

## *Bacillus subtilis* HA를 이용한 soybean grit의 고체발효 기간에 따른 생리활성물질 생산 및 항산화 효과

김지은 · 이삼빈\*

계명대학교 식품가공학과

### Production of Bioactive Components and Anti-Oxidative Activity of Soybean Grit Fermented with *Bacillus subtilis* HA according to Fermentation Time

Ji-Eun Kim and Sam-Pin Lee\*

Department of Food Science and Technology, Keimyung University

**Abstract** Soybean grits, fortified with various bioactive components, were produced by solid-state fermentation using *Bacillus subtilis* HA.  $\alpha$ -Amylase activity gradually increased during fermentation over 5 days. Fibrinolytic and protease activities were highest in the soybean grits fermented for 7 days. The grits fermented for 5 days also showed the highest tyrosine content, indicating a higher peptide content. Peptides of low molecular weight (below 3,000 daltons) and browning pigments increased with increasing fermentation time. The fermented soybean grits showed higher contents of total phenolic compounds, to approximately 18 mg/g. DPPH free radical scavenging effects were higher in the soybean grits fermented for 3 days. Also, ABTS radical scavenging effects were greater in the fermented grits compared to the unfermented grits. Overall, the soybean grits fermented by solid-state fermentation for 5 days showed enhanced production of bioactive compounds and greater antioxidant properties.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, solid-state fermentation, bioactive compounds, soybean grit

## 서 론

콩은 단백질, 지방질 등 풍부한 영양성분과 다양한 생리 활성 물질을 함유하고 있어서 건강식품 및 성인병 예방에 가장 적절한 식품 소재로 주목 받고 있다. 동양에서 콩은 발효식품의 주된 원료로 널리 이용되어 왔으며, 나라마다 고유한 맛과 풍미를 갖는 발효식품을 생산해 왔다. 특히, 고초균에 의한 콩의 발효는 단기간 발효를 통해서 영양성분과 기능성이 향상된 발효제품을 생산할 수 있으며, 일본의 생청국장(Natto)과 한국의 청국장 등이 고유한 발효식품으로 널리 섭취되어 왔다. 특히 콩 발효 식품은 발효 과정을 거치면서 균주가 생산하는 효소의 작용으로 콩 단백질이 분해되어 기능성 펩타이드가 생산되고 이소플라본 비배당체와 같은 다양한 생리 활성 물질이 생성됨으로써 원료 콩보다 기능성이 강화된 식품으로 인식되고 있다(1).

콩 발효 식품의 생리활성물질의 연구로서 콩 단백질이 가수분해되어 생성되는 펩타이드와 유리 아미노산에 관한 많은 연구가 수행되었다(2). 콩 단백질은 가수분해효소의 작용에 의하여 부분적으로 가수분해되어 생리활성을 갖는 콩 펩타이드로 생성될 수 있으며, 펩타이드는 생체 내에서 흡수를 촉진하며, 콩 단백질의 C-말단이나 N-말단으로부터 소수성 아미노산을 분해하여 쓴맛을

감소시켜준다. 또한 단백질 기능성으로서 겔 형성능, 유화능 또는 거품형성 능력도 증진된다(3). 콩 펩타이드 생리활성은 소화기 내에서 담즙산의 재흡수를 저해함으로써 혈중 콜레스테롤의 저하 및 LDL과 지방의 감소효과가 있어 동맥경화의 예방과 치료에 기대된다(4,5). 또한 ACE 저해 활성에 의한 혈압강화 펩타이드(6), 혈소판 응집저해 활성을 갖는 항혈전 펩타이드(7), 항암 펩타이드(8) 등이 보고되고 있다.

항산화 물질은 식품 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패 등을 방지하거나 지연하는 기능을 수행하며, 인체 내 세포의 산화 및 유독성 활성 라디칼의 소거능으로 노화억제 등에 관한 연구가 많이 보고되었다(9). 최근 성인병 예방과 노화예방을 위해서 항산화물질에 대한 천연소재의 발굴 및 효능 평가에 대한 관심이 고조되고 있다. 천연물 중 항산화성 물질로는 L-ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids, flavonoids, maillard 반응물, 아미노산, 펩타이드, 단백질과 phospholipids 등이 알려져 있다(10).

항산화 식품소재와 식품에 대한 관심과 연구가 증가하면서 콩 발효 식품의 항산화효과에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며, 콩과 콩 발효 식품에 존재하는 대표적인 항산화 물질로는 chlorogenic acid, isochlorogenic acid, caffeic acid, isoflavone, 펩타이드와 아미노산 및 갈변물질 등이 알려져 있다(11).

최근 전통 콩 발효물로부터 다양한 균주들이 분리되어 콩을 원료로 한 생리활성물질 생산에 관한 연구들이 수행되어 왔다. 특히 전통 청국장에서 분리된 *Bacillus subtilis* 균주는 생리활성 물질인 poly- $\gamma$ -glutamic acid(PGA) 점질물과 혈전분해효소를 생산하는 우량 균주로 보고되었다(12). 고초균에 의한 발효 원료로는 콩

\*Corresponding author: Sam-Pin Lee, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea  
Tel: 82-53-580-5554  
Fax: 82-53-580-5554  
E-mail: splee@kmu.ac.kr  
Received December 2, 2008; revised January 6, 2009;  
accepted January 7, 2009

이외에 콩 비지를 이용한 고초균 발효(13), 콩 비지의 고초균 발효에 의한 점질물 생산 및 특성에 관한 차이(14) 및 soybean grit를 이용한 단기간 고초균에 의한 고체 발효시킨 발효물 특성에 관한 연구가 수행되었다(15). 고초균 발효에 의한 콩 발효물은 발효기간에 따라 풍미생성, 갈변화 및 다양한 생리활성 물질의 생산에 변화가 있을 것으로 사료된다.

