

Bacillus subtilis KMKW4를 이용한 백미 및 아마란스 발효물의 이화학적 특성 및 생리활성

양수진 · 이래현 · 홍주현
대구가톨릭대학교 식품공학전공

Physicochemical Characteristics and Biological Activities of Rice and Amaranth Fermented by *Bacillus subtilis* KMKW4

Su-Jin Yang, Rea-Hyun Lee, and Joo-Heon Hong

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

ABSTRACT This study examined the cultural characteristics and biological activities of fermented rice and amaranth with *Bacillus subtilis* KMKW4. These samples were made with various amounts of rice and amaranth [100:0 (R100), 90:10 (R90), 80:20 (R80), and 70:30 (R70)]. *B. subtilis* KMKW4 was used as starter for the fermentation, and its cultures at the lated logarithmic growth were inoculated for final concentration of 2% (v/v). Number of viable cells of fermented R80 (7.67 log CFU/mL) was greater than those of R100, R90, and R70 (7.48 log CFU/mL, 7.38 log CFU/mL, and 7.09 CFU/mL, respectively) during the fermentation period (120 h). Amylase activities of fermented R80 and R100 were 57.77 U/mL and 19.91 U/mL, respectively. Furthermore, amylase activities of fermented freeze-dried powders of R100 and R80 were 24.31 U/g and 9.12 U/g, respectively. Free sugar contents of R100 and R80 increased after fermentation, and that of R80 (5,454.15 mg/100 g) significantly increased compared to that of R100 (4,274.85 mg/100 g). The free amino acid content of R80 was higher than that of R100. DPPH and superoxide radical scavenging activities of 5 mg/mL of fermented freeze-dried powder (R80) were 44.21% and 89.76%, respectively. ACE inhibition rates and α -glucosidase inhibitory activities were significantly higher in R80 than R100. This study suggested that fermentation of R80 might be a new potential source of antioxidant, anti-diabetic, and anti-hypertensive agents applicable to grain enzyme-containing foods.

Key words: *Bacillus subtilis* KMKW4, rice, amaranth, amylase activity, α -glucosidase inhibitory activity

서 론

최근 소비자들의 건강 증진 인식이 높아지면서 질병예방 및 건강 유지 나아가 평균 수명의 연장 등에 기여하는 기능성 식품에 대한 관심이 확대되고 있으며 수요도 증가하고 있다. 이에 따라 기능성 식품을 개발하기 위해 건강 관련 기능성 물질의 탐색, 기능성 소재 및 식품에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(1,2). 효소식품은 식품유형상 기타 식품류로 곡류 효소 함유 제품, 배아 효소 함유 제품, 과채류 효소 함유 제품 및 기타 식물 효소 함유 제품으로 분류하고 있으며, 식품공전에서 식물성 원료에 식용 미생물을 배양시켜 효소를 다량 함유하게 하여 섭취가 용이하도록 가공한 것이라고 정의하고 있다(3). 현재까지 효소를 생산하는 수많은 미생물들이 보고되어 있는데 이러한 미생물 중에서도 특

히 안전성이 확보된 식용가능 미생물 유래의 효소는 중요한 생물자원으로서 다양한 생물 산업에서 활용 가치가 점차 높아지고 있어 주목을 받고 있다. 이 중 *Bacillus* 속 미생물은 amylase를 생산하는 대표적인 세균 중 하나로 현재 많은 산업분야에서 활용되고 있으며 이들 효소에 대한 특성 또한 다양한 연구에서 지속적으로 검토되어 왔다(4-8). 미생물에 의한 amylase는 다른 효소원에 비해 생산이 용이하고 효소의 균일성 및 대량생산 등의 조건이 유리하기 때문에 그 이용도가 높다(9). 이러한 amylase는 전분을 분해하여 제약, 식품을 비롯하여 섬유산업 분야에서 다양하게 활용되고 있으며, 1984년 이후로 *Bacillus*를 이용하여 amylase가 소화장애 개선을 위한 목적으로 생산되어 급속한 성장을 보인 산업적으로 중요한 미생물이다(10). 곡류 효소식품으로 활용 가능한 여러 가지 곡물 중 쌀은 주성분이 전분으로 중요한 에너지 공급원인 동시에 단백질의 주 공급원인 아미노산 중 필수아미노산인 라이신이 220 mg/100 g으로 밀가루 140 mg/100 g, 옥수수 110 mg/100 g 및 조 120 mg/100 g에 비해 1.5배 이상 함량이 많고, 아미노산가는 61로 밀가루 39, 옥수수 31, 조 33 등과 비교해 양질의 단백질을 함유

Received 8 December 2014; Accepted 11 February 2015

Corresponding author: Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-702, Korea
E-mail: jhhong@cu.ac.kr, Phone: +82-53-850-3218

하고 있어(11) 다른 곡류에 비하여 단백질로서 체내에서 이용률이 높다고 알려져 있다(12). 또한 감자나 식빵보다 혈당 및 인슐린 분비가 낮다고 보고하였으며(13) 대두단백질 등 다른 단백질보다 체내에서 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 농도를 낮게 유지시켜 준다고 보고되고 있다(14).

아마란스(Amaranth)는 비름과(*Amaranthus* spp. L.)에 속하는 일년생 유사 화곡류이고 쌍자엽 식물로 영양성분을 보면 조단백질은 17~18%, 지방은 7~8% 정도로 옥수수나 밀보다 높으며 섬유소는 비슷하거나 높게 함유하고 있다. 아마란스의 단백질은 특히 화곡류에 부족한 lysine 함량이 단백질 100 g당 5.2 g으로 옥수수(3.4 g), 밀(3.2 g)에 비해 높으며, 두피 작물에서 부족한 황 함유 아미노산 함량도 단백질 100 g당 4.4 g으로 많이 함유하고 있다(15). 이와 같이 아마란스는 영양 생리학 측면에서 유용 성분을 함유하고 있어 지질대사에 효과가 있으며 또한 독특한 맛과 영양가가 높아 국수, 비스킷 등의 식품 개발에도 이용되고 있다(16, 17).

