

## ***Bacillus licheniformis*와 *Lactobacillus casei* 2단 발효에 의해 조제된 효소식품**

강조은 · 문기성\*

한국교통대학교 생명공학과

## **Enzyme Food prepared by Two-step Fermentation with *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus casei***

Jo-Eun Kang and Gi-Seong Moon\*

Dept. of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong, Korea

### **Abstract**

1-B-12 strain presenting  $\alpha$ -amylase and protease activity was isolated from a local *Doenjang* product. The strain was identified as *Bacillus licheniformis* by 16S rRNA gene sequencing and named *B. licheniformis* 1-B-12. A combination of raw materials with unpolished rice (50%), rice bran (30%), and soybean (20%) was best for the enzyme activities. A lactic acid bacterium *Lactobacillus casei* GW140 was applied for co-culture with *B. licheniformis* 1-B-12 aiming at the production of a function-added enzyme food. Two-step fermentation, where 24 h fermentation with *B. licheniformis* 1-B-12 and additional 12 h fermentation with *L. casei* GW140 were performed, resulted in maintenance of both of the enzyme activities and high level of lactic acid bacteria cell count. Furthermore the freeze-dried enzyme food sample was stable at 25°C for 45 d which was the last day we tested.

### **Keywords**

enzyme food, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus casei*, two-step fermentation

## **서 론**

효소(enzyme)는 생명체 내의 화학반응에 관여하는 촉매로서 인체 생리활성에서 가장 중요한 분자 중에 하나이다(김일천, 1993). 그러나 현대사회로 접어들면서 식이 및 생활패턴의 변화로 개개인의 효소활성이 낮아지는 경향이 있으며, 특히 중·장년층으로 갈수록 노화와 더불어 식생활에서 효소의 섭취가 부족한 실정이다(Lee *et al.*, 2015). 이러한 추세를 반영하듯 각종 대중매체를 통해서 효소식품 및 발효 효소액(효소표방식품) 등의 이름으로 검증되지 않은 다양한 제품들이 소개되고 있으나, 효소식품으로서의 품질적 수준은 천차만별이다(Kim *et al.*, 2015). 효소식품은 다양한 효소의 활성을 높이기 위해 곡류, 과일 및 채소로부터 유래된 효소와 이들을 기질로 하여 미생물 발효과정을 통해 그 활성을 강화한다(Lee *et al.*, 2015). 효소식품은 크게 세 가지로 분류할 수 있으며, 60% 이상의 곡류를 포함하는 곡류효소식품,

Received: 6월 4일, 2016

Revised: 6월 17일, 2016

Accepted: 6월 21일, 2016

\*Corresponding author :  
Gi-Seong Moon, Dept. of  
Biotechnology, Korea National  
University of Transportation,  
Jeungpyeong, Korea.  
Tel : 82-43-820-5251,  
Fax : 82-43-820-5272  
E-mail : gsmoon@ut.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

곡물의 배아가 40% 이상 함유된 배아효소식품, 60% 이상의 과채류를 포함하는 과채류효소식품이 있다(박명운, 1995). 또한 유산균과 같은 유익균을 효소식품의 생산에 적용하여 기능성을 강화하려는 시도들이 이루어지고 있다(Kim *et al.*, 2006). 이러한 노력에도 불구하고, 시중에 판매되는 효소식품의 효소활성이 제각각이며, 적용되는 유익균의 기능성을 검증하는 것도 현실적으로 불가능하다. 따라서 효소식품 제조공정의 최적화 및 표준화를 통해 생산되는 효소활성을 극대화하고, 제형의 안정화를 통해서 효소식품의 기능성을 증대시키는 연구가 필요한 시점이다. 본 연구는  $\alpha$ -amylase 및 protease 활성이 우수한 *Bacillus* sp. 균주를 분리하여 효소식품 제조의 스타터 균주로 활용하고, 동시에 유산균 *Lactobacillus casei* 균주와의 혼합배양을 통해 효소활성 및 유산균 생균수 확보의 두 가지 목적을 달성하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 효소( $\alpha$ -amylase, protease) 활성 *Bacillus* sp. 균주 분리

