

Research Article

α -Amylase와 Protease 효소 활성을 가진 *Bacillus subtilis* 균주를 이용한 기능성 소재 개발

이재혁 · 문기성*

한국교통대학교 생명공학전공

Development of Functional Material by Using *Bacillus subtilis* Harboring α -Amylase and Protease Enzyme Activity

Jae-Hyuk Lee and Gi-Seong Moon*

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Received: Dec. 11, 2023

Accepted: Dec. 20, 2023

*Corresponding author :

Gi-Seong Moon

Department of Biotechnology,
Korea National University of
Transportation, Jeungpyeong
27909, Republic of Korea.

Tel: +82-43-820-5251,

Fax: +82-43-820-5272,

E-mail: gsmoon@ut.ac.kr

ORCID

Jae-Hyuk Lee

<https://orcid.org/0009-0006-4294-3498>

Gi-Seong Moon

<https://orcid.org/0000-0003-3033-5250>

Abstract

Bacillus subtilis MGE 2012 strain was selected for the production of both digestive enzymes, α -amylase and protease, on nutrient agar plates supplemented with starch or skim milk as substrates, and the optimal composition of materials was investigated using combinations of brown rice powder, soybean powder, and rice protein powder. The final fermentation was tested for its antioxidation activity and bifidogenic growth stimulation activity. *B. subtilis* MGE 2012 simultaneously produced both digestive enzymes, and a combination of brown rice powder and soybean powder was confirmed to be the optimal material for the highest production of the enzymes. The fermentation under the optimized condition showed increased antioxidation activity and bifidogenic growth stimulation activity for *Bifidobacterium lactis* and *Bifidobacterium breve* strains when compared with controls. These results indicate the fermentation presented multi-functions including digestion enzyme activity, anti-oxidation activity, and bifidogenic growth stimulation activity and could be used as a healthy ingredient for the human gut.

Keywords

Bacillus subtilis, enzyme food, bifidogenic growth stimulation, anti-oxidation activity, gut health

서론

최근 산업의 성장과 현대인들의 빠르고 편리한 생활로 식습관이 인스턴트 식품, 밀키트, 패스트푸드 등으로 빠르게 변화하고 있다(Choi *et al.*, 2019). 이러한 변화는 빠르고 불규칙한 식사 습관을 유발하고 있으며, 이는 소화효소 분비를 억제하고 소화불량을 초래할 수 있다(Kim and Kim, 2006; Shin and Je, 2018).

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.

특히, 고연령층은 노화로 인해 소화능력이 저하되고 amylase 및 protease와 같은 소화효소의 활성 및 분비가 원활하지 않아 음식물 소화가 어려워지며, 불규칙한 식습관까지 동반하게 된다면 이를 악화시킬 수 있다(Kim and Kim, 2006; Lee, 2015). 이러한 소화작용을 개선하기 위한 방법으로 소화효소제가 일반적으로 사용되지만, 최근 마이크로바이옴에 대한 연구가 활발히 진행되면서 장내 미생물에 의한 소화 효소 생산에도 관심이 증대되고 있다(Bhattacharya et al., 2015; Jia et al., 2022).

효소식품은 식품에 효소를 첨가하거나 미생물의 발효를 통하여 효소활성을 강화함으로써 음식물의 분해를 도우며, 소화능력을 개선하여 영양성분의 흡수를 촉진하는 건강기능식품으로 개발될 수 있다(Lee et al., 2015; Martinez-Villaluenga et al., 2017). 현재는 *Bacillus* 속을 포함한 다양한 미생물을 활용한 효소식품 개발 연구가 진행 중이며, 효소 생산 고초균(*Bacillus subtilis*)을 활용한 프로바이오틱스 균주 개발 연구도 활발하게 진행되고 있다(Kwon et al., 2023; Maske et al., 2021; Sharma et al., 2020). 그럼에도 불구하고, 판매되는 효소식품의 효소 활성은 제각각이며 이는 소비자들의 불만요소이기도 하다 (Lee et al., 2015). 따라서 효소활성이 우수한 균주를 발굴하고 이를 활용하여 장내 건강기능성이 우수한 소재를 개발한다면 소비자들의 건강 증진에 도움이 될 것으로 판단된다. 이런 관점에서 본 연구에서는 선행연구에서 분리된 *B. subtilis* MGE 2012 균주를 활용하여 효소활성을 위한 기질 최적화시험을 진행하였고, 최종발효물의 항산화능과 비피도박테리아 증식능을 검증하여 장 건강을 위한 건강기능식품으로서의 가능성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

