고 품질관리가 불가능하기 때문이다. 균일한 맛, 향 및 색상을 가진 청국장 제품을 생산하기 위해서는 전통적 방식에서 탈피하여 환경개선, 설비자동화, 기술교육은 물론 종균의 개발 및 사용, 유지기술이 절실히 필요한 상황이다. 청국장 발효에 주된 역할을 하는 *B. subtilis* 균주를 반복해서 계대배양 하게 되면 각종 효소 활성 및 대사산물 생산능이 점진적으로 감소되는 변이체가 고빈도로 출현해서 청국장 품질이 저하되는 것이 문제점으로 지적되고 있다. 균일한 품질의 청국장을 안정적으로 생산하기 위해서 우수한 특성을 가진 균주를 많이 확보하여 유전자원으로 보존하는 일도 중요하지만 균주 특성을 개량하여 우수균주의 활성을 유지시킬 수 있는 기술을 개발하는 것이 효율적인 유전자원 보호측면에서 더욱 절실히 요구되고 있다. 열악한 환경조건에서 아포 형태로 생명만 유지하고 다시 환경여건이 좋아지면 발육·증식·분열하는 청국장 발효 미생물의 활성회복을 조사하기 위해 영양원을 대상으로 경쟁상태가 되도록 *Micrococcus luteus*와의 혼합배양을 통해 청국장 제조 종균의 활성을 회복시켜 고품질의 청국장 제조법을 확립하고자 하였다.

(4) 청국장 종균의 효율적 유통

액체 배지에 증균배양하여 제조된 영양세포형태의 종균은 보관시간이 길어지면 산소부족, 영양분 고갈, 바이러스 즉 박테리오파지 증식 그리고 배양 시 생성된 물질에 따른 농도차 등에 의해 균주의 활성이 크게 떨어지고 변이를 일으킬 수 있으므로 장기간 보존·유통이 가능한 아포(포자) 형태의 종균이 필요하다. 효율적인 청국장 제조를 기대하려면 혈전용해효소활성, 점질물 생성능, 단백질 분해능 등의 일반적인 균주의 활성이 변이되지 않고 장기간 보관 가능할 뿐만 아니라 잡균의 오염을 최소화할 수 있는 아포형 제품을 개발함으로써 산업적으로 간편하고 유용하게 사용할 수 있는 종균 제품 보급이 우선되어야 한다.

나 . 경제·산업적 측면

우수 종균을 이용한 청국장 종균의 개발로 다음과 같은 효과가 기대된다.

- (1) 청국장 제품의 향이나 맛이 일정하게 생산할 수 있어 기존 불균일한 제품에 대한 소비자의 불만이 해소되어 청국장 소재 관련 종사자들의 소득증대 및 생산지역의 경제를 활성화 시킬 수 있다.
- (2) 우수 종균과 공정 관리 기술의 보급으로 장류조합의 기능을 활성화하고 현재 회원사에 공급할 수 있는 유통망을 구축함으로써 국내 청국장 산업의 혁신적 성장을 기대할 수 있다.
- (3) 대두 발효 식품의 선진화된 가공 관련 기술을 바탕으로 종균 수출국 대열에 합류할 수 있다.
- (4) 고품질의 생청국장 및 종균 수출로 우리 식품 문화의 우수한 이미지를 부각시킬 수 있다.
- (5) 장류 제품의 수출 증가에 따른 국제 경쟁력을 강화시킬 수 있다.
- (6) 청국장 발효 중 유발될 수 있는 오염 및 발효 실패 등의 리스크를 최소화함으로써 장류 산업계의 안전적 제품 생산을 기대할 수 있다.

제 3절 연구개발의 목표 및 내용

본 연구에서는 우수한 발효용 종균을 분리·동정하고 균주별 특성을 조사하여 기능성이 우수하며 소비자 기호에 맞는 균주를 선발하고 이 균주를 활용하여 품질이 균일한 청국장을 제조하고자 한다.

따라서 1) 청국장(시료 102건)에서 종균들을 분리(분리균주 523종)한다. 2) 분리한 청국장 종균의 품질 특성을 조사하고 동정하며 신 균주를 확보(1차 선발 45건)한다. 3) 확보한 균주들을 소비자 기호에 맞게 세분화(2차 선발 5종, 특히 및 기탁 균주 4종 추가)하고 최종 균주(*Bacillus subtilis* P-L2)를 선발한다. 4) 산업적 활용을 위하여 청국장 제조업체의 우수 종균(Starter)의 제조법을 확립하고 시제품을 생산한다. 5) 종균의 활성 복원 기술 및 장기저장 기술을 개발·확립한다. 6) 청국장 발효용 종균 보급을 위한 크러스트 구축을 도모한다. 이러한 청국장 균주분리 및 분석, 종균의 저장 기술 개발 및 종균보급에는 연구 참여자의 전문성에 바탕을 두어 역할을 분담하여 효율적으로 연구를 수행할 것이다.

○ 본 연구의 선행 연구 결과로 초기 종균의 수(10^4 or 10^6 CFU/mL)를 달리하여 발효시간에 따른 생균수, 총질소 및 아미노태 질소 함량 분석을 통해 우수 종균의 분리 및 이를 이용한 청국장을 제조하였다. 또한 청국장 종균의 아포생성 기술을 개발하여 선행 연구 결과를 바탕으로 최적 발효시간과 초기 종균수를 확립하여 이를 제품화 시킬 것이다.

○ 소비자가 직접 제조 할 경우 소비자가 기호에 맞는 특정 청국장 종균을 사용하여 균일한 품질의 맛과 향을 가질 수 있도록 종균에 대한 정보 체계적인 메뉴얼을 제공해야 할 것임. 또한 *Bacillus cereus*, 곰팡이류 등 유해 균으로부터 근본적인 차단 시스템을 구축하여 안전성과 이미 이취를 차단하고 장기간 보관 및 유통되는 경우에는 동결 건조 방식으로 소포장을 하며 대량으로 청국장을 제조하는 업체는 사용량에 따라 제품화 할 것이다.

- 현재 시판중인 파우더 타입의 청국장 종균의 포장 및 단가의 보완점을 모색한다

○ 소비자나 청국장 제조업체는 제조 공정이 체계적으로 이루어지지 못해 연중 균일한 제품을 생산 할 수 없어 종균 사용의 장점을 100% 활용하기 힘들다. 따라서 본 개발 종균제품이 가장 우수한 청국장 제품을 생산 할 수 있도록 체계화된 메뉴얼을 제공 할 것임.

- 최근 젊은 세대층의 경우 청국장의 기능성에 관심은 많으나 특유의 강한 냄새로 거부감을 가지므로 청국장의 냄새를 최소화한 종균을 사용하고 발효 시간을 조절하여 냄새를 최소화한 청국장을 제조 할 것임. 그러나 노년층의 경우 청국장의 냄새를 오히려 즐기는 경향이 있으므로 적당한 청국장 냄새를 가지며 기능성이 우수한 맞춤형 청국장을 제조 할 것임
- 분리, 동정된 종균을 소비자에게 안정적이고 지속적으로 공급하기 위해 동결건조 기술을 이용하여 장기간 보관. 소비자에게 공급되는 종균 제품의 경우 파우더 타입으로 소포장으로 제품화함으로써 유통기한을 설정하고 청국장의 대량 생산이 필요한 업체에는 액상형의 앰플 타입으로 생산량에 따라 다양한 용량으로 제품화하여 공급함으로써 보다 효율적인 종균의 보급이 가능할 것임.

이러한 목표를 달성하기 위해서 다음과 같은 연구를 수행할 것이다.

- (1) 국내 시판 청국장 제품의 수집 및 크리스트화
- (2) 최적 발효를 위한 발효 종균의 선발
- (3) 우수 종균의 수집, 분리, 개발, 보유 및 보급
- (4) 균주들의 세분화 및 특성 유지 방법 개발
- (5) 우수 종균의 보급을 위한 크리스트를 구축
- (6) 우수 종균의 실용화 기술 구축
- (7) 우수 종균의 저장 및 유통 기술 개발
- (8) 청국장 종균의 저장 및 상품성을 위한 제형개발
- (9) 제품화된 종균을 이용한 청국장제조를 위한 메뉴얼 확립
- (10) 우수 종균의 보급을 위한 크리스트를 구축
- (11) 식품공전에 규정되어 있는 *Bacillus cereus*의 생육저해 생산기술 확보
- (12) 품질 표준화된 청국장 종균의 대량생산 시험

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

우리나라에서 전통 청국장에 관해서 수행된 연구로는 발효과정 중 성분변화, 균주를 달리한 제조방법, 유지성분, 향기성분, 물성변화, 점질물 생산 등이 보고되었으나 전통 청국장 전반에 관한 연구는 아직도 미미한 실정이다. 최근 많은 연구자들에 의해서 밝혀지고 있는 청국장의 생리활성 효과로 청국장이 콩으로부터 유래된 isoflavons, phytic acid, saponin, trypsin inhibitor, tocopherol, 불포화지방산, 식이섬유, 올리고당 등의 각종 생리활성 물질과 항산화물질 및 혈전용해 효소를 다량 함유하고 있는 기능성 식품으로서 그 중요성이 재조명되고 있다 [1-3].

한편, 일본에서는 우리나라의 전통 청국장과 유사한 낫토로부터 발효과정 중에 생성된 점질물 중에서 혈전 중에 약리효과가 탁월한 nattokinase를 확인, 분리, 정제하여 치료약으로 개발함으로써 낫토에 대한 새로운 인식과 함께 현재 많은 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다[4,5]. 일본의 낫토가 기능성 식품으로서의 가치를 인정받으면서 낫토 산업이 10배 이상 성장했는데, 낫토는 임상실험 등의 결과가 축적되어 있고 다양한 연구도 진행되고 있어 우리나라와는 대조를 보이고 있다. 이에 청국장에 대한 연구 활성화와 종균 및 다양한 제품개발 등이 필요한 시점이다. 인도네시아를 비롯한 동남아시아에서는 땅콩박 단백질을 *Neurospora sitophila*로 발효시킨 후, 기름에 튀겨 분말화한 온썸(Ontjom), 대두에 거미줄 곰팡이(*Rhizopus sp.*)를 접종발효한 후, 기름에 튀긴 템페(Tempeh kedelele)를 즐겨 먹는다. 템페는 인도네시아 국민들이 상식하는 대두발효식품으로 *Rhizopus oligosporus*를 접종하여 30℃에서 발효시키지만 *Bacillus brevis*, *B. pumilus*를 약 10⁸ CFU/g, *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus casei*, *Enterobacter cloacae* 및 *Klebsiella pneumoniae* 등의 세균을 10⁶~10⁷ CFU/g 소장하였다. 대두를 발효시켜 제조하는 식품은 이외에도 중국의 Sufu(fu-ju 또는 tou-fu-ju), 대두 curd를 *Mucor sufu*, *Mucor hiemalis*, *M. silvaticus* 등의 *Mucor sp.*에 의해 발효시킨 제품 등이 있다.

청국장 발효는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* 및 *Bacillus megaterium*과 같은 *Bacillus* 속의 균주를 단독 또는 두 균주를 혼합하여 사용한 예가 보고되고 있다[6]. 청국장은 다양한 생리활성이 있는 우수한 발효 식품임에도 불구하고 발효과정 중에 발생하는 암모니아에 기인한 특유의 냄새로 말미암아 청소년층과 외국인이 기피하고 있는 실정이다. 이러한 문제점을 해결하고 세계적인 전통 발효 식품으로서의 자리매김을 하기 위해서는 특정 균주를 이용한 발효과정 중 청국장 고유의 냄새를 줄이는 방법과 아울러 정장의 효과가 있는 생리활성이 우수한 균주를 이용한 균일한 품질의 청국장 제조기법의 확립이 시급한 실정이다. 또한 청국장

은 조리 시에 발생하는 특유의 이취로 말미암아 소비자의 선택에 제한적인 요인으로 작용하기 때문에 개선을 위한 연구가 이루어져 왔다. 이러한 연구로서 주 등은 청국장 제조 시 동결 처리된 콩과 쭈 추출물을 이용하여 풍미를 향상시켰으며[7], 유는 쭈의 물 추출물이 적은 농도로 첨가될 때 청국장의 관능적 특성이 향상되었고, 쭈의 에탄올 추출물보다 물 추출물의 첨가가 청국장의 냄새성분 변화에 더 큰 영향을 준다고 보고하였다[8,9]. 그리고 청국장 발효미생물 개발 및 키워와 무, 알로에, 상황버섯 추출물[10], 양파추출물[11], 홍삼첨가 방법에 따른 청국장의 품질특성[12] 등 천연 식품 첨가물을 이용한 연구가 수행되어 문제해결을 위한 가능성을 제시한 바 있다.

백 등의 연구[13]에서 기존 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. Kn-10과 볏짚에서 분리한 *Bacillus* sp. B-59로 청국장을 제조하고 그 청국장의 품질 특성을 비교한 결과 *Bacillus* sp. B-59는 *Bacillus* sp. Kn-10보다 protease활성이 우수하였고 *Bacillus* sp. B-59는 발효기간 동안 DPPH 소거능이 증가하였다. *Bacillus* sp. B-59는 청국장의 색, 맛, 조직감, 종합적 기호도에서도 가장 양호하였다. 그리고 황 등의 보고[14]에서 *Bacillus* sp. SC-1와 SC-2균주는 SC-5와 SC-20번 균주에 비해 높은 아미노태 질소 함량이 높은 것으로 측정되었고 이취에 영향을 미치는 암모니아태 질소는 *Bacillus* sp. SC-1, *Bacillus* sp. SC-3, SC-20이 SC-5 균주에 의해 제조된 청국장에 비해 높았다. 또한 인 등의 연구[15]에서는 *Bacillus subtilis* p01 균주를 이용하여 제조한 청국장은 숙성 기간 동안 아미노태 질소 함량이 증가하였고 암모니아태 질소의 양은 숙성기간 동안 증가한 후 숙성 6일 이후 급격히 감소하였다. 그리고 amylase 활성은 숙성 12일까지 증가를 보이다가 그 후 다소 감소하였고 protease 활성은 숙성 9일 최고 높은 효소활성을 보였으며, 그 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었다.

청국장의 불쾌취는 여러 휘발성 물질에 기인하겠지만 주된 발생원인물질로는 청국장 발효과정 중 생성된 암모니아 성분에 기인한다. 암모니아 생성 시점은 다음과 같이 *B. subtilis*가 탄소와 에너지 급원으로서 아미노산을 이용한 결과이며, 암모니아 생성억제는 *B. subtilis*의 발육과 대사를 가능한 제한시킴으로서 가능하고 이를 위해서는 방향물질 생성, 단백질 가수분해 효소작용을 발효 종료 시까지 유지시키는 것이 바람직하다고 보고되었다[16,17].

종균을 사용하지 않고 청국장을 제조할 때에는 다수의 *Bacillus*속 균들이 생육할 수 있다. 청국장에서 분리한 *Bacillus licheniformis* CK 11-4 균주가 생산하는 alkaline thermophilic serine protease는 novel 효소로서 in vitro 실험에서 청국장에는 항돌연변이성이 있음도 확인되어 있다[18].

우리나라가 종균개발을 간과한 채 재래식으로만 장류를 생산할 때 일본은 황국균을 배양할 수 있는 종균을 개발, 우리보다 빠른 시간에 안전한 장류를 대량 생산할 수 있는 시스템을 갖추고 있다. 이로 인해 해외시장에서 일본의 미소된장, 낫토 등이 명성을 쌓아가고 있을 뿐만

아니라 우리 장류업체도 대부분 이 일본 종균을 수입해 쓰고 있는 현실이 되어 버렸다. 일본이 주로 생산하는 방식인 황국균 배양은 자칫 우리 고유의 맛을 잃게 할 수 있기 때문에 종균개발이 필요한 시점이라 할 수 있다.

중국에서 생산되는 장류는 대부분 국내 소비를 목표로 생산되고 있고 그 양이 매년 증가하고 있으나 사정은 우리나라와 다르지 않다. 다만 국내로 운송되는 과정 중에 맛이 나쁘게 숙성되는 문제가 있어 종균개발이 요구되고 있다.

장류의 종균개발에서, 아직 본 연구개발제품과 같이 상업적으로 유통시킬 목적으로 분말제제화된 제품은 없지만 현재 2개 김치제조업체 종가집과 베지퀸에서 자체 김치종균을 개발하여 사용하고 있다. 이들은 모두 *Leuconostoc mesenteroides* 단일균만을 종균으로 분리하여 자기 업소에서 필요한 경우에 직접 배양하여 사용하고 있고 고추장의 경우는 없다.

현재는 김치 발효업자가 자사의 김치제품의 품질을 조절할 목적으로 종균을 개발하여 자사에서만 생산하여 이용하고 있지만 앞으로 본 연구개발의 결과로 청국장 종균이 상업화되어 사업의 규모가 커지면 종균제품의 생산, 판매만을 목적으로 후속 종균제품을 개발하는 전문업자가 나타날 가능성도 있다. 본 연구에서 개발한 종균제품을 사업화하는 경우 가장 우려되는 부분이 이점이다.

장류의 시장규모는 2000년을 기준으로 약 4,500억원이며 제조업체는 150여개 업체에 달하는데, 이 중 전통식으로 장류를 생산하는 업체는 40여개로 추정된다. 전통식으로 제조되는 장류 생산량은 전체 장류의 약 7%에 달하는 것으로 추정되어 장류시장의 틈새시장임을 보여주고 있다. 전통장류는 주로 농협 등 생산자 단체나 영농 조합법인이 생산하고 있으며 국내산 원료를 사용하기 때문에 이들 제조업체의 수익성은 농가 소득과 밀접한 관련을 지닌다. 그 동안 김치를 비롯한 우리 전통음식이 국제화 추세로 인해 세계적으로 많이 알려져 왔는데, 최근에는 고추장 등 장류의 수출이 증가하는 경향을 보이고 있다. 최근 3년 장류 수출금액은 1,400~1,500만\$ 수준으로 1990년대 접어들어 증가하는 추세이다. 이 중에 전통장류의 수출비중은 4%로 매우 미미한데 이들 생산업체들은 개별적으로 수출에 많은 관심을 갖고 있지만 수출시장에 대한 정보가 부족하고 수출한 경험이 없어서 마케팅 전략수립에 어려움을 지니고 있다.

최근 우리 전통음식의 보급이 확산되고 장류의 항암효과가 알려지면서 일본 등지에서 한국 장류에 대한 관심이 높아지고 있다. 일본에 대한 장류 수출은 현재 약 150만\$ 정도인데 한국 음식에 대한 선호도가 높아지고 있어 김치 다음으로 수출 잠재력이 큰 것으로 평가되고 있다. 장류 수출을 전망하고 소비자 지향적인 마케팅을 위해서는 수입국의 시장여건 및 소비자의 기호 분석 등 사전에 해당국에 대한 철저한 시장조사가 필요하다. 또한 전통장류는 국산 농산물을 재료로 사용하고 고유의 전통방식으로 제조되기 때문에 일반가공품과 가격차가 크며 소량 생산되는 특성이 있어 상품개발, 판매촉진, 유통, 가격 등에 있어서 차별적인 전략수립이 필요하

다.

2001년 장류 수출량은 약 10천톤으로 1993~2001년간 연평균 11.6%씩 증가하여 왔다. 수출금액 기준으로 2001년 장류 수출액은 14백만\$로 5천억 장류시장의 약 4%를 차지하는 규모인 것으로 추정된다. 장류 수출품의 대부분은 개량식으로 제조된 것이며, 전통장류 수출액은 50만\$ 미만으로 전체 수출액의 4% 정도에 불과하다. 우리나라 청국장 업체수는 2007년 현재 420여개에 이르지만 이 중 5인 이하 사업장이 343개, 5~9인 48개, 10~19인 25개, 20~30인 9개 등 대부분 열악한 수준이다. 또한 우리나라 청국장 업계의 출하량은 2009년 기준 5600여톤으로 20만톤을 넘어선 일본나토에 비해 너무나 낮은 수준에 머물고 있다.

국내 장류생산업체는 소규모 가내수공업 형태로 운영되고 있는 업체가 상당수에 달하므로 현황을 정확히 파악하기는 어렵지만 2002년 현재 장류조합업체 83개소와 정부지원 장류업체 92개소 등 약 170여개에 달하며, 이중에서 약 40개 업체가 장류제품을 수출하고 있는 것으로 추정된다. 정부지원 장류업체는 전통식품개발사업체와 산지일반가공사업체, 특산단지 지원업체가 포함된다. 정부지원 장류업체 중에서 전통장류 수출업체는 16개 업체로 파악된다. 수출규모는 대단히 영세하여 수출액이 1억원 이상인 업체는 2개소에 불과하며 대부분 5천만원 이하 규모이다.

일본에 전통장류를 수출하는 업체는 정부지원 업체 중에서 4개 업체에 불과하며, 그밖에 통계상 파악되지 않지만 일본바이어를 통한 소량 수출이 있는 것으로 추정된다. 장류업체에 대한 수출지원사업은 농수산물유통공사를 통해서 수행되고 있으며, 해외시장 개척 및 수출경쟁력 제고와 관련된 직접적인 지원과 정보 제공 등 수출지원 인프라 구축과 관련된 간접적인 지원사업이 있다.

즉, 장류 수출업체에 대한 정부지원정책은 다양하게 개발되어 있음에도 불구하고 실제 지원실적은 국내산 원료 사용업체와 김치, 인삼 등 수출확대 품목에 국한되어 있어 일반장류업체나 전통장류업체에 대한 지원은 매우 적은 실정이다.

청국장 발효의 주요 균은 널리 알려진 바와 같이 *Bacillus*속 균주들이다. 이러한 *Bacillus*속 균주들은 여러 다양한 세포외(extracellular) 및 세포내 protease를 생산하는데, 여기에는 alkaline protease, neutral metalloprotease 그리고 esterase가 있으며 특히, subtilisin protease는 세제 및 여러 분야에 응용되고 있다. 또한 발효숙성 과정 중에 *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis* 등이 생산하는 효소작용에 의해 대두에 없던 성분인 효소 및 다양한 생리활성물질이 만들어지며, 콩 단백질이 분해되어 그 특유의 구수한 맛과 냄새를 내는 동시에 끈적끈적한 점질물이 생성된다.

고초균은 암모니아, 인돌 및 아민 등의 발암촉진물질의 생성을 감소시키며, 이러한 유해물질

들을 흡착하여 변과 함께 배설시키기도 한다. 그리고 병원균에 대해 항균작용을 하며, 유기산을 생성하여 장을 자극해 소화가 잘 되게 돕기도 한다.

B. subtilis 는 예전부터 식품과 함께 이용되어 오면서 안전성이 입증된 GRAS(generally recognized as safe) 미생물이고, *B. subtilis* 관련 연구에는 효소생산 및 항생제 관련 분야 등의 많은 연구가 이루어지고 있다.

지금까지 고초균 발효에 대한 연구는 주로 콩을 주원료로 하여 청국장을 제조하는 것이며, 전통방법으로 발효를 수행함으로써 잡균의 오염이 가능하며, 균일한 품질의 청국장 발효 제품을 제조하는데 어려움이 있다. 전통재래식 청국장 제조 시 볏짚에 부착된 고초균을 이용하는 경우에 청국장 제품의 품질에 차이가 있으며, 동시에 잡균에 의한 풍미의 저하 또는 점질물 등의 생리활성 물질의 생산이 저해된다. 이러한 잡균에 의한 청국장 품질의 저하를 방지하기 위해서는 청국장 발효용 종균을 사용하여야 하고, 종균의 사용으로 일정한 품질의 청국장을 위생적으로 제조할 수 있다. 또한 우리나라 전통 청국장의 품질 고급화와 표준화를 위해서는 청국장 관여 미생물 특성 및 우수균주 선별, 청국장의 발효특성구명과 최적 발효조건 확립, 이취 제거 및 소비자의 다양한 욕구에 맞는 다양한 청국장 제조 기술을 개발하는 등 새로운 형태의 청국장 제조 기술이 필요하다.

근래 청국장 관련 특허출원의 건수를 보면, 2000년부터 2006년까지 7년간 총 288건이 출원되었는데, 2004년 79건, 2005년 67건 그리고 2006년 84건이 출원되어 최근 3년간 출원 건수가 근래 7년간 출원 건수의 대략 80%를 차지하고 있어 청국장 관련 출원이 최근 들어 급격히 증가하고 있음을 알 수 있다.

청국장 관련 특허출원의 기술 유형을 보면, 증자된 대두 원료에 신규미생물 및 기능성이 알려진 물질들을 첨가하거나 발효 공정을 개선함으로써 청국장 고유의 냄새를 제거하는 한편 기능성 및 기호성을 향상시킨 청국장에 대한 특허출원이 58%를 차지하여, 일단 청국장 자체의 품질 개선에 대한 특허출원이 대부분을 이루고 있음을 알 수 있다.

일본은 종균을 개발해 판매까지 하고 있는 반면, 우리나라는 자연 미생물만을 이용하고 있고 종균 역시 낫토균을 수입해 쓰고 있다. 미생물만을 이용해 청국장을 제조할 경우 여름철엔 대장균 등 위해미생물이 들어갈 확률도 높고, 일본 낫토균 수입으로 인해 우리 청국장 산업이 일본 낫토시장에 잠식당할 수도 있다. 그래서 우리나라 종균을 통해 낫토균 수입대체효과, 유해물질 저감화 제품 개발, 전통 청국장 발효 공정의 과학화 등을 가져올 수 있도록 하기 위해 종균 개발이 필요하다.

청국장은 많은 잠재력을 가진 식품임에는 틀림없지만, 독특한 냄새와 맛 때문에 폭넓은 소비층을 형성하지 못하고 있으며, 특히 서구화, 감각화 되어가는 현대인의 특성을 따라가기가 힘

들어지고 있다. 그리고 계절적 상품으로서 소비가 계절별로 큰 격차를 보이고 있어 꾸준한 공장운영이 어려웠고, 봄과 여름에는 대체상품으로 공장을 운영해야 하는 문제점을 가지고 있기도 했다. 게다가 공장의 여건이 영세하여 자동화 시스템을 갖추지 못해 규격화된 제품생산을 못하고 있었다. 그러다 보니 운영자들의 청국장 산업에 대한 비전을 갖기가 어려워 경영능력 함양을 바라기도 힘든 상황이었다. 이러한 단점을 극복하기 위해 젊은 세대의 입맛에 맞는 다양한 청국장 소개 식품개발로 청국장의 상품가치를 높이고, 폭넓은 소비층 형성과 더불어 계절적 소비 격차를 극복해 나가야 할 것이다. 또한 표준 생산 공정 도입에 의한 품질 고급화, 규격화로 청국장의 소비를 확대해야 할 것이다. 그리고 향후 청국장의 소비 진작과 청국장 산업의 발전을 위하여 청국장의 품미개선을 위한 다양한 기법 개발과 청국장의 기능을 강화하기 위한 발효조건 규명 및 발효시스템 개발, 보존성 향상을 위한 포장기술 개발, 청국장의 대량생산을 위한 자동화 공정 확립 등의 기술개발과 제품생산시설 개선이 필요하다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 세부과제

제 1절 한국 청국장 품질 표준화 연구

1. 서론

청국장은 *Bacillus* sp.를 이용하여 발효되는 한국 고유의 콩 발효식품으로 다른 장류에 비해 발효기간이 2~3일 정도로 매우 짧은 특징이 있다[19]. 발효과정 중에 고초균이 생산하는 효소류에 의해 원료콩의 당질과 단백질등이 분해되어 독특한 풍미는 물론 유래된 levan form fructan과 polyglutamate의 혼합물질인 점질물이 다량 생성된다. 청국장은 된장이나 고추장보다 단백질과 지방함량이 높은 양질의 콩 발효식품이다[20]. 혈전용해능[21], 면역기능 강화[22], 항산화효과[23], 생리효과[19] 등 청국장의 생리활성 기능이 보고됨에 따라 기능성 식품으로 관심이 증가하고 있는 추세이며, 또한 청국장으로부터 혈전 용해 활성이 우수한 균주를 분리[24]하여 향후 의약품 또는 식품 첨가물의 기초 원료로 이용하려는 시도도 활발히 진행되고 있다.

시판청국장에 관한 연구로는 발효과정 중 성분변화[25-27], 균주를 달리한 제조방법[28-29], 발효과정 중 유지성분[30], 향기성분변화[31-34], 물성변환[35], 점질물 생산[36], 제조방법과 이용실태 연구[37] 등이 보고되었으나 우리나라 각 지역에서 생산된 시판청국장의 품질에 관한 연구는 미미한 실정이다. 청국장은 벧짚 등 자연계 미생물을 이용하여 발효시키고 위생 및 품질의 관리 문제와 고유한 불쾌취로 인해 소비층이 한정된 단점이 있을 뿐만 아니라 저장성이 낮아 보존 및 유통상 어려움이 많다. 따라서 균일하고 위생적인 청국장을 제조하기 위해서는 우수 균주의 필요성이 대두 되고 있는 실정이다.

청국장 발효의 주축이 되는 미생물[38,39]은 protease 활성이 우수하고, 유리아미노산이 원인이 되는 바이오제닉 아민(Biogenic amine, BA)의 생성에도 관여하는 것으로 추측 된다. BA의 생성은 아미노산 및 탈탄산효소활성을 가지는 미생물의 유무에 따라 결정되며, 미생물의 최적 발육조건 및 높은 탈탄산효소활성은 식품 중 BA의 생성을 증가시킨다[40]. 히스타민과 티라민 등의 BA을 섭취한 경우 정상적인 인체에서는 소장에 존재하는 mono-diamine oxidase가 무독화시키지만, 소장에 질환이 있는 경우에는 소량의 BA을 섭취하여도 인체에 유해한 증상이 나타날 수 있다고 보고되어 있다[41]. 이와 관련하여 국내외 연구에서는 BA을 생성하는 미생물을 규명하고, 미생물의 성장을 제어함으로써 BA을 저감화시킬 수 있는 방법을 연구하고 있다.

따라서 우수한 기능성을 지닌 청국장의 품질을 향상시키고, 산업화하기 위해서는 발효균주, 발효온도 및 기간 등의 제조방법을 표준화하는 것이 절실히 요망된다[42]. 이에 본 연구에서는 전국에서 시판 또는 농가 제조 판매중인 청국장을 수집하여 제품의 총질소, 아미노태 질소 함량, 질소분해율 및 티라민과 히스타민 함량을 분석하여 품질특성을 명확히 규명함으로써, 한국 청국장의 보급 및 산업화에 이용할 수 있는 기초자료를 제시하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 청국장 제품의 수집

2009년 4월부터 11월까지 한국장류협동조합 회원사, 비회원사 및 농가에서 제조하여 시판중인 청국장 제품 102건의 지역적 분포는 Fig. 1과 같다. 즉 경기도 22건, 충청도 18건, 전라도 26건, 경상도 20건, 충청도 18건, 서울 2건, 대구 3건, 대전 1건으로 내륙지방이 해안지역보다 생산이 많았다. 시료는 A ~ DF로 명명하여 연구에 사용하였다.

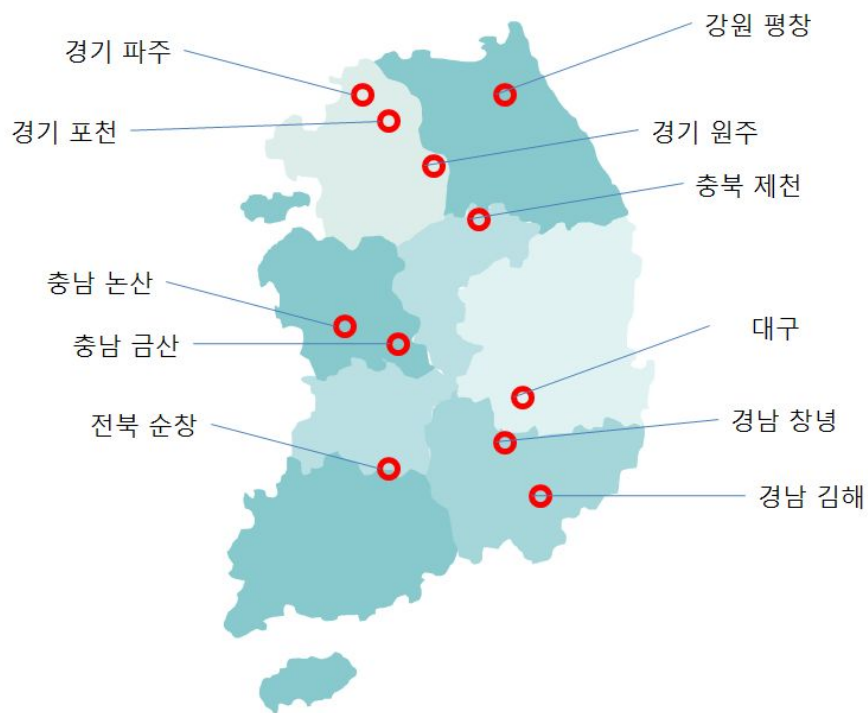


Fig 1. 수집한 청국장 제품의 지역적 분포



Fig 2. 수집된 청국장 제품 (I)



Fig. 2. 수집된 청국장 제품 (II)

나. 수분 측정

청국장 시료의 수분함량은 적외선 수분측정기(FD-600, Kett, USA)로 40분간 측정하였다.

다. 염도 측정

수집된 청국장의 염도는 분쇄한 청국장 5 g을 증류수로 균일하게 현탁하여 250 ml로 정용하고 이 중 10 ml을 취하여 2% K_2CrO_4 1 ml을 넣고 0.1 N $AgNO_3$ 로 적정하였다.

라. 총질소 측정

청국장 중의 총질소(TN : Total nitrogen) 함량 측정은 균일하게 분쇄한 시료 1 g을 취하여 Kjeldahl flask에 넣고, K_2SO_4 와 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 를 9 : 1의 비로 혼합한 촉매제 2~3 g과 conc. H_2SO_4 15ml을 넣어 2시간 동안 분해시킨 후 증류수를 첨가하여 100 ml로 정용하고 소비된 0.02 N HCl의 ml수를 총질소로 환산하였다. 증류시 사용한 시약은 NaOH - Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)용액과 2% Boric acid (H_3BO_3)용액 그리고 지시약은 Bromocresol green과 Methyl red를 에탄올에 2 : 1의 비로 섞은 혼합지시약을 사용하였다.

마. 아미노태 질소 측정

청국장의 아미노태 질소(AN : Amino type nitrogen) 함량 측정은 균일하게 분쇄한 시료 5 g을 250 ml 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 100 ml 까지 정용한다. 이 중 50 ml을 취하여 100 ml beaker에 넣은 후 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 중화한다. 여기에 중성포르말린 20 ml을 가하고 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 적정한다. 적정의 종점을 결정하기 위하여 pH meter (Orion 420A, USA)를 이용하였다.

바. 히스타민 및 티라민 측정

히스타민 및 티라민 함량은 청국장 5 g을 정확히 칭량하여 0.1 N HCl 50 ml을 가하고 균질화시킨 후 여과(Whatman, No.2) 하여 시료로 사용하였다. 또한 히스타민(Sigma, USA) 및 티라민(Sigma, USA)을 각각 0.1 g씩 0.1N HCl 100 ml에 균일하게 현탁시킨 후 표준용액으로 사용하였다. 시료 및 표준용액 각 1 ml씩 취하여 포화탄산나트륨 0.5 ml, 1% 염화단실아세톤 용액 0.8 ml을 가하여 45°C에서 1시간 환류 추출하였으며 이후 10% 프롤린 용액 0.5 ml, 에테르 5 ml을 가하여 25°C에서 10분간 진탕시킨 후 원심분리(8000 rpm)하여 상정액을 질소농축시킨 후 아세토나이트릴에 녹여 HPLC로 분석하였다. 이때 HPLC 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for histamin and tyramine content analysis

Item	Condition
Column	Capcell pak C18 UG 4.6 × 250 mm
Mobile phase	Mixture of acetonitrile and water
Detector	254 nm
Flow rate	1 ml/min
Injection volume	5 ul
Running time	40 min

사. 생균수 측정

각 청국장 1 g을 단계 희석한 후 TSA (Tryptic Soy Agar) 평판배지에 도말하여 37°C에서 18~24시간 배양시킨 후 나타난 colony를 계수하여 생균수를 측정하였다

3. 한국 청국장 품질특성 조사

가. 청국장 제품의 품질특성

수집된 청국장 제품의 품질특성 및 생균수를 조사하였다.

(1) 수집된 청국장의 수분함량 및 염도

수집된 청국장의 수분함량과 염도 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 분말상태로 시판되는 청국장의 경우 수분함량이 5.21 ~ 7.23%, 일반적인 청국장의 수분은 38.66 ~ 65.79%로 나타났다. 이는 청국장의 건조정도나 발효실의 습도, 발효온도, 발효기간 및 발효 미생물의 차이에 기인하는 것이라 사료되며, 특히 청국장에 점질물이 다량 생성되었을 경우 콩알 표면의 점질물이 수분의 증발 방지 역할을 하기 때문일 수도 있지만 국내 청국장 제품 중 수분함량 50% 이상인 제품이 75건(73.52%)이나 된다는 점으로 미루어 원료콩의 함유량이 낮은 점은 소비자의 입장을 고려하여 규격을 정할 필요가 있을 것이다. 청국장의 염도는 0.23 ~ 11.51%였으며, 특히 염도가 3% 이상인 제품은 20.58%를 차지했다. 이는 청국장의 유통 중 변질을 최소화하거나 찌개용 청국장의 조미를 위한 소금 첨가량의 차이가 있기 때문이라 생각되며, 식품 공전상 청국장 제품의 염도에 관한 별도의 규정이 없어 업체별 제조방법에 의한 차이가 현저하다. 청국장 제조 현장에서 여름철의 경우 수분 함량을 줄이고 소금을 첨가하여 유통기간을 늘리기 위해 노력하고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구용 시료도 대부분 봄부터 여름 사이에 구입하였으며 지역적 특성도 제품에 영향을 미치므로 차이가 심한 듯하다. 하지만 청국장 제품에 염도가 높을 경우 유용균주의 생육에 영향을 미치거나 섭취시 쓴맛을 유발할 수 있으므로 적절한 기준의 제시가 필요하다고 사료된다.

Table 2. 수집된 청국장의 수분함량 및 염도

(%)

Sample	Moisture	Salinity	Sample	Moisture	Salinity	Sample	Moisture	Salinity
A	61.55	1.12	AI	44.57	2.86	BQ	53.05	2.76
B	57.20	1.17	AJ	6.91	0.25	BR	45.81	0.42
C	62.09	0.96	AK	5.21	0.50	BS	51.85	0.64
D	56.77	4.11	AL	5.38	0.12	BT	57.44	2.32
E	57.10	2.74	AM	45.05	2.85	BU	55.61	0.32
F	57.02	1.47	AN	54.98	6.05	BV	58.56	2.20
G	52.45	2.16	AO	47.71	3.67	BX	60.63	2.38
H	51.55	1.39	AP	59.31	2.17	BY	40.54	0.37
I	55.57	2.57	AQ	65.70	2.48	BZ	58.06	2.03
J	55.31	1.59	AR	55.62	2.43	CA	65.60	0.35
K	54.21	2.16	AS	53.67	3.08	CB	55.47	0.21
L	54.33	2.44	AT	53.62	2.96	CC	53.62	1.67
M	59.46	1.91	AU	45.09	2.06	CD	48.81	1.58
N	54.84	5.77	AV	57.31	1.61	CE	49.28	3.70
O	53.68	4.34	AW	55.49	0.33	CF	56.79	0.39
P	54.16	1.97	AX	47.24	0.81	CG	64.07	2.90
Q	49.86	0.22	AY	58.60	0.64	CH	49.13	1.66
R	52.31	0.69	AZ	58.43	1.09	CI	61.11	1.84
S	53.70	1.26	BA	54.95	2.21	CJ	50.65	3.74
T	54.24	1.82	BB	56.81	0.42	CK	61.69	3.15
U	54.67	1.71	BC	60.30	2.41	CL	56.39	0.31
V	45.58	1.11	BD	60.53	1.85	CN	51.48	1.98
W	55.12	1.22	BE	52.37	0.21	CO	46.67	4.33
X	46.64	4.37	BF	56.93	1.77	CP	49.06	3.12
Y	53.56	2.51	BG	53.66	2.58	CQ	50.71	5.44
Z	45.20	0.23	BH	61.58	0.35	CR	45.85	0.24
AA	54.32	3.18	BI	53.11	3.85	CU	58.77	2.76
AB	51.02	4.75	BJ	52.48	0.61	CV	38.66	0.25
AC	55.26	2.34	BK	56.33	3.85	CW	7.23	11.51
AD	58.06	1.43	BL	57.84	1.48	CX	53.22	2.02
AE	49.77	3.02	BM	48.33	0.40	CZ	43.59	4.13
AF	53.56	1.99	BN	53.35	1.39	DC	49.59	1.92
AG	46.68	5.04	BO	56.58	2.47	DE	57.63	2.94
AH	50.49	0.61	BP	52.92	1.36	DF	56.88	2.21

Table 3. 수집된 청국장의 수분함량 및 염도의 분포

Ranges of Moisture(%)	Number (rate %)	Ranges of Salinity(%)	Number (rate %)
>65	2 (1.96%)	>5.0	5 (4.90%)
60~65	9 (8.82%)	4.0~4.9	6 (5.88%)
55~60	31 (30.39%)	3.0~3.9	10 (9.80%)
50~55	33 (32.35%)	2.0~2.9	28 (27.45%)
45~50	19 (18.63%)	1.0~1.9	27 (26.47%)
<45	4 (3.92%)	<1.0	26 (25.49%)
<8 (Powder type)	4 (3.92%)		
Total	102 (100%)	Total	102 (100%)

(2) 수집된 청국장의 총질소 및 아미노태 질소 함량

수집된 청국장의 총질소 및 아미노태 질소 함량을 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. 청국장의 총질소 함량은 5.82 ~ 8.76%로 나타났으며 이는 원료인 대두 성분차이 및 건조상태에 따라 다른 것으로 사료된다. 수집된 청국장의 아미노태 질소 함량은 173.71 ~ 2700.66 mg%로 나타났다. 청국장의 아미노태 질소 함량은 발효 미생물의 생육과 효소 생성조건, 보관·숙성조건 등 여러 가지 요인에 따라 차이를 보이며, 청국장의 풍미를 결정하는 주요 요소이므로 단일균주 사용 및 발효환경의 제어를 통해 연중 균일하고 우수한 품질의 제품을 제조할 수 있을 것으로 기대된다.

총질소 함량에 대한 아미노태 질소 함량의 비율이 나타내는 값은 균주에 의해 발효가 어느 정도로 진행되었는지 알 수 있는 지표가 되며, 특히 일본의 낫토는 그 비율이 10% 가량이라 알려져 있다. 본 연구에 사용된 국내에서 수집된 청국장의 총질소 함량에 대한 아미노태 질소 함량의 비율은 2.88 ~ 26.93 %로 나타나, 청국장 제조에 사용된 균주 및 균주의 효소역가에 따라 발효 정도에 상당한 차이가 있음을 알 수 있고, 이 결과는 바이오제닉 아민인 히스타민과 티라민의 함량을 추적하는 주요 근거로 활용 할 수 있을 것이다.

Table 4. 수집된 청국장의 총질소(%) 및 아미노태 질소(mg%) 함량

(Dry weight basis)

Sample	Total Nitrogen	Amino Nitrogen	Sample	Total Nitrogen	Amino Nitrogen	Sample	Total Nitrogen	Amino Nitrogen
A	9.13	729.00	AI	7.76	644.09	BQ	8.26	1382.17
B	7.27	1028.87	AJ	7.55	173.71	BR	6.48	883.19
C	8.76	1088.63	AK	7.45	356.86	BS	8.45	1785.32
D	6.50	830.32	AL	7.68	221.00	BT	7.89	1914.05
E	8.04	2054.93	AM	7.46	719.68	BU	8.13	645.41
F	7.65	2028.76	AN	6.82	1621.41	BV	7.17	433.44
G	7.38	1046.05	AO	6.27	912.37	BX	7.57	1598.71
H	6.89	626.20	AP	6.22	1396.97	BY	6.04	1401.16
I	7.02	610.80	AQ	6.85	1527.31	BZ	8.49	349.71
J	6.91	1142.90	AR	7.48	1112.78	CA	7.06	1922.07
K	6.44	1023.23	AS	7.10	1254.57	CB	8.87	762.65
L	6.44	707.64	AT	6.55	664.73	CC	6.99	608.75
M	7.03	1837.92	AU	5.88	729.46	CD	6.62	872.05
N	6.82	306.00	AV	6.61	589.41	CE	6.60	1576.10
O	6.52	574.39	AW	7.55	672.77	CF	7.17	874.59
P	6.26	1064.45	AX	6.60	1777.65	CG	7.15	665.07
Q	7.26	518.25	AY	9.95	2195.07	CH	6.51	1256.36
R	7.34	728.63	AZ	7.77	1360.43	CI	7.77	657.91
S	7.28	1189.37	BA	8.35	971.32	CJ	7.86	759.37
T	6.27	666.67	BB	7.55	1307.13	CK	8.12	443.51
U	6.97	661.08	BC	6.83	524.68	CL	6.58	440.29
V	6.98	554.65	BD	6.74	693.01	CN	7.73	1274.61
W	6.08	1254.94	BE	7.16	1440.19	CO	7.69	2700.66
X	6.45	1261.01	BF	7.31	1142.19	CP	7.75	1660.76
Y	6.46	725.23	BG	6.86	1587.14	CQ	6.65	1267.13
Z	6.11	399.13	BH	7.00	484.31	CR	6.19	1189.95
AA	7.88	608.17	BI	7.61	607.80	CU	7.18	1512.51
AB	5.84	616.94	BJ	7.83	1216.65	CV	6.78	654.45
AC	7.13	403.46	BK	5.29	1123.01	CW	6.23	1348.69
AD	7.51	217.99	BL	7.95	1249.43	CX	6.71	727.26
AE	6.21	635.58	BM	7.55	1583.39	CZ	7.07	2110.25
AF	7.13	712.56	BN	8.21	1004.93	DC	7.72	537.06
AG	7.56	1302.10	BO	7.55	462.37	DE	7.15	1186.97
AH	5.82	734.69	BP	8.67	1595.73	DF	8.51	920.96

Table 5. 수집된 청국장용 총질소 함량에 대한 아미노태 질소 함량의 비율

(%)

Sample	AN TN	Sample	AN TN	Sample	AN TN	Sample	AN TN	Sample	AN TN	Sample	AN TN
A	7.98	R	9.93	AI	8.30	AZ	17.51	BQ	16.73	CI	8.47
B	14.15	S	16.34	AJ	2.30	BA	11.63	BR	13.63	CJ	9.66
C	12.43	T	10.63	AK	4.79	BB	17.31	BS	21.13	CK	5.46
D	12.77	U	9.48	AL	2.88	BC	7.68	BT	24.26	CL	6.69
E	25.56	V	7.95	AM	9.65	BD	10.28	BU	7.94	CN	16.49
F	26.52	W	20.64	AN	23.77	BE	20.11	BV	6.05	CO	35.12
G	14.17	X	19.55	AO	14.55	BF	15.63	BX	21.12	CP	21.43
H	9.09	Y	11.23	AP	22.46	BG	23.14	BY	23.20	CQ	19.05
I	8.70	Z	6.53	AQ	22.30	BH	6.92	BZ	4.12	CR	19.22
J	16.54	AA	7.72	AR	14.88	BI	7.99	CA	27.22	CU	21.07
K	15.89	AB	10.56	AS	17.67	BJ	15.54	CB	8.60	CV	9.65
L	10.99	AC	5.66	AT	10.15	BK	21.23	CC	8.71	CW	21.65
M	26.14	AD	2.90	AU	12.41	BL	15.72	CD	13.17	CX	10.84
N	4.49	AE	10.23	AV	8.92	BM	20.97	CE	23.88	CZ	29.85
O	8.81	AF	9.99	AW	8.91	BN	12.24	CF	12.20	DC	6.96
P	17.00	AG	17.22	AX	26.93	BO	6.12	CG	9.30	DE	16.60
Q	7.14	AH	12.62	AY	22.06	BP	18.41	CH	19.30	DF	4.98

(3) 수집된 청국장용 히스타민 및 티라민 함량

바이오제닉 아민(BA)은 단백질을 함유한 식품이 부패하거나 발효·숙성과정에서 유리아미노산이 미생물에 의한 탈탄산 작용으로 생성되는 물질로서, BA 중 가장 널리 알려진 물질인 히스타민은 부패로 다량 발생하게 되어 scombrototoxicosis를 유발하게 되며, 티라민은 혈관 수축에 관여하여 고혈압 및 편두통을 유발하기도 한다. 식품에서의 BA의 생성은 아미노산 및 탈탄산효소활성을 가지는 미생물의 유무에 따라 결정된다. 청국장은 발효되는 동안 BA로 변환될 가능성이 있는 serine, proline, histidine, glutamic acid, aspartic acid, phenylalanine 등의 유리아미노산을 생성한다는 연구가 보고 되어 있으므로, 수집된 청국장에 존재하는 대표적인 BA인 히스타민과 티라민의 함량을 분석하여 Table 6에 나타내었다. 대부분의 제품에서 히스타민과 티라민이 검출되었으며, 히스타민은 최고 853.19 mg/kg, 티라민은 1913.51 mg/kg으로 나타났다. 이는 청국장 발효에 관여하는 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* 등 *Bacillus sp.*의 탈탄소 효소의 활성이 각각 다르기 때문인 것으로 사료된다. 식품에서 BA의 검출은 식품의 품질을 저하시키거나 위해요소로 분류되는 경향이 있으나, 미생물에 의한 발효를 통해 제조되는 장류제품에 있어서 BA의 생성은 피할 수 없는 요소일 뿐만 아니라 청국장 특유의 구수한 풍미와도 연관이 있으므로 완전히 저감시키기 보다는 적절한 수준을 유지할 수 있도록 관리하는 방안을 모색해야 할 것이다.

Table 6. 수집된 청국장용의 히스타민 및 티라민 함량

(mg/kg)

Sample	Histamin	Tyramine	Sample	Histamin	Tyramine	Sample	Histamin	Tyramine
A	0.00	230.93	AI	22.63	310.32	BQ	0.00	15.58
B	40.68	139.56	AJ	0.00	241.08	BR	5.02	13.19
C	0.00	397.93	AK	0.00	298.84	BS	0.00	104.72
D	0.00	135.81	AL	4.61	45.52	BT	0.00	14.55
E	8.69	239.65	AM	0.00	1193.53	BU	0.00	427.93
F	26.92	1779.75	AN	0.00	120.41	BV	0.00	283.67
G	18.80	1536.76	AO	0.00	46.33	BX	0.00	14.48
H	0.00	564.90	AP	0.00	1342.43	BY	0.00	546.81
I	0.00	786.86	AQ	0.00	92.65	BZ	0.62	12.71
J	28.68	812.32	AR	0.00	1086.86	CA	0.00	1059.82
K	0.00	1100.74	AS	19.34	343.25	CB	0.00	16.29
L	6.37	1217.59	AT	0.00	79.08	CC	0.00	21.02
M	5.38	1658.59	AU	0.00	17.89	CD	1.60	765.96
N	0.00	28.61	AV	25.26	44.87	CE	0.00	27.66
O	0.00	79.50	AW	0.00	668.79	CF	1.58	307.78
P	1.82	67.57	AX	59.93	11.43	CG	0.00	1205.28
Q	13.77	356.60	AY	0.00	567.37	CH	0.00	534.60
R	24.09	692.83	AZ	0.00	394.85	CI	0.00	638.76
S	51.81	487.37	BA	0.00	296.92	CJ	63.82	16.52
T	0.00	570.64	BB	0.00	1064.02	CK	40.03	1.13
U	0.00	866.70	BC	0.00	245.40	CL	43.48	170.76
V	0.00	51.13	BD	0.00	19.60	CN	0.00	440.21
W	0.00	1397.50	BE	23.65	1214.68	CO	4.77	1098.59
X	562.06	1674.51	BF	0.00	1029.75	CP	0.00	35.66
Y	0.00	166.14	BG	0.00	224.41	CQ	0.00	11.18
Z	533.97	1913.51	BH	0.85	543.71	CR	0.00	70.01
AA	44.33	642.61	BI	0.00	41.74	CU	0.00	853.19
AB	0.00	0.00	BJ	0.00	28.50	CV	14.77	192.95
AC	0.00	179.95	BK	0.00	1018.45	CW	3.59	4.15
AD	0.00	144.98	BL	0.00	555.87	CX	0.00	15.80
AE	0.00	510.39	BM	0.00	34.82	CZ	0.00	214.60
AF	16.60	0.00	BN	0.00	603.57	DC	1.80	48.56
AG	755.40	1757.04	BO	0.00	60.03	DE	2.52	126.07
AH	73.48	172.91	BP	0.00	1221.55	DF	0.00	495.05

(4) 수집된 청국장의 생균수

수집된 청국장에 존재하는 미생물의 밀도를 측정하기 위해 청국장을 멸균 증류수에 현탁하여 단계희석한 후 TSA 배지에 도말하여 생균수를 측정하였다. Table 7는 수집된 청국장의 생균수를 조사하여 나타낸 것으로 청국장 중의 생균수는 $3.0 \times 10^6 \sim 9.6 \times 10^{10}$ CFU/g으로 나타났다. 청국장 제품에 따라 생균수의 차이가 나는 이유를 밝히기 위해서는 생산 현장을 세심하게 분석해야 할 것이나 실험적인 오차도 있을수 있다. 청국장의 유통·보관 중 과발효의 진행에 따른 암모니아취와 바이오제닉 아민이 생성되므로, 청국장 발효 후 저온 숙성에 의한 풍미 증가 및 안정화 과정을 도입하고 소비자의 식탁에 오르기까지 저온 유통 시스템이 구축된다면 청국장산업이 더욱 활성화 될 것으로 예상된다.

