

## 향미성 Natto의 Nattokinase, $\gamma$ -GTP, Protease 활성도와 관능적 평가

김복란<sup>†</sup> · 이상영  
강원대학교 식품공학과

### Nattokinase, $\gamma$ -GTP, Protease Activity and Sensory Evaluation of Natto Added with Spice

Bok-Nan Kim<sup>†</sup> and Sang-Young Lee

Dept. of Food Science and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### Abstract

To make Natto, traditional Japanese food fermented by *Bacillus natto*, more acceptable to Koreans, garlic (2%) and/or red pepper oleoresin (0.2%) were mixed with Natto. Through out the fermentation period, the changes in enzyme activities and sensory evaluation were compared with those of conventional Natto. Nattokinase activities were detected from 12 hour fermentation in all samples. After that period, steady increase in Nattokinase activity was observed. The activity of nattokinase decreased slightly when garlic and/or red pepper oleoresin was added. Changes in  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP) was not significant among samples and the similar tendency was observed in nattokinase activity. With addition of garlic, production of protease reached maximum after 8 hour of fermentation whereas it took 16 hour when red pepper oleoresin was added. However, after 24 hour of fermentation, any significant differences in protease activity were not observed. Sensory evaluation indicated that the tastes of Natto with either garlic and red pepper oleoresin or red pepper oleoresin only were much more acceptable than conventional Natto or one with garlic only.

Key words : Natto, nattokinase,  $\gamma$ -GTP, protease activity

#### 서 론

오늘날 물질문명의 발달로 인간의 활동량이 감소되고 우리의 식생활이 점차 서구화됨에 따라 동물성 식품의 섭취량이 증가하여 동물성 지방의 과다섭취로 인하여 열량이 많아지고 체액의 산성화 위험이 따르고 있다. 이러한 식생활로 동맥경화증, 심근경색, 뇌졸중, 고혈압, 혈전증과 같은 성인병 발생이 날로 증가하고 있으므로 이들의 치료와 예방의 한 방법으로 체내 콜레스테롤 저하 대책이 연구되고 있다. 혈전은 fibrin이 주성분인데 이것을 용해하기 위한 효소계를 fibrinolytic enzymes라고 하며, 현재 혈전용해제로 여러가지가 사용되고 있는데 일본에서는 주로 urokinase(UK), 구미에서는 streptokinase(SK)가 정맥주사로 투여되고 있으며 이외에 tissue plasminogen activator(TPA), pro-UK, anisoylated

plasminogen streptokinase activator complex(APSAC) 등도 개발되고 있으나 이것 등은 전부 정맥 주사 약으로서 혈중에서의 반감기는 20분 이내로 극히 짧은 효과를 나타내며 인체와 다른 이물질로서 알레르기 등의 부작용이 따를 수 있다. 반면, 최근에 일본의 Natto 점질물에서 발견된 fibrinolytic enzyme(nattokinase)이 fibrin을 강력하게 분해하는 효소로 밝혀지면서 이에 대한 nattokinase의 활성과 기능에 대한 연구<sup>1-4)</sup>가 보고되고 있다.

須見<sup>5)</sup>은 건강한 성인에게 Natto 100~200g을 하루 3회씩 먹이고 경시적인 혈중 용해 활성의 변화를 측정한 결과, euglobulin lysis time의 감소 또는 euglobulin fibrinolytic activity의 증가로 장시간에 걸쳐서 혈전용해 항진이 일어난다는 것을 보고 하였으며 분리한 nattokinase를 래트에 경구 투여시, 십이지장내의 활성 효소 함량이 투여량의 약 7% 이상에 도달하였음을 밝혔다.

따라서 본 연구는 기능성 식품으로서 한국인의 기호

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

에 맞는 Natto 식품의 이용도를 높이기 위해 마늘과 고추 oleoresin을 첨가한 Natto를 제조하여 혈전 용해제로의 이용이 기대되고 있는 fibrinolytic enzyme (nattokinase)의 활성을 비롯하여 Natto 점질물의 생성에 영향을 주는  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase 및 protease의 활성을 측정하고 또한 관능검사도 실시하여 기호면에 적합성 여부를 알아 보았으므로 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 원료는 태백중 대두, 한초 고추가루, 국산 마늘과 일본 朝日食品(株)에서 분양받은 *Bacillus natto*(NN-1) 균주를 사용하였다.

