

청국장에서 분리한 *Bacillus* spp. 균주의 혈전용해능 및 면역증강활성

장진희 · 심윤영¹ · 김승호 · 지규만¹ · 차성관*
한국식품연구원, ¹고려대학교

Fibrinolytic and Immunostimulating Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from *Chungkuk-jang*

Jin-Hee Chang, Youn-Young Shim¹, Seung-Ho Kim, Kyoo-Man Chee¹, and Seong-Kwan Cha*
Traditional Food Research Division, Korea Food Research Institute
¹Graduate School of Biotech., Korea University

To make *Chungkuk-jang* with enhanced fibrinolytic and immunostimulating activities, 220 strains isolated from *Chungkuk-jangs* were tested, and 13 *Bacillus* strains with excellent proteolytic and polysaccharide-producing activities were selected and tested for their fibrinolytic and immunostimulating activities using fibrin plate method and RAW 264.7 cell line, respectively. To assess macrophage activation, contents of cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-1 α , and nitric oxide were measured. Three strains showing highest fibrinolytic and immunostimulating activities were identified as *Bacillus licheniformis* (CHKJ 1249, 1326) and *Bacillus subtilis* (CHKJ 1339).

Key words: *Chungkuk-jang*, fibrinolytic activity, immunostimulating activities, *Bacillus* strain

서 론

청국장은 삶은 콩에 고초균을 번식시켜 콩 단백질을 분해시키고 파, 마늘, 고춧가루, 소금 등을 가미하여 저장성을 부여한 식품으로, 제조기간이 짧고, 독특한 맛과 향을 가지고 있으며 각종 유기산 및 비타민 함량이 높아 영양학적 가치가 높은 식품으로 알려져 있다. 그렇지만 종래의 청국장은 자연계의 여러 균주들이 발효에 관여하여 심한 암모니아 취가 발생하므로 젊은 세대의 기호에 맞지 않아 여러 연구자들은 각종 첨가물, 발효균주의 선발 등 다각적인 방법으로 냄새를 줄이고자 하였다(1-6). 또한 청국장에 기능성을 부여하고자 하는 많은 연구가 이루어졌는데, Cho 등(7)은 청국장에서 항 고혈압성 peptide를 분리하고자 하였으며, Lee 등(8)은 분말 청국장에서 알코올로 추출한 물질의 항산화능에 대하여 그리고 Youn 등(9)은 청국장 점질물질의 항 미생물 활성에 대한 연구결과를 보고하였다. 청국장의 혈전용해 활성과 관련된 많은 연구논문(10-13)들이 발표되었는데, Kim 등(10)은 청국장으로부터 혈전용해 활성 균주를 분리하여 동정하였고, Kil 등(11)은 청국장에서 분리한 *Bacillus* 균주의 혈전용해 활성 효소의 효소생성 최적조건을 찾기 위

한 실험을 수행하였다. Kang 등(12)은 혈전용해 활성 *Bacillus* 균주가 생산하는 효소의 정제와 특성규명에 관한 실험을 수행하였고, Kim 등(13)은 혈전용해효소 함유 기능성 청국장 제조에 관한 실험결과를 보고하였다. 그렇지만 아직까지 청국장 미생물의 면역세포 활성능과 관련된 연구는 아직까지 없는 실정이다. 본 연구에서는 혈전용해 활성과 면역세포 활성능이 우수한 청국장을 제조하기 위하여 청국장 제품으로부터 분리된 *Bacillus* 균주 중 단백질 분해능이 우수하고 점질물질을 생성하는 균주들을 이용하여 혈전용해 활성능과 면역세포 활성능을 조사하는 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

세포배양에 사용된 배지와 항생제는 GIBCO(USA)사의 것을 사용하였고, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-1 α (IL-1 α) 분석을 위한 antibodies와 streptavidin-HRP는 Pierce(USA)사의 제품을 사용하였다. Washing buffer로는 phosphate buffered saline(PBST: 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05% Tween20)을, 기질용액으로는 phosphate-citrate buffer tablets(0.05 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0, 1 tablet/100 mL), 기질에는 5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride(TMB) 등은 Sigma(St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였다. 기타의 시약은 GR급 이상을 사용하였다. 면역세포 활성실험에 사용된 RAW 264.7 cell line은 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul)에서 분양 받아 사용하였다.

