

신 균주 *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효한 청국장의 항산화효과

김한수¹, 윤현^{2*}

¹조선대학교 대학원 보건학과, ²한려대학교 임상병리학과

The Antioxidant Effect of Cheonggukjang, Fermented Using the New Strain, *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1

Han Soo Kim¹, Hyun Yun^{2*}

¹Department of Health science Graduate School of Chosun University,

²Biomedical laboratory science of Hanlyo University

요약 본 연구의 목적은 대나무 줄기표면에서 처음 발견 하였으나, 아직까지는 연구가 미흡한 신 균주 *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1의 생리활성 효과를 알아보기 위하여 청국장 전통 발효 균주인 *Bacillus subtilis* NG24를 대조군으로 하여 항산화효과에 대한 비교분석을 실시하였다. 청국장 추출물의 항산화 실험 결과에서 Total Polyphenol 추출물 함량의 측정 결과는 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 시료에서 유의하게 증가하였다($p=0.032$). SOD 유사활성과 DPPH radical 소거능 및 NO radical 소거능에서 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 포함한 시료에서 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였다($p<.05$). 추가적으로, 각 항산화 실험의 IC₅₀은 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 시료에서 SOD 유사활성($p=0.045$), DPPH radical 소거능($p=0.041$), NO radical 소거능($p=0.019$)과 같이 유의한 차이로 감소하였다.

Abstract This study aims to compare and analyze the antioxidant effect of Cheonggukjang's traditional fermentation strain, *Bacillus subtilis* NG24 which was a control of the study, in order to see the biological activity effect of the new strain, *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1 that was first found in the surface of the bamboo stem, but hasn't been insufficiently researched. In the antioxidant activity experiment of the Cheonggukjang extract, the *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 sample showed a significant increase in the total polyphenol extract content, compared to *B.subtilis* NG24($p=0.032$). Also, compared to *B.subtilis* NG24, the sample containing *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 showed a significant increase in SOD-like Activity, DPPH radical scavenging, and NO radical scavenging, as the concentration rose($p<.05$). Additionally, IC₅₀ in each antioxidant activity experiment significantly decreased in the *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 sample like SOD-like Activity($p=0.045$), DPPH radical scavenging($p=0.041$), and NO radical scavenging($p=0.019$), compared to *B.subtilis* NG24.

Keywords : Antioxidant activity; Bamboo; *B.subtilis*; *B.amyloliquefaciens*; Cheonggukjang.

1. 서론

최근 생활수준의 향상과 함께 식품산업이 발달함에 따라 유통 및 저장과정에서 발생하기 쉬운 식품의 부패

나 변질의 원인이 되는 미생물의 증식을 억제하기 위한 노력이 계속되고 있다[1,2]. 그러나 최근 건강 지향적인 소비자의 욕구에 따라 기존의 화학적 합성 보존료의 사용을 기피하고 합성보존료의 지속적인 사용이 인체에 부

*Corresponding Author : Hyun Yoon(Hanlyo Univ.)

Tel: +82-10-2635-9076 email: yh9074@yahoo.co.kr

Received May, 4 2015

Accepted August 6, 2015

Revised (1st June 2, 2015, 2nd June 8, 2015)

Published August 31, 2015

작용을 일으킬 수 있는 안정성 문제가 제기됨에 따라[3], 인체에 무해하면서 변태를 억제하고 유통시한을 늘릴 수 있는 천연자원의 이용개발이 시도되고 있으며, 특히 식물성 한약재 및 약용식물 유래 항균활성 및 생리활성 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[4]. 2001년 세계보건기구(WHO)와 국제식량기구(FAO)의 합동전문가 위원회에서 Probiotics를 ‘살아있는 미생물로 적당한 양을 섭취하면 건강에 유익한 세균을 포함한 식이보충제’라고 정의 하였으며[5], Prebiotics란 ‘Probiotics의 미생물의 생육을 촉진하는 물질을 의미하는 것’이며, 대두에는 oligosaccharide, lactitol, lactulose 등이 있다[6].

