

고초균을 이용한 조직대두단백의 고체 발효 기간에 따른 라디칼 소거 활성 및 물성 평가

김지은 · 이삼빈[†]

계명대학교 식품가공학과, 전통 미생물자원개발 및 산업화 연구센터

Evaluation of Radical Scavenging Activity and Physical Properties of Textured Vegetable Protein Fermented by Solid Culture with *Bacillus subtilis* HA According to Fermentation Time

Ji-Eun Kim and Sam-Pin Lee[†]

Dept. of Food Science and Technology and The Center for Traditional Microorganism Resources (TMR), Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

Textured vegetable protein (TVP) was fermented by the solid-state fermentation using *Bacillus subtilis* HA and biologically active compounds were produced by fermentation for 7 days. The longer fermentation time resulted in the color change of fermented TVP with strong dark red and yellow color. Melanoidin production rapidly increased until fermentation for 48 hr, but did change afterwards. The 70% ethanol extract of TVP fermented for 24 hr showed higher DPPH radical scavenging effect with IC₅₀ of 0.99 mg/mL but longer fermentation did not increase its activity. Also, 70% ethanol extract of TVP fermented for 72 hr indicated higher ABTS radical scavenging effect with IC₅₀ of 1.68 mg/mL. Consistency index in TVP fermented for 48 hr was the highest values with 7.89 Pa·sⁿ. Viscoelastic properties of TVP fermented for 48 hr were maximally enhanced, and viscous value (G'') is higher than the elastic value (G'). The γ -polyglutamic acid (PGA) content was increased by increasing fermentation time with 37.72% of γ -PGA at 168 hr. However, levan content and molecular weight of PGA were decreased with increasing fermentation time from 7.83% to 3.91% and 1649.3 kDa to 1286.8 kDa, respectively.

Key words: textured vegetable protein, solid-state fermentation, radical scavenging activity, viscoelastic property

서 론

대두는 동양에서 간장, 된장, 고추장, 청국장 등의 발효식품의 형태로 널리 이용되어 왔으며, 다양한 풍미와 영양소의 공급원이 되어왔다. 또한 대두 단백질의 다양한 기능성은 식품의 물성 향상과 가공식품소재로 활용되고 있다(1). 최근 대두 단백질의 가수분해물과 대두 발효식품의 다양한 생리활성이 보고되면서 대두는 중요한 식품소재로 이용되고 있다(2). 대두는 대표적인 식물성 단백질원이면서 saponin, phytic acid, isoflavones, hemagglutinins 등의 다양한 생리활성물질을 포함하고 있어 암을 비롯한 성인병 예방 및 치료에 대한 가능성이 보고되고 있다(3).

또한 두류 가공품인 탈지대두분(defatted soy flour), 분리대두단백(soy protein isolate), 농축대두단백(soy protein isolate) 및 조직대두단백(textured vegetable protein) 등도 새로운 단백질식품 소재로 각광받고 있다. 특히 조직대두단

백은 탈지된 대두 분말을 압출 성형하여 조직화한 제품으로 단백질 함량이 높고 지방의 함량은 매우 낮으며 섬유질이 풍부하여 식품가공 및 기능성식품 소재로서의 가치가 있다. 최근에는 조직대두단백을 육제품에 첨가하여 물성을 개선하거나 효소 처리에 의해 단백질에서 생성되는 펩타이드의 기능성에 대한 연구가 진행되고 있으나 고초균 발효를 통한 발효물의 기능성 평가에 대한 연구는 미비한 실정이다(4).

특히 조직화된 대두단백질은 가열과 조직화과정을 거치면서 다양한 모양으로 제품화되면서 가공적성이 우수하며 또한 호기적 조건의 고체 발효에 유리한 특징을 갖는다. 특히 고초균을 이용한 고체 발효(solid-state fermentation) 시 침지 공정을 생략할 수 있어 간편하게 기능성 발효물 생산을 생산할 수 있는 적합한 소재로서 보고되었다(5).

대두 발효식품은 발효과정 중에 식품 고유의 갈색화 반응이 효소적 조건 또는 비효소적 조건에서 다양하게 일어나고 있다. 비효소적 갈변화 반응은 당류와 아미노화합물간의

[†]Corresponding author. E-mail: splee@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5554, Fax: 82-53-580-5554

maillard 반응이며 효소적 갈색화 반응은 아미노산이 tyrosinase에 의하여 산화되어 결국 melanin이 된다. 이때 관여하는 발효 미생물에 따라 색깔이 달라지고, 원료의 종류에 따라 다소 다르나 발효 중 색깔의 40~50%가 이루어진다고 보고 있다(6). Maillard 반응의 최종 단계에서 갈색을 형성하는 melanoidin은 색소 이외에 풍미와 향산화성에도 기여하는 것으로 보고되고 있다(7). 향산화식품 소재 개발의 관심이 더욱 증대되면서 대두 발효식품의 향산화 활성에 관한 많은 연구가 진행되고 있는 실정이다. 대두 및 대두 발효 식품의 향산화 물질로는 갈변 물질 이외에도 chlorogenic acid, isochlorogenic acid, caffeic acid, isoflavone, 저분자 펩타이드 등이 알려져 있다(8).

