

발효식품 유래 미생물을 이용한 단백질 분해효소 생산 최적화

소윤상¹ · 조성호² · 김준태² · 김광표^{1,3} · 민경현^{4*} · 서동호^{1,5*}

¹전북대학교 식품공학과, ²재단법인 발효미생물산업진흥원, ³전북대학교 농축산식품융합학과,
⁴전북대학교 약학과, ⁵경희대학교 식품생명공학과

Optimization of Protease Production Using Microorganisms from Fermented Food

Yun-Sang So¹, Sung Ho Cho², Jun Tae Kim², Kwang-Pyo Kim^{1,3},
Kyung Hyun Min^{4*}, and Dong-Ho Seo^{1,5*}

¹Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University

²Microbial Institute for Fermentation Industry

³Department of Agricultural Convergence Technology, Jeonbuk National University

⁴School of Pharmacy and Institute of New Drug Development, Jeonbuk National University

⁵Department of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Biotechnology and Institute of Life Science and Resources, Kyung Hee University

Abstract

Microbial proteases are more economical than plant- and animal-derived proteases due to their ease of production and high activity. This study aimed to optimize the production of proteases from fermentative food-derived microorganisms. Five strains with proteolytic activity among 50 *Bacillus* sp. were first screened. Two strains with high protease activity were identified: *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139 and *Bacillus subtilis* SRCM 104999. SRCM 102139 strain and SRCM 104999 strain had the highest protease activity in 0.8% glucose and 0.3% yeast extract, and in 0.8% starch and 0.1% soy peptone, respectively. The production of protease for two strains was optimized by the Central Composite Design (CCD) under response surface methodology. The optimal conditions for protease production in SRCM 102139 were 0.5% and 0.347%, pH 6.0, for carbon (glucose) and nitrogen (yeast extract springer 0202) sources, respectively, with a predicted value of 0.929 U/mL. Additionally, the optimal conditions for protease production in SRCM 104999 were 0.5% and 0.5%, pH 6.7, for carbon (starch) and nitrogen (soy peptone HSP-349) sources, respectively, with a predicted value of 0.431 U/mL. The actual protease activities of SRCM 102139 and SRCM 104999 under the established conditions were 0.926 U/mL and 0.428 U/mL, respectively, closely matching the predicted values.

Keywords: protease, *Bacillus* sp., fermented food, optimization, response surface methodology

서 론

Protease는 대표적인 단백질 가수분해 효소로 제약, 세계 산업 및 식품 산업 등 다양한 분야에서 폭넓게 이용되고 있다(Hamza, 2017; Singh et al., 2016). 곰팡이, 세균 및 효모와 같은 다양한 미생물로부터 생산되는 protease는 전 세계 효소 시장에서 약 60% 이상을 차지하고 있으며, 효

소활성 및 생산성에 대해 높은 효율을 가지고 있어 산업적 측면에서 매우 유용하다(Razzaq et al., 2019). 특히, 세균성 protease는 식물 및 동물성 protease와 달리 복잡한 발현과정 없이 단순 배양만으로 세포 외 효소로 발현되어 높은 protease 생산에 높은 경제성을 가지고 있다(Supuran et al., 2001). Protease 생산 미생물은 다양한 발효 식품에 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 우리나라의 된장, 간장, 고추장 등과 같은 콩 유래 발효식품은 발효과정 중 *Bacillus* sp.가 생성하는 protease에 의해 단백질이 아미노산 및 펩타이드로 분해되며 단백질 분해 산물로 구수한 맛과 향기에 영향을 주는 것으로 보고되었다(Ali & Bavisetty, 2020; Nam et al., 2012). 또한, 전통 발효식품 유래 미생물들은 안전한 생물자원인 GRAS (generally recognized as safe)로 인정을 받아 오랫동안 식품 및 바이오산업에 안전

*Corresponding author: Kyung Hyun Min, School of Pharmacy and Institute of New Drug Development, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

Tel: +82-63-219-5651; E-mail: khmin1492@jbnu.ac.kr

Dong-Ho Seo, Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

Tel: +82-63-270-2571; E-mail: dhseo@jbnu.ac.kr

Received April 26, 2023; revised May 8, 2023; accepted May 9, 2023

한 생물자원으로 활용이 되고 있다(Hamza, 2017; Jeong & Lee, 2014). 이러한 관점에서 protease의 산업적 생산을 위해서 높은 활성 및 특이성을 가지는 protease 발현 미생물을 전통 식품에서 발굴하며 이를 대량 생산을 위한 배양 기술 연구는 필수적인 연구 분야라고 할 수 있다(Matkawala et al., 2021).

미생물 유래 효소를 산업적으로 활용할 경우, 미생물 성장에 영향을 줄 수 있는 배지 조건인 탄소원, 질소원, pH 등의 조절이 매우 중요하다(Gupta et al., 2002). 특히, 질소원의 경우 크게 동물성 및 식물성 질소원으로 구분되는데 동물성 질소원의 경우 황을 함유하고 있는 아미노산이 풍부할 뿐만 아니라 균 성장에 요구되는 다양한 성장인자를 많이 함유하고 있다(Elisashvili et al., 2008; Kachlishvili et al., 2006). 하지만, 동물성 질소원은 산업적으로 이용하는데 높은 비용 뿐만 아니라 동물 유래 전염병인 광우병 등의 위험성 때문에 최근 식물성 질소원으로 대체되고 있다(Bae et al., 2016). 식물성 질소원은 가격이 저렴할 뿐만 아니라 동물성 성분에 비해 안전성이 높고, 높은 용해성과 열에 대한 안정성을 또한 가지고 있어 미생물 배지 산업에 큰 주목을 받고 있다(Brune et al., 2009). 이와 같은 여러 조건에 대한 최적화 기술은 대표적으로 One Factor At a Time (OFAT)법과 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)이 있다(Singh et al., 2017). OFAT 법은 다른 통계적 방법에 비해 많은 시간이 소모되지만, 효소 생산에 영향을 주는 탄소원과 질소원의 종류 및 농도를 검증하는데 비교적 경제적인 측면을 가지고 있다(Saha & Mazumdar, 2019). 하지만, 여러 변수에 대한 상호작용을 확인하고, 최적 조건을 얻기는 어렵다는 단점을 가지고 있다. 최근, 이를 보완하여 반응표면분석법인 통계적 방법을 활용하여 생산 공정의 최적화 연구는 활발하게 진행되고 있다(Yolme & Jafari, 2017). 반응표면분석법은 각 독립변수들의 복잡한 상호작용을 통계적인 방법을 통해 최소값과 최대값을 예측할 수 있으며, 이를 토대로 실험을 통해 검증하여 최적조건을 확립하는데 효과적인 방법이다(Khuri & Mukhopadhyay, 2010). 특히, 미생물 성장에 영향을 주는 많은 요인들의 상호 관계를 확인하여 효소 생산 배지 최적조건을 확립하는데 유용하게 사용되고 있으며, 고전적인 방법에 비해 간단한 생산공정과 비용 절감 등의 경제적인 효과를 나타내므로, 여러 분야에서 최적조건을 확립하기 위한 방법으로 널리 활용되고 있다(Dey & Dora, 2014; Wejse et al., 2003).

