

|                                                                                   |                                                                                                                         |                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|  | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                                                                                      | (11) 공개번호 10-2015-0089321<br>(43) 공개일자 2015년08월05일 |
| <hr/>                                                                             |                                                                                                                         |                                                    |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/202 (2006.01)                 | (71) 출원인<br>경희대학교 산학협력단<br>경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)                                                    |                                                    |
| (21) 출원번호 10-2014-0009805<br>(22) 출원일자 2014년01월27일<br>심사청구일자 없음                   | (72) 발명자<br>홍연<br>서울특별시 강남구 삼성로 151 10-602 (선경아파트)<br>김해영<br>경기 용인시 수지구 동천로135번길 21, 1307동 901호 (동천동, 한빛마을래미안이스트팰리스3단지) |                                                    |
|                                                                                   | (74) 대리인<br>특허법인 대아                                                                                                     |                                                    |

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **된장으로부터 분리한 기능성 균주, 이를 이용한 기능성 된장의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 기능성 된장**

**(57) 요약**

본 발명은 된장으로부터 분리한 기능성 균주, 이를 이용한 기능성 된장의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 기능성 된장에 관한 것이다. 보다 구체적으로 상기 균주를 이용하여 단백질 분해 활성, 혈전 용해 활성, 항산화 활성 및 ACE 저해 활성이 기능성 된장을 제조하는 방법과 상기 방법으로 제조된 기능성 된장에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 재래 된장으로부터 분리된 기능성 균주를 이용하여 단백질 분해 활성, 혈전 용해 활성, 항산화 활성 및 ACE 저해 활성이 기능성 된장을 제조할 수 있으며, 상기 방법으로 제조된 기능성 된장은 종래 시판되는 된장에 비해 이취 성분이 제거 또는 저감되어 소비자 기호도를 획기적으로 향상시킬 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109138-3

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 된장으로부터 기능성 균주의 분리 및 이를 이용한 고기능성 된장의 제조에 관한 연구

연구과제명 농림축산식품 연구개발사업

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2009.04.10 ~ 2012.04.09

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) KHG19 수탁번호 KFCC11574P.

#### 청구항 2

- (a) 제1항에 따른 균주를 30 ~ 35 °C의 온도에서 20 ~ 30 시간 배양한 후 액체 배지에 접종하여 10 ~ 15시간 배양하여 균주 배양액을 제조하는 단계;
- (b) 상기 균주 배양액으로부터 균체를 분리하는 단계;
- (c) 쿡을 상온에서 12 ~ 18시간 침지시킨 후 끓는 물에서 2 ~ 3 시간 삶는 단계;
- (d) 상기 삶은 쿡에 소금을 첨가하고, 상기 (b) 단계에서 분리한 균체를 접종한 후 30 ~ 40 °C에서 2 ~ 3일 동안 배양하여 스타터를 제조하는 단계;
- (e) 상기 스타터 및 소금이 첨가된 삶은 쿡을 혼합하여 30 ~ 40 °C에서 2 ~ 3일 동안 배양하는 단계; 및
- (f) 20 ~ 25 °C에서 숙성시키는 단계;를 포함하는 기능성 된장의 제조 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 소금은 제조된 된장의 중량에 대하여 8 ~ 12 wt%인 기능성 된장의 제조 방법.

#### 청구항 4

제2항에 있어서,

상기 (f) 단계의 숙성은 30 ~ 120일 동안 이루어지는 기능성 된장의 제조 방법.

#### 청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조되며, 단백질 분해 활성, 항산화 활성, 혈전 용해 활성 및 안지오텐신 전환효소 저해 활성으로부터 선택되는 적어도 하나의 활성을 가지는 기능성 된장.

