

Isolation and Identification of GABA-producing Microorganism from *Chungkookjang*

So-Yon Mann¹, Eun-Ah Kim¹, Ga-Young Lee¹, Ro-Ui Kim¹, Dae-Youn Hwang², Hong-Joo Son³ and Dong-Seob Kim^{1*}

¹Department of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

²Department of Biomaterial Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

³Department of Life Science & Environmental Biochemistry, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Received October 30, 2012 / Revised December 20, 2012 / Accepted January 3, 2013

To isolate GABA-producing microorganisms, 1,500 strains were isolated from different *Chungkookjang* samples and screened. From these strains, 20 were selected for further analyses based on a protease and slime-producing activity test. The MC 31 strain showed the highest GABA concentration in *Chungkookjang* and was used in this study. MC 31 was identified as *Bacillus subtilis* by an API 50CHB kit and 16S rDNA sequences analysis and named as *B. subtilis* MC 31. *B. subtilis* MC 31 showed exponential growth up to 12 hours at 37°C in LB broth, and it reached a stationary phase after 24 to 36 hours of incubation. *B. subtilis* MC 31 showed maximum GABA content at 72 hours after incubation at 40°C.

Key words : Isolation, identification, GABA, *Chungkookjang*

서 론

대두는 콩과식물 중 가장 영양성분이 많고 특히 단백질과 지방질이 풍부한 영양공급원일 뿐만 아니라 isoflavone, lysine, linoleic acid, dietary fiber 등과 같은 생리활성물질도 풍부하다. 그러나 콩은 조직이 단단하여 그대로 삶거나 볶아서 섭취하기에는 소화흡수가 잘 되지 않기 때문에 대두를 가공하거나 발효시켜 소화율과 영양가를 높여서 섭취하기 위한 식품들이 개발되었고, 청국장은 대두를 짧은 시간에 발효시키는 식품으로 한국의 뚜렷한 사계절 기후에 맞는 독특한 조리법으로 발달되어 왔다[12]. 다른 나라에서도 대두를 이용하여 그 나라의 기후에 맞는 발효식품들이 발전하였는데, 그 예로 중국의 간장, 된장 및 청국장과 일본의 natto, 인도네시아의 tempeh을 들 수 있다[8]. 우리나라의 청 국장은 일본의 natto에 비해 원료의 차이는 없지만 발효과정 중 대두의 종류도 다양하게 쓸 수 있고 단일 균이 아닌 다양한 미생물이 관여하여 세균 주도형 발효패턴을 취하고 있는 것이 특징이다[27]. 우리나라 전통대두발효식품인 청 국장은 단백질과 불포화지방산의 함량이 많고 소화율이 높은 고단백식품[19]으로 다른 전통 장에 비해 담그는 기간이 짧고 방법이 간단하다. 전통적인 청

국장은 대두를 18시간 이상 불려서 익힌 다음 벧짚에 있는 *Bacillus subtilis*를 이용하여 40°C에서 2~3일 정도 발효를 시켜 만든다[20]. 청국장은 발효가 진행됨에 따라 숙성 과정 중 균으로부터 각종 효소가 생성이 되고 그 효소들이 청국장에 작용하여 대두 성분들을 분해해 소화를 증진시키고 발효과정 중 특이한 향미와 구수한 맛을 형성하는 동시에 끈끈한 점질물을 생성시킨다[25]. 청국장의 발효과정에서 생산되는 여러 가지 생리활성 물질들은 혈전용해능[14], 당뇨병[9], 항암 및 항산화 기능[26]의 효능을 가진다. 그 밖에 고혈압 예방, 섬유질의 변비 예방, 발암물질과 혈중 콜레스테롤의 체외 배출, 점질물의 알코올 흡수에 의한 해장효과, 사포닌의 혈관강화와 혈액순환 촉진 및 젖산분해, 레시틴의 뇌 노화와 치매 예방, 비타민 K 생성 그리고 항돌연변이 등의 활성이 있는 것으로 알려져 있다[2, 4, 11, 13, 15, 18].

최근 GABA의 기능성이 알려지면서 기능성 식품으로 관심이 증대되고 있다. 그러나 GABA는 배아미, 녹차 및 빵잎 등에 다소 함유되어 있다는 보고는 많지만, 약리작용을 발휘하기에는 함량이 낮아 자연적인 섭취로 GABA의 생리작용을 기대하기는 어려운 실정이다[17, 24]. 지난 수 년 동안 GABA의 대량 생산에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으나, 합성 GABA의 경우 식욕 부진, 변비, 설사 등의 부작용이 있어 인위적으로 함량을 높이는 연구가 진행되고 있으며, 그 예로서 발아를 이용하여 함량을 증가시키거나[1, 3, 23], 유산균이나 청국장 같은 발효를 통한 함량 증가[5], 열이나 cold shock 같은 스트레스 요법을 이용한 증가[10] 및 험기적인 처리에 의한 증가[21] 등을 활용한 실험들이 있다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5356, Fax : +82-55-350-5359