*Corresponding author: Seong-Kwan Cha, Traditional Food Research Division, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea
Tel: 82-31-780-9108
Fax: 82-31-780-9234
E-mail: skcha@kfri.re.kr

단백질 분해력 및 점질물질 생성능

청국장 3일간의 발효 기간 중 채취된 시료에서 순수분리한 220 균주의 단백질 분해능은 skim milk 1% 첨가된 표준한천 배지에 접종하여 배양한 후 생성된 집락 주변이 투명해지는 정도를 측정하여 단백질 분해력을 측정하였다. 점질물질 생성 정도는 점질물질 생성배지(phytone 1.5%, glutamic acid sodium salt 1.5%, sucrose 3%, KH_2PO_4 0.25%, Na_2HPO_4 0.17%, NaCl 0.05%, $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, Biotin 100 μL , Agar 1.5%)에 균을 접종하여 48시간 배양 후 loop를 이용하여 집락을 떼어 올렸을 때 점질물질이 따라 올라오는 길이를 측정하여 점질물질 생성균주를 선별하였다.

미생물 균주의 동정

미생물 균주의 동정은 Cappuccino(14)의 방법에 따라 위상차 현미경(Olympus BH2)을 이용한 세포 모양의 관찰과 Gram staining을 수행하였고, MacFaddin(15)의 방법에 따라 Catalase test(유리 위에 시험균주를 도말한 후, 3% 과산화수소 용액을 떨어뜨려 기포 발생을 양성으로 판정)와 Oxidase test를 실시하였는데, Oxidase test는 시험균주를 여과지 위에 도말하고, Oxidase 측정시약(N,N,N',N' -tetramethyl-P-Phenyldiamine-dihydrochloride 0.2%, sodiummethylenediamine tetraacetate 0.1%, sodium thiosulfate 0.05%)을 균체에 떨어뜨려 15초 이내에 푸른색으로 변하였을 때 양성 반응으로 판정하였다(15). 이 후 *Bacillus*속으로 추정되는 미생물은 *Bacillus* 동정 kit(API 50 CHB/E, Bio-Merieux, France)를 사용하여 동정하였다.

혈전용해능 조사

청국장 발효 과정 중 분리한 13개 균주를 TSB(trypsin soy broth)에 키운 배양액의 혈전 용해능과 콩에 접종하여 제조한 청국장 시료에서 혈전용해능 분석을 실시하였다. TSB 배양은 tryptone 17.0 g, soytone 3.0 g, dextrose 2.5 g, sodium chloride 5 g, dipotassium phosphate 2.5 g, final volume 1L(pH 7.3)의 조성으로 하는 영양배지를 사용하였다. 혈전용해능은 fibrin plate 법(16)을 변형하여 lysed zone의 반경을 측정하였다. Fibrin plate는 0.01M phosphate buffered saline(pH 7.25)에 fibrinogen을 0.3%가 되도록 용해시킨 후 petridish에 10 mL을 분주하고 thrombin 20 unit을 가하여 균일한 두께의 fibrin clot을 형성시킨 후, 실온에서 30분 방치하여 혈전용해효소 활성 측정에 사용하였다. 균 배양액과 청국장 시료는 동일한 질량의 생리식염수로 희석한 후 사용하였다. 활성측정은 제조한 fibrin plate에 paper disk(8 mm, Toyo Roshi, Japan)를 놓고, 시료를 20 μL 를 점적하여 35°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 생성된 투명한 부위의 직경을 조사하였다.

면역세포 활성화 조사를 위한 시료 및 cell line의 준비

RAW 264.7 cell이 생성한 nitric oxide, IL-1 α , TNF- α 양을 측정하여 선별된 미생물 균주의 면역세포 활성능을 조사하기 위하여 시료는 혈전용해능에 사용한 시료를 100°C에서 30분간 처리 후 1배와 3배로 희석하여 사용하였다. RAW 264.7 cell line은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)에 10% fetal bovine serum과 streptomycin-penicilline(100x) 1%를 첨가하여 이용하였으며, 고착성(anchorage-dependent)을 갖는 세포를 cell scraper로 회수 부유시켜 사용하였다.

Nitric oxide 분석

RAW 264.7 cell의 배양 상등액 중의 nitric oxide 생성 농도를 microplate assay를 이용하여 정량함으로써 측정하였다(17). 즉, 96 well plate(Nunc Maxisorp™ 446612, Denmark)에 시료 및 RAW 264.7 cell(1×10^5 cells/well)를 넣고 2시간 동안 CO_2 incubator에서 37°C를 유지하면서 부착시킨 후, sample을 농도별로 희석하여 첨가하였다. 그 후 20시간 동안 세포를 배양하고 상등액 50 mL를 취하여 동일 부피의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% N-1-naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% H_3PO_4)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 이때 ELISA reader(Molecular Devices THERMOmax™, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 sodium nitrite의 표준곡선으로부터 nitric oxide의 대사물인 nitrite의 생성 정도를 산출하였다.

