

***Bacillus* sp. SP-KSW3을 이용하여 제조한 간장의 발효 기간에 따른 효소 활성 및 기능성의 변화**

김병수 · 이창호¹ · 홍영아² · 권태형 · 신미경 · 김진희 · 우철주² · 김영배³ · 박희동^{2†}
안동대학교 식품생명공학과, ¹(재)경북바이오산업연구원, ²경북대학교 식품공학과, ³니껴바이오

Changes of Enzyme Activity and Physiological Functionality of Traditional *Kanjang*(Soy Sauce) during Fermentation in the Using *Bacillus* sp. SP-KSW3

Byoung-Soo Kim, Chang-Ho Rhee¹, Young-Ah Hong², Tae-Hyung Kwon, Mi-Kyoung Shin, Jin-Hui Kim, Cheol-Joo Woo², Young-Bae Kim³ and Heui-Dong Park^{2†}

School of Food Sciences & Biotechnology, Andong National University, Andong 760-749, Korea

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

²Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³Nikkyuhbio, Andong 760-863, Korea

Abstract

Bacillus sp. SP-KSW3 is an auxotroph bacteria that is being used for starter in fermentation. Physico-chemical characteristics, enzyme activities, ACE inhibitor and antimutagenicity in fermented soybean (*Kanjang*) inoculated with *Bacillus* sp. SP-KSW3 starter was investigated for the ripening duration of fermentation. Tyrosinase and ACE showed 7% higher activity degree on the *Kanjang* matured fermented 2 years with *Bacillus* sp. SP-KSW3 (Type I) than test field than *Kanjang* matured 2 years (control). For antimutagenicity using *S. enterica* serovar Typhimurium TA100 against MNNG and NPD showed 35.17% and 28.37% (Type I). Similarly, *S. enterica* serovar Typhimurium TA98 was used against NPD and NQO showed 25.48% and 21.64% (Type I), respectively. Hydrogen donating ability 2 year for maturing (Type I) appeared most highly in the test eulogy 83.1% which it makes. Daidzin of isoflavone in fermented soybean showed similarly. Genistein was not detected. The initial test field for daidzin and genistein contained 3.95 mg/kg and 1.25 mg/kg (Type I), respectively.

Key words : *Bacillus* sp. SP-KSW3, *Kanjang*, enzyme activities, antimutagenicity, isoflavone

서 론

간장은 단백질의 콩과 전분질의 곡류를 주원료로 하여 제조되는 액상의 발효조미 식품으로 우리나라의 식문화에서 오랜 전통을 가진 대표적인 발효식품의 일종으로서 지역적으로 한국, 일본, 중국을 비롯한 동아시아에서 주로 사용되어 왔으나 아시아권 식품의 세계화와 더불어 그 사용범위도 점차 넓어지고 있다(1). 전통식품의 하나인 간장도 맛에

의한 미각의 촉진, 향기에 의한 식욕의 증진 등 기호적인 측면뿐만 아니라 양질의 단백질 급원으로 큰 효용성을 가지고 있으며 국균이 생산하는 효소에 의해서 복잡한 발효 과정을 거치면서 콩에 존재하는 단백질이 저분자의 peptide와 아미노산을 포함한 기능성 물질로 전환되고, 전분질에 함유된 탄수화물이 단당류의 가용성 물질로 분해되어 특유한 맛을 생성하게 된다(2). 간장은 콩을 주원료로 한 발효식품으로 쌀을 주식으로 하는 동양인들에게 영양학적으로 중요한 조미료로 사용되어온 오랜 역사를 가진 식품이지만, 사회가 서구화되면서 장류제품의 기호도와 기능성에 대한 소비자들의 다양화된 요구를 충족시키지 못하고 있는

