

분리국균과 시판국균으로 제조한 된장의 숙성 중 품질과 생리기능성 변화

노재덕¹ · 이대형¹ · 이대형¹ · 최신양² · 김나미³ · 이종수^{1*}

¹배재대학교 생명유전공학과

²한국식품연구원

³(주)KT&G 중앙연구원

Changes of Quality and Physiological Functionality during the Fermentation of Doenjangs Made by Isolated Nuruk Mold and Commercial Nuruk Mold

Jae-Duck No¹, Dae-Hyung Lee¹, Dae-Hyung Lee¹, Shin-Yang Choi²,
Na-Mi Kim³ and Jong-Soo Lee^{1*}

¹Dept. of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

²Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

³KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-805, Korea

Abstract

In other to develop new functional doenjangs, two types of the isolated nuruk doenjangs were prepared with protease and amylase-producing *Aspergillus oryzae* D-2 and antihyperlipidemia *Bacillus subtilis* LK-12 and then changes of its quality and physiological functionalities were investigated during 2 months of fermentation and compared with those of the commercial nuruk doenjangs made by commercial *Aspergillus oryzae* and antihyperlipidemia *Bacillus subtilis* LK-12. α-Amylase activity of the isolated nuruk doenjangs during fermentation were decreased slightly, whereas proteases activities were increased significantly to 1.8~2.8 Unit per mL after 1 month of fermentation. These α-amylase activities and proteases activities were similar with those of the commercial nuruk doenjangs. Amino-nitrogen content and reducing sugar content of the doenjangs after 2 months of fermentation were approximate 1.63~1.72 mg% and 0.77~0.81%, respectively. Antihypertensive angiotensin-I converting enzyme inhibitory activities of the isolated nuruk doenjangs were slightly decreased from 85.6~87.2% to 84.0~85.1% after 2 months of fermentation and the commercial nuruk doenjangs were also significantly decreased from 85.7~88.0% to 69.1~79.7%, lower than the isolated nuruk doenjangs. Fibrinolytic activity and HMG-CoA reductase inhibitory activity of the isolated nuruk doenjangs were very low and it were also similar with those of the commercial nuruk doenjangs. Antioxidant activity of the isolated nuruk doenjangs were showed 17~22%, lower than that of the commercial nuruk doenjangs (22~26%).

Key words: quality, functional doenjang, physiological functionality, fermentation

서 론

전통 발효식품 중의 하나인 된장은 오래전부터 우리 식생활에 중요한 조미식품으로 뿐만 아니라 식물성 단백질이 풍부한 건강식품으로 널리 이용되어오고 있다. 특히 최근 된장이 활성산소에 의한 세포나 유전자의 파괴와 변형을 방지하여 노화억제효과가 있고 발효 중 생성되는 리놀산과 펩타이드들이 각각 면역성과 항암성 및 각종 심혈관 질환을 예방하는 것으로 알려지면서 그 수요가 점점 증가하고 있다(1-3).

지금까지의 된장관련 주요연구로는 국균과 숙성균의 효율적인 관리, 숙성중의 미생물 분포와 이화학적 특성 및 효소활성의 변화조사, 장류의 보존 및 된장의 분말화 연구, 저

염 장류의 제조와 안정성, 영양성과 생리기능성, 약리효능 연구 등을 들 수 있다(4-12). 특히 된장숙성에 관하여는 미생물과 각종 영양성분의 변화에 관한 연구가 많이 진행되어 된장의 풍미에 관여하는 주요 세균으로 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*와 일부 *Bacillus*속 균 등이 알려져 있고 한국 재래식 된장으로부터 *Bacillus* sp.와 *Mucor* sp. 및 *Penicillium* sp. 등이 분리되었다(3,6-8,10,12). 또한 최근 저자 등(1)은 약용식물 추출물첨가 된장(한방된장)을 제조하여 60일간 숙성시켰을 때 다양한 생리기능성 물질이 생성되었고 아미노테질소와 유리당 함량 등이 점점 증가하는 경향이 있음을 보고하였다. 그 밖에도 많은 연구들이 젊은층이 기피하는 된장 특유의 냄새를 개선하는 연구를 수행하였지

*Corresponding author. E-mail: biotech8@pcu.ac.kr
Phone: 82-42-520-5388, Fax: 82-42-520-5388

만(6,7,9,11) 보다 확실한 연구결과를 얻지 못하여 아직도 재래식 된장의 수요층이 젊은층으로 확대되지 못하고 있는 실정이다. 한편, 지금까지의 된장제조에 이용되어오고 있는 재래식 메주는 제조기간이 3개월로 비교적 장시간 걸리므로 최초 삶은 콩에 직접 세균과 곰팡이를 접종하여 제조하는 개량식 메주가 각광을 받고 있다.

