전통된장에서 단백분해효소 활성이 우수한 미생물의 분리 및 이를 이용한 된장의 제조

선유경 · 박지선 · 양은주

(재)전남바이오산업진흥원 식품산업연구센터

Isolation of Microorganism with High Protease Activity from *Doenjang* and Production of *Doenjang* with Isolated Strain

Yoo Kyung Seon, Ji Sun Park, and Eun Ju Yang

Food Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation

ABSTRACT We isolated a bacterial strain with the highest protease activity from Korean traditional *doenjang*. From the analysis of the gene sequence of 16S rRNA, the isolated strain TSD was identified as *Bacillus subtilis* and was therefore named *B. subtilis* TSD. This strain showed maximal growth and the highest protease activity after 16 h at 37°C. The protease activity of *B. subtilis* TSD was stably maintained at a high level in the pH range of 5~9 but gradually decreased with increasing sodium chloride (NaCl) concentration. Starter *doenjang* was prepared using *B. subtilis* TSD, and its quality and functional properties were compared with those of the control *doenjang* (without starter) after 30 days of fermentation. The content of amino-type nitrogen, a quality index of *doenjang*, was 278 mg% in the starter *doenjang*, which is more than 217 mg% seen in the control *doenjang*. The DPPH and ABTS radical scavenging and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition activities of starter *doenjang* were higher than those of control *doenjang*.

Key words: *doenjang*, *Bacillus subtilis*, protease, starter, fermentation properties

서론

우리나라의 대표적인 전통식품인 된장은 콩을 주원료로 발효시켜 곡류 단백질에서 부족하기 쉬운 필수아미노산뿐만 아니라 지방산, 유기산, 미네랄, 비타민 등을 풍부하게 함유하고 있는 우수한 발효식품이다(Kim 등, 2011). 된장은 저장성이 우수하며 발효 과정 중 단백질과 탄수화물이 아미노산, 펩타이드, 유리당 등으로 분해되어 구수한 맛과 특유의 향미를 형성하므로 예로부터 식생활에서 중요한 조미식품으로서 역할을 담당하고 있다(Lee 등, 2012). 또한 전통된장의 기능성에 대한 다수의 연구가 진행되어 항산화 활성(Oh 등, 2014), 혈전 용해(Hyun 등, 2005), 항암 효과(Kwon과 Shon, 2004), 항돌연변이 활성(Park 등, 1996), 항고혈압 활성(Yu 등, 1996) 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다.

전통방식의 장류는 삶은 콩을 메주로 성형하고 볶짚으로 묶어 겨울 동안 매달아 자연 발효된 메주를 소금물에 침지하여 된장과 간장을 제조한다. 메주는 발효 과정 중 볶짚에 있는 고초균과 공기 중의 곰팡이들이 자연적으로 접종되어 메

주의 내부와 표면에서 증식하게 되고, 이때 생성된 효소의 작용으로 만들어진 아미노산, 당, 유기산 등이 장류의 독특한 맛과 향을 형성한다(Kim 등, 2011; Cho 등, 2016). 그러나 전통방식의 된장 제조는 기간이 오래 걸리고 저장성을 확보하기 위해 높은 염도로 제조되며, 메주 발효 중 불필요하게 유입되는 다양한 미생물에 의해 된장의 품질 규격화가 어려울 뿐만 아니라 위생적으로 문제가 될 수 있다(Chang과 Chang, 2007; Cho 등, 2016; Gil 등, 2017).

최근 전통된장의 제조에서 발생할 수 있는 문제점을 보완하기 위해 유용 미생물을 된장 종균으로 개발하여 적용하는 연구들이 진행되고 있다. 해양심층수와 protease 고생산성 *Bacillus subtilis* 균주를 이용하여 영양성과 생리 기능성이 증진된 된장의 제조(Jung 등, 2009), *B. cereus*와 바이오제닉 아민 저해 효과를 나타내는 *B. amyloliquefaciens* 균주를 종균으로 활용하여 아미노태 질소와 총 폴리페놀 함량이 높고 항산화 활성이 우수한 된장의 제조(Jeong 등, 2018), 안전하고 전통된장의 풍미를 보유한 된장의 생산을 위한 바로 사용 종균의 개발 연구(Lee 등, 2019) 등이 보고된 바 있다. 그러나 된장 종균의 개발과 산업적 적용은 여전히 미흡한 실정으로 전통된장의 품질과 기능성은 유지하면서 문제점을 개선할 수 있는 다양한 연구가 필요하다.

된장은 발효에 관여하는 미생물이 생산하는 protease에

의해 생성된 펩타이드와 아미노산에 의해 우수한 생리활성과 구수한 감칠맛을 발현한다(Rhee 등, 2006; Lee 등, 2016b; Kang 등, 2016). 이에 본 연구에서는 품질과 생리활성이 우수한 된장 제조를 위한 종균을 개발하기 위해 전통된장으로부터 protease 활성이 가장 높은 균주를 분리·동정하고 생육 특성을 조사하였다. 또한 분리 균주를 이용한 된장을 제조하여 발효를 진행한 후 품질 특성과 항산화 및 ACE 저해 활성을 평가하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 protease 활성 측정

전통된장으로부터 protease 활성이 높은 균주를 분리하기 위해 가정에서 재래식으로 제조한 된장 22종을 수집한 후 된장 시료 1 g을 각각 멸균수 10 mL에 현탁한 회색액을 준비하여 2% skim milk를 첨가한 Tryptic Soy Agar(TSA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 배지에 도말하였다. 도말한 배지를 37°C에서 24시간 배양한 후 시료당 skim milk 분해환을 가장 크게 형성하는 균주를 선별하였다.

