

메주 유래의 *B. subtilis* SCB-3으로 제조된 된장의 Angiotensin I Converting Enzyme 저해효과

황 증 현

두산인재기술개발원

Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Effect of Doenjang Fermented by *B. subtilis* SCB-3 Isolated from Meju, Korean Traditional Food

Jong-Hyun Hwang

Doosan Training and Technology Center, Kyungkido 449-840, Korea

Abstract

Morphologically different 18 strains were isolated and examined for their abilities to inhibit ACE. Those strains were cultured in the medium containing 10% of soybean extract at 37°C for 48hr or fermented with boiled soybean at 30°C for 60 days. The concentration of inhibitors to inhibit 50% of ACE activity, IC₅₀ was measured on the culture broth of each strain and also on the hot-water extract from 20, 40 and 60 day fermented Doenjang by each strain. As a result, SCB-3 which is isolated from Meju showed the highest ACE inhibitory activity on the cultured broth and 40 day matured Doenjang. Then, IC₅₀ of SCB-3 was 0.02mg/ml and 0.26mg/ml respectively. SCB-3 was identified as a *Bacillus subtilis* based upon its morphological, biochemical and physiological properties. Changes in general components and ACE inhibitory activity of Doenjang fermented by SCB-3 were examined during 90 days. Total acidity of Doenjang was increased from 1.39% to 1.66% and pH was decreased from 6.02 to 5.79 after 90 day fermentation. Total sugar contents were decreased from 16.4% to 15.1% and reducing sugar contents was also decreased from 2.45% to 1.62%. Total nitrogen contents were nearly not changed, but amino nitrogen contents were drastically increased from 196mg% to 541mg%. The numbers of total microorganism were increased to 1.1×10^8 cells/g after 45 days. Protease activity was increased to 622.1U/g after 75 days. The highest ACE inhibitory activity was shown in 60 day fermented Doenjang and IC₅₀ of the hot-water extract was 0.31mg/ml.

Key words: Doenjang, Meju, ACE inhibitory activity, *B. subtilis*

서 론

Angiotensin I Converting Enzyme(EC 3.4.15.1; ACE)은 승압활성이 약한 Angiotensin I을 강력한 승압 펩타이드인 Angiotensin II로 변환시킴과 동시에 강압 펩타이드인 Bradykinin을 불활성화하는 반응을 촉매하는 효소이다. 따라서 ACE를 특이적으로 저해하는 물질은 혈압상승을 억제하는 효과를 가지며, 이 관점에서 강압제의 개발이 이루어져 이미 실용화되어 있다(1). 한편 식품공업에서는 각종 생물자원의 단백질의 효소 가수분해물에서 ACE 저해활성을 갖는 펩타이드를 구하고, 이것을 식품으로 섭취하므로써 고혈압 예방에 도움이 되게 하는 연구가 주목을 받고 있다. 특히 대표적인 식물 단백질인 대두를 발효하여 만든 일본된장(MISO)의

경우 ACE 저해효과를 비롯한 다양한 생리활성기능이 밝혀지면서(2). 우리나라의 전통된장에 대한 연구의 발전과 계승이 더욱 강조되고 있는 시점에 와있다. 된장에 관한 국내의 연구로는 메주 및 코지 미생물의 종류에 따른 된장 숙성과정 중의 성분변화(3-5), 숙성과정 중의 아미노산, 지방, 유기산 등 정미성분에 관한 연구(6-10), 된장의 향미성분에 관한 연구(11), 원료의 배합에 따른 숙성과정 중 품질변화(12,13) 등 된장의 제조에 관한 연구가 있다. 된장의 기능성에 관한 연구로는 된장의 항돌연변이 효과(14), 된장 유래의 항혈전펩타이드 탐색(15) 등이 있으며, 된장유래의 ACE 저해 펩타이드에 관한 연구로는 서 등(16)과 신 등(17)의 보고가 있다.

한편, 우리나라와 유사한 식생활 습관을 지니며, 발효식품의 전통에서도 유사성을 지니는 일본에서는 일

찍부터 鈴木 등(18)이 식품, 약재 등을 대상으로 광범위하게 ACE 저해활성을 조사한 결과 된장, 간장 등의 대두 발효식품에서 높은 저해활성을 확인한데 이어서, 岩下 등(19)은 찐된장의 열수추출물이 자연발증고혈압쥐(SHR)의 혈압을 저하시킨다는 것을 확인하였다. 또한 寺中 등(20)은 찐된장, 브리된장 및 콩된장의 물 추출액으로부터 ACE 저해활성을 조사하여 미숙된 된장보다 숙성된 된장이 저해활성이 높다는 것을 확인하였다.

