

된장추출물의 항균활성

이상덕[†] · 양재승 · 정재홍* · 성창근* · 오만진*

한국원자력연구소 조사식품검지실

*충남대학교 식품공학과

Antimicrobial Activities of Soybean Paste Extracts

Sang-Duk Yi[†], Jae-Seung Yang, Jae-Hong Jeong*, Chang-Kun Sung* and Man-Jin Oh*

Detection Laboratory of Irradiated Food, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-600, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract

To identify antimicrobial activities of soybean paste, studies have been carried out with laboratory manufactured soybean paste, traditional and improved type soybean paste purchased on the market. The soybean paste fermented with *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus tamar* and commercial soybean paste were shown antimicrobial activities for *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium*. Non-fermented soybean paste did not show antimicrobial activities against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*. The extract of soybean paste extracted by 80% methanol showed the highest antimicrobial activities of in ethyl acetate fraction and followed butanol fraction, respectively. Antimicrobial activities of traditional and improved type soybean paste were shown against all tested microorganisms and clear zone length of traditional soybean paste was slightly larger than that of improved type. Components of antimicrobial fractions of soybean paste were guessed peptides, 4-hydroxy benzoic acid, benzoic acid by GC-MS.

Key words: soybean paste, antimicrobial activity, GC-MS

서 론

된장은 콩을 원료로 하여 제조한 메주나 쌀, 밀가루 등의 전분질 원료에 *Asp. oryzae*를 접종하여 배양한 코오지에 콩과 식염 등을 적당히 혼합하여 발효시킨 것으로 발효과정중 곰팡이와 세균이 생성한 protease, amylase 등의 효소작용으로 아미노산, 당분 등이 생성되어 식염의 짠맛과 조화를 이루는 향미가 독특한 발효식품으로서 영양소의 공급원일 뿐만 아니라 주요한 조미료로서 이용되고 있다(1,2).

된장은 우리의 식생활에서 주요한 위치를 차지하고 있는 전통식품으로서 많은 연구자들에 의하여 된장의 영양, 미생물, 숙성과정 중의 성분변화, 향기성분에 대하여 연구가 진행되어 왔으며 근래에는 된장의 기능성에 대하여 많은 관심을 불러일으키고 있다. 된장이 높은 생리활성을 갖는 것은 콩 중에 함유되어 있는 단백질, isoflavone, phytic acid, saponin 등과 같은 성분과 된장 발효과정중 콩단백질로부터 생성된 peptide에 기인되는 것으로 알려져 있다. 콩 중의 isoflavone은 항암효과, 골다공증, 신부전증,

심장질환 등의 예방과 Bowman-Birk inhibitor, β -sitosterol 등에 의한 대장암 예방효과(3-8), phenol 화합물 등에 의한 항산화효과(9,10) 등의 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 된장의 단백질 가수분해물로부터 유래된 peptide 등은 백혈병, 림프암, 대장암에 대한 항종양 활성과 angiotensin 전환효소의 저해제로서 작용하여 혈압강하 활성을 나타낸다고 하였으며(11,12), 된장은 위장의 점막을 자극하여 식욕을 촉진하고 숙취해소와 상처에 바르면 이차오염을 방지할 수 있다고 전해 내려오고 있다(13).

식품의 변질을 방지하기 위하여 지금까지는 여러 종류의 화학합성보존제가 이용되어 왔으나 그의 독성 때문에 소비자들이 기피하고 있어 인체에 해가 적은 천연물로부터 항균성물질을 검출코자 많은 연구가 수행되어왔다(14-18). 또한 우리 인류가 오랫동안 이용하여온 식품 중에서 달걀의 lysozyme(19), 우유의 lactoferrin(20), 발효유의 bacteriocin(21) 등이 항균성 물질로 알려져 왔으며 항균성분을 분리하여 가장 안전한 방부제로 식품공업에 이용하여오고 있다. 따라서 된장 중의 항균성분을 규명하여 식

[†]To whom all correspondence should be addressed

품소재로 이용하고자 하는 시도는 매우 가치 있는 연구라 하겠다. 본 연구는 지금까지 보고된 상기의 생리활성 이외에도 민가에서 상처에 발라 효과를 보았다는 내용이 구전되어 음에 따라 된장의 어떤 성분이 항균활성을 나타내는 것으로 생각하게 되어 된장이 가지고 있는 항균활성을 규명하려고 시도하였다. 본 연구에서는 된장 중의 항균성분을 분리하여 천연 방부제로 이용하기 위한 기초연구로서 시판되고 있는 재래식된장과 개량식된장 그리고 실험실에서 *Asp. oryzae*와 *R. tamaris*를 이용하여 120일 동안 숙성시켜 얻어진 된장의 항균활성을 측정하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료

공시재료는 대전, 아산 지역의 민가에서 제조한 재래식 된장과 *Asp. oryzae*를 이용하여 제조한 시판 개량식 된장 그리고 실험실에서 제조한 된장을 사용하였다.

Koji 및 된장의 제조

Koji는 1L 삼각 플라스크에 35% 수분이 함유하도록 만든 콩가루 150g을 넣은 후에 121°C에서 15분간 autoclaving을 한 후에 공시균주를 접종하여 30°C에서 3일간 배양하여 *koji* 13, 증자대두 47, 천일염 13, 정수 27의 비율로 제조하였으며 30°C에서 120일간 숙성시켰다.

된장의 일반성분 측정

일반성분은 AOAC법(22)을 사용하여 수분과 고형물의 함량은 105°C 상압건조법, pH는 pH meter, 조단백질은 semi micro kjeldahl법, 조지방은 ether추출법, 아미노산성 질소는 formol 적정법, 식염은 AgNO₃ 적정법으로 측정하였다.

색도 측정

된장의 색도는 시료 된장 20g을 1회용 petri dish에 넣어서 위 부분을 0.03mm polyethylene film으로 덮은 후에 color difference meter(CR-300, Minolta, Japan)로 3회 측정하여 평균한 값을 hunter L, a, b 값으로 표시하였다.

