

보리, 썩, 다시마, 대두 혼합물의 청국장 발효

유형재 · 이동석¹ · 김한복*

호서대학교 자연과학부 생명과학전공, ¹인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과

보리, 썩, 다시마, 대두를 재료로 하고 *Bacillus licheniformis* B1을 접종하여, 맛과 향이 향상된 청국장을 제조하였다. 본 혼합발효에서 단백질분해효소의 활성은 발효시작 하루만에 최대치에 이르렀으며, 발효시작 2일만에 pH는 8.4까지 증가하였다. 당과 아미노산에 의해 생성되는 갈변물질은 초기에 비해 20배 이상 증가하였다. 이상으로 대두에 보리, 썩, 다시마를 혼합하여도 청국장 제조가 가능함을 확인할 수 있었다. Ethanol과 methanol에 녹인 혼합발효분말의 농도를 각각 0.2에서 1% (w/v)로 증가시킬수록 농도의존적으로 항산화도는 증가하였다. 항산화도는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하여 결정하였다. Methanol에 1%의 분말청국장을 녹였을 때 항산화도가 가장 높았다. 고혈압군이 본 혼합발효분말 20 g을 복용했을 때 수축기 혈압이 2시간 지나 10 mmHg 떨어지는 강화효과가 있었다. 또한 맛과 향의 선호도면에서 보리, 썩, 다시마가 포함된 혼합발효분말이 발효대두보다 t 검정으로 유의적으로 높음을 보였다. 혼합발효분말은 앞으로 혈압강하용 기능성 청국장으로 개발될 수 있을 것이다.

Key words □ antioxidant, *Chungkookjang*, high blood pressure, melanoidin, peptide, protease.

우리가 섭취하는 식품에는 단순한 영양학적인 기능뿐만 아니라, 질병을 예방하고 치료할 수 있는 가능성도 있다. 기능성 식품(functional food)의 효과에는 정장작용, 혈당강하, 혈압강하, 콜레스테롤 저하, 혈액순환 개선, 미네랄흡수 촉진, 면역증강, 알러지 개선 등이 포함된다. 이러한 기능식품을 일본에서는 '특정 보건용 식품 (foods for specified health use)'라고 불리고 있으며 400 종류가 알려져 있다. 요즘 한국에서는 전통 발효식품인 청국장이 정장, 혈액순환 개선 등의 기능성 식품으로서 부각되고 있다. 청국장은 나라에 따라 템페, 두시, 키네마, 낫도로 불리기도 한다. 청국장은 대두 발효식품으로, 발효가 되면서, 대두에 없었던 미생물, 효소, 다양한 생리활성물질이 새롭게 만들어진다(2). 청국장 발효는 *Bacillus* 속에 의해 이루어지며(2), 청국장 속의 한 효소인 *Bacillus* 단백질분해효소는 일본에서는 낫도키나제라고 불리며, 인체에서 혈전용해 효과가 있다고 알려져 있다(20). 청국장의 생리활성물질에서는 genistein에 의한 항산화, 항암(18), 고분자핵산에 의한 면역증강(2,7,10), 펩타이드 성분에 의한 혈압강하 효과 등이 알려져 있다(15).

다른 일반 장류식품과는 달리, 청국장은 소금을 사용하지 않고 제조할 수 있다. 이런 점에서 청국장의 섭취는 한국인의 소금의 과잉섭취를 막아준다. 또한 1년간의 제조기간이 필요한 된장과는 달리 청국장은 2-3일의 비교적 단기간에 제조할 수 있는 장점도 있다. 청국장은 미생물과 효소 식품이다. 그러나 끓이게 되면 대부분의 미생물과 효소는 파괴되어, 미생물이나 효소에 의한 건강

증진효과를 빠른 시간에 얻기 힘들다. 따라서 생청국장을 섭취하는 것이 미생물과 효소를 살려서 먹는 좋은 방법이나, 아직까지 한국인에게 생청국장의 섭취는 기호 면에서 힘든 상황이다. 그 대안으로써 분말청국장을 생각할 수 있으나, 분말형태 역시 특유의 냄새와 맛이 남아 있어 많은 사람이 섭취하기에 쉽지 않은 형편이다.

