

Bacillus subtilis HJ18-9로 제조한 된장의 페놀성분 및 라디칼 소거 활성의 변화

이경하¹ · 송진² · 장연정² · 이은준³ · 김현주¹ · 오세관¹ · 우관식¹

¹농촌진흥청 국립식량과학원

²농촌진흥청 국립농업과학원

³청운대학교 호텔관광대학

Changes in Phenolic Compounds and Radical Scavenging Activity of Doenjang Prepared by Fermentation with *Bacillus Subtilis* HJ18-9

Kyung Ha Lee¹, Jin Song², Yeon Jeong Jang², Eun Jun Lee³, Hyun Joo Kim¹,
Sea Kwan Oh¹, and Koan Sik Woo¹

¹National Institute of Crop Science and ²National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration

³Department of Hotel Culinary Management, Chung-Woon University

ABSTRACT This study was conducted to investigate changes in isoflavone composition (glycosides and bio-active aglycones) and evaluate the quality characteristics of *doenjang* prepared using different *Bacillus* strains (KACC15935 and HJ18-9). After 60 days of fermentation, β -glucosidase activity of *doenjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-9 was higher than those of other samples. Contents of aglycones (daidzein, genistein, and glycitein) in *B. subtilis* HJ18-9 significantly increased up to $703.90 \pm 11.09 \mu\text{g/g}$. In addition, total phenolic content and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity increased markedly during fermentation. These results suggest that fermentation with *B. subtilis* could be used to increase β -glucosidase activity with a view towards development of functional foods.

Key words: soybean, *doenjang*, isoflavone, *Bacillus subtilis*

서론

장류의 기능성은 콩이나 부재료 자체가 갖는 기능성뿐만 아니라 메주나 장류 발효에 관여하는 미생물이 생산하는 다양한 2차 대사산물과 효소에 의한 것으로 알려졌으며, 발효 과정 중에 단백질과 탄수화물이 아미노산, 당, 유기산, 휘발성 물질 등으로 전환되어 풍미에도 기여한다(1,2). 이는 된장 제조 시 메주를 띄우는 동안 많은 종류의 세균과 곰팡이류가 자연적으로 착생하여 서식하기 때문에 숙성과정에서 미생물들의 대사 작용에 의하여 된장 특유의 품질 특성이 나타나게 된다(3). 최근에는 발효된장에서 항산화 활성, 항돌연변이 활성, ACE 저해 활성, 혈전 용해 활성 등 여러 가지 생리활성이 확인되면서 관심이 증대되고 있다(4).

대두에 함유된 대표적인 항산화 물질은 폴리페놀 화합물과 플라보노이드이다. Chlorogenic acid 및 caffeic acid는 항산화 활성을 나타내는 대표적인 페놀 화합물이며, 대두 isoflavone 또한 강한 항산화 활성을 가진 플라보노이드이

다(5). 대두 isoflavone은 여성 호르몬인 estrogen과 구조와 기능이 유사하여 phytoestrogen으로 불린다. 이는 혈중 콜레스테롤을 낮추고 심혈관 질환, 골다공증을 예방할 뿐만 아니라 폐경기 이후의 각종 증후군을 완화하고 유방암, 전립선암, 난소암, 대장암 등의 예방 효과를 보이는 등 생리적 활성이 활발하게 보고되고 있다(6). Brouns(7)에 의하면 isoflavone은 nonionic passive diffusion 기작에 의하여 흡수되므로 배당체 형태보다 비배당체 형태가 이러한 흡수 메커니즘에 유리하다고 보고되었다.

대두에는 β -glucosidase가 함유되어 있어 대부분 가공식품 제조 중 행해지는 침지과정에서 이 효소에 의해 배당체 형태가 가수분해 되어 비배당체 형태로 전환된다. 또한 된장과 같은 발효식품 제조 시 미생물(*Aspergillus oryzae*, *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis* 등)에 의해 생산되기도 한다(8,9). 이와 같이 장류와 같은 발효 대두식품은 비발효 대두식품보다 isoflavone 비배당체를 많이 함유하고 있어서 생리활성이 강하여 질병예방에 더 효과적이고, 대두가 발효되면서 새로 생성되는 이들 성분들은 사용하는 균주에 따라 성분의 함량이나 생리활성에서 차이가 날 수 있다(10).

국내 된장 관련 연구를 살펴보면 메주나 장류에서의 미생물의 동정과 분리에 관한 연구가 다수 진행되었으며, 특히 된장의 풍미에 관여하는 주요 세균 등 된장발효와 숙성에

Received 21 January 2016; Accepted 22 February 2016

Corresponding author: Koan Sik Woo, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon, Gyeonggi 16429, Korea

E-mail: wooks@korea.kr, Phone: +82-31-695-4084

관여하는 미생물 연구는 많이 이루어지고 있다고 보고하였다(11). 또한 최근에는 발효과정 중 각종 영양 성분의 변화에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으나 아직 균 종류에 따른 isoflavone 등의 영양성분 변화에 기인하는 균의 특성에 관한 연구는 미비한 실정이며 이들을 활용한 가공 특성, 현장에서의 이용 및 산업화 연구는 부족한 실정이다(4).

따라서 본 연구에서는 산업적으로 표준화가 용이하고 기능성이 있는 장류의 starter 표준화를 위하여 α -amylase, cellulase와 같은 세포외 효소분비능이 우수한 *B. subtilis* HJ18-9를 starter로 사용하여 된장을 제조하고 발효기간 동안 isoflavone 함량의 조성 변화와 항산화 활성을 살펴보았다.

재료 및 방법

시험재료 및 된장 제조

본 실험에서 사용된 콩은 대원콩으로 경상북도에 있는 재배농가에서 2013년산을 구입하여 사용하였다. Starter로 사용된 KACC15935는 국립유전자원센터(Jeonju, Korea)에서 분양받은 균으로 전통장에서 분리한 *B. subtilis*이다. *B. subtilis* HJ18-9는 선행연구를 통해 메밀 속성장에서부터 분리된 균으로 β -glucosidase 활성이 있으며 amylase, cellulase 등의 세포외 효소분비능이 우수한 균주이다. 또한 *Candida albicans*, *Salmonella enterica*, *Streptococcus aureus* 등의 항균 활성이 있는 균이다(12). 대원콩은 세척하여 25°C에서 24시간 수침하고 autoclave를 이용하여 증자(121°C, 30 min)하였다. 증자된 콩을 40°C 이하로 무균 작업대에서 냉각한 다음 증자된 콩 무게의 1%의 균을 접종하였다. 즉 증자된 콩 1 kg에 Luria Bertani broth에 10^6 CFU/mL 이상의 농도가 되도록 2차 계대배양 하고 10 mL 배양액을 원심분리(8,000×g, 10 min) 하여 균체를 가라앉혀 상등액은 버리고, 0.88% sodium chloride를 3 mL 넣어 균체를 잘 풀어준 후 골고루 분사하였다. 균 접종한 콩을 스티로폼 박스에 담아 37°C에서 24시간 발효시켰다. 발효시킨 콩을 50°C 송풍건조기에서 약 8시간 건조(건조된 콩의 수분: 8.5~9.5%)하여 완성된 콩알메주로 된장을 제조하고, 콩알메주, 소금 및 물을 각각 34, 15 및 51의 비율로 하여 3.4 kg 된장을 밀폐용기에 담아 28°C에서 60일 동안 발효하였다. 실험은 자연 발효시킨 대조구와 *B. subtilis* KACC 15935, *B. subtilis* HJ18-9를 첨가한 균으로 나누어 진행하였다.

