

## $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity and protease characteristics produced by *Bacillus amyloliquefaciens*

Rea-Hyun Lee<sup>1</sup>, Su-Jin Yang<sup>1</sup>, Tae-Young Hwang<sup>2</sup>, Shin-Kyo Chung<sup>3,4</sup>, Joo-Heon Hong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyengsan 38430, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Jungwon University, Goesan 28024, Korea

<sup>3</sup>School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>4</sup>Food and Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

### *Bacillus amyloliquefaciens*로부터 생산된 protease 특성 및 $\alpha$ -glucosidase 저해활성

이래현<sup>1</sup> · 양수진<sup>1</sup> · 황태영<sup>2</sup> · 정신교<sup>3,4</sup> · 홍주현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>대구가톨릭대학교 식품공학전공, <sup>2</sup>중원대학교 식품공학과, <sup>3</sup>경북대학교 식품공학부, <sup>4</sup>경북대학교 식품생물산업연구소

#### Abstract

In this study, three GRAS (generally recognized as safety) strain was isolated from *Doenjang* and *Cheonggukjang* and identified as a protease-producing microorganism, following the appearance of a clear zone around its colony when cultured on a medium containing skim milk. Based on an analysis of the nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA, the strains were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* and were therefore named *Bacillus amyloliquefaciens* CDD5, *Bacillus amyloliquefaciens* CPD4, and *Bacillus amyloliquefaciens* CGD3. Here, we analyzed the protease and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of the three *B. amyloliquefaciens* strains. Among the isolated strains, *B. amyloliquefaciens* CGD3 exhibited the highest protease activity (9.21 U/mL, 24 hr). The protease activities of *B. amyloliquefaciens* CDD5 and *B. amyloliquefaciens* CPD4 reached 1.14 U/mL and 8.02 U/mL, respectively, at 48 hr. The proteases from the three *B. amyloliquefaciens* strains showed the highest activities within a pH range of 8.0–9.0 at 50°C, and casein was found to be the preferred substrate on evaluating enzyme activity in the substrate specificity assay. The *B. amyloliquefaciens* strains exhibited maximal growth when the nutrient broth medium had an initial pH within the range of 5.0–10.0, 6–9% sodium chloride (NaCl), and 5% glucose. *B. amyloliquefaciens* CDD5 exhibited a low  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate (5.32%), whereas *B. amyloliquefaciens* CPD4 and *B. amyloliquefaciens* CGD3 exhibited relatively higher inhibition rates of 96.89% and 97.55%, respectively.

**Key words :** *Bacillus amyloliquefaciens*, probiotic, protease,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity

#### 서 론

최근 현대인들은 생활수준의 향상과 더불어 건강에 대한

관심도 높아지고 있으며, 건강 증진을 위해 장내 균총을 새롭게 형성하거나 면역계 활성화 등을 목적으로 프로바이오틱스(probiotics)라는 미생물 유래 식품 보충제가 널리 사용되고 있다(1,2). 현재, 프로바이오틱스로는 *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus polyfermenticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* 등이 주로 연구되었다. 그 중 *Bacillus* 속은 산업적으로 중요한 종으로 오랜 기간 식품, 의약품 및 각종 발효 산업에서 사용되어 안전성이 확립되어 있다. *Bacillus* 속 미생물은 다양한 소화효소를 분비하거나

\*Corresponding author. E-mail : jhhong@cu.ac.kr  
Phone : 82-53-850-3218, Fax : 82-53-850-3218  
Received 27 July 2015; Revised 2 October 2015; Accepted 7 October 2015.  
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

생리활성을 가지는 펩타이드를 생산할 수 있는데, 대표적인 소화효소에는 protease와 xylanase가 있다(3,4).

Protease는 다른 단백질의 아미노산간 peptide 결합을 가수분해하는 효소이며 전 세계적으로 공업효소 판매량의 60%를 차지하고 있다. 단백질 구조와 기능 등의 기초연구 분야 뿐만 아니라 조미료 제조, 식육의 연화, 주류의 혼탁방지, 치즈숙성, 제빵 등의 식품산업, 소화제 등의 제약산업, 세제, 피혁, 환경에 관련된 각종 산업분야에서 그 요구도가 증가하고 있다. Protease는 모든 생물체에서 생성되며, 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물에 의해 다량 생산되지만 특히 *Bacillus* 속 균주가 산업적 생산을 위해 사용되고 있다(5,6). 미생물에 의해 생산되는 protease는 대량배양을 통해 안정적으로 생산 가능하다. 이는 미생물 배양조건을 통해 공정을 최적화하여 생산성과 경제성을 높일 수 있으므로 산업적 측면에서 매우 유용하게 용도와 기능에 따라 지속적으로 개발되고 있다(6). 현재까지 효소를 생산하는 미생물들이 보고되어져 있는데 protease를 생산하는 *Bacillus* 속 균주는 콩을 발효한 식품인 청국장(7,8), 된장(9), 간장(10) 등으로부터 분리되어 연구되고 있으며 이러한 미생물 중에도 특히, 안전성이 확보된 생물자원으로서 다양한 바이오산업에 활용 가치가 높아 주목을 받고 있다(11).

