



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

제주 전통발효 식품 갈치속젓에서 분리한
Bacillus subtilis JNUCC의 유전체 분석과
항비만 및 미백 개선 효능 탐색

제주대학교 대학원

화학과

한지민

2020년 8월

제주 전통발효 식품 갈치속젓에서 분리한
Bacillus subtilis JNUCC의 유전체 분석과
항비만 및 미백 개선 효능 탐색




지도교수 현 창 구

한 지 민

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2020년 8월

한지민의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장	李南昊	
위 원	金德洙	
위 원	玄昌久	

A study of whitening and anti-obesity of
Bacillus subtilis JNUCC isolated from
galchisok-jeot and analysis of the strain's
genome sequence

Ji-Min Han

(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2020. 8.

This thesis has been examined and approved by

Nam Ho Lee

Duk Soo Kim

CHANG-GU HYUN

06/23/20

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



ABSTRACT

젓갈과 같은 발효 식품에서 분리된 미생물은 항균, 항산화, 항염증 효능이 있는 것으로 알려져 기존의 화장품 및 의약품의 부작용을 줄일 수 있는 천연 원료 탐색에 있어서 중요성이 강대되고 있다. α -glucosidase는 탄수화물 소화를 촉진시키는 효소로, α -glucosidase 저해제는 체내 탄수화물의 흡수 속도와, 탄수화물에 유도되는 저밀도 지질 단백질 (Low density lipoprotein, LDL)의 생합성을 감소시켜 항비만제로 사용할 수 있다. tyrosinase는 피부의 색을 결정하는 색소인 멜라닌 생합성의 초기 반응에 작용하는 효소이며, tyrosinase 활성 억제제를 미백제로 사용할 수 있다. 이번 연구는 제주도 지역 전통 발효 식품인 갈치속젓에서 분리한 *Bacillus subtilis* JNUCC 균주의 2차 대사산물 추출물로 항비만 및 미백 개선 원료로서의 가능성을 알아보고 균주의 유전체를 분석하여 미생물 유전자원의 확보를 하고자 하였다.

제주산 어린 갈치를 사용해 제조한 갈치속젓에서 17개의 균주를 분리하여 각 균주의 배양액으로 항비만 및 미백 개선 효능을 탐색하고 결과를 종합적으로 판단하여 우수 균주를 선발하였다. 선발 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열 database와 비교하여 *Bacillus subtilis*와 가장 근연 중임을 확인하였고 균주 명은 JNUCC로 정하였다. MiSeq 플랫폼 (Illumina Inc, USA)을 이용하여 균주의 전장 유전체를 분석하여 14개의 contig에 4,170,746 bp의 염기서열로 4,338개의 유전자를 가지고 있음을 확인하였다. 이를 통해 G + C 함량은 43.6% 임을 알 수 있었다.

Bacillus subtilis JNUCC 2차 대사산물 추출물을 서로 다른 농도로 각각 α -glucosidase 및 tyrosinase 억제 활동에 대해 평가하였으며, 각각 acarbose와 arbutin을 대조군으로 사용하였다. α -glucosidase 활성 저해 평가에서 균주의 2차 대사산물 추출물과 대조군의 반수 억제 농도(IC₅₀)값은 각각 101.92 μ g/mL, 100.94 μ g/mL이었다. Tyrosinase 활성 저해 평가에서 균주의 2차 대사산물 추출물과 대조군의 IC₅₀값은 각각 669.52 μ g/mL와 79.23 μ g/mL이었다. 이번 연구는 *Bacillus subtilis* JNUCC 2차 대사산물 추출물이 acarbose와 흡사한 활성을 가졌으며 억제 활성이 농도에 의존한다는 것을 발견하였다. 또한 *Bacillus subtilis* JNUCC 2차 대사산물 추출물의 tyrosinase 억제 활성은 대조군인 arbutin보다는 약한 활성을 가졌으나 농도 의존적으로 증가함을 보였다. 따라서 갈치속젓에서 분리한 *Bacillus*

subtilis JNUCC는 α -glucosidase 및 tyrosinase 억제제로서 잠재적인 가능성을 가졌으며, 항비만제 및 미백 개선제로 화장품 및 의약품 산업에서 사용될 수 있음을 시사한다.

목 차

ABSTRACT	I
목차	III
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	7
2.1. 시료의 준비	7
2.2. 세균 분리	8
2.3. 1차 효능 탐색 및 균주 선발	9
2.3.1. 균주 배양 및 시료 준비	10
2.3.2. α -glucosidase 저해 활성 시험	11
2.3.3. Tyrosinase 저해 활성 시험	12
2.4. 선발 균주의 2차 대사산물 추출 및 효능 평가	13
2.4.1. 대사 배지 제조 및 배양	14
2.4.2. 2차 대사산물 추출물 제조	15
2.4.3. α -glucosidase 저해 활성 평가	16
2.4.4. Tyrosinase 저해 활성 평가	17
2.5. 균주의 전장 유전체 분석	18
2.5.1. 16S rRNA 염기서열 분석	18
2.5.2. 전장 유전체 분석	18
III. 결과 및 고찰	19
3.1. 세균 분리	19
3.2. 균주 선발 및 분류	20
3.3. <i>Bacillus subtilis</i> JNUCC 균주의 분류	22
3.4. 선발 균주의 2차 대사산물 효능 분석	24
3.4.1. α -glucosidase 저해 활성	24
3.4.2. Tyrosinase 저해 활성	26
3.5. <i>Bacillus subtilis</i> JNUCC의 전장 유전체 분석	28
IV. 결론	32
V. 참고문헌	34

표 목차

Table 1. Composition of LB medium	8
Table 2. Composition of metabolite medium	14
Table 3. Number of cultured colonies by dilution ratio	19
Table 4. α -glucosidase and tyrosinase inhibitory activity of Galchisok-jeot isolate d strains culture medium	21
Table 5. General genome features and genome sequencing information <i>Bacillus s</i> <i>ubtilis</i> JNUCC	29

그림 목차

Figure 1. Mechanism of hydrolysis of <i>p</i> -NPG by α -glucosidase	2
Figure 2. The biosynthetic pathway of melanin	4
Figure 3. Galchisok-Jeot	7
Figure 4. Nucleotide database of <i>Bacillus subtilis</i> JNUCC	23
Figure 5. α -glucosidase inhibition activities of extract of <i>Bacillus subtilis</i> JNUCC and acarbose	25
Figure 6. Tyrosinase inhibition activities of extract of <i>Bacillus subtilis</i> JNUCC and arbutin	27
Figure 7. Circular map of <i>Bacillus subtilis</i> JNUCC genome	30
Figure 8. Registered status in Genbank	31

I. 서 론

급속한 경제발전과 생활 수준 향상, 편리한 생활을 위해 발전한 자동화는 신체 활동량을 감소시켜 운동량 부족으로 비만 인구의 증가를 불러 일으켰다. 비만은 칼로리 과다 섭취시 칼로리의 잉여 부분이 체내 말초조직 및 복부 등의 지방조직에 축적되어 나타나는 질병으로 당뇨병, 고혈압, 심혈관계 질환, 암과 같은 만성질환을 유발하는데, 이러한 만성질환은 전 세계 사망률 원인에 큰 부분을 차지하며[1], 우리나라에서는 식생활의 서구화로 고지혈증을 동반한 비만율이 높아지고 고지혈증에 기인된 뇌졸중 및 동맥경화 등의 심혈관계 질환이 한국인 사망 원인의 30 % 이상을 차지한다는 보고로 미루어볼 때, 비만은 심각한 사회문제로 간주되며 이에 대한 대책이 필요하다[2]. 최근 현대 사회에서는 대중매체의 영향으로 건강과 미의 대한 관심이 높아지면서 다이어트라는 용어가 일상어로 정착할 만큼 아름답고 건강한 신체를 만들고자 하는 사회적 분위기가 더해져 비만 치료와 다이어트에 대한 관심이 증가하고 있다.

