J Korean Soc Food Sci Nutr
39(8), 1113~1118(2010)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2010.39.8.1113

Bacillus subtilis KC-3 발효두유의 특성과 항산화 및 AGS 인체위암세포의 성장 억제효과

정은정[1] · 김지영[1] · 문숙희[2] · 박건영[1†]

[1]부산대학교 식품영양학과
[2]경남정보대학 식품영양제과제빵계열

Characteristics, Antioxidative Activities and Growth Inhibitory Effects in AGS Human Gastric Adenocarcinoma Cells of Soymilk Fermented by *Bacillus subtilis* KC-3 during Fermentation

Eun-Jung Jeong[1], Ji-Young Kim[1], Suk-Hee Moon[2], and Kun-Young Park[1†]

[1]Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
[2]Dept. of Subdivision of Food Nutrition & Bakery, Kyungnam College of Information and Technology, Busan 616-701, Korea

Abstract

The antioxidative activities and growth inhibitory effects of fermented soymilk (FS) by *Bacillus subtilis* KC-3 (KCCM 42923) in AGS human gastric adenocarcinoma cells were studied during fermentation at pH 5.5, 5.25 and 5.0. The pH of *B. subtilis* KC-3 from Cheonggukjang, decreased from 6.8 to 5.0 during the fermentation. The acidity decreased, but amino and ammonia type nitrogen contents increased significantly as pH decreased. FS at pH 5.0 (FS 5.0) exhibited the highest DPPH free radical scavenging activities among other samples. The hydroxy radical scavenging activity of FS 5.0 was found to be approximately 2.5 times higher than that of the non-fermented soymilk (NFS). The SOD-like activity of FS 5.0 was 32.1% at 1.0 mg/mL and 50.6% at 2.0 mg/mL compared to the NFS of 9.1% and 17.3%, respectively. FS, especially FS 5.0, showed increased anti-cancer effect in AGS human gastric adenocarcinoma cells. These results suggest that soymilk fermented by *B. subtilis* KC-3 has increased antioxidative activities and anticancer effects during fermentation (pH 6.0 to pH 5.0).

Key words: soymilk, *Bacillus subtilis*, antioxidant, AGS human gastric adenocarcinoma cells

서 론

두유의 주원료인 콩은 isoflavone, saponin, phytic acid, trypsin inhibitor, oligosaccharides 등의 기능성 성분이 많이 함유되어 있고 양질의 단백질과 지방질이 풍부해 혈압 조절 작용, 혈전 용해능, 항돌연변이 및 항암작용, 면역증강 효과(1-5), 혈중 콜레스테롤 저하능(6) 등의 다양한 생리활성을 가진다고 알려져 있다. 콩은 발효를 거치면서 균주가 생성하는 효소의 작용으로 콩 단백질이 분해되어 새롭게 생성된 물질인 isoflavone의 aglycone, 유리아미노산, 펩타이드 등을 함유하게 된다(7). 두유, 두부 같은 비발효 식품은 aglycone의 비율이 10% 미만에 불과하지만 청국장, 된장 같은 발효식품은 약 70~80% 정도로 증가한다. Aglycone 형태는 배당체 형태보다 생리활성도 높고 흡수가 빨라서 발효대두식품은 비발효 대두식품보다 여러 생리활성이 강하고 질병예방에 더 효과적이다(8).

두유는 대두를 갈아 만든 음료의 형태로 수용성 단백질과 불포화지방산 및 필수아미노산의 함량이 높아 영양학적으로 우수하지만 특유의 콩 비린내로 인해 이용성이 저하되는 문제점이 있다. 발효두유는 발효를 통해 새로운 풍미를 부여하거나 불쾌취를 제거할 수 있고 소화율도 높일 수 있는 장점이 있다. 시중에 판매중인 발효두유는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lab. bulgaricus*와 같은 유산균을 이용하여 제조한 제품과 사례는 많으나, 두유의 원재료인 콩에서 유래한 *Bacillus subtilis*를 유음료에 적용시킨 사례는 거의 없었다. 청국장에서 분리된 *B. subtilis*는 혈전분해효소를 생산하고 생리활성 물질인 poly-γ-glutamic acid(PGA) 점질물을 생산하는 우수한 균주로 보고되고 있으며(9), 장내 부패균이 생성하는 indole, 발암물질 등의 물질을 감소시키고 흡착시켜 배설시키는 작용을 한다(10). 본 연구에서는 항암기능성

