

재래식 된장으로부터 아민 산화 효소를 생산하는 프로바이오틱 바실러스균의 분리 동정

임은서[†]

동명대학교 식품영양학과, 부교수
(2020년 11월 20일 접수: 2020년 12월 21일 수정: 2020년 12월 21일 채택)

Isolation and Identification of Probiotic *Bacillus* strain Forming Amine Oxidase from Traditional Fermented Soybean Paste

Eun-Seo Lim[†]

Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Republic of Korea
(Received November 20, 2020; Revised December 21, 2020; Accepted December 21, 2020)

요약 : 본 연구의 목적은 3년 이상 숙성된 재래식 된장으로부터 아민 산화 효소를 생산하는 프로바이오틱 바실러스균을 분리 동정하는 것이다. 시료로부터 분리된 바이오제닉 아민(biogenic amines, BA) 생성균은 *Bacillus* sp. TS09, *Bacillus licheniformis* TS17, *Bacillus subtilis* TS19, *Bacillus cereus* TS23, *Bacillus* sp. TS30, *Bacillus megaterium* TS31, *B. subtilis* TS44, *Bacillus coagulans* TS46 및 *Bacillus amyloliquefaciens* TS59 등으로 동정되었다. 한편 동일한 시료로부터 분리된 *B. subtilis* TS04와 TS50은 인공 위액 및 담즙액에 대한 저항성, 장내 상피세포에 대한 부착능 및 BA 생성균(*Bacillus* sp. TS30 및 *B. subtilis* TS44)에 대한 박테리오톨린 생산 등의 프로바이오틱 활성을 나타내었다. 게다가 *B. subtilis* TS04와 TS50 균주가 생산한 아민 산화 효소에 의하여 카다베린, 푸트레신 및 티라민의 생성량을 감소시킬 수 있었으므로 이들은 BA 중독 위험을 낮출 수 있는 프로바이오틱스 소재로서의 활용 가치가 높을 것으로 판단된다.

주제어 : 아민 산화 효소, 바실러스균, 바이오제닉 아민, 프로바이오틱, 된장

Abstract : The primary objective of this study was to isolate and identify amine oxidase-producing probiotic *Bacillus* strains from traditional fermented soybean paste. Biogenic amines (BA)-forming bacteria isolated from the samples were identified as *Bacillus* sp. TS09, *Bacillus licheniformis* TS17, *Bacillus subtilis* TS19, *Bacillus cereus* TS23, *Bacillus* sp. TS30, *Bacillus megaterium* TS31, *B. subtilis* TS44, *Bacillus coagulans* TS46 and *Bacillus amyloliquefaciens* TS59. Meanwhile, *B. subtilis* TS04 and TS50 isolated from the same samples exhibited good probiotic properties, including the tolerance to artificial gastric juice and bile salts, the adhesion to intestinal epithelial cells, and the production of

[†]Corresponding author
(E-mail: limsm0208@naver.com)

bacteriocin(s) active against BA-forming bacteria (*Bacillus* sp. TS30 and *B. subtilis* TS44). In addition, the amine oxidase produced by *B. subtilis* TS04 and TS50 significantly decreased the formation of BA, especially cadaverine, putrescine, and tyramine, therefore, these strains could be considered good potential probiotic candidates to prevent or reduce BA accumulation in food products.

Keywords : Amine oxidase, *Bacillus*, Biogenic amine, Probiotic, Soybean paste

1. 서론

바이오제닉 아민(biogenic amines, BA)는 치즈, 소시지, 발효 채소, 와인 및 장류 등 다양한 발효 식품 제조 과정 중 발효 미생물의 아미노산 탈탄산효소 작용에 의해 생성되는 염기성 질소 화합물이다[1]. 히스타민, 푸트레신, 카다베린, 티라민, 트립타민, 베타-페닐에틸아민, 스페르민 및 스페르미딘 등이 식품에서 흔히 검출되는 BA의 종류들이다[2]. BA 생성량은 염 농도, pH, 발효 및 저장 온도, 제조 환경, 아민 생성 미생물의 존재, 원료의 품질 및 발효 미생물의 유리아미노산 이용능 등 많은 식품의 물리화학적 인자들에 의해 영향을 받는다[3].

소량의 BA는 신경전달을 비롯하여 호르몬, 핵산 및 단백질 합성을 위한 전구체로서 다양한 생리기능 유지에 필수적이기는 하나, 과잉 섭취하게 된 경우 장내 아민 산화 효소의 기능이 상실하게 됨으로써 두통, 메스꺼움, 설사, 복통, 발진, 고혈압 및 부정맥 등을 유발하고 때로는 치명적인 중독 증상을 야기한다[4]. 게다가 일부 BA는 항영양물질로서 영양 흡수 및 대사기능을 방해하거나 아질산염과 반응하여 니트로자민을 생성함으로써 발암을 유발하게 된다[5]. BA에 의한 독성에 확립됨에 따라 일부 식품에서는 허용 한계 수준 설정 및 저감화에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. European Commission은 “Scombroid poisoning”의 원인물질인 히스타민의 함량은 신선 어류에서는 200 mg/kg, 염지한 어류 가공품은 400 mg/kg으로 최대 허용한계치를 설정하였다[6]. 하지만 단백질이 풍부한 콩을 원료로 하여 장기간 발효시켜 제조하는 두류 가공품인 된장(히스타민 952 mg/kg, 티라민 1,430 mg/kg)이나 미소(히스타민 462 mg/100 g, 푸트레신 1,234 mg/100g, 카다베린 634 mg/100 g, 티라민 3,568 mg/100 g) 등으로부터 다량의 BA가 검출됨에도 불구하고 이들에 대한 규제가 명확하지

않다[4,7].

