KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 35, No. 2, pp. 291~296 (2003)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

Bacillus subtilis koji와 *Rhizopus oryzae* koji를 이용한 된장 및 간장의 키토올리고당 함량 증대

음병욱 · 곽보연[1] · 김순영 · 손동화[1,*] · 이계호
서울대학교 식품공학과, [1]한국식품개발연구원

Enhancement of Chitooligosaccharides in *Doenjang* (Soybean Paste) and *Kanjang* (Soy Sauce) using *Bacillus subtilis* Koji and *Rhizopus oryzae* Koji

Byong-Wook Eum, Bo-Yeon Kwak[1], Soon-Young Kim, Dong-Hwa Shon[1,*] and Ke Ho Lee
Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University
[1]Korea Food Research Institute

Effects of *Bacillus subtilis* and *Rhizopus oryzae* on chitooligosaccharides (COS) content of *doenjang* (soybean paste) and *kanjang* (soy sauce) were investigated using kojis made with the two strains. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay (cdELISA) system using anti-COS mixture (COSM) antibody was applied for COS detection ranging from 0.001 to 1 μg/mL, and the recoveries of COSM spiked to *doenjang* and *kanjang* were 102 and 115%, respectively. *Doenjang* and *kanjang* products made with a mixture of *B. subtilis* and *R. oryzae* kojis showed COS contents of 171 and 29 μg/mL, respectively, during two-month aging period, much higher than those of Japanese and Korean commercial ones.

Key words: *doenjang* (soybean paste), *kanjang* (soy sauce), *Bacillus subtilis*, *Rhizopus oryzae*, chitooligosaccharides (COS), competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay (cdELISA)

서 론

Chitooligosaccharide(COS)는 β-1,4-D-glucosamine의 중합체인 chitosan의 oligomer로 면역부활성[1,2], 항암성[3], 칼슘 흡수 촉진 작용[4] 등의 생리적 기능성을 갖는 올리고당이다. 이러한 키토산 올리고당이 기능성 식품소재로서 이용이 주목됨에 따라 일본 후생성은 여러 가지 생리적 기능에 대한 결과를 바탕으로 식품첨가제로써 승인하고 있다. 한편, 우리 나라에서도 식품첨가물로 승인되어 몇몇 제품에 첨가물로 사용되고 있는 실정이다.

Samson 등[5]에 따르면 식품과 사료에 관계하는 곰팡이류가 주로 Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, 그리고 Deuteromycetes로 분포하며 이들 균주의 세포벽은 주로 chitin-chitosan과 chitin-glucan으로 이루어져 있다고 알려져 있다[6]. 특히, Zygomycetes 류의 곰팡이 세포벽이 chitin과 chitosan으로 구성되어 있으며 *Mucor* sp.[7], *Absidia* sp.[8], 그리고 *Rhizopus* sp.[9] 들에 대한 chitosan 함량은 33%내외로 존재하고 있다고 보고했다. 이러한 곰팡이를 이용한 우리 나라의 전통 발효식품인 탁주, 간장, 고추장, 된장 등의 발효식품을 섭취함으로써 chitosan 올리고당을 식품으로 자연스럽게 이용하여 왔다. 특히, 된장과 간장은 우리 나라의 가장 주된 부식으로, 발효 숙성 과정에서 자가분해(autolysis)나 메주 내부에 분포하는 *Bacillus* sp.가 생산하는 분해효소들에 의해 chitooligosaccharide의 존재 가능성이 매우 클 것이다. 메주표면에는 *Mucor mucedo*, *Rhizopus japonicus*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium* sp. 등의 곰팡이들이 주된 균총이고 세균으로 *Bacillus*속과 *Bacillus subtilis*가 주로 서식한다고 보고하였다[10]. 이러한 메주를 사용한 전통적 재래식 장류 제조 방법들이 일반가정에서 주로 행해져 왔으나 국민소득의 향상에 의해 가정에서 직접 메주를 제조하는 것보다 상업적으로 생산되는 장류를 사용하고 있는데, 이들 상업적으로 생산된 것들은 주로 *Aspergillus oryzae*를 이용한 koji가 사용되고 있어 COS의 존재 가능성은 전통적인 메주보다 낮을 것으로 보인다.

