

Amylase activity and characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 isolated from *Doenjang*

Su-Jin Yang¹, Dae-Hoon Lee¹, Hye-Mi Park¹, Hee Kyoung Jung²,
Chang-Su Park¹, Joo-Heon Hong^{1*}

¹Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

²Biohealth Convergence Center, Daegu Technopark, Daegu 704-801, Korea

된장으로부터 분리된 *Bacillus subtilis* CBD2의 생육특성 및 amylase 활성

양수진¹ · 이대훈¹ · 박혜미¹ · 정희경² · 박창수¹ · 홍주현^{1*}

¹대구가톨릭대학교 식품공학전공, ²(재)대구테크노파크 바이오헬스융합센터

Abstract

In this study, one GRAS strain was screened from *doenjang*, a traditional Korean fermented food, as a microorganism producing amylase due to the formation of a clear zone on the medium including soluble starch. From the analysis of the gene sequence of 16S ribosomal RNA, the strain was identified as *Bacillus subtilis* and was therefore named *Bacillus subtilis* CBD2. When the nutrient broth medium was prepared with 3% NaCl, 5% glucose, and the initial medium pH 7.0, the *B. subtilis* CBD2 showed maximum growth. Among soluble starch, corn starch, maize amylopectin, and wheat starch, soluble starch was the most effective carbon source in the production of amylase by *B. subtilis* CBD2. The amylase from *B. subtilis* CBD2 showed the highest activities at pH 8.0 and 50°C, and corn starch was the most proper substrate for the enzyme activity. When corn starch was used as a substrate, the production of sugars through enzyme activity increased for 24 h, and then the enzyme activity became constant.

Key words : *Doenjang*, *Bacillus subtilis*, amylase, enzyme activity

서 론

현대 산업사회에 있어서 생물자원은 환경 친화적이고 안전한 작업공정으로부터 유용한 물질을 생산할 수 있다는 장점으로 인해 다양한 산업분야에서 활용하기 위한 연구가 진행되고 있다(1). 이러한 생물자원 중에서 특히, 효소자원은 기질특이성의 특징으로부터 부산물의 생산 없이 목적으로 하는 유용물질만을 높은 비율로 생산할 수 있다는 장점까지 다양한 산업분야에 적용할 수 있는 생물자원으로서 많은 주목을 받고 있다(2-4). 일반적으로 산업분야에서 활용되어지고 있는 효소 자원은 미생물 유래의 효소가 가장 광범위하게 활용되고 있으며 현재까지 보고되어져 있는 산업용 효소 또한 대부분이 미생물에서 유래한 효소라고

할 수 있다. 따라서, 유용한 효소 자원의 발굴을 위해서는 우선적으로 효소를 생산하는 미생물의 발굴이 선행되어야 한다. 현재까지 효소를 생산하는 수많은 미생물들이 보고 되어져 있는데 이러한 미생물 중에서도 특히, 안전성이 확보된 미생물 유래의 효소는 안전한 생물자원으로서 다양한 생물산업에 활용 가치가 높아 주목을 받고 있다. 이러한 GRAS(generally recognized as safety) 미생물 중에서도 특히, *Bacillus*속은 50년 이상 산업적으로 사용되어온 생물자원으로서 일본, 미국 및 중국 등의 여러 나라에서 프로바이오틱 상품으로 시판되고 있다(4-6). 특히, *Bacillus* 속 미생물은 amylase, protease, cellulase, glucosidase와 같은 생물산업에 있어서 널리 활용되고 있는 유용한 효소들을 생산하는 균주로서 알려져 있으며 이들 효소에 대한 특성 또한 다양한 연구에서 지속적으로 검토되어져 왔다(7-12). *Bacillus* 속 미생물이 생산하는 효소가 함유된 배양액을 첨가한 가축 사료의 경우 사료의 효율증진, 소화장애 감소, 질병 저항성

*Corresponding author. E-mail : jhhong@cu.ac.kr
Phone : 82-53-850-3218, Fax : 82-53-850-3218

중진, 섬유질과 전분 등의 유기물 분해력, 유지방 생산 증가, 약취제거 및 유해균 억제 등의 다양한 기능이 있으며, 특히, *Bacillus* 속 미생물 유래의 amylase는 식품산업에 있어서 식품원료를 가공하거나 특성을 개선하는데 있어서 오래전부터 전분을 가공하는 핵심 효소로서 지속적으로 활용되어져 왔다(13-15). 식품산업에 있어서 전분은 가장 풍부한 식품 저장 다당류의 하나로 식품공업 및 양조, 섬유, 의약품 등 각종 산업의 중요 소재로 향후 그 활용 분야가 계속 확대될 것으로 기대되어지기에 전분을 가수분해하는 amylase의 식품산업에서의 이용성은 지속적으로 증가될 것으로 예상되어진다(16).