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

실정이다(3). 최근 전통식품에도 생리활성이 강화된 기능성 식품의 개발이 절실할 뿐만 아니라 이에 대한 연구가 소비자들의 요구에 부합하므로 간장의 기능성에 관한 연구가 점차 증가하고 있는 추세이다(3-6). 장류의 기능성은 아직 생성 기작과 생리적 효과가 규명되지 않았지만 주로 메주 제조와 된장 발효에 관여하는 미생물, 원료 콩 및 발효에 관여하는 미생물이 생산하는 2차 대사산물에 의한 것으로 알려져 있으며(3), 간장에 대한 연구로는 사입과 숙성조건의 영향(4), 전통간장의 기능성 물질 탐색(5,6), 품질개선을 위한 메주의 제조법개선(7), 재래식간장에 효모를 첨가한 공정개선(8), *Aspergillus* 속 균류의 이용(9), 전통간장의 숙성기간별 생육 미생물의 분리 및 동정(10), 제조기간에 따른 재래식 간장의 발효특성(11), 담금 비율을 달리한 간장의 품질의 영향에 미치는 영향(12), 고온에서의 간장 제조법에 대한 연구(13), 및 효소에 대한 연구(14) 등이 진행되고 있으나, 메주를 제조할 때 자연적인 방법으로 발효시키지 않고 미생물 starter를 접종하여 메주를 제조하고 이를 이용하여 담금한 간장의 생리기능성에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 청국장 제조할 때 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 메주 starter로 접종(26)하여 발효시킨 메주를 이용하여 간장을 담금 후 일정기간 숙성시킨 다음 생리활성 기능성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 재료인 콩은 경북 안동시 서후면에서 2005년도와 2006년도에 생산된 흰콩을 사용하였으며, 식염은 순도 98%인 정제염을 사용하였다. 대조구로서는 2005년도에 생산된 흰콩을 사용하여 경북 안동시 남선면 일반가정에서 전통적인 방법으로 제조한 메주를 사용하여 담금을 한 간장을 사용하였다.

사용 균주

메주 제조시에 사용한 청국장 균주는 안동대학교 생약자원학과 응용미생물연구실에서 분리하여 보관중인 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 사용하였다.

메주 및 간장의 제조

메주의 제조는 원료 콩을 증자한 후 냉각한 다음 청국장 발효 균주인 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 LB 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)를 사용하여 37°C, 200 rpm에서 24 hr 배양한 다음 원료 콩 20 kg당 종 배양액을 0.5% (v/w) 접종하여 메주를 제조하였으며, 간장의 제조는 메주 17 kg, 물 40 L와 정제염 10 kg을 혼합하여 숙성시키고 분리하여 간장을 제조하였다. 대조구는 재래식 방법으로

메주를 제조하여 간장을 제조한 다음 2년간 숙성시켰으며, Type I은 메주 제조시 *Bacillus* sp. SP-KSW3를 접종하여 제조한 메주를 이용하여 간장을 제조한 후 2년간 숙성시켰으며, Type II는 1년간 숙성시켰다.

이화학적 성분의 분석

간장 발효 과정중의 이화학적 성분의 분석으로 pH는 pH meter(Mettler Toledo Co., Model 340, Switzerland) 측정하였으며 산도와 아미노산도는 중화 적정법에 준하여 측정하였다. NaCl 농도는 Mohr법(15), 환원당 측정은 DNS(dinitrosalicylic acid)법(16)으로 측정하였으며, 총당은 Phenol-H₂SO₄법(17)으로 측정하였다.

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°C에서 5분간 방치한 다음, 여기에 간장을 원심 분리한 상징액 0.1 mL 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 이 때 생성된 환원당의 함량은 DNS법(16)으로 측정하였으며, 활성의 단위는 상기의 반응조건에서 1분당 생성하는 1 μmol의 환원당을 1 unit로 하였으며, 생성된 환원당의 양을 glucose의 양(g)으로 환산하여 표시하였다.