### Natto의 제조

전보<sup>7)</sup>에 준하여 *Bacillus natto* 균주를 배양하고 고추 oleoresin과 세절편 마늘을 제조한 다음 선별한 대두를 가압증자관에서 53분간 증자한 후 품온이 85°C가 될 때에 증균수를 원료대두 100g당 1ml를 접종한 N-1 시험구, 증자대두에 균 접종 후 전처리한 마늘 2%를 첨가한 N-2 시험구, 증자대두에 균 접종 후 전처리한 고추 oleoresin 0.2%를 첨가한 N-3 시험구, 마늘 2%와 고추 oleoresin 0.2%를 혼합하여 첨가한 N-4 시험구 별로 나누어 폴리스티렌 용기에 각각 담아 40°C에서 24시간 발효시켰다.

### Nattokinase의 역가

시료용액의 조제는 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>을 혼합하여 pH 7.5로 조절하고 이용액으로 0.85% NaCl을 조제하여 물로 10배 희석한 액 100ml를 Natto 5g에 첨가하고 5°C에서 24시간 추출한 후 No. 2 여지로 여과하여 시료용액으로 하였으며 NaCl 0.01M이 함유한 (pH 7.8) 0.17M 붕산염을 완충용액 중에 용해시켜 용액 중에 fibrinogen의 응고성 단백질의 농도가 0.15%로 되게 한 다음 이 용액 10ml를 직경이 90mm인 멸균된 샤페에 취하고 thrombin (20unit/ml) 0.5ml를 가하여 잘 혼합한 다음 덮개를 덮고 실온에서 1시간 방치 후 fibrin plate를 제조하였다<sup>8)</sup>.

측정방법<sup>9)</sup>은 시료용액과 fibrin plate를 37°C에서 30분간 보온한 후 fibrin plate에 시료용액 10 $\mu$ l를 적가하고 37°C에서 4시간 반응시켜 형성된 fibrin lyzed zone의 면적(장축의 지름(mm)×단축의 지름(mm))에 희석 배율을 곱하여 Natto 1g당 fibrin lyzed zone의 면적(mm<sup>2</sup>

/g)으로 하였으며 이 면적을 비교하여 각 시료의 fibrinolytic activity를 측정하였다.

한편, 표준 plasmin용액을 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0unit/ml로 되도록 tris-NaCl 완충용액<sup>10)</sup>으로 조제한 후, fibrin plate에 10 $\mu$ l씩 적가하여 형성된 lyzed zone의 면적을 측정된 후 시료용액의 활성과 비교하였다.

### $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase( $\gamma$ -GTP)의 역가

$\gamma$ -GTP의 역가 측정 방법은 Tamaoki 등<sup>11)</sup>과 納豆試驗法<sup>12)</sup>의 방법에 따랐다. 즉, 곱게 마쇄한 시료 20g에 증류수 80ml를 가하여 1시간 진탕 추출하고 가제로 여과하여 5,000rpm에서 20분 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 하였다. 기질용액은 NIKKOL NP10 100g에 증류수 60ml를 가하여 완전히 용해시킨 다음 tris 1.21g, glycylglycine 1.59g을 용해시켜 L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (和光純藥工業(株), 日本) 142.6mg을 0.25N HCl 8ml에 가하여 용해시킨 것을 교반하여 가한 후 용해시키고 0.2N NaOH으로 pH를 8.3으로 조절한 다음 증류수 200ml로 정용하여 갈색병에 넣고 냉장고에 보존하였다. 반응정지액은 초산 특급을 증류수로 12.5배 희석하여 사용하였으며 기질용액의 제조방법 대로 표준용액 (25, 50, 100, 150, 200 $\mu$ mol)을 제조하여 표준곡선을 작성하였다.

측정방법<sup>12,13)</sup>은 기질용액 1ml를 시험관에 넣고 37°C에서 5분간 예열하여 시료용액 0.05ml를 가하고 37°C에서 30분간 반응시키며 이어 반응정지액 5ml를 가하여 잘 교반한 후 410nm에서 흡광도를 측정하고 공시험은 시료용액의 첨가를 반응정지액 첨가 후에 행하고 시료용액의 흡광도치에서 공시험의 흡광도치를 뺀 것을 계산에 이용하며, 흡광도치를 표준곡선에 대입하여 유리된 *p*-nitroaniline을 구하여 1분간에 1 $\mu$ mol의 *p*-nitroaniline을 유리하는 활성을 효소 1단위로 표시하였다.

