

# Bacillus subtilis (chungkookjang)균을 이용한 유용 아미노산 고분자소재 폴리감마글루탐산의 대량생산 및 용도개발

박 청<sup>1</sup>, 성 문 희<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>(주)바이오리더스 폴리감마글루탐산 사업본부

<sup>2</sup>국민대학교 자연과학대학 생명나노화학과

폴리감마글루탐산은 우리 전통 콩 발효식품인 청국장의 끈적끈적한 점액성의 성분으로, 매우 다양한 기능을 가지고 있는 천연 소재로서 최근 건강에 관한 웰빙문화는 바이오 신소재를 개발하는 데 충분한 사회적 요구를 제공하고 있다. "건강"을 키워드로 한 바이오 신약에 대한 기대가 고조되어 새 밀레니엄시대를 주도할 바이오 의약기술 개발에 관한 많은 연구 및 기술개발이 진행되고 있어 이러한 바이오 기술개발의 열풍과 동시에 안전성에 대한 새로운 시각은 "안전" 및 "안심"을 키워드로 한 바이오 신소재 산업에 대한 관심과 기대를 새롭게 하였다.

본고에서는 청국장에서 분리한 식품미생물이 생산하는 아미노산 고분자 소재인 폴리감마글루탐산의 대량생산과 용도개발에 관하여 살펴보기로 한다.

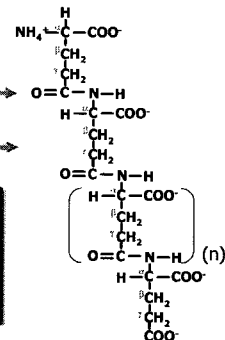
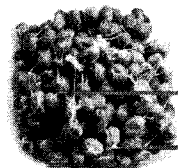
## I. 바이오 신소재 폴리감마글루탐산이란?

폴리감마글루탐산 (Poly-γ-glutamic Acid, γ-PGA)은 글루탐산의 γ-카르복실기와 글루탐산의 α-아미노기가 아마이드 결합된 γ-폴리펩타이드로 콩 발효 식품미생물인 *Bacillus subtilis*가 보유하고 있는 폴리

감마글루탐산 합성계 (γ-PGA synthetase complex, pgsBCA system)에 의해서 생성되는 수용성, 음이온성, 생분해성, 및 식용의 아미노산 고분자소재로 고부가가치의 의약품, 화장품, 기능성 식품, 환경용, 공업용 등으로 적용 범위가 매우 다양하다.

폴리감마글루탐산은 그림1의 구조에서 알 수 있듯이 γ-카르복실기가 노출되어 있는 음이온성의 고분자로 이러한 폴리감마글루탐산의 수용액상에서 구조는 이온화되어 있는 정도에 따라 다른 형상을 보이며, 이러한 구조적 특성은 폴리감마글루탐산이 수용액의 pH에 따라 다른 구조를 가지고 있음을 보여주며, 이러한 구조적 특성에 대한 연구는 폴리감마글루탐산의 응용성을 증가시킬 수 있을 것으로 보인다.

청국장 (Chungkookjang)



