

연구노트

쌀겨발효로부터 분리된 우점종 미생물 *Bacillus coagulans*의 분리

이상한[†] · 박포¹

경북대학교 식품생물산업연구소 및 식품공학과, ¹엔자임하우스

Isolation of Major Microflora *Bacillus coagulans* from Rice Bran

Sang-Han Lee[†] and Po Park¹

Food & Bio-Industry Research Institute and Department of food science & Biotechnology,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹Enzyme House Co., Ltd., Goyang 411-838, Korea

Abstract

It is known that temperature during solid fermentation using rice bran is increased upto 60-70 degree. To investigate the major microflora regarding temperature maintenance of rice bran bathing, we first isolated predominant microbes using various media by a limiting dilution method. The RNA of isolated strains were purified and sequenced. The rRNA sequencing revealed that the selected strains were similar to *Bacillus coagulans* according to their taxonomical relationships. Together, these results indicate that *Bacillus coagulans* is a major kind of microflora during solid fermentation using rice bran.

Key words : Rice bran, *Bacillus coagulans*, major microflora, rRNA sequencing, isolation.

서 론

쌀겨란 현미를 도정하여 정백미를 제조시 생기는 과피, 종피, 호분층 등의 분쇄혼합물을 지칭하는 것으로서, 현미의 도정도를 높일 경우, 그 양이 약 8%보다 많아지며, 도정도에 따라서 그 성분이 달라진다. 쌀겨의 화학조성으로는 수분 13.5%, 단백질 13.2%, 지방 18.3%, 단백질 38.3%, 섬유 7.8%, 회분 8.9%이며, 비타민 B1은 100 g 중 2.5 mg 정도 함유되어 있으며, 비타민 A, E도 다량 함유되어 있다(1,2).

한편, 피부 미용에 대한 관심이 고조되면서 여러 가지 천연자원으로부터의 응용이 각광을 받기 시작하였다. 특히 그 중에서 쌀겨를 기질로 발효시 발생하는 높은 열을 이용하여 미용을 위한 찜질도 좋은 일례가 되고 있다(3,4). 쌀겨는 오래전부터 이미 미백효과로 인하여 피부미용에 사용되어 왔으나 이의 과학적인 data는 미진할 실정이다. 최근, 쌀겨의 미세화와 분말화로, 쌀겨가 가진 좋은 특성을 그대로 살려 식용, 세정, 미용 등의 목적으로 사용하고 있으며

(5-7), 또한, 쌀겨로부터 추출한 광합성 세균, 유산균, 방선균, 사상균, 효모균 등의 미생물을 복합해 배양한 미생물제제를 활용하여 축산환경개선, 농 어업의 생산성 향상에 사용한 보고가 있으며(4), 피부미용 등에 이용되고 있는 쌀겨(rice flour/bran) 효소제는 미생물의 종류, 성질 및 상태에 따라 그 효과에서 차이가 나는 것으로 알려져 있다(8). 종래에는 쌀겨 본래에 존재하는 토착균에 의하여 발효가 일어나 그 열로 찜질을 하는 방법이 사용돼 왔으나, 존재하는 세균의 종류에 따라 발효 효율에 차이가 있어 쌀겨를 제품화하는데 어려움이 있었다.

이에, 본 연구는 쌀겨발효에 관여하는 우점균을 분리하고 이를 실제로 효소온욕에서 사용할 starter로 개발하기 위하여, 먼저, 쌀겨를 기질로 하는 쌀겨온욕조로부터 우점균을 분리하고, rRNA 시퀀싱을 통해 *Bacillus coagulans*임을 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

미생물 분리용 배지

미생물 분리에 사용된 배지는 Difco사의 PDA agar, MRS

[†]Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

agar, PCA agar를 사용하였다. B&F Enzyme House의 싹겨온육조는 2 m X 1.5 m X 1 m의 싹겨육조에서 싹겨 10 g을 무균적으로 50 ml centrifuge tube에 담아서 clean bench로 이동시켜서 동량의 멸균수를 넣고 limiting dilution method에 적용하여 균주 분리를 수행하였다.