Protease활성은 간장을 원심 분리한 상징액 1.0 mL에 50 mM NaOH-borate 완충용액(pH 10.0)에 용해한 0.6% casein 5 mL 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후, 0.4M TCA(trichloroacetic acid) 용액을 5 mL 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 37°C에서 20분간 방치시킨 후 여과하여 사용하였다. 반응산물의 양은 Hull의 방법(18)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(19)은 475 nm에서 단위 시간당 변화된 초기 흡광도의 변화값(S_{Abs})과 간장을 원심 분리한 상징액 대신에 증류수를 0.1 mL 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.

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

ACE(Angiotensin converting enzyme) 저해 활성 측정

ACE 저해 활성의 측정은 Cushman과 Cheung의 방법(20)

에 준하여 실시하였다. 간장을 원심 분리한 상정액 시료 50 μ L에 기질 50 μ L 첨가한 후, 37°C에서 5 분간 방치하였다. 여기에 ACE 용액을 50 μ L 첨가하고 다시 37°C에서 1 시간 반응시킨 후, 1 N HCl 용액 250 μ L 첨가하여 반응을 정지시켰다. 다시 여기에 ethyl acetate 1.5 μ L 가하여 15 초간 균질화한 후 5,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상정액 1 μ L 취하였다. 이 상정액을 80°C에서 1시간 가열하여 완전히 건조시킨 후 1 M NaCl 용액 3 mL 첨가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

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

- A : 시료 첨가 시 흡광도
- B : 시료 대신 증류수 첨가 시 흡광도
- C : 반응 정지 후 시료 첨가 시 흡광도

항돌연변이 활성 측정

시료의 돌연변이 및 항돌연변이 활성 측정은 Ames test를 개량한 preincubation method(21-23)에 따라 히스티딘 영양 요구주로서 point mutant인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA100(hisG46, rfa, Δ uvrB)과 frame shift mutant인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 (hisD3052, rfa, Δ uvrB)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 μ g, 15 μ g되게 사용하였으며, *S. enterica* serovar Typhimurium TA98인 경우에는 NPD와 NQO (4-nitroquinoline-1-oxide)를 각각 2.5 μ g, 0.25 μ g되게 사용하였다. 항돌연변이 활성은 minimal glucose agar상에서 생육하는 His⁺복귀 돌연변이 콜로니를 계수하고 다음 식으로 환산하여 His⁺복귀 돌연변이 저해율(inhibition ratio)로서 나타내었다.

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = 100 \times [\text{A-B/A-C}]$$

- 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 돌연

변이 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.

수소 공여능 측정

수소 공여능의 측정은 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazine (DPPH)의 환원성을 이용하여 516 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉 간장을 원심 분리한 상정액 0.1 mL와 대조구로 사용한 0.15 BHT 1 mL에 4×10^{-4} M DPPH 용액 3 mL 각각 첨가하여 혼합한 후 증류수에 대한 흡광도를 측정하고, 대조구에 시료 대신에 에탄올 1 mL 첨가하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로 나타내었다(24).

$$\text{수소공여능} = [1 - (\text{시료의 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도})] \times 100$$

Isoflavone 함량 분석

간장 시료 10 mL에 100% 메탄올 50 mL 첨가하여 80°C에서 3 시간 동안 환류 추출한 다음 추출액을 0.45 μ m filter로 여과하여 HPLC로 genistin, daidzin, genistein 및 daidzein을 정량하였다(25). HPLC 분석을 위한 column은 RP C18 (4.6 \times 250 mm, Waters Co., USA)을 사용하였으며, 이동상은 0.55% acetic acid를 함유한 H₂O와 0.11% acetic acid를 함유한 acetonitrile(이때 acetonitrile은 35 분 동안 5%에서 100%까지 증가하도록 농도구배를 줌)이다. Flow rate는 0.8 mL/min으로 조절하였으며 UV detector를 사용하여 254 nm에서 검출하였다.