Interleukin-1 α 생성능

상등액 중의 Interleukin-1 α (IL-1 α) 정량은 Dong 등(18)에 의한 방법을 변형하여 측정하였다. 반응성 질소종 생성능 측정시와 동일한 절차로 RAW 264.7 cell(1×10^5 cells/well)을 96 well plate에 37°C의 CO_2 incubator에서 2시간 동안 cell을 부착시킨 다음, sample을 농도 별로 첨가하여 20시간 동안 배양하였고, 배양 상등액을 즉시 취하여 -70°C에서 동결보관 하며 분석에 이용하였다. Biotinylated anti-mouse IL-1 α 단일 클론 항체가 pre-coated 되어 있는 96-well microtiter plate에 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 blocking 시약(3% BSA용액, w/v)을 가한 다음 Tween20이 0.05%(v/v) 함유된 0.01 M PBS(PBST, pH 7.4)로 3회 세척하였다. 세척한 plate에 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석한 biotinylated anti-mouse IL-1 α 항체를 50 μL 씩 넣고, 표준 IL-1 α 또는 배양한 시료액을 50 μL 씩 well에 주입하고, 25°C에서 2시간 반응시켰다. 반응시킨 plate를 세척용 완충액으로 다시 3회 세척하고, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 streptavidin-horsereidish peroxidase conjugate를 100 μL 씩 가한 다음, 실온에서 30분간 반응시킨 후, 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 여기에 발색기질용액(TMB substrates buffer, 30% H_2O_2 , TMB 1 mg/mL DMSO)을 100 μL 첨가하여 실온에서 30분간 발색시킨 다음, 0.18 M H_2SO_4 100 μL 씩 가해 발색반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader로 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 IL-1 α 함량을 계산하였다.

Tumor necrosis factor 생성능

거식세포의 tumor necrosis factor(TNF) 생성능을 청국장시료가 증진시키는지 알아보기 위해 청국장 시료를 IL-1 α 분석시와 같은 절차로 처리한 후, ELISA reader를 이용하여 TNF- α 생성능을 분석하였다. 즉, microtiter plate에 표준 TNF- α 용액, 배양한 시료액 및 biotinylated anti-mouse TNF- α 용액을 50 μL 씩 well에 주입하고, 25°C에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 5회 세척하고, streptavidin-horsereidish peroxidase conjugate 100 μL 씩 가한 다음, 실온에서 30분간 반응시킨 후, 세척용 완충액으로 5회 세척하였다. 여기에 상기의 기질용액을 처리하고 반응 정지액으로 발색반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader로 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 TNF- α 함량을 계산하였다.

Table 1. Number of the strains isolated from *Chungkuk-jang* classified by protease activity and slime material formation

Fermentation Period (days)	Slime formation ²⁾	Number of strains containing protease activity ¹⁾			
		None	Weak	Moderate	Strong
0	0	14	4	3	12
	+	1	4	0	2
	++	1	0	1	0
	+++	0	0	0	2
	++++	0	0	2	1 ³⁾
1	0	0	1	1	0
	+	0	0	9	10
	++	0	0	4	3
	+++	0	2	3	3
	++++	2	3	7	2 ³⁾
2	0	0	2	0	1
	+	0	5	3	1
	++	1	7	3	1
	+++	3	3	0	1
	++++	5	0	4	14 ³⁾
3	0	0	0	0	0
	+	1	5	13	32
	++	0	0	2	0
	+++	0	2	0	2
	++++	0	0	1	11 ³⁾

¹⁾Protease activity: None (No protease activity), Weak (small clear zone within colony), Moderate (large clear zone within colony), Strong (clear zone around colony).

²⁾+: No slime formation, ++: 1-cm long slime formation, +++: 3-cm long slime formation, ++++: more than 5-cm long slime formation.

³⁾The selected strains containing the highest protease activity (total 28 strains).

통계처리

모든 실험결과와 통계분석은 Statistics Analysis System(SAS) 프로그램을 이용하였고, 결과는 평균치(mean)와 표준편차(standard deviation, S.D.)로 표시하였다. 유의성 여부는 General Linear Model(19)을 사용하여 one-way ANOVA(analysis of variance)에 의하여 확인하였으며, 각 처리구별 평균값 사이의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 유의수준을 검증하였다.

결과 및 고찰

단백질 분해력 및 점질물질 생성능

청국장 3일간의 발효 중 시료에서 순수분리된 220개 균주의 단백질 분해능 및 점질물질 생성능을 조사한 결과는 Table 1에서 보여주는 것과 같다. 표에서 볼 수 있는 것과 같이 단백질 분해능이 가장 높고 점질물질 생성능이 가장 많은 28개 균주를 선별한 후, 선별균주에 대한 지속적인 혈전용해 활성과 면역활성에 대한 조사 실험을 진행하였다.

