

항산화와 혈전용해 활성을 갖는 기능성 된장의 개발

류 병 호

경성대학교 식품공학과

Development of Functional Doenjang for Antioxidative and Fibrinolytic Activity

Beung Ho, Ryu

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungshung University, Busan 608-736, Korea

Abstract

The aim of present study is to investigated on the development of the functional doenjang possessing antioxidative and fibrinolytic activity. A strain, BH-23 showing antioxidative and fibrinolytic activity was isolated from traditionally doenjang, and then identified as *Bacillus subtilis* based on morphological, physiological, and biochemical characteristics, and named as *Bacillus subtilis* BH-23. The optimal pH level and temperature conditions were 5.0 and 40°C, NaCl concentration was grown well at 15%. Antioxidative and fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* BH-23 was accordance with growth conditions of the original state. By comparising with traditionally commercialized doenjang, it is prepared with *Bacillus subtilis* BH-23. The final results evaluated with positive elements rised above the surface such as color, taste and flavor without ammonia. Therefore, it is safe to assume, doenjang has strong market value in the food industry.

Key words – Antioxidative, Fibrinolytic activity, Doenjang, *Bacillus subtilis*.

서 론

된장은 예로부터 내려오는 전통 발효 식품으로 우리 식탁에 없어서는 안 될 대표적인 조미식품이다. 된장은 아미노산, 지방산, 비타민, 무기질등이 풍부하며, 특수성분인 피토에스트로겐류가 들어있어 항산화[12,19], 항돌연변이[22], 항암[20], 혈전용해[17] 등의 기능성이 우수한 것으로 밝혀지고 있다.

된장은 미생물을 이용하는 가장 복잡한 양조기술이 요

구된다. 된장을 제조할 때 메주에서 성장한 수많은 미생물에 의해 숙성되면서 단백질은 저분자의 펩타이드와 아미노산으로 당질은 단당류로 분해된다. 이 때 된장 숙성중 발효에 관련이 있는 미생물에 의해 각종 향기성분이 생성되어 된장의 풍미를 높여 준다. 된장에 관련된 국균으로는 *Aspergillus sojae*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus* 속 등 수많은 곰팡이가 된장 숙성에 관련이 있고, 유산균으로는 *Lactobacillus* sp. *Streptococcus* 등이 관여하며, 세균으로는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, 그리고 효모로는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulopsis versatilis*. 등에 대한 연구가 있다.[18] 된장의 숙성 중 미생물 유래의 각종 효소 작용에 의하여 콩 단백질이 여러 형태의 peptides로 분해 되어 된장 특유의 맛을 유지한다. 이러한

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : (051) 620-4712, Fax : (051) 622-4986
E-mail : bhryu@star.ks.ac.kr

일련의 연구들은 장류를 비롯한 전통 발효식품 중에는 아직 규명되지 않는 미지의 신기능성 물질들이 다량 존재한다는 것을 보여주고 있다. 그러나 된장은 인스턴트 식품의 대량보급과 화학조미료의 개발등으로 인하여 판매가 신장되지 않고 있으며, 오랜 기간 숙성으로 인하여 색, 맛, 냄새 등 품질관리가 용이하지 않아 된장 제조 공정의 새로운 공정개선이 요구된다. 이러한 품질개선을 위한 일련의 연구는 개량메주의 제조, 저염된장, 숙성기간을 단축시키는 미생물의 대량 번식 그리고 단백질 분해능이 우수한 미생물을 starter를 이용하는 연구가 있다.[10]

된장은 5~6개월 정도 숙성기간이 소요되고 개방상태로 숙성하기 때문에 수많은 균과 공기중에서 유입되는 부패균 등에 의하여 불쾌한 냄새도 생성되어 품질이 떨어지게 된다[8]. 특히 메주 제조시 생성되는 불쾌취는 *Bacillus* 속 세균의 특유한 대사 산물로서 콩 성분중 질소가 분해되면서 발생하는 암모니아 가스이며 또한 공기중의 낙하균이 번식하여 식품위생상 문제가 되기도 한다.[8] 그리고 된장은 저장기간이 경과함에 따라 색이 진하여져 과도한 착색현상이 나타나 제품이 갈변 또는 흑변될 뿐만 아니라 풍미까지 떨어뜨리게 된다.[9]

본 연구는 된장의 풍미를 개선시키고 항산화 작용, 혈전 용해활성과 같은 기능성이 있는 새로운 개념의 된장을 제조할 목적으로 된장으로부터 강력한 항산화 작용과 혈전 용해작용을 동시에 갖는 균주를 분리 동정하였고, 이 균주의 최적 성장, 및 최적 효소 생산 조건등을 조사하였으며, 된장을 만들어 상품으로서의 이용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

시료 및 실험방법

시료

시료는 균주의 분리·배양, 항산화 활성 및 혈전용해 활성 등 신기능성 활성을 갖는 균주를 분리하기 위하여 오복(주)으로부터 생산된 된장에서 균주를 선별한 후 분리 동정하였다.

항산화 활성 측정

된장을 멸균 증류수로 10배 희석한 후 0.1mL를 액체 배지에 접종한 후 30℃에서 24시간 진탕 배양한 배양액을 멸균 증류수로 100배 희석하여 한천배지에 도말한 후 30℃에

서 2일간 방치하였다. 여지를 건조한 후 DPPH(8.0mg/ethanol 50mL)를 분무하여 자주색이 무색으로 탈색되는 균주를 1차 선별하였다. 선별된 균주를 액체배지에 접종한 후 30℃에서 24시간 배양하면서 균의 성장을 측정하고, 여액을 membran filter로 여과한 후 thiocyanate법[5]으로 측정하였다.

