

메밀 속성장 유래 효소활성 우수 저영양성 균주 분리 및 특성

이성영 · 김지연 · 백성열 · 여수환 · 구본성¹ · 박혜영 · 최혜선*
농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부

Isolation and Characterization of Oligotrophic Strains with High Enzyme Activity from Buckwheat *Sokseongjang*

Sung Young Lee, Ji-Yeun Kim, Sung Yeol Baek, Soo-Hwan Yeo, Bon Sung Koo¹, Hye Young Park, and Hye-Sun Choi*

Departments of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Science, RDA

¹Departments of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, RDA

Abstract *Bealmijang* is a short-term fermented regional product that is prepared with soybean and extra ingredients. In this study, starter strain candidates were screened from *Bealmijang* for fermented soybean paste products. Twenty one bacterial strains producing extracellular enzymes (amylase, cellulase, protease, xylanase and lipase) were isolated from *Bealmijang*, buckwheat *sokseongjang*. The isolates were assessed for fibrinolytic and antibacterial activities, and salt tolerance. Strain HJ18-4, identified as *Bacillus subtilis* (AB601598) by biochemical properties (89.6%) and 16S rDNA sequencing (100%), showed the highest enzymatic, fibrinolytic, and antibacterial activities among the isolates. Although the growth of HJ18-4 was inhibited by the increase of NaCl concentration, the growth still exceeded that of *B. subtilis* KACC 10114 at 5% and 10% NaCl. These results suggest that *B. subtilis* HJ18-4 is suitable as a starter for soybean paste manufacture.

Keywords: buckwheat *sokseongjang*, enzyme activity, antibacterial activity, fibrinolytic activity

서 론

고추장, 된장, 청국장, 별미장 등은 대두를 이용한 발효식품으로 항암, 항산화, 혈전용해 및 항균효과 등이 우수한 식품으로 알려져 있다. 대두에 함유된 isoflavone, trypsin inhibitor, phenolic compounds, peptide 등은 암, 혈관계 질환, 골다공증 등의 성인병에 예방 및 치료 효과를 나타내며, 특히 isoflavone은 골다공증 예방과 항산화 작용을 하는 것으로 보고되었다(1-3). 속성장은 대두를 주원료로 제조된 메주를 다른 방법으로 띄우거나, 부재료를 섞어 단기 발효시키는 것으로 별미장이라 표현하기도 한다. 대표적인 대두발효식품인 된장이나 청국장 등은 생리 기능성 및 품질 특성을 조사하는 여러 연구가 활발히 진행되고 있지만 별미장에 대한 연구는 미비한 실정이다. 장류 발효에 관여하는 대표 균주로 *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* 및 *B. citreas* 균주 등이 보고되고 있다. 최근 보고에 따르면 고추장 유래 균주 *B. stearothermophilus*(TPP 0014, TPP 6013) 및 *B. amyloliquefacience*(TPP 6015)은 높은 면역세포활성과 혈전용해능을 갖고 있고(4), 된장 유래 분리 균주 *B. stratosphericus* JR19, *B. subtilis* HS25 및 *Bacillus* spp. KH-15는 세포외효소 분비능, 혈전용해능 및 hemolysis 활성도가 높고 β-glucosidase 효소활성이 우수한 것

으로 보고된 바 있다(5-7). 또한 청국장에서 *B. cereus*에 대한 길항 활성이 높은 *Bacillus* spp. SC-8이나 단백질분해능 및 혈전용해능이 우수한 *B. subtilis*(CHKJ 1339) 및 *B. licheniformis*(CHKJ 1249, CHKJ 1326)가 분리되었다고 보고되었다(8,9). 별미장은 전래된 제조법으로 제조하거나 향기 분석 및 품질 특성 등에 대한 연구는 진행되었으나 미생물학적 고찰은 전무한 실정이다(10-12).

자연계에 존재하는 모든 미생물 중 중에서 실제로 분리되어 이용되는 종은 1% 미만으로 나머지 99%의 다양한 미생물들은 실생활에 이용하지 못하고 있다. 저 농도 영양조건하에서 느리게 증식하는 세균이 자연계에서 다수 존재한다는 사실이 알려지면서 담수, 해수, 토양 등 자연계에 분포해 있는 저영양 세균에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 국내에서는 저영양성 세균의 기능성 물질이나 분류, 생리적 특성에 대한 연구는 미비하며(13,14), 특히 장류 유래 저영양 미생물을 분리한 보고는 전무하여 본 연구가 발효미생물 연구에 좋은 기초 자료가 될 것으로 보인다.