†Corresponding author. E-mail: kunypark@pusan.ac.kr
Phone: 82-51-510-2839, Fax: 82-51-514-3138

이 높은 전남 순창지역의 청국장에서 분리·동정한 *B. subtilis* KC-3(11)를 사용하여 청국장의 기능을 살린 발효두유를 제조하고자 하였다. 청국장은 발효정도에 따라 이화학적 성분 및 γ-GTP 활성이 향상되는데(12), 청국장 유래균으로 발효한 발효두유에서도 발효정도에 따라 성분 및 기능성이 변화하는지 알아보고자 하였다. 이에 본 연구에서는 *B. subtilis* KC-3 발효두유의 발효정도에 따른 특성과 *in vitro* 항산화 및 AGS 인체위암세포의 성장 억제효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

발효두유 및 추출물 제조

(주)동화식품(Yangsan, Korea)에서 첨가물이 들어있지 않은 미국산 콩으로 만든 순 대두유를 구입하여, 고압멸균기로 121°C, 15분간 가열처리하여 멸균한 후 30°C로 냉각하여 실험에 사용하였다. 두유에 접종한 *B. subtilis* KC-3(KCCM 42923)는 전통 청국장에서 분리 동정된 균(11)으로, nutrient broth 배지에서 37°C, 24시간 배양하였다. 멸균된 두유에는 발효에 이용될 glucose를 두유 양의 1%(w/w) 첨가하고 약 10^7/g으로 배양된 균을 1%(v/w) 접종하여 37°C, 100 rpm, shaking water bath에서 발효하였다.

발효가 끝난 두유는 동결건조 시킨 후 이를 마쇄하여 시료의 20배(w/v)의 methanol을 첨가하고 24시간 교반을 3회 반복한 후 여과하였다. 여과물을 회전식 진공농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축해 추출물을 얻고 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 희석하여 사용하였다.

일반 특성 측정

균(*B. subtilis*)수 측정: 발효가 완료된 직후 1 mL의 시료를 무균적으로 취하여 10배수로 희석하여 plate count agar(Difco Co., Detroit, MI, USA) 배지에 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후 집락수를 계수하였다.

pH 및 산도 측정: 발효두유의 pH는 pH meter(TP-93, Toko Chemical Laboratories, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 산도는 두유 1 mL을 취하여 증류수 19 mL에 희석하여 0.1 N NaOH로 pH 8.4가 될 때까지 적정한 후 소비된 NaOH의 mL수를 %로 환산하였다(13).

점도 측정: 점도는 Brookfield 점도계(Viscometer, model DV-I, Brookfield Engineering Lab. Inc., Stoughton, MA, USA)를 사용하여 실온에서 spindle No.3으로 100 rpm, 60초간 회전시킨 후 측정하였다.

아미노태 및 암모니아태 질소 함량: 아미노태 질소 함량은 formol법(14)으로 측정하였다. 시료 2 mL에 증류수 18 mL을 가하여 1시간 동안 상온에서 교반한 후, 중성 formalin (pH 8.4)용액 20 mL를 가한 다음, pH 8.4가 될 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 그 양으로 아미노태 질소의 함량을 측정하였다. 암모니아태 질소는 AM505-K(Asan Pharmaceutical, Hwasung, Korea)에 의한 Indophenol법(13)으로 측정하였다.

