Korean Journal of Microbiology (2018) Vol. 54, No. 4, pp. 384-397
DOI https://doi.org/10.7845/kjm.2018.8066
Copyright ⓒ 2018, The Microbiological Society of Korea
pISSN 0440-2413
eISSN 2383-9902

Bacillus amyloliquefaciens SRCM 100731의 반려 동물용 프로바이오틱스 소재로서의 특성 규명 및 배양 조건 최적화

류명선 · 양희종 · 정수지 · 서지원 · 하광수 · 정성엽 · 정도연*
(재)발효미생물산업진흥원

Characteristic study and optimization of culture conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 100731 as probiotic resource for companion animal

Myeong Seon Ryu, Hee-Jong Yang, Su-Ji Jeong, Ji Won Seo, Gwangsu Ha, Seong-Yeop Jeong, and Do-Youn Jeong*
Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Republic of Korea

(Received September 12, 2018; Revised October 2, 2018; Accepted October 4, 2018)

The aim of this study is to screen the strains of *Bacillus* spp. possessing safety, probiotic activity, and so on, which can be utilized as probiotic resource for using the feed and supplement food of companion animal. About 300 isolates were isolated from traditional Korean sauces, four isolates that did not have or produce the six kinds of *B. cereus* type vomiting and diarrhea toxin genes, β-hemolytic, and three kinds of carcinogenic enzymes were selected. Antibiotic gene retention, cell surface hydrophobicity, antibiotic sensitivity, and glucose utilization were analyzed for four isolates, and finally SRCM 100731 was selected. SRCM 100731 was named as *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 100731 16S rRNA sequencing analysis, and carried out optimization of cell growth for industrial applications such as pet food and feed. The effects of 14 different components on cell growth were investigated and three significant positive factors, molasses, sodium chloride, and potassium chloride were selected as the main factors based on a Plackett-Burman design. In order to find out optimal concentration on each constituent, we carried out central composite design. The predicted optimized concentrations were 7% molasses, 1.1% sodium chloride, 0.5% potassium chloride. Finally, an overall about 7-fold increase in dry cell weight yield (12.6625 ± 0.0658 g/L) was achieved using the optimized medium compared with the non-optimized medium (1.8273 ± 0.0214 g/L). This research is expected to be highly utilized in the growing pet industry by establishing optimal cultivation conditions for industrial application as well as screening *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 100731 as probiotic resource for companion animal.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, companion animal, isolation, optimization, probiotics

***For correspondence.** E-mail: jdy2534@korea.kr;
Tel.: +82-63-650-2036; Fax: +82-63-653-9590

1인 및 노인 가구, 핵가족화 등으로 국내에서 반려동물을 키우는 인구는 1천 만명 이상이 될 것으로 예측되고 있으며, 반려동물을 가족 구성원 중 하나로 인식하는 문화가 형성되면서 반려동물 관련 시장이 새로운 블루오션 시장으로 주목받고 있다. 최근에는 사람보다 동물이 잘 먹고 잘 사는 시대가 도래하면서 국내 반려동물 산업의 매출 규모는 2020년 6조원 규모로 예상되고 있으며, 특히 유기농 사료의 매출이 급격하게 증가하는 추세로 프리미엄 동물 먹거리 시장이 새롭게 대두되어 더욱 빠르게 성장할 것으로 예측되고 있다(Son *et al*., 2017).

사회적 인식의 변화로 애완의 개념에서 동반자의 개념으로 반려동물에 대한 인식이 전환되면서 반려동물의 사료에 대한 개념도 사람과 동일하거나 그 이상의 기준으로 안전성이 확보되고 품질이 우수한 반려동물용 제품의 시장이 나날이 성장하고 있다(Buff *et al.*, 2014). 하지만 세계 반려 동물 사료 시장은 글로벌 다국적 기업인 마스(Mars)와 네슬레(Nestle)가 전체 시장의 69%를 차지하고 있으며, 국내 시장 또한 70% 이상이 수입 브랜드가 차지하고 있어 수입 제품에 대한 국내 시장 의존도가 매우 높은 산업 분야로 국내의 독자적 기술 및 경쟁력 있는 제품 개발이 무엇보다도 시급한 실정이다.

최근에는 국내에서도 이러한 문제점 해결을 위해 고품질 프리미엄 사료 개발을 위해 발효 기술을 접목하여 미생물을 활용한 다양한 제품을 만들기 위한 체계적 연구를 진행하고 있다. 특히 프로바이오틱스가 돼지의 성장에 긍정적 역할을 하고, *Bifidobacterium* 속, *Lactobacillus* 속, *Bacillus* 속 및 효모와 같은 유익 미생물이 가축의 성장을 증진시킨다고 보고하였다(Danek *et al*., 1991; Kim *et al*., 2013). 또한, Fuller (1973)는 프로바이오틱스가 동물의 장내 환경 변화를 통해 *Escherichia coli*와 *Salmonella* 등의 병원균의 성장을 억제하여 장질환 및 내인성 질병을 감소시키고, Mohan 등(1996)은 프로바이오틱스가 장관 내에서 단백질, 비타민, 효소, 유기산 및 미지성장인자 등의 합성을 통해 가축에 긍정적 영향을 미치며, 영양소 소화율 개선 및 장관 면역 발달에 관여하여 가축의 생산성 및 면역 능력을 향상시킨다고 보고하였다. 특히, *Bacillus*는 섬유질 분해효소, 전분 분해효소 등 세포외 효소의 활성이 높아 섬유질 등 유기물을 분해하여 사료의 효율을 증가시키고, 소화장애 감소, 가축의 증체율 증가 등에 효과가 우수하여 사료 첨가제로서 활용도가 높은 균주로 알려지고 있다(Bae *et al*., 2012).

사료에 사용 가능한 미생물의 선별도 중요하지만 최근에는 프로바이오틱스 소재의 효율적 활용을 위해서는 대량 배양을 위한 선별 미생물의 배양 조건 또한 중요성이 강조되고 있으며, 이는 산업화 적용을 위해서는 필수적으로 고려해야 할 사항이다. 일반적으로 사용되는 시험용 배지의 경우 고가의 생합성 배지로 제품 개발을 위한 기업체 측면에서는 경제적 부분의 부담이 발생하게 된다. 따라서 최근에는 산업화 배지로 구입이 용이하고, 비용이 저렴한 가공산업의 부산물인 molasses, corn steep powder (CSP), yeast extract, soybean meal, whey protein 등 다양한 성분을 활용하여 발효에 적용하고 있으며, 부산물 자체가 갖는 다양한 영양성분을 활용하여 기능성 증진 등 추가 효과에 대한 연구 결과도 보고되고 있다(Yanez-Mendizabal *et al*., 2012; Wang *et al*., 2016; Yang *et al*., 2016).

따라서, 본 연구에서는 반려동물의 펫사료 및 펫푸드에 사용할 수 있는 잠재적 프로바이오틱스 소재로서 *Bacillus* 균주를 확보하고, 분리주를 대상으로 세포외 효소 활성, 항균물질 유전자 보유 등 기능성 검증과 통계학적 기법을 이용하여 산업화 적용이 가능한 최적의 배양 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물의 분리 및 선별

프로바이오틱스 활성을 갖는 고초균을 분리하기 위해 전국에서 전통적인 방법으로 제조된 장류 64종을 수집하여 균원 시료로 사용하였다. 각각의 시료 1 g을 멸균수 9 ml에 혼합한 후 단계 희석하여 Luria-Bertani agar (LB agar, Difco™)에 도말하고, 37°C에서 18시간 배양 후 형성된 집락의 형태학적 차이를 이용하여 1차 선별하였다. 1차 선별 균주 중 설사 및 구토를 유발하는 것으로 알려진 *Bacillus cereus*를 제거하기 위해 Bacillus cereus agar (BCA, Oxoid Ltd.) 배지에 획선 도말하여 37°C에서 18시간 배양 후 콜로니 및 콜로니 주변이 푸른색을 띄는 균주를 *B. cereus*로 판정 후 제외하였다. 2차 선별된 균주는 10% skim milk (Difco™)에 현탁 후 -80°C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