미생물 분리 및 균 배양

Difco사의 PDA agar, MRS agar, PCA agar를 사용하여 균 분리를 수행하였다. 균은 분리배지에서 호기적으로 30도에서 배양하였으며, DNA 추출은 액체 배양배지를 사용하여 수행하였다. 집식배양은 30도의 진탕기에서 150 rpm의 속도로 진탕시켰다.

균의 특성

균의 형태는 phase contrast microscope (Motic, Hong Kong)에 의하여 촬영하였다.

DNA 분리 및 16S rRNA sequencing

Chromosome DNA는 Fink(9)의 방법에 의하여 수행하였다. 16S rRNA는 2개의 universal primers에 의하여 PCR을 수행하여 그의 PCR product를 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)에 의하여 정제하였다. 정제된 16S rDNA는 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)에 의하여 시퀀싱하였고, 정제된 mixtures는 Applied Biosystems model 310 automatic DNA sequencer에 의하여 자동적으로 전기영동하였다. 16S rRNA gene sequences는 CLUSTAL W software에 의하여 분석을 하였다. 분류도는 neighbor-joining method에 의하여 만들었으며, 상호안정성은 SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR, and CONSENSE of the PHYLIP package 등에 의하여 수행하였다.

싹겨육조 내에서의 미생물 거동

싹겨온육의 육조 내에서 싹겨육조에서 실제 거동에 관련된 환경 변화를 육조 내 온도와 실내온도 및 실내습도를 관찰하였다. 육조 내 온도는 Digital Thermometer (Alla, AL 910.0150E)를 사용하여 오전 9시와 오후 6시에 1일 2회 측정하였고, 실내온도와 습도는 각 5개 육조에서 매일 오전 9시에 측정하였다. 육조 내 온도 유지를 위하여 매일 저녁 20시에 육조 내의 싹겨는 최소 5회 이상 교반하였다.

통계학적 분석

실험결과에 대한 분산의 동질성을 비교하기 위해 대조군과의 유의적인 차이가 있는 시험균을 알아내기 위해 Student t-test를 실시하여 유의차가 5% 미만 ($p < 0.05$)일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

미생물 분리 및 균 배양

싹겨로부터 우점균을 분리하기 위하여, 싹겨온육조로부터(B&F Enzyme House, 한국) 한계희석법에 의해 콜로니를 분리하였다. MRS (Man, Rogosa and Sharpe)배지, PDA (Potato Dextrose Agar) 배지, PCA(Plate Count Agar) 배지를 사용하여 균의 분리를 수행 후, 균의 성장 패턴을 살펴보았다. 균은 50°C-60°C의 배지에서 호기적으로 배양하였고, DNA 추출을 위한 균체는 액체 배지를 이용하여 50°C의 진탕기에서 150rpm의 속도로 진탕시켜 배양하였다. 샘플은 희석의 배수를 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 으로 설정하여 순차적으로 희석한 후 50°C에서 24 시간 배양하였고, 배양된 배지에서 생성된 콜로니의 수를 카운팅하여, 희석 배율에 따라 콜로니 수를 보정해 실제 어느 정도 수의 미생물이 있는지를 알아보았다. 그 결과, 각각의 MRS 배지, PDA 배지 및 PCA 배지에서 배양된 콜로니 수는 특히 MRS 배지에서 다수의 미생물이 선택적으로 분리되었으므로, 유산균일 가능성이 높을 것으로 판단하였다. 본 균수는 약 4.0×10^6 cells/ml이었으며, 형태적으로 다른 미생물은 발견되지 않았다.

분리 균의 형태 관찰

싹겨온육에 관여하는 미생물의 형태를 관찰하기 위하여 플레이트에서 독립적으로 콜로니를 형성하는 10개의 콜로니를 선택하였다. 균주형태의 정밀관찰은 콜로니의 형태적인 차이점이 발견되지 않았으므로 전자현미경 대신 광학현미경에 의하여 관찰하였다. 그 결과, 싹겨 효소에서 분리된 우점균의 콜로니 형태는 타원형의 간균 모양이고 고초균과 형태학적으로 유사하게 관찰되었다 (Fig. 1).

