반응표면분석을 이용한 청국장 제조시 마늘의 첨가조건 최적화

황초롱¹ · 심혜진¹ · 김경민¹ · 조계만² · 김정환³ · 신정혜^{1†}

¹(재)남해마늘연구소, ²경남과학기술대학교 식품과학부

³경상대학교 식품공학과 · 농업생명과학연구원

Optimization of the Addition of Garlic in *Cheonggukjang* using Response Surface Methodology

Cho-Rong Hwang¹, Hye-Jin Sim¹, Gyeong-Min Kim¹, Kye-Man Cho², Jeong-Hwan Kim³ and Jung-Hye Shin^{1†}

¹Namhae Garlic Research Institute, Namhae 668-812, Korea

²Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

³Department of Food Technology, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

This study was performed to determine the optimal composition of *Cheonggukjang* added with garlic. The experiment utilized a central composite design (CCD). The evaluation was carried out by means of response surface methodology (RSM), which included 18 experimental points with three independent variables : the content of the garlic (1.3~9.7%, X_1), the steaming time of garlic (0~15.1 min, X_2), and the fermentation time of *Cheonggukjang* (48.2~71.8 h, X_3). The viscous substance (Y_1), acidity (Y_2), amino-type nitrogen (Y_3), γ -GTP activity (Y_4) and ABTS radical scavenging activity (Y_5), were assessed in four replicates with five dependent variables. The maximum content of the viscous substance was 13.02% at 6.53% (X_1), 6.81 min (X_2) and 55.18 h (X_3). The acidity was increased when the fermentation time was longer, and the minimum acidity point was 0.50% at 7.75% (X_1), 3.42 min (X_2) and 58.60 h (X_3), respectively. The content of the amino-type nitrogen at the experimental range studied was 80.58~158.82 mg%, and the stationary point was at saddle point. Using ridge analysis, the maximum point was 156.97 mg% at 6.21% (X_1), 14.85 min (X_2) and 58.04 h(X_3). The optimum conditions of γ -GTP activity was 5.73% (X_1), 6.99 min (X_2) and 57.96 h(X_3), respectively, at the maximum point was 353.66 mU/mL. The maximum point of ABTS radical scavenging activity was 76.43% at 3.78% (X_1), 14.28 min (X_2) and 57.99 h(X_3) at the saddle point, when the garlic steaming time was longer.

Key word: garlic, *Cheonggukjang*, response surface methodology(RSM), γ -GTP

I. 서론

청국장은 일반 장류와는 달리 삶은 콩에 *Bacillus*속 미생물

을 접종해 속성 발효한 후 식품에 가미하여 식용하기 때문에 제조기간이 짧으며, 된장이나 고추장에 비해 단백질, 필수아미노산, 비타민 B₁, B₂ 및 나이아신 등의 함량이 높다(Hong JY 등 2008). 또한 콩에서 기인된 isoflavone, phytic acid, saponin, tocopherol 등의 각종 생리활성 물질과 항산화 물질이 다량 함유되어 있어 콜레스테롤 저하, 항고혈압, 항암, 항산화 및 혈전용해 활성 등의 다양한 생리활성과 관련된 연구 결과가 보고되어 있다(Song JER 등 2004, Min HK 등 2008, Park MK 2011).

한편 청국장의 기능성 및 품질 향상을 위해 홍삼, 복분자,

[†]Corresponding author: Jung-Hye Shin, Namhae Garlic Research Institute

Tel: +82-55-860-8947

Fax: +82-55-860-8945

E-mail: whanbee@hanmail.net

Table 1. Experimental data on viscous substance, acidity, amino type nitrogen, γ -GTP activity and ABTS scavenging radical activity of *Cheonggukjang* prepared with garlic by response surface methodology analysis

