

## 한국인유래의 Amyolytic *Bifidobacterium*에 의한 쌀발효

박종현 · 송혜경 · 안준배 · 지근억\* · 목철균\*\*  
한국식품개발연구원, \*한림대학교 식품영양학과,  
\*\*경원대학교 식품생물공학과

### Rice Fermentation by Korean Amyolytic *Bifidobacterium* spp.

Jong-Hyun Park, Hey Kyung Song, Jun-Bae Ahn,  
Geun Eok Ji\* and Chulkyoon Mok\*\*

Korea Food Research Institute

\*Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

\*\*Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

#### Abstract

For bifidus fermentation food, gelatinized rice solution was fermented without liquefaction/saccharification by amyolytic *Bifidobacterium* spp. isolated from Korean. Eighteen amyolytic *Bifidobacterium* on the starch agar were isolated from 38 Korean and four strains were finally selected as good amylase producers. The most enzyme-producing strain of *Bif.* sp. FBD-12 secreted extracellular amylase of 0.17 U/mg and intracellular amylase of 1.8 U/mg. Three strains of *Bif.* sp. FBD-12, *Bif.* sp. FBD-16 and *Bif.* sp. FBD-17 also showed good growth on pH controlled media by HCl/acetic acid to pH 5.0 while *Bif.* sp. FBD-6 was not so tolerant that viable cell counts reduced to  $10^2$  times on the media. Initial cell number of  $10^6$  CFU/mL for those strains reached to  $10^9$  CFU/mL on the rice medium supplemented with yeast extract (0.2%) and cysteine (0.05%). Ascorbic acid instead of cysteine was added to the medium for improving off-flavour and the best growth was shown at 0.1% addition. Isolated soybean proteins (ISP) of 3% accelerated the growth of the strains. Maximum count of  $10^9$  CFU/mL reached within 12 hour fermentation on the rice medium with ascorbic acid and isolated soybean protein instead of 32 hours on the cysteine medium, and total acidity increased from 0.5% to 1% on each media. Reducing sugar in the ascorbic acid/ISP cultures generally increased especially 2 mg/mL to 15.5 mg/mL for *Bif.* sp. FBD-6. From sensory evaluation, the products showed good acceptability so that it suggested possibility of development of bifidus-fermented rice food.

Key word: *Bifidobacterium* spp., amylase, ascorbic acid, rice fermentation

#### 서 론

쌀은 세계적으로 중요한 작물의 하나이며 한국인의 주식으로 식생활에 중요한 부분을 차지하고 있다. 최근에는 쌀을 이용한 우리나라 고유의 식품인 식혜, 떡, 한과등 여러가지 기호식품이 등장하고 있다. 쌀은 높은 탄수화물 조성(현미: 단백질 7~8%, 수분 14%내외, 탄수화물 76%, 지질 2~3%, 무기질은 K, P가 대부분)을 가지고 있으므로 이러한 특성을 이용하여 기능성 식품으로서 유용도를 높일 수 있을것으로 생각된다.

김 등<sup>(1)</sup>은 유산균으로 우유와 곡류를 발효하여 요구르트의 제조를 시도하였으며, 목 등<sup>(2)</sup>은 쌀을 이용하여 호상 젖산발효식품의 제조를 시도하였다.

유산균은 발효유제품뿐 아니라 김치, 장류등 대부분 자연발효 식품에서 매우 중요한 역할을 담당하는 미생물군이다. 특히, 장내 유산균인 *Bifidobacterium*은 장내에서 lactic, acetic acid를 분비하여 병원성 세균의 증식을 억제하고 항암성, 혈압강하, 콜레스테롤 수치를 낮추는데 기여하는 것으로 알려져 있다<sup>(3,5)</sup>. 최근, 사람의 건강과 장내세균과의 이러한 상관관계가 알려지면서 장내 유용성이 입증되었고, *Bifidobacterium*이 용 음료, 기호성 식품제조등을 통해 장내균총 및 체질 개선등 그 유용성을 이용하려는 움직임이 확산되고

Corresponding author: Jong-Hyun Park, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

있다<sup>6)</sup>. 일본, 유럽등지에서는 이미 유산균 발효음료에 *Lactobacillus*, *Streptococcus* 이외에 *Bifidobacterium*을 혼합배양<sup>7)</sup>하여 이용하기 시작했으며, 우리나라에서도 유산균 발효음료에 *Bifidobacterium*이 이용되는 추세이다<sup>8)</sup>. 국내에서 쌀을 이용한 젖산발효는 전분분해효소 처리후 젖산균으로 발효시키는 연구<sup>2,9)</sup>가 이루어진 바 있으나, *Bifidobacterium*을 이용한 연구는 적다. 그런데 이때 전분분해효소를 처리함으로써 풍미가 나빠짐으로 외부의 효소를 사용하지 않는 액/당화를 위한 amylolytic균주의 개발이 제안되었다.