혈전 용해 활성 측정

Fibrin(혈전) 용해 활성은 Astrup 등의 방법[3]을 일부 수정한 방법에 의해 측정하였다. Fibrinogen을 0.3%가 되도록 10mM 인산완충용액(pH 8.0)에 완전히 용해시키고, 이 fibrinogen 인산 완충용액 10mL를 평판에 붓고, 45℃로 유지된 1% 멸균 한천용액을 동량 첨가하여 충분히 혼합 후, thrombin 100 units(Sigma Co., USA)를 첨가하였다. 이를 상온에서 1시간 정도 방치하여 고화된 fibrin 평판에 적정수의 구멍(지름 2mm)을 뚫은 후 시료 50μL를 분주하여 37℃에서 10시간 배양한 후 형성되는 투명 환의 크기로 활성의 정도를 비교하였다. 양성 대조구는 대표적인 혈전 용해제인 plasmin(1.0U/mL, Sigma. Co., USA)을 사용하였고, 음성 대조구는 멸균 BHI 액체배지를 시료와 동량 사용하였다.

$$\text{혈전 용해 활성(\%)} = \frac{\text{시료의 용해영역}}{\text{plasmin의 용해영역}} \times 100$$

형태적 특성

선정된 균주의 세포 형태와 집락의 특징은 Nutrient agar 배지상에서 30℃에서 24시간동안 배양한 후 colony의 형태 및 표면의 특징을 관찰하였다. 세포의 험막은 india ink법으로 확인하였고, 편모염색은 Leifson변법에 따라 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한 transmission electron microscopy (TEM), JEOL, 1200 EX-II(Japan)를 이용하여 형태학적 특징을 검토하였다.

균주의 분리·동정

선정된 균주의 생화학적 성장조사

탄수화물 자화성은 Biochemical tests for identification of medical bacteria[21] 및 Manual for the identification of medical bacteria[1]와 Sneath가 제시한 방법[24]으로 실시하였다. 또한 *Bacillus*속 세균 동정은 상품화 된 Kit인

ATB 50CHB와 API 20E(API bioMerieux Co.)를 이용하여 kit system에 따라 조작하였고 판독은 ATB Computer database version 2.0을 이용하였다.

B. subtilis BH-23의 항산화 활성 및 혈전 용해효소 최적 생산조건

온도 : *B. subtilis* BH-23를 BHI 액체배지(2% NaCl, pH 7.0)에 접종하여 37°C에서 18시간 전배양 하였다. 동일 배지 100mL에 전배양액에 100μL씩 분주하여 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 그리고 50°C의 각 온도에서 48시간 배양시킨 후 3,000×g, 30분간 원심분리 하였다. 원심 분리한 배양 상등액을 0.2μm의 membrane filter로 여과 멸균하여 항산화 활성과 혈전 용해 활성을 측정하였다.

pH : *B. subtilis* BH-23의 전배양액 100μL를 pH 4, 5, 6, 7, 8 및 9로 조절된 BHI 액체배지(2% NaCl) 100 mL에 접종하여 37°C에서 48시간 배양시킨 후 3,000×g, 20분간 원심 분리 하였다. 원심 분리한 배양 상등액을 0.2μm의 membrane filter로 여과 멸균하여 항산화 활성과 혈전 용해 활성 측정하였다.

식염농도 : *B. subtilis* BH-23의 전배양액에 100μL를 NaCl이 각각 0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15% 그리고 20% 함유된 BHI 액체배지(pH 7.0) 100mL에 접종하여 37°C에서 30일간 배양시키면서 5일 간격으로 흡광도를 측정하여, 흡광도가 0.8~0.9 범위에 도달한 실험구의 배양액을 3,000×g, 20분간 원심분리 하였다. 원심 분리한 다음 배양 상등액을 0.2μm의 membrane filter로 여과 멸균하여 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 측정하였다.

선별 균주를 이용한 된장의 제조

1) 재료

된장 제조에 사용된 대두(황태, 수분 12.5%, 총 질소 6.2%, 조지방 19%), 재래식 메주(수분 15%, 11.5cm×12.0cm×3.4cm)는 시판품, 소금은 한주소금(수분 3.9%, 염화나트륨 97%)을 사용하였다. 분석에 사용된 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

2) 콩 메주의 제조

콩을 수세한 후 20°C에서 10시간정도 수침하여 1시간 이상 물 빠기한 다음 121°C에서 30분간 증자하여 충분히

냉각한 콩에 *Aspergillus oryzae* 포자를 α-화 소맥분으로 증량시켜 1g당 10⁶ CFU 되도록 접종하고 30°C에서 48시간동안 발효시킨다. 다음 *Bacillus subtilis* (BH-23)를 1g당 10⁶ CFU 되도록 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양한 후 저온 건조한 다음 보관하였다.

3) 된장의 제조

콩 메주를 염분 함량이 12%가 되도록 첨가하여 할수(割水)한 다음 30°C에서 30일간 발효시키면서 경시적으로 품질을 분석하였다.

