pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 29, No. 1, pp. 40~46 (2014)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2014.29.1.040

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

*Bacillus cereus*에 대한 길항적 저해 작용과 biogenic amines 분해 능력을 지닌 *Bacillus licheniformis* SCK A08 균의 특성

이은실[1] · 김용상[2] · 류명선[2] · 정도연[1] · 엄태붕[2,3] · 조성호[1]*
[1]순창군발효미생물관리센터, [2]전북대학교 자연과학대학 생명과학과, [3]전북대학교 방사선 기술연구소

Characterization of *Bacillus licheniformis* SCK A08 with Antagonistic Property Against *Bacillus cereus* and Degrading Capacity of Biogenic Amines

Eon Sil Lee[1], Yong Sang Kim[2], Myeong Seon Ryu[2], Do Yeon Jeong[1], Tai Boong Uhm[2,3], and Sung Ho Cho[1]*
[1]*Sunchang Research Center for Fermentation Microbes (SRCM), Sunchang 595-804, Korea*
[2]*Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*
[3]*Institute for Radiation Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*
(Received August 23, 2013/Revised December 3, 2013/Accepted December 21, 2013)

ABSTRACT - We have screened *Bacillus* strains suitable for the fermentation of soybean products with respect to the control of *Bacillus cereus* and the reduction of biogenic amines. Of 26 isolates, a strain named as the SCK A08 carried antimicrobial activity against *B. cereus* and *Staphylococcus aureus*, major food poisoning species in soybean products. PCR analysis revealed that the SCK A08 strain did not contain genes for *Bacillus cereus* toxins including nonhemolytic enterotoxin, hemolytic enterotoxin, cytotoxin K, cereulide and certrax. The SCK A08 strain could degrade histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine by 67.41%, 76.59%, 57.32%, and 50.69%, respectively, during fermentation in cooked soybeans containing 0.5% (w/w) of each biogenic amine. The morphological and biochemical properties and phylogenetic relationships based on 16S rRNA gene sequences indicated that the isolate was most closely related to *Bacillus licheniformis*. Use of the strain SCK A08 would be a potential measure to overcome two hygienic problems that were frequently faced during manufacture of traditionally fermented soybean products.

Key words : *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis,* Biogenic amines, *Cheonggukjang*

전통장류는 장류제조에 있어 전통방식을 이용하기 때문에 자연에 존재하는 다양한 미생물에 의한 오염으로부터 자유롭지 못하며, 이렇게 오염된 부패미생물들로 인해 식중독을 유발할 수 있다. 장류의 발효과정에서 식품안전을 좌우하는 3가지 주요인자는 biogenic amines (BAs), 곰팡이독소인 aflatoxins와 식중독미생물인 *Bacillus cereus* (BC)로 요약될 수 있다[1].

BAs는 인체의 필수적인 대사 조절 물질이긴 하지만 식품을 통해 과다 섭취한 histamine, tyramine, cadaverine, putrescine의 경우 심각한 알레르기(histamine)나 혈압 변화(histamine, tyramine), 두통(tyramine), 또는 nitrosamines, nitrosopiperidine등과 같은 발암물질의 생성(cadaverine, putrescine)으로 인체에 매우 유해한 작용을 나타낸다. 미생물의 작용에 의해 생성되는 BAs는 주로 전통 된장과 젓갈 등의 고단백질 발효식품에서 높은 농도로 발견되며 (KFDA, 2005), 이는 단백질의 분해로 생성된 유리아미노산이 발효 · 숙성과정 또는 저장 과정에서 미생물의 탈탄산작용(decarboxylation)을 받기 때문으로 추정된다[2]. 특히 전통장류는 대기에 노출된 상태에서 제조되어 다수의 미생물들의 발효 및 숙성 과정에 참여하기 때문에 높은 농도의 biogenic amines이 생성될 확률이 높다. 전통 장류 내 고농도 biogenic amine 생성에 관련된 유해성 문제를 해결하기 위해 장류 제조에 적합한 주요 발효 미생물들 중 biogenic amine을 생성하지 않으면서 동시에 분해할 수 있는 종균(starter)을 분리한다면 BAs에 대한 문제를 해결할 수 있을 것이다.