혈전용해능 조사 및 선별 방법 검증

단백질 분해력과 점질물 생성력이 우수한 28개 균주 중 그램양성, Catalase 양성, Oxidase 양성 간균으로 *Bacillus*속으로 추정되는 13 균주(CHKJ 1227, CHKJ 1248, CHKJ 1249, CHKJ 1303, CHKJ 1332, CHKJ 1307, CHKJ 1308, CHKJ

Table 2. Fibrinolytic activities of various *Bacillus* spp. strains fermented in trypticase soy broth or in soybean

Strain	Fibrinolytic activity (cm) ¹⁾	
	Trypticase soy broth	Soybean
CHKJ 1339	2.12 ± 0.14 ^c	2.42 ± 0.06 ^a
CHKJ 1249	2.29 ± 0.02 ^{ab}	2.36 ± 0.05 ^a
CHKJ 1326	2.20 ± 0.10 ^{bc}	2.32 ± 0.07 ^a
CHKJ 1227	2.00 ± 0.01 ^d	2.14 ± 0.15 ^b
CHKJ 1332	1.06 ± 0.06 ^h	1.91 ± 0.02 ^{fg}
CHKJ 1329	1.20 ± 0.11 ^g	1.83 ± 0.03 ^d
CHKJ 1303	1.82 ± 0.02 ^e	1.63 ± 0.07 ^e
CHKJ 1308	1.31 ± 0.02 ^{fg}	1.51 ± 0.02 ^{ef}
CHKJ 1311	1.41 ± 0.04 ^f	1.49 ± 0.06 ^{ef}
CHKJ 1248	0.90 ± 0.07 ⁱ	1.43 ± 0.13 ^f
CHKJ 1315	1.15 ± 0.0 ^g	1.33 ± 0.01 ^{fg}
CHKJ 1348	1.39 ± 0.07 ^f	1.20 ± 0.08 ^{gh}
CHKJ 1307	1.21 ± 0.02 ^g	1.04 ± 0.03 ^h
CHKJ 0101 ²⁾		1.21 ± 0.06 ^{gh}
KFRI 0170 ³⁾	2.35 ± 0.05 ^a	2.43 ± 0.02 ^a
KFRI 0183 ⁴⁾	1.03 ± 0.06 ^h	1.21 ± 0.02 ^{gh}

¹⁾Values are means ± S.D. and means within the same column bearing different superscripts are different ($p < 0.05$).

²⁾Commercial *Chungkuk-jang* sample.

^{3,4)}KFRI 0170 (*B. natto*) and KFRI 0183 (*B. subtilis*).

1311, CHKJ 1315, CHKJ 1326, CHKJ 1329, CHKJ 1339, CHKJ 1348)와 대조균으로 KFRI 0170(*Bacillus natto*), KFRI 0183(*Bacillus subtilis*) 두 균주 그리고 시중 청국장 제품(CHKJ 0101)을 대조균으로 사용하였으며, 균주들을 콩에 1% 접종하여 청국장을 제조한 시료군과 TSB(Trypticase soy broth) 배지를 이용하여 균주들을 배양한 두 가지 시료군으로 나누어 혈전용해능을 조사하였다. Table 2에서는 혈전용해능 조사결과를 SAS program의 multifur range test를 이용한 유의성 검증 결과를 보여주고 있다. Table 2에서 볼 수 있는 것과 같이 두 처리군(TSB 배지 및 청국장) 간의 혈전용해능은 많은 균주들(CHKJ 1339, CHKJ 1326, CHKJ 1227, CHKJ 1332, CHKJ 1329, CHKJ 1248, CHKJ 1348, CHKJ 1307)에 있어서 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 그렇지만 TSB 배지에 접종하였을 때와 콩에 접종하여 제조한 청국장균 간의 상관관계는 0.81 ($p < 0.05$)로 높은 유의적인 상관관계를 나타내어, 분리균으로 청국장을 제조하여 혈전분해능을 측정하지 않고도 TSB 배지에 배양하여 혈전용해능이 우수한 균주선발을 할 수 있을 것으로 사료되어진다. 혈전용해능의 높은 값을 보여준 KFRI 170 균주와 CHKJ 1339, 1326 균주의 혈전용해능 실험에 대한 사진 그림은 Fig. 1에서 보여주는 것과 같다.