소장에 존재하는  $\alpha$ -glucosidase는 식이 중에 함유된 탄수화물을 단당류로 전환시켜 흡수를 가능하게 하는 탄수화물 소화에 필수적인 효소이다.  $\alpha$ -Glucosidase 저해제는 섭취한 탄수화물의 흡수를 막고 바로 배출시켜 식후 혈당을 저하시키는 효과를 가지며(12,13) type II 인슐린 비의존성 당뇨병, 비만과 고지혈증 등의 대사성 질환 치료제로서의 개발 가능성에 대해 관심을 받고 있는 물질이다(14,15).  $\alpha$ -Glucosidase 저해제는 주로 식물 또는 식품에서 유래되어 개발되었는데 천연물 기원의 물질은 대량생산의 어려움이 있기 때문에 미생물에 의한 저해제가 최근 많이 연구되고 있다(16). 대표적인 예로 *Actinoplanes* spp.의 발효산물에서 분리한 acarbose가 있으며(17), 중국의 비지(okara)와 국내 토양 등에서 유래된 미생물로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해물질 탐색이 이어지고 있다(17-19).

따라서 본 연구에서는 새로운 프로바이오틱스를 선발하고자 국내 된장 및 청국장으로부터 protease 활성이 우수하면서 GRAS(generally recognized as safety)균주로 안전성이 확보된 *Bacillus* 속 균주를 분리, 동정하였으며 protease 생산 특성 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성에 대해 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리

Protease 생산 균주를 분리하기 위하여 4개지역(구미, 김천, 대구 및 포항) 각 가정에서 제조한 된장16종 및 청국장

5종을 수집하고 2014년 11월에 80종을 분리하여 시료로 사용하였으며, 그 중 protease분비능이 있는 균주를 다음과 같이 분리하였다. 0.85% sodium chloride(Duksan pure chemicals Co., Ltd., Seoul, Korea)용액 9 mL를 혼합하여 10배 희석법으로 희석한 다음, 각각에 희석액 100  $\mu$ L를 nutrient agar(Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C 배양기(IB-25G, Jeio tech Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 24시간 배양한 다음 형성된 colony를 skim milk가 2% 포함된 nutrient agar 배지에 균주를 접종한 뒤 37°C에서 24시간 배양한 후 형성되는 투명환의 크기를 측정하여 protease 활성이 높은 균주를 분리하였고 CDD5, CPD4, CGD3로 명명하였다.

### 분리 균주의 동정

된장 및 청국장으로부터 분리된 protease 생산균주가 식품에 적용가능한 한 미생물인지 확인하기 위하여 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열 분석을 통한 균주동정을 (주솔젠트(Solgent Co., Daejeon, Korea)에 의뢰하여 동정하였다.

### 분리 균주의 생육 및 protease 활성

균주의 생균수 측정은 배양액 1 mL에 0.85% sodium chloride(Duksan pure chemicals.)용액 9 mL를 혼합하여 10배 희석법으로 희석한 다음, 각각의 희석액 100  $\mu$ L를 nutrient agar(Difco.)에 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 배양한 다음 형성된 colony 수를 계측하고, colony에 희석배수를 곱하여 시료 mL당 colony forming unit(CFU)로 나타내었다. Protease 활성은 Kunitz법(20)을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL와 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)을 이용한 0.6% casein 용액(w/v, Duksan pure chemicals.) 0.5 mL를 가하고 진탕 항온수조(BS-31, Jeio tech.)를 이용하여 37°C, 100 rpm에서 30분간 반응시킨 후 0.44 M trichloroacetic acid(Acros organics, Geel, Belgium) 1.0 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응을 중지시키고 반응액을 원심분리기(1236MG, GYROZEN Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액 1 mL를 취하여 0.55 M sodium carbonate anhydrous (Duksan pure chemicals.) 2.5 mL와 1/3 희석한 folin ciocalteu 용액(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 0.5 mL를 가하여 37°C에서 30분간 발색반응을 시킨 다음 분광광도계(Ultraspac-2100pro, Amersham Co., Uppsala, Sweden)로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease 활성은 tyrosine(Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였으며, 활성단위(unit)는 1분당 1  $\mu$ g의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

### Protease 활성에 대한 pH, 온도, 및 기질 특이성

Protease 활성에 영향을 미치는 pH, 온도 및 기질특이성

은 37°C에서 24시간 동안 180 rpm으로 진탕 배양한 후 배양액을 3,000 rpm, 10분간 원심분리 하여 배양 상층액을 조효소액으로 사용하였고, 가장 높은 protease 효소활성을 100%로 하여 각 균주의 효소활성의 pH, 온도, 기질특이성을 나타내었다. 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 확인하기 위하여 50 mM 완충용액(pH 3.0~7.0, citrate-phosphate buffer; pH 6.0~8.0, phosphate buffer; pH 8.0~9.0, Tris-HCl buffer; pH 10.0, carbonate-bicarbonate buffer)을 이용하여 기질을 제조하였으며, 온도의 영향은 20°C~70°C 범위에서 확인하였다. 효소활성에 따른 기질특이성은 0.6%의 bovine serum albumin, casein, egg white, elastin, skim milk를 기질로 하여 protease활성을 측정하였다.