그러나 일본된장은 양조법이나 관여하는 미생물이 한국의 된장과는 크게 다르므로 숙성된장에서 형성되는 펩타이드의 종류도 다르며, 따라서 ACE 저해활성에 미치는 효과도 현저하게 다를 수 있다. 특히 일본된장의 숙성에는 순수분리된 곰팡이 코지에서 분비되는 산성 protease가 관여하는 반면, 한국의 전통된장의 숙성에는 메주제조시 대두 또는 벧짚에 부착된 세균의 중성 및 알칼리성 protease가 주요 효소원으로 관여하고 있다(21). 따라서 한국전통된장의 품질과 생리활성기능을 연구발전시키기 위해서는 전통된장의 제조에 관여하는 우수미생물의 분리와 이를 이용한 제조방법의 연구가 선행되어야 할 것이다. 이와 관련하여 메주 또는 된장에서 분리한 *Bacillus*속의 세균을 이용하여 된장의 제조에 관해 보고한 예는 안과 이(3)가 메주 중 *Bacillus* sp.와 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 된장의 숙성과정을 조사한 예, 이와 정(5)이 *B. natto*가 된장에 미치는 영향을 조사한 예, 그리고 서 등(4)과 박 등(11)이 *Bacillus* sp.와 *Aspergillus* sp.로 제조한 메주가 된장에 미치는 영향을 조사한 예 등에서 찾아볼 수 있으나, 아직 재래식 메주, 된장 등에서 순수 분리한 세균으로 된장을 제조하여 생리기능을 조사한 예는 없으며, 아직도 메주에서 분리된 다양한 세균을 된장제조에 응용하여 된장의 품질과 생리적 기능에 유효한 균주를 선발하는 다양한 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 메주로부터 된장의 품미가 우수하며 ACE 저해활성이 우수한 균주를 분리하여 된장을 담그고, 숙성기간 중의 이화학적 변화와 ACE 저해효과를 비교하므로써 순수분리한 균주로 담근 된장의 품질특성과 생리활성을 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

균주 스크리닝에 이용된 메주, 된장, 청국장은 서울, 경기, 순창, 대구 지역의 가정 또는 상점에서 7종을 구입하였고, Natto는 일본에서 시판되고 있는 3종의 제품(Table 1)을 구입하여 사용하였다. 균주의 보관과 배양

Table 1. List of Meju, Doenjang and Natto samples for screening of strains producing Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor

Strain	Product Name	Source
KB-1	Meju	Seoul
KB-2	Meju	Seoul
KB-3	Meju	Seoul
SB-1	Doenjang	Daekoo
SB-2	Meju	Daekoo
SB-3	Meju	Daekoo
SCB-1	Doenjang	Soonchang
SCB-2	Meju	Soonchang
SCB-3	Meju	Soonchang
OB-1	Doenjang	Seoul
OB-2	Doenjang	Seoul
OB-3	Doenjang	Seoul
OB-4	Doenjang	Seoul
NS-1	Chungkookjang	M Foods Co.
NS-2	Chungkookjang	H Food Co.
JB-1	Natto	Nagano Foods
JB-2	Natto	Asahi Foods
JB-3	Natto	Azuma Foods

을 위하여 사용한 nutrient agar 및 nutrient broth는 Difco Co.(Detroit, MI, 미국)의 제품을 사용하였으며, 된장의 담금에 사용된 콩은 국산콩을, 식염은 한주소금(순도 95% 이상)을 사용하였다.

균주의 분리

한국에서 구입한 7종의 메주, 청국장 및 된장과 일본에서 구입한 3종의 Natto 제품 1g을 각각 균질용 무균비닐봉지에 취한 후 saline용액 100ml를 넣고 stomacher(Promedia SH-001/일본 ELMEX제)에서 3분간 균질하였다. 균질 후 상등액을 단계적으로 희석하여 nutrient agar배지에 도말하고 37°C incubator에서 24~48시간 배양하고 nutrient agar에 형성된 단일 균락 중 형태적으로 서로 다른 것을 분리하여 검경을 통해 전형적인 *Bacillus* type의 균주를 선택하여 분리원의 특징에 따라 각각 KB, SB, SCB, OB, NS, JB로 명명하였다(Table 1). 분리한 균주는 nutrient broth에서 37°C, 24시간 진탕배양하여 종균배양액으로 하고, 권 등(22)이 사용한 향기형성배지(Table 2)에서 37°C, 48시간 진탕 배양하여 배양액의 향기특성과 ACE 저해효과 및 protease활성을 비교 조사하였다.

다음에, 20°C의 물에서 15시간 침지하여 물빼기를 한 후, 121°C에서 30분간 증자 후 40°C로 냉각한 500g의 대두에 향기형성배지의 배양액 25ml를 혼합하여 37°C에서 48시간 배양하여 콩메주를 만들고, 동일방식으로 증자 냉각된 380g의 덧밥용 대두와 120g의 식염을 혼

Table 2. Medium composition for screening of strains producing Doenjang flavor

Glucose	1.0 %
Polypeptone	0.5 %
Yeast extract	0.5 %
KH ₂ PO ₄	0.1 %
MgSO ₄	0.01%
NaCl	2.0 %
Soybean extract	10.0 %

pH was adjusted to 7.0

For the preparation of soybean extract, 100g of the mashed soybean was boiled for 6hr with 1,000ml of distilled water and the final volume was adjusted to 200ml followed by filtration. The filtrate was used as a soybean extract.

합 후 screw mixer에 의해 마쇄하여 2L용 유리용기에 담아 30°C에서 60일 동안 숙성하면서 균주별 ACE 저해 활성의 변화를 측정하였다. 이와같이 액체배지와 된장 담금을 통하여 된장의 풍미가 양호하고 ACE 저해활성이 가장 우수한 균주 SCB-3를 선발하여 된장 담금에 사용하였으며, 균주의 동정은 Bergey's Manual에 준하여 실시하였다.