#### 청구항 6

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조되며, 2-메틸 프로판산, 뷰탄산 및 3-메틸 뷰탄산으로부터 선택되는 적어도 하나의 이취 성분을 포함하지 않는 기능성 된장.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 된장으로부터 분리한 기능성 균주, 이를 이용한 기능성 된장의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 기능성 된장에 관한 것이다. 보다 구체적으로 상기 균주를 이용하여 단백질 분해 활성, 혈전 용해 활성, 항산화 활성 및 ACE 저해 활성이 기능성 된장을 제조하는 방법과 상기 방법으로 제조된 기능성 된장에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 전통 메주를 사용한 된장은 1 ~ 2종의 단일 곰팡이를 이용하여 제조한 개량식 메주로 제조한 된장에 비해 맛과 영양학적 측면에서 우수하고 그 원인은 메주의 발효과정에 관여하는 균주의 차이에서 비롯된다. 그러나 전통메주를 사용할 경우 제조기간이 길고 제조의 표준화가 어려워 과학화 및 산업화가 힘들다. 따라서 전통 메주나 된장의 다양한 미생물들을 산업화에 적용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.
- [0003] 특히 전통 메주에서 콩의 단백질을 가수분해하는 주 발효 균주로 연구된 *Bacillus*를 사용하여 된장을 제조하는 시도가 있었다. *Bacillus*의 경우, 곰팡이나 효모에 비해 많은 수가 메주의 표면과 내부에 골고루 존재하면서 protease와 amylase등 각종 효소를 생성하여 주도적인 발효를 행하여서 전통된장 특유의 맛과 향을 부여하는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 다만 장류 시료로부터 발효 공정에서 나타나는 미생물의 변화를 검토해야 하고 이들 미생물의 활용을 통한 장류의 제조와 공정 개발을 하는 것이 필요하다. 재래 된장의 긴 발효기간 중 초기에는 호기성 세균의 증가가 두드러지고 효모는 좀더 빠른 생육을 보였으며 혐기성 세균은 발효, 숙성 기간 동안 일정하게 유지되는 것으로 보고되었다.
- [0005] 따라서, 전통 장류에 분포하는 균주의 확보와 이러한 균주들의 특성을 파악하여 산업화에 이용하는 응용 연구가 필요하다.
- [0006] 종래 기술로는 한국공개특허공보 제2005-0116850호 등이 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제2005-0116850호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 된장으로부터 분리한 단백질 분해 활성, 혈전 용해 활성, 항산화 활성 및 ACE 저해 활성이 우수한 균주를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 이용한 기능성 된장의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 기능성 된장을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 측면에 따르면, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) KHG19 수탁번호 KFCC11574P가 제공될 수 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) 제1항에 따른 균주를 30 ~ 35 °C의 온도에서 20 ~ 30 시간 배양한 후 액체 배지에 접종하여 10 ~ 15시간 배양하여 균주 배양액을 제조하는 단계; (b) 상기 균주 배양액으로부터 균체를 분리하는 단계; (c) 쿵을 상온에서 12 ~ 18시간 침지시킨 후 끓는 물에서 2 ~ 3 시간 삶는 단계; (d) 상기 삶은 쿵에 소금을 첨가하고, 상기 (b) 단계에서 분리한 균체를 접종한 후 30 ~ 40 °C에서 2 ~ 3일 동안 배양하여 스타터를 제조하는 단계; (e) 상기 스타터 및 소금이 첨가된 삶은 쿵을 혼합하여 30 ~ 40 °C에서 2 ~ 3일 동안 배양하는 단계; 및 (f) 20 ~ 25 °C에서 숙성시키는 단계;를 포함하는 기능성 된장의 제조 방법이 제공될 수 있다.
- [0013] 일 실시예에 있어서, 상기 소금은 제조된 된장의 중량에 대하여 8 ~ 12 wt%일 수 있다.

- [0014] 일 실시예에 있어서, 상기 숙성은 30 ~ 120일 동안 이루어질 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 방법으로 제조되며, 단백질 분해 활성, 향산화 활성, 혈전 용해 활성 및 안지오텐신 전환효소 저해 활성으로부터 선택되는 적어도 하나의 활성을 가지는 기능성 된장이 제공될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 2-메틸 프로판산, 뷰탄산 및 3-메틸 뷰탄산으로부터 선택되는 적어도 하나의 이취 성분을 포함하지 않는 기능성 된장이 제공될 수 있다.

