

Screening of Non-Biogenic-Amine-Producing *Bacillus subtilis* and Medium Optimization for Improving Biomass by the Response Surface Methodology

Hee-Jong Yang^{1†}, Su-Ji Jeong^{1†}, Seong-Yeop Jeong^{1,2}, Ju-Hee Heo¹, Nack-Shick Choi² and Do-Youn Jeong^{1*}

¹Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 595-804, Korea

²Department of Biochemistry and Health Science, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

Received January 14, 2016 / Revised March 22, 2016 / Accepted April 28, 2016

Biogenic amines are produced primarily by microorganisms found in fermented foods and are often implicated in poisoning incidents in humans. In this study, 620 strains of microorganisms were isolated from traditional Korean fermented food in Sunchang in order to screen for non-biogenic-amine-producing microorganisms present in these foods. One strain was identified and named *Bacillus subtilis* SCJ1, by using 16S rRNA sequencing and biochemical characterization. We investigated the cell growth of this organism in order to understand its potential for industrial application. To this end, we optimized the culture medium constituents by using the response surface methodology. The Plackett-Burman experimental design was used for screening of the medium constituents, such as molasses, yeast extract and peptone, for improving cell growth. In order to determine the optimal concentration of each constituent, we used a central composite design. Consequently, the optimized concentrations of molasses, yeast extract and peptone were predicted to be 27.5 g/l, 7.5 g/l and 17.5 g/l, respectively. By model verification, we confirmed that a 1.49-fold increase in dry cell weight compared to the basal medium-from 1.32 g/l, to 1.9722 g/l-was achieved.

Key words : *Bacillus subtilis*, biogenic amine, biomass, optimization, response surface methodology

서 론

한국인의 식탁에 장류는 필수적인 식 재료이기 때문에 식품으로서의 안전성 확보는 무엇보다도 중요한 요소 중 하나이다. 현재 전통 방식으로 제조되는 장류의 발효과정에서 식품 안전을 좌우하는 가장 큰 3가지 요인은 *Bacillus cereus* 계열이 생산하는 장 및 구토 독소, *Aspergillus flavus*나 *A. parasiticus*가 생산하는 aflatoxin, 발효 미생물들에 의해 생산되는 생체 아민 등으로 요약된다. 이 중 생체 아민은 최근 식품의 안전성 측면에서 단백질을 함유한 발효식품 중에 생체 아민의 분포와 함량 조사에 대한 연구가 수행되면서 문제점으로 나타나고 있다 [4]. 생체 아민류는 지방족(putrescine, cadaverine, spermine, spermidine), 방향족(tyramine, phenylethylamine), 헤테로 고리구조(histamine, tryptamine)를 가진 형태로 되어 있으며 [32], 동물, 식물, 미생물에서 아미노산의 탈탄산 반응에 의해 생성되며, 특히 탈탄산효소(decarboxylase) 생산 미생물에 의

해 고단백질 식품이 부패하거나 발효 및 숙성 과정에서 생성되며, 체내에서 중추신경의 신경전달물질 또는 간접적인 혈관계 조절 등에 관여한다[34]. 특히, 생체 아민 중 histamine의 과잉 섭취시 혈압강하와 알레르기, tyramine은 혈압 상승 및 두통, cadaverine과 putrescine은 장에서 강한 발암물질인 nitrosamines, nitrosopiperidine, nitrosopyrrolidine을 생성할 수 있다[2, 10, 14]. 따라서 국내에서는 생체 아민의 저감화를 위하여 감마선 조사[16], pH, 온도와 NaCl의 농도에 따른 영향 조사[6], 스타터를 통한 저감화 연구[5] 등 식품 내 생체 아민에 관한 다양한 연구가 진행되는 추세이나, 비생성 미생물에 대한 연구는 아직까지 미비한 실정이다.

전통 장류의 발효과정에서 *Aspergillus* 속과 함께 발효에 주 역할을 하는 *Bacillus* 속은 발효에 관여하는 많은 세균 군집 중 가장 우점을 하고 있는 미생물로써[18], *Bacillus* 속의 일부 균주들은 넓은 항균 스펙트럼과 다양한 구조를 지니는 펩티드 항생물질을 생산하는 특성을 갖고 있으며, 이들이 생산하는 항생물질은 ribosomal과 non-ribosomal 항생물질로 분류할 수 있다[22]. 또한, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* 등의 미생물은 전통 장류의 발효과정 중에 다양한 효소에 의해 단백질과 같은 고분자 물질을 분해하여 맛과 향기에 영향을 준다고 보고되었다[17]. *Bacillus* 속은 amylase와 protease, cellulose, glucosidase 같은 상업적으로 중요한 효소를 생산하는 균으로 널리 알려져 있으며[38], 현재까지 효소를 생산하는 수

†Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-63-653-9579, Fax : +82-63-653-9590

E-mail : jdy2534@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

많은 미생물 중에서도 안전한 생물자원으로 인정을 받고 있는 GRAS (generally recognized as safety)에 속해있어 50년 이상 산업적으로 사용되어온 생물 자원으로 미국, 일본 등 여러 나라에서 프로바이오틱스 상품으로 시판되고 있다[9]. 하지만 전통 장류의 발효 과정에서 주로 *Bacillus*, *Aspergillus*, Lactic acid bacteria 및 효모들의 복합적 대사과정으로 이루어져 있어 여러 종의 미생물의 상호 작용에 의하여 발효가 이루어지기 때문에 생체 아민이 생산되기에 적절한 조건을 갖추게 된다[19]. 따라서 다양한 가능성을 갖지만 생체 아민과 같은 유해물질도 생산하는 역할을 하기 때문에 많은 산업 분야에 응용을 위해서는 자연계에 존재하는 미생물 중 중에서 실제 분리 되어 사용되는 1%의 종을 제외한 새로운 종의 선별을 통하여 안전성 및 기능성이 확보되어 실생활에 응용이 가능한 기능성 미생물의 선별이 매우 절실하다.

*B. subtilis*이 산업에 이용되기 위해서는 대량생산을 위한 최적배지 조성의 확립과 손쉬운 배양 조건이 필수요소이며, 배지성분은 균체 생산성에 직결되고 각 배지 성분의 농도와도 매우 밀접한 관련이 있다[11]. 기존의 대량생산을 위한 최적화 공정은 하나의 배지성분을 여러 수준으로 놓고 나머지 배지성분들의 농도를 고정시켜 실험하는 방법을 주로 이용해왔으나, 이 방법은 주어진 조건에서 특정 성분의 영향을 파악할 수 있는 장점을 갖지만 다른 요소와의 상호작용에 의한 결과 즉, 다른 성분들의 조건이 변하면 그 결과의 예측이 어려운 단점을 갖고 있다. 반응표면분석법(Response surface methodology, RSM)은 여러 개의 인자가 상호작용을 하는 경우 원인 보다는 결과에 근거하여 최적점을 찾는 통계방법으로 최적 배지조성 확립과 배지 성분 간의 상호관계를 확인하는데 적합한 방법이다. 이러한 장점을 지니기 때문에 최적배지 조건과 배지성분간의 상호관계를 통하여 생산성을 증가시킬 수 있으며, 복잡하고 번거로운 공정을 간소화할 수 있고, 산업화 공정에서의 비용 절감 효과를 지니기 때문에 발효공학 분야에서는 최근 최적조건을 확립하는 연구에 종종 응용되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 순장균 전통 발효식품으로부터 다양한 가능성을 가지며, 인체에 유해한 물질인 생체 아민을 생성하지 않는 토종발효 미생물을 선별하고, 특성을 조사하며, 통계학적 기법인 반응표면분석법을 이용하여 선별 분리주의 산업화를 위한 최적의 배지조성을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물의 분리 및 배양

본 연구에서 사용한 균원시료(고추장, 된장, 메주, 간장 시료)는 전라북도 순창군 11개 면의 일반 가정집에서 2014년도에 제조된 장류 200여 종을 수집하여 사용하였고, 수집한 시료 1 g을 0.85% 멸균 NaCl용액 9 ml에 현탁하여 각 단계별로 희석한 후 Luria-bertani agar (LB, Difco™, MI, USA)배지에

100 µl 도말하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양한 미생물의 형태적 차이를 이용하여 콜로니를 1차 선별하였고, 다시 순수 배양하여 미생물을 선별하였다.

