

Changes in cultural characteristics and biological activities of amaranth during fermentation

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

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 38430, Korea

발효시간에 따른 아마란스 발효물의 배양특성 및 생리활성

이래현 · 양수진 · 홍주현*

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Abstract

Bacillus amyloliquefaciens CGD3 was used as a starter for fermentation of amaranth and cultural characteristics and biological activities of amaranth were investigated. The viable cells in fermented amaranth was 4.54~8.01 log CFU/mL during 96 hr of fermentation period. Protease activities of amaranth showed the highest by 36.7 unit/mL after 72 hr of fermentation. The total phenolic and flavonoid contents of amaranth increased with fermentation time while its total sugar content decreased. The total protein content was the highest in amaranth fermented for 96 hr (0.25 mg/g). The DPPH scavenging activities, FRAP (ferric reducing antioxidant power), and reducing power of amaranth were highest in amaranth fermented for 72 hr, showing 84.46%, 551.91 μ M, and 2.74, respectively. ACE (angiotensin converting enzyme) and α -Glucosidase inhibition rates increased with fermentation time and showed the highest after 72 hr.

Key words : *Bacillus amyloliquefaciens* CGD3, fermented amaranth, protease activity, ACE inhibitory activity, α -glucosidase inhibitory activity

서 론

최근 생활수준이 향상됨에 따라 현대인들의 식생활은 서구화 되어 동물성 식품 및 고칼로리 인스턴트식품의 섭취가 증가하고 있다. 이로 인해 건강에 대한 관심이 높아지고 있으며, 건강 증진을 위해 장내 균총을 새롭게 형성하거나 면역계 활성화 등을 목적으로 프로바이오틱스(probiotics)라는 미생물 유래 기능성식품이 소비되고 있다(1,2). 또한 비만, 당뇨병 및 고혈압 등의 만성질환 유병률이 증가함에 따라 소비자들은 영양공급이라는 식품고유의 기능 이외에 건강증진과 질병치료 등의 기능을 가진 식품에 대한 관심이 늘어나고 있다(3,4). 식품공전에서 효소식품은 식물성 원

료에 식용 미생물을 배양시켜 효소를 다량 함유하게 하거나 식품에서 효소함유 부분을 추출한 것 또는 이를 원료로 하여 섭취가 용이하도록 가공한 것으로 정의하고 있다. 식품 유형상 기타 식품류에 속하며 곡류 효소함유 제품, 배아 효소함유 제품, 과채류 효소함유 제품 및 기타 식물 효소 제품으로 분류된다(5).

발효는 미생물을 이용하여 유기물을 분해시키는 과정으로 유효성분 및 흡수율 증가 등의 효과를 나타내어 다양한 기능성 연구가 활발히 이루어지고 있다(6). 특히, 영양성분을 그대로 유지하면서 미생물이 분비하는 각종 가수분해효소와 세포 내 조직에 결합되어 있는 생리활성 물질들이 유리화되면서 생체 이용률을 향상 시켜주는 효과가 있다(7).

아마란스(*Amaranthus* ssp L.)는 비름과에 속하는 일년생 식물로 곡물과 비슷하여 아곡류(pseudocereal)로 불려지고 있으며 영양성분을 보면 조단백질은 17~18%, 지방은 7~8% 정도로 옥수수나 밀보다 높으며 섬유소는 비슷하거나 높게 함유하고 있다. 특히 아마란스 단백질은 화곡류에 부족한

*Corresponding author. E-mail : jhhong@cu.ac.kr

Phone : 82-53-850-3218, Fax : 82-53-850-3218

Received 6 April 2016; Revised 3 May 2016; Accepted 11 May 2016.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

lysine 함량이 단백질 100 g당 5.2 g으로 옥수수(3.4 g), 밀(3.2 g)에 비해 높으며, 스쿠알렌, 토코트리엔올, 비 발효성 식이섬유, 인지질, 렉틴 및 기타 항산화 성분 등 다수의 유용한 기능성분을 함유하고 있다(8-10). 이와 같이 아마란스는 영양 생리학 측면에서 유용 성분을 함유하고 있어 지질대사에 효과가 있으며 또한 아마란스 전분 입자의 크기는 전분 중 가장 작아 다양한 용도로 이용이 가능하여 제과-제빵용 혼합분, 국수, 비스킷 등에 혼합하여 사용되고 있다(11-13).

따라서 본 연구에서는 곡류 효소함유 제품 개발을 위한 소재 탐색의 일환으로 아마란스를 영양원으로 하여 protease를 생산하는 *Bacillus amyloliquefaciens* CGD3로 발효하였으며 발효시간에 따른 배양특성과 기능적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 아마란스는 원산지가 강원도 평창군인 제품을 농협 하나로마트에서 구입하여 이물질을 제거하고 분쇄기(J-NCM, Jisico, Seoul, Korea)로 분쇄하여 40 mesh 표준망체를 통과시켜 사용하였다. 아마란스 발효를 위해 사용된 미생물은 청국장으로부터 분리동정하여 보관중인 *Bacillus amyloliquefaciens* CGD3(KACC92048P) 균주를 이용하였다.

