

표고버섯 첨가에 따른 재래식 된장 발효 과정중의 미생물, 효소 활성 및 기능성의 변화

이창호¹ · 이주백 · 장상문*

대구보건대학 보건식품계열, ¹경북대학교 식품공학과

초 록 : 전통 발효 식품인 된장에 새로운 기능성을 부여하기 위한 기초실험으로서 된장을 제조하여 일정기간 숙성시킨 후, 표고버섯을 일정 비율로 첨가하여 된장 숙성 중의 미생물, 효소 활성 변화와 주요 성분의 변화를 조사하였다. pH는 표고버섯의 첨가량에 관계없이 숙성기간 내내 감소하였으며, 총산은 숙성기간이 길어짐에 따라 증가하였다. NaCl 함량은 숙성 30일까지는 15.67~16.02%로 증가하는 경향을 나타내었으나 그 이후에는 감소하였으며, 아미노산도는 표고버섯의 첨가농도가 높을수록 증가하였다. 환원당 함량은 숙성 30~45일까지는 증가하였으며, 총당은 숙성 30일 일 때 18.21~20.57%로 증가하는 경향을 나타내었으며 표고버섯의 농도가 높을수록 증가하였다. 총균수는 모든 시험구에서 숙성 45일때 최대 균수를 나타내었으며, 효모수는 숙성 30일까지는 증가한 후 다시 감소하였으며, 곰팡이의 경우에는 숙성 초기에 많은 균수를 나타내었으나 숙성이 진행됨에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 숙성 과정중 amylase와 protease는 대두 단백질 분해에 중요한 역할을 수행한다. Amylase 활성은 표고버섯의 농도가 높을수록 감소하였으며, protease 활성과 tyrosinase의 저해 활성은 표고버섯의 농도가 높을수록 증가하였다. ACE 저해 활성은 숙성이 진행됨에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며 표고버섯을 첨가하여 된장을 숙성시킨 경우에 활성이 높게 나타났다. 항돌연변이 활성은 숙성 기간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었으며, *Salmonella typhimurium* TA100에 대하여 변이원 MNNG와 NPD에 대한 항돌연변이 활성은 표고버섯을 10% 첨가시 각각 83.15%와 65.88%로 높은 활성을 나타내었다. *S. typhimurium* TA98에 대하여 변이원 4-NQO와 NPD에 대한 항돌연변이 활성은 *S. typhimurium* TA100과 마찬가지로 숙성 기간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 4-NQO와 NPD에 대한 항돌연변이 활성은 표고버섯을 10% 첨가시 각각 54.59%와 55.00%로 높은 활성을 나타내었다. (2000년 8월 4일 접수, 2000년 10월 31일 수리)

서 론

장류는 대두를 주원료로 하여 가공한 저장성이 있는 조미식품으로서 예전부터 전해 내려온 조미 발효 식품인 동시에 우리 식생활의 단백질 공급원으로서도 중요한 전통적인 부식이다.¹⁾ 그 중 된장은 전통적인 맛과 향을 지닌 대두 발효식품으로 탄수화물 원료에 *Aspergillus* sp.의 균을 이용 대두와 함께 제조하는 것으로 우리의 식생활에 필수 불가결한 식품이다.²⁾ 된장은 콩이나 콩 가공식품을 이용하여 제조하는 것으로서 콩에 존재하는 여러 가지 건강 기능성을 나타내는 성분들인 isoflavone, trypsin inhibitor, phenolics, maillard 반응 산물, globulin, 펩타이드 등이 암, 혈관계 질환, 골다공증, 신장 질환 등의 각종 성인병에 예방 및 치료 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 따라서 콩을 이용한 발효 식품인 된장의 기능성에 관한 연구가 점차 증가하고 있는 추세이다. 이미 일본에서는 일본의 된장(Miso) 및 간장(Shoyu)에서 항암(anti-tumor), 항 돌연변이(anti-mutagenic) 및 항산화(anti-oxidizing) 물질이 발견된다는 보고가 있으며,⁶⁻¹⁰⁾ 한국에서도 전통 된장에서 분리한 항 돌연변이 및 항 암 물질이 존재한다는 사실이 여러 연구자들에 의해 밝혀지고 있다.¹¹⁻¹⁵⁾ 또한 기타 된장의 발효 숙성 과정 중에 생성되는

생리 활성 물질의 기능은 고혈압 방지 효과^{11,12)} 등이 있다.

