

누룩에서 분리한 *Saccharomycopsis fibuligera* 미강발효물의 효소활성 및 항산화능에 대한 연구

박용원
경동대학교 임상병리학과 교수

A Study on Enzyme Activity and Antioxidant Activity of Fermented Rice Bran of *Saccharomycopsis fibuligera* Isolated from Nuruk

Yong-Won Park
Professor, Department of Biomedical Laboratory Sciences, Kyungdong University

요약 본 논문은 대체식품 및 화장품 원료로 사용되는 미강을 발효를 통해 기능성과 경쟁력을 증가시키는 것을 목표로 하였다. 5종류의 누룩에서 분리한 *Saccharomycopsis fibuligera* 50종의 균주 중 효소 활성이 우수한 6 균주와 표준균주를 이용한 발효미강물의 α -amylase, CMCase, β -glucosidase, protease 등의 효소 활성을 통해 비교한 결과, A8균이 KCTC 7806 균주에 비하여 13.7%, 21.1%, 50.3%, 10.0%의 우수한 효소 활성을 보였다. 발효의 결과지표로서 ABTS, DPPH 검사를 시행한 결과, A8으로 발효한 미강이 KCTC 7806 균주로 발효한 미강에 비하여 1.12배, 1.28배의 항산화능이 있음을 확인하였다. 본 논문으로, *S. fibuligera* 표준균주인 KCTC 7806 보다 우수한 *S. fibuligera* A8 균주를 확인할 수 있었다. 또한, 선행연구과제의 항염활성 및 항독성 결과와 더불어 우수한 효소 활성과 항산화능 결과를 통해 *S. fibuligera* A8 균주를 통한 미강 발효물이 대체식품 및 화장품 원료로서의 기능성과 가격 경쟁력을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

주제어 : *Saccharomycopsis fibuligera*, 고체상발효, 누룩, 발효, 항산화

Abstract This paper aimed to increase the functionality and competitiveness of rice bran, which is used as an alternative food and cosmetic raw material, through fermentation. As a result of comparing the enzyme activity of α -amylase, CMCase, β -glucosidase, protease, etc. of fermented rice bran using standard strains with 6 strains with excellent enzyme activity among 50 strains of *Saccharomycopsis fibuligera* isolated from 5 types of Nuruk, A8 strain showed excellent enzyme activity of 13.7%, 21.1%, 50.3%, and 10.0% compared to the KCTC 7806 strain. As a result of the ABTS and DPPH tests as a result of fermentation, it was confirmed that rice bran fermented with A8 had 1.12 times and 1.28 times more antioxidant activity than rice bran fermented with KCTC 7806 strain. In this paper, it was possible to confirm the *S. fibuligera* A8 strain superior to the standard *S. fibuligera* strain KCTC 7806.

Key Words : *Saccharomycopsis fibuligera*, Solid state fermentation, Nuruk, Fermentation, Antioxidant

*Corresponding Author : Yong-Won Park(stronghead@hanmail.net)

Received September 28, 2021

Revised October 27, 2021

Accepted November 20, 2021

Published November 28, 2021

1. 서론

발효는 미생물을 이용하여 원 재료의 cellulose, starch, maltose, lactose와 같은 disaccharide와 polysaccharide, protein, peptide와 같은 amino acid polymer, 다양한 생리활성물질의 glycoside 등 고분자화 된 물질을 분해하는 과정이며, 발효과정을 통해 영양소의 흡수율을 높일 수 있을 뿐만 아니라 식품 보존과 alcohol생산에 중요한 역할을 한다[1]. 발효식품은 미생물의 증식을 조절하여 식품성분을 효소작용으로 전환하여 생산한 식품 및 음료를 말하며[2], 전 세계에서 전통적으로 제조되는 발효식품은 이러한 과정을 통해 난소화성 식품을 소화 가능한 형태로 만들거나, 관능적인 특성을 향상시키기 위해 사용되었다[3].

발효과정에서 생성되는 organic acid, alcohol을 통해 식품의 보존성을 증가시키기 위해 발효법을 사용한다[1]. 그중 동아시아 지방에서는 곡식과 yeast, fungi, 유산균을 혼합하여 누룩(麴)을 제조하여 술을 빚는다. 주조 과정은 이 누룩에 포함되어 있는 yeast와 fungi, 유산균이 쌀의 전분을 분해하여 ethanol을 생성하는 과정이며[4], 이 과정에서 쌀이나 부재료에 포함되어 있는 세포 활성물질의 추출과 활성이 증가한다는 것이 많은 연구에 의해 알려졌다[5].