생체 아민 생성능 조사

분리한 미생물에 대하여 생체 아민의 생성여부는 Chang과 Chang의 방법[3]에 준하여 측정하였으며, 검출용 고체 배지는 0.25% glycerol (Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan), 0.006% bromocresol purple (BCP, Sigma-aldrich, MO, USA), 0.1% histidine과 tyrosine (Sigma-aldrich, MO, USA)이 함유된 LB agar (pH 7.0) 배지를 제조하여 사용하였다. 균체는 멸균 증류수로 3회 세척하여 8 mm ADVANTEC paper disc (Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)에 10 µl씩 분주한 후 37°C에서 24시간 배양한 후 대조구인 일반 LB 배지와 발색 정도에 따라 생체 아민의 생성여부를 확인하였다. 또한, 선별 분리주를 대상으로 생체 아민 정량 실험은 LB 액체 배지에 각 분리 미생물을 접종한 후 30°C shaking incubator (VS-1203P3V, Vision Scientific Co. Ltd., Daejeon, Korea) 150 rpm에서 24시간 전배양한 후 전배양액 1 ml을 전구체 0.1% histidine과 tyrosine이 포함된 LB 액체 배지 9 ml에 접종하고 37°C shaking incubator 150 rpm에서 24시간 동안 본배양 하였다. 본 배양액은 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 균체가 제거된 상등액을 생체 아민 분석을 위한 전처리 시료로 사용하였다. 전처리 시료용액과 표준용액을 각각 0.5 ml 취한 후 0.25 µl 1,7-diaminoheptane (Sigma-aldrich, MO, USA)와 0.25 ml 포화 Na₂CO₃ 용액(Sigma-aldrich, MO, USA), 1% acetone (Sigma-aldrich, MO, USA), 0.4 ml dansyl chloride (Sigma-aldrich, MO, USA)을 혼합한 후 45°C에서 1 시간 동안 유도체화 하였다. 유도체화한 시료에 0.25 ml의 10% proline (Sigma-aldrich, MO, USA)을 가한 후 여분의 dansyl chloride를 제거한 뒤 2.5 ml의 ethyl ether (Samchun, Seoul, Korea)를 가하여 3분간 진탕한 후, 분리된 상등액을 취하여 증발시키고 남은 잔사를 0.5 ml acetonitrile (Mallinckrodt J. T. Baker, Phillipsberg, NJ, USA)에 정용하여 0.45 µm syringe filter (Sartorius, Frankfurt, Germany)로 여과한 것을 분석에 사용하였다. 생체 아민의 분석을 위한 기기 분석 조건은 Jakszyn와 Gonzalez의 방법[13]을 따라 조사하였다.

세포의 효소 활성 측정

전통식품 유래 미생물이 균체외(exo-type)로 방출하는 효소 중 protease와 cellulase의 활성 검증은 각 효소와 특이적으로 반응하는 기질이 포함된 고체 선별배지를 이용하여 well diffusion 방법으로 조사하였다. 분리한 미생물의 각 배양 상등액을 0.45 µm syringe filter (Sartorius, Frankfurt, Germany)로 제균한 뒤 100 µl씩을 8 mm의 준비한 well에 접종하여 25°C에서 24시간 반응시킨 후 억제환을 측정하였다. Protease 분비능

은 Vermelho 등의 방법[36]에 따라 2% skim milk (Difco™, MI, USA)에 1.5% agar (Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 첨가하여 분리균의 배양 상등액을 접종한 후 억제환을 관찰하였고, cellulase 분비능은 Teather와 Wood의 방법[35]에 따라 1% carboxymethyl cellulose (CMC, Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)에 1.5% agar를 첨가하여 분리균의 상등액을 접종한 후 0.1% congo red (Sigma-aldrich, MO, USA)로 염색하고, 1 M NaCl (Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd., Siheung, Korea)로 세척한 뒤 억제환을 관찰하였다.

항균 활성 측정

각각의 장류로부터 분리한 미생물들의 항균력을 조사하기 위해 각각의 분리주는 LB 액체 배지에 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 0.45 µm syringe filter (Sartorius, Frankfurt, Germany)로 여과시킨 후 0.8% soft agar plate를 이용한 well diffusion 방법[24]에 준하여 100 µl씩을 8 mm의 준비한 well에 접종한 후 30°C에서 24시간 배양하여 well 주변에 억제환의 형성유무를 확인하였다. 항균력 측정을 위한 지시 균주로 Gram 양성균 *Micrococcus luteus* KCTC 1056, *Listeria monocytogenes* KCCM 40307, KCTC 3710, *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCCM 41446, *Bacillus cereus* KCTC 1661, KCTC 3624 등 7종과 Gram 음성균 *Escherichia coli* KCCM 11596, KCTC 2443, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* KCCM 40763, *Salmonella typhimurium* KCTC 1926, *Shigella flexneri* KCCM 40948, *Shigella sonnei* KCTC 2518 등 6종을 한국미생물보존센터(KCCM)과 생명공학연구원 미생물자원센터(KCTC)에서 분양 받아 사용하였다. 각 배양 배지에서 배양한 지시 균주를 균일한 농도(O.D.₆₅₀, 0.4)로 앞선 0.8% soft agar에 접종하여 항균활성 측정을 위한 배지를 제조하였다.

분리 미생물의 동정 및 phylogenetic tree 작성

최종 선별 균주의 생화학적 특성은 API 50 CHB kit (Bio-mérieux, Marcy-L'Etoile, France)를 이용하여 분석하였다. 분리 균주를 지시약이 포함된 kit medium에 현탁하여 strip에 분주한 후 24~48시간 동안 배양하여 당 발효능을 측정된 후 균주 동정 프로그램(<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 확인하였다. 최종적인 선별 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 염기서열을 결정하여 알려진 균주들과 비교를 하였다. 염기서열은 BLASTN 프로그램을 이용하여 GeneBank에 등록된 염기서열들과 비교하였으며, EzTaxon-e 서버(<http://www.eztaxon.org>)를 통해서 다운로드 받아 표준 균주의 16S rRNA 염기서열을 얻은 다음 염기 서열들 간의 상호 비교는 Clustal W 2.0 program을 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S

rRNA 유전자 염기서열을 정렬하고 MEGA 3.0 program [20]을 사용하여 계통도를 작성하였다. 계통도의 작성은 염기서열의 정렬에서 정보량을 가장 간단한 형태로 만들어 데이터 분석 및 다루기가 쉽고 빠른 Neighbor-joining 알고리즘[29]을 사용하였고 1,000회 반복으로 bootstrapping 하여 계통도의 견고성을 확인하였다.

배양 시간에 따른 균체 성장 조사

선별한 균주의 배양시간에 따른 생육 정도를 조사하기 위하여 LB 액체 배지에 5% 분리균을 접종한 다음 72시간 동안 150 rpm, 30°C shaking incubator에서 배양하였고, 4시간 단위로 배양액을 회수하여 건조 균체량(DCW, dried cell weight), 흡광도를 측정하여 분리균의 생육곡선을 작성하였다. 흡광도는 4시간 간격으로 회수한 배양액 1 ml을 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 후 멸균 증류수로 3회 세척하고, 멸균 증류수 1 ml에 재부유 하여 UV/VIS spectrophotometer (SPECORD 200, Analytic jena) 600 nm에서 측정하여 기록하였다. 건조 균체량의 측정은 4시간 간격으로 배양액 10 ml을 회수하여 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 후 멸균 증류수로 3회 세척하여 80°C에서 항량이 도달할 때까지 건조한 후 균체의 무게를 측정하였다.