β -Glucosidase 활성 측정

β -Glucosidase 활성 측정을 위한 시료 전처리는 된장 시료 20 g에 80 mL(w/v)의 증류수를 첨가하고 1분간 균질화(400 rpm, POLYTRON® PT 2100 Homogenizers, Kinematica AG, Luzern, Switzerland)한 후 이를 원심분리(8,000×g, 10 min) 하였다. 그 상등액을 취하여 Choi 등

(13)의 방법에 따라 측정하였다. 기질용액은 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 5 mM *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)가 되도록 제조하였다. 이 기질용액 0.6 mL에 시료추출액 0.2 mL를 넣어 반응(37°C, 20 min)시킨 후, 2 M sodium carbonate 용액 0.5 mL를 첨가한 다음 원심분리(15,000×g, 5 min) 하여 상등액을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 후 분해물의 양은 *p*-nitrophenol(Sigma-Aldrich Co.) 표준곡선으로부터 계산하였으며, 효소 활성은 시료 1 g에 의해 1분간 *p*-nitrophenol 1 μ g을 생성하는 능력을 1 unit으로 하였다.

Isoflavone 함량 분석

Isoflavone 함량 분석을 Wang 등(14)의 방법을 사용하였다. 즉, 동결건조 분말 2 g에 acetonitrile 24 mL와 1 M hydrogen chloride 6 mL로 실온에서 1시간 추출하여 여과(Whatman No. 2, Whatman, Clifton, NJ, USA)한 후 3차 증류수로 2배 희석하였고, 0.2 μ m membrane filter로 filtration 시켜 ultra performance liquid chromatography (UPLC, Waters Co., Milford, MA, USA)로 분석하였다. Column은 ACQUITY UPLC®HSS C18 column(1.8 μ m, 2.1×75 mm), 이동상은 0.1% acetic acid를 함유한 10% 메탄올(용매 A)과 0.1% acetic acid를 함유한 메탄올(용매 B)을 사용하였다. 용매 gradient는 용매 B의 농도를 17분간 26%에서 50%로 증가시켰고, 유속은 0.3 mL/min, 주입량은 0.8 μ L, UV detector(254 nm)로 검출하였다.

추출물 제조 및 phenolic acid, flavanol 분석

동결건조 분말 10 g에 80% 메탄올 100 mL와 실온에서 12시간 진탕하고 여과(Whatman No. 2, Whatman)하여 분석용 시료로 사용하였다. Phenolic acid 및 flavanol 분석은 Cho 등(15)의 방법을 사용하였으며, 추출물을 0.2 μ m syringe filter(Whatman)로 여과하여 UPLC(Waters Co.)로 분석하였다. 분석에 사용된 column은 Acquity UPLC®HSS C18 column(1.8 μ m, 2.1×100 mm), 이동상은 10 mM potassium biphosphate(pH 2.5, 용매 A)와 100% 메탄올(용매 B)을 사용하였다. 용매 gradient는 용매 B의 농도를 16분간 0%에서 26%로 증가시켰고, 다시 19분까지 3분간 35%로 증가시켰다. 유속은 0.3 mL/min, 주입량은 0.8 μ L, UV detector(254 nm)로 검출하였다.

총페놀 함량 분석

총페놀 함량은 Singleton 등(16)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu 법으로 측정하였으며, 추출물을 농축하여 100 mg/mL 농도로 조정하여 분석용 시료로 사용하였다. 시료용액 1 mL에 1 mL 2 N Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich Co.)를 가하여 5분간 상온에서 반응시켰다. 혼합용액에 1 mL 10% sodium carbonate를 가하여 상온에서

1시간 방치 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선으로 환산하였고 표준물질로는 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 이용한 표준곡선에 따른 검량선을 작성하여 총페놀 함량을 계산하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성 분석

대표적인 항산화능의 지표로 이용되는 DPPH 라디칼 소거 활성은 Tagashira와 Ohtake(17)의 방법을 변형하여 DPPH(Sigma-Aldrich Co.)에 대한 전자공여 효과로 각 시료의 활성을 측정하였다. 0.1 mM DPPH를 함유한 에탄올 용액 2 mL에 100 mg/mL 농도의 시료용액 0.1 mL를 가해 vortex 하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도의 감소를 측정하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = 1 - \frac{A}{B} \times 100$$

A: absorbance of sample at 517 nm

B: absorbance of control at 517 nm

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 자료 처리는 SPSS program 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 시행하였으며, 각 항목에 대한 평균(mean) 및 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. 처리구 간 유의적인 차이는 $P < 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA를 시행하였으며, Duncan's multiple range test로 그 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

β -Glucosidase 활성 측정

발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 된장의 β -glucosidase 활성 변화를 조사한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 각 시료의 β -glucosidase 활성은 $4.06 \pm 0.29 \sim 10.12 \pm 0.89$ unit/g 범위를 나타내었으며, 모든 처리구에서 발효 50일에 가장 높은 효소 활성을 보였고 HJ18-9 처리구가 발효 초기부터 발효가 끝나는 시점까지 유의적으로 높은 효소 활성을 나타내었다. β -Glucosidase는 isoflavone의 β -glycosidic bond 형태를 체내 이용률이 높은 비배당체 형태로 전환시켜주는 역할을 한다는 연구 결과가 보고된 바 있다(18,19). 또한 Yang 등(20)은 고온이나 강산을 이용한 반응의 경우 반응산물이 무작위적이고 부반응에 의해 효율이 저

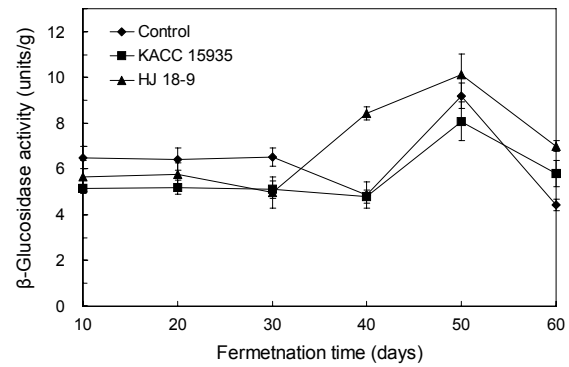
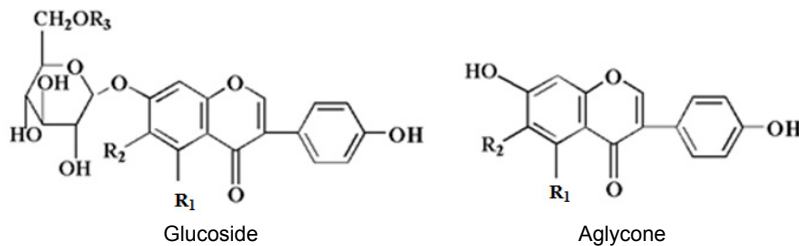


Fig. 1. Change in β -glucosidase activities during *doenjang* fermentation by different *Bacillus* strains.



