

발효 된장의 바이오제닉 아민 함량에 영향을 미치는 바실러스균의 분리 동정 및 프로바이오틱 특성

임은서* 

동명대학교 식품영양학과

Isolation, identification, and probiotic characteristics of *Bacillus* strains affecting the biogenic amine content in fermented soybean paste

Eun-Seo Lim* 

Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Republic of Korea

(Received February 11, 2019; Revised March 25, 2019; Accepted March 27, 2019)

The primary objective of this study was to determine the content of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean pastes (doenjang) and to isolate potential probiotic *Bacillus* sp. with the ability to inhibit biogenic amines accumulation. There were significant differences in the bacterial cell counts, pH value, titratable acidity, salinity, and biogenic amine content between the samples. Among *Bacillus* strains isolated from doenjang, *Bacillus* (*B.*) *licheniformis* DB102, *B. subtilis* DB203, *B. stearothermophilus* DB206, *Bacillus* sp. DB209, *Bacillus* sp. DB310, *B. coagulans* DB311, *B. cereus* DB313, *B. amyloliquefaciens* DB714, *Bacillus* sp. DB917, *B. cereus* DB 915, *B. subtilis* DB1020, and *Bacillus* sp. DB1022 were found to be able to produce biogenic amines. On the other hand, biogenic amine-degrading strains were identified as *Bacillus* sp. DB403, *Bacillus* sp. DB407, *B. subtilis* DB517, *B. licheniformis* DB612, and *B. subtilis* DB821. In particular, *Bacillus* sp. DB407 and *B. subtilis* DB821 showed probiotic properties including tolerance to artificial digestive juices, adherence to intestinal epithelial cells, resistance to antibiotics, and antibacterial activity against biogenic amine-producing strains. In conclusion, the two probiotic *Bacillus* strains may be considered as the suitable starter for manufacture of fermented soybean foods with low biogenic amines content.

Keywords: *Bacillus*, biogenic amine, probiotic

바이오제닉 아민(biogenic amine)은 생체 내 생리기능을 유지하는데 관여하는 물질로서 세포 증식 및 분화, 핵산 기능 조절, 단백질 합성, 두뇌 발달, 신경 세포 성장과 조절 등 살아 있는 세포에 있어 내재적 필수 불가결한 성분이다(Kalač and Krausová, 2005). 하지만 과량의 티라민이나 페닐에틸아민 등은 고혈압의 위험과 식이성 편두통을 야기하는 것으로 보고되고 있으며, 히스타민은 알레르기 식중독 유발 원인 물질로 알려져 있고, 푸트레신, 스페르민, 스페르미딘 및 카다베린 등은 자체적으로는 인체에 해가 적으나, 아질산염과 반응하면 발암 물질인 니트로자민을 생성하게 된다(Hernandez-Jover *et al.*, 1997). 특히 히스타민의 독성은 소장 내에 있는 히스타민 대사 효소를 저해하는 푸트레신이나 카다베린 등 혼재하는 다른 종류의 바이오제닉 아민에 의해 유의하게 증가된다(Lehane and Olley, 2000). 게다가 일부 바이오제닉 아민은 장관에 흡수되어 대사 기능을 방해하고 항영양물질(anti-nutritional compound)로서 작용하며, 아드레날린, 노르아드레날린 및 위산의 분비를 자극하고 심장병 발병 위험을 높일 뿐만 아니라, 부정맥, 혈당 상승 및 혈압을 높이기도 한다(Shalabhy, 1996).

바이오제닉 아민은 세균, 효모 및 곰팡이 등 다양한 미생물에 의한 주로 생성되는 저분자 질소 화합물로서 탈탄산 효소에 의해 특정 아미노산의 카르복시기를 제거하여 아민과 이산화탄소를 생성하게 되는데(Gardini *et al.*, 2016), 독성을 유발할 정도의 바이오제닉 아민은 탈탄산화를 유발하는 미생물의

*For correspondence. E-mail: limsm020@tu.ac.kr;
Tel.: +82-51-629-1714; Fax: +82-51-629-1709

생균수가 적어도 7 log CFU/g 이상이어야 하므로 유해한 미생물의 증식 여부 지표로써 바이오제닉 아민 함량을 측정하기도 한다(Al Bulushi *et al.*, 2009). 식품 내에 생성되는 가장 흔한 바이오제닉 아민으로는 히스타민, 티라민, 페닐에틸아민, 트립타민, 푸트레신 및 카다베린 등이 있다(Wunderlichová *et al.*, 2014). 사실상 거의 대부분의 식품은 단백질이나 유리 아미노산을 함유하고 있기 때문에 미생물학적 활성에 의해 바이오제닉 아민이 생성될 수 있는데, 주로 생선 및 가공품, 육류 및 가공품, 난류, 치즈, 발효 야채, 과일, 너트, 초콜릿, 와인 등 단백질이 풍부한 음료나 유제품 및 장류 등의 발효 식품에서 흔히 검출된다(Shalaby, 1996). 특히 두류 가공품 내 다량의 유해 아민은 숙성에 관여하는 그람 양성균 및 음성균, 곰팡이 등의 과도한 증식에 따른 것으로 알려져 있다(Shalaby, 1996). 일본식 발효 된장인 미소(miso) 내에는 히스타민(462 mg/100 g), 푸트레신(1,234 mg/100 g), 카다베린(634 mg/100 g) 및 티라민(3,568 mg/100 g) 등의 바이오제닉 아민이 다량 검출되었다고 보고된 바 있다(Shalaby, 1996). 한편 Cho 등(2006)은 우리나라 전통 발효 된장 내에서 히스타민과 티라민이 각각 952 mg/kg과 1,430.7 mg/kg 정도 검출되었다고 확인한 바 있다. 이외에도 간장이나 춘장 및 sufu 등 아시아 각국의 전통 콩 발효 식품 내에서도 바이오제닉 아민의 함량이 높게 측정되었다(Guan *et al.*, 2013; Mah, 2015).

바이오제닉 아민 함량은 식품을 구성하는 성분, 제조 공정, 원료의 품질, 원료 내 콩의 비율, 발효 스타터의 종류 및 발효 조건과 기간에 따라 차이가 있다(Brink *et al.*, 1990; Eerola *et al.*, 1998). 따라서 단백질 함량이 높고 숙성 과정을 거쳐 제조하는 콩 발효 식품들의 유해 아민으로 인한 중독 위험을 최소화하기 위해선 미생물 오염도가 낮은 신선한 원료 사용, 바이오제닉 아민 생성능이 없는 발효 스타터 이용 및 탈탄산 효소 생성 미생물의 증식을 억제할 수 있는 제조 공정 개선 등 저감화할 수 있는 최적 조건 설정에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 연구에 따르면, 유기산이나 박테리옌과 같은 항균 물질을 생산하는 세균들이 바이오제닉 아민 생성균의 증식을 억제시킴으로써 발효 식품 내 유해 아민의 함량을 낮출 수 있다는 결과가 보고된 바 있다(Zhang *et al.*, 2013).

유산균이나 바실러스균은 프로바이오틱(probiotic) 균주로서 숙주의 장내 미생물의 균형을 유지하여 장 건강에 이로운 역할을 하는 인체 유익균이므로 이들을 발효 스타터로 이용하여 발효 식품을 제조할 경우 유해 아민 생성 위험을 낮추고 생리활성 물질을 생성함에 따라 건강 향상에도 도움을 줄 수 있어 유용하게 이용될 수 있다(Fuller, 1991). 지금까지 보고된 연구들은 주로 유산균을 대상으로 바이오제닉 아민 생성균을 제

어하는 내용이 주를 이루고 있으므로 본 연구에서는 시판되고 있는 발효 된장의 바이오제닉 아민 함량에 영향을 미치는 바실러스균을 분리 동정하였고, 이 중에서 바이오제닉 아민 분해능을 비롯하여 인공 소화액과 항생제에 대한 내성, 용혈능 및 항균물질 생성능 등 프로바이오틱 활성을 나타내는 균주를 최종 선발하였다.