보리, 썩, 다시마, 대두는 우리가 흔히 섭취하는 음식이면서, 서로의 부족함을 보완할 수 있는 자연건강식품으로 알려져 있다. 보리, 썩, 다시마, 대두를 각각 발효 시 항산화도가 크게 증가하는 것으로 보고되어 있다(5). 본 연구에서는 보리, 썩, 다시마, 대두를 같이 발효하여, 청국장이 제조될 수 있는지 여부와, 효소활성, 갈변도의 변화 등을 지표로 하여 발효과정을 추적하였다. 아울러 보리, 썩, 다시마 발효산물이 첨가된 청국장의 기능성 중 하나인 혈압강하 효과, 기호도를 결정하였다.

재료 및 방법

균주

청국장 발효균주로 *Bacillus licheniformis* B1을 이용하였다(2).

청국장 발효

쌀보리, 다시마, 대두는 식품매장에서 구입하였고, 인진썩은 한 약방에서 구입하였다. 보리, 썩은 물로 깨끗이 닦고 실온에서 건조하였다. 다시마는 물에 충분히 불려 소금기를 제거한 후, 오븐에서 건조하였다. 건조된 보리, 썩, 다시마는 분쇄한 후, 그 혼합물을 autoclave하였다. 수지, 증자된 대두 90%, 보리, 썩, 다시마 분말을 각각 7, 2.5, 0.5%의 비율로 혼합하였다. 여기에 *Bacillus licheniformis* B1 배양액을 1% 접종하여, 40°C 인큐베이터 속에

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-540-5624, Fax: 041-548-6231
E-mail: hbkim@office.hoseo.ac.kr

서 발효시켰다(2). 3일간 발효 후 발효산물을 진공동결 건조하여 최종분말을 제조하였다.

단백질 분해효소의 활성측정

대두가 포함된 혼합 분말의 단백질 분해효소의 활성측정은 skim milk 한천배지를 이용하였다. 발효시작부터 4일까지 하루에 한번씩 20 g을 덜어 진공동결 건조하여 분말을 제조하였다. 그 중 0.2 g을 5배 부피의 증류수에 넣은 후 4°C, 14,000×g에서 10분간 원심분리하였다. Skim milk 한천배지에 구멍을 뚫고 상층액 5 µl를 넣고 37°C incubator에 15시간 두었다. 단백질분해효소의 활성은 배지의 투명환의 지름을 측정하여 결정하였다. 이때, 배지에서 균주가 자라지 못하도록 0.1% Na₂N₃를 첨가하였다.

갈변도의 측정

갈변물질은 청국장장의 당 성분과 아미노산의 반응에 의해 생성된다(3). 대두가 포함된 혼합분말의 발효 시작부터 4일까지 하루에 한번씩 20 g을 덜어 진공동결 건조하여 분말을 제조하였다. 그 중 0.2 g을 5배 부피의 증류수에 넣은 후 4°C, 14,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액의 흡광도를 각각 390, 500 nm에서 측정하여 갈변도를 결정하였다.

pH 측정

대두가 포함된 혼합분말의 발효 시작부터 4일까지 하루에 한번씩 20 g을 덜어 진공동결 건조하여 분말을 제조하였다. 그 중 0.2 g을 5배 부피의 증류수에 넣은 후 4°C, 14,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액의 pH를 pH meter를 사용하여 결정하였다.

