

***Bacillus* sp. SP-KSW3를 이용하여 제조한 된장 발효 과정중의 효소 활성 및 기능성의 변화**

김병수¹ · 이창호¹ · 홍영아² · 우철주² · 장철민 · 김영배³ · 박희동^{2*}

안동대학교 식품생명공학과, ¹(재)경북바이오산업연구원, ²경북대학교 식품공학과, ³니껴바이오

Changes of Enzyme Activity and Physiological Functionality of Traditional *Doenjang* during Fermentation Using *Bacillus* sp. SP-KSW3

Byoung-Soo Kim, Chang-Ho Rhee¹, Young-Ah Hong², Cheol-Joo Woo², Cheol-Min Jang,
Young-Bae Kim³ and Heui-Dong Park^{2*}

School of Food Sciences & Biotechnology, Andong National University, Andong 760-749, Korea

¹Gyeongbuk Institute for Bio Industry, Andong 760-380, Korea

²Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³Nikkuyuhbio, Andong, 760-863, Korea

Abstract

Bacillus sp. SP-KSW3 is an auxotroph bacteria that is being used for starter in fermentation. Physico-chemical characteristics, enzyme activities, ACE inhibitor and antimutagenicity in fermented soybean inoculated with *Bacillus* sp. SP-KSW3 starter was investigated for the ripening duration of fermentation. Tyrosinase and ACE showed 10% higher activity degree on test field than control. For antimutagenicity using *S. enterica* serovar Typhimurium TA100 against MNNG and NPD showed 86.24% and 75.63%. Similarly, *S. enterica* serovar Typhimurium TA98 was used against NPD and NQO showed 60.28% and 50.92%, respectively. Hydrogen donating ability increased compared to the control having 81.7% and 80.1%, respectively. Daidzin of isoflavone in fermented soybean showed higher concentration in control than in the test field. Genistein from two years of ripening test field contained 11.67 mg/kg compared to the test field. The initial test field for daidzin contained 389.96 mg/kg which increased to 453.67 mg/kg after two years and the initial genistein contained 402.68 mg/kg which also increased to 556.86 mg/kg.

Key words : *Bacillus* sp. SP-KSW3, enzyme activities, antimutagenicity, isoflavone

서 론

우리의 전통된장은 청국장과 간장과 같이 대두를 이용하여 발효된 식품으로 고유한 풍미를 지니고 있으며, 영양적으로 우수한 단백질 공급원으로서 저장성이 매우 우수하다(1). 특히 최근 된장이 활성산소에 의한 세포나 유전자의 파괴와 변형을 방지하여 노화 억제 효과가 있고 발효 중 생성되는 리놀렌산과 펩타이드들이 각각 항암성과 항고혈

압성을 나타내는 것으로 알려지면서 그 수요가 점점 증가하고 있는 추세이다(2). 재래식 된장은 최근 전통적인 맛과 향을 지닌 대두 발효식품(3)에서 탄수화물을 부원료로 첨가하여 제조되는 개량식 된장으로 바꾸어 보급되고 있으며 한국식과 일본식의 혼합형의 제조 방법 등이 연구되고 있다(4).

된장도 콩을 이용한 발효 식품이므로 콩이 가지고 있는 생리 활성이 된장에도 존재하고 있으므로 최근 된장의 기능성에 관한 연구가 점차 증가하고 있는 추세이다. 대표적인 식물자원인 대두를 발효하여 만든 된장의 경우 ACE 저해 효과를 비롯한 다양한 생리 활성 기능이 밝혀지면서(5) 우리나라의 전통 된장에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

*Corresponding author. E-mail : hpark@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-5774, FAX : 82-53-950-6772

된장의 기능성에 관한 연구로는 항돌연변이(2,3,6), 항암(1,7) 및 혈전 용해능이 보고되고 있으며, 또한 면역증진(10), 혈압강하(11,12), 고지혈증과 당뇨 개선(13), 아질산염 소거능(14) 및 항산화능(15,16)을 가지는 생체 조절 기능의 성분이 밝혀지고 있다.