Exp. No ¹⁾	Conditions			Experimental items				
	Content of garlic(%)	Steaming time of garlic(min)	Fermentation time(h)	Viscous substance (%)	Acidity (%)	Amino type nitrogen (mg %)	γ -GTP activity (mU/mL)	ABTS radical activity (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
1	3.0(-1)	3.0(-1)	53(-1)	8.52±0.01 ^{BC}	0.73±0.01 ^{DE}	80.58±0.71 ^A	18.05±0.84 ^{AB}	66.18±0.15 ^{EF}
2	3.0(-1)	3.0(-1)	67(1)	4.85±0.06 ^A	0.73±0.06 ^{DE}	89.44±1.77 ^B	14.55±1.15 ^{AB}	68.66±1.11 ^G
3	3.0(-1)	12.0(1)	67(1)	6.69±0.06 ^{AB}	0.77±0.06 ^{EF}	89.91±7.54 ^B	13.44±0.84 ^{AB}	71.82±0.64 ^H
4	3.0(-1)	12.0(1)	53(-1)	11.17±0.05 ^{DEF}	0.41±0.05 ^A	103.29±1.89 ^{CD}	361.14±12.87 ^F	70.63±1.06 ^H
5	8.0(1)	3.0(-1)	67(1)	5.41±0.02 ^A	0.73±0.02 ^{DE}	97.84±0.71 ^{BC}	14.92±0.96 ^{AB}	62.50±0.43 ^{DE}
6	8.0(1)	3.0(-1)	53(-1)	14.27±0.08 ^G	0.45±0.08 ^A	90.22±7.13 ^B	426.89±14.95 ^H	58.90±0.67 ^B
7	8.0(1)	12.0(1)	67(1)	9.35±0.03 ^{CD}	0.99±0.03 ^G	114.96±8.47 ^E	31.68±4.70 ^B	56.51±0.40 ^A
8	8.0(1)	12.0(1)	53(-1)	10.22±0.07 ^{CDE}	0.77±0.07 ^{EF}	127.71±1.50 ^F	9.02±1.59 ^A	63.18±0.56 ^E
9	5.5(0)	7.5(0)	60(0)	12.13±0.01 ^{EF}	0.53±0.01 ^B	136.42±2.21 ^G	334.44±1.78 ^{DE}	61.58±0.31 ^C
10	5.5(0)	7.5(0)	60(0)	13.15±0.00 ^{FG}	0.54±0.00 ^B	141.09±1.43 ^{GH}	348.80±27.05 ^{EF}	58.05±0.14 ^B
11	5.5(0)	7.5(0)	60(0)	12.38±0.02 ^{EF}	0.44±0.02 ^A	140.93±1.62 ^{GH}	400.74±31.43 ^G	63.21±1.73 ^D
12	5.5(0)	7.5(0)	60(0)	12.45±0.01 ^{EF}	0.52±0.01 ^B	133.16±3.00 ^{FG}	317.31±11.35 ^D	65.40±0.58 ^E
13	1.3(-1,682)	7.5(0)	60(0)	8.05±0.03 ^{BC}	0.67±0.03 ^{CD}	91.78±8.22 ^B	14.55±0.84 ^{AB}	67.17±0.43 ^F
14	9.7(1,682)	7.5(0)	60(0)	9.20±0.02 ^{CD}	0.65±0.02 ^C	103.29±5.14 ^{CD}	14.36±1.46 ^{AB}	62.28±1.10 ^{DE}
15	5.5(0)	0(-1,682)	60(0)	6.75±0.06 ^{AB}	0.67±0.06 ^{CD}	146.07±7.24 ^H	53.78±2.61 ^C	57.65±0.42 ^{AB}
16	5.5(0)	15.1(1,682)	60(0)	6.40±0.02 ^{AB}	0.78±0.02 ^{EF}	158.82±3.44 ^I	25.41±1.99 ^{AB}	82.52±0.43 ^I
17	5.5(0)	7.5(0)	71.774(-1,682)	8.54±0.03 ^{BC}	0.84±0.03 ^F	112.78±3.91 ^E	12.34±0.32 ^{AB}	67.05±0.61 ^F
18	5.5(0)	7.5(0)	48.226(1,682)	9.46±0.03 ^{CD}	0.72±0.03 ^{CDE}	107.02±4.99 ^{DE}	13.63±1.39 ^{AB}	69.13±0.19 ^G

¹⁾ The number of experimental conditions by central composite design.^{A-J} Mean±SD in the same column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

배추, 참깨달지박 등을 이용한 청국장이 제조되고 있으며 (Hong JY 등 2008, Kim TS 등 2009, Kim JH 등 2012), *Bacillus subtilis*-DC-2, *Bacillus natto*와 *Bacillus licheniformis*의 혼합균주를 이용한 청국장 제조와 관련된 연구(Choi UK 등 1998, Youn KC 등 2002)가 활발히 진행되고 있다.

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과 파속에 속하는 인경작 물로 전 세계적으로 양념, 조미료, 건강기능식품 및 의약품으로 널리 이용되어 왔다. 마늘에 함유된 주요물질인 함황아미노산의 일종인 alliin은 allinase에 의해 분해되어 마늘 특유의 자극성 신미성분인 allicin을 생성하게 되고(Stoll A와 Seebeck E 1951), 이때 생성된 allicin 등의 thiosulfates 화합물이 항산화, 항암, 항혈전, 콜레스테롤 저하 등의 생리적 기능성을 가지는 것으로 알려져 있다(Nishimura H 등 1988, Kim HJ 등 2010). 그러나 마늘에 존재하는 다량의 유기 황화합물은 주요 생리활성 발현에 관여함과 동시에 강한 향과 매운 맛의 자극성으로 인하여 생으로 일정량 지속적으로 섭취하는 데는 많은 어려움이 있다.

마늘의 이러한 단점을 보완하기 위하여 열처리 및 고온숙성 방법이 활용되는데, 마늘을 열처리 할 경우 마늘 특유의 향은 감소되는 반면, 폴리페놀류의 함량은 증가하고 생마늘

보다 높은 항산화력을 가지는 것으로 보고된 바 있다(Choi YH 등 2007, Jang EK 등 2008). 또한 마늘을 15분간 가열하면 cyclooxygenase 활성(Ali M 1995)과 thromboxane B2의 합성을 억제하여 항암활성이 증가하며(Bordia T 등 1996), 고온숙성 후 S-allylcysteine의 함량이 증가되어 항산화 및 혈중 콜레스테롤을 포함한 지질 개선 효과가 더 향상되는 것으로 보고되어 있다(Shin JH 등 2011).