발효식품의 건강상 이익과 위장 건강에 대한 관심의 증가로 건강과 질병에 유익한 효과를 나타내는 몇 가지 기전이 있는데, 유산균과 같은 잠재적인 probiotic 미생물을 함유하고 있고[2], 발효로 인한 유산균과 같은 대사산물은 심혈관과 면역 및 대사 관련 건강상 이점을 발휘할 수 있으며[6], 특정 화합물을 생물학적 활성 대사산물로 전환시킬 수 있을 뿐만 아니라 독소와 항 영양소를 감소시킬 수 있다[7].

누룩에서 분리한 *Saccharomycopsis fibuligera*는 α -amylase 외에 glucoamylase, protease, β -glucosidase, ethanol을 생산하는 균주로 알려져 있다[8]. 또한, *S. fibuligera*가 생산하는 trehalose, amylases, acid protease, β -glucosidase는 발효 및 제약 산업에서 많은 응용 분야에 사용된다[9].

일반적으로 막걸리에는 와인이나 맥주에 비해 50~200배 많은 향종양물질인 farnesol 등에 의한 항암효과, 항염증 작용, 항산화와 면역조절물질이 있으며, 필수 아미노산인 phenylalanine, leucine, threonine 등과 함께 항산화 물질인 glutathione을 함유하고 있다[10].

항산화 작용이란 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이나 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)와 같은 free radical을 소거하는 작용이다. 과도한 양의 free radical이 동맥경화, 뇌와 심장 혈관계 장애, 노화와 발암을 발생시킨다는 점이 밝혀지며, 항산화물질의 효과 및 효능이 주목을 받고 있다[11].

주로 체내에서 생성되는 활성 산소종은 세포의 많은 대사과정 중에 생성되거나 Cytokine 작용과 같은 자극으로 인하여 생성되기도 한다. 이로 인하여 체내에서는 산화적 스트레스가 발생하면서 노화, 비만, 성인병과 같은 질병들의 원인이 된다. 그러므로 활성산소를 제거하는 항산화제는 인체의 성인병 예방, 노화 방지 등의 다양한 기능이 있다고 알려져 있다[17].

항산화 반응은 효소적 항산화와 비 효소적 항산화로 나누어진다. 효소적 항산화에서 중요하게 사용되는 항산화 물질인 glutathione은 cysteine, glutamic acid, glycine 등 세 가지의 아미노산 중합체로서, 환원된 상태에서는 단 분자 형태로 존재하며 GSH라 표기한다. 산화된 상태에서는 두 분자의 glutathione이 결합된 상태로 존재하며, GSSG라 표기한다. GSH와 glutathione peroxidase은 free radical과 반응하여 산화됨으로써 free radical을 제거하는 역할을 한다 [11]. 비 효소적 항산화에서는 ascorbic acid와 tocopherol이 대표적 항산화 물질이다.

본 연구에서는 누룩에서 분리, 동정한 6가지 *Saccharomycopsis fibuligera* 균을 한국생명공학 연구원의 생물자원센터(KCTC, Korean Collection for Type Cultures)에서 받은 표준균주(KCTC 7806)와 protease, α -amylase, β -glucosidase, CMCase 효소 활성 능력과 ABTS assay, DPPH assay의 항산화능을 수행하고 비교 분석하여 표준균주보다 우수한 성질을 갖는 균의 특성을 확인하고자 한다.

Saccharomycopsis fibuligera A8균주의 발효 미감을 이용한 선행 연구과제에서 항염활성 및 항독성도 확인하였으며, 우수한 효소 활성과 항산화능의 결과로 장내 유익균의 활성화와 항산화 보조제로서 산업화 가치를 보고하고자 한다.

2. 실험 방법

2.1 실험 전 준비

2.1.1 균주 분리

S. fibuligera 효모의 비교를 위해 한국생명공학 연구원의 생물자원센터의 표준균주인 *S. fibuligera* KCTC 7806을 분양받아 사용하였다. 한편 신규 균주의 사용을 위해 금정산성누룩, 김포햇짜윈누룩, 송학곡자누룩, 진주곡자누룩, 화왕산산성누룩에서 *S. fibuligera*를 분리하였다. 분리된 균주는 성장률을 기준으로 누룩 별 상위 10개 균주를 선정하여 금정산성누룩(A1-A10), 김포햇짜윈누룩(B1-B10), 송학곡자누룩(C1-C10), 진주곡자누룩(D1-D10), 화왕산산성누룩(E1-10)로 지정하였다. 누룩에서 *S. fibuligera*를 분리하는 데에는 YM agar (malt extract 3 g/L, yeast extract 3 g/L, dextrose 10 g/L, agar 15 g/L, peptone 5 g/L, distilled water 1 L)를 이용하였다.