DNA 분리 및 16S rRNA 염기배열 결정

선택된 10개의 콜로니는 Fink(9)의 방법에 의해 염색체 DNA를 추출하였고, 16S rRNA는 2개의 일반 프라이머에 의하여 중합효소 연쇄반응을 수행하여, 그의 중합효소 연쇄반응 생산물을 QIAquick PCR purification kit(Qiagen, Hilden, Germany)에 의해 정제하였다. 정제된 16S rDNA는 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit(Biosystems, Foster City, CA)에 의하여 배열결정을 하였다. 정제된 혼합물은 automatic DNA sequence (Biosystems, Model 310)에 의하여 자동으로 전기영동하였고, 16S rRNA 유전자 배열은 CLUSTAL W software에 의하여 분석하였다. 상기 10 콜로니 중 2콜로니의 rRNA서열은 별첨 *Bacillus* sp. EH-1 sequence 및 *Bacillus* sp. EH-2 sequence로 나타내었다. 상기 분석결과는 근린결합법으로 분류도를 만들었으며, 상호안정성은 SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR, 및 CONSENSE of the PHYLIP package 등에 의하여 수행하였다. 그 결과, 상기의 분리된 균주는 *Bacillus*

균주로서, EH-1과 EH-2는 상호 93%의 상동성을 지니고 있으며 이들은 각각 *B. coagulans*와 100%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 2).

쌀겨 온육조의 유지

분리된 균주와 동일한 쌀겨온육조 내에서의 온도를 측정하여 보았다. 효소온육조는 가로, 세로, 높이가 각각 2 m

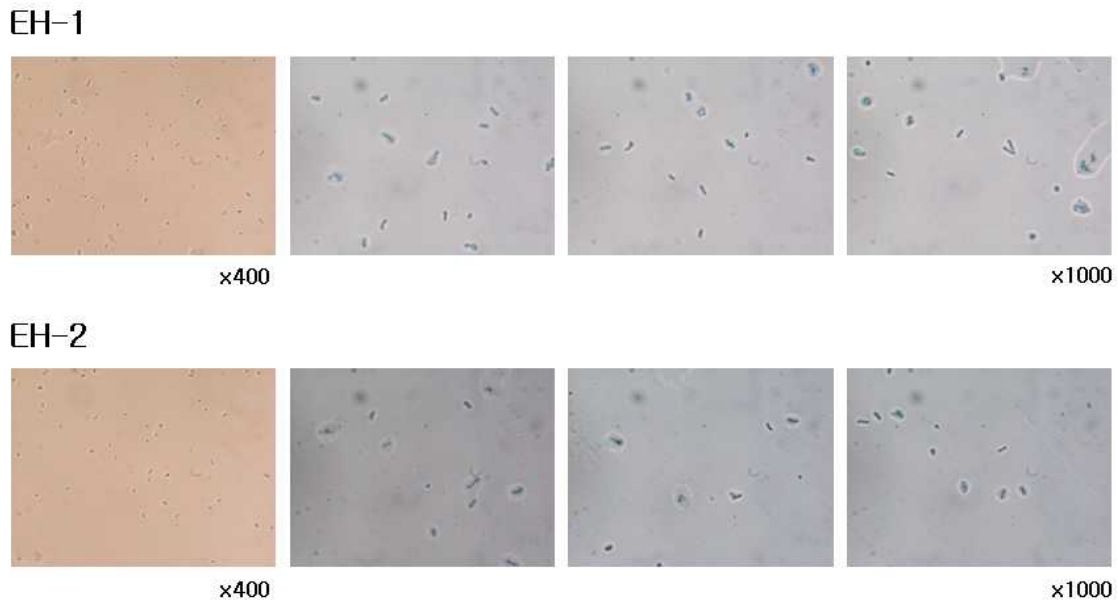


Fig. 1. Comparison of isolated strains by phase contrast microscope.

