

찰쌀의 수침 시간에 따른 수침액의 효소 및 미생물에 관한 특성

전형주 · 손경희* · 이명권**

서일전문대학 식품영양과, *연세대학교 식품영양학과, **서울대학교 임상병리과

Characteristics on Enzyme and Microorganism by Soaking Time of Glutinous Rice

Hyeong Ju Jeon, Kyung Hee Sohn* and Myung Kwun Lee**

Dept. of Food and Nutrition, Seoil College,

*Dept. of Food and Nutrition, Yonsei University

**Dept. of Clinical Pathology, Seoul University

Abstract

This study was attempted to simplify the complex steeping mechanism and propose the scientific approach of microorganism. As Enzyme activity showed that as steeping hours increase, the α -amylase activity increased. Most commonly microorganisms in steeping liquid were *Corynebacter* spp., *Candida* spp. and *Lactobacillus* spp. According to results, steeping acidifies the character of glutinous rice, affecting the starch's α -amylase and bring about component's changes. As *Candida* spp. and *Lactobacillus* spp. of the steeping liquid increase, the character of liquid is acidifying.

I. 서 론

현대에 이르러 유과를 비롯한 과점류의 과학적이고 재현 가능성 있는 제조 방법을 모색하기 위하여 지속적인 연구¹⁻⁴⁾가 진행되고 있지만 복잡한 유과 제조 과정의 원리 및 기전에 대하여는 아직 보고되지 않았다. 유과는 찰쌀의 수침 시간에 영향을 받는다^{4,5)}는 연구 결과가 보고되었으며 찰쌀을 이용한 제품 개발에 발전을 꾀하고 과학적인 보급을 위해서는 장기간 수침의 기전을 규명하고 현대화된 방법을 보급해야 한다. 신 등⁶⁾은 무증자 전분을 알칼리로 처리하는 경우 호화가 일어나며 이것을 중화한 후 α -amylase와 glucoamylase로 처리하게 되면 증자 전분과 동일한 당화율을 얻을 수 있다고 하였다. 최근 전분을 가수분해하는 효소에 대한 연구^{7,8)}가 활발히 진행되고 있으며 정⁹⁾과 최¹⁰⁾는 세균에서 추출한 효소가 생전분을 가수분해 한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 찰쌀의 수침시간이 수침액의 효소와 미생물에 미치는 영향을 알아보고 장기간 수침의 기전을 규명하기 위한 몇가지 시도를 해보았다.

II. 실험재료 및 방법

본 실험에서는 1991년 평택에서 수확한 「아끼바레 논찰」의 찰쌀을 수침시킨 수침액을 사용하였다.

1. 수침액의 α -amylase와 β -amylase의 활성도 측정

(1) α -amylase

수침시간별 수침액의 효소 활성도는 Bernfeld 방법(1951)[11]으로 측정하였다. 수침액은 예비실험을 거쳐

1~10 microgram/ml의 enzyme 농도를 갖도록 희석하여 280 nm에서 흡광계(SP850 spectrophotometer, Meter-tek)로 측정하였다.

$$\text{mg/ml} = A_{280}/\text{ml} \times 0.38$$

0.5 ml의 시료용액을 25°C에서 3~4분간 incubation시키고 시간의 간격을 조금 둔 후 25°C에서 α -amylase용 starch solution을 0.5 ml 가하였다. 정확히 3분간 incubation시킨 후 1 ml의 dinitrosalicylic acid color reagent를 넣어 boiling water bath에서 5분간 가열한 후 실온에서 냉각시켰다. 10 ml의 증류수를 가하여 잘 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 읽고 standard maltose curve로부터 계산하여 활성도를 측정하였다.

$$\text{Units/mg} = \frac{\text{micromoles maltose liberated}}{\text{mg enzyme in reaction mixture} \times 3 \text{ min}}$$

(2) β -amylase

찰쌀 수침액의 효소활성도는 Bernfeld의 방법(1955)[12]으로 측정하였다. 수침액은 예비실험을 거쳐 1~10 microgram/ml의 enzyme 농도를 갖도록 희석하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{mg/ml} = A_{280}/\text{ml} \times 0.81$$

0.5 ml의 시료용액을 25°C에서 3~4분간 incubation시키고 시간의 간격을 조금 둔 후 25°C에서 β -amylase용 starch solution을 0.5 ml 가하여 α -amylase활성 측정의 방법과 동일하게 실시하였다.