항산화 효과 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거효과: 발효두유의 DPPH 소거효과능은 Blois의 방법(15)에 준하여 추출물의 DPPH에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 농도별로 methanol에 녹인 시료 100 µL와 150 µM DPPH 용액 100 µL를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 540 nm에서 ELISA reader(model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 pH에 따른 발효두유의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

Hydroxy radical(·OH) 소거활성: Chung 등(16)의 방법에 따라 10 mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$-ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt(EDTA)에 10 mM의 2-deoxyribose와 농도별 시료용액을 혼합한 다음, 10 mM의 H_2O_2를 첨가하여 Fenton 반응에 따라 37°C에서 4시간 동안 배양한다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid(TCA) 1.0 mL와 1.0% thiobarbituric acid(TBA) 1.0 mL을 첨가하여 끓는 물에서 10분간 반응시킨 다음 냉각시킨 후 520 nm에서 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Superoxide anion dismutase(SOD) 유사활성: Marklund와 Marklund의 방법(17)에 따라 일정 농도의 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer(50 mM Tris+10 mM EDTA, pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl(0.1 mL)로 반응을 정지시킨다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

In vitro 항암효과

암세포 배양: AGS 인체 위암세포(AGS human gasrtic adenocarcinoma cell)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 암세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA)과 10%의 fetal bovine serum(FBS)이 함유된 RPMI 1640배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator(model 3154, Forma Scientific Inc, Marietta, Ohio, USA)에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고, 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리해 원심분리 하였다. 그 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 cell culture flask에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay: 배양된 암세포는 96-well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 180 µL씩 분주하고 시료를 적정 농도로 희석한 후 20 µL 첨가하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 72시간 배양하였다. 여기에 phosphate buffer

saline(PBS)에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 20 μL를 첨가하여 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 그 후 상등액을 제거하고 DMSO 150 μL를 각 well에 가하여 30분간 교반한 뒤 ELISA reader(model 680, Bio-Rad)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(18).

통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 표시하였다. 모든 통계분석은 Statistic Analysis System(v9.1 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

발효에 따른 발효두유의 균수, 산도 및 점도 변화

발효를 위해 첨가한 8.5×10^4 cfu/mL의 *B. subtilis* KC-3는 pH 5.5에서 3.4×10^6 cfu/mL, pH 5.25에서 7.2×10^6 cfu/mL, pH 5.0에서 7.5×10^7 cfu/mL로 나타났다(Fig. 1). 즉, 두유에 접종한 *B. subtilis* KC-3는 pH 저하와 발효시간 증가에 따라 그 균수가 증가함을 알 수 있었다. 이는 Kim 등(19)이 혼합 균주를 이용해 두유를 발효시켰을 때 시간이 지남에 따라 pH가 낮아지고 균수는 증가한다는 결과와 유사하였다. 산도의 경우 발효가 진행됨에 따라 발효 전 0.1%에서 발효 후 pH 5.0에서 0.5%로 높아졌으나, 대표적인 발효유인 요구르트에 비해서는 산 생성이 미흡함을 알 수 있다. 이는 제조된 발효두유 내의 lactic acid와 citric acid의 함량이 우유로 발효된 제품에 비해 현저히 낮은 것에 기인한 것으로 판단된다(20). 일반적으로 유산균으로 발효한 발효유의 경우 pH 4.0~4.2를 나타내고 산도는 1.0~1.1%일 때 가장 양호한 품질을 나타낸다(21)고 하여 본 *B. subtilis* KC-3 발효두유 제품화 시 유산균과 혼합배양 하여 pH를 더 낮추고 산도를 더 높이는 것이 더 적합하다고 사료된다.

일반적으로 요구르트 같은 발효유제품은 소비자의 기호도가 점도에 의해 크게 좌우되므로 발효과정 중의 점도를 측정해보았다. 두유의 점도는 127 cps이었으나, 발효두유는 발효과정에 따라 pH 5.5, 5.25, 5.0에서 각각 325 cps, 621 cps, 712 cps로 측정되었다. 점도는 pH 5.5와 pH 5.25 사이에 점도가 크게 증가해 약간의 curd가 생성되고 적정산도의 변화와 같은 경향을 나타내었고 관능평가에서도 발효가 될수록 새콤한 맛이 증가되는 경향을 보였다. Rasic과 Kurmann (22)은 요구르트의 점도는 요구르트 혼합액의 총 고형분 함량과 사용균주의 단백질 가수분해 정도, slime 생성능력과 산생성력에 영향을 받는다고 보고하였다. 유산균으로 발효한 우유의 점도는 다량의 유기산 생성 및 casein과 유청단백질의 응집으로 인해 높은 점도(130~1930 cps)를 나타냈지만(23), 상대적으로 산 생성이 적은 *B. subtilis*는 점도가 낮게 나타났다.