콩은 사용목적에 따라 다양한 형태로 가공되었으며, 최근 분체공학의 발전으로 콩으로부터 초미세분말의 제조가 가능하며, 이는 전두유 및 전두부 등 다양한 콩가공제품의 원료로 활용되고 있다. 또한 콩 파쇄물인 soybean grit는 콩의 모든 영양성분을 함유하고 있으며, 입자크기가 감소함에 따라서 표면적이 증가되며, 동시에 효렴특성이 매우 양호하여 가공적성이 향상된 콩소재이다.

따라서 콩보다 가공 적성이 뛰어난 soybean grit를 이용하여 고초균에 의한 고체 발효를 장기간 수행함으로써 생산되는 다양한 생리활성물질을 평가하는 것은 기능성 성분들이 강화된 콩 발효물을 생산하기 위한 기초 연구로 사료된다. Soybean grit의 발효기간에 따른 발효물로부터 peptide의 생성 정도, 혈전용해효소 등 가수분해효소 활성의 측정함으로써 soybean grit의 발효기간에 따른 생리활성 물질 생성 최적화 및 갈변화에 따른 발효물의 항산화력을 측정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 균주

원료 soybean grit는 두원식품(Gimcheon, Gyeongbuk, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 혈전용해능 측정에 사용된 fibrin, fibrinogen, thrombin은 Sigma Co.(St. Louis, Mo, USA)의 제품을 구입하여 사용하였으며, tyrosine 함량 측정에는 folin-phenol reagent(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다. Peptide 분포도 측정시 standard로 사용한 neurotensin(분자량: 1,672 dalton; Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH), angiotensin(분자량: 1031.17 dalton; Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe), paba(분자량: 137.14 dalton; 4-aminobenzoic acid)는 Sigma Co의 제품을 구입하여 사용하였다. HPLC를 통한 peptide 분석에 사용된 용매는 HPLC용 특급시약을 사용하였다.

### 균주 및 스타터 배양액 제조

제래식 청국장에서 분리한 후 한국미생물보존센터에 기탁한 *B. subtilis* HA(KCCM 10775P) 균주를 사용하였다. 스타터 배양액은 탈지대두분말 5% 용액(w/v)을 균질화한 후 121°C에서 15분간 멸균한 액체 배지 50 mL에 MRS agar plate에서 42°C에서 24시간 동안 배양한 균주를 1회 접종한 뒤 진탕배양기(SI-900R, Jeio Tech. Co., Daejeon, Korea)에서 42°C에서 1일 동안 배양(180 rpm)하여 스타터로 사용하였다.

### Soybean grit의 고체 발효

Soybean grit 25 g을 250 mL 비이커에 넣은 후 원료 무게의 증량비로 1.5배에 해당되는 증류수를 첨가하여 흡수시킨 후 autoclave (MLS-3020, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan)를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균하였다. 실온에서 냉각한 후 고초균 스타터 *B. subtilis* HA 배양액을 1% 수준으로 접종한 후 골고루 혼합하여 42°C에서 시간별 발효를 수행하였다. 고초균 발효를 7일 동안 발효시키면서 1일 간격으로 발효물을 취하여 동결건조한 후 분말화하여 사용하였다.

발효물의 수분 함량은 적외선 수분 함량 측정기(FD-720, Kett

Electric Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 발효물의 갈색도는 동결 건조 발효물 1 g에 증류수 19 mL을 첨가하여 실온에서 30분간 교반하고 15,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리한 후 상등액을 spectrophotometer(Uvikon, Kontron Co., Milano, Italy)로 350 nm에서 측정하였다.

### Tyrosine 함량 측정

발효물의 콩 peptide 생성정도를 측정하기 위하여 folin phenol 시약을 이용하여 발효물의 물 추출액 중에 존재하는 tyrosine 함량을 측정하였다. 각 시료를 증류수로 5배 희석하여 추출한 시료액 0.7 mL에 0.44 M TCA(trichloroacetic acid) 0.7 mL을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 15,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 mL와 phenol reagent 0.5 mL를 차례로 넣고 혼합한 후 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 반응액의 흡광도를 660 nm에서 측정하였다.

### HPLC를 통한 peptide 분자량 분포

Soybean grit 발효물로부터 얻어진 동결건조 분말 2 g을 증류수로 10배 희석한 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액의 2배 부피에 해당하는 isopropanol을 첨가하여 침전되는 고분자 점질물은 제거한 뒤 회수된 상등액을 감압 농축하여 최종 부피가 10 mL이 되도록 정용하였다. Centricon YM-3(Millipore Co., Billerica, MA, USA)을 이용하여 분자량 3,000 dalton 이하의 peptide 분획물을 얻은 뒤 HPLC (Knauer Co., Berlin, Germany)를 이용하여 콩 peptide의 생성 및 분자량 분포도를 확인하였다. Column은 biobasic SEC-120(Thermo Co., Waltham, MA, USA)을 사용하였으며, 용매는 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7)를 사용하여 분당 1.0 mL씩 흘려주었으며 시료를 20 µL씩 주입하여 UV 254 nm에서 측정하였다.