기본적인 비만 치료 방법에는 식 Mayo법, 운동요법, 행동요법, 수술요법, 약물요법 등이 있다. 그 중 체중 감량을 목적으로 하는 약물요법은 식 Mayo법과 운동 요법의 보조 치료로 이용이 가능하다[3-4]. 이전 연구에서 혈당강하제의 한 부류인 α -glucosidase의 억제제는 장내 소화 산물인 소당류와 이당류의 단당으로의 분해를 억제하며 탄수화물에 유도되는 저밀도 지질 단백질 (Low density lipoprotein, LDL)의 생합성, 혈중 중성 지방을 감소시킨다고 보고되었다[5]. 이는 곧 섭취한 탄수화물의 흡수를 저해하고 바로 배출시켜 식후 혈당 저하를 유도하여 당뇨, 비만과 고지혈증 등의 치료제로서의 개발 가능성을 갖는다[6]. α -glucosidase는 포유류의 소장 점막 상피세포에 존재하는 소당류(oligosaccharidases) 중의 하나로 올리고당과 다당류의 비환원 말단으로부터 α -D-glucosidic 결합을 가수분해하여 D-glucose를 유리시키는 효소이며, 이는 섭취된 소장에서의 탄수화물 흡수를 촉진시킨다[7]. (Figure 1)

α -glucosidase의 대표적인 억제제로 acarbose, voglibose 등을 예로 들 수 있다. 이러한 α -glucosidase 저해제의 지속적인 복용은 설사와 복통 등의 부작용을 불러오기 때문에 이러한 부작용이 개선된 α -glucosidase 억제제의 개발이 필요한 실정이다[8].

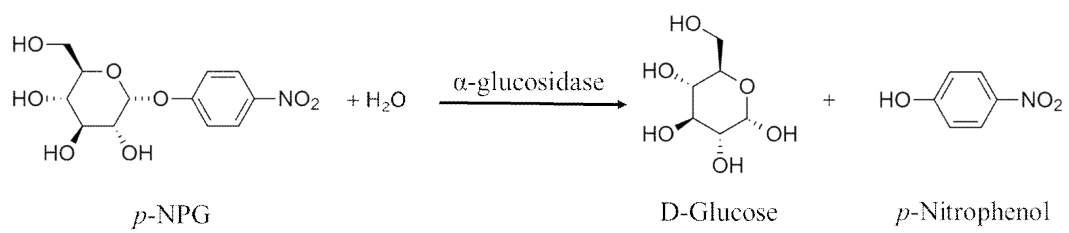


Figure 1. Mechanism of hydrolysis of p -NPG by α -glucosidase.

우리나라에서는 예로부터 밝고 잡티 없는 깨끗한 피부를 상징적인 아름다움으로 인식해왔으며, 현재까지 사회적으로도 피부 미백 개선에 대한 수요가 상당하며 미백 개선을 강조한 기능성 화장품 시장들이 앞다투어 제품을 개발해 내는 등 미백 개선 화장품 시장은 지속적인 성장세를 이어가는 중이다[9]. 사람의 피부의 색은 주로 멜라닌이라는 피부나 눈 등의 조직에 존재하는 갈색 또는 검은색의 고분자 색소 물질에 의해 결정이 된다. 이 멜라닌은 인체의 피부에 존재하며 자외선, 건조, 극한온도 등에 대한 생존 능력을 높여주기도 하지만, 과도한 멜라닌 생성은 기미, 주근깨, 검버섯과 같은 피부 노화를 촉진시키며 피부암 유발에 관여하기도 한다[10]. Melanin은 색소 생성을 촉진하는 여러 가지 인자 중 tyrosinase가 주요 인자로 인식되고 있으며 생체 내의 melanin 생합성 반응은 tyrosine을 tyrosinase가 산화시키며 시작이 되는데 tyrosine은 L-DOPA에서 dopaquinone으로 바뀌게 되며, 여기서 생성된 dopaquinone은 다양한 경로를 통하여 Eu-Melanin 또는 Pheo-Melanin을 생성한다[11-12]. (Figure 2) 따라서 tyrosinase의 억제는 피부의 멜라닌 색소의 조절을 통하여 피부의 미백효과를 기대할 수 있다. 현재 개발된 대표적인 tyrosinase 저해제로는 arbutin, kojic acid 등이 있으나 피부의 안전성과 제형 안정성 등의 문제로 피부 미백제로 적용하기엔 다소 어려운 단점을 가졌다. 그 단점을 보완하기 위해 현재 미백제로 활용 가능한 새로운 천연 원료를 찾기 위한 연구가 많이 진행되어 오고 있다.

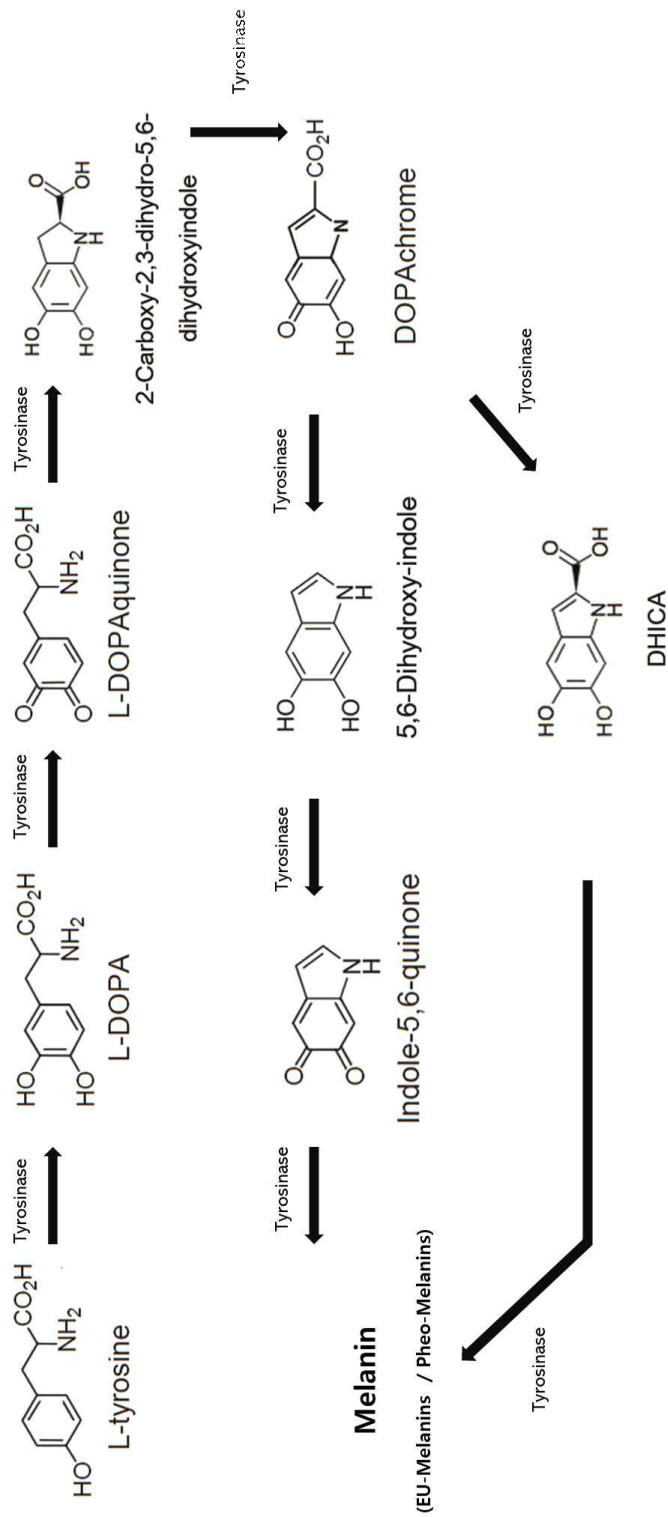


Figure 2. The biosynthetic pathway of melanin.