일반적으로 amylase는 세균류, 효모류, 진균류등과 같이 매우 다양한 미생물로부터 생산되는 효소로서 전분을 가수분해하며 소당류 및 glucose와 같은 식품산업에서 널리 활용될 수 있는 당류를 생산한다(17). 이러한 관점에서 미생물 유래 유용한 특성을 지닌 amylase의 발굴 및 효소 특성에 대한 연구는 식품산업에 있어서 생물자원의 활용을 확대함으로써 식품산업 및 생물공학산업의 발전에도 크게 기여할 수 있는 연구 분야라고 할 수 있다(18,19).

본 연구에서는 GRAS 미생물 중에서 *Bacillus*속 미생물의 분리를 위하여 한국 전통식품인 된장을 활용하였다. 그리고, 된장 유래 미생물 중에서 특히 amylase 활성이 높은 *Bacillus*속 미생물을 분리하여 미생물의 동정과 함께 분리된 미생물의 amylase 생산 특성 및 효소 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

된장은 경상남도 고성군, 전라남도 나주시 및 충청남도 부여군에서 전통적인 방법으로 제조 판매하고 있는 업체로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

균주의 분리

된장으로부터 amylase의 분비능이 우수한 균주는 다음과 같이 분리하였다. 0.85% 생리식염수에 십진희석법으로 108배까지 희석하고 희석된 용액을 nutrient agar(Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였고 자란 colony를 평판배지에 접종하여 전분분해효소 활성으로 인한 명확한 활성환을 형성하는 균주를 amylase 생산 균주로 분리하였다. Amylase 활성으로 인해 형성된 활성환을 확인하는 방법으로는 soluble starch가 2% 포함된 nutrient agar 배지에 균주를 접종한 뒤 37°C에서 24시간 배양한 후 요오드 용액으로 염색하여 형성되는 투명환을 확인하였다.

분리 균주의 동정

된장으로부터 amylase 생산균주로서 분리된 균주를 식

품에 적용가능 한 미생물인지 확인을 위하여 ㈜솔젠트(Solgent Co., Korea)에 분리된 균주 유래의 16s ribosomal RNA 유전자 염기서열 분석을 통한 균주동정을 의뢰하였다.

균주의 생육조건 확인

분리 동정된 미생물의 생육 조건을 확인하기 위해 초기 pH, NaCl 및 glucose 조건을 달리하여 균의 생육 정도를 600 nm에서 흡광도로 측정하였다. 균 생육에 있어서 pH 영향을 검토하기 위하여 nutrient broth(NB) 배지의 초기 pH를 3~11로 조정 후, 1%(v/v)의 전배양 균주를 각 배지에 접종하여 24시간 배양을 진행하면서 균 생육을 관찰하였다. 그리고, 균 생육에 있어서 NaCl 및 glucose 농도가 미치는 영향을 검토하기 위하여 최적 pH의 균생육 배지에 NaCl 농도를 1~4%로 그리고, glucose 농도는 5~40%로 조정하여 1%(v/v)의 전배양 균주를 각 배지에 접종한 후 24시간 배양을 진행하면서 균 생육을 관찰하였다.

Amylase 활성 측정

Amylase 활성은 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 0.5% soluble starch를 녹인 후 0.5 mL를 기질로 이용하였고 미생물의 배양 상층액 0.5 mL를 효소액으로 첨가하여 37°C에서 30분 반응시켰다. 이 때 생성된 환원당의 함량은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)방법(20)으로 측정하였으며, 본 연구에서 효소 활성의 1 unit은 1 분에 1 μ mol의 glucose를 생산하는 효소량으로 정의하였다.

Amylase 생산성에 대한 배양시간의 영향

분리균주의 배양시간이 amylase 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 500 mL의 삼각플라스크에 NB 배지를 넣고 121°C에서 15분간 멸균 후, 분리균주의 전 배양액을 1% 접종한 다음 37°C, 180 rpm으로 96시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 시료를 채취하여 생육특성 및 amylase 효소활성을 측정하였다.

Amylase 생산성에 대한 탄소원의 영향

분리균주의 amylase 생산성에 미치는 배지성분의 영향을 조사하기 위해서 탄소원으로서 soluble starch, corn starch, maize amylopectin, wheat starch를 2% 첨가하고 pH를 7.0으로 조절한 후 전 배양액 1%(v/v)를 접종하고 37°C에서 24시간 동안 180 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양 후 배양액을 원심분리(9,000×g, 30분, 4°C)한 다음 배양 상층액을 조효소액으로 사용하여 amylase 활성을 측정하여 amylase 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토하였다.

Amylase 활성에 대한 pH, 온도 및 기질특이성

Amylase 활성에 영향을 미치는 pH, 온도 및 기질특이성

은 37°C에서 24시간 동안 180 rpm으로 진탕 배양한 후 배양액을 원심분리(9,000×g, 30분, 4°C)하였고 배양 상층액을 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 완충용액은 50 mM 완충용액(pH 3~6; citrate phosphate buffer, pH 6~8; sodium phosphate buffer, pH 8~9; Tris-HCl buffer)을 이용하였으며, 온도의 영향은 30°C에서 70°C 온도 범위에서 효소 활성의 특성을 검토하였다. 기질에 대한 효소 활성의 특성은 0.5%의 soluble starch, corn starch, maize amylopectin, wheat starch를 각각 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 8.0)에 용해하여 기질을 제조한 후, 50°C에서 30분간 반응 후 효소 활성에 의해 생성된 환원당을 검토했으므로 각 기질에 대한 특이성을 검토하였다.