재료 및 방법

시판 된장의 미생물학적 및 물리화학적 특성

부산 일대 전통 시장과 마트에서 된장 10종을 구입한 후 시료 30 g에 멸균된 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS) 270 ml를 가한 다음 약 2분간 스토마커(3M Center)로 분쇄하였다. 균질화된 시료 용액은 심진 희석한 후 Plate Count Agar (BD Difco Co.)를 사용하여 표준한천평판배양법으로 생균수를 측정하였다. 한편, 시료 용액은 80°C에서 15분간 가열 처리 직후 냉각한 다음 Luria-Bertani (BD Difco Co.) 평판배지 상에서 내열성 포자 형성균수를 측정하였고, 독립 집락을 Brain Heart Infusion agar (BHI, BD Difco Co.) 상에서 순수 분리 배양한 다음 배양액을 20% (v/v) glycerol stock으로 제조하여 -80°C에서 보관하면서 실험하였다. 시료 용액의 pH 및 염도는 pH meter (Fisher Scientific)와 염도계(CAS salt-free 2500)로 각각 측정하였다. 한편, 시료 5 g에 동량의 증류수를 가하고 1% (w/v) 페놀프탈레인 지시약을 첨가한 후에 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 적정산도를 계산하였다. 시료의 바이오제닉 아민 함량은 Li 등(2018)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 시료(0.5 g)에 1.5 ml 0.4 M HClO₄를 가한 다음 1시간 진탕하여 추출한 후 원심분리(12,000 × g, 10분, 4°C)해서 얻은 상등액(250 μl)에 25 μl 2 M NaOH와 75 μl 포화 NaHCO₃를 첨가하고 500 μl dansyl chloride를 넣어 50°C, 45분간 반응시켰다. 반응물은 25 μl 25% NH₄OH와 혼합하고 잔존하는 dansyl chloride를 제거하기 위해 50°C에서 15분 배양한 다음 1.5 ml acetonitrile를 가하고 원심분리(2,500 × g, 5분)하여 얻은 상등액을 membrane filter (0.22 μm, Millipore Corp.)로 여과하여 dansyl 유도체를 제조하였다. 시료 내 바이오제닉 아민은 High pressure liquid chromatography (HPLC, Shimadzu)의 Nova-Pak C₁₈ 컬럼(150 × 3.9 mm, Waters)을 사용하여 30°C에서 분석하였다. 이동상 ammonium acetate (0.1 M, solvent A)와 acetonitrile (solvent B)을 선형 구배로 하여 유속은 1 ml/min 하에서 흡광도(254 nm)를 측정함으로써 시료 내 바이오제닉 아민 함량을 구하였다.

바실러스 균주 동정

분리된 내열성 포자 형성 균주는 그람 염색하여 그람 양성 균만을 바실러스균으로 간주한 다음 DNA purification kit (Promega)로 genomic DNA를 추출한 후 universal primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTACCCTGTTACGACTT-3')을 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)으로 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다. PCR 조건으로는 주형 DNA 변성(97°C에서 5분) 시킨 다음 94°C에서 1분, 56°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초 동안 35회 반복 수행하여 DNA 증폭시켰고 최종적으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 산물은 전기 영동으로 증폭 여부를 확인하였고, QIAquick PCR purification kit (Qiagen)로 정제한 후 염기서열을 분석하였다. 16S rRNA sequencing 결과는 National Center for Biotechnology Institute (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 GenBank database를 통해 분리 균주와의 상동성을 비교하여 동정하였다.

분리 균주의 바이오제닉 아민 생성 및 분해능

동정된 바실러스 균주의 바이오제닉 아민 생성능은 효소 유도를 촉진시키기 위해 전구체 아미노산(L-histidine monohydrochloride monohydrate, L-tyrosine disodium salt, L-lysine monohydrochloride 및 L-ornithine monohydrochloride, Sigma-Aldrich, 1 g/L)과 1 mg/L pyridoxal 5-phosphate를 첨가한 탈카르복시화 액체배지(decarboxylating broth)에서 37°C, 24시간 동안 5회 전 배양하였다. 각각의 아미노산(2%, w/v)이 첨가된 탈카르복시화 액체배지(1 ml)에 전 배양액(0.5 ml)을 접종한 후 혐기적인 조건(Anoxomat 8000 system, MART Co.)에서 37°C, 72시간 동안 배양한 후 앞서 설명한 방법에 따라 HPLC를 이용하여 바이오제닉 아민 생성량을 측정하였다.

바이오제닉 아민 분해능은 Lee 등(2015)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 실험 균주는 BHI broth에 접종하여 37°C, 24시간 동안 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)해서 모은 세포를 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 세포 현탁액(1 ml, 1.0 × 10⁶ CFU/ml)은 바이오제닉 아민(histamine dihydrochloride, tyramine hydrochloride, cadaverine dihydrochloride, putrescine dihydrochloride, 0.1%, w/v)을 첨가한 액체배지[glucose 0.1% (w/v), yeast extract 0.2% (w/v), NaCl 0.5% (w/v), K₂HPO₄ 0.05% (w/v); pH 7.0, 10 ml]에 접종하고 난 다음 35°C, 5일간 배양한 후에 얻은 배양액(0.1 ml)은 바이오제닉 아민(2%, w/v) 평판배지에 도말 접종하여 30°C, 5일간 배양하였다. 평판 배

지 상에 자란 독립된 집락을 선택하여 trypticase soy agar (TSA, BD Difco Co.) 상에서 순수 분리한 다음 바이오제닉 아민 분해능을 조사하기 위해 바이오제닉 아민(50 ppm)이 첨가된 trypticase soy broth (TSB, BD Difco Co.)에 접종하고 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 바이오제닉 아민 혼합 표준용액(500 ppm) 및 세포 배양액 1 ml에 0.4 M perchloric acid (Merck) 9 ml를 가하고 진탕 혼합한 후 원심분리(3,000 × g, 10분)하여 얻은 상등액은 Whatman paper No. 1로 여과하였다. 시험 용액은 dansyl chloride로 유도체화한 후에 앞서 언급에 조건과 같이 HPLC를 이용하여 잔존하는 바이오제닉 아민 함량을 측정하여 계산식($M = [(A-B)/A] \times 100$, M: 바이오제닉 아민 분해능(%), A: 초기 바이오제닉 아민 함량, B: 잔존하는 바이오제닉 아민 함량)에 따라 분해능을 조사하였다.

프로바이오틱 활성 측정

인공 위액 및 담즙액에 대한 저항성: 인공 소화액에 대한 저항성은 Lee 등(2017)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 분리 균주를 BHI broth에 접종한 후 37°C, 24시간 배양하여 얻은 배양액으로부터 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)을 통해 모은 세포 침전물을 PBS (pH 7.0)로 2회 세척 후 세포수를 1.0 × 10⁸ CFU/ml에 맞춰 현탁액을 제조하였다. PBS (pH 2.5)에 125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO₃ 및 1 mg/ml pepsin (Sigma-Aldrich)을 첨가하여 제조한 인공 위액에 바실러스균 현탁액을 접종한 후 37°C에서 2시간 배양한 다음 잔존하는 균수를 측정하여 인공 위액 상에서의 생존율(%)을 조사하였다. 한편, BHI broth에 3.0% (w/v) bile salts (Sigma-Aldrich)를 첨가하여 인공 담즙액(10 ml)을 제조한 다음 인공 위액에서 잔존하는 균수로 조정된 균 현탁액(1 ml)을 접종하고 37°C에서 3시간 배양하였다. BHI agar 상에서 평판 배양 후 잔존하는 균수를 측정하여 대조구(bile salts 대신 PBS 첨가) 상의 균수와 비교하여 인공 담즙액 상에서의 생존율(%)을 조사하였다.

