

재래식 된장의 발효과정 중 이화학적 특성과 Angiotensin 전환효소 저해능 및 항돌연변이원성의 변화

이창호¹ · 김원찬² · 이인구² · 이오석 · 박희동[†]

경북대학교 식품공학과, ¹경북바이오산업연구원, ²경북대학교 농화학과

Changes in the Physicochemical Property, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Effect and Antimutagenicity During the Fermentation of Korean Traditional Soy Paste (*Doenjang*)

Chang-Ho Rhee¹, Won-Chan Kim², In-Koo Rhee²,

Oh-Seuk Lee and Heui-Dong Park[†]

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹Gyeongbuk Institute for Bio Industry, Andong 760-380, Korea

²Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Korean traditional soy paste (*Doenjang*) was fermented using *Meju* prepared by the culture of wild microorganisms in steamed soy beans. During the fermentation, changes in the physicochemical and several functional properties were monitored. Total acidity and amino acidity increased from 0.09 to 0.96, and 2.24% to 3.28%, respectively. Amylase and protease activities increased and showed the maximal level after 60 days of fermentation, which were 4.03 and 7.29 units/ml, respectively. However, both enzyme activities decreased after then. The inhibitory activities against tyrosinase and angiotensin converting enzyme increased and reached 20.57 and 38.18%, respectively. Antimutagenic activities against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and 4-nitro-O-phenylenediamine (NPD) increased for 90 days and reached 70.21 and 60.01% in *S. enterica serovar* Typhimurium TA100, respectively. Against NPD and 4-nitroquinoline-1-oxide, the antimutagenic activities also increased and reached 50.91 and 46.35% in the strain TA98, respectively.

Key words : *Doenjang*, enzyme activity, physiological functionality, soy paste

서 론

간장, 된장, 청국장 등과 같은 우리나라 전통 대두 발효식품은 오랜 역사를 지닌 식품으로서 식문화적 관점뿐만 아니라 우리 식생활의 필수 아미노산과 같은 단백질 공급원으로도 매우 중요한 역할을 담당하는 전통적 부식이다(1). 대두를 원료로 사용하는 우리나라 장류에 대한 기원은 삼국시대 이전으로 추정될 만큼 오랜 역사를 가지고 있으며 1970년대까지만 해도 대부분의 장류는 각 가정에서 나름대로 독특

한 제조비법에 따라 제조되었다. 그러나 산업화, 도시화, 핵가족화가 진행되면서 현재 우리나라 장류 총수요량의 50% 이상이 공장에서 제조한 장류로 공급되고 있으며, 향후 몇 년 안에 대부분의 장류가 산업화된 대량 생산체제로 전환될 것으로 전망된다(2).

전통적인 맛과 향을 지닌 된장은 탄수화물 원료에 *Aspergillus* sp.를 이용하여 제조한 코지와 대두를 함께 혼합하여 제조하는 것으로(3) 여러 가지 건강 기능성 성분인 isoflavone, trypsin inhibitor, phenolics, maillard 반응산물, globulin, peptide 등이 함유되어 있어 암, 혈관계질환, 골다공증, 신장질환 등의 각종 성인병을 예방하거나 치료하는

[†]Corresponding author. E-mail : hpark@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-5774, Fax : 82-53-950-6772

효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(4-6). 또한, 일본 된장(miso) 및 일본 간장(shoyu)에서 항암, 항돌연변이 및 항산화 물질이 발견된다는 보고가 일본에서 이뤄진 바 있으며(7-11), 국내에서도 전통 된장에서 분리한 항돌연변이 및 항암물질이 존재한다는 사실이 여러 연구자들에 의해 밝혀지고 있다(12-16). 최근에는 된장의 발효 숙성과정 중에 고혈압을 예방하는 생리활성 물질이 생성되는 것으로도 보고된 바 있다(12,13).

장류의 기능성은 아직 자세한 생성기작과 생리적 효과가 규명되지 않았지만 주로 된장 발효에 관여하는 미생물과 원료인 대두의 성분 및 발효에 관여하는 미생물이 생산하는 2차 대사산물에 의한 것으로 알려지고 있다(17). 지금까지의 된장에 관한 연구로는 각 균주를 이용한 단백질 분해력, 당화력, 향기의 생성능력 그리고 일반적인 화학성분의 변화에 관한 연구(3,14,15)와 제조방법을 다르게 하여 된장을 제조한 후, 일정기간 숙성시키면서 각각의 품질 변화를 측정하는 연구결과가 있다(7-11). 또한 최근에는 된장의 분말화, 저염 장류의 제조와 안정성, 영양가와 기능성의 강화 등으로 활발히 진행되고 있다(18,19).

