

항균력을 지닌 *Bacillus* 균주들을 종균으로 사용한 청국장에서 *Bacillus cereus* 억제

이재용¹ · 심재민¹ · 류샤오밍¹ · 야오쥔¹ · 이강욱¹ · 조계만² · 김경민³ · 신정혜³ · 김정상⁴ · 김정환^{1,5}

¹경상대학교 대학원 응용생명과학부(BK21 Plus)

²경남과학기술대학교 식품과학부, ³남해마늘연구소

⁴경북대학교 식품공학부(BK21 Plus), ⁵경상대학교 농업생명과학연구원

Inhibition of *Bacillus cereus* in *Cheonggukjang* Fermented with *Bacillus* Starters with Antimicrobial Activities

Jae Yong Lee¹, Jae Min Shim¹, Xiaoming Liu¹, Zhuang Yao¹, Kang Wook Lee¹, Kye Man Cho²,
Gyoung Min Kim³, Jung-Hye Shin³, Jong-Sang Kim⁴, and Jeong Hwan Kim^{1,5}

¹Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Graduate School and ⁵Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University

²Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology

³Namhae Garlic Research Institute

⁴School of Food Science and Biotechnology (BK21 Plus), Kyungpook National University

ABSTRACT *Cheonggukjang*, a traditional Korean fermented soy food, was prepared by inoculation of *Bacillus subtilis* EMD4 or *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17 with anti-bacterial or anti-fungal activities into soybeans. *Cheonggukjang* was also prepared by co-inoculation of EMD4 and EMD17 (1:1, v/v). Control *cheonggukjang* was prepared by using *B. subtilis* KACC16450 (Natto strain). Growth of *B. cereus* cells spiked with starter organisms was completely inhibited by *B. amyloliquefaciens* EMD17 after 12 h of fermentation at 37°C. Growth of *B. cereus* was also inhibited by *B. subtilis* EMD4, but the degree of inhibition was weaker. After 48 h of fermentation, *cheonggukjang* samples were stored for 10 days at 4°C. *B. cereus* cells were not detected from *cheonggukjang* inoculated with EMD4, whereas significant numbers still present in control. The pH values of *cheonggukjang* samples were not significantly different. During fermentation, *cheonggukjang* fermented with EMD17 showed the highest fibrinolytic activity and during storage, *cheonggukjang* fermented with a Natto strain was the highest. *Cheonggukjang* fermented with a Natto strain also showed the highest amount of total phenolic compounds. The results show that control of *B. cereus* in *cheonggukjang* is possible by using starters such as *B. amyloliquefaciens* EMD17.

Key words: *cheonggukjang*, starter, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*

서 론

청국장은 전통적으로 증자한 대두를 벧짚으로 덮은 후 따뜻한 곳에서 2~3일 두어 얻었다. 벧짚에는 포자를 형성하는 bacilli들이 존재하며 이들이 고온 다습한 환경에서 급속히 증식하면서 콩 성분들을 분해하여 아미노산, 펩타이드 등 영양성분들과 풍미성분들을 생성하고 또한 콩 표면에 끈적한 점질물질들을 생성하기도 한다. 콩 자체가 지니는 높은 영양적 가치에 더해 발효 중 bacilli들이 생성하는 혈전용해효소나 γ -PGA(polyglutamic acid) 등 기능성 물질들로

인해서 청국장은 기능성이 우수한 발효식품이다(1,2). 그러나 전통방식의 청국장 제조에서 가장 큰 문제점은 독소 생성 유해균들의 증식과 그로 인한 식중독 위험성이다. Aflatoxin을 생성하는 *Aspergillus flavus* 같은 곰팡이나 설사나 구토를 유발하는 독소 생성 *Bacillus cereus* 같은 유해세균들의 서식처는 발효 유익균인 *Aspergillus oryzae*나 *Bacillus subtilis*와 일치하고 또한 유익균과 유해균들은 서로 분류학적, 유전적, 생리적 차이가 크지 않아 구별이 쉽지 않기 때문이다(3). 최근 들어 된장, 간장 등 전통대두발효식품들의 소비와 생산이 감소하고 있어 이를 극복하기 위한 노력이 요구되고 있다. 전통대두식품들의 소비 촉진과 세계화를 위해서는 품질 향상, 다양한 풍미를 지닌 제품 개발과 함께 안전성 개선, 특히 독소 생성 유해균 증식을 억제하는 기술 개발이 요구된다(4). 유해균 증식 억제를 위해서는 식품에 화학 합

Received 11 January 2016; Accepted 16 February 2016

Corresponding author: Jeong Hwan Kim, Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea
E-mail: jeonghkim@gnu.ac.kr, Phone: +82-55-772-1904

정보존제를 첨가하는 것이 효과적이지만 소비자들이 합성 보존제를 기피하고 있어 이를 대체할 수 있는 천연보존제 개발이 요구된다(5). 천연보존제로 사용 가능한 방법의 하나는 유해균 증식을 억제하는 균주들을 발효식품들로부터 분리한 다음 이들을 종균으로 개발, 사용하는 것이다. 상당수의 균들이 이미 존재하는 식품에는 추후 유해균 오염이 일어나더라도 성공적인 증식이 어려운 환경이 되는 소위 “미생물 저해 현상(general microbial interference)”을 이용하는 것이다. 만약 종균으로 접종하는 균주가 유해균 증식을 억제하는 bacteriocin이나 lipopeptide 같은 항균물질들을 생산한다면 더욱 효과적인 유해균 억제 가능할 것이다(6). 현재 bacteriocin과 같은 항균물질들을 생산하는 유산균(lactic acid bacteria)들을 protective culture로 사용하는 방안에 관해 많은 연구들이 이루어지고 있다(5,7). 이는 합성보존제를 기피하는 소비자들의 요구와 유산균이 지닌 특성, 즉 식용에 안전한 GRAS(generally recognized as safe) 균이라는 점에 기인한다. *Bacillus subtilis*를 포함한 일부 종들의 bacilli 균주들은 유산균과 마찬가지로 그람 양성균이고 된장, 간장 등의 발효에 기여하는 GRAS 균들로 이들 중에는 bacteriocin이나 lipopeptide 등 다양한 항균물질들을 생산하는 균주들이 있어 이들을 발효식품 제조에 종균으로 사용할 경우 해당 식품들의 미생물학적 안전성을 향상할 수 있다(8). 본 연구에서는 전통장류들에서 분리한 항균력과 향진균력을 각각 지닌 *Bacillus* 두 균주를 단독으로 그리고 1:1(v/v)로 함께 대두에 접종하여 청국장을 제조하였다. 종균 접종과 동시에 인위적으로 오염시킨 *Bacillus cereus* 균수 변화를 48시간 동안 37°C에서 발효한 다음 4°C에서 10일간 냉장 저장 중에 측정하여 종균 접종이 *B. cereus* 증식을 억제하는 효과를 조사하였다. 청국장의 경우 통상 발효 기간이 2~3일로 짧아서 곰팡이들보다 빨리 증식하면서 독소를 생성하는 *B. cereus*가 문제가 되므로 본 실험에서는 *B. cereus* 증식 억제를 주된 목표로 설정하였다(9).

