

Amylase와 Protease의 활성이 높은 현미 발효 미생물의 선별

김기연 · 김희규 · 송병철 · 차창준*

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과

현미는 백미에 비하여 식품영양학적 가치 및 식이섬유의 함유량이 높은 쌀겨 및 배아를 포함하고 있으나 소화가 잘되지 않는 단점이 있다. 따라서 발효현미는 소화력을 높임과 동시에 좋은 영양 공급원이 될 수 있으므로 높은 amylase와 protease의 활성으로 현미를 발효할 수 있는 미생물을 선별하였다. 2.5%(w/v)의 현미분말을 유일한 영양원으로 한 액체배지를 성장배지로 사용하여 성장능력과 효소 생산능력을 조사하였다. 조사한 8종의 *Bacillus*와 11종의 유산균 중에서 모든 *Bacillus* 균주와 두 종의 유산균이 성장과 효소활성을 보였다. 생균수는 10^7 CFU/mL을 초과하였으며, *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, *Bacillus* sp. B11, *Leuconostoc gelidum*, *Pediococcus pentosaceus*가 생산하는 최고 amylase 활성은 각각 17.85, 17.50, 17.10, 17.10, 3.24 U/ml이었고, 최고 protease 활성은 각각 22.48, 22.04, 23.76, 12.13, 3.80 U/ml이었다. 따라서 이 균주들은 발효 현미 제조를 위한 접종균주로서 이용이 가능하리라 사료된다.

Key words □ Amylase, *Bacillus*, Brown rice, Lactic acid bacteria, Protease

현미는 벼의 최외각층인 왕겨층만을 벗긴 것을 말하며, 도정과정을 거쳐 주로 전분이 구성성분인 배유만 남은 백미로 가공된다. 겨층의 섬유질은 각종 질병의 예방효과가 있는 것으로 알려져 있고(6), 호분층과 배아에는 단백질, 지방질, 무기질, 비타민 등이 많이 함유되어 있다(13). 도정도가 높아짐에 따라 소화율은 증가하나 호분층 및 배아의 손실이 많아지므로 영양적 손실도 많아진다고 할 수 있다. 이는 현미의 섭취가 건강증진의 효과 면에서 백미의 섭취보다 좋으나 소화가 잘 되지 않는 단점도 함께 가지고 있음을 의미한다. 따라서 현미의 영양학적 가치와 건강증진효과를 이용함과 동시에 소화력을 높이기 위한 방법으로 현미를 발효하는 방법이 이용되고 있다.

현미를 발효하는 방법으로는 현미의 발아 시 생성되는 amylase에 의한 당화작용이 가장 일반적이다(7). 발효 중 미생물이 분비하는 가수분해효소에 의하여 전분 및 단백질 같은 고분자 물질의 분해를 통한 소화력의 증진과 다양한 유기산, 올리고당, 펩톤, 펩티드, 미량원소와 각종 생리활성물질을 공급하고 건강에 좋은 살아있는 미생물을 프로바이오틱(probiotic)으로 공급할 수 있는 장점 때문에 미생물을 이용하기 위한 방법도 개발되었다(5, 10). 미생물을 이용한 현미의 발효는 주로 곰팡이에 국한되어 있고(12), 프로바이오틱으로서 유산균을 이용한 경우는 현미만을 발효하지 않고 다른 영양원을 첨가하여 발효하거나 유산균의 초기 성장을 돕기 위해 삶아서 당화시킨 백미를 발효한 경우가 많다(4, 9). 당화시키지 않은 현미를 유일한 영양원으로 하여 발효한 경우는 보고된 바 없으며, protease와 amylase의 활성이 매우

