Microbiol. Biotechnol. Lett. (2016), 44(3), 303–310
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1606.06005
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

소금 종류를 달리하여 제조한 된장들의 발효 중 protease 역가 및 항산화 활성 변화

심재민[1], 이강욱[1], 김현진[1,2], 김정환[1,2]*
[1]경상대학교 대학원 응용생명과학부(BK21 Plus)
[2]경상대학교 농업생명과학연구원

Received: June 22, 2016 / Revised: August 3, 2016 / Accepted: August 9, 2016

Proteases and Antioxidant Activities of Doenjang, Prepared with Different Types of Salts, during Fermentation

Jae Min Shim[1], Kang Wook Lee[1], Hyun-Jin Kim[1,2], and Jeong Hwan Kim[1,2]*
[1]Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Graduate School, [2]Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

In this study, doenjang samples were prepared with different types of salts (12%, w/w): purified salt (PS), 3-year aged solar salt (SS3), 1-year aged solar salt (SS1), and bamboo salt melted 3 times (BS). Whole-soybean *mejus* were fermented with starters consisting of 2 *Bacillus* strains, a yeast, and a fungus (starter doenjang), and control *mejus* were fermented with organisms present naturally in rice straw (non-starter doenjang). The whole-soybean *mejus* were dried, and then mixed with cooked soybeans and the respective salts. The doenjang samples were fermented for 13 weeks at 25℃. The protease (acid, neutral, and alkaline) activities, fibrinolytic activities, and antioxidant capacities of the samples were examined every week. BS doenjang showed the highest acid protease (6.46 ± 0.20 unit/g) and fibrinolytic activities (0.61 unit/ml). Among the starter doenjang samples, those made with SS and BS showed the highest total phenolic contents after 91 days of fermentation. For antioxidant activities, SS3 doenjang showed higher activities than the other doenjang samples, as evaluated by ABTS, DPPH, and FRAP assays. These results suggest that solar salt, especially aged for 3 years, is better than purified salt in terms of producing better functionalities of doenjang.

Keywords: **Solar salt, bamboo salt, purified salt, antioxidant activity, doenjang**

서 론

소금은 김치, 된장, 간장 등 전통발효식품 제조에서 필수 재료로 사용된다. 소금은 발효식품들의 짠맛를 내는 동시에 다른 맛들을 풍부하게 하며 발효 중 잡균 증식을 억제하여 이상발효를 방지한다[2]. 소금 농도에 따라 생육 가능한 미생물 종류가 달라지고 발효식품의 미생물 균총이 변하면 대사체들의 조성과 농도가 달라져서 결국 발효식품 품질에 영향을 미친다[19]. 천일염은 현재 가정에서 김치나 된장 제조에 널리 사용되고 있으나 정제염을 사용한 경우와 비교하여 발효식품 품질에 미치는 영향에 관한 연구들은 많지 않다. 죽염은 천일염을 고온에서 여러 번 녹여서 얻는 특수한 소금으로 천일염이나 정제염 보다 기능성이 우수한 소금으로 인식되고 있다[20]. 최근에는 죽염을 사용한 장류 제조가 보고되고 또 제품들도 판매되고 있으나 정제염이나 천일염을 사용한 제품들과 품질을 비교한 연구는 아직 부족한 실정이다[8, 16].

본 연구자들은 앞서 정제염, 3년 숙성 천일염, 1년 숙성 천일염과 3회 죽염을 사용하여 된장들을 제조하고 13주 동안 발효시키면서 발효 중 미생물 수, pH, 적정산도, 수분함량, 조지방 및 조단백 변화들을 조사하였고 관능검사도 실시하여 결과들을 보고한 바 있다[17]. 본 논문에서는 숙성 중인 된장들의 단백질가수분해효소, 혈전용해효소 역가 변화와 몇

***Corresponding author**
Tel: +82-55-772-1904, Fax: +82-55-772-1909
E-mail: jeonghkm@gnu.ac.kr
© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

가지 방법으로 측정한 항산화능을 보고하고자 한다. 전보의 결과와 함께 본 결과들은 소금 종류를 달리하여 제조한 된장들의 품질 차이에 대한 이해를 촉진함으로써 향후 천일염이나 죽염을 이용한 고품질 장류 제조에 도움이 될 것이다.

