

Hydrolysis of Non-digestible Components of Soybean Meal by α -Galactosidase from *Bacillus coagulans* NRR1207

Seok Han Ra¹, Gereltuya Renchinkhand², Min-gil Park³, Woan-sub Kim³, Seung-Hee Paik⁴ and Myoung Soo Nam^{2*}

¹Chungmi-Bio Company, Ansung 17528, Korea

²Department of Animal Bio-system Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea

³Major in the Animal Biotechnology, Graduate School of Future Convergence Technology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

⁴Division of Food Service Industry, Yonam College, Cheonan 31005, Korea

Received July 11, 2018 / Revised October 19, 2018 / Accepted October 22, 2018

The fermentation of non-digestible soy meal can convert polysaccharides into many compounds that have a wide variety of biological functions. *Bacillus* strains are capable of hydrolyzing non-digestible saccharides, such as melibiose, raffinose, and stachyose, found in soy meal components. A highly active α -galactosidase (α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22) was isolated from a bacterium in a traditional Korean fermented medicinal herb preparation. The isolate, T2-16, was identified as *Bacillus coagulans* based on its 16S rRNA sequence and biochemical properties, and the strain was named *Bacillus coagulans* NRR-1207. When incubated in 10%(w/v) skim milk, *Bacillus coagulans* NRR1207 caused a decrease in the pH of the culture medium, as well as an increase in titratable acidity and viable cell counts. This strain also showed higher activities of α -galactosidase, β -galactosidase, α -glucosidase, naphthol-AS-BO-phosphohydrolase, and acid phosphatase when compared to other enzymes. It hydrolyzed oligomeric substrates, such as raffinose and stachyose, and liberated galactose, indicating that the *Bacillus coagulans* NRR1207 α -galactosidase hydrolyzed the α -1,6 glycoside linkage. These results suggest that the decreased stachyose and raffinose contents observed in fermented soy meal are due to this α -galactosidase activity. *Bacillus coagulans* NRR1207 therefore has potential probiotic activity and could be utilized in feed manufacturing, as well as for hydrolyzing non-digestible soy meal components.

Key words : α -Galactosidase, *Bacillus coagulans* NRR1207, raffinose, soy meal, stachyose

서 론

미국대두협회에 따르면 미국에서는 옥수수 다음으로 대두가 2번째로 재배면적이 크다[1]. 대두박이란 대두로부터 기름 추출 후 남는 잔여 물질을 말하며, 일반적으로 4가지 생산물로 생산된다(대두분말, 농축대두단백, 대두박, 탈피대두박)[15]. 이중 대두박은 동물사료로 이용되는데, 동물들의 이용 분포를 보면 닭(48%), 돼지(26%), 소(12%), 젖소(9%), 애완동물(2%), 기타(3%)인데, 닭과 돼지 두 동물의 이용성이 74%에 이른다[1]. 대두가 식품과 사료용으로 널리 이용되는 이유는 훌륭한 단백질 공급원인데 비해 대두에 대한 항영양인자, 즉 phytic acid,

올리고당, 트립신 저해제와 같은 물질의 이용에 한계가 있는데, GRAS (generally recognized as safe) 미생물로 발효를 시키면 항영양인자 요소들의 분해에 도움을 주기 때문에 이러한 방법이 이용되고 있다[5, 13]. 인간의 장관 효소에 의해 소장에서 소화되어지지 않는 비소화성 raffinose와 stachyose와 같은 콩과식물의 올리고당은 미생물에 의해 발효되면 장내에서 가스가 많이 차는 원인인 된다[11, 22]. 따라서 콩에서 올리고당 제거는 콩의 소비 수준을 향상시키는 데 중요한 요소가 될 수 있다[14]. 학자들에 따르면 pulse 제품에 probiotic를 추가하면 가스로 인하여 위장관에 불편감을 줄일 수 있다고 보고하였다[11, 20].

Raffinose, stachyose 및 verbascose는 콩과식물 종자에서 상대적으로 높고 흔하게 발견되는 올리고당이다[9]. α -Galactosidase (EC 3.2.1.22)는 raffinose, stachyose 및 verbascose와 같은 올리고당에 존재하는 α -D-galactosidic linkage를 가수분해하여 비소화성 oligosaccharide의 이용성을 증가시킨다[7]. 미생물이 생산하는 α -Galactosidase의 이용성에 관한 연구는 *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 [12], *Aspergillus niger* [16], *Bacillus coagulans* KM-1 [17]이 보고되었다.

*Corresponding author

Tel : +82-42-821-5782, Fax : +82-42-823-2766

E-mail : namsoo@cnu.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.