B. subtilis MGE 2012 균주는 선행연구에서 메주로부터 분리되었으며 이를 효소활성 발효물 제조를 위한 종균으로 사용하였다. 비피도박테리아 증식능 확인을 위하여 *Bifidobacterium lactis* BL750 균주(Culture Systems Inc., Mishawaka, IN, USA)와 *Bifidobacterium breve* KCTC 3220 균주를 사용하였다. *B. subtilis* MGE 2012 균주는 Nutrient 배지(BD, Sparks, MD, USA)를 이용하여 배양하였고, 비피도박테리아 균주들은 Reinforced Clostridial Medium (RCM) 배지(BD, Sparks, MD, USA)를 사용하여 혐기 챔버 (DG250; Don Whitley Scientific Ltd., Bingley, UK)에서 배양하였다.

효소활성 측정

효소활성 측정을 위하여 Nutrient agar (BD, Sparks, MD, USA)에 starch (Showa Chemicals Inc., Osaka, Japan)와 skim milk (BD, Sparks, MD, USA)를 첨가하여 배지를 제조하였다. 즉, Nutrient agar에 starch (1%, w/v)와 skim milk (10%, w/v)를 각각 첨가한 후 α -amylase와 protease 활성 측정을 위한 배지로 사용하였다. 제조된 고체배지에 하룻밤 배양한 *B. subtilis* MGE 2012 균주 배양액 1 μ L를 점적한 후 37°C에서 7시간 동안 배양한 후, 균체 주변의 환을 통해 protease 활성을 측정하였고 α -amylase 활성의 경우 배지 위에 iodine 용액((주)동성상사, 서울, 대한민국) 2 mL를 골고루 뿌려 염색되지 않는 투명한 생성 여부로 판단하였다.

곡물 기질에 따른 효소활성 비교

현미 분말, 대두 분말, 쌀 단백질 분말은 (주)제이케이뉴트라(수원, 대한민국)에서 제공받아 사용하였다. 세 가지의 곡물을 단독 혹은 복합[현미와 대두 분말(1:1), 현미와 쌀 단백질 분말(1:1)]으로 사용하여 곡물 기질을 조제하였으며 기질 총 중량 5g에 최종 수분 함량이 60%가 되도록 멸균수를 첨가한 후 증숙(121°C, 15분)하였다. 이후 멸균수로 2회 세척한 *B. subtilis* MGE 2012 균주(약 10^9 CFU/mL)를 0.5% 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 0시간과 24시간째에 0.4g의 시료를 취해 멸균수 1.2 mL에 현탁하여 원심분리(14,000rpm, 4분) 후 상등액을 멤브레인 필터(AnyLab Co., Seoul, Korea)로 2회 여과(0.45 μ m 필터 1회, 0.22 μ m 필터 1회)하였다. 여과액 1 μ L를 상기의 효소활성 측정을 위한 배지에 점적하여 활성 유무를 판단하였다.

항산화능 측정

항산화능 측정은 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (Roche, Mannheim, Germany) 라디칼을 이용한 분석법으로 실시하였다. 즉, 7 mM의 ABTS와 2.45 mM potassium persulfate (Daejung chemicals, Siheung, Korea)를 1:1 비율로 혼합한 다음 24시간 암반응시켜 반응액을 제조하였으며, 제조된 반응액은 OD₇₃₄에서 흡광도가 0.7 \pm 0.02 부근이 되도록 희석하였다. 이후 상기의 방법으로 제조된 여과된 복합기질(현미 분말과 대두 분말) 발효물(4 μ L)과 희석 반응액(196 μ L)을 혼합하여 암반응 20분 진행 후 OD₇₃₄에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성 유무를 판단하였다. 항산화 활성의 정량적 분석을 위하여 (+)-sodium L-ascorbate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 표준곡선 작성을 위한 표준물질로 사용하였고 정량값은 Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity

(AEAC; mg eq. AA / 100 mg) 값으로 나타내었다.