항산화 활성은 식품 성분의 대표적 기능성으로 알려졌다. 생체 내에서 DNA 손상, 암 유발, 노화 등 다양한 질병의 원인과 관련성이 있는 유리자유기에 의한 손상을 방지함으로써 생체를 보호하는 중요한 기능성으로 주목 받았다[7].

대두는 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며[8,9], 우리나라에서는 대두를 이용한 대표적인 발효식품인 청국장(된장, 간장, 고추장 등과 함께 오래 전부터 행해져 온 가공공정의 일환으로 식품에 좋은 발효식품으로 상용되어 왔다. 예전부터 된장과 간장은 대두를 발효시킨 메주를 염수에 넣어 다시 발효시켜 제조하는데 1년 정도의 기간이 소요되는데 비해 청 국장은 가을부터 겨울철에 고온에서 단시간 발효 숙성시켜 제조되었다[10]. 청국장과 같은 발효식품은 맛과 향, 조직감을 부여하기 위해 미생물 작용을 통해 젖산 및 초산, 알코올 발효 과정을 지나 식품의 저장성 향상, 단백질, 필수 아미노산 및 비타민 등이 풍부한 식품이 되고, 독성물질 파괴 및 생리활성물질 생산, 소화증진 등의 효과가 있다고 보고하였다[11].

전통발효균주로 인정받는 고초균(*Bacillus subtilis*)은 호기성으로 다양한 가수 분해 효소를 생산하며, 이러한 균주를 이용해 발효시켜 만든 청국장은 대표적인 대두 발효식품이다. 이 식품은 발효과정을 거치면서 고초균에 의해 생산되는 단백질 및 탄수화물 가수분해 효소, 기능성 펩타이드, 고분자 점질물 등의 생리활성물질을 포함하고 있다[12]. 이러한 점질물은 발효제품의 품질특성에 중요한 영향을 미치며, γ -PGA는 미생물 고분자물질의 일종으로 면역증진 효과, 당뇨효과, 항산화효과[13], 항암효과 등의 기능을 가지고 있고, 보습성이 뛰어나 화장품으로도 각광받고 있는 기능성 소재이다[14].

신 균주 *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1은 대나무 줄기 표면에서 처음 발견 되었으며, 16S rDNA 염기서열 구조 분석에 근거하여 분자계통학적 유연관계에 의해 분리된 균주[15]로써 proteolytic, lipolytic, amyolytic과 cellulolytic 효과에 관한 plate 분석에 의한 결과에서 식품의 부패와 인체에 병원성을 일으키는 미생물인 *Listeria monocytogenes*와 *Yeast, Candida albicans* 등에 대한 항균 효과가 있다고 알려져 있다[16]. 아직까지 *B. amyloliquefaciens* NBF11-1에 대한 연구는 거의 없지만, *B. amyloliquefaciens* NBF11-1이 발견된 대나무에 대한 몇몇 보고서에서는 대나무가 신경보호효과와 면역기능강화, 항산화효과, 항암 및 항균효과, 가수분해 효과 등의 여러 생리활성기능이 있다고 보고하고 있다[15, 17-19]. 그러나 대나무 줄기 표면에서 발견된 *B. amyloliquefaciens* NBF11-1은 발견이 된지 얼마 지나지 않았기 때문에 이 균주에 대한 연구는 아직까지 미비한 실정이고, *B. amyloliquefaciens* NBF11-1이 청국장의 여러 가지 생리활성기능에 어떠한 영향을 주었는지는 아직은 알 수가 없다.

따라서 본 실험에서는 청국장 발효의 대표적인 균주로 잘 알려진 *B. subtilis* NG24를 이용한 청국장을 대조균으로 정한 다음 대나무 표면의 줄기 끝부분에서 발견된 신 균주 *B. amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 청국장을 실험균으로 하여 두 가지 균의 항산화 효과를 비교분석함으로써 신 균주인 *B. amyloliquefaciens* NBF11-1의 청국장 발효에 의한 생리활성에 대한 기초 자료로 사용함을 목적으로 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료

본 실험에 사용한 대두(국산)는 용두농업 협동조합(무안)에서 1 kg을 구매하여 실험에 사용하였다.