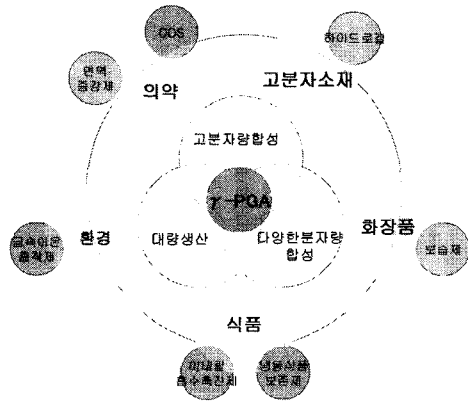


그림1. 폴리감마글루탐산의 구조 및 다양한 산업적 용도

## II. 바이오 신소재 폴리감마글루탐산을 생산하는 생산 균주

폴리감마글루탐산은 미생물에 의해서 생산되는 아미노산계 폴리머로서 지금까지 *Natrialba aegyptiaca*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus magaterium*, *Bacillus subtilis* 등의 균주가 생산하는 것으로 보고되어 있으며, 생산하는 미생물에 따라서 조금씩 다른 성질을 나타낸다. 폴리감마글루탐산 생산균주는 영양요구성에 따라 크게 두 종류로 구분되는데, 첫 번째 그룹은 폴리감마글루탐산 생산성을 증가시키기 위하여 배지 내에 L-glutamic acid를 첨가하는 glutamic acid 의존성 균주 (*B. subtilis chungkookjang*, *B. anthracis*, *B. licheniformis* ACTC 9945A, *B. subtilis* IFO 3335, *B. subtilis* F-2-01), 두 번째 그룹은 배지 내에 L-glutamic acid의 첨가가 필요 없는 glutamic acid 비의존성 균주(*B. subtilis* 5E, *B. subtilis* TAM-4, *B. subtilis* A35)로 구분된다. 지금까지 알려진 폴리감마글루탐산 생합성 균주들의 특성과 분자량의 크기를 조사한 결과 우리나라 전통 발효식품 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*)균의 폴리감마글루탐산 생산성이 가장 뛰어났으며 분자량도 지금까지 알려진 미생물 생산 폴리감마글루탐산 중 가장 큰 것으로 나타났다. *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*) 균

은 Nitrate reduction을 하지 못하며, Indole을 생성하지 않는다. gelatin과 starch을 분해하며,  $\beta$ -galactosidase와  $\beta$ -glucosidase활성이 양성이며, oxidase 활성을 가졌다. 또한, Urease를 생산하며, Glycerol, galactose, glucose, sucrose, maltose, starch을 이용할 수 있는 것으로 나타났다. 16S rDNA의 유전자 염기서열 분석을 실시하여 종래 보고된 여러 미생물의 16S rDNA 염기배열과 상동성을 비교한 결과, *Bacillus subtilis*와 99.0% 상동성을 나타내었다. 하지만, 기존의 *Bacillus subtilis* 종들과는 달리  $Co^{2+}$  등의 2가 양이온의 첨가에 의해서도 spore 형성이 잘 유도되지 않는 특성을 가지며, 기존의 폴리감마글루탐산 생산 균주들과는 달리 plasmid를 보유하고 있지 않는 특성을 가지고 있다. 폴리감마글루탐산을 생산하는데 있어서, 각각의 목적에 부합되도록 그 제조법상의 기술 차이를 보이고 있으며, 주로 *Bacillus*속 균주인 *B. subtilis* (*chungkookjang*), *B. subtilis natto* 및 *B. licheniformis* 등의 미생물의 배양액으로부터 제조하는 공정이 대부분을 차지하고 있다. 또한 폴리감마글루탐산의 활용범위가 다양해짐에 따라, 폴리감마글루탐산의 생산성을 높이고자 하는 배지성분, 배양조건 및 분리방법에 대한 연구도 활발히 진행되고 있으며, 폴리감마글루탐산과 같은 바이오 폴리머의 물성을 개량하기 위하여 각각 다른 분자량이 요구되는 이유는 바이오 폴리머의 물성이 분자량에 크게 의존하기 때문이다.

표1. 폴리감마글루탐산 생산균주 *B. subtilis*(*chungkookjang*)의 특성

Gram stain	+
Shape	rod
Size	0.7 - 0.8 x 2.0 - 3.0 $\mu$ m
Spotulation	+
Endospores	(very weak)
Motility	Cylindrical, central
Nitrate reduction	-
Starch and casein hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Voges-Proskauer test	+
Citrate utilization	+
Catalase test	+
Oxidase test	-
Denitrification	-
Urease production	+
Indole formation	-
Growth at 55 °C	-
Growth on pH 5.7	+
Growth in 12% NaCl	+

