

작두콩 첨가 청국장장의 Isoflavonoids 함량과 항균력 및 생리활성

김운성^{1*} · 김재영^{2*} · 김성조³ · 문광현⁴ · 백승화^{5†}

¹한국보건산업진흥원 품질향상평가팀, ²식품의약품안전청 식품의약품안전평가원
³원광대학교 식품·환경학과, ⁴순창군청 건강장수과, ⁵충북도립대학교 바이오식품생명과학과

Isoflavonoid Contents, Antibacterial Activities, and Physiological Activities of *Cheonggukjang* Made from Sword Bean

Un-Sung Kim^{1*}, Jae-Young Kim^{2*}, Seong-Jo Kim³, Kwang-Hyun Moon⁴, and Seung-Hwa Baek^{5†}

¹Quality Improvement Evaluation Team, Korea Health Industry Development Institute, Chungbuk 363-951, Korea

²Dept. of Food Safety Evaluation, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Korea Food & Drug Administration, Chungbuk 363-951, Korea

³Dept. of Food and Environmental Sciences, Wonkwang University, Jeonbuk 570-749, Korea

⁴Dept. of Health and Longevity, Sunchang County Office, Jeonbuk 595-805, Korea

⁵Dept. of Biofood Science and Biotechnology, Chungbuk Provincial University, Chungbuk 373-806, Korea

Abstract

This research aimed to examine the isoflavonoid contents, antibacterial activities, and physiological activities of *Cheonggukjang* made from sword bean (CS). The effects of adding sword bean were compared with those of raw materials (RM), steamed materials (SM), and traditional *Cheonggukjang* (TC). In the case of the antibacterial activity on Gram-positive bacteria, the result of CS in ethanol extract was the highest in *Bacillus cereus*, and the result of water extract was the highest in *Staphylococcus aureus*. However, in the case of Gram-negative bacteria, *Salmonella* Typhimurium was the highest in all the extraction. Antioxidant activity and total flavonoid contents were present in the order of TC<CS. The isoflavonoid glycosides daidzin and genistin were present in the order of SM<RM<FM. Meanwhile, daidzein, glycitein, and genistein, which are aglycones, increased in fermented *Cheonggukjang*. ACE inhibitory activities of all extracts were higher in CS compared with TC. In conclusion, we found that addition of CS provided an excellent *Cheonggukjang* material.

Key words: sword bean, *Cheonggukjang*, antibacterial activities, physiological activities, isoflavonoids

서 론

우리 민족의 전통적인 식품 원료 가운데 대두(soybean, *Glycine max*)는 단백질 급원 식품으로서 비중이 높을 뿐 아니라 각종 영양 성분이 풍부하며 또한 인체의 건강 증진을 위한 생리활성 물질인 식이섬유, 인지질, isoflavonoids (genistein, daidzein 등), phenolic acids, saponins, trypsin inhibitor, phytic acid, 배당체 등의 성분이 함유되어 있어 항암 효과, 항 노화, 변비 완화, 항 신부전, 항 알레르기, 항비만, 담석증 예방, 이노작용, 치매 예방, 고지혈증 억제, 동맥경화 예방, 심장병 예방, 당뇨병 예방, 골다공증 억제 등 성인병 예방, 항바이러스 및 항 지혈 효과 등의 기능이 알려져 있다 (1). 최근 웰빙 열풍에 발맞추어 대두를 이용한 가공식품의 소비가 지속적으로 늘고 있으며, 이들 가운데 청국장은 식품 공전(2)에서 “대두를 주원료로 하여 바실러스(*Bacillus*)속

균으로 발효시켜 제조한 것이거나 이를 고춧가루, 마늘 등으로 조미한 것으로 페이스트, 환, 분말 등을 말한다.”로 정의 되어 있고, 납두는 잘 익힌 대두에 납두균(*Bacillus subtilis* natto)을 번식시킨 대두 발효물로 일본 사람들이 즐겨 먹는 대두 세균 발효제품이라 할 수 있는데 요즘은 이들 모두를 청국장으로 칭하고 있다.

한편 청국장장의 기능성을 향상시킬 목적으로 작두콩[*Canavalia gladiata*(Jacq.) DC.]을 이용하는데, 그 기원은 열대 아시아와 아프리카에서 야생으로 자라고 있는 *Canavalia virosa* Wight & Am.으로부터 파생된 것으로 추정된다. 열대 아시아에서 어린 꼬투리와 콩은 채소로 널리 이용되며, *Canavalia* 속은 4개의 하위 속 51종으로 분류되는데, 작두콩은 *Canavalia* genus의 sub-genus *Canavalia*에 속하며, 꽃과 종실이 흰색인 *Canavalia gladiata*(Jacq.) DC. var. *alba*와 붉은색인 *Canavalia gladiata*(Jacq.) DC.의 두 종이 있다(3).

*The first two authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. E-mail: jinho@cpu.ac.kr
Phone: 82-43-730-6381, Fax: 82-43-731-8337