따라서 본 연구에서는 새로운 기능성을 가지는 전통 발효된장의 산업적 생산에 응용하고자 메주를 사용하여 된장을 발효하면서 숙성 중의 이화학적 특성, amylase, protease 등의 효소활성과 tyrosinase 저해활성, ACE 저해활성, 항돌연변이원성 및 isoflavone의 함량변화를 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에서 원료로 사용한 대두는 2002년도 경북 군위에서 생산된 태광 콩을 구입하여 사용하였으며, 염도를 조절하기 위해 순도 97% 이상인 정제염을 사용하였다.

메주 및 된장의 제조

메주는 대두를 물에 8시간 침지하여 2시간동안 가압 증자하여 냉각시킨 후, 분쇄기로 일정한 크기의 입자로 분쇄하여 메주의 무게가 1~1.2 kg이 되도록 균일한 크기(260×60×50 mm)로 성형하여 20℃ 온도로 조절된 항온실에서 1개월간 발효시켜 사용하였다. 된장은 메주를 세척한 후, 전통발효 된장독에 메주 50 kg에 소금 23 kg을 물 78 kg에 완전히 용해하여 최종 염 농도가 15±1%로 되도록 조절하였으며, 수분 함량은 50±1% 되도록 조절하여 실온에서 90일간 숙성시켰다.

이화학적 성분의 분석

된장 발효 과정중의 이화학적 성분의 분석으로 pH는 pH

meter(Mettler Toledo Co., Model 340, Switzerland) 측정하였으며 산도와 아미노산도는 중화 적정법에 준하여 측정하였다. NaCl 농도는 Mohr법(20), 환원당 측정은 DNS (dinitrosalicylic acid)법(21)으로 측정하였으며, 총당은 Phenol-H₂SO₄법(22)으로 측정하였다.

조효소액의 조제

된장 시료 10 g에 증류수를 첨가하여 200 mL로 정용한 후, 30℃의 진탕항온수조에서 4 시간 동안 추출하여 4℃에서 2 시간 방치한 다음 12,000 × g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성의 측정

Amylase활성은 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 용해한 soluble starch 0.5 mL에 0.4 mL의 sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)을 첨가하여 30℃에서 5분간 방치한 다음, 여기에 조효소액 0.1 mL을 첨가하여 30℃에서 30분간 반응시켰다. 이 때 생성된 환원당의 함량은 DNS법(21)으로 측정하였으며, 활성의 단위는 상기의 반응조건에서 1분당 생성하는 1 μmol의 환원당을 1 unit로 하였으며, 생성된 환원당의 양을 glucose의 양(g)으로 환산하여 표시하였다.

Protease활성은 조효소액 1.0 mL에 50 mM NaOH-borate 완충용액(pH 10.0)에 용해한 0.6% casein 5 mL을 첨가하여 40℃에서 10분간 반응시킨 후, 0.4M TCA (trichloroacetic acid) 용액을 5 mL 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 37℃에서 20분간 방치시킨 후 여과하여 사용하였다. 반응산물의 양은 Hull의 방법(23)을 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 활성의 단위는 상기의 반응조건에서 1분당 생성하는 1 μg의 tyrosine을 1 unit로 하였으며, 생성된 반응산물의 양을 tyrosine의 양(μg/mL)으로 환산하여 나타내었다.

Tyrosinase 활성 저해능 측정

Tyrosinase 활성 저해능 측정(24)은 475 nm에서 단위 시간당 변화된 초기 흡광도의 변화값(S_{Abs})과 효소액 대신에 증류수를 0.1 mL를 첨가하여 흡광도를 측정한 값(B_{Abs}), 시료 용액 대신에 증류수를 0.5 mL 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 값(C_{Abs})을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibitory effect(\%)} = 1 - [S_{Abs} - B_{Abs} / C_{Abs}] \times 100$$

ACE (Angiotensin converting enzyme) 저해 활성 측정

시료의 조제는 된장 시료 20 g에 증류수를 20 mL를 첨가하여 95℃ 항온수조에서 20분간 방치한 후, 증류수를 20 mL를 첨가하여 10,000 × g에서 20 분간 원심 분리하여