따라서 본 연구에서는 곡류 효소 함유 제품 개발을 위한 소재 탐색의 일환으로 백미와 아마란스를 영양원으로 하여 *Bacillus subtilis* KMKW4로 발효하였으며 발효에 따른 배양 특성과 amylase 활성 및 기능적 특성을 확인하고자 향산화 활성 및 생리활성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 백미(경상북도 의성군 재배)는 2013년 10월에 수확한 쌀을 이용하여 건식분쇄 한 다음 표준망체(0.074 mm)를 통과한 분말을 사용하였으며, 아마란스(강원도 원주 재배)는 2013년 9월 중순에 수확한 것으로 이물질을 제거하고 분쇄기(J-NCM, Jisico, Seoul, Korea)로 분쇄하여 표준망체(0.491 mm)를 통과한 분말을 사용하였다. 백미 및 아마란스 발효를 위하여 사용된 미생물은 김치로부터 분리 동정한 *Bacillus subtilis* KMKW4를 이용하였다(9). 3,5-Dinitrosalicylic acid(DNS), soluble starch, glucose, maltose, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ethanol(99.9%), phenazine methosulfate(PMS), nitro blue tetrazolium(NBT), β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), rabbit lung acetone powder, hippuryl-histidyl-leucine(HHL), α -glucosidase, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였고, hydrogen chloride, sodium chloride, ethyl acetate, methanol, ethanol(94%) 등의 용매는 일급 시약(Duksan Co., Seoul, Korea)으로, HPLC 용매는 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA) 제품을 사용하였다. Nutrient broth, agar는 Difco(Detroit, MI, USA)의 제품을 사용하였다.

Starter 배양액 제조

백미와 아마란스는 백미 100%(R100), 백미 90%에 아마란스 10%(R90), 백미 80%에 아마란스 20%(R80) 및 백미 70%에 아마란스 30%(R70)로 하여 아마란스 혼합 비율을 달리하였으며 각각 20 g씩 삼각플라스크에 넣고 살균 후 멸균수 40 mL를 가한 다음 shaking 하였다. 또한 백미 및 아마란스 발효에 이용한 *B. subtilis* KMKW4는 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 starter액으로 사용하였다.

백미 및 아마란스의 발효

본 실험에서는 백미와 백미에 부족한 단백질을 보충하기 위하여 아마란스를 혼합하여 사용하였으며, 백미 및 아마란스의 혼합비를 달리한 R100, R90, R80 및 R70에 *B. subtilis* KMKW4를 이용하여 제조한 starter 액을 2% 접종하였다. 접종 후 항온기(LIS-2005RL, Daihan Labtech Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 120시간까지 37°C에서 160 rpm으로 shaking 하여 발효하였으며, 발효물의 배양적 특성은 배양이 진행되는 동안 매 시간마다 측정하였고 생리활성 분석에 사용된 시료는 발효물을 동결건조 한 다음 -72°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

생균수 측정

배양시간대별로 회수한 시료는 1분 동안 균질화 시킨 후 일정량을 취하여 실험에 사용하였다. 생균수는 배양액 1 mL에 0.85% NaCl 용액 9 mL를 혼합하여 10배 희석법으로 희석하였고 희석액 100 μ L를 plate에 접종하고 1.5% agar가 첨가된 nutrient broth를 이용한 평판측정법으로 생균수를 측정하였다. 각각의 plate는 37°C 배양기에서 24시간 배양 후 형성된 colony 수를 계측하고 그 colony에 희석배수를 곱하여 시료 mL당 CFU(colony forming unit)로 나타내었다.

pH 측정

pH는 pH meter(CH-8603, Mettler-Toledo Inc., Schwerzenbach, Switzerland)를 사용하여 10 mL의 시료를 채취하고 3회 반복 측정 후 평균값을 나타내었다.

Amylase 활성 측정

Amylase 활성은 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 용해한 0.5% soluble starch 0.5 mL를 기질로 이용하여 백미 및 아마란스 발효물의 상층액 0.5 mL를 효소액으로 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이때 생성된 환원당의 함량은 DNS 방법(18)으로 측정하였으며, 본 연구에서의 효소 활성 1 unit은 1분에 1 μ mol의 glucose를 생산하는 효소량으로 정의하였다.

유리당 함량 분석

유리당 함량은 백미 및 아마란스 발효물 동결건조분말

100 mg에 10 mL 증류수를 가한 다음 0.2 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC(Waters2996, Waters Co., Milford, MA, USA)로 분석하였다. 이때 column은 carbohydrate column(ID 4.6×250 mm, Waters Co.)을 사용하였으며, column oven 온도는 35°C, mobile phase는 85% acetonitrile, flow rate는 1.2 mL/min이었고 시료 주입량은 20 µL로 하여 refractive index(RI) detector를 이용하여 검출하였다. 표준품은 glucose, maltose를 증류수에 녹여 표준용액으로 사용하였다. 표준품과 시료의 당 성분은 머무른 시간을 직접 비교하여 확인하였고, 유리당 함량 계산은 각 표준품의 검량 곡선을 작성한 후 peak의 면적으로 산출하였다.

유리아미노산 조성 분석

유리아미노산 조성은 시료 0.2 g에 94% ethanol 10 mL를 가하여 24시간 교반한 다음 원심분리(4,000 rpm, 15분)하여 상층액과 고형분을 분리하였다. 분리된 상층액을 40°C 이하에서 감압 농축하였으며 농축한 시료는 0.02 N HCl 5 mL로 정용하여 여과(0.22 µm, membrane filter)한 다음 amino acid analyzer(L-8900, Hitachi Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정

전자공여능은 DPPH의 환원력을 이용하여 측정하였다(19). 즉 농도별로 희석한 시료 0.5 mL에 4×10^{-4} M DPPH 용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 4.5 mL를 가하여 총액의 부피가 5 mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에 30분간 방치한 후 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co., Buckinghamshire, Sweden)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료 첨가 전후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample}_{\text{absorbance}}}{\text{Control}_{\text{absorbance}}}\right) \times 100$$

Superoxide radical 소거 활성 측정

Superoxide radical 소거 활성은 Nishikimi(20)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 500 µL에 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 100 µL, 100 µM phenazine methosulfate(PMS) 200 µL를 혼합하여 반응시킨 후 500 µM nitro blue tetrazolium(NBT) 200 µL 및 500 µM β-nicotinamide adenine dinucleotide(NADH) 400 µL를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide radical 소거 활성은 시료 첨가 전후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Superoxide radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample}_{\text{absorbance}}}{\text{Control}_{\text{absorbance}}}\right) \times 100$$

Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 활성 측정

ACE 저해 활성은 Cushman과 Cheung(21)의 방법을 변형하여 측정하였으며, 조효소액은 rabbit lung acetone powder를 1 g/10 mL(w/v)의 농도로 4°C에서 24시간 추출한 후 원심분리(4°C, 10,000 rpm, 40분)하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 기질은 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)에 hippuryl-histidyl-leucine(HHL)을 5 mg/mL(w/v)의 농도로 녹인 후 기질로 사용하였다. ACE 저해 활성은 시료액 50 µL에 ACE 조효소액 50 µL를 가한 다음 37°C에서 5분간 예비반응을 시킨 후 기질 50 µL를 가하고 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 1 N HCl 150 µL를 가하여 반응을 정지시키고 750 µL의 ethyl acetate를 가한 다음 1분간 교반하고 원심분리(4°C, 5,000 rpm, 10분)하여 500 µL의 상등액을 얻었다. 이 상등액을 120°C에서 30분간 완전히 건조시켜 2 mL의 methanol을 넣은 후 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수를 50 µL를 가하여 측정하였으며, ACE 저해 활성은 아래와 같이 나타내었다.

$$\text{ACE inhibition rate (\%)} =$$

$$\left(1 - \frac{\text{Control}_{\text{absorbance}} - \text{Sample}_{\text{absorbance}}}{\text{Control}_{\text{absorbance}} - \text{Blank}_{\text{absorbance}}}\right) \times 100$$

α-Glucosidase 저해 활성 측정

α-Glucosidase 저해 활성은 Tibbot과 Skadsen(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. α-Glucosidase(0.2 U/mL)와 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside(3 mM, pNPG)는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하여 사용하였으며, 각각의 시료액 50 µL를 0.2 U/mL α-glucosidase 효소액 100 µL와 혼합하여 37°C에서 20분간 전 배양한 후 3 mM pNPG 50 µL를 가하여 37°C에서 20분간 반응하였다. 반응 후 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 저해율(%)을 계산하였다.

통계처리

실험 결과는 3회 반복 측정 후 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS 19.0(IBM Corp., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 시료군 간의 유의성을 검증한 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

배양시간에 따른 발효물의 생균수 및 pH 변화

백미와 아마란스의 혼합비율에 따라 미생물 생장에 미치는 영향을 검토하기 위하여 R100, R90, R80 및 R70에 대해 120시간 발효 후 배양시간별 생균수를 Fig. 1A에 나타내었다. 초기 0시간에서의 생균수는 5.33~5.37 log CFU/mL였으며 배양 12시간 및 24시간 경과함에 따라 R100은 7.48 log CFU/mL와 7.37 log CFU/mL였고, R90은 7.16 log

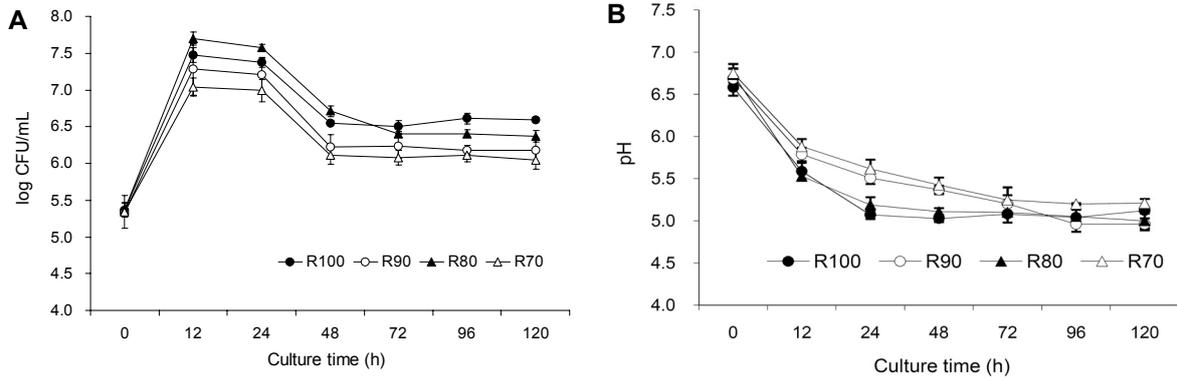


Fig. 1. Time course of growth and pH during fermentation of *Bacillus subtilis* KMKW4 in rice and amaranth broth medium at 37°C for 120 h. Values are expressed as the mean±SD (n=3). R100, rice 100%; R90, rice 90%+amaranth 10%; R80, rice 80%+amaranth 20%; R70, rice 70%+amaranth 30%.

CFU/mL와 7.18 log CFU/mL, R80은 7.67 log CFU/mL와 7.52 log CFU/mL 및 R70은 7.09 log CFU/mL와 7.01 log CFU/mL로 측정되어 아마란스 혼합비율에 따른 4개의 시료 중 R80에서 가장 높은 생육 활성을 나타내었다. 발효물의 생육은 12시간 동안 가장 많이 증식하였으며 배양 24시간 이후부터는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 *B. subtilis* KMKW4가 백미와 아마란스를 효과적으로 자기 증식에 이용하였으며 발효가 잘 진행되었음을 확인하였다. 백미 및 아마란스의 발효 정도를 확인하기 위하여 배양시간별 곡류 발효물의 pH 변화를 Fig. 1B에 나타내었다. 배양시간에 따른 pH 값은 0시간에서 R100, R90, R80 및 R70이 각각 pH 6.58, pH 6.69, pH 6.73 및 pH 6.75를 나타내어 아마란스가 첨가됨에 따라 pH가 약간 증가함을 확인하였으며, 12시간 발효 시 pH는 각각 5.59, 5.79, 5.53 및 5.88로 나타나 R80에서 가장 낮은 pH를 나타내었다. 백미 및 아마란스 혼합비율에 따른 발효물의 pH는 배양시간이 경과함에 따라 pH가 낮아져 모든 실험군에서 발효가 일어났음을 확인하였고 R80이 가장 낮게 분석되었다. 이는 Kim 등(23)의 연구에서 포도가공 부산물을 이용하여 *B. subtilis*로 발효시킨 실험군에서 발효하지 않은 배지의 pH 값은 6.27인 반면 발효한 배지는 24시간째 pH 값이 4.27로 낮아져 발효가 일어났

음을 확인한 결과와 유사하였다. 따라서 본 실험에서는 배양 시간에 따른 생균수 및 pH 변화를 고려할 때 아마란스를 20% 첨가한 R80 구간을 선정하였고 대조구로는 백미 100%(R100)로 하여 배양시간에 따른 amylase 활성을 분석하였다.