최적 배지 성분의 선별을 위한 Plackett-Burman design

SCJ1의 균체 성장 증가를 위한 배양 조건의 최적화를 수행하기 위해 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)를 실시하였다. 먼저 다양한 배지 조성 성분 중 SCJ1의 균체 성장에 가장 영향력이 있는 성분을 선별하기 위하여 선행 연구를 통해 선별한 11개의 배지 성분 중 주 효과가 있는 3개의 성분을 선별하기 위한 방법으로 2수준 일부 실시 실험 계획법 중 하나인 Plackett-Burman design (PBD)을 이용하였다. 균체 성장을 위한 배지 성분에 대한 모델의 변수와 수준은 Table 1에 나타내었으며, 균체 성장에 영향을 줄 수 있는 변수로는 탄소원 5종(glucose, fructose, molasses, lactose, mannitol), 질소원 3종(yeast extract, tryptone, peptone), 기타 미량 원소로 3종(NaCl, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄)을 설정하였다. 실험의 초기값 선별을 위한 모델로 3개의 중심점을 포함한 15개의 실험구(Run)를 구성하였으며, 각각의 성분의 2가지 수준, 즉 높은 수준(+1)과 낮은 수준(-1)으로 나누어 실험에 적용하였다. 모든 실험구는 3회 반복 측정을 통하여 수행하였고, 실험 계획, 데이터 분석과 최적화 분석은 Design expert 9.0 (Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) 프로그램을 사용하였다.

중심합성계획법을 통한 배지 성분 농도의 최적화

Plackett-Burman design을 통하여 선별된 배지성분의 최적 농도를 결정하기 위해 배지 성분의 각각의 농도 변화가 균체

Table 1. Range of different variables for the Plackett-Burman design and results for dried cell weight using factors

Factor	Symbol (unit)	Coded values		
		-1	0	+1
Glucose	X ₁ (g/l)			
Fructose	X ₂ (g/l)			
Molasses	X ₃ (g/l)	5	10	15
Lactose	X ₄ (g/l)			
Mannitol	X ₅ (g/l)			
Yeast extract	X ₆ (g/l)			
Tryptone	X ₇ (g/l)	3	8	13
Peptone	X ₈ (g/l)			
NaCl	X ₉ (g/l)			
MgSO ₄	X ₁₀ (g/l)	0.2	0.4	0.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	X ₁₁ (g/l)			

Runs	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	Response ^a Y (g/l)
1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1.07
2	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	0.885
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.99
4	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1.14
5	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1.31
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1.245
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1.0
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1.49667
9	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1.04333
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1.16667
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.02667
12	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1.45
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.05667
14	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1.39
15	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.19

Dried cell weight by *Bacillus subtilis* SCJ1 cultivated at 150 rpm, 30°C for 28 hr. The experiments were carried out in triplicate. ^aResponse were dried cell weight from *Bacillus subtilis* SCJ1.

생산에 미치는 영향을 중심합성계획법(CCD, central composite design)을 이용하여 분석하였다. 앞선 연구를 통해 선별된 독립변수로는 molasses (g/l, X₁), yeast extract (g/l, X₂), peptone (g/l, X₃)을 설정하였으며, PBD 실험계획을 기반으로 중심값과 실험범위를 각각 -2, -1, 0, 1, 2로 설정하여 5단계로 부호화하고 17개의 실험계획으로 이루어진 중심합성계획법을 실시하였다. 또한, 독립변수의 영향을 받는 종속변수(Y, 균체량)를 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다. 중심점 3회를 포함한 3회 반복실험을 실시하여 평균값을 회귀분석에 사용하였으며, 이때의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀 모형식은 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1 X_1 + \beta_{21} X_2 X_1 + \beta_{22} X_2 X_2 + \beta_{31} X_3 X_1 + \beta_{32} X_3 X_2 + \beta_{33} X_3 X_3$$

여기에서 Y는 종속변수이며, X₁, X₂, X₃은 독립변수, β₀은 절편, β_X는 회계계수이다. 실험을 통해 얻은 결과는 Design Expert 9.0 (Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA)

을 사용하여 회귀분석에 의한 모델식을 예측하였으며, 분산분석(ANOVA, analysis of variance)을 통해 유의성을 검토하였다. 또한, 각 배지 성분 간의 상호영향을 분석하고, 이 결과를 바탕으로 하여 최대 균체 생산을 위한 각 배지성분의 최적농도를 결정하였다.

결과 및 고찰

생체 아민 비생성 균주의 분리

토종 발효 미생물의 분리를 위하여 사용한 균원 시료로는 순창군의 일반 가정집에서 제조한 장류 약 200여 종을 수집하여 사용하였다. *Bacillus* 속 미생물은 주로 메주, 청국장 발효에 이용되는 미생물로 알려져 있으며, 그 유용성과 안전성이 이미 널리 알려져 있고, 다수의 *Bacillus* 속 미생물의 특징 중 하나로 넓은 항균 스펙트럼을 가지고 있어[25], 다양한 장류로부터 *Bacillus* 계열의 미생물을 분리하기 위하여 먼저 수집한

각 시료를 취해 균질화한 후 1 g을 취하여 멸균 증류수에 현탁하고 단계 희석법을 이용하여 균주를 배양한 후 육안으로 colony의 형태, 크기 등의 형태학적 특징에 따라 620여 종의 미생물을 분리하였다. 정성 실험을 통한 생체 아민 비생성 균주의 1차 선별을 위하여 생체 아민 검출용 고체배지를 이용하여 진행하였고, 그 결과 620여 종의 분리주 중 203종의 분리주가 생체 아민을 생성하지 않음을 확인하였다(data not shown). 따라서 203종의 분리주를 대상으로 LB 액체배지에 접종하여 2일간 배양한 후 균체를 다음 연구를 위해 4°C에서 보관하여 사용하였다.

세포외 효소 분비능이 우수한 균주 선별

장류 발효에 관여하는 대표적인 균주로는 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. citreus* 등이 알려져 있으며, 이들은 발효과정에서 protease, amylase, cellulase, lipase와 같은 미생물의 다양한 효소에 의해 amino acid, free sugar, isoflavone, aglycone, fatty acid 등으로 분해되어 풍미뿐만 아니라 다양한 기능성을 갖는 2차 산물이 생성된다고 알려져 있다[26, 27]. 따라서 앞서 선별한 203종의 분리주를 대상으로 세포외 효소 활성을 측정 한 결과 86종의 분리주에서 protease 및 cellulase 2가지 효소를 모두 생성하는 것을 확인하였다(data not shown).

분리 균주의 항균 활성

앞서 선별한 분리주 86종을 대상으로 병원성 미생물에 대한 항균활성을 Gram 양성균 7종과 음성균 6종을 대상으로 조사하였다. 총 13종의 병원성 미생물에 대하여 항균 활성을 측정 한 결과 대부분 1종 이상의 유해 미생물에 대하여 항균활성을 지니고 있었으며, 특히 Table 3에 제시된 Gram 양성균인 *L. monocytogenes* KCCM 40307, *L. monocytogenes* KCTC3710, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444, *M. luteus* KCTC1056, *B. cereus* 1661, *B. cereus* 3624에 대한 저해 활성과 Gram 음성균인 *S. typhimurium* KCTC 1926 7종의 병원성 미생물에 대하여 가장 많은 종류의 분리주에서 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 분리주 중에서도 SCJ1, SCJ3, SCJ34, SCJ123, SCJ287, SCJ305, SCJ520, SCJ555, SCJ587 등 9종이 다양한 항균 spectrum을 지니고 있었으며, 저해 효과 또한 우수하였다. 특히 앞선 9종의 분리주 대부분의 항균활성이 Gram 양성균에 집중되어 있으므로 세균이 생산하는 항균 물질인 subtilin, subtilisin A와 같은 bacteriocin이 근연 관계의 종에 저해 활성을 나타내는 특성과 유사함을 확인하였다[1, 12]. 분리주 중 SCJ1은 7종의 병원성 미생물에 대하여 가장 우수한 활성을 보였으며, *L. monocytogenes* KCCM 40307, KCTC 3710과 *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444와 같은 *Listeria*에 강한 항균활성을 나타내었고, 따라서 저온성 병원 미생물의 성장 억제에도 효과적인 것으로 예상되었다. 전통 장류 발효 및 식품 제조에

Table 2. Range of different variables for the central composite design and results for dried cell weight using factors

Factor	Symbol (unit)	Coded values				
		-2	-1	0	+1	+2
Molasses	X ₁ (g/l)	5	12.5	20	27.5	35
Yeast extract	X ₂ (g/l)	2.5	7.5	12.5	17.5	22.5
Peptone	X ₃ (g/l)	2.5	7.5	12.5	17.5	22.5
Runs	X ₁	X ₂	X ₃	Response ^a , Y (g/l)		
1	-2	0	0	1.18333		
2	-1	1	-1	1.32333		
3	1	1	-1	2.18333		
4	1	1	1	2.21667		
5	2	0	0	2.48		
6	-1	-1	-1	1.07333		
7	0	0	-2	1.4		
8	1	-1	-1	2.06333		
9	0	0	0	1.26667		
10	0	0	0	1.27		
11	0	2	0	1.55		
12	-1	1	1	1.40333		
13	-1	-1	1	1.075		
14	0	0	2	1.41667		
15	0	0	0	1.235		
16	0	-2	0	1.33		
17	1	-1	1	2.26333		

Dried cell weight by *Bacillus subtilis* SCJ1 cultivated at 150 rpm, 30°C for 28 hr. The experiments were carried out in triplicate. ^aResponse were dried cell weight from *Bacillus subtilis* SCJ1.