재료 및 방법

된장 제조와 발효

국내산 콩을 이용한 콩알메주 제조와 이를 이용한 된장 제조 및 숙성 방법들은 앞서 보고된 논문에 설명되었다 [17]. 콩알메주 제조시 하나에는 종균들(*Bacillus amyloliquefaciens* EMD17, *B. amyloliquefaciens* MJ1-4, *Pichia farinosa* SY80, *Rhizopus oryzae*)을 대두 1 g 당 1×10^6 CFU (spore) 접종하여 발효하였고(종균된장) 다른 하나에는 짧게 절단한 볏짚을 대두에 첨가하여 발효를 유도하였다(비종균 된장). 발효가 완료된 콩알메주들을 섞고 건조한 후에 새로 증자한 대두, 물, 소금을 섞어 된장을 제조하였다. 소금은 정제염(한주, 울산, 2015, NaCl 99.18%), 3년 숙성 천일염(태평염전, 신안, 전남, 2012, NaCl 82.55%) 1년 숙성 천일염(태평염전, 2014, NaCl 79.84%), 그리고 3회 죽염(인산가, 함양, 경남, 2014, NaCl 94.54%)을 사용하였고 된장들의 염도는 NaCl 함량으로 12% 되게 조정하였다. 정제염(PS) 된장, 3년 숙성 천일염(SS3) 된장, 1년 숙성 천일염(SS1) 된장과 죽염(BS) 된장을 각각 2종씩(종균접종과 비접종) 총 8종의 된장을 얻은 후 25℃ 배양기에서 13주간 숙성하였다. 매 주 bacilli와 효모들수, pH, TA, 수분함량, 염도, 조지방, 조단백 함량을 측정하고 그 결과들은 이미 보고하였다[17]. 본 연구에서는 동결건조한 된장시료들에 대해 protease 역가들과 항산화능을 아래와 같이 측정하였다.

된장 추출물 제조

된장 시료 20 g을 동결건조한(PVTFD50A, Korea) 후 분말화하였다. 된장 분말 1 g씩을 취해서 증류수 40 ml과 혼합하여 항온수조(37℃)에서 4시간 진탕(150 rpm)하였다. 원심분리(4,000 × *g*, 15 min)하여 얻은 상등액을 여과 (Whatman, No.2, GE Healthcare, UK) 하여 얻은 여액을 -20℃에 보관하고 추후 단백질 가수분해효소 활성 측정과 총페놀 함량, 항산화 활성 측정 들에 사용하였다.

단백질 가수분해효소 활성 측정

동결건조한 된장을 추출하여 얻은 시료에 대해 산성, 중성, 염기성 조건에서 protease 활성들을 앞서 보고한 방법을 일부 수정해서 측정하였다[5]. Casein (Sigma-Aldrich, USA)을 0.2 M Mcilvaine buffer (pH 3.0, pH 6.0)와 0.2 M boric acid-borate buffer (pH 9.0)에 2% (w/v) 되게 녹여서 각각 acid, neutral, alkaline protease 활성 측정을 위한 기질로 사용하였다. Casein 기질용액 1 ml, 효소액 200 µl, $CaCl_2$ (10 mM) 20 µl를 혼합한 후 37℃에서 20분 반응시킨 후 5% TCA (trichloroacetic acid, Sigma-Aldrich) 용액을 2 ml 첨가하여 반응을 정지시켰다. 원심분리(4,000 × *g*, 15 min)하여 얻은 상등액 1 ml에 0.5 N NaOH 2 ml, Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich) 100 µl를 첨가하고 실온에서 10분 반응시켰다. 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 660 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였고 효소 1 unit는 1분당 1 µmole의 tyrosine을 생성하는 효소 양으로 정의하였다.

혈전용해효소활성

된장 10 g에 0.1% peptone 수 90 ml를 가한 다음 Stomacher (Seward Lab. Systems Inc., USA)를 사용하여 균질화하였다. 균질액을 원심분리(8,000 × *g*, 15 min)하여 얻은 상등액 1 ml씩을 −70℃에서 보관하고 이들을 된장의 혈전용해효소 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다 혈전용해효소 활성은 Jeong 등의 fibrin plate method를 사용하여 측정하였다[9]. Fibrinogen (MP biomedicals, USA)을 50 mM 인산완충용액 (pH 8.0)에 0.3% (w/v)로 용해한 후 5 ml를 2% agarose (Dongin-Genomic, Korea) 용액 5 ml와 혼합하였다. 혼합 용액에 thrombin (100 NIH units/ml, MP biomedicals) 100 µl를 첨가한 다음 petri dish에 부어 굳혀서 fibrin plate를 얻었다. 된장 시료 40 µl를 fibrin plate에 만든 well에 주입하여 37℃에서 16시간 반응시킨 후 형성된 분해환 면적을 측정하였다. 양성 대조구로 plasmin (P1867, Sigma-Aldrich)을 농도를 달리하여 well 들에 주입하고 얻어진 각각의 분해환 크기들을 측정하였다. 시료의 혈전용해활성은 대조구들의 용해 면적에 대한 시료 용해 면적의 상대적인 비율로 환산한 다음 이를 plasmin 단위로 표시하였다.

총페놀함량 측정

된장 시료들의 총 페놀 화합물 함량은 Singleton 등[18]의 방법에 따라 측정하였다. 동결건조한 된장 추출물 1 ml에 증류수 9 ml, Folin & Ciocalteau reagent (Sigma-Aldrich) 1 ml를 첨가하고 실온에서 5분간 둔 다음 7% Na_2CO_3 10 ml를 첨가 후 증류수로 총 부피를 25 ml로 조정한 후 실온에서 2시간 반응시켰다. 이후 760 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식으로 총 페놀함량을 계산하였다.

