



## 초정광천수에서 분리한 *Bacillus* sp. 균주의 특성 분석

김명기<sup>1</sup> · 이용직<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>서원대학교 식품공학과, <sup>2</sup>서원대학교 바이오코스메틱학과

## Characterization of *Bacillus* sp. bacteria isolated from Chojeong mineral water

Myong Ki Kim<sup>1</sup> and Yong-Jik Lee<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food science & Engineering, Seowon University, Cheongju 28674, Korea

<sup>2</sup>Department of Bio-Cosmetics, Seowon University, Cheongju 28674, Korea

### Abstract

This study aimed to identify a *Bacillus* strain isolated from Chojeong mineral water in Korea. One strain was isolated using a marine agar medium, and its growth temperature was analyzed in complex media. Strain identification confirmed that it was similar to *Bacillus subtilis*. The ability of the strain to produce extracellular hydrolytic enzymes was assessed to determine whether the culture medium of the isolated strain could be used in the cosmetics and food-related industries. The LKSU-1 strain showed higher protease activity when cultured in Luria-Bertani (LB) broth compared to media containing nutrient broth (NB) and tryptic soy broth (TSB). As a first step toward optimizing culture media, the carbon source utilization of the LKSU-1 strain was evaluated, indicating that it could metabolize 18 types of carbon sources. Therefore, this research contributes valuable data for securing domestic genetic resources and optimizing media for isolated strains.

**Keywords:** Mineral water, Chojeong-ri, *Bacillus*, Enzyme, Characterization

## 서론

*Bacillus* 속의 균주는 예로부터 식품 등의 발효 산업에 널리 사용되어 왔으며, *Bacillus* 균주를 산업적으로 이용하기 위한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다(Zheng et al., 2011; Lee et al., 2015). 또한, *Bacillus* 속의 균주는 가수분해 효소인 protease, amylase 등 산업적으로 활용도가 높은 효소들을 생산하며(Blanco et al., 2016; Qureshi et al., 2016), 포자를 형성함으로써 균주가 장까지 도달할 수 있어 장 질환에 대한 개선 효과를 기대할 수 있다(Shin et al., 2012). 이러한 특성으로 최근 미국, 유럽 등의 여러나라에서 장 건강을 위한 프로바이오틱스 균주로도 활용되고 있다(Cutting, 2011).

단백질 가수분해효소(Protease)는 단백질의 1차 구조를 형성하는 펩타이드 결합을 가수분해하는 효소로서 세균에서는 *Bacillus* 속이 주요 생산 균주로 알려져 있으며 다양한 산업에서 활용되고 있다(Harwood & Cranenburgh, 2008). 또한, *Bacillus* 속의 균주는 일반적이거나 특수한 자연 환경 등 다양한 조건에서 생육이 가능하기 때문에 이들 균주들이 생산하는 효소들의 안정성과 우수한 활성을 지닌다. 이 효소는 식품 산업, 세제 산업 등에 이용되고 있으며 세계 효소 판매시장의 약 60%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다(Contesini et al., 2018). 또한, *Bacillus* 균주가 생산하는 protease는 다양한 종류의 천연물 유래의 단백질 성분을 분해하여 저분자 펩타이드의 생산을 위해 화장품 산업이나 식품 산업에 사용되고 있다

Received: Aug 08, 2024 / Revised: Sep 10, 2024 / Accepted: Sep 10, 2024

Corresponding author: Yong-Jik Lee, Department of Bio-Cosmetics, Seowon University, Cheongju 28674, Korea

E-mail: yjlee75@seowon.ac.kr

Copyright © 2024 Korean Society for Food Engineering.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(Porres et al., 2002; Latiffi et al., 2013). 또한, 산업 공정에서 발생되는 고체 형태의 부산물의 고부가가치 자원화를 위한 대두박의 고체 발효 균주로도 활용할 수 있어 다양한 산업에서 사용할 수 있는 경제적 효율성이 있기에 이를 활용하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있다(Shivasharana & Naik, 2012; Contesini et al., 2018).

