

Poly- γ -Glutamic Acid 고생성 *Bacillus* spp. 균주의 분리 및 발효특성

심상협¹ · 박홍진¹ · 오현화¹ · 정도연² · 송근섭¹ · 김영수¹

¹전북대학교 식품공학과
²(재)발효미생물산업진흥원

Isolation and Characterization of *Bacillus* spp. with High-Level Productivity of Poly- γ -Glutamic Acid

SangHyeob Sim¹, Hong-Jin Park¹, HyeonHwa Oh¹, Do-Youn Jeong²,
Geun-Seoup Song¹, and Young-Soo Kim¹

¹Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University

²Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI)

ABSTRACT *Bacillus* strains not producing harmful components were isolated from Korean traditional soybean products. Extracellular enzyme activities (amylase, protease, cellulase, and xylanase) of isolated *Bacillus* strains were measured, and *Bacillus* strains with high protease activity were selected. The selected 15 strains were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* (10), *Bacillus methylotrophicus* (1), *Bacillus velezensis* (1), and *Bacillus subtilis* (3). Among them, *B. subtilis* JBG17019, *B. amyloliquefaciens* JBD17076, and *B. amyloliquefaciens* JBD17109 showed antimicrobial activities against food-borne microorganisms. The production abilities of glutamate, glutamine, and poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) of the selected *Bacillus* strains were measured to analyze fermentation characteristics related to glutamic acid metabolism. The factor for multivariate was analyzed by the principal components analysis (PCA) method between fermentation characteristics and γ -PGA production. The three principal components were classified according to the PCA method: PC1 [enzyme activity (amylase, cellulase, and xylanase)], PC2 (γ -PGA), and PC3 (protease, glutamate, and glutamine). As a result, *B. amyloliquefaciens* JBD17076 and *B. subtilis* JBG17019 strains were evaluated as having excellent enzyme activity and γ -PGA production.

Key words: poly- γ -glutamic acid, *Bacillus*, glutamate, glutamine, enzyme activity

서 론

Poly- γ -glutamic acid(γ -PGA)는 γ -PGA 합성 system(pgsBCA system)을 보유한 세균 중 특히 *Bacillus* 균주에 의해서 생성되는 glutamic acid의 γ -polypeptide 화합물이다(1-3). γ -PGA는 수용성, 음이온성, 생분해성 및 식용 가능성을 가지고 있어 고부가가치의 산업 소재로 사용되고 있으며(1), 식품산업에서는 한국의 청국장과 일본의 나또(natto)가 대표적인 γ -PGA 고함유 식품으로 알려져 있다(4).

γ -PGA는 관능적 특성뿐만 아니라 항비만(5), 항당뇨(6), 조골세포 활성 증가(7) 등의 건강 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어져 있어, 이를 고생산하는 균주에 대한 확보에 관심이 증대되고 있다. γ -PGA를 합성하는 기작은 L,D-

glutamic acid 존재 하에 γ -PGA를 합성할 수 있는 glutamic acid 의존성과 glutamic acid가 배양액 내에 존재하지 않아도 대사경로에 의해 citric acid, L-glutamine, ammonia, ammonium sulfate 등의 존재 하에 합성이 가능한 glutamic acid 비의존성으로 구분할 수 있다(8,9). 청국장 발효에 사용되는 원료인 대두의 아미노산 조성 중 약 19%가 glutamic acid를 함유한다는 것이 보고됨에 따라 청국장 발효에는 glutamic acid 의존성 균주에 의한 합성이 우세할 것으로 추정된다(10).

γ -PGA의 대량생산에는 *B. subtilis chungkookjang* 균주나 *B. subtilis natto* 균주와 같은 산업적 균주들이 이용되고 있다(8,11). 그러나 전통장류에서는 *B. subtilis* 이외에 *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* 등이 우점균으로 분리된다고 보고되고 있다(12-14). 이 균주들은 pgsBCA system을 가지고 있기 때문에 전통장류에서 분리할 수 있는 *Bacillus*속 균주 중 γ -PGA를 고생산할 수 있는 균주를 분리하여 γ -PGA의 대량생산을 위한 산업균주로 확보할 필요가 있다. 하지만 전통장류에서 분리한 *Bacillus*속 균주 중에는 구토와 설사를 유발하는 *B. cereus* 등과 같은 병원성

Received 20 June 2017; Accepted 2 August 2017

Corresponding author: Young-Soo Kim, Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 54896, Korea
E-mail: ykim@jbnu.ac.kr, Phone: +82-63-270-2569

미생물과 원치 않는 이취나 건강에도 문제를 야기할 수 있는 biogenic amine을 생성하는 균주들이 포함될 수 있어 이런 균주들을 제거해야 한다(15,16). 또한, 콩 단백질의 원활한 분해를 위하여 protease 활성이 우수한 산업용 균주를 선발할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 먼저 전통장류로부터 *B. cereus*나 biogenic amine과 같은 유해요소를 생성하지 않는 *Bacillus* 균주를 선발하였다. 그 후 선발된 균주의 세포 외로 분비되는 효소의 활성 측정과 균주의 우점화를 위한 항균 활성 분석을 수행하여 청국장 발효 종균을 선발한 후, γ -PGA 고생성능을 확인하여 산업용 *Bacillus* 균주를 확보하고자 하였다. 연구의 일환으로 protease 활성이 우수한 선발균주에 대해 γ -PGA 생성능을 기존연구에서 보고된 합성배지 상에서 평가한 후 청국장에 적용해 선발균주의 γ -PGA 생성능과 비교하였으며, 선발균주의 발효특성에 대한 요인분석을 시행하여 산업적 균주 선발의 적합성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