기존의 chitooligosaccharide(COS) 검출 방법으로는 HPLC[11]와 TLC[12,13] 그리고 비색법[14,15] 등이 있다. 이러한 방법들은

*Corresponding author : Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea
Tel: 82-31-780-9133
Fax: 82-31-780-9234
E-mail: dhs95@kfri.re.kr

추출과 정제과정에서 시간을 많이 요할 뿐만 아니라 식품과 같은 matrix로부터 미량의 COS를 회수하기가 대단히 어렵다. 또한 COS는 chitin oligomer인 N-acetylchitooligosaccharide(NACOS)와 달리 deacetylation되어 있어 HPLC에 의한 분석시 UV 검출기가 아닌 RI 검출기를 사용해야 하므로 낮은 농도에서 감도가 좋지 못하고 식품으로부터 추출하여 정량화 할 경우 순수분리가 어려운 점이 있다. TLC에 의한 분석은 정량적이기보다는 정성적이라 볼 수 있겠으나 HPLC의 경우와 마찬가지로 몇 단계의 분리를 거쳐야 하며 ninhydrin spray에 대해 특이적 반응으로 볼 수 없다. 비색법의 경우는 방해물질에 대해 영향을 많이 받는 단점이 있으며, oligomer에 대한 정량보다는 glucosamine monomer에 대한 검출이 우선적으로 일어나 oligomer의 정량여부가 정확하지 못하다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 앞선 연구에서 chitooligosaccharide mixture (COSM) 에 특이적인 항체를 생산하고 이 항체를 이용한 직접경합 ELISA법을 확립하고 COSM의 정량을 간편하고 빠르게 할 수 있는 방법을 보고하였다[16].

*Rhizopus oryzae*와 *Bacillus subtilis*는 우리 나라 메주에 상재하는 microflora로서 메주를 사용하여 제조된 된장, 간장, 고추장 형태로 과거부터 현재까지 계속 섭취하여 왔기 때문에 이들 균주를 이용하여 제조한 식품의 안전성에 문제가 없을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 주로 *Aspergillus oryzae*만을 이용하는 일본식, 또는 메주의 균총이 일정하지 않은 재래식과 달리 koji 제조 시 우리나라 전통 메주에 많이 분포하는 세균으로 *Bacillus subtilis*와 chitosan을 세포벽에 함유하는 *Rizopus oryzae*균을 조절하여 된장, 간장을 만들고 이들 내에 chitooligosaccharide 함량을 높이고자 하였고 직접 경합 효소면역측정법(competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay cdELISA) 으로 된장 및 간장의 COS 함량을 정량하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

항체 정제용 Protein A column(ImmunoPure plus IgG Purification Kit(#44679)), ImmunoPure Activated Peroxidase kit 등은 Pierce 사(Rockford, IL, USA)에서 구입하였으며, phosphate buffer with Tween 20(PBST: 0.01 M phosphate buffer, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05% Tween 20), 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride(TMB) 등의 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 모든 시약은 GR 등급 또는 GR 등급 이상을 사용하였다. COSM에 대한 특이항체는 Kim 등[16]이 생산한 것을 사용하였다. *Bacillus subtilis*(KCCM 11316)와 *Rhizopus oryzae*(KCCM 6945) 등은 공시 균주를 사용하였다. Potato dextrose agar(PDA) 및 Nutrient broth는 Difco사(Detroit, Michigan USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Koji 만들기

콩의 무게를 측정한 후 삼각 플라스크에 넣고 하룻밤 동안 수침한 후 30분간 물기를 제거하였다. 이것을 121℃에서 1 h 증자한 후 여기에 *Rhizopus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 각각 접종하였다. *R. oryzae*는 potato dextrose agar(PDA)에 배양한 후, 멸균수에 포자를 현탁, 희석하여 2.4×10^7 spores/mL이 되도록 하였고, *B. subtilis*는 nutrient broth에 배양하여 균수를 2.4×10^7 cells/mL로 희석하였다. 희석액을 수침하여 증자한 콩에 1/30(v/w)의 비율로 접종하고 30℃에서 일주일간 배양하여 각각의 koji를 만들었다.