Bacillus 균주에 의한 발효된 대두 발효식품은 균주가 생산하는 효소의 작용에 의해 대두 단백질이 분해되고 끈끈한 점질물이 생성되어 그 특유의 맛과 향을 낸다. 대두 발효식품에서 생성되는 점질물(γ -PGA)은 글루탐산의 γ -카복시기와 글루탐산의 α -아미노기가 아마이드 결합된 γ -폴리펩타이드로 미생물에 의해서 생산되는 아미노산계 폴리머이다. 지금까지 *Natrialba aegyptiaca*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus magaterium*, *Bacillus licheniformis* 등의 균주가 생산하는 것으로 보고되고 있으나, 대두 발효 미생물인 *Bacillus subtilis*에 의해서 생성되는 γ -PGA가 가장 일반적이다(9). γ -PGA의 보고된 효능으로는 면역 기능 증강(10), 세포내 세균 및 바이러스 감염에 대한 억제효능 및 암세포 사멸 효과(11), 세포벽보호 및 향산화 효과(12), 갈습 흡수 촉진(13) 등이 있으며 보습성이 뛰어나 식품뿐만 아니라 화장품 소재로도 각광받고 있는 기능성 소재이다.

대두의 고초균 발효물은 다량의 단백질 가수분해물을 함유하고 있어서 발효기간에 따른 비효소적 갈색화 반응이 최종 발효제품의 색상, 품질 및 생리활성물질 생산에 영향을 줄 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 대두보다 가공적성이 뛰어난 조직대두단백을 이용하여 고초균에 의한 고체 발효를 장기간 수행하였고 이에 따라 생산된 발효물의 품질, 향산화 활성과 γ -PGA 함량 및 물성을 평가하여 기능성 성분들이 강화된 조직대두단백 발효물을 생산하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

원료인 조직대두단백(textured vegetable protein, TVP)은 Archer Daniels Midland Co.(Decatur, IL, USA)로부터 구입하여 밀봉한 후 암소에서 보관하여 사용하였다. 용매인 pretanol은 Duksan 화학(Ansan, Korea)에서 구입하였으며, HPLC에 사용된 water와 acetonitrile은 HPLC 등급용 용매(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)와 ABTS(2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)는 Sigma사(St. Louis,

MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

스타터 배양액 제조

재래식 청국장에서 분리한 후 한국미생물보존센터에 기탁한 *B. subtilis* HA(KCCCM 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 24시간 동안 배양하여 스타터로 사용하였다.

조직대두단백의 고체발효

250 mL 비커에 조직 대두 단백질 25 g과 원료 무게의 1.5배에 해당하는 증류수를 첨가한 후 autoclave(MLS-3020, Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균한 뒤 *B. subtilis* HA starter 1%를 접종하여 항온 발효조에서 42°C에서 기간별로 발효하여 동결 건조하여 사용하였다.

색도 및 수용성 추출물의 갈색도 측정

동결 건조된 조직대두단백 발효물 2 g에 증류수 18 mL을 가하여 상온에서 30분간 교반 추출하여 1,000×g에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 취한 다음 상등액 1 mL을 screw cap test tube의 cap(PYREX, diameter 13 mm)에 담아 colorimeter(Color Reader, CR-10, MINOLTA, Osaka, Japan)를 이용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값을 측정하였다. 이때 사용한 표준 백색판은 L=97.37, a=0.12, b=1.82이었으며, ΔE 값은 백색판의 L, a, b값과 시료 L, a, b값과의 차이값을 이용하여 계산하였다. 시료의 갈색도는 상등액 1 mL을 1.5 mL cuvettes에 담아 spectrophotometer(Uvikon, Kontron Co., Ltd., Milano, Italy)를 이용하여 UV-VIS spectra(scanning range, 200~550 nm; scanning, 1 nm)와 갈색도(300 nm)를 측정하였다.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

DPPH radical 소거능 측정

동결 건조된 발효물 분말 2 g에 물과 70% 주정을 각각 200 mL을 첨가하여 진탕 배양기를 이용하여 25°C에서 120 rpm의 속도로 12시간씩 3회 추출하였다. 추출물을 여과지를 이용하여 여과한 뒤 감압농축한 후 동결건조 하여 향산화 측정을 위한 시료로 사용하였다. DPPH 라디칼에 대한 소거 활성은 Blois의 방법(14)에 따라 측정하였다. 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. 각 시료의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 IC₅₀ 값으로 나타내었다. 이때 상대 활성의 비교를 위하여 대조군으로 BHT, BHA, Vit-C를 사용하였다.

ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+[·] cation decolorization assay 방법(15)에 의하여 시행하였다. 7 mM ABTS(Sigma Chemical Co.)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+[·]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. 상대 활성 비교를 위한 대조군으로는 Vit-C와 trolox를 사용하였다.

발효물의 점도 측정

동결건조된 TVP 발효물 5 g에 증류수 45 mL 첨가하여 균질화 후에 여과 체(sieve, 0.99 mm)를 이용하여 여과시킨 시료를 제조하였다. 여과액 13 mL을 취하여 원통형점도계(HAAKE RheoStress 1, Karlsruhe, Germany)에 spindle (Rotor DG43 DIN 53544 Titan)을 장착하여 measuring cup DG43을 사용하여 측정하였다. 측정온도는 20°C에서 전단속도($\dot{\gamma}$)는 1~100 sec⁻¹의 범위에서 점도 측정을 통해서 유동특성을 알아보고, 점도도 지수는 power law model로 측정하였다(16).

Power law model: $\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$

σ 는 전단응력(shear stress, Pa), K는 점도도 지수(consistency index, Pa·sⁿ), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate, s⁻¹), n은 유동성 지수(flow behavior index)이다.

점질물 함량 및 성분 분석

동결 건조된 TVP 발효물 5 g에 100 mL의 증류수를 첨가하여 균질화 한 후 여과 체(sieve, 0.99 mm)를 이용하여 여과한 다음 1,500×g에서 20분간 원심분리하여 균체 및 불용성 성분을 제거하고 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 2배 부피의 isopropanol을 첨가하여 고형분을 침전시킨 후 회수하여 60~70°C 진공감압건조기에서 하루 동안 건조 후 건조무게를 측정하였다.