*Bacillus coagulans*는 유산균 형태의 한 종류로 1915년 Iowa agricultural Experiment Station에서 Hammer에 의해 처음 분리되었고 명명되었다[8]. Gram-positive 간균으로 catalase 양성, 포자형성, motile, 통성혐기성 균으로 최적성장온도는 50°C이고, 30-55°C 범위에서 잘 성장한다. 이 균은 특히, probiotic으로 양돈, 가금, 유우, 육우 등 가축분야에 응용되고 있다. 인간에 존재하는 균으로, 특히 여성의 질의 균총을 향상시키고[19], 과민성장증후군 환자의 복부 통증과 팽만을 향상시키고[10], 병원성 미생물의 침입에 대한 면역반응을 증가시키는 기능이 있다[4].

본 연구의 목적은 *Bacillus coagulans* NRR1207이 생산하는 α -galactosidase에 의해 대두박의 비소화성분을 분해시켜 식품 산업과 가축사료 산업에 이용성을 증대시키기 위함이다. 따라서 한국 전통 약용식물(구기자과 오미자 잎)의 발효물로부터 분리한 *Bacillus coagulans* NRR1207의 발효 특성, α -galactosidase 활성, 비소화성분의 분해에 대해 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

유산 생성 균주의 분리

*Bacillus coagulans*의 분리원은 전통약용식물(구기자과 오미자 잎)의 발효물로부터 분리하였다. 0.1M phosphate buffered saline (0.85% NaCl, pH 7.2) 용액에 10배 희석한 시료를 BCP agar (Bromo Cresol Purple agar, Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)에 도말하여 유산을 생성하는 경우 배지의 색깔이 보라색에서 노란색으로 변하는 균주를 선발하였다. 노란색 colony를 선발하여 MRS broth에 접종 후 37°C에서 24시간 배양한 후, 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 균체를 회수하여 MRS broth와 멸균된 글리세롤 20%를 첨가하고 세포 저장용 tube에 넣고 -80°C에서 보관하면서 이용하였다.

효소 활성 조사

분리된 균주의 효소 활성은 API ZYM enzyme system (version 4.0 of API LAB plus, BioMérieux, Mercy l'Etoile, France)을 사용하여 조사하였다. Incubation box를 준비하고 약 5 ml의 멸균 증류수를 tray에 부어서 수분을 유지하도록 한다. 그리고 스트립을 tray 위에 올려놓는다. 분리된 균주를 액체배지 (0.85% NaCl, Ref 20070, BioMérieux, France)에 현탁하고 표준 탁도 농도 McFarland No 5.0-6.0 standard (BioMérieux, France)를 맞춘다. 각 API ZYM 19 dehydrated chromogenic enzyme substrates에 50 μ l씩 분주 및 현탁 한 다음 37°C에서 4시간 동안 배양한다(version 4.0 of API LAB plus; BioMérieux, France). ZYM A와 ZYM B시약을 각각의 컵에 한 방울씩 떨어뜨린다. ZYM A가 표면의 활성을 증가시켜 ZYM B의 용해를 돕는다. 5분간 기다린 후에 판독한다. 가능하다면 cupule 위의 10 cm 위치에 강력한 빛(1,000 W bulb)을 10초간

쬐이도록 한다. 반응 결과를 읽고 색의 변화 정도에 따라 0-5까지의 값으로 표시할 수 있다. 0은 음성반응, 5는 최대 강도의 반응이고 1, 2, 3, 4는 중간 반응 값이며 3 이상이면 양성으로 판정한다.

분리 균주의 16S rRNA 염기서열

분리된 균은 24시간 동안 MRS 배지에서 배양하고 원심분리하여 1 ml 농축액을 회수했다. Genomic DNA는 Genomic DNA prep Kit (Solgent Co., Ltd, Korea)를 이용하여 분리하였다. 프라이머는 27F (5'-AGAGTTTGATCACTGGCTCAG-3' 및 1492R: 5'-GGTGA CCTGTACGACTT-3')를 사용하였다.

PCR은 PCR machine - Veriti의 2 \times PCR을 사전 혼합해 사용하였다. PCR 조건은 30 cycles로 초기 변성 95°C에서 3분, 94°C에서 20초간 냉각 후 56°C에서 40초간, 72°C에서 40초, 그리고 최종 72°C에서 3분간 연장하였다.

pH, 산도 및 총균수 측정

분리한 균을 MRS broth (Dickinson and Company, MD, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 10%(w/v) skim milk (Seoul Milk Co. Ansan. Korea) 배지에 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24시간 배양 후 적정 산도, pH, 생균수를 측정하였다. 적정 산도는 phenolphthalein을 지시약으로 0.1N NaOH로 pH 8.3까지 중화시키는 데 소비된 0.1N NaOH의 양(ml)을 lactic acid로 환산하여 측정하였으며 pH 측정에는 Orion pH meter (3 star plus, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하였다. 생균수는 배양 시료 1 ml를 무균적으로 채취하여 0.85% NaCl 용액 9 ml에 분주하고 10진 희석법으로 희석하여 MRS agar에 접종한 뒤, 37°C에서 48시간 배양하여 측정하였다[2].