2.2 실험 균주

본 실험에서 청국장 발효에 이용되고 있는 대표적인 균주 *B. subtilis* NG24와 대나무에서 표면 끝부분에서 처음 분리된 신균주 *B. amyloliquefaciens* NBF11-1을 사용하였다. 목포대학교 생물학과 미생물학 실험실에 보관중인 청국장 발효균주 *B. subtilis* NG24와 신균주

B. amyloliquefaciens NBF11-1 균주를 이용하여 37℃, 24시간 계대 배양을 통하여 활성화한 다음 신속히 항산화 실험에 사용하였다.

2.3 시약 및 기기

실험에 사용한 기기로는 Shaking incubator, UV/Visible spectrophotometer, freezing dryer와 Rotary vacuum evaporator 외 일반 실험기구들을 사용하였다. 총 폴리페놀 측정시약은 Folin-Ciocalteu phenol을 사용하였고, 표준시약으로 Gallic acid와 10% Na₂CO₃을 사용하였다. SOD(superoxide dismutase) 유사활성 측정시약은 tris-HCl buffer와 10 mM pyrogallol, 1.2 N HCl을 조제하여 사용하였다. DPPH(2,2 diphenyl 1-picryl hydrazyl) radical에 대한 소거능 측정시약은 100 μM의 DPPH(Sigma Co.)용액을 사용하였다. NO(nitric oxide) radical 소거능 측정시약은 1 mM NaNO₂ 용액, 0.1 N HCl 용액, 2% acetic acid, Griess 시약을 사용하였고, 추출용 시약은 70% ethanol을 사용하였다.

2.4 *B. subtilis* NG24와 *B. amyloliquefaciens* NBF11-1의 MHB 배양액

MHB(Mueller Hinton broth)를 10 ml씩 두개를 제조한 다음 *B. subtilis* NG24와 *B. amyloliquefaciens* N11-1을 이용하여 배양 되어 있는 slant broth tube에서 Loop로 채취하여 각 플라스크에 넣는다. 진탕 배양기를 이용하여 종균액을 37℃, 24시간 배양한 다음 5 ml tube에 각 100 μl씩 24시간 배양하였다.

2.5 *B. subtilis* NG24와 *B. amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS 조제

FS(Fermented Soybean)의 제조방법은 대두(콩)를 500 g을 세척하여 3배의 증류수를 넣고 실온, 24시간을 침지하였다. 침지하여 불린 대두를 멸균기에서 115℃, 25분간 증자하고 다시 50-60℃로 냉각하였다. 대두는 100 g씩 5개의 비커에 나누어 담고 전날 배양한 종균액을 전체의 1%(w/w)가 되도록 접종하였다. 균주를 접종한 대두를 37℃에서 24시간 동안 발효시켜 -70℃에서 24시간 냉동시킨 후 동결건조 하였다. 동결건조 된 시료 100 g은 3배의 70% ethanol로 실온에서 24시간 3회 반복하여 진탕한 후 상층액을 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.2)로 여과하여 불순물을 제거하고 진공

농축기에서 40℃로 감압·농축한 후 사용하였다.

2.6 항산화 실험

2.6.1 Total Polyphenol compound 함량 측정

Total Polyphenol 함량은 Folin-Denis법을 응용하여 측정하였다[20]. 균주 *B. subtilis* NG24와 *B. amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 각각 5개의 FS 추출물 시료 5 mg/ml을 80% Methanol 0.5 ml와 증류수 2 ml에 용해시키고 2 N Folin-ciocalteu phenol reagent 100 μl를 가하였다. 37℃에서 30분 혼합한 후 10% Na₂CO₃ 100 μl을 첨가하고 96 well plate에 200 μl씩 분주하였다. 각각의 시료는 725 nm에서 UV/Visible spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 표준물질은 Gallic acid를 증류수에 5 mg/ml로 희석 후 흡광도를 측정하여 얻은 표준 검량 곡선으로부터 총 폴리페놀 추출량의 결과를 나타내었다.