점질물에 함유된 레반의 함량을 측정하기 위하여 건조된 점질물을 1% 용액으로 제조하여 1% oxalic acid를 동량 가한 후 100°C에서 15분간 가열한 후 22,500×g에서 5분간 원심한 뒤 레반 가수 분해물을 포함하는 상층액을 회수하였다. 회수한 용액을 0.45 µm syringe filter(Minisart RC 15, Sartorius, Goettingen, Germany)로 여과한 다음, 여액 20 µL를 HPLC(Knauer Co., Berlin, Germany)에 주입하여 정량하였다. HPLC 분석조건은 40°C로 유지시킨 column (Shodex Asahipak NH₂P 50, Kawasaki, Japan)을 이용하여 이동상을 70% acetonitrile로 유속 1.0 mL/min의 속도로 흘려주었고 RI detector를 이용하여 검출하였다. Fructose를 농도별로 주입하여 각 농도별에 따른 peak 면적을 이용하여 표준곡선을 작성하였다(17).

발효물의 점탄성 측정

B. subtilis HA 균주를 이용한 TVP 발효물을 동결건조한 후 분말을 5% 점질물 용액으로 만든 후 동적 점탄성을 측정하였다. 점탄성 측정은 20°C로 설정된 원통형점도계에 spindle(Platte PP35Ti, 3.5 cm diameter, 2°)을 장착하여 measuring plate P61을 사용하여 측정하였다. TVP 발효물의 탄성율(elastic modulus, G')과 점성율(viscous modulus, G'')은 0~1 Hz의 범위 내에서 frequency sweep에 의하여 측정하였다.

γ-PGA(γ-polyglutamic acid) 분자량 및 함량 측정

건조한 점질물을 0.1 M Na₂SO₄/0.05 M NaN₃(glacial acetic acid로 pH를 4로 조정) 용액에 1% 되게 녹인 다음, 원심분리 후 상등액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 GPC(gel permeation chromatography)로 분석하였다. 분석 조건은 검출기로 RI를 이용하였으며, GPC column은 Shodex SB 805 HQ(Kawasaki, Japan)를 이용하여 이동상을 0.1 M Na₂SO₄/0.05 M NaN₃로 유속은 1.0 mL/min의 속도로 흘려주었다(18). 표준곡선은 각기 다른 분자량(130, 400, 770, 1200 kDa)을 가진 dextran(American Polymer Corporation, Mentor, OH, USA)을 이용하여 작성하였다. γ-PGA의 함량은 정제한 γ-PGA를 표준물질로 사용하여 GPC 분석을 실시하고 생성된 peak area를 이용하여 계산하였다.

통계처리

실험 결과는 SPSS statistical package program(V.17.0)을 이용하여 평균과 표준오차(mean±SE)를 구하였으며, 각 집단 간 평균치 차이를 검증하기 위하여 one way-ANOVA 및 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 결과에 대한 검증은 p<0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

TVP 발효물의 색도 변화

TVP 발효물의 색도 변화를 Hunter's color values 측정한 결과는 Table 1과 같다. 발효 전 TVP는 L값(명도) 56.47, a값(적색도) -3.71, b값(황색도) 6.54로 나타났으며 발효가 시작되면서 L값은 점차 감소하였고 a, b 값은 증가하였다. 발효 168시간째 L값은 46.10, a값은 1.81, b값은 36.66으로 나타나 발효 시간의 증가로 인해 색이 어두워지고 적색과 황색이 진행되는 것으로 나타났다.

Kim(19)은 한국 전통 된장의 숙성 중 색도 변화를 측정한 결과 제조 직후에 비하여 L, a, b 값이 모두 감소하였다고 보고한 바 있으나 숙성 과정이 매우 긴 것을 감안할 때 본 실험과 약간의 차이가 있을 것으로 추측된다. 또한 Kwak 등(20)은 숙성 온도가 높을수록 색도의 차이가 큰 것이 변색 관련 효소의 최적 활성에 대한 온도의 영향으로 판단하였다. 대두 발효식품의 숙성 중 변화는 maillard reaction, enzy-

Table 1. Hunter's color values of TVP fermented by *Bacillus subtilis* HA for 7 days

Fermentation time (hr)	L (lightness)	a (redness)	b (yellowness)	ΔE
0	56.47±0.01 ^{al}	-3.71±0.01 ^a	6.54±0.01 ^a	41.24±0.01 ^a
12	53.34±0.01 ^b	-3.14±0.03 ^b	12.30±0.01 ^b	44.27±0.01 ^b
24	51.58±0.01 ^c	-2.68±0.01 ^c	15.76±0.01 ^c	45.95±0.01 ^c
48	49.36±0.03 ^d	-2.13±0.01 ^d	21.50±0.03 ^d	48.11±0.03 ^d
72	47.91±0.01 ^e	-1.19±0.03 ^e	27.25±0.04 ^e	49.49±0.01 ^e
120	47.38±0.01 ^f	-0.02±0.03 ^f	32.87±0.07 ^f	49.99±0.01 ^f
168	46.10±0.02 ^g	1.81±0.10 ^g	36.66±0.05 ^g	51.33±0.03 ^g

¹⁾Each value is mean±SD (n≥3). Means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

matic browning reaction 및 ferrychrichin 생성에 의한다고 알려져 있으며 갈변 현상은 산소, 금속이온, 각종 염, 온도 영향을 받으며 특히 균주의 영향을 크게 받는다고 알려져 있다(21). 색도는 발효물의 품질 평가에 중요한 인자가 되며 냄새와 더불어 관능성에 상당한 영향을 미칠 수 있으므로 매우 중요하고 발효 기간이 길어질수록 관능적 품질이 낮을 것으로 생각된다.

