

전통 메주로부터 분리한 Protease 생성 곰팡이로 제조된 된장의 품질 특성

김종호 · 유지수 · 이치호¹ · 김수영² · 이시경*

건국대학교 응용생물화학과, ¹건국대학교 축산식품생물공학과, ²건국대학교 생명과학과

Quality Properties of Soybean Pastes Made from Meju with Mold Producing Protease Isolated from Traditional Meju

Jong Ho Kim, Ji Soo Yoo, Chi Ho Lee¹, Soo Young Kim² and Si Kyung Lee*

Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University

¹Department of Food Science & Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University

²Department of Biological Science, Konkuk University

Received January 11, 2006; Accepted February 14, 2006

This study was carried out to examine the quality characteristics of soybean pastes made of Meju with mold-producing protease isolated from traditional Meju. The changes in moisture content, enzyme activity (amylase, protease, lipase), reducing sugar, amino-type nitrogen contents and antioxidant activity were investigated during the aging period. The moisture contents decreased gradually with time. Amylase activity decreased during the aging period while protease and lipase activities increased until 30-45 days of aging, but decreased thereafter. Especially protease activity in soybean paste with mold was greater than that in the control. Amino-type nitrogen and ammoniacal nitrogen contents increased, but reducing sugar contents decreased with time. Amino-type nitrogen contents were greater in soybean paste made of Meju with isolated mold than those in the control. Antioxidative activity was also confirmed in soybean paste.

Key words: soybean paste, enzyme activity, mold

서 론

된장은 청국장, 간장 등과 함께 콩을 주원료로 하여 발효, 숙성시킨 우리 나라의 대표적인 대두 발효식품이다. 이들은 단백질과 아미노산 함량이 높을 뿐만 아니라, 저장성이 뛰어나며, 그 특유의 맛과 향을 지니고 있어 우리 조상들의 식생활에 널리 애용되어 왔다.

된장은 영양학적으로도 우수하여 필수아미노산, 지방산, 유기산, 미네랄, 비타민 등을 보충해 줄 수 있으며¹⁾, 각종 생리활성, 예를 들어 항산화 효과²⁾, 혈전용해 효과³⁾, 항암효과⁴⁾, 고혈압방지효과⁵⁾, 항돌연변이성⁶⁾ 등에 대한 효과가 입증되면서 된장에 대한 여러 가지 연구가 활발히 진행되어왔다.

된장의 숙성과정 중 맛, 향, 색 등의 품질을 결정짓는 데에는 여러 가지 요인이 있으나, 크게 원료, 제조방법, 메주나 Koji 제조에 사용되는 균주 등으로 나눌 수 있다. 좋은 원료와 제조

방법이 된장 품질에 많은 영향을 끼치는 하지만, 된장은 숙성 과정에서 미생물의 작용에 따라 그 맛과 향 등이 결정되므로 작용하는 미생물이 가장 중요하다고 할 수 있다. 숙성에 관여하는 미생물로는 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis* 등이 있으며, 이런 곰팡이와 각종 세균 등의 여러 미생물들이 복합적으로 작용하여 이들이 내는 효소에 의해 된장의 맛과 향에 영향을 끼친다. 된장 품질에 영향을 끼칠 수 있는 미생물 효소로는 protease, amylase, lipase 등을 들 수 있으며, 이런 미생물 효소에 의해 원료의 단백질과 탄수화물 그리고 지방 등이 가용성으로 분해되어 된장의 맛과 향이 결정된다. 즉, 된장 고유의 맛과 향은 소금에서 오는 짠맛, 탄수화물이 알코올로 발효됨으로서 나타나는 tangy flavor, 단백질의 가수분해 산물인 아미노산에서 오는 구수한 맛 등이 조화를 이루면서 또한 향미 생성과 색이 생성된다⁷⁾.

된장에 작용하는 미생물에 관한 연구로는 Seo 등⁸⁾의 *Bacillus* sp.과 *Aspergillus oryzae*로 만든 메주가 개량식 된장의 성분에 미치는 영향, Yoo 등⁹⁾의 전통된장으로부터 분리한 균종으로 제조된 된장의 품질특성, Ahn 등¹⁰⁾의 메주 균을 달리한 숙성 된장의 유리아미노산, 유리당 및 유기산 조성의 비교, Park 등⁷⁾의

*Corresponding author
Phone: +82-2-405-3759; Fax: +82-2-456-7183
E-mail: lesikyung@konkuk.ac.kr

균주를 달리한 된장의 발효기간에 따른 대두의 조직학적 변화에 관한 연구 등이 있다.

따라서 본 연구에서는 전통 메주로부터 protease 생성능이 우수한 균주를 선별하여 메주를 만들어 된장을 제조하여 90일간 숙성시키면서 각 된장의 숙성도와 효소력, 그리고 항산화력을 숙성일별로 측정하면서 protease 생성 균주의 사용이 된장의 품질에 미치는 영향을 조사하여 된장 제조를 위한 기초 자료로 사용하고자 하였다.

재료 및 방법

원료 및 균주 분리. 된장 제조에 사용한 대두는 건국대학교 여주실습농장에서 재배한 황 대두를 구입하여 사용하였으며, 소금은 태초솔트(주)태초솔트) 볶음 소금을 사용하였다. 전국에서 수집한 메주에서 곰팡이를 분리하기 위하여 각각의 시료 10 g에 생리 멸균수 90 ml를 취해서 30분간 진탕하여 10^{-3} ~ 10^{-5} 로 희석한 후 PDA 3.3 g과 Skim milk 0.5 g, Agar 0.5 g, Rosebengal 1 g을 증류수 100 ml에 녹여 제조한 배지에 도말하여 25°C에서 72시간 배양한 후 배지에 나타난 환의 크기와 protease 활성을 측정하여 단백질 분해능이 우수한 균주를 선별하였다.