Bacillus spp. 독소 및 항균물질 유전자 보유 유무 확인

*B. cereus*는 토양 및 공기 부유 미생물로 구토형 독소 및 설사나 장염 유발 독소를 분비하여 식품내 부패 원인 유해 미생물로 알려지고 있어(Kim *et al*., 2010), 선별 미생물에 대한 구토 및 설사 독소 유전자 보유 여부를 PCR을 통하여 확인하였다. 선별 균주는 QiAamp DNA mini kit (QIAGEN)을 이용하여 DNA를 추출 후 코젠바이오텍의 PowerChek™ Bacillus cereus toxin 6-plex detection kit (Kogenbiotech)를 이용하여 cytotoxin K (*cyt*K), non-hemolytic enterotoxin (*nhe*A), enterotoxin FM (*ent*FM), enterotoxin T (*bce*T), hemolytic enterotoxin (*hbl*C), emetic toxin (*cer*) 등 총 6개의 독소 유전자를 확인하였다. 또한 *Bacillus* 속 균주는 병원성 세균을 억제하는 항균 펩타이드를 합성하는 것으로 알려지고 있으며 대표적인 항생물질로는 surfactin, lichomycin 등이 있어(Stein, 2005) 식품내 부패 유해 균에 대한 항균 활성을 지니게 되어 유해 세균의 성장을 억제하게 되므로, 선별 균주를 대상으로 항생물질 생성 유전자의 보유 여부를 추가로 확인하였다. 항생물질 유전자 보유 여부를 확인하기 위해 surfactin (*surf*A, F: 5'-ACAGTATGGAGGCATGGTC-3', R: 5'-TTCCGCCACTTTTTCAGTTT-3'), iturinA (*itu*A, F: 5'-GATGCGATCTCCTTGGATGT-3', R: 5'-ATCGTCATGTG

CTGCTTGAG-3'), bacillomycin (*bmy*A, F: 5'-GAAGGACA CGGCAGAGAGTC-3', R: 5'-CGCTGATGACTGTTCATGCT-3') 에 대한 프라이머를 제작하여 총 3종의 항생물질 유전자를 확인하였다. 반응 조건은 95°C에서 10분간 초기 변성 후, 95°C에서 30초간 변성, 60°C에서 30초간 결합, 72°C에서 30초간 증폭 과정을 35회 실시하고 72°C에서 10분간 마지막 증폭을 실시하였다.

용혈성 및 유해 효소 생성능 분석

선별 균주의 용혈성은 5% sheep blood (MBcell)가 함유된 고체 배지에 각각의 선별 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 생기는 환의 형태를 육안으로 관찰하여 용혈성 여부를 판별하였다. 또한, 발암에 관련된 유해 효소로 알려진 tryptophanase, urease, β-glucuronidase의 생성 여부를 조사하였으며, tryptophanase 생성 여부는 Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid Ltd.) 배지에 선별 균주를 접종한 후 37°C, 24시간 진탕 배양 후 indole reagent dropper (BD BBL^{TM})를 첨가하여 배지 표면의 색 변화로 확인하였다. Urease 생성 여부는 urea rapid test kit (MBcell)에 선별 균주를 각각 접종하고, Vaseline oil (MBcell)을 첨가하여 산소가 차단된 상태로 37°C에서 4~24시간 배양한 후 배지의 색 변화로 확인하였다. β-glucuronidase는 Tryptone Bile X-glucuronide (TBX, Oxoid Ltd.) 고체 배지에 선별 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 집락의 색 변화를 통해 활성 여부를 확인하였다.

세포외 효소 활성 분석

선별 균주의 세포외 효소 생성 여부는 단백질 분해효소, 섬유소 분해효소, 전분 분해효소를 대상으로 측정하였다. 단백질 분해효소의 활성은 각각의 선별 균주를 2% skim milk (Difco^{TM}), 섬유소 분해효소의 활성은 1% carboxylmethyl cellulose (CMC, Junsei Chemical Co. Ltd.), 전분 분해효소는 1% soluble starch (Junsei Chemical Co. Ltd.)를 기질로 함유한 배지를 제조하여 well diffusion 방법으로 측정하였다. 또한 혈전 분해효소 활성은 Astrup와 Mullertz의 방법(1952)을 일부 변형하여 측정하였으며, 100 unit/ml thrombin (Sigma-aldrich) 용액을 petri-dish에 200 µl씩 분주하고, 10 ml의 0.5% fibrinogen 용액[in phosphate buffered saline (PBS) buffer, pH 7.4]과 10 ml의 1% agarose (Bio-Rad) 용액을 순서대로 분주 후 혼합하여 혈전 용해 고체 배지를 제조하였다. 각각의 선별 균주는 LB 액체 배지에 접종 후 37°C에서 24시간 배양한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리 후 배양 상등액을 효소 활성 분석을 위한 시료로 사용하였다.

세포 표면 소수성 분석

선별 균주의 장내 부착성에 영향을 주는 미생물의 세포 표면 소수성에 대한 조사를 위해 4종의 선별 균주를 대상으로 Doyle과 Rosenberg의 방법(1995)을 일부 변형하여 용매에 대한 미생물의 부착능(MATS, Microbial adhesion to solvents)을 측정하였다. 액체 배지에 각각의 선별 균주를 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후 배양액을 600 nm에서 UV/Vis spectrophotometer (SPECORD 200, Analytic jena)로 0.4의 흡광도가 되도록 적정 후 540 nm에서 흡광도(A_1)를 측정하였다. 각각의 배양액에 5% hexadecane (Sigma-aldrich)을 넣고 충분히 혼합한 후 실온에서 1시간 정치하여 유기용매를 제외한 상층액을 540 nm에서 흡광도(A_2)를 측정하여 상층의 hydrocarbon phase로 이동된 세포의 양을 아래의 식에 대입하여 세포 표면 소수성을 확인하였다.

$$MATS\ (\%) = 100 \times (A_1-A_2) / A_1$$

A_1 : Absorbance of initial suspension media at 540 nm.

A_2 : Absorbance of aqua phase at 540 nm after one hour incubation.

선별 균주의 동정 및 당 이용성 분석

선별 균주의 동정을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열 및 생화학적 특성 분석을 통한 균주의 당 이용성을 분석하였다. 16S rRNA 염기서열 분석을 위해 universal 프라이머인 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 유전자를 증폭 후 ㈜마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 해독하였다. 염기서열의 chromatogram을 이용하여 gap을 최소화한 후 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 서열 일치도가 높은 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열을 확보하여 계통도를 작성하였다. 계통도 분석은 Tamura-Nei 모델에 기초한 Maximum Likelihood 방법(Tamura and Nei, 1993)을 사용하여 분석하였고, 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 산출하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며, 분석은 MEGA 7.0.26 program을 사용하였다. 또한 당 이용성 분석은 API 50 CHB kit (bioMérieux)를 사용하여 측정하였다.

항생제 감수성 분석

선별 균주의 항생제 감수성 여부를 판단하기 위해 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 디

스크 확산 방법으로 측정을 실시하였다. 각각의 선별 균주를 Mueller-Hinton broth (Merck)에 접종하고 37°C에서 5시간 배양한 후 0.5 McFarland (bioMérieux)로 적정 후 Muller-Hinton agar (Merck)에 도말하고 30분간 건조한 후 24종의 항생제 디스크를 올리고 37°C에서 24시간 방치 후 각 항생제에 대한 환의 크기를 측정하여 CLSI 가이드라인에 따라 감수성과 내성을 판정하였다. 사용한 항생제 디스크(Liofilchem)는 amikacin (30 μg, AK), amoxicillin/clavulanic acid (2 μg/1 μg, AUG), ampicillin (10 μg, AMP), cephalothin (30 μg, KF), ciprofloxacin (5 μg, CIP), erythromycin (15 μg, E), gentamicin (30 μg, CN), imipenem (10 μg, IMI), kanamycin (30 μg, K), lincomycin (15 μg, MY), methicillin (5 μg, MET), neomycin (30 μg, N), nitrofurantoin (300 μg, F), ofloxacin (5 μg, OFX), oxacillin (5 μg, OX), penicillin G (1 IU, P), penicillin G (2 IU, P), penicillin G (10 IU, P), rifampicin (5 μg, RD), streptomycin (10 μg, S), streptomycin (300 μg, S), tetracycline (30 μg, TE), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25 μg/23.75 μg, SXT), vancomycin (30 μg, VA) 등 24종의 디스크를 사용하여 측정하였다.

최종 선별 균주의 균체 성장 조사

최종 선별 균주의 균체 성장을 조사하기 위해 LB 액체 배지에 최종 선별 균주의 순수한 콜로니를 접종하여 37°C에서 72시간 동안 150 rpm으로 진탕배양하면서 4시간 단위로 시료를 회수하여 흡광도 및 건조 균체량을 측정하여 조사하였다. 흡광도의 측정은 각 배양액 1 ml을 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 멸균 증류수로 3회 반복 세척 후 1 ml의 멸균 증류수로 재부유하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 건조 균체량은 각각의 회수한 배양액 10 ml을 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 3회 멸균 증류수로 세척하여 80°C에서 항량이 도달할 때까지 건조 후 건조 균의 무게를 측정하였다.