천연 원료를 찾기 위한 노력에서, 최근 미생물을 활용한 발효 식품은 미래 사회 사람들의 건강증진과 질병 예방을 위한 요소로 전망되어지고 있다. 과거 세대의 발효는 식품을 오래 보존하고 유지, 저장하는 정도의 개념 정도 뿐이었다면, 현대 사회에서의 발효는 여러 가지 유익한 요소들을 첨가하여 최상의 효과를 내하고자 하는 조성 조건에 초점을 맞추었다[13]. 식품 뿐만 아니라 발효 물질, 효소류, 에너지원 등으로 활용이 가능하며 그 용도는 발효 식품을 넘어 의약, 특수물질 생산 창출로 이어진다. 이전의 연구를 통해 발효 식품 내 미생물의 2차 대사산물을 식품, 의약, 화장품 산업에서의 폭넓은 이용 가능성을 밝힌 많은 사례를 볼 수 있다[14-15]. 그러한 이유들로 발효 식품 유래 미생물을 활용한 기능성 보강 및 구멍을 통한 응용 기술의 확립, 제품 및 산업화의 필요성이 제기되고 있다. 발효 식품 유래 미생물이 가진 여러 산업에서의 이용 가능성을 평가하기 위해 각 미생물의 유전적인 특성 확인 및 보충하고자 하는 유효 성분의 생산 능력 여부를 확인하기도 하는데, 이를 위해 차세대 염기서열 분석(NGS, Next Generation Sequencing)를 이용하여 유전체를 분석하는 기술이 사용될 수 있다. 차세대 염기서열 분석의 발달은 이전의 유전체 해독 방식인 Sanger sequencing 방식과 달리 대량의 염기서열을 저렴한 비용으로 분석할 수 있게 되었는데, 이는 수많은 생물 종들의 유전체 및 전사체 분석을 가능케 하였다[16]. 이전 연구에서 된장, 청국장, 고추장 등의 발효 식품 유래 미생물의 특성을 확인하는데 차세대 염기서열 분석 방법이 유용하게 사용되었으며[17-20], 그에 더불어 차세대 염기서열 분석 방법은 미생물 유전자원의 확보에 대한 유용한 도구로도 사용될 수 있다. 전통 발효 식품 내 미생물의 유전체 분석을 통하여 유전자의 기능을 탐색하는 이러한 노력은 우수한 미생물의 수집 및 보존, 전통 발효 식품 유래 유용 미생물 자원이 산업적으로 활용되게끔 할 수 있다.

우리나라의 3대 전통 염장 발효 식품에는 젓갈, 장류, 김치류가 속하였으며 그 중 젓갈은 어패류의 살, 내장, 알을 20 - 30% (w/w) 식염에 절여 상온에서 일정 기간 동안 발효, 숙성시켜 제조한다[21]. 젓갈의 발효 과정 중에는 protease, amylase, lipase, cellulase와 같은 미생물 유래 다양한 효소가 분비되며, 이러한 효소에 의해 향균, 항산화, 항암 작용 등 다양한 기능성을 갖는 2차 대사산물이 생성된다고 보고되고 있다[22-25].

이러한 젓갈의 주 발효 미생물 중 *Bacillus* 속에 속한 *Bacillus subtilis*는 유용한 2차 대사산물을 생산해내는 토양미생물로 식품 산업, 화장품산업 및 농업 부분에서의 이용이 가능하며[26], 또한 GRAS(General Recognized As Safe : 미국 FDA에서 지정한 일반적으로 안전한 물질로 인정되는 목록)로 인증되어 있으며 대표적인 프로바이오틱스 미생물로 알려져 있다[27]. 이러한 *Bacillus* 속 균주들은 이전 연구에서 poly- γ -glutamic acid, 1-deoxynojirimycin 등과 같은 물질을 2차 대사산물로 하여 tyrosinase 또는 α -glucosidase 효소를 저해하여 미백제, 항비만제로 이용 가능성이 있다고 알려져 있다[28-29]. 그러나 젓갈에서 분리한 균주에서의 항비만 및 미백 개선 활성을 나타내는 연구는 아직 보고된 바가 거의 없었기에, 따라서 젓갈에서 유래한 새로운 미생물의 항비만 및 미백 활성에 대한 탐색을 할 필요가 있다.

우리나라의 지역별 특산물로 만든 젓갈의 종류는 무궁무진하며 다른 지역에 비해 따뜻한 날씨 탓에 소금으로 염장을 하는 젓갈이 발달한 남해안에선 어패류의 내장으로 만든 독특한 젓갈이 다른 지역에 비해 많다. 그 중 제주도의 전통 발효 음식인 갈치속젓은 갈치(*Trichiurus lepturus*)와 그 내장을 발효시킨 것으로, 약 25 %의 소금을 함유하고 있다. 갈치속젓은 갈치 육젓에 비해 감칠맛이 더 우수한데, 이는 갈치 내장에 존재하는 많은 자가분해 효소와 그 외의 다양한 호염성 세균이 분비하는 효소에 의해 영향을 받는다[30]. 본 연구에서는 제주도의 향토 발효 식품인 갈치속젓으로부터 세균을 분리하여 현대 사회에서 수요가 커지고 있는 외적인 요건을 위한 다이어트(항비만) 및 피부 미백에 효능이 있는 원료로서의 가능성을 알아보고자 하였다. 이를 위하여 제주산 갈치를 재료로 하여 제조한 갈치속젓에서 분리한 미생물들 중 tyrosinase와 α -glucosidase 억제 능력이 우수한 균주를 선발하고 균주의 2차 대사산물을 추출 및 효능 평가를 하며 우수 균주에 대한 유전체 분석을 통해 미생물 유전자원 확보를 하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

2.1. 시료의 준비

제주의 대표 전통 발효 식품 중 하나인 갈치속젓을 주 시료로 활용하였다. 제주산 어린 갈치와 천일염을 재료로 사용한 연중 13 °C 내외를 유지하는 동굴에서 12개월 이상을 숙성하여 제조한 (주)오름물산의 갈치속젓을 2016년에 구입하였다. (Figure 3)



Figure 3. Galchisok-Jeot.

2.2. 세균 분리

준비한 시료를 무균대 내에서 1 g을 취하여 멸균한 생리식염수 9 mL에 담아 현탁을 하였으며, 동일한 용액에서 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 배까지 희석을 한 후에 LB (Difco 24 4620) 고체 배지에 100 μ L씩 도말하여 30 °C에서 3일간 배양하였다. (Table 1) 집락의 형태와 크기에 유의하여 균주를 선별하고, 선별한 균주를 단일 집락이라고 판단될 때까지 계대 배양하며 순수분리를 하였다. 순수분리 된 균주는 액체 배양한 뒤에 배양액을 글리세롤(20 %, w/v) 용액에 현탁하여 -80 °C에 냉동보관 하였다.

Table 1. Composition of LB medium.

Media	Composition	Ratio (%)	pH
Luria-Bertani medium	Tryptone	1	7
	Yeast Extract	0.5	
	Sodium chloride	1	
	Agar	1.5	

2.3. 1차 효능 탐색 및 균주 선발

갈치속젓에서 분리하여 얻은 균주들을 대상으로 항비만과 피부 미백 개선제로서의 개발 가능성을 알아보기 위해 효소 저해 효능 평가를 진행하였다. 균주를 액체 배양시킨 배양액을 시료로 사용하였으며 α -glucosidase 저해 활성 평가를 통하여 항비만 원료로서의 가능성을, 그리고 tyrosinase 저해 활성 평가를 통해 피부 미백 개선 원료로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 그 결과를 토대로 원료 개발로서의 가능성이 있는 우수 균주를 선발하고자 하였다.

2.3.1. 균주 배양 및 시료 준비

갈치속젓에서 분리한 각 균주의 단일 집락을 LB 액체 배지 (Difco 244620) 20 mL에 옮겨 액체배양(30 °C, 3일)을 한 후 원심분리기(9분, 12,000 rpm)를 이용하여 균체와 배양 상등액으로 분리를 하였다. 그 후 상등액을 별도의 튜브로 옮겨 담아 α -glucosidase와 tyrosinase를 저해하는 활성의 유무를 판단하기 위한 시료로 사용하였다.