2.1.2 생장 속도

다양한 누룩에서 분리된 *S. fibuligera*를 전배양을 통해 증균한 뒤 600 nm 흡광도를 이용하여 흡광도 0.7 기준 1% 농도로 YM broth (malt extract 3 g/L, distilled water 1 L, yeast extract 3 g/L, dextrose 10 g/L, peptone 5 g/L)에 접종하였다. 그 후 실험에 적합한 생장속도와 생장 특성을 보인 균주 A8, A9, C6, C7, C9, D10를 실험에 사용하였다.

2.1.3 조효소액

실험에 사용된 미강은 세종시의 정미소에서 2019년 10월에 채취된 미강을 사용하였다. 미강 발효용 균주를 분리하기 위해 미강을 기질로 하는 solid state fermentation을 실시하였다. 기질로 사용된 미강은 이물질 제거 및 균질화를 위해 600 μ m mesh를 이용하여 mesh를 통과하지 못한 미강을 이용하여 배양하였다. 미강은 1:2(w:v)로 distilled water에 혼합하고, 30g 을 직경 15 cm petri dish에 넣고 autoclave 하여 균을 사멸시켰다. 그 후 600 nm에서의 흡광도가 2.0이 되도록 증균한 배양액을 10 mL 넣어 접종한다. 그 후 배양기를 이용하여 25°C 조건에서 5일간 배양하였다.

배양이 끝난 미강은 5g을 회수하여 1:10(w:v)로 distilled water에 첨가한 뒤 mixing을 통해 효모의 효소를 회수하였다. 동시에 이를 조효소액으로 사용하였다.

2.2 효소 활성

2.2.1 α -amylase

S. fibuligera KCTC 7806과 누룩에서 분리된 *S. fibuligera* 효모가 생성하는 α -amylase의 활성 측정을 위해서 0.50% starch solution (w/v) 1 mL에 균의 상층액 1 mL를 넣고 혼합한 후 20°C에 3 분간 배양하였다. 배양 후 각 균 검체에 DNS reagent 1 mL를 넣고 뚜껑을 덮고 끓는 물에 15 분간 끓인 후에 실온에서 냉각하고 D.W를 9 mL씩 첨가하고 혼합한 후에 540nm에서 측정하였다. 측정 시 sample blank도 측정하여 각 검체의 OD값에서 빼고 희석배수를 보정한 후 결과를 산출하였다.

2.2.2 CMCase

S. fibuligera KCTC 7806과 누룩에서 분리된 *S. fibuligera* 효모가 생성하는 CMCase activity의 활성을 알아보았다. 실험에 사용된 carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) solution은 sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) 100 mL에 CMC 1g을 넣어 90 °C로 2시간 동안 가열하여 투명해질 때까지 녹였다. CMCase 측정을 위해 1% CMC solution 1 mL와 조효소액 1 mL를 혼합한 뒤 65 °C에서 30분간 반응시켜 CMC가 분해되도록 하였다. CMC 분해 정도를 측정하기 위해 분해산물인 glucose 농도를 측정하였다. Glucose 농도 측정에는 α -amylase의 활성 측정과 동일하게 DNS를 사용하였다.

해당 과정을 통해 생성된 glucose는 standard curve를 작성하여 환산하였다. 이때 CMCase 활성 1 unit은 glucose 1 μ M의 생성물로 변화시키기 위해 필요한 효소량으로 정의하였다.

2.2.3 β -glucosidase

S. fibuligera KCTC 7806과 누룩에서 분리된 *S. fibuligera* 효모가 생성하는 cellulase 중 하나인 β -glucosidase의 활성을 알아보았다. 5 mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG)용액 450 μ L에 조효소액 50 μ L를 가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 1 M Na₂CO₃용액 1 mL 첨가하여 반응을 정지시킨 뒤 원심분리 (4,000g, 5min, 4°C)하여 불용성 물질을 제거하였다. 그 후 상층액을 회수하여 400 nm 파장에서의 OD value를 측정하였다.

해당 과정을 통해 생산된 p-nitrophenol은 standard curve를 작성하여 환산하였다. 이때 β -glucosidase 활성 1 unit은 분당 p-nitrophenol 1 μ M의 생성물로 변화시키기 위해 필요한 효소량으로 정의하였다.