항산화도 결정

혼합 분말청국장을 100% ethanol과 methanol에 0.2, 0.5, 1% (w/v) 되게끔 녹인 후 12시간 실온에 두었다. Ethanol과 methanol 추출액을 12,000×g, 4°C에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 항산화도는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, St. Louis, USA)방법을 이용, 517 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다(11). Ethanol이나 methanol 추출액을 DPPH와 섞어준 후, spectrophotometer (UVICON 930, Kontron Instruments, Denver, USA)의 time drive 기능을 이용하여 초기반응부터 30분간 항산화도의 kinetics를 추적 결정하였다.

혈압측정

혈압측정은 자동혈압측정계 (Omron R4 model, Omron Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 분말을 복용전과 2시간 경과후, 각각 개인당 2회 측정하여 평균값을 취하였다.

t 검정

11명을 대상으로 대두 발효분말을 복용케 하고, 30분 후에 혼합 발효분말을 복용하게 한 다음, 선호도를 1에서 10점 범위에서 기록하도록 하였다. SPSS 통계 패키지 10.0(SPSS Ins., Chicago,

Ill., USA)의 대응표본 t검정 기능을 통해, 선호도를 통계적으로 검정하였다.

결과 및 고찰

청국장 발효

보리, 쑥, 다시마, 대두가 혼합되었을 때도 청국장 발효가 일어나는지 여부를 결정하였다. 쑥등은 항균효과가 있어, 쑥의 추출물을 이용할 경우, *Bacillus*균의 증식을 억제할 수도 있다는 보고도 있다(1). 청국장 발효의 기준은 대두 표면의 색깔이 갈색으로 바뀌고, 암모니아 냄새가 나며, 점질성 물질이 생기는 것으로 하였다. 증자대두의 자체 pH는 6.8이었으나, 발효 2일째는 8.4까지 증가하였다(Fig. 1). 이는 대두의 단백질이 아미노산, 암모니아로 분해되면서 pH가 증가한다는 기존의 보고와 부합하였다(2). 본 실험에서 추출물이 아닌 2.5% 쑥 분말을 청국장 제조에 이용했을 때, 청국장 발효는 정상적으로 이루어졌고, 오히려 청국장 향의 기호도를 증진시킬 수 있었다.

단백질분해효소의 활성

대두, 보리, 쑥, 다시마 혼합물이 발효될 때 단백질분해효소의 활성을 추적하였다. 효소의 활성은 발효시작 하루만에 14 mm의 투명환을 보여 최대치에 이르고, 그 후로는 12 mm 내외의 투명환을 보이는 등, 약간 떨어진 상태로 일정수준을 유지하였다(Fig. 2). *Bacillus* 단백질분해효소는 인체에서 위, 장을 통과하면서 상당량 파괴되지만, 소량이 혈관 속으로 흡수되어 혈전을 직접 녹이거나, tPA양을 증진시키는 간접적인 방법으로 혈전용해효과가 인체 내에서도 가능하다고 보고되어 있다(9, 20). 최근 몇몇 *Bacillus* 혈전용해 효소 유전자 클로닝된 바 있다(17). 혈전은 심장혈관이나 뇌혈관을 막아 협심증, 뇌졸중 등을 일으킨다. 통계청 '2002년도 사망원인 통계'에 의하면 인구 10 만명당 사망률은 암이 130.7명, 뇌혈관질환이 77.2명, 심장질환이 37.2명으로 되어 있다. 1위인 암이 여러 장기의 모든 암의 사망률을 합쳐 계산한 것을 고려하면 사실상 혈관질환이 사망률 1순위라고 볼 수 있다. 혈전치료제로 tPA, urokinase, streptokinase 등이 개발되어 있으나 이들은 매우 고가이며 응급시 정맥으로 주사된다(16). 반면에 청국장 속의 혈전용해 효소는 식품으로 섭취할 수 있는

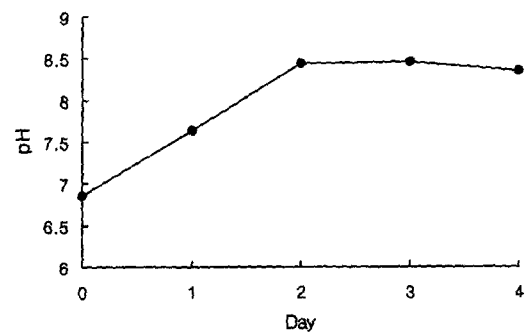


Fig. 1. pH change during fermentation.

