

## 신균주 *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 청국장향균활성과 열 및 pH 안정성

김한수  
조선대학교 대학원 보건학과

### The Antimicrobial Activity of Cheonggukjang, Using the New Strain, *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1 Extract and Their Heat and pH Stabilities

Han Soo Kim

Department of Health science Graduate School of Chosun University

**요약** 본 연구의 목적은 대나무 줄기 마디 부분의 표면에서 처음 발견 되었으나, 아직까지는 연구가 미흡한 신 균주 *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1로 발효한 청국장 추출물의 향균 활성을 알아보려고 한다. 청국장 전통 발효 균주인 *Bacillus subtilis* NG24를 대조 균으로 하고, 비교 분석을 실시하였다. 실험 방법은 향균 활성, 최소 억제 농도(MIC)와 열 및 pH 안정성을 측정하였다. 향균 활성 실험 결과, 병원성 6종 균주에서 그람 양성 균주 *C.perfringens*, *S.aureus*와 그람 음성 균주 *A.faecalis*, *E.coli*에서 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1이 *B.subtilis* NG24에 비해 강한 향균 활성을 나타내었다. 최소 억제 농도 실험 결과, *C.perfringens*, *S.aureus*, *A.faecalis*, *E.coli*에서 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1이 *B.subtilis* NG24에 비해 0.01 %, 0.21 %, 0.45 %, 0.29 %의 농도로 억제 효과를 나타내었다. 열과 pH 안정성 실험 결과, *B.subtilis* NG24와 더불어 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 청국장 추출물은 121℃, 15분 간 열처리와 pH 2-10 처리에 의한 안정성에서 활성이 감소하지 않았고, 열과 pH 실험에서 비교적 안정하였다.

**Abstract** This study aims to determine the antimicrobial activity of fermented Cheonggukjang extract using the new Strain, *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1, which was first found on the surface of the node part of bamboo stems, but has been studied very little so far. *Bacillus subtilis* NG24, which is the traditional fermented strain of Cheonggukjang, was selected as the control group and a comparative analysis was performed. The experimental method included measurements of the antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and heat and pH stability. *B. amyloliquefaciens* NBF11-1 had stronger antimicrobial activity than *B. subtilis* NG24 against the gram-positive bacteria, *C. perfringens* and *S. aureus* and the gram-negative bacteria, *A. faecalis* and *E. coli* among the six species of pathogenic bacteria studied. When the minimum inhibitory concentration was measured, *B. amyloliquefaciens* NBF11-1 in *C. perfringens*, *S. aureus*, *A. faecalis*, and *E. coli* had an inhibitory effect at concentrations of 0.01 %, 0.21 %, 0.45 % and 0.29 %, respectively, compared to *B. subtilis* NG24. When the heat and pH stability was measured, *B. subtilis* NG24 and *B. amyloliquefaciens* NBF11-1 Cheonggukjang extract did not show any decrease in activity when held at a temperature of 121℃ for 15 minutes and at pH values ranging from 2 to 10 and were therefore considered to be relatively stable against heat and pH changes

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

\*Corresponding Author : Han Soo Kim(Chosun University)

Tel: +82-10-7788-9474 email: kims2718@naver.com

Received April 11, 2016

Revised (1st May 2, 2016, 2nd May 10, 2016)

Accepted July 7, 2016

Published July 31, 2016

## 1. 서론

최근, 의학과 식품과학 발전과 더불어 식생활 개선 및 건강 지향적인 소비자 욕구에 따라 기존의 화학적 혼합 식품의 사용을 기피하고 합성보존료의 지속적인 사용이 인체에 부작용을 일으킬 수 있는 안정성에 대한 문제를 꾸준히 제기함으로써[1,2], 인체에 무해하고 변패를 억제하며 유통시한을 늘릴 수 있는 천연자원의 식품 이용 개발이 시도되고 있으며, 특히 식물성 한약재를 비롯한 약용식물 유래 항균활성 및 생리활성 물질에 대한 연구가 활발히 진행이 되고 있는 실정이다[3]. 세계보건기구(WHO) 및 국제식량기구(FAO)의 합동전문가위원회에서 2001년에 Probiotics를 ‘살아있는 미생물로 적당한 양을 섭취하면 건강에 유익한 세균을 포함한 식이보충제’라 정의 하였으며[4], Prebiotics는 ‘Probiotics안에서 발효 미생물의 생육을 촉진하는 물질’을 의미한다[5].

