

Phytase 생산균주의 콩과 옥수수 가루의 발효에 미치는 영향

이홍열 · 정희종*

전남대학교 농과대학 식품공학과

Effect of Phytase-Producing Bacteria on the Fermentation of Soybean and Corn Meals

Lee, Hong-Yeol and Hee-Jong Chung*

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Abstract — Two Phytase-producing bacteria isolated from the fermented soybean and corn meals, *Enterobacter cloacae* and *Bacillus licheniformis*, were used to investigate the degradation of phytic acid and changes of some nutrient contents in fermented soybean and corn meals. The pH in fermented soybean meal with *E. cloacae* was rapidly dropped after 48 hours, but the pH in fermented corn meal was declined gradually for 5 days. The degradation of phytic acid were optimized at 35°C, pH 8.0 for 5 days and at 30°C, pH 7.0 for 5 days fermented with *E. cloacae* and *B. licheniformis*, respectively. Riboflavin and vitamin B₁₂ contents were greatly increased after the fermentation with these two bacteria, and also available lysine, methionine and tryptophan contents were greatly increased.

Phytic acid는 종자류에 있는 인의 주요 저장형태이며, 식물 특히 곡류나 두류에 널리 존재하는 영양저해물질의 하나이기도 하다(1-3) 더구나, phytate는 구리, 아연, 코발트, 마그네슘, 철 및 칼슘 등과 결합하여 phytate mineral 또는 protein-phytate-mineral complexes를 형성하기 때문에 장내의 체내흡수가 크게 감소된다고 알려져 있다(4).

두류의 소비량이 날로 증가함을 볼때 대두를 주원료로 하는 여러가지 식품중의 total phosphorus의 약 70%를 차지하는 phytic acid phosphorus는 무기성분의 체내 이용율에 크게 영향을 미치기 때문에 이들 phytates의 제거 또는 감소에 관한 연구가 절실히 요구된 바(5), legume seeds의 수화나 발아과정에서의 내부효소에 의한 phytates의 가수분해에 대한 연구는 진행되고 있으나(6), 미생물 효소에 의한 phytates 분해에 대한 연구는 미흡하다고 판단되어 본

연구에서는 제 1보에서 분리된 콩과 옥수수가루의 발효에 관여하는 세균(7) 중 phytase 생산성이 우수하다고 인정된 두 균주의 콩과 옥수수가루의 발효에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

콩과 옥수수는 전남 승주군 외서면과 순천시에서 수확한지 1개월된 것을 구입하여 각각 파쇄된 것과 이물질을 제거하여 수세한 후 50±1°C에서 48시간 동안 건조, 분쇄하여 30 mesh 체로 친 다음 밀폐된 유리용기에 담아 상온의 어두운 곳에 저장하면서 사용하였다.

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 콩과 옥수수가루 발효과정 중 각각 분리된 phytase 생산능이 우수한 균주인 *Enterobacter cloacae*와 *Bacillus licheniformis*를 사용

Key words: Phytase-producing bacteria, phytase, phytic acid degradation

*Corresponding author

하였다(7).

발효방법

콩 또는 옥수수가루를 각각 비이커에 수도물과 1 : 4 (w/v)로 하여 잘 섞은 후 aluminium foil로 덮고 autoclave를 사용하여 100°C에서 15분간 증자한 다음 수도물을 가해 총량을 1 : 17(w/v)로하여 slurry를 만든다. 각 slurry의 pH를 조절하여 121°C에서 45분간 살균한 후 soybean meal에는 *Enterobacter cloacae*, corn meal 에는 *Bacillus licheniformis*를 접종하여 발효시켰다. 발효된 sample은 위에서와 동일한 방법으로 건조, 분쇄하여 갈색 유리용기에 담아 냉장고에 보관하였다.

pH와 산도의 측정

콩과 옥수수가루를 증자, 살균한 후 각각 두 균주를 24시간 동안 전배양하여 접종액으로하고 시료량의 1%를 접종하여 배양하면서 매 24시간마다 pH와 산도의 변화를 전 보에서와 같은 방법(7)으로 측정하였다. pH는 시료 10 ml를 50 ml 비이커에 취하여 pH meter로 측정하였고 산도는 0.1 N NaOH를 가하여 pH 8.2를 종말점으로 NaOH의 소비 ml 수로 계산하여 % lactic acid로 나타냈다.