장내 상피세포에 대한 부착능: 선발 균주의 장관 상피세포에 대한 부착능은 Kim 등(2009)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받은 Caco-2 세포는 56°C에서 30분간 가열 처리한 10% (v/v) fetal bovine serum (FSB, Gibco), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin 및 0.1 mg/ml streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich)에 접종하고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하여 monolayer를 형성하도록 하였다. FBS와 항생제가 첨가

되지 않은 DMEM 배지를 12-well culture plate (Falcon)에 분주하고 난 다음 Caco-2 세포(1.0×10^5 cells/ml) 현탁액을 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 2시간 동안 전 배양하였다. 한편, BHI broth에서 37°C, 24시간 동안 배양한 바실러스균 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)를 통해 세포만을 모아 PBS (pH 7.0)로 세척한 다음 DMEM 배지(1.6 ml) 내에 현탁시켜 앞서 인공 담즙액에서 배양한 후 잔존하는 균수로 조정하였다. Caco-2 세포 현탁액(0.2 ml)을 접종한 plate의 well에 바실러스균 현탁액(0.2 ml)을 접종하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 Caco-2 세포에 부착되지 않은 바실러스균을 제거하였다. 부착된 세균은 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 탈착시킨 다음 PBS (pH 7.0)로 세척하고 BHI agar에서 평판 배양하여 바실러스 균수를 측정하여 부착율(%)로 나타내었다.

항생제에 대한 저항성: 항생제에 대한 저항성은 Jeon 등(2016)과 Wang과 Su (2016)의 방법을 일부 변형하여 최소증식억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 선발 균주는 BHI broth에 접종하여 37°C, 24시간 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)해서 모은 세포 침전물을 PBS (pH 7.0)로 2회 세척한 다음 세포수를 1.0×10^7 CFU/ml로 조정하였다. 세포 현탁액(1%, v/v)은 BHI agar (agar 1.0%, w/v)에 접종하고 난 후 BHI 평판배지 위에 중층하여 응고시켰다. 항생제(ampicillin, erythromycin, kanamycin, penicillin G, streptomycin, tetracycline 및 vancomycin; Sigma-Aldrich)의 stock solution (1 mg/ml)을 2배씩 연속적으로 희석한 다음 paper disk (φ 8 mm)에 loading (50 μl)한 후 균 현탁액이 접종된 BHI 평판배지 위에 올리고 37°C에서 24시간 배양하여 disk 주변에 저해환을 생성한 최소 농도를 측정하였다.

용혈능

실험 균주는 BHI agar 사면배지에서 3회 계대 배양하여 활성을 높인 후 5% (w/v) human blood가 함유된 BHI agar 평판배지에 희석 접종 후 37°C에서 48시간 배양한 후 α-haemolysis (집락 주변 녹색환 생성), β-haemolysis (집락 주변 황색 투명한 생성) 및 γ-haemolysis (집락 주변 환 생성 없음)를 조사하였다.

항균 활성 측정

바실러스균의 박테리옌 활성은 Savitha 등(2016)의 방법을 일부 변형하여 측정하였는데, 즉 BHI broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 전 배양액을 0.1% (w/v) 포도당이 첨

가된 BHI broth상에서 35°C, 22시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)해서 얻은 배양 상등액 6 N NaOH를 이용하여 pH 6.5로 조정하고 1 mg/ml catalase (Sigma-Aldrich)를 처리한 다음 40% (w/v) 황산암모늄을 첨가하여 4°C에서 overnight 동안 교반해서 단백질을 침전시켰다. 원심분리(12,000 × g, 30분, 4°C)해서 모은 침전물은 20 mM PBS (pH 6.5)에 현탁시키고 4°C에서 24시간 동안 동일한 buffer 내에서 투석막(molecular weight cut-off = 1,000 Da; Spectrum Medical Industries, Inc.)으로 투석시켰다. 시료 용액(100 ml)에 클로로포름과 메탄올 1:1의 비율로 만든 혼합 용액(100 ml)을 첨가하여 격렬하게 진탕 시킨 후 4°C에서 1시간 동안 방치시킨 다음 분액 깔대기로 옮겨 수상과 유기상 사이 박테리옌이 함유된 계면층을 회수하고 남은 클로로포름은 고속 진공기로 제거하여 조 박테리옌 용액을 제조한 것을 microtiter plate method (Holo *et al.*, 1991)로 항균 활성을 측정하였다. 항균력 측정에 사용된 지시 균주는 된장에서 분리한 바이오제닉 아민 생성 바실러스 균주로서 이들을 BHI broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 모으고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척한 다음 세포수를 1.0×10^5 CFU/ml로 조정하였다. Plate well에 BHI broth를 분주하고 2진 희석법으로 농도를 맞춘 박테리옌 용액을 첨가한 다음 지시 균주(1.0×10^5 CFU/ml)의 세포 현탁액(1%)을 접종하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 microplate reader (BioTek, Inc.)를 이용하여 흡광도(600 nm)를 측정하고 박테리옌 용액 대신 PBS (pH 7.0)를 처리한 대조구와 비교하여 배양액의 혼탁도가 50% 저해된 최대 희석배수의 역수를 박테리옌 활성(arbitrary units, AU)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

시판 된장의 미생물학적 및 물리화학적 특성

시료 10종에 대한 호기성 일반 세균수, 바실러스균수, pH, 적정산도, 염도 및 바이오제닉 아민의 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 일반 세균수는 $8.8 \pm 1.7 \times 10^7 \sim 5.4 \pm 1.6 \times 10^9$ CFU/g, 바실러스균수는 $4.0 \pm 2.9 \times 10^4 \sim 1.8 \pm 2.0 \times 10^7$ CFU/g으로 나타났다. Lee 등(2009)은 재래 된장과 시판 된장으로부터 일반 세균수는 $6.02 \pm 0.57 \sim 7.96 \pm 0.03$ Log CFU/g의 분포를 보여 시판 개량식 된장보다 재래식 된장에서 유의하게 높은 균수가 검출되었다고 보고하였는데 본 연구 결과에서는 이보다 다소 높은 균수가 측정되었으며, 시료별 균수에 차이가 나는 것은 원료, 제조 방법 및 환경의 차이에서 기인한다고 보

Table 1. Microbiological and physicochemical characteristics of traditional fermented soybean paste

Sample No.	Viable cell counts (CFU/g)		pH	Titratable acidity (%)	Salinity (%)	Biogenic amine contents (mg/kg)			
	Aerobic	<i>Bacillus</i> sp.				Cadaverine	Histamine	Putrescine	Tyramine
1	5.0±0.3×10 ⁸	3.5±0.1×10 ⁵	6.30±0.08	0.35±0.01	14.2±0.1	1,616.3±12.0	525.8±10.7	ND	130.5±11.5
2	8.8±1.7×10 ⁷	4.0±2.9×10 ⁴	5.94±0.13	0.50±0.01	13.7±0.1	451.1±22.5	1,123.3±0.2	ND	1,008.3±26.9
3	6.2±0.4×10 ⁸	3.7±1.9×10 ⁵	6.11±0.27	0.47±0.03	14.9±0.3	221.5±18.2	870.2±20.4	1,128.0±15.8	367.2±17.7
4	1.6±1.1×10 ⁹	1.8±2.0×10 ⁷	5.12±0.05	0.84±0.02	16.4±0.0	58.8±8.6	414.5±15.0	89.2±14.7	224.9±16.0
5	4.7±0.8×10 ⁸	6.2±1.1×10 ⁵	5.29±0.07	0.70±0.07	17.0±0.0	103.5±5.8	ND	205.4±10.6	329.1±9.9
6	5.5±2.0×10 ⁸	7.6±0.5×10 ⁵	6.00±0.18	0.40±0.05	15.4±0.1	519.2±22.9	ND	90.1±5.9	657.0±13.3
7	1.0±2.6×10 ⁸	5.4±0.9×10 ⁵	4.91±0.22	0.88±0.01	12.7±0.0	125.7±17.2	389.2±22.3	806.9±24.8	41.8±2.8
8	2.3±1.7×10 ⁸	8.1±1.7×10 ⁴	5.62±0.04	0.66±0.04	17.2±0.2	ND	127.7±6.6	152.3±8.7	ND
9	7.1±0.9×10 ⁸	3.3±0.1×10 ⁵	5.37±0.17	0.72±0.03	16.9±0.0	440.2±5.2	678.9±14.1	225.7±12.0	763.2±24.7
10	5.4±1.6×10 ⁹	9.1±0.8×10 ⁶	5.08±0.26	0.79±0.03	14.5±0.0	1,951.4±13.7	208.0±11.5	56.1±3.3	1,156.3±0.3

ND, not detected (biogenic amine level less than 1 ppm).