Starter 배양액 제조

아마란스 발효물 제조를 위한 starter 배양액은 nutrient broth를 121°C에서 15분간 멸균한 액체 배지에 nutrient agar(Difco, Detroit, MI, USA)로 37°C에서 24시간 동안 배양한 *B. amyloliquefaciens* CGD3를 1회 접종한 뒤, 진탕배양기에서 37°C, 24시간 동안 배양하여 starter로 사용하였다.

발효물 제조

발효시간에 따른 아마란스 발효물 제조를 위해 각각의 아마란스 분말 20 g을 삼각플라스크에 넣고 살균 후 40 mL의 멸균수를 가한 다음 미리 배양된 *B. amyloliquefaciens* CGD3 starter액을 2% 접종 후 37°C 진탕배양기에서 96시간 까지 발효하였으며, 발효물의 배양적 특성은 배양 시간별로 측정하였다. 배양이 완료된 발효물은 동결건조 하였으며, 동결건조 분말은 -72°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

생균수 측정

아마란스 발효물의 생균수 측정은 배양액 1 mL에 0.85% sodium chloride(Duksan pure chemicals, Ansan, Korea)용액

9 mL를 혼합하여 10배 희석법으로 희석한 다음, 각각의 희석액 100 µL를 nutrient agar(Difco)에 접종하였다. 배양기에서 37°C, 24시간 배양한 다음 형성된 colony 수를 계측하고 colony에 희석배수를 곱하여 시료 mL당 colony forming unit(CFU)로 나타내었다.

Protease활성 측정

Protease 활성은 Kunitz법(14)을 변형하여 측정하였으며, 아마란스 발효물을 원심분리 후 여과한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 시료 0.5 mL와 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)을 이용한 0.6% casein 용액(w/v, Duksan pure chemicals) 0.5 mL를 가하고 진탕 항온수조(BS-31, Jeio tech, Seoul, Korea)를 이용하여 37°C, 100 rpm 에서 30분간 반응시킨 후 0.44 M trichloroacetic acid(Acros organics, Geel, Belgium) 1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응을 중지시키고 반응액을 원심분리기(1236MG, GYROZEN Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액 1 mL를 취하여 0.55 M sodium carbonate anhydrous(Duksan pure chemicals) 2.5 mL와 1/3 희석한 Folin Ciocalteu 용액(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.5 mL를 가하여 37°C에서 30분간 발색반응을 시킨 다음 분광광도계(Ultraspec-2100pro, Amersham Co., Uppsala, Sweden)로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease 활성은 tyrosine(Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였으며, 활성단위(unit)는 1분당 1 µg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀함량 및 총 플라보노이드 함량은 아마란스 발효물 동결건조분말 0.2 g에 증류수 10 mL를 가하여 원심분리 후 여과한 상등액을 시료로 이용하였다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis(15) 방법에 따라 시료 1 mL에 1 N Folin-Ciocalteu reagent를 혼합하고 20% Na₂CO₃ 0.5 mL를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co., Uppsala, Sweden)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 총 폴리페놀 함량은 tannic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선에 의하여 함량을 계산하였다.

총 플라보노이드함량은 Jimenez 등(16)의 방법을 응용하여 시료 100 µL에 1 mL diethyl glycol을 혼합하여 실온에서 5분간 반응 시킨 후 0.1 N NaOH 200 µL와 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시키고 420 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 정량하여 작성한 표준곡선에 의하여 계산하였다.

총 단백질 및 총 당 함량

총 단백질 함량 및 총 당 함량은 아마란스 발효물 동결건조 분말에 증류수를 가하여 원심분리 후 여과한 상등액을 시료로 이용하였다. 총 단백질 함량은 Lowry 등(17)의 방법으로 측정하였으며 BSA(bovine serum albumin, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 당 함량 분석은 Saha와 Brewer(18)의 방법에 따라 phenol-sulfuric acid법으로 실시하였다. 즉 5% phenol (w/v) 1 mL와 sulfuric acid 5 mL를 시료 1 mL와 반응시킨 후 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co., Uppsala, Sweden)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하고 glucose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

유리아미노산분석

유리아미노산은 시료 0.2 g에 80% ethanol 20 mL를 가하여 24시간 교반한 뒤 원심분리(4,000×g, 15분)하여 상등액과 침전물을 분리하였다. 분리된 상등액을 45°C에서 감압 농축하였으며 농축한 시료는 0.02 N HCl 3 mL로 정용한 후 0.4 µm membrane filter로 여과하여 아미노산 자동분석기(L-8900, Hitachi Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다.