다양한 항균 spectrum을 갖는 미생물의 사용은 식품 제조업체에서의 오염에 대한 문제 해결에 유용할 것으로 보이며, 천연 식품 보존제나 사료보존제로서 뿐만 아니라 새로운 항생제 대체 의약소재로의 응용이 가능함을 보여주었다.

선별 균주의 amine 생성능 분석

국내 전통 발효식품 대부분 단백질이 풍부한 콩을 원료로 사용하고 있으며, 식품에 존재하는 미생물들은 protease 활성이 우수하기 때문에 유리 아미노산이 원인이 되는 생체 아민의 생성에도 영향을 주고 있어, 장류와 발효식품에 있어서 최근에는 생체 아민의 안정성 측면에서의 문제점이 대두되고 있는 실정이다. 생체 아민은 N-nitrosamine과 같은 발암물질로 전환될 수 있는 잠재적인 위험성을 갖고 있는 물질이며[31], 다량 섭취 또는 amine 대사과정이 저해 또는 결핍이 된 경우에는 사람이나 동물의 체내에서 독성을 나타내기도 한다[7]. 특히 대두를 발효하여 제조한 장류 식품의 경우 생체 아민 중에서 histamine과 tyramine의 함량이 높은 것으로 보고되고 있다[8]. 따라서 선별한 균주를 생체 아민의 전구체인 histidine, tyrosine이 함유된 액체배지에 배양하여 해당 아미노산에 대한 탈탄산 활성능과 균주가 생성한 histamine, tyramine의 함량을 측정하여 Table 3에 나타내었다. 선별한 9종의 균주 대부분 앞선 정성분석 결과와 동일하게 생체 아민을 생성하지 않는 것으로 분석되었고, 일부 균주에서는 생체 아민이 검출이 되었으나 정량이 되지 않는 매우 낮은 수준의 검출로 인해

에 유해하지 않은 수준을 나타내었다. 따라서 앞선 결과들을 바탕으로 세포의 효소활성, 항균활성, 생체 아민의 생성능 모두에서 가장 우수한 결과를 보여준 SCJ1 균주를 최종선별 하였다.

유용 균주의 동정

최종 선별한 SCJ1 균주의 동정을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였으며, 결과를 기반으로 BLAST search 결과 SCJ1은 *Bacillus subtilis*로 판명되었으며, 염기서열을 이용하여 Eztaxon server에서 표준 균주와 상동성을 분석한 결과 SCJ1 (1262 bp)는 *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633^T (NR118486), *B. subtilis* DSM 10^T(AJ276351)과 각각 97%의 유사성을 나타내었으며, Sequence alignment 분석에 사용한 parameter 및 option 값으로는 protein weight matrix로 Gonnet series를 사용하였으며, GAP (Gap opening) 15, GEP (Gap extension 6.66, delay transition weight 0.5로 설정하였으며, Gap penalty 5, K-tuple size 2, Top diagonals 4, window size 4로 설정하여 sequence alignment 분석을 실시하였다. 16S rRNA 염기서열을 토대로 하여 phylogenetic tree를 작성하기 위한 evolutionary distances의 추론은 maximum composite Likelihood 방법을 nucleotide substitution 모델로 사용하였다 (Fig. 1). Seki 등[30]의 보고에 따르면 *Bacillus* 속은 다양한 환경속에서 포자를 형성하여 생존할 수 있는 능력을 지녀 환경에 따라 종 다양성이 매우 큰 세균으로 분류되며, 16S rRNA

Table 3. Comparison of enzyme activity, antibacterial activity and contents of the biogenic amine for selected strains

Test contents		Selected strains								
		SCJ1 (<i>B. subtilis</i>)	SCJ3 (<i>B. subtilis</i>)	SCJ34 (<i>B. subtilis</i>)	SCJ123 (<i>B. subtilis</i>)	SCJ287 (<i>B. subtilis</i>)	SCJ305 (<i>B. subtilis</i>)	SCJ520 (<i>B. subtilis</i>)	SCJ555 (<i>B. subtilis</i>)	SCJ587 (<i>B. subtilis</i>)
Enzyme activity (mm) ^a	Protease	15	11	12	13	14	12	10	12	13
	Cellulase	w ^c	13	13	13	11	12	14	11	10
Antimicrobial Activity (mm)	TS1 ^b	10	-	8	-	8	-	7	-	8
	TS2	10	-	-	9	10	12	-	11	9
	TS3	10	9	-	-	-	-	-	-	-
	TS4	15	12	7	-	7	-	9	10	9
	TS5	- ^d	-	-	10	11	9	-	7	-
	TS6	10	7	10	7	8	11	10	-	9
	TS7	11	-	-	-	-	-	10	7	-
Biogenic amines (mg/l)	Histamine	N.D. ^e	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.
	Tyramine	N.Q. ^f	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.

^aSize of clear zone (diameter).

^bTested strains = TS1: *L. monocytogenes* KCCM 40307, TS2: *L. monocytogenes* KCTC 3710, TS3: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444, TS4, *S. typhimurium* KCTC 1926, TS5: *M. luteus* KCTC 1056, TS6: *B. cereus* KCTC 1661, TS7: *B. cereus* KCTC 3624.

^cNo formation of clear zone.

^dw-weak response.

^eNot detected.

^fNot quantified.