### 가수분해효소 활성 측정

Soybean grit 발효물 5 g에 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0) 95 mL을 첨가한 뒤 실온에서 진탕 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min)하여 상등액으로부터 효소액을 조제한 다음 효소활성을 측정하였다. α-Amylase의 기질로는 1% 가용성전분(0.02 M phosphate buffer, pH 7.0) 1 mL을 사용하였다. 미리 조제한 효소액을 1 mL 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 M acetic acid 10 mL로 반응을 정지시키고 요오드화 용액(0.005% I<sub>2</sub>+0.05% KI) 2 mL을 넣고 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 blank O.D값의 10% 감소시키는 것을 1 unit로 하여 시료 1 g으로 환산시킨 후 표시하였다. 대조군인 공시험은 미리 제조한 효소액을 100°C에서 30분간 끓여서 불활성화시킨 검액을 사용하였다. Protease의 활성도는 Anson의 방법(16)을 변형하여 측정하였다. 기질로 0.6%의 casein 용액 0.35 mL과 효소액 0.35 mL를 test-tube에 넣고 항온수조에서 반응(37°C, 10 min)시킨 다음 0.44 M TCA 용액 0.7 mL을 넣어 반응을 정지시킨 후 37°C에서 30분간 정지시켰다. 이 반응액을 원심분리(15,000 rpm, 15 min)한 후 여액 1 mL에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 mL과 3배 희석된 Folin reagent 0.5 mL을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 반응조건 하에서 1분간에 tyrosine 1 µg을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

### 혈전용해능 측정

혈전용해효소 활성측정용 fibrin plate는 0.5% fibrinogen을 0.067

M sodium phosphate buffer(pH 7.4)에 용해시켜서 최종 10 mL로 정용한 후 직경 9 cm인 petri dish에 가하여 제조하였다. Thrombin (100 unit/mL) 0.1 mL을 가하고 신속하게 혼합한 후 실온에서 30 분 방치하여 fibrin젤로 고정화시켰다. 혈전용해능 측정 시료는 발효물 1 g에 0.1 M phosphate buffer(pH 7.5) 9 mL을 혼합한 후 15,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 얻은 상등액을 이용하였다. Fibrin plate에 상등액을 20 µL씩 점적하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 fibrin젤의 용해 면적으로 효소 활성을 구하였다.

**항산화 활성측정**

동결 건조된 발효물 분말 2 g에 물과 60% 주정을 각각 200 mL을 첨가하여 진탕배양기를 이용하여 25°C에서 120 rpm의 속도로 12시간씩 3회 추출하였다. 추출물을 여과지(Advantec 5A)를 이용하여 여과한 뒤 감압 농축한 후 동결 건조하여 항산화 측정을 위한 시료로 사용하였다.

총 폴리페놀함량은 AOAC법에 의하여 측정하였다(17). 물과 60% 주정 추출물을 농도별로 희석한 용액 1 mL을 취하여 2%(w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 1 mL을 가하여 3분간 방치한 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 가하여 반응시켜 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 증류수로 gallic acid 0.1%(w/v)를 제조한 후 최종농도가 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL 용액이 되도록 조제하고 이를 일정량 취하여 위와 같은 방법으로 750 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼에 대한 소거활성은 Blois의 방법에 따라 측정하였다(18). 시료를 각각의 용매에 녹여 농도별로 희석한 희석액 0.8 mL과 에탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 0.2 mL를 가하여 실온에서 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS Radical-Scavenging 활성 측정은 ABTS + cation decolorization assay방법에 의하여 항산화측정을 하였다(19). 7 mM ABTS(2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup>을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70(±0.02)이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 990 µL에 sample 10 µL를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**Soybean grit 발효 기간에 의한 tyrosine 함량 및 peptide 분자량 분포**

Soybean grit의 수분함량은 9.92%, 입자크기는 851.4 mm이며 bulk density는 0.65 g/cm<sup>3</sup>로 콩 원료와는 다르게 집지 공정을 생략할 수 있어 전처리 공정이 간편화되어 고체발효(solid-state fermentation)를 통한 기능성 발효물 생산에 적합한 소재이다(15).

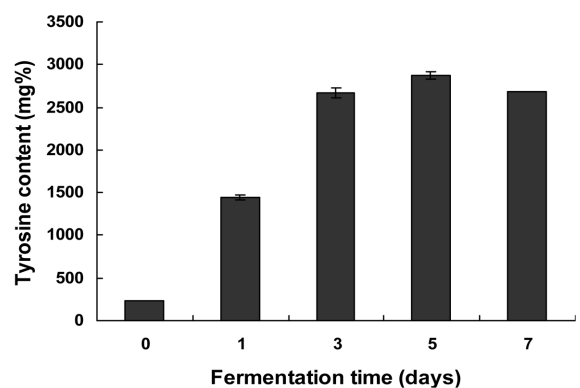
Soybean grit의 고체발효를 통한 발효물의 수분함량은 발효기간에 따른 변화는 거의 없었으며 60% 정도로 나타났다. 발효물은 다량의 점질물을 함유하면서 발효기간이 증가에 따라 발효물의 갈색도가 지속적으로 높아지는 경향을 나타내었다(Table 1). 갈변 물

질은 항산화성과의 깊은 연관이 있으며 갈변 반응 초기에 항산화성 물질이 거의 형성된다는 보고(35)와 갈변도가 증가함에 따라 항산화력이 증가한다고 하여 고분자 물질인 melanoidin 색소가 항산화성의 원인물질이라고 하는 보고가 있다(36). 또한 발효 기간이 증가할수록 청국장 특유의 냄새가 증가하는 것으로 나타났다.

