J. Fd Hyg. Safety 16(3), 188–193 (2001)

청국장 발효 세균의 종류에 따른 청국장 점질물의 항 미생물 활성에 관한 연구

윤호경 · 최희선* · 허성호 · 홍정화†**

*인제대학교 식품과학부, *유니푸드테크(주), **동의공업대 식품과학연구소*

Antimicrobial Activities of Viscous Substance from *Chongkukjang* Fermented with different *Bacillus* spp.

Ho-Kyoung Youn, Hee-Sun Choi*, Sung-Ho Hur and Jeong-Hwa Hong†**

School of Food Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

** Unifood Tech, Kimhae 621-010, Korea*

*** Institute of Food Science, Dongeui Institute of Technology, Pusan 614-715, Korea*

ABSTRACT – To evaluate antimicrobial activities of *chongkukjang slime* fermented by different strains, growth characteristics were compared using various standard microorganisms with addition of *chongkukjang slime*. *Chongkukjang slime* was prepared by fermenting cooked soybean after inoculating with *Bacillus circulans* K-1, *Bacillus* spp N-1 and *Bacillus subtilis* CH-1, respectively. Significant antimicrobial activity was observed by *chongkukjang slime* on gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Micrococcus luteus*), gram negative bacteria(*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas fluorescens*), and yeast (*Pichia membranaefaciens, Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans*). In case of *B. cereus* growth inhibition of 80% was achieved by the addition of *chongkukjang slime*; on the contrary, to *Escherichia coli* O157:H7 only 20% inhibition was observed. Slime from *Bacillus subtilis* CH-1, in particular, inhibition of 40% toward bacteria and yeast, whereas slime from *Bacillus circulans* K-1, *Bacillus* spp N-1 showed only 20% inhibition.

Key words □ antimicrobial activity, *chongkukjang slime*, *Bacillus subtilis* CH-1

청국장은 대두 발효식품으로서 발효숙성과정 중에 *Bacillus natto, Bacillus subtilis* 등이 생산하는 효소 작용으로 대두의 단백질이 분해되어 끈끈한 점질물을 생성하여 그 특유의 구수한 맛과 고유의 향기성분을 지닌다.[1] 청국장은 콩으로부터 유래되고 발효과정중에 생성되는 각종 생리활성물질을 보유하여, 고혈압방지효과(angiotesin converting enzyme inhibitor), 혈중 콜레스테롤 저하능, 항돌연변이성, 항암성, 항산화성 및 혈전용해능 등이 있다고 보고되었다.[2-5] 한편 청국장과 유사한 나토는 발효과정 중에 생성되는 단백질 분해효소인 nattokinase가 혈전증의 예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 보고되었으며[6], 청국장도 발효시 이와 유사한 생리활성 기능을 갖는 물질이 생성되는 것으로 추측된다.[7]

청국장 발효균은 이미 알려진 바와 같이 *Bacillus*속 균주들로서, 다양한 extracellular 및 intracelluar protease를 생산하며, 여기에는 alkaline protease(subtilisin), neutral metalloprotease, esterase가 포함된다. 청국장 발효 시 나타나는 생리활성기능은 *Bacillus*속 균주의 발효대사산물인 청국장 점질물에 의한 것으로 추정되어지며, 청국장 점질물은 글루탐산이 한 줄로 약 5,000개가 연결된 폴리펩티드와 과당으로 구성된 프락탄이라는 성분으로 구성되어 있다.[8]

최근 천연물이 가지는 2차 대사산물인 생리활성물질이 매우 적은 양으로 효과적인 활성을 나타내어 새로운 개념의 고부가가치 물질로 관심이 고조되고 있으며, 이에 다양한 연구가 진행되고 있다.[9-10]

따라서, 본 연구에서는 *Bacillus subtilis*의 2차 대사산물인 청국장의 점질물이 생리활성물질임을 확인하기 위하여, 유해 식중독 미생물 및 식품 부패 미생물에 대한 생육 억제 효과를 알아보고, 청국장 점질물의 항 미생물 활성을 평가하였다.

재료 및 방법

청국장 발효 공시균주

전편에서 분리한 *Bacillus subtilis* CH-1, *Bacillus circulans*

†Author to whom correspondence should be addressed.

K-1, *Bacillus* spp. N-1을 사용하였다11).