Table 7. 수집된 청국장의 생균수 (CFU/g)

Sample	Viable cells	Sample	Viable cells	Sample	Viable cells
A	1.0×10^{10}	AI	3.0×10^9	BQ	5.6×10^7
B	6.0×10^9	AJ	4.0×10^7	BR	2.2×10^8
C	4.0×10^9	AK	3.0×10^6	BS	1.6×10^8
D	2.0×10^9	AL	3.6×10^8	BT	2.9×10^7
E	1.1×10^{10}	AM	2.3×10^8	BU	2.9×10^8
F	1.4×10^{10}	AN	2.0×10^8	BV	6.2×10^8
G	9.6×10^{10}	AO	2.44×10^8	BX	2.3×10^7
H	1.6×10^{10}	AP	1.0×10^8	BY	5.0×10^7
I	1.8×10^{10}	AQ	1.3×10^8	BZ	3.6×10^7
J	1.1×10^{10}	AR	6.4×10^7	CA	3.4×10^6
K	1.4×10^{10}	AS	1.7×10^8	CB	2.5×10^7
L	1.2×10^{10}	AT	2.3×10^8	CC	2.9×10^7
M	6.0×10^9	AU	3.9×10^8	CD	3.4×10^7
N	1.6×10^{10}	AV	2.7×10^8	CE	3.4×10^7
O	8.0×10^9	AW	2.9×10^7	CF	2.3×10^7
P	3.4×10^8	AX	1.4×10^8	CG	2.2×10^7
Q	8.6×10^6	AY	5.1×10^8	CH	2.7×10^7
R	7.8×10^6	AZ	1.7×10^8	CI	1.2×10^7
S	2.8×10^8	BA	1.8×10^7	CJ	2.0×10^7
T	4.7×10^7	BB	1.3×10^8	CK	2.5×10^7
U	1.3×10^8	BC	1.9×10^8	CL	5.0×10^8
V	1.7×10^8	BD	2.2×10^8	CN	3.1×10^9
W	2.4×10^8	BE	8.2×10^7	CO	4.2×10^7
X	1.8×10^9	BF	2.2×10^8	CP	1.8×10^7
Y	1.1×10^9	BG	1.2×10^8	CQ	5.6×10^9
Z	4.4×10^9	BH	1.1×10^8	CR	2.2×10^9
AA	1.9×10^9	BI	2.4×10^7	CU	2.2×10^9
AB	1.5×10^9	BJ	4.1×10^8	CV	3.2×10^9
AC	1.9×10^7	BK	1.9×10^8	CW	2.7×10^9
AD	2.9×10^9	BL	1.4×10^7	CX	2.1×10^9
AE	5.8×10^8	BM	2.0×10^6	CZ	1.9×10^9
AF	7.4×10^8	BN	1.9×10^7	DC	3.3×10^9
AG	3.7×10^9	BO	1.1×10^8	DE	1.9×10^9
AH	9.0×10^8	BP	2.3×10^7	DF	1.5×10^9

(5) 결론

이상의 결과에서 살펴본 바와 같이 국내에 시판중인 청국장 제품 간의 차이는 지역적 특성과 원료콩의 품종이 다른 점은 물론 자연발효에 의한 균일화·체계화되지 못한 발효공정에 기인한 것이라 사료된다. 국내 청국장의 제조 시 발효실에 상주하고 있는 자연계의 우점종 미생물 일부가 발효에 관여하는 것으로 생각된다. 과학적인 발효환경의 제어가 결여되어 발효실 내부의 미세 환경이 계절적 영향을 받아 큰 폭으로 변하기 때문에, 동일한 작업장에서 제조되더라도 매회 동일한 품질의 제품 생산을 기대하기 어려운 현실이다. 따라서 우수한 발효용 종균을 개발하고 그 균주의 특성을 유지하며 현장에서 간편하게 이용할 수 있는 종균 제품을 보급해야 기능성을 살린 고품질의 청국장을 대량생산 할 수 있을 것이다.

4. 청국장 제품 유래 대두 발효용 우수 균주 분리

가. 청국장 제품 유래 우수 균주의 분리

수집된 청국장 제품에서 우수 발효균주를 분리하기 위하여 청국장 20g을 채취하여 멸균 증류수 80ml에 완전히 현탁한 후 80℃에서 30분간 열처리하여 단계 희석하였다. 희석된 시료를 1% skim milk를 함유한 NA 배지에 도말하여 37℃에서 12시간동안 배양한 후 균주 주변에 생기는 단백질 분해환의 크기(Fig 3)를 관찰하고 순수분리하여 523종의 균주를 분리하였다.

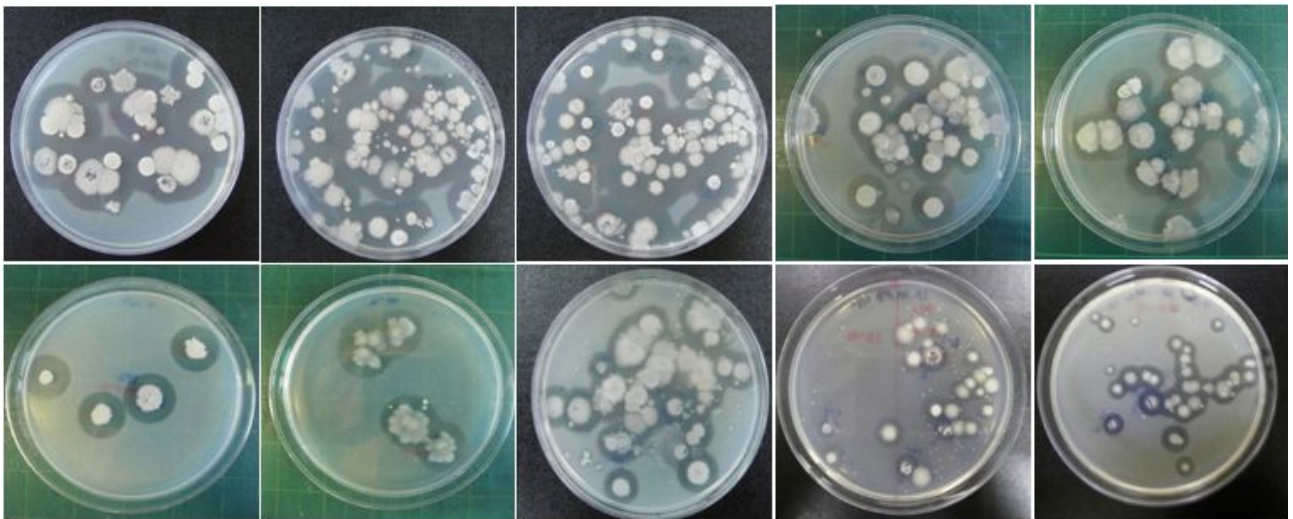


Fig. 3. 청국장 유래 내열성 균주의 분리

나. 단백질 분해능과 점질물 생성능이 우수한 발효 균주의 선발

단백질 분해능이 우수한 균주를 선발하기 위하여 균주 주변에 생긴 단백질 분해환의 크기를 측정하여 Table 8에 나타내었다. 콜로니 주변의 분해환의 크기가 < 1mm인 것은 +, < 2 mm인 것은 ++, 2 mm <인 것은 +++, 분해환이 관찰되지 않은 것은 -로 표시하였다. 또한 균주의 점질물 생성정도를 관찰하기 위하여 백금이로 콜로니를 취한 후 서서히 늘어뜨려 점질물이 생성되는 길이를 측정하였다. 점질물의 길이가 < 0.5 mm인 것은 +, < 2 cm인 것은 ++, 2 cm <인 것은 +++, 점질물이 생성되지 않은 것은 -로 표시하여 Table 8에 나타내었다.

Table 8. 청국장에서 분리한 균주의 단백질 분해능과 점질물 생성능(I)

Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length
A-M1	+++	++	G-2	+	+	K-S21	+++	+
A-M2	+++	++	G-3	+	+	K-S22	+++	+
A-N1	+++	+	G-S1	+	+	K-S23	+++	+
A-N2	+++	+	G-S2	+++	+	L-W1	+	-
A-1	+	-	G-S21	+	+	L-1	+	-
A-2	+	-	G-S22	+	-	L-2	+	-
A-W1	+++	-	H-1	+	-	L-S1	+++	-
A-W2	+++	-	H-S1	+++	++	L-S2	+	+
A-W3	-	-	H-S2	+++	+	L-S3	+	+
A-W4	-	-	H-S21	+++	-	L-S4	+	+
B-1	-	+	H-S22	+++	-	M-1	+	+
B-2	-	-	H-SS1	-	-	M-2	+	-
B-3	-	-	H-SS12	-	-	M-3	+	-
B-4	+++	+	H-SS21	-	+	M-4	+++	++
B-S1	-	++	H-SS22	+++	++	M-5	+	-
B-S2	+++	++	I-LM	+++	++	M-T1	+	+
B-S3	+++	++	I-W	+++	++	M-T2	+	+
B-S4	-	-	I-S1	+++	+	M-T3	+	+
C-L1	+	+++	I-S2	+++	+	N-F1	+	+
C-L2	+	+++	I-S3	+	+	N-F2	+	-
C-M1	++	-	I-S4	+++	+	N-C	+	+
C-M2	++	-	I-S5	+++	+	N-1	+	-
D-M1	+++	-	I-1	+	-	N-2	++	+
D-G	-	+	I-2	+++	-	N-3	++	+
D-S1	+++	++	I-3	+++	+	N-4	+	+
D-S2	+++	-	I-4	+	-	N-5	+	-
D-S3	+++	++	J-1	+	+	N-6	+	+
D-S4	-	+	J-2	++	+++	O-L1	+	++
E-P1	+++	+	J-3	++	+	O-L2	++	+++
E-P2	-	++	J-4	++	+++	O-S1	+	+
E-S	++	+	J-5	++	+++	O-S2	+++	+++
E-L1	+++	+++	J-W1	++	+++	O-S3	+	++
E-L2	++	+++	J-W2	+	+++	O-L3	+	+++
E-L3	++	+++	J-S2	++	++	P-S1	+	+
E-M	+	+	J-NO	+	-	P-P1	+	-
F-L2	+	-	K-H	+	+	P-P2	+	++
F-SP2	+	-	K-S1	+++	+	P-P3	+	+
F-SP3	+	-	K-S2	+++	+	P-P4	+	++
F-SP1	++++	+++	K-S3	+++	++	P-M1	+	+
F-L1	+	+++	K-TS	+++	+	P-M2	+	+
G-1	+	-	K-S1	+++	+	P-A1	+	+

Table 8. 청국장에서 분리한 균주의 단백질 분해능과 점질물 생성능(II)

Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length
P-A2	-	+	U-U1	+++	+++	AC-L1	++	+++
P-L1	+++	+++	U-U2	+++	+	AC-L2	++	++
Q-M1	+++	++	U-SS2	+++	++	AD-S1	+++	-
Q-MC	++	++	U-SP2	+++	++	AD-M1	+	+++
Q-LC	++	++	V-SP1	+++	++	AD-C1	++	+
Q-L2	++	+++	V-SP2	+++	++	AE-C1	++	++
Q-L3	++++	+++	W-L1	++	+++	AE-F1	+	+
Q-L1	++	+++	W-L2	+	+++	AE-L1	+	++
Q-S1	+	-	W-S1	+	-	AE-M1	+	++
R-L1	+	++	W-S2	+	+++	AF-L1	+	-
R-L2	+	+++	W-P1	+	-	AF-M1	++	-
R-M	+	+	W-P2	+	-	AF-M2	++	-
R-P	++	++	W-M	++	++	AF-M3	++	-
R-L3	+	+++	X-S1	++	++	AF-S1	++	-
R-S1	+	-	X-P1	++	++	AF-S2	++	-
R-S2	+	-	X-C1	++	+	AG-C1	++	+
S-SP1	+	-	X-C2	++	+	AG-C2	++	+
S-SP2	+	++	X-C3	++	++	AG-M1	+++	+++
S-SP3	++	++	Y-C1	++	++	AG-M2	++	+
S-L1	+	-	Y-C2	++	+	AG-S1	++	++
S-L2	+	++	Y-C3	++	+	AG-F1	++	++
S-L3	+++	+++	Y-C4	+++	+	AH-C1	++	+
S-S1	-	++	Y-L1	+	+++	AH-M1	+	+
S-S2	-	++	Y-L2	++	+++	AH-P1	++	+++
S-S3	+++	++	Z-M1	+++	+	AH-L1	++	+++
S-L4	++	++	Z-M2	+++	+	AI-C1	+	+
T-S1	+++	++	Z-L1	++	-	AI-C2	++	+
T-S2	+++	++	Z-S1	+	-	AI-M1	+	-
T-S3	+++	-	AA-M1	+++	++	AI-S1	+	-
T-S4	+	++	AA-M-2	+++	-	AI-F1	+	+
T-S5	+	++	AA-S1	++	+	AI-L1	++	+
T-L1	+	++	AA-L1	++	++	AJ-L1	+	+++
U-P1	+	-	AA-P1	++	+++	AJ-S1	++	+
U-P2	++	-	AB-F1	+	++	AJ-C1	++	++
U-S1	+	+++	AB-F2	+	++	AJ-C2	++	++
U-S2	+	-	AB-L1	++	+++	AK-C1	++	++
U-SS1	+	+	AB-L2	++	+++	AK-C2	++	++
U-L1	+	++	AB-L3	++	+++	AK-C3	++	++
U-M	++		AC-C1	+++	+	AL-B1	++	+
U-SP1	+++	+	AC-C2	+++	+	AL-B2	++	++
U-S3	++++	+	AC-C3	+++	+	AL-C1	++	++

Table 8. 청국장에서 분리한 균주의 단백질 분해능과 점질물 생성능(III)

Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length
AL-C2	+	++	AS-F1	+	+	BA-M1	+++	+++
AL-S1	++	+	AS-F2	+	+	BA-M2	++	+++
AL-M1	++	+++	AS-F3	+	+	BA-S	++	+
AM-M1	+++	+++	AS-F4	+	+	BB-C	+	+
AM-M2	++	++	AS-F5	+	+	BB-S	++	-
AM-L1	++	-	AS-F6	+	+	BB-F	+	+
AM-S1	++	+	AT-M1	++	+++	BB-L	++	-
AM-S2	++	-	AT-M2	++	+++	BB-P	+	-
AM-S3	+	+++	AT-S1	++	+++	BC-M1	++	++
AN-M1	+++	+++	AT-S2	+	+++	BC-M2	+	++
AN-M2	+++	+++	AT-S3	+	+++	BC-S	++	++
AN-P1	+++	+++	AT-C1	+	+++	BD-C	+	++
AN-P2	+++	+++	AT-L1	++	+++	BD-S	++	++
AN-L1	++	+++	AU-S1	+	++	BD-L	++	+++
AO-F1	++	+++	AU-M1	+++	+++	BE-S	++	-
AO-F2	+	+++	AU-M2	++	+	BE-M	+	+++
AO-M1	+	+++	AU-M3	+	+	BE-F	+	-
AO-M2	+	+++	AU-C1	++	+	BE-P	++	-
AO-M3	+	+++	AU-C2	+++	+	BF-M	++	+++
AO-S1	++	-	AU-P1	++	+++	BF-S1	+	-
AO-C1	++	+	AU-L1	+	-	BF-S2	++	++
AO-C2	++	++	AV-C1	+	+++	BG-M1	+++	+++
AP-M1	++	-	AV-C2	+	+++	BG-M2	++	+++
AP-M2	++	+++	AV-M1	+	+	BG-S	+++	++
AP-M3	+	-	AV-M2	++	++	BH-M	++	+++
AP-P1	+++	+++	AV-L1	+	-	BH-S	+	++
AP-P2	+++	+++	AW-L	+	++	BH-P	+	+++
AP-P3	++	-	AW-M	++	+++	BI-L	+	+
AQ-L1	++	+	AX-L1	+	+++	BJ-M1	++	+
AQ-P1	++	+++	AX-L2	+	-	BJ-M2	++	+
AQ-P2	++	+	AX-L3	+	+++	BJ-P	++	++
AQ-F1	++	+++	AX-C1	++	++	BK-L	+	-
AQ-F2	++	+++	AX-C2	+++	++	BK-M	++	++
AR-M1	++	+	AX-M	++	+	BK-P1	++	+
AR-M2	+	++	AY-M	+	+	BK-P2	++	+
AR-M3	+	++	AY-P	++	+	BK-C	+	++
AR-C1	++	+	AY-S	+	+	BL-M	++	+++
AR-L1	+	+++	AY-L	++	+	BL-S	++	+++
AS-M1	+	-	AZ-M1	+++	++	BL-P	+	+++
AS-M2	++	+	AZ-M2	+++	+++	BM-M	++	++
AS-M3	+	-	AZ-S	++	++	BM-L	++	+++

Table 8. 청국장에서 분리한 균주의 단백질 분해능과 점질물 생성능(IV)

Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length
BM-P	+	+++	BY-S1	++	+	CJ-C1	+++	+
BN-P	+	+	BY-S2	++	++	CJ-C2	+++	+
BN-M	++	+++	BZ-M1	++	+++	CK-C	+	+
BO-M1	+	+	BZ-M2	+++	+++	CK-S	+++	+
BO-M2	++	++	BZ-C	++	++	CK-M	+++	+++
BO-C1	+	+++	BZ-S1	+	+	CK-P	+++	++
BO-C2	+	+++	BZ-S2	++	++	CL-C1	++	+
BP-P1	+++	+	BZ-P	+	+	CL-C2	+++	+
BP-P2	++	+	CA-S	++	++	CL-M1	++	-
BP-P3	+	++	CB-M	+	-	CL-M2	++	-
BP-M	++	+++	CB-L1	+	++	CL-S	+++	+
BP-S	+++	+	CB-L2	++	+++	CN-M	+++	+++
BP-L	++	++	CC-L1	+	+++	CN-P	+++	+
BQ-M1	+++	-	CC-L2	++	+++	CN-S	++	+
BQ-M2	++	-	CC-C	++	-	CO-M1	+	+
BQ-L	+	+++	CD-M1	+++	+	CO-M2	+++	+
BQ-S	+++	-	CD-M2	+++	+	CO-M3	++	+
BQ-P	++	+++	CD-L	++	+++	CO-L	+++	+
BR-P	+	++	CD-S	++	++	CP-C1	++	++
BR-M	+	++	CE-L	+++	+++	CP-C2	++	++
BS-M	++	+++	CE-M	+++	-	CP-S	+++	+++
BS-L1	+	+++	CE-F	++	-	CP-M	++	+++
BS-L2	+	+++	CE-S1	++	++	CQ-C1	++	++
BT-M1	+++	+++	CE-S2	+	++	CQ-C2	++	+
BT-M2	++	+++	CG-M1	+++	+++	CQ-C3	+	++
BT-C	+	+	CG-M2	++	+++	CQ-M1	+++	+++
BU-M1	+	+	CG-S	+	+	CQ-M2	++	+++
BU-M2	++	+	CG-L	++	+++	CR-M	+++	+++
BU-S1	++	++	CH-S	+++	+	CR-C	++	-
BU-S2	++	+	CH-C1	+++	+	CR-S1	+++	+
BV-P1	+	+	CH-C2	+++	+	CR-S2	++	+++
BV-P2	++	-	CH-C3	++	+	CR-S3	++	+++
BV-P3	+	++	CH-P	++	+++	CV-S1	++	++
BV-S	++	-	CH-M	+++	+++	CV-S2	+++	+
BV-C	++	+	CI-S1	++	+	CV-C1	+++	++
BV-M	++	+	CI-S2	++	+	CV-C2	+++	++
BX-M1	++	+++	CI-M	++	+	CV-M1	++	+++
BX-M2	++	+	CI-P1	++	+	CV-M2	++	+++
BX-S	+++	+	CI-P2	++	+++	CX-S1	+	++
BY-M1	+++	+	CJ-M1	+++	+++	CX-2	+++	++
BY-M2	++	+	CJ-M2	++	+++	CX-C1	++	+

Table 8. 청국장에서 분리한 균주의 단백질 분해능과 점질물 생성능(V)

Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length	Strains	Proteolytic activity	Mucilage length
CX-C2	++	++	DC-M1	++	-	DE-C	++	++
CX-M	+++	+	DC-M2	++	+++	DE-S1	+++	+++
CX-F	+	++	DC-P	+	-	DE-S2	+++	+++
CY-S	++	+	DC-C	++	++	DE-P1	++	+++
CY-C	+	+	DC-L	+++	++	DE-P2	+++	+++
CY-M	++	+++	DC-S	+	+++	DF-P	++	++
CZ-S1	+++	+++	DD-C1	++	+++	DF-M	++	++
CZ-S2	++	++	DD-C2	+++	+++	DF-S	+++	+++
CZ-S3	++	++	DD-C3	+++	+	DF-C	++	++
CZ-S4	++	-	DD-M1	++	++			
CZ-M	+	-	DD-M2	++	++			

균주를 분리한 청국장의 넘버와 콜로니의 형태를 바탕으로 균주를 명명하였다. S는 작음, M은 중간, L은 큼, W는 생육약함, F는 경쟁, H는 불록한 모양, C는 점질물, P는 콜로니 가운데의 점, TS는 특수한 형태의 균을 의미한다. 이 규정에 따라 523 균주를 명명하였으며, 위의 결과를 바탕으로 동일한 것이라 추정되는 균주는 배제한 후 단백질 분해능과 점질물 생성능이 우수한 균주 88종을 선발하였다. N-F-1과 N-F-2는 다른 균주들에 대해 강한 경쟁 현상을 보여, 청국장 균주의 안정성 유지 및 장기 보존을 위한 경쟁 배양에 이용하기 위하여 선발하였다. 선발된 균주의 목록과 고체배지에 배양된 형태를 Table 9과 Fig. 4에 나타내었다.

Table 9. 청국장 분리 균주에서 선발한 우수균주

Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain
A-M1	J-W1	S-L3	AM-M1	AU-M1	BP-M	CH-M	CV-C1
B-S2	J-4	U-U1	AN-M1	AW-M	BQ-P	CI-P2	CV-M1
B-S3	J-S2	W-L1	AN-P1	AZ-M2	BS-M	CJ-M1	CX-S2
D-S1	K-S3	Y-L2	AN-P2	BA-M1	BT-M1	CK-M	CY-M
D-S3	M-4	AA-M1	AP-M2	BD-L	BT-M2	CK-P	CZ-S1
E-L1	N-F-1	AB-L1	AP-P1	BG-M1	BX-M1	CN-M	DC-M2
F-SP1	N-F-2	AC-L1	AQ-P1	BG-S	BY-M1	CP-S	DC-L
H-S2	P-L1	AG-M1	AQ-F1	BH-M	BY-M2	CP-M	DD-C2
H-SS22	P-L2	AH-P1	AS-F1	BL-M	CB-L2	CQ-M1	DE-S1
I-LM	Q-L3	AH-L1	AT-M1	BM-L	CE-L	CR-M	DE-P2
I-W	Q-S2	AL-M1	AT-L1	BN-M	CG-M1	CR-S2	DF-S

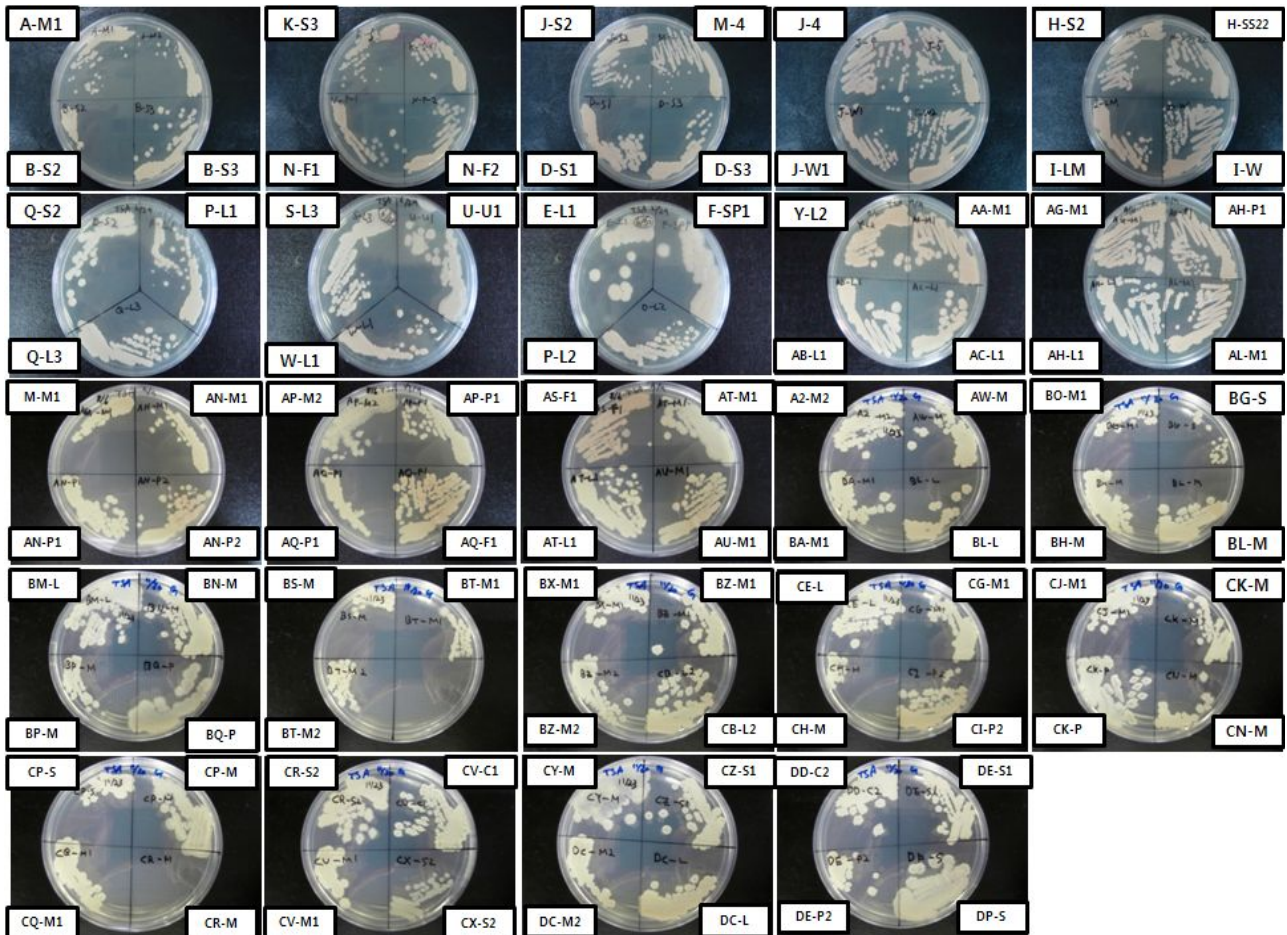


Fig 4. 청국장 분리 균주에서 선발한 우수균주의 고체배양

다. 특허 등록 및 기탁 균주의 수집

특허 등록 및 기탁되어 있는 청국장 발효용 우수 균주를 검색하여 한국미생물보존센터 및 생물자원센터로부터 *Bacillus subtilis* KCCM 11314, KCCM 11315, KCCM 11315, KCTC 3014를 분양받았다.

라. 청국장 분리 균주의 동정

청국장으로부터 분리된 우수 균주들을 유전학적으로 동정하기 위하여 16S rRNA 염기서열을 분석하여 표 9에 나타내었다. Forward primer인 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'와 reverse primer인 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'를 이용하여 PCR 반응을 실시하였으며, PCR 증폭산물 중 1.5 ~ 1.6 kDa에 해당하는 밴드를 정제하여 유전자 해석센터(Macrogen, Korea)에 분석을 의뢰하였고, 염기서열 분석을 통하여 얻은 각 균주의 염기서열은 Blast Network Service를 이용하여 NCBI GeneBank database의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 분리균주는 모두 97% 이상의 유사성을 보여 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

Table 10. 청국장 분리 균주의 16S rRNA 염기서열 분석에 따른 동정

No.	Strains	Identities(%)	No.	Strains	Identities(%)
A-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	AU-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	100
B-S2	<i>Bacillus subtilis</i>	100	AW-M	<i>Bacillus subtilis</i>	99
B-S3	<i>Bacillus subtilis</i>	100	AZ-M2	<i>Bacillus subtilis</i>	99
D-S1	<i>Bacillus subtilis</i>	99	BA-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
D-S3	<i>Bacillus subtilis</i>	99	BD-L	<i>Bacillus subtilis</i>	99
E-L1	<i>Bacillus subtilis</i>	98	BG-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
F-SP1	<i>Bacillus subtilis</i>	99	BG-S	<i>Bacillus subtilis</i>	99
H-S2	<i>Bacillus subtilis</i>	99	BH-M	<i>Bacillus subtilis</i>	99
H-SS22	<i>Bacillus subtilis</i>	99	BL-M	<i>Bacillus subtilis</i>	99
I-LM	<i>Bacillus subtilis</i>	100	BM-L	<i>Bacillus subtilis</i>	99
I-W	<i>Bacillus subtilis</i>	100	BN-M	<i>Bacillus subtilis</i>	99
J-W1	<i>Bacillus subtilis</i>	99	BP-M	<i>Bacillus subtilis</i>	98
J-4	<i>Bacillus subtilis</i>	99	BQ-P	<i>Bacillus subtilis</i>	99
J-S2	<i>Bacillus subtilis</i>	100	BS-M	<i>Bacillus subtilis</i>	99
K-S3	<i>Bacillus subtilis</i>	100	BT-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	98
M-4	<i>Bacillus subtilis</i>	100	BT-M2	<i>Bacillus subtilis</i>	97
N-F-1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	BX-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
N-F-2	<i>Bacillus subtilis</i>	100	BY-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	97
P-L1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	BY-M2	<i>Bacillus subtilis</i>	99
P-L2	<i>Bacillus subtilis</i>	99	CB-L2	<i>Bacillus subtilis</i>	99
Q-L3	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CE-L	<i>Bacillus subtilis</i>	99
Q-S2	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CG-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	98
S-L3	<i>Bacillus subtilis</i>	99	CH-M	<i>Bacillus subtilis</i>	99
U-U1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CI-P2	<i>Bacillus subtilis</i>	99
W-L1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CJ-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
Y-L2	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CK-M	<i>Bacillus subtilis</i>	99
AA-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CK-P	<i>Bacillus subtilis</i>	99
AB-L1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CN-M	<i>Bacillus subtilis</i>	100
AC-L1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CP-S	<i>Bacillus subtilis</i>	98
AG-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CP-M	<i>Bacillus subtilis</i>	99
AH-P1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CQ-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
AH-L1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CR-M	<i>Bacillus subtilis</i>	98
AL-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CR-S2	<i>Bacillus subtilis</i>	98
AM-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CV-C1	<i>Bacillus subtilis</i>	98
AN-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CV-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	98
AN-P1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CX-S2	<i>Bacillus subtilis</i>	99
AN-P2	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CY-M	<i>Bacillus subtilis</i>	97
AP-M2	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CZ-S1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
AP-P1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	DC-M2	<i>Bacillus subtilis</i>	99
AQ-P1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	DC-L	<i>Bacillus subtilis</i>	98
AQ-F1	<i>Bacillus subtilis</i>	99	DD-C2	<i>Bacillus subtilis</i>	98
AS-F1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	DE-S1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
AT-M1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	DE-P2	<i>Bacillus subtilis</i>	99
AT-L1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	DF-S	<i>Bacillus subtilis</i>	98

마. 청국장 분리 균주의 생화학적 특성

Automated Microbial Identification System(bioMerieux Inc.)을 이용하여 청국장에서 분리된 균주의 생화학적 특성을 조사하여 Table 11에 나타내었다. 이 결과를 미루어보아 대부분의 균주가 *Bacillus subtilis*와 동일한 생화학적 특성을 보이며 16S rRNA 분석결과와 동일하게 나타났다. AW-M 이후의 균주들의 분석은 추후에 계속 진행하기로 한다.

Table 11. 청국장 분리 균주의 생화학적 특성(I)

Biochemical details	Strains No.																									
	A		B			D		E		F		H		I		J			K	M	N		P		Q	
	M1	S2	S3	S1	S3	L1	SP1	S2	SS22	L1	W	W1	4	S2	S3	4	F1	F2	L1	L2	L3	S2				
BXYL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+				
LysA	-	-	-	-	-	+	-	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-				
AspA	-	(-)	+	(-)	(+)	(-)	(+)	-	-	-	-	+	+	-	+	-	(+)	+	-	-	-	+				
LeuA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	(-)	+	+	+	(+)	(+)	+				
PheA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
ProA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
BGAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
PyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
AGAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
AlaA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
TyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
BNAG	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	+	-	(+)	+	-	-	-	+				
APPA	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	(+)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	(-)				
CDEX	+	(-)	+	-	-	-	-	+	+	(-)	-	+	-	-	-	(+)	+	+	+	+	-	-				
dGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
GLYG	-	-	+	+	-	+	+	-	(+)	-	+	-	-	-	-	(-)	+	+	+	(-)	-	-				
INO	-	(-)	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	(-)	+	+	+	-	-	+				
MdG	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	(-)	-	-	+				
ELLM	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
MdX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
AMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
MTE	-	-	(+)	(+)	○	+	-	+	(+)	-	(-)	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+				
GlyA	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+				
dMAN	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
dMNE	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
dMLZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
PLE	-	(-)	+	+	(-)	+	+	+	+	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
IRHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
BGLU	+	+	+	(+)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
BMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
PHC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-				
PVATE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
AGLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
dTAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
dTRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+				
INU	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	(+)	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+				
dGLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
dRIB	+	+	+	+	-	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+				
PSCNa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-				
NaCl 6.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
KAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
OLD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
TTZ	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-				
POLYB_R	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-				

Table 11. 청국장 분리 균주의 생화학적 특성(II)

Biochemical details	Strains No.																						
	S	U	W	Y	AA	AB	AC	AG	AH	AL	AM	AN			AP		AQ		AS	AT		AU	
	L3	U1	L1	L2	M1	L1	L1	M1	P1	L1	M1	M1	M1	P1	P2	M2	P1	P1	F1	F1	M1	L1	M1
BXYL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	
LysA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
AspA	(-)	-	(+)	-	-	(+)	+	-	-	(-)	+	-	(-)	+	-	(-)	-	+	-	(-)	+	-	+
LeuA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+
PheA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ProA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
BGAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAL	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AlaA	++	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TyrA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BNAG	-	(-)	(-)	-	+	-	-	-	-	(-)	+	-	(+)	-	+	-	+	-	-	-	(+)	-	(-)
APPA	(+)	(-)	-	(+)	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	(+)	-	-
CDEX	-	-	-	-	-	-	+	-	+	(-)	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
dGAL	(-)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
GLYG	(-)	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	(-)	-	+	-	(-)	(-)	-	-	(+)	+	(-)	-
INO	(-)	-	(+)	+	+	+	+	-	+	+	+	(-)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
MdG	+	(+)	+	(-)	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	+
ELLM	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
MdX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MTE	-	+	(+)	+	(-)	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
GlyA	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
dMAN	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
dMNE	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
dMLZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLE	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
IRHA	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
BGLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
BMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PHC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVATE	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	+
AGLU	+	+	+	+	+	+	+	(-)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
dTAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dTRE	+	(-)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
INU	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
dGLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
dRIB	+	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	(+)	+	(+)	+	(+)
PSCNa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 6.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KAN	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OLD	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TTZ	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	(-)	-	+	-
POLYB_R	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

전통 청국장으로부터 분리된 균주는 일반적으로 *Bacillus subtilis*, *B. lichenformis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus* 등이 알려져 있다. 본 연구에서 분리한 균주는 대부분 *B. subtilis*로 나타났으며, 97% 정도의 비교적 낮은 상동성을 보이는 균주들은 생화학적 특성으로 미루어 볼때 *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. vallismortis* 등으로도 추정된다.

바. 청국장 분리 균주의 내열성

청국장에서 분리된 균주의 내열성을 관찰하기 위해 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64℃에서 24h 동안 배양하며 생육가능 온도를 조사하여 Table 12에 나타내었다. 후보 균주들은 모두 내열성이 있는 *Bacillus subtilis*로서 대부분 52℃의 고온에서도 생육했으며, 특히 Y-L2, AQ-F1, AU-M1은 62℃에서도 생육가능하여 강한 내열성을 보였다. 우리나라 전통 청국장의 발효에 관여하는 *Bacillus subtilis*는 55℃에서 용균되는 *Bacillus natto*보다 더욱 강한 내열성을 가지고 있다. 이와 같은 *Bacillus subtilis*의 특징을 이용하여 *Bacillus cereus*와 같은 부패발효미생물을 고온 제어한다면 청국장 제조 시 발생하는 오염을 방지하며 그에 따른 폐기량을 최소화 할 수 있을 것이다.

Table 12. 생육온도범위

Strain	Growth temperature(℃)	Strain	Growth temperature(℃)
A-M1	<56	U-U1	<60
B-S2	<54	W-L1	<58
B-S3	<56	Y-L2	<62
D-S1	<56	AA-M1	<57
D-S3	<54	AB-L1	<58
E-L1	<58	AC-L1	<58
F-SP1	<56	AG-M1	<60
H-S2	<54	AH-P1	<60
H-SS22	<56	AH-L1	<58
I-LM	<58	AL-M1	<58
I-W	<56	AM-M1	<56
J-W1	<52	AN-M1	<58
J-4	<56	AN-P1	<60
J-S2	<60	AN-P2	<58
K-S3	<56	AP-M2	<56
M-4	<58	AP-P1	<58
N-F1	<58	AQ-P1	<58
N-F2	<56	AQ-F1	<62
P-L1	<58	AS-F1	<58
P-L2	<56	AT-M1	<52
Q-L3	<58	AT-L1	<58
Q-S2	<58	AU-M1	<62
S-L3	<58		

이상의 결과를 통해 선발된 45균주를 경상대학교에 분양하여 이후 실험을 진행하였다.

제 2 협동과제

제 2 절 청국장 발효용 우수 균주의 분리 및 실용화 기술 개발

1. 서론

최근 청국장은 대표적인 고단백 전통 발효식품으로 아미노산 등 영양성분이 많고 소화율이 높아 건강 기능이 우수한 식품으로 알려져 있다. 그러나 청국장 제조 지역마다 체계화 되지 못한 제조방법으로 품질이 균일하지 못해 소비자로부터 호응을 얻지 못하고 있어 청국장의 품질향상 및 표준화가 시급한 실정이다. 이에 본 연구에서는 국내 청국장을 수집하고 품질 특성을 분석하여 우수한 품질의 청국장 제조를 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다. 그 결과로 국내 청국장은 종류가 매우 다양하며 제품마다 풍미와 영양성분이 현저한 차이가 있음을 확인하였다. 이는 지역마다 다른 품종의 원료대두의 사용 및 균일화·체계화되지 못한 발효공정에 기인한 것이라 사료된다. 국내 청국장의 제조 시 발효실에 상주하고 있는 자연미생물 다수가 발효에 관여하며, 과학적인 발효환경의 제어가 결여되어 발효실 내부의 습도 및 온도가 계절의 영향을 받아 변하기 때문에, 동일한 작업장에서 제조되더라도 매회 동일한 품질의 제품을 기대하기 어려운 것이다. 따라서 발효용 종균을 분리, 동정하고 분리된 균주의 특성을 규명한 후 우수한 균주를 선발하여 제품화하고 보급함으로써 고품질의 청국장을 균일하게 대량생산 할 수 있을 것이라 사료된다.

2. 재료 및 방법

가. 청국장의 제조

콩을 세척한 후 콩의 무게가 약 2배가 될 때까지 수침하여 1시간이상 물빼기한 후 121℃에서 가압증자하여 충분히 냉각된 콩에 전배양한 균주를 콩 1g당 10^6 CFU되도록 접종하여 37℃에서 24시간동안 발효하여 청국장을 제조하였다.

나. 총질소 측정

청국장의 총질소 함량 측정은 유[34]의 방법을 이용하여 시료 1 g을 취하여 Kjeldahl flask에 넣고, K_2SO_4 와 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 를 9 : 1의 비로 혼합한 촉매제 2~3 g과 conc. H_2SO_4 15ml을 넣어 2시간 동안 분해시킨 후 증류수를 첨가하여 100 ml로 정용하고 소비된 0.02 N HCl의 ml수를

총질소로 환산하였다. 증류시 사용한 시약은 NaOH - Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)용액과 2% Boric acid (H_3BO_3)용액 그리고 지시약은 Bromocresol green과 Methyl red를 에탄올에 2 : 1의 비로 혼합하여 계산하였다.

다. 아미노태 질소 측정

청국장 아미노태 질소 함량 측정은 최[6]의 방법을 이용하여 시료 5 g을 250 ml 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 100 ml 까지 정용한다. 이 중 50 ml을 취하여 100 ml beaker에 넣은 후 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 중화한다. 여기에 중성포르말린 20 ml을 가하고 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 적정한다. 적정의 종점을 결정하기 위하여 pH meter (Orion 420A, USA)를 이용하였다.

라. 점질물 길이 측정

점질물 길이는 Investigative approach to Natto(Japan) 법에 준하여 측정하였다.

마. 수분 측정

수분함량은 적외선 수분측정기(FD-600, Kett)로 40분간 측정하였다.

바. 혈전용해능 측정

혈전용해효소의 활성은 fibrin plate method로 측정하였다. 0.1 M PBS 용액(pH 7.5) 10ml에 0.06g의 fibrinogen을 첨가하여 37°C에서 완전히 용해시켰다. 20 unit의 thrombin을 첨가하여 섞은 후 30분간 정치하여 불투명의 fibrin plate를 제조하였다. 지름 8mm의 paper disc에 청국장 추출 효소액 20 ul씩 흡수시킨 후 fibrin plate 위에 놓고 37°C에서 4시간 반응후 fibrin이 분해되어 투명해진 직경을 측정하여 상대적인 효소 활성을 구하였다.

사. 환원당 측정

환원당은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)법을 사용하여 시료 1 ml에 0.75% DNS 용액 1 ml에 0.75% DNS 용액 1 ml을 첨가하고 100°C에서 5분간 반응시킨 다음 증류수 8ml을 가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아. 색도 측정

색도측정은 Chroma meter (Minolta CT 310, Japan)를 이용하여 L(명도), a(적색도) 및 b(황색도) 값으로 측정하였다.

자. 관능평가

청국장 발효의 관능검사에 대한 이해도를 충분히 숙지시킨 20명의 패널을 선정하여 색, 냄새, 단맛, 쓴맛, 전체적인 기호도를 매우 나쁘다(1점), 나쁘다(2점), 보통이다(3점), 좋다(4점), 매우 좋다(5점)으로 분류하여 5점 채점법으로 실시하였다.

차. pH 측정

pH는 pH meter(Orion 420A, USA)로 측정하였다.

카. DPPH 자유라디칼 소거능 측정

DPPH 자유라디칼 소거활성은 Kilani 등의 방법에 의하여 측정하였다. 즉 시료 1 ml에 0.2 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 2 ml 첨가하여 실온에서 30분간 반응시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유라디칼 소거 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Saverging activity (\%)} = (1 - A1/A0) \times 100$$

A1 : 시료 처리군의 흡광도

A0 : 시료 대조군의 흡광도

3. 선발된 청국장 발효용 우수균주의 특성

한국장류협동조합으로부터 고체배양 된 45종의 청국장 분리 균주를 분양받아 이후 연구에 사용하였다. 45종의 균주를 TSB 액체배지에 접종하여 37 °C에서 진탕배양하면서 액체배지 상에서의 정상적인 생육 유무와 시간에 따른 autolysis 현상을 조사하였다(Fig. 1). 45균주 모두 배양 6시간 후부터 서서히 생육하기 시작하여 18h에는 최대 생육에 도달하였으며, 균체 및 점질물이 생성되어 배지가 뿌옇게 변했다. 또한 배양액의 향미는 균주에 따른 약간의 차이가 있었지만 이취가 적어, 정상적인 발효를 진행할 수 있는 청국장 발효용 우수종균으로 이용할 수 있음을 확인하였다. 반면 배양 48h 이후에는 autolysis 현상이 발생하여 균주에 의해 혼탁되었던 배양액이 투명하게 변했다. Autolysis는 청국장 발효 중 빈번히 발생하는 현상으로, 균주의 당소비와 gas 발생이 급격히 감소되어 활성을 떨어뜨려 발효 실패의 원인이 된다. 따라서 균주의 최적배양시간을 설정하여 autolysis가 발생하기 이전의 균체 배양액을 청국장 발효를 위한 starter로 사용해야 한다.

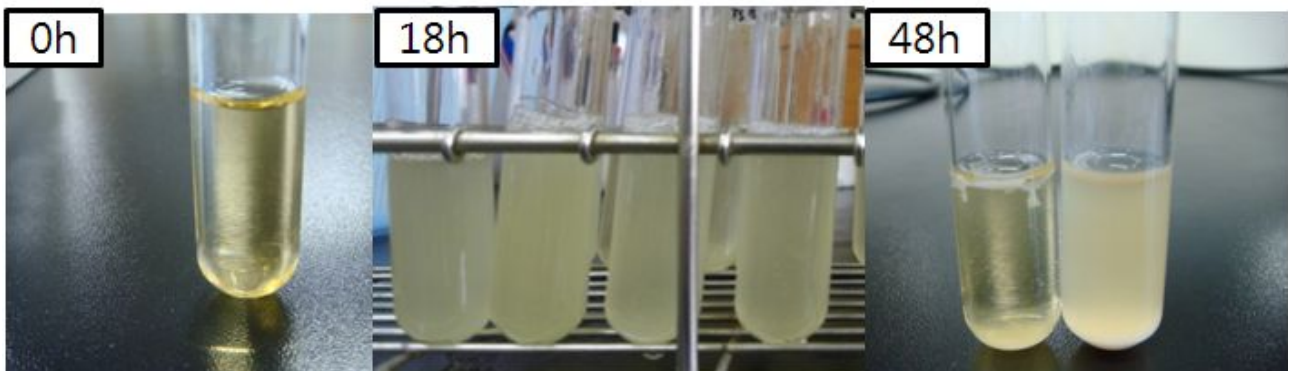


Fig. 1. 배양시간에 따른 청국장 발효균주의 액체배양

4. 선발된 균주를 이용한 청국장의 품질특성 조사

가. 선발된 균주로 발효시킨 청국장 제조

선발된 45가지 균주를 37 °C에서 24시간 동안 발효시켜 제조한 청국장을 Fig. 2에 나타내었다. 대부분의 청국장에서 청국장 특유의 점질물을 형성하였으며 균주의 종류에 따라 발효된 대두 표면에 주름진 모양의 차이가 있었다. 또한 증자 대두에 비해 짙은 색을 띄었으며 악취가 나지 않았다.



Fig 2. 선발된 후보균주로 발효시킨 청국장 및 증자대두의 사진

나. 선발된 균주로 발효시킨 청국장용 아미노태 질소 함량

Table 1은 선발된 45가지 균주를 이용하여 제조한 청국장용 아미노태 질소 함량을 나타낸 것이다. 청국장용 아미노태 질소 함량은 218.01 ~ 491.07 mg%로 나타났으며, F-SP1이 491.07 mg%로 가장 높게 나타나, 아미노태 질소 함량이 가장 낮은 AH-P1에 비해 약 2.3배 높게 나타났다. E-L1과, F-SP1 등 7가지는 400 mg% 이상이었으며 AM-1 등 27가지는 300 mg% 이상, D-S1 등 11가지는 200 mg% 이하의 값을 나타내었다. 아미노태 질소는 protease의 작용에 의하여 단백질이 아미노산의 형태로 분해된 정도를 나타낸 것이다. 따라서 청국장용 발효와 숙성 과정 중에 생성된 아미노태 질소의 함량이 높을수록 아미노산 함량이 높아 맛이 우수한 청국장을 제조 할 수 있을 것으로 기대된다. 아미노태 질소의 수준은 제조과정에서 대두단백의 변성도, 관여 발효 미생물의 생육과 효소 생성 조건 그리고 보관 및 숙성 조건 등 여러 가지 요인에 따라 차이를 보이는 것으로 여겨진다. 현재 우리나라 식품공전의 규격에는 청국장용 아미노태 질소 함량을 300.0 mg% 이상으로 규정되어 있다. 그러나 아미노산 형태로 분해된 정도가 클수록 쓴맛이 강해지므로 적절한 수준의 아미노태 질소 함량이 요구된다.

Table 1. 선발된 균주를 이용한 청국장용 아미노태 질소 함량 (mg%, dry weight)

Strain	Amino nitrogen	Strain	Amino nitrogen
A-MI	321.42	U-U1	252.50
B-S2	365.99	W-L1	226.64
B-S3	329.61	Y-L2	371.39
D-S1	283.44	AA-MI	407.02
D-S3	378.18	AB-L1	233.37
E-L1	451.10	AC-L1	310.52
F-SP1	491.07	AG-MI	246.38
H-S2	275.40	AH-L1	299.38
H-SS2	318.07	AH-P1	218.01
I-LM	382.88	AL-MI	304.57
I-W	344.12	AM-MI	425.18
J-4	301.01	AN-MI	350.66
J-S2	386.23	AN-P1	384.36
J-W1	337.85	AN-P2	342.35
K-S3	354.30	AP-M2	363.19
M-4	316.20	AP-P1	401.42
N-F-1	256.70	AQ-F1	412.28
N-F-2	263.30	AQ-P1	397.28
P-L1	382.78	AS-F1	357.20
P-L2	422.80	AT-L1	354.02
Q-L3	352.88	AT-MI	352.65
Q-S2	373.14	AU-MI	330.92
S-L3	289.29	Steamed soybean	121.69

다. 선발된 균주로 발효시킨 청국장 총질소 함량

선발된 균주를 이용하여 제조한 청국장의 총질소의 함량은 Table 2와 같다. 2009년의 전통식품표준규격회에 따르면 청국장의 총질소 함량은 12.5% 이상이다. 선발된 균주를 이용한 청국장의 총질소 함량은 24.49 ~ 32.08 %로 나타났으며, Q-S2이 35.1 %로 가장 높게 나타났다. 주 등[43]은 시판청국장의 총질소 함량 범위는 17.7 ~ 22.54% 범위 정도라고 보고하여, 본 연구에서 제조된 청국장의 총질소 함량이 다소 높게 나타났는데 이는 대두 품종의 차이에 기인한다고 추정된다.

Table 2. 선발된 균주를 이용한 청국장의 총질소 함량 (% , dry weight)

Strain	Total Nitrogen	Strain	Total Nitrogen
A-MI	30.38	U-U1	27.95
B-S2	27.56	W-L1	29.79
B-S3	28.92	Y-L2	27.87
D-S1	27.59	AA-MI	29.65
D-S3	29.57	AB-L1	30.78
E-L1	27.03	AC-L1	28.01
F-SP1	25.51	AG-MI	29.57
H-S2	29.23	AH-L1	25.59
H-SS2	29.30	AH-P1	25.42
I-LM	27.33	AL-MI	24.49
I-W	29.28	AM-MI	25.89
J-4	28.37	AN-MI	27.28
J-S2	28.40	AN-P1	26.39
J-W1	29.81	AN-P2	26.74
K-S3	28.62	AP-M2	26.42
M-4	28.44	AP-P1	27.25
N-F-1	28.39	AQ-F1	27.07
N-F-2	29.92	AQ-P1	27.39
P-L1	31.54	AS-F1	28.91
P-L2	26.09	AT-L1	28.34
Q-L3	25.08	AT-MI	28.69
Q-S2	32.08	AU-MI	26.89
S-L3	29.83	Steamed soybean	29.52

라. 선발된 균주로 발효시킨 청국장의 점질물의 길이

청국장 제조시 생성되는 점질물은 γ -polyclutamic acid과 fructose의 polymer인 fructan(혹은 levan)으로 구성된 물질로써 발효 미생물의 특성과 발효조건에 따라 생성량과 강도 등의 차이가 나는 것으로 알려져 있다. 선발된 균주 25종으로 국산콩을 37°C, 18시간 발효시킨 후에 일본 낫토시험법을 개량하여 나무젓가락을 이용하여 점성을 측정하였다. 발효된 청국장을 10회 저은 후 충분한 양(약 1/3)의 시료를 나무젓가락으로 잡고 천천히 들어올려 늘리면서 점액성 물질이 끊어지지 않고 최대로 늘어나는 길이를 측정하여 표 3에 나타내었다. 대조구로 사용된 증자대두에서는 점질물이 형성되지 않았고, Q-S2 균주는 250 cm 이상으로 가장 길게 나타났으며 N-F-2는 5 cm로 점질물 길이가 가장 짧았다. 대부분의 균주가 50 cm 이상이었으며, 점질물 길이가 200 cm 이상은 균주 5종이었고, 100 cm 이상인 균주도 14종으로 나타났다. 점질물의 주성분인 γ - polyglutamate은 *Bacillus*속의 일부 미생물에 의하여 생성되는 헵막을 구성하는 대사산물이며, 동결에 의한 세포의 보호 및 골다공증 예방, 쓴맛의 제거 등의 기능성을 지닌 biopolymer로 알려져 있다. 청국장의 점질물은 쓴맛과의 역상관성이 높아서 점질물의 함량이 높으면 쓴맛은 적은 것으로 알려져 있고, 김 등[44]은 청국장에 함유된 점질물은 5.0 ~ 6.3 % 정도이며, 점질물 중의 조단백질 함량은 61 % 정도이고 특히 glutamic acid의 함량이 높다고 보고되어 있다.



Fig 3. 점질물 길이 측정

Table 3. 선발된 균주를 이용한 청국장의 점질물의 길이 (cm)

Strain	Mucilage	Strain	Mucilage
A-MI	120	U-U1	80
B-S2	150	W-L1	80
B-S3	>200	Y-L2	110
D-S1	50	AA-MI	90
D-S3	80	AB-L1	80
E-L1	50	AC-L1	100
F-SP1	20	AG-MI	50
H-S2	110	AH-L1	150
H-SS2	>200	AH-P1	100
I-LM	85	AL-MI	30
I-W	60	AM-MI	30
J-4	70	AN-MI	60
J-S2	>200	AN-P1	70
J-W1	120	AN-P2	60
K-S3	85	AP-M2	50
M-4	180	AP-P1	150
N-F-1	30	AQ-F1	50
N-F-2	5	AQ-P1	80
P-L1	144	AS-F1	50
P-L2	>200	AT-L1	90
Q-L3	138	AT-MI	150
Q-S2	>250	AU-MI	10
S-L3	132	Steamed soybean	0

Table 4. 선발된 균주를 이용한 청국장의 점질물의 길이의 분포

Ranges of Mucilage (cm)	Number
>200	5
151~200	1
101~150	11
51~100	16
<50	12

마. 선발된 균주로 발효시킨 청국장 수분 함량

45종의 선발된 균주를 사용하여 제조한 청국장 시료 5 g을 분쇄하여 적외선 수분측정기 (FD-600, Kett)로 측정한 수분함량을 Table 5에 나타내었다. 증자대두의 수분함량은 56.6 %였으며 청국장의 수분함량은 56.3 % ~ 62.1 %로 나타났다. 주 등[43]은 시판 청국장의 수분함량 범위는 17.7 ~ 54.0 %이며 평균 수분함량은 32.7 %라고 보고하였는데, 이러한 차이는 콩의 증자상태, 발효균주의 특성 등에 따라 수분함량이 달라지기 때문이라 사료된다. 수분함량은 청국장 중의 제품의 수율 및 물성을 결정하는 중요한 품질관리 요소이므로 수분량을 뺀 건조중량에 대한 질소성분 분석값을 중심으로 우량 균주 및 발효물의 품질 평가 방안 및 종균화가 필요할 것으로 생각된다.