균체 성장에 영향을 주는 배지 성분의 선별

균체 성장에 영향을 주는 배지 성분의 선별을 위하여 통계학적 방법인 Plackett-Burman design (PBD)를 실시하였다(Hibbert, 2012). 일반적으로 균체 성장에 영향을 주는 요인을 대상으로 실험 계획은 균체 성장 변수로 탄소원 5종[glucose, sucrose, fructose, galacto-oligosaccharide (GOS), molasses], 질소원 4종(yeast extract, beef extract, tryptone, peptone), 기타 미량 원소 5종(sodium chloride, potassium phosphate, dipotassium phosphate, magnesium sulfate, potassium chloride)으로 총 14개의 요인을 선정하여 진행하였다. 각 요인의 수준은 고농도(high level, +)와 저농도(low level, -) 2가지 수준으로 나누어 진행하였으며, 탄소원의 경우 중심값 30.0 ± 20.0 g/L로 설정하였고, 질소원은 20.0 ± 15.0 g/L, 기타 미량 원소는 6.0 ± 4.0 g/L의 농도로 설정하였다(Table 1). 각 실험군의 배양은 각각의 배지에 전배양액을 5% (v/v)로 접종한 뒤 37°C에서 150 rpm으로 24시간 배양 후 건조 균체량을 측정하였다. 모든 실험구는 3회 반복 실험으로 수행하였고, 실험 모델의 계획 및 통계 분석은 Design expert 9.0 program (Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc.)을 이용하여 분석하였다.

중심합성계획법을 이용한 배지 성분 농도의 최적 조건 확립

앞선 PBD를 통해 균체 성장에 중요 인자로 선정된 3가지 요인을 대상으로 각 성분의 균체 성장에 대한 최적 농도를 결정하기 위하여, 각각의 성분의 농도 변화가 균체 성장에 미치는 영향을 중심합성계획법(Central composite design, CCD)을 적용하여 실시하였다(Hibbert, 2012). 실험 계획은 독립변수로 molasses (X_1), potassium chloride (X_2), sodium chloride (X_3)을 5단계로 부호화하고 16개의 실험군으로 모델을 계획하였고 반응 값(Y)로 건조 균체량을 측정하여 사용하였다(Table 2). 각 실험군은 최종 선별 균주의 전배양액 5%를 접종한 후 37°C에서 150 rpm으로 24시간 배양한 후 균체량을 측정하였다. 모든 실험구는 3회 반복 실험을 통한 평균값을 회귀분석에 사용하였고, 이때의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀 모형식은 아래와 같다. 여기에서 Y는 종속변수, X_i는 독립변수, β_0은 상수 계수이며, β_i, β_{ii}, β_{ij}는 교호작용 계수를 나타낸다. Design expert 10.0 program (Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc.)을 이용하여 회귀분석에 의한 모델식을 예측하였고, 회귀분석 결과를 바탕으로 임계점 및 균체량 증량을 위한 최적 농도와 통계적 유의성 검정을 실시하였다.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_{i+} \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

결과 및 고찰

전통 발효식품으로부터 미생물의 분리 및 선별

반려동물의 사료 및 보조 식품 등에 사용하기 위한 안전성이 우수하고 프로바이오틱스 특성을 갖춘 *Bacillus*속 균주의 분리를 위하여 전국에서 전통적인 방법으로 제조된 장류 64종을 수집하였으며, 각각의 시료에서 형태학적 특징에 따라 약 300종의 미생물을 분리하였다. 300여 종의 분리주 중 토양과

Table 1. Range of different variables for Plackett-Burman design (PBD) and response value (Y)

Source	Factor	Symbol (unit)	Coded values	
			-1	+1
Carbon source	Glucose	X_1 (%)	1.0	5.0
	Sucrose	X_2 (%)		
	Fructose	X_3 (%)		
	GOS[a]	X_4 (%)		
	Molasses	X_5 (%)		
Nitrogen source	Yeast extract	X_6 (%)	0.5	3.5
	Beef extract	X_7 (%)		
	Tryptone	X_8 (%)		
	Peptone	X_9 (%)		
Etc.	Sodium chloride	X_{10} (%)	0.2	1.0
	Potassium phosphate	X_{11} (%)		
	Dipotassium phosphate	X_{12} (%)		
	Magnesium sulfate	X_{13} (%)		
	Potassium chloride	X_{14} (%)		

Run	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	Response Y (g/L)
1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	8.06
2	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	10.33
3	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	18.99
4	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	11.27
5	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	12.27667
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5.806667
7	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	9.04
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17.21
9	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	25.46
10	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	17.90667
11	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	9.19
12	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	6.886667
13	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	6.956667
14	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	15.73667
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17.53
16	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	30.37667
17	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	26.64667
18	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	24.99333
19	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	20.39667
20	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	22.53333
21	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	33.17333
22	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	29.57

Response value was dry cell weight from *B. amyloliquefaciens* SRCM 100731 cultivated at 150 rpm, 37°C for 24 h. All experiments were performed in triplicate.
[a]GOS, galacto-oligosaccharide.

공기중에 부유하는 미생물로 전통 장류의 발효과정에서 쉽게 오염될 수 있는 구토와 설사 유발 독소를 생성하는 *B. cereus* (Kim *et al.*, 2010)의 제거를 위해 *B. cereus* 선택 배지를 사용하여 100여 종의 분리주를 선별하였고, 추가로 안전성 확보를 위하여 구토형 독소와 설사, 장염을 유발한다고 알려진 독소 6종의 유전자를 모두 보유하지 않는 53종을 선별하였다. 또한,

Table 2. Range of different variables for central composite design (CCD) and response value (Y)

Factor	Symbol (unit)	Coded values				
		-2	-1	0	+1	+2
Molasses	X_1 (%)	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
Potassium chloride	X_2 (%)	0.2	0.5	0.8	1.1	1.4
Sodium chloride	X_3 (%)	0.2	0.5	0.8	1.1	1.4

Run	X_1	X_2	X_3	Response Y (g/L)
1	-1	1	-1	4
2	-1	-1	1	3.816667
3	0	0	0	7.4
4	0	2	0	7.403333
5	1	-1	1	12.53333
6	-1	1	1	3.913333
7	0	0	-2	7.453333
8	0	0	0	7.51
9	1	-1	-1	12.36333
10	0	-2	0	7.493333
11	1	1	-1	12.59
12	1	1	1	11.77333
13	0	0	2	7.863333
14	2	0	0	20.01667
15	-2	0	0	1.386667
16	-1	-1	-1	4.15

Response value was dry cell weight from *B. amyloliquefaciens* SRCM 100731 cultivated at 150 rpm, 37°C for 24 h. All experiments were performed in triplicate.

Bacillus 속 미생물 중 일부 *B. subtilis*, *B. licheniformis* 등은 세포막에 계면활성제와 같이 작용하는 surfactin과 같은 항생 물질을 생성하여 식품의 제조 및 유통상 외부에서 유입되는 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 갖는 것으로 보고되고 있어 (Carrillo *et al*., 2003; Stein, 2005), 53종의 선별 미생물을 대상으로 지질 펩타이드 항생물질인 surfactin, iturin, bacillomycin 중 2종 이상의 유전자를 보유하고 있는 4개의 균주를 선별하였다(Table 3).

용혈성 및 유해 효소 생성

용혈은 자연적으로 적혈구의 파괴나 손상에 의해 일어나기도 하지만 유전적 결함, 화학물질, 미생물에 의한 독성물질에 의해 비정상적으로 발생하기도 한다(Yun *et al*., 2013). 특히, 미생물 감염에 의한 용혈성은 혈전성 혈소판 감소증이나 용혈성 요독 증후군과 같은 질병으로 이어질 수 있어 앞서 선별한 4종의 균주를 대상으로 측정한 결과 4종 모두 가용성 hemolysin에 의한 적혈구 막 파괴를 일으키는 병원성 미생물에 빈번하게 나타나는 β형 용혈성을 갖고 있지 않은 것을 확인하였다(Table 3). 또한 장내 미생물에 의해 대장암을 유발하는 것으로 알려진 tryptophanase, urease, β-glucuronidase (An and Friedman, 1998)에 대하여 4종의 균주를 대상으로 확인한 결과 모든 균주가 3종의 유해 효소를 생성하지 않는 것으로 나타나 4종의 선별 균주 모두 유해 효소에 대한 안전성이 우수함을 확인하였다(Table 3).

