

보 문

전통 장류 유래 *Bacillus subtilis* SCJ4의 특성확인 및 통계학적 방법을 이용한 배양조건 최적화

정수지 · 양희종 · 정성엽 · 정도연*

(재)발효미생물산업진흥원

Identification of characterization and statistical optimization of medium constituent for *Bacillus subtilis* SCJ4 isolated from Korean traditional fermented food

Su-Ji Jeong, Hee-Jong Yang, Seong-Yeop Jeong, and Do-Youn Jeong*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI)

(Received February 5, 2015; Accepted February 26, 2015)

ABSTRACT: 612 strains isolated from Korean traditional fermented food in Sunchang and their investigated biochemical characterization and ability of biogenic amines non-producing. We selected the SCJ4 having various activity by measurement of extracellular enzyme, antioxidant and antimicrobial activities. Selected strain SCJ4 by 16S rRNA sequencing and biochemical characterization was named *Bacillus subtilis* SCJ4. And then, we investigated cell growth of SCJ4, and optimized of culture medium constituents using response surface methodology as statistically method. Response surface methodology used Plackett-Burman experimental design for screening of medium constituent. Tryptone, peptone and $MgSO_4$ as medium constituent improving cell growth selected. In order to find out optimal concentration on each constituent, we carried out central composite design. Consequently, optimized concentrations of tryptone, peptone and $MgSO_4$ were predicted to be 15.35 g/L, 12.235 g/L, and 3.5 g/L respectively. Through the model verification, we confirmed about 1.28-fold improvement of the dried cell weight from 0.8767 g/L to 1.1222 g/L when compared to basal medium.

Key words: *Bacillus subtilis*, Korean traditional fermented food, medium constituent, optimization, response surface methodology

생물다양성과 생물유전자원의 가치가 높게 평가되고 있음에 따라 최근 이를 이용한 기술개발 관련 다양한 산업이 급증하고 있다. 하지만 ‘인류공동의 유산’으로 오랫동안 인식되어 온 생물유전자원은 2010년 제10차 유엔 생물다양성협약(CBD: Convention on Biological Diversity) 총회에서 나고야의정서(ABS: Access to genetic resources and Benefit-Sharing)가 채택됨으로 인해 앞으로 해외의 생물유전자원이나 관련 전통지식을 사용하기 위해서는 생물유전자원을 제공해주는 국가로부터 복잡한 이용허가절차를 받아야 하며, 이로부터 발생하는 이익에 대한 대가의 지불이 이루어져야만 한다(Lee and Kweon, 2012). 생물다양성협약(CBD)에 대응하기 위해 현재 국내에

서 보유하고 있는 생물유전자원에 대한 보호와 더욱더 다양한 유용 생물유전자원의 확보에 대한 노력이 절실한 가운데 농업 분야에서는 상추 균핵병의 항균력을 갖는 길항미생물 *Bacillus subtilis* GG95 (Lee *et al.*, 2014), 식물 병원균에 대한 항진균 활성을 갖는 *B. subtilis* KYS-10 (Kang *et al.*, 2012), 인삼뿌리썩음병 방제에 유효한 길항미생물(Kim *et al.*, 2012b) 등을 분리하여 농업미생물제제 확보를 위한 연구가 진행되고 있고, 식품분야에서는 발효주에 적용 가능한 야생효모분리(Lee *et al.*, 2010)와 한국의 대표적인 발효식품인 장류로부터 유산균(Yun *et al.*, 2013), 세균(Jeon *et al.*, 2013), 효모(Yi *et al.*, 2014) 등을 분리하여 식품산업발전에 기여할 수 있는 우수한 미생물을 확보하기 위한 연구가 꾸준히 진행되어지고 있다.

전통 장류는 예로부터 한국인의 주식에서 빼놓을 수 없는

*For correspondence. E-mail: godfilts@naver.com;
Tel.: +82-63-653-9597; Fax: +82-63-653-9590

발효식품으로서 안전성의 확보는 가장 중요한 과제이다. 장류 발효과정 중 식품의 부패에 관여하는 미생물의 amino acid decarboxylase 작용에 의해 생성되는 biogenic amine은 식품의 안전을 좌우하는 주요인자 중 하나(Kim *et al.*, 2012a)로 생체기능을 유지하기 위한 필수대사물질이지만 이들 중 histamine과 tyramine을 식품에서 과량으로 섭취할 경우 알레르기, 혈압강하, 두통과 같은 증상이 나타나기도 하며, putrescine과 cadaverine 같은 경우 장에서 강력한 발암물질인 nitrosamine, nitrosopiperidine, nitrosopyrrolidine을 생성할 수 있는 독성을 나타낸다(Kim *et al.*, 2012a). 이와 관련하여 biogenic amine을 저감화 시키고자 biogenic amine의 생성원인 조사(Han *et al.*, 2007), 저생성 스타터의 선발(Choi *et al.*, 2012), 등의 연구가 진행되고 있으며 이와 같이 미생물로부터 biogenic amine의 성장을 제어 및 저감화시킬 수 있는 방법의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

장류 발효에서 가장 중요한 역할을 하는 *B. subtilis*는 식품 및 의약품에서의 사용에 있어 안전한 GRAS 균주로 전통발효식품의 숙성 중 *Aspergillus* sp.가 생산하는 aflatoxin 등의 발암물질생성 및 균체 생육을 억제시켜주고(Ryu *et al.*, 2007), 펩타이드계 저분자 물질로 항진균 및 항세균 특성을 나타내며(Kim *et al.*, 2010), 발효과정 중 amylase, cellulase, protease와 같은 생물 산업에 활용될 수 있는 유용 효소들을 생산하는 것으로 알려져 있다(Yang *et al.*, 2014). 이러한 관점에서 미생물로부터 생산되는 유용한 특성에 대한 연구는 식품산업 및 생물공학산업에 안정성을 부여할 뿐만 아니라 산업적 발전에도 크게 기여할 수 있는 연구 분야라고 할 수 있다(Baek *et al.*, 2014).

산업적으로 유용한 미생물을 이용하고자 할 때에는 일반적으로 균주의 배양조건 및 영양 물질에 대한 조절이 중요하며, 균체량의 증식, 유용 물질 회수의 편리성, 경제성 등의 복합적인 조건을 고려하여 선정해야 한다(Choi *et al.*, 1997). 일반적으로 미생물 배양 및 배지조건에 관하여 최적조건을 설정할 때 가장 효과가 좋은 방법으로 반응표면분석법(response surface methodology)이 있는데 이는 실험계획법의 한 분야로 실험 경비를 절약할 수 있고, 각 요인들의 교호작용을 통한 최대 및 최소 반응치와 두 가지 이상의 결과를 동시에 예측 및 확인할 수 있는 장점을 갖고 있다(Kim *et al.*, 1994).