이처럼 산업적인 대량 생산 공정에서 생산 단가로 인한 충분한 영양 성분의 공급이 제한되는 반응 조건과 유사한 환경 조건에서 생육이 가능한 특수 환경 미생물과 이들이 생산하는 다양한 가수분해효소들이 이러한 대량 생산 공정의 제한된 반응 조건에서도 활성을 나타내거나 안정성을 유지할 가능성이 있다. 따라서 특수 환경의 시료에서 미생물을 분리하고 분리된 균주의 생리학적 특성을 분석을 위한 다양한 연구가 이루어지고 있다(Gupta et al., 2014; Lee et al., 2022).

천연광천수는 미네랄이 많이 함유되어 있는 물로 독일, 이탈리아 등 유럽에서는 음용 효과에 대한 생리학적 연구가 진행되었으며, 혈압, 골 건강, 근육 건강 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Yoon, 2020). 초정광천수의 주요 금속이온을 분석한 결과 칼륨(K), 망간(Mn), 아연(Zn)이 다른 광천수에 비해 높은 함량을 보였으며, 각각 6 mg/L, 0.816 mg/L, 0.026 mg/L의 함량을 보였고 칼슘(Ca), 알루미늄(Al), 구리(Cu), 철(Fe), 마그네슘(Mg), 나트륨(Na), 셀레늄(Se) 등을 함유하고 있다고 보고하였다(Kim, 2006). 초정광천수는 세계 3대 광천수로 세종대왕이 안질과 피부병을 치료한 약수로 잘 알려져 있다. 현재 초정광천수를 이용하여 음료, 화장품 등의 제품을 제조·판매하고 있으며 온천수로도 활용되고 있다(Park, 2015).

따라서 본 연구에서는 현재 식수로 사용 중인 충청북도 초정리 지역의 초정광천수는 식음료 제품 개발을 위한 화학성분 분석 관련 연구가 수행(Park, 2015)되었으나 아직 유용한 균주의 분리와 동정 관련 연구는 없었다. 또한, 영양성분이 부족하고 미네랄 성분이 많은 국내 온천수에서도 *Bacillus* 속의 균주들을 분리하여 특성 분석과 같은 연구(Lee et al., 2022)들이 진행된 것처럼, 미네랄 이외 영양성분이 부족한 광천수에서 포자를 형성할 수 있는 *Bacillus* 속의 균주 분리 가능성이 높을 것으로 예상하고 균주 탐색을 시도하였다. 이에 본 연구를 통해 *Bacillus* 속 균주를 분리하고 동정하였으며 온도에 따른 생육과 다양한 복합배지 사용에 따른 세포의 가수분해 효소의 생산 특성 탐색과 함께 탄소원 이용 능력을 확인하였다. 이를 통해 분리 균주를 다양한 천연물 유래 단백질의 분해 균주로의 산업적 활용 가치를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 분리 및 배양

국내 충청북도 초정광천수로부터 *Bacillus* 속 균주 분리를 위해

배양 배지로 marine agar (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하였다. 시료 1 mL을 배지 표면에 점적하고 일회용 spreader (SPL, Pocheon, Korea)로 도말해 37°C에서 정치 배양(LIB-080M, Labtech, Namyangju, Korea)하였다. 배양 48 h 후 고체 배지 표면에 생성된 콜로니를 일회용 loop (SPL)를 사용해 희선도말법으로 marine agar (BD)에 접종하여 단일 콜로니 분리를 수행했다. 순수 분리된 콜로니를 3 mL의 marine broth (BD) 배지를 주입한 14 mL round tube (SPL)에 접종하고 37°C에서 24 h 진탕 배양(LSI-3016A, Labtech, Namyangju, Korea) 후, 2개의 1.5 mL microcentrifuge tube (SPL)에 배양액을 옮긴 후 13,500 rpm에서 5 min간 원심분리(Mini, Labogene, Daejeon, Korea)하고 배양상등액을 제거한 후 1 mL의 25% glycerol 용액을 사용해 현탁한 후 2 mL cryogenic vial (Corning, Glendale, AZ, USA)에 500  $\mu$ L씩 분주해 균주 stock을 제조한 후 -80°C에 보관하며 각각의 실험에 사용하였다.

분리된 균주가 복합 배지의 생육 가능성과 함께 생육 온도를 확인하기 위하여 nutrient agar (BD), Luria-Bertani agar (BD)와 tryptic soy agar (BD) 배지 각각에 희선 도말법으로 접종해 37°C, 45°C, 50°C로 조절된 배양기에서 24 h 정치 배양을 하였다.