### Protease의 역가

Natto 10g을 mortar에 넣어 곱게 마쇄시킨 후, 0.2% NaCl 90ml를 가하여 30°C에서 1시간 진탕 추출한 후 여과하여 조효소액으로 하며 Anson의 방법<sup>14)</sup>에 의해 조효소액 1ml와 sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 0.6% milk casein용액 5ml를 혼합하고 30°C에서 10분간 반응시켰다. 다음 0.4M trichloroacetic acid 5ml를 가하여 반응을 중단시킨 후 여과한 여액 2ml에 0.4M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>와 phenol 시약으로 발색시키고 spectrophotometer를 사용하여 660nm에서 흡광도를 측정하고 blank치를 뺀 흡광도값을 별도로 작성한 standard

curve에 의하여 tyrosine량( $\mu\text{g/ml}$ )으로 환산하여 표시하였다.

### 관능검사

24시간 발효시킨 Natto의 관능검사 판정기준은 納豆試驗法<sup>2)</sup>의 방법에 의해 실시하였다. 즉 Natto의 외관상태, 균의 퍼짐상태, 콩의 색, 콩점질의 갈라진 정도, 향기, 질감, 맛, 점질물의 탄력도 등에 대해 5점 기호 척도 시험법(1 매우 싫다, 2 싫다, 3 양호하다, 4 좋다, 5 매우 좋다)으로 남, 녀 각각 15명으로 구성된 관능검사원에 의해 평가하고 그 결과를 ANOVA로 분석한 후 Duncan's multiple range test로 검정하여 시료간의 유의성을 통계 처리하였다.

## 결과 및 고찰

### Nattokinase의 활성

Natto 발효 과정 중의 nattokinase(NK) 활성을 측정하기 위해 plasmin 표준품(2.5unit/mg protein)을 사용하여 Fig. 1과 같이 검량선을 작성하였고, Natto 점질물의 NK를 측정된 결과는 Fig. 2와 같으며 fibrin lysed zone은 Fig. 3과 같다. NK 활성은 전 시험구에서 발효 12시간에서 부터 나타나기 시작하여 점차적으로 증가하였으며 발효 24시간에서는 46.0~60.8NK의 높은 활성을 나타내었고 마늘과 고추 oleoresin을 첨가하여 발효시킨 Natto의 NK 활성이 무첨가 Natto에 비해 활성

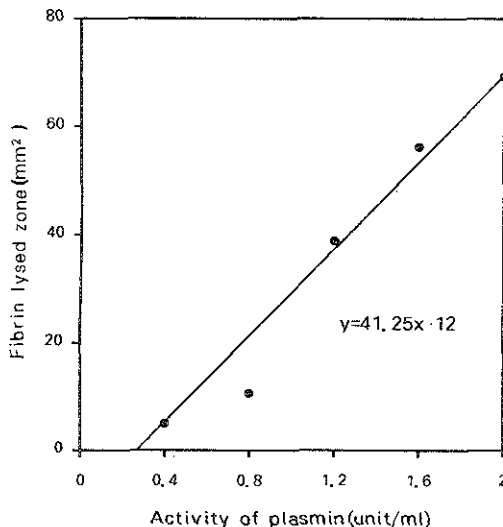


Fig. 1. Fibrin lysed zone observed with increasing amounts of plasmin.

도가 약간 낮음을 알 수 있었다.

須見<sup>3,6)</sup>은 Natto 중에 혈전 용해 활성을 인정했고 그의 활성을 nattokinase(NK)라고 명명하였으며 실제로 Natto를 건강한 성인에 먹었을 경우 장시간에 걸쳐 혈전 용해 현상이 생기는 것을 확인하였는데 Natto 1g당 40CU plasmin 또는 1600IU urokinase의 효소활성이 있음을 밝혔다. 한편 이 등<sup>7)</sup>은 *B. natto*와 *B. subtilis*에 의해 청국장을 제조하여 fibrinolytic activity(nattokinase)를 측정하였는데 *B. subtilis*로 부터 얻은 점질물에서 보다 *B. natto*로 부터 얻은 것에서 lysed zone이 훨씬 크게 나타났으며, 점질물의 fibrinolytic activity도 약 3배 정도 높았고 100°C에서 5분간 열처리 하였을 때 *B. natto*와 *B. subtilis* 모두 90% 정도의 효소활성이 남아 있었으며, 100°C에서 열처리 시간이 증가할수록 효소활성이 감소하였는데 30분간 열처리시 *B. natto*나 *B. subtilis* 모두 45% 정도의 효소 활성이 남아 있었으므로 끊어서 먹는 청국장의 섭취에서 보다 Natto의 섭취시 혈전용해 활성이 강함을 알 수 있었다.