열처리 한 마늘은 다른 가공식품을 만들기 위한 중간소재로서의 활용도가 높아 막걸리, 조청, 대두유, 스핀지케이크 등에 다양하게 이용되며 각종 식료품에 첨가되어 그 소비가 증가되는 추세이다(Shin JH 등 2007, Kang MJ와 Shin JH 2012). Song HS 등(2008)은 마늘을 고추장에 첨가할 경우 마늘 특유의 향을 감소시켜 관능적으로 우수한 고추장을 제조할 수 있다고 하였으며, 간장 제조시 마늘의 첨가는 당과 구성 및 유리아미노산의 함량을 증가시키고 동시에 항산화활성을 향상시켜 간장의 영양 및 기능적 특성의 개선에 기여하는 바가 크다는 보고도 있다(Shin JH 등 2010).

따라서 본 연구에서는 마늘의 첨가량, 열처리 시간 및 청국장의 발효시간을 달리하여 중심합성계획에 따라 청국장을 제조하고, 품질관련 인자를 분석함으로써 마늘이 첨가된 청국

장의 최적의 발효조건을 설정하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용된 대두는 경남 함양군 함양농협에서 산지가 확인된 것을 구입하였으며, 마늘은 경남 남해군 새남해농협에서 남해산 깬마늘을 구입하여 사용하였다. 마늘은 흐르는 물에 세척한 다음 자연건조하여 물기를 제거한 후 $4 \times 4 \times 4$ mm 이내의 입자로 다져 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험계획

마늘의 첨가량은 1~10%, 마늘의 열처리시간은 0~15분, 청국장 발효는 48~72시간 범위에서 실시한 예비실험 결과에 기초하여 반응표면분석에 적합한 범위를 설정하였다. 마늘의 첨가량 및 열처리 시간과 청국장 발효시간의 최적화를 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였으며, 주요 독립변수(Xi)로 고려되는 마늘의 첨가량(X_1 , 1.3~9.7%), 마늘 열처리 시간(X_2 , 0~15.1분), 및 청국장 발효시간(X_3 , 48.2~71.8시간)에 대한 실험범위를 설정하여 각각 5단계로 부호화하였고, 18군으로 구분하였다(Table 1). 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수(Y_n)는 청국장의 점질물 생성량(Y_1), 산도(Y_2), 아미노태 질소량(Y_3), γ -GTP(Y_4) 및 ABTS 라디칼 소거능(Y_5)을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다.

2) 청국장 제조

정선된 대두를 흐르는 물에 잘 수세하여 상온에서 24시간 동안 침지시킨 후 약 30분간 물빼기를 하고 유리병에 150 g 씩 담아 고압증기살균기로 121℃에서 20분간 증자·살균하였다. 증자한 대두를 50℃로 냉각시킨 후 실험계획(Table 1)에 따라 96℃ 이상으로 가열한 찜기에서 조건별 시간만큼 가열한 다진 마늘을 비율별로 혼합하였다. 여기에 청국장으로부터 분리하여 자체 보관중인 *Bacillus* 균주 3종(*Bacillus subtilis* HCD02, *Bacillus* sp. EMD17, *Bacillus amyloliquefaciens* MJ1-4)을 혼합한 starter를 불린 콩 무게 대비 3% (v/w) 접종하여 37℃의 incubator에서 정해진 시간 동안 발효시켜 각각의 청국장을 제조하였다.

3) 점질물 생성량 측정

점질물 생성량은 Lee BY 등(1991)의 방법에 따라 청국장 시료에 동량의 증류수를 가하여 30분간 진탕한 후 여과한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 얻은 상등액 5 mL을 105℃에서 건조시켜 그 무게를 측정하여 시료에 대한 건

물량(%)으로 나타내었다.

4) 산도 측정

청국장 5 g에 증류수를 가하여 50 mL로 만든 후 30분간 교반한 다음 여과지로 여과한 여액 20 mL를 pH 8.4가 될 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 시료 100 mL에 함유되어 있는 젖산(lactic acid)함량으로 환산하여 표시하였다.

5) 아미노태 질소량 측정

아미노태 질소량은 formal 적정법(Park SK 등 2000)에 준하여 시료 5 g에 증류수를 가하여 50 mL로 정용한 다음 30분간 진탕한 후 여과지로 여과한 여액 20 mL에 0.1 N NaOH 용액을 가해 pH 8.4로 조정하여 포르말린 용액 20 mL를 가하였다. pH가 산성화 되면 다시 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4까지 적정하여 소비된 NaOH 양으로 아미노태 질소 함량을 구하였다.

6) 청국장의 생리활성 평가

생리활성 검증을 위해 청국장 5 g에 증류수를 가하여 20 mL로 만든 다음 진탕 혼합한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. γ -GTP(γ -Glutamyltranspeptidase) 활성은 조효소액을 시료로 하여 γ -GTP 측정용 kit(AM158-K, Asan Pharmaceutical)를 이용한 5-aminolicylic acid법으로 측정하였으며, 이것을 mU/mL 단위로 나타내었다.

ABTS [2,2-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonate)] 라디칼 소거활성은 Re R 등(1999)의 방법에 따라 7 mM의 ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시킨 후, 415 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정된 ABTS 용액 180 μ L에 조효소액 20 μ L를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

모든 실험은 4회 반복하여 실시하였으며 실험으로부터 얻은 결과는 SAS package 9.1을 사용하여 분석하였다. 결과치는 실험군당 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 시행하였다. 반응표면분석 실험은 중심합성계획(central composite design)에 따라 분석하였으며, 분석결과 정상점이 안정점일 경우에는 능선분석(ridge analysis)을 통하여 원래 설정된 실험영역보다 좁아진 제한된 실험영역에서 원하는 최대값 및 최소값을 구하였다.