결과 및 고찰

이화학적 성분의 분석

청국장 균주인 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 간장을 분리하여 숙성기간에 따라 시료를 채취하여 이화학적 성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 간장의 pH는 메주의 제조방법의 차이와 숙성기간에 따라 큰 차이를 나타내지 않았으나, 청국장 균주를 이용하여 제조한 간장의 pH가 5.36으로 가장 높게 나타났다. 총산의 경우는 제조방법의 차이 없이 비슷한 경향을 나타내었으며, NaCl의 함량은 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 starter로 접종하여 제조한 간장의 경우 대조구보다 4~5% 정도 높게 나타났다. 아미노산도의 경우는 청국장 균주를 이용하여 된장을 제조한 경우가 대조구보다 낮게 나타났다. 환원당 함량과 총당의 함량은 실험구와 대조구 모두 미량만 검출 되었는데 이는 숙성이 된장의 발효가 진행됨에 따라 당이 숙성에 관여하는 미생물의 영양원과 각종 발효의 기질로 이용되었기 때문에 간장에는 당 함량이 거의 검출되지 않는 것으로 추측된다.

Table 1. Proximate analysis of physiochemical properties of *Kanjang* at room temperature during maturation period

Type of <i>Kanjang</i> ¹⁾	pH	Acidity (%) ²⁾	NaCl (%) ²⁾	Amino acidity ²⁾	Reducing sugar(mg/mL) ²⁾	Total sugar (mg/mL) ²⁾
Control	5.19	0.07	13.92	5.70	0.068	0.448
Type I	5.36	0.08	19.49	4.80	1.000	1.110
Type II	5.17	0.09	17.75	5.35	0.768	0.750

¹⁾Control is *Kanjang* matured 2 years, Type I is *Kanjang* using *Meju* prepared by the culture of *Bacillus* sp. SP-KSW3 matured 2 years, Type II is *Kanjang* using *Meju* prepared by the culture of *Bacillus* sp. SP-KSW3 matured 1 year.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate.

효소활성의 변화

청국장 균주인 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 간장을 분리하여 숙성기간에 따른 amylase와 protease 활성은 Table 2와 같다. 청국장 균주를 이용하여 제조한 간장과 대조구를 2년간 숙성시킨 경우의 amylase의 활성은 대조구의 경우 각각 0.202 U/mL로 실험구의 0.127 U/mL과 0.068 U/mL 보다 높게 나타났으며, protease의 활성은 실험구가 각각 1.96 U/mL와 1.74 U/mL로 대조구의 0.87 U/mL보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 김 등(26)이 보고한 된장 숙성 중 발효시간에 따른 amylase와 protease의 활성보다 낮게 나타났는데 그 이유는 간장의 높은 소금 농도에 의하여 효소 활성이 저해 받은 결과로 추측된다. 간장 발효에 있어서 amylase의 경우 총당과 환원당의 변화에 영향을 미치며 protease는 된장 발효시 단백질 분해 특유의 구수한 맛 성분을 유리하고 이들의 숙성도를 나타내는 유리 아미노산 함량에 많은 영향을 준다(26).

Table 2. Amylase and protease activity of *Kanjang* at room temperature during maturation period

Type of <i>Kanjang</i> ¹⁾	Amylase activity(U/mL) ²⁾	Protease activity(U/mL) ²⁾
Control	0.202	0.87
Type I	0.127	1.96
Type II	0.068	1.74

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate. Significantly different from the control at the P<0.05 level.

Tyrosinase활성 저해능과 ACE(Angiotensin converting enzyme) 저해 활성 변화

청국장 균주인 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 간장을 분리하여 숙성기간에 따른 tyrosinase의 활성과 안지오펜신전환 효소(angiotensin converting enzyme) 활성 저해효과를 조사한 결과는 Table 3과 같다. *Bacillus* sp. SP-KSW3을 starter로 접종하여 제조하고 숙성기간이 2년 경과한 간장의 경우