높고 각종 생리활성물질을 생산하는 기능을 가지고 있는 *Bacillus* 속을 이용한 현미발효도 보고된 바 없다. 본 연구에서는 현미를 *Bacillus*와 유산균으로 발효시킬 목적으로 현미분말을 유일한 영양원으로 한 액체배지를 성장배지로 사용하여 그 성장능력과 protease와 amylase의 활성을 조사함으로써 유산균과 *Bacillus* 속을 이용한 현미발효식품의 개발에 기초자료를 제공하고자 한다. 현미를 미생물 배양을 위한 액체배지로 만들기 위하여 멸균수로 3번 행군 현미(150 g)를 끓는 물에 5분간 침지한 후 물을 따라내고 clean bench에서 UV를 쬐 상태에서 24시간동안 건조시켰다. 소형분쇄기(Model 33BL79, Dynamics Co., USA)를 사용하여 분쇄한 후 1.5기압, 121°C로 20분간 멸균하였다. 이렇게 얻은 현미분말과 멸균수를 혼합한 액체배지(2.5%, w/v)를 배양배지(BRPL 배지)로 하였다. BRPL배지에서 성장능력과 효소의 활성을 측정할 11종의 유산균은 서울대학교 미생물연구소에서 분양받아 사용하였으며, *Bacillus* 균주들은 청국장장에서 분리한 것을 사용하였다(Table 1). 청국장 1g을 멸균된 식염수(0.85% NaCl)에 현탁시킨 후, 100°C에서 15분간 증탕하였다. 이것을 멸균된 식염수로 희석한 후 LB (Difco, USA) 한천배지에 도말하고 30°C에서 24시간 배양하였다. 형성된 집락들의 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참조하여 *Bacillus* 속에 속하는 균주들을 분리하였다(2). 분리한 8개의 균주 모두 내성포자를 형성하는 그람 양성 호기성 간균이고 catalase 양성이었으며, 각각 B1, B2, B3, B4, B7, B8, B10, B11로 명명하였다.

BRPL배지에서 사용균주의 성장능력을 조사하기 위하여 *Bacillus* 균주는 LB 한천배지에, 유산균은 MRS (Conda, Spain) 한천배지에 각각 전배양하여 10^2 CFU/ml 정도의 농도로 BRPL

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-670-4706, Fax: 82-31-675-0432
E-mail: cjcha@cau.ac.kr

Table 1. Microorganisms used for screening

Microorganisms	Origin	Microorganisms	Origin
<i>Bacillus</i> sp. B1	Isolated from Chongkukjang	<i>Leuconostoc mensenteroides</i>	Institute of Microbiology, Seoul National University
<i>Bacillus</i> sp. B2		<i>Leuconostoc gelidum</i>	
<i>Bacillus</i> sp. B3		<i>Leuconostoc kimchii</i>	
<i>Bacillus</i> sp. B4		<i>Leuconostoc citreum</i>	
<i>Bacillus</i> sp. B7		<i>Leuconostoc citreum</i> KM20	
<i>Bacillus</i> sp. B8		<i>Lactobacillus sakei</i>	
<i>Bacillus</i> sp. B10		<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Bacillus</i> sp. B11		<i>Weissella kimchii</i> CHJ3	
		<i>Weissella koreansis</i>	
		<i>Lactococcus lactis cremoris</i> MG1363	
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	