세포외 효소 활성

미생물이 생성하는 단백질 가수분해 효소, 전분 분해효소, 혈전 분해효소 등 다양한 세포외 효소들은 그 자체만으로도 상업적 이용이 이루어지고 있으며, 배양 원물의 유기물을 분해하여 생리활성 물질을 생성하거나, 배양물의 기능성 효율

Table 3. Comparison of safety and functional characterization for selected strains that isolated from traditional fermented products

Strain no.		SRCM101352	SRCM101405	SRCM100169	SRCM 100731
Bacteriocin related gene[a]	Surfactin (*sufA*)	+	+	+	+
	Iturin (*ituA*)	+	+	+	+
	Bacillomycin (*bmyA*)	+	+	-	+
Hemolysis type		γ	α	α	α
Harmful enzyme production[b]	Tryptophanase	-[b]	-	-	-
	Urease	-	-	-	-
	β-Glucuronidase	-	-	-	-
Extracellular enzyme activity (diameter, cm)	Protease	1.32 ± 0.07	2.10 ± 0.10	1.71 ± 0.04	1.93 ± 0.07
	Amylase	1.19 ± 0.09	1.2 ± 0.06	1.32 ± 0.07	1.22 ± 0.04
	Cellulose	0.8 ± 0.01	0.78 ± 0.03	1.20 ± 0.10	1.24 ± 0.05
Thrombolytic activity (diameter, cm)		1.77 ± 0.06	1.97 ± 0.04	1.26 ± 0.03	1.78 ± 0.08

[a] +, detection of gene; -, no detection.
[b] -, no production.

증가, 소화흡수 증진 등의 기능을 수행한다(Yang *et al*., 2014). 특히, *Bacillus* 속 미생물은 amylase, protease, cellulase 등 효소를 생성하는 대표 균주로 선별 균주 4종을 대상으로 측정한 결과 3종의 효소를 모두 생성하며 1.0 cm 이상의 활성을 대부분 갖는 것으로 확인되었다. 특히, 이들이 생성하는 효소가 함유된 배양액이 펫 사료에 적용될 경우 사료 내 단백질과 전분, 섬유소를 효과적으로 분해하여 사료의 흡수율과 효율을 증진시키고 소화 장애 감소 등의 효과가 발생할 것으로 판단된다. 또한, 최근 사람뿐만 아니라 가축도 식습관의 변화로 인해 고지방 식이와 비만 등으로 야기되는 혈전증(thrombosis)이 증가하고 있는 추세로, 치료 시 plasmin을 절단하는 urokinase, tPA (tissue type plasminogen activator) 등의 효소가 사용되고 있지만 현재는 고가로 판매되고 있고, 그 부작용이 알려지면서 미생물에 의한 대체 혈전용해제에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다(Baek *et al*., 2010). 따라서 선별 균주를 대상으로 혈전용해제에 대한 활성을 측정한 결과 대조구로 사용한 urokinase 0.25 unit/ml이 1.9 cm임을 감안할 때 가장 우수한 활성을 보인 SRCM 100937의 경우 섭취 시 사람과 동물의 혈관 장애에 도움을 줄 것으로 사료된다.

세포 표면 소수성 분석

미생물의 숙주 조직내 부착 능력은 장내 미생물 군락 형성에 있어 우선시되는 선행조건으로 면역조절 기능에 있어서도 중요한 역할을 수행하고 있으며, 일반적인 미생물의 장 상피세포 부착 방법으로는 물리적인 힘, capsule이나 pili와 같은 중합체 등이 있으며, 생물 세포 표면의 소수성 또한 세포 부착능에 많은 영향을 주는 것으로 알려지고 있다(An and Friedman, 1998). 선별 균주 4종을 대상으로 용매에 대한 미생물의 부착능을 확인하기 위한 실험을 수행하였으며, 대조구로는 상업적으로 가장 빈번하게 사용되는 프로바이오틱스 대표 유산균 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)를 사용하였다. n-Hexadecane 용매에 대한 부착능을 측정한 결과 LGG의 경우 81.02%의 부착능을 나타내었고, 4종의 선별 균주 중 SRCM 100731 균주가 가장 높은 74.3%의 LGG와 유사한 부착능을 나타내었다 (Fig. 1). Sansawat와 Thirabunyanon의 보고(2009)에 의하면 n-hexadecane에 17~57%의 소수성을 갖는 *Bacillus* 균주들이 Caco-2 세포에서 2.8~4.9 log CFU/well의 부착능을 갖는다고 보고하고 있어, SRCM 100731 균주의 경우 섭취 시 장내 상피세포에 부착할 수 있는 능력이 우수할 것으로 판단되며, 앞선 기능성 및 특성 분석 결과에서도 우수한 효과를 보이고 있어, 반려 동물용 프로바이오틱스로 활용하기 위한 균주로 SRCM 100731을 최종 선별하였다.

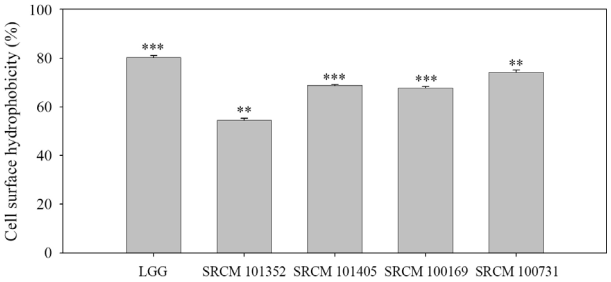

Fig. 1. Cell surface hydrophobicity of selected strains. Data were expressed as mean ± SD of three independent experiments. *, **, ***, ****, indicate significance at $P < 0.1$, 0.05, 0.01, 0.0001 in Duncan test.

SRCM 100731의 동정 및 당 이용성 분석

최종 선별 SRCM 100731의 16S rRNA 유전자 염기서열 결과를 이용하여 NCBI nucleotide BLAST search를 수행하였고, GenBank에 등록된 타 균주와 염기서열을 비교한 결과 *B. amyloliquefaciens* strain BCRC 11601, strain MPA 1034와 99.82%, *B. amyloliquefaciens* strain DSM7과 strain 15535와 99.77%의 상동성을 보여 *B. amyloliquefaciens* SRCM 100731로 명명하였고, 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 *B. amyloliquefaciens* KCCM 11967P로 기탁하였다. 염기서열을 바탕으로 phylogenetic tree를 작성하기 위해 evolutionary distance 추론은 Maximum Likelihood method를 사용하였고, bootstrap 분석 1,000회를 시행하여 계통수의 신뢰도를 확보하였다(Fig. 2). Earl 등 (2006)의 보고에 따르면, *Bacillus* 속 균주의 경우 16S rRNA 유전자 서열이 높은 상동성을 갖더라도 DNA-DNA reassociation analysis 결과 DNA relatedness가 58~69%로 나타나기 때문에 같은 종이라도 유전적 특성이 다를 수 있어 균주에 따라 산업적 적용을 위해서는 추가적인 균주 고유의 특성 규명에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 따라서 추가적으로 SRCM 100731의 물질대사를 확인하기 위하여 API kit을 이용하여 각각의 당 이용성을 조사한 결과 Wu와 Ahn (2011)이 보고한 *B. amyloliquefaciens* BY01과 유사한 glycerol, glucose, fructose, mannose, mannitol 등 16종의 당을 이용하는 것을 확인하였다(Table 4).

