

FOOD&CHEMISTRY

Comparison of changes in functional characteristics of fermented soybean with different microbial strains

Hyewon Lim, Bosung Kim, Heewon Jung, Sungkwon Park*

Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Science, Sejong University, Seoul 05006, Korea

*Corresponding author: sungkwonpark@sejong.ac.kr

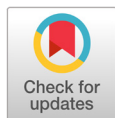
Abstract

The purpose of this study was to compare the effect of solid-state fermentation on soybean using three microbial strains under four different fermentation times. Soybean was fermented for 12, 24, 36 or 48 hours with highly proteolytic microbes, either *Bacillus amyloliquefaciens* (BA), *B. subtilis* (BS), or *B. subtilis* var. natto (BN), and levels of total protein concentration, protein distribution, and antioxidant activity were analyzed. Total protein was highest in the BS 12 h group ($9.21 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) and lowest in BN 48 h ($6.80 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), respectively ($p < 0.001$). Furthermore, three microbes decomposed large molecular weight proteins as well as major allergens of soybean such as β -conglycinin, Gly m Bd 30K, and glycinin. Each treatment group showed the highest degradation rate at 48 h fermentation and among the three microbes, BS showed a relatively higher degradation rate. The radical scavenging ability, known as an indicator of antioxidant activity, showed a significant increase in all treatment groups except BA 24 h. The results from this study suggest that protein concentration, and degradation and antioxidant activity were affected by different types of microbial strains and fermentation period and that *B. subtilis* fermentation might be the most effective way to increase nutritional and functional properties of soybean.

Key words: *Bacillus subtilis*, solid-state fermentation, soybean

Introduction

대두는 약 40%의 단백질을 함유하고 있는 대표적인 식물성 단백질 소재이다. 대두단백은 영양적, 기능적 특성 및 가공적성이 뛰어나 식품 또는 동물 사료에 주로 이용되며 (Mugisha et al., 2016) 대두 단백질의 약 70%는 7S (β -conglycinin), 11S (glycinin) globulin 단백질로 구성되어 있다. 그 외에도 이소플라본, 페놀화합물 등의 항산화 물질과 생리활성물질을 함유하고 있고 최근에는 혈당조절, 항콜레스테롤 등 다양한 기능을 가진 식품으로 주목받고 있다 (Nishinari et al., 2014).



OPEN ACCESS

Citation: Lim H, Kim B, Jung H, Park S. Comparison of changes in functional characteristics of fermented soybean with different microbial strains. Korean Journal of Agricultural Science 49:995-1001. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20220091>

Received: September 28, 2022

Revised: November 22, 2022

Accepted: November 25, 2022

Copyright: © 2022 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

그러나 대두에는 8대 알레르기 유발 물질(알레르겐)이 포함되어 폭 넓은 사용 및 섭취가 제한적이며, 다른 콩과 식물과 교차 반응을 일으킬 수 있어 주의가 필요하다(Frias et al., 2008; Ra et al., 2022). 주로 알레르기를 유발하는 물질은 단백질이며, 대두의 주요 알레르겐 단백질로는 7.0 - 71 kDa 크기의 β -conglycinin (α , α' , β -subunit), Gly m Bd 30K 및 glycinin (acidic, basic subunit) 등이 있다.

미생물 발효는 알레르겐을 분해하여 알레르기 유발성을 저하하는 동시에 건강 기능성을 증진할 수 있는 방법 중 하나로 알려져 있다. 그중 고상발효는 낮은 수분 함량으로 고체 기질을 발효하는 방법으로 공정 중 오염될 가능성이 적으며 낮은 에너지 소모량과 높은 생산성을 특징으로 하는 배양 기술이다(Singhania et al., 2009).

Bacillus 속 균주는 단백질 분해효소 생산에 주로 이용되는 세균 중 하나로 열과 pH에 안정성을 가지므로(Yang et al., 2019) 상업적 가치가 뛰어나 식품 가공, 사료 보충제 및 박테리아 접종제 등 광범위하게 이용되고 있다(Back et al., 2022; Bai et al., 2022).

