

벼짚에서 분리한 청국장 starter용 *Bacillus* spp.의 생리적 특성

이신호* · 백낙민 · 박나영
대구가톨릭대학교 식품가공학과

Physiological Characteristics of *Bacillus* spp. Isolated from Rice Straw as *Cheonggukjang* Starter

Shin-Ho Lee*, Lag-Min Baek, and La-Young Park

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

Abstract The primary objective of this study was to select a probiotic starter for *cheonggukjang* using 60 strains isolated from rice straw. Among isolated strains, only 8 strains including strain B-59 evidenced proteolytic, amyolytic and soybean activity. These 8 strains were all gram-positive, spore-forming rods. The B-59 strain evidenced antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Vibrio parahaemolyticus*. The antimicrobial activity of isolated B-59 was verified by its ability to inhibit the growth of *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. fluorescens*, and *V. parahaemolyticus*. The selected B-59 strain was indentified as *Bacillus licheniformis*, as shown by a result of 99.0% homology upon API kit analysis. The selected B-59 strain also displayed viability in pH 2.5 artificial gastric juice, artificial bile acid, NaCl (2, 4, 8, 16, 32%), and ethanol (4, 8, 16, 32%). The antioxidative activity of the strain B-59 culture was assessed via a DPPH free radical scavenging activity assay. The activity increased with an increasing in the fermentation time of strain B-59 for 20 hours.

Key words: *Cheonggukjang*, probiotic starter, antimicrobial activity, antioxidative activity

서 론

청국장은 혈중 콜레스테롤 저하(1), 고혈압 예방(2), 항산화(3), 혈전용해(4) 및 항균효과(5)가 있다고 밝혀진 이후 건강기능성 식품으로서의 관심이 집중되고 있다. 청국장은 벼짚위에 삶은 콩을 담아 40°C에서 2-3일간 발효시키면 점질물이 생성되고 특유의 냄새와 맛을 내는 전통 대두발효 식품이다. 그러나 청국장은 각 지방마다, 가정마다 제조방법과 발효에 관여하는 미생물이 동일하지 않아 균일한 품질을 갖는 위생적인 청국장 제조법이 확립되어 있지 않는 실정이다. 청국장의 품질은 발효에 관여하는 미생물의 종류에 따라 달라지므로 생리활성을 보유한 균일한 제품을 제조하기 위해서는 발효관련 미생물의 선별이 무엇보다 중요하다 할 수 있다. 청국장 발효에 관여하는 미생물로는 *Bacillus subtilis*(6), *B. licheniformis*(7), *B. pumilis*(8) *B. amyloliquefaciens*(9) 등이 보고되고 있다. 오늘날 발효과정 중 미생물의 작용으로 각종 영양분이 소화되기 쉬운 상태로 변화되는 이점 외에 발효에 관여하는 미생물 자체를 생균제(probiotics)로서 기능성을 보강하는 분야에 관한 연구가 진행되고 있으며, 생균제의 기능은 장내균총의 정상화, 유해세균의 정착억제에 따른 부패산물의 생성

감소 및 질병예방, 면역기능의 강화, 콜레스테롤 저하 등이 인정되고 있다(10-13). 생균제로 이용되기 위해서는 생존성, 정착성, 병원성세균의 억제능 등의 기능적 측면과 관능적 특성, 안정성, 박테리오파지 저항성이 있어야 하며, 특히 미생물로서 장내 생존력이 우수해야 상업적으로 이용가치를 가진다(14-16).

본 연구는 청국장의 생리활성의 증진과 청소년과 외국인 고려하는 청국장 특유의 냄새를 완화시켜 기호성을 개선시키기 위하여 벼짚에 청국장 제조가 가능한 균주를 분리하여, 단백질 분해력, 전분 분해력, soybean activity 등 청국장 제조 적성을 검토하였으며, 아울러 생균제로서 활용가능성을 검토하기 위하여 항균성, 인공 위액에 대한 내성, 인공 담즙산에 대한 내성, 염내성, 알콜 내성, 항산화활성 등을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 선별

경북지역에서 수집한 벼짚 시료 20점을 멸균 증류수에 현탁시킨 후 Nutrient Agar(Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하고, 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 독립된 colony를 순수 분리하여 AmoA-Awua등의 방법(17)에 준하여 proteolytic activity, amyolytic activity, soybean activity를 측정하여 활성이 우수한 균주를 선별하였다.

