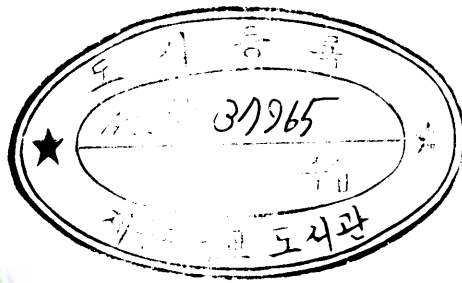


17
174
346pp

碩士學位論文

γ -Poly(Glutamic acid) 분해 세균의
분리 및 동정



濟州大學校 大學院
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

食品工學科

許 允 姬

1998年 12月

γ -Poly(Glutamic acid) 분해 세균의 분리 및 동정

指導教授 高 榮 煥

許 允 姬

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함



許允姬의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 姜 永 周



委 員 宋 大 鎮



委 員 高 榮 煥



濟州大學校 大學院

1998年 12月

Isolation and Identification of a
 γ -Poly(Glutamic Acid) Degrading
Bacterium



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Yoon-Hee Huh

(Supervised by professor Young-Hwan Ko)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Summary	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 시료	8
2. 사용 균주	8
1) γ -PGA 생산 균주	8
2) γ -PGA 분해 세균	8
3. 사용 배지 및 시약	8
1) γ -PGA 생산 배지	8
2) γ -PGA 분해 세균 분리 배지	9
3) 균주 동정용 배지 및 반응 시약	10
4. 균주 지방산 조성 분석 배지 및 시약	15
5. 방법	16
1) γ -PGA 생산	16
2) γ -PGA 분해 세균 분리	16
3) γ -PGA 분해 세균의 동정	17
(1) 형태적 특성	17

1.1. Gram 염색법	17
1.2. 포자 관찰	18
(2) 생화학적 특성	18
2.1. Catalase 활성	18
2.2. Voges-Proskauer 반응	18
2.3. 인돌 생성능	18
2.4. Dihydroxyacetone 생성능	19
2.5. Egg-yolk 반응	19
2.6. 전분 가수분해능	19
2.7. Casein 분해능	19
2.8. Tyrosine 분해능	19
2.9. Gelatin 액화능	20
2.10. Citrate와 propionate 이용성	20
2.11. Nitrate의 환원능	20
2.12. Phenylalanine의 탈아민화 반응	20
(3) 당 이용성	20
3.1. 당을 이용한 산 생성능과 발효능	20
(4) 배양특성	21
4.1. pH 5.7에서의 균주 성장	21
4.2. 3~12% NaCl을 첨가한 배지에서의 균주 성장	21
(5) 세균의 지방산 조성 분석	21

Ⅲ. 결과 및 고찰	23
1. γ -PGA 생산	23
2. γ -PGA 분해 세균 분리 및 분해 확인	24
3. γ -PGA 분해 세균 동정	29
1) 형태적 특성	29
(1) Colony 특성	29
(2) 현미경 관찰	30
2) 생화학적 특성	32
3) 당 이용성	34
4) 배양 특성	36
5) 지방산의 조성	37
요 약	40
참고문헌	42



Summary

γ -poly(glutamic acid)(γ -PGA) was produced in the culture filtrate of *Bacillus licheniformis* 9945a. It is a water soluble and naturally derived polyamide consisted of glutamic acid repeating units that are linked between the α -amino and γ -carboxylic acid functionalites. It is the major component of the capsular substances from *Bacillus species*.

γ -PGA is not toxic to human health and biodegradable. It has a potential to be used in the field of medicine, artificial human organ, food additives, plastic manufacture and oil industry. Even though its production has been studied steadily, few research reports concerning its biodegradation have appeared. Few informations about depolymerizing enzyme, degradation mechanism and organisms, which are necessary for industrial applications, are available.

The principal purpose of this study was to isolate and identify a γ -PGA degrading bacterium from fermented soy paste. Eight strains from soy paste were isolated and 3 of those apparently decreased the viscosity of the culture filtrate with γ -PGA. The isolate No. 5 which decreased most rapidly the viscosity of the culture with γ -PGA was chosen and identified.

The isolate No. 5 was very similar to *Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus* according to the keys in Bergey's Manual of

Systematic Bacteriology. The fatty acid composition of the bacteria also confirmed its identity as *Bacillus species*. According to MIDI program the isolate No. 5 showed 91.8% similarity to *Bacillus licheniformis*.



I. 서 론

발효과정 중 생합성되는 polyester와 polyamide계 물질들은 매우 다양한 구조와 기능성을 갖고 있다. 생고분자 물질은 생분해가 가능하며, 의약품, 인공장기, 식품, 플라스틱, 석유산업 분야에 응용될 수 있는 잠재력이 있다. 특히, 식품의 첨가물이나, 인체적합성 고분자로의 활용은 부가가치의 창출 면에서 가능성이 높다(Atsuo와 Masao, 1992). 이 중 세균의 캡슐 성분인 γ -poly(glutamic acid)(γ -PGA)는 단백질과 유사한 구조를 갖고있는 수용성의 polyamide이나, 합성에 리보솜이 관여하지 않으며, α -amino기와 γ -carboxyl기 사이에 amide 결합(Fig. 1.)으로 이루어진 glutamic acid의 중합체이다(Gross 등, 1993; Housewright, 1962). γ -결합으로 이루어진 중합체라는 점에서 자연계의 단백질과는 다른 구조를 갖고며, 단일 아미노산 glutamate가 반복 단위체인 점에서 매우 특이하다(Ivanovics와 Erdos, 1937; Torii, 1959; Chung과 Ko, 1996). *Bacillus licheniformis* 9945a에서 생산되는 γ -PGA는 L-형 또는 D-형으로 존재한다. *Bacillus species*에서 유래되는 γ -PGA는 생산 미생물에 따라 D, L 또는 D와 L형의 혼합체로 존재하기도 한다(Nitecki와 Goodman, 1971; Troy, 1973; Marlborough, 1973). γ -carboxyl기로 연결된 glutamic acid는 주로 glutathion이나, 동물, 식물, 미생물의 대사산물 중에 저분자량의 화합물로 존재하며, 고분자량의 단백질에서는 발견되지 않는다(Nitecki와 Goodman, 1971). γ -PGA는 효소합성 및 생합성에 의해 생성되며, 구조가 조금씩 다르고 분자량은 효소합성 고분자물질인 경우 $1.72 \times 10^5 \sim 3.63 \times 10^5$ 이며, 생고분자물질은 $8.4 \times 10^4 \sim 1.15 \times$

10⁶ 으로 생합성의 경우가 분자량이 크다(Troy, 1973). 또한 γ -PGA는 α -helix구조를 갖고 있고((Nitecki와 Goodman, 1971; Marlborough, 1973 ; Housewright, 1962), 물에 쉽게 용해되며, 점성이 큰 특성을 가지고 있다 ((Nitecki와 Goodman, 1971). γ -PGA는 중성용액에서는 D, L, D-L복합체 모두 용해되나, 산성용액에서는 D, L 각각의 형은 용해성이 있으나, D-L복합체는 불용성이다 (Thorne, 1956; Thorne과 Leonard, 1958).

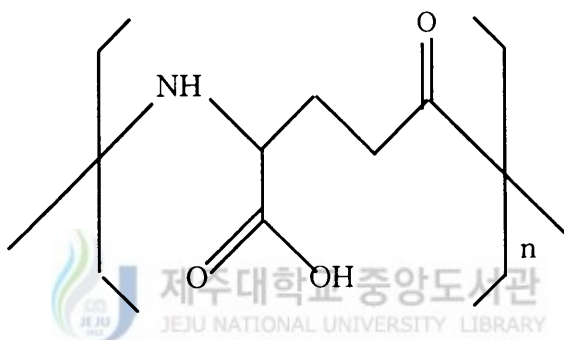


Fig. 1. Structure of γ -poly(glutamic acid)(γ -PGA).

Bacillus licheniformis ATCC 9945a의 세포를 둘러싸고 있는 물질중에는 γ -D-glutamic acid의 고분자량 중합체를 형성하기 위하여 L-glutamic acid의 중합을 촉매하는 polyglutamyl synthetase를 포함하고 있으며 (Leonard와 Housewright, 1963; Troy, 1973; Puiggali 등, 1988), γ -PGA의 생합성 경로는 TCA cycle과 관련이 있다(Atsuo와 Masao, 1992; Chung과 Ko, 1996).

γ -PGA에 대한 최초의 관심은 소의 질병인 anthrax의 치료제를 찾는 데서 시작되었으며, anthrax를 일으키는 미생물인 *Bacillus anthracis*는 특정 조건하에서 캡슐을 생성하며 성장하고 이 캡슐물질은 비교적 쉽게 분리 할

수 있다. 이 캡슐 물질 즉, γ -PGA는 1921년에 최초로 언급되었으며, 생고분자 물질인 γ -PGA의 구조와 특징은 1921년에서 1937년 사이에 밝혀졌다 (Nitecki와 Goodman, 1971).