### 발명의 효과

- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 재래 된장으로부터 분리된 기능성 균주를 이용하여 단백질 분해 활성, 혈전 용해 활성, 향산화 활성 및 ACE 저해 활성이 기능성 된장을 제조할 수 있으며, 상기 방법으로 제조된 기능성 된장은 종래 시판되는 된장에 비해 이취 성분이 제거 또는 저감되어 소비자 기호도를 획기적으로 향상시킬 수 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명을 더 쉽게 이해하기 위해 편의상 특정 용어를 본원에 정의한다. 본원에서 달리 정의하지 않는 한, 본 발명에 사용된 과학 용어 및 기술 용어들은 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥상 특별히 지정하지 않는 한, 단수 형태의 용어는 그것의 복수 형태도 포함하는 것이며, 복수 형태의 용어는 그것의 단수 형태도 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0019] 본 발명의 일 측면에 따르면, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) KHG19 수탁번호 KFCC11574P가 제공될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) 제1항에 따른 균주를 30 ~ 35 °C의 온도에서 20 ~ 30 시간 배양한 후 액체 배지에 접종하여 10 ~ 15시간 배양하여 균주 배양액을 제조하는 단계; (b) 상기 균주 배양액으로부터 균체를 분리하는 단계; (c) 콩을 상온에서 12 ~ 18시간 침지시킨 후 끓는 물에서 2 ~ 3 시간 삶는 단계; (d) 상기 삶은 콩에 소금을 첨가하고, 상기 (b) 단계에서 분리한 균체를 접종한 후 30 ~ 40 °C에서 2 ~ 3일 동안 배양하여 스타터를 제조하는 단계; (e) 상기 스타터 및 소금이 첨가된 삶은 콩을 혼합하여 30 ~ 40 °C에서 2 ~ 3일 동안 배양하는 단계; 및 (f) 20 ~ 25 °C에서 숙성시키는 단계;를 포함하는 기능성 된장의 제조 방법이 제공될 수 있다.
- [0021] 일 실시예에 있어서, 상기 소금은 제조된 된장의 중량에 대하여 8 ~ 12 wt%, 바람직하게는 9 ~ 11 wt%, 보다 바람직하게는 10 wt%일 수 있다.
- [0022] 일 실시예에 있어서, 상기 숙성은 30 ~ 120일 동안 이루어질 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 기능성 된장의 단백질 분해 활성은 숙성 기간이 2 ~ 4개월, 바람직하게는 3개월째에 가장 높을 수 있다. 다른 실시예에 있어서, 기능성 된장의 혈전 용해 활성은 숙성 기간이 1 ~ 3개월, 바람직하게는 2개월째에 가장 높을 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 방법으로 제조되며, 단백질 분해 활성, 향산화 활성, 혈전 용해 활성 및 안지오텐신 전환효소 저해 활성으로부터 선택되는 적어도 하나의 활성을 가지는 기능성 된장이 제공될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 2-메틸 프로판산, 뷰탄산 및 3-메틸 뷰탄산으로부터 선택되는 적어도 하나의 이취 성분을 포함하지 않는 기능성 된장이 제공될 수 있다.
- [0026] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다 할 것이다.

**실험 방법**

**1. *B. amyloliquefaciens* KHG19를 이용한 된장 시료의 제조**

*B. amyloliquefaciens* KHG 19 균주를 35 ℃에서 24 시간 동안 TSB 액체 배지에 배양 후 다시 12 시간 동안 TSB에 배양하였다. 균주 배양액을 원심분리(4,300 × g, 15 분, 4 ℃)하고 균체를 멸균한 0.85% NaCl로 2회 세척하여 회수하였다. 2011년 9월 강원도 홍천에서 구입한 콩 1 kg을 물로 세척하고 상온에서 15 시간 침지한 후 2시간 30분 동안 삶았다. 삶은 콩을 으깨어 35 ℃까지 식힌 후 5.0% (w/w)의 소금(전라남도 신안)을 넣고 회수한 균체를 접종하여 고루 혼합하였다. 35 ℃에서 48 시간 동안 배양한 후에 4 kg의 콩을 동일한 조건으로 삶아 으깨서 혼합하고 5.0% (w/w)의 소금을 가하여 다시 35 ℃에서 48 시간 동안 배양하여 스타터를 제조하였다.