대표적인 식중독 균으로 *Bacillus cereus*는 *B. mycoides, B. thuringiensis, B. anthracis*와 함께 *Bacillus* subgroup I에 속하는 그람 양성균이다. *B. cereus*는 토양 및 공기 부유 미생물로서 전통장류 제조 시 쉽게 오염되어 구토형

*Correspondence to: Sung Ho Cho, Sunchang Research Center for Fermentation Microbes (SRCM), Sunchang 595-804, Korea
Tel: 82-63-653-9578, Fax: 82-63-653-9590
E-mail: sunghyej3@nate.com

독소인 cereulide 또는 설사 및 장염을 일으키는 독소인 non-hemolytic enterotoxin (*Nhe*), hemolytic enterotoxin (*Hbl*), cytotoxin K (*CytK*)를 분비한다. 이들 중 D-형 아미노산을 함유하며 cyclic peptide의 구조를 가지는 cereulide는 단백질형의 설사 독소들과는 달리 열이나 단백질 가수분해에 대해 강한 저항성을 가지고 있다. *B. cereus*의 설사 독소 유전자는 염색체 상에 위치하는 반면 구토형 독소 유전자는 플라스미드에 위치하기 때문에 *B. cereus*는 구토 및 설사를 동시에 일으키는 종과 설사만 일으키는 종으로 구분할 수 있다. 설사형 독소 균주의 경우 외부 환경에 따라 전사조절 단백질인 phospholipase C regulator (*PlcR*)가 전사인자인 *PapR*과 결합하여 독소 발현량을 조절하기 때문에 발효 상태에 따라 독소 분비량은 달라진다[3].

*B. subtilis*와 *B. licheniformis*는 장류 발효에서 가장 중요한 역할을 하는 세균이며, 이들 중 일부 균주들은 다양한 종류의 계면활성제나 항생물질을 생산하여 경쟁관계에 있는 주위 균들의 증식을 억제하며, 일부는 biogenic amine을 분해하는 능력을 가지고 있음을 보고하였다[4].

전통 장류의 제조 방식으로는 필연적으로 가질 수 밖에 없는 이들 위생적인 문제를 해결하기 위해서는 우수한 발효 특성, *B. cereus*에 대한 강한 길항 능력, biogenic amine을 생산하지 않으면서 분해 능력을 지닌 균주를 선발하는 것이 필요하였다. 본 연구는 이러한 특성을 지닌 발효 균주들을 전통 장류에서 분리하고 청국장 제조를 통해 종균으로의 사용가능성을 실증하는데 목표를 두었다.

재료 및 방법

균주의 선발 및 배양

전통방식에 의해 제조한 50종의 메주, 된장, 청국장을 구입하여 0.1 g을 취해 0.3 mM 인산완충액(pH 7.2)으로 희석하였다. Nutrient Agar (NA)와 *B. cereus* 선택배지인 chromogenic polymyxin B-methoprim agar (CPMA) 표면에 희석된 균액을 각각 200 uL씩 도포하고 37°C에서 18시간 배양 후, NA에서 자란 집락수에 비해 CPMA에서 자란 집락수의 비율이 낮았던 장류들을 선발하였다. NA에서 배양한 이 선발 장류의 집락들을 toothpick으로 찍어 미리 만들어둔 NA와 CPMA 배지의 같은 위치에 각각 접종하여 37°C에서 18시간 후 CPMA에 자라지 않은 균들만을 수집하였다[1].

1차 선발한 균들을 대상으로 biogenic amine을 생성하지 않는 균주를 선발하기 위해 biogenic amine 생성 검출배지[14]를 제조하여 보라색을 띄는 균주만을 수집하였다. 목표 미생물이 amino acid decarboxylase를 생산할 경우 선택 배지에 첨가된 L-histidine 또는 L-tyrosine은 염기인 histamine이나 tyramine로 바뀌며, 이 때 변화된 pH는 발색 시약인 bromocresol purple의 변색으로 확인할 수 있다[1].

Biogenic amine을 분해하는 균주를 선발하기 위해 균주가 이용 가능한 탄소와 질소원으로 0.5%의 histamine과 tyramine을 함유하는 최소배지에서 증식력이 좋은 균주만을 선별하였다[1].