	Isoflavone	R ₁	R ₂	R ₃
Aglycone	Daidzein	H	H	
	Glycitein	H	OCH ₃	
	Genistein	OH	H	
β -Glucoside	Daidzin	H	H	H
	Glycitin	H	OCH ₃	H
	Genistin	OH	H	H
Malonyl glycoside	6''-O-Malonyldaidzin	H	H	COCH ₂ OOHC
	6''-O-Malonylglycitin	H	OCH ₃	COCH ₂ OOHC
	6''-O-Malonylgenistin	OH	H	COCH ₂ OOHC
Acetyl glycoside	6''-O-Acetyldaidzin	H	H	COCH ₃
	6''-O-Acetylglycitin	H	OCH ₃	COCH ₃
	6''-O-Acetylgenistin	OH	H	COCH ₃

Fig. 2. Chemical structures of isoflavones.

하될 수 있는 반면, 천연물 유래의 β -glucosidase 효소를 활용하는 경우 반응산물의 선택성을 증가시킬 수 있으며 유해한 유기용매의 사용을 감소시킬 수 있다고 하였다. 따라서 본 연구 결과 β -glucosidase가 높게 나타난 HJ18-9 접종구에서 체내 이용률이 높은 기능성 장류를 제조할 수 있을 것으로 기대된다.

Isoflavone 함량 변화

콩에 함유된 이소플라본은 genistein, daidzein, glycitein 3종류의 비배당체(aglycone)와 각각의 배당체인 daidzin, genistin, glycitin 그리고 malonyl화 배당체, acetyl화

배당체의 12종류의 존재가 확인되었다(Fig. 2). 28°C에서 60일 동안 발효시킨 된장 12종의 isoflavone 함량은 Table 1에, 그리고 그 각각의 함량을 네 가지 형태로 나타낸 것을 Fig. 3에 나타내었다. 발효 종료시점인 60일에 대조구, KACC15935, HJ18-9 처리구의 isoflavone 비배당체 함량은 각각 122.10±0.11, 137.78±1.12 및 703.80±11.09 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 이는 발효 10일 차 된장의 비배당체 함량이 44.66±14.43, 73.26±2.02 및 68.52±3.18 $\mu\text{g/g}$ 인 것에 비하여 각각 2.74, 1.88 및 10.27배 높은 전환율을 보인다. 또한 본 연구의 선행연구에서 HJ18-9 균주를 접종하여 청국장을 제조하였을 때 isoflavone 비배당체 함량이 187.00

Table 1. Change in isoflavone contents during *doenjang* fermentation by different *Bacillus* strains ($\mu\text{g/g}$ dry basis)

