

Bacillus licheniformis B1에 의한 청국장 및 간장 발효

이재중 · 이동석¹ · 김한복*

¹인제대학교 임상병리학과, 호서대학교 자연과학부 생명과학전공

충남 아산시 호서대 주변 토양에서 *Bacillus* 균주를 분리하고, 생화학적 검사, VITEK, MIDI system을 이용해 *Bacillus licheniformis* B1으로 동정하였다. *B. licheniformis* B1은 amylase와 protease를 세포 외로 분비하였다. 본 균주를 증자 대두에 접종해서 청국장과 간장발효 과정을 추적하였다. 당과 아미노산의 항산화물질로 알려져 있는 갈변물질이, 청국장 발효에서는 초기에 비해 8배 이상, 간장에서는 2배 이상 증가하였다. 또한 청국장 발효에서는 단백질 분해효소의 활성이 발효시작 하루만에 최대치에 이르렀다. 간장발효에서는 단백질 분해효소의 활성이 발효시작 하루만에 50% 감소했으나 그 후로는 일정한 값을 유지하였는데, 이는 salt의 영향으로 보인다. 또한 청국장과 간장이 발효되면서, 증자대두에 존재하지 않던 안정된 고분자 핵산이 확인되었다. 호서대 주변 토양에서 분리한 *B. licheniformis* B1으로, 청국장과 간장발효를 연속적이면서 성공적으로 수행할 수 있음을 본 연구를 통해 확인하였고, 아울러 갈변물질과 핵산 기능성 물질의 개발 가능성을 제시하였다.

Key words □ amylase, *Bacillus licheniformis*, Chungkookjang, Kanjang, melanoidin, nucleic acids, protease

암이나 혈관질환과 관련된 뇌졸중이 사망질환의 주된 원인이 되고 있다. 그럼에도 불구하고 현대의학이 이런 질환을 본격적으로 치료할 수 있다고 보기 힘들며 가까운 미래에 돌파구가 나올 가능성도 보이지 않는다. 따라서 이런 질환은 예방만이 현 재로서는 최선책이다. 인간은 생존하기 위해 음식을 매일 섭취해야 한다. 음식의 단순한 영양학적 기능을 떠나 좀 더 적극적으로 질병의 예방에 이용하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 특히 한국의 전통발효 식품은 이러한 질병의 예방에서 큰 역할을 할 수 있는 가능성이 기대되고 있다.

한국의 장류식품인 청국장, 된장, 간장은 우리 조상으로부터 수백년 동안 섭취한 음식으로써 특별한 부작용이 없는 식품으로 알려져 있고, 요즘은 각종 유익한 생리활성 물질들이 밝혀지고 있다. 청국장에서는 항산화 효과(6), 혈전용해 효과(19), 혈압강하 효과(16) 등이 보고되고 있다. 청국장의 발효에 관여하는 주된 미생물 중의 하나는 *Bacillus* 속이다(4, 11). 대두가 *Bacillus* 균주에 의해 발효되면서, 대두에 존재하지 않았던 점질성의 poly-glutamic acid(7, 15), protease(4, 6)가 생성된다. Polyglutamic acid는 항암효과(12), 약물전달 매개체로(14), protease는 혈전용해 효과가 있는 것으로 알려져 있다(19). 본 연구에서는 충남 호서대 주변 토양에서 분리한 *Bacillus licheniformis* B1을 수지, 증자된 대두에 접종하여 청국장을 제조할 수 있는 지 여부와 발효과정을 추적하였다. 본 균주에 의해 청국장이 발효되면서 항산화물질인 갈변물질의 급격한 증가를 확인할 수 있었다. 또한 이 청국장을 재료로 하여 연속적으로 간장을 제조하면서 발효과정의 특성변화를 연구하였다. 청국

장과 간장에서는 안정된 고분자 핵산이 확인되었으며, 핵산식품으로서의 개발 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

균주분리 및 동정

충남 아산시 호서대 주변의 토양에서 bacteria를 skim agar 배지(3)에서 배양하면서, 투명환을 형성하는 균주를 분리하였고, 이를 여러가지 생화학적 성상 검사, 자동화 균주 동정 VITEK (bioMereux Co.) system과 MIDI system(17)을 이용하여 *Bacillus licheniformis* B1으로 동정하였다.