E-mail : kds@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

최근 들어 전통식품과 다양한 생리활성 물질에 대한 새로운 인식과 관심이 되살아남에 따라 우리나라의 전통발효식품인 청국장 소비가 급증하고 뇌·신경 전달에 우수한 GABA와 청국장 관련 발효식품들의 다양한 연구 및 새로운 제품들이 계속해서 나오고 있다. 대두에 함유된 GABA와 같은 생리활성 물질들을 증대시키기 위한 방법으로 다양한 연구가 발표되었으나 발효를 통해 증진시키는 미생물 관련 연구가 더욱 요구되고 있다. 따라서 본 연구는 대두를 청국장이나 된장으로 발효 시 GABA가 증가한다는 다양한 보고들을 바탕으로 청국장 발효능이 뛰어난 균주를 찾기 위해 여러 가지 청국장들로부터 발효 균주들을 분리하고, 분리된 균주들 가운데 GABA의 함량이 높은 청국장을 생산하는 실험균주를 선택하였다. 선택된 실험균주를 동정하고, GABA의 대량 생산에 적합한 발효 온도나 시간을 살펴보았다.

재료 및 방법

재료 및 시약

청국장 제조에 사용된 대두는 2011년 국내에서 수확된 국산 대두를 구입하여 사용하였으며, 청국장 발효 균주를 분리하기 위해 가정, 대중음식점 그리고 기존 제품으로 판매되고 있는 청국장 등을 시료로 수집하여 사용하였다. 미생물 배양용 배지로는 luria-bertani media (LB)를 사용하였으며 균주의 단백질 분해능을 조사하기 위한 배지로는 1% skim milk를 포함하는 표준천배지를 사용하였고 구성시약은 Difco Lab. (Detroit, MI, USA)사의 제품을 사용하였다. GABA함량 측정에 필요한 시약들은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA), Junsei Co. (Tokyo, Japan), 그리고 Yakuri Co. (Kyoto, Japan)의 제품을 구입하여 사용하였다.

청국장 발효균주의 분리

수집된 각 시료 5 g을 시험관에 넣고, 멸균된 증류수 10 ml를 가한 후 교반하여 충분히 혼합한 뒤 30분간 방치하였다. 방치된 시료의 상등액에 멸균된 증류수를 가하여 10^{-6} ~ 10^{-7} 까지 단계별로 희석하고 90°C의 항온수조에서 15분간 방치하여 열에 약한 미생물들을 1차 제거하였다. 각 시료 0.1 ml를 skim milk배지(10% skim milk, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, pH 7.5)에 도말하여 37°C에서 2일 동안 배양하였다. 배양결과 skim milk배지 상에서 clear zone의 크기가 크고 선명하며, 성장속도가 빠른 colony만을 선별하여 청국장 발효실험에 사용하였다.

선별균주를 이용한 청국장 제조

청국장은 대두 15 g을 24시간 동안 초순수에 침지하여 충분히 불린 후 체로 걸러 물기를 제거한 뒤 발효용기에 넣고 호일로 감싸 autoclave로 121°C에 50분간 증자하였다. 증자된 대두

는 clean bench 안에서 45~50°C로 냉각한 후 LB broth에서 24시간 동안 증배양하고 6시간 동안 주 배양한 1차 선별균주를 2% 접종하여 40°C에서 72시간 동안 발효시켜 제조하였다. 균주들 가운데 청국장고유의 점질물을 형성하지 못하는 균주들을 실험 대상에서 제외하고, 점질물의 생성량이 많은 균주들을 후보균주들로 분리하여, 청국장 발효능과 각종활성을 측정하였다.

Protease activity 및 점질물 생성능 측정

Protease활성을 측정하기 위해서 LB broth에 배양한 1차 선별균주를 15,000 rpm으로 15 min 동안 원심 분리한 뒤 상등액을 micro filter로 여과·제균 하여 조효소액으로 사용하였다. 멸균된 paper disc를 1% skim milk plate 위에 올려놓고, 조효소액 0.02 ml을 적점한 후 37°C에서 72시간 동안 반응시켜 생성된 clear zone을 측정하여 protease활성을 비교하였다.

점질물 생성능을 측정하기 위해 대두 15 g을 24시간 동안 초순수에 침지하여 충분히 불린 후 체로 걸러 물기를 제거한 뒤 발효용기에 넣고 호일로 감싸 autoclave로 121°C에서 50분간 증자하였다. 증자된 대두는 clean bench안에서 45~50°C로 냉각한 후 LB broth에서 24시간 동안 증배양하고 6시간 동안 주 배양한 1차 선별균주를 2% 접종하여 40°C에서 72시간 동안 발효시켜 청국장을 제조하였다. 완성된 청국장의 점질물이 늘어나는 길이와 굵기, 점질물의 양을 비교하여 점질물 생성능을 측정하였다.