충북 괴산지역의 장류 업체로부터 숙성된 된장을 얻어  $\alpha$ -amylase 및 protease 활성이 우수한 *Bacillus* sp. 균주들을 선발하였다. 즉, 된장 시료 3.5 g을 취하여 펩톤 수(0.1%, w/v) 31.5 mL에 넣고 현탁시켜 십진희석법(ten-fold dilution method)으로 Nutrient agar(Difco, Sparks, MD, USA) 평판배지에 도말한 다음, 형성된 콜로니 430개를 확보하였다. 3분획법에 의한 순수분리 후 5 mL의 Nutrient broth(Difco)에 배양하고, 글리세롤(최종농도 40%)을 첨가하여 -78°C에 보관하였다. 보관된 균주들은 Nutrient broth에서 계대배양한 후 0.5%(w/v) starch와 1%(w/v) skim milk가 각각 포함된 Nutrient agar 평판배지에 점종(toothpicking)하여 하룻밤 배양 후 기질 분해 환(substrate degradation zone)의 크기로 효소활성을 측정하였다.

### 균주 동정

선발된 1-B-12 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법을 이용하였다. Nutrient agar에서 순수 분리한 균주를 국내 생명공학회사(Macrogen, Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였으며, 분석된 서열은 미국립보건원 생명공학정보센터(NCBI; The National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Align Search Tool) 프로그램(blastn)을 이용하여 상동성(homology) 평가 후 동정하였다.

### 효소활성을 위한 최적의 기질 조합 선발

현미분말, 미강분말, 대두분말을 이용하여 단독 혹은 적절한 비율의 혼합기질[현미분말(100 중량%), 미강분말(100 중량%), 대두분말(100 중량%), 현미분말(60 중량%) + 미강분말(40 중량%), 현미분말(50%) + 미강분말(30%) + 대두분말(20%), 현미분말(50%) + 대두분말(50%)]을 만들고, 최종농도 60%로 수분함량을 맞춘 후 100°C에서 1시간 증숙하였다. 실온 냉각 후 1-B-12 균주를 1% 접종하였으며, 30°C에서 72시간 동안 배양하면서 경시적으로(0, 12, 24, 36, 48, 60, 72시간)  $\alpha$ -amylase와 protease의 활성을 측정하였다.

### 혼합배양

선발된 기질 조합을 배지원으로 *B. licheniformis* 1-B-12와 *L. casei* GW140 균주의 혼합배양이 가능한 조건을 확립하였다. 즉, 바실러스와 유산균의 동시배양 혹은 단계배양(2단발효: 1-B-12 접종 > 24 h 배양 > GW140 접종 > 12 h 배양) 방법을 도입하여 효소의 활성이 유지되면서 유산균의 생균수도 확보하는 조건을 확립하였다.

### 효소안정성

앞서 확립한 최적 기질 조합[100g: 현미(50%) + 미강(30%) + 대두(20%)]과 혼합배양(1-B-12 1% 접종 > 24 h 배양 > GW140 1% 접종 > 12 h 추가 배양) 조건으로 효소식품 시료를 제조한 다음, 동결건조하여 10°C와 25°C에서 보관하면서 경시적으로 45일 동안 효소활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

충북 괴산 지역 장류 업체로부터 숙성된 된장을 얻어  $\alpha$ -amylase 및 protease 활성이 우수한 *Bacillus* sp. 균주를 선발한 결과, 1-B-12 균주의 활성이 우수하여 이 균주를 효소식품 생산의 스타터(starter)로 사용하였다(Fig. 1). 16S rRNA 유전자 염기서열에