Maillard reaction은 거의 모든 식품에서 일어날 수 있는 갈변반응으로서 식품가공이나 저장과정 중에 일어날 수 있는 비효소적 갈변 반응이다. 된장이나 간장을 발효 숙성하는 과정에서 아미노산과 당이 반응하여 갈색의 중합체인 melanoidin 색소가 형성되는데, melanoidin은 강력한 항산화 작용이 있으며, 암을 예방한다고 알려져 있다(22).

TVP 발효물의 수용성 추출물의 갈색도 변화를 300 nm에서 흡광도를 측정하여 Fig. 1에서 나타내었다. 발효가 시작되면서 melanoidin이 생성되기 시작하여 발효 48시간째 까지 급격하게 증가하며 그 이후에는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. Hondo(23)는 된장을 공기 중에 방치하면 된장의 갈변이 촉진되며, 된장의 갈변은 온도에 의해 영향을 받는데 30°C에서의 갈변속도를 1로 보면 35°C에서는 2.45로 10°C 온도차로 갈변속도가 3.5배 촉진된다고 보고한 바 있다. 또한 갈변 물질의 항산화성에 관하여 Yamaguchi 등(24)은 갈변 반응 중간 생성물인 reductone의 수소 공여능에 의한 것이라 추정하였고, Lee 등(25)은 maillard 반응물질이 경시적으로 증가하지 않으므로 항산화성 물질은 갈변반응 초기에 거의 형성된다고 보고하였다. 반면에 Kirigaya 등(26)은 갈변도가 증가함에 따라 항산화력이 증가하며 고분자 물질인 melanoidin 색소가 항산화성의 원인물질로 추측된다고 보고하였다.

DPPH radical 소거 활성

DPPH는 hydrazyl의 질소 원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들임으로서 자체의 정색성을 잃게 되는 성질을 이용하여 항산화 활성을 측정할 수 있게 된다. DPPH radical 소거 활성 방법은 일종의 전자 공여능을 측정하는 방법으로 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화 활성 측정이 가능하다(27).

TVP 발효물의 물과 70% 에탄올 추출물의 DPPH radical

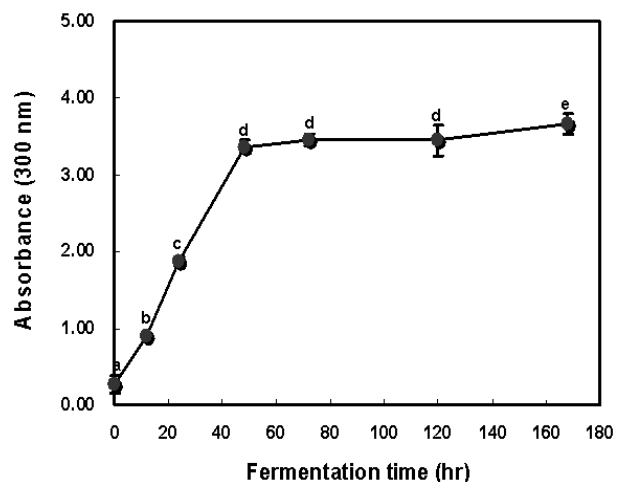


Fig. 1. Changes in melanoidin production of TVP fermented by *Bacillus subtilis* HA for 7 days. Each value is mean±SD (n≥3). Means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

소거 활성 측정 결과를 Table 2에 나타내었다. 발효 전 증자 TVP는 IC₅₀ 값은 물 추출물이 2.68 mg/mL, 70% 에탄올 추출물은 2.34 mg/mL로 나타났으며 발효가 진행되면서 소거 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 발효 24시간째 IC₅₀ 값이 물 추출물은 1.22 mg/mL, 70% 에탄올 추출물은 0.99 mg/mL으로 가장 우수한 소거 활성을 나타내었고 발효시간이 길어져도 활성이 증가하지 않는 것으로 나타났다.

Park 등(28)은 대두 발효식품의 DPPH radical 소거 활성 측정 결과 200 mg/mL의 농도에서 된장(50.54%)>메주(18.61%)>청국장(17.08%) 순으로 소거 활성이 나타났다고 보고하였고 Kim과 Lee(29)는 soybean grit 발효물의 발효 기간에 따른 DPPH radical 소거 활성 측정 결과 발효 3일째 가장 활성이 우수하며 100 mg/mL 농도에서 60%가 조금 넘는 활성을 나타내었다고 보고하였다. 이와 비교해보면 TVP 발효물의 소거 활성이 다른 대두 발효식품보다 우수하다는 사

Table 2. DPPH radical scavenging effect of TVP fermented by *Bacillus subtilis* HA for 7 days

Fermentation time (hr)	IC ₅₀ ¹⁾ (mg/mL)	
	Water extract	70% EtOH extract
0	2.68±0.05 ^{d2)}	2.34±0.01 ^d
12	1.88±0.06 ^c	1.78±0.24 ^c
24	1.22±0.07 ^a	0.99±0.13 ^a
48	1.35±0.10 ^{ab}	1.27±0.02 ^{ab}
72	1.57±0.06 ^{abc}	1.44±0.09 ^{bc}
120	1.45±0.18 ^{abc}	1.37±0.03 ^{ab}
168	1.81±0.17 ^{bc}	1.27±0.31 ^{ab}
BHT ³⁾	2.62±0.92 µg/mL	
BHA ⁴⁾	9.63±0.31 µg/mL	
Vit-C	6.38±0.50 µg/mL	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH radical at 30 min after starting the reaction.

²⁾Each value is mean±SD (n≥3). Means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

³⁾Butylated hydroxy toluene.

⁴⁾Butylated hydroxy anisole.