Phytic acid 정량

phytic acid는 Tompson and Erdman의 변법(8)으로 추출하여 Bartlett법(9)으로 정량하였다.

phytic acid 분해에 미치는 온도, pH 및 배양시간의 영향

콩 또는 옥수수가루의 발효 중 phytic acid 분해가 최대에 달하는 최적발효 조건을 검토하기 위하여 온도, 초기 pH 및 배양시간을 달리하였을 때의 phytic acid 함량변화를 측정하였다.

수분 및 조단백질의 정량

발효전과 후의 수분과 조단백질은 AOAC 방법(10)에 따라 측정하였다.

비타민의 정량

비타민 B₂와 B₁₂의 함량은 *Lactobacillus casei* ATCC 7469와 *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830을 각각

사용한 Difco의 미생물학적 방법(11)을 사용하여 정량하였다.

Available lysine, methionine 및 tryptophan의 정량

분석시료는 Ford 방법(12)에 따라 준비하였고 Difco의 미생물학적 방법(11)에 준하여 L-lysine은 *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042, DL-methionine은 *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042, L-tryptophan은 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014를 이용한 Bioassay에 의하여 정량하였다.

결과 및 고찰

pH 및 산도의 변화

콩과 옥수수가루를 기질로 각각 *E. cloacae*와 *B. licheniformis*의 단독균주로 접종, 발효시켰을때의 pH와 산도의 변화는 그림 1에서와 같다. 즉, 콩가루에 *E. cloacae*를 접종한 경우 초기 pH 6.95에서 발효 2일째에 pH 5.35로 급격하게 떨어졌는데 이는 주로 coliform 균인 *E. cloacae*가 증식하여 48시간후면 정상기에 도달함을 보여주었으나 발효 2일째 이후에는 pH나 산도의 변화가 거의 없음을 알 수 있었다.