재료 및 방법

청국장 발효에 사용한 종균들

청국장 제조 시 종균으로 접종한 *Bacillus subtilis* EMD4와 *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17은 간장에서 분리한 균주들로 각각 항균능과 향진균능이 우수하다(10,11). *B. amyloliquefaciens* EMD17은 식중독균인 *B. cereus*와 *Listeria monocytogenes*를 포함하여 여러 세균들을 저해하고 또 ochratoxin을 생성하는 *Penicillium* 속 한 균주를 포함해서 식물병을 유발하는 여러 곰팡이들을 강력히 저해한다(11). *B. subtilis* EMD4와 *B. amyloliquefaciens* EMD17은 Luria Bertani broth(LB, BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 접종하여 37°C에서 진탕배양(150 rpm) 하였다. *Bacillus cereus* ATCC14579도 LB 배지에서 진탕배양 하였다.

청국장 제조

함양농협에서 구입한 국내산 콩(2012년산)을 선별한 다음 300 g을 1 L 비커에 담은 후 70% 에탄올로 3분간 처리하여 표면을 살균하였다. 에탄올을 따라내고 증류수로 3회 세척한 다음 3차 증류수 600 mL를 넣고 실온에서 18시간 콩을 불렸다. 물을 따라낸 후 고압멸균기에서 121°C, 50분간 열처리하였다. 냉각 후 콩에 미리 배양한 균주들을 콩 중량의 2%(v/w)가 되게 6 mL를 접종하였다. *B. amyloliquefaciens* EMD17(EMD17)과 *B. subtilis* EMD4(EMD4)의 배양액(LB) 6 mL씩을 각각 접종하였다(단일 종균 접종 시료들). 또 다른 콩 시료 300 g에는 두 균주를 1:1(v/v)로 각각 3 mL씩 함께 접종하였다(EMD17+EMD4, 혼합종균 접종 시료). 별도로 나토균주인 *Bacillus subtilis* KACC16450 배양액 6 mL를 콩 300 g에 접종하여 대조구로 하였다(Natto). 총 4종류의 콩 시료들과 배양액을 잘 섞은 후 직사각형 plastic 용기에 담아 37°C 배양기에서 48시간 동안 발효하였다. 종균에 의한 *B. cereus* 증식 억제를 조사하기 위해서 별도로 한 세트의 시료들을 제조하였다. 이들의 경우 콩 300 g씩에 종균들을 접종할 때 *B. cereus* ATCC14579 배양액도 시료당 2%(v/w)인 6 mL를 함께 접종하였다. 총 8종류 시료들을 37°C에서 배양하였다. 발효 0, 6, 12, 18, 24, 36 및 48시간에 10 g씩을 회수하여 분석하였다. 발효가 완료된 직후 4°C 냉장고에서 10일간 저장하면서 저장 2, 5, 10일차에 시료를 취하여 조사하였다.

청국장 발효 중 pH 변화

청국장 발효와 냉장 보관 중 시료를 취하여 pH를 측정하였다. 청국장 10 g을 취하여 아래 생균수 측정 시와 동일하게 균질액을 얻은 후 pH meter로 측정하였다.

청국장 발효 중 생균수 변화

생균수 측정을 위해서는 청국장 시료 10 g을 취하여 0.1% peptone 수 90 mL와 섞은 후 Stomacher(Seward, West Sussex, UK)를 사용하여 균질화하였다. 균질액 1 mL를 취해서 10배씩 10^{-7} 까지 단계 희석한 다음 희석액 0.1 mL씩을 LB 한천배지에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 다음 균락들을 계수하고 희석배율을 곱하여 생균수를 구하였다. 시료당 3반복하여 평균값으로 나타내었다. 청국장 시료들에서 *B. cereus* 검출을 위해서는 *B. cereus* 선택배지인 Mannitol Egg Yolk Polymyxin(MYP, Neogen, Lansing, MI, USA) 배지를 사용하였다.

청국장 발효 중 혈전용해능 측정

발효 중 6~12시간 간격으로 그리고 냉장 저장 중 2, 5, 10일에 청국장 10 g씩을 취하여 0.1% peptone 수 90 mL와 섞은 후 Stomacher를 사용하여 균질화하였다. 균질액을 원심분리 하여 얻은 상등액을 -70°C에 보관 후 혈전용해능은 추후 측정하였다. 혈전용해능은 fibrin plate 방법을 사용하

여 측정하였고 사람의 plasmin(P1867, 2 u/mg, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 대조구로 사용하였다(12). 상등액 20 µL를 fibrin plate에 spot 하고 동일 plate에 plasmin을 농도별(1~40 mU)로 spot 한다. 37°C에서 12시간 배양 후 분해환들의 크기를 측정하여 plasmin 표준곡선을 얻었다. 시료의 혈전용해능은 표준곡선을 이용해서 역가를 계산하였다. 모든 측정은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

청국장 발효 중 항산화능 측정

발효 중 6~12시간 간격으로 얻은 청국장 시료를 동결건조(FDU-1200; Eyela, Tokyo, Japan) 하여 얻은 분말을 막자사발을 이용하여 곱게 분쇄하였다. 분말 1 g을 80% 에탄올 10 mL에 넣고 60°C 수조에서 2시간 진탕하였다. Whatman No. 2 filter paper(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)로 여과한 여액을 항산화 활성 측정용 시료로 사용하였다. Total polyphenolic compounds 함량 측정과 항산화능을 보여주는 지표들인 DPPH radical scavenging activity, ABTS radical cation-decolorization assay 및 ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay들은 앞서 기술한 방법들을 사용하여 수행하였다(13).

청국장 발효 중 protease 역가 측정

동결건조 한 청국장 분말 1 g을 멸균수 20 mL와 섞은 후 30°C 수조에서 4시간 진탕하였다. 그 후 4°C에서 11,000×g, 30분간 원심분리(Supra 22K, Hanil Sci. Indus., Incheon, Korea) 하고 상등액을 Whatman No. 2 filter paper(GE Healthcare)로 여과한 여액에 대해 protease 역가를 측정하였다(14,15). Casein(C3400, Sigma-Aldrich Co.)을 0.4 M lactic acid(pH 3.0), 0.5 M sodium phosphate(pH 6.0) 그리고 0.2 M McIlvaine buffer(pH 8.0)에 녹여서 각각 acid protease, neutral protease 및 alkaline protease 역가를 측정하였다. 여액 100 µL를 casein 1 mL 및 0.01 M CaCl₂ 20 µL와 섞어서 37°C 수조에 15분간 둔 후 5% trichloroacetic acid 2 mL를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음 여과하였다. 여액 1.0 mL에 0.5 M NaOH 2 mL와 Folin-Ciocalteu 시약 0.1 mL를 첨가하여 실온에서 10분간 둔 후 660 nm 흡광도를 Libra S32 PC spectrophotometer(Biochrom, Cambridge, UK)를 사용하여 측정하였다. Protease 역가 측정은 해당 조건하에서 1 µM tyrosine에 해당하는 색을 1분에 띠게 하는 효소 양을 1 unit으로 정의하였다.