Angiotensin Converting Enzyme 저해활성 측정

시료의 조제

된장을 시료로 한 경우에는 된장 10g을 증류수 200 ml에 넣고 100°C에서 최종 부피가 50ml될 때까지 열수로 추출한 후, 이를 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하고 Whatman No.41 여지로 여과 후 시료로 사용하였으며 액체배지를 시료로 한 경우에는 동일방법으로 원심분리하여 상등액을 취하고 여과하여 사용하였다.

완충용액의 조제

Lieberman의 방법을 변형한 山本 등(23)의 방법을 이용하여 실험하였다. 0.2M의 H₃BO₃와 0.05M의 Na₂B₄O₇을 삼차 증류수를 이용하여 제조 후 5.5:4.5의 비율로 섞어서 pH를 8.3으로 맞춘 다음 분석시 최종 농도가 0.1 M이 되게 NaCl을 가한다.

기질의 조제

위의 방법에 의해 제조된 borate-NaCl buffer에 Hip-His-Leu 기질을 125mM 되게 용해시키고 pH를 8.3으로 조절하였다.

ACE의 조제

Rabbit lung acetone powder를 g당 10ml의 borate-

NaCl buffer에 넣어, 4°C에서 24시간 동안 교반용해 후, 12,000rpm에서 30분간 원심분리시킨 다음 상등액을 취해서 냉동보관하여 사용하였다.

ACE 저해활성 측정

시료 0.05ml에 Hip-His-Leu을 0.1ml 가한 후 37°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 ACE 효소액을 0.15ml 가하고 다시 37°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5N HCl을 0.25ml 가하여 반응을 정지시켰다. 공실험은 시료용액 대신 증류수 0.05ml를 사용하였으며 대조구는 HCl을 가한 후 효소액을 가하였다. 여기에 ethyl acetate 1.5ml을 천천히 가하여 15초간 섞어준 후 2,500rpm에서 10분간 원심분리시켜 상등액을 0.5ml 취하였다. 이 상등액을 oil bath 140°C에서 15분간 건조 후 1M NaCl을 3ml 가하여 용해시킨 후 228nm에서 흡광도를 측정하여 다음식에 의해 ACE 저해율을 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{E_c - E_s}{E_c - E_b} \times 100$$

E_c=시료 대신 증류수 첨가시의 흡광도,

E_s=시료 첨가시의 흡광도

E_b=반응 정지후 시료 첨가시의 흡광도

IC₅₀은 각각의 시료를 30μl, 50μl, 70μl를 가한 후 ACE 저해활성을 비교하여 ACE 활성을 50% 저해하는데 필요한 시료의 단백질 양으로 표시하였으며, 시료의 단백질은 Lowry 등의 방법(24)에 의해 측정하였다.

된장의 담금

동결보관 중인 SCB-3균주를 nutrient broth에서 37°C, 24시간 배양하여 활성화시킨 후 권 등(22)이 사용한 배지 250ml에 2% 접종하여 37°C, 48시간 동안 증배양하였다 증배양액은 대두 5kg을 20°C의 물에 15시간 침지하여 1시간 물빼기하고, 121°C에서 30분간 증자하여 40°C로 냉각한 증자대두에 접종 후, 37°C 배양기에서 48시간 배양하여 담금용 배주로 사용하였다.

다음에 대두 5kg을 동일 방법으로 증자, 냉각하여 식염 2kg과 미리 준비된 메주와 함께 팔고루 혼합하고 screw mixer로 마쇄 후 5L용 유리용기에 분할하여 30°C에서 90일간 숙성하였다.

된장성분 분석

수분은 시료 5g을 취하여 moisture analyzer(Orion, Model II)를 이용하여 105°C에서 측정하였고, 염도는 시료 10g에 증류수 90ml를 가하여, mixer로 1분 동안 균질화한 다음, 염도계(Merbabu Trading Co., NS-3P)를 이용하여 측정하였다. pH 및 산도는 균질화된 시료의

Table 3. Angiotensin Converting Enzyme inhibitory effect of the cultured broth by various strains isolated from Meju, Doenjang, Cheongkukjang and Natto

Strain	Flavor Type	ACE inhibition rate(%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Protease activity (U/ml)
KB-1	Cheongkukjang	28	1.11	17.3
KB-2	Doenjang	32	0.76	11.6
KB-3	Doenjang	27	0.81	15.2
SB-1	Cheongkukjang	30	1.23	15.3
SB-2	Kanjang	17	1.08	13.7
SB-3	Kanjang	53	0.60	10.3
SCB-1	Cheongkukjang	22	1.17	13.9
SCB-2	Cheongkukjang	39	0.64	48.0
SCB-3	Cheongkukjang	61	0.02	68.0
OB-1	Cheongkukjang	29	0.87	55.3
OB-2	Meju	18	1.19	22.1
OB-3	Cheongkukjang	79	0.05	55.6
OB-4	Doenjang	31	0.98	17.3
NS-1	Cheongkukjang	21	1.19	15.2
NS-2	Doenjang	54	0.02	48.2
JB-1	Cheongkukjang	19	1.33	34.5
JB-2	Doenjang	34	0.77	55.8
JB-3	Cheongkukjang	45	0.57	35.1

pH를 pH meter(Orion Ion Analyzer EA901)로 측정 후, potentiometric titration method(25)에 의하여 산도를 구하였다.

총당은 황산처리법에 의하여, 환원당은 Somogy-Nelson법(26)에 따라 측정하였다.