2.6.2 SOD 유사활성

SOD 유사활성 실험은 superoxide에 의해 산화되는 pyrogallol의 산화속도를 억제시키는 원리를 이용하였다 [21]. *B. subtilis* NG24와 *B. amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 각각 5개의 FS 추출물 시료 5 mg/ml 중에서 sample 10 μl을 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer 50 mM tris(hydroxymethyl) 130 μl와 10 mM pyrogallol 10 μl를 tube에 넣고 150 μl 혼합하였다. 혼합물은 5℃에서 20분간 방치한 후 1.2 N HCl 10 μl로 반응을 정지시켰다. 그리고 500 μg/ml, 1000 μg/ml, 2000 μg/ml씩 첨가한 FS 추출물은 96 well plate에 각각 200 μl씩 맞춘 후 420 nm에서 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Control은 tris buffer 130 μl와 pyrogallol 20 μl를 첨가하여 5℃에서 20분 반응시켰다. 반응물은 1.2 N HCl 10 μl를 첨가하여 반응정지를 시킨 후 흡광도를 측정하였다. IC₅₀(Inhibition concentration 50)값은 첨가한 SOD 유사활성도가 산화적 장애를 50% 제거시키는 추출물의 농도를 의미한다. SOD 유사활성은 계산식을 이용하여 FS 추출물 시료에 의한 첨가구와 무 첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 산출하여 측정하였다.

$$\text{SOD 유사 활성능(\%)} = (1 - \frac{\text{추출물 有 첨가구의 Sample}}{\text{추출물 無 첨가구의 Control}}) \times 100$$

2.6.3 DPPH radical에 대한 소거능 측정

B.subtilis NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 FS 추출물 시료를 이용하여 각각의 추출물에 대한 DPPH radical에 대한 소거능 측정을 실시하였다[22]. 즉, 희석한 시료 10 µl을 Methanol 90 µl에 용해시켜 0.3 mM DPPH 용액 100 µl와 혼합하여 잘 교반하여 30분 동안 암실에서 보관하였다. 그리고 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml씩 첨가한 FS 추출물은 96 well plate에 각각 200 µl씩 맞추고 30분간 암소에서 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. IC₅₀ 값은 첨가한 DPPH radical의 50%를 억제하는 추출물의 농도를 의미한다. DPPH radical에 대한 소거능은 계산식을 이용하였고, FS 추출물 시료에 의한 첨가구와 무 첨가구의 흡광도는 SOD 유사활성 실험과 같은 방법으로 측정하였다.

2.6.4 NO radical 소거능 측정

NO radical 소거능 측정은 Gray & Dugan의 방법을 응용하여 실시하였다[23]. *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 각각의 FS 추출물 시료 5 mg/ml를 증류수에 희석된 시료 100 µl와 1 mM NaNO₂용액 100 µl와 0.1 N HCl 100 µl를 사용하여 pH 1.2로 조정된 반응용액을 가해 1 set(C)를 준비하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 배양한 후 1 set(A)는 반응액 200 µl에 2% acetic acid 1 ml, griess reagent 80 µl를 가하여 혼합하였고, 1 set(B)는 1 set(A)에 griess 시약 대신 증류수 80 µl를 가하여 혼합하였다. 그리고 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml씩 첨가한 FS 추출물은 96 well plate에 각각 200 µl씩 맞추고 다음 실온에서 15분 동안 반응시키고 570 nm에서 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 잔존하는 아질산염 양을 구하였다.

$$N(\%) = \left(1 - \frac{A-C}{B} \right) \times 100$$

N : NO 소거율에 대한 항산화 활성(%)

A : 1 mM NaNO₂ 용액에 시료를 첨가하여

1시간 반응시킨 후의 흡광도

B : 1 mM NaNO₂에 시료 대신 증류수를 첨가하여

1시간 반응 후의 흡광도

C : 시료 흡광도(1 set)

IC₅₀ 값은 첨가한 아질산염의 50%를 소거하는 추출물의 농도를 의미한다. 대조시험으로 Griess 시약 대신 증류

수를 0.4 ml 첨가하여 동일하게 행하였다. 아질산염 소거작용은 계산식을 이용하여 FS 시료의 첨가의 유무에 따른 NO 백분율을 흡광도로 측정하였다.