발효 기간에 따라 얻어진 soybean grit 발효물을 이용한 물 추출물의 tyrosine 함량의 변화는 Fig. 1과 같다. 발효 기간에 따른 물 추출물의 tyrosine 함량은 발효 기간 3일까지 급격하게 증가하였으며 발효 5일째 2868 mg%로 최대의 함량을 보인 후 발효 7일에는 약간 감소하는 경향을 보였다. 발효물의 tyrosine함량이 발효 전의 soybean grit보다 10배 이상 높은 값을 보이면서, 고초균에 의한 soybean grit의 발효는 단백질 가수분해효소의 생성을 초래하며, 동시에 발효 기간이 증가하면서 단백질 가수분해물이 증가하는 것을 알 수 있었다. 발효 기간이 장기간 되면서 발효물의 tyrosine함량이 감소하는 이유는 발효물에 존재하는 tyrosine을 포함한 아미노산, 펩타이드와 환원당에 의한 비효소적 갈변화 반응에 기인한 감소로 사료된다. 비효소적 갈변화에 의해 생성된 갈색 물질은 갈색 정도에 비례하여 항산화 활성을 나타내며 그 항산화력이 α-tocopherol보다는 낮았으나 저장 안정성이 있다고 보고하였다(20).

따라서 콩 단백질의 가수분해정도를 나타내는 tyrosine함량이 발효시간 5일에서 최대의 값을 나타내는 것을 고려할 때 발효시간에 따른 soybean grit 발효물의 조성에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

Soybean grit 발효물의 저분자 펩타이드가 다양한 생리활성을 가지는 것으로 사료되어 환외여과를 통해 3,000 Da 이하의 저분자 펩타이드 fraction을 얻었으며, 이들의 펩타이드 분자량 분포를 HPLC를 이용하여 분석하였다. 발효 기간이 증가함에 따라 콩 단백질의 가수분해에 의한 저분자 펩타이드의 함량이 증가한 것으로 나타났다(Fig. 2). 펩타이드 표준물질로 사용한 neurotensin (MW 1.67 kDa), angiotensin(MW 1.03 kDa), paba(MW 0.13 kDa)의 retention time은 각각 9.6분, 11.3분, 13.9분으로 나타났다. Soybean grit



**Fig. 1. Changes in tyrosine content of the soybean grit fermented by B.subtilis HA according to the fermentation time.**

**Table 1. Total polyphenol content and browning pigment of the soybean grit fermented by B. subtilis HA according to fermentation time**

	Fermentation time (days)				
	0	1	3	5	7
EtOH extract	5.91±0.23	16.11±0.41	18.10±0.51	17.28±0.28	17.09±0.64
Water extract	5.71±0.19	14.98±0.63	14.28±0.46	14.87±0.22	14.61±0.11
O.D.(350 nm)	0.18	0.85	1.32	1.54	1.75

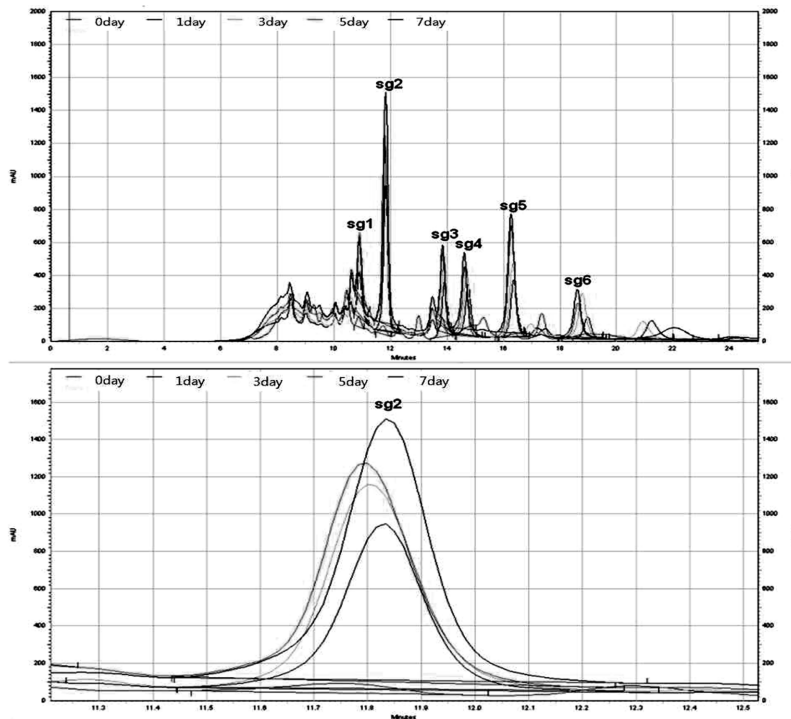


Fig. 2. HPLC chromatography patterns of low molecular weight peptides prepared from fermented soybean grits.