### $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase( $\gamma$ -GTP)의 활성

Natto 발효 과정 중의  $\gamma$ -GTP 활성 변화를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Natto 점질물의 구성 성분은 fructose와 glutamic acid가 중합된 levan form fructan과 poly-

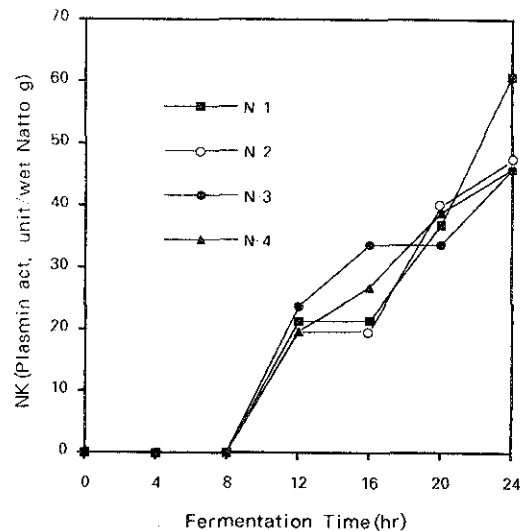


Fig. 2. Changes in activity of nattokinase (NK) during fermentation.

N-1 : Conventional Natto  
 N-2 : Natto added with 2% garlic  
 N-3 : Natto added with 0.2% red pepper oleoresin  
 N-4 : Natto added with 2% garlic, 0.2% red pepper oleoresin