결과 및 고찰

종균으로 사용한 균주들

청국장 제조에 종균으로 접종한 *B. subtilis* EMD4와 *B. amyloliquefaciens* EMD17은 간장에서 분리한 균주들로 각각 향균능과 향진균능이 우수하다(10,11). *B. subtilis*

EMD4는 식중독균인 *B. cereus*와 *L. monocytogenes* 증식을 강력히 억제하고 *Bacillus thuringiensis* 증식도 억제한다(10). *B. amyloliquefaciens* EMD17은 *B. subtilis* EMD4에 의해 억제되는 세균들 외에 곰팡이들도 다수 억제한다. 증식이 억제되는 곰팡이들에는 ochratoxin 생성 *Penicillium* 균주와 여러 식물체에서 병을 유발하는 곰팡이 4종이 포함된다(11). *B. subtilis* EMD4는 3.5 kDa 크기의 박테리옴신을 생산하고 *B. amyloliquefaciens* EMD17은 surfactin을 생산하지만 두 균주는 서로의 증식은 억제하지 않아 종균으로 함께 사용하기에 적합하다.

청국장 발효 중 pH 변화

선발된 종균들을 접종하여 제조한 청국장을 37°C에서 48시간 발효하면서 6~12시간 간격으로 채취한 시료와 발효 후 4°C에서 저장하면서 2, 5, 10일 간격으로 채취한 시료들의 pH를 측정하였다(Fig. 1). *B. amyloliquefaciens* EMD17을 단독으로 2% 접종한 청국장은 접종 직후 pH 6.7에서 초기 발효 중 pH가 감소하여 18시간에 6.5로 되고 이후에는 완만히 증가하여 48시간에 7.1에 도달하였다. 4°C에서 10일간 저장 중에는 큰 변화 없이 유지되었고 저장 10일에 7.3을 나타내었다. *B. subtilis* EMD4 단독 접종 청국장은 발효 6시간에 최저값을 보이고 이후에는 완만히 증가하여 48시간에 7.5를 나타내었다. 냉장 저장 중에는 큰 변화를 보이지 않았다. EMD17과 EMD4를 1:1로 접종한 청국장의 pH 변화는 두 균주 단독 접종한 경우들의 중간치를 보였다. 한편 나토균주인 *B. subtilis* KACC16450을 접종한 청국장의 pH는 12시간까지 낮아져서 12시간에는 다른 청국장들보다 낮은 값을 나타내었다. 12시간 이후로는 pH가 빨리 상승하여 48시간에는 청국장 시료 중 가장 높은 pH 7.6을 나타내었다. 나토균주를 접종한 발아콩 청국장의 경우도 발효 12시간에 다른 균주를 접종한 청국장들보다 낮았다는 보고도 있으나 본 연구 결과와는 달리 시간이 지나도 발아콩 청국장의 pH가 많이 증가하지는 않았다(14). *B. cereus*를 종균과 함께 접종한 청국장들의 pH 변화도 기본적으로 종균만 접종한 청국장들과 같았다. 다만 초기에 pH 강하 정도는 종균만 접종한 청국장들보다 조금 더 큰 특징을 보였다. 나토균주와 *B. cereus*를 함께 접종한 청국장의 12시간 pH가 5.9로 청국장들 중 가장 낮았으나 이후에는 급속히 증가하여 48시간에 pH가 7.7이었다. 48시간대 pH 값은 *B. cereus*를 오염시킨 청국장들이 종균만 접종한 청국장들보다 높았고 이는 냉장 저장 중에도 유지되었다.

청국장 발효 중 pH 변화는 주된 균총을 구성하는 미생물들이 생성하여 청국장에 축적하는 대사물들의 종류와 양에 의해 일어난다. 종균을 사용하지 않는 자연발효의 경우 유산균 같은 산 생성균들이 생성한 젖산이나 초산 등 유기산들에 의해 발효 초기(6~12시간) pH는 낮아지고 적정산도는 증가한다. 그러나 이후 bacilli들 숫자가 증가하면서 bacilli들이 생성하는 암모니아와 아민류들에 의해 청국장의 pH는 높아