실을 알 수가 있다.

발효에 의한 radical 소거 활성의 증가는 발효 과정 중에 생성되는 펩타이드와 갈변화 물질, 점질물과 같은 생리활성 물질에 기인한 복합적인 작용이라는 보고(30)가 있으며 또한 isoflavone aglycone 형태인 genistein과 daidzein에 의한 작용이라는 보고가 있다(31).

ABTS radical 소거 활성

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방지하여 ABTS+이 생성되면 시료의 항산화력에 의해 ABTS+이 소거되어 radical 특유의 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 ABTS+의 소거 활성을 측정할 수 있다. TVP 발효물의 ABTS radical 소거 활성은 발효 전보다 발효 후가 높았으며 이는 DPPH radical 소거능 결과와 일치하였다(Table 3).

발효 전 TVP의 물 추출물과 70% 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값은 각각 4.82, 4.86 mg/mL로 나타났으며 발효에 의해 소거 활성이 증가하여 물 추출물은 발효 72시간째 IC₅₀ 값이 2.17 mg/mL, 70% 에탄올 추출물은 1.68 mg/mL으로 항산화 활성이 가장 높았으나 발효 시간이 길어지면서 감소하는 경향을 보였다.

Kim과 Lee(29)는 soybean grit 발효물의 ABTS radical 소거 활성 측정 결과 에탄올 추출물이 10 mg/mL의 농도에서 60% 정도의 활성을 보인다고 보고하였다. 된장이나 일본의 Okara koji 및 인도네시아의 tempeh 발효 시 단백질 분해가 일어나 항산화 활성이 증가하였다는 보고(32)가 있으며 Chen 등(33)은 대두 단백질 β-conglycinin에서 6개의 항산화 활성 펩타이드 조각들을 분리하였는데, 5~16개의 아미노산 잔기가 포함되어 있다고 보고된 바 있다. 대두 발효식품은 발효 균종, 발효 및 숙성기간과 갈변물질의 생성 정도에 따라 항산화 활성이 다르며 일반적으로 대두나 증자대두에 비해 대두발효식품은 토코페롤 함량은 낮으나, 발효미생물이

Table 3. ABTS radical scavenging effect of TVP fermented by *Bacillus subtilis* HA for 7 days

Fermentation time (hr)	IC ₅₀ ¹⁾ (mg/mL)	
	Water extract	70% EtOH extract
0	4.82±0.16 ^{c2)}	4.86±0.21 ^c
12	2.94±0.08 ^b	2.82±0.03 ^b
24	2.64±0.05 ^b	2.25±0.17 ^a
48	2.78±0.19 ^b	2.33±0.22 ^{ab}
72	2.17±0.37 ^a	1.68±0.09 ^{ab}
120	2.97±0.01 ^b	2.14±0.61 ^a
168	2.71±0.24 ^b	2.62±0.27 ^{ab}
Vit-C	67.29±5.94 µg/mL	
Trolox	57.55±1.28 µg/mL	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of ABTS radical.

²⁾Each value is mean±SD (n≥3). Means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

생성하는 β-glucosidase의 작용에 의한 isoflavone aglycones(genistein, daidzein) 증가로 항산화 효과가 증가한다는 보고가 있다(34). 대두 발효식품 중 청국장에서의 genistein과 daidzein의 함량은 각각 796.15 µg/g, 401.68 µg/g 정도 함유하고 있다고 보고된 바 있으며 그 함량은 발효 기질 및 균주에 따라 큰 차이가 있다(35).

점조도와 점질물 함량 변화

B. subtilis HA를 이용한 장기간 TVP 발효 시 점조도 변화와 생산되는 점질물 함량 변화는 Fig. 2와 같다. TVP 발효물의 점조도는 발효 48시간째 7.89 Pa·sⁿ으로 가장 높았고 이후에는 감소하는 것으로 나타났다. 점질물 함량은 발효 24시간째 26.49%(w/w)로 가장 높은 함량을 보였고 48 시간까지 그 함량을 유지하다 이후에는 소량 감소하는 것으로 나타났다. 이는 발효 시간이 길어짐에 따라 효소에 의해 점질물의 일부분이 가수분해 되어 점조도가 감소되고 점질물 함량이 감소되는 것이라 여겨지며, Ashiuchi 등(36)은 청

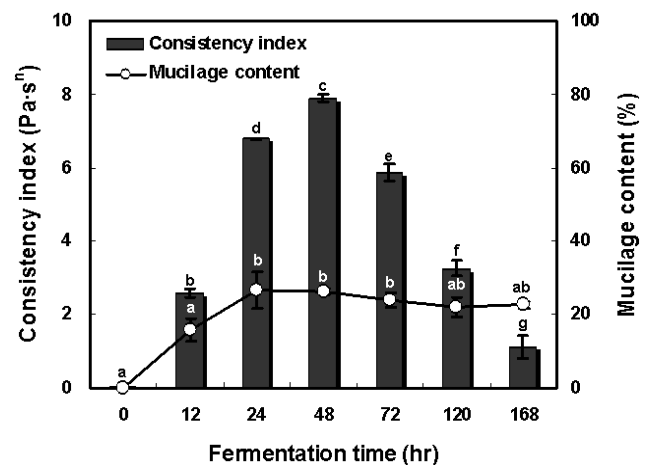


Fig. 2. Consistency index and mucilage content of TVP fermented by *Bacillus subtilis* HA for 7 days. Each value is mean±SD (n≥3). Means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

국장 점질물의 분해효소인 poly- γ -glutamate depolymerase가 균체 외 효소로서 생성되어 점질물을 분해시켜 점조도를 저하시킨다고 보고하였다. 따라서 대두 가공품인 TVP를 이용하여 고체발효를 수행하는 경우에 다량의 점질물 생산 및 고점도의 발효물을 얻기 위해서는 단기간에 발효를 수행하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