본 연구에 사용된 균주인 *Bacillus amyloliquefaciens*는 막걸리, 템페, 된장 등 전통 발효 식품이나 치즈, 요거트와 같은 유제품에도 적용할 수 있는 활용성이 뛰어난 균주로 α -amylase, protease, lipase와 cellulase 등 다양한 효소의 생산이 보고된 바 있으며(Ngalimat et al., 2021), 최근 Eom 등(2015)은 된장에서 분리된 *B. amyloliquefaciens* 균주가 *B. cereus*와 그 독소에 억제효과를 보임을 확인했다(Woldemariamyohannes et al., 2020).

*B. subtilis*는 청국장을 제조할 때 주로 이용되는 균주로 알칼리성 단백질 분해효소를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있으며 항균 화합물을 생성하여 식품 방부제 및 동물 의약품 등 다방면으로 활용되고 있다(Wang et al., 2015).

B. subtilis var. natto는 일본의 전통 발효식품인 낫토(natto)를 제조할 때 이용되는 *B. subtilis* 와 계통학적으로 동일한 균주 중 하나로 최근 항균, 항염증, 항산화, 면역 조절 활성 등의 효과가 입증되었다(Schallmey et al., 2004; Ruiz Sella et al., 2021).

발효 대두에 대한 연구는 지속적으로 이어지고 있으나, *Bacillus* 속 균주의 발효 시간에 따라 변화되는 기능적 특성에 대한 비교는 아직 미비하다. 따라서 본 연구에서는 단백질 분해능이 뛰어난 *Bacillus* 속 균주로 발효한 대두의 단백질 분포 변화 및 기능적 특성을 비교하고자 한다.

Materials and Methods

실험 균주 배양

발효과정에 사용된 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*와 *Bacillus subtilis* var. natto로, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*는 건국대학교 동물자원과학과에서 제공받았으며 각각 우유와 된장에서 분리되었다. 낫토에서 분리된 *Bacillus subtilis* var. natto (KCTC3239)는 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받았다. *B. amyloliquefaciens*와 *B. subtilis*는 pH 7.4 nutrient broth에서 37°C로 배양되었으며 *B. subtilis* var. natto는 pH 6.8 nutrient broth에서 30°C로 배양되었다.

대두 발효물 제조

본 실험에서는 대한농산의 국산 백태를 구매하여 실험을 진행하였고 발효 과정은 다음과 같다. 대두를 흐르는 수돗물에 세척한 뒤 증류수에 24시간 침지하였다. 물기가 제거된 대두는 121°C에서 30분 증자 후 37°C 이하가 되도록 충분히 냉각하였다. 각각의 균주를 대두 1 g 당 10^6 CFU가 되도록 접종하여 상대습도 90%, 온도 37°C에서 각각 12, 24, 36, 48 시간 발효하고 121°C에서 15분 가압증자하여 발효를 중단하였다. 이후 발효된 대두는 동결건조하여 보관하였다.

대두 단백질 추출 및 농도 측정

발효 대두는 곱게 분쇄한 후 시료 내 지방성분을 제거하기 위해 0.07% β -mercaptoethanol이 함유된 acetone에서 2시간 교반하였다. 이후 얻어진 분말은 pH 8.0 50 mM Tris-HCl buffer과 1 : 10 (w·v⁻¹) 비율로 섞은 후 4시간 교반하여 4°C, 8,000 × g에서 40분간 원심분리하였다. 상등액은 실험 전까지 -20°C에 보관하였고 BCA (bicinchoninic acid) protein assay를 이용하여 단백질 정량하였다. Standard로는 bovine serum albumin (BSA)이 사용되었고, 단백질 추출물과 BSA는 96-well plate에 25 μ L씩 분주되었고 각각 200 μ L의 Working reagent와 반응하여 Multiskan SkyHigh Microplate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

발효 대두 추출물은 동일한 농도로 증류수와 희석한 뒤 5X Tris-glycine SDS loading buffer로 변성되었고 1 well 당 15 μ g이 되도록 loading 하였다. 전기영동은 15% separating gel과 5% stacking gel을 이용하여 각 80, 100 V에서 시행되었으며 gel은 Coomassie staining solution으로 염색되었다.