총 질소와 아미노테질소는 각각 micro kjeldahl me-

thod과 Formol 적정법(25)에 따라 측정하였고, 총 균수는 시료 10g을 멸균수 90ml와 함께 멸균비닐팩에 넣은 후 stomacher(일본Elmex, PromediaSH-001)로 3분동안 균질한 다음, 균수측정에 편리한 농도로 희석하여 nutrient agar배지에 도말하고 37°C에서 24~36시간 평판 배양하여, 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

한국에서 구입한 7종의 메주, 된장, 청국장과 일본에서 시판되고 있는 3종의 Natto 제품으로부터 18종의 균주를 분리한 후 향기형성배지에서 향기 특성, ACE 저해활성 및 protease 활성을 비교하여 본 결과(Table 3), SB-3, SCB-3, OB-3, NS-2, JB-3 균주가 각각 53%, 61%, 79%, 54%, 45%의 높은 저해율을 나타내었으며, IC₅₀값도 각각 0.6mg/ml, 0.02mg/ml, 0.05mg/ml, 0.02mg/ml, 0.57mg/ml로써 낮은 수치를 보여주고 있다 특히 SCB-3, OB-3, NS-2 등은 타균주보다 상대적으로 ACE 저해활성과 protease 활성이 높아서 protease 활성이 ACE 저해펩타이드의 생성에 밀접하게 관련되고 있음을 짐작하게 하였다.

한편, 동일균주를 이용하여 담근 된장을 60일동안 숙성하면서 20일마다 분석하여 본 결과(Table 4) 숙성 40일째에 SCB-3와 JB-2가 저해율이 47%로써 가장 높은 값을 나타냈으며 IC₅₀값도 0.26mg/ml, 0.27mg/ml로

Table 4. Angiotensin Converting Enzyme inhibitory effect of Doenjang matured for 60 days

Strain	20 days		40 days		60 days	
	Inhibition rate(%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Inhibition rate(%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Inhibition rate(%)	IC ₅₀ (mg/ml)
KB-1	28	1.11	39	0.56	36	0.62
KB-2	33	0.4	26	0.94	26	3.17
KB-3	32	0.76	45	0.45	23	4.23
SB-1	30	0.93	40	0.54	30	1.99
SB-2	17	1.17	29	1.01	32	2.18
SB-3	33	0.81	44	0.54	12	5.83
SCB-1	33	0.75	41	0.59	29	2.55
SCB-2	22	1.08	42	0.24	33	1.74
SCB-3	39	0.51	47	0.26	41	1.13
OB-1	29	0.87	42	0.62	24	5.00
OB-2	18	1.19	24	1.07	36	2.23
OB-3	49	0.31	43	0.59	31	2.19
OB-4	33	0.71	46	0.51	27	2.31
NS-1	21	1.19	43	0.54	20	4.25
NS-2	54	0.47	44	0.58	18	4.16
JB-1	45	0.56	39	0.48	18	2.72
JB-2	19	1.33	47	0.27	30	2.55
JB-3	34	0.77	40	0.42	11	5.41

써 타균주에 비해 낮은 값을 나타내었다. 그러나 숙성 60일째에는 ACE 저해효과가 다소 감소되는 경향을 보여 주었다. 이와같은 결과는 숙성과정 중 protease의 작용에 의해 분해 생성된 ACE 저해 펩타이드가 다시 가수분해되어 저해활성이 일부 소실되는 것으로 생각되었다. 이와같이 액체배지와 된장 담금에서 비교한 결과에 따라 ACE 저해율 및 IC₅₀값이 가장 우수한 균주로써 메주로부터 분리한 SCB-3균주를 선정하여 된장담금의 공시균주로 사용하였다.

균주의 동정

SCB-3균주는 형태학적 특성, 배양학적 특성, 생화학적 특성에 대한 실험결과를 종합하여 볼 때 *Bacillus subtilis*로 동정되어 *B. subtilis* SCB-3로 명명하였으며 이 균주에 대한 특성은 Table 5와 같다 SCB-3 균주는 형태학적 특성으로, 운동성이 있는 호기성 그람양성 간균으로써 포자를 형성하였으며 배양학적 특성으로는, 7% NaCl용액에서 생육하는 내염성을 지니며, 55°C 이상에서 생육하지 않아 내열성이 약한 중온성균의 특성을 지닌다. 또한 생화학적 특성으로는, casein, gelatin, starch를 모두 가수분해하여 단백 및 전분분해능이 있는 catalase 양성이었다.

Table 5. Morphological, cultural and biochemical characteristics of the strain SCB-3

1. Morphological characteristics
- Form: Rods(0.5~1.0µm×2.0~3.8µm)
- Motility: Positive
- Gram stain: Positive
- Endospore: Positive
2. Cultural characteristics
- Nutrient agar: Good growth. Slime formed
- Growth pH 6.8. Positive, pH 5.7. Positive
- Growth NaCl 5%: Positive, NaCl 7%: Positive
- Growth at 50°C: Positive, at 55°C. Negative
- Anaerobic growth: Negative
3. Biochemical characteristics
- Hydrolysis of casein: Positive
gelatin: Positive
starch: Positive
- Acid from glucose: Positive
arabnose: Positive
xylose: d
mannitol: Positive
- Catalase test: Positive
- Voges-Proskauer test: Positive
- Utilization of citrate' d
propionate: Negative

