

전통 된장으로부터 분리한 항균물질 생산 *Bacillus subtilis*의 특성

유현순^{1,2} · 손미예¹ · 조수정² · 박석규^{1,3} · 이상원^{1,2,*}

¹한국전통발효식품연구소, ²진주산업대학교 미생물공학과, ³순천대학교 식품영양학과

Characterization of Antibacterial Substance - Producing *Bacillus subtilis* Isolated from Traditional *Doenjang*

Hyun Soon Ryu^{1,2}, Mi Yae Shon¹, Soo Jeong Cho², Seok Kyu Park^{1,3} and Sang Won Lee^{1,2,*}

¹Korea Fermented Food Research Institute, Jinju 660-844, Korea

²Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

³Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Received March 16, 2007; Accepted June 13, 2007

A bacterium which has high enzymatic activities such as amylase, cellulase and protease was isolated from Korean traditional soybean food, *doenjang*. The isolated bacterium was identified to *Bacillus subtilis* HS25 by the test of morphological and biochemical properties according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and API 50 CHL kit, and by the 16S rDNA sequence. The isolated *B. subtilis* HS25 had a potent antibacterial activity against food born causative or pathogenic bacteria. *B. subtilis* HS25 is endospore forming cell and contained flagella and abundant viscous material at the out layer of cell wall. It was rod type bacterium (0.5~0.8 × 3~5 μm) having biochemical characteristics such as gram staining(+), catalase(+), oxidase(-) and hydrolysis of esculin(+). The optimal medium compositions for production of antibacterial substance in the *B. subtilis* HS25 were 1% of soluble starch, 0.5% of yeast extract, 0.5% of peptone and 0.05% of MgCl₂ · 6H₂O. The optimum temperature and pH of the growth of the *B. subtilis* HS25 was 35°C and pH 7.5, respectively. The antibacterial activity was more high in neutral to a little alkaline pH (6.5-10.5) than in acidic pH. The optimal shaking speed to grow and to produce antibacterial substance of the *B. subtilis* HS25 was 160~200 rpm. The optimal culture time for antibacterial activities of the bacterium were shown to be in the range of 12-36 hr.

Key words: *Bacillus subtilis* HS25, *doenjang*, antibacterial substance, media composition, culture condition

서 론

식품의 생산, 저장, 유통 및 소비에 이르는 과정에서 식품의 변질을 억제하고 품질을 향상시킬 목적으로 식품을 가열, 동결 및 건조시키는 물리적인 방법이나 미생물의 발효, 염장 및 훈연 등의 다양한 방법을 사용하여 식품의 보존성을 증대시켜 왔다.¹⁻⁵⁾ 이러한 방법들은 모든 식품에 적용될 수 있는 것은 아니며, 단지 부분적으로만 효과를 나타내기 때문에 식품의 장기보존을 위해서는 주로 화학합성 보존제 및 관련 식품첨가물 등을 광범위하게 사용해 왔다.⁶⁻⁸⁾ 그러나 이들 대부분은 자체 독성 등의 여러 가지 문제점을 내포하고 있어서 그 이용범위가 한정되어 있을 뿐만 아니라 또한 소비자들의 심리는 이러한 보존제

등이 첨가된 가공식품의 섭취를 기피하는 실정이다.⁹⁾ 이의 대체 방안으로 방부 및 항균효과가 있으며 안정성이 확보된 생약재 및 식물을 대상으로 오래전부터 천연항균성 물질의 검색과 식품의 이용에 관한 보고가 활발하게 진행되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 또한 1977년 Wong¹³⁾ 등에 의해서 *Monascus purpureus*의 항균효능이 확인된 이후 Monoacidin A¹⁴⁾ 및 Ankalactone¹⁵⁾의 항균물질이 분리되기도 하였으며, Yoon 등¹⁶⁾은 전통된장에서 분리한 *Bacillus subtilis*로부터 과채류 저장병균(*Penicillium* sp.) 등에 항균활성이 우수한 3종류의 lipopeptide의 isomer를 분리하여 보고하였다. 그리고 *Bacillus subtilis*는 전통된장과 간장의 숙성 중에 aflatoxin을 비롯한 mycotoxin을 생산하는 *Aspergillus* sp. 곰팡이의 균체생육 및 발암물질 생성을 현저하게 감소시키는 것으로 보고하였다.^{17,18)}

한편 전통 장류발효식품은 우리민족의 건강을 지켜온 우수한 단백질 급원으로 인정되고 있으나, 염분의 함량이 높아 현대인의 식생활 흐름과 성인병 등의 예방 측면에서 저염화 추세가 요

*Corresponding author

Phone: +82-55-751-3394; Fax: +82-55-751-3399

E-mail: swlee@jinju.ac.kr

구되고 있다.^{19,20)} 이와 같이 전통장류 발효식품을 저염화시킬 경우 여러 가지 부패미생물의 증식으로 저장성이 낮아지는 등 많은 문제점이 대두되기 때문에 이를 해결하기 위해서 장류식품에 효모를 첨가하거나 수분감소 및 에탄올을 첨가하는 방법 등^{19,21-23)}에 관한 연구가 진행되었으나 아직 실용화에는 이르지 못하고 있다.