선별된 균의 protease 활성은 azocasein법을 일부 변형하여 측정하였다(Kim 등, 1998). 분리 균주 22종을 TSB(Tryptic Soy Broth, Difco Laboratories) 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 10 min, Micro 17TR, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Gimpo, Korea)하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 기질용액은 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 azocasein(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 농도가 0.5%(w/v)가 되도록 용해하여 사용하였다. 기질용액 150 µL에 조효소액 50 µL를 혼합하여 30°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 400 µL를 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응액을 원심분리(10,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 500 µL에 525 mM NaOH 700 µL를 가하여 혼합한 다음, 432 nm에서 흡광도(PowerWave XS, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 측정하였다. 효소 활성은 30°C에서 1시간 동안 효소반응에 의하여 유리되는 azo기에 의해 432 nm에서 흡광도를 0.01 증가시키는 양을 1 unit/mL로 정의하였다.

된장 발효 종균의 선정 및 동정

된장 발효를 위한 종균을 선정하기 위해 protease 활성이 높은 분리 균주 4종을 이용하여 대두를 각각 발효시킨 후 발효 시료의 protease 활성을 측정하였다. 함평 농협(Hampyeong, Korea)에서 구입한 대두를 실온에서 24시간 수침 후 100°C에서 1시간 증자하고 마쇄하였다. 증자 대두 100 g에 미리 배양한 분리 균주 4종의 배양액을 1%(v/w) 접종하여 30°C에서 2일간 발효하였다. 발효 대두의 protease 활성은 각 시료 1 g을 증류수 4 mL로 현탁한 후 원심분리(8,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하여

상기와 동일한 방법으로 측정하였다.

된장 종균으로 선정된 TSD 균주의 동정을 위해 universal primer인 785F(5'-GGATTAGATACCTGGTA-3')와 907R(5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')을 이용하여 16S rRNA 염기서열을 결정 한 후, NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BlastN 프로그램을 이용하여 GenBank에 등록된 염기서열들과 비교하였으며, 표준 균주(type strain)와의 상동성은 Mega version 6.06 프로그램(<http://www.megasoftware.net/>)의 ClustalW를 이용하여 분석하였다(Saitou와 Nei, 1987).

배양조건에 따른 종균의 생육 및 protease 활성 측정

된장 종균으로 선정된 TSD 균주의 생육 특성을 확인하기 위해 배양온도, 배양시간, 초기 pH 및 NaCl 조건을 달리하여 배양한 후 배양액의 생균수 및 protease 활성을 측정하였다. TSD 균주를 TSB 배지에 접종한 후 배양온도에 따른 영향을 평가하기 위해 30°C, 37°C, 50°C 온도에서 각각 24 시간 동안 배양하였고, 배양시간에 따른 생육 곡선 측정을 위해 TSD 균주를 37°C에서 120시간 동안 배양하였다. pH 조건에 따른 영향을 평가하기 위해 TSB 배지의 초기 pH를 pH 4~9로 조정하였고, NaCl 농도에 따른 영향을 평가하기 위해 TSB 배지에 NaCl 농도를 각각 0%, 5%, 10%, 15%, 20%로 조정 한 후 TSD 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양조건에 따른 TSD 균주 배양액의 생균수 측정은 배양액 1 mL를 멸균 생리식염수를 이용하여 10배씩 단계적으로 희석한 시료를 TSA 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 균주의 집락을 계수하여 측정하였으며, 배양액의 protease 활성은 상기와 동일한 방법으로 측정하였다.

종균 된장 제조

종균 된장의 제조를 위해 마쇄한 증자 대두 100 g에 TSD 균주 배양액을 1%(v/w) 접종하여 30°C에서 2일간 발효시킨 후 (주)장흥식품(Jangheung, Korea)에서 제공받은 장 가르기 한 생된장 900 g과 혼합하여 1 kg의 종균 된장을 제조하였다. 대조구로 종균을 접종하지 않은 증자 대두와 생된장을 상기와 동일한 배합비로 혼합하여 제조하였다. 대조구와 종균 된장은 30°C에서 30일간 발효를 진행한 후 분석 시료로 사용하였다.

염도, pH 및 아미노태 질소 함량 측정

된장 시료 10 g에 증류수 40 mL를 가하여 균질화한 후 3,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 상등액을 시료액으로 사용하였다. 염도는 시료액을 염도계(PAL-ES2, Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 측정하였고, pH는 pH meter(Mettler-toledo GmbH 8603, Schwerzenbach, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 아미노태 질소 함량은 식품공전(MFDS, 2020)의 formol 적정법으로 측정하였다. 시료액

5 mL, 중성 formalin 용액 10 mL, 증류수 10 mL를 넣은 플라스크에 1% phenolphthalein 용액을 2~3방울 가한 후 0.1 N NaOH로 pH 8.4(미홍색)가 될 때까지 적정하였다. 이때 소모된 0.1 N NaOH mL 수를 아미노태 질소 함량으로 결정하였다. 대조구는 중성 formalin 용액 대신 증류수를 사용하여 측정하였다.