폴리감마글루탐산은 상업적으로는 일본, 대만의 몇 개의 회사들이 생산하고 있으며, 일본의 아지노모토사는 생산균주가 *Bacillus subtilis natto*인 관계로 인하여 고분자량의 폴리감마글루탐산 제조가 불가능하여 최근에 폴리감마글루탐산 분해계에 관한 연구를 하고 있으며, 폴리감마글루탐산을 드링크류에 첨가하여 기능성 효과를 강조하고 있고, 메이지 세이카의 경우는 환경용 소재에 사용하는 폴리감마글루탐산을 생산하여 주로 토양 개질제로 시판하고 있으나 분자량은 40-50만 Da 수준에 머물러 거대분자량의 폴리감마글루탐산 생산 및 이를 이용한 제품 개발에 한계가 있다. 한편, 우리나라에서는 폴리감마글루탐산의 효율적 생산과 물성개선 등과 같은 기초연구와 고농도 폴리감마글루탐산의 생산방법 등이 있고, 고분자량의 폴리감마글루탐산을 생산하는 내염성 균주 *Bacillus subtilis (chungkookjang)* 균주에 관하여 보고되어 있다. 한편 폴리감마글루탐산 생합성에 필요한 글루탐산의 산업 생산균주인 *Corynebacterium* 속 세균을 이용한 초거대분자량의 폴리감마글루탐산 생산방법도 검토되고 있다.

### III. 폴리감마글루탐산의 대량생산

고분자 폴리감마글루탐산 생산은 용도개발을 통하여 산업적인 바이오소재로 자리매김하기 위하여는 실험실 규모에서의 소량 생산을 넘어 대량생산을 통한 원가절감이 반드시 요구된다. (주)바이오리더스가 우리나라 전통 콩발효식품인 안동 유래의 청국장에서 분리하여 생산균주로 사용중인 *Bacillus subtilis (chungkookjang)*은 폴리감마글루탐산의 원료 물질인 아미노산 L-glutamic acid를 필요로 하는 글루탐산 의존성 생산균주로서 기존의 글루탐산 비의존성 생산균주에 비하여 발효기간이 짧으며 생산된 폴리감마글루탐산의 평균분자량이 2,000만Da 이상

으로서 생산된다. 2001년부터 본 생산균주의 생산공정 및 발효 안정화를 추진하여 현재는 평균분자량 2,000만Da 이상의 폴리감마글루탐산 생산성은 발효액 L당 25-30g의 고생산성에 도달하였으며 정제회수율도 85% 이상의 높은 회수 정제 공정기술을 개발 완료하여 Knowhow로 확보하고 있다(그림2). 고분자 폴리감마글루탐산 생산기술은 환경친화적인 생물학적 생산 공정의 기술특징을 가지며, GRAS로 인정 받은 식용 미생물 *Bacillus subtilis (chungkookjang)*을 이용한 발효 공학적 생산으로, 대량생산 공정을 확립하여, 고분자 폴리감마글루탐산의 물질특허(초거대분자량의 폴리감마글루탐산 및 그의 이용방법, 대한민국등록 10-0399091 (2003.09.09), 러시아 특허등록 RU 2 281 958 C2 (2005.07.20), PCT 특허출원 PCT/KR03/01369 (2003.07.10))를 바탕으로 향후 응용개발이 보장된 고 부가가치의 의약품, 화장품, 기능성 식품, 환경용 소재개발로서의 그 활용과 수요는 더욱 증가될 것으로 판단된다.



그림2. 고분자량 폴리감마글루탐산의 대량생산 공정

### IV. 바이오 신소재 폴리감마글루탐산의 다양한 용도 개발을 통한 산업적 활용 및 적용

폴리감마글루탐산은 식품, 의약, 환경, 화장품, 공업용 소재로 다양한 분야에 응용할 수 있는 무한한 잠재력을 보유하고 있으므로 21세기 차세대 바이오 신소재로 개발 될 수 있을 것으로 기대된다. 관련