본 연구자들은 항균물질 및 효소의 분비력이 우수한 발효미생물을 순수분리하여 전통메주를 발효시킬 때 이용한다면 전통메주의 여러 가지 위생적인 문제점 등²⁴⁾이 해결됨과 동시에 장류발효식품의 생리활성 및 저장성이 증진된 기능성된장의 개발이 가능할 것으로 생각되었다. 본 연구에서는 전통 콩 된장으로부터 단백질 및 전분분해력이 높으면서 항균물질 생산성이 우수한 미생물을 순수분리하여 그 미생물의 특성을 밝히고 항균물질 대량생산을 위한 배양조건 등을 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주. 공시균주는 각 가정에서 채취한 된장시료로부터 protease와 amylase 등의 효소활성 및 항균활성이 우수한 미생물을 순수 분리하여 사용하였다. 항균활성 검토를 위한 유해미생물로는 *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Staphylococcus aureus* KCTC 1927 등의 Gram(+)균과 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* KCCM 1202, *Klebsiella pneumoniae* KCCM 11319, *Proteus mirabilis* KCTC 2433, *Vibrio parahaemolyticus* 등의 Gram(-)균을 한국중균협회로부터 분양 받아 사용하였다.

사용배지. 미생물의 분리용 배지는 sodium chloride 1%, yeast extract 0.5%, peptone 1%, skim milk 2%로 구성된 SM배지와 SM배지에서 skim milk 대신 2% soluble starch가 함유된 AM배지 및 1% carboxy methyl cellulose(CMC)가 함유된 CM배지를 사용하였다. 항균 spectrum 조사는 Meller Hinton 평판배지를, 분리균주의 형태학적 및 생화학적 특성의 동정을 위한 배지는 Nutrient broth배지를 사용하였으며, 최적배지성분의 검토는 glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02%를 함유한 GY배지를 사용하였다.

미생물의 분리 및 동정. 채취한 각 균원시료 1g씩을 멸균된 생리식염수 9mL에 잘 희석한 후 SM, AM 및 CM평판배지에 각각 도말하여 생육속도가 빠르고 clear zone이 뚜렷한 균주를 선별한 후 유해미생물에 대한 항균활성이 높은 균주를 최종적으로 선정하였다. 최종 분리균주의 형태학적 및 생화학적 검토를 행하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology²⁵⁾ 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology²⁶⁾에 따라 1차 동정하였다. 그리고 당 발효실험은 API 50 CHL carbohydrate test kit(Bio Merieux, France)를 사용하여 nutrient broth 배지에 24시간 배양하면서 배양액의 색도변화 결과를 ATB identification computer system(Bio Merieux, France)에 입력하여 조사하였고, 16S rDNA 유전자 분석을 행하여 동정하였다.

항균활성 측정. 유해미생물에 대한 항균활성은 agar diffusion 법²⁷⁾에 준하여 측정하였다. 500 mL의 삼각플라스크에 200 mL의

액체배지를 넣고 살균한 후, 전배양액을 1% 접종하여 35°C, 180 rpm, 24시간 배양하였다. 그 배양액을 8,000 × g에서 원심분리한 후 얻은 상정액을 0.2 μm membrane filter로 여과하여 항균활성 측정시료로 사용하였다. 측정법은 0.6% soft agar가 함유된 Meller Hinton 배지에 각 유해미생물의 액체배양액 50 μL씩을 접종하여 잘 혼합한 후 미리 준비해둔 Meller Hinton 평판배지에 증충하여 응고시켰다. 그리고 항균활성 측정시료 120 μL씩을 흡착시켜 건조시켜 둔 paper disc(Toyo Rhoishi kaisha, Ltd., 8 mm)를 증충배지 위에 얹어 35°C 항온기에서 배양하면서 유해미생물의 생육저해를 나타내는 clear zone의 직경(mm)을 측정하였다.

최적 배지 조성. 분리균주의 최적배지는 GY배지에 탄소원으로 glucose, sorbitol, mannitol, soluble starch, xylose, maltose, lactose, fructose, arabinose, cellobiose, raffinose, rhamnose, mannose, sucrose 및 galactose 등을 각각 1%씩 첨가하여 35°C, 180 rpm으로 24시간 배양 한 후 유해미생물에 대한 항균활성 및 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였다. 질소원은 NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, NaNO₃, (NH₄)₂C₂O₄, malt extract, yeast extract, asparagine 및 peptone을 각각 0.5%씩 첨가하고, 무기염은 CoCl₂·6H₂O, CaCl₂, NaCl, ZnCl₂, FeSO₄·7H₂O, AgNO₃, HgCl₂, MgCl₂·6H₂O, K₂HPO₄, ZnSO₄·7H₂O, MgSO₄·7H₂O 등을 각각 0.05%씩 첨가하여 탄소원의 영향과 동일한 방법으로 검토하였다.

최적 배양 조건. 분리균주의 최적 배양조건은 500 mL 삼각플라스크에 200 mL의 액체배지를 넣고 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH 용액으로 배지의 초기 pH를 4.5~11.5의 범위로 조절하여 121°C, 15분 동안 멸균하였다. 제조한 액체배지에 최종 선정균주의 전배양액을 1%씩 접종하고 35°C, 180 rpm에서 24시간 배양한 후 660 nm에서 흡광도 및 항균활성을 검토하였다. 최적 배양온도는 15~50°C의 온도범위에서, 진탕속도의 영향은 80~240 rpm의 범위에서 pH 영향과 동일하게 검토하였다.