**배양조건에 따른 분리균주의 생육특성**

분리 동정된 미생물의 생육조건을 확인하기 위해 초기 pH, NaCl 및 glucose 조건을 달리하여 균의 생육 정도를 600 nm에서 흡광도로 측정하였다. Nutrient broth(Difco)의 pH를 3.0~11.0로 조정 후, 1%(v/v)의 전배양 균주를 각 배지에 접종하여 24시간 배양을 진행하면서 균 생육을 관찰하였다. 그리고 균 생육에 있어서 NaCl 및 glucose 농도의 영향을 확인하기 위하여 NaCl은 3~15% 농도를 달리한 Nutrient broth(Difco)를 제조하였고, glucose는 5~40% 농도를 달리하여 1%(v/v)의 전배양 균주를 각각의 배지에 접종한 후 24시간 배양을 진행하면서 균 생육을 관찰하였다.

**분리 균주의 α-glucosidase 저해활성 측정**

α-Glucosidase 저해활성은 Watanabe 등(21)의 방법에 따라 측정하였다. 각 균주의 배양 상층액 60 μL에 0.2 Unit/mL α-glucosidase 효소액 50 μL, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 50 μL를 혼합하여 37°C에서 20분 동안 전배양 한 후 3 mM p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside(pNPG) 50 μL를 첨가한 다음 37°C에서 20분간 반응시키고 0.1 M sodium carbonate 500 μL로 반응을 정지시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하고 시료용액과 동량의 완충용액을 넣은 대조군을 기준으로 효소 저해 활성을 아래의 식으로 계산하였다.

Ab<sub>Sample, blank, control</sub> : Absorbance of the sample, blank, and control  
α-glucosidase Inhibition rate (%) =  $1 - \frac{(Ab_{Sample} - Ab_{Sblank})}{Ab_{Scontrol}}$  × 100

**결과 및 고찰**

**Protease 효소 생산 균주의 분리 및 동정**

된장 및 청국장으로부터 protease 생산균주를 분리한 결과 skim milk(2.0%)를 첨가한 nutrient agar배지에서 우수

한 활성환을 나타내면서 GRAS 미생물인 3개의 protease 생산균주를 선정하였다(Table 1). 최종적으로 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열을 이용하여 BLAST 분석한 결과 분리한 세 균주는 모두 *Bacillus amyloliquefaciens*와 98~99%의 유사성을 보였으며 각각 *Bacillus amyloliquefaciens* CDD5, *Bacillus amyloliquefaciens* CPD4 및 *Bacillus amyloliquefaciens* CGD3로 명명하였다. Jung(22)은 *B. amyloliquefaciens*를 이용하여 콩 종류와 발효온도를 달리한 청국장을 제조하였고, Lee 등(23)은 된장으로부터 분리한 *B. amyloliquefaciens* KHG 19를 이용하여 시판 된장보다 우수한 단백질 분해능과 혈전용해능을 가지는 기능성된장을 제조에 *B. amyloliquefaciens*를 활용하여 연구한 바 있다.

**Table 1. Identification results of the strains isolated from Deonjang and Cheonggukjang**

Regions	Isolated strains	Species	Identity (%)
Daegu-si Dalseong-gun	CDD5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99
Gyeongsangbuk-do Pohang-si	CPD4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99
Gyeongsangbuk-do Gumi-si	CGD3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98

**배양시간에 따른 생육 및 protease 활성**

분리된 *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CPD4 및 *B. amyloliquefaciens* CGD3의 배양시간별 생육도와 protease활성은 Fig. 1과 같다. 각 균주의 생육도는 12시간 배양하였을 때 *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CPD4 및 *B. amyloliquefaciens* CGD3가 각각 7.13, 7.18, 7.32 log CFU/mL로 최대 생육도를 보였으며 protease활성은 0~6시간까지는 protease활성이 나타나지 않다가 6시간이후 protease활성이 점차 증가하는 경향을 보여주었다. 생균수는 12~24시간 배양시 최고생육이 유지되다가 24시간 이후부터 생육이 감소하였다. Protease 활성 또한 최고생육을 유지하는 24시간 배양 시 *B. amyloliquefaciens* CGD3는 9.21 U/mL로 가장 높은 활성을 나타내었고, *B. amyloliquefaciens* CPD4는 6시간 이후 지속적으로 생육이 증가하다가 48시간 배양시 8.02 U/mL로 높은 활성을 나타내었다. 이는 Ahn 등(8)이 청국장으로부터 분리한 *Bacillus strains* 중 *B. subtilis*를 24시간 배양 시 가장 높은 protease 활성이 약 8.00 U/mL이었으며, *B. amyloliquefaciens* 5종은 24시간 배양 시 약 2.00~6.00 U/mL의 활성을 나타내었다. 이에 따라 본 연구에서 분리한 *B. amyloliquefaciens* 균주 중 *B. amyloliquefaciens* CGD3균주가 우수한 protease활성을 갖는 균주임을 확인하였다. 이러한 결과를 종합하여 보면, 12시간 이상 배양이 요구되며 protease 효소 활성도 우수한 것으로 사료되며 Lim 등(24)의 연구결과에 따르면 최대

활성이 검출된 시점이 exponential phase의 말기시점으로서 균체량과 효소생산량과의 상관관계가 약간의 차이를 보이며 균주의 grow pattern과 효소활성과는 반드시 일치하는 것은 아니나 정체기 시점에서부터 활성이 감소하는 현상이 일반적인 현상이라고 보고하였는데 이는 본 실험결과와 유사하였다. *B. amyloliquefaciens* CDD5는 7.13 log CFU/mL 까지 생육하였지만 protease 활성이 0.55~1.14 U/mL로 낮았고 *B. amyloliquefaciens* CPD4 및 *B. amyloliquefaciens* CGD3의 균주는 우수한 protease 활성을 가지는 균주임을 확인하였다.