연은 상징액을 시료로 사용하였다. ACE 저해 활성의 측정 은 Cushman과 Cheung의 방법(25)에 준하여 실시하였다. 시료 50 µg에 기질 50 µL를 첨가한 후, 37°C에서 5 분간 방치하였다. 여기에 ACE 용액을 50 µL를 첨가하고 다시 37°C에서 1 시간 반응시킨 후, 1 N HCl 용액 250 µL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 다시 여기에 ethyl acetate 1.5 µL를 가하여 15 초간 균질화한 후, 5,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상징액을 1 µL를 취하였다. 이 상징액을 80°C에서 1시간 가열하여 완전히 건조시킨 후, 1 M NaCl 용액을 3 mL를 첨가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{ACE inhibitory effect(\%)} = [(B-A)/(B-C)] \times 100$$

A : 시료 첨가 시 흡광도

B : 시료 대신 증류수 첨가 시 흡광도

C : 반응 정지 후 시료 첨가 시 흡광도

항돌연변이 활성 측정

된장 시료 20 g에 증류수 100 mL를 첨가하여 균질화한 후, 80°C 항온수조에서 3 시간 열수 추출한 다음 원심분리하여 상징액을 건조시킨 후, 증류수를 첨가하여 시료로 사용하였다. 시료의 돌연변이 및 항돌연변이 활성 측정은 Ames test를 개량한 preincubation method(26-28)에 따라 히스티딘 영양 요구주로서 point mutant인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA100(hisG46, rfa, ΔuvrB)과 frame shift mutant인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 (hisD3052, rfa, ΔuvrB)을 사용하여 시료에 의한 His⁺복귀 돌연변이 정도를 조사하였다. 변이원으로는 *S. enterica* serovar Typhimurium TA100인 경우에는 MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)와 NPD(4-nitro-O-phenylenediamine)를 plate당 각각 5 µg, 15 µg되게 사용하였으며, *S. enterica* serovar Typhimurium TA98인 경우에는 NPD와 NQO (4-nitroquinoline-1-oxide)를 각각 2.5 µg, 0.25 µg되게 사용하였다. 항돌연변이 활성은 minimal glucose agar상에서 생육하는 His⁺복귀 돌연변이 콜로니를 계수하고 다음 식으로 환산하여 His⁺복귀 돌연변이 저해율(inhibition ratio)로서 나타내었다.

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = 100 \times [(a-b) / (a-c)]$$

a : 변이원에 의해 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수

b : 변이원과 시료를 처리할 때 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수

c : 변이원과 시료를 처리하지 않았을 때 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수

시료의 돌연변이원성 조사를 위하여 변이원을 첨가하지 않고 시료만을 첨가하여 상기의 항돌연변이 활성 실험과

동일한 방법으로 행하였다. 돌연변이 활성은 시료에 의한 His⁺복귀 돌연변이율로서 무처리 시 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수에 대한 시료 처리 시 유도된 His⁺복귀 돌연변이 콜로니 수의 %로 나타내었다. 돌연변이 및 항돌연변이 활성 조사는 3구 3회 반복으로 실험하여 평균값으로 나타내었다.

Isoflavone 함량 분석

된장 시료를 80°C에서 2일간 건조하여 분쇄기로 분쇄한 후, 분쇄한 된장 시료 10 g에 100% 메탄올 50 mL를 첨가하여 80°C에서 3 시간 동안 환류추출한 다음 추출액을 0.45 µm filter로 여과하여 HPLC로 genistin, daidzin, genistein 및 daidzein을 정량하였다(29). HPLC 분석을 위한 column은 Nova-Pak(Waters Co., USA)을 사용하였으며, 이동상은 1% acetic acid를 함유한 H₂O와 1% acetic acid를 함유한 MeOH (이때 methanol은 40 분 동안 10%에서 60%까지 증가하도록 농도구배를 줌)이다. Flow rate는 0.8 mL/min로 조절하였으며 UV detector를 사용하여 254 nm에서 검출하였다.