전자공여능

전자공여능은 Biois(19)의 방법에 따라 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 환원력을 이용하여 측정하였다. 즉, DPPH 용액은 DPPH 12 mg을 absolute ethanol 100 mL에 용해한 후 dH₂O 100 mL 첨가하여 제조하였다. 아마란스 발효물 동결건조 분말을 증류수로 10배 희석하여 원심분리한 상등액 시료 0.5 mL에 DPPH reagent 5 mL를 혼합하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 분광광도계로 흡광도를 측정하고 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{EDA} (\%) = \left(1 - \frac{S - SB}{C}\right) \times 100$$

S : absorbance of sample at 517 nm

SB : absorbance of sample blank at 517 nm

C : absorbance of control at 517 nm

FRAP 측정

FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정은 Benzie와 Strain(20)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buffer(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 2.5 mL와 20 mM ferric chloride(FeCl₃) 2.5 mL를 첨가하여 제조하였다. 원심분리 한 시료 상등액 30 µL에 제조된

FRAP reagent 900 µL와 증류수 90 µL를 넣은 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP는 FeSO₄·7H₂O(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

환원력 측정

환원력은 Oyaizu(21)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 원심분리 한 시료 상등액 1 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL와 1% potassium ferricyanide 용액 2.5 mL를 가한 후 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 10% trichloroacetic acid 용액 2.5 mL를 가한 후 원심분리한 뒤, 상등액 2.5 mL에 증류수 2.5 mL와 0.1% FeCl₃용액 0.5 mL를 가한 후 분광광도계를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

α-Glucosidase 저해활성

α-Glucosidase 저해활성은 Watanabe 등(22)의 방법에 따라 측정하였다. 원심분리 한 시료상등액 60 µL에 0.2 unit/mL α-glucosidase 효소액 50 µL, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 50 µL를 혼합하여 37°C에서 20분 동안 전배양 한 후 3 mM p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (pNPG) 50 µL를 첨가한 다음 37°C에서 20분간 반응시키고 0.1 M sodium carbonate 500 µL로 반응을 정지시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하고 시료용액과 동량의 완충용액을 넣은 대조군을 기준으로 효소 저해활성을 아래의 식으로 계산하였다.

$$\alpha\text{-Glucosidase inhibition rate}(\%) = \left(1 - \frac{S - SB}{C}\right) \times 100$$

S : absorbance of sample at 405 nm

SB : absorbance of sample blank at 405 nm

C : absorbance of control at 405 nm

ACE 저해활성

ACE(angiotensin converting enzyme) 저해활성은 Cushman와 Cheung(23)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 조효소액은 rabbit lung acetone powder(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 0.3 M NaCl을 함유한 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)에 1 g/10 mL (w/v)의 농도로 4°C에서 24시간 추출한 다음, 4°C, 10,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상등액을 ACE 조효소액으로 사용하였다. 기질은 0.3 M NaCl을 함유한 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)에 12.5 mM HHL(hippuril-L-histidine-L-leucine, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 녹여 기질로 사용하였다. ACE 저해활성은 원심분리한 시료 상등액 10 µL와 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 45 µL에 기질을 100 µL 첨가한 후,

37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 1 N HCl 250 μL를 사용하여 반응을 정지시키고 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 30초간 교반하여 3,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상등액 1 mL를 취하였다. 이 상등액을 120℃에서 완전히 건조시킨 후 증류수 1 mL를 넣어 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 ACE 저해활성은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 비교하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{ACE inhibitory activity}(\%) = \left(1 - \frac{S - SB}{C}\right) \times 100$$

S : absorbance of sample at 228 nm

SB : absorbance of sample blank at 228 nm

C : absorbance of control at 228 nm

통계처리

실험 결과는 3회 반복 측정 후 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS 19.0을 이용하여 각 시료간의 유의성을 검증한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

생균수 및 protease 활성

청국장으로부터 분리된 *B. amyloliquefaciens* 중 우수한 protease 활성을 가지는 *B. amyloliquefaciens* CGD3를 이용하여 아마란스 분말을 발효한 다음 미생물 생장에 미치는 영향을 검토하기 위하여 96시간 발효 후 배양시간별 생균수 및 protease 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 아마란스 발효물의 생균수는 초기 0시간에서 4.54 log CFU/mL였으며, 발효 12시간 이후에는 7.01 log CFU/mL 수준으로