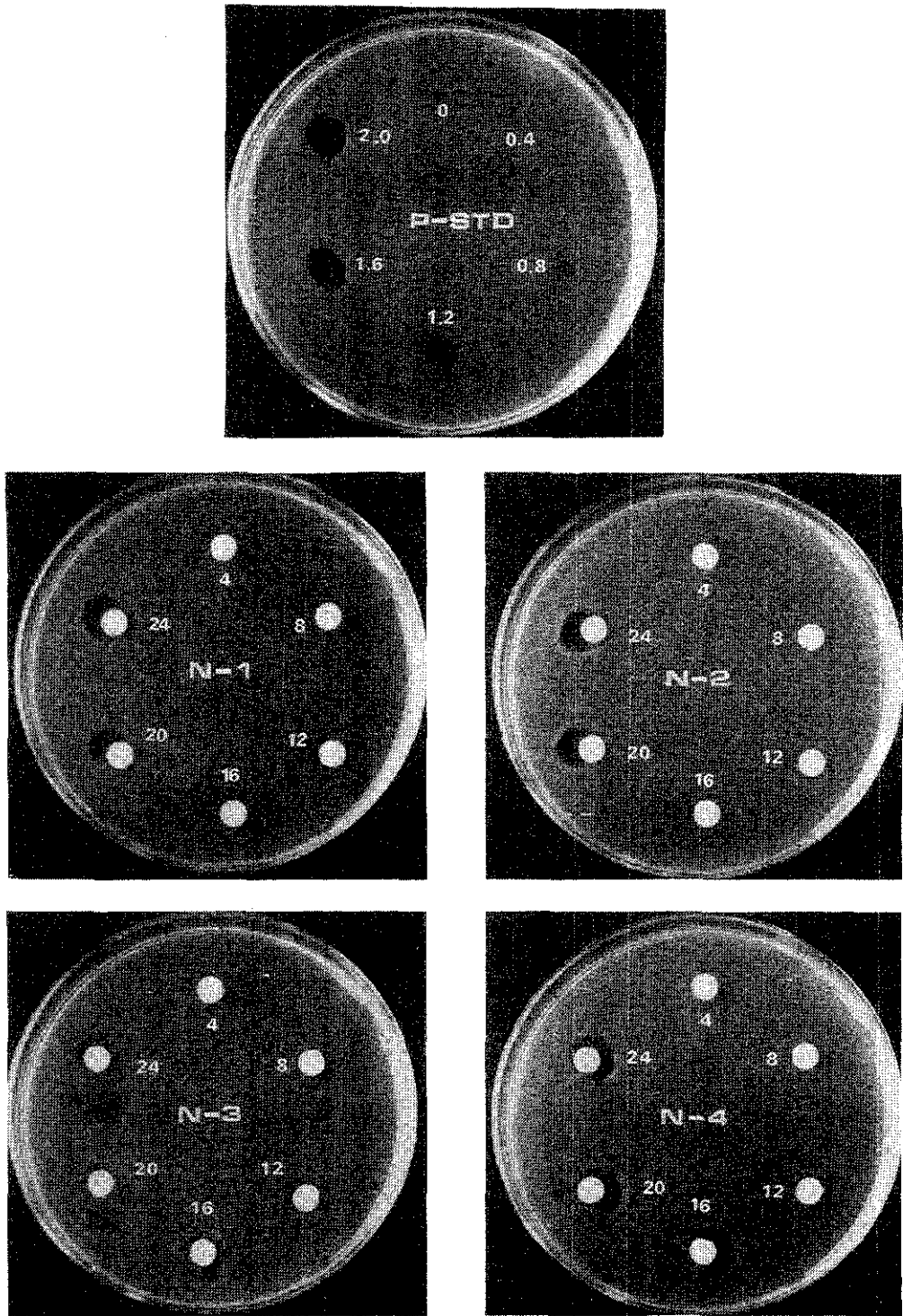


Fig. 3. Changes in fibrin lysed zone of plasmin-STD(0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 unit/ml) and sample (N-1, N-2, N-3, N-4) during fermentation.

A numeral of plasmin-STD : unit/ml

A numeral of sample : fermentation hours

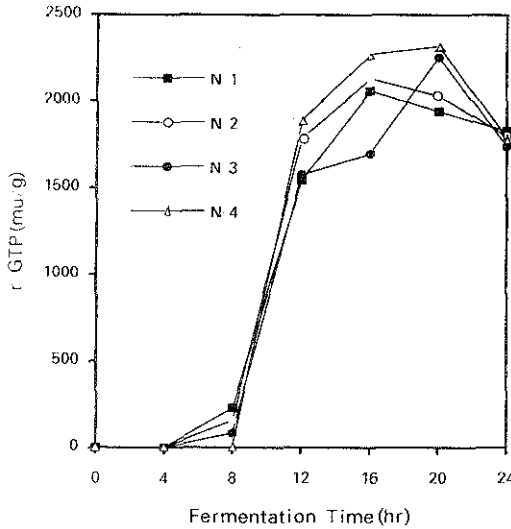


Fig. 4. Changes in  $\gamma$ -GTP activity of Natto during fermentation.

See Fig. 2 for the abbreviations.

glutamate (PGA)의 혼합물질<sup>10)</sup>이며 PGA는  $\gamma$ -GTP에 의해 생성되는 것으로 본 실험의 결과에 의하면 무첨가 Natto구는 발효 16시간에 2055.67m $\mu$ /g으로 최대 활성을 보인 후 약간 감소하는 경향이었으며, N-2, N-3, N-4구는 발효 20시간에 2032.86~2318.07m $\mu$ /g으로 최대치를 나타낸 후 감소하는 경향이였다. 24시간 발효시켰을 때의 잔존 활성은 전 시험구에서 1740.03~1827.50m $\mu$ /g으로서 비슷한 활성도를 나타내었으므로 마늘 2%와 고추 oleoresin 0.2% 첨가에 의해  $\gamma$ -GTP의 활성도에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. Akimoto 등은 시판 Natto 19제품을 시료로  $\gamma$ -GTP를 측정한 결과, 390~1156m $\mu$ /g으로 평균 757m $\mu$ /g을 나타냈다고 보고한 바 있다.

#### Protease 활성

Natto 발효 과정 중의 protease 활성 변화를 측정 한 결과는 Fig. 5와 같이 발효시간이 경과함에 따라 증가하여 24시간 발효시켰을 때 약간 저하하는 경향을 나타내었다. 즉, 무첨가 Natto구는 발효되면서 점차 증가하여 12시간 발효에서 최대의 활성을 보인 후에는 약간씩 감소하였고, 마늘 첨가구는 발효 8시간에서 271.0 $\mu$ g/g으로 높은 활성을 나타냈는데 이 결과는 마늘의 성분이 영향을 준 것으로 추정되나 이에 대하여는 앞으로 더욱 연구 검토되어야 할 것이라고 생각되며 oleoresin 첨가구는 발효되면서 점차 증가하여 발효 16시간에서 최대 활성을 보인 후 감소하였고, 마늘과 oleoresin 첨가