2.7 자료 분석 방법

본 연구의 자료 분석은 Window용 SPSS(Ver. 18.0)을 사용하였다. 발효 균주 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효시킨 청국장 생리활성(총 폴리페놀, SOD 유사활성, DPPH radical에 대한 소거능, NO radical 소거능)은 대조군과 실험군 모두 각각 5개의 시험관에서 측정된 값을 평균±표준편차(M±SD)로 나타내었다. 대조군과 실험군의 평균비교는 t-검정을 시행 하였고, 유의수준은 p<0.05로 설정하였다.

3. 결 과

3.1 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS의 항산화 실험

3.1.1 Total Polyphenol compound 측정

B.subtilis NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효시킨 FS 추출물에 함유된 총 폴리페놀의 추출량은 Table 1과 같다.

Table 1. Total polyphenol compound of ethanol extracts of FS

Sample (µg/ml)	Total polyphenol (mg/ml)		p-value
	NG24 (M±SD)	NBF11-1 (M±SD)	
FS	34.2±0.03	35.5±0.16	0.032

FS의 추출물 시료에 함유된 총 폴리페놀의 추출량은 *B.subtilis* NG24 (34.2±0.03 mg/ml)에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 (35.5±0.16 mg/ml)로 발효시킨 시료에서 총 폴리페놀의 추출량이 유의하게 증가하였다(p=0.032).

3.1.2 SOD 유사활성

B.subtilis NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효시킨 FS의 SOD 유사활성 결과는 Table 2와 같다. SOD 유사활성은 500 µg/ml에서는 유의한 차이

를 보이지 않았으나(p=0.539), 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p=0.015)과 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p=0.011)에서 균주의 양이 증가함에 따라 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 시료에서 유의하게 증가하였고, IC₅₀은 *B.subtilis* NG24 (1134.5±1.4 mg/mL)에 비하여 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 (1026.7±2.3 mg/mL)에서 유의하게 감소하였다(p=0.045).

Table 2. SOD-like activity of ethanol extracts of FS

Sample ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SOD-like activity (mg/mL)		p-value
	NG24 (M±SD)	NBF11-1 (M±SD)	
500	42.6±1.0	42.3±0.8	0.539
1000	45.1±1.5	48.7±1.2	0.015
2000	48.1±0.4	53.0±0.4	0.011
IC ₅₀ values	1134.5±1.4	1026.7±2.3	0.045

3.1.3 DPPH radical 소거능 측정

B.subtilis NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효된 FS의 DPPH radical 소거능의 결과는 Table 3과 같다. DPPH radical에 대한 소거능은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p=0.029)에서 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p=0.034), 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p=0.026)까지 모두에서 균주의 양이 증가함에 따라 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 시료에서 유의하게 증가하였고, IC₅₀은 *B.subtilis* NG24 (793.7±3.7 mg/mL)에 비하여 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 (696.4±1.8 mg/mL)에서 유의하게 감소하였다(p=0.041).

Table 3. DPPH radical Scavenging activity of ethanol extracts of FS

Sample ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DPPH radical Scavenging activity (mg/mL)		p-value
	NG24 (M±SD)	NBF11-1 (M±SD)	
500	31.5±0.5	35.9±0.6	0.029
1000	57.1±0.9	65.1±0.9	0.034
2000	69.7±0.7	79.6±0.4	0.026
IC ₅₀ values	793.7±3.7	696.4±1.8	0.041

3.1.4 NO radical 소거능 측정

B.subtilis NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효된 FS 추출물 시료의 NO radical 소거능의 결과는 Table 4와 같다. NO radical 소거능은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(p=0.021)에서 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p=0.029), 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p=0.035)까지 모두에서 균주의 양이 증가함에 따라 *B.subtilis* NG24에 비하여 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 시료에서 유의하게 증가하였고, IC₅₀은 *B.subtilis* NG24 (296.9±1.2 mg/mL)에 비하여 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 (276.5±1.6 mg/mL)에서 유의하게 감소하였다(p=0.019).