된장 제조. 된장 제조에 사용한 원료, 메주와 소금과 물의 비율을 33 : 13 : 54로 하였다. 선별한 대두를 물로 씻어 이물질을 제거한 다음, 24시간 동안 침지한 후 이를 121°C에서 1시간 동안 증자시킨 후, 30°C까지 냉각시켰다. 여기에 미리 배양한 균주를 접종하여 메주를 성형하였다. 즉, 전통메주로부터 분리한 균주를 접종하여 제조한 것과, 균주를 접종하지 않고 자연 발효시켜 제조한 것을 대조군으로 해서 메주를 성형하였다. 성형한 메주를 상온에서 걸말림을 한 뒤, 벗집으로 묶어 30일 동안 발효시켰다. 완성된 메주를 적당히 파쇄하여 항아리에 넣고 소금과 물을 넣어 90일간 숙성시켰다. 숙성기간 동안 15일마다 된장 시료를 채취하여 동결 건조하여 보관하면서 본 실험에 사용하였다. 수분은 시료 1 g을 취해서 Moisture Determination Balance를 사용하여 측정하였다.

효소활성 측정. 효소활성 측정을 위한 조효소액은 된장시료 10 g에 증류수 100 ml를 첨가하여 상온에서 30분 동안 진탕 추출한 후, 원심분리기를 사용하여(8,000 rpm, 20 min) 그 상정액을 취하여 조효소액으로 하였다. Amylase 활성 측정은 1% soluble starch용액을 기질로 사용하는 D.U.N.(Dextrinogenic Unit of Nagase)법¹¹⁾, protease 활성 측정은 0.6% casein 용액을 기질로 하는 Anson 변법¹²⁾, lipase 활성은 올리브 오일을 사용하는 김 등¹³⁾의 방법을 변형시켜 tributyrin을 기질로 사용하여 측정하였다. 환원당 함량은 Dinitrosalicylic acid(DNS)에 의한 비색법¹⁴⁾에 의해 측정하였다.

아미노태 질소함량 측정. 시료 10 g을 100 ml의 열수로 용해한 후 1분간 약하게 끓이고 250 ml가 되도록 증류수로 세척하고 이를 잘 혼합하여 여지(Whatman No. 2)로 여과한 후, 그 여액 25 ml씩을 취하여 2개의 삼각플라스크에 취한다. 한쪽에 중성 formalin 용액 20 ml와 물 20 ml를 가하고, 다른 쪽은 공시험으로서 물 40 ml를 가한다. 양쪽에 0.5% 페놀프탈레인 용액을 약 2-3방울 가하여 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 아미

노태 질소함량을 측정하였다¹⁴⁾.

암모니아태 질소함량 측정. 암모니아태 질소함량 측정은 indophenol-blue 법¹⁵⁾을 사용하여 측정하였다. 아미노태 질소함량 측정과 동일한 시료액 0.1 ml에 A용액(Phenol 10 g and sodium nitroprusside dihydrate 0.05 g in distilled water 1,000 ml)과 B용액($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9 g, NaOH 6 g and NaOCl 10 ml in distilled water 1,000 ml)을 각각 2 ml씩 넣어 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 ammonium sulfate를 0-200 μg 으로 단계적으로 희석하여 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정하여 작성하였다.

전자공여능 측정. 된장의 에탄올 추출물을 이용한 전자공여능 측정은 α, α -diphenyl- β -picryl hydrazyl(DPPH, Sigma, USA)에 대한 전자공여효과로서 추출물의 환원력을 측정하였다¹⁵⁾. 즉, 추출물 0.6 ml에 4×10^4 M DPPH 용액(99% Ethanol에 용해) 2.4 ml를 가한 후 vortex로 10초간 진탕하고 10분후 526 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 추출물 대신 추출용매만을 넣은 것으로 같은 방법으로 흡광도를 측정하였으며, 전자공여능은 시험구와 대조구의 흡광도를 통해 백분율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A: 시험구의 흡광도, B: 대조구의 흡광도

또한 linoleic acid emulsion 2 ml에 된장 추출액 1 ml을 넣고 37°C에서 15시간 산패시킨 후, 60% methanol 6 ml을 넣고 234 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 linoleic acid emulsion에 추출용매만을 넣은 것을 같은 방법으로 하여 흡광도를 측정하였으며, 다음 식에 의하여 AOA(Antioxidant activity)를 계산하였다.

$$\text{AOA} = 1 - \frac{A}{B}$$

A: 실험구의 흡광도, B: 대조구의 흡광도

과산화물가 측정. Linoleic acid에 의한 과산화물가를 통해 된장 추출물의 항산화 효과를 측정하였다¹⁶⁾. Linoleic acid 1 g을 ethanol 20 ml에 녹인 후, 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 25 ml를 가하고 시료에 대한 각 추출물 5 ml를 linoleic acid-ethanol 용액에 첨가하였다. 그리고 45°C로 유지되는 incubator에서 9일간 반응시키면서, 일정 기간별 반응 용액을 채취하여 이 반응 용액을 separating funnel에서 chloroform 25 ml를 첨가하여 진탕시킨 후, 하층부만을 취하여 acetic acid glacial 25 ml와 KI 포화용액 1 ml을 가한 다음, 암소에서 5분간 방치시킨 다음, 증류수 50 ml를 가하고 0.01 N Sodium thiosulfate solution으로 적정하여 과산화물가를 계산하였다.

$$\text{과산화물가(meq/kg)} = \frac{(V1 - V0) \times F \times 0.01}{S} \times 10$$

V1: 본시험의 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액의 적정소비량(ml)

V0: 공시험의 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액의 적정소비량(ml)

F: 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액의 역가, S: linoleic acid의 양(g)

Table 1. Changes of moisture contents in soybean paste made from Meju with mold producing protease with aging time (Unit: %)

Soybean pastes	Aging time (days)					
	15	30	45	60	75	90
Control	53.4	52.7	50.9	50.2	50.5	49.8
Pro D*	52.9	52.7	51.1	50.2	49.3	48.6