두류 가공품 내 BA 생성균으로는 *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* 및 *Enterococcus* 속 등이 알려져 있는데[8], 발효 과정 중 외부 환경으로부터 혼입되는 장내세균이나 부패균들의 강한 아미노산 탈탄산효소 활성에 의해 BA 생성량이 급증하게 되므로 아민은 식품의 위생지표물질로 활용되고 있다[9]. BA는 가열, 냉동 및 훈연 등의 처리 조건 하에서도 분해되지 않고 활성이 유지될 수 있으므로 BA 생성을 억제할 수 있는 신선한 원료 사용 및 발효 조건 등을 통한 저감화 방법이 알려져 있다[10]. 한편, BA 생성량을 낮추기 위한 방법으로는 진공 포장, 고압 처리, 방사선 조사, 염장이나 향신료 사용 등의 방법도 효과적이기는 하나, 영양소 파괴, 물성이나 관능학적 품질 악화를 유발할 수 있으므로 사용이 제한적이다[11].

물리화학적 방법에 대한 대안으로 잔류성과 독성이 없는 것으로 알려진 생물학적 보존제인 박테리오신과 같은 항균물질의 처리에 의해 수산 가공품 내 BA 생성균의 증식을 억제시키거나 사멸시킴으로써 BA 함량을 효과적으로 낮추었다[12]. 게다가 아민 분해 효소 생산 균주는 BA를 산화시켜 암모니아, 과산화수소 및 알데히드로 전환시킴으로써 식품 내 BA 축적량이 유의하게 감소된 것으로 보고된 바 있다[13]. 특히 프로바이오틱 활성이 나타내는 박테리오신 및 아민 분해 효소 생성 균주를 발효 스타터로 이용할 경우 독성 물질 생산량 억제 효과 및 기능성에 따라 발효 식품으로서의 이용 가치는 더욱 높아지게 될 것이다. 종균을 이용하여 제조한 개량식 된장보다는 재래식으로 제조한 된장은 원료나 제조 및 발효 환경으로부터 다양한 미생물이 혼입될 수 있으므로 본 연구에서는 재래식 된장으로부터 프로바이오틱 활성 및 박테리오신과 아민 분해 효소를 생산하는 바실러스균을 분리 동정하고 BA 생성균과의 혼합에 의한 BA 생산량 감소 효과를

측정해 보고자 한다.

2. 실험

2.1. 바실러스균 분리 동정

일반 가정에서 제조하여 3년 이상 숙성된 재래식 된장 10종을 수집한 후 시료(30 g)에 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS, 270 mL)를 가한 다음 균질화 하였다. 시료 용액은 가열 처리(80°C, 15분간) 후 냉각한 다음 Luria-Bertani (BD Difco Co.) 평판배지에 자란 독립 집락을 Brain Heart Infusion agar (BHI, BD Difco Co.)에서 순수 분리 배양하였다. BA 생성능이 있는 균주와 프로바이오틱 활성 및 아민 분해 효소 생성능이 있는 바실러스균을 각각 분리하여 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 동정하였다. 선발된 바실러스균의 DNA purification kit (Promega)로 genomic DNA를 추출한 후 universal primer 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTA CCTTGTTACGACTT-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 QIA quick PCR purification kit (Qiagen)로 정제한 후 염기서열을 분석하였고 National Center for Biotechnology Institute (NCBI)의 GenBank database를 이용하여 분리 균주를 동정하였다.

2.2. BA 생성능 측정

분리된 바실러스 균주의 BA 생성능 측정을 위해 탈카복실기 액체배지(decarboxylating broth)에 전구체 아미노산(L-histidine monohydrochloride monohydrate, L-tyrosine disodium salt, L-lysine monohydrochloride 및 L-ornithine monohydrochloride, Sigma-Aldrich, 1 g/L)과 pyridoxal 5-phosphate (1 mg/L)를 첨가하고 실험 균주를 접종한 후 5회 전 배양(37°C, 24시간)하였다. 각 아미노산(2%, w/v)을 첨가한 탈카복실화 액체배지(1 mL)에 전 배양액(0.5 mL)을 접종한 후 혐기적인 조건(Anoxomat 8000 system, MART Co.)에서 배양(37°C, 72시간) 하였다. 세