장류의 기능성은 아직 생식 기작과 생리적 효과가 규명되지 않았지만 주로 메주 제조와 된장 발효에 관여하는 미생물, 원료 대두 및 발효에 관여하는 미생물이 생산하는 2차 대사산물에 의한 것으로 알려져 있으며(17), 지금까지의 된장에 관한 연구로는 된장 발효에 관여하는 미생물을 이용한 단백질 분해력, 당화력, 향기 생성능력 및 일반화합성분의 변화에 관한 연구(18-20) 및 제조 방법을 다르게 하여 된장을 제조한 후, 일정 기간 숙성시키면서 각각의 품질의 변화를 측정한 연구 결과가 있다(3,4,21). 또한 최근에는 된장의 분말화, 저염 장류의 제조와 안전성, 영양가와 기능성의 강화(3,4), 및 각종 첨가물을 첨가하여 발효시킨 된장의 생리활성 기능에 관한 연구(3,4,21,22)가 진행되고 있으나, 메주를 제조할 때 자연적인 방법으로 발효시키지 않고 미생물 starter를 접종하여 메주를 제조하고 이를 이용하여 담금한 된장의 생리기능성에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 청국장 제조할 때 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 메주 starter로 접종하여 발효시킨 메주를 이용하여 된장을 담근 후 일정기간 숙성시킨 다음 생리 활성 기능성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 사용 균주

본 실험의 재료인 대두는 경북 안동시 서후면에서 2005년도와 2006년도에 생산된 백태를 사용하였으며, 식염은 순도 98%인 정제염을 사용하였다. 대조구로서는 2005년도에 생산된 백태를 사용하여 경북 안동시 남선면 일반가정에서 전통적인 방법으로 제조한 메주를 사용하여 담금을 한 된장을 사용하였다. 메주 제조시에 사용한 청국장 균주는 안동대학교 생약자원학과 응용미생물연구실에서 분리하여 보관중인 *Bacillus* sp. SP-KSW3를 사용하였다.

메주 및 된장의 제조

메주의 제조는 원료 대두를 증자한 후 냉각한 다음 청국장 발효 균주인 *Bacillus* sp. SP-KSW3를 LB 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)를 사용하여 37°C, 200 rpm 에서 24 hr 배양한 다음 원료 대두 20 kg당 종 배양액을 0.5%(v/w) 접종하여 메주를 제조하였으며, 된장의 제조는 메주 17 kg, 물 40 L와 정제염 10 kg을 혼합하여 숙성시켰다.

이화학적 성분의 분석

된장 발효 과정중의 이화학적 성분의 분석으로 pH는

pHmeter(Mettler Toledo Co., Model 340, Switzerland) 측정하였으며 산도와 아미노산도는 중화 적정법에 준하여 측정하였다. NaCl 농도는 Mohr법(23), 환원당 측정은 DNS(dinitrosalicylic acid)법(24)으로 측정하였으며, 총당은 Phenol-H₂SO₄법(25)으로 측정하였다.

조효소액의 조제

된장 시료 10 g에 증류수를 첨가하여 200 mL로 정용한 후, 30°C의 진탕항온수조에서 4 시간 동안 추출하여 4°C에서 2 시간 방치한 다음 12,000 x g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성의 측정

Amylase활성은 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 용해한 soluble starch 0.5 mL에 0.4 mL의 sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)을 첨가하여 30°C에서 5분간 방치한 다음, 여기에 조효소액 0.1 mL을 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 이 때 생성된 환원당의 함량은 DNS법(24)으로 측정하였으며, 활성의 단위는 상기의 반응조건에서 1분당 생성하는 1 μmol의 환원당을 1 unit로 하였으며, 생성된 환원당의 양을 glucose의 양(g)으로 환산하여 표시하였다.

Protease활성은 조효소액 1.0 mL에 50 mM NaOH-borate 완충용액(pH 10.0)에 용해한 0.6% casein 5 mL을 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후, 0.4M TCA (trichloroacetic acid) 용액을 5 mL 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 37°C에서 20분간 방치시킨 후 여과하여 사용하였다. 반응산물의 양은 Hull의 방법(26)을 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 활성의 단위는 상기의 반응조건에서 1분당 생성하는 1 μg의 tyrosine을 1 unit로 하였으며, 생성된 반응산물의 양을 tyrosine의 양(μg/mL)으로 환산하여 나타내었다.