### 균주 동정

순수 분리된 균주 동정의 분석 의뢰를 위해 marine agar (BD) 배지에 균주 stock으로부터 희선도말법으로 접종 후 37°C에서 24 h 배양 후 균주가 배양된 상태의 고체배지를 (주)마크로젠에 송부해 16S rDNA 염기서열의 분석을 통한 균주 동정을 실시하였다. (주)마크로젠에서 제공한 standard ID 분석 결과와 함께 16S rDNA 염기서열 분석 결과를 사용하여 CJ 바이오사이언스의 EzBioCloud 데이터베이스를 기반으로 하는 16S-based ID 분석 플랫폼을 사용하여 분리된 균주 동정을 위한 분석을 실시하였다.

### 세포의 가수분해 효소 생산능 분석

초정광천수로부터 분리한 균주의 복합 배지 종류에 따른 가수분해 효소들(amylase, lipase와 protease)의 세포의 생산 능력을 확인하기 위해 먼저 앞서 언급한 각각의 복합 배지를 사용한 고체 배지에 균주 stock으로부터 일회용 loop (SPL)를 사용해 배지 표면에 접종하고 24 h 배양 후 각각의 동일한 종류의 3 mL의 액체 배지에 배양된 콜로니를 접종하여 37°C에서 12 h 진탕 배양을 통해 전배양하였다. 전배양 후 각각의 같은 종류의 액체 배지 25 mL이 들어있는 250 mL baffle flask에 전배양액 1%를 접종하여 37°C에서 진탕 배양을 통해 본배양을 수행하였다. 본배양 24 h 후, 1 mL의 배양액을 회수하고 원심분리 후 배양 상등액을 회수하였으며 다시 0.2  $\mu$ m syringe filter (Advantec, Tokyo, Japan)를 사용해 균체를 완전히 제

거하였다. 균체가 제거된 배양 상등액을 paper disc (Advantec)에 25 µL 점적한 후 각각의 같은 종류의 복합 배지에 0.2% soluble starch (BD), 1% Tween 80 (Sigma, St. Louis, MO, USA), 그리고 2% skim milk (BD)를 amylase와 lipase, 그리고 protease 각각의 가수분해 효소의 기질로 사용하여 제조한 가수분해 효소 활성 평가용 고체 배지 표면에 올려 37°C에서 48 h 배양한 후 투명환(clear zone)의 직경으로 확인하였으며, 투명환의 크기는 디지털 캘리퍼스 (DC-150-1, CAS, Yangju, Korea)를 사용하여 측정하였다.

**탄소원 자화능 분석**

국내 초정리 광천수로부터 분리한 균주의 탄수화물 대사에 사용할 수 있는 탄소원의 확인을 위해 API 50 CH kit (Biomerieux, Craponne, France)를 사용하여 제조업체에서 제공되는 실험방법에 따라 탄소원 자화능 분석을 실시하며 37°C에서 48 h 배양 후 결과를 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**균주 분리 및 동정**

미네랄 성분이 많이 포함돼 있는 국내 충청북도 초정광천수로부터 *Bacillus* 속 균주를 분리하기 위해 사용한 복합배지는 미네랄 성분이 많이 포함돼 있는 해양 미생물 배양용 marine agar (BD) 배지를 사용하였다. 초정광천수의 경우 음용수로 현재 사용중이기에 세균이 많이 존재하지 않을 것으로 예상되어 시료를 희석하지 않고 원액을 시료로 사용해 최종 1균주를 분리하고 LKSU-1으로 명명하였다.

(주)마크로젠으로부터 받은 standard ID 분석 결과와 함께 제공받은 16S rDNA 염기서열과 CJ 바이오사이언스의 EzBioCloud 분석 플랫폼을 사용한 16S-based ID 분석 결과를 종합한 결과, Table 1에

서 나타난 것처럼 LKSU-1 균주는 NCBI 웹사이트의 BLAST 분석 플랫폼을 사용한 (주)마크로젠의 standard ID 분석 결과와 CJ 바이오사이언스의 EzBioCloud 분석 플랫폼을 사용한 16S-based ID 분석 결과가 동일하게 *Bacillus subtilis* DSM 10과 99.87%의 유사도를 보였기에 초정광천수에서 분리된 균주는 *B. subtilis*인 것으로 확인되었다(Table 1). 또한, 분리된 균주의 동정 결과로 확인된 *B. subtilis*는 1960년대 초에 미국의 식품의약국(Food and Drug Administration)이 발행한 의견서에서 GRAS (Generally Recognized As Safe) 균주로 인정한 미생물에서 유래된 물질(효소)로 protease가 이미 안전한 것으로 알려져 있다(Kramer & Gilbert, 1989; Denner & Gillanders, 1996). 따라서, 초정광천수에서 분리한 균주의 식품산업이나 화장품 산업에서의 기능성 소재 개발을 위한 발효 균주로의 사용이나 산업적 활용 측면에 있어 장점이 될 수 있을 것으로 예상되었다.