2.2.4 Protease

S. fibuligera KCTC 7806과 누룩에서 분리된 *S. fibuligera* 효모가 생성하는 protease의 활성을 알아 보았다. Casein solution은 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) 100 mL에 casein 1g을 첨가한 casein이 녹을 때까지 교반 한 뒤 pH 7로 중화한 뒤 증류수를 첨가하여 100 mL로 맞추었다. 조효소액 1 mL와 casein solution 9 mL를 혼합한 후 27°C에서 30 분간 incubation을 실시하였다. Incubation 후 1 M Trichloroacetic acid 1 mL 주입하여 protease를 denaturation 시키는 동시에 분해되지 않은 casein을 응고시켰다. 응고된 casein은 2000 rpm에서 2 min 분간 원심 분리하여 제거하였다. 이때 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액 900 μ L와 Folin 시약 100 μ L를 넣고 혼합을 한 후 5 분 동안 발색 반응을 진행시켰다 발색 반응이 끝나면 760 nm 파장에서의 OD value를 측정하였다.

해당 과정을 통해 생산된 tyrosine 및 tryptophan은 tyrosine에 대한 standard curve를 작성하여 환산하였다. 이때 protease 활성 1 unit은 tyrosine 1 μ M의 생성물로 변화시키기 위해 필요한 효소량으로 정의하였다.

2.3 향산화능

2.3.1 ABTS assay

0.01 M PBS (phosphate buffer solution, pH 7.4) 50 mL에 7 mM 2-2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)를 7 mM 농도가 되도록 용해시킨 뒤, 140 mM $K_2S_2O_8$ 0.88 mL를 가하여 산화반응을 일으킨다. 그 후 27°C, 빛을 차단한 환경에서 16시간 동안 방치하여 발색 반응을 진행하였다. 발색이 진행된 ABTS solution은 734 nm에서 OD value를 측정하여 0.01 M PBS로 희석을 통해 OD value를 0.8로 보정하여 ABTS solution을 제조하였다. 미강 발효 추출물은 동결건조를 통해 용매를 제거하였으며, 0.5 mg/mL의 농도로

미강 발효 추출물을 희석하여 사용하였다. ABTS solution 2.0 mL에 추출물 0.2 mL를 가한 후 30분간 반응시킨 뒤, 734nm에서 OD value를 측정하여 라디칼 소거능을 계산하였다.

2.3.2 DPPH assay

70% ethanol에 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 70 μ M가 되도록 용해시킨 뒤, 517nm에서 OD value를 측정하여 OD value가 0.8이 되도록 70% ethanol 또는 DPPH를 추가하고 보정하여 DPPH solution을 제조하였다. 미강 발효 추출물은 동결건조를 통해 용매를 제거하였으며, 0.5 mg/mL의 농도로 미강 발효 추출물을 희석하여 사용하였다. DPPH solution 2.0 mL에 추출물 0.2 mL를 가한 후 30분간 반응시킨 뒤, 517nm에서 OD value를 측정하여 라디칼 소거능을 계산하였다.

3. 실험 결과

3.1 효소 활성 측정 결과

3.1.1 α -amylase

전분은 식물의 광합성 작용에 의해 생성되어 저장되는 탄수화물로 amylase에 의해 분해되어 동물의 에너지원으로 사용된다. α -amylase (E.C.3.2.1.1)는 3개 이상 가진 포도당 중합체(녹말, 아밀로스, 아밀로펙틴, 글리코젠, 텍스트린)의 α -1,4 glycosidic bond를 분해하여 가수 분해하여 포도당, 맥아당, 및 텍스트린을 생성한다.

전분을 이용한 α -amylase activity를 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 효소 활성이 높은 순으로 정렬하였을 때 A8>C7>D10>A9>KCTC>C9>C6 순으로 높은 α -amylase activity가 각각 나타났으며, KCTC 7806 균주를 기준으로 각 균의 α -amylase activity를 비교하면 13.7>10.3>5.0>4.9>0~3.5>-7.6%의 α -amylase activity 차이를 보였다. 모든 균주에서 통계적으로 유의미한 차이는 나타내지 못하였으나 A8의 경우 가장 높은 차이를 나타내었다.

3.1.2 CMCase

Cellulose는 식물 세포벽의 주 성분으로 endoglucanases나 cellulase (Endo- β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4) 의해 분해되어 cellobiose와 짧은 올리고당으로 전환된다. 그

다음으로 cellobiose는 더 작은 cellobiose로 분해되거나 β -glucosidase에 의해 두 개의 포도당 분자로 가수 분해된다 [12]. CMC(carboxymethyl cellulose)는 실험에서 사용되는 cellulose의 일종으로 사용되며, 이를 분해하는 활성을 가진 효소를 CMCase라 부르며, cellulose의 분해 활성의 기준으로 사용된다.