특허출원은 폴리감마글루탐산 생산성 증대에 관한 특허와 폴리감마글루탐산의 용도개발에 관한 특허로 크게 나눌 수 있는데, 폴리감마글루탐산 관련기술의 특허출원 비율은 용도관련특허가 50% 이상임을 알 수 있으며, 이는 최근 들어서 폴리감마글루탐산의 활용가능성이 다양하게 제시됨에 따라 종래 고가의 폴리감마글루탐산 제조방법상의 문제점을 극복하여 그 활용범위를 넓히고자 하는 패러다임의 변화로, 이들 용도로는 전해질 수용액, 전기 점성유체, fiber 또는 film의 재료, 칼슘이온 용해제, 칼슘 흡수 촉진제, 의약품반응 담체, 수분 흡수제, 사료첨가물, 식품의 선도유지제 및 제과 제빵원료의 첨가제로 범위가 다양하다.

특히 식품첨가물로서 2006.12.29에 한국식품의약품안전청(KFDA)으로부터 천연첨가물 신규인정을 획득하였으며, 최근 면역보강의 기능이 밝혀져 다양한 제품개발이 추진되고 있다. 또한 보습소재로서의 기능을 식품에 도입하려는 시도가 제방 및 음료분야에서 활발히 추진 중이다(그림3). 식품산업에서 음이온성 및 서방성 물성을 이용하여 미네랄 흡수촉진 보조제로 사용할 수 있다. 폴리감마글루탐산은 소장에서 칼슘이 인과 결합하여 불용성이 되는 것을 저해하고 칼슘의 흡수를 촉진시키는 것이 확인되어 국내의 유가공제품에도 도입되고 있다(그림4).

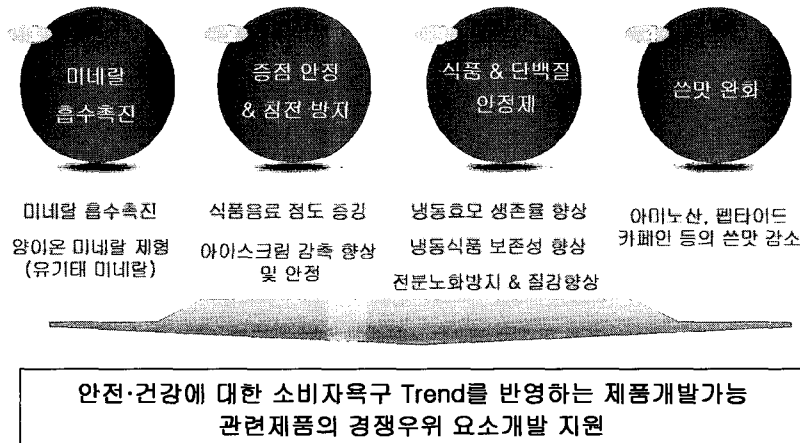


그림3. 식품산업에서의 폴리감마글루탐산의 다양한 용도

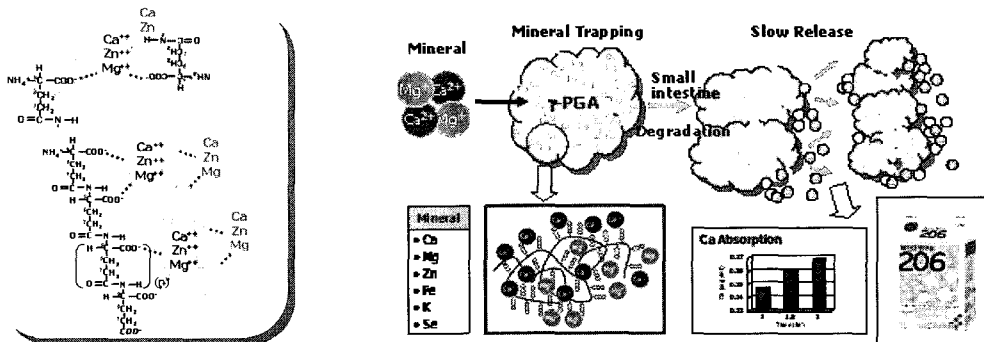


그림4. 폴리감마글루탐산의 미네랄 흡수촉진 기능성 효과

식품용 폴리감마글루탐산은 물에 잘 녹으며, 생분해성을 가지고, 식용 가능하며, 수천년간 먹어온 청국장의 성분으로 사람에게 독성이 없는 안전한 소재이다.