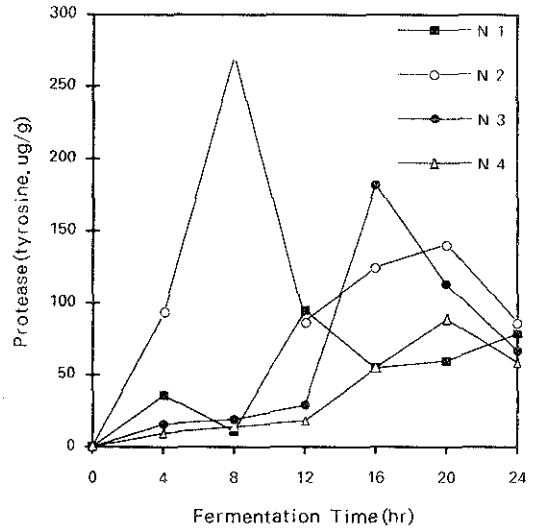


Fig. 5. Changes in protease activity of Natto during fermentation.

See Fig. 2 for the abbreviations.

구는 발효되면서 큰 변화없이 발효 20시간에서 최대 활성을 나타냈으나 다른 시험구에 비해 활성도가 비교적 낮았다.

#### 관능적 평가

9종류의 평가항목을 만들어 각 제품에 대한 관능검사를 실시한 결과 Table 1과 같다. Natto균의 퍼짐이 일정한 두께로 얼룩이 없으면 양호한 것으로 판정하는데 각 제품간에 유의성은 없었지만 마늘과 고추 oleoresin 첨가구가 다른 제품에 대하여 약간 낮았고, 균상의 용해된 상태가 일정하지 않게 뭉쳐있는 상태가 많을수록 점수를 적게 주는 데 이 항목에서는 마늘과 고추 oleoresin 첨가구가 유의성 있게 낮았다. 또한 콩의 상태가 껍질이 벗겨진 것이 적거나 전혀 없으면 양호한 것으로 판정하도록 하였는데 전 시험구에서 3.9~4.2로 보통과 약간 좋다는 중간 점수로 비슷하게 나타났다.

콩의 색에 대하여는 선명하고 옅은 갈색 또는 선홍색을 띄는 것일수록, 향기에서는 감미취가 좋고 암모니아취, 산취 등으로 판단하여 부적당한 냄새가 적을수록, 딱딱한 정도에서는 쉼 때 부드럽고 매끄러운 느낌이 많을수록 양호한 것으로 판정하는데 이들 항목에서는 각 구간에 유의성은 없었으나 콩의 색과 향기는 N-3구가 비교적 높은 점수를 얻었다.

또한 맛에서는 oleoresin 첨가구와 마늘, oleoresin 첨가구가 유의성이 인정되었으며, 마늘 첨가구는 예상과는 달리 평점이 낮았는데 이는 pannel 요원들 중 마늘

Table 1. Sensory evaluation of Natto fermented for 24 hours

	Type of Natto			
	N-1	N-2	N-3	N-4
Spotted appearance	4.2	4.0	4.2	3.2
Texture	4.4 <sup>a</sup>	4.1 <sup>a</sup>	3.6 <sup>ab</sup>	3.1 <sup>b</sup>
Mouthfeel	3.9	4.0	4.2	3.9
Color	3.5	3.5	4.3	4.2
Flavor	2.9	3.5	3.7	3.0
Hardness	3.4	3.5	3.3	3.1
Taste	3.3 <sup>a</sup>	3.0 <sup>b</sup>	3.9 <sup>b</sup>	4.2 <sup>b</sup>
Viscosity	2.9 <sup>a</sup>	4.5 <sup>b</sup>	4.6 <sup>b</sup>	4.3 <sup>b</sup>
Overall eating-quality	3.1 <sup>a</sup>	3.4 <sup>a</sup>	4.0 <sup>b</sup>	4.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Values in the same column with different superscript letters are significantly different from others at  $p < 0.05$  level. Refer to Fig. 2 for the abbreviations