**생육 특성 분석**

다음으로 분리된 균주의 복합 배지에서의 생육 가능성을 확인했다. 이는 산업적으로 미생물의 균체를 활용하거나 미생물이 생산하는 가수분해 효소들을 활용하기 위해선 미생물의 대량 배양과 같은 공정이 필요하다. 이를 위해 일반적으로 배지 성분의 종류가 단순한 복합 배지에서의 생육이 가능하면 장점이 될 수 있기에 이를 검증하기 위해 3종류의 복합 배지(nutrient agar, Luria-Bertani agar, tryptic soy agar)에서 분리 균주의 생육 가능성과 함께 생육 온도(37°C, 45°C, 50°C)의 특성을 확인했다. 그 결과 Table 2와 Fig. 1에서 나타난 것처럼 사용한 모든 조건의 복합 배지와 일반적인 중온 및 고온의 배양 온도에서 균주의 생육이 확인되었으며, 균주 분리 시 사용한 marine agar (MA) 배지와 유사한 생육이 확인되었다. 하지만 tryptic soy agar (TSA) 배지에서는 균주의 생육이 다른 배지에

Table 1. Identification of a cultured strain isolated from Chojeong mineral water

No	Isolate name	Closed strain	Closed strain number	Similarity (%)
1	LKSU-1	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10	99.87

Table 2. Isolation and characterization of an isolated strain from Chojeong mineral water

Isolate name	Media								
	NA*			LA**			TSA***		
	Temp. (°C)			Temp. (°C)			Temp. (°C)		
	37	45	50	37	45	50	37	45	50
LKSU-1	+ <sup>1)</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+

\*: Nutrient agar, \*\*: Luria-Bertani agar, \*\*\*: Tryptic Soy agar, <sup>1)</sup>: Well growth.

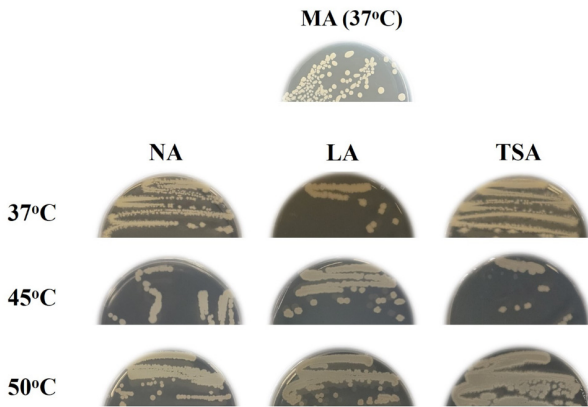


Fig. 1. The result of the cultivation of an isolated strain from Chojeong mineral water on the diverse agar media. MA, NA, LA and TSA indicates the media of marine agar, nutrient agar, Luria-Bertani (LB) agar, and tryptic soy agar, respectively.

비해 퍼져 자라는 생육 특성이 확인되었다. 이는 분리 균주의 대량 배양을 위해 일반적으로 사용하는 복합 배지의 사용 가능성을 확인함과 함께 발효식품에서 분리된 *Bacillus* 속의 균주가 복합 배지 종류에 따라 균체의 생육이나 혈전용해효소(subtilisin) 활성에 차이가 있다는 연구(Park, 2012)처럼 배지 성분에 따른 생육 특성이 다른 것을 나타내기 위해 분리 균주의 대량 배양을 위해선 배지 성분의 최적화와 같은 추가적인 생리학적 특성 분석 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

**복합 배지 종류에 따른 세포외 가수분해효소 생산 활성 분석**

초정리 광천수에서 분리된 균주의 다양한 종류의 복합 배지에서 생육이 가능함을 확인한 결과를 바탕으로 복합 배지 종류에 따른 세포외 가수분해효소(amylase, lipase, protease)들의 활성 검증을 위해 생육 특성 분석 시험에서 사용한 3 종류의 액체 타입의 복합 배지를 사용하여 배양을 실시했다. 이를 통해 화장품과 식품 산업에서 기능성 소재 개발을 위한 발효 균주로의 활용 가능성을 확인할 수 있을 것으로 생각되며 그 결과를 Table 3과 Fig. 2에 나타냈다.