대두(Soybean, *Glycine max*)는 우리 민족의 전통적인 식품 원료이며, 각종 영양성분이 풍부한 단백질 급원 식품으로서 식이섬유, 인지질, Iso-flavonoids, saponins, trypsin, inhibitor, 배당체 등의 다양한 생리활성 성분이 함유되어 있다고 알려져 있으며[6,7], 대두 발효 식품 중에 대표적인 청국장장은 된장과 간장, 고추장 등과 함께 오래전부터 행해져 온 가공공정의 일환으로 좋은 발효식품으로 상용되어 왔다. 청국장 발효식품은 맛과 향, 조직감 등을 부여하기 위해서 미생물 작용을 통해 초산 및 젖산, 알코올 발효 과정을 지나 저장성 향상과 필수 아미노산, 단백질, 비타민 및 무기질 등이 풍부한 발효식품이 된다. 또한, 독성물질 파괴 및 생리활성 물질 생산 및 소화증진 등의 효과도 있다[8].

*Bacillus* spp.가 생산하는 가장 보편적인 항생물질인 lipopeptide는 amphiphilic한 특성으로 계면에서의 물리적, 화학적 성질을 변화시킬 수 있어서 소수성 기질의 이용 능력을 향상시키며, 미생물이 표면에 부착 및 탈락하는데 영향을 주기도 한다. 항생물질의 일종인 Surfactin은  $\beta$ -hydroxy fatty acid의 carboxyl group과 heptapeptide의 hydroxyl group이 결합한 구조로, Surfactin을 생산하는 균종에는 *B.subtilis*과 *B.pumilus*, *B.amyloliquefaciens* 등이 있다[9].

전통발효균주로 인정받은 고초균(*Bacillus subtilis*)은 호기성으로 다양한 가수 분해 효소를 생산하며, 이러한 균주를 이용해 발효시켜 제조한 청국장은 대표적인 대두

발효식품으로 발효과정을 거치면서 고초균에 의해 생산되는 단백질 및 탄수화물 기능성 펩타이드, 가수분해효소, 고분자 점질물 등의 생리활성 물질을 포함하고 있다[10]. 이러한 생리 물질은 발효제품의 품질특성에 중요한 영향을 미치며,  $\gamma$ -PGA(Poly- $\gamma$ -glutamic acid)[11]는 미생물 고분자 물질의 일종으로 항균 효과[12], 면역증진 효과, 혈청 콜레스테롤 저하, 동맥경화 예방, 항산화 효과[13], 항암 효과뿐만 아니라, 보습성이 뛰어나 화장품으로도 각광받고 있는 기능성 소재이다[14].

신균주 *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1은 대나무 줄기 표면에서 처음 발견이 되었으며, 16S rDNA 염기서열 구조 분석에 근거하여 분자계통학적 유연관계에 의해 분리된 균주[15]로써 cellulolytic, proteolytic, amyolytic과 lipolytic 효과에 관한 plate 분석 결과에서 식품의 부패와 인체에 병원성을 일으키는 미생물인 *Listeria monocytogenes*와 *Candida albicans*, *Yeast* 등에 대한 항균 효과가 있다고 현재까지는 알려져 있다[16]. 아직까지 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 대한 연구는 거의 없지만, *B.amyloliquefaciens* NBF11-1이 발견된 대나무에 대한 몇몇 보고서에서는 대나무가 항균 효과, 신경보호효과와 면역기능강화, 항산화 효과, 항암 및 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 신균주에 대한 여러 연구는 아직까지 미비한 실정이다. 또한, 혈중 콜레스테롤 저하 및 당뇨 개선 효과[14]가 있는 전통발효균주인 *B.subtilis* NG24와 염기서열 구조분석에 근거하여 유연관계에 있는 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 균주를 이용하여 발효한 청국장장이 병원성 균주들에서 항균활성, 최소 억제농도와 열 및 pH 안정성에 어떠한 특성을 나타내는지에 대한 비교 실험의 결과는 아직은 알 수가 없다.

따라서 본 실험에서는 대나무 줄기의 마디부분의 표면에서 발견된 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 청국장 추출물을 실험균으로 하고, 청국장 발효의 대표적인 균주로 알려진 *B.subtilis* NG24를 이용한 청국장 추출물을 대조균으로 정하여 항균 활성, 최소억제농도를 비교분석하고, 열 및 pH 안정성도 함께 조사해 봄으로써 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효한 청국장의 기능성을 확인할 수 있는 기초자료로 사 용함을 목적으로 한다.