유기산과 유당 분석

분리한 균을 유기산 생성과 유당 이용을 알기 위해서 10% 탈지유에 접종 후 배양하고 원심분리기(Mega 17R, Hanil Science Industrial, Korea)를 이용하여 6,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리 하였다. 분리된 상등액을 0.2 μ m membrane filter를 사용하여 여과한 후 HPLC system (600E Multisolvant Delivery System, Waters Associates, USA)을 이용하여 유당 분해 양상을 분석하였다. 시료는 7725 injector (Rheodyne, USA)를 사용하여 20 μ l를 주입하였고, Detector는 유기산은 Saidi와 Warthesen방법[18]으로 UV Detector (2487 UV detector, Waters Associate., USA), 당은 Refractive Index Detector (2410 RI Detector, Waters Associates., USA)를 사용하였다. Column은 유기산과 유당 분해는 SUPELCOGEL C-610H (38 cm \times 7.8 mm, Sigma-Aldrich Co., USA)을 사용하였고, column의 온도는 Waters Column Heater Module (serial #F98 CHM095M)을 사용하여 40°C를 유지하였다. 이동상은 유기산과 유당 분해는 HPLC용 Water (TEDIA Company Inc.,

USA)와 0.1% Phosphoric acid를 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 실시하였으며 실험에 사용된 표준물질은 Sigma-Aldrich Co. (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 분석에 사용하였다.

발효대두박의 총균수와 비소화성분 분해

대두박(Chungmi Bio Co., Ansung, Korea) 조성은 수분 11.5%, 조단백질 45%, 조지방 1% 이하, 조섬유소 6%로 대두박 40 g에 물 60 g을 첨가하고 *Bacillus coagulans* NRR1207을 스타터로 5%를 접종한 후 비닐봉지로 밀봉하고 50°C 배양기에서 1, 3, 7일 동안 배양 한 후 대두박의 총균수는 앞장에 제시한 방법으로 측정하였고 탄수화물은 분리하여 HPLC (high press liquid chromatography) (LC-6AD, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다. Prontoil 120-5-C18 ACE-EPS column을 사용하였으며, 이동상으로 사용한 용매 A는 CH₃CN:H₂O=20:80, 용매 B는 CH₃CN:H₂O=80:20이었다. 용매는 gradient elution system으로 0분(0% B), 0-10분(5% B), 10-30분(15% B), 30-60분(35% B), 60-70분(50% B), 70-95분(100% B), 95-140분(100% B), 140-14분(0% B), 142-150분(0% B)으로 조절하였다. 전개온도는 40°C로 유지하였고 유속은 1.5 ml/min이었으며, 시료는 0.5 um의 acrodisc syringe filter (Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA)를 통하여 주입하였고, column의 흡광도는 UV detector (Shimadzu, Japan)를 사용하여 205 nm에서 판독하였다. 사용된 비소화성분표준물질은fructose, glucose, melibiose, stachyose, sucrose 및 raffinose (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France)로 이들 성분을 HPLC로 분석하여 얻어진 분리 시간을 근거로 비소화성분의 분해를 확인하였다.

결과 및 고찰

유산 생성 및 α-galactosidase 활성을 갖는 균주 분리

한국전통양식물(구기자와 오미자 잎)의 발효물의 발효액을 BCP agar에 도말하여 유산을 생성하는 경우 배지의 색깔이 보라색에서 노란색으로 변하는 균주를 분리하였다. 유산을 생성하는 균주 19개(T1-1, T1-5, T1-5', T1-6, T1-14, T1-15, T2-2, T2-6, T2-7, T2-9, T2-12, T2-13, T2-13', T2-15, T2-15', T2-16, T2-17, T2-20, T2-22)를 분리하였고 이 중 α-galactosidase 생성 능력이 있는 균주는 Table 1과 같이 T2-16 균주가 가장 활성이 높은 ≥40 nmol 이상의 5를 나타내었고 이외에도 10종의 효소 활성이 있는 것으로 관찰되었다. Alkaline phophatase와 지방 분해에 관여하는 Esterase, Esterase lipase와 펩타이드 가수분해 효소인 Leucine arylamidase, Valine arylamidase에서 5~30 nmol의 활성을 나타내었다. 또한 유당 분해에 관여하는 β-galactosidase 도 가장 높은 40 nmol 이상의 활성을 나타내었고, α-glucosidase도 가장 높은 40 nmol 이상의 활성을 나타내었다. 분리 균주인 T2-16이 비소화성분인 raffinose, stachyose 및 verbascos와 같은 oligosaccharide에 존재하는 α-D-

Table 1. Enzymatic activities of strain T2-16 using API ZYM kit

Enzymes	Strain
Control	0*
Alkaline phophatase	4
Esterase (c4)	4
Esterase lipase (C8)	4
Lipase (c14)	1
Leucine arylamidase	3
Valine arylamidase	1
Cystine arylamidase	0
Trypsin	0
α-chymotrypsin	0
Acid phosphatase	5
Naphtol-AS-BO-phosphohydrolase	5
α-galactosidase	5
β-galactosidase	5
β-glucuronidase	2
α-glucosidase	5
β-glucosidase	2
N-acetyl-β-glucosamidase	1
α-mannosidase	1
α-fucosidase	0

*Quantity of hydrolyzed substrate. 0: 0 nmol, 1: 5 nmol, 2: 10 nmol, 3: 20 nmol, 4: 30 nmol, 5: ≥40 nmol.

galactosidic linkage를 가수분해하여 비소화성 올리고당의 이용성을 높일 것으로 판단되었다.