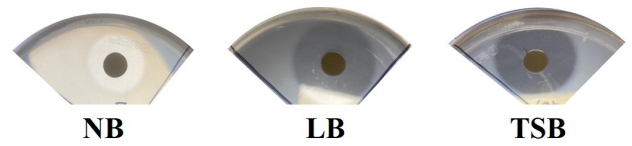


Fig. 2. The activity of extracellular protease. The cultured-media filtered was used to analyze the activity of protease by using nutrient broth (NB), Luria-Bertani (LB) broth, and tryptic soy broth (TSB), respectively, for the cultivation of a LKSU-1 strain.

분리 균주의 경우 amylase와 lipase의 세포외로 분비되는 효소의 활성은 사용한 3 종류의 배지에서는 확인되지 않았다(Table 3). 이와 반대로 세포외로 분비되는 protease 활성은 분리 균주 배양에 사용한 모든 액체 배지에서 확인되었으며, 이 중 LB broth 배지를 사용한 경우 20.8±0.14 mm의 투명한이 측정되어 가장 높은 protease 활성이 확인되었다(Table 3, Fig. 2). Fig. 1에서 나타낸 것처럼 nutrient agar (NA) 배지에서 분리 균주의 양호한 생육이 확인된 것과는 다르게 nutrient broth (NB) 배지를 사용한 경우의 protease 활성은 사용한 복합 배지 중에서 가장 낮은 투명한 크기(17.96±0.08 mm)가 확인되었다. 이는 산업적으로 분리 균주가 생산하는 세포외 가수분해효소를 활용할 경우에 배양 배지 최적화의 필요성이 있음을 시사한다. 예를 들어 분리 균주가 생산하는 세포외 protease의 생산이나 정제 등과 같이 protease를 목적으로 할 경우 질소원인 tryptone과 yeast extract, 무기염인 NaCl만이 배지 구성 성분으로 되어 있는 LB 배지 구성 성분을 기본으로 배양 상등액 대량 생산을 위한 배지 최적화 시험을 실시할 수 있을 것으로 예상되었다.

또한, 분리 균주의 유전체 분석과 배지별 분리 균주에서 발현되는 유전자를 분석하는 전사체 분석을 통해 배지 성분에 따라 특이적으로 유도되는 protease 탐색과 *in vitro* 발현 및 정제, 재조합 단백질을 사용한 PI site 분석 등을 통해 선택적인 아미노산 서열을 가지는 펩타이드의 생산 관련 기초 실험 결과의 확보를 위한 추가적인 연구도 가능할 것으로 예상된다.

**탄소원 자화능 분석**

탄소원 자화 능력은 탄소원 종류에 따른 미생물 대사에 이용하

Table 3. The activity of extracellular hydrolytic enzymes

Isolate name	Size of clear zone (mm)								
	Media								
	NB*			LB**			TSB***		
	Am <sup>1)</sup>	Li <sup>2)</sup>	Pr <sup>3)</sup>	Am	Li	Pr	Am	Li	Pr
LKSU-1	- <sup>4)</sup>	-	17.96±0.08 <sup>5)</sup>	-	-	20.8±0.14	-	-	19.05±0.18

\*: Nutrient broth, \*\*: Luria-Bertani broth, \*\*\*: Tryptic soy broth, <sup>1)</sup>: Amylase, <sup>2)</sup>: Lipase, <sup>3)</sup>: Protease, <sup>4)</sup>: No activity, <sup>5)</sup>: Data are means±standard deviation.



여 균주 증식에 사용할 수 있는 능력을 평가할 수 있다. *Bacillus* 속 균주의 경우 대사에 질소원을 이용하여 아민 화합물 등을 생성함으로써 균주 배양 시 이취를 발생시켜 산업화에 적용 시 문제가 되기도 한다(Cotesini et al., 2018; Yoo et al., 2021).