그리고 버섯에서 항암효과와 혈중콜레스테롤 저하 효과등이 있다는 것으로 알려진 이래 버섯류의 생리활성 물질에 대한 연구가 진행되고 있다.¹⁶⁾ 그 중 표고버섯(*Lentinus edodes*)은 항미생분과 약리효과를 가지고 있어 국내에서도 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있다.¹⁷⁾ 표고버섯의 약리효과는 균사체(mycelium) 및 자실체(fruiting body)에 존재하는 성인병 예방과 인터페론 생성을 촉진하는 단백질다당체가 종양에 대한 생체 고유의 방어력을 높여줌으로서 간 종양에 대한 생체 고유의 방어능력을 높여줌으로서 간접적으로 종양세포의 증식을 저해하거나,¹⁸⁾ 암세포나 병원성균을 직접 사멸하는데 중요한 역할을 담당하는 대식세포의 수를 증가시키는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.¹⁹⁾ 이러한 단백질 다당체는 주로 균사체에 많이 존재하며 바이러스성 질환에 스스로 방어하고 인터페론과 같은 항체생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.^{20,21)}

그러나 지금까지의 된장에 관한 연구로는 각 균주를 이용한 단백질 분해력, 당화력, 향기의 생성 능력 그리고 일반적인 화학 성분의 변화에 관하여 많은 연구^{2,13,14)}와 제조 방법을 다르게 하여 된장을 제조한 후, 일정 기간을 숙성시키면서 각각의 품질의 변화를 측정하거나, 된장의 생리기능성을 조사하였다.^{6-10,22)} 그러나 된장 숙성 중 여러 가지 생리 기능성을 가진 표고버섯을 첨가하여 된장 숙성중의 변화와 생리 기능성을 검토한 결과는 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 된장 제조시 표고버섯을 일정 비율로 첨가하여 된장 숙성 중의

찾는말 : *Cortinellus edodes*, Traditional Doenjang, Enzyme activity, Physiological functionality

*연락처 : Tel : 82-53-320-1482; Fax : 82-53-320-1490

E-mail : smjang@mail.teagu-hc.ac.kr

Table 1. Mixing ratio for making traditional Doenjang

Materials	Type of sample				
	A	B	C	D	E
Traditional meju(kg)	0.700	0.693	0.679	0.665	0.630
Lentinus edodes(kg)	-	0.007	0.021	0.035	0.070
Salt(kg)	0.300	0.300	0.300	0.300	0.300
Water(kg)	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100

A, Traditional Meju Doenjang(Control); B, 1% *Lentinus edodes* + Traditional Meju Doenjang; C, 3% *Lentinus edodes* + Traditional Meju Doenjang; D, 5% *Lentinus edodes* + Traditional Meju Doenjang; E, 10% *Lentinus edodes* + Traditional Meju Doenjang.

미생물, 효소 활성 및 주요 기능성을 조사하였다.

재료 및 방법

원료

본 실험의 재료인 재래식 메주는 경북 경산시에 소재하고 있는 성 바오로 수녀원에서 1997년도 국내산 대두로 제조한 것을 구입하여 사용하였으며, 식염은 순도 97%인 정제염을 사용하였다. 그리고 표고버섯(*Lectinus edodes*)은 시장에서 구입하여 분말화하여 사용하였다.

된장의 제조

제조한 된장의 배합은 표 1과 같이 표고버섯의 분말을 메주 중량에 대하여 1%, 3%, 5% 및 10% 농도로 첨가한 5개의 시험구로 하여 각각의 메주에 소금 300 g을 첨가하여 염 농도가 15±1% 되도록 조절하였고 수분 함량은 55±1% 되도록 조절하여 항온 배양기(20±1°C)에서 60일간 숙성시켰다.

이화학적 성분의 분석

이화학적 성분의 분석은 pH는 pH meter로, 산도와 아미노산도의 측정에는 중화법에 준하였고, NaCl 농도는 Mohr 법,²³⁾ 환원당 측정에는 DNS(Dinitrosalicylic acid)법²⁴⁾으로 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 총당의 정량은 phenol-H₂SO₄법²⁵⁾으로 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

미생물 균수의 측정

된장 시료 10 g에 멸균 증류수 90 ml를 첨가하고 상온에서 2시간 진탕한 후, 시료를 단계별로 희석하여 평판 배지에서 배양하였다. 총 균수의 측정은 영양한천배지(Nutrient agar plate)를 이용하여 30°C에서 2-3일, 효모수의 측정은 YPD agar plate(yeast extract 0.5%, peptone 1.0%, dextrose 1.0%, agar 1.5%)를 이용하여 30°C에서 2-3일, 곰팡이의 측정은 PDA(potato dextrose agar) plate를 이용하여 30°C에서 4-6일 배양한 후에 생육하는 colony수를 계수 하였다.