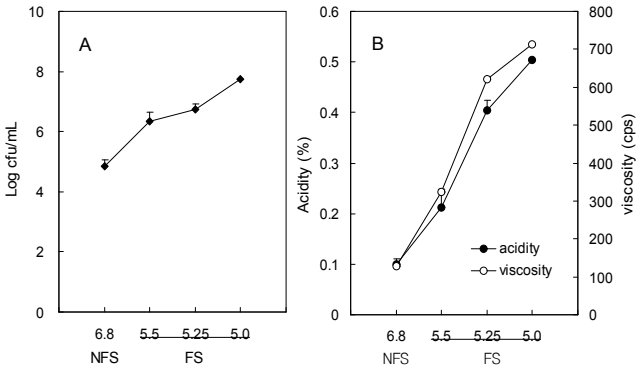

Fig. 1. Changes of cell counts of *B. subtilis* (A) and acidity and viscosity (B) at different pHs during fermentation. NFS: non-fermented soymilk (pH), FS: *B. subtilis* fermented soymilk (pH). All values represent the mean±SD of triplicate determinations.

아미노태 및 암모니아태 질소 함량 변화

아미노태 질소 함량은 단백질이 아미노산의 형태로 분해되는 정도를 나타낸 것으로 단백질가수분해효소의 작용에 의하므로 발효도를 평가할 때 사용되고 있다(24). 아미노태 질소 함량이 두유는 542.5 mg/dL로 나타났으나, 발효가 시작됨에 따라 급격히 증가하여 pH 5.5에서 882 mg%였으며, 그 후 증가속도가 완만해져 pH 5.0까지 1190 mg%를 나타내었다(Table 1). 이는 *B. subtilis*에 의한 두유의 발효는 단백질 가수분해 효소의 생성을 초래하며, 발효시간이 증가하면서 단백질 가수분해물이 증가하는 것을 알 수 있다. 암모니아태 질소는 단백질을 분해하는 과정에서 탈아미노화 반응에 의해 생성되며 암모니아성 질소가 과량 발생하게 되면 부패 혹은 변패의 지표로 사용된다(24). 두유의 암모니아태 질소함량은 129.1 μg/dL가 나타난 반면 발효가 진행되면서 pH 5.0에서는 508.3 μg/dL까지 상승하였다. 이는 Kim 등(25)의 연구에서 *B. subtilis*로 콩을 발효했을 때 아미노태 및 암모니아태 질소가 증가한 것과 유사한 결과를 보였다.

DPPH 및 hydroxy radical 소거활성능 변화

수소 공여능을 측정하는 대표적인 방법인 DPPH는 비교

Table 1. Changes in amino and ammonia type nitrogen contents of non-fermented and fermented soymilk by *B. subtilis* KC-3

	6.8	5.5	5.25	5.0
NH_2-N (mg%)	542.5±1.7[1)]	882.4±10.6	1016.0±12.4	1190.0±16.6
NH_3-N (μg/dL)	129.2±2.8	280.6±9.6	397.2±9.6	508.3±7.2

[1)]All values represent the mean±SD of triplicate determinations.

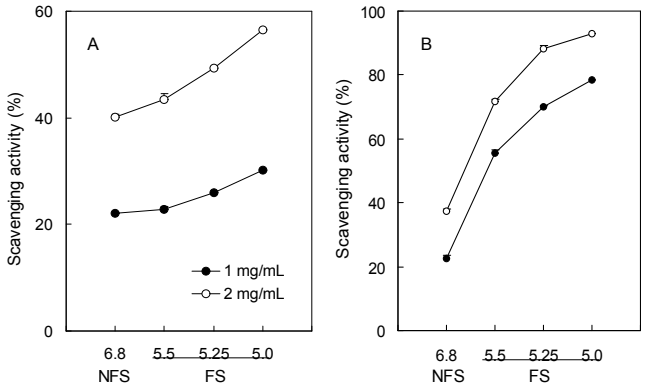

Fig. 2. DPPH radical scavenging effects (A) and hydroxy radical scavenging effect (B) of the non-fermented and fermented soymilk by *B. subtilis* KC-3. All values present the mean±SD of triplicate determinations.