Bacillus 균주를 분리하기 위하여 전통 방식으로 제조 판매되고 있는 장류(된장, 간장, 고추장 및 청국장, 2016년)를 경북, 경남 및 전북지역에서 수집하여 사용하였다. 균주를 배양하기 위한 배지인 nutrient agar, nutrient broth, LB broth 및 배지 조성 성분들과 효소 활성 기질로써 사용한 skim milk는 Becton, Dickinson & Co.(Franklin Lakes, NJ, USA) 제품을 사용하였고, *B. cereus* 균주 제거를 위한 Brilliance™ *Bacillus cereus* agar는 Oxoid Ltd.(Basingstoke, Hampshire, UK) 제품을 사용하였다. 또한, biogenic amine 생산 균주를 제거하기 위한 기질로써 사용한 histidine, tyrosine과 효소 활성 측정을 위한 기질로써 사용한 soluble starch, carboxymethyl cellulose, xylan과 γ -PGA 생성능을 확인하기 위한 L-glutamic acid는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 그리고 glutamate 및 glutamine을 정량하기 위해 사용한 kit은 Biovision사(Milpitas, CA, USA) 제품을 사용하였다. 그 외 시약은 대정화금(Siheung, Korea)의 제품을 사용하였다.

배양된 배양물의 균체를 제거하기 위하여 소형 원심분리기(VS-15000, Vision Scientific Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 사용하였고, γ -PGA 분리를 위하여 대형 원심분리기(Avanti J-26 XP, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 사용하였다. 균주 및 청국장 배양을 위하여 배양기(SI-2S, Universal Scientific Industrial (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai, China)를 사용하였고, 대두콩의 열수 추출물을 얻기 위하여 항온수조(TW-PC-1, Universal Scientific Industrial (Shanghai) Co., Ltd.)를 사용하였다.

균주 분리

수집한 시료 1 g을 채취하여 단계희석법으로 nutrient agar에 도말하여 배양한 후 *B. cereus* 균주를 제외하기 위한 선별배지(Brilliance™ *Bacillus cereus* agar)와 biogenic amine(histamine, tyramine) 비생산균주 선별배지(17)를 사용하여 균주를 분리한 후 1차 선별하였다. 선별한 균주는 다음 연구에 사용하기 위하여 배양 후 25% glycerol을 첨가하여 -70°C 에 보관하며 각 실험균주로 하였다.

Amylase, cellulase, xylanase, protease 측정

선발된 균주의 세포 외 효소활성(amylase, cellulase, xylanase, protease)은 paper disc 확산법(18-20)으로 측정하였다. 균주를 nutrient broth에 접종하여 37°C , 200 rpm으로 18시간 동안 진탕 배양한 후 $10,000\times g$, 4°C 에서 10분간 원심분리 하여 배양 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다. Amylase 활성은 1% soluble starch를 함유한 starch agar 배지, cellulase 활성은 1% carboxymethyl-cellulose(CMC)를 함유한 CMC agar 배지(18), xylanase 활성은 1% xylan을 기질로 하는 xylan agar 배지(19)를 각각 사용하여 배지의 정해진 위치에 6 mm paper disc(Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 올리고 조효소액을 20 μL 분주하여 37°C 에서 24시간 배양하였다. 그 후 Gram iodine 시약으로 15분간 염색하고 증류수로 세척한 후 생기는 투명환의 지름을 측정하여 균 집락 지름과의 크기 비를 상대 활성도로 나타내었다. Protease 활성은 2% skim milk에 1.5% agar를 첨가한 skim milk agar 배지(20)를 제조하여 6 mm paper disc(Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)를 올리고 균주 배양 상등액을 20 μL 분주하여 37°C 에서 24시간 배양한 후 투명환의 지름을 측정하여 균 집락 지름과의 크기 비를 상대 활성도로 나타내었다.

선발균주의 동정

Protease 활성이 우수한 15개 균주를 2차 선발하고 선별된 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 동정을 진행하였다. Universal primer 27F(5'-AGAGTTTGTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 유전자를 증폭한 후 이 PCR 산물을 정제하여 염기서열을 해독하였다. 이 염기서열을 이용하여 BLASTN search(21)와 Ribosomal Database Project (RDP, ver.11)의 SeqMatch program에서 서열 일치도가 높은 표준균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 얻었고, 염기서열 간의 상호비교를 위하여 CLUSTAL W(22)를 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 chromatogram의 비교와 수작업으로 gap이 최소화되게 보정한 후 Tamura-Nei model에 기초한 Maximum Likelihood 방법(23)을 사용하였고, 각각의 계통수에서 각 분자에 대한 통계적 신뢰의 산출은 bootstrap을 1,000회를 설정하여 MEGA program(24)을 사용하여 계통

분석 tree를 작성하였다.