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유 라디칼 소거능 분석

분쇄 대두 샘플 0.1 g을 추출용매 1 mL에 넣고 섞은 뒤 24시간 동안 실온에 보관하였다. 이후 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 뒤 상등액을 채취하여 실험에 이용하였다. 빛이 없는 상태에서 샘플 용액 40 μ L에 0.2 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) solution 160 μ L을 넣어준 뒤 37°C에서 30분 반응시킨 후 Multiskan SkyHigh Microplate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid가 사용되었으며 DPPH 라디칼 소거능은 Ascorbic acid standard curve를 이용하여 계산한 뒤 μ g AAE (ascorbic acid equivalent)/100 mg of dry weight로 나타내었다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복으로 수행하였고 값을 평균과 표준편차로 나타내었다. 유의성은 Prism 9.40 (GraphPad Software, California, USA)을 이용하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 Two-way ANOVA와 Tukey test를 통해 검증하였다. 결과값의 유의 수준은 Control group과 비교하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 와 같이 나타냈다.

Results and Discussion

단백질 농도

발효균주 및 시간 별 단백질 농도를 확인하기 위해 BCA assay로 분석하였다(Fig. 1). 대조군은 8.61 μ g· μ L⁻¹의 농도를 보였으며 *B. amyloliquefaciens*로 12시간 발효한 대두를 제외하고 모두 대조군보다 높은 농도 값을 나타냈다.

B. subtilis 12, 24시간 발효물과 *B. amyloliquefaciens* 24시간, 48시간 발효물의 단백질농도는 대조군에 비해 유의적인 증가를 보였다($p < 0.05$). 반면 *B. subtilis* var. natto로 발효한 대두에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으며 발효 시간에 따른 단백질 농도의 차이를 보이지 않았다. *B. subtilis*로 12시간 발효한 대두의 단백질 농도는 대조군 대비 51.74% 증가하였고 *B. amyloliquefaciens*로 48시간 발효한 대두는 31.57%의 증가를 나타냈다.

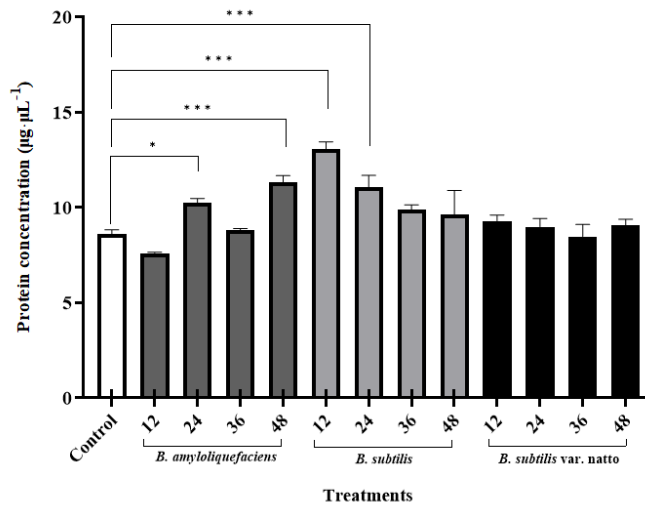


Fig. 1. Protein concentration of control and fermented soybean with different fermentation time. *B.*, *Bacillus*.

SDS-PAGE

발효 대두 단백질의 분포를 확인하기 위해 발효 시간 별 대두 단백질 추출물을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 시간이 경과함에 따라 고분자 단백질 밴드가 분해됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 발효 전 대두는 10 - 140 kDa에 걸쳐 다양한 밴드가 분포하였으며 주요 알레르겐으로 알려진 β-conglycinin (52 - 76 kDa), Glycinin (21 - 38 kDa) 및 Gly m Bd 30K (34 kDa) 단백질 밴드가 관찰되었다. 12시간 발효 이후부터 60 kDa 이상의 고분자 밴드가 희미해지고 15 - 25 kDa 사이의 저분자 밴드의 농도가 증가하였다. *B. amyloliquefaciens*와 *B. subtilis* 발효물은 발효시간의 경과에 따른 단백질 밴드의 변화를 눈으로 확인할 수 있었지만 *B. subtilis var. natto* 발효물에서는 발효 시간과 관계없이 유사한 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 발효 전 대두에서 뚜렷하게 관찰되는 β-conglycinin은 세가지 발효 대두에서 모두 높은 수준으로 분해되었음을 확인할 수 있었으며 *B. subtilis* 발효 대두에서 최대 87.19%의 분해율을 보였다 (Table 1). 38 kDa의 Glycinin 단백질은 *B. amyloliquefaciens*와 *B. subtilis*의 48시간 발효물에서 대부분 분해되었으나 *B. subtilis var. natto* 발효물에서는 발효시간의 증가에 따른 뚜렷한 변화를 확인할 수 없었다. 본 결과는 대두에 접종된 미생물이 분비하는 단백질 분해효소에 의해 주요 알레르겐으로 알려진 단백질이 작은 펩타이드로 가수분해 되었으며 *B. subtilis*가 세 균주 중 비교적 높은 분해율을 가짐을 알 수 있다. 이 결과는 *B. subtilis*의 발효능을 간접적으로 증명하고 발효에 인한 pH 감소와 연관된 것으로, 선행연구에서 pH 변화에 따른 β-conglycinin의 구조가 바뀌어 가수분해가 더 활발히 진행되는 결과와도 관련이 있을것으로 사료된다(Yang et al., 2020).