비피도박테리아 증식능

상대적으로 효소활성이 우수한 복합기질(현미 분말과 대두 분말 혼합)의 배양물(37°C, 48시간 배양) 500 μ L를 동결건조 후 멸균수 60 μ L에 현탁하였다. 현탁액 20 μ L를 5 mL RCM broth (배지 성분 1/10 포함)에 넣고 *B. lactis* BL750과 *B. breve* KCTC 3220 균주를 각각 1% 접종하였다. 이를 37°C에서 혐기 배양하면서 경시적으로(0, 6, 12시간) 생균수를 측정하여 비피도박테리아 증식 유무를 판단하였다.

통계처리

본 논문에서 기술된 결과 값은 3반복 실험 결과의 평균 및 표준편차로 나타냈고 유의성 검증을 위해 SPSS ver. 25 (SPSS Inc., Chicago, IL) 프로그램을 사용하였다. 독립표본 *t*-검정으로 유의성을 검정하고 Levene의 등분산 검정을 통해 평균의 동일성에 대한 *t*-검정으로 $p < 0.05$ 수준에서 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

효소활성 확인

실험방법에서 언급한 α -amylase 및 protease 활성 확인용 고체 배지에 *B. subtilis* MGE 2012 균주 배양액 1 μ L 점적한 후 배양한 결과, 균체 주변에서 효소 활성 투명환이 관찰되었다 (Fig. 1). 이는 *B. subtilis* MGE 2012 균주가 α -amylase 및 protease를 동시에 효율적으로 생산하고 있음을 의미한다. 일반적으로 *B. subtilis* 균종은 α -amylase (glycogenase; EC 3.2.1.1)를 생산하는데 이는 전분의 한 종류인 amylose를 가수분해하여 maltotriose와 maltose를 생성하며 전분의 또 다른 종류인 amylopectin을 가수분해하여 glucose와 dextrin을 생성한다

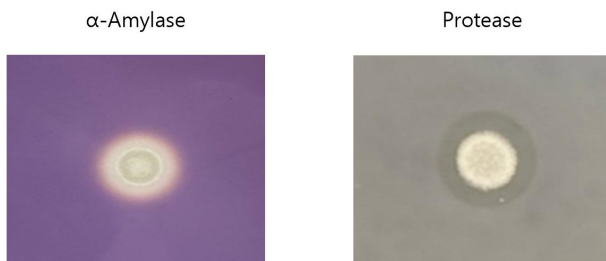


Fig. 1. Enzyme activity of *Bacillus subtilis* MGE 2012 strain on nutrient agar supplemented with starch (for α -amylase) and skim milk (for protease).

(Raul *et al.*, 2014). 또한, protease는 단백질의 펩타이드 결합을 가수분해하여 아미노산을 생성한다(Harwood and Kikuchi, 2022).

곡물 기질에 따른 효소활성 비교

B. subtilis MGE 2012 균주의 곡물 기질에 따른 효소활성을 비교하기 위하여 현미 분말, 대두 분말, 쌀 단백질 분말을 단독 혹은 복합(현미와 대두 분말, 현미와 쌀 단백질 분말)으로 사용한 결과, α -amylase의 경우 현미 분말과 대두 분말 복합기질에서 24시간 배양 후 가장 높은 효소활성을 나타냈고(Fig. 2A), protease의 경우에도 24시간 배양 후 현미 분말과 대두 분말 복합기질에서 가장 높은 효소활성이 확인되었다(Fig. 2B). 이는 상대적으로 전분질이 풍부한 현미 분말과 단백질이 풍부한 대두 분말의 조합이 *B. subtilis* MGE 2012 균주의 α -amylase 및 protease 유전자의 발현을 유도한 것으로 추론되었다. 본 연구그룹에서 수행한 선행연구에서 *Bacillus licheniformis* 1-B-12 균주의 경우 현미 분말(50%), 미강 분말(30%) 및 대두 분말(20%) 복합기질에서 가장 우수한 효소활성이 관찰되었다(Kang and Moon, 2016). 따라서 사용하는 균주에 따라 최적의 기질 조합을 선정함으로써 효율적인 효소식품의 소재 생산이 가능할 것으로 판단된다.