폴리감마글루탐산의 이용에 대한 연구는 식품의 농축, 보습제, 고미 제거제, 냉해 방지제, 동물 사료 첨가제 등에서 활발히 진행되어왔는데, 식품에 있어 잦은 냉동과 해동은 제품의 품질을 하락시키는데, 이러한 품질 하락을 억제시키기 위해 냉해 방지제가 사용되고 있음. 최근 그 물질의 결속 효과(colligative effect)에 의해 수백배의 antifreeze activity를 가지는 몇몇 antifreeze proteins (AFPs) 들이 보고되고 있고 그러한 효과는 단백질이 가지고 있는 peptide 의 acidic 아미노산 잔기의 sodium salt 들에 기인한다고 설명되고 있다. 이와 마찬가지로, *Bacillus* 에 의해 생산되는 다양한 올리고감마글루탐산과 폴리감마글루탐산 역시 antifreeze activity 를 가진다는 것이 Mitsui 등에 의해 연구되어 (Mitsui et al., 1998) 그 결과, 기존에 높은 antifreeze activity 를 가진다고 알려진 glucose 보다 폴리감마글루탐산이 높은 antifreeze activity 를 가진다고 밝혀졌다. 폴리감마글루탐산은 일반적으로 사용 되는 당이나 무

기염, 아미노산 등의 저분자의 냉해 방지제 보다 맛이 약하기 때문에 냉동식품산업에 있어 효과적이며 식품의 맛에 영향을 주지 않으므로 많은 양이 사용될 수 있다.

식품의 부패와 변질은 주로 미생물작용에 의해 일어나는데, 이를 방지하기 위해 각종 보존제를 사용하여 미생물 증식을 억제하여 저장기간의 연장을 시도하고 있으나, 대부분의 보존제는 화학적 합성 제품으로 그 안전성에 대한 재고가 사회적인 관심사로 대두되고 있으며, 더욱이 근래 소비자들의 건강욕구 증대에 따라 식품제조가공에서도 합성첨가물의 사용을 제한하려는 추세이다. 한편 천연물 중에도 상당한 항균성 물질을 갖는다는 사실은 옛날부터 전해지고 있다. 이로 인하여 오래전부터 이에 대한 연구가 계속적으로 수행되어 왔으며, 현재도 천연항균성 물질의 검색과 식품의 이용에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 유산균 배양물과 폴리감마글루탐산을 배합하여 이루어진 천연 식품 보존제 조성물 및 이를 포함한 식품에 관한 것으로 유해 미생물의 증식억제 효과, 중량 감소 억제 및 신선도 유지 효과를 가지는 제품의 저장기간 연장 및 상품의 고급화를 추구하는 친환경적 천연 식품 보

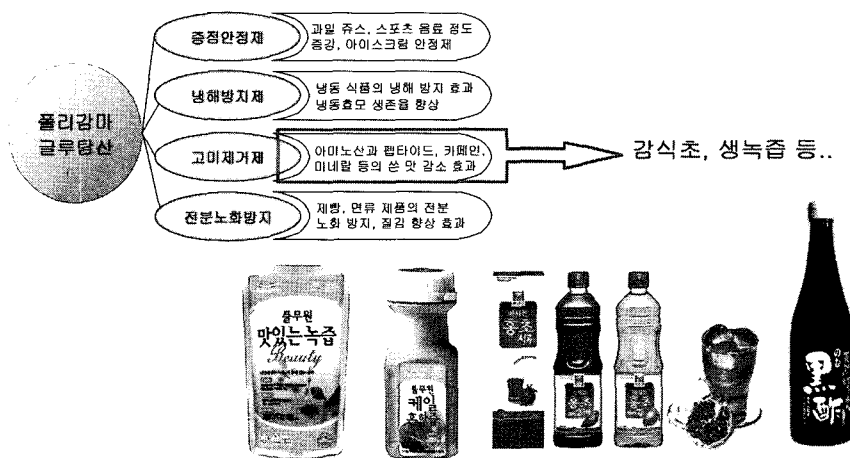


그림5. 식품 고미성분의 마스킹제로서 폴리감마글루탐산의 응용

존제로서도 응용이 가능하다 (폴리감마글루탐산 함유 천연 식품 보존제 및 이의 제조방법, 대한민국 특허 등록 제0645089호)