Total phenolics content (mg/g GAE)
= {[(Sample O.D. – 0.005) – 0.007]/0.004} × 희석배수/1000

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1606.06005

항산화 활성 측정

항산화 활성 측정을 위한 된장 시료들은 동결건조한 된장 1 g에 증류수 40 ml로 열수 추출하고 여과한 추출물로 실험하였다. ABTS radical 소거활성은 Pellefrini 등[14]의 방법을 사용하였다. ABTS 용액 제조는 7 mM ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt, Sigma-Aldrich)와 2.45 mM potassium persulfate (Sigma-Aldrich)을 혼합하여 사용하였다. 제조한 ABTS 용액을 734 nm에서 흡광도 값을 0.7000 ± 0.005으로 보정하여 실험에 사용하였다. 된장 추출물 20 μl와 보정한 ABTS 용액 980 μl를 섞어서 어두운 곳에서 10분 반응시킨 뒤 734 nm에서 흡광도를 측정하고 아래 식에 따라 계산하였다. 대조구로는 시료 대신 추출에 사용한 용매를 사용하였다.

ABTs radical scavenging activity (%)
= [1 − (sample O.D./control O.D.)] × 100

된장시료들의 DPPH radical scavenging activity는 Lee 등[12]의 방법을 사용하여 측정하였다. DPPH 용액(0.2 mM)은 DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich)를 80% MeOH에 용해시켜 제조하였다. DPPH 용액은 사용직전에 517 nm에서 흡광도 값을 1.000 ± 0.020으로 보정하였으며, 보정한 DPPH 용액 800 μl와 시료 200 μl를 혼합하여 실온에서 30분 반응시켰다. 반응 후 시료의 흡광도를 517 nm에서 측정하여 아래 식을 사용하여 DPPH radical scavenging activity를 계산하였다. 대조구로는 시료 대신 80% MeOH을 사용하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)
= [1 − (sample O.D/control O.D)] × 100

Benzie와 Strain의 FRAP assay 방법을 사용하여 된장 시료들의 항산화능을 측정하였다[3]. FRAP 용액 제조를 위해 300 mM acetate buffer (pH 3.6)와 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine, Sigma-Aldrich) 그리고 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma-Aldrich)를 10:1:1 (v/v/v) 비율로 혼합하였다. FRAP 용액 1.5 ml와 시료 추출물 50 μl를 혼합하여 어두운 곳에서 30분간 반응시킨 뒤 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

모든 측정은 3회 반복하였으며, 결과들은 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 모든 통계 분석은 SPSS (v18.0, SPSS Inc., USA) 통계 프로그램을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

된장 숙성 중 단백질가수분해 효소활성 변화

발효 중 된장시료들의 산성 protease 활성 측정결과를 Fig. 1A에 나타내었다. 종균 접종 된장들 중에서는 죽염 된장의 역가가 높았다. 죽염 된장은 제조 직후 2.69 ± 0.13 unit/g에서 계속 상승하여 숙성 14일에 5.45 ± 0.17 unit/g으로 타 된장들(PS, 3.19 ± 0.57; SS3, 3.16 ± 0.13; SS1, 2.72 ± 0.20 unit/g) 보다 높은 역가를 보였다. 이후로는 감소하여 49일에 최저치를 보이고 이후 다시 증가하여 숙성 70일에 6.46 ± 0.20 unit/g으로 다른 된장들(PS, 4.05 ± 0.39; SS3, 5.26 ± 0.08; SS1, 5.23 ± 0.08 unit/g) 보다 높았다. 이후 완만히 감소하나 91일에도 타 된장들 (PS, 4.09 ± 0.39; SS3, 5.06 ± 0.25; SS1, 3.75 ± 0.15 unit/g) 보다 높은 역가(5.09 ± 0.15 unit/g)을 나타내었다. 3년 숙성(SS3) 천일염 된장은 숙성 70일에 5.26 ± 0.08 unit/g으로 죽염된장 다음으로 높았고 숙성 종료시에도 5.06 ± 0.25 unit/g으로 죽염된장 다음으로 높았다. 정제염 된장의 숙성 77일에 가장 높은 값인 5.40 ± 0.29 unit/g을 나타내었지만 제조 직후부터 숙성 91일 사이에는 역가가 낮았고 숙성 종료시에는 4.09 ± 0.39 unit/g를 나타내었다. 1년 숙성 천일염 된장이 숙성 종료시 3.75 ± 0.15 unit/g으로 가장 낮았다. 비종균 접종 된장들에서는 3년 숙성 천일염 된장이 숙성 63일에 5.85 ± 0.27 unit/g으로 가장 높은 수치를 나타낸 반면 정제염 된장은 숙성 전 기간 중 1.88 ± 0.13–3.70 ± 0.30 unit/g으로 된장들 중 가장 낮은 값들을 보였다.

중성 protease 역가 측정 결과(Fig. 1B) 종균 접종된장들 중 3년 숙성 천일염 된장이 1.9–3.3 unit/g으로 가장 높았고 다음은 정제염 된장이 1.5–3.1 unit/g를 나타내었다. 비종균 접종 된장들중에서는 숙성 63일에 죽염 된장이 3.23 ± 0.61 unit/g으로 가장 높았다. 숙성 종료시에는 3년 숙성 천일염(2.54 ± 0.35 unit/g), 1년 숙성 천일염(2.07 ± 0.18 unit/g), 죽염(1.95 ± 0.34 unit/g), 그리고 정제염(1.58 ± 0.17 unit/g) 된장 순으로 나타났다.