항산화능

B. subtilis MGE 2012 균주를 적용한 복합기질(현미 분말과 대두 분말) 발효물의 ABTS radical 소거능을 확인한 결과, 0시간째 시료의 경우 19.82 AEAC (mg eq. AA / 100 mg)를 나타낸 반면, 24 시간 발효 후에는 35.08 AEAC (mg eq. AA / 100 mg)로 나타나 발효 전·후 항산화능이 약 1.77배 증가하였다 (Fig. 3). 이는

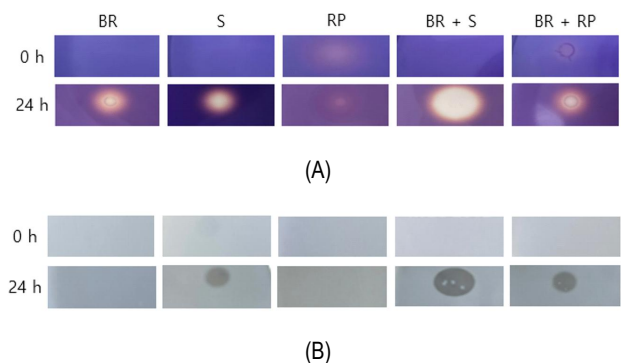


Fig. 2. Enzyme activity of fermentations by *Bacillus subtilis* MGE 2012 with different substrate compositions. A, α -amylase; B, protease activity. BR, brown rice powder; S, soybean powder; RP, rice protein powder.

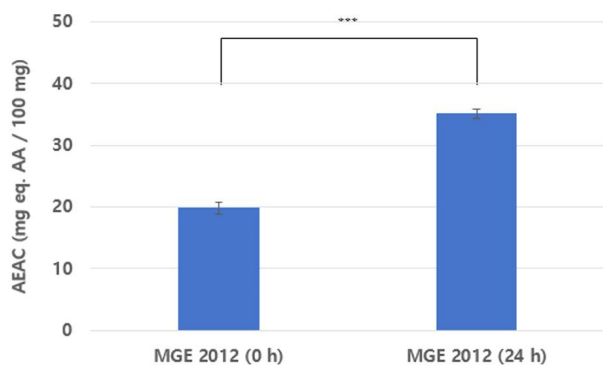


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of fermentation by *Bacillus subtilis* MGE 2012 in a mixture of brown rice powder and soybean powder. *** $p < 0.001$ vs. control (0 h).

복합기질에 적용된 *B. subtilis* MGE 2012 균주의 발효과정에서 단백질 분해 산물 및 다양한 대사산물이 생산되어 항산화 활성에 기여했을 것으로 추론된다.