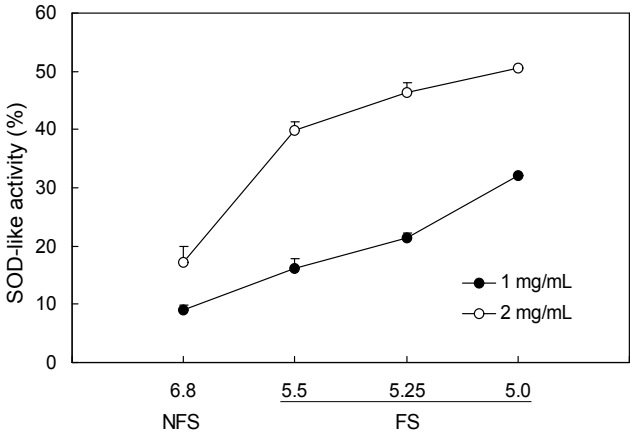

Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD)-like activity of the non-fermented and fermented soymilk by *B. subtilis* KC-3. All values present the mean±SD of triplicate determinations.

적 안정한 free radical로써 짙은 자색을 나타내지만 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 전자가 쌍이 되어 환원되면 특유의 색이 사라지게 되는 것을 이용하여 항산화능을 측정하는 방법이다(26).

DPPH radical 소거능법을 이용하여 발효에 따른 발효두유의 항산화효과 차이를 측정한 결과 발효두유는 농도 의존적으로 소거능을 나타냈다(Fig. 2A). 특히 2 mg/mL에서 두유는 40% 소거능을 나타낸 반면, 발효두유는 56%의 활성능을 보여 발효가 진행될수록 소거능이 증가하는 것으로 나타났다. Shon 등(27)은 발효 기간의 증가에 따른 항산화력의 증가는 발효 중 대사산물의 생성에 의한 작용이라고 보고하였으며, 발효에 따른 DPPH 소거능 증가는 두유 원료인 대두 isoflavone의 대사물질 및 peptide 등의 화합물들의 효과로 사료된다.

Hydroxy radical은 활성산소 중에서 화학적으로 반응성이 가장 크며 생체 내의 산화 원인이 되어 DNA 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있으므로 ·OH 소거활성에 의한 발효두유의 항산화 효과를 측정해 보았다(Fig. 2B). 발효두유는 발효가 진행됨에 따라 ·OH 소거활성이 2 mg/mL 농도에서는 23%에서 78%로 급격히 증가함을 알 수 있었다. 이는 Choi(28)가 *Bacillus*로 발효한 여러 가지 두유에서 80% 이상의 ·OH 소거능을 보인 결과와 유사하였다.

SOD 유사활성능 변화

두유와 발효두유의 메탄올 추출물의 SOD 유사활성 효과를 pyrogallol에 대한 자동산화 반응을 이용하여 측정하였다(Fig. 3). pH가 5.0인 발효두유에서는 2 mg/mL의 농도에서 50.6%의 활성을 보여 두유의 17.3%보다 약 3배 높은 활성을 나타내었다. SOD 유사활성능은 flavonoids 화합물과 페놀성 화합물을 많이 함유할수록 높아지는 것으로 보고되고 있어(29), 발효두유의 SOD 유사활성효과는 발효가 진행될수록 이 같은 화합물이 증가하여 나타난 것으로 사료된다.