따라서 본 연구에서는 전통장류에서 항균 물질 및 유용 효소들을 생산하고, biogenic amine을 생성하지 않는 *B. subtilis*를 분리하고, 통계학적 기법인 반응표면분석법을 기반으로 균체량의 최적화를 통하여 산업적 적용이 가능한 최적의 배지 조성을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배양

메주, 된장, 고추장 시료는 전라북도 순창군 11개 면에서 전통적인 방법으로 제조된 장류 약 200여 종을 수집하였으며, 수집한 시료 1 g을 채취하여 멸균된 0.85% NaCl 용액 9 ml에 현탁하여 각 단계별로 희석한 후 희석액 100 μ l을 Luria-bertani agar (LB, Difco™) 배지에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 순수한 균주를 분리하기 위해 배양된 미생물의 형태적 차이를 이용하여 1차적으로 선별한 후 다시 순수 배양하여 균주를 분리하였다. 분리한 미생물은 다음연구에 사용을 위하여 -80°C에서 보관하여 사용하였다.

세포외 효소 분비능 측정

분리 미생물이 균체외로 방출하는 세포외 효소들 중 protease, cellulase의 활성 검증을 위하여 well diffusion 방법을 이용하였고, 각 효소와 특이적으로 반응할 기질의 성분이 포함된 고체 선별배지를 사용하였다. Protease 분비능은 skim milk를 기질로 선택하여 2%의 skim milk (Difco™)에 1.5%의 agar를 첨가한 skim milk agar 배지를 제조(Vermelho *et al.*, 1996)하여 사용하였고, cellulase 분비능은 carboxymethyl cellulose (CMC, JUNSEI chemical Co. Ltd.)을 기질로 선택하여 1% carboxymethyl cellulose를 함유한 CMC agar 배지를 제조(Teather and Wood, 1982)하여 사용하였다. 제조된 효소 분비능 측정 배지에 각 균주의 배양 상등액을 0.45 μ m membrane filter (Sartorius)로 제균한 뒤 100 μ l씩을 직경 8 mm의 준비한 well에 분주하여 25°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 protease 및 cellulase 분비능을 투명한 직경으로 조사하였다.

항산화 활성 측정

선별한 균주에 대한 항산화 활성의 측정은 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH, Sigma-aldrich)의 방법(Lee *et al.*, 2009)에 따라 실험하였다. 100 μ M DPPH Ethanol-용액 1 ml에 200 μ l의 배양 상등액을 가한 다음 반응 산물은 30분 동안 실온에서 반응 시킨 후 528 nm에서 UV/VIS spectrophotometer (SPECORD 200, Analytic jena)로 흡광도를 측정하여 아래 식에 따라 항산화 활성의 정도를 측정하였다. 대조구로는 배양 배지만을 첨가한 실험구를 사용하여 동일하게 측정하였다.

$$\text{Antioxidant activity}(\%) = \left[1 - \frac{\text{Abs}_{528\text{nm of sample}}}{\text{Abs}_{528\text{nm of control}}} \right] \times 100$$

항균활성 측정

식품 유해미생물을 대상으로 선별한 균주의 항균활성을 조사하였다. 식품 유해 미생물은 *Micrococcus luteus* (KCTC 1056), *E. coli* (KCCM 11596, KCTC 2443), *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (KCCM 40763), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1926), *Listeria monocytogenes* (KCCM 40307, KCTC 3710), *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* (KCTC 3444), *Shigella flexneri* (KCCM 40948), *Shigella sonnei* (KCTC 2518), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (KCCM 41446), *Bacillus cereus* (KCTC 1661, KCTC 3624) 등 총 13 균주를 대상으로 수행하였다. 유해 미생물의 대한 항균 활성은 유해 미생물이 포함되어있는 0.8% soft agar plate를 이용한 well diffusion 법(Park *et al.*, 2002)에 준하여 조사하였으며, 0.45 µm membrane filter (Sartorius)로 제균한 분리 균주의 배양 상등액 100 µl을 각 항균활성 측정 배지의 well에 분주하고 30°C incubator에서 24시간 동안 배양하여 억제환의 크기에 따라 항균활성을 측정하였다.

Biogenic amine 생성 확인

선별한 분리주에 대한 biogenic amine 생성여부는 정성 및 정량실험을 통해 확인하였다. 정성 실험을 통한 biogenic amine 생성여부의 확인은 biogenic amine 검출용 고체 배지를 제조하여 조사하였다. Biogenic amine 검출용 고체 배지는 0.25% glycerol, 0.006% bromocresol purple (BCP, Sigma-aldrich), 0.1% histidine과 tyrosine (Sigma-aldrich)이 함유되어있는 LB agar (pH 5.0) 배지를 제조하여 사용하였고, 멸균증류수로 3회 세척한 균체를 8 mm ADVANTEC paper disc (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)에 10 µl씩 분주한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 발색 정도에 따라 biogenic amine 생성 여부를 확인하였다(Chang and Chang, 2012). 정량실험을 통한 biogenic amine 생성여부는 LB 액체 배지에 각 분리 균주를 접종한 후 30°C shaking incubator 150 rpm에서 24동안 전배양한 후 전배양액 1 ml을 전구체 아미노산인 histidine 및 tyrosine 이 0.1% 포함된 LB 배지 9 ml에 접종하고, 37°C shaking incubator 150 rpm에서 24시간 동안 본배양 하였다. 본 배양액은 13,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 이를 biogenic amine 분석을 위한 전처리 시료로 사용하였다. 전처리 시료용액과 표준용액을 각각 0.5 ml씩 취한 후 1,7-diaminoheptane (Sigma-aldrich) 0.25 µl과 포화 Na₂CO₃ 용액 0.25 ml, acetone 1%, dansyl chloride (Sigma-aldrich) 용액 0.4 ml을 혼합한 후 45°C에서 1시간 동안 유도체화 하였다. 유

Table 1. Conditions of HPLC analysis for biogenic amine detection

Instrument	Agilent 1200 series (Agilent Technologies)
Column	CapcellPak C18 Column
Detector	DAD detector (254 nm)
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in H ₂ O B: 0.1% formic acid in Acetonitrile
Gradient condition	A:B = 45:55, 0-10 min A:B = 35:65, 10-15 min A:B = 20:80, 15-20 min A:B = 10:90, 20-30 min A:B = 10:90, 40 min over
Flow rate	1.0 ml/min
Temperature	40°C
Injection volume	20 µl

도체화한 시료에 10%의 proline (Sigma-aldrich) 용액 0.25 ml을 가한 후 여분의 dansyl chloride를 제거한 뒤 2.5 ml의 ethyl ether를 가하여 3분간 진탕하였고, 분리된 상등액을 취하여 증발시킨 후 잔사를 acetonitrile 0.5 ml에 정용하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 것을 분석에 사용하였다. Biogenic amine의 분석을 위한 기기 분석 조건(Jeong *et al.*, 2014)은 Table 1과 같다.

균주의 동정

최종 선별 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 분석을 실시하였다. 균주의 동정을 위하여 균체를 Nutrient broth (NB, Difco™)에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 원심 분리하여 균체를 회수한 뒤 ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep kit (Zymo Research Corp.)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 16S rRNA 유전자는 universal primer인 27F와 1492R로 합성하여 유전자 단편을 PCR로 증폭시켰고(Baek *et al.*, 2010), 증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)로 정제한 후 Cosmogentech Co.에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 또한 Bergey's manual of systematic bacteriology의 실험법(Leadbetter, 1974)에 기초하여 API 50CH kit (bioMérieux)를 이용해 당발효 특성을 통한 생화학적 특성을 조사하였다.