Table 4. NO radical scavenging activity of ethanol extracts of FS

Sample ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	NO radical scavenging activity (mg/mL)		p-value
	NG24 (M±SD)	NBF11-1 (M±SD)	
500	50.4±0.7	52.6±0.3	0.021
1000	60.5±0.4	64.5±0.4	0.029
2000	77.8±0.4	78.9±1.1	0.035
IC ₅₀ values	296.9±1.2	276.5±1.6	0.019

4. 고찰 및 결론

본 연구의 목적은 대나무 줄기 표면의 끝부분에서 발견하였으나 아직까지는 연구가 미흡한 신 균주인 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1의 항산화 기능을 분석하기 위하여 청국장의 대표적인 발효균주인 *B.subtilis* NG24를 대조군으로 하여 항산화 기능의 비교분석 실시하였다. Fiordiligie[16]의 연구에서는 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1의 추출물에서 잠재적인 aglycone 형태로 존재하는 생체 이용성이 우수한 물질인 isoflavone이 다량 존재한다고 하였고, Lauan 등[25]의 연구에서는 Peptidases 및 proteases와 같은 대사산물이 *B.subtilis*보다 *B.amyloliquefaciens*에서 훨씬 풍부하다고 하였다. 또한, Kim[28]의 연구에서는 *B.subtilis* NG24와 유연관계가 가장 가까운 *B.subtilis* HH28을 이용한 청국장보다 *B.amyloliquefaciens* KC41을 이용한 청국장의 γ -polyglutamate와 isoflavone-glycosides 및 β -glucosidase의 활성이 높다고 하였고, amino nitrogen의 함량은 *B.amyloliquefaciens* KC41이 450.0 mg%, *B.subtilis* HH28은 291.6 mg%로 *B.amyloliquefaciens* KC41의 함량이 더 많은걸 알 수 있었다. Ahn 등[27]의 연구에서는 단백질 및 가수분해 중간생성물에 작용하여 생리활성을 촉진하는 proteases가 *B.subtilis*에서는 179.6

Unit/mL/min로 나타난 반면 *B.amyloliquefaciens*에서는 201.9 Unit/mL/min로 높게 나타났다. 또한, Yoon 등 [29]의 연구에서는 *B.amyloliquefaciens*와 *B.subtilis*를 이용한 녹차의 발효에서 *B.amyloliquefaciens*를 이용한 녹차발효액은 항산화효과가 있다고 알려져 있는 모든 카테킨류인 EGC, EC, EGCG, ECG 중에서 EGC와 EC는 감소하였지만 EGCG와 ECG는 증가하였다. 그러나, *B.subtilis*를 이용한 녹차발효액은 오히려 모든 카테킨류(EGC, EC, EGCG, ECG)가 감소하였다. 이와 같이 *B.amyloliquefaciens*를 이용한 발효식품이 *B.subtilis*를 이용한 발효식품보다 여러 가지 생리활성 측면에서 증가하였고, 항산화 기능면에서도 더 높게 나타났다.

본 항산화 효과 연구의 결과에서 *B.subtilis* NG24를 이용하여 발효한 청국장에 비하여 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효한 청국장의 총 폴리페놀의 추출량이 많았다. 또한, 균주 첨가량이 증가할수록 SOD 유사활성과 DPPH radical 및 NO radical 소거능이 유의하게 증가하였고, IC₅₀ values는 SOD 유사활성과 DPPH radical 및 NO radical 소거능에서 유의하게 감소하였다. 이와 같은 결과는 *B.subtilis* NG24를 이용한 발효에 비하여 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 발효가 항산화에 대한 활성 측면에서 증가했기 때문으로 사료된다.