따라서 본 연구에서는 재래식 된장의 기능성 강화를 통한 품질 고급화의 일환으로 각종 생리기능성을 가진 고부가가치의 전통된장을 개발하고자, 자연계에서 분리한 균으로 전분당화 활성과 단백질 분해활성이 우수한 *Aspergillus oryzae* D-2와 콜레스테롤 합성 억제능력이 우수한 *Bacillus subtilis* LK-12를 이용하여 메주를 제조하고 이들을 일정비율로 혼합하여 2종류의 분리국균 된장을 제조한 후 2개월동안 발효시키면서 각종 영양성분과 효소활성 및 항고혈압성 엔지오텐신 전환효소(ACE) 저해활성과 같은 몇 가지 생리 기능성 등의 변화를 조사하여 시판 *Aspergillus oryzae*와 콜레스테롤 합성 억제능이 있는 *Bacillus subtilis* LK-12를 이용하여 제조한 시판국균 된장의 결과들과 비교하였다.

재료 및 방법

균주 및 재료

메주제조에 사용한 균주는 자연계로부터 분리한, 단백질 분해효소와 전분 당화효소 활성이 각각 3.3 Unit/g과 400 Unit/g으로 비교적 우수한 *Aspergillus oryzae* D-2 균주와 항고지혈성 HMG-CoA reductase 저해활성이 83.7%로 우수한 *Bacillus subtilis* LK-12 균주들을(13) 각각 Potato dextrose(PDA) 배지와 YPD 배지에 접종하여 30°C와 37°C에서 각각 배양하여 사용하였다. 시판 곰팡이 균주로는 밀기울에 배양된 *Aspergillus oryzae*(충무 발효사, 한국)를 시중에서 구입하여 사용하였다.

메주제조에 사용된 콩은 충남 부여 농가에서 2005년 가을에 수확한 것을 구입하여 사용하였고 소금은 99.9%의 정제염을 사용하였다. 기능성 측정용 시약으로 Hip-His-Leu와 fibrin, pyrogallol, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 등은 Sigma사(미국) 제품을 사용하였고 ACE는 rabbit lung acetone powder(Sigma사, 미국)에서 추출하여 사용하였으며 그 밖의 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

생균수 및 효소활성의 측정

숙성 30일, 40일, 60일 각각의 된장 5 g을 증류수 20 mL에 균일하게 현탁시키고 원심분리하여 연속 희석시킨 다음 LB 배지(세균용), YPD 배지(효모용)와 PDA 배지(곰팡이용)에 접종하여 배양한 후 각각의 생균수를 측정하였다(14). 또한 각각의 시료 5 g에 증류수 20 mL를 첨가하여 균일하게 현탁시키고 원심분리한 후 조효소액을 얻은 다음 이들 중의 amylase와 protease 활성을 일본 장류시험법(15)에 따라 측정하였다.

아미노태질소와 환원당 측정

된장숙성 중 아미노태질소 함량은 Formal 적정법을 이용하여 측정하였는데 먼저 시료 1 g에 증류수 20 mL를 첨가하여 교반한 후 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 여과액을 얻었다. 이 여과액 10 mL를 formalin 10 mL와 혼합한 후 pH 8.3이 될 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 적정 mL 수를 계산한 후 질소함량을 환산하였다(15). 또한 환원당 함량은 DNS법(16)을 이용하여 측정하였다.