다시 콩 5 kg을 동일하게 삶아 으깨고 위에서 제조한 스타터와 혼합한 후 최종 농도가 10% (w/w)가 되도록 소금을 가하였다. 된장을 옹기항아리에 넣고 35 ℃에서 48 시간 배양한 후 20 ℃에서 4개월 동안 숙성하며 1개월 간격으로 시료를 채취하여 기능성 분석에 사용하였다.

시판 된장 시료는 2011년 10월에 슈퍼마켓(서울시 강남구)에서 한국 전통 재래 된장(비교예 1)과 개량 된장(비교예 2), 청국장(비교예 3)을 구입하여 사용하였다.

**2. 된장 시료의 단백질 분해 활성 측정 방법**

지름 0.7 cm의 멸균 paper disk를 2% skim milk (BD Difco™, Sparks, MD, USA) 및 3% NaCl이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 평판배지(BD, Detroit, MI, USA) 상에 놓고, disk 위에 된장 시료의 2배 희석액 0.1 ml를 가한 후 30 ℃에서 30시간 동안 배양하였다.

된장 시료에 존재하는 단백질 분해효소에 의해 배지 상에 생성된 투명환의 면적을 시료 중의 단백질 함량으로 나누어 정규화하고 그 값을 비교하였다. 시료 중의 단백질 함량은 Bradford assay를 통해 측정하였다.

단백질 함량 표준곡선은 소혈청알부민(BSA) 농도를 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 µg/ml로 조정하여 protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)와 혼합 후 595 nm에서 흡광도 (UV-Spectrophotometer, UV-1700, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 측정하여 얻었다. 된장 시료는 5 µl를 protein assay dye reagent concentrate 1 ml를 혼합한 후 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 단백질 함량을 구하였다.

**3. 된장 시료의 혈전 용해 활성 측정 방법**

된장 시료를 증류수로 2배 희석하여 원심분리(4,300 × g, 15 분, 4 ℃)한 상등액을 반응액으로 사용하였고, 혈전 용해 활성은 modified fibrin plate method에 의하여 측정하였다.

즉, 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.4)으로 0.6% fibrinogen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 제조하고 이 용액 10 ml와 2% agarose 용액 10 ml, 20 ml thrombin 용액(250 units/ml, Sigma-Aldrich)을 혼합하여 petri dish에 넣고 실온에서 한 시간 동안 방치하여 0.3% fibrin clot plate를 제조하였다.

조효소액 20 ml를 분주한 paper disk (0.7 cm 직경)를 fibrin plate에 올려놓고 30 ℃에서 18시간 동안 배양하였다. 대조구로는 plasmin 용액 (1 NIH unit/ml, Sigma-Aldrich)을 20 ml 사용하였고, plasmin에 의해 형성된 투명환을 100%로 하여 시료의 혈전 용해 활성을 비교하였다.

**4. 된장 시료의 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해 활성 측정**

NaCl 0.3 M을 함유한 0.1 M sodium borate 완충액(pH 8.3) 10 ml에 rabbit lung acetone powder (Sigma-Aldrich)를 1 g 용해시키고 4 ℃에서 24 시간 동안 추출한 후 원심분리(4,300 × g, 30 분, 4℃) 하여 -20 ℃에 보관하며 ACE 조효소 액으로 사용하였다. 기질로는 같은 완충액에 10 mM의 hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL)을 용해하여 사용하였다. 된장 시료 2배 희석액을 원심분리(4,300 × g, 15 분, 4 ℃)하여 상등액을 취하고, 이 상등액 중의 ACE 저해활성을 측정하였다. 즉, 이 상등액 30 ml와 100 mM sodium borate buffer 40 ml, HHL 용액 200 ml, ACE 조효소액 30 ml를 혼합하여 37 ℃에서 30분 동안 반응시킨 후 1 N HCl 용액 250 ml를 가

하여 반응을 정지시켰다.