0시간에 비해 2 log 이상 증가하였고 그 이후 발효시간에 따라 증가하여 72시간에서 8.01 log CFU/mL로 가장 높게 나타났다. Yang 등(24)의 연구에서 *B. subtilis* CBD2를 이용한 곡류 발효물의 배양특성에서 미생물들이 곡류를 자기 증식에 효과적으로 이용함에 따라 96시간 발효하였을 때 6.89 log CFU/mL로 생균수가 증가하였다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. 또한, 0~6시간 아마란스 발효물의 protease 활성은 측정되지 않았으며, 12~96시간 발효 시 10.12~36.70 unit/mL 증가하여 72시간 배양하였을 때 최대로 높은 protease 활성을 나타내었고 이후부터는 감소하는 경향을 보였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

아마란스 발효물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 Table 1과 같다. 총 폴리페놀 함량은 0시간에서 412.14 mg/100 g으로 나타났으며, 12시간 이상 발효하였을 때 558.90 mg/100 g으로 0시간에서 보다 총 폴리페놀 함량이 35.61% 증가하였다. 발효시간이 증가할수록 총 폴리페놀 함량은 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈으며, 96시간 발효하였을 때 582.07 mg/100 g 함량을 나타내었다. 아마란스 발효물의 총 플라보노이드 함량은 아마란스 0시간에서 180.56 mg/100 g이었으며 발효 6시간까지는 유지되다가 12시간 발효하였을 때 254.95 mg/100 g으로 발효 초기에 비해 40.38% 증가하였다. 발효시간이 증가할수록 유의적으로 증가하는 총 폴리페놀 함량 변화와 유사한 경향이었으며, 총 폴리페놀 및 플라보노이드는 72시간 발효 하였을 때 각각 627.99 mg/100 g 및 442.32 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 이는 발효과정 중에 미생물 또는 가열반응에 의해 phenol ethyl 유도체 및 vinyl 유도체가 생성되어 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 증가한다는 연구(25)와 유사한 경향을 나타내었다.

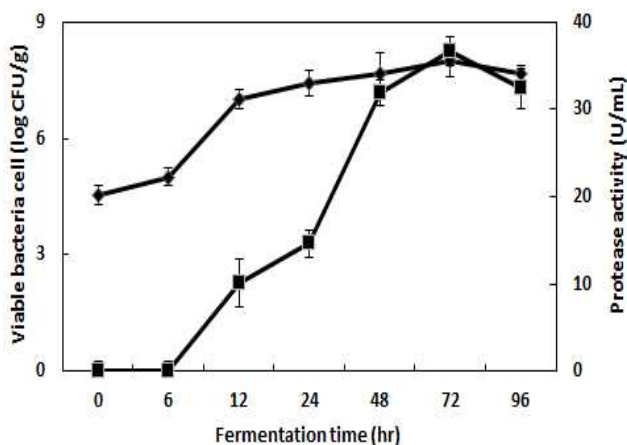


Fig. 1. Growth curve and protease activity of fermented amaranth according to fermentation time.

◆, Viable bacteria cell; ■, Protease activity. The data are expressed the means±SD (n=3).

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of fermented amaranth according to fermentation time

Fermentation time (hr)	Total polyphenol content (mg/100 g)	Total flavonoid content (mg/100 g)
0	412.14±1.89 ^{f1)}	180.56±8.43 ^f
6	428.59±4.60 ^f	181.61±0.80 ^f
12	558.90±6.03 ^e	254.95±4.11 ^e
24	601.12±3.74 ^c	345.47±4.32 ^d
48	613.52±4.91 ^{ab}	411.79±8.17 ^c
72	627.99±3.72 ^a	442.32±7.37 ^f
96	582.07±7.24 ^d	435.12±4.75 ^a

¹⁾All values are mean±SD (n=3). Means with different superscripts (a-f) within the same column are significantly different (p<0.05).

총 단백질 및 총 당 함량

아마란스 발효물의 총 단백질 및 총당 함량은 Table 2와 같다. 0시간 구간에서 0.09 g/100 g의 단백질 함량을 나타내었고 아마란스 발효 시간이 증가할수록 단백질 함량이 높아지는 경향을 보였으며 96시간 아마란스 발효 시 0.25 g/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 이는 Ahn 등(26)이 비 발효 동충하초 분말보다 발효 동충하초 분말에서 단백질 농도가 약 2배 높게 나타났으며, *Bacillus*, *Aspergillus*와 같은 미생물 유래 단백질 분해효소 분비에 의해 단백질 함량이 증가하였다고 보고되어 본 연구에서도 protease 생산 균주인 *B. amyloliquefaciens* CGD3를 이용하여 발효함으로써 단백질 함량이 증가한 것이라 사료된다.