CMC를 이용한 CMCase activity를 비교한 결과는 Fig. 2과 같다. 효소활성이 높은 순으로 정렬하였을 때 A8>D10>C7>A9>C6>C9>KCTC7806 순으로 높은 CMCase activity가 각각 나타났으며, KCTC 7806 균주를 기준으로 각 균의 CMCase activity를 비교하면 21.1>20.0>19.6>12.3>11.1>5.2>0%의 CMCase activity 차이를 보였다.

모든 균주에서 통계적으로 유의미한 차이는 나타내지 못하였으나 A8의 경우 가장 높은 차이를 나타내었다.

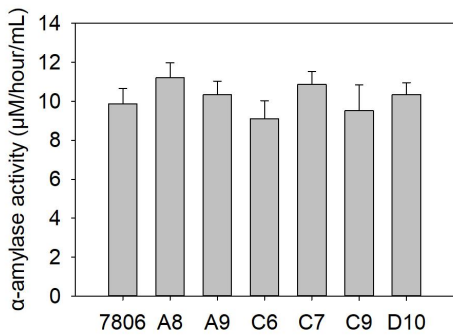


Fig. 1. α -amylase activity of fermented rice bran

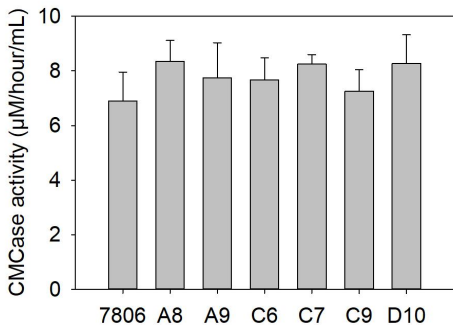


Fig. 2. CMCase activity of fermented rice bran

3.1.3 β -glucosidase

β -Glucosidase (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21)는 cellobiose로부터 glucose를 생성하는

효소로 cellobiose에 의한 성장 억제를 해소하는 동시에 균의 성장을 촉진한다 [13].

PNPG를 이용한 β -Glucosidase activity를 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 효소 활성이 높은 순으로 정렬하였을 때 A8>C9>A9>C6>D10>C7>KCTC7806 순으로 높은 β -Glucosidase activity가 각각 나타났으며, KCTC 7806 균주를 기준으로 각 균의 β -Glucosidase activity를 비교하면 50.3>23.7>16.6>9.0>5.6>3.8>0%의 β -Glucosidase activity 차이를 보였다.

A8의 경우 $p<0.01$, C9의 경우 $p<0.05$ 로 통계적으로 유의미한 차이를 나타내었으며 동시에 비교 군에 비해 높은 효소 활성을 나타내었다.

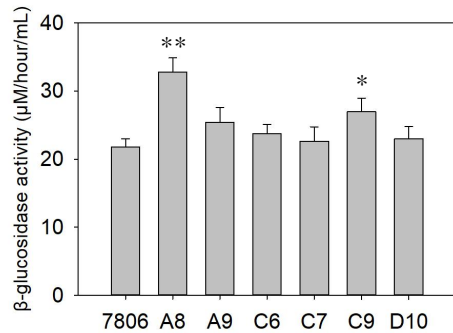


Fig. 3. β -Glucosidase activity of fermented rice bran (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

3.1.4 Protease

Protease는 원핵생물과 진핵생물부터 바이러스에 이르기까지 모든 유기체에서 발생하는 효소로 특정 서열 또는 제한 없이 단백질을 분해하여 단백질을 펩티드 또는 아미노산으로 분해한다. 이런 분해 작용은 세포 성장을 포함한 많은 생물학적 기능의 활성화에 관여한다.

Casein를 이용한 protease activity를 비교한 결과는 Fig. 4과 같다. 효소 활성이 높은 순으로 정렬하였을 때 A8>C9>D10>A9>C6>C7>KCTC7806 순으로 높은 protease activity가 각각 나타났으며, KCTC 7806 균주를 기준으로 각 균의 protease activity를 비교하면 10.0>9.5>7.0>4.0>1.5>1.3>0%의 protease activity 차이를 보였다.

A8의 경우 $p<0.05$ 로 통계적으로 유의미한 차이를 나타내었으며 동시에 비교 군에 비해 높은 효소 활성을 나타내었다.