식품 유해미생물 성장 억제능

선발된 균주의 식품 유해미생물에 대한 성장 억제능은 paper disc 확산법으로 비교·분석하였다. 유해미생물을 nutrient broth에 접종하여 37°C, 200 rpm에서 18시간 배양한 후 멸균된 면봉을 사용하여 nutrient agar에 도말하였다. 각 균이 도말된 nutrient agar 배지에 6 mm paper disc (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)를 올리고, 그 위에 원심분리 한 균주배양 상등액을 20 µL 점적하여 37°C에서 18시간 정치 배양 하였다. 그 후 paper disc 주위로 형성된 투명한 지름을 측정하여 paper disc 지름의 크기에 대한 투명한 크기 비를 상대 활성도로 나타내었다. 실험에 사용된 식품 유해미생물은 그람양성(*B. cereus* KACC 10097, *Staphylococcus aureus* KACC 1927, *Listeria monocytogenes* KACC 10764) 3종과 그람음성(*Escherichia coli* KACC 10115) 1종을 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC, Wanju, Korea)에서 분양 받아 사용하였다.

Glutamate 및 glutamine 생성능

선발된 균주의 glutamate 및 glutamine 함량 측정은 assay kit을 사용하여 진행하였다. 대두콩을 수세하고 증류수에 overnight 침지하여 얻은 불린 콩 중량의 10배가량의 증류수를 가한 후에 환류냉각장치를 연결하여 100°C에서 2시간 동안 추출한 다음 여과하여 콩물배지를 얻었다. 이 콩물배지에 선발균주를 1백금이 접종하여 37°C, 200 rpm에서 24시간 동안 배양한 후 4°C에서 10분간 원심분리(10,000×g) 하였다. 상등액을 취하여 각 kit의 분석방법에 따라 효소적인 방법으로 반응시키고 glutamate와 glutamine 표준곡선을 작성하여 콩물 1 mL에 함유된 glutamate와 glutamine의 함량을 정량하였다.

합성배지와 청국장 제조조건에서 γ -PGA의 생성량 비교

선발된 균주의 γ -PGA 생성능을 비교하기 위하여 합성배지를 제조한 후 액체 배양하였고, 청국장 제조조건을 이용하여 고형 발효하였다. 그 후에 Goto와 Kunioka(3)의 방법을 일부 변형하여 γ -PGA를 분리 및 회수하여 정량하였다. 합성배지(L-glutamic acid 2%, glucose 0.5%, K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.07%, pH7.0)를 조성하여 121°C에서 15분간 멸균한 다음, 활성화된 균주를 1% 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 24시간 배양하였다(25). 배양 후 배양액과 동일한 양의 증류수를 가하여 혼합한 다음 회수하여 4°C에서 10분간 원심분리(15,000×g) 하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 4배의 cold-ethanol을 가하고 진탕 혼합한 후 냉장온도(4°C)에서 overnight 정치하여 γ -PGA를 침전시켰고, 4°C에서 10분간 원심분리(15,000×g) 하여 상등액은 버리고 남은 침전물에 증류수를

소량 첨가하여 충분히 녹였다. 회수한 γ -PGA는 105°C dry oven에서 건조해 γ -PGA의 무게를 정량하였다. 청국장 제조는 콩을 수세한 후 증류수를 가하고 overnight 침지시켜 121°C에서 30분 동안 멸균하고 활성화된 균주를 1% 접종한 후 37°C에서 24시간 발효시켰다. 고형 발효된 청국장의 γ -PGA는 동일한 양의 증류수를 가하여 혼합한 후 회수하여 액체배양액에서와 동일한 방법으로 분리하여 정량하였다.

통계분석

각 실험에서 얻은 결과는 SPSS package program(Ver. 12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 각 시료 간의 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA로 분산분석한 후에 Duncan's multiple range test로 비교하였다. 선발균주의 γ -PGA 생성능과 효소 활성, glutamate와 glutamine 생성능 사이의 다변량 분석은 SPSS package program(Ver. 12.0K)을 사용하여 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA)을 실시하였다.

결과 및 고찰

선발균주의 효소활성 및 유해미생물 억제능

대두콩은 단백질뿐만 아니라 여러 가지 복합체들을 함유하고 있으며, 이들을 분해하기 위해서는 높은 효소 활성을 보유한 균주를 선발할 필요가 있다. 또한, 식품유해균에 의한 오염이나 잡균들에 의한 원치 않는 발효를 막기 위해서는 항균 활성이 우수한 균주를 확보해야 한다. 따라서 전통장류에서 분리한 *Bacillus* 균주 중 선발된 15개 균주의 효소활성 및 식품 유해미생물에 대한 성장억제능을 측정하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다. 청국장 제조 균주선발에 있어서 *B. cereus*나 biogenic amine과 같은 유해물질을 생성하는 균주를 제거하는 것이 먼저 이루어졌고, 콩 단백질을 빠르게 분해할 수 있는 protease 활성 우수 균주를 이차적으로 선발하였다. 선발된 *Bacillus* 균주의 protease 활성은 1.06~3.15로 넓은 범위를 나타내었다. 그중에서 protease 활성을 2 이상 나타낸 14개 균주를 실험균주로 선발하였고, 비교균주로서 활성이 2 미만을 나타낸 균주 JBS17138을 선발하였다.

Protease 활성이 3.15로 가장 높았던 JBG17015 균주는 중간 정도의 amylase 활성을 나타내었지만, cellulase와 xylanase 활성은 나타나지 않았다. 또한, 식품에 악영향을 미치는 균주들에 대한 성장 억제능을 확인하고 청국장 제조 시 선발균주의 우점화에 영향을 미치는 인자인 항균 활성을 확인하고자 선발균주의 식품 유해미생물에 대한 성장 억제능을 측정하였다.