NO 생성능 측정에 의한 면역세포 활성능 조사 및 선별 방법 검증

Table 3은 콩에 균을 접종하여 제조한 청국장 처리군과 TSB 배지를 이용하여 균주를 배양한 처리군에 있어서 면역세포 RAW 264.7 Cell의 NO 생성량 측정에 의한 면역세포 활성능 측정결과를 보여주고 있다. Table 3에서 볼 수 있는 것과 같이 균주간에 있어 NO 생성량 측정에 의한 면역세포 활성능은 유의적인 차이가 있었다($p < 0.05$). 그렇지만 청국장 분리균을 TSB 배지에 키운 처리군과 콩에 접종하여 청국장을 제조한 처리군

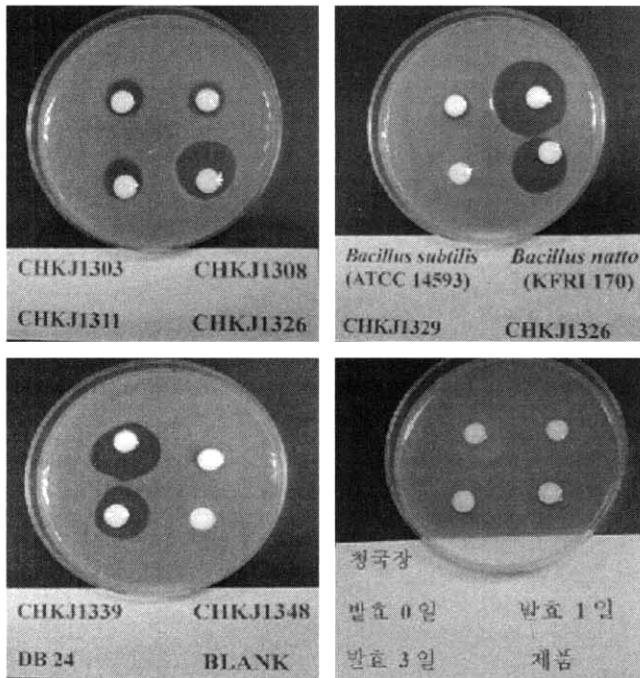


Fig. 1. Fibrinolytic activities of various *Bacillus* spp. strains and of *Chungkuk-jang* at different stages of fermentation, as assessed by the size of clear zones on fibrin plates.

Ten mL of 5% fibrinogen solution in a fibrin plate buffer was poured into each sterile petri-dish and 50 μ L of 20 unit/mL thrombin solution was slowly mixed in each dish. The mixture was let to solidify for 1 h at room temperature. Ten μ L of test samples was dropped onto the fibrin plate and the plate was incubated for 4 h at 37°C. Diameter of hydrolyzed clear zone was measured.

사이의 NO 생성능의 상관관계를 조사한 결과, 0.76으로 매우 높게 나타났다($p < 0.05$). 이는 균을 달리하여 청국장을 제조하였을 때면역세포의 NO 생성능이 유의적으로 다른 청국장을 제조할 수 있으며, 분리균으로 청국장을 제조하여 면역세포의 NO 생성능을 측정하지 않고, TSB 배지에 키워둔 면역세포의 NO 생성능이 우수한 균을 선별 할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다. 실험 균주들을 콩에 접종하여 제조한 청국장 시료처리균의 경우 CHKJ 1249 균주의 흡광도가 0.779 ± 0.0898 을 나타내어 가장 높은 측정값을 보여주었으며, 그 다음으로 CHKJ 1339(0.756 ± 0.0247) 순이었다. TSB 배지상에서의 NO 생성능은 $\text{CHKJ1249}(0.642 \pm 0.0010) > \text{CHKJ1339}(0.462 \pm 0.080) > \text{CHKJ1326}(0.452 \pm 0.0165)$ 균주 순으로 높게 나타났다.

제조한 청국장의 거식세포 활성화 능력 분석

거식세포(macrophage)는 골수로부터 생산되는 면역세포로서, 활성화된 거식세포는 *in vitro*에서 정상세포와 종양세포를 식별하는 선택성(selectivity)과 종양세포의 형태에 상관없이 살해하는 비특이성(non-specificity)을 동시에 가지며 H_2O_2 를 비롯한 반응성 nitric oxide(NO), tumor necrosis factor(TNF), Interleukin- 1α (IL- 1α), protease, arginase 등을 생성함으로써 종양세포를 살해하는 것으로 보고되고 있다(20). 선별한 세 균주(CHKJ 1249, CHKJ 1326, CHKJ 1339)를 이용하여 제조한 청국장 시료가 *in vitro*에서 거식세포 활성화 능력을 나타내는지 살펴보기 위해 반응성 질소종 생성능, cytokine(IL- 1α) 및 TNF- α 생성능을 측정 한 결과는 Table 4에서 보여주는 것과 같다.