Pro D*: Soybean paste made by Meju with mold producing protease

결과 및 고찰

된장의 숙성기간별 수분함량의 변화. 된장의 숙성기간에 따른 수분함량의 변화를 Table 1에 나타내었다. 시료별로 수분함량의 차이가 크게 나타나지 않았으며, 숙성 15일에서의 수분함량은 52.9-53.4%를 나타내었으나, 숙성 90일에는 48.6-49.8%를 나타내어 전반적으로 숙성기간이 경과함에 따라 수분함량은 다소 감소하는 경향을 보였다. 이는 된장 담금 직후 수분함량은 평균 47.7%이었으며, 40일 숙성 후에는 평균 52.9%로 숙성기간 경과에 따라 수분함량은 증가하는 경향을 보였다는 주 등¹⁷⁾의 결과와 친일염으로 제조한 된장의 발효과정 중 수분함량은 발효 20일 경에 최대를 나타내었고 그 이후는 감소하는 경향을 나타내었다는 김 등¹⁸⁾의 결과와는 달랐으나, 된장숙성 과정에서 담금 직후부터 계속 감소되었다는 박 등¹⁹⁾의 결과와는 일치하였다. 이와 같은 수분함량의 감소는 3월경에 담금을 시작한 된장이 숙성일이 경과함에 따라 초여름으로 접어들어 기온 상승으로 인한 수분의 증발로 인한 것으로 생각된다.

Amylase 활성의 변화. 된장의 숙성기간별 amylase 활성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 일반적으로 모든 시료의 제품에서 amylase 활성은 매우 낮게 나타났다. 시료별로는 대조구가 숙성 15일에서 44.80 unit/g으로 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, protease 생성균주를 접종한 시료가 같은 기간에 42.22 unit/g으로 나타났다. 대조구와 시험구의 효소활성은 큰 차이를

보이지는 않았지만, 숙성기간에 따라 amylase 효소활성은 급격히 감소하는 경향을 보였다. 즉, 숙성기간에 따른 효소활성은 모든 시료 된장에서 숙성 초기인 15일째에서 가장 높았으며, 그 이후에 지속적인 감소를 보여, 숙성 90일에는 시료별로 각각 4.65, 8.64 unit/g의 매우 낮은 효소활성을 보였다. 이는 담금 초기 된장의 원료인 콩에 소량 함유되어 있는 전분이 amylase의 기질이 되어 효소 활성이 높았다가 숙성일이 경과하면서 기질이 소모됨에 따라 그 활성이 계속적으로 떨어진 것으로 보인다.

주 등²⁰⁾은 *Aspergillus* sp.에 의한 콩된장 발효와 효소활성을 측정하였는데 그 결과를 보면, 된장 숙성 20일째에서 시료별로 amylase 활성이 323.2-490.0 unit/g의 분포를 나타내었으며, 숙성 100일에서는 83.6-445.2 unit/g를 나타내었다. 이들의 결과와 비교하였을 때 본 연구에서의 amylase 활성도는 매우 낮은 결과인데, 이는 시료 된장의 제조 방법에 따른 차이로 보인다. 즉, 주 등²⁰⁾은 쌀코지를 만들어 된장을 제조한 반면 본 연구에서는 별도의 쌀이나 밀 등을 이용하여 코지를 만들지 않았고, 메주와 소금과 쌀 만으로 제조하였으므로 amylase의 기질이 되는 전분이 부족한 결과에 따른 것으로 생각된다.

Protease 활성의 변화. 된장의 숙성 기간별 protease 활성을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 시료별로는 protease 생성 균주를 사용하여 제조한 된장의 경우, 대조구에 비해 월등히 높은 효소활성을 나타내었다. 이는 메주 제조시 사용한 균주가 생성하

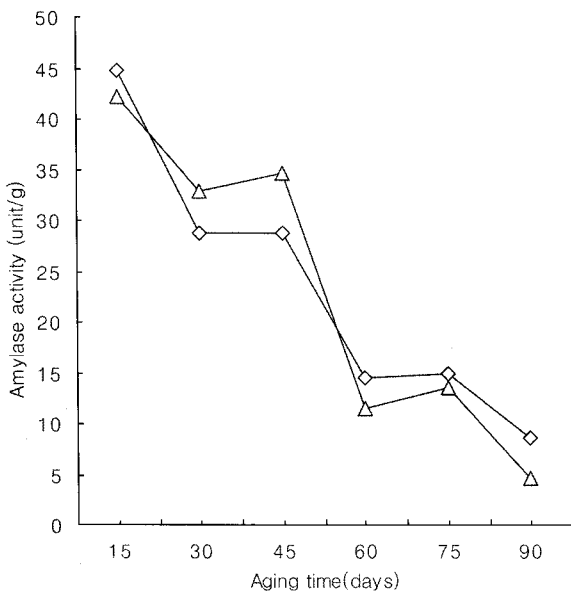


Fig. 1. Changes of amylase activity in soybean paste made from Meju with mold producing protease with aging time. ◇: Control, △: Pro D.

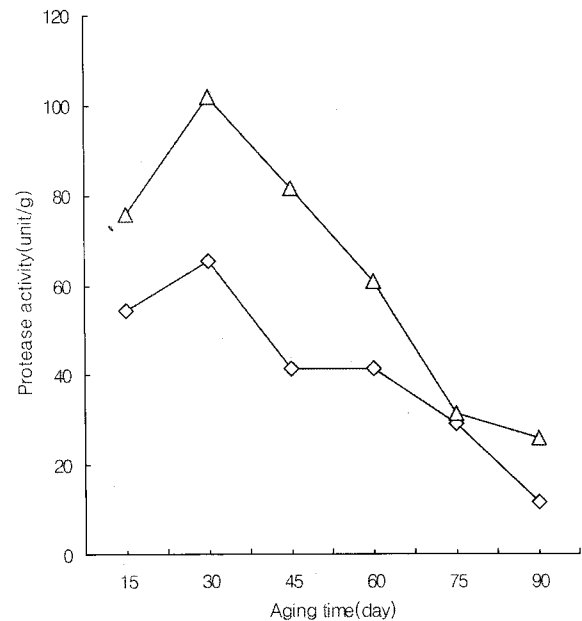


Fig. 2. Changes of protease activity in soybean paste made from Meju with mold producing protease with aging time. ◇: Control, △: Pro D.

는 protease 활성이 높기 때문에 나타난 결과이며, 대조구의 경우 시험구보다 낮기는 하지만 protease 활성이 나타난 것은 자연 상태에서 다양한 균주가 protease 생성에 관여했기 때문인 것으로 생각된다.