결과 및 고찰

이화학적 성분의 분석

재래식 된장을 담금한 후 숙성시키면서 일정 기간 간격으로 시료를 채취하여 일반성분 변화를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 된장의 pH와 총산은 숙성과정에 관여하는 미생물의 발효대사와 밀접한 관련이 있어 발효의 한 지표로 사용된다. 메주의 제조방법에 관계없이 된장의 pH는 숙성 기간이 길어질수록 감소하는 경향을 나타내었으며, 감소하는 비율은 거의 유사한 수준이었다. 총산은 제조방법의 차이에 관계없이 숙성기간에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. NaCl의 함량 변화는 된장 숙성 45일까지는 증가하는 경향을 나타내었으며 그 이후의 기간에는 거의 일정한 농도를 유지하였다. 된장 숙성 초기에 NaCl의 농도가 낮게 나타난 이유는 메주 내부로 NaCl의 확산이 불완전하여 평형화가 이루어지지 않았기 때문으로 사료된다. 아미노산도의 변화는 된장 숙성기간이 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 환원당 함량은 숙성 60일까지는 6.36%로 증가하는 경향을 나타내었으나, 그 이후에는 감소하였다. 이러한 결과는 숙성이 진행됨에 따라 amylase의 활성이 비교적 높게 나타나 환원당 함량이 최대를 나타내었고, 그 후 된장 숙성에 관여하는 미생물의 영양원, 알콜발효, 유기산 발효의 기질로 당이 이용되었기 때문에 환원당 함량이 감소된 것으로 생각된다. 이는 된장 숙성 중반기에 환원당 함량이 증가하였다가 숙성이 진행됨에 따라 감소하였다는 Lee 등(30)의 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 총당의 함량도 환원당 함량과 마찬가지로 숙성이 진행됨에 따라 증가하여 숙성 60일일 때 최대치를 나타내었다.

Table 1. Changes in the physicochemical properties during the fermentation of soy paste

Fermentation time (days)	pH	Acidity (%)	NaCl (%)	Amino acidity	Reducing sugar (%)	Total sugar (%)
0	6.52 ¹⁾	0.09	0.00	2.24	2.79	9.88
15	6.24	0.38	12.41	2.38	3.05	12.48
30	6.20	0.49	14.50	2.54	5.71	14.71
45	6.13	0.60	15.38	2.89	6.18	15.48
60	6.02	0.72	15.39	3.05	6.36	15.99
75	5.91	0.80	15.37	3.11	6.25	14.81
90	5.87	0.96	15.33	3.28	6.07	13.56

¹⁾ values are mean of triplicated determination.

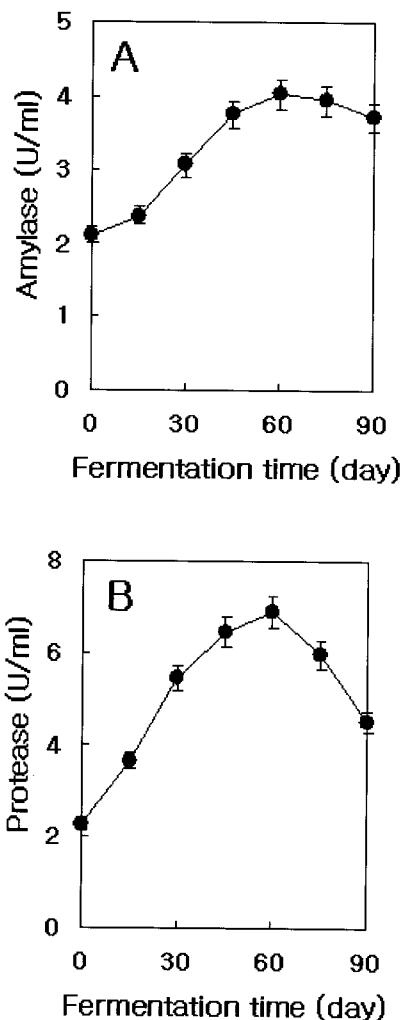


Fig. 1. Changes in the amylase (A) and protease activities (B) during the fermentation of soy paste.

The *Meju* was prepared by the culture of wild microorganisms in steamed soybean curds (each 1.0-1.2 kg) at 20 °C for 1 month. After the culture, the mixture of 50 kg of *Meju*, NaCl and water, which contained 15% NaCl and 50% water at final concentrations, respectively, was fermented at room temperature for 90 days to prepare the soy paste.

효소 활성의 변화

메주 제조방법에 따른 된장 숙성 중의 효소 활성의 변화는 Fig. 1과 같다. 된장의 맛 성분에 관여하는 유리당은 된장 발효에 관여하는 미생물이 분비하는 amylase의 활성도에 영향을 받으며, 이는 미생물의 변화와 총당, 환원당의 변화에 영향을 미친다. 된장 숙성중의 amylase의 경시적 변화는 숙성이 진행됨에 증가하였으며, 숙성 60일일 때 amylase의 활성이 4.03 unit/mL로 가장 높게 나타났으며 숙성이 더욱 진행됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 된장의 protease의 활성은 단백질을 분해하여 특유의 구수한 맛 성분을 생산하고 이들의 숙성 정도를 나타내는 유리 아미노산 함량에 많은 영향을 준다. 숙성 중 protease의 활성 변화는 숙성이 진행됨에 따라 증가하여 숙성 60일일 때 protease의 활성이 7.29 unit/mL로 가장 높게 나타났으며 숙성이 더욱 진행됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었다.