균체성장조사

배양시간에 따른 생육 정도를 조사하기 위하여 LB 배지에 선별한 균주 5%를 접종하여 30°C shaking incubator에서 150 rpm, 72시간 배양한 후 건조 균체량, 흡광도, 항산화 활성을 측정하였으며, 시간에 따른 균체 성장의 조사를 위해 4시간 간격

Table 2. 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	0.616667
2	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1.11
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00667
4	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0.483333
5	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	0.946667
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0.833333
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1.12333
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	0.95
9	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.65
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	0.83
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.94
12	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	0.735
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.93
14	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	0.736667
15	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.68

Dried cell weight by *Bacillus subtilis* SCJ4 cultivated at 150 rpm, 30°C for 28 h. The experiments were carried out in triplicate.

^aResponse were dried cell weight from *B. subtilis* SCJ4.

으로 배양액을 회수하였다. 건조 균체량의 측정은 배양액 10 ml를 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 후 멸균 증류수로 3회 세척하여 80°C에서 항량에 도달할 때까지 건조한 후 무게를 측정하였다. 또한 흡광도의 조사를 위하여 배양액 1 ml를 회수하여 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 후 멸균 증류수로 3회 세척하고, 멸균 증류수 1 ml에 재부유하여 UV/VIS spectrophotometer (SPECORD 200, Analytic jena) 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 항산화 활성은 앞선 방법에 따라 동일하게 측정하였다.

반응표면분석법을 이용한 배지조성의 최적화

배양 조건의 최적화를 위해 발효공정 및 생산 공정의 최적화를 수행하는데 가장 영향력이 있는 반응표면분석법(Response surface methodology)을 이용하여 통계학적으로 최적화를 수

행하였다. 실험계획, 데이터 분석 및 배지의 최적화 분석은 Design Expert 9.0 (Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc.) 프로그램을 사용하였고, 실험계획법은 Plackett-Burman design과 중심합성계획법(CCD, Central composite design)에 따라 설계하였다. 먼저 균체 성장을 위한 최적 배지 조성을 설정하기 위해 11개의 배지 성분 중 균체 성장에 주 효과가 있는 3개의 성분을 선별하기 위해서 다양한 배지 조성 중 주 효과를 주는 요소를 선별할 수 있는 PBD 실험계획법을 사용하였다. 배지 구성성분의 선별을 위한 실험 모델의 변수와 수준은 Table 2에 나타내었으며, PBD의 계획법에 따라 11개의 변수를 -1, 0, 1로 부호화하였고, 종속변수로는 건조 균체량(g/L, Y)을 설정하여 실험을 실시하였으며, 3개의 중심점을 포함한 15개의 실험계획으로 이루어진 모델을 실시하였다. 다음으로 선별된 배지성분의 최적 농도를 결정하기 위해 배지성분 각각의 농도 변화

Table 3. 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
Tryptone	X ₁ (g/L)	2.5	7.5	12.5	17.5	22.5
Peptone	X ₂ (g/L)	2.5	7.5	12.5	17.5	22.5
MgSO ₄	X ₃ (g/L)	0.5	1.5	2.5	3.5	4.5
Runs	X ₁	X ₂	X ₃	Response ^a , Y (g/L)		
1	-2	0	0	0.343333		
2	-1	1	-1	0.815		
3	1	1	-1	0.84		
4	1	1	1	1.02		
5	2	0	0	0.85		
6	-1	-1	-1	0.823333		
7	0	0	-2	1.05333		
8	1	-1	-1	0.853333		
9	0	0	0	0.996667		
10	0	0	0	1.02667		
11	0	2	0	0.933333		
12	-1	1	1	0.873333		
13	-1	-1	1	0.846667		
14	0	0	2	1.105		
15	0	0	0	0.976667		
16	0	-2	0	1.00333		
17	1	-1	1	1.00333		

Dried cell weight by *B. subtilis* SCJ4 cultivated at 150 rpm, 30°C for 28 h. The experiments were carried out in triplicate.

^aResponse were dried cell weight from *B. subtilis* SCJ4.

가 균체 생산성에 미치는 영향을 중심합성계획법을 이용하여 조사하였다. 배지 조성 성분의 농도 결정을 위한 실험은 Table 3과 같이 앞서 PBD 방법을 통해 선별한 균체량 생산 증가에 중요한 독립변수로 고려되는 인자 즉, tryptone (X₁), peptone (X₂), MgSO₄ (X₃)의 농도(g/L)에 대한 중심값과 범위를 설정하여 각각을 -2, -1, 0, 1, 2의 5개의 수준으로 부호화하였다. 또한, 독립변수의 영향을 받는 종속변수(Y, 균체량)를 측정하여 결과를 회귀분석에 사용하였다. 3회(중심점 3회) 반복 실험하여 평균값을 회귀 분석에 사용하였으며, 이때 3개의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀 모형식은 아래와 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 회계계수이고, 회귀분석에 의한 모델식의 예측은

Design Expert 9.0 (Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc.)을 이용하여 분석하였고, 회귀분석 결과를 바탕으로 임계점 분석 및 최고 균체 생산을 위한 각 배지 성분의 최적 농도를 결정하였다.

결과 및 고찰

Biogenic amine 비생성 균주의 분리

다양한 기능성 및 생리활성을 갖는 국내 토종 발효미생물을 분리하기 위해 전라북도 순창군에서 전통적인 방법으로 제조한 메주, 된장, 고추장 시료 약 200여 종을 수집하였다. 수집한 시료를 멸균 증류수에 현탁하여 단계 희석법을 이용하여 균주를 배양한 후 육안으로 집락의 형태, 색 등의 형태적 특징에 따라 612종의 미생물을 분리하였다. 분리주를 대상으로 biogenic amine 비생성 균주의 1차 선별을 위하여 biogenic amine 검출용 고체배지를 이용해 정성 실험을 진행하였고, 203종의 분리주가 biogenic amine을 생성하지 않음을 확인하였다(결과 미제시). 1차 선별을 완료한 균주는 LB 액체 배지에 접종하여 2일간 배양한 후 다음 연구에 사용하였다.

세포외 효소 분비능 측정

전통 장류의 발효과정 중에는 amylase, protease, cellulase, lipase 및 tyrosinase와 같은 미생물 유래 다양한 세포외 효소가 분비되며, 이러한 효소에 의해 풍미 뿐만 아니라 다양한 기능성을 갖는 2차 대사산물이 생성된다고 보고되고 있다(Rhee et al., 2000; Kim et al., 2007; Oh et al., 2010). 특히 protease는 발효 시 단백질질을 분해하여 특유의 구수한 맛 성분인 유리아미노산 함량에 영향을 미치며(Kim et al., 2007), cellulase는 곰팡이 및 세균 등에 의해 분비되는 cellulase에 의해 분해되어 이용되며, cellulase의 성분으로는 endo-1,4-β-D-glucanase, exo-1,4-β-D-glucanase, β-glucosidase에 의하여 isoflavones 배당체가 aglycon으로 전환되어 항산화 등의 기능성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Ra et al., 2004). 따라서 1차 선별한 203종의 분리주를 대상으로 well diffusion 방법을 통해 protease 및 cellulase 생성능을 조사하였고, 86종의 분리주가 protease 및 cellulase 2가지 효소를 모두 생성하면서 활성능 또한 우수한 것을 확인하였다(Table 4).