Table 5. 선발된 균주를 이용한 청국장의 수분 함량 (%)

Strain	Moisture	Strain	Moisture
A-MI	57.8	U-U1	61.2
B-S2	62.1	W-L1	59.3
B-S3	58.0	Y-L2	59.3
D-S1	58.9	AA-MI	59.4
D-S3	58.6	AB-L1	59.3
E-L1	60.7	AC-L1	58.6
F-SP1	58.5	AG-MI	59.1
H-S2	57.6	AH-L1	59.9
H-SS2	58.2	AH-P1	60.3
I-LM	59.1	AL-MI	61.4
I-W	58.4	AM-MI	60.2
J-4	59.8	AN-MI	59.2
J-S2	59.5	AN-P1	59.5
J-W1	59.4	AN-P2	59.2
K-S3	58.5	AP-M2	60.8
M-4	59.4	AP-P1	59.9
N-F-1	58.8	AQ-F1	59.2
N-F-2	57.4	AQ-P1	61.7
P-L1	59.0	AS-F1	56.3
P-L2	59.0	AT-L1	58.1
Q-L3	58.7	AT-MI	58.0
Q-S2	58.9	AU-MI	56.8
S-L3	58.0	Steamed soybean	56.6

바. 선발된 균주로 발효시킨 청국장장의 혈전용해능 확인

선발된 균주를 이용한 청국장장의 혈전분해능을 Table 6에 나타내었다. 청국장 10 g을 멸균 증류수 40 mL에 용출시킨 후 여과하여 지름 5.41 cm의 paper disk에 20 ul를 떨어뜨려 6시간동안 반응시킨 후 분해된 fibrin 분해환의 길이를 측정하였다. 증자대두에서는 분해환이 나타나지 않았으며 Y-L2의 분해환의 길이는 14.23 cm로 나타났고 5.41 cm로 나타난 N-F-1와의 차이가 8.82 cm로 나타나, 균주에 따른 혈전용해활성이 크게 차이가 나는 것을 알 수 있다. 윤 등[45]은 콩 발효 식품에서 분리된 *Bacillus* 속에 속하는 세균들의 혈전분해활성을 보고하였으며, 현 등[46]은 조효소액을 이용한 연구에서 조효소 1 mL 이 1분당 39.1 ug의 혈전을 분해하는 균주를 분리하였는데, 삼투압 등의 변화와 첨가된 탄소원 종류에 따라 혈전용해활성이 증가한다는 보고도 있어 추후의 연구를 통하여 혈전용해활성을 증가시키는 것도 가능할 것으로 생각된다.

Table 6. 선발된 균주를 이용한 청국장장의 혈전용해능 (cm)

Strain	Fibrinolytic activity	Strain	Fibrinolytic activity
A-MI	7.52	U-U1	9.27
B-S2	8.27	W-L1	9.53
B-S3	8.16	Y-L2	14.23
D-S1	12.37	AA-MI	11.32
D-S3	9.57	AB-L1	11.99
E-L1	10.41	AC-L1	8.06
F-SP1	10.82	AG-MI	12.37
H-S2	7.56	AH-L1	14.04
H-SS2	7.34	AH-P1	8.15
I-LM	7.26	AL-MI	8.46
I-W	9.49	AM-MI	7.17
J-4	7.61	AN-MI	6.92
J-S2	7.58	AN-P1	10.24
J-W1	8.15	AN-P2	7.74
K-S3	8.24	AP-M2	10.12
M-4	7.81	AP-P1	8.21
N-F-1	5.41	AQ-F1	7.44
N-F-2	5.41	AQ-P1	8.02
P-L1	7.19	AS-F1	8.42
P-L2	10.78	AT-L1	8.38
Q-L3	8.78	AT-MI	8.25
Q-S2	8.06	AU-MI	7.52
S-L3	9.03	Steamed soybean	5.41

Table 7. 선발된 균주를 이용한 청국장의 혈전용해능 분포

Ranges of Fibrinolytic activity	Number
> 10.00	11
9.00 ~ 9.99	5
8.00 ~ 8.99	14
7.00 ~ 7.99	12
6.00 ~ 6.99	1
< 6.00	2

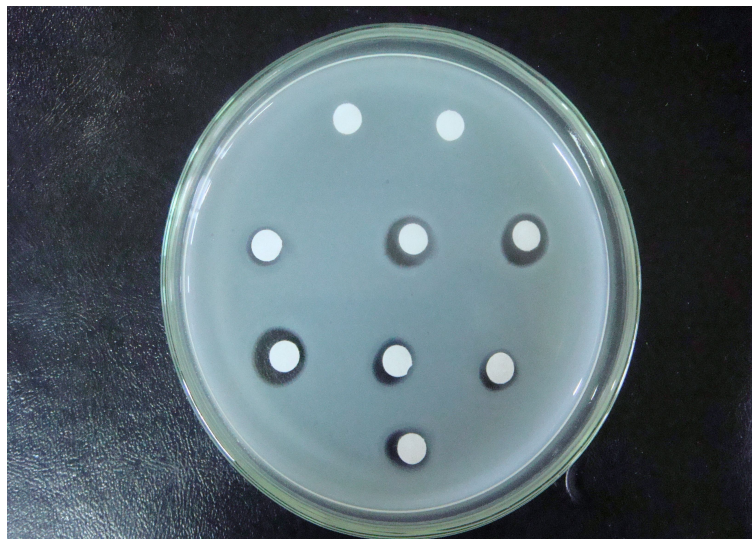


그림 4. 선발된 균주의 혈전용해능

사. 선발된 균주로 발효시킨 청국장의 지역특성 조사

선발된 균주로 발효시킨 청국장의 특성을 조사한 결과를 종합하여 분리된 균주의 지역별 특성을 조사하여 Table 8에 나타내었다. 전북 순창 지역의 시판 청국장의 경우 아미노태 질소 함량은 256.70~491.07을 나타내었다. 이는 대구 233.37~371.39, 경기도 포천 352.88~373.14, 충북 제천과 청원 342.35~384.36, 363.19~401.42에 비해 가장 큰 격차를 나타내었다. 총질소 함량은 전북 순창지역의 시판 청국장의 경우 6.30~7.95를 나타내었고 경기도 포천 6.29~7.98, 서울시 6.96~7.64로 나타내어 전체적으로 6.19에서 7.95의 값을 나타내었다. 수분 함량은 전체적으로는 57.4~62.1로 나타나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 점질물 길이 측정은 균의 차이에 따라 차이가 났다. 경기도 포천시의 경우 250cm 이상으로 가장 길게 나타났으며, 전북 순창 지역의 청국장 점질물 길이도 200cm 이상으로 길게 나타났다.

Table 8. 선발된 균주의 지역별 특성

지역	Strain	Amino nitrogen (mg%)	Total nitrogen (%)	Moisture (%)	Mucilage(cm)
서울시	AQ-P1, AQ-F1	397.28~4 12.28	6.96~ 7.64	59.2~ 61.7	50~80
경기도 포천시	Q-L3, Q-S2	352.88~3 73.14	6.29~ 7.98	58.7~ 58.9	138~ >250
경기도 남양주시	AU-M1	330.92	6.19	56.8	10
경기도 파주시	AG-M1	246.38	7.48	59.1	50
경기도 용인시	AC-L1	310.52	6.94	58.6	100
강원도 원주시	AS-F1	357.20	6.52	56.3	50
충북 충주시	AH-P1, AH-L1	218.01~2 99.38	6.70~ 6.76	59.9~ 60.3	100~150
충북 제천시	AN-M1, AN-P1, AN-P2	342.35~3 84.36	6.79~ 7.18	59.2~ 59.5	50~70
충북 청원군	AP-M2, AP-P1	363.19~4 01.42	7.13~ 7.18	59.9~ 60.8	50~150
충남 논산시	AL-M1, AM-M1	304.57~4 25.18	6.82~ 6.86	60.2~ 61.4	30
대구시	Y-L2, AB-L1, AT-M1, AT-L1	233.37~3 71.39	6.85~ 7.85	58.0~ 59.3	80~150
경남 김해시	U-U1	252.50	7.72	61.2	80
경남 진주시	W-L1	226.64	7.60	59.3	80
전북 순창군	A-M1, B-S2, B-S3, D-S1, D-S3, E-L1, F-SP1, H-S2, H-SS22, I-LM, I-W, J-W1, J-4, J-S2, K-S3, M-4, N-F1, N-F2, P-L1, P-L2, S-L3, AA-M1	256.70~4 91.07	6.30~ 7.95	57.4~ 62.1	5~>200

5. 청국장 발효용 후보균주 선발

우수균주를 이용하여 제조한 청국장의 품질특성을 고려하여 후보균주를 선발하기 위하여 아미노태 질소 함량, 혈전용해능, 점질물 길이를 각각 상, 중, 하 로 나누어 분류한 후 우수한 후보균주를 선발한 결과를 Table 9에 나타내었다. 우선 아미노태 질소 함량과 혈전용해능이 상급인 분류에서 점질물 길이의 상, 중, 하에 따라 P-L2, AN-P1, F-SP1을 선발하였다. 또한 아미노태 질소 함량이 높을 경우 쓴맛이 증가하여 소비자의 기호도가 떨어질 수 있는 점을 고려하여 아미노태 질소 함량이 낮지만 혈전용해능과 점질물 길이가 상급인 AH-L1 및 점질물 길이가 하급인 D-S1도 함께 선발하여 후보균주로 결정하였다. 이외에 한국장류협동조합에서 검색한 특허균주 4가지(*Bacillus subtilis* KCCM 11314, KCCM 11315, KCCM 11316, KCCM 3014)를 제공받아 연구에 사용하였다.

Table 9. 청국장 발효용 후보균주 선발

		Amino Nitrogen			
			High	Middle	Low
Fibrinolytic activity	High	Mucilage	High	P-L2	AH-L1
			Middle	D-S3, AA-M1, AN-P1	Y-L2 U-U1, W-L1, AB-L1
			Low	F-SP1	I-W, AP-M2 D-S1, AG-M1
	Middle	Mucilage	High	Q-S2, AT-L1	B-S2, B-S3, Q-L3 J-4, S-L3, AP-P1
			Middle	AC-L1	K-S3, AQ-F1, AT-M1 AH-P1
			Low	AS-F1	AL-M1
	Low	Mucilage	High	P-L1	A-M1, H-SS22, J-W1 M-4
			Middle	I-LM, J-S2	H-S2
			Low	AM-M1, AQ-P1	AN-M1, AN-P2, AU-M1 N-F-1, N-F-2

6. 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장 품질특성 조사

가. 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 환원당 함량

최종 선발된 후보균주와 특허균주를 이용하여 제조한 청국장의 환원당 함량을 Table 10에 나타내었다. 청국장의 환원당 함량은 P-L1이 1.37 g/100 ml로 다른 균주에 비해 가장 낮게 나타났다. DS-1, F-SP1, AH-L1, AN-P은 1.69 ~ 1.80 g/100 ml로 유사하게 나타났으며 이는 증자대두의 0.39 g/100 ml보다 약 6배 높은 결과이다. KCCM 11314 등 특허균주로 제조한 청국장의 환원당 함량은 후보균주로 제조한 청국장보다 다소 낮게 나타났다. 청국장의 환원당 함량은 일반적으로 발효 초기에 전분 분해 효소의 작용으로 증가되다가 미생물의 영양원, 유기산 발효의 기질로 이용되어 수치가 감소하게 된다.

Table 10. 후보균주 및 특허균주로 제조한 청국장의 환원당 함량 (g/100 ml)

Sample	Reducing sugar
D-S1	1.69
F-SP1	1.80
P-L2	1.37
AH-L1	1.76
AN-P1	1.73
KCCM11314	0.64
KCCM11315	1.36
KCCM11316	0.69
KCCM3014	1.55
Steamed soybean	0.39

나. 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 색도

최종 선발된 후보균주와 특허균주를 이용하여 제조한 청국장의 색도를 Table 11에 나타내었다. 청국장의 명도는 58.35 ~ 68.85로 나타났으며 P-L1과 AN-P1이 각각 58.92와 58.92로 낮게 나타나 어두운색을 나타내었으며 KCCM 11316과 KCCM 3014 등 특허균주를 이용한 청국장은 68.85와 68.26으로 증자 콩의 명도 68.26과 유사하게 나타났다.

후보균주로 제조한 청국장의 적색도는 특허균주로 제조한 청국장보다 다소 낮았으나 대부분의 청국장에서 적색도는 유사하게 나타났다. 청국장의 황색도는 21.38 ~ 27.30으로 나타났으며 AN-P1로 제조한 청국장의 황색도가 27.30으로 가장 높았고 F-SP1의 황색도가 21.38로 가장 낮게 나타났다. 따라서 후보균주로 제조한 청국장은 특허균주를 이용한 청국장 발효에 비해 어둡고 황색에 가까운 것으로 생각된다. 이는 후보균주로 제조한 청국장의 발효가 특허균주를 이용한 청국장 발효에 비해 활발히 진행되어 아미노-카르보닐 반응에 의한 melanoidin 색소형성이 강했기 때문으로 사료된다.

Table 11. 후보균주 및 특허균주로 제조한 청국장의 색도

Sample	L value	a value	b value
D-S1	62.17	5.52	23.28
F-SP1	63.90	6.71	21.38
P-L2	58.92	5.45	24.04
AH-L1	61.11	5.70	24.15
AN-P1	58.35	5.83	27.30
KCCM11314	63.23	6.54	22.13
KCCM11315	61.70	6.23	22.54
KCCM11316	68.85	6.46	22.54
KCCM3014	68.26	6.46	23.78
Steamed soybean	68.26	5.92	23.78

다. 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 관능평가

최종 선발된 후보균주와 특허균주를 이용하여 제조한 청국장의 관능검사 결과를 Table 12에 나타내었다. 청국장의 관능검사에 대한 이해도를 충분히 숙지시킨 20명의 패널을 선정하여 색, 냄새, 단맛, 쓴맛, 전체적인 기호도를 매우 나쁘다(1점), 나쁘다(2점), 보통이다(3점), 좋다(4점), 매우 좋다(5점)으로 분류하여 5점 채점법으로 실시하였다. 청국장의 색에 대한 기호도는 KCCM 11316이 가장 우수한 것으로 나타났으며 다음으로 KCCM 11315, KCCM 3014 및 AH-L1가 비교적 높게 나타났다. 냄새는 KCCM 11316 균주가 4 ± 0.28 점으로 가장 좋은 것으로 평가되었으며, 쓴맛과 단맛에서는 KCCM 11315 균주로 제조한 청국장이 가장 나쁘게 나타났다, 단맛은 AH-L1이 4 ± 0.16 점으로 가장 우수한 것으로 나타났다. 전체적 기호도에서는 AH-L1이 가장 높게 평가되었으며, 후보균주로 제조한 청국장이 특허균주를 이용한 청국장에 비해 관능검사 결과가 우수한 것으로 나타났다.

Table 12. 후보균주 및 특허균주로 제조한 청국장의 관능평가

	D-S1	F-SP1	P-L2	AH-L1	AN-P1	KCCM 11314	KCCM 11315	KCCM 11316	KCCM 3014
Color	2 ± 0.41	3 ± 0.40	3 ± 0.35	4 ± 0.23	3 ± 0.21	2 ± 0.22	4 ± 0.32	4 ± 0.42	4 ± 0.41
Flavor	3 ± 0.82	1 ± 0.26	2 ± 0.37	3 ± 0.13	3 ± 0.42	2 ± 0.27	3 ± 0.14	4 ± 0.28	2 ± 0.37
Bitter taste	3 ± 0.31	3 ± 0.28	3 ± 0.56	3 ± 0.15	3 ± 0.24	3 ± 0.23	1 ± 0.75	3 ± 0.45	2 ± 0.28
Sweet taste	3 ± 0.56	3 ± 0.28	3 ± 0.36	4 ± 0.16	3 ± 0.17	2 ± 0.18	1 ± 0.44	2 ± 0.28	2 ± 0.56
Overall acceptability	3 ± 0.48	3 ± 0.45	3 ± 0.52	4 ± 0.24	3 ± 0.16	2 ± 0.44	2 ± 0.26	3 ± 0.45	3 ± 0.24

1 : 매우 나쁘다 2 : 나쁘다 3 : 보통이다 4 : 좋다 5 : 매우 좋다

라. 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장의 pH

최종 선발된 후보균주와 특허균주를 이용하여 제조한 청국장의 pH는 분쇄한 시료 5 g을 증류수 45 mL에 현탁시켜 pH meter(420A, Orion)로 측정하여 Table 13에 나타내었다. 청국장 발효시 pH값의 차이는 전체적으로 6.69 ~ 7.63 이었고 증자대두의 pH는 6.69를 나타내었고, AN-P1이 7.63으로 약알칼리성이었다. 후보균주가 특허균주에 비해 pH는 조금 더 높은 것으로 나타났다. 청국장의 pH는 발효 중에 생성되는 아미노산과 ammonia에 의해서 높아진다고 보고되어 있으며, 석 등[47]은 증자콩의 pH는 6.23이나 청국장의 pH는 8.05정도라고 보고하였으며, 손 등[48]은 *Bacillus sp.* CS-17로 발효시킨 청국장의 pH는 8.56이라 보고하여 본 실험에 비해 다소 높게 나타났다. 그러나 pH와 청국장의 품질과의 관계에 대하여 보고된 바 없으며 ammonia의 생성이 단백질이나 아미노산의 탈아미노 반응에 의하여 생성됨을 고려할 때 pH가 지나치게 높을 경우는 오히려 품질이 좋지 않을 것으로 사료된다.

Table 13. 후보균주 및 특허균주로 제조한 청국장의 pH

Sample	pH
D-S1	7.50
F-SP1	6.88
P-L2	7.12
AH-L1	7.54
AN-P1	7.63
KCCM11314	7.08
KCCM11315	7.13
KCCM11316	6.84
KCCM3014	6.75
Steamed soybean	6.69

마. 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장 DPPH 자유라디칼 소거능

최종 선발된 후보균주와 특허균주를 이용하여 제조한 청국장의 DPPH 자유라디칼 소거능을 Table 14에 나타내었다. DPPH 자유라디칼 소거능은 항산화 활성과 관련되는 전자공여능으로, 노화억제 등과 관련된 생리기능을 나타내는 지표이다. 증자대두는 45.6 %, 후보균주와 특허균주는 52.2 ~ 62.6 %를 나타냈다. 가장 높은 소거능을 가진 특허균주인 KCCM 11316는 62.6 %, 후보균주인 AH-L1는 61.1 %로 증자대두 46.6 %의 비해 높은 값을 나타내었다. 이 등[49]은 천일염을 함유한 청국장의 항산화 효과에 대한 보고에서 *Bacillus subtilis* DJI 균주를 접종하여 발효시킨 청국장은 시판청국장에 비하여 자유라디칼 소거능이 우수하다고 보고한 바 있어, 후보종균이나 부소재의 종류 및 첨가량에 따라 청국장의 DPPH 자유라디칼 소거능을 향상시킬 수도 있을 것으로 생각 된다.

Table 14. 후보균주 및 특허균주로 제조한 청국장의 DPPH 자유라디칼 소거능 (%)

Sample	DPPH Free-radical Scavenging Activity
D-S1	52.2
F-SP1	56.0
P-L2	56.2
AH-L1	61.1
AN-P1	58.9
KCCM11314	57.0
KCCM11315	57.6
KCCM11316	62.6
KCCM3014	56.1
Steamed soybean	45.6

바. 후보균주 및 특허균주를 이용한 청국장용 아미노태 질소 및 총질소 함량

최종 선발된 후보균주와 특허균주를 이용하여 제조한 청국장용 아미노태 질소함량 및 총질소 함량을 Table 15에 나타내었다. 증자대두의 아미노태 질소 함량은 121.69 mg%인 반면, F-SP1의 아미노태 질소 함량이 443.87 mg%로 가장 높게 나타났으며 KCCM 3014 > KCCM 11315 > KCCM 11316 > AN-P1의 순서로 나타났다. 총질소 함량은 증자대두가 29.5 %로 나타났고 D-S1이 28.6%로 가장 높은 함량을 나타냈다. 동일한 조건에서의 아미노태 질소 함량, 총질소 함량이 각기 다른 이유는 균주의 발효 특성에 따른 차이 때문인 것으로 사료된다.

Table 15. 후보균주 및 특허균주로 제조한 청국장용 아미노태 질소함량(mg%) 및 총질소 함량(%) (Dry weight basis)

Sample	Amino nitrogen	Total nitrogen
D-S1	297.45	28.6
F-SP1	443.28	25.2
P-L2	331.87	25.8
AH-L1	298.67	25.3
AN-P1	397.23	26.2
KCCM 11314	305.40	26.1
KCCM 11315	384.12	27.2
KCCM 11316	347.35	25.8
KCCM 3014	421.23	26.5
Steamed soybean	121.69	29.5

제 1 세부과제

제 3 절 우수 종균을 이용한 국내 청국장 품질 표준화 연구

1. 서론

장류란 김치, 주류와 아울러 우리나라의 대표적인 전통발효식품으로써 미생물을 이용하여 단백질의 영양적 이용률을 높여 가공한 것이다[50,51]. 발효에 관여하는 주요 미생물로는 곰팡이 속의 *Aspergillus* 속과 *Bacillus* 속, 유산균과 효모 등이 있으며 이러한 다양한 균주의 상호 작용에 의해서 발효식품이 만들어진다[52,53]. 이러한 전통발효식품은 전통적 제조 방법에 의한 가내수공업적 제조 시스템으로 위생적 취약성 및 인력의 한계 등으로 표준화의 어려움이 있었다. 장류제품에서 검출되는 주요 미생물은 전통식과 개량식으로 제조되는 제품에 따라 차이가 있으며 특히 최근 주로 이용되고 있는 개량식 장류 제조에 관여하는 균주는 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)와 *Aspergillus oryzae* 등이 있다[54-60]. 그러나 장류 제조 공정 중 혼입되는 *Bacillus cereus* (*B. cereus*)와 같은 오염균주들은 토양세균의 일종으로, 아포형태로 존재하다가 식품에 오염되어 독소를 만들어내는 식중독 균주로서 이로 인해 발효에 큰 영향을 받게 된다[61-63].

Bacillus 속에는 약 100여 종의 호기성 또는 통성 혐기성의 포자를 생성하는 그람 양성균의 간균들이 포함되어 있다. 대부분의 경우 *Bacillus* 속 세균들은 토양이나 주변의 환경에서 흔히 존재하며 대다수가 비병원성이다[64]. *B. cereus*는 그람 양성 균으로서 포자를 형성하며, 운동성을 지닌 호기성 균이나 혐기적 상태에서도 잘 자란다. 이 균은 토양, 물, 공기 등 자연계에서 흔히 발견되는 미생물로 식품에 혼입될 가능성이 높아 과채소류, 과채류가공품, 곡류 건조제품, 향신료, 식육 및 식육가공품, 유제품 그리고 즉석 조리식품 등에 오염될 확률이 매우 높은 것으로 보고되고 있다[65,66]. *B. cereus*는 일정한 생육 조건이 되면 독소를 생성하며, 생성된 독소에 의하여 식중독이 발생한다[67-70]. *B. cereus*에 의하여 생성된 독소는 diarrhoeal type과 emetic type의 두 가지가 있다. Diarrhoeal type은 *B. cereus*가 소장에서 성장하는 동안에 생산되는 enterotoxin에 의해 발생하며[71] diarrhoeal syndromes는 단백질이 포함된 식육 제품이나 채소수프, 소스, 푸딩 등의 식품에서 주로 발생한다. Emetic type의 독소는 식품에서 *B. cereus*가 영양 세포상태로 성장하거나 발아하는 동안에 생산된 독소로 쌀, 파스타, 국수 등을 튀기거나 조리한 전분질 식품에 의해서 발생한다[72]. 특히 *B. cereus*는 불안정한 조리과정을 거친

식품을 48°C 이하로 유지한 경우 빠른 증식을 하여 식중독을 다수 일으키나, *B. cereus*에 의한 식중독 증상은 미약하고 보통 24시간 내에 치료가 가능하므로 식중독 발생 건수에 비해 보고가 많이 되고 있지 않다[73]. 하지만 *B. cereus*가 생장함에 따라 쓴맛이 생겨[74] 제품의 품질을 현저히 저하시키므로 장류식품에서 검출 기준을 도입하여 관리를 실시할 필요가 있다. *B. cereus*의 포자는 5-6 log spores/g의 범위에서 일반적인 감염 수치이며, 과거부터 *B. cereus*의 포자를 비활성화 시키기 위한 여러 가지 방법이 연구[75, 76] 되어 오고 있다.

본 연구는 선별된 우수균주인 *B. subtilis* P-L2를 이용하여 국내 장류 제품 제조 시 발견되고 있는 *B. cereus*의 효과적인 제어 방법을 탐색하여 국내 장류제품의 품질향상을 도모하고자 시행되었다. 또한 제조된 *B. subtilis* P-L2 종균제품의 최적 저장 온도 및 저장 기간을 설정하고, 이를 효율적으로 국내에 보급하기 위해 공장단위의 대용량 실증실험 및 보급 시스템 구축 및 산업화 기반 조성을 위한 조사를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 점질물 길이 측정

점질물 길이는 Investigative approach to Natto(Japan) 법에 준하여 측정하였다.

나. 수분 측정

수분 함량은 적외선 수분측정기(FD-600, Kett)로 40분간 측정하였다.

다. pH 측정

pH는 pH meter(Orion 420A, USA)로 측정하였다.

라. 총질소 측정

청국장장의 총질소 함량 측정은 시료 1 g을 취하여 Kjeldahl flask에 넣고, K_2SO_4 와 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 를 9 : 1의 비로 혼합한 촉매제 2~3 g과 conc. H_2SO_4 15ml을 넣어 2시간 동안 분해시킨 후 증류수를 첨가하여 100 ml로 정용하고 소비된 0.02 N HCl의 ml수를 총질소로 환산하였다. 증류시 사용한 시약은 NaOH - Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)용액과 2% Boric acid (H_3BO_3)용액 그리고 지시약은 Bromocresol green과 Methyl red를 에탄올에 2 : 1의 비로 혼합하여 계산하였다.

마. 아미노태 질소 측정

청국장의 아미노태 질소 함량 측정은 시료를 5 g을 250 ml 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 100 ml 까지 정용한다. 이 중 50 ml을 취하여 100 ml beaker에 넣은 후 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 중화한다. 여기에 중성포르말린 20 ml을 가하고 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 적정한다. 적정의 종점을 결정하기 위하여 pH meter (Orion 420A, USA)를 이용하였다.

바. 혈전용해능 측정

혈전용해효소의 활성은 fibrin plate method로 측정하였다. 0.1 M PBS 용액(pH 7.5) 10ml에 0.06g의 fibrinogen을 첨가하여 37°C에서 완전히 용해시켰다. 20 unit의 thrombin을 첨가하여 섞은 후 30분간 정치하여 불투명의 fibrin plate를 제조하였다. 지름 8mm의 paper disc에 청국장 추출 효소액 20 ul씩 흡수시킨 후 fibrin plate 위에 놓고 37°C에서 4시간 반응후 fibrin이 분해되어 투명해진 직경을 측정하여 상대적인 효소 활성을 구하였다.

사. 바이오제닉 아민 측정

히스타민 및 티라민 함량측정은 청국장 5 g을 정확히 칭량하여 0.1 N HCl 50 ml을 가하고 균질화시킨 후 여과(Whatman. No.2) 하여 시료로 사용하였다. 또한 히스타민(Sigma. USA) 및 티라민(Sigma. USA) 0.1 g 0.1N HCl 100 ml에 완전히 녹인 후 표준용액으로 사용하였다. 시료 및 표준용액 1 ml을 각각 취하여 포화탄산나트륨 0.5 ml, 1% 염화단실아세톤 용액 0.8 ml을 가하여 45°C에서 1시간 환류 추출하였으며 이후 10% 프롤린 용액 0.5 ml, 에테르 5 ml을 가하여 25°C에서 10분간 진탕시킨 후 원심분리(8000 rpm)하여 상정액을 질소농축 시킨 후 아세트나이트릴에 녹여 HPLC로 분석하였다. 이때 HPLC 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for histamine and tyramine content analysis

Item	Condition
Column	Capcell pak C18 UG 4.6 × 250 mm
Mobile phase	Mixture of acetonitrile and water
Detector	254 nm
Flow rate	1 ml/min
Injection volume	5 ul
Running time	40 min

아. 혼합배양 사용 균주

실험에 사용된 균주는 생물공학실에서 분리한 *B. subtilis* 2종과 *B. cereus* KCCM 12142를 사용하였다.

자. 현장 컨설팅

국내 청국장 제조업체 중 *B. cereus*가 검출되는 문제점을 가진 업체를 선정하여 제조공정 중 *B. cereus*가 오염될 수 있는 과정을 교육하고 설비 세척 및 살균법 지도에 관한 현장 컨설팅을 수행한 후, 제조된 청국장과 그렇지 않은 업체의 청국장으로부터 *B. cereus* 검출여부를 확인하였다. 컨설팅의 개요는 Fig. 1에 나타내었다.

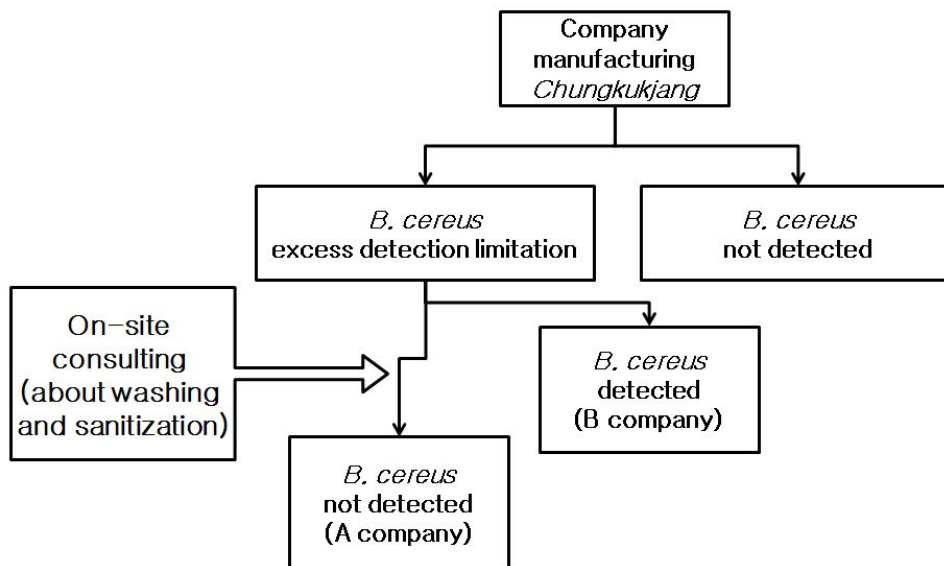


Fig. 1. *Bacillus cereus* 오염을 제어하기 위한 청국장 제조업체를 위한 컨설팅 프로그램

차. *B. cereus*의 검출

*B. cereus*의 검출은 시료 25g을 취하여 225mL의 멸균 인산완충용액에 가하고 균질화 하였다. 균질화 한 시험액을 MYP agar (Merck, Germany)에 200 μ L씩 도말한 뒤 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양 한 후 혼탁한 환을 가지며 lecithinase를 분해한 분홍색 집락을 선별 계수하였다. 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선별하여 Nutrient agar (Merck, Germany)에 접종하고 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양 한 후 확인된 균수에 희석배수를 곱하여 최종 집락수를 산정하였다.

카. *B. subtilis*와 *B. cereus*의 혼합 비율 설정

*B. subtilis*의 혼합배양에 의한 효율적인 *B. cereus* 생육저해 조건을 검색하기 위하여 각 균주를 Table 2 에 나타낸 농도로 조절하여 혼합한 후 배양하여 본 연구에 사용하였다.

Table 2 . *B. subtilis* 와 *B. cereus* 의 혼합배양을 위한 균주 배합 농도

<i>B. subtilis</i> P-L2 (CFU/mL)	<i>B. cereus</i> KCCM 12142 (CFU/mL)
10 ³	10 ³
	10 ⁴
	10 ⁵
	10 ⁶
10 ⁶	10 ³
	10 ⁴
	10 ⁵
	10 ⁶

타. *B. subtilis*와 *B. cereus*의 혼합 배양

*B. subtilis*와 *B. cereus*를 혼합배양 하는 과정은 Fig. 2에 나타내었다. 먼저 본 연구에서 분리한 *B. subtilis* P-L2를 *B. cereus* KCCM 12142와 표 1 과 같은 비율로 TSB (Trypticase Soy Broth ; BBL, USA) 배지에 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 shaking 배양한 후 TSA (Trypticase Soy Agar ; BBL, USA) 배지에 도말하였다. 위의 조건과 동일한 비율로 *B. subtilis*와 *B. cereus*를

soymilk 배지에 접종 한 후, 6시간 간격으로 TSA 배지에 도말하여 생균수를 측정하여 혼합 배양에 의한 *B. cereus* 저해효과를 측정하였다.

3. 종균 제품의 안정성 확보를 위한 장기 저장 기술 개발

경상대학교에서 개발한 종균 제품의 안정성 확보를 위하여 종균제품의 저장 온도 및 저장 기간을 설정하고자 하였다.

가. 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 청국장 점질물의 변화

종균 제품의 안정성 확보를 위하여 종균제품의 저장 온도 및 저장 기간을 설정하기 위해 종균을 각각 4℃, 실온, 37℃에서 보관하면서 3개월, 6개월 후 종균으로 청국장을 제조하여 청국장 점질물 생산량을 비교하여 Fig.2에 나타내었다. 초기 종균 제품을 이용하여 접종한 청국장에서 생성된 점질물의 길이는 270cm 였으나, 4℃에서 종균을 보관한 후 3개월째에 청국장을 제조하였을 때 점질물의 길이는 150cm, 6개월째에는 100cm로 점질물 생성능이 점점 약화됨을 알 수 있었다. 또한 37℃에서 3개월간 보관한 종균으로 제조한 청국장의 점질물 길이는 260cm, 6개월간 보관시에는 117cm로 나타나 적절하지 못한 생육환경의 저온 및 고온에서 종균제품의 보관은 균주의 활성을 떨어뜨려 청국장 제조효율이 감소함을 알 수 있었다. 반면 종균 제품을 실온에서 보관하였을 때 3개월째에 제조한 청국장의 점질물길이는 260cm, 6개월째에는 220cm로 나타나, 종균 제품은 특별한 보관온도의 설정 없이 실온에서 보관하여도 6개월 정도의 장기보관이 가능할 것이다.

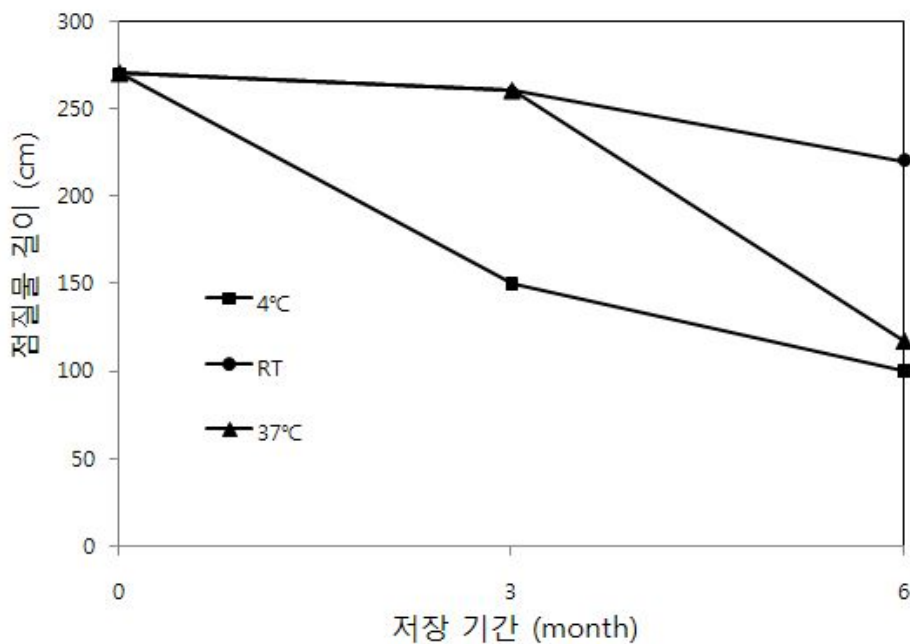


Fig. 2. 종균의 저장 기간 및 저장 온도에 따른 청국장의 점질물 길이

나. 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 수분 및 pH의 변화

종균 제품의 안정성 확보를 위하여 종균제품의 저장 온도 및 저장 기간을 설정하기 위해 종균을 각각 4℃, 실온, 37℃에서 보관하면서 3개월, 6개월 후 종균으로 청국장을 제조하여 수분함량 및 pH 변화를 비교하여 Fig. 3 에 나타내었다. 초기 종균 제품을 이용하여 집종한 청국장에서 생성된 수분함량은 56.6%였으며, 4℃에서 종균을 보관한 후 3개월째에 청국장을 제조하였을 때 수분함량은 59.6%, 6개월째에는 58.6%로 나타났다. 또한 37℃에서 3개월간 보관한 종균으로 제조한 수분함량은 58.9%, 6개월간 보관시에는 59.1%였으며, 실온에서 보관하였을 때 3개월째에 제조한 청국장의 수분함량은 59.4%, 6개월째에는 58.9%로 나타나, 보관온도 및 저장 기간이 품질특성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 보관 온도 및 기간에 따른 종균 제품은 Fig. 4 에 나타낸 바와 같이 청국장 제조시 pH 6.85~7.96 사이로 나타나 pH에도 큰 영향을 미치지 않는다고 사료된다. 따라서 종균 제품은 실온에서 6개월 이상의 장기보관이 가능할 것이다.

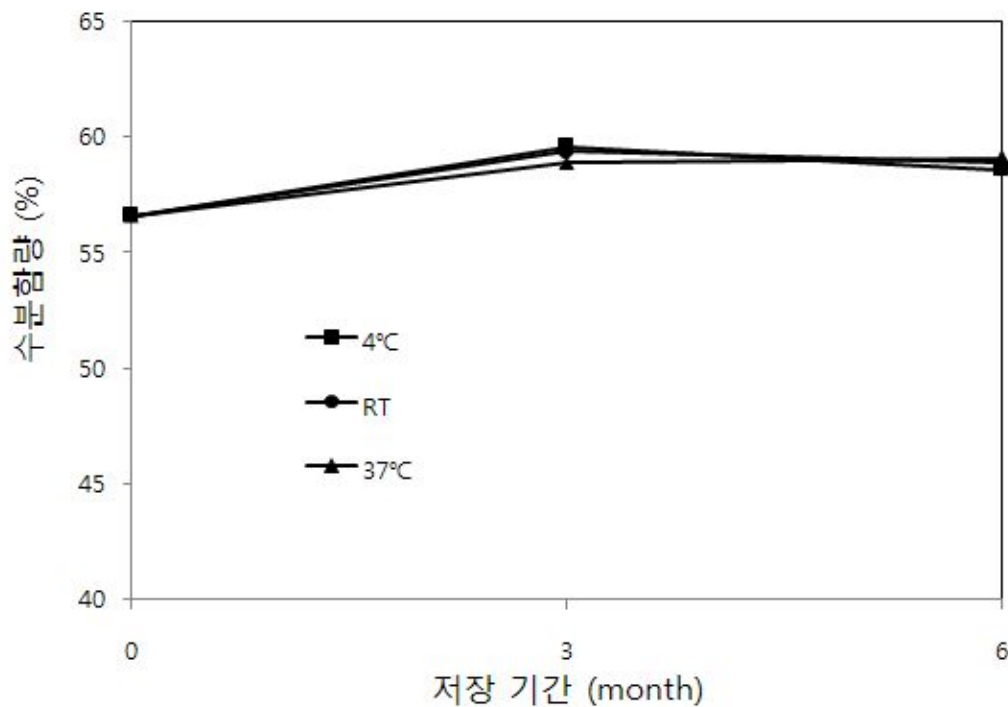


Fig. 3. 종균의 저장 기간 및 저장 온도에 따른 청국장의 수분함량

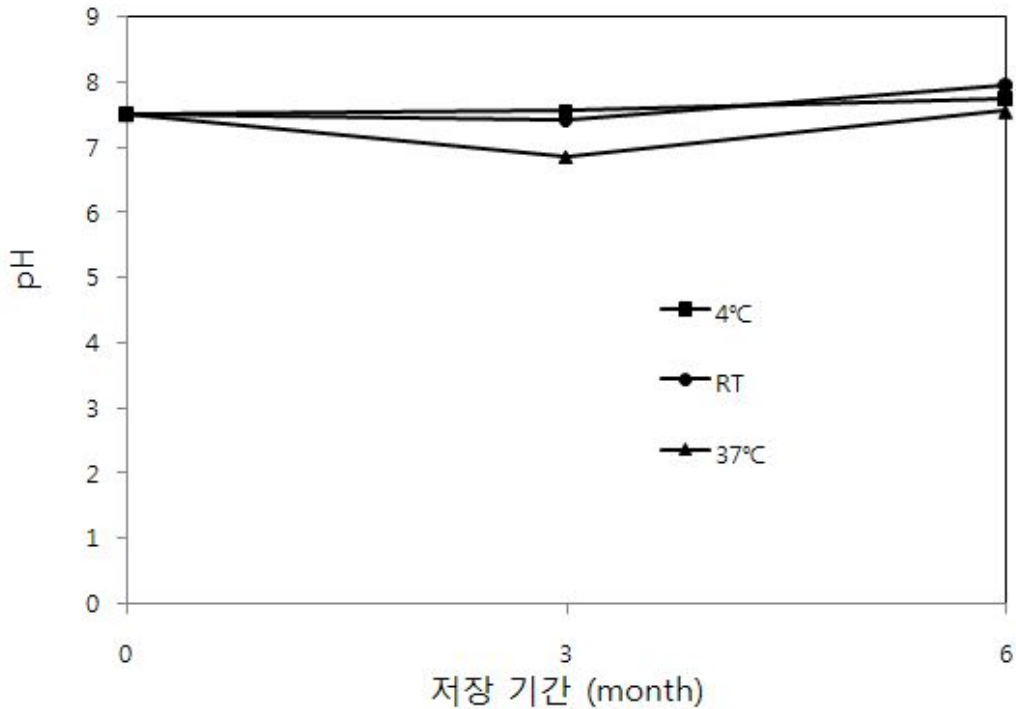


Fig. 4. 종균의 저장 기간 및 저장 온도에 따른 청국장의 pH

다. 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 총질소 및 아미노태 질소의 변화

종균 제품의 안정성 확보를 위하여 종균제품의 저장 온도 및 저장 기간을 설정하기 위해 종균을 각각 4°C, 실온, 37°C에서 보관하면서 3개월, 6개월 후 종균으로 청국장을 제조하여 총질소 및 아미노태 질소 함량의 변화를 비교하여 Fig. 5, 6 에 나타내었다. 초기 종균제품으로 제조한 청국장의 총질소 함량은 32.31%였으며 4°C, 37°C 및 실온에서 6개월간 보관한 후 청국장을 제조하였을 때에도 약 31.44~31.64%로 나타나 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간이 청국장 제조시 총질소 함량에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 저장 온도 및 저장 기간에 따른 청국장 제조시의 아미노태 질소의 변화를 관찰한 결과, 초기 종균 제품을 이용하여 집중한 청국장에서 생성된 아미노태 질소 함량은 583.14 mg% 였으나, 4°C에서 종균을 보관한 후 3개월째에 청국장을 제조하였을 때 아미노태 질소 함량은 581.674 mg%, 6개월째에는 430.68 mg%로 나타나 아미노태 질소의 함량이 저장 기간이 경과할수록 점점 감소함을 알 수 있었다. 또한 37°C에서 3개월간 보관한 종균으로 제조한 청국장의 아미노태 질소 함량은 590.85 mg%, 6개월간 보관시에는 399.66 mg%로 나타나, 적절하지 못한 생육환경의 저온 및 고온에서 종균 제품의 보관시 균주의 단백질 분해 효소의 활성이 저하되어 청국장 제조효율이 감소하는 것이라 사료된다. 종균 제품을 실온에서 보관하였을 때 3개월째에 제조한 청국장의 아미노태 질소

합576.66 mg%, 6개월째에는 455.71 mg%로 나타나 저장 기간이 경과함에 따라 아미노태 질소 생성량이 점차 감소하였지만, 저온 및 고온 보관과 비교하여 감소폭이 적으며 특별한 온도 조절없이 약 3~6개월 이상 저장이 가능하여 저장·유통비용 절감효과도 기대할 수 있을 것이다.

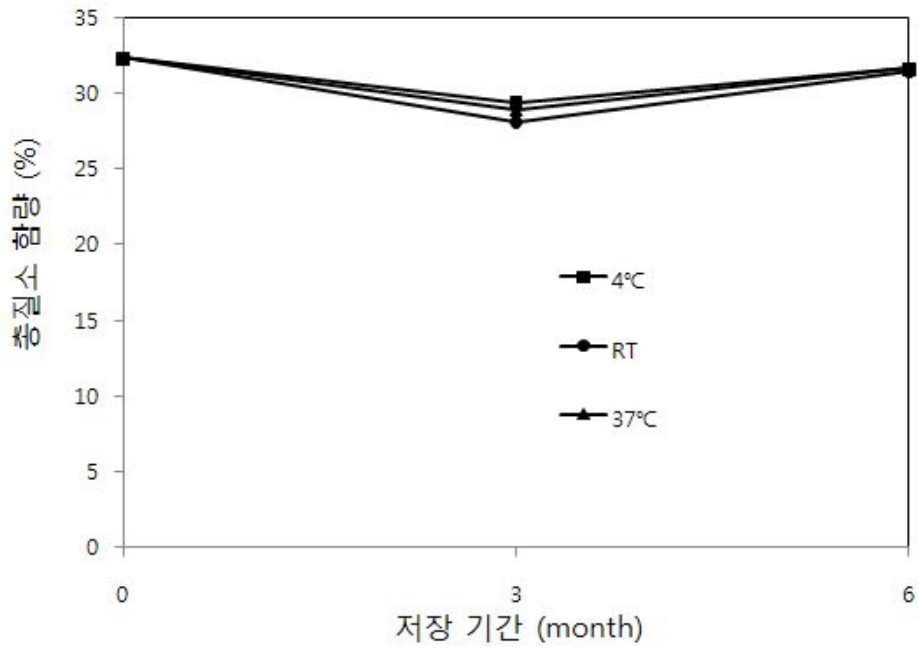


Fig. 5. 종균의 저장 기간 및 저장 온도에 따른 청국장의 총질소 함량

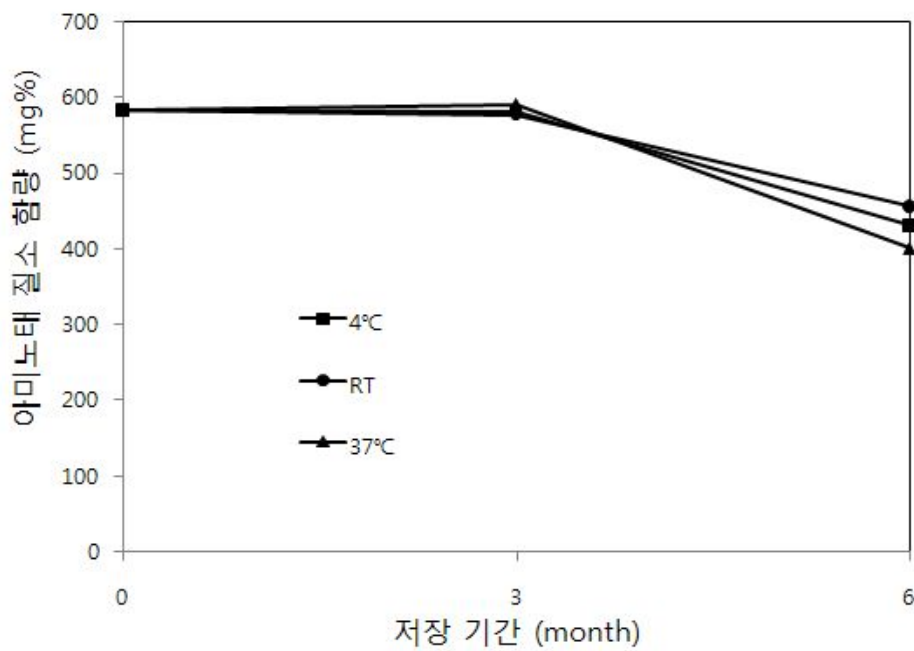


Fig. 6. 종균의 저장 기간 및 저장 온도에 따른 청국장의 아미노태 질소 함량

라. 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 혈전용해능의 변화

종균 제품의 안정성 확보를 위하여 종균제품의 저장 온도 및 저장 기간을 설정하기 위해 종균을 각각 4℃, 실온, 37℃에서 보관하면서 3개월, 6개월 후 종균으로 청국장을 제조하여 혈전용해능을 비교하여 Fig. 7에 나타내었다. 초기 종균제품으로 제조한 청국장의 혈전용해활성에 의한 클리어존의 크기는 12.32 mm였으며 4℃에서 3개월 보관시 9.72 mm로 약간 감소되었지만, 37℃ 및 실온에서 6개월간 보관한 후 청국장을 제조하였을 때에도 약 10.23~11.51 mm로 나타나 종균 제품의 저장 온도 및 저장 기간이 청국장 제조시 혈전용해능에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

본 연구에서 제조된 청국장 발효용 종균 제품은 아포형으로 제조되어 있기 때문에 저장 기간 및 보관온도에 의해 큰 영향을 받지 않지만, 균주의 최적 활성 유지 및 저장 비용 절감을 위하여 실온에서 보관하며 최대 6개월 이내에 사용하는 것이 효율적이라 사료된다.

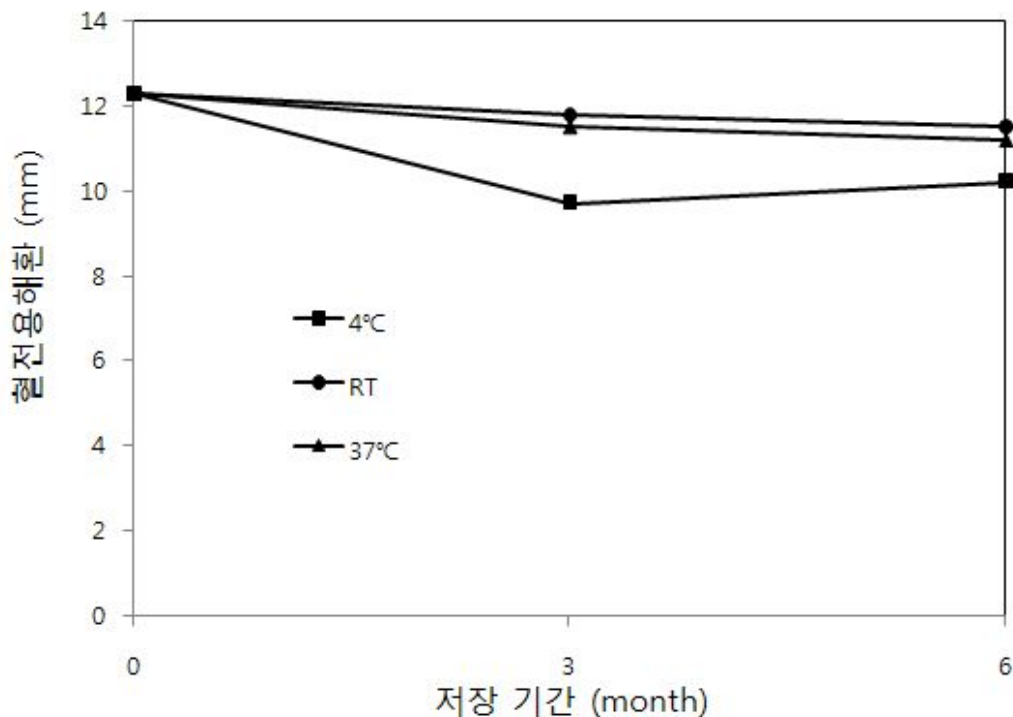


Fig. 7. 종균의 저장 기간 및 저장 온도에 따른 청국장의 혈전 용해능

4. 발효 중 바이오제닉 아민 생산량 조사

본 연구에서 선별된 우수균주인 *Bacillus subtilis* P-L2로 제조된 청국장 발효용 종균 제품으로 청국장 발효 시 시간에 따른 대표적인 바이오제닉 아민인 히스타민과 티라민의 생성정도를 분석하여 Table 3에 나타내었다. 종균을 이용하여 청국장 발효 시 발효 시간이 경과함에 따라 초기에는 검출되지 않았던 히스타민이 약 24시간째에는 19.34 mg/kg, 72시간째에는 48.68 mg/kg으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 티라민의 함량 또한 유사하게 증가하는 경향을 보였다. 보통 바이오제닉 아민은 미생물들에 의해 고단백 질성 식품으로부터 생성되는 물질로서, 고단백질 원료인 콩의 발효에 의해 제조되는 청국장 및 모든 장류제품에서 불가피한 원인이 된다. 본 연구에서 사용된 종균에 의한 청국장 발효중 바이오제닉 아민함량은 발효시간이 경과함에 따라 서서히 증가하는 경향을 보였지만, 이를 이전에 검색한 타사의 시판 청국장 제품과 비교하였을 때는 낮은 수준으로 되었기 때문에, 우수 발효 균주의 선별을 통해 충분히 제어할 수 있는 요소로 사료된다.

Table 3. *Bacillus subtilis* P-L2의 종균 제품을 이용해 제조된 청국장의 발효 시간에 따른 바이오제닉 아민 함량의 변화

	히스타민 (mg/kg)	티라민 (mg/kg)
0	0	135.81
12	18.8	239.65
24	19.34	427.93
36	19.53	415.93
48	28.68	564.90
72	48.68	582.56

5. 혼합배양에 의한 발효 중 *Bacillus cereus*의 생육 저해 효과

가. 업체별 *B. cereus*의 검출

청국장 제조의 원료 및 제조 공정 중 *B. cereus*가 오염될 수 있는 요인을 Fig. 8에서 살펴보면, 우선 원료 소맥과 소맥분 증자과정에서 일반세균 및 *B. cereus*가 50 CFU/g 이상으로 나타나 양성으로 판명되었으며, 제국 공정 및 대두가 증자 후 방냉기를 통과하면서 공중낙하균 또는 컨베어 오염물에 의해 *B. cereus*가 검출될 수 있다. 이렇게 초기 오염이 발생하면 최종 발효 산물에서도 *B. cereus*가 검출되게 된다. 청국장 제품에 *B. cereus*가 오염되면 식중독을 유발하는 독소가 생성될 뿐만 아니라 *B. subtilis*에 의한 정상적인 발효가 저해되게 되므로 업체에 심각한 피해를 유발한다. *B. subtilis*에 의해 정상적으로 발효된 청국장 제품과 *B. cereus*가 오염되어 비정상 발효가 일어난 청국장 제품을 Fig. 9에 비교하여 나타내었다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 *B. cereus*가 검출되는 문제점을 지닌 업체를 선정하여 *B. cereus*가 오염되는 경로를 충분히 교육하고, 장류제품의 원료와 제조 공정상 이용되는 설비의 세척 등에 관한 현장 컨설팅을 수행하였다. 현장 컨설팅을 받은 A업체 및 그렇지 않은 B업체의 청국장 제품을 MYP 배지에 도말한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 제조설비 및 환경 개선을 거친 A업체에 비해 B업체 제품에서 *B. cereus*로 의심되는 균의 오염이 심한 것을 알 수 있었다.