본 연구는 유용기능성 성분을 갖는 메밀과 대두를 이용하여 제조된 메밀 속성장 으로부터 발효관련 효소활성, 식중독균에 대한 항균활성 및 혈전용해능이 우수한 저영양 균주를 분리하였으며 균주의 내염성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

시료

메밀 속성장은 Choi 등(12)의 방법으로 제조되었다. 콩은 24 h 수침 후, 고압멸균기를 이용하여 증자(121°C, 40 min)하였고 마쇄하였다. 증자콩과 메밀 가루의 배합을 달리하여 일정한 크기(400 g, 지름 15 cm, 높이 3 cm)로 성형한 후, 양지에서 하루 동안 길

*Corresponding author: Hye-Sun Choi, Fermentation & Food Processing Division, Department of Agrofood Resources, NAAS, RDA, Suwon, Gyeonggi 441-853, Korea
Tel: 82-31-299-0582
Fax: 82-31-299-0554
E-mail: choihs9587@korea.kr
Received March 17, 2011; revised August 8, 2011;
accepted August 29, 2011

말린하고, 7일 동안 발효(28°C, RH 80%)시켜 속성장용 메주를 제조하였다. 메주 10 kg, 천일염 2.5 kg, 물 15 L를 혼합한 후, 40 L 항아리(Kalsantoki, Hongsung, Korea)에서 자연 발효(25-28°C)시키면서 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

균주의 분리

균주 분리에 사용된 저영양 배지인 R₂A배지(LAB, UK)는 yeast extract(0.05%), meat peptone(0.5%), casamino acid(0.05%), starch(0.05%), dipotassium hydrogen phosphate(0.03%), magnesium sulphate(0.005%), sodium pyruvate(0.03%) 및 agar(1.5%) 비율로 구성되어 있다. 시료 10 g에 0.85% NaCl 용액 90 mL를 첨가하여 균질기(Bag mixer 400, Interscience, St. Nom la Bretèche, France)로 진탕한 후, 이를 10⁵-10⁷배 단계적 희석한 후, R₂A agar에 도말 하였다. 이를 28°C에서 24 h 배양한 후, 배지 내 colony 색, 크기 및 모양 등의 형태학적 특징으로 구분하여 분리하였으며, 3회 계대 배양하여 순수분리 하였다.

세포 외 효소 활성 측정

Protease 분비능은 R₂A agar에 1% skim milk, lipase 측정배지에는 R₂A agar에 1% tri-butyryn을 첨가하여 제조하였다. Amylase 분비능은 R₂A agar에 0.5% soluble starch를 첨가하였고 전배양 균주(O.D., 1.0)를 접종하여 28°C에서 18 h 배양한 후, iodine 용액으로 염색하여 starch 분해활성을 측정하였다. Cellulase와 xylanase 분비능은 R₂A agar에 각각 0.4% carboxymethyl cellulose와 0.4% xylan을 기질로 첨가하여 제조하였다. 이에 분리 균주(O.D., 1.0)를 접종하여 28°C에서 18 h 배양한 후, 0.1% congo red로 30 min 염색하고 1 M NaCl 용액으로 세척하여 clear zone을 관찰하였다. 효소활성 측정은 선택배지에 96 pin replicator로 접종하여 high-throughput 방법으로 1차 스크리닝 한 후, 선발된 단일 균주에 대해 확정 실험을 실시하였다.

혈전 용해능 측정

혈전 용해능은 Astrup과 Müllertzt(15)의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.3% fibrinogen용액은 15 M NaCl이 포함된 10 mM phosphate buffer(pH 7.8)를 이용하여 제조하였고, 0.3% fibrinogen 용액 5 mL에 1% agarose 용액 5 mL를 첨가하여 혼합하였다. 이에 thrombin(100 NIH/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.1 mL를 첨가하여 혼합한 후, 18°C에서 5-10 min동안 응고시키고 시료 점적 구멍을 만들어 fibrin plate를 제조하였다. 배양액 5 µL를 주입하고 37°C에서 18 h 동안 반응시킨 후, 생성된 clear zone의 면적을 측정하였다. 대조구는 정제 혈전용해효소인 plasmin(1.0 U/mL)을 사용하였으며, 혈전용해능식에 의해 계산하였다.

$$\text{Fibrinolytic activity(\%)} = (\text{Area of sample} / \text{Area of plasmin}) \times 100$$

항균 활성 측정

항균활성 측정은 agar diffusion 방법과 paper disc 방법으로 측정하였다(16). Indicator microorganism으로 그람 양성균 3종 *B. cereus* KACC 10004, *Staphylococcus aureus* KACC 10778, *Listeria monocytogenes* KACC 10550, 그람 음성균 2종 *Salmonella enterica* KACC 11595, *Escherichia coli* KACC 13821 및 *Candida albicans* KACC 30062 등 6종을 한국농업미생물자원센터(KACC)에서 분양 받아 사용하였다. 배양된 indicator microorganism 6종을 균일한 농도(O.D.₆₅₀ 0.4)로 BHI agar에 접종하여 plate를 제조하였다. 분리 균주를 spot하고 37°C에서 128 h 이상 배양

한 후, clear zone 생성을 확인하고 면적을 측정하였다. 항균활성 측정은 선택배지에 96 pin replicator로 접종하여 high-throughput 방법으로 1차 스크리닝 한 후, 선발된 단일 균주에 대해 paper disc 법으로 확정 실험을 실시하였다.