항균활성 측정

Biogenic amine 비생성 및 세포외 효소 생성능이 우수한 균주 86종을 대상으로 항균활성을 확인하기 위해 13종의 병원

Table 4. Comparison of enzyme activity, antibacterial activity, antioxidant activity and contents of the biogenic amine for selected strains

Test contents		Selected strains								
		SCJ3	SCJ4	SCJ34	SCJ123	SCJ287	SCJ305	SCJ520	SCJ555	SCJ587
Enzyme activity (mm) ^a	Protease	11	14	12	13	14	12	10	12	13
	Cellulase	13	14	13	13	11	12	14	11	10
Antimicrobial Activity (mm) ^a	TS1 ^b	- ^c	14	8	-	8	-	7	-	8
	TS2	-	12	-	9	10	12	-	11	9
	TS3	9	13	-	-	-	-	-	-	-
	TS4	12	11	7	-	7	-	9	10	9
	TS5	-	14	-	10	11	9	-	7	-
	TS6	7	14	10	7	8	11	10	-	9
	TS7	-	11	-	-	-	-	10	7	-
Antioxidant activity (%)		15.4244	7.5865	12.2449	2.9873	13.3097	17.5983	5.1760	5.1316	0.3106
Biogenic amines (mg/L)	Histamine	N.D. ^d	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.
	Tyramine	N.Q. ^e	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.

^a Size of clear zone (diameter).

^b Tested 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.

^c No formation of clear zone.

^d Not detected.

^e Not quantified.

성 그람양성 및 음성 세균이 포함되어있는 0.8% soft agar plate 에 well diffusion 방법을 통한 생육저지대 측정법으로 항균 활성 여부를 조사하였다. 현재까지 전통 장류 유래 미생물의 항균활성에 대한 연구는 전통된장에서 분리한 균주가 *E. coli* 및 *S. aureus* 등의 유해균에 대한 항균 효과(Ryu *et al.*, 2007), 초피를 첨가한 전통 장류가 *E. coli* O157: H7에 대해 뛰어난 항균 활성(Kim *et al.*, 2007) 등 식품 유해 미생물에 대한 다양한 효과가 보고되고 있다. 활성 조사 결과 선별 분리주 대부분은 1개 이상의 유해 미생물에 대한 항균활성을 갖고 있었고, SCJ3, SCJ4, SCJ34, SCJ123, SCJ287, SCJ305, SCJ520, SCJ555, SCJ587 등 9종이 다양한 유해미생물에 항균활성을 갖고 있었으며 활성능 또한 우수하였다. 분리주 중 SCJ4은 그람 양성세균인 *L. monocytogenes* (KCCM 40307, KCTC 3710), *L. subsp.* (KCTC 3444), *M. luteus* (KCTC 1056), *B. cereus* (KCTC 1661, KCTC 3624)와 그람 음성세균인 *S. typhimurium* (KCTC 1926) 등 7종의 유해 미생물에 대한 우수한 항균활성을 나타내었다 (Table 4). 특히 SCJ4는 *L. monocytogenes*와 같은 저온성 병원 미생물의 성장 억제에도 효과적인 것으로 예상되며, 세포외 효소활성이 우수하고 항균물질 생산성이 높은 균주를 선발하여 발효에 이용할 경우 생리활성이나 저장성이 증진된 장류의 개발이 가능할 것이다. 또한 전통 장류 발효에 다양한 항 유해 균 스펙트럼을 갖는 균주의 사용은 HACCP 시스템의 도입이 어려운 장류 업체 및 소규모 제조업체에서는 오염문제를 해결

하는 효과적인 대안이 될 것이며, 장류 발효 이외에도 동물 사료, 의료, 공중 위생분야에서 사용 가능성을 고려해 볼 수 있을 것이다.

항산화 활성 측정

항균력이 있는 9종의 분리주의 항산화 활성 측정은 DPPH 에 의한 free radical 제거효과를 측정하여 조사하였다. DPPH 는 항산화 활성을 측정하기 위한 대표적인 기질로 페놀성 물질에 대한 항산화작용의 지표 중 하나이며, free radical에 전자를 공여하여 식품 내 지방질 산화를 억제하고, 인체 내 활성산소에 의한 노화를 억제하여 질병 및 노화를 예방하는데 중요한 역할을 한다(Lee *et al.*, 1997). 특히, *Bacillus* sp.는 균체가 성장함에 따라 항산화능이 증가한다고 보고되고 있다(Jeong *et al.*, 2003). DPPH를 이용하여 분리주의 항산화 활성을 측정한 결과 선별 균주 중 SCJ3, SCJ34, SCJ287, SCJ305가 10% 이상의 DPPH 활성을 나타냈으며, SCJ4는 7.5865%의 항산화 활성을 갖고 있어 4개의 균주와 비교하여 낮은 수치를 나타냈다. 하지만 앞선 조사를 통해 밝혀진 다른 활성능에서는 가장 우수한 결과를 보였고, 미생물에 의한 항산화 활성의 경우 배지의 조성 및 배양 조건에 따라 항산화 활성의 차이를 나타낸다고 보고(Kim and Heo, 2005)되어 SCJ4 균주를 포함한 5개의 균주를 선별하였다. 이러한 결과는 발효식품에서 항산화에 관

여하는 균주를 분리할 경우 *Bacillus* 속과 같은 프로바이오틱 생균이 항산화 활성을 나타낸다는 보고와도 일치하는 결과이다(Cha *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2003).

Biogenic amine 생성 확인

Biogenic amine은 주로 단백질이 함유되어 있는 발효식품에서 높은 농도로 검출되며, 식품의 발효 및 숙성과 저장과정에서 아미노산이나 탈탄산효소활성을 갖는 미생물에 의해 생성된다(Han *et al.*, 2007). Biogenic amine 중 histamine은 사람이 섭취 시 식중독과 알레르기를 유발하기도 하며, tyramine의 경우 혈관수축인자들을 분비해 고혈압을 일으킬 수 있다(Kwak *et al.*, 2014). 따라서 선별한 균주를 histidine, tyrosine이 포함된 액체배지에 첨가하고, 해당 아미노산에 대한 탈탄산 활성능과 균주가 생성한 histamine, tyramine의 함량을 측정할 결과를 Table 4에 나타내었다. SCJ3, SCJ287, SCJ555의 일부 분리주에서 biogenic amine이 검출되었으나 정량이 되지 않는 검출수치를 나타내었고, 식품 내 histamine은 8-40 mg은 약한 정도, 40-80 mg은 중증 정도, 100 mg 이상은 극심한 중독 증상을 일으킬 수 있고, tyramine은 100 mg 이상을 섭취해야 중독증상을 일으킬 수 있다고 보고하고 있다(Majjala and Eerola, 1993) 앞서 선별한 균주 모두 유해한 수준은 아님을 확인하였다. 특히 SCJ4, SCJ34, SCJ123, SCJ305, SCJ520, SCJ587의 분리주에서는 histamine, tyramine이 모두 검출되지 않아 앞서 진행한 biogenic amine 검출용 고체배지를 이용해 진행한 정성분석과 결과와 동일한 것을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 세포의 효소활성과 항균 및 항산화 활성, biogenic amine 생성확인 모두에서 우수한 결과를 나타낸 SCJ4를 최종 균주로 선정하였다