숙성기간에 따른 protease 활성의 변화를 살펴보면, 된장의 숙성 초기인 15일째에는 각각 54.30, 75.39 unit/g을 보였으며, 그 이후 숙성이 진행됨에 따라 점차적으로 증가하여 숙성 30일째에 최대치를 나타내어 각각 65.2, 105.6 unit/g 까지의 분포를 보였으나, 그 이후에는 계속 감소하는 경향을 나타내었다. 주 등²⁰⁾은 각 시험구의 protease 활성도 측정결과 발효 40일까지는 증가하는 경향을 보였으나, 발효 60일에는 0.7-18.5 unit/g으로 감소하였으며, 다시 발효 100일까지는 증가하는 경향을 보였다고 보고하여 본 연구와는 다소 차이가 있다. 그러나 윤 등²¹⁾은 *B. subtilis*로 추정되는 균을 첨가한 된장의 발효과정 중에 protease 활성이 발효 40일까지 증가하나 그 후 감소하는 경향을 보였다고 하였으며, 김 등¹⁸⁾은 천일염으로 제조한 된장의 발효특성에서 protease의 활성을 측정한 결과 발효 기간 동안 점점 증가하다가 그 이후 감소한다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다.

이상의 실험 결과 숙성초기부터 30일 까지 protease 활성이 증가하다가 그 이후에 감소하는 것으로 나타났으나 이 이후 다시 활성이 증가한다고 보고한 주 등²⁰⁾은 그 원인에 대해 계속 숙성되어 가면서 가용성 단백질이나 peptide가 아미노산으로 가수 분해되면서 protease 활성도가 증가한 것으로 사료된다고 밝혔는데, 본 연구에서는 그런 현상이 나타나지 않았다. 이는 된장의 효소활성은 사용한 미생물에 따라 큰 차이가 날 수 있어, 사용한 균주의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

된장에서 protease의 분비는 대두 단백질의 소화성과 영양성 개선에 큰 역할을 하며, 아미노산 질소 함량과도 연관성이 있어 된장 특유의 맛을 내는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 protease 활성이 높은 균주를 사용하여 된장을 제조할 경우, 된장의 맛과 영양성에 좋은 영향을 미칠 것으로 생각된다.

Lipase 활성의 변화. 된장 시료를 달리하여 숙성기간별로 lipase 활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 대조구와 protease 활성이 높은 균주를 사용하여 제조한 된장의 숙성기간에 따른 lipase 효소활성의 변화는 숙성초기인 15일에서부터 숙성 30일까지는 그 활성이 증가하여 최대치를 보여 각각 33.0, 35.75 unit/g을 나타냈으며, 그 이후 숙성 60일까지는 완만히 감소하다가 숙성 75일 부터는 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이런 경향은 20일까지는 lipase의 활성도가 증가하여 최대 활성을 나타냈으나 그 이후 100일까지 감소하는 경향을 보였다는 주 등²⁰⁾의 보고와 비슷하였다. 한편 이 등²²⁾은 발효가 진행되면서

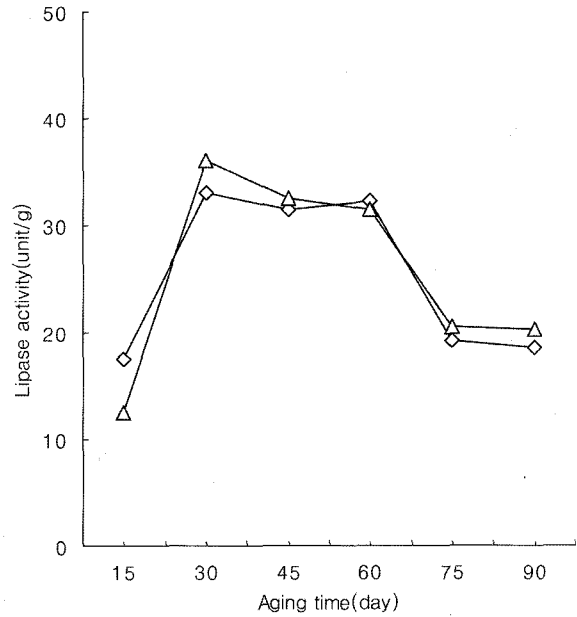


Fig. 3. Changes of lipase activity in soybean paste made from Meju with mold producing protease with aging time. ◇: Control, △: Pro D.

lipase의 작용으로 콩된장 중의 triglyceride가 diglyceride나 monoglyceride와 free fatty acid로 가수분해 되기 때문에 lipase 활성이 감소한 것으로 생각된다고 하였다.

콩을 원료로 하여 양조간장을 만들 경우, 대두 중의 지질이 구균과 내염성 미생물의 lipase에 의하여 가수분해되어 지방산과 glycerine으로 된다. 이 지방산은 효모에 의하여 ethyl ester로 되나, ethyl ester 자신은 향기의 중요한 성분이 된다. 한편 가수분해로 생긴 glycerine은 간장의 감미와 점성을 주며, 또 풍미를 증가시켜준다. 된장의 경우도 원료 대두의 유지는 간장과 유사한 효소변화를 받아 glyceride 이외에 유리 고급지방산과 휘발산 및 그의 ester, 불검화물로 되어 일부는 풍미에 영향을 미친다^{23,24)}. 따라서 lipase 활성이 우수한 균주를 된장제조에 사용할 경우 맛과 함께 향미가 더욱 향상되어 된장 품질 향상에 기여할 것으로 생각된다.

된장의 숙성기간별 환원당 함량변화. 숙성기간에 따른 각 시료 된장의 환원당 함량을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 된장 중의 환원당 함량은 2.08% 이하로 매우 낮았으며, 숙성일이 경과함에 따라 환원당 함량은 점차 낮아지는 경향을 보였다.