Tyrosinase 활성 저해능 측정

Tyrosinase 활성 저해능 측정(27)은 475 nm에서 단위 시간당 변화된 초기 흡광도의 변화값(S_{Abs})과 효소액 대신에 증류수를 0.1 mL를 첨가하여 흡광도를 측정한 값(B_{Abs}), 시료 용액 대신에 증류수를 0.5 mL 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 값(C_{Abs})을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibitory effect(\%)} = 1 - \left[\frac{S_{Abs} - B_{Abs}}{C_{Abs}} \right] \times 100$$

Angiotensin converting enzyme 저해 활성 측정

시료의 조제는 된장 시료 20 g에 증류수를 20 mL를 첨가하여 95°C 항온수조에서 20분간 방치한 후, 증류수를 20 mL를 첨가하여 10,000 × g에서 20 분간 원심 분리하여 얻은 상정액을 시료로 사용하였다. ACE 저해 활성의 측정

은 Cushman과 Cheung의 방법(28)에 준하여 실시하였다. 시료 50 µg에 기질 50 µL를 첨가한 후, 37°C에서 5 분간 방치하였다. 여기에 ACE 용액을 50 µL를 첨가하고 다시 37°C에서 1 시간 반응시킨 후, 1 N HCl 용액 250 µL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 다시 여기에 ethyl acetate 1.5 µL를 가하여 15 초간 균질화한 후, 5,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 1 µL를 취하였다. 이 상정액을 80°C에서 1시간 가열하여 완전히 건조시킨 후, 1 M NaCl 용액을 3 mL를 첨가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{ACE inhibitory effect(\%)} = [(B-A)/(B-C)] \times 100$$

A : 시료 첨가 시 흡광도

B : 시료 대신 증류수 첨가 시 흡광도

C : 반응 정지 후 시료 첨가 시 흡광도

항돌연변이 활성 측정

된장 시료 20 g에 증류수 100 mL를 첨가하여 균질화한 후, 80°C 항온수조에서 3 시간 열수 추출한 다음 원심분리하여 상정액을 건조시킨 후, 증류수를 첨가하여 시료로 사용하였다. 시료의 돌연변이 및 항돌연변이 활성 측정은 Ames test를 개량한 preincubation method(29-31)에 따라 히스티딘 영양 요구주로서 point mutant인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA100(hisG46, rfa, ΔuvrB)과 frame shift mutant인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 (hisD3052, rfa, ΔuvrB)을 사용하여 시료에 의한 His⁺복귀 돌연변이 정도를 조사하였다. 변이원으로는 *S. enterica* serovar Typhimurium TA100인 경우에는 MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)와 NPD(4-nitro-O-phenyl-enediamine)를 plate당 각각 5 µg, 15 µg되게 사용하였으며, *S. enterica* serovar Typhimurium TA98인 경우에는 NPD와 NQO (4-nitroquinoline-1-oxide)를 각각 2.5 µg, 0.25 µg되게 사용하였다. 항돌연변이 활성은 minimal glucose agar상에서 생육하는 His⁺복귀 돌연변이 콜로니를 계수하고 다음 식으로 환산하여 His⁺복귀 돌연변이 저해율(inhibition ratio)로서 나타내었다.

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = 100 \times [(a-b) / (a-c)]$$

a : 변이원에 의해 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수

b : 변이원과 시료를 처리할 때 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수

c : 변이원과 시료를 처리하지 않았을 때 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수

시료의 돌연변이원성 조사를 위하여 변이원을 첨가하지 않고 시료만을 첨가하여 상기의 항돌연변이 활성 실험과 동일한 방법으로 행하였다. 돌연변이 활성은 시료에 의한

His⁺복귀 돌연변이율로서 무처리 시 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수에 대한 시료 처리 시 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수의 %로 나타내었다. 돌연변이 및 항돌연변이 활성 조사는 3구 3회 반복으로 실험하여 평균값으로 나타내었다.

수소 공여능 측정

수소 공여능의 측정은 α,α-diphenyl-β-picrylhydrazine (DPPH)의 환원성을 이용하여 516 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉 각 추출물 0.1mL와 대조구로 사용한 0.15 BHT 1 mL에 4×10⁴ M DPPH 용액 3 mL를 각각 첨가하여 혼합한 후 증류수에 대한 흡광도를 측정하고, 대조구에 시료 대신에 에탄올 1 mL를 첨가하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로 나타내었다(32).

$$\text{수소공여능} = [1 - (\text{시료의 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도})] \times 100$$