Proteolytic activity은 10% skim milk agar(2% agar 첨가)에 접종하여 37°C에서 3일 동안 배양 후 clear zone을 mm단위로 측정하였으며, amyolytic activity는 1% starch를 첨가한 Nutrient agar에 접종하여 37°C에서 3일 동안 배양 후 iodine solution을 반응시켜 형성된 clear zone을 mm단위로 측정하였다. soybean activity

*Corresponding author: Shin-Ho Lee, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyungsan, Gyoung-sangbuk-do 712-702, Korea
Tel: 82-53-850-3217
Fax: 82-53-850-3217
E-mail: leesh@cu.ac.kr
Received July 17, 2008; revised August 7, 2008;
accepted August 20, 2008

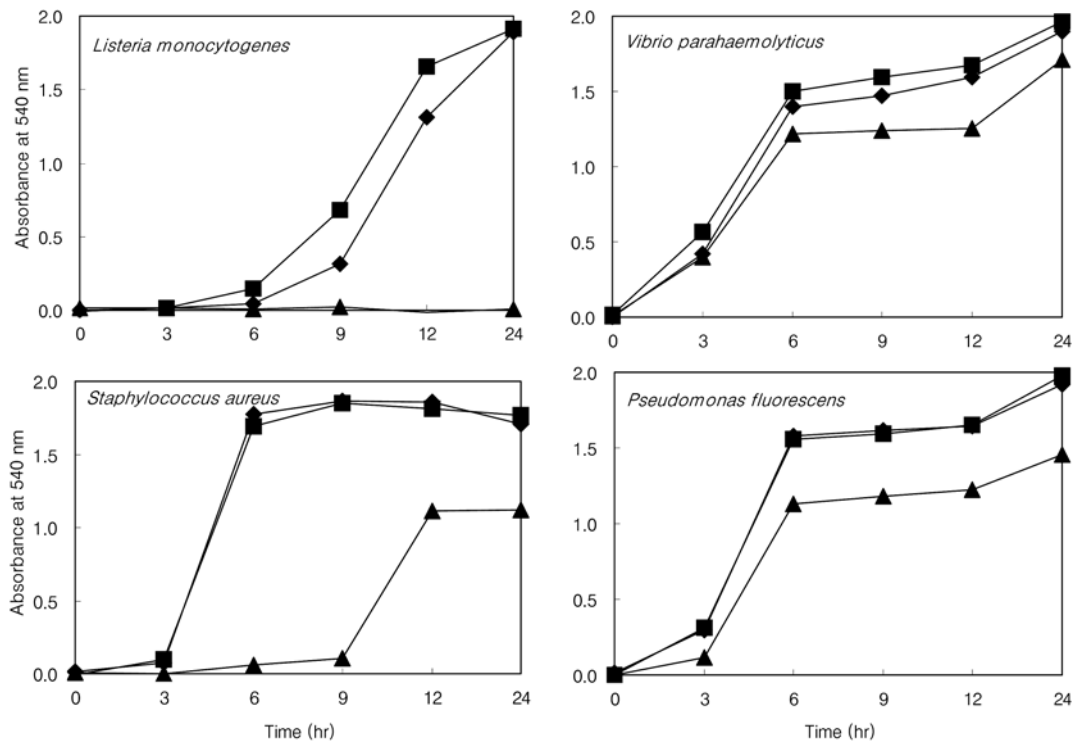


Fig. 1. Growth of various pathogens for 24 hrs at 37°C in Nutrient broth and Nutrient broth containing isolated strain B-55 or B-59 cultured media. -■-, NB (Nutrient broth); -◆-, NB containing B-55 cultured media; -▲-, NB containing B-59 cultured media.