Table 1. The mixture of koji (or *maeju*), salt and water for *doenjang*

mixture	koji or *maeju* (g)[1]	salt (g)	water (mL)
BR[2]	720 (*B. subtilis*) 720 (*R. oryzae*)	330	300
TM[3] (control)	1152[4]	330	300+288

[1]Dry weight of soybean before soaking and sterilization for koji making.
[2]*Doenjang* made by mixing *Bacillus subtilis* and *Rhizopus oryzae* koji.
[3]*Doenjang* made by mixing Korean traditional *maeju*.
[4]1440 g~288 g (20% of weight loss during *maeju* fermentation).

Table 2. The mixture of koji (or *maeju*), salt and water for *kanjang*

mixture	koji or *maeju* (g)[1]	salt (g)	water (mL)
BR[2]	720 (*B. subtilis*) 720 (*R. oryzae*)	1300	5760
TM[3] (control)	11524[4]	1300	5760+288

[1]Dry weight of soybean before soaking and sterilization for koji making.
[2]*Kanjang* made by mixing *Bacillus subtilis* and *Rhizopus oryzae* koji.
[3]*Kanjang* made by mixing traditionally made *maeju* in Korea.
[4]1440 g~288 g (20% of weight loss during *maeju* fermentation).

된장 및 간장 담그기

앞서 제조한 각각의 koji와 소금 및 물을 섞어서 된장을 담궜다. 즉, *B. subtilis* koji와 *R. oryzae* koji를 반반 섞어 1440 g이 되게 하고 여기에 소금 330 g, 물 300 mL을 첨가하여 된장(BR 된장)을 담근 후 상온에서 두 달간 숙성시켰다. 대조구로서는 우리 나라에서 전통적으로 제조된 메주를 원주농협에서 구입하여 된장을 담구었다(TM 된장). 이때는 koji와 달리 메주 발효과정에서의 약 20%의 감량을 계산하였다(Table 1).

간장은 된장과 같은 방법으로 만들었으며 각각의 배합비는 koji 1440 g에 소금 1300 g과 물 5760 mL를 첨가한 후 상온에서 두 달간 숙성시켰고(BR 간장), 대조구는 앞서 구입한 메주를 사용하여 간장을 제조하여 상온에서 두 달간 숙성시켰다(TM 간장)(Table 2).

키토산 올리고당 혼합물(chitooligosaccharide mixture, COSM)의 생산

COSM은 Kim 등[16]의 방법에 따라서 생산하였다. 간략하면, 97% 탈아세틸화된 chitosan 1.5 g을 1% lactic acid 50 mL에 녹이고 pH는 5.5에 맞추었다. 여기에 키토산 분해효소 2.5 U를 가하여 50℃에서 30분간 반응시켰다. 분해된 산물을 냉동 건조하여 gel fractionation(Biogel P4, 1×100 cm)하여

중합도 3 이상의 분획을 COSM으로 사용하였다.

항체의 정제

COSM에 대한 특이항체의 정제는 Protein A column을 이용하여 제조자의 정제 방법에 따라 정제하였다.

COSM-Horseradish Peroxidase (COSM-HRP) conjugate의 제조

직접법 ELISA(direct ELISA)에 사용하기 위한 COSM-HRP를 제조하기 위해 ImmunoPure Activated Peroxidase Kit를 이용하여 제조회사의 사용방법에 따라서 COSM-HRP를 제조하였다.

경합적 직접 ELISA (competitive direct ELISA (cdELISA))

시료 중 COS의 농도 측정을 하기 위해 확립한 cdELISA의 과정은 coating시 정제한 항체를 sodium carbonate-bicarbonate buffer(0.1 M, pH 9.6)에 2 μg/mL이 되게 했고, 경합시 수세용 완충 용액(0.02 M Tris, 0.15% Tween 20, pH 7.4)에 희석한 COSM-HRP와 시료 또는 COSM 용액을 1 : 1로 혼합한 후 각 well에 100 μL씩 넣고 상온에서 1시간 처리하였다. 수세용 완충액으로 3회 세척 한 후 기질용액으로 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine(TMB) 1 mg을 10 mL의 0.05 M phosphate citrate buffer, pH 5.0에 용해시킨 후 10 μL의 hydrogen peroxide를 가한 것을 각각의 well에 100 μL씩 넣고 30분간 방치한 뒤 2 M H_2SO_4 반응정지액 50 μL씩을 첨가한 후 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 중에 있는 COS의 양은 COSM을 표준 물질로 사용한 표준곡선을 이용해서 COSM equivalent로서 구하였다.