SRCM 100731의 항생제 감수성

항생제는 1940년대부터 전염병 원인인 병원성 미생물 감염의 치료를 목적으로 개발되어 사용되었으나, 무분별한 항생제 과다 사용으로 인해 항생제 내성을 갖는 병원성 미생물이 해마다 증가하는 추세로(Alanis, 2005), 항생제 내성을 가지는 유전자의 전이를 통하여 대표 항생물질인 vancomycin, teicoplanin 등

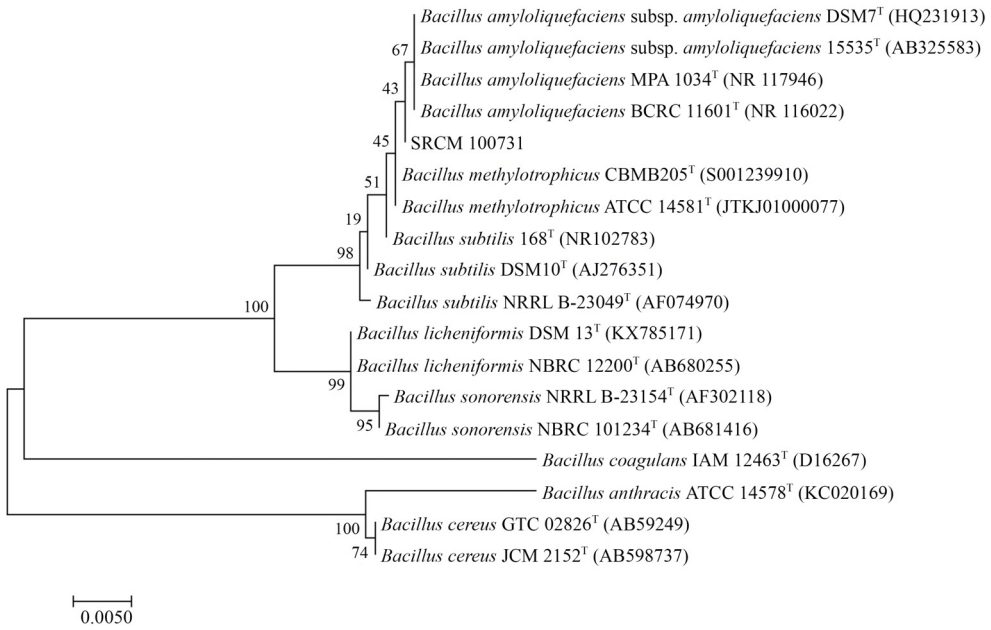

Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of SRCM 100731 and *Bacillus* type strains. SRCM 100731 showed the phylogenetic position similar to *Bacillus amyloliquefaciens* type strains. GenBank accession numbers are given in parentheses. The branching pattern was generated by maximum likelihood method. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values are expressed as percentages of 1,000 replicates.

Table 4. Carbohydrates and antibiotics susceptibility characterization of SRCM 100731

Carbohydrate	Result[a]	Carbohydrate	Result	Antibiotic substance	Susceptibility[b]
Glycerol	+	Salicine	-	Amikacin (30 μg)	SS
Erythritol	-	Cellobiose	+	Amoxicillin/clavulanic acid (2 μg/1 μg)	R
D-Arabinose	-	Maltose	+	Ampicillin (10 μg)	R
L-Arabinose	-	Lactose	+	Cephalothin (30 μg)	R
Ribose	-	Melibiose	-	Ciprofloxacin (5 μg)	SS
D-Xylose	-	Saccharose	+	Erythromycin (15 μg)	SS
L-Xylose	-	Trehalose	+	Gentamicin (30 μg)	SS
Adonitol	-	Inuline	-	Imipenem (10 μg)	SS
β Methyl-xyloside	-	Melezitose	-	Kanamycin (30 μg)	R
Galactose	-	D-Raffinose	+	Lincomycin (15 μg)	S
D-Glucose	+	Amidon	+	Methicillin (5 μg)	S
D-Fructose	+	Glycogene	+	Neomycin (30 μg)	SS
D-Mannose	+	Xylitol	-	Nitrofurantoin (300 μg)	SS
L-Sorbose	-	β-Gentiobiose	-	Ofloxacin (5 μg)	SS
Rhamnose	-	D-Turanose	-	Oxacillin (5 μg)	SS
Dulcitol	-	D-Lyxose	-	Penicillin G (1 IU)	R
Inositol	-	D-Tagatose	-	Penicillin G (2 IU)	R
Mannitol	+	D-Fucose	-	Penicillin G (10 IU)	R
Sorbitol	+	L-Fucose	-	Rifampicin (5 μg)	SS
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-	Streptomycin (10 μg)	S
α-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-	Streptomycin (300 μg)	SS
N-Acetyl glucosamine	+	Gluconate	-	Tetracycline (30 μg)	S
Amygdaline	-	2-Aceto-gluconate	-	Vancomycin (30 μg)	R
Arbutine	-	5-Aceto-gluconate	-	Trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25 μg/23.75 μg)	R
Esculine	-				

[a] +, positive effect; -, negative effect.
[b] S, sensitive, halo size 1.2−1.5 cm; SS, very sensitive, halo size 1.6−2.0 cm; R, resistance.

에도 내성을 가지는 VRSA (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*), VSE (vancomycin resistant *Enterococci*) 등이 보고되고 있다(Park *et al*., 2013). 따라서 미생물을 기반으로 상업화를 하기 위해서는 무엇보다도 항생제에 대한 감수성 결과가 중요한 자료로 활용되고 있어 최종 선별 균주 SRMC 100731을 대상으로 대표적 항생제 24종에 대한 항생제 감수성 분석을 실시하였다. 측정 결과 SRCM 100731은 단백질 합성 억제제인 amino glycoside 계열의 streptomycin, gentamicin 등 13개의 항생물질에 대하여 생육이 저해되었으며, 펩타이드 전이를 저해하여 세균의 용균 현상을 유발하는 penicillin G, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, amino glycoside 계열로 단백질 합성을 억제하는 kanamycin, 다이하이드로 엽산염 환원 효소(DHFR, dihydrofolate reductase)를 억제하는 trimethoprim/sulfamethoxazole에 대한 내성을 가지는 것으로 확인되었다(Table 4). Thirabunyanon과 Thongwittaya (2012)와 Hong 등(2008)에 의하면 프로바이오틱스 활성을 가지는 *B. subtilis natto* 와 NC11 균주는 vancomycin, kanamycin, ampicillin, penicillin을 포함한 대부분의 항생제에 대하여 생육이 억제되었으나, Lee 등(2017)이 분리한 *B. amyloliquefaciens* AMS1은 penicillin과 ampicillin에 대하여 내성을 가지고 있어 SRMC 100731과 유사한 결과를 나타내었으며, 특히 SRCM 100731은 일부 항생물질을 제외한 항생제에 대해서는 민감성을 지니고 있어 향후 사료 등 제품 개발 활용에 용이할 것으로 판단된다.

SRCM 100731의 균체 성장 조사

최종 선별 균주인 SRCM 100731의 산업화를 위한 배지 성분의 최적화에 앞서 기본 배양 배지인 LB 배지를 이용하여 시간에 따른 균체 성장을 조사하였다. 4시간 단위로 배양액을 회수하여 흡광도와 건조 균체량을 측정한 결과, 배양 4시간부터 균체 성장이 급격히 증가하기 시작하여 배양 24시간에 흡광도 1.35, 1.8213 ± 0.0214 g/L의 최대 성장을 나타내었다(Fig. 3). 또한 배양 24시간 이후부터 56시간까지 정지기, 배양 56시간 이후에는 감소기를 나타내어 최적 배양 시간을 대수기에서 초기 정지기에 도달하는 24시간으로 결정하였다. 이러한 결과는 Yu 등(2002)이 보고한 *B. amyloliquefaciens* B94의 균체 성장이 22시간에 최대를 나타낸 결과와 유사함을 확인하였다.

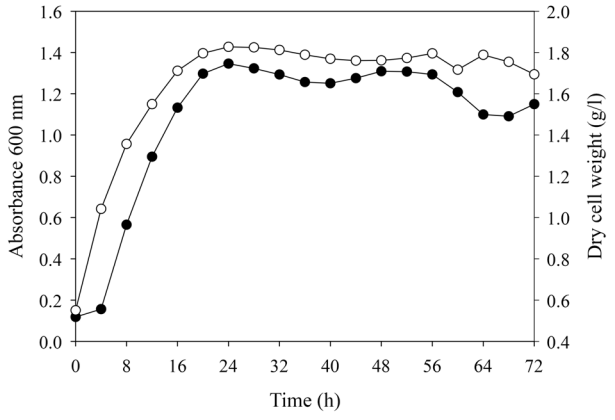

Fig. 3. Growth profiling of *B. amyloliquefaciens* SRCM 100731 by absorbance and dry cell weight. SRCM 100731 cultivated in LB broth medium at 150 rpm, 37°C (○, dry cell weight; ●, absorbance 600 nm).