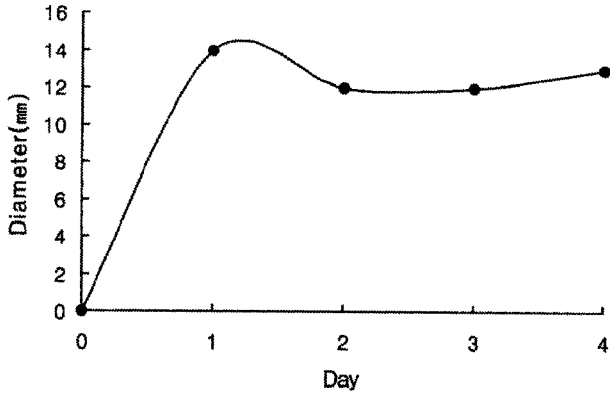


Fig. 2. Protease activities during *Chungkookjang* fermentation.

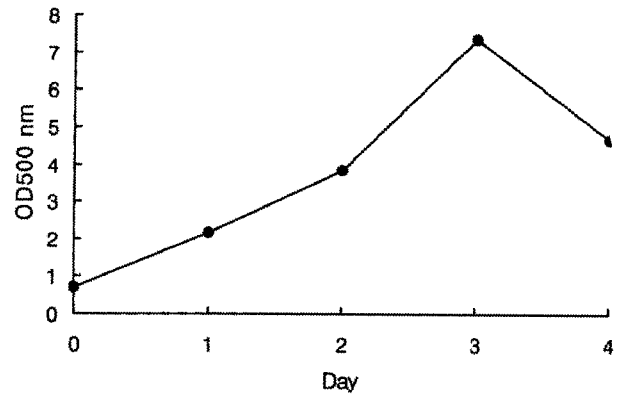


Fig. 4. Detection of browning materials at 500 nm.

경구용이런 장점이 있다. 꾸준히 생청국장을 먹게 되면 혈관관련 질환 예방에 상당한 도움을 줄 수 있을 것이다.

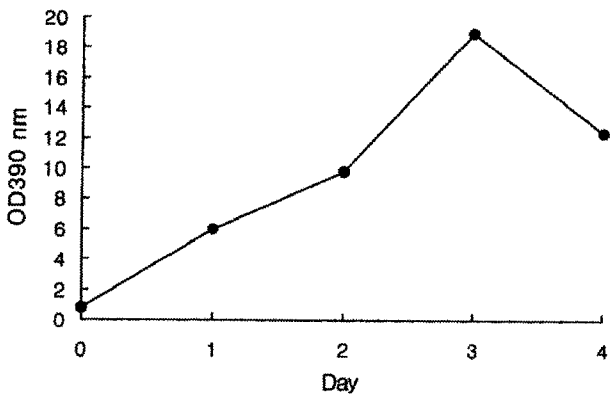
본 *B. licheniformis* B1 단백질분해효소도 혈전용해능이 있음이 확인되었다(data not shown). 또한 본 효소에 의해 대두 단백질이 분해되면서 생성되는 peptide류도 다양한 생리활성을 지닐 것으로 사료되며 이에 대한 연구가 진행 중이다.