포 배양액(1 mL)에 0.4 M perchloric acid (Merck, 9 mL)를 가하고 원심분리(12,000 × g, 10분)해서 얻은 상등액(250 μl)에 2 M NaOH (25 μl), 포화 NaHCO₃ (75 μl) 및 dansyl chloride (500 μl)를 가하고 반응(50°C, 45분간)시켰다. 반응물에 25% NH₄OH(25 μl)를 가하여 배양(50°C, 15분)시킨 다음 acetonitrile (1.5 mL)를 가하고 원심분리(2,500 × g, 5분)하여 얻은 상등액을 membrane filter (0.22 μm, Millipore Corp.)로 여과하여 dansyl 유도체를 제조하였다. 시료 내 BA는 High pressure liquid chromatography (HPLC, Shimadzu)의 Nova-Pak C₁₈ 컬럼(150 × 3.9 mm, Waters)을 사용하여 분석(30°C) 하였다. 이동상 ammonium acetate (0.1 M, solvent A)와 acetonitrile (solvent B)을 선형 구배로 하여 유속 1 mL/min 하에서 흡광도(254 nm)를 측정하여 바실러스균의 BA 생성량을 조사하였다.

2.3. 프로바이오틱 활성

BA 생성능이 없는 분리 균주를 대상으로 프로바이오틱 활성을 측정하였다. 인공 소화액에 대한 저항성은 Grimoud 등[14]의 방법을 일부 변형하여 조사하였다. 즉, BHI broth에 전 배양액(1%, v/v) 접종 및 배양(37°C, 24시간)하여 얻은 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하였다. 모은 세포를 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 난 다음 세포수(1.0 × 10⁸ CFU/mL)를 조정하여 인공 위액(NaCl 125 mM, KCl 7 mM, NaHCO₃ 45 mM, pepsin 1 mg/mL; Sigma-Aldrich, pH 2.5)에서 배양(37°C, 2시간)하였다. 한편, 인공 담즙액(oxgall 0.5%, Sigma-Aldrich, pH 8.0) 하에서도 37°C, 3시간 배양한 다음 BHI agar 평판배지 상에서 표준한천평판배양법으로 잔존하는 균수를 측정하였다.

HT-29 세포에 대한 부착능은 Osmanagaoglu 등[15]의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich)에 가열 처리(56°C, 30분간)한 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 streptomycin 을 첨가하고 HT-29 세포 (Korean Cell Line Bank)를 접종하고 배양(37°C, 5% CO₂) 하였다. 6-well culture plate (Falcon, Beckton Dickinson)에 FBS와 항생제를 첨가하지

얇은 DMEM 배지를 분주하고 monolayer를 형성한 HT-29 세포(1.0×10^5 cells/mL)를 접종하고 전 배양(37°C, 2시간, 5% CO₂) 하였다. 바실러스균 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 균수(1.0×10^8 CFU/mL)를 조정하여 다음 plate well에 접종한 후 배양(37°C, 2시간) 하였다. Well을 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 고정(2% formalin)한 후 염색(2% eosin Y)하고 나서 세척(1% acetic acid)하였다. Microplate reader (BioTek, Inc.)로 흡광도(570 nm)를 측정하여 HT-29 세포에 대한 바실러스균의 부착능을 조사하였다.

박테리옌 활성은 Savitha 등[16]의 방법을 일부 변형하여 측정하였는데, 즉 BHI broth 전 배양액(37°C, 24시간)을 BHI broth (0.1%, w/v 포도당 첨가)에서 진탕 배양(35°C, 22시간, 150 rpm)하였다. 배양 상등액은 pH 6.5로 조정하고 catalase (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) 및 황산암모늄(40% w/v)을 첨가하여 회수한 침전물은 20 mM PBS (pH 6.5)에 현탁시킨 다음 투석시켰다. 시료 용액에 동량의 클로로포름:메탄올(1:1) 혼합 용액을 첨가하여 격렬하게 진탕 시킨 후 분액 깔대기로 옮겨 수상과 유기상 사이 박테리옌이 함유된 계면층을 회수한 것을 microtiter plate method [17]로 BA 생성능이 확인된 바실러스 균주에 대한 박테리옌 활성을 측정하였다. 지시 균주는 BHI broth에서 배양(37°C, 24시간)한 후 모은 세포를 PBS (pH 7.0)로 세척하였다. 2진법으로 희석한 박테리옌 용액을 plate well에 분주하고 지시 균주(1.0×10^5 CFU/mL)의 세포 현탁액(1%)을 접종하고 배양(37°C, 24시간)한 후 microplate reader (BioTek, Inc.)를 이용하여 흡광도(600 nm)를 측정하였다. 대조구 혼탁도의 50%에 달하는 시료 용액의 최대 희석배수의 역수를 박테리옌 활성(arbitrary units, AU)으로 나타내었다.

2.4. 아민 산화 효소(amine oxidase) 활성 측정

아민 산화 효소 활성은 Heo 등[18]의 방법에 따라 배양액(tryptic soy broth, BD Difco Co., 37°C, 12시간)을 원심분리(7,000×g, 10분, 4°C)하여 모은 세포를 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 농도를 McFarland No. 0.5 (600 nm)로 조정하였다. Amplex Red Monoamine Oxidase Assay Kit (Molecular Probes, USA)를 사용하여 배양액의 amine oxidase 활성을 측정하였다. 효소 활성

은 20°C, pH 6.0에서 20초 간 pyrogallol로부터 1.0 mg의 purpurogallin을 생성하는 능력을 1 unit로 정의하였다.