그중 청국장 제조에 사용한 백색 작두콩은 칼콩, 넝쿨 작두콩, 줄 작두콩, 콩각지의 모양이 작두날과 같다고 하여 도두라고 불리는 콩과의 한해살이 덩굴성 식물로 식용 두류 가운데 제일 큰 품종이다. 개화기는 6~7월, 결실기는 8~10월에 꼬투리를 맺고 늦가을에 열매가 완숙된다(4). 또한 작두콩을 싸고 있는 콩각지의 길이는 10~30 cm 정도로 10~14개의 콩이 들어 있으며, 식용 부위는 종실뿐만 아니라 뿌리, 꼬투리, 잎 등 식물체 모두 약용 또는 식용으로 사용한다(5). 작두콩에는 전분, 단백질, 지방, 무기질, 비타민 A, B1, B2, C 및 niacin, urease, 혈구 응집소(PHA: phytohemagglutinin), canavanine 등이 함유되어 있고, 유두에는 canavalia gibberellin I 및 II가 있으며(6), 잎에 canavanine이 함유되어 종양 억제 작용, 소염, 혈액 순환 촉진 작용 및 민간요법으로 딸국질, 축농증, 비염, 백일해 및 신허요통 등의 개선 및 치료에 사용하는 것으로 알려져 있다(6). 또한 작두콩의 혈구 응집소(PHA)는 항암 효과가 우수하며, 일본에서는 작두콩을 비염, 치통, 치조농루, 습진, 종기 및 화농성·염증성 질환 등의 개선을 위한 민간 치료 요법에 사용되고 있다(4). 이렇게 다양한 약리적 효능과 건강 기능성이 알려져 있음에도 불구하고 가공방법 및 용도개발 그리고 건강 기능의 효과에 대한 연구의 부족으로 작두콩의 생산량 대비 수요량이 적어 재배농가의 수익성이 낮은 실정이다(7). 이 문제를 해결할 수 있는 방안으로 작두콩에 의해 발현되는 기능성을 제시함과 동시에 기호성 및 기능성이 개선된 청국장을 개발하면 작두콩의 소비촉진에 매우 의미 있는 일이 될 것이다.

따라서 본 연구는 대중화가 미미한 작두콩의 영양과 기능성에 대한 기 보고된 결과를 활용하여 기능성이 향상된 청국장을 개발하고자 작두콩을 첨가하여 발효시켜 만든 청국장장의 항균 및 항산화 활성, flavonoids 및 isoflavonoids 함량, ACE 저해효과를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 시료는 대두(soybean: SOB) 및 작두콩(sword bean: SWB)과 증자대두(steamed soybean: SSOB) 및 증자작두콩(steamed sword bean: SSWB), 이를 다시 발효시켜 제조한 전통 청국장(traditional *Cheonggukjang*: TC) 및 작두콩 첨가 청국장(*Cheonggukjang* made from the sword bean: CS)을 사용하였으며, 원료인 백색 작두콩은 충북 진천에서 수확된 것을, 대두는 전북 순창에서 수확된 것을 사용하였다.

청국장 제조

정선한 대두에 백색 작두콩 30%(w/w)으로 혼합하여 20±2°C의 수돗물에 12시간 수침하면서 물갈이를 2회 실시한 다음 1.5 kg/cm² 압력솥에서 20~30분간 삶아 50~60°C로 냉각하였다. 여기에 순수 분리하여 보관중인 *Bacillus*

*subtilis*를 nutrient broth(Difco™, Detroit, MI, USA)에 24시간 배양한 현탁액을 2%(v/w)되게 분무 접종하고 40~45°C에서 24시간 발효시켜 청국장을 제조한 후 동결 건조시켜 보관하면서 분석에 사용하였다.

항균 활성

항균 활성은 시료 1 g에 증류수 및 75% 에탄올 40 mL로 60분간 각각 추출한 후 여과하고 50 mL로 정용하여 시험용액으로 사용하였다. 항균활성 측정에 사용된 검정균주는 Gram positive(+) bacteria 2종(*Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Bacillus cereus* KCTC 1012)과 Gram negative(-) bacteria 2종(*Escherichia coli* KCTC 2441, *Salmonella* Typhimurium KCTC 1925)을 KCTC(Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 항균성 검정은 검정균 1 백균이를 5 mL의 액체 배지(nutrient broth; Difco™)에 접종하여 1~2일간 배양한 후 새로운 배지 5 mL를 함유한 시험관에 증류수 및 75% 에탄올로 추출한 시료 0.1 mL와 상기 검정균의 배양액 0.1 mL를 각각 넣고 37°C에서 24시간 배양한 후 표준평판 배양법으로 생균수를 측정하고 시험용액 대신 물과 75% 에탄올을 첨가한 검정균의 배양액을 대조액으로 하여 아래 식에 의하여 항균 효과를 확인하였다.

$$\text{항균력(\%)} = \left(1 - \frac{\log \text{ 시험액의 생균수}}{\log \text{ 대조액의 생균수}}\right) \times 100$$

항산화 활성

항산화 활성은 DPPH radical-scavenging activity test에 의해 Moon과 Terao(8)의 방법으로 측정하였다. 100 μM DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 에탄올 용액 0.9 mL와 시료를 methanol로 추출한 용액 0.1 mL를 시험관에 넣고 30초 동안 진탕한 후 암소에서 10분간 반응시켜 분광광도계(UV/VIS spectrophotometer; V-560, Jasco, Tokyo, Japan)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 대신 75%(v/v) methanol을 대조액으로 하여 아래 식에 의하여 항산화 활성을 확인하였다.

$$\text{항산화 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시험액의 흡광도}}{\text{대조액의 흡광도}}\right) \times 100$$

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Davis변법(9)을 이용해 측정하였다. 즉, 시료 0.1 g을 50 mL의 75% methanol 용액(v/v)에 가하여 실온에서 150 rpm으로 24시간 진탕추출한 후, 이 추출액 1 mL를 시험관에 취하고 10 mL의 diethylene glycol을 가하여 잘 혼합하였다. 여기에 0.1 mL의 1 N NaOH 용액(w/v)을 잘 혼합시켜 37°C의 항온 수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도(UV/VIS spectrophotometer; V-560, Jasco)를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 50% methanol 용액(v/v)을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 rutin(Sigma Chemical)으로 작성하여 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

Isoflavonoids 함량

Isoflavonoids의 추출은 뚜껑이 있는 갈색 시험관에 작두콩 첨가 청국장 분말 0.2 g과 10 mL의 80% methanol 용액(v/v)을 가하여 70°C, 150 rpm으로 15시간 진탕 추출한 후 원심분리(800×g, 10 min)한 추출액을 30°C에서 농축한 뒤 10 mL의 80% methanol 용액(v/v)에 녹인 다음 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC(1100 series, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)로 분리하였다. 이때 column은 Symetry shield RP C₁₈(4.6×250 mm i.d., Waters, Milford, MA, USA)을 25°C로 유지되도록 하고, 용매는 ACN : A 용액(80:20, v/v)[A 용액=glacial acetic acid : DW (52.6:900, v/v)]의 비율로 섞인 것을 분당 1 mL로 용리되게 하였다. Detector는 DAD로서 254 nm에서 분리된 각 peak를 표준 isoflavone(Sigma Chemical)의 retention time과 비교하여 동정 및 정량하였다(10).

Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성

ACE 저해활성은 Cushman 등의 방법(11)을 개량하여 측정하였다. 즉, 효소 반응은 0.36 mL의 50 mM sodium borate buffer(pH 8.3), 0.36 mL의 300 mM NaCl 및 효소액(10 mU)을 혼합하여 37°C에서 10분간 pre-incubation 시킨 후, 0.36 mL의 5 mM HHL(pH 8.3, HHL[N-Hippuryl-His-Leu tetra hydrate, Sigma Chemical) 기질을 넣어 37°C에서 30분간 정확하게 반응시킨 후 즉시 0.36 mL의 1 N HCl을 반응정지액으로 첨가하였다. 이 용액에 1.5 mL의 ethyl acetate를 가하여 hippuric acid를 추출하고 800×g로 10분간 원심분리 한 다음, 1.0 mL의 ethyl acetate 층을 취하여 다른 시험관에 옮기고 temp-block을 이용해 90°C 상에서 1시간 evaporation하고 1.0 mL의 50 mM sodium borate buffer(pH 8.3)를 넣어 hippuric acid를 녹인 다음 분광광도계(UV/VIS spectrophotometer; V-560, Jasco)로 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 1 unit는 표준 분석 조건하에서 37°C 상에서 1분 동안 1 µM의 hippuric acid가 HHL로부터 생성된 것의 흡광도를 구하여 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$[A_{228} - A_{228}(\text{control})] \times 5.6 \times 10^{-3} = \text{unit}$$

또한 ACE 저해율은 sodium borate 완충액(pH 8.3)에 최종 농도가 2×10^{-4} , 2×10^{-5} 및 2×10^{-6} M이 되게 조절한 다음 기질을 넣지 않은 assay mixture와 30분간 pre incubation 시킨 후 기질을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl

을 가하여 반응을 정지시켰다. 저해제를 넣지 않은 것을 0% 억제로 보고, 완전히 억제된 것을 100% 억제로 보아 ACE 활성의 저해도를 측정하였으며 비교 물질로 enalapril(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 사용하여 ACE 저해 능력을 비교하였다.

통계처리

분석항목에 대한 실험은 3회 반복하였고, 얻은 결과들을 excel software를 사용하여 평균, 표준오차를 작성하였다. 또한 One way ANOVA에 의해 p<0.05에서 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple test로 군간 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

일반성분

SOB, SWB, SSOB, SSWB, TC 및 CS의 일반성분은 수분 6.2~9.7%, 탄수화물 28.3~53.1%, 조단백질 28.3~38.0%, 조지방 5.5~18.4%, 조회분 3.4~9.3% 범위이었다(Table 1). 이들 가운데 발효된 CS와 TC의 탄수화물, 조단백, 조지방 및 조회분 함량의 차이를 보였는데, 이는 TC의 경우 대두만을 증자하여 발효시킨 반면 CS의 경우는 대두량을 줄이는 대신 작두콩량을 증가시킨 결과로서 증자 및 발효과정을 거친 CS가 탄수화물은 증가, 조단백 및 조지방은 감소된 것으로 사료된다. Kim(12)에 의하면 청국장의 일반성분을 수분 55.0%, 탄수화물 14.3%, 조지방 11.0%, 조단백 17.8%, 조회분 1.9%로 보고한 바 있어, 이를 CS와 동일조건으로 비교하기 위하여 건조물량으로 환산한 결과, 탄수화물 29.7%, 조지방 22.9%, 조단백 37.0%, 조회분 4.0%로 나타났다. 이를 비교한 바 Kim(12)의 청국장 일반 성분 결과보다 본 연구의 CS가 탄수화물 및 조회분 함량에서는 높은 경향을 나타냈으나 조지방 함량의 경우는 낮았다. 이는 대두에 비하여 도두의 성분 중 탄수화물의 함량이 높으나 단백질과 지질의 함량이 낮는데 그 원인이 있는 것으로 생각된다.

항균 활성

Gram positive(+) bacteria인 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621의 항균력은 에탄올 추출의 경우 0.58~4.70% 범위로 CS<TC<SSOB<SSWB<SOB<SWB 순으로 높았고, 물 추출의 경우 0.00~4.93% 범위로 TC<SSWB<SWB

Table 1. Composition content of each materials

Component	SOB ¹⁾	SWB	SSOB	SSWB	TC	CS
Moisture	9.7±0.3	9.3±0.3	6.3±0.1	6.3±0.2	6.2±0.1	6.4±0.2
Carbohydrate	30.5±1.1	53.1±1.5	30.8±1.1	52.7±1.5	28.3±0.7	42.7±1.7
Crude lipid	17.9±0.5	5.9±0.2	17.2±0.5	5.5±0.2	18.4±0.4	10.8±0.3
Crude protein	36.0±0.9	28.3±1.1	36.4±0.8	28.2±1.1	38.0±0.7	33.6±1.3
Ash	5.9±0.1	3.4±0.1	9.3±0.2	7.3±0.3	9.1±0.2	6.5±0.1
SUM	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

¹⁾SOB: soybean, SWB: sword bean, SSOB: steamed soybean, SSWB: steamed sword bean, TC: traditional *Cheonggukjang* (manufactured with only soybean), CS: *Cheonggukjang* added sword bean (manufactured with added soybean with sword bean [30% (w/w)]).