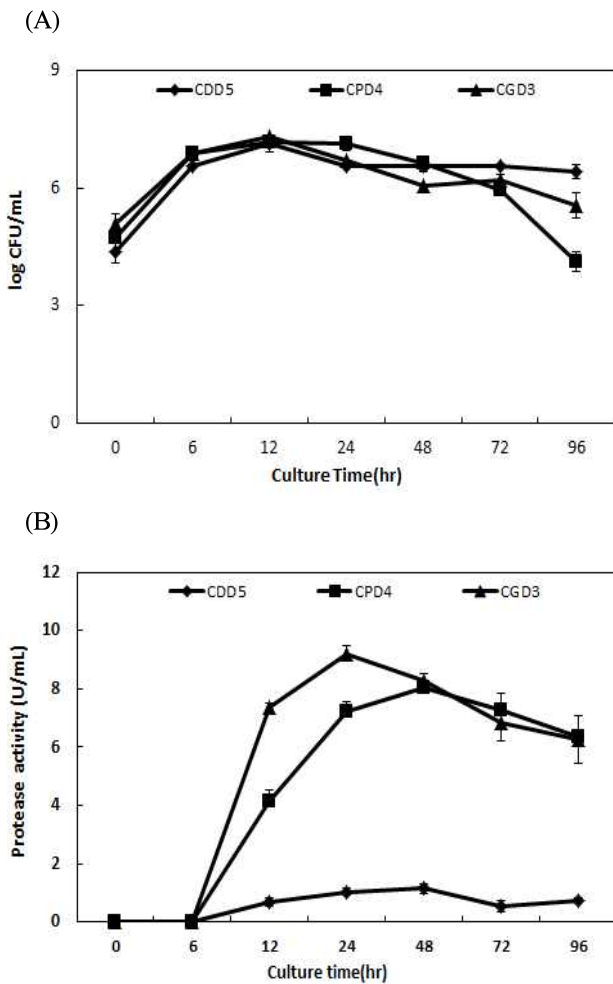


Fig. 1. Growth curve (A) and protease activities (B) of *Bacillus amyloliquefaciens* strains CDD5, CPD4 and CGD3 isolated from *Deonjang* and *Cheonggukjang*.

The data are expressed as the mean $\pm$ SD (n=3).

#### Protease 활성에 대한 pH, 온도 및 기질 특이성

*B. amyloliquefaciens* 균주를 pH와 온도를 달리하면서 protease 활성을 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 그 결과 최적 pH는 *B. amyloliquefaciens* CDD5에서 pH 8.0, *B. amyloliquefaciens* CPD4가 pH 9.0, *B. amyloliquefaciens* CGD3는 pH 8.0으로

나타났다. 이는 Kim(25), Hwang 등(26), Moon 등(27), Kim 등(28)이 *Bacillus* sp.의 alkaline protease의 최적 pH가 9.0~10.0인 연구결과와 비교하여 *B. amyloliquefaciens* CDD5는 pH 7.0~9.0범위에서 78% 이상, *B. amyloliquefaciens* CPD4는 pH 8.0~10.0범위에서 protease 활성이 62% 이상, *B. amyloliquefaciens* CGD3는 pH 7.0~9.0의 범위에서 protease 활성이 75% 이상의 활성을 나타냄으로써 유사한 경향을 보였다. 특히 *B. amyloliquefaciens* CPD4가 pH 10.0에서 84.54% protease 활성을 보였으며, pH 8.0 이하에서 활성이 급격히 감소하여 alkaline protease로 판단한 Bang 등(29)의 연구와 유사하게 pH 8.0이하에서 *B. amyloliquefaciens* CPD4의 protease 활성이 52.09%로 감소하는 경향으로 나타나 alkaline protease로 사료된다. *B. amyloliquefaciens*의 protease의 최적 활성 온도를 확인한 결과 분리된 *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CPD4, *B. amyloliquefaciens* CGD3 균주 모두 50°C에서 최적 온도를