염기성 protease 역가는 종균 접종 된장들에서는 숙성 21일에서 42일까지 3년 숙성 천일염 된장이 3.16–3.75 unit/g으로 가장 높았다(Fig. 1C). 숙성 종료시 죽염된장과 3년 숙성 천일염 된장들(3.19 ± 0.77 unit/g)이 가장 높고 1년 숙성 천일염 된장(2.66 ± 0.17 unit/g)과 정제염 된장(2.69 ± 0.10 unit/g)들은 낮았다. 종균 비접종 된장들의 경우, 정제염 된장이 14일 이후 2.89–3.26 unit/g로 꾸준히 높은 수치를 나타내었다. 그러나 숙성 종료 시에는 죽염 된장(2.84 ± 0.29 unit/g)의 역가가 가장 높았다.

Jeong 등의 연구에서 protease 역가는 제품의 아미노태 질소 함량과 비슷한 경향을 보인다고 보고하였다[8]. 본 연구

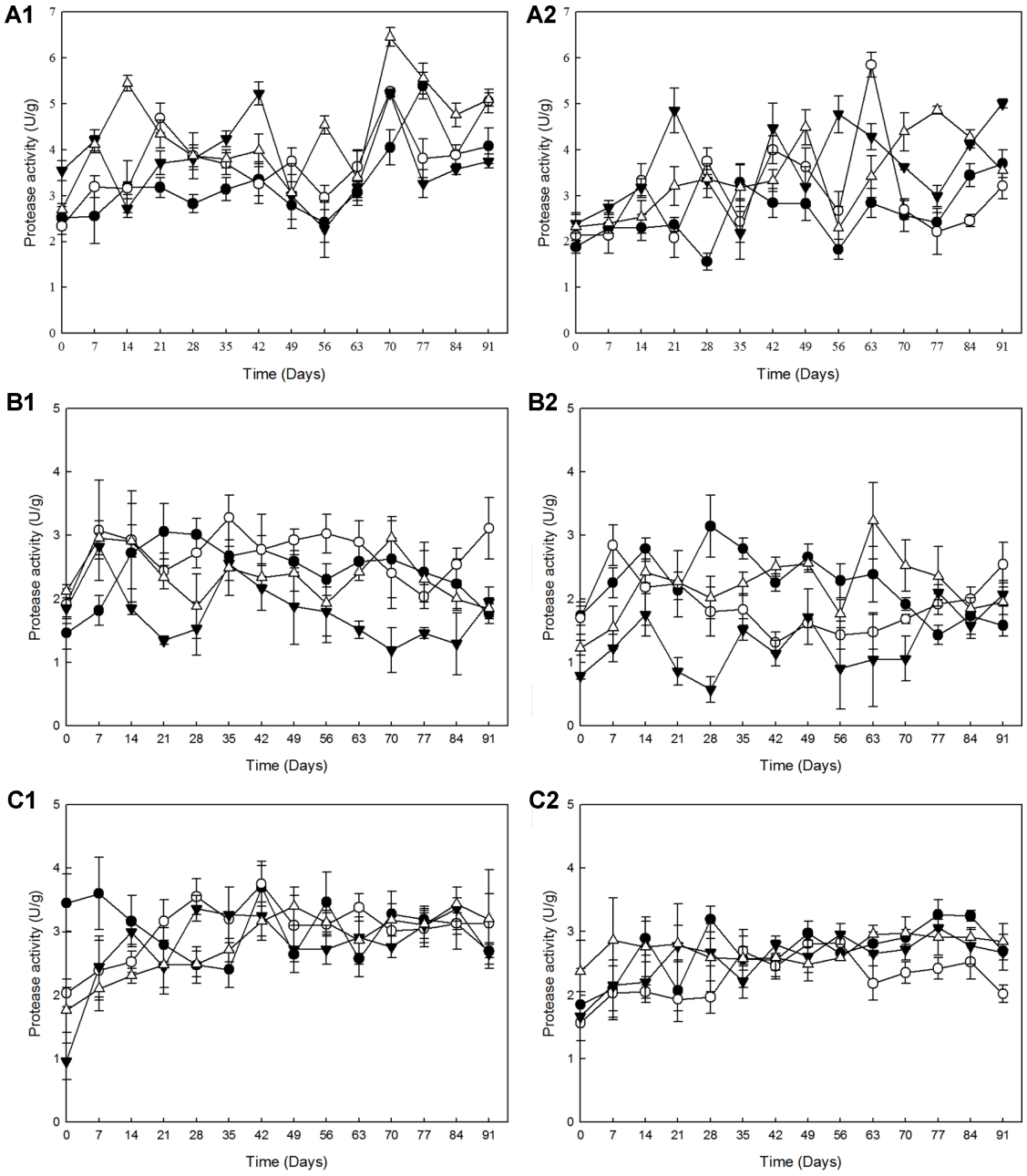

Fig. 1. Changes in acid protease activities (A), neutral protease activities (B), and alkaline protease activities (C) of starter Doenjang samples (1) and non-starter doenjang samples (2) during fermentation. ●, PS doenjang; ○, SS3 doenjang; ▼, SS1 doenjang; △, BS doenjang.