배양시간에 따른 항균물질의 생산. 분리균주의 배양시간이 항균물질의 생산에 미치는 영향은 500 mL 삼각플라스크에 최적배지 200 mL를 넣고 121°C에서 15분간 멸균한 후, 분리균주의 전배양액을 1% 접종한 다음 35°C, 180 rpm의 최적배양조건으로 96시간 동안 배양하면서 12시간 간격으로 시료를 채취하여 여러 종류의 유해미생물에 대한 항균활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

미생물의 분리 및 선정. 전통장류 발효식품의 저장성과 발효도를 증진시킬 우수한 균주를 분리할 목적으로 균원시료로부터 약 150여종의 균주를 1차 선별한 후, 성장속도가 빠르면서 SM, AM 및 CM의 평판배지 상에서 clear zone이 뚜렷한 균주를 2차 분리하여 여러 종류의 유해미생물에 대한 항균활성을 측정 한 결과는 Table 1에 나타내었다. SM 및 AM배지 상에서는 HS2, HS18, 및 HS25, CM배지 상에서는 HS9, HS25 및 HS32 분리균주의 clear zone이 비교적 크게 나타났다. 그리고 항균활성을 검토한 결과, HS2 분리균주는 *E. coli* 및 *Pro. mirabilis*에 항균활성을 나타내었고, HS18 분리균주는 *E. coli*

Table 1. Comparison of cell growth, clear zone size, enzyme activities and antibacterial activity of the isolated bacterial strains by agar diffusion method

Isolated strains	Growth rate ¹⁾	Clear zone (mm) ²⁾			Antibacterial activity (mm, size of clear zone)							
		SM ³⁾	AM ⁴⁾	CM ⁵⁾	A3 ⁶⁾	A7	A8	A12	A14	A25	A26	
HS2	+++	19.3	18.5	6.3	8.3	8.2	12.8	9.8	10.8	12.5	10.5	
HS7	+++	16.2	18.0	5.2	8.0	8.4	13.4	8.6	10.7	9.6	10.7	
HS9	++	14.7	14.9	8.5	8.2	8.4	11.4	8.2	10.5	10.1	10.5	
HS18	+++	18.4	18.9	6.4	9.6	9.4	12.7	12.4	12.2	12.6	12.4	
HS25	+++	18.4	23.5	9.6	12.4	10.3	13.4	12.4	12.5	12.6	12.5	
HS32	++	14.5	18.0	8.5	8.2	8.4	8.2	8.5	8.5	8.2	8.3	

¹⁾Growth rate: + slow, ++ medium, +++ fast. ²⁾Size of clear zone on SM³⁾ containing skim milk for protease, AM⁴⁾ containing soluble starch for amylase and CM⁵⁾ media containing carboxy methyl cellulose for cellulase activity. Composition of each media is well described in the Materials and Methods.

⁶⁾Tested strains = A3: *B. cereus* KCCM 11204, A7: *Pseu. aeruginosa* ATCC 15442, A8: *E. coli* ATCC 25922, A12: *Sta. aureus* KCTC 1927, A14: *Sal. enteritidis* KCCM 1202, A25: *Pro. mirabilis* KCTC 2433, A26: *V. parahaemolyticus*.

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of the strain HS25 isolated from traditional Doenjang

Characteristics	Reaction	Characteristics	Reaction
Morphology shape	Rod	N-Acetyl-glucosamine	-
Gram stain	+	Amygdalin	-
Cell dimension (μm)	0.5~0.8×3~5	Oxidase	-
Catalase	+	Esculin	+
Spore	+	Salicin	+
Flagellum	+	Cellobiose	+
Glycerol	+	Maltose	+
Erythritol	-	Lactose	-
L-Arabinose	+	Melibiose	+
Ribose	+	Sucrose	+
D-Xylose	+	Trehalose	+
L-Xylose	-	Inulin	+
Adonitol	-	Melezitose	-
β-Methyl-D-xyloside	-	Raffinose	+
Galactose	-	Starch	+
Glucose	+	Glycogen	+
Fructose	+	Xylitol	-
Mannose	+	Gentiobiose	-
Sorbose	-	D-Turanose	-
Rhamnose	-	D-Lyxose	-
Dulcitol	-	D-Tagatose	-
Inositol	+	D-Fructose	-
Mannitol	+	L-Fructose	-
Sorbitol	+	D-Arabitol	-
Gluconate	-	L-Arabitol	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction.



Fig. 1. Transmission electron microscope of the strain HS25 from after 18 hrs of culture time on LB broth medium. Scale bar was 1 μm.

Sta. aureus, *Sal. enteritidis*, *Pro. mirabilis* 및 *V. parahaemolyticus* 등에 항균활성을 나타내었다. 그리고 HS25 분리균주는 *B. cereus*를 비롯한 모든 유해미생물에 대하여 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. 이상의 결과로 3종류의 평판배지 상에서 clear zone이 뚜렷하며 다양한 유해미생물에 대한 항균활성이 우수한 HS25균주를 최종 분리균주로 선정하였고, 이 분리균주의 형태학적, 생화학적 및 유전학적 특성 등을 검토하였다. 분리한 HS25균주는 편모를 가지며, 세포벽 외부에 다량의 점질물을 형성하는 간균으로 관찰되었다(Fig. 1). 그리고 내생포자를 형성하며 세포의 크기는 0.5~0.8×3~5 μm로 그람양성 세균이었다. 생화학적 특성으로는 catalase 양성 및 oxidase 음성이었으며, esculin을 가수분해하였다(Table 2). 이상의 결과를 토대로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology²⁵⁾ 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology²⁶⁾에 준하여 동정한 결과 *Bacillus*속인 것으로 추정되었다. 또한 Table 2의 API kit(API, France)를 사용한 당 발효성 실험 결과를 ATB indentification program에 입력하여 분석하고 그리고 16S rDNA 분석(Fig. 2)을 행한 결과, HS25 균주는 *B. subtilis*와 유사한 것으로 판명되어, 최종 분리·선정한 항균물질 생산의 미생물을 *B. subtilis* HS25로 명명하였다.