배양시간에 따른 발효물의 amylase 활성

백미(R100) 및 백미와 아마란스(R90, R80, R70) 혼합 발효물과 발효물 동결건조분말의 배양시간에 따른 amylase 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 발효물의 경우 배양 0시간에서의 amylase 활성은 R100, R90, R80 및 R70이 각각 7.34 unit/mL, 6.99 unit/mL, 6.18 unit/mL 및 5.17 unit/mL로 나타났으며, 배양 24시간까지는 amylase 활성의 변화가 크게 나타나지 않았으나 배양 24시간 이후부터 amylase 활성이 급격하게 증가하여 배양 48시간 후 가장 높은 amylase 활성을 나타내었다. 배양 48시간에서 R100, R90, R80 및 R70의 amylase 활성은 각각 19.91 unit/mL, 25.12 unit/mL, 57.77 unit/mL 및 31.72 unit/mL로 나타났으며 백미만을 영양원으로 한 발효물보다 아마란스를 혼합하여 배양한 발효물에서 더 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 본 연구에서의 amylase 활성은 발효 초기

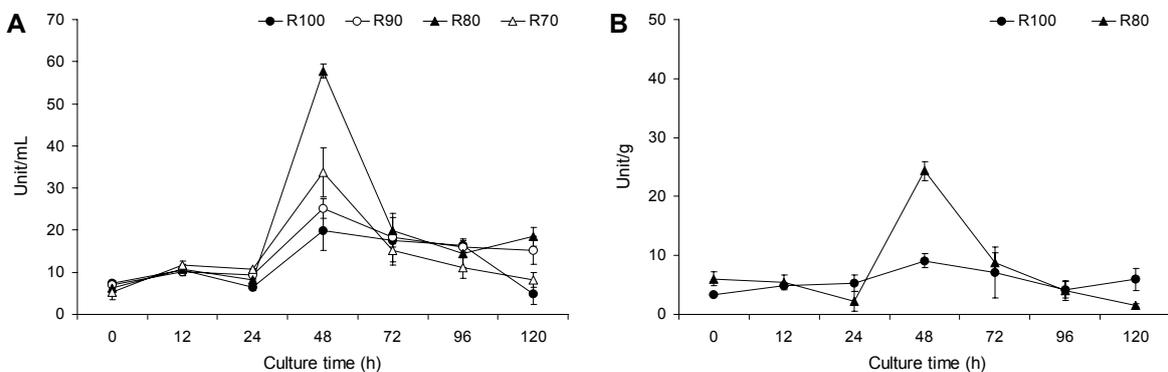


Fig. 2. Time course of amylase activity during fermentation of rice and amaranth by *Bacillus subtilis* KMKW4. Values are expressed as the mean±SD (n=3). (A) Fermentation products. (B) Fermentation freeze dried powder. R100, rice 100%; R90, rice 90%+amaranth 10%; R80, rice 80%+amaranth 20%; R70, rice 70%+amaranth 30%.

효소 활성이 약간 감소하다가 다시 증가되는 경향을 나타내었는데, 이는 통통마디를 이용한 발효물의 효소 활성 변화를 측정된 결과에서 발효 2일째에는 효소 활성이 증가하다 3일째 효소 활성이 다시 감소하였고, 4일 이후부터 활성이 다시 안정적으로 증가한다(24)는 보고와 유사하였다. 또한 발효물 동결건조분말의 amylase 활성을 측정된 결과 발효물과 같은 결과를 나타내었다(Fig. 2B). 발효물 동결건조분말은 amylase 활성이 가장 높은 R80과 대조구인 R100을 비교하였는데, 배양 48시간에서 R80이 24.31 unit/mL로 측정되어 발효물에 대한 amylase 활성의 약 42%를 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 백미와 아마란스 발효물(R90)을 곡류 효소 함유 제품용 소재로 활용 가능성을 확인하였으며 amylase 활성이 가장 높은 구간인 배양 48시간을 발효 조건으로 선정하였다.

발효물의 유리당 함량

백미(R100) 및 백미와 아마란스(R80) 발효물 동결건조분말의 유리당 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. R100 및 R80에 함유되어 있는 유리당은 glucose와 maltose로 분석되었고 발효 전 R100은 glucose 765.3±39.1 mg/100 g, maltose 160.0±16.1 mg/100 g을 함유하고 있었으며, 발효 48시간에서 glucose가 4,274.9±53.3 mg/100 g으로 나타나 glucose 함량이 증가함을 확인하였고 maltose는 검출되지 않았다. R80은 발효 전 glucose 1,828.8±56.3 mg/100 g, maltose 147.4±29.7 mg/100 g으로 나타나 R100보다 초기 glucose 함량이 높았는데, 이는 아마란스에 유리되기 용이한 당당류가 많이 함유되어 있는 것으로 사료되며 미생물 생육에 영향을 주는 관계로 R80에서 생육도가 더 높은 것으로 판단된다. 발효 후 R80은 maltose는 검출되지 않았으며, glucose는 5,454.2±73.2 mg/100 g으로 함량이 증가하였는데 R100보다 glucose 함량이 높음을 확인하였다. Glucose 함량은 R100 및 R80 모두 발효 후 증가하여 유사한 결과를 보여주었는데 이는 *B. subtilis* KMKW4가 생성하는 amylase에 의해 전분이 분해되어 glucose가 생성되었음을 알 수 있었다. Kim과 Park(25)의 쌀 전분 상태에 따른 전분분해효소의 작용과 특성에 대한 연구에서 전분에

α -amylase를 작용시켰을 경우 glucose의 생성이 증가하는데 이는 α -amylase가 전분 사슬의 말단기로부터 glucose 단위로 가수분해시키는 것으로 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 또한 Lee 등(26)의 보고에 따르면 amylase 효소를 분비하는 백국균(*Aspergillus kawachii*)을 이용한 쌀 막걸리 제조 시 발효과정 중 전분질 원료의 분해로 인해 발효 전과 비교 시 glucose, maltose의 함량이 증가한다고 하였다.