4) 시판 재래식 된장구매

일반성분 분석, 색도 및 관능검사 비교를 위하여 사용된 시판재래식 된장은 2002년 9월에 부산 및 경남 지역 일원의 대형 할인점, 슈퍼 및 백화점에서 구입한 것을 사용하였다.

5) 일반 성분 분석

재래식 메주 및 증숙대두의 수분은 상압가열건조법, 각 시료의 아미노태질소(NH₂-N)는 포르볼 적정법[14], 조지방은 Soxhlet 추출법[15], 염도는 AgNO₃ 적정법[16]에 준하였다. 조단백질은 자동단백질 분석장치(Kjeltec Auto 1035/38 Sampler system, Tecator사, Sweden)를 이용하였으며, 질소계수 5.71을 곱하여 조단백질 함량(%)으로 표시하였다. pH는 pH meter(Mettler Delta 340, UK)로 측정한 값으로 표시하였다.

6) 관능검사

관능검사는 잘 훈련된 판넬 요원 10명을 대상으로, 시판 재래식 된장 3품목과 본 실험에서 색상이 가장 많이 개선된 처리구(재래식 메주 및 증숙 대두의 배합비율이 1.0 : 4.0인 것)를 풀어서 10배로 희석한 다음 가스렌지에서 15분간 끓인 후 실온으로 냉각한 것을 KS 관능검사 일반법[20]에 준해 색, 향 그리고 맛을 9점법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

항산화 활성이 있는 균주의 분리

된장으로부터 항산화 활성이 우수한 균주를 분리하기 위하여 된장 시료를 10배 정도 희석한 후 고체 한천배지에 도달한 후 30°C에서 24시간 배양한후 DPPH법으로 확인한

결과 30여종의 균주를 얻었다. 이들 균주중 항산화 활성이 상대적으로 우수한 균주를 10종을 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주를 각각 액체배지로 30℃에서 24시간 배양하여 배양액을 여과한 후 thiocyanate법으로 항산화 활성을 측정하였다 선별된 10여종의 균주를 BHA 와 α -tocopherol을 항산화 활성을 비교 대조한 결과 (Table 생략) 이들 중 상대적으로 활성이 가장 높은 균주를 BH-23으로 잠정적으로 명명하였다.

혈전 용해 활성의 측정

항산화 활성을 나타내는 분리균주들의 혈전 용해 활성을 조사하였다. 분리한 균주중에서 성장속도가 빠르고 혈전용해 높은 균주 10 균주를 plasmin을 positive control로 하고 BHI broth를 negative control로 비교하여 혈전용해 활성을 측정한 결과, 상대활성도가 이들 균주중 strain BH-23이 110%로 가장 높았으며 strain BH-35가 90%, strain BH-29가 85%의 순으로 활성도가 높았다. 본 연구에서는 항산화 활성도 높고, 혈전 용해 활성도 높은 균 strain BH-23을 2차적으로 선별하여 균주를 동정하였다.

분리균주의 세균학적 특성 및 동정

1) 형태학적 특성

항산화 활성과 혈전 용해 활성이 높은 균주를 분리하여 선별된 BH-23 균주를 평판배지상에서 30℃에서 24시간 배양한 후 집락의 특징을 관찰하였고 평판배지상에서 배양하여 형성된 colony의 특성에 대하여 조사한 결과는 Table 1 과 같다. 전자현미경으로 관찰한 세포의 형태로서 전형적인 간균이었으며 크기는 $3.4 \times 0.9 \mu\text{m}$ 으로 나타났고 균주의 세포로부터 방출되어 있는 포자의 형태를 관찰할 수 있었는데 포자의 크기는 $0.6 \times 1.1 \mu\text{m}$ 이었다. 선별된 BH-23균주를 Finley와 Fields[4]의 배지상에서 접종하여 30℃에서 18시간 배양하면서 현미경으로 형태적 특성을 관찰한 결과 gram양성의 내생포자를 형성하는 호기성 간균으로 주모성 편모를 가지고 있었으며 spore의 위치는 paracentral로 나타났다[6].

Table 2에서 보는 바와 같이 세포의 크기는 4~5mm이고 불규칙적인 모양을 나타내고 있으며, 흰색의 colony를 나타내었다. 본 분리균주의 spore의 위치가 paracentral로 나타나 spored 형태에 근거한 Gordon 등[7]의 분류에 의하

Table 1. Morphological characteristics of the isolated strain BH-23

Content	Characteristics
Gram stain	positive
Shape of cell	rod
With of cell(μm)	3.4
Length of cell(μm)	0.9
Spore Shape	ellipsoidal
Spore position	paracentral
Motility	motile

Table 2. Cultural properties of the strain BH-23

Content	Characteristics
Size(diameter)	4~5mm
Shape	Irregular
Elevation	Flat
Margin	Undulate
Color	White
Surface appearance	Rough
Density	Opaque
Consistency	Butyraceous

면 본 분리균은 Morphological group I (*B. megaterium*, *B. cereus* group, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. coagulans*)에 속하는 것으로 판단되었다[23]. 전자현미경 사진으로, 세포벽의 두께가 23nm로 나타나 gram 양성균임을 확인할 수 있었다.