유해균주 성장 억제능을 측정한 결과, *B. cereus* 억제능이 우수한 균주로 JBD17076과 JBD17109가 확인되었으며, 오염지표 미생물인 *E. coli*에 길항력을 보이는 균주로

Table 1. Enzyme activity and anti-microbial activity of selected *Bacillus* spp. isolated from Korean traditional soybean products

Strain	Enzyme activity ¹⁾				Anti-microbial activity			
	Amylase	Protease	Cellulase	Xylanase	<i>B. cereus</i> KACC 13064	<i>L. monocytogenes</i> KACC 10764	<i>S. aureus</i> KACC 1927	<i>E. coli</i> KACC 10115
JBG17015	1.34±0.06 ^{cd2)}	3.15±0.16 ^a	1.00 ³⁾	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
JBG17019	1.36±0.04 ^{cd}	2.16±0.20 ^c	2.64±0.12 ^d	2.40±0.04 ^{bc}	1.00	1.11±0.01 ^a	1.80±0.11 ^a	1.00
JBG17044	1.37±0.06 ^c	2.86±0.00 ^a	3.02±0.24 ^b	2.82±0.37 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00
JBG17057	1.23±0.03 ^{ef}	2.23±0.11 ^c	2.64±0.06 ^d	2.64±0.08 ^{ab}	1.00	1.00	1.38±0.09 ^c	1.00
JBD17064	1.61±0.04 ^a	2.23±0.02 ^c	2.74±0.18 ^{cd}	2.55±0.13 ^{ab}	1.00	1.00	1.00	1.00
JBD17065	1.24±0.01 ^{ef}	2.07±0.17 ^c	2.79±0.08 ^{cd}	2.54±0.05 ^{ab}	1.00	1.00	1.54±0.14 ^b	1.00
JBD17073	1.51±0.02 ^b	2.18±0.16 ^c	2.77±0.02 ^{cd}	2.55±0.23 ^{ab}	1.00	1.00	1.00	1.00
JBD17076	1.37±0.04 ^c	2.09±0.23 ^c	2.62±0.09 ^d	2.49±0.19 ^b	1.58±0.23 ^a	1.07±0.03 ^b	1.25±0.05 ^d	1.00
JBD17089	1.63±0.09 ^a	2.09±0.14 ^c	2.93±0.17 ^{bc}	2.65±0.23 ^{ab}	1.00	1.00	1.00	1.00
JBD17109	1.27±0.02 ^{de}	2.14±0.17 ^c	2.28±0.06 ^e	2.17±0.08 ^c	1.59±0.05 ^a	1.00	1.46±0.14 ^{bc}	1.20±0.02 ^a
JBS17138	1.42±0.03 ^c	1.06±0.01 ^d	2.73±0.06 ^{cd}	2.57±0.16 ^{ab}	1.00	1.00	1.00	1.00
JBS17145	1.17±0.05 ^{fg}	2.54±0.20 ^b	1.00	1.33±0.04 ^d	1.00	1.00	1.00	1.00
JBS17146	1.16±0.07 ^{fg}	2.10±0.19 ^c	1.00	1.29±0.06 ^d	1.00	1.00	1.00	1.00
JBS17169	1.10±0.02 ^g	2.94±0.00 ^a	1.00	1.22±0.04 ^d	1.00	1.00	1.00	1.00
JBH17182	1.58±0.07 ^{ab}	2.06±0.35 ^c	3.38±0.11 ^a	2.82±0.19 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00

¹⁾Halo diameter / Colony diameter.

²⁾Means±SD (n=3) within each column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

³⁾1.00 means no activity.

JBD17109가 확인되었다. 그러나 protease 활성이 가장 높은 JBG17015나 amylase, cellulase, xylanase 활성이 높은 JBH17182는 항균력을 보유하지 않음이 확인되었다. 따라서 청국장 제조 시 가장 중요한 효소 활성인 protease가 우수하고, 식품 유해미생물에 대한 억제능이 우수한 JBG17019, JBD17076, JBD17109 균주가 산업용 균주로서 적합할 것으로 판단되었다.

선발균주의 동정결과

RDP의 SeqMatch 프로그램을 이용하여 15개 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열과의 일치율이 높은 표준균주들을 선정된 뒤 MEGA program에서 계통도를 분석하였고, 그 결과는 Fig. 1과 같다. 선발균주 중 JBS17145, JBS17146, JBS17138, JBD17089, JBD17076, JBG17044, JBG17015, JBS17169, JBD17109는 표준균주인 *B. amyloliquefaciens* (T) FZB42와 근연관계가 가장 가까웠으며, JBD17073 균주는 *B. methylotrophicus*로, JBH17182 균주는 *B. velezensis*로 확인되었다. JBG17019, JBD17065, JBG17057은 *B. subtilis*, JBD17064는 *B. amyloliquefaciens*(T) NBRC 15535와 가장 가까운 근연관계로 나타났다.