Isoflavone 함량 분석

된장 시료를 80°C에서 2일간 건조하여 분쇄기로 분쇄한 후, 분쇄한 된장 시료 10 g에 100% 메탄올 50 mL를 첨가하여 80°C에서 3 시간 동안 환류 추출한 다음 추출액을 0.45 µm filter로 여과하여 HPLC로 genistin, daidzin, genistein 및 daidzein을 정량하였다(33). HPLC 분석을 위한 column은 RP C18(4.6×250 mm, Waters Co., USA)을 사용하였으며, 이동상은 0.55% acetic acid를 함유한 H₂O와 0.11% acetic acid를 함유한 acetonitrile(이때 acetonitrile은 35 분 동안 5%에서 100%까지 증가하도록 농도구배를 줌)이다. Flow rate는 0.8 mL/min로 조절하였으며 UV detector를 사용하여 254 nm에서 검출하였다.

결과 및 고찰

이화학적 성분의 분석

청국장 균주인 *Bacillus sp. SP-KSW3*를 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 숙성기간에 따라 시료를 채취하여 이화학적 성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 된장의 pH와 총산은 숙성에 관여하는 미생물의 발효 대사와 밀접한 관련이 있어 발효의 한 지표로 사용된다(21). pH는 메주의 제조 방법의 차이와 숙성기간에 따라 청국장 균주를 이용하여 제조한 된장의 pH가 대조구보다 낮게 나타났다. 총산의 경우는 제조방법의 차이 없이 비슷한 경향을 나타내었으며, NaCl의 함량은 숙성기간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었다. 된장의 숙성기간이 길어질수록 NaCl의 함량이 높게 나타난 이유는 숙성기간이 길어질수록 환경에 의한 수분의 소실이 원인인 것으로 추측된다. 아미노산도의 경우는 청국장 균주를 이

용하여 된장을 제조한 경우가 대조구보다 높게 나타났는데 이러한 경향은 메주 제조시 곰팡이에 의한 대두 단백질의 분해보다는 청국장 균주를 starter로 접종한 경우가 대두 단백질의 분해가 재래식 된장 발효보다 용이하게 일어난 결과로 사료된다(21). 환원당 함량과 총당의 함량은 숙성 기간이 짧을수록 높게 나타났으며, 동일한 기간 숙성시 청국장 균주를 이용하여 된장을 제조한 경우가 대조구보다 함량이 낮게 나타났는데 이는 숙성이 진행됨에 따라 당이 숙성에 관여하는 미생물의 영양원과 각종 발효의 기질로 이용되었기 때문에 당 함량이 감소된 것으로 추측된다.

Table 1. Proximate analysis of physicochemical properties of Doenjang at room temperature during maturation period

Type of Doenjang ¹⁾	pH	Acidity (%) ²⁾	NaCl (%) ²⁾	Amino acidity ²⁾	Reducing sugar(mg/mL) ²⁾	Total sugar (mg/mL) ²⁾
Control	6.64	0.06	14.7	5.50	0.823	1.165
Type I	5.61	0.06	14.8	7.50	0.728	1.097
Type II	5.12	0.08	12.5	6.15	1.102	1.792

¹⁾Control is Doenjang matured 2 years, Type I is Doenjang matured fermented 2 years with *Bacillus* sp. SP-KSW3, Type II is Doenjang fermented 1 year with *Bacillus* sp. SP-KSW3.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate.

효소활성의 변화

된장 발효에 있어서 amylase의 경우 총당과 환원당의 변화에 영향을 미치며 protease는 된장 발효시 단백질 분해 특유의 구수한 맛 성분을 유리하고 이들의 숙성도를 나타내는 유리 아미노산 함량에 많은 영향을 준다. Amylase와 protease 활성은 Table 2와 같다. 청국장 균주를 이용하여 제조한 된장과 대조구를 2년간 숙성시킨 경우의 amylase와 protease의 활성은 대조구의 경우 각각 1.07 unit/mL과 1.65 unit/mL이었으며, 청국장 균주를 이용한 경우의 0.99 unit/mL과 1.59 unit/mL과 비슷한 경향을 나타내었으나 청국장을 이용하여 1년간 숙성시킨 된장의 경우 amylase와 protease의 활성이 각각 1.32 unit/mL과 1.87 unit/mL로 나타났다. 이러한 결과는 Jang 등(4)이 보고한 된장 숙성 중 발효 시간에 따른 amylase와 protease의 활성보다 낮게 나타났는데 그 이유는 된장 숙성시간이 길어짐으로써 대두 단백질이 완전히 분해되어 효소활성이 소실된 것으로 추측된다.