GABA 함량 측정

GABA함량을 측정하기 위해서 청국장의 GABA정량은 Zhang과 Bown의 방법을 사용하였다[29]. 시료의 전처리를 위해 48시간 동결 후 동결진공 건조하여 분말화한 뒤 불순물과 시료의 색소 등을 제거하기 위해 청국장 분말 0.3 g을 99% 에탄올 1.2 ml에 5시간 동안 추출하여 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상정액을 시료로 사용하였다. Microtube에 상정액 0.1 ml과 MeOH 0.4 ml을 가하고 70~80°C로 조정된 water bath에서 약 30분 정도 완전 건조 시켰다. 여기에 70 mM LaCl₃ 용액 1 ml를 가하여 10분간 흔들어 주고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상정액 0.8 ml을 0.1 M KOH용액 0.16 ml을 미리 넣어둔 microtube에 가하여 3~5분간 교반하였다. 그리고 이를 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 syringe filter를 거쳐 나온 상정액 0.55 ml을 cuvette에 넣어 0.5 M K₄P₂O₇용액 0.2 ml, 4 mM NADP용액 0.15 ml, 2.0 units Gabase/ml용액 0.05 ml를 각각 혼합하고 340 nm에서 흡광도(Optozen POP, Mecasys, Korea)를 측정(Initial A)하였다. 여기에 20 mM α-ketoglutarate용액 0.05 ml을 가하여 25°C에서 1시간 방치 후 340 nm에서 흡광도를 측정(Final A)하였다. 측정된 흡광도 값(Final A - Initial A)를 표준곡선에 대입하여 GABA량을 구하였다.

분류학적 위치 검토

Biolog system을 이용한 동정

실험균주의 탄소원 대사지문은 Biolog사의 MicroLog™ system (USA)을 이용하여 분리균주를 4시간 및 24시간 동안 배양한 후, 발색반응을 측정함으로써 조사하였다.

16S rRNA sequence분석

분리균주들의 정확한 동정을 위하여 16S rRNA sequence 비교·분석하였다. 염기서열 분석을 통하여 얻어진 분리균주의 부분 염기서열은 Blast network service를 이용하여 GenBank에 등록된 다른 미생물의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다.

배양배지 종류, 온도, 시간에 따른 미생물 생육

배양배지 종류에 따른 미생물의 생육을 측정하기 위해 실험 균주를 brain heart infusion (BHI)배지, luria-bertani media (LB) 배지, MRS배지, nutrient broth (NB) 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양 후 600 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 일반적으로 BHI배지는 dextrose broth와 뇌세포를 함유하고 있어 *Streptococci*의 생육에 최적배지로 쓰이고 LB는 *Escherichia coli*의 표준산업용 배지로 쓰이며, MRS배지는 sodium acetate가 포함되어 있어 *Lactobacillales*의 생육에 경쟁적으로 작용하는 미생물을 약화시키는 특징을 지니고 NB는 주로 물, 가수, 배설물 등에서의 미생물을 분리하는데 이용되지만 위의 모든 배지들은 기본적으로 광범위하고 까다로운 미생물 생육에 사용이 가능하다. 배지온도에 따른 미생물의 생장을 측정하기 위해 실험균주를 앞의 결과에 선택된 최적배지에 접종하여 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C에서 24시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배지시간에 따른 미생물의 생장을 측정하기 위해 실험균주를 앞의 결과에 선택된 최적배지와 온도에서 150 rpm으로 진탕 배양하면서 3시간 간격으로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아미노산 분석기를 이용한 GABA함량의 측정

B. subtilis MC 31에 의해 발효가 된 청국장의 정확한 GABA 함량을 조사하기 위해 최적 생육조건과 발효조건을 바탕으로 아미노산 분석을 하였다. 시료 0.1 g을 50 ml 튜브에 취하고 6 N HCl을 시료 0.03 g당 5 ml씩 가해 약 5분간 N₂ gas을 충전 후 뚜껑을 닫아 110°C oven에서 24시간 동안 가수분해시킨다. 가수분해 시킨 시료를 50°C 감압농축기에서 감압농축하여 HCl을 제거한 후 증발플라스크에 옮겨 2회 정도 반복하여 증발건조 시킨 뒤 시료희석 완충액을 가하여 용해시켰다. 용해시킨 용액을 0.45 µm membrane filter로 여과하여 아미노산 자동분석기(L-8800 Amino Acid Analyzer, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

균주 분리 및 실험 균주 선택

청국장 발효균주 분리 및 선별

시판되는 청국장으로부터 발효에 관여하는 것으로 보이는 1,500여 종의 균을 분리하고, 단일 균주를 이용한 청국장 발효 실험에 사용하였다. 제조된 1,500여 개의 청국장을 육안으로 점질물 함량을 비교하고 점질물 함량이 많은 200여 종의 균주를 1차 선별하였다.