미생물 분석

된장 시료 1 g을 멸균 생리식염수를 이용하여 10배씩 단계적으로 희석한 다음 총 세균수는 희석액 1 mL를 Petrifilm™ Aerobic Count Plate(3M, Maplewood, MN, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였으며, 효모와 곰팡이는 Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate(3M)에 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 형성된 집락을 계수하여 측정하였다. TSD 종균 수의 확인은 종균 된장 희석액을 TSA 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 일차적으로 TSD 종균 집락의 특이적 형태를 관찰하고 광학현미경(Olympus BX41TF, Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 세포의 형태를 관찰한 후, 이차적으로 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 rRNA 염기서열의 동일함을 확인하여 종균의 집락 수를 측정하였다.

색도 분석

색도는 색차계(CM-3500d, Konica minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 된장 시료 10 g을 petri dish에 담아 L(명도, lightness), a(적색도, redness), b(황색도, yellowness) 값을 측정하여 나타내었다. 이때 사용한 표준 백색판(standard plate) 값은 각각 L=99.03, a=-0.19, b=-0.29였다.

된장 추출물 제조

된장 시료 10 g에 증류수를 첨가하여 200 mL로 정용한 후 항온수조(37°C)에서 4시간 동안 추출한 추출액을 원심 분리(3,000 rpm, 10 min)하였다. 원심분리한 상등액을 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 동결건조기(PVTFD 10R, IIShin Lab Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 건조하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

농도별로 제조한 된장 추출물 20 µL에 0.1 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 180 µL를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거능 측정

7 mM ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), Wako Pure Chemical Industries)와 2.45 mM potassium persulfate를 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS 양이온을 형성시킨 후, 사용 직전 734 nm에서 흡광도가 0.80 ± 0.02 가 되도록 조정하였다. 농도별 된장 추출물 20 µL에 ABTS 용액 180 µL를 혼합하여 실온에서 6분 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

ACE(angiotensin converting enzyme) 저해 활성 측정

ACE 저해 활성은 ACE Kit-WST(Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan)를 사용하여 측정하였다. 농도별 된장 추출물에 substrate buffer와 enzyme working 용액을 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 indicator working 용액을 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수를 처리하였고 ACE 저해 활성은 아래의 식으로 계산하여 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{ACE 저해 활성(\%)} = \left(\frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{대조구 흡광도} - \text{효소 무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

통계분석

모든 실험은 3회 반복하여 수행되었으며 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 나타내었다. 시험군과 대조군 간의 차이는 SPSS program(Statistical Package for the Social Sciences, version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Student's *t*-test 분석을 통해 분석하였고, 3군 이상에서의 유의적 차이 비교는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다($P < 0.05$).

결과 및 고찰

Protease 활성이 높은 균주의 선별 및 동정

Skim milk 2%가 포함된 TSA 배지에 전통된장 22종의 희석액을 각각 도말하여 평판 배양한 후 skim milk 분해환을 가장 크게 형성하는 집락을 된장 시료별로 1종씩 선정하였다. 된장에서 분리한 protease 활성 균주 22종을 각각 TSB 배지에 배양하여 배양 상등액의 protease 활성을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 39~1,664 unit/mL의 범위에서 다양한 수준의 protease 활성을 나타내었으며, 이 중 1,000 unit/mL 이상의 높은 활성을 나타내는 HJD1(1,647 unit/mL), SKD(1,664 unit/mL), TSD(1,502 unit/mL), J4(1,240

Fig. 1. Protease activity in the culture supernatant of isolated strains from traditional *deonjang*.

Fig. 2. Protease activity of soybean paste fermented with isolated strains. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

unit/mL) 4종을 1차 후보 균주로 선발하였다. 높은 protease 활성을 보유한 4종(HJD1, SKD, TSD, J4)의 균주 중 된장 발효에 적합한 균주를 최종 선정하기 위해 증자 대두에 각각의 후보 균주를 1% 접종하여 2일 동안 발효시킨 후 발효 대두의 protease 활성을 측정하였다. 측정 결과 Fig. 2와 같이 TSD를 이용하여 발효한 대두에서 3,612 unit/g의 가장 높은 protease 활성을 나타내어 된장 제조를 위한 발효 종균으로 TSD를 최종 선정하였다. TSD 균주의 동정을 위해 16S rRNA 염기서열을 분석하여 GenBank에 등록된 표준 균주들과 염기서열을 비교한 결과, *B. subtilis* DSM 10과 99%의 상동성을 나타내었으며 신규 균주로 한국미생물보존센터(KCCM)에 KCCM12595P로 기탁하였다. *B. subtilis*는 우리나라 전통 발효 식품인 된장(Yang 등, 2014; Lee와 Kim, 2017), 청국장(Moon 등, 2015), 메주(Choi 등, 2003; Lim, 2009) 등의 장류에서 주로 분리되며, amylase와 protease 등의 효소 활성이 우수하여 된장의 풍미에 중요한 역할을 하므로 된장 종균으로 개발하기 위한 연구들이 진행되어 왔다(Chang과 Chang, 2007; Jung 등, 2009; Lee 등, 2016b). 본 연구에서 분리된 *B. subtilis* TSD 균주는 대두 발효에서 우수한 protease 활성을 나타내므로 된장 발효

Fig. 3. Effect of temperature on growth and protease activity of *B. subtilis* TSD. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

종균으로 활용할 경우 아미노태 질소 함량의 증가와 함께 구수한 맛이 증진된 된장의 제조가 가능할 것으로 기대된다.