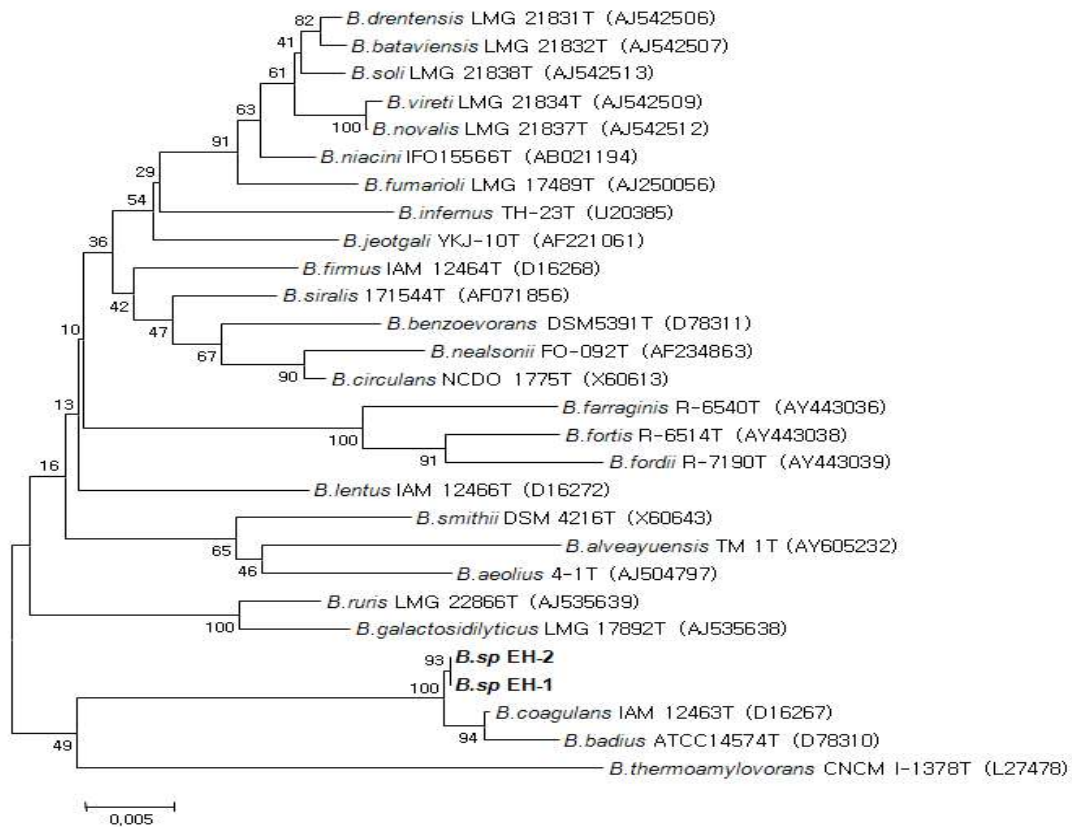


Fig. 2. Phylogenetic tree of isolated strains.