분리 균주의 특성 및 16S rDNA 유전자 염기서열 분석

분리 균주의 생화학적 특성은 API 50CHB kit(Biomereux Inc., Marcy l'Etoile, France)로 분석하였다. 분리 균주를 지시약이 포함된 kit medium에 현탁하여 strip에 분주한 후 24-48 h 동안 배양하고 그 결과를 API analytical profile index로 분석하였다. 16S rDNA 유전자 염기서열 분석은 균주의 chromosomal DNA를 GenEX genomic Sx DNA kit(GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea)를 이용해 추출하였으며, 27F(5'-AGAGTTTGATCAT GGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 이용하여 분리 균주의 16S rDNA 유전자 단편을 PCR로 증폭한 후, 염기서열을 분석하였다(SolGent Co., Ltd., Daejeon, Korea). 그 결과를 NCBI GenBank database(<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 염기서열과 비교하여 계통분류학적 유연관계를 분석한 후, Clustal W와 MEGA 4.0을 사용하여 neighbor-joining 알고리즘을 바탕으로 한 phylogenetic consensus tree를 작성하였으며, *B. subtilis* HJ18-4의 16s rDNA sequence정보를 DDBJ에 등록하였다.

분리 우수 균주의 내염성

분리 균주의 내염성은 NaCl 농도 0, 5, 10, 20%(w/w)로 제조된 Nutrient broth 50 mL에 전배양 된 분리 균주(O.D., 1.0) 500 µL를 접종 한 후, 배양(37°C, 48 h)하면서 Microlog ELISA system(Biolog Inc., Hayward, CA, USA)를 사용하여 0, 6, 12, 24, 30, 48 h에서의 흡광도(650 nm)를 측정하고 생육곡선을 작성하여 분석하였다.

결과 및 고찰

메밀 속성장 유래 세포외효소 분비능 우수 균주의 선발

장류 발효과정 중에는 미생물 유래 다양한 세포 외 효소(amylase, protease, cellulose, lipase 및 tyrosinase)가 분비되며, 이러한 효소에 의해 풍미뿐만 아니라 다양한 기능성을 갖는 2차 대사산물이 생성된다는 연구가 진행되고 있다(1,5,7,17,18). Ra 등(7)은 콩 된장으로부터 대두의 isoflavone을 소화섭취하기 쉬운 상태인 aglycone으로 전환시키는 역할을 하는 β-glucosidase 활성 우수 균주를 분리하였다. Amylase는 발효에 있어 총당과 환원당의 변화에 영향을 미치며, protease는 발효 시 단백질을 분해하여 특유의 구수한 맛 성분인 유리아미노산 함량에 영향을 미친다(17,18). 그리고 콩에 함유된 20%의 지방은 발효과정 중 미생물이 분비하는 lipase의 작용에 의해 linoleic acid와 같은 필수 지방산으로 분해되어 이용된다(5). 본 연구에서는 메밀 속성장으로부터 저영양 배지(R₂A)를 이용하여 colony 및 morphology에 따라 168개 균주를 선발하였고 protease, cellulose 및 amylase 등 세포 외 효소 분비능이 우수한 23개 균주를 1차 선발하였다(Table 1). 선발된 균주 중 HJ0-3을 비롯한 13개 균주는 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114보다 우수한 protease 활성을 보였다. Amylase 분비능의 경우, HJ18-4을 포함한 10개 균주는 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114보다 우수한 효소 활성을 보였다. HJ11-19 등 5개 균주는 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114보다 cellulase 분비능이 우수함을 확인할 수 있었다. 표준균주에 대한 선발균주의 2차 검정을 통해 HJ18-4를 protease, cellulase, amylase, lipase,

Table 1. Extracellular enzymatic activities of bacteria isolated from buckwheat sokseongjang

Strains	Clear zone				
	Xylanase	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
HJ0-3	+ ^a	+	-	+	+++
HJ0-13	+++	++	-	+++	++
HJ5-21	+	+	+	+++	++
HJ11-4	+	+	++	+++	+
HJ11-17	+	-	+	++	+
HJ11-18	+	-	+	++	+
HJ11-19	+++	++	+++	++	+++
HJ18-3	+++	++	+	-	+++
HJ18-4	+++	+++	+++	++	+++
HJ18-9	+	++	++	++	+
HJ18-13	+++	+++	+++	++	+++
HJ25-6	+++	+++	+	++	+++
HJ25-7	+++	+++	+	++	+++
HJ25-11	+++	+++	++	++	++
HJ39-1	+++	+++	++	++	+++
HJ39-2	+	+	-	++	+
HJ39-5	++	++	+	++	-
HJ39-6	+++	++	-	++	+++
HJ53-2	+++	+++	+	++	+++
HJ53-4	++	+++	+	+	+++
HJ53-6	++	+++	+++	++	+++
HJ53-7	+	+	+	-	+
HJ53-8	+	+++	+++	++	+++
KACC 10114	++	++	+	+	++