청국장 제조

청국장 제조는 정선한 콩 500 g을 10°C에서 5시간 침지 후 물 빼기를 하여 스테인레스 상자에 담아 121°C에서 30분간 증자하였다. 증자 후 50°C로 냉각시키고, 미리 24시간 배양시킨 청국장 공시 균주를 원료 콩에 대해 각각 2% 정도 접종하여 40°C에서 48시간 발효시켰다. 이때 항온기 내부의 습도는 90%를 유지하였다[4].

점질물의 제조

발효 청국장에 3배의 증류수를 첨가하여 30분간 진탕기에서 진탕한 후 여과 및 원심분리(10,000 × g, 10 min)하여 상등액을 동결건조 한 후 분말화하여 시료로 사용하였다[5].

사용균주 및 배지

항미생물 실험에 사용한 균주는 일반식품류와 발효식품의 품질변화에 관여하는 균주를 선정하여 KCTC에서 분양 받아 실험에 사용하였다[12-14](Table 1).

청국장 점질물의 적정 첨가 농도를 측정하기 위해 gram positive · negative, yeast 별 대표균주를 선택하여 청국장 점질물을 각각 1%, 2%, 3% 농도로 첨가하여 적정 첨가 농도를 정하였고, 청국장 점질물의 항균효과는 배지에 청국장 점질물 분말을 선정된 농도로 첨가하여 멸균한 후 사용하였다. 대조군 시험용 배지는 점질물을 넣지 않은 배지를 사용하였으며, 청국장 점질물 분말 첨가로 인한 시험용 배지와 대조군 배지의 탁도 차이를 없애기 위해 배지의 초기 탁도 값을 blank로 보정하였다.

항균활성 시험방법

항균활성측정을 위하여 액체배양한 균액을 생리식염수로 희석하여 600 nm에서 흡광도가 0.1이 되도록 조정하였다. 세균과 효모의 항균활성은 일정농도로 희석된 균액을 각각의 배지에 접종하여 적정배양온도에서 24시간 배양시키면서 3시간 간격으로 흡광도(600 nm)를 측정하여 항균력을 판별하였다[15].

결과 및 고찰

적정 첨가농도

청국장 점질물을 각각 1%, 2%, 3%씩 배지에 첨가하여 적정 첨가 농도를 측정하였다. Gram positive · negative, yeast 별 대표 균주인 *Bacillus cereus, Escherichia coil* O157:H7, *Candida albicans*의 균액을 6시간과 24시간 배양 후에 항균성을 조사하였다(Table 2). 1%점질물을 첨가하였을 때 청국장 점질물의 항균성은 확인되었으나 그 효과는 2%보다 미약하였고, 청국장 점질물을 3% 첨가하였을 때의 결과는 2% 첨가한 결과와 유의적인 차이가 없었다. 따라서 본 실험에 사용한 청국장 점질물의 적정 첨가농도는 2%로 하였다.

그람 양성 세균에 대한 항균성

Staphylococcus aureus 균주의 항균활성 실험에서 다른 병원성 미생물과는 다른 형태의 항균활성이 관찰되었다(Fig. 1). 배양초기인 12시간 이전까지는 대조군에 비해 청국장 점질물 첨가군의 균 생육이 억제되었으나 배양 12시간 이후에는 청국장 점질물 K-1, N-1 첨가군은 대조군에 비해 성장이 증가하였다. 청국장 점질물 CH-1군은 생육 전 기간 동안 뚜렷하게 성장이 억제되었다. 균 생육의 억제 정도는 배양시간에 따라 다르게 나타났으며, 12시간 배양 기준으로 점질물 첨가군 N-1, K-1은 대조군에 비해 5%, CH-1군은 55% 정도 성장을 억제하였다.