Protease 활성 및 점질물 생성능

대두를 원료로 하여 청국장을 제조 시 단백질은 발효과정을 통해 *Bacillus subtilis*가 분비하는 protease의 작용으로 polypeptide가 peptide와 amino acid로 분해되어 소화흡수 되기 쉽도록 분해되고 끈적끈적한 점질물이 생성되어 고유의 맛과 향을 지니게 된다[6]. Protease활성과 점질물 생성능을 측정하여 청국장 발효 능력을 평가할 수 있으므로 1차 선별된 200여 종의 균주에서 protease활성과 점질물 생성능을 측정하였다 (Table 1). 측정 결과 점질물 형성능력이 양호한 동시에 protease활성을 나타내는 20개의 균주를 2차 선별하였다. 그 중에

Table 1. Slime material formation and protease activity of various strains isolated from *Chungkookjang*

Strain No.	Protease activity	Slime material formation
Control	+++	++++
BS 67	-	++
BS 102	+++	+
BS 135	+	+
BS 308	-	+
BC 21	-	++
BC 26	-	+++
BC 58	++	++++
BC 133	+	++
BC 134	++	+++
BC 153	+	++++
MS 9	-	+
MS 80	-	++
MS 123	++++	++
MS 190	+	+
MS 268	+++	++++
MC 31	+++	+++
MC 40	+++	+++
MC 61	+	+
MC 125	++	+++
MC 126	-	++++
MC 150	+	++++

*++++: over powering detectable activity, +++: strong detectable activity, ++: detectable activity, +: weak detectable activity, -: feeble detectable activity. **Chungkookjang* was fermented at 40°C for 72 hr.

*Control bacterium was isolated from commercial *Chungkookjang*

서도 특히 strain No. MS 268, MC31, MC40은 protease활성과 점질물 형성이 +++ 이상으로 우수하였다. 실험을 통해 protease의 투명화와 점질물이 늘어나는 길이에 비례하여 활성도 높아지는 것을 확인하였다.

선별 균주들의 GABA 함량

Protease활성과 점질물 생성능이 높은 선별 균주 20개의 GABA생산량을 측정된 결과 Table 2와 같았다. 선별한 20개의 균주들 가운데 strain No. MC31은 1.392 µg/ml로 가장 높은 GABA함량을 보였으며, 이는 control로 사용된 시중에 단일 균주로 발효하여 판매되는 청국장 GABA함량 0.582 µg/ml 보다 약 2.3 배 가량 높은 수치였다. 따라서 GABA함량측정 결과 분리된 균주 가운데 가장 함량이 높은 strain No. MC 31을 실험균주로 선택하였다.

실험균주의 동정

Gram염색 및 Catalase test

Strain No. MC31의 동정을 위한 기초 실험으로 gram염색과 catalase test를 실시하였다. 그 결과 strain No. MC31은 현미경 검정을 통하여 gram양성의 막대형으로서 catalase양성을 나타낸 것으로 보아 *Bacillus*속 세균인 것으로 추정 된다 (data not shown).

Table 2. GABA contents in *Chungkookjang* fermented by isolated strains

Strain No.	GABA (µg/ml)
Control	0.582153
BS 67	0.681336
BS 102	0.235015
BS 135	0.383789
BS 308	0.780518
BC 26	0.284607
BC 58	0.482971
BC 133	0.780518
BC 134	0.334198
BC 153	0.012940
MS 9	0.631745
MS 80	0.582153
MS 123	0.532562
MS 190	0.730927
MS 268	0.631745
MC 31	1.391663
MC 40	0.582153
MC 61	0.966891
MC 125	0.482971
MC 126	0.780518
MC 150	0.965860

**Chungkookjang* was fermented at 40°C for 72 hr.

*Control bacterium was isolated from commercial *Chungkookjang*.

Biolog system을 이용한 동정

생화학적 특성으로 MicroLog™ system (USA)을 이용하여 당대사능을 검토한 결과 Table 3와 같은 결과를 나타내었다. Glycerol, L-Arabinose, D-Glucose, D-Fructose, Inositol, Mannitol, Sorbitol, α-Methyl-D-glucoside, Esculine 및 Maltose 등은 발효할 수 있으나, Erythritol, D-Arabinose, Ribose, D-Xylose, L-Xylose, Adonitol, β-Methyl-xyloside, Galactose, D-Mannose 및 L-sorbose 등에는 비발효성을 나타내며 *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*로 동정되었다.

16S rRNA sequence 분석

Strain No. MC 31의 16S rRNA sequence를 비교·분석한 결과 *Bacillus subtilis* strain GD3b와 99%의 상동성으로 biolog system에 의한 동정과 일치하는 결과를 보여 *Bacillus subtilis* MC 31로 명명하였다(Fig. 1).

배양배지 종류에 따른 미생물 생육

B. subtilis MC 31의 최적 생장배지를 알아보기 위하여 BHI, LB, MRS, NB배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양 후 흡광도를 측정된 결과 NB배지를 제외한 모든 배지에서 비교적 양호한 생육을 나타내었다. 특히 LB에서 가장 높은 생육을 보였으며, LB에 비해 BHI에서 93%, MRS에서 83%, NB에서 35%의 낮은 생육을 보여 LB를 최적 배지로 실험에 사용하였다(Fig. 2).

배양온도에 따른 미생물 생육

B. subtilis MC 31의 최적 온도를 알아보기 위하여 앞의 결과에 선택된 최적배지인 LB액체배지에 접종하여 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C에서 24시간 동안 배양 후 흡광도를 측정하였다. 그 결과 30°C에서 40°C까지 비교적 넓은 범위에서 생육이 높게 나타났으며 그 중 37°C에서 가장 높은 생육을 보여 *B. subtilis* MC 31의 최적 배양 온도는 37°C임을 확인하였다(Fig. 3). Xiao [28]은 분리한 *B. subtilis* A7, B4, C6 모두 배양 온도 37°C에서 생육이 가장 활발하였으며 42°C에서는 감소하였고 47°C와 30°C에서 가장 낮았다고 보고하였으며 본 실험에서도 *B. subtilis* MC 31가 37°C에서 가장 높은 생육을 보이며 유사한 경향임을 확인하였다.