배양온도 및 시간에 따른 종균의 생육도 및 protease 활성

된장 발효 종균으로 선정된 *B. subtilis* TSD를 각각 다른 온도(30°C, 37°C, 50°C)에서 24시간 동안 배양한 후 배양 온도에 따른 배양액의 protease 활성 및 생균수를 측정하였다. Fig. 3과 같이 *B. subtilis* TSD를 37°C에서 배양했을 때 생균수가 8.72 Log CFU/mL로 가장 높은 생육도를 보였고, protease 활성도 1,521 unit/mL로 가장 높았다. 30°C 배양 조건에서는 생균수 8.23 Log CFU/mL, protease 활성 1,392 unit/mL로 37°C 배양에 비해 좀 더 감소하였으며, 50°C 배양 조건에서는 생균수 6.91 Log CFU/mL, protease 활성 256 unit/mL로 균 생육도에 비해 protease 활성이 크게 감소하는 결과를 보였다. Baek 등(2014)은 전통 장류에서 분리한 *B. subtilis* 균주를 온도별(20°C, 30°C, 37°C, 45°C)로 배양하였을 때 37°C에서 가장 높은 생육을 보였고 30°C에서도 비교적 높은 생육을 나타내는 결과를 보고하였다. 또한 Kim(2014)은 장류에서 protease 활성이 우수한 *B. subtilis* 균주를 분리하고 배양온도(20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C)에 따른 protease 활성을 비교한 결과 35°C 배양 조건에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

B. subtilis TSD 균주의 생육곡선을 측정하기 위해 37°C에서 120시간 동안 배양하면서 생균수를 측정하고 생육에 따른 protease 활성을 측정하였다(Fig. 4). TSD 균주는 배양 8시간까지 급격히 성장하며 대수기를 지나 배양 16시간 후에 생균수 9.30 Log CFU/mL로 가장 높은 생육도를 보였으며 이후 사멸기에 접어들어 생균수가 서서히 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 *B. subtilis* 균주의 생육곡선을 측정한 다수의 연구에서 *B. subtilis* 균이 생육 초기에 빠르게 성장하여 균주에 따라 배양 9~28시간 사이에 최대 생육도에 도달한 후 서서히 감소하는 경향과도 유사하다(Yang과 Chang, 2007; Kim, 2014; Jeong 등, 2015). 배양에 따른 TSD 균주의 protease 활성도 생육곡선과 유사한 경향을

Fig. 4. Cell growth and protease activity of *B. subtilis* TSD at 37°C for 120 h.

보이며 배양 초기부터 급격히 증가하여 배양 16시간 후에 1,585 unit/mL로 최대 활성을 보인 후 시간이 지남에 따라 서서히 감소하였으나 배양 120시간 후에도 1,000 unit/mL 이상의 활성을 유지하였다. Lim 등(2000)은 전통 메주에서 분리한 *B. subtilis* 균주의 생육에 따른 protease 활성을 조사한 결과, 생육도는 배양 24시간에 가장 높았으며 효소 활성은 배양 20시간에 가장 높은 결과를 보였다. Lee 등(2016a)도 토양에서 분리된 protease 생산 균주인 *Bacillus* sp. 균의 배양 시간에 따른 효소 활성을 측정한 결과 배양 24시간에 최대 생육도를 나타내었으며, 효소 활성은 배양 20~24시간에서 가장 높은 결과를 나타내어 균주의 생육과 효소의 생산성에 연관성이 있는 것으로 생각된다. *B. subtilis* TSD의 배양온도 및 시간에 따른 생육도와 protease 활성을 측정한 결과 TSD 균주의 배양은 37°C, 16시간 배양 조건을 선정하였다.

pH에 따른 종균의 생육도 및 protease 활성

된장은 발효 및 숙성이 진행되면서 pH가 변화하며 발효 조건에 따라 유기산의 생성 및 함량이 달라 다양한 pH를 나타내는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 1996; Ahn 등, 2012).

Fig. 5. Effect of pH on growth and protease activity of *B. subtilis* TSD. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P<0.05$).

된장 발효 종균으로서 *B. subtilis* TSD의 생육과 protease 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH를 달리한 배지(pH 4~9)에서 균주를 배양한 후 생균수와 protease 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. *B. subtilis* TSD 균주는 pH 5~8의 범위에서 생균수 9 Log CFU/mL 이상, protease 활성 1,558~1,583 unit/mL 수준으로 유사한 생육도와 효소 활성을 나타내었으며, pH 9 조건에서도 비교적 높은 생균수(8.82 Log CFU/mL)와 protease 활성(1,527 unit/mL)을 나타내어 넓은 pH 범위에서 안정함을 확인하였다. pH 4의 조건에서 TSD 균주의 생육도는 8.61 Log CFU/mL로 비교적 높은 수준이었으나 protease 활성(438 unit/mL)은 크게 감소하는 결과를 보였다. Yang 등(2014)은 된장에서 분리한 *B. subtilis* CBD2의 pH 조건에 따른 생육 특성을 조사한 결과 생육도는 pH 7에서 가장 높았으나 pH 5~9의 범위에서 비교적 안정적인 생육을 나타내어 본 실험의 결과와 유사하였다. 또한 Lim 등(2000)은 메주에서 분리한 *B. subtilis*가 생산하는 protease 활성에 대한 pH의 영향을 조사한 결과 pH 7에서 최대 활성을 보였으나 pH 5~9의 범위에서도 비교적 안정적인 활성을 나타내었다. 반면 Lee 등(2016a)은 *Bacillus* sp. 균주의 pH 조건에 따른 생육과 protease 활성을 측정한 결과 pH 9에서 균체 생육과 효소 활성이 최댓값을 나타내었으며, 효소 활성은 pH 8 이하에서 현저히 낮아지는 호알칼리성 protease의 특성을 보고하였다. 다양한 연구를 통해 *Bacillus* 속 균주에 따라 생육도와 protease 활성에 대한 pH의 영향이 다를 수 있다.