^aSymbols: -, not shown; +, 0.30 mm; ++, 0.31-0.5 mm; +++, 0.51-0.80 mm

xylanase의 세포 외 효소 분비능 우수 균주로 선발하였다(Fig. 1). 효소 활성 우수 균주를 종균으로 사용하면 장류 품질 향상과 기능성 증진에 도움이 될 것으로 사료된다.

유용 균주의 혈전 용해능

효소 활성 우수 균주로 선발된 23개 균주의 혈전 용해능을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 선발된 23개 균주 중에서 HJ5-21 (21.12%), HJ18-4(86.11%), HJ18-9(31.16%) 및 HJ18-13(63.80%)가 높은 혈전 용해능을 보였다. 분리 균주 중 우수한 혈전 용해능을 가진 4개 균주와 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114와 혈전 용해능을 비교한 결과 HJ18-4가 가장 우수한 혈전 용해능을

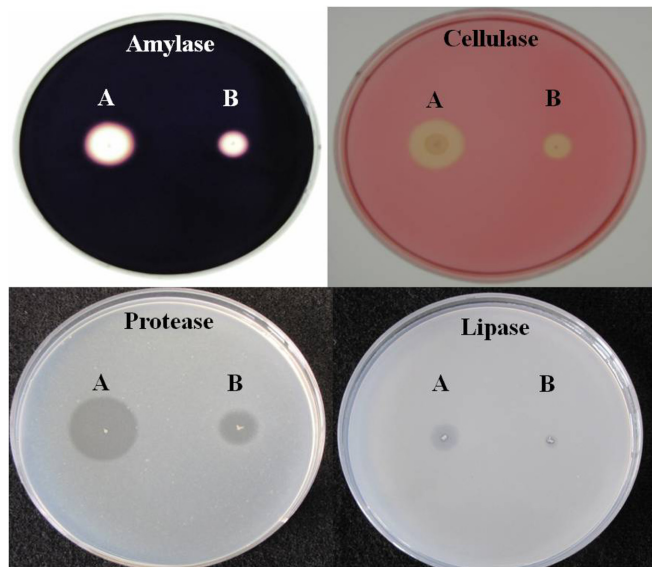


Fig. 1. Extracellular enzymatic activities of bacteria isolated from buckwheat sokseongjang. (A) HJ18-4, (B) *Bacillus subtilis* KACC 10114

나타내었으며, 동일한 결과(*B. subtilis*)로 동정된 다른 균주와 전혀 다른 특성을 보였다(Fig. 2, 4). 전통발효식품 유래 미생물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 된장에서 분리한 균주의 혈전용해능(5,7), 청국장에서 분리한 *Bacillus* spp. 균주의 혈전용해 우수 균주를 능 및 면역증강 활성에 대한 연구가 보고된 바 있다(9,19). 이처럼 혈전 용해 우수 균주를 장류 제조에 있어 우수한 starter로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

유용 균주의 항균 활성

메밀 속성장 유래 분리 균주의 항균 활성은 agar diffusion method을 이용하여 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114의 clear zone을 비교 하여 측정하였고 그 결과는 Table 3과 같다. 선발된 23개 균주 중, 5개 균주(HJ18-4, HJ18-9, HJ18-13, HJ25-6, HJ25-11)는 3개 이상의 병원성 균에 대해 항균 활성을 나타내었다. 특히 HJ18-4는 모든 병원성 균에 대하여 항균활성을 나타내었으며, 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114는 항균 활성이 나타나지 않았다(Fig 3). Yi(2)의 보고에 따르면 시판되는 된장과 *Aspergillus oryzae*와 *Rhizopus tamar*를 이용하여 제조한 된장 추출물이 *S. typhimurium*, *E. coli* 및 *S. aureus*에서 항균 활성을 가지고 있으며, Ryu(6)는 전통 된장에서 분리한 균주가 *E. coli* 및 *S. aureus*

Table 2. Fibrinolytic activities of the culture supernatants from the strains isolated from buckwheat sokseongjang