분리 균주의 16S rRNA 염기서열

T2-16 균주를 Fig. 1과 같이 16S rRNA 염기서열에 기초한

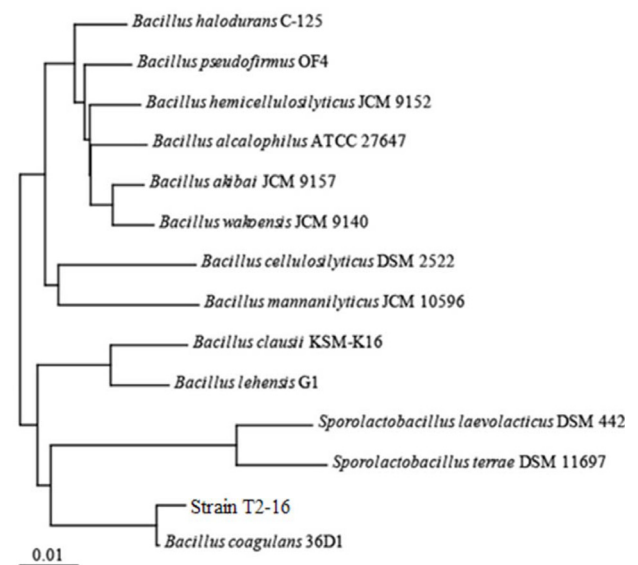


Fig. 1. Phylogenetic tree of based on 16S rDNA sequences showing the phylogenetic relationships among strain T2-16 and other bacteria. Scale length is 0.01.

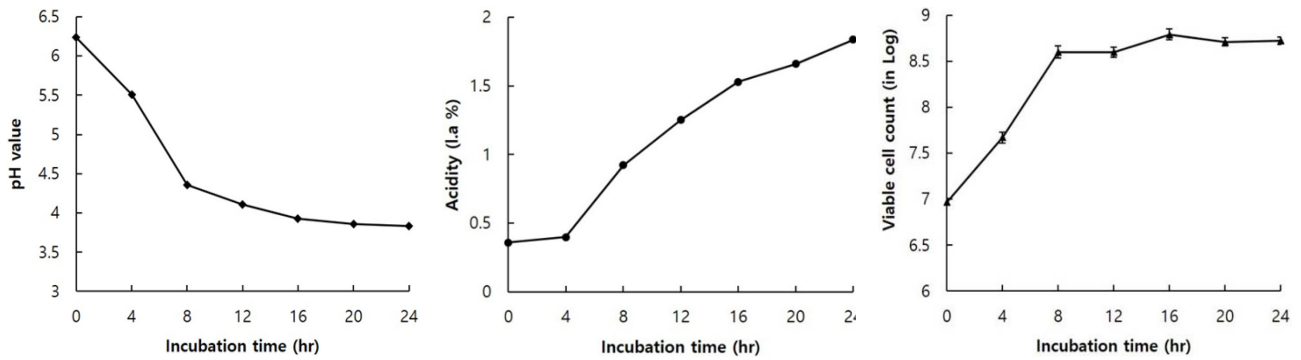


Fig. 2. Kinetic changes of pH, acidity, and viable cell number during cultivation of *B. coagulans* NRR1207 in 10% skim milk for 24 hr at 37°C.

분자계통분류학적 분석에서 *Bacillus coagulans* 표준균주와 99.9%의 가장 높은 상동관계를 보여주어 *Bacillus coagulans* NRR1207으로 명명하였다.

pH, 산도 및 생균수

10% skim milk에 *Bacillus coagulans* NRR1207 스타터로 2%를 접종하여 24시간 배양 후 pH, 산도 및 생균수를 측정 한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. pH는 배양 8시간이 지나면서 4.3까지 급속히 낮아졌고 8시간 이후부터는 완만하게 떨어져 배양 종료시점인 24시간째는 3.9로 나타났다. 산도는 배양 시작 때는 0.18%, 4시간 경과 때는 0.45%로 급속히 증가하여 배양 종료 시점인 24시간째는 1.90%까지 증가하였는데, 이러한 결과는 분리된 *Bacillus coagulans* NRR1207이 배양 과정 중 유기산 생성을 아주 활발하게 하였다. 생균수는 배양 시작 때는 7 log CFU/ml 이었으나 4시간째는 7.5 log CFU/ml, 8시간째

는 8.6 log CFU/ml로 급속히 증가하였고 그 이후에는 완만하게 증가하여 배양 종점인 24시간째는 8.8 log CFU/ml로 나타나 *Bacillus coagulans* NRR1207은 스타터로 이용 가능하다고 판단되었다.