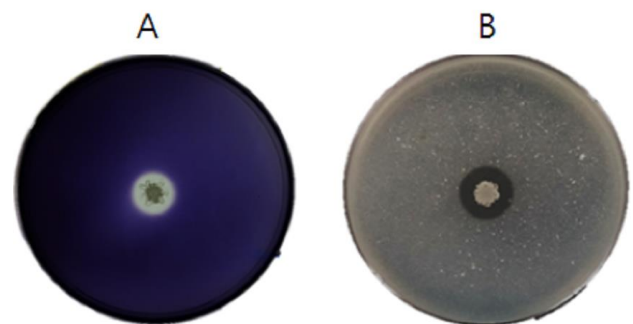
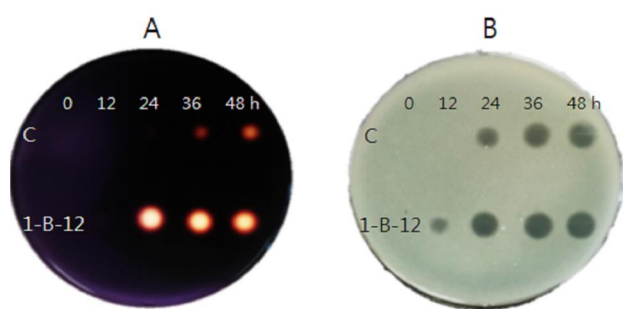
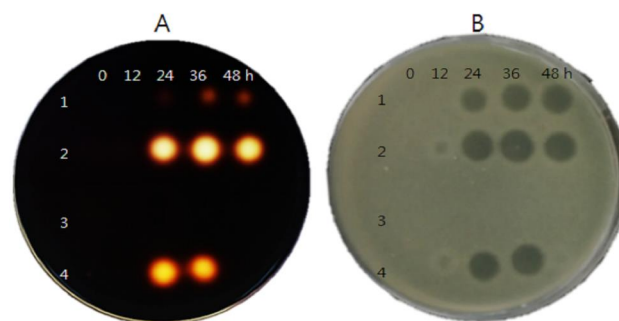


Fig. 1.  $\alpha$ -Amylase (A) and protease (B) activities of 1-B-12 strain.

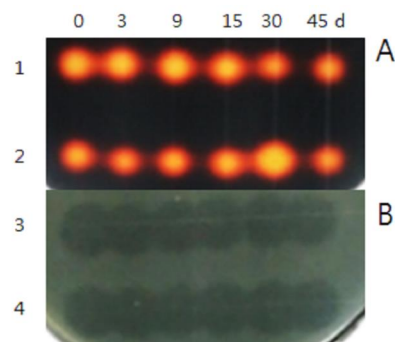
기초한 균주 동정 결과, 1-B-12 균주는 *Bacillus licheniformis* 균주(GenBank accession no., JX203250.1)와 가장 높은 상동성(99%)을 보여 *B. licheniformis* 1-B-12로 명명하였다. *B. licheniformis* 균주들은 상업적으로 중요한 효소들( $\alpha$ -amylase, glucoamylase, protease, pectinase 및 cellulase)의 생산 미생물로 잘 알려져 있다(Ghani et al., 2013). 효소활성 향상을 위한 기질 선별에 있어 현미분말, 미강분말 및 대두분말을 조합하여 배지원으로 한 다음 1-B-12 균주를 1%와 2%로 각각 접종한 후 정시적으로 분석한 결과, 대부분의 조합에서 두 효소의 활성이 관찰되었다(data not shown). 그 중에서도 현미(50%), 미강(30%) 및 대두(20%)의 조합이 최적의 기질조합으로 확인되었다(Fig. 2). 효소의 활성을 유지하면서 동시에 기능성 유산균의 생균수( $10^9$  cfu/g 이상)를 확보하기 위한 *B. licheniformis* 1-B-12 균주와 *L. casei* GW140 균주의 혼합 배양 조건을 확인한 결과, *B. licheniformis* 1-B-12 균주를 접종하여 24 h 배양한 후 *L. casei* GW140 균주를 접종하여 추가적으로 12 h 배양하는 것이 최적의 방법으로 확인되었다(Fig. 3). 바실러스를 유산균과 동시에 접종할 경우, 생육이 억제되어 효율적인 효소의 생산이 불가능하며, 또한 2단 발효의 경우에도 유산균 접종 후 배양시간이 길어지면 효소의 활성이 급격히 떨어지는 것이 관찰되어 *L. casei* GW140 균주 접종 후 12 h 추가 배양이 이상적인 것으로 확인되었다. 이러한 최적의 조건으로 효소식품을 생산한 다음, 동결건조 후 10℃와 25℃에서 보관하면서 정시적으로 45일 동안 효소활성을 측정한 결과, 해당기간 동안 효소활성의 소실이 거의 일어나지 않았다(Fig. 4). 결론적으로  $\alpha$ -amylase 및 protease 활성이 우수한 *B. licheniformis* 1-B-12와 기능성 *L. casei* GW140 균주의 조합으로 생산된 효소식품은 현대인들의 건강 증진에 일조할 수 있는 건강기능소재로서 손색이 없을 것으로 판단된다.