γ -PGA는 Tocsik와 Kramar(1933)에 의해 *B. anthracis*의 캡슐물질로 처음 발견되었고, Ivanovics와 Erdos(1937), Murao 등(1971), 그리고 Toshio 등(1982)은 *Bacillus*속 균주들 즉, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*, *B. mesentericus*, *B. megaterium* 등이 γ -PGA를 생산한다고 보고하였으며, 이 등(1993)은 호알카리성 세균 *Alcaligenes sp.*를 희분배양함으로써 γ -PGA를 대량생산할 수 있다고 보고하였다. Gross 등(1993)은 *B. licheniformis* 9945a에서 γ -PGA를 생산할 때 여러 탄소원들 중 citric acid는 발효종료시기인 90시간 이후 완전히 소비된다고 보고하였고, Atsuo와 Masao(1992)는 *B. subtilis* IFO 3335가 생산하는 γ -PGA는 TCA cycle을 거쳐 합성되며, 그 중간산물인 citric acid와 ammonium sulfate를 첨가할 경우 α -ketoglutaric acid로 전환되고, α -ketoglutaric acid는 ammonium sulfate와 결합하여 glutamate를 형성한다고 보고하였다.

Kream 등(1954)은 γ -L-glutamyl exopeptidase라는 효소가 C-말단 L-glutamic acid 잔기가 있는 γ -PGA를 분해하고, γ -L-glutamyl 결합을 가수분해하는 비슷한 효소가 인간의 혈액 세포 조직에서 발견되었다고 보고하였고, Torii(1959)는 개의 간 추출물이 *B. subtilis*가 생산하는 γ -PGA를 부분적으로 분해하거나, γ -L-glutamyl 결합을 가수분해하였으나, *B. anthracis*가 생산하는 γ -PGA는 분해하지 않았다고 보고하였다. Utsumi 등(1961)은 개의 간 추출물에서 분리한 효소는 *in vivo*에서 *B. anthracis*의

capsule 생성을 억제할 수 있었고, 정제된 γ -PGA는 trypsin, pepsin 또는 papain에 저해한다고 보고하였다. Volcani와 Margalith(1957)도 γ -L-glutamyl peptidase가 합성 γ -poly-L-glutamic acid를 분해한다고 보고하였다. Atsuo와 Masao(1992)은 γ -PGA 수용액을 온도 80°C, 100°C, 120°C에서 열처리하였을 때, 분자량의 변화 중 80°C 가열 처리구는 60분 이내에서 가수분해 정도가 미비하였고, 120°C에서는 가수분해가 빠르게 일어나 γ -PGA는 80°C이내의 온도에서 내열성을 갖는다고 보고하였다. 또한 Takanori 등(1988)도 α -glutamyl peptide, γ -glutamyl peptide 모두 수용액 상에서 멸균시키면 완전히 분해된다고 보고하였다.

Bacillus 속 균주들은 우리 나라의 대표적인 발효산물인 된장에 많으며 (Kwon 등, 1986; Cho 와 Lee, 1970), 장류는 대두를 증자하여 발효시킨 메주에 소금물을 넣어 발효시켜 제조한다. 발효가 진행되는 동안 세균, 곰팡이 및 효모가 증식하며, 이들에 의하여 protease, amylase 및 lipase 등의 효소가 생성되고, 이들이 대두의 단백질, 탄수화물 및 지방질에 작용하여 펩타이드, 아미노산, 당분 및 향기성분 등이 생성되어 독특한 맛과 풍미를 준다(Yoo와 Kim, 1998). Kwon 등(1986)은 메주와 간장 중에 서식하는 세균은 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. citreus*, *Micrococcus caseolyticus*, *Sarcina maxima*, *Pediococcus acidilactic* 및 *Staphylococcus aureus* 등이고, 사상균으로는 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium kaupscinskii*, *Mucor abundans* 등이 있으며, 효모로는 *Rhodotorula dattila*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces acidifaciencie* 등이 있다고 보고하였다. 또한 일본의 전통적인 발효 식품인 "Natto"의 점성물질 성분 중에는 γ -PGA

가 0.1~0.8% 정도 함유되어 있으며, Natto에서 분리된 *B. subtilis* natto도 γ -PGA를 생산한다(Gross 등, 1993; Toshio 등, 1982).

심각해져가는 대기, 토양 및 해수의 오염에 대하여 세계각처에서 경각심이 일고 있는 이때에 우리나라에서도 쏟아져 나오는 폐기물의 양을 줄이려는 노력이 각계각층에서 활발히 이루어지고 있다. 현재 사용되고있는 합성고분자 화합물에 의한 환경 오염이 심각한 사회문제로 대두되고 있으며, 폐기되는 쓰레기의 대부분을 매립에 의존하고 있는 우리나라의 현 실정에 비추어 볼 때 재활용 및 소각에 의한 처리시설을 확대할 필요가 있으나, 부지 확보, 소각시 유독성 가스의 방출 가능성, 소각장 설치에 대한 주민의 반대 등으로 많은 어려움을 겪고 있다. 폐기 쓰레기 중의 상당량은 분해되거나 영구히 토양속에 존재하게 되어 환경 오염의 문제가 되어 생분해되는 고분자 화합물에 대한 연구가 시급한 실정이다(임, 1994).

여러 고분자 화합물 중 γ -PGA는 생분해성을 가질뿐 아니라, 인체에 대한 독성이 낮고 비교적 싼 가격으로 생산할 수 있는 등 고분자로서 우수한 특성을 가지므로 최근 환경문제의 심각성이 고조되면서 앞으로 생분해성 고분자의 소재연구에 매우 적합한 재료이고(이 등, 1993), 의약, 식품, 플라스틱, 유지산업 분야에서 잠재성을 가지고 있다(Chung 등, 1996).

γ -PGA가 처음 보고되어 생산에 관한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나 생분해에 대한 연구는 초기 단계로 분해효소나 분해미생물에 대해 연구된 바가 거의 없어서 산업적 이용을 위하여 이에 대한 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 γ -PGA를 분해하는 미생물을 분리하여 동정하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시 료

전통적인 재래식 방법에 따라서 제조 숙성된 일반가정의 된장을 수집하여 세균 분리용 시료로 사용하였다.

2. 사용 균주

1) γ -PGA 생산 균주

American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 분양 받은 *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a를 γ -PGA 생산 균주로 사용하였다.



2) γ -PGA 분해 세균

된장에서 분리한 8개의 균주 중에서 γ -PGA 분해력이 가장 우수한 No. 5 균주를 최종 선별하여 분해 세균으로 사용하였다.

3. 사용 배지 및 시약

1) γ -PGA 생산 배지

γ -PGA를 생산하기 위하여 Table 1.과 같은 조성을 가진 Medium E(고등, 1996)를 사용하였다.

Table 1. Medium E composition for γ -PGA production by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a

Component	Concentration(g/L)
Glucose	68.0
Citric acid	12.0
Glycerol	30.0
NH ₄ Cl	10.0
KH ₂ PO ₄	0.340
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.895
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.04
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.15
MnSO ₄ · H ₂ O	0.104
Distilled water	1,000ml

2) γ -PGA 분해 세균 분리 배지

Medium E에 *Bacillus licheniformis* ATCC9945a를 배양하여 γ -PGA를 생산하였고, 이 배양액을 여과막(0.45 μ m)으로 여과하여 얻은 무세포 배양액과 PGA minimal agar(PMA)을 배지로 사용하였으며, 그 조성은 Table 2와 같다.

Table 2. PGA minimal agar(PMA) composition for isolation of γ -PGA degrading bacteria

Component	Concentration(g/L)
K ₂ HPO ₄	0.8
NaH ₂ PO ₄	0.2
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0.05
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
Agar	10
γ -PGA	1.0
Distilled water	1000ml



3) 균주 동정용 배지 및 반응 시약

분리된 균주의 배양학적 특징을 관찰하기 위하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Sneath, 1986)에 따른 배지의 조성과 반응시약은 다음과 같다.

① Voges-Proskauer broth

Proteose peptone	7.0 g
Glucose	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Distilled Water	1.0 L
40% Sodium hydroxide	3.0 ml
Creatin	0.5 mg

② Indole production medium

Tryptone	1.0 g
Sodium chloride	0.5 g
Distilled water	100 ml
Kovacs's indole reagent	0.5 ml

③ Glycerol agar

Nutrient agar	100 ml
Yeast extract	1.0 g
Glycerol	2.0 ml
a) Hydrous copper sulfate	34.66 g
Distilled water	500 ml
b) Potassium sodium tartrate	173 g
Sodium hydroxide	50 g
Distilled water	500 ml

④ Egg-yolk reaction medium

Tryptone	10.0 g
Disodium hydrogen phosphate	5.0 g
Potassium dihydrogen phosphate	1.0 g
Sodium chloride	2.0 g
Magnesium sulfate · 7H ₂ O	1.0 g
Glucose	2.0 g
Distilled water	1.0 L

⑤ Starch agar

Potato starch	1.0 g
Distilled water	10 ml
Nutrient agar	100 ml
95% Ethanol	

⑥ Milk agar

Skim milk	5 g
Distilled water	50 ml
Agar	1 ml
Distilled water	50 ml

⑦ Citrate and propionate utilization medium

Sodium propionate	2.0 g
Magnesium sulfate · 7H ₂ O	1.2 g
Diammonium hydrogen phosphate	0.5 g
Potassium chloride	1.0 g
Trace element solution	40.0 ml
Agar	15.0 g
Distilled water	920 ml
0.04%(W/V) Phenol red	20.0 ml
Trace element solution	
Ethylenediaminetetraacetate	500 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	200 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	3 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
CoCl ₂ · 2H ₂ O	20 mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	1 mg
NiCl ₂ · 6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3 mg
Distilled water	1.0 L