항균성분의 분획

동결 건조한 시료 된장 200g을 Fig. 1과 같은 방법으로 분획하여 항균활성 측정용 시료로 하였으며 200ml씩 3회씩 분액여두 진탕기로 3000 rpm에서 30분간 진탕하여 분획된 chloroform 분획, ethyl acetate 분획, butanol 분획은 45°C 감압하에서 2ml까지 농축하여 항균활성을 측정하였다. 또한 추출용매에 따른 된장의 항균활성 유무를

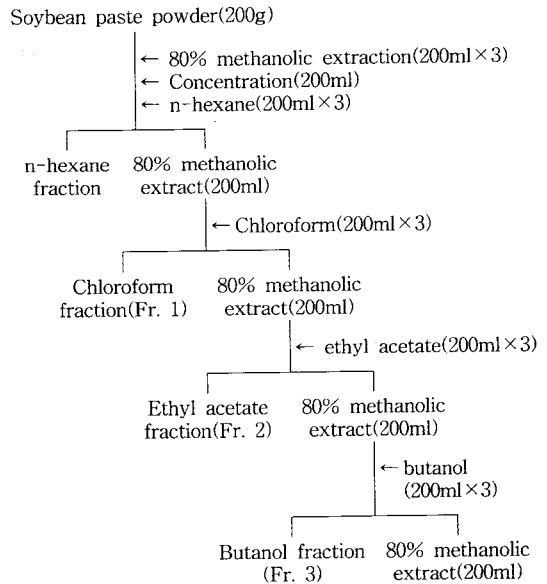


Fig. 1. Fractionation of antimicrobial components from methanol extracts of soybean paste.

검색하기 위하여 *R. tamaris*와 *Asp. oryzae*로 혼합배양하여 제조하고 동결건조한 된장 50g을 추출용매로서 water, methanol, chloroform, ethyl acetate, butanol을 각각 500 ml씩 가하여 추출하고 여과한 후 감압농축기로 물과 메탄올추출물은 10ml 나머지 추출용매는 5ml까지 농축한 후에 *B. subtilis*에 대한 항균활성을 측정하여 된장추출물이 항균활성이 있음을 확인하였다.

사용균주

된장의 항균활성을 측정하기 위하여 *Aspergillus oryzae* (KCCM 11371), *Bacillus cereus*(ATCC 11778), *Bacillus subtilis*(ATCC 6633), *Escherichia coli*(ATCC 10536), *Escherichia coli* O157 : H7(ATCC 43894), *Listeria monocytogenes*(ATCC 7644), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus*(ATCC 13301), *Streptococcus faecalis*(ATCC 19433) 균주를 사용하였다.

된장의 항균활성측정

항균성 검색에 사용한 균주는 세균은 nutrient broth (Difco), 곰팡이는 potato dextrose broth(Difco)에 *Listeria monocytogenes*는 brain heart infusion broth(Difco) 배지에 접종하고 30°C에서 18~24시간씩 3회 계대배양하여 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각의 생육배지로 멸균된 기층용 배지(agar 1.5%)를 petri dish에 15ml씩 분주하여 응고시키고, 각종 시험균액 0.1ml를 무균적으로 첨가하여 멸균된 유리병으로 기층용 배지 위에 고르게 퍼지도록 도포한 균점종 평판배지를 만들어 사용하였다. 시료의 항균력 검색은 한천배지 diffusion법

(disk plate method)으로 측정하였다. 즉, 각각의 시료용액(100mg/ml in MeOH)을 0.45µl membrane filter(Mi-lipore사, USA)로 여과하여 제공하고 멸균된 filter paper disc(8mm, Toyo, Japan)에 100µl씩을 흡수시킨 후, 추출 용매를 완전히 증발시키고 시험용 평판배지위에 놓아 밀착시켜 4°C 냉장고에서 1시간 방치한 후 30°C에서 24~48시간 배양한 다음 disc 주변의 clear zone의 직경을 측정하였다(15,16).

GC-MS에 의한 항균성분 분석의 확인

된장의 chloroform 분획, ethyl acetate 분획을 각각 TMS 유도체화시켜서 GC-MS로 동정하였다. TMS유도체화 방법은 각각의 분획물 0.5ml를 감압건조한 시료에 silylating reagent(anhydrous pyridine : hexamethyl disilazane : trimethyl chlorosilane=9 : 3 : 1 혼합용액)를 3ml 첨가한 후 vortex mixer로 40초간 교반하고 45°C 항온 수조에서 15분간 반응시켜 trimethylsilyl 유도체로 만들었다.

이를 2,000 rpm으로 2분간 원심 분리하여 침전물을 제거한 후 상정액을 syringe로 취해 GC-MS의 분석시료로 하였으며, Wiley 6.0 version으로 동정하였다. GC-MS 분석조건은 Table 1과 같았다(23).

결과 및 고찰

일반성분

실험에 사용되어진 된장의 일반성분은 Table 2와 같았다.

항균활성 측정용 된장의 수분은 44~53%, 단백질은 7.8~19.5%, 지방함량은 2.8~11.2%로 된장간에 유의적인 차이를 나타내었으며, 이는 된장 제조시에 사용되는 원료의 배합조성의 차이로 기인되는 것으로 생각된다. 그 외의 성분으로서 NaCl은 8.9~13.8%, pH는 4.59~6.33, 아미노산 질소는 530~1,647mg%를 나타내었으며 채래식 된장이 1,327mg%, 1,647mg%로 다른 된장보다도 높은 아미노산 질소 함량을 나타내었다.

된장의 색도

시료된장의 색도를 측정한 결과는 Table 3과 같았다.