청국장 및 간장 발효

강력한 protease와 amylase를 분비하는 *B. licheniformis* B1을 LB meida에서 37°C, 18시간동안 배양한 액을 starter로 이용하였다. 정선된 백태를 18시간 동안 수지하고, 120°C에서 20분간 autoclave한 원료대두 30g에다 상기 균주 배양액이 1%가 되도록 접종하였다. 접종 후, 37°C에서 96시간까지 발효시켰다. 96시간 발효시킨 청국장, NaCl, 증류수를 각각 1:1:4(w/v)의 비율로 배합하여 간장을 제조하고 이를 25°C에서 발효, 숙성시켰다.

pH 측정

청국장의 pH 측정을 위해, *B. licheniformis* B1을 증자대두에 접종한 날부터 발효 4일째 되는 날까지 매일 0.2g을 취해 분쇄하고, 5배 부피의 증류수를 첨가하여 섞어주었다. 4°C, 14,000 ×g에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 취해 pH meter로 측정하였다. 간장의 pH 측정을 위해서는, 간장을 충분히 흔들어

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 82-0418-540-5334, Fax: 82-0418-548-6231
E-mail: hbkim@dogsuri.hoseo.ac.kr

준 후, 위와 같은 조건에서 20분 동안 원심분리하여 얻어진 상층액을 pH meter를 사용하여 측정하였다.

갈변도 측정

당 성분과 이미노산의 반응에 의해 생성되는 갈변물질(6)의 농도를 결정하기 위해, 청국장의 경우, 증자대두에 본 균주를 접종해서 4일 째 되는 대두를 취해 분쇄하고 5배 부피의 증류수를 가해 섞어준 후, 14,000×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 각각 390, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 간장의 경우에는, 제조된 간장을 같은 조건에서 20분간 원심분리하고, 상층액을 390, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 분해효소의 활성측정

청국장의 발효된 대두 0.2 g을 분쇄하고 5배 부피의 증류수를 첨가하여 4°C, 14,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 조효소 용액으로 사용하였다. 간장은 같은 조건에서 20분간 원심분리하여 상층액을 조효소 용액으로 사용하였다. Casein을 기질로 하고 Bradford 시약을 발색시약으로 하여, 김 등(3)의 방법에 의해, 청국장과 간장에 존재하는 단백질 분해효소의 활성을 결정하였다.

Amylase 활성측정

Amylase의 활성은 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하였다(13). 세포배양액을 조효소로 하여 기질인 전분과 반응시킨 다음, DNS용액을 가하여 반응을 정지시켰다. 95°C에서 5분간 가열하여 발색시킨 다음, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

청국장과 간장의 핵산확인

분쇄된 청국장 대두 0.2 g에 5배 부피의 증류수와 0.2 g의 NaCl을 섞어 준 다음 4°C, 14,000×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 간장의 경우 같은 조건에서 20분 동안 원심분리하였다. 각각의 상층액에 동량의 absolute ethanol을 가하고 상온, 14,000×g에서 10분간 원심분리하여 pellet을 얻었다. Pellet을 실온에서 건조한 후, 증류수로 용해하고 agarose gel 전기영동을 하였다. EtBr로 염색을 하고 UV를 조사하여 핵산을 확인하였다.

결과 및 고찰

균주동정

충남 아산시 호서대 주변 토양을 채취하고 회석하여 skim agar 배지에 도말하고 항온배양기 30°C에서 하루동안 배양하였다. Skim agar 배지에서 투명한을 형성하는 colony를 선택하여 동정작업에 들어갔다. 이 균주는 Gram (+)이며 포자를 갖는 막대형이고 catalase (+)인 것으로 보아 *Bacillus* 속이었다. 이 균주는 20~55°C까지 성장할 수 있었으며 10% NaCl에서도 성장이 가능한 것으로 보아 내염성이 있었다. 또한 protease와 amylyase를 분비하였다. Amylase의 활성은 pH 9와 50°C에서 최고활성을 나타내었다. Protease는 pH 7과 40°C에서 최고활성

