

청국장으로부터 분리한 Poly(γ -glutamic acid)를 생산하는 균주 *Bacillus subtilis* GS-2의 분리 및 γ -PGA의 확인

방병호 · 정은자 · 이문수¹ · 김용민² · 이동희^{2*}

을지대학교 식품영양학과, ¹한국생명공학연구원, ²건국대학교 미생물공학과

Isolation of *Bacillus subtilis* GS-2 Producing γ -PGA from *Ghungkukjang* Bean Paste and Identification of γ -PGA

Byung-Ho Bang, Eun-Ja Jeong, Moon-Soo Rhee¹, Yong-Min Kim², and Dong-Heui Yi^{2*}

Department of Food and nutrition Science, Eulji University,
212 Yangji-dong, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 461-713, Republic of Korea

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
52 Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Republic of Korea

²Department of Microbial Engineering, Konkuk University,
1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Republic of Korea

Received November 19, 2010; Accepted March 8, 2011

γ -PGA(poly- γ -glutamic acid) is an unusual anionic polypeptide that is made of D- and L-glutamic acid units connected by amide linkages between α -amino and γ -carboxylic acid groups. γ -PGA has been isolated from many kinds of organisms. Many *Bacillus* strains produce γ -PGA as a capsular material of an extracellular viscous material. It is safe for eating as a viscosity element of fermented soybean products such as *Chungkookjang* and *Natto*. It is biodegradable, edible and non-toxic toward humans and the environment and its molecular weight varies from ten thousand to several hundred thousand depending on the kinds of strains used. Therefore, potential applications of γ -PGA and its derivatives have been of interest in the past few years in a broad range of industrial fields such as food, cosmetics, medicine, water-treatment, etc. In this study, a bacterium, *Bacillus subtilis* GS-2 isolated from the Korean traditional seasoning food, *Chungkookjang* could produce a large amount of γ -PGA with high productivity and had a simple nutrient requirement. Based on carbon utilization pattern and partial 16S rRNA sequence analysis, the GS-2 strain was identified as *B. subtilis*. The determination of purified γ -PGA was confirmed with thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), fourier transform infrared (FT-IR) spectra, and ¹H-nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy.

Key words: *Bacillus subtilis*, *Chungkookjang*, poly(γ -glutamic acid)

서 론

대두는 식용 및 공업용으로 널리 쓰이는데, 자실(子實)은 단백질 및 지방이 풍부하다. 콩은 한국인의 식생활에서 가장 중요한 식물성 단백질원이 되고 있으며, 가공하여 콩나물, 두부·된장·간장·청국장 등을 제조하여 식용한다[Oh 등, 2007]. 이 중 청국장은 우리나라 전통 발효식품의 하나로, 대두에 고초균을 번식시켜 제조한 단기 발효식품이다. 청국장은 발효속성과

정에서 고초균이 생성하는 효소의 작용으로 콩 단백질이 저분자의 펩타이드로 분해되어 소화흡수가 용이하고 풍미가 특유하다. 청국장은 벧짚위에 삶은 콩을 담아 40°C에서 2-3일 발효시키면 점질물이 생성되고 특이한 냄새와 맛을 내는 우리나라 전통 발효식품 중의 하나이다. 또한 영양학적, 생리학적으로 여러 가지 기능을 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 항산화효과, 혈압강하효과, 항균효과, 항암성 등 각종 유용한 생리활성 기능이 보고됨에 따라 기능성 식품으로서 관심이 증가하고 있는 추세이다[Back 등, 2008].

Poly- γ -glutamic acid(γ -PGA)는 청국장이 발효될 때 생성되는 점질성 물질의 하나로, monomer glutamic acid의 α -아미노기와 γ -카르복실기 사이의 amide linkage에 의해 결합된 D(-)와 L(-) glutamic acid repeated units로 이루어진 homopolymer이다

*Corresponding author

Phone: +82-2-450-3522; Fax: +82-2-3437-8360

E-mail: dhyi@konkuk.ac.kr

[Bovarnick, 1942; Thorne 등, 1954; Shih & Van, 2001]. γ -PGA는 Ivánovics 등에 의해 *Bacillus anthracis*의 capsule로부터 처음 발견되었으며[Oh 등, 2007], 이후 *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 등과 같은 nonpathogenic *Bacillus* spp.의 surrounding cell로부터 발견되기도 하였다. 또한, γ -PGA가 fermentation product로서 *B. subtilis*에 의해 medium 내로 분비된다는 사실이 밝혀졌으며 이후로 여러 *Bacillus* 종들이 extracellular γ -PGA를 생산한다는 연구들이 보고되었다[Hara & Ueda, 1982; Cheng 등, 1989; Goto & Kunioka, 1992].