본 연구에서는 전통발효식품 내 분리된 *Bacillus* sp. 균주들 중 높은 protease 활성을 가진 균주를 선발하였으며, OFAT 법을 통해 탄소원 8종, 저렴한 식물성 질소원 9종을 평가하여 최적 배지성분을 선정하고 이에 적정 농도를 설정하여 배양시간에 따른 생산조건을 확인하였다. 최종적으로 선발된 *Bacillus* sp.의 protease 생산을 위한 최적 배지

조건 확립을 위해 탄소원 및 질소원의 농도와 pH 범위를 설정하여 반응표면분석을 수행하였다. 또한, 대량 생산 가능성을 확인하기 위해 pilot scale (3.5 L 발효기)에서 확립된 최적 조건에서의 protease 생산성을 확인하였다.

재료 및 방법

Protease 활성 미생물 선발

본 실험에서 사용한 발효 식품 유래 미생물 *Bacillus* sp. 50종이며 (재)발효미생물산업진흥원(Sunchang, Korea)으로부터 분양 받았다(Table 1). *Bacillus* sp.의 액체 배양은 nutrient broth (Difco, Sparks, MD, U.S.A)에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 진탕 배양하였으며, 전배양 한천 배지는 nutrient agar (Difco, Sparks, MD, U.S.A)를 사용하여 37°C에서 24시간 동안 정지 배양하였다. protease 활성 균주 선별에는 1%의 skim milk가 첨가된 한천 배지(Difco, Sparks, MD, U.S.A)를 사용하였다. 한천 배지에 배양된 50종 *Bacillus* sp. 균주의 단일 콜로니를 무작위로 선별하여 skim milk가 첨가된 한천 배지에 접종한 뒤 37°C에서 24시간 배양 하였다. 배양 후, 생성된 콜로니 대비 투명한 크기를 측정하여 protease 생산 및 활성을 확인하였다.

배지의 탄소원 및 질소원에 따른 protease 생산 확인

선발된 균주의 protease 생산능에 영향을 미치는 영양원을 조사하기 위해, protease 생산 배지 0.5% (w/v) glucose (DAEJUNG Co., Ltd., Siheung, Korea), 0.5% yeast extract (Becton, Dickinson & Co., Paris, France), 0.5% KH_2PO_4 (DAEJUNG Co., Ltd., Siheung, Korea), 0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (DAEJUNG Co., Ltd., Siheung, Korea), 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (DAEJUNG Co., Ltd., Siheung, Korea) pH 7.5를 기본으로 하여 탄소원의 경우 glucose을 fructose, galactose, lactose, maltose, starch, sorbitol (DAEJUNG Co., Ltd., Siheung, Korea)로 각각 같은 농도로 교체하였으며, 식물성 질소원의 경우 yeast extract gistex LS (Gistex LS Powder, DSM, the Netherlands), yeast extract springer 0202 (Bio Springer, Maisons-Alfort, France), yeast extract 751 MG (Procelys, Maisons-Alfort, France), yeast extract FM888 (Angel Yeast Co., Ltd., Yichang, China), potato peptone E210 (Organotechnie S.A.S, La Courneuve, France), soy peptone HSP-349 (Tatua, Morrinsville, New Zealand), soy peptone F (Solabia, Pantin, France), soy peptone FP410 (Angel Yeast Co., Ltd., Yichang, China), yeast peptone FP102 (Angel Yeast Co., Ltd., Yichang, China)로 각각 0.5% 농도로 교체하였다. 이후, protease 생산에 영향을 미친 영양원의 농도를 0.1-1.0% 범위로 나누어 protease 생산을 확인하였다. 모든 실험균은 균주 전배양액(seed culture)을 2% 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배

Table 1. List of fifty *Bacillus* sp. from fermented food

Number	Strains	Number	Strains
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 100731	26	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 102751
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 101352	27	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 102754
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 101368	28	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 102832
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 101405	29	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 102846
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 101439	30	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 102899
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102031	31	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 103752
7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102032	32	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104139
8	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102073	33	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104161
9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102139	34	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104166
10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102672	35	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104384
11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102789	36	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104400
12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102815	37	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104948
13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 103692	38	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104999
14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 104078	39	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 106908
15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 104081	40	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 106917
16	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 104136	41	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 100156
17	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 104466	42	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 101401
18	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 104576	43	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 102045
19	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 104798	44	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 102075
20	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 104942	45	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 102080
21	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 100169	46	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 103608
22	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 100757	47	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 103742
23	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 101407	48	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 104557
24	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 102059	49	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 105004
25	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 102172	50	<i>Bacillus licheniformis</i> SRCM 106858

양액을 10,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

배양시간에 따른 미생물 성장, 효소 생산 및 탄소원 변화 분석
선발된 균주의 배양시간이 protease 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 선발된 영양원 배지에 배양된 균주 2%를 접종한 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 1-2 시간 간격으로 배양액을 회수하여 protease 활성 측정과 미생물 성장을 확인하였다. 미생물 생장은 회수된 배양액을 microplate reader spectrophotometer (SpectroMax iD3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도 600 nm에서 측정하였다. Protease 생산 배지에 사용되는 최적 탄소원인 glucose가 미생물 생육 및 효소생산에 영향을 미치는 요인을 확인하기 위해 High Pressure Anion Exchange Chromatography (HPAEC) (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 통해 이용하였으며, CarboPac™ PA1 컬럼 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 통해 glucose의 양을 정량하였다. α -Amylase 활성은 0.1% soluble starch를 50 mM sodium phosphate pH 7.0에 녹인 후, 기질 용액 0.25 mL과 조효소액 0.25 mL를 37°C에서 20분간 반응시킨 후, DNS 용액 0.5 mL를 혼합하여 100°C에서 10분동안 효소 불활성화를 하였다. 효소 활성(1 U/mL)은 기질인 soluble starch에서 단위시간(min)당 1 μ mol의 glucose를 생산하는 효소량으로 정의하였다.

Protease 효소 활성 측정

Protease 활성 측정은 casein in milk (SHOWA, Chemical CO, Ltd, Japan)을 기질로 하였으며, 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5로 0.65% casein을 용해 시킨 뒤, 다시 pH 7.5로 조절하여 기질 용액으로 사용하였다. 기질 용액 0.5 mL과 조효소액 0.1 mL를 가하고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 정지를 위해 110 mM trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5 mL를 가하고, 37°C에서 30분간 정치하였다. 이후 원심분리하여 침전물을 제거하고 상등액 0.2 mL를 취하였다. 여기에 500 mM Na₂CO₃ (DAEJUNG Co., Ltd, Sliheung, Korea) 0.5 mL과 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Junsei Chemical Co., Ltd, Tokyo, Japan) 0.1 mL를 가하고 37°C에서 30분간 발색시킨 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성(1 U/mL)은 기질인 casein에서 단위시간(min)당 1 μ mol의 tyrosine에 상응하는 유리 아미노산을 생성하는 능력으로 정의하였다.