Table 1. Operating conditions for the identification of antimicrobial compounds by mass spectrometer

Instrument	Hewlett Packard 5890
Setup source electron voltage	70 ev
Resolution	1000
Column	HP-1 capillary column(25m)
Oven temp.	60°C(3min)→5°C/min→300°C
Injector temp.	300°C
Carrier gas	He

Table 2. General compositions of soybean pastes

Sample ¹⁾	(unit: %)					
	Moisture	Protein	Fat	NaCl	pH	Amino nitrogen (mg%)
A	53.2	18.8	10.9	11.5	6.12	72
B	52.1	18.1	10.5	11.7	5.82	530
C	51.7	19.2	10.7	12.1	5.41	720
D	53.1	18.1	10.3	11.2	5.39	780
E	49.6	8.1	3.1	10.8	5.26	1040
F	52.8	7.9	2.9	10.2	5.58	1201
G	48.7	8.3	2.6	11.7	5.60	1118
H	56.2	15.7	5.7	13.7	5.70	759
I	56.8	19.5	10.3	8.9	6.33	1327
J	44.5	19.1	11.2	13.8	4.59	1647
K	48.1	7.8	2.8	11.6	5.67	1026

¹⁾A : Soybean paste that was not fermented.

B : Soybean paste fermented with soybean powder koji cultured by *Rhizopus tamari*

C : Soybean paste fermented with soybean powder koji cultured by *Aspergillus oryzae*

D : Soybean paste fermented with soybean powder koji cultured by *Aspergillus oryzae* & *Rhizopus tamari*.

E : Commercial soybean paste fermented with *Asp.oryzae* 1

F : Commercial soybean paste fermented with *Asp.oryzae* 2

G : Commercial soybean paste fermented with *Asp.oryzae* 3

H : Traditional soybean paste fermented with *meju* 1

I : Traditional soybean paste fermented with *meju* 2

J : Traditional soybean paste fermented with *meju* 3

K : Japanese *miso*

Table 3. Hunter L, a, b value of various soybean pastes

Sample ¹⁾	Hunter value		
	L	a	b
A	57.1	+5.2	+16.3
B	38.5	+8.8	+12.7
C	40.2	+7.1	+ 9.1
D	37.6	+5.3	+ 6.7
E	48.3	+5.5	+16.0
F	39.8	+6.8	+12.5
G	47.5	+5.8	+13.5
H	45.0	+5.0	+11.9
I	42.7	+6.0	+12.5
J	31.1	+3.0	+ 3.6
K	47.1	+8.9	+17.4

¹⁾Refer to the legend in Table 2.

Hunter L value 는 31.1~57.1의 수치를 나타내었으며 숙성전의 된장인 A 시험구가 57.1로 가장 높은 수치를 보였고, D 시험구가 37.6, F 시험구가 39.8, J 시험구가 31.1의 수치를 보였다. Hunter a value는 +3.0~+8.9의 수치를 보였으며 D 시험구가 +5.3, F 시험구가 +6.8, J 시험구가 +3.0으로 다른 시험구보다 낮은 값을 보였으며 Hunter b value는 D 시험구가 +6.7, I 시험구가 +12.5, J 시험구가 +3.6이었다. 생된장(A 시험구)보다는 발효된장(B~K 시험구)에서 더 낮은 Hunter L value를 보였으며, 아미노산 질소가 1647mg으로 가장 높았던 J 시험구 된장이 가장 낮은 Hunter L value 를 보였다. 이는 된장이 숙성되어지면

서 아미노태 질소가 증가되고(24) 더불어 메일야드 반응(Maillard reaction)이 다른 시험구의 된장보다 더욱더 진행되어서 상대적으로 낮은 Hunter L value를 보인 것으로 생각된다. 공시된장의 Hunter a, b value는 된장의 종류간에 뚜렷한 경향을 나타내지 않았다.

된장추출물의 항균활성

추출용매에 따른 항균활성

추출용매에 따른 된장의 항균활성은 Fig. 2와 같았다.

물 추출물은 항균활성을 전혀 나타내지 않은 반면에 methanol, chloroform, ethyl acetate, butanol 추출물은 모두 항균활성을 보여주었다. 이러한 결과에 의해 된장 중에는 항균활성을 나타내는 물질이 존재하고 있음을 확인할 수 있었다.

된장추출 분획물의 항균활성

Chloroform 분획의 항균활성

*R. tamaris*와 *A. oryzae*로 제조한 된장과 시판 된장의 항균활성을 규명하기 위하여 80% methanol 된장 추출물을 얻은 다음에 chloroform, ethyl acetate, butanol로 순차 분획하여 각 분획물의 항균활성을 검토한 결과 된장중의 chloroform 분획에 의한 여러 공시균주에 대한 항균활성은 Table 4, Fig. 3과 같았다.

모든 된장시험구는 고른 항균활성을 나타내었으며 다른 미생물에 비하여 *B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*에 대해서는 약간 높은 항균활성을 보였으며, C 시험구의 된장과 E 시험구의 된장은 *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*에 대해서 항균활성을 나타내었으나 다른

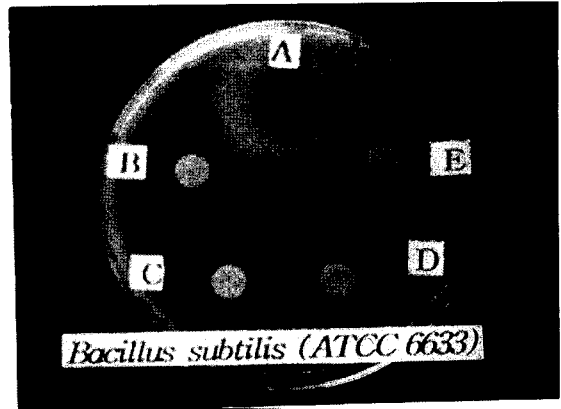


Fig. 2. Antimicrobial activities of soybean pastes prepared with soybean powder koji cultured by *Aspergillus oryzae* & *Rhizopus tamaris*.