Table 2. Antibacterial activity of extracts obtained from each material and its effect on the growth of gram positive and gram negative bacteria

Strains	Materials ¹⁾	Antibacterial activity (%)		
		EtOH	Water	
Gram(+) bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	SOB	2.82±0.11	4.93±0.15
		SWB	4.70±0.17	0.66±0.02
		SSOB	1.51±0.06	2.63±0.08
		SSWB	2.27±0.08	0.37±0.01
		TC	0.99±0.02	—
	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1012	CS	0.58±0.01	1.50±0.05
		SOB	2.42±0.09	—
		SWB	4.26±0.07	—
		SSOB	1.28±0.05	—
		SSWB	2.32±0.05	—
Gram(-) bacteria	<i>Escherichia coli</i> KCTC 2441	TC	3.86±0.13	—
		CS	4.97±0.17	—
		SOB	2.62±0.10	0.59±0.02
		SWB	1.90±0.07	4.38±0.16
		SSOB	1.25±0.04	0.31±0.01
	<i>Salmonella</i> Typhimurium KCTC 1925	SSWB	0.92±0.03	2.21±0.04
		TC	0.31±0.01	4.41±0.14
		CS	0.13±0.01	8.57±0.27
		SOB	1.11±0.04	0.71±0.02
		SWB	3.12±0.11	1.06±0.04
	SSOB	0.79±0.02	0.58±0.02	
	SSWB	1.74±0.07	0.88±0.02	
	TC	4.51±0.15	0.28±0.01	
	CS	5.30±0.16	1.42±0.05	

¹⁾See footnote Table 1.

<CS<SSOB<SOB 순으로 높았다. *Bacillus cereus* KCTC 1012의 결과는 물 추출의 경우 항균력이 0이었고, 에탄올 추출의 경우 1.28~4.97% 범위로 SSOB<SSWB<SOB<TC <SWB<CS 순으로(Table 2) 항균력이 가장 높은 CS는 SSOB에 비하여 3.88배나 높아 CS 원료의 하나인 작두콩을 이용하면 현 장류 발효제품에서 문제가 된 *Bacillus cereus*의 10,000 이하 기준(13)을 충족시킬 가능성이 높은 소재로 생각되었다. 또한 gram positive bacteria들에 대한 CS의 항균력은 추출용매에 따라 차이가 있어 에탄올 추출물에서 *Bacillus cereus* KCTC 1012, 물 추출물은 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621가 TC보다 높은 결과를 나타내었다.

Gram negative(-) bacteria인 *Escherichia coli* KCTC 2441에 대한 항균력은 에탄올 추출물의 경우 0.13~2.62% 범위로 CS<TC<SSWB<SSOB<SWB<SOB 순으로 높았고, 물 추출물의 경우 0.31~8.57% 범위로 SSOB<SOB<SSWB<SWB<TC<CS 순으로 높았다. *Salmonella* Typhimurium KCTC 1925의 항균력은 에탄올 추출물의 경우 0.79~5.30% 범위로 SSOB<SOB<SSWB<SWB<TC<CS 순으로 높았고, 물 추출물의 경우 0.28~1.42% 범위로 TC<SSOB <SOB<SSWB<SWB<CS 순으로 높았다(Table 2). CS의 gram negative bacteria에 대한 항균력은 에탄올 및 물 추출 모두 *Salmonella* Typhimurium KCTC 1925에서 가장 높은 반면, *Escherichia coli* KCTC 2441의 에탄올 추출에 경우 낮아 그 결과가 상이하였다.

따라서 CS의 항균물질은 gram positive에서 *Bacillus cereus*와 gram negative에서 *Salmonella* Typhimurium 균의 증식억제 효과가 있음을 확인하였다. 이와 같은 항균효과는 청국장의 발효과정에서 생성되는 점질물(점액성 다당체)과 작두콩 유래의 항균물질에 의한 것으로 판단되었는데 이를 뒷받침하는 연구로 청국장의 점질물(점액성 다당체)로 항균력을 시험한 결과 첨가량이 증가할수록 gram positive 및 gram negative 세균에서 항균력이 증가한 사실(14), 작두콩을 메탄올로 단일 추출한 추출물과 유기용매로 순차 추출한 ethyl acetate 추출물에서 높은 항균활성(4) 및 작두콩의 메탄올 추출물에서 항균물질로 3,4,5-trihydroxybenzoic acid methyl ester, methyl gallate 동정(15)을 확인한 바 있기 때문이다. 이러한 결과로부터 TC보다 CS의 항균력이 높은 원인은 발효 시 생성된 점질물(점액성 다당체)의 효과보다 CS의 원료의 하나인 작두콩에 함유된 항균물질에 의한 효과가 증가한 것으로 추정된다.

항산화 활성

*In vivo*에서의 산화는 free radical에 의하여 진행되는데 대두 단백질과 isoflavonoid의 섭취는 노화억제와 동맥경화를 예방하는 작용이 있다. 이러한 효과를 판단하기 위하여 SOB, SWB, SSOB, SSWB, TC 및 CS의 항산화 활성을 측정 한 결과는 Table 3과 같다.