반응표면분석법 설계

본 연구에서는 protease의 생산에 영향을 줄 수 있는 요인들 중 탄소원, 질소원, pH 3가지를 이용하여 효소 생산을 최적조건을 확립하기 위해 Design Expert 7 (Design Expert 7, Stat-Easy Co., Minneapolis, MN, USA)를 이용하였다. 선행 실험결과를 토대로 탄소원의 농도(X₁), 질소원의 농도(X₂), pH (X₃)를 독립변수로 고정하고, 3개의 수

Table 2. Experimental CCD design of three variable for protease production

Strain	Factor	Levels		
		-1	0	+1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102139	Glucose (% , X ₁)	0.5	0.75	1.0
	Yeast extract springer 0202 (% , X ₂)	0.3	0.55	0.8
	pH (X ₃)	6	7.5	9
<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104999	Starch (% , X ₁)	0.5	0.75	1.0
	Soypeptone HSP-34P (% , X ₂)	0.15	0.325	0.5
	pH (X ₃)	6	7.5	9

준 (-1, 0, +1)으로 설정하였다(Table 2). 이때, pH는 설정된 배지 조성을 완전히 용해시키고 pH meter (DocuClip pH Meter, Sartorius Co., Göttingen, Germany)를 이용하여 1 N HCl이나 1 N NaOH 용액으로 조절하였다. 이는 중심합성계획법(Central Composite Design)을 통해 각각 다른 20개의 실험군을 거쳐 protease 생산을 확인하였으며, 이에 따른 모델 식은 다음과 같다.

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{23} X_2 X_3 + \alpha_{11} X_1^2 + \alpha_{22} X_2^2 + \alpha_{33} X_3^2$$

종속변수 Y는 protease 생산량이며, protease 생산에 영향을 주는 요인들을 각각 X₁, X₂, X₃의 독립변수로 설정하였다.

3.5 L fermenter를 이용한 protease 생산

반응표면분석에 의해 확립된 최적조건 중 protease 생산이 높았던 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139 균주를 통해 protease 대량생산 가능성을 확인하였으며, 이때 5 L 발효기(Biotron Co., Korea)를 이용하여 배양시간에 따른 protease 생산을 확인하였다. 본 배양액은 0.5% (w/v) glucose, 0.347% yeast extract springer 0202, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% MgSO₄·7H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O를 제조 후 1 N NaOH를 이용해 pH 6으로 조절하여 3.5 L 배양액을 제조하였다. 발효기의 종배양은 전배양액 2%를 접종하였으며, 배양온도는 37°C, 교반속도는 200 rpm으로 설정하였으며, 72시간까지 protease 생산성을 확인하였다.

통계 분석

모든 실험은 3회 반복 실험하였으며, 얻은 결과는 SPSS package program (Version 12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였다. 각 실험군의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 One-way ANOVA로 분석 후, Duncan's multiple range test로 비교하였다.

결과 및 고찰

전통 식품 유래 고 활성 protease 생산 균주 선발

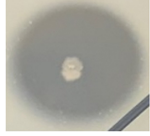
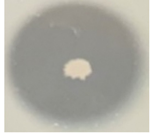
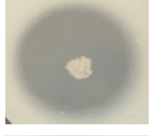

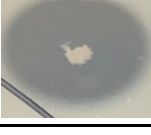
다양한 전통 장류 식품에서 분리된 미생물 중 protease

활성이 존재하는 *Bacillus* sp. 50종 균주를 (재)발효미생물 산업진흥원에서 제공받았다(Table 1). Protease 활성이 높은 균주를 선발하기 위해 skim milk가 첨가된 고체배지에서 배양하였으며 균 집락 주변에 생성되는 투명환으로 protease 활성을 간접적으로 측정하였다(Table 3). 이 때, protease 활성은 균 집락 대비 투명환의 크기의 상대적인 값을 통해 비교하였다. 비교한 결과, 모든 50종 *Bacillus* sp.에서 protease 활성이 나타났으며, 이중 가장 높은 활성이 가진 *Bacillus subtilis* SRCM 102172, *Bacillus subtilis* SRCM 102751, *Bacillus subtilis* SRCM 104999, *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139, *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 104576 5종 균주를 1차로 선발하였다(Table 3). *Bacillus amyloliquefaciens*와 *Bacillus subtilis*는 다양한 연구를 통하여 protease에 대한 생산성이 높은 것으로 알려져 있을 뿐 아니라 산업적으로 안전성이 입증된 생물자원으로 활용되고 있다(Jeong & Lee, 2014). Protease 활성이 가장 높은 *Bacillus amyloliquefaciens* 2종과 *Bacillus subtilis* 3종을 식품 및 바이오산업에 유용한 미생물 자원으로 판단하여 대량생산을 위한 최적조건의 균주로 선정하였다.

탄소원이 protease 생산에 미치는 영향

미생물은 배양배지 내 탄소원의 종류에 따라 성장하는 것이 다르며 이에 따라 생산되는 효소의 양에 영향을 준다(Ruiz et al., 2010). 1차로 선발된 5종 균주를 protease 생산배지의 탄소원을 각각 0.5% (w/v) glucose, fructose, lactose, maltose, galactose, sucrose, starch와 sorbitol로 교체하였다. 선발된 균주를 탄소원이 교체된 생산 배지에 24시간 배양한 후 상등액을 조효소액으로 protease 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 starch에서는 *Bacillus subtilis* SRCM 104999가 1.01±0.01 U/mL로 가장 높은 생산성을 보였으며, 또한 glucose, maltose, sucrose에서 비교적 높은 효소 생산성이 보였다. 이러한 결과는 보고된 *Bacillus subtilis* IB NO. 11와 비슷한 결과를 보여주었다(Lee et al., 2009). *Bacillus subtilis*는 starch를 분해할 수 있는 amylolytic 효소들을 생산하여 다른 *Bacillus* sp.에 비하여 고분자 탄소원인 starch를 잘 이용하는 것으로 추측할 수 있다(Konsula & Liakopoulou-Kyriakides, 2004). 탄

Table 3. Clear zone diameter of protease activity at 1% (w/v) skim milk agar

No.	Strains	Protease activity (Clear zone diameter/Colony diameter)	Clear zone
1	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 102172	6.89±0.92	
2	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 102751	5.80±1.31	
3	<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104999	5.45±0.29	
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 104576	5.43±1.04	
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102139	5.43±0.34	

소원이 glucose일 경우 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139에서 가장 높은 protease 생산성을 보였다. 이와 같은 결과는 *Bacillus amyloliquefaciens* JH-35의 protease 생산에 영향을 미치는 0.5% (w/v) glucose에서 1.06±0.25 U/mL로 유사한 결과를 나타내었다(Yoo et al., 2016). 위 결과를

토대로 낮은 비용으로 높은 protease 생산 최적 조건을 확립하고자 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999를 선정하였으며, 각각 protease 생산이 가장 높았던 glucose와 starch를 선정하였다. 선정된 탄소원들의 첨가 농도에 따른 protease 생산에 미치는 영향을 확인하기 위해 0.1-1.0% (w/v)로 농도를 달리하였으며, *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139는 glucose 0.8%와 1.0%에서 가장 높게 나왔으며(Fig. 2A), *Bacillus subtilis* SRCM 104999는 starch 0.8%와 1.0%에서 가장 높은 protease 생산성을 보였다(Fig. 2B). 각각 높았던 탄소원 농도의 protease 생산성에 대한 통계적으로 유의적인 차이가 나타나지 않아, *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999의 탄소원의 농도는 glucose 0.8% 및 starch 0.8%로 결정하였다. 이와 같은 결과는 동일한 균주에서 glucose와 starch의 농도가 증가함에 따라 protease 생산성이 높아지는 것으로 나타났다 (Yang et al., 2021; Yoon et al., 2006).