Table 3. Nitric oxide production by continuous macrophage RAW 264.7 cells induced by *Bacillus* spp. strains fermented in trypticase soy broth or in soybean

Strain	NO assay (A_{540}) ¹⁾	
	Trypticase soy broth	Soybean
CHKJ 1249	0.642 ± 0.0010^a	0.779 ± 0.0898^a
CHKJ 1339	0.462 ± 0.0800^b	0.756 ± 0.0247^a
CHKJ 1326	0.452 ± 0.0165^{cb}	0.405 ± 0.0118^c
CHKJ 1329	0.240 ± 0.0064^g	0.250 ± 0.0227^{de}
CHKJ 1303	0.274 ± 0.0081^{ef}	0.246 ± 0.0088^{de}
CHKJ 1227	0.254 ± 0.0088^{fg}	0.239 ± 0.0007^{de}
CHKJ 1348	0.186 ± 0.0081^h	0.167 ± 0.0807^{ef}
CHKJ 1248	0.132 ± 0.0010^i	0.142 ± 0.0124^{ef}
CHKJ 1332	0.127 ± 0.0088^i	0.132 ± 0.0007^{ef}
CHKJ 1307	0.243 ± 0.0006^g	0.097 ± 0.0110^f
CHKJ 1308	0.042 ± 0.0060^j	0.061 ± 0.0029^f
CHKJ 1311	0.050 ± 0.0081^j	0.059 ± 0.0270^f
CHKJ 1315	0.421 ± 0.0107^d	0.058 ± 0.0044^f
CHKJ 0101 ²⁾		0.065 ± 0.0058^f
KFRI 0170 ³⁾	0.424 ± 0.0168^{cd}	0.629 ± 0.0118^b
KFRI 0183 ⁴⁾	0.290 ± 0.0061^e	0.336 ± 0.0778^{cd}

¹⁾Values are means \pm S.D. and means within the same column bearing different superscripts are different ($p < 0.05$).

²⁾Commercial *Chungkuk-jang* sample.

^{3,4)}KFRI 0170 (*B. natto*) and KFRI 0183 (*B. subtilis*).

Table 4에서 볼 수 있는 것과 같이 선별한 3종의 균주로 제조한 청국장 시료를 RAW 264.7 macrophage에 처리한 결과 청국장 시료 농도(1배와 3배 희석)에 따라 NO 생성량의 증가추세가 나타냄으로써 NO 생성 촉진능이 있음을 보여주었다. 1배의 농도로 처리한 선별된 3종의 균주의 경우에는 대조균인 soybean 시료($0.20 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$)에 비해 평균 $1.27 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ 로 6배의 많은 NO 생성 촉진능을 나타내었다. 또한, 양성 대조균으로 사용한 KFRI 0183(*Bacillus subtilis*) 보다는 3배, KFRI 0170(*Bacillus natto*) 보다는 1.7배의 NO 생성능을 보였다. 이러한 실험 결과로부터 본 연구에서 제조된 3종의 균주 macrophage의 NO 생성을 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

선별한 3종의 균주(CHKJ 1249, 1326, 1339)로 제조한 청국장의 상등액에 대하여 macrophage 세포(RAW 264.7) 모델계에서 면역 기능의 중요한 매개물질인 TNF- α 생산유도 정도를 ELISA방법에 의해 측정 한 결과는 Table 4에서 보여주는 것과 같다. 3배로 희석된 soybean 대조균은 TNF- α 의 생산을 촉진하지 않았으나, 1배의 농도에서는 $2.33 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 미약한 생성량을 나타내었다. 선별한 3종의 균주는 $7.52 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ 의 TNF- α 생성량을 보여 양성대조균으로 사용한 *Bacillus subtilis* ($8.80 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$)와 *Bacillus natto* ($8.47 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$) 보다는 다소 미약한 효과가 관찰되었다. Han 등(21)이 보고한 영지의 β -glucan성 다당류에 의해 활성화된 흰쥐 간내 Kuffer 세포에서 $2.6 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.01$) TNF- α 를 생성시킨 보고에 비하면, 본 연구에 선별한 3종의 균주로 제조한 청국장의 TNF- α 생성능이 약 3배 높은 결과를 보여주고 있다. 이들 균주들을 이용하여 제조한 청국장의 상등액이 macrophage를 직접 자극하여 TNF- α 등을 생성하게 되고, 나아가 tumor cell-killing의 기능을 할 수 있도록 자극할 것이라고 예측할 수 있으며, 추후 *in vivo*에서의 실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 4. Fibrinolytic and immunostimulating activities of Chungkuk-jang fermented with various *Bacillus* spp. strains¹⁾