Strains	Clear zone	Strains	Clear zone	Strains	Clear zone	Fibrinolytic activity (Unit: %)
HJ0-3	-	HJ25-11	+ ^a	HJ53-7	+	-
HJ0-13	-	HJ39-1	-	HJ53-8	+	-
HJ11-4	+	HJ39-2	-	HJ5-21	++	21.12±6.75
HJ11-17	-	HJ39-5	+	HJ18-4	+++	86.11±0.90
HJ11-18	-	HJ39-6	+	HJ18-9	++	31.16±0.39
HJ11-19	+	HJ53-2	+	HJ18-13	+++	63.80±9.14
HJ18-3	+	HJ53-4	+	KACC 10114	-	-
HJ25-6	+	HJ53-6	+		-	-

^aSymbols: -, not shown; +, 0.30 mm; ++, 0.31-0.5 mm; +++, 0.51-0.80 mm

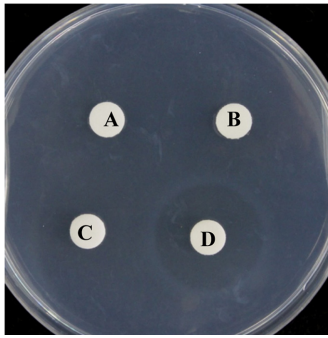


Fig. 2. Fibrinolytic activity of strains isolated from buckwheat sokseongjang. (A) HJ0-3, (B) HJ39-2, (C) *Bacillus subtilis* KACC 10114, (D) HJ18-4

등의 유해균에 대한 항균 효과를 보고하였다. 그리고 초피를 첨가한 전통 장류가 *E. coli* O157: H7에 대해 뛰어난 항균활성이 있는 것으로 보고하였다(20). 또한 발아 메밀 추출물이 *S. aureus* 와 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해 높은 항균 활성이 있음이 보고되었다(21). 따라서 메밀 속성장은 항균 활성을 가진 균주와 메밀의 유용 성분이 병원성균에 대한 항균 작용에 시너지 효과를 낸 것으로 판단된다.

유용 균주의 동정

선발된 HJ18-4의 생화학적 특성을 API 20E와 API 50CHB kit 를 이용하여 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114와 비교 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. HJ18-4와 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114는 acetoin production과 gelatinase에서 양성반응을 보였다. 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사한 결과, HJ18-4는 xylitol을 이용하지만 KACC 10114는 이용하지 못하였으며 다른 48개의 탄소원 이용은 동일한 패턴을 보였다. API analytical profile index를 분석한 결과 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114는 95.4%, HJ18-4는 89.6%의 상동성을 나타내었다. 메밀 속성장 유래 분리 균주들의 16S rDNA 유전자 염기서열 분석 결과, 모두

Table 3. Antibacterial effect of isolates from buckwheat sokseongjang

Strains	Inhibition zone					
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. albicans</i>
HJ0-3	+ ^a				+	
HJ0-13						
HJ5-21						
HJ11-4						
HJ11-17		++				
HJ11-18						
HJ11-19						
HJ18-3	+					+
HJ18-4	+	+	++	++	+	++
HJ18-9			+	+		++
HJ18-13	++	+	++	+	+	+
HJ25-6	+	+	+	++	+	
HJ25-7	+		+			
HJ25-11	+	+			+	
HJ39-1						+
HJ39-2						
HJ39-5	+					+
HJ39-6						
HJ53-2	+		+			
HJ53-4						
HJ53-6						
HJ53-7						
HJ53-8						
KACC 10114						

^aSymbols: -, not shown; +, 0.30 mm; ++, 0.31-0.5 mm; +++, 0.51-0.80 mm

Bacillus(99%)와 높은 유사도를 보였으며 HJ18-4 균주는 *B. subtilis* 와 100%의 유사성을 나타내었다. 또한 분리 균주와 *Bacillus* 속