A: Water extracts, B: Butanol extracts, C: Ethyl acetate extracts, D: Chloroform extracts, E: Methanol extracts

된장에서는 나타나지 않았다. A 시험구 된장은 *B. cereus*에 대해서만 항균활성을 나타내었고, B 시험구 된장은 *B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*에 대하여 항균활성을 보였으며, C 시험구 된장은 *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. faecalis*에 대하여 항균활성을 보였고, D 시험구 된장은 *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. faecalis*에 대하여 항균활성을 나타내었다.

모든 시판 된장과 실험실에서 제조한 된장 추출물은 공시균주에 대해서 항균활성의 차이는 있었지만 대부분 항균활성을 나타내었으며 된장 담금 직후의 추출물은 *B. cereus*에 대해서 항균활성을 나타내었고 그 이외의 균주

Table 4. The antimicrobial activities of chloroform fraction of soybean paste against various microorganisms

Sample ¹⁾	Strain ²⁾									TS ³⁾
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	mg/100g
A	-	10.4	-	-	-	-	-	-	-	19.9
B	-	13.0	13.0	-	-	10.4	-	9.1	-	21.5
C	-	19.5	16.9	11.7	14.0	11.7	-	14.3	13.0	36.1
D	-	14.0	13.0	10.0	-	-	-	-	11.0	47.7
E	15.0	17.0	13.0	10.0	10.0	10.0	-	10.0	-	29.0
F	-	12.0	12.0	-	-	12.0	-	-	-	94.5
G	12.0	13.0	11.0	11.0	20.0	11.0	11.0	-	-	35.6
H	-	13.0	13.0	-	-	10.0	-	-	-	56.3
I	-	12.0	-	-	-	10.0	-	-	-	12.7
J	-	16.0	11.0	-	13.0	11.0	-	-	16.0	42.8
K	-	14.0	-	-	-	-	-	-	-	56.0
PC ⁴⁾	-	20.0	19.0	29.0	28.0	10.0	25.0	19.0	15.7	100mg/ml

¹⁾Refer to the legend in Table 2.

²⁾Strain 1. *Aspergillus oryzae*(KCCM 11371), Strain 2. *Bacillus cereus*(ATCC 11778)

Strain 3. *Bacillus subtilis*(ATCC 6633), Strain 4. *Escherichia coli*(ATCC 10536)

Strain 5. *Escherichia coli* O157:H7(ATCC 43894), Strain 6. *Listeria monocytogenes*(ATCC 7644)

Strain 7. *Salmonella typhimurium*(ATCC 14028), Strain 8. *Staphylococcus aureus*(ATCC 13301)

Strain 9. *Streptococcus faecalis*(ATCC 19433)

³⁾TS: Total solid, ⁴⁾Positive control(PC): Benzoic acid

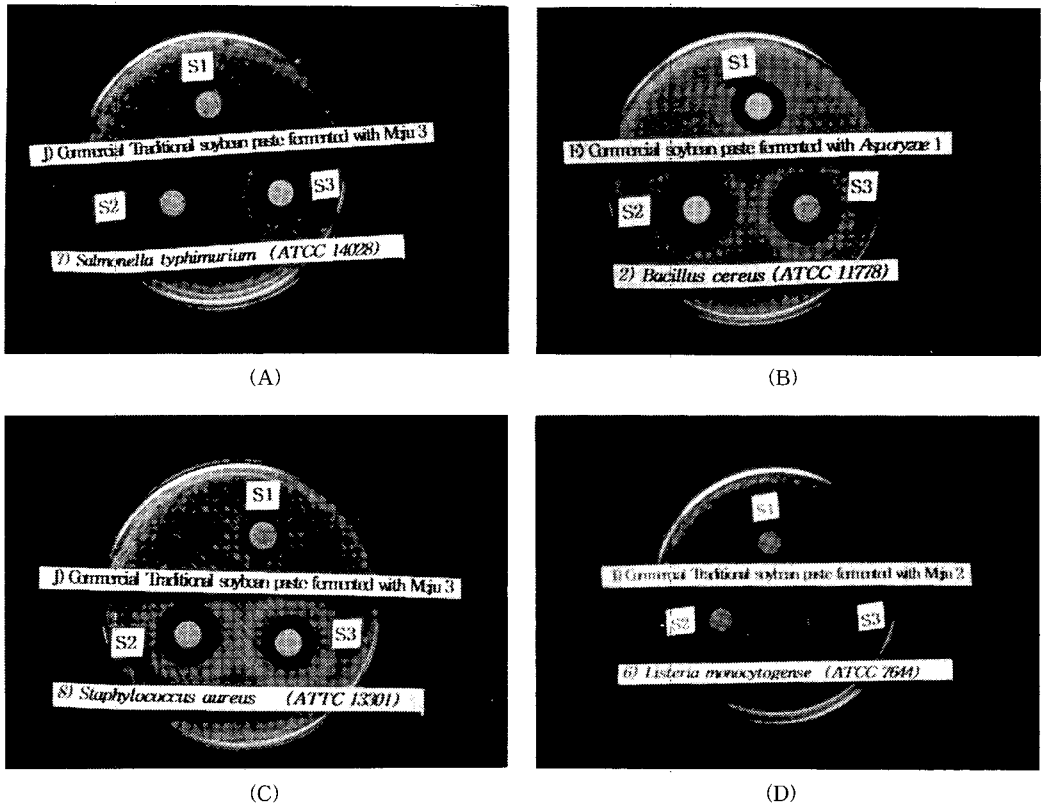


Fig. 3. Antimicrobial activity of solvent fraction of soybean pastes against various microorganism.