Table 2. Amylase and protease activity of Doenjang at room temperature during maturation period

Type of Doenjang ¹⁾	Amylase activity(U/mL) ²⁾	Protease activity(U/mL) ²⁾
Control	1.07	1.65
Type I	0.99	1.59
Type II	1.32	1.87

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate.

Tyrosinase활성 저해능과 Angiotensin converting enzyme 저해 활성 변화

Tyrosinase는 동, 식물 및 곰팡이 등에 널리 존재하는 검정색 색소인 멜라닌의 합성에 가장 중요한 효소로서 tyrosine으로부터 quinone이 생성된 후에 아미노산 또는 단백질과의 중합 반응에 의해 melanin이 합성(34,35)되어 사람의 피부에 비정상적으로 생성되어 나타나는 원인물질이다. 청국장 균주인 *Bacillus* sp. SP-KSW3를 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 숙성기간에 따른 tyrosinase의 활성을 측정된 결과는 Table 3과 같이 숙성기간이 동일한 경우에는 *Bacillus* sp. SP-KSW3를 starter로 접종하여 제조한 된장이 대조구보다 약 10%이상 높게 나타났으며, 동일한 시료인 경우 숙성시간이 길어질수록 높게 나타났다. tyrosinase 저해제로 여러 가지가 사용되고 있으나(36-39), 안전성과 경제성 등의 문제점을 고려하여 볼 때 tyrosinase활성이 존재하는 된장을 섭취함으로써 자연스럽게 활성을 저해할 수 있으리라 사료된다. 안지오텐신전환효소(angiotensin converting enzyme) 활성 저해효과를 조사한 결과, Table 3과 같이 tyrosinase와 마찬가지로 *Bacillus* sp. SP-KSW3를 starter로 접종하여 제조한 된장이 대조구보다 약 10%이상 높게 나타났으며, 동일한 시료인 경우 숙성시간이 길어질수록 높게 나타났다. 최근 우리나라에서도 식품으로부터 항고혈압에 관한 생리 활성을 나타내는 기능성 성분들에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데 (11,40)이들의 활성 저해는 혈압강화제와 비교하였을 때 낮은 활성을 나타내지만 항상 섭취하는 식품 중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대되어 진다.

Table 3. Tyrosinase inhibitor and ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitor of Doenjang at room temperature during maturation period

Type of Doenjang ¹⁾	Tyrosinase inhibitor (%) ²⁾	ACE inhibitor (%) ²⁾
Control	30.17	41.78
Type I	40.81	53.27
Type II	23.94	38.14

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate. Significantly different from the control at the P<0.05 level.

항돌연변이 활성(antimutagenicity activity) 변화

전통 발효 식품인 된장이 항돌연변이 활성을 가지고 있다고 알려져 있다(3,4)고 확인되었기에 된장 제조시 청국장 발효 균주인 *Bacillus* sp. SP-KSW3를 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 항돌연변이 활성을 측정하기 위하여 된장을 물로 추출하여 *S. enterica* serovar Typhimurium TA100과 TA98을 사용하여 직접변이 원인 MNNG, NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성을 조사한 결과(Table 4), 2년간 숙성시킨 된장의 경우 *S. enterica*

serovar Typhimurium TA100에 대하여 변이원 MNNG와 NPD에 대한 물 추출물의 항돌연변이 활성은 각각 86.324%와 75.63%도 대조구에 비해 활성이 높게 나타났으나, 1년간 숙성시킨 경우는 대조구와 비슷한 경향을 나타내었다. S. enterica serovar Typhimurium TA98에 대하여 변이원 NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성은 S. enterica serovar Typhimurium TA100과 마찬가지로 비슷한 경향을 나타내었다. 된장의 물 추출물은 돌연변이원의 종류와 사용균주에 따라 항돌연변이 활성에 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 돌연변이원의 종류에 따라 작용기작이 다르므로 항돌연변이 활성도 변이원에 따라 서로 다른 경향을 보이는 것으로 추정되며 사용한 균주의 유전자형 또한 항돌연변이 활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 4. Antimutagenicity activity of Deonjang at room temperature during maturation period

Type of Deonjang ¹⁾	TA100 ²⁾		TA98 ²⁾	
	MNNG	NPD	NQO	NPD
Control	74.58	63.27	51.33	40.87
Type I	86.24	75.63	60.28	50.92
Type II	73.49	61.92	50.27	40.01

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate. Significantly different from the control at the P<0.05 level.