전분 함량 측정

배양액 중의 전분 함량 분석은 Lee 등(21)의 방법에 따라 NB 배지와 2% corn starch를 기질로 첨가하여 배양한 배양액 5 mL 및 0.05 N H₂SO₄ 2 mL를 넣고 100°C로 유지한 수조에서 30분간 증탕한 후 신속히 100 mL 삼각 플라스크로 시료를 옮긴 다음 냉각한 증류수 20 mL를 첨가하였다. 그리고 20°C에서 25분 방치한 후 KI-I₂ 용액 0.2 mL를 넣고 30분간 교반한 다음 분광광도계(Ultaspec 2100 pro, Amersham Co., Sweden)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였고 corn starch(Sigma Co., St Louis, MO, USA)를 이용한 표준곡선으로부터 전분 함량을 계산하였다.

총당 함량 측정

배양액 중의 총당 함량은 Saha와 Brewer(16)의 방법에 따라 phenol-sulfuric acid법으로 실시하였다. 즉 5% phenol(w/v) 1 mL와 sulfuric acid 5 mL를 NB 배지에 2% corn starch를 기질로 첨가하여 배양한 배양액 1 mL를 실온에서 반응시킨 후 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였고 glucose(Sigma Co.)를 이용한 표준곡선으로부터 총당 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

Amylase 생산 균주의 분리 및 동정

된장으로부터 amylase 생산균주를 분리 한 결과 전분을 기질로 첨가한 고체 배지에서 명확한 활성환을 나타낸 4균주를 amylase 생산균주로 선정하였다(Table 1). 분리한 균주를 각각 액체배양하여 획득한 배양 상층액을 효소액으로 이용하여 soluble starch에 대한 amylase 활성을 검토하여 분리 균주의 amylase 효소활성을 확인하였다. 최종적으로 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열을 이용하여 BLAST

분석한 결과 분리 한 균주는 *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*로 나타났으며 모든 균주에서 99%의 유사성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 식용가능 한 미생물 중 amylase 활성이 가장 높은 효소활성을 보인 균주는 충청남도 부여군에서 제조된 된장에서 분리한 균주였으며, 분리된 균주를 *B. subtilis* CBD2로 명명하였다. 일반적으로 *B. subtilis*는 우리나라의 된장(22), 청국장(23) 등에서 분리되는 균으로서 최근에는 프로바이오틱 균주로서 식품산업을 비롯한 다양한 산업분야에 높은 잠재적 활용가치를 가지는 균주로서 알려져 있다(24,25).

Table 1. Amylase activity of the isolated strains from Doenjang

Regions	Isolated No.	Species	Identity (%)	amylase activity (U/mL)
Gyeongsangnam-do Goseong-gun	1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	50.8
	2	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	99	33.0
Jeollanam-do Naju-si	3	<i>Bacillus subtilis</i>	99	24.2
Chungcheongnam-do Buyeo-gun	4	<i>Bacillus subtilis</i>	99	82.4

Bacillus subtilis CBD2의 생육특성

분리된 *B. subtilis* CBD2의 최적 생육조건을 확인하기 위해 초기 pH를 달리한 배지에서 본 균주를 배양하면서 균주의 생육특성을 검토하였다(Fig. 1). 그 결과 본 균주는 초기 pH 7.0의 배지에서 가장 높은 균 생육을 보였으며 pH 4.0 이하의 조건에서는 균 생육이 현저하게 저하되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고, pH 11.0의 조건에서 균 생육은 거의 확인되지 않았다. *B. subtilis* CBD2의 내염성을 검토하기 위하여 NaCl을 농도별로 첨가한 배지에서의 균 생육특성을 조사하였다. 그 결과 3% NaCl 농도에서 최대 균 생육을 보였으며 4%의 농도부터는 균 생육이 감소하는 경향을 확인하였다. 그리고, glucose를 이용한 *B. subtilis* CBD2의 내당성은 glucose의 농도를 변화하면서 OD 값을 측정하였으며, 그 결과 10%까지는 균 생육에 큰 영향을 미치지 않는으나 20%의 glucose 농도부터는 급격히 균 생육이 저하하는 것을 확인할 수 있었다. Choi 등(26)의 연구결과에 따르면 *Bacillus* 속의 생육 최적 pH는 7.0~7.5이었고, pH 9.0 이상과 pH 5.0 이하에서는 생육이 급격히 저하된다고 보고하였는데 이는 본 실험결과와 유사한 결과를 나타내었다. NaCl의 구성이온인 Na⁺와 Cl⁻이 미생물 생장에 있어 촉매역할 한다는 연구결과와 유사하게 본 연구에서도 적절한 농도의 NaCl은 세균 성장에 있어서 좋은 영향을 미치는 것으로 확인되었다(27). Choi 등(26)의 연구결과에 따르면 *Bacillus* 속의 생육가능 염농도는 0~5%이며, 최적 염농도는 2~3%이었고, 7% 이상의 염 농도에서 균의