쌀 된장의 특성 변화를 연구한 정 등²⁵⁾은 숙성중 환원당의 변화는 전반적으로 숙성 초기에 증가하였으며, 숙성 30-50일에 최대치를 보인 후 감소하는 경향을 보였다고 하여 본 연구 결과와 다소 상이하였다. 또한 환원당 함량도 숙성 20일에 10-

Table 2. Changes of reducing sugar contents in soybean paste made from Meju with mold producing protease with aging time (Unit: %)

Soybean pastes	Aging time (days)						
	15	30	45	60	75	90	
Control	2.08	1.75	1.14	1.01	0.62	0.51	
Pro D*	1.88	1.11	0.99	0.56	0.51	0.46	

Pro D*: Soybean paste made from Meju with mold producing protease

11%의 함량을 보였으나 본 연구에서는 비슷한 기간에 1-2% 정도의 함량을 나타내 큰 차이를 보였다. 이는 정 등²⁵⁾의 연구에서는 된장 제조시 전분질 원료인 쌀을 이용하였으며, 숙성기간에 따라 된장에 함유된 곰팡이가 생성하는 amylase에 의해 이들 전분이 환원당으로 분해된 것에 기인하는 것으로 생각된다.

그러나 서 등⁸⁾은 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus*속으로 만든 된장에서 환원당 함량은 3.5% 미만으로 극히 적었으며, 시험구에 따라 다소 차이가 있으나 경시적으로는 숙성이 진행됨에 따라 감소의 경향을 보였다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보여주었다.

된장 숙성시 환원당 함량은 주로 당화효소의 작용에 의한 것으로 당화 amylase의 활성이 상승되어 당 함량이 최대치를 나타내고, 그 후 당이 미생물에 의한 알콜발효 및 유기산 발효의 기질로 사용됨에 따라 감소하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 따라서 본 연구에서 각 시료 된장의 amylase의 활성이 매우 낮았으며, 숙성 초기인 15일에서 최대를 보인 후, 그 이후 계속적인 감소 추세를 보였으므로, 환원당 함량 변화 역시 이와 비슷하게 나타난 것으로 보인다. 또한 본 연구에서 된장 제조시 전분질 원료를 사용하지 않았으므로, amylase의 기질이 되는 전분이 부족하여 그 활성이 낮았으며, 환원당 함량도 낮은 것으로 추정된다. 최 등²⁷⁾은 코지의 종류와 배합을 달리한 된장의 특성 연구에서 환원당 함량 변화는 쌀 된장과 밀 된장의 환원당 함량은 코지의 비율이 높을수록 증가하였으나, 콩 된장은 코지의 비율과는 관계없이 다른 된장에 비해 환원당 함량이 낮다고 보고하였다.

또한 서 등⁸⁾의 보고에 의하면, *Bacillus natto*와 *Bacillus subtilis*를 사용한 된장에서 환원당 함량은 비슷하였는데, 이 두 된장에서는 메주 제조 과정 중에 생성되는 점질물 등에 의하여 amylase 활성이 저해를 받게 되어 환원당 생성이 적었던 것으로 추측된다고 하였다. 김²⁸⁾도 된장 갈변과 그의 억제에 관한 연구에서 된장 저장 기간 중 환원당 함량이 계속적으로 감소하는 결과를 보였다고 하였으며, 이에 관한 원인으로 저장 중 당과 아미노산에 의한 Maillard 반응에 의해 당이 소비되어진 것으로 판단된다고 보고하였다.

된장의 숙성기간별 아미노태 질소함량의 측정. 된장의 숙성기간별 아미노태 질소함량을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 아미노태 질소함량은 시료에 따라 차이를 보였으며, protease 생성 균주를 사용하여 제조한 된장의 경우 전반적으로 대조구보다 높은 함량을 나타내었다. 숙성 초기인 15일째에 대조구는 182 mg%, 시험구는 341 mg%를 나타냈으며, 모든 시료가 숙성일이 증가함에 따라 아미노태 질소함량도 함께 증가하는 경향을 나타내어, 숙성 90일에 이르러서는 대조구 및 시험구의 아미노태 질소 함량은 각각 289 및 612 mg%를 보였다. 이런 결과는 팽화밀을 이용한 고추장 및 된장의 숙성중 이화학적 특성을 연구한 금 등²⁹⁾의 결과와는 상반되었다. 이들은 숙성 기간 중의 아미노태 질소함량은 감소하는 경향을 나타내었고, 아미노태 질소의 감소는 시료의 공기 노출 시 심한 변화를 일으켜 마이알 반응으로 추정되고 있다고 보고하였다. 그러나 일반적으로 아미노태 질소함량이 된장의 숙성이 진행됨에 따라서 함께 증가하며, 이는 된장 제조시 사용된 균주의 protease 활성으

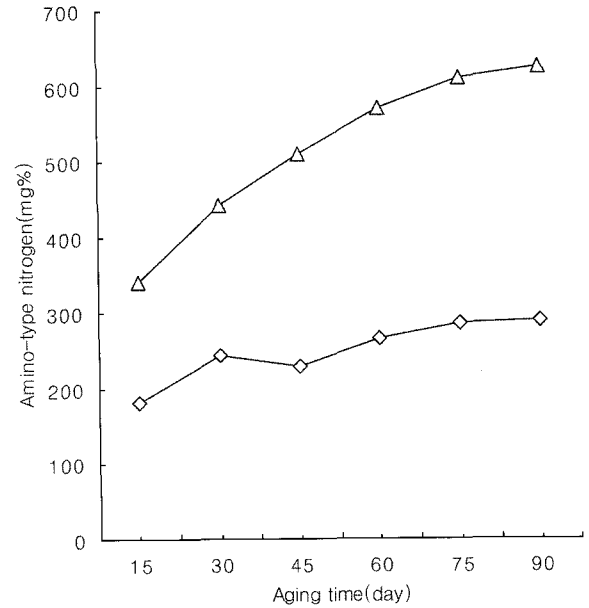


Fig. 4. Changes of amino-type nitrogen contents in soybean paste made from Meju with mold producing protease with aging time. ◇: Control, △: Pro D.

로 인하여 원료 중의 단백질이 아미노산으로 변하였기 때문이라고 알려져 있어³⁰⁾, 본 연구에서의 결과와 일치한다. 또한 protease 생성 균주를 사용하여 제조한 된장의 경우, 대조구에 비해 높은 아미노태 질소함량을 갖는 것도 이런 protease 활성과의 연관성 때문인 것으로 생각된다.