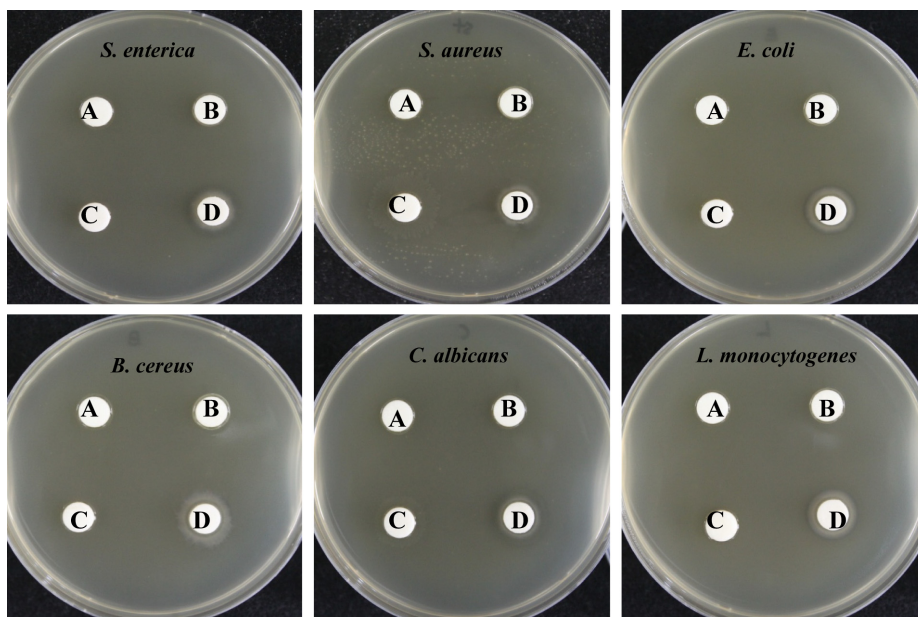


Fig. 3. Antibacterial activity of strains isolated from buckwheat sokseongjang. (A) HJ0-3, (B) HJ39-2, (C) *Bacillus subtilis* KACC 10114, (D) HJ18-4

Table 4. Biochemical utilization of the HJ18-4 isolated from buckwheat sokseongjang

No.	Characteristics	Result ¹⁾		No.	Characteristics	Result ¹⁾	
		KACC 10114	HJ18-4			KACC 10114	HJ18-4
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

의 표준 균주들과의 유연관계를 비교한 결과, HJ18-4(AB601598)는 *B. subtilis*(GU397398), *B. subtilis*(GU357825), *B. amyloliquefaciens*(GU339230), *B. subtilis* KACC 10114와 가장 가까운 관계를 보였다(Fig 4). 결과적으로, HJ18-4는 동일한 결과로 동정된 다른 균주에 비해 우수한 효소활성을 보유한 것으로 보아 분리 균주별 strain specific한 특징을 가지고 있는 것으로 판단된다.

유용 균주의 내염성

메밀 속성장 유래 분리 균주의 내염성을 규명하기 위해 NaCl 농도별 생육특성을 조사하였으며, 그 결과는 Fig 5와 같다. 5% NaCl 농도에서 24 h 배양할 경우, 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114(O.D.: 0.92), HJ18-4(O.D.: 1.69)의 값으로 HJ18-4의 생육 속도가 2배 이상 빠른 것으로 나타났다. 소금의 구성이온인 Na⁺와 Cl⁻이 미생물 생장에 있어 촉매 역할을 하고 적절한 농도의 소금 양은 세균 성장의 좋은 조건이 되는 것으로 판단되며, type strain 및 HJ18-4 균주 모두 12시간 이후에 대수 증식기가 유도되는 것으로 보인다. 또한 10% NaCl 농도에서 48 h 배양한 결과, 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114(O.D., 0.62) 및 HJ18-4(O.D., 0.72)로 나타났다. HJ18-4는 염 농도 5-10%에서 우수한 생육특성을 가지는 내염성 세균으로 판단되며, 이는 저염 및 고염 장류 제조에 있어서 starter로 사용이 가능함을 보여주었다.

요 약

메밀 속성장 유래 세포외효소(protease, amylase, cellulase, lipase,

xylanase) 분비능이 우수한 균주를 분리하여 혈전 용해능, 항균 활성 및 내염성을 분석하였다. 선별된 균주 중 HJ0-3을 비롯한 13개 균주는 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114보다 우수한 protease 활성을 보였다. Amylase 분비능의 경우, HJ18-4을 포함한 10개 균주는 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114보다 우수한 효소 활성을 보였다. HJ11-19 등 5균주는 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114보다 cellulase 분비능이 우수함을 확인할 수 있었다. 선별된 23개 균주 중에서 HJ5-21(21.12%), HJ18-4(86.11%), HJ18-9(31.16%), HJ18-13(63.80%)가 높은 혈전 용해능을 보였다. 선별된 23개 균주 중, 5개 균주(HJ18-4, HJ18-9, HJ18-13, HJ25-6, HJ25-11)는 3개 이상의 병원성 균에 대해 항균 활성을 나타내었고, 특히 HJ18-4는 모든 병원성 균에 대하여 항균활성을 나타내었으나 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114는 항균 활성이 나타나지 않았다. 메밀 속성장 유래 분리 균주 중 세포외효소 활성 및 혈전 용해능, 항균 활성이 우수한 균주 HJ18-4(AB601598)는 API kit 분석결과 *B. subtilis*(89.6%), 16S rDNA 염기서열 분석으로는 *B. subtilis*(99%)로 동정되었다. HJ18-4는 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114와 마찬가지로 NaCl의 농도가 높아질수록 생육이 억제되나 5%와 10%의 NaCl 농도에서 표준 균주 *B. subtilis* KACC 10114 보다 HJ18-4가 우수한 생육 특성을 나타내었다. 이는 HJ18-4가 염 농도 5-10%에서 우수한 생육특성을 가짐으로써 저염 및 고염 장류 제조에 있어서 starter로 사용이 가능함을 보여주었다.