Table 2. Polynomial equations calculated by RSM program of *Cheonggukjang* prepared with garlic

Response	Polynomial equations	R ²	Si
Viscous substance	$Y = 12.478794 + 0.729145X_1 + 0.277506X_2 - 1.194493X_3 - 1.159506X_1X_1 - 0.577500X_1X_2 - 1.884701X_2X_2 - 0.198333X_1X_3 + 0.898333X_2X_3 - 1.026956X_3X_3$	62.33%	0.0001
Acidity	$Y = 0.509114 + 0.019746X_1 + 0.034934X_2 + 0.049408X_3 + 0.045476X_1X_1 + 0.108750X_1X_2 + 0.069630X_2X_2 + 0.017083X_1X_3 + 0.037083X_2X_3 + 0.087892X_3X_3$	69.72%	0.0001
Amino type nitrogen	$Y = 138.845290 + 6.360002X_1 + 7.265210X_2 - 1.414729X_3 - 18.516012X_1X_1 + 3.926667X_1X_2 + 0.892823X_2X_2 - 0.78333X_1X_3 - 5.328333X_2X_3 - 14.144812X_3X_3$	82.02%	0.0001
γ-GTP activity	$Y = 345.085124 + 5.491551X_1 - 7.821437X_2 - 54.058926X_3 - 95.199013X_1X_1 - 92.887500X_1X_2 - 86.312870X_2X_2 - 4.765833X_1X_3 + 11.303333X_2X_3 - 95.719787X_3X_3$	69.74%	0.0001
ABTS radical scavenging activity (%)	$Y = 62.212175 - 3.253111X_1 + 3.494523X_2 + 0.299503X_3 + 0.255774X_1X_1 - 1.165417X_1X_2 + 2.150353X_2X_2 - 0.842917X_1X_3 - 1.447917X_2X_3 + 1.444599X_3X_3$	62.07%	0.0001

III. 결과 및 고찰

1. 점질물 생성량

중심합성계획에 의한 18구간의 마늘 첨가조건에 따른 청국장의 점질물 생성량을 측정된 결과는 Table 1과 같으며, Table 2에서와 같은 반응표면 회귀식을 얻었다. 점질물의 생성량은 4.85~14.27%의 범위로 마늘의 첨가량, 마늘 열처리 및 청국장 발효시간이 각각 8%, 3분, 53시간(Exp. 6)인 발효조건에서 가장 높았다. 회귀식의 유의성은 결정계수(R²)가 62.33%였으며, 분산분석 결과 유의확률이 0.0001로 모형이 적합하다고 판단할 수 있다. 반응표면의 정상점은 최대점이며, 이 때 마늘 첨가량, 마늘 열처리 및 청국장 발효시간은 각각 6.53%, 6.81분, 55.18시간이었고 이 조건에서 점질물의 최대값은 13.02%로 예상되었다(Fig. 1).

일반적인 청국장에는 2.15~6.03%의 점질물이 함유되어 있는데(Choe JS 등 1999), 청국장의 점질물은 발효과정 중 fructose와 glutamic acid가 중합된 levan form fructan과 polyglutamate의 혼합물질로 sucrose를 기질로 사용하므로(Lee YL 등 1992) sucrose의 농도가 높을수록 점질물의 생합성이 증가되는 것으로 보고되어 있다(Jo SJ 등 2008). 본 연구의 마

늘 첨가 청국장은 일반 청국장보다 점질물 함량이 더 높은 것으로 나타났는데, 이는 마늘에 716~816 mg% 정도 함유되어 있는 sucrose가(Kim MB 등 2009) 청국장 발효 중 점질물 생성의 기질로 작용하였기 때문으로 생각된다.

Jung JB 등(2012)은 청국장의 점질물은 발효가 진행됨에 따라 점차 그 양이 증가하며 48시간에 최고점에 도달하였다가 72시간에 다시 감소하는 경향이었다고 보고하였으며, Jung YJ 등(2007)은 홍삼엑기스를 첨가한 청국장은 무첨가 대조구에 비해 점질물 생성량이 더 높는데, 엑기스의 첨가량이 높을수록 더 많은 점질물을 생성한다고 보고하였다. 본 실험 결과에서도 마늘의 첨가량이 많고, 열처리 시간이 길수록 청국장의 점질물 생성량이 많으며, 발효시간이 60시간 이상일 때는 점질물의 생성량이 다소 감소하여 이상의 결과들과 동일한 경향이었다.

2. 산도

마늘의 첨가량, 열처리 시간 및 청국장 발효시간을 달리한 청국장의 산도를 측정된 결과는 Table 1과 같으며, 제조조건에 따른 산도는 0.41~0.99%의 범위였다. 반응표면분석의 R² 값은 69.72%였고, 유의확률은 0.0001 이하로 모형이 적합하였다(Table 2). 정상점은 최소점으로 실제변수인 마늘의 첨가량

Fig. 1. Response surface plot for viscous substance content of *Cheonggukjang* prepared with garlic

Fig. 2. Response surface plot for acidity of *Cheonggukjang* prepared with garlic

이 7.75%, 열처리 시간 3.42분, 청국장 발효 58.60시간에서 산도의 최적 값은 0.50%로 예측되었다(Fig 2).