효소 활성의 측정

조효소액의 조제: 된장 시료 10 g에 증류수를 첨가하여 200 ml로 정용한 후, shaking water bath(30°C)에서 4시간 동안 추출하여 4°C에서 2시간 방치한 다음 12,000×g에서 10분간 원심 분리 하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

활성도의 측정: Amylase의 활성은 DNS법,²⁴⁾ Protease의 활성은 Hull²⁶⁾의 방법을 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosine양(μg/ml)으로 환산하였다. Tyrosinase 활성 저해능 측정²⁷⁾은 475 nm에서 단위 시간당 변화된 초기 흡광도의 변화 값(S_{Abs})과 효소액 대신에 증류수를 0.1 ml 첨가하여 흡광도를 측정한 값(B_{Abs}), 시료 용액 대신에 증류수를 0.5 ml 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 값(C_{Abs})을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibitory effect(\%)} = 1 - \frac{S_{\text{Abs}} - B_{\text{Abs}}}{C_{\text{Abs}}} \times 100$$

ACE(Angiotensin converting enzyme) 저해 활성 측정

시료의 조제: 된장 시료 20 g에 증류수를 20 ml 첨가하여 95°C 항온 수조에서 20분간 방치한 후, 증류수를 20 ml 첨가한 후, 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상정액을 시료로 사용하였다.

ACE 저해 활성의 측정: ACE 저해 활성의 측정은 Cushman과 Cheung의 방법²⁸⁾에 준하여 실시하였다. 시료 50 μl에 기질 50 μl를 첨가한 후, 37°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 ACE 용액을 50 μl를 첨가하고 다시 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 1 N HCl 용액 250 μl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 다시 여기에 ethyl acetate 1.5 μl를 가하여 15초간 균질화 한 후, 5,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 1 μl를 취하였다. 이 상정액을 80°C에서 1시간 가열하여 완전히 건조시킨 후, 1 M NaCl 용액을 3 ml를 첨가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{B-A}{B-C} \times 100$$

B: 시료 대신 증류수 첨가시의 흡광도

A: 시료 첨가시의 흡광도

C: 반응 정지 후 시료 첨가시의 흡광도

항돌연변이 활성의 측정

시료의 조제: 된장 시료 20 g에 증류수를 100 ml 첨가하여 균질화 한 후, 80°C 항온 수조에서 3시간 열수 추출한 다음 원심 분리하여 상정액을 건조 시킨 후, 증류수를 첨가하여 시료로 사용하였다.

Ames test에 의한 돌연변이원성 및 항돌연변이 활성 측정: 시료의 돌연변이 및 항돌연변이 활성 측정은 Ames test를 개량한 preincubation method²⁹⁻³¹⁾에 따라 히스티딘 영양 요구주로서 point mutant인 *Salmonella typhimurium* TA100(hisG46,

rfa, ΔuvrB)과 frame shift mutant인 *S. typhimurium* TA98 (*hisD3052, rfa, ΔuvrB*)을 사용하여 시료에 의한 His⁺ 복귀 돌연변이 정도를 조사하여 행하였다. 변이원으로는 *S. typhimurium* TA100인 경우에는 MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) NPD(4-nitro-O-phenylenediamine)를 plate당 각각 5 μg, 15 μg되게 사용하였으며, *S. typhimurium* TA98인 경우에는 NPD, NQO(4-nitroquinoline-1-oxide)를 각각 2.5 μg, 0.25 μg되게 사용하였다. 항돌연변이 활성 조사를 위하여는 미리 건열시킨 시험관에 시료 용액을 100 μl를 첨가하고 변이원을 50 μl 첨가한 다음 여기에 영양배지에서 16시간 배양시킨 *S. typhimurium* TA 배양액 100 μl와 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.5 ml를 첨가하였다. 이것을 37°C에서 30분간 preincubation한 다음 소량의 histidine/biotin이 첨가된 top agar(45°C) 3 ml를 혼합한 후, 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar상에서 증중하여 평판고화 시킨 다음 37°C에서 48 시간 배양하였다. 항돌연변이 활성은 상기의 고체 배지에서 생육하는 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니를 계수한 다음 다음식으로 환산하여 His⁺ 복귀 돌연변이 저해율(inhibition ratio)로서 나타내었다.

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

a: 변이원에 의해 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수

- b: 변이원과 시료 처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수
- c: 변이원과 시료 무처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수

시료의 돌연변이원성 조사를 위하여는 변이원을 첨가하지 않고 시료만을 첨가하여 상기의 항돌연변이 활성 실험과 같은 방법으로 행하였다. 돌연변이 활성은 시료에 의한 His⁺ 복귀 돌연변이율로서 무처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수에 대한 시료 처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수의 %로 나타내었다. 돌연변이 및 항돌연변이 활성 조사는 3구 3회 반복으로 실험하여 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

이화학적 성분의 분석

된장을 제조하여 일정 기간 숙성시킨 후, 표고버섯을 각 농도별로 첨가하여 숙성시키면서 일반 성분의 변화를 측정할 결과는 표 2와 같다. pH 변화와 총산의 변화는 숙성중의 미생물 발효 대사산물과 밀접한 관련이 존재하는데 pH의 변화는 표고버섯의 처리량에 관계없이 된장 제조 직후의 pH가 6.19에서 숙성기간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며, 감

Table 2. Changes of pH, acidity, NaCl, amino acidity, reducing sugar and total sugar in the traditional *Doenjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation

Type of sample ¹⁾	Fermentation time (days)	pH	Acidity (% ²⁾	NaCl (% ²⁾	Amino acidity ²⁾	Reducing sugar (% ²⁾	Total sugar (% ²⁾
A	0	6.19	0.47	15.21	1.10	2.97	12.73
	15	6.13	0.68	15.79	1.93	5.86	15.47
	30	6.08	0.77	15.67	2.35	6.02	17.75
	45	5.92	0.90	15.40	2.75	6.02	16.43
	60	5.80	1.15	15.21	2.95	5.78	14.17
B	0	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-
	30	6.10	0.79	15.67	2.55	5.97	18.37
	45	5.95	0.92	15.29	3.05	6.00	16.73
	60	5.85	0.97	14.63	3.15	5.93	14.20
C	0	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-
	30	6.07	0.83	16.09	2.55	5.84	19.21
	45	5.98	0.95	15.70	3.05	6.08	16.94
	60	5.87	0.97	14.92	3.25	6.06	14.56
D	0	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-
	30	6.06	0.77	15.21	2.60	5.76	20.11
	45	5.95	0.90	15.01	3.10	6.08	17.14
	60	5.83	0.99	14.63	3.30	6.03	16.49
E	0	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-
	30	6.06	0.81	16.09	2.70	5.68	20.57
	45	5.94	0.95	15.60	3.10	6.19	17.49
	60	5.87	0.97	15.21	3.55	6.05	17.03

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾Significantly different from the control at the P<0.05 level.

소하는 비율은 거의 유사한 수준이었다. 총산의 변화는 숙성 기간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 대조구에서 비교적 높게 나타났다. 그리고 표고버섯을 첨가한 경우에는 표고버섯의 첨가농도에 관계없이 거의 비슷한 수준을 나타내었다. NaCl의 함량 변화는 발효 30일까지는 증가하는 경향을 나타내었으며 그 이후의 기간에서는 표고버섯의 첨가 농도에 관계없이 감소하는 경향을 나타내었다. 아미노산도의 변화는 대조구 보다 표고 버섯 첨가한 실험구에서 비교적 높은 아미노산도를 나타내었으며, 표고버섯의 첨가량이 증가하거나 발효 기간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 표고버섯의 성분에는 핵산과 아미노산이 풍부하게 존재하여 이들 성분이 발효중 미생물이 생성하는 효소의 작용으로 생성 축적되기 때문으로 사료된다.¹⁶⁾ 환원당 함량은 담금 직후에는 2.97%이었던 것이 숙성 30~45일까지는 6.02~6.19%로 증가하는 경향을 나타내었으나, 그 이후에는 감소하였다. 이러한 결과는 담금 초기에 당화 amylase의 작용이 미약하여 환원당의 생성이 적으나, 담금 30~45일 때 당화 amylase의 활성이 비교적 높게 나타나 당 함량이 최대치를 나타내었고, 그 후 된장에 생육되는 미생물의 영양원, 알콜 발효, 유기산 발효의 기질로 당이 이용되었기 때문에 환원당 함량이 감소된 것으로 생각된다. 이는 담금 중반기에 환원당이 증가하였다가 그 후 감소되었다는 Lee 등⁽³²⁾의 보고와 유사하였다. 총당의 함량은 환원당 함량과 마찬가지로 숙성 30일일 때 최대를 나타내었으며, 표고버섯의 첨가량이 많을수록 총당 함량은 증가하는 경향을 나타내었다.

미생물 생균수의 변화

된장 숙성 과정 중에 생육하는 미생물은 된장의 품질에 중요한 영향을 주며 특히 맛과 향기 생성에 크게 기여한다.³³⁾ 또한 미생물에 의하여 생성된 효소는 대두에 작용하여 각종 단백질과 지방을 분해하여 저분자량의 물질을 생성한다. 된장 숙성 과정중의 미생물 생균수의 변화는 표 3과 같다. 총 균수의 경우 전 시험구에서 발효 45일까지는 증가하다가 그 이후에는 감소하는 경향을 나타내었다. 된장에 존재하는 효모는 발효 30일까지는 증가한 후 다시 감소하였으며, 재래식 된장의 경우 발효 초기에 pH가 6.10 전후로서 효모의 생육이 가능했음에도 불구하고 숙성 15일부터 출현하여 발효 30일까지 증가한 후 감소하였다. 곰팡이의 경우에는 발효 초기에 많은 균수를 나타내었으나 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Kim 등³⁴⁾이 발효 기간에 따른 곰팡이의 변화를 조사한 결과, 발효 60일까지 증가한 후 감소하였다고 보고하여 본 실험과 다른 결과를 나타내었다. 표고버섯을 첨가한 경우 대조구보다 미생물 생균수(총균수, 효모, 곰팡이)가 적게 나타났으며, 또한 농도가 높을수록 적게 나타났다. 이는 pH의 저하로 인한 생육 환경의 변화와 표고버섯에 존재하는 항미생물성 성분이 미생물의 생육을 억제하였기 때문이라고 생각된다.