2) 분리 균주의 동정

분리균주의 동정과 대조균주의 확인을 위하여 *Bacillus* species의 동정에 최근 이용되고 있는 API system(API 50CHB & API 20E)을 kit system의 방법에 따라 조작하여 ATB computer data base version 2.0으로 판독한 결과 95% 이상의 유사도로 “Good identification” 이상으로 받아들여지고 있으므로 모두 표준 균주임이 확인되었다. 그리고 분리균주 BH-23에 대한 ATB system의 결과 99.5%의 *B. subtilis*로 “Very good identification”으로 나타나고 있어 본 분리균주와 대조균주에 대한 API system의 항목과 그 외 방법에서의 생화학적 특성을 조사하였다. Table 3에서와 같이 본 분리균주는 12% NaCl이 함유된 배지에서도 성장하였으며 성장온도는 50℃까지 성장하는 고온 균주였으

항산화와 혈전용해 활성을 갖는 기능성 된장의 개발

며 가수분해활성에 있어서는 glucose, fructose, inositol 등을 분해하였고, catalase, oxidase 등을 생산하였으나 urease, indol 등은 생산하지 않았다.

따라서 이상의 균학적 제 성질을 분석하여 분류학상의

위치를 검토한 결과 분리주 BH-23은 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

3) *Bacillus subtilis* BH-23의 최적 성장 조건

된장 숙성 중에 분리한 균주 중 항산화 활성과 혈전용해

Table 3. Biochemical characteristics of the isolated and reference strains.

Test	BH-23	ATCC 6633	ATCC 23845	ATCC 21037
API 50CHB				
1. Glycerol (GLY)	+	-	+	+
2. Erythritol (ERY)	-	-	-	-
3. D-Arabinose (DARA)	-	-	-	-
4. L-Arabinose (LARA)	+	-	+	+
5. Ribose (RIB)	+	+	+	+
6. D-Xylose (DXYL)	-	-	-	+
7. L-Xylose (LXYL)	-	-	-	-
8. Adonitol (ADO)	-	-	-	-
9. β -Methyxcycloside (MDX)	-	-	-	-
10. Galactose (GAL)	-	-	-	+
11. D-Glucose (GLU)	+	+	+	+
12. D-Fructose (FRU)	+	+	+	+
13. D-Mannose (MNE)	+	-	+	+
14. L-Sorbose (SBE)	-	-	-	-
15. Rhamnose (RHA)	-	-	-	-
16. Dulcitol (DUL)	-	-	-	-
17. Inositol (INO)	+	-	-	+
18. Mannitol (MAN)	+	-	+	+
19. Sorbitol (SOR)	-	-	+	+
20. α -Methy-D-Mannoside (MDM)	-	-	-	-
21. α -Methy-D-glucoside (MDG)	+	-	+	+
22. N-Acetylglucosamine (NAG)	-	+	+	+
23. Amygdaline (AMY)	-	-	+	+
24. Arbutin (ARB)	+	+	+	+
25. Esculin (ESC)	+	+	+	+
26. Salicin (SAL)	+	+	+	+
27. Cellobiose (CEL)	+	+	+	+
28. Maltose (MAL)	+	+	+	+
29. Lactose (LAC)	-	-	+	+
30. Melibiose (MEL)	+	-	+	+
31. Sucrose (SAC)	+	+	+	+
32. Trehalose (TRE)	+	+	-	+
33. Inulin (INU)	+	-	+	+
34. Melezitose (MLZ)	-	-	-	-
35. D-Raffinose (RAF)	+	-	+	+

+: positive, -: negative.

활성이 가장 높은 *Bacillus subtilis* BH-23의 성장 최적 온도와 pH를 조사한 결과를 각각 Fig. 1 및 2에 나타내었다.

Bacillus subtilis BH-23의 성장 온도는 20°C이하의 온도에서는 성장이 원활하지 않았으나, 25°C이상에서는 성장이 비교적 좋았으며 30°C이상에서는 온도가 증가할수록 성장속도가 빨라지는 경향을 나타내었다. *Bacillus subtilis* BH-23의 최적 성장온도는 37~40°C로 일반적인 *Bacillus*속의 성장 온도와 비슷한 경향을 나타내었다[25].

이는 청국장에서 분리한 혈전용해 효소를 생산하는 *Bacillus*속과 발효대두로부터 분리한 단백질 분해활성을 갖는 *Bacillus subtilis*의 최적 성장온도가 37~40°C사이였다는 보고와 유사한 경향을 나타내고 있다[25].

Fig. 2에서 표시한 것과 같이 *Bacillus subtilis* BH-23 최적 성장 pH는 5.0에서 가장 빠른 성장을 나타내었으며 pH 4.0이하에서는 성장이 거의 불가능하였다. 그러나 pH 6.0

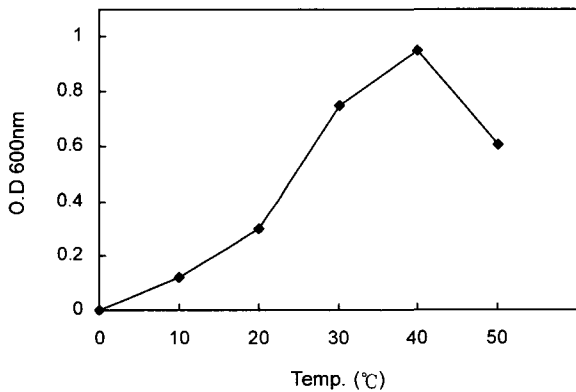


Fig. 1. Optimal growth condition of temperature of *Bacillus subtilis* BH-23 isolated Doenjang.