2.3.2. α -glucosidase 저해 활성 시험

α -glucosidase 저해 활성 측정은 Pistia-Brueggeman G [31]의 방법을 변형하여 사용하였다. 분리 균주들의 α -glucosidase 저해 활성을 평가하기 위해서 효소로 α -glucosidase (α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, SIGMA G5003), 버퍼로 1X PBS buffer (Biosesang p2004, pH 7), 기질로는 5 mM *p*-NPG (*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, SIGMA N7006)를 사용하였다. 실험방법은 각각의 균주 배양액 20 μ L을 첨가한 각각의 well에 1.5 mM *p*-NPG 100 μ L, 750 μ U/mL α -glucosidase 20 μ L 순으로 첨가한 뒤 암반응을(37 $^{\circ}$ C, 10분) 시킨 후에 정지액인 1 M Na_2CO_3 60 μ L를 넣고 파장 405 nm에서 분광 광도계 (Microplate reader, Sunrise, TECAN Austria GmbH)로 측정하여 아래의 공식으로 α -glucosidase 저해율을 구하였다. 효소 저해 활성 (%)은 아래의 식에 따라 계산하였다. α -glucosidase 효소 저해 활성 실험은 각각 3 회 이상 수행되었고, 데이터는 평균 값 \pm 표준 편차(SD)로 표시되었으며 IC_{50} 값은 비선형 회귀 알고리즘 (SigmaPlot version 12.0)에 의해 추정되었다.

$$\alpha\text{-glucosidase inhibition (\%)} = \frac{(A - B)(C - D)}{(A - B)} \times 100$$

A : 시료 용매를 넣고 기질에 효소를 첨가하여 기질이 반응한 후의 흡광도

B : 시료 용매를 넣고 기질에 효소를 첨가하기 전의 흡광도

C : 시료를 넣고 기질에 효소를 첨가하여 기질이 반응한 후의 흡광도

D : 시료를 넣고 기질에 효소를 첨가하기 전의 흡광도

2.3.3. Tyrosinase 저해 활성 시험

Tyrosinase 저해 활성 측정은 Yagi A [32]의 방법을 변형하여 사용하였다. 분리 균주들의 tyrosinase 저해 활성을 평가하기 위해서 효소로 Mushroom tyrosinase (SIGMA T3824), 기질로는 L-tyrosine (SIGMA T3754), 버퍼로 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)를 사용하였다. 실험방법은 균주 배양액 20 μ L을 첨가한 각각의 well에 2 mM L-tyrosine 130 μ L, 250 units/mL tyrosinase 50 μ L 순으로 첨가하고 암반응을(37 $^{\circ}$ C) 시키며 5분 간격으로 파장 490 nm에서 분광 광도계 (Microplate reader, Sunrise, TECAN Austria GmbH)로 흡광도를 측정하고, 대조군 흡광도 값이 0.3 ~ 0.4 에 도달할 때의 흡광도 값으로 tyrosinase 효소 저해율을 아래의 공식에 따라 계산하였다. tyrosinase 효소 저해 활성 실험은 각각 3 회 이상 수행되었고, 데이터는 평균 값 \pm 표준 편차(SD)로 표시되었으며 IC₅₀ 값은 비선형 회귀 알고리즘 (SigmaPlot version 12.0)에 의해 추정되었다.

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \frac{(A - B)(C - D)}{(A - B)} \times 100$$

- A : 시료 용매를 넣고 기질에 효소를 첨가하여 기질이 반응한 후의 흡광도
- B : 시료 용매를 넣고 기질에 효소를 첨가하기 전의 흡광도
- C : 시료를 넣고 기질에 효소를 첨가하여 기질이 반응한 후의 흡광도
- D : 시료를 넣고 기질에 효소를 첨가하기 전의 흡광도

2.4. 선발 균주의 2차 대사산물 추출 및 효능 평가

앞에서의 1차 탐색 단계에서 좀 더 정확한 효능을 평가하기 위해, 배지의 조성, pH, 배양 온도 등이 균주의 생육 및 2차 대사산물의 생성에 있어 중요한 요인임을 고려하며 선발한 우수 균주의 2차 대사산물 추출물을 제조하였다[33]. 그 후 2차 대사산물 추출물로 항비만 및 미백 효능을 평가하였다.

2.4.1. 대사 배지 제조 및 배양

대사 배지는 M J SEO [34]의 방법을 참고하여 증류수에 glucose (1 %), yeast extract (1 %), KH_2PO_4 (0.05 %), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.05 %)를 첨가하고 pH 7.2으로 조정 한 후 멸균 처리를 하여(121 °C, 15 분) 사용하였다.

Table 2. Composition of metabolite medium.

Medium	Composition	Contents (%)	pH
Metabolite medium	Glucose	1	7.2
	Yeast extract	1	
	KH_2PO_4	0.05	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.05	

2.4.2. 2차 대사산물 추출물 제조

LB (Difco 244620) 액체 배지에 집락 하나를 접종하여 전배양(aerobic condition, 30 °C, 1일)을 하였다. 그리고 전배양한 배양액 1 mL를 대사 배지 50 mL에 접종하여 액체배양(aerobic condition, 30 °C, 7일)을 하였다. 그 후 300 mm filter paper (ADVANTEC 01511300)를 사용하여 배양액을 걸러 균체를 제거하였다. 그 다음 2차 대사산물 배양액에 동량의 95 % EtOH을 첨가하고 상등액만 취하여 농축 후 동결건조하여 실험에 사용하였다.

2.4.3. α -glucosidase 저해 활성 평가

선발 균주 2차 대사산물 추출물에 대한 α -glucosidase 저해 활성 측정은 Lee J M [35]에서 주어진 방법을 변형하여 평가하였다. α -glucosidase 저해 활성을 평가하기 위해서 효소로 α -glucosidase (α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, SIGMA G5003), 버퍼로 1X PBS buffer (Biosesang p2004, pH 7), 기질로는 5 mM *p*-NPG (*p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, SIGMA N7006)를 사용하였다. 실험 방법은 1X PBS 75 μ L에 대사산물 추출물 5 μ L을 첨가하고, 효소 α -glucosidase (0.75 units/mL) 20 μ L을 첨가한 뒤 암반응을(37 $^{\circ}$ C, 5분) 시킨 후, 기질인 1.5 mM *p*-NPG 100 μ L를 첨가한 뒤에 37 $^{\circ}$ C 에서 25분간 추가로 반응시켰다. 정지액인 1 M Na_2CO_3 을 60 μ L 첨가하여 파장 405 nm에서 분광 광도계 (Microplate reader, Sunrise, TECAN Austria GmbH)로 측정하였다. 효소 저해 능력은 아래와 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 IC_{50} 값을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 acarbose를 사용하였다. α -glucosidase 효소 저해 활성 실험은 각각 3 회 이상 수행되었고, 데이터는 평균 값 \pm 표준 편차(SD)로 표시되었으며 IC_{50} 값은 비선형 회귀 알고리즘 (SigmaPlot version 12.0)에 의해 추정되었다.

$$\alpha\text{-glucosidase inhibition (\%)} = \frac{(A - B)(C - D)}{(A - B)} \times 100$$

A : 시료 용매를 넣고 효소에 기질을 첨가하여 효소가 반응한 후의 흡광도

B : 시료 용매를 넣고 효소에 기질을 첨가하기 전의 흡광도

C : 시료를 넣고 효소에 기질을 첨가하여 효소가 반응한 후의 시료의 흡광도

D : 시료를 넣고 효소에 기질을 첨가하기 전의 시료의 흡광도

2.4.4. Tyrosinase 저해 활성 평가

선발 균주의 2차 대사산물 추출물에 대한 tyrosinase 저해 활성 측정은 Yagi A [36]에서 주어진 방법을 수정하여 평가하였다. Tyrosinase 저해 활성을 평가하기 위해서 효소로 2500 units/mL tyrosinase (mushroom tyrosinase, SIGMA T3824), 버퍼로 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8), 기질로는 농도 2 mM의 L-tyrosine를 사용하였다. 실험방법은 균주 추출물 20 µL을 첨가한 각각의 well에 2500 units/mL tyrosinase 5 µL와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 45 µL을 첨가하고 암반응을(37 °C, 10분) 시킨 후, 2 mM L-tyrosine 70 µL와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 60 µL을 첨가한 뒤 파장 490 nm에서의 대조군 흡광도 값이 0.3 ~ 0.4 사이가 될 때까지 흡광도를 5분 간격으로 분광 광도계 (Microplate reader, Sunrise, TECAN Austria GmbH)로 측정하였다. 효소 저해 능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 IC₅₀ 값을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 arbutin을 사용하였다. Tyrosinase 효소 저해 활성 실험은 각각 3 회 이상 수행되었고, 데이터는 평균 값 ± 표준 편차(SD)로 표시되었으며 IC₅₀ 값은 비선형 회귀 알고리즘(SigmaPlot version 12.0)에 의해 추정되었다.