Bacillus cereus 균주에 대한 항균력은 대조군에 비해 청국장 점질물 첨가군이 강력한 억제력을 나타냈으며, 대조군에 비해 CH-1군은 80%, N-1군은 40%, K-1군은 20% 정도

Table 1. List of microorganisms subjected to antimicrobial activity test

	Microorganisms	Medium	Incubation temperature
Gram Positive bacteria	*Staphylococcus aureus* KCTC 1621	Nutrient broth	37°C
	Bacillus cereus KCTC 1012	Nutrient broth	35°C
	Bacillus subtilis KCTC 1022	Nutrient broth	30°C
	Micrococcus luteus KCTC1071	Nutrient broth	30°C
Gram Negative bacteria	*Escherichia coil* O157:H7	Nutrient broth	37°C
	Salmonella typhimurium KCTC 2541	Nutrient broth	37°C
	Pseudomonas fluorescens KCTC1645	Nutrient broth	25°C
Yeast	*Pichia membranaefaciens* KCTC7628	Malt extract broth	25°C
	Saccharomyces cerevisiae KCTC7245	YM broth	25°C
	Candida albicans KCTC7121	YM broth	25°C

Table 2. Growth rate of putrefying bacteria depend upon added *Chongkukjang* slime

Microorganism	Addition volume of *Chongkukjang* slime	Growth rate (%)					
		Incubation (6hr)			Incrbation (24hr)		
		CH-1*	N-1**	K-1***	CH-1*	N-1**	K-1***
Bacillus cereus	1%	82	88	90	80	88	90
	2%	30	62	77	30	62	77
	3%	31	60	70	32	60	70
Escherichia coil O157:H7	1%	86	88	88	86	90	90
	2%	72	77	80	72	77	80
	3%	70	71	80	70	71	80
Candida albicans	1%	86	88	90	83	85	87
	2%	73	72	87	65	73	77
	3%	71	72	85	67	69	72

*CH-1: *Chongkukjang* slime produced by *Bacillus subtilis* CH-1.
**N-1: *Chongkukjang* slime produced by *Bacillus* spp. N-1.
***K-1: *Chongkukjang* slime produced by *Bacillus circulans* K-1.

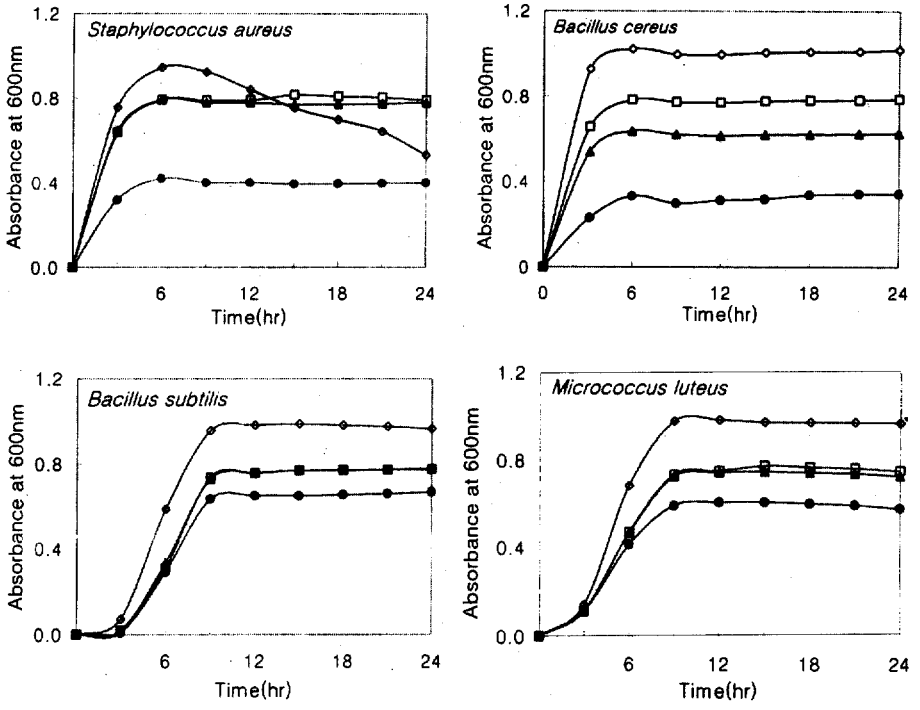

Fig. 1. Antibacterial effect of viscous substance from *chongkukjang* on the growth of gram positive bacteria.
-◇-: Control, -□-: K-1, -▲-:N-1, -●-:CH-1

억제하였다(Fig. 1). 따라서 청국장 점질물은 *Bacillus cereus* 성장에 대하여 가장 강력한 항균능을 나타내었다.

Bacillus subtilis 균주에 대한 항균력은 Fig. 1과 같으며, 억제정도는 대조군에 비해 K-1, N-1군이 25% 정도 억제되었고 CH-1군은 40% 정도의 억제력을 나타내었다. *Bacillus subtilis*균에 대한 청국장 점질물의 항균력은 CH-1이 높게 나타났다.