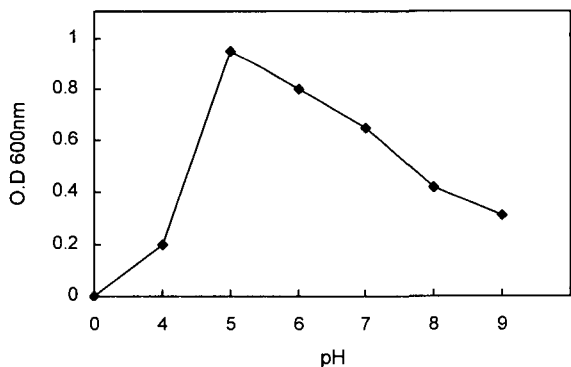


Fig. 2. Optimal growth condition of pH of *Bacillus subtilis* BH-23 isolated from Doenjang.

~7.0에서는 성장속도가 약간 감소하였고, pH 9.0에서는 거의 성장이 억제된 것으로 보아 알칼리성 조건에서는 성장이 저해 받는 것으로 나타났다.

Fig. 3은 *Bacillus subtilis* BH-23의 최적 식염농도를 조사한 결과이다. 일반적으로 된장에서 분리한 균주들은 고농도의 염분의 조건하에서 생존하기 때문에 *Bacillus subtilis* BH-23의 생육 조건을 조사하였다. *Bacillus subtilis* BH-23은 식염이 첨가되지 않는 대조구에서는 성장이 매우 높았으나 식염농도가 3.0~12.0%에서는 성장이 양호하였고, 식염이 14%이상의 농도에서는 성장 10일까지는 약간의 성장 저해를 보였다. 그러나 배양시간이 경과함에 따라 성장이 양호하여 배양 종료 시점인 30일이 지난 후에는 식염을 20% 첨가한 경우 점차적으로 성장이 억제되었다.

4) *Bacillus subtilis* BH-23의 항산화 및 혈전 용해 효소의 최적생산 조건

온도 : *Bacillus subtilis* BH-23의 항산화 활성 및 혈전용해 효소의 생산에 미치는 최적 온도를 Fig. 4에 나타내었다. *Bacillus subtilis* BH-23을 20°C~40°C에서 배양한 모든 실험구에서 항산화 활성과 혈전용해 활성을 나타내었으며 40°C에서는 가장 높은 활성을 나타내었다.

pH : *Bacillus subtilis* BH-23의 항산화 활성 및 혈전용해 효소의 생산에 미치는 최적 pH를 조사하였다. Fig. 5에 나타낸바와 같이 pH 4.0에서는 거의 활성을 나타내지 않았고 pH 5.0에서 가장 높은 활성을 나타내었다. pH 6.0~9.0에서는 활성이 억제됨을 볼 수 있었다.

식염농도 : *Bacillus subtilis* BH-23의 항산화 및 혈전용해

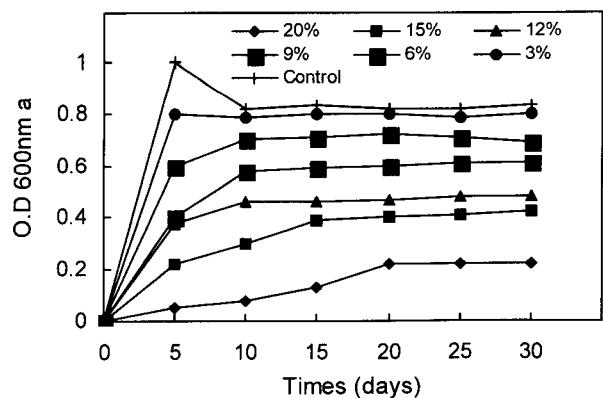


Fig. 3. Optimal growth condition of NaCl concentration of *Bacillus subtilis* BH-23 isolated from Doenjang.

항산화와 혈전용해 활성을 갖는 기능성 된장의 개발

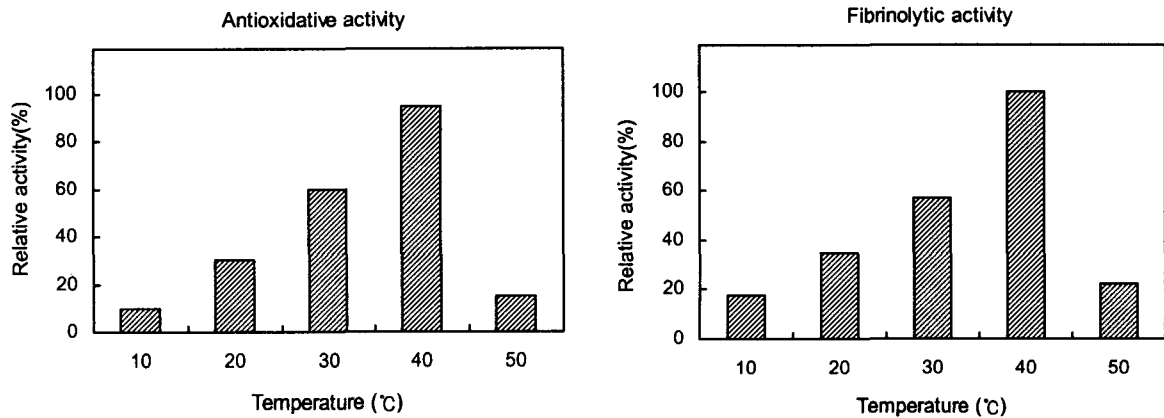


Fig. 4. Optimal temperature for the antioxidative activity and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* BH-23