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \frac{(A - B)(C - D)}{(A - B)} \times 100$$

A : 시료 용매를 넣고 효소에 기질을 첨가하여 효소가 반응한 후의 흡광도

B : 시료 용매를 넣고 효소에 기질을 첨가하기 전의 흡광도

C : 시료를 넣고 효소에 기질을 첨가하여 효소가 반응한 후의 시료의 흡광도

D : 시료를 넣고 효소에 기질을 첨가하기 전의 시료의 흡광도

2.5. 균주의 전장 유전체 분석

2.5.1. 16S rRNA 염기서열 분석

선발 균주의 16S rRNA 염기서열 분석은 균주를 배양한 후에 (주)솔젠트(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 진행하였으며, 16S rRNA 유전자 증폭을 위하여 Universal PCR primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT- 3') primer를 사용하였다. 분석한 선발 균주의 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 및 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>) 데이터베이스에서 유사한 염기서열을 비교하였고 가장 근 연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다.

2.5.2. 전장 유전체 분석

선발 균주의 전장 유전체 분석을 위하여 (주)천랩에 의뢰하여 MiSeq platform (Illumina Inc, USA) 을 이용하여 진행하였다. LB 배지 (Difco 244620)에서 3일 동안 액체 배양한 균주를 원심분리하여 균체를 모은 후에 -20 °C에서 동결하여 Genomic DNA 분리에 이용하였다. Genomic DNA는 FastDNA Spin Kit for Soil (MPbio 6560200)을 사용하여 추출되었으며, MP biomedical (MP biomedical Inc, USA)의 protocol을 따라 진행되었다. 추출된 DNA는 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen P7589), Qubit dsDNA HS assay kit (Invitrogen Q32851)를 사용하여 Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo fisher Inc, USA) 에 의해 정량화되었다. 제작된 Library는 paired-end sequencing protocol (2 × 300 bp)에 따라 MiSeq platform (Illumina Inc., USA)을 사용하여 염기서열을 분석하여 SPAdes 3.1.18로 조립되었으며, 유전체는 NCBI의 Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)으로 주석을 달았다.

III. 결과 및 고찰

3.1. 세균 분리

갈치속젓을 희석하여 배양한 결과 세균의 집락 수는 10^{-4} 배에서 84개의 집락, 10^{-5} 배에서 9개의 집락을 확인하였다. (Table 3) 이를 통하여 갈치속젓의 세균 수는 0.87×10^6 CFU/g 임을 확인하였다. 이 중 집락의 모양, 색깔, 크기를 비교하여 17개의 집락을 선별하여 순수 분리하였다. 그리고 분리된 순서에 따라 1번부터 17번까지의 번호를 붙였다.

Table 3. Number of cultured colonies by dilution ratio.

Dilution ratio	CFU number
10^1	TNTC
10^2	TNTC
10^3	TNTC
10^4	84
10^5	9

- TNTC : Too Numerous To Count.

3.2. 균주 선발 및 분류

갈치속젓에서 분리한 17개의 균주의 배양액으로 미생물의 항비만제 및 피부 미백제로서의 잠재적인 가능성을 평가하기 위해 α -glucosidase와 tyrosinase를 저해하는 활성의 정도를 확인하였다. α -glucosidase 저해 활성은 8번째 균주가 4.84 %, tyrosinase 저해 활성은 7번째 균주가 22.92 %로 가장 높게 나타났다. α -glucosidase와 tyrosinase를 비교적 높게 저해하는 활성을 나타내는 균은 7, 9, 11번째 균주였으며 균주 별 tyrosinase 효소의 억제 활성 격차가 크다는 점 등을 종합적으로 판단하여 7번째 균주를 우수 균주로 선발하였다. (Table 4)

Table 4. α -glucosidase and tyrosinase inhibitory activity of Galchisok-jeot isolated strains culture medium.

Screening bacteria NO.	α -glucosidase inhibition (%)	Screening bacteria NO.	Tyrosinase inhibition (%)
8	4.84	7	22.92
2	4.25	3	18.03
4	3.65	9	14.90
6	3.64	16	14.05
1	3.56	15	9.86
11	2.87	5	8.94
9	2.78	11	6.43
13	2.23	14	2.13
7	1.70	4	0.75
15	1.62	1	-0.37
3	0.42	2	-0.48
10	0.40	12	-1.14
5	0.08	6	-1.55
16	-0.61	8	-3.53
12	-1.08	10	-16.62
17	-1.44	13	-17.75
14	-2.65	17	-30.04

3.3. *Bacillus subtilis* JNUCC 균주의 분류

우수 균주로 선발된 7번째 균주의 16S rRNA 염기서열을 NCBI GenBank와 EZBio Cloud에 등록 된 자료와 비교하여 가장 유사성이 높은 종을 알아보았다. 이를 통하여 본 연구에서 선발한 균주는 *Bacillus subtilis* 와 가장 유사성이 높은 종임을 확인하여 균주명은 *Bacillus subtilis* JNUCC로 정하였다.

Bacillus subtilis JNUCC의 16S rRNA 유전자 염기서열은 NCBI GenBank에 등록하여 MT033075의 번호를 부여 받았다. (Figure 4) 또한 이 균주는 국립농업과학원 (Korean Agricultural Culture Collection, Korea)에 기탁하여 KACC 92300P 등록번호를 부여받았다.

Bacillus subtilis strain JNUCC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MT033075.1

[FASTA](#) [Graphics](#)
[Go to:](#)

LOCUS MT033075 1098 bp DNA linear BOT 15-FEB-2020
 DEFINITION Bacillus subtilis strain JNUCC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION MT033075
 VERSION MT033075.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Bacillus subtilis
 ORGANISM Bacillus subtilis
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1098)
 AUTHORS Byun,H.-O., Han,J.-H. and Hyun,O.-g.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (10-FEB-2020) Chemistry, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju Special Self-Governing Province 63248, Republic of Korea
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1098
 /organism="Bacillus subtilis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="JNUCC"
 /db_xref="taxon:1422"
 rRNA <1..>1098
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gggccgcgct gggcgcttgc tccctgctgt tggcggcggc cgggtgcgct ccccgctggt
 81 aacctgcctg tggcctggg ataacctcgg gaaacggggg ctcaatcagg atgcttgctt
 121 gaaacgctg attcaaacat caaacgctgg ttggccttcc caattacaga tggccccggg
 181 ggcactttag tcttggctga ggtcttggct ccccccgggg ccgctgcgta ggcgcctgca
 241 gggcctgctc gcccacactc ggcctgccc cggccccgca ctctctcagg agcagcgcct
 301 aggcactctt cgcacatgca cgcacgctcg cggcgccccc cccgctgtag tgcctcagct
 361 ttctgctatg tggcctctg ttgttgggga agaacacgta ccgctgcact agggcgctac
 421 ctgccccttc cctcaacaga aagccccgga taactcctg cccgcccctg ccgctcctag
 481 tggctggccc gcttctcctg gacttcttgg ccgtcaaggg ctgcgaggcg gttctctcag
 541 tctctctgca agccccccgg ctcaaacagg ccgctcactt ggcacatgga gcaactcact
 601 ggcgcgcagg agctgacct taacactgta ccgctgcaat ccgctgcact gtcgagccc
 661 cccagctggc agggcgcctc tctgctctgt aactgcacct gggcgccgca agcctgagga
 721 ggcacacgca ttgcctcccc tggctgctca cgcctcacc ccctgctgct agctcttggg
 781 ggttttccgc ccttctctgc tgcagctaac caattcaaga ctcccccctg ccgctcctag
 841 cgcacacgca aactcaaac gacttgcagg ggcccccccc agggcctgca gactctgctt
 901 taactgcagc caagcgcagc aactcaaca ggtcttgcac tctctctcgc atctctcaga
 961 tggcctctcc ccttccgggg ccagctgaca gctgctgact gcttctctgc agctctctgc
 1021 gtcgactgct gacttcaagt cgcacacgca cgcacccctt gctctctgct gcccacttcc
 1081 agttgggccc tctcagctga ctgcagctga ccaacccggc gcaagctgga atgccttccc
 1141 ctcaactgca ccttctctgc ctgagctcgc ccgctgctcc aatgcccaga ccaaacggcc
 1201 ggcacacgca gacttcaagt caatccccca aatctgtctt ccgcttggct ccgactctgc
 1261 aactcctctg ctgcaagctg caactcctct taactcggga tccgcttccc ccgctgactc
 1321 cgttccgggg ccttctcacc aacgccccgc ccaacccgag agtttctaac ccccccagtc
 1381 gctcagctca ccttctgag
 //

Figure 4. Nucleotide database of *Bacillus subtilis* JNUCC.