- S1: Chloroform fraction, S2: Ethyl acetate fraction, S3: Butanol fraction
- (A) Antimicrobial activity of sample E for *Bacillus cereus*(ATCC 11778)
- (B) Antimicrobial activity of sample J for *Salmonella typhimurium*(ATCC 14028)
- (C) Antimicrobial activity of sample J for *Staphylococcus aureus*(ATTC 13301)
- (D) Antimicrobial activity of sample I for *Listeria monocytogenes*(ATCC 7644)

에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 된장의 숙성 정도에 따라 항균활성이 달랐으며 숙성을 오래 시킨 된장일수록 활성이 높았다. 또한 된장 추출물로부터 chloroform 희분에서 얻어진 건조물의 양은 *A. oryzae*로 제조한 개량식 된장(F)이 94.5mg/100g,

재래식 된장(I)이 12.7mg/100g으로서 시료 된장간의 차이를 나타내었다.

Ethyl acetate 분획의 항균활성
80%methanol 된장 추출물을 chloroform으로 분획하

Table 5. The antimicrobial activities of ethyl acetate fraction of soybean paste against various microorganisms (unit: mm)

Sample ¹⁾	Strain ²⁾									TS ³⁾ mg/100g
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
A	-	16.9	-	11.7	-	11.7	-	13.0	14.3	12.1
B	-	16.9	14.3	11.7	14.3	14.3	-	13.0	19.5	27.4
C	-	20.8	19.5	15.6	-	10.4	14.3	20.8	20.8	35.7
D	-	20.0	21.0	21.0	16.0	11.0	16.0	12.0	12.0	52.1
E	10.0	22.0	25.0	12.0	25.0	13.0	10.0	11.0	-	56.7
F	-	21.0	20.0	12.0	24.0	13.0	11.0	13.0	-	40.1
G	-	17.0	19.0	12.0	13.0	11.0	11.0	-	20.0	45.9
H	-	15.0	17.0	9.0	15.0	11.0	10.0	-	-	30.0
I	-	17.0	15.0	-	-	12.0	9.0	-	-	12.3
J	-	26.0	20.0	22.0	30.0	11.0	20.0	19.0	22.0	32.5
K	-	16.0	16.0	-	15.0	12.0	-	-	-	36.7
PC ⁴⁾	-	20.0	19.0	29.0	28.0	10.0	25.0	19.0	15.7	100mg/ml

¹⁾Refer to the legend in Table 2.
²⁾-⁴⁾Refer to the legend in Table 4.

고 잔류물에 ethyl acetate로 추출한 분획물의 항균활성은 Table 5와 같았다.

Ethyl acetate 분획물은 여러 균주에 대하여 고른 항균활성을 보여 주었으며 발효되지 않은 생된장은 *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. faecalis*에 대해서 항균활성을 보였다.

B 시험구 된장은 *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. faecalis*에 대하여 항균활성을 나타내었고 *B. subtilis*, *S. typhimurium* 등에 대해서는 항균력을 나타내지 않았다. C 시험구 된장은 *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. faecalis*에 대하여 항균활성을 보였으며, D 시험구 된장도 *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. faecalis*에 대하여 항균활성을 나타내었다. Ethyl acetate로 추출 분획한 건조물의 양은 생된장(A)이 12.1mg/100g 이었고 *A. oryzae*로 숙성시킨 된장(E)이 56.7mg/100g으로 된장시료간의 심한 차이를 나타내었으며, 이는 숙성 정도 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

Butanol 분획의 항균활성

된장 80%methanol 추출물을 chloroform, ethyl acetate로 순차 분획한 잔류물에 butanol 분획의 항균활성은 Table 6과 같았다.

된장 butanol 분획은 모든 균주에 대하여 고른 항균활성을 보여 주었지만 생된장은 *B. cereus*, *E. coli*, *S. faecalis*에 대해서만 항균활성을 보였다.

B 시험구 된장은 *A. oryzae*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. faecalis*에 대하여 항균활성을 보였으며, C 시험구 된장은 *A. oryzae*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. faecalis*에 대하여 항균활성을 보였으며, D 시험구 된장은

A. oryzae, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. faecalis*에 대하여 항균활성을 나타내었다.

*R. tamari*와 *A. oryzae*로 혼합 배양하여 제조한 된장 butanol 분획물은 *A. oryzae*에 대해서도 항균활성을 나타내었으며, butanol 분획의 건조물은 생된장이 238.4mg/100g이었고, D 시험구 된장이 601.7mg/100g로 된장간에 차이를 나타내었으며, chloroform, ethyl acetate 분획에 비하여 분획건조물이 4~5배 가량 많았다.

이는 butanol 용매의 극성이 높기 때문에 된장 중에 함유된 성분들이 많이 추출되어진 것으로 생각되어진다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 실험실에서 제조한 된장의 경우 숙성되기 전의 된장인 A 시험구에서는 *B. subtilis*에 대하여 chloroform 분획, ethyl acetate 분획, butanol 분획 모두에서 10.4mm, 16.9mm, 11.7mm의 clear zone을 보였으며 ethyl acetate 분획에서 가장 높게 나타났으며, *E. coli*에 대하여는 ethyl acetate 분획에서 11.7mm, butanol 분획에서 16.9mm의 활성을 보였다. *L. monocytogenes*에 대해서는 ethyl acetate 분획에서만 11.7mm를 나타냈고, *S. aureus*에 대해서 ethyl acetate 분획에서만 13.0mm의 clear zone을 보여 부분적인 항균활성만을 보였다.