Biogenic amine 분석

선발 균주들의 biogenic amines 분해 능력을 정량적으로 분석하기 위해 HPLC를 수행하였다[1]. 증기 멸균한 콩가루 0.3 g에 각 16 mg의 histamine, tyramine, putrescine, cadaverine을 녹인 0.8 mL nutrient broth (NB)를 첨가하고 선발한 균주의 배양액 0.2 mL를 접종하였다. 비교를 위해 biogenic amine없이 NB 배지에 균주만 접종한 대조군과, 균만 첨가하지 않은 대조군을 사용하였다. 47°C에서 배양 후 준비된 시료를 10,000 × g에서 10분간 원심분리하여 얻은 0.1 mL 상층액과 80 *u*L 아세톤 용해 1% dansyl chloride, 50 *u*L 포화 Na_2CO_3, 분석 시 편차를 줄이기 위해 50 *u*L 내부 표준용액(1,7-diaminoheptane)을 섞어 45°C에서 1시간 유도체화 시켰다. 유도체화한 시료용액에 50 *u*L 10% proline을 넣어 여분의 dansyl chloride를 제거한 뒤 0.5 mL ether를 넣고 3분 후 분리된 상층액만을 모아 증발 후 0.1 mL acetonirile에 녹였다. HPLC의 분석으로 역상칼럼은 C18 (Capcellpak, 4.6 mm × 250 mm, 5 *u*m), 이동상은 H_2O에 녹인 0.1% formic acid (A)와 acetonitrile에 녹인 0.1% formic acid (B), 농도 경사는 0-10분, A:B = 45:55; 11-15분, A:B = 35:65; 16-25분, A:B = 20:80; 26-30분, A:B = 10:90, 30분 유속은 분당1 mL이었으며 10 *u*L 시료를 주입하였다.

균주의 동정

선발균의 생화학적 동정을 위해 균을 새로운 NA배지에 접종하고 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 형성된 집락은 NA배양액에 희석 후 46종 건조배지 및 생화학 반응물로 구성된 BCL ID card (bioMereux Vitek Inc., USA)에 주입하였고, 15분 간격으로 결과들이 VITEK Compact software (bioMerieux, Vitek, France)에 통합적으로 저장 분석된 뒤 14시간 후 동정이 완료되었다. 16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 균주 동정을 위해 universal primer로서 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1,492R (5'-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3')을 이용, 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭 후에 동정에 중요한 가변 염기 영역을 포함하는 1,490 bp를 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem Inc., USA)를 사용하여 해독하였다[5]. 이 염기서열은 NCBI database로부터 BLASTN program[6]과 Ribosomal Database Project (RDP)의 Seqmatch program (version 3)을 사용하여 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 얻은 다음 염기 서열들 간의 상호 비교를 위해 CLUSTALW 프로그램[10]을 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 시각

적 관찰과 수작업으로 gap이 최소화되도록 보정 후 Kimura's two-parameter method[7]와 maximum parsimony method[8]를 사용하여 작성하였다. 산출은 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 산출하기 위해 Bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며 계통 분석과 bootstrap 분석은 PAUP (version 4.0b)을 사용하였다[9].

독소특성분석

최종 선발한 *B. licheniformis* SCK A08이 *B. cereus*의 설사독소유전자(*nheABC*, *hblACD, cytK*), 구토 독소 cereulide 합성 효소 유전자(*cesA*, *cesB*), 를 갖는지 확인하기 위하여 PCR을 실시하였다[15]. 독소 검출용 primers 서열들은 Table 1과 같다. PCR 조건은 94ºC에서 2분간 초기 변성 후, 94ºC 1분간 변성, 56ºC 1분간 결합, 72ºC 1분간 증폭 과정을 30회 반복하고 72ºC에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다.

항균활성

표준 균주인 *B. cereus* KACC 10004 (ATCC 27348), KACC 11240 (ATCC 14579), KACC 13064와 KACC 13066, 그리고 *Staphylococcus aureus* KACC 1621, KACC 1916, KACC 1927과 KACC 3881을 Nutrient Broth (NB) 배지에서 37ºC, 18시간 진탕배양 후 200 *u*L를 각 CPMA 표면에 골고루 도말하고 배지 중앙에 6 mm paper disc(3M)를 올려놓았다. 본 실험실에서 분리한 *B. licheniformis* SCK A08 균주를 NB배지에서 37ºC, 48시간 진탕배양 후 원심분리한 상층액을 paper disc 중앙에 20 *u*L를 분주하고 37ºC에서 18시간 배양 뒤 투명환 크기(지름)를 측정하였다. 이들 균주 증식에 대한 SCK A08 균의 길항력은 각 균의 최적 온도에서 배양한 뒤 6 mm paper disc 주변의 투명환 직경으로 비교하였다.