배양시간에 따른 미생물 생육

B. subtilis MC 31의 생장 곡선을 알아보기 위하여 앞의 결과에 선택된 최적배지와 온도인 LB액체배지에 접종하여 37°C에서 진탕 배양하여 3시간 간격으로 흡광도를 측정된 결과 0-6시간 까지 대수기를 나타내었고, 6시간 이후 18시간까지 증식이 점차 느려져 18시간에서 36시간까지 정지기에 들어갔다(Fig. 4). 이러한 결과를 바탕으로 최적배양 시간을 대수기에서 정지기로 들어가는 6시간으로 정하였다. Park [22] 등은 *Bacillus sp.* FF-9를 토양으로부터 분리하여 최적 배양시

Table 3. Characteristics of carbohydrate fermentation of strain No. MC31 isolated from *Chungkookjang* by API 50 CHB

Carbohydrates	Isolated strain MC31	Carbohydrates	Isolated strain MC31
Control	-	Esculine	+
Glycerol	+	Salicine	-
Erythritol	-	Cellobiose	-
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	-
Ribose	-	Melibiose	+
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	+
β Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	-	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	+
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	-	Xylitol	-
L-sorbose	-	β Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	+	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
NAcetylglucosamine	-	Gluconate	-
Amygdaline	-	2 ceto-gluconate	-
Arbutine	-	5 ceto-gluconate	-

*Symbols: +: positive, -: negative

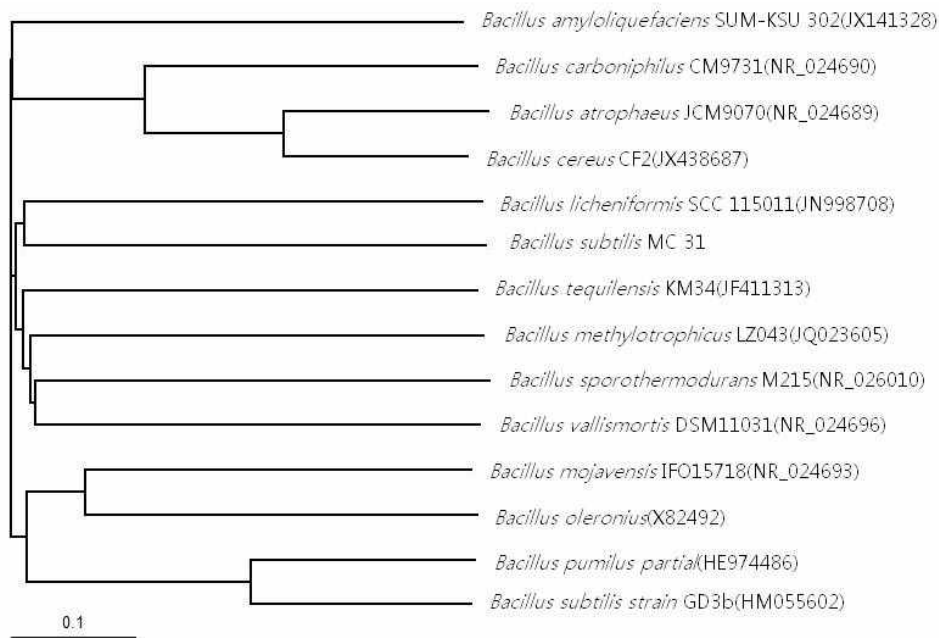


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of *B. subtilis* MC 31 isolated from *Chungkookjang*. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bar, 0.1 nucleotide substitution per position.

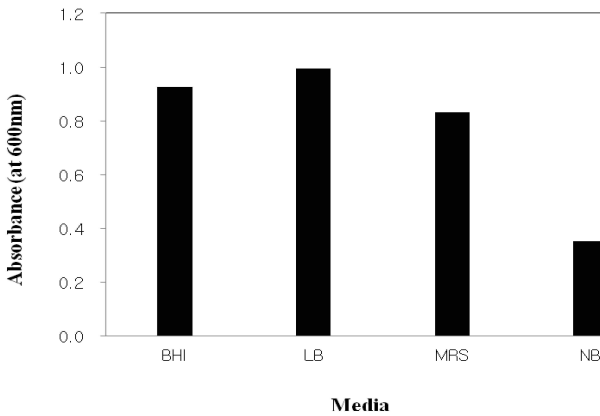


Fig. 2. Effect of different culture media on growth of *B. subtilis* MC31. Cultivation was carried out at 37°C for 72 hr on each culture media.