비피도박테리아 증식능

효소활성 발효물의 비피도박테리아 증식능을 확인하기 위하여 *B. lactis* BL750과 *B. breve* KCTC 3220 균주를 대상으로 시험한 결과, *B. lactis* BL750 균주의 경우 대조군은 5.25 log CFU/mL로 시작해 6, 12시간째 각각 5.67, 5.91 log CFU/mL로 증가한 반면 효소활성 발효물은 5.38 log CFU/mL로 시작해 6, 12시간째 각각 6.38, 6.87 log CFU/mL로 증가하여 대조군 대비 6, 12시간째 각각 0.71, 0.96 log CFU/mL의 차이를 보였다(Fig. 4A). *B. breve* KCTC 3220 균주의 경우 대조군은 3.23 log CFU/mL로 시작해 6, 12시간째 각각 3.69, 3.43 log CFU/mL로 증가한 반면 효소활성 발효물 첨가군은 3.64 log CFU/mL로 시작해 6, 12시간째 각각 4.57, 6.00 log CFU/mL로 증가하여 대조군 대비 6, 12시간째 각각 0.88, 2.57 log CFU/mL의 차이를 보였다 (Fig. 4B). 이는 *B. subtilis* MGE 2012 균주가 적용된 복합기질(현미 분말, 대두 분말)의 발효과정에서 생산되는 분해산물과 대사산물이 비피도박테리아의 증식에 기여한 것으로 추론되며 이는 소화효소 활성과 함께 장내 유익균의 증식에도 도움을 줄 수 있는 소재의 개발에 관한 것이어서 그 의미가 크다. 향후 본 연구에서 개발된 소재를 활용한 장 건강 기능성 검증 임상시험이 이루어진다면 건강기능성 소재로서 각광을 받을 수 있을 것으로 판단된다.

현대인들의 식습관 및 생활환경의 변화는 건강상 부정적인 영향을 초래하고 이는 사회적 부담으로 작용한다. 이러한 건강상의 문제를 해결하기 위하여 다양한 방법이 고려될 수 있겠지만 평소 건강기능

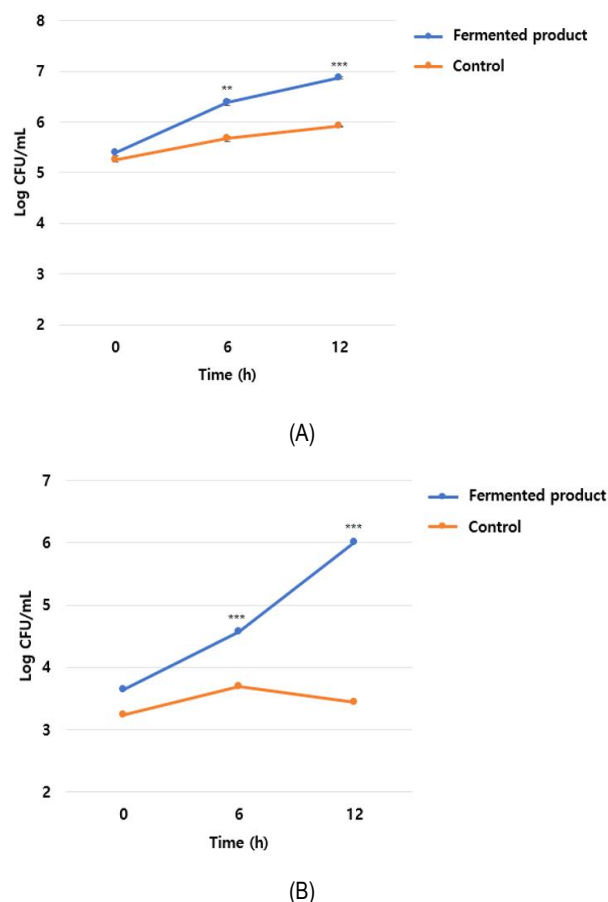


Fig. 4. Bifidogenic growth stimulation activity of fermentation by *Bacillus subtilis* MGE 2012 in a mixture of brown rice powder and soybean powder. A, *Bifidobacterium lactis* BL750; B, *Bifidobacterium breve* KCTC 3220. ** $p < 0.005$ vs. control; *** $p < 0.001$ vs. control.

성 식품을 꾸준히 섭취하는 것도 한 방법일 것이다. 특히, 중·장년층의 경우 소화효소 활성 저하 및 장내 마이크로바이옴의 변화로 인한 장내 건강이 나빠지는 것이 일반적이며 이를 개선하기 위한 많은 소재들이 연구 개발되고 있다(Eun, 2013; Jeong *et al.*, 2022). 본 연구에서 개발된 소재 또한 동일한 목적에 활용될 수 있을 것이다.