선발균주의 glutamate, glutamine 및 γ -PGA 생성능 비교

Bacillus 균주의 glutamate와 관련된 대사는 Fig. 2와 같이 합성과 분해에 여러 효소가 작용하면서 세포질 내와 배양액의 영양성분에 의해 영향을 받는다(26). 콩 단백질의 주 아미노산인 glutamate는 풍미를 증강하는 아미노산임과 동시에 *Bacillus* 균주에 의해 발효기간 동안 glutamine으로 전환되거나 γ -PGA 합성에 관여하는 중요한 아미노산이다

(27). 따라서 *Bacillus* 선발균주의 발효특성을 분석하기 위하여 발효 후 glutamate와 glutamine 함량변화를 측정할 결과(Table 2), 콩 열수 추출물에 유리되어 존재하는 glutamate와 glutamine의 함량은 각각 20.09 $\mu\text{g/mL}$ 와 31.86 $\mu\text{g/mL}$ 수준이었다. Protease 활성이 3.15와 2.94로 우수했던 JBG17015와 JBS17169 균주의 glutamate 함량은 각각 33.18 $\mu\text{g/mL}$ 와 34.84 $\mu\text{g/mL}$ 로 발효 전보다 각각 65.16%와 73.42% 증가하였다. Glutamine 함량은 amylase의 효소활성이 모두 우수한 JBD17089 균주가 259.2 $\mu\text{g/mL}$ 로 발효 전 31.86 $\mu\text{g/mL}$ 보다 8배 이상 증가하여 생

Table 2. Changes of glutamate and glutamine contents after fermentation in soybean water extracts

Strain	Amino acid productivity ($\mu\text{g/mL}$)	
	Glutamate	Glutamine
N.C. ¹⁾	20.09	31.86
JBG17015	33.18	217.87
JBG17019	20.65	108.11
JBG17044	18.80	41.83
JBG17057	17.15	138.05
JBD17064	8.66	86.02
JBD17065	8.66	185.08
JBD17073	30.97	178.67
JBD17076	16.59	208.60
JBD17089	21.57	259.20
JBD17109	26.36	32.57
JBS17138	12.35	24.73
JBS17145	8.48	24.02
JBS17146	12.72	26.16
JBS17169	34.84	26.87
JBH17182	29.31	21.17

¹⁾N.C. means non-inoculated soybean water extract.

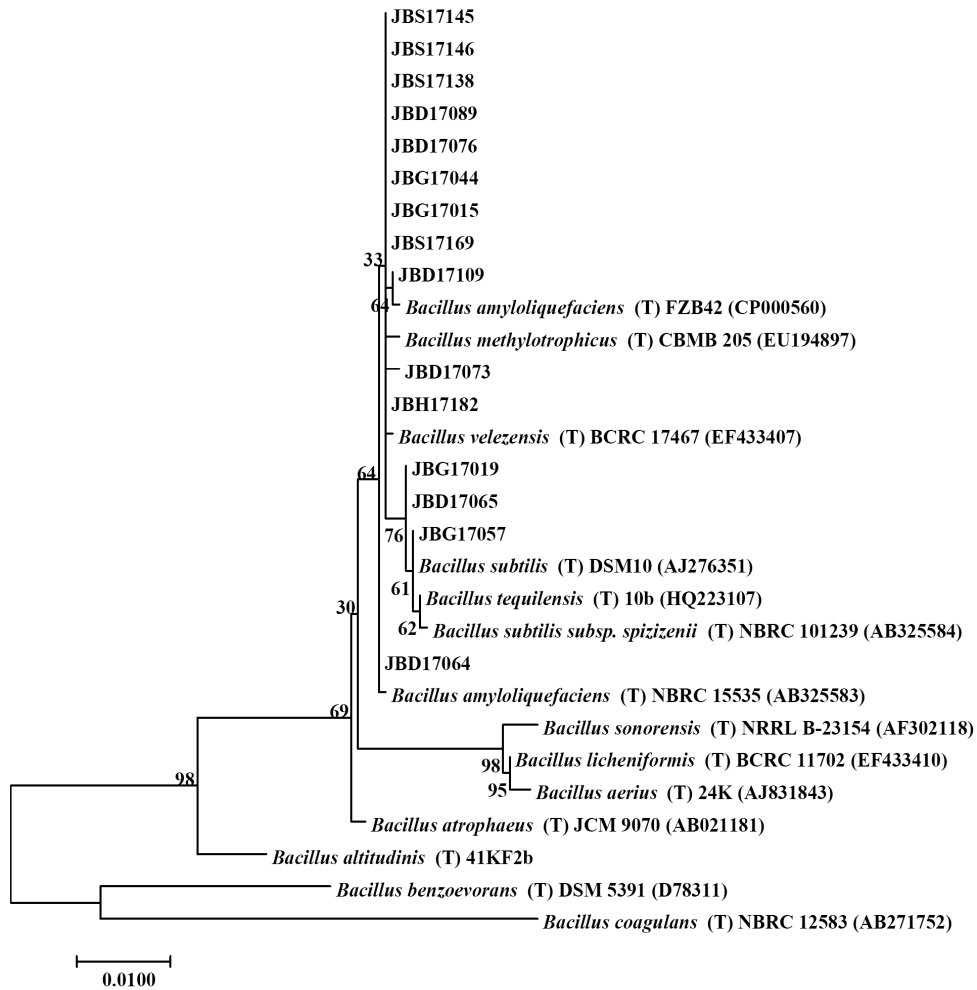


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of selected strain. All sequences used here were from *Bacillus* type strains. GenBank accession numbers are given in parentheses. The branching pattern was generated by maximum likelihood method. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values are expressed as percentages of 1,000 replicates.