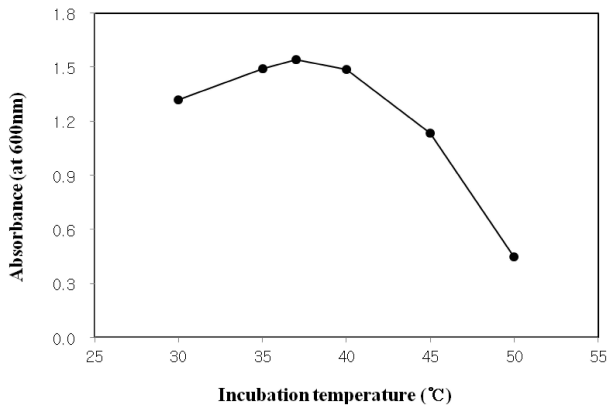


Fig. 3. Effect of different incubation temperature on growth of *B. subtilis* MC31. Cultivation was carried out on LB broth at each temperature for 72 hr.

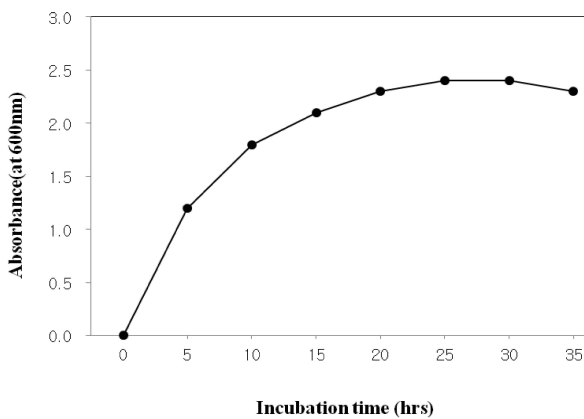


Fig. 4. Growth curve of *B. subtilis* MC31. Cultivation was carried out on LB broth at 37°C.

간을 본 결과 6시간 이후부터 급격히 증가하여 배양 12시간에는 가장 높은 생육을 나타내었으며 그 이후부터 점차적으로 감소하다가 일정한 수치를 나타내었다 보고하였고, Koh

[16]는 phytase생산 균주 *Bacillus sp.* CF 5-26을 분리하여 균체의 생육을 본 결과 24시간 까지 정체기에 있다 48시간까지 대수기로 들어가 그 이후부터 정지기에 들어갔다고 하였다. *B. subtilis* MC 31의 경우 다른 보고들 보다 빠른 생육을 보이는 것으로 확인되었다.

최적 발효배양 조건확립

B. subtilis MC 31로 부터 GABA대량 생산의 최적조건을 확립하기 위해 온도와 시간이 균의 GABA생산에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. *B. subtilis* MC 31을 대두에 접종하여 배양 온도 별로 72시간 배양 후 GABA함량을 측정한 결과 40°C에서 1.524 µg/ml로 가장 높은 GABA함량을 보였고 그 다음으로 45°C에서 1.475 µg/ml, 35°C에서 1.425 µg/ml, 30°C에서 1.375 µg/ml, 50°C에서 1.276 µg/ml 순으로 낮아졌다(Fig. 5). 이러한 결과를 바탕으로 GABA가 가장 많이 생성되는 청국장 최적 발효 온도를 40°C로 정하였다. *B. subtilis* MC 31을 대두에 접종하여 40°C에서 시간 별로 배양 후 GABA함량을 측정한 결과 Fig. 6과 같았다. GABA함량을 측정한 결과 *B. subtilis*

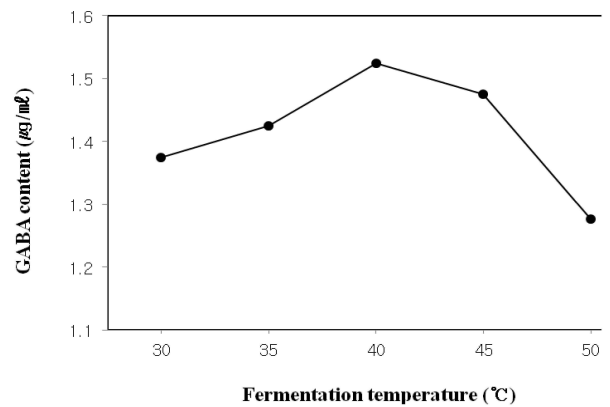


Fig. 5. Effect of different fermentation temperature on GABA content in *Chungkookjang* fermented by *B. subtilis* MC31. *Chungkookjang* fermented for 72 hr.

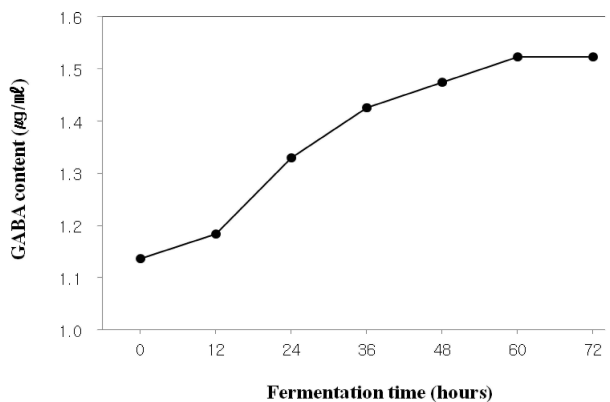


Fig. 6. Changes of GABA content in *Chungkookjang* fermented by *B. subtilis* MC31. *Chungkookjang* fermented at 40°C.