d: 11~89% of strains positive

수분 및 염도의 변화

숙성 중의 수분 및 염도의 변화는 Table 6과 같다. 담금 직후의 수분은 54.2%였으며, 90일 숙성 후에는 50.8%로 감소하였다. 이는 *A. oryzae* koji와 재래메주의 배합을 달리하여 담금 된장에 수분이 증가하였다는 보고(13)와는 다른 결과였으나, 안과 이(3)가 보고한 *B. subtilis*로 담금한 된장에서 다소 감소한 것과 비슷한 경향을 보였으며 이와같은 결과는 담금 후 평형화된 수분이 시료 채취과정 또는 밀폐상태에 따라 자연 증발된 것으로 추측되었다. 한편, 숙성과정 중 염도 변화는 숙성기간의 경과에 따라 약간의 증가를 보여주고 있으나, 거의 일정 수준을 유지하고 있으며 이는 숙성기간에 따른 염도 변화가 거의 없다는 보고(12,13)와 일치하였다.

pH 및 산도의 변화

된장숙성 중의 pH와 산도 변화를 측정된 결과(Fig. 1) 된장 담금 직후의 pH가 6.02였으나, 90일 숙성 후에는 5.79로 감소되어 숙성기간의 경과에 따라 약간 감소하는 경향을 보이고 있다. 이는 안과 이(3)가 *B. subtilis*를 이용한 된장 담금에서 숙성초기 pH가 5.82였던 것이 90

Table 6. Changes in the contents of moisture and salt during the Doenjang maturation at 30°C by *Bacillus* sp. SCB-3

Fermentation period(day)	Moisture(%)	Salt(%)
0	54.2	10.1
15	54.1	9.8
30	53.6	10.2
45	51.5	10.4
60	51.3	10.7
75	51.6	10.6
90	50.8	10.7

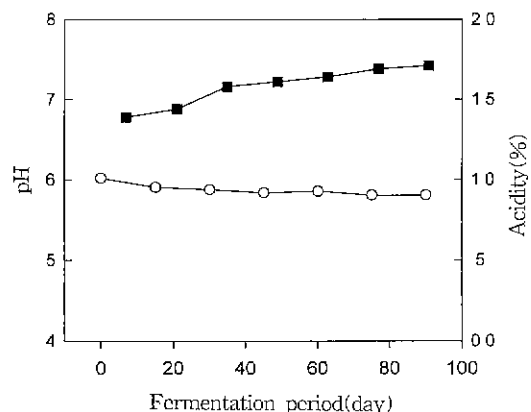


Fig. 1. Changes in pH and acidity during Doenjang fermentation at 30°C by *B. subtilis* sp. SCB-3. ○-○ pH, ■-■ Acidity

일 숙성 후 5.02까지 저하되었다는 보고와 같은 경향을 보이고 있었다.

pH의 경시적 변화에 이어 산도를 측정한 결과, 숙성 초기의 산도가 3.2였던 것이 숙성 90일 이후 3.7로 증가하여 숙성기간 경과에 따라 매우 완만한 산도증가 경향을 보였다 이와같은 결과는 *B. natto*균주를 이용한 된장 담금의 경우, 산도가 일정기간 증가한 후 다소 감소하였다는 보고(5,12)와는 차이가 있었으며, 안과 이(3)가 *B. subtilis*를 이용한 된장 담금에서 담금 직후 6.29이었던 산도가 숙성 90일 후 17.30으로 상승되었다는 보고와는 커다란 차이가 있었다.

안과 이(3)는 보고에서 된장 숙성과정 중 유산균의 오염, 증식에 의한 pH 저하와 산도 증가를 언급하였으나, 본 된장 담금에서의 산도 증가는 SCB-3균주에 의한 결과를 평가하기 위해 오염의 배제를 최대한 억제하였기 때문에 *B. subtilis* SCB-3의 배주 배양시 생성된 유기산과 숙성과정 중 SCB-3균주에 의해 생성된 미량의 산에 의한 것으로 추측되었다.

총당 및 환원당의 변화

된장 숙성과정 중의 총당 함량과 환원당의 함량은 Fig. 2와 같다. 총당 함량은 담금 직후 16.4%였으나 숙성기간의 경과에 따라 점차 감소하여 숙성 90일 후에는 15.1%로 저하되었다. 숙성과정 중 총당 함량이 감소된 것은 당질의 일부가 미생물의 생육과 유기산 발효의 기질로 사용된 것으로 생각되며, 일반적으로 된장 발효시 숙성기간 경과에 따라 총당 함량이 감소되었다는 보고(3,13)와 일치하였다. 또한, 숙성과정 중 환원당의 양은 숙성

30일째 2.45%로 가장 높은 값을 보이다가 점차 감소하여 숙성 90일째 1.62%가 되었으며, 안과 이(3)의 보고에서도 *B. subtilis*에 의한 된장 발효시 담금 초기 0.62%였던 환원당이 숙성 50일째 1.68%로 최고에 도달하고 숙성 90일째 1.56%로 감소되어 유사한 경향을 보여 주었다. 따라서 된장 발효시 환원당의 함량은 숙성에 관여하는 균의 종류에 따라 다르나 *Bacillus* sp.에 의한 된장 발효시는 초기에 존재하는 환원당이 우선 세균 증식의 기질로 이용되며 *Bacillus* sp.의 amylase에 의해 환원당 함량이 약간 증가하나 곧 발효기질로 사용되며 점차 감소하는 것으로 추측되었다.