유당 분해와 유기산 생성

10% skim milk에 *Bacillus coagulans* NRR1207 스타터 2%를 접종하여 72시간 배양 후 유당 분해는 Fig. 3, 유기산 생성은 Fig. 4에 나타난 바와 같다. Lactose, galactose, glucose 순으로 분리되는데 10-13분 사이에 lactose, galactose, glucose 가 모두 분리되기 때문에 분리 시간차가 매우 짧기 때문에 3종류 성분의 peak가 겹쳐서 나타났고, 18분에 분리된 성분은 알 수 없는 성분으로 발효가 진행되면서 급격하게 증가하였는데, 우유 단백질 중 당단백질인 k-casein이 발효가 진행되면서 분해되어 펩타이드와 당이 결합된 물질로 사료된다. Lactose는 배양 시

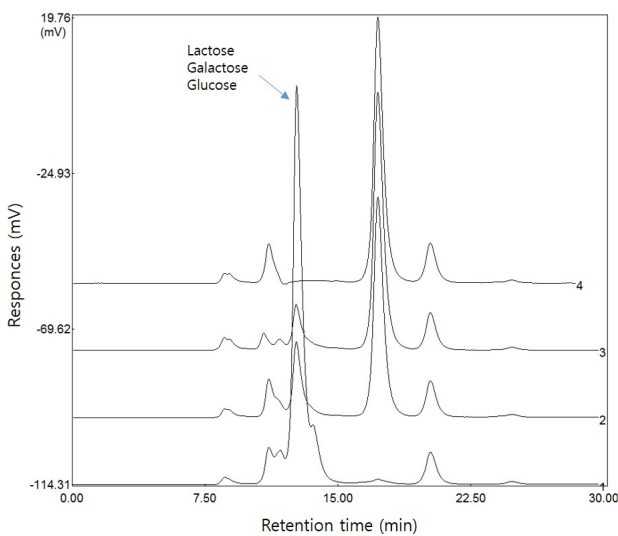


Fig. 3. Decrease and increase in the levels of lactose and galactose during cultivation of *B. coagulans* NRR1207 in 10% skim milk at 37°C for various time periods. Symbols: 1, control; 2, 24 hr; 3, 48 hr; 4, 72 hr.

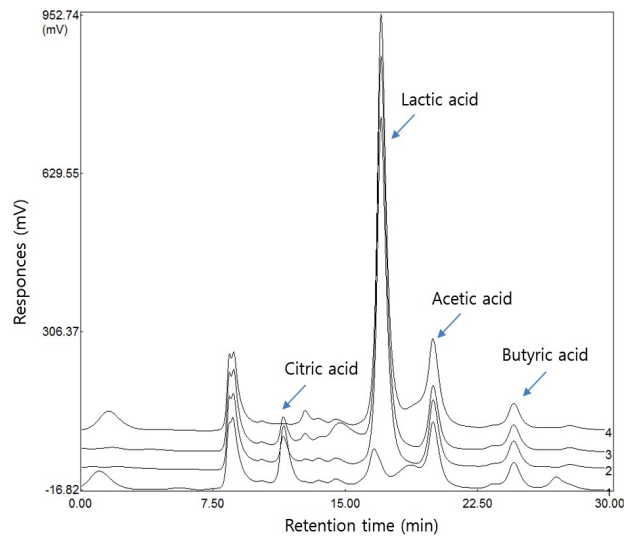


Fig. 4. Kinetic analysis of organic acid productions during cultivation of *B. coagulans* NRR1207 in 10% skim milk at 37°C for various time periods. Symbols: 1, control; 2, 24 hr; 3, 48 hr; 4, 72 hr.

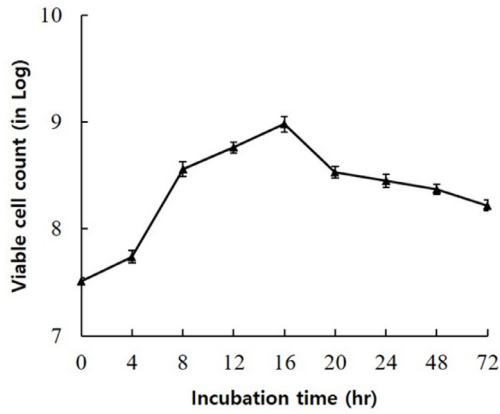


Fig. 5. Growth kinetics of *B. coagulans* NRR1207 during cultivation in soymeal broth for 72 hr at 50°C.