⑧ Tyrosine agar

L-Tyrosine	0.5 g
Distilled water	10.0 ml
Nutrient agar	100 ml

⑨ Nutrient gelatin

Gelatin	0.4 g
Nutrient agar	100 ml
1N H ₂ SO ₄ with Na ₂ SO ₄	10 ml

⑩ Nitrate broth

Peptone	5 g
Beef extract	3 g
Potassium nitrate	1 g
Distilled water	1.0 L
a) Sulfanilic acid	8 g
5N Acetic acid	1.0 L
b) Dimethyl- α -naphthylamine	6.0 ml
5N Acetic acid	1.0 L

⑪ Phenylalanine agar

Yeast extract	3.0 g
D, L-phenylalanine	2.0 g
Disodium hydrogen phosphate	1.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar	12.0 g
Distilled water	1.0 L
10%(W/V) Ferric chloride	3.0 g

⑫ Medium for acid production from carbohydrates

Diammonium hydrogen phosphate	1.0 g
Potassium chloride	0.2 g
Magnesium sulfate	0.2 g
Yeast extract	0.2 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1.0 L
10%(W/V) Glucose	4.0 ml
Arabinose	4.0 ml
Xylose	4.0 ml
Mannitol	4.0 ml

⑬ Sabouraud dextrose agar

Neopeptone	10.0 g
Dextrose	20.0 g
Distilled water	1.0 L



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4. 균주 지방산 조성 분석 배지 및 시약

분리된 세균의 세포막과 세포벽의 주요한 구성인자인 지방산 조성을 분석하기 위하여 균주 생육 배지로 trypticase soy broth agar(TSBA)배지를 이용하였으며, 그 조성은 Table 3와 같다.

Table 3. Trypticase soy broth agar(TSBA) composition for fatty acid analysis

Component	Concentration(g/L)
Trypticase soy broth (DIFCO)	30
Granulated agar (DIFCO)	15
Distilled water	1000 ml



1) Saponification reagent (Reagent #1)

Sodium hydroxide(certified ACS)	45.0 g
Methanol(reagent grade)	150.0 ml
Deionized distilled water	150.0 ml

2) Methylation reagent (Reagent #2)

6.00N Hydrochloric acid	325 ml
Methanol(reagent grade)	275 ml

3) Extraction solvent (Reagent #3)

Hexane (HPLC grade)	200 ml
Methyl-tert-butyl ether	200 ml

4) Base wash (Reagent #4)

Sodium hydroxide(certified ACS)	10.8 g
Deionized distilled water	900 ml

5. 방 법

1) γ -PGA 생산

γ -PGA는 Medium E(고 등, 1996)에 *Bacillus licheniformis* 9945a를 접종하여 35 °C, 150 rpm의 진탕항온배양기에서 호기적으로 생산하였으며, γ -PGA의 생성 여부는 배양액을 원심분리(7,000 rpm, 5 °C, 10 min)하고, 여과막(0.45 μ m)으로 여과하여 Ostwald 점도계(C=0.00827 cSt/sec)로 20 °C (H₂O의 점도 1 cSt)에서 점도를 측정하였다.

$$\text{Kinematic viscosity, } V(\text{cSt}) = C \times t$$

(C : 상수, 0.00827 cSt/sec, t : 점도계 통과시간)

2) γ -PGA 분해 세균 분리

γ -PGA 분해 세균의 분리에는 Medium E(고 등, 1996)에 *Bacillus licheniformis* 9945a를 접종하여 호기적으로 4일간 배양한 배양액을 원심분리(7,000 rpm, 5 °C, 10 min)하고, 여과막(0.45 μ m)으로 여과한 여과액과 PMA를 배지로 사용하였다. 여과액에 된장을 접종하여 진탕배양기(30 °C, 150 rpm)에서 호기적으로 3일 동안 배양하여, 원심분리(7,000 rpm, 5 °C, 10 min)하고 점도(Ostwald viscometer; C=0.00827 cSt/s; 20 °C; V=C×t)를

측정하여 점도 저하여부를 관찰하였다. PMA에 된장 배양액 20 μ l를 접종하여 배지상에 형성된 콜로니 모양 등의 형태적인 특징(Harrigan 등, 1976)에 따라 분리한 후 계대배양하여 순수분리하였다. 분리된 균주들을 PGA 발효 여과액에 접종하여 호기적인 조건(30 $^{\circ}$ C, 150 rpm)으로 3일간 배양하였고, 그 배양액을 원심분리(5 $^{\circ}$ C, \times 10,000 g, 10 min)하여 점도를 측정(Ostwald viscometer; $C=0.00827$ cSt/s; 20 $^{\circ}$ C; $V=C\times t$)하고 균주들간의 점도차를 측정하여 점도 저하가 가장 월등한 균주를 선택 분리하였다.

3) γ -PGA 분해 세균의 동정

분리한 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986), Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology(1976), Manual of Methods for General Bacteriology(1981)에 준하여 형태적 특성, 현미경 관찰, 생화학적 특성, 배양 특성, 그리고 지방산 조성을 조사하였다.

(1) 형태적 특성

1.1. Gram 염색법

NA배지에서 18~24시간 배양시킨 균주를 Gram 염색하여 검색 및 현미경(Olympus Microscope, \times 400) 관찰을 하였다. Gram 염색은 슬라이드 글라스위에 균주를 열 고정된 후 crystal violet으로 1분간 염색하고 물로 세척하였고, iodine용액으로 1분 염색한 후 물로 세척하여 95% 에탄올로 색이 없어질 때까지 세척하고 다시 물로 세척하였다. Safranin으로 대비염색한 후 물로 세척하여 관찰하였다.

1.2. 포자 관찰

NB배지에서 2~3일간 배양시킨 균주 배양액을 미량의 water agar위에 떨어뜨려 현미경(Olympus microscope, $\times 400$)하에서 포자를 관찰하였다.

(2) 생화학적 특성

2.1. Catalase 활성

NA 사면배지에 균주를 18~24시간 배양하여 10% 과산화수소수를 2~3방울 떨어뜨려 가스 발생유무를 관찰하였다. 과산화수소수에 의해 가스가 발생하면 catalase 양성으로 판별하였다.

2.2. Voges-Proskaur 반응

Acetylmethylcarbinol 생성을 관찰하기 위하여 Voges Proskaur broth에 균주를 접종하여 3, 5, 7일 동안 배양하여 40 %(w/v) sodium hydroxide 3 ml를 가하고, 0.5~1 mg의 creatin을 가하여 30~60분간 실온에 방치한 후 붉은색으로 변색되는지를 관찰하였다.

2.3. 인돌 생성능

Indole production medium에 균주를 접종하여 7일간 배양한 후 Kovacs' 시약을 0.5ml 가하여 흔들어 준 뒤 방치하였을 때 층분리가 이루어지면서 위층에 분홍색~붉은색을 띄는지를 관찰하였다.

2.4. Dihydroxyacetone 생성능

Glycerol agar에 균주를 접종하여 10일간 배양한 후 hydrous copper sulfate용액과 potassium sodium tartrate 용액을 1:1로 섞은 용액을 가하여 2시간 방치한 후 콜로니 주위에 붉은색 환이 생성되었는지를 관찰하였다.

2.5. Egg-yolk 반응

Egg-yolk broth와 Egg-yolk가 포함되지 않은 control 용액에 균주를 접종하여 1, 3, 5, 7일간 배양한 후 배지상에 흰색의 침전물 또는 고형물이 있는지를 관찰하였다.

2.6. 전분 가수분해능

Starch agar에 균주를 접종하여 3일, 5일간 배양한 후 95 % ethanol을 plate위에 부은 후 15~30분간 방치한 후 clear zone이 형성되는지를 관찰하였다.

2.7. Casein 분해능

Milk agar배지에 균주를 접종하여 30℃에서 7일, 14일, 21일 동안 배양하면서 균주 주위에 투명한 환을 형성하는지 관찰하였다.

2.8. Tyrosine 분해능

Tyrosine agar에 균주를 접종하여 7일, 14일간 배양하면서 성장한 균주의 주위나 밑에 tyrosine crystal이 투명하게 형성되는지를 관찰하였다.

2.9. Gelatin 액화능

Nutrient gelatin에 균주를 접종하여 28℃에서 3~5일간 배양하여 Na₂SO₄로 포화시킨 1N H₂SO₄ 10 ml를 가하여 1시간 방치한 후 clear opaque가 형성되는지를 관찰하였다.

2.10. Citrate와 propionate 이용성

Citrate and propionate utilization medium에 균주를 접종하여 14일간 배양한 후 유기산 생성에 의한 붉은 색이 나타나는지를 관찰하였다.

2.11. Nitrate의 환원능

Nitrate broth에 균주를 접종하여 35℃에서 18~24시간 배양한 후 α -naphthylamine용액과 sulfanilic acid 용액을 각각 1 ml씩 가하여 변색여부를 관찰한다. 시약을 가하여 적색으로 변하면 nitrite가 존재함을 나타냄으로 nitrate 환원 양성 반응으로 하였다.

2.12. Phenylalanine의 탈아민화 반응

Phenylalanine agar에 균주를 접종하여 7일간 배양한 후 10 %(w/v) ferric chloride 용액 4~5방울 떨어뜨려 녹색을 띠면 phenylalanine으로 부터 phenylpyruvic acid를 형성한 것으로 하였다.