효소활성

Protease activity는 skim milk 함유배지(skim milk 0.5%, peptone 0.5%, glucose 0.1%, agar 1.5%)를 제조하여 사용하였고, paper disc assay 방법을 활용하였다. 활성화시킨 균주 배양액 20 *u*L를 disc에 분주하고 37ºC에서 21시간 배양 후 지름(cm)을 측정하였다.

일반성분

수분 함량은 적외선 수분측정기(FD-720, kett, Japan)을 사용하여 0.1% 이하의 유의차를 항량으로 측정하였다.

pH, 적정산도, 염도

pH, 적정산도의 측정은 자동적정장치(Excellence Titrator T50M, Switzerland)를 이용하여 분석하였다. 적정산도는 시료 5 g에 증류수 45 mL를 넣고 진탕한 후 0.1 N NaOH를 가하여 pH 8.4가 될 때까지 적정하고, 이 때의 소비된 0.1 N NaOH mL수로 표시하였다. pH는 위 적정산도와 동일하게 처리된 샘플을 이용하여 자동적정장치로 측정되었다. 염도는 시료 10 g에 증류수 90 mL를 가하여 혼합한 후 디지털 염도계(Model TM-30D, Takemura Electric Works, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

Table 1. The PCR primers used in this study

Primer pair	Sequence	Target sequence (GenBank accession no)	Size (bp)
nheAF	ATATGCGCAAAATGTAATTGCTCCA	Non-hemolytic enterotoxin, *nheA* (AY835995)	935
nheAR	TGCCTTCTTCAACATTTGTTTGAATTT		
nheBF	ACTTATGGCAGTATTTGCAGCAGGA	Non-hemolytic enterotoxin, nheB (AY835995)	972
nheBR	TGCAACGCTGTAATTGCAGTATCAA		
nheCF	GACCAGCAGGATTCCCAGATGTAAT	Non-hemolytic enterotoxin, *nheC* (AY835995)	930
nheCR	CCACGCCTTCATGTAATTTTTCTGT		
hblAF	ACCAGTAGCGACTTTTGCAAGTGAA	Hemolytic enterotoxin, *hblA* (AY822584)	909
hblAR	TTTTGAGCTGCATTCTCAATATGCC		
hblCF	ATCAATACTCTCGCAACACCAATCG	Hemolytic enterotoxin, *hblC* (AY822584)	957
hblCR	ATGTGCTCGTTGCTCTGCTGTTAAT		
hblDF	GACTGAAGACAGCATTGGCTCAAAC	Hemolytic enterotoxin, *hblD* (AY822584)	1,059
hblDR	CGATGTCTTTCGAAATGAATTCTGC		
cytKF	CCGCTGTTTTTGCTAGTAGTGCTGT	Cytotoxin K, *cytK* (DQ019311)	901
cytKR	ACGTCTTTTACGTTGTTTCCAACCC		
cesAF	GTTGGCGTGTTATGTGATCG	Cereulide synthetase A, *cesA* (AB248763)	662
cesAR	GGTGAAACAGCTTCTCCTGC		
cesBF	AAAGAATGTTTCACCGAAGACGGTT	Cereulide synthetase B, *cesB* (AB248763)	1,161
cesBR	ACACACTTCTTTTCCGATTCCACCT		
ctxF	TGCTAAAGGAGGGAAGGAACCGT	Certrax, *ctx* (AAEK01000004)	1,000
ctxR	AGCCCCATGTACCCCTTCTGGA		

아미노태질소(AN) 함량

아미노태 질소는 자동적정장치(Excellence Titrator T50M, Switzerland)를 이용하여 분석하였다. 아미노태 질소 함량은 Formol 적정법에 준하여 실시하였다. 시료 2 g을 취하여 증류수 50 mL를 가하고 1시간 동안 진탕한 후 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4로 조정하였다. 여기에 20 mL의 중성 formaldehyde (pH 8.4)를 가하고 0.1 N NaOH 용액으로 다시 pH 8.4가 되도록 중화 적정하였다. 별도로 증류수에 대한 바탕시험을 실시하여 아미노태 질소 함량을 구하였다.