B, C, D 시험구에서는 A 시험구에서보다 모든 분획에서 고르게 항균활성을 나타내었다. Hunter L value가 31.1로서 다른 된장보다 낮았고, 아미노태 질소가 1,647mg%로 상대적으로 높은 수치를 나타내었던 J 시험구 된장의 항균활성은 ethyl acetate 분획에서는 공시균주별로 비교하여 볼 때 다른 된장에 비하여 항균활성이 5~10mm 정도 길게 나타났다. 발효되지 않은 생된장인 A 시험구는 Hunter L value가 57.1, 아미노태 질소가 72mg%를 나타내었으며 그 외의 발효된장의 경우에는 Hunter L value가 31.1~48.3, 아미노태 질소가 530~1,647mg%로 더 높은 수치를 나타내었고, 이러한 결과에 비례하여 항균활성

Table 6. The antimicrobial activities of butanol fraction of soybean paste against various microorganisms

Sample ¹⁾	Strain ²⁾									(unit: mm)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TS ³⁾ mg/100g
A	-	11.7	-	16.9	-	-	-	-	19.5	238.4
B	20.8	15.6	18.2	20.8	-	11.7	15.6	14.3	14.4	299.1
C	19.5	27.3	15.6	19.5	13.0	20.8	18.2	18.2	27.3	516.7
D	13.0	23.0	24.0	17.0	20.0	-	17.0	15.0	16.0	601.7
E	-	21.0	20.0	17.0	22.0	14.0	15.0	14.0	22.0	193.2
F	-	22.0	13.0	15.0	24.0	15.0	13.0	13.0	22.0	589.7
G	-	18.0	16.0	12.0	20.0	13.0	13.0	11.0	15.0	252.6
H	-	12.0	15.0	9.0	11.0	13.0	11.0	-	15.0	576.4
I	-	11.0	-	10.0	-	22.0	13.0	9.0	12.0	279.8
J	-	21.0	13.0	17.0	29.0	14.0	17.0	16.0	17.0	545.3
K	-	20.0	19.0	11.0	22.0	25.0	10.0	11.0	16.0	497.7
PC ⁴⁾	-	20.0	19.0	29.0	28.0	10.0	25.0	19.0	15.7	100mg/ml

¹⁾Refer to the legend in Table 2.

²⁾⁻⁴⁾Refer to the legend in Table 4.

도 증가되는 것으로 보아 된장이 발효가 진행되어 된장발효의 지표수준으로 이용되는 Hunter L value가 낮아지고 아미노태 질소가 높아질수록 콩중에 함유되어 있는 여러 가지 성분들의 유리율이 높아지게 되고, 발효에 의한 콩 성분들의 변화에 의해 항균성을 나타내는 물질이 증가되는 것으로 생각된다. 분획별로는 chloroform 분획보다는 ethyl acetate 분획과 butanol 분획에서 더 높은 항균활성을 나타내었고, 균주별로는 *B. subtilis*와 *B. cereus*에 대하여 다른 공시균주보다 더 높은 항균활성을 보였다.

시판되고 있는 개량식, 재래식 된장도 실험실에서 제조한 된장에서 처럼 모든 분획에서 항균활성을 보였으며 chloroform 분획보다는 ethyl acetate 분획과 butanol 분획에서 더 높은 항균활성을 보여 주었고, 재래식 된장이 시판 개량식 된장보다 약간 높은 항균활성을 보였다.

GC-MS에 의한 항균물질의 확인

*Asp. oryzae*와 *R. tamari*로 제조한 된장의 항균물질을 추정하기 위하여 각 단계별 순차 분획물에 대하여 TMS 유도체를 만들어 GC-MS에 의하여 분석하였다. Chloroform 분획과 Ethyl acetate 분획은 mass spectra의 quality가 70% 이상 되는 물질들이 다수 확인되었으나 butanol 분획은 mass spectra의 quality가 모두 70% 이하로 확인되어 GC-MS의 결과에서 제외시켰다.

Quality가 높았던 chloroform 분획과 ethyl acetate 분

획 결과는 다음과 같았다.

chloroform 분획물

담금직후된장(A 시험구)의 chloroform 분획물을 GC-MS에 의하여 확인한 결과 10개의 물질이 확인되었으며, 주요성분으로서는 hexadecanoic acid, 9,12-octadecadienoic acid, octadecanoic acid 등과 같은 지방산 등이 검출되었으며 미량성분으로서 benzofuran-2,3-dihydroxy, benzenoacetic acid, benzoate, benzenoacetic acid, benzoic acid-4-hydroxy 등의 물질들이 검출되었다(Table 7).

*R. tamari*와 *Asp. oryzae*로 혼합 배양하여 120일 동안 숙성시킨 된장(D 시험구)의 chloroform 분획에서는 지방산으로서는 hexadecanoic acid만이 미량으로 검출되었으며 benzenoacetic acid, 1,2-benzenedicarboxylic acid와 같은 벤젠화합물과 cyclo-(L-leucyl-L-phenylalanyl), phenylalanine-prolinediketopiperazin 등과 같은 peptide류가 검출되었다(Table 8). 우유의 lactoferrin(20), 발효유의 bacteriocin(21) 등은 항균성 물질로 알려져 있는데 이러한 물질은 여러개의 아미노산이 결합하여 있는 peptides로 되어져있다. 따라서 chloroform 분획물에서의 항균활성은 cyclo-(L-leucyl-L-phenylalanyl), phenylalanine-prolinediketopiperazin 등과 같은 peptide에서 기인된 것으로 생각된다.

Table 7. Antimicrobial compounds identified from chloroform fraction of soybean paste that was not fermented by GC-MS

Order	Compound	Retention time	Peak area	Area%	Quality%
1	4H pyran-4-one,3-hydroxy-2-methyl	9.12	1744.0	13.52	91
2	benzofuran,2,3-dihydroxy	12.26	433.6	3.30	74
3	benzenoacetic acid	13.14	225.6	1.72	91
4	silanol,trimethyl-,benzoate	13.36	328.3	2.50	94
5	benzenoacetic acid, trimethylsilyl ester	14.65	301.6	2.30	90
7	benzoic acid,4-hydroxy-3,5-dimethoxy	26.12	250.1	1.91	93
8	3,9-diazatricyclo[7.3.0.0(3.9)]dodeca	32.95	247.1	1.88	96
9	hexadecanoic acid	29.85	437.8	3.34	96
10	9,12-octadecadienoic acid(z,z)	32.95	1874.5	14.29	93
11	octadecanoic acid	33.55	389.3	2.97	93

Table 8. Antimicrobial compounds identified from chloroform fraction of soybean paste fermented during the 120 days with *Aspergillus oryzae* & *Rhizopus tamari* by GC-MS