NaCl 농도에 따른 종균의 생육도 및 protease 활성

B. subtilis TSD의 NaCl 농도에 따른 생육도 및 protease 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. NaCl의 농도에 따른 생균수 측정 결과 5% NaCl 농도까지 생육에 영향을 나타내지 않았고, 10% NaCl 농도에서는 8.13 Log CFU/mL로 비교적 높은 생육도를 나타내었으나 NaCl 농도의 증가와 함께 생균수는 점차 감소하여 20% NaCl 농도에서는 3.80 Log CFU/mL 수준으로 감소하였다. NaCl의 농도에 따른 pro-

Fig. 6. Effect of NaCl on growth and protease activity of *B. subtilis* TSD. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different ($P<0.05$).

tease 활성은 NaCl의 농도와 비례적으로 감소하는 경향을 보이며 10% NaCl 농도에서 초기 활성의 약 50% 수준까지 감소하였으나, 20% NaCl의 고농도에서도 낮은 활성(215 unit/mL)을 보유했다. Lee 등(2011)은 메밀 속 성장 유래 *B. subtilis* 균의 NaCl 농도별(0%, 5%, 10%, 20%) 생육 특성을 조사한 결과 5% NaCl에서 최대 생육을 나타낸 후 염 농도가 증가할수록 생육이 억제되었으며, 내염성을 나타내므로 저염 및 고염 장류 제조에서 스타터로 활용이 가능함을 보고하였다. 된장에서 분리된 *B. subtilis* CBD2는 1~4% NaCl 농도 조건에서 생육특성을 조사한 결과 3% NaCl 농도에서 최대 생육을 보였으며 4% NaCl 농도에서는 생육이 감소하였다(Yang 등, 2014). NaCl의 농도별 배양 조건에 따라 *Bacillus* 군주가 생산하는 protease 활성을 비교한 연구 보고는 많지 않으나 Kalwasińska 등(2018)이 분리한 호염성 *B. luteus* H11 균주의 NaCl 농도(1~10%)에 따른 protease 활성을 측정된 결과 5% NaCl 농도에서 가장 높은 활성을 나타내었고, Suganthi 등(2013)은 호염성균으로 분리한 *B. licheniformis* 균주를 0~2 M NaCl 농도 조건에서 배양한 후 protease 활성을 측정된 결과 1 M(5.85%) NaCl 농도에서 좀 더 높은 효소 활성을 나타내어 유사한 경향을 보였다. 일반적으로 호염성 세균은 2.5~4% NaCl 조건에서 잘 성장하는 미생물이며 고염성 세균은 4~30% NaCl 농도에서도 성장이 가능한 미생물로 알려져 있다(Sohn, 2005). 본 연구결과를 통해 *B. subtilis* TSD는 20% NaCl 농도에서도 생육이 가능한 고염성 또는 내염성이 우수한 세균임을 확인하였으며, 10%의 고염 조건에서도 50% 정도의 protease 활성을 보유하므로 된장의 종균으로서 발효 기간에도 생존력과 단백 분해능의 유지력이 우수할 것으로 판단된다.

종균 된장의 발효 특성

Protease 활성이 높은 *B. subtilis* TSD를 접종하여 제조한 종균 된장(starter)과 메주로만 제조한 대조구 된장(control)을 30일 동안 발효시킨 후 품질 특성을 비교하였다(Table 1). 대조구와 종균 된장의 염도와 pH는 시료 간 차이를 보이지 않았으나 된장의 숙성 지표인 아미노태 질소 함량은 대조

Table 1. Fermentation properties of *doenjang* fermented with *B. subtilis* TSD for 30 days

Items	Type of <i>doenjang</i>	
	Control	Starter
Salinity (%)	10.40±0.06	10.48±0.11
pH	4.40±0.02	4.43±0.00*
Amino-type nitrogen (mg%)	217±4.82	278±1.08*
Total cell count (log CFU/g)	11.04±0.04	10.93±0.01*
Yeast and mold count (log CFU/g)	3.26±0.01	3.26±0.03
<i>B. subtilis</i> TSD (log CFU/g)	—	10.16±0.06
Color value L	52.83±0.01	50.73±0.11*
a	10.01±0.01	10.77±0.11*
b	21.75±0.01	22.68±0.14*

Values are expressed as the mean±SD (n=3).

*Significantly different by *t*-test ($P<0.05$).