고하였다. 또한 된장에서 분리되는 주요 미생물로는 누룩곰팡이 및 효모와 같은 진균류를 비롯하여 바실러스균, 유산균, *Micrococcus* sp. 등과 같은 각종 세균들이 주를 이루고, 우점종인 바실러스 균주들은 주로 메주의 발효 과정에 사용되는 벚짚이나 발효 환경으로부터 오염된 것으로 추정되었다고 보고(Lee *et al.*, 2009)되었다. Shim 등(2016)은 된장 제조 직후 바실러스균수가 7.59 ± 0.10~9.36 ± 0.59 log CFU/g에 이르렀고 발효가 진행될수록 균수는 서서히 증가하다가 일정 기간 후에 다시 감소하는 경향을 나타내었다고 하였는데 본 연구에서도 일부의 시료에서 비슷한 수준의 균수가 검출되었다.

한편, pH (4.91 ± 0.22~6.30 ± 0.08), 적정산도(0.35 ± 0.01~0.88 ± 0.01), 염도(12.7 ± 0.0~17.2 ± 0.2%) 등도 시료마다 측정값이 다양하게 나타났다. Shukla 등(2010)은 우리나라 전통 발효 된장 23종의 pH를 측정한 결과 4.8~6.0 정도로 발효가 진행될수록 산도가 높아졌다고 하였는데 이는 유산균의 증식에 따른 것이라고 하였는데 본 연구에서도 이와 유사한 pH값이 측정되었다. Kim 등(2003a)도 된장의 낮은 pH (3.0~6.0)가 탈탄산 효소 활성을 증가시켜 바이오제닉 아민의 생성량을 증가시킨다고 보고하였다.

카다베린은 시료 8에서는 검출되지 않았으나 그 외 시료에서는 58.8 ± 8.6~1,951.4 ± 13.7 mg/kg, 히스타민은 시료 5와 6에서 불검출되었으나, 나머지 시료에서는 127.7 ± 6.6~1,123.3 ± 0.8 mg/kg, 푸트레신은 시료 1과 2에서는 검출되지 않았으나, 그 외 시료에서는 56.1 ± 3.3~1,128.0 ± 15.8 mg/kg, 티라민은 시료 8 이외에서 41.8 ± 2.8~1,008.3 ± 26.9 mg/kg으로 시료마다 상이하게 측정되었다. Lee 등(2009)은 재래식 및 개량식 된장으로부터 검출된 바이오제닉 아민의 함량은 시료별로 유의한 차이(푸트레신: 28.8 ± 9.6~1,076.6 ± 9.5 mg/kg, 티라민:

12.5 ± 4.1~967.6 ± 7.4 mg/kg, 소량의 히스타민과 카다베린)가 있었는데 재래식 된장보다 개량식 된장에서 푸트레신, 티라민, 히스타민의 함량이 훨씬 높게 나타났다고 하였다. Cho 등(2006)도 재래식 및 개량식 된장에서 검출된 바이오제닉 아민으로는 푸트레신, 카다베린, 히스타민, 티라민, 스페르미딘 및 스페르민 등이 있었는데 개량식(180~295.5 mg/kg) 보다는 재래식 된장(234.1~1,453.7 mg/kg)에서 더 많은 양의 아민이 검출되었다고 하여 이들을 본 연구 결과와 비교해 볼 때 원료, 제조 방법 및 상재하는 미생물의 종류에 따라 된장 내 바이오제닉 아민의 함량에 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한 된장 시료별 바이오제닉 아민 함량의 차이는 원료 내 단백질의 비율, 제조 과정(콩의 침지 시간이나 가열 온도) 및 미생물 오염도에 기인하는 것으로 알려져 있다(Shukla *et al.*, 2010). 한편, Lee 등(2009)은 시료 내 일반 세균수와 바이오제닉 아민 함량과는 상관성이 크지 않았고, 반면 식품 내 아민의 함량은 내재된 미생물의 아미노산 이용능, 아미노산 탈탄산 효소를 생성하는 미생물, 발효 및 숙성기간, 제조 공정, 식염 첨가량, 주정 등의 기타 원료 사용 여부에 따라 차이가 나는 것으로 고찰하였다(Kim *et al.*, 2003b). 게다가 낫또(natto)의 pH (4.9~7.3), 호기성 세균수(7.8~11.2 Log CFU/g) 및 히스타민의 함량 사이에는 상관관계가 없다고 확인되었으며, 본 연구 결과도 이와 유사하게 호기성 세균수, 바실러스균수, pH, 산도 및 염도와 바이오제닉 아민 함량 간에는 뚜렷한 상관 관계가 없는 것으로 확인되었다. 두반장, 된장이나 낫또와 같은 두류 발효 식품에는 특히 베타-페닐에틸아민, 티라민 및 히스타민의 함량이 다른 유해 아민들에 비해 높다고 알려져 있으며, 티라민은 100~800 mg/kg, 베타-페닐에틸아민은 30 mg/kg 검출되었고, 히스타민은 100 mg/kg 이상 섭취 시 독성을 유발한다고 보고

하였는데(Mah, 2015), 본 연구 결과에서도 우리나라 대표적인 콩 발효 식품인 된장의 특정 시료 내에서는 위험 수준의 아민이 검출되었다.

바실러스균 분리 동정 및 바이오제닉 아민 생성과 분해능

전통 발효 된장으로부터 분리된 바실러스균의 동정 결과는 Table 2와 같다. DB102 (99.9%), DB203 (99.0%), DB206 (99.8%), DB311 (100.0%), DB313 (99.7%), DB513 (99.2%), DB517 (98.7%), DB605 (99.0%), DB612 (100.0%), DB618 (98.9%), DB714 (99.9%), DB804 (99.1%), DB809 (99.6%), DB821 (100.0%), DB1019 (99.9%), DB1020 (100.0%) 등은 상동성이 높게 나타나 각각 *Bacillus (B.) licheniformis*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. thermoamylovorans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*,

B. amyloliquefaciens, *B. circulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus* 및 *B. subtilis*로 동정되었다. 하지만 DB108 (98.2%), DB209 (98.1%), DB310 (96.3%), DB403 (95.1%), DB407 (97.0%), DB520 (96.0%), DB730 (97.0%), DB814 (96.8%), DB915 (97.2%), DB917 (98.0%), DB1022 (98.4%) 등은 신중 여부의 판단 기준인 98.65%(Kim *et al.*, 2014)보다 상동성 낮아 이들은 *Bacillus* sp.로 명명하였다. 이상의 결과와 같이 시료마다 분리된 바실러스균종은 다양하였으며, *B. subtilis*가 검출된 시료수가 가장 많았고, 식중독을 유발하는 *B. cereus*도 몇몇 시료로부터 분리되었다.

한편, 본 연구에서 사용된 된장 내 아민의 함량이 높은 이유는 시료 내에 함유된 아미노산 탈탄산 효소 생성능이 있는 미생물에 기인하는 것으로 사료되므로 된장 내 우점종 중 하나인 바실러스균을 대상으로 바이오제닉 아민 생성능을 조사한 결과

Table 2. Identification of *Bacillus* sp. isolated from traditional fermented soybean paste