항산화 활성은 3.84~25.99% 범위로 SSWB<SWB<SSOB

Table 3. Antioxidative activity and total flavonoid content of soybean and sword bean forms as raw, steamed, traditional *Cheonggukjang*, and *Cheonggukjang* made from sword bean

Materials ¹⁾	Antioxidative activity [% (v/v)]	Total flavonoid content (%)
SOB	25.99±0.85 ^{a2)}	2.56±0.25 ^b
SWB	6.77±0.65 ^c	3.10±0.55 ^a
SSOB	14.29±0.46 ^d	1.33±0.24 ^d
SSWB	3.84±0.26 ^f	1.65±0.26 ^{cd}
TC	17.85±0.62 ^c	1.88±0.37 ^c
CS	19.88±0.83 ^b	2.32±0.39 ^b

¹⁾See footnote Table 1.

²⁾Mean with the same lettered superscripts in a column are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

<TC<CS<SOB 순으로 높아져 유의성이 인정되었다($p < 0.05$). 원료인 SOB 및 SWB의 항산화력은 증가시킨 결과 감소되었으며 증가된 SSOB 및 SSWB를 미생물로 발효시켜 얻은 청국장장의 경우 항산화력이 증가하는 경향을 보였고 TC보다 CS가 활성이 높음을 확인할 수 있었다. 이렇게 항산화 활성의 증가 원인은 대두 유래의 phenolic acid과 작두콩 유래의 phenolic acid와 당, 아미노산, 단백질 등이 상호작용으로 생성된 화합물이 free radical을 쉽게 소거시키거나 또는 phenolic acid와 금속이 결합하여 착체를 형성하여 free radical의 생성을 억제하기 때문임으로 생각된다(16,17).

이러한 항산화 활성을 TEAC(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)값으로 표시하였는데 대두가 0.68 mM, 볶은 대두 0.61 mM, 삶은 대두 0.35 mM, 대두 삶은 물 1.63 mM, 청국장은 2.09 mM로 나타나 항산화물질이 대두를 삶는 과정에서 genistic acid, chlorogenic acid, p-coumaric acid가 물로 이행되고, 또 삶은 대두가 발효될 때 genistic acid, chlorogenic acid, caffeic acid 및 ferulic acid가 증가함을 Kwak 등(18)은 보고하였으며, 청국장이 발효되는 과정에 대두와 작두콩에 들어있는 단백질, peptide, 아미노산, amines 및 당류의 carbonyl기, 지방산화에 의한 carbonyl기들에 의해 Maillard 반응으로 생성되는 물질인 3-deoxyglucosone이 항산화능이 크다고(19-21) 한바 있어 이러한 사실들로부터 본 CS의 발효과정에서 항산화능을 가진 물질이 생성되는 것으로 추정된다.

총 플라보노이드 함량

Flavonoids는 식물의 2차 대사산물로 얻어지는데 IUPAC 명명법에 따라 2-phenylchromen-4-one(또는 2-phenyl-1,4-benzopyrone), isoflavonoids는 3-phenylchromen-4-one(또는 3-phenyl-1,4-benzopyrone), neoflavonoids는 4-phenyl coumarin(또는 4-phenyl-1,2-benzopyrone)의 이름으로 분류된다. 이러한 flavonoids의 자원은 citrus fruits, berries, onions, parsley, legumes, green tea, red wine, seabuckthorn, dark chocolatez(cocoa) 등이 있으며, 이들로부터 분리된 hesperidin, rutin(a glycoside quercetin), luteolin,

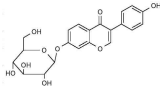
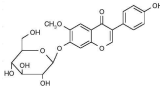
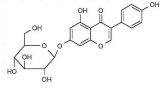
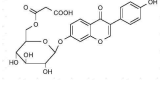
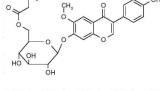
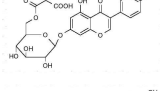
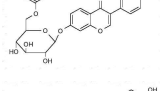
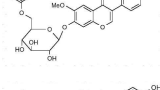
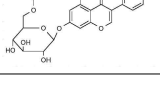
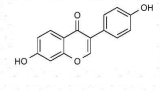
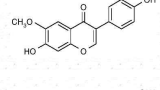
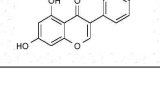
tangeritin, catechins(catechin, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate), oligomeric proanthocyanins 등에 의해 항산화능, 항알레르기, 항염증, 항균성 그리고 여러 기작에 의해 항암작용과 심장 질환에 대항하는 것으로 알려져 있다(22). 따라서 이러한 특성을 보유한 총 플라보노이드 함량을 조사한 결과는 1.33~3.10% 범위로 SSOB<SSWB<TC<CS<SOB<SWB 순으로 실험 군들 간 유의성이 인정되었다($p < 0.05$, Table 3). 작두콩의 첨가로 인해 총 플라보노이드 함량이 증가되는 경향을 보이나, 원료를 증가하면 용출 또는 파괴로 감소되지만 이를 발효시키면 증가된 작두콩의 함유 수준보다 증가되는 결과를 보였다. 이러한 원인은 증가초기에 작두콩이 보유한 효소에 의한 분해작용과 증가가 진행되는 동안 열분해로 인하여 감소되지만 미생물에 의한 발효 과정에서 청국장장의 flavonoids가 생성되기 때문으로 추정된다. 이는 Toda 등(23)의 *Bacillus subtilis* (natto)가 대두발효 중에 6"-0-succinylgenistin, 6"-0-succinylidaidzin, 6"-0-succinyl glycitin을 생성한다고 보고한 결과가 이를 뒷받침하였다. 또한 Matsuura 등(24)은 대두에 함유된 β -glucosidase는 침지 중에 genistin이나 daidzin을 가수분해 시켜 aglycone인 genistein과 daidzein이 증가된다고 하였고, Kudou 등(25)은 대두의 증가 시 malonyl isoflavone 배당체의 분해가 많이 일어난다고 하였다. 또한, Toda 등(26)은 대두를 95°C에서 증가하면 isoflavone화 배당체인 6"-0-malonyl genistin, 6"-0-malonyl daidzin, 6"-0-malonyl glycitin의 비율이 각각 감소되고 isoflavone 배당체인 genistin, daidzin, glycitin의 비율이 증가된다고 보고한 바 있다.