구 된장은 217 mg%를 나타낸 반면 종균 된장은 278 mg%의 더 높은 함량을 나타내었다. 총 세균수는 대조구 된장에서 11.04 log CFU/g으로 종균 된장의 10.93 log CFU/g에 비해 좀 더 높았으나, 종균 된장에서 *B. subtilis* TSD가 10.16 log CFU/g의 수준을 나타내어 종균 된장의 세균 군총에서 TSD 균주가 우점하고 있음을 확인하였다. 효도와 곰팡이 수는 대조구와 종균 된장 간에 차이가 없는 결과를 보였다. 된장의 색도 분석에서 대조구에 비해 종균 된장은 명도(L)는 약간 낮고, 적색도(a)와 황색도(b)는 약간 높은 값으로 측정되었으나 큰 차이를 보이지 않았다. *B. subtilis* TSD를 이용한 종균 된장의 발효에 따라 대조구와 뚜렷한 차이를 나타내는 품질 특성은 아미노태 질소의 증가이며, 이러한 결과는 *B. subtilis* TSD가 생산하는 protease 활성에 의해 단백질 가수분해가 촉진되어 나타나는 결과로 생각된다. 된장의 구수한 맛의 척도인 아미노태 질소는 장류 발효의 품질 지표로서 중요하며, 전통식품 규격에서 한식 된장의 아미노태 질소 함량 규격은 300 mg% 이상으로 규정되어 있다(Lee 등, 2016b; Paek 등, 2019). 본 연구에서 종균 된장은 발효 30일 후에 아미노태 질소가 278 mg%의 함량을 나타내므로 *B. subtilis* TSD를 이용하여 된장을 생산할 경우 기존의 된장에 비해 아미노태 질소 함량 규격에 더 빠르게 도달하며

Fig. 7. DPPH and ABTS radical scavenging activity of *doenjang* fermented with *B. subtilis* TSD for 30 days. *Significantly different by *t*-test ($P<0.05$).

된장의 발효 숙성 기간을 단축할 수 있을 것으로 생각된다.

종균 된장의 항산화 활성

대조구 된장과 종균 된장을 발효 30일 후에 항산화 활성을 비교하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 평가한 결과는 Fig. 7과 같다. 대조구와 종균 된장 모두 된장 추출물의 농도에 따라 항산화 활성이 증가하였으나, 동일한 농도에서 대조구 된장에 비해 종균 된장의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능이 더 우수한 결과를 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능은 항산화 활성이 있는 물질이 안정한 DPPH 라디칼을 환원시켜 탈색반응이 나타나는 원리로서 대조구와 종균 된장 추출물의 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능은 0.5 mg/mL 농도에서 17.57%, 23.64%, 1 mg/mL 농도에서 24.46%, 31.68%, 2.5 mg/mL 농도에서 42.57%, 49.05%, 5 mg/mL 농도에서 60.63%, 74.11%의 소거능을 각각 나타내었다. ABTS 라디칼 소거능은 ABTS^{•+} 자유 라디칼이 된장의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 원리를 이용한 반응으로, 대조구와 종균 된장 추출물의 농도에 따른 ABTS 라디칼 소거능은 0.25 mg/mL 농도에서 9.25%, 9.97%, 0.5 mg/mL 농도에서 19.95%, 26.70%, 1 mg/mL 농도에서 34.18%, 48.26%, 2 mg/mL 농도에서 55.27%, 71.22%의 소거능을 각각 나타내었다. Ahn 등(2012)은 국내 지역별 된장의 DPPH 라디칼 소거능 분석 결과 항산화 활성의 차이는 된장의 주원료인 콩의 발효 상태에 따라 생성되는 아미노산의 종류와 함량 차이에서 기인하는 것으로 보고하였다. Jeong 등(2018)은 종균을 이용하여 제조한 콩알메주 된장의 DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과 대조구에 비해 종균 된장의 소거능이 높게 측정되었고, 된장 시료별 아미노산의 종류와 함량 차이에 의해 종균 된장의 소거능이 높게 나타난 것으로 추정하였다. 또한, Jung 등(2009)이 protease 고생산성 *B. subtilis* 균주를 접종하여 제조한 된장의 발효 30일째 항산화 활성을 측정한 결과 대조구에 비해 약 4배 높은 활성을 나타내었다. 본 연구에서 *B. subtilis* TSD를 이용하여 제조한 종균 된장이 대조구 된장에 비해 항산화 활성이 우수한 결과는 TSD 균주의 높은 protease 활성으로 항산화 활성에 영향을 주는 아미노산의 생성이 증가한 원인으로 생각된다.

종균 된장의 ACE(angiotensin converting enzyme) 저해 활성

ACE는 불활성인 angiotensin I을 절단하여 활성형인 angiotensin II로 전환시키는 것을 촉매하는 효소로 혈압을 상승시키는 동시에 혈압 강화 작용을 하는 bradykinin을 분해하는 작용으로 생체 내에서 고혈압을 일으키는 중요한 효소로 알려져 있다(Hong 등, 2004). 된장, 청국장과 같은 대두 발효식품은 발효 과정 중 단백질 가수분해에 의해 생성되는 유용 펩타이드에 의해 ACE 저해 활성을 나타낸다고 보고되고 있다(Rhee 등, 2006; Jung 등, 2009). *B. subtilis* TSD

Fig. 8. ACE inhibitory activity of *doenjang* fermented with *B. subtilis* TSD for 30 days. *Significantly different by *t*-test ($P < 0.05$).