총 당 함량은 0시간에서 2,816.67 mg/100 g이었고 아마란스 분말을 24시간 발효하였을 때 2,102.73 mg/100 g으로 0시간에서 보다 33.95% 감소하였고, 48시간 발효 시 당 함량이 1,643.31 mg/100 g까지 감소하였으며 48시간 발효 시간 이후에는 급격한 감소는 관찰되지 않았다. 이는 발효 중 환원당이 미생물의 작용으로 lactic acid, acetic acid 및 그 외 여러 물질들로 변하거나 미생물이 당을 분해해서 에너지원으로 이용함으로써 환원당 함량이 감소한다는 보고(27,28)와 유사한 경향을 보였으며, 본 연구에서 아마란스를 시간별 발효과정을 거치면서 저분자의 단당류나 이당류를 에너지원으로 이용한 것으로 사료된다.

Table 2. Total sugar and total protein contents of fermented amaranth according to fermentation time

Fermentation time (hr)	Total protein content (g/100 g)	Total sugar content (mg/100 g)
0	0.09 ^{e1)}	2,816±61 ^a
6	0.10 ^f	2,859±30 ^a
12	0.14 ^c	2,918±63 ^a
24	0.18 ^d	2,102±44 ^b
48	0.21 ^c	1,643±22 ^c
72	0.23 ^b	1,554±21 ^d
96	0.25 ^a	1,493±41 ^d

¹⁾All values are mean±SD (n=3). Means with different superscripts (a-g) within the same column are significantly different (p<0.05).

유리아미노산 함량

아마란스는 균형잡힌 아미노산을 구성하고 있어 bioactive properties가 높아 다양하게 이용될 수 있는 새로운 곡물로 인식되고 있다(29). 아마란스를 발효함으로써 변화하는 유리아미노산을 확인하고자 발효시간에 따른 아마란스 발효물의 유리아미노산을 분석 하여 Table 3에 나타내었다. 실험구 0시간에서의 유리아미노산 함량은 119.49 mg/100 g이었으며 그 중 필수아미노산 함량은 62.49 mg/100 g으로 총 유리아미노산의 52.30%를 차지하였다. 발효시간이 증

가함에 따라 유리아미노산 함량은 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 96시간 아마란스 발효물에서 유리아미노산 함량은 886.94 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며 필수아미노산 함량은 517.54 mg/100 g으로 유리아미노산 함량의 58.35%를 차지하였다. 발효 후 유리아미노산 중 leucine이 126.67 mg/100 g으로 가장 높게 나타내었고, valine 102.37 mg/100 g, phenylalanine 94.27 mg/100 g, isoleucine 70.02 mg/100 g 등의 함량 순이었다. Kim 등(30)은 벚짚을 이용하여 제조한 청국장 발효제품의 유리아미노산 함량이 원료콩의 것보다 많았다고 보고하여 본 실험과 유사한 경향을 나타내었으며, 아마란스 또한 발효를 통해 유리아미노산 함량이 증가한 것으로 사료된다. 식품으로 섭취된 단백질 등의 아미노산은 흡수된 후 생체 단백질을 합성하는 재료가 되는데 생체 단백질은 20여종이 일정한 순서에 따라 결합 및 합성되므로 그 중 1종류의 아미노산이라도 부족하면 생체 단백질은 합성될 수 없다. 특히

Table 3. Free amino acid contents of fermented amaranth according to fermentation time

Free amino acid	Fermentation time (hr)						
	0	6	12	24	48	72	96
Taurine	4.13	4.86	4.47	4.19	4.56	4.48	4.83
Urea	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	56.23	52.20
Threonine	6.17	8.21	8.25	11.77	14.20	23.75	26.10
Glutamic acid	5.97	4.89	14.62	25.25	25.68	29.47	33.21
Glycine	3.20	4.98	5.37	7.56	7.61	9.23	11.20
Alanine	9.15	17.35	17.32	18.04	21.99	59.14	47.68
Citrulline	0.40	0.43	1.07	2.72	3.75	3.67	9.20
Valine	14.75	15.03	16.47	36.62	42.05	45.99	102.37
Methionine	4.19	4.28	8.30	23.07	28.05	38.72	63.57
Isoleucine	12.30	12.79	12.69	24.07	29.43	56.63	70.02
Leucine	9.41	9.56	12.88	35.85	66.84	93.85	126.67
Tyrosine	9.07	9.30	10.23	22.72	28.52	40.83	69.76
Phenylalanine	8.99	9.04	11.32	31.75	36.95	60.94	94.27
β-Alanine	6.37	6.75	1.45	1.24	1.01	1.52	5.91
γ-Amino-n-butyric acid	14.52	14.65	14.81	14.09	13.04	14.44	14.60
Ethanolamine	3.49	3.71	4.00	2.85	2.77	2.13	2.04
δ-Hydroxylysine	0.19	0.30	0.34	0.43	0.44	0.45	0.48
Ornithine	0.51	0.47	3.30	13.39	11.98	16.97	22.29
Lysine	4.23	4.13	5.08	12.43	13.83	12.72	21.21
Histidine	2.45	1.96	2.58	5.76	6.95	6.18	13.33
Arginine	12.30	12.31	12.19	21.65	23.84	26.35	26.59
Total amino acid	117.04	136.73	163.97	312.04	400.7	643.16	873.61
Total EAA ¹⁾	62.49	65.00	77.57	181.32	238.3	338.78	517.54