Isoflavonoids 함량

Isoflavonoid 화합물의 기본 골격은 isoflavonoid, isoflavan, isoflavanone, coumestan, rotenoid, pterocarpan, coumaronochromone의 7개로 분류되어진다(27). 모든 두과 식물에서 7종의 isoflavonoids 중 isoflavone 89%, isoflavanone 100%, coumestan 100%, pterocarpan 100%, 그리고 rotenoid 95%가 함유되어 있음이 확인되었다(28).

Table 4와 같이 isoflavonoids 함량은 daidzin과 genistin은 청국장 재료인 SOB 및 SWB가 증가 과정에서는 감소되었으나 청국장으로 발효시키면 증가하는 경향을 나타내었고, malonyl daidzin, malonyl glycitin, malonyl genistin의 함량은 증가 및 청국장 발효 시 함량이 급격하게 감소하는 경향을 보였다. 또한, acetyl daidzin, acetyl glycitin, acetyl genistin의 경우에도 SOB 및 SWB 재료에서는 높았고, 증가 및 청국장으로 발효 시 함량이 감소하는 경향을 보이나 그 차이는 크지 않았다. 한편 daidzein, glycitein, genistein은 SOB 및 SWB보다 증가 과정에서 감소경향을 보이나 청국장으로 발효되면서 함량이 급격하게 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 Table 3의 총 플라보노이드 함량의 변화와 같이 발효과정에서 여러 종류의 효소작용으로 원료에 함유된

Table 4. Isoflavonoids content of soybean and sword bean forms as raw, steamed, traditional *Cheonggukjang*, and *Cheonggukjang* made from sword bean (Unit: mg/kg)

Isoflavonoids	Molecular structure	SOB ¹⁾	SWB	SSOB	SSWB	TC	CS	CS/TC
Daidzin		486.7	374.3	230.5	228.1	587.4	756.0	1.29
Glycitin		195.9	205.1	179.2	188.1	242.7	191.5	0.79
Genistin		387.3	404.3	233.7	242.0	679.1	791.5	1.17
Malonyl daidzin		742.3	488.2	552.5	332.0	28.3	46.4	1.64
Malonyl glycitin		501.6	506.7	368.8	370.9	25.7	21.5	0.84
Malonyl genistin		1,010.5	868.8	794.7	632.9	18.6	10.7	0.58
Acetyl daidzin		37.9	88.3	25.3	52.2	28.5	30.3	1.06
Acetyl glycitin		68.1	26.2	46.8	32.7	20.7	9.5	0.46
Acetyl genistin		144.0	138.9	98.5	94.7	95.9	89.6	0.93
Total glycoside		3,574.3	3,100.8	2,530	2,173.6	1,610.3	2,147.0	0.98
Daidzein		18.5	25.5	13.4	23.3	319.5	392.7	1.23
Glycitein		10.6	42.8	5.4	22.4	33.7	56.2	1.67
Genistein		17.2	39.3	11.7	35.2	385.1	402.2	1.04
Total aglycone		46.3	107.6	30.5	80.9	2,025.7	851.1	0.43
SUM		3,620.6	3,208.4	2,560.5	2,254.5	2,465.2	2,798.1	1.14

¹⁾See footnote Table 1.

polyphenol 화합물 및 flavonoids가 isoflavonoids로 전환되어진 것으로 생각할 수 있다. Jang 등(29)에 의하면 청국장을 제조하는 동안 isoflavone의 변화가 본 연구와 상반된 경향을 보인 isoflavone류는 glycoside의 malonyl glycitin, acetyl daidzin, acetyl glycitin, acetyl genistin이었고, 원료 대두의 malonyl genistin 함량은 1,111 µg/g이었으나 증자 후 발효 직전부터 발효가 종료된 45시간까지 흔적 수준을 유지하였던 결과와 본 연구에서 발효가 되어진 CS의 경우 10.7 µg/g 수준으로 감소하여 차이를 나타내었다. 그러나 Jang 등(29)

의 결과는 청국장 발효 종료 후 total isoflavone 함량이 감소되었으나, 본 CS의 경우에는 약간 증가하는 경향을 보이며 daidzin과 genistin의 함량이 증가를 보였는데 이는 Shon 등(30)의 검정콩을 이용해 청국장을 72시간까지 발효하는 경우 시간이 경과될수록 계속적으로 증가하였다고 하였던 보고와 isoflavone 중 daidzin과 genistin의 함량이 발효 종료 후 발효 전보다 증가한 원인을 aglycone인 daidzein과 genistein의 분해 결과(29)로 보고된 내용, 그리고 Table 3의 총 플라보노이드 함량이 증가된 원인에서 찾을 수 있었다.

Table 5. ACE inhibitory activity in the extract of soybean and sword bean forms as raw, steamed, traditional *Cheonggukjang*, and *Cheonggukjang* made from sword bean

Materials ¹⁾	ACE inhibitory Activity (%)	
	EtOH	Water
SOB	28.89±0.20 ²⁾	25.82±0.30 ^f
SWB	32.55±0.40 ^e	28.24±0.50 ^e
SSOB	37.86±0.30 ^d	33.75±0.60 ^d
SSWB	39.37±0.50 ^c	35.77±0.40 ^c
TC	43.87±0.70 ^b	40.28±0.80 ^b
CS	49.33±0.80 ^a	42.86±0.50 ^a

¹⁾See footnote Table 1.