균주의 동정

최종 선별한 SCJ4의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과를 이용하여 BLAST search 결과 *Bacillus subtilis*로 판명되었으나, *Bacillus* 속은 다양한 환경에서 포자를 생성하여 생존할 수 있어 환경에 따라 종 다양성이 매우 큰 세균으로 16S rRNA 염기서열에서 100% 상동성을 나타내더라도 서로 다른 종으로 분류될 수 있기 때문에(Seki *et al.*, 1978) 추가로 API 50CH kit을 사용하여 당 대사능을 분석하였다. 당 대사능 분석 결과는 Table 5와 같으며 glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-mannitol 등은 발효할 수 있으나 erythritol, D-arabinose, D-xylose, L-xylose 등에는 비 발효성을 나타내며 *B. subtilis*로 동정되어 16S rRNA sequencing

Table 5. Carbohydrates assimilation of SCJ4 by API 50 CHB kit

Enzyme ^a	SCJ4	Enzyme ^a	SCJ4
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.

결과와 일치함을 확인하였고, 최종적으로 *Bacillus subtilis* SCJ4로 명명하였다. 최종 선별 균주인 SCJ4는 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 *Bacillus subtilis* KCCM 11569P로 기탁하였다.

균체성장조사

SCJ4의 성장곡선을 확인하기 위해 TSB (Oxoid CM0129) 배지에 접종하여 30°C shaking incubator, 150 rpm에서 배양하였고, 4시간 간격으로 흡광도, 건조 균체량과 DPPH를 측정하였다. 생육곡선 측정 결과 4시간에서 28시간까지 대수기를 나타냈고, 24시간 이후 증식이 점차 느려져 28시간부터 정지기에 들어갔다(Fig. 1). 또한 28시간에 흡광도 1.3848 (OD₆₀₀)와 0.8767 g/L의 건조 균체량으로 가장 높은 세포 성장을 보였다. 24시간에서 28시간 이내에 *B. subtilis*의 세포 성장이 정지기에 도달한다는 보고(Yang and Chang, 2007; Chi *et al.*, 2011)

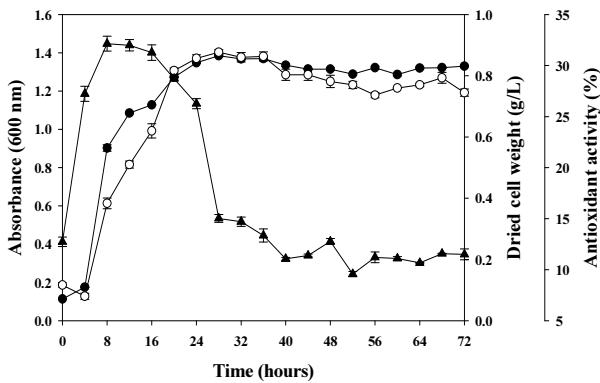


Fig. 1. The time course profile of cell growth. Time course profile of absorbance, dried cell weight, and antioxidant activity by *B. subtilis* SCJ4 cultivated in LB medium (as basal medium) at 150 rpm, 30°C (○, absorbance 600 nm; ●, dried cell weight; ▲, antioxidant activity).

와 일치하는 결과를 보였으며, 항산화능의 경우 생육 초기에 증가하여 24시간 이후 급속히 감소하는 경향을 보였다. 이는 *Bacillus* sp.의 성장에 따라 항산화능이 증가되었다는 보고 (Jeong *et al.*, 2003)와 유사한 경향을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 최적 배양 시간을 대수기에서 정지기로 들어가는 24시간으로 설정하였다.

Plackett–Burman experimental design (PBD)

항산화능 및 다양한 효소활성과 항균활성을 갖는 *B. subtilis* SCJ4의 최적의 균체성장을 위한 배지 조성을 확인하기 위하여 통계학적 방법을 이용하여 배지 최적화를 수행하였다. 먼저 중요한 실험변수를 선별하는 방법으로 실험횟수를 감소시킬 수 있으며 변수들의 영향을 조사할 수 있는 PBD를 이용하여 탄소원 5종(glucose, fructose, molasses, lactose, mannitol), 질소원 3종(yeast extract, tryptone, peptone), 기타 미량원소 3종(NaCl, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄)의 영향을 조사하였다. 실험을 진행하기 위한 high level(+)값과 low level(-)값의 설정은 농도가 높은 탄소원의 경우 중심값에서 10 g/L로 조절하였으며, 질소원은 8 g/L, 기타 미량원소 0.4 g/L로 변수를 조절하였다 (Table 2). 각각의 실험 변수의 level과 균체량에 대한 plot은 Fig. 2와 같으며, tryptone, peptone, NaCl, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄는 높은 수준에서 균체량이 증가하는 경향을 보였고, 나머지 변수는 높은 수준으로 갈수록 균체량이 감소하는 것으로 분석되었다. 반응값에 대한 각 변수의 영향, 모델 계수, F-value, P-value와 신뢰수준에 대한 분석결과는 실험결과에 의한 통계처리를 통하여 Table 6에 나타내었다. 균체 성장을 위한 최적의 결과값을 얻기 위해 신뢰수준이 90% 이상으로 나타난 glucose 94.41%, fructose 91.67%, tryptone 98.73%, peptone

92.07%, MgSO₄ 99.12%를 중요한 인자로 선정하였다. 따라서 앞선 실험 변수의 수준과 균체량에 대한 plot 결과를 토대로 변수의 수준이 증가함에 따라 균체량이 증가하는 요인(positive effects, coefficient with + sign)과 신뢰수준의 결과를 기반으로 하여 tryptone, peptone, MgSO₄를 균체 성장을 위한 최적의 factor로 선별하였다.

Central composite design (CCD)

최종 선별된 배지성분의 최적 농도를 결정하기 위해 배지 성분 각각의 농도 변화가 *B. subtilis* SCJ4의 균체 성장에 미치는 영향을 반응표면분석법 가운데 중심합성계획법을 이용하여 분석하였다. 중심점 3개를 포함한 모두 17개의 구간에서 실험을 실시하였고, 배양조건을 최적화하기 위하여 3가지 독립 변수들의 조합에 대한 종속변수(건조 균체량)의 반응값을 Table 3에 나타내었다. 반응값에 대한 회귀분석의 모델식 예측은 Design expert program을 이용하였으며, 분산분석을 수행한 결과 R-square(결정계수)는 0.9175로 1에 가까운 값을 나타내어 높은 유의성을 보였으며, 전체 모델에 대한 유의확률이 0.0048로 0.05보다 작아 가정된 실험 모형이 자료에 적합함을 확인하였다. 또한 변동계수(CV, Coefficient of variation)는 8.22로 상대적으로 낮은 수치를 나타내어 균체량 생산에 변수들의 독립적인 영향 뿐만 아니라 변수들 간의 상호작용도 매우 높음을 확인하였다(Table 7). 균체량에 대한 반응표면 회귀 방정식은 아래와 같다.