쌀젖산발효물은 영양적인 면에서는 단백질과 lysine 함량이 낮은 편이므로 lysine 함량이 높은 대두 단백질과 혼합<sup>10)</sup>하여 발효시키면, 영양적으로 상호 보완적이다. 대두 단백질은 대두취로 일컬어 지는 비린내 계통의 좋지 않은 향을 가지고 있으나 젖산 발효를 통하여 향이 개선된다는 보고<sup>11)</sup>가 있다.

따라서 본 연구에서는 *Bifidobacterium*으로 직접 쌀을 발효하여 쌀이용의 다양화와 기능성을 제고하고자 한국인의 장내에서 전분분해효소활성이 있는 *Bifidobacterium* spp.를 분리하여 쌀발효특성을 연구하였고 쌀발효식품의 기호성 향상과 영양적 균형을 위하여 쌀발효에 ascorbic acid와 분리대두단백(isolated soybean protein)를 첨가하여 발효시키 기능성 식품으로의 bifidus 쌀발효식품에 대한 연구결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 배지

실험에 사용된 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) 등에서 구입하여 사용하였으며 *Bifidobacterium* 기본배지인 MBS (modified *Bifidobacterium* selective medium)에 첨가한 fructooligo-saccharide, galactooligosaccharide, isomaltoligosaccharide는 (주)선일포도당으로부터 구입하였다. 당자화성 실험을 위한 API 50 CH system은 Bio Merieux사 (Marcy l'Etoile, France)에서 구입하였다. 기타의 시약은 특급시약을 구입하여 사용하였다.

Amylolytic *Bifidobacterium*의 1차선발 한천배지는 BHI (Difco)에 가용성전분(1%)을 첨가하여 사용하였고, *Bifidobacterium*의 기본배지는 MBS (trypticase 10 g, protease 5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g, L-cysteine 0.5 g,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2\text{Na}$  10 g,  $\text{MgSO}_4$  0.1 g, 올리브고당 mixture 25 mL, D.W 1 L)를 이용하였으며<sup>12)</sup> amylase 활성측정 배지로는 MBS 기본배지에 올리고

당 혼합물 대신 가용성전분 1%를 첨가한 배지를 이용하였다. 당자화성 실험배지로는 SMRS (MRS+ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.02%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01%, L-cysteine 0.05%) 배지와 bromocresol purple (Bio-Rad)을 첨가한 SMRS배지를 사용하였다. 분리대두단백은 Protein Technologies International사 (St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였다.

### 균주

사용균주로는 선발된 amylolytic *Bifidobacterium* spp.를 사용하였고 *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 00425와 *Streptococcus thermophilus* KFRI 00674를 사용하였다. *Bifidobacterium*은 MBS에서 37°C, 24시간 배양한 후 1% 접종하여 발효하였고 기타의 유산균은 MRS (Merk)배지에서 같은 조건으로 배양하여 종균으로 사용하였다. 그 외의 공시균주로는 *B. adolescentis* ATCC 15073, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. breve* ATCC 15700, *B. infantis* ATCC 15697, *B. longum* ATCC 15707을 사용하였다.

### Amylase 활성의 측정

분리된 *Bifidobacterium*의 amylase 활성을 측정하기 위하여 변형된 Miller 등의 방법인 DNS 법<sup>13)</sup>과 iodine method<sup>14)</sup>를 병용하여 사용하였다. 균주를 MBS broth, 37°C에서 24시간 전배양한 후 1% starch를 첨가한 배지에 균을 1% (V/V) 접종하여 24시간 배양하였다. 원심분리하여 상등액은 균체의 조효소로 사용하고, 회수된 균체는 sonication하여 상등액을 균체내 조효소로 사용하였다. 1.25% starch 0.4 mL과 0.1 M Na·acetate buffer (pH 5.5) 0.5 mL을 50°C에서 5분 예열하고, 100  $\mu\text{L}$ 의 조효소를 가하여 1시간 반응시켰다. DNS로 반응을 정지시키고, 95°C에서 5분간 발색시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 50°C에서 1시간 반응시킨 후 1 mole의 maltose를 생성하는 효소의 양으로 정하였다. Iodine method는 반응액 0.2 mL에 0.2 mL의 0.1 N HCl을 첨가하고, 4 mL의 iodine solution을 가한 후 반응시켜 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 50°C에서 1시간 반응시켜 1 mg의 starch를 분해하는 효소의 양으로 정하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법<sup>15)</sup>으로 하였다.