갈변물질의 생성

청국장 속의 갈변물질은 아미노산의 아미노기와 당의 carbonyl 기의 반응에 의해 생성되는 melanoidin으로 그 항산화효과가 알려져 있다(3, 8). *B. licheniformis* B1이 분비하는 단백질분해효소와 glucosidase 등에 의해 아미노산과 당이 생성된다(2). 혼합분말의 발효시간에 따른 갈변도의 변화를 390과 500 nm에서 확인하였다. 390 nm에서는 발효시작 3일 만에 흡광도가 1.1에서 19까지 약 19배 증가하였다(Fig. 3). 500 nm에서도 발효시작 3일 만에 1.0에서 8.0까지 약 8배 증가하였다(Fig. 4). 이와 같은 갈변물질의 생성은 청국장이 제대로 만들어지는지 여부를 결정할 수 있는 대표적인 지표라고 볼 수 있다.

항산화도의 증가

Ethanol과 methanol에 녹인 혼합 발효분말의 농도를 각각 0.2



Detection of browning materials at 390 nm.

에서 1%(w/v)로 증가시킬수록 농도의존적으로 항산화도는 증가하였다(Fig. 5). Methanol에 1%의 분말청국장을 녹였을 때 항산화도가 가장 높았다(Fig. 5). 단순 대두 발효분말에서는 ethanol추출물의 항산화도가 methanol 추출물 보다 더 높았으나(3, 5), 보리, 쑥, 다시마 혼합분말에서는 methanol 추출물의 항산화도가 뚜렷이 높았다. 보리, 쑥, 다시마에 포함되어 있는 항산화물질이 methanol에 더 잘 용해될 가능성이 있을 것으로 사료된다.

각종 곡물, 채소, 과일, 해조, 약초류 등은 강한 자외선으로부터 자신을 보호하기 위해 껍질 등에 항산화물질을 풍부하게 포함하고 있다. 대두와 청국장에 존재하는 대표적인 항산화물질에는 caffeic acid, chlorogenic acid, isoflavone, genistein, 아미노산, 갈변물질 등이 알려져 있다(3, 5). 특히 발효대두에서는 285 nm에서 발견되는 phenol류의 항산화물질이 다량 존재하는 것으로 알려져 있다.

혈압강하효과

혼합 발효산물 20 g을 섭취하게 한 후, 2시간 지나서 혈압변화를 측정하였다. 이러한 혼합 발효산물은 소금을 전혀 포함하지

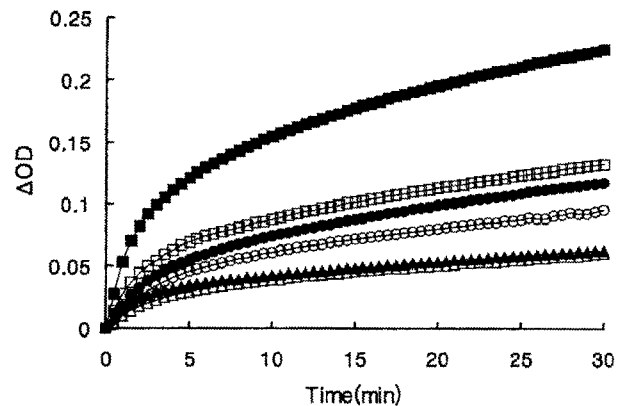


Fig. 5. Increase of antioxidant activity. Fermented products were dissolved to be 0.2 (▲), 0.5 (●), and 1.0% (■) in methanol or 0.2 (△), 0.5 (○), and 1.0% (□) in ethanol, and each antioxidant activity was determined by measuring decrease of OD at 517 nm.

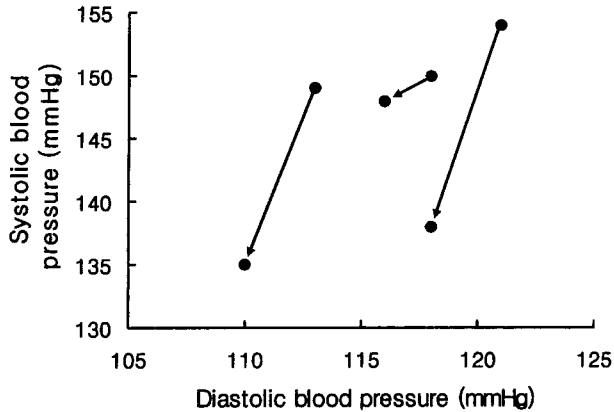


Fig. 6. Change in blood pressure. Systolic and diastolic blood pressures of the three volunteers were determined at 0 and 2 h after the administration of 20 g of the mixed fermented product.