Order	Compound	Retention time	Peak area	Area%	Quality%
1	benzenoacetic acid	13.18	189.2	2.18	91
2	benzenoacetic acid, trimethylsilyl ester	14.66	215.6	2.49	83
3	phenol,2,4-bis(1,1-dimethyl ethyl)	20.06	67.9	0.78	90
4	3,9-diazatricyclo[7.3.0.0(3.9)]dodeca	27.89	946.3	10.91	96
5	hexadecanoic acid	29.86	136.2	1.57	91
6	cyclo-(L-leucyl-L-phenylalanyl)	35.64	942.3	10.86	87
7	phenylalanine-prolinediketopiperazin	35.78	1740.6	20.07	73
8	1,2-benzenedicarboxylic acid	39.48	90.3	1.04	90
9	2,5-piperazinedione,3,6-bis(phenylmethyl)	42.25	640.6	7.38	96

Ethyl acetate 분획물

생된장의(A 시험구) ethyl acetate 분획물에서는 daidzein과 genistein의 함량이 높았고 그 외의 성분으로서 는 benzoic acid-4-hydroxy, 2-propenoic acid-3-(2-hydroxy phenyl) 등과 같은 물질이 동정되었으며(Table 9), *R. tamari*와 *Asp. oryzae*로 혼합 배양하여 120일 동안 숙성시킨 된장의(D 시험구) ethyl acetate 분획물에서는

daid zein이 2배정도 증가하였고 그 외의 성분으로 ben- zeneacetic acid-4-hydroxy, benzoic acid-4-hydroxy, 2- benzimidazolone 등의 물질들이 새로이 생성되었으며, 특 히 benzoic acid-4-hydroxy는 3배정도 증가하는 경향을 보여 주었다(Fig. 4, Table 10). 본 실험에서 확인된 benzoic acid-4-hydroxy, benzoic acid 등은 식품보존제로서 알 려져 있으며 세균, 곰팡이, 효모와 같은 미생물에 항균활

Table 9. Antimicrobial compounds identified from ethyl acetate fraction of soybean paste that was not fermented by GC-MS

Order	Compound	Retention time	Peak area	Area%	Quality%
1	2-propenoic acid, 3-(2-hydroxy phenyl)	12.29	149.7	1.86	78
2	benzoic acid,4-hydroxy-3-methoxy	20.93	352.1	4.36	96
3	daidzein	44.55	2311.8	28.64	98
4	genistein	44.61	2515.7	31.17	90

Table 10. Antimicrobial compounds identified from ethyl acetate fraction of soybean paste fermented for 120 days at 30°C with *Aspergillus oryzae* & *Rhizopus tamari* by GC-MS

Order	Compound	Retention time	Peak area	Area%	Quality%
1	butanoic acid,trimethylsilyl ester	7.72	90.3	0.57	78
2	2-benzimidazolone	12.14	225.9	1.43	83
3	benzenacetic acid	13.30	485.6	3.07	83
4	benzenacetic acid,trimethylsilyl ester	14.68	441.6	2.80	83
5	benzoic acid,4-hydroxy	20.04	487.1	3.08	97
6	benzenacetic acid,4-hydroxy	20.85	1354.7	8.57	70
7	benzoic acid,4-hydroxy-3-methoxy	20.93	1084.9	6.87	97
8	cyclododecane	24.37	451.7	2.86	91
9	benzoic acid,4-hydroxy-3,5-dimethyl	26.33	561.3	3.55	93
10	daidzein	44.55	5087.2	37.76	98
11	genistein	44.61	2317.0	14.67	71

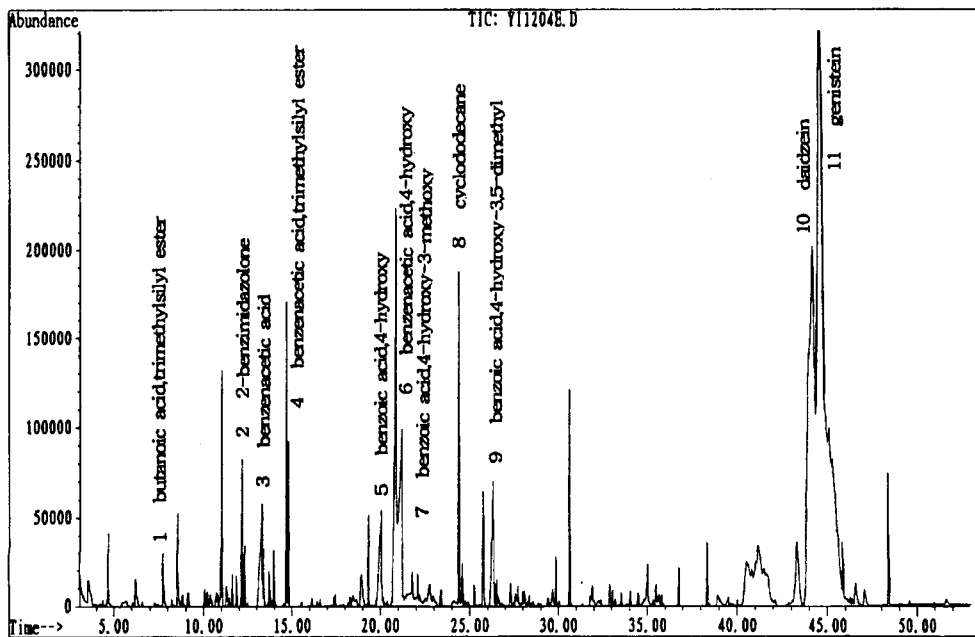


Fig. 4. GC-MS chromatogram of ethyl acetate fraction of soybean paste fermented for 120 days at 30°C with *Aspergillus oryzae* & *Rhizopus tamari*.