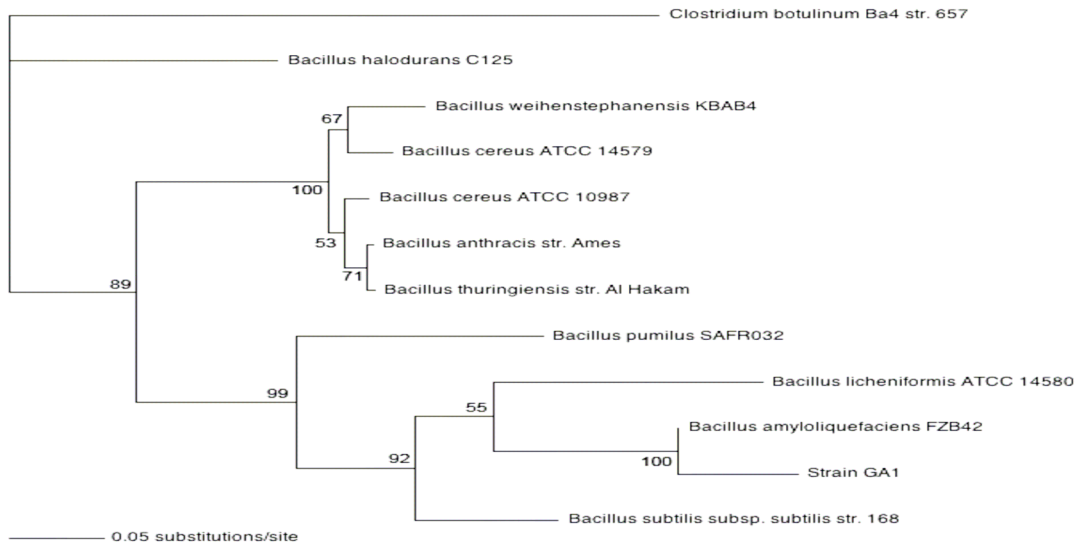


Fig. 1. Phylogenetic tree showing relationships between some members of the *Bacillus* species (Arguelles-Arias et al., 2009).

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 실험 재료

본 연구에서 사용한 대두(국산)는 2014년 용두농업 협동조합(무안)에서 1 kg을 구매하여 본 항균활성과 최소억제농도와 열 및 pH 안정성 실험에 사용하였다.

### 2.2 발효 균주

본 실험에서 청국장 발효에 이용되고 있는 대표적인 균주 *B.subtilis* NG24와 대나무 줄기의 마디부분의 표면에서 처음 분리된 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 사용하였다. 목포대학교 생물학과 미생물학 실험실에 보관중인 청국장 발효균주 *B.subtilis* NG24와 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1은 일반적으로 유전적 분석에서 유사한 관계에 있다고 알려져 있다(Fig 1).

### 2.3 항균 활성 균주

청국장 추출물의 병원성 균주들에 대한 항균효과를 측정하기 위한 6종 균주로 Gram Positive 균주는 *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*를 사용하였고, Gram Negative 균주는 *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*이다. 각 균주는 한국 미생물보

존센터에서 분양을 받아 항균 활성 실험에 사용하였으며, 균주의 배양조건은 다음과 같다[Table 1].

Table 1. List of strains used for antimicrobial activity test

Gram stain	Strains	Strain number	Media (°C)
Positive (+)	<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	MHB & MHA (37°C)
	<i>C. perfringens</i>	KCTC 5014	
	<i>S.aureus</i>	ATCC 13565	
Negative (-)	<i>A. faecalis</i>	ATCC 49677	MHB & MHA (37°C)
	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	
	<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 21636	

### 2.4 시약 및 기기

실험 기기로는 Shaking incubator, UV/Visible spectrophotometer, Freezing dryer와 Rotary vacuum evaporator의 일반 실험기구들을 사용하였다. 추출용 시약은 70 % ethanol을 사용하였다. 고초균 생육배지는 NB(Nutrient broth, Difco, Becton Dickinson Co., USA)를 사용하였고, 항균활성에 사용한 배지는 Mueller Hinton Broth & Mueller Hinton Agar(MHB & MHA, Difco, Becton Dickinson Co., USA)를 구입하여 사용하였다. 그 외 8 mm paper disc(ADVANTEC, LTD. Japan) 및 나머지 기타 시약은 필요에 따라 구매하여 사용하였다.

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

MHB를 10 kg씩 두개를 제조한 다음 *B.subtilis* NG24와 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 배양 되어 있는 slant broth tube에서 Loop로 채취하여 각 broth flask에 넣는다[Table 2]. 진탕 배양기를 이용하여 중균액을 37°C, 24시간 배양한 다음 5 ml tube에 각각 100 µl씩 24시간 배양하였다.

Table 2. Components factor of MHB

Components	Concentration
Beef Extract	2.0 g
Acid Hydrolysed Casein	17.5 g
Starch	1.5 g
Calcium ions	50 mg/litre
Magnesium ions	20 mg/litre
pH : 7.4 ± 0.2	
Appearance : Pale straw, clear	

## 2.6 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS의 추출물 조제

Fermented Soybean(FS)의 제조방법은 대두(콩)를 500 g을 세척하여 3배의 증류수를 넣고 실온, 24시간을 침지하였다. 침지한 대두를 고압증기 멸균기에서 115°C, 25분간 증자하고, 50-60°C로 냉각하였다. 대두는 100 g씩 10개의 비커에 나누어 담고 전날 배양한 두 중균액을 전체의 1% (w/w)가 되도록 5개의 비커에 나누어서 접종하였다. 균주를 접종한 대두를 37°C, 24시간 동안 발효시켜 100g을 뺀 나머지를 -70°C, 24시간 냉동시킨 후 동결건조 된 시료 중 400 g을 3배의 70% ethanol로 실온, 24시간 3회 반복하여 진탕한 후 상층액 시료를 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 2)로 여과하여 불순물을 제거하고 진공농축기에서 40°C로 감압-농축한 후 사용하였다. 모든 시료는 4°C 보관하였으며, 실험 시 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