Bacillus sp. B-59 균주의 항균활성

분리 균주 B-59의 병원성 미생물에 대한 성장 억제 효과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 분리균주 B-59를 24시간 배양한 후 균체를 제거한 배양액을 함유한 Nutrient broth에서 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *P. fluorescens*의 성장은 억제되었으며, 특히 *L. monocytogenes*의 성장은 B-59 균주의 배양액을 함유한 배지에서 배양 초기부터 관찰할 수 없었다. 반면 생육 저해 환을 생성하지 않은 분리균주 B-55 배양액을 함유한 Nutrient broth에서는 공시 병원성 미생물의 성장은 대조군과 유사한 경향을 나타내어 분리 균주인 *Bacillus* sp. B-59 균주는 공시 병원성 미생물에 대해 항균성 물질을 생성하여 항균활성이 있는 것으로 나타났으며, 생균제제로서의 사용 가능성을 검토하기 위해 내산성, 내담즙성 등의 생리활성을 검토하였다.

인공 위액과 인공 담즙산에 대한 내성

정장의 효과가 있는 생균제제로서의 기능을 발휘하기 위해서는 강산성의 위액과 담즙을 분비하는 췌장 및 십이지장을 통과하여 최종 목적 부위인 장에 도달하여야 정장의 효과를 발휘하게 된다(21). 특히 식품용 프로바이오틱 생균제제로서 가져야 할 특성은 생존력이 높아야 한다는 점이다(15). 분리균주인 B-59의 인공위액과 인공 담즙액에 대한 내성은 Table 4에서 보는 바와 같다. 순수한 위액은 pH 1.4-2.0 정도의 강산성을 나타내지만 섭취한 음식물의 완충작용으로 pH가 높아져 미생물의 사멸율이 감소하게 된다(22,23). 분리균주인 B-59의 pH 2.5로 조정된 인공 위액에서 생존실험 결과 배양 초기 생균수 8.33 CFU/mL에서 37°C에서 3시간 배양후의 생균수는 6.91 CFU/mL로 높은 생존율을 나타내어 섭취한 후 위를 통과하는 기간 동안 생존할 수 있을 것으로 판단되었다. 섭취한 프로바이오틱 생균이 장내 도달하기 위해서는 위를 통과하여 췌장과 십이지장을 통과하게 되는데, 이

부위에서 분비되는 담즙에 대해 내성이 있어야 한다. 인공위액에서 3시간 처리한 후 B-59의 균체를 인공 담즙액에서 접종하여 24시간 배양동안 생균수의 변화를 관찰한 결과 초기 균수 6.90 CFU/mL에서, 배양 6시간째 8.20 CFU/mL, 24시간 후 8.24 CFU/mL로 증가하여 Lee 등(20)과 Paik 등(24)의 결과와 일치하였으며, 인공 담즙산에 대한 내성을 나타내었다. 생균제제로서의 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도(0.6 g/L)보다 훨씬 높은 농도의 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다(24)는 결과를 미루어 볼 때 분리균인 B-59는 인공위액과 인공담즙에 대해 내성을 나타내어 위와 췌장을 통과하여 장에 도달하여 생균제제로서의 기능을 발휘할 수 있을 것으로 판단된다.

NaCl과 에탄올에 대한 내성

현대의 복잡한 사회구조와 식생활 패턴의 변화로 동맥경화, 심장병 등 성인병의 발병율이 증가되고 있다. 특히 고염 섭취는 뇌나 심장뿐만 아니라 신장 질환 유발의 원인이 되며(25), 상습적인 음주로 인한 동맥경화 당뇨, 간경화 등 대표적인 성인병을 초래하기도 한다(26). 이러한 고염 및 알코올 섭취에 노출된 현대인의 식생활 환경에서 생균제제로서의 기능을 발휘하기 위해서는 고염과 알코올에 대한 내성이 있어야 한다.

분리균주인 B-59의 NaCl 농도에 따른 안정성은 Fig 2에서 보는 바와 같이 NaCl 0, 2, 4% 농도에서는 각각 7.63, 7.70, 7.67 CFU/mL로 나타내어 분리균주인 B-59의 성장에 영향을 미치지 않았으나, 8%, 32% 농도에서는 각각 5.85 CFU/mL와 4.16 CFU/mL를 나타내어 생균수는 감소하였으나 NaCl에 대한 내성이 있는 것으로 사료된다.