(3) 당 이용성

3.1. 당을 이용한 산 생성능과 발효능

Glucose, mannitol, arabinose, xylose를 각각 첨가한 배지에 균주를 접종하여 노란색으로 변색되면 산 생성능 양성으로 하였고, 배지에 Durham tube를 넣어 CO₂를 포집하여 발효능을 판별하였다.

(4) 배양특성

4.1. pH 5.7에서의 균주 성장

NB배지를 대조구로 하여, NB와 Sabouraud dextrose broth에 균주를 접종하여 1일, 1주일, 2주일 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장여부를 관찰하였다.

4.2. 3~12% NaCl을 첨가한 배지에서의 균주 성장

0, 3, 5, 7, 10, 12 %(W/V)의 NaCl을 첨가한 NB 배지에 균주를 접종하여 호기적으로 하기위해 배양기에 비스듬히 기울여 1일, 1주일, 2주일 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장여부를 관찰하였다.

(5) 세균의 지방산 조성 분석

균주의 지방산 분석은 분리된 균주를 TSBA 배지에서 28℃에서 24시간 배양 과정을 3회 반복하였고, 배양 균주중 소량을 백금으로 취하여, 비누화, 메틸화, 추출, 세척의 과정(Fig. 2)으로 전처리하여 Gas Chromatography(Hewlett-Packard 5890 Series II plus ; MIDI)에 의하였으며, HP-1 column은 capillary(25 m×0.2 mm i. d., Supelco)를 사용하였고, column 온도는 170 ℃, 5 ℃/min 속도로 260 ℃까지 온도를 높여 사용하였다. 검출기는

FID를 사용하였고, 검출기 및 주입구의 온도는 300 °C, 250 °C로 유지하였다. 운반기체로서 수소가스는 split ratio를 100:1로 주입하였다. 지방산 분석은 standard calibration을 한 후 2회 반복 시행하였다.

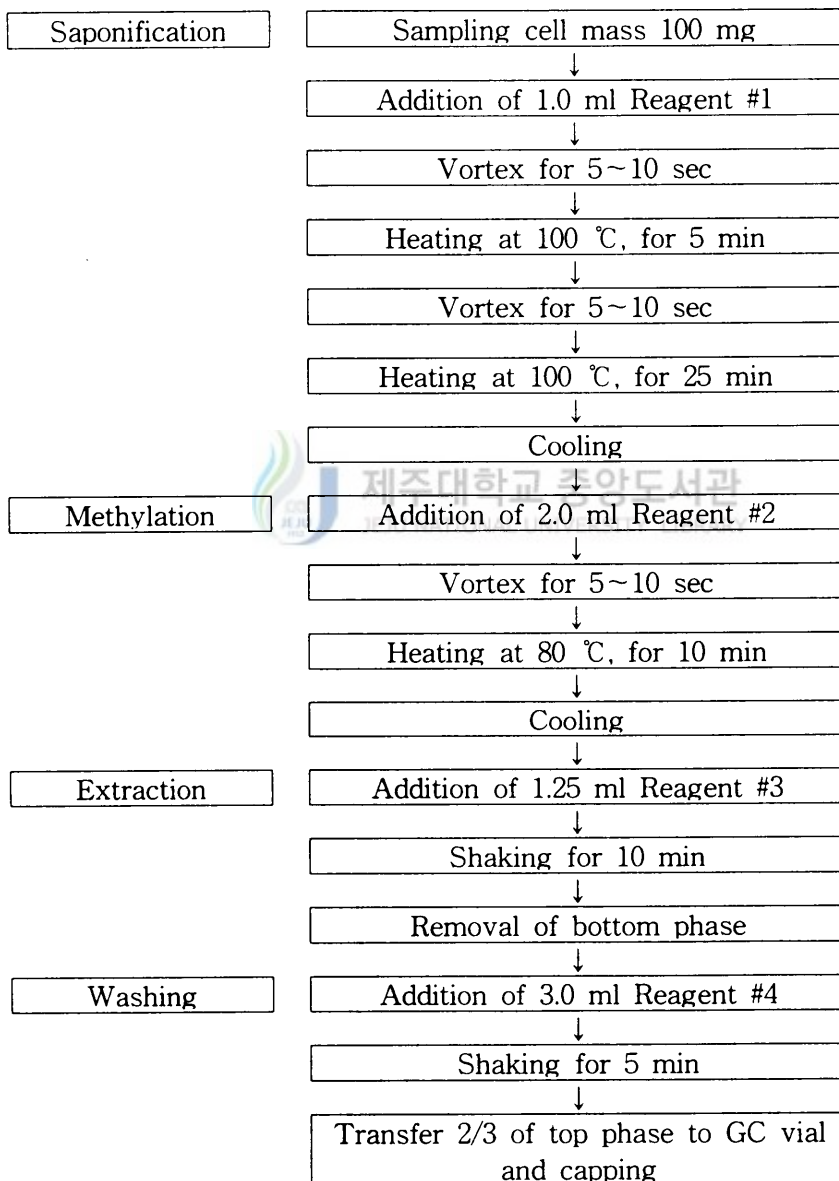


Fig. 2. Flow sheet for fatty acid analysis.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. γ -PGA 생산

B. licheniformis 9945a를 35 °C에서, 150 rpm으로 96시간 배양하여 γ -PGA를 생산하였고, 생성여부는 발효 종료 후 발효액을 원심분리하여 점도를 측정함으로써 확인하였고, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 발효전 배지의 점도는 1.24 cSt였고 *B. licheniformis*를 배양시킨 배양 여과액의 점도는 10.49 cSt로 균주의 생육과 더불어 점도가 크게 증가하여 γ -PGA 생산을 확인하였다. 또한 발효전 배지의 pH는 6.8이었으나 배양 종료 후 pH는 5.5~5.7을 나타내 pH가 저하되었다.

Troy II(1982)는 *B. licheniformis*를 호기적으로 배양하여 배양시간이 지남에 따라 균수가 증가하였고 점도가 증가하여 100시간에서 γ -PGA생성량이 최대가 됨을 보고하였다.

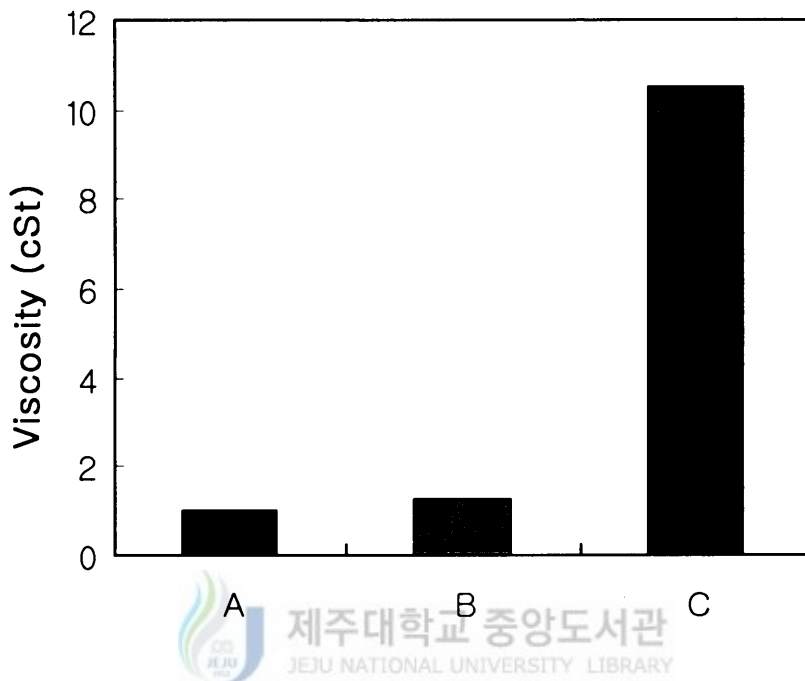


Fig. 3. Production of γ -poly(glutamic acid)

Medium E with *B. licheniformis* 9945a was cultured for 4 days at 35 °C, 150 rpm. A, distilled water; B, medium E; C, culture filtrate.

2. γ -PGA 분해 세균 분리 및 분해 확인

γ -PGA 발효 여과액에 된장을 접종하여 35 °C에서 호기적으로 72시간 동안 배양한 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 20 °C 항온수조에서 점도를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. γ -PGA 발효 여과액의 점도가 10.49 cSt, 9.56 cSt에서 각각 1.55 cSt, 1.6 cSt로 현저하게 낮아졌고, 된장 내에 γ -PGA를 분해 이용할 수 있는 물질이 있음을 확인하였다.

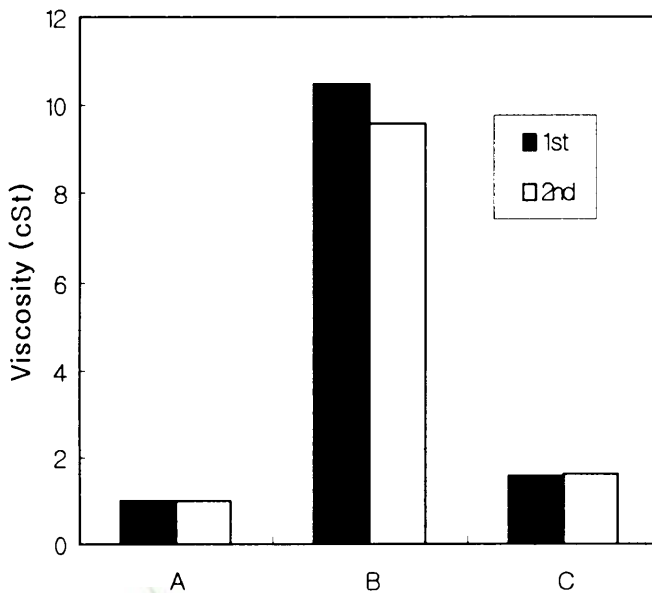


Fig. 4. Viscosity of the culture with fermented soy paste.