배지(50 ml)에 접종하고 30°C에서 250 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양액을 6시간 단위로 144시간 까지 무균적으로 취하여 적정농도로 희석한 후 한천배지에 각각 도말하고, 30°C에서 24시간에서 48시간 동안 배양한 후 나타난 콜로니 수를 측정하였다. 사용된 모든 *Bacillus* 균주들은 BRPL 배지에 접종한 후 24시간 만에 10⁷ CFU/ml 이상 성장하였고, 유산균 중에서는 *L. gelidum*, *P. pentosaceus* 만이 성장능력을 보여주었다. 그림 1은 성장능력이 뛰어난 3종의 *Bacillus* 균주와 2종의 유산균의 성장곡선을 보여준다(Fig. 1). 유산균은 유도기가 *Bacillus*에 비하여 36시간 정도로 매우 길었고, 96시간 후에 정지기에 이르렀다. 특이한 점은 음성대조군으로 사용된 BRPL 배지에서도 36시간 이후에는 2종의 *Bacillus* 균주가 자라기 시작하였다. 이는 현미에 존재하던 열에 내성이 강한 *Bacillus*의 내생포자를 완전히 사멸하지 못했기 때문으로 사료된다. Margosch 등은 경우에 따라 1.4 GPa, 120°C의 조건하에서도 *Bacillus amyloliquefaciens* TMW 2.479의 내생포자는 살아남는다고 보고하였다(8). 따라서 현미를 특정 미생물로 발효시키기 위해서는 저렴하면서 확실히 현미를

살균할 수 있는 방법의 개발이 필요할 것이다.

BRPL 배지에서 균주의 성장능력을 통하여 1차 선별된 2종의 유산균과 8종의 *Bacillus* 균주를 대상으로 전분 한천배지 (1% soluble starch, 0.4% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.15% MgSO₄ · 7H₂O, 1.5% agar)와 skim milk 한천배지 (2.5% skim milk, 0.3% yeast extract, 0.5% peptone, 1.2% agar)에서 amylase와 protease의 활성을 조사하였다. 균주들의 단일집락을 이쑤시개로 접종하고 30°C에서 48시간 배양한 후, 전분 한천배지는 Lugol's iodine 용액을 처리한 후 24시간 방치하여 형성되는 투명환과 skim milk 한천배지에서 형성되는 투명환의 각각의 반지름을 콜로니의 반지름으로 나는 값을 측정하였다. 이 값이 높은 3종의 *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, *Bacillus* sp. B11을 세포외 amylase와 protease의 활성이 높은 균주로 2차 선별하였다 (Table 2). 1차 선별되었던 2종의 유산균은 선별된 *Bacillus*에 비하여 낮은 효소활성을 보였으나, 평판배지 상에서 amylase와 protease의 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

선별된 균주들을 BRPL 배지에서 시간의 경과에 따른 세포외 효소의 활성을 측정하기 위하여 각각의 균주를 10² CFU/ml의 농도로 50 ml의 BRPL 배지에 접종하였다. 30°C에서 250 rpm으로 배양하면서 6시간 간격으로 배양액을 1 ml을 취하여 10,000×g로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 pore의 지름이 0.45 μm인 membrane syringe filter로 제균한 것을 조효소로 사용하였다. Protease의 활성은 casein을 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.3)에 1%가 되도록 용해하여 기질용액으로 사용하고, 기질용액 0.5 ml에 조효소 0.5 ml를 가하여 30°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5 ml의 40% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 용액을 가하여 반응을 정지시킨 후 실온에서 15분간 방치하였다. 12,000×g로 15분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 가용성 peptide 양을 280 nm에서 흡광도로 측정하였다. 표준곡선은 L-tyrosine 용액을 사용하였으며, 효소활성 단위는 1분간 1 μg에 상당하는 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다(1). Amylase 효소활성은 1% (w/v) soluble starch 0.5 ml에 0.5 ml의 조효소를 가하여 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 차가운 1N HCl 1 ml을 가하여 반응을 정지시킨 후 0.1 ml의 Lugol's iodine 용액을 가하여