### 내산성 실험

내산성 실험은 *Bifidobacterium*의 주된 대사산물인 acetic acid와 대표적인 무기산인 HCl에 대한 내성으로 측정하였다. MBS broth, 37°C에서 24시간 전배양된 균

주를 38 mM의 acetic acid (pH 5.0)을 첨가한 MBS배지와 5 M HCl을 첨가하여 pH를 5.0로 맞춘 MBS 한천 배지에 도달하여 glove box (anaerobic incubator, H<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>=5: 15: 80)내에서 72시간 배양하였다. 이때, pH 7.0인 MBS배지를 대조구로 사용하였다.

**당자화성 실험**

균주를 SMRS broth에서 37°C로 24시간 전배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하고 당자화성 배지에 현탁하여 API 50 CH system에 접종하였다. 12시간, 24시간, 48시간에 따른 배지색의 변화로 당자화성의 유, 무를 판단하였다.

**쌀발효**

쌀을 갈아서 60 mesh 이하 크기의 시료로 만든 후 호화시킨 쌀죽 5% (w/v)와 yeast extract 0.2%, cysteine 0.05%를 첨가하는 것을 기본배지로 하였다. 이때 cysteine을 대체하여 ascorbic acid를 사용하였고 분리대두단백을 첨가하여 발효하였다. 배지에 종균 2% (v/v)를 접종한 후 3, 6, 22, 32, 44시간마다 균수, pH, 산도, 환원당량으로 발효의 정도를 측정하였다. 균수는 시료를 십진희석하고 MBS 한천배지에 도달하여 anaerobic incubator에서 72시간 배양한 후 colony를 계수하여 CFU/mL로 나타냈다. pH는 pH meter (SA-520, Orion Co.)를 이용하였고, 산도는 시료 10 mL을 취하여 0.1 N NaOH로 pH 8.6까지 적정하여 다음과 같은 식으로 계산하였다. 환원당량은 DNS법으로 정량하여 mg/mL로 표시하였다.

$$\text{Total acidity (\%)} = \frac{0.1N \text{ NaOH 소비량 (mL)} \times F \times 0.009}{\text{시료부피 (mL)}} \times 100$$

**관능검사**

Bifidobacterium의 발효액의 기호도측정은 매우 좋다(10), 보통이다(5), 매우싫다(0)의 단계로 나누고 각각의 기호도에 따라 1점차이로 채점하였으며 data의 처리는 분산분석 및 Duncan's multiple range test<sup>(17)</sup>를 사용하여 유의성을 검증하였다.

**결과 및 고찰**

한국인 유래의 amylolytic Bifidobacterium의 분리 Amylolytic Bifidobacterium은 한국인 분변에서 분리하였다. 변시료를 제공한 지원자는 성인 및 유아들로

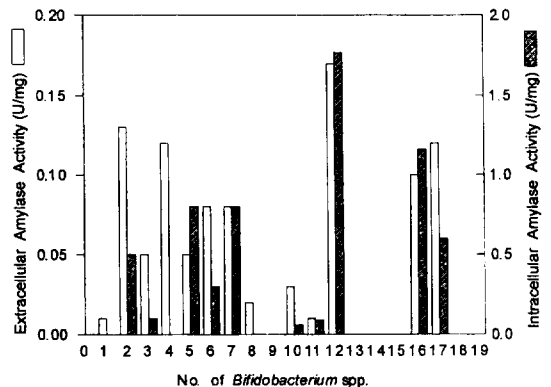
구성되었으며 지원자 38명으로 부터 얻은 변시료는 받은 즉시 혐기적 상태에서 십진법에 의해 희석한 후 전분이 함유된 BHI 고체배지에 도달되었다. Gas-pak (BBL)와 glove box의 혐기적 장치를 이용하여 2일간 시료를 배양한 배지에 요오드 용액을 첨가하여 투명환을 형성하는 균주를 선택하였다. 이중에서 형태학적으로 Bifidobacterium으로 생각되는 colony를 선정하였다. 선정된 균주중 Y, V자형의 무정형의 그람양성 혐기성 균이며 젖산과 초산을 주요 발효산물로 갖는 균주중 fructose-6-phosphate phosphoketolase (f-6-ppk)양성인 18개를 선발하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>(12)</sup>에 의거 Bifidobacterium sp.으로 동정하였다.