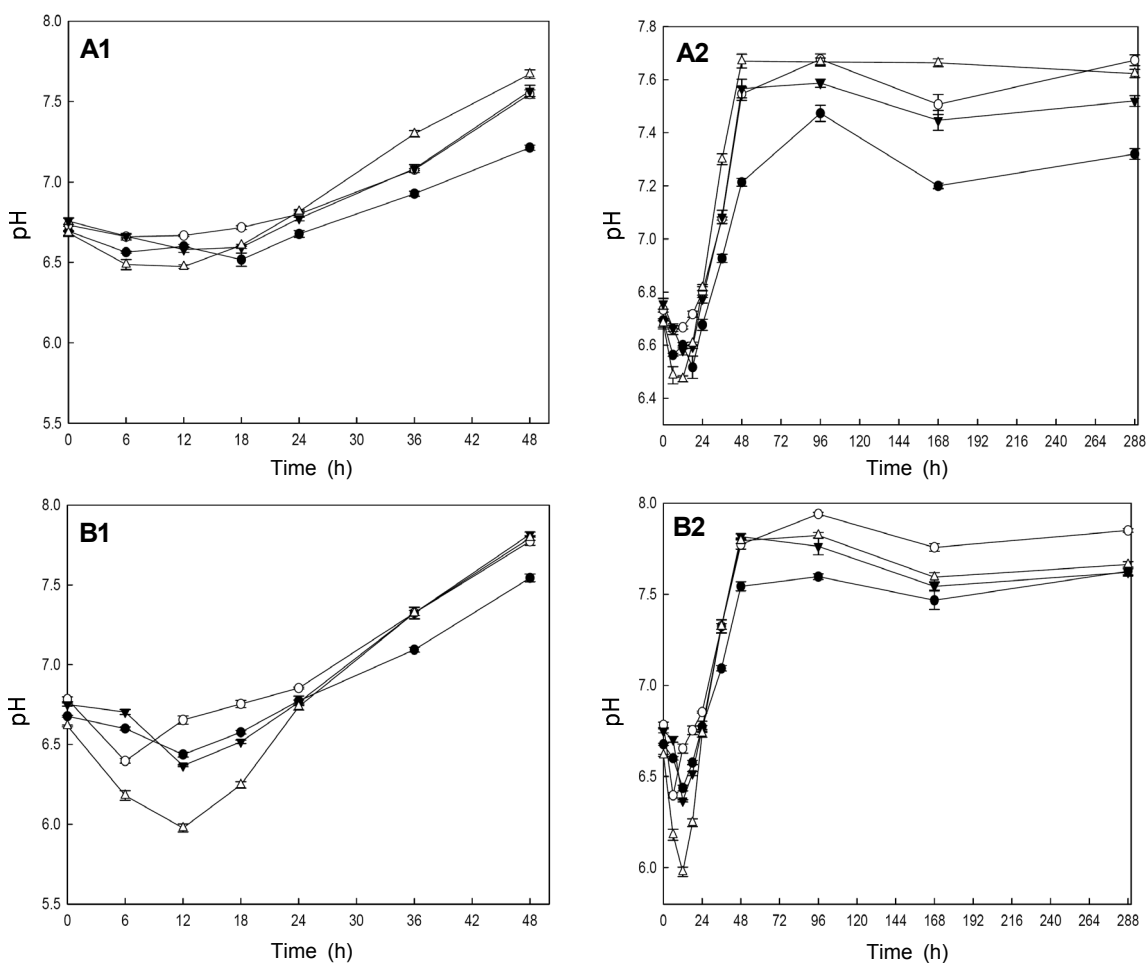


Fig. 1. Change in pH of *cheonggukjang*. A1, *cheonggukjang* samples were fermented at 37°C for 48 h after inoculated with different *Bacillus* strains. A2, *cheonggukjang* samples were stored at 4°C for 10 days after fermentation. B1, same as A1 except all *cheonggukjang* samples were spiked with *B. cereus* ATCC14579. B2, same as A2 except all *cheonggukjang* samples were spiked with *B. cereus* ATCC14579. ●, *B. amyloliquefaciens* EMD17; ○, *B. subtilis* EMD4; ▼, EMD17+EMD4 (1:1, v/v); △, *B. subtilis* (natto) KACC16450.

지고 적정산도는 감소한다(13). 본 실험에서는 종균인 bacilli 균주들 간 대사 생성물 차이가 pH 차이를 나타낸 것으로 보인다. *B. subtilis* KACC16450이나 *B. cereus* 같이 발효 초기에 산성 대사물을 많이 생성하는 균주들을 접종한 청국장들의 pH는 떨어지지만 이후 혐기성 화합물들의 생성량이 증가하면서 pH는 상승한 것으로 보인다.

청국장 발효 중 생균수 변화

청국장 발효 중 생균수 변화를 측정하였다(Fig. 2). 총 bacilli 균수는 시료 균질액 희석액을 LB 한천배지에 도말하여 얻은 균수로 구하였고, *B. cereus* 생균수는 MYP 한천배지에서 자라는 노란색 균락들을 계수하여 구하였다. 종균만 접종한 청국장들 모두에서 총 bacilli 균수는 처음 6시간 동안 급속히 증가하고 이후로는 완만히 증가하여 접종 직후 $10^6 \sim 10^7$ CFU/g에서 48시간에 10^{10} CFU/g 이상으로 증가하여 1,000배 이상 균수가 증가하였다(Fig. 2-A1). 10일간 냉장 저장 중에도 생균수는 큰 증감 없이 일정하게 유지되었다

(Fig. 2-A2). 한편 *B. cereus* 생균수는 접종한 종균에 따라 차이가 커서 EMD17과 EMD4를 1:1로 접종한 청국장은 초기 10^6 에서 계속 감소하여 12시간 이후에는 검출되지 않았고 이는 10일간의 냉장 중에도 마찬가지였다(Fig. 2-B2). EMD17을 접종한 청국장에서 처음 6시간은 *B. cereus*가 증가하여 6시간에 6.5×10^6 CFU/g에 달하였지만 이후 급속히 감소하여 12시간 이후로는 검출되지 않았다. EMD4 접종 청국장의 경우 발효 12시간까지 증가하여 12시간에 최대인 3×10^7 CFU/g이고 이후 완만히 감소하나 48시간에도 최초 접종량보다 많은 수를 유지하였다. 하지만 냉장 저장 중 감소하여 저장 10일에는 검출되지 않았다. 반면 나토균주를 접종한 청국장에서 *B. cereus*는 저해를 받지 않고 48시간 후에도 1×10^8 CFU/g을 유지하며 저장 10일에도 이 수준을 유지하였다(Fig. 2-B2). 한편 항균력과 항진균력을 각각 지닌 *B. subtilis* W42와 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4 균주를 단독으로 혹은 1:1(v/v)로 함께 접종한 청국장들의 경우 종균과 함께 접종한 *B. cereus* ATCC11778(1×10^5 CFU/g