AGS 인체위암세포 성장 저해 효과

발효에 사용된 *B. subtilis* KC-3은 다른 *B. subtilis*와 비교하여 AGS 인체위암세포와 HT-29 인체결장암세포에서 가장 우수한 항암효과를 나타냈다고 보고되었다(30). 본 연구에서는 발효두유의 발효정도에 따른 암세포 성장억제 효과 차이를 AGS 인체 위암세포를 이용하여 알아보았다(Fig. 4). pH 5.5, pH 5.25, pH 5.0의 발효두유는 2 mg/mL의 농도에서는 각각 76%, 93%, 95%의 저해율을 보여 두유는 발효가 진행될수록 인체 위암세포 성장 저해 효과를 가지는 것으로 보인다. 이는 Yoon 등(31)이 보고한 유산균 등을 이용하여 발효한 발효유가 인체 후두암세포의 항종양 억제효과를 나타낸 결과와 비슷하다. 또한 *B. subtilis*를 이용한 탈지대두 발효물에서도 AGS 인체위암세포, A-549 폐암세포, Hela 자궁암세포에서 억제효과를 나타내는 것으로 보고되는 것과도 비슷한 결과를 보인다(32). 두유는 발효 시간 경과에 의해

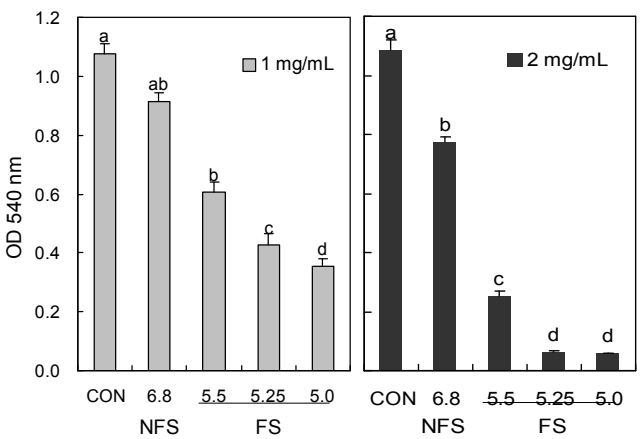

Fig. 4. Inhibitory effect of methanol extracts from non-fermented and fermented soymilk by *B. subtilis* KC-3 on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. All values present the mean±SD of triplicate determinations. [a-d]Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

암세포 성장 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.

요 약

청국장에서 분리한 *B. subtilis* KC-3(KCCM 42923)균을 이용하여 발효한 두유의 발효정도에 따른 이화학적 특성, 항산화효과 및 AGS 인체위암세포 억제효과 차이를 살펴보았다. 발효진행 된 pH 5.5, pH 5.25, pH 5.0 발효두유의 이화학적 특성을 pH, 균수, 산도, 점도, 아미노태 및 암모니아태 질소를 통해 살펴본 결과, 발효가 진행됨(pH 6.8에서 5.0)에 따라 균수는 8.5×10^4 cfu/mL에서 7.5×10^7 cfu/mL까지 증가하고, 산생성과 점도는 높아졌다. 두유는 발효에 의해 단백질이 분해되면서 아미노태 질소 및 암모니아태 질소도 증가하는 경향을 보였다. 발효두유의 항산화 효과를 살펴보기 위해 DPPH, ·OH, SOD 유사활성능을 측정해 본 결과, 두유에 비해 발효두유의 항산화 활성이 높아졌고, 발효진행에 따라 그 활성이 더 증가하여 발효두유는 두유에 비해 항산화 효과를 가지는 것으로 나타났다. 또한 AGS 인체위암세포에서 성장 억제 효과를 가지는 것으로 나타났다. 발효두유는 두유에 비해 항산화 및 AGS 인체위암세포 성장 억제능을 가지며 이는 발효가 진행됨에 따라(pH 감소) 증가하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임