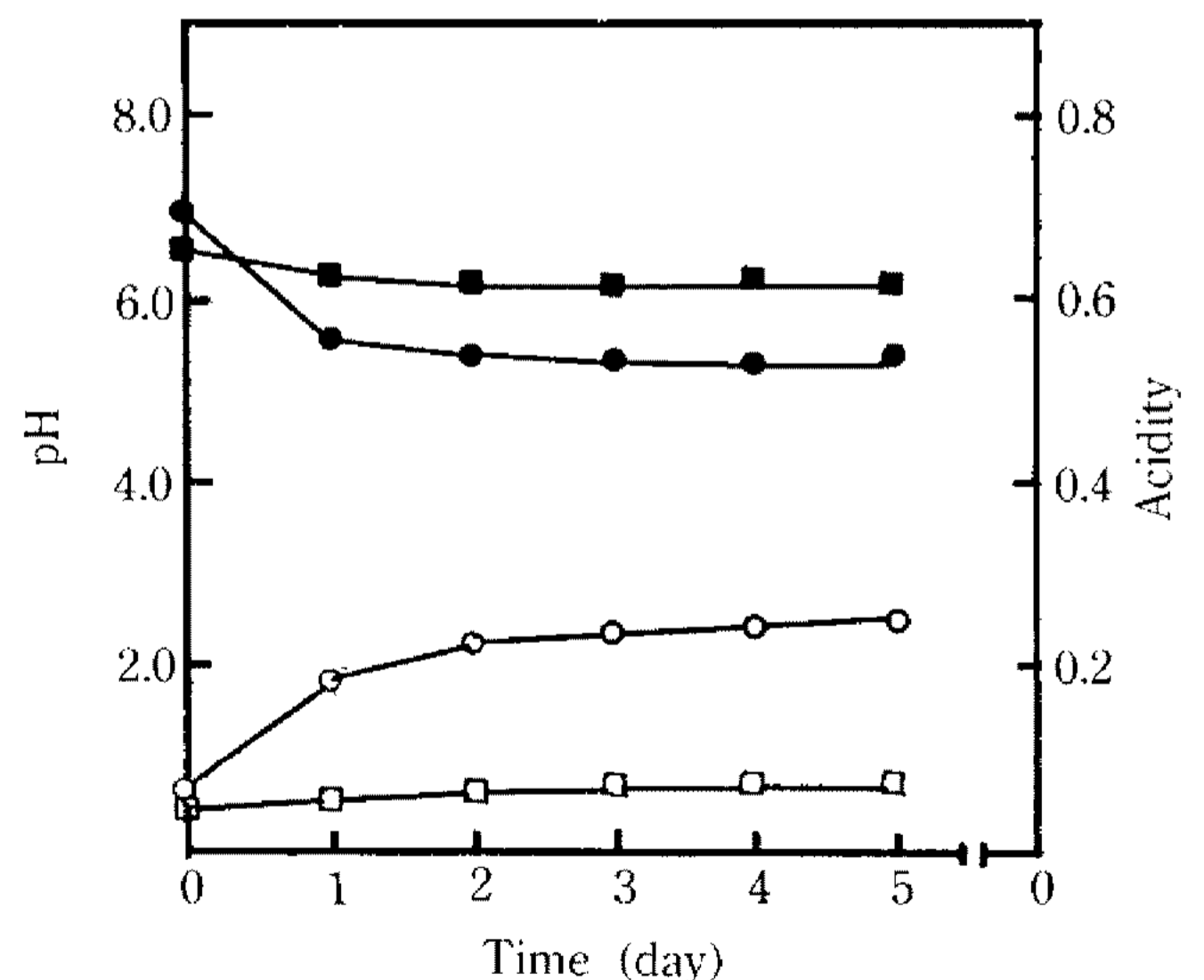


Fig. 1. Changes in pH and acidity of soybean and corn meal fermented with *E. cloacae* and *B. licheniformis*, respectively.

pH (●) and acidity (○) with *E. cloacae* in soybean meal; pH (■) and acidity (□) with *B. licheniformis* in corn meal.