총질소 및 아미노태 질소의 변화

된장숙성 중의 총 질소 및 아미노태 질소의 변화는 Fig. 3과 같다. 담금 직후 총 질소의 양은 1.91%이었으나, 숙성 30일째까지 다소 상승하여 2.16%가 된 후 점차 감소하여 숙성 90일 후 1.77%가 되었으며 전체적으로는 1.77~2.16% 범위에서 미약한 변화를 보였으며, 이와같은 결과는 강과 이(6)가 채래식 메주를 이용한 된장담금에서 총 질소량이 숙성기간이 경과함에 따라 점차 증가하여 숙성 초기 2.22%이었던 총 질소량이 숙성 90일 이후 2.49%로써 약간 증가하였다는 보고와는 상반된 경향이며 총 질소량이 다소 낮았다.

한편, 아미노태 질소는 담금 직후 급격히 상승하여 196mg%이었던 것이 숙성기간의 경과에 따라 점차 상승하여 숙성 90일에는 541mg%를 나타내었다. 이와같은 결과는 안 등(3,6)의 보고에서 *B. subtilis*를 이용한 메주로 된장을 제조한 결과, 담금 직후 103mg%이던 것이 아미노태 질소가 점차 증가하였다는 보고와 일치하

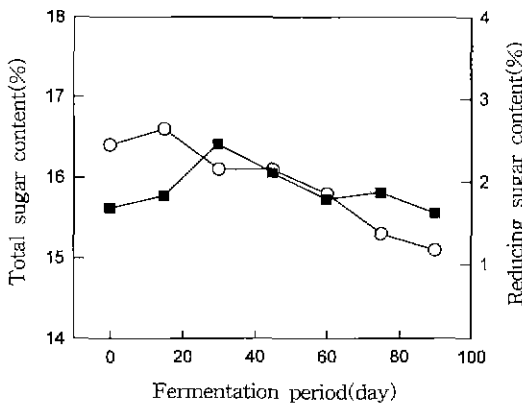


Fig. 2. Changes in the contents of total sugar and reducing sugar during Doenjang fermentation at 30°C by *B. subtilis* sp. SCB-3.
○—○. Total sugar
■—■. Reducing sugar

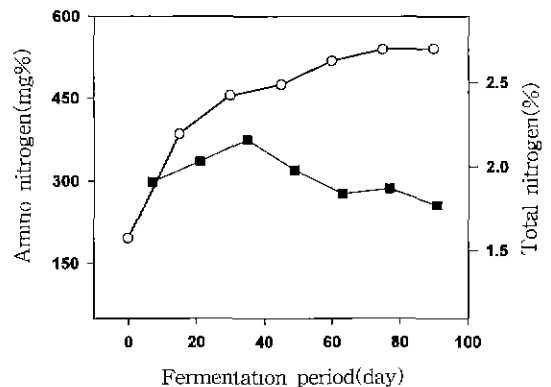


Fig. 3. Changes in amino nitrogen and total nitrogen contents during Doenjang fermentation at 30°C by SCB-3.
○—○: Amino nitrogen(mg%)
■—■: Total nitrogen(%)

는 경향이었으나 아미노태 질소의 양은 본 실험의 결과가 월등히 높았으며, 이는 *B. subtilis* SCB-3의 단백질해력이 높음을 시사하는 것이었다. 아울러 초기의 아미노태 질소가 196mg%로 다소 높았던 이유는 *B. subtilis* SCB-3를 발효시켜 만든 콩메주에 아미노태 질소가 다량 함유되어 있던 것으로 추측되었다.

총균수의 변화

된장의 숙성과정 중 미생물과의 관계를 검토하고자 숙성기간에 따른 세균수를 측정된 결과(Fig. 4), 담금 직후 5.5×10^7 cell/ml이었던 것이 숙성경과에 따라 약간 증가하여 숙성 45일째 최대 1.1×10^8 cell/ml이었다가, 그 이후 숙성 90일째까지 숙성기간의 경과에 따라 약간 감소하여 커다란 증감없이 7.0×10^7 cell/ml 수준의 세균수를 유지하고 있는 것으로 보였다

이는 신 등(27)이 *Bacillus*속 세균과 *Saccharomyces*속 효모를 이용한 된장 담금에서 발효경과에 따라 세균이 증감한 후 숙성말기에 다소 감소한다는 경향과 유사하였으나, 본 실험에서의 세균수가 다소 적은 것으로 생각되었다.

특히, 숙성기간 중 균수의 증감없이 일정한 균수를 유지하고 있는 것은 다른 잡균의 오염에 의한 변화가 없고 초기에 집중하여 발효시킨 콩메주 속의 *Bacillus* 균에 의한 숙성이 진행되고 있는 것으로 추측되었다.

Protease의 활성 변화

된장 숙성과정 중의 protease활성은 숙성기간의 경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5). 담금 직후의 활성이 347.9U/g이었으며 숙성 75일째에 가장

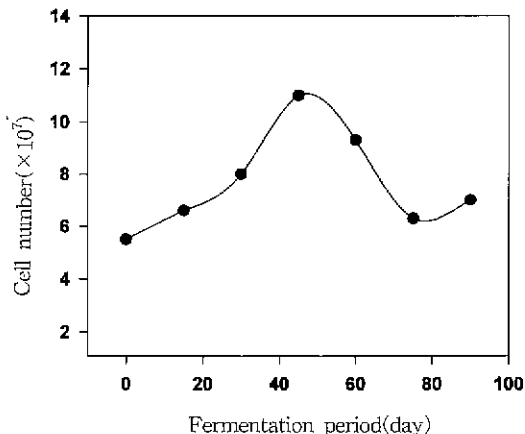


Fig. 4. Changes of cell numbers during Doenjang fermentation at 30°C by SCB-3.