3.4. 선발 균주의 2차 대사산물 효능 분석

3.4.1. α -glucosidase 저해 활성

Bacillus subtilis JNUCC의 2차 대사산물 추출물을 제조하여 2차 대사산물의 α -glucosidase 저해 활성을 분석하였다. α -glucosidase 저해 활성을 측정한 결과 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 *Bacillus subtilis* JNUCC 2차 대사산물 추출물은 α -glucosidase 활성도를 각각 30.69 %, 61.11 %, 80.17 %, 89.42 %, 90.04 % 억제하였다. 2차 대사산물 추출물과 대조군인 acarbose에 대한 반수 억제 농도 (IC_{50}) 값은 각각 101.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. (Figure 5) *Bacillus subtilis* JNUCC 2차 대사산물 추출물은 농도 의존적으로 α -glucosidase 활성을 억제하였으며 대조군으로 사용된 acarbose와 근접한 IC_{50} 값을 얻을 수 있었다.

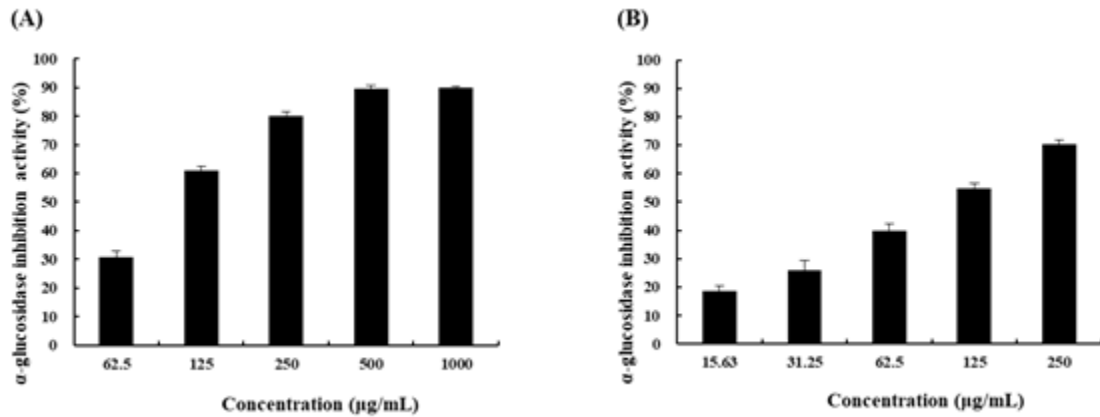


Figure 5. α -glucosidase inhibition activities of (A) extract of *Bacillus subtilis* JNUCC and (B) acarbose.

The appropriate amount of acarbose was used as a positive control. The inhibition of *p*-nitrophenol, a reaction product produced by α -glucosidase, was confirmed by measuring absorbance. α -glucosidase inhibition activities data are expressed as mean \pm SD (n = 3).

*IC₅₀ Values : Extract of *Bacillus subtilis* JNUCC = 101.92 $\mu\text{g/mL}$, acarbose (positive control) = 100.94 $\mu\text{g/mL}$

3.4.2. Tyrosinase 저해 활성

Bacillus subtilis JNUCC의 2차 대사산물 추출물을 제조하여 2차 대사산물의 tyrosinase 저해 활성을 분석하였다. tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 *Bacillus subtilis* JNUCC 2차 대사산물 추출물은 tyrosinase 활성도를 각각 6.98 %, 11.92 %, 13.50 %, 35.75 %, 58.19 % 억제하였다. *Bacillus subtilis* JNUCC 2차 대사산물 추출물과 대조군으로 사용한 arbutin의 IC_{50} 값은 각각 669.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 79.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. *Bacillus subtilis* JNUCC 2차 대사산물 추출물은 대조군으로 사용된 arbutin보다 약한 억제 활동을 보였지만, 억제 활성이 농도 의존적으로 증가함을 보였다. (Figure 6)

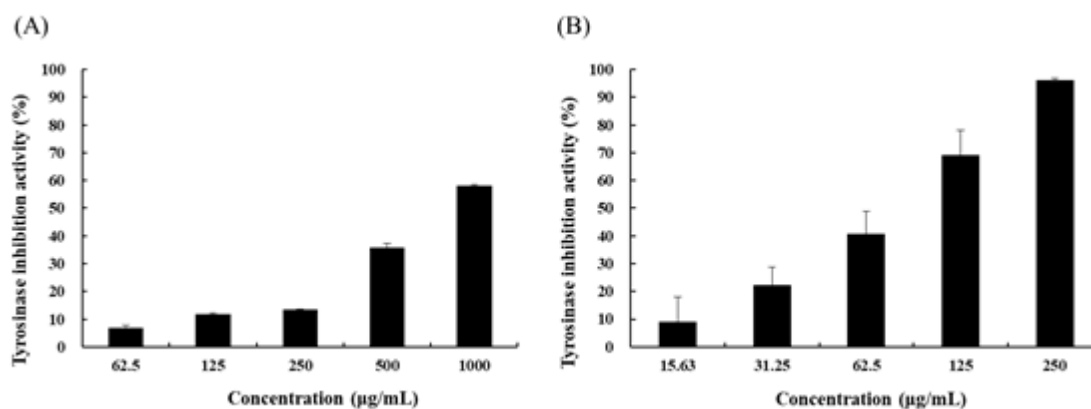


Figure 6. Tyrosinase inhibition activities of (A) extract of *Bacillus subtilis* JNUCC and (B) arbutin.

The appropriate amount of arbutin was used as a positive control. The inhibition of DOPachrome, a reaction product produced by tyrosinase, was confirmed by measuring absorbance. The data are expressed as mean \pm SD (n = 3).

*IC₅₀ Values : Extract of *Bacillus subtilis* JNUCC = 669.52 µg/mL, arbutin (positive control) = 79.23 µg/mL.

3.5. *Bacillus subtilis* JNUCC의 전장 유전체 분석

Bacillus subtilis JNUCC의 전장 유전체는 MiSeq platform (Illumina Inc, USA)을 사용하여 분석하였다. 분석 결과 14개의 contig를 얻었으며 이를 통하여 전체 유전체의 크기는 4,170,746 bp, G + C 함량은 43.6 % 임을 확인할 수 있었다. 전체 유전자 수는 4,338개로 tRNA 81개, rRNA 21개(5S rRNA 8개, 16S rRNA 9개, 23S rRNA 4개)로 구성되었다. 단백질 코딩 DNA 서열(CDSs, coding DNA sequence)는 4,112개로 나타났다. (Table 5, Figure 7) 본 연구에서 분석한 전장 유전체는 GenBank에 VPFB000000000 번호로 등록되었다. (Figure 8)

Table 5. General genome features and genome sequencing information *Bacillus subtilis* JNUCC.