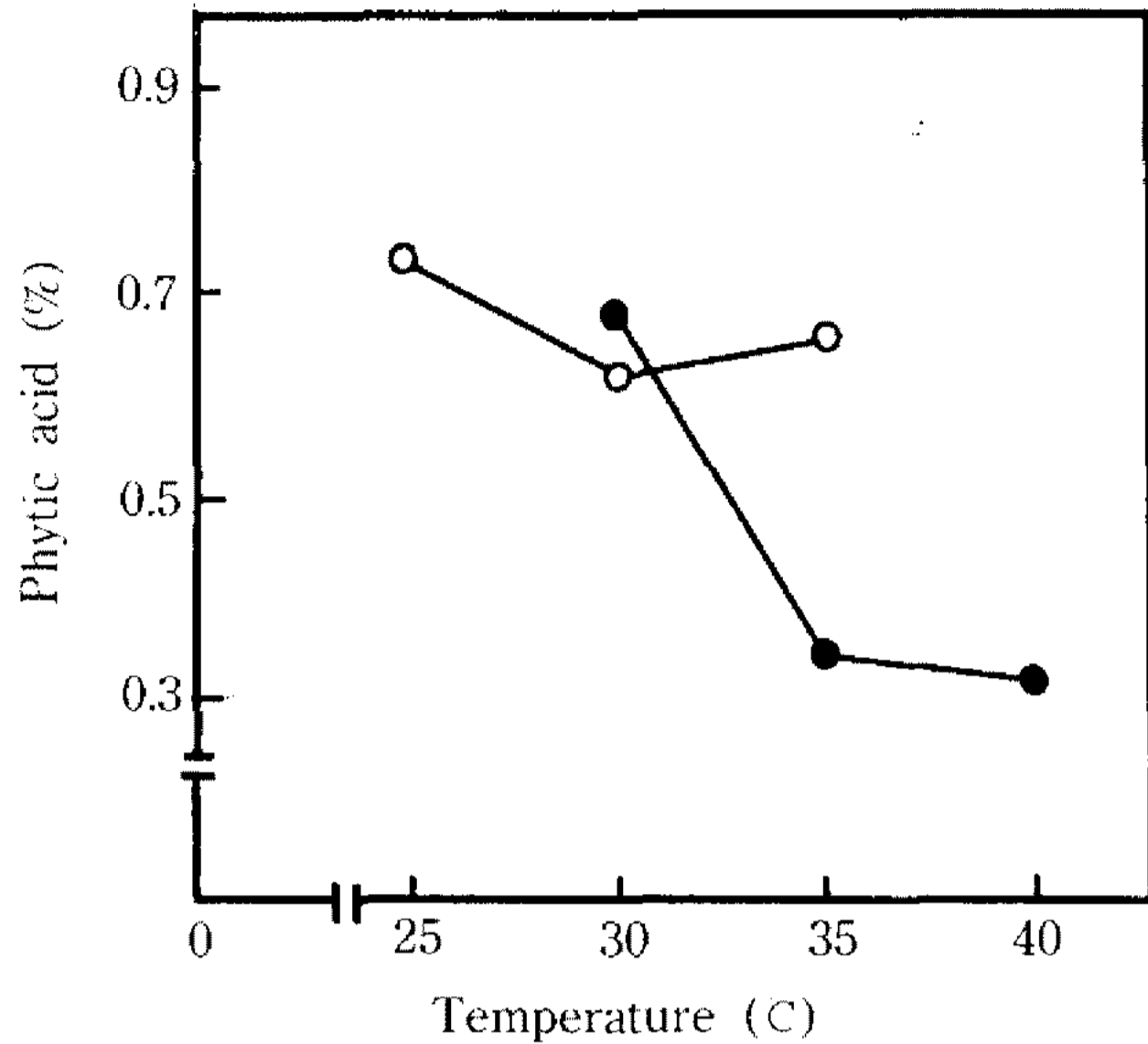


Fig. 2. Effect of temperature on phytic acid degradation in soybean and corn meals fermented with *E. cloacae* (pH 7.0, 120 hrs) and *B. licheniformis* (pH 7.0, 120 hrs), respectively.

●—●: soybean meal with *E. cloacae*; ○—○: corn meal with *B. licheniformis*.

옥수수가루를 기질로 *B. licheniformis*를 접종한 경우 발효중 pH의 큰 변화가 없어 초기 pH 6.55에서 발효 5일째에 pH 6.1로 떨어졌는데 이는 *B. licheniformis*가 당을 분해하여 산을 생성하지 못함을 나타낸 것이다.

phytase 생산을 위한 최적배양조건

두 균주를 단독균주로 접종하여 콩과 옥수수가루를 기질로 발효시키는 과정에서의 온도, 초기 pH 및 배양시간을 달리하였을때의 phytic acid의 함량변화를 측정된 결과는 그림 2, 3 및 4와 같다. 그림 2에서 보면 콩가루를 기질로 *E. cloacae*를 접종 발효시켰을 때 35C와 40C에서의 phytic acid분해정도는 30C에서보다 2배 이상으로 컸으나, 35C 이상에서는 큰 차이가 없었다. 옥수수가루를 기질로 *B. licheniformis*를 접종, 발효시켰을 때 phytic acid의 분해가 30C에서 최대에 달하였으며 30C 전후의 온도에서는 오히려 감소함을 알 수 있었다. 그림 3을 보면 콩가루 기질에 *E. cloacae*를 접종하여 발효시키면 pH 8.0에서 phytic acid의 분해가 최대를 나타냈고, 옥수수가루 기질에 *B. licheniformis*를 접종, 발효시키면 pH 7.0과 8.0에서 phytic acid분해정도가 거의 비슷하여 최대에 달함을 알 수 있었다. 콩과 옥수수가루를 기질로 *E.*