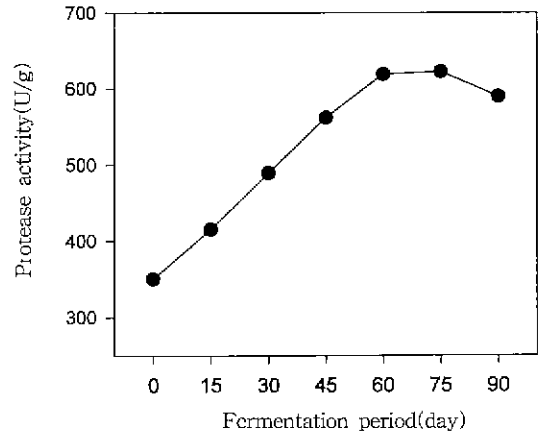


Fig. 5. Change of protease activity during Doenjang fermentation at 30°C by SCB-3.

높은 622.1U/g에 도달 후 약간 감소하는 경향을 보였으며, 이러한 결과는 아미노태 질소의 증가와 유사한 경향을 띠고있어, protease의 활성증가가 아미노태 질소의 증가와 직접적인 상관성이 있음을 시사하였고, 이러한 경향은 *Bacillus natto*를 이용한 담금에서 protease 활성이 숙성기간에 따라 증가하는 경향(28)과 같은 양상을 보였다.

ACE 저해활성의 변화

숙성기간에 따른 혈압강하효과를 비교한 결과 숙성

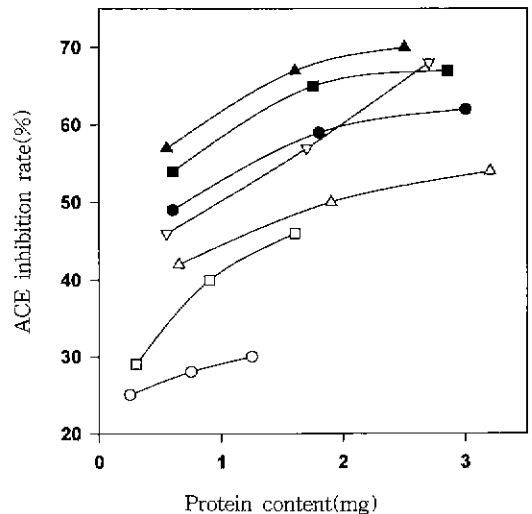


Fig. 6. Comparison of the ACE inhibition rate according to protein contents of each extract during Doenjang fermentation at 30°C by SCB-3. —○—: non-fermentation, —▲—: 60th day, —□—: 15th day, —■—: 75th day, —△—: 30th day, —●—: 90th day, —▽—: 45th day

60일 이후에 ACE 저해활성이 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 6) 숙성기간의 경과에 따른 ACE 저해율을 측정기에 사용된 시료의 양(단백량)의 차이에 따라 측정하여 본 결과, ACE 저해율이 50% 이하인 부분의 그래프는 급격하지만, 저해율이 50% 이상일 경우는 점차 완만하여지므로, IC₅₀과 저해율의 상관성에서 비례관계는 성립하지 않고, 같은 숙성된장이라 하더라도 정확한 IC₅₀을 구하기 위해서는 ACE 저해율이 50%에 가까운 시점의 단백질 농도를 구하여야 함을 알 수 있다. 이러한 관점에서 그래프를 살펴볼 때, IC₅₀이 1mg/ml 이하의 낮은 값을 얻기 위하여는 된장의 숙성기간이 60일 이상이어야 하고, 숙성기간 60일째에 ACE 저해율은 가장 높았으며, 이때의 IC₅₀ 값은 0.31mg/ml이었다.

요 약

우리나라의 메주, 된장 및 청국장과 일본의 Natto로부터 형태학적으로 구분되는 18종의 균주를 분리하고, 배양물의 풍미특성, protease활성 및 ACE 저해활성을 비교하여, 가장 우수한 균주 1종을 선정하였으며, 선발된 SCB-3 균주는 균주의 형태학적 특성, 배양특성, 생화학적 특성을 조사한 결과 *Bacillus* sp.로 동정되었으며, *Bacillus* sp. SCB-3라 명명하였다. SCB-3 균주를 향기형성배지에서 37°C, 48시간 진탕배양한 후 측정된 ACE 저해율은 61%이었으며, IC₅₀은 0.02mg/ml의 높은 값을 보여주었다. 또한 대두를 이용한 된장담금실험에서 숙성 40일째에 IC₅₀은 0.26mg/ml로써 ACE 저해효과가 가장 높았고, 숙성 60일째에는 ACE 저해활성이 소실되어 과숙된장의 경우에는 오히려 ACE 저해활성이 낮았다. SCB-3균주를 이용한 된장의 숙성기간 중 일반성분과 ACE 저해활성의 변화를 경시적으로 분석한 결과, 90일 숙성과정 중 약 0.32%의 미비한 산도 증가가 있었으며, 된장의 맛과 관계되는 아미노태 질소량은 숙성 90일째에 541mg%로써 숙성과정 중 꾸준히 증가하여, 된장의 정미성분에 상당량 기여함을 알 수 있었다. 총 균수의 변화는 숙성기간에 따라 약간 증가하여 숙성 45일째 최대 1.1×10^8 cells/ml이었으며, 오염균에 의한 산증가나 균수변화는 보이지 않았다. Protease활성은 숙성 75일째에 최고 622.1U/g이었으며, ACE 저해활성은 숙성기간에 따라 점차 증가하여 숙성 60일째에 가장 높았으며, 이때의 IC₅₀은 0.31mg/ml이었다.