Isoflavone	Strains	Fermentation time (days)					
		10	20	30	40	50	60
Daidzein	Control	13.60±4.24 ^{Be1)}	21.40±0.99 ^{Ad}	23.05±0.78 ^{AcD}	27.45±0.64 ^{Bc}	32.30±0.28 ^{Cb}	45.55±0.35 ^{Ba}
	KACC15935	20.45±1.34 ^{ABc}	20.30±0.85 ^{Ac}	26.85±7.00 ^{Abc}	31.15±6.72 ^{Bb}	34.10±0.14 ^{Bb}	52.15±0.78 ^{Ba}
	HJ18-9	22.18±1.34 ^{Ad}	30.23±8.10 ^{Ad}	31.43±1.80 ^{Ad}	96.80±0.94 ^{Ac}	191.37±0.14 ^{Ab}	302.04±4.29 ^{Aa}
Genistein	Control	26.10±7.92 ^{Be}	44.30±0.14 ^{AcD}	43.35±0.21 ^{Bd}	51.75±0.21 ^{Bbc}	57.80±0.14 ^{Bab}	65.30±1.13 ^{Ba}
	KACC15935	45.15±0.49 ^{Ad}	44.80±1.41 ^{Ad}	47.75±0.78 ^{Ad}	52.45±2.05 ^{Bc}	59.85±1.77 ^{Bb}	72.10±0.28 ^{Ba}
	HJ18-9	38.80±1.65 ^{ABc}	45.19±0.04 ^{Ade}	50.67±1.58 ^{Ad}	109.66±0.78 ^{Ac}	201.35±1.12 ^{Ab}	326.68±5.92 ^{Aa}
Glycitein	Control	4.95±2.33 ^{Ac}	7.70±0.42 ^{ABc}	8.05±0.35 ^{Bb}	9.50±1.27 ^{Bab}	10.50±0.71 ^{Bab}	11.25±0.64 ^{Ca}
	KACC15935	7.60±0.14 ^{AcD}	7.40±0.85 ^{Ad}	8.15±0.35 ^{Bcd}	8.70±0.28 ^{Bbc}	9.85±0.64 ^{Bb}	13.55±0.07 ^{Ba}
	HJ18-9	7.56±0.20 ^{Ae}	8.54±0.54 ^{Ae}	11.56±0.73 ^{Ad}	38.31±0.43 ^{Ac}	65.02±2.28 ^{Ab}	75.09±0.88 ^{Aa}
Daidzin	Control	505.65±7.00 ^{Aa}	508.95±5.30 ^{Aa}	484.20±8.91 ^{Aa}	496.25±10.82 ^{Aa}	499.20±18.53 ^{Aa}	488.50±9.19 ^{Aa}
	KACC15935	509.40±8.63 ^{Aa}	512.60±8.91 ^{Aa}	511.10±6.36 ^{Aa}	511.40±1.56 ^{Aa}	502.30±4.24 ^{Aa}	494.90±13.01 ^{Aa}
	HJ18-9	476.53±20.44 ^{Aa}	477.59±28.80 ^{Aa}	457.13±63.01 ^{Aa}	413.26±41.04 ^{Bab}	353.93±22.95 ^{Bb}	210.76±26.16 ^{Bc}
Genistin	Control	845.10±24.61 ^{Bc}	917.50±2.97 ^{Aa}	868.55±1.20 ^{Bbc}	907.35±7.85 ^{Aa}	920.80±1.84 ^{Aa}	894.80±5.23 ^{Aab}
	KACC15935	912.75±5.30 ^{Aa}	907.95±6.15 ^{Aab}	904.45±4.45 ^{Aab}	905.40±11.03 ^{Aab}	893.30±1.56 ^{Bb}	899.40±0.42 ^{Aab}
	HJ18-9	882.69±6.99 ^{ABb}	914.89±4.88 ^{Aa}	907.87±13.29 ^{Aa}	837.70±0.08 ^{Bc}	742.83±2.55 ^{Cd}	529.45±4.79 ^{Be}
Glycitin	Control	115.05±3.61 ^{Aa}	114.55±4.17 ^{Aa}	108.00±4.10 ^{Aa}	108.85±7.00 ^{Aa}	106.90±10.47 ^{Aa}	105.70±5.52 ^{Aa}
	KACC15935	117.30±1.98 ^{Aa}	113.95±5.16 ^{Aab}	113.50±3.68 ^{Aab}	113.95±2.62 ^{Aab}	110.95±2.90 ^{Aab}	105.60±7.07 ^{Ab}
	HJ18-9	106.00±11.56 ^{Aa}	102.95±15.87 ^{Aa}	88.83±31.90 ^{Aa}	59.28±19.57 ^{Bab}	34.12±9.93 ^{Bbc}	9.49±13.42 ^{Bc}
M-daidzin	Control	1.25±0.35 ^{Bab}	2.10±1.56 ^{Aab}	3.90±1.27 ^{Aa}	0.85±1.20 ^{Ab}	0.00±0.00 ^{Ab}	0.85±1.20 ^{Bb}
	KACC15935	4.60±1.27 ^{Aa}	2.40±0.85 ^{Aa}	0.40±0.57 ^{Aa}	2.65±0.92 ^{Aa}	3.15±4.45 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Ba}
	HJ18-9	2.77±0.99 ^{ABb}	1.69±1.15 ^{Ab}	4.32±6.10 ^{Ab}	3.64±5.15 ^{Ab}	3.41±4.82 ^{Ab}	14.90±0.64 ^{Aa}
M-genistin	Control	0.00±0.00 ^{Aa}	0.70±0.99 ^{Aa}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^a
	KACC15935	0.00±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^a	1.60±2.26 ^{Aa}	2.55±3.61 ^{Aa}	0.00±0.00 ^a
	HJ18-9	7.99±8.65 ^{Aa}	7.51±6.61 ^{Aa}	0.00±0.00 ^a	7.84±11.08 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^a
M-glycitin	Control	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND	ND
	KACC15935	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	HJ18-9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A-daidzin	Control	45.65±1.06 ^{Ab}	44.85±0.49 ^{Ab}	59.90±1.84 ^{Aa}	45.45±13.65 ^{Ab}	35.30±0.00 ^{ABb}	32.05±0.21 ^{Ab}
	KACC15935	51.05±0.49 ^{Aa}	47.25±0.07 ^{Aa}	54.75±17.04 ^{Aa}	42.20±0.42 ^{Aa}	48.85±12.37 ^{Aa}	35.25±4.31 ^{Aa}
	HJ18-9	47.05±10.05 ^{Aa}	40.23±9.44 ^{Aab}	30.54±0.59 ^{Abc}	26.10±0.67 ^{Abc}	22.98±0.28 ^{Bc}	19.08±0.35 ^{Bc}
A-genistin	Control	78.40±8.91 ^{Bb}	93.45±0.21 ^{Aa}	81.75±0.07 ^{Bb}	79.75±0.64 ^{Bb}	77.95±0.49 ^{ABb}	74.40±0.71 ^{Bb}
	KACC15935	102.15±0.92 ^{Aa}	97.70±0.42 ^{Ab}	92.70±2.12 ^{Ac}	89.35±2.33 ^{Ac}	83.75±1.34 ^{Ad}	83.50±0.28 ^{Ad}
	HJ18-9	90.37±0.33 ^{ABa}	86.80±2.55 ^{Ba}	76.92±0.91 ^{Cb}	74.23±0.83 ^{Cbc}	71.79±3.44 ^{Bc}	61.03±0.03 ^{Cd}
A-glycitin	Control	13.95±0.07 ^{ABa}	15.30±0.42 ^{Aa}	14.60±0.57 ^{Aa}	14.50±1.27 ^{Aa}	14.65±0.21 ^{Aa}	14.20±0.28 ^{Aa}
	KACC15935	16.00±0.71 ^{Aa}	15.50±1.13 ^{Aa}	14.65±1.06 ^{Aa}	12.90±4.38 ^{Aa}	14.20±0.99 ^{ABa}	13.70±1.27 ^{Aa}
	HJ18-9	13.55±0.97 ^{Ba}	13.66±1.83 ^{Aa}	12.50±1.59 ^{Aab}	12.10±0.52 ^{Aab}	12.36±0.66 ^{Bab}	10.60±0.10 ^{Bb}

¹⁾Results are expressed as the means of three replications. Means with different lower case (row) and upper case (column) superscript letters are significantly different at $P<0.05$.

²⁾ND: not detected.

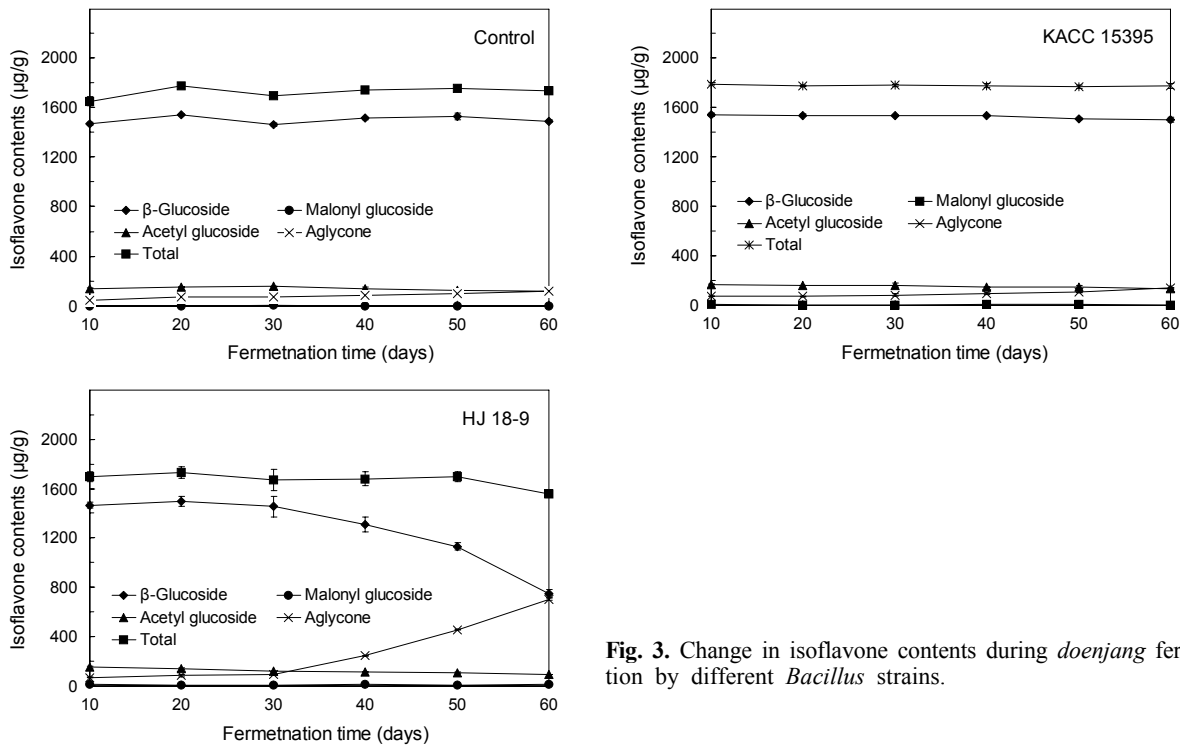


Fig. 3. Change in isoflavone contents during *doenjang* fermentation by different *Bacillus* strains.