효소 활성의 변화

된장 숙성중 효소활성의 변화는 표 4와 같다. 숙성 중 amylase 활성의 경시적 변화는 숙성이 진행됨에 따라 초기에 1.36 unit/ml인 것이 숙성 30일까지 2.83-3.07 unit/ml로 활성이

Table 3. Changes of Total cell, yeast and mold in the traditional Doenjang with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation
[Unit: log number(CFU/G)]

Type of sample ¹⁾	Fermentation time(days)	Total cells ²⁾	Yeast ²⁾	Mold ²⁾
A	0	6.54 ³⁾	0.00	5.47
	15	7.04	2.24	5.24
	30	7.84	3.98	4.39
	45	7.85	3.82	3.94
	60	7.46	3.40	2.14
B	0	-	-	-
	15	-	-	-
	30	7.16	3.96	4.33
	45	7.45	3.74	3.87
	60	7.45	3.37	2.07
C	0	-	-	-
	15	-	-	-
	30	7.12	3.88	4.28
	45	7.45	3.70	3.80
	60	7.38	3.34	2.11
D	0	-	-	-
	15	-	-	-
	30	7.12	3.90	4.30
	45	7.39	3.62	3.83
	60	7.36	3.29	2.10
E	0	-	-	-
	15	-	-	-
	30	7.15	3.78	4.29
	45	7.30	3.56	3.79
	60	7.30	3.22	2.11

The total cells was cultured at 30°C for 2-3 days in nutrient agar medium, Yeast was cultured at 30°C for 2-3 days in YPD agar medium, Mold was cultured at 30°C for 4-6 days in potato dextrose agar medium.

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾Significantly different from the control at the P<0.05 level.

³⁾The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate.

증가하였으나 발효가 진행되면서 점차 활성이 감소하였다. 그리고 표고버섯을 첨가한 경우의 amylase의 활성은 대조구와 비교시 낮은 활성을 나타내었다. 된장의 맛 성분에 관여하는 유리당은 된장 발효에 관여하는 미생물이 분비하는 amylase의 활성도에 영향을 받으며, 이는 미생물의 변화와 총당, 환원당의 변화에 영향을 미친다. 된장의 protease의 활성은 단백질 분해 특유의 구수한 맛 성분을 유리하고 이들의 숙성 정도를 나타내는 유리 아미노산 함량에 많은 영향을 준다. 숙성 중 protease 활성의 변화는 숙성이 진행됨에 따라 초기에 4.87 unit/ml인 것이 숙성 30일일 때 표고버섯을 첨가한 경우 7.49-7.77 unit/ml까지 점차 그 활성이 증가하였으며 표고버섯의 농도가 높을수록 활성이 높게 나타났고 숙성이 진행되면서 점차 활성이 감소하였다. 된장 제조시 표고버섯을 첨가하여 tyrosinase의 저해 활성능의 변화는 숙성이 진행됨에 따라 tyrosinase의 저해 활성은 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 표고버섯을 10%첨가하여 된장을 발효시킨 경우에 대조구 보다 약 10%정도 높은 활성을 나타내었다. Tyrosinase는 tyrosine으로부터 quinone이 생성

Table 4. Changes of amylase, protease activity and tyrosinase inhibitor in the traditional Doenjang with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation

Type of sample ¹⁾	Fermentation time(days)	Amylase activity(unit/ml) ²⁾	Protease activity(unit/ml) ²⁾	Tyrosinase inhibitor(%) ²⁾
A	0	1.36	4.87	4.79
	15	2.46	6.46	7.30
	30	3.07	7.46	9.55
	45	3.00	6.29	12.76
	60	2.75	4.65	16.49
B	0	-	-	-
	15	-	-	-
	30	3.01	7.49	12.58
	45	2.96	6.64	15.29
	60	2.77	5.13	19.57
C	0	-	-	-
	15	-	-	-
	30	3.00	7.57	13.13
	45	2.92	6.63	16.97
	60	2.64	5.24	20.64
D	0	-	-	-
	15	-	-	-
	30	2.92	7.66	14.58
	45	2.72	6.87	18.79
	60	2.58	5.66	22.87
E	0	-	-	-
	15	-	-	-
	30	2.83	7.77	15.06
	45	2.76	6.91	20.09
	60	2.61	5.78	26.26

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾Significantly different from the control at the P<0.05 level.