Plackett-Burman design을 이용한 배지 성분의 확립

균체량 증가를 위한 산업용 배지 성분의 확립을 위해 배지 성분 중 유용한 주요 인자에 대한 주된 효과를 분석함으로써 다양한 배지의 조합에서 균체 생산성에 큰 영향을 미치는 주요 성분을 찾는 PBD 방법을 적용하여 최적화를 수행하였다. 실험 모델에 따라 22가지의 배지 조합을 설계하고 반응값인 건조 균체량(Y)을 3회 반복 측정하여 평균값을 적용하였으며, 각각의 성분의 수준이 균체량 증가에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 각각 요인 별로 보면 탄소원으로는 sucrose, fructose, molasses가 변수의 수준이 증가할수록 균체량 또한 증가하는 positive effect임을 확인하였고, 질소원은 tryptone, 기타 미량 성분으로는 sodium chloride, potassium phosphate, dipotassium phosphate, potassium chloride로 확인되었다. 모델에 대한 신뢰수준은 99.83%로 나타나 반응값에 대한 실험 결과의 신뢰수준이 매우 높음을 확인하였으며, 실험군의 반응값에 대한 각 변수의 영향, 모델 계수, *F*-value, *P*-value 등 신뢰 수준에 대한 통계 분석 결과는 Table 5에 나타내었고, 이를 바탕으로 positive effect 중 균체량에 영향력이 높을수록 수치가 높은 confidence level을 바탕으로 molasses (99.99%), potassium chloride (99.71%), sodium chloride (91.51%)를 SRCM 100731의 균체량 증가를 위한 주요 인자로 최종 선정하였다. 특히, 주요 인자로 선정된 성분 중 molasses의 경우 부산물로 가격이 저렴하고, 비정제 사탕수수당으로서 미생물의 배양에 필수적인 미네랄, 유기산, 비타민 등을 함유하고 있어(Makkar and Cameotra, 1997) 산업적 활용을 위한 대체 탄소원으로서 경제적 측면뿐만 아니라 미생물의 균체량 증가 측면에서도 매우 유용한 소재임을 확인하였다.

Central composite design을 통한 배지 성분의 농도 최적화

앞서 선정된 배지 성분 농도를 최적화하기 위해 중심합성계획법(CCD, central composite design)을 이용하여, 각각 X_1 (molasses), X_2 (potassium chloride), X_3 (sodium chloride)로 변수를 선정하고 2개의 중심점을 포함한 16개의 실험군을 설

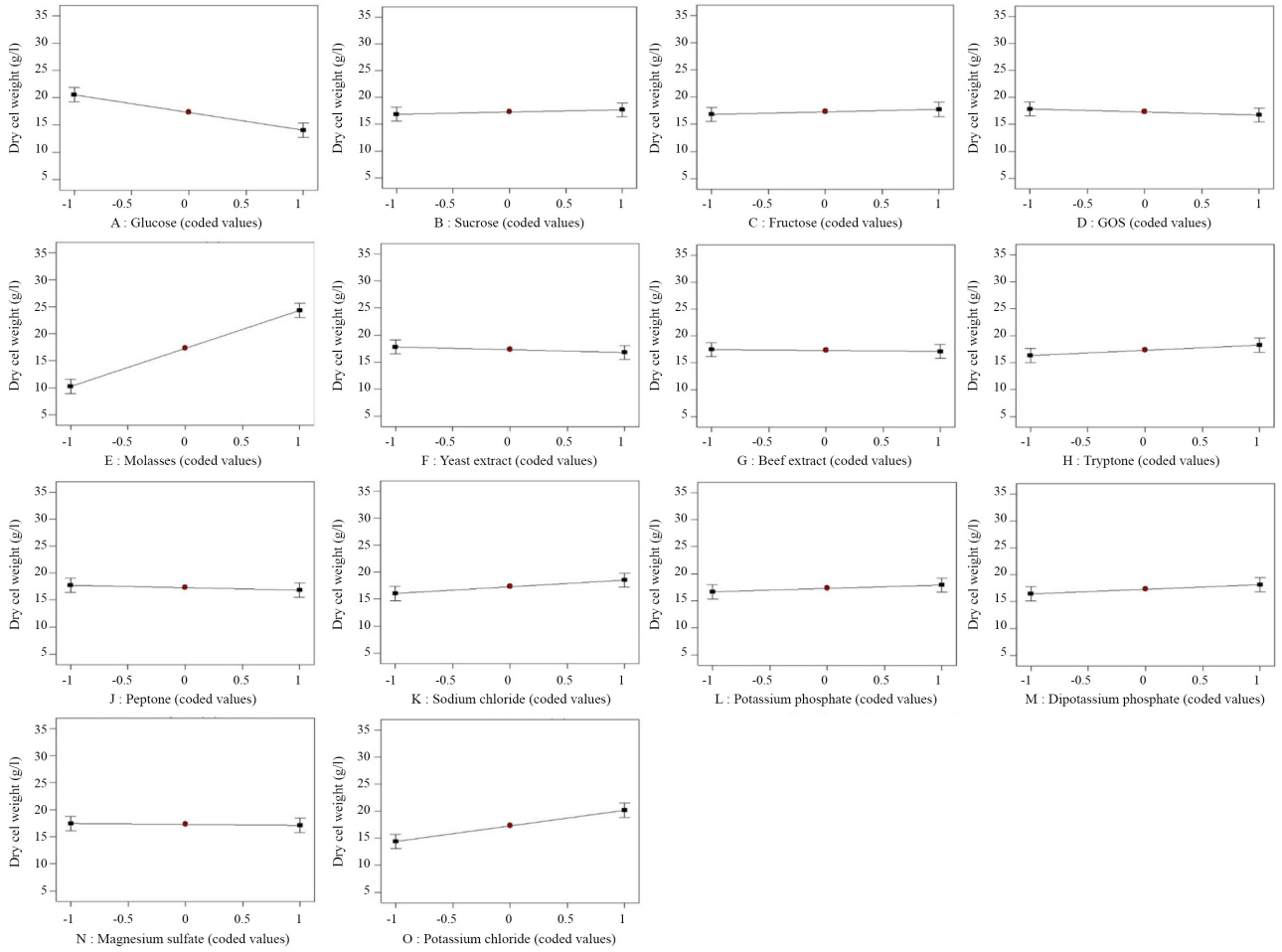

Fig. 4. Effects of medium components depending on various levels for improving dry cell weight.

Table 5. Variables and their effects values from a quadratic regression equation results of Plackett-Burman design

Variable (X_i)	Effect (E_{xi})	Coefficient (β_i)	Sum of squares	*F*-value	*P*-value	Confidence level (%)
Model		17.28	1463.854	14.74291	0.001666	99.8334
Glucose	-6.48267	-3.24133	210.1248	29.6272	0.001598	99.84023
Sucrose	0.845333	0.422666	3.572939	0.503778	0.504481	49.55192
Fructose	0.917332	0.458666	4.207493	0.593248	0.470395	52.96048
GOS[a]	-1.10933	-0.55467	6.153077	0.867572	0.387572	61.2428
Molasses	14.09	7.045	992.6406	139.9604	2.21E-05	99.99779
Yeast extract	-1.02133	-0.51067	5.215613	0.735391	0.424065	57.59345
Beef extract	-0.342	-0.171	0.584819	0.082458	0.783652	21.63477
Tryptone	1.922	0.961	18.47043	2.604295	0.157701	84.22985
Peptone	-0.90467	-0.45233	4.092106	0.576979	0.476273	52.37269
Sodium chloride	2.455332	1.227666	30.14328	4.250146	0.08487	91.51303
Potassium phosphate	1.247332	0.623666	7.779189	1.096851	0.335302	66.46975
Dipotassium phosphate	1.706	0.853	14.55219	2.05183	0.201996	79.80038
Magnesium sulfate	-0.35267	-0.17633	0.621865	0.087682	0.777127	22.28733
Potassium chloride	5.756664	2.878332	165.6959	23.36281	0.0029	99.71001

[a] GOS, galacto-oligosaccharide.