Micrococcus luteus 균주에 대한 항균력 대조군에 비해 CH-1첨가군의 성장이 40% 정도 억제되었으며, N-1, K-1 첨가군은 20% 정도 억제되었다. 청국장 점질물을 종류별로 *Micrococcus luteus* 첨가하였을 때 항균능의 차이가 뚜렷하게 확인 되었으며, 항균능은 CH-1, N-1, K-1순서로 항균능

이 나타났다(Fig. 1).

그람 음성 세균에 대한 항균성

Escherichia coli O157:H7에 대한 항균력은 대조군에 비해 생육이 억제되었다(Fig. 2). 미생물 생육의 억제 정도는 CH-1, N-1, K-1순으로 나타났으며, 대조군에 비해 CH-1군은 40%, N-1군은 30%, K-1군은 20% 정도 억제되었다. 다른 병원성 미생물과의 성장곡선을 비교하였을 때, *Escherichia coli* O157:H7 대조군과 청국장 점질물 첨가군 사이의 생육차이는 작았으며, 이는 청국장 점질물이 다른 병원성 미생물에 비해 *Escherichia coli* O157:H7에 대한 항균능은 약한 것으로 판단된다.

Salmonella typhimurium 균주에 대한 항균력은 다른 병원성 미생물의 성장곡선과는 다른 유형이 관찰되었다(Fig. 2). 배양 초기인 배양 12시간 이전까지는 대조군에 비해 청국장 점질물 첨가군의 생육이 더 활발하여 높은 성장 값을 나타

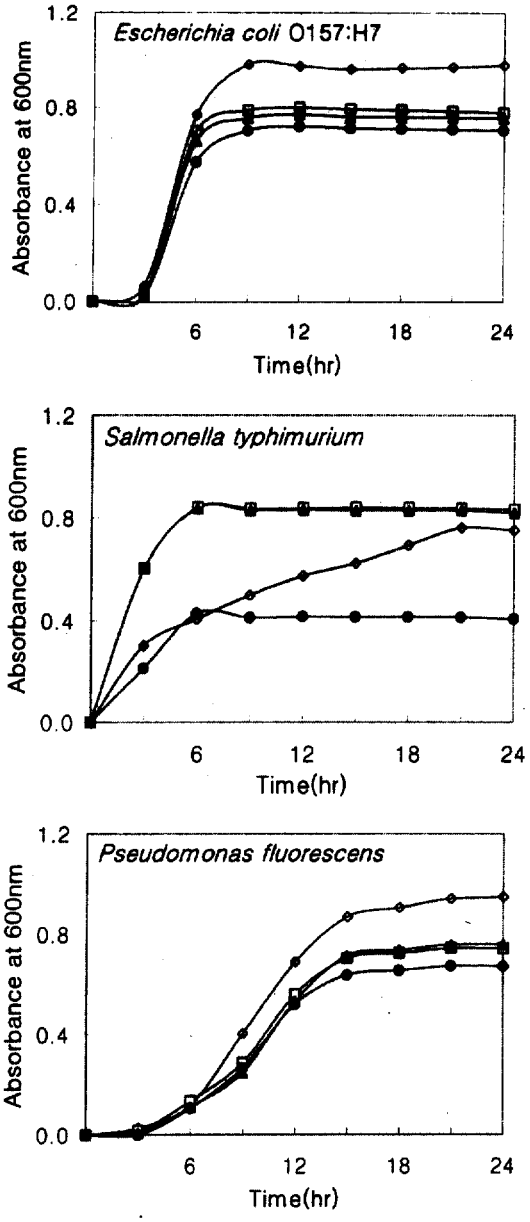

Fig. 2. Antibacterial effect of viscous substance from *chongkukjang* on the growth of gram negative bacteria.
-◇-: Control, -□-: K-1, -▲-:N-1, -●-:CH-1