X 1.5 m X 1 m의 나무 욕조에 쌀겨 400 kg에 물 40 L를 넣고, 3-4일 동안 매일 6-7회 교반하면서 온도가 약 48도 정도를 확인한 후, 포도당 2.5%, 건조 효모 0.1%, 쌀겨겉질 1.25%를 첨가시켜 다시 교반을 매일 6-7회 실시하여 온도가 60-70도로 유지되는 것을 확인하였다(data not shown). 효소온욕조의 평균 온도를 측정하여 보았다. 그 결과, 오전 9시에 측정한 각 욕조의 최저온도는 64도, 최고온도는 68도 이었다. 각 욕조에는 효소온욕을 적게는 0회, 많게는 5회를 실시할 경우, 오후 6시경의 욕조의 온도는 최저 55도, 최고 64도이었다. 온욕 중 온도가 60도 이하로 강하시 당분이나 물을 1/10 수준으로 투입하고 교반을 하여 정치시 온도가 다시 60-70도 사이로 회복됨을 확인할 수 있었다. 효소온욕실의 실내의 온도와 습도는 효소욕조 내의 온도 유지를 위하여 매우 중요한 요인이다. 2009년 9월1일부터 2009년9월 30일까지 30일간 각 온욕실의 실내온도와 습도를 측정한 결과는 다음과 같다. 각 5개의 온욕실의 실내 온도는 1번에서 5번까지 각각 31.21 ± 1.322 , 25.08 ± 0.095 , 30.10 ± 1.665 , 25.09 ± 0.096 , 25.02 ± 0.068 이었다. 또한 습도는 각각 43.29 ± 8.485 , 42.58 ± 4.822 , 48.70 ± 4.858 , 48.83 ± 4.949 , 38.70 ± 4.481 이었다. 이상의 결과로부터 효소온욕실의 실내 온도는 약 25-31도 정도이며, 습도는 약 38-48% 전후가 적당함을 알 수 있었다. 이러한 효소온욕실의 실내온도를 유지시킴으로서 욕조내의 온도는 항상 60-70도를 유지하는데 많은 기여를 할 수 있는데, 효소온욕실의 실내와 동일하게 온도와 습도를 확인하였다. 먼저 전일 20시에 교반한 효소온욕실의 욕조내부의 온도는 익일 오전 9시에 온도를 측정하였다. 오전 9시에 온도는 각각 65.86 ± 1.268 , 66.83 ± 0.848 , 66.45 ± 0.632 , 67.04 ± 0.576 , 66.70 ± 0.702 이었고, 오후 8시(20시)에 온도는 각각 59.31 ± 2.989 , 60.64 ± 3.176 , 59.93 ± 1.804 , 60.54 ± 2.728 , 60.54 ± 1.732 이었으므로 약 6-7도가 상승하는 것을 알 수 있었다. 이상의 효소온욕의 욕조는 경우에 따라서는 매일 쌀겨의 1/10 정도를 새로운 쌀겨로 교체가 가능하며, 1개월이 경과시 전량 새로운 쌀겨로 교체하여 청결하게 유지하며, 당분과 물을 공급해 주는 과정을 반복하여 욕조의 온도를 60-70도로 유지시킬 수 있으며 이 과정 중에 다른 여타의 미생물은 검출되지 않았다(data not shown). 따라서 본 균주에 의하여 효소온욕이나 피부미용을 목적으로 그 응용이 가능할 것으로 추측되며 이의 온도 유지에 관련된 요인의 연구를 수행 중에 있다.

요 약

쌀겨의 발효는 온도상승이 되면서 열을 많이 발생하여 온도가 60-70도로 상승한다. 이 발효에서 분리된 *Bacillus coagulans*는 효소온욕시 사용되는 주요 미생물로서, 이를 응용하여 피부미용건강에 사용되어질 수 있다. 쌀겨발효 중 온도유지에 관련이 있는 major microflora의 분리 연구를 수행한 결과, 고초균이라 판단되는 균주 10여종을 분리하였으며 이를 분자분류학적인 연구를 수행한 결과 *Bacillus coagulans*로 동정하였다. 본 균주는 쌀겨발효에서 온도상승에 관여하는 주요 미생물로서 이의 피부미용에의 응용이 가능하리라 판단된다.

참고문헌

1. Kang, D. K. (2005) Final Report, Searching of biomaterials for agricultural applications and development of ceramic and/or industrial materials using silicate complex from rice. Korea Atomic & Energy Research Institute.
2. Shih, F.F. (2003) An update on the processing of high-protein rice products. *Nahrung*, 47, 420-424
3. Amended final report on the safety assessment of rice bran oil, rice germ oil, rice bran acid, rice bran wax, hydrogenated rice bran wax, rice bran extract, rice extract, rice germ powder, rice starch, rice bran, hydrolyzed rice bran extract, hydrolyzed rice bran protein, hydrolyzed rice extract, and hydrolyzed rice protein. *Int. J. Toxicol., Suppl* 2, 91-120
4. Huang, Z.R., Lin, Y.K. and Fang, J.Y. (2009) Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, 14, 540-554
5. Kim, M.K. (2007) Processed method of the crude crop bran. Korea Patent 10-0701883-0000
6. Kim, H.H. (2006) Preparation of rice bran for agricultural processing. Korea Patent 10-0570508-0000
7. Cho, J.R. (2009) Composition for body scrub massage using rice bran and sulfide salts without any preservatives, and its method the same. Korea Patent 10-0884364-0000
8. Lee, K.H. (2005) Preparation of crop powder for skin beauty. Korea Patent 10-0481003-0000
9. Fink, W.L. (1986) Microcomputers and phylogenetic analysis. *Science*, 234, 1135 - 1139