청국장 제조

선발된 균주의 실증연구를 위한 청국장을 제조하였다. 대두 150 g을 24시간 동안 물에 불린 뒤 121°C에서 30분 동안 증자하고 균주 배양액을 접종하였다. 배양액은 tryptic soy broth (TSB) 배지 10 mL에 *B. licheniformis* SCK A08 균주 1 colony를 접종하여 24시간 1차 배양한 다음 이 배양액의 100 *u*L를 새 TSB 10 mL에 2차 접종하여 12시간 배양하였다. 이 배양액은 흡광도계를 사용하여 600 nm에서 OD값이 0.5로 조정한 뒤 삶은 콩 중량의 2%를 접종하였다. 균 접종 후 각 청국장 100 g 당 500 mg의 histamine dihydrochloride (Sigma, St. Louis, USA), tyramine dihydrochloride (Sigma), putrescine dihydrochloride (Sigma), cadaverine dihydrochloride (Sigma)이 함유된 액을 각 시료별로 첨가하여 잘 혼합하고 37°C에서 48시간 발효시켰다.

관능검사

관능검사는 (재)순창군발효미생물관리센터 연구원 10명을 대상으로 관능검사의 목적과 시료에 대하여 설명한 후 실시하였고, 제조된 청국장을 상온으로 냉각 후에 외관(색) 냄새(향), 맛 및 전체적기호도를 대상으로 9점 척도법(1; 대단히 나쁨, 5; 보통, 9; 대단히 좋음)으로 평가하여 통계처리하였다. 통계처리는 각 분석항목에 대하여 R 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였다.

결 과

균주의 선발 및 동정

순창군과 전국에서 수집한 50종의 전통장류인 메주, 된장과 청국장으로부터 biogenic amine을 생성하지 않고 분해하는 *B. licheniformis* SCK A08 균주가 최종 선발되었다. 분리된 SCK A08 균주를 NA 배지에서 배양 후 집락 형태를 관찰한 결과, 백색의 집락 주위로 반투명의 광택환을 형성하였다. 또한 선발균주 SCK A08 균주를 1,500 x 배율의 광학 현미경하에서 관찰했을 때 움직임이 매우 활발했고 Gram 염색에서 양성을 나타내었다.

Vitek BCL card를 이용하여 46 종류의 생화학적 검사 결과를 Vitek 2 Compact Software에서 분석한 결과, 98%의 확률로 *B. licheniformis*로 분류되었다(Table 2). Ribosomal DNA Project (RDP)에 등록된 모든 *Bacillus* 표준 균주들만을 사용하여 계통도를 분석한 결과, SCK A08 균주는 *B. licheniformis* ATCC 14580 균주와 가장 가까운 근연 관계로 16S rDNA 유전자 서열 상동성은 100% (1,399 bp/1,400 bp)를 보였다(Fig. 1). 따라서 생화학 분석과 계통학적 분류를 고려하여 SCK A08 균주를 *B. licheniformis*로 동정하였다.

Table 2. Biochemical characterization for the identification of the strain SCK A08

Test	Reaction	Test	Reaction
ß-Xylosidase	-	Phenylalanine arylamidase	+
L-Lysine arylamidase	-	L-Proline arylamidase	-
L-Aspartate arylamidase	-	ß-Galactosidase	+
D-Mannose	+	L-Pyrrolydonyl arylamidase	+
D-Melezitose	-	a-Galactosidase	-
N-Acetyl-D-glucosamine	(+)	Alanine arylamidase	-
Palatinose	+	Tyrosine arylamidase	+
L-Rhammose	-	ß-N-Acetyl-glucosaminidase	-
ß-Glucosidase	+	Ala-Phe-Pro arylamidase	-
ß-Mannosidase	-	Cyclodextrin	+
Phosphorylcholine esterase	-	D-Galactose	-
Pyruvate	-	Glycogen	-
a-Glucosidase	+	Myoinositol	+
D-Tagatose	+	Methyl-a-D-glucopyranose	+
D-Trehalose	+	Ellman	+
InuLin	-	Methyl-D-xylosidase	-
D-Glucose	+	a-Mannosidase	-
D-Ribose	-	Maltotriose	+
Putrescine assimilation	-	Glycine arylamidase	+
Growth in 6.5% NaCl	+	D-Mannitol	+
Kanamycin resistance	-	EscuLin hydrolase	+
Oleandomycin resistance	-	Tetrazolium red	(+)
Leucine arylamidase	+	Polymyxin B resistance	+

독소특성 분석

B. cereus 독소인 *Nhe*, *Hbl*, *CytK*, cereulide, certhrax의 유전자들을 대상으로 PCR을 수행한 결과, *B. licheniformis* SCK A08는 이들 유전자의 어느 것도 함유하고 있지 않았다(Fig. 2).