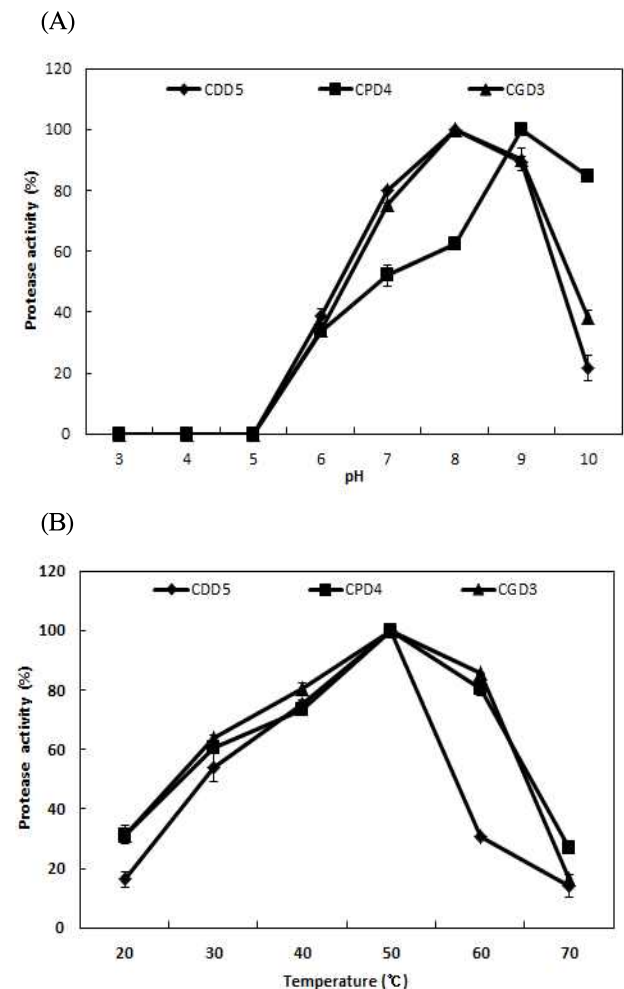


Fig. 2. Effect of pH (A) and temperature (B) on the protease activities of *Bacillus amyloliquefaciens* strains CDD5, CPD4 and CGD3 isolated from *Deonjang* and *Cheonggukjang*.

The data are expressed as the mean $\pm$ SD (n=3).

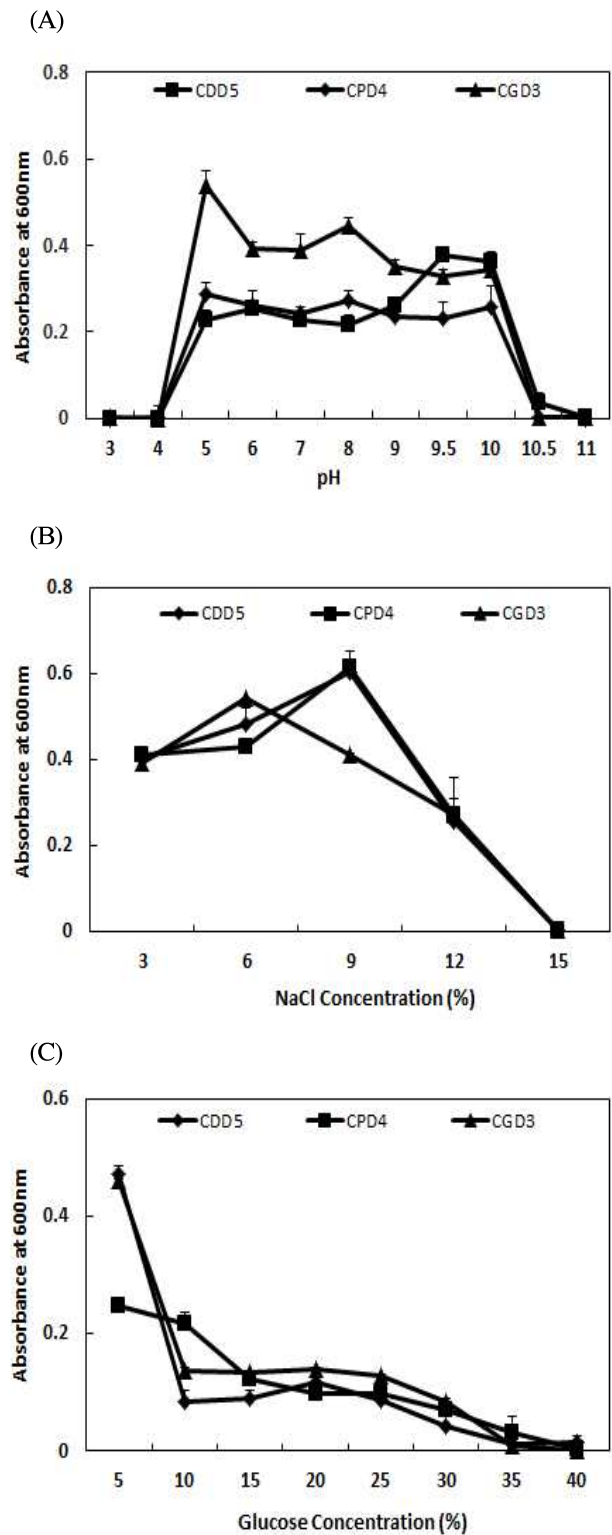
나타내었다. *B. amyloliquefaciens* CDD5는 40~50℃에서 75% 이상, *B. amyloliquefaciens* CPD4는 40~60℃에서 73% 이상, *B. amyloliquefaciens* CGD3는 40~60℃에서 80% 이상 높은 효소활성을 보였다. 이 결과는 protease 활성의 최적 온도가 30℃인 Kim 등(28)의 연구와 비교하면 본 연구의 균주가 다소 높은 최적 온도를 나타냈으며, Kim(25)이 청국장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* JK-1의 최적 온도가 55℃인 결과와 유사하였다. 이러한 결과로 볼 때 분리된 균주는 알칼리범위인 pH 8.0~9.0, 50℃에서 최대 protease 활성을 나타내는 특성을 보였으며, Bang 등(29)의 연구결과에서 pH 10.0, 50℃의 조건에서 최대 활성을 나타낸 alkaline protease의 특성과 유사하였다. protease의 기질에 대한 특이성을 확인한 결과 Table 2와 같으며 *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CPD4, *B. amyloliquefaciens* CGD3 세 균주 모두 casein을 기질로 사용하였을 때 가장 높은 protease활성을 보였으며 skim milk를 기질로 사용하였을 때 45.34, 57.24 및 67.12%의 활성을 확인하였다. 이는 Lim 등(30)이 메주에서 분리한 단백질분해 효소생산하는 *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae* 및 *Absidia corymbifera* 와 같은 접합균모두 Hammastein casein에 대한 기질특이성이 가장 높아 유사한 경향을 나타내었으며, Byun 등(31)이 전통메주에서 분리한 *Bacillus subtilis* YG-95는 soy protein isolate(SPI)가 casein보다 높게 나와 상이한 결과를 나타내었다.