를 접종하여 제조한 종균 된장과 대조구 된장을 발효 30일 후에 ACE 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. 대조구와 종균 된장의 ACE 저해 활성은 추출물의 농도에 따라 증가하였으며, 0.25 mg/mL 농도에서 31.25%, 41.18%, 0.5 mg/mL 농도에서 42.02%, 53.25%, 1 mg/mL 농도에서 61.96%, 72.63%, 2 mg/mL 농도에서 79.02%, 85.72%의 저해 활성을 나타내어 동일한 농도에서 대조구에 비해 종균 된장의 ACE 저해 활성이 유의적으로 높은 결과를 보였다. Rhee 등(2008)은 *B. subtilis*로 제조한 메주를 이용하여 담근 된장의 ACE 저해 활성을 대조구 된장과 비교한 결과, 숙성이 진행되면서 대조구에 비해 종균을 이용한 된장의 활성이 좀 더 높은 결과를 나타내었다. Jung 등(2009)은 protease 고생산성 *B. subtilis* 균주를 접종하여 발효시킨 된장과 대조구 된장의 ACE 저해 활성을 비교한 결과 발효 30일 후 대조구 된장의 ACE 저해 활성은 14.11%지만 종균 된장은 88.43%의 우수한 저해 활성을 나타내었으며, 이러한 결과는 protease 생산성이 우수한 종균의 특성에 의해 유용 펩타이드의 생산이 증가하였기 때문으로 보고하였다. 된장의 ACE 저해 활성은 혈압 강하제와 비교했을 때 낮은 활성을 나타내지만, 항상 섭취하는 식품 중에 존재한다는 점에서 유용성이 기대된다(Jang 등, 2000; Rhee 등, 2008).

요 약

된장 발효 종균의 개발을 위해 전통 된장으로부터 protease 활성이 높은 균주를 분리하였고, 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *B. subtilis*로 동정되어 *B. subtilis* TSD로 명명하였다. 배양온도 및 시간에 따른 *B. subtilis* TSD 균주의 생육도 및 protease 활성을 측정한 결과 37°C, 16시간 배양에서 가장 높은 결과를 보였다. 된장 종균으로서 산업적 활용을 위해 *B. subtilis* TSD의 생육과 protease 활성에 대한 pH와 NaCl의 영향을 검토한 결과 pH 5~9의 넓은 범위에서 비교적 안정한 결과를 보였으며, NaCl 농도와 비례하여 생균수와 protease 활성은 감소하였으나 10%의 고농도 조건에서

도 50% 정도의 protease 활성을 유지하였다. *B. subtilis* TSD를 이용하여 제조한 종균 된장을 30일 동안 발효시킨 후 품질 특성, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능, ACE 저해 활성을 대조구 된장과 비교하였다. 발효 30일 후 종균 된장은 된장의 발효 품질 지표인 아미노태 질소의 함량이 278 mg%로 대조구 된장의 217 mg%에 비해 더 높은 함량을 나타내었다. 또한 종균 된장 추출물은 동일한 농도에서 대조구 된장에 비해 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능과 ACE 저해 활성이 더 우수한 결과를 보였다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부의 재원으로 커뮤니티비즈니스 활성화사업의 지원을 받아 연구되었음(P0008719).