Zheng Y 등(2011)은 72시간 자연 발효시킨 청국장의 산도를 측정된 결과, 0.8%로 보고하였는데, 이는 본 실험에서 71.774시간 발효시킨 청국장의 산도와 비슷한 결과였다. Jung JB 등(2012)은 발아대두 청국장의 총산은 발효 48시간까지는 변화가 없었으나 발효 72시간에서는 증가하였다고 보고하였는데, 이는 청국장이 발효됨에 따라 콩 단백질이 아미노산으로 분해되고 탈아미노화 반응으로 암모니아가 생성되어 pH는 높아지고 산도는 낮아지기 때문인 것으로 알려져 있다(Ann YG 2011). 본 실험결과, 청국장 발효시간에 따른 산도는 53시간에 0.41~0.77%, 60시간에 0.52~0.78%, 67시간에는 0.73~0.99% 범위로 발효시간이 길어질수록 산도가 증가하는 경향이었는데, 이는 상기의 연구보고들과 유사한 결과였다.

3. 아미노태 질소량

마늘을 첨가한 청국장 제조시 마늘의 첨가조건에 따른 아미노태 질소량을 측정된 결과(Table 1), 마늘 첨가량 5.5%, 열처리 시간 15분, 청국장 발효 60시간(Exp. 16)에서 158.82 mg%로 유의적으로 가장 높은 함량이었다. 반응표면 회귀식에 따른 결정계수(R^2)는 82.02%로 높게 나타났으며, 분산분석 결과 유의확률이 0.0001로 모형의 적합성이 인정되었다(Table 2). 정상점은 안장점으로 능선분석을 통해 마늘 첨가량과 열처리 시간은 높이고 청국장 발효시간은 낮추는 경우 아미노태 질소량의 최고값 156.97 mg%를 얻을 수 있었다. 이 때 마늘 첨가량 및 열처리 시간은 각각 6.21%와 14.85분이었고, 청국장 발효시간은 58.04시간 이었다.

아미노태 질소는 protease의 작용에 의해 생성된 아미노산의 함량을 나타내며 청국장의 구수한 맛을 좌우하는 요소로서 청국장의 품질을 측정하는 기준이 된다(Youn KC 등 2002). 본 실험에서 청국장에 마늘을 5.5% 첨가한 군들이 3% 첨가군들에 비해 아미노태 질소량이 높았으나 8% 첨가군들에서는 오히려 감소하였다. 이는 5~20%의 더덕을 첨가하여 청국장장을 제조하였을 때 15% 이상 첨가시는 대조군에 비해

아미노태 질소 함량이 오히려 감소하였다는 Hong SC와 Kwon DJ(2011)와 유사한 경향이었다. 썩을 첨가하여 청국장을 발효 할 때, 일정량 이상의 썩은 콩 단백질의 분해에 관여하는 *Bacillus subtilis*의 생육이나 단백질 분해효소의 생성을 억제하여 아미노태 질소 함량이 낮았다는 Joo HK(1996)의 보고도 본 실험의 결과를 뒷받침해 주고 있다.

Kim JH 등(2012)은 발효시간에 따른 청국장의 아미노태 질소 함량을 측정된 결과, 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보인다고 하였으며, Jung JB 등(2012)도 대두 발아시간에 따른 청국장의 아미노태 질소량이 비슷한 패턴으로 계속 증가한다고 하였는데, 본 실험의 결과에서는 청국장 발효 시 아미노태 질소량은 발효 60시간까지는 증가하다가 이후 다시 감소하는 경향이었다.

4. γ -GTP 활성

청국장의 생리활성 평가를 위하여 18구간의 마늘 첨가조건에 따른 청국장의 γ -GTP 활성을 측정된 결과(Table 1), 반응표면분석에 의한 회귀식의 유의성 결정계수(R^2)는 69.74%로 나타났으며, 분산분석 결과 유의확률이 0.0001로 모형이 적합하였다(Table 2). 예측된 정상점은 최대점으로 353.66 mU/mL의 최대값을 얻을 수 있었으며, 마늘 첨가량, 마늘 열처리 시간 및 청국장 발효시간이 각각 5.73%, 6.99분, 57.96시간일 때가 γ -GTP 활성이 최대화 되는 조건이었다.

청국장 특유의 점질물 생성과 관련이 있는 γ -GTP 활성 역시 청국장의 발효정도를 나타내는 지표라고 할 수 있으며, γ -GTP는 아미노산에 glutaminyll기를 결합시키는 효소로 점질물의 구성 성분인 polyglutamate를 생성한다(Im CM 등 2006).