**Table 2. Substrate specificity of an proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* strains CDD5, CPD4, and CGD3 isolated from Deonjang and Cheonggukjang.**

Substrate	Relative activity (%)		
	CDD5	CPD4	CGD3
Bovine serum albumin	0	0	0
Casein	100	100	100
Egg white	3.47	17.44	1.95
Elastin	0	0	0
Skim milk	45.34	57.24	67.12

**배양조건에 따른 분리균주의 생육특성**

된장 및 청국장으로부터 분리된 *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CPD4, *B. amyloliquefaciens* CGD3의 최적 생육특성을 확인하기 위해 초기 pH, NaCl, glucose를 달리한 배지에서 균주를 배양하여 생육특성을 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 세 균주 모두 초기 pH 5.0~10.0의 배지조건에서 고르게 생육하였다. 이는 Bae 등(32)이 맥아에서 분리한 *B. amyloliquefaciens* CNL-90는 pH 6.0~9.0 범위에서 95% 생존율을 나타낸 결과와 비교하여 분리균주가 더 넓은 pH 범위에서 생육함을 확인할 수 있었다. 특히 *B. amyloliquefaciens* CGD3가 pH 5.0에서 가장 안정적으로



**Fig. 3. Investigation of growth conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* strains CDD5, CPD4 and CGD3 isolated from Deonjang and Cheonggukjang.**

The incubation was carried out at 37℃ for 24 hr and then cell growth was analyzed at absorbance 600 nm, (A) The effect of pH on the *B. amyloliquefaciens* CDD5, CPD4, CGD3 (B) The effect of NaCl on the *B. amyloliquefaciens* CDD5, CPD4, CGD3 (C) The effect of glucose on the *B. amyloliquefaciens* CDD5, CPD4, CGD3. The data are expressed as the means±SD (n=3).



생육함을 알 수 있었고 pH 5.0 이하, pH 10.0 이상의 조건에서는 분리된 모든 균주가 생육이 현저하게 저하되어 pH 3.0, pH 11.0의 조건에서 균 생육은 거의 확인되지 않았다. *B. amyloliquefaciens*의 내염성을 확인하기 위해 NaCl을 농도별로 첨가한 배지에서의 생육특성을 확인한 결과 *B. amyloliquefaciens* CGD3는 6% 농도에서 배양 시 흡광도 값이  $0.54 \pm 0.05$ 로 가장 높은 생육을 보였으며, 동일한 농도에서 *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CPD4의 흡광도는 각각  $0.48 \pm 0.03$ ,  $0.43 \pm 0.01$ 를 보였고 9% 농도에서 가장 높은 생육을 보여 각각  $0.60 \pm 0.01$ ,  $0.61 \pm 0.03$ 의 흡광도 값을 나타내었고 분리 세 균주 모두 12% 농도까지 느리지만 증식하였으며 15% 농도에서는 생육하지 못하였다. 이는 Lee 등(33)의 연구결과에도 유사하게 12%의 NaCl 농도에서도 균생육이 양호하다는 보고하였으며 이러한 결과를 종합하여 볼 때, *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CPD4는 *B. amyloliquefaciens* CGD3는 내염성이 높은 균주임을 확인하였다. Glucose를 농도별로 첨가한 배지에서 *B. amyloliquefaciens* 내당성을 확인한 결과 *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CPD4, *B. amyloliquefaciens* CGD3 모두 5% 농도까지 균이 생육하였으나 10% 이상에서는 현저하게 생육이 낮아짐을 확인할 수 있었으며, 특히 *B. amyloliquefaciens* CPD4는 5% 농도에서 *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CGD3 균주들 보다 생육이 저조하여 내당성이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 넓은 범위의 pH에 생육이 가능하고 저염장류들의 식염농도가 통상 12% 부근인 점을 고려할 때 장류등의 염을 포함한 조건하에서 발효하여 산업용 미생물로서 적용가능하리라 사료된다.

### 분리균주의 $\alpha$ -glucosidase 저해활성 측정

분리된 3종의 균주가 생산하는  $\alpha$ -glucosidase 효소활성 저해능을 각 균주의 배양 상층액으로 측정된 결과 *B. amyloliquefaciens* CPD4 및 *B. amyloliquefaciens* CGD3 균주에서 양성대조균인 acarbose만큼 우수한 억제효과를 나타냄을 확인하였다(Fig. 4). *B. amyloliquefaciens* CDD5의 경우  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 거의 나타내지 않았지만 *B. amyloliquefaciens* CPD4 및 *B. amyloliquefaciens* CGD3에서는 각각 96.65% 및 97.85%의 높은 저해활성을 나타내었다. Myoung 등(19)이 전통식품에서 분리하여 항당뇨 물질로서 이용가능성을 보고한 *B. subtilis* Y3-7의 배양액의  $\alpha$ -glucosidase 저해능이 80.01%의 결과와 비교하여 본 실험에서 분리한 *B. amyloliquefaciens* CPD4 및 *B. amyloliquefaciens* CGD3가  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성이 우수함을 확인하였다. Kim(34)이 청국장에서 분리한 *B. subtilis*가  $\alpha$ -glucosidase 저해제활성을 가지며 in vivo상에서도 현저한 혈당감소효과를 보여 *B. subtilis*를 경구혈당강하제로서 이용가능성을 확인하여 본 연구에서도 분리한 균주 또한 탄수화물 대사