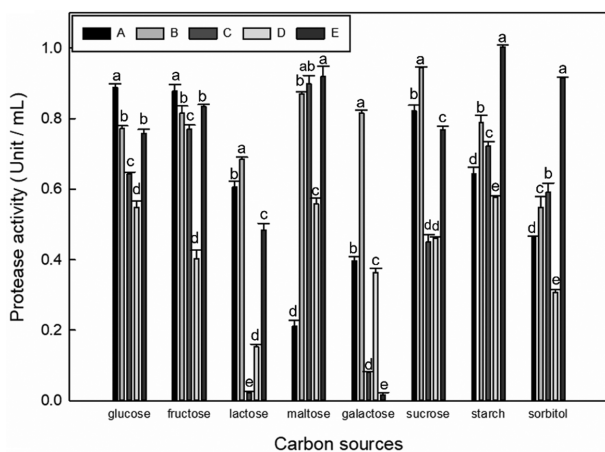


Fig. 1. Effect of eight carbon sources for protease production using *Bacillus* sp. (A: *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139, B: *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 104576, C: *Bacillus subtilis* SRCM 102172, D: *Bacillus subtilis* SRCM 102751, E: *Bacillus subtilis* SRCM 104999) Different letter (a-e) above the bar indicate significant difference for each carbon sources according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

식물성 질소원이 protease 생산에 미치는 영향

선택된 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999 균주의 최적 protease 생산을 위한 식물성 질소원을 확인하기 위해 각각의 최적 탄소원을 0.8%로 고정하였다. 기존 질소원인 Bacto yeast extract을 대조군으로 하여 식물성 질소원 성분인 yeast extract

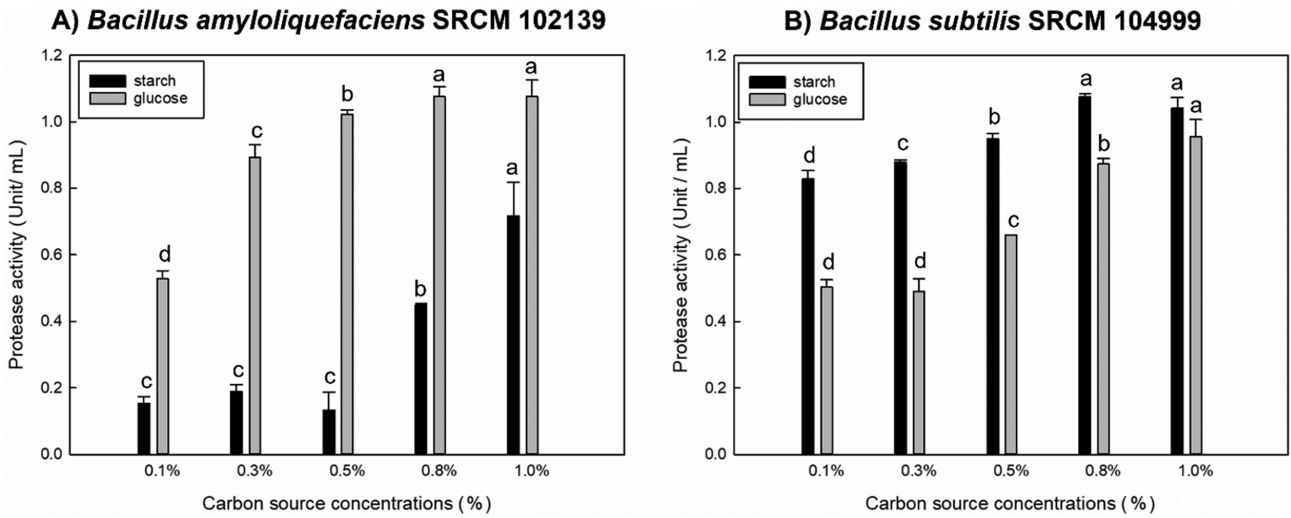


Fig. 2. Effect of selected carbon sources concentration for protease production. Different letter (a-d) above the bar indicate significant difference for each carbon source concentrations according to Duncan’s multiple range test ($p < 0.05$).

gistex LS, yeast extract springer 0202, yeast extract 751 MG, yeast extract FM888, potato peptone E210, soy peptone HSP-349, soy peptone F, soy peptone FP410, yeast peptone FP102을 0.5% (w/v)로 교체한 배지에 배양된 균주를 접종하여 protease 생산성을 확인하였다. 그 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999는 각각 yeast extract springer 0202 (N2)와 soy peptone HSP-349 (N5)에서 대조군보다 높은 값인 1.09 ± 0.07 U/mL와 1.16 ± 0.02 U/mL으로 가장 높은 생산성을 보여, 각각의 최적 식물성 질소원으로 선정하였다 (Fig. 3). *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 경우 glucose와 yeast extract에서 protease 생산성이 높다는 보고된 바 있으며, 다른 *Bacillus* sp. 균주들도 위와 같은 결과를 나타내었다

(Kim et al., 2002; Yang et al., 2021). 또한, 재래식 된장에서 분리된 *Bacillus* sp.의 protease 생산성이 soy peptone을 첨가하였을 때 높은 것으로 보고되었으며, 된장 유래 미생물로 대두 질소원을 활용하여 protease 생산성이 우수할 것으로 판단하였다(Bae & Yoon, 2012). 선정된 질소원들의 첨가 농도에 따른 protease 생산에 미치는 영향을 확인하기 위해 0.1-1.0% (w/v)로 농도를 달리하였으며 각각의 농도에 맞게 Bacto yeast extract를 대조군으로 제조하여 비교하였다. 그 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139는 N2 0.3%와 0.5%에서 가장 높게 나왔으며(Fig. 4A), *Bacillus subtilis* SRCM 104999는 N5 0.1%와 0.3%에서 가장 높은 protease 생산성을 보였다(Fig. 4B). 각각 높았던 질소원 농도 범위에서 protease 생산성에 대한 통계적으