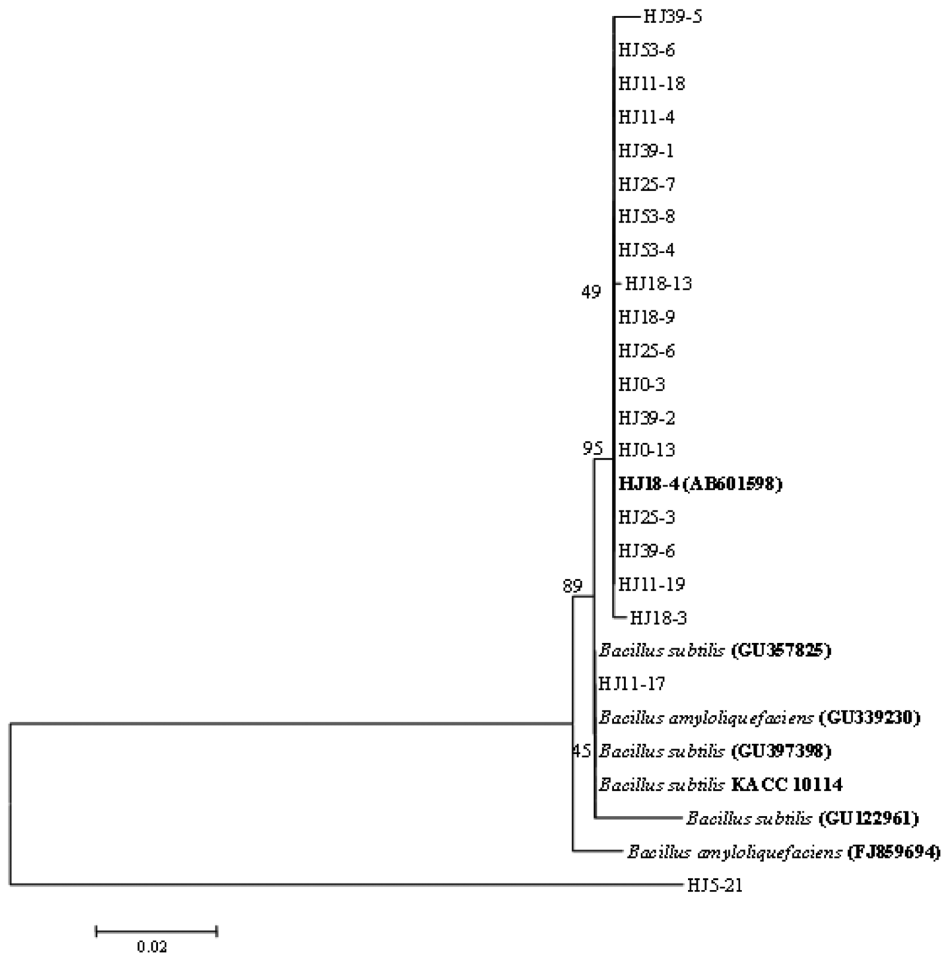


Fig. 4. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of the strains producing extracellular enzymes isolated from buckwheat sokseongjang.

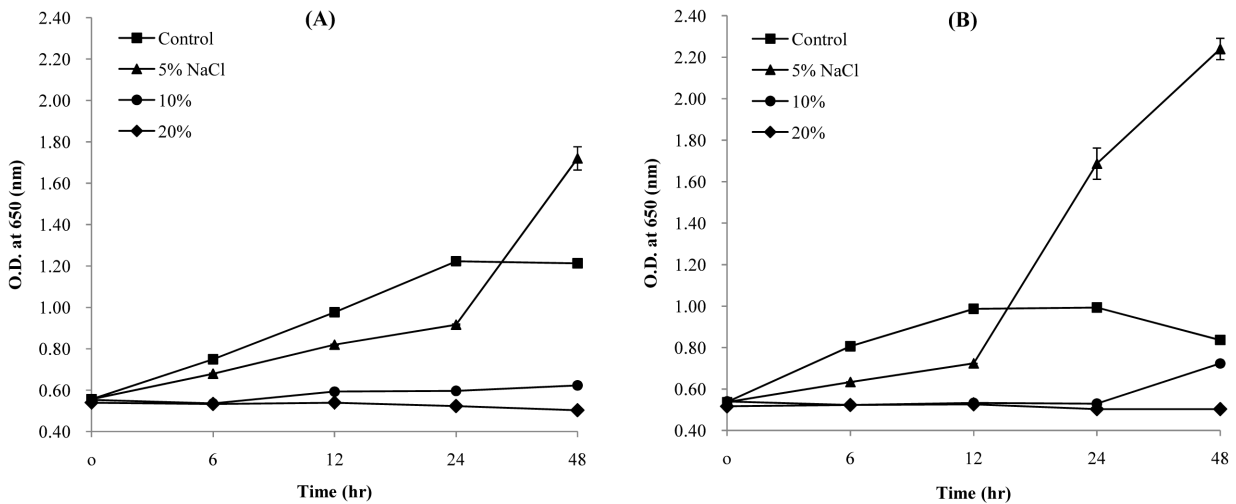


Fig. 5. Effect of salt concentrations on the growth of HJ18-4 isolated from buckwheat sokseongjang. (A) *Bacillus subtilis* KACC 10114, (B) HJ18-4

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발 사업 과제번호(PJ006762, PJ007486, PJ907153)의 지원에 의해 이루어진 것임.