일반적으로 γ -PGA는 수용성(water-soluble), 음이온성(anionic), 무독성(non-toxic), 생분해성(biodegradable), 생체적 합성, 식용(edible) 등의 다양한 특성을 가지고 있기 때문에 여러 분야에서 응용되고 있다. 즉, 수질 및 수처리 분야에서는 금속 킬레이트(metal chelates), 흡수제(adsorbents), 생물응집제(bioflocculant), 폐수처리 응고제(coagulant) 등에 이용되고, 식품산업에서는 칩전제(thickener), 동결 방지제(cryoprotectant), 쓴맛 감소제(bitterness relieving agents), 동물 사료첨가제(animal feed additives) 등에 이용되고, 의료분야에서는 약물전달체(drug carriers), 의료용 생물접착제(curative biological adhesives), 골다공증 예방(osteoporosis-preventing factors) 등에 이용되며, 화장품분야에서는 습윤제 또는 보습제(humectants) 기타 분야에서는 생분해성 대체물질(biodegradable substitutes)인 thermoplastics, fibers와 히드로겔(hydrogel) 등에 이용되고 있다[Borbely 등, 1994; Choi 등, 1995; Markland 등, 1999; Francis 등, 2003].

현재, 이 균을 이용한 γ -PGA 최적 생산 조건을 검토하고 있으며, 본 연구에서는 γ -PGA를 생산하는 GS-2균을 동정하고, 그리고 정제된 점질성 생성물인 γ -PGA를 thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), fourier transform infrared (FT-IR), 그리고 ^1H -nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) spectroscopy를 통하여 확인하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 선별. 시판 청국장 1g을 멸균된 증류수 9mL에 현탁하여 70°C에서 10분간 열처리한 후 10^{-5} ~ 10^{-6} 으로 희석하여 현탁액을 분리배지(isolation medium)인 L-glutamic acid 1.0%, glucose 1.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, KH_2PO_4 0.05%, agar 1.5% (pH 7.0)에 도말하고, 37°C에서 24시간 평판 배양하였다. 분리배지에서 배양 후 생성된 colony들 중 점성을 가지거나, 집락 표면에 탄성을 보이는 colony들을 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주들 중에서 여러 차례 새로운 배지에 옮겨 배양한 후 점성이 가장 높고 blank test를 하여 생산된 물질이 γ -PGA임이 확인된 후 가장 많은 양의 γ -PGA를 생산하는 균주 GS-2를 최종 선별하였다.

균주의 보존. Nutrient agar medium (beef extract 0.3%, peptone 0.5%, agar 1.5%)에서 균주를 순수분리한 후 분리용 사면배지에 접종, 37°C에서 2일간 배양하여 균의 증식 정도를 확인한 다음, 4°C에서 냉장 보관하였다. 계대배양은 nutrient

agar medium에 1개월 간격으로 계대 배양하였다. 또한 분리된 균주는 균배양액과 30% glycerol을 1:1로 혼합하여 micro-tube에 담은 후 -50°C deep freezer에서 냉동 보관하였다.

GS-2의 형태 및 배양학적 특성. 분리균주의 크기와 형태는 그람 염색(gram stain)하여 관찰하였고 spore는 아포 염색(spore stain)을 하여 광학현미경(ML2000, Meiji)으로 관찰하였다. Glucose-nutrient agar 배지, skim milk 배지, Luria-Bertani (LB) 배지, nutrient agar 배지 등에서 생육한 집락의 크기, 모양과 색깔 등을 관찰하였으며, 반유동 고체배지(tryptone 1.0%, sodium chloride 0.5%, agar 0.5%)에 배양하여 운동성을 조사하였다.