발효물의 주된 펩타이드 분획은 6개였으며 표준 펩타이드의 retention time 사이에서 얻어진 분획은 3개였으며, 이 중에서 retention time이 11.8분인 sg-2 분획물은 발효 기간이 길어짐에 따라 농도가 증가하는 경향을 나타내었다. 표준물질을 이용하여 곡선을 작성하였고 이때 일차 방정식 값은  $y = -337.43x + 486.01 (R^2 = 0.9991)$  로 나타났으며 이에 대비한 sg-2 분획물의 분자량은 878.43 Da 으로 나타났다. sg-2 분획물에 대한 아미노산 서열 분석 등의 추가 실험이 필요하리라 사료된다.

**혈전 용해능 변화**

혈전 용해 효소는 혈관의 혈액순환을 방해하는 혈전(fibrin) 물질에 대해 분해능을 갖는 효소로써 혈전이 축적되어 발생하는 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화, 협심증 등의 각종 순환계 질병의 예방에 효과가 있다고 알려진 효소이다(21). 혈전 용해 효소는 serine protease로 분류되며, 이는 대두 발효물의 발효시간이 증가되면서 단백질분해효소가 증가와 밀접한 관련이 있다고 사료된다(22). Soybean grit 발효물의 발효 기간에 따른 혈전 용해 효소의 활성은 발효 기간이 증가하면서, 비례적으로 효소 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 발효 초기에는 효소 활성이 없었으나 발효 1일째 19.87 unit/g의 활성을 보였으며 발효 5일째 30 unit/g 이상의 활성을 보였으며 이후 완만히 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3). 대두 발효물의 혈전 용해 효소는 일반적으로 고초균의 종류에 따라 차이를 보이며, 콩 원료의 형태에 따른 약간의 차이를 볼 수 있다. Soybean grit를 이용하여 고초균 *Bacillus firmus* NA-1으로 발효시킨 발효물의 물 추출물의 경우 혈전 용해 효소가 24 시간 까지 증가하다가 발효 기간이 증가되면서 완만하게 감소하는 경향을 보였다고 보고하였다(23). 청국장에서 분리된 여러 *Bacillus* sp.를 이용한 고초균 발효에서 얻어진 콩 발효물로부터 얻어진 혈전용해효소는 차이가 있었다(13). 이는 대두의 고체발효 시에 사용하는 고초균의 종류에 따라서 혈전용해 효소의 생

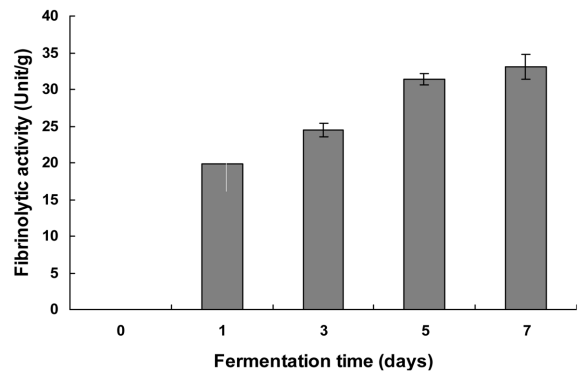


Fig. 3. Changes in fibrinolytic activity of the soybean grit fermented by *B. subtilis* HA according to the fermentation time.

산 양상에 차이가 있다는 사실을 보여 주고 있다. 따라서 soybean grit를 이용한 고초균 발효에서 발효기간이 혈전용해효소의 활성에 영향을 미치며, 발효기간이 5일 정도에서 높은 혈전용해효소 활성을 갖는 발효물을 얻을 수 있다고 사료된다.

**가수분해효소활성 변화**

Soybean grit의 기간별 발효에 따른 가수분해효소 활성의 변화를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Protease 효소 활성의 경우 발효 초기에는 효소 활성이 나타나지 않으나 발효 기간이 증가할수록 효소 활성이 증가하는 경향을 보였다. 이는 In 등(24)이 *Bacillus* sp. b01 균주를 이용한 청국장에서의 protease 효소 활성은 발효 9일까지 완만한 증가를 보였다는 보고와, Choi 등(25)이 *Bacillus subtilis* 균주를 이용한 청국장 메주 제조 시 protease 효소활성이 발효 7일까지 급격한 증가를 보인 후 14일 후부터 급격히 감소한다고 보고한 것과 비교할 때 유사한 결과를 나타냈다.

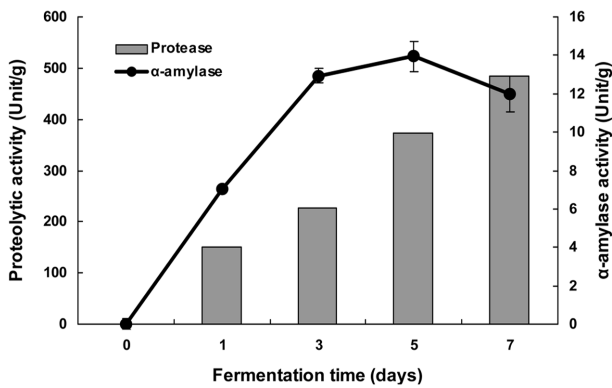


Fig. 4. Changes in proteolytic activity and  $\alpha$ -amylase activity of the soybean grit fermented by *B. subtilis* HA according to the fermentation time.