된 후에 아미노산 또는 단백질과의 중합 반응에 의해 melanin이 합성된다.^{35,36)} 이 때 생성된 melanin은 사람의 얼굴이나 팔, 다리 등의 피부에 색소가 비정상적으로 생성되어 나타나는 원인 물질로서 화학적 물리적으로 매우 안정하여 일단 생성된 색소를 파괴 또는 분해하여 제거하기란 매우 어렵다고 알려져 있다. 그리고 현재 tyrosinase 저해제로 여러 가지가 사용되고 있으나,³⁷⁻⁴⁰⁾ 안전성과 경제성등의 문제점을 안고 있기 때문에 표고버섯을 첨가하여 된장 제조시 tyrosinase의 저해 활성능이 증가하기 때문에 자연스럽게 식품을 통하여 섭취하면 tyrosinase

의 활성을 저해할 수 있으리라 사료된다.

ACE(Angiotensin converting enzyme) 저해 활성의 변화

전통 발효 식품인 된장 숙성시 표고버섯을 첨가하여 안지오텐신전환효소(angiotensin converting enzyme; ACE) 활성 저해 효과를 조사한 결과, 표 5와 같이 숙성이 진행됨에 따라 ACE 저해 활성은 증가하는 경향을 나타내었으며, 또한 표고버섯의 농도가 높을수록 저해 활성은 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 표고버섯에 ACE 저해 활성 물질이 존재하든지 아니면 된장 발효 중에 대두 단백질을 가수분해하여 ACE 저해 활성을 나타내는 peptide 생성에 된장 발효 중에 첨가된 표고버섯이 직접 또는 간접적으로 관여하였을 것으로 추정할 수 있다고 사료된다. ACE는 혈압을 상승시킴과 동시에 생체내에서 혈압을 저하시키는 bradykinin을 분해한다. 그리고 지방산의 산화를 촉진하거나 과산화기를 증가시킴으로 동맥경화의 위험을 높이는 것으로 알려져 있다.^{41,42)} 최근 우리 나라에서도 식품으로부터 영양소 또는 비 영양소 성분의 항암, 항노화, 항고혈압 등 다양한 생리 활성을 나타내는 기능성 성분들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이들의 활성 저해 효과는 혈압 강하제와 비교했을 때 비교적 낮은 활성을 나타내지만 대량으로 항상 섭취하는 식품 중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대되어진다.⁴³⁻⁴⁵⁾

항돌연변이 활성의 변화

전통 발효 식품인 된장이 항돌연변이 활성을 가지고 있다고 알려져 있다고 확인¹⁵⁾되었기에 된장 제조시 표고버섯을 첨가하여 된장 숙성시 항돌연변이 활성에 어떤 영향을 미치는지를 숙성 기간별로 물 추출하여 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을 사용하여 직접 변이원인 MNNG, NPD 및 4-NQO에 대한 항돌연변이 활성을 조사한 결과(표 6), *S. typhimurium* TA100에 대하여 변이원 MNNG와 NPD에 대한 된장의 물 추출물의 항돌연변이 활성은 표고버섯의 농도가 높을수록 그리고 발효 기간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 표고버섯을 10% 첨가하여 60일 숙성시 각각 83.25%와 65.88%로 대조구 보다 약 25%와 15%정도 높게 나타났다. *S. typhimurium* TA98에 대하여 변이원 4-NQO와 NPD에 대한 된장의 물 추출물의 항돌연변이 활성은 *S. typhimurium* TA100과 마찬가지로 표고버섯의 농도가 높을수록 그리고 발효 기간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었는데 표고버섯 10% 첨가

Table 5. Changes of ACE(Angiotensin converting enzyme) inhibitor in the traditional Doenjang with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation

Fermentation time (days)	Type of sample ¹⁾	ACE inhibitor(%) ²⁾				
		A	B	C	D	E
0		15.24	-	-	-	-
15		20.17	-	-	-	-
30		24.48	25.12	24.98	25.21	25.69
45		29.96	32.17	34.58	38.19	42.18
60		35.58	37.19	38.51	42.57	45.76

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾Significantly different from the control at the P<0.05 level.

Table 9. Changes of Antimutagenic activity in the traditional Doenjang with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation

Strains	Type of sample ¹⁾ Fermentation times(days)	Inhibition ratio(%) ²⁾									
		A		B		C		D		E	
		MNNG	NPD	MNNG	NPD	MNNG	NPD	MNNG	NPD	MNNG	NPD
TA100	0	11.06	10.41	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	25.44	21.04	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	39.57	32.13	39.90	33.08	40.82	34.76	41.98	36.71	43.82	38.65
	45	50.55	44.43	54.71	47.90	58.04	55.47	63.19	57.37	68.18	61.78
	60	60.04	51.58	64.28	55.79	70.68	59.26	76.75	62.10	83.15	65.88
TA98		NQO	NPD	NQO	NPD	NQO	NPD	NQO	NPD	NQO	NPD
	0	9.49	6.70	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	18.31	14.02	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	27.36	26.34	28.25	28.22	29.95	33.54	30.43	39.02	32.96	41.46
	45	35.17	34.05	39.07	37.32	41.56	44.81	42.89	48.29	46.44	51.34
60	40.31	38.32	45.20	44.02	47.86	49.51	51.94	51.95	54.69	55.00	

Antimutagenic activity of the water extract *Doenjang*(100 μ l/plate) were determined using *S. typhimurium* TA100 and TA98 and are expressed as inhibition ratio(%) of His⁺ reversion. For the reversion of His⁺ mutation of *S. typhimurium*, MNNG(5 μ g/plate) and NPD(15 μ g/plate) were used for *S. typhimurium* TA100 and NPD(2.5 μ g/plate) and NQO(0.25 μ g/plate) were used for *S. typhimurium* TA98.