요 약

본 연구에서는 α -amylase 및 protease의 동시 생산을 위해 *Bacillus subtilis* MGE 2012 균주를 선발하였고 이를 현미 분말, 대두 분말 및 쌀 단백질 분말의 조합에 적용하여 효소활성을 위한 최적 기질 조합을 선정한 결과, 현미 분말과 대두 분말의 복합물 기질



에서 가장 우수한 효소활성을 나타냈다. 또한 효소활성 최적조건으로 생산된 발효산물에 대한 항산화 활성 및 비피도박테리아 증식능을 확인한 결과, 발효 후 항산화 활성이 발효 전에 비해 약 1.77배 증가하였고 최종 발효산물의 비피도박테리아(*Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve* 균주) 증식능도 확인되었다. 이는 *B. subtilis* MGE 2012 균주의 적용과 발효과정에서 효소활성뿐만 아니라 장내 건강기능성을 향상시킬 수 있는 주요 인자의 변화에도 긍정적 영향을 미친 것으로 향후 장 건강 기능성 소재로서 각광을 받을 것으로 판단된다.

References

1. Bhattacharya T, Ghosh TS and Mande SS (2015) Global profiling of carbohydrate active enzymes in human gut microbiome. *Plos One* **10**, e0142038.
2. Choi MK, Park ES and Kim MH (2019) Home meal replacement use and eating habits of adults in one-person households. *Korean J. Community Nutr.* **24**, 476-484.
3. Eun CS (2013) Role of intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases. *Int. Res.* **11**, 161-168.
4. Harwood CR and Kikuchi Y (2022) The ins and outs of *Bacillus* proteases: Activities, functions and commercial significance. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, fuab046.
5. Jeong YB, Hwang HW, Jung HJ and Oh JE (2022) A study on the purchasing behavior and choice attributes of HMR products by the middle-aged and elderly based on the types of food-related life style: Focusing on Seoul and Gyeonggi areas. *J. Korea Cont. Assoc.* **22**, 770-781.
6. Jia B, Han X, Kim KH and Jeon CO (2022) Discovery and mining of enzymes from the human gut microbiome. *Trends Biotechnol.* **40**, 240-254.
7. Kang JE and Moon GS (2016) Enzyme food prepared by two-step fermentation with *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus casei*. *Curr. Top. Lactic Acid Bac. Probio.* **4**, 24-27.
8. Kim ES and Kim YC (2006) Factors associated with the Beautician's dyspepsia. *J. Korean Soc. Health Edu. Prom.* **23**, 121-134.
9. Kwon C, Kim JW, Park YK, Kang S, Chung MJ, Kim SJ and Lim S. (2023) Bioconversion of rutin in tartary buckwheat by the Korean indigenous probiotics. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **51**, 83-92.
10. Lee SJ (2015) Recent sensory and consumer studies for the development of texture modified foods for elderly. *Food Sci. Ind.* **48**, 13-19.
11. Lee DH, Jung HK and Hong JH (2015) Research trends of enzyme food in Korea. *Food Ind. Nutr.* **20**, 18-22.
12. Martinez-Villaluenga C, Peñas E and Frias J (2017) Bioactive peptides in fermented foods: Production and evidence for health effects. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* pp. 23-47, Academic Press.
13. Maske BL, de Melo Pereira GV, Vale ADS, de Carvalho Neto DP, Karp SG, Viesser JA, Lindner JDD, Pagnoncelli MG, Soccol VT and Soccol CR (2021) A review on enzyme-producing lactobacilli associated with the human digestive process: From metabolism to application. *Enzyme Microb. Technol.* **149**, 109836.
14. Raul D, Biswas T, Mukhopadhyay S, Das SK and Gupta S (2014) Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) using solid state fermentation. *Biochem. Res. Int.* **2014**, 568141.
15. Sharma R, Garg P, Kumar P, Bhatia SK and Kulshrestha S (2020) Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation* **6**, 106.
16. Shin KO and Je HJ (2018) A Study on the problems of eating habits of modern people and suggesting alternatives to overcome diseases: A review of the five blue zones, based on the Roma Linda region in the USA. *J. Korean Soc. Neuroco. Rehab.* **10**, 53-62.