2.5. BA 분해능 측정

BA 분해능은 Lee 등[19]의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 실험 균주는 BHI broth에서 배양(37°C, 24시간)한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 모은 세포를 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 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 BA (histamine dihydrochloride, tyramine hydrochloride, cadaverine dihydrochloride, putrescine dihydrochloride, 0.1%, w/v)을 첨가하고 난 후 세포 현탁액(1 mL, 1.0×10^6 CFU/mL)을 접종하였다. 배양(35°C, 5일간)한 후 배양액(0.1 mL)은 BA (2%, w/v)가 첨가된 평판 배지에 도말 접종하여 30°C, 5일간 배양하였다. 독립된 집락은 trypticase soy agar (BD Difco Co.) 상에서 순수 분리한 다음 BA (50 ppm)가 첨가된 trypticase soy broth (BD Difco Co.)에 접종하고 배양(35°C, 24시간)하였다. 세포 배양액(1 mL)에 BA 혼합 표준용액(500 ppm)을 가한 다음 앞서 설명한 방법에 따라 dansyl chloride 유도체화 한 다음 HPLC로 잔존하는 BA 함량을 측정하여 계산식($M = [(A-B)/A] \times 100$, M: BA 분해능(%), A: 초기 BA 함량, B: 잔존하는 BA 함량)에 따라 분해능을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 바실러스균 분리 동정

재래식 된장 시료 10종으로부터 바실러스균 총 31 균주를 분리하였고 이들 중 카다베린, 히스타민, 푸트레신, 티라민 중 적어도 1종 이상의 BA 생성균과 BA 분해능과 프로바이오틱 활성을 가진 바실러스균을 각각 분리하여 16S rRNA 염기 서열을 분석하여 동정한 결과는 Table 1과 같다. BA 생성균 총 9종은 98% 이상의 상동성이 확인되어 *Bacillus* sp. TS09, *Bacillus licheniformis* TS17, *Bacillus subtilis* TS19, *Bacillus cereus* TS23, *Bacillus* sp. TS30, *Bacillus megaterium* TS31, *B. subtilis* TS44, *Bacillus coagulans* TS46 및 *Bacillus amyloliquefaciens* TS59로 동

Table 1. Identification of *Bacillus* strains isolated from traditional fermented soy sauce using 16S rRNA gene sequence analysis

Classification	Isolated strain	Related strain in NCBI	GenBank access	Percentage identity (%)
BA-forming strain	TS09	<i>Bacillus</i> sp. KIGAM418	MW130838	98.6
	TS17	<i>Bacillus licheniformis</i> BY65	MN133912	99.2
	TS19	<i>Bacillus subtilis</i> SQ33	MT804654	99.9
	TS23	<i>Bacillus cereus</i> BY57	MN133904	99.9
	TS30	<i>Bacillus</i> sp. RGM1	EF467626	98.0
	TS31	<i>Bacillus megaterium</i> SL4	MG333483	100.0
	TS44	<i>Bacillus subtilis</i> SBAMU8	MK861089	100.0
	TS46	<i>Bacillus coagulans</i> 3T27	MN559542	99.6
	TS59	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SA70	MK467609	100.0
BA-degrading probiotic strain	TS04	<i>Bacillus subtilis</i> MA-26	KX426626	99.0
	TS13	<i>Bacillus coagulans</i> SF1014	MN588276	98.9
	TS42	<i>Bacillus licheniformis</i> MA-37	KX426637	99.3
	TS50	<i>Bacillus subtilis</i> BY49	MN133896	99.0

정되었다. 한편 BA 분해능과 프로바이오틱 활성을 나타낸 4균주는 *B. subtilis* TS04, *B. coagulans* TS13, *B. licheniformis* TS42 및 *B. subtilis* TS50으로 확인되었다. 이상의 결과, 재래식 된장으로부터 *B. subtilis*의 검출률이 가장 높았고 *B. licheniformis*, *B. coagulans* 및 *Bacillus* sp. 등도 우점종으로 나타났다.

Lim [20]의 연구 결과, 발효 된장으로부터 분리된 바실러스균은 *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens* 등으로 동정되었으며 이는 본 연구에서 분리된 균종과 거의 일치하였다. Jung 등[21]은 우리나라 전통 발효 된장에 내재된 미생물 동정 결과 *Bacillus* 속이 우점종이기는 하나 된장 발효에 주된 역할을 한다고 보긴 어렵고, 주로 유산균종들이 당을 분해함으로써 유기산이나 γ -aminobutyric acid를 생산함에 따라 풍미나 기능성에 영향을 미친다고 보고하였다. 발효 된장 내 우점종인 바실러스균은 주원료인 메주의 제조 과정 중에 사용된 볶짚으로부터 유래하는 것으로 메주에서 분리되는 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus* 등이 된장에서 다수를 차지하는 균종인 것으로 보고된 바 있다[22].