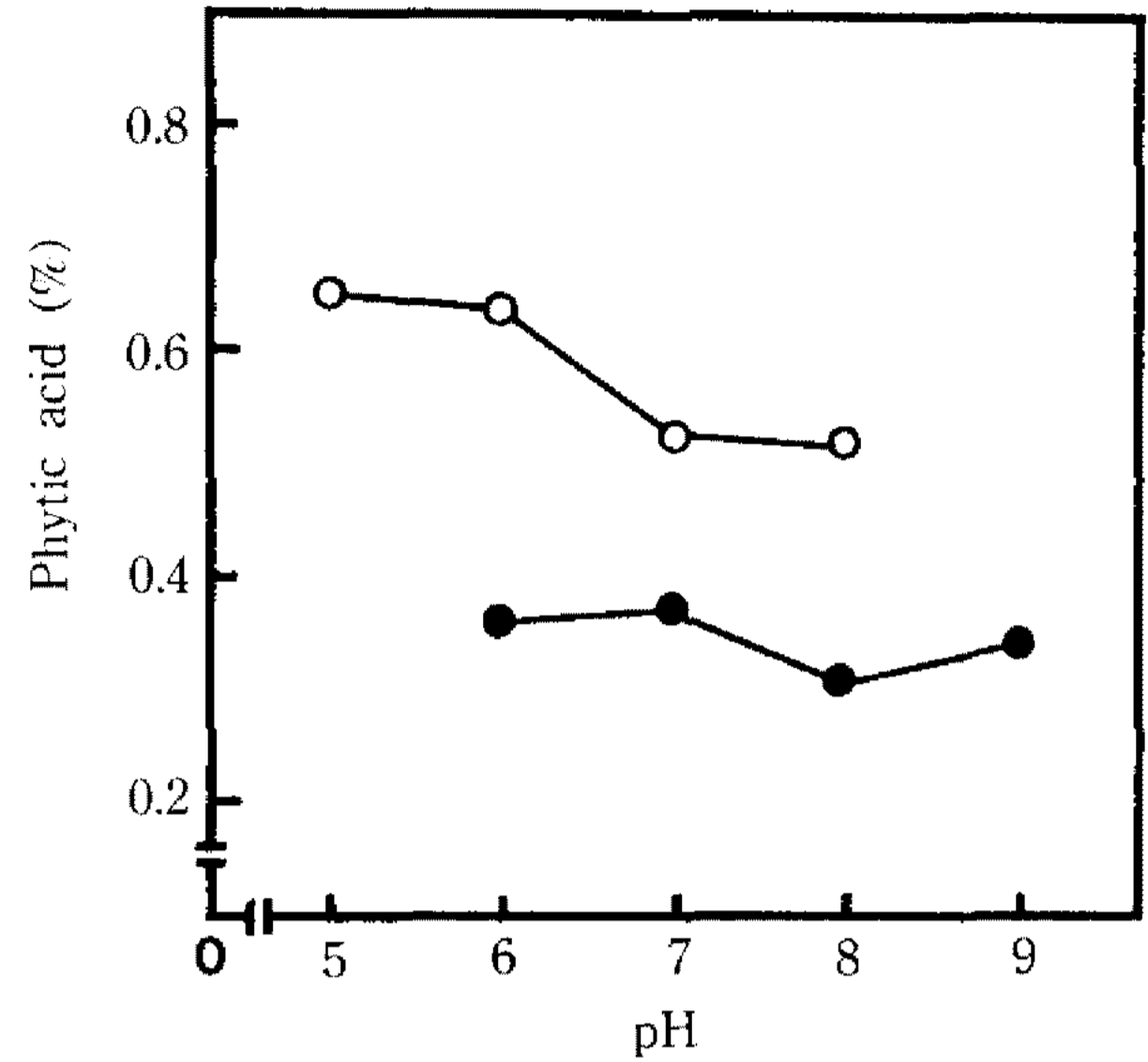


Fig. 3. Effect of initial pH on phytic acid degradation in soybean and corn meals fermented with *E. cloacae* (35°C, 120 hrs) and *B. licheniformis* (30°C, 120 hrs), respectively.

●—●: soybean meal with *E. cloacae*; ○—○: corn meal with *B. licheniformis*.