$$\begin{aligned}
 Y = & 0.99072 + 0.085729 * \text{Tryptone} - 0.00739581 \\
 & * \text{Peptone} + 0.032188 * \text{MgSO}_4 - 0.00187488 \\
 & * \text{Tryptone} * \text{Peptone} + 0.031042 * \text{Tryptone} \\
 & * \text{MgSO}_4 + 0.00812487 * \text{Peptone} * \text{MgSO}_4 - 0.10199 \\
 & * \text{Tryptone}^2 - 0.00907626 * \text{Peptone}^2 + 0.018632 \\
 & * \text{MgSO}_4^2
 \end{aligned}$$

균체량 증가에 각 변수가 미치는 영향을 쉽게 확인하기 위해 3개의 변수 중 한 개의 독립변수를 최적점에 고정한 후 나머지 2개의 변수를 이용하여 삼차원 형태로 교호작용을 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 최종적으로 반응표면분석을 통해 *B. subtilis* SCJ4의 균체 성장에 가장 영향을 주는 독립변수의 농도를 예측할 수 있었으며, 실험 범위내에서 tryptone과 MgSO₄는 첨가량이 증가할수록 균체량이 증가한 반면, peptone의 경우 첨가량에 따라 큰 변화를 나타내지 않았다. 중심합성

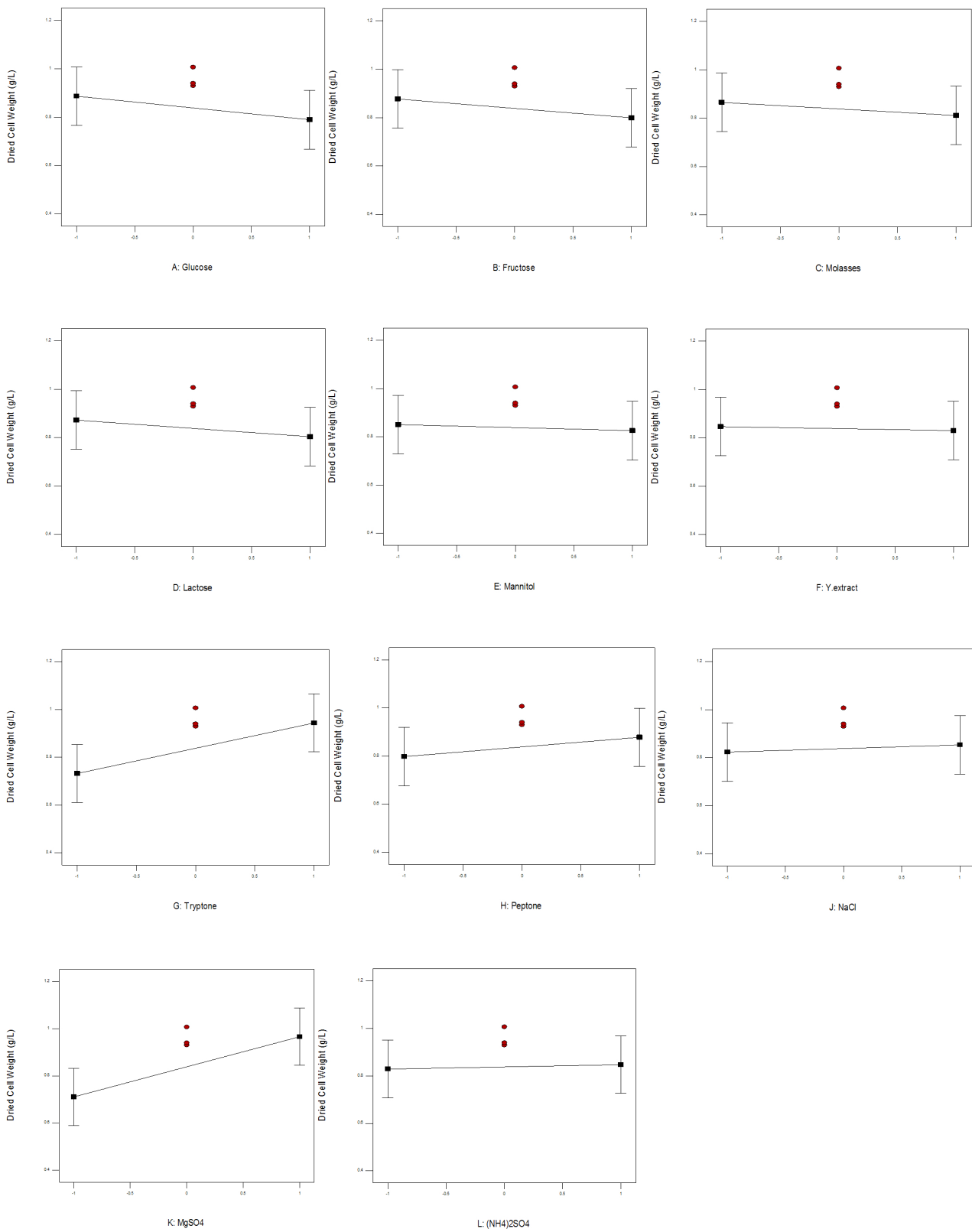


Fig. 2. Main effect of media components on biomass production.

Table 6. 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 *B. subtilis* SCJ4

Variable (X _i)	Effect (E _{xi})	Coefficient (β _i)	Sum of squares	F-value	P-value	Confidence level (%)
Mean	-	-	-	22.24	0.0438	-
Glucose	-0.098	-0.049	0.029	16.42	0.0559	94.41
Fructose	-0.078	-0.039	0.018	10.52	0.0833	91.67
Molasses	-0.054	-0.027	0.008802	5.07	0.1533	84.67
Lactose	-0.069	-0.034	0.014	8.13	0.1041	89.59
Mannitol	-0.025	-0.012	0.001834	1.06	0.4123	58.77
Yeast extract	-0.016	-0.008194	0.000805	0.46	0.5661	43.39
Tryptone	0.21	0.11	0.13	77.17	0.0127	98.73
Peptone	0.080	0.040	0.019	11.13	0.0793	92.07
NaCl	0.030	0.015	0.00265	1.53	0.3422	65.78
MgSO ₄	0.26	0.13	0.20	112.54	0.0088	99.12
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.019	0.009305	0.001039	0.60	0.5202	47.98

Table 7. Analysis of variance (ANOVA) of central composite design for improving dried cell weight about *B. subtilis* SCJ4. Response model was suggested quadratic model through the lack of fit tests

Source	Coefficient estimate	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	Standard error	F-value	P-value, Prob > F ^a
Model	0.99	0.43	9	0.048	0.041	8.65	0.0048
X ₁ -Tryptone	0.086	0.12	1	0.12	0.019	21.31	0.0024
X ₂ -Peptone	-0.007396	0.0008752	1	0.0008752	0.019	0.16	0.7023
X ₃ -MgSO ₄	0.032	0.017	1	0.017	0.019	3.00	0.1267
X ₁ X ₂ ^b	-0.001875	0.0000281	1	0.0000281	0.026	0.005096	0.9451
X ₁ X ₃	0.031	0.007709	1	0.007709	0.026	1.40	0.2758
X ₂ X ₃	0.008125	0.000528	1	0.000528	0.026	0.096	0.7661
X ₁ ²	-0.10	0.20	1	0.20	0.017	36.51	0.0005
X ₂ ²	-0.009076	0.001596	1	0.001596	0.017	0.29	0.6074
X ₃ ²	0.019	0.006724	1	0.006724	0.017	1.22	0.3062
Residual		0.039	7	0.005518			
Lack of Fit		0.037	5	0.007472		11.80	0.0800
Pure Error		0.001267	2	0.0006333			
Cor Total ^c		0.47	16				
Standard deviation		0.074		Press ^d		0.32	
Mean		0.90		R - squared		0.9175	
Coefficient of variation		8.22		Adjusted R - squared		0.8114	

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

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

^b X₁X₂, X₁X₃, X₂X₃ represent the interaction effect of variables X₁, X₂, and X₃. X₁², X₂², and X₃² are the squared effects of the variables.