간이 경과함에 따라 glucose와 galactose로 분해되었고, 분해된 glucose와 galactose는 *Bacillus coagulans* NRR1207이 이용

함에 따라 lactose는 점차 감소하여 배양 종점인 72시간에는 모두 고갈되었다.

유기산 중 lactic acid는 배양 전에는 전혀 생성 되지 않았지만 배양 시간이 경과함에 따라 분해된 lactose의 glucose 성분을 *Bacillus coagulans* NRR1207가 이용하면서 lactic acid를 생성하였다. 배양 종점인 72시간에는 많은 양의 유산이 생성됨으로 낮은 pH와 높은 산도를 유지하는데 영향을 미치게 되었다.

발효대두박의 총균수와 비소화성분 분해

Bacillus coagulans NRR1207을 대두박 고상발효 후 배양 시간에 따른 생균수의 변화는 Fig. 5에 나타난 바와 같다. 배양 시작 시에는 7.6 log CFU/ml, 배양 8시간 경과 때는 8.6 log CFU/ml, 배양 16시간 경과 때는 최고에 도달하여 9.0 log CFU/ml이었고, 배양 종점인 72시간에는 8.3 log CFU/ml로 조금 감소하였지만 *Bacillus coagulans* NRR1207은 왕성하게 성

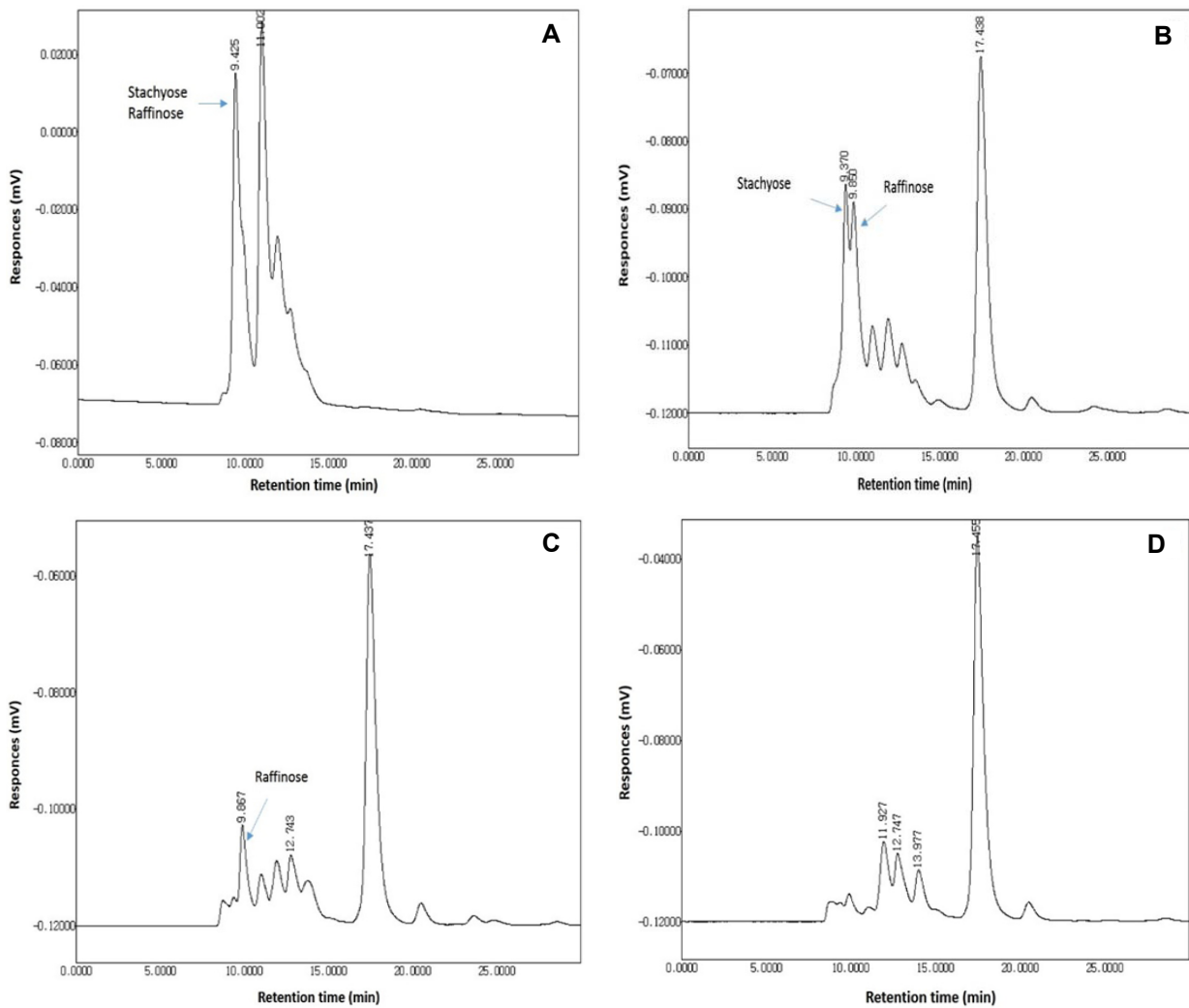


Fig. 6. Kinetic analysis of stachyose and raffinose levels during cultivation of *B. coagulans* NRR1207 in soybean broth at 50°C for various time periods. Symbols: A, control; B, 1 day; C, 3 days; D, 7 days.