A, distilled water; B, culture filtrate with γ -PGA; C, culture filtrate after incubation with fermented soy paste.

된장 배양액으로부터 PMA배지에 균주를 계대배양하여 순수분리 하였다. 1차 3개의 균주가, 2차 5개의 균주가 분리 되었으며, 2차 분리시에는 집락 이 형성된 형태 관찰을 통하여 1차 분리균주와 같은 것은 제외하였다. 분리 된 균주들을 γ -PGA발효 여과액에 접종하여 35 °C에서 호기적으로 72시간 동안 배양하고 원심분리한 후 점도를 측정 한 결과는 Fig. 5와 같았다. 8개의 균주들 중 No. 1, No. 4, No. 5가 9.57 cSt에서 각각 5.59 cSt, 5.82 cSt, 4.47 cSt로 비교적 점도의 저하가 크게 나타났으며, 나머지 5개의 균주들은 이보다 작은 점도 변화를 나타내었다.

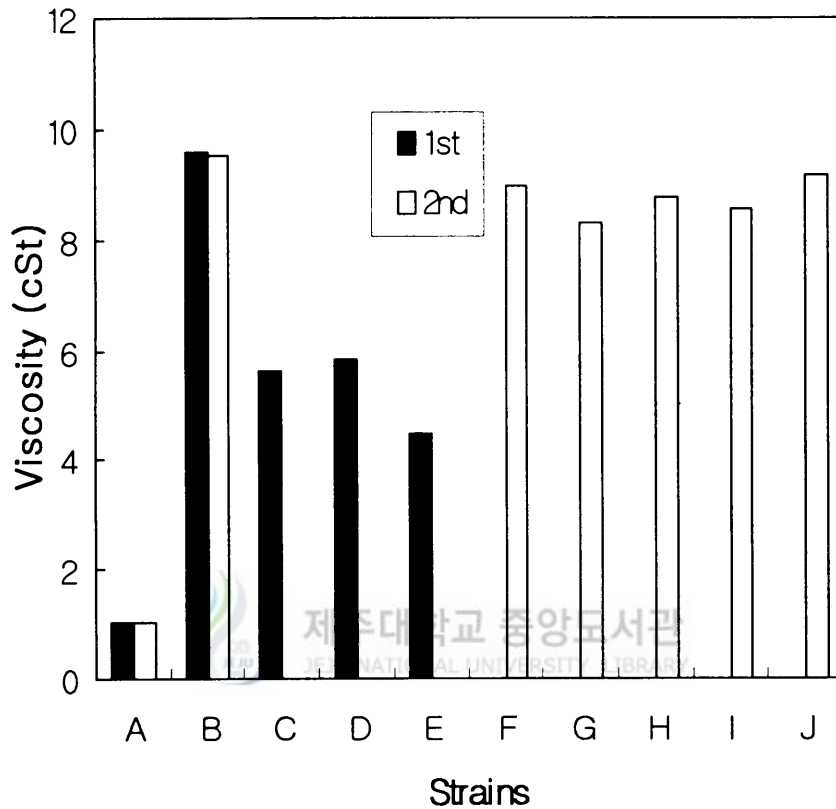


Fig. 5. γ -PGA degradation by the isolated strains from fermented soy paste.

A, distilled water; B, culture filtrate with γ -PGA; C, culture filtrate after incubation with isolate No. 1; D, culture filtrate after incubation with isolate No. 4; E, culture filtrate after incubation with isolate No. 5; F, culture filtrate after incubation with isolate No. 11; G, culture filtrate after incubation with isolate No. 13; H, culture filtrate after incubation with isolate No. 14; I, culture filtrate after incubation with isolate No. 15; J, culture filtrate after incubation with isolate No. 16.

8개의 균주들 중 점도저하가 비교적 컸던 No. 1, No. 4, No. 5 균주를 γ -PGA 발효 여과액에 재배양하고, 대조구로서 균주를 접종시키지 않은 발효 여과액을 함께 호기적으로 배양한 후, 배양액을 원심분리하여 점도를 측정한 결과는 Fig. 6과 같았다. γ -PGA 발효 여과액의 점도는 초기에 4.22 cSt였으나 3일간 배양한 후 균주를 접종하지 않은 대조구인 경우에도 점도가 3.71 cSt로 저하되어 γ -PGA가 분해되는 것으로 보인다.

이는 Chung과 Ko(1997)가 γ -PGA는 일정한 배양시간이 지남에 따라 분자량이 서서히 감소하는 특징을 가지고 있으며, 이는 자체적으로 생산하는 효소의 활성화에 기인한다는 보고와 일치하였다. Volcani와 Margalith(1957)는 γ -L-glutamyl peptidase에 의해 γ -PGA가 분해된다고 보고하였다. 또한 Ward 등(1963)은 γ -PGA는 pH 5.5~6.6 범위에서 점도가 가장 크게 나타났으며, 산성 조건하에서는 γ -PGA가 서서히 자체적으로 분해된다고 보고하였다.

No. 1과 No. 4 균주를 접종하고 배양한 경우는 점도가 4.22 cSt에서 3.62 cSt와 3.48 cSt로 각각 저하되었고, No. 5 균주인 경우는 2.52 cSt로 점도 저하 폭이 가장 컸다. 따라서 된장에서 분리되었던 8개의 균주들 가운데 No. 5 균주가 γ -PGA를 가장 잘 분해하는 균주로 판단되었다.

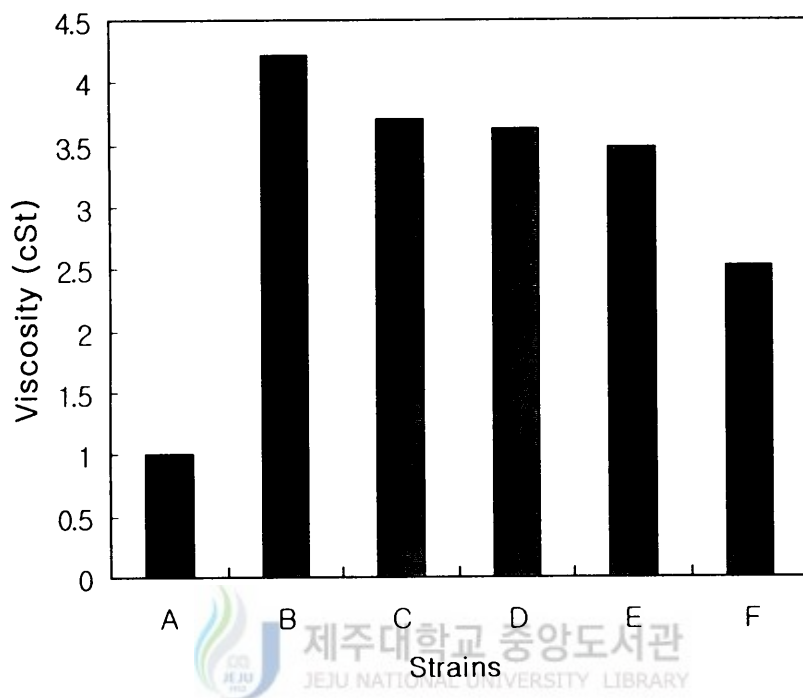


Fig. 6. γ -PGA degradation by the isolated strains from fermented soy paste.

A, distilled water; B, initial culture filtrate with PGA; C, culture filtrate after incubation without inoculation; D, culture filtrate after incubation with isolate No. 1; E, culture filtrate after incubation with isolate No. 4; F, culture filtrate after incubation with isolate No. 5.

3. γ -PGA 분해 세균 동정

1) 형태적 특성

(1) Colony 특성

Nutrient agar plate상에서 No. 5를 배양하여 형성된 집락의 특성에 대해 조사한 결과를 Table 4와 Table 5에 나타내었다. 독립된 집락의 형태는 둥근 모양을 나타내었고, 연한 노란 빛깔을 띠고 있다. 집락 끝은 방사상의 모양을 가지고 있고 배지에서의 집락의 높이는 아주 낮았다. Gram 염색의 결과 ethanol에 의해 탈색되지 않아 연한 자주색을 나타내어 Gram 양성을 나타내었고, 포자를 형성하였으며, 포자 형성 균주들이 주로 Gram 양성을 나타낸다는 Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology(1976)의 내용과 일치하였다.

Table 4. Cultural characteristics of the isolate No. 5 on nutrient agar plate

Characteristics	Description
Shape	Circular
Elevation	Flat
Edge	Rizoid
Color	Pale yellow
Surface appearance	Rough
Consistency	Granular

Cultivation was carried out at 30 °C for 24 hrs.

Table 5. Morphological characteristics of the isolate No. 5

Characteristics	Description
Form	Rod
Gram stain	Positive
Spore	Present

(2) 현미경 관찰

분리된 γ -PGA 분해 세균인 No. 5의 Gram 염색 결과 양성으로 나타났으며, 현미경하에서 세포는 단간형이며, 단일 또는 연속적으로 결합되어 chain과 같은 모양을 띠고 있고, 둥근 포자를 가지고 있었다 (Fig. 7).