Table 1. Biochemical characteristics of B1 strain using VITEK test system

Characteristics	Results
Catalase production	+
Gram stain	+
Voges-Proskauer reaction	+
Spore	+
Formation of indole	-
Motility	+
Hydrolysis of starch	+
gelatin	+
casein	+
Citrate utilization	+
Nitrate reduction	+
Denitrification	-
Reduction of tetrazolium red	+/-
Deamination of phenylalanin	-
Acid from sucrose	+
tagatose	+
glucose	+
inositol	+/-
galactose	-
arabinose	+
xylose	-
mannitol	+
raffinose	-
salicin	+
amygdalin	+/-
inulin	-
ribose	+/-
maltose	+
trehalose	+
palatinose	+
sorbitol	+/-
N-acyetyl-D-glucosamine	+
amylopectin	+/-
arabitol	-

을 나타내었다.

자동화 균주동정 VITEK system을 이용해 본 균주의 당 이용도를 조사해 보았다. 본 균주는 sucrose, tagatose, glucose, arabinose, mannitol, maltose 등을 이용해 산을 생성하였지만, galactose, xylose, raffinose등을 이용하지는 못했다(Table 1). VITEK system을 통해 본균주는 *Bacillus licheniformis*로 동정되었다. 또한 균주동정을 보다 더 정확하게 하기 위해, 세포벽 지방산 성분을 MIDI system을 이용해 확인하였다. 본 균주의 주된 세포벽 지방산은 15:0 anteiso, 15:0 iso, 16:0의 형태가

Table 2. Fatty acid profile of B1 strain

Major cellular fatty acid	Result (%)
15 : 0 anteiso	43.3
15 : 0 iso	19.0
16 : 0	13.2
17 : 0 anteiso	9.6
17 : 0 anteiso	7.0

iso, iso-form; anteiso, anti-iso form.

각각 43, 19, 13%로 되어 있어, 본 균주가 *B. licheniformis*임을 최종적으로 확인할 수 있었다 (Table 2).

청국장 및 간장발효

Bacillus 균주 중 소장하고 있는 *B. megaterim* HYH-4, *B. pumilus* A4, *B. cereus* SH-7 등(3)을 증자대두에 접종하더라도 청국장 발효는 일어나지 않았다. *B. megaterim* HYH-4와 *B. pumilus* A4는 자연계에서 분리한 균주이고, *B. cereus* SH-7은 된장에서 분리한 균주이다. 청국장 발효의 기준은 외관상 대두의 표면이 흰색으로 덮이고, 이쭉시개로 떠 보았을 때, 실모양의 점질성 물질 생성여부로 판단했다. 이상의 *Bacillus* 균주는 모두 casein을 분해할 수 있는 protease를 분비하였다. 그럼에도 오직 *B. licheniformis* B1만이 청국장 발효를 할 수 있는 것으로 보아, 청국장 발효에는 protease의 특성 이외에도 여러 요소가 관여되는 것으로 보인다. *B. licheniformis* B1을 이용해 제조한 청국장의 pH 변화는 Fig. 1과 같았다. 증자대두의 pH는 6.4이었으나, 발효가 진행될 수록 알칼리화하여 발효 4일째에는 7.6까지 증가하였다. 이는 청국장 발효시 생성되는 ammonia로 인해 pH가 증가한다는 기존의 보고들과 부합하였다(6).

본 청국장을 재료로 제조한 간장의 겨우 pH는 청국장과 달

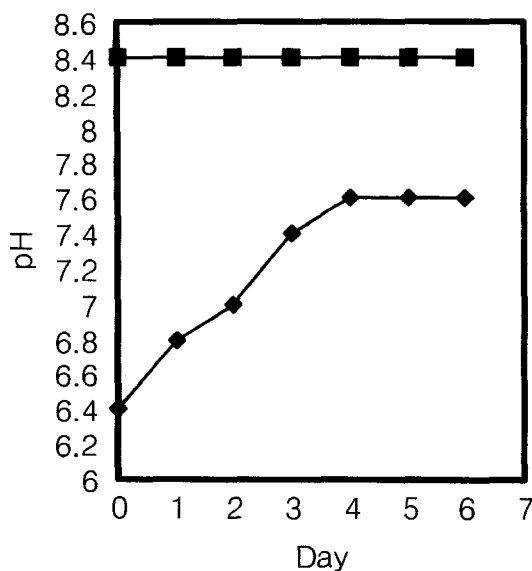


Fig. 1. pH change during fermentation. ◆, Chungkookjang; ■, Kanjang.