[0042] 생성된 hippuric acid (HA)는 ethyl acetate 1.5 ml를 용매로 사용하여 2분간 교반하여 추출한 뒤 원심분리 (900 × g, 5 분, 4℃)한 상등액 1 ml를 취하였다. 상등액 중의 용매를 95 ℃에서 30분 동안 증발시키고 증류수 1 ml에 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도 (S)를 측정하였다. ACE 저해 활성은 하기의 식으로 계산하였다.

[0043]  $ACE\ inhibition\ rate\ (\%) = [1 - (S - SB) / (C - CB)] \times 100$

[0044] 이 때, 된장 시료 회석액을 첨가하지 않고 반응시킨 용액의 흡광도(C)를 control로 하였고, SB는 기질용액 (HHA)과 된장 시료 회석액만을 반응시켰을 때의 흡광도, CB는 기질용액(HHA)의 흡광도이다.

[0045] 상기 control과 blank 값과는 별도로, ACE의 저해가 시료 중의 단백질 분해활성에 의해 ACE가 분해되어 저해 활성이 나타나는지 여부를 판단하기 위해 시료의 회석액을 95 ℃에서 5분간 열처리한 것으로 동일한 실험을 진행하여 결과를 비교하였다.

## [0046] 5. 된장의 이취 성분 검출

[0047] 된장시료의 휘발성 화합물 추출은 head space-solid phase micro extraction (HS-SPME)을 사용하였고 분석은 GC-mass spectrometry (GC-MS)를 사용하였다. 즉 4개월 숙성된 된장 시료 20 g과 증류수 34 ml, NaCl 6.0 g을 100 ml vial에 넣고 divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, gray, stable flex, 24 Ga, with 50/30 μm film thickness, for manual holder) fiber를 장착한 SPME 장치 (Supelco 57328-U, Bellefonte, PA, USA)로 40 ℃에서 30분 동안 550 rpm으로 교반하면서 휘발성 성분을 fiber에 흡착시켰다.

[0048] 내부표준물질로는 2-methyl-1-pentanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 5 ppm 사용하였다. GC의 주입구에서 splitless mode로 230 ℃에서 10분 동안 탈착하였다. GC (G3440A)와 MS (G3171A)는 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) 제품을 사용하였고, 컬럼은 HP-5 (30 m × 0.32 mm I.D., 0.25 μm film thickness, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다.

[0049] 컬럼 오븐 온도는 40 ℃에서 3분 동안 유지한 후 180 ℃까지 분당 5 ℃의 속도로, 230 ℃까지 분당 15 ℃의 속도로 증가시킨 후 230 ℃에서 5분 동안 유지시켰다. Carrier 가스는 헬륨을 분당 1.0 ml의 유속으로 조절하여 흘려주었다. Inlet의 head pressure는 7.07 psi, septum purge flow는 3 ml/분, gas saver는 off로, splitless mode로 분석하였다.

[0050] MS의 이온화 온도는 250 ℃로, interface 온도는 280 ℃, 이온화 전압은 70 eV였다. MS는 scan mode로 사용하였고 질량스펙트럼 범위는 40-350 m/z였으며 threshold는 15였다. 검출된 peak들은 Wiley library (W8N05ST, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)와 비교하여 동정하였고, 이취성분으로 알려진 표준물질들의 retention time과 비교하여 동정 결과를 확인하였다.

[0051] 이취 성분의 정량은 2-methyl propanoic acid (isobutyric acid)와 butanoic acid (butyric acid), 3-methyl butanoic acid (isovaleric acid)를 각각 0, 5, 10, 25, 50, 100 ppm씩을 혼합한 standard mixture를 사용하여 표준곡선을 구한 후 시료 분석 시 각 성분의 area %값을 표준곡선과 비교하였다.

## [0052] 실험 결과

### [0053] 1. 된장 시료의 단백질 분해 및 혈전 용해 활성 측정 결과

[0054] 상기 실험 방법에 따라 측정된 본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 된장 및 비교예의 단백질 분해 및 혈전 용해 활성 측정 결과는 하기의 표 1에 기재되어 있다.