Biogenic amine 분석

HPLC를 이용하여 선발된 SCK A08 균주가 biogenic

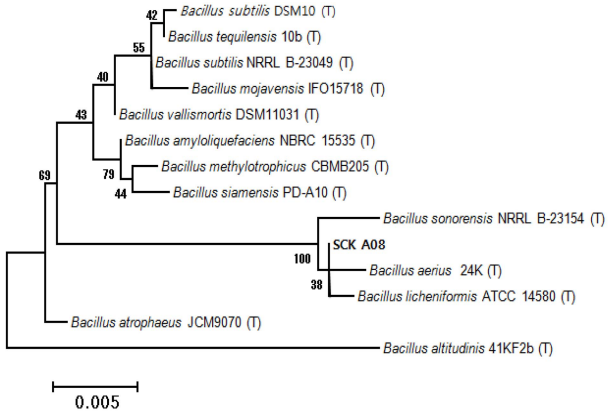

Fig. 1. Molecular phylogenetic analysis of strain SCK A08 by Maximum Likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei mode [1]. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying the Maximum Parsimony method. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 1386 positions in the final dataset. Evolutionary analysis were conducted in MEGA5 [2]. (T) means type strain.

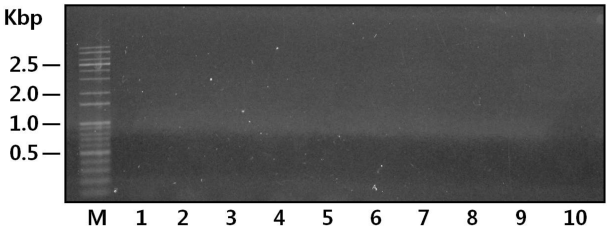

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products to detect whether the strain SCK A08 harbour the toxin genes of *Bacillus cereus*. M, size marker; 1, *Nhe* A gene; 2, *Nhe* B gene; 3, *Nhe* C gene; 4, *Hbl* A gene; 5, *Hbl* C gene; 6, *Hbl* D gene; 7, cereulide synthetase A gene; 8, cereulide synthetase B gene; 9, cytotoxin K gene; 10, certrax gene.

amine을 분해하는 능력을 정량적으로 분석한 결과, 삶은 콩 g당 각 53 mg의 histamine, tyramine, putrescine과 cadaverine을 첨가한 배지에서 2일간 배양 후 이들 amine류를 각각 80%, 57%, 69%와 73% 분해하였다. Kim 등(2012)이 *Bacillus licheniformis* SCK B11균주를 이용하여 hitamine과 tyramine을 각각 53%와 45%를 분해하였다[1]는 결과에 비해 좋은 결과를 보여주고 있다.

또한 실제 SCK A08 균주를 장류의 종균으로 이용가능성이 있는지 확인하고자 청국장 제조시에 histamine, tyramine, putrescine과 cadaverine을 각각 2.0%를 넣은 실험구와 넣지 않은 대조구에 대하여 잔여 histamine, tyramine, putrescine과 cadaverine 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과, histamine, tyramine, putrescine과 cadaverine

Table 3. Antimicrobial activities of the strain SCK A08 against pathogenic bacteria

Test strain	Antimicrobial Activity (halo size, cm)	Culture condition[a,b]
Bacillus cereus KACC 10004 (ATCC 27348)	1.2	NA, 37°C
Bacillus cereus KACC 11240 (ATCC 14579)	1.72	NA, 37°C
Bacillus cereus KACC 13064	1.28	NA, 37°C
Bacillus cereus KACC 13066	1.65	NA, 37°C
Staphylococcus aureus KACC 1621	1.43	NA, 37°C
Staphylococcus aureus KCTC 1916	1.28	NA, 37°C
Staphylococcus aureus KCTC 1927	1.41	NA, 37°C
Staphylococcus aureus KCTC 3881	1.16	NA, 37°C

[a]NA, Nutrient agar
[b]The bacterial cells were grown on agar plates for 18-21 h, respectively.