¹⁾Symbol were same as those used in Table 1.

²⁾Significantly different from the control at the P<0.05 level. The means represent the average of at least three trials that were performed in triplicate.

하여 60일 숙성시 각각 83.25%와 65.88%로 대조구 보다 약 25%와 15%정도 높게 나타났다. 된장의 추출물은 돌연변이원의 종류와 사용 균주에 따라 다른 항돌연변이 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 돌연변이원의 종류에 따라 작용 기작이 다르므로 항돌연변이 활성도 돌연변이원에 따라 서로 다른 경향을 보이는 것으로 추정되며, 사용한 균주의 유전자형 또한 항돌연변이 활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Joo, H. K., Kim, D. H. and Oh, K. T. (1992) Chemical composition changes in fermented Doenjang depend on Doenjang koji and its mixture. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**, 351-360.
- Joo, H. K., Oh, K. T. and Kim, D. H. (1992) Effects of mixture of improved Meju, Korean traditional Meju and Natto on soybean paste fermentation. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**, 286-293.
- Messina, M. (1995) Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J. Nutr.* **125**, 567-571.
- Persky, V. and van Horn, L. (1995) Epidemiology of soy and cancer: perspective and directions. *J. Nutr.* **125**, 709-712.
- Potter, S. M. (1995) Overview of proposed mechanisms for the hypocholesteolemic effects of soy. *J. Nutr.* **125**, 606-614.
- Benjamin, H., Storkson, J., Tallas, P. G. and Pariza, M. W. (1988) Reduction of bezo(α)pyren-induced mouse forestomach neoplasms in mice given nitrite and dietary soy sauce. *Food Chem. Toxic.* **26**, 671-678.
- Benjamin, H., Storkson, J., Nagahara, A. and Pariza, M. W. (1991) Inhibition of bezo(α)pyren-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res.* **51**, 2940-2942.
- Nagahara, A., Benjamin, H., Storkson, J., Krewson, J., Sheng, K., Liu, W., and Pariza, M. W. (1992) Inhibition of bezo(α)pyren-induced mouse forestomach neoplasia by a principal flavor component of japanese-style fermented soy sauce. *Cancer Res.* **52**, 1754-1756.
- Ohsaki, Y., Gazdar, A. F., Chen, H. C. and Johnson, B. E. (1992) Antitumor activity of Magainin analogues against human lung lines. *Cancer Res.* **52**, 3534-3538.
- Asahara, N., Zhang, X. B. and Ohta, Y. (1992) antimutagenicity and mutagen-binding activation of mutagenic pyrolyzates by microorganisms isolated from Japanese miso. *J. Sci. Food Agric.* **58**, 395-401.
- Cheigh, H. S. and Lee, C. Y. (1993) Antioxidative and antimutageni characteristics of melanoidin related products. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **22**, 246-252.
- Cheigh, H. S., Lee, J. S., Moon, G. S. and Park, K. Y. (1993) Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **22**, 565-569.
- Cheigh, H. S., Lee, J. S. and Lee, C. Y. (1993) Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **22**, 570-575.
- Park, K. Y., Moon, S. H., Baik, H. S. and Cheigh, H. S. (1990) Antimutagenic effect of Doenjang(Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **19**, 156-162.
- Park, K. Y., Lin, S. Y. and Rhee, S. H. (1997) Antimutagenic and anticarcinogenic effects of Doenjang. *J. Kor. Assoc.* **1**, 99-107.
- Park, K. M. and Lee, B. W. (1998) Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharides from Mycelia of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**, 1236-1242.
- Chang, Y. S., Lee, H. B., Lee, S. R. and Shin, Z. I. (1990) Studies on the extracts preparation of korean Shiitake mushroom(*Lentinus edodes*). *Kor. J. Food Sci.* **22**, 828-832.