**선발된 균주의 amylase 효소활성**

BHI-starch 고체배지에서 colony주위의 요오드 용액에 의한 투명환은 비슷하였지만 액체배지에서 배양된 균주의 효소활성은 각기 다른 양상을 보였다.

한국인의 장내에서 분리된 amylase 보유 Bifidobacterium 18균주 중 14균주(Bifidobacterium sp. FBD-1~12, 16, 17)는 균체의 amylase 활성이 있었으며, 10균주(Bifidobacterium sp. FBD-2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 16, 17)는 균체내 amylase 활성이 있었고, 5균주(Bifidobacterium sp. FBD-13, 14, 15, 18)는 soluble starch를 첨가한 배지에서 잘 자라지 않았고 효소활성도 아주 낮은 것으로 나타났다. Bifidobacterium sp. FBD-12가 균체내, 외 amylase 활성이 가장 높았으며, Bifidobacterium sp. FBD-16, -17의 효소활성도 높았다(Fig. 1).

Amylase역가를 요오드법에 의한 전분액화성 효소



**Fig. 1. Amylase activity of Bifidobacterium spp. isolated from Korean by DNS method.** The numbers indicate the strain numbers isolated. 6: Bif. sp. FBD-6, 12: Bif. sp. FBD-12, 16: Bif. sp. FBD-16, 17: Bif. sp. FBD-17. The amylase activity was determined intracellularly and extracellularly by specific activity (U/mg).

활성을 요오드가로 측정하였는데 14균주가 역가를 보여주고 있었으며, 균체내 효소활성은 *Bifidobacterium* sp. FBD-6가 높았으나 균체의 효소활성은 *Bifidobacterium* sp. FBD-12, -16이 높았다(data not shown). 흥미롭게도 대부분의 균주들은 2가지 방법의 역가가 세포내·외의 비율이 같았지만 *Bifidobacterium* sp. FBD-6는 요오드법에 의한 효소역가가 세포외에서 보다 세포내에서 높았다. 그러나 *Bifidobacterium* FBD-16균은 세포외에서 더 높은 것으로 나타났으며 또한 *Bifidobacterium* sp. FBD-1 균주는 DNS법에 의한 측정 효소활성은 매우 약했으나 이에 비해 요오드법으로 확인된 전분 액화력은 더 강하게 나타났다.

따라서 *Bifidobacterium* sp. FBD-6, -12, -16, -17균주들이 전분분해력이 높은 균주로 선정하였다.

**선발된 균주의 당자화특성 및 내산성특성**

전분분해력이 높게 나타난 *Bifidobacterium* sp. FBD-6, -12, -16, -17 균주를 49종의 당을 이용하여 당자화성을 조사하였고 비amylase생산균주의 당자화성과 비교하였다. 이들 선발균주는 Table 1에서와 같이 mannitol, melezitose 등을 이용하지 못했으나 esculine, trehalose, gluconate는 다른 당과 같이 잘 이용하고 있는 것으로 나타났다. 흥미롭게도 대표적인 인체유래의 amylase 비생산균인 *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B.*

*breve*, *B. infantis*, *B. longum*들은 esculine, trehalose, gluconate를 이용하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 당자화성으로 볼 때 *Bifidobacterium* sp. FBD-6은 *B. adolescentis*로, 기타의 균주들은 *B. pseudocatenu-latum* 계통으로 사료된다.

그리고 Table 2에서와 같이 선발균주의 산에 대한 내성을 알아보고자 하였다. *Bifidobacterium* sp. FBD-12, -16, -17들은 HCl과 acetic acid에 대한 내성이 있었고 특히, *Bifidobacterium* sp. FBD-16는 HCl과 acetic acid에 다같이 높은 내성을 보여 주고 있었다. 그러나 *Bifidobacterium* sp. FBD-6은 산에 대한 내성이 아주 낮은 것으로 나타나 발효후에 생존율이 떨어질 것으로 예상된다.