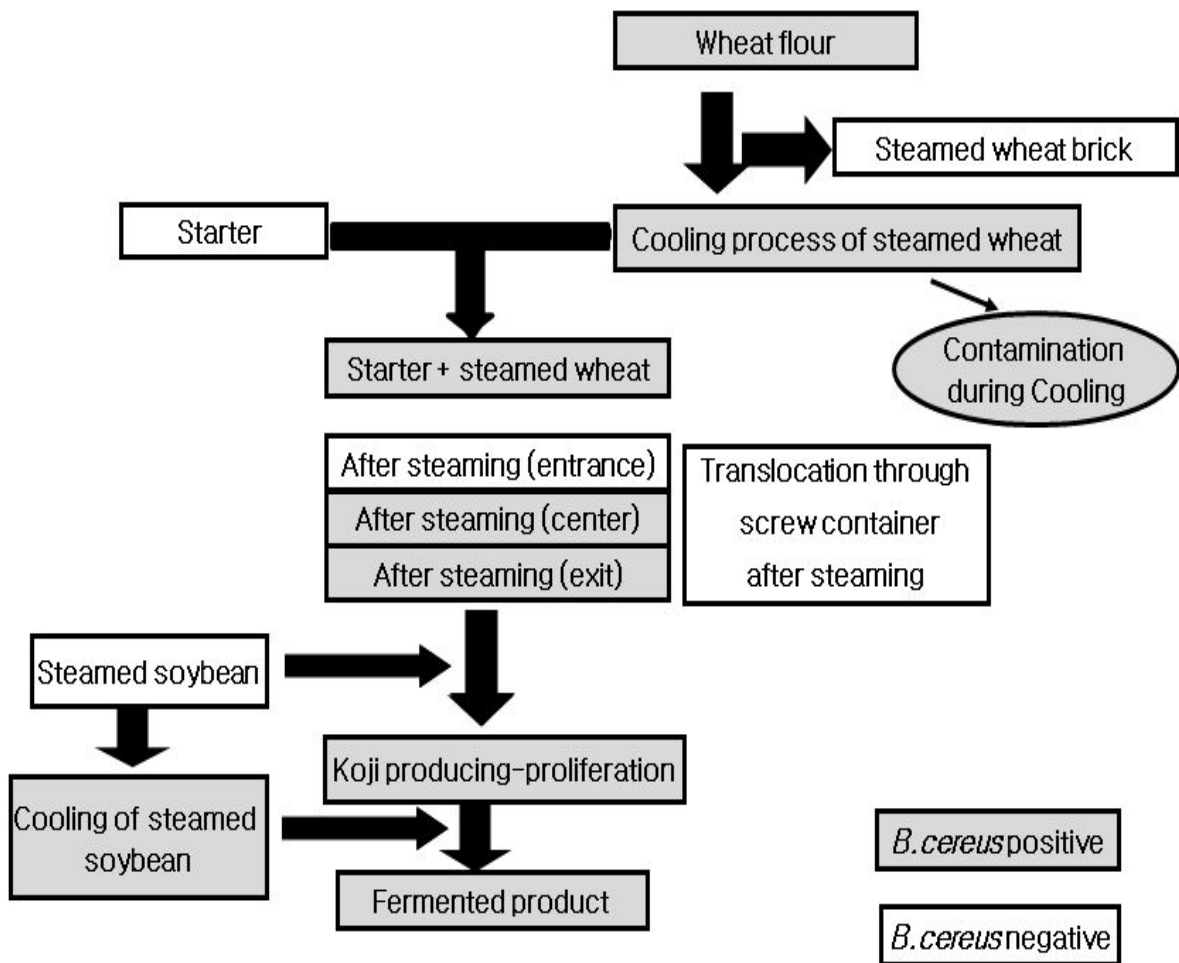


Fig. 8. 청국장 제조 중 *B. cereus*의 오염 위험성이 있는 단계

(A)

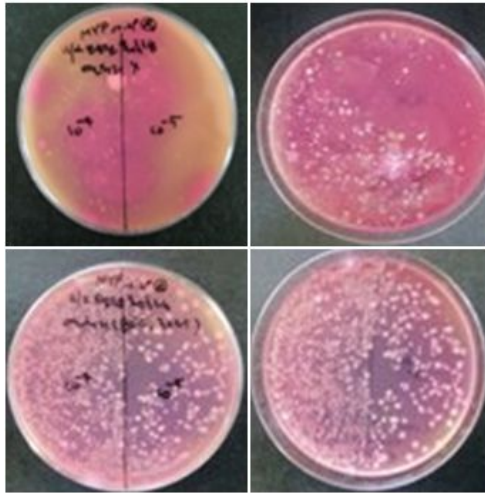


(B)



Fig. 9 . *B. subtilis*에 의해 정상적으로 발효된 청국장(A)과 *B.cereus*에 의해 오염된 청국장(B)의 비교

(A)



(B)

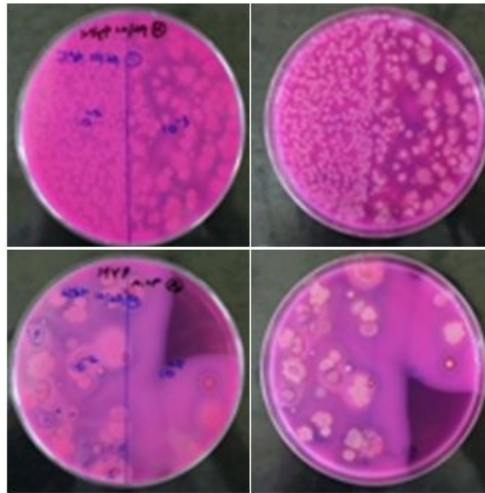


Fig. 10. 현장컨설팅을 거친 업체 A에서 생산된 청국장과 현장컨설팅을 거치지 않은 업체 B에서 생산된 청국장으로부터 *B.cereus*의 검출

나. Nutrient배지에서 *B.subtilis* P-L2에 의한 *B.cereus* KCCM 12142의 생육 저해 효과

*B. subtilis*와 혼합 배양에 의한 *B. cereus*의 생육저해 효과를 살펴보기 위해 Nutrient agar 배지에 A업체에서 분리한 *B. subtilis* P-L2와 *B. cereus*를 각기 다른 비율로 혼합 배양하며 경시적으로 생균수를 측정된 결과를 Table 4에 나타내었다. 초기 접종한 *B. subtilis* P-L2 균수가 10^6 일 때 48시간까지 10^5 CFU/mL 이하의 *B. subtilis*가 검출되었고 6S3C구는 배양 0~48시간까지 *B. cereus*가 불검출 되었으며, 6S4C구는 배양 24시간 이후까지 *B. cereus*가 불검출, 6S6C구는 36시간 이후까지 *B. cereus*가 불검출, 3S3C~3S6C구는 *B. subtilis*가 전혀 검출되지 않았다. 또한 *B. cereus* 균수도 10^5 CFU/mL 이하로 검출되어 *B. subtilis*와 *B. cereus*가 혼합 배양 시 상당히 스트레스를 받음을 알 수 있었으며 균수가 같을 경우, *B. cereus*가 *B. subtilis* 생육을 억제하는 경향을 알 수 있었다. 김 등[77]에 따르면 *Lactobacilli* sp.에 의해 Emetic toxin을 가진 *B. cereus* 를 저해했다는 보고가 있어 본 연구와 유사하게 나타났다.

Table 4.. Nutrient broth 배지에서 *B. cereus* KCCM 12142의 생육에 영향을 미치는 *B. subtilis* P-L2의 효과 (CFU/mL)

Time	Strains	6S3C*	6S4C	6S5C	6S6C
0	S	4.90×10^5	1.58×10^5	3.60×10^4	1.22×10^5
	C	ND	8.00×10^3	1.14×10^6	1.40×10^6
12	S	2.30×10^5	1.20×10^5	8.80×10^4	2.78×10^5
	C	ND	2.20×10^4	8.60×10^4	2.62×10^5
24	S	2.20×10^5	5.20×10^5	1.60×10^5	2.20×10^5
	C	ND	ND	ND	2.00×10^4
36	S	1.80×10^5	1.20×10^5	1.04×10^6	2.45×10^5
	C	ND	ND	ND	ND
48	S	1.72×10^5	8.20×10^3	1.68×10^5	3.78×10^5
	C	ND	ND	ND	ND

Cells were incubated at 37°C for overnight. S : *B. subtilis*. C : *B. cereus*. 6S3C* : 10^6 CFU/mL *B. subtilis* and 10^3 CFU/mL of *B. cereus* were incubated together.

다. Soymilk 배지에서 *B.subtilis* P-L2에 의한 *B.cereus* KCCM 12142의 생육 저해 효과

*B. subtilis*와 혼합 배양에 의한 *B. cereus*의 생육저해 효과를 살펴보기 위해 콩 단백질이 함유된 soymilk 배지에 A업체에서 분리한 *B. subtilis* P-L2와 *B. cereus*를 각기 다른 비율로 혼합 배양하며 경시적으로 생균수를 측정하여 결과를 Table 5에 나타내었다.

B. subtilis P-L2를 10^6 CFU/mL 첨가한 6S3C~6S6C 혼합 배양구에서는 6~24시간 발효과정 중 *B. cereus*가 전혀 검출되지 않았고 3S5C구는 12시간 이후부터, 3S6C구는 배양초기부터 *B. cereus*가 검출되었다. 이 결과로 미루어 *B. subtilis*가 10^6 CFU/mL 이상인 경우에는 *B. cereus*가 $10^3\sim 10^6$ CFU/mL 오염되어 있더라도 우점균 역할을 하는 것으로 생각된다. 김 등[77]에 따르면 *L. acidophilus*와 *B. cereus*의 균주에 따라 성장 억제 효과에 차이가 있으며, *B. cereus* 세포의 생장이 억제되면서 내열성 포자수가 증가하였다는 보고가 있어 본 연구와 유사하게 나타났다.

Table 5. Soymilk 배지에서 *B. cereus* KCCM 12142의 생육에 영향을 미치는 *B. subtilis* P-L2의 효과 (CFU/mL)

Time	Strains	3S3C	3S4C	3S5C	3S6C
6	S	ND	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND	5.50×10^6
12	S	2.70×10^7	1.40×10^7	ND	ND
	C	ND	ND	6.00×10^6	2.40×10^6
18	S	3.00×10^6	2.90×10^6	ND	ND
	C	ND	ND	1.20×10^7	4.30×10^6
24	S	2.90×10^5	4.00×10^4	ND	ND
	C	ND	ND	1.40×10^7	3.80×10^6

라. 청국장 제조 시 *B.subtilis* P-L2에 의한 *B.cereus* KCCM 12142의 생육 저해 효과

Nutrient agar 및 soymilk 배지를 이용하여 *B. subtilis*와 *B. cereus*의 혼합배양을 통해 *B. cereus*의 생육을 저해하기 위한 최적 농도를 설정한 후, 실제 현장 적용 가능성을 검색하기 위하여 검색된 최적 농도로 청국장을 제조하였다.

B. cereus 억제능이 우수한 *B. subtilis* P-L2을 10^6 CFU/mL, 즉 6S로 고정하고 *B. cereus*를 10^2 , 10^4 , 10^6 CFU/mL가 되도록 증자 콩에 혼합하여 24시간 동안 발효하여 청국장을 제조한 후 생균수를 측정된 결과를 Table 6에 나타내었다. 발효 후 *B. cereus*는 모든 구에서 검출되지 않아, 종균을 사용하여 발효시킬 경우 *B. cereus*의 생육을 현저히 저해하여 안전성을 확보할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 6. *B. subtilis* P-L2와 *B. cereus* KCCM 12142 의 혼합배양에 의해 제조된 청국장에서 *B.cereus*의 생육저해 (CFU/mL)

Time	Strains	6S2C*	6S4C	6S6C
24	S	4.40×10^9	4.20×10^9	4.68×10^9
	C	ND	ND	ND

6. 고품질 청국장 대량 생산 실증 실험

경상대학교에서 개발한 *Bacillus subtilis* P-L2 종균을 산업체의 대량생산 공정에 직접 적용시켜보기 위하여 종균제품을 이용한 대량 생산 실증 실험을 Fig. 11와 같이 수행하였다. 대량 실증 실험은 K 청국장 생산업체를 수배하여 수행되었으며, 원료콩 100 kg을 수세하여 증자한 후 미리 준비해둔 종균 제품을 10^3 SFU/ml이 되도록 접종하였다. 이때 종균의 접종은 콩을 증자한 후 발효상자에 옮긴 즉시 수행되었으며, 이때 증자콩의 온도는 약 80℃로써 내열성이 약한 잡균의 오염을 방지할 수 있고 종균의 생육에는 영향을 미치지 않아 제품의 오염없이 정상발효가 일어날 수 있을 것이라 사료된다. 종균이 접종된 콩을 발효실에서 각각 24시간, 48시간 동안 발효시키고, 발효가 완료된 후 제품 포장하였다. 발효는 정상적으로 진행되었으며 완성된 제품은 본 연구 성과 발표를 위해 개최된 세미나에서 참석자에게 나누어 주어 전반적인 품질에 대한 평가를 확인하였다.



Fig. 11. 종균 제품을 이용한 청국장 대량 생산 실증 실험

7. 청국장 종균 제품의 보급 시스템 구축 및 산업화 기반 조성

가. 종균 보급시스템 구축

(1) 청국장 및 업계 현황

(가) 우리나라 장류 시장은 2009년도 총 1조원 규모로 추정되며 06년 'Health'의 세계건강 6대 식품에 포함되어 있는 콩, 김치 등의 발효식품은 그 기능성과 우수성이 입증되어 있으며, 최근 장류의 항암효과, 된장의 면역증강물질 그리고 청국장의 혈전용해 활성 등과 같은 장류의 건강 기능성이 밝혀져 소비자들의 관심이 높아지고 있음

(나) 대두식품은 영양학적으로 단백질 및 지방을 다량 함유한 우수한 식품으로 이용되어 왔으며, 최근에 들어서는 대두 중의 생리활성 물질인 isoflavone, dietary fiber, oligosaccharide, phytic acid, protease inhibitor, saponin, sterol , phenol compounds 등의 기능성이 알려지며 더욱 각광을 받고 있다.

(다) 대표적인 대두 발효식품에는 우리나라의 청국장, 된장, 간장, 일본의 Natto, Miso, hoyou, 인도네시아의 Tempe 등이 널리 알려져 있다.

(라) 장류시장 중에서 청국장 업계는 450여개가 되며 생산현황은 약 7,000톤 출하시장은 약 6,000톤으로 전체 장류시장의 3%에 불과하며 제품의 안전성, 기능성, 표준화, 유통구조 개선 등과 같은 대외적인 환경변화에 대한 대응이 미흡하여 성장세가 둔화되고 있는 실정이다.

따라서 이러한 환경변화에 대한 영향을 최소화시키고 유통구조를 개선하여 국내 발효 식품의 안전성을 도모하는 한편, 연중 균일한 제품을 생산 할 수 있는 제품의 생산이 절실한 상황이다.

나. 종균 도입 가능성

(1) 종균 보급 및 유통 가능성

(가) 본 연구에 의해 개발된 청국장의 우수 종균 개발 결과에 대한 세미나를 지난 3월 22일 코엑스에서 개최한 결과 청국장 업계 및 발효식품 업계에서 많은 관심을 갖고 있다는 사실이 확

인되었으며 특히 청국장업체에서는 개발된 시제품을 평가한 결과 우수하다는 반응을 보인바 있음.

(나) 따라서 종균을 보급함에 있어 유통을 위한 보급시스템을 구축하여 개발된 종균에 의한 청국장의 제품화로 청국장 품질의 혁신을 이루고자 하며 아울러 종균 사용법 및 생산관리 등 제조 매뉴얼도 개발하여 연구과제의 성과를 갖고자 함

(다) 종균 개념 도입 및 자체 종균 개발

본 연구에 의해 개발된 종균 이외에 청국장 업체에서 사용되고 있는 종균을 분리, 동정하여 그 종균을 제조, 보관, 유통 할 수 있는 시스템의 개발도 청국장 업체에서 요구하고 있음.

(라) 앰플 및 파우더 형태의 종균 저장방법 개발로 우량 종균을 체계적으로 보급하여 국내 청국장 제품 생산의 과학적인 제조와 연중 균일한 제품을 생산하는 것이 필요함

(마) 따라서 개발된 종균을 사용해 본 후 맛, 향, 칼라 등에 대한 장단점을 감안하여 각 업체에 적용 될 수 있는 부분을 검토하고 종균사용에 대한 당위성, 필요성을 이해시키고 적용토록 유도

다. 종균 보급 시스템

(1) 종균 보급에 대한 시스템으로 경상대에서 개발된 종균을 관리하고 생산하여 조합에서 청국장업체에 대한 수요조사 및 신청 수량 파악한 결과에 대해 발송 체계 확립

(2) 제품 양산계획

(가) 경상대학교에서 생산 보관된 개발 종균을 청국장 제조업체에 공급할 계획이며

(나) 종균을 공급받은 청국장 업체에서 시제품 생산 후 품질안정화 여부를 확인한 다음 청국장 업체에 청국장 제조 기술을 공급하여 상품화를 유도할 계획임.

(다) 또한 현재 청국장업체의 열악한 기술력과 기존 제조 방법을 고집하는 업체를 위한 일환으

로 현재의 사용 종균의 지속적인 맛과 향을 유지 할 수 있도록 종균의 분리.동정을 통한 종균 보관 및 공급으로 품질안정화 여부를 확인하고 지속적 제조 기술지도 역할 예정

(라) 품질 안정화 및 향상을 통한 10% 생산량 증가

- 청국장 2009년 생산량 기준인 6,962톤에서 약 10% 신장을 유도하여 전체 청국장 생산량을 2012년도에는 8,000톤으로 증가시킬 예정임.

(3) 판로확보 및 마케팅 계획

(가) 종균을 이용한 청국장 제품의 품질 안정화를 확인한 후 조합 참여의사를 밝힌 청국장 제조업체에 3업체에 종균 사용방법 및 제조기술을 1회 무상 공급하여 청국장의 생산과 판매를 유도하고 이후 청국장의 제조기술과 종균을 원하는 청국장제조업체에 유상으로 공급할 계획임

(나) 조합 공동판매사업을 통한 공급

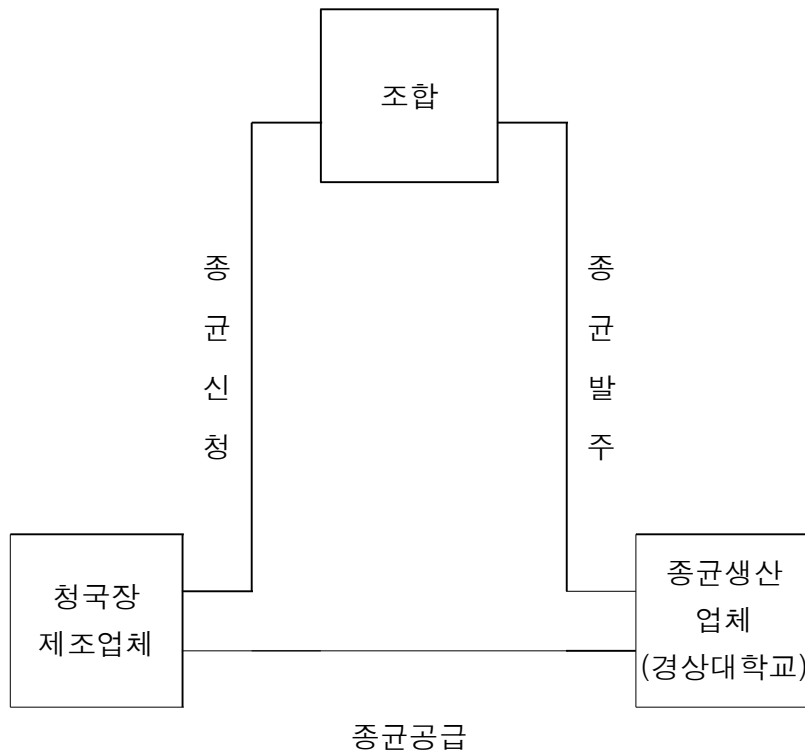
- 청국장 종균의 판매 확대를 유도하기 위해 한국장류협동조합에서 청국장의 제조기술과 종균을 원하는 사업체에 공동판매사업을 통해 공급할 계획임.

- 조합의 홈페이지 공동판매 시스템을 이용한 종균 구매 신청 접수 후 경상대에 주소 및 종균량 발송 고지

- 종균 사용방법 첨부하여 발송하고 직접 방문하여 지도 요청할 경우 조합 출장 규정에 의거 출장비 청구

- 운송의 문제 또는 충분한 반품 사유가 있는 것으로 판단 될 경우 재발송

(4) 보급 및 유통구조도



- 조합 구매시스템(홈페이지 B2B, 조합 ERP)을 활용한 균주구매신청 및 접수
- 구매 신청량을 경상대학교에 발주
- 균주 생산(경상대학교)
- 생산자 → 균주신청업체에 균주공급

(5) 청국장 종균 개발의 기대성과

(가) 기술적 측면

- 전통발효식품의 품질 표준화에 기여
- 청국장 뿐 아니라 기타 발효식품 제조 기술에 영향
- 생물학적 방제를 이용한 식중독원인균 등 제어
- 전통발효 식품의 안전한 생산 공정 개선에 기여
- 공정 중 위해 인자 제어기술은 발효식품 전반에 기술 파급 기대
- 조직적이고 다 학문간 협력 연구를 수행함으로써 효율적 성과가 기대됨
- 주제별 연구결과의 공유로 효능에 관한 상호검증을 시너지 창출
- *in vitro* 생리활성 효능평가 인력 양성과 기능성 식품소재 관련 식품과학/생명공학의 전문 인력 양성

- 생리활성 물질의 신속 간편한 정제법의 도입 및 미량성분 농축기술 확립
- 국내고유의 식용생물자원으로부터 약리·생리활성 신규후보 물질의 개발모델
- 암예방/항암 및 심혈관질환 조절에 효과적인 천연 소재의 screening 방법의 확립을 통한 청국장의 기능성에 대한 작용 기전을 학문적으로 입증

(나) 경제적·산업적 측면

- 우수 종균과 공정 관리 기술의 보급으로 장류조합의 기능 활성화
- 대두 발효 식품을 통한 가공 관련 기술의 선진화 및 종균 수출
- 청국장의 수출로 우리 식품 문화의 이미지 상승
- 장류 제품의 수출 증가에 따른 국제 경쟁력 강화
- 장류 생산업계의 안전적 제품 생산
- 청국장 제품의 기능성을 과학적으로 검증하게 되어 소비자의 신뢰향상으로 인한 소비 촉진으로 인한 청국장 관련 종사자들의 소득증대 및 생산지역의 경제 활성화
- 소비자의 선호도 향상으로 인해 청국장 산업의 매출증대

(다) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 장류제품 중에서 대부분이 된장, 고추장, 쌈장 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으며, 생활형태의 변화, 소비자 취향 및 소비계층의 변화가 빠르게 진행되고 있는 시장 상황에서 본 연구과제에서는 산·학·연 연구를 통하여 품질향상 기술개발로 기호성이 뛰어나며, 식품위해 미생물로부터 안전한 청국장 및 관련 응용 제품을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임
- 우수한 종균의 분리로 고품질의 청국장 생산이 가능하여 보다 수준 높은 장류 마인드를 국민들이 가질 수 있으며 이를 이용한 기능성 연구가 더욱 활발 해 질것이며 소비자 기호에 맞춘 청국장을 제조함으로써 청국장 시장의 활성화와 종균 수출에 대한 기대효과를 가짐

라. 기술개발 후 국내·외 주요 판매처 현황

※ 본 기술/제품 개발 완료 후 판매 가능한 판매처를 명기 하되 수요량은 파악이 가능한 경우만 작성

※ 관련제품의 경우 본 기술/제품 개발 완료 후 판매될 제품을 명기하되, 판매처에서 원부 자재로 사용되는 경우 최종 제품 명기

판매처	국가명	판매 단가 (천원)	예상 연간 판매량(개)	예상 판매기간(년)	예상 총판매금 (천원)	관련제품
청국장업체	한국	30	10,000,000	20	6,000,000	
종균공급업체	한국	20	10,000,000	20	4,000,000	

* 현재 *Aspergillus oryzae*의 가격 kg당 1만원

청국장의 생산량(2009년 기준) 6,962톤, 종균소요량 7톤(청국장의 0.1%을 감안 산정)

마. 사업화 계획

구 분		사업화 년도		
		(2011)년 (개발종료 해당년)	(2012)년 (개발종료 후 1년)	(2013)년 (개발종료 후 2년)
사업화 제품		청국장 종균	청국장 종균	청국장 종균
투자계획(백만원)		1,000	1,000	1,000
판매 계획 (백만원)	내 수	1,000	2,000	3,000
	수 출		100	1,000
	계	1,000	2,100	4,000
수입대체효과(백만원)				
고용 창출(명)		5	10	20

바. 기술이전 계획

- 청국장 종균 제품 생산 (2011년)
 - 기술이전신청 5개업체를 선정하여 종균 및 제조방법을 이전할 것임.

- 안정적인 청국장 제품 생산 (2012~2014년)
 - 청국장 제조 업체와 협의하여 종균 사용 및 제조기술을 보급함으로써 한국 청국장의 제품 품질 안정화에 기여.

- 종균사용 청국장 제조 기술보급 상용화 (2015년 이후)
 - 청국장 제조업체에 종균 및 제조기술을 보급하여 생청국장 시장 활성화.
 - 본 보급과제 기술을 상용화하여 청국장의 표준기준화를 통한 제품의 안정화, 안전성, 기능성의 청국장제품을 생산. 보급하여 국민보건향상 증진.

종균 + 환경 + 제어기술 → 종합적인 기술이전

제 2 협동과제

제 4 절 청국장 우수 균주의 분리 및 보관 기술 개발

1. 서론

우리나라의 청국장의 경우 야생균주를 사용하여 경험에 의존해 제조되고 있어 잡균오염이 심하고 품질관리가 잘 되지 않는 단점이 있다. 안전한 청국장 제품을 생산하기 위해서는 우수한 종균 개발이 절실히 필요한 상황이다. 그러나 *B. subtilis* 균주를 반복적으로 계대배양 하게 되면 각종 효소 활성이 감소하여 청국장의 품질이 저하되게 된다. 그러므로 우수한 품질의 청국장 생산을 위해서 종균의 활성유지 방법 개발이 절실히 요구되고 있다. 이에 본 연구에서는 *Micrococcus luteus* 와의 경쟁배양을 통해 청국장 제조 종균의 활성을 회복시켜 고품질의 청국장 제조를 위한 우수 균주의 보관 기술 방법을 확립하고자 하였다.

이전에는 청국장의 체계화 및 통일화된 제조방법 및 종균의 제조·사용법이 잘 알려져 있지 않아, 균일한 품질의 청국장 제조가 용이하지 않았다. 산업적으로 청국장 제조업체에서는 대부분 자연유래균의 발효에 의존하거나 액상의 종균을 사용하는 경우도 있으나, 일반적으로 다루기가 쉽지 않아 보급용으로는 적합하지 않고 오염되기 쉬워 균일한 품질의 청국장 발효가 이루어지지 않았다. 무엇보다도 액상형으로 제조된 영양세포형태의 종균은 보관시간이 경과함에 따라 따라서 균주의 활성이 크게 떨어지고 변이를 일으킬 수 있으므로 장기간 보존·유통 및 효율적인 청국장 제조를 기대하기 어렵다. 따라서 혈진용해효소활성, 점질물 생성능, 단백질 분해능 등의 일반적인 균주의 활성이 변이되지 않고 장기간 보관가능 할 뿐만 아니라 잡균의 오염을 최소화할 수 있는 아포형 제품을 개발함으로써 산업적으로 간편하고 유용하게 사용할 수 있는 종균 제품을 보급하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 사용균주

본 실험에 사용한 고초균(*Bacillus subtilis* P-L2)의 보존 및 계대배양은 TSA(Trypticase Soy Agar ; BBL, USA)와 TSB(Trypticase Soy Broth ; BBL, USA) 배지를 사용하여 37 °C 에서 배양하였다. 경쟁배양에 사용한 *Micrococcus luteus* 는 KCCM에서 분양받아 TSA(Trypticase Soy Agar ; BBL, USA) 배지에 배양하여 사용하였다.

나. pH 측정

pH는 pH meter(Orion 420A, USA)로 측정하였다.

다. 수분 측정

수분함량은 적외선 수분측정기(FD-600, Kett)로 40 분간 측정하였다.

라. 점질물 길이 측정

점질물 길이는 Investigative approach to Natto (Japan)에 준하여 측정하였다.

마. 조단백질 함량 측정

시료 1 g을 취하여 Kjeldahl flask에 넣고, K₂SO₄와 CuSO₄·5H₂O를 9 : 1의 비로 혼합한 촉매제 2~3 g과 conc. H₂SO₄ 15 mL을 넣어 2시간 동안 분해시킨 후 증류수를 첨가하여 100 mL로 정용하고 소비된 0.02 N HCl의 수를 환산하여 함량을 구하였다. 증류시 사용한 시약은 NaOH - Sodium thiosulfate(Na₂S₂O₃·5H₂O)용액과 2 % Boric acid(H₃BO₃)용액 그리고 지시약은 Bromocresol green과 Methyl red를 2 : 1의 비로 혼합하여 사용하였다.

$$\text{Crude nitrogen(\%)} = (V_1 - V_0) \times F \times D \times 100 / (S \times 1,000)$$

V₀ : Blank test 의 적정 mL

V₁ : 시료의 적정 mL

F : 0.02N-HCl의 factor

D : 희석배수

S : 시료 채취량

바. 아미노태 질소 함량 측정

아미노태 질소 함량 측정은 A.O.A.C에 명시된 Formol 적정법으로 시료를 5 g을 250 mL 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 100 mL 까지 정용한다. 이 중 50 mL을 취하여 100 mL beaker에 넣은 후 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 중화한다. 여기에 중성포르말린 20 mL을 가하고 0.1 N NaOH로 pH 8.4가 될 때까지 적정한다. 적정의 종점을 결정하기 위하여

pH meter (Orion 420A, USA)를 이용하였다.

사. 혈전용해효소 활성 측정

혈전용해효소의 활성은 fibrin plate method로 측정하였다. 0.1 M PBS 용액(pH 7.5) 10 mL에 0.06 g의 fibrinogen을 첨가하여 37 °C에서 완전히 용해시켰다. 20 unit의 thrombin을 첨가하여 섞은 후 30분간 정치하여 불투명의 fibrin plate를 제조하였다. 지름 8 mm의 paper disc에 효소액 20 ul씩 흡수시킨 후 fibrin plate 위에 올려놓고 37 °C에서 4시간 반응 후 fibrin이 분해되어 투명해진 직경을 측정하여 상대적인 효소 활성을 구하였다.

아. Gelatinolytic 활성 측정

8% polyacrylamide gel에 gelatin을 첨가하여 최종 농도가 0.1 mg/mL이 되도록 하였다. 균 배양액 20 µl에 sample 용액(10 % SDS, 50 % glycerol, 25 mM Tris-HCl(pH 6.8), 0.1 % bromophenol blue)를 혼합하여 gel에 loading하고 전기영동 하였다. Gel을 2.5 % Triton X-100에서 20분간 2회 세척하고 다시 증류수로 20분간 2회 세척하였다. 세척된 gel은 reaction 용액 1 M Tris(pH 7.5), 1 M CaCl₂, 5 M NaCl, 0.2 mM ZnCl₂, 25% TX-100, 0.2 % NaN₃에 넣어 37°C에서 16시간 반응시킨 후 Comassie blue R250으로 1시간 염색하고 50 % 메탄올과 10 % 빙초산으로 탈색하였다.

자. *Bacillus subtilis* P-L2균과 *Micrococcus luteus* KCCM 11905와의 경쟁배양

Bacillus subtilis P-L2 균과 *M. luteus*를 TSB(Tryptic Soy Broth ; BBL, USA) 배지에 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10 비율로 혼합한 뒤 37 °C에서 24시간 배양하여 TSA(Trypticase Soy Agar ; BBL, USA) 배지에 도말하였다.

차. 아포형 종균의 제조

Bacillus subtilis P-L2를 포자형성배지인 NBP 배지에 약 4일간 배양하여 아포를 생산하도록 유도한 다음 모두 회수하여 원심분리를 통하여 3회 세척을 한다. 세척 후 균체를 증류수에 현탁하여 4°C의 저온에서 약 1일간 저온쇼크를 가하고, 45°C의 고온에서 약 2일간 고온쇼크를 가하여 아포의 생성 효율을 더욱 높이고 영양세포 상태로 잔재하는 균체를 제어하였다. 이후 seasand를 첨가하여 강하게 교반하여 아포 표면에 남아있는 영양세포 및 잔사를 제거한 후 실리콘겔이 들어있는 감압진공 데시케이터에 약 2일간 건조시켰다. 건조가 끝난 후 seasand로부터 아포를 회수하고 앰플병에 넣어 동결건조를 수행하였다.

차. 아포 형성 수율 조사

제조된 종균 제품속에 존재하는 아포와 영양세포의 비율을 살펴보기 위해 종균을 80℃에서 20분간 열처리 하여 영양세포를 사멸시킨 후 Nutrient agar 배지에 도말하여 생육하는 비율을 열처리하지 않은 제품과 비교하였다.

카. 영양세포와 아포의 발효 효율

우수균주인 *Bacillus subtilis* P-L2를 이용하여 제조된 아포형 종균 제품의 청국장 발효 효율을 살펴보기 위하여 영양세포 상태의 균주와 아포 상태의 균주 및 최적 배양기를 지닌 영양세포를 이용하여 발효 균주의 농도를 콩 무게당 10^3 SFU/g로 접종하여 37℃에서 24시간동안 발효하여 청국장을 제조하였을 때 총질소, 아미노태질소, 점질물 길이, 혈전용해능을 조사하였다.

타. 영양세포와 아포제품의 형태

Bacillus subtilis P-L2의 영양세포 상태의 균주와 아포 형태로 제조된 종균 제품의 차이를 살펴보기 위해 주사현미경(SEM) 및 투과현미경(TEM)으로 각각 $\times 5,000$, $\times 20,000$ 배율로 균주를 관찰하였다.

3. 종균의 우수 특성 유지 및 제품화

가. 계대 배양에 따른 종균의 특성 변화

(1) 균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 pH 및 수분 함량 측정

발효 균주의 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 pH는 Fig 1에 나타내었다. pH는 7.4~7.6 범위로 균주 계대 횟수에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 시판 청국장의 경우 6.4~7.3 정도로 나타나 본 연구와 차이가 있었다. 이러한 결과는 청국장의 발효 시 발효 균주에 따라 다양한 발효양상이 전개될 뿐만 아니라 원료 콩의 발아에 따른 수분함량의 증가, 원료 콩의 발아에 따른 세포벽 파괴와 영양성분의 용출 등 다양한 원인에 의한 것으로 판단된다[78].

청국장 발효 과정에서 제품의 수율 및 물성을 결정하는 중요한 품질관리 요소[79]인 수분 함량은 Fig. 2에 나타내었다. 수분 함량은 57.7~58.9 %로 나타나 균의 계대 횟수에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다.

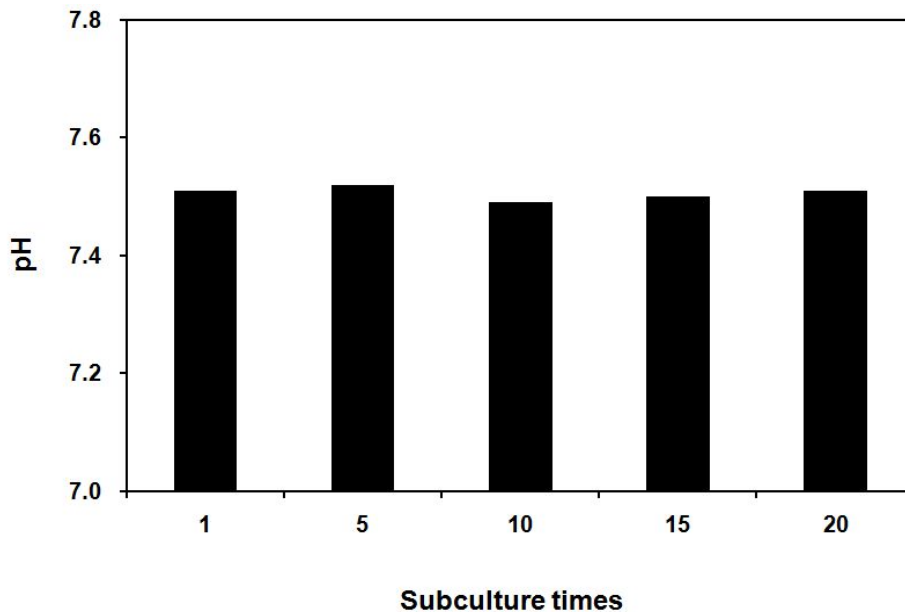


Fig. 1. 계대 횟수에 따른 청국장의 pH 변화

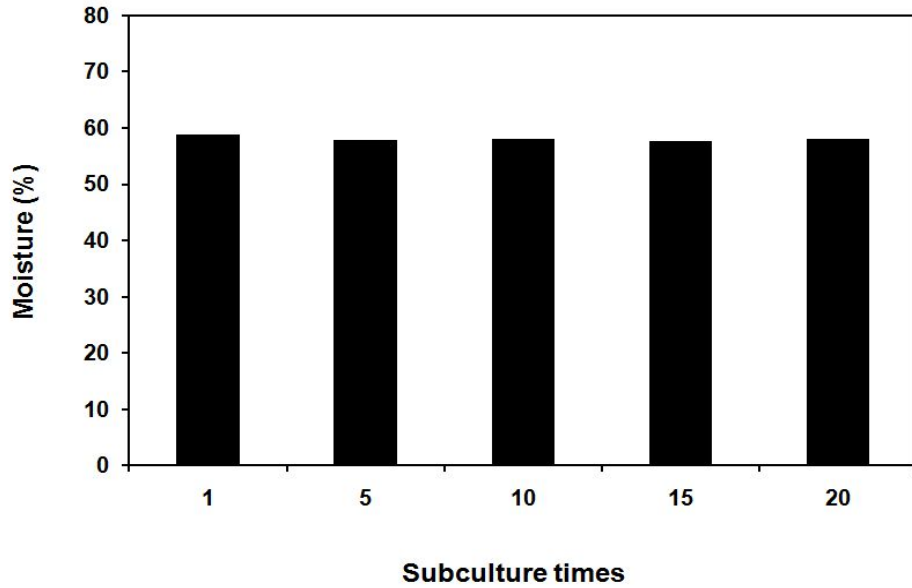


Fig. 2. 계대 횟수에 따른 청국장 수분 함량 변화

(2) 균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 조단백질 함량 측정

균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 조단백질 함량은 Fig. 3에 나타내었다. 조단백질 함량은 32.23~32.98 % 범위로 큰 차이는 보이지 않았다. 주 등[80]은 시판 청국장의 조단백질 함량은 11.99~22.54 % 수준이라는 보고에 비하여 매우 높았다. 이는 발효 균주와 발효 조건 등 다양한 차이에 기인된 것이라 사료된다. 전통식품표준규격에 따르면 청국장의 조단백질의 함량은 12.5 % 이상으로 규정하고 있어 본 연구에서는 규정보다 높게 나타났다.

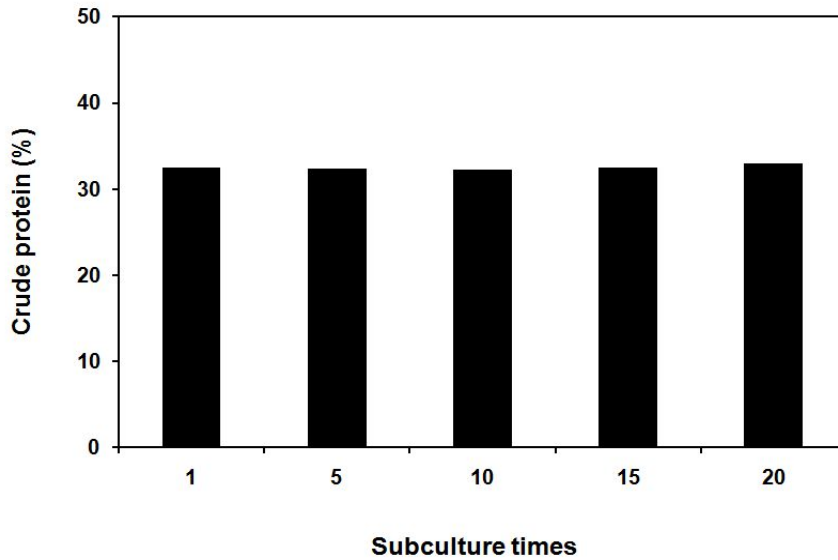


Fig. 3. 계대 횟수에 따른 청국장의 조단백질 함량 변화

(3) 균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 점질물 길이 측정

균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 점질물 길이는 Fig. 4에 나타내었다. 계대배양이 진행될수록 점질물 길이는 줄어드는 경향을 보였다. 1회 계대배양하여 청국장을 제조한 구는 230cm를 나타내었고 15회, 20회 계대배양하여 청국장을 제조한 구는 155, 130cm를 나타내어 1회에 비해 각각 32.6, 43.5% 줄어들었다. 이는 계대 횟수가 증가함에 따라 균주의 활성이 감소하여 점질물 생성량 및 끈적한 정도에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

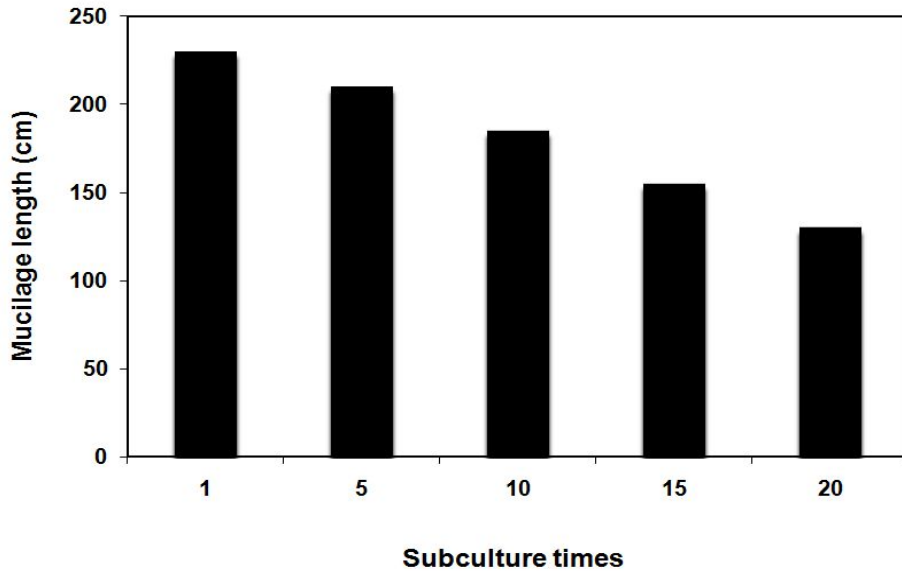


Fig. 4. 계대 횟수에 따른 청국장의 점질물 길이 변화

(4) 균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 아미노태 질소 함량 측정

균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 아미노태 질소 함량의 변화는 Fig. 5에 나타내었다. 아미노태 질소는 protease의 작용에 의하여 단백질이 아미노산의 형태로 분해되는 정도를 나타낸 것으로 장류 발효의 품질지표로 사용되고 있으며 우리나라 식품공전의 규격에는 청국장의 아미노태 질소 함량을 300 mg% 이상으로 규정되어 있다[81]. 또한 청국장의 품질 특성에 가장 영향을 미칠 뿐만 아니라 생산수율과도 밀접관련이 있는 중요한 성분이다. 따라서 균주의 계대 횟수에 따른 청국장의 아미노태 질소 함량의 감소는 청국장의 품질을 떨어뜨리는 주요 원인이므로 이를 방지하기 위한 균주 보관 방법의 개발이 요구된다. 계대배양을 거듭할수록 아미노태 질소 함량은 줄어들었다. 1회 계대배양 하여 청국장 제조 시 618.44 mg%는 나타내었고 20회 계대배양 하여 청국장 제조 시 아미노태 질소 함량은 530.50 mg%로 나타나 두 구간에 차이는 78 mg% 정도 차이가 났다. 이러한 결과로 미루어 보아 아미노태 질소 함량은 기존의 보고[82-87]들과 마찬가지로 단백질분해 효소의 활성화에 의하여 결정된다고 사료된다.

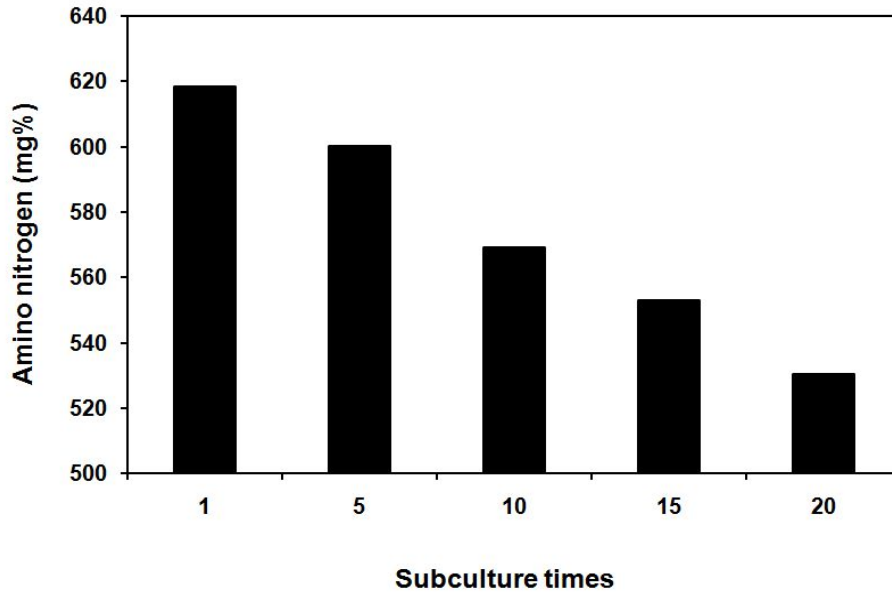


Fig. 5. 계대 횟수에 따른 청국장의 아미노태 질소 변화

(5) 균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 혈전용해효소의 활성과 gelatinase 활성 측정

콩 발효식품에서 분리된 *Bacillus* 속에 속하는 세균들의 혈전분해활성은 많이 보고되었다 [88-90]. 균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 혈전용해효소의 상대 활성을 경시적으로 측정 한 결과는 Fig. 6과 같다. 반응 시작 6시간이 경과된 후 측정하였을 때 계대횟수가 거듭될수록 용해환의 면적은 감소하였으며 1회, 5회, 10회, 15회, 20회 계대배양하여 청국장을 제조한 각각의 구의 용해환의 크기는 12.35, 11.62, 10.95, 10.00, 9.01 cm로 나타났었다. 계대 횟수에 따라 균주 활성이 감소하여 혈전용해효소능이 감소되는 것으로 사료된다.

균주 계대 횟수에 따른 청국장 제조 시 gelatinase 활성을 측정한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 각각의 균주 배양액을 zymography한 결과 약 150 kDa에서 밴드가 확인되었으며 계대배양이 거듭될수록 단백질 분해능이 감소하는 것으로 나타나 단백질 분해 효소의 활성이 저하된 것으로 사료된다[91]. *Bacillus subtilis* 계대 횟수가 증가할수록 종균의 활성이 상실되는 단점을 극복하기 위하여 경쟁배양을 통한 활성회복 연구를 실시하였다.

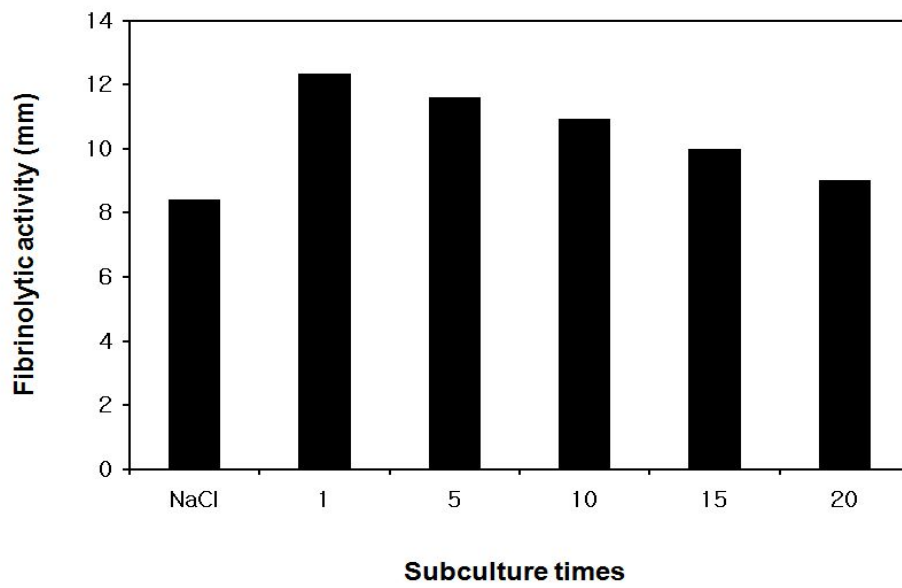
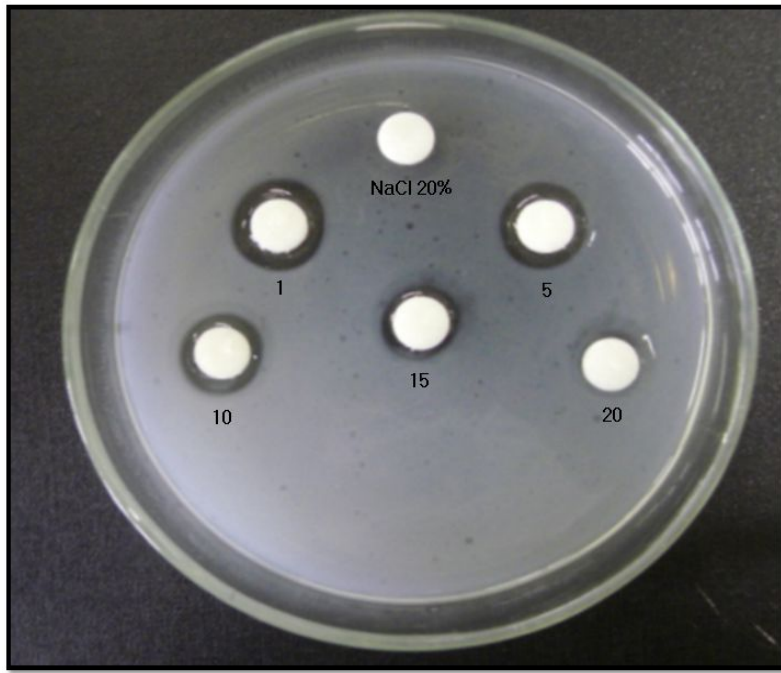


Fig. 6.. 계대 횟수에 따른 청국장의 혈전용해활성 변화

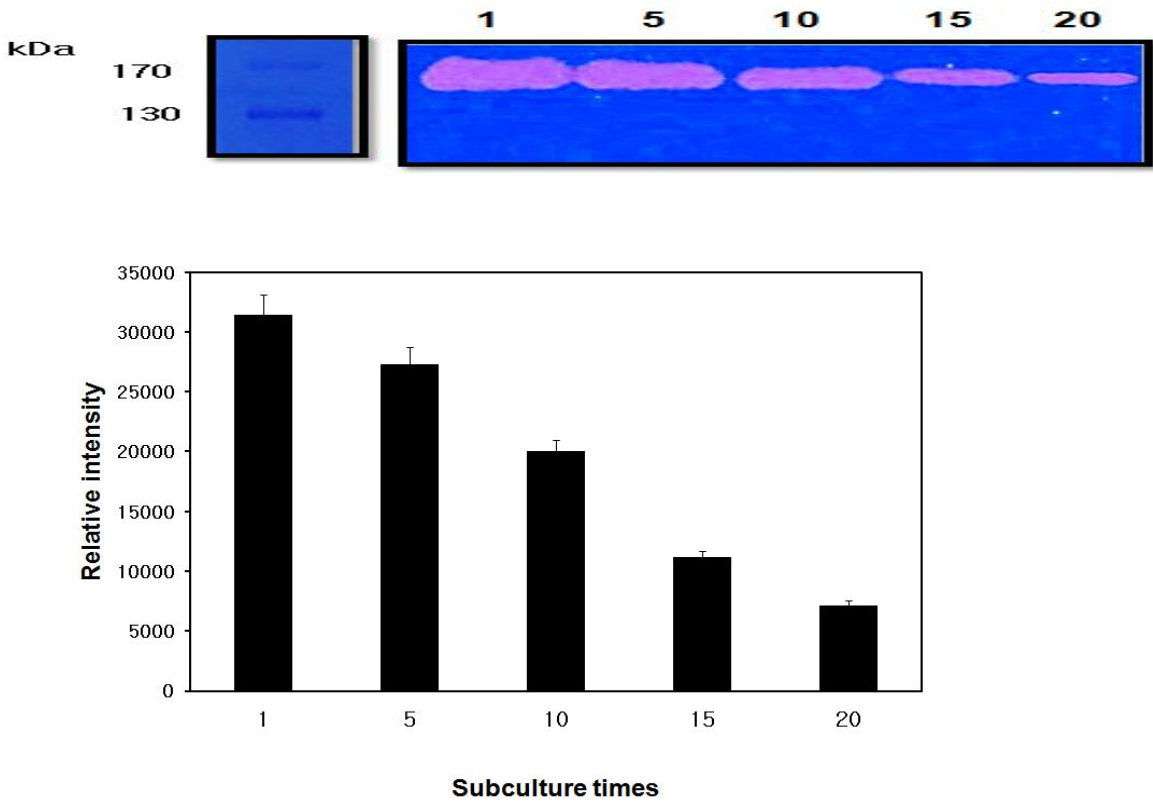


Fig. 7. 계대 횟수에 따른 청국장의 단백질분해효소 활성 변화

나. 안정적인 우수 특성 유지 기술 개발

(1) 경쟁배양에 의한 균주 특성 회복

증자한 대두에 안전한 *Bacillus*속 미생물의 증식으로 제조되는 청국장은 혈전용해 효소능, 고혈압 방지 효과 등 다양한 생리적 기능성을 가지고 있는 대표적인 콩발효 식품이다. 국내의 청국장은 야생균주를 사용하여 경험에 의존하여 제조되어 잡균의 오염이 심하고 품질관리가 되지 않는 단점이 있다. 안전한 청국장 제품 생산을 위해서는 우수한 균주개발이 요구된다. 청국장 제조에 사용되는 *B. subtilis* 균주는 반복적으로 계대배양 하게 되면 활성이 떨어져 청국장 제조 시 품질이 저하 요인이 된다. 우수한 품질의 청국장을 생산하기 위해서는 균주의 활성을 다시 회복시키는 것이 필요하다. 이에 본 연구에서는 활성이 떨어진 *B. subtilis* P-L2(이하 *B. P-L2*)와 *Micrococcus luteus* KCCM 11905(이하 *M. luteus*)를 경쟁배양하여 균주의 활성을 회복하고자 하였다. 이때 경쟁배양에 사용가능한 균주는 *B.subtilis*와 같은 온도에서 생육가능한 호기성 균주일 것이며 독성물질을 생성하지 않아 *B.subtilis*의 변이를 유발할 위험이 없는 균주여야 한다. Fig. 8에는 경쟁배양을 위한 균주의 혼합비율 및 고체배지에 도달한 결과를 나타내었으며, 각각 다른 형태를 나타내는 균주를 선별

하여 Fig. 9에 나타내었다. 경쟁배양을 통해 선별된 균주의 발효 특성을 조사하여 경쟁배양에 의한 균주의 활성 회복을 조사하였다.