Gordon 등(1974)의 분류에 의하면, spore의 위치에 근거하여 포자가 세포의 중심에 위치하는 균주를 Morphology group I (*B. megaterium*, *B. cereus* group, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. coagulance*)으로 보고하였다.

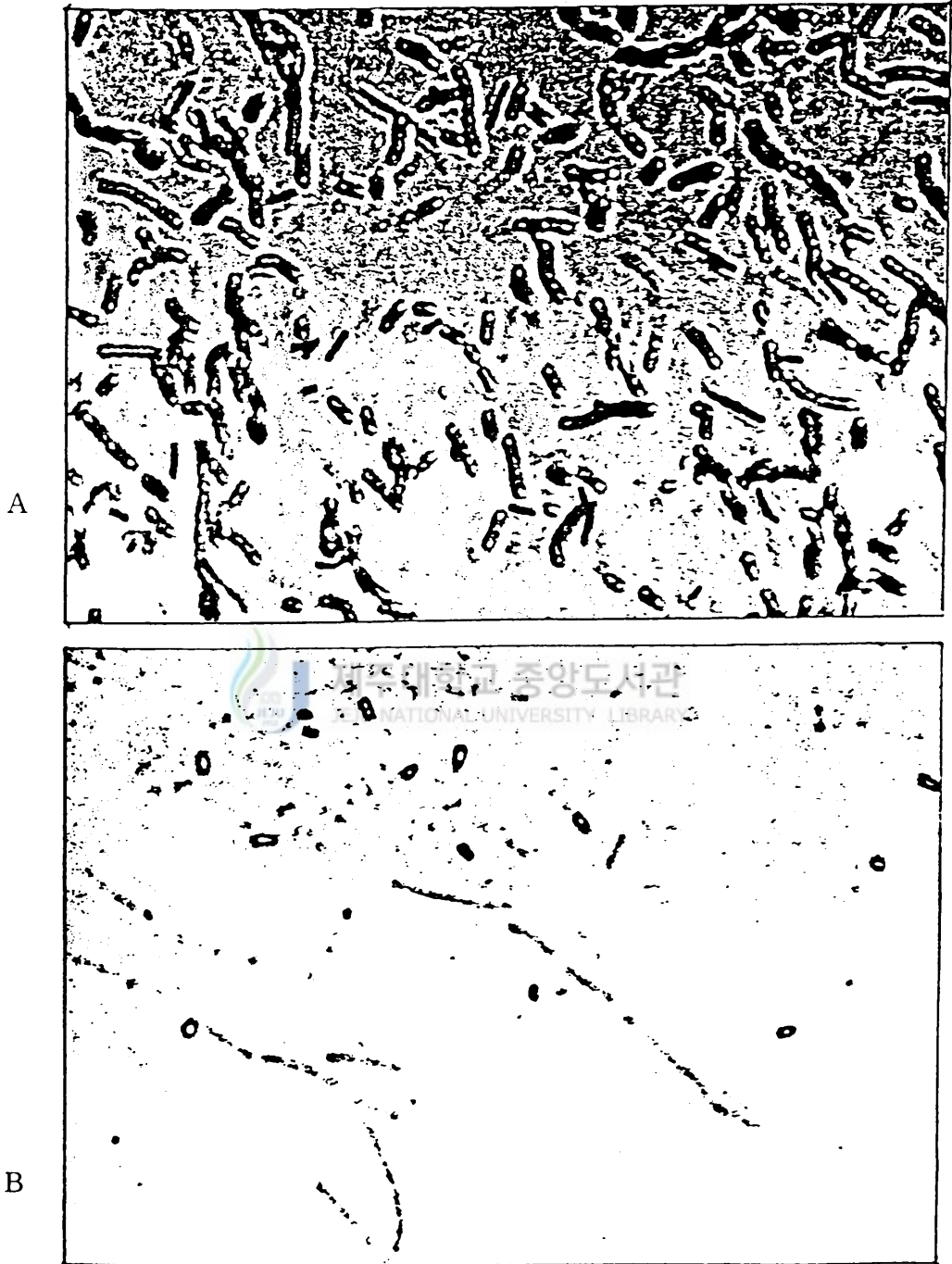


Fig. 7. Microscopic(X400) morphology of the isolate No.5.

A, Cell; B, Spore

2) 생화학적 특성

No. 5의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 실시하였고, 그 결과는 Table. 6과 같다.

Catalase 활성 시험의 결과는 배양된 균주에 과산화수소를 가하였을 때 기포가 격렬히 생성되어 양성의 반응을 보였으며, 이는 No. 5가 catalase를 생성하는 균주임을 확인하였다.

Voges-Proskauer 시험은 반응 결과 붉은 색을 띠어 이 균주가 glucose로부터 acethylmethylcarbonyl을 형성할 수 있음을 나타내었다. 인돌 생성 시험은 균주가 tryptophan을 이용하여 인돌을 형성하는지를 관찰하였는데 층분리는 이루어지나 Kovacs시약에 의해 붉은 색을 띠지 않아 인돌이 생성되지 않음이 관찰되었다.

Dihydroxyacetone 생성 시험은 균주가 glycerol을 이용하여 dihydroxyacetone을 형성하는지를 관찰하였는데, 반응시약을 가하여 2시간 방치 후 관찰한 결과, 균락 주위에 붉은색 환이 생성되어 dihydroxyacetone을 형성함을 나타내었다.

Egg-yolk 반응은 균주가 난황중의 lecithin을 가수분해하는 lecithinase를 생성하는지를 관찰하였는데 1일, 3일, 5일, 7일, 14일 동안 균주를 배양하면서 흰색 침전물이 생성되는지를 관찰한 결과 1~7일 배양기간 동안에는 흰색 침전이 생성되지 않다가 14일째 관찰 시에는 대조구에는 없는 흰색 침전물이 형성되었다.

전분가수분해 시험에서는 95 %의 ethanol을 가하였을 때 흰색 opaque zone이 형성되지 않아 음성 반응을 나타내어 이 균주는 전분을 가수분해

할 수 없는 것으로 나타났다.

Casein 분해 시험은 milk agar에서 균주 배양 결과 3일 이후에 균락 주위에 clear zone이 뚜렷이 형성되어 No. 5가 casein을 분해할 수 있는 것으로 나타났다.

Tyrosine 분해 시험은 tyrosine agar에 균주를 7, 14, 21일 동안 배양하였을 때, 균락 주위나 밑에 clear zone이 형성되지 않아 tyrosine을 분해하지 못하는 것으로 나타났다.

Gelatin 액화시험에서는 nutrient gelatin에 균주를 배양하여 균락 주위에 clear zone이 형성되지 않아 이 균주는 gelatin 액화능이 없는 것으로 확인되었다.

탄소원으로 citrate와 propionate 이용성 시험인 경우 배양 7일 동안에는 변색이 없었으나, 14일 배양 후 약간의 붉은 색으로 변하여 citrate와 propionate를 이용하여 유기산을 생성할 수 있는 것으로 나타났다.

Nitrate를 환원하여 nitrite를 생성하는 시험의 경우 nitrate broth 배지에 균주를 배양하고 반응 결과 적색을 띠어 환원성이 있는 것으로 나타났다.

Phenylalanine 탈아민화 반응시험은 균주를 phenylalanine agar에 배양하여 10 % ferric chloride용액을 가하였을 때 색의 변화가 없어 탈아민화 반응을 할 수 없는 것으로 확인되었다.

따라서 catalase 생성, dihydroxyacetone 생성, nitrate를 nitrite로 환원, Voges-Proskauer 시험에 양성 반응을 나타냈고, 전분을 가수분해 시험, Indole 생성, phenylalanine의 탈아민화, tyrosin 분해, gelatin 액화에 음성 반응을 나타내었다. 또한, glucose, mannitol, arabinose, xylose로부터 산을

생성하였고, 발효능은 없었다. 그 결과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986)의 *Bacillus* 속 균주들 중 *B. licheniformis*, *B. pumilus* 와 유사함을 보였다.

Table 6. Biochemical characteristics of the isolate No. 5

Characteristics	Strains		
	No. 5	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilus</i>
Catalase activity	+	+	+
Voges-Proskauer reaction	+	+	+
Egg-yolk reaction	d	-	-
Hydrolysis of starch	-	+	-
Utilization of citrate	d	+	+
Utilization of propionate	d	+	-
Nitrate reduction to nitrite	+	+	-
Production of indole	-	-	-
Production of dihydroxyacetone	+	ND	ND
Deamination of phenylalanine	-	-	-
Decomposition of casein	+	+	+
Degradation of tyrosine	-	-	-
Liquefaction of gelatin	-	+	+

Symbols: -, 90% or more of strains are negative; +, 90% or more of strains are positive; d, 11-89% of strains are positive; ND, no data available

3) 당 이용성

Glucose, arabinose, xylose, mannitol에 대한 No. 5 균주의 당 이용성을

관찰한 결과는 Table 7과 같았고, 4종의 당류들 중 glucose, xylose, mannitol은 균주가 이용하여 산을 생성하였으나, arabinose는 1일과 7일 째 관찰한 경우 산을 생성하지 못하였다가 10일 이후 산을 생성하였고, 당을 발효시켜 CO₂의 생성여부를 관찰 한 결과 mannitol은 많은 시간이 경과한 후에 Durham tube내에 CO₂가 포집되어 CO₂ 형성능력이 있는 것으로 나타났다. 그러나 나머지의 당에 대한 발효력은 없는 것으로 나타났다. 이는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986)의 *Bacillus* 속 균주들 중 *B. licheniformis*, *B. pumilus*와 유사함을 보였다.