Sample No.	Isolated strain	Related strain in NCBI	GenBank access	Percentage identity (%)
1	DB102	<i>Bacillus licheniformis</i> PB1	MH470474	99.9
	DB108	<i>Bacillus megaterium</i> DS-4	MF802485	98.2
	DB203	<i>Bacillus subtilis</i> PS01	MG496015	99.0
2	DB206	<i>Bacillus stearothermophilus</i> N1233	KY433303	99.8
	DB209	<i>Bacillus pumilus</i> PM2	KX350055	98.1
	DB310	<i>Bacillus subtilis</i> GS1	MG273747	96.3
3	DB311	<i>Bacillus coagulans</i> LA204	KM096994	100.0
	DB313	<i>Bacillus cereus</i> B4	KM391942	99.7
4	DB403	<i>Bacillus licheniformis</i> SMR6	KU239975	95.1
	DB407	<i>Bacillus subtilis</i> N3	KU973548	97.0
	DB513	<i>Bacillus thuringiensis</i> B17	JQ579628	99.2
5	DB517	<i>Bacillus subtilis</i> J1	KT957305	98.7
	DB520	<i>Bacillus cereus</i> 16L	KF591117	96.0
6	DB605	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> JNTUH16	FR863635	99.0
	DB612	<i>Bacillus licheniformis</i> SCTB104	JN650270	100.0
	DB618	<i>Bacillus pumilus</i> A586	AF447806	98.9
7	DB714	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PB3	MH470473	99.9
	DB730	<i>Bacillus circulans</i> EGK6	MG016504	97.0
8	DB804	<i>Bacillus circulans</i> AMJ245	KY027177	99.1
	DB809	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LH23	JQ917764	99.6
	DB814	<i>Bacillus licheniformis</i> LZ049	JQ023627	96.8
	DB821	<i>Bacillus subtilis</i> DMS	KR709231	100.0
9	DB915	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SML1161	MG937586	97.2
	DB917	<i>Bacillus licheniformis</i> KKR2017	MF040751	98.0
10	DB1019	<i>Bacillus cereus</i> WS-1	MF964937	99.9
	DB1020	<i>Bacillus subtilis</i> SPB18	KY082729	100.0
	DB1022	<i>Bacillus megaterium</i> SAK	KM369985	98.4

는 Table 3과 같다. 실험 균주 중에서 가장 많은 양의 바이오제닉 아민 생성균을 조사한 결과, 카다베린은 *B. licheniformis* DB102 ($1,051.0 \pm 33.5$ mg/L), 히스타민은 *Bacillus* sp. DB310 ($1,345.5 \pm 37.2$ mg/L), 푸트레신은 *B. amyloliquefaciens* DB714 ($1,069.5 \pm 31.1$ mg/L), 티라민은 *B. subtilis* DB203 ($2,018.4 \pm 45.3$ mg/L)에 의해 생산되었다. 이 외에도 *B. stearothermophilus* DB206은 카다베린(804.2 ± 25.1 mg/L), *B. coagulans* DB311은 히스타민(778.2 ± 10.2 mg/L)과 푸트레신(809.1 ± 40.5 mg/L), *Bacillus* sp. DB915는 과량의 티라민(925.4 ± 22.5 mg/L)을 생산하는 것으로 확인되었다. 이상의 결과에서 볼 때, 동일한 균

종일지라도 균주에 따라 생성하는 바이오제닉 아민의 종류가 다르고 생성량에도 큰 차이가 있음을 확인하였다.

반면, *Bacillus* sp. DB403은 카다베린($33.4 \pm 0.7\%$)을 분해하였고, *Bacillus* sp. DB407은 푸트레신($9.8 \pm 0.9\%$)과 티라민($26.7 \pm 1.3\%$)을 분해하는 것으로 확인되었다. 또한 *B. licheniformis* DB612는 히스타민($30.4 \pm 0.9\%$), *B. subtilis* DB821은 히스타민($29.6 \pm 1.1\%$)과 푸트레신($55.0 \pm 0.2\%$)에 대한 분해능이 나타났다. 하지만 그 이외의 균주들로부터는 아민 분해능이 확인되지 않았고 균주에 따라 분해능이 상이하였다(Table 4). Kim 등(2012)도 된장 내 주된 미생물인 바실러스균은 종에 따라 아

Table 3. Biogenic amine-production ability of *Bacillus* sp. isolated from traditional fermented soybean paste

Strain	Cadaverine (mg/L)	Histamine (mg/L)	Putrescine (mg/L)	Tyramine (mg/L)
<i>Bacillus licheniformis</i> DB102	1,051.0±33.5	ND	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i> DB203	ND	ND	ND	2,018.4±45.3
<i>Bacillus stearothermophilus</i> DB206	804.2±25.1	339.2±19.5	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB209	552.4±13.4	ND	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB310	ND	1,345.5±37.2	ND	ND
<i>Bacillus coagulans</i> DB311	ND	778.2±10.2	809.1±40.5	ND
<i>Bacillus cereus</i> DB313	628.6±30.2	ND	462.0±5.9	ND
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DB714	ND	ND	1,069.5±31.1	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB915	441.2±11.5	ND	ND	925.4±22.5
<i>Bacillus</i> sp. DB917	ND	582.3±29.6	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i> DB1019	ND	ND	ND	391.2±11.3
<i>Bacillus subtilis</i> DB1020	550.8±8.9	ND	ND	489.1±21.5
<i>Bacillus</i> sp. DB1022	104.7±2.3	ND	ND	ND

ND, not detected.

Table 4. Biogenic amine-degradation ability of *Bacillus* sp. isolated from traditional fermented soybean paste

Strain	Cadaverine (%)	Histamine (%)	Putrescine (%)	Tyramine (%)
<i>Bacillus</i> sp. DB108	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB403	33.4±0.7	ND	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB407	ND	ND	9.8±0.9	26.7±1.3
<i>Bacillus thuringiensis</i> DB513	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i> DB517	ND	44.1±3.0	19.5±2.7	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB520	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus thermoamylovorans</i> DB605	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus licheniformis</i> DB612	ND	30.4±0.9	ND	ND
<i>Bacillus pumilus</i> DB618	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB730	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus circulans</i> DB804	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DB809	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB814	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i> DB821	ND	29.6±1.1	55.0±0.2	ND

ND, not detected.

민을 생성하기도 하지만 일부 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 및 *B. licheniformis* 등은 바이오제닉 아민의 함량을 감소시키는 것으로 보고한 바 있는데 본 연구와 일부 균종에서 동일한 결과가 나타났다.

콩을 삶은 후 벗짚 내 상재균을 이용하여 발효시킨 메주가 된 장의 주 원료이므로 된장에서 분리된 주요 미생물들은 주로 메주 발효 과정 중의 유입균에 기인하는 것으로 알려져 있다. 메주로부터 분리된 주요 바실러스균으로는 *B. citreus*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. pumilus* 등이 있다고 보고(Shin and Jeong, 2015)된 바 있는데 이와 동일한 균종 일부가 된장에서 검출되었다. 대두 발효 식품 내 우점종인 바실러스 균종은 매우 다양하며 이들의 바이오제닉 아민 생성능 및 분해능도 균종에 따라 상이한 것으로 나타났다. Han 등(2007)에 따르면 청국장에서 분리된 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* 등이 바이오제닉 아민을 생성하였고, Choi 등(2012)도 전통 발효 청국장으로부터 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* 등이 탈탄산 효소를 생성하여 바이오제닉 아민을 생성한다고 보고하였는데 본 연구의 전통 발효 된장에서도 이와 유사한 균종들이 바이오제닉 아민을 생성하는 것으로 밝혀졌다.

전통 장류로부터 분리된 *B. subtilis* SCC B1110, SCK B1108, SCK B1109, SCS B1106과 *B. amyloliquefaciens* SCB B1307은 27~92%의 바이오제닉 아민을 분해하였는데 이 중에서도 *B. subtilis*은 히스타민과 티라민보다는 푸트레신과 카다베린의 분해율이 더 높게 나타났으며, 아민의 분해 정도는 동일한 균종이라도 균주에 따라 상이한 것으로 밝혀졌다(Kim *et al.*, 2012). 또한 전통 발효 방식으로 제조한 청국장으로부터 분리한 *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610과 상동성이 99% 이상인 YD-6, KJ-21, 2RL2-3, PJ-7, KJ-10 및 Mpul-4 등의 균주들은 비교적 높은 티라민 분해능을 보여 주었는데(Moon *et al.*, 2015) 이와 같이 아민 분해 메커니즘으로는 아민 산화 효소(amines oxidase)에 의한 산화적 탈아미노화 반응이나, 항균 물

질을 생산함으로써 유해 아민 생성균의 증식을 억제하거나 사멸시켜 아민 생성량을 감소시키는 것으로 밝혀졌다(Tabanelli *et al.*, 2014).