분리국균 된장과 시판국균 된장의 제조

자연계에서 단백질 분해활성과 전분 당화활성이 우수한 균으로 분리한 *Aspergillus oryzae* D-2와 콜레스테롤 합성 억제능이 우수한 *Bacillus subtilis* LK-12를 이용하여 다음과 같이 분리국균 된장을 제조하였다. 콩을 정선하여 세척한 후 9시간 침지한 다음 100°C로 50분간 삶은 후 냉각시킨 다음 두 그룹으로 구분하여 한 그룹에는 *Aspergillus oryzae* D-2균주를 접종하여 30°C에서 48시간 배양하고 다른 한 그룹에는 *Bacillus subtilis* LK-12 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 이들을 50°C로 24시간 열풍 건조하여 파쇄한 후 *Aspergillus oryzae* D-2 배양물과 *Bacillus subtilis* LK-12 배양물을 1:1(분리국균 된장: I)과 1.5:1(분리국균 된장: II) 비율로 구분하여 혼합하고 소금물(18 Be')을 첨가하여 60일까지 발효시켰다. 대조구로 시판 곰팡이(*Aspergillus oryzae*)와 콜레스테롤 합성 억제능이 있는 *Bacillus subtilis* LK-12 배양물을 1:1(시판국균 된장: I) 또는 1.5:1(시판국균 된장: II) 비율로 혼합하여 위와 같이 된장을 제조한 후 숙성시켰다.

생리기능성 측정

각종 된장 일정량에 증류수를 4배 부피로 넣고 각각 30°C에서 1시간씩 추출한 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상등액을 동결건조하여 시료로 사용하였다(혈전용해 활성은 상등액 사용). 엔지오텐신 전환효소(ACE) 저해활성은 Cushman과 Cheung(17)의 방법에 따라 시료 1 mg을 증류수 50 μ L에 녹이고 여기에 ACE용액 150 μ L(약 3.0 Unit)와 기질용액(pH 8.3의 100 mM sodium borate 완충용액 2.5 mL에 25 mg Hip-His-Leu를 용해) 50 μ L를 첨가하여 섞은 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 1 N HCl로 반응을 정지시켰다. 이 반응액에 유리되어 나오는 hippuric acid의 양을 228 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였고 시료 무첨가구를 대조구로 하여 저해율을 구하였다.

혈전용해활성은 Haverkate-Trass의 fibrin법(18)에 따라 0.6%(W/V) fibrinogen 용액 10 mL와 10 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)에 녹인 thrombin(10 unit)을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin 막을 만든 다음 Whatman 6.0 mm paper disc를 올려놓고 여기에 시료 25 μ L를 첨가하여 37°C에서 6시간 반응시킨 후 clear zone을 측정하였다.

HMG-CoA reductase 저해활성은 50 mM 인산염 완충용

액(pH 7.0) 100 μ L, 2 mM DTT 100 μ L, 0.4 mM β -NADPH 100 μ L, HMG-CoA reductase 조효소액 100 μ L에 0.3 mM HMG-CoA 100 μ L와 각 추출물 100 μ L를 넣은 후 3분간 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다(19). 이와 동시에 HMG-CoA 대신 증류수를 가한 것을 대조구로 반응시킨 후 흡광도의 변화를 비교하여 활성을 계산하였다.

전자공여능(항산화활성)은 DPPH의 환원력을 이용하는 Blois(20)의 방법으로 측정하였다. 시료 200 μ L에 DPPH 용액(DPPH 12.5 mg을 에탄올 100 mL에 용해) 800 μ L를 가한 후 10분간 반응시키고 525 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 무침가 대조구와 활성을 비교하였다.

결과 및 고찰

미생물 생균수의 변화

분리국균 된장 (I)과 (II)의 발효 중 세균의 경시적 변화를 조사한 결과 Table 1과 같이 제조 직후 $1.1 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^4$ CFU/g에서 발효 30일에 $3.0 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^6$ CFU/g으로 증가한 후 다시 $3.4 \sim 3.7 \times 10^5$ CFU/g으로 다시 낮아지는 경향이 있었다. 이러한 세균수는 시판국주로 제조한 시판국균 된장 (I)과 (II)의 발효 30일의 생균수 1.4×10^4 CFU/g과 7.0×10^3 CFU/g, 발효 60일의 2.2×10^4 CFU/g과 1.8×10^5 CFU/g보다 많은 세균수로서 아마 발효 직후의 분리국균 된장의 초기 세균수($1.1 \sim 1.8 \times 10^4$ CFU/g)가 시판국균 된장의 초기 세균수($1.0 \sim 1.1 \times 10^3$ CFU/g)보다 많았기 때문인 것으로 추정된다. 또한, 이러한 된장중의 세균 생균수는 재래식 봄메주와

