Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society
Vol. 17, No. 7 pp. 442-450, 2016

http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2016.17.7.442
ISSN 1975-4701 / eISSN 2288-4688

신균주 *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용한 청국장의 항균활성과 열 및 pH 안정성

김한수
조선대학교 대학원 보건학과

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

Han Soo Kim
Department of Health science Graduate School of Chosun University

요 약 본 연구의 목적은 대나무 줄기 마디 부분의 표면에서 처음 발견 되었으나, 아직까지는 연구가 미흡한 신 균주 *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1로 발효한 청국장 추출물의 항균 활성을 알아보려고 한다. 청국장 전통 발효 균주인 *Bacillus subtilis* NG24를 대조 군으로 하고, 비교 분석을 실시하였다. 실험 방법은 항균 활성, 최소 억제 농도(MIC)와 열 및 pH 안정성을 측정하였다. 항균 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 항균 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 청국장은 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 β-hydroxy fatty acid의 carboxyl group과 heptapeptide의 hydroxyl group이 결합한 구조로, Surfactin을 생산하는 균종에는 *B.subtilis*과 *B.pumilus*, *B.amyloliquefaciens* 등이 있다[9].

전통발효균주로 인정받는 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, ɣ-PGA(Poly-ɣ-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, amylolytic과 lipolytic 효과에 관한 plate 분석 결과에서 식품의 부패와 인체에 병원성을 일으키는 미생물인 *Listeria monocytogenes*와 *Candida albican*s, *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 청국장이 병원성 균주들에서 항균활성, 최소억제농도와 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 실험군으로 하고, 청국장 발효의 대표적인 균주로 알려진 *B.subtilis* NG24를 이용한 청국장 추출물을 대조군으로 정하여 항균 활성, 최소억제농도를 비교분석하고, 열 및 pH 안정성도 함께 조사해 봄으로써 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1을 이용하여 발효한 청국장의 기능성을 확인할 수 있는 기초자료로 사용함을 목적으로 한다.

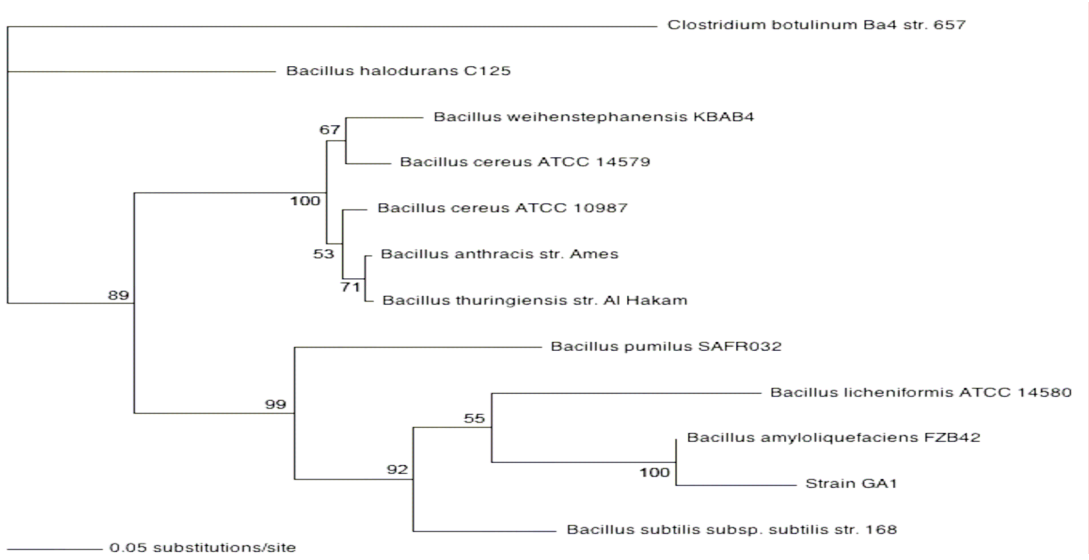

Fig. 1. Phylogenetic tree showing relationships between some members of the *Bacillus* species (Arguelles-Arias et al., 2009).