바이오제닉 아민 분해능이 있는 바실러스균의 프로바이오틱 활성

바이오제닉 아민 분해능이 있는 프로바이오틱 바실러스균을 발효 스타터로 이용하고자 인공 소화액에 대한 내성, 장관 상피세포에 대한 부착능 및 병원성을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 실험 균주 중에서 *B. subtilis* DB517 ($4.5 \pm 1.4\%$)과 *Bacillus* sp. DB403 ($2.7 \pm 0.2\%$)은 인공 위액에 대한 저항성이 높았던 반면, *Bacillus* sp. DB407, *B. licheniformis* DB612 및 *B. subtilis* DB821의 생존율은 1% 미만으로 저항성이 낮게 나타났다. 한편, 3% bile salts가 첨가된 인공 담즙액 내에서 *B. licheniformis* DB612 ($90.7 \pm 4.0\%$)와 *B. subtilis* DB821 ($93.8 \pm 0.7\%$)은 인공 담즙액에 대한 저항성이 높게 나타났으나, *Bacillus* sp. DB403, *Bacillus* sp. DB407 및 *B. subtilis* DB517은 이들보다 낮은 생존율을 나타내었다. 체내로 유입된 세균의 많은 생균수가 대장에 도달한 후 상피세포에 부착한 다음 기능성을 발휘해야만 하므로 산도가 높은 위액과 담즙액에 대한 저항성은 프로바이오틱 균주가 되기 위한 필수적인 요건이다(Jena *et al.*, 2013). Hanifi 등(2015)에 따르면 *B. subtilis* R0179는 위장관을 통과하는 동안 높은 생존율을 나타내었고 인체에 무해하여 다양한 형태로 이용 가능하다고 설명하였다. Argyri 등(2014)에 따르면 pH 2.5의 인공 위액 내에서 3시간 동안 *Lactobacillus* 속보다 포자 형성균인 바실러스균이 인공 소화액에 대한 저항성이 크다고 보고하였고 *B. amyloliquefaciens* AMS1은 0.3% pepsin (pH2.0)이 첨가된 배양액에서 3시간 동안 70.07%의 생존율을 보였다(Manhar *et al.*, 2015). 전통 간장으로 분리된 바실러스속 균주는 위액에 대해 91% 이상의 높은 저항성을 나타내었고, 특히 3%의 bile salts 하에서도 90.31~99.31%에 이르렀으나(Lee *et al.*, 2017), 본 연구에서 분리된 바실러스균들의 저

Table 5. Probiotic characteristics of *Bacillus* sp. isolated from traditional fermented soybean paste

Strain	Survival (%)		Adhesion (%)	Antibiotics resistance (MIC, µg/ml)						Haemolysis	
	Gastric juice	Intestinal juice		A	E	K	P	S	T		V
<i>Bacillus</i> sp. DB403	2.7±0.2	82.5±2.4	20.5±1.1	32	128	256	16	128	4	16	α
<i>Bacillus</i> sp. DB407	0.2±0.5	76.4±5.7	9.8±0.7	128	32	128	256	8	512	4	α
<i>Bacillus subtilis</i> DB517	4.5±1.4	80.5±1.3	2.2±0.2	256	128	64	32	32	256	16	α
<i>Bacillus licheniformis</i> DB612	0.1±0.0	90.7±4.0	11.8±1.8	16	8	8	4	256	512	4	γ
<i>Bacillus subtilis</i> DB821	0.1±0.0	93.8±0.7	30.5±3.5	16	256	4	256	8	8	128	α

A, ampicillin; E, erythromycin; K, kanamycin; P, penicillin; S, streptomycin; T, tetracycline; V, vancomycin.

항성은 이들보다 저항성이 낮았으나, 일부 분리균들은 사람이나 동물의 장관 내에서 상당수 생존할 것으로 추정되었다.

Caco-2 세포에 대한 부착능을 측정한 결과, *B. subtilis* DB517 ($2.2 \pm 0.2\%$)이 가장 낮았고, *Bacillus* sp. DB403 ($20.5 \pm 1.1\%$)과 *B. licheniformis* DB612 ($11.8 \pm 1.8\%$)의 부착능도 비교적 높았으며, *B. subtilis* DB821 ($30.5 \pm 3.5\%$)은 가장 높은 부착능을 보였다. 간장에서 분리된 *Bacillus* sp. MKSK-MI, E1 및 J1 균주들은 강한 세포 소수성과 자기 응집성을 나타내었으므로 세포 부착력이 높은 것으로 나타났으며(Lee *et al.*, 2017), *B. amyloliquefaciens* SRCM 100730의 인체 상피세포에 대한 부착율도 72.2%에 이르렀다고 보고하였는데(Ryu *et al.*, 2017), 본 연구에서 분리된 바실러스균주들은 이들보다는 다소 낮은 부착능을 보여주었다. 자일렌, 클로로포름 혹은 에틸 아세테이트와 같은 용제로 인한 세포 소수성은 세균의 세포 부착능 지표에 이용되며, 부착능이 높을수록 연동 운동에 의한 세포의 탈락을 막고 상피세포에 부착하도록 하여 장내 환경의 균형을 맞춰 기능을 발휘하게 된다고 보고하였다(Pedersen and Tannock, 1989; Alander *et al.*, 1997). 체내 상피조직에 대한 부착과 집락 형성을 통해 프로바이오틱 미생물은 세포 수용체에 입체적 상호작용이나 특이적 봉쇄에 의해 병원균의 접근을 막을 수 있다(Otero *et al.*, 2004).

Bacillus sp. DB403은 erythromycin (128 µg/ml), kanamycin (256 µg/ml) 및 streptomycin (128 µg/ml), *Bacillus* sp. DB407은 ampicillin (128 µg/ml), kanamycin (128 µg/ml), penicillin G (256 µg/ml) 및 tetracycline (512 µg/ml), *B. subtilis* DB517은 ampicillin (256 µg/ml), erythromycin (128 µg/ml) 및 tetracycline (256 µg/ml), *B. licheniformis* DB612은 streptomycin (256 µg/ml) 및 tetracycline (512 µg/ml), *B. subtilis* DB821은 erythromycin (256 µg/ml), penicillin G (256 µg/ml) 및 vancomycin (128 µg/ml) 등의 항생제에 대한 저항성이 강한 것으로 나타나 균주마다 저항할 수 있는 항생제의 종류가 다르고, MIC도 상이하였다. *B. subtilis* DET6은 *B. megaterium* JHT3과 *B. thuringiensis* DET9 균주보다 erythromycin과 novobiocin에 대해 감수성이 높았다. 반면 JHT3은 DET6과 DET9 균주에 비해 tetracycline과 lincomycin에 대해서는 감수성이 높게 나타났으나, ampicillin과 penicillin에 대해서는 감수성이 낮은 것으로 확인되었고(Patel *et al.*, 2009), *B. amyloliquefaciens* AMS1은 ampicillin과 penicillin에 대해 강한 저항성을 보였다(Manhar *et al.*, 2015). 간장으로부터 분리된 MKSK-E1, J1 및 M1 바실러스 균주는 세포벽을 저해시키는 항생제인 ampicillin, cephalixin, penicillin G 및 vancomycin 등과 단백질 합성 저해제인 chloramphenicol, erythromycin, gentamicin 및 tetracyclin 등에 감수성이 높았다

(Lee *et al.*, 2017).

B. licheniformis DB612만이 γ -haemolysis를 나타내었으나, 그 이외의 균주들은 모두 α -haemolysis를 생산하는 것으로 확인되었다. *B. megaterium* JHT3은 γ -haemolysin을 생산한 반면, *B. subtilis* DET6과 *B. thuringiensis* DET9는 β -haemolysin을 생산하였다(Patel *et al.*, 2009). *B. cereus*는 β -haemolysin 현상을 나타내었는데 이는 세균의 세포독성 인지질 분해효소에 의하며, 용혈 인자는 숙주를 위한 철원자의 공급원인 헤모글로빈의 양을 감소시킨다(Seker, 2010). 이미 보고된 결과와 비교해 볼 때 바실러스균의 항생제에 대한 저항성과 용혈성은 균주에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다.