발효물의 유리아미노산 조성

발효물 동결건조분말의 유리아미노산 조성을 Table 2에 나타내었다. 유리아미노산 함량은 발효 전보다 발효 후 증가하였는데 R100은 발효 전 664.09 mg/100 g에서 48시간 발효 후 834.2 mg/100 g으로 증가하였으며, R80은 발효 전 868.8 mg/100 g에서 발효 후 1,085.2 mg/100 g으로 증가하였다. 이는 *B. subtilis* KMKW4의 protease 활성에 의하여 백미 및 아마란스에 함유되어 있는 단백질이 아미노산으로 분해된 것으로 사료된다. Ryu와 Lee(27)는 *Bacillus subtilis* CT-D를 이용한 두유 발효물의 품질 특성 연구에서 발효 후 유리아미노산이 증가되었다고 보고하였으며, Park 등(28)은 *B. subtilis*로 발효된 함초의 유리아미노산이 발효 후 증가한다고 보고하여 식품원료는 상이하나 *B. subtilis*는 단백질을 분해하여 유리아미노산을 증가시킴을 확인하였다. 또한 아마란스는 백미와 비교 시 단백질 함량이 높기 때문에 아마란스가 혼합되어 있는 R80에서의 유리아미노산 함량이 높아졌을 것으로 판단되며 다양한 영양원이 공급됨에 따라 발효가 더 잘 일어난 것으로 사료된다. 분석된 아미노산 36종 중 aspartic acid, serine, glycine 등은 발효 후 함량이 감소하는데 이는 발효가 진행되면서 급격히 번식한 미생물들이 유리아미노산을 생육의 일부로 이용하여 감소한다는 Choi 등(29)의 연구 결과와 유사하였다. 발효물 동결건조분말의 주요 유리아미노산으로는 asparagine, glutamic acid, alanine, γ -amino-n-butyrac acid 등이 분석되었는데 구수한 맛을 내는 glutamic acid는 발효 후 R100보다 R80에서 더 높게 나타났고 쓴맛을 지닌 valine, leucine, isoleucine 등은 R80보다 R100에서 더 높은 것을 알 수 있었으며, 단맛을 내는 lysine의 경우 발효 전보다 발효 후 다량 증가하는 것을 확인하였으며 R80이 R100보다 높은 함량을 나타내었다.

발효물의 항산화 활성

일반적으로 항산화 활성을 측정하는 방법 중 DPPH radical 소거 활성법은 비교적 간단하게 측정 가능한 방법으로 이용되고 있다. 전자공여 작용은 활성 radical에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐 아니라 인체 내에서 활성 radical에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용되고 있다(30). 발효물 동결건조분말에 대한 DPPH radical 소거 활성을 측정된 결과 모든 실험구에서

Table 1. The free sugar contents of rice and amaranth fermented by *Bacillus subtilis* KMKW4

Samples ¹⁾		Free sugar contents (mg/100 g)	
		Glucose	Maltose
R100	0 h	765.3±39.1 ^{d2)}	160.0±16.1 ^a
	48 h	4,274.9±53.3 ^b	ND ⁴⁾
R80	0 h	1,828.8±56.3 ^c	147.4±29.7 ^a
	48 h	5,454.2±73.2 ^a	ND

¹⁾R100: rice 100%, R80: rice 80%+amaranth 20%.

²⁾Values represent mean±SD (n=3).

³⁾Means with different letters (a-d) within the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

⁴⁾ND: not detected.

Table 2. Free amino acid contents of rice and amaranth fermented by *Bacillus subtilis* KMKW4 (unit: mg/100 g)

Free amino acid	R100 ¹⁾		R80	
	0 h	48 h	0 h	48 h
Taurine	1.4±0.1 ²⁾	3.8±0.2	2.6±0.7	7.5±0.9
O-Phosphoethanolamine	1.3±0.1	4.8±2.4	10.8±1.1	65.8±1.2
Urea	7.5±0.3	28.3±1.7	29.1±0.8	92.0±5.7
L-Aspartic acid	59.2±1.1	—	96.1±3.8	—
L-Threonine	5.5±0.7	3.4±1.4	11.6±1.2	—
L-Serine	19.2±1.6	6.5±0.1	23.1±1.6	—
L-Asparagine	246.8±5.3	13.7±0.3	226.9±7.8	163.5±3.4
L-Glutamic acid	118.5±4.5	6.6±0.3	152.6±0.5	40.2±1.4
L-Sarcosine	22.3±3.1	21.4±1.2	49.3±0.1	11.8±1.9
L-Proline	—	31.6±0.9	—	32.3±0.2
Glycine	10.7±0.2	2.8±0.6	20.8±2.1	7.3±0.1
L-Alanine	46.7±2.4	15.6±2.7	57.5±2.9	41.9±0.7
L-Citrulline	—	25.2±4.5	—	6.1±0.8
L-α-Amino-n-butyric acid	3.3±1.9	28.9±0.4	3.3±0.6	31.0±2.4
L-Valine	9.8±0.7	60.7±5.1	18.1±0.5	19.5±0.8
L-Cystine	—	0.8±0.1	0.7±0.2	1.8±0.3
L-Methionine	1.1±0.6	23.2±0.2	5.9±0.2	18.2±1.5
Cystathionine	—	10.1±0.8	—	9.2±1.6
L-Isoleucine	2.2±0.2	17.7±1.8	8.3±0.4	3.8±0.7
L-Leucine	4.0±2.4	69.4±7.1	9.2±2.1	21.3±3.4
L-Tyrosine	4.7±1.5	63.6±3.7	10.4±0.7	33.1±5.7
β-Alanine	—	4.0±1.1	—	—
L-Phenylalanine	3.6±1.3	62.4±0.6	7.7±1.5	23.2±1.9
D,L-β-Aminoisobutyric acid	—	1.1±0.4	—	—
L-Homocysteine	—	5.0±0.9	—	4.3±0.7
γ-Amino-n-butyric acid	29.7±0.9	31.2±1.2	32.9±3.2	51.7±4.4
Ethanolamine	5.4±3.2	20.5±0.3	5.6±1.1	19.3±0.7
Ammonium chloride	27.1±2.6	44.3±2.2	32.8±1.6	151.8±2.4
δ-Hydroxylysine	—	4.9±1.3	—	0.3±0.2
L-Ornithine	—	21.2±0.7	0.4±0.2	37.0±2.8
L-Lysine	7.8±0.9	73.6±1.9	15.4±1.3	103.1±0.9
1-Methyl-L-histidine	—	—	—	1.6±0.4
L-Histidine	3.5±2.1	28.6±3.5	6.1±1.0	17.3±1.5
L-Tryptophan	—	7.6±1.8	—	13.7±2.3
L-Carnosine	—	2.7±0.5	—	—
L-Arginine	23.6±1.7	89.0±2.4	31.6±0.8	55.6±0.6
Total amino acid	664.9±39.4	834.2±54.3*	868.8±38.0	1,085.2±51.5*

¹⁾R100: rice 100%, R80: rice 80%+amaranth 20%.