이상 질환의 증상개선에 유용한 물질로 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다. 또한 Kim 등(35)은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성과  $\alpha$ -glucosidase 저해제인 DNJ(1-deoxynojirimycin)를 가지는 *B. subtilis* MORI 균주를 분리하였는데  $\alpha$ -glucosidase 저해제인 DNJ는 최초로 L-sorbofuranose로부터의 합성 또는 nojirimycin의 환원 등과 같은 화학적인 방법에 의해 얻어졌으나, 이후 *Bacillus* sp.나 *Streptomyces* sp. 등과 같은 미생물의 배양액 등으로부터 정제되어 이용되고 있으므로 본 연구에서  $\alpha$ -glucosidase 저해 효과를 가지고 있어 당뇨예방 기능성식품 소재로의 활용가능성이 기대된다.

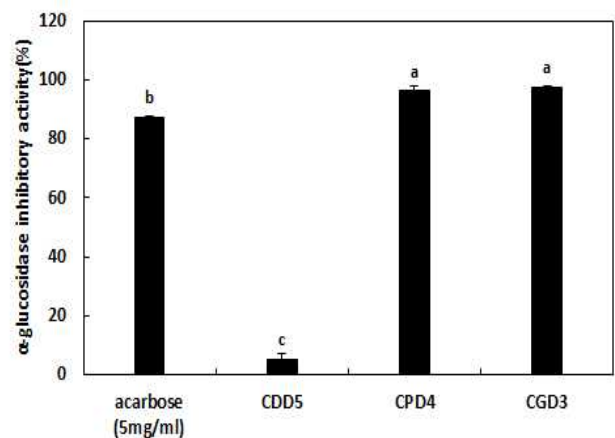


Fig. 4. Effect of culture media on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of *Bacillus amyloliquefaciens* strains CDD5, CPD4 and CGD3 isolated from *Deonjang* and *Cheonggukjang*.

Mean $\pm$ SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### 요 약

본 연구에서는 새로운 프로바이오틱스를 선발하고자 protease를 생산하는 GRAS균주를 된장 및 청국장으로부터 분리하고 그 특성을 조사하였다. 분리한 균주를 분리 동정한 결과 각각 *B. amyloliquefaciens* CDD5, *B. amyloliquefaciens* CPD4 및 *B. amyloliquefaciens* CGD3로 명명하였다. 분리균주의 생육은 12시간 배양 시,  $7.13 \sim 7.32$  log CFU/mL로 최대 생육도를 보였으며 24시간까지 유지되다가 감소하는 경향을 나타내었고, 그 중 *B. amyloliquefaciens* CGD3의 protease 활성이 9.21 U/mL로서 가장 높게 나타났다. *B. amyloliquefaciens*이 생산하는 protease 활성은 pH 7.0~10.0, 온도는 50°C에서 최적활성을 나타내었으며, casein에서 protease 활성이 가장 우수하게 나타났다. pH, NaCl, glucose 농도를 달리한 배양 조건에 따른 *B. amyloliquefaciens*의 생육특성으로는 pH 5.0~10.0의 넓은 범위에서 생육하였고, NaCl은 12% 농도까지 증식하였으며 glucose 5%까지는 생육하나 10% 농도부터는 현저하게 생육이 낮아짐을 확인하였다. 또한 혈당저

하를 유도하는  $\alpha$ -glucosidase의 저해활성을 측정된 결과, *B. amyloliquefaciens* CPD4 및 *B. amyloliquefaciens* CGD3에서는 각각 96.65% 및 97.85%의 저해율을 나타내었다. 이러한 결과는 특히 protease활성이 가장 우수하고  $\alpha$ -glucosidase 또한 높은 저해활성을 가진 *B. amyloliquefaciens* CGD3 균주의 생육특성을 고려하여 단백질 분해 분야의 프로바이오틱 적용 및 당뇨예방용 기능성식품 소재로의 가능성이 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 지역혁신창의인력 양성사업으로 수행된 연구결과임(No.2013H1B8A2032215).