Tyrosinase 저해 활성의 변화

된장의 발효기간 중 tyrosinase의 저해 활성의 변화를 조사한 결과(Fig. 2), 숙성기간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. Tyrosinase는 tyrosine으로부터 quinone이 생성된 후에 아미노산 또는 단백질과 중합반응에 의해 melanin이 합성된다(31,32). 이때 생성된 melanin은 사람의 얼굴이나 팔, 다리 등의 피부에 색소가 비정상적으로 생성되어 나타나는 원인 물질로서 화학적 물리적으로 매우 안정하여 일단 생성된 색소를 파괴 분해하여 제거하기 매우 어렵다고 알려져 있다. 현재 tyrosinase 저해제로 여러 가지가 사용되고 있으나(33-36), 안전성과 경제성 등 여러 문제점이 발생할 여지가 많다. 그러나 된장이 숙성되는 과정에

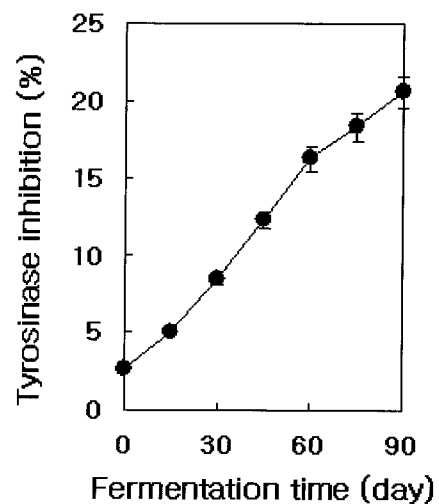


Fig. 2. Changes in the inhibitory effects against tyrosinase during the fermentation of soy paste.

생성되는 tyrosinase의 저해물질은 식품을 통하여 자연스럽게 섭취되기 때문에 안전성 등 문제점이 발생할 여지가 거의 없는 장점이 있다.

ACE 저해 활성의 변화

된장을 숙성시키면서 ACE 활성 저해효과를 측정한 결과는 Fig. 3과 같이 숙성이 진행됨에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 메주 제조과정에 관여하는 미생물이 메주 발효와 된장 발효 중에 대두 단백질을 가수분해하여 ACE 저해 활성을 나타내는 peptide 생성에 직접 또는 간접적으로 관여하였을 것으로 추정할 수 있었다. ACE는 혈압을 상승시킴과 동시에 생체 내에서 혈압을 저하시키는 bradykinin을 분해하는 작용을 한다. 또한 지방산의 산화를 촉진하여 과산화물을 증가시킴으로서 동맥경화의 위험도 높이는 것으로 알려져 있다(37,38). 최근 우리나라에서도 식품으로부터 영양소 또는 비영양소 성분의 항암, 항노화, 항고혈압 등 다양한 생리활성을 나타내는 기능성 성분들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이들의 활성 저해효과는 혈압 강하제와 비교할 때 활성이 낮지만 일상 식생활에서 늘 섭취하는 식품 중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대된다(39-41).

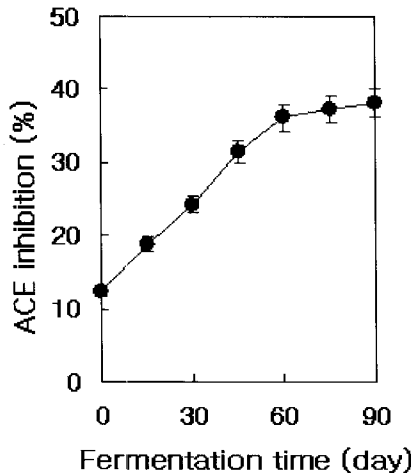


Fig. 3. Changes in the inhibitory effects against angiotensin converting enzyme during the fermentation of soy paste.