자들도 선행연구에서 3년 숙성 천일염과 죽염 된장의 아미노태 질소 함량이 정제염 된장 보다 높은 것을 보고하였다[17]. 산성 protease 활성 측정결과도 3년 숙성 천일염과 죽염 된장들이 정제염 첨가 된장에 비해 높은 효소활성을 나타내었다. Ca, K, Cu 등의 무기질에 의하여 protease 역가가 증가한다는 보고를 고려할 때 천일염과 죽염 된장에서 protease 역가가 비교적 높게 나타난 것은 천일염과 죽염에 함유된 다량의 미네랄 및 생리활성 물질들의 영향으로 인한 bacilli 균주들의 생육 촉진때문으로 추정된다[10].

혈전용해효소 활성 변화

Bacillus 종균을 접종한 된장들의 숙성 91일 동안의 혈전

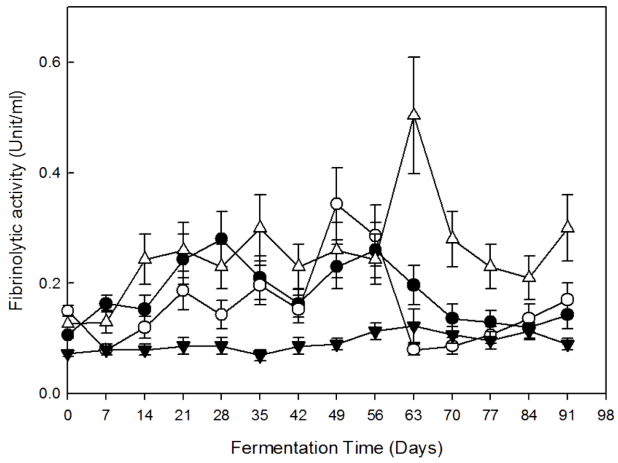

Fig. 2. Changes in the fibrinolytic activities of starter Doenjang samples during fermentation. ●, PS doenjang; ○, SS3 doenjang; ▼, SS1 doenjang; △, BS doenjang.

용해 효소 활성을 측정하였다(Fig. 2.). 종균 접종한 죽염 된장이 숙성 49일 이후 꾸준히 높은 수치를 보였고 특히 63일에 가장 높은 수치인 0.50 ± 0.11 unit/ml를 보였다. 3년 숙성 천일염 된장의 혈전용해능이 다음으로 높았고 숙성 49일에 0.34 ± 0.07 unit/ml를 나타내었다. 대체로 숙성 초기에는 죽염 된장과 정제염 된장들이 높은 수치를 보인 반면 숙성 49일에는 3년 숙성 천일염 된장이 가장 높았다. 63일 이후로 죽염 된장의 혈전용해능이 현저히 높았고 이는 아마도 *Bacillus* 생육 증가로 인한 영향으로 생각된다. 실제 된장 시료들의 숙성기간중 total bacilli 수를 측정한 결과 정제염 된장보다는 3년 숙성천일염 된장이나 죽염 된장의 균수가 높게 나타났고 이는 천일염이나 죽염에 존재하는 미네랄 들이 bacilli 생육을 촉진하기 때문으로 추정된다[17].

총페놀함량측정

된장의 주 재료인 대두는 isoflavones과 tocopherol이 존재하고 발효 과정에서 미생물 효소들의 작용에 의해 대두에 존재하지 않는 caffeic acid와 ferulic acid 등의 phenolic acid 항산화 성분들 함량도 증가한다[1, 15]. 페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 대사산물의 하나로 다양한 구조를 갖는다. 특히 이 중 phenolic hydroxyl기가 항산화 등과 같은 생리활성 기능을 나타내게 된다[7, 13]. 된장 숙성 중 0, 49, 91일의 항산화능을 4가지 방법(total phenolic contents, ABTS, DPPH, FRAP)으로 측정한 결과들을 Fig. 3–6에 각각 나타내었다.

총 페놀 함량 측정 결과(Fig. 3), 종균 접종 된장들에서는 제조 직후에 정제염 된장과 3년 숙성 천일염 된장이 각각 32.72 ± 1.24와 32.66 ± 0.96 mg/g GAE로 높은 함량을 보였