**선발된 균주의 싹발효**

선발된 *Bifidobacterium* sp. FBD-6, -12, -16, -17를 싹발효 배지에 접종하여 직접 발효시켜 bifidus싹발효

**Table 1. Characteristic of principal carbohydrate fermentation of amylolytic *Bifidobacterium* spp. isolated from Korean feces**

	<i>Bif.</i> FBD-6	<i>Bif.</i> FBD-12	<i>Bif.</i> FBD-16	<i>Bif.</i> FBD-17
L-arabinose	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Esculine	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
5-ceto-gluconate	+	+	+	+
Inulin	+	-	-	-
Lactose	+	+	+	+
Mannose	-	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-
Melzitose	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+

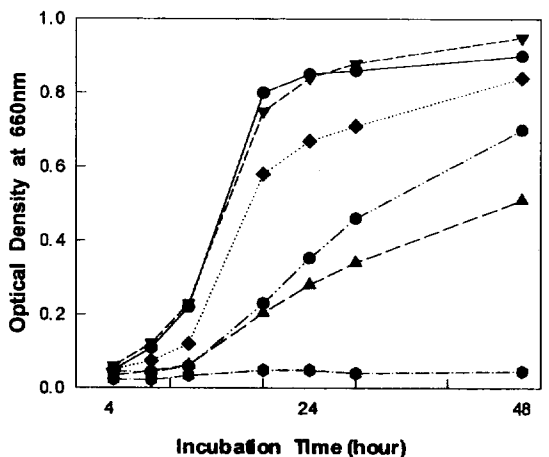
\*(+): growth on the carbon source of API kit, (-): Non-growth.

**Table 2. Relative acid resistability<sup>1)</sup> (%) of *Bifidobacterium* spp. isolated from Korean feces on the medium by addition of HCl<sup>2)</sup> and CH<sub>3</sub>COOH<sup>3)</sup> to pH 5.0**

	<i>Bif.</i> FBD-6	<i>Bif.</i> FBD-12	<i>Bif.</i> FBD-16	<i>Bif.</i> FBD-17
HCl	2	78	99	99
CH <sub>3</sub> COOH	3	76	99	65

<sup>1)</sup>Relative acid resistability (%) was determined by colony forming units on the control and on the medium.

<sup>2,3)</sup>HCl and CH<sub>3</sub>COOH were used to adjust pH of medium.



**Fig. 2. Growth pattern of *Bifidobacterium* sp. FBD-12 in MBS medium with various concentration of ascorbic acid. ●—●: 0.05% cysteine, ▼---▼: 0.1% ascorbic acid, ◆····◆: 0.2% ascorbic acid, ●---●: 0.4% ascorbic acid; ▲---▲: 0.05% ascorbic acid, ●---●: non-addition.**

식품의 가능성을 검토하였다. 선발 4균주 모두가 쌀발효배지의 초기 균수는  $10^6$  수준에서  $10^9$  CFU/mL까지 증가하여 균의 생육은 쌀발효배지에서 잘 이루어지고 있었다(Fig. 3). 그러나 최고의 균수에 도달된 32시간 발효후에 균의 숫자가 감소하였으며 특히 *Bifidobacterium* sp. FBD-6는 이런 현상이 심하게 발생하였다. 이러한 결과는 *Bifidobacterium* sp. FBD-6균이 내산성 실험의 결과와 마찬가지로 다른 선발된 균들에 비해 산에 대한 내성이 떨어지는 것으로 보인다. 초기 pH는 6.7이었으나 44시간후에는 3.6~3.8로 낮아졌으며 산도는 초기 0.1에서 0.5~0.7로 증가하였는데 발효 22시간만에 급격한 pH의 감소와 산도의 증가를 보였다. 반면, *Bifidobacterium* sp. FBD-6는 발효 6시간째에 급격한 pH의 감소와 산도의 증가를 보였다.

선발균주는 쌀발효배지에서 생육이 왕성하게 이루어져서  $10^9$  CFU/mL까지 도달하여 이들 *Bifidobacterium*를 이용하여 쌀발효식품의 개발가능성을 제시해주었다. 그러나 배지중에 환원제인 cysteine이 사용되어 이를 식용가능한 소재로의 대체하는 문제 그리고 이들 균의 발효후 viability가 현저히 떨어지고 있는 것은 발효액의 pH에 대한 완충작용이 적은 것으로 보여 이의 보완하는 연구가 뒤따라야 되리라 사료된다. 또한 현재 우유발효에 사용되고 있는 *Bifidobacterium*와 같이 대사작용으로 나오고 있는 acetic acid이 적도록 조절하는 문제도 해결해야 되리라 생각된다.