냄새를 싫어하는 사람이 있는 경우 전체적으로 평점이 낮아진 것이라 생각되며 점질물의 점도가 강하고 탄력이 좋은 것은 oleoresin 첨가구와 마늘, oleoresin 첨가구가 무첨가구와 마늘 첨가구 보다 유의성 있게 높았다. 따라서 전체적인 것을 고려해 평가할 때 고추 oleoresin 첨가(N-3구)와 마늘, 고추 oleoresin 첨가구(N-4구)가 무첨가 Natto, 마늘 첨가 Natto구에 비해 평가 점수가 유의성 있게 높은 것으로 나타나 전반적으로 Natto를 제조할 때 고추 oleoresin 0.2%와 마늘 2% 또는 고추 oleoresin 0.2%를 혼합하여 Natto를 제조할 때 한국인의 입맛에 적합한 좋은 맛을 느낄 수 있으며 따라서 향미 개선에도 바람직한 것으로 생각된다.

## 요 약

일본의 전통 발효 식품인 Natto의 맛 개선을 위한 연구 목적으로 증자대두에 *Bacillus natto*(NN-1)를 접종하고 마늘 2%와 고추 oleoresin 0.2%를 각각 첨가한 후, 40°C에서 24시간 발효시켜 제조한 Natto에서의 nattokinase 활성은 전 시험구에서 발효 12시간 부터 나타나기 시작하여 점차적으로 증가하였으며 24시간 발효하였을 때의 활성은 마늘과 고추 oleoresin 첨가에 의해 활성도가 약간 낮았다.  $\gamma$ -GTP 활성은 24시간 발효하였을 때 전 시험구간에 활성도가 비슷하였으며 마늘 2%와 고추 oleoresin 0.2% 첨가에 의해  $\gamma$ -GTP 활성에는 영향을 주지 않았다. Protease 활성은 마늘 첨가구에서 발효 8시간에 가장 높은 활성을 나타내었으며 발효 24시간에는 전 시험구간에서 비슷한 활성을 나타내었다. 관능검사 결과, 맛에서는 oleoresin 첨가구와 마늘, 고추 oleoresin 첨가구가 유의성이 인정되었으므로 Natto를 제조할 때 고추 oleoresin 0.2%와 마늘 2%, 고추

oleoresin 0.2%를 혼합하여 Natto를 발효시키는 것이 한국인의 입맛에 적합한 Natto의 맛 개선에 바람직한 것으로 생각된다.

## 문 헌

- Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsushima, H. and Mihara, H. : Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme*, **33**, 121 (1985)
- Sumi, H., Hamada, H., Mihara, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. : Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haemat.*, **84**, 139 (1990)
- 須見洋行 : 薬餌としての納豆 : ナットウキナーゼとその效能. 大豆月報, **154**, 4 (1988)
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, 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)
- 須見洋行 : ナットウキナーゼと線溶系. 化学と生物, **29**, 2 (1991)
- 須見洋行 : ナットウキナーゼの機能性と應用. 月刊フドケミカル, **12**, 1 (1990)
- 김복란, 박창희, 윤복만, 정민철, 이상영 : 향미성 Natto 제조과정중 당류 및 아미노산 함량 변화. 한국영양식품학회지, **24**, 114 (1994)
- Astrup, T. and Mullertz, S. : The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 346 (1952)
- 納豆試験法研究会 : 納豆試験法. 光琳社, 東京, p.79 (1990)
- Moroz, L. A. and Gilmore, N. J. : Fibrinolysis in normal plasma and blood : Evidence for significant mechanisms independent of the plasminogen-plasmin system. *Blood*, **48**, 531 (1976)
- Tamaoki, H., Minato, S., Takei, S. and Fujisawa, K. : A clinical method for the determination of serum  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase. *Clin. Chim. Acta*, **65**, 21 (1975)
- Akimoto, T., Yamada, S. and Matsumoto, I. : The relation between protease and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase activities and qualities of Natto. *Nippon Shokuhin Kogyo Cakkaishi*, **37**, 872 (1990)
- A.O.A.C. : *Official method of analysis*. 15th ed., Association of official analytical chemists. Washington D.C., p.32 (1990)
- Anson, M. L. : The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79 (1938)
- 이부용, 김동만, 김길환 : 청국장 점질물의 이화학적 특성. 한국식품과학회지, **23**, 5 (1991)
- 이용호, 김성호, 정낙현, 임무현 : 청국장 발효중 점질성 고분자 물질의 생성에 관한 연구. 한국농화학회지, **35**, 202 (1992)

(1994년 11월 24일 접수)