## 2.7 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS의 항균활성

본 실험은 *B.subtilis* NG24와 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 청국장 추출물 시료를 가지고 항균활성을 비교분석 하였고, Paper disc diffusion method[20]을 응용하여 사용하였다. 각 균주는 액체배지에서 37°C, 24시간 배양하여 세균 배양액을 650 nm에서 Optical

Density(O.D) 값 0.4[106 CFU(Colony Forming Unit)/mL]가 되게 조절한 후 활성화시킨 다음 병원성 균주 6종이 배양된 배지에 1회 백금으로 균을 채취해 2.5 ml MHB의 생육액체배지에 현탁시켜 배양한 후 높이가 4~5 mm인 MHA 배지를 만들어 하루정도 건조시킨 후 시험균액 40 µl을 무균상태에서 Plate에 분주한 후 멸균된 유리막대로 잘 도말한다. 각 청국장 추출물을 에탄올을 이용하여 4 mg/mL 농도로 희석한 다음 시료를 30 µl씩 지름이 8 mm인 멸균된 paper disc에 흡수시켜 균주가 도말된 배지 표면에 고정시켰다. 이를 실온, 1시간동안 확산, 건조시킨 후 24시간동안 배양하였으며, 각 추출물로부터 형성된 disc 주위에 생성된 환의 모습을 clear zone의 크기로 판단하였다.

## 2.8 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS의 최소억제농도

최소억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 실험은 한천배지 확산법을 응용하여 비교분석을 실시하였다[21]. 본 실험은 멸균 후 완전히 굳지 않은 MHA 배지에 *B.subtilis* NG24와 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효시킨 청국장지의 70% ethanol 추출물을 0.3-0.01% (w/v) 범위의 농도별로 최종 맞춰 첨가하고 여기에 시험 균주의 농도가 약 105~106 CFU 가량 되도록 접종한 후 혼합하였다. 이를 평판에 분주하여 실온에서 굳히고, 37°C incubator에서 24시간 배양하였다. 여기서, 배양 후 실제 현미경 상에서 균의 성장이 관찰되지 않은 평판의 농도를 최소억제농도로 판단하였다.

## 2.9 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS의 열 안정성

열 안정성(Heat stability) 실험은 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효시킨 청국장지의 70% ethanol 추출물을 4 mg/mL 농도로 희석하였다. 희석한 시료를 60°C에서 10, 30 및 60분, 80°C 및 100°C에서 10분과 20분, 121°C에서 15분간 열처리한 후 즉시 냉각하였다. 이렇게 처리된 시료의 항균활성 변화를 paper disc법[20]으로 측정하였다.

## 2.10 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS의 pH 안정성

pH 안정성 실험은 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens*

NBF11-1을 이용하여 발효시킨 청국장의 70 % ethanol 추출물을 4 mg/mL 농도로 희석하였다. 희석한 시료의 pH를 0.1 N NaOH와 0.1 N HCl을 이용하여 2, 4, 6, 8 및 10으로 조절한 후 실온에서 24시간 동안 방치하였다. 이렇게 방치한 시료는 0.1 N NaOH와 0.1 N HCl을 사용하여 본래의 pH로 중화시켜 4 mg/mL 농도로 희석하여 항균활성 변화를 paper disc법[20]으로 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS의 항균활성

*B.subtilis* NG24와 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효시킨 청국장의 항균활성도를 확인하기 위하여 70 % ethanol로 추출한 후, paper disc 법을 이용하여 그람 양성균주 3종, 그람 음성균주 3종에 대하여 실험을 실시하였다. 청국장 에탄올 추출물은 4 mg/mL 농도에서 병원성 균주 6종 전체에서 항균효과를 보였고, 두 균주간 결과는 다음과 같다(Table 3). 그람양성에서 *E.faecalis*는 항균효과의 차이가 없었으나, *C.perfringens*와 *S.aureus*가 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens*에서 높은 항균효과를 보였다. 그람 음성에서 *P.aeruginosa*는 항균효과의 차이가 없었으나, *A.faecalis*와 *E.coli*에서는 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens*에서 높은 항균효과를 보였다. Yang 등[22]의 연구에서는 *B.subtilis*에 비해 *B.amyloliquefaciens*는 세균 및 곰팡이에 항균 활성에 대한 넓은 범위를 가지며, 원인물질을 규명한 결과 항세균 및 진균 활성을 함께 가지는 fengycins와 surfactins을 동시에 생산하는 특성과 lipopeptide 계열의 물질로서 단백분해효소의 영향이 없다고 하였다. 또한, *B.subtilis*에 비해 *B.amyloliquefaciens* 균주가 발효과정 중에 세포벽 분해효소인 chitinase를 더 많이 생산하였다고 하였으며[23], 청국장 발효시 peptidases 및 proteases와 같은 발효 대사산물이 *B.subtilis*보다 *B.amyloliquefaciens*에서 훨씬 풍부하다고 하였다[24]. 이는 *B.amyloliquefaciens*가 세균의 원형질막을 용해할 수 있는 surfactins과 같은 항균물질이 더 풍부하고, lipopeptide 계열을 비롯한 단백질 분해 효소에 영향을 받지 않는 *B.amyloliquefaciens* 균주가 대두혼합에 의한 청국장 발효과정에서 생리활성의 증가에 시너지 효과를