대조구보다 약 7%이상 높게 나타났으나, 1년간 숙성시킨 경우에는 대조구 보다 활성이 낮게 나타났다. Tyrosinase는 검정색 색소인 멜라닌의 합성에 가장 중요한 효소로서 tyrosine으로부터 quinone이 생성된 후에 아미노산 또는 단백질과의 중합 반응에 의해 melanin이 합성(27,28)되어 사람의 피부에 비정상적으로 생성되어 나타나는 원인물질로서 tyrosinase 저해제로 여러 가지가 사용되고 있으나 (29-32), 자연 발효에 의해 만들어지는 간장을 섭취함으로써 활성을 저해할 수 있으리라 사료된다. 안지오펜신전환 효소(angiotensin converting enzyme) 활성 저해효과도 tyrosinase와 마찬가지로 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 starter로 접종하여 제조하고 숙성기간이 2년 경과한 간장의 경우 대조구보다 약 8%이상 높게 나타났으나, 1년간 숙성시킨 경우에는 대조구 보다 활성이 낮게 나타났다. 접종하여 제조한 된장이 대조구보다 약 10%이상 높게 나타났으며, 동일한 시료인 경우 숙성시간이 길어질수록 높게 나타났으나, 1년간 숙성시킨 경우에는 대조구 보다 활성이 낮게 나타났다. 최근 전통 식품으로부터 고혈압 억제에 관한 활성을 나타내는 성분들에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데 (33) 이들의 활성 저해는 혈압강하제와 비교하였을 때 낮은 활성은 낮지만 우리 국민들이 조미료로서 항상 섭취하는 간장 중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대되어 진다.

Table 3. Tyrosinase and ACE inhibitor of *kanjang* at room temperature during maturation period

Type of <i>Kanjang</i> ¹⁾	Tyrosinase inhibitor (%) ²⁾	ACE inhibitor (%) ²⁾
Control	23.45	25.47
Type I	30.39	33.51
Type II	18.14	21.92

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate. Significantly different from the control at the P<0.05 level.

항돌연변이 활성(antimutagenicity activity) 변화

청국장 균주인 *Bacillus* sp. SP-KSW3을 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 간장을 분리하여 숙성기간에 따른 항돌연변이 활성을 측정하기 위하여 *S. enterica* serovar Typhimurium TA100과 TA98을 사용하여 직접변이원인 MNNG, NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 2년간 숙성시킨 된장의 경우 *S. enterica* serovar Typhimurium TA100에 대하여 변이원 MNNG와 NPD에 대한 물 추출물의 항돌연변이 활성은 각각 35.17%와 28.37%로 대조구에 비해 활성이 높게 나타났으나, 1년간 숙성시킨 경우는 대조구와 비슷한 경향을 나타내었다. *S. enterica* serovar Typhimurium TA98에 대하여 변이원 NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성은 *S. enterica* serovar Typhimurium TA100과 마찬가지로 비슷한

경향을 나타내었으나, 된장의 항돌연변이 활성이 비해서는 낮은 활성을 나타내었다(26).

Table 4. Antimutagenicity activity of Kanjang at room temperature during maturation period

Type of Kanjang ¹⁾	TA100 ²⁾		TA98 ²⁾	
	MNNG	NPD	NQO	NPD
Control	26.35	23.59	20.11	15.49
Type I	35.17	28.37	25.48	21.64
Type II	25.42	19.14	19.83	15.17

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate. Significantly different from the control at the P<0.05 level.

수소 공여능 측정

수소 공여능은 노화 억제에 관련된 중요한 생리기능으로 작용하는데 *Bacillus sp. SP-KSW3*을 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 간장을 분리하여 숙성기간에 따른 수소 공여능을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 항산화 활성은 숙성 기간에 관계없이 대조구 보다 청국장 발효 균주인 *Bacillus sp. SP-KSW3*을 starter로 접종하여 제조한 간장의 수소공여능 활성이 높게 나타났다.

Table 5. Hydrogen - donation activity of Kanjang at room temperature during maturation period

Type of Kanjang ¹⁾	Hydrogen - donation activity (%) ²⁾
Control	70.1
Type I	83.1
Type II	74.7

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate. Significantly different from the control at the P<0.05 level.