문헌

1. Rhee CH, Lee JB, Jang SM. Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the traditional *Deonjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 43: 277-284

- (2000)
2. Yi SD, Yang JS, Jeong JH, Sung CK, Oh MJ. Antimicrobial activities of soybean paste extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 1230-1238 (1999)
 3. Hwang HA, Lee NK, Cho IJ, Hahm YT, Kwon KO, Kim BY. Selection of microorganisms and optimization of manufacture process for *cheonggukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 406-411 (2008)
 4. Seo MY, Kim SH, Lee CH, Cha SK. Fibrinolytic, immunostimulating, and cytotoxic activities of microbial strains isolated from *Kochujang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 315-322 (2007)
 5. Oh YS, Park JE, Oh HJ, Kim JH, Oh MC, Oh CK, Oh YJ, Lim SB. Isolation and characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from Jeju traditional fermented soybean paste (*doenjang*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 47-53 (2010)
 6. Ryu HS, Shon MY, Cho SJ, Park SK, Lee SW. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional *doenjang*. *J. Korean Soc. Appl. Chem.* 50: 87-94 (2007)
 7. Ra KS, Oh SH, Kim JM, Suh HJ. Isolation of fibrinolytic enzyme and β -glucosidase producing strains from *doenjang* and optimum conditions of enzyme production. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 439-442 (2004)
 8. Lee NK, Park JW, Cho IJ, Kim BY, Kwon KO, Hahm YT. Isolation of *Bacillus* spp. from *cheonggukjang* and its antagonistic effect against *Bacillus cereus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 669-673 (2008)
 9. Chang JH, Shim YY, Kim SH, Chee KM, Cha SK. Fibrinolytic and immunostimulating activities of *Bacillus* spp. strains isolated from *chungkuk-jang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 255-260 (2005)
 10. Woo KS, Yu SM, Im SK, Chun HK, Kwon OC, Lee JS. Changes in aroma compounds of several *byeolmijang* during aging. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 1689-1697 (2004)
 11. Woo KS, Han SY, Yoon HS, Lee JS, Jeong HS, Kim HR. Aroma characteristics of *byeolmijang* with optional ingredients. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 738-746 (2006)
 12. Choi HS, Lee SY, Baek SY, Koo BS, Yoon HS, Park HY, Yeo SH. Quality characteristics of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) *Soksungjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 77-82 (2011)
 13. Kim DG, Yeo YS, Kwon SW, Jang KS, Lee CM, Lee MH, Kim SJ, Koo BS, Yoon SH. Identification of the oligotrophic bacteria strain 7F biocontrolling phytophthora blight disease of red-pepper. *Res. Plant Dis.* 16: 41-47 (2010)
 14. Kim SJ, Kim MY, Koo BS, Yoon SH, Yeo YS, Park IC, Kim YJ, Lee JW, Hwang KS. Isolation and phylogenetic characterization of chitinase producing oligotrophic bacteria. *Korean J. Microbiol.* 41: 293-299 (2005)
 15. Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 40: 346-351 (1991)
 16. Hahn YS. Effect of salt type and concentration on the growth of lactic acid bacteria isolated from *kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 743-747 (2003)
 17. Jang SM, Lee JB, An H, Rhee CH, Park HD. Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the Korean soybean paste with various concentrations of *ginseng* extract during fermentation. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 7: 313-320 (2000)
 18. Kim BS, Rhee CH, Hong YA, Woo CJ, Jang CM, Kim YB, Park HD. Changes of enzyme activity and physiological functionality of traditional *Doenjang* during fermentation using *Bacillus* sp. SP-KSW3. *Korean J. Food Preserv.* 14: 545-551 (2007)
 19. Ryu BH. Development of functional *doenjang* for antioxidative and fibrinolytic activity. *Korean J. Life Sci.* 5: 559-568 (2003)
 20. Kim KK, Park HC, Son HJ, Kim YG, Lee SM, Choi IS, Choi YW, Shin TS. Antimicrobial and anticancer activity of Korean traditional soy sauce and paste with chopi. *Korean J. Life Sci.* 17: 1121-1128 (2007)
 21. Hwang EJ, Lee SY, Kwon SJ, Park MH, Boo HO. Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic activities of *Fagopyrum wsculentum* Mönch extract in germinated seeds. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14: 1-7 (2006)