준 것으로 생각된다. 또한, Fiordiligie[16]는 *B.subtilis*와 유전적 분석에 의한 유전정보가 가장 유사하며 같은 포자형성의 형태를 보이는 상관관계(25-27)의 균주인 *B.pumilus*를 대조균으로 하고 *B.amyloliquefaciens*를 이용한 항균활성을 실험한 결과 *B.amyloliquefaciens*에서 같은 조건 및 시간을 배경으로 할 때 배출하는 효소나 항생물질이 배양시간의 경과에 따라 *B.pumilus*에 비해 강하게 증가하였다고 보고하였다. 또한, Kim 등[28]은 *B.amyloliquefaciens* KC41을 이용한 청국장이 *B.subtilis* NG24와 유연관계가 가장 가까운 *B.subtilis* HH28보다는  $\gamma$ -polyglutamate와 isoflavone-glycosides 및  $\beta$ -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 많았다고 하였는데,  $\gamma$ -polyglutamate와  $\beta$ -glucosidase 같은 가수분해효소가 풍부한 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1와 대두 안의 성분이 발효 시에 생성된 다량의 점질물(점액성 다당체)이 *B.subtilis* NG24보다 배지 위에서 항균력 활성 부분이 더욱 활발하게 적응하는 환경이 되었기 때문이라 판단된다. Ahn 등[29]은 발효과정 중에 단백질 및 가수분해 중간 생성물에 작용하여 생리활성을 촉진하는 proteases가 *B.subtilis*에서는 179.6 Unit/mL/min로 나타난 반면, *B.amyloliquefaciens*에서는 201.9 Unit/mL/min로 높았다고 보고하였다. 이에 본 연구에서 미생물의 생리대사 기작과 균주의 형태 및 구조적 특성에 따른 항균물질이 *B.subtilis*와 다른 *B.amyloliquefaciens*로 발효된 청국장이 여러 단백질 및 효소물질이 항균 기능성에 더 높은 활성증가로 작용하였기 때문이라고 사료된다.

**Table 3.** Antimicrobial activity of 70% ethanol extracts from *B.subtilis* NG24 and *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 with soybean (concentration: 4 mg/mL)

Strains	NG24	NBF11-1
<i>E. faecalis</i>	+	+
<i>C. perfringens</i>	+	+++
<i>S. aureus</i>	+	++
<i>A. faecalis</i>	+	+++
<i>E. coli</i>	+	++++
<i>P. aeruginosa</i>	+	+

\* Growth inhibition size of clear zone: -, non detected; +, smaller than 1.5 mm; ++, 1.5~3. mm; +++, 3~5 mm; +++++, larger than 5 mm.

### 3.2 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS의 최소억제농도

*B.subtilis* NG24와 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1로 발효시킨 청국장 추출물에 대한 최소억제농도는 다음과 같다(Table 4). 그람 양성균주 중 *E.faecalis*에서는 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 추출액의 최소억제농도는 각각 0.60 %, 0.55 %로 차이는 없었다. *C.perfringens*에서는 0.15 %, 0.01 %이었고, *S.aureus*에서는 0.40 %, 0.21 %로 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1의 최소억제농도가 *B.subtilis* NG24보다 높았다. 그람 음성균주 중 *A.faecalis*에서는 *B.subtilis* NG24는 1.50 %, 0.45 %이었고, *E.coli*에서는 >0.80 %, 0.29 %로 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1의 항균효과가 *B.subtilis* NG24보다 높은 것으로 나타났지만, *P.aeruginosa*에서는 두 기간에 효과가 없었다. 그람 음성 균주에 비해 그람 양성 균주가 항균물질에 대한 감수성이 높게 나온다는 보고(30)와 본 연구와 유사한 결과를 나타내었는데, 이는 그람양성균주가 감수성이 높은 것은 양성균주에 비해 그람 음성 균주가 세포막의 구조가 훨씬 복잡하며, 세포막을 둘러싸고 있는 외막이 큰 분자량의 친수성 물질의 유입을 차단하기 때문이라 생각된다. 또한, *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 청국장 추출물이 *B.subtilis* NG24에 비해 작은 농도로도 항균활성이 우수하다고 할 수 있으며, 대나무 유래의 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1의 항균물질이 미생물의 생리대사 기작과 균주의 구조적 특성 및 형태가 항균활성의 정도에 서로 다르게 작용하기 때문이라 사료된다.