Table 7. Carbohydrate utilization by the isolate No. 5

Characteristics	Strains		
	No. 5	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilis</i>
Acid from glucose	+	+	+
Acid from arabinose	d	+	+
Acid from xylose	+	+	+
Acid from mannitol	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-
Gas from arabinose	-		
Gas from xylose	-		
Gas from mannitol	d		

Symbols: -, 90% or more of strains are negative; +, 90% or more of strains are positive; d, 11-89% of strains are positive

4) 배양 특성

pH 조건에 따른 균주의 성장 정도를 알아보기 위하여 pH 6.8인 경우는 NB배지를, pH 5.7인 경우는 Sabouraud dextrose agar 배지에 각각 균주를 배양하여 600 nm에서 흡광도를 측정한 결과를 Fig. 8에 나타내었고, No. 5는 pH 6.8 보다 pH 5.7에서 성장이 용이함을 나타내었다. 이는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986)의 *Bacillus* 속 균주들 중 *B. licheniformis*, *B. pumilus*와 유사함을 보였다.

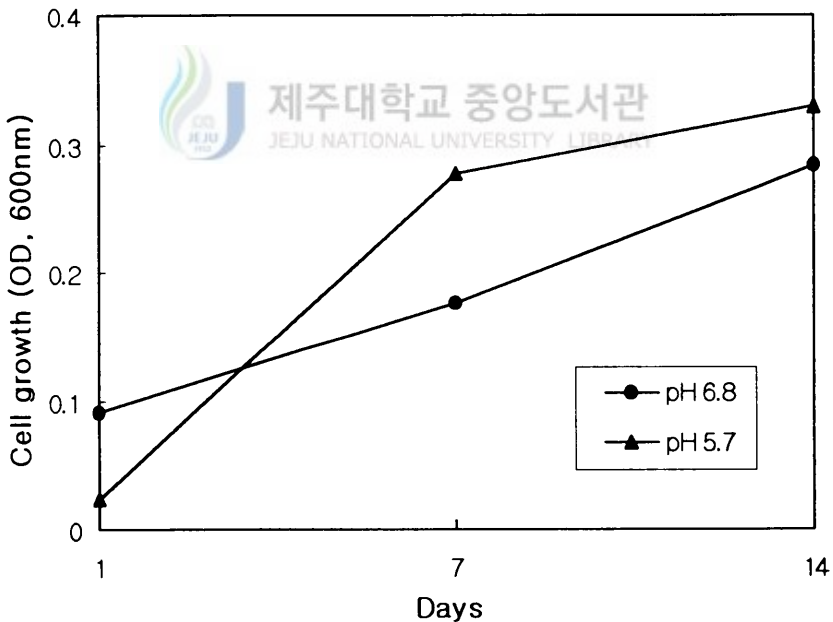


Fig. 8. Cellular growth of the isolate No. 5 at pH 5.7 and pH 6.8.

NaCl이 0%, 2% 또는 5% 들어있는 배지에서는 균주가 잘 자랐으나, 7%

들어있는 배지에서는 0%, 2%, 5% 인 경우 보다 균주가 잘 자라지 않았다. 10%, 12%의 NaCl이 함유된 경우는 균주가 잘 자라지 않았다(Table 8). 이는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986)의 *B. licheniformis*, *B. pumilus*의 경우와 유사함을 보였다.

Table 8. Effect NaCl concentration on the growth of the isolate No.5

NaCl concentration	Strains		
	No. 5	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilus</i>
0 %	+	+	+
2 %	+	+	+
5 %	+	+	+
7 %	d	+	+
10 %	-	-	-
12 %	-	-	-

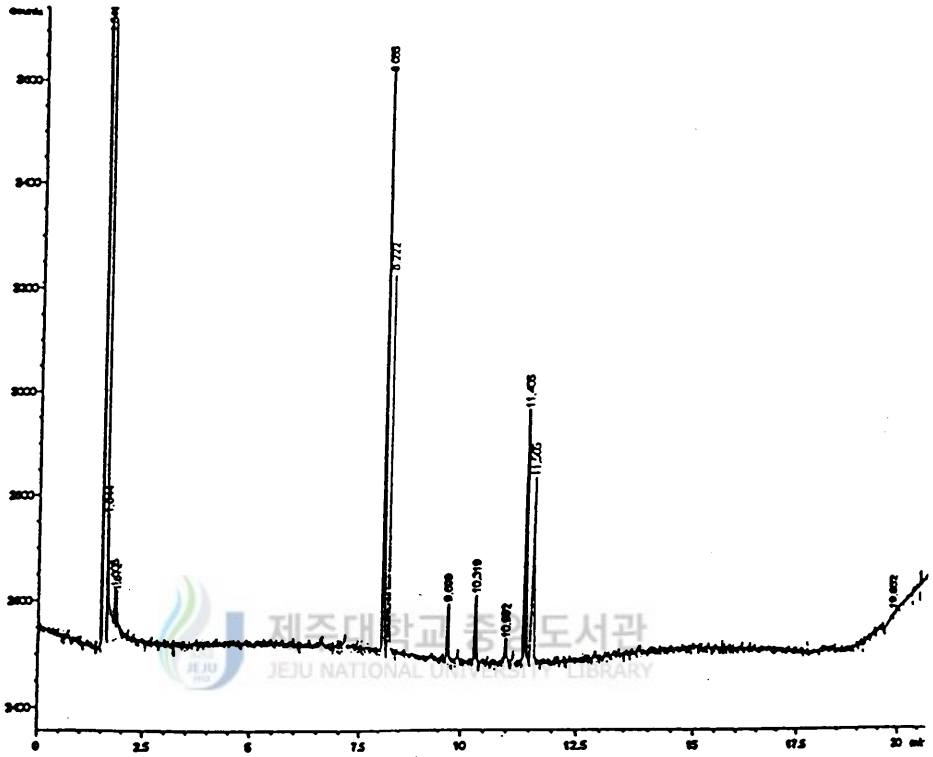
Symbols: -, 90% or more of strains are negative; +, 90% or more of strains are positive; d, 11-89% of strains are positive

5) 지방산의 조성

지질은 세균의 세포막과 세포벽의 주요 구성인자로 장쇄 지방산을 포함하고 있으며, 그 조성은 세균에 따라 차이가 있다. 따라서 균체의 지방산 조성은 그 분류학상의 위치를 알 수 있다. 분리 균주 No. 5의 지방산 조성을 분석한 결과는 Fig. 9와 같이 측쇄사슬인 iso-Cn과 anteiso -Cn이 대부분이고, 측쇄사슬의 전체 조성이 95.49 %로 나타났고 이는 Gram 양성균이며, *Bacillus sp.*의 특징을 나타내었다. anteiso-C₁₅ acid와 iso-C₁₅ acid가 각

각 24.2 %, 35.5 %를 나타내었고, 사슬의 길이는 15~17을 나타내었다. Kaneda(1977)는 불포화지방산이 현저하지 않거나 아주 적고(3 % 이하), anteiso-C₁₅ acid와 iso-C₁₅ acid가 각각 26~60 %, 13~30 %로 사슬의 길이는 14~17이면 group A(*B. alvei*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*)에 속한다고 보고하였다. 따라서 Kaneda의 지방산 분류 그룹(A-F)중 group A에 가까운 균주임을 알 수 있었다. 또한 MIDI 프로그램으로 지방산의 조성을 판독한 결과 *B. licheniformis*와 91.8 %의 유사도를 나타내었다.





RT	Area	Ar/RT	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.544	133212600	0.023	. . .	7.032	SOLVENT PEAK	. . .	< min rt	
1.644	4399	0.040	. . .	7.233	< min rt	
1.805	1536	0.040	. . .	7.555	< min rt	
1.872	1354	0.037	. . .	7.689	< min rt	
8.085	16006	0.036	0.984	14.621	15:0 ISO	35.50	ECL deviates 0.000	Reference 0.003
8.222	10933	0.039	0.982	14.711	15:0 ANTEISO	24.20	ECL deviates -0.000	Reference 0.002
8.699	1801	0.038	0.945	15.624	16:0 ISO	3.92	ECL deviates 0.000	Reference -0.000
10.319	2093	0.042	0.959	16.000	16:0	4.52	ECL deviates -0.000	Reference -0.001
10.992	742	0.037	0.953	16.390	ISO 17:1 w10c	1.60	ECL deviates 0.003	
11.405	7983	0.043	0.950	16.629	17:0 ISO	17.10	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
11.545	6157	0.044	0.949	16.722	17:0 ANTEISO	13.17	ECL deviates -0.000	Reference 0.001
19.852	807	0.084	. . .	21.509	> max rt	
Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Area	Mbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift	
133212600	45717	45717	100.00	44157	6	0.001	0.001	
* QUESTION ANALYSIS: TOTAL AREA LESS THAN 50000. CONCENTRATE AND RE-RUN.								
S. licheniformis 0.918								

Fig. 9. Gas chromatogram for the analysis of fatty acids of the isolate No. 5.

요 약

γ -poly(glutamic acid)(γ -PGA)는 수용성 천연고분자로 glutamic acid의 반복단위체로서 α -amino 기능단과 γ -carboxylic acid 기능단이 연결된 polyamide 구조를 이루고 있다. 이 고분자는 *Bacillus species*의 capsule을 구성하는 주성분으로 알려져 있으며, *Bacillus licheniformis* 9945a를 배양하면, 배양액중으로 배출되는 균체의 물질이다.