문 헌

1. (株)島科學濃誌：高血壓症治療藥市場. 生物産業, 9, 40 (1994)

2. 海老根英雄：味噌の生體調節機能. 味噌の科學と技術, 43, 339(1995)

3. 안호진, 이택수 : 메주균을 달리한 재래식 형태의 메주가 된장의 품질에 미치는 영향. 서울여자대학 농촌발전 연구, 12, 99(1987)

4. 서정숙, 한은미, 이택수 · *Bacillus*속과 *Aspergillus oryzae*로 만든 메주가 개량식 된장의 성분에 미치는 영향 한국영양식품학회지, 15, 1(1986)

5. 이갑상, 정동호 · *Bacillus natto*가 된장에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 5, 163(1973)

6. 강정희, 이혜수 · 된장숙성 중 지질의 변화 및 카보닐 화합물의 함량변화. 식품과학회지, 10, 51(1994)

7. 김미정, 이혜수 : 된장숙성 중 정미성분의 변화에 관한 연구. 한국식품과학회지, 9, 261(1993)

8. 김미정, 이혜수 · 된장숙성 중 정미성분의 변화에 관한 연구-유리당과 휘발성, 비휘발성 유기산. 한국식품과학회지, 9, 257(1993)

9. 홍혜정, 이혜수 : 된장의 쓴맛 펩타이드 특성. 한국식품과학회지, 10, 45(1994)

10. 손양도, 최춘연, 안봉정, 손규득, 최청 : 한국재래식 메주 발효과정에 있어서 지질 및 지방산 조성의 변화. 한국농화학회지, 28, 226(1995)

11. 박정숙, 이명령, 김정수, 이택수 · 균주를 달리한 된장의 향기성분. 한국식품과학회지, 26, 255(1994)

12. 주현규, 오근택, 김동현 · 재래 및 개량메주와 남두의 배합이 된장발효에 미치는 영향. 한국농화학회지, 35, 286 (1992)

13. 최경숙, 이혜수 : 코오지의 종류와 배합을 달리한 된장의 특성. 한국식품과학회지, 10, 39(1994)

14. 박진영, 문승희, 백형석, 최홍식 : 된장의 aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이 효과. 한국영양식품학회지, 19, 156(1990)

15. 손동화, 이정애, 김승호, 안창원, 남희섭, 이형재, 신재익 : Microplate법에 의한 된장 유래의 항혈전펩타이드 탐색. 한국식품과학회지, 28, 684(1996)

16. 서형주, 서대방, 정수현, 황중현, 성하진, 양한철 : 된장으로부터 angiotensin converting enzyme 활성 저해물질의 정제. 한국농화학회지, 37, 411(1994)

17. 신재익, 안창원, 남희섭, 이형재, 이형주, 문태화 : 된장으로부터 ACE 저해 펩타이드의 분획. 한국식품과학회지, 27, 230(1995)

18. 鈴木建夫, 石川宣子, 日黒照 : 食品中のアンジオテンシンI 変換酵素阻害能について, 57, 1143(1983)

19. 岩下敦子, 高橋裕司, 河村幸雄 · 味噌の生理機能, 89, 869 (1994)

20. 寺中椽頼, 江澤底, 松山岸 · 米味噌, 變味味噌および豆味噌抽出のアンジオテンシンI 変換酵素抑制效果. 日本農藝化學會誌, 69, 1163(1995) -

21. 조덕현, 이우진 · 한국 재래식 간장의 발효 미생물에 관한 연구. 한국농화학회지, 13, 35(1970)

22. 권오진, 김종규, 정영건 : 한국 재래식 간장 및 된장에서 분리한 세균의 특성. 한국농화학회지, 29, 422(1986)

23. 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎 : 血清アンジオテンシンI 変換酵素活性測定法檢討. 日胸疾會誌, 18, 197(1980)

24. Lowry, O. H., Resbraugh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)

25. A.O.A.C. : *Official methods of analysis* 14th ed., Association of official analytical chemists. Washington. D. C (1984)

- 26 Whistler, R. L. : *Methods in carbohydrate chemistry*. Academic Press, Vol.1, p.386(1964)
- 27 신순영, 김영배, 유태중 · *Bacillus licheniformis*와 *Saccharomyces rouxii* 첨가에 의한 된장의 풍미향상. 한국 식품과학회지, 17, 8(1985)
28. 김복란, 한용봉, 박창희 : *Bacillus subtilis* S.N.U 816균주를 이용한 Natto 제조 중 유리당 및 유리아미노산의 변화. 한국농화학회지, 30, 192(1987)

(1997년 7월 16일 접수)