않은 것이다. 정상인 군에서는 혈압변화가 거의 일어나지 않았지만(data not shown), 고혈압군인 3명의 평균 수축기 혈압은 151 mmHg에서 섭취 후 140 mmHg로 떨어졌고 이완기 혈압은 117 mmHg에서 115 mmHg로 큰 차이는 없었다(Fig. 6). 2시간만에 수축기 평균혈압이 10 mmHg 떨어진 것은 상당히 뚜렷한 효과이다. 보다 많은 대상을 상대로 혼합 발효산물의 혈압강하 효과가 검증되는 과정을 거쳐, 앞으로 혼합 발효산물이 혈압강하용 기능성 식품으로 개발되기를 기대한다.

Angiotensin converting enzyme (ACE)는, 신장에서 분비되는 레닌에 의해 생성되는 angiotensin I을 II로 전환시키는 효소이다(14). Angiotensin II는 혈압을 높이는 데 직접 관여한다(14). 또한 ACE는 혈압강하 peptide인 bradykinin을 불활성화시킨다(14). 근래에 captopril과 같은 ACE 저해제가 고혈압 치료제로 사용되고 있다(14). Captopril이 효과적인 고혈압 치료제이나 마른 기침 등 부작용이 보고되어 있어, 식품 유래의 ACE 저해제의 장기적인 섭취가 오히려 도움이 될 수 있다. 종자, 정어리 분해산물 등 단백질을 포함한 식품소재에서도 다양한 peptide성 ACE 저해제가 발견되고 있다(13, 14). 발효대두 속에서도 Ile-Phe-Leu, Trp-Leu, His-His-Leu 등의 ACE 저해자들이 보고되어 있다(4, 6, 12, 19).

본 실험에서 사용된 발효 대두 peptide 중에 존재하는 다양한 ACE 저해제가, 고혈압군의 혈압을 떨어뜨렸을 가능성이 높다. 앞으로 발효대두 중의 ACE저해제의 분리, 정제, 특성 등에 관한 깊이있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