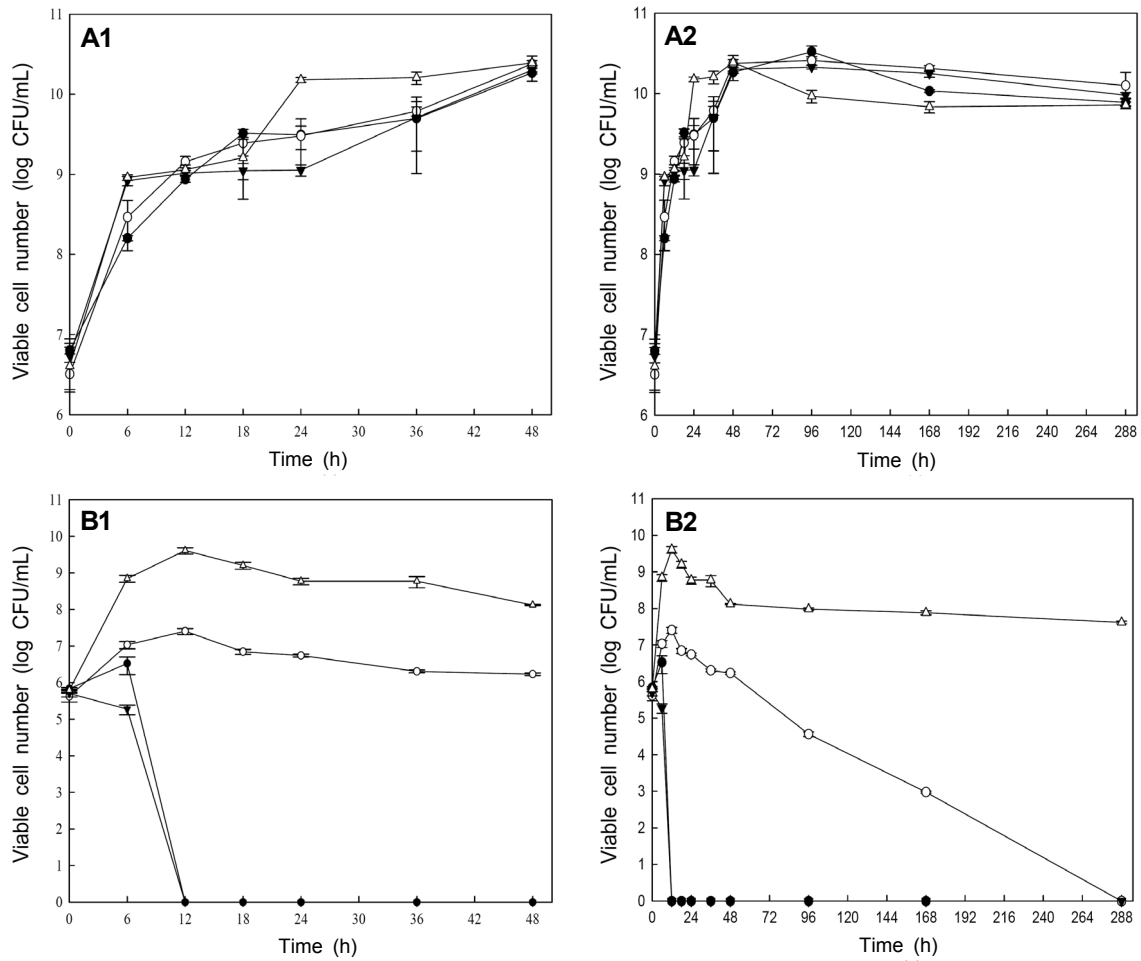


Fig. 2. Changes in the viable cell numbers of *cheonggukjang*. A1, total bacilli counts during *cheonggukjang* fermentation at 37°C for 48 h. A2, total bacilli counts during storage at 4°C for 10 days after fermentation. B1, *B. cereus* counts during *cheonggukjang* fermentation at 37°C for 48 h. Samples were spiked with *B. cereus* ATCC14579. B2, *B. cereus* counts during storage of *cheonggukjang* at 4°C for 10 days after fermentation. Samples were spiked with *B. cereus* ATCC14579. ●, *B. amyloliquefaciens* EMD17; ○, *B. subtilis* EMD4; ▼, EMD17+EMD4 (1:1, v/v); △, *B. subtilis* (natto) KACC16450.

대두) 균수를 조사한 결과 72시간 발효 중 점진적으로 그 수가 감소하였지만 완전한 저해는 관찰되지 않았다(13). *B. subtilis* W42와 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4를 1:1로 접종한 청국장에서 *B. cereus* 저해가 가장 컸지만 발효 72시간에 *B. cereus*는 10^3 CFU/g 이상 여전히 검출되었다(13). 이와 비교할 때 *B. amyloliquefaciens* EMD17에 의한 *B. cereus* 저해는 매우 효과적임을 알 수 있다. 따라서 *B. cereus* 저해가 주목적이라면 *B. amyloliquefaciens* EMD17이 종균으로서는 최적으로 생각된다. *B. subtilis* EMD4는 agar well diffusion 방법에 의해서는 *B. cereus* 증식을 효과적으로 억제하였지만 실제 청국장 발효에서는 효과가 EMD17에 크게 못 미침을 확인하였다. 이는 청국장 발효 환경과 한천배지 상에서의 조건이 다르기 때문으로 보인다. 항균력 검증을 위해 흔히 사용되는 agar well diffusion 혹은 gel overlay 방법에 의해 항균력이 확인된 균주들도 실제 발효식품에서 효과가 있는지는 직접 발효에 사용하여 확인할 필요가 있다.

청국장 발효 중 혈전용해능 변화

혈전용해능은 모든 청국장에서 발효 48시간까지 증가하였고 저장 중에도 완만히 증가하여 저장 5일(168 h)에 최고에 도달한 다음 그 후로 감소하였다(Fig. 3). *B. amyloliquefaciens* EMD17을 접종한 청국장과 *B. amyloliquefaciens* EMD17과 *B. subtilis* EMD4를 함께 접종한 청국장들이 발효 48시간 혈전용해능이 가장 높았다. 나토균주를 접종한 청국장이 다음이고 가장 낮은 것은 EMD4를 접종한 청국장이었다. 나토균주 접종 청국장의 혈전용해능은 냉장 저장 중 계속 증가하여 저장 5일차인 168시간에 가장 높았고 다음이 EMD17 접종 청국장이었다. 발효와 저장 전 기간을 통해 이 시간대 혈전용해능이 가장 높았고 이후로는 완만히 감소하지만 저장 10일에도 여전히 높은 수준의 혈전용해능을 보였다. 혈전용해효소들 중 가장 잘 알려진 대표적인 효소가 *B. subtilis* 나토균주가 생성하는 nattokinase이다(16). Nattokinase와 매우 유사한 아미노산 서열을 지닌 혈전용해효소들이 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. li-*

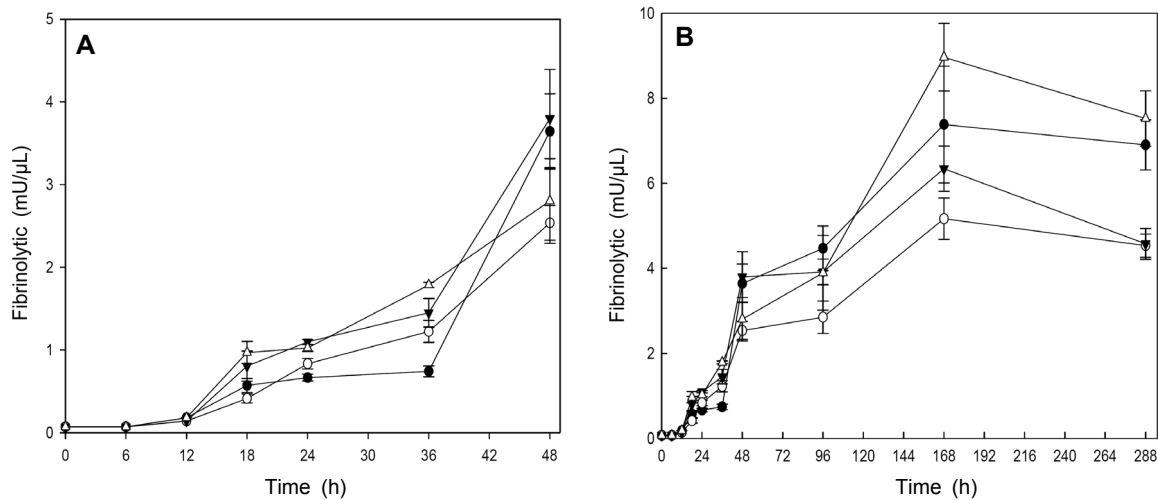


Fig. 3. Changes in the fibrinolytic activities of *cheonggukjang*. A, *cheonggukjang* samples were fermented at 37°C for 48 h after inoculated with different *Bacillus* strains. B, *cheonggukjang* samples were stored at 4°C for 10 days after fermentation. ●, *B. amyloliquefaciens* EMD17; ○, *B. subtilis* EMD4; ▼, EMD17+EMD4 (1:1, v/v); △, *B. subtilis* (natto) KACC16450.

cheniformis 균주들로부터 분리되며 이들은 subtilisin 계열의 serine protease들로 일반적인 protease들과 비교 시 fibrin에 대한 기질 특이성이 높은 차이점을 보인다(17). 이들의 최대 역가는 *Bacillus* 생육에서 흔히 대수기보다는 정상기에서 나타나며 정상기에서 *Bacillus* 세포의 protease 생산은 이 시기의 *Bacillus* 세포 내에서 일어나는 여러 변화들, 항균물질 생산, 포자 형성, competence 상태 등과 밀접하게 연결되어 있는 것으로 밝혀지고 있다(18).