수소 공여능 측정

항산화 활성을 나타내는 수소 공여능은 노화 억제에 관련된 중요한 생리기능으로서 된장 제조시 청국장 발효 균주인 Bacillus sp. SP-KSW3를 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 수소 공여능을 측정된 결과 (Table 5), 숙성 기간에 관계없이 대조구 보다 청국장 발효 균주인 Bacillus sp. SP-KSW3를 starter로 접종하여 제조한 된장의 수소공여능 활성이 높게 나타났다.

Table 5. Hydrogen-donating activity of Deonjang at room temperature during maturation period

Type of Deonjang ¹⁾	Hydrogen - donating activity (%) ²⁾
Control	75.7
Type I	80.0
Type II	81.7

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate. Significantly different from the control at the P<0.05 level.

Isolflavone 함량 분석

전통 발효식품인 된장 또한 대두를 이용하여 생산하는 제품이기 때문에 발효 숙성시킨 된장의 isolflavone의 함량을 측정된 결과(Table 6), glucoside의 일종인 daidzin은 대조

구가 높게 나타났으나, genistin의 경우 대조구는 검출되지 않았으나 Bacillus sp. SP-KSW3를 starter로 접종하여 제조한 된장은 숙성기간 2년일 때 11.67 mg/kg로 나타났다. Aglycone의 일종인 daidzein과 genistein의 함량은 실험구가 대조구보다 많은 함량을 나타내었으며 숙성기간이 길어질수록 증가하였다. Daidzein의 함량은 각각 453.67 mg/kg과 389.96 mg/kg, genistein의 경우 각각 556.86 mg/kg과 402.68 mg/kg으로 나타났다. 대두의 여러 가지 생리활성물질 중 isolflavone류는 lignin류와 함께 식물에서 발견되는 phytoestrogen으로 본래 estrogen과 유사한 생리활성을 갖거나 장내 균총에 의해 활성화되는 phytochemical이다. 이러한 isolflavone류 중에서 생리활성의 기초를 이루는 화합물은 주로 genistein, daidzein과 같은 isolflavones aglycone류로 알려져 있다(41,42). 대두에는 isolflavone류가 건조중량 당 약 1.5~2.5% 정도 함유되어 있으며 이들 중 isolflavone glycoside의 일종인 daidzin, genistin이 전체 isolflavonoid의 60~70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있는 것으로 알려져 있다(43). 이에 비하여 glycoside보다 생리활성이 다양하고 높은 기능성을 갖는 aglycone 형태의 화합물, 즉 daidzein, genistein 함량은 각각의 배당체의 약 10~30분의 1에 불과한 것으로 알려져 있다(43). 생체 이용률에 있어서는 aglycone인 genistein을 섭취한 경우와 배당체인 genistin을 섭취한 경우에 이들의 체내 대사는 약간 차이가 있는데, 실험동물과 인체실험에서 공히 genistein이 더 빨리 흡수되는 현상을 보여 aglycone이 생체 이용률이 우수함이 알려져 있다 (44,45).

Table 6. Content of isolflavone in Deonjang at room temperature during maturation period

Type of Deonjang ¹⁾	Glucoside (mg/kg)		Aglycone (mg/kg)	
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
Control	87.66	ND	185.46	79.68
Type I	52.06	11.67	453.67	556.86
Type II	69.74	2.96	389.96	402.68

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

요 약

청국장 제조시 사용되는 균주인 Bacillus sp. SP-KSW3을 메주 제조시 starter로 접종하여 발효시킨 메주를 이용하여 된장을 담근 후 일정기간 숙성시킨 다음 된장의 이화학적 성질 등의 변화를 측정하였다. NaCl의 함량은 숙성 숙성기간이 길어질수록 증가하였으며, 아미노산도는 대조구보다 실험구가 높게 나타났다. Amylase와 protease의 활성은 모두 대조구와 실험구가 비슷한 경향을 나타내었으며, Tyrosinase의 저해 활성과 ACE 저해 활성은 숙성기간이