GS-2의 생리학적 특성. 분리균주의 생리학적 특성으로는 casein 분해능, starch 분해능, gelatin 액화능, 당발효성, indole 생성능, nitrate 환원력, Voges-Proskauer 시험, catalase와 oxidase 생산능 등을 조사하였다. 선별된 균주의 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성은 Bergey's manual of systematic bacteriology [Peter 등, 1986]의 실험법에 기초하여 조사한 후 분류 및 동정하였다.

GS-2의 API kit와 16S-rRNA sequencing 의한 동정. *Bacillus*의 동정에 사용되는 API 50 CHB kit (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하여 분리균주의 생리화학적 특성을 조사하였으며 API 50 CHB database V4.0을 이용하여 동정하였다. 그리고 GS-2균의 chromosomal DNA는 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI)를 이용하여 분리한 후 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG3')와 1492R (5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR 증폭[Yoo 등, 1996]한 다음, 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and clean-up system (Promega, Madison, WI)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물의 sequencing은 ABI PRISM 3700 DNA analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 GenBank의 ribosomal DNA sequence Date base와 비교하였으며, sequence의 상동성은 Clustal X와 Mega 2 program을 이용하여 비교분석하였다 [Thompson 등, 1994].

γ -PGA의 분리 및 정제. γ -PGA는 Goto & Kunioka [1992]와 Shih & Van [2001]의 방법을 응용하여 분리 및 정제하였다. 즉, culture broth를 동량의 증류수로 희석한 후 20,000 \times g에서 20분간 원심분리한 후 얻은 상정액에 6M HCl로 pH를 3.0으로 조절한 다음 4°C에서 12시간 정치시켰다. 그런 다음 이 상정액에 4배 volume의 cold EtOH를 첨가하여 4°C에서 하루 동안 정치시켰다. 그런 후 25,000 \times g에서 30분간 다시 원심분리한 후 침전체를 회수하였다. 침전체를 100~200배의 deionized water에 완전히 용해시킨 후 25,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 불순물을 제거하고 4°C에서 하루 동안 dialysis하여 salts를 제거하였다. 이것을 freezer dryer로 동결건조하여 pure γ -PGA를 회수하였다.

HPLC에 의한 γ -PGA의 hydrolysate의 확인. 정제된 γ -PGA의 hydrolysate를 분석하기 위하여 high performance liquid chromatography (HPLC SCL-10A, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 수행하였다. Column은 reverse phase ODS column

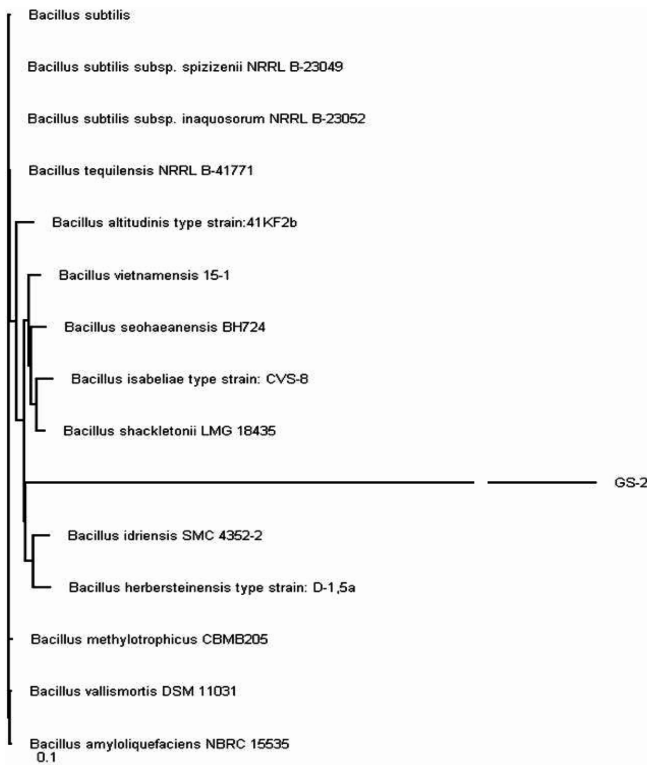


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences showing the positions of strain GS-2 isolated from Korean traditional *Cheonggukjang*.