점탄성 변화

동결건조 된 TVP 발효물을 5% 농도로 제조하여 점질물의 점탄성 특성을 알아보았다. 발효 시간에 따른 점성과 탄성의 변화에는 차이가 있었으며 전반적으로 TVP 발효물은 탄성(G')보다 점성(G'')이 높은 것으로 나타났다(Fig. 3). 발효 초기인 12시간 후에 발효물의 점탄성은 매우 낮으며 발효 시간이 증가함에 따라 점탄성 모두 높아져 발효 48시간째 최대치를 나타내었다. 그 후 점탄성은 급격하게 감소하여 발효 초기와 유사한 값을 나타내었다. 이러한 결과는 점질물에 포함되어 있는 γ -PGA의 분자량이 점질물 용액의 점탄성에 영향을 미치는 것이라 추측된다. Oh 등(37)은 발효 비지로부터 얻은 점질물을 이용하여 점탄성을 측정한 결과 *Bacillus* 균주에 따른 점탄성에 차이가 있음을 보고하였는데 *B. subtilis* GT-D 균주의 경우 점성이 탄성보다 약간 높은 것으로 나타나 본 실험에 사용한 *B. subtilis* HA 균주와 유사한 것으로 나타났다. 앞으로 여러 고초균들에 의해서

생산된 점질물 또는 γ -PGA의 점탄성의 특성과 분자량간의 관계에 대한 더 많은 연구가 필요할 것이라 생각된다.

γ -PGA, levan 함량 및 γ -PGA 분자량

미생물의 발효에 의해 생산된 고분자 물질들은 강한 점성을 지니고 있을 뿐만 아니라, 생분해성이 높고 인체에 무해한 점 등의 산업적 응용이 용이한 장점을 지니고 있다. *Bacillus*속이 생산하는 biopolymer는 γ -PGA와 levan form fructan이 혼합되어 이루어진 점질성의 고분자로, dextran과 유사하여 물에 잘 녹으며 알코올에 의해 침전된다(38).

TVP의 발효기간에 따른 고체 발효 시 생산된 점질물에 함유된 γ -PGA와 levan의 함량과 생산된 γ -PGA의 분자량을 측정된 결과는 Table 4와 같다. TVP 발효물에서 생산된 점질물 중의 γ -PGA 함량은 발효시간이 길어짐에 따라 증가하였으며, 발효 48시간에서 31.56%에서 168시간에는 37.72%를 함유하고 있었다. Oh 등(37)이 보고한 콩 우유 부산물인 비지의 고초균 발효 시 glutamate 5%를 첨가하였을 때 62.4 g/kg으로 가장 많은 γ -PGA를 생산하였다고 한 결과와 비교해 볼 때 TVP 발효물이 생산하는 γ -PGA 함량이 많은 것으로 나타났다.

미생물이 생산하는 다당류 중 fructose로 구성된 다당류를 fructan이라 하며, 이중 대표적인 levan(poly-D-fructan)은 fructose가 β -2,6 결합과 β -2,1 결합으로 연결된 생체고분자이다(39). *B. subtilis* HA 균주는 levan을 생산하는 균주로 TVP 발효물의 점질물에서도 levan이 검출되었다. 발효 시간에 따른 TVP 발효물 중 levan 함량은 발효 12시간째 7.83%에서 발효시간이 경과될수록 감소하는 것으로 나타났다. 미생물에 의한 levan의 생산은 탄소원의 농도, 당 종류에 따른 저해, 질소원의 농도, salt의 영향 등 영양적 요인과 배양온도, 압력, pH 등의 환경적 요인 등 여러 가지 요인에 의해 영향을 받는다고 보고되고 있다(40).

발효 기간에 따라 생산된 점질물중인 γ -PGA의 분자량 변화를 GPC를 이용하여 측정하였다(Table 4). 발효 초기인 12시간째 γ -PGA의 분자량은 1649.3 kDa이었으나 발효 시간이 경과할수록 분자량이 감소하여 발효 168시간째 γ -PGA 분자량은 1286.8 kDa로 나타났다. 발효 초기에 생산된

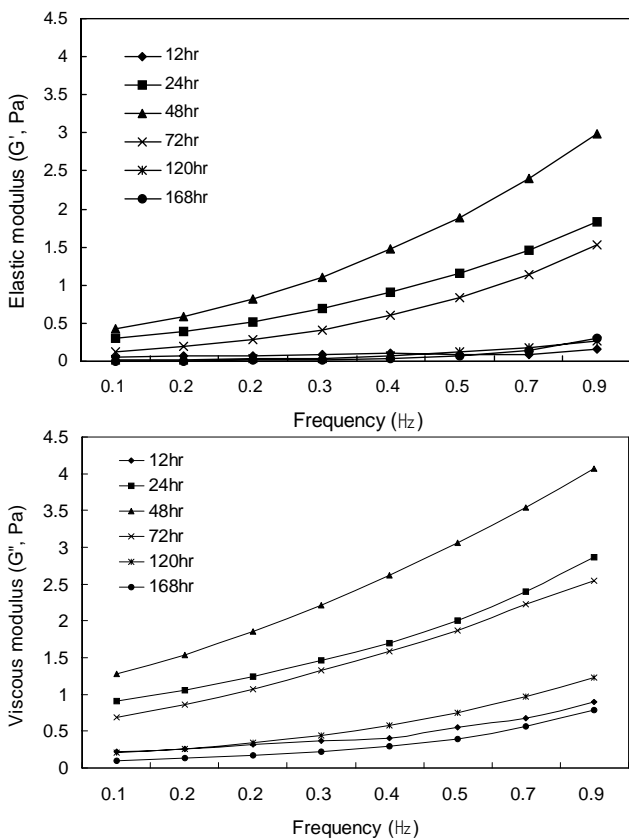


Fig. 3. Elastic and viscous modulus of TVP fermented by *Bacillus subtilis* HA for 7 days.