$\alpha$ -Amylase 효소 활성 역시 발효 기간에 따라 점차 효소 활성이 증가하여 발효 5일째 최대의 활성을 보였으며 그 이후 감소하였다. *Bacillus* 균주를 이용한 청국장 발효 시  $\alpha$ -amylase의 활성이 발효 6일까지 증가를 보이다 그 이후 감소한다는 보고(24)가 있으며, 썩 추출물을 첨가한 청국장에서  $\alpha$ -amylase 효소 활성이 발효 7일까지 증가를 보이다가 차츰 감소한다는 보고가 있었다(25). 이는 soybean grit의 고초균 발효 시에 발효 기간이 길어질수록  $\alpha$ -amylase 효소 활성이 낮아지는 경향과 일치하는 결과를 보였다.

따라서 soybean grit를 이용하여 고초균 발효물을 제조할 때 발효 기간을 5일 정도 수행하는 것이 대두 펩타이드 함량, 혈전 용해 효소, protease 효소 활성 및  $\alpha$ -amylase 효소 활성이 최대화 되는 것으로 사료된다. 그러나 soybean grit 발효물의 제조 시에 발효 기간이 3일 이상 경과되는 경우 생성되는 청국장 특유의 발효취와 비효소적 갈변화에 의한 어두운 색깔은 발효물의 품질을 저하시키는 요인이 되고 있다.

**총 폴리페놀함량 측정**

식물성 식품 속에 함유되어 있는 많은 생리활성 물질 중 페놀 화합물은 가장 많이 함유되어 있으며, 또한 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. Soybean grit 발효물의 총 폴리페놀 함량을 Table 1에 나타내었다.

Soybean grit 발효물은 주정 추출물이 물 추출물보다 총폴리페놀 함량이 전반적으로 높게 나타났다. 물 추출물에서는 발효 초기에 5.71 mg/g으로 나타났으나 발효기간이 1일 경과하면서 3배 정도 증가된 14.98 mg/g를 나타냈으며 주정 추출물도 발효 초기 5.91 mg/g에서 발효기간이 1일 경과하면서 16.11 mg/g으로 증가하였으며 발효 3일째 18.10 mg/g으로 가장 높은 함량을 가지는 것으로 나타났다. 이는 폴리페놀 화합물이 원료 전처리 및 발효에 의한 대두 조직 변화 등의 이유로 쉽게 추출되어 함량이 높아진 것이라 사료되며, 이와 함께 불용성 폴리페놀 화합물이 고분자 화합물로부터 분리되어 유리 폴리페놀 화합물로 분해되었을 것으로 사료된다(26).

발효 기간 7일까지 총 폴리페놀 함량의 증가가 없이 거의 일정한 값을 나타냈으며 soybean grit의 물 추출 가능한 최대의 총 폴리페놀 함량은 14.5 mg/g이며 주정 추출은 18.10 mg/g이라 나타났다. Lee 등(1)은 콩 삶은 물을 첨가한 청국장 제조 시 폴리페놀 함량이 671.65 mg% 함유하고 있다고 보고하였으며 발효과정중 항산화 활성이 높은 유리 phenolic acid 함량이 증가하였다고 보고하였다.

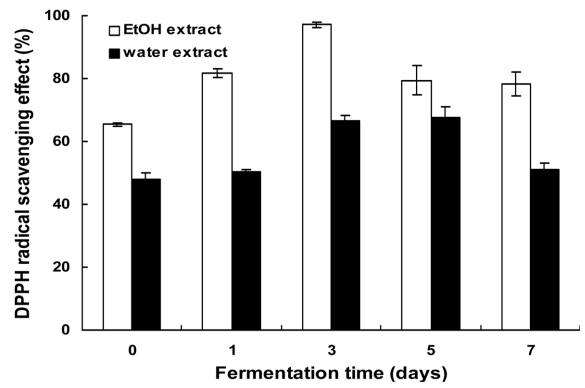


Fig. 5. DPPH radical scavenging effects of the soybean grit fermented by *B. subtilis* HA according to fermentation time. Sample concentration is 100 mg/mL.

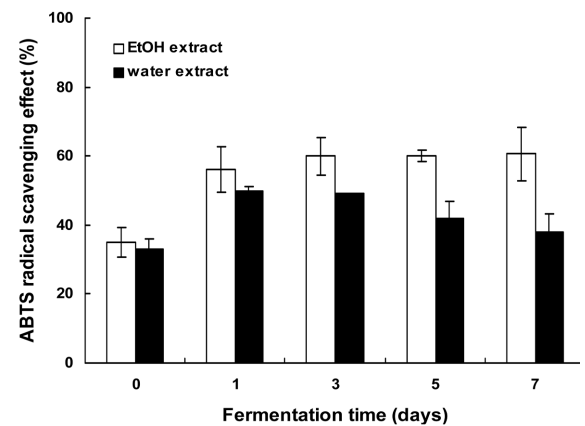


Fig. 6. ABTS radical scavenging effects of the soybean grit fermented by *B. subtilis* HA according to fermentation time. Sample concentration is 10 mg/mL.