분리균주의 동정. 분리균주의 고체배지 상에서의 특성은 glucose-nutrient agar 배지, skim milk 배지, LB 배지에서 균의 생장이 좋았으며, 이들 배지에서 집락은 유백색이었고, 집락 형태는 원형이었으며 불록하였다. 이외에 nutrient agar, potato dextrose agar, Endo-agar에서도 좋은 생장을 보였다.

분리균주의 생리적 특성을 검토한 결과, 이 균주는 그람 양성으로 endospore를 형성하였으며 rod type을 보였다. Catalase를 생성하였고 glucose, arabinose, xylose, mannitol 등의 당류로부터 산을 생성하였다. Anaerobic condition에서는 성장하지 않았고 Voges-Proskauer test에서 양성 반응을 보였다. Casein과

starch를 잘 분해하였으며 gelatin 액화능도 나타내었다. 또한 citrate utilization, nitrate reduction에서도 양성 반응을 나타내었으며 indole을 생성하였다. 균의 생장은 20, 30, 37°C에서 생장을 잘 하였으나 50°C에서는 생장이 미약하였고, 55°C에서는 전혀 성장하지 못 하였다(Table 1).

Bacillus sp. 동정 kit인 API 50 CHB의 판독 결과, 분리균주의 *B. subtilis*에 대한 identity가 99.7%로 나타났다. 형태 및 배양학적, 생리학적 특성 그리고 API kit를 이용하여 동정한 결과, 분리균주는 *B. subtilis*에 속하는 균주임이 확인되었다(Table 2). 또한 16S rRNA sequencing을 이용하여, 확인, 동정 결과 *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B 23049와 99.86%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1). 따라서 본 최종 선발 균주를 *B. subtilis* GS-2로 명명하였다.

γ -PGA의 용해도 측정. 분리균주 *B. subtilis* GS-2가 생산하는 γ -PGA의 여러 유기용매에 대한 용해도를 조사한 결과는 다음과 같았다. 즉, γ -PGA는 aqueous NaHCO_3 , H_2O , D_2O , DMSO, formaldehyde, formic acid, 5 N NaOH, 5 N HCl 등에는 침전물이 형성되지 않고 투명하게 잘 용해되었으며, benzene, chloroform, ethanol, methanol, acetaldehyde 등의 용매에서는 불용성의 상태로 침전되었다. Aqueous NaHCO_3 , formic acid, 5 N NaOH, 5 N HCl 등의 산과 염기에 대한 high solubility의 특성은 solubility control에 적용 가능할 것으로 보이며, 불용성의 용매에 대해 γ -PGA 자체적으로 용해되지 않는 특성은 chemical modification을 통해 solubility를 증가시킬 수 있을 것으로 보이며 γ -PGA의 application의 폭을 더 넓혀줄 수 있을 것으로 생각된다.

TLC에 의한 Hydrolysate의 분석. 정제된 γ -PGA의 hydrolysate를 TLC 분석한 결과[Francis 등, 2003]는 plate 상에는 단일한 amino acid만이 나타났으며 γ -PGA의 hydrolysate와 authentic glutamic acid의 Rf value가 일치하는 것으로 보아 정제된 γ -PGA는 glutamic acid로 이루어진 homopolymer로 생각된다. 또한, HPLC를 이용하여 정제된 γ -PGA의 hydrolysate를 분석한 결과, authentic glutamic acid (A)와 γ -PGA의 hydrolysate (B)의 peak가 같은 retention time에서 detection된 점으로 보아 정제된 γ -PGA의 hydrolysate는 glutamic acid임을 확인하였다(Fig. 2).