3.2. 바실러스균의 BA 생성능

바실러스균의 BA 생성능을 조사한 결과는 Table 2와 같다. *Bacillus* sp. TS09는 푸트레신

(259.1±13.5 mg/L), *B. licheniformis* TS17은 카다베린(412.9±20.8 mg/L)와 푸트레신(112.4±5.9 mg/L), *B. subtilis* TS19는 카다베린(136.±9.9 mg/L), 히스타민(309.5±14.2 mg/L), *B. cereus* TS23은 카다베린(222.5±4.4 mg/L), 푸트레신(462.3±30.5 mg/L) 및 티라민(241.6±2.5 mg/L)을 생산하는 것으로 확인되었다. 게다가 *Bacillus* sp. TS30은 히스타민(162.8±9.9 mg/L)과 푸트레신(606.8±27.0 mg/L), *B. megaterium* TS31은 카다베린(518.3±25.3 mg/L), 히스타민(85.3±4.1 mg/L) 및 티라민(405.8±11.5 mg/L), *B. subtilis* TS44는 카다베린(281.6±13.5 mg/L), 히스타민(173.5±11.3 mg/L) 및 티라민(691.2±31.4 mg/L), *B. coagulans* TS46은 티라민(299.6±15.2 mg/L), *B. amyloliquefaciens* TS59는 히스타민(375.2±21.2 mg/L)과 푸트레신(582.6±19.9 mg/L)을 생산하였다. 이상의 결과, 바실러스균의 BA 생성량과 생산하는 BA 종류는 균주에 따라 상이한 것으로 나타났는데 이는 균주마다 이용 가능한 아미노산의 종류가 다르고 아미노산 탈탄산 효소 활성의 차이에 기인하는 것으로 추정된다.

Lim [20]의 보고에 따르면 전통 발효 된장으로부터 분리된 *Bacillus* sp. DB209, *Bacillus* sp. DB1022는 카다베린, *Bacillus* sp. DB915는 카다베린과 티라민, *Bacillus* DB917은 히스타민만을 생산하였으므로 *Bacillus* sp. TS09 및 TS30과는 동일한 균종이지만 생산하는 BA의 종류가 다른

Table 2. Quantity of BA produced by *Bacillus* strains isolated from traditional fermented soybean paste

Stain	BA production (mg/L)			
	Cadaverine	Histamine	Putrescine	Tyramine
<i>Bacillus</i> sp. TS09	ND	ND	259.1±13.5	ND
<i>Bacillus licheniformis</i> TS17	412.9±20.8	ND	112.4±5.9	ND
<i>Bacillus subtilis</i> TS19	136.4±9.9	309.5±14.2	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i> TS23	222.5±4.4	ND	462.3±30.5	241.6±2.5
<i>Bacillus</i> sp. TS30	ND	162.8±9.9	606.8±27.0	ND
<i>Bacillus megaterium</i> TS31	518.3±25.3	85.3±4.1	ND	405.8±11.5
<i>Bacillus subtilis</i> TS44	281.6±13.5	173.5±11.3	ND	691.2±31.4
<i>Bacillus coagulans</i> TS46	ND	ND	ND	299.6±15.2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TS59	ND	375.2±21.2	582.6±19.9	ND

ND, not detected.

Table 3. Probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from traditional fermented soybean paste

Stain	Probiotic properties			
	Survival in gastric juice(%)	Survival in intestinal juice(%)	Adhesion to HT-29(%)	Antibacterial activity against BA-forming strain (Bacteriocin activity, AU/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> TS04	15.7±0.8	89.3±2.5	23.1±5.2	<i>Bacillus</i> sp. TS30 (256 AU/mL)
<i>Bacillus coagulans</i> TS13	32.7±1.6	94.2±4.1	11.4±8.6	ND
<i>Bacillus licheniformis</i> TS42	29.3±3.7	98.2±1.6	19.2±2.9	ND
<i>Bacillus subtilis</i> TS50	45.7±3.0	97.2±1.1	33.5±3.5	<i>Bacillus subtilis</i> TS44 (1,024 AU/mL)

ND, not detected.

것으로 확인되었다. 게다가 *B. coagulans* DB311은 히스타민과 푸트레신을 생산한 반면 *B. coagulans* TS46은 티라민만을 생산하여 바실러스 균주에 따라 생산한 BA 종류에 큰 차이가 있었다. 하지만 *B. licheniformis* DB102는 히스타민, 푸트레신 및 티라민을 생산하지 않고 카다베린만을 생산한다고 하여 *B. licheniformis* TS17과 동일한 종류의 BA 생성능을 보였다. 게다가 춘장에서 분리된 *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* 등에 의해서도 BA 생성능이 확인된 바 있는데[23] 본 연구의 동일한 균종에서도 이와 유사한 결과가 나타났다.