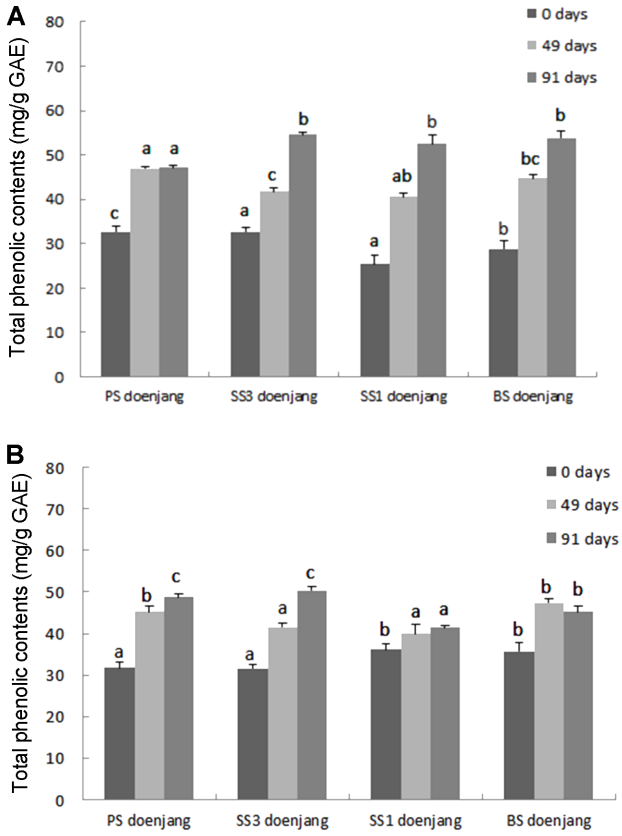

Fig. 3. Changes in the total phenolic contents of starter Doenjang samples (A) and non-starter Doenjang samples (B) during fermentation. Values are mean ± SD and values with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

고, 숙성 49일에는 정제염 된장이 47.00 ± 0.28 mg/g GAE으로 가장 높았다. 하지만 숙성 91일에는 정제염 된장이 가장 낮았고(47.08 ± 0.45 mg/g GAE) 3년 숙성 천일염 된장이 가장 높았다(54.56 ± 0.53 mg/g GAE). 다음이 죽염된장(53.89 ± 1.43 mg/g GAE)과 1년 숙성 천일염 된장(52.49 ± 1.96 mg/g GAE)이나 정제염 된장을 제외한 된장들간에는 유의적인 차이가 없었다. 비종균 접종 된장들에서는 제조 직후 총 페놀 함량은 죽염 된장과 1년 숙성 천일염 된장이 각각 36.17 ± 1.27과 35.66 ± 2.12 mg/g GAE 로 높았고, 숙성 49일에는 정제염 된장이 45.16 ± 1.56 mg/g GAE으로 가장 높았으며 숙성 91일에는 3년 숙성 천일염 된장이 50.34 ± 0.93 mg/g GAE으로 가장 높았다. 숙성 기간이 증가할수록 총 페놀화합물 함량이 증가하며 이는 Oh와 Kim 등이 보고한 결과와도 일치한다[13]. 숙성기간은 같더라도 소금에 따른 차이를 보이는 이유는 소금 종류에 따라 미생물 생육 정도가 달라지고 이로 인해서 생성되는 페놀화합물의 함량 변화가 생기는 것으로 추정된다.

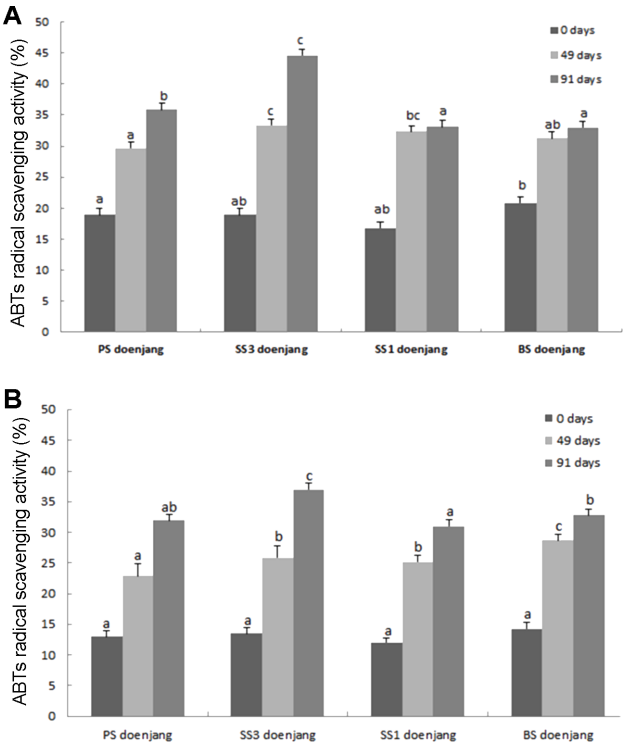

Fig. 4. Changes in the ABTs radical scavenging activities of starter Doenjang samples (A) and non-starter Doenjang samples (B) during fermentation. Values are mean ± SD and values with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

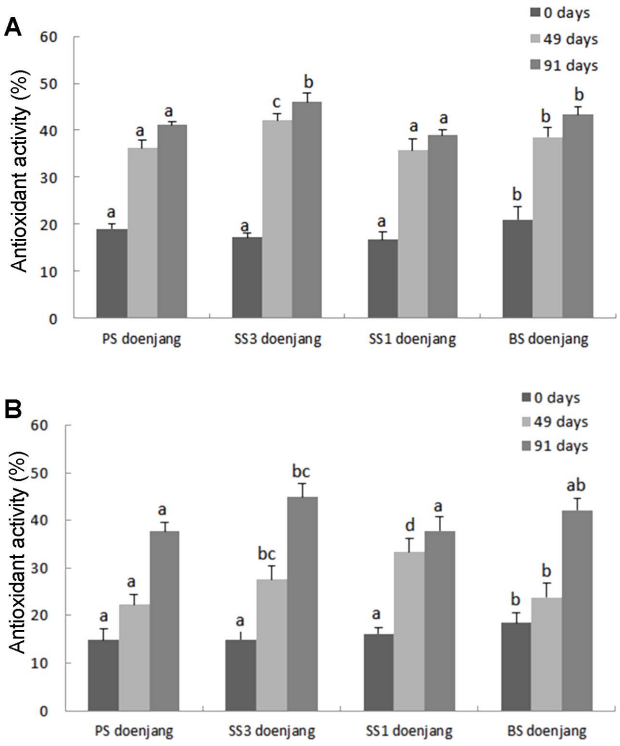

Fig. 5. Changes in the DPPH assay results of starter Doenjang (A) and non-starter Doenjang samples (B) during fermentation. Values are mean ± SD and values with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