γ -PGA는 인체에 대한 독성이 없고, 생분해성이 있어서 의약품, 인공장기, 식품, 플라스틱, 석유산업 분야에 응용될 수 있는 잠재력이 있다. γ -PGA의 생산에 대한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나 생분해에 대한 연구는 많이 이루어지지 않아 분해효소, 분해기작, 분해미생물 등 생분해와 관련된 정보가 거의 없다. 산업적 이용을 위해서는 생분해와 관련된 연구가 이루어져야 한다. 본 연구는 우리 나라의 전통적인 발효식품인 된장으로부터 γ -PGA를 분해하는 미생물을 분리하고 분리된 미생물을 동정하는데 그 목적이 있었다.

γ -PGA는 *B. licheniformis* ATCC9945a를 배양하여 생산하였고, 이 발효여과액에 된장을 접종원으로 사용하여 72시간 배양 후 점도를 측정함으로써 γ -PGA의 분해를 확인하였다. 된장 접종 배양액에서 배지상에 자라는 균락 모양 등의 형태적 관찰로 8종의 균주를 분리하였고, 그 중 No. 5의 점도 저하폭이 가장 현저하여 γ -PGA 분해 세균으로 분리동정되었다. No. 5는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 동정한 결과, *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus pumilis*에 유사한 것으로 나타났다. 또한 No. 5의 구성지방산을 gas chromatography로 분석한 결과, *Bacillus species*의 특징을 나타내었으며, MIDI 프로그램에 의한 비교분석을 통하여 *Bacillus licheniformis*와 91.8 %의 유사성을 나타내었다.

따라서, 된장으로부터 분리된 γ -PGA 분해 세균은 *Bacillus licheniformis* No. 5라 할 수 있다.



참고문헌

Atsuo, G and K. Masao, 1992. Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -D-glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(7), pp. 1031-1035.

Balasubramanian, D., C. C. Kalita and J. Kovacs, 1973. Conformational studies of anthrax polypeptide, subtilis polypeptide and synthetic poly- γ -L-glutamic acid, *Biopolymers*, 12(1), pp. 1088-1095.

Cho, D. H. and W. J. Lee, 1970. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation: A study on the microflora of fermented Korean Maeju loaves, *J. of the Korean Agricultural Chemical Society*, 13(1), pp. 35-42.

Chung, W. S. and Y. H. Ko, 1996. Transformation and mutation of *Bacillus licheniformis* 9945a producing γ -poly(glutamic acid), *J. of the Korean Agricultural Chemical Society*, 40(3), pp. 173-177.

Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Neter, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips, 1981. Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, pp. 22-27.

Gordon, R. E., W. C. Haynes, and C. H. N. Pang, 1973. The genus *Bacillus* handbook No. 427, In "해양에서 용균효소를 분비하는 균주의 분리과 동정" (ed. 진성현, 류병호), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 23(5), pp. 580-587.

Gross, R. A., G. A. Birrer, A. M. Cromwick, S. A. Giannos and S. P. McCarthy, 1993. Biotechnological polymers: Polymers from biotechnology: Bacterial polymers and γ -PGA(glutamic acid). Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, Pennsylvania, pp. 1-6.

Harrigan, W. F. and M. E. McCance, 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology, Academic Press, New York. pp. 66-79.

Housewright, R. D., 1962. The Bacteria: The Biosynthesis of homopolymeric peptides. Vol. III, Academic Press, New York, pp. 389-400.

Ivanovics, G., and L. Z. Erdos, 1937. In "Polyglutamate production by *Bacillus subtilis*(natto)" (ed. Toshio, H., F. Yusaku and U. seinosuke), *J. of Applied Biochemistry*, 4, pp. 112-120.

Kaneda, T. 1977. Fatty acid of the genus *Bacillus*, An example of

branched-chain preference. In "해양에서 용균효소를 분비하는 균주의 분리와 동정" (ed. 진성현, 류병호), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 23(5), pp. 584-586.

Ko, Y. H., J. H. Kim and R. A. Gross, 1996. Glucose as a carbon source for γ -PGA production by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a, Proceedings of the fourth joint symposium of Cheju National University and Nagasaki University on science and high technology, pp. 285-291.

Kramar, E., 1921. In "Chemistry and biochemistry of amino acid, peptides and proteins" (ed. Weinstein B.), Marcel Dekker, Vol. I. p. 88.

Kream, J., B. A. Borek, J. Digrado and M. Bovarnik, 1954. In "Chemistry and biochemistry of amino acid, peptides and proteins" (ed. Weinstein B.), Marcel Dekker, Vol. I. p. 90.

Kwon, O. J., J. K. Kim and Y. G. Chung, 1986. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste, *J. of the Korean Agricultural Chemical Society*, 29(4), pp. 422-428.

이신영, 강태수, 김갑수, 1993. 호알카리성 *Alcaligenes* sp.의 배양에 의한 γ -PGA의 생산, *한국생물공학회지* 8(3), pp. 217-223.

Leonard, C. B., R. D. Housewright, 1963. In "Peptide antibiotics biosynthesis and functions; Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl peptide) capsule in *Bacillus licheniformis*" (ed. Tory II, F. A.), Walter de Gryter, New york, p. 52.

임 승택, 1994. 전분의 플라스틱 소재로서의 이용, 생물공학뉴스, 1(3), p. 15.

Marlborough, D. I., 1973. The optical rotatory properties of poly- γ -D-glutamic acid, *Biopolymers*, 12, pp. 1083, 1086-1087.

Murao, S., S. Sawa, T. Murakawa and S. Omata, 1971. Cultural conditions for the production of polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* No. 5E: Effects of amino acids and glucose, *Agric. Biol. Chem.*, 45(3), pp. 118-119.

Nitecki, D. E. and J. W. Goodman, 1971. γ -Glutamyl peptides : Chemistry and immunochemistry. In "Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides and proteins" (ed. Weinstein B.), Marcel Dekker publisher, Vol. I. pp. 87-126.

Puigalí, J., S. Muñoz-Guerra, A. Rodríguez-Galán, C. Alegre and J. A. Subirana, 1988. Helical and sheet structures in the nylon 4-derivatives poly(α -benzal-L-glutamate) and poly(α -methyl-L-glutamate),

Makromol. Chem., Macromol. Symp. 20(21), pp. 167-169.

Sneath, P. H. A., 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2, Williams & Wilkins, pp. 1105-1106, 1121-1125.

Takanori, K., N. Tsuyoshi and S. Sadao, 1983. Transformation of glutamyl dipeptides by heating in aqueous solution, *Agric. Biol. Chem.*, 47(11), pp. 2647-2649.

Thorne, C. B., 1956. Capsule formation and glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*, Symposia of the Society for General Microbiology No. IV, Bacterial Anatomy, pp. 75-77.

Thorne, C. B. and C. G. Leonard, 1958. Isolation of D- and L-glutamyl polypeptides from culture filtrates of *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.*, 233, pp. 1109-1112.

Torii, M., 1959. Paper electrophoresis and detection on paper of glutamyl polypeptide, *Biken's Journal*, 2, pp. 259-261.

Toshio, H., F. Yusaku and U. Seinosuke, 1982. Polyglutamate production by *Bacillus subtilis*(natto), *J. of Applied Biochemistry*, 4, pp. 112-120.

Troy, F. A., 1973. Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*: Characterization and structural properties of the enzymatically synthesized polymer. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(1), pp. 316-320.

Troy II, F. A., 1982. Peptide antibiotics biosynthesis and functions: Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*, Walter de Gruyter & Co., Berlin · New York, pp. 146-150.

Utsumi, S., M. Torii, H. Yamamuro, Y. Higashi and T. Amano, 1960. In "Chemistry and biochemistry of amino acid, peptides and proteins" (ed. Weinstein B.), Marcel Dekker, Vol. I. pp. 90-91.

Volcani, B. E. and P. Margalith, 1957. In "The bacteria" (ed. Gunsalus, I. C., R. Y. Stainer), Academic Press, New York and London, p. 401

Ward, R. M., R. F. Anderson and F. K. Dean, 1963. Polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* NRRL B-2612 grown on wheat gluten, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 5, pp. 41-48.

Yoo, J. Y. and H. G. Kim, 1998. Characteristics of traditional mejus of nation-wide collection, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27(2), pp. 259-267.

감사의 글

한해를 마무리 하면서 조그마한 결실을 맺게 되었습니다.

이 자리에 설 수 있도록 학문의 길을 열어주시고 이끌어 주신 고영환 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 항상 아낌없는 조언과 격려를 주신 강영주 교수님, 송대진 교수님, 김재하 교수님, 김수현 교수님, 하진환 교수님 그리고 임상빈 교수님께도 감사를 드립니다.

대학원 생활동안 항상 조언과 관심을 주신 김효선 선생님과 정완석 선생님, 많은 이해와 사랑으로 힘이 되어준 좌미경 후배님과 김인순 선생님 그리고 이해와 관심으로 지켜 봐주신 대학원 선·후배님께도 감사를 드립니다.

사랑과 이해로 항상 함께 하는 친구 현숙에게 감사를 드립니다.

늘 한결같은 같은 마음으로 사랑과 희생을 주신 어머님과 항상 든든하고 힘이 되는 동생들에게도 감사를 드립니다.

생활을 함에 있어 든든한 버팀목이었던 작년에 작고하신 아버님 영전에 이 글을 바칩니다.