가을메주를 이용하여 제조한 Lee 등(3)의 재래식 된장들의 초기 세균수(호기성 세균: $6.5 \sim 7.9 \times 10^7$ /g, 혐기성 세균: 5.5×10^7 /g)와 숙성 60일 후의 세균수 $2.5 \sim 3.0 \times 10^8$ /g보다 매우 적은 결과로서 이는 사용한 메주가 재래식 메주로 제조 시 자연계의 많은 균들이 접종, 배양되어 혼재되어 있고 이들 된장들의 제조방법이 본 실험과 달랐기 때문인 것으로 추정된다. 그러나 Ahn과 Sung(14)의 재래식 고추장 중의 세균수보다는 많았다.

또한 발효 중 분리국균 된장 (I)과 (II)의 효모 생균수는 제조 직후 각각 4.8×10^3 CFU/g, 1.2×10^3 CFU/g이었고 발효 60일에 각각 1.0×10^3 CFU/g, 3.3×10^4 CFU/g을 보여 큰 변화가 없었고 이 결과는 시판국균 된장과 비슷한 경향이었으며 생균수도 차이가 없었지만 Lee 등(3)의 재래식 된장의 숙성 60일의 효모 생균수 $5 \sim 7 \times 10^7$ /g보다 낮은 생균수이었다. 한편 모든 된장에서 발효 전 기간에 걸쳐 표면에 곰팡이로 추정되는 푸른색과 검정색 콜로니들이 생육증가 없이 일정하게 관찰되었다(data not shown). Song 등(7)도 재래식 된장에서 *Mucor*속 균과 *Penicillium*속 균을 분리한 후 향기 생성여부를 조사하여 보고한바 있다.

효소활성의 변화

분리국균 된장과 시판국균 된장 (I)과 (II)의 발효 중 각종 효소활성의 변화를 조사한 결과 Table 2와 같이 3종류의 단백질 분해효소활성은 대체로 발효 30일까지 약 1.8~2.8 Unit/mL로 3~5배 이상 증가한 후 낮아지는 경향을 보여 Lee 등(3)의 재래식 된장의 숙성중의 단백질 분해효소활성의 변화와 유사한 경향을 보였지만 활성은 이들에 비하여

Table 1. Changes of viable cell count of bacteria and yeast in the doenjangs during fermentation (CFU/g)¹⁾

Types of doenjangs	Days	Bacteria				Yeasts			
		0	30	40	60	0	30	40	60
Isolated nuruk doenjang (I) ²⁾		1.8×10^4	1.1×10^6	3.1×10^5	3.7×10^5	4.8×10^3	1.0×10^3	4.0×10^4	1.0×10^3
Isolated nuruk doenjang (II)		1.1×10^4	3.0×10^5	4.5×10^5	3.4×10^5	1.2×10^3	5.1×10^3	4.0×10^4	3.3×10^4
Commercial nuruk doenjang (I) ³⁾		1.0×10^3	1.4×10^4	3.0×10^4	2.2×10^4	2.8×10^3	3.9×10^4	6.1×10^4	1.0×10^3
Commercial nuruk doenjang (II)		1.1×10^3	7.0×10^3	1.9×10^5	1.8×10^5	2.6×10^3	4.3×10^4	3.0×10^3	1.0×10^3

¹⁾Mean value of triplicate measurements.

²⁾Isolated nuruk doenjang (I) and (II) were made by mixture of protease and amylase-producing *Aspergillus oryzae* D-2 and antihyperlipidemia *Bacillus subtilis* LK-12 (1:1) and (1.5:1), respectively.

³⁾Commercial nuruk doenjang (I) and (II) were made by mixture of commercial *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* LK-12 (1:1) and (1.5:1), respectively.