항산화활성 측정

ABTS 방법에 의한 항산화능 측정 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 제조 직후 종균 접종 된장들 중에서는 죽염 된장이 20.88 ± 1.69%로 가장 높았다. 숙성 49일 이후에는 3년 숙성 천일염 된장이 가장 높은 수치를 보였다. 숙성기간이 증가할수록, 모든 된장의 항산화력은 증가하지만 3년 숙성 천일염 된장이 가장 높은 항산화력을 보이고 또 숙성 기간에 따른 증가 폭이 가장 두드려졌다. 91일에 3년 숙성 천일염 된장은 44.64 ± 1.24%로 가장 높았다. 다음은 정제염 된장(35.91 ± 0.34%), 1년 숙성 천일염 된장(33.14 ± 1.81%), 죽염된장(33.05 ± 0.89%) 순이였다. 종균 비접종 된장 시료들도 숙성 91일에 3년 숙성 천일염 된장이 가장 높은 수치를(37.00 ± 0.67%) 보였고 다음은 죽염 된장이였다(32.80 ± 1.97%).

DPPH 측정을 통한 항산화능 측정 결과(Fig. 5), 종균 접종된장들 중에서는 숙성 0일에는 죽염 된장이 21.00 ± 2.65%로 높게 측정된 반면 숙성 49일에는 3년 숙성 천일염 된장이 42.09 ± 1.41%로 가장 높고 다음이 정제염 된장이였다. 숙성 91일 차에도 3년 숙성 천일염 된장이 가장 높고(45.99 ± 1.89%) 다음이 죽염된장(43.31 ± 1.73%)였다.

비종균 접종 된장들의 경우, 숙성 91일에 3년 숙성 천일염 된장이 44.90 ± 2.83%로 가장 높고 다음이 죽염 된장으로 42.15 ± 2.50%를 보였다. 정제염 된장은 37.69 ± 1.90%를 나타내었다.

FRAP assay를 통한 항산화능 측정 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 된장 시료 대신 3차 증류수로 측정한 대조구 결과는 0.3509 ± 0.001으로 나타났다. 종균 접종한 된장들 중에서는 3년 숙성 천일염 된장이 91일에 0.5517 ± 0.002로 가장 높은 수치를 보였고, 다음이 죽염 된장으로 0.5146 ± 0.009를 나타내었다. 정제염 된장은 0.4960 ± 0.0052를 나타내었다. 비종균 접종 된장들에서는 죽염 된장이 숙성 91일에 가장 높은 0.5963 ± 0.008를 나타내었고 다음이 3년 숙성 천일염 된장으로 0.5424 ± 0.008를 보였다. 정제염 된장은 0.4776 ± 0.008을 나타내었다. 된장에 함유된 항산화 물질들은 발효과정을 통해서 더욱 활성화된 형태로 전환되는 것으로 알려져 있다. 된장이 숙성됨에 따라 대두의 isoflavone들은 배당체 형태에서 생체 내 흡수율과 이용률 및 건강기능성이 높은 비배당체 형태인 daidzein과 genistein으로 전환됨이 보고된 바 있다[4, 6]. 또한 발효 중 대두원료의 분해에 의해 항산화 효

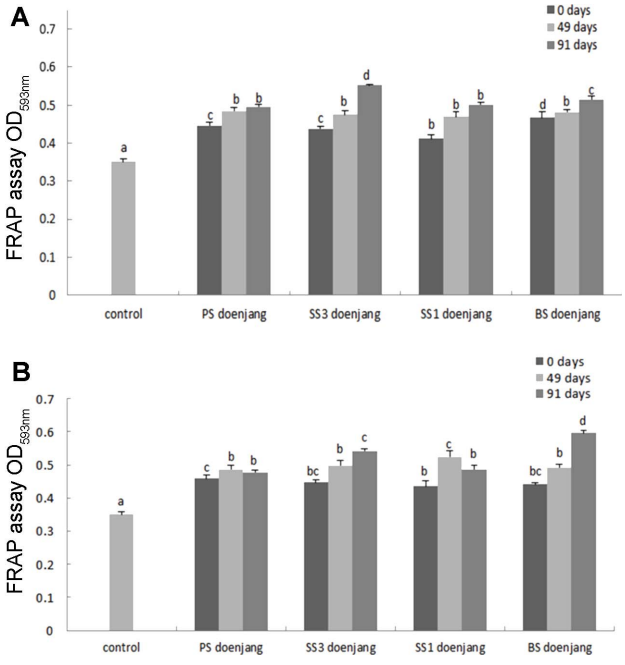

Fig. 6. Changes in FRAP assay results of starter Doenjang samples (A) and non-starter Doenjang samples (B) during fermentation. Values are mean ± SD and values with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

과를 지닌 것으로 알려진 아미노산, 펩타이드, 페놀화합물들 및 melanoidin 성분들이 생성된다[11]. Shim [16]과 Jeong [8]의 결과에서도 죽염과 정제염 첨가 된장들 간 항산화 활성에서 차이를 보였으며 이는 죽염이 지닌 다량의 미네랄 및 기타 생리활성 성분들에 의해 발효가 촉진된 때문이라 추정하였다.