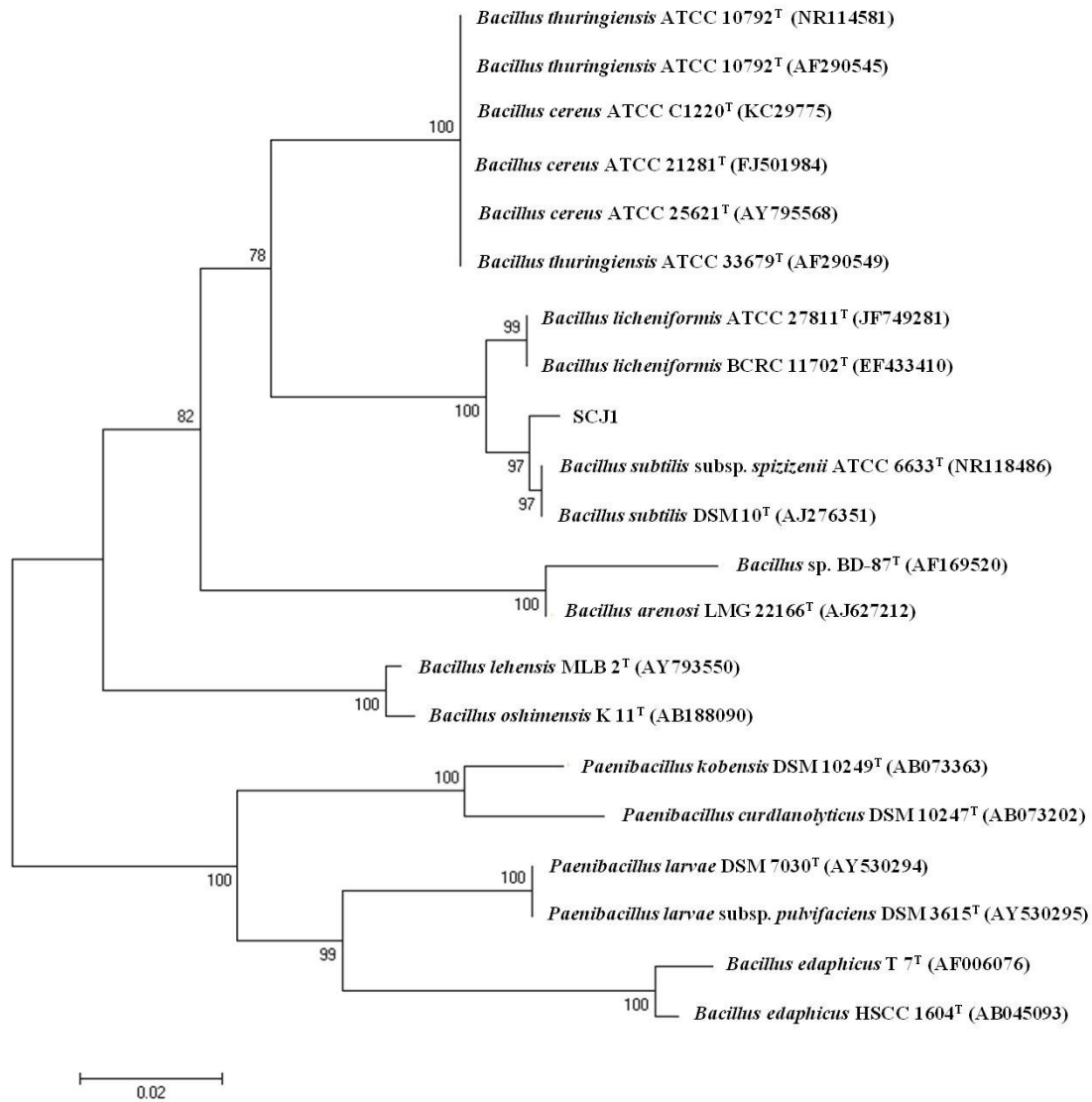


Fig. 1. Phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequence of strain SCJ1. All the sequences used here were from *Bacillus* type strains. *Bacillus* species and other related bacteria, based on 16S rRNA sequences. GenBank accession numbers are given in parentheses. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values are expressed as percentages of 1,000 replicates.

염기서열에서 100%의 상동성을 나타내어도 서로 다른 종으로 분류될 수 있기 때문에 추가적으로 API 50CH kit을 사용하여 SCJ1의 당 대사능을 조사하였다. 당 대사능 조사 결과는 Table 4와 같으며, glycerol, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-mmitol 등을 발효할 수 있는 능력을 지니나 erythritol, D-arabinose, xylose 등에는 비 발효성을 나타내면서 SCJ1 균주는 98.0%의 유사율로 *B. subtilis*로 동정되어 앞선 16S rRNA 염기서열 분석결과와 일치함을 확인하였으며, 최종적으로 *Bacillus subtilis* SCJ1로 명명하였다. SCJ1은 한국 미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 *Bacillus subtilis* KCCM 11568P로 기탁하였다.

배양시간에 따른 균체 성장

B. subtilis SCJ1의 성장 곡선을 조사하기 위해 LB 액체배지에 접종하여 30°C에서 72시간 동안 배양하였으며, 4시간 간격으로 흡광도와 건조 균체량을 측정하였다. 0~8시간 까지 균체가 급속도로 성장하는 대수기를 나타냈으며, 8~28시간까지 증식이 점차 느려져 28시간 이후에는 정지기에 들어갔다. 배양 28시간에서 흡광도 1.4001(O.D₆₀₀)과 1.32 g/l의 건조 균체량으로 가장 높은 세포성장을 보여 일반적으로 *B. subtilis*의 세포 성장이 28시간 이내에 정지기에 도달한다는 보고[37]와 청국장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* MC31의 최적 배양 시간이 24시간이라는 보고[21]와도 유사한 결과를 보였다. 따라서 SCJ1의 균체 성장의 최적 배양시간을 대수기에서 정지기에

들어가는 28시간으로 결정하였다(Fig. 2).

Plackett-Burman design에 의한 배지 조성 선별

SCJ1의 장류와 같은 전통발효식품 및 기능성 식품 제조, 사료첨가제 등 다양한 산업적 분야에 적용을 위해 1차적으로 스타터나 종균으로 제조하여 사용할 경우 값싼 배지 조성의 사용과 높은 균체량 생산 수율은 가장 중요한 요소 중 하나이며, 이를 위해 균체의 배양 조건 최적화를 수행하였다. 산업화를 위한 배지 성분의 선별을 위해 Plackett-Burman design을 사용하였으며, Plackett-Burman design에 의한 방법은 적은 실험횟수로 각 요인이 결과에 미치는 영향을 예측할 수 있는 방법으로 시간과 비용을 감소시킬 수 있어 중요한 변수 선별 시 매우 유용한 장점을 가지고 있다[33]. 실험을 진행하기에 앞서 높은 수준(+)와 낮은 수준(-) 값의 설정은 농도가 높은 탄소원의 경우 중심값에서 10±5 g/l로 설정하였으며, 질소원은 8±5 g/l, 기타 미량원소 0.4±0.2 g/l로 설정하였다(Table 1). Table 1의 실험 결과값으로부터 각각의 변수 level과 균체량에 대한 plot은 Fig. 3에 나타내었다. Molasses, yeast extract, peptone은 높은 수준에서 균체량이 더욱더 증가하는 경향을 보였으며, glucose, lactose, NaCl, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄는 높은 수준으로 갈수록 균체량이 감소하는 것으로 나타났으며, 나머

지 변수의 경우 첨가에 따른 큰 차이를 보이지 않는 것으로 분석되었다. 또한 반응값에 대한 각 변수의 영향, 모델 계수, F-value, P-value와 신뢰 수준에 대한 분석결과는 Table 5에 나타내었으며, 균체 성장을 위한 최적의 결과값을 얻기 위해 신뢰수준이 80% 이상의 변수를 중요한 인자로 선정하였다. 따라서 앞선 실험 변수 수준과 균체량에 대한 plot 결과와 신뢰수준의 결과를 기반으로 하여 molasses, yeast extract, peptone을 균체 성장을 위한 최적의 변수로 선정하였다. 이러한 결과는 *B. subtilis*의 생육에 미치는 질소원의 경우 무기질소원을 첨가하는 것보다 yeast extract 및 peptone과 같은 유기질소원을 첨가하는 경우가 균체 생육이 더 양호하며, 특히 단독으로 첨가하는 경우보다 2종류의 성분을 혼합하여 첨가한 결과가 균의 생육 및 항균 활성이 더욱 우수하다는 보고[28]와도 일치하는 결과였다. 또한 탄소원으로 선정된 molasses의 경우 균체량 증가를 위한 산업적 응용을 위해 사용되는 대체 탄소원으로 미생물의 성장에 필요한 영양분이 풍부하며, pH 5.0의 점성이 높은 비정제 사탕수수당으로 탄소, 질소, 인, 염, 철 성분이 64, 6, 0.3, 0.33, 5.5%씩 함유되어 있고, 미네랄원소가 풍부하며 비질소 화합물을 2~8% 함유하고 있어 최근 사용량이 증가하는 추세인 대체 탄소원으로 산업적 적용에서도 매우 유용할 것으로 나타났다[23].

Table 4. Carbohydrates assimilation of SCJ1 by API 50 CHB kit

Enzyme ^a	<i>B. subtilis</i>	SCJ1	Enzyme ^a	<i>B. subtilis</i>	SCJ1
Control	-	-	Esculin	+	+
Glycerol	+	+	Salicin	+	+
Erythritol	-	-	D-cellobiose	+	+
D-arabinose	-	-	D-maltose	+	+
L-arabinose	+	+	D-lactose	-	+
D-ribose	+	+	D-melibiose	-	-
D-xylose	-	-	D-saccharose	+	+
L-xylose	-	-	D-trehalose	+	+
D-adonitol	-	-	Inulin	-	-
Methyl-D-xylopyranoside	-	-	D-melezitose	-	-
D-galactose	-	-	D-raffinose	+	+
D-glucose	+	+	Starch	+	+
D-fructose	+	+	Glycogen	+	+
D-mannose	+	+	Xylitol	-	-
L-sorbose	-	-	Gentiobiose	+	+
L-rhamnose	-	-	D-turanose	-	-
Dulcitol	-	-	D-lyxose	-	-
Inositol	+	+	D-tagatose	-	-
D-mannitol	+	+	D-fucose	-	-
D-sorbitol	+	+	L-fucose	-	-
Methyl-D-mannopyranoside	-	-	D-arabitol	-	-
Methyl-D-glucopyranoside	+	+	L-arabitol	-	-
N-acetyl glycosamine	-	-	Potassium gluconate	-	-
Amygdalin	+	+	Potassium 2-ketogluconate	-	-
Arbutin	+	+	Potassium 5-ketogluconate	-	-

^a+, utilized; -, not utilized.