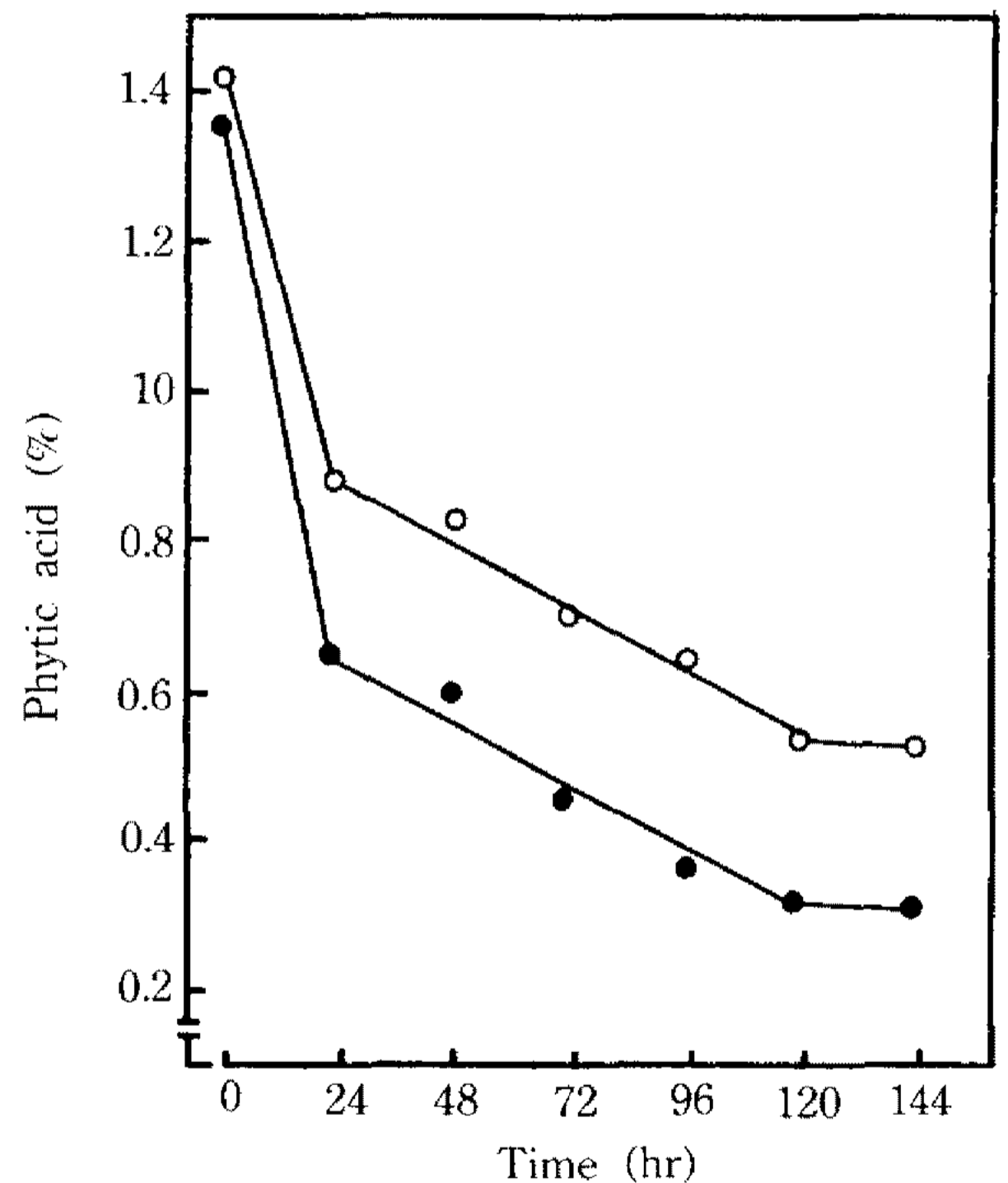


Fig. 4. Effect of incubation time on phytic acid degradation in soybean and corn meals fermented with *E. cloacae* (35°C, pH 8.0) and *B. licheniformis* (30°C, pH 7.0), respectively.

●—●: soybean meal with *E. cloacae*; ○—○: corn meal with *B. licheniformis*.

*cloacae*와 *B. licheniformis*를 접종하여 발효과정 중의 시간에 따른 phytic acid 함량은 그림 4에서와 같이

Table 1. Changes of moisture, crude protein and vitamin contents in non-fermented and fermented soybean and corn meals.

Sample	Moisture (%)	Crude protein (%)	Vitamin	
			B ₂ (mg/100 g)	B ₁₂ (µg/100 g)
Soybean				
Non-fermented	5.69	37.14	0.19	0.77
Fermented with <i>E. cloacea</i> ¹	6.34	38.34	1.42	4.08
Corn				
Non-fermented	5.86	10.53	0.12	0.06
Fermented with <i>B. licheniformis</i> ²	7.12	11.08	0.22	3.46

All values are means of triplicate determination and express as dry weight bases.

¹ Fermented at 35°C, pH 8.0 for 5 days.

² Fermented at 30°C, pH 7.0 for 5 days.

Table 2. Available lysine, methionine and tryptophan contents of non-fermented and fermented soybean and corn meals.