Table 1. Relative content of allergenic proteins in fermented soybean.

MW ^a (kDa)	<i>B. amyloliquefaciens</i>						<i>B. subtilis</i>						<i>B. subtilis var. natto</i>					
	Control	12	24	36	48	Total	Control	12	24	36	48	Total	Control	12	24	36	48	Total
76.0	51.094	19.088	10.917	10.183	8.719	100	49.530	15.580	13.307	12.859	8.724	100	44.996	12.45	13.715	17.4	11.978	100
72.0	54.231	19.212	9.28	9.288	7.988	100	60.135	12.305	11.551	8.303	7.706	100	56.646	9.413	9.315	15.887	8.77	100
52.0	40.464	19.475	13.949	13.104	12.986	100	32.536	18.694	18.689	15.901	14.181	100	37.047	14.095	16.936	18.712	13.209	100
38.0	16.408	10.776	8.595	8.593	5.542	100	35.609	18.166	19.892	16.28	10.053	100	38.59	15.33	16.087	15.959	14.033	100
34.0	21.269	23.095	18.682	17.923	19.032	100	24.698	17.856	19.418	19.00	19.028	100	27.116	17.743	19.815	19.315	16.011	100
21.0	28.733	21.08	16.796	16.66	16.731	100	40.345	14.969	15.15	15.351	14.185	100	34.833	16.41	15.86	18.204	14.693	100

^a Molecular weight (MW) (kDa) means the molecular weight of main allergens. 76.0, α' subunit of β-conglycinin; 72.0, α subunit of β-conglycinin; 52.0, β subunit of β-conglycinin; 38.0, acidic subunit of glycinin; 34.0, Gly m Bd 30K; 21, basic subunit of glycinin. *B.*, *Bacillus*.

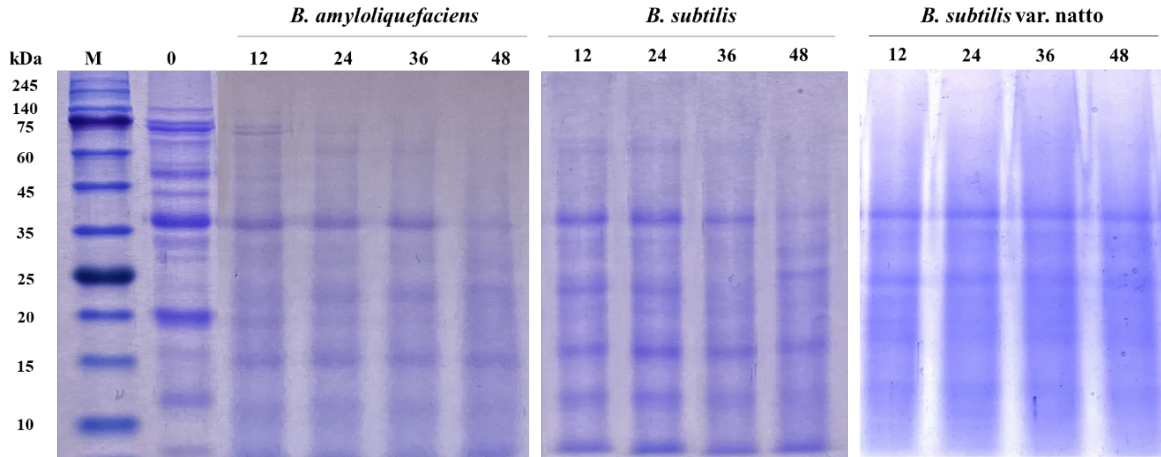


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of extracted soybean protein after different fermentation time (0, 12, 24, 36, 48 hour) by *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. subtilis var. natto*. M, protein marker; 0, unfermented soybean; 12, 12 hours fermented soybean; 24, 24 hours fermented soybean; 36, 36 hours fermented soybean; 48, 48 hours fermented soybean. SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; *B.*, *Bacillus*.