탄소원의 영향. 각종 배지성분은 항균물질 생산에 중요한 것으로 알려져 있기 때문에 탄소원의 종류가 미생물의 생육에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 3에 나타내었으며, 대조구는 GY배지에서 탄소원을 제외시킨 배지를 사용하였다. *B. subtilis* HS25는 탄소원 중에서 soluble starch, cellobiose 및 raffinose 등의 첨가 순으로 잘 이용하였으나, sorbitol, mannitol 및 xylose 등은 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리고 *E. coli*, *Sta. aureus* 및 *Pro. mirabilis*에 대한 항균활성도 균의 생육이 왕성한 soluble starch, cellobiose 및 raffinose 등을 첨가한 시험구에서 높게 나타났다. 이상의 결과로 *B. subtilis* HS25

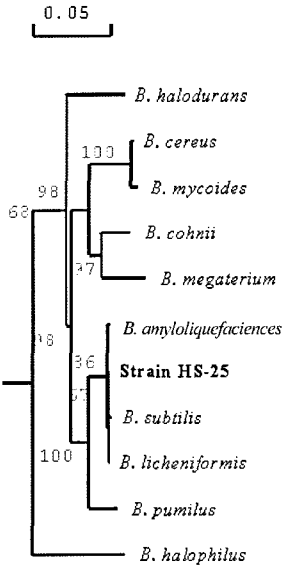


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA nucleotide sequences showing the position of strain HS25.

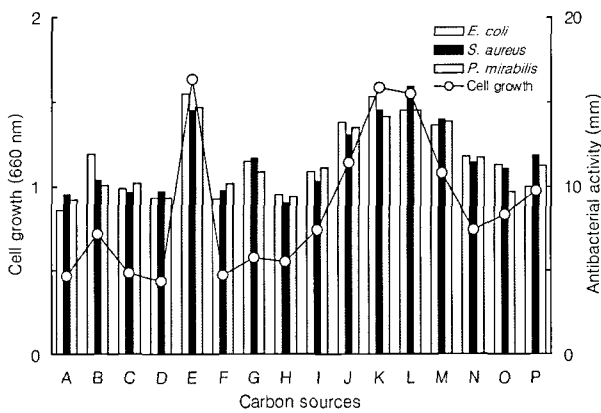


Fig. 3. Effect of various carbon sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* HS25. A: Control, B: Glucose, C: Sorbitol, D: Mannitol, E: Soluble starch, F: Xylose, G: Maltose, H: Lactose, I: Fructose, J: Arabinose, K: Cellobiose, L: Raffinose, M: Rhamnose, N: Mannose, O: Sucrose, P: Galactose.

균주의 항균활성은 균의 생육과 깊은 관계가 있는 것으로 판단 되었으며, 최종 탄소원으로 soluble starch를 결정하였다. 또한 *B. subtilis* HS25는 raffinose를 첨가한 시험구에서도 잘 생육하는 것으로 보아 대두 중에 비 소화성당으로 존재하는 raffinose를 분해할 수 있는 galactosidase 및 invertase의 분비력이 우수할 것으로 예측된다.

B. subtilis HS25의 생육 및 항균활성에 가장 효과적인 soluble starch의 최적 첨가 농도를 검토한 결과(Fig. 4), 1% 첨가까지는 균의 생육 및 항균활성이 급격하게 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 아주 완만하게 감소하는 현상을 나타내어 최적 첨가농도를 1%로 선정하였다. John 등²⁸⁾은 탄소원으로 glucose가 첨가되었을 때 streptococin A-FF22 생산이 증대되는 반면, streptococin B-74628의 경우에는 감소하는 것으로 보고하면서 항균물질은 미생물의 종류에 따라 최적 탄소원의 종

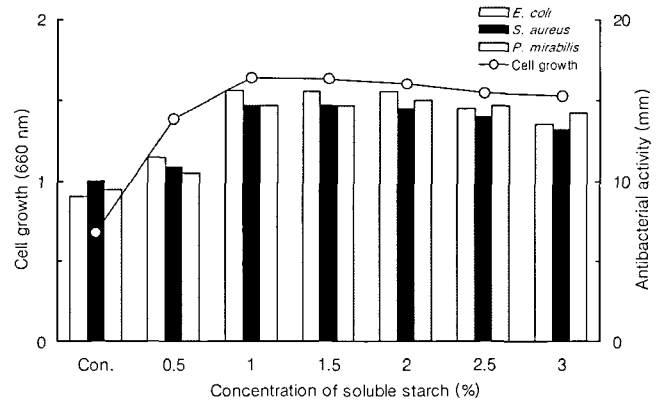


Fig. 4. Effect of concentrations of soluble starch on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* HS25.

류 또한 다양한 것으로 보고하였다.

질소원의 영향. *B. subtilis* HS25 균주의 생육에 미치는 질소원의 영향을 검토하여 Fig. 5에 나타내었다. 대조구는 GY배지에 1%의 soluble starch를 첨가하고 질소원을 제외한 배지를 사용하였다. 무기질소원을 첨가하는 것보다 yeast extract 및 peptone과 같은 유기질소원을 첨가한 시험구에서 생육이 양호하였고, *E. coli*, *Sta. aureus* 및 *Pro. mirabilis*에 대한 항균활성도 높게 나타났다. Chun 등²⁹⁾은 *B. alkalophilshaggy* JY827 균주로부터 항균물질을 생산할 때 KNO_3 를 비롯한 무기질소원보다 yeast extract와 같은 유기질소원이 효과적이라고 보고하였으며, Shomura 등³⁰⁾은 *Micromonospora* sp. SF-1927에 의한 항진균성 항생물질을 생산할 때 yeast extract가 가장 효과적이라고 보고하였다.