표 1

| 된장 시료 | 숙성 기간<br>(월) | 단백질 분해 활성       | 혈전 용해 활성<br>(%, 상대활성값) |
|-------|--------------|-----------------|------------------------|
| 실시예   | 0            | $0.32 \pm 0.07$ | $154.73 \pm 66.28$     |
|       | 1            | $0.28 \pm 0.08$ | $214.16 \pm 18.82$     |
|       | 2            | $0.61 \pm 0.04$ | $236.11 \pm 20.75$     |
|       | 3            | $0.86 \pm 0.20$ | $131.41 \pm 76.86$     |
|       | 4            | $0.45 \pm 0.18$ | $81.44 \pm 15.89$      |
| 비교예 1 | -            | $0.17 \pm 0.02$ | $142.83 \pm 11.07$     |
| 비교예 2 | -            | $0.3 \pm 0.05$  | $68.77 \pm 17.37$      |
| 비교예 3 | -            | $0.04 \pm 0.01$ | $109.99 \pm 34.07$     |

(1) 본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 된장의 단백질 분해 활성은 숙성 기간이 3개월째에 최대값을 나타냈으며, 상기 값은 비교예에 따른 된장 시료 중 단백질 분해 활성이 가장 높은 개량식 된장(비교예 2)의 단백질 분해 활성보다 2배 더 높은 값이었다.

비교예 1 (재래 된장)의 *Bacillus* 균은 생육과 사멸이 빠르게 진행되며 (Chang M, Chang HC. Characteristics of bacterial-koji and doenjang (soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 35: 325-333 (2007)), 균이 사멸하면 자가분해에 의해 다량의 단백질 분해효소가 세포 밖으로 용출된다. 재래 된장의 제조기간이 약 6개월인 것을 고려하면 (Chang M, Chang HC. Characteristics of bacterial-koji and doenjang (soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 35: 325-333 (2007)) 3개월째 최대값을 보인 본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 된장의 단백질 분해 활성이 4개월째 감소한 점에 비추어 숙성 기간이 이보다 더 긴 재래 된장의 경우 더 낮은 단백질 분해 활성을 나타낼 것으로 예상된다.

된장에 포함된 미생물의 단백질 분해 활성은 최종 제품의 유리 아미노산 함량을 결정하여 된장의 품질에 중요한 영향을 끼치므로(Kim JH, Yoo JS, Lee CH, Kim SY, Lee SK. Quality properties of soybean pastes made from meju with mold producing protease isolated from traditional meju. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 49: 7-14 (2006)) 단백질 분해 활성이 우수한 미생물들은 된장 제조시 종균으로서 활용 가치가 높다.

(2) 혈전 용해 활성은 2개월째 시료가 가장 높았고, 그 이후 점차 감소하여 4개월째에는 대조군으로 사용한 plasmin의 용해 활성보다 낮은 값을 나타내었다. 비교예 2(개량 된장)의 혈전 용해 활성은 plasmin의 약 69%로 시료들 중 가장 낮은 값을 나타내었다.

김 등(Kim DH, Song HP, Kim KY, Kim JO, Byun MW. A correlation between fibrinolytic activity and microflora in Korean fermented soybean products. J Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 41-46 (2004))은 재래식 된장과 공장산 된장 제품, 메주 및 코지의 미생물과 혈전 용해효소의 상관 관계를 연구하였는데, 재래 된장의 *Bacillus* 분포와 혈전 용해효소의 활성이 양 (+)의 상관관계를 보였다고 보고함으로써 재래 된장의 혈전 용해 활성의 변화 및 높은 혈전 용해 활성이 된장에 포함된 *Bacillus*의 분포 때문임을 제시하였다.

혈전 용해 효소들은 fibrin clot을 용해시키는 효소들로 urokinase와 streptokinase 등 현재 사용하고 있는 효소들은 가격이 비싸고 소화관 출혈이나 알레르기 반응 등 부작용을 나타내기도 한다. 따라서 최근에는 식품 유래의 혈전 용해 효소에 대한 연구가 시작되었다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 된장은 종래의 장류 식품보다 우수한 혈전 용해능을 보이므로, 기능성 식품으로 발전시킬 수 있다.

## 2. 된장 시료의 ACE 저해 활성 측정 결과

상기 실험 방법에 따라 측정된 본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 된장 및 비교예의 ACE 저해 활성 측정 결과는 하기의 표 2에 기재되어 있다.