시료의 준비

된장 샘플의 경우, 냉동 건조한 뒤 분말화 한 0.5 g의 된장에 10 mL의 증류수를 넣고 121℃에서 15분간 추출하였다. 추출액은 2,000×g에서 20분간 원심분리하고 Whatman No. 41로 여과하였다. 여액은 1/600에서 1/200,000까지 PBST buffer에 희석하여 ELISA의 시료로 사용하였다. 간장의 경우에는, 추출, 여과 없이 1/30에서 1/10,000까지 PBST buffer에 희석하여 ELISA의 시료로 사용하였다.

Spike 실험

COS의 회수율을 보기 위해서 COSM 용액을 최종 농도가 1, 3, 10, 30, 100 μg/mL가 되게 각각의 된장, 간장 샘플에 spike하였다. 된장의 경우에는 앞의 시료 준비에서와 같이 추출, 여과한 뒤에 spike하였고 간장의 경우에는 바로 spike하였다.

결 과

ELISA에 의한 COS의 회수율

COSM에 대한 특이항체를 이용한 cdELISA의 표준곡선(Fig. 1)에서 보는 바와 같이 COS의 검출 한계는 0.001 μg/mL로, 검출 범위는 0.001~1 μg/mL 사이인 것으로 나타났다.

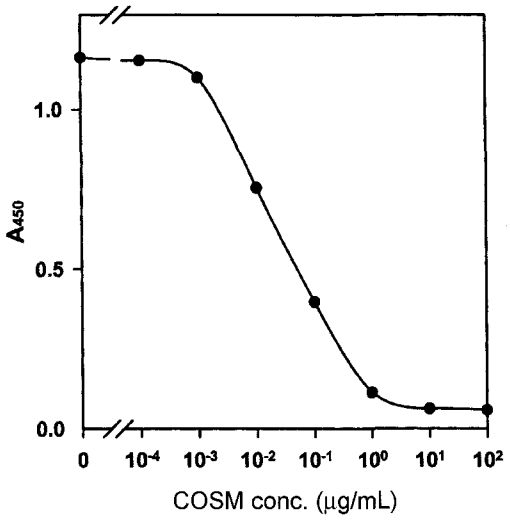

Fig. 1. Standard curve for COSM as determined by cdELISA. A 1 : 1 mixture (COSM : COSM-HRP conjugate diluted to 1/1000 in the PBST buffer) was added to the anti-COSM-BSA antibody-coated plate. After 1 hr the plate was washed, the substrate solution (H_2O_2/TMB) was added and developed for 30 min, and finally the absorbance in 450 nm was measured.

Table 3. Recovery of COS spiked to *doenjang*[1] as determined by cdELISA[2]

COSM, added (μg/g)	COSM equiv., detected[3] (μg/g)	Recovery (%)
1	1	100
3	3	100
10	10.4	104
30	32.1	107
100	99.9	100
Overall		102±3.2 (3.1)[4]

[1] *Doenjang* showing the lowest COSM content in Japanese one was used.
[2] A 1:1 mixture (COSM or sample: COSM-HRP conjugate diluted to 1/1000 in the PBST buffer) was added to the anti-COSM-BSA antibody-coated plate. After 1 hr, the plate was washed, the substrate solution (H_2O_2/TMB) was added and developed for 30 min, and finally the absorbance in 450 nm was measured. The COS concentration as a COSM equivalent was determined in reference to the standard curve within the linear range.
[3] (detected COS of spiked *doenjang*) - (detected COS of not spiked *doenjang*).
[4] Mean ± S.D. (C.V.).