스타터를 달리한 청국장의 γ -GTP 활성은 67~128 mU/mL 범위라고 보고되어 있는데(Zheng Y 등 2011), 콩 품종별 청국장의 γ -GTP 활성과 관련된 연구결과 점질물의 생성량이 가장 높았던 시료에서 γ -GTP의 활성도 높아 γ -GTP 활성과 점질물의 생성량이 양의 상관관계를 가지는 것으로 보고되어 있다(Yoo SM와 Chang CM 1999). 본 실험의 결과, 마늘 첨가량 및 열처리시간, 청국장 발효시간이 각각 8%, 3.0분, 53시

Fig. 3. Response surface plot for amino type nitrogen content of *Cheonggukjang* prepared with garlic Fig. 4. Response surface plot for γ -GTP activity of *Cheonggukjang* prepared with garlic Fig. 5. Response surface plot for ABTS radical scavenging activity of *Cheonggukjang* prepared with garlic

간(Exp. 6) 일 때 가장 높은 γ -GTP 활성을 나타내었으며, 이 때 점질물의 생성량도 가장 높았다. 또 타 실험군에 비해 γ -GTP 활성이 높았던 Exp. 4구간(3%, 12 min, 53 h)과 중심 범위인 Exp. 9~12구간(5.5%, 7.5 min, 60 h)에서도 점질물의 생성량이 유의적으로 높아, 점질물의 생성량이 높았던 구간에서 γ -GTP의 활성도 높다는 상기의 연구보고와 일치하는 결과였으며 점질물의 함량과 γ -GTP 활성사이에 양의 상관관계

가 성립되는 것으로 판단된다.

5. ABTS 라디칼 소거활성

청국장의 마늘 첨가조건에 따른 항산화 활성 평가를 위해 ABTS 라디칼 소거활성을 측정하였다(Table 1). 중심합성계획에 의한 18구간의 청국장에서 마늘 첨가량이 5.5%, 열처리

Table 3. Treatment conditions and maximum and minimum value of *Cheonggukjang* prepared with garlic by response surface methodology analysis

Experimental items	Predicted values	Treatment conditions			
		Content of garlic(%)	Steaming time of garlic(min)	Fermentation time(h)	
Viscous substance (%)	Max.	13,02	6,53	6,81	55,18
Acidity (%)	Min.	0,50	7,75	3,42	58,60
Amino type nitrogen (mg %)	Max.	156,97	6,21	14,85	58,04
γ -GTP activity (mU/mL)	Max.	353,66	5,73	6,99	57,96
ABTS radical scavenging activity (%)	Max.	76,43	3,78	14,28	57,99

시간 15.1분, 청국장을 60시간(Exp. 16) 발효시켰을 때 유의적으로 가장 높았으며, 다음으로 마늘 첨가량과 열처리 시간을 각각 3% 및 12분으로 설정한 구간(Exp. 3, 4)에서 높은 활성을 나타내었다. 마늘 비열처리 구간(Exp. 15)과 비교할 때, 마늘의 열처리 시간이 높을수록 라디칼 소거활성이 증가하였는데, 이는 열처리 방법을 달리한 마늘의 항산화능을 평가한 Lee YR 등(2012)의 보고에서 마늘을 steaming한 경우 처리시간이 높을수록 라디칼 소거능이 증가하였으며, 폴리페놀 함량에 의존적이라는 보고와 동일한 경향인 것으로 판단된다. 열처리한 마늘은 생마늘에 비해 총 폴리페놀 함량이 증가하는데, 이는 열처리로 인하여 마늘 내 폴리페놀의 추출이 용이해졌기 때문이라고 보고되어 있으며(Kwon OC 등 2006), Stewart AJ 등(2000)도 토마토를 열처리할 경우 조직에 결합되어 있는 결합형의 페놀화합물이 분리되어 유리형으로 전환된 페놀의 함량이 증가되는 것으로 보고하였다.

한편으로, 마늘 중의 allicin과 thiosulfinate 등은 미생물 대사와 관련된 단백질의 SH기와 반응하여 단백질의 활성을 저해함에 따라 미생물의 증식을 억제하게 되는데(Cavallito CJ 등 1994), 마늘을 가열처리할 경우 휘발성 함황화합물이 감소되고(Bae HJ와 Chun HJ 2002), 열처리한 마늘은 비열처리 마늘에 비해 *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* 등에 대한 항균활성이 감소되는 것으로 보고되어 있다(Ko MS와 Yang JB 2008). 본 연구결과에서도 마늘을 열처리함에 따라 항균활성이 감소되어 생육이 용이해진 *Bacillus subtilis*는 α - 또는 β -amylase를 생성함으로써 청국장 발효 중 대두의 전분을 분해하여 환원당으로 전환시키는 요소로 작용하는데(Lee JO 등 2005), 이때 생성된 다량의 환원당도 항산화력 증가에 기여한 것으로 추정된다.

본 실험의 반응표면분석 결과(Table 2), 회귀식 유의성은 결정계수(R^2)가 62.07%였으며 유의확률은 0.0001이었는데, 정상점은 안장점으로 능선분석을 이용하여 마늘 첨가량과 청국장 발효시간을 낮추고 마늘의 열처리 시간을 높임으로써 최고값을 예측할 수 있었다. 실제변수인 마늘의 첨가량과 열처리 시간이 각각 3.78% 및 14.28분이며 청국장 발효시간이 57.99시간 일 때 ABTS 라디칼 소거활성은 최고값인 76.43%를 얻을 수 있었다(Table 3).