표 2

| 된장 시료 | 숙성 기간<br>(월) | ACE 저해 활성    |             |
|-------|--------------|--------------|-------------|
|       |              | (%, 25 ℃)    | (%, 95 ℃)   |
| 실시예   | 0            | 93.27±5.90   | 91.62±21.72 |
|       | 1            | 103.28±10.36 | 94.47±6.01  |
|       | 2            | 97.88±14.42  | 90.16±9.73  |
|       | 3            | 101.97±5.52  | 103.41±2.04 |
|       | 4            | 102.11±1.35  | 97.56±3.21  |
| 비교예 1 | -            | 93.21±5.68   | 78.21±10.73 |
| 비교예 2 | -            | 95.62±1.36   | 106.91±4.69 |
| 비교예 3 | -            | 102.63±1.50  | 86.5±20.79  |

본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 된장의 ACE 저해 활성은 숙성 기간 전반에 걸쳐 비교예들에 비해 우수한 것으로 나타났다. 된장 시료를 열처리할 경우(25 ℃ → 95 ℃), 약간의 ACE 저해 활성의 저하가 나타났으나 본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 된장은 저하 정도가 크지 않았으나, 비교예 1 및 비교예 3은 ACE 저해 활성이 크게 감소하였다. 이는 단백질 분해 활성의 감소때문인 것으로 판단되었다.

김 등(Kim TW, Kim YH, Jung HJ, Park CS, Kim HY. Screening of strains with fibrinolytic activity and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity from doenjang. Food Sci. Biotechnol. 21: 581-585 (2012))의 보고에 의하면 *B. amyloliquefaciens* 표준 균주의 ACE 저해 활성은 69.4% 이었고, 청국장장의 스타터로 가장 널리 알려진 *B. subtilis*는 17.2%의 저해활성을 나타낸다.

### 3. 된장 시료의 이취 성분 검출 결과

상기 실험 방법에 따라 측정된 본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 된장 및 비교예의 이취 성분 검출 결과는 하기의 표 3 (본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 된장에서 검출되지 않은 화합물만을 기재함)에 기재되어 있다.

표 3

| 화합물                | 된장 시료         |   |   |       |       |       |
|--------------------|---------------|---|---|-------|-------|-------|
|                    | 실시예(숙성 기간; 월) |   |   | 비교예 1 | 비교예 2 | 비교예 3 |
|                    | 0             | 2 | 4 |       |       |       |
| 에틸 프로파노에이트         | -             | - | - | +     | -     | -     |
| 에틸 2-메틸-프로파노에이트    | -             | - | - | +     | -     | -     |
| 에틸 3-메틸-뷰타노에이트     | -             | - | - | +     | -     | -     |
| 프로필 뷰타노에이트         | -             | - | - | +     | -     | -     |
| 에틸 펜타노에이트          | -             | - | - | -     | +     | -     |
| 펜틸 2-메틸-뷰타노에이트     | -             | - | - | -     | +     | -     |
| 프로필 펜타노에이트         | -             | - | - | +     | -     | -     |
| 프로필 3-메틸-뷰타노에이트    | -             | - | - | +     | -     | -     |
| 에틸 헥사노에이트          | -             | - | - | -     | +     | -     |
| 에틸 2-하이드록시-프로파노에이트 | -             | - | - | -     | +     | -     |
| 알릴 아이소싸이오사이아네이트    | -             | - | - | -     | +     | -     |
| 에틸 옥타노에이트          | -             | - | - | -     | +     | -     |
| 에틸 벤조에이스           | -             | - | - | -     | +     | -     |
| 에틸 벤젠아세테이트         | -             | - | - | +     | -     | -     |
| 에틸 뷰타노에이트          | -             | - | - | +     | -     | -     |
| 3-메틸-2-뷰탄올         | -             | - | - | +     | -     | -     |
| 3-메틸-2-펜탄올         | -             | - | - | -     | -     | +     |