**Fig. 2.**  $\alpha$ -Amylase (A) and protease (B) activities of enzyme food sample, where a combination of raw materials with unpolished rice (50%), rice bran (30%), and soybean (20%) was used, fermented by *Bacillus licheniformis* 1-B-12 strain. C: no addition of starter; 1-B-12: *B. licheniformis* 1-B-12 was inoculated as a starter.



**Fig. 3.**  $\alpha$ -Amylase (A) and protease (B) activities of enzyme food sample, where a combination of raw materials with unpolished rice (50%), rice bran (30%), and soybean (20%) was used, fermented by *Bacillus licheniformis* 1-B-12 strain alone or with *Lactobacillus casei* GW140. 1: Control (no addition of starter); 2: 1-B-12 inoculation; 3: 1-B-12 and GW140 co-inoculation; 4: 1-B-12 inoculation > 24 h fermentation > GW140 inoculation > 12 h fermentation.



**Fig. 4.**  $\alpha$ -Amylase (A) and protease (B) activities of freeze dried enzyme food sample during storage at 10℃ (1, 3) and 25℃ (2, 4), where a combination of raw materials with unpolished rice (50%), rice bran (30%), and soybean (20%) was used, fermented by *Bacillus licheniformis* 1-B-12 strain with *Lactobacillus casei* GW140 (1-B-12 inoculation > 24 h fermentation > GW140 inoculation > 12 h fermentation).

## 요 약

$\alpha$ -Amylase 및 protease 활성을 동시에 가지는 1-B-12 균주를 된장으로부터 분리하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과, *Bacillus licheniformis*로 동정되어 *B. licheniformis* 1-B-12 균주로 명명하였다. 효소활성 측면에서 현미(50%), 미강(30%) 및 대두(20%)의 조합이 최적의 기질 조합 조건으로 확인되었다. 기능성이 부가된 효소식품을 제조하기 위하여 *Lactobacillus casei* GW140 균주를 도입하였는데, *B. licheniformis* 1-B-12 균주와의 혼합배양 조건은 2단발효(*B. licheniformis* 1-B-12 접종 >



24 h 발효 > *L. casei* GW140 접종 > 12 h 추가 발효)가 적합한 것으로 나타났다. 이러한 최적 조건으로 생산된 효소식품을 동결건조하여 25℃에서 보관하였을 때 시험 마지막 날인 45일까지 효소의 활성이 유지되었다.

## 감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2014년도 산학협력 기술개발사업(Grant No. C0191455)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

## References

1. Ghani M, Ansari A, Aman A, Zohra RR, Siddigui NN, and Qader SA. (2013) Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pak. J. Pharm. Sci.* **26**, 691-697.
2. Kim KY, Kim HG, Song BC, and Cha CJ. (2006) Screening for fermentative microorganisms that grow on brown rice with high amylase and protease activities. *Kor. J. Microbiol.* **42**, 160-163.
3. Kim MG, Oh MS, Kang SH, Kim HT, and Yoon MH. (2015) A study on contents of sugar and the activities of amylase in enzyme foods and enzyme-shaped foods. *J. Food Hyg. Saf.* **30**, 359-365.
4. Lee DH, Jung HK, and Hong JH. (2015) Research trends of enzyme food in Korea. *Food Indus. Nutri.* **20**, 18-22.
5. Lee DH, Park HM, and Hong JH. (2015) Physicochemical properties and microencapsulation process of rice fermented with *Bacillus subtilis* CBD2. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 225-231.
6. 김일천 (1993) 효소식품:미생물을 이용한 건강보조식품의 개발 현황과 전망. *미생물과 산업* **19**, 38-40.
7. 박명운 (1995) 건강보조식품(4) -효소식품-. *보건세계* **42**, 16-19.