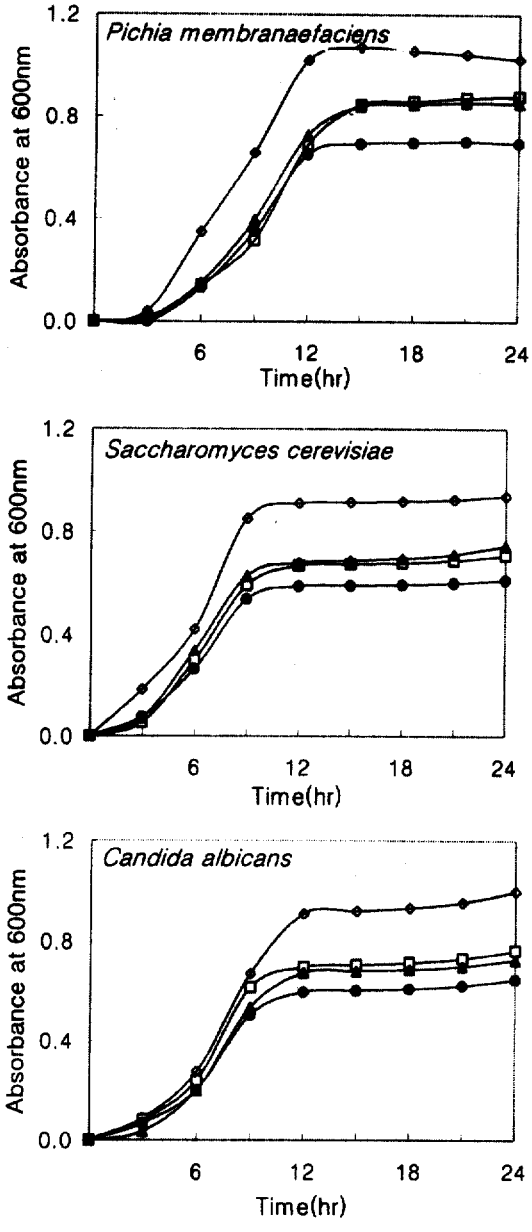

Fig. 3. Antibacterial effect of viscous substance from *chongkukjang* on the growth of yeasts.
-◇-: Control, -□-: K-1, -▲-:N-1, -●-:CH-1

내었으며, 배양 12시간 이후 균의 성장이 정지되어 일정한 값을 나타내었다. 점질물 CH-1군은 대조군에 비해 생육 기간 계속 성장이 억제되었고, CH-1 시험군의 억제 정도는 24시간 배양시에 대조군에 비해 약 50% 정도의 항균력을 나타내었다.

Pseudomonas fluorescens 균주에 대한 항균력은 배양 12시간에 시험군 K-1, N-1은 대조군에 비해 20% 정도 억제되어 다른 미생물과 유사한 억제력을 나타내었으며, CH-1군은 40% 정도 억제되었다(Fig. 2).

효모에 대한 항 미생물 활성

*Pichia membranaefaciens*에 대한 항균력은 대조군에 비해 CH-1 첨가군의 성장이 40% 정도 억제되었으며, N-1, K-1 첨가군은 20% 정도 억제되었다(Fig. 3). *Pichia membranaefaciens* 성장에서 청국장 점질물 종류에 따라 항균능의 차이가 뚜렷하였으며, 항균능은 CH-1, N-1, K-1순서로 나타났다.

*Saccharomyces cerevisiae*에 대한 항균력은 CH-1군이 가장 크게 나타났으며, K-1, N-1 순서였다. 억제정도는 배양 12시간을 기준으로 대조군에 비해 CH-1군은 40%, K-1군은 30%, N-1군은 28% 정도였다(Fig. 3).

*Candida albicans*에 대한 항균력은 CH-1, N-1, K-1 순이였으며, 억제 정도는 배양 12시간을 기준으로 대조군에 비해 CH-1군이 40%, N-1군은 30%, K-1군은 25% 정도로 CH-1군이 강력한 항균능을 나타냈다(Fig. 3).

청국장 점질물이 그람양성세균과 그람음성세균, 효모 등에 대해 비슷한 항균활성 정도를 나타내는 것은 구조가 다른 세포벽에 작용하는 것이 아니라 구조가 같은 세포질막에 작용하는 것으로 판단된다. 항균물질이 세포질막에 작용하는 기전은 세포질막에 기계적인 손상을 주어서 세균 세포내에 있는 물질이 외부로 흘러나가 세균이 죽는다고 알려져 있다[16-17]. 이러한 작용기작으로 청국장 점질물은 세포막을 손상시켜 항균활성을 나타내는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 1998년 한국 과학 재단의 특정기초연구과제(97-04-02-06-01-3)로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