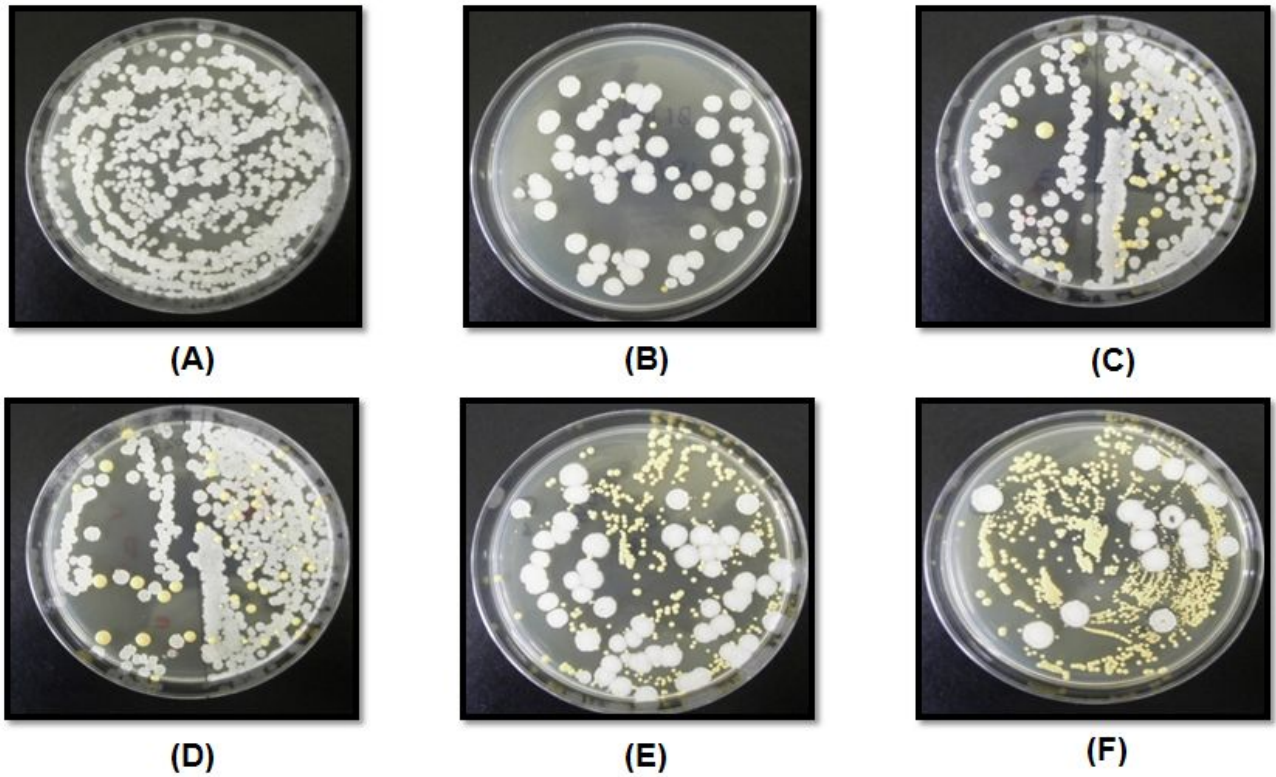


Fig. 8. *B. subtilis* P-L2와 *M. luteus* KCCM 11905의 경쟁배양후 고체배지에서 균주의 생육 (A) *B.subtilis* P-L2, (B) *B.subtilis* : *M.luteus* 혼합비율 1:1, (C) *B.subtilis* : *M.luteus* 혼합비율 1:2, (D) *B.subtilis* : *M.luteus* 혼합비율 1:3, (E) *B.subtilis* : *M.luteus* 혼합비율 1:5, (F) *B.subtilis* : *M.luteus* 혼합비율 1:10

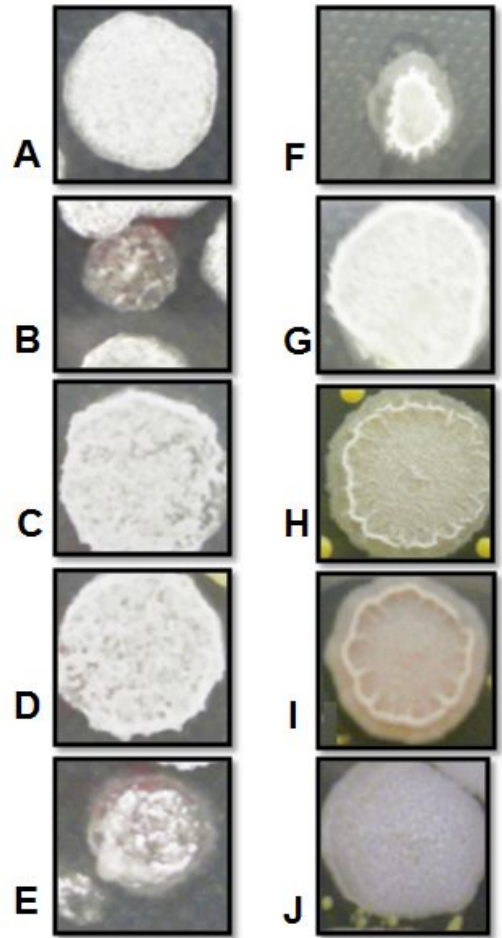
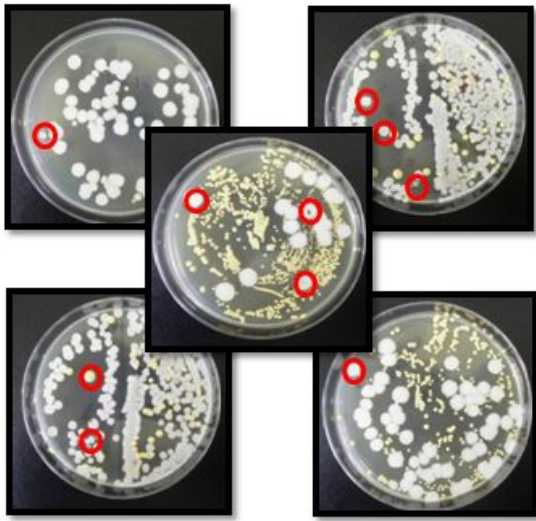


Fig. 9. *B. subtilis* P-L2와 *M. luteus* KCCM 11905의 경쟁배양 후 *B. subtilis* P-L2 균주의 선별

(2) 경쟁배양에 따른 및 pH 함량 및 조단백질 함량 측정

경쟁배양은 영양분이 제한된 환경에서 두 종류의 미생물을 동시에 배양하여 생존력이 강한 우수한 균주를 선택할 수 있는 경쟁배양 기술이 알려져 있다. *B. subtilis* P-L2를 *M. luteus*와 경쟁배양 한 후 선별한 10가지의 콜로니 A~J로 청국장을 제조하여 pH를 측정한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 대조 구로는 20회 계대배양하여 제조한 청국장을 사용하였으며 대부분의 실험구에서 pH는 6.44~7.25로 나타나 큰 차이가 없었다. 계대배양에 따른 청국장 제조 시의 pH와 비교하였을 때 약간 감소하였다.

경쟁배양을 통해 얻은 균주로 청국장을 제조하여 조단백질 함량을 측정한 결과는 Fig. 11에 나타내었다. 조단백질 함량은 31.63~33.42 %로 나타나 큰 차이를 나타내지 않았다. 이 두 가지 결과로 미루어 보았을 때 균주의 활성의 변화가 청국장의 pH와 조단백질 함량에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

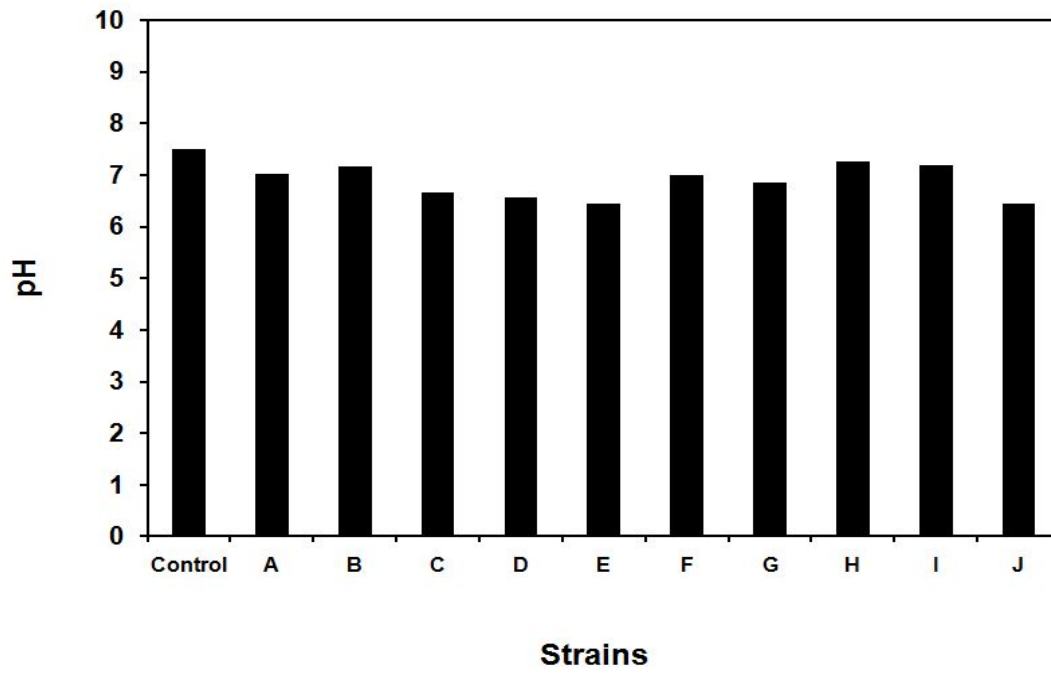


Fig. 10. 경쟁배양 후 선별된 *B.subtilis* P-L2 균주에 의해 발효된 청국장의 pH

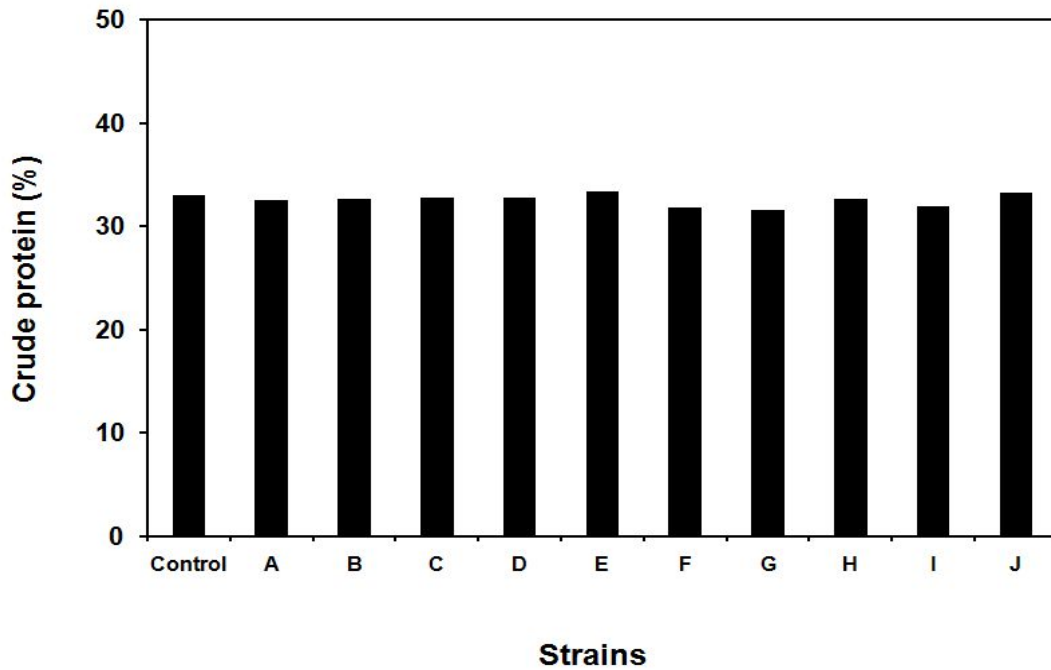


Fig. 11. 경쟁배양 후 선별된 *B.subtilis* P-L2 균주에 의해 발효된 청국장의 조단백질 함량

(3) 경쟁배양에 따른 점질물 길이 측정

B. subtilis P-L2를 *M. luteus* 와 경쟁배양 한 후 선별한 10가지의 콜로니 A~J로 청국장을 제조하여 점질물 길이를 측정한 결과를 Fig. 12에 나타내었다.

음성 대조구로는 20회 계대하여 제조한 청국장을 사용하였으며 양성대조구로는 1회 계대하여 제조한 청국장을 사용하였다. A, B, H, I가 200 cm 이상을 나타내어 1회 계대배양하여 제조한 청국장 구와 비슷한 결과를 나타내었고 C, G, J의 경우는 20 cm 미만을 나타내어 20회 계대배양하여 제조한 청국장의 점질물 길이보다 매우 낮게 나타났다. 이는 균주의 활성의 변화에 의해 점질물 생성량 및 끈적한 정도에 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다. 점질물은 *B. subtilis*의 효소에 의해 콩의 당질과 단백질이 저분자 펩타이드로 분해되어 생성되는데 경쟁배양을 통해 선별된 A, B, H, I는 지속된 계대배양에 의해 감소된 효소 활성을 회복하여 점질물 생성이 증가한 것으로 사료된다.

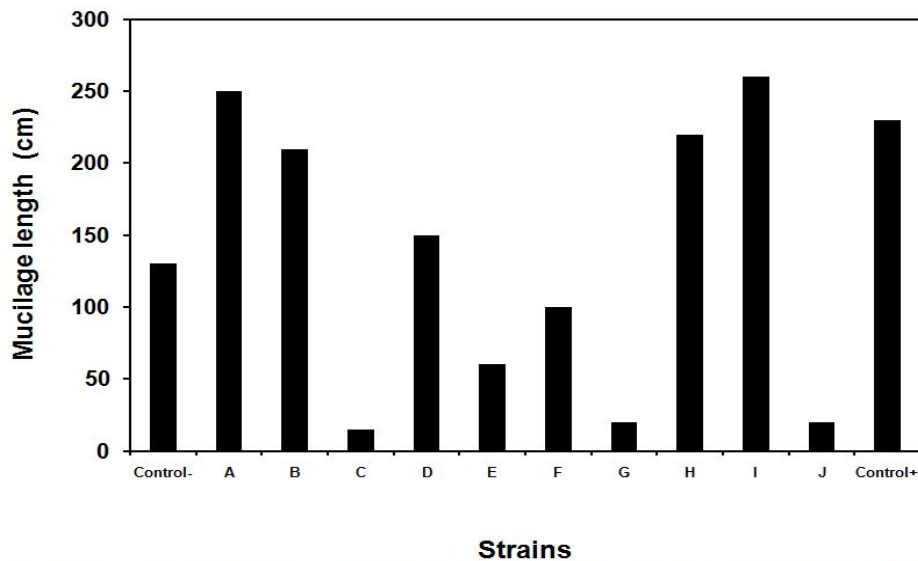


Fig. 12. 경쟁배양 후 선별된 *B.subtilis* P-L2 균주에 의해 발효된 청국장의 pH. Negative control : 계대 횟수 20회의 *B.subtilis* P-L2, Positive control : 계대 횟수 1회의 *B.subtilis* P-L2

(4) 경쟁배양에 따른 아미노태 질소 함량 측정

B. subtilis P-L2-2를 *Micrococcus luteus* KCCM 11905와 경쟁배양 한 후 선별한 10가지의 콜로니 A~J로 청국장을 제조하여 아미노태 질소 함량을 측정한 결과를 Fig. 13에 나타내었다.

C와 G 를 제외한 나머지 구에서 1회 계대배양하여 청국장을 제조한 양성대조구와 비슷한 결과를 나타내었다. A, B, H, I 구에서는 양성대조구보다 16.33~55.00 mg%로 높게 나타나 경쟁배양을 통하여 몇 가지 균주는 아미노태 질소 함량이 회복되는 경향을 나타내었다. 균주에 따른 점질물 길이와 아미노태 질소 함량의 차이가 유사한 경향을 보이는 것으로 미루어 보아, 이 두 가지 품질은 발효균주의 활성에 의해 결정되는 것으로 사료된다. 또한 경쟁배양을 통해 각각의 균주는 서로 다른 특성을 보이는 것으로 보아, *B. subtilis*와 *M. luteus*의 생육 경쟁을 통해 균주 특성이 높게 회복되거나 혹은 상실되는 것으로 사료되며, 우수한 활성을 회복한 균주를 재선별하여 발효 종균으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

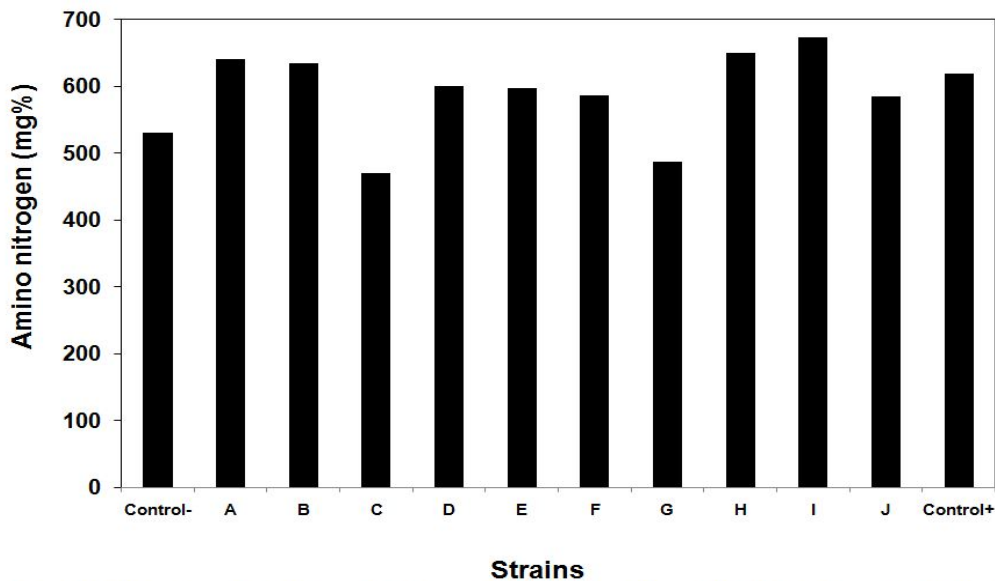


Fig. 13. 경쟁배양 후 선별된 *B.subtilis* P-L2 균주에 의해 발효된 청국장의 아미노태질소 함량. Negative control : 계대 횟수 20회의 *B.subtilis* P-L2, Positive control : 계대 횟수 1회의 *B.subtilis* P-L2

(5) 혈전용해효소의 활성과 gelatinolytic 측정

B. subtilis P-L2를 *Micrococcus luteus* KCCM 11905와 경쟁배양 한 후 선별한 10가지의 콜로니 A~J로 청국장을 제조하여 혈전용해효소 활성을 측정한 결과를 Fig. 14에 나타내었다.

혈전용해능효소 활성의 결과에서 A, B균주로 제조된 청국장의 용해환이 음성대조구인 20회 계대배양한 구보다 3~4mm 정도 크게 나타났으며, 양성대조구인 1회 계대배양하여 청국장을 제조한 구보다 B의 구는 용해환의 면적이 더 넓게 나타났다. Gelatinase 활성을 측정하기 위해 zymogram 한 결과는 Fig. 15에 나타내었다. 약 150 kd에서 밴드가 나타났으며 음성대조구보다 대부분의 구에서 높게 나타났다. 경쟁배양에 의해 균주의 단백질 분해 효소 활성이 크게 영향을 받는 것을 미루어 보아 우수한 균주의 선별을 통해 효소 역가가 높은 균주를 선택하여 우수한 품질의 청국장을 제조할 수 있을 것이라 사료된다.

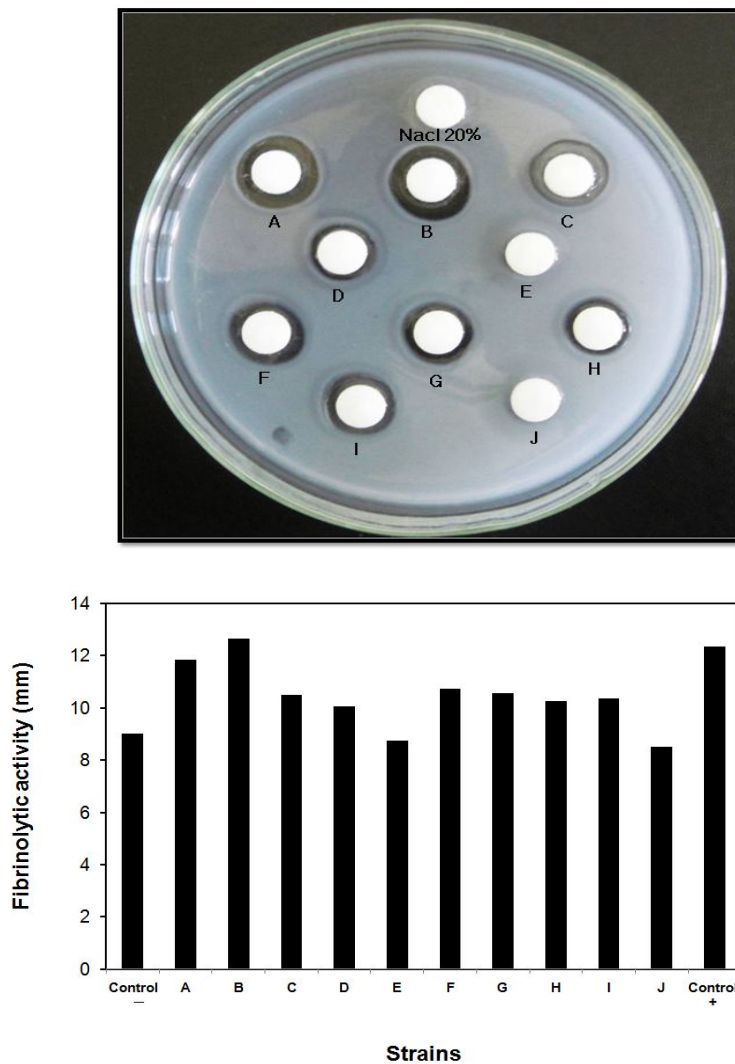


Fig. 14.. 경쟁배양 후 선별된 *B.subtilis* P-L2 균주에 의해 발효된 청국장의 혈전용해활성. Negative control : 계대 횟수 20회의 *B.subtilis* P-L2, Positive control : 계대 횟수 1회의 *B.subtilis* P-L2

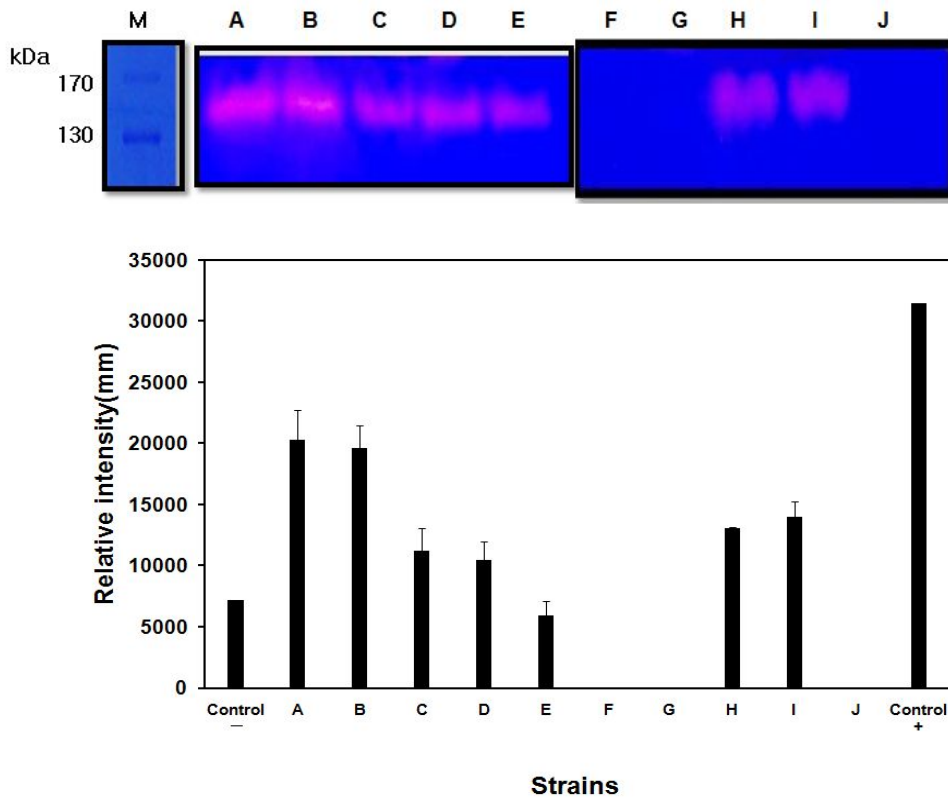


Fig. 15. 경쟁배양 후 선별된 *B.subtilis* P-L2 균주에 의해 발효된 청국장의 단백질분해효소 활성. Negative control : 계대 횟수 20회의 *B.subtilis* P-L2, Positive control : 계대 횟수 1회의 *B.subtilis* P-L2

4. 장기 저장형 종균 보급 및 사용 매뉴얼 개발

가. 장기 저장형 종균의 제조기술의 개발

(1) 영양세포형 종균 사용의 문제점

이전에는 청국장의 체계화 및 통일화된 제조방법 및 종균의 제조·사용법이 잘 알려져 있지 않아, 균일한 품질의 청국장 제조가 용이하지 않았다. 산업적으로 청국장 제조업체에서는 대부분 자연 유래균의 발효에 의존하거나 액상의 종균을 사용하는 경우도 있으나, 일반적으로 다루기가 쉽지 않아 보급용으로는 적합하지 않고 오염되기 쉬워 균일한 품질의 청국장 발효가 이루어지지 않았다. 무엇보다도 액상의 종균의 경우에는 다음과 같은 문제점이 발생할 수 있다. Fig. 16은 일반 영양 배지에서 1일간 배양한 *Bacillus subtilis*를 나타내었는데, 최적 생육시간을 경과한 이후에는 그림과 같이 세포벽이 파괴되고 세포내 물질이 용출되어 사멸되거나 혹은 아포를 형성하게 된다. 이렇게 생성된 아포는 배지로 용출된 세포내 물질을 영양성분으로 이용하여 다시 생육한 후 다시 사멸하게 된다. 따라서 액상형으로 제조된 영양세포형태의 종균은 보관시간이 경과함에 따라 균주의 활성이 크게 떨어지고 변이를 일으킬 수 있으므로 장기간 보존·유통 및 효율적인 청국장 제조를 기대하기 어렵다.

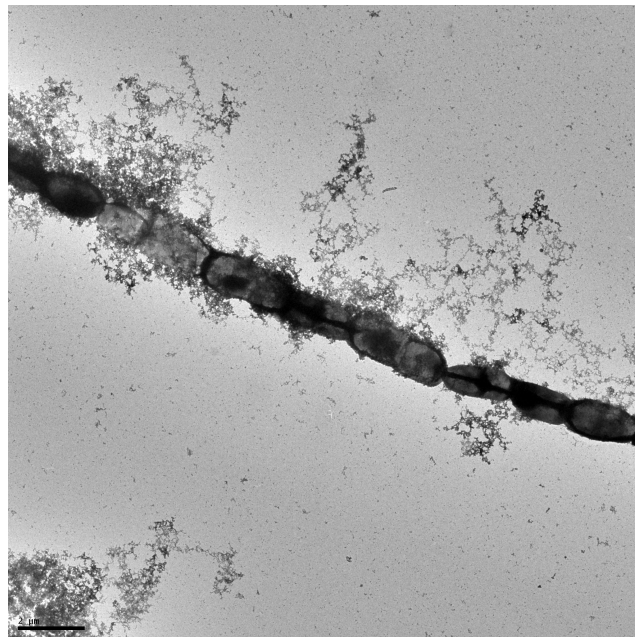


Fig. 16. 최적 배양 기간 이후의 *Bacillus subtilis*의 용균

따라서 혈전용해효소활성, 점질물 생성능, 단백질 분해능 등의 일반적인 균주의 활성이 변이되지 않고 장기간 보관가능할 뿐만 아니라 잡균의 오염을 최소화할 수 있는 아포형 제품을 개발함으로써 산업적으로 간편하고 유용하게 사용할 수 있는 종균 제품을 보급하고자 하였다.

균주의 아포가 형성되는 과정은 Fig. 17에 나타내었다[92]. 아포의 형성은 영양세포 유지에 필요한 환경적 조건이 결핍되면 다음과 같은 과정을 거쳐서 아포를 형성하게 된다. 이러한 사실을 응용하여 청국장 종균의 아포형 종균 제품의 제조방법을 개발하였다.

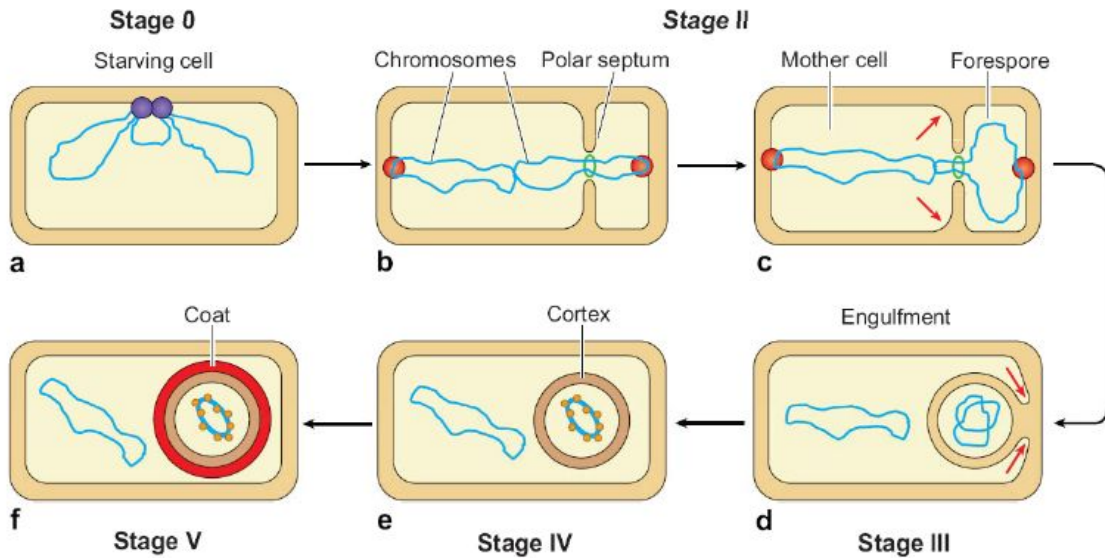


Fig. 17. 아포 형성 과정

(2) 아포형 종균의 제조

청국장 발효 종균의 효율적인 제조 및 보관·유통을 위해 본 연구에서 선별된 우수 균주인 *Bacillus subtilis* P-L2를 이용하여 아포형의 종균제품을 개발하였으며 제조 방법은 Fig. 18에 나타내었다. 먼저 *Bacillus subtilis* P-L2를 포자형성배지인 NBP 배지에 약 4일간 배양하여 아포를 생산하도록 유도한 다음 모두 회수하여 원심분리를 통하여 3회 세척을 한다. 세척 후 균체를 증류수에 현탁하여 4℃의 저온에서 약 1일간 저온쇼크를 가하고, 45℃의 고온에서 약 2일간 고온쇼크를 가하여 아포의 생성 효율을 더욱 높이고 영양세포 상태로 잔재하는 균체를 제어하였다. 이후 seasand를 첨가하여 강하게 교반하여 아포 표면에 남아있는 영양세포 및 잔사를 제거한 후 실리카겔이 들어있는 감압진공 데시케이터에 약 2일간 건조시켰다. 건조가 끝난 후 seasand로부터 아포를 회수하고 앰플병에 넣어 동결건조를 수행하였다. 아포 회수 시 멸균 증류수를 사용하여 액상형 종균을 제조할 수 있으며, 5% skim milk, 5% glucose 용액을 사용하여 회수하고 동결건조하여 고체 파우더형 종균제품을 제조할 수 있다.



Fig. 18.. 청국장 제조용 아포형 종균의 제조 방법

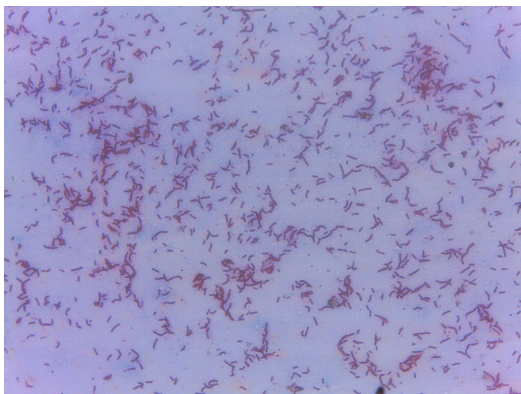
(3) 아포의 수율

우수균주인 *Bacillus subtilis* P-L2를 이용하여 제조된 아포형 종균 제품의 아포 생산 수율을 조사하였다. 제조된 종균 제품속에 존재하는 아포와 영양세포의 비율을 살펴보기 위해 종균을 80℃에서 20분간 열처리 하여 영양세포를 사멸시킨 후 Nutrient agar 배지에 도말하여 생육하는 비율을 열처리하지 않은 제품과 비교하여 Table 1 에 나타내었다. 본 연구에서 제조된 종균제품의 생균수는 1.58×10^9 SFU/ml로 나타났으며, 80℃의 열처리를 하여 영양세포를 제거한 후의 생균수는 1.23×10^9 SFU/ml로 나타나, 종균 제품에 존재하는 균주는 대부분 아포상태이며 아포형성 효율 및 수율이 95% 이상인 것으로 나타났다. 또한 균주의 아포염색법을 이용하여 *Bacillus subtilis* P-L2의 영양세포와 아포를 각각 비교하여 Fig. 19에 나타내었는데, 영양세포는 붉은색의 균주로 확인되었으며, 종균 제품은 아포를 의미하는 녹색으로 염색된 균주가 확인되었다. 따라서 본 종균 제품의 아포 형성 비율은 우수한 것으로 나타나 균주의 활성변화 없이 장기 보존이 가능할 것이라 사료된다.

Table 1. 종균 제품의 아포 제조 수율

	생균수
종균 제품	1.58×10^9 SFU/ml
열처리 후 종균 제품	1.23×10^9 SFU/ml

(A)



(B)

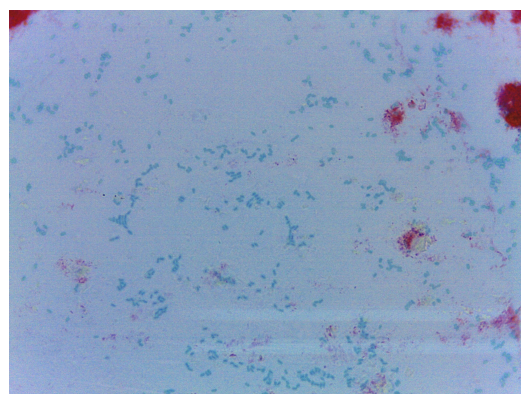


Fig. 19. *Bacillus subtilis* P-L2 영양세포(A)와 종균제품(B)의 아포염색 결과 (배율 : $\times 1,000$)

(4) 영양세포와 아포의 발효 효율

우수균주인 *Bacillus subtilis* P-L2를 이용하여 제조된 아포형 종균 제품의 청국장 발효 효율을 살펴보기 위하여 영양세포 상태의 균주와 아포 상태의 균주 및 최적 배양기를 지난 영양세포를 이용하여 청국장을 발효한 후 품질특성을 비교하여 Table 2에 나타내었다. 발효 균주의 농도를 콩 무게당 10^3 SFU/g로 접종하여 37°C에서 24시간동안 발효하여 청국장을 제조하였을 때 총질소, 아미노태질소, 점질물 길이, 혈전용해능을 조사한 결과, 18시간 배양한 영양세포로 발효한 청국장과 아포로 발효한 청국장의 총질소 함량은 각각 31.95, 32.31% 였으며, 아미노태질소 함량은 각각 701.64 및 715.32 mg%로 매우 유사하게 나타났다. 점질물 길이 및 혈전용해환의 크기도 매우 유사한 값으로 나타나, 아포로 제조된 종균 제품의 발효효율은 균주의 활성이 가장 우수한 배양 18시간째의 영양세포와 유사하게 우수한 것으로 나타났다. 반면 2일간 배양한 영양세포로 청국장을 제조하였을 때는 모든 품질특성이 저하되는 경향을 나타낸 것으로 미루어 보아, 영양세포 형태의 균주를 장기간 보존함에 따라 균주의 활성이 감소하여 발효 효율이 낮아짐을 알 수 있다. 따라서 종균 제품의 장기보관·유통 및 활성보존을 위하여 아포형태로 제작하는 것이 효율적이라 사료된다.

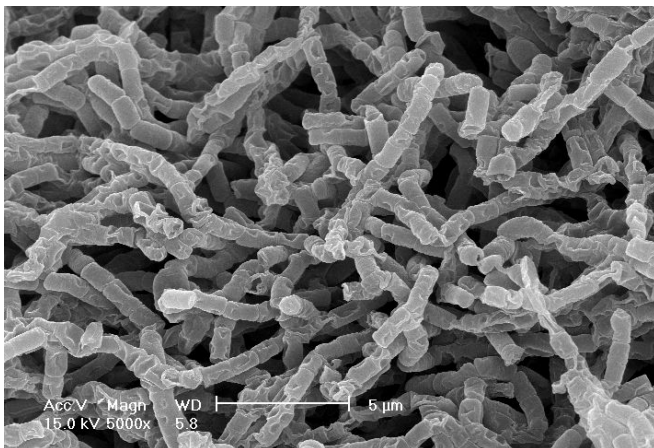
Table 2. *Bacillus subtilis* P-L2의 영양세포와 아포제품의 청국장 발효 효율

	총질소(%)	아미노태질소(mg%)	점질물(cm)	혈전용해능(mm)
영양세포 (배양 18시간)	31.95	701.64	142	12.55
아포	32.31	715.32	130	12.32
영양세포 (배양 2일)	31.31	515.32	85	10.32

(5) 영양세포와 아포제품의 형태 비교

Bacillus subtilis P-L2의 영양세포 상태의 균주와 아포 형태로 제조된 종균 제품의 차이를 명확히 살펴보기 위해 주사현미경(SEM) 및 투과현미경(TEM)으로 균주를 관찰하였다. Fig. 20에는 Nutrient broth 배지에서 18시간동안 배양된 *Bacillus subtilis* P-L2의 영양세포 형태를 나타내었다. 영양세포는 간균이며 최적 배양시간이 지나면 박테리오파지의 감염에 의해 용균현상이 일어나고 세포내 물질이 분비됨으로써 균주가 사멸하게 되므로, 영양세포 형태의 균주를 배지가 아닌 멸균 증류수에 현탁하여 유통하게 되더라도 세포에서 분비된 물질을 다시 영양원으로 하여 아포형태로 존재하고 있던 균주까지 발아하게되어 생육 후 다시 사멸하게 되어버리므로 영양세포를 종균제품으로 유통하기에는 문제점이 있다.

(A)



(B)

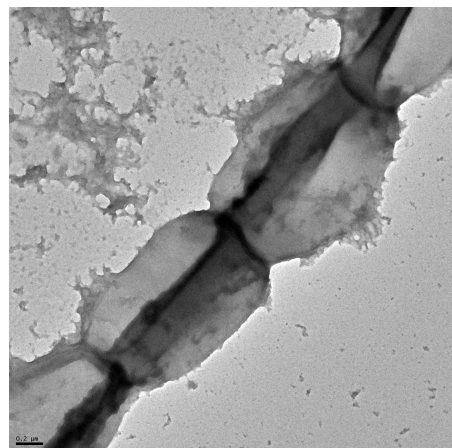
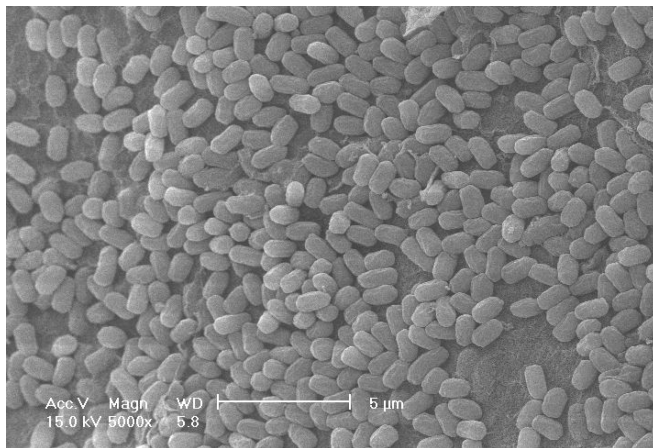


Fig. 20. 영양세포 형태의 *Bacillus subtilis* P-L2 균주의 (A) SEM 촬영사진(배율 : ×5,000배) 과 (B) TEM 촬영사진(배율 : ×20,000)

Fig. 21 에는 본 연구에서 개발된 종균제품인 아포형태로 제작된 *Bacillus subtilis* P-L2의 형태를 나타내었다. 저온쇼크 및 고온쇼크를 통해 아포를 형성하게 한 후 Seasand 경쟁 교반을 통해 마쇄하여 균주의 세포벽 성분 및 다른 세포 구성물질을 제거하고 아포형태의 균주만 존재하도록 제조된 아포형태의 종균제품이다. 아포를 형성한 *Bacillus subtilis*는 고온에서도 안정하며 휴면상태로 존재하다가 적절한 영양성분 및 온도조건하에서 발아하여 균주의 활성을 되찾게 된다. 이는 청국장 제조 시 증자된 콩의 표면에 접종하여 줌으로써 적절한 영양공급 하에서 아포의 발아가 원만하게 이루어지며, 특히 다른 오염 미생물들이 증식할 수 없는 80℃ 정도의 고온에서도 생육가능하기 때문에, 콩의 증자 후 냉각시간을 현저히 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라 원료콩의 증자 직후 80℃ 가량의 고온상태에 접종하여 접종조작 중 발생할 수 있는 잡균의 오염을 고열로 제어할 뿐만 아니라, 고온의 증자콩에서 방출되는 고온의 증기로 인해 작업장에 산재하는 잡균이 증자콩으로 낙하하여 발생하는 오염도 제어될 수 있다. 뿐만 아니라 콩의 원료단계에서부터 증자후 및 청국장 완성단계에 이르기까지 동일한 제조설비 및 용기를 사용하는 업체의 제조 특성상 발생할 수 있는 교차오염을 고열로서 제어할 수 있는 효과가 있다.

(A)



(B)

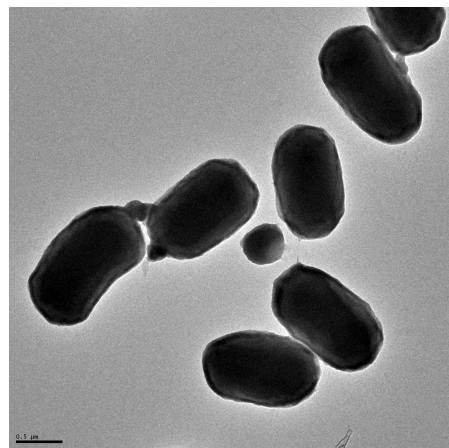


Fig. 21. 종균으로 제조된 포자 형태의 *Bacillus subtilis* P-L2 균주의 (A) SEM 촬영사진 (배율 : ×5,000배) 과 (B) TEM 촬영사진(배율 : ×20,000)

(5) 종균제품을 이용한 청국장의 제조

개발된 청국장 발효용 종균제품을 이용하여 청국장을 제조하는 방법을 Fig. 22에 나타내었다. 종균을 이용한 청국장의 제조는 기존의 청국장 제조방법과 동일한 방법으로 진행되었다. 선별된 대두를 세척한 후 콩의 무게가 약 2배가 될 때까지 실온에서 하루밤 정도 침지하여 1시간 이상 물빼기를 한 후 121°C에서 가압증자하여 약 80°C 정도가 될 때까지 냉각한 후 종균제품을 콩 무게 당 10^{3-4} SFU/g이 되도록 접종하여 37~43°C에서 약 1~2일간 발효하여 제조한다. 기존의 방법과의 차별점은 증자된 콩의 냉각온도가 약 80°C 정도로 높아, 냉각시간을 단축시켜 경제적이며 고온에서 생육이 불가능한 일반 미생물들의 오염이 현저히 억제되어 접종된 종균에 의한 발효가 진행되게 되므로 제품의 오염에 의한 발효 실패를 감소시킬 수 있다.

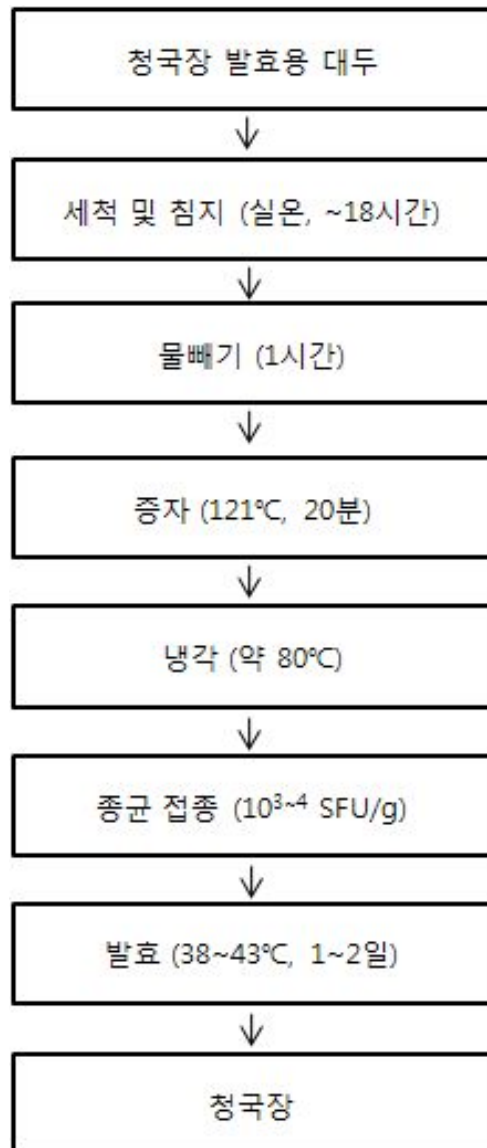


Fig. 22. 종균제품을 이용한 청국장 제조 방법

일반적으로 대두 1 g당 아포형태의 청국장균 $10^3 \sim 10^6$ 정도로 제조 환경의 청결도에 따라 접종할 종균량은 달리하는 것이 적당할 것으로 생각된다. 이 때 원료콩과 증자 대두의 무게는 2배 정도의 차이가 나지만 실제로 균 접종 시에는 그 정도의 차이를 무시할 수 있는 양에 해당한다.

개발된 종균의 분말 제품은 청국장균의 영양세포를 아포형태로 변환시킨 다음 세포 내 물질과 세포 외막 등을 물리적인 방법으로 세척하여 제거시킨 후 동결건조시킨 제품으로 아포수가 $>10^{10}$ SFU/g이다. 분말 종균 0.1~1 g을 1 ml의 물에 희석하면 아포수 $10^9 \sim 10^{10}$ SFU/ml에 해당한다. 액상 제품은 분말 제품을 100배로 희석시켰으므로 아포수는 10^8 SFU/ml 이다.

청국장 제조 공장에서 120 kg의 대두로 제품을 생산할 경우에는 아래의 두 가지 방법으로 종균을 첨가할 수 있다.

- 1) 분무기를 사용할 경우는 아포형태의 종균에 끓여서 50°C 로 식힌 물로 1 리터가 되도록 최종 종균 희석액을 준비하고 대두 1 g당 $10 \sim 20$ ul 씩 균일하게 스프레이 한다.
- 2) 물뿌리개로 뿌릴 경우에는 종균 희석액의 최종량을 2.5 리터로 준비하고 대두 1 g당 $25 \sim 50$ ul 씩 균일하게 뿌려서 섞는 것이 좋을 것으로 생각된다.

가정에서 5kg이하의 소량 대두로 청국장을 정성들여 띄워서 즐기는 소비자들을 위해서 종균의 특성이나 품질에 영향을 미치지 않는 안전한 포장재를 찾고 시판 청국장 제조기의 용량에 대응한 포장 단위를 결정하여 액상 혹은 분말상태의 종균제품을 개발할 필요가 있다.

한국인의 청국장에 대한 기호도가 매우 다양하여 고유의 냄새를 싫어하여 악취라고 여기는 사람이 있는가 하면 구수한 향기라고 예찬하는 소비자도 있다. 청국장의 맛은 전국의 각 제조사마다 모두 다르고 지금까지 전통 청국장의 맛이나 향에 대한 과학적인 연구를 통한 비교분석한 결과는 물론 청국장 맛에 대해 기준으로 제시한 결과가 없어 그냥 구수하다는 단어만으로 맛있는 청국장임을 강조하고 있는 것이 현실적인 상황이다. 다양한 맛과 향을 가진 우리나라의 청국장을 세계화시키기 위해서는 각 회사에서 생산하는 청국장 유래의 종균을 각각 별도로 분리하고 종균화하여 미래의 귀중한 자원으로 보존해야 할 것으로 판단된다.

(5) 종균제품의 최적 사용량 확립

우수균주인 *Bacillus subtilis* P-L2를 이용하여 제조된 아포형 종균 제품의 최적 사용량을 확립하기 위하여 원료 콩의 무게에 대한 균의 농도를 각각 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 SFU/g으로 조절하여 접종하여 청국장을 발효한 후 아미노태 질소 함량 및 점질물의 길이의 변화를 비교하여 Fig. 23, 24에 나타내었다. 균주를 10^7 SFU/g 로 접종하여 청국장을 발효하였을 때 청국장의 아미노태 질소 함량은 807 mg%로 나타났으며 10^3 SFU/g로 접종 농도가 감소되었을 때 715.32 mg%로 나타난 반면, 10^7 SFU/g의 접종 농도에서 청국장의 아미노태 질소 함량은 604.76 mg% 현저히 감소하였다.

균주를 10^7 SFU/g 로 접종하여 청국장을 발효하였을 때 청국장의 점질물 길이는 210 cm였으며 접종농도가 10^6 SFU/g일 때 235 cm로 최대값을 나타내었으며, 균주의 사용량이 감소할수록 점질물의 길이도 점차 감소하여 10^2 SFU/g 농도로 접종하였을 때는 117 cm로 나타났다. 따라서 종균 사용량에 따른 아미노태 질소 함량의 변화 및 점질물의 길이를 종합적으로 고려하여 볼 때, 종균의 경제적이며 효율적인 사용 및 발효를 위해 10^{3-4} SFU/g 범위의 농도로 사용하는 것이 적합할 것이라 사료된다.

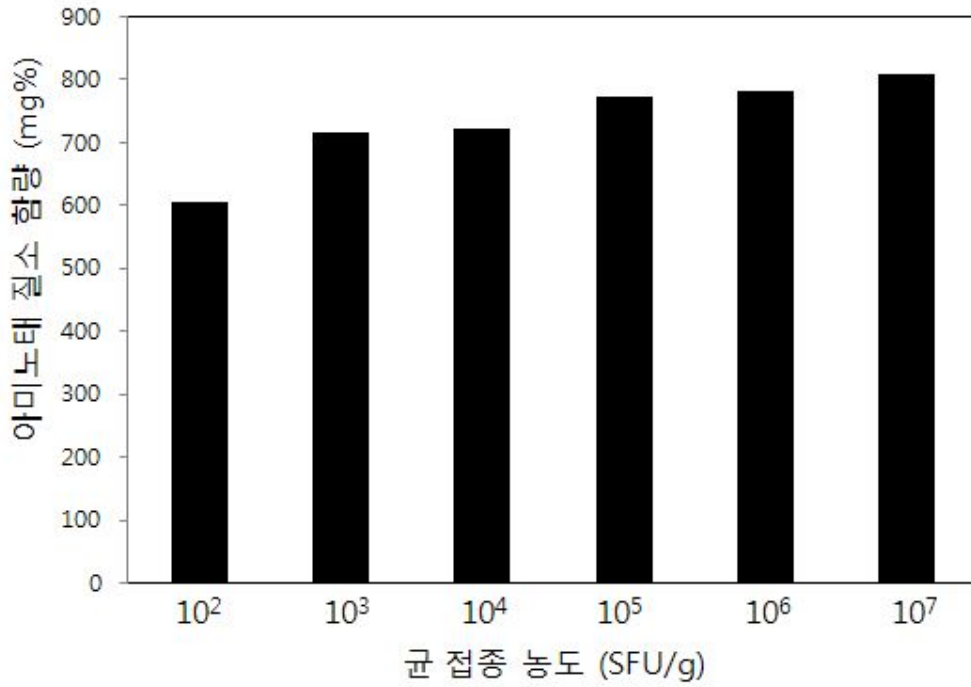


Fig. 23. 종균의 접종 농도에 따른 청국장의 아미노태 질소 함량

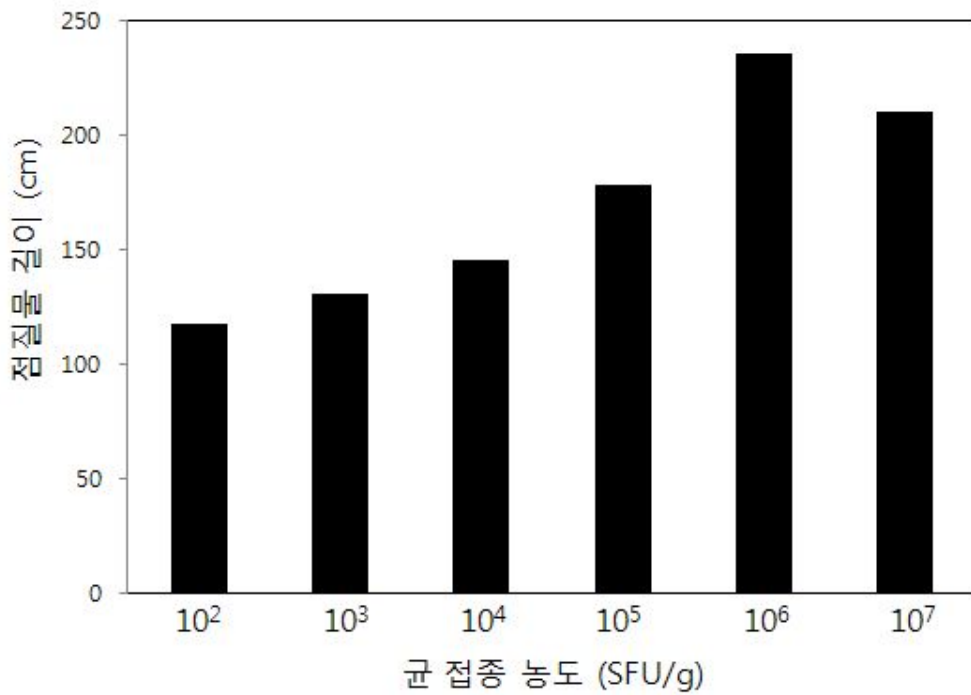


Fig. 24. 종균의 접종 농도에 따른 청국장의 점질물 깊이

나. 종균 제품의 개발

(1) 개발된 청국장 발효용 종균제품

우수 균주인 *Bacillus subtilis* P-L2를 이용하여 제조된 아포형 종균을 청국장 업체 및 가정에서 용이하게 사용하기 위한 앰플형 고상 제품을 포함한 사용 kit 및 스프레이에 포장된 액상 제품을 개발하였다. Fig. 25는 개발된 청국장 발효용 종균제품 및 kit의 간단한 사용법을 그림으로 나타내었다. 액상 제품은 증자가 끝난 콩에 즉시 접종할 수 있는 형태로 제조되어 있어 사용이 간편하지만 고상제품에 비해 안정성이 낮은 단점이 있어 단기유통 및 보급에 적합할 것이다. 고상 제품은 kit에 포함된 주사기에 멸균증류수를 주입한 후 앰플에 삽입하여 파우더 타입의 종균을 모두 현탁한 후 다시 주사기로 회수하여 스프레이에 옮겨 담아 희석함으로써 외부오염의 위험 없이 간단하게 사용 가능하다.