분리균주의 에탄올에 대한 내성은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 알코올 농도 0, 4, 8%의 경우 7.63, 7.74, 7.35 CFU/mL로 생균수의 변화는 나타나지 않았으나, 16%, 32%의 경우 생균수는 감소

Table 3. Identification of strains B-59 by API 50CHB Kit

No.	Characteristics	Results ¹⁾	No.	Characteristics	Results ¹⁾
0	Control	-	25	Esculine	+
1	Glycerol	+	26	Salicine	+
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	+	29	Lactose	+
5	Ribose	+	30	Melibiose	+
6	D-Xylose	+	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	+
8	Adonitol	-	33	Inuline	+
9	β-Methyl-xyloside	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	+	35	D-Raffinose	+
11	D-Glucose	+	36	Amidon	+
12	D-Fructose	+	37	Glycogene	+
13	D-Mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	+	39	β-Gentiobiose	-
15	Rhamnose	+	40	D-Turanose	+
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	+	42	D-Tagatose	-
18	Mannitol	+	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	+	44	L-Fucose	-
20	α-Methyl-D-mannoside	-	45	D-Arabitol	-
21	α-Methyl-D-glucoside	+	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetyl glucosamine	-	47	Gluconate	-
23	Amygdaline	+	48	2 Ceto-gluconate	-
24	Arbutine	+	49	5 Ceto-gluconate	-

¹⁾+, positive; -, negative

Table 4. Survival of isolated strain B-59 in artificial gastric juice and artificial bile acid at 37°C

Incubation time	Artificial gastric juice ¹⁾		Artificial bile acid ²⁾		
	0	3	0	6	24
Viable cell (log No. CFU/mL)	8.33±0.16 ³⁾	6.91±0.12	6.90±0.12	8.20±0.27	8.24±0.11

¹⁾Survival cell in artificial gastric juice for 3 hr at 37°C.

²⁾Survival cell in artificial bile acid for 24 hr at 37°C after treated with artificial gastric juice for 3 hr at 37°C.

³⁾Viable cell, (log No. CFU/mL)±SD (n=3)

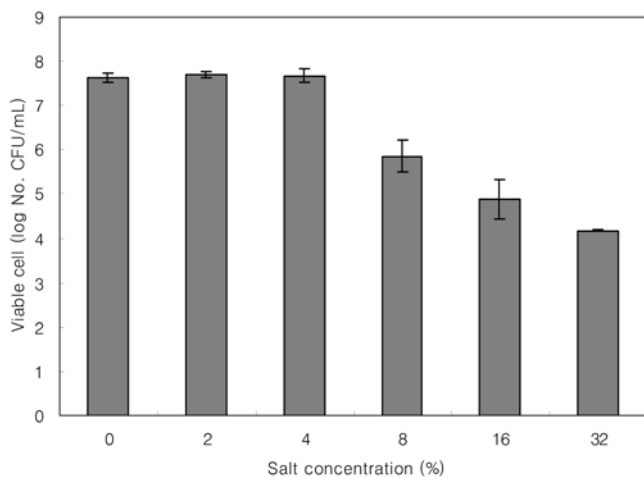


Fig. 2. Effect of NaCl concentration on survival of isolated strain B-59.

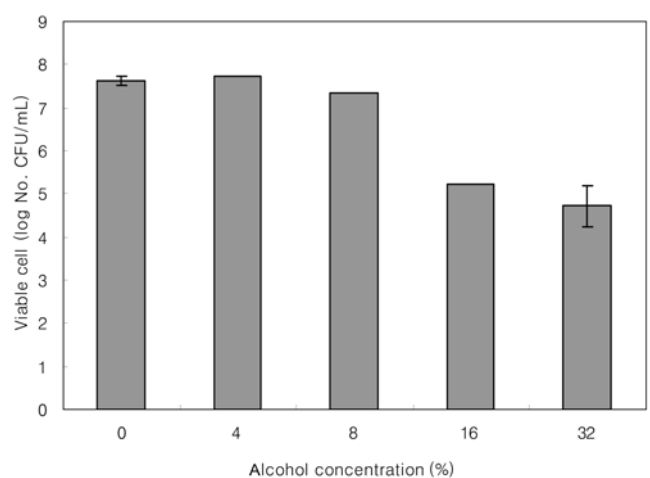


Fig. 3. Ethanol resistance of isolated strain B-59.