### References

1. FAO/WHO (2002) Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/ World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada
2. Homma N (1998) Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Biosci Microflora*, 7, 35-43
3. Shin HJ, Bang JH, Choi HJ, Kim DW, Ahn CS, Jeong YK, Joo WH (2012) Probiotic potential of indigenous *Bacillus* sp. BCNU 9028 isolated from Meju. *Korean J Food Sci Technol*, 22, 605-612
4. Hairul Islam VI, Prakash Babu N, Pandikumar P, Ignacimuthu S (2011) Isolation and characterization of putative probiotic bacterial strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from North East Himalayan soil based on in vitro and in vivo functional properties. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 3, 175 - 185
5. Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 381 - 395
6. Bae YE, Yoon KH (2012) Production and characterization of thermostable protease from *Bacillus licheniformis* isolated from Korean traditional soybean paste. *Korean J Microbiol*, 48, 298-304
7. Park CS, Min DK, Ahn YS, Lee JH, Hong SK, Kim JH, Kang DK (2002) Isolation and characteristics of soy protein-degrading strain, *Bacillus subtilis* EB464. *J Microbiol Biotechnol*, 30, 210-215
8. Ahn YS, Kim YS, Shin DH (2006) Isolation, identification and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional Cheonggukjang. *Korean J Food Sci Technol*, 38, 82-87
9. Jung HK, Jeong YS, Youn KS, Kim DI, Hong JH (2009) Quality characteristics of soybean paste (*Doejang*) prepared with *Bacillus subtilis* DH3 expressing high protease levels and deep-sea water. *Korean J Food Preserv*, 16, 348-354
10. Kim DY, Lee ET, Kim SD (2003) Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* K7 isolated from Korean traditional soy sauce. *J Korean Soc Agric Biol Chem*, 46, 176-182
11. Yang SJ, Lee DH, Park HM, Jung HK, Park CS, Hong JH (2014) Amylase activity and characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 isolated from Doenjang. *Korean J Food Preserv*, 21, 286-293
12. Bell DS (2004) Type 2 diabetes mellitus : what is the optimal treatment regimen? *Am J Med*, 116, 23-29
13. Lebovitz HE (1997) Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 26, 539-551
14. De Melo EB, da Silveira Gomes A, Cavalho I (2006)  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase inhibitors : chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62, 10277-10302
15. Courageot MP, Frenkiel MP, Dos Santos CD, Deubel V, Depres P (2000) Alpha-glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *J Virol*, 74, 564-572
16. Kim SD (2014) Isolation and characterization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor produced by *Bacillus* sp. SKU31-1 Strain. *Korean J Microbiol*, 50, 381-383
17. Schmidt DD, Frommer w, Junge B, Muller L, Wingender W, Truscheit E, Schafer D (1977) Alpha-glucosidase inhibitors. *Naturwissenschaften*, 64, 535-536
18. Zhu YP, Yin LJ, Cheng YQ, Yamaki K, Yutaka M, Su YC, Li LT (2008) Effect of source of carbon and nitrogen on production of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* B2. *Food Chem*, 109, 737-742
19. Myoung KS, Heo G, Yoon SY, Shim JJ, Lee JH, Lim KS, Huh CS (2008) Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* Y3-7 culture broth on  $\alpha$ -glucosidase activity. *Korean J Food Sci Technol*, 40, 558-561
20. Kunitz M (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol*, 30, 291-295
21. Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R (1997)

- Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotech Biochem*, 61, 177-178
22. Jung HJ (2012) Preparation of functional *deonjang* using *Bacillus amyloliquefacie* -ns isolated from traditional commercial *deonjang*. MS Thesis. Kyung hee University. Korea. p 16
  23. Lee NR, Go TH, Lee SM, Hong CO, Park KM, Park GT, Hwang DY, Son HJ (2013) Characteristics of Chungkookjang prepared by *Bacillus amyloliquefaciens* with different soybeans and fermentation temperatures. *J Microbiol*, 49, 71-77
  24. 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, 154-160
  25. Kim JY (2007) Isolation and characterization of an alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* JK-1. *J Microbiol*, 43, 331-336
  26. Hwang SY (1995) Purification and characterization of extracellular serine protease produced from *Bacillus* sp. KUN-17. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 23, 53
  27. Moon SY, Oh TK, Rho HM (1994) Purification and characterization of an extra cellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RM 615. *Korean Biochem J*, 27, 323-329
  28. Kim TH, Park SH, Lee DS, Kwon TK, Kim JH, Hong SD (1990) Properties of alkaline protease produced by an alkalophilic *Bacillus* sp. *J Microbiol Biotechnol*, 18, 159-163
  29. Bang SH, Jeong IS (2011) Characterization of an alkaline protease from an alkalophilic *Bacillus pseudofirmus* HS-54. *Korean J Microbiol*, 47, 194-199
  30. Lim SI, Kwak EJ, Choi SY, Yoo JY (2002) Characteristics of protease produced by *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae* and *Absidia corymbifera* from Korean traditional Meju. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 31, 211-215
  31. Byun YG, Kim SH, Joo HK, Lee GS, Yim MH (1998) Purification and characterization of protease produced by *Bacillus subtilis* YG-95. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 41, 349-354
  32. Bae HC, Choi SH, Na SH, Nam MS (2012) Characteristics of  $\alpha$ -amylase and protease produced from *Bacillus amyloliquefacies* CNL-90 isolated from malt grain. *J Anim Sci Technol*, 54, 133-139
  33. Lee JY, Jeong SJ, Cho MJ, Cho KM, Kim GM, Shin JH, Lee KC, Kim JS, Kim JH (2014) Fibrinolytic activities of *Bacillus* species isolated from traditional fermented soyfoods. *J Agric Life Sci*, 48, 163-173
  34. Kim JW (2009) Screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor producing *Bacillus subtilis* and its application. MS Thesis. Kangwon University, Korea, p 40-43
  35. Kim SH, Lee JY, Whang GY, Cho YS, Park YS, Kang KD, Seong SI (2011) Isolation and identification of a *Bacillus* sp. producing  $\alpha$ -glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin. *J Microbiol Biotechnol*, 39, 49-55