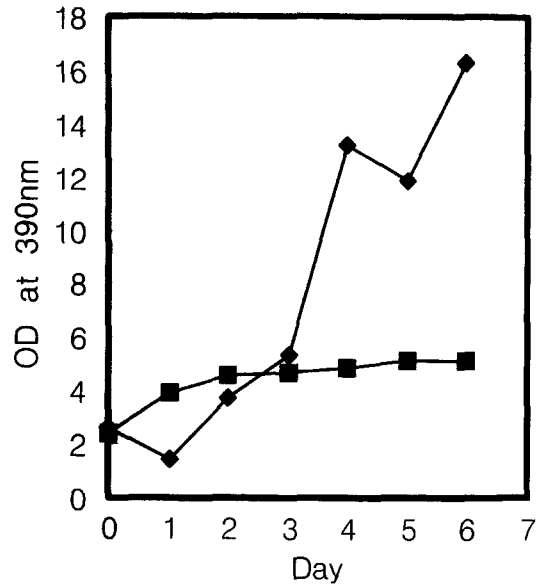


Fig. 2. Detection of browning materials at 390 nm. ◆, Chungkookjang; ■, Kanjang.

리 pH 8.4로 일정하였다(Fig. 1). 간장발효의 진행은 간장냄새와 갈변도의 증가 등으로 확인할 수 있었다. 간장냄새로 땅콩냄새를 맡을 수 있었으며, 재래식 간장의 역겨운 냄새와는 판이하게 틀렸다. 본 제조법에 의해 제조된 간장은 좋은 향기를 갖고 있기 때문에 기능성 간장으로 개발할 여지가 있다. 두 달 정도 간장을 숙성시켰을 때는 pH가 6.4로 떨어졌다. 이는 외부에서 효모나 유산균의 유입 때문인 것으로 사료된다. 전통적인 간장 제조에서는 벽돌형의 메주를 사용하나 본 연구에서는 콩알 형태의 청국장을 메주로 사용하였다. 콩알형의 메주(1)는 공기와의 접촉 면이, 벽돌형보다 넓기 때문에, *Bacillus* 균주에 의한 발효가 빨리 일어나서 간장의 숙성제조가 가능한 것으로 보인다.

갈변도의 변화

청국장, 간장 성분 중 갈변물질은 amino-carbonyl 기의 반응에 의해 생성되는 melanoidin 때문이라는 보고들이 많다(5, 6, 8). Melanoidin은 강력한 항산화 물질로 알려져 있다(5). 청국장의 발효시간에 따른 갈변도의 변화를 확인하기 위해, 갈변물질의 흡수대로 알려져 있는 390과 500 nm에서 흡광도를 측정하였다(6). 발효가 진행되면서 390 nm에서는 흡광도가 2.6에서 16.2까지 8배 증가하였으며(Fig. 2), 500 nm에서는 1.1에서 9.2까지 8배 이상 급격히 증가하였다(Fig. 3). *B. licheniformis* B1이 분비하는 protease와 amylase에 의해 생성된 amino산과 당 성분에 의해 발효가 진행되면서, 왕성하게 갈변물질이 만들어지는 것으로 보인다. 간장은 담금직 후, 390 nm에서 흡광도가 2.4에서 5.2로 증가하였다(Fig. 2). 500 nm에서는 0.6에서 증가하여 완만히 상승하다 숙성 6일째에는 1.3까지 증가하였다(Fig. 3). 청국장, 간장에서 만들어지는 갈변물질의 정체를 바탕으로 생리활성 규명이 더욱 이루어져야겠다.