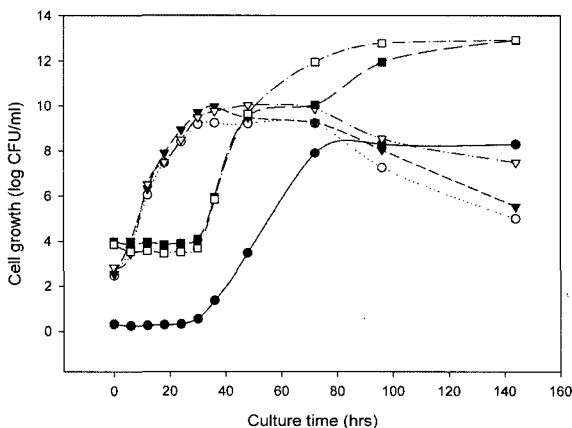


Fig. 1. Viable cell count of bacteria cultured in BRPL media at 30°C. Symbols: ●, brown rice-resident bacteria; ○, *Bacillus* sp. B1; ▼, *Bacillus* sp. B2; ▽, *Bacillus* sp. B11; ■, *P. pentosaceus*; □, *L. gelidum*.

Table 2. Extracellular amylase and protease activities tested on starch and skim milk agar plates

Microorganisms	Starch		Relative amylase activity ^b	Skim milk		Relative protease activity ^b
	Colony size ^a (mm)	Halo size ^a (mm)		Colony size ^a (mm)	Halo size ^a (mm)	
<i>Bacillus</i> sp. B1	5.0	9.0	1.80	5.0	6.5	1.30
<i>Bacillus</i> sp. B2	4.0	7.0	1.75	7.0	10.0	1.43
<i>Bacillus</i> sp. B11	3.0	7.0	2.33	2.5	6.0	2.40
<i>P. pentosaceus</i>	2.0	2.5	1.25	3.5	6.0	1.71
<i>L. gelidium</i>	2.0	3.0	1.50	5.0	9.0	1.80

^aThe sizes are given as radii.

^bThe activities are presented as ratio of halo size to colony size.

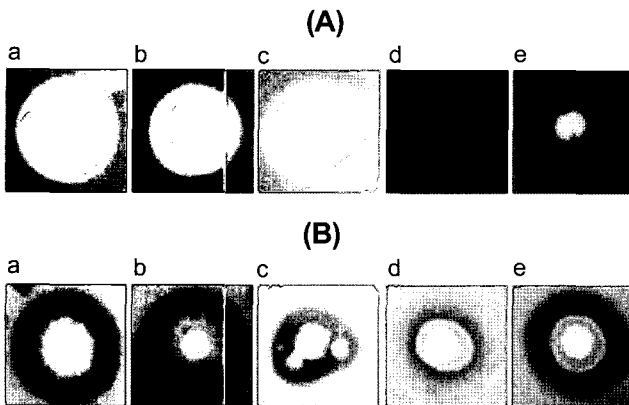


Fig. 2. Haloes formed on starch agar plates flooded with Lugol's iodine (A) and skim milk agar plates (B): a, *Bacillus* sp. B1; b, *Bacillus* sp. B2; c, *Bacillus* sp. B11; d, *P. pentosaceus*; e, *L. gelidium*.

발색시켰다. 증류수를 가하여 25 ml로 정용한 후, 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 maltose 용액을 사용하였으며, 효소활성 단위는 1분간 0.01%의 soluble starch를 줄이는데 상당하는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다(11).

선별된 *Bacillus* 균주들의 amylase와 protease의 활성은 세포가 성장함에 따라 같이 증가하여 amylase의 최고 활성은 17.0 U/ml 정도였고, protease의 최고 활성은 22.0 U/ml 정도였다(Fig. 1과 Fig. 3). *L. gelidium*의 amylase 효소활성도 세포의 성장과 함께 증가하여 17.0 U/ml 정도였으나, 최고의 활성에 이르는 시간이 80시간 이후로 세포 성장속도와 마찬가지로 시간적 측면에서 *Bacillus*에 비해 두 배정도 느렸으며, proteases의 활성이 높아지는 속도는 세 배정도 느렸다. *P. pentosaceus*는 *L. gelidium*과 유사한 성장속도와 생균수에도 불구하고 배양을 멈춘 144시간 까지 amylase와 protease의 활성이 음성대조군과 거의 같은 수준인 각각 3.24 U/ml와 3.80 U/ml로 세포의 효소활성이 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 1과 Fig. 3) (음성대조군은 무균상태이어야 하나 내생포자가 발아하므로 효소생성에 영향이 미칠 수 있음). 또한 순수 고체 현미를 이들 균주로 발효한 후 발효산물의 점성을 비교해 본 결과, *Bacillus*와 *L. gelidium*의 발효산물은 점성이 높았으나 *P. pentosaceus*의 발효산물과 음성대조군은 거의 점성이 없는 결과를 얻었다 (자료 미제시). 이는 BRPL 배지에서 측정된 효소활성으로 볼 때 amylase에 의한 전분의 당화 등으로