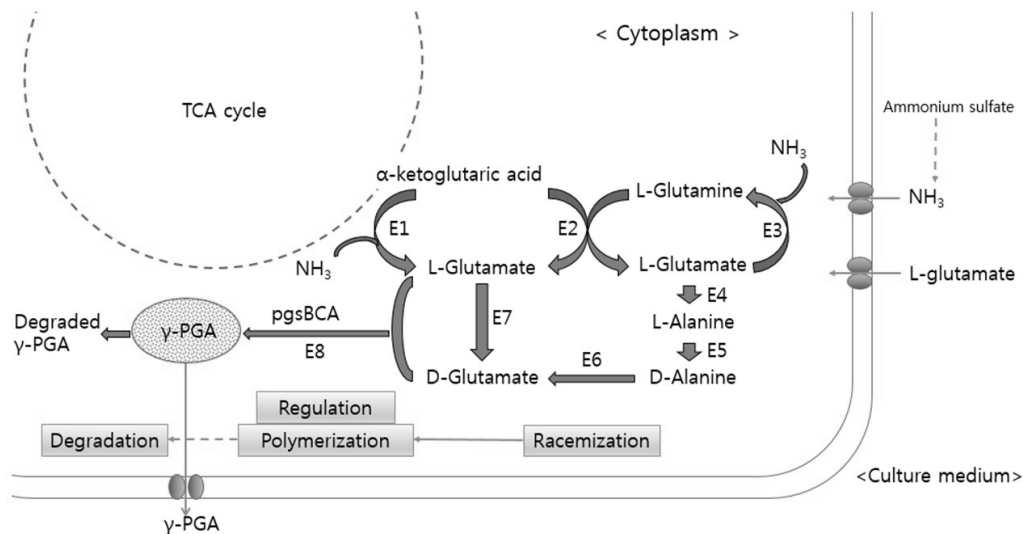


Fig. 2. The biosynthetic pathway for the production of γ -PGA (26). E1: glutamate dehydrogenase (GD), E2: glutamate 2-oxoglutarate aminotransferase, E3: glutamine synthetase (GS), E4: L-glutamic acid:pyruvate aminotransferase, E5: alanine racemase, E6: D-glutamic acid: pyruvate aminotransferase, E7: direction conversion, E8: PGA synthetase.

성능이 우수한 것으로 나타나 발효에 의해 glutamine의 전환율이 높을 것으로 예측되었다.

균주의 성장에 따른 glutamate 및 glutamine 함량변화와 γ -PGA의 생성량과의 관계는 균주의 발효특성에 따라 다르며, glutamate의 amide 결합을 통해 생성되는 γ -PGA는 glutamate 의존성과 비의존성으로 분류되는 것으로 알려져 있다(26). 따라서 glutamate 의존성 *Bacillus* 균주를 선별하기 위하여 glutamic acid가 첨가된 합성배지 상에서 γ -PGA의 생성능 평가를 시행하였으며, 그 결과는 Fig. 3A와 같다. 사용된 균주 중에서 JBG17019 균주는 glutamate 생성능이 낮았지만 γ -PGA 생성량이 2.49 mg/mL로 가장 높아 glutamate 의존성 균주임이 확인되었다. 한편 protease 활성이 가장 높았던 JBG17015 균주의 경우, 발효 전보다 glutamate 및 glutamine 함량이 증가하였으나 γ -PGA 함량은 낮은 것으로 확인되었다.

균주의 청국장 적용특성을 평가하기 위하여 청국장 발효 후에 회수된 γ -PGA의 함량을 분석한 결과(Fig. 3B), JBD17076 균주의 γ -PGA 생성능이 합성배지 상에서보다 청국장 환경에서 더 우수한 것으로 확인되었다. 한편 합성배지 상에서 γ -PGA 생성능이 가장 우수하였던 JBG17019는 청국장에서 γ -PGA 생성능이 높아 γ -PGA 고생성능을 보유한 산업적 균주로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

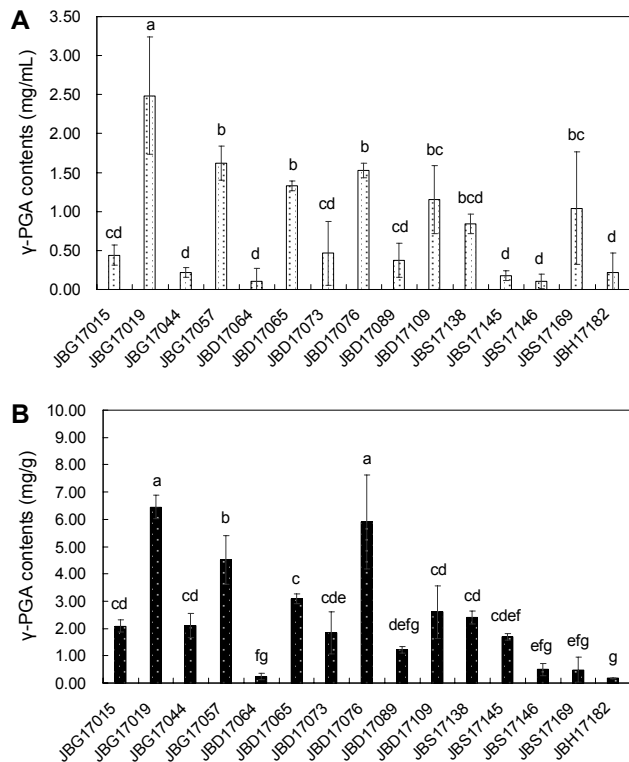


Fig. 3. The γ -PGA contents produced in synthetic culture medium and Cheonggukjang. A: Synthetic culture medium, B: Cheonggukjang. Error bar indicates the standard deviation of the mean, and means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