Fig. 25. 청국장 발효용 종균 제품 및 사용

다. 사용 매뉴얼의 보급

1. 균일한 청국장 제조를 위한 매뉴얼 확립

- 청국장의 품질 표준화와 고품질 제품 생산을 위한 공정표준화
- 제조환경, 시스템의 유무에 따른 매뉴얼 개발 보급
- 종균 외 미생물 오염을 방지하기 위한 제조시설의 위생시설 가이드 설정
- 금속탐지기를 이용한 철분 검출
- 제조 시설물, 용기, 이송기, 내벽, 천정 등 내장재를 통한 오염 방지
- 제조 작업자를 통한 오염방지
- 포장 및 유통과정에서 변질, 오염방지
- 제조공정 관리 적용
 - 침지 · 증자공정, 발효 · 숙성공정, 발효온도관리, 건조공정, 포장관리, 위생관리 등 적용
- HACCP 매뉴얼 일부 적용 검토

라. 청국장 종균 제품의 경제성 분석

1. 청국장 종균의 생산 단가

본 연구에서 개발된 청국장 종균의 생산에 소요된 비용은 Fig. 26에 나타난 바와 같이 아포형 종균 1 g당 약 20,000원으로 나타났다. 1g의 종균을 사용하여 10^4 SFU/g의 농도가 되도록 대두에 접종할 경우 1 ton 이상의 청국장을 제조할 수 있어 대량 생산 시 원가절감이 가능할 것이라 전망된다.

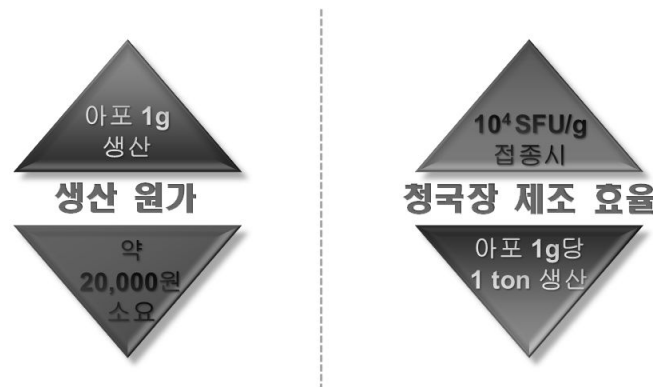


Fig. 26. 청국장 종균의 생산 단가 분석

2. 경제성 분석

청국장 1 ton의 제조에 필요한 종균 1 g의 생산에 소요되는 경비는 20,000원으로, 청국장 생산 단가에 거의 영향을 미치지 않을 정도의 비용이다. 이로 인해 얻을 수 있는 효과는 우수한 발효 종균을 접종함으로써 부패균의 생육이 억제되어 청국장의 발효실패에 의해 전량 폐기해야 하는 경우를 원천 봉쇄할 수 있다는 것이다. 청국장 생산 시 발효 실패로 폐기되는 용량은 정확히 보고되지는 않았으나, 전체 생산량의 10% 정도라 가정하고 2009년의 청국장 출하량 5,674 ton (출하액 28,142,528,000원)을 기준으로 계산하였을 때, 종균 5,674 g (비용 113,480,000원)의 사용 시 567 ton (2,814,252,800원)의 단가 절감(약 250배)이 가능하다. 뿐만 아니라 품질의 균일화 및 우수 종균에 의한 기능성 증강 등의 효과를 감안한다면 청국장의 국내 보급 및 수출이 훨씬 용이해져 현재 출하액의 몇 배 이상의 이익 상승이 예상된다.

[청국장 제조 매뉴얼 별첨 자료]

[청국장 업소용]

청국장 제조매뉴얼

표준관리기준서

회사로고

제정이력
문서 번호 : 0000-H-101
제정 일자 : 2011. 04. .

구 분	직 책	성명	서명	일 자
승 인	대표이사			
검 토	생산팀장			
작 성	팀원 A			

목 차

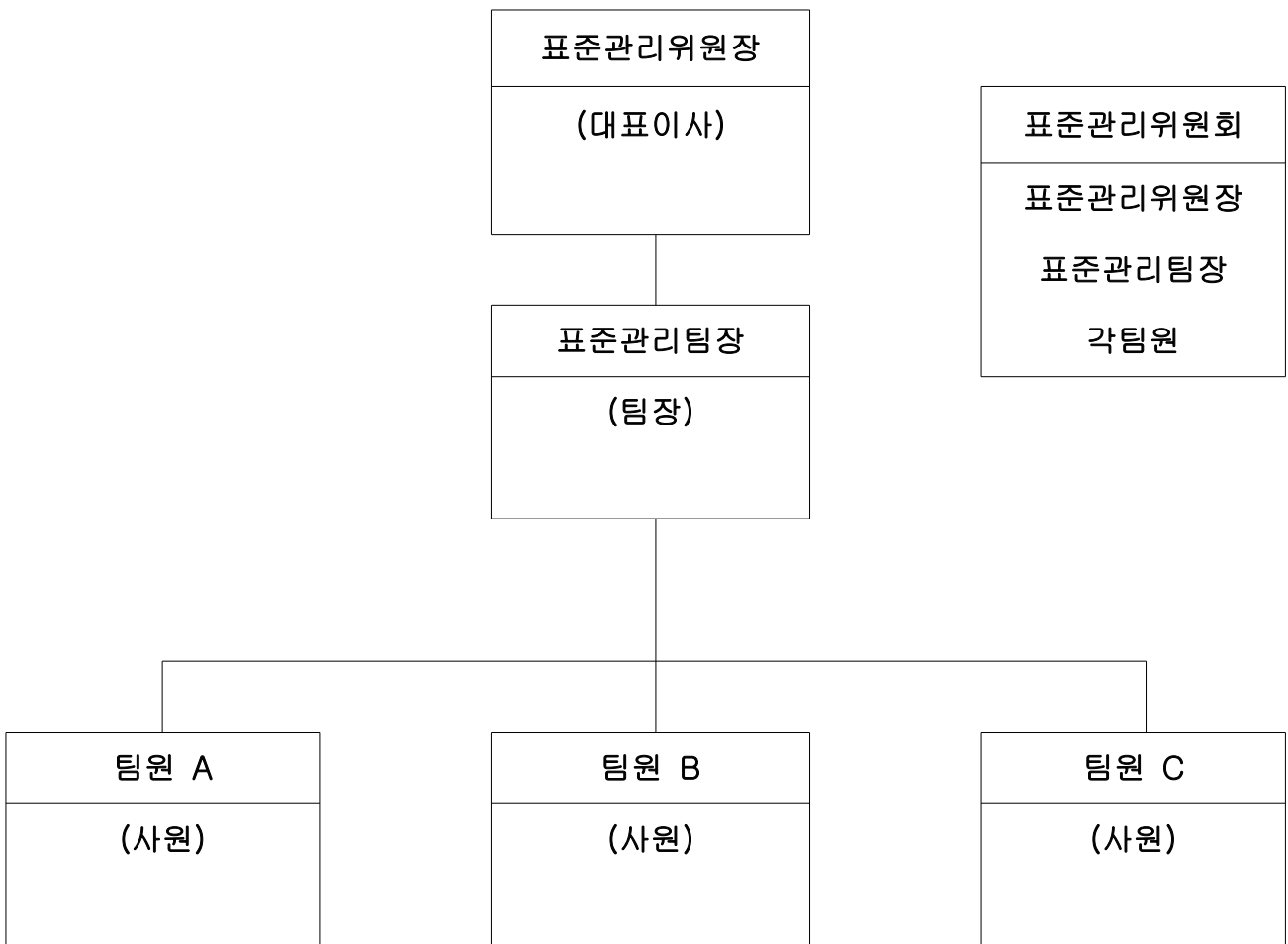
1. 요약	1
2. 조직도	2
3. 제조공정 및 생산	3
4. 현 황	5
5. 위해요소 분석	7
6. 중요관리점	9
7. 주기적 관리계획	11
[점검표]	13
1. 중요관리공정(증자공정) 점검표	13
2. 중요관리공정(발효, 숙성공정) 점검표	14
3. 중요관리공정(건조공정) 점검표	15
4. 중요관리공정(원료이송공정) 점검표	16
5. 중요관리공정(포장이송공정) 점검표	17
6. 일반위생관리 및 공정점검표	18
7. 제조공정 일일 위생관리점검표	19
8. ()분기별 위생관리점검표	20
9. 중요관리공정 검증점검표	21

1 요약

- 본 업소는 청국장을 생산하는 식품제조·가공업소로서 총 5명의 인원이 청국장류(페이스트, 분말, 환) 3개 제품을 생산하여 매출액은(약 00원)이며 주로 대형 유통판매업소 및 일반소매점에 판매하고 있다.
- 본 업소의 청국장류는 대두를 주원료로 하여 바실러스(*Bacillus*)속균으로 발효시켜 제조한 것이거나, 이를 식염, 고춧가루, 마늘 등으로 조미한 것으로 원료 취급 및 제조과정에서 식중독균(*Bacillus cereus* 등) 오염과 이물(금속 등)이 혼입될 수 있으며,
- 이로 인한 주요클레임 발생사례는 최근 3년간 관계당국으로부터 *Bacillus cereus* 00 건, 소비자클레임 00 건이 있었다.
 - 연도별 주요 클레임내용은 '08년도 *Bacillus cereus* 검출 00 건, '09년도 날벌레 이물 검출 00 건, '10년도에는 철수세미 00 건 이었다.
- 이러한 위해발생을 사전에 예방하기 위해 중점관리해야 하는 공정은 원료 이송 및 세척 시 분진등 오염원 차단과 증자, 발효, 숙성 시 오염원 차단, 건조, 포장 시 오염원 차단 등으로 판단되며, 이물은 원료세척 공정 및 금속검출기에서 중점적으로 관리할 필요성이 있다
- 본 업소에서는 작업장의 오염방지를 위해 원료처리실 구획작업과 세척시설, 증자시설, 발효시설, 작업시설, 포장시설은 작업 후 청소, 소독을 하며 이에 대한 확인·기록하도록 하고 있다.
- 또한 이물 제거를 위해 대두 세척 시 세척기의 작동상태를 작업시작 전과 2시간마다 모니터링하고 기록하도록 하고 있다.
- 종합적인 공정 및 일반위생관리를 위해 개인위생 상태, 냉동·냉장고 온도 확인 등 총 30개 항목에 대하여 정기적 점검(매일 17, 주간 4, 월간 5, 분기 1, 연간 3)을 실시하고 있으며,
- 따라서 지속적인 모니터링을 통해 미흡사항의 원인을 파악하고 문제점 제거를 위해 체계적이고 지속적인 관리가 필요하다

2 조직도

표준관리팀 조직도



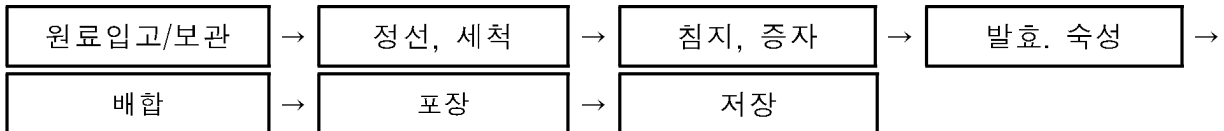
모니터링 담당자(정/부)

청국장 증자공정, 건조공정(정: / 부:)
 청국장 원료이송, 포장라인 금속검출공정(정: / 부:)
 청국장 발효, 숙성공정(정: / 부:)

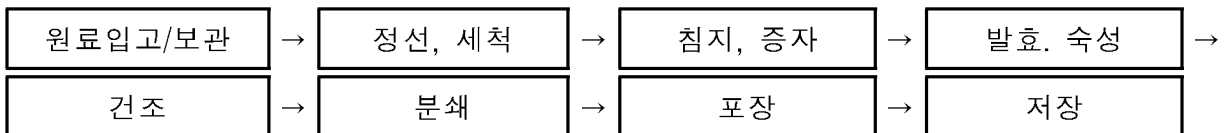
3 제품 공정 및 생산

- 소재지 : 00 시 00 읍 00 리
- 생산품목 : 청국장류(습식청국장, 분말청국장, 환청국장)
- 생산량/총매출액 : 연간 00 톤/ 000 천만원
- 주요공정

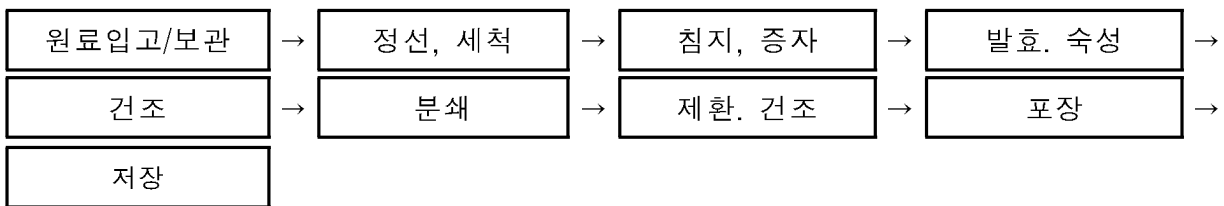
- 습식청국장



- 분말청국장



- 환청국장



○ 중요관리점

1) 증자공정

구분	점 검 방 법	주 기	책 임 자
증자공정	증자기 온도, 압력상태 확인 작업 후 증자기 내외부 청소상태 확인	작업시작 전 매 2시간마다 작업 전후마다	팀원A

2) 건조공정 - 건조온도(60 ±2℃), 건조시간(24 시간)

구분	점 검 방 법	주 기	책 임 자
건조공정	건조기 온도, 시간 확인 건조 전후 청소상태 확인	작업시작 전 매 2시간 마다 작업전 후	팀원A

3

제품 공정 및 생산

3) 발효, 숙성공정

구분	점 검 방 법	주 기	책 임 자
발효, 숙성 공정	공유균 및 제국상자 정기적 배양검사 확인	월 1회이상	팀원 C

지정된 발효용 종균 이외의 오염균주 검출

4) 금속검출공정1 - 금속이물 크기 3mmφ 이상 불검출

구분	점 검 방 법	주 기	책 임 자
금속검출공정 (원료이송)	표준시편을 제품과 함께 자석봉에 통 과시켜 정상 작동여부 확인	작업시작 전 매 2시간 마다	팀원 B

5) 금속검출공정2 - 금속이물 크기 3mmφ 이상 불검출

구분	점 검 방 법	주 기	책 임 자
금속검출공정 (포장라인)	표준시편을 제품과 함께 금속검출기 에 통과시켜 정상 작동여부 확인	작업시작 전 매 2시간 마다	팀원 B

○ 종사자별 중요관리점 및 제조공정 운영 관리

대표자	총괄책임, 점검표 최종승인
생산팀장	점검표 작성 등 작업장 일반위생관리 및 공정관리 총괄
생산팀원A	중요관리공정(증자공정) 모니터링 등 담당 중요관리공정(건조공정) 모니터링 등 담당
생산팀원B	중요관리공정(원료이송 금속검출공정) 모니터링 등 담당 중요관리공정(포장라인 금속검출공정) 모니터링 등 담당
생산팀원C	원부재료 입고·보관, 작업장 청소, 폐기물 관리 등 담당 중요관리공정(발효, 숙성공정) 모니터링 등 담당

- 본 업소는 '00년도부터 00 지역내 (소재지)에 위치하며, 건물은 00년 된 (콘크리트, 철골 등) 구조로서 자가/임대하여 사용하고 있으며, 총면적은 00㎡, 제조시설은 세척기, 증자기, 발효실, 배합시설, 포장기, 건조기, 제환기, 제국상자 등의 설비와 냉동·냉장창고를 갖추어 운영하고 있다.
- 본업소의 주요 생산품목은 습식, 분말, 환 청국장으로서 1년 생산량(000)톤이며, 매출액은 (000)천만원이고 주로 대형유통 판매업소 및 일반소매점 등에 판매하고 있다.
- 본 업소는 대표자의 4명(생산직3명, 관리직2명)으로 구성되어 있으며, 직원의 연령층은 60대 3명, 50대 1명, 40대 1명으로, 종업원 중 식품관련학과를 졸업한 직원은 없고, 청국장 류 관련 분야에서 3년이상 종사한 종업원은 3명이 있다.
- 본 업소에서 생산하는 청국장 류 중 습식청국장, 분말청국장, 환 청국장 등 총 3개 제품을 생산하고 있다.

4

현황

- 본 업소에서 생산하는 청국장류의 주요 원부재료는 다음과 같다.

구분	원료명	보관방법
농산물	대두	실온
	고춧가루	실온, 냉장
식염	천일염, 정제염	실온
물(용수)	상수도, 지하수	실온
포장재	내포장재 : 폴리프로필렌(OPP):외면+폴리에틸렌(PE):내면 외포장재 : 골판지 상자	실온

- 농산물원료인 대두는 한국장류협동조합에서 구입하여, 본 업소의 상온차량으로 운송되어 입고되고 있다. 대두의 포장상태는 마대포장으로 포장되어 있다. 입고 시 구분유통증명서를 수령 또는 접수하여 관리한다.
- 농산물원료인 고춧가루는 0000 시장에서 구입하여, 본 업소의 상온차량으로 운송되어 입고되고 있다. 포장상태는 PE포장으로 되어 있으며 입고 시 시험성적서 및 육안검사를 통해 관리한다.
- 식염은 000에서 납품받고 있으며, 상온차량으로 운송하여 입고되고 있다. 입고 시 시험성적서 및 육안검사를 통해 관리한다.
- 수돗물이 아닌 지하수 등을 먹는물 또는 식품의 제조·가공 등에 사용하는 때에는 「먹는물관리법」 제43조에 따른 먹는물 수질검사 기관에서 1년마다 「먹는물관리법」 제5조에 따른 먹는물의 수질 기준에 따라 검사를 받아 마시기에 적합하다고 인정된 물을 사용하며 합격 시험성적서를 비치 관리한다.
- 포장재는 000에서 납품받고 있으며, 상온차량으로 운송하여 입고되고 있다. 입고 시 육안검사를 통해 관리하며 6개월에 1회 이상 시험성적서를 받아 관리한다.

1) 위해요인 및 예방조치

- 본 업소에서 생산하는 청국장류에서 발생할 수 있는 위해요소를 분석해 보면 다음과 같다.
 - 생물학적 위해요소로는 바실러스세레우스 식중독균이 있다.
 - 화학적 위해요소로는 잔류농약, 아플라톡신이 있다
 - 물리적 위해요소로는 돌, 콩대, 풀씨, 금속성이물, 벌레, 비닐 등 이물이 있다.

- 이의 위해요소를 효율적으로 관리하기 위한 방법으로는
 - 생물학적 위해요소인 식중독균은 각 공정별로 오염원 관리 및 소독을 통해 식품공전 기준인 10^4 cfu/g이하로 관리한다.
 - ⇒ 식중독균을 기준이하로 관리하기 위해서는 생산제품의 초기균수가 적도록 관리하는 것이 중요하므로, 작업공정 중 원료세척, 증자공정을 통한 식중독균제거, 철저한 개인위생관리 및 작업환경(작업장, 제조설비·도구 등)에 대한 세척·소독관리를 통해 교차오염을 방지하여야 한다.
 - 화학적 위해요소인 잔류농약, 아플라톡신 등을 관리하기 위해서는 원부재료 입고 시 시험성적서 등을 통해 적합성 여부를 판단하고 관리해야 한다.
 - 물리학적 위해요소인 이물 등을 관리하기 위해서는 대두의 이물제거와 제조공정에서 혼입될 수 있는 금속파편, 나사, 너트, 기타 비닐, 노끈 등 이물은 제조공정 상에서 관리가 필요하며 육안 등으로 선별한다.

5

위해요소 분석

○ 위해요인에 대한 예방관리방법은 다음과 같다

구분	위해요인	예방관리
농산물 (대두)	○ 재배 및 유통과정, 종업원 등으로 인해 식중독균과 흙, 비닐 등 이물이 혼입될 수 있다	☞ 식중독균 증식을 줄이기 위해 건냉 보관하고, 이물 등은 석발 또는 세척을 통해 실시한다.
부원료 (식염, 고춧가루)	○ 포장재 훼손으로 인한 이물 혼입, 유통기한 경과 원료 사용 등으로 품질 저하가 발생될 수 있다.	☞ 포장재 훼손여부 및 유통기한 확인 등 입고검사를 실시한다.
포장재	○ 부적절한 포장재 사용으로 인하여 화학물질이 제품에 오염될 수 있다.	☞ 포장재에 대한 재질 확인 및 시험성적서등을 확인하여 관리한다.
제조 과정	○ 개포작업 부주의로 인해 원부재료의 포장재 파편(나무, 비닐, 플라스틱, 종이, 금속못 등)이 제품에 혼입될 수 있다.	☞ 개포작업 전 포장재의 재질을 확인하고 포장재 파편이 혼입되지 않도록 작업 중 수시로 확인 관리한다.
	○ 종업원, 기구·설비 등의 세척·소독이 불충분할 경우 식중독균이 교차오염 될 수 있다.	☞ 개인위생관리, 기구·설비 등의 세척·소독관리를 통해 교차오염을 방지할 수 있다.
	○ 종업원의 위생복, 위생모 착용 불량 등으로 인해 머리카락, 실 등의 이물이 제품에 혼입될 수 있다.	☞ 작업장 입실 전에 복장착용상태를 확인하고 이물 등 제거를 철저히 실시한다.
	○ 제조설비 및 제조도구의 파손에 의해 플라스틱 조각, 금속 조각(나사, 너트 등)이 제품에 혼입될 수 있다.	☞ 매일 작업 전 제조설비 및 도구의 파손상태를 확인한다.

(증자공정)

- 세척. 침지한 대두를 증자솥(온도 $121\pm 2^{\circ}\text{C}$, 압력 $2.0\text{kgf}/\text{cm}^2$)에서 1시간이상 증자한다.
- 균일한 증자대두 관리를 위해 증자온도, 압력, 시간이 유지되는지 작업시마다 확인. 기록한다.
- 온도계는 정상작동 여부를 확인하기 위해 연 1회 이상 검. 교정한다.

(발효. 숙성)

- 작업공정 후 작업장과 제국상자 및 상자포를 세척. 소독. 건조한다.
- 발효실 공유균, 발효상자, 상자포에 있는 균 채취를 하여 배양검사를 하여 오염상태를 확인한다.
- 발효실은 항상 청결한 상태로 유지하며 적정의 온도, 습도관리를 한다.
- 발효실의 온도계 정상작동 여부를 확인하기 위해 연 1회 이상 검. 교정을 한다.

(건조공정)

- 숙성물을 건조용 선반에 담아 건조기에 넣고 60°C 에서 24시간 건조하며 건조온도, 시간을 확인. 기록한다.
- 건조작업 후 건조선반, 건조기 내부를 세척 건조, 소독한 후 오염물 여부 확인. 기록한다.

(원료 이송 및 내포장 후 금속검출공정)

- 금속이물을 제거하고 균일한 품질을 확보하기 위하여 자석봉, 금속검출기의 정상작동 유무를 작업시작 전, 매 2시간, 작업종료 후마다 확인. 기록한다.

※ 금속검출공정 정상 작동유무를 2시간 마다 실시하는 이유는 자석봉, 금속검출기의 입력전압 불균형, 이송벨트 속도 변동 등 가동상태가 지속적으로 유지되는지 확인·관리하기 위함이다.

- 금속검출기의 감도 확인 방법은 다음과 같다.
 - ① 기기감도의 설정 조건을 확인한다.
 - ② 표준시편 【금속성 이물(Fe, SUS)의 크기가 3mm ϕ 이하】 과 금속이 물이 없는 것으로 확인된 공정품을 각각 금속검출기에 통과시켜 인식 여부를 확인한다.
 - ③ 금속이물이 없는 것으로 확인된 제품에 표준시편을 넣고 인식 여부를 확인한다.

- 금속성 이물이 제품에서 검출된 경우, 공정품에 혼입된 금속이 출처를 조사하여 그 원인을 제거한다. 금속이물 검출 내역 및 개선조치 사항을 일지에 기록한다.

- 금속검출기의 고장이 확인된 경우, 즉시 수리하고, 이전 모니터링 시점부터 고장 확인 시점까지 금속검출기를 통과한 공정품을 재통과 시킨 후 그 결과를 기록한다. 즉각적인 수리가 불가능할 경우, 공정품을 교차오염이 되지 않도록 별도 보관 후 수리가 끝나면 금속검출기의 정상 작동을 확인한 후 제품 생산을 재개한다.

- 금속자석봉의 정상작동 여부를 확인하기 위해, 연 1회 이상 검 · 교정을 확인한다.

7 주기적 관리계획

주기적으로 관리해야 할 위생, 공정관리는 별첨(일반위생관리 및 공정점검표)에 따라 매일, 주간, 월간, 반기, 연간별로 점검·확인한다

1) 주기적 관리내용

- ① 본 업소에서는 **매일** 종업원 개인위생관리·제조설비 정상작동 여부·제조공정 적정성·작업장 제조설비 청결상태 등을 전반적으로 확인·관리 한다.
- ② 본 업소에서는 **매주** 방충·방서설비에 포획된 개체수, 위생복 세탁여부 등을 확인한다.
- ③ 본 업소에서는 **매월** 작업장내 전체청소, 원부재료 보관상태, 종업원 위생교육, 완제품 검사, 발효·숙성실 균 채취 검사, 중요관리점 검증 등을 확인한다.
- ④ 본 업소에서는 **매반기별** 용수탱크 청소·소독을 실시하고 있는지 확인 한다.
- ⑤ 본 업소에서는 **매년** 증자솥 및 건조기, 냉장창고 온도계, 자석봉 등 점검·교정 여부, 용수검사 실시여부를 확인한다.

2) 종사자별 관리내용

- ① **생산팀장은 매일** 「일반위생관리 및 공정점검표」를 작성·관리하고, 작업 중에는 청결작업 구역에 교차오염 발생여부를 확인하며, 식품위생법에서 정한 시설기준, 영업자 준수사항 등에 대하여 적합하게 관리되고 있는지 확인하여야 한다
매월 첫째 주 월요일에 「중요관리공정 검증표」를 작성한다.
- ② **생산팀원A는 매일** 작업시작 전에 위생복 및 외출복장의 구분보관 여부, 종업원복장 및 위생상태, 위생설비 이상 유무 등을 확인하고, 작업 중에는 「중요관리점 점검표(증자, 건조공정)」를 작성하고 작업 종료 후에는 작업장 바닥, 배수로 청소·소독상태, 제조설비(제품과 직접 닿는 부분) 청소·소독상태를 확인한다

7 주기적 관리계획

매주 금요일에 냉장창고 내부청소 상태, 작업장 벽 청소 상태, 제조설비(제품과 직접 닿지 않는 부분) 청소·소독 상태 등을 확인한다

매월 첫째 주 월요일에 종업원 위생교육여부, 작업장 전체 청소 상태, 발효 숙성실 균 채취 검사를 확인한다.

- ③ 생산팀원B는 매일 작업시작 전에 작업장 밀폐상태, 작업도구의 파손여부 등 시설설비 고장여부를 점검하고 매일 작업 중에는 「중요관리점 점검표(원료이송, 포장이송 금속검출공정)」를 작성하고, 모니터링 장비 사용전후 세척·소독상태 확인하며, 작업종료 후에는 제조설비(제품과 직접 닿는 부분) 청소·소독상태를 확인한다.

매주 목요일에는 방충방서설비에 포획된 개체수를 확인한다

☞ 방충방서 설비 확인 결과 개선조치(작업장 방역 등)가 필요한 경우 주말을 이용하여 실시한다.

매월 첫째 주 월요일에는 완제품검사 의뢰여부 확인한다

매년 12월 마지막 주 월요일에는 증자솥 및 건조기, 냉장창고 온도계, 자석봉 등의 검·교정 여부, 용수검사 여부를 확인한다.

- ④ 생산팀원C는 원부재료 및 포장재 입고 시에 시험성적서 수령여부 등을 확인하고 육안검사를 실시하며, 매일 작업시작 전에는 냉장·냉동창고 온도를 확인하며, 작업 중에는 「중요관리점 점검표(발효, 숙성공정)」를 작성하고 완제품의 포장 상태를 확인하며, 작업종료 후에는 폐기물 처리상태를 확인한다.

매주 금요일에는 냉장창고 내부청소상태, 위생복 세탁 실시여부를 확인한다.

중요관리점 점검표 [증자공정]				결 재	작성자	승인자
작성일자				점검자		
한계기준	증자온도		증자시간		증자압력	
	121 ±2℃		1.0 시간		2.0 Kg/cm ²	
주 기	개별 batch 작업시마다					
방 법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 증자 온도 : 증자기 온도 확인 ○ 증자 시간 : 증자기 시간 확인 ○ 증자 압력 : 처리조의 압력을 판넬 압력기로 확인 ※증자기 온도계는 연 1회 검·교정 실시 필요					
품 명	측정시각	증자온도	증자시간	증자압력	판 정	서 명
	:	℃	분	Kg/cm ²	○ / ×	
	:	℃	분	Kg/cm ²	○ / ×	
	:	℃	분	Kg/cm ²	○ / ×	
	:	℃	분	Kg/cm ²	○ / ×	
	:	℃	분	Kg/cm ²	○ / ×	
개선조치 방법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가열온도 및 가열시간, 가열 후 대두 증자정도에 따라 재가열을 실시하고 제품 검사 후 이상이 없을시 출고한다. ○ 가열온도 및 가열시간 초과 시 제품 검사 후 이상이 없을시 출고한다. ○ 기계 고장 시 생산을 중단하고 수리 후 제품 생산을 속개한다. ○ 즉각적인 수리가 불가능할 경우 공정품을 분리하여 별도로 보관한 후 수리가 끝나면 제품 생산을 속개한다. 					
한계기준 이탈내용			개선조치 및 결과		조 치 자	확 인

중요관리점 점검표 [발효. 숙성공정]				결 재	작성자	승인자
작성일자				점검자		
한계기준	균 명칭		낙하균	제국상자 채취균		
	대장균		음성	음성		
	포도상구균		음성	음성		
	바실러스세레우스		g당 1,000이하	g당 1,000이하		
주 기	매월 첫째주 월요일마다					
방 법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 낙하균 채취법 : 발효실 청소. 소독 후 내부에 영양배지를 시간 방치한 후 균을 채취한다. ○ 제국상자 채취균 채취법 : 멸균 면봉으로 제국상자 또는 제국포에서 균을 채취한다. 					
품 명	채취시각	채취부분	검사결과일자	검사결과 data	판 정	서 명
대장균	:			음성 양성	○ / ×	
	:			음성 양성	○ / ×	
포도상구균	:			음성 양성	○ / ×	
	:			음성 양성	○ / ×	
B.C균	:			/g	○ / ×	
	:			/g	○ / ×	
개선조치 방법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 균 채취한 검사결과 한계기준에 초과 시 재 청소, 소독하여 재검사를 실시하여 한계기준 이하일 때 생산 작업을 진행한다. ○ 즉각적인 검사가 불가능할 경우 검사기관에 검사의뢰한 후 결과가 한계기준 이하 일 때 제품 생산을 속개한다. 					
한계기준 이탈내용			개선조치 및 결과		조 치 자	확 인

중요관리점 점검표 [건조공정]				결 재	작성자	승인자
작성일자				점검자		
한계기준	건조온도			건조시간		
	60 ±2℃			24 시간		
주 기	개별 batch 작업시마다					
방 법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 건조온도 : 건조기 온도 확인 ○ 건조시간 : 건조 시간 확인 ※건조기 온도계는 연 1회 검 · 교정 실시 필요 					
품 명	측정시각	건조온도	건조시간	판 정	서 명	
	:	℃		분	○ / ×	
	:	℃		분	○ / ×	
	:	℃		분	○ / ×	
	:	℃		분	○ / ×	
	:	℃		분	○ / ×	
개선조치 방법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가열온도 및 가열시간, 가열 후 건조정도에 따라 재가열을 실시하고 제품 검사 후 이상이 없을시 출고한다. ○ 가열온도 및 가열시간 초과 시 제품 검사 후 이상이 없을시 출고한다. ○ 기계 고장 시 생산을 중단하고 수리 후 제품 생산을 속개한다. ○ 즉각적인 수리가 불가능할 경우 공정품을 분리하여 별도로 보관한 후 수리가 끝나면 제품 생산을 속개한다. 					
한계기준 이탈내용			개선조치 및 결과		조 치 자	확 인

중요관리점 점검표 [원료 이송공정]				결 재	작성자	승인자
작성일자			점검자			
한계기준	○ 금속 불검출(3mm ϕ 이하)					
주 기	금속자석봉 정상작동 여부 확인		작업시작 전, 매 2시간마다			
	금속자석봉에 의한 공정품 확인		작업 중 상시			
방 법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 금속자석봉 감도 모니터링 <ul style="list-style-type: none"> ① 표준시편 (철 : 3mm)만 통과 ② 금속이물이 없는 것으로 확인된 공정품 통과 ③ 표준시편 (철 : 3mm)와 공정품을 함께 통과 ○ 금속자석봉에 의한 공정품 확인 <ul style="list-style-type: none"> ① 제품 금속자석봉 통과 					
금속자석봉 감도 모니터링						
품명	통과시간	Fe만 통과	제품만 통과	Fe+제품 통과	판정	서명
	:				○ / x	
	:				○ / x	
	:				○ / x	
	:				○ / x	
	:				○ / x	
개선조치 방법	<ul style="list-style-type: none"> ① 고장(자력 미달) 확인시 담당자는 즉시 교체하고, 이전 모니터링 시점부터 고장 확인 시점까지 금속자석봉을 통과한 공정품을 재통과 시킨 후 그 결과를 기록한다. ② 즉각적인 교체가 불가능할 경우 공정품을 분리하여 별도로 보관한 후 교체가 끝나면 금속자석봉의 정상 작동을 확인 후 제품 생산을 속개한다. 					
금속자석봉 제품 통과						
품명	최초통과시간	통과종료시간	이탈유무	특이사항		
개선조치 방법	<ul style="list-style-type: none"> ① 공정품에 혼입된 금속이물을 찾아내고, 그 출처를 조사하여 원인을 제거한다. ② 금속이물 검출 내역 및 개선조치 사항을 일지에 기록한다. 					
이탈내용		개선조치 및 결과		조치자	확인	

중요관리점 점검표 [포장 이송공정]				결 재	작성자	승인자		
작성일자				점검자				
한계기준	○ 금속 불검출(3mm ϕ 이하)							
주 기	금속검출기 정상작동 여부 확인			작업시작 전, 매 2시간마다				
	금속검출기에 의한 공정품 확인			작업 중 상시				
방 법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 금속검출기 감도 모니터링 <ul style="list-style-type: none"> ① 표준시편 (철 : 3mm, 스테인리스 : 3mm)만 통과 ② 금속이물이 없는 것으로 확인된 공정품 통과 ③ 표준시편 (철 : 3mm, 스테인리스 : 3mm)와 공정품을 함께 통과 ○ 금속검출기에 의한 공정품 확인 <ul style="list-style-type: none"> ① 제품 금속검출기 통과 							
금속검출기 감도 모니터링								
품명	통과시간	Fe만 통과	SUS만 통과	제품만 통과	Fe+제품 통과	SUS+제품 통과	판정	서명
	:						○ / x	
	:						○ / x	
	:						○ / x	
							○ / x	
							○ / x	
개선조치 방법	<ul style="list-style-type: none"> ① 고장 확인시 담당자는 즉시 수리하고, 이전 모니터링 시점부터 고장 확인 시점까지 금속검출기를 통과한 공정품을 재통과 시킨 후 그 결과를 기록한다. ② 즉각적인 수리가 불가능할 경우 공정품을 분리하여 별도로 보관한 후 수리가 끝나면 금속검출기의 정상 작동을 확인 후 제품 생산을 속개한다. 							
금속검출기 제품 통과								
품명	최초통과시간	통과종료시간	이탈유무	특이사항				
개선조치 방법	<ul style="list-style-type: none"> ① 공정품에 혼입된 금속이물을 찾아내고, 그 출처를 조사하여 원인을 제거한다. ② 금속이물 검출 내역 및 개선조치 사항을 일지에 기록한다. 							
이탈내용		개선조치 및 결과		조 치 자	확 인			

일반위생관리 및 공정점검표

결 제	작성자	승인자

작성일자	년 월 일(요일)	점검자		
주기	관리	점검내용	기록	
			예	아니오
일일 (작업전)	개인 위생	위생복장과 외출복장이 구분하여 보관되고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		종업원은 개인장신구 등을 소지하지 않고, 청결한 위생복장을 착용하고 작업하고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		위생설비(손세척소독기 등) 중 이상이 있는 것이 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	방출 방서	작업장은 밀폐가 잘 이루어지고 있으며, 방출시설에는 이상이 없는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	이물 입고 보관	파손되거나 고장난 제조설비가 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		냉장·냉장제품 입고 시 배송차량온도 및 품온은 적절한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		냉장·냉동 창고의 온도가 적절히 관리되고 있는가?	냉장창고: ℃ 냉동창고: ℃	
일일 (작업중)	공정 관리	(구획이 안된 작업장의 경우) 청결구역작업과 일반구역작업이 시간차를 두고 이루어지고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		원료(대두) 전처리 이송 시 먼지 등 분진을 제거하는 환기시설을 작동하여 오염원을 제거하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		완제품의 포장 상태가 양호한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		모니터링장비(온도계 등)는 사용전후 세척·소독을 실시하고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
일일 (작업후)	제품 관리	냉장이 요구되는 선도 유지의 원료와 완제품을 냉장창고에 보관하고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		작업장 바닥, 배수로, 위생시설, 제조설비(식품과 직접 닿는 부분)의 청소·소독 상태는 양호한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	점검 폐기물	중요관리점 점검표를 작성 주기에 맞게 작성하고, 한계기준 이탈 시 적절히 개선조치 하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		폐기물 처리상태 양호한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
일일 (입고시)	입고 보관	원부재료 입고 시 시험성적서를 수령하거나, 육안검사를 실시하고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
주간 (목요일)	방출 방서	쥐뿔, 해충유인 포획장치(날파리, 바퀴벌레 등)에 포획된 개체수는?		
주간 (금요일)	세척 소독	냉장·냉동창고 내부 청소 상태는 양호한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		작업장 벽, 제조설비(제품과 직접 닿지 않는 부분)에 대한 청소·소독 상태는 양호한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		위생복 세탁은 실시하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매월 (첫째 월요일)	세척 교육	작업장 전체 청소 상태는 양호한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		종업원 위생교육을 실시하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	검사	완제품에 대한 검사를 실시와 기준 및 규격기준에 적합한 제품을 판매하고 부적합제품에 대한 회수관리를 하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		발효·숙성실 낙하균,제국상자.상자포의 균채취 검사관리하는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		중요관리공정 검증표를 작성하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
반기별	세척 소독	용수탱크의 청소·소독은 실시하였는가(반기 첫째 주 월요일)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
년간 (8월중)	점검 검사 검진	증자기, 발효시설, 건조기, 냉장고등 온도계는 검교정하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		자석봉을 검교정하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		용수검사(지하수의 경우)를 실시하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		종사자의 건강검진을 실시하였는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
특이사항		개선조치 및 결과	조치자	확인

제조공정 일일 위생관리점검표

결 재	작성자	승인자

점검자		기록(예 O, 아니오 X)														
팀원	점 검 내 용	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	위생복장과 외출복장이 구분하여 보관하였는가?															
	종업원복장 및 위생상태, 위생설비 이상유무를 확인하였는가?															
	원료(대두) 전처리 이송시 먼지 등 분진을 제거하는 환기시설을 작동하여 오염염을 제거하였는가?															
	원료 세척 후 세척시설의 오염원(공눈, 흙, 모래 등)을 제거, 세척, 소독하였는가?															
	침지탱크, 증자솥을 사용 후 청소, 소독하였는가(작업 후)?															
	건조선반, 건조기 내부를 청소, 소독하였는가?															
	성형기, 제 환기를 오염물이 없도록 청소, 소독을 하였는가?															
	작업장 바닥, 배수로, 배수구 등 위생시설의 오염물제거 및 청소·소독을 하였는가?															
B	작업장은 밀폐가 잘 이루어지고 있으며, 방충시설에는 이상이 없는가?															
	작업도구가 파손여부 등 시설설비 고장여부를 확인하였는가?															
	배합탱크, 배합기구, 서비스탱크를 청소, 소독하였는가?															
	모니터링장비(온도계 등)는 사용전후 세척·소독을 실시하고 있는가?															
	작업 종료 후에 제조설비(제품과 직접 닿는 부분) 청소, 소독을 실시하고 있는가?															
C	(구획이 안된 작업장의 경우) 청결구역 작업과 일반구역작업이 시간차를 두고 이루어지고 있는가?															
	발효상자, 발효포, 발효실 천장, 벽, 바닥을 청소, 소독하였는가(작업 후)?															
	원부재료 입고 시 시험성적서를 수령하거나, 육안검사를 실시하고 있는가?															
	작업시작 전 냉장, 냉동창고 온도가 정상적으로 작동하는가?															
	냉장이 요구되는 선도 유지의 원료와 완제품을 냉장창고에 보관하고 있는가?															
	포장작업 후 포장기를 분해하여 포장기 내부의 오염물을 청소, 소독을 하였는가?															
	작업 종료 후에 폐기물 처리는 하였는가?															
	완제품의 포장 상태가 양호한가?															
특이사항		개선조치 및 결과					조치자					확인				

()분기별 위생관리점검표

결 계	작성자	승인자

점검자		기록(예 O, 아니오 X)														
팀원	점 검 내 용	1 주	2 주	3 주	4 주	5 주	6 주	7 주	8 주	9 주	10 주	11 주	12 주	13 주	14 주	
A	(금요일)작업장 벽 청소상태, 제조설비(제품과 직접 닿지 않는 부분)청소, 소독은 하였는가?															
	(매월 첫째 주 월요일)종업원 위생교육은하였는가?															
	(매월 첫째 주 월요일)작업장 전체 청소는 하였는가?															
B	(목요일)방충방서설비에 포획된 개체수를 확인하였는가?															
	(매월 첫째 주 월요일)완제품 검사 의뢰를 하였는가?															
	(매년 12월 마지막 주 월요일)증자술,건조기,냉장고,발효실 등의 온도계,자석봉 검교정 및 용수검사를 하였는가?															
C	(금요일)냉장창고 내부청소상태를 하였는가?															
	(금요일)위생복 세탁은 하였는가?															
특이사항		개선조치 및 결과					조치자					확인				

중요관리점 검증점검표

결 재	작성자	승인자

작성일자	점검자		
공정	검증 내용	기 록	
		예	아니오
증자공정	종업원이 주기적으로 증자온도, 증자시간 및 증자압력을 확인하고, 그 내용을 기록하고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	증자솔의 온도계는 연 1회 이상 검교정이 이루어지고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 증자온도를 확인하는 방법을 정확히 알고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 증자시간을 확인하는 방법을 정확히 알고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 증자 압력을 확인하는 방법을 정확히 알고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 한계기준 이탈시 실시해야 하는 개선조치 방법을 알고 있으며, 이탈 및 개선 조치 내용이 기록되고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
건조공정	종업원이 주기적으로 건조온도, 건조시간을 확인하고, 그 내용을 기록하고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	건조기의 온도계는 연 1회 이상 검교정이 이루어지고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 건조온도를 확인하는 방법을 정확히 알고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 건조시간을 확인하는 방법을 정확히 알고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 한계기준 이탈시 실시해야 하는 개선조치 방법을 알고 있으며, 이탈 및 개선 조치 내용이 기록되고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
발효, 숙성공정	종업원이 주기적으로 낙하균, 제국상자 채취균을 확인하고 기록하고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 한계기준 이탈시 실시해야 하는 개선조치 방법을 알고 있으며, 이탈 및 개선 조치 내용이 기록되고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
금속검출공정	종업원이 주기적으로 표준시편을 통해 금속검출기, 금속자석봉의 감도 이상 유무를 확인하고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	금속검출기, 금속자석봉을 정기적으로 이상 유무를 확인하고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 금속검출기, 금속자석봉 감도를 확인하는 방법을 정확히 알고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	종업원이 한계기준 이탈시 실시해야 하는 개선조치 방법을 알고 있으며, 이탈 및 개선 조치 내용이 기록되고 있습니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
한계기준 이탈내용	개선조치 및 결과	조 치 자	확 인

별첨

목 차

[별첨]

1. 제조공정 위생관리	25
전처리 공정	25
침지, 증자공정	26
발효, 숙성공정	27
2차 가공 공정	28
내포장 공정	29
외포장 공정	30
2. 일반위생관리	32
작업장/부대시설관리	32
개인위생관리	32
방충방서관리	33
이물관리	34
청소·소독관리	35
입고·보관관리	36
용수관리	37
제조시설관리	37
회수관리	37
3. 위해요소 및 예방·제거방법	38
4. 청소관리 매뉴얼 예시	39
5. 배치도, 이동선, 위치도 등 예시	40

[별첨1] 제조공정 위생관리

1) 전처리 공정

- “전처리 공정”은 정선 및 세척공정을 통하여 생물학적, 물리적 위해요소 일부가 제어되므로, 일반적인 위생관리 수준으로 관리하는 공정을 말한다.
- 금속검출공정은 원재료에서 유래될 수 있거나, 원재료 이송 중에 혼입될 수 있는 금속이물을 관리하기 위한 중요관리점이다. (금속 검출공정이 없는 업소의 경우 세척 전에 별도의 이물 선별 관리인원을 배치하여 이물혼입여부를 확인한다)
- 해당공정 : 원료입고 / 보관, 정선/ 세척

○ 입고/보관

원부재료 운송차량이 들어오면 운송차량의 온도 및 원부재료의 외관상태 등을 확인하고 정상제품만 해당창고 (실온제품 → 실온창고, 냉장제품 → 냉장창고, 냉동제품 → 냉동창고)에 입고·보관한다. 부적합제품의 경우 식별표시 후 반품 또는 폐기한다.

※ 정상제품

- 가공품 : 제품의 보관 온도가 일정하고, 포장에 파손되어 있지 않으며 표시사항이 정상적으로 표시되어 있는 제품
- 농산물 : 선도가 유지되어 있는 제품, 포장에 훼손되지 않은 제품

☞ 냉장, 냉동 원료를 실온이거나 실온에서 오랫동안 방치할 경우 품온 상승으로 인해 원료의 노화 및 세균이 증식될 수 있으므로 이에 대한 관리가 필요하다. (온도 기록관리)

[별첨1] 제조공정 위생관리

○ 이송/ 정선/ 세척

농산물(대두)은 토양에서 재배·수확되어 단순포장을 하기 때문에 흙이나 이물, 위해미생물 등이 부착되어 있어 이 공정을 통해 비 가식 부위 제거 및 세척을 실시한다.

대두에 있는 이물 중 금속물질은 금속자석봉의 관리를 통하여 제거한 후 세척한다.

☞ 대두이송 시설은 구획 관리하여 대두사용 시 발생 먼지의 오염을 방지한다.

☞ 대두사용 시 발생 먼지는 식중독균 등 주 오염원으로 대두이송 작업시마다 이송실의 환기시설을 작동 확인·기록 관리한다.

☞ 세척작업이 끝난 후 세척시설에 부착된 오염원(콩눈, 흙, 모래 등)이 제거되도록 충분히 청소 관리한다.

☞ 특히 콩눈(유기물)이 세척기에 오염되어 방치하면 위해미생물의 오염원이 되어 부패 및 미생물 오염이 될 수 있으므로 청소, 소독을 해야 한다.

2) 침지. 증자공정

- “침지. 증자공정”은 생물학적 위해요소가 일부 제거되므로 안전한 제품을 생산하기 위해 중요한 공정으로 준 청결위생관리 수준으로 관리하는 공정이다.

[별첨1] 제조공정 위생관리

□ 농산물에는 병원성대장균, 바실러스세레우스 등의 **식중독균**이 존재할 수 있고, 제조공정 중 위생처리를 하지 않은 종업원과 청소·소독이 불충분하게 이루어진 청국장 제조설비에 의해 교차오염이 발생할 수 있다.

□ 해당공정 : 침지/ 증자

○ 침지/ 증자

침지/ 증자공정은 발효의 최적조건으로 대두를 침지. 증자하는 작업이다.

☞ 침지/ 증자작업이 끝난 후 침지탱크/ 증자솥은 오염원이 없도록 청소. 소독 관리한다.

☞ 증자솥에 불린 대두를 투입하여 설정된 증자 온도($00 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 시간(00 시간) 및 압력($0.0\text{Kgf}/\text{cm}^2$)에 따라 증자를 실시한다.

3) 발효. 숙성공정

□ “발효. 숙성공정”이란 증자된 대두를 청국장 미생물에 의해 발효. 숙성을 통하여 맛과 향을 내는 중요한 공정으로 준 청결위생관리 수준으로 관리하는 공정이다.

□ 해당공정 : 발효/ 숙성/ 배합

[별첨1] 제조공정 위생관리

○ 발효/ 숙성

발효, 숙성공정은 미생물에 의해 청국장의 품미가 형성되는 과정으로 청국장 품질이 결정되는 중요한 공정이다.

- ☞ 증자 후 노출되는 공정으로 청결한 상태로 관리되어야 한다. 따라서 개인위생을 준수하지 않은 상태로 작업에 임할 경우 종업원으로 인해 병원성대장균, 황색포도상구균 등의 식중독균을 오염시킬 수 있으므로 종업원은 반드시 개인위생을 준수하고 수시로 손세척, 소독을 실시하여야 한다. 또한 종업원은 필요 시 마스크를 착용하거나 위생장갑 등을 착용하고 작업하도록 한다.
- ☞ 발효/ 숙성 작업이 끝난 후 작업장의 천장, 벽, 바닥을 고압세척기를 통하여 깨끗한 용수로 청소, 소독 관리한다.
- ☞ 발효/ 숙성 작업이 끝난 후 발효상자는 깨끗한 용수로 세척, 소독 관리한다.

○ 배합

배합공정은 숙성물과 식염 등을 배합하여 제품포장의 준비 단계이다.

- ☞ 배합탱크, 배합기구에 청국장의 진이 묻어 있으므로 작업 후 청소, 소독하여 오염원을 제거한 후 다음 작업에 대비한다.

4) 2차 가공 공정

- 제품 노출로 인한 추가적인 교차오염 우려가 있어 청결위생관리 수준으로 관리하는 공정이다.

[별첨1] 제조공정 위생관리

- 개인위생을 준수하지 않은 상태로 작업에 임할 경우 종업원으로 인해 병 원성대장균, 황색포도상구균 등의 식중독균을 오염시킬 수 있으므로 종업원은 반드시 개인위생을 준수하고 수시로 손세척, 소독을 실시하여야 한다. 또한 종업원은 필요 시 마스크를 착용하거나 위생장갑 등을 착용하고 작업하도록 한다.
- 해당공정 : 건조, 분쇄, 성형, 제환, 내포장

○ 건조/ 분쇄

건조/ 분쇄공정은 숙성물을 건조용 선반에 담아 건조기에 넣고 60℃, 20시간 건조. 분쇄하여 청국장 분말을 제조하는 단계이다.

- ☞ 건조용 선반, 건조기 내부의 오염원을 제거하고 청소. 소독 관리한다.
- ☞ 분쇄기의 입구, 롤러 등 오염물을 제거하고 청소. 소독 관리한다.

○ 성형. 제환

분말청국장을 반죽하여 사출. 성형을 하여 제환기에서 당이기를 한 후 건조하는 과정이다.

- ☞ 성형, 제환기를 오염물이 없도록 깨끗이 청소. 소독 관리한다.

5) 내포장 공정

○ 충전/ 내포장

[별첨1] 제조공정 위생관리

포장기를 통하여 습식청국장은 성형, 충전, 포장, 분말, 환청국장은 용기에 충전, 포장하여 제품을 완성하는 청결위생관리 수준으로 관리하는 공정이다.

- ☞ 포장작업 후 포장기를 분해하여 포장기 내부에 오염된 오염물을 청소, 소독 관리한다.

6) 외포장 제조공정

- “외포장 제조공정”이란 포장된 상태로 제품을 취급하는 공정으로 준청결 위생관리 수준으로 관리하는 공정이다.
- 금속검출공정은 원부재료에서 유래될 수 있거나, 제조공정 중에 혼입될 수 있는 금속이물을 관리하기 위한 중요관리점이다. (금속검출공정이 없는 업소의 경우 내포장 전에 별도의 이물 선별 관리인원을 배치하여 이물혼입여부를 확인한다.)
- 해당공정 : 금속검출, 외포장, 보관 및 출하

○ 금속검출

포장된 제품을 컨베이어벨트에 올려놓고 금속검출기를 통과시킨다. 검출 신호 발생 시 금속이물이 혼입된 제품을 제거하고 기록 관리한다. 세부적인 내용은 중요관리점(금속검출공정) 내용과 같다.

○ 외포장

내포장된 제품은 종이박스에 외포장 한다.

[별첨1] 제조공정 위생관리

☞ 외포장 공정은 분진이 발생될 수 있으므로 외포장 작업은 환기시설이 설치된 곳에서 작업하여야 한다.

부득이 내포장 작업과 외포장 작업이 같은 작업장에서 이루어진다면 두 작업이 동시에 일어나지 않도록 시간 차이를 두어 작업계획을 수립해야 하며, 가급적 내포장 작업 (청결작업)을 먼저 실시하고 작업 후에는 반드시 작업장에 대한 청소, 소독을 실시한다.