본 연구에서는 대나무의 줄기표면의 끝부분에서 발견되었으며, 아직 잘 알려지지 않은 새로운 균주인 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1로 청국장을 발효하였기 때문에 이 균주를 이용한 청국장의 발효가 *B.subtilis* NG24를 이용한 청국장의 발효보다 어떠한 종류의 항산화물질이 더 많이 존재하는지는 명확히 알 수는 없었다. 그러나, 천연 항산화물질과 항균물질을 가지고 있다고 알려져 있는 *B.amyloliquefaciens*의 새로운 균주인 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1은 대두가 발효되는 과정에서 *B.subtilis* NG24보다 청국장 점질물의 기능 중 항산화효과 면에서 우월한 효과를 나타낸 것으로 사료된다. 따라서, 향후의 연구에서는 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 발효가 청국장 점질물의 기능 중 항균기능에 어떠한 영향을 주는지와 어떠한 활성물질이 있는지에 대한 비교 연구가 필요하다고 사료된다.

References

- [1] J. H. Bae. "Antimicrobial effect of *Ulsatilla koreana* extracts on food-borne pathogens", *Kor J. Nutr*, Vol. 37, pp. 655-661, 2004.
- [2] K. S. Chung, J. Y. Kim, Y. M. Kim. "Comparison of antibacterial activities of garlic juice and heat-treated garlic juice", *Korean J. Food Sci. Technol*, Vol. 35, pp. 540-543, 2003.
- [3] C. J. Shim, G. H. Lee, J. H. Jung, S. D. Yi, Y. H. Kim, M. J. Oh. "Isolation and identification of antimicrobial active substances from *Rhodiola sachlinensis*", *Korean J. Food. Preserv*, Vol. 11, pp. 63-70, 2004.
- [4] S. Y. Jang, H. J. Choi, N. Y. Ha, O. M. Kim, Y. J. Jeong. "Study on the antimicrobial effects of citrus peel by different extract methods", *Korean J. Food Preserv*, Vol. 11, pp. 319-324, 2004.
- [5] FAO/WHO. Working Group Report on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2001.
- [6] M. B. Roberfroid. "Prebiotics and probiotics: are they functional foods?", *The American journal of clinical nutrition*, Vol. 71, pp. 1682-1687, 2000.
- [7] S. J. Jung, J. H. Lee, H. N. Song, N. S. Seong, S. E. Lee, N. I. Beak. "Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts", *Korean J. Soc. Appl Biol Chem*, Vol. 47, pp. 135-140, 2004.
- [8] P. A. Hammerschmidt and D. E. Pratt. "Phenolic antioxidants of dried soybeans", *J. Food Sci*, Vol. 43, pp. 556-559, 1978.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb02353.x>
- [9] D. E. Pratt and P. M. Bibrac. "Source of antioxidant activity of soybean and soy products", *J. Food Sci*, Vol. 44, pp. 1720-1722, 1979.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb09125.x>
- [10] Z. M. Zin, A. Abdul-Hamid, A. Osman. "Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf", *Food Chem*, Vol. 78, pp. 227-231, 2002.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00402-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00402-2)
- [11] M. Ongena and P. Jacques. "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol." *Trends. Microbiol*, Vol. 16, pp. 115-125, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- [12] H. H. Lee and S. Y. Lee. "Cytotoxic and antioxidant effects of taraxacum coreanum Nakai and *T. officinale* WEB extracts", *Korean J. Medicinal Crop Sci*, Vol. 16, pp. 79-85, 2008.
- [13] N. K. Lee and Y. T. Hahm. "Antioxidative characteristics of browning reaction products of glucose-