Strain	Fibrinolytic activity (cm)	NO (µg/mL)		TNF-α (ng/mL)		IL-1α (pg/mL)	
		S/3 ²⁾	S ³⁾	S/3	S	S/3	S
KFRI0183 ⁴⁾	1.20 ± 0.41	0.27 ± 0.03	0.44 ± 0.01	7.40 ± 0.03	8.80 ± 0.09	0.1 ± 0.02	143.8 ± 0.37
KFRI0170 ⁴⁾	2.40 ± 0.21	0.56 ± 0.04	0.75 ± 0.12	7.37 ± 0.04	8.47 ± 0.05	ND ⁶⁾	138.7 ± 0.24
CHKJ1249	2.30 ± 0.32	0.79 ± 0.02	1.39 ± 0.01	7.03 ± 0.05	7.67 ± 0.02	ND	105.9 ± 0.18
CHKJ1326	2.30 ± 0.57	0.41 ± 0.01	1.26 ± 0.12	7.10 ± 0.03	7.57 ± 0.07	ND	146.9 ± 0.19
CHKJ1339	2.40 ± 0.42	0.59 ± 0.02	1.16 ± 0.02	6.57 ± 0.04	7.33 ± 0.09	ND	123.8 ± 0.38
Soybean ⁵⁾	ND	0.20 ± 0.24	0.18 ± 0.04	ND	2.33 ± 0.01	ND	ND

¹⁾Values are means ± S.D.

²⁾Samples were diluted three times for measurement.

³⁾Samples were used as is for measurement.

⁴⁾KFRI 0183 (*B. subtilis*) and KFRI 0170 (*B. natto*).

⁵⁾Water soaked soybean without fermentation.

⁶⁾ND: Not Detected.

Table 5. Assimilation of fifty carbon sources by *Bacillus* spp. strains as assessed in API 50 CHB kit

Carbon sources	<i>Bacillus</i> spp.		
	CHJ 1249	CHJ 1326	CHJ 1339
Glycerol	+	+	-
Erythritol ¹⁾	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+/-
D-Ribose ²⁾	+	+	+
D-Xylose	-	+	-
D-Galactose	+	+	-
L-Rhamnose	+/- ³⁾	+/-	-
Inositol	-	+	+
D-Sorbitol	+	+	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	-	+	+
Amygdalin	+	+	-
D-Lactose	+	+	-
D-Melibiose	+	-	-
D-Raffinose	+	-	+
Gentiobiose	+	+	-
D-Tagatose	+	+	-
Potassium gluconate	+	+	+/-
Identification as	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>

¹⁾Other carbon sources which were not assimilated by all three strains were: D-Arabinose, L-Xylose, D-Adonitol, Methyl-βD-xylopyranoside, L-Sorbose, Dulcitol, Methyl-αD-Mannopyranoside, Inuline, D-Melezitose, Xylitol, D-Lyxose, D-Fucose, L-Fucose, D-Arabitol, L-Arabitol, potassium 2-Keto-Gluconate, potassium 5-Keto-Gluconate.

²⁾Other carbon sources which were assimilated by all three strains were: D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, D-Mannitol, N-Acetyl-Glucosamine, Arbutin, Esculin, Salicin, D-Cellobiose, D-Maltose, D-Saccharose, D-Trehalose, Amidon, Glycogen, D-Turanose.

³⁾+/-: Weak.

Interleukin-1α(IL-1α)는 17 kDa의 단백질로서 T cell의 생산을 증가시키고 B cell의 활성화 및 항체생산을 증가시키는 등 생체내 여러 면역 기능조절에 관여하고 있는 면역 조절 물질 중의 하나이다. 선별된 균주로부터 제조한 청국장시료가 *in vitro*

에서 거식세포 활성화능을 나타내는지 살펴보기 위해 RAW 264.7 거식세포주의 세포배양 시 여러 농도로 처리한 다음 IL-1α 생성정도를 ELISA로 측정한 결과는 Table 4에서 보여주고 있다. Table 4에서 보여주고 있는 것과 같이 선별한 3종의 균주(CHKJ 1249, 1326, 1339)로 제조한 청국장은 1배의 농도에서 평균 125.5 ± 0.25 pg/mL의 IL-1α가 생성되었는데 반해, 대조군(soybean)에서는 IL-1α가 생성되지 않았다. 또한, 양성 대조군으로 사용한 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus natto*의 평균 141.30.31 pg/mL 생성량과 거의 비슷한 수준이었다. 이상과 같은 세 가지 선별균주의 면역활성 검정결과 세 가지 균주들은 모두 높은 수준으로 면역세포를 활성화시켰음을 알 수 있었고, 선별된 균주로 제조한 청국장은 노화 및 질병에 수반되는 면역력 감소를 방지하는 기능성식품 재료로서의 사용가능성을 보여주고 있다.