MC 31은 증자하기 전의 원료대두의 GABA함량에 비해 증자 후 감소하여 값이 1.14 µg/ml 이었으나 발효가 진행됨에 따라 12시간에 1.18 µg/ml, 36시간에 1.43 µg/ml, 48시간에 1.47 µg/ml, 60시간에 1.52 µg/ml까지 지속적으로 증가하다 72시간 이후로는 큰 차이 없이 일정하였다. *B. subtilis* MC 31을 이용하여 청국장을 제조 시 GABA함량이 70시간에서 최대인 것으로 보아 최적시간을 70시간으로 정하였다. 선실험인 *B. subtilis* MC 31의 생육곡선 결과와 최적 발효배양조건을 비교해보면 생육은 6시간 만에 대수기에서 정지기로 들어가는 빠른 생육을 보인데 반해 청국장으로 제조 시 GABA함량은 36시간부터 일정해지는 결과를 보여 GABA생산속도가 균의 생육속도에 비해 떨어지며 생육에 상관없이 그 이후로도 계속해서 GABA는 생산되는 것으로 판단된다. Eom [3]은 원료 콩의 증자 후 GABA함량은 증자전보다 감소하였으나 발효가 진행됨에 따라 증가하여 발효 72시간에는 약 5.7배 증가하였다고 보고하여 본 실험과 유사함을 알 수 있었다. Jo [7] 등은 전통된장의 숙성기간에 따른 함량 변화를 본 결과는 숙성기간이 증가함에 따라 기능성 생리활성 물질인 GABA의 함량이 증가되었고 그 이유를 여러 가지 효소적 반응에 의해 GABA의 전구체인 glutamic acid가 감소하고 GABA함량은 증가하는데 있다고 보고하였다.

아미노산 분석기를 이용한 GABA의 함량

B. subtilis MC 31의 최적 생육조건과 발효조건을 바탕으로 청국장을 제조하여 GABA함량을 조사한 결과 일반적으로 알려진 삶은 콩 함량인 0.025 mg/g보다 발효가 진행되면서 0.2 mg/g까지 증가하였다(data not shown). Jo [7]는 전통된장의 숙성기간에 따른 GABA함량이 숙성기간 1년 경과된 된장의 경우 0.0438 mg/g이었고, 3년 숙성된 된장의 GABA함량이 0.1206 mg/g으로 증가한다 보고하여, 본 실험과 비교하면 *B. subtilis* MC 31로 제조한 청국장의 GABA함량이 0.2 mg/g로 다소 높은 함량을 나타내었다.

이상의 결과로 미루어 보아 *B. subtilis* MC 31은 높은 protease활성과 점질물 생성능을 보이고 청국장으로 제조 시 뛰어난 GABA생성능이 있어 우수한 청국장 제조용 균주로 사용이 가능한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원(관리번호 111030-3)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. An, M. K., Ahn, J. B., Lee, S. H. and Lee, K. G. 2010. Analysis of γ -aminobutyric acid content in germinated pigmented

rice. *Food Sci Tech* **42**, 632-636.
 2. Byun, M. W., Son, J. H., Yook, H. S., Jo, C. and Kim, D. H. 2002. Effect of gamma irradiation on the physiological activity of Korean soybean fermented foods, *Chungkookjang* and *Doenjang*. *Radiat Phys Chem* **64**, 245-248.
 3. Eom, S. M. 2006. Changes in chemical constituents of soybeans during germination and quality characteristics of *Chungkukjang* prepared with germinated soybeans. M.S. dissertation, Sejong University, Seoul, Korea.
 4. Hong, J. Y., Choue, R. W., Baek, J. Y., Cho, H. J. and Song, Y. B. 1999. The study of correlation between serum vitamin K concentration and bone metabolism in postmenopausal women. *Korean J Nutr* **21**, 287-295.
 5. Jeo, G., Lee, M. Y., Yoon, J. Y., Jang, S., Jung, M., Jeong, H. S. and Lee, J. 2010. Effects of heat treatment and selected medicinal plant extracts on GABA content after germination. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **39**, 154-158.
 6. Joo, H. K. 1996. Studies on chemical composition of commercial *Chungkukjang* and flavor compounds of *Chungkukjang* by mugwort (*Artimisia asiatica*) or red pepper seed oil. *Korea Soybean Digest* **13**, 44-56.
 7. Jo, S. J., Hong, C. O., Yang, S. Y., Choi, K. K., Kim, H. K., Yang, H. and Lee, K. W. 2011. Changes in contents of γ -Aminobutyric Acid (GABA) and isoflavones in traditional korean *Doenjang* by ripening periods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **40**, 557-564.
 8. Jung, D. H. and Sim, S. K. 1994. *Fermented soybean foods*, pp. 3, Pond of intellect, Korea.
 9. Kang, M. J., Kim, J. I. and Kwon, T. W. 2003. Effect of *Chungkukjang* on blood glucose and lipid profile in neonatal streptozotocin induced diabetic rats. *Food Sci Biotechnol* **12**, 544-547.
 10. Katagiri, M., Shimizu, S. 1989. α -aminobutyric acid accumulation in bean sprouts (soybean, black gram, green gram) treated with carbon dioxide. *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi* **36**, 916-919.
 11. Kim, B. N. and Lee, S. Y. 1995. Nattokinase, γ -GTP, protease activity and sensory evaluation of natto added with spice. *J Korean Soc Food Nutr* **24**, 228-233.
 12. Kim, J. U., Park, S. G. and Kim, J. H. 1999. Food technology. pp. 44. Munundang.
 13. Kim, S. H., Yang, J. L. and Song, Y. S. 1999. Physiological functions of *Chungkukjang*. *Food Ind and Nutr* **4**, 40-46.
 14. Kim, W. K., Choi, K., Kim, Y. T., Park, H. H. and Lee, S. Y. 1996. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* strain CK 11-4 screened from *Chungkook-Jang*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2482-2488.
 15. Kim, Y. T., Kim, W. K. and Oh, H. I. 1995. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *Chungkookjang*. *Korean J Appl Microbial Biotechnol* **23**, 1-5.
 16. Koh, H. J. 2001. A study on isolation, purification and characterization of phytase producing bacteria. M.S. dissertation, Yonsei University, Seoul, Korea.
 17. Kum, J. S., Choi, B. K., Lee, H. Y. and Park, J. D. 2004. Physicochemical properties of germinated brown rice. *Korean J Food Preserv* **11**, 182-188.