장하였다.

탄수화물 표준물질로 fructose, glucose, melibiose, stachyose, sucrose 및 raffinose를 이용해 분리 시간을 얻었고 이를 이용하여 성분을 확인하였다. Fructose는 13.703분에서, glucose는 12.673분에서, melibiose는 10.843분에서, stachyose는 9.333분에서, sucrose는 10.9분에서, raffinose는 9.947분에서 분리되었다. Fig. 6은 대두박 고상발효 전후의 탄수화물의 변화를 보여 주고 있다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 대두박 고상발효 전 시료를 대조군(Fig. 6A)의 경우 stachyose와 raffinose가 분리되지 않고 동시에 하나의 peak에 혼합되어 나타났다. 이는 표준 그래프(data not shown)에 나타난 바와 같이 stachyose와 raffinose의 분리 시간 차이가 거의 없기 때문에 나타날 수도 있다. 고상발효 1일(Fig. 6B) 경과 후에서 stachyose와 raffinose가 분리되면서 peak의 크기도 감소한 대신 galactose peak가 새로이 생성되었고, 고상발효 3일(Fig. 6C)의 경우에는 stachyose peak는 없어졌고 raffinose peak도 1일째에 비해 현저히 낮아졌다. 고상발효 7일(Fig. 6D)에는 stachyose와 raffinose의 peak는 모두 소실되었고, galactose와 fructose가 생성되었음을 알 수 있었다. 이를 통해 대두박에서 비소화성분인 stachyose와 raffinose가 *Bacillus coagulans* NRR1207에 의해 완전히 분해되었음을 알 수 있었다. Nam 등[17]의 연구에 의하면, 멸치에서 분리한 *Bacillus coagulans* KM-1으로 대두박을 48시간 배양하면 α -galactosidase에 의한 비소화성분의 분해가 raffinose는 0.75 mg/100 g에서 0.39 mg/100 g으로, stachyose는 0.49 mg/100 g에서 0.16 mg/100 g으로 감소되었고, saccharose는 0에서 0.42 mg/100 g으로, galactose는 0에서 0.49 mg/100 g으로 생성되었다. 이러한 결과는 본 연구 결과와 유사하였다. 한편, Manzanares 등[16]은 locust bean gum을 정제된 α -galactosidase로 발효시키면 galactose가 생성되고 β -mannanase의 첨가에 의해 생성된 양이 증가하였다고 보고하였다. 또한 α -galactosidase는 melibiose를 가수분해한다[6]. Wheat bran에서 자란 *Aspergillus niger*로 부터 분리 정제된 α -galactosidase와 *Aspergillus niger*로 부터 유래되어 분리 정제된 상업용 효소인 α -galactosidase는 melibiose 뿐만 아니라 다른 galacto-oligosaccharides와 galactomannans를 가수분해한다고 보고하였다[3, 21]. 따라서 *Bacillus coagulans* NRR1207은 대두박의 비소화성분을 분해하는 probiotics로써 이용하여 식품 및 가축 사료의 이용성 증대에 활용이 가능할 것으로 사료된다.