동일한 경우 대조구 보다 실험구가 약 10% 이상 높은 활성을 나타내었다. 항돌연변이 활성은 2년간 숙성시킨 경우에 실험구가 대조구 보다 높은 활성을 나타내었으며, *S. enterica* serovar Typhimurium TA100을 사용한 경우 변이원 MNNG와 NPD에 대한 항돌연변이 활성은 각각 86.24%와 75.63%를 나타내었다. 또한, *S. enterica* serovar Typhimurium TA98을 사용한 경우 변이원 NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성은 각각 60.28%와 50.92%를 나타내었다. 수소 공여 능은 숙성기간에 관계없이 대조구보다 실험구가 각각 80.0%와 81.7%로 높게 나타났다. 된장의 isoflavon 중 daidzin은 대조구가 높게 나타났으며 genistin은 실험구를 2년간 숙성시킨 경우 11.67 mg/kg, daidzein은 실험구가 각각 389.96 mg/kg와 453.67 mg/kg, genistein은 각각 402.68 mg/kg와 556.86 mg/kg으로 나타났다.

참고문헌

1. Kwon, S.H. and Shon, M.Y. (2004) Antioxidant and Anticarcinogenic effects of traditional *Doenjang* during maturation periods. *Kor. J. Food Preservation*, 11, 461-467
2. Lee, D.H., Kim, J.H., Yoon, B.H., Lee, G.S., Choi, S.Y. and Lee, J.S. (2003) Changes of physiological functions during the fermentation of medicinal herbs *Doenjang*. *Kor. J. Food Preservation*, 10, 213-218
3. Rhee, C.H., Lee, J.B. and Jang, S.M. (2000) Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the traditional *Doenjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 43, 277-284
4. Jang, S.M., Lee, J.B., An, H., Rhee, C.H. and Park, H.D. (2000) Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the korean soybean paste with various concentrations of *Ginseng* extract during fermentation. *Kor. J. Postharvest Sci. Technol.*, 7, 313-320
5. Kim, S.H., Lee, Y.J. and Kwon, D.Y. (1999) Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Doenjang*. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 31, 848-854
6. Park KY, Moon SH, Baik HS, Cheigh HS. (1990) Antimutagenic effect of Doenjang(Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 19, 156-162
7. Cui, C.B., Lee, E.Y., Lee, D.S. and Ham, S.S. (2002) Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from korean traditional doenjang added sea tangle. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 31, 322-328
8. Kim, S.H.(1998) New trends of studying on potential activities of doenjang - fibrinolytic activity. *Korea Soybean Digest*, 15, 8-15
9. Lee, S.K., Hur, S., Ju, H.K. and Song, K.B. (1999) The study on isolation of fibrinolytic bacteria from soybean paste. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 42, 6-11
10. Lee, B.K., Jang, Y.S., Yi, Y.S., Chung, K.S. and Choi, S.Y. (1997) Immunomodulators extracted from Korean-style fermented soybean paste and their function. 1. Isolation of B cell mitogen from Korean-style fermented soybean paste. *Korean J. Immunol.*, 19, 559-569
11. Suh, H.J., Suh, D.B., Chung, S.H., Whang, J.H., Sung, H.J. and Yang, H.C. (1994) Purification of ACE inhibitor from soybean paste. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 37, 441-446
12. Whang, J.H. (1997) Angiotensin I converting enzyme inhibitory effect of doenjang fermented by *B. subtilis* SCB-3 isolated from meju, Korean traditional food. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 775-783
13. Yang, B.K., Jeong, S.C., Hur, N.J., Ha, S.O., Kim, K.Y., Kym, K.H., Yun, J.W. and Song, C.H. (2000) Hypoglycemic effects of extracts of soybean paste containing mycelia of mushrooms in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Mycol.*, 28, 126-129
14. Choe, G.S., Lim, S.Y. and Choi, J.S. (1998) Antioxidant and nitrite scavenging effect of soybean, meju and doenjang. *Korean J. Life Sci.*, 8, 473-478
15. Kim, M.H., Im, S.S., Kim, S.S., Kim, G.E. and Lee, J.H. (1994) Antioxidative materials in domestic meju and doenjang. 2. Separation of lipophilic brown pigment and their antioxidative activity. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23, 251-260
16. Choi, U.K., Ji, W.D., Chung, H.C., Choi, D.H. and Chung, Y.G. (1997) Optimum condition for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 26, 1039-1043
17. Lee, J.S., Kwon, S.J., Ahn, C. and Yoo, J.Y. (1997) Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional Meju. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 525-528
18. Joo, H.K., Oh, K.T. and Kim, D.H. (1992) Effects of mixture of improved Meju, Korean traditional *Meju* and Natto on soybean paste fermentation. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, 35, 286-293
19. Cheigh, H.S., Lee, J.S. and Lee, C.Y. (1993) Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J.*