국문요약

청국장은 전통발효식품으로 우리 식단의 중요한 단백질 공급원으로 자리해 왔으며, 발효과정 중에 나타나는 생리활성기능은 미생물의 작용으로 생성되는 점질물에 의한 것으로 추정된다. 청국장 점질물의 생리활성기능을 확인하기 위하여, 점질물을 첨가하여 유해미생물의 성장곡선을 관찰하였다. 발효균주 *Bacillus circulans* K-1, *Bacillus* spp. N-1, *Bacillus subtilis* CH-1균주를 이용하여 각각의 청국장을 제조한 후, 청국장으로부터 생성된 점질물인 K-1, N-1, CH-1 등을 분리하여 실험에 사용하였다. 청국장 점질물 K-1, N-1, CH-1을 이용하여 항균활성을 측정한 결과, 그람양성세균(*Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Microscopics luteus*), 그람음성세균(*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium, Pseudomonas fluorescens*), 효모(*Pichia membranaefaciens, Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans*)등에 항균작용을 나타내었다. 청국장 점질물은 *Bacillus cereus*에 대해 80%의 높은 성장억제력을 나타내었으며, *Escherichia coli* O157:H7에 대해서는 20%의 약한 성장억제력을 나타내었다. 청국장 점질물 중 CH-1은 세균, 효모에 대해 40%, K-1과 N-1은 20% 정도의 성장억제력을 나타내었다.

참고문헌

1. 주현규: 청국장 제조에 관한 연구. 한국식품과학회지, **3**, 64-67 (1971).
2. 김경자, 유명기, 김상순: 볏짚을 이용한 청국장 제조에 관한 연구. 한국식품과학회지, **14**, 301-308(1982).
3. 이부용, 김동만, 김길환: 청국장 점질물의 이화학적 특성. 한국식품과학회지, **23**, 599-604(1991).
4. 이부용, 김동만, 김길환: 청국장의 물성 변화에 대한 연구, *Korean J. Food SCI. Technol.* **23**, 478-484 (1991).
5. 이부용, 김동만, 김길환: 청국장 점질물의 이화학적 특성, *Korean J. Food SCI. Technol.* 23, 599-604 (1991).
6. 길지은, 김기남, 박인식: 새로운 혈전용해 효소의 생성 및 특성: 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. KP-6408로부터 효소 생성의 최적조건. 한국식품영양과학회지, **27**, 51-56 (1998).
7. Bernhelmer, A. W. and Avigud, I. S.: Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtills*. *J. Gen, Microbiol.* **61**, 361-369 (1970).
8. Kameda Y., Ouhira, S., Matsui, K. and Kanatomo, S.: Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 938-944 (1974).

9. 신동화 : 천연 항균성 물질의 연구현황과 식품가공에의 이용, 식품과학과 산업, 23, 68-73 (1990).
10. 이병완, 신동화 : 식품 부패미생물에 대한 천연 항균성물질의 농도별 및 분획별 항균 특성, 한국식품과학회지, **23**, 205-211 (1991).
11. 홍정화, 윤호경, 강민철, 이호재, 허성호: 청국장 발효균주의 분리 및 특성. 산업식품제조학회지, **4**, 67-72 (2000).
12. 마재형, 황한준: 항균성 *Monascus* 균주의 Screening 및 영양원과 배양조건이 항균활성에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지, **25**, 1080-1086 (1996).
13. 주인선, 성창, 오만진, 김찬조: 구기자(*Lycii fructus*)추출물이 미생물 생육에 미치는 영향. 한국식품 영양과학회지, **26**, 625-631 (1997).
14. 강성구, 성낙계, 김용두, 신수철, 서재신, 최갑성, 박석규: 갓(*Brassica juncea*)의 에탄올 추출물이 미생물 생육에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **23**, 1014-1019 (1994).
15. 이재진: 한천올리고당의 항균활성과 장내균총 개선효과에 관한 연구, 인제대학교 석사 학위 논문 (1998).
16. Sheppard J. D., Jumarie, C. and Cooper, D. G.: Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1064**, 13-23 (1991).
17. Zuber, P., Nakano, M, and Marahiel. M. A.: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular geneties. American Society for Microbiology, Washington. D.C. Peptide antibiotics of bacilli and other gram-positive bacteria, 897-916 (1993).