Table 2. Change of proteases activities in the doenjangs during fermentation (Unit/mL)¹⁾

Type of doenjangs ²⁾	Days	0			30			40			60		
		Acid. p ³⁾	Neut. p	Alka. p	Acid. p	Neut. p	Alka. p	Acid. p	Neut. p	Alka. p	Acid. p	Neut. p	Alka. p
Isolated nuruk doenjang (I)		0.3	0.5	0.7	1.9	2.0	2.3	0.9	1.0	1.0	1.4	1.5	1.5
Isolated nuruk doenjang (II)		0.5	0.5	0.6	1.8	2.2	2.1	1.0	2.3	1.0	1.3	1.5	1.7
Commercial nuruk doenjang (I)		0.1	0.3	0.6	1.8	2.3	2.0	1.0	1.1	1.2	1.5	1.6	1.6
Commercial nuruk doenjang (II)		0.6	1.0	0.6	2.1	1.9	2.8	1.4	1.5	1.5	1.8	1.8	1.7

¹⁾Mean value of triplicate measurements.

²⁾All of doenjangs are the same as in Table 1.

³⁾Acid. p, Neut. p and Alka. p means acidic protease, neutral protease and alkali protease, respectively.

매우 미약하였다. 또한 α -amylase 활성은 발효기간이 길어짐에 따라 약간 낮아지는 경향이었고(Fig. 1), glucoamylase 활성은 매우 미약하였다(data not shown).

pH, 환원당 및 아미노태질소 함량의 변화

분리국균 된장과 시판국균 된장의 발효 중 pH는 큰 변화 없이 각각 pH 6.0~6.2와 pH 5.7~6.1을 보여(Table 3) Lee 등(3)의 봄메주 된장과 가을메주 된장의 6.43~7.13, 6.35~6.98보다 약간 낮았다. 또한 환원당 함량은 제조 직후 0.57~0.71%(분리국균 된장)와 0.48~0.79%(시판국균 된장)에서 발효 60일에 각각 0.77~0.81%와 0.82~0.91%로 약간 높아지는 경향이었지만 Lee 등(3)의 재래식 메주 된장보다는 매우 낮은 함량을 보였다.

한편 발효 중 아미노태질소 함량도 0.49~0.63 mg%(분리국균 된장)과 0.84~0.98 mg%(시판국균 된장)에서 발효 60일에 1.63~1.72 mg%(분리국균 된장)과 1.73~2.39 mg%(시판국균 된장)으로 약간 증가하는 경향을 보였다(Table 3).

생리기능성의 변화

혈전용해활성: 피브린 중합체인 혈전에 의하여 뇌 혈전증, 심부전증, 심장마비 등이 발병되며 근래 심혈관계 질환 중 가장 위험한 질병중의 하나로 대두되고 있다. 최근 대두 발효식품에서 혈전용해 물질인 plasminogen activator 등이 보고(2)된 바 있어 콩을 주원료로 제조한 분리국균 된장과 시판국균 된장의 발효 중 혈전용해활성의 변화를 조사하였다(Table 4). 제조 직후 분리국균 된장에서 모두 5 mm의 혈전용해 환을 보였으나 발효 30일에는 20 mm로 혈전용해 활성이 증가한 다음 다시 낮아지는 경향이였다. 이는 시판국균 된장과 유사한 결과이었으나 이미 알려진 청국장(2)의 혈전용해활성(2)보다 대체로 낮은 결과이었는 데 이는 발효균주(청국장 발효에는 *Bacillus natto*가 주로 관여하는 것으로 알려짐)와 제조방법 등의 차이에 의한 것으로 추정된다.

HMG-CoA reductase 저해활성: HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성 경로에서 제일 중요한 반응속도 제한 효소로서 이 효소의 저해제는 고지혈증을 예방(또는 치료)하는 대체의약 또는 기능성 식품 제조에 매우 중요한 소재 중 하나로 이용되고 있다(19).

분리국균 된장과 시판국균 된장의 발효 중 HMG-CoA reductase 저해활성을 조사한 결과 Table 4와 같이 분리국균 된장과 시판국균 된장 모두 4% 미만의 낮은 활성을 보였다. 본 실험의 분리국균 된장의 제조 시 사용한 균주가 HMG-CoA reductase 저해활성이 비교적 우수한 균주이었지만 이

Fig. 1. Changes of α -amylase activity of the isolated nuruk doenjang I (■) and II (▨) and commercial nuruk doenjang I (□) and II (□) during fermentation.