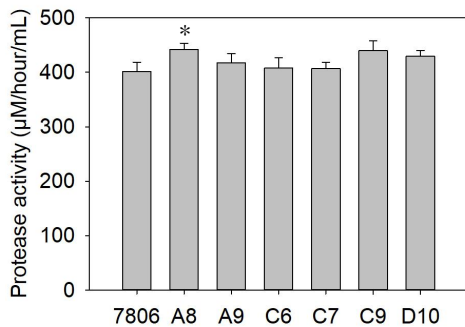


Fig. 4. Protease activity of fermented rice bran (* $p<0.05$)

3.2 항산화능 측정 결과

3.2.1 ABTS 측정 결과

많은 질병의 기초, 체액 및 식품의 항산화 활성화 및 양의 측정은 임상 화학에서 산화 스트레스 관련 질병의 진단 및 치료, 항산화 성분과 관련한 비교를 위해 수행되는데, ABTS 시약으로는 친수성 및 친유성 물질을 모두 분석 가능한 방법으로 항산화 활성 실험에서 많이 적용하는 검사방법이다.

ABTS를 이용한 항산화 실험 결과는 Table 1과 같다. A8>C9>KCTC>A9>D10>C7>C6 순으로 항산화능이 나타났으며, KCTC 7806 균주에 비하여 A8은 4.12% 높은 항산화능을 보였다.

이를 바탕으로 A8과 KCTC 7806으로 발효된 미강 추출물과 ascorbic acid의 IC₅₀을 계산하였다. KCTC 7806으로 발효한 경우 0.3513 mg/mL로 나타났으며, A8로 발효한 경우 0.3137 mg/mL, ascorbic acid 0.0136 mg/mL로 나타났다. 이를 이용해 환산한 경우 KCTC의 경우 38.71 ascorbic acid mg / g로 환산되며 A8은 43.35 ascorbic acid mg / g로 환산된다. 이는 KCTC7806에 비해 1.12배 높은 항산화 수치를 나타낸다.

모든 균주에서 KCTC 7806에 비해 통계적으로 유의미한 차이는 나타나지 못하였으나 A8의 경우 가장 높은 차이를 나타내었다.

Table 1. ABTS scavenging activity of fermented rice bran extract

	ABTS scavenging activity (%)
Control	42.49±2.54
KCTC 7806	68.88±2.63
A8	73.00±2.63
A9	64.88±3.00
C6	54.75±3.88
C7	58.25±4.75
C9	70.38±2.63
D10	59.50±3.25

3.2.2 DPPH 측정 결과

많은 질병의 기초, 체액 및 식품의 항산화 활성화 및 양의 측정은 임상 화학에서 산화 스트레스 관련 질병의 진단 및 치료, 항산화 성분과 관련한 비교를 위해 수행되는데, DPPH 시약으로는 유기성 물질을 분석 가능한 방법으로 항산화 활성 실험에서 많이 적용하는 검사 방법이다 [14].

DPPH를 이용한 항산화 실험 결과는 Table 2와 같다. A8>A9>C6>C9>KCTC 7806>C7>D10 순으로 항산화능이 나타났다. KCTC 7806 균주에 비하여 A8은 14.22% 높은 항산화능을 보였다. 이를 바탕으로 A8과 KCTC 7806으로 발효된 미강 추출물과 ascorbic acid의 IC₅₀을 계산하였다. 농도 별 측정 결과는 Fig. 3-2에 나타내었다. KCTC 7806으로 발효한 경우 0.5283 mg/mL로 나타났으며, A8로 발효한 경우 0.4127 mg/mL, ascorbic acid 0.0147 mg/mL로 나타났다. 이를 이용해 환산한 경우 KCTC의 경우 27.82 ascorbic acid mg / g로 환산되며 A8은 35.61 ascorbic acid mg / g로 환산된다. 이는 KCTC7806에 비해 1.28배 높은 항산화 수치를 나타낸다.

블랙커런트 추출물과 발효된 블랙커런트 추출물의 항산화 효능을 비교한 논문에서 블랙커런트 추출물과 발효된 블랙커런트 추출물 모두 농도 의존적인 항산화 효과가 나타났으며, 발효된 블랙커런트의 항산화능이 증가하였다 [15]. 한편 발효와 활성성분의 경향에 대한 연구 결과에 따르면 발효과정에서 glucosidase, esterase 등의 미생물이 생산한 효소는 세포벽과 조직을 약화시켜 추출이 더 용이하게 이루어 질 수 있도록 도우며, 배당체 물질을 비배당체로 전환하여 추출물의 활성을 높여주기도 하는 등 긍정적 효과를 일으키지만, 추출물의 활성 성분을 분해하는 동시에 미생물의 생물적 대사반응에

의해 생성된 산화물질에 의해 항산화능이 감소하기도 한다고 보고하였다 [16].