선발균주의 발효특성에 대한 요인 분석결과

전통장류로부터 분리 선발된 15개 *Bacillus* 균주의 발효 특성에 대해 요인분석을 하고자 R-program을 사용하여 주 성분 분석(PCA)을 한 결과는 Table 3과 같다. 효소(amy-lase, protease, cellulase, xylanase) 활성, glutamate 및 glutamine 함량, 합성배지와 청국장에서 γ -PGA 생성능 등 8가지 독립변수 간의 주 성분 분석을 시행한 결과, PC1, PC2 및 PC3의 세 가지 요인에 의해 설명되는 누적기여율(Cumulative Proportion)은 81.87%였다. 주 성분 함수는 Z1~Z3로 확인되었고, Z1은 PC1(amy-lase, cellulase, xylanase)이 양수(+)로, Z2는 PC2(γ -PGA productivity)가 음수(-)로, 그리고 Z3가 PC3(protease, glutamate, glutamine)가 음수(-)로 나타났고(Table 3), 각각의 절댓값이 클수록 각 요인의 영향이 크게 작용하는 것으로 나타났다. 결과적으로 *B. subtilis* JBG17019와 *B. amyloliquefaciens* JBD17076 균주는 PC1과 PC2가 주요인으로 작용하는 균주로 합성배지만만 아니라 청국장 발효에서 효소 활성이 높고 γ -PGA 생성능이 우수한 균주로 확인되었다. *B. amyloliquefaciens* JBD17089 균주의 경우 효소 활성은 우수하지만 γ -PGA 생성능이 낮았으며, glutamine 생성능은 259.2 μ g/mL로 가장 높았다. 한편 *B. amyloliquefaciens* JBD17109 균주는 효소 활성이나 γ -PGA 생성능이 높지 않아 평균으로서의 가치가 떨어졌지만 유해미생물에 대한 억제능이 우

Table 3. Principal component analysis (PCA) scores for fermentation characteristics

Strain	Principal component ¹⁾ analysis		
	PC1	PC2	PC3
JBG17015	-2.64	-0.35	-2.31
JBG17019	1.44	-2.67	-0.09
JBG17044	-0.01	0.85	-0.09
JBG17057	0.95	-1.64	0.17
JBD17064	0.85	2.06	0.48
JBD17065	1.10	-1.00	0.58
JBD17073	0.83	0.87	-1.46
JBD17076	1.54	-1.81	-0.39
JBD17089	1.58	1.32	-1.47
JBD17109	-0.26	-0.43	0.29
JBS17138	1.62	0.54	2.01
JBS17145	-2.42	0.05	1.52
JBS17146	-2.36	0.51	1.66
JBS17169	-3.32	-0.53	-0.54
JBH17182	1.09	2.25	-0.35

¹⁾PC1: amylase, cellulase, xylanase (+), PC2: γ -PGA productivity (-), PC3: protease, glutamate, glutamine (-).

Function of principal component

Z1=0.37(x1) - 0.38(x2)+0.54(x3)+0.53(x4) - 0.15(x5)+0.19(x6) +0.2(x7)+0.24(x8): PC1

Z2=0.41(x1) - 0.06(x2)+0.13(x3)+0.12(x4)+0.02(x5) - 0.17(x6) - 0.63(x7) - 0.61(x8): PC2

Z3=-0.3(x1) - 0.45(x2) - 0.07(x3)+0.01(x4) - 0.63(x5) - 0.56(x6) - 0.01(x7) - 0.03(x8): PC3

x1: amylase activity, x2: protease activity, x3: cellulase activity, x4: xylanase activity, x5: glutamate, x6: glutamine, x7: γ -PGA (synthetic culture medium), x8: γ -PGA (Cheonggukjang).

수하고 선발된 균주 중 유일하게 Gram 음성균에 대한 억제능을 보유하고 있다.

결과적으로 균주의 발효특성 분석에 주성분 분석을 접목하는 것이 산업적 용도에 맞는 맞춤형 균주의 선택과 최적 생성능을 확인하는 좋은 방법이라고 판단되었고, 그 결과 *B. amyloliquefaciens* JBD17076 및 *B. subtilis* JBG 17019가 높은 효소 활성과 γ -PGA 생성능을 보유하여 산업균주로서의 기대가 높을 것으로 보인다.

요 약

전통장류로부터 식품 유효요소를 생성하지 않는 *Bacillus* 균주를 분리하여 세포외효소 활성(amylase, protease, cellulase, xylanase)을 측정 후, 단백질 분해 활성이 우수한 14개 균주와 비교균주 1균주를 선발하였다. 선발된 균주에 대해 16S rRNA 유전자를 이용한 균주 동정을 실시한 결과, *B. amyloliquefaciens* 10종, *B. methylotrophicus* 1종, *B. velezensis* 1종, *B. subtilis* 3종이 분리 동정되었다. 그중 *B. subtilis* JBG17019, *B. amyloliquefaciens* JBD17076, *B. amyloliquefaciens* JBD17109 균주에서 식중독미생물에 대한 증식 억제능이 확인되었다. Glutamic acid 대사과 관련한 발효특성을 확인하기 위하여 선발된 *Bacillus* 균주에 대해 glutamate, glutamine 및 γ -PGA 생성능을 측정하였다. 발효특성과 γ -PGA 생성능에 대한 다변량 요인분석을 주성분(PCA) 추출법으로 분석한 결과, PC1(효소 활성(amylase, cellulase, xylanase), PC2(γ -PGA 생성능) 및 PC3(protease, glutamate 및 glutamine)의 3가지 주성분이 분류되었다. 주성분(PC)의 추출에 따라 *B. amyloliquefaciens* JBD17076 및 *B. subtilis* JBG17019 균주는 우수한 효소 활성 및 γ -PGA 생성을 하는 것으로 평가되었다.