Table 4. γ -PGA and levan content and molecular weight of mucilage obtained TVP fermented by *Bacillus subtilis* HA for 7 days

Fermentation time (hr)	γ -PGA content (%)	Levan content (%)	Molecular weight of γ -PGA (kDa)
12	7.00±0.11 ^{a1)}	7.83±0.15 ^d	1649.3
24	20.52±0.70 ^b	5.33±0.16 ^c	1533.1
48	31.56±0.97 ^c	5.35±0.04 ^c	1512.6
72	35.66±1.65 ^d	4.56±0.06 ^b	1464.6
120	35.75±0.03 ^d	4.25±0.18 ^b	1396.4
168	37.72±0.48 ^d	3.91±0.03 ^a	1286.8

¹⁾Each value is mean±SD (n≥3). Means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

점질물은 isopropanol 혼합에 의해 쉽게 멍쳐졌으나 발효 시간이 경과할수록 점질물의 상태가 잘 멍쳐지지 않고 퍼지는 형태가 되어 점질물의 물성에 차이가 있음을 나타냈다. 이는 고초균이 TVP로부터 생산하는 고분자 점질물인 γ -PGA와 levan의 조성 및 PGA depolymerase 효소 의해 γ -PGA 분자량의 감소 등에 의한 복합적인 결과라 추측되며, Yao 등 (41)은 *Bacillus subtilis* NX-2에 의해 생산된 γ -PGA가 γ -PGA depolymerase 효소에 의한 가수분해로 배양 시간이 경과할수록 분자량이 작아진다고 보고하였다.

요 약

조식대두단백을 이용하여 *B. subtilis* HA에 의한 장기간 동안 고체 발효를 통해 얻어진 발효물의 품질, 항산화 활성 및 물성 변화를 평가하였다. 발효시간에 따라 발효물의 색도는 L값은 감소하고 a, b 값은 증가하였으며 수용성 추출물의 갈색도는 발효 48시간까지는 서서히 증가하나 그 후에는 변화가 없는 것으로 나타났다. TVP 발효물의 물과 70% 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거 활성 측정 결과 발효 24시간째 70% 에탄올 추출물의 IC₅₀값이 0.99 mg/mL로 가장 활성이 우수하였고 발효시간이 길어져도 활성이 증가하지 않았다. 또한 ABTS radical 소거 활성도 70% 에탄올 추출물이 발효 72시간째 IC₅₀값이 1.68 mg/g으로 가장 높았다. TVP 발효물의 점조도는 발효 48시간째 7.89 Pa·sⁿ으로 가장 높았고 그 후에는 감소하는 것으로 나타났으며 점질물 함량은 발효 24시간째 26.49%로 가장 높은 함량을 보인 후 감소하는 것으로 나타났다. 발효물의 점탄성은 발효 48시간째 가장 높았으며 이후 감소하였고 탄성(G')보다 점성(G'')이 높은 것으로 나타났다. γ -PGA 함량은 발효시간이 증가하면서 증가하는 경향을 보이면서 168시간에 37.72% 생산되었고, 분자량은 발효시간이 경과될수록 감소하였다. Levan 함량은 발효 초기인 12시간째 7.83%에서 발효시간이 경과할수록 감소하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

- Shim JJ, Seo JH, Soh HS, Yoo BS, Lee SP. 2003. Rheological properties of soymilk and curd prepared with micronized full-fat soy flour. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 75-81.
- Song HN, Jung KS. 2006. Quality characteristics and physiological activities of fermented soybean by lactic acid bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 38: 475-482.
- Heo S, Lee SK, Joo HK. 1998. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional *Chungkook-jang*. *Agric Chem Biotechnol* 41: 119-124.
- Kim EB, Kim EJ, Lee HN, Lee MK, Oh JS, Kim SO, Lee SY. 2008. The quality characteristics of soy cultures using textured soy protein treated with different enzymes. *Korean J Food Culture* 23: 507-513.
- Lee MK. 2009. The quality characteristics of soy wan-ja using proteolytic enzyme treated textured soy protein. *MS Thesis*. Chungang University, Seoul, Korea.
- Park SK, Kyung KH. 1986. Pigment-forming bacteria in the presence of L-tyrosine and their possible role in the browning of fermented soybean products. *Korean J Food Sci Technol* 18: 376-381.
- Eiserich JP, Shibamoto T. 1992. Antioxidative activity of volatile heterocyclic compounds. *J Agric Food Chem* 42: 1060-1063.
- Im SK. 2002. Antioxidative activity of Doenjang prepared by different conditions and isolation of antioxidative peptides. *PhD Dissertation*. Yonsei University, Seoul, Korea.
- Seo JH, Kim CS, Lee SP. 2008. Physicochemical properties of poly- γ -glutamic acid produced by a novel *Bacillus subtilis* HA isolated from *Cheonggukjang*. *J Food Sci Nutr* 13: 354-361.
- Hahm JH, Lee TY, Lee JS, Park C, Sung MH, Poo H. 2004. Antitumor effect of poly- γ -glutamic acid by modulating cytokine production and NK cell activity. Abstract No. H003 presented at 2004 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, Seoul, Korea. Oct 21-22.
- Lee JS, Park C, Poo H, Kim CJ, Sung MH. 2004. Enhancement of immunogenicity for the target antigen expressed on the surface of lactic acid bacteria with poly- γ -glutamic acid. Proceeding of the 3rd Japan-Korea Joint Meeting on Molecular Display, Kobe, Japan, July 22. p 9-11.
- Lee NK, Hahm YT. 2005. Antioxidative characteristics of browning reaction products of glucose-poly- γ -glutamate (Glu-PGA) obtained from amino-carbonyl reaction. *Korean J Food Sci Technol* 37: 812-815.
- Lee MS, Kang JI, Kim HS. 2006. Effect of γ -PGA (poly- γ -glutamic acid) supplement on calcium absorption and bone metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 255-261.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
- Pellegrini N, Proteggente A, Pannlala A, Yang M, Rice-evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Genc M, Zorba M, Ova G. 2002. Determination of rheological properties of *boza* by using physical and sensory analysis. *J Food Eng* 52: 95-98.
- Kang TH, Jung SJ, Kang SA, Jang KH, Jang EK, Kim SH, Kim IH, Kim SH, Rhee SK, Chun UH. 2002. Preparation of levan oligosaccharides by acid hydrolysis and its application in growth of lactic acid-producing bacteria. *Korean J Biotechnol Bioeng* 17: 137-141.
- Hong X, Min J, Hui L, Dingqiang L, Pingkai O. 2005. Efficient production of poly(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. *Proc Biochem* 40: 519-523.
- Kim JK. 2004. Changes of components affecting organoleptic quality during the ripening of traditional Korean soybean paste. *J Fd Hyg Safety* 19: 31-37.
- Kwak EJ, Park WS, Lim SI. 2003. Color and quality properties of *Doenjang* added with citric acid and phytic acid. *Koran J Food Sci Technol* 35: 455-460.