Table 5. Variables as medium constituents, their effects, coefficients, sum of squares, t-values, probability due to chance, and confidence levels obtained by analyzing the experimental data for the Plackett-Burman design used for screening of medium components for biomass production by *Bacillus subtilis* SCJ1

Variable (X _i)	Effect (E _{xi})	Coefficient (β _i)	Sum of squares	F-value	P-value	Confidence level (%)
Mean	-	-	-	31.49	0.0312	96.88
Glucose	-0.060	-0.030	0.011	9.69	0.0896	91.04
Fructose	0.011	-0.005278	0.0003342	0.30	0.6390	36.10
Molasses	0.28	0.14	0.23	210.12	0.0047	99.53
Lactose	-0.088	-0.044	0.023	20.73	0.0450	95.50
Mannitol	0.014	0.007223	0.000626	0.56	0.5318	46.82
Yeast extract	0.047	0.024	0.00669	6.00	0.1340	86.60
Tryptone	0.002778	0.001389	0.00002316	0.021	0.8986	10.14
Peptone	0.078	0.039	0.018	16.51	0.0556	94.44
NaCl	-0.042	-0.021	0.005208	4.67	0.1632	83.68
MgSO ₄	-0.071	-0.036	0.015	13.61	0.0663	93.37
(NH ₄) ₂ SO ₄	-0.15	-0.077	0.072	64.18	0.0152	98.48

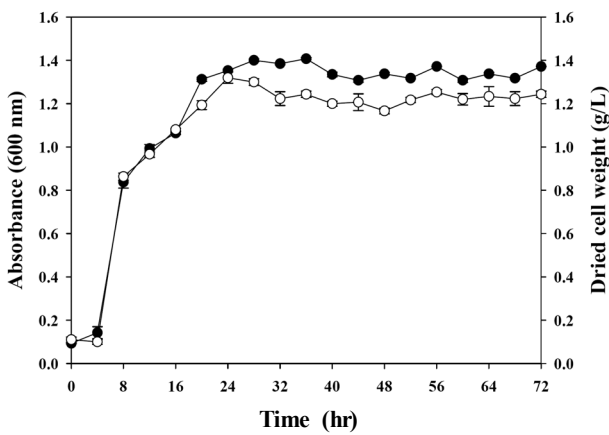


Fig. 2. The time course profile of cell growth. Time course profile of absorbance, dried cell weight, and antioxidant activity by *Bacillus subtilis* SCJ1 cultivated in LB medium(as basal medium) at 150 rpm, 30°C(○, dried cell weight; ●, absorbance 600 nm).

중심합성계획법에 의한 배지 조성의 최적화

균체량 증가를 위하여 Plackett-Burman design을 통해 최종 선별된 배지 성분의 최적 농도를 결정하기 위하여 반응표면 분석법 중 중심합성계획법을 사용하여 최적화를 수행하였다. 독립변수로는 앞서 선정한 molasses (X₁), yeast extract (X₂), peptone (X₃)을 3개의 요인 변수로 설정하였으며, 5개의 수준에서 실험계획을 수립하여 건조 균체량을 측정하였다. 중심점 3개를 포함한 모두 17개의 구간에서 실험을 실시하였고, 각각의 독립변수에 대한 종속변수(Y, 건조 균체량)의 반응값은 Table 2에 나타내었다. 반응값에 대한 모델식의 예측은 Design expert 프로그램을 사용하여 분석하였으며, 건조 균체량에 대한 회귀 방정식은 아래와 같다.

$$Y = 1.33232 + 0.40281 * Molasses + 0.068229 * Yeast\ extract + 0.021771 * Peptone - 0.063125 * Molasses * Yeast\ extract + 0.018958 * Molasses * Peptone - 0.011042 * Yeast\ extract * Peptone + 0.153 * Molasses^2 + 0.055081 * Yeast\ extract^2 + 0.047165 * Peptone^2$$

분산 분석을 실시한 결과 R-square (결정계수)는 0.9111으로 1에 가까운 값을 나타내어 매우 높은 유의성을 보였으며, 전체 모델에 대한 유의확률이 0.0061로 0.05보다 작아 가정된 실험 모형이 결과에 적합함을 확인하였다. 또한 변동계수(CV, Coefficient of variation)는 13.37로 균체량 생산에 변수들의 독립적인 영향뿐만 아니라 변수들 간의 상호작용도 매우 높음을 확인할 수 있었다(Table 6). Fig. 4는 각 변수가 미치는 영향을 쉽게 확인하기 위하여 3개의 변수 중 하나의 독립변수를 최적점에 고정된 후 나머지 2개의 변수를 이용하여 3차원의 형태로 교호작용을 확인한 결과이며, 실험 범위 내에서 molasses와 peptone은 첨가량이 증가할수록 균체량은 더욱더 증가하는 경향을 보였으나, yeast extract는 첨가량이 증가함에 따라 균체량이 감소하는 경향을 보였다. 최종적으로 중심합성계획법을 통하여 예측된 최대 건조 균체량은 2.03704±0.210283 g/l로 예측되었고, 이때의 각 변수의 농도는 molasses 27.5 g/l, yeast extract 7.5 g/l, peptone 17.5 g/l로 예측되었다.

실험 모델의 검증

중심합성계획법을 통해 확립한 최적 배지에서 *B. subtilis* SCJ1의 균체 성장을 검증하기 위해 예측된 최적 배지에 SCJ1을 접종하여 건조 균체량을 조사하였다. 대조구로는 최적화를 실시하기 이전의 기본 LB 액체 배지를 사용하였으며, 최적 배지에서 배양한 결과 SCJ1의 건조 균체량은 1.9722±0.0194 g/l로 예측된 2.03704±0.210283 g/l의 오차범위 내에 존재하여 실험모델의 예측값이 신뢰할 수 있음을 확인하였다. 또한, 최적화를 수행하기 이전의 배지 대조구 균체량 1.32±0.0265 g/l와 비교하면 0.6522 g/l 증가하여 49.4%의 균체량이 증가하는