References

- American Soybean Association. Soy States. <http://soystats.com/2012>, accessed 1st May 2012.
- AOAC. 1980. Official methods of analysis of the association official analytical chemists. Washington, D.C.
- Bahl, O. P. and Agrawal, K. M. L. 1969. Glycosidases of *Aspergillus niger*. Purification and characterization of α - and β -galactosidase and β -N-acetylglucosaminidase. *J. Biol. Chem.* **244**, 2970-2978.
- Baron, M. 2009. A patented strain of bacillus coagulans increased immune response to viral challenge. *Postgrad. Med.* **121**, 114-118.
- Chen, L., Madl, R. L., Vadlani, P.V., Li, L. and Wang, W. 2013. Value-added products from soybean: Removal of anti-nutritional factors via bioprocessing. <http://dx.doi.org/10.5772/52993>
- Dey, P. M. and Pridham, J. B. 1972. Biochemistry of α -galactosidases. *Adv. Enzymol.* **36**, 91-130.
- Ganter, C. A., Bock, P., Buckel, P. and Mattes, R. 1988. Production of thermostable, recombinant α -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *J. Biotechnol.* **8**, 301-310.
- Hammer, B. W. 1915. Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. *Iowa Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* **19**, 119-131.
- Henry, R. J. and Saini, H. S. 1989. Characterization of cereal sugars and oligosaccharides. *Cereal Chem.* **66**, 362-365.
- Hun, L. 2009. Bacillus coagulans significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS. *Postgrad. Med.* **121**, 119-124.
- Leblanc, J. G., Ledue-Clier, M., Bensaada, M., de Giori, G. S., Guerekobaya, T., Sesma, F., Juillard, V., Rabot, S. and Piard, J. C. 2008. Ability of *Lactobacillus fermentum* to overcome host α -galactosidase deficiency, as evidenced by reduction of hydrogen excretion in rats consuming soys - galacto-oligosaccharides. *BMC Microbiology* doi: 10.1186/1471-2180-8-22.
- Leder, S., Hartmeier, W. and Marx, S. P. 1999. α -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Current Microbiol.* **38**, 101-106.
- Liyan, C., Ronald, L., Madl, P. V., Vadlani, L. L. and Weiqun, W. 2013. (February, 20th) Value- Added Products from Soybean: Removal of Anti-Nutritional Factors via Bioprocessing, Soybean Hany El-Shemy, Intech Open. doi: 10.5772/ 52993.
- Machaiiah, J. P., Pednekar, M. D. and Thomas, P. 1999. Reduction in flatulence factors in mung beans (vigna radiate) using low-dose gamma-irradiation. *J. Sci. Food Agri.* **7**, 648-652.
- Maeda, H. and Nakamura, A. 2009. Soluble soybean polysaccharide. In: Phillips G. O, Williams, P. A., Handbook of Hydrocolloids (2nd), New York:Woodhead Publishing., 693-709.
- Manzanares, P., de Graaff, L. H. and Visser, J. 1998. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel α -Galactosidase activity. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 383-390.
- Nam, K. H., Jang, M. S., Park, H. Y. and Koneva, E. 2014. Biochemical characterization of α -galactosidase producing thermophilic bacillus coagulans KM-1. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **47**, 516-521.
- Saidi, B. and Warthesen, J. J. 1989. Analysis and stability

- of orotic acid in milk. *J. Dairy Sci.* **72**, 2900-2905.
19. Sanders, M. E., Morelli, L. and Tompkins, T. A. 2003. Spore-formers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehen. Reviews in Food Sci. Food Safety* **2**, 101-110.
 20. Saulnier, D. M., Kolida, S. and Gibson, G. R. 2009. Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 1403-1414.
 21. Somiari, R. I. and Balogh, E. 1995. Properties of and extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 311-316.
 22. Yamaguishi, C. T., Sanada, C. T., Gouvea, P. M., Pandey, A., Woiciechowski, A. L., Parada, J. L. and Soccol, C. R. 2009. Biotechnological process for producing black bean slurry without stachyose. *Food Res. Inter.* **42**, 425-429.

초록 : *Bacillus coagulans* NRR1207이 생산하는 α -galactosidase에 의한 대두박 비소화성분의 가수분해

라석한¹ · 렌친핸드² · 박민길³ · 김완섭³ · 백승희⁴ · 남명수^{2*}

(¹청미바이오㈜, ²충남대학교 동물자원과학부, ³한경대학교 동물생명환경과학과, ⁴연암대학 외식산업계열)

본 연구는 한국전통약용식물(구기자, 오미자 잎)의 발효물로부터 분리한 *Bacillus coagulans* NRR1207의 발효 특성을 파악하고 *Bacillus coagulans* NRR1207의 α -galactosidase의 활성과 이를 통한 대두박의 비소화성분의 분해를 확인하였다. *Bacillus coagulans* NRR1207이 생산하는 효소 중 α -galactosidase, β -galactosidase, α -glucosidase가 가장 높은 40 nmol 이상의 활성을 나타내었다. *Bacillus coagulans* NRR1207의 발효 특성은 10% skim milk에서 배양했을 때, pH는 급속히 감소했고 적정 산도는 1.9%까지 증가했고 생균수도 발효 24시간에 8.8 log CFU/ml로 증가했다. 유당은 배양 72시간째 완전히 고갈되었고 유산 생산 능력도 탁월했다. *Bacillus coagulans* NRR1207을 대두박에 접종 후 배양시간에 따른 생균수의 변화는 배양 시작 시 7.6 log CFU/ml, 배양 16시간에 최고에 도달하여 9.0 log CFU/ml이었고 배양 72시간에 8.3 log CFU/ml로 *Bacillus coagulans* NRR1207이 왕성하게 잘 성장하였다. 대두박의 비소화성분 분해는 *Bacillus coagulans* NRR1207 접종 후 발효 24, 48, 72시간이 경과하면서 이 균이 생산한 α -galactosidase에 의해 비소화성분인 stachyose와 raffinose가 대부분 분해되고 galactose가 생성되었다. 따라서 *Bacillus coagulans* NRR1207은 대두박의 비소화성분을 분해하는 생균제(Probiotics)로써 이용하여 식품 및 가축 사료 이용성 증대에 활용이 가능할 것으로 사료된다.