µg/g으로 나타나 본 연구에서는 이보다 3.34배 높은 결과를 나타냈다(21). 이는 청국장에 비해 발효기간이 길어지면서 다양한 미생물의 활성이 높아진 것으로 사료된다. 일반적으로 앞에서 언급한 바와 같이 대두의 isoflavone은 glycosided conjugate(malonyl glycoside, β-glycosides 및 acetyl glycosides 형태)의 isoflavone isomer와 비배당체 형태로 존재하는데 대두의 수침이나 가열 등의 가공처리를 하면 용출된 β-glycosidase의 작용에 의해 비배당체로 전환되는 것으로 알려졌다(22). 뿐만 아니라 발효과정 중에 관여하는 미생물이 가지고 있는 β-glucosidase에 의해 배당체가 가수분해 되는 것으로 생각한다. 따라서 본 연구에서는 발효에 사용되는 *B. subtilis*를 접종하는 데 있어 β-glucosidase 활성과 cellulase 등의 효소 활성이 있는 균주 HJ18-9를 접종하여 된장을 제조함으로써 isoflavone 비배당체 함량을 유의적으로 증가시키는 결과를 얻었으며, 이는 항산화 항암 등의 기능성을 갖는 장류를 제조하는 데 기초자료가 될 것으로 생각한다.

Phenolic acid 및 flavanol 함량 변화

28°C에서 60일 동안 발효시킨 된장의 phenolic acid 및 flavanol 함량은 Table 2 및 3에 나타내었다. 식물에 존재하는 phenolic acid는 항산화 활성과 자유 라디칼 소거능을 가지고 있어 인간의 건강에 잠재적으로 많은 이점을 가지고 있으므로 많은 관심을 얻고 있다(23). 그중에서도 gallic acid, protocatechuic acid, *p*-coumaric acid 및 ferulic acid는 콩에 존재하는 주요 phenolic acid이며 이는 강한

항산화 활성을 나타낸다. 본 연구의 총 phenolic acid 함량은 Control과 HJ18-9 처리구는 40일, KACC 15395 처리구는 발효 30일에 가장 높은 함량을 나타냈으며 그 이후로는 감소하는 경향을 나타냈고, 7가지 phenolic acid 중 protocatechuic acid와 hydroxybenzoic acid에서 가장 높은 비율을 나타내었다(Table 2).

대조구, KACC15395, HJ18-9 처리구의 flavanol 함량은 발효시간의 경과에 따라 gallate 형태는 감소하였으며 epigallocatechin, catechin, epicatechin은 증가하는 경향을 나타내었다. 몇몇 연구에 따르면 esterase나 tannase 활성에 flavanol gallate가 flavanols로 전환된다고 하였다(24). Cho 등(25)에 따르면 청국장 발효기간이 증가하면서 esterase 활성이 증가함에 따라 flavanols gallate 함량이 감소한 반면, flavanols 중 catechin의 함량이 7.86~59.6 µg/g, epicatechin 함량이 12.3~54.8 µg/g으로 나타나 catechin 함량은 본 연구 결과보다 더 높게, epicatechin 함량은 더 낮게 나타났다. 이와 같은 차이는 접종된 각각의 미생물의 특성과 온도, 기간 등의 발효조건에 따른 미생물의 효소 활성에 의한 차이에 기인한 것으로 생각한다.

총페놀 함량 변화

발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 된장의 총페놀 함량을 조사한 결과는 Table 4에 나타내었다. 대조구와 KACC 15395에서는 50일차에 가장 높은 함량을, HJ18-9는 발효 종료 시점인 60일차에 378.14 mg/100 g으로 유의적으로 높은 페놀 함량을 나타내었다. 콩 등의 식물체에 포

Table 2. Change in total phenolic acid contents during *doenjang* fermentation by different *Bacillus* strains ($\mu\text{g/g}$ dry basis)