증식이 어려운 것으로 보고하였는데 이는 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

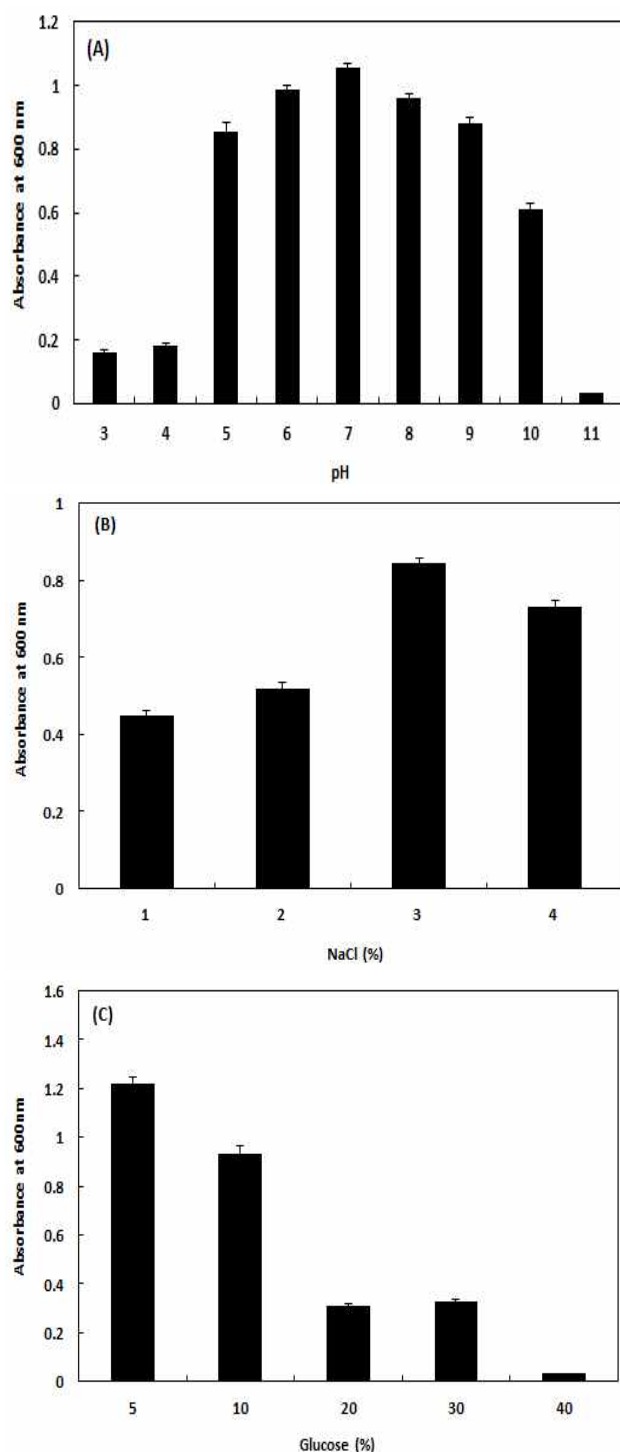


Fig. 1. Investigation of growth conditions of *B. subtilis* CBD2 from Doenjang.

The cultivation was carried out at 37°C for 24 hr and then the cell growth was analyzed at Absorbance 600 nm. (A) The effect of pH on the *B. subtilis* CBD2. (B) The effect of NaCl concentration on the growth of *B. subtilis* CBD2 (C) The effect of glucose concentration on the growth of *B. subtilis* CBD2. The data are representative of three separate experiments.