또한 식품산업에서 고미, 이취 등을 효과적으로 마스킹하는 소재로서 폴리감마글루탐산의 효능이 입증되면서 이 분야에서의 적용범위가 확대되고 있다(그림5). 감식초, 생식 제품, 녹즙제품 등의 마스킹에 사용할 수 있다. 또한 아미노산이나 펩타이드, 키닌 (quinine), 카페인, 미네랄 등과 같은 쓴맛이 나는 물질에 첨가하였을 때 쓴맛을 현저히 감소시키는 효과가 있다.

폴리감마글루탐산은 아이스크림의 안정제로 사용하거나 (Daninippon, 1972) 과일 주스 음료의 농축, 또는 스포츠 음료의 맛을 개선하거나 마시기 좋게 만드는 작용을 가지고 있으며, 고분자량 폴리감마글루탐산은 기존의 보습제로 사용되고 있는 히알루론산보다 뛰어난 보습력을 가지고 있으며, 히알루론산에는 없는 NMF(Natural Moisturizing Factor), 천연보습인자의 활성화 기능을 가지고 있다(그림6). 히알루론산은 생분해성 바이오소재로서 폴리감마글루탐산과 같은 성질과 응용성을 가지고 있으나 가격 면에서 상대적으로 높은 가격으로 응용소재화의 용도확대가 어려움이 있으며, 일본에서 생산되는 폴리감마글루탐산은 저분자이기 때문에 화장품 및

의약품으로 널리 사용하는 히알루론산에 비하여 응용성이 뒤쳐져 있었으나 폴리감마글루탐산은 저분자에서 고분자까지 히알루론산의 대체물질로서 최적소재로 판단된다. 그 뿐만 아니라 피부 조직내 히알루론산 분해 효소 활성화로 인해 일어나는 피부 조직의 파괴 및 염증을 막는 항염증 기능을 가지며 면역활성 조절기능이 있어 민감성, 스트레스성 피부염의 증상을 완화시키는 기능에 대한 특허를 보유하고 있어, 보습력은 기본이며 항염증 기능을 가지는 기능성 소재로서도 큰 각광을 받을 것으로 판단된다.

최근 폴리감마글루탐산의 끈적끈적한 특성이 바이러스를 흡착할 수 있음이 알려져, 폴리감마글루탐산 흡착제를 마스크나 에어컨의 필터 등에 코팅해, 바이러스 인플루엔자 감염 방지에 유용하게 사용할 수 있으며, 폴리감마글루탐산은 또한 감마선을 차단함으로써 방사선을 차단하는 특수용도 분야에 사용할 수 있고 특히 폴리감마글루탐산 나노섬유로 만든 의복은 매우 유용할 것이다. 또한 생분해성의 폴리감마글루탐산은 암 부위에 약물을 효율적으로 전달하는 새로운 개념의 약물전달체로서 주목 받고 있다. 최근 바이오접착제로서 접착력이 합성접착제보다 우수하여 수술용도로서 사용이 검토되는 등 의료용 소재로서도 전망이 매우 밝다(그림7).