Phenolic acid	Strains	Fermentation time (days)					
		10	20	30	40	50	60
Gallic acid	Control	1.00±0.16 ^{Ab1)}	1.79±0.33 ^{Aab}	2.34±0.43 ^{Aa}	2.25±0.41 ^{Aa}	1.67±0.35 ^{Aab}	1.61±0.47 ^{Aab}
	KACC15935	0.45±0.04 ^{Bc}	1.08±0.03 ^{Bb}	1.64±0.04 ^{ABa}	1.01±0.01 ^{Bb}	1.14±0.19 ^{ABb}	1.12±0.34 ^{Ab}
	HJ18-9	0.49±0.03 ^{Bd}	0.62±0.01 ^{Bcd}	1.14±0.12 ^{Bb}	1.80±0.08 ^{Aa}	0.68±0.07 ^{Bc}	0.64±0.03 ^{Ac}
Hydroxybenzoic acid	Control	7.49±0.40 ^{Bcd}	6.64±0.08 ^{Bd}	10.21±0.13 ^{Ab}	13.25±0.23 ^{Aa}	9.38±2.42 ^{Abc}	8.12±0.42 ^{Abcd}
	KACC15935	10.29±0.07 ^{Aa}	8.84±0.14 ^{Aa}	10.58±0.87 ^{Aa}	8.88±1.17 ^{Ba}	4.25±0.75 ^{Bb}	4.66±1.10 ^{Bb}
	HJ18-9	0.99±0.03 ^{Cc}	3.55±0.49 ^{Cb}	6.73±0.95 ^{Ba}	4.49±0.10 ^{Cb}	3.23±1.10 ^{Bb}	4.53±0.26 ^{Bb}
Protocatechuic acid	Control	2.34±0.54 ^{Bb}	2.41±0.35 ^{Ab}	3.66±0.13 ^{Aab}	4.16±1.20 ^{Aab}	4.77±0.93 ^{Aa}	3.62±0.82 ^{Aab}
	KACC15935	3.57±0.19 ^{Aa}	2.70±0.33 ^{Aab}	2.47±0.49 ^{Bb}	2.35±0.13 ^{Ab}	2.79±0.58 ^{ABab}	2.87±0.43 ^{ABab}
	HJ18-9	1.13±0.15 ^{Cbc}	1.06±0.24 ^{Bbc}	0.86±0.28 ^{Cc}	2.77±0.47 ^{Aa}	2.37±0.06 ^{Ba}	1.55±0.13 ^{Bb}
Vanillic acid	Control	0.28±0.01 ^{Ab}	0.51±0.04 ^{ABb}	1.00±0.15 ^{Aa}	0.92±0.16 ^{Ba}	1.17±0.12 ^{ABa}	0.99±0.27 ^{ABa}
	KACC15935	0.78±0.06 ^{Aab}	0.73±0.16 ^{Aab}	1.31±0.53 ^{Aa}	0.62±0.11 ^{Bb}	0.91±0.04 ^{Bab}	0.58±0.13 ^{Bb}
	HJ18-9	0.43±0.38 ^{Ac}	0.31±0.11 ^{Bc}	0.40±0.16 ^{Ac}	3.25±0.11 ^{Aa}	1.28±0.06 ^{Ab}	1.68±0.23 ^{Ab}
<i>p</i> -Coumaric acid	Control	0.66±0.06 ^{Abc}	0.49±0.00 ^{Bd}	0.91±0.04 ^{Aa}	0.71±0.07 ^{Ab}	0.74±0.06 ^{Ab}	0.57±0.04 ^{Ac}
	KACC15935	0.70±0.14 ^{Aab}	0.75±0.11 ^{Aab}	0.78±0.11 ^{ABa}	0.64±0.01 ^{Aab}	0.68±0.10 ^{Aab}	0.45±0.18 ^{Ab}
	HJ18-9	0.46±0.02 ^{Ac}	0.20±0.07 ^{Cc}	0.57±0.01 ^{Bb}	0.43±0.06 ^{Bcd}	0.71±0.03 ^{Aa}	0.35±0.02 ^{Ad}
Caffeic acid	Control	0.66±0.16 ^{Aab}	0.62±0.12 ^{Aab}	0.31±0.10 ^{Ab}	0.80±0.06 ^{Aa}	0.72±0.12 ^{Aab}	1.00±0.33 ^{Aa}
	KACC15935	0.31±0.00 ^{Bb}	0.54±0.06 ^{Aa}	0.38±0.16 ^{Aab}	0.55±0.07 ^{Ba}	0.51±0.02 ^{Aab}	0.50±0.06 ^{ABab}
	HJ18-9	0.08±0.01 ^{Bde}	0.04±0.01 ^{Be}	0.11±0.01 ^{Ac}	0.15±0.04 ^{Cbc}	0.18±0.03 ^{Bb}	0.27±0.03 ^{Ba}
Ferulic acid	Control	2.62±0.18 ^{Ba}	1.95±0.24 ^{Bb}	1.14±0.00 ^{Bc}	1.78±0.29 ^{Bb}	0.87±0.25 ^{Cc}	0.33±0.04 ^{Cd}
	KACC15935	3.82±0.00 ^{Aa}	2.91±0.27 ^{Aab}	2.69±0.04 ^{Aab}	3.65±1.26 ^{ABa}	2.05±0.21 ^{Bb}	2.21±0.23 ^{Ab}
	HJ18-9	2.20±0.01 ^{Cc}	2.40±0.16 ^{ABc}	2.54±0.15 ^{Ac}	4.40±0.14 ^{Aa}	3.15±0.04 ^{Ab}	1.54±0.24 ^{Bd}
Total	Control	15.02±0.07 ^{Bc}	14.41±0.43 ^{Bc}	19.57±0.45 ^{Ab}	23.87±0.57 ^{Aa}	19.30±1.52 ^{Ab}	16.25±1.45 ^{Ac}
	KACC15935	19.91±0.21 ^{Aa}	17.53±0.49 ^{Ab}	19.83±0.02 ^{Aa}	19.69±0.64 ^{Ba}	12.33±0.01 ^{Bc}	12.38±1.48 ^{Bc}
	HJ18-9	5.76±0.30 ^{Cd}	8.16±0.27 ^{Cc}	12.34±0.78 ^{Bb}	22.05±1.88 ^{ABa}	11.59±1.18 ^{Bb}	10.54±0.16 ^{Bbc}

¹⁾Results are expressed as the means of three replications. Means with different lower case (row) and upper case (column) superscript letters are significantly different at $P<0.05$.

Table 3. Change in flavanol contents during *doenjang* fermentation by different *Bacillus* strains ($\mu\text{g/g}$ dry basis)

Flavanols	Strains	Fermentation time (days)					
		10	20	30	40	50	60
Epigallocatechin	Control	5.22±3.74 ^{Ba1)}	4.39±0.32 ^{Ba}	7.63±0.47 ^{Ba}	8.47±2.80 ^{Ba}	10.04±1.07 ^{Ba}	10.69±3.63 ^{Aa}
	KACC15935	15.80±2.83 ^{Ac}	17.15±2.47 ^{Ac}	27.85±0.35 ^{Aab}	27.40±0.42 ^{Aab}	31.60±0.28 ^{Aa}	22.70±5.94 ^{Abc}
	HJ18-9	1.70±0.54 ^{Bb}	1.55±0.16 ^{Bb}	1.45±0.16 ^{Cb}	3.78±3.39 ^{Bb}	9.84±1.23 ^{Ba}	13.03±0.09 ^{Aa}
Catechin	Control	8.32±1.46 ^{Aa}	9.42±1.70 ^{Aa}	11.52±7.57 ^{Aa}	13.94±2.00 ^{ABa}	13.16±2.60 ^{Aa}	12.71±1.76 ^{Aa}
	KACC15935	7.75±0.35 ^{Ac}	8.45±3.18 ^{Abcd}	13.60±2.12 ^{Aab}	16.35±2.62 ^{Aa}	12.80±0.57 ^{Aabc}	6.85±1.91 ^{Bd}
	HJ18-9	4.31±3.27 ^{Aa}	6.40±3.59 ^{Aa}	5.27±0.80 ^{Aa}	8.64±2.09 ^{Ba}	6.70±0.47 ^{Ba}	6.94±0.06 ^{Ba}
Epicatechin	Control	108.52±4.01 ^{Ab}	112.25±16.20 ^{Ab}	276.17±19.36 ^{Aa}	239.56±1.28 ^{Aa}	273.34±3.59 ^{Aa}	235.29±53.18 ^{Aa}
	KACC15935	67.85±12.66 ^{Bd}	94.50±6.51 ^{ABc}	140.50±7.35 ^{Ba}	111.15±11.53 ^{Bc}	137.35±8.98 ^{Bab}	114.25±9.55 ^{Bbc}
	HJ18-9	64.51±2.88 ^{Bd}	75.06±7.41 ^{Bd}	114.68±4.10 ^{Bc}	113.77±17.98 ^{Bc}	172.20±6.75 ^{Bb}	233.33±6.58 ^{Aa}
Epigallocatechin gallate	Control	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND	ND
	KACC15935	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	HJ18-9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Epicatechin gallate	Control	29.64±2.55 ^{Aa}	30.30±4.26 ^{ABa}	21.20±1.12 ^{Ab}	16.87±2.17 ^{Abc}	11.38±1.39 ^{Ac}	6.15±1.39 ^{Bd}
	KACC15935	23.45±1.06 ^{Ba}	22.50±0.42 ^{Ba}	21.95±0.49 ^{Aa}	11.00±3.54 ^{Abc}	7.30±0.71 ^{Bc}	12.50±1.13 ^{Ab}
	HJ18-9	30.71±1.36 ^{Aa}	33.40±0.93 ^{Aa}	16.81±2.82 ^{Ab}	12.95±0.58 ^{Ac}	9.86±0.12 ^{ABc}	5.84±0.43 ^{Bd}
Catechin gallate	Control	5.94±1.44 ^{ABa}	4.65±1.08 ^{ABab}	4.93±0.41 ^{Aab}	3.92±0.37 ^{Abc}	2.50±0.06 ^{Bc}	2.16±0.07 ^{Bc}
	KACC15935	7.05±0.64 ^{ABa}	5.60±0.14 ^{Aab}	4.95±0.07 ^{Ab}	5.00±0.85 ^{Ab}	6.90±1.27 ^{Aa}	5.00±0.57 ^{Ab}
	HJ18-9	3.43±0.14 ^{Ba}	3.40±0.10 ^{Ba}	1.82±0.02 ^{Bb}	0.50±0.26 ^{Bc}	0.13±0.00 ^{Cd}	0.00±0.00 ^{Cd}
Total	Control	157.63±0.08 ^{Ab}	160.99±22.92 ^{Ab}	321.46±10.73 ^{Aa}	282.74±4.28 ^{Aa}	310.40±3.51 ^{Aa}	266.98±49.11 ^{Aa}
	KACC15935	121.90±17.68 ^{Bd}	148.25±6.29 ^{Ac}	208.85±5.30 ^{Ba}	171.00±13.72 ^{Bbc}	195.95±8.70 ^{Bab}	161.30±15.27 ^{Bc}
	HJ18-9	104.64±7.11 ^{Bd}	119.81±4.50 ^{Ad}	140.01±0.34 ^{Cc}	139.63±13.34 ^{Bc}	198.73±6.11 ^{Bb}	259.13±6.99 ^{Aa}