²⁾Mean with the same lettered superscripts in a column are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

ACE 저해활성

고혈압의 조절은 주로 renin angiotensin계에 의한 생리·생화학적 기작으로 일어나며, angiotensin I converting enzyme의 활성을 억제시켜 혈압상승 원인이 되는 angiotensin II의 생성을 저하시킴으로써 혈압상승을 억제할 수 있으므로(31) 작두콩을 첨가한 청국장의 고혈압억제효능 평가를 위해 ACE 저해활성을 측정하였다.

Table 5의 angiotensin converting enzyme(ACE)의 저해활성은 에탄올 추출의 경우 28.89~49.33%로 SOB<SWB<SSOB<SSWB<TC<CS 순이었고, 증류수 추출의 경우 25.82~42.86%로 SOB<SWB<SSOB<SSWB<TC<CS 순이었다. 이처럼 ACE 저해 활성은 콩과 작두콩<증자한 콩과 작두콩<콩과 작두콩을 첨가한 발효 청국장 순으로 증가하였는데, 이는 저해활성을 나타내는 oligopeptide들이 원료인 콩과 작두콩보다는 증자 과정 초기에 자가분해효소의 작용과 후기에는 열분해, 그리고 발효과정에 *Bacillus subtilis*가 분비하는 효소의 작용으로 생성된 oligopeptide들에 의하여 증가된 결과로 생각되며, 특히 물 추출물보다는 에탄올 추출의 경우에 저해활성이 높아 한 종류 이상의 oligopeptide들이 ACE를 저해시키는 것으로 생각되었다. 따라서 ACE 저해활성은 모든 추출조건에서 CS가 가장 높아 작두콩을 첨가하여 만든 청국장의 경우 혈압조절 효과 기능이 증가됨을 알 수 있었다. 고혈압 치료제로서 ACE 저해작용을 지닌 화학합성품인 captopril 혹은 enalapril 등(32,33)을 이용하고 있으나 안전성과 각종 부작용 등의 문제점이 많아 천연물 중에서 ACE 저해활성을 가지는 peptide를 찾고 있다. 이러한 과정에서 동물성 단백질인 카제인과 식물성 단백질인 대두로부터 *in vitro*에서 ACE 활성을 저해하는 peptide가 분리되었고(34), 청국장의 단백질 분해산물인 아미노산 조각들의 혈압강하 효과(35)와 콩에 함유된 이소플라본과 분해산물인 펩타이드는 혈압강하 효과와 혈전용해 효과 등이 보고된바 있어(36-38), 작두콩을 첨가한 CS에도 이들 활성을 보유하고 있을 것으로 추정되었다. 한편 Kim(39)은 *Bacillus* 속 균주를 이용하여 제조한 청국장의 항균성 및 ACE 저해활성의 연구에서 *Bacillus* 속 균주에 따라 ACE 저해활성이 차이가

있어 *Bacillus licheniformis*로 발효시킨 청국장을 물로 추출한 경우 45.2% 경향을 보여 가장 높았으며 그 외 균들로 만든 청국장의 경우는 20.5~36.5% 수준으로 본 연구와 비교한바 ACE 저해활성이 *Bacillus licheniformis*로 만든 청국장보다는 낮으나 그 외의 균으로 만든 청국장의 추출물보다는 높았음을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구는 영양과 기능성을 보유한 작두콩으로 제조한 청국장의 isoflavonoids 함량과 항균성 및 생리활성을 조사한 결과로서 청국장 제조과정에서 사용하는 원료, 증자한 원료 및 이를 발효시킨 청국장을 비교 분석하였다. 작두콩으로 제조한 청국장(*Cheonggukjang* made from the sword bean: CS)의 gram positive bacteria에 대한 항균력은 전통청국장(traditional *Cheonggukjang*: TC)과 비교하여 에탄올 추출에서는 *Bacillus cereus*, 물 추출은 *Staphylococcus aureus*에서 높은 결과를 나타내었다. 그러나 CS의 gram negative bacteria에 대한 항균력은 모든 추출물이 *Salmonella Typhimurium*에서 가장 높은 결과를 나타내었다. 항산화활성과 총 플라보노이드 함량은 청국장으로 발효함에 따라 증가하는 경향이었고 기존의 TC보다 SC가 우수하였다. CS의 isoflavonoids 함량에서 glycoside 형태인 daidzin과 genistin은 증자 과정에서는 감소되었으나 청국장으로 발효시키면 증가되어 가장 높았다. 한편 aglycone 형태인 daidzein, glycitein, genistein의 경우도 증자 과정에서 감소경향을 보이거나 발효되면서 증가하였다. ACE 저해활성은 원료<증자 원료<발효 청국장 순으로 증가하였고, 각각의 추출조건에서 CS의 추출물이 가장 우수하였다. 이상의 결과를 종합하면 청국장 제조 시 작두콩 첨가는 항균성, 항산화능, 총 flavonoid, isoflavonoids, ACE 저해활성 등의 기능성을 강화할 수 있는 원료로 확인되었다.

문 헌

1. Chung DH. 1999. *Soybean science*. Taekwang Publish, Seoul, Korea. p 56-77.
2. KFDA. 2010. *Food code*. Korea Food and Drug Administration, Cheongwon-gun, Korea. p 5.20.2.
3. Smartt J. 1990. *Grain legumes*. Cambridge University Press, London, UK. p 301-309.
4. Cho YS, Seo KI, Shim KH. 2000. Antimicrobial activities of Korean sword bean (*Canavalia gladiata*) extracts. *Korean J Food Preserv* 7: 113-116.
5. Chang MI, Kim JY, Kim SJ, Baek SH. 2011. Effect of sword bean *Chunggukjang* addition on quality of *Kochujang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1292-1299.
6. Lee SZ. 1994. *Bonchogangmok*. Eusungdang press, Seoul, Korea. p 585.
7. Cho YS, Bae YI, Shim KH. 1999. Chemical components in different parts of Korean sword bean (*Canavalia gladiata*). *Korean J Food Preserv* 6: 475-480.