21. Kim MH, Kang WW, Lee NH, Kwon DJ, Kwon OJ, Chung YS, Hwang YH, Choi UK. 2007. Changes in quality characteristics *Cheonggukjang* made with germinated soybean. *Korean J Food Sci Technol* 39: 676-680.
22. Morales FJ, Jimenez S. 2001. Free radical scavenging capacity of maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem* 72: 119-125.
23. Hondo S. 1993. Browning and color of miso, brightness and darkness. *J Brew Soc* 88: 41-49.
24. Yamaguchi N, Naito S, Yokoo Y, Fujimaki M. 1982. Changes in antioxidative activity of non salted soybean miso during maturation. *J Food Sci Technol* 29: 407-412.
25. Lee JW, Park CK, Do JH. 2005. Antioxidative activity of the water soluble browning reaction products from Korean red ginseng. *J Ginseng Res* 29: 44-48.
26. Kirigaya M, Kato H, Fujimaki M. 1969. Studies on anti-oxidant activity of nonenzymatic browning reaction products. *J Agric Chem Soc Jpn* 43: 484-491.
27. Nieva MM, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
28. Park JW, Lee YJ, Yoon S. 2007. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on anti-oxidant activities determined by different assays. *Korean J Food Culture* 22: 353-358.
29. Kim JE, Lee SP. 2009. Production of bioactive components and antioxidative activity of soybean grit fermented with *Bacillus subtilis* HA according to fermentation time. *Korean J Food Sci Technol* 41: 179-185.
30. Shon MY, Lee J, Choi JH, Choi SY, Nam SH, Seo KI, Lee SW, Sung NJ, Park SK. 2007. Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *Cheonggukjang*. *J Food Compos Anal* 20: 113-118.
31. Ryu SH. 2001. Studies on antioxidative effects and anti-oxidative components of soybean and Chongkukjang. *PhD Dissertation*. Inje University, Gimhae, Korea.
32. Matsuo M, Nakamura N, Shidoji Y, Muti Y, Esaki H, Osawa T. 1997. Antioxidative mechanism and apoptosis induction by 3-hydroxyanthranilic acid, an antioxidant in Indonesian food, *Tempeh*, in the human hepatoma derived cell line, HuH-7. *J Nutr Sci Vitaminol* 43: 249-259.
33. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the anti-oxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 44: 2619-2623.
34. Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Kee DS, Kim HB. 2001. Antioxidant activity of substances extracted by alcohol from *Chungkookjang* powder. *Korean J Microbiol* 37: 177-181.
35. Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. 2001. Some biological activities and isoflavone content of *Chungkukjang* prepared with black beans and *Bacillus* strains. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 662-667.
36. Ashiuchi M, Nakamura H, Yamamoto T, Kamei T, Soda K, Park C, Sung MH, Yagi T, Misono H. 2003. Poly- γ -glutamate depolymerase of *Bacillus subtilis*: production, simple purification and substrate selectivity. *J Mol Catal* 23: 249-255.
37. Oh SM, Jang EK, Seo JH, Ryu MJ, Lee SP. 2007. Characterization of γ -polyglutamic acid produced from the solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus* sp. *Food Sci Biotechnol* 16: 509-514.
38. Jang EK, Seo JH, Park SC, Yoo BS, Lee SP. 2007. Characterization of mucilage produced from the solid state fermentation of soybean grit by *Bacillus firmus*. *Food Sci Biotechnol* 16: 722-727.
39. Johnes MR, Greenfield PF, Dolle HW. 1991. Byproducts from *Zymomonas mobilis*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 44: 97-121.
40. Han YW. 1990. Microbial levan. *Adv Appl Microbiol* 35: 171-194.
41. Yao J, Jing J, Xu H, Liang J, Wu Q, Feng X, Ouyang P. 2009. Investigation on enzymatic degradation of γ -polyglutamic acid from *Bacillus subtilis* NX-2. *J Mol Catal* 56: 158-164.

(2010년 3월 3일 접수; 2010년 5월 5일 채택)