○ 보관

외포장된 완제품은 냉장창고에 보관 적재한다.

☞ 완제품 보관 공정에서 가장 중요한 것은 적정온도(10℃이하)에서 보관하고 벽(20cm), 바닥면(15cm)에 이격 관리해야 한다는 점이다. 바닥, 벽면의 이격관리를 하지 못할 경우 설치류에 의한 제품 훼손, 창고 청소, 소독관리의 어려움, 벽면으로부터의 제품오염 등이 발생될 수 있다.

○ 출하

완제품을 운송차량에 적재한다.

☞ First In, First Out(선입선출)방식에 의해 가장 먼저 제조된 즉 유통기간이 짧은 제품부터 먼저 출하시킨다.

[별첨2] 일반위생관리

1) 작업장/부대시설관리

- 제조과정상 발생할 수 있는 오염을 최소화하기 위해 청결구역을 분리한다. 청결구역은 전처리 이후 공정부터 내포장 공정까지가 해당된다. 분리가 어려울 경우 청결구역의 위치를 정하여 바닥 등에 선을 이용하여 구분한다. 이 경우에는 청결구역작업과 다른 작업이 동시에 이루어지지 않도록 시간차를 두어 교차오염이 발생하지 않도록 관리한다.
- 작업장내에서 옷을 갈아입게 되면 제품에 이물이 혼입되거나, 미생물이 교차 오염될 수 있기 때문에, 작업장 외부에 옷을 갈아입을 수 있는 공간을 정한다. 또한 일반 외출복장과 깨끗한 위생복장을 같은 공간에 보관할 경우 교차오염이 발생할 수 있기 때문에 구분하여 보관한다.

2) 개인위생관리

- 종업원은 작업장 출입 전에 위생복장 [(위생복, 위생모자, 위생화, 마스크(필요시))] 을 착용한다. 작업장 입실 시에는 이물제거장치(끈끈이롤러, 진공흡입기 등)를 이용하여 위생복장에 묻어 있는 이물(머리카락, 실 등)을 제거하고, 손으로부터의 교차오염을 방지하기 위해 손세척, 건조, 손소독을 실시한다. 위생복장을 착용한 상태에서 제조 외의 다른 활동(출퇴근, 외출, 운동 등)은 위생복장을 오염시킬 수 있기 때문에 관리를 철저히 한다.
- 제품에 이물로 혼입될 수 있는 개인장신구(반지, 귀걸이 등), 개인소지품(담배, 필기구 등) 및 사무용품(클립, 스테플러, 커터칼 등)은 작업장 입실 시 소지하지 않는다.
- 원료나 제품을 직접 접촉하는 종업원은 정기적인 건강검진을 받아야 하고, 설사, 복통, 외상, 염증이 있을 경우 작업에 투입시키지 않는다.

[별첨2] 일반위생관리

- 손과 손톱에는 많은 병원성 미생물이 존재할 수 있기 때문에 교차오염 방지를 위해 항상 청결히 관리한다. 특히 청결구역 종업원은 작업 중 수시로 손을 소독액으로 소독한다.
- 제품에 교차오염이 발생하는 것을 방지하기 위해 종업원은 귀·입·코·머리와 같은 신체부위를 만지거나 긁은 경우, 깨끗하지 않은 기구와 불결한 옷이나 행주 걸레 등을 만졌을 경우, 작업하는 품목이 변경되었을 경우 등과 같은 행동한 후에는 다음과 같은 요령에 따라 손세척 및 소독을 실시하여야 한다.

대상	부위	세척 또는 소독방법	주기
종업원	손	<ul style="list-style-type: none"> ☞ 물을 사용하여 비누거품을 내어 30초 동안 팔과 손, 손가락 사이를 문질러 닦는다. ☞ 손톱 브러쉬로 손톱 사이를 문지른다. ☞ 흐르는 물에 충분히 세척한다. ☞ 건조한다. ☞ 소독제를 분무한다. 	수시

- 화장실은 대장균 등 많은 미생물이 존재할 수 있는 곳으로 작업장에 오염을 주지 않도록 관리하고, 이용 후 손에 묻어 있는 미생물 제거를 위해 반드시 손세척·소독을 실시해야 한다.

3) 방충·방서관리

- 해충의 서식 방지를 위해 작업장 주변에 음식물폐기물(음식물이 묻어 있는 폐포장재 포함)이 방치되지 않도록 관리하고, 작업종료 후에 폐기물처리업체를 통해 폐기물을 처리한다. 주기적으로 폐기물 제거가 어려운 경우에는 폐기물을 밀폐하여 보관하고, 방역작업을 실시하여 해충이 번식되지 않도록 한다.

[별첨2] 일반위생관리

- 해충이 제품에 혼입되는 것을 방지하기 위해 작업장(출입문, 창문, 벽, 천장 등)은 해충이나 설치류가 침입하지 못하도록 관리하고, 환기시설이 가동 되지 않을 때 해충이나 설치류가 유입되지 않도록 방충망 등을 이용하여 관리한다.
- 작업장에는 포충등(작업장 내부), 바퀴트랩(작업장 내부), 쥐덫(작업장 외부) 등을 설치하여 유입된 해충이나 설치류의 개체수를 확인·점검한다. 개체수가 평소보다 많이 발생한 경우 작업장의 전체적인 밀폐여부확인, 작업장 배수로 청소 등을 실시하거나, 작업장 및 작업장 주변에 대한 방역을 실시한다.

4) 이물관리

- 이물이 발생할 수 있는 원부재료는 입고 시 또는 제조공정 중에 이물 혼입 여부를 반드시 육안으로 선별하여 완제품에 이물이 남지 않도록 관리한다.
- 작업 중 이물의 혼입여부 및 공정품의 정상유무를 확인하기 위해 육안선별 공정의 조도는 540Lux 이상으로 유지하고, 조명장치의 파손에 의해 식품이 오염되지 않도록 보호장치(보호커버 등)를 설치한다.
- 작업도구 및 제조설비에 대해 파손여부를 매일 작업전에 점검하여 관리하고, 파손되었을 경우 제품에 이물이 혼입되지 않도록 즉시 보수하거나 교체한다. 또한 작업 후에 매일 설비에 붙어 있는 볼트, 너트 등의 개수를 확인하여 제품에 혼입 여부를 확인한다.
- 구동부위(베어링)에 사용하는 윤활유 등은 제품에 혼입되어 위해를 가할 수 있어 노출되지 않도록 보호 커버 등을 설치하고, 제조설비의 관리 미비 시 발생하는 탄화물, 기름때, 녹 등이 제품에 혼입될 수 있으므로, 혼입 방지를 위해 매일 청소를 실시한다.

[별첨2] 일반위생관리

5) 청소·소독관리

- 작업장, 제조설비 및 제조도구 등에 존재하는 미생물은 다시 제품에 교차오염이 될 수 있기 때문에, 대상별로 주기적으로 청소·소독이 필요하다. 종업원은 아래의 방법에 따라 청소·소독을 실시한다.

대상	부위	청소 또는 소독방법	주기
작업장	바닥,벽, 천장, 환기시설, 조명시설	<ul style="list-style-type: none"> ☞ 빗자루나 진공청소기로 찌꺼기, 이물 등을 제거한다. ☞ 세제를 사용하여 청소 후 물로 씻는다.(조명시설 제외) ☞ 건조한다. (조명시설 제외) ☞ 소독제를 사용하여 분무, 소독한다. (조명시설 제외) 	바닥 : 1회/일 벽 : 1회/주 이외 : 1회/월
위생복	전체	<ul style="list-style-type: none"> ☞ 세제를 사용하여 세탁한다. ☞ 건조한다. 	1회/주
제조설비 및 도구	제품접촉면 내부 외부	<ul style="list-style-type: none"> ☞ 면포로 찌꺼기, 이물 등을 제거한다. ☞ 세제를 이용해 세척한다. ☞ 건조한다. ☞ 식품이 접촉하는 부분은 소독제를 사용하여 분무, 소독한다. 	제품접촉면 1회/일 내부,외부 1회/주
냉장냉동창고	내부 냉각기	<ul style="list-style-type: none"> ☞ 빗자루로 성애, 이물 등을 제거한다. ☞ 냉각기 팬을 세제로 세척한다. ☞ 건조한다. ☞ 소독제를 사용하여 분무, 소독한다. 	내부 1회/주 냉각기 1회/년
모니터링장비 (온도계 등)		<ul style="list-style-type: none"> ☞ 물에 씻은 행주로 깨끗이 닦아낸다. ☞ 건조한다. ☞ 소독제를 사용하여 분무, 소독한다. 	사용전후

[별첨2] 일반위생관리

6) 입고·보관관리

- 냉장·냉동 원부재료는 도착 즉시 검수를 실시하여 상온에 장시간 방치되지 않도록 하고, 검수가 종료되면 품목별 저장조건에 따라 신속히 냉장·냉동창고 등으로 운반·보관한다.
- 원부재료 입고 시 자가품질검사서 등 시험성적서 수령이 가능한 품목은 시험성적서를 통해 입고검사를 실시하고, 농산물 등 시험성적서 수령이 불가능하거나 육안으로 제품 상태 확인이 가능한 품목의 경우 육안검사를 실시한다.
- 유통기한이 경과하였거나 시험성적서 부적합 제품, 육안검사 결과 상태가 부적합한 원·부재료는 즉시 반품 등의 조치를 취하고, 동일한 사항이 계속 발생시 구입처를 변경한다.
- 종업원은 냉장·냉동창고의 온도를 관리계획에 따라 주기적으로 확인하며, 온도가 한계기준에 이탈했을 경우는 원인을 찾아 개선한다.
- 원부재료의 교차오염을 방지하기 위해 품목별(농산물, 가공품 등)로 가능한 한 각각 분리·보관한다. 분리보관이 어려울 경우 서로 교차오염이 되지 않도록 이격시켜서 구분·보관한다.
- 개봉한 원부재료가 개봉하지 않은 원부재료 및 주변 환경으로부터의 교차오염을 방지하기 위해 밀봉하여 보관한다.
- 원·부재료 및 완제품은 제품별 보관기준에 따라 구분 보관하여 선입선출하고, 회수상황이 발생할 경우를 대비하여 판매처, 연락처 등을 정확히 파악하고 있어야 한다.

[별첨2] 일반위생관리

7) 용수관리

- 제조과정에서 사용되는 용수의 안전성 확인을 위해 연 1회 먹는물관리법 항목에 대한 용수검사를 실시하여야 한다(지하수를 사용하는 경우에만 한함)
- 별도의 용수저장탱크가 있는 경우 저장탱크로 부터의 교차오염을 방지하기 위해 인체에 유해하지 않은 재질을 사용하며 누수 및 오염여부를 확인하고 반기 1회 이상 주기적으로 청소, 소독을 실시하여야 한다.

8) 제조시설관리

- 식품취급시설설비로 인한 교차오염을 방지하기 위해 식품과 접촉하는 취급시설·설비는 인체에 무해한 내수성·내부식성 재질로 열탕·증기·살균제 등으로 소독·살균이 가능하여야 하며, 기구 및 용기류는 용도별로 구분하여 사용·보관하여야 한다.
- 식품취급시설 설비의 파손 및 노후로 인한 교차오염을 방지하기 위해 주기적으로 파손 유무를 확인하여야 한다.

9) 회수 관리

- 제품을 로트별로 관리하여 식품위생상의 위해가 발생하였거나 발생할 우려가 있다고 인정되는 식품 등이 행정처분 기준에서 당해 제품 폐기에 해당되는 제품은 해당되는 로트제품을 회수하여야 한다
- 기준·규격에 부적합한 제품은 회수여부를 검토하고, 회수대상으로 결정된 경우 신속하게 회수하여야 한다.

[별첨3] 위해요소 및 예방·제거방법

구분	제품에 해를 줄 수 있는 요인	예방·제거 방법
원·부재료	○ 기준·규격에 적합하지 아니한 원·부재료 사용으로 식중독균, 중금속 등에 오염이 가능하다	☞ 원료 생산업체가 시험성적서를 발급하는 규모의 업체의 경우 구매시 시험성적서를 수령한다. ☞ 농산물 등 시험성적서 수령이 불가능한 경우 검수자가 제품관능(외관, 선도, 표시사항 부착여부 등)을 확인한다.
	○ 부적절한 포장재 사용으로 인하여 화학물질이 제품에 오염될 수 있다.	☞ 포장재에 대한 재질 확인 및 시험성적서 등을 입수하여 관리한다.
	○ 농산물(불충분한 세척 후 이용시 토양 유래 병원성미생물 잔존가능) 등 원부재료 자체에 병원성미생물 오염이 가능하다.	☞ 병원성미생물은 증자(멸균)공정으로 제어할 수 있다.
공정 및 종업원	○ 원부재료의 포장재 개봉시 비닐, 플라스틱, 금속캔 조각 등이 함유될 수 있다.	☞ 비닐, 플라스틱의 경우 개봉과정에서 제품에 혼입되지 않도록 주의하면 관리할 수 있다. ☞ 금속이물의 경우 금속검출공정을 통해 관리할 수 있다
	○ 종업원이 손세척·소독을 제대로 하지 않거나, 기구·설비 등의 세척·소독이 불충분할 경우 황색포도상구균 등의 병원성 미생물이 제품에 교차 오염될 수 있다.	☞ 개인위생관리, 세척소독관리를 통해 교차오염을 방지할 수 있다. ☞ 공정 중 교차오염된 병원성미생물은 증자(멸균)공정으로 제어할 수 있다.
	○ 종업원의 위생복 착용 불량 등으로 인해 머리카락, 실 등의 이물이 제품에 혼입될 수 있다.	☞ 연질이물의 경우 위생관리점검, 종업원 위생교육을 통하여 관리할 수 있다. ☞ 작업장 입실 전 복장착용상태 확인 및 이물제거를 철저히 실시한다.
	○ 제조공정에서는 일반적으로 스테인레스나 철 재질의 제조설비·도구를 사용하므로, 마찰에 의해 발생하는 금속조각의 나사, 너트 등이 제품에 혼입될 수 있다.	☞ 매일 작업 전 제조설비 및 도구의 파손상태를 확인한다. ☞ 금속이물의 경우 금속검출공정을 통해 관리할 수 있다.

[별첨4] 청소관리매뉴얼 예시

청소관리매뉴얼			작성일	2011. . .
			관리번호	설-29
작업실명	내포장실	설비명	실링기	
외 관			작업조건	
(기기 사진)			담당자	별도표기
			세척주기	작업종료후
			살균소독제	발효주정
			점검주기	-
			*작업도구 브러쉬/헤라 행주 진공청소기	
구분	작업방법		비고	
전체	1. 깨끗한 행주로 설비면의 먼지를 닦는다.			
	※ 포장지가 들어가 포장하는 부위가 가장중요함(빨간색 선)			
	※ 벨트를 회전을 시키면서 작업을 실시한다.			
	2. 발효주정을 분사하여 소독 후 깨끗이 닦는다.			
	※ 발효주정분무시에 실링기 온도가 떨어졌을때 분사하여야 한다.		화재주의	
	3. 발효주정이 남아있지 않도록 깨끗한 행주로 닦는다.			

- 일반적 제조매뉴얼 관련 구역구분 및 위생시설, 이동선 -

1. 구역구분

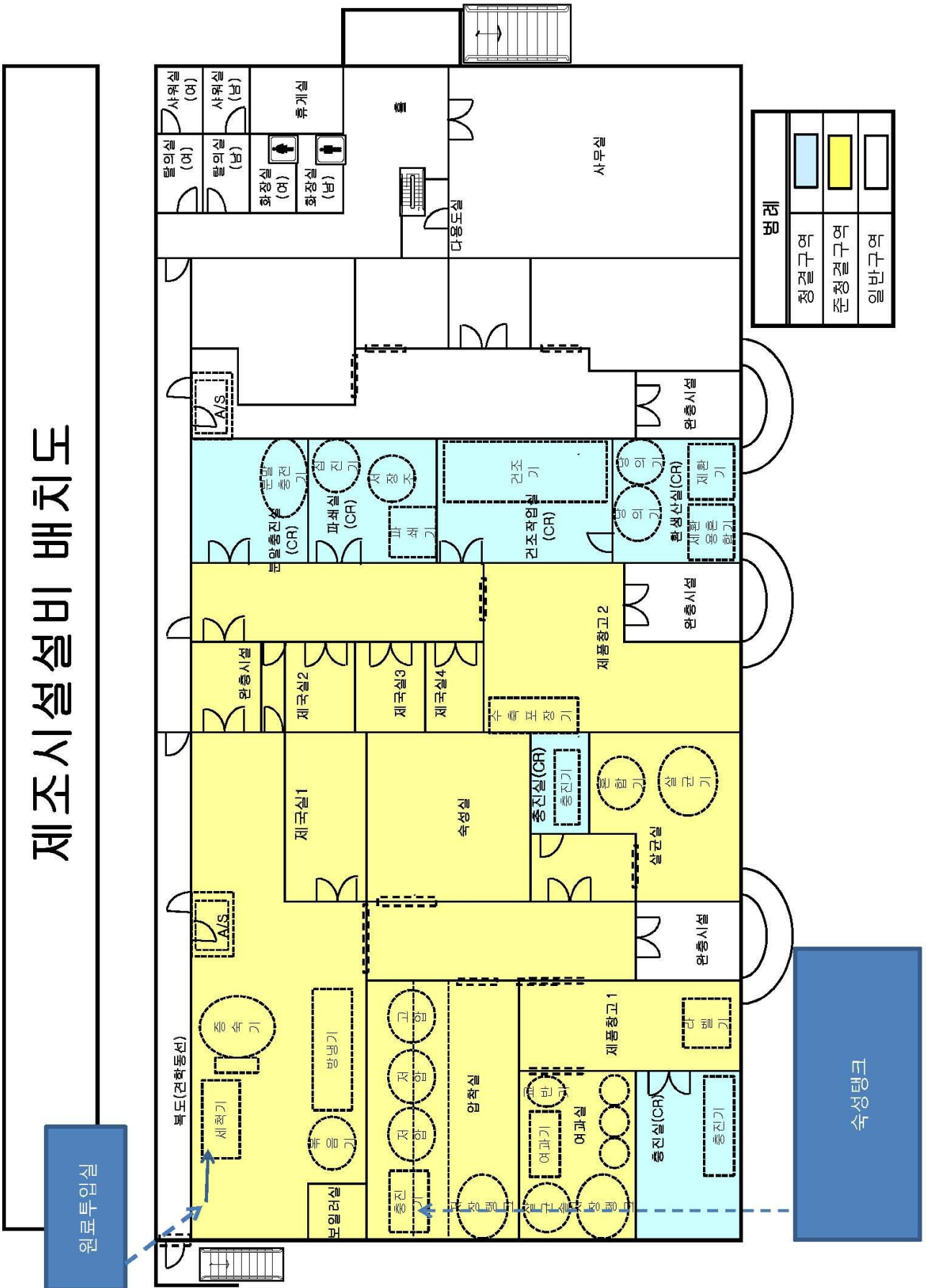
- 청결지역 : 분쇄실, 충전실, 제환실, 건조실, 내포장실 등
- 준청결지역 : 세척실, 증자실, 발효, 숙성실, 배합실, 외포장실 등
- 일반지역 : 사무실, 화장실, 휴게실, 탈의실, 창고, 일반통로 등

2. 작업자 이동선 : 동일구역 작업자는 동일구역에서 작업이 기본

작업자가 일반지역, 준 청결지역에서 청결지역으로 이동시 몸 소독 후 진입(에어 샤워기 통과), 청결지역에서 준청결지역 또는 일반지역으로 이동시 바로이동 가능.

3. 일반 위생시설 : 위생모, 위생복, 위생화 보관소, 손세척대, 손소독기, 손건조기, 에어커튼, 발소독기, 비닐커튼, 접착롤러 등

제조시설설비 배치도

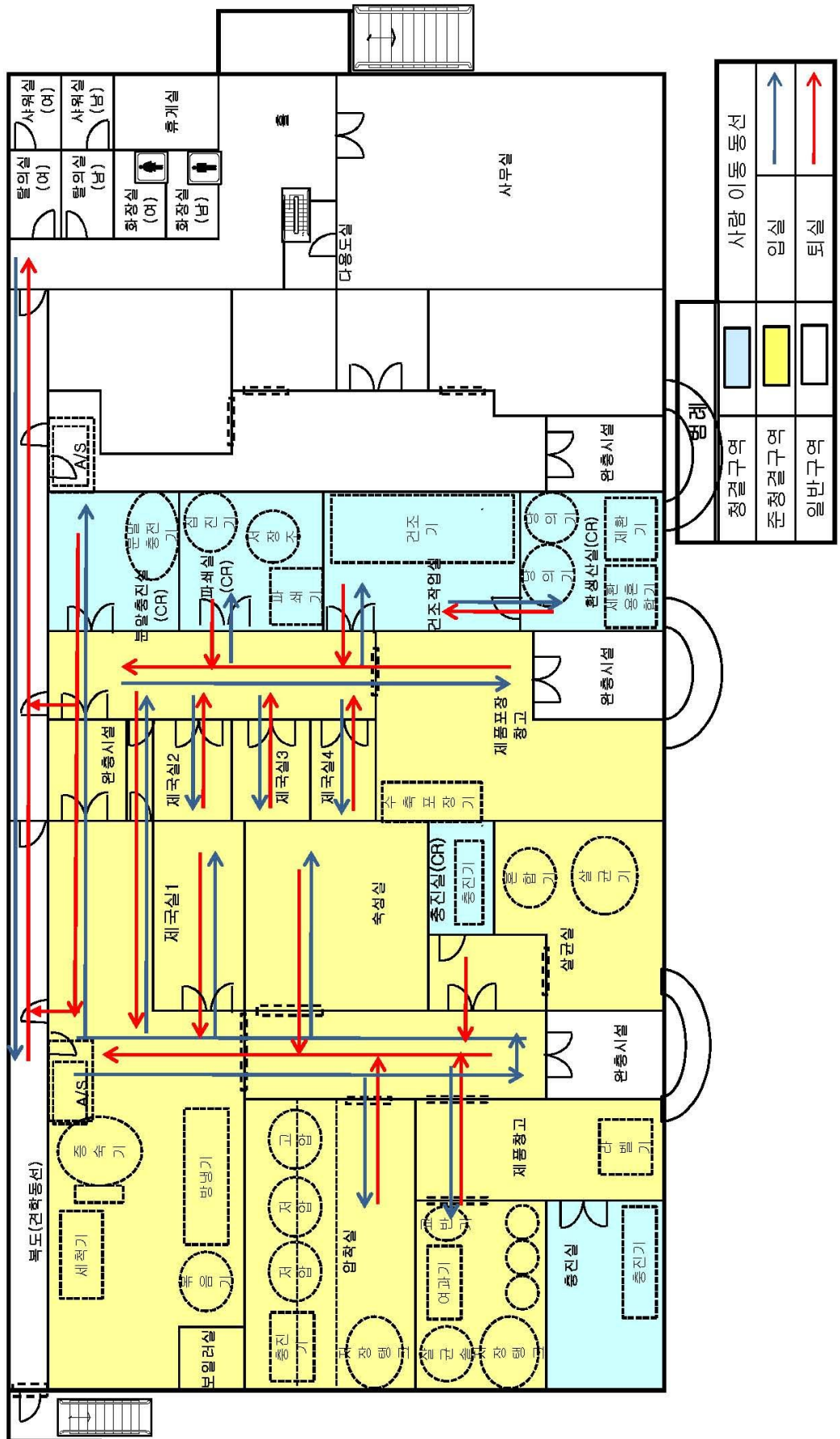


원료투입실

수성탱크

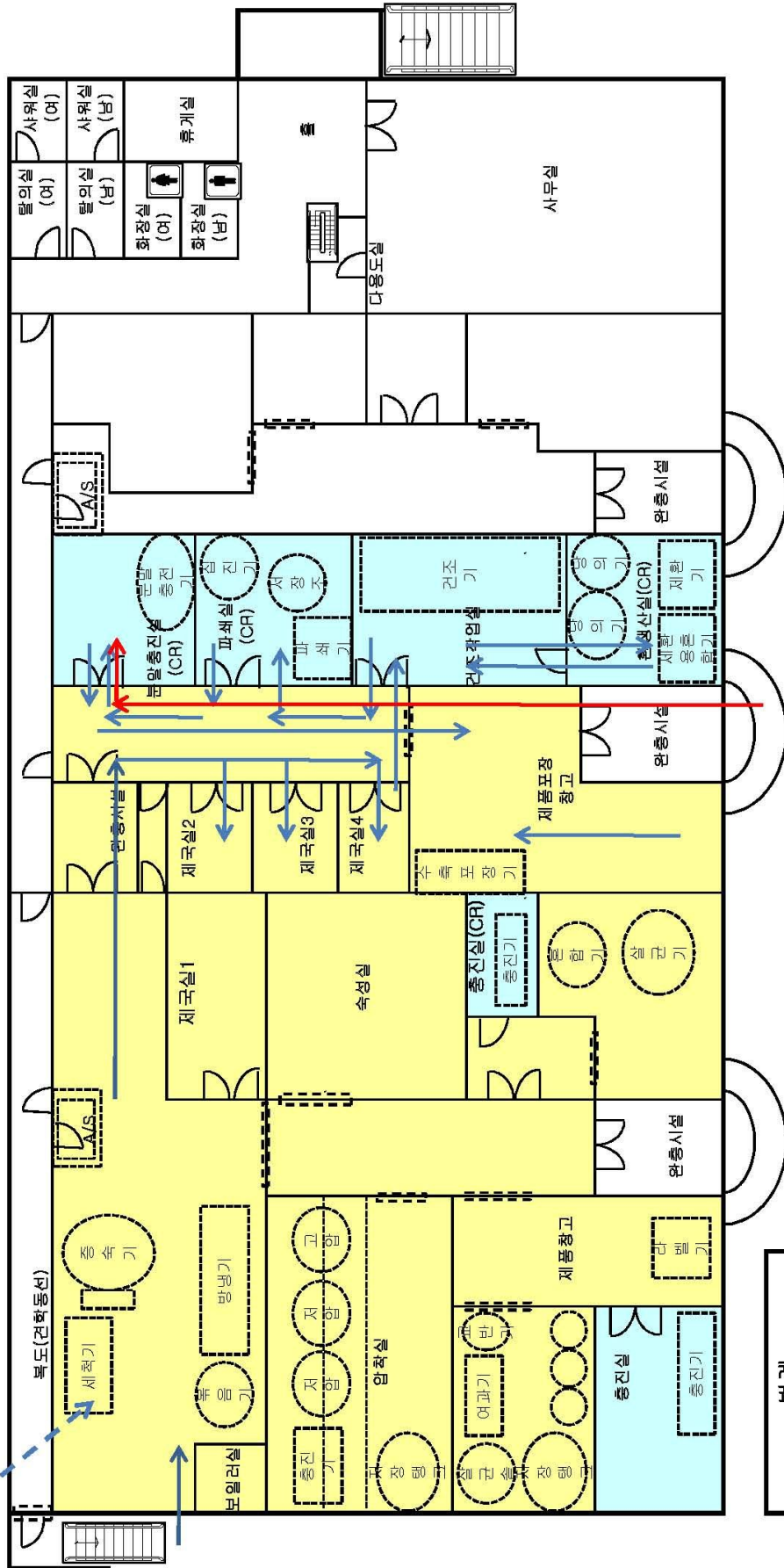
범례	
	정정구영
	준정정구영
	일반구영

작업자 이동동선



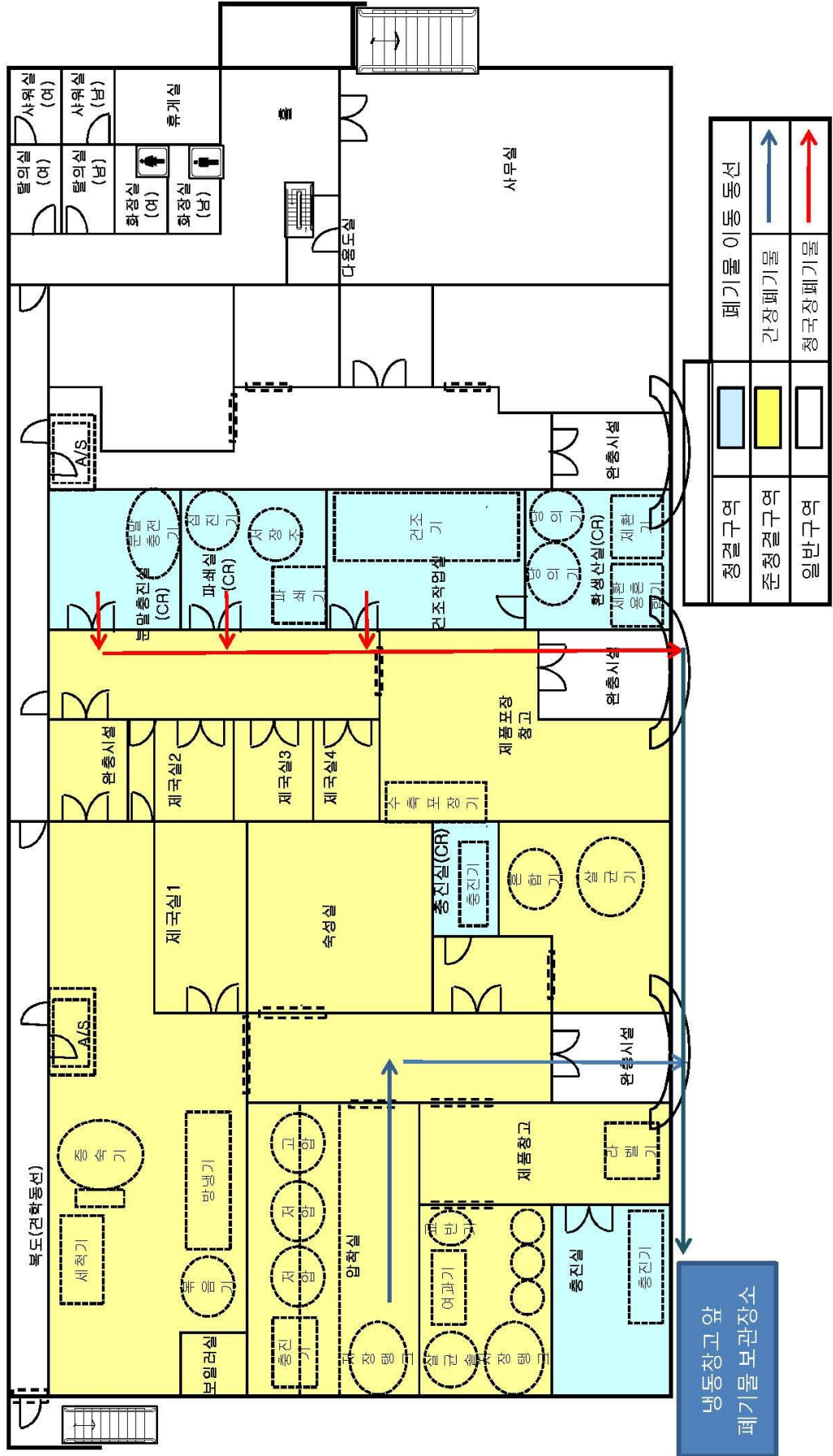
원부자재이동동선(청국장)

원료부인입선

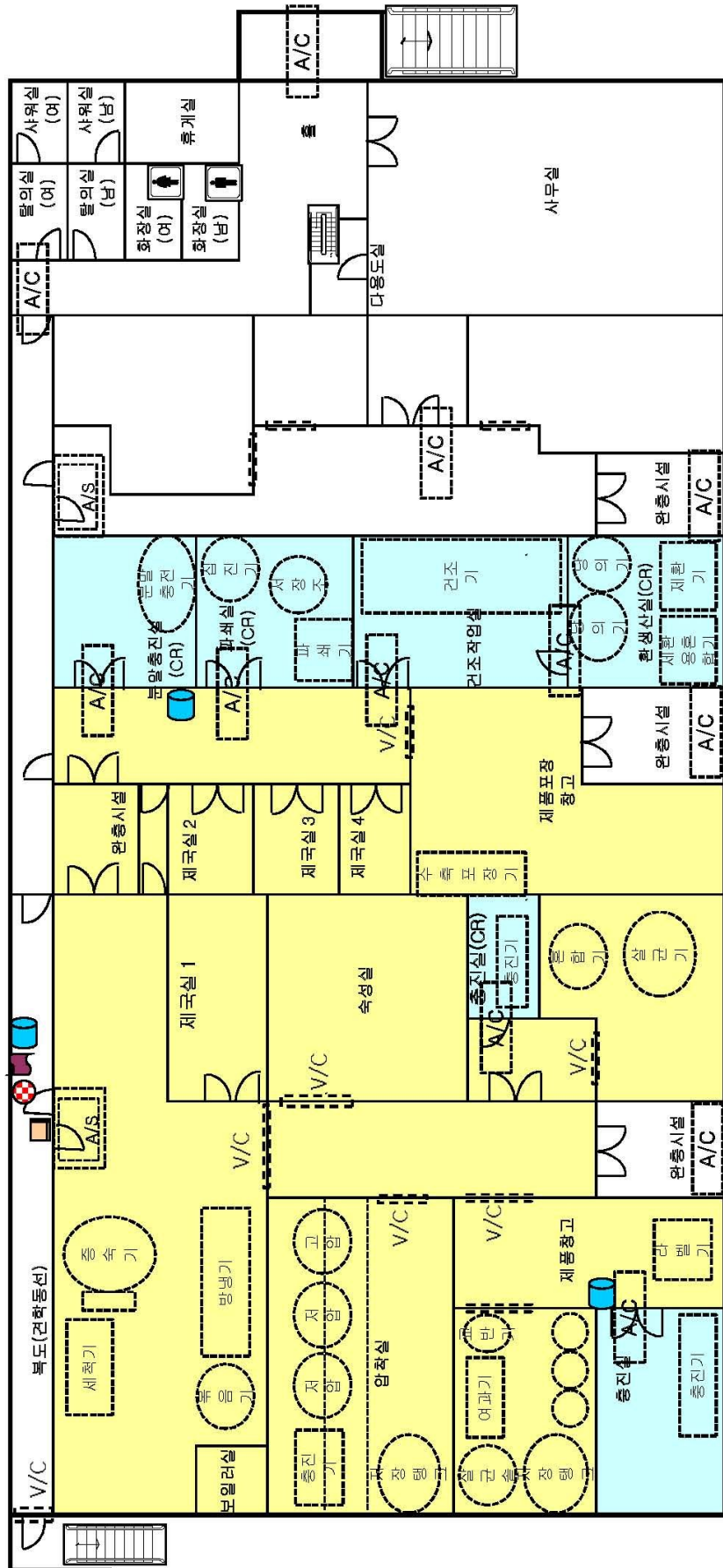


범례	
	원료이동동선
	원료
	포장재

폐기물 이동동선

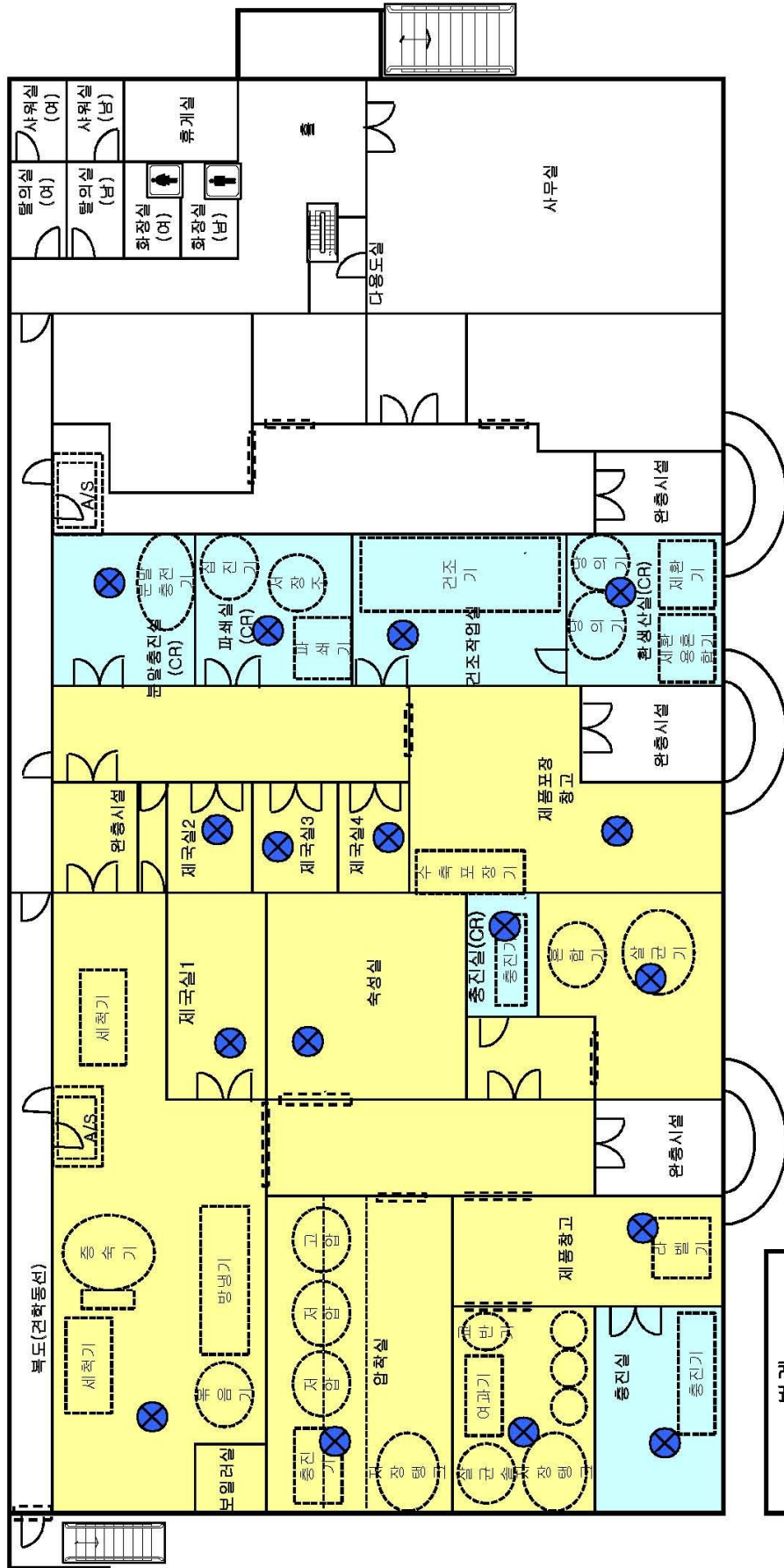


위생설비 배치도



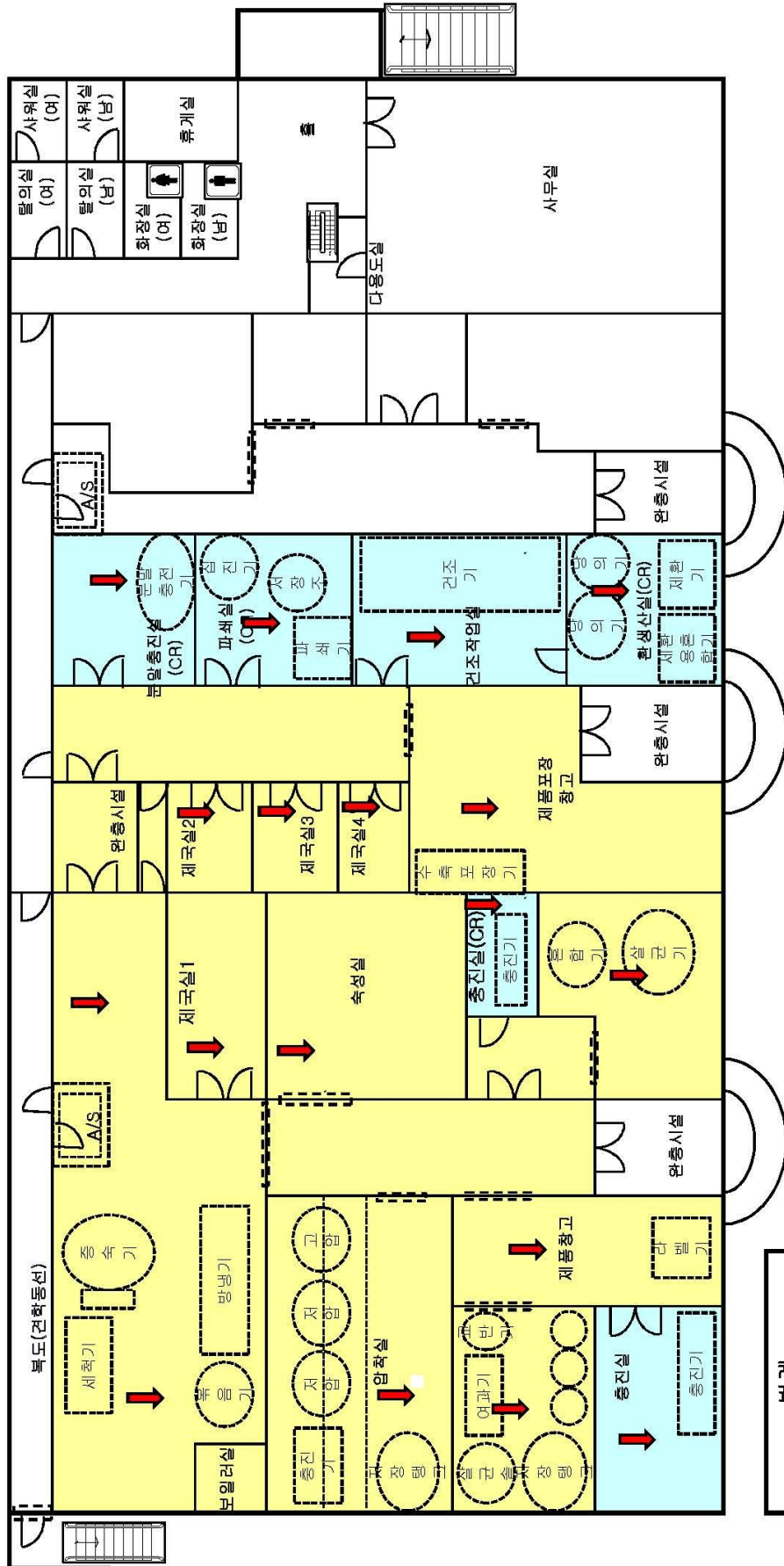
범례		위생설비배치도	손소독기	에어커튼	A/C
청결구역			손소독기		A/C
진정구역			발판소독기		V/C
일반구역			점착롤러		




조도측정 위치도



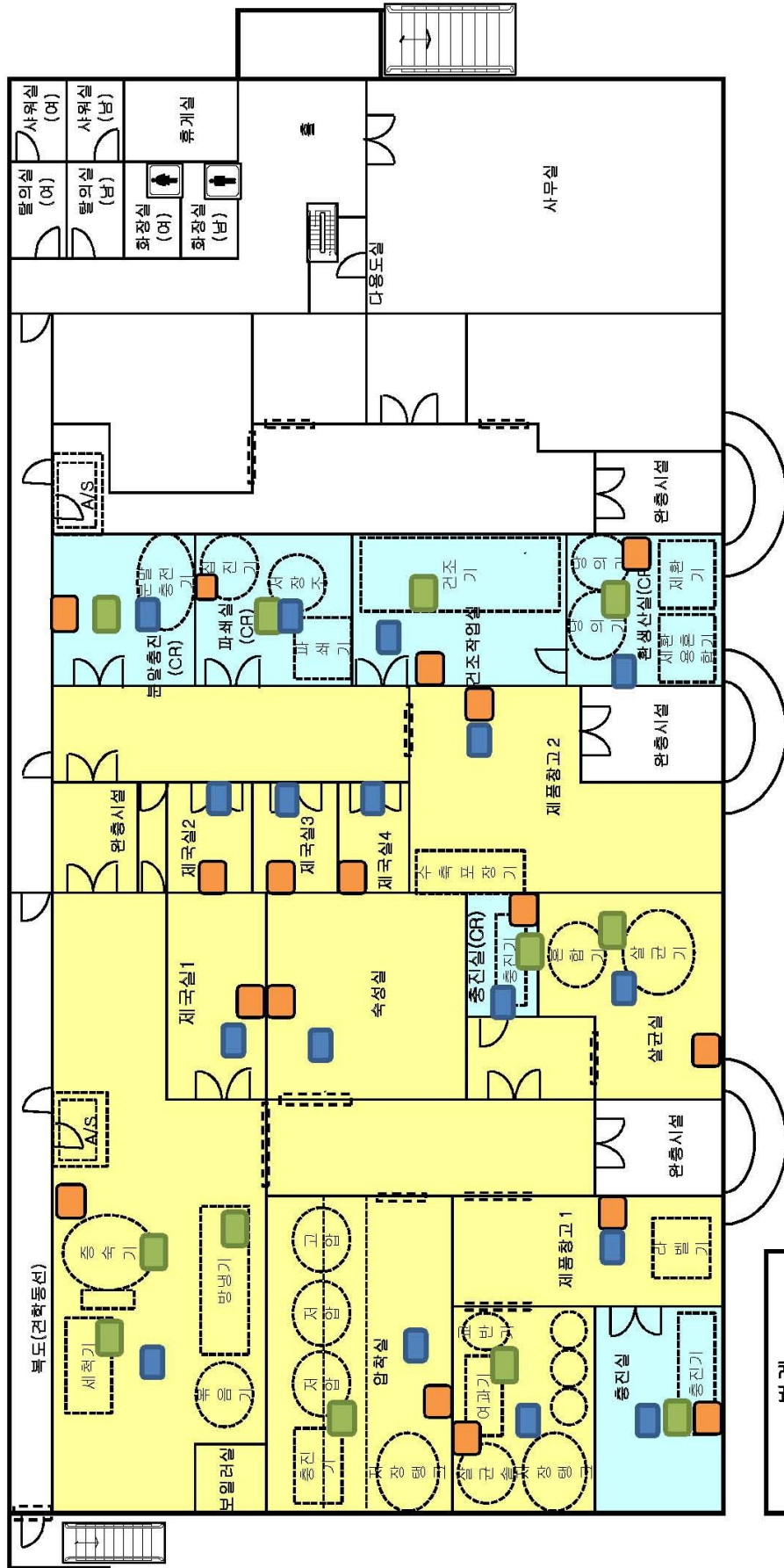
범례	
청결구역	조도측정위치도
진정구역	측정위치
일반구역	

낙하관 측정위치도



범례	
	낙하관 측정위치도
	측정위치
	연구구역

표면균 측정위치도



범례			
정밀구역		표면균 측정위치도	
중진구역		부면	설비
일반구역		바닥	

5. 청국장 제품의 체계적인 관능평가 방법 확립

본 연구는 우수한 청국장 발효용 종균을 선발하여 우수 균주를 종균 제품으로 개발하여 종균을 보급함에 있어 유통을 위한 보급시스템을 구축하여 개발된 종균에 의한 청국장의 제품화로 청국장 품질의 혁신을 이루고자 하며 아울러 종균 사용법 및 생산관리 등 제조 매뉴얼도 개발하고자 하였다. 따라서 간편한 형태의 청국장 종균 저장·유통 방법으로 연중 균일한 제품의 생산과 소비자 맞춤형 청국장 제조를 통해 청국장 시장의 활성화 및 수출을 기대할 수 있다.

청국장 제품 및 종균의 세계화를 위해서 서구인들에게 거부감을 일으킬 수 있는 불쾌취를 최소화하면서 기능성이 뛰어난 제품을 생산하여 청국장 시장이 구축될 수 있는 지역에서 식품박람회 등을 통하여 제품의 우수성을 홍보하고 시식회 등을 시행함으로써 소비자들에게 제품을 알려야 한다. 따라서 우리 청국장 제품의 우수성과 기능성을 먼저 홍보하고 시장이 구축되면 다양하게 개발된 종균을 바탕으로 기존 시장이 형성된 낫토 시장과 차별화하여 다양한 맛과 향, 기능성을 가미한 소비자의 기호에 맞는 다양한 제품개발로 시장 규모를 확대할 수 있을 것이다.

이를 위해 청국장 제품의 우수성을 입증할 수 있는 과학적인 데이터의 제공이 물론 중요하지만, 청국장 제품의 특성상 무엇보다도 모든 연령층의 소비자 뿐만 아니라 서구인에게도 적용하여 제품의 향미와 맛을 정확히 표현할 수 있는 과학화된 관능평가 방법이 절실히 요구된다. 따라서 본 연구에서는 청국장 제품의 관능적 특성을 과학적으로 제시할 수 있는 관능평가와 앙케이트의 조사방법 및 판정기준을 체계화하여 제시하고자 한다.

(1) 관능평가와 양케이트 조사

(가) 관능평가 방법

- ① 패널 선정시험 등은 필요에 따라 실시(선정시험, 패널 수는 3,4) 를 참고 바람)
- ② 대조구는 시판 닛토를 사용(Table 3).
- ③ 제품의 판정기준을 확인 한다(Table 4).
- ④ 냉장고에 보관 중인 닛토를 꺼내 실온, 1시간 방치 후 시료로 사용한다.
- ⑤ 폴리에틸렌필름을 뜯는다.
- ⑥ 폴리스티렌페이퍼(PSP)용기 바깥에서 손으로 잡고 누르며 비벼서 PSP용기와 닛토가 떨어지기 쉽게 한다
- ⑦ 균의 피복, 용균상태, 깨짐, 색, 향, 냄새 등의 외관과 표면과 밑면(용기를 뒤집어 뚜껑에 닛토를 뺀 상태)을 검사한다.
- ⑧ 실(진)형성능은 닛토를 나무젓가락으로 20회 돌려서 섞은 후 젓가락으로 닛토 (40~50 g 포장일 경우) 1/2~1/3을 잡고 40 cm 정도 들어 올려 관찰한다.
- ⑨ 시료가 2개 이상일 때는 같은 사람이 실시할 것.
- ⑩ 콩의 경도, 맛, 종합평가, 기호를 검사한다.
- ⑪ 다량의 시료를 연속 검사할 경우 10~20배 희석한 진간장으로 입안을 헹구며 실시함
- ⑫ 비고란에는 평가한 이유와 신경 쓰인 즉 특이 사항을 기록한다.
- ⑬ data 해석은 “3”의 통계처리법을 참조바람

* 관능평가지 작성할 때 왼쪽은 Table 4, 오른쪽은 Table 3을 붙여 A3 용지에 인쇄해서 배포하는 것이 좋다.

* ⑧ 실형성능 검사 시 돌려 젓는 정도는 사람에 따라 다르므로 실생성 정도에 차이가 날 수 있으므로 동일한 사람이 실시하는 것이 좋다. 이 때 젓는 횟수는 20~50회 중에서 일정한 횟수를 정해서 돌리고 용기를 바꾸어 실시할 때도 똑같은 용기를 사용해야 한다.

(2) 청국장 제품의 품질 판정 기준

(가) 균의 피복

(좋다) 고르게 일정한 두께로 덮혀 있고 석(소)두나 불규칙적 피복이 없는 것

(나쁘다) 덮힌 상태가 일정하지 않고 석두가 산재. 아주 얇게 덮힌 상태

(주의 사항) 좋다 나쁘다 대신 피복상태가 두껍다-얇다, 보기 좋다-보기 나쁘다도 가능함

(나) 용균상태

(좋다) 콩을 덮고 있는 균이 용균되지 않음

(나쁘다) 균이 녹아 찢득찢득하게 되어 있음

(다) 비정상적 콩(깨지고 뭉개지고 껍질 벗겨짐)

(좋다) 깨지고, 뭉개지고, 껍질 벗겨진 것이 적거나 거의 없음

(나쁘다) 깨지고 뭉개지고 껍질 벗겨진 것이 많음

(라) 콩의 색깔

(좋다) 갈색~연갈색을 띄고 색상이 맑고 선명함

(나쁘다) 진한 갈색~kara(から; 곡), 검은 색을 띤 것

(마) 향 (일본 이토히키 낫토와 유사한 향)

(좋다) 감미롭고 좋은 향, 암모니아·눌은·신 냄새, 이취를 기준으로 판단 시 적절한 향

(나쁘다) 감미롭고 좋은 향, 암모니아·눌은·신 냄새, 이취를 기준으로 판단 시 부적절한 향

(바) 냄새(일본 이토히키 낫토와 유사한 향)

(좋다) 일본 이토히키 낫토 같은(고유의) 향이 남

(나쁘다) 일본 이토히키 낫토 같지 않은 향이 안 남. 이취 등으로 판단 시 부적절한 냄새

(사) 실형성

(좋다) 섞어 돌릴 때 점성이 강하고 실형성이 좋은 것

(나쁘다) 점성이 적고 실형성이 약함

(주의 사항) 실이 깨끗하다-지저분하다, 덩어리가 많다-적다, 실이 강하다-약하다

(아) 경도

(좋다) 연하고 부드러운 촉감(씹힘성, hazawari)이 있음

(나쁘다) 딱딱하고 촉감이 나쁨

(자) 맛

(좋다) 아미노산 등의 지미, 고미, 감미, 이미 등으로 판단 시 적당한 맛을 가짐

(나쁘다) 아미노산 등의 지미, 고미, 감미, 이미 등으로 판단 시 부적당한 맛을 가짐

(주의 사항) 좋다-나쁘다 대신 맛있다-맛없다

(차) 종합평가

전체적으로 생각해서 평가한다. 이물, 티로신 결정 등이 보이지 않으면 비고란에 기재

(카) 기호도

자신의 기호에 맞는지를 생각해서 평가한다.