다만, 본 연구에서 COS의 함량표시는 ELISA 분석시 표준물질로 사용한 COSM을 기준으로 나타냄으로 실제로는 COSM equivalent를 의미하고 있다. 분석할 자료인 된장과 간장 중 COS의 분석 회수율을 검토한 결과, 된장의 경우 spike하여 처리한 COSM의 회수율은 평균 102%로 여러 처리구에서 균일하게 나타났다 (Table 3). 이는 된장 중의 COS 함량이 1~100 μg/g범위에서 cdELISA의해 측정 가능한 것을 보여주고 있다. 또한 간장의 경우는 된장보다 약간 높은 평균 회수율(115%)을 보이고 있으나 모든 처리구에서 균일한 회수율을 보여주고 있다(Table4). 이것은 된장에서와 마찬가지로 간장 중의 COS 함량이 1~100 μg/mL 범위에서 cdELISA의해

Table 4. Recovery of COS spiked to *kanjang*[1] as determined by cdELISA[2]

COSM added (μg/mL)	COSM equiv., detected[3] (μg/mL)	Recovery (%)
1	1.2	120
3	3.1	103
10	11.7	117
30	31.7	106
100	128.7	129
Overall		115 ± 10.6 (9.2)[4]

[1]*Kanjang* showing the lowest COS content was used.
[2]A cdELISA was performed according to the same procedure as in the Table 3.
[3](detected COS of spiked *kanjang*) - (detected COS of not spiked *kanjang*).
[4]Mean ± S.D. (C.V.).

측정 가능한 것을 보여주고 있다.

접종 미생물이 COS 함량에 미치는 영향

BR 된장과 대조구인 TM 된장을 두 달간 숙성시킨 후 COS 함량을 비교하였다. BR 된장이 담금 직후 119 μg/g의 함량을 보인 반면 TM 된장은 담금 직후 45 μg/g의 함량을 나타냈다. BR 된장은 담근 직후부터 숙성 전기간에 걸쳐 COS 함량이 증가를 보여주어 2달 후에는 COS의 함량이 171 μg/g로 나타났다. 한편 대조구로서 TM 된장은 숙성 한달 정도까지는 COS의 함량 변화가 거의 나타나지 않았고 그 후로 숙성 두 달까지 COS의 함량이 증가하여 91 μg/g을 나타내었다(Fig. 2). BR 간장에서는 담금 직후 9.37 μg/mL에서 숙성 후에 29.05 μg/mL의 COS 함량 증가를 보여주었고, TM 간장의 경우에는 1.93 μg/mL에서 10.79 μg/mL의 COS 함량 증가를 나타내었다(Fig. 3). 간장의 경우 숙성 한달까지 COS의 증가를 볼 수 있었으나 그 후에는 COS 함량의 증가는 없었다.

된장의 경우, 두 달 후에도 검출되는 COS의 양이 증가하고 있어서 숙성 기간을 연장하면 좀 더 많은 양의 COS가 검출되리라 생각되는 반면, 간장의 경우에는 한 달 후에는 더 이상의 COS 함량의 증가가 없었다. 된장, 간장 모두 BR 시료구에서 TM 시료구보다 높은 COS 함량을 나타내고 있었다.

시판 된장 및 간장과의 COS 함량 비교

본 실험에서 제조된 BR 된장의 COS 함량의 정도를 시판되고 있는 일본 및 우리 나라 된장 및 간장과의 비교를 통해 알아보았다. 전체적으로는 우리 나라의 된장 및 간장 제품들이 일본 제품보다 높은 함량을 보였다(Table 5, 6). 실험실적으로 담근 BR 된장의 COS 함량은 시판되는 된장보다 월등히 높게 나타나서 가장 높은 것의 약 4.6배 정도의 COS 함량을 보여주고 있다(BR 된장 171 μg/g, 시판 된장 37.2 μg/g). 또한 간장의 경우에도 실험실적으로 담근 BR 간장이 시판 간장중 가장 높은 것의 약 2.3배 정도의 높은 COS함량을 보여주고 있다(BR 간장 29.1 μg/mL, 시판 간장 12.7 μg/mL). BR 된장과 간장 둘 간에 COS의 함량 차이를 보이고 있는데 이는 간장을 제조할 때 들어가는 물과 소금의 양 차