Ascorbic acid와 분리대두단백(ISP isolated soy-bean protein)의 첨가효과

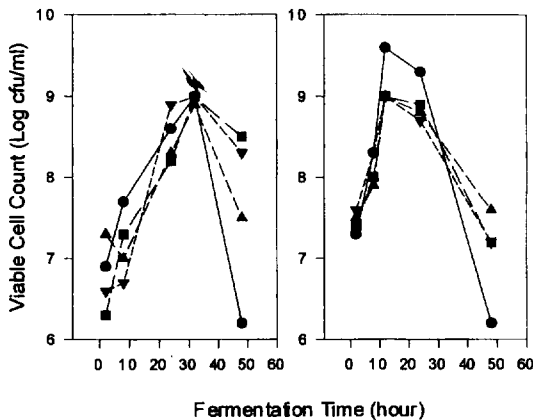


Fig. 3. Viable cell count of 4 *Bifidobacterium* spp. fermented in the rice medium adding cysteine (left) and ascorbic acid/ISP (right). ●—●: *Bif.* sp. FBD-6, ■—■: *Bif.* sp. FBD-12, ▲—▲: *Bif.* sp. FBD-16, ▼—▼: *Bif.* sp. FBD-17.

배지의 산화환원전위를 낮추기 위하여 사용하고 있는 cysteine에 의한 관능의 저하를 방지하기 위하여 ascorbic acid로 대체사용하고자 하는 연구와 ISP를 사용하여 배지상의 미생물질소원의 공급과 발효물의 영양적인 균형을 위하여 ISP첨가효과를 보았다. Fig. 2에서와같이 *Bif.* FBD-12를 사용하여 그의 최적첨가량을 결정하였다. 균의 생육은 cysteine를 첨가하는 대신 ascorbic acid를 0.05%, 0.4%, 0.2%, 0.1% 첨가함에 따라 균의 생육이 양호해졌고 그 이후의 농도에서는 생육이 감소하는 경향을 보였으며 0.1% ascorbic acid를 첨가하였을 때 cysteine을 첨가하였을 때와 거의 같은 생육현상을 보여 주었다. 이때 약 24시간 이후에 최고의 균수를 측정할 수가 있었다. 따라서 cysteine (0.05%)보다 ascorbic acid (0.1%)를 사용하는 것이 식용첨가제로 기호성을 증가시키는 효과뿐만아니라 발효시간을 단축시킬 수 있으리라 사료된다.

또한 ISP를 2%, 3%, 5%첨가하여 *Bif.* sp. FBD-12를 배양하였을 때는 2%첨가구보다는 3%, 5%첨가구의 생육이 왕성하였고 3%와 5%첨가구는 비슷한 정도의 생육을 관찰할 수가 있었다(data not shown). 따라서 3% ISP첨가가 가장 적당하리라 사료된다. 이때 균의 생육이 빨라 8시간에 생육이 거의 다 이루어져서  $10^9$  CFU/mL을 보여주었다. 따라서 ISP는 균생육을 촉진시켜 균의 배양시간을 단축할 수가 있게 하였다. 또한 최고의 균수를 보인 후 균의 viability의 감소도 완만하여 균의 안정화에도 기여하고 있는 것을 알 수가 있었다. 따라서 ascorbic acid (0.1%)와 ISP (3%)의 첨가는 bifidus 쌀발효에 아주 좋은 환경을 제공하여 주는 것

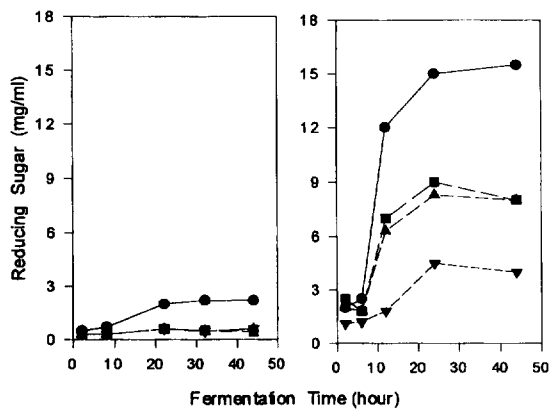


Fig. 4. Changes of reducing sugar in the fermentation products by 4 *Bifidobacterium* spp. Cysteine (left) and ascorbic acid/ISP (right) were added to the rice media. ●—●: *Bif.* sp. FBD-6, ■—■: *Bif.* sp. FBD-12, ▲—▲: *Bif.* sp. FBD-16, ▼—▼: *Bif.* sp. FBD-17.