Table 1. Blood Agar

Constituents	
Beef heart muscle, infusion from	375.0g
Tryptose or Thiotone peptic digest of animal tissue	10.0g
Sodium chloride	5.0g
Agar	15.0g
Distilled or Demineralized water(pH 7.4)	1000 ml
Sterile, defibrinated sheep blood	50 ml

(final pH: 7.1)

Table 2. MacConkey Agar

Constituents	
Bacto-Peptone(Difco) or Glysate(BBL)	17g
Proteose Peptone(Difco) or Poly peptone(BBL)	3g
Bile Salts no.3	10g
Sodium chloride	5g
Neutral red	0.03g
Crystal violet	0.001g
Agar	13.5g
Distilled water	1000 ml

(final pH: 7.4)

Table 3. Sabouraud Dextrose Agar

Constituents	
Dextrose	20g
Polypeptone	5g
Agar	7.5g
Distilled water	500 ml

(final pH: 5.6±0.2)

$$\text{Units/mg} = \frac{\text{micromoles maltose liberated}}{\text{mg enzyme in reaction mixture} \times 3 \text{ min}}$$

2. 수침액의 미생물 수 측정 및 균주 확인

(1) 배지 조성

수침액에 분포된 미생물의 종류와 양을 측정하기 위하여 증식용 배지인 Blood Agar, MacConkey Agar와 Sabouraud Dextrose Agar를 조성하였다(Table 1, 2, 3).

(2) 균수 측정

수침액에 분포되어 있는 미생물의 수를 측정하기 위하여 증식용 배지인 Blood Agar, MacConkey Agar, Sabouraud Dextrose Agar에 각각 수침액을 배양시키고 증균용 배지인 Thioglycollate broth에도 수침액을 배양시켰다. 수침액을 platinum 제품인 standard loop(0.01 ml)를 사용하여 loop 목까지 잠기게 한 후 꺼내어 배지에 십자 모양을 그린 후 다른 loop(Nichrome)로 배지를 가득 채워서 35°C, 3~5%의 CO₂ gas가 있는 incubator에서 18시간 배양시켜 균수측정(colony counting)을 하였다.

(3) 균주확인

수침 기간별로 수침액에 분포된 균주를 확인하기 위

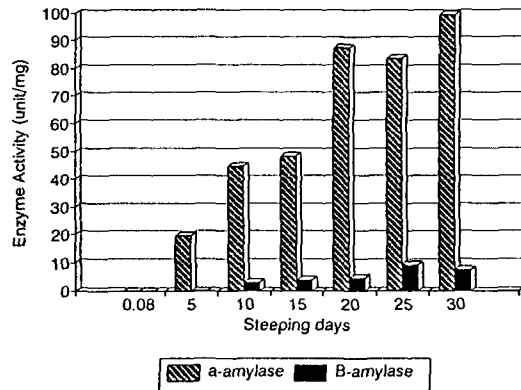


Fig. 1. Changes in Enzyme Activity of Steeping Liquid.

Table 4. Changes in Enzyme Activity of steeping Liquid

Treatment (No)	Steeping (days)	α-amylase (units/mg)	β-amylase (units/mg)
1	0.08	0 ^g	0 ^d
2	5	19.7 ^f	0 ^d
3	10	44.8 ^e	3.1 ^{b,c}
4	15	48.4 ^d	3.9 ^{b,c}
5	20	87.6 ^b	4.7 ^{b,c}
6	25	83.8 ^c	9.2 ^a
7	30	99.4 ^a	7.4 ^{a,b}
P value		p<0.001	p<0.001

a,b,c,d: Values with different letters in a same column e,f,g: are significantly different.

하여 그래염색(Gram Staining)을 하여 양성균과 음성균을 분리하고, 미생물 동정은 Vitek JR(Becton Dickinson Co.)을 이용하여 실시하였다. Vitek card에 marking을 한 후 4%의 half saline을 1.8 ml씩 분주한 시킨 후 면봉으로 균을 풀었다. 카드를 끼워 Vitek JR의 filler에 넣은 후 꺼내어 색도계(Colorimeter)로 균의 농도를 맞추어 미생물의 종류와 양을 측정하였다.

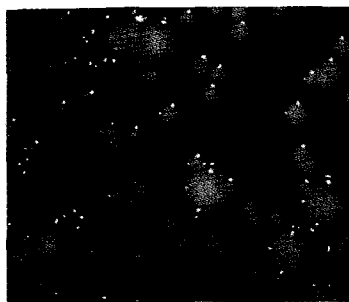
III. 실험결과 및 고찰

1. 수침액의 α-amylase와 β-amylase의 활성도

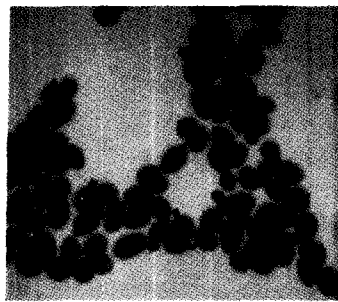
수침액의 α-amylase와 β-amylase의 효소 활성도를 측정된 결과 α-amylase는 수침기간이 지남에 따라 증가하여(Fig. 1) 수침 30일에 99.4 units/mg의 활성도를 가지고 있어 유의적인 차이를 보였다(Table 4). 반면 β-amylase는 수침기간이 지남에 따라 유의적 차이는 있었으나 변화량이 적게 나타나 α-amylase가 참쌀 전분의 특성을 변화시키는데 중요한 요인으로 작용한다고 사료된다.