Treatment	Amino acid (mg/gN)		
	Lysine	Methionine	Tryptophan
Soybean			
Non-fermented	26.88	5.07	4.95
Fermented with <i>E. cloacea</i> ¹	43.27	11.94	7.89
Corn			
Non-fermented	15.21	8.42	3.38
Fermented with <i>B. licheniformis</i> ²	37.14	13.63	5.29

¹ Fermented at 35°C, pH 8.0 for 5 days.

² Fermented at 30°C, pH 7.0 for 5 days.

최초 24시간동안 급격한 감소를 보였고 그 이후로도 계속적으로 감소하여 발효 5일째에 최대에 이르러 그 이후에는 거의 변화가 없음을 나타냈다. 즉 콩가루를 기질로 *E. cloacea*를 접종, 발효할때의 phytic acid 분해는 35°C와 초기 pH 8.0에서 5일동안 발효시켰을때 최적에 달하였으며 옥수수가루를 기질로 *B. licheniformis*를 접종, 발효할때의 phytic acid 분해는 30°C와 초기 pH 7.0에서 5일동안 발효시켰을때 최적에 달함을 알 수 있었다. 이는 두 균주가 콩과 옥수수가루에 함유된 1.36%와 1.43%의 phytic acid를 각각 0.35%와 0.56%로 감소시킴으로서 phytic acid 분해세균으로서의 이용가능성을 보여준 것이었다.

일반성분 및 비타민 함량의 변화

콩과 옥수수가루를 기질로하여 *E. cloacea*와 *B. licheniformis*를 각각 접종하여 최적조건에서의 발효한 시료의 수분, 조단백질, 비타민 B₂ 및 B₁₂의 함량은 Table 1과 같다. 비타민 B₂와 B₁₂의 함량은 발효후에 크게 증가함을 보였는데 이는 발효에 관여한 *E. cloacea*와 *B. licheniformis*의 두 균주가 모두 이들 비타민을 다량 생산함을 의미하는 것이다.