**DPPH 라디칼 소거능**

식품 유래 항산화물질의 일반적인 항산화력은 수소공여 기전이다. 수소 공여능 항산화물질의 특징은 hydroxyl기를 하나 이상 함유하고 있는 환구조(ring)와 메틸기나 비극성 탄화수소 사슬 구조와 같은 비극성기를 가지고 있는 것이다. 식품에 함유되어 있는 폴리페놀계 물질이 이와 같은 분자 구조적 특징을 측정하는 대표적인 항산화 물질이다. 수소 공여능을 측정하는 대표적인 방법인 DPPH는 free radical에서 특유의 색을 나타내지만, 전자나 수소원자에 의해 전자가 짝이 되어 비라디칼이 되면 특유의 색이 사라지게 된다. 이 원리를 이용하여 수소공여를 하는 물질의 수소 혹은 전자 공여능을 측정하여 항산화능을 측정하는 방법이다(27).

DPPH 라디칼 소거능을 이용한 시료의 항산화력을 측정할 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 시료의 소거활성은 시료 100 mg/mL의 농도에서 주정 추출물이 물 추출물보다 높은 소거 활성을 가지는 것으로 나타났으며 이는 총 폴리페놀 함량 결과와 유사하다. 주정 추출물의 경우 발효 초기 60%가 조금 넘는 소거활성을 보였으나 발효 시간이 경과할수록 소거능이 증가하여 발효 3일째 90%가 넘는 활성을 보이고 이후 차츰 감소하였다. 또한 물 추출물도 발효 시간이 경과할수록 소거능이 증가하여 발효 5일째 60%가 넘는 활성을 보이고 이후 감소하였다. Park 등(28)은 발효 대두 식품의 DPPH 소거능을 측정 결과 200 mg/mL의 농도

에서 된장(50.54%) > 메주(18.61%) > 청국장(17.08%) 순으로 소거능이 나타났다고 보고하였다.

발효 기간의 증가에 따른 항산화능의 증가는 발효 과정 중에 생성되는 대사산물들에 의한 작용이라는 보고가 있으며(29), isoflavones의 대사물질 및 peptide와 유리 아미노산등의 화합물들의 효과로 사료된다.

### ABTS 라디칼 소거능

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 ABTS<sup>+</sup>이 생성되면 시료의 항산화력에 의해 ABTS<sup>+</sup>이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 ABTS<sup>+</sup>의 소거활성능을 측정할 수 있다. ABTS 라디칼의 소거능은 발효 전보다 발효 후가 높았으며 이는 DPPH 라디칼 소거능 결과와 유사한 결과이다. 또한 주정 추출물이 물 추출물보다 전반적으로 소거능이 높게 나타났으며 이는 총 폴리페놀 함량 결과와 관련이 있으리라 사료된다. 또한 된장이나 일본의 Okara Koji 및 인도네시아의 tempeh에서 발효 시 단백질 분해가 일어나 항산화 활성이 증가하였다는 보고가 있으며(30,31), Chen 등(32)은 대두 단백질  $\beta$ -conglycinin에서 6개의 항산화성 펩타이드 조각들을 분리하였는데, 5-16개의 아미노산 잔기로 이루어졌고, N-말단 부분에 Val 또는 Leu을, 그리고 Pro, His 또는 Tyr 순열이 포함되어 있다고 보고하였다. Marcuse(33,34)는 cysteine을 제외한 다수의 아미노산이 잠재적인 항산화효과를 가진다고 보고하였다. 따라서 발효물에 증가된 펩타이드 함량은 발효물의 항산화 효과에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

## 요 약

Soybean grit를 이용하여 *B. subtilis* HA에 의한 고체발효를 통해 얻어진 발효물의 발효 시간에 따른 생리활성물질의 변화 및 항산화능을 평가하였다. 발효시간이 증가함에 따라 혈전분해효소 활성 및 protease 활성은 계속적으로 증가하는 경향을 보였으며,  $\alpha$ -amylase 활성은 발효 5일에서 최대값을 나타내었다. Tyrosine 함량은 발효 5일에서 최대값을 보였으며, 콩 가수분해물중에서 분자량 3,000 Da 이하의 분자량을 갖는 콩 펩타이드 및 갈변화색소는 발효시간이 증가함에 따라서 증가하는 경향을 보였다. Soybean grit 발효물의 총 폴리페놀함량은 주정 추출물이 물 추출물보다 전반적으로 높게 나타났으며 주정 추출물은 발효시간 3일째 18.10 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 항산화능을 나타내는 DPPH 라디칼 소거능은 발효시간 3일째 가장 높은 값을 보였으며, ABTS 라디칼 소거능은 발효 기간이 증가함에 따라 대조군에 비해 증가되었다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