항돌연변이 활성의 변화

발효식품인 된장의 항돌연변이 활성을 측정하기 위하여 숙성기간별로 물로 추출하여 *S. enterica* serovar Typhimurium TA100과 TA98을 사용하여 직접변이원인 MNNG, NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성을 조사한 결과(Fig. 4), *S. enterica* serovar Typhimurium TA100에 대하여 변이원 MNNG와 NPD에 대한 물 추출물의 항돌연변이 활성은 숙성기간이 경과함에 따라 증가하여 90일 숙성시 각각 70.21%와 60.01%를 나타내었으며, *S. enterica* serovar

Typhimurium TA98에 대하여 변이원 NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성은 *S. enterica* serovar Typhimurium TA100과 마찬가지로 숙성기간이 경과함에 따라 증가하여 90일 숙성시 각각 50.91%와 46.35%를 나타내었다. 된장의 물 추출물은 돌연변이원의 종류와 사용균주에 따라 다른 항돌연변이 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 돌연변이원의 종류에 따라 작용기작이 다르므로 항돌연변이 활성도 변이원에 따라 서로 다른 경향을 보이는 것으로 추정되며 사용한 균주의 유전자형 또한 항돌연변이 활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

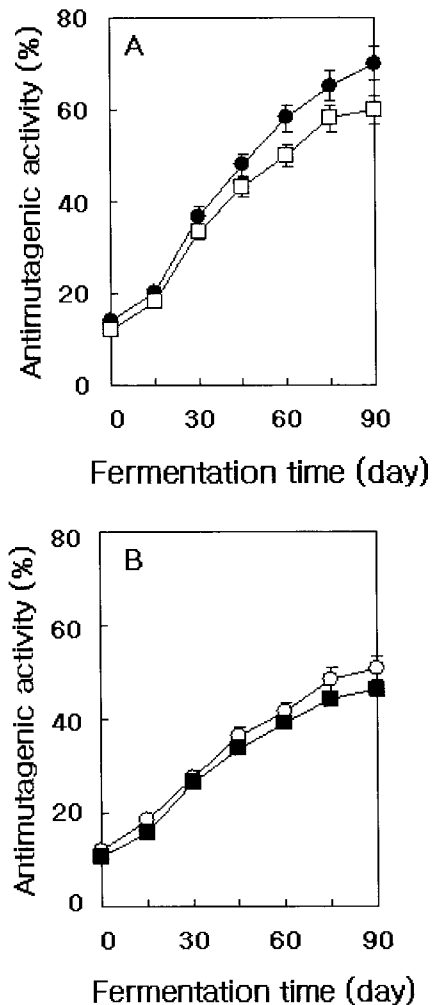


Fig. 4. Changes in the antimutagenic activities during the fermentation of soy paste.

The antimutagenic activities of the soy paste were assayed against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and 4-nitro-O-phenylenediamine (NPD) in *S. enterica* serovar Typhimurium TA100 (A) and NPD and 4-nitroquinoline-1-oxide (NQO) in *S. enterica* serovar Typhimurium TA98 (B).

Isoflavone 함량

전통 발효 식품인 된장 또한 대두를 이용하여 생산하는 제품이기 때문에 90일간 발효 숙성시킨 된장의 isoflavone의

함량을 측정된 결과(Table 2), glucoside의 일종인 daizin은 검출되지 않았으며, genistin의 함량은 31.30 µg/g으로 나타났다. Aglycone의 일종인 daidzein과 genistein의 함량은 각각 574.88 µg/g과 532.92 µg/g으로 나타났다. 대두의 여러 가지 생리활성물질 중 isoflavone류는 lignin류와 함께 식물에서 발견되는 phytoestrogen으로 본래 estrogen과 유사한 생리활성을 갖거나 장내 균총에 의해 활성화되는 phytochemical이다. 이러한 isoflavone류는 콩의 배축이나 배엽에 비교적 많이 존재하고 있으며 이들 중 생리활성의 기초를 이루는 화합물은 주로 genistein, daidzein과 같은 isoflavones aglycone류로 알려져 있다(42,43). 대두에는 isoflavone류가 건조중량 당 약 1.5~2.5% 정도 함유되어 있으며 이들 중 isoflavone glycoside의 일종인 daidzin, genistin이 전체 isoflavonoid의 60~70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있는 것으로 알려져 있다(44). 이에 비하여 glycoside보다 생리활성이 다양하고 높은 기능성을 갖는 aglycone 형태의 화합물, 즉 daidzein, genistein 함량은 각각의 배당체의 약 10~30분의 1에 불과한 것으로 알려져 있다(44). 생체 이용률에 있어서는 aglycone인 genistein을 섭취한 경우와 배당체인 genistin을 섭취한 경우에 이들의 체내 대사는 약간 차이가 있는데, 실험동물과 인체실험에서 공히 genistein이 더 빨리 흡수되는 현상을 보여 aglycone이 생체 이용률이 우수함이 알려져 있다(45,46).