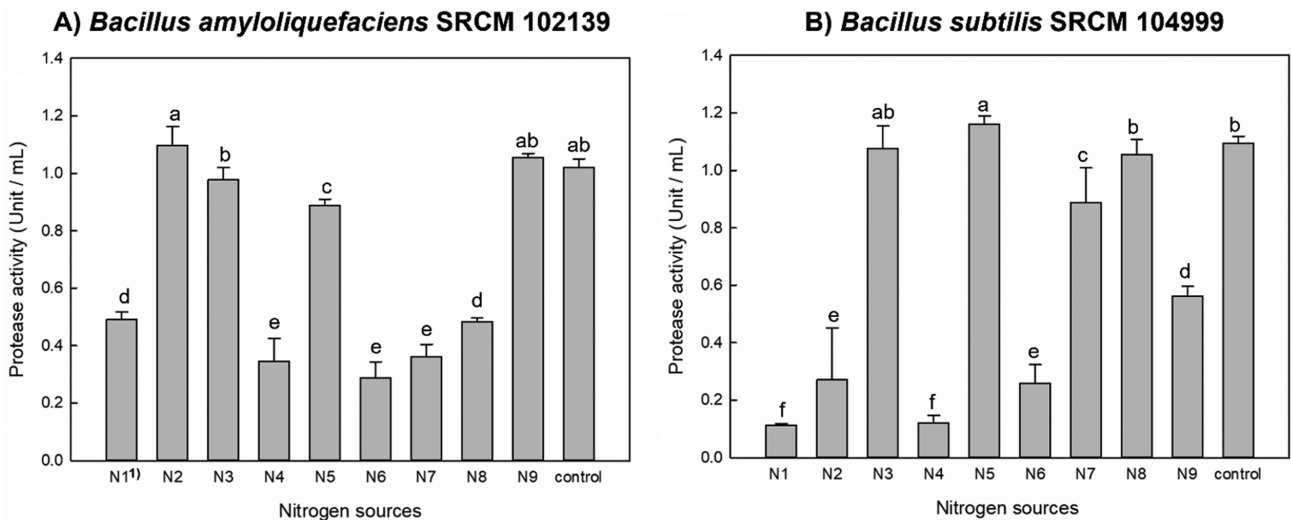


Fig. 3. Effect of non-animal nitrogen sources for protease production. Different letter (a-f) above the bar indicate significant difference according to Duncan’s multiple range test ($p < 0.05$).

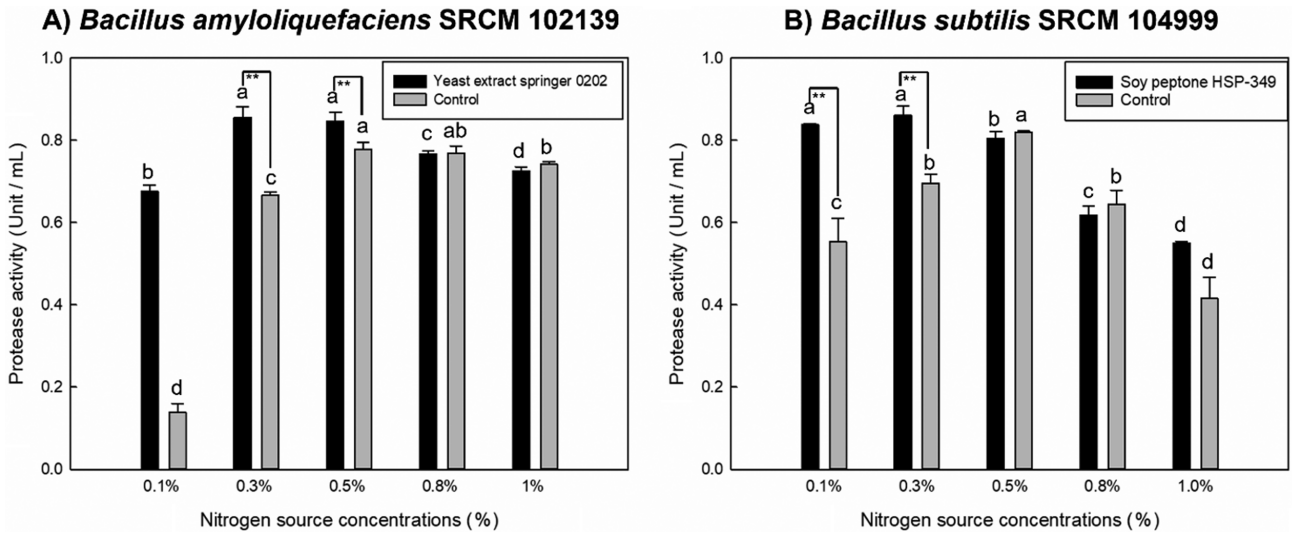


Fig. 4. Effect of selected non-animal nitrogen sources concentration for protease production. Different letter (a-d) above the bar indicate significant difference for each nitrogen source concentrations according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$) and ** indicate significant difference between nitrogen source and control by t-test ($p < 0.05$).

로 유의적인 차이가 보이지 않아, *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999의 질소원의 농도는 N2 0.3% 및 N5 0.1%로 결정하였다. 이는 기존 연구에서 일정량 이상의 질소원의 농도가 첨가되었을 때, protease 생산이 억제됨이 나타났기 때문이다(Yoon & Shin, 2010). 비록 된장 유래 *Bacillus licheniformis* 균주는 1.5% soypeptone에서 가장 높은 protease 생산성을 보였지만, 본 연구결과는 산업적 관점에서 0.1%의 낮은 식물성 질소원 성분 농도로 배지의 원가를 절감할 뿐만 아니라 protease를 고생산을 할 수 있음을 의미한다(Bae & Yoon, 2012).

배양시간에 따른 미생물 성장, 효소생산

Bacillus amyloliquefaciens SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999의 선정된 각각의 탄소원 및 질소원의 농도를 사용하여 배양시간에 따른 protease 생산성과 균생장의 관계를 확인하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139는 배양시간 8-14시간 사이에서 가장 높은 생산성을 보였으며, 14시간 이후 protease 생산이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 5A). 이는 protease가 자가소화 현상이 일어나 효소활성이 강할수록 이와 같은 현상이 일어나는 것으로 추측할 수 있으며, 효소 최대 생산 시점이 exponential phase와 반드시 일치하지 않음을 보고하였다(Lim et al., 2000). 또한, 균생장은 7시간부터 급격히 감소하다가 12시간부터 다시 급격히 증가되는 경향을 확인하였다(Fig. 5A). 이는 탄소원인 포도당의 소모량을 확인하였을 때, 12시간 전에는 포도당의 소모가 빠르지만 12시간 이후부터 소모가 느려지는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 초기 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주는 protease 생산

하는데 glucose을 활용하는 것을 의미한다(Kole et al., 1988). 12시간 이후, SRCM102139의 세포 성장이 급격히 증가하였는데, 이는 생산된 protease 등이 배지 성분들과 반응하여 생성되는 물질에 의해서 나타난 현상으로 추측된