아미노태 질소함량은 보통 된장을 비롯한 여러 장류 식품에 있어서 그 숙성도를 판단하는 지표로 사용된다. 또한 아미노태 질소의 함량은 된장의 고유한 맛인 구수한 맛 성분과도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다³¹⁾. 한편 식품공전상 된장의 아미노태 질소함량의 규격은 160 mg% 이상이며³²⁾, 국내 산업체 생산 된장의 아미노태 질소함량은 보통 250-430 mg%으로 알려져 있다³³⁾. 본 연구에서 protease 생성 균주를 사용하여 제조한 된장의 경우, 숙성 초기인 15일에 이미 이 수치를 넘고 있어 빠른 숙성도를 보이고 있음을 알 수 있다. 반면 대조구의 경우, 숙성 초기인 15일째는 182 mg%의 아미노태 질소함량을 보여 공전상의 규격은 넘었으나, 국내 산업체 생산 된장의 함량에는 숙성 90일이 되어야 어느정도 도달하여 protease 생성 균주를 첨가한 된장보다 숙성도가 느린 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서와 같이 protease 활성이 높은 균주를 된장 제조에 이용할 경우, 더욱 빠른 숙성속도와 함께 된장 고유의 맛을 낼 수 있을 것으로 생각된다.

된장의 숙성기간별 암모니아태 질소함량의 측정. 각 시료 된장의 숙성기간별 암모니아태 질소함량의 측정결과는 Fig. 5와 같다. 암모니아태 질소함량은 대조구 보다는 시험구에서 높은 함량을 나타내었다. 숙성일별로 살펴보면 모든 된장에서 숙성일이 경과함에 따라 암모니아태 질소함량도 증가하는 경향을 나타내 숙성 초기인 15일째에는 각각 22, 39 mg%의 함량에서 숙성 90일에는 79, 107 mg%까지 증가하였다. 숙성 45일째까지는 다소 급격히 증가하던 암모니아태 질소함량이 그 이후에는

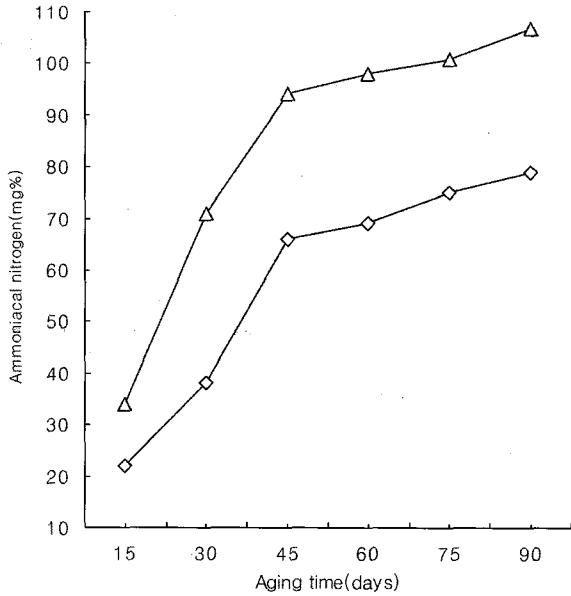


Fig. 5. Changes of ammoniacal nitrogen contents in soybean paste made from Meju with mold producing protease with aging time. ◇: Control, △: Pro D.

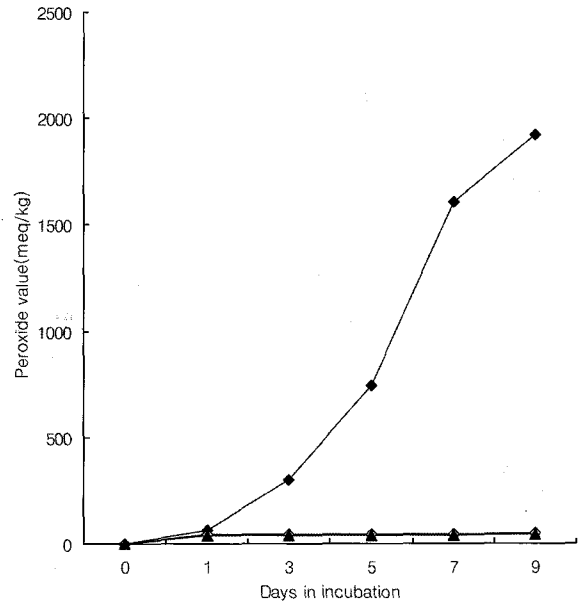


Fig. 6. Changes of peroxide value in linoleic acid according to addition of ethanol extracts of soybean paste. ◆: Non-extracts, ◇: Control, ▲: Pro D.

완만한 증가를 보였다. 이와 같은 암모니아태 질소함량의 변화는 아미노태 질소함량의 변화와 유사하였으며, 전처리 방법 및 숙성온도 변화에 따른 쌀된장의 특성 변화를 살펴본 정 등²⁵⁾의 결과, 그리고 *Bacillus*속과 *Aspergillus oryzae*로 만든 메주가 개량식 된장의 성분에 미치는 영향을 조사한 서 등⁸⁾의 결과와 일치하였다.

Protease 생성 균주를 사용한 된장이 다른 시료에 비해 암모니아태 질소함량이 높은 것과 숙성일이 경과하면서 암모니아태 질소함량이 증가하는 원인은, 김 등³⁴⁾의 보고에서 처럼 숙성과정 중 protease 작용으로 단백질성 질소가 감소하므로 이에 따른 상대적인 증가라고 할 수 있다.

암모니아태 질소함량이 높은 시료와 숙성 기간에 따라 암모니아태 질소함량이 증가하는 것이 좋지 않은 결과로 해석할 수도 있으나, 된장 품질에 좋은 영향을 끼치는 아미노태 질소와 비교하였을 때, 그 함량이 월등히 낮을 뿐만 아니라, 식품 공전상의 규격이 400 mg% 이하인 것을 고려할 때, 본 연구에서 사용한 균주로 제조한 된장의 품질에 나쁜 영향을 미친다고는 볼 수 없다고 생각된다.