관능검사

혼합 발효분말과 대두 발효분말의 선호도 평균은 각각 7.3과 4.2이었으며, t검정결과 혼합발효분말이 대두만의 발효분말보다 선호도 면에서 5% 유의수준에서, 유의적으로 높다는 것을 확인하였다. 생청국장이나 분말청국장을 먹기 힘든 사람에게는, 보리, 쭉, 다시마가 포함되어 있는 혼합 발효분말형이 맛이나, 향 면에서 복용하기에 부담이 없을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부 한국과학재단 지정 지역협력연구센터인 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터의 연구비와, 호서대학교 특별 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. 김영숙, 김무남, 김정옥, 이정호. 1994. 쭉의 열수추출물과 주요 향기성분이 세균의 생육에 미치는 영향. 한국영양학회지 23, 994-1000.
2. 이재중, 이동석, 김한복. 1999. *Bacillus licheniformis* B1에 의한 청국장 및 간장 발효. 미생물학회지 35, 296-301.
3. 이재중, 조창훈, 김지연, 이동석, 김한복. 2001. 분말청국장에서 알코올로 추출한 물질의 항산화능. 미생물학회지 37, 177-181.
4. 유리나, 박수아, 정대균, 남희섭, 신재익. 1996. 대두 가수분해물에서 분리한 UF-peptide가 in vivo에서 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압 강하에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 25, 1031-1036.
5. 유형재, 이승훈, 이동석, 김한복. 2002. 발효 보리, 쭉, 다시마, 대두의 항산화효과. 미생물학회지 38, 230-233.
6. 차명화, 박정룡. 2001. 간장으로부터 Angiotensin converting enzyme 활성 저해물질 생성 균주의 분리 동정. 한국식품영양과학회지 30, 594-599.
7. Carver J.D. 1999. Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta. Paediatr. Suppl.* 88, 83-88.
8. Chuyen, N.V., K. Ijichi, H. Umetsu, and K. Moteki. 1998. Antioxidative properties of products from amino acids or peptides in the reaction with glucose. *Adv. Exp. Med. Biol.* 434, 201-212.
9. Fujita, M., K. Hong, Y. Ito, S. Misawa, N. Takeuchi, K. Kariya, and S. Nishimuro. 1995. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1194-1196.
10. Gil, A. 2002. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, Suppl. 3, S1-4.
11. Hirota, A., S. Taki, S. Kawaii, M. Yano, and N. Abe. 2000. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1038-1040.
12. Kuba, M., K. Tanaka, S. Tawata, Y. Takeda, and M. Yasuda. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1278-1283.
13. Marczak, E.D., H. Usui, H. Fujita, Y. Yang, M. Yokoo, A.W. Lipkowski, and M. Yoshikawa. 2003. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* 24, 791-798.
14. Matsui, T., K. Tamaya, E. Seki, K. Osajima, K. Matsumo, and T. Kawasaki. 2002. Absorption of Val-Tyr with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity into the circulating blood system of mild hypertensive subjects. *Bio. Pharm. Bull.* 25, 1228-1230.
15. Okamoto, A., H. Hanagata, Y. Kawamura, and F. Yanagida. 1995. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Foods Hum. Nutr.* 47, 39-47.
16. Osborn, T.M., M.P. LaMonte, and W.R. Gaasch. 1999. Intravenous thrombolytic therapy for stroke: A review of recent studies and

- controversies. *Ann. Emerg. Med.* 34, 244-255.
17. Peng, Y., Q. Huang, R. Zhang, and Y. Zhang. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Com. Biochem. and Physiol. B.* 134, 45-52.
18. Sarkar, F.H. and Y. Li. 2002. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.* 21, 265-280.
19. Shin, Z.I., R. Yu, S.A. Park, D.K. Chung, C.W. Ahn, H.S. Nam, K.S. Kim, and H.J. Lee. 2001. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3004-3009.
20. Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi, and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic-activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* 84, 139-143.

(Received January 28, 2004/Accepted March 3, 2004)

ABSTRACT: Chungkookjang Fermentation of Mixture of Barley, Wormwood, Sea Tangle, and Soybean

Hyung Jae Yoo, Dong Seok Lee¹, and Han Bok Kim (Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea, ¹Department of Medical Laboratory Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea)

Barley, wormwood, sea tangle, and soybean were fermented by *Bacillus licheniformis* B1 to make *Chungkookjang* with better flavor and aroma. Maximal protease activity in mixed grains was observed one day after inoculation. pH increased to 8.4 two days after inoculation. Browning material derived from interaction between sugar and amino acids increased 20-fold. Thus, it is proved that *Chungkookjang* can be made in the mixed grains. Antioxidant activities of mixed fermented grains dissolved in ethanol or methanol (0.2 and 1%) increased depending on their concentrations. Antioxidant activities were determined using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). One % of powder *Chungkookjang* dissolved in methanol showed highest antioxidant activity. Systolic blood pressure of hypertensive volunteers who took 20 g of mixed fermented powder decreased on average by 10 mmHg in 2 h. Preference of mixed fermented soybean containing barley, wormwood, sea tangle to fermented soybean was demonstrated by t-test analysis. Mixed fermented grains can be developed as a functional food to lower hypertension.