²⁾Values represent mean±SD (n=3).

*Significantly different between 0 h and 48 h by Student's t-test at P<0.05.

발효 전보다 발효 48시간 경과 후 항산화 활성이 증가하였는데, 발효 후 5 mg/mL 농도에서 R100과 R80은 각각 36.21%와 44.21%를 나타냈으며 R80이 높게 분석되었다 (Fig. 3). 이는 Park 등(28)의 연구 결과에서 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효한 통통마디가 무발효균보다 항산화 활성이 우수하다고 보고하였고, Moon 등(30)의 연구 결과에서도 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효시킨 감귤 가공 부산물 추출물에서 발효하지 않은 것보다 발효한 것에서 전자공여능이 증가하는 경향이 있다고 보고하였는데, 본 연구 결과에서도 발효 전보다 후의 항산화 활성이 2배 이상 증가하는 것을 확인하였다. Superoxide radical 소거 활성은 친수성이 강한 항산화 물질이 라디칼과 얼마만큼 직접적으로 반응할 수 있는지를 측정하기 위해 널리 이용되고 있다(31).

발효물 동결건조분말의 superoxide radical 소거 활성은 발효 전 R100의 경우 1, 2.5, 5 mg/mL 농도에서 각각 2.77%, 17.51% 및 38.36%로 나타났으나 발효 후 각각 8.50%, 58.40% 및 78.93%로 증가함을 확인하였다(Fig. 4.). R80의 경우 R100과 유사하게 발효 후 항산화 활성이 증가되었으며, 1, 2.5, 5 mg/mL 농도에서 각각 13.63%, 70.06% 및 89.76%로 나타나 R100보다 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

발효물의 ACE 및 α-glucosidase 저해 활성

ACE는 renin-angiotensin-aldosterone system의 중요한 효소 물질로서 불활성형의 angiotensin- I로부터 C-terminal에서 dipeptide인 His-Leu를 분리시켜 가수분해

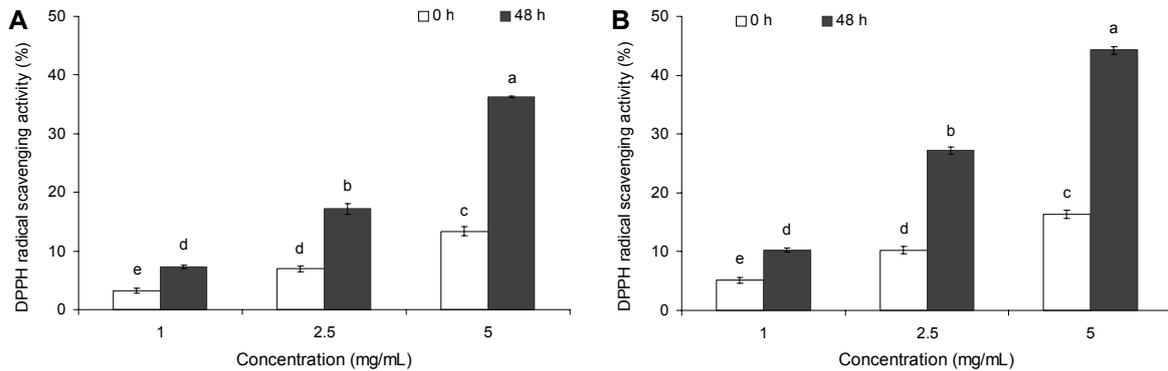


Fig. 3. Comparison of DPPH radical scavenging activity in rice and amaranth fermented by *Bacillus subtilis* KMKW4 with different time. (A) R100, rice 100% fermentation freeze-dried powder. (B) R80, rice 80% and amaranth 20% fermentation freeze-dried powder. Values are expressed as the mean±SD (n=3). Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

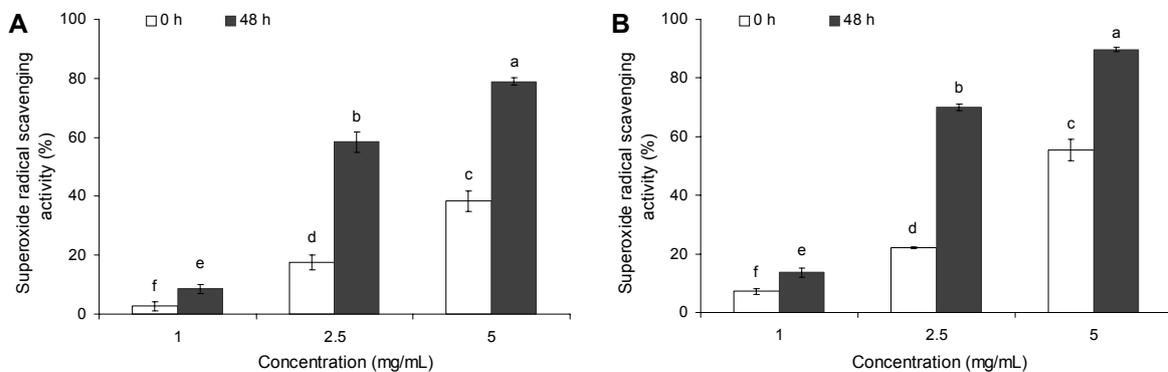


Fig. 4. Comparison of superoxide radical scavenging activity in rice and amaranth fermented by *Bacillus subtilis* KMKW4 with different time. (A) R100, rice 100% fermentation freeze-dried powder. (B) R80, rice 80% and amaranth 20% fermentation freeze-dried powder. Values are expressed as the mean±SD (n=3). Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

함으로써 강력한 혈관수축 작용을 하는 angiotensin-II를 생성하는데, 혈압을 감소시키는 bradykinin을 불활성화시키는 효소로서 결국 본태성 고혈압의 원인이 된다고 보고되고 있다(32). 따라서 ACE 활성을 저해함으로써 혈압을 낮추고 심혈관 및 뇌혈관 질환 등의 고혈압과 관련이 깊은 질환