18. Chihara, G. (1985) Immune modulation agents and their mechanisms(Lentinan, A T-cell oriented immunopotentiator). *NY and Basel*. **19**, 409-436
19. Takehara, M. (1979) Antiviral activity of virus-like particles from *Lentinus edodes*(Shiitake). *Arch. Virol.* **59**, 269-280.
20. Takehara, M. (1981) Antiviral effect of virus-like particles from *Lentinus edodes*(Shiitake) on Ehrlich carcinoma in mice. *Arch. Virol.* **68**, 297-303.
21. Tsunoda, A. (1969) A mushroom extract as an interferon inducer. *Ann NY Acad. Sci.* **173**, 719-725.
22. Lee, H. J. (1996) Health functional peptides from foods. Proceed. IUFOST '96 Regional Symp. on Non-Nutritive Health Factors for future Foods. (October, Seoul, Korea). 192-200.
23. AOAC. (1990) In 'Official Methods of Analysis,' 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C.,
24. Sumner, J. B. (1925) Dinitrosalicylic method for glucose. *J. Biol. Chem.* **60**, 393-398.
25. Dubois, M., Gills, K. A., Hamilton, J. N., Rebers, P. A. and Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-352.
26. Hull, M. E. (1974) Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.* **30**, 881-884.
27. Jung, S. W., Han, D. S., Kim, S. J. and Chun, M. J. (1996) Fermentation of tyrosinase inhibitor in mushroom media. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 227-233.
28. Cheung, H. S. and Chushman D. W. (1971) Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637-1640.
29. Maron, D. M. and Ames B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-219.
30. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto Y. (1975) Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivative. *Cancer Lett.* **1**, 91-98.
31. Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T., and Okada M. (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.* **48**, 121-126.
32. Lee, J. S., Kwon, S. J., Chung, S. W., Choi, Y. J., Yoo, J. Y. and Chung, D. H. (1996) Changes of microorganisms, enzyme activities and major components during the fermentation of korean traditional Doenjang and Kochujang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 247-253.
33. Cho, J. S. (1980) Fermented soybean products. in "Survey on Korean Fermented Foods" (in Korean). Kijeon Pub. Ltd., 47-90.
34. Kim, Y. S., Kwon, D. J., Koo, M. S., Oh, H. I. and Kang, D. S. (1993) Changes in microflora and enzyme activities of traditional *Kochujang* during fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **25**, 502-509.
35. Iyenger, R. and McEvily A. J. (1992) Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Sci. Technol.* **3**, 60-65.
36. Vamons-Vigyazo, L. (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **15**, 49-53.
37. Tomita, K., Oda, N., Ohbayashi, M. and Kamei, H. (1990) A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiotics.* **43**, 1601-1605.
38. Lozano-de-Gonzales, P. G., Barrett, D. M., Wrolstad, R. E. and Durst, R. W. (1993) Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice. *J. Food Sci.* **58**, 399-405.
39. Otwell, W. S., Iyenger, R. and McEvily, A. J. (1992) Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexylresorcinol. *J. Aquatic Food Prod. Technol.* **1**, 53-57.
40. McEvily, A. J., Iyenger, R. and Gross, A. T. (1993) Compositions and methods for inhibiting browning in foods and beverages. U. S. Patent. 5,202,141.
41. Manjusri, D. and Richard, L. S. (1975) Pulmonary angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **250**, 6762-6768.
42. Gavars, I. (1992) Braykinin-mediated effects of ACE inhibition. *Kidney International.* **42**, 1020-1029.
43. Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kikuchi, M. (1993) Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1107-1110.
44. Suh, H. J., Suh, D. B., Chung, S. H., Whang, J. H., Sung, H. J. and Yang, H. C. (1994) Purification of ACE inhibitor from soybean paste (in Korean). *Agric. Chem. Biotechnol.* **37**, 441-446.
45. Shin, Z. I., Ahn, C. W., Nam, H. S., Lee, H. J. and Moon, T. H. (1995) Fraction of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste (in Korean). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 230-234.

Changes of Microorganisms, Enzyme activity and Physiological functionality in the traditional *Deonjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation

Chang-Ho Rhee¹, Joo-Baek Lee and Sang-Moon Jang* (Department of Health Food, Taegu Health College, Taegu 702-722; ¹Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

Abstract: In order to investigate the changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality of five types of traditional *Deonjang* prepared with various concentrations of *Lentinus edodes*. The pH of traditional *Deonjang* was decreased but total acidity was increased during fermentation. NaCl concentrations was increased up to 15.67~16.02% until 30~45 days of fermentation but decreased after that. Amino acidity was increased on the traditional *Deonjang* with increasing the mixture ratio of *Lentinus edodes*. Reducing sugar content was increased up to 30~45 days of fermentation. Total sugar content was increased up to 18.21~20.57% until 30 days of fermentation. As the mixing ratio of *Lentinus edodes* increased, total sugar also increased. The number of bacteria was highest in all sample after 45 days fermentation, while that of mold was decreased during fermentation. Amylase activity was decreased but protease activity, tyrosinase inhibitor and ACE inhibitor were increased on the traditional *Doenjang* with increasing the mixture ratio of *Lentinus edodes*. Antimutagenic activities of traditional *Deonjang* (10% *Corticellus edodes*) were 83.15%, 65.88% against MNNG, NPD on *S. typhimutium* TA100 and 54.59%, 55.00% against NQO, NPD on *S. typhimutium* TA98

Key words: *Lentinus edodes*, traditional *Doenjang*, enzyme activity, physiological functionality

*Corresponding author