3.3. 바실러스균의 프로바이오틱 활성

바실러스균의 프로바이오틱 활성 측정 결과는 Table 3과 같다. *B. subtilis* TS04은 인공 위액과 인공 담즙액 내에서의 생존율이 각각 15.7±0.8%와 89.3±2.5%로 측정되었고 HT-29에 대한 부착율은 23.1±5.2%, *Bacillus* sp. TS30에 대

하여 256 AU/mL의 박테리오신 활성을 나타내었다. *B. coagulans* TS13은 32.7±1.6%와 94.2±4.1%의 소화액에 대한 저항성을 나타내었고 장내 상피세포에 대한 부착율은 11.4±8.6%로 실험 균주 중 가장 낮게 측정되었으며 박테리오신 활성은 확인되지 않았다. *B. licheniformis* TS42는 위액 내에서 약 30%의 저항성을 보였고 담즙액에 대한 생존율(98.2±1.6%)은 실험 균주 중에서 가장 높게 측정되었으나 박테리오신 생산능은 확인되지 않았다. *B. subtilis* TS50은 가장 높은 위액에 대한 저항성(45.7±3.0%)을 보여주었고 담즙액에서도 높은 생존율(97.2±1.1%)과 HT-29에도 가장 높은 부착율(33.5±3.5%)뿐만 아니라 *B. subtilis* TS44에 대한 높은 항균활성(1,024 AU/mL)이 확인되었다. 이상의 결과, 바실러스 균주에 따라 인공 소화액에 대한 저항성과 장내 상피세포에 대한 부착능 및 박테리오신 활성에 차이가 있었다. 실험 균주 중에서 *B. subtilis* TS50이 가장 높은 프로바이오틱 활성을 나타내

었으므로 섭취 후 소화기관을 통과하는 동안 소화액에 대한 저항성이 강하여 다수 생존한 상태로 장내 상피세포에 부착하여 기능을 발휘할 수 있을 것으로 추정된다. 게다가 발효 스타터로 이용할 경우 BA 생성균에 대한 항균 활성으로 인하여 발효 식품 내 BA 함량을 감소시키는데도 효과적인 것으로 판단된다.

Lim [20]은 전통 발효 된장에서 분리된 *B. subtilis* DB517과 *B. subtilis* DB821의 인공 위액에 대한 저항성은 각각 $4.5 \pm 1.4\%$ 와 $0.1 \pm 0.0\%$, 인공 담즙액에 대한 저항성은 $80.5 \pm 1.3\%$ 와 $93.8 \pm 0.7\%$ 로 측정되었고 장내 상피세포에 대한 부착율도 $2.2 \pm 0.2\%$ 와 $30.5 \pm 3.5\%$ 로 나타났는데 본 연구의 *B. subtilis* TS50은 이들 보다 높은 프로바이오틱 활성이 확인되었다. 또한 *B. licheniformis* TS42의 인공 소화액에 대한 저항성과 HT-29 세포에 대한 부착능도 *B. licheniformis* DB612 보다 높게 측정되었다. Argyri 등[24]은 바실러스균은 포자를 형성하기 때문에 무포자균에 비해 인공 소화액에 대한 저항성이 높다고 보고하였다. 장내 상피세포에 대한 부착능은 균주들의 세포 소수성과 자기 응집성에 기인하며[25] 부착율이 높을수록 세포 수용체와의 상호작용하고 특이적으로 봉쇄하여 병원균이 부착되지 않도록 방어할 수 있게 된다[26]. 한편 Lim [20]은 *B. subtilis* DB517은 BA 생성균에 대한 박테리옌 활성을 나타내지 않았지만, *B. subtilis* DB821은 *B. subtilis* DB203 (64 AU/mL), *Bacillus* sp. DB209 (128 AU/mL) 및 *Bacillus* sp. DB1022 (32 AU/mL) 등의 BA 생성균에 대해 항균 활성을 나타낸 박테리옌을 생산하는 것으로 확인되었는데 *B. subtilis* TS04 및 *B. subtilis* TS50의 박테리옌 활성은 이들보다 높게 측정되었다. Lee 등[25]은 *Bacillus* sp. MKSK-M1, E1 및 J1은 식중독 및 감염병 등 병원성균에 대한 항균

활성을 나타내었다고 하였지만, 본 연구의 *B. subtilis* TS04와 TS50은 BA 생성균의 제어에 효과적이었다.

3.4. 바실러스균의 아민 산화 효소 활성 및 BA 분해능

바실러스균의 아민 산화 효소 활성 및 BA 분해능을 측정된 결과는 Table 4와 같다. *B. subtilis* TS04의 아민 산화 효소 활성은 17.5 ± 1.2 U/mL이었으며 카다베린($24.3 \pm 1.5\%$)과 푸트레신($8.5 \pm 0.7\%$) 분해능이 확인되었다. *B. coagulans* TS13의 아민 산화 효소 활성($13.5 \pm 0.9\%$)은 가장 낮게 측정되었으며 카다베린($30.5 \pm 4.8\%$)에 대한 분해능만 나타났다. *B. licheniformis* TS42 ($20.4 \pm 5.1\%$)와 *B. subtilis* TS50 ($22.5 \pm 3.7\%$)은 TS04 및 TS13에 비해 높은 아민 산화 효소 활성을 나타내었고, TS42는 히스타민($29.1 \pm 5.4\%$)과 티라민($18.6 \pm 4.2\%$), TS50은 히스타민을 제외한 BA를 분해할 수 있었다. 이상의 결과, 아민 산화 효소 활성 및 BA 분해능도 바실러스 균주에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다.