청국장 발효 중 항산화능 변화

청국장의 총 페놀성 화합물 함량은 발효가 진행될수록 조금씩 증가하는 경향을 보인다(Table 1). EMD17을 접종한 청국장은 발효 24시간에 38.33 mg/g GAE(gallic acid equivalent), EMD4 접종 청국장은 36시간에 최대치인 41.08 mg/g GAE를 보이고 1:1 공동 접종 청국장과 나토균주 접종 청국장도 24시간에 최대값인 47.50 mg/g GAE와 48.00 mg/g GAE를 나타내었다. 나토균주를 접종한 청국장이 가장 높은 값을 보이고 저장 10일에도 타 청국장들보다

높은 값인 46.17 mg/g GAE를 나타내었다. 발효가 진행되면서 콩으로부터 유리되어 나오는 페놀성 화합물 양이 증가하고 증가 정도는 균주의 효소역가와 관련되어 있다. 본 실험의 청국장 시료들의 총 페놀성 화합물 함량은 *B. subtilis* W42와 *B. amyloliquefaciens* MJ1-4 균주를 단독으로 혹은 1:1(v/v)로 접종한 청국장들에서 얻은 값들과 대체로 일치하였다(13).

청국장 발효 중 청국장들의 DPPH radical scavenging activity는 발효가 진행될수록 증가하나 냉장 저장 중 다시 감소하였다(Table 2). EMD17 접종 청국장은 최초 65.03%에서 발효 24시간에 82.51%까지 증가하나 이후 감소하고 냉장 저장 10일에는 60.08%였다. EMD4 접종 청국장은 최초 66.70%에서 36시간에 71.02%로 약간 증가하나 냉장 저장 중 감소하여 10일에 44.63%로 감소하였다. 공동접종 청국장은 처음 54.99%에서 24시간에 85.53%로 증가하고 이후 감소하여 저장 10일에는 55.43%를 나타내었다. 나토균주 접종 청국장의 경우 최초 61.06%에서 48시간에 73.93%로 증가하고 저장 10일에는 59.19%를 나타내었다. ABTS

Table 1. Changes in total phenolic compounds of *cheonggukjang*

Time (h)	Total phenolics content (mg/g GAE ¹⁾)			
	EMD17	EMD4	EMD17+EMD4	Natto
0	20.58±1.38	36.75±1.95	20.17±1.77	42.50±1.25
6	26.08±1.53	21.58±1.04	24.08±0.58	37.17±0.76
12	37.42±1.51	26.17±0.58	40.83±0.38	34.25±1.95
18	38.01±1.88	23.21±1.12	46.02±2.04	42.42±0.24
24	38.33±0.58	21.17±1.28	47.50±1.00	48.00±1.52
36	31.42±3.36	41.08±1.44	45.75±1.15	32.17±1.02
48	14.83±1.51	12.25±0.90	38.17±2.16	31.50±1.15
96	33.25±2.05	25.08±1.01	25.17±1.91	33.17±2.02
168	39.58±1.53	22.92±1.01	22.00±1.50	29.67±0.63
288	16.58±1.26	16.50±1.00	28.00±1.15	46.17±0.95

¹⁾Gallic acid equivalent.

Table 2. Changes in the DPPH assay of *cheonggukjang*

Time (h)	DPPH radical scavenging activity (%)			
	EMD17	EMD4	EMD17+EMD4	Natto
0	65.03±0.44	66.70±0.78	54.99±3.99	61.06±1.19
6	62.60±2.26	61.25±0.92	61.61±1.80	63.24±5.25
12	79.93±1.22	67.86±1.13	82.44±1.67	65.43±1.41
18	80.39±1.25	61.18±2.25	84.79±1.82	66.01±0.89
24	82.51±1.19	54.27±1.77	85.53±1.33	66.44±0.81
36	71.39±2.32	71.02±0.69	76.08±0.70	63.64±0.55
48	60.34±1.55	49.61±1.62	72.48±1.96	73.93±3.07
96	77.42±0.89	70.01±1.82	55.39±2.25	64.44±0.37
168	82.37±1.54	50.30±2.90	51.18±1.40	65.79±1.77
288	60.08±4.62	44.63±1.25	55.43±1.66	59.19±0.97

Table 3. Changes in the ABTS assay of *cheonggukjang*

Time (h)	ABTS radical scavenging activity (%)			
	EMD17	EMD4	EMD17+EMD4	Natto
0	72.62±0.14	75.16±0.29	70.27±0.60	78.62±0.52
6	74.83±0.30	74.21±0.29	72.33±0.38	80.31±0.58
12	82.47±0.68	80.79±0.51	77.09±0.25	84.63±0.50
18	79.92±0.22	76.27±1.69	81.75±0.74	86.26±0.36
24	78.53±0.29	64.70±0.90	84.77±0.68	87.24±0.33
36	75.17±0.36	80.31±0.58	81.17±0.30	88.90±0.58
48	71.66±1.02	70.65±1.20	83.96±1.53	86.84±0.30
96	80.79±0.98	83.09±0.79	72.14±1.34	84.20±0.30
168	86.98±0.22	69.69±0.36	69.21±0.36	84.20±0.22
288	73.82±0.58	65.56±0.29	73.01±0.36	93.13±0.42

radical cation-decolorization assay 측정 결과(Table 3)도 역가는 발효 중 완만하게 상승하다 발효 후 저장 중에는 완만하게 감소하였다. EMD4보다는 EMD17 접종 청국장의 역가가 높았고 나토균주 접종 청국장의 역가가 발효와 저장 중 가장 높게 나왔다. FRAP assay 측정 결과(Fig. 4) 발효 중에는 EMD17과 EMD4 접종 청국장들 간 별 차이가 없었

고 48시간에는 EMD17 청국장이 높았으며 이후 저장 중에는 EMD17 접종 청국장의 역가가 높게 유지되었다. 저장 5일차에 가장 차이가 컸다. EMD4 접종 청국장은 발효 36시간과 저장 2일에(96 h) 가장 높은 역가를 보였다. EMD17과 EMD4를 함께 접종한 청국장은 37°C 발효 중 가장 높은 역가를 보였다.

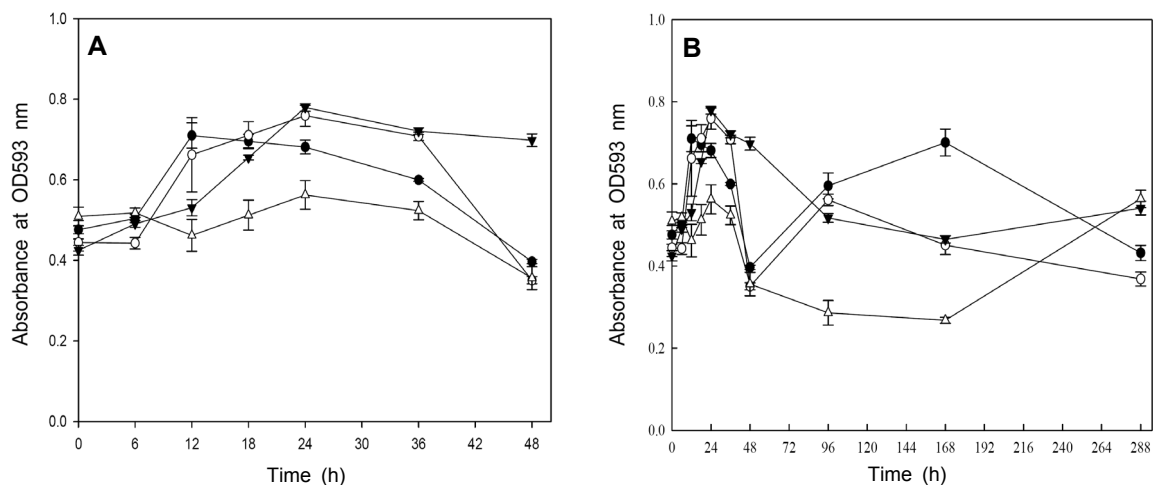


Fig. 4. Changes in the FRAP assay of *cheonggukjang*. A, *cheonggukjang* samples were fermented at 37°C for 48 h after inoculated with different *Bacillus* strains. B, *cheonggukjang* samples were stored at 4°C for 10 days after fermentation. ●, *B. amyloliquefaciens* EMD17; ○, *B. subtilis* EMD4; ▼, EMD17+EMD4 (1:1, v/v); △, *B. subtilis* (natto) KACC16450.