바이오테크 아민 생성능이 있는 바실러스균주에 대한 프로바이오틱 활성이 있는 바실러스균의 항균 활성을 측정한 결과는 Table 6과 같다. *Bacillus* sp. DB407은 *B. subtilis* DB203 (256 AU/ml), *Bacillus* sp. DB310 (128 AU/ml), *B. cereus* DB313 (128 AU/ml), *B. cereus* DB1019 (64 AU/ml), *B. subtilis* DB1020 (64 AU/ml)에 대해 항균 활성을 나타내었다. *B. subtilis* DB821은 *B. subtilis* DB203 (64 AU/ml), *Bacillus* sp. DB209 (128 AU/ml)와 *Bacillus* sp. DB1022 (32 AU/ml)의 증식 억제 효과가 있는 것으로 확인되었으므로 이들을 된장 발효 스타터로 이용한다면 유해 아민의 함량을 낮추는데 효과적일 것으로 판단된다. 하지만 *Bacillus* sp. DB403과 *B. licheniformis* DB612 및 *B. subtilis* DB517은 지시 균주의 증식을 억제할 수 있는 박테리오파지를 생산하지 못하는 것으로 나타났다.

간장에서 분리된 바실러스속 MKSK-MI, E1 및 J1 균주들은 *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonase fluorescens* 및 *Klebsiella pneumoniae*에 대해 항균 활성을 나타내었는데 특히 전통 발효 장류 식품의 안전을 위협하는 대표적인 *B. cereus*의 증식을 가장 강하게 억제하는데 효과적임을 확인하였다(Lee *et al.*, 2017). 바실러스균은 대사 활성이 높기 때문에 인체 장관 내에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌는데 이는 항균물질 생산에 따른 것이며 항균 스펙트럼과 항균 물질의 구조는 매우 다양하다. 특히, *B. subtilis*는 다양한 병원균(*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* 등)에 대해 특이적이고 신속하게 사멸시킬 수 있는 항균 물질을 생산하였고, 이 물질은 인체 항미생물의 방어 시스템의 일부분처럼 작용하므로 병원균의 내성과 부작용 발생 가능성이 극히 낮다고 하였다(Olmos and Paniagua-Michel, 2014). *B. subtilis*가 생산한 항균물질로는 subtilin, ericin, mersacidin, subtilosin, bacilloccin, surfactin, bacilysin 등 매우 다양하며 이들은 세포막에 구멍을 뚫어서 세포 내 물질을 유출시키고, 세포벽 합성을 저해하고

Table 6. Antibacterial activity of probiotic *Bacillus* strain against biogenic amine-producing *Bacillus* sp. isolated from traditional fermented soybean paste

Indicator	Bacteriocin activity (AU/ml)				
	<i>Bacillus</i> sp. DB403	<i>Bacillus</i> sp. DB407	<i>Bacillus subtilis</i> DB517	<i>Bacillus licheniformis</i> DB612	<i>Bacillus subtilis</i> DB821
<i>Bacillus licheniformis</i> DB102	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i> DB203	ND	256	ND	ND	64
<i>Bacillus stearothermophilus</i> DB206	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB209	ND	ND	ND	ND	128
<i>Bacillus</i> sp. DB310	ND	128	ND	ND	ND
<i>Bacillus coagulans</i> DB311	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i> DB313	ND	128	ND	ND	ND
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DB714	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB915	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB917	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i> DB1019	ND	64	ND	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i> DB1020	ND	64	ND	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. DB1022	ND	ND	ND	ND	32

ND, not detected.

세포막 수용체에 결합하여 기능을 방해하기도 하며, 핵산, 아미노산, 조효소 합성에 관여하는 효소를 불활성화시켜 결국 세포를 용해시킨다고 알려져 있다(Suva *et al.*, 2018).

유해 아민 저감화를 위해 방사선 조사, 진공 포장, 고압 처리 및 염장과 같은 삼투압을 이용한 가공법이 보고된 바 있으나 (Dapkevicius *et al.*, 2000), 이런 물리적 처리 방법들은 식품의 조직감이나 영양학적 가치 손상 및 독성을 유발하는 단점이 있으므로 바이오제닉 아민 생성능이 없거나 분해능이 있는 미생물을 이용하는 생물학적 제어 방법을 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Mah, 2015). 생물학적 보존제인 박테리오신이나 과산화수소 등과 같은 항균 물질을 생산하는 유산균을 발효 스타터로 이용하거나 혼용함으로써 발효 식품 내 아민 축적을 억제시키는데 효과적인 것으로 보고되었다(Herrero-Fresco *et al.*, 2012). 프로바이오틱 균주로는 주로 *Lactobacillus* 속 및 *Bifidobacterium* 속들이 이에 해당되는 것으로 많이 알려져 왔으나, 포자 형성균인 바실러스균도 그 활성이 보고되고 있는데 이들은 위액에 대한 강한 저항성 및 가열 처리 공정과 저온 하에서도 활성이 안정할 뿐만 아니라 장내 상피세포에 대한 병원성균의 부착 억제, 항산화 활성 및 면역 조절 기능 등이 확인된 바 있다(Elshagabee *et al.*, 2017). 바실러스균은 포자를 형성함으로써 외부 환경에 대한 저항성이 강하므로 프로바이오틱균으로서의 이용 가치가 높으며 독성 유발이나 위해 발생 가능성이 낮으므로 안전성이 확보되어 generally recognized as safe (GRAS)의 요구 조건을 충족하는 것으로 확인되었다

(Patel *et al.*, 2009). 프로바이오틱 활성을 나타내는 바실러스속 균주로는 *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. cereus* var. *toyoi*, *B. natto* (*subtilis*), *B. clausii*, *B. pumilus*, *B. clausii*, *B. amyloliquefaciens* 및 *B. polyfermenticus* 등이 보고된 바 있는데(Manhar *et al.*, 2015; Suva *et al.*, 2018), 본 연구 결과 발효 된장에서 분리된 *Bacillus* sp. DB407과 DB821도 프로바이오틱 활성 및 항균 물질 생산에 따라 바이오제닉 아민 생성균에 대한 항균 활성도 확인되었으므로 향후에는 분리 균주들을 발효 스타터로 이용하여 된장을 제조한 후 바이오제닉 아민 함량 측정 및 다양한 생리활성 검색에 관한 연구를 계속 이어갈 것이다. 한편, 바이오제닉 아민의 함량이 높음에도 불구하고 발효 장류 제품들에 대한 허용 가능한 유해 아민 기준치가 마련되어 있지 않아 소비자들의 건강을 위협하고 있으므로 유해 아민의 만성 독성 시험을 통해 1일 섭취 허용량 결정하고 유해 아민 생성을 최소화할 수 있는 발효 조건 설정에 관한 연구도 시급하다.

적 요

본 연구에서는 우리나라 전통 발효 된장 내 바이오제닉 아민 함량을 측정하고 이들 아민의 축적을 억제할 수 있는 프로바이오틱 바실러스균을 분리하였다. 된장 내 세균수, pH, 적정 산도, 염도 및 바이오제닉 아민 함량은 시료마다 유의한 차이

가 있었다. 된장에서 분리된 바실러스균 중에서 *Bacillus* (*B.*) *licheniformis* DB102, *B. subtilis* DB203, *B. stearothermophilus* DB206, *Bacillus* sp. DB209, *Bacillus* sp. DB310, *B. coagulans* DB311, *B. cereus* DB313, *B. amyloliquefaciens* DB714, *Bacillus* sp. DB917, *B. cereus* DB 915, *B. subtilis* DB1020 및 *Bacillus* sp. DB1022는 바이오제닉 아민 생성능이 있는 것으로 확인되었다. 반면, 바이오제닉 아민 분해균은 *Bacillus* sp. DB403, *Bacillus* sp. DB407, *B. subtilis* DB517, *B. licheniformis* DB612 및 *B. subtilis* DB821로 동정되었다. 특히, *Bacillus* sp. DB407과 *B. subtilis* DB821은 인공 소화액에 대한 저항성, 장관 상피 세포에 대한 부착능, 항생제에 대한 내성 및 바이오제닉 아민 생성균에 대한 항균 활성 등의 프로바이오틱 특성을 나타내었다. 결론적으로 이들 두 프로바이오틱 바실러스균은 바이오제닉 아민이 낮은 대두 발효 식품 제조에 적합한 스타터로 사료된다.