Isoflavone 함량 분석

콩에는 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(34). 이러한 isoflavone류 중에서 생리활성의 기초를 이루는 화합물은 주로 genistein, daidzein과 같은 isoflavones aglycone류로 알려져 있다(35,36). 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(37). 전통 발효식품인 간장을 *Bacillus sp. SP-KSW3*을 starter로 접종하여 제조한 메주를 이용하여 된장을 담금한 후, 간장을 분리하여 숙성기간에 따른 isoflavone의 함량을 측정한 결과(Table 6), glucoside의 일종인 daidzin의 함량은 비슷한 결과를 나타내었으나,

genistin의 경우 대조구와 실험구 모두 검출되지 않았다. Aglycone의 일종인 daidzein의 함량은 실험구가 각각 3.95 mg/kg과 4.65 mg/kg으로 대조구보다 높게 나타났으며, genistein의 경우 실험구가 각각 1.25 mg/kg과 3.55 mg/kg으로 나타났으나, 대조구에서는 검출되지 않았다.

Table 6. Content of isoflavones in Kanjang at room temperature during maturation period

Type of Kanjang ¹⁾	Glucoside (mg/kg)		Aglycone (mg/kg)	
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
Control	17.97	ND	1.04	ND
Type I	16.52	ND	3.95	1.25
Type II	18.26	ND	4.62	3.55

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

요 약

청국장 제조시 사용되는 균주인 *Bacillus sp. SP-KSW3*을 메주 제조시 starter로 접종하여 발효시킨 메주를 이용하여 된장을 담금 후 일정기간 숙성시킨 다음 간장을 분리하여 이화학적 성질 등의 변화를 측정하였다. NaCl의 함량은 대조구보다 실험구가 높게 나타났으며, 아미노산도는 실험구보다 대조구가 높게 나타났다. Amylase활성은 대조구가 높게 나타났으며 protease의 활성은 실험구가 약 2배 높게 나타났다. Tyrosinase의 저해 활성과 ACE 저해 활성은 숙성기간이 동일한 경우 대조구 보다 실험구가 약 7% 이상 높은 활성을 나타내었다. 항돌연변이 활성은 2년간 숙성시킨 경우에 실험구가 대조구 보다 높은 활성을 나타내었으며, *S. enterica* serovar Typhimurium TA100을 사용한 경우 변이원 MNNG와 NPD에 대한 항돌연변이 활성은 각각 35.17%와 28.37%를 나타내었다. 또한, *S. enterica* serovar Typhimurium TA98을 사용한 경우 변이원 NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성은 각각 25.48%와 21.64%를 나타내었다. 수소 공여능은 2년간 숙성시킨 실험구가 83.1%로 가장 높게 나타났다. 간장의 isoflavon 중 daidzin은 비슷한 경향을 나타내었으며 genistin은 모구 검출되지 않았다. Aglycone의 일종인 daidzein은 실험구가 각각 3.95 mg/kg과 4.62 mg/kg, genistein은 각각 1.25 mg/kg과 3.55 mg/kg으로 나타났다.

참고문헌

1. Cho, S.H., Choi, Y.J., Oh, J.Y., Kim, N.G., Rho, C.W., Choi, C.Y. and Cho, S.H. (2007) Quality characterization of Kanjang (Soy sauce) fermentation with bamboo sap,