## 문 헌

- Lee KH, Ryu SH, Lee YS, Kim YM, Moon GS. Changes of anti-oxidative activity and related compounds on the *cheonggukjang* preparation by adding drained boiling water. Korean J. Food Cookery Sci. 21: 163-170 (2005)
- Lee HJ. Health functional peptides from soybean foods. Korea Soybean Digest 15: 16-22 (1998)
- Kim SY, Kim WU. Studies on the changes of protein, peptide and amino acid during preparation. Korean J. Agric. Chem. 8: 11-20 (1967)
- Pak VV, Koo MS, Lee NR, Oh SK, Kim MS, Lee JS, Kwon DY. Hypocholesterolemic soybean peptide (IAMP) inhibits HMG-CoA reductase in a competitive manner. Food Sci. Biotechnol. 14: 727-731 (2005)
- Kim HJ, Bae IY, Ahn CW, Lee SY, Lee HG. Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. Peptides 28: 2098-2103 (2007)
- Shin ZI, Ahn CW, Nam HS, Lee HJ, Lee HJ, Moon TH. Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 230-234 (1995)
- Shon DH, Lee KA, Kim SH, Ahn CW, Nam HS, Lee HJ, Shin JI. Screening of antithrombotic peptides from soybean paste by the microplate method. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 684-688 (1996)
- Kim SE, Kim HH, Kim JY, Kang YI, Woo HJ, Lee HJ. Anti-cancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins. Bio-factors 12: 151-155 (2000)
- Dong Wang, Lijun Wang, Fengxue Zhu, Jiye Zhu, Xiao Dong Chen, Lei Zou, Masayoshi Saito, Lite Li. *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of *douchi* (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). Food Chem. 107: 1421-1428 (2008)
- Lee CH, Moon SY, Lee JC, Lee JY. Study on the antioxidant activity of soybean products extracts for application of animal products. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 24: 405-410 (2004)
- Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Kee DS, Kim HB. Antioxidant activity of substances extracted by alcohol from *cheonggukjang* powder. Korean J. Microbiol. 37: 177-181 (2001)
- Seo JH. Modulation of functional properties of poly- $\gamma$ -glutamic acid by chemical modification. Ph.D thesis, Keimyung University, Daegu, Korea (2007)
- Oh SM, Kim CS, Lee SP. Characterization of the functional properties of soy milk cake fermented by *Bacillus* sp. Food Sci. Biotechnol. 15: 704-709 (2006)
- Oh SM, Jang EK, Seo JH, Ryu MJ, Lee SP. Characterization of  $\gamma$ -polyglutamic acid produced from the solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus* sp. Food Sci. Biotechnol. 16: 509-514 (2007)
- Jang EK, Seo JH, Park SC, Yoo BS, Lee SP. Characterization of mucilage produced from the solid-state fermentation of soybean grit by *Bacillus firmus*. Food Sci. Biotechnol. 16: 722-727 (2007)
- Kim HJ, Lee JJ, Cheigh MJ, Choi SY. Amylase, protease, peroxidase, and ascorbic acid oxidase activity of *kimchi* ingredients. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 1333-1338 (1998)
- AOAC. Official Methods of Analysis. 17<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA, p.17 (2000)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1198-1200 (1958)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannalà A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio. Med. 26: 1231-1237 (1999)
- Yamaguchi N, Naito S, Yokoo Y, Fujimaki M. Changes in anti-oxidative activity of non-salted soybean miso during maturation. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 407-412 (1982)
- Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *cheonggukjang*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 1-5 (1995)
- Yoo CK, Seo WS, Lee CS, Kang SM. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *cheonggukjang*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 507-514 (1998)
- Seo JH, Lee SP. Production of fibrinolytic enzyme from soybean grits fermented by *Bacillus firmus* NA-1. J. Med. Food 7: 442-449 (2004)
- In JP, Lee SK, Ahn BK, Chung IM, Jang CH. Flavor improvement of *cheonggukjang* by addition of *Yucca* (*Yucca shidigera*) extract. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 57-64 (2002)

25. Choi BD, Lee SK, Yun SE, Joo HK. Effect of mugwort extract on the quality and the changes of chemical compositions of the *cheonggukjang* prepared with frozen soybean. *Agric. Chem. Biol.* 41: 510-515 (1998)
26. Lee JJ, Kim CS, Kim SH, Huh CS, Baek YJ. Changes of polyphenol contents in unripe apples according to heat treatments. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 147-152 (1999)
27. Nieva MM, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114 (2000)
28. Park JW, Lee YJ, Yoon S. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays. *Korean J. Food Culture* 22: 353-358 (2007)
29. Shon MY, Lee J, Choi JH, Choi SY, Nam SH, Seo KI, Lee SW, Sung NJ, Park SK. Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *cheonggukjang*. *J. Food Compos. Anal.* 20: 113-118 (2007)
30. Matsuo M. *In vivo* antioxidant activity of Okara *koji*, a fermented Okara, by *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Biochem. Bioch.* 61: 1968-1972 (1997)
31. Matsuo M, Nakamura N, Shidoji Y, Muto Y, Osawa T. Anti-oxidative mechanism and apoptosis induction by 3-hydroxyanthranilic acid, an antioxidant in Indonesian food, *tempeh*, in the hyamn hepatoma derived cell line, HuH-7. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43: 249-259 (1997)
32. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. Antioxidant activity of designed peptides based on the anti-oxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agr. Food. Chem.* 44: 2619-2623 (1996)
33. Marcuse R. Anti-oxidative effect of amino-acids. *Nature* 186: 886-887 (1960)
34. Marcuse R. The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 39: 97-103 (1962)
35. Lee JW, Park CK, Do JH. Antioxidative activity of the water soluble browning reaction products from Korean red ginseng. *J. Ginseng Res.* 29: 44-48 (2005)
36. Kirigaya M, Kato H, Fujimaki M. Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products. Part 2. Antioxidant activity of non-dialyzable browning reaction products. *J. Agr. Chem. Soc. Jpn.* 43: 484-491(1969)