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

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

계획법을 통해 최대 균체량은 1.07497 g/L로 예측되었고, 이때의 각 변수의 농도는 tryptone 15.35 g/L, peptone 12.235 g/L, MgSO₄ 3.5 g/L이었다.

실험계획 모델의 검증

반응표면분석법을 이용하여 실시한 최적화 배지에서의 *B. subtilis* SCJ4의 균체성장을 검증하기 위하여 예측된 최적 균

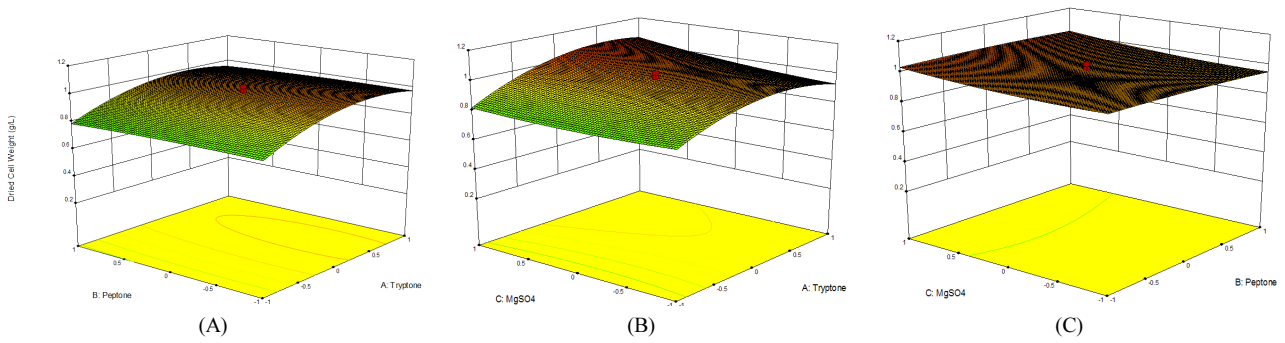


Fig. 3. Three-dimensional response surface of maximal dried cell weight showing the interactions between tryptone, peptone, and $MgSO_4$ concentration. (A) Response surface plot showing the effect of tryptone (X_1) and peptone (X_2) on dried cell weight (Y, response value) (B) Response surface plot showing the effect of tryptone (X_1) and $MgSO_4$ (X_3) on dried cell weight (Y, response value) (C) Response surface plot showing the effect of peptone (X_2) and $MgSO_4$ (X_3) on dried cell weight (Y, response value).

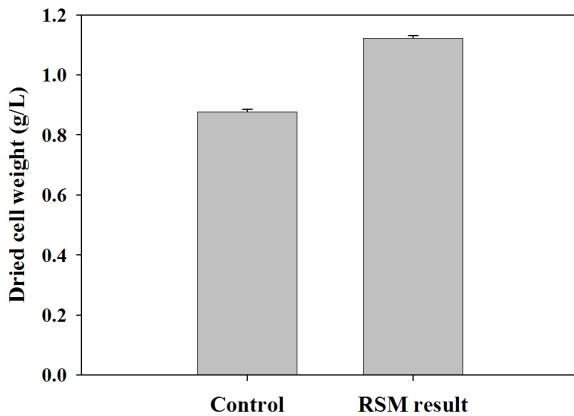


Fig. 4. The comparison of LB (basal) and optimal culture broth after incubation for 28 h. The experiments were carried out in triplicate ($P < 0.05$).

체량 생산배지에 SCJ4를 접종하여 균체의 생산량을 확인하였다. 대조구로는 최적화를 실시하기 이전의 기본 TSB 액체 배지를 사용하였다. 최적 배지에서 배양한 결과 SCJ4의 건조균체량은 1.1222 ± 0.008819 g/L로 중심합성계획법으로 실시하여 예측된 1.07497 g/L와 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 중심합성계획법을 이용하여 실시한 실험모델의 예측값이 신뢰할 수 있음을 확인하였고, 최적화를 실시하기 이전인 대조구의 균체량 0.8767 ± 0.008819 g/L과 비교하면 28% 증가한 0.2455 g/L의 균체량이 향상되었다(Fig. 4). 또한 최적화 배지에서 배양한 결과 세포의 효소활성은 배지 조성에 영향 없이 동일한 활성능을 보였고, 항균활성의 경우 선별과정에서 활성을 보인 7개의 균주 중 *S. typhimurium* KCTC 1926, *M. luteus* KCTC 1056, *B. cereus* KCTC 3624은 모두 동일한 활성을 보였고, *L. monocytogenes* KCCM 40307, *L. monocytogenes* KCTC 3710, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444, *B. cereus* KCTC 1661

의 경우 40–50% 활성능이 증가하였다. DPPH에 의한 항산화능 또한 7.5865%에서 23.1586%로 3배 증가하여 균체의 성장은 높은 증가를 나타내지 않았지만 SCJ4 균주가 갖는 활성은 증가하는 효과를 얻을 수 있었다. 추후 SCJ4의 산업화 및 다양한 분야에 응용을 위해서는 안전성 및 산업화를 위한 최적화 공정이 필요하지만, 다양한 분야에 응용이 가능한 *B. subtilis* 로의 가능성을 확인하였다.

적 요

순창군에서 제조된 전통 장류로부터 612종의 다양한 미생물을 분리하였고, 612종의 미생물 중에서 생리활성 분석 및 biogenic amine 생성여부를 조사하여 최종적으로 *Bacillus subtilis* SCJ4를 선별하였다. 최종 선별한 균주 SCJ4의 생화학적 특성과 16S rRNA 염기서열 분석에 의해 *B. subtilis* SCJ4로 명명하였으며, *B. subtilis* SCJ4의 산업적으로 사용이 적합한 최적배지조성을 확립하기 위하여 통계학적 방법인 반응표면 분석법을 사용하였다. 실험계획법은 배지조성을 예측하기 위해 Plackett-Burman design을 사용하여 모델을 설정하였다. 실험 모델을 통하여 선별된 배지 조성으로는 tryptone, peptone, $MgSO_4$ 로 예측되었으며, 배지조성에 대한 농도를 설정하기 위해 중심합성계획법을 사용하여 최적화를 수행하였다. 최종 예측된 배지 조성의 농도는 tryptone 15.35 g/L, peptone 12.235 g/L, $MgSO_4$ 3.5 g/L로 예측되었다. 이때 최대 균체량은 1.07497 g/L로 예측되었으며, 모델의 검증실험을 통하여 예측된 모델과 실제 결과가 동일함을 확인하였으며, 기본배양배지와 비교하였을 때 균체량이 0.8767 g/L에서 1.1222 g/L으로 약 28% 증가하였다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호:PJ009990)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