Amylase 효소활성에 미치는 배양시간 및 탄소원의 영향

탄수화물 분해 효소를 생산하는 미생물의 배양에 있어서 탄소원의 종류는 효소 수율에 매우 큰 영향을 미치는 성분으로 알려져 있기에 본 연구에서도 *B. subtilis* CBD2에 의한 amylase 생산과 탄소원의 관계에 대하여 검토하였다(18). 배양시간 및 탄소원의 종류에 따른 amylase 활성을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 탄소원 종류를 달리하여 균주를 배양한 후 균주 생육과 배양 상층액에 존재하는 amylase 활성을 검토한 결과, 대부분의 탄소원에서 12시간 배양 시간에서 효소활성이 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 24시간 배양 시 amylase 활성이 최대임을 확인할 수 있었다. 그리고, 배양 72시간부터는 효소활성이 점차 감소하는 경향을 나타내었기에 본 균주의 효소 생산을 위한 배양 시간은 24시간이 가장 효과적인 것으로 검토되었다. 다양한 탄소원 중에서도 soluble starch를 탄소원으로 이용한 배지에서 53.03 U/mL로 가장 높은 amylase 활성을 나타내었고 corn starch(42.32 U/mL), wheat starch(32.46 U/mL), maize amylopectin(18.45 U/mL) 순으로 amylase 활성을 보여주었다. 본 연구 결과로부터 *B. subtilis* CBD2 균주는 대부분의 탄소원에서 생육에는 큰 차이를 보이지 않았지만 amylase 효소 활성에 있어서는 soluble starch를 탄소원으로 이용하였을 때 가장 높은 효소 활성을 나타내었기에 본 연구에서 *B. subtilis* CBD2의 배양을 위한 탄소원으로는 soluble starch가 적합하다는 것을 확인하였다. Ryu 등(20)의 연구결과에 따르면 된장으로부터 분리한 항균물질 생산 *Bacillus subtilis*의 특성을 확인한 연구결과에서도 본 연구결과와 유사하게 *B. subtilis*의 탄소원으로 soluble starch에서 가장 높은 항균활성 및 균 생육도를 나타내었다는 보고하였는데, soluble starch를 탄소원으로 사용하였을 경우 최적의 amylase 활성뿐만 아니라 항균활성이 부여된 *B. subtilis* CBD2 배양액 제조가 가능할 것으로 사료된다.

Amylase 효소활성에 미치는 pH 및 온도의 영향

B. subtilis CBD2 유래 amylase의 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 본 균주 유래의 amylase는 pH 8.0에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었으며, 온도는 50°C에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 본 연구에서 분리된 균주 유래 amylase는 pH 6.0에서 pH 9.0사이에서 명확한 효소활성을 나타내었으며 pH 3.0에서 pH 5.0 사이에서는 최대 효소 활성대비 20% 이하의 낮은 효소 활성을 나타내었다. 그리고, 최적 pH가 8.0이며 pH 9.0 및 pH 10.0의 알칼리성 영역에서 최대 활성의 20% 이상의 효소 활성을 나타내었기에 본 연구에서 분리된 균주 유래의 amylase는 알칼리성 영역에서 효소 활성을 유지하는 효소임이 강하게 시사되었다. 본 효소가 나타내는 알칼리성 영역에서의 효소 활성은 일반적으로 *Bacillus*속 유래 amylase의 효소 활성이 pH 5~6의 산성 영역에서 최적 pH를 가지는