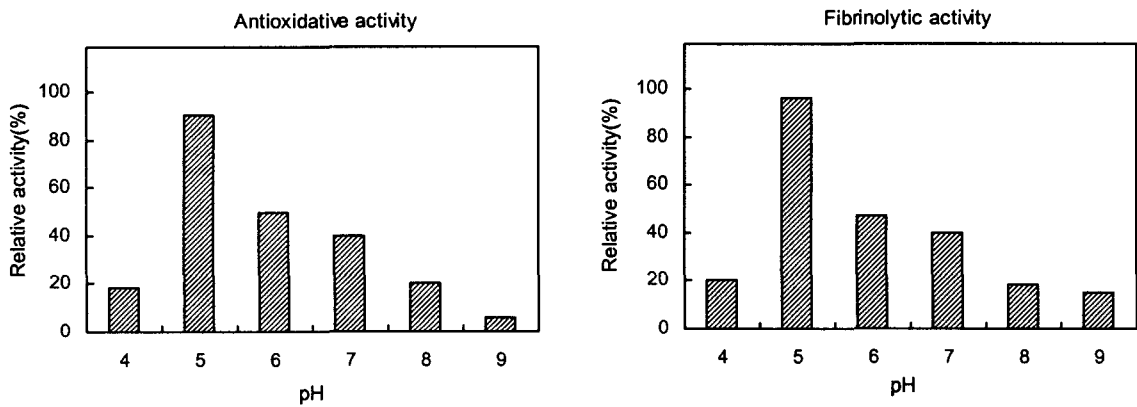


Fig. 5. Optimal pH for the antioxidative activity and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* BH-23

효소에 미치는 식염의 농도를 0~20%범위에서 조사하였다.

Fig. 6에서 보는바와 같이 식염농도를 첨가한 모든 실험구에서 항산화 활성과 혈전용해 활성이 나타났으며 고식염농도인 20%에서도 활성은 나타났으나 대조군의 약 45%의

활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 보는바와 같이 *Bacillus subtilis* BH-23의 항산화활성 및 혈전용해 효소의 생산의 최적온도는 37~40°C에서 최적 pH는 5이었고 식염농도는 1~5%이었다. 이러한 결과는 대부분의 미생물이 생

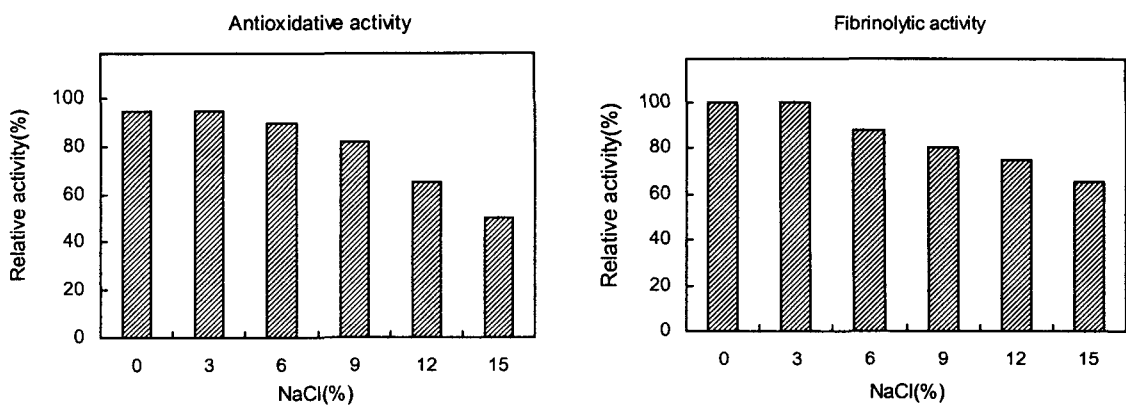


Fig. 6. Optimal NaCl concentration for the antioxidative activity and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* BH-23

산하는 효소활성이 본 연구에서 분리 동정한 최적 성장 조건과 거의 일치하며 또한 최적 효소의 생산 범위와도 거의 일치하는 경향을 나타내고 있다. *Bacillus subtilis*의 항산화에 대한 활성은 균체가 생산하는 효소나 유용물질에 의하여 효과가 나는 것으로 알려져 있다[25].

본 연구에서 *Bacillus subtilis* BH-23은 항산화 활성과 혈전 용해 효소의 생산조건과 같은 pH 5.0에서 가장 높은 생산능을 나타내므로, 된장의 제조에 첨가하면 된장의 숙성 중 항산화활성과 혈전 용해능력 가지는 신기능성 된장을 개발할 것으로 사료된다. 우리나라의 된장 및 청국장에서 각종 활성 물질이 밝혀지고 있고, nattokinase 등은 상품화가 되어있다. 앞으로 *Bacillus subtilis* BH-23 이 생산하는 항산화 물질 및 혈전용해 효소의 특징이 규명된다면 신기능 된장의 가능성을 기대할 수 있을 것이다.

본 연구의 결과로 미루어보아 *Bacillus subtilis* BH-23은 항산화 활성과 혈전용해 활성이 가장 높은 균주로서 기능성 된장을 제조할 때 starter로서 이용 가능성이 확인 되었으며 앞으로 본 균주를 이용하여 경제성이 있는 기능성 된장을 만들 수 있을 것으로 생각되어진다.