질소원의 최적 첨가농도를 조사한 결과 yeast extract 및 peptone을 단독으로 첨가하는 것 보다 2종류의 성분을 0.5%씩 혼합하여 첨가한 시험구에서 균의 생육 및 항균활성이 양호한 것으로 나타났다(Table 3). 이상의 결과로 *B. subtilis* HS25 균주를 배양할 때 질소원으로서 yeast extract와 peptone을 각각 0.5%씩 혼합하여 첨가하였다.

무기염의 영향. 무기염의 영향은 1% soluble starch와 0.5%의 yeast extract 및 peptone을 각각 첨가한 후 각종 무기염을 0.05% 농도로 첨가하여 검토하였다(Fig. 6). $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 등을 첨가한 시험구에서는 균주의 생육이 약간 양호하였으나 $HgCl_2$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 $ZnCl$ 등을 첨가했을 때는 생육이 크게 억제되었으며, 항균활성도 전혀 나타나지 않았다. 이상의 결과로 *B. subtilis* HS25 균주의 배양 및 항균물질 생산을 위한 무기염은 0.05%의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 로 선정하였다. Chun 등²⁹⁾은 *B. alkalophilshaggy* JY-827균주로부터 항균물질을 생산할 때 KH_2PO_4 가 효과적인 반면, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 4H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 및 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 등의 금속염을 사용할 때 생산능이 급격하게 저하되었다고 보고하였으며, Yoo³¹⁾ KCl을 사용할 때는 좋은 효과를 나타내었으나 금속염을 사용할 때는 생산능이 감소하였다고 보고하였다.

배양 온도의 영향. 배양온도가 *B. subtilis* HS25의 생육 및 항균물질 생산에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 7에 나타내었다.

Table 3. Effect of concentrations of nitrogen sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* HS25

Nitrogen sources	Concentration (%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Antibacterial activity (mm) ¹⁾		
			A8 ²⁾	A12	A25
Yeast extract	Control ³⁾	1.473	14.50	14.00	14.50
	0.25	1.684	16.00	15.50	16.00
	0.5	1.805	16.50	16.00	16.20
	1.0	1.785	16.50	15.35	15.90
	1.5	1.651	16.45	15.35	15.90
Peptone	0.25	1.733	16.00	15.00	15.50
	0.5	1.821	16.00	15.50	16.20
	1.0	1.785	12.50	10.50	11.00
	1.5	1.642	11.90	9.90	9.00
Yeast extract + Peptone (1 : 1)	0.25	1.954	15.50	15.50	16.00
	0.5	2.173	17.35	16.50	16.85
	1.0	2.188	17.50	16.70	17.00
	1.5	2.187	17.50	17.00	17.00

¹⁾Size of clear zone and inhibitory effect of culture broth of the isolated bacterial strains against tested strains by agar diffusion method.

²⁾Tested strains = A8: *E. coli* ATCC 25922, A12: *Sta. aureus* KCTC 1927, A25: *Pro. mirabilis* KCTC 2433.

³⁾Control medium was GY medium with 1% soluble starch.

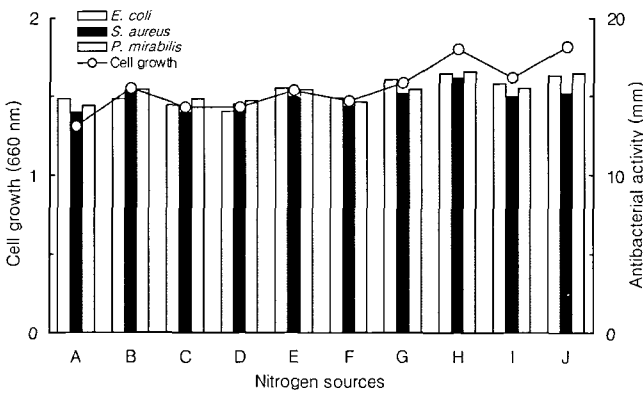


Fig. 5. Effect of various nitrogen sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* HS25. A: Control, B: NH_4Cl , C: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, D: NH_4NO_3 , E: NaNO_3 , F: $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, G: Malt extract, H: Yeast extract, I: Asparagine, J: Peptone.

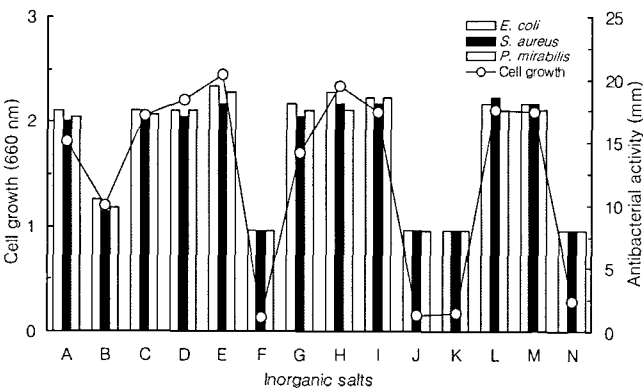


Fig. 6. Effect of various inorganic salts on cell growth and antibacterial activity of the isolated *B. subtilis* HS25. A: Control, B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, C: KH_2PO_4 , D: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, E: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, F: HgCl_2 , G: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, I: NaCl , J: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, K: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, L: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, M: K_2HPO_4 , N: ZnCl_2 .