- γ -poly-glutamate(Glu- γ -PGA) obtained from amino-carbonyl reaction”, *Korean J. Food Sci. Technol*, Vol.37, pp.812-815, 2005.
- [14] C. J. Shim, G. H. Lee, J. H. Jung, S. D. Yi, Y. H. Kim, M. J. Oh. “Isolation and identification of antimicrobial active substances from *Rhodiola sachlinensis*”, *Korean J. Food. Preserv*, Vol. 11, pp. 63-70, 2004.
- [15] A. Arguelles-Arias, M. Ongena, B. Halimi, Y. Lara, A. Brans, B. Joris, P. Fickers. “*Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens”, *Microb. Cell. Fact*, Vol. 8, pp. 63, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- [16] P. Fiordiligie. “Extracellular Enzyme and Antibiotic Substance Production of *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1 and *Bacillus pumilus* NBF11-14 Isolated from the Surface of Bamboo Culms. Department of Biotechnology. *Korean. National Uni.* 2009.
- [17] Y. Ito, Y. Akao, M. Shimazawa, N. Seki, Y. Nozawa, H. Hara. “Lig-8, a highly bioactive lignophenol derivative from bamboo lignin, exhibits multifaceted neuroprotective activity”, *CNS Drug Rev*, Vol. 13, pp. 296-307, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1527-3458.2007.00017.x>
- [18] T. Seki, K. Kida, H. Maeda. “Immunostimulation mediated antitumor activity of bamboo(*Sasa senanesis*) leaf extracts obtained under ‘vigorous’ condition”, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 7, pp. 447-457, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nen026>
- [19] Y. Lin, A. C. Collier, W. Liu, M. J. Berry, J. Panee. “The inhibitory effect of bamboo extract on the development of 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced breast cancer”, *Phytother. Res*, Vol. 22, pp. 1440-1445, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2439>
- [20] O. Folin and W. Denis. “On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents”, *J. Biol. Chem*, Vol. 12, pp. 239-249, 1912.
- [21] S. Marklund and G. Marklund. “Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase”, *Eu J. Biochem*, Vol.47, pp.469-474, 1974.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- [22] L. P. Leong and G. Shui. “An investigation of antioxidant capacity of fruits in singapore markets”, *Food Chemistry*, Vol. 76, pp. 69-75, 2002.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00251-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00251-5)
- [23] J. I. Gray and L. R. Dugan. “Inhibition of n-nitrosamine formation in model food system”, *J. Food Sci*, Vol. 40, pp. 981-984, 1975.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb02248.x>
- [24] N. K. Lee and Y. T. Hahm. “Antioxidative characteristics of browning reaction products of glucose-poly- γ -glutamate(Glu-PGA) obtained from amino-carbonyl reaction”, *Korean J. Food Sci, Technol* Vol. 37, pp. 812-815, 2005.
- [25] M. C. Lauan, I. L. Santos, J. K. Lim. “Comparative Study of Extracellular Proteomes for *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Major in Food Biomaterials”, *Kyung Book National University, Daegu, South Korea*. Vol. 31, pp. 30-37, 2013.
- [26] J. H. Kim, C. E. Hwang, C. K. Lee, J. H. Lee, G. H. Kim, et, al. “Characteritics and Antioxidant Effect of Garlic in the Fermentation of Cheonggukjang by *Bacillus amyloliquefaciens* MJ1-4”, *J. Microbiol. Biotechnol*. Vol. 24, pp. 959-968, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1311.11088>
- [27] Y. S. Ahn, Y. S. Kim, D. H. Shin. “Isolation, Identification, and Fermentaion Characteristics of *Bacillus* sp. with High Protease Activity from Traditional Cheonggukjang”, *Korean J. Food Sci. Technol*. Vol. 38, pp. 82-87, 2006.
- [28] M. S. Kim. “Selection of Microorganisms for Cheonggukjang Fermentation and its Functional Cheonggukjang Manufacturing. Resources and Technol”, *The Graduate School. Yonsei Uni.* 2013.
- [29] H. Yun, H. J. Oh, S. W. Choi. “Difference of Catechins Extracted Level When Fermented Sun-dried Salt and Green Tea”, *Korean J. Contents*. Vol. 12, pp. 278-285. 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5392/JKCA.2012.12.11.278>

김 한 수(Han-Soo Kim)

[정회원]



- 2015년 2월 : 목포대학교 생물학과 (이학석사)
- 2016년 2월 : 조선대학교 보건학과 (박사과정)
- 2008년 8월 ~ 현재 : 해남한국병원 진단검사의학과 실장

<관심분야>
보건학, 혈액학, 임상화학

윤 현(Hyun Yoon)

[정회원]



- 2010년 8월 : 목포대학교 생물학과 (이학석사)
- 2014년 2월 : 조선대학교 보건학과 (보건학박사)
- 2010년 9월 ~ 현재 : 한려대학교 임상병리학과 교수

<관심분야>

보건학, 미생물학, 면역학