을 치료하는 데 활용될 수 있다(33). 백미 및 백미와 아마란스 발효물의 발효 전후 ACE 저해 활성 분석 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 발효 전 R100과 R80은 각각 30.12%와 40.22%로 나타났으며, 발효 후에는 각각 59.13%와 78.57%로 나타나 발효 후 크게 증가하는 경향을 보였고 R80의

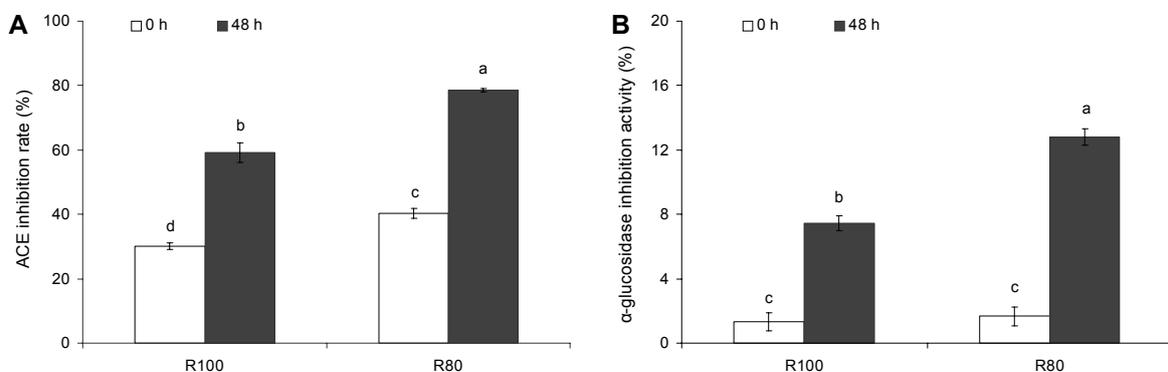


Fig. 5. Comparison of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition rate and α -glucosidase inhibition activity in rice and amaranth fermented by *Bacillus subtilis* KMKW4 with different time. (A) ACE inhibition rate of R100 and R80 fermentation freeze-dried powder. (B) α -Glucosidase inhibition activity of R100 and R80 fermentation freeze-dried powder. Values are expressed as the mean±SD (n=3). Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

경우 R100보다 더 높은 ACE 저해 활성을 나타내는 것을 확인하였다. Cho 등(34)의 연구 결과에 따르면 ACE 저해 활성은 발효시간에 따라 차이를 나타내며 발효 중에 단백질의 분해로 생성되는 peptide가 관련이 있다고 보고하였고, Yeum 등(35)은 ACE 저해 활성은 peptide 사슬 길이나 구조 및 그 아미노산 배열의 차이에 더 큰 영향을 받는다고 보고하였다.

식품으로부터 섭취한 다당류는 α-amylase에 의해 이당류로 분해되며 최종적으로 α-glucosidase가 이당류를 단당류로 분해함으로써 소장의 용털로 흡수된 후 혈관으로 이동되기 때문에 이당류 분해효소인 α-glucosidase의 활성을 억제할 경우 당질 가수분해와 흡수를 지연시켜 식후 급격한 혈당 농도의 증가를 조절할 수 있다(36). 발효물 동결건조분말의 α-glucosidase 저해 활성은 모든 실험군에서 발효 전보다 발효 후에 높은 저해 활성을 나타내었으며, R100보다 R80에서 발효 48시간 경과 후 더 높은 저해 활성을 나타내었다. Jang(37)의 연구 결과에서 아마란스는 고 콜레스테롤 식이를 급여한 쥐의 지질대사를 개선시키고 혈당을 낮추는데 도움이 된다는 보고와 같이 아마란스를 첨가한 R80에서 R100보다 높은 α-glucosidase 저해 활성을 나타내는 것으로 사료된다. 또한 Kim 등(38)의 결과에 따르면 생더덕과 발효더덕의 α-glucosidase 저해 활성 비교 시 생더덕의 저해 활성보다 발효더덕의 저해 활성이 높았다고 하였는데, 이는 발효를 통해 칼로리가 적고 소화흡수율이 높은 유리당의 증가와 유용성분의 변화 및 용출로 인해 α-glucosidase 저해 활성이 증가된 것이라 보고하였다. 따라서 본 연구 결과를 종합할 때 백미와 아마란스 혼합 발효물은 amylase 활성은 물론 다양한 생리활성을 보여주어 향후 곡류 효소 함유 제품 개발에 활용 가능하다고 사료된다.

요 약

본 연구에서는 김치에서 분리한 *Bacillus subtilis* KMKW4를 이용하여 백미 및 아마란스를 영양원으로 발효하였으며 발효물의 배양 특성과 항산화 활성 및 생리활성을 조사하였다. 백미와 아마란스의 비율별로 제조한 발효물 중 아마란스 20%가 첨가된 R80의 생균수가 가장 높았고 pH 또한 낮아 발효가 잘 진행되었음을 확인하였다. 발효물의 amylase 활성을 측정된 결과 R100, R90, R80, R70 중 R80에서 48시간 배양 시 57.77 unit/mL로 가장 높아 R80을 곡류 효소 함유 제품 개발을 위한 혼합조건으로 선정하였다. 발효물의 동결건조분말에 대한 amylase 활성도 발효물과 동일하게 48시간에서 가장 높게 나타나 동결건조 후에도 효소 활성이 유지되는 것을 확인하였다. 발효물 동결건조분말의 유리당 함량은 발효 후 R80에서 maltose는 검출되지 않았으며, glucose는 5,454.2 mg/100 g으로 함량이 증가하였고 R100보다 높음을 확인하였다. 유리아미노산 함량은 R100의 경우 발효 전 664.9 mg/100 g에서 48시간 발효 후 834.2 mg/

100 g으로 증가하였으며, R80은 발효 전 868.8 mg/100 g에서 발효 후 1,085.2 mg/100 g으로 증가하였다. 항산화 활성은 발효함에 따라 증가하였으며 R100보다 R80에서 우수하였다. ACE 저해 활성은 발효 전 R100과 R80에서 각각 30.12%와 40.22%로 나타났으며 발효 후에는 각각 59.13%와 78.57%로 나타나 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보였고 R80이 R100보다 더 높은 ACE 저해 활성을 나타내었다. α-Glucosidase 저해 활성은 모든 실험군에서 발효 전보다 발효 후에 높은 저해 활성을 나타내었으며, R100보다 R80이 우수하여 향후 곡류 효소 함유 식품 제조를 위한 소재로 활용 가능하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 지역혁신창의인력양성 사업으로 수행된 연구 결과임(No.2013H1B8A2032215).