**Table 4.** Minimum Inhibitory Concentration(MIC) of 70% ethanol extracts from *B.subtilis* NG24 and *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 with soybean (unit: %)

Strains	MIC(mg/ml)	
	NG24	NBF11-1
<i>E. faecalis</i>	0.60	0.55
<i>C. perfringens</i>	0.15	0.01
<i>S. aureus</i>	0.40	0.21
<i>A. faecalis</i>	1.50	0.45
<i>E. coli</i>	> 0.80	0.29
<i>P. aeruginosa</i>	> 0.80	0.60

### 3.3 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 FS의 열 및 pH 안정성

현재 대부분의 가공 식품들은 제품 고유의 특성을 살

리거나, 저장성과 기호성을 향상시키기 위해 열처리 또는 pH의 처리 과정을 거치게 되므로 이들 식품에 첨가되는 보존료는 열 및 pH에 안정성이 있어야 한다. 이에 *B.subtilis* NG24와 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 청국장 추출물의 열 및 pH의 안정성을 측정하였다. 열 안정성 실험 결과, *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 청국장 추출물을 121℃에서 15분간 열처리를 하여도 항균활성에 변화가 없었다. *B.subtilis* NG24와 더불어 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 청국장 추출물도 열에 안정성을 확인할 수 있는 물질임을 알 수 있었다(Table 5). 이러한 결과로 볼 때, *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 청국장 추출물은 가공과정에서 열처리를 동반하는 대부분의 식품 보존제로 사용하기 용이할 것으로 보여진다. 특히, *B.amyloliquefaciens*에 의한 발효 추출물은 *C.perfringens*와 같이 retort 및 통조림 제품에서 변패나 식중독을 일으킬 수 있는 균주에 대해서도 열처리 시 항균활성에 변화가 없는 것으로 나타나 통조림이나 retort 제품의 상업적 멸균 시 이용할 수 있을 것으로 기대가 된다. pH 안정성 실험 결과, *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 청국장 추출물은 pH 2-8의 범위에서 모두 항균활성이 잘 유지되었다. 알칼리 조건인 pH 10에서 *B.subtilis* NG24는 감소한 반면, *B.amyloliquefaciens* NBF11-1은 대부분의 실험균주에서 항균활성은 나타내었다(Table 6). 이와 같이 세포외막을 둘러싸는 특정 단백질 성분인 proteome 물질이 온도 변화에도 *B.subtilis* 및 *B.amyloliquefaciens*의 구성되어 있는 단백질막의 변성 변화가 나타나지 않았다고 하였다(31). 이는 청국장을 포함한 일반적인 가공식품의 pH가 약산성 또는 중성임을 고려할 때, pH 10의 알칼리 조건에서 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 추출물이 적정수준의 항균활성을 유지하는 것은 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 천연 식품보존제도 *B.subtilis* NG24와 더불어 안정된 물질임을 확인할 수 있었다. 또한, 산성 및 중성조건에서는 항균활성이 그대로 유지됨으로 유통 중 미생물 생육 억제 효과를 지속적으로 얻을 수 있어 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1의 추출물은 열과 pH에 비교적 안정성을 나타냄으로서 식품의 가공처리에도 적합한 천연가공식품으로 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

**Table 5.** Effect of heat treatments on antimicrobial activity of 70% ethanol extracts from *B.subtilis* NG24 and *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 with soybean

		(concentration: 4 mg/mL)											
Temp(°C)		<i>E.faecalis</i>		<i>C.perfringens</i>		<i>S.aureus</i>		<i>A.faecalis</i>		<i>E.coli</i>		<i>P.aeruginosa</i>	
		NG	NBF	NG	NBF	NG	NBF	NG	NBF	NG	NBF	NG	NBF
		24	11-1	24	11-1	24	11-1	24	11-1	24	11-1	24	11-1
Untreated		+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
60°C	10 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
	30 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
	60 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
80°C	10 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
	20 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
100°C	10 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
	20 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
121°C	15 min	+	+	+	+++	+	++	+	+	+	++	+	+

\* Growth inhibition size of clear zone: +, smaller than 1.5 mm; ++, 1.5-3 mm; +++, 3-5 mm.