Available lysine, tryptophan 및 methionine의 변화

Table 2에서와 같이 이용가능한 lysine, tryptophan 및 methionine의 함량이 콩과 옥수수가루의 발효과정에서 모두 현저하게 증가함을 알 수 있었다. 그런데, Tongnual과 Fields(13)는 옥수수와 옥수수-콩의 혼합물을 천연젖산발효 시켰을때 이용가능한 lysine과 methionine의 함량이 2~3배 증가한다고 보고하였는데 이것은 본 실험에 사용한 phytase 생산균과 같은 발효미생물이 관여했기 때문인 것으로 추정된다. 이처럼 단백질 분해세균은 단백질을 가수분해 할 수 있기 때문에 이용가능한 아미노산의 함량을 증가시키는 것이고, 특히 본 실험에 사용한 콩과 옥수수의 제한 아미노산인 methionine, lysine 및 tryptophan의 이용 가능성이 높아진 것은 의미있는 결과라 하겠다.

요 약

콩과 옥수수가루의 발효에 관여하는 미생물중 phy-

tase 생산성이 강한 두 균주인 *Enterobacter cloacae*와 *Bacillus licheniformis*를 단독 균주로 사용하여 콩과 옥수수가루를 기질로 발효시켰을 때 각 기질의 phytic acid 분해와 그에 따른 영양 성분의 변화를 검토한 결과, 콩가루를 기질로 *E. cloacae*에 의한 발효과정에서는 pH가 발효 2일 동안에 급격히 낮아졌으나, *B. licheniformis*의 경우는 옥수수가루중에 함유된 당으로부터 산을 생성하지 않기 때문에 pH가 발효 5일째까지 약간 감소하는 경향을 보였다. *E. cloacae*와 *B. licheniformis*는 각각 35°C, pH 8.0과 30°C, pH 7.0에서 콩과 옥수수가루를 5일동안 배양했을 때 phytic acid의 분해가 최대에 달하였다. 두 균주 모두 상당량의 riboflavin과 vitamin B₁₂를 발효과정에서 생합성하였으며 콩과 옥수수의 제한 아미노산으로 알려진 lysine, methionine 및 tryptophan의 이용 가능성이 두 균주의 발효에 의해 크게 증가되었다.

감사의 말

본 연구는 한국 과학 재단의 신진연구 학술 조성비 (1986~1988)의 지원에 의해 수행한 연구의 일부로 한국 과학 재단에 감사드립니다.

참고문헌

1. IUPAC-IUB: *Eur. J. Biochem.*, **5**, 1 (1968)
2. Reddy, N., C.V. Balakrishnan and D.K. Salunkhe: *J. Food Sci.*, **43**, 540 (1978)
3. Maga, J.A.: *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1 (1982)
4. Erdman, J.W.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 736 (1979)
5. Lolas, G.M. and P. Markakis: *J. Food Sci.*, **42**, 1094 (1969)
6. Chang, R., S. Schwimmer and H.K. Burr: *J. Food Sci.*, **42**, 1098 (1977)
7. 강성구, 강성국, 정희종: *산업미생물학회지*, **16**, 433 (1988)
8. Thompson, D.B. and J.W. Erdman, JR.: *J. Food Sci.*, **47**, 513 (1982)
9. Bartlett, G.R.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959)
10. AOAC: *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., No. 14-006, 14-067 (1984)
11. Difco: *Media for the Microbiological Assay of Vitamins and Amino acids*, Difco Lab. Inc., Detroit, Michigan (1977)
12. Ford, J.E.: *Bri. J. Nutr.*, **18**, 499 (1964)
13. Tongnual, P. and Fields, M.L.: *J. Food Sci.*, **49**, 563 (1984)

(Received July 25, 1991)