References

- Al Bulushi I, Poole S, Deeth HC, and Dykes GA. 2009. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation. A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 369-377.
- Alander M, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Matilla-Sandholm T, and Wright A. 1997. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 361-364.
- Argyri AA, Nisiotou AA, Malauchos A, Panagou EZ, and Tassou CC. 2014. Performance of two potential probiotic *Lactobacillus* strains from the olive microbiota as starters in the fermentation of heat shocked green olives. *Int. J. Food Microbiol.* **171**, 68-76.
- Brink B, Damink C, Joosten HMLJ, and Huis In't Veld JHJ. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 73-84.
- Cho TY, Han GH, Bahn KN, Son YW, Jan MR, Lee CH, Kim SH, Kim DB, and Kim SB. 2006. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**, 730-737.
- Choi JY, Hong SW, and Chung KS. 2012. Selection of biogenic amine-reducing microorganisms from a traditional Korean-style fermented food, Cheonggukjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**, 196-201.
- Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH, and Wymenga W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **191**, 53-59.
- Eerola S, Roig-Sagues AX, and Hirvi TK. 1998. Biogenic amines in Finnish dry sausages. *J. Food Saf.* **18**, 127-138.
- Elshagabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, and Panwar H. 2017. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Front. Microbiol.* **8**, 1-15.
- Fuller R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut* **32**, 439-442.
- Gardini F, Özogul Y, Suzzi G, Tabanelli G, and Özogul F. 2016. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. *Front. Microbiol.* **7**, 1-18.
- Guan RF, Liu ZF, Zhang JJ, Wei YX, Wahab S, Liu DH, and Ye XQ. 2013. Investigation of biogenic amines in sufu(*furu*): A Chinese traditional fermented soybean food product. *Food Cont.* **31**, 345-352.
- Han GH, Cho TY, Yoo MS, Kim CS, Kim JM, Kim HA, Kim MO, Kim SC, Lee SA, Ko YS, et al. 2007. Biogenic amines formation and content in fermented soybean paste (Cheonggukjang). *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, 541-545.
- Hanifi A, Culpepper T, Mai V, Anand A, Ford AL, and Ukhanova M. 2015. Evaluation of *Bacillus subtilis* R0179 on gastrointestinal viability and general wellness: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy adults. *Benef. Microbes* **6**, 19-27.
- Hernandez-Jover T, Izquierdo-Pulido M, Vechiana-Nogues MT, Marine-Font A, and Vidal-Carou MC. 1997. Biogenic amines and polyamine contents in meat and meat products. *J. Ag. Food Chem.* **45**, 2098-2102.
- Herrero-Fresno A, Martinez N, Sanchez-Llana E, Diaz M, Ferrandez M, Martin MC, Ladero V, and Alvarez MA. 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amines accumulation in an experimental model. *Int. J. Food Microbiol.* **157**, 297-304.
- Holo H, Nilssen O, and Nes IF. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**, 3879-3887.
- Jena PK, Trivedi D, Thakore K, Chaudhary H, Giri SS, and Seshadri S. 2013. Isolation and characterization of probiotic properties of lactobacilli isolated from rat fecal microbiota. *Microbiol. Immunol.* **57**, 407-416.
- Jeon HH, Jung JY, Chun BH, Kim MD, Baek SY, Moon JY, Yeo SH, and Jeon CO. 2016. Screening and characterization of potential *Bacillus* starter cultures for fermenting low-salt soybean paste (doenjang). *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 666-674.
- Kalač P and Krausová P. 2005. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.* **77**, 349-351.
- Kim JH, Ahn HJ, Kim DH, Jo C, Yook HS, Park HJ, and Byun MW. 2003a. Irradiation effects on biogenic amines in Korean fermented soybean paste during fermentation. *J. Food Sci.* **68**, 80-84.
- Kim YS, Cho SH, Jeong DY, and Uhm TB. 2012. Isolation of biogenic amines-degrading strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* from traditionally fermented soybean products. *Korean J. Microbiol.* **48**, 220-224.
- Kim KM, Kim MJ, Kim DH, Park YS, and Kang JS. 2009. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 as a probiotic. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1013-1018.

- Kim M, Oh HS, Park SC, and Chun J.** 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 346–351.
- Kim JH, Park HJ, Kim MJ, Ahn HJ, and Byun MW.** 2003b. Survey of biogenic amine contents in commercial soy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 325–328.
- Lee HT, Kim JH, and Lee SS.** 2009. Analysis of microbiological contamination and biogenic amines content in traditional and commercial doenjang. *J. Fd. Hyg. Safety* **24**, 102–109.
- Lee SK, Lee JJ, Jin YI, Jeong JC, Chang YH, Lee YS, Jeong YH, and Kim MS.** 2017. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. *LWT-Food Sci. Technol.* **79**, 518–524.
- Lee YC, Lin CS, Liu FL, Huang TC, and Tsai YH.** 2015. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *J. Food Drug Anal.* **23**, 836–844.
- Lehane L and Olley J.** 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 1–37.
- Li L, Wen X, Wen Z, Chen S, Wang L, and Wei X.** 2018. Evaluation of the biogenic amines formation and degradation abilities of *Lactobacillus curvatus* from Chinese bacon. *Front. Microbiol.* **9**, 1–9.
- Mah JH.** 2015. Fermented soybean foods: Significance of biogenic amines. *Austin J. Nutri. Food Sci.* **3**, 1058–1060.
- Manhar AK, Saikia D, Bashir Y, Mech RK, Nath D, and Konwar BK.** 2015. *In vitro* evaluation of cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* AMS1 isolated from traditional fermented soybean (Churpi) as an animal probiotic. *Res. Veterinary Sci.* **99**, 149–156.
- Moon JY, Kwon SW, Hong SB, Seok SJ, Kim JS, and Kim SJ.** 2015. Characteristics and functional analysis of *Bacillus* strains from the fermented soybean products, Cheonggukjang. *Korean J. Microbiol.* **51**, 300–307.
- Olmos J and Paniagua-Michel J.** 2014. *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *J. Microb. Biochem. Technol.* **6**, 7–10.
- Otero MC, Ocana VS, and Macias ENM.** 2004. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. *Methods Mol. Biol.* **268**, 435–440.
- Patel AK, Ahire JJ, Pawar SP, Chaudhari BL, and Chincholkar SB.** 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. *Food Res. Int.* **42**, 505–510.
- Pedersen K and Tannock GW.** 1989. Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 279–283.
- Ryu MS, Yang HJ, Kim JW, Jeong SJ, Jeong SY, Eom JS, and Jeong DY.** 2017. Potential probiotics activity of *Bacillus* spp. from traditional soybean pastes and fermentation characteristics of Cheonggukjang. *Korean J. Food Preserv.* **24**, 1168–1179.
- Savitha K, Srinivas M, and Dhanalakshmi K.** 2016. Isolation and characterization of bacteriocin from *Bacillus cereus* MTCC 1307. *Int. J. Appl. Pure Sci. Agric.* **2**, 200–208.
- Seker E.** 2010. Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their *in vitro* hemolytic activity in Western Turkey. *Mycopathologia* **169**, 303–380.
- Shalaby AR.** 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **29**, 675–690.
- Shim JM, Lee KW, Yao Z, Kim HJ, and Kim JH.** 2016. Properties of doenjang (soybean paste) prepared with different types of salts. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1533–1541.
- Shin DH and Jeong DY.** 2015. Korean traditional fermented soybean products: Jang. *J. Ethnic Food* **2**, 2–7.
- Shukla S, Park HK, Kim JK, and Kim MH.** 2010. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food Chem. Toxicol.* **48**, 1191–1195.
- Suva MA, Sureja VP, and Kheni DB.** 2018. Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: Mechanism of action and clinical applications. *J. Curr. Res. Sci. Med.* **2**, 65–72.
- Tabanelli G, Montanari C, Bargossi E, Lanciotti R, Gatto V, Felis G, Torriani S, and Gardini F.** 2014. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *Int. J. Food Microbiol.* **190**, 14–23.
- Wang T and Su J.** 2016. *Bacillus subtilis* from soybean food shows antimicrobial activity for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by affecting the *adeS* gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 2043–2050.
- Wunderlichova L, Bunkova L, Koutny M, Jancova P, and Bunka F.** 2014. Formation, degradation, and detoxification of putrescine by foodborne bacteria: a review. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* **13**, 1012–1030.
- Zhang Q, Lin S, and Nie X.** 2013. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* **32**, 496–500.