평가 점수 구분

점수	7	6	5	4	3	2	1
평가	아주 좋다	좋다	약간 좋다	보통	약간 나쁘다	나쁘다	아주 나쁘다

(3) 청국장 품평회 평가 포인트

1. 외관 : 콩 표면에 균의 증식

상태, 콩의 색상, 깨진 정도, 부스러기의 다소, 점질성

2. 향 : 암모니아취, 탄(눌은)냄새, 산취, 그 외 이취의 유무, 청국장 고유 향의 유무

3. 조직감(맛을 포함) ; 콩의 경도, 껍질(갈라츠키) 유무, 지·고·감·이미의 유무

(4) 청국장 품질평가 항목

Table 5. *Bacillus subtilis*로 제조된 청국장 제품의 관능평가 항목

Appearance	외관
Lysis of bacilli	(고초균의) 용균
Color of soybean	콩의 색상
Crack of soybean	콩 크랙 정도
Stickiness	점성(점질물=진형성)
Smell	향
Different odor from natto	이취
Toughness	경도
Umami	맛난맛
Taste of soybean	콩맛
Bitter taste	쓴맛
Total evaluation	종합평가
Fancy	기호도

1. 균 피복 정도 2. 용균 상태 3. 콩의 상태(으깨짐) 4. 콩의 색상 5. 향 6. 냄새 7. 진(실)형성 8. 경도 9. 맛 10. 종합평가 11. 기호

Table 3 청국장 관능 평가표

실시 일: 년 월 일

성명:

시료:

성별: 남 여

나이: 세

평가항목	평 가							비 고
	1	2	3	4	5	6	7	
1. 균의 피복	나쁘다 () 좋다							
2. 용균 상태	많다 () 적다							
3. 콩의 으깨짐	많다 () 적다							
4. 콩 의 색상	나쁘다 () 좋다							
5. 향	나쁘다 () 좋다							
6. 냄새	나쁘다 () 좋다							
7. 실(진)형성능	약하다 () 세다							
8. 경도	강하다 () 연하다							
9. 맛	나쁘다 () 좋다							
10. 종합평가	나쁘다 () 좋다							
11. 기호도	나쁘다 () 좋다							

점수	평가
7	아주 좋다
6	좋다
5	약간 좋다
4	보통
3	약간 나쁘다
2	나쁘다
1	아주 나쁘다

Table 4 청국장 관능 평가표 (Old, 198?년)

실시 일: 년 월 일 성명:

시 료: 성별: 남 여 나이: 세

평가 항목	평가	비고										
1. 균의 피복정도	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">나쁘다</td> <td style="text-align: center;">약간 나쁘다</td> <td style="text-align: center;">보통</td> <td style="text-align: center;">약간 좋다</td> <td style="text-align: center;">좋다</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </table>	나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다	1	2	3	4	5	
나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다								
1	2	3	4	5								
2. 용균상태	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">나쁘다</td> <td style="text-align: center;">약간 나쁘다</td> <td style="text-align: center;">보통</td> <td style="text-align: center;">약간 좋다</td> <td style="text-align: center;">좋다</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </table>	나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다	1	2	3	4	5	
나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다								
1	2	3	4	5								
3. 콩의 상태	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">나쁘다</td> <td style="text-align: center;">약간 나쁘다</td> <td style="text-align: center;">보통</td> <td style="text-align: center;">약간 좋다</td> <td style="text-align: center;">좋다</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </table>	나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다	1	2	3	4	5	
나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다								
1	2	3	4	5								
4. 콩의 색상	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">나쁘다</td> <td style="text-align: center;">약간 나쁘다</td> <td style="text-align: center;">보통</td> <td style="text-align: center;">약간 좋다</td> <td style="text-align: center;">좋다</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </table>	나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다	1	2	3	4	5	
나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다								
1	2	3	4	5								
5. 향	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">나쁘다</td> <td style="text-align: center;">약간 나쁘다</td> <td style="text-align: center;">보통</td> <td style="text-align: center;">약간 좋다</td> <td style="text-align: center;">좋다</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </table>	나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다	1	2	3	4	5	
나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다								
1	2	3	4	5								
6. 경도	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">나쁘다</td> <td style="text-align: center;">약간 나쁘다</td> <td style="text-align: center;">보통</td> <td style="text-align: center;">약간 좋다</td> <td style="text-align: center;">좋다</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </table>	나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다	1	2	3	4	5	
나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다								
1	2	3	4	5								
7. 맛	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">나쁘다</td> <td style="text-align: center;">약간 나쁘다</td> <td style="text-align: center;">보통</td> <td style="text-align: center;">약간 좋다</td> <td style="text-align: center;">좋다</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </table>	나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다	1	2	3	4	5	
나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다								
1	2	3	4	5								
8. 진형성	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">나쁘다</td> <td style="text-align: center;">약간 나쁘다</td> <td style="text-align: center;">보통</td> <td style="text-align: center;">약간 좋다</td> <td style="text-align: center;">좋다</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </table>	나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다	1	2	3	4	5	
나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다								
1	2	3	4	5								
9. 종합평가	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">나쁘다</td> <td style="text-align: center;">약간 나쁘다</td> <td style="text-align: center;">보통</td> <td style="text-align: center;">약간 좋다</td> <td style="text-align: center;">좋다</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </table>	나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다	1	2	3	4	5	
나쁘다	약간 나쁘다	보통	약간 좋다	좋다								
1	2	3	4	5								

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 세부과제 (한국장류협동조합)

1. 한국 청국장 품질 표준화 연구

가. 우수한 청국장발효 균주를 분리하기 위하여 국내 시판 중인 청국장 제품 또는 농가제조의 청국장 102건을 수집하였다. 청국장은 경기도 포천시, 파주시, 광주시, 남양주시, 충남 논산시, 금산군, 충북 제천시, 전북 순창군, 대구광역시 등 전국에 분포된 장류조합 등록 업체와 그 외의 청국장 제조업체 및 제조 농가로부터 수집하였다

나. 전국에서 시판 또는 농가 제조 판매중인 청국장을 수집하여 제품의 총질소, 아미노태 질소 함량, 질소분해율 및 티라민과 히스타민 함량을 분석하여 품질특성을 명확히 규명함으로써, 한국 청국장의 보급 및 산업화에 이용할 수 있는 기초자료를 제시하였다.

다. 우수한 발효용 종균을 분리·동정하고 균주별 특성을 조사하여 기능성이 우수하며 소비자 기호에 맞는 균주를 선발하고 동정하여 신 균주를 확보하였다. 확보한 균주들의 산업적 활용을 위하여 청국장 제조업체의 우수 종균의 보급을 위한 크리스트 구축을 도모하였다.

라. 수집된 청국장 제품에서 단백질 분해능과 점질물 생성능을 토대로 발효 균주를 순수분리하여 523종의 균주를 분리하였다. 이중 균주의 생화학성 특성을 고려하여 우수균주를 선별하였다.

마. 선별된 후보 균주들은 모두 내열성이 있는 *Bacillus subtilis*로서 대부분 52℃의 고온에서도 생육했으며, 몇몇 균주는 62℃에서도 생육 가능하여 강한 내열성을 보였다. *Bacillus subtilis*의 특징을 이용하여 *Bacillus cereus*와 같은 부패발효미생물을 고온 제어한다면 청국장 제조 시 발생하는 오염을 방지하며 그에 따른 폐기량을 최소화 할 수 있을 것이다.

2. 우수 종균을 이용한 국내 청국장 품질 표준화 연구

가. 선별된 우수균주인 *B. subtilis* P-L2를 이용하여 국내 장류 제품 제조 시 발견되고 있는 *B. cereus*의 효과적인 제어 방법을 제시함으로써 우수 종균을 이용한 유해균의 성장 억제 및 잘못된 제품 폐기량의 최소화로 장류 제조업체의 리스크 최소화 및 국내 장류제품의 품질 향상 가능성을 제시하였다.

나. *B. cereus*가 검출되는 문제점을 지닌 업체를 선정하여 *B. cereus*가 오염되는 경로를 충분히 교육하고, 장류제품의 원료와 제조 공정상 이용되는 설비의 세척 등에 관한 현장 컨설팅을 수행하였다. 따라서 *Bacillus cereus*, 곰팡이류 등 유해 균으로부터 근본적인 차단 시스템의 구축을 위한 중요한 자료로 활용될 것으로 평가된다.

다. 청국장의 안전성과 관련된 유해 미생물·유해물질 저감화 기술 개발을 통해 안전성을 확보할 수 있을 것으로 평가된다.

라. 제조된 *B. subtilis* P-L2 종균제품의 최적 저장 온도 및 저장 기간을 제시함으로써, 종균제품을 효율적으로 국내에 보급하기 위한 중요한 자료로 활용될 것으로 평가된다.

마. 본 연구에서 제조된 청국장 발효용 종균 제품은 아포형으로 제조되어 있기 때문에 저장 기간 및 보관온도에 의해 큰 영향을 받지 않지만, 균주의 최적 활성 유지 및 저장 비용 절감을 위하여 실온에서 보관하며 최대 6개월 이상 보관·유통할 수 있을 것이다.

바. 우수 종균의 특성을 유지시킬 수 있는 종균 제품 제조방법 개발로 국내 청국장 제조 기업이체가 안정적이고 지속적인 고품질 및 안전한 제품을 제조할 수 있을 것이라 사료된다.

사. 본 연구에서 사용된 종균에 의한 청국장 발효중 바이오제닉 아민 함량은 발효시간이 경과함에 따라 서서히 증가하는 경향을 보였지만, 이를 이전에 검색한 타사의 시판 청국장 제품과 비교하였을 때는 낮은 수준으로 되었기 때문에, 우수 발효 균주의 선별을 통해 바이오제닉 아민의 생산을 충분히 제어할 수 있는 요소로 사료된다.

아. 개발된 종균을 산업체의 대량생산 공정에 직접 적용시켜보기 위하여 종균제품을 이용한 대량 생산 실증 실험을 거침으로써 산업화 가능성을 제시하였다.

제 2 절 협동과제 (경상대학교)

1. 청국장 발효용 우수 균주의 분리 및 실용화 기술 개발

가. 국내 청국장의 제조시 발효실에 상주하고 있는 자연미생물 다수가 발효에 관여하며, 과학적인 발효환경의 제어가 결여되어 발효실 내부의 습도 및 온도가 계절의 영향을 받아 변하기 때문에, 동일한 작업장에서 제조되더라도 매회 동일한 품질의 제품을 기대하기 어려운 것이다. 따라서 발효용 종균을 분리, 동정하고 분리된 균주의 특성을 규명한 후 우수한 균주를 선발함으로써 고품질의 청국장의 균일한 대량생산 가능성을 제시하였다.

나. 국내 시판되고 있는 청국장 제품으로부터 분리한 우수한 발효용 균주별 특성을 조사하여 과학적인 데이터를 제시함으로써 기능성이 우수하며 소비자 기호에 맞는 균주 선발할 수 있는 중요한 자료로 활용될 것으로 평가된다.

다. 선발된 균주로 발효시킨 청국장의 특성을 조사한 결과를 종합하여 분리된 균주의 지역별 특성을 제시하였다.

라. 우리 청국장 제품의 우수성과 기능성을 먼저 홍보하고 시장이 구축되면 다양하게 개발된 종균을 바탕으로 기존 시장이 형성된 낫토 시장과 차별화하여 다양한 맛과 향, 기능성을 가미한 소비자의 기호에 맞는 다양한 제품개발로 시장 규모를 확대할 수 있도록, 다양한 우수 균주의 생화학적 특성 및 발효 특성에 관련한 정보 클러스터를 구축함으로써 다양한 균주의 혼합 발효에 의한 다양성을 추구할 수 있는 기초자료를 제시하였다.

2. 청국장 우수 균주의 분리 및 보관 기술 개발

가. 청국장 제조에 사용되는 *B. subtilis* 균주는 반복적으로 계대배양 하게 되면 활성이 떨어져 청국장 제조 시 품질이 저하 요인이 된다. 우수한 품질의 청국장을 생산하기 위해서는 균주의 활성을 다시 회복시키는 것이 필요하다. *Bacillus subtilis* 계대 횟수가 증가할수록 종균의 활성이 상실되는 단점을 극복하기 위하여 혼합배양을 통한 활성회복 방법을 제시하였다.

나. *Micrococcus luteus* 와의 혼합배양을 통해 청국장 제조 종균의 활성을 회복시켜 고품질의 청국장 제조를 위한 우수 균주의 보관 기술 방법을 확립하였다.

다. 분리, 동정된 종균을 소비자에게 안정적이고 지속적으로 공급하기 위해 동결건조 기술을 이용하여 장기간 보관하고 소비자로 공급되는 종균 제품의 경우 파우더 타입으로 소포장으로 제품화함으로써 유통기한을 설정하였다. 또한 청국장의 대량 생산이 필요한 업체에는 액상형의 앰플 타입으로 생산량에 따라 다양한 용량으로 제품화하여 공급함으로써 보다 효율적인 종균의 보급이 가능할 것이다.

라. 소비자가 직접 제조 할 경우 소비자가 기호에 맞는 특정 청국장 종균을 사용하여 균일한 품질의 맛과 향을 가질 수 있도록 종균에 대한 정보 체계적인 메뉴얼을 제공하였다.

마. 소비자나 청국장 제조업체는 제조 공정이 체계적으로 이루어 지지 못해 연중 균일한 제품을 생산 할 수 없어 종균 사용의 장점을 100% 활용하기 힘들다. 따라서 본 개발 종균제품이 가장 우수한 청국장 제품을 생산 할 수 있도록 과학적이고 체계화된 메뉴얼을 제공하였다.

바. 청국장 제품의 특성상 무엇보다도 국내 모든 연령층의 소비자 뿐만 아니라 서구인에게도 적용하여 제품의 향미와 맛을 정확히 표현할 수 있는 과학화된 관능평가 방법이 절실히 요구된다. 청국장 제품의 관능적 특성을 과학적으로 제시할 수 있는 관능평가와 앙케이트 조사방법 및 판정기준을 체계화하여 제시하여 향후 지속적인 연구를 위한 주요 자료가 될것으로 사료된다.

제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 학술발표

가. 2009. 10. 15. YJ Ko, YH Son, DH Kim, CH Ryu, Isolation, identification and characterization of *Bacillus spp.* from the chungkukjang in the various regions of Korea, *Korean Society of Life Science*

나. 2009. 10. 15, YH Son, BS Gu, YJ Ko, CH Ryu, Quality characteristics of chungkukjang fermented by isolated strains from commercial product, , *Korean Society of Life Science*

다. 2010. 06. 24, YH Son, YJ Ko, EJ Kim, EJ Kim, DH Kim, CH Ryu, Isolation superior strains from commercial chungkukjang and Its quality characteristics, *The Korean Society for Microbiology and Biotechnology*

라. 2010. 10. 21, YH Son, HS Je, CH Ryu, Competitive culture of *B.subtilis* and *B.cereus* in soymilk and nutrient broth, *Korean Society of Life Science*

마. 2010. 10. 21, YH Son, DH Kim, HS Choi, CH Ryu, Quality characteristics of chungkukjang fermented by isolated strains from commercial chungkukjang, *Korean Society of Life Science*

2. 인력양성 및 활용 결과

가. 학위논문

1) 손용희 석사학위 논문, 2011. 02. 28.

Bacillus subtilis P-L2균의 활성회복을 위한 *Micrococcus luteus*와 혼합배양

2) 김진용 석사학위 논문, 2011. 02. 28.

Bacillus subtilis P-L2 의 항염증 효과

3) 제해수 석사학위 논문, 2011. 02. 28.

청국장 제조 중 *Bacillus subtilis* 혼합배양에 의한 *Bacillus cereus*의 생육 저해 효과

3. 기술컨설팅

가. 계약일 : 09.08.05, 업체 : 한국맥꾸름 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

나. 계약일 : 09.08.06, 업체 : 고방 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

다. 계약일 : 09.08.06, 업체 : 장마을 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

라. 계약일 : 09.08.06, 업체 : 창녕식품 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

마. 계약일 : 09.08.07, 업체 : 삼상식품 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

바. 계약일 : 09.08.07, 업체 : 상주식품 (중소)

내용 : 청국장균의 관리 및 접종 발효상자의 관리 및 온도 관리

4. 기술 실시 이전

가. 업체 : 산청덕산곶감고추장 영농조합법인

실시기간 : 2011.10~2012.10

내용 : 청국장 종균의 활용 및 제품생산기술

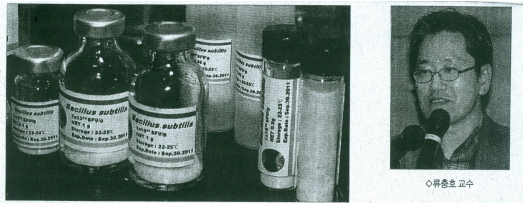
나. 업체 : 산청기능성콩 영농조합법인

실시기간 : 2011.10~2012.10

내용 : 청국장 종균의 활용 및 제품생산기술

5. 언론 홍보

가. '청국장 종균 개발. 세계화 눈앞'. 식품음료신문, 2011.3.28.



유교수가 개발한 청국장 종균 바실러스 서브틸리스.

청국장 종균 개발...세계화 눈앞

실은서 장기간 활성유지 안정생산 가능

청국장 발효용 우수 균주인 국내1술로 개발된 제품의 균질화는 물론 위생안전성 확보까지 가능하게 된 건강기능성을 앞세운 청국장 산업의 세계화도 가능하게 됐다.

우리 고유의 전통식품인 청국장은 항암 활성을 비롯하여 혈중콜레스테롤, 소변혈당, 혈당, 콜레스테롤, 지방, 당노 및 골다공증 예방, 고혈압방지 효과 등 각종 기능성이 풍부하여도 불구하고 그동안 제조기술자의 경험에 의존한 생산과 야생균주 사용, 표준화 되지 않은 발효 공정으로 인한 불균일 등 산업화에 어려움이 많았다.



개발된 청국장을 이용해 제조한 청국장 시제품.

성 평가 항목에 따라 우수 균주를 선별한 것이다. 실온에서 6개월 이상 활성이 유지되며 저장성이 높고 종균 1g으로 청국장 1톤을 안정적으로 생산할 수 있는 것이 특징이다.

유 교수가 따르면 선별된 균주도 여러 차례 계대 배양을 반복, 중량한 뒤 결정 대안을 통해 생명력이 강하고 건강한 균을 다시 선별해 우수한 특성의 종균을 얻어 냈다. 이 종균은 파우더 타입과 액상 타입인 키트(CT) 형태로 만들어져 일정량을 물에 희석해 증자된 콩에 부부의 접종한다.

유 교수는 "중량과 위해 제거 배양을 반복적으로 실시한다. 또한 활성도가 떨어지는데 이때 균주의 활성을 회복시켜 유지는 기술이 중요하다"며 "이 기술이 확보되어 외국에서 배양 등을 들여 오는

들여오지 않고 꾸준한 종균 연구가 가능 하다고 설명했다.

그는 "청국장 종균 접종 시 주의할 점은 갖 짜 나중 콩에 바로 사용해야 된다는 것"이라며 "콩은 깊이 표지면서 먼저나 알박세균의 혼입을 막아주고, 살균 알박 세균이 침투한다. 활자라도 뜨거운 온도에 의해 사멸하기 때문에 위생 관리가 가능 하다고 말했다.

이처럼 "정당한 장류 생산을 위해서는 종균의 정종과 포장 등 공정 개선과 발효 실의 온도 및 습도의 자동화, 우수한 종균 사용이 필수적"이며 "이와 함께 청국장 종균 연구 및 보급, 인체대사 및 항암성 조 절 등 기능성에 대한 심층적인 연구를 지속해야 한다"고 강조했다.

이러한 한국식품연구원 최상민 박사와 과 장으로 진행될 종합토포에서는 청국장 산 업 발전을 위해서는 지속적인 청국장 종 균 개발이 필요하다는 의견과 다양한 종 류의 제품 개발이 진행돼야 한다는 의견 이 주를 이뤘다. 아울러 청국장의 기능성 을 강화시켜 건강기능식품 개발, 고부가 가치 창출과 해외 수출을 모색해야 한다 는 주장도 제기됐다.

(김현옥·최승근 기자)

4면에 계속 →

토론

→1면에서 계속

◇안병용(전북대 교수)=청국장의 기능성에 대한 연구개발을 통해 청국장 시장을 확대시켜야 한다. 한 예로 골다공증 예방을 위해서는 칼슘 섭취보다 흡수가 중요 한데 이를 도와주는 비타민K 생산 에 청국장이 도움을 줄 수 있다.

일본에서 진행된 실험 결과에 서는 일본 낫토를 많이 먹는 도쿄 남성들의 혈청에서 다른 지역 남 성들보다 비타민K 성분이 많은 것으로 나타나기도 했다.

다만 비타민K가 열에 약한 특 성이 있어 전통발효식품의 형태 보다는 기능성을 강화한 다른 형 태의 청국장 개발이 진행돼야 한 다.

◇여수현(농촌진흥청 박사)=우 수한 특성의 청국장 종균을 보존 하고 활성화시키는 연구가 지속 해야 한다. 대부분 연구자들은 연구 로 끝내지만 이에 대한 상업화 가 뒷받침돼야 한다.

또 국내 청국장 업체들의 품질 관리가 열악한 만큼 장류조합이 중심점이 돼 회원사들에 종균을

청국장 종균 연구 상업화로 이어져야 기능성 높은 장류·건식 개발 모색을



보급하고 품질 관리에 대한 교육 을 실시해야 한다.

아울러 청국장 등 장류 제품의 다양한 포트폴리오 구축도 중요 하다. 종균 개발과 더불어 우리나 라 전통 장류에 대한 역사성, 문화 성 등을 접목시켜 해외 수출 시 고 부가 가치 창출이 가능토록 해야 한다.

◇정명섭(중앙대 교수)=청국장 업체들의 위생 관리에 있어 좀 더 상세하고 실용적인 기준 설정이 필요하다.

특히 영세한 업체가 대부분인

만큼 비용부담이 큰 HACCP 보다 는 위생 관리에 초점을 맞춘 GHP(우수위생기준)를 강화하는 것이 필요하다.

또 올해 식품업계 주요 이슈가 편의성과 건강기능성인 만큼 이 에 대한 다양한 제품개발이 이 루어져야 하고, 특히 기능성을 강조한 제품을 개발, 개별형 건강기능식 품 인증을 획득해 해외 시장 진출 도 모색해야 한다.

◇유영배(교하식품 대표)=업계 를 대표해 이번에 개발된 청국장 종균에 대한 질문을 드리겠다. 먼

저 개발된 종균이 현 제조공정에 그대로 적용이 가능한지와 이를 통해 유해미생물 문제 해결이 가능한지 알고 싶다. 또 시판이 된다 면 구입 경로와 예상 가격이 궁금 하다.

◇류충호(경상대 교수)=개발 된 종균은 갖 증자된 콩에 분무 돼 접종시킬 수 있다. 균 접종을 위해서는 스프레이 형식의 노즐 이 필요하고 위생 관리를 위해 용기째 포장돼 발효가 가능한 자 동화 포장기기도 필요할 것으로 보인다.

발효된 청국장을 사람이 떠서 개별 포장하는 지금의 시스템으 로는 발효 후 교차오염으로 인한 유해 미생물 문제 해결은 불가능 하다. 또 생공과 진공, 발효종을 담은 용기도 각각 분리돼야 한다.

현재 시스템으로는 종균의 대 량 생산이 불가능하다. 때문에 다음 과제로 대량 생산이 가능한 대량 종균 제조 시스템 개발에 관한 연구를 실시할 계획이다. 다만 필요하신 분은 장류조합을 통해 요청하시면 최대한 도움을 드리겠다.

(최승근 기자)

나. '우리 고유맛 살리는 종균개발로 산업 판도 바뀌야', 한국농어민신문, 2011.04.11

●장류/ 류충호 경향대(BK21) 교수

“우리 고유맛 살리는 종균개발로 산업 판도 바뀌야”

**일본으로 중심축 이동 아쉬워
청소년·외국인 거부감 없애는
다양한 곡류 상품 만들어야**

“우리로부터 건너간 일본 장류산업, 하지만 지금 상황은 완전히 역전됐습니다. 다시 한 번 이 구도를 바꿔놓는 것이 우리에게 주어진 과업입니다.”

경향대 식품공학과에 재직 중인 류충호 교수. 그는 일본과 우리나라의 장류산업 격차가 벌어진 주요 이유 중에 하나로 종균을 지목한다. 류 교수는 “우리는 종균개발을 간과한 채 재래식으론만 장류를 생산할 때 일본은 황국균을 배양할 수 있는 종균을 개발, 우리보다 빠른 시간에 안전한 장류를 대량 생산할 수 있는 시스템을 갖추고 있다”고 설명했다. 이로 인해 해외 시장에서 일본의 미소된장, 낫토 등이 명성을 쌓아가고 있을 뿐만 아니라 우리 장류업체도 대부분이 일본 종균을 수입해 쓰고 있는 현실이 되어 버렸다는 것이다.

이를 타계하고자 류 교수는 우리 고유 맛을 살릴 수 있는 고초균을 배양할 수 있는 종균을 최근 개발하기도 했다. 류 교수는 “일본이 주로 생산하는 방식인 황국균 배양은 자칫 우리 고유의 맛을 잃게 할 수 있다”며 종균을 개발한 취지를 설명했다.

우리 고유의 장류 맛을 살릴 수 있다면 다행스러운 일. 그렇지만 옛 장류 맛에 익숙지 않거나 거부감을 갖기도 하는 청소년들이나 외국인들을 위해 무엇이 필요하지 않을까. 이에 대해 그는 다양한 곡류를 활용한 제품개발을 들었다. 류충호 교수는 “청소년들이나 외국인 입맛에 맞추려면 소금의 양을 줄이고 다양한 곡류를 첨가해 깔끔한 맛을 내면 된다”고 설명했다.

끝으로 류 교수는 “우리 콩 자급률이 5%를 계속 밀두고 있을 때 3%도 채 되지 않았던 일본의 콩 자급률은 7%를 넘어 현재 계속 상승하고 있다”며 “현재 콩 농가 대부분이 단위당 적은 생산량, 고노동력으로 허덕이고 있을 때 이들을 살릴 수 있는 정책적 지원이 필요하다”고 당부했다.

류충호 교수(54)는 1989년 일본 동경대에서 농학박사 학위를 취득한 뒤 일본 NHN 연구원, 해천들 연구실장 등을 거쳐 한국장류협동조합 자문위원 등을 겸하며 장류산업발전에 일조하고 있다.

다. 청국장 산업화 성공, 종균개발, , KBS 뉴스, 2011.04.20

KBS NEWS

http://news.kbs.co.kr/society/2011/04/20/2278764.html

검색

ON AIR 뉴스 5:17시 방송예정

사회

청국장 산업화 성공... '종균 개발'

오늘의 영상

포토뉴스

일찍시간 2011.04.20 (19:33) 진정은 기자

KBS 뉴스는 http://news.kbs.co.kr 에서만 보실수 있습니다.
Copyright © KBS all rights reserved. 무단 전재-재배포 금지

제 2 절 연구 성과의 활용계획

- 식품공전에 규정되어 있는 BC의 기준이하 **생산기술 확보**
- 소비자 기호에 맞는 다양한 **장류 제품 개발지표**
- 개발 기술을 장류업체에 기술이전 하여 **안전한 제품의 생산에 활용**
- 탐색 미생물 및 개발된 기술은 특허출원 후 산업체에 **기술 이전하고자 함**
- 수입에 의존하고 있는 **なた** **종균의 수입 대체 및 종균 수출 효과**
- 청국장만의 새로운 인식을 통한 **신수요 창출을 통해 대두소비 촉진**
- 청국장의 안전성 확보에 의한 **소비자 건강 보호**
- 전통발효식품의 **우수성 홍보용 자료 제공**
- 청국장 외에 기타 발효식품 **고품질화의 표본**
- 세부과제간의 연구 흐름을 파악하여 연구 실적 및 결과물 **초과달성 함**
- 과학적 검증 없이 생산하고 소비하는 청국장 제품의 기능성을 검증하여 소비자가 안심하고 소비하게 하여 청국장 가공품의 소비를 촉진시켜 국민건강 향상에 기여함
- 전통발효식품 산업의 **활성화를 통한 농민소득 증대**
- 한국 전통발효식품의 **세계화를 위한 초석이 됨**
- 고부가가치 청국장 소재 건강기능식품들에 대한 국민적 관심과 지식을 높임
- 연구 수행을 위하여 얻어진 결과들을 전문 SCI급 논문집에의 게재 및 특허권 조기 설정에 따른 **독점적 지위의 확보**
- 국내 및 국외시장 분석결과 장류제품 중에서 대부분이 된장, 고추장, 쌈장 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으며, 생활형태의 변화, 소비자 취향 및 소비계층의 변화가 빠르게 진행되고 있는 시장 상황에서 본 연구과제에서는 산·학·연 연구를 통하여 품질향상 기술개발로 기호성이 뛰어나며, 식품위해 미생물로부터 안전한 청국장 및 관련 응용 제품을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임
- 우수한 종균의 분리로 고품질의 청국장 생산이 가능하여 보다 수준 높은 장류 마인드를 국민들이 가질 수 있으며 이를 이용한 기능성 연구가 더욱 활발해 질 것이며 소비자 기호에 맞춘 청국장을 제조함으로써 청국장 시장의 활성화와 종균 수출에 대한 기대효과를 가짐
- 우수한 종균의 분리로 고품질의 청국장 생산이 가능하여 보다 수준 높은 장류 마인드를 국민들이 가질 수 있으며 이를 이용한 기능성 연구가 더욱 활발해질 것이며 소비자 기호에 맞춘 청국장을 제조함으로써 청국장 시장의 활성화와 종균 수출에 대한 기대효과를 가짐.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 해외

우리나라를 비롯하여 동양 여러 나라에서는 각 민족의 기호에 맞는 독특한 대두가공 식품들이 제조, 이용되어 왔는데 그 예로 우리나라와 중국에는 간장, 된장, 고추장, 청국장이고, 일본에는 miso, shoyu, natto, 인도네시아에는 tempeh 등이 있다.

일본은 좋은 natto 제품을 안정적으로 생산하기 위해 낫토에서 분리한 *Bacillus subtilis* (*natto*)균 이용한 청국장 제조, 발효 및 그 과정중의 품질특성 변화 조사, 부재료를 이용한 영양성분 보강 및 품질개선 등에 관한 연구가 수행되어 오고 있다.

인도네시아의 전통적인 발효식품인 tempeh는 400년 전부터 단백질원 식품으로 이용되어 왔다. 된장, 간장 등의 대두발효식품과 두부 등은 아시아 각지에서 이용하고 있으나, tempeh는 인도네시아와 그 주변국에 한정되고 있다. tempeh를 건조시켜 종균으로 사용하는 방법으로 10년 전까지는 hibiscus로 만든 "우사루"도 보였으나, 현재는 비교적 근대적인 공장에서 생산된 종균이 사용되고 있다. 종균은 증미를 원료로 하여 4~5일 배양하여 충분히 포자를 착생시킨 후, 건조분말로 가공 한 종균 "라기텐페"를 시판하고 있다. 이는 복수의 균주를 혼합하는 것 같다. 1g 당 10^7 개 정도의 포자가 함유되어 있고 세균성 잡균류는 $10^4 \sim 10^5$ 정도 포함되어 있으나, pH와 온도를 적정히 관리하면 실용상 문제는 없다. 우리나라의 청국장 종균에 관한 연구를 살펴보면 대부분 우수 종균을 분리·개발하여 품질을 향상시키려는 시도는 지속적으로 수행되고 있으나 대부분 단순한 균주의 특성을 밝히는 연구의 수준이었고, 분리된 균주의 우수한 특성을 유지시키고 안정된 종균을 보급하여 산업화시키고자 하는 노력이 부족한 실정이었다.

본 연구를 수행하면서 취득한 정보는 젖산균과 효모의 동결보호제에 관한 정보였다. 종균을 보호제 첨가 분말체제로 생산하면 저장 중 생균수 감소와 미생물 조절 능력 저하가 발생된 현상은 동결건조된 세포가 산화되면서 나타나는 현상이기 때문에 저장용기가 진공이 아니면 피할 수 없게 되어 있지만 산화사멸 및 약화는 생산배지, 동결건조의 보호제 등에 관련이 있다. 따라서 동결보호제를 적절히 선택하는 것이 동결건조 초기의 균수 파괴에 따른 감소 뿐만 아니라 저장기간 중 사멸속도 완화, 용해시 균일하고 빠른 현탁액 제조에 탁월할 것이다. 동결보호나 건조 후 생존을 유지에 효과가 있다고 보고된 보호제를 보면 alpha-trehalose-borate system, 8% Dried nonfat milk와 5% peptone, 19.4mM glucose, adonitol과 nonfat milk solids 등이 있다.

제 2 절 일본

우리나라가 종균개발을 간과한 채 재래식으로만 장류를 생산할 때 일본은 황국균(*Aspergillus oryzae*) 등의 종균을 개발하여 사용함으로써, 우리보다 발효속도가 빠르고 안전한 장류를 대량으로 생산할 수 있는 시스템을 갖추고 있다. 이로 인해 해외시장에서 일본의 미소(된장), 낫토 등이 대표적인 동양의 콩 발효식품으로 세계적 집중과 명성을 쌓아가고 있을 뿐만 아니라 우리 장류업체도 대부분 이들 일본산 종균을 수입해 쓰고 있는 현실이다. 일본이 주로 생산하는 방식인 황국균 배양은 자칫 우리 고유의 맛을 잃게 할 뿐만 아니라 자칫 우리의 전통식품의 명맥마저 끊어버리는 우릴 범할 수도 있기 때문에 체계적인 종균개발 시스템 구축이 필요한 시점이라 할 수 있다.

장류용 종균개발에서, 아직 본 연구개발제품과 같이 상업적으로 유통시킬 목적으로 분말제제화된 제품은 없지만 현재 2개 김치제조업체 종가집과 베지퀸에서 자체 김치종균을 개발하여 사용하고 있다. 이들은 모두 *Leuconostoc mesenteroides* 단일균만을 종균으로 분리하여 자기 업소에서 필요한 경우에 직접 배양하여 사용하고 있고 고추장의 경우는 없다.

일본은 우리나라와 거의 유사한 맛과 향을 가진 된장과 간장 및 청국장을 즐긴다. 간장은 기꼬망 제품이 대부분의 시장을 점유하고 있으며, 된장은 쌀, 보리, 밀 등의 곡류와 콩을 *Aspergillus sp.*로 발효시키고 있다. 최근 고추장은 매운 성분인 캡사이신이 비만치료와 사스(SARS)에 효능이 있는 것으로 알려지면서 사용량이 늘고 있다.

우리의 청국장과 비교할 수 있는 일본의 natto는 독특한 점질물과 풍미를 가졌다. 콩을 발효시킬 경우 미생물 중 곰팡이에 의하여 가수분해되어 여러 종류의 발효제품을 생산하는데 비해 natto는 증자대두에 *Bacillus subtilis* 균을 순수하게 배양한 것을 이용한 일본의 전통식품이며 기능성 식품이다. Natto는 소화율이 높고 식물성 단백질 특유의 아미노산, 비타민 B₁, B₂, B₁₂, 비타민 E, 특히 비타민 K의 생리작용이 관심의 대상이 되고 있는데 이것은 고혈압, 당뇨병에 좋다는 연구결과가 나와 있다. 콜레스테롤이 전혀 없고 장내 병원균의 번식을 억제하며 항암효과 및 두뇌발달 보조와 정장 효과 등도 있다는 보고가 있다.

Natto에 관한 일본의 연구 동향을 살펴보면 natto starter 생산에 관한 연구와 natto 제조공정 중 당성분과 식이섬유의 변화, 저장 및 숙성 중의 휘발성 향기성분의 변화에 대한 연구 등이 있으며 natto의 발효과정 중에 생산되는 단백질 분해효소 중에는 혈전증을 예방 및 치료할 수 있는 nattokinase가 함유되어 있다는 최근 연구결과 보고 등이 있다. nattokinase는 일종의 microbial serine protease(subtilisin NAT)로서 이를 경구 투여시 체내에 흡수되어 plasminogen activator로 작용하는 plasminogen을 plasmin으로 활성화시켜 응고 혈액의 fibrin

을 용해시키는 혈전 용해성을 가지고 있다.

Natto의 발효 중 natto 냄새 외에 암모니아 냄새를 저하시킨 natto를 개발하였고, natto의 원료를 변화시키고 용기의 개량, natto균의 개량 등으로 지속적인 natto의 신제품 개발은 연간 매출액이 1,000억 엔을 차지할 정도로 일본인이 즐겨먹는 건강식품, 자연식품의 대표라고 할 수 있다. 일본에서 이처럼 natto에 대한 연구와 이용은 꾸준히 이루어져 왔으나 우리나라에서 소비가 없는 것은 콩 식품 중에서도 우수한 조성을 가졌음에도 불구하고 우리의 기호에 적합하지 않기 때문이라고 사료된다.

제 3 절 인도네시아

템페(tempeh)란 대두에 *Rhizopus* 곰팡이균을 접종하여 발효시켰을 때 순하고 향긋한 향을 내는 대두발효식품으로서 인도네시아에서 수백년 전부터 제조되어 오고 있다. 발효가 끝난 후 하얀 균사가 덮힌 케익같은 템페는 곰팡이 균에 의한 효소적 반응으로 단백질 및 지방이 분해되어 원래의 대두보다 소화가 용이하며 식용유에 튀기거나 국에 넣어 먹거나 혹은 식성에 맞게 다양한 조리를 하여 먹을 수 있는 고단백 식품임과 동시에 제조비가 적게 드는 경제적인 식품이어서 영양결핍문제를 안고 있는 전세계의 개발도상국가에 있어서 우수식품으로 각광받고 있다. 실제로 인도네시아에서는 템페를 이용한 다양한 식품이 소비되고 있었으며 유아식 및 어린이의 설사병 치료에도 사용되고 있었다. 템페는 현재 미국, 말레이시아, 네덜란드, 캐나다, 인도 그리고 일본 등지에서도 생산, 소비되고 있다. 특히 미국에서는 1983년 현재 53개의 템페 제조업체가 있어 90만톤의 템페를 생산하고 있다. 인도네시아 국민의 80%가 살고 있는 자바섬에는 크고 작은 규모의 템페 제조업체가 40,000개 정도가 고 연간 75,000톤의 대두를 템페 제조에 이용하고 있다고 한다.

템페에 관한 연구는 많은 연구자들에 의해 여러 가지 다른 결과가 보고되어 있는데, 이 중 템페 제조에 관한 보고는 Martinelli와 Hesseltine이 다양한 발효용기를 사용하여 템페를 제조하였는데 적당한 통기를 해줄 수 있는 기공이 뚫린 플라스틱 필름 용기를 사용하여 템페 발효를 하였을 경우 양호한 템페를 얻을 수 있었으며, Steinkraus 등은 시험공장 규모로 54.4kg의 템페를 생산한 실험결과를 보고하였다. 템페 발효 후 성분변화에 있어서 수용성 고형분과 수용성 질소, pH 및 섬유질은 증가되나 총 질소 함량은 크게 변화하지 않고 환원당은 감소한다고 보고되었다. 또 비타민 중 나이아신, 리보플라빈, 티아민 및 비타민 B₁₂ 함량은 템페 발효 후 현저히 증가하였다. 반면 대부분의 아미노산은 크게 변함이 없다고 하였다. 대두 내에 존재하는 피트산은 단백질 분해효소와 아밀라제 활성을 저해하고 무기물의 생체이용도를 감소시키며 다

가의 무기물과 불용성 복합체를 형성하는데, Sudarmadj와 Markakis는 대두를 템페 발효시키면 대두 내에 존재하는 피트산의 1/3 가량이 감소된다고 하였다. Wang 등은 대두 템페에 있어 영양저해인자인 트립신억제제의 활력이 감소한다고 하였다. 또 템페가 항산화력이 있어 산화에 안정함을 Pockett 등은 보고하였다.

제 4 절 중국

중국에서 생산되어 수입되는 장류는 대부분 국내 업체의 현지공장에서 생산되고 있고 그 양이 매년 증가하고 있으나 종균 및 생산 전반적인 사정은 우리나라와 다르지 않고, 국내로 운송도중에 실온 혹은 저온유통 시스템이 지켜지지 않고 있을 뿐만 아니라 생산 시설의 안전성도 열악할 것으로 예상된다.

제 7 장 참고문헌

1. Lee DG, Kim NY, Jang MK, Yoo BH, Kim KY, Kim SG, Jeong YK and Lee SH. Isolation of a fibrinolytic bacterium from *Cheongkukjang* and characterization of its bioactivity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34(4), 299-305, 2006
2. Ryu SH. Studies on antioxidative effects and antioxidative components of soybean and *chongkukjang*. Doctorial thesis, Inje University of Korea, 23-122, 2002
3. Shon MY, Kwon SH, Park SK and Chor JS. Changes in chemical components of blackbean *Chungkuk-jang* added with kiwi and radish during fermentation. *Kor. J. Posthavest Sci. Technol.* 8, 449-455, 2001
4. M. Fujita, K. Hong, Y. Ito, R. Fujii, K. Kariya and S. Nishimuro. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1387-1391, 1995
5. Sumi. H, H. Hamada, K. Nakanishi and H. Hiratani. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* 84, 139-143, 1990
6. Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM and Byun MW. Quality characteristics of the *Chungkookjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 31, 204-210, 2002
7. Park WJ, Park HY, Yoo JH and Rhee MS. Effect of *Artemisia asiatica* Nakaki extract on the flavor of *cheonggukjang*. *Food Eng. Prog.* 5, 115-124, 2001
8. Lee JJ, Kim AR, Chang HC and Lee MY. Antioxidative effects of *Chungkukjang* preparation by adding solar salt. *Kor. J. Food Preserv.* 16(2), 238-245, 2009
9. Lee KA, Jang JO, Yoon H.K and Kim MS. Antithrombotic activities of *cheongkookjang* and *F cheongkookjang* fermented with green tea or mugwort. *Kor. J. Microbiol.* 43, 298-303, 2007
10. Koh JB. Effects of *cheonggukjang* added *Phellinus linteus* on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35, 410-415, 2006
11. Park JH, Kim JM, Park EJ and Lee KH. Effects of *chungkukjang* added with onion on

lipid and antioxidant metabolisms in rats fed high fat-cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37, 1244-1250, 2008

12. Lee SI, Shin JG and Kim DS. Effect of red ginseng-chungkukjang extracts on lipid profiles of serum in alcohol administered diabetes-induced rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34, 1362-1366, 2005

13. Baek LM, Park LY, Park KS and Lee SH. Effect of starter cultures on the fermentative characteristics of *Cheonggukjang*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 40(4), 400-405, 2008

14. Hwang HA, Lee NK, Cho IJ, Hahm YT, Kwon KO and Kim BY. Selection of microorganisms and optimization of manufacture process for *Cheonggukjang*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 40(4), 406-411, 2008

15. In JP and Lee SK. Effect of Yucca extract on quality characteristics of *Chungkookjang* using *Bacillus subtilis* p01. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 47(2), 176-181, 2004

16. Choi UK, Ji WD and Chung YG. Characteristics of *Chunggugjang* produced by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27, 846-851, 1998

17. Kim YS, Jung HJ, Park YS and Yu TS. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *Chunggukjang*. *J. Food Sci. Technol.* 35, 475-478, 2003

18. Kim DY, Park HH, Kim HS and Kwon IB. A process of manufacturing highly purified isoflavone aglycones by fermentation, 2003

제 1 절 한국 청국장 품질 표준화 연구

19. Shon MY, Seo KI, Lee SW, Choi SH and Sung NJ. Biological activities of *cheonggukjang* prepared with black bean and changes in the phytoestrogen content during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32, 936-941, 2000

20. Lee YL, Kim SH, Choung NH and Yim MH. A study on the production of viscous substance during *Chungkookjang* fermentation. *Korea J. Agric. Chem. Soc.* 35, 202-209, 1992

21. Kim WK, Chio KH, Park HH, Chio JY, Lee YS, Oh HI, Kwon IB and Lee SY. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strains CK11-4 screened from *chungkookjang*. *Appl Environ Microbiol.* 62, 2482-2488, 1996
22. Lee BK. Immunomodulation materials of fermented soybean products. lecture 3 presented at 2 and symposium for soybean fermentation foods. The Research Institute of Soybean Fermentation Foods. Yeungnam University, Gyeongsan, Korea, 1999
23. Cheigh HS, Lee JS and Lee CY. Antioxidative characteristics of soybean sauce. *Korean J. Soc Food Nutr.* 22, 570-575, 1993
24. Yun GH, Lee ET and Kim SD. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus amyloliquefaciens* K42 isolated Korean soy sauce. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31(3), 284-291, 2003
25. Ju HK. Studies on the manufacturing of *chungkukjang* . *Korean J. Food Sci. Technol.* 3, 64-67, 1971
26. Park KI. Studies on the N-compounds during *Chung-Kook-jang Meju* fermentation(1). *Korean J. Agric. Chem. Soc.* 15, 93-109, 1972
27. Park KI. Studies on the N-compounds during *Chung-Kook-jang Meju* fermentation(2). *Korean J. Agric. Chem. Soc.* 15, 111-142, 1972
28. Lee HJ and Suh JS. Effect of *Bacillus* strains on the *Chung-kook-jang* processing(1). *Korean J. Food Sci. Technol.* 14, 97-194, 1981
29. Suh JS, Lee SG and Ryu MK. Effect of *Bacillus* strains on the *Chung-kook-jang* processing(2). *Korean J. Food Sci. Technol.* 14, 309-314, 1982
30. Rhee SH, Kim SK and Chrih HS. 1983. Studies on the lipids in Korean soybean

fermented foods (1). *Korean J. Food Sci. Technol.* 15, 399-403, 1983

31. Bock JY. Changes in chemical composition of steamed soybean during fermentation and in alkylpyrazines during aging of *Chungkookjang*. Ph.D. Thesis, Chung-Ang University, Seoul, Korea, 1993

32. Choi SH. and Ji YA. Changes in flavor *Chungkookjang* during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21, 229-234, 1989

33. Kim BN, Park CH, Ham SS and Lee SY. Flavor component, fatty acid and organic acid of Natto with spice added. *Korean J. Soc. Food Nutr.* 24, 219-227, 1995

제 2 절 청국장 발효용 우수 균주의 분리 및 실용화 기술 개발

34. Kim CH. Changes of volatile flavor compounds during *Chungkookjang* fermentation. Kon-Kuk University, Seoul, Korea, 1996

35. Lee BY, Kim DM and Kim KH. Studies on the change in rheological properties of *Chungkook-Jang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23, 478-484, 1991

36. Lee BY, Kim DM and Kim KH. Physicochemical properties of viscous substance extracted from *Chungkook-Jang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23, 599-604, 1991

37. Choe JS, Kim JS, Yoo SM, Kim TY, Chang CM and Shin SY. Survey on preparation method and consumer response of *Chung-Kuk-Jang*. *Korea Soybean Digest.* 13, 29-43, 1996

38. Kim YS, Jung HJ, Park YS and Yu TS. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *Chunggukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35, 475-478, 2003

39. Lee MY, Park SY, Jung KO, Park KY and Kim SD. 2005. Quality and functional characteristics of *cheonggukjang* prepared with various *Bacillus* sp. isolated from traditional *cheonggukjang*. *J. Food Sci.* 70, M191-M196, 2005
40. Ten Brink BC, Damink HM, Joosten and Huis JH in't Veld. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73-84, 1990
41. Chu CH and Bjeldanes LF. Effects of diamines polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. *J. Food Sci.* 47, 7980-7988, 1981
42. Kim IJ, Lee JO, Park MH, Shon DH, Ha YL and Ryu CH. Preparation Method of *meju* by Three Step Fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35, 536-539, 2002
43. Joo HK. Studies on Chemical Composition of Commercial *Chung-kuk-jang* and Flavor Compounds of *Chung-kuk-jang* by Mugwort(*Artemisia asiatica*) or Red Pepper Seed Oil. Korea Soybean Society, 13(2), 44-56, 1996
44. BY Kim. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *cheonggukjang*.
45. Yun GH, Lee ET and Kim SD. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus amyloliquefaciens* K42 isolated Korean soy sauce. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31(3), 284-291, 2003
46. Hyun KW, Lee JS, Ham JH and Chio SY. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from Korean traditional *Deonjang*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33(1), 24-28, 2005
47. Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM and Byun MW. Quality characteristics of the *Chungkookjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. lichenformis*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 31(2), 204-210, 2002
48. Son DH, Kwon OJ, Ji WD, Choi UK, Kwon OJ, Lee EJ, Cho YJ, Cha WS and Chung YG. The quality changes of *chungkukjang* prepared by *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43(1), 1-6, 2000

49. Lee JJ, Kim AR, Chang HC and Lee MY. Antioxidative Effects of Chungkukjang Preparation by Adding Solar Salt. *Kor. J. Food Preserv.* 16(2), 238-245, 2009

제 3 절 우수 종균을 이용한 국내 청국장 품질 표준화 연구

50. Kwon SH, Lee KB, Im KS, Kim SO and Park KY. Weight reduction and lipid lowering effects of korean traditional soybean fermented products. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* 35(9), 1194-1199, 2006

51. Mun CL, Kim JU, Sin DH. Survey on manufacturing status of traditional fermented soybean product at Jeongeup region. *Bulletin of the Agricultural College Chonbuk National University.* 34, 62-70, 2003

52. Lee JO, Kim TK, Choi YH, Ha YL and Ryu CH. Development of three step fermentation for production of high quality soybean fermented product. *Korea Soybean Digest.* 23(1), 10-18, 2006

53. Lee CY. Korean soy seasonings and culture. *Food Science and Industry.* 22, 3, 1989

54. 김구택, 서병철. 장류 발효균의 산업적 이용. *한국균학회.* 14(1), 31-36, 2002

55. 한용석, 박병득. 간장제조에 관한 연구(제1보). *J. Korean Chemical Society.* 4(1), 5, 1957

56. 한용석, 박병득. 채래메주 및 곡자중의 *Aspergillus oryzae*에 대하여. *중앙공업연구소보* 7, 51, 1959

57. 한용석, 박병득. 채래속자중의 *Rhizopus* 속, *Mucor* 속에 대하여, 연구보고. *중앙공업연구소보* 9, 147-161, 1959

58. 장건형 등. 장류용 강력국균 연구(제1보). 한국미생물학회. 1, 40, 1962
59. 장윤수. 간장의 미생물학적 연구, 재래식 간장에서의 세균의 분리 및 동정. 한국미생물학회. 1(1), 30, 1963
60. 장지현. 보리고지 첨가에 의한 재래식 메주의 개량화에 대하여. 서울대학교 창립 60주년 기념논문집. 81, 1966
61. Lee JS, Kim, KS, Hong SY and Kwon MS. Understanding of genomic information of *Bacillus cereus* group bacteria. *Safe Food*. 5(3), 27-33, 2010
62. Cho YS, Jung E, Lee MK, Yang CY and Shin DB. Survival, isolation and characterization of *Bacillus cereus* from Sunshik. *J. Fd. Hyg. Safety*. 4, 343-347, 2008
63. Lee HT, Kim JH, Lee SS. Analysis of microbiological contamination and biogenic amines content in traditional and commercial *Doenjang*. *J. Fd. Hyg. Safety*. 24(1), 102-109, 2009
64. Sun JK, Baek JH. The consuming tendency analysis of soybean paste market in Korea. *Korean J. Food Marketing Association*. 25(3), 25-52, 2008
65. Rho JD, Choi SY, Lee SJ. Quality characteristics of soybean pastes (*Doenjang*) prepared using different types of microorganisms and mixing ratios. *Korean J. Food Cookery Sci*. 24(2), 243-240, 2008
66. Per Einar G, Terje L. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett*. 157, 223-228, 1997
67. Crielly EM, Logan NA and Anderton A. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *J. Appl. Bacteriol*. 77, 256, 1994
68. Dufrenne J, Soentoro P, Tatini S, Day T and Notermans S. Characteristics of

- Bacillus cereus* related to safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 89, 1994
69. Goepfert JM, Spira WM and Kim HU. *Bacillus cereus*: Food poisoning organism. A review. *J. Milk Food Technol.* 35, 213, 1972
70. Shinagawa K. Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. *Neth. Milk Dairy J.* 47, 89, 1993
71. Anwarul H and Nicholas JR. Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates Bangladeshi rice. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 23-34, 2005
72. Valero M, Hernandez-Herrero LA, Fernandez PS and Salmeron MC. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 491-499, 2002
73. Valero M, Hernandez-Herrero LA and Giner MJ. Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 671-677, 2007
74. Champagne CP, Laying RR, Roy D, Mafu AA and Griffiths MW. Psychrotrophs in Dairy Products: Their effects and their control. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.* 34, 1, 1994
75. Kim SJ, Jung JH, Tahk HM, Baek SY and Lee SY. Effect of factors on the sporulation of *Bacillus cereus* and their thermal resistance. *J. Fd Hyg. Safety.* 24(3), 256-261, 2009
76. Jang JH, Jang JS, Lee SY, Kim HS, Kang SM and Park JH. Growth inhibition effects of ethanol and sodium chloride on *Bacillus cereus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35(5), 998-1002, 2003

77. Kim YH, Ahn YT, Jang YH and Kim HU. A study on the growth inhibition of *Bacillus cereus* by *Lactobacilli*. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* 42(3), 331-338, 2000

제 4 절 청국장 우수 균주의 분리 및 보관 기술 개발

78. Kim MH, Lee NH and Choi UK. Fermentation Characteristics of *cheonggukjang* made of germinated soybean under light condition. *Journal of Life Science*. 18(10), 1420-1425, 2008

79. Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM and Byun MY. Quality characteristics of the *chungkookjang* fermented by the mixed culture of *bacillus natto* and *B. licheniformis*. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.* 31(2), 204-210, 2002

80. Ju HK. Studies on chemical composition of commercial *Chung-kuk-jang* and flavor compounds of *Chung-kuk-jang* by Mugwort(*Artemisia asiatica*) orred pepper seed oil. *Korean Soybean Digest*. 13, 44-56, 1996

81. Allagheny N, Obanu ZA, Campbell-Platt G and Owens JD. Control of ammonia formation during *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 321-333, 1996

82. Kim DH, Lim DW, Bai S and Chun SB. Fermentation characteristics of whole soybean *meju* model system inoculated four *bacillus* strains, *Korean J. Food Sci. Technol.* 29, 1006-1015, 1997

83. Lee HJ and Suh JS. Effect of *Bacillus* strains on the *chungkookjang* processing(1)- Changes of the components and enzyme activities during *chungkookjang koji* preparation. *Korean J. Nutr.* 14, 97-104, 1981

84. Lee KH, Lee HJ. and Chung MK. Studies on *chungkookjang* (Part 1)- On the changes of soybean protein in manufacturing *chungkookjang*. *Korean J. Agric. Chem.*

Soc. 14, 191-200, 1971

85. Seok YR, Kim YH, Woo HS, Kim TW, Lee SH and Choi C. Change of protein and amino acid composition during *chungkookjang* fermentation using *bacillus licheniformis* CN-115. *Korean J. Agric. Chem. Soc.* 37, 65-73, 1994

86. Suh JS, Lee SG and Ryu MK. Effect of *bacillus* strains on the *chungkookjang* processing II - changes of the components and enzyme activities during the storage of *chungkookjang*, *Korean J. Food Sci. Technol.* 14, 309-314, 1982

87. Sung NJ, Ji YA and Chung SY. Changes in nitrogenous compounds of soybean during *Chungkookjang koji* fermentation. *Korean J. Soc. Food Nutr.* 13, 275-284, 1984

88. Kim SS, Lee JH, Ahn YS, Kim JH and Kang DK. A Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7 Isolated from *Chungkook-Jang* It's Characterization and Influence of Additives on Thermostability. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31(3), 271-276, 2003

89. Hyun KW, Lee JS, Ham JH and Chol SY. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from korean traditional *deonjang*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33(1), 24-28, 2005

90. Lee DG, Kim NY, Jang MK, Yoo BH, Kim KY, Kim SG, Jung YK and Lee SH. Isolation of a fibrinolytic bacterium from *cheongkukjang* and characterization of its bioactivity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34(4), 299-305, 2006

91. You SO, Park JE, Oh HJ, Kim JH, Oh MC, Oh CK, Oh YJ and Lim SB. Isolation and characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from jeju traditional fermented soybean paste (*doenjang*). *Korean J. Soc Food Sci. Nutr.* 39(1), 47-53, 2010

92. <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/Inclusions.html>

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.