마늘의 첨가량(1.3~9.7%), 마늘의 열처리 시간(0~15.1분) 및 청국장 발효시간(48.2~71.8시간)을 독립변수로 하여 청국

장의 품질특성과 관련된 5개의 인자에 대한 분석 결과(Table 3), 아미노태 질소의 함량이 가장 결정 계수가 높아 82.02%였고, 여타 항목은 62.07~69.74%의 범위였다. 분석된 5개의 항목 중 산도는 최소값을, 여타 분석항목은 최대값을 나타내었으며, 이들이 최소 또는 최대를 나타내는 조건에서의 마늘 첨가량은 3.78~7.75%이며, 마늘의 열처리 시간은 3.42~14.85분 이었고, 청국장의 발효 시간은 55.18~58.60 시간이었다.

IV. 요약

마늘을 이용한 청국장의 제조조건을 최적화 하고자 중심합성계획에 따라 마늘의 첨가량(X_1), 마늘 열처리시간(X_2) 및 청국장 발효시간(X_3)을 독립변수로 하고, 점질물 생성량(Y_1), 산도(Y_2), 아미노태 질소량(Y_3), γ -GTP(Y_4) 및 ABTS 라디칼 소거능(Y_5)을 종속변수로 하여 반응표면분석을 실시하였다. 점질물 생성량의 정상점은 최대점으로 실제변수인 마늘의 첨가량이 6.53%, 열처리 시간 6.81분, 청국장 발효시간 55.18시간에서 13.02%의 최적 값을 보였다. 산도는 청국장의 발효시간이 길어질수록 증가하였으며, 최소값인 0.50%를 나타내는 마늘 첨가량의 실제변수는 7.75%, 열처리 시간은 3.42분, 청국장 발효는 58.60시간이었다. 아미노태 질소 함량은 80.58~158.82 mg% 범위였는데 정상점은 안장점으로 능선분석을 통해 얻어진 아미노태 질소의 최고값은 156.97 mg%였다. 이 때 마늘 첨가량 및 열처리 시간은 각각 6.21% 및 14.85분, 청국장 발효시간은 58.04시간이었다. γ -GTP 활성은 353.66 mU/mL의 최대값을 가질 때, 마늘 첨가량, 마늘 열처리 시간 및 청국장 발효시간이 각각 5.73%, 6.99분, 57.96시간 이었다. ABTS 라디칼 소거능은 마늘 첨가량과 청국장 발효시간을 낮추고 마늘의 열처리 시간을 높이는 경우 76.43%의 최고값 얻을 수 있었는데, 이에 따른 실제변수의 마늘의 첨가량과 열처리시간은 각각 3.78% 및 14.28분과 청국장 발효시간은 57.99 시간이었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 마늘이 첨가된 청국장 제조를 위해 마늘은 불린 콩 무게 대비 3.78~7.75%로 첨가되되 3.42~14.85분의 범위에서 스팀가열한 후 사용하며, 55~59시간 정도 발효시키는 것이 적합하였다.

V. 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치 식품개발사업(과제 번호 : 112066031)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ali M. 1995. Mechanism by which garlic (*Allium sativum*) inhibits cyclooxygenase activity. Effect of raw versus boiled garlic extract on the synthesis of prostanoids. Prostag Leukotr Ess 53: 397-400
- Ann YG. 2011. Changes in components and peptides during fermentation of *chunggukjang*. Korean J Food Nutr 24: 124-131
- Bordia T, Mohammed N, Thomson M, Ali M. 1996. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. Prostag Leukotr Ess 54: 183-186
- Bae HJ, Chun HJ. 2002. Changes in volatile sulfur compounds of garlic under various cooking condition. Korean J Soc Food Cookery Sci 18: 365-371
- Choi UK, Ji WD, Chung YG. 1998. Characteristics of *chunggugjang* produced by *Bacillus subtilis* DC-2. J Korean Soc Food Sci Nutr 27: 846-851
- Choi YH, Shim YS, Kim CT, Lee C, Shin DB. 2007. Characteristics of thiosulfinates and volatile sulfur compounds from blanched garlic reacted with allinase. Korean J Food Sci Technol 39: 600-607
- Choe JS, Yoo SM, Kim HI, Kim JS, Chang CM. 1999. Volatile compounds of chungkookjang prepared by different fermentation methods and soybean cultivars. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 42: 111-115
- Cavallito CJ, Buck JS, Suter CM. 1944. Allicin the antibacterial principle of *Allium sativum*: 1. Determination of the chemical structure. J Am Chem Soc 66: 1952-1954
- Hong JY, Kim EJ, Shin SR, Kim TW, Lee IJ. 2008. Physicochemical properties of Chungkookjang containing Korean red ginseng and *rubus coreanus*. Korean J Food Preserv 15: 872-877
- Hong SC and Kwon DJ. 2011. Changes in quality characteristics of Chungkookjang added with Deodeok. Korean J Food Preserv 18: 171-177
- Im CM, Kwon SH, Bae MS, Jung KO, Moon SH, Park KY. 2006. Characteristics and increased antimutagenic effect of black soybean (var. Seoritae) chungkukjang. Cancer Prev Res 11: 218-224
- Jang EK, Seo JH, Lee SP. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. Korean J Food Sci Technol 40: 443-448
- Jung JB, Choi SK, Jeong DY, Kim YS, Kim SY. 2012. Effects of germination time of soybeans on quality characteristics of *Cheonggukjang* fermented with an isolated bacterial strain. Korean J Food Sci Technol 44: 69-75
- Jung YJ, Woo SM, Kwon JH, Choi MS, Seong JH, Lee JW. 2007. Quality characteristics of red ginseng *Cheonggukjang* according to addition methods of red ginseng. J Korean Soc Food Sci Nutr 36: 889-895
- Jo SJ, Oh SM, Jang EK, Jang EK, Hwang Ki, Lee SP. 2008. Physicochemical properties of carrot juice fermented by *Leuconostoc mesenteroides* SM. J Korean Soc Food Sci Nutr 37: 210-216
- Joo HK. 1996. Studies on chemical composition of commercial Chungkookjang and flavor compounds of Chungkookjang by mugwort (*Artemisia asiatica*) or red paper seed oil. Korean Soybean Digest 13: 44-56
- Kim MB, Oh YJ, Lim SM. 2009. Physicochemical characteristic of garlic from daejeong jeju and major cultivation area in Korea. The Korean Journal of Culinary research 15: 59-66
- Kim JH, Park LY, Lee SH. 2012. Fermentation and quality characteristics of *Cheonggukjang* with Chinese cabbage. Korean J Food Preserv 19(5): 659-664
- Kim TS, Choi MK, Kim JS, Han JW, Kang MH. 2009. Screening of lignan compounds and antioxidant activity of *Chungkukjang* fermented with defatted sesame flour. J Korean Soc Food Sci Nutr 38: 1580-1586
- Kim HJ, Han CH, Kim NY, Lee EK, Lee KN, Cho HE, Choi YH, Chong MS. 2010. Effect of garlic extracts with extraction conditions on antioxidant and anticancer activity. Korean J Oriental Physiology & Pathology 24: 111-117
- Kang MJ and Shin JH. 2012. Quality characteristics of jochung containing various level of steamed garlic powder. Korean J Food Cookery Sci 28: 865-870
- Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2006. Physicochemical characteristic of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. Korean J Food Sci Technol 38: 331-336
- Lee BY, Kim DM, Kim KH. 1991. Physico chemical properties of viscous substance extracted from *Chungkook-jang*. Korean J Food Sci Technol 23: 599-604