본 연구 결과에서는 초정광천수로부터 분리된 균주가 3 종류의 복합 배지 중에서 2가지의 질소원과 1가지의 무기염이 배지 성분으로 이루어져 있는 LB 배지를 사용한 경우에서 높은 세포의 protease 활성을 나타냈다. 향후 분리 균주 배양 시 배지 내 질소원을 대체해 사용함으로써 *Bacillus* 속 균주 발효 시 이취를 저감시킬 수 있을 것으로 예상하고 분리 균주가 에너지원으로 활용 가능한 탄소원을 확인했다.

API 50 CH kit (Biomerieux)를 이용해 분리 균주의 탄수화물 대사에 사용할 수 있는 탄소원을 평가한 결과, Table 4와 같이 실험에 사용된 49종류의 탄소원 중 glycerol 외 18 종류의 탄소원을 대사에 사용할 수 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 배지 최적화를 위해 LB 배지 조성 성분 중 질소원인 tryptone을 자화 가능한 탄소원으로 대체한 배지를 사용하여 분리한 균주 배양을 통해 protease 활성 검증 등의 추가적 연구의 필요성이 있을 것으로 판단된다.

본 연구를 통해 국내 충청북도에 위치하고 있는 초정광천수를 사용하여 *B. subtilis*의 1균주를 분리했다. 이는 국내에 존재하는 초정광천수 이외의 유명한 약수로부터 *Bacillus* 속 균주의 분리가 가능한 것을 나타냄과 동시에 국내 생명 자원의 다양성 확보에 있어서도 의미가 있을 것으로 판단된다. 본 연구를 통해 분리된 균주의 생육 특성, 세포의 분비 protease 활성과 탄소원에 따른 자화 능력의 평가를 통해 분리 균주의 청국장과 같은 발효 식품 개발에의 적용이나 천연물 유래 추출물의 발효를 통한 화장품 기능성 소재 개발을 위한 발효 균주로의 산업적 활용 가능성을 검증하였으며 배지 최적화를 위한 기초 연구 자료를 활용할 수 있을 것이다.

## 요약

본 연구는 국내 충청북도 지역에 위치한 초정광천수로부터 *Bacillus* 속 균주를 분리하고자 하였으며 이를 위해 marine agar 배지를 사용하여 *B. subtilis* 균주를 분리했다. 분리 균주의 생육 온도와 복합 배지에서의 생육 가능성을 확인했으며 균주 동정 결과 *B. subtilis*와 가장 유사한 것으로 확인됐다. 다음으로 분리한 균주의 배양액이 화장품 및 식품 관련 산업에 활용 가능한지를 확인하기 위해 세포 외 분해효소 생산 능력을 확인한 결과, LB 배지를 사용해 배양한 경우 높은 protease 활성을 나타내는 것을 확인했다. 또한, 분리 균주의 다양한 탄소원의 이용 능력을 확인한 결과 18 종류의 탄소원을 대사에 사용할 수 있는 것을 확인하였다. 이번 연구는 국내 유전자원 확보와 분리된 균주의 배지 최적화를 위해 기본 연구 결과로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

Table 4. Carbohydrate source utilization of the isolate LKSU-1

Carbohydrate source	Utilization	Carbohydrate source	Utilization
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-arabinose	-	Maltose	+
L-arabinose	+	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	-
D-xylose	-	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	+
$\beta$ -Methyl-D-xylose	-	Melezitose	-
Galactose	-	Raffinose	+
Glucose	+	Starch	+
Fructose	+	Glycogen	+
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-turRanose	-
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	+	D-tagatose	-
Mannitol	+	D-fucose	-
Sorbitol	+	L-fucose	-
$\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	-	D-arabitol	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-	L-arabitol	-
N-Acetyl-Glucosamine	-	Gluconate	-
Amygdalin	-	2-Keto-gluconate	-
Arbutin	+	5-Keto-gluconate	-
Esculin	-		

## ORCID

Myong Ki Kim <https://orcid.org/0000-0002-2956-7006>  
 Yong-Jik Lee <https://orcid.org/0000-0002-0047-2302>

## Conflict of interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## Acknowledgements

This research was funded by the 2024 Seowon University Academic Research Fund.

## Data availability

Upon reasonable request, the datasets of this study can be available from the corresponding author.