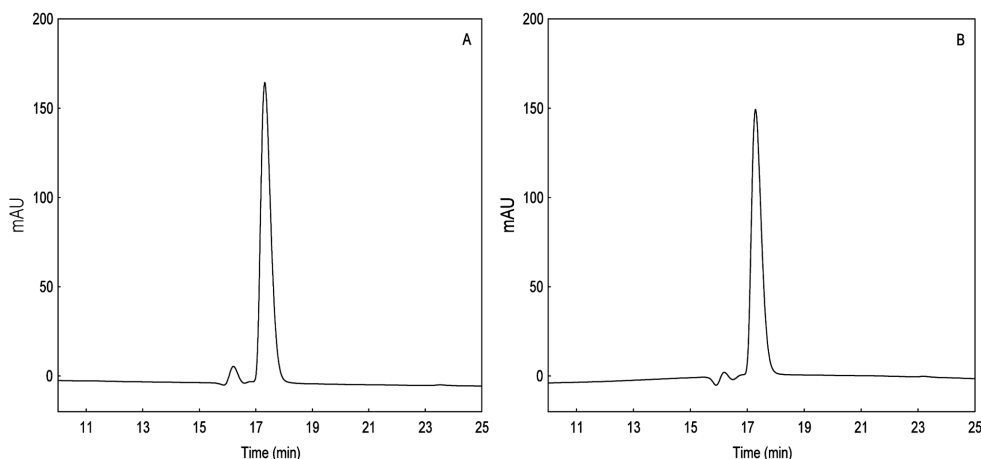


Fig. 2. HPLC chromatograms of hydrolysate of purified γ -PGA. A: authentic glutamic acid, B: hydrolysate of purified γ -PGA

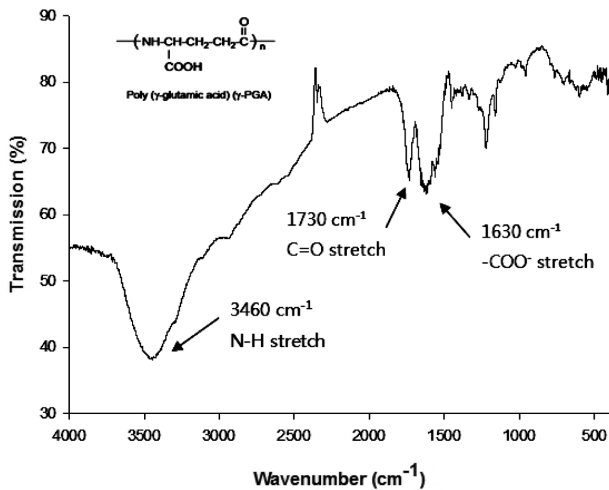


Fig. 3. FT-IR spectra of purified γ-PGA.

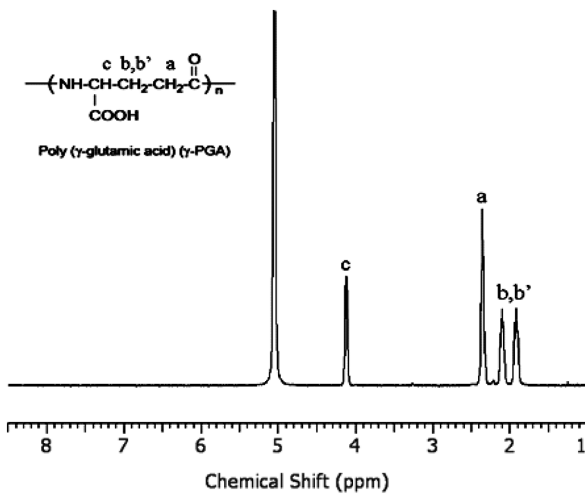


Fig. 4. ¹H-NMR spectroscopy of purified γ-PGA.

γ-PGA의 FT-IR spectra. 정제된 γ-PGA를 FT-IR 분석한 결과, γ-PGA의 carboxylic acid salt (-COO⁻ asymmetric stretch) peak (1630 cm⁻¹), C=O stretch peak (1730 cm⁻¹) 그리고 N-H stretch peak (3460 cm⁻¹)를 확인하였다(Fig. 3).

γ-PGA의 ¹H-NMR spectroscopy. 정제된 γ-PGA를 ¹H-NMR 분석한 결과, chemical shift 상에서 γ-PGA의 α-CH (c, 4.1 ppm), β-CH₂ (b, 2.1 ppm; b', 1.9 ppm), γ-CH₂ (a, 2.3 ppm)를 확인하였으며 다른 macromolecular impurities는 나타나지 않았다(Fig. 4).