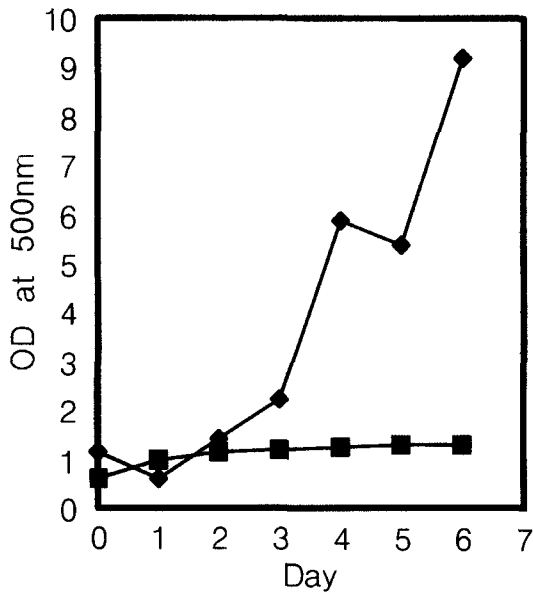


Fig. 3. Detection of browning materials at 500 nm. ◆, Chungkookjang; ■, Kanjang.

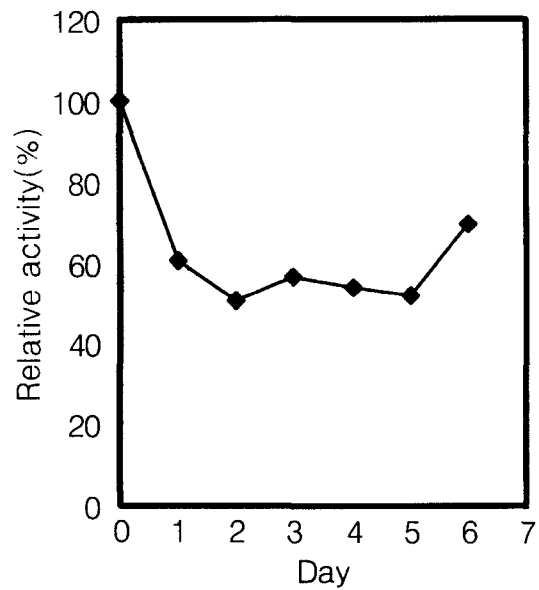


Fig. 5. Protease activities during Kanjang fermentation.

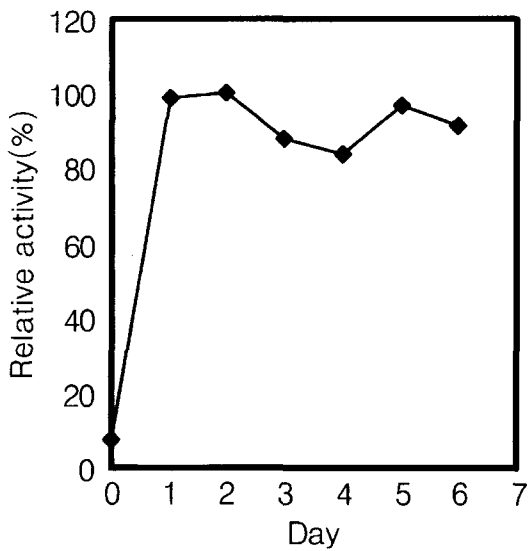


Fig. 4. Protease activities during Chungkookjang fermentation.

단백질 분해효소의 활성

증자대두에 *B. licheniformis* B1을 접종하여, 청국장을 제조하면서 단백질 분해효소의 활성을 추적하였다. 증자대두에서 없었던 효소활성이 발효시작 하루만에 최대치에 이르고, 그 후로는 약간의 변화만이 관찰되었다(Fig. 4). 본 균주가 분비하는 단백질 분해효소는 대두의 불용성 단백질을 분해할 수 있는 것 같다. 다른 *Bacillus* 균주가 청국장 발효를 못하는 것은 그들의 단백질 분해효소가 대두의 단백질 성분을 분해하지 못하는 것으로 보인다. 간장의 경우, 제조 처음의 단백질 효소활성에 비해, 발효 하루만에 활성이 50% 감소했으며, 그 이후로는 일정한 값을 유지하였다(Fig. 5). 이는 간장의 15% 소금에 의해 효

소활성이 저해받는 것으로 보인다.

*Bacillus natto*kinase는 생체내에서 혈전분해능이 있는 것으로 알려져 있으며(19), *B. licheniformis*의 protease가 혈전분해능이 있는지도 조사되어야 할 것이다. 또한 본 균주에 의해 대두 단백질 성분이 분해되면서 생성되는 oligo-peptide도 다양한 생리활성을 가질 수도 있을 것으로 기대된다.