라디칼 소거능

발효하지 않은 대두와 시간 별 발효처리한 대두의 항산화능력을 DPPH assay로 측정된 결과는 Fig. 3와 같다. 발효처리한 샘플이 대조군보다 높은 라디칼 소거능을 가짐을 확인할 수 있었다. *B. subtilis var. natto* 발효 대두가 평균적으로 가장 높은 항산화능을 보였으며 24시간 발효물(41.5909 $\mu\text{g AAE}/100 \text{ mg DW}$)에서 가장 높은 값으로 대조군(37.348 $\mu\text{g AAE}/100 \text{ mg DW}$) 대비 약 11.36% 증가하였다. *B. amyloliquefaciens* 발효 대두는 세가지 균주 중 가장 낮은 항산화능을 보였으나 대조군보다 유의적으로 높은 값을 보였다($p < 0.01$). 이는 효소를 이용한 대두 가수분해물이 기존 대두에 비해 항산화능이 향상되었다는 기존 연구와 유사한 결과를 나타내며(Zhang et al., 2018) 큰 분자량의 단백질이 유리 아미노산으로 분해되면서 강한 환원력을 나타낸다는 선행 연구(Sanjukta et al., 2015)에 따라 Fig. 2에서 분해된 유리 아미노산의 증가가 본 결과에 기여하였음을 추측할 수 있다.

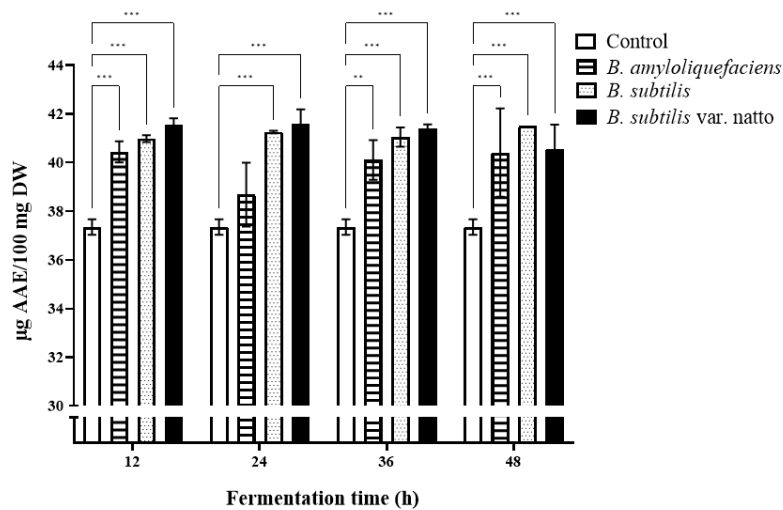


Fig. 3. DPPH radical scavenging capacity ($\mu\text{g AAE}/100 \text{ mg}$) of raw soybean (control) and fermented soybean with different microbial strains and fermentation time (12, 24, 36, 48 hours). DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DW, distilled water; *B.*, *Bacillus*.

Conclusion

대두는 식품산업과 가축용 사료산업에서 널리 활용될 수 있는 대표적인 단백질 원료로 최근 대체단백식품에 주 원료로 사용되고 있다. 이에 본 연구에서는 *Bacillus* 균주 발효를 통해 대두의 기능적 특성 변화를 확인하고자 하였다. Protease 활성이 높은 것으로 알려진 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* 와 *B. subtilis* var. *natto* 균주를 선발한 뒤 각각 12시간 간격으로 발효를 진행하였으며 균주 별 발효처리가 단백질 농도 및 분포와 향산화능에 미치는 영향을 조사하였다. 발효시간별로 상이한 결과를 보였으나 특정 시간을 제외한 대부분의 처리군에서 단백질 농도가 증가하였으며 대두 단백질이 발효 시간이 증가함에 따라 분해됨을 확인할 수 있었다. 단백질 농도는 $11.33 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 의 농도를 보인 *B. subtilis* 12시간 발효물에서 가장 높게 나타났으며 *B. subtilis* 48시간 발효물에서 가장 높은 알레르겐 단백질의 분해를 확인할 수 있었다. 또한 대조군과 비교했을 때, 모든 처리군에서 향산화능의 증가를 확인할 수 있었으며 *B. subtilis* var. *natto* 24시간 발효물에서 가장 높은 향산화능을 보였다.