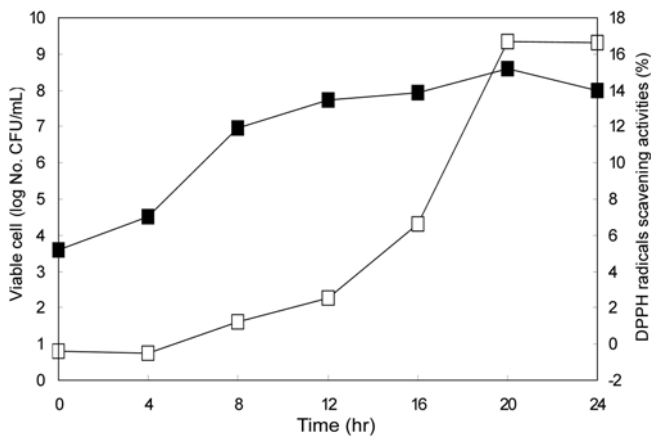


Fig. 4. Changes in DPPH radical scavenging ability and growth of the B-59 for -□-, DPPH radical scavenging effect (%); -■-, cell growth.

하였으나 각각 5.23 CFU/mL, 4.22 CFU/mL를 나타내어 에탄올에 대한 내성이 있는 것으로 사료된다.

DPPH에 의한 항산화 활성

항산화성 물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하여 복합체를 만들고, DPPH는 항산화성 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로, 전자공여능으로부터 항산화 활성을 추정할 수 있다(27,28). DPPH radical 소거능으로 측정된 분리균주인 B-59 배양액의 항산화활성은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 성장에 따라 radical 소거능이 증가하였다. 이러한 결과는 Cho 등(29)의 대두, 제주, 된장의 발효를 거치는 동안 발효에 의한 항산화 효과의 증가는 뚜렷하다는 보고와, *Bacillus* sp.의 성장에 따라 항산화능은 증가되었다는 정 등(30)의 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

짚에서 분리하여 *Bacillus licheniformis*로 간이 동정된 균주 B-59는 병원성 미생물에 대한 항균활성, 내산성, 내담즙성, 내염성, 제 알코올성 그리고 항산화활성이 있어 이를 활용한 생균제 제조의 사용가능성이 확인되었으며, 청국장 제조용 균주 또는 발효 사료 제조에 활용이 가능할 것으로 사료된다. 이러한 용도로 사용할 경우 최적 발효조건 구명에 관한 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

짚에서 60균주를 분리하여 생균제 제조로서의 기능이 있는 청국장 제조용 starter로 사용가능성을 조사하였다. 분리한 60균주 중 단백 분해력, 전분 분해력, 대두 분해력을 나타낸 균주는 B-59 등 8균주 이었으며 모두 그람 양성 간균으로 포자를 형성하였다. 선별된 8균주의 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus*에 대해 항균활성을 나타낸 균주는 B-59이었다. 항균활성을 나타낸 분리균주 B-59에 의해 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *P. fluorescens*의 성장은 억제되었으며, API 50CHB kit를 이용하여 동정한 결과 99.0%의 유사율로 *Bacillus licheniformis*로 간이 동정되었다. 분리균주인 B-59는 pH 2.5로 조정된 인공 위액에 초기 생균수 8.33 CFU/mL에서 37°C에서 3시간 배양 후의 6.91 CFU/mL로 높은 생존율을 나타내었으며, 인공담즙산에서 초기 균수 6.90 CFU/mL에서, 배양 24시간 후 8.24 CFU/mL로

증가하여 내성을 나타내었다. 분리균주인 B-59는 NaCl 0, 2, 4% 농도에서는 각각 7.63, 7.70, 7.67 CFU/mL로 성장에 영향을 미치지 않았으나, 32% 농도에서도 생존하여 NaCl에 대한 내성을 나타내었으며, 알코올농도 32%에서도 4.22 CFU/mL를 나타내어 에탄올에 대한 내성을 나타내었다. DPPH radical 소거능으로 측정된 B-59 배양액의 항산화 활성이 균주의 성장에 따라 증가하였다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임.