REFERENCES

1. Kim SS, Kim SY, Lee WJ. 1998. Microwave vacuum drying of germinated brown rice as a potential raw material for enzyme food. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1107-1113.
2. Lee NY. 2013. Antioxidant effect and tyrosinase inhibition activity of seaweeds ethanol extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 42: 1893-1898.
3. Korea Food and Drug Administration. 2010. *Food Code*. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. p 239-240.
4. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 70: 1-12.
5. Jack RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59: 171-200.
6. Bae HC, Choi SH, Na SH, Nam MS. 2012. Characteristics of α-amylase and protease produced from *Bacillus amyloliquefacies* CNL-90 isolated from malt grain. *J Anim Sci Technol* 54: 133-139.
7. Cutting SM. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 28: 214-220.
8. Qin H, Yang H, Qiao Z, Gao S, Liu Z. 2012. Identification and characterization of a *Bacillus subtilis* strain HB-1 isolated from *Yandow*, a fermented soybean food in China. *Food Control* 31: 22-27.
9. Yang SJ, Kang EJ, Lee RH, Jung HK, Park CS, Hong JH. 2014. Characterization of amylase produced by *Bacillus subtilis* KMKW4 isolated from *Kimchi*. *J Chitin Chitosan* 19: 21-28.
10. Mukherjee AK, Borah M, Rai SK. 2009. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α-amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α-amylase in laundry detergent formulations. *Biochem Eng J* 43: 149-156.
11. Ha TY. 2002. Nutritional and functional properties of rice. Proceedings of the Korean Society of Postharvest Science and Technology of Agricultural Products Conference, Daegu, Korea. p 64-71.
12. Kim MS, Jeong JI, Jeong YH. 2003. Amino acid composi-

- tion of milled and brown rices. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1385-1389.
13. Grapo PA, Reaven G, Olefsky J. 1977. Postprandial plasma-glucose and plasma-insulin response to different complex carbohydrate. *Diabetes* 26: 1178-1183.
 14. Kum JS. 2010. Nutrition and food processing of rice. *Food Preservation and Processing Industry* 9(1): 38-54.
 15. Lee JH, Kim KJ, Lee J, Lee ST, Ryu SN. 1996. Functional ingredient and their some variance in amaranth and quinoa. *Korean J Crop Sci* 41: 145-165.
 16. Kim JS, Ryoo HJ. 2002. Application to the biscuits manufacture of processed amaranth seeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 15: 321-325.
 17. Choi HS. 2011. Effect of adding amaranth powder on noodle quality. *Korean J Food & Nutr* 4: 664-669.
 18. Miiler GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
 19. Lee EJ, Kim JS, Kwon JH. 2008. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for total catechin and electron donating ability of grape seed extracts. *Korean J Food Preserv* 15: 840-846.
 20. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 849-854.
 21. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
 22. Tibbot BK, Skadsen RW. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol* 30: 229-241.
 23. Kim KH, Yun YS, Chun SY, Yook HS. 2012. Antioxidant and antibacterial activities of grape pomace fermented by various microorganisms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1049-1056.
 24. Kim HS, Park IB, Lee YJ, Shin GW, Lim JY, Park JW, Jo YC. 2010. Characteristic of glasswort (*Salicornia herbacea* L.) mixture fermentation utilizing *Aspergillus oryzae*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1384-1390.
 25. Kim HY, Park KH. 1986. Characterization of bacterial α -amylase by determination of rice starch hydrolysis product. *J Korean Agric Chem Soc* 29: 248-254.
 26. Lee Y, Yi H, Hwang KT, Kim DH, Kim HJ, Jung CM, Choi YH. 2012. The qualities of makgeolli (Korean rice wine) made with different rice cultivars, milling degrees of rice, and nuruks. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1785-1791.
 27. Ryu MJ, Lee HI. 2007. Quality characteristics of cookies fortified with soymilk cake fermented by *Bacillus subtilis* GT-D. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1070-1076.
 28. Park IB, Park JW, Lee YJ, Shin GW, Kim HS, Jo YC. 2009. Quality characteristic of glasswort (*Salicornia herbacea* L.) fermented by *Bacillus subtilis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 902-908.
 29. Choi SJ, Ko HM, Choi WS, Lee NH, Choi UK. 2014. Changes in sensory characteristics of *Cheonggukjang* made with smoked soybeans. *Korean J Food & Nutr* 27: 280-286.
 30. Moon YG, Lee KJ, Kim KY, Song CB, Jeon YJ, Heo MS. 2006. Characteristics of citrus by-product ferment using probiotics as starter. *Korean J Microbiol Biotechnol* 34: 158-165.
 31. Hwang ES, Thi ND. 2014. Antioxidant contents and antioxidant activities of hot-water extracts of aronia (*Aronia melanocarpa*) with different drying methods. *Korean J Food Sci Technol* 46: 303-308.
 32. Noh H, Song KB. 2001. Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibition from *Oenanthe javanica*. *Agric Chem Biotechnol* 44: 98-99.
 33. Oh SJ, Kim SH, Kim SK, Beak YJ, Cho KH. 1997. Angiotensin I -converting enzyme inhibitory activity of the K-casein fragments hydrolysed by chymosin, pepsin, and trypsin. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1316-1318.
 34. Cho YJ, Cha WW, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK. 2000. Production and separation of anti-hypertensive peptide during chungkukjang fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 247-252.
 35. Yeum DM, Lee TG, Byun HS, Kim SB, Park TH. 1992. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *J Korean Fish Soc* 25: 229-235.
 36. Kim SY, Lee HJ, Park JH, Kim RY, Cheong HS, Park EJ. 2013. Effect of fermentation on the metabolic activities of pine needle juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 325-334.
 37. Jang YJ. 2000. Hypolipidemic effects of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) in rats fed high cholesterol diets. *MS Thesis*. Korea University, Seoul, Korea. p 30-31.
 38. Kim SS, Ha JH, Jeong MH, Ahn JH, Yoon WB, Park SJ, Seong DH, Lee HY. 2009. Comparison of biological activities of fermented *Codonopsis lanceolata* and fresh *Codonopsis lanceolata*. *Korean J Med Crop Sci* 17: 280-285.