선별균주의 동정

이상의 결과로부터 최종 선별된 3종의 균주들은 API 동정 kit로 동정을 한 결과 두 균주(CHKJ 1249, CHKJ 1326)는 *Bacillus licheniformis*로 그리고 CHKJ 1339 균주는 *Bacillus subtilis*로 동정되었다(Table 5).

요 약

혈전용해 활성과 면역세포 활성능이 우수한 청국장을 제조하기 위하여 청국장에서 분리된 220개의 세균으로부터 단백질 분해능과 점질물질 생성능이 우수한 13개의 *Bacillus* 균주를 선별하였다. 이들 13개 *Bacillus* 균주들의 fibrin plate 방법을 이용한 혈전용해 활성과 RAW 264.7 cell line을 이용한 cytokine 생성능력 (NO 생성능, Interlukin-1α, TNF-α) 검정에 의한 면역세포 활성능 측정실험을 수행하였는데, *Bacillus* 균주들을 TSB (Trypticase soy broth)에 키운 시료와 콩에 접종하여 제조한 청국장시료와 같은 두 가지 상이한 시료를 이용하여 혈전용해능과 면역세포 활성능을 측정한 결과, 혈전용해능과 면역세포 활성능이 가장 우수한 세 균주가 최종 선발되었다. 선발된 세균주의 동정결과 두 균주(CHKJ 1249, CHKJ 1326)는 *Bacillus licheniformis*로 그리고 CHKJ 1339 균주는 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

감사의 글

본 연구는 Biogreen 21 사업 연구결과의 일부로서 이에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

- In JP, Lee SK, Ahn BK, Chung IM, Jang CH. Flavor improvement of *Chungkukjang* by addition of *Yucca (Yucca shidigera)* extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 57-64 (2002)
- Son DH, Kwon OJ, Ji WD, Choi UK, Kwon OJ, Lee EJ, Cho YJ, Cha WS, Chung YG. The quality changes of *Chungkukjang* prepared by *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43: 1-6 (2000)
- Choi UK, Ji WD, Chung YG. Characteristics of *Chungkukjang* produced by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 846-851 (1998)
- Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. Some biological activities and isoflavone content of *Chungkukjang* prepared with black beans and *Bacillus* strains. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 662-667 (2001)
- Park WJ, Park HY, Yoo JH, Rhee MS. Effect of *Artemisia asiatica* Nakai extract on the flavor of *Chungkukjang*. *Food Eng. Prog.* 5: 115-124(2001)
- Kim YS, Jung HJ, Park YS, Yu TS. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *Chungkukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 475-478 (2003)
- Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK. Production and separation of anti-hypertensive peptide during *Chungkukjang* fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43: 247-252 (2000)
- Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Kee DS, Kim HB. Antioxidant activity of substances extracted by alcohol from *Chungkukjang* powder. *Korean J. Microbiol.* 37: 177-181 (2001)
- Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. Antimicrobial activities of viscous substance from *Chungkukjang* fermented with different *Bacillus* spp. *J. Fd. Hyg. Safety* 16: 188-193 (2001)
- Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *Chungkukjang*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1-5 (1995)
- Kil JO, Kim GN, Park IS. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from *Chungkookjang*. *Korean J. Food Sci. Nutr.* 27: 51-56 (1998)
- Kang SM, Lee CS, Yoo CK, Seo WS. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *Chung Guk Jang*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 507-514 (1998)
- Kim IJ, Kim HK, Chung JH, Jeong YK, Ryu CH. Study of functional *Chungkukjang* contain fibrinolytic enzyme. *Korean J. Life Sci.* 12: 357-362 (2002)
- Cappuccino JG, Sherman N. *Microbiology, a Laboratory Manual*. 2nd ed. Benjamin Cummings. USA. pp. 31-35 (1987)
- MacFaddin JF. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed. Williams and Wilkins, USA (1980)
- Astrup TS, Mullertz. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochim. Biophys.* 40: 346-351 (1991)
- Ding AJ, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogenintermediate and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 144: 2407-2413 (1988)
- Dong W, Azcona-Olivera JI, Brooks KH, Linz JF, Pestka JJ. Elevated gene expression and production of interleukins 2, 4, 5 and 6 during exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) and cyclogeximide in the EL-4 thymoma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127: 282-190 (1994)
- SAS Institute, Inc. *SAS User's Guide, Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA* (1996)
- Murakami H, Kaminogawa S. *Food and Life Body Defence*. Hanrimwon Publ. Co., Seoul, Korea (1996)
- Han MD, Lee JW, Jeong H, Kim YS, Ra SJ, Yoon KH. Nitric oxide, TNF- α , and TNF- β formation of Rat Kuffer cell activated by the β -glucan from *Ganoderma lucidum*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 28-34 (1999)

(2004년 11월 24일 접수; 2005년 3월 17일 채택)