- Lee YL, Kim SH, Jung NH, Lim MH. 1992. A study on the production of viscous substance during the chugkookjang fermentation. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 35: 202-209
- Lee YR, Woo KS, Hwang IG, Kim HY, Lee SH, Lee JS, Jeong HS. 2012. Physicochemical properties and antioxidant activities of garlic (*Allium sativum* L.) with different heat and pressure treatments. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 278-282
- Lee JO, Ha SD, Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Park SH. 2005. Industrial application and physiological functions of *Chongkukjang*. Food Sci Ind 38: 69-78
- Min HK, Kim HJ, Chang HC. 2008. Growth-inhibitory effect of the extract of porphyran-chungkookjang on cancer cell. J Korean Soc Food Sci Nutr 37: 826-833
- Nishimura H, Hanny W, Mizutani J. 1988. Volatile flavor components and antithrombotic agent: vinylthiins from *Allium victorialis*. J Agric Food Chem 36: 563-569
- Park MK. 2011. Effect of enzymatic hydrolysis by proteases on antioxidant activity of chungkukjang. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 327-333
- Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assays. Free Radic Biol Med 26: 1231-1237
- Song JER, You HJ, Hwang JS, Lee DS, Kim HB. 2004. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from chungkookjang. Korean J Microbiol 40: 355-358
- Stoll A and Seebeck E. 1951. Chemical investigation on alliin, the specific principle of garlic. Advan Enzymol 11: 377-400
- Shin JH, Kang MJ, Kim RJ, Ryu JH, Kim MJ, Lee SJ, Sung NJ. 2011. Biological activity of browning compounds from processed garlics separated by dialysis membrane. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 357-365
- Shin JH, Choi DJ, Kwen OC. 2007. The quality characteristics of sponge cake with added steamed garlic powder. Korean J Food Cookery Sci. 23: 696-702
- Song HS, Kim YM, Lee KT. 2008. Antioxidant and anticancer activities of traditional *Kochujang* added with garlic porridge. J Life Sci 18: 1140-1146
- Shin JH, Kang MJ, Yang SM, Lee SJ, Ryu JH, Kim RJ, sung NJ. 2010. Comparison of physicochemical properties and antioxidant activities of Korean traditional *kanjang* and garlic added *kanjang*. J Agric Life Sci 44: 39-48
- Stewart AJ, Bozonnet S, Mullen W, Jenkins GI, Michael EJ, Groaier A. 2000. Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. J Agric Food Chem 48: 2663-2669
- Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. 2002. Quality characteristics of the chungkookjang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. J Korean Soc Food Sci Nutr 31: 204-210
- Yoo SM and Chang CM. 1999. Study on the processing adaptability of soybean cultivars for korean traditional Chungkookjang preparation. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 42: 91-98
- Zheng Yanfei, Jeong JK, Choi HS, Park KY. 2011. Increased quality characteristics and physiological effects of *Chungkukjang* fermented with *Bacillus subtilis*-SKm. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 1694-1699

2013년 6월 13일 접수; 2013년 6월 21일 심사(수정); 2013년 10월 21일 채택