¹⁾Results are expressed as the means of three replications. Means with different lower case (row) and upper case (column) superscript letters are significantly different at $P<0.05$.

²⁾ND: not detected.

Table 4. Change in total phenolic contents and effect of radical scavenging activity during the *doenjang* fermentation by different *Bacillus* strains

	Strains	Fermentation time (days)					
		10	20	30	40	50	60
DPPH radical scavenging activity (%)	Control	18.38±1.01 ^{Ac1)}	21.92±2.01 ^{Abc}	24.97±1.39 ^{ABab}	26.86±1.50 ^{Ba}	26.52±1.82 ^{Ba}	26.19±1.68 ^{Aa}
	KACC15935	18.16±0.40 ^{Ad}	18.72±1.66 ^{ABd}	28.59±1.93 ^{Ab}	32.69±1.13 ^{Aa}	24.35±0.93 ^{Bc}	20.29±1.63 ^{Bd}
	HJ18-9	16.03±0.05 ^{Bd}	15.76±1.55 ^{Bd}	22.62±1.70 ^{Bc}	28.91±2.36 ^{ABb}	33.74±1.61 ^{Aa}	29.08±0.90 ^{Ab}
Total phenolic contents (mg/100 g)	Control	279.18±20.65 ^{Ac}	286.76±15.71 ^{Ac}	354.15±20.23 ^{Ab}	421.23±22.73 ^{Aa}	427.07±18.01 ^{Aa}	274.76±16.01 ^{Bc}
	KACC15935	214.47±4.86 ^{Bc}	223.47±8.23 ^{Cb}	244.93±4.52 ^{Ca}	247.14±3.68 ^{Ca}	249.35±0.99 ^{Ca}	248.41±4.74 ^{Ca}
	HJ18-9	225.99±5.34 ^{Bc}	250.46±4.40 ^{Bd}	301.59±13.58 ^{Bc}	288.97±6.26 ^{Bc}	362.36±0.95 ^{Bb}	378.14±13.96 ^{Aa}

¹⁾Results are expressed as the means of three replications. Means with different lower case (row) and upper case (column) superscript letters are significantly different at $P<0.05$.

함된 페놀성 화합물은 대사산물의 하나로 특히 phenolic hydroxyl 기가 항산화 생리활성을 가진다고 알려졌다(26). Min(27)의 보고에 따르면 된장의 총폴리페놀 함량은 전통 된장에서 269.6 mg%, 황기를 첨가한 된장에서 332.4 mg%로 측정되었다고 보고하였는데, 본 연구에서 HJ18-9를 접종한 된장에서 더 높은 함량을 나타내었다. 또한 Park 등(28)의 보고에 따르면 폴리페놀화합물을 많이 함유한 연근 분말을 15% 첨가하여 발효하였을 때 총페놀 함량이 대조구보다 1.25배 높은 함량을 나타내었다고 하였다. 따라서 본 연구에서 사용된 균주 HJ18-9와 같이 기능성이 확인된 균주와 황기나 연근과 같은 폴리페놀을 함유한 첨가물을 넣어 된장을 제조함으로써 항산화 기능성이 높은 발효식품을 제조할 수 있을 것으로 생각한다.

DPPH 라디칼 소거 활성의 변화

발효기간에 따른 균주를 달리하여 제조한 된장의 DPPH 라디칼 소거 활성은 Table 4에 나타내었다. 각 처리구의 DPPH 소거 활성이 대조구는 18.38~26.86%, KACC15935는 18.16~32.69%, HJ18-9는 16.03~33.74% 범위를 나타내었으며, 대조구와 KACC15935에서는 40일차에, HJ18-9는 50일차에 가장 높은 활성을 나타내었다가 감소하는 경향을 나타내었다. Ku 등(29)의 보고에 따르면 총 DPPH 라디칼 소거 활성은 숙성 1년과 2년 된장이 평균 10.0%, 숙성 3년이 26.8%로 20배 이상 증가하는 결과를 보였으며, 그 후 지속적으로 증가하는 경향을 나타냈다고 하여 본 연구 결과와 차이가 있었다.

항산화 활성 증가는 총페놀 함량과 상관관계가 있다는 결과가 수차례 발표된 바 있으나, 실험방법이나 외부 환경에 따라 DPPH 라디칼 소거능과 페놀 함량의 상관성이 없다는 일부 연구 결과도 발표된 바 있다(30). 본 연구에서는 된장 제조, 발효과정 및 균주 활성 등의 다양한 원인으로 인해 DPPH 라디칼 소거능과 페놀 함량의 상관관계가 관찰되지 않은 것이라 사료된다.