## Authorship contribution statement

Conceptualization: Kim MK, Lee YJ.

Data curation: Kim MK, Lee YJ.

Formal analysis: Kim MK, Lee YJ.

Methodology: Kim MK, Lee YJ.

Validation: Kim MK, Lee YJ.

Investigation: Kim MK, Lee YJ.

Writing - original draft: Kim MK, Lee YJ.

Writing - review & editing: Kim MK, Lee YJ.

## Ethics approval

Not applicable.

## References

- Blanco AS, Durive OP, Pérez SB, Montes ZD, Guerrab NP. 2016. Simultaneous production of amylases and proteases by *Bacillus subtilis* in brewery wastes. *Braz. J. Microbiol.* 47: 665-674.
- Contesini FJ, Melo DD, Sato M. 2018. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38: 321-334.
- Cutting SM. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 28: 214-220.
- Denner WHB, Gillanders TGE. 1996. The legislative aspects of the use of industrial enzymes in the manufacture of food and food ingredients. In: *Industrial Enzymology*, 2nd ed. Godfrey T, West S. (eds). The Macmillan Press Ltd. Basingstoke, UK. pp. 397-411.
- Gupta G, Srivastava S, Khare SK, Prakash V. 2014. Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *IJAEB.* 7: 371-380.
- Harwood CR, Cranenburgh R. 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.* 16: 73-79.
- Kim MJ. 2006. A study of the physical and chemical characteristics of spring water. M.S. Kyungwon Univ., Sung-Nam, Korea.
- Kramer JM, Gilbert RJ. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: *Food-borne Bacterial Pathogens*. Doyle MP. (ed). Marcel Dekker, New York, NY, USA. pp. 21-70.
- Latiffi AA, Salleh AB, Rahman RNZRA, Oslan SN, Basri M. 2013. Secretory expression of thermostable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* FI by using native signal peptide and  $\alpha$ -factor secretion signal in *Pichia pastoris*. *Genes Genet. Syst.* 88: 85-91.
- Lee KH, Kim EJ, Choi HS, Park SY, Kim JH, Song J. 2015. Quality characteristics of popped rice Doenjang prepared with *Bacillus subtilis* strains. *Korean J. Food Preserv.* 22: 545-552.
- Lee YJ, Ganbat D, Oh D, Kim H, Jeong GE, Cha IT, Kim SB, Nam G, Jung YJ, Lee SJ. 2022. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from hot springs in Republic of Korea. *Microorganisms.* 10: 2375.
- Park CS. 2012. Effect of tryptic soy broth (TSB) and luria-bertani (LB) medium on production of subtilisin CP-1 from *Bacillus* sp. CP-1 and Characterization of subtilisin CP-1. *J. Life Sci.* 22: 823-827.
- Park KW. 2015. Social change of Chojeong mineral water in Japanese colonial era. *The Japan Modern Assoc. Kor.* 49: 367-388.
- Porres JM, Benito MJ, Lei XG. 2002. Functional expression of keratinase (*kerA*) gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 24: 631-636.
- Qureshi AS, Khushk I, Ali CH, Chisti Y, Ahmad A, Majeed H. 2016. Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 8: 146-151.
- Shin HJ, Bang JH, Choi JH, Kim DW, Ahn CS, Jeong YK, Joo WH. 2012. Probiotic potential of indigenous *Bacillus* sp. BCNU 9028 isolated from Meju. *J. Life Sci.* 22: 605-612.
- Shivasharana CT, Naik GR. 2012. Ecofriendly applications of thermostable alkaline protease produced from a *Bacillus* sp. JB-99 under solid state fermentation. *Int. J. Environ. Sci.* 3: 956-964.
- Yoo H, Yoon Y, Oh S. 2021. Growth media conditions for large-scale fermentation of *Bacillus subtilis* FWC1, *B. amyloliquefaciens* NAAS1, and *Pichia farinosa* NAAS2. *J. Dairy Sci. Biotechnol.* 398: 87-93.
- Yoon HY. 2020. Considering the effect of drinking natural mineral water and consumers' purchasing behavior. *J. Humanit. Soc. Sci.* 11: 1651-1664.
- Zheng Y, Jeong JK, Choi HS, Park KY. 2011. Increased quality characteristics and physiological effects of Chunggukjang fermented with *Bacillus subtilis*-SKm. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 1694-1699.