청국장 발효 중 protease 역가 변화

장류 발효 중 곰팡이들과 bacilli가 분비하는 protease들에 의해 콩 단백질이 가수분해되어 저분자량의 펩타이드들과 아미노산들이 생성된다. 펩타이드들과 아미노산들은 인

체 소화관 내에서 쉽게 흡수되어 발효대두식품의 영양가를 높여주며, 또한 쓴맛과 단맛을 부여하여 장류의 풍미를 증진한다. 생성되는 펩타이드들 중에는 항종양, 항고혈압, 혈전 용해능과 같은 기능성들을 지닌 종류들도 있어 발효식품의

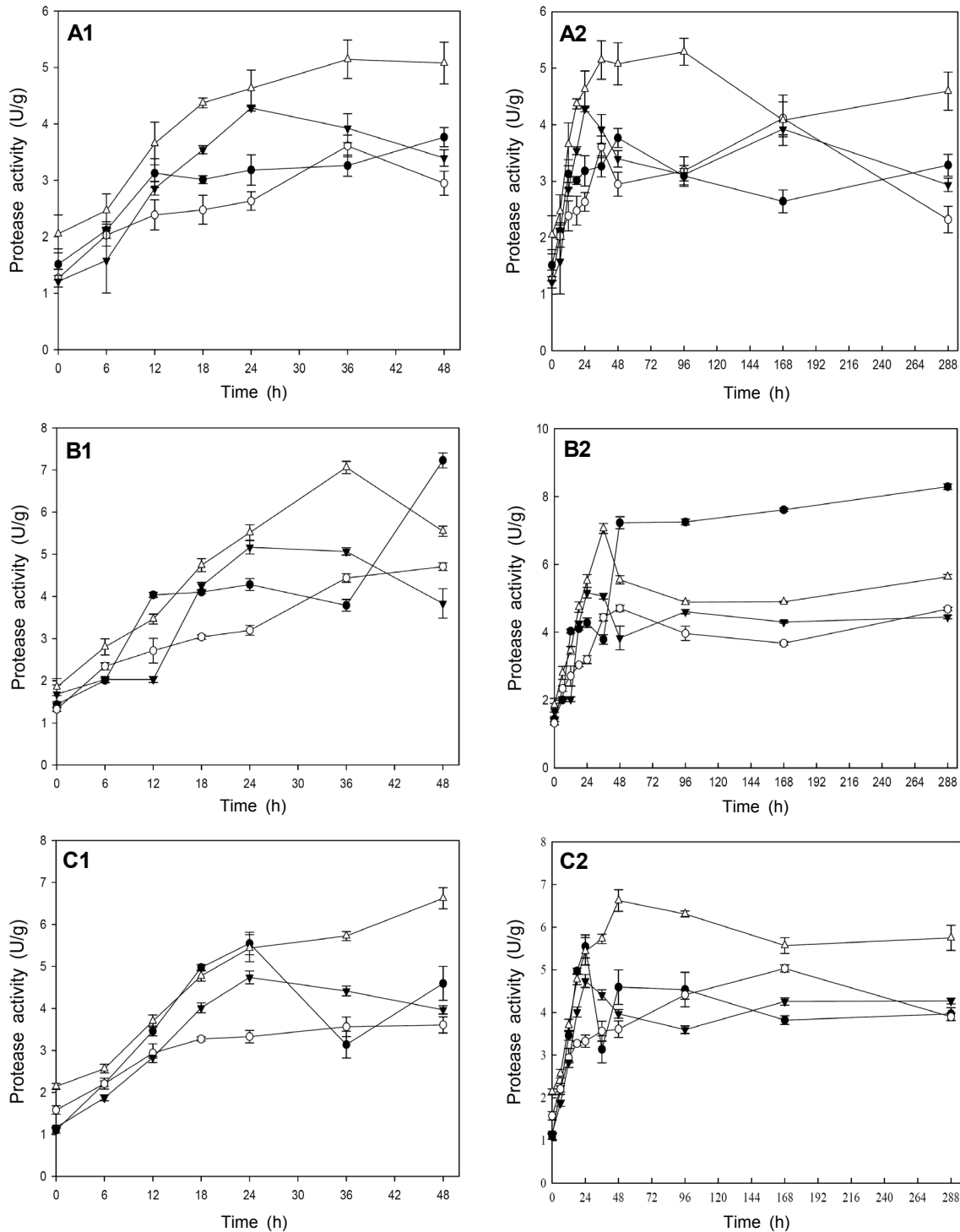


Fig. 5. Changes in the proteases activities of *cheonggukjang*. A, acid protease; B, neutral proteases; C, alkaline proteases. 1, *cheonggukjang* samples were fermented at 37°C for 48 h after inoculated with different *Bacillus* strains. 2, *cheonggukjang* samples were stored at 4°C for 10 days after fermentation. ●, *B. amyloliquefaciens* EMD17; ○, *B. subtilis* EMD4; ▼, EMD17+EMD4 (1:1, v/v); △, *B. subtilis* (natto) KACC16450.

가능성도 높게 된다(19,20). 대두발효와 관련하여 종균에 바람직한 효소들로는 amylase, protease, α -galactosidase, β -glucosidase 등이 있다. 이들 효소들은 대두제품 섭취 시 소화를 도와주거나 혹은 기능성 제고와 관련되어 있어서 가능한 이들 효소역가가 높은 균주들이 종균으로 바람직하다. 청국장의 protease 활성을 측정한 결과 중성 protease 역가가 전반적으로 높았고 다음이 염기성 protease 이고 산성 protease 활성이 가장 낮았다(Fig. 5). 산성 protease 활성은 나토균주 접종 청국장이 발효와 저장 중 가장 높았고 중성 protease 역가는 발효 36시간까지는 나토균주 접종 청국장이 높았으나 이후로는 EMD17 청국장이 가장 높았다. 발효 48시간에 EMD17 청국장은 7.2 U/g이고 냉장 저장 중 완만히 증가하여 10일에는 8.1 U/g을 나타내었다. 나토균주 접종 청국장은 발효 48시간과 저장 10일에 각각 5.8과 5.7 U/g을 그리고 EMD4 접종 청국장은 해당 시간대에 각각 4.8과 4.9 U/g이었다. 염기성 protease 역가는 발효 중에는 나토균주 접종 청국장이 가장 높았고 EMD17 접종 청국장이 다음이고 냉장 저장 중에는 나토균주 접종 청국장이 가장 높았다.