**Table 6.** Effect of pH treatments on antimicrobial activity of 70% ethanol extracts from *B.subtilis* NG24 and *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 with soybean

		(concentration: 4 mg/mL)											
pH		<i>E.faecalis</i>		<i>C.perfringens</i>		<i>S.aureus</i>		<i>A.faecalis</i>		<i>E.coli</i>		<i>P.aeruginosa</i>	
		NG	NBF	NG	NBF	NG	NBF	NG	NBF	NG	NBF	NG	NBF
		24	11-1	24	11-1	24	11-1	24	11-1	24	11-1	24	11-1
Untreated		+	+	++	+++	+	++	+	+	+	++	+	++
2		+	+	++	+++	+	++	+	+	+	++	+	++
4		+	+	++	+++	+	++	+	+	+	++	+	++
6		+	+	++	+++	+	++	+	+	+	++	+	++
8		+	+	++	+++	+	++	+	+	+	++	+	++
10		-	+	-	++	-	+	-	-	-	+	-	+

\* Growth inhibition size of clear zone: +, smaller than 1.5 mm; ++, 1.5-3 mm; +++, 3-5 mm.

#### 4. 결론

연구의 목적은 대나무 줄기의 마디부분의 표면에서 발견하였으나, 아직까지는 연구가 미흡한 신균주인 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효한 청국장장의 항균활성의 효능을 알아보려고 한다. 혈중 콜레스테롤 저하 및 당뇨 개선 효과[14]를 가지고 있는 청국장장의 대표적인 발효균주인 *B.subtilis* NG24을 이용하여 발효한 청국장장을 대조군으로 하였다. 실험방법은 병원성 균주 6종을 대상으로 항균활성, 최소억제농도와 열 및 pH 안정성을 비교분석하였다.

본 항균 실험의 결과에서는 *B.subtilis* NG24를 이용하여 발효한 청국장장에 비하여 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1로 발효한 청국장장의 항균효과가 그람양성 *E.faecalis*는 항균활성의 차이가 없었고, *C.perfringens*와 *S.aureus*가 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에서 높은 항균활성을 보였다. 그람음성에서 *P.aeruginosa*

는 항균활성이 없었으며, *A.faecalis*와 *E.coli*에서는 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에서 높은 항균활성을 보였다. 최소억제농도 실험에서는 그람 양성균주 중 *E.faecalis*를 제외한 *C.perfringens*와 *S. aureus*는 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에서 0.01 % 및 0.21 % 농도로 생육을 억제하는 효과가 있었다. 그람 음성균주 중 *P.aeruginosa*을 제외한 *A.faecalis*와 *E.coli*는 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에서 0.45 % 및 0.29 % 농도에서 생육을 억제하는 효과가 있었다. 열 안정성 실험 결과는 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 청국장 추출물 모두에서 100°C, 20분까지는 열처리를 하여도 항균활성에 변화가 없었다. 따라서, *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 추출물도 *B.subtilis* NG24와 더불어 열에 안전한 천연물질을 알 수 있었다. pH 안정성 실험 결과에서는 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1과 *B.subtilis* NG24를 이용한 추출물을 pH 2-8로 처리해도 변화가 없었으

며, 알칼리인 pH 10에서 *B.subtilis* NG24에 비해 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 항균활성의 변화가 없어 이들 추출물 유래의 항균물질은 가공식품을 만들기 위한 조건인 열 및 pH 변화에도 안정한 천연물질임을 알 수 있었다.

이와 같이, *B.subtilis* NG24와 더불어 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효된 청국장 추출물의 항균활성과 열 및 pH 안정성에서 유사한 시너지 효과를 보여준 것은 여러 단백질, 가수분해효소 물질 및 점질물이 항균활성 및 생리활성 측면에서 높은 가능성을 가지고 있기 때문일 것으로 사료된다. 본 연구에서는 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1로 발효된 청국장이 *B.subtilis* NG24를 이용하여 발효된 청국장보다 어떠한 종류의 항균 물질이 더 많이 존재하는지에 대해서는 명확히 알 수는 없었다. 그러나, 천연 항균력 및 항산화 물질을 가지고 있다고 알려져 있는 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1은 대두가 청국장으로 발효되는 과정에서 *B.subtilis* NG24보다 청국장 점질물의 기능 중 항균활성과 열 및 pH의 안전성 면에서 우월한 효과를 나타내었다.

따라서, 향후의 연구에서는 *B.subtilis* NG24에 비해 신균주 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 발효가 청국장 점질물의 기능 중 항균활성에 영향을 준 물질들에 대해 세부적으로 파악하고 그 구조적, 기능적 특성들을 비교분석을 하여 항균작용에 있어 두 물질의 상승효과 등에 대한 연구가 함께 실행되어야 할 것으로 사료된다.