|                              |   |   |   |   |   |   |
|------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| 3-메틸3-뷰텐-1-올                 | - | - | - | + | - | + |
| 3-펜탄올                        | - | - | - | - | - | + |
| 2-헵탄올                        | - | - | - | + | - | + |
| 1-헥산올                        | - | - | - | - | + | - |
| 3-옥탄올                        | - | - | - | + | + | + |
| 2-퓨란메탄올                      | - | - | - | - | + | - |
| 벤젠에탄올                        | - | - | - | + | + | - |
| 4-에틸 구아아콜                    | - | - | - | + | + | - |
| 사이클로프로판카복실산                  | - | - | - | - | - | + |
| 2-메틸 뷰탄산                     | - | - | - | + | - | - |
| 벤조산                          | - | - | - | + | - | - |
| 3-메틸-2-뷰텐알                   | - | - | - | + | - | - |
| 2-퓨란카복스알데하이드                 | - | - | - | + | + | - |
| 5-메틸-2-퓨란카복스알<br>데하이드        | - | - | - | - | + | - |
| 벤젠아세트알데하이드                   | - | - | - | + | + | - |
| 2-메틸-3-펜탄온                   | - | - | - | - | - | + |
| 4-메틸헥산-3-온                   | - | - | - | - | - | + |
| 2-헵탄온                        | - | - | - | - | - | + |
| 6-메틸-3-헵탄온                   | - | - | - | - | - | + |
| 3-옥탄온                        | - | - | - | + | + | + |
| 5-에틸<br>다이하이드로-2(3H)-퓨<br>란온 | - | - | - | + | - | - |
| 다이메틸 다이설파이드                  | - | - | - | - | + | - |
| 메틸 2-프로페닐 다이설파<br>이드         | - | - | - | - | + | - |
| 다이알릴 다이설파이드                  | - | - | - | - | + | - |
| 메틸-피라진                       | - | - | - | + | - | - |
| 2,5-다이메틸-피라진                 | - | - | - | + | - | + |
| 2,6-다이메틸-피라진                 | - | - | - | + | - | - |
| 트라이메틸-피라진                    | - | - | - | + | - | + |
| 4-메틸-페놀                      | - | - | - | + | - | - |
| 2-에틸-페놀                      | - | - | - | - | + | - |
| 3-에틸-페놀                      | - | - | - | + | - | - |
| 2-메톡시-4-바이닐페놀                | - | - | - | + | - | + |
| 3-메틸-2-뷰탄 아민                 | - | - | - | - | - | + |
| 1,1,-다이에톡시-2-<br>메틸-프로판      | - | - | - | - | + | - |
| 에틸 벤젠                        | - | - | - | - | - | + |
| 2-펜틴-퓨란                      | - | - | - | - | + | + |
| 1,2-다이메톡시-벤젠                 | - | - | - | + | - | - |

[0070] - : 검출되지 않음; + : 검출됨.

[0071] 이취성분으로서 2-메틸 프로판산(isobutyric acid)와 뷰탄산(butyric acid), 3-메틸 뷰탄산(isovaleric acid)을 정량 분석한 결과, *B. amyloiquefaciens* KHG19와 비교예 2 및 비교예 3에서는 이들 이취 성분이 검출되지 않았다. 반면, 비교예 1에서는 2-메틸 프로판산(isobutyric acid)이 4.8 ppm, 뷰탄산(butyric acid)이 12.0 ppm, 3-메틸 뷰탄산(isovaleric acid)이 3.4 ppm 검출되었으며, 표준물질로 정량은 하지 않았으나 역시 된장 이취성분으로 알려진 2-메틸 뷰탄산(2-methyl butyric acid)도 비교예 1에서 검출되었다.

[0072] 즉, 상기에 살펴본 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따르면, 재래 된장으로부터 분리된 기능성 균주를 이용하여 단백질 분해 활성, 혈전 용해 활성, 항산화 활성 및 ACE 저해 활성이 기능성 된장을 제조할 수 있으며, 상기 방법으로 제조된 기능성 된장은 종래 시판되는 된장에 비해 이취 성분이 제거 또는 저감되어 소비자 기호도를

획기적으로 향상시킬 수 있다.

[0073]

이상, 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.