KCTC 7806 발효 균과 비교했을 때 A8과 A9의 경우 $p < 0.05$ 로 통계적으로 유의미한 차이를 나타내었으며 동시에 KCTC 7806 발효 균에 비해 높은 항산화 활성을 나타내었다.

Table 2. DPPH scavenging activity of fermented rice bran extract

	DPPH scavenging activity (%)
Control	21.40±2.93
KCTC 7806	45.14±2.14
A8	59.36±4.00*
A9	56.29±3.43*
C6	46.29±4.14
C7	44.71±4.00
C9	45.86±2.57
D10	24.86±6.86

(* $p < 0.05$)

4. 결론

과거 폐기물이었던 미강을 최근 항산화 및 우수한 수분 보유력 등으로 대체 식품, 항산화 화장품 원료 등 여러 방면으로 기능성이 입증되어 신소재로 사용되고 있다 [18]. 이에 미강의 기능성과 원료 대비 가격경쟁성을 증가시키기 위해 *S. fibuligera* 발효를 이용하였다. 미강 발효에 적합한 균주를 분리하기 위해 amylase, glucosidase, CMCase, protease의 활성을 측정하였으며, 발효의 결과 지표로서 DPPH와 ABTS와 같은 항산화능을 측정하였다.

α -amylase activity를 비교한 결과를 효소 활성이 높은 순으로 정렬하였을 때 A8>C7>D10>A9>KCTC>C9>C6 순으로 높은 α -amylase activity가 나타났으며, KCTC 7806 대비 13.7%에서 -7.6%의 활성 차이를 보였다. CMCase activity를 비교한 결과를 효소 활성이 높은 순으로 정렬하였을 때 A8>D10>C7>A9>C6>C9>KCTC7806 순으로 높은 CMCase activity가 각각 나타났으며, KCTC 7806 대비 CMCase activity를 비교하면 21.1-5.2%의 CMCase activity 차이를 보였다. β -Glucosidase activity를 비교한 결과를 효소 활성이 높은 순으로 정렬하였을 때 A8>C9>A9>C6>D10>C7>KCTC7806 순으로 높은 β -Glucosidase activity가 각각 나타났으며, KCTC 7806 대비 β -Glucosidase activity를 비교하면 50.3-3.8%의 β -Glucosidase

activity 차이를 보였다. Protease activity를 비교한 결과를 효소 활성이 높은 순으로 정렬하였을 때 A8>C9>D10>A9>C6>C7>KCTC7806 순으로 높은 protease activity가 각각 나타났으며, KCTC 7806 대비 10.0-1.3%의 protease activity 차이를 보였다. 결과적으로 KCTC 7806 대비 높은 활성이 기대되는 균주를 선정하였으며 이들을 이용한 발효물의 항산화능을 측정하였다.

ABTS를 이용한 항산화 실험 결과에서 A8>C9>KCTC7806>A9>D10>C7>C6 순으로 항산화능이 나타났다. DPPH를 이용한 항산화 실험 결과에서 A8>A9>C6>C9>KCTC7806>C7>D10 순으로 항산화능이 나타났다. 결과적으로 A8으로 발효한 미강이 가장 높은 항산화능을 나타냈으며, 미강 발효에 *S. fibuligera* A8이 가장 적합함을 확인하였다.

선행연구과제의 항염활성 및 항독성 결과와 더불어 우수한 효소 활성과 항산화능 결과를 통해 *S. fibuligera* A8 균주를 이용한 피부 개선 화장품 및 장 기능 개선을 위한 probiotic과 유사한 기능성을 위해 연구 예정이다.

REFERENCES

- [1] S. N. Chilton, J. P. Burton & G. Reid. (2015). Inclusion of fermented foods in food guides around the world. *Nutrients*, 7(1), 390-404. DOI : 10.3390/nu7010390
- [2] M. L. Marco, D. Heeney, S. Binda, C. J. Cifelli, P. D. Cotter, B. Foligné, ... & R. Hutkins. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion in biotechnology*, 44, 94-102. DOI : 10.1016/j.copbio.2016.11.010.
- [3] E. Dimidi, S. R. Cox, M. Rossi & K. Whelan. (2019). Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients*, 11(8), 1806. DOI : 10.3390/nu11081806
- [4] S. Y. Baek, H. J. Yun, H. S. Choi, S. B. Hong, B. S. Koo & S. H. Yeo. (2010). Screening and characteristics of useful fungi for brewing from commercial nuruk in Chungcheong provinces. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 38(4), 373-378.
- [5] G. Das, S. Paramithiotis, B. S. Sivamaruthi, C. H.