이상의 결과로부터 발효균주 및 시간에 따라 대두의 특성 변화에 미치는 영향력이 상이하며 추후 대두의 사용 용도별로 적절한 발효 균주를 선정하여 고품질 발효 식품에 접목할 수 있을 것으로 예상된다.

Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 ‘국내산 축산물 활용 반려견 기능성 사료 안전성 증진기술 개발(과제번호: PJ01689101)’의 지원으로 수행되었습니다.

Authors Information

Hyewon Lim, <https://orcid.org/0000-0001-9458-9941>

Bosung Kim, <https://orcid.org/0000-0002-5417-0238>

Heewon Jung, <https://orcid.org/0000-0002-3578-9344>

Sungkwon Park, <https://orcid.org/0000-0002-7684-9719>

References

- Back C, Han Y, Dumin WB, Park J, Bae Y. 2022. Phylogenetic analysis and biological characterization of *Stemphylium* species isolated from *Allium* crops. *Korean Journal of Agricultural Science* 49:113-120. [in Korean]
- Bai J, Franco M, Ding Z, Hao L, Ke W, Wang M, Xie D, Li Z, Zhang Y, Ai L, et al. 2022. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* on fermentation, dynamics of bacterial community and their functional shifts of whole-plant corn silage. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 13:1-14.
- Eom JS, Choi HS. 2015. Inhibition of *Bacillus cereus* growth and toxin production by *Bacillus amyloliquefaciens* RD7-7 in fermented soybean products. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:44-55.

- Frias J, Young SS, Martínez-Villaluenga C, De Mejia EG, Vidal-Valverde C. 2008. Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:99-105.
- Mugisha J, Asekova S, Kulkarni KP, Park CW, Lee J. 2016. Evaluation of crude protein, crude oil, total flavonoid, total polyphenol content and DPPH activity in the sprouts from a high oleic acid soybean cultivar. *Korean Journal of Agricultural Science* 43:723-733.
- Ngalimat MS, Yahaya RSR, Baharudin MMAA, Yaminudin SM, Karim M, Ahmad SA, Sabri S. 2021. A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms* 9:1-18.
- Nishinari K, Fang Y, Guo S, Phillips GO. 2014. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids* 39:301-318.
- Ra SH, Bae HC, Nam M. 2022. Effects of soybean meal fermented by *Bacillus coagulans* NRR1207 and kefir on the feeding characteristics of weaned HANWOO calves and Holstein cows. *Korean Journal of Agricultural Science* 49:93-102. [in Korean]
- Ruiz Sella SRB, Bueno T, de Oliveira AAB, Karp SG, Soccol CR. 2021. *Bacillus subtilis* natto as a potential probiotic in animal nutrition. *Critical Reviews in Biotechnology* 41:355-369.
- Sanjukta S, Rai AK, Muhammed A, Jeyaram K, Talukdar NC. 2015. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. *Journal of Functional Foods* 14:650-658.
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* 50:1-17.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44:13-18.
- Wang T, Liang Y, Wu M, Chen Z, Lin J, Yang L. 2015. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 23:744-754.
- Woldemariamyohannes K, Wan Z, Yu Q, Li H, Wei X, Liu Y, Wang J, Sun B. 2020. Prebiotic, probiotic, antimicrobial, and functional food applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68:14709-14727.
- Yang J, Wu XB, Chen HL, Sun-waterhouse D, Zhong HB, Cui C. 2019. A value-added approach to improve the nutritional quality of soybean meal byproduct: Enhancing its antioxidant activity through fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens* SWJS22. *Food Chemistry* 272:396-403.
- Yang Y, Wang Q, Lei L, Li F, Zhao J, Zhang Y, Li L, Wang Q, Ming J. 2020. Molecular interaction of soybean glycinin and β -conglycinin with (-)-epigallocatechin gallate induced by pH changes. *Food Hydrocolloids* 108:106010.
- Zhang Q, Tong X, Qi B, Wang Z, Li Y, Sui X, Jiang L. 2018. Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport. *Journal of Functional Foods* 42:298-305.