All of doenjangs are the same as in Table 1.

Table 3. Changes of pH, reducing sugar content and amino-nitrogen content in the doenjangs during fermentation

Type of doenjangs ¹⁾	Days	pH				Reducing sugar content (%)				Amino-nitrogen content (mg%)			
		0	30	40	60	0	30	40	60	0	30	40	60
Isolated nuruk doenjang (I)		6.0 ²⁾	6.1	6.2	6.1	0.71	0.82	0.68	0.81	0.49	1.18	1.62	1.72
Isolated nuruk doenjang (II)		6.0	6.1	6.2	6.2	0.57	0.83	0.67	0.77	0.63	1.20	1.49	1.63
Commercial nuruk doenjang (I)		5.7	5.9	5.8	5.8	0.79	0.95	0.75	0.91	0.98	1.83	2.28	2.39
Commercial nuruk doenjang (II)		5.8	6.1	6.1	6.0	0.48	0.61	0.71	0.82	0.84	1.44	1.76	1.73

¹⁾All of doenjangs are the same as in Table 1.

²⁾Mean value of triplicate measurements.

Table 4. Changes of physiological functionalities in the doenjangs during fermentation

Types of doenjangs ¹⁾	Days	Fibrinolytic activity (clear zone=cm)				HMG-CoA reductase inhibitory activity (%)				ACE inhibitory activity (%)				Electron-donating ability (%)			
		0	30	40	60	0	30	40	60	0	30	40	60	0	30	40	60
Isolated nuruk doenjang (I)		0.5 ²⁾	2.0	1.0	-	0.5	2.6	3.5	4.3	87.2	85.6	82.2	85.1	17	23	18	17
Isolated nuruk doenjang (II)		0.5	2.0	1.0	1.0	0.5	3.6	2.1	0.5	85.6	83.4	82.9	84.0	19	19	23	22
Commercial nuruk doenjang (I)		1.0	3.0	1.5	1.5	0.5	1.6	1.7	0.5	88.0	87.3	81.2	79.7	7.0	12	12	22
Commercial nuruk doenjang (II)		0.5	1.0	1.0	-	0.5	1.9	2.2	0.5	85.7	85.1	76.6	69.1	20	24	21	26

¹⁾All of doenjangs are the same as in Table 1.

²⁾Mean value of triplicate measurements.

와 같이 이들의 활성이 낮은 것은 삶은 콩에 시험균주를 접종하여 2일 배양후의 HMG-CoA reductase 저해활성이 73.6%이었으나, 담금 후 숙성 직전의 활성이 거의 0%를 보였던 점(13)으로 보아 아마 건조시키는 과정에서 일부 생성된 저해물질이 파괴되어 된장에 적게 함유되어 있기 때문인 것으로 추정된다.

엔지오텐신 전환효소(ACE) 저해활성: ACE는 체내혈압 조절계에서 엔지오텐신 (I)을 (II)로 전환시키는 것을 촉매하는 효소로 근래에 ACE 저해제를 이용한 고혈압 예방용 건강식품이나 한방 의약품 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(21,22). 발효기간에 따른 분리국균 된장과 시판국균 된장의 ACE 저해활성의 변화를 조사한 결과 먼저 분리국균 된장 (I), (II) 모두 제조 직후 각각 87.2%와 85.6%이었던 ACE 저해활성이 발효 2개월에 모두 84.0~85.1%로 감소하였다(Table 4). 또한 시판국균 된장의 경우는 85.7~88.0%에서 발효기간에 따라 심하게 감소하여 발효 2개월에 61.9~79.7%로 제조 직후보다 약 15%정도 활성이 낮아졌다. 이와 같이 숙성기간이 길어짐에 따라 ACE 저해활성이 낮아지는 것은 일반적으로 많은 ACE 저해물질들이 펩타이드 또는 단백질 가수분해물로 알려져 있고(21,22) 발효 2개월 된장에서도 protease활성이 높았던 점 등을 감안하여 볼 때 메주에 함유되어 있던 단백질(펩타이드) 분해효소에 의해 된장 중의 ACE저해 펩타이드들이 발효 중에 다시 분해되었기 때문인 것으로 생각된다. 이와 같은 발효기간에 따른 ACE 저해활성의 저하를 막을 수 있는 생물 공학적 방법으로 숙성에 관여하는 미생물을 ACE저해제 생산균주로 대치하거나 맛과 향을 고려하여 ACE 저해활성이 우수하다고 알려진 곡류 등(22)을 발효 중에 첨가하는 방법 등을 생각해 볼 수 있으며 이들에 관한 추가연구가 필요한 것으로 생각한다. 비록 발효 중에 ACE 저해활성이 낮아지고 시판 항고혈압성 제제인 captopryl의 활성(IC₅₀: 17.9 μM)보다 매우 낮은 활성이었지만(22), 본 실험의 분리국균 된장과 시판국균 된장 모두 저자 등이 보고한 3개월 발효된 약용된장된장의 ACE 저해활성(48.0~65.0%)(1)보다 약 20%~36% 높은 ACE 저해활성을 갖고 있으므로 고혈압 예방을 위한 건강기능성 식품으로의 산업적 가치가 매우 우수한 것으로 생각한다.