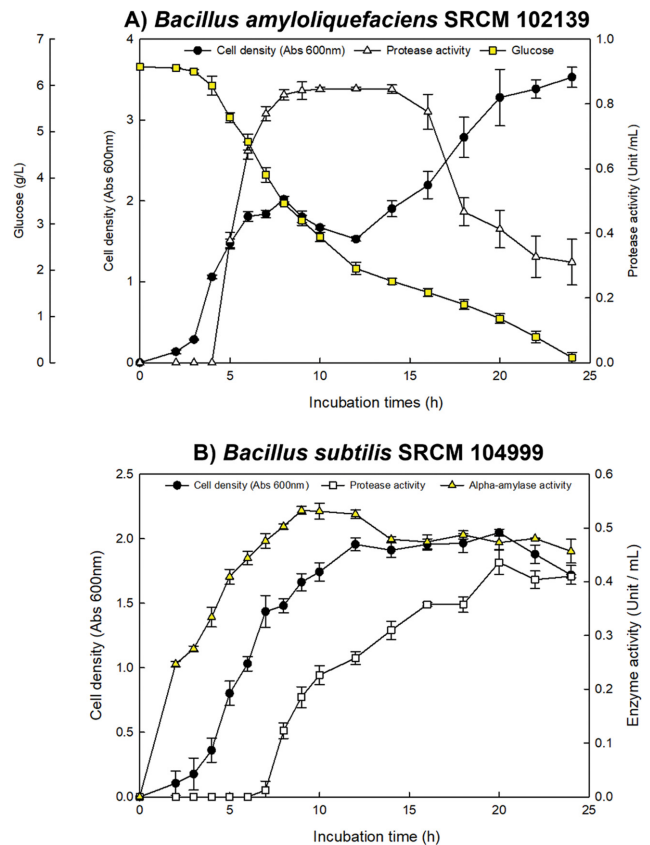


Fig. 5. Effect of incubation times for protease production.

다(Beg et al., 2002). *Bacillus subtilis* SRCM 104999는 20-24시간에서 가장 높은 protease 생산성을 보였으며, 균의 성장과 비슷한 경향으로 나타났다(Fig. 5B). *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139에 비해 생산 속도가 현저

히 낮은 것을 확인되었으며, 이는 α -amylase 생산을 확인해본 결과 2시간부터 생산되어 탄소원인 starch를 균주로부터 분비되는 α -amylase가 직접 분해하여 영양성분을 제공하기 때문에 판단된다(Kim et al., 2002).

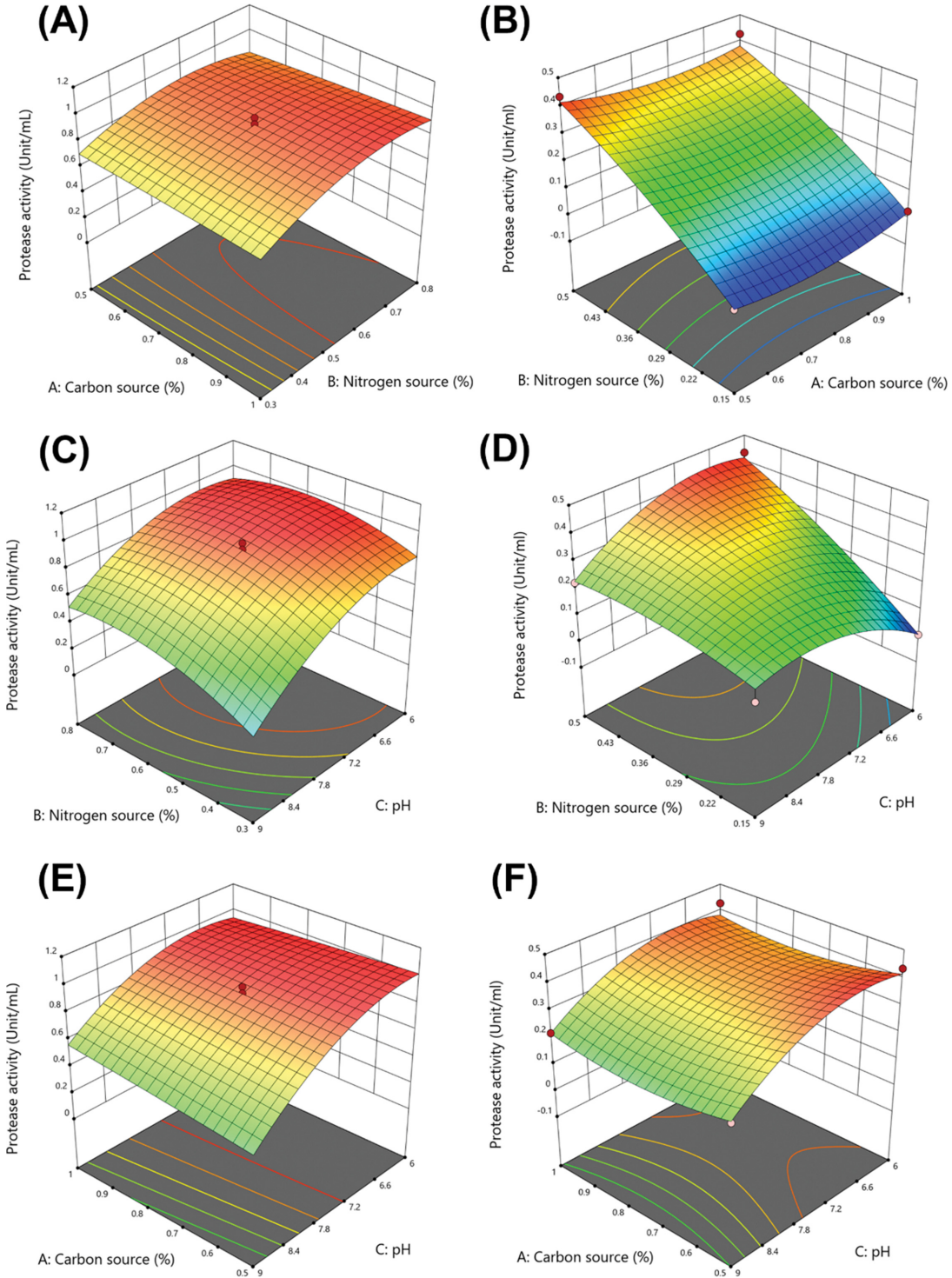


Fig. 6. The 3D response surface graph of protease production as predicted by quadratic model and indicated the effect of two independent variable on protease production. A, C, E: *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139, B, D, F: *Bacillus subtilis* SRCM 104999, A and B: carbon and nitrogen source, C and D: Nitrogen source and pH, E and F: Carbon source and pH.