18. Lee, H. C. and Won, M. B. 1995. *Mystery of Chungkookjang*. Shinkwangpub, Korea.
19. Lee, I. B., Choi, K. J., K. K., Chuag, K. W. and Kim, K. J. 1992. Tocopherols and fatty acids in plant seeds from Korea. *J Korean Agric Chem Soc* **35**, 1-5.
20. Lee, J. O., Ha, S. D., Kim, A. J., Yuh, C. S., Bang, I. S. and Park, S. H. Industrial application and physiological functions of *Chongkukjang*. 2005. *Food Sci Indu* **38**, 69-78.
21. Lim, A. D. and Kim, K. S. 2009. Effects and utilization of GABA. *Korean J Dairy Sci Technol* **27**, 45-51.
22. Park, J. C., Yoo, J. H., Cha, J. Y., Kim, M. S and Cho, Y. S. 2004. Isolation, identification and optimal culture condition of *Bacillus sp.* FF-9 having antifungal on the turf grass pathogens caused by *Rhizoctonia solani* AGII-II. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **47**, 373-378.
23. Pyo, Y. H. 2008. Effect of monascus-fermentation on the content of GABA and free amino acids in soybean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 1208-1213.
24. Sawai, Y., Konomi, K., Odaka, Y., Yoshitomi, H., Yamaguchi, Y., Miyama, D. and Takeuchi, A. 1999. Repeating treatment of anaerobic and aerobic incubation increases the amount of α -aminobutyric acid in tea shoots. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **46**, 462-466.
25. Shon, M. Y., Seo, K. I., Lee, S. W., Choi, S. H. and Sung, N. J. 2000. Biological activities of *Chungkukjang* prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* **32**, 936-941.
26. Wei, H., Wei, L., Frenkel, F., Brown, R. and Barnes, S. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr Cancer* **20**, 1-12.
27. Yoshikatsu, murooka. and Mitsuo, yamshita. 2008. Traditional healthful fermented products of Japan. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**, 791-798.
28. Xiao, L. Y. 2011. Identification of three strains isolated from *Cheongkukjang* and characteristics of their crude protease and amylase. M.S. dissertation, Konkuk University, Seoul, Korea.
29. Zhang, G. and Bown, A. W. 1997. The rapid determination of γ -aminobutyric acid. *Pytochemistry* **44**, 1007-1009.

초록 : GABA 함량이 높은 청국장을 발효하는 균주의 분리 및 동정

맹소연¹ · 김은아¹ · 이가영¹ · 김로의¹ · 황대연² · 손홍주³ · 김동섭^{1*}
 (¹부산대학교 식품공학과, ²바이오소재공학과, ³생명환경화학과)

전통적인 방법으로 제조된 청국장으로부터 우수한 발효 균주들을 분리하여 재래식으로 청국장을 제조하고, 제조된 청국장의 생리활성 물질인 GABA를 유지 및 보강하면서 품질을 향상시키기 위하여 청국장 발효능이 뛰어난 종균을 찾아 분리하였다. 분리된 균주들 가운데 GABA의 함량이 높은 청국장을 생산하는 MC 31을 실험균주로 선택하였고 API Kit와 16S rDNA sequence를 통하여 *Bacillus subtilis* MC 31로 명명하였다. *B. subtilis* MC 31의 최적배지와 온도, 시간을 찾아본 결과 LB 배지에서 37°C, 24시간이 가장 높은 생육을 나타내었다. GABA 생산에 적합한 발효 온도와 시간을 조절하여 최적 조건을 찾아본 결과 *B. subtilis* MC 31는 40°C에서 72시간에 가장 많은 GABA를 생산하였다.