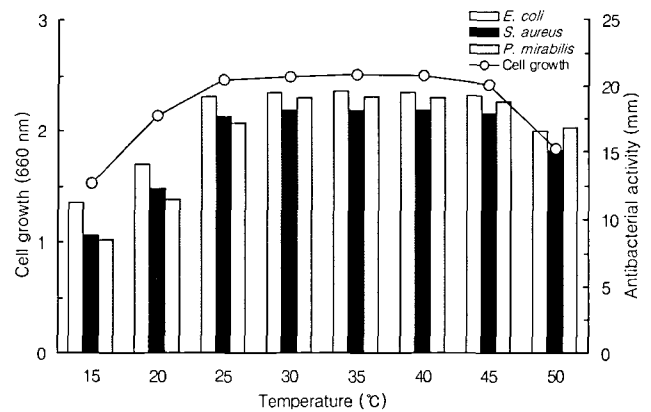


Fig. 7. Effect of temperature on cell growth and antibacterial activity of *B. subtilis* HS25.

배양온도를 15~50°C의 범위로 변화시키면서 배양한 결과 25~45°C 범위에서 미생물의 생육이 매우 왕성하였고 유해미생물에 대한 항균활성도 높게 나타났다. 이상의 결과로 *B. subtilis* HS25 균주의 최적 배양온도는 35°C로 결정하였다. Berridge 등³²⁾은 *Streptococcus lactis*의 경우 배양온도에 따라 생성되는 물질의 패턴이 변화되는 것을 발견하였으며, nisin생성의 최적온도는 28~30°C로 보고된 바 있어 분리한 *B. subtilis* HS25균주와는 다른 적온을 나타내었다.

초기 pH의 영향. *B. subtilis* HS25의 초기 pH의 영향을 조사하여 Fig. 8에 나타내었다. 초기 pH를 4.5~11.5 범위로 조절하고 35°C의 최적 배양온도에서 배양한 결과 미생물의 생육은 pH 6.5~9.5의 범위에서 왕성하였으며, *E. coli*, *Sta. aureus* 및 *Pro. mirabilis*에 대한 항균활성은 pH가 6.5~10.5의 범위에서 높게 나타났다. 이상의 결과로 *B. subtilis* HS25 균주의 생육 및 항균물질 생산을 위한 초기 pH는 배지를 제조할 때 pH 조절이 필요가 없는 pH 7.5로 결정하였다. Barehoot 등³³⁾은

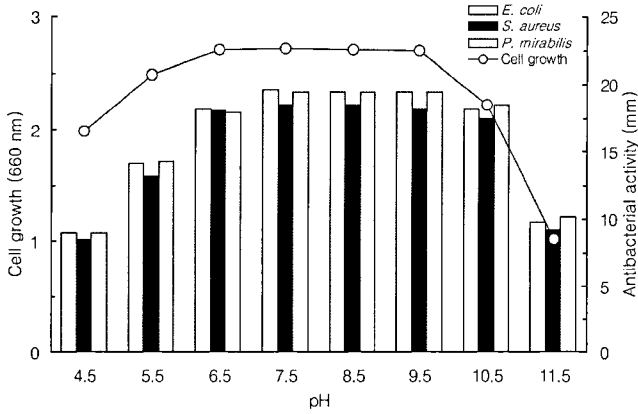


Fig. 8. Effect of pH on cell growth and antibacterial activity of *B. subtilis* HS25.

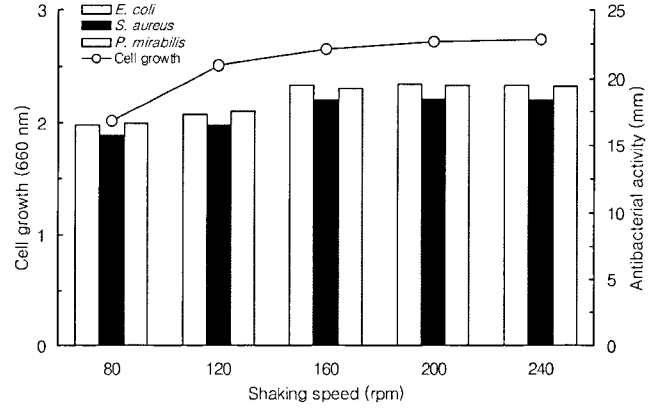


Fig. 9. Effect of shaking speed on cell growth and antibacterial activity of *B. subtilis* HS25.

lactacin B의 경우 pH 6.5~7.0, lactacin F는 pH 6.0~7.0의 범위에서 항균활성이 증가하였다고 보고한 내용과 비교해 보면 *B. subtilis* HS25균주의 초기 pH 영역은 상당히 넓은 것으로 사료된다.

교반속도의 영향. 교반속도를 80~240 rpm으로 변화시키면서 *B. subtilis* HS25 균주의 생육 및 항균물질의 생산에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 9에 나타내었다. 교반속도가 240 rpm까지 증가함에 따라 균의 생육 및 항균물질의 활성이 서서히 증가하여 120 rpm 이상에서는 완만한 곡선을 나타내었다. 이상의 결과로 *B. subtilis* HS25균주를 배양할 때 교반속도는 균체증식 및 항균물질 생산을 고려하여 180 rpm 정도가 적당한 것으로 판단되었다.