고분자 핵산

대두는 핵산의 함유량이 높은 식품이다. 항암효과, 면역증강 효과 등 핵산의 유익한 생리활성이 요즘 많이 알려지고 있다(9, 10). 기존의 연구는 주로 간장이나 된장에 존재하는 핵산분해물인 IMP, GMP에 관련된 것이었으며, 이들 성분이 미치는 맛의 측면에서 연구되었다(2). 세포내에서 핵산의 생합성은 de novo와 salvage pathway의 2 경로가 있다(18). 음식물에 존재하는 핵산은 세포의 salvage pathway에 의해 세포내 핵산 생합성에 이용된다(10). 과거에는 간장에서 de novo 대사경로에 의해 핵산이 합성되므로 음식물을 통해 공급할 필요가 없다고 생각했다. 그러나, 근래에는 골수, 뇌, 피부 등의 조직에서는 de novo에 의한 합성능력이 약해서 음식물을 통한 핵산공급이 도움이 된다는 보고가 있다(10).

본 연구에서는 증자대두가 발효되면서 핵산의 질적, 양적 변화를 조사하였다. 놀랍게도 증자대두 자체에서는 핵산이 관찰되지 않았다(Fig. 6). 이는 대두를 autoclave하는 과정에서 대두의 핵산성분이 모두 파괴되는 것으로 보인다. 단 수지만 한 대두에서는 핵산이 관찰되었으며 청국장과 간장의 발효에서는 고분자의 핵산이 발견되었다(Fig. 6). 증자대두에서는 핵산이 발견되지 않았기 때문에, 청국장과 간장의 핵산은 미생물 특히 *B. licheniformis* B1의 것으로 사료된다.

체내에서 흡수된 저분자 핵산은 salvage pathway에서 이용되기에, 이미 너무 분해가 되어 사용할 수 없는 경우가 대부분

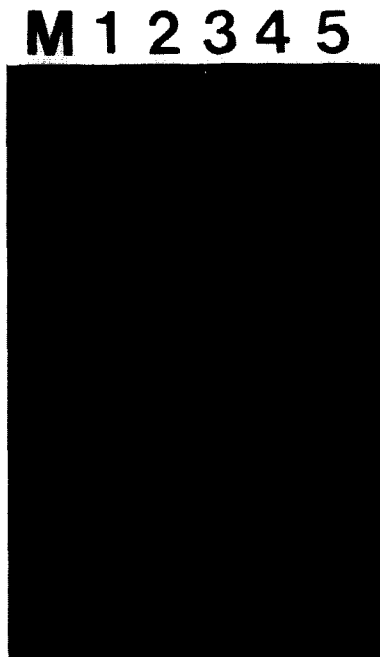


Fig. 6. Nucleic acids in *Chungkookjang* and *Kanjang* during fermentation. Nucleic acids from two-month old *Kanjang* (1), *Chungkookjang* (2), one-day old *Kanjang* (3), autoclaved soybean (4), soaked soy-bean (5) were purified, electrophosed, and then visualized by EtBr staining. λ DNA cut by *Hind*III (23, 9.4, 6.7, 4.4, 2.3, 2.0 kb) was used as a marker (M).

이라고 알려져 있다. 본 연구에 의해 제조된 청국장이나 간장에서 발견되는 고분자핵산은 이용의 효율 면에서 기대가 된다. 또한 청국장과 간장에서 핵산의 보존성도 우수하므로, 이들 발효 식품을 핵산식품으로 개발할 수도 있을 것이다.

감사의 말

이 논문은 1999년도 호서대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김동호, 김승호. 1999. *Mucor* 및 *Rhizopus*속 균류를 이용한 콩알 메주 발효의 생화학적 특성. 한국식품과학회지 **31**, 176-182.
2. 김미정, 이혜수. 1988. 재래식, 개량식 된장과 시판된장의 유리아미노산, 핵산과 그 관련 물질 함량. 한국영양식량학회지 **17**, 69-72.
3. 김성조, 윤주희, 이명숙, 김한복. 1997. 된장에 존재하는 *Bacillus cereus*의 분리 및 균주가 분비하는 단백질 가수분해효소의 특성에 관한 연구. 한국미생물학회지 **33**, 136-141.
4. 김용택, 김원국, 오훈일. 1995. 청국장으로부터 혈전용해균주의 분