Features	Data
Genomic size (bp)	4,170,746
G + C content	43.6 %
rRNA	21
tRNA	81
CDSs	4,112
NCBI project ID	PRJNA559441
Accession number	VPFB00000000
Sequencing platforms	Illumina MiSeq
Fold coverage	186.01 ×
Assemblers	SPAdes v 3.13.0
Annotation source	PGAP

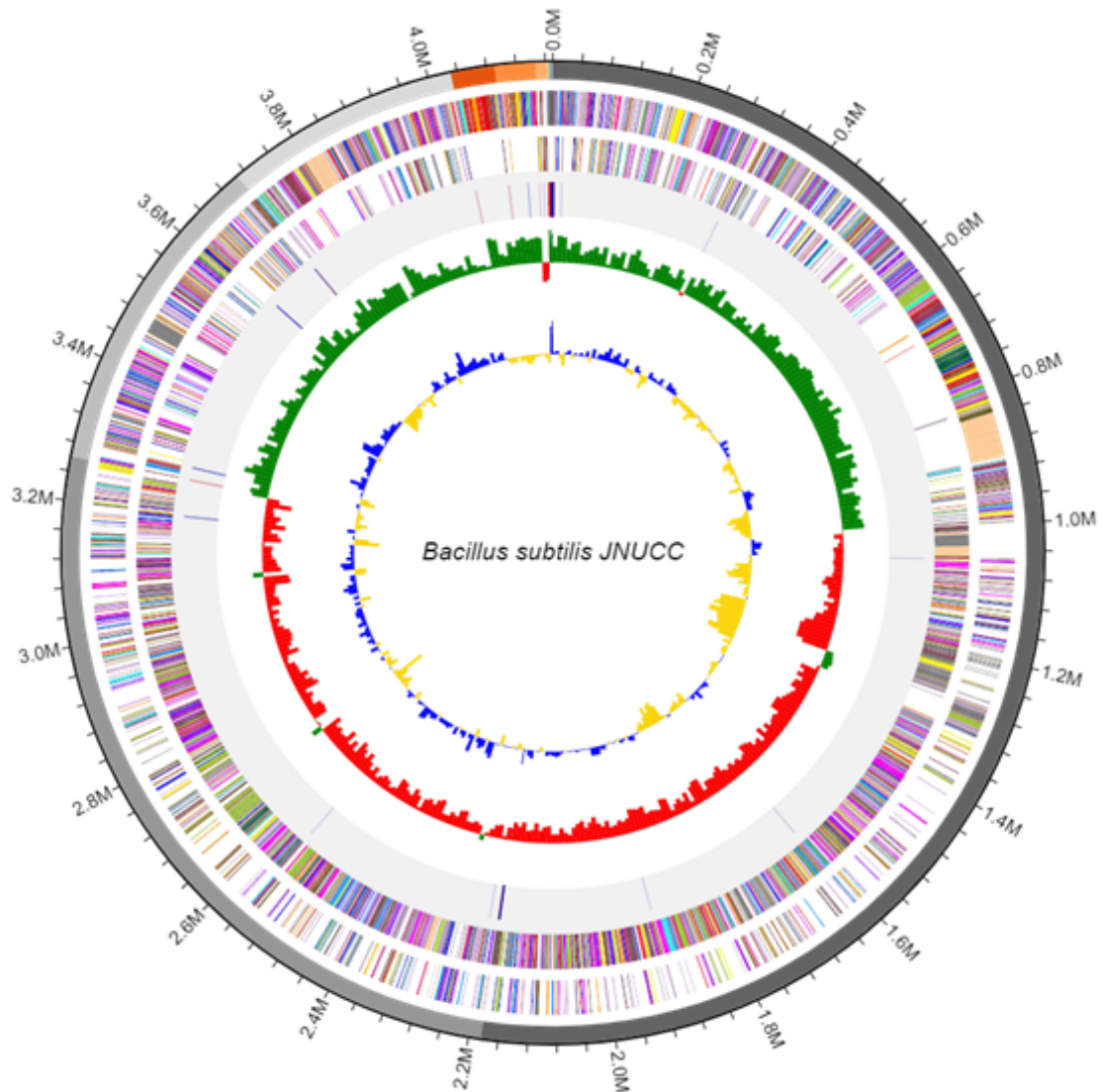


Figure 7. Circular map of *Bacillus subtilis* JNUCC genome.

The whole genome sequence visualization was performed using CGView software. From outside to the center : Genes on the forward strand (color by COG categories), genes on the reverse strand (color by COG categories), RNA genes (tRNAs : green, rRNAs : red, other RNAs : black), G + C content (red and green), GC skew (yellow and blue).

Bacillus subtilis strain JNUCC, whole genome shotgun sequencing project

GenBank: VPFB00000000.1

i This entry is the master record for a whole genome shotgun sequencing project and contains no sequence data.

Go to: [□](#)

```

LOCUS       VPFB01000000          14 rc  DNA   linear   BCT 18-AUG-2019
DEFINITION  Bacillus subtilis strain JNUCC, whole genome shotgun sequencing
            project.
ACCESSION   VPFB00000000
VERSION     VPFB00000000.1
DBLINK     BioProject: PRJNA559441
            BioSample: SAMN12541738
KEYWORDS    WGS.
SOURCE      Bacillus subtilis
ORGANISM    Bacillus subtilis
            Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacilliales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 14)
AUTHORS     Byun,H.-D., Han,J.-M. and Hyun,C.-G.
TITLE       Draft Genome Sequence of Bacillus subtilis Strain JNUCC, a Strain
            Exhibiting Interesting Tyrosinase Inhibitory Activities
JOURNAL     Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 14)
AUTHORS     Byun,H.-D., Han,J.-M. and Hyun,C.-G.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (09-AUG-2019) Chemistry & Cosmetics, Jeju National
            University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju Special Self-Governing
            Province 63243, Republic of Korea
COMMENT     The Bacillus subtilis whole genome shotgun (WGS) project has the
            project accession VPFB00000000. This version of the project (01)
            has the accession number VPFB01000000, and consists of sequences
            VPFB01000001-VPFB01000014.
            Bacteria and source DNA available from coscew.
            The annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation
            Pipeline (PGAP). Information about PGAP can be found here:
            https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\_prok/
            ##Genome-Assembly-Data-START##
            Assembly Method      :: SPAdes v. 3.13.0
            Genome Representation :: Full
            Expected Final Version :: Yes
            Genome Coverage       :: 185.01x
            Sequencing Technology  :: Illumina MiSeq
            ##Genome-Assembly-Data-END##
            ##Genome-Annotation-Data-START##
            Annotation Provider   :: NCBI
            Annotation Date       :: 08/13/2019 15:42:04
            Annotation Pipeline   :: NCBI Prokaryotic Genome
            Annotation Pipeline (PGAP)
            Annotation Method     :: Best-placed reference protein
            set: GeneMarkS-2+
            Annotation Software revision :: 4.8
            Features Annotated    :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA;
            repeat_region
            Genes (total)         :: 4,338
            CDSs (total)         :: 4,231
            Genes (coding)       :: 4,112
            CDSs (with protein)   :: 4,112
            Genes (RNA)          :: 107
            rRNAs                 :: 8, 9, 4 (5S, 16S, 23S)
            complete rRNAs       :: 5 (5S)
            partial rRNAs        :: 3, 9, 4 (5S, 16S, 23S)
            tRNAs                 :: 81
            ncRNAs                :: 5
            Pseudo Genes (total)  :: 119
            CDSs (without protein) :: 119
            Pseudo Genes (ambiguous residues) :: 0 of 119
            Pseudo Genes (frameshifted) :: 88 of 119
            Pseudo Genes (incomplete) :: 38 of 119
            Pseudo Genes (internal stop) :: 42 of 119
            Pseudo Genes (multiple problems) :: 40 of 119
            ##Genome-Annotation-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..14
                        /organism="Bacillus subtilis"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /strain="JNUCC"
                        /isolation_source="Jeju"
                        /host="fermented food"
                        /db_xref="taxon:1423"
                        /country="South Korea: Jeju"
                        /collection_date="2018-07-09"
WGS                   VPFB01000001-VPFB01000014
//

```

Figure 8. Registered status in Genbank.

IV. 결론

최근 화장품 및 의약품의 부작용을 줄일 수 있는 천연 원료를 찾기 위한 연구들에서 미생물을 활용한 발효 식품의 중요성이 증대되고 있으며, 젓갈에서 분리한 미생물의 미백, 항비만 효능이 보고되지 않은 것을 토대로 본 연구에서는 제주도의 향토 발효 식품인 갈치속젓에서 미생물을 분리하여 항비만 및 미백제로서의 소재 탐색을 진행하였다.

(주)오름물산에서 구입한 갈치속젓에서 총 17개의 균주들을 순수분리하고 순서대로 번호를 붙인 뒤 항비만과 피부 미백 개선제로서의 개발 가능성을 알아보기 위하여 각 균주의 배양액으로 α -glucosidase 저해 실험으로 항비만 효능을, 그리고 tyrosinase 저해 실험을 통해 피부 미백 효능을 확인하였다. 그 결과를 바탕으로 효소 저해 활성이 비교적 가장 우수하였던 7번째 균주를 우수 균주로 선정하였다.

우수 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열 데이터베이스 자료와 비교하여 가장 유사성이 높은 종으로 *Bacillus subtilis*임을 확인하고 균주명을 *Bacillus subtilis* JNUCC로 정하였다.