성을 나타내는 것으로 보고되어지고 있다(17). Chloroform 분획보다 ethyl acetate 분획의 항균활성이 높았던 것은 상기의 결과로 볼 때 benzoic acid-4-hydroxy, benzoic acid와 같은 물질들이 ethyl acetate 분획에 더 많이 존재하기 때문이라고 생각되며 발효된장이 생된장보다 항균활성이 높은 것도 발효에 의해 benzoic acid-4-hydroxy, benzoic acid와 같은 항균물질이 더 많이 생성되어 된장 중에 존재하기 때문이라고 생각된다.

GC-MS 결과로 볼 때 된장에서 항균활성을 나타내는 성분은 peptide류와 benzoic acid-4-hydroxy, benzoic acid와 같은 물질들로 추정되어지며 차후의 실험을 통하여 재확인 동정할 계획이다.

요 약

된장의 생리활성을 조사하기 위하여 *Asp. oryzae*와 *R. tamaris*를 이용하여 제조한 된장과 시판되고 있는 된장을 수집하여 항균활성을 측정 한 결과는 다음과 같다. *R. tamaris*, *Asp. oryzae*로 단일 배양된 코지로 담금한 된장과 혼합 배양된 코지로 담금한 된장 모두에서 항균활성을 나타내었으며, 시판 된장의 경우에도 모든 시험구에서 항균활성을 보였고, 아미노태 질소의 함량이 높고, hunter L 값이 낮을수록 증가하는 경향을 보였다. 담금 직후의 된장추출물은 *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. faecalis*에 대하여 항균활성을 보였고 *E. coli* O157:H7, *B. subtilis*, *S. typhimurium* 대하여는 항균활성을 나타내지 않았다. 동결 건조한 된장의 80% methanol 추출물을 chloroform, ethyl acetate, butanol로 순차 분획하여 항균활성을 측정 한 결과 ethyl acetate, butanol 층에서 높은 항균활성을 나타내었으며, GC-MS 결과로 볼 때 peptide류와 benzoic acid-4-hydroxy, benzoic acid 등이 된장이 항균활성을 나타내게 하는 성분 중의 하나라고 추정된다.

문 헌

- Rhee, S. H., Cheigh, H. S. and Kim, C. S.: Studies on the changes of lipids during soybean *koji* preparation for *doenjang* fermentation in model system. *Korea J. Food Sci. Technol.*, **14**, 375-380(1982)
- Seo, J. S., Han, E. M. and Lee, T. S.: Effect of *meju* shapes and strains on the chemicals composition of soybean paste. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **15**, 1-9(1986)
- Barnes, S.: Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. *J. Nutr.*, **125**, 777-783(1995)
- Steel, V. E., Pereira Caroline, M. A., Sigman, C. and Kelloff, G. J.: Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J. Nutr.*, **125**, 713-716 (1995)
- Kennedy, A. R.: The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J. Nutr.*, **125**, 733-743(1995)
- Arjmani, B. H., Alkel, L., Hollis, B. W., Amin, D., Sapuntzakis, M. S., Guo, P. and Kukreja, S. C.: Dietary soybean protein prevents bones loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J. Nutr.*, **126**, 161-167(1996)
- Shin, Z. I., Ahn, C. W., Nam, H. S., Lee, H. J., Lee, H. J. and Moon, T. H.: Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptide from soybean paste. *Korea J. Food Sci. Technol.*, **27**, 230-234(1995)
- Park, K. Y.: Destruction of aflatoxin during the manufacture of *doenjang* by traditional method and anti-cancer activities of the *doenjang*. *J. Food Sci. Technol. Konkuk Univ.*, **1**, 91(1996)
- Lee, J. H., Kim, M. H. and Im, S. S.: Antioxidative materials in domestic *meju* and *doenjang*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **2**, 148-155(1991)
- Pratt, D. E. and Birac, P. M.: Source of antioxidant activity of soybeans and soy product. *J. Food Sci.*, **44**, 1720-1727(1979)
- Lee, H. J.: Health functional peptides from soybean hydrolysate and fermented food. *J. Food Sci. Technol. Konkuk Univ.*, **1**, 102(1996)
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Murahhi, H.: A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese *natto*. *A typical and popular Soybean Food in the Japanese diet, Experientia*, **43**, 1110 (1987)
- Ebine, H.: Functions of *miso*. *J. Japanese Brewing.*, **85**, 70(1990)
- Park, C. S.: Antibacterial activity of water extract of green tea against pathogenic bacteria. *Korean J. Post Harvest Sci Technol.*, **5**, 286-291(1998)
- Yang, M. S., Ha, Y. L., Nam, S. H., Choi, S. U. and Jang, D. S.: Sereeing of domestic plants with antibacterial activity. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **38**, 584-589(1995)
- Choi, M. Y., Choi, E. J., Rhim, T. J., Cha, B. C. and Park, H. J.: Antimicrobial activities of pine needle. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 293-297(1997)
- Luck, E. and Jager, M.: *Antimicrobial food additives*. Springer-Verlag, Berlin, pp.174-189(1996)
- Jeong, Y. J., Lee, M. H., Lee, G. D., Park, N. Y. and Kwon J. H.: Effects of ethanol extracts from chrysanthemum petals on the growth inhibition of microorganism. *Korean J. Post Harvest Sci Technol.*, **5**, 299-304(1998)
- Akashi, A.: Preservative effect of egg white lysozyme of Vienna sausage. *Japan J. Zootech Sci.*, **42**, 289-295 (1971)
- Bellamy, W., Wakabayashi, H. and Shimamura, S.: Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.*, **182**, 97-105(1993)
- Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R.: Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helvecin. *J. Bacteriology*, **172**, 6339-6347(1990)
- AOAC: *Official methods for analysis*. 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., Ch.27, p.31(1995)
- Nollet, L. M. L.: *Handbook of food analysis*. Marcel Dekker, Inc., New York, Vol. 1, pp.828-849(1996)
- Joo, H. K., Kim, D. H. and Oh, K. T.: Chemical composition changes in fermented *doenjang* depend on *doenjang koji* and its mixture. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **35**, 351-360(1992)