전자공여능: 항산화활성을 나타내는 전자공여능은 노화억제에 관련된 중요한 생리기능성 중의 하나이다(20). 된장의 발효 중 전자공여능의 변화를 조사한 결과 Table 4와 같이 제조 직후 17~19%(분리국균 된장)와 7.0~20.0%(시판국균 된장)의 전자공여능이 발효 60일에 분리국균 된장 (I)에서는 변화가 없었고 분리국균 된장 (II)와 시판국균 된장에서 22% 이상으로 상승하였으나 기 보고된 약용된장의 95%(1)와 양성 대조물질로 사용되고 있는 L-ascorbic acid 0.1%용액의 항산화활성인 97.4%(23)보다 훨씬 낮은 활성이었다.

기호도: 20대에서 60대까지의 여성 각 10명씩을 선발하여 60일 발효시킨 4종류의 된장에 대한 간이 관능검사를 실시

한 결과 분리국균 된장 (I)은 이취미가 있고 짠 냄새가 강하였고 시판국균 된장 (I)과 (II)에서는 역시 이취미와 짠맛이 강하고 풋 콩냄새와 곰팡이 냄새가 강하였다. 그러나 분리국균 된장 (II) 즉, *Aspergillus oryzae* D-2와 *Bacillus subtilis* LK-12를 1.5:1로 혼합하여 제조한 된장이 된장 고유의 맛과 냄새가 강하고 전체적인 기호도가 제일 우수하였다. 따라서 현재 기호도와 항고혈압활성 등이 우수한 분리국균 된장 (II)의 산업화를 위한 시제품 제조와 특성연구가 진행되고 있다.

요 약

새로운 고부가가치의 생리기능성 된장을 개발하기 위하여 단백질 분해효소와 전분 분해효소 생성능이 우수한 *Aspergillus oryzae* D-2와 콜레스테롤 합성 억제활성이 우수한 *Bacillus subtilis* LK-12를 이용하여 2종류의 분리국균 된장 (I), (II)를 제조한 후 시판 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis* LK-12를 이용하여 제조한 시판국균 된장과의 발효 중의 품질과 생리기능성의 변화를 조사하여 비교하였다. α-Amylase 활성은 발효기간이 길어짐에 따라 약간 낮아졌고 단백질 분해효소활성은 발효 30일까지 1.8~2.8 Unit/mL로 증가하였으나 대체로 낮은 활성이었다. 발효 60일 후의 분리국균 된장 (I)과 (II)의 아미노태질소 함량과 환원당 함량은 각각 1.63~1.72 mg%와 0.77~0.81%이었고 시판국균 된장 (I)과 (II)는 각각 1.73~2.39 mg%와 0.82~0.91%를 보였다. 항고혈압성 엔지오텐신 전환효소 저해활성은 제조 직후 85.6~87.2%(분리국균 된장)와 85.7%~88.0%(시판국균 된장)에서 발효 60일 후 각각 84.0~85.1%와 69.1~79.7%로 감소하는 경향이 있었지만 매우 우수하였다. 그러나 4종류의 된장 모두 혈전용해활성과 HMG-CoA reductase 저해활성은 모두 미약하였으며 항산화 활성은 17~26% 미만을 보였다. 간이 관능검사에서도 *Aspergillus oryzae* D-2와 *Bacillus subtilis* LK-12의 배양물을 1.5:1로 혼합하여 제조한 분리국균 된장 (II)가 된장 고유의 맛과 냄새가 강하고 기호도가 제일 높았다. 따라서 항고혈압성 활성과 기호도가 우수한 분리국균 된장 (II)의 산업화를 위한 추가의 연구가 진행되고 있다.