Table 2. Contents of isoflavones in the soy paste after fermentation

Glucoside (µg/g)		Aglycone (µg/g)	
Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
ND	31.30	574.88	532.92

¹⁾Values are mean of triplicated determination.

요 약

전통 된장의 발효 중 이화학적 성질 및 기능적 특성의 변화를 조사하기 위하여 전통 메주를 제조한 후 된장을 발효하면서 일정 간격으로 된장 숙성중의 이화학적 성질 및 amylase와 protease 활성, ACE 저해활성, 항돌연변이원성 등의 변화를 측정하였다. pH는 된장 숙성기간 내내 감소하였으며, 총산은 숙성기간에 길어짐에 따라 증가하였다. NaCl의 함량은 숙성 45일까지 15.4%로 증가하는 경향을 나타내었으며, 아미노산도의 변화는 된장 숙성기간이 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 환원당 함량은 숙성 60일까지는 6.4%로 증가하였으나, 그 이후에는 감소하였다. 총당은 숙성 60일일 때 16.0%로 가장 높게 나타났다. Amylase와 protease의 활성은 숙성 60일일 때 4.03 unit/mL

와 7.29 unit/mL로 가장 높게 나타났으며 숙성이 더욱 진행됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. Tyrosinase의 저해활성과 ACE 저해 활성은 숙성 기간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 항돌연변이 활성은 숙성기간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었으며, *S. enterica* serovar Typhimurium TA100을 사용한 경우 변이원 MNNG와 NPD에 대한 항돌연변이 활성은 90일 숙성시 각각 70.21%와 60.01%를 나타내었다. 또한, *S. enterica* serovar Typhimurium TA98을 사용한 경우 변이원 NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성은 90일 숙성시 각각 50.91%와 46.35%를 나타내었다. 된장의 isoflavon 중 genistin, daidzein 및 genistein은 각각 31.30 µg/g, 574.88 µg/g 및 532.92 µg/g으로 나타났다.

참고 문헌

- 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
- Kim, D.H., Lim, D.W, Bai, S. and Chun, S.B. (1997) Fermentation characteristics of whole soybean *Meju* model system inoculated with 4 *Bacillus* strains. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 29, 1006-1015
- Joo, H.K., Oh, K.T. and Kim, D.H. (1992) Effects of mixture of improved *Meju*, Korean traditional *Meju* and *Natto* on soybean paste fermentation. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, 35, 286-293
- Messina, M. (1995) Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J. Nutr.*, 125, 567-571
- Persky, V. van Horn, L. (1995) Epidemiology of soy and cancer: perspective and directions. *J. Nutr.*, 125, 709-712
- Potter, S.M. (1995) Overview of proposed mechanisms for the hypocholesteolemic effect of soy. *J. Nutr.*, 125, 606-614
- Benjamin, H., Storkson, J., Tallas, P.G. and Pariza, M.W. (1988) Reduction of benzo(a)pyren-induced mouse forestomach neoplasms in mice given nitrite and dietary soy source. *Food Chem. Toxic.*, 26, 671-678
- Benjamin, H., Storkson, J., Nagahara, A. and, Pariza, M.W. (1991) Inhibition of benzo(a)pyren-induced mouse for stomach neoplasms by dietary soy source. *Cancer Res.*, 51, 2940-2942
- Nagahara, A., Benjamin, H., Storkson, J., Krewson, J.,