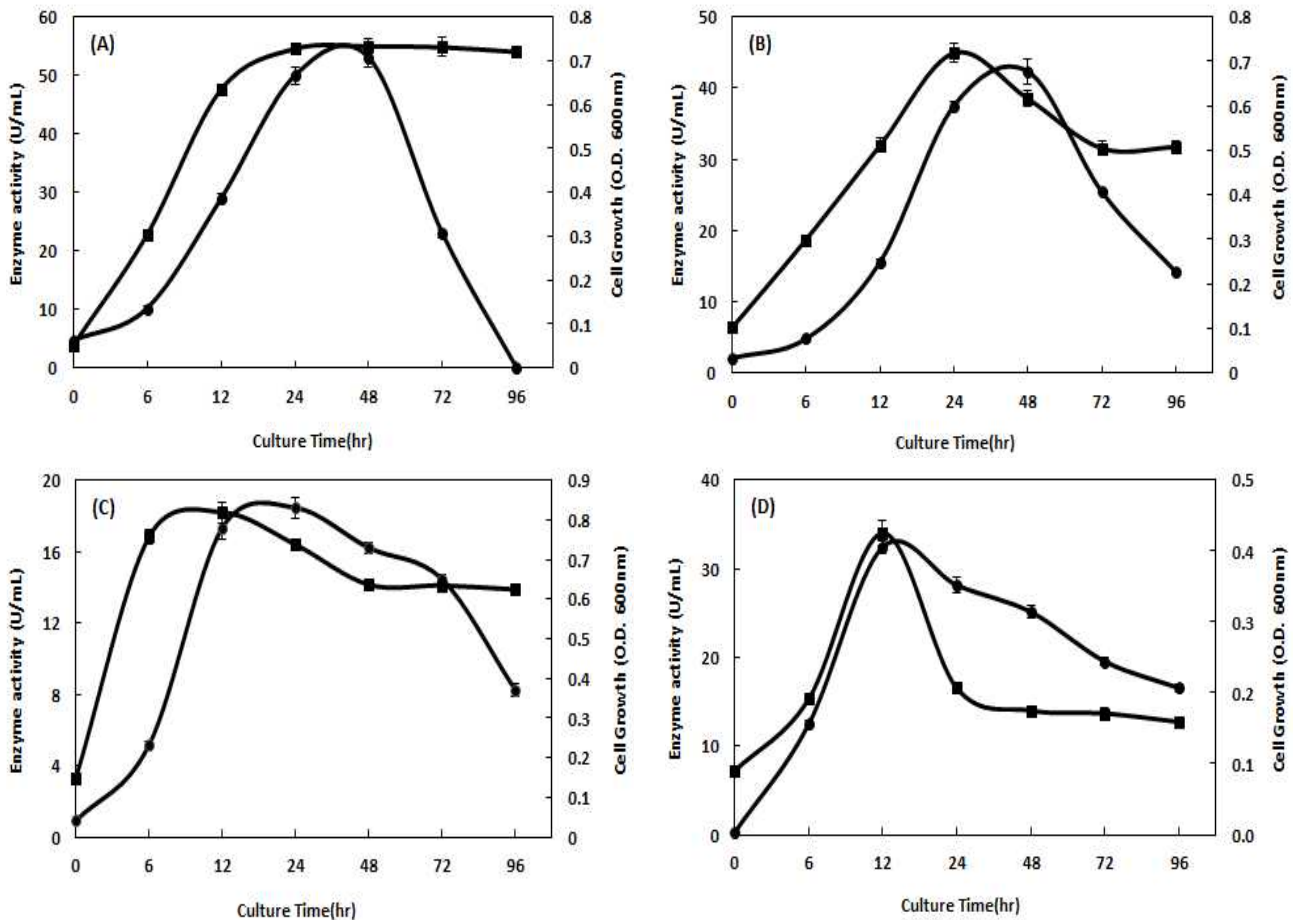


Fig. 2. Effect of carbon sources on the cell growth and amylase activity of the Isolated *B. subtilis* CBD2.

Each substrate was added in the medium with 0.5% concentration and the *B. subtilis* was cultivated at 37°C for 96 hr. (A) soluble starch (B) corn starch (C) maize amylopectin (D) wheat starch. ■, Cell growth ●; Amylase activity). The data are representative of three separate experiments.

것으로 보고되고 있는 관계로 향 후 알카리성의 반응 조건에서 amylase를 적용할 때 매우 유용하게 활용될 수 있는 효소특성이라고 할 수 있겠다(28,29). 온도에 대한 amylase의 활성은 20~50°C의 범위에서는 온도가 증가함에 따라 효소 활성도 증가하였으며 60°C에서도 최적 온도에서의 효소 활성과 거의 유사한 활성을 나타내었다. 하지만, 70°C 부터는 급격한 효소 활성의 저하를 나타내었다. 일반적으로 *B. subtilis* 유래 amylase는 온도 50~60°C 범위에서 최적 온도의 특성을 가지고 있기에 온도에 대한 효소 활성의 특성은 일반적인 *B. subtilis* 유래 효소와 큰 차이를 보이지 않았다(13,30,31).

Amylase 효소의 기질특이성

B. subtilis CBD2 유래 amylase의 기질에 대한 특이성을 검토하기 위하여 soluble starch, corn starch, maize amylopectin, wheat starch를 기질로 이용하여 효소 활성을 검토하였다. 그 결과 *B. subtilis* CBD2 유래 효소액은 corn starch에 대하여 가장 높은 효소 활성을 나타내었으며, wheat starch와 soluble starch의 두 기질에 대해서는 corn

starch와 비교시 약 50% 정도의 효소 활성을 나타내었다 (Table 2). 하지만, amylopectin 함량이 높은 maize amylopectin에 대해서는 25.4%의 활성을 나타내어 상대적으로 낮은 효소활성이 나타남을 확인하였다.

Table 2. Substrate specificity of an amylase from *B. subtilis* CBD2

Substrate	Relative activity (%)
Soluble starch	59.9
Corn starch	100
Maize amylopectin	25.4
Wheat starch	50.9

Amylase 효소의 전분 분해능 및 당 생성을

B. subtilis CBD2 유래 amylase는 corn starch에 대하여 가장 높은 효소 활성을 나타내었기에 corn starch를 기질로 이용하여 전분 분해능 및 당생성율에 대한 time course를 검토하였다(Fig. 4). 그 결과 *B. subtilis* CBD2는 배양시간 24시간에 가장 높은 당 생성율을 나타내었으며, amylase의