요 약

본 연구는 된장 제조 시 자연 발효시킨 대조구와 *Bacillus*

subtilis KACC15935, *B. subtilis* HJ18-9 균주를 starter로 접종하여 발효시킨 된장의 품질 특성과 isoflavone의 함량과 항산화 활성을 측정하였다. β -Glucosidase 활성은 발효 50일에 가장 높은 효소 활성을 보였으며, HJ18-9 처리구가 발효 35일부터 발효가 끝나는 시점까지 유의적으로 높은 효소 활성을 나타내었다. 발효종료시점인 60일에 된장의 체내 이용률이 높은 isoflavone 비배당체 함량은 대조구, KACC15935, HJ18-9 처리구가 각각 122.10±0.11, 137.78±1.12 및 703.80±11.09 μ g/g으로 나타났다. 이는 발효 10일차 된장의 비배당체 함량에 비하여 각각 2.74, 1.88 및 10.27배 높은 전환율을 보였다. 또한 발효 60일 차에 HJ18-9 처리구가 DPPH 라디칼 소거 활성은 29.08%, 총페놀 함량은 378.14 mg/100 g으로 다른 처리구보다 유의적으로 높은 함량을 나타내었다. 이러한 결과로 본 연구를 통해 β -glucosidase 활성이 있는 HJ18-9 균주를 starter로 접종하여 체내흡수율이 높은 isoflavone 비배당체 함량이 높으며 총페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능이 우수한 기능성 된장을 제조함으로써, 기능성 장류 가공품 개발의 기초연구가 되고자 하였다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 AGENDA 연구사업(ATIS 과제번호: PJ01175403)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Kim BS, Rhee CH, Hong YA, Woo CJ, Jang CM, Kim YB, Park HD. 2007. Changes of enzyme activity and physiological functionality of traditional *Doenjang* during fermentation using *Bacillus* sp. SP-KSW3. *Korean J Food Preserv* 14: 545-551.
- Kim DH, Kim SH. 1999. Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Mucor* and *Rhizopus* strains. *Korean J Food Sci Technol* 31: 176-182.
- Lee GG, Lee HD, Lee CH. 2003. Changes in sensory characteristics during salt aging of *Doenjang* (fermented soybean paste) made by different starters. *Food Eng Prog* 7: 13-19.
- Rho JD, Choi SY, Lee SJ. 2008. Quality characteristics of soybean pastes (*doenjang*) prepared using different types of

- microorganisms and mixing ratios. *Korean J Food Cook Sci* 24: 243-250.
5. Park JW, Lee YJ, Yoon S. 2007. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays. *Korean J Food Cult* 22: 353-358.
 6. 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.
 7. Brouns F. 2002. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. *Food Res Int* 35: 187-193.
 8. Yeo KE, Kim WJ. 2002. Effects of acid hydrolysis on isoflavone of defatted soybean flour. *Korean J Food Sci Technol* 34: 916-918.
 9. Choi YB, Woo JG, Noh WS. 1999. Hydrolysis of β -glycosidic bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. *Korean J Food Sci Technol* 31: 189-195.
 10. Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. 2001. Some biological activities and isoflavone content of *cheonggukjang* prepared with black beans and *Bacillus* strains. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 662-667.
 11. Lee DH, Kim JH, Yoon BH, Lee GS, Choi SY, Lee JS. 2003. Changes of physiological functionalities during the fermentation of medicinal herbs doenjang. *Korean J Food Preserv* 10: 213-218.
 12. Lee SY, Kim JY, Baek SY, Yeo SH, Koo BS, Park HY, Choi HS. 2011. Isolation and characterization of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat *sokseongjang*. *Korean J Food Sci Technol* 43: 735-741.
 13. Choi YB, Kim KS, Rhee JS. 2002. Hydrolysis of soybean isoflavone glucosides by lactic acid bacteria. *Biotechnol Lett* 24: 2113-2116.
 14. Wang G, Kuan SS, Francis OJ, Ware GM, Carman AS. 1990. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J Agric Food Chem* 38: 185-190.
 15. Cho KM, Lee JH, Yun HD, Ahn BY, Kim H, Seo WT. 2011. Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavanols, and phenolic acids) during *cheonggukjang* soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. *J Food Compos Anal* 24: 402-410.
 16. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
 17. Tagashira M, Ohtake Y. 1998. A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta Med* 64: 555-558.
 18. Champagne CP, Tompkins TA, Buckley ND, Green-Johnson JM. 2010. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiol* 27: 968-972.
 19. Marazza JA, Nazareno MA, de Giori GS, Garro MS. 2012. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *J Funct Foods* 4: 594-601.
 20. Yang S, Wang L, Yan Q, Jiang Z, Li L. 2009. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. *Food Chem* 115: 1247-1252.
 21. Lee KH, Choi HS, Hwang KA, Song J. 2015. Changes in isoflavone content and quality characteristics of *Cheonggukjang* prepared by some different strains. *Korean J Int Agric* 27: 481-488.
 22. Lee KH, Choi HS, Choi YH, Park SY, Song J. 2014. Changes in isoflavone content and quality characteristics of *Cheonggukjang* prepared with *Bacillus subtilis* HJ18-3 and KACC 15935. *Korean J Food Preserv* 21: 121-128.
 23. Choi JS, Kim HY, Seo WT, Lee JH, Cho KM. 2012. Roasting enhances antioxidant effect of bitter melon (*Momordica charantia* L.) increasing in flavan-3-ol and phenolic acid contents. *Food Sci Biotechnol* 21: 19-26.
 24. Du Q, Li M, Cheng Q, Zhang TY, Ito Y. 1994. Purification of (-)-epigallocatechin from enzymatic hydrolysate of its gallate using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 687: 174-177.
 25. Cho KM, Hong SY, Math RK, Lee JH, Kambiranda DM, Kim JM, Asrafal Islam SM, Yun MG, Cho JJ, Lim WJ, Yun HD. 2009. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of *cheonggukjang* by *Bacillus pumilus* HY1. *Food Chem* 114: 413-419.
 26. Gramza A, Khokhar S, Yoko S, Gliszczynska-Swiglo A, Hes M, Korczak J. 2006. Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *Eur J Lipid Sci Technol* 108: 351-362.
 27. Min SH. 2006. Quality characteristics of doenjang containing *Astragalus membranaceus* water extracts. *Korean J Food Cookery Sci* 22: 514-520.
 28. Park IB, Park JW, Kim JM, Jung ST, Kang SG. 2005. Quality of soybean paste (*Doenjang*) prepared with lotus root powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 519-523.
 29. Ku KH, Park K, Kim HJ, Kim Y, Koo M. 2014. Quality characteristics of *Doenjang* by aging period. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 720-728.
 30. de Oliveira AMF, Pinheiro LS, Pereira CKS, Matias WN, Gomes RA, Chaves OS, de Souza MFV, de Almeida RN, de Assis TS. 2012. Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species. *Antioxidants* 1: 33-43.