Table 4. Optimal conditions of protease production for *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139 and *Bacillus subtilis* SRCM 104999

Strains	Carbon source ¹⁾ (%)	Nitrogen source ²⁾ (%)	pH	Calculated value (U/mL)	Experimental value (U/mL)	Error (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM 102139	0.5	0.347	6	0.929	0.926±0.01	0.33
<i>Bacillus subtilis</i> SRCM 104999	0.5	0.5	6.7	0.431	0.428±0.06	0.78

¹⁾*Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139: glucose, *Bacillus subtilis* SRCM 104999: starch

²⁾*Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139: yeast extract springer 0202, *Bacillus subtilis* SRCM 104999: soypeptone HSP-349

반응표면분석을 이용한 protease 생산 배지 최적조건 확립

Bacillus amyloliquefaciens SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999 균주의 protease 생산을 위한 배지 조성의 최적 조건을 확립하기 위해 Central Composite Design (CCD)를 이용하여 실험을 설계하였다. 위 결과를 토대로 각 균주의 탄소원 및 질소원의 농도와 pH를 각각 중심값으로부터 저농도와 고농도 수준으로 하여 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139는 탄소원(glucose)은 0.75±0.25% (w/v), 질소원(yeast extract springer 0202)은 0.55±0.25% (w/v), pH 7.5±1.5로 설정하였으며, *Bacillus subtilis* SRCM 104999 균주는 탄소원(starch)은 0.75±0.25% (w/v), 질소원(soypeptone HSP-349)은 0.325±0.25% (w/v), pH 7.5±1.5로 설정하였다. CCD 실험 설계에 따른 각 20개 실험군의 종속변수인 protease 생산량(Y, protease U/mL)에 미치는 독립변수의 영향을 3D surface plot으로 나타내었다 (Fig. 6). *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139 균주는 설정한 범위 내에서 pH 증가함에 따라 protease 생산량이 감소되는 경향을 보였으며, 질소원인 yeast extract springer 0202가 증가함에 따라 protease 생산량이 증가되는 경향이 보이지만, 탄소원인 glucose의 농도는 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 6A, C, E). 이 결과는 Fig. 5에서의 배양시간의 한 시점에서부터 균의 성장이 급격히 증가하는 것이 질소원에 영향임을 추측해볼 수 있다. *Bacillus subtilis* SRCM 104999 균주는 pH 변화에 따라 탄소원과 질소원의 영향을 크게 받는 것으로 나타났으며(Fig. 6B, D, F), 탄소원인 starch의 농도가 감소함에 따라 protease 생산량이 증가하는 반면, 질소원인 soypeptone HSP-349는 증가함에 따라 protease 생산이 증가되는 경향을 나타내었다. 이를 기반으로 하여 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139는 0.5% (w/v) glucose, 0.347% (w/v) yeast extract springer 0202, pH 6의 최적조건이 예측되었으며, *Bacillus subtilis* SRCM 104999는 0.5% (w/v) starch, 0.5% (w/v) soypeptone HSP-349, pH 6.7의 최적 조건으로 예측되었다. 특히, 두 균주의 최적 조건의 배지 pH는 상대적으로 낮은 범위에서 protease 생산 최적 조건을 가졌으며, 선행연구결과에 따르면 콩 발효식품에서 분리된 *Bacillus subtilis* strain 38가 pH 6.5에서 최적의 pH로 나타났으며, 이러한 배지 pH의 영향은 세포막을 통한 여러 영양성분의 전달 및 효소 생산 과정에 큰 영향을 준 것으로 사료된다(Chantawannakul et

al., 2002; Sharma et al., 2017). 반응표면분석을 통해 얻어진 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999의 protease 생산 배지 최적조건을 검증하기 위해 직접 배지를 제조하고, 각 균주를 배양한 후 protease 생산량을 측정하였다. 각 최적배지에서 반복 수행한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139는 0.926±0.01 U/mL로 CCD로부터 얻어진 예측값인 0.929 U/mL과 0.33% 차이를 보였으며, *Bacillus subtilis* SRCM 104999는 0.428±0.06 U/mL로 예측값인 0.431 U/mL과 0.78% 차이가 나타났다(Table 4). 두 균주 모두 1%미만의 오차범위로 CCD를 통한 최적조건이 신뢰할 수 있음을 확인하였다.

Pilot scale 발효를 통한 대량 생산 가능성 확인

Protease 생산이 높았던 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139를 통해 3.5 L pilot scale 발효를 통하여 확립된 최적 배지 조성에서 대량 생산 가능성을 확인하였다. 최적조건의 protease 생산배지에 전배양액 2% 접종 후 배양시간에 따라 효소 생산성을 확인하였다. 그 결과 Fig. 7과 같이 3.5 L 발효기의 protease 최대 생산 시점은 15시간에서 0.736±0.03 U/mL으로 가장 높은 protease 생산성을 보여주었다. Fig. 5에서 protease 최대 생산 시점과 비슷한 경향을 보였으나 Table 4의 최적조건의 실제 값에 비해 protease

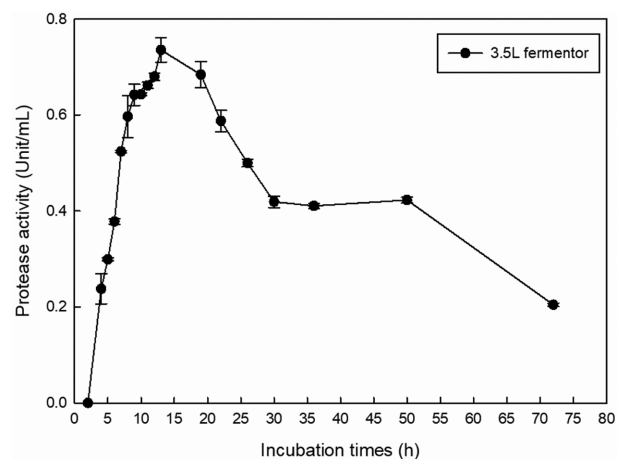


Fig. 7. Mass production of protease at optimal condition for *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139 using 3.5 L fermenter.

생산성이 0.19 U/mL 낮아짐이 확인되었다. 이는 배양조건인 회전속도 및 용존산소 조절 등의 영향을 받은 것으로 판단된다(Gupta et al., 2012). 하지만, 확립된 최적 조건은 부피를 35배 증가하여도 protease 생산성에 유의적 영향을 주지 않는다고 판단되며 이는 확립된 최적 조건으로 대량 생산이 가능함을 확인하였다.