문 헌

1. Yoo JY. Present status of industries and research activities of Korean fermented soybean products. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 13-30 (1997)
2. Okamoto A, Hanagata H, Matsumoto E, Kawamura T, Koizume Y, Yanagida F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods. *Biosci. Biotech. Bioch.* 59: 1147-1149 (1995)
3. Iwai K, Nakaya N, Kawasaki Y, Matsue H. Antioxidative functions of *natto*, a kind of fermented soybeans: Effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol fed rats. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3597-3601 (2002)
4. Yoo CK, Seo WS, Lee CS, Kang SM. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *cheonggukjang*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 506-514 (1998)
5. Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. Antimicrobial activities of viscous substance from *cheonggukjang* fermented with difference *Bacillus* spp. *J. Food Hyg. Safety* 16: 188-193 (2001)
6. Kim YS, Jung HJ, Park YS, Yu TS. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *cheonggukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 475-478 (2003)
7. Lee MY, Park SY, Jung KO, Park KY, Kim SD. Quality and functional characteristics of *cheonggukjang* prepared with various *Bacillus* sp. isolated from traditional *cheonggukjang*. *Korean J. Food Sci.* 70: 191-196 (2005)
8. Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY. Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from *cheonggukjang* and fermentation al characteristics of JB-1. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 291-296 (2004)
9. Kim SS, Lee JH, Ahn YS, Kim JH, Kang DK. A fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* DS-7 isolated from *cheonggukjang*. Its characterization and influence of additive on thermostability. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 271-276 (2003)
10. Tannock GW. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. *Trends Biotechnol.* 15: 270-274 (1997)
11. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378 (1989)
12. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 32: 439-443 (1991)
13. Takiguchi R, Mochizuki E, Suzuki Y, Nakajima I, Benno Y. *Lactobacillus acidophilus* SBT 2928 on harmful intestinal bacteria. *J. Int. Microbiol.* 11: 11-17 (1997)
14. Koo SM, Cho YH, Huh CS, Beak YJ, Park JY. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alainate and chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 376-383 (2001)
15. Cambell GL, Bedford MR. Enzyme applications for monogastric feeds, A review. *Can. J. Anim. Sci.* 72: 449-466 (1992)
16. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378 (1989)
17. Amoa-Awua WK, Terlabbe NN, Sakyi-Dawson E. Screening of 42 *Bacillus* isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 343-347 (2006)

18. Kobayashi Y, Tohyama K, Terashima T. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* 29: 691-697 (1974)
19. Lee SH, No MJ. Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6: 617-622 (1997)
20. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1204 (1958)
21. Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67: 3045-3051 (1984)
22. Camobell GL, Bedford MR. Enzyme applications for monogastric feeds, A review. *Can. J. Anim. Sci.* 72: 449-466 (1992)
23. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70: 1-12 (1987)
24. Paik HD, Jung MY, Jung HY, Kim WS, Kim KT. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* Sci for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 73-78 (2002)
25. MacGregor GA. Salt-more adverse effects. *Am. J. Hypertens.* 10: 37S-41S. (1997)
26. Kim JW, Jun KD, Kang JS, Jang JS, Ha BJ, Lee JH. Characterization of *Bacillus licheniformis* as a probiotic. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 20: 359-362 (2005)
27. Chung YC, Chang CT, Chao WW, Chou ST. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanol extract from red bean fermented *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agr. Food Chem.* 50: 2454-2458 (2002)
28. Seo YH, Kim IJ, Min HK, Park SU. Fatty acid composition and antioxidative activity in wax corn (*Zea mays* L.) Fls. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 1415-1420 (1999)
29. Choe GS, Lim SY, Choi JS. Antioxidant and nitrite scavenging effect of soybean, *meju*, and doenjang. *Korean J. Life Sci.* 8: 473-478 (1998)
30. Jeong HY, Kim TH, Park JS, Kim KT, Paik HD. Antioxidative and cholesterol-reducing activity of *Bacillus polyfermenticus* SCD. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 18: 371-376 (2003)