- Baek, S.Y., Lee, Y.J., Yun, H.J., Park, H.Y., and Yeo, S.H. 2014. Characterization of alkaline cellulase from *Bacillus subtilis* 4-1 Isolated from Korean traditional soybean paste. *Korean J. Food Preserv.* **21**, 442-450.
- Baek, S.Y., Yun, H.J., Choi, H.S., Koo, B.S., and Yeo, S.H. 2010. Isolation and physiological characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from Korean traditional soybean sauce and soybean paste. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 379-384.
- Cha, J.Y., Kim, H.J., Jun, B.S., Park, J.C., Ok, M., and Cho, Y.S. 2003. Antioxidative and produced condition of antioxidative substance by *Bacillus* sp. FF-7. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 165-170.
- 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.
- Chi, W.J., Park, D.Y., Uyangaa, T., Lee, J.Y., Chang, Y.K., and Hong, S.K. 2011. Identification of a cellulase producing marine *Bacillus* sp., GC-1 and GC-4 isolated from coastal seawater of Jeju island. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 97-103.
- Choi, J.Y., Hong, S.W., and Chung, K.S. 2012. Selection of biogenic amine-reducing microorganisms from a traditional Korean-style fermented food, *Cheonggukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**, 196-201.
- Choi, U.K., Ji, W.D., Chung, H.C., Choi, D.H., and Chung, Y.G. 1997. Optimization for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 1036-1043.
- 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., et al. 2007. Biogenic amines formation and content in fermented soybean paste (*Cheonggukjang*). *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, 541-545.
- Jeon, S.B., Ryu, M.S., Kim, Y.S., Jo, S.W., Jeong, D.Y., and Uhm, T.B. 2013. Isolation and identification of *Bacillus* strains with antagonistic properties against film-forming yeasts overgrown in low salted soybean pastes. *Korean J. Microbiol.* **49**, 286-291.
- Jeong, H.Y., Kim, T.H., Park, J.S., Kim, K.T., and Paik, H.D. 2003. Antioxidative and cholesterol-reducing activity of *Bacillus polyfermenticus* SCD. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 371-376.
- 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. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 550-556.
- Kang, D.W., Ryu, I.H., and Han, S.S. 2012. The isolation of *Bacillus subtilis* KYS-10 with antifungal activity against plant pathogens. *Korean J. Pestic. Sci.* **16**, 178-186.
- Kim, Y.S., Cho, S.H., Jeong, D.Y., and Uhm, T.B. 2012. Isolation of biogenic amine-degrading strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* from traditionally fermented soybean products. *Korean J. Microbiol.* **48**, 220-224.
- Kim, M.C. and Heo, M.S. 2005. Identification and cultural characterization of antioxidant producing bacteria isolated from the Jeju coasts. *Kor. J. Life Science* **15**, 749-754.
- Kim, Y.S., Jeong, J.O., Cho, S.H., Jeong, D.Y., and Uhm, T.B. 2012a. Antimicrobial and biogenic amine-degrading activity of *Bacillus licheniformis* SCK B11 isolated from traditionally fermented red pepper paste. *Korean J. Microbiol.* **48**, 163-170.
- Kim, Y.S., Lee, M.S., Yeom, J.H., Song, J.G., Lee, I.K., Yeo, W.H., and Yun, B.S. 2012b. Screening of antagonistic bacteria for biological control of ginseng root rot. *Korean J. Mycol.* **40**, 44-48.
- Kim, S.K., Oh, S.J., Lee, S.J., Baek, Y.J., and Park, Y.H. 1994. Optimization conditions for the growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. HY 449 using response surface methodology. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 522-530.
- Kim, B.S., Rhee, C.H., Hong, Y.A., Woo, C.J., Jang, C.M., Kim, Y.B., and Park, H.D. 2007. Changes of enzyme activity and physiological functionality of traditional *Doenjang* during fermentation using *Bacillus* sp. SP-KSW3. *Korean J. Food Preserv.* **14**, 545-551.
- Kim, Y.S., Yun, S.H., Jeong, D.H., Hahn, K.S., and Uhm, T.B. 2010. Isolation of *Bacillus licheniformis* producing antimicrobial agents against *Bacillus cereus* and its properties. *Korean J. Microbiol.* **46**, 270-277.
- Kwak, H.J., Kim, J.Y., Lee, H.S., and Kim, S.M. 2014. Formation of biogenic amines by *Lactobacillus plantarum* isolated from *Makgeolli*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**, 438-445.
- Lee, J.H., Chae, M.S., Choi, G.H., Lee, N.K., and Paik, H.D. 2009. Optimization of medium constituent for production of the antioxidant substances by *Bacillus polyfermenticus* SCD using response surface methodology. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 959-964.
- Lee, G.D., Chang, H.G., and Kim, H.K. 1997. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible Mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 432-436.
- Lee, H.J., Kim, J.Y., Lee, J.G., and Hong, S.S. 2014. Biological control of *Lettuce sclerotinia* rot by *Bacillus subtilis* GG95. *Korean J. Mycol.* **42**, 225-230.
- Lee, J.H. and Kweon, K.T. 2012. Determination of harvest time and nominal origin from *Cynanchi wilfordii radix*. *J. Korean Orient. Med. Soc.* **33**, 160-168.
- Lee, S.Y., Park, H.K., and Kim, M.H. 2010. Isolation and identification of wild yeasts from schizandra (*Schizandra chinensis*) for wine

- production and its characterization for physicochemical and sensory evaluations. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1860–1866.
- Leadbetter, E.R.** 1974. Order II. Cytophagales nomen novum, p. 99. In Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
- Maijala, R. and Eerola, S.** 1993. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Sci.* **35**, 387–395.
- Oh, Y.S., Park, J.E., Oh, H.J., Kim, J.H., Oh, M.C., Oh, C.K., Oh, Y.J., and Lim, S.B.** 2010. Isolation and characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from Jeju traditional fermented soybean paste (*deonjang*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 47–53.
- 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. *Kor. J. Life Science* **12**, 200–207.
- Ra, K.S., Oh, S.H., Kim, 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. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 439–442.
- Rhee, C.H., Lee, J.B., and Jang, S.M.** 2000. Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the traditional *Deonjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 277–284.
- 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 *Deonjang*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 87–94.
- 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.
- Teather, R. and Wood, P.J.** 1982. Use of congo fed polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 777–780.
- 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.
- Yang, E.J. and Chang, H.C.** 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJPI. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 339–346.
- 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 *Deonjang*. *Korean J. Food Preserv.* **21**, 286–293.
- Yi, J.H., Heo, N.K., Choi, B.G., Park, E.H., Kwun, S.Y., Kim, M.D., Hong, W.P., Yeo, S.H., and Baek, S.Y.** 2014. Isolation of fibrinolytic yeasts Korean traditional fermented soybean. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 184–189.
- Yun, H.J., Lee, Y.J., Yeo, S.H., Park, H.Y., Park, H.D., and Baek, S.Y.** 2013. Isolation and characterization of exopolysacchried producing lactic acid bacteria from Korean soy sauce and soybean paste. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 190–197.