된장 추출물의 항산화력 측정. 된장의 ethanol 추출물의 DPPH 라디칼에 의한 전자공여작용을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 표에서와 같이 시료에 따라 전자공여작용에 큰 차이를 보이지는 않았으며, 숙성일이 경과함에 따라 전자공여작용이 다소 감소하기는 했으나, 역시 숙성일별로도 거의 비슷

한 정도의 전자공여작용을 보였다.

된장과 같은 대두제품, 그리고 양조간장이 지방질의 산화반응에 항산화적 효과는 대두 중에 함유된 항산화물질인 tocopherol, isoflavones 및 phenolic acids 등과 발효대두식품의 발효숙성 과정중 원료 대두 및 기타 곡류 등의 분해에 의하여 생성된 아미노산 또는 펩티드 성분들, 그리고 동원료에서 용출된 페놀화합물들 그리고 마이야르 반응 등에 의하여 형성된 멜라노이딘 성분들에 의한 것으로 보고되고 있다³⁵⁾.

일반적으로 전자공여작용으로만 항산화 작용을 설명할 수는 없지만, 추출물중의 항산화물질들은 유지의 자동산화 과정 중 생성되는 ROO·, R·, RO· 등의 라디칼에 전자를 주는 능력인 전자 공여능이 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 대조구와 균주를 첨가한 시험구 된장 간에 DPPH에 의한 전자공여작용을 통해 조사한 항산화 작용에서 별다른 차이가 나지 않는 것은 항산화력을 나타내는 물질이 균주에 의한 것이라기 보다는 주로 대두 자체에 들어있는 성분에 의한 것이므로 이같은 결과를 나타낸 것으로 생각된다.

또한 유지가 산화되면 conjugated diene oxide의 생성량이 많아지면서 234 nm에서의 흡광도가 증가하게 되는데, 이를 이용한 각 시료별 된장의 ethanol 추출물의 AOA(Antioxidant activity) 측정결과는 Table 4와 같다. Ethanol 추출물에서 AOA의 값이 0.17-0.27로 나타나 항산화성을 확인할 수 있었으며, 시료별로는 큰 차이를 보이지 않았고, 숙성일별로도 큰 차이를

Table 3. Electron donating activity in ethanol extract of soybean paste from Meju with mold producing protease with aging time(Unit: %)

Soybean pastes	Aging time (days)					
	15	30	45	60	75	90
Control	48.35	51.81	50.37	47.43	44.33	43.83
Pro D*	47.32	46.16	44.18	42.99	42.27	40.93

Pro D*: Soybean paste made from Meju with mold producing protease

Table 4. Antioxidant activity (AOA) in ethanol extract of soybean paste from Meju with mold producing protease with aging time

Soybean pastes	Aging time (days)					
	15	30	45	60	75	90
Control	0.27	0.27	0.26	0.23	0.20	0.19
Pro D*	0.24	0.23	0.24	0.21	0.20	0.17

Pro D*: Soybean paste made from Meju with mold producing protease

보이지 않았다. 이는 앞선 전자공여능에서 나타난 결과와 같은 원인인 것으로 생각된다.

Linoleic acid에 의한 과산화물가 측정. 90일간 숙성시킨 된장 에탄올 추출물 5m를 linoleic acid에 넣고 9일간 과산화물가를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 9일간 반응시켰을 때 추출물을 넣지 않은 linoleic acid의 경우 1919 meq/kg까지 과산화물가가 증가하였으나, 에탄올 추출물을 넣은 경우는 43-52 meq/kg을 보여 항산화 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 시료에 따라 과산화물가가 다르게 나타나기는 했지만 그 차이가 크지 않았으며, 숙성 기간에 따른 차이 역시 숙성일이 증가함에 따라 큰 차이를 볼 수 없었다. 이렇게 시료별, 숙성일별로 과산화물가의 차이가 크지 않은 것은 대조구와 균주를 첨가한 시험구 된장의 항산화력에 차이가 거의 없는 것으로 생각된다. 김 등³⁵⁾은 재래식 메주 및 된장 중의 항산화성 물질에 관한 연구에서 본 연구에서처럼 숙성일별로 된장에서 추출한 항산화물질을 넣어 과산화물가 측정을 통해 항산화력을 측정하였는데, 대두와 메주 및 된장으로부터 분리된 항산화물질인 isoflavones, 그리고 이 물질이 가수분해되어 생성되는 aglycone의 함량 차이가 큰데도 불구하고 항산화 효력에는 큰 차이가 없었다고 보고하였다. 따라서 이런 과산화물가 측정 결과도 된장 제조에 사용되는 균주나 숙성일에 따라 항산화력에 영향을 끼치는 것이 아니라, 된장 제조의 원료인 대두로부터 나온 여러 항산화물질에 따라 된장의 항산화력이 영향을 받는 것으로 생각된다.

초 록

전통 메주로부터 protease를 생성하는 곰팡이를 분리한 후, 이를 사용하여 메주를 만들고, 자연 발효 하여 메주를 만든 것을 대조구로 하여 된장을 제조하고 90일간 숙성시키면서 각 된장의 효소력과 환원당 함량 그리고 아미노태 질소와 암모니아태 질소량을 측정하여 첨가한 곰팡이가 된장의 품질에 미치는 영향을 조사하였다.

수분 함량은 숙성기간이 증가하면서 감소하는 경향을 보였으며, 시료별 수분 함량의 차이는 크지 않았다. 효소력 측정 결과, amylase 활성은 모든 시료에서 낮은 활성을 보였으며, 숙성이 진행되면서 지속적인 감소세를 보였다. Protease 활성은 분리 곰팡이를 사용한 된장이 대조구보다 높았으며 숙성 30-45 일경에 최대치를 보이다가 그 이후 감소하는 경향을 나타내었다. Lipase 활성은 대조구와 시험구 된장에서 차이가 거의 없었고, 숙성 30일경에 최대 활성을 보이다가 그 이후 계속적으로 감소하였다. 환원당 함량은 숙성이 진행되면서 감소하였다. 아미노태 질소함량은 분리한 곰팡이를 사용하여 제조한 된장이

대조구보다 높았으며, 숙성이 진행되면서 지속적인 증가세를 보였다. 모든 시료의 에탄올 추출물에서 항산화력이 있음이 확인되었다.