정하여 각각 3번의 반복 실험을 통한 평균값을 종속변수(Y, g/L)의 결과값으로 나타내었다(Table 2). 반응값에 대한 모델식의 예측은 Design expert 9.0 프로그램을 이용하여 분석하였고, 이때의 균체량에 대한 회귀방정식은 아래와 같다.

$$Y\ (\text{Dry cell weight}) = 7.36833 + 4.415 \times \text{molasses} - 0.047917 \times \text{potassium chloride} - 0.015417 \times \text{sodium chloride} - 0.06 \times \text{molasses} \times \text{potassium chloride} - 0.028334 \times \text{molasses} \times \text{sodium chloride} - 0.0925 \times \text{potassium chloride} \times \text{sodium chloride} + 0.811671 \times \text{molasses}^2 - 0.00166675 \times \text{potassium chloride}^2 + 0.05083325 \times \text{sodium chloride}^2$$

분산분석을 통한 모델 적합성 확인 결과 전체 모델의 *F*-value가 146.4153으로 나타나 가정된 모델이 적합함을 확인하였으며, *P*-value는 0.000000247로 통계적 유의성 또한 매우 높음을 확인하였다. 또한 결정 계수(R^2)은 0.9955로 1과 가까워 실제값과 실험 모델에 의한 예측값이 거의 일치함을 확인할 수 있었고, 종속 변수의 평균값에 대한 오차제곱합의 제곱근으로 변수간 상호 작용과 독립적 영향의 작용을 확인하는 변동 계수(CV, coefficient of variation)는 6.06으로 매우 높게 작용하고 있음을 확인하였다(Table 6). 각각의 독립변수가 다른 독립변수에 미치는 영향을 확인하기 위해 3개의 변수 중 하나의 독립변수를 최적점에 고정하고 나머지 변수를 이용한 3차원 등고선으로 교호 작용을 확인한 결과 설정 범위 내에서 중심값으로부터 molasses, potassium chloride의 경우 농도가 높아질수록 균체량이 증가함을 확인하였고, sodium chloride의 경우 -1에서 최대 성장을 나타냄을 확인하였다(Fig. 5). 최종적으로 SRCM 100731의 최대 균체량 생산을 위한 배지 성분의 농도는 molasses 7%, sodium chloride 1.1%, potassium chloride 0.5%로 예측되었고, 이때 최대 균체량은 12.6625 g/L로 예측되었다.

실험 모델의 검증

최종적으로 예측된 최적 배지에서 *B. amyloliquefaciens* SRCM

Table 6. Analysis of variance (ANOVA) of central composite design for improving dry cell weight of *B. amyloliquefaciens* SRCM 100731

Source	Coefficient estimate	Sum of Squares	Degree of Freedom	Mean square	Standard error	*F*-value	*P*-value Prob > F[a]
Model	7.368333	327.256	9	36.36178	0.329624	146.4153	2.47E-06****[e]
X_1-Molasses	4.415	311.8756	1	311.8756	0.124586	1255.806	3.37E-08****
X_2-Potassium chloride	-0.04792	0.036736	1	0.036736	0.124586	0.147923	0.713791
X_3-Sodium chloride	-0.01542	0.003803	1	0.003803	0.124586	0.015313	0.905558
X_1X_2[b]	-0.06	0.0288	1	0.0288	0.176191	0.115966	0.745058
X_1X_3	-0.02833	0.006423	1	0.006423	0.176191	0.025861	0.877517
X_2X_3	-0.0925	0.06845	1	0.06845	0.176191	0.275623	0.61841
X_1^2	0.811667	10.54086	1	10.54086	0.124586	42.44408	0.000624****
X_2^2	-0.00167	4.44E-05	1	4.44E-05	0.124586	0.000179	0.98976
X_3^2	0.050833	0.041344	1	0.041344	0.124586	0.166478	0.697422
Residual	-	1.490082	6	0.248347	-	-	-
Lack of Fit	-	1.484032	5	0.296806	-	49.05889	0.107954
Pure Error	-	0.00605	1	0.00605	-	-	-
Cor. Total[c]	-	328.7461	15	-	-	-	-
Standard deviation	0.5		Press[d]	12.49			
Mean	8.23		R-squred	0.9955			
Coefficient of variation	6.06		Adjusted R-squre	0.9887			
			Adequate precision	44.825			

Response model was suggested quadratic model through the lack of fit tests.
[a] *P*-value, probability distribution value. *P*-value less than 0.05 indicate that the term is significant.
[b] X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3 represent the interaction effect of variables X_1, X_2, and X_3. X_{12}, X_{22}, and X_{32} are the squared effects of the variables.
[c] Cor Total, Sum of squares total corrected for the mean.
[d] Press, The predicted residual sum of squares for the model.
[e] *, **, ***, ****, indicate significance at $P < 0.1$, 0.05, 0.01, 0.0001, respectively.

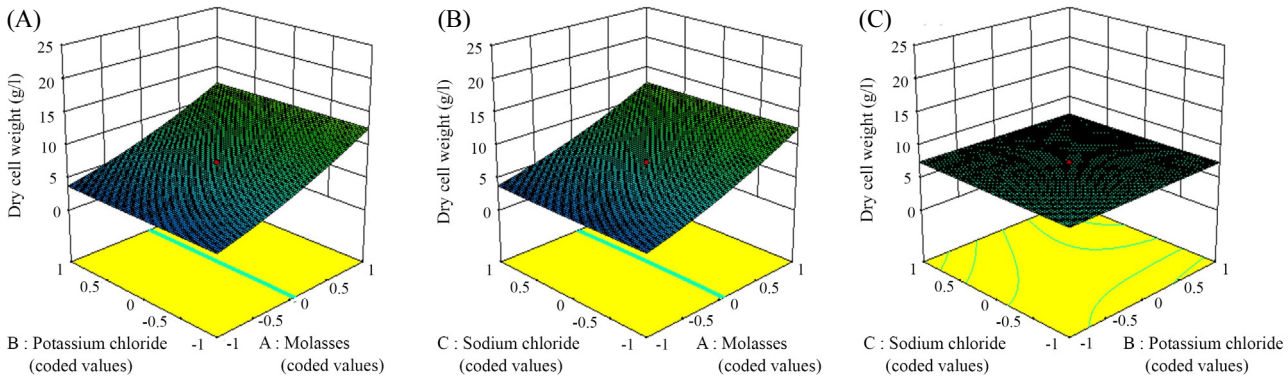

Fig. 5. Three-dimensional response surface plots for improving dry cell weight of *B. amyloliquefaciens* SRCM 100731. Dry cell weight represents as a function of the concentration of molasses-potassium chloride (A), molasses-sodium chloride (B), potassium chloride-sodium chloride (C).

100731의 균체량을 검증하기 위해 대조구로 초기 기본 배양 배지인 LB 액체 배지를 이용하여 각각의 배지를 제조 후 동일 조건하에 건조 균체량을 측정하여 비교 연구를 수행하였다. 최적화를 통해 확립한 배지에서의 균체량은 12.8008 ± 0.0658 g/L로 예측된 균체량 12.6625 g/L와 매우 유사한 결과값을 나타내어 신뢰도가 높음을 다시 확인할 수 있었으며, 대조구의 건조 균체량 1.8273 ± 0.0214 g/L와 비교 시 균체량이 10.8352 g/L만큼 증가하여 약 7배로 균체량이 증가함을 확인하였다 (Fig. 6). 일반적으로 *B. subtilis*의 균체 생산량은 배지 성분과 농도, 배양 시간 등 물리적 요인에 따라 달라지게 되고(Jeong *et al*., 2015), 통계학적 방법을 적용한 발효 공정 개선의 경우 *Bacillus* 종의 균체 생산이 최대 10배 증가한다고 보고(Jeong *et al*., 2010)하고 있어 본 결과와 비교 시 10배까지 증가하지는 않았으나, 물리적 요인을 배제한 성분의 최적화만을 통한 방법에서도 7배 증가하여, 향후 추가로 외부 요인에 대한 연구를 진행할 경우 더욱더 균체량 증가가 가능할 것으로 예측되었다. 결론적으로 잠재적 프로바이오틱스 활성을 갖는 *Bacillus* 균주를 반려 동물 사료 시장에 산업적으로 이용하기 위하여 적절한 균주를 선별하였고 균체량 증진을 위한 통계적 방법을 적용하여 최적화를 수행한 결과 고가의 생합성 배지를 대체할 수 있는 저가의 부산물 배지를 제시함으로써 향후 반려동물 제품 이외에도 다양한 분야에 활용할 수 있는 기반을 마련하였다.

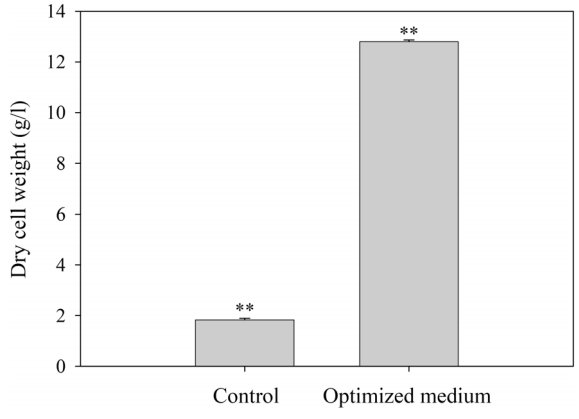

Fig. 6. Dry cell weight comparison between control (LB, non-optimized medium) and optimized medium. Data were expressed as mean ± SD of three independent experiments. *, **, ***, ****, indicate significance at $P < 0.1, 0.05, 0.01, 0.0001$ in Duncan test.