## References

- [1] Kwon, H. Y., Ryu, H. Y., Kwon, C. S., Lee, S. H. and Sohn, H. Y., Optimization of culture conditions of *Bacillus pumilus* JB-1 for Chungkook-jang fermentation in soybean boiling-waste liquor medium, *Korean J. Microbiol Biotechnol*, Vol.35, pp.304-309, 2007.
- [2] Jung, J. B., Choi, S. K., Jeong, D. Y., Kim, Y. S. and Kim, Y. S., Effects of germination time of soybeans on quality characteristics of Cheonggukjang fermented with an isolated bacterial strain, *Korean J. Food sci, Technol*, Vol.44, pp.69-75, 2012.
- [3] 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.
- [4] FAO/WHO, "Working Group Report on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food", London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2001.
- [5] M. B. Roberfroid, "Prebiotics and probiotics: are they functional foods?", *The American J. of clinical nutrition*, Vol.71, pp. 1682-1687, 2000.
- [6] Han ss, Hur SJ, Lee SK, 2015, A comparison of antioxidative and anti-inflammatory activities of sword beans and soybeans fermented with *Bacillus subtilis*, *Food funct*, Vol.6, pp.2736-2748, 2005.
- [7] Park GS, Cookwise approach of slow food: Focused on traditional fermented sauces. *Korean J. Soc Food Cookery Sci*, Vol.20 pp.317-334, 2004.
- [8] 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>
- [9] S. J. Jung, J. H. Lee, H. N. Song, N. S. Seong, S. E. Lee, and N. I. Beak, "Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts", *Korean J. Soc. Appl Biol Chem*, Vol.47, pp.135-140, 2004.
- [10] 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.
- [11] B. Y. Lee, D. H. Lim, and K. H. Kim, "Physico-chemical properties of viscous substance extracted from Cheongguk-jang", *Korean J. Food Sci*, Vol.23, pp.599-604, 1991.
- [12] H. K. Youn, H. S. Choi, S. H. Hur, and J. H. Hong, "Physico-chemical properties of viscous substance extracted from Cheonggukjang", *Korean. J. food, Hyg Safety*, Vol.16, pp.188-193, 2001.
- [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, and 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, and 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, and H. Hara, "Lig-8, a highly bioactive lignin derivative from bamboo lignin, exhibits multifaceted neuro-protective 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, and H. Maeda, "Immunostimulation-Mediated anti-tumor activity of bamboo(*Sasa senanensis*) 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 and 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] Mothana, R.A. and U. Lindequist. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqatra, *J. Ethno-Pharmacol*, Vol.96, pp.177-181, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.006>
- [21] Pearson RD, Steigbigel RT, Davis HT, Chapman SW, Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol.18 PP.699-708, 1980.
- [22] S. Yang, L. Sun, Z. Lu, X. Bie and F. Lu, "Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, form *Scutellaria baicalensis* Georgi", *World J. Microbiol Biotechnol*, Vol.22, pp.1259-1266, 2006.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9170-0>
- [23] S. L. Wang, I. L. Shin, Y. W. Liang and C. H. Wang, "Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens*", *J. Agric. Food. Chem*, Vol.50, pp.2241-2248, 2002.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf010885d>
- [24] M. C. Lauan, I. L. Santos, and J. K. Lim, "Comparative Study of Extracellular Proteomes for *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Major in Food Biomaterials", *Kyung Book National Uni*, Vol.31, pp.30-37, 2013.
- [25] A. L. Sonenshein, "Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*", *Curr. Opin. Microbiol*. Vol.3, pp.561-566, 2000.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00141-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00141-7)
- [26] S. Yoshida, S. Hiradate, T. Tsukamoto, K. Hatakeda and A. Shirata. "Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC 2 isolated from mulberry leaves", *Phytopathology*, Vol.92, pp.181-187, 2000.
- [27] Prazdnova EV, Chistyakov VA, Churilov MN, Mazanko MS, Bren AB, Volski A, Chikindas ML, DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933, *Lett Appl Microbiol*, Vol.61 PP.549-554, 2015.
- [28] J. H. Kim, C. E. Hwang, C. K. Lee, J. H. Lee, and G. H. Kim, "Characteristics 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.1310.10065>
- [29] Y. S. Ahn, Y. S. Kim, and D. H. Shin, "Isolation, Identification, and Fermentation Characteristics of *Bacillus* sp. with High Protease Activity from Traditional Cheonggukjang", *Korean J. Food Sci. Technol*, Vol.38, pp.82-87, 2006.
- [30] C. Magallanes, C. Cordoba, and R. Orozco, "Antimicrobial activity of ethanolic extracts of marine algae from central coast of Peru", *Rev Peru Biol*, Vol.10, pp.125-132, 2003.
- [31] Lauan Maria Claret, Santos IlynLyzette, Lim Jinkyu, Comparative study of extracellular proteomes for *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*, *Current Research on Agriculture and Life Sciences*, Vol.31, pp.30-39, 2013.

김 한 수(Han-Soo Kim)

[정회원]



- 2007년 8월 : 목포과학대학 임상병리학과 (보건학사)
- 2015년 2월 : 목포대학교 생물학과 (이학석사)
- 2015년 3월 ~ 현재 : 조선대학교 보건학과 (박사과정)
- 2008년 8월 ~ 현재 : 해남한국병원 진단검사의학과 실장

<관심분야>

보건학, 혈액학, 미생물학