의 분해율은 각각 67.41%, 76.59%, 57.32%와 50.69%를 나타냈다. 이는 콩을 멸균처리한 후 클린벤치에서 종균을 접종하여 오염이 되지 않도록 배양하였기 때문에 종균인 *B. licheniformis* SCK A08 균주가 histamine, tyramine, putrescine과 cadaverine을 분해한 것으로 판단되었다.

항균활성

B. licheniformis SCK A08 균주가 전통장류에서 주로 발생되는 식중독미생물인 *B. cereus*와 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 효과를 갖는지 시험 분석한 결과를 Table 3에 요약하였다. 증식 억제에 차이는 있었으나 SCK A08 균주는 시험에 사용한 *B. cereus* 4종과 *S. aureus* 4종 모두의 증식을 억제하였다. 전통 장류에 존재하는 유해미생물 억제능을 가진 SCK A08 균주의 사용은 HACCP 시스템의 도입이 어려운 전통장류 업체에서 유해균들의 오염 문제를 해결할 수 있는 효과적 대안이 될 수 있을 것이다.

효소활성

B. licheniformis SCK A08 균주를 메주발효와 청국장 발효에 종균으로 이용가능성을 확인하기 위해 paper disk assay 방법을 이용하여 protease효소의 활성을 측정한 결과, 확산거리가 2.64 cm로서 자체 보유중인 선별된 균주들의 활성 평균인 1.0~2.5 cm에 비하여 활성이 높게 나타났다.

청국장의 품질특성

선발한 SCK A08균주를 이용하여 제조한 청국장을 적

Table 4. Sensory characteristics of *Cheonggukjang*

	Mean value	
Apearence	6.4	std err : 0.4 min : 4 max : 8
Flavour	7.7	std err : 0.26 min : 6 max : 9
Taste	6.0	std err : 0.45 min : 3 max : 8
Overall preference	6.8	std err : 3.6 min : 5 max : 8

[1] 1way
[2] $P < 0.05$

외선수분측정기를 이용하여 수분함량을 측정한 결과, 56.67%를 나타내었다. 이 결과는 순창 고추장단지 내 청국장의 평균 수분함량인 57 ± 3.1과 유사하였다. pH는 7.8 이었고, 적정산도는 0.55 mL이었으며 염도는 0%를 나타내었다. 이 결과는 순창 고추장단지 내 청국장의 평균 pH인 7.0 ± 0.8 범위 내였다. 염도의 경우 시중 판매되는 청국장은 최종 조미를 한 후 유통되기 때문에 평균 4.2 ± 1.8%를 나타내는데 이번 연구에서는 조미과정이 없기 때문에 0%를 나타냈다.

제조한 청국장의 아미노태 질소 함량은 48시간 배양 후 103.85 mg%를 나타내었다. 전통청국장의 경우 평균 230 mg%를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 이는 발효시간이 최소 72시간 이상일 경우이다.

색택과 향 등을 관능평가로 살펴본 결과, 청국장의 향은 약한 편에 속했으며 색택은 적절하다고 판단되었다. 발효미생물센터 연구원 10명을 대상으로 9점 척도법으로 기호도 조사를 실시한 결과를 보면 외관 6.4, 향 7.7과 맛 6.0 이었고, 전체적기호도도 6.8로 좋은 평가를 받았다(Table 4).