5) 시판 재래식 된장의 이화학적 성분 및 색도

본 실험에서 제조한 된장과 현재 시판되고 있는 6종류의 된장에 대한 이화학적 성분 및 색도를 비교 조사하였다. 결과를 Table 4에서 보는 바와 같이 된장의 수분 함량은 평균 54.33%이었으나 본제품은 56.20%였다. 이 중 재래식 메주 및 콩 함량이 95%이상인 A, B 및 C 제품은 수분 함량이 55%이상으로 다른 제품보다 높은 편이었다. 이러한 수분함량의 차이는 개량식 된장 제조 시에는 최종제품

에 미리 수분함량을 계산하며 수돗물을 첨가하고 있으나, 재래식 메주로 된장을 만들 경우에는 여액인 간장을 걸러낸 후에 잔사를 사용하기 때문에 잔사의 채취방법에 따라 차이가 나타난 것으로 사료된다.

조단백질의 경우 본 제품은 14.20%였으나, 시판된장의 경우 평균 12.82%이었으며 D사제품은 11.05%로 가장 낮았으며, 재래식 메주로 제조한 A사 제품이 14.80%로 가장 높은 값을 나타내었는데 이는 원료 대두의 함량이 다르기 때문인 것으로 생각된다. D사 제품은 미국산 대두 18.0%, 소맥분 11.43% 재래식 메주를 약간 첨가하여 제조한데 비하여 A사 제품은 재래식 메주 81%와 간장박 16%로 대두 함량이 높았기 때문이다.

아미노태 질소는 본 제품이 528.68 mg%였고, 평균 546.83 mg%로서 역시 대두함량이 많고 제조일자가 오래된 C사 제품이 820.63 mg%로 가장 높았으며, 대두 함량이 낮고 제조 날자가 짧은 E사 제품이 337.78 mg%로 가장 낮았다.

이와 같은 결과는 대두함량이 높고 제조일자가 오래된 제품이 아미노태 질소함량이 높은 이유는 대두 중에 단백질 분해 효소가 작용하여 아미노태 질소를 더 유지시킨 것으로 추측할 수 있다.

한편 시판 된장 3종과 본 실험에서 생산된 된장에 대하여 관능검사를 실시하였다. Table. 5에 나타난 바와 같이 본 실험에서 만들어진 된장이 맛이나 향기에서 가장 좋은 평가를 받았는데 이는 시판 된장 3종류에서 보다 암모니아취가 적었기 때문이라고 생각된다. 색도의 경우 본 제품은 7.20로 색도가 낮았으나 시판 된장이 모두 10.9~12.90의 범위로 재래식 된장에서 색도가 높게 나타났다. 된장 제조

Table 4. General properties of the commercialized traditional Doenjang

Products	Moisture(%)	Crude protein*(%)	Amino-N(mg%)	Crude fat(%)	pH	NaCl(%)
A	58.20	14.80	649.65	2.70	5.30	11.68
B	56.43	13.29	688.43	2.41	5.40	14.50
C	55.80	13.40	820.63	3.86	5.12	15.06
D	49.60	11.05	388.62	2.04	5.10	13.30
E	51.43	11.45	337.78	3.88	5.40	12.45
F	54.50	12.90	395.86	2.42	5.30	12.05
Average	54.33	12.82	546.83	2.89	5.27	13.17
Sample	56.20	14.20	528.68	2.61	5.40	13.00

*Crude protein (%) = total nitrogen(%)×nitrogen factor(5.71).

**O.D.490 nm × 100/g.

Table 5. Sensory evaluation on three commercialized traditional *Doenjangs* and sample one (traditional *meju* : steamed soybean = 1.0 : 4.0)

doenjang samples	Sample*	A**	B**	C**
Color	7.24±1.03	10.90±0.23	11.20±0.72	12.90±0.33
Flavor	6.70±0.24	4.90±0.27	3.80±0.65	3.50±0.45
Taste	6.07±0.83	4.20±0.74	4.84±0.53	2.95±0.63
Overall preference	6.67±1.02	6.66±0.85	6.613±0.63	6.45±0.83

¹⁾Average±Standard deviation.

*Traditional *meju* : Steamed soybean = 1.0 : 4.0(w/w).

**Commercialized traditional *doenjang*.

시 색깔의 생성은 Maillard 반응(당-아미노 카보닐 반응)으로 나타나는데 이는 원료를 배합할 때 전분질 원료를 많이 첨가 할수록 대두중의 아미노 함량이 상대적으로 줄어들어 색도가 낮게 나타난 것으로 생각된다[13].

또한 종합적 기호도에서도 본 제품 된장이 높았다. 이러한 결과는 본 실험된장의 경우 *Bacillus subtilis* BH-23을 단일 균주로 첨가하여 메주를 만들었으므로 단일 균주가 된장 숙성시 성장 및 분비효소를 생산하는데 저해를 받지 않았기 때문이라고 생각된다.