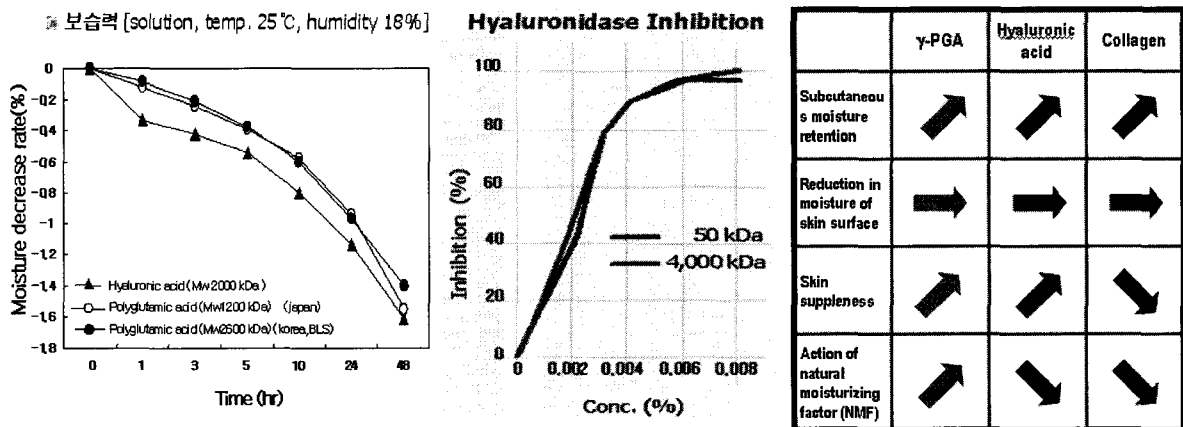


그림6. 폴리감마글루탐산의 보습효과

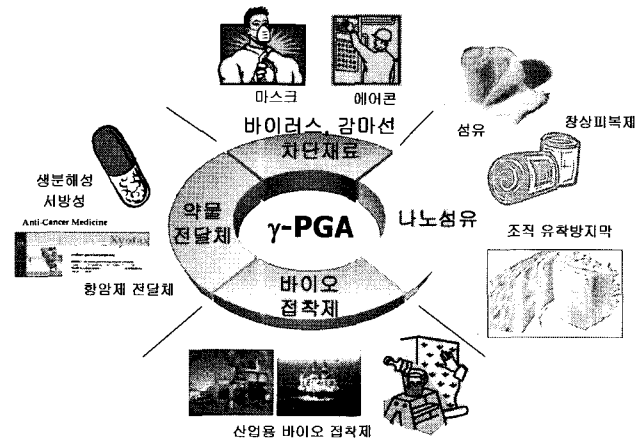


그림7. 폴리감마글루탐산의 신용도 개발

바이오 기술과 소재의 패러다임의 변화는 국가경쟁력 순위를 크게 변화시키고 있으며, 새로운 시장을 창출할 뿐 아니라 기술융합을 통하여 IT, NT, 전통산업 등에 지대한 영향을 미친다. 우리나라의 전통 발효식품 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis chungkookjang*균이 생산하는 폴리감마글루탐산은 세계에 자랑할 수 있는 바이오 소재이다. 초거대분자량 폴리감마글루탐산의 물질특허보유 및 지속적인 응용, 용도개발에 힘입어 업계, 연구소 등 관련 기관에서의 바이오 신소재 개발에 크게 기여 할 것으로 여겨지며, 아울러, 정부의 꾸준한 지원과 협조를 통하여 선도 바이오 핵심소재로 자리매김 할 것으로 기대된다.

[2006년도 서울특별시 산학연 협력 사업을 지원 받아 수행된 연구임.]