Heo 등[18]은 메주와 된장에서 분리된 바실러스균주 중 *B. subtilis*는 12.4 U/mL의 아민 산화 효소 활성을 나타내었다고 하였는데 *B. subtilis* TS04와 TS50은 이보다 높은 효소 활성이 확인되었다. 게다가 *B. licheniformis* 38균주 중에서 14BML13 균주(31.8 U/mL)가 가장 높은 활성을 가진 반면, 14BDL20 균주는 가장 낮은 활성(7.4 U/mL)을 나타내었는데 *B. licheniformis* TS42는 20.4 U/mL이었으므로 균주에 따라 효소 활성에 차이가 있음을 알 수 있었다. 한편, Heo 등[18]은 BA 분해능을 가진 *B. subtilis*와 *Bacillus idriensis* 균주는 아민 분해 효소 *yobN* 유전자를 보유하고 있으나, 가장 높은 아민 산화 효소 활성을

Table 4. Amine oxidase activity and BA-degradation ability of *Bacillus* strains isolated from traditional fermented soybean paste

Stain	Amine oxidase activity (U/mL)	BA-degradation ability (%)			
		Cadaverine	Histamine	Putrescine	Tyramine
<i>Bacillus subtilis</i> TS04	17.5 ± 1.2	24.3 ± 1.5	ND	8.5 ± 0.7	ND
<i>Bacillus coagulans</i> TS13	13.5 ± 0.9	30.5 ± 4.8	ND	ND	ND
<i>Bacillus licheniformis</i> TS42	20.4 ± 5.1	ND	29.1 ± 5.4	ND	18.6 ± 4.2
<i>Bacillus subtilis</i> TS50	22.5 ± 3.7	16.4 ± 6.0	ND	12.9 ± 1.6	35.7 ± 5.3

ND, not detected.

나타낸 *B. licheniformis* 14BML13 균주가 효소 *yobN* 유전자를 보유하지 않은 것으로 보았으므로 *yobN* 유전자 외에도 아민 분해 효소활성에 기여할 수 또 다른 유전자가 존재한다고 보고하였다. 게다가 아민 분해 효소 활성이 확인된 *B. licheniformis* 8MI05와 8MS03 균주 배양액으로부터는 음성 대조군 8DJ14 균주 배양액 대비 카다베린, 히스타민, 푸트레신 및 티라민 함량 감소 효과가 확인되었는데 8MI05 균주는 4종류 BA를 평균 444 ppm 감소 시켰고, 8MS03 균주는 평균 279 ppm 감소시켰다. 이와는 달리 *B. licheniformis* TS42는 카다베린과 푸트레신 감소 효과는 나타나지 않았고 히스타민과 티라민을 각각 29.1%과 18.6% 감소시켰다. TS42보다 *B. subtilis* TS50은 히스타민을 제외한 나머지 BA를 효과적으로 감소시킨 것으로 확인되었다.

4. 결론

1. 3년 이상 숙성된 재래식 된장으로부터 분리된 바실러스균 중 일부 균주에서는 BA 생성능이 확인되었는데 균주마다 생성하는 BA의 종류 및 BA 생성량에 큰 차이가 있었다.

2. BA 생성균이 검출된 동일한 시료로부터 분리된 일부 바실러스 균주들로부터 인공 위액 및 담즙액에 대한 높은 저항성과 장내 상피세포에 대한 부착능 및 BA 생성균에 대한 박테리오파지 활성뿐만 아니라 아민 분해 효소 생성으로 인하여 BA 생성량 감소 효과가 확인되었다.

3. 프로바이오틱 활성을 가진 *B. subtilis* TS04와 TS50 균주는 소화기관을 통과하는 동안 다수 생존하여 장내 상피세포에 부착되어 기능성을 발휘하는데 유용할 것으로 추정되며, 특히 BA 생성균에 대한 박테리오파지 활성과 아민 산화 효소 생성으로 인하여 BA 분해능이 확인되었으므로 이들 균주를 발효 스타터로 이용한다면 BA로 인한 독성 위험을 효과적으로 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다.

References

1. P. Kalac, P. Krausova, "A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods", *Journal of Food Chemistry*, Vol.90, No.1 pp. 219-230, (2005).
2. G. Suzzi, S. Torriani, "Biogenic amines in foods", *Journal of Frontier Microbiology*, Vol.6, pp. 472, (2015).
3. D. M. Linares, M. Martin, V. Ladero, M.A. Alveraz, M. Fernandez, "Biogenic amines in dairy products", *Journal of Critical Review Food Science Nutrition*, Vol.51, No.7 pp. 691-703, (2011).
4. A. R. Shalaby, "Significance of biogenic amines to food safety and human health", *Journal of Food Research International*, Vol.29, No.7 pp. 675-690, (1996).
5. T. Hernandez-Jover, M. Izquierdo-Pulido, M. T. Vechiana-Nogues, A. Marine-Font, M. C. Vidal-Carou, "Biogenic amines and polyamine contents in meat and meat products", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol.45, No.6 2098-2102, (1997).
6. P. Visciano, M. Schirone, R. Tofalo, G. Suzzi, "Biogenic amines in raw and processed seafood", *Journal of Frontier Microbiology*, Vol.3, No.4 pp. 188, (2012).
7. T. Y. Cho, G. H. Han, K. N. Bahn, Y. W. Son, M. R. Jang, C. H. Lee, S. H. Kim, D. B. Kim, S. B. Kim. "Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods", *Journal of Korean Food Science Technology*, Vol.38, No.6 pp. 730-737, (2006).
8. J. S. Moon, S. K. Cho, H. Y. Choi, J. E. Kim, S. Y. Kim, K. J. Cho, N. S. Han, "Isolation and characterization of biogenic amine producing bacteria in fermented soybean pastes", *Journal of Microbiology*, Vol.48, No.2 pp. 257-261, (2010).