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료

본 연구에서 사용한 대두(국산)는 2014년 용두농업협동조합(무안)에서 1 ㎏을 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 미생물보존센터에서 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 (℃)
Positive (+)	*E. faecalis*	ATCC 29212	MHB & MHA (37℃)
	C. perfringens	KCTC 5014	
	S.aureus	ATCC 13565	
Negative (-)	*A. faecalis*	ATCC 49677	
	E. coli	ATCC 25922	
	P. aeruginosa	ATCC 21636	

2.4 시약 및 기기

실험 기기로는 Shaking incubator, UV/Visible spectrophotometer, Freezing dryer와 Rotary vacuum evaporator외 일반 실험기구들을 사용하였다. 추출용 시약은 70 % ethanol을 사용하였다. 고초균 생육배지는 NB(Nutrient broth, Difco, Becton Dicnson Co., USA)를 사용하였고, 항균활성에 사용한 배지는 Mueller Hinton Broth & Mueller Hinton Agar(MHB & MHA, Difco, Becton Dicnson 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 ㎏씩 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 종균액을 37℃, 24시간 배양한 다음 5 ㎖ tube에 각각 100 ㎕씩 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, dear	

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℃, 25분간 증자하고, 50-60℃로 냉각하였다. 대두는 100 g씩 10개의 비커에 나누어 담고 전날 배양한 두 종균액을 전체의 1 % (w/w)가 되도록 5개의 비커에 나누어서 접종하였다. 균주를 접종한 대두를 37℃, 24시간 동안 발효시켜 100g을 뺀 나머지를 -70℃, 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℃로 감압·농축한 후 사용하였다. 모든 시료는 4℃ 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℃, 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 백금이로 균을 채취해 2.5 ㎖ MHB의 생육액체배지에 현탁시켜 배양한 후 높이가 4~5 mm인 MHA 배지를 만들어 하루정도 건조시킨 후 시험균액 40 ㎕을 무균상태에서 Plate에 분주한 후 멸균된 유리막대로 잘 도말한다. 각 청국장 추출물을 에탄올을 이용하여 4 mg/mL 농도로 희석한 다음 시료를 30 ㎕씩 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 청국장의 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℃ 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 청국장의 70 % ethanol 추출물을 4 mg/mL 농도로 희석하였다. 희석한 시료를 60℃에서 10, 30 및 60분, 80℃ 및 100℃에서 10분과 20분, 121℃에서 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. 그람음성에서 *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 대조군으로 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 γ-polyglutamate와 isoflavone-glycosides 및 β-glucosidase의 활성이 높다고 하였고, amino nitrogen의 함량은 *B.amyloliquefaciens* KC41이 450.0 mg%, *B.subtilis* HH28은 291.6 mg%로 *B.amyloliquefaciens* KC41의 함량이 더 많았다고 하였는데, γ-polyglutamate와 β-glucosidase 같은 가수분해효소가 풍부한 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1와 대두 안의 성분이 발효시에 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 발효 된 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
E. faecalis	+	+
C. perfringens	+	+++
S. aureus	+	++
A. faecalis	+	+++
E. coli	+	++++
P. aeruginosa	+	+

* Growth inhibition size of clear zone: -, non detected; +, smaller than 1.5 mm; ++, 1.5~3. mm; +++, 3~5 mm; ++++, lager 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 군간에 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
E. faecalis	0.60	0.55
C. perfringens	0.15	0.01
S. aureus	0.40	0.21
A. faecalis	1.50	0.45
E. coli	> 0.80	0.29
P. aeruginosa	> 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 살리거나, 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(℃)		*E.faecalis*		*C.perfringens*		*S.aureus*		*A.faecalis*		*E.coli*		*P.aeruginosa*	
		NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 11-1
Untreated		+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
60℃	10 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
	30 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
	60 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
80℃	10 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
	20 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
100℃	10 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
	20 min	+	+	++	++++	+	++	+	+	+	++	+	++
121℃	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	*E.faecalis*		*C.perfringens*		*S.aureus*		*A.faecalis*		*E.coli*		*P.aeruginosa*	
	NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 11-1	NG 24	NBF 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. 결 론

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

본 항균 실험의 결과에서는 *B.subtilis* NG24를 이용하여 발효한 청국장에 비하여 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1로 발효한 청국장의 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 안전성 실험 결과는 *B.subtilis* NG24와 *B.amyloliquefaciens* NBF11-1에 의한 청국장 추출물 모두에서 100℃, 20분까지는 열처리를 하여도 항균활성에 변화가 없었다. 따라서, *B.amyloliquefaciens* NBF11-1 추출물도 *B.subtilis* NG24와 더불어 열에 안전한 천연물질임을 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 기능성을 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 실행되어져야 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-ɣ-poly-glutamate(Glu-ɣ-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 lignophenol derivative from bamboo lignin, exhibits multifaceted neuro-protectve 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 senanesis) Leaf extracts obtained under ‘vigorous’ Condition”, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, Vol.7, pp.447-457, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nen026

[19] Y. Lin. A. C. Collier, W. Liu, M. J. Berry and J. Panee, “The inhibitory effect of bamboo extracton 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 Soqotra, *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

[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