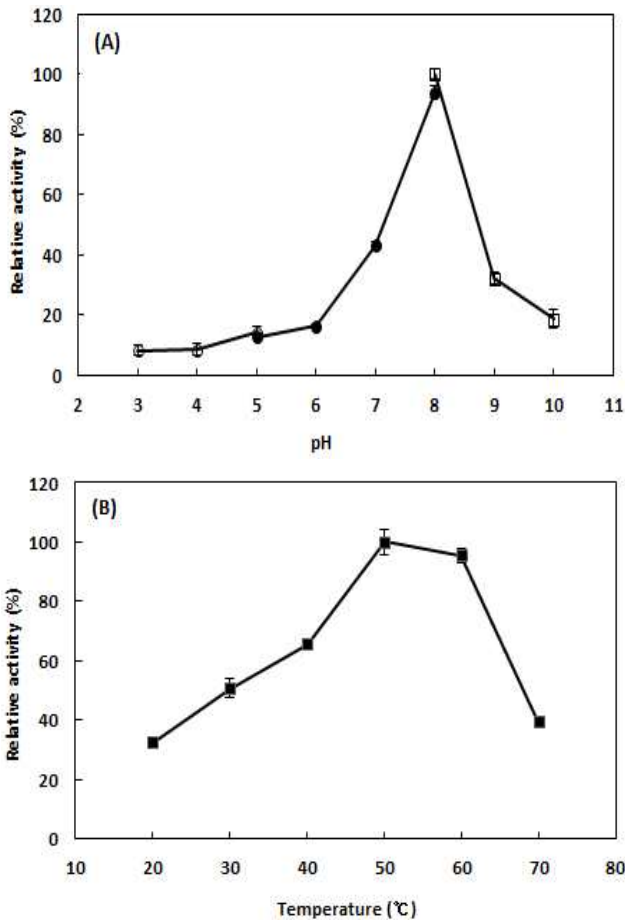


Fig. 3. Effect of pH (A) and temperature (B) on the amylase activity from *B. subtilis* CBD2.

(A) The reactions were performed in 50 mM citrate buffer (○; pH 3.0-6.0) or 50 mM sodium phosphate buffer (●; pH 6.0-8.0) or 50 mM Tris-HCl buffer (□; pH 8.0-9.0) containing 0.5% soluble starch at 37°C for 30 min. (B) The reactions were performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.5% soluble starch at temperature ranges from 20-70°C for 30 min. The data are representative of three separate experiments.

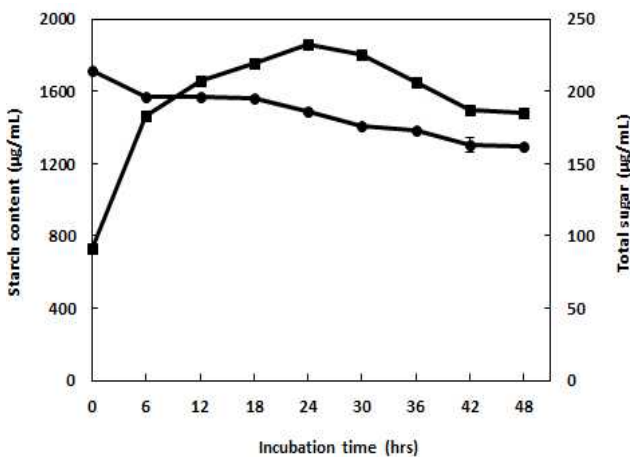


Fig. 4. The reaction containing 2% corn starch and enzyme solution was carried out at 37°C for 96 hr with shaking (180 rpm).

The reaction mixture sampled and then the sugar and corn starch concentrations were analyzed. The NB medium was used as analysis culture medium (■; Total sugar ●; Starch contents). The data are representative of three separate experiments.

corn starch 분해 활성 또한 24시간 배양에서 유의적인 함량 감소를 나타내었다. 그리고 24시간 이후에는 당 생성에는 큰 변화가 없었으며 corn starch의 기질 감소에 있어서도 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 Lee 등(21)의 *Bacillus cereus* IAM 1072의 말토 올리고당 생성 및 특성 실험에서 배양 18~30시간에서 높은 당 생성율을 나타내었고 이후 당 생성 및 starch의 기질 감소에 있어서 변화가 없는 결과와 유사하였다. 따라서 본 실험의 corn starch를 이용한 효소반응은 24시간이 가장 적절한 반응 시간임을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 식품산업에 적용 가능한 amylase의 발굴을 위하여 된장으로부터 amylase를 생산하는 균주를 분리하였고, 분리된 미생물들의 동정을 통하여 GRAS 미생물로부터 생산되는 amylase에 대한 효소 특성을 규명하였다. 그 결과 균주 유래 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열에서 *B. subtilis*로 동정되어 본 균주를 *B. subtilis* CBD2로 명명하였다. *B. subtilis* CBD2 균주의 생육에 미치는 배지 성분대 대한 특성을 검토한 결과 본 균주는 pH 7.0, NaCl 3%, glucose 10%에서 가장 높은 균 생육 특성을 나타내었다. 그리고 본 균주의 amylase 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토한 결과, 본 균주는 soluble starch, corn starch, maize amylopectin 및 wheat starch 중에서 soluble starch를 탄소원으로 사용하였을 때 가장 높은 amylase 생산성을 나타내었다. *B. subtilis* CBD2 유래 amylase의 활성에 미치는 반응 조건을 검토한 결과 본 균주 유래 amylase는 pH 8.0 그리고 50°C에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었으며 기질특이성에 대한 검토에서는 corn starch > wheat starch > soluble starch > maize amylopectin 순으로 효소 활성을 나타내었다. *B. subtilis* CBD2가 생성하는 amylase 효소와 corn starch 기질 반응에 대한 전분 분해능 및 당 생성을 변화에서는 24시간에서 가장 높은 전분 분해능 및 당 생성율을 나타내어 corn starch를 이용한 효소 반응은 24시간이 가장 적절함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 분리된 균주는 GRAS 미생물인 *B. subtilis*이었으며 본 균주 유래의 amylase 특성을 활용한다면 향후 식품산업에 있어서 전분 분해 관련 분야에 유용하게 이용될 것으로 기대되어진다.