9. C. Ruiz-Capillas, F. Jimenez-Colmenero, "Biogenic amines in meat and meat products", *Journal of Critical Review Food Science Nutrition*, Vol.44, No.7 pp. 489-499, (2004).
10. Y. K. Park, J. H. Lee, J. H. Mah, "Occurrence and reduction of biogenic amines in kimchi and Korean fermented seafood products", *Journal of Foods*, Vol.8, No.11 pp. 547-561, (2019).
11. M. L. N. E. Dapkevicius, M. J. R. Nout, F. M. Rombouts, J. H. Houben, W. Wymenga, "Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms", *Journal of International Food Microbiology*, Vol.57, No.1 pp. 107-114, (2000).
12. E. S. Lim, "Microbiological and chemical properties of sourdough fermented with probiotic lactic acid bacteria", *Journal of Korean Microbiology*, Vol.52, No.1 pp. 84-97, (2016).
13. A. Naila, S. Flint, G. Fletcher, P. Bremer, G. Meerdink, "Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches", *Journal of Food Science*, Vol.75, No.7 pp. R139-R150, (2010).
14. J. Grimoud, H. Durand, C. Courtin, P. Monsan, F. Ouarne, V. Theodorou, C. Roques, "In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics", *Journal of Anaerobe*, Vol.16 No.5 pp. 493-500, (2010).
15. O. Osmanagaoglu, F. Kiran, H. Ataoglu, "Evaluation of in vitro probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk", *Journal of Probiotics Antimicrobial Proteins*, Vol.2, No.3 pp. 162-174, (2010).
16. K. Savitha, M. Srinivas, K. Dhanalakshmi, "Isolation and characterization of bacteriocin from *Bacillus cereus* MTCC1307", *Journal of International Apply Pure Science Agricultural*, Vol.2, No.12 pp. 200-208, (2016).
17. H. Holo, O. Nilssen, I. F. Nes, "Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene", *Journal of Bacteriology*, Vol.173, No.12 pp. 3879-3887, (1991).
18. S. J. Heo, K. C. Jeong, H. D. Lee, D. W. Jeong, J. H. Lee, "Selection and characterization of *Bacillus* strains harboring the gene for biogenic amine degradation", *Journal of Microbiology Biotechnology Letter*, Vol.45, No.2 pp. 143-148, (2017).
19. Y. C. Lee, C. S. Lin, F. L. Liu, T. C. Huang, Y. H. Tsai, "Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products", *Journal of Food Drug Analysis*, Vol.23, No.4 pp. 836-844, (2015).
20. E. S. Lim, "Isolation, identification, and probiotic characteristics of *Bacillus* strains affecting the biogenic amine content in fermented soybean paste", *Journal of Korean Microbiology*, Vol.55, No.2, pp. 131-142, (2019).
21. W. Y. Jung, J. Y. Jung, H. J. Lee, C. O. Jeon, "Functional characterization of bacterial communities responsible for fermentation of doenjang: A traditional Korean fermented soybean paste", *Journal of Frontier Microbiology*, Vol.7, No.6 pp. 1-10, (2016).
22. D. H. Shin, D. Y. Jeong, "Korean traditional fermented soybean products: Jang", *Journal of Ethnic Food*, Vol.2, pp. 2-7, (2015).
23. X. Bai, Y. Byun, J. H. Mah, "Formation and destruction of biogenic amines in Chunjang(a black soybean paste) and Jajang(a black soybean sauce)", *Journal of Food Chemistry*, Vol.141, No.2 pp. 1026-1031, (2013).
24. A. A. Argyri, G. Zoumpouloum K. A. G. Karatzas, E. Tsakalidou, G. E. Nychas, E. Z. Panagou, "Selection of potential

- probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests”, *Journal of Food Microbiology*, Vol.33, No.2 pp. 282-291 (2013).
25. S. K. Lee, J. J. Lee, Y. I. Jin, J. C. Jeong, Y. H. Chang, Y. S. Lee, Y. H. Jeong, M. S. Kim, “Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce”, *Journal of LWT-Food Science Technology*, Vol.79, pp. 518-524, (2017).
26. M. C. Otero, V. S. Ocana, E. N. M. Macias, “Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms”, *Journal of Methods Molecular Biology*, Vol.268, pp. 435-440, (2004).