감사의 글

본 연구는 2005년 충남농업테크노파크 연구비 지원에 의해 시행된 결과로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lee DH, Kim JH, Yoon BH, Lee GS, Choi SY, Lee JS. 2003. Changes of physiological functionalities during the fermenta-

- tation of medicinal herbs doenjang. *Korean J Food Preser* 10: 213-218.
2. Kim YT. 1995. Characteristics of fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. isolated from chungkookjang. *PhD Dissertation*. Sejong University, Seoul.
 3. Lee JS, Kwon SJ, Chung SW, Choi YJ, Yoo JY, Chung DH. 1996. Changes of microorganisms, enzyme activities and major components during the fermentation of Korean traditional doenjang and kochujang. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 24: 247-253.
 4. Lee WJ, Cho DH. 1970. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation—A study on the microflora changes during Korean native soy-sauce fermentation. *J Korean Agric Chem Soc* 13: 35-42.
 5. Yoon IS, Kim HO, Yoon SE, Lee KS. 1997. Studies on the changes of N-compounds during the fermentation process of the Korean daenjang. *Korean J Food Sci Technol* 9: 131-137.
 6. Shin SY, Kim YB, Yu TJ. 1985. Flavour improvement of soybean pastes by the addition of *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces rouxii*. *Korean J Food Sci Technol* 17: 14-18.
 7. Song JY, Ahn CW, Kim JK. 1984. Flavor components produced by microorganism during fermentation of Korean ordinary soybean paste. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* 12: 147-152.
 8. Kwon OJ, Kim JK, Chung YG. 1986. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *J Korean Agric Chem Soc* 29: 422-428.
 9. Chang JK, Kim JK. 1984. Statistical analysis for the relationship between gas chromatographic profiles of Korean ordinary soybean paste flavor and sensory evaluation. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* 12: 153-163.
 10. Ki WK, Kim JK, Kang DH, Cho YU. 1987. Development of excellent mutants for manufacture of ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* 15: 21-28.
 11. Park JS, Lee MY, Kim KS, Lee TS. 1994. Volatile flavor components of soybean paste (doenjang) prepared from different types of strains. *Korean J Food Sci Technol* 26: 255-260.
 12. Lee JS, Choi YJ, Kwon SJ, Yoo JY, Chung DH. 1996. Screening and characterization of osmotolerant and gas-producing yeasts from traditional doenjang and kochujang. *Food and Biotechnol* 5: 54-58.
 13. Yoon BH, Lee JS. 2006. Research report on development of new functional soybean paste. Agroventure Business Support Project of Chungnam Agrotechno Park.
 14. Ahn CW, Sung NK. 1987. Change of main components and microbes during Korean traditional kochujang. *J Korean Soc Food Nutr* 16: 35-39.
 15. 井口信義. 1988. KS H2120 (kochujang).
 16. AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
 17. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
 18. Haverkate F, Traas DW. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb Haemost* 59: 155-157.
 19. Kim HJ, Lee DH, Hwang YY, Lee KS, Lee JS. 2005. Characterization of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor from *Pueraria thungbergiana*. *J Agric Food Chem* 53: 5882-5888.
 20. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 21. Lee DH, Kim JH, Park JS, Choi YJ, Lee JS. 2004. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 25: 621-627.
 22. Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Chung KS, Lee JS. 2004. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *S. cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 14: 1318-1323.
 23. Kim HK, Han HS, Lee GD, Kim KH. 2005. Physiological activities of fresh *Pleurotus eryngii* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 439-445.

(2006년 7월 4일 접수; 2006년 8월 29일 채택)