- Wijaya, S. Suharta, N. Sanlier, ... & J. K. Patra. (2020). Traditional fermented foods with anti-aging effect: A concentric review. *Food Research International*, 134, 109269. DOI : 10.1016/j.foodres.2020.109269
- [6] E. Pessione & S. Cirrincione. (2016). Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: encrypted peptides and biogenic amines. *Frontiers in microbiology*, 7, 876. DOI : 10.3389/fmicb.2016.00876
- [7] F. M. Abu-Salem, R. Mohamed, A. Gibriel & N. M. Rasmy. (2014). Levels of some antinutritional factors in tempeh produced from some legumes and jojobas seeds. *Int. Sch. Sci. Res. Innov.*, 8, 296-301.
- [8] M. S. Kim, S. I. Kim, B. S. Ha, H. Y. Park, S. Y. Baek, S. H. Yeo & H. S. Ro. (2014). Diversity, Saccharification Capacity, and Toxigenicity Analyses of Fungal Isolates in Nuruk. *The Korean Journal of Mycology*, 42(3), 191-200. DOI : 10.4489/KJM.2014.42.3.191
- [9] Z. Chi, Z. Chi, G. Liu, F. Wang, L. Ju & T. Zhang. (2009). Saccharomycopsis fibuligera and its applications in biotechnology. *Biotechnology advances*, 27(4), 423-431. DOI : 10.1016/j.biotechadv.2009.03.003
- [10] J. Ha, Y. Wang, H. Jang, H. Seog & X. Chen. (2014). Determination of E, E-farnesol in Makgeolli (rice wine) using dynamic headspace sampling and stir bar sorptive extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Food chemistry*, 142, 79-86. DOI : 10.1016/j.foodchem.2013.07.038
- [11] Y. J. Yoon. (2013) *Comparison of the antioxidant effects of rice wine (Makgeolli) and clear rice wine(Cheongju) and applied to the human HaCaT*. Master's thesis. Seo Kyung University, Seoul.
- [12] R. R. Singhania, A. K. Patel, R. K. Sukumaran, C. Larroche & A. Pandey. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource technology*, 127, 500-507. DOI : 10.1016/j.biortech.2012.09.012
- [13] C. J. Yeoman, Y. Han, D. Dodd, C. M. Schroeder, R. I. Mackie & I. K. Cann. (2010). Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Advances in applied microbiology*, 70, 1-55. DOI : 10.1016/S0065-2164(10)70001-0
- [14] O. P. Sharma & T. K. Bhat. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205. DOI : 10.1016/j.foodchem.2008.08.008
- [15] J. H. Jang, H. K. Lee, J. T. Bae, J. S. Lee & B. Y. Hwang. (2020). Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Fermented Blackcurrant Fruit Extracts with Saccharomycopsis fibuligera. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 46(4), 403-413. DOI : 10.15230/SCSK.2020.46.4.403
- [16] O. A. Adebo & I. Gabriela Medina-Meza. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. *Molecules*, 25(4), 927. DOI : 10.3390/molecules25040927
- [17] J. G. Je, H. S. Kim, H. G. Lee, J. Y. Oh, L. Wang, S. Rho & Y. J. Jeon. (2019). Antioxidant and Antihypertension Effects of Enzyme Hydrolysate from Hippocampus abdominalis. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(2), 127-133. DOI : 10.5657/KFAS.2019.0127
- [18] H. C. Chio, S. H. Jung & N. H. Jeong. (2020). Evaluation for Antioxidant Effects and Water-holding Capacity of Rice Protein Extracts from Cheongwon Area. *Applied Chemistry for Engineering*, 31(4), 398-403. DOI : 10.14478/ace.2020.1040

박 용 원(Yong-Won Park)

[정회원]



- 2002년 2월 : 한국방송통신대학교 환경보건학과 (보건학사)
- 2006년 8월 : 건국대학교 생물공학과 (공학석사)
- 2021년 8월 : 건국대학교 생물공학과 (공학박사수료)

- 2020년 2월 ~ 현재 : 경동대학교 임상병리학과 교수
- 관심분야 : 임상병리, 향산화
- E-Mail : stronghead@hanmail.net