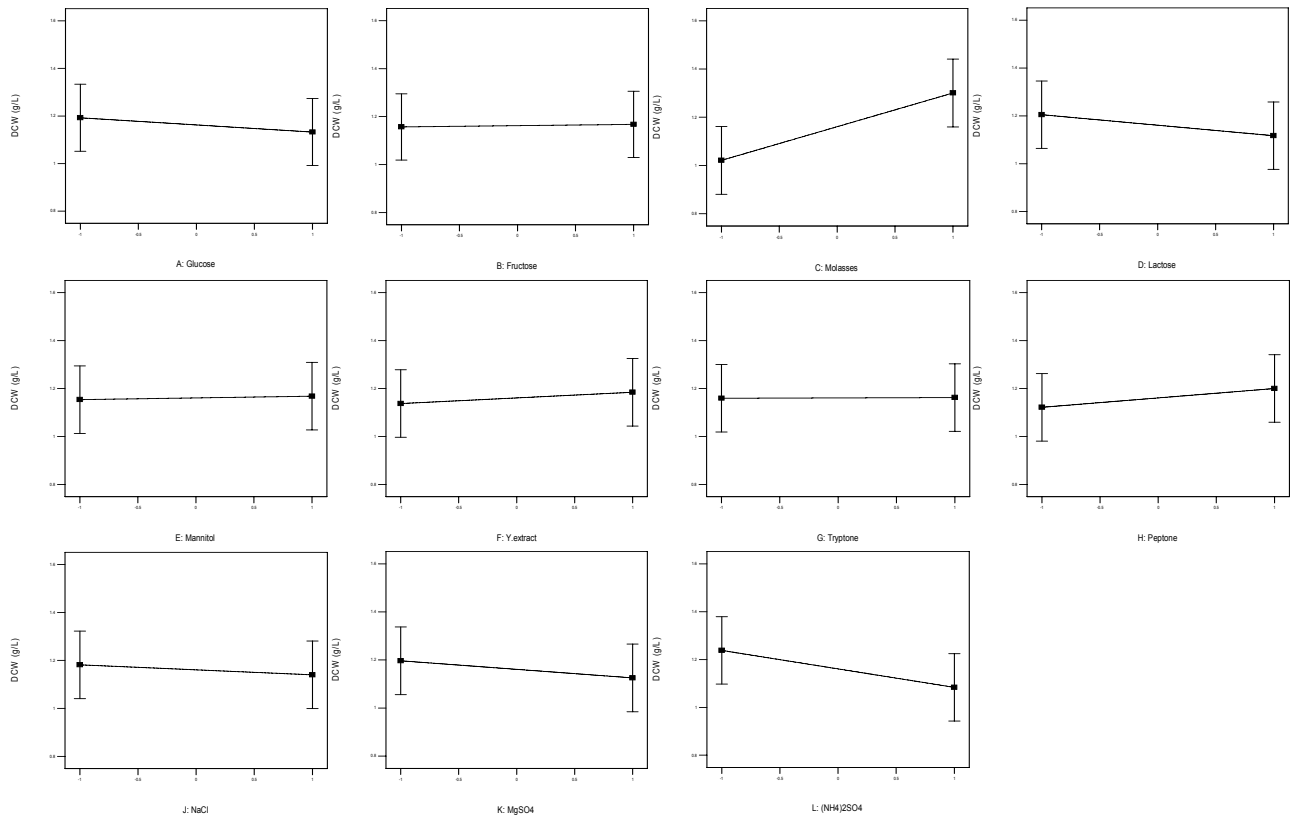


Fig. 3. Main effect of media components on biomass production.

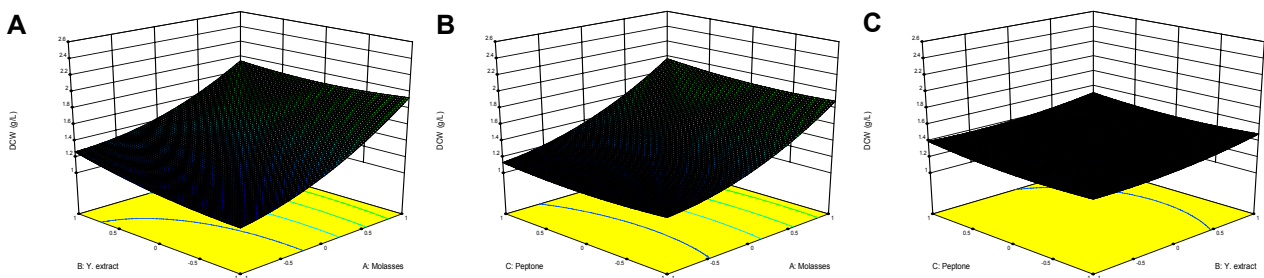


Fig. 4. Three-dimensional response surface of maximal dried cell weight showing the interactions between molasses, yeast extract and peptone concentration. (A) Response surface plot showing the effect of molasses (X_1) and yeast extract (X_2) on dried cell weight (Y , response value) (B) Response surface plot showing the effect of molasses (X_1) and peptone(X_3) on dried cell weight (Y , response value) (C) Response surface plot showing the effect of yeast extract (X_2) and peptone (X_3) on dried cell weight (Y , response value).

결과를 얻을 수 있었다(Fig. 5). 최적 조건에서 배양한 후 세포의 효소 활성은 조성의 변화에 큰 영향 없이 동일한 활성능을 얻을 수 있어 배지의 조성의 변화에 따라 효소활성이 큰 차이를 보인다는 Kim 등의 보고[15]와는 다르게 SCJ1 균주는 산업화 적용 가능한 배지 조성에서도 변화를 나타내지 않음을 확인하였다. 병원성 미생물에 대한 항균활성은 *S. typhimurium* KCTC 1926, *M. luteus* KCTC 1056, *B. cereus* KCTC 3624에서는 모두 동일한 활성을 보였으나, *L. monocytogenes* KCCM 40307, *L. monocytogenes* KCTC 3710, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444, *B. cereus* KCTC 1661에서는 2배 이상 활성능이 증가함을

확인할 수 있었다. 추후 안전성 및 기능성 부분에 대한 세부적인 추가 연구가 필요하지만 다양한 기능성을 갖는 산업적 적용이 가능한 *B. subtilis*로의 가능성 및 산업화 적용 가능 배지 조성을 확립하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 : PJ0099900 32014)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

Table 6. Analysis of variance(ANOVA) of central composite design for improving dried cell weight about *Bacillus subtilis* SCJ1

Source	Coefficient estimate	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	Standard error	F-value	P-value, Prob > F ^a
Model	1.33	3.17	9	0.35	0.12	7.97	0.0061
X ₁ - Molasses	0.40	2.60	1	2.60	0.053	58.71	0.0001
X ₂ - Yeast extract	0.068	0.074	1	0.074	0.053	1.68	0.2355
X ₃ - Peptone	0.022	0.007584	1	0.007584	0.053	0.17	0.6912
X ₁ X ₂ ^b	-0.063	0.032	1	0.032	0.074	0.72	0.4239
X ₁ X ₃	0.019	0.002875	1	0.002875	0.074	0.65	0.8061
X ₂ X ₃	-0.011	0.0009753	1	0.0009753	0.074	0.022	0.8861
X ₁ ²	0.15	0.45	1	0.45	0.048	10.25	0.0150
X ₂ ²	0.055	0.059	1	0.059	0.048	1.33	0.2868
X ₃ ²	0.047	0.043	1	0.043	0.48	0.97	0.3565
Residual		0.31	7	0.044		165.49	0.0060
Lack of Fit		0.31	5	0.062			
Pure Error		0.0007464	2	0.003732			
Cor Total ^c		3.48	16				
Standard deviation		0.21		Press ^d			2.48
Mean		1.57		R - squared			0.9111
Coefficient of variation		13.37		Adjusted R - squared			0.7967

Response model was suggested quadratic model through the lack of fit tests.

^aP-value, probability distribution value. P-value less than 0.05 indicate that the term is significant.

^bX₁X₂, X₁X₃, X₂X₃ represent the interaction effect of variables X₁, X₂, and X₃. X₁², X₂², and X₃² are the squared effects of the variables.

^cCor Total, Sum of squares total corrected for the mean.

^dPress, The predicted residual sum of squares for the model.

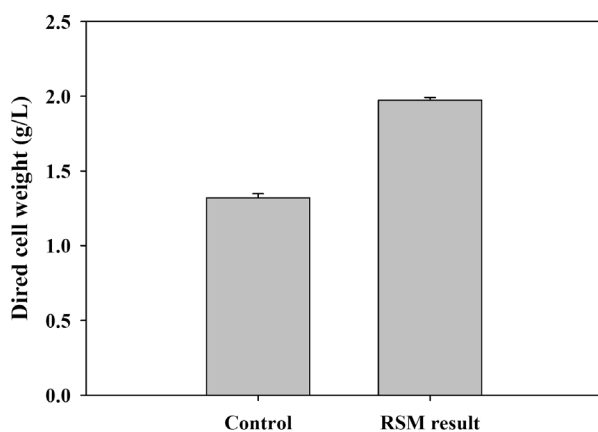


Fig. 5. The comparison of LB(basal) and optimal culture broth after incubation for 28 hr. The experiments were carried out in triplicate.