REFERENCES

- Ahn JB, Park JA, Jo H, Woo I, Lee SH, Jang KI. Quality characteristics and antioxidant activity of commercial *Doenjang* and traditional *Doenjang* in Korea. *Korean J Food Nutr.* 2012. 25:142-148.
- Baek SY, Lee YJ, Yun HJ, Park HY, Yeo SH. Characterization of alkaline cellulase from *Bacillus subtilis* 4-1 isolated from Korean traditional soybean paste. *Korean J Food Preserv.* 2014. 21:442-450.
- Chang M, Chang HC. Characteristics of bacterial-koji and deon-jang (soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. *Kor J Microbiol Biotechnol.* 2007. 35:325-333.
- Cho MJ, Shim JM, Lee JY, Lee KW, Yao Z, Liu X, et al. Properties of meju fermented with multiple starters. *Microbiol Biotechnol Lett.* 2016. 44:109-116.
- Choi KK, Cui CB, Ham SS, Lee DS. Isolation, identification and growth characteristics of main strain related to meju fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2003. 32:818-824.
- Gil NY, Choi BY, Park SY, Cho YS, Kim SY. Physicochemical properties of *Doenjang* using grain type *Meju* fermented by *Aspergillus oryzae* and protease. *Korean J Food Preserv.* 2017. 24:697-706.
- Hong JS, Park JR, Jeon JR, Cha MH, Kim J, Kim JH. Quality characteristics and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *doenjang* prepared with *Bacillus subtilis* SS103. *J East Asian Soc Diet Life.* 2004. 14:363-369.
- Hyun KW, Lee JS, Ham JH, Choi SY. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from Korean traditional *Doenjang*. *Kor J Microbiol Biotechnol.* 2005. 33:24-28.
- Jang SM, Lee JB, An H, Rhee CH, Park HD. Changes of micro-organisms, enzyme activity and physiological functionality in the Korean soybean paste with various concentrations of *Ginseng* extract during fermentation. *Korean J Postharvest Sci Technol.* 2000. 7:313-320.
- Jeong EJ, Yoon HS, Kim IJ, Hong ST, Kim SY, Gil NY, et al. Quality characteristics of whole soybean *meju doenjang* prepared with addition times and starter contents. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2018. 47:1159-1168.
- Jeong SJ, Yang HJ, Jeong SY, Jeong DY. Identification of characterization and statistical optimization of medium constituent for *Bacillus subtilis* SCJ4 isolated from Korean traditional fermented food. *Korean J Microbiol.* 2015. 51:48-60.
- Jung HK, Jeong YS, Youn KS, Kim DI, Hong JH. Quality characteristics of soybean paste (*Doenjang*) prepared with *Bacillus subtilis* DH3 expressing high protease levels, and deep-sea water. *Korean J Food Preserv.* 2009. 16:348-354.
- Kalwasińska A, Jankiewicz U, Felföldi T, Burkowska-But A, Brzezinska MS. Alkaline and halophilic protease production by *Bacillus luteus* H11 and its potential industrial applications. *Food Technol Biotechnol.* 2018. 56:553-561.
- Kang KK, Choi SY, Kim JS, Kim GC, Kim KM, Baek DR. Quality characteristics of buckwheat *soksungjang* and factory-style *doenjang*. *Food Eng Prog.* 2016. 20:379-385.
- Kim GE. Isolation of protease producing microorganisms. *J Kor Soc Environ Eng.* 2014. 36:265-270.
- Kim HJ, Lee JJ, Cheigh MJ, Choi SY. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of *kimchi* ingredients. *Korean J Food Sci Technol.* 1998. 30:1333-1338.
- Kim JW, Doo HS, Kwon TH, Kim YS, Shin DH. Quality characteristics of *doenjang meju* fermented with *Aspergillus* species and *Bacillus subtilis* during fermentation. *Korean J Food Preserv.* 2011. 18:397-406.
- Kwon SH, Shon MY. Antioxidant and anticarcinogenic effects of traditional doenjang during maturation periods. *Korean J Food Preserv.* 2004. 11:461-467.
- Lee EJ, Hurh BS, Lee I. Development of ready-to-use starters for the production of *doenjang*. *Microbiol Biotechnol Lett.* 2019. 47:234-241.
- Lee H, Yoo JS, Bai DH. Purification and characterization of an alkaline protease produced by alkalophilic *Bacillus* sp. DK1122. *Microbiol Biotechnol Lett.* 2016a. 44:333-340.
- Lee JS, Kwon SJ, Chung SW, Choi YJ, Yoo JY, Chung DH. Changes of microorganisms, enzyme activities and major components during the fermentation of Korean traditional *Doenjang* and *Kochujang*. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol.* 1996. 24:247-253.
- Lee KH, Choi HS, Hwang KA, Song J. Quality changes in *doen-jang* upon fermentation with two different *Bacillus subtilis* strains. *J East Asian Soc Diet Life.* 2016b. 26:163-170.
- Lee SH, Kim CH. Characteristics of hydrolytic enzymes that produced by *Bacillus subtilis* CK-2 isolated from Doenjang. *Korean J Life Sci.* 2017. 27:805-811.
- Lee SY, Kim JY, Baek SY, Yeo SH, Koo BS, Park HY, et al. Isolation and characterization of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat *sokseongjang*. *Korean J Food Sci Technol.* 2011. 43:735-741.
- Lee SY, Park NY, Kim JY, Choi HS. Quality characteristics of rice-*doenjang* during fermentation by differently shaped meju and adding starter. *Korean J Food Nutr.* 2012. 25:505-512.
- Lim SI, Kim HK, Yoo JY. Characteristics of protease produced by *Bacillus subtilis* PCA 20-3 isolated from Korean traditional *meju*. *Korean J Food Sci Technol.* 2000. 32:154-160.
- Lim SM. Characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* MJ-226 isolated from *Meju*. *Kor J Microbiol.* 2009. 45:377-384.
- MFDS. Food code. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea. 2020. p 5-11.
- Moon JY, Kwon SW, Hong SB, Seok SJ, Kim JS, Kim SJ. Characteristics and functional analysis of *Bacillus* strains from the fermented soybean products, Cheonggukjang. *Korean J Microbiol.* 2015. 51:300-307.
- Oh SI, Sung JM, Lee KJ. Physicochemical characteristics and antioxidative effects of barely soybean paste (*Doenjang*) containing kelp extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2014. 43: 1843-1851.

- Paek HY, Kim JH, Kwak EJ. Quality characteristics of *doenjang* added with root vegetables powder. J East Asian Soc Diet Life. 2019. 29:326-335.
- Park KY, Moon SH, Cheigh HS, Baik HS. Antimutagenic effects of doenjang (Korean soy paste). J Food Sci Nutr. 1996. 1:151-158.
- Rhee CH, Kim WC, Rhee IK, Lee OS, Park HD. Changes in the physicochemical property, angiotensin converting enzyme inhibitory effect and antimutagenicity during the fermentation of Korean traditional soy paste (*Doenjang*). Korean J Food Preserv. 2006. 13:603-610.
- Rhee CH, Kim WC, Rhee IK, Park HD. Effects of inoculation of *Bacillus subtilis* cells on the fermentation of Korean traditional soy paste (*Doenjang*). Korean J Food Preserv. 2008. 15:598-605.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987. 4:406-425.
- Sohn JH. Salts requirement of moderately halophilic bacterium, *Kordia algicida* gen. nov., sp. nov. Korean J Microbiol. 2005. 41:112-116.
- Suganthi C, Mageswari A, Karthikeyan S, Anbalagan M, Sivakumar A, Gothandam KM. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. J Genet Eng Biotechnol. 2013. 11:47-52.
- Yang EJ, Chang HC. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJ1. Kor J Microbiol Biotechnol. 2007. 35:339-346.
- Yang SJ, Lee DH, Park HM, Jung HK, Park CS, Hong JH. Amylase activity and characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 isolated from *Doenjang*. Korean J Food Preserv. 2014. 21:286-293.
- Yu R, Park SA, Chung DK, Nam HS, Shin ZI. Effect of soybean hydrolysate on hypertension in spontaneously hypertensive rats. J Korean Soc Food Sci Nutr. 1996. 25:1031-1036.