8. Moon JH, Terao J. 1998. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem* 46: 5062-5065.
9. Korean Society of Food Science and Nutrition. 2000. *Handbook of experiments in food science and nutrition*. Hyoil, Seoul, Korea. p 285-286.
10. Wang SF, Ridsdill TJ, Ghisalberti EL. 1999. Level of isoflavonoids as indicators of resistance of subterranean clover trifoliates to redlegged earth mite *Halotydeus destructor*. *J Chem Ecol* 25: 795-803.
11. Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. 1977. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Biochem* 16: 5484-5491.
12. Kim HB. 2003. *Chunggukjang diet and health method*. Human & Books, Seoul, Korea. p 43.
13. KFDA. 2010. *Food code*. Korea Food and Drug Administration, Cheongwon-gun, Korea. p 2.1.8.
14. Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. 2001. Antimicrobial activities of viscous substance from *Chongkukjang* fermented with different *Bacillus* spp. *J Fd Hyg Safety* 16: 188-193.
15. Lee HY, Jeong HS. 2005. Isolation and identification of antimicrobial substance from *Canavalia gladiata*. *Food Sci Biotechnol* 14: 268-274.
16. Natella F, Nardini M, Felice MD, Scaccini C. 1999. Benzoic acid and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J Agric Food Chem* 47: 1453-1459.
17. Kweon MH, Hwang HJ, Sung HC. 2001. Identification and antioxidant of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *J Agric Food Chem* 49: 4646-4655.
18. Kwak CS, Kim MY, Kim SA, Lee MS. 2006. Cytotoxicity on human cancer cells and antitumorogenesis of *Chungkookjang*, a fermented soybean product, in DMBA-treated rats. *Korean J Nutr* 39: 347-356.
19. Moon GS, Cheigh HS. 1986. Antioxidative effect of soybean sauce on the lipid oxidation of cooked meat. *Korean J Food Sci Technol* 18: 313-318.
20. Moon GS, Cheigh HS. 1987. Antioxidative characteristics of soybean sauce in lipid oxidation process. *Korean J Food Sci Technol* 19: 537-541.
21. Moon GS, Cheigh HS. 1990. Separation and characteristics of antioxidative substances in fermented soybean sauce. *Korean J Food Sci Technol* 22: 461-465.
22. Wikipedia. 2011. *Flavonoid*. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/flavonoid>. Accessed July 26, 2011.
23. Toda T, Uesugi T, Hirai K, Nukaya H, Tsuji K, Ishida H. 1999. New 6-O-acyl isoflavone glycosides from soybeans fermented with *Bacillus subtilis* (Natto). *Biol Pharm Bull* 22: 1193-1201.
24. Matsuura M, Obata A, Fukushima D. 1989. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. *J Food Sci* 54: 602-605.
25. Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K. 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem* 55: 2227-2233.
26. Toda T, Sakamoto A, Takayanagi T, Yokotsuka K. 2000. Changes in isoflavone compositions of soybean foods during cooking process. *Food Sci Technol Res* 6: 314-319.
27. Whitten PL, Kudo S, Okubo K. 1997. Isoflavonoids. In *Handbook of plant and fungal toxicants*. CRC press, FL, USA. p 117-137.
28. Hegnauer R, Grayer-Barkmeijer RJ. 1993. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: a chemotaxonomic approach. *Phytochemistry* 34: 3-16.
29. Jang CH, Lim JK, Kim JH, Park CS, Kwon DY, Kim YS, Shin DH, Kim JS. 2006. Change of isoflavone content during manufacturing of *cheonggukjang*, a traditional Korean fermented soyfood. *Food Sci Biotechnol* 15: 643-646.
30. Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. 2001. Some biological activities and isoflavone content of *Chungkukjang* prepared with black beans and *Bacillus* strains. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 662-667.
31. Lim SI, Choi SY, Cho GH. 2006. Effects of functional ingredients addition on quality characteristics of *Kochujang*. *Korean J Food Sci Technol* 38: 779-784.
32. Brunner HR, Gavras H, Waerber B, Kershaw GR, Turini GA, Vukovich RA, McKinstry DN, Gavras I. 1982. Oral angiotensin-converting enzyme inhibitor in long-term treatment of hypertensive patients. *Ann Intern Med* 90: 19-23.
33. Atkinson AB, Brown JJ, Cumming AM, Fraser R, Lever AF, Leckie BJ, Morton JJ, Robertson JJ, Davies DL. 1982. Captopril in the management of hypertension with renal artery stenosis: its long-term effect as a predictor of surgical outcome. *Am J Cardiol* 49: 1460-1466.
34. Shin ZI, Ahn CW, Nam HS, Lee HJ, Lee HJ, Moon TH. 1995. Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J Food Sci Technol* 27: 230-234.
35. Okamoto A, Hanagata H, Kawamura Y, Yanagida F. 1995. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Foods Hum Nutr* 47: 39-47.
36. Nevala R, Vaskonen T, Jani Vehniäinen J, Korpela R, Vapaatalo H. 2000. Soy based diet attenuates the development of hypertension when compared to casein based diet in spontaneously hypertensive rat. *Life Sci* 66: 115-124.
37. Wu J, Ding X. 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 49: 501-506.
38. Martin DS, Breitkopf NP, Eyster KM, Williams JL. 2001. Dietary soy exerts an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R553-560.
39. Kim SD. 2005. Antimicrobial and ACE inhibitory activities of *Chungkukjangs* prepared with various *Bacillus* sp. isolated from traditional *Chungkukjang*. *Nat Sci Res Thesis Coll* 3: 79-85.

(2011년 11월 15일 접수; 2011년 12월 28일 채택)