¹⁾EAA, Essential amino acid (Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+Lys+His).

isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, methionine, threonine, tryptophan, valine 등의 아미노산은 인간의 체내에서 합성되지 않거나 합성되어도 수요량을 충족시키지 못하는 필수 아미노산으로 음식을 통해서 필요량을 공급해 주어야만 하는 아미노산이다. 본 연구에서는 발효를 통해 필수 아미노산의 함량이 상당히 증가하여 아마란스 발효물을 식품소재로 이용할 경우 영양학적 가치가 높을 것으로 판단된다.

항산화 활성

아마란스 발효물의 전자공여능, FRAP 및 환원력은 Table 4에 나타내었다. 전자공여능을 분석한 결과 발효시간이 증가함에 따라 전자공여능이 증가하였으며 아마란스 72시간 발효물이 84.46%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 발효 전에 비해 29% 정도 증가하였고 양성대조군인 ascorbic acid와 유사한 전자공여능을 나타내었다. FRAP를 분석한 결과 실험구 0시간에서 325.10 μM 으로 가장 낮은 활성을 나타내었고 72시간 발효물에서 551.91 μM 로 가장 높은 FRAP 함량을 나타내었다. 환원력을 분석한 결과 아마란스의 발효가 진행되지 않은 0시간에서 2.07로 가장 낮은 환원력을 나타내었고 72시간 발효물이 2.74로 가장 높은 환원력을 나타내었다. Kim 등(31)은 발효 미생물에 따른 포도가공 부산물의 항산화 활성을 나타낸 결과에서도 발효한 포도박이 발효하지 않은 포도박의 대조군에 비해 높은 활성을 나타내었다고 보고하였는데, 이는 폴리페놀 화합물 함량과 관련이 있다고 보고하였다. Kang와 Kim(32)은 phenolic acid의 일종인 caffeic acid, p-coumaric acid 등과 flavonoid 일종인 catechin, quercetin, catechol 및 chlorogenic acid를 포함한 기타 페놀성 물질이 전자공여능에 관여하는 것으로 보고하여 본 연구에서 발효시간에 따른 항산화 활성의 증가는 발효시간에 따라 phenolic acid와 flavonoid 함량의 증가로 인한 것으로 사료된다.

α -Glucosidase 및 ACE 저해활성

식품으로부터 섭취한 다당류는 α -amylase에 의해 이당류

Table 4. DPPH radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power and reducing powder of fermented amaranth according to fermentation time

Fermentation time (hr)	DPPH (%)	FRAP (μM)	Reducing power
0	54.32 \pm 1.56 ^{d1)}	325.10 \pm 6.36 ^d	2.07 \pm 0.01 ^c
6	55.70 \pm 1.71 ^d	328.06 \pm 6.30 ^d	2.34 \pm 0.09 ^b
12	53.72 \pm 1.72 ^d	434.58 \pm 8.51 ^c	2.42 \pm 0.04 ^b
24	65.13 \pm 0.90 ^c	508.90 \pm 5.75 ^b	2.64 \pm 0.03 ^a
48	71.63 \pm 1.02 ^b	515.51 \pm 4.94 ^{ab}	2.70 \pm 0.06 ^a
72	84.46 \pm 0.43 ^a	551.91 \pm 8.16 ^a	2.74 \pm 0.08 ^a
96	73.12 \pm 0.36 ^b	510.93 \pm 6.49 ^{ab}	2.69 \pm 0.04 ^a

¹⁾All values are mean \pm SD (n=3). Means with different superscripts (a-d) within the same column are significantly different (p<0.05).

로 분해되고, 최종적으로 α -glucosidase가 이당류를 단당류로 분해함으로써 소장의 용털로 흡수된 후 혈관으로 이동되므로, 이당류 분해 효소인 α -glucosidase의 저해활성은 당질 가수분해와 흡수를 지연시켜 식후 혈당농도가 급격하게 증가되는 것을 억제한다고 보고되고 있다(33). 본 연구에서는 아마란스 발효시간에 따른 발효물의 α -glucosidase 저해활성을 Fig. 2에 나타내었다. 아마란스를 0~72시간 발효하였을 때 α -glucosidase 저해활성이 유의적으로 증가하다가 72시간 발효 시 81.41%로 가장 높은 저해활성을 나타내었으며, 발효 96시간부터 감소하는 경향을 보였다.