감사의 글

본 연구는 2017년 산업통상자원부 산업기술거점기관지원(한국형 유용균주, 과제번호: R0004073) 사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- You KO, Oh YN, Kim BW, Nam SW, Jeon SH, Kim DE, Kim YM, Kwon HJ. 2005. Isolation of *Bacillus* sp. producing poly- γ -glutamic acid with high efficiency and its characterization. *Korean J Microbiol Biotechnol* 33: 200-206.
- Kimura K, Tran LSP, Do TH, Itoh Y. 2009. Expression of the *pgsB* encoding the poly- γ -DL-glutamate synthetase of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 1149-1155.
- Goto A, Kunioka M. 1992. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1031-1035.
- Kim YM. 2007. Production and characterization of γ -PGA produced by *Bacillus subtilis* GS-2 from Chungkookjang. *MS Thesis*. Konkuk University, Seoul, Korea. p 9-11.
- Ju D. 2010. Anti-obese effects of dietary poly gamma glutamate in diet induced obese rats. *MS Thesis*. Kookmin University, Seoul, Korea. p 13-17.
- Moon JA, Wang SG, Oh SY. 2013. Antidiabetic effect of soybean and chunggukjang, γ -PGA powder diet in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Entertainment Ind Assoc* 7(3): 263-276.
- Lee KH, Sim MO, Song YS, Jung HK, Jang JH, Kim MS, Kim TM, Lee HE, An BK, Jung WS. 2016. Effects of poly-gamma glutamate contents Cheonggukjang on osteoblast differentiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 664-670.
- Park C, Sung MH. 2009. New bioindustrial development of high molecular weight of poly- γ -glutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (chungkookjang). *Polym Sci Technol* 20: 440-446.
- Kunioka M. 1997. Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 469-475.
- Lee CH. 1973. Studies on the amino acid composition of Korean fermented soybean Meju products and the evaluation of the protein quality. *Korean J Food Sci Technol* 5: 210-214.
- Ogawa Y, Yamaguchi F, Yuasa K, Tahara Y. 2014. Efficient production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 1684-1687.
- Ahn YS, Kim YS, Shin DH. 2006. Isolation, identification, and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional Cheonggukjang. *Korean J Food Sci Technol* 38: 82-87.
- Bang BH, Jeong EJ, Rhee MS, Kim YM, Yi DH. 2011. Isolation of *Bacillus subtilis* GS-2 producing γ -PGA from Chungkookjang bean paste and identification of γ -PGA. *J Appl Biol Chem* 54: 1-6.
- Kim YS, Jeong JO, Cho SH, Jeong DY, Uhm TB. 2012. Antimicrobial and biogenic amine-degrading activity of *Bacillus licheniformis* SCK B11 isolated from traditionally fermented red pepper paste. *J Microbiol* 48: 163-170.
- Moon JY, Kwon SW, Hong SB, Seok SJ, Kim JS, Kim SJ. 2015. Characteristics and functional analysis of *Bacillus* strains from the fermented soybean products, Cheonggukjang. *J Microbiol* 51: 300-307.
- Lee ES, Song YJ, Kim KP, Yim EJ, Jeong DY, Cho SH. 2015. Manufacturing and qualify characteristics of the Cheonggukjang fermented using starter derived from rice straw removed *Bacillus cereus* selectively. *J Food Hyg Saf* 30: 65-73.
- Chang M, Chang HC. 2012. Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp.. *Int J Food Microbiol* 153: 269-274.
- Baek HJ, Zo YG, Ahn TS. 2009. Hydrolytic and metabolic capacities of thermophilic *Geobacillus* isolated from litter deposit of a lakeshore. *Korean J Microbiol* 1: 32-40.
- Yoon YM, An GH, Kim JK, Ahn SH, Cha YL, Yang J, Yu KD, Ahn JW, Moon YH, Koo BC, Choi IH. 2014. Xylanase activity of *Bacillus pumilus* H10-1 isolated from *Ceratotherium simum* feces. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 29: 316-322.
- Vermelho AB, Meirelles MNL, Lopes A, Petinate SDG, Chaia AA, Branquinha MH. 1996. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 755-760.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy

- algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7: 203-214.
22. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
 23. Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512-526.
 24. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
 25. Lee HJ, Kim JY, Lee JG, Hong SS. 2014. Biological control of lettuce sclerotinia rot by *Bacillus subtilis* GG95. *Korean J Mycol* 42: 225-230.
 26. Luo Z, Guo Y, Liu J, Qiu H, Zhao M, Zou W, Li S. 2016. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnol Biofuels* 9: 134.
 27. Marini JC. 2016. Interrelationships between glutamine and citrulline metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 19: 62-66.