요약 및 고찰

Biogenic amine은 주로 단백질이 풍부한 전통장류 중 된장과 간장에서 높게 발생하고 있다. 현재까지 국내외 식중독 사고를 보면 biogenic amine중 tyramine, histamine과 putrescine에 의한 보고가 있다. 전통장류의 biogenic amine에 대한 위생적인 문제를 해결하기 위해 전통장류 제조에 적합한 발효미생물 중에서 biogenic amine 비생성 및 분해하는 미생물을 선발하여 종균으로 적용한다면 biogenic amine에 대한 문제를 해결할 수 있을 것이다. 이러한 문제의 해결을 위해 본 연구에서는 우수한 발효능력과 함께 유해균에 대해 강한 길항 능력을 지니며, biogenic amine을 생산하지 않지만 높은 분해능력을 보이는 균주를 선발하여 장류제조 종균으로의 이용가능성을 실증하였다. 결론적으로 선발된 장류발효균주를 종균으로 이용하여 메주제조 및 청국장 제조 등에 이용한다면 biogenic amine과 *Bacillus cereus*를 안전한 수준으로 낮출 수 있을 것으로 사료되었고, 전통장류의 HACCP적용을 위한 HAZARD를 관리하는 우수한 수단으로 이용될 수 있을 것이다. 또한 향후에는 단일 균종만 종균으로 사용할 경우 전통장류의 우수한 풍미를 재현하는데 한계가 있기 때문에 종균들을 적절하게 조합한 혼합발효를 통해 제조한다면 풍미가 좋을 뿐만 아니라, 위생문제를 해결한 우수한 장류를 생산할 수 있을 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산부고부가가치 식품개발사업(과제번호311036-3) 및 2012년 지역농식품선도클러스터 육성 사업에의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Kim, Y. S., Jeong, J. O., Cho, S. H., Jeong D. Y. and Uhm, T. B.:Antimicrobial and Biogenic Amine-Degrading Activity of *Bacillus licheniformis* SCK B11 Isolated from Traditionally Fermented Red Pepper Paste., *Korean J. Microbiol.*, **48**(2), 163-170 (2012).
2. Anna Halász, Ágnes Barátha, Livia Simon-Sarkadib, and Wilhelm Holzapfel.: Biogenic amines and their production by microorganisms in food., *Trands Food Sci.* **5**, 42-48 (1994).
3. Kim, Y. S., Yun, S. H., Jeong, D. Y., Hahn, K. S. and Uhm, T. B.: Isolation of *Bacillus licheniformis* Producing Antimicrobial Agents against *Bacillus cereus* and Its Properties., *Korean J. Microbiol.*, **46**(3), 270-277 (2010).
4. Kim, Y. S., Kim, M. C., Kwon, S. W., Kim, S. J., Park, I. C., Ka, J. O. and Weon, H. Y.: Analyses of bacterial communities in meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-basded and pyrosequencing methods. *J. Microbiol.,* **49**, 340-348 (2011).
5. Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., and Alland, D.: A detaild analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria., *J. Microbiol. Methods* **69**, 330-339 (2007).
6. Zhang, Z., Schwarz, S., Wagner, L., and Miller, W.: A greedy algorithm for aligning DNA sequences., *J. Comput. Biol.* **7**, 203-214 (2000).
7. Kimura, M.: A simple method for estimating evloutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences., *J. Mol. Evol.,* **16**, 111-120 (1980).
8. Fitch, W.M.: Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology., *Syst. Zool.,* **20**, 406-416 (1971).
9. Swofford, D. L.,: PAUP. Phylogenetic Analysis using Parsimony. 4.0 ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA

(1998).
10. Thomson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.: CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive muLtiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice., *Nucleic Acids Res.,* **22**, 4673-4680 (1994).
11. Kim, Y. S., Jeong, D. Y., Hwang, Y. T., and Uhm, T. B.: Bacterial Community Profiling during the Manufaturing Process of Traditional Soybeen Paste by Pyrosequencing Method., *Korean J. Microbiol.,* **47**(3), 275-280 (2011).
12. Joo, M. H., Hur, S. H., Han, Y. S., and Kim, J. Y.: Isolation, Identification, and Characterization of *Bacillus* strains from the Traditional korean Soybean-fermented Food, *Chungkookjang*., *J. Appl. Biol. Chem.* **50**(4), 202-210 (2007).
13. Lee, J. J., Lee, D. S., and Kim, H. B.: Fermentation Patterns of *Chungkookjang* and *Kanjang* by *Bacillus licheniformis* B1., *Korean J. Microbiol.,* **35**(4), 296-301 (1999).
14. Bover-Cid, S. and Holzapfel, W. H., Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria, *Int. J. Food Microbiol.* **53**, 33-41 (1999).
15. Yun, S. H., Y.S. Kim, S.K. So, D.Y. Jeong, K.S. Hahn, and T.B. Uhm.: Detection of *plcR-papR* genes by PCR in identifying enterotoxin genes-harboring *Bacillus cereus* strains., *Kor. J. Microbiol.* **45**, 425-429 (2009).