배양시간에 따른 항균활성. *B. subtilis* HS25를 최적배양조건으로 배양할 때 배양시간이 항균물질의 생산에 미치는 영향을

검토하여 Fig. 10에 나타내었다. 항균물질의 활성은 배양 12~48 시간째까지 *E. coli*, *Sta. aureus*, *Sal. enteritidis*, *K. pneumoniae*, *Pro. mirabilis* 및 *V. parahaemolyticus* 등에 대하여 매우 높게 나타났으나 배양 48시간 이후부터는 급격하게 떨어져 배양 72 시간째에는 거의 활성이 나타나지 않았다. 그러나 *E. coli* 및 *Pro. mirabilis*의 유해미생물에 대해서는 배양 84시간째에도 약 30%의 항균활성을 나타내었다(Fig. 10, 사진 A 및 E). 이상의 결과로 *B. subtilis* HS25의 항균물질 생산을 위한 배양시간은 12~36시간 정도가 적당한 것으로 생각되었다. Daba 등³⁴⁾이 *Leuconostoc mesenteroides*로부터 mesenterocin 5를 생산할 때 배양 8시간에서 최대 활성을 나타내었으나, 배양 24시간에서는 90% 이상의 활성이 소실되었다고 보고한 내용과 비교하면 *B. subtilis* HS25균주는 항균물질을 생산하는 시간의 폭이 상당히 넓은 균으로 사료된다.

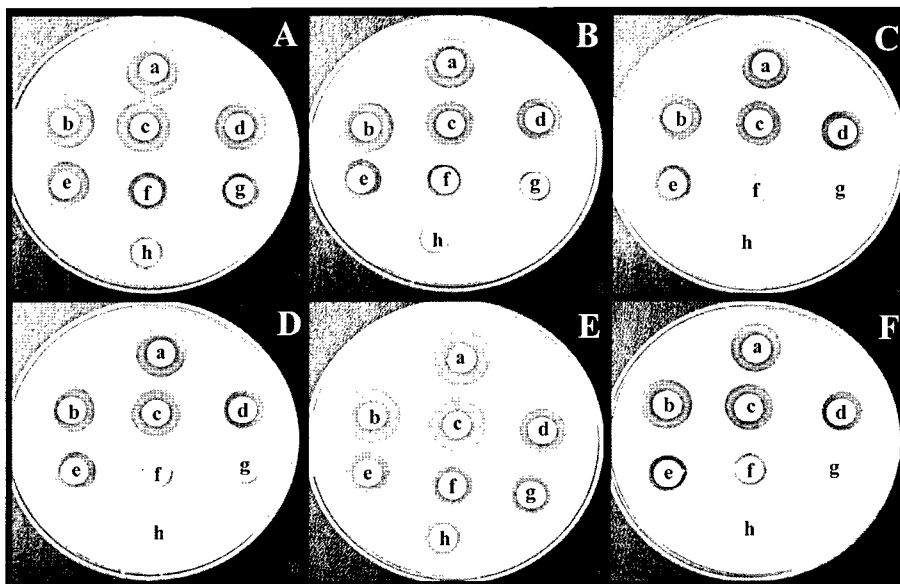


Fig. 10. Antibacterial activity of the culture broth of *B. subtilis* HS25 cultured for 96 hrs against food poisoning and pathogenic bacteria. A: *E. coli* ATCC 25922, B: *Sta. aureus* KCTC 1927, C: *Sal. enteritidis* KCCM 1202, D: *Kle. pneumoniae* KCCM 11319, E: *Pro. mirabilis* KCTC 2433, F: *V. parahaemolyticus*. a: 12 hr, b: 24 hr, c: 36 hr, d: 48 hr, e: 60 hr, f: 72 hr, g: 84 hr, h: 96 hr.

초 록

전통 장류 발효식품의 발효도와 저장성을 증진시키기 위하여 전통 콩 발효식품으로부터 cellulase, amylase, protease 활성 및 항균활성 물질 생성이 우수한 바실러스 HS25 균주를 분리하여 그 배양학적 특성을 검토하였다. HS25 균주는 편모와 내생포자를 가지며, 다량의 점질물을 형성하는 그람양성 간균으로 catalase 양성, oxidase 음성으로 esculin을 가수분해하였고, 16S rDNA분석 등을 통하여 *Bacillus subtilis*로 밝혀져 *B. subtilis* HS25로 명명하였다. *B. subtilis* HS25 균주의 생육 및 항균물질 생산을 위한 최적 배지조성은 soluble starch 1%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5% 및 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05%이었으며, 최적 배양온도는 25~45°C, 초기 pH는 6.5~9.5, 최적 교반속도는 160~200 rpm이었으며, 항균활성이 가장 높게 나타나는 배양 시간의 범위는 12~36시간이었다.