## V. 참고 문헌

1. Oral Administration of High Molecular Weight Poly-Gamma-Glutamate Induces NK Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity. Tae Woo Kim, Tae Young Lee, Hyun Cheol Bae, Jeong Ho Hahm, Yang Hyun Kim, Chung Park, Tae Heung Kang, Chul Joong Kim, Moon-Hee Sung, Haryoung Poo. 2007. *Journal of Immunology* (Revised)
2. Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on *Lactobacillus casei* induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice. Haryoung Poo, Hyun-Mi Pyo, Tae-Young Lee, Sun-Woo Yoon, Jong-Doo Lee, Chul-Joong Kim, Moon-Hee Sung, and Seung-Hoon Lee. 2006. *Int.J.Cancer* 119, 1702-1709.
3. Natural and Edible biopolymer Poly- $\gamma$ -glutamic Acid: Synthesis, Production and its Applications. Moon-Hee Sung, Chung Park, Chul-Joong Kim, Haryoung Poo, Kenji Soda, and Makoto Ashiuchi. 2005. *The Chemical Record*. Vol.5, 352-366.
4. Synthesis of super-high-molecular-weight poly- $\gamma$ -glutamate by *Bacillus subtilis* subsp. *Chungkookjang*. Chung Park, Jae-Chul Choi, Yoon-Ho Choi, Hisaaki Nakamura, Kazuya Shimanouchi, Terumi Horiuchi, Haruo Misono, Tomomitsu Sewaki, Kenji Soda, Makoto Ashiuchi, and Moon-Hee Sung. 2005. *J. Mol. Catl. B:Enzymatics* 35, 128-133.
5. The coagulation characteristics of wastewater using poly- $\gamma$ -glutamic acid. *Journal of the Korean*

- Society of Water and Wastewater. Kwi-bock Kwon, Dong-ha Kim, Seon-Hong Kang, Moon-Hee Sung, Chung Park. 2005. 19(3), 357-362.
6. Distribution of poly- $\gamma$ -glutamate ( $\gamma$ -PGA) producers in Korean fermented foods, Cheongkukjang, Doenjang, and Kochujang. Seong Eun Kang, Joo Hyung Rhee, Chung Park, Moon-Hee Sung, Inhyung Lee. 2005. Food Sci. Biotechnol. 14(5), 704-708.
  7. Effects of high-molecular weight of poly- $\gamma$ -glutamic acid from Bacillus subtilis chungkookjang on Ca solubility and intestinal absorption. Park Chung, Yoon-Ho Choi, Hyun-Jin Shin, Haryoung Poo, Jae-Jun Song, Chul-Joong Kim, and Moon-Hee Sung. 2005. J. Microbial. Biotechnol. 15(4), 855-858.
  8. Enzymatic synthesis of high-molecular-mass poly- $\gamma$ -glutamate and regulation of its stereochemistry. Makoto Ashiuchi, Kazuya Shimanouchi, Hisaaki Nakamura, Tohru Kamei, Kenji Soda, Chung Park, Moon-Hee Sung, and Haruo Misono. 2004. Appl. Environ. Microbiol. 70(7), 4249-4255.
  9. 첨단 바이오신소재 폴리감마글루탐산, 한국미생물 생명공학회 생물산업 제17권 6호, 2004. 성문희
  10. Poly- $\gamma$ -glutamate depolymerase of Bacillus subtilis: production, simple purification and substrate selectivity. Makoto Ashiuchi, Hisaaki Nakamura, Takashi Yamamoto, Tohru Kamei, Kenji Soda, Chung Park, Moon-Hee Sung, Toshiharu Yagi, and Haruo Misono. 2003. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic 23, 249-255.
  11. Effect of poly- $\gamma$ -glutamic acid on Calcium solubility in vitro and in vivo. Chung Park, Kwang-Seok Kim, Chang-Min Jung, Hyun-Jin Shin, Chul-Joong Kim, Makoto Ashiuchi, Kenji Soda, and Moon-Hee Sung. 2003. The society of deep sea water and health science. Kyoto. Japan 3, 71-75.
  12. Isolation of Bacillus subtilis (chungkookjang), a poly- $\gamma$ -glutamate producer with high genetic competence. M, Ashiuchi, T. Kamei, D.-H. Baek, S.-Y. Shin, M.-H. Sung, K. Soda, T. Yagi, H. Misono. 2001. Appl. Microbiol. Biotechnol 57, 764-769.
  13. Physiological and biochemical characteristics of poly- $\gamma$ -glutamate synthetase complex of Bacillus subtilis. Makoto Ashiuchi, Chizuka Nawa, Tohru Kamei, Jae-Jun Song, Seung-Pyo Hong, Moon-Hee Sung, Kenji Soda, Toshiharu Yagi, and Haruo Misono. 2001. Eur.J.Biochem. 268, 5321-5328