문 헌

1. Wyvratt MJ, Patchett AA. 1985. Recent developments in the design of an angiotensin converting enzyme inhibitors. *Med Res Rev* 5: 483-489.
2. Kim JS. 1996. Current research trends of bioactive function of soybean. *Korea Soybean Digest* 13: 17-24.
3. Sung MK. 1996. The anticarcinogenic properties of soybeans. *Korea Soybean Digest* 13: 19-31.
4. Ryu KJ, Xin Z, Bak SS, Kim BK, Jeon JT, Park KY. 2008. *In vitro* anticancer effect of chungkukjangs from Folk Villages of Sunchang region in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Prev Res* 13: 62-67.
5. Messina M. 1995. Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J Nutr* 125: 567-569.
6. Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuno T, Kimoto M. 1999. Cholesterol-lowering activity of various undigested fraction of soybean protein in rats. *J Nutr* 120: 977-981.
7. Park GS. 2004. Cookwise approach of slow food: focused on traditional fermented sauces. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 20: 317-334.
8. Chung WY, Kim SK, Son JY. 2008. Isoflavones contents and physiological activities of soybeans fermented with *Aspergillus oryzae* or *Bacillus natto*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 141-147.
9. Seo JH. 2007. Modulation of functional properties of poly-γ-glutamic acid by chemical modification. *PhD Dissertation.* Keimyung University, Daegu, Korea.
10. Matsui T, Yoo HJ, Hwang JS, Lee DS, Kim HB. 2004. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *chunggugjang*. *Korean J Microbioly* 40: 355-358.
11. Seo HR, Kim JY, Kim JH, Park KY. 2009. Identification of *Bacillus cereus* in a Chungkukjang that showed high anticancer effects against AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J Med Food* 12: 1274-1280.
12. Kim KM, Kim HR, Park HJ. 2006. The quality characteristics of Chunggugjang prepared by *Bacillus subtilus* NRLSI Ⅳon the different inoculum levels and fermentation times. *Korean J Community Living Science* 17: 123-131.
13. AOAC. 1990. *Official method of analysis*. Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC, USA. p 79.
14. Shin DH, Kim DH, Choi U, Lim MS, An EY. 1998. Changes in microflora and enzymes activities of traditional Kochujang prepared with various raw materials. *Korean J Food Sci Technol* 29: 901-906.
15. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
16. Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 118-123.
17. Marklund S, Marklund G. 1975. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
18. Park JG, Kramer BS, Steinber CJ, Collins JM, Minna JD, Gazdat AF. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetra zolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* 47: 5875-5879.
19. Kim CH, Shin YK, Baick SH, Kim SK. 1999. Changes of oligosaccharide and free amino acid in soy yogurt fermented with different mixed culture. *Korean J Food Sci Technol* 31: 739-745.
20. Lee SY, Morr CV, Seo A. 1990. Comparison of milk-based and soymilk-based yogurt. *J Food Sci* 55: 532-536.
21. Shin YS, Lee KS, Kim DH. 1983. Studies on the preparation of yogurt from milk and sweet potato or pumpkin. *Korean J Food Sci Technol* 25: 666-671.
22. Rasic JL, Kurmann JA. 1978. *Yogurt*. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark. p 369-380.
23. Lee YS, Joo EY, Kim NW. 2005. Antioxidant activity of extract from the *Lespedeza bicolor*. *Korean J Food Preserv* 12: 75-79.
24. Eom SM, Jung BY, Oh HI. 2009. Changes in chemical components of cheonggukjang prepared with germinated soybeans during fermentation. *J Appl Biol Chem* 52: 133-141.
25. Kim DH, Lim DW, Bai S, Chun SB. 1997. Fermentation characteristics of whole soybean meju model system inoculated with 4 *bacillus* strains. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1006-1015.
26. 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.
27. 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.
28. Choi JM. 2009. Protective activity of *Bacillus* sp.-fermented

soymilk from oxidative stress. *MS Thesis*. Pusan National University, Busan, Korea.
29. Lee IS, Lee SO, Kim HS. 2002. Preparation and quality characteristics of yogurt added with *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 411-416.
30. Seo HR. 2009. Isolation and identification of *Bacillus* sp. from cheonggukjang and in vitro anticancer effect of fermented soymilk by *Bacillus* sp. *MS Thesis*. Pusan National University, Busan, Korea.
31. Yoon WH, Nam BR, Kim JM, Kim CH. 2006. Characteristics of functional fermented milk by mixed starters of *Lactobacillus bulgaricus* and *Kluyveromyces marxianus*. *Korean J Food Sci Ani Resour* 26: 252-256.
32. Lee SG, Kim HJ, Lee SP, Lee IS. 2009. Antioxidant and anticancer activities of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUC1. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 657-662.

(2010년 4월 19일 접수; 2010년 4월 26일 채택)