- Kor. Soc. Food Nutr., 22, 570-575.
20. Park K.Y., Moon S.H., Baik, H.S. and Cheigh, H.S. (1990) Antimutagenic effect of *Doenjang* (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. J. Kor. Soc. Food Nutr., 19, 156-162
 21. Rhee, C.H., Kim, W.C., Rhee, I.K., Lee, O.S. and Park, H.D. (2006) Changes in the physiochemical property, angiotensin converting enzyme inhibitory effect and antimutagenicity during the fermentation of korean traditional soy paste(doenjang). Korean J. Food Preserv., 13, 603-610
 22. Park, W.P., Kim, N.D., Lee, S.C., Kim, S.Y. and Cho, S.H. (2006) Effects of powder and concentrations of *Prnus mume* on the quality of *Doenjang* during fermentation. Korean J. Food Preserv., 13, 574-580
 23. AOAC. (1990) *Official methods of analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. US.
 24. Summer, J.B. (1925) Dinitrosalicylic acid method for glucose. J. Biol. Chem., 60, 393-398
 25. Dubois, M., Gills, K.A., Hamilton, J.N., Robers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28, 350-352
 26. Hull, M.E. (1974) Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci., 30, 881-884
 27. Jung, S.W., Han, D.S., Kim, S.J. and Chun, M.J. (1996) Fermentation of tyrosinase inhibitor in mushroom media. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 227-233
 28. Cheung, H.S. and Chushman, D.W. (1971) Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol., 20, 1637-1640
 29. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113, 173-219
 30. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Mastsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975) Mutagenicity of carcinogenic azo dye and their derivative. Cancer Lett., 1, 91-98
 31. Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Mastsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M. (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella test. Mutat. Res., 48, 121-126
 32. Bois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-2004
 33. Kim, W.C., Kwon, S.H., Rhee, I.K., Hur, J.M., Jeong, H.H., Choi, S.H., Lee, K.B., Kang, Y.H. and Song, K.S. (2006) Rapid high performance liquid chromatographic quantification of major isoflavones in soybeans and soybean pastes. Food. Sci. Biotechnol., 15, 24-27
 34. Iyenger, R. and McEvily, A.J. (1992) Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. Trends Food Sci. Technol., 3, 60-65
 35. Vamons-Vigyazo, L. (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 15, 49-53
 36. Tomita, K., Oda, N., Ohbayashi, M., and Kamei, H. (1990) A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. J. Antibiotics, 43, 1601-1605
 37. Lozano-de-Gonzales, P.G., Barrett, D.M., Wrolstad, R.E. and Durst, R.W. (1993) Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice. J. Food Sci., 58, 399-405
 38. Otwell, W.S., Iyenger, R. and McEvily, A.J. 1992. Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexyresorcinol. J. Aquatic Food Prod. Technol., 1, 53-57
 39. McEvily, A.J., Iyenger, R. and Gross, A.T. (1993) Compositions and methods for inhibiting browning in foods and beverages. US Patent 5,202,141
 40. Shin, Z.I., Anh, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J. and Moon, T.H. (1995) Fraction of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste(Korean). Kor. J. Food Sci. Technol., 27, 230-234
 41. Peterson, G. and Barnes, S. (1991) Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. Biochem. Biophysic. Res. Comm., 179, 661-667
 42. Pagliacci, M.C., Smacchia, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi, C. and Nicoletti, I. (1994) Growth-inhibitory effects of the natural phytoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. Eur. J. Cancer, 30, 1675-82
 43. Wang, H.J. and Murphy, A.P. (1994) Isoflavone composition of america and japanese soybeans in iowa: Effects of variety, crop years, and location. J. Agric. Food Chem., 42, 1674-1677
 44. Hutchins, A.M., Slavin, J. L. and Lampe, J.W. (1995) Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. J. Am. Dietetic Assoc., 95, 545-551
 45. King, R.A., Broadbent, J.L. and Head, R.J. (1996) Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. J. Nutr., 126, 176-182