Key words: *Bacillus subtilis* HS25, 된장, 항균물질, 배지 조성, 배양조건

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(벤처형 중소기업기술개발과제)의 지원에 의해 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Kim, S. M. (1996) The effects of vacuum and nitrogen packages on the shelf-life of boiled scallop [*Patinopecten yessoensis* (Jay)]. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 932-936.
- Arabhosseini, A., Huisman, W., Boxtel A. ven and Miller, J. (2007) Long-term effects of drying conditions on the essential oil and color of tarragon leaves during storage. *Journal of Food Engineering.* **79**, 561-566.
- Park, J. H. and Kim, J. K. (2006) Change in chemical components of green powder tea during storage period at -5°C storage temperature. *Korean J. Food Preserv.* **13**, 681-685.
- Kim, G. H. (1998) Studies on quality maintenance of fresh fruit and vegetables using modified atmosphere packaging. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **5**, 23-28.
- Woo, I. S., Ko, Y. D., Jeong, H. Y., Seo, C. H., Chung, S. K. and Park, H. D. (1997) Effect of microwave treatment on the preservation of foods. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **4**, 17-25.
- Kim, H. J., Lee, N. K., Cho, S. M., Kim, K. T. and Paik, H. D. (1999) Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria by Lacticin NK24, a bacteriocin produced *Lactococcus lactis* NK24 from fermented fish food. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 1035-1043.
- Kim, S. M. (1996) The effects of food additives on the shelf-life of low-salted *Myungran-jeot*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 937-943.
- Kim, T. K., Shin, H. D. and Lee, Y. H. (2003) Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 266-271.
- Baeck, B. S. and Lee, Y. H. (2006) Consumer's awareness and policies directions on food additives - Focusing on consumer information. *Korean Society of Consumer Studie* **17**, 133-141.
- Lee, S. W., Shin, S. Y. and Yu, T. J. (1985) Effect of the ethanol contents on the preparation of low salt *Doenjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **17**, 336-339.
- Kim, J. D., Cheo, M. and Ju, J. S. (1995) A study on correlation between blood pressure and dietary Na, K intakes pattern in the family member of normal and cerebrovascular disease patients. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 24-29.
- Park, B. J., Jang, K. S., Kim, D. H., Yook, H. S. and Byun, M. W. (2002) Changes of microbiological and physicochemical characteristics of *Doenjang* prepared with low salt content and gamma irradiation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 79-84.
- Park, S. K., Jeong, H. J., Kim, S. H., Kwon, S. H. and Lee, S. W. (2004) Quality properties of traditional *Doenjang* supplemented with extracts of Korean herb medicines. *J. Life Sci.* **14**, 553-559.
- Lee, J. O. and Ryu, C. H. (2002) Preparation of low salt *Doenjang* using by nisin-producing lactic acid bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 75-80.
- Choi, J. H., Kwon, S. H., Lee, S. W., Nam, S. H., Choi, S. D. and Park, S. K. (2003) Quality properties of capsule type *Meju* prepared with *Aspergillus oryzae*. *Korean J. Food Preserv.* **10**, 339-346.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology (9th ed.). Williams & Wilkins, Baltimore.
- Gerhardt, P. R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Sneath, G. B. (1981) Phillips manual of methods for general bacteriology. *America Soc. Microbiol.* **35**, 144-150.
- Tramer, J. and Fowler, G. G. (1964) Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agric.* **26**, 45-52.
- John, W. M. and Mulders, J. B. (1991) Identification and characterization of the antibiotic nisin variant. *Eur. J. Biochem.* **201**, 581-584.
- Chun, J. Y., Ryu, I. H., Lee, S. U. and Lee, K. S. (2000) Purification and properties of anticaries microbial agent by *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 270-278.
- Shomura, T., Nishizawa, N., Iwata, M., Yoshida, J., Ito, M. and Aman, S. (1983) Studies on a new nucleoside antibiotic. *Dapiramicin. J. Antibiot.* **36**, 1300-1304.
- Yoo, J. H. (1994) Studies on the antifungal antibiotic produced by *Bacillus* sp. SY-414. Kangwon National University.
- Berridge, V. A., Barranova, I. P. and Egorov, N. S. (1979) Nisin accumulation dynamic in a *Streptococcus lactis* culture. *Appl. Biochem. Microbiol.* **15**, 360-362.
- Barehoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. (1983) Detection and activity of lactacin B a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1808-1815.
- Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. and Lacroix, C. (1991) Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 57, 3450-3455.
26. Sofos, J. N., Beuchat, L. R., Davidson, P. M. and Johnson, E. A. (1998) Naturally occurring antimicrobials in food. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **28**, 71-72.
27. Min, T. J., Kim, E. M., Lee, S. J. and Bae, K. G. (1995) Studies on the screening and development of antibiotics in the mushroom. *The Korean Journal of Mycology.* **23**, 14-27.
28. Kim, H. Y., Lee, Y. J., Kim, S. H., Hong, K. H. and Lee, J. Y. (1999) Studies on the development of natural preservatives from natural products. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 1667-1678.
29. Wong, H. C. and Bau, Y. S. (1977) Pigmentation and antibacterial of fast neutron and X-ray-induced strains of *Monascus purpureus*. *Plant Physiol.* **60**, 576-581.
30. Wong, H. C., Lin, Y. C. and Koehler, P. E. (1981) Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentration. *Mycologia.* **73**, 649-654.
31. Nozaki, H., Date, S., Kondo, H., Kiyihara, H., Takaoka D., Tada, T. and Akayama, K. (1991) Ankalactone, a new α , β -unsaturated η -lactone from *Monascus anka*. *Agric Biol. Chem.* **55**, 899-900.
32. Yoon, S. H., Kim, J. B., Lim, Y. H., Hong, S. Y., Song, J. K., Kim, S. S., Kwon, S. W. and Park, I. C. (2005) Isolation and characterization of three kinds of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* JKK238 from Jeot-Kal of korean traditional fermented fishes. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 295-301.
33. Kim, J. K. and Roh, W. S. (1998) Changes of aflatoxins during the ripening of korean soy paste and soy sauce and the characteristics of the changes-part 1. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. *J. Fd Hyg. Safety.* **13**, 313-317.
34. Kang, K. J., Park, J. H. and Cho, J. I. (2000) Control of aflatoxin and characteristics of the quality in *doenjang* (soybean paste) prepared with antifungal bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 1258-1265.