ACE(angiotensin covering enzyme)는 renin에 의하여 생성된 angiotensin I 으로부터 C- 말단 dipeptide(His- Leu)를 가수분해 시킴으로써 강력한 혈관수축작용을 나타내는 angiotensin II를 생성한다. Angiotensin II는 결과적으로 혈압을 상승시키므로, ACE 활성 저해를 통하여 혈관벽의 파괴나 뇌졸중 등의 질환 발생을 억제 할 수 있다. 본 연구에

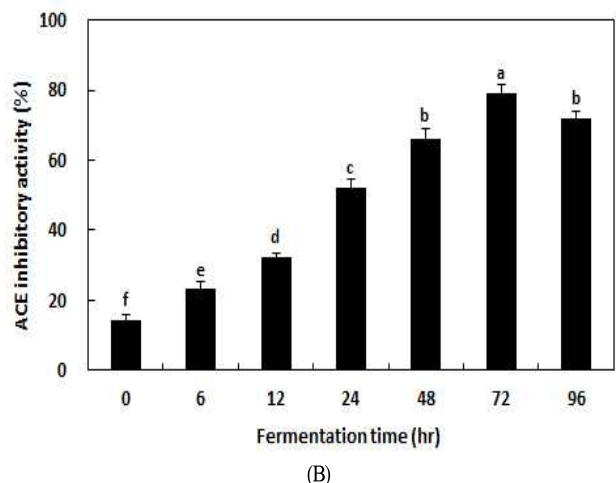
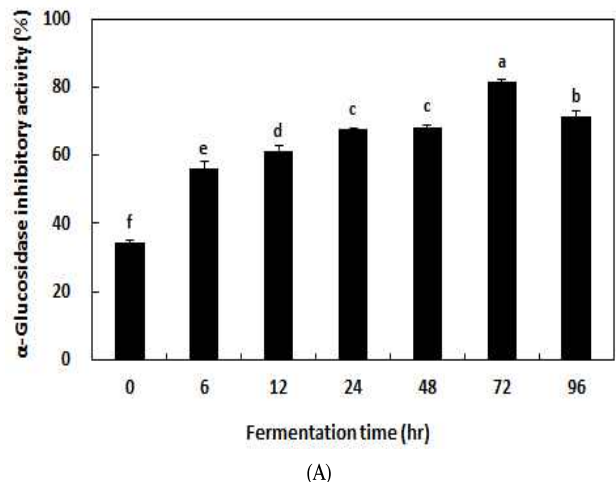


Fig. 2. α -Glucosidase (A) and ACE (Angiotensin converting enzyme) inhibitory activities (B) of fermented amaranth according to fermentation time.

Means \pm SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

서는 protease 생산 균주인 *B. amyloliquefaciens* CGD3를 아마란스에 접종하여 발효시간에 따른 발효물의 ACE 저해활성을 측정된 결과 발효시간이 증가할수록 ACE저해활성이 증가하는 경향을 보였으며 72시간 발효하였을 때 발효하기 전보다 5배 이상 증가하여 79.09%의 높은 저해활성을 보였다(Fig. 2). Jung 등(34)의 연구 결과, 발효시간이 길어짐에 따라 높은 ACE 저해활성이 나타났는데 본 연구와 일치하는 경향을 나타내었다. 일반적으로 대두 등 일부 식품 성분 중의 단백질이 protease에 의해 가수 분해되어 유용 펩타이드를 생성시킴에 따라 ACE 저해활성을 나타낸다고 보고(35)되어 본 연구에서도 단백질이 가수분해되면서 발효시간에 따라 ACE 저해활성이 증가한 것으로 사료된다.

요 약

청국장으로부터 분리된 *B. amyloliquefaciens* CGD3를 이용하여 아마란스를 발효하였으며 발효시간에 따른 발효물의 이화학적 특성 및 생리활성을 조사하였다. 아마란스 발효 0시간에서의 생균수는 4.54 log CFU/mL로 나타났으며 72시간 발효물에서 8.01 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 나타내었고, protease 활성은 72시간 배양하였을 때 36.70 unit/mL로 가장 높았다. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 발효시간이 증가함에 따라 증가하여 72시간 발효 시 각각 601.12 mg/100 g 및 442.32 mg/100 g으로 가장 높았으며 72시간 이후부터 감소하는 경향을 보였다. 총 단백질 함량은 발효시간이 증가할수록 증가하여 96시간 발효 시 0시간 보다 2.7배 단백질 함량이 증가하였으며, 총 당 함량은 발효 12시간 이후부터 급격히 감소하는 경향을 보였다. 유리아미노산 함량은 발효시간이 증가할수록 증가하였는데 0시간에서 119.49 mg/100 g이었고 96시간 발효시 886.94 mg/100 g으로 증가하였다. 전자공여능, FRAP 및 환원력은 72시간 발효구간에서 각각 84.46%, 551.91 μ M 및 2.74로 가장 항산화활성이 우수하였다. α -glucosidase 저해활성 및 ACE 저해활성은 발효 72시간 구간에서 각각 81.41% 및 79.09%의 저해활성을 나타내어 발효최적 시간임을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 지역혁신창의인력 양성사업으로 수행된 연구결과임(No.2013H1B8A2032215).