- 리 및 동정. 한국산업미생물학회지 **23**, 1-5.
5. 문갑순, 최홍식. 1990. 양조간장으로 부터 항산화성 물질의 분리 및 그 특성. 한국식품과학회지 **22**, 461-465.
6. 최용규, 지원대, 정영진. 1998. *Bacillus subtilis* DC-2로 제조한 청국장의 특성. 한국식품영양과학회지 **27**, 846-851.
7. Ashiuchi, M., K. Soda, and H. Misono. 1999. A poly-gamma-glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: gene cloning and biochemical analysis of poly-gamma-glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 6-12.
8. Chuyen, N.V. 1998. Maillard reaction and food processing. Application aspects. *Adv. Exp. Med. Biol.* **434**, 213-235.
9. Cohen, A., J. Barankiewicz, H.M. Lederman, and E.W. Gelfand. 1984. Purine metabolism in human T lymphocytes: role of the purine nucleoside cycle. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **62**, 577-583.
10. He, Y., S.H. Chu, and W.A. Walker. 1993. Nucleotide supplements alter proliferation and differentiation of cultured human (Caco-2) and rat (IFC-6) intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* **123**, 1017-1027.
11. Kim, W., K. Choi, Y. Kim, H. Park, J. Choi, Y. Lee, H. Oh, I. Kwon, and S. Lee. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2482-2488.
12. Li, C., D.F. Yu, R.A. Newman, F. Cabral, L.C. Stephens, N. Hunter, L. Milas, and S. Wallace. 1998. Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. *Cancer Res.* **58**, 2404-2409.
13. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
14. Multani, A.S., C. Li, M. Ozen, M. Yadav, D.F. Yu, S. Wallace, and S. Pathak. 1997. Paclitaxel and water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel, induce direct chromosomal abnormalities and cell death in a murine metastatic melanoma cell line. *Anticancer Res.* **17**, 4269-4274.
15. Nagai, T. and Y. Itoh. 1997. Characterization of a generalized transducing phage of poly- γ -glutamic acid-producing *Bacillus subtilis* and its application for analysis of Tn917-LTV1 insertional mutants defective in poly- γ -glutamic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4087-4089.
16. Okamoto, A., H. Hanagata, Y. Kawamura, and F. Yanagida. 1995. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Foods Hum. Nutr.* **47**, 39-47.
17. Stager, C.E. and J.R. Davis. 1992. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 302-327.
18. Stanier, R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, and P.R. Painter. 1986. The microbial world. Prentice-Hall. pp. 108-113.
19. Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi, and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta. Haematol.* **84**, 139-143.

(Received November 10, 1999/Accepted November 29, 1999)

ABSTRACT : Fermentation Patterns of Chungkookjang and Kanjang by *Bacillus licheniformis* B1

Jae Jung Lee, Dong Seok Lee¹, and Han Bok Kim (Department of Life Science, Hoseo University, Asan-Si, 336-795, ChungNam, Korea, ¹Department of Medical Laboratory Science, Inje University, Kimhae-Si, 621-749, Korea)

A *Bacillus* strain from Korean soil was isolated and identified to be *Bacillus licheniformis* B1 through various biochemical tests, VITEK, and MIDI system analysis. The strain produced extracellular amylase and protease. Whether or not the strain can perform *Chungkookjang* fermentation with autoclaved soybean and *Kanjang* fermentation was determined in this study. In *Chungkookjang* fermentation, browning materials of strong anti-oxidant increased 8-fold, and 2-fold in *Kanjang*, compared with initiation material for fermentation. Maximal protease activity in *Chungkookjang* was observed one day after inoculation. Protease activities in *Kanjang* decreased to the half, and then maintained constant values during fermentation, probably due to the inhibitory effect of salt on protease activities. High molecular mass of nucleic acids was identified in *Chungkookjang* and *Kanjang*. Since the nucleic acids were not observed in autoclaved soybean, they seem to be originated from *B. licheniformis* B1. This study demonstrated successive fermentation of *Chungkookjang* and *Kanjang* by *B. licheniformis* B1 isolated from nature, and suggested possible development of food rich in browning materials and nucleic acids.