요 약

전통 발효식품에서 분리된 50 *Bacillus* sp. 중 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999의 protease 생산량을 증가시키기 위해 OFAT 법을 통해 탄소원과 식물성 질소원을 선정하였으며, 이후 반응표면분석법을 통해 protease 최대 생산 배지의 최적조건을 확립하였다. 탄소원, 식물성 질소원의 배지성분 및 배양시간이 protease 생산에 미치는 영향을 확인해본 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139는 0.8% glucose와 0.3% yeast extract springer 0202 배지 조성에서 8-14시간에 가장 높은 protease 생산성을 보였으며, *Bacillus subtilis* SRCM 104999는 0.8% starch와 0.1% soypeptone HSP-349 배지 조성에서 20-24시간에 가장 높은 protease 생산성을 보였다. 이는 탄소원의 영향으로 protease 생산 속도의 차이가 보이는 것으로 판단된다. 이 후, 반응표면분석을 통해 최적 조건은 central composite design (CCD)로 실험을 설계하였으며, 실험 모델에 대한 최적 조건 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139는 0.5% glucose, 0.347% yeast extract springer 0202, pH 6.0이며, *Bacillus subtilis* SRCM 104999는 0.5% starch, 0.5% soypeptone HSP-349, pH 6.7로 예측되었다. 이 때, *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139와 *Bacillus subtilis* SRCM 104999의 최적 조건에서 protease 생산량은 각각 0.929 U/mL과 0.431 U/mL로 예측되었으며, 이를 검증해본 결과 0.926±0.01 U/mL과 0.428±0.06 U/mL으로 protease 생산 최적조건이 신뢰할 수 있음을 확인하였다. 최종적으로, 대량생산 가능성을 확인하기 위해 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 102139로 3.5 L pilot scale로 배양시간에 따른 protease 생산량을 확인해본 결과 3.5 L pilot scale에서 0.736±0.03 U/mL로 배양시간 15시간에서 가장 높은 protease 생산성을 보였으며, 비록 flask scale의 최적조건의 실제 값에 비해 protease 생산성이 0.19 U/mL 낮은 생산성이 보였지만, 배지 부피가 35배가 증가하여도 protease 생산에 유의적 영향을 미치지 않았다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구사업(과제번호 PJ017093)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

References

- Ali AMM, Bavisetty SCB. 2020. Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: a comprehensive review. *Int. J. Biol. Macromol.* 163: 1498-1517.
- Bae HA, Lee DH, Hurh BS. 2016. Development of the broth for fermented food and beverage. *Food Industry and Nutrition.* 212: 36-39.
- Bae YE, Yoon KH. 2012. Production and characterization of thermostable protease from *Bacillus licheniformis* isolated from Korean traditional soybean paste. *Korean J. Microbiol.* 484: 298-304.
- Beg QK, Saxena R, Gupta R. 2002. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Process Biochem.* 3710: 1103-1109.
- Brune D, Lundquist T, Benemann J. 2009. Microalgal biomass for greenhouse gas reductions: potential for replacement of fossil fuels and animal feeds. *J. Environ. Eng. (New York).* 13511: 1136-1144.
- Chantawannakul P, Oncharoen A, Klanbut K, Chukeatirote E, Lumyong S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Sci. Asia.* 284: 241-245.
- Dey SS, Dora KC. 2014. Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *J. Food Sci. Technol.* 51: 16-24.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M. 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3511: 1531-1538.
- Gupta R, Beg Q, Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 15-32.
- Gupta RK, Prasad D, Sathesh J, Naidu RB, Kamini NR, Palanivel S, Gowthaman MK. 2012. Scale-up of an alkaline protease from *Bacillus pumilus* MTCC 7514 utilizing fish meal as a sole source of nutrients. *J. Microbiol. Biotechnol.* 229: 1230-1236.
- Hamza TA. 2017. Bacterial protease enzyme: safe and good alternative for industrial and commercial use. *Int. J. Chem. Biomol. Sci.* 31: 1-0.
- Jeong DW, Lee JH. 2014. Safety assessment of starters for traditional Korean fermented foods. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 421: 1-10.
- Kachlishvili E, Penninckx MJ, Tsiklauri N, Elisashvili V. 2006. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 391-397.
- Khuri AI, Mukhopadhyay S. 2010. Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics.* 22: 128-149.
- Kim KP, Kim NH, Rhee CH, Woo CJ, Bae DH. 2002. Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 315: 754-759.
- Kole M, Draper I, Gerson DF. 1988. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 413:

- 197-206.
- Konsula Z, Liakopoulou-Kyriakides M. 2004. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* 39(11): 1745-1749.
- Lee MH, Lee KM, Choi YJ, Baek YS. 2009. Isolation, production, and characterization of protease from *Bacillus subtilis* IB No. 11. *J. Anim. Sci. Technol.* 51(6): 527-536.
- Lim SI, Kim HK, Yoo JY. 2000. Characteristics of protease produced by *Bacillus subtilis* PCA 20-3 isolated from Korean traditional meju. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32(1): 154-160.
- Matkawala F, Nighojkar S, Kumar A, Nighojkar A. 2021. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 37: 1-12.
- Nam YD, Yi SH, Lim SI. 2012. Bacterial diversity of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing. *Food Control.* 28(1): 135-142.
- Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, Ashraf M. 2019. Microbial proteases applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7: 110.
- Ruiz B, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. 2010. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol.* 36(2): 146-167.
- Saha SP, Mazumdar D. 2019. Optimization of process parameter for alpha-amylase produced by *Bacillus cereus* amy3 using one factor at a time (OFAT) and central composite rotatable (CCRD) design based response surface methodology (RSM). *Biocatal Agric Biotechnol.* 19: 101168.
- Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A. 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *J. Genet Eng. Biotechnol.* 15(1): 115-126.
- Singh R, Mittal A, Kumar M, Mehta PK. 2016. Microbial proteases in commercial applications. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 43: 365-374.
- Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi C. 2017. Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Front Microbiol.* 7: 2087.
- Supuran CT, Scozzafava A, Mastrolorenzo A. 2001. Bacterial proteases: current therapeutic use and future prospects for the development of new antibiotics. *Expert. Opin Ther. Pat.* 11(2): 221-259.
- Wejse PL, Ingvorsen K, Mortensen KK. 2003. Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.* 32(6): 721-727.
- Yang HG, Ha G, Ryu MS, Park SW, Jeong HJ, Yang HJ, Jeong DY. 2021. Optimization of medium to improve protease production using response surface methodology by *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM115785. *J. Life Sci.* 31(8): 761-770.
- Yolmeh M, Jafari SM. 2017. Applications of response surface methodology in the food industry processes. *Food Bioproc. Tech.* 10(3): 413-433.
- Yoo JH, Joo JH, Kim SG, Jang IH. 2016. Isolation and characterization of protease producing *B. amyloliquefaciens* JH-35 from food waste. *Korean J. Environ. Agric.* 35(4): 294-301.
- Yoon KH, Lee MS, Park BW, Park YH, Kim HI, Kim JH, Kim MS. 2006. Enzyme production of a protease-producing strain, *Bacillus* sp SH-8 isolated from insect-eating plant. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 34(4): 323-328.
- Yoon KH, Shin HY. 2010. Medium optimization for the protease production by *Bacillus licheniformis* isolated from Cheonggukjang. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 38(4): 385-390.

Author Information

- 소윤상:** 전북대학교 식품공학과 박사과정
조성호: (재)발효미생물산업진흥원 경영전략부장
김준태: (재)발효미생물산업진흥원 연구원
김광표: 전북대학교 식품공학과 교수
민경현: 전북대학교 약학과 조교수
서동호: 전북대학교 식품공학과 부교수/
 경희대학교 식품생명공학과 연구교수