- Sheng, K., Liu, W. and Pariza, M.W. (1992) Inhibition of benzo(a)pyren-induced mouse forestomach neoplasms by a principal flavor component of japanese-style fermented soy source. *Cancer Res.*, 52, 1754-1756
10. Ohsaki, Y., Gazdar, A.F., Chen, H.C. and Johnson, B.C. (1992) Antitumor activity of magainin analogues against human lung lines. *Cancer Res.*, 52, 3534-3538
11. Asahara, N., Zhang, X.B. and Ohta, Y. (1992) Antimutagenicity and mutagen-binding activation of mutagenic pyrolyzates by microorganisms isolated japanase *miso*. *J. Sci. Food Agric.*, 58, 395-401
12. Cheigh, H.S. and Lee, C.Y. (1993) Antioxidative and antimutagenic characteristics of melanoidin related products. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 22, 246-252
13. Cheigh, H.S., Lee, J.S., Moon, G.S. and Park, K.Y. (1993) Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 22, 565-569
14. Cheigh, H.S., Lee, J.S. and Lee, C.Y. (1993) Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 22, 570-575.
15. Park K.Y., Moon S.H., Baik, H.S. and Cheigh, H.S. (1990) Antimutagenic effect of *Doenjang* (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 19, 156-162
16. Park, K.Y., Lin, S.Y. and Rhee, S.H. (1997) Antimutagenic and anticarcinogenic effects of *Doenjang*. *J. Kor. Assoc.*, 1, 99-107
17. Lee, J.S., Kwon, S.J., Ahn, C. and Yoo, J.Y. (1997) Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional *Meju*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 448-453
18. Rhee, C.H., Lee, J.B. and Jang, S.M. (2000) Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the traditional *Doenjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 43, 277-284
19. Jang, S.M., Lee, J.B., An, H., Rhee, C.H. and Park, H.D. (2000) Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the korean soybean paste with various concentrations of ginseng extract during fermentation. *Kor. J. Postharvest Sci. Technol.*, 7, 313-320
20. AOAC. (1990) *Official methods of analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. US.
21. Summer, J.B. (1925) Dinitrosalicylic acid method for glucose. *J. Biol. Chem.*, 60, 393-398
22. Dubois, M., Gills, K.A., Hamilton, J.N., Robers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-352
23. Hull, M.E. (1974) Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.*, 30, 881-884
24. Jung, S.W., Han, D.S., Kim, S.J. and Chun, M.J. (1996) Fermentation of tyrosinase inhibitor in mushroom media. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 227-233
25. Cheung, H.S. and Chushman, D.W. (1971) Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637-1640
26. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 173-219
27. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Mastsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975) Mutagenicity of carcinogenic azo dye and their derivative. *Cancer Lett.*, 1, 91-98
28. Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Mastsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M. (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella test. *Mutat. Res.*, 48, 121-126
29. Kim, W.C., Kwon, S.H., Rhee, I.K., Hur, J.M., Jeong, H.H., Choi, S.H., Lee, K.B., Kang, Y.H. and Song, K.S. (2006) Rapid high performance liquid chromatographic quantification of major isoflavones in soybeans and soybean pastes. *Food. Sci. Biotechnol.*, 15, 24-27.
30. Lee, J.S., Kwon, S.J., Chung, S.W., Choi, Y.J., Yoo, J.Y. and Chung, D.H. (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.
31. Iyenger, R. and McEvily, A.J. (1992) Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 3, 60-65
32. Vamons-Vigyazo, L. (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 15, 49-53
33. Tomita, K., Oda, N., Ohbayashi, M., and Kamei, H. (1990) A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiotics*, 43, 1601-1605

34. Lozano-de-Gonzales, P.G., Barrett, D.M., Wrolstad, R.E. and Durst, R.W. (1993) Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice. *J. Food Sci.*, 58, 399-405
35. Otwell WS, Iyenger R, McEvily AJ. 1992. Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexyresorcinol. *J. Aquatic Food Prod. Technol.*, 1, 53-57
36. McEvily, A.J., Iyenger, R. and Gross, A.T. (1993) Compositions and methods for inhibiting browning in foods and beverages. US Patent 5,202,141
37. Manjusri, D. and Richard, L.S. (1975) Pulmonary angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 250, 6762-6768
38. Gavars, I. (1992) Bradykinin-mediated effects of ACE inhibition. *Kindeg International*, 42, 1020-1029
39. Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kikuhi, M. (1993) Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1107-1110
40. Suh, H.J., Suh, D.B., Chung, S.H., Whang, J.H., Sung, H.J. and Yang, H.C. (1994) Purification of ACE inhibitor from soybean paste(in Korean). *Agric. Chem. Biotechnol.*, 37, 441-445
41. Shin, Z.I., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J. and Moon, T.H. (1995) Fraction of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste(in Korean). *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 27, 230-234
42. Peterson, G. and Barnes, S. (1991) Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.*, 179, 661-667
43. Pagliacci, M.C., Smacchia, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi, C. and Nicoletti, I. (1994) Growth-inhibitory effects of the natural phytoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer*, 30, 1675-82
44. Wang, H.J. and Murphy, A.P. (1994) Isoflavone composition of america and japanese soybeans in iowa: Effects of variety, crop years, and location. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1674-1677
45. Hutchins, A.M., Slavin, J. L. and Lampe, J.W. (1995) Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Dietetic Assoc.*, 95, 545-551
46. King, R.A., Broadbent, J.L. and Head, R.J. (1996) Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.*, 126, 176-182

(접수 2006년 4월 19일, 채택 2006년 9월 29일)