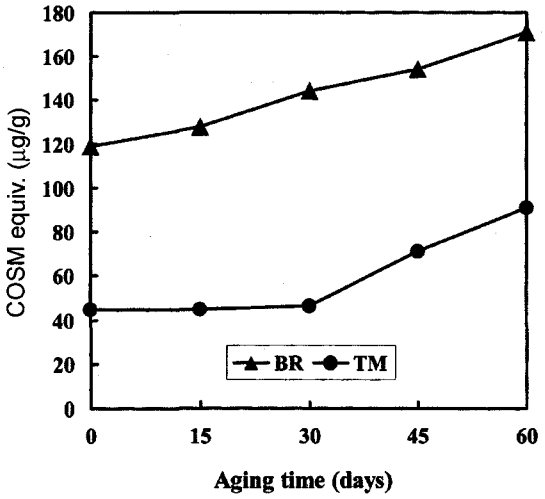

Fig. 2. Changes in COS content of *doenjang* during two-month aging.
The content of COS in the sample was determined as COSM equivalent by cdELISA. BR: *Doenjang* made by mixing *Bacillus subtilis* and *Rhizopus oryzae* koji; TM: *Deonjang* made by mixing Korean traditional *maeju*.

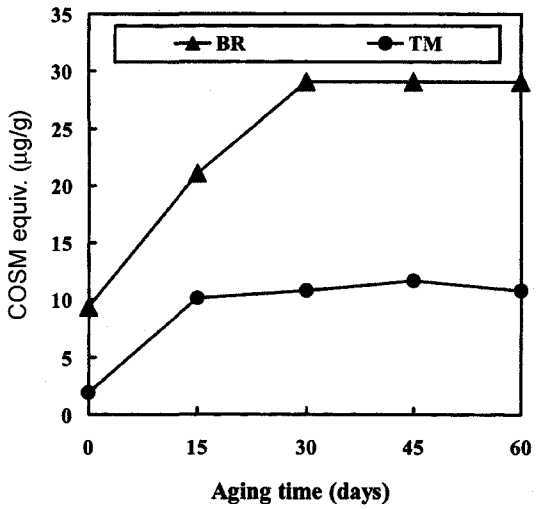

Fig. 3. Changes in COS content of *kanjang* during two-month aging.
The content of COS in the sample was determined as COSM equivalent by cdELISA. BR: *Kanjang* made by mixing *Bacillus subtilis* and *Rhizopus oryzae* koji; TM: *Kanjang* made by mixing Korean traditional *maeju*.

이에 기인한 것으로 생각된다.

한편 일본 장류는 제조할 때 주로 세포벽에 chitosan을 가지지 않은 *Aspergillus oryzae*만을 이용하므로 COS가 검출되지 않을 것으로 예상했었으나 된장의 경우 아주 미량이 검출되었다. 이는 chitosan을 가진 균주가 발효나 숙성 중에 오염된 것으로 생각된다. 본 연구에서 *Bacillus subtilis*와 *Rhizopus oryzae*를 이용해 실험실적으로 제조한 된장 또는 간장에서 전통적으로 제조한 것과 상업적으로 제조한 된장 및 간장에서보다 COS의 함량이 더 높게 존재하였고 또한 우리 나라의 된장 또는 간장에서 일본의 된장 또는 간장보다 높은

Table 5. Comparison of the COS contents in BR *deonjang* and commercial Korean and Japanese ones.

Deonjang		COSM equiv. (μg/g)[1)]
Lab-made	BR[2]	171.0
Korean	D1	37.2
	D2	0.1
	D3	3.6
	D4	2.5
	D5	2.4
	D6	20.6
Japanese	D7	1.8
	D8	1.1
	D9	0.0

[1)]Contents were determined by cdELISA which was performed according to the same procedure as in the Table 3. The COS concentration was calculated as a COSM equivalent.
[2)]BR: *Deonjang* made by mixing *Bacillus subtilis* and *Rhizopus oryzae* koji.

Table 6. Comparison of the COS contents in BR *kanjang* and commercial Korean and Japanese ones.