따라서 불쾌한 냄새가 거의 없는 *Bacillus subtilis* BH-23 균주만으로 된장을 생산하면 불쾌한 냄새의 생성을 억제하므로 현재 시판중인 된장보다는 상품가치를 높일 수 있고 나아가서는 항산화 효과 및 혈전용해효소가 든 신기능성 된장이 될 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 된장 숙성 중 각종 미생물중에서 항산화 및 혈전 용해효소를 분비하는 균주를 분리 동정하고 이들 균주를 이용하여 기능성 항산화 및 혈전용해활성이 있는 된장을 제조하였다. 본 실험에서 된장에서 분리한 균주 중 1차적으로 항산화 활성 및 혈전용해 활성이 우수한 균주 BH-23을 선별하였다. 분리, 선별한 균주 BH-23은 형태학적, 생리화학적 및 생화학적 특성을 확인한 결과 *Bacillus subtilis*으로 잠정 적으로 결정하였고, 편의상 *Bacillus subtilis* BH-23으로 명명하였다. *Bacillus subtilis* BH-23의 최적 생육 조건은 온도 40℃, pH 5.0에서 가장 좋았고, 식염이 15%에서도 성장속도는 좋았다. 그리고 *Bacillus subtilis* BH-23

의 항산화 활성 및 항혈전효소의 최적생성 조건은 본 균주의 성장조건과 거의 일치하였다. *Bacillus subtilis* BH-23을 이용하여 만든 제품과 시판된장과 비교 분석한 결과 *Bacillus subtilis* BH-23로 만든 된장은 시판된장보다 암모니아 취가 거의 없었으며 된장의 색깔도 탁하지 않았으며 풍미도 우수하였다. 따라서 *Bacillus subtilis* BH-23으로 만든 된장을 본래의 제품에 큰 영향이 없으면서 항산화 및 혈전 용해 효소를 분비하는 기능성 된장을 제조 할 수 있을 것으로 생각되어진다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 중기청과 오복(주)의 컨소시엄의 지원으로 연구가 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Abel, K., H. De Shmertzing and J. I. Peterson. 1963. Classification of microorganism by analysis of chemical composition. I. Flability of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.* **85**, 1039-1044.
2. Asociation of Korean Standadization 1992. General Method of Organoleptic Test, KS A 7001.
3. Astrup, T. and S. Mullertz, 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* **40**, 346-350.
4. Finley, N. and M. L. Fields. 1962. Heat actication and heat induced dormarcy of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl, Microbiol.* **10**, 1110-1118.
5. Fukuda, Y., Osawa, T., Namiki, M. and T. Ogaki. 1985. Thiocyanate methanol. *Agri. Biol Chem.* **49**, 301.

6. Gerhardt, P. 1967. Cytology of *Bacillus anthracis*. *Fed-proc.* **26**, 1504-1517.
7. Gordon, R. E., W. C. Haynes and C. H. N., Pang. 1973. The genus *Bacillus* handbook No. **427**. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
8. Ji, W. D., E. J. Lee and J. K., Kim. 1992. Volatile flavor compounds of soybean pastes manufactured with traditional and improved method. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **35**, 248-253.
9. Kim, D.W. 1990. Food chemistry. Thamkudang press, Seoul pp. 401-447.
10. Kim, I. J., J. O. Lee., M. H. Park., D. W. Son., Y. L. Ha and C. H. Ryu. 2002. Preparation method of meju by three step fermentation, *Koeran J. Food Sci. Technol.* **34**, 536-539.
11. Kim, J. K. and C. S. Kim. 1995. The taste components of ordinary korean soy sauce and consumer sensory evaluation. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **38**, 521-526.
12. Kim, M. H., S. S. Im., S. H. Kim., G. E. Kim and J. H. Lee. 1994. Antioxidant materials in domestic *meju* and *doenjang* (II). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **23**, 251-260.
13. Kim, N. D. 1996. Study on the browning and it's inhibition in soybean paste (*deonjang*). Ph.D. dissertation, *Kon-Kuk Univ., Seoul, Korea*.
14. Korean Food Industry Association 1999. Food Codex, pp. 715-717 *Hanil printing, Seoul*
15. Korean Food Industry Association 1999. Food Codex, pp. 719-720 *Hanil printing, Seoul*.
16. Korean Food Industry Association 1999. Food Codex, pp 968-969 *Hanil printing, Seou*
17. Kim, S. H., N. S. Choi., W. Y. Lee., J. W. Lee and D. H. Kim. 1998. Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzyme from *doenjang*. *Kor. J. Microbiol.*, **34**, 87-90.
18. Lee. C. Y. 1989. Korean soy seasonings and culture. *Food Sci. Ind.* **22**, 3-7.
19. Lee, J. H., M. H. Kim., S. S. Im., S. H. Kim and G. E. Kim. 1994. Antioxidant materials in domestic *meju* and *doenjang* (III). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **23**, 604-613.
20. Lim, S. Y., K. Y. Park and S. H. Rhee. 1999. Anti-cancer effects of *doenjang* in *in vitro* sulforhodamine B (SRB) assay. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 240-245.
21. MacFaccin, J. F. 1980. Biochemical tests for identification of Medical Bacteria, 2nd ed., Baltimore, Williams and Wilkins.
22. Park, K. Y., S. H. Moon., H. S. Cheigh and H. S. Baik. 1996. Antimutagenic effects of *doenjang*. *J. Food Sci. Nutr.* **1**, 151-158.
23. Pries, F. G., M. Goodfellow and C. Todd. 1988. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. *J. Gen. Microb.* **134**, 1847-1882.
24. Sneath, P. H. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology, pp. 1104-1138. Vol. 2. Baltimore, Williams and Willkins Co.
25. Wuh, J. S., S. G. Lee and M. K. Ryu. 1982. Effect of *Bacillus* strains on the chungkookjang processing(II). *Korean J. Food. Sci. Technol.* **14**, 309-314.

(Received June 30, 2003; Accepted September 30, 2003)