References

1. FAO/WHO (2002) Joint FAO/WHO (Food and Agriculture

Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada

2. Homma N (1998) Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Biosci Microflora*, 7, 35-43

3. Lee NY (2013) Antioxidant effect and tyrosinase inhibition activity of seaweeds ethanol extracts. *J Korean Soc Food Nutr*, 42, 1893-1898

4. 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

5. KFDA (2010) Food Code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea, 239-240

6. Shin S, Park SS, Lee HM, Hur JM (2014) Effects of fermented chicory fiber on the improvement of intestinal function and constipation. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 43, 55-59

7. Seo JS, Kim YC, Hong JH (2014) Effect of meju shapes and strains on the chemical composition of soybean paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 15, 1-9

8. Lee JH, Kim KJ, Lee JI, Lee ST, Ryu SN (1996) Functional ingredient and their some variance in amaranth and quinoa. *Korean J Crop Sci*, 41, 145-165

9. He HP, Cai Y, Sun M, Corke H (2002) Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* grain. *J Agric Food Chem*, 50, 368-372

10. Lee JH, Moon HI, Lee JI, Kang CW, Lee ST (1996) Isolation and identification of squalene and antineoplastic activity of its residue extract in amaranth. *Korean J Crop Sci*, 41, 450-455

11. Choi CR, Choi HJ, Kim SR, Lee JH, Shin MS (2000) Comparison of characteristics of amaranth starches isolated from five cultivars grown in Korea. *Korean J Food Sci Technol*, 32, 252-257

12. Kim JS, Ryoo HJ (2002) Application to the biscuits manufacture of processed amaranth seeds. *Korean J Food Nutr*, 15, 321-325

13. Choi HS (2011) Effect of adding amaranth powder on noodle quality. *Korean J Food Nutr*, 4, 664-669

14. Kunitz M (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J Gen Physiol*, 30, 291-310

15. singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16, 144-158

16. Jimenez-Aguilar DM, Ortega-Regules AE, Lozada-Ramirez JD, Perez MCI, Vernon-Carter EJ, Welti-Chanes J (2011)

- Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *J food comp anal*, 24, 889-894
17. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr A, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275
 18. Saha AK, Brewer CF (1994) Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr Res*, 254, 157-167
 19. Biois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *nature*, 181, 1199-1200
 20. Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70-76
 21. Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction-antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap J Nutr*, 44, 307-315
 22. Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R (1997) Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci biotech biochem*, 61, 177-178
 23. Cushman DW, Cheung HS (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol*, 20, 1637-1648
 24. Yang SJ, Lee DH, Park HM, Jung HK, Park CS, Hong JH (2014) Amylase activity and characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 isolated from *Doenjang*. *Korean J Food Preserv*, 21, 286-293
 25. Uda Y, Osawa Y, Takayama M, Suzuki K, Maeda Y (1988) Free and soluble bound phenolic acids in some cruciferous vegetables. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 35, 360-366
 26. Ahn HY, Park KR, Kim YR, Cha JY, Cho YS (2013) Chemical Characteristics in Fermented Cordycepin-enriched *Cordyceps militaris*. *J Life Sci*, 23, 1032-1040
 27. Cho Y, Lee HS (1991) Effect of lactic acid bacteria and temperature on kimchi fermentation. *Korean J Food Cook Sci*, 7, 89-95
 28. Yi JH, Cho Y, Hwang IK (1998) Fermentative characteristics of Kimchi prepared by addition of different kinds of minor ingredients. *Korean J Food Cook Sci*, 14, 1-8
 29. Asao M, Wantanabe K (2010) Functional and bioactive properties of quinoa and amaranth. *Food Sci Technol Res*, 16, 163-168
 30. Kim KJ, Ryu MK, Kim SS (1982) *Chungkook-jang koji* fermentation with rice straw. *Korean J Food Sci Technol*, 14, 301-308
 31. 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
 32. Kang DH, Kim HS (2010) Characterization and anti-*Helicobacter pylori* activity of *Xanthium strumarium* L. extract on lactic acid fermentation. *KSBB*, 25, 244-250
 33. 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
 34. Jung HK, Jeong YS, Youn KS, Kim DI, Hong JH (2009) Quality characteristics of soybean paste (*Doenjang*) prepared with *Bacillus subtilis* DH3 expressing high protease levels and deep-sea water. *Korean J Food Preserv*, 16, 348-354
 35. Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK (2000) Production and separation of anti-hypertensive peptide during *chunggugjang* fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol*, 43, 247-252