- xylem sap and goroae. Kor. J. Food Preserv., 14, 294-300
2. Ito, A., Watanabe, H. and Basaran, N. (1993) Effects of soy products in reducing risk of spontaneous and neutron induced liver tumors in mice. Int. J. Oncol., 2, 773-775
 3. Lee, E.J., Kwon, O.J., Im, M.H., Choi, U.K., Son, D.H., Lee, S.I., Kim, D.G., Cho, Y.J., Kim, W.S., Kim, S.H. and Chung, Y.G. (2002) Chemical changes of *Kanjang* made with Barely Bean. Kor. J. Food Sci. Technol., 34, 751-756
 4. Choi, J.D., Im, M.H., Chung, H.C., Lee, C.W., Kim, Y. H., Choi, C. and Choi, K.S. (1997) The effects of mashing and maturing conditions on the quality of Korean traditional *Kanjang* (Soy sauce). 40, 365-368
 5. Choi, S.Y. (1997) A study on the physiological function of traditional *kanjang* and *doenjang*, and development of process for functional food. Annual report of ARPC, Korea
 6. Kim, J.K. (1997) Study on the novel antimutagenic pigments in traditional soy sauce and soybaen paste. Annual report of ARPC, Korea
 7. Im, M.H., Choi, J.D., Chung, H.C., Lee, S.H., Lee, C.W., Choi, C. and Choi, K.S. (1998) Improvement of meju preparation method for the production of korean traditional *Kanjang* (Soy sauce). Kor. J. Food Sci. Technol., 30, 608-614
 8. Yoo, J.Y., Kim, H.G. and Kwon, D.J. (1998) Improved process for preparation of traditional *Kanjang* (Korean-Style Soy Sauce). J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr., 27, 268-274
 9. Kim, D.H., Kim, S.H., Choi, N.S., Bai, S. and Chun, S.B. (1998) Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Aspergillus* strains. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26, 551-557
 10. Yoo, S.K., Cho, W.H., Kang, S.M. and Lee, S.H. (1999) Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybaen paste and soybean sauce. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 113-117
 11. Choi, K.S., Chung, H.C., Choi, J.D., Kwon, K.I., Im, M.H., Kim, Y.J. and Seo, J.S. (1999) Effects of Meju manufacturing periods on the fermentation characteristics of *Kanjang*, Korean traditional soy sauce. J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 42, 277-282
 12. Choi, K.S., Choi, J.D., Chung, H.C., Kwon, K.I., Im, M.H., Kim, Y.H. and Kim, W.S. (2000) Effects of mashing proportion of soybean to salt brine on *Kanjang* (Soy sauce) quality. Kor. J. Food Sci. Technol., 32, 174-180
 13. Chung, H.C., Choi, J.D., Kwon, K.I., Jung, M.S., Im, M.H., Choi, C. and Choi, K.S. (2000) The effects of maturing temperature of *Kanjang* mash on the distributions of compositions and sensory characteristics of *Kanjang*. J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 43, 253-259
 14. Chae, H.J., In, M.J. and Kim, M.H. (1997) Production and characteristics of enzymatically hydrolyzed soy sauce by the treatment using protease. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr., 26, 784-787
 15. AOAC. (1990) *Official methods of analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. USA.
 16. Summer, J.B. (1925) Dinitrosalicylic acid method for glucose. J. Biol. Chem., 60, 393-398
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. Cheung, H.S. and Chushman, D.W. (1971) Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol., 20, 1637-1640
 21. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113, 173-219
 22. 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
 23. 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
 24. Bois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-2004
 25. 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
26. Kim, B.S., Rhee, C.H., Hong, Y.A., Woo, C.J., Jang, C.M., Kim, Y.B. and Park. H.D. (2007) Changes of enzyme activity and physiological functionality of traditional *Doenjang* during fermentation in the using *Bacillus* sp. SP-KSW3. Kor. J. Food Preserv., 14, 545-551
27. 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
28. Vamons-Vigyazo, L. (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 15, 49-53
29. Tomita, K., Oda, N., Ohbayashi, M., and Kamei, H. (1990) A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. J. Antibiot., 43, 1601-1605
30. 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
31. Otwell, W.S., Iyenger, R. and McEvily, A.J. 1992. Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexyresorcinol. J. Aquatic Food Prod. Technol., 1, 53-57
32. 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
33. Shin, Z.I., Anh, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J. and Moon, T.H. (1995) Fraction of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste (Korean). Kor. J. Food Sci. Technol., 27, 230-234
34. 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
35. 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. Biophys. Res. Commun., 179, 661-667
36. 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, 1675-1682
37. 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

(접수 2008년 1월 14일, 채택 2008년 3월 28일)