감사의 글

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성 사업으로 수행된 연구결과임(No.2013H1B8A2032215).

References

1. Dixon B (1998) Power unseen : How microbes rule the world. Oxford University Press, USA, P357-359
2. Kim CH, Lee SH (2011) Isolation of *Bacillus subtilis* CK-2 hydrolysing various organic materials. J Life Sci, 21, 1716-1720
3. Casula G, Cutting SM (2002) *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol, 68, 2344-2352
4. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J Dairy Sci, 70, 1-12
5. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC (2004) Probiotics. Best Prac Res Cl Em, 18, 299-313
6. Green DH, Wakeley PR, Page A, Barnes A, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM (1999) Characterization of two *Bacillus* probiotics. Appl Environ Microbiol, 65, 4288-4291
7. Cutting SM (2011) *Bacillus* probiotics. Food Microbiol, 28, 214-220
8. Qin HB, Yang HJ, Qiao Z, Gao S, Liu Z (2012) Identification and characterization of a *Bacillus subtilis* strain HB-1 isolated from Yandou, a fermented soybean food in China. J Food Control, 31, 22-27
9. Asgher M, Javaid Asad M, Rahman SU, Legge RL (2007) A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. J Food Eng, 79, 950-955
10. Chang CT, Wang PM, Hung YF, Chung YC (2012) Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean. Food Chem, 133, 1611-1617
11. Jetendra KR, Sudhir KR, Ashis KM (2012) Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. Int J Biol Macromol, 50, 219-229
12. Jetendra KR, Ashis KM (2013) Applications of a high maltose forming, thermo-stable α -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. Biochem Eng J, 77, 220-230
13. Jack RW, Tagg JR, Ray B (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol Rev, 59, 171-200
14. Nataša B, Jordi R, Josep LS, Zoran V (2011) Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. Biochem Eng J, 53, 203-209
15. Konsula Z, Liakopoulou-Kyriakides M (2004) Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. Process Biochem, 39, 1745-1749
16. Bae HC, Choi SH, Na SH, Nam MS (2012) Characteristics of α -Amylase and protease produced from *Bacillus amyloliquefacies* CNL-90 isolated from malt grain. Anim Feed Sci Tech, 54, 133-139
17. Ravindar DJ, Elangovan N (2013) Molecular identification of amylase producing *Bacillus subtilis* and detection of optimal conditions. J Pharm Res, 6, 426-430
18. Lee SH, Lee MS (2000) Utilization the Tofu-Residue for production of the bacteriocin I. Cultural conditions of *Bacillus* sp. for amylase. J Food Hyg Safety, 15, 271-276
19. Mukherjee AK, Bora M, Rai SK (2009) To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. Biochem Eng J, 43, 149-156
20. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem, 31, 426-428
21. Lee MY, Kang TS (1998) Production and properth of maltooligosaccharide by *Bacillus cereus* IAM 1072 with response surface methodology. J Korean Soc Food Sci Nutr, 27, 639-647
22. Ryu HS, Shon MY, Cho SJ, Park SK, Lee SW (2007) Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional *Doenjang*. J Korean Soc Appl Biol chem, 50, 87-94
23. Kwon CH, Lee HA, Park JY, Kim JS, Lim JK, Park CS, Kwon DY, Kim YS, Kim JH (2009) Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from *Cheonggukjang*. Int J Food Microbiol, 129, 282-287
24. Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC (2007) The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. Digest Dis Sci, 53, 954-963
25. Logan NA (2011) *Bacillus* and relatives in foodborne illness. J Appl Microbiol, 112, 417-429
26. Choi KK, Bi CB, Ham SS, Lee DS (2003) Isolation, Identification and growth characteristics of main strain related to meju fermentation. J Korean Soc Food Nutr,

- 32, 818-824
27. Lee SY, Kim JY, Beak SY, Yeo SH, Koo BS, Park HY, Choi HS (2011) Isolation and characterization of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat *sokseongjang*. Korean J Food Sci Technol, 43, 735-741
28. Park JW, Kim BJ, Lee JW, Kim YB (2002) Purification and characterization of a maltopentaose-producing amylase from *Bacillus megaterium* KSM C-404, J Microbiol Biotechnol, 30, 352-358
29. Shon MY, Kwon SH, Sung CK, Lee SW, Park SK (2001) Isolation and microbiological characteristics of *Bacillus megaterium* SMY-212 for preparation of black bean *Chungkugjang*, J Life Sci, 11, 304-310
30. Park CS, Kang DO, Choi NS (2012) Characterization of cellulase and xylanase from *Bacillus subtilis* NC1 isolated from environmental soil and determination of its genes, J Life Sci, 22, 912-919
31. Konsoula Z, Kiakopoulou-Kyriakides L (2007) Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. Bioresource Technol, 98, 150-157

(접수 2014년 2월 6일 수정 2014년 4월 2일 채택 2014년 4월 3일)