으로 평가되었다(Fig. 3). 이때 발효액중의 pH의 변화는 cysteine만 첨가했을 때와 같이 비슷한 감소경향을 보여 주었는데 초기의 pH 6.5에서 24시간 배양시에 약 4.0으로 떨어졌다. 총산은 cysteine발효구(약 0.6)보다 크게 보였으나(약 0.8) 배양액중의 환원당은 ascorbic acid/ISP 발효구에서 현저히 큰 값을 보여 주고 있었다.

특히, Fig. 4에서와 같이 *Bif. sp. FBD-6*발효액의 환원당양은 cysteine발효구에서 2 mg/mL를 보였으나 ascorbic acid/ISP 발효구에서는 15.5 mg/mL를 보여 주었다. 따라서 쌀의 탄수화물을 보다 이용하기 좋은 상태로의 전환시켜 소화흡수가 용이한 상태를 제공하고 있었다.

#### 발효물의 관능검사

쌀호화물을 *Bif. sp. FBD-6*, *Bif. sp. FBD-12* 그리고 *Lac. bulgaricus*와 *Str. thermophilus*의 혼합균주로 15시간 발효한 후 관능적인 기호도를 조사하였다(Table 3). 이때 배지의 환원제로 쓰는 cysteine 대신 ascorbic acid (0.1%)와 ISP (3%)를 각각 첨가하여 발효시켜 시료로 사용하였다.

사용균주에 따라 향, 맛 그리고 종합적인 기호도가 서로 다르게 나타났다. 향은 *Bif. sp. FBD-6*와 *Bif. sp. FBD-12*의 발효물은 ISP를 첨가하지 않은 시료가 좋았지만 혼합균주의 경우는 반대의 현상을 보여 주었다. 그리고 맛과 전체적인 종합기호도도 향과 같은 경향을 보여주고 있었다. 전체적인 기호도는 높지 않았지만 *Bif. sp. FBD-6*균주를 사용한 쌀호화물을 ISP 첨가하지 않고 ascorbic acid첨가한 배지의 발효물은 보통 정도의 기호도를 보여 주고 있었다. 따라서 쌀발효

식품의 산업화를 위해서는 ISP첨가시의 기호도 및 전체적인 기호도를 제고시키는 보완적인 연구가 계속되어야 하리라 사료된다.

## 요 약

쌀을 이용한 기능성 식품개발을 위하여 쌀전분에서 직접 발효가능한 amyolytic *Bifidobacterium*을 한국인에서 분리하여 쌀발효를 통한 bifidus발효식품을 개발하고자 하였다. 한국인 38명으로부터 한천배지에서 amyolytic *Bifidobacterium* 18균주를 선발하였고 이중 amylase 활성이 높은 4균주를 최종선발하였다. *Bif. sp. FBD-12*는 세포의 amylase역가가 0.17 U/mg였고 세포내 역가는 1.8 U/mg로 가장 우수한 균이었다. 그리고 이중 *Bif. sp. FBD-12*, *Bif. sp. FBD-16*, *Bif. sp. FBD-17*은 산에 대한 내성이 강했으나 *Bif. sp. FBD-6*는 내산성이 비교적 약해 pH 5.0배지에서의 생육이 대조구의 10<sup>2</sup>로 감소하고 있었다. 이들을 이용하여 쌀을 발효한 결과 초기균수 10<sup>6</sup> CFU/mL에서 10<sup>9</sup> CFU/mL까지 생육이 잘 이루어지고 있음을 알았다. 발효물의 기호와 기능을 제고하기 위하여 배지환원제인 cysteine대신 ascorbic acid를 0.1%첨가했을 때 같은 생육효과를 보여 주었으며 분리대두단백첨가 쌀배지에서 발효시켰을 때 3% 첨가시가 가장 좋았다. 쌀배지에 0.1%의 ascorbic acid와 3% 분리대두단백을 첨가하여 발효시켰을 때 발효가 빨리 일어나 초기 10<sup>7</sup> CFU/mL에서 12시간만에 10<sup>9</sup> CFU/mL까지 증가하였고, pH는 초기 6.5에서 3.8로 저하되었다. 산도도 0.8~1.0%로 증가하였으며 환원당도 증가하였는데 *Bif. sp. FBD-6*은 2 mg/mL에서 15.5 mg/mL이 생성되어 cysteine만을 첨가했을 때에 비해 현저히 향상된 발효특성을 보여주었다. 발효물에 대한 관능검사결과 *Bif. sp. FBD-12*에 의한 발효물은 기호도가 양호하게 나타나 *Bifidobacterium*에 의한 쌀식품개발에 대한 가능성을 제시해주고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 1995년 농림부에서 시행한 '95첨단농림수산기술개발사업에 의하여 수행된 결과중의 일부이며 연구비지원에 감사를 드립니다.