References

- Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y. and Kurahashi, K. 1985. Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J. Biochem.* **98**, 585-603.
- Bulushi, I. A., Susan, P., Hilton, C. D. and Gary, A. D. 2009. Biogenic amines in fish: Role in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation-A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 369-377.
- Chang, M. and Chang, H. C. 2012. Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **150**, 269-274.
- Cho, T. Y., Han, G. H., Bahn, K. N., Son, Y. W., Jang, M. R., Lee, C. H., Kim, S. H., Kim, D. B. and Kim, S. B. 2006. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 730-737.
- Enes Dapkevicius, M. L. N., Robert Nout, M. J., Rombouts, F. M., Houben, J. H. and Wymenga, W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **57**, 107-114.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., Guerzoni, M. E. and Suzzi, G. 2001. Effect of pH, temperature, and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity, and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 105-117.
- Gilbert, R. J., Hobbs, G., Murray, C. K., Cruickshank, J. G. and Young, S. E. 1980. Scombrototoxic fish poisoning: Features of the first 50 incidents to be reported in Britain (1976-9). *Br. Med. J.* **281**, 71-72.
- Han, G. H., Cho, T. Y., Yoo, M. S., Kim, C. S., Kim, J. M., Kim, H. A., Kim, M. O., Kim, S. C., Lee, S. A., Ko, Y. S., Kim, S. H. and Kim, D. B. 2007. Biogenic amines formation and content in fermented soybean paste (*cheonggukjang*). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**, 541-545.
- Isolauri, E., Salmine, S. and Ouwehand, A. C. 2004.

- Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 299-313.
10. Jakszyn, P. and Gonzalez, C. A. 2006. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. *World J. Gastroenterol.* **12**, 4296-4303.
 11. Jang, Y. M., Shin, W. S., Lee, D. H. Kim, S. Y., Park, C. H., Jeong, Y. S. and Chun, G. T. 2009. Statistical optimization of production medium for enhanced production of itaconic acid biosynthesized by fungal cells of *Aspergillus terreus*. *KSBB J.* **24**, 30-40.
 12. Jansen, E. F. and Hirschmann, D. J. 1944. Subtilin-an antibacterial product of *Bacillus subtilis*: culturing conditions and properties. *Arch. Biochem.* **4**, 297-309.
 13. Jeong, S. J., Shin, M. J., Jeong, S. Y., Yang, H. J. and Jeong, D. Y. 2014. Characteristic analysis and production of short-ripened Korean traditional soy sauce added with rice bran. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 550-556.
 14. Karovicova, J. and Kohajdova, Z. 2005. Biogenic amines in foods. *Chem. Pap.* **59**, 70-79.
 15. Kim, G. P., Kim, N. H., Rhee, C. H., Woo, C. J. and Bae, D. H. 2002. Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 754-759.
 16. Kim, J. H., Ahn, H. Y., Jo, C., Park, H. J., Chung, Y. J. and Byun, M. W. 2004. Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation. *Food Control* **15**, 405-408.
 17. Kim, S. H. 1998. New trends of studying on potential activities of Doen-Jang, fibrinolytic activity. *Korea Soybean Digest* **15**, 8-15.
 18. Kim, Y. S., Jeong, D. Y., Hwang, Y. T. and Uhm, T. B. 2011. Bacterial community profiling during the manufacturing process of traditional soybean paste by pyrosequencing method. *Kor. J. Microbiol.* **47**, 275-280.
 19. Kim, Y. S., Cho, S. H., Jeong, D. Y. and Uhm, T. B. 2012. Isolation of biogenic amines-degrading strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* from traditionally fermented soybean product. *Kor. J. Microbiol.* **48**, 220-224.
 20. Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3 : Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**, 150-163.
 21. Mann, S. Y., Kim, E. A., Lee, G. Y., Kim, R. U., Hwang, D. Y., Son, H. J. and Kim, D. S. 2013. Isolation and identification of GABA-producing microorganism from *Chungkookjang*. *J. Life Sci.* **23**, 102-109.
 22. Nakano, M. M. and Zuber, P. 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**, 223-240.
 23. Nour, S. H. E. G., Hekmat, R. and Salem, S. A. A. 2013. Design and optimization of a process for sugarcane molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Int. J. Microbiol.* **2013**, 1-9.
 24. Park, J. H., Kim, J. H. and Kang, S. J. 2002. Isolation and antifungal activity of *Bacillus ehimensis* YJ-37 as antagonistic against vegetables damping-off fungi. *J. Life Sci.* **12**, 200-207.
 25. Park, S. Y., Yoo, J. C., Seong, C. N. and Cho, S. S. 2013. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* MP56 with antimicrobial activity against MDR (Multi Drug Resistant) strains. *Kor. J. Microbiol.* **49**, 90-94.
 26. Ra, K. S., Oh, S. H., Kin, J. M. and Suh, H. J. 2004. Isolation of fibrinolytic enzyme and β -glucosidase producing strains from Doenjang and optimum conditions of enzyme production. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 439-442.
 27. Ryu, B. H. 2003. Development of functional Doenjang for antioxidative and fibrinolytic activity. *J. Life Sci.* **13**, 559-568.
 28. Ryu, H. S., Shon, M. Y., Cho, S. J., Park, S. K. and Lee, S. W. 2007. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional Doenjang. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 87-94.
 29. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method : A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
 30. Seki, T., Chung, C. K., Mikami, H. and Oshima, Y. 1978. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 182-189.
 31. Shalaby, A. R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **29**, 675-690.
 32. Silla Santos, M. H. 1996. Biogenic amines: Their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 213-231.
 33. Srinivas, M. R. S., Nagin Chand, and Lonsane, B. K. 1994. Use of Plackett-Burman design for rapid screening of several nitrogen sources, growth/product promoters, minerals and enzyme inducers for the production of alpha-galactosidase by *Aspergillus niger* MRSS 234 in solid state fermentation system. *Bioprocess Eng.* **10**, 139-144.
 34. Suzzi, G. and Gardini, F. 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 41-54.
 35. Teather, R. and Wood, P. J. 1982. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 777-780.
 36. Vermelho, A. B., Meirelles, M. N. L., Lopes, A., Petinate, S. D. G., Chaia, A. A. and Branquinha, M. H. 1996. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **91**, 755-760.
 37. Yang, E. J. and Chang, H. C. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJPI. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 339-346.
 38. Yang, S. J., Lee, D. H., Park, H. M., Jung, H. K., Park, C. S. and Hong, J. H. 2014. Amylase activity and characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 isolated from Doenjang. *Kor. J. Food Preserv.* **21**, 286-293.

초록 : 바이오제닉 아민 비생성 *Bacillus subtilis*의 선별 및 반응표면 분석법에 의한 균체량 증가를 위한 배지 최적화

양희종^{1†} · 정수지^{1†} · 정성엽¹ · 허주희¹ · 최낙식² · 정도연^{1*}

(¹계발효미생물산업진흥원, ²창원대학교 보건의학과)

바이오제닉 아민은 주로 발효식품에 존재하는 미생물에 의해 발생하며, 종종 사람의 체내에서 심각한 독성을 나타내기도 한다. 따라서 바이오제닉 아민 비생성 균주의 선별을 위하여 순창균에서 제조된 전통 장류 200여 종으로부터 620종의 다양한 미생물을 분리하였고, 이 중에서 다양한 생리활성 분석 및 바이오제닉 아민 생성여부를 조사하여 최종적으로 바이오제닉 아민 비생성 균주로써 *Bacillus subtilis* SCJ1을 선별하였다. 최종 선별한 SCJ1의 생화학적 특성과 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 *Bacillus subtilis* SCJ1로 명명하였다. *Bacillus subtilis* SCJ1의 산업적 적용이 가능한 최적배지 조성을 확립하기 위해 먼저 SCJ1균체 성장을 조사하였으며, 이를 기반으로 통계학적 방법인 반응표면 분석법을 사용하여 최적화를 수행하였다. 실험계획법은 배지 조성 성분의 선별을 위해 Plackett-Burman design을 사용하여 모델을 설정하였다. 실험 모델을 통하여 선별된 배지 성분으로는 molasses, yeast extract, peptone으로 예측되었으며, 배지조성에 대한 최적 농도를 설정하기 위해 중심합성계획법을 사용하여 최적화를 수행하였다. 최종적으로 예측된 배지 성분의 농도는 molasses 27.5 g/l, yeast extract 7.5 g/l, peptone 17.5 g/l로 예측되었고, 이때의 최대 균체량은 2.03704 g/l로 예측되어 모델의 검증실험을 통한 예측 모델과 실제 결과가 동일함을 확인하였다. 또한, 기본 배지와 균체량을 비교하였을 때 1.32 g/l에서 1.9722 g/l로 약 49.4% 증가하였고, 효소활성과 항균활성 또한 증가함을 확인하였다.