Bacillus subtilis JNUCC 균주의 2차 대사산물 추출물을 제조한 후에 α -glucosidase 및 tyrosinase 저해 활성 평가를 추가로 진행하였다. 그 결과 *Bacillus subtilis* JNUCC 균주의 2차 대사산물은 농도 의존적으로 두 효소의 활성을 억제함을 보였고, 두 효소에 대한 IC₅₀ 값은 각각 101.92 μ g/mL, 669.52 μ g/mL로 나타나서 산업화의 가능성을 보여 주었다. 특히 α -glucosidase 저해 활성 실험에서 대조군으로 사용한 acarbose와 근접한 활성을 보였다.

그리고 *Bacillus subtilis* JNUCC 균주의 전장 유전체를 MiSeq platform (Illumina Inc, USA)을 사용하여 분석하였다. 분석 결과 14개의 contig를 얻었으며 이를 통하여 전체 유전체의 크기는 4,170,746 bp, G + C 함량의 값은 43.6 %으로 확인할 수 있었다. 전체 유전자 수는 4,338개로 tRNA 81개, rRNA 21개 (5S rRNA 8개, 16S rRNA 9개, 23S rRNA 4개)로 구성되었다. 단백질 코딩 DNA 서열 (CDSs, coding DNA sequence)는 4,112개로 나타났다.

갈치속젓 유래 분리 균주인 *Bacillus subtilis* JNUCC와 가장 근연종인 *Bacillus subtilis*는 유용한 2차 대사산물을 생산해내는 토양세균의 일종으로 식품 산업, 화장품 산업 및 농업 분야에서 이용할 수 있다.

본 연구의 결과들을 토대로 갈치속젓에서 분리한 *Bacillus subtilis* JNUCC 균주의 배양액 및 2차 대사산물 추출물은 α -glucosidase 및 tyrosinase 저해제로서의 효능을 가졌으며, 향비만 및 미백 개선으로서의 기능성 소재로 화장품 및 의약품 산업에서 사용될 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

V. 참고문헌

1. World Health Organization., NCD mortality and morbidity. Available online : (https://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/). [Accessed 18 May 2020]
2. Statistics Korea., Cause of death statistics. Available online : (<https://meta.narastat.kr/metasvc/index.do?confmNo=101054&inputYear=2019>). [Accessed 18 May 2020]
3. Berke, E. M., et al., Medical management of obesity. Am Family Physician, **62**(2) : p. 419-426. 2000
4. World Health Organization., Obesity : Preventing and Managing the Global Epidemic. World Health Organ Tech Rep Ser, **894** : p. 1 - 253. 2000
5. Heacock, P. M., et al., Effects of a medical food containing an herbal α -glucosidase inhibitor on postprandial glycemia and insulinemia in healthy adults. Journal of the American Dietetic Association, **105**(1) : p. 65-71. 2005
6. Matsuda, M., et al., Impact of dyslipidemic components of metabolic syndrome, adiponectin levels, and anti-diabetes medications on malondialdehyde-modified low-density lipoprotein levels in statin-treated diabetes patients with coronary artery disease. Diabetology And Metabolic Syndrome, **5**(1) : p. 77. 2013
7. Maki, K. C., et al., High-viscosity hydroxypropylmethylcellulose blunts postprandial glucose and insulin responses. Diabetes Care, **30**(5) : p. 1039-1043. 2007

8. Bischoff, H., The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clinical and Investigative Medicine*, **18**(4) : p. 303-311. 1995
9. Park, J. S., et al., The research of the way to gain domestic and foreign market economy force of whitening cosmetics. *International Area Studies Review* **21**(2) : p. 121-141. 2017.
10. Kim, D. H., Verification of anti-oxidative activity of *Aruncus dioicus*, a native plant of Ulleungdo. *Journal of plant biotechnology*, **42**(1) : p. 55-59. 2015
11. Jeong, S.-H., A Review of Current Research on Natural Skin Whitening Products. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, **16**(4) : p. 599-607. 2018
12. David, A., Brown, Skin pigmentation enhancers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **63**(1-3) : p.148-161. 2001
13. Lee, H.-J., Lighting of Health Promotion using Fermentation. *Korean society for Wellness*, **14**(2) p. 469-478. 2019
14. Lee, H. J., A study on efficacy enhancement of the fermented Hwangryun haedoktang as anti-acne material using *Lactobacillus plantarum* from kimchi. Honam University : Gwang ju, 2019
15. Choi, J. Y., Functional Effects of *Cudrania tricuspidata* Fruit Fermented by Lactic Acid Bacteria from Sikhae of Korean Traditional Fermented Food. Kyungpook National University : Daegu, 2017
16. Nam, Y.-D., Identification and Industrial Application of Fermented Food Microorganisms Analyzed by NGS Technology. *Food industry and nutrition*,

23(1) : p. 13-17. 2018

17. Cha, I.-T., et al., Analysis techniques for fermented foods microbiome. Food science and industry, **50**(1) : p. 2-10. 2017

18. Nam, Y.-D., et al., Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. International Journal of Food Microbiology, **155**(1-2) : p. 36-42. 2012

19. Nam, Y.-D., et al., Bacterial diversity of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing. Food science and industry, **2011**(10) : p. 327. 2011

20. Nam, Y.-D., et al., Microbial composition of the Korean traditional food kochujang analyzed by a massive sequencing technique. Journal of food science, **77**(4) : p. 250-256. 2012

21. Kim, Y. M., Present Status and Prospect of Fermented Seafood Industry in Korea. Food Science and Industry, **41**(4) : p. 16-33. 2008

22. Rhee, C. H., et al., Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the traditional Deonjang with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, **43**(4) : p. 277-284. 2000

23. Kim, B. S., et al., Changes of enzyme activity and physiological functionality of traditional Doenjang during fermentation using *Bacillus* sp. SP-KSW3. The Korean Society of Food Preservation, **14**(5) : p. 545-551. 2007

24. Oh, Y. S., et al., Isolation and characteristics of microorganisms producing

extracellular enzymes from Jeju traditional fermented soybean paste (deonjang).
Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, **39**(1) : p. 47-53.
2010

25. Park, J. K., et al., Antitumor activity of *Bacillus subtilis* SW-1 isolated from Jeotgal. Journal of Life Science, **14**(5) : p. 815-820. 2004

26. Choi, I. S., Study of culture for *Bacillus subtilis*. Gongju University : Gongju, 2013

27. Jung, J.-H., et al., *Bacillus polyfermenticus* CJ9, Isolated from Meju, Showing Antifungal and Antibacterial Activities. The Korean Society for Applied Microbiology, **37**(4) : p. 340-349. 2009

28. Jang, W. K., Screening of α -glucosidase Inhibitor Producing *Bacillus subtilis* and Its Application. Kangwon National University : Chuncheon, 2009

29. Liu, X., et al., Poly- γ -glutamate from *Bacillus subtilis* inhibits tyrosinase activity and melanogenesis. Applied microbial and cell physiology, **97**(22) : p. 9801-9809. 2013

30. The academy of korean studies., Jeot-Gal, Encyclopedia of korean culture, Available online :

(<https://encykorea.aks.ac.kr/Contents/SearchNavi?keyword=%EC%A0%93%EA%B0%88&ri dx=0&tot=17>). [Accessed 20 May 2020]

31. G, Pistia.-B., et al., A preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors. Tetrahedron, **57**(42) : p. 8773-8778. 2001

32. Yagi, A., et al., The effect of tyrosinase inhibition for aloe. planta Medica, **3**

981 : p. 517-519. 1986

33. Vyas, P., et al., Statistical optimization of medium components for mass production of plant growth-promoting microbial inoculan, *Pseudomonas trivialis* BIHB 745 (MTCC5336). *Ind. J. Microbiol*, **54** : p. 239-241. 2014

34. Seo, M.-J., Isolation of the Putative Biosynthetic Gene Cluster of 1-Deoxynojirimycin by *Bacillus amyloliquefaciens* 140N, Its Production and Application to the Fermentation of Soybean Paste. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **7** 7(2) : p. 398-401. 2013

35. Lee, J. M., et al., Antioxidant and Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity of *Strychnos nux-vomica* Extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **39**(9) : p. 1243-1248. 2010

36. Yagi, A., et al., Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Medica*, **53**(6) : p. 515-517. 1987