Deonjang		COSM equiv. (μg/g)[1)]
Lab-made	BR[2]	29.1
Korean	K1	1.3
	K2	1.8
	K3	6.2
	K4	12.7
Japanese	K5	0.1

[1)]Contents were determined by cdELISA which was performed according to the same procedure as in the Table 3. The COS concentration was calculated as a COSM equivalent.
[2)]BR: Kanjang made by mixing *Bacillus subtilis* and *Rhizopus oryzae* koji.

COS 함량이 존재하였다. 이것은 된장 또는 간장과 같은 장류 제품을 만들 때 이에 사용되는 koji 또는 메주를 *Rhizopus oryzae*와 이를 올리고당으로 분해할 수 있는 *B. subtilis*와 같은 세균을 같이 접종하여 제조할 때 COS의 장류내 함량이 높아짐을 보여준 것이다.

향후 BR 된장의 경우 숙성기간을 길게 하는 연구, chitosan을 함유하는 Zygomycetes류의 다른 곰팡이(*Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*류)로 koji 제조하는 연구, 이들 곰팡이 세포벽에 존재하는 chitosan을 효율적으로 분해하기 위해 chitinase 활성이나 chitosanase 활성이 뛰어난 곰팡이를 같이 배양하는 연구 등을 수행할 예정이다.

고 찰

본 연구는 된장 및 간장의 koji 발효에 관여하는 미생물을 조절함으로써, chitooligosaccharide(COS) 함량을 높이고자 하였다. BR 된장이나 간장이 기존의 된장 및 간장보다 높게 나타난 것은 *Rhizopus oryzae*의 세포벽에 존재하는 chitosan이 자가분해를 통해 COS로 분해되거나 *B. subtilis*가 생산하는 효소에 의해 chitosan을 분해하였기 때문이다. Alfonso 등[17]은 Mucorales의 자가분해(autolysis)로 인해 chitosan의 분해가 이루어진다고 하였고, Reyes 등[18]은 Mucorales에 속하는 *Rhizopus oryzae*의 chitosan이 미량으로 존재하는 monomer나 oligomer들에 의해 유도, 합성되는 분해 효소에 의해 분해될 가능성이 있다고 했다. 다른 한편 Cody 등[19]은 *Rhizopus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 각각 일주일 배양한 koji를 하나는 *Rhizopus oryzae* 단독으로, 다른 하나는 *Bacillus subtilis*와 섞어 4시간 추출하여 COS 함량을 측정했을 때, 전자는 3 μg/g, 후자는 25 μg/g이 검출되었다. 이들 연구자들의 결과는 본 실험에서 제조된 BR 된장 또는 간장이 *Rhizopus oryzae*의 autolysis와 *Bacillus subtilis*의 chitosan 분해에 의해서 높은 COS 함량을 가지는 사실과 부합된다.

Chitooligosaccharide의 검출 방법에 있어서는, HPLC, TLC 그리고 비색법(colorimetric assay)의 복잡한 샘플 정제와 낮은 감도를 보완 할 수 있는 ELISA 방법을 사용하였다. COSM과 HRP의 conjugation에서 10^{-3} μg/mL까지 COSM을 검출 할 수 있는 우수한 감도를 가질 수 있어서 검출에 유리하였다. 이것은 김 등[16]이 연구한 결과와 비교했을 때 약 10배 정도의 검출 한계가 좋아진 것으로 나타났다. 이는 직접 경합 ELISA에 사용되는 COSM-HRP conjugate가 김 등이 제조한 것보다 더 좋은 경합 반응을 보여주었기 때문인 것으로 생각된다.