적 요

본 연구는 전통 발효식품에서 반려동물의 사료 및 보조식품 등에 사용될 수 있도록 안전성 확보와 프로바이오틱스 활성 등 기능성을 갖춘 *Bacillus* 속 균주를 선발하고자 하였다. 전국에서 수집한 전통 장류에서 약 300종의 분리주를 확보하였고, *Bacillus cereus*가 생성하는 구토와 설사 독소 유전자 6종, β형 용혈성, 발암 관련 효소 3종 등을 보유하지 않거나 생성하지 않는 4종의 균주를 선별하였다. 4종의 분리주를 대상으로 항생물질 유전자 보유 여부, 세포 표면 소수성, 항생제 감수성과 당 이용성 등을 분석하였고, 최종적으로 항생물질 생성 유전자 3종을 모두 보유하고, 혈전 용해 및 세포 표면 소수성이 가장 우수한 SRCM 100731을 선정하였다. 최종 선별된 SRCM 100731의 16S rRNA 염기서열 분석 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정 되었으며, 펫 사료 및 식품 등 산업적 적용을 위하여 균체 성장 최적화를 수행하였다. SRCM 100731의 배지 성분 선별을 위하여 Plackett-Burman design (PBD)을 사용하였으며, 최적 성장을 위한 배지 성분으로는 molasses와 sodium chloride, potassium chloride가 예측되었다. PBD를 통해 선정된 배지 성분의 농도를 최적화하기 위하여 central composite design (CCD)

을 사용하였으며, 실험 결과 7.0% molasses, 1.1% sodium chloride, 0.5% potassium chloride로 예측되었다. 이때 최대 균체량은 12.6625 g/L로 예측되었으며, 최종적으로 실험 모델의 예측값과 실 측정값이 12.6625 ± 0.0658 g/L로 오차 범위내의 결과를 나타내어 실험 모델의 신뢰성을 검증할 수 있었다. 이는 실험 모델에 의해 예측된 최적 배지 사용 시 최적화 이전 배지에서의 균체량(1.8273 ± 0.0214 g/L) 대비 약 7배로 균체량이 증가함을 확인할 수 있었다. 향후 *B. amyloliquefaciens* SRCM 100731의 제품 개발 등 후속 연구의 진행이 필요하나 본 연구를 통해 산업 적용이 가능한 프로바이오틱스 소재의 발굴 및 산업화 배양 조건이 확립 되었으므로 앞으로 성장하고 있는 반려동물 산업에 유용하게 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말

본 연구는 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단-전통문화융합연구사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다(No. 2016M3C1B5907049).

References

Alanis AJ. 2005. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res*. **36**, 697–705.

An YH and Friedman RJ. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **43**, 338–348.

Astrup T and Mullertz S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys*. **40**, 346–351.

Bae HC, Choi SH, Na SH, and Nam MS. 2012. Characteristics of α-amylase and protease produced from *Bacillus amyloliquefaciens* CNL-90 isolated from malt grain. *J. Anim. Sci. Technol*. **54**, 133–139.

Baek SY, Yun HJ, Choi HS, Koo BS, and Yeo SH. 2010. Isolation and physiological characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from Korean traditional soybean sauce and soybean paste. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **38**, 379–384.

Buff PR, Carter RA, Bauer JE, and Kersey JH. 2014. Natural pet food: A review of natural diets and their impact on canine and feline physiology. *J. Anim. Sci.* **92**, 3781–3791.

Carrillo C, Teruel JA, Aranda FJ, and Ortiz A. 2003. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1611**, 91–97.

Danek P, Novak J, Semradova H, and Diblikova E. 1991. Administration of the probiotics *Lactobacillus casei* CCM 4160 to sows and its effects on piglet efficiency. *Zivocisna Vryoba* **36**, 411–415.

Doyle RJ and Rosenberg M. 1995. Measurement of microbial adhesion to hydrophobic substrata. *Methods Enzymol*. **253**, 542–550.

Earl AM, Losick R, and Kolter R. 2006. *Bacillus subtilis* genome diversity. *J. Bacteriol*. **189**, 1163–1170.

Fuller R. 1973. Ecological studies on the *Lactobacillus* flora associated with the crop epithelium of the fowl. *J. Appl. Bacteriol*. **36**, 131–139.

Hibbert DB. 2012. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B* **910**, 2–13.

Hong HA, Huang JM, Khaneja R, Hiep LV, Urdaci MC, and Cutting SM. 2008. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J. Appl. Microbiol*. **105**, 510–520.

Jeong YM, Lee JH, Chung HJ, Chun GT, Yun SI, and Jeong YS. 2010. Optimization of medium and fermentation conditions for mass production of *Bacillus licheniformis* SCD121067 by statistical experimental design. *KSBB J.* **25**, 539–546.

Jeong SJ, Yang HJ, Jeong SY, and Jeong DY. 2015. Identification of characterization and statistical optimization of medium constituent for *Bacillus subtilis* SCJ4 isolated from Korean traditional fermented food. *Korean J. Microbiol*. **51**, 48–60.

Kim DW, Chae SJ, Kim YH, Jung HJ, Lee SD, Park JC, Cho KH, Sa SJ, Kim IC, and Kim IH. 2013. Effects of prebiotics and probiotics on swine intestinal microflora and fermentation products *in vitro* fermentation. *Korean J. Microbiol*. **49**, 24–29.

Kim YS, Yun S, Jeong DY, Hahn KS, and Uhm TB. 2010. Isolation of *Bacillus licheniformis* producing antimicrobial agents against *Bacillus cereus* and its properties. *Korean J. Microbiol.* **46**, 270–277.

Lee S, Lee J, Jin YI, Jeong JC, Chang YH, Lee Y, Jeong Y, and Kim M. 2017. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. *LWT-Food Sci. Technol*. **79**, 518–524.

Makkar RS and Cameotra SS. 1997. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc*. **74**, 887–889.

Mohan B, Kadirvel R, Natarajan A, and Bhaskaran M. 1996. Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilisation and serum cholesterol in broilers. *Br. Poult. Sci*. **37**, 395–401.

Park S, Yoo J, Seong C, and Cho S. 2013. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* MP56 with antimicrobial activity against MDR (multi drug resistant) strains. *Korean J. Microbiol*. **49**, 90–94.

Sansawat A and Thirabunyanon M. 2009. Anti-aeromonas hydrophila activity and characterization of novel probiotic strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. *Maejo Int. J. Sci. Technol*. **3**, 77–87.

Son SJ, Bae JM, Park SJ, Lee HJ, and Lee HS. 2017. A new area of food industry; companion animal market. *Food Sci. Ind.* **50**, 92–103.

Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **56**, 845–857.

Tamura K and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in

humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol*. **10**, 512–526.

Thirabunyanon M and Thongwittaya N. 2012. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella* Enteritidis infection. *Res. Vet. Sci*. **93**, 74–81.

Wang Y, Chen C, Cai D, Wang Z, and Qin P. 2016. The optimization of L-lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsterile conditions. *Bioresour. Technol.* **218**, 1098–1105.

Wu WJ and Ahn BY. 2011. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* BY01 with high productivity of menaquinone for *Cheonggukjang* production. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **54**, 783–789.

Yanez-Mendizabal V, Vinas I, Usall J, Torres R, Solsona C, and Teixido N. 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biol. Control* **60**, 280–289.

Yang HJ, Jeong SJ, Jeong SY, Heo JH, Choi NS, and Jeong DY. 2016. Screening of non-biogenic-amine-producing *Bacillus subtilis* and medium optimization for improving biomass by the response surface methodology. *Korean J. Life Sci.* **26**, 571–583.

Yang SJ, Lee DH, Park HM, Jung HK, Park CS, and Hong JH. 2014. Amylase activity and characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 isolated from *Doenjang*. *Korean J. Food Preserv*. **21**, 286–293.

Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, and Bertagnolli BL. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem*. **34**, 955–963.

Yun HJ, Lee YJ, Yeo SH, Park HD, and Baek SY. 2013. Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from Korean soy sauce and soybean paste. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*. **41**, 190–197.