본 실험에서는 여러 방법들로 측정한 된장의 항산화력은 정제염 된장보다는 3년 숙성 천일염 된장이 유의적으로 높게 나왔다. ABTS radical scavenging activity test, DPPH assay와 FRAP assay 결과 모두 3년 숙성 천일염 된장의 항산화능이 정제염 된장보다 유의적으로 높게 나왔다. 죽염 된장의 혈전용해능은 다른 된장들 보다 유의하게 높은 결과를 보였다. 이상 결과들로 볼 때 정제염 보다는 3년 숙성 천일염이나 죽염으로 된장을 제조할 경우 보다 기능성이 우수한 된장을 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 3년 숙성 천일염이나 죽염 된장에서 항산화능과 같은 기능성이 증진되는 이유로는 정제염에는 없는 미네랄 등에 의해 bacilli들 증식이 촉진되거나 혹은 효소 활성이 증가하여 항산화 대사체 농도가 증가한 때문이라 추정된다. 앞으로 종균 증식을 촉진하는 구체적 성분들과 된장 대사체 변화에 관한 연구가 필요하다.

Acknowledgments

This work was supported by a grant 201300290 to Solar Salt Research Center of Mokpo National University from Ministry of Oceans and Fisheries of Korea. J.M. Shim and K.W. Lee were supported by BK21 plus program, MOE, Republic of Korea.

References

1. Ahn JB, Park JA, Jo HJ, Woo IH, Lee SH, Jang KI. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of commercial doenjang and traditional doenjang in Korea. *Korean J. Food Nutr.* **25**: 142-148.
2. Bautista-Gallego J, Rantsiou K, Garrido-Fernández A, Cocolin L, Arroyo-López FN. 2013. Salt reduction in vegetable fermentation: reality or desire? *J. Food Sci.* **78**: R1905-R1100.
3. Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power"; the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**: 70-76.
4. Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I. 2003. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem. Toxicol.* **41**: 631-636.
5. Cho MJ, Lee JY, Kim JH. 2014. Microbial and physiochemical properties of cheonggukjang fermented using *Bacillus* strains with antibacterial or antifungal activities. *Food Sci. Biotechnol.* **23**: 1525-1532.
6. Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. 1993. Genistein, daidzein and their β-glycoside conjugates, antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric. Food Chem.* **41**: 1961-1967.
7. Gramza A, Khokhar S, Yoko S, Swiglo AG, 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.
8. Jeong MW, Jeong JK, Kim SJ, Park KY. 2013. Fermentation characteristics and increased functionality of Doenjang prepared with bamboo salt. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**: 1915-1923.
9. Jeong S-J, Kwon G-H, C hun J, Kim JS, Park C -S, Kwon DY, Kim JH. 2007. Cloning of fibrinolytic enzyme gene from *Bacillus subtilis* isolated from cheonggukjang and its expression in protease-deficient *Bacillus subtilis* strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 1018-1023.
10. Kim JY. 2007. Isolation and characterization of an alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* JK-1. *Korean J. Microbiol.* **43**: 331-336.
11. Kim MH, Im SS, Yoo YB, Kim GE, Lee JH. 1994. Antioxidative materials in domestic-Meju and doenjang. 4. Separation of phenolic compounds and their antioxidative activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **23**: 792-798.
12. Lee CH, Yang L, Xu JZ, Yeung SYV, Huang Y, Chen ZY. 2005. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosids. *Food Chem.* **90**: 735-741.

13. Oh HJ, Kim CS. 2007. Antioxidant and nitrite scavenging ability of fermented soybean foods (Chungkukjang, Doenjang). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**: 1503-1510.
14. Pellefrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiaz-oline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Meth. Enzymol.* **299**: 379-389.
15. Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. 1997. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radical Res.* **26**: 63-70.
16. Shim JH, Park ES, Kim IS, Park KY. 2015. Antioxidative and anticancer effects of doenjang prepared with bamboo salt in HT-29 human colon cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 524-531.
17. Shim JM, Lee KW, Yao Z, Kim HJ, Kim JH. 2016. Properties of doenjang (soybean paste) prepared with different types of salts. *J. Microbiol. Biotechnol.* DOI : 10.4014/jmb.1605.05019.
18. Singleton VL, Rossi JA Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphormolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**: 144-158.
19. So MH, Lee YS, Kim HS, Cho EJ, Yea MJ. 1996. An influence of salt concentrations on growth rates of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Food Nutr.* **9**: 341-347.
20. Zhao X, Jung OS, Park KY. 2012. Alkaline and antioxidant effects of bamboo salt. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 1301-1304.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1606.06005