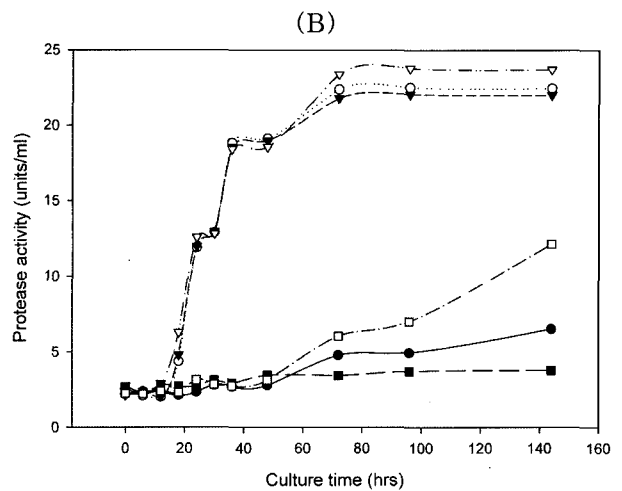
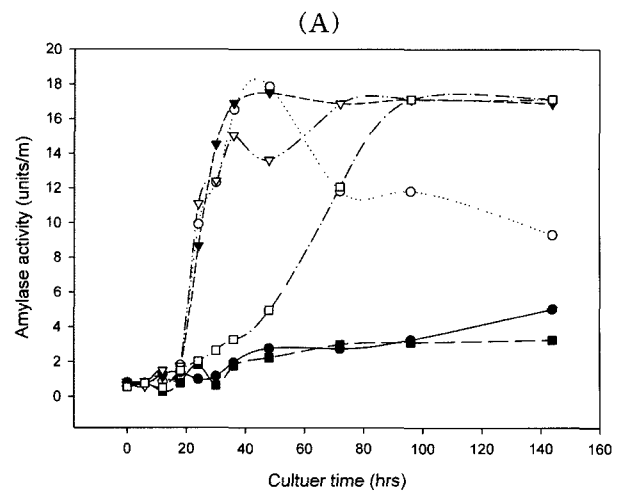


Fig. 3. Comparison of amylase (A) and protease (B) activities produced by *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, *Bacillus* sp. B11, *L. gelidium*, *P. pentosaceus*. Each bacterium was cultivated at 30°C in BRPL medium. Symbols: ●, negative control; ○, *Bacillus* sp. B1; ▼, *Bacillus* sp. B2; ▽, *Bacillus* sp. B11; ■, *L. gelidium*; □, *P. pentosaceus*.

형성되는 점질물질로 사료된다(7).

이와 같은 결과로 미루어 볼 때 현미만을 유일한 영양원으로 한 발효에서 선별된 *Bacillus* 균주들과 *L. gelidium*을 이용한 발

효는 다량의 amylase와 protease를 분비함으로써 현미의 단점인 소화력을 해결해 줄 수 있고 생식의 경우에는 프로바이오틱으로서 제공될 수 있는 이점도 있으리라 판단되며, *P. pentosaceus*의 경우는 소화의 문제점은 해결하기 어려우나 현미에서 성장능력은 좋으므로 가수분해효소의 활성이 높은 균주와 혼합발효 할 경우 프로바이오틱으로서의 기능은 제공할 수 있으리라고 사료된다.