Key words: 된장, 항산화력, 효소활성

감사의 글

이 논문은 2005년도 건국대학교 학술 진흥 연구비 지원에 의한 논문임.

참고문헌

1. Yang, S. H. and Chung, Y. J. (1992) Optimization of the taste components composition in traditional Korean soybean paste. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**, 449-453.
2. Santago, L. A., Hiramatsu, H. and Mori, A. (1992) Japanese soybean paste miso scavenging free radicals and inhibit lipid peroxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **38**, 297-302.
3. Kim, S. H. (1998) New trend of studying on potential activities of Doenjang-fibrinolytic activity. *Korea Soybean Digest.* **15**, 8-15.
4. Hong, S. S. (1994) Anticancer effects of Korean traditional soy-bean paste. *Food Technol.* **7**, 56-57.
5. Shin, Z. I., Ahn, C. W., Nam, H. S., Lee, H. J., Lee, H. J. and Moon, T. H. (1995) Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 230-234.
6. Park, K. Y., Moon, S. H., Cheigh, H. S. and Baik, H. S. (1996) Antimutagenic effects of Doenjang. *J. Food Sci. Nutr.* **25**, 151-158.
7. Park, J. S. (1992) Histological changes of Doenjang during the fermentation with different strains. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 477-481.
8. Seo, J. S., Han, E. M. and Lee, T. S. (1986) Effect of Meju shapes and strains on the chemical composition of soybean paste. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **15**, 1-9.
9. Yoo, S. K., Kang, S. M. and Noh, Y. S. (2000) Quality properties on soybean pastes made with microorganism isolated from traditional soybean pastes. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 1266-1270.
10. Ahn, H. S., Bae, J. S. and Lee, T. S. (1997) Comparison of free amino acids, sugars, and organic acids in soybean paste prepared with various organisms. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **30**, 4-12.
11. In, Z. P. (2001) Flavor enhancement of chungkookjang by addition of yucca (*Yucca shidigera*) extract. Master's thesis,

- Konkuk University, Korea.
12. Anson, M. L. (1939) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**, 79-91.
 13. Kim, S. Y., Park, Y. J. and Lee, C. Y. (1971) Factors that influence the activity of a *Candida* lipase. *Korean Agric. Chem. Soc.* **14**, 207-212.
 14. Chae, S. K., Kang, K. S., Ma, S. J., Bang, G. W., Oh, M. H. and Oh, S. H. (2000) In Standard Food Analysis, Gigu Munhwasa Co. Seoul, pp. 299-301, 403-404.
 15. A.O.A.C. Association of official analytical chemists, 10th ed., Washington D.C.
 16. Naohiko, Y. (1979) Antioxidative activities of miso and soybean sauce on linoleic acid. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **26**, 20-25.
 17. Joo, H. K., Kim, D. H. and Oh, K. T. (1992) Chemical composition changes in fermented Doenjang depend on Doenjang Koji and its mixture. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**, 351-360.
 18. Kim, S. H., Kim, S. J., Kim, B. H., Kang, S. G. and Jung, S. T. (2000) Fermentation of Doenjang prepared with sea salts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 1365-1370.
 19. Park, S. K., Seo, K. I., Shon, M. Y., Moon, J. S. and Lee, Y. H. (2000) Quality characteristics of home-made Doenjang, a traditional Korean soybean paste. *Korean J. Soc. Food Sci.* **16**, 121-127.
 20. Joo, H. K., Kim, N. D. and Yoon, K. S. (1989) Changes of enzymatic activities during the fermentation of soybean paste by *Aspergillus* spp. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32**, 295-302.
 21. Yoon, I. S., Kim, H. O., Yoon, S. E. and Lee, K. S. (1977) Studies on the changes of N-compounds during the fermentation process of the Korean Doenjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **9**, 131-137.
 22. Lee, S. Y., Min, Y. K. and Park, K. H. (1983) Nutritional evaluation of naturally fermented soybean and the enzymatic activity changes during the preparation, *Korean J. Food Sci. Technol.* **15**, 101-107.
 23. Jung, D. H. (1987) The enzyme, Sunjinmunhwasa Co. Seoul, pp. 312-313.
 24. Park, J. S., Lee, M. Y. and Lee, T. S. (1995) Compositions of sugars and fatty acids in soybean paste(Doenjang) prepared with different microbial sources. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 917-924.
 25. Jung, S. W., Kim, Y. S. and Chung, K. S. (1995) Effects of preparation methods and aging temperatures on the properties of rice-Doenjang. *Agric. Chem. Biotechnol.* **38**, 83-89.
 26. Kim, H. L., Lee, T. S., Noh, B. S. and Park, J. S. (1998) Characteristics of samjangs prepared with different Doenjangs as a main material. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 54-61.
 27. Choi, K. S. and Rhee, H. S. (1994) Characteristics of Doenjang made from different material and ratio of *Koji*. *Korean J. Soc. Food Sci.* **10**, 39-44.
 28. Kim, N. D. (1996) Study on the browning and its inhibitor in soybean (Doenjang). Ph. D. thesis, Konkuk University, Korea.
 29. Kum, J. S. and Han, O. (1997) Changes in physicochemical properties of Kochujang and Doenjang prepared with extruded wheat flour during fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 601-605.
 30. Park, J. S., Lee, M. R., Kim, J. S. and Lee, T. S. (1994) Compositions of nitrogen compound and amino acid in soybean paste (Doenjang) prepared with different microbial sources. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**, 609-615.
 31. Kim, J. S., Choi, S. H., Lee, S. D. and Oh, M. J. (1999) Quality changes of sterilized soybean paste during its storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1069-1075.
 32. Oh, K. T. (1989) The standard of soy source, quality and hygiene. *Food Sci. and Indus.* **22**, 18-27.
 33. Korea Consumer Protection Board (1995) Gochoojang, Doenjang. The consumer's age. **11**, 58-61.
 34. Kim, D. H. and Kim, S. H. (1999) Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Mucor* and *Rhizopus* strains. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 176-182.
 35. Kim, M. H., Im, S. S., Yoo, Y. B., Kim, G. E. and Lee, J. H. (1994) Antioxidative materials in domestic meju and Doenjang. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **23**, 792-798.