초 록

Poly-γ-glutamic acid (γ-PGA)는 청국장이 발효할 때 생성되는 점질성 물질의 하나로, monomer glutamic acid의 α-아미노기와 γ-카르복실기 사이의 amide linkage에 의해 결합된 D(-)와 L(-) glutamic acid repeat units로 이루어진 homopolymer이다. 주로 *Bacillus* sp.에 의해 생산된다. γ-PGA는 수용성, 음이온성, 무독성, 생분해성, 생체적 합성, 식용 등의 다양한 특성을 가지

고 있기 때문에 여러 분야에서 응용되고 있다. 본 실험에서 γ-PGA를 생산하는 균주를 우리나라의 전통발효식품인 청국장으로부터 분리하였다. 분리균주의 형태 및 배양학적, 생리학적 특성, API kit 및 16S rRNA 서열을 사용하여 동정한 결과, 분리균주 GS-2는 *B. subtilis*와 가장 유사하여 *B. subtilis* GS-2로 명명하였다. 분리·정제된 γ-PGA의 동정은 TLC, HPLC, FT-IR 그리고 ¹H-NMR spectroscopy를 통하여 확인하였다.

Key words: *Bacillus subtilis*, poly(γ-glutamic acid), 청국장

참고문헌

Back LM, Park LY, Park KS, and Lee SH (2008) Effect of starter cultures on the fermentative characteristics of Cheonggukjang. *Kor J Food Sci Technol* **40**, 400-405.

Borbely M, Nagasaki Y, Borbely J, Fan K, Bhogle A, and Sevoian M (1994) Biosynthesis and chemical modification of poly(γ-glutamic acid). *Polymer Bull* **32**, 127-132.

Bovarnick M (1942) The formation of extracellular D(-)glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J Bio Chem* **145**, 415-424.

Cheng C, Asada Y, and Asada T (1989) Production of γ-polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* A 35 under denitrifying conditions. *Agric Biol Chem* **53**, 2369-2375.

Choi HJ, Yang R, and Kunioka M (1995) Synthesis and characterization of pH-sensitive and biodegradable hydrogels prepared by γ-irradiation using microbial poly(γ-glutamic acid) and poly(ε-lysine). *J Appl Polym Sci* **58**, 807-814.

Francis F, Sabu A, Madhavan Nampoothiri K, Ramachandran S, Ghosh S, Szakacs G, and Pandey A (2003) Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α-amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochem Eng J* **15**, 107-115.

Goto A and Kunioka M (1992) Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ-glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**, 1031-1035.

Gu NY, Kim CH, Kim BW, Nam SW, Kwon HJ, Kim DE, Kim YM, and Jeon SJ (2006) Study on production of poly-γ-glutamic acid by *Bacillus subtilis* CH-10. *Korean J Life Sci* **16**, 176-179.

Hara T and Ueda S (1982) Regulation of polyglutamate production in *Bacillus subtilis*(natto); transformation of high PGA productivity. *Agric Biol Chem* **46**, 2275-2281.

Ito Y, Tanaka T, and Asada Y (1996) Glutamic acid independent production of poly(γ-glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**, 1239-1242.

Markland P, Amidon GL, and Yang VC (1999) Modified polypeptides containing γ-benzyl glutamic acid as drug delivery platforms. *Int J Pharm* **178**, 183-192.

Oh SM, Jang EK, Seo JH, Ryu MJ, and Lee SP (2007) Characterization of γ-polyglutamic acid produced from the solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus* sp. *Food Sci Biotechnol* **16**, 509-514.

Peter HAS, Nicholas SM, Sharpe ME, and Holt JG (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. II. p 1104-1139.

Shih IL and Van YT (2001) The production of poly(γ-glutamic acid) from microorganism and its various applications. *Bioresour Technol* **79**, 207-225.

- Taiki S, Tatsuo K, Takeshi S, and Mitsuru A (2004) Preparation and thermosensitivity of naturally occurring polypeptide poly(γ -glutamic acid) derivatives modified by propyl groups. *Macromol Biosci* **4**, 407-411.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, and Clustal W (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* **22**, 4673-4680.
- Thorne CB, Gomez CG, Noyes HE, and Housewright RD (1954) Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **68**, 307-315.
- Yoo Jh, Lee ST, and Park YH (1996) Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of genus nocardioidea and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 187-194.