요 약

된장 및 간장의 chitooligosaccharide(COS) 함량을 높이기 위해 *Bacillus subtilis*와 *Rhizopus oryzae*를 접종하여 koji를 만들고 이들 균주들에 의한 된장 및 간장에서 COS 함량변화에 대하여 알아보았다. COSM에 특이적인 항체를 이용하여 competitive direct ELISA(cdELISA)로 COS를 검출하였는데, 검출 감도는 0.001~1 μg/mL이었고, 회수율은 된장 및 간장에서 각각 102%, 115%를 보였다. *B. subtilis* koji와 *R. oryzae* koji를 섞어 담근 된장 또는 간장(BR 된장 또는 간장)이 높은 COS 함량을 보였는데, 두 달 숙성에서 된장이 171 μg/g, 간장이 29 μg/mL을 나타내었다. 일본, 국내 시판, 그리고 실험실에서 만든 된장 및 간장의 COS 함량을 비교해 본 결과, BR 시료구가 일본이나 국내 시판용보다 훨씬 높은 함량을 나타내 주어서 본 실험에서 koji 제조시 이용된 *Bacillus subtilis*와 *Rhizopus oryzae* 의해 COS의 함량을 높일 수 있는 가능성을 보여주었다.

문 헌

1. Mikami, T., Tokoro, A., Suzuki, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. Interferon inducing activity of chitooligosaccharides. Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo. 35: 177-182 (1988)
2. Ishitani, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. Transglutaminase activity of macrophages induced with chitohexaose and N-acetylchitohexaose. Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo. 35: 183-187 (1988)
3. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. Growth-inhibitory effect of N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. Chem. Pharm. Bull. 36:

784-790 (1988)
4. Kim S. K. and Jeon, Y. J. Antitumor, antibacterial and calcium absorption acceleration effects of chitosan oligosaccharides prepared by using ultrafiltration membrane enzyme reactor. Korean J. Chitin Chitosan 2: 60-78 (1997)
5. Samson, R. A., Frisvad, J. C., and Arora, D. K. Taxonomy of filamentous fungi in foods and feeds, Vol. 3, pp. 1-29. In: Handbook of Applied Mycology, Marcel Dekker, New york, USA (1995)
6. Bartnick-Garcia, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Annu. Rev. Microbiol. 22: 87-108 (1968)
7. Kobayashi, T., Kaji, Y., Takiguchi, Y., Shimahara, K. and Sannan, T. Distribution of chitosan in *Mucor* strains and some properties of the chitosan isolated. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 62: 1471-1474 (1988)
8. Kobayashi, T., Takiguchi, Y., Shimahara, K. and Sannan, T. Distribution of chitosan in *Absidia* strains and some properties of the chitosan isolated. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 62: 1463-1469 (1988)
9. Kubo, T., Yoshihara, K., Hosogawa, J. and Nishiyama, M. Effect of the cultivation pH on the degree of deacetylation of chitosan produced by *Rhizopus acetonius* HUT1219. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 66: 1641-1643 (1992)
10. Cho, D. H. and Lee, W. J. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation; A study on the microflora of fermented Korean *Maeju* loaves. J. Kor. Agric. Chem. Soc. 13: 35-42 (1970)
11. Uchida, Y., Izume, M. and Ohtakara, A. Purification and enzymatic properties of chitosanase from *Bacillus* sp. No. 7-M. Bull. Fac. Agr. Saga Univ. 66: 105-116 (1989)
12. Yabuki, M., Uchiyama, A., Suzuki, K., Ando, A. and Fuji, T. Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-H1. J. Gen. Appl. Microbiol. 34: 255-270 (1988)
13. Yoshihara, K., Hosokawa, J., Kubo, T., Nishiyama, M. and Koab, Y. Purification and properties of a chitosanase from Pseudomonas sp. H-14. Biosci. Biotech. Biochem. 56: 972-973 (1992)
14. Moore, S. Amino acid analysis: Aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. J. Biol. Chem. 243: 6281-6283 (1968)
15. Rondle, C. J. M. and Morgan, W. T. J. The determination of glucosamine and galactosamine. Biochem. J. 61: 586-589 (1955)
16. Kim, S. Y., Shon, D. H. and Lee, K. H. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of chitooligosaccharides. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 696-701 (2000)
17. Alfonso, C., Martinez, M. J. and Reyes, F. Degradation of chitosan in the autolysis of Mucorales. Mycol. Res. 95: 217-219 (1991)
18. Reyes, F., Calatayud, J., and Martines, M. J. Chitinolytic activity in the autolysis of *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. 49: 239-243 (1989)
19. Cody, R. M. Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus* sp. Curr. Microbiol. 19: 201-205 (1989)

(2003년 1월 20일 접수; 2003년 4월 14일 채택)