## 문 헌

1. 김경희, 고영태 : 우유와 곡류를 이용한 요구르트의 제조. 한국식품과학회지, 25, 130 (1993)

**Table 3. Comparison of sensory scores<sup>1)</sup> of fermentation product by *Bifidobacterium FBD-6* and *Bifidobacterium FBD-12***

Strain	Sample <sup>3)</sup>	Overall acceptability	Taste	Flavour
<i>Bif. FBD-6</i>	A	4.3 <sup>ab</sup>	3.6 <sup>abc</sup>	4.5 <sup>ab</sup>
	B	2.7 <sup>c</sup>	2.7 <sup>abc</sup>	1.6 <sup>c</sup>
<i>Bif. FBD-12</i>	C	5.0 <sup>a-d)</sup>	4.3 <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>
	D	4.2 <sup>ab</sup>	3.9 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>b</sup>
LAB <sup>2)</sup>	E	2.8 <sup>c</sup>	2.1 <sup>c</sup>	4.0 <sup>ab</sup>
	F	3.4 <sup>bc</sup>	2.6 <sup>bc</sup>	4.7 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>Each value represented the mean of 12 observations.

<sup>2)</sup>LAB=*Lactobacillus bulgaricus*+*Streptococcus thermophilus*.

<sup>3)</sup>Sample A, C and E were products of rice fermentation at the medium of ascorbic acid (0.1%) and others were those at the ascorbic acid (0.1%) and ISP (3%) medium.

<sup>4)</sup>Means in a row followed by the same letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

2. Mok, C., Han J., Kim Y.G. and Kim N.: Lactic acid fermentation of rice and quality improvement by amyolytic enzyme treatment during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 739 (1991)
3. Modler, H.W., Mckeller, R.C. and Yaguchi, M.: Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, **23**, 29 (1990)
4. Sekine, K., Watanabe, E., Ohta, J., Toida T., Tatsuki, T., Kawashima, T. and Hashimoto, Y.: Induction and activation of tumoricidal cells *in vivo* and *in vitro* by the bacterial cell wall of *Bifidobacterium infantis*. *Bifidobacteria Microflora*, **13**, 65 (1994)
5. Hatcher, G.E. and Lambrecht.: Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J. Dairy Sci.*, **76**, 2485 (1993)
6. 박소영, 고영태, 정후길, 양진오, 정현서, 김영배, 지근익 : 유산균들의 콜레스테롤 저하성, 내산성, 내담즙성, 항생제 내성비교. *한국산업미생물학회지*, **24**, 304 (1996)
7. 박종현 : 장내미생물과 건강. *식품기술*, **5**, 5 (1992)
8. 이세경, 손현수, 지근익 : *Bifidobacterium*과 기타 장내세균에 의한 두유배양 비교. *한국식품과학회지*, **25**, 694 (1993)
9. Macfarlane, G.T. and Englyst, H.N.: Starch utilization by the human large intestinal micro flora. *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 195 (1986)
10. Juliano, B.O.: Production and utilization of rice In *Rice: Chemistry and Technology*, Juliano, B.O. (Ed.), American Association of Cereal Chemistry: St. Paul, MN, U.S.A. p.1 (1985)
11. Mok, C., Han, J., Kim Y.J., Kim, N., Kwon, D.Y. and Nam, Y.J.: Risogurt, a mixture of lactic acid fermented rice and soybean protein: development and properties. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 745 (1991)
12. Sneath, P.H.A. Nicholas, S.M., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol.2. Willams and Wilkins, Baltimore (1986)
13. Ji, G.E., Han, H.K., Yun, S. and Rhim, S.: Isolation of amyolytic *Bifidobacterium* sp. Int-57 and characterization of amylase. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 85 (1992)
14. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **13**, 426 (1959)
15. Lee, S.K.: Purification and characterization of amylase from *Bifidobacterium* sp. Int-57. *M.S. Thesis*, Korea University (1995)
16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L. and Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1955)
17. SAS: *SAS User's Guide: Statistic*. 5th ed., SAS Institute, Cary, NC., USA (1985)

---

(1997년 3월 13일 접수)