감사의 말

이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

참고문헌

1. Basma, G., S.K. Alya, and M. Nasri. 2003. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 513-518.
2. Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1872. Genus *Bacillus* cohn, p. 1105-1139. In P.H.A. Sneath (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
3. Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.
4. Jeoun, K.S., Y.J. Kim, and S.I. Park. 1995. Preparation and characteristics of yogurt from milk added with soy milk and brown rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27, 47-55.
5. Kiers, J.L., A.E.A. Van Laeken, F.M. Rombouts, and M.J.R. Nout. 2000. In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 136-169.
6. Lee, H.J., S.M. Byun, and H.S. Kim. 1988. Studies on the dietary fiber of brown rice and milled rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20, 576-584.
7. Lee, W.J. and S.S. Kim. 1998. Preparation of Sikhe with brown rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30, 146-150.
8. Margosch, D., M.A. Ehrmann, R. Buckow, V. Heinz, R.F. Vogel, and M.G. Ganzle. 2006. High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3476-3481.
9. Mok, C., J. Han, Y.J. Kim, N. Kim, D.Y. Kwon, and Y.J. Nam. 1991. Lactic acid fermentation of rice and quality improvement by amyolytic enzyme treatment during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23, 739-744.
10. Park, K.B. and S.H. Oh. 2005. Production and characterization of GABA rice yogurt. *Food Sci. Biotechnol.* 14, 518-522.
11. Saxena, R.K., K. Dutt, L. Agarwal, and R. Nayyar. 2006. A highly thermostable and alkaline amylase from *Bacillus* sp. PN5. *Biore-sour. Technol.* 1-6.
12. Takasuga, T., K. Senthilkumar, H. Takemori, E. Ohi, H. Tsuji, and J. Nagayama. 2004. Impact of fermented brown rice with *Aspergillus oryzae* (FEBRA) intake and concentration of polybrominated diphenylethers (PBDEs) in blood of humans from Japan. *Chemosphere* 57, 759-811.
13. Yoon, S.H. and S.K. Kim. 2004. Physicochemical properties of rice differing in milling degrees. *Food Sci. Biotechnol.* 13, 57-62.

(Received May 16, 2006/Accepted June 15, 2006)

ABSTRACT : Screening for Fermentative Microorganisms that Grow on Brown Rice with High Amylase and Protease Activities

Ki-Yeon Kim, Hee-Gyu Kim, Byeong-Chul Song, and Chang-Jun Cha* (Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea)

Brown rice contains rice bran and germ with higher nutritional value and dietary fiber content compared with the polished rice. However, brown rice has a limitation of poor digestion. Fermented brown rice could be better nutritional source and improve digestibility. Therefore, we tried to select good fermentative microorganisms which have nutritional values with high amylase and protease activities, and probiotic effects. Nineteen microorganisms, including eight *Bacillus* strains isolated from Chongkukjang and 11 lactic acid bacteria, were screened for the fermentation ability and enzyme production. The liquid broths containing 2.5%(w/v) of raw brown rice powder as a sole nutritional source were used for culture media. Among the strains tested, all of the *Bacillus* strains and two lactic acid bacteria (*Leuconostoc gelidum* and *Pediococcus pentosaceus*) showed increase in cell population and enzyme activities. The viable cell counts of all the *Bacillus* strains and two lactic acid bacteria exceeded 10^7 CFU/mL. The maximal enzyme activities produced by *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, *Bacillus* sp. B11, *L. gelidum* and *P. pentosaceus* were 17.85, 17.50, 17.10, 17.10 and 3.24 U/mL for amylase and 22.48, 22.04, 23.76, 12.13, and 3.4 U/mL for protease, respectively. Therefore, the results of this study demonstrated that the above strains could be potential starters for the fermentation of raw brown rice.