이상 결과들을 고려할 때 *B. amyloliquefaciens* EMD17과 *B. subtilis* EMD4 균주는 청국장에 종균으로 접종할 경우 *B. cereus* 증식을 억제함을 알 수 있고, 특히 *B. amyloliquefaciens* EMD17의 저해 효과가 매우 뛰어났다. 두 균주를 1:1(v/v)로 함께 접종한 경우 *B. cereus* 저해에서 상승 효과가 확인되었다. 본 실험의 경우 청국장 제조 시 일반적으로 오염되는 *B. cereus*보다 훨씬 더 많은 수를 인위적으로 오염시킨 점을 고려할 때 종균들, 특히 *B. amyloliquefaciens* EMD17의 저해능이 월등함을 알 수 있다. 현재 장류 제품들에서 허용되는 *B. cereus* 균수는 1×10^4 CFU/g으로 본 실험에서 오염시킨 균수의 1%에 불과하다(9). 따라서 *B. amyloliquefaciens* EMD17을 종균으로 접종할 경우 *B. cereus* 오염은 일어나지 않을 것이다. 청국장은 발효 및 저장 기간이 짧아서 곰팡이 오염 가능성은 세균보다는 적지만 곰팡이 오염이 일어날 경우에도 *B. amyloliquefaciens* EMD17이나 *B. subtilis* EMD4에 의해 증식이 저해될 가능성이 크다. *B. amyloliquefaciens* EMD17을 혈전용해능이나 γ -PGA 생산과 같은 기능성이 우수한 다른 균주들과 함께 종균으로 사용한다면 *B. cereus*나 곰팡이 오염으로부터 더욱 안전하면서 동시에 기능성도 향상된 청국장 제조가 가능할 것이다.

요 약

유해균인 *Bacillus cereus*와 독소 생성 곰팡이 증식 억제 능력을 지닌 *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17(EMD17)과 *Bacillus subtilis* EMD4(EMD4)를 단독 혹은 1:1로 대두에 접종하여 청국장을 제조하였다. 대조구로는 나토균주로 알려진 *Bacillus subtilis* KACC16450 균을 접종한 청국장

을 제조하였다. *B. amyloliquefaciens* EMD17 접종 청국장에서는 오염시킨 *B. cereus* 증식이 즉시 억제되어 37°C 발효 12시간에 검출되지 않았다. EMD4 접종 청국장에서도 *B. cereus* 증식 억제가 관찰되었으나 억제 정도는 약했다. 48시간 발효 후 청국장 시료들은 4°C에서 10일간 저장하였고 *B. cereus*는 EMD4 접종 청국장에서 검출되지 않았다. 그러나 대조구에서는 상당수 *B. cereus* 균수가 유지되었다. 청국장의 pH 값은 시료 간 유의차가 없었고 혈전용해능은 발효 중에는 EMD17을 접종한 청국장이 그리고 저장 중에는 나토균주를 접종한 것이 높았다. 총 페놀성 화합물도 나토균주 청국장에서 높았다. 이상 결과들에서 *B. amyloliquefaciens* EMD17 같은 균주들을 종균으로 사용함으로써 청국장에서 *B. cereus* 억제가 가능함을 알 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2012년 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술 개발과제 (112066-3)로 지원받아 수행하였습니다. 이재용, 심재민, 이강욱은 교육부의 BK21 Plus program 지원을 받았습니다. 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim SH, Yang JL, Song YS. 1999. Physiological functions of *chongkukjang*. *Food Industry and Nutrition* 4(2): 40-46.
- Mann SY, Kim EA, Lee GY, Kim RU, Hwang DY, Son HJ, Kim DS. 2013. Isolation and identification of GABA-producing microorganism from *Chungkookjang*. *J Life Sci* 23: 102-109.
- Chang PK, Ehrlich KC. 2010. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*?. *Int J Food Microbiol* 138: 189-199.
- Shin DH. 2006. Globalization of Korean fermented soybean products. *Food Industry and Nutrition* 11(2): 19-24.
- Galvez A, Lopez RL, Abriouel H, Valdivia E, Omar NB. 2008. Application of bacteriocins in the control of food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 28: 125-152.
- Jordan K, Dalmasso M, Zentek J, Mader A, Bruggeman G, Wallace J, De Medici D, Fiore A, Prukner-Radovic E, Lukac M, Axelsson L, Holck A, Ingmer H, Malakauskas M. 2014. Microbes versus microbes: control of pathogens in the food chain. *J Sci Food Agric* 94: 3079-3089.
- Settanni L, Corsetti A. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 121: 123-138.
- Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 35: 201-232.
- Kim YS, Yun SH, Jeong DY, Hahn KS, Uhm TB. 2010. Isolation of *Bacillus licheniformis* producing antimicrobial agents against *Bacillus cereus* and its properties. *Korean J Microbiol* 46: 270-277.
- Liu X, Lee JY, Jeong SJ, Cho KM, Kim GM, Shin JH, Kim JS, Kim JH. 2015. Properties of a bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* EMD4 isolated from *ganjang* (soy sauce). *J Microbiol Biotechnol* 25: 1493-1501.

11. Lee JY, Shim JM, Yao Z, Liu X, Lee KW, Kim HJ, Ham KS, Kim JH. 2016. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17 isolated from *cheonggukjang* and its potential as a starter for fermented soyfoods. *Food Sci Biotechnol* 25 (In Press).
12. Jeong SJ, Kwon GH, Chun JY, Kim JS, Park CS, Kwon DY, Kim JH. 2007. Cloning of fibrinolytic enzyme gene from *Bacillus subtilis* isolated from *cheonggukjang* and its expression in protease-deficient *Bacillus subtilis* strains. *J Microbiol Biotechnol* 17: 1018-1023.
13. Cho MJ, Lee JY, Kim JH. 2014. Microbial and physiochemical properties of *cheonggukjang* fermented using *Bacillus* strains with antibacterial or antifungal activities. *Food Sci Biotechnol* 23: 1525-1532.
14. Oh HI, Eom SM. 2008. Changes in microflora and enzyme activities of *cheonggukjang* prepared with germinated soybeans during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 40: 56-62.
15. Kim YS, Kwon DJ, Koo MS, Oh HI, Kang TS. 1993. Changes in microflora and enzyme activities of traditional *kochujang* during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 25: 502-509.
16. Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43: 1110-1111.
17. Peng Y, Yang X, Zhang Y. 2005. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 126-132.
18. Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56: 845-857.
19. Chung SW, Choi MA, Park JS, Kim KS, Chung DK, Nam HS, Shin ZI, Yu R. 1999. Effect of dietary soybean hydrolysate on plasma lipid profiles, select biochemical indexes, and histopathological changes in spontaneously hypertensive rats. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1101-1108.
20. Choi SY. 2006. Roles of soy peptide on the Korean traditional fermented foods. *Food Industry and Nutrition* 11(1): 19-26.