Table 5. Distribution of Microorganism

Treatment (No)	Steeping (days)	Microorganism		Species	(%)
		Genus	Number/ml		
1	0.08	<i>Enterobacter</i>	18×10^3	<i>Enterobacter cloacae</i>	67
2	5	Yeast	50×10^3	<i>Enterobacter agglomerans</i>	14
				<i>Candida lusitaniae</i>	99
3	10	Yeast	70×10^3	<i>Candida famata</i>	1
				<i>Lactobacillus</i> spp.	99
4	15	Yeast	70×10^3	<i>Candida lusitaniae</i>	99
				<i>Candida famata</i>	1
5	20	Yeast	70×10^3	<i>Lactobacillus</i> spp.	78
				<i>Rhodotorula glutinis</i>	22
6	25	Yeast	70×10^3	<i>Lactobacillus</i> spp.	78
				<i>Rhodotorula glutinis</i>	22
7	30	Yeast	70×10^3	<i>Lactobacillus</i> spp.	78
				<i>Rhodotorula glutinis</i>	22
		<i>Lactobacillus</i>	2×10^5	<i>Corynebacterium</i> spp.	78
				<i>Corynebacter</i>	22
		<i>Lactobacillus</i>	2×10^5	<i>Lactobacillus</i> spp.	
		<i>Corynebacter</i>	2×10^5	<i>Corynebacterium</i> spp.	



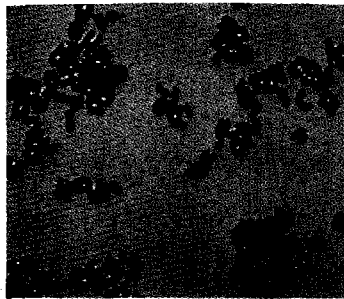
Enterobacter spp.



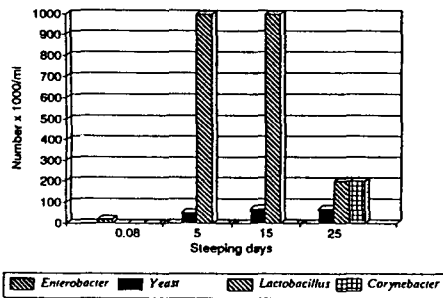
Candida nspp.



Lactobacillus spp.



Corynebacter spp.



Changes in Microorganism of Steeping Liquid.

Fig. 2. Distribution of Microorganism.

α -amylase는 amylopectin에 반응하여 전분을 maltose, glucose 등 여러 pentose의 혼합물을 생성[13]시킨다. 따라서 전분은 이 효소에 의해 가수분해 됨으로써 환원당으로 변화하게 되고, 그 다음 단계로 미생물의 작용에 의해 발효와 유사한 과정을 거치게 된다고 생각할 수 있다.

2. 수침액의 미생물 수 측정 및 균주 확인

수침 2시간의 수침액은 그램 염색(gram staining)에서 그램 음성 간균(gram negative rod)으로 나타나 *Enterobacter*가 18×10^3 개/ml 존재하였는데 *Enterobacter cloacae*는 물이나 토양에서 발생하는 균이기 때문에 찰쌀 수침 중에 오염된 균으로 생각된다. 한편 Table 5와 Fig. 2에 제시한 바와 같이 수침 5일부터 수침 20일까지 수침액에 존재하는 균주는 *Yeast spp.(Candida spp.)*와 *Lactobacillus spp.*였다. 따라서 수침 후 20일까지 생성된 *Yeast spp.*와 *Lactobacillus spp.*는 유과 제조시 수침 기간에 따른 유과의 팽화도와 경도에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한 *Lactobacillus spp.*는 전분으로부터 lactic acid와 acetic acid의 유기산을 생성시켜 찰쌀의 특성을 변화시키고, 전분에 영향을 주는 것으로 생각할 수 있다. *Corynebacter spp.*, *Yeast spp.*와 *Lactobacillus spp.*는 찰쌀의 수침액을 산성화 시키면서 향미와 유과의 질감에 큰 영향을 준 것으로 사료된다. 일반적으로 호화 전분은 효소에 의하여 용이하게 분해 되지만 생전분은 분해하기가 어렵고¹⁴⁾ 전분 당화의 과정이 복잡하여 개선이 요구된다는 시점에서 미생물이 생성하는 효소를 추출하여 이용한다면 큰 효과가 있을 것이다.

IV. 요약 및 결론

1. 찰쌀을 수침시킨 수침액의 효소 활성도를 측정한 결과 α -amylase는 수침 시간이 지남에 따라 활성도가 증가했으나 β -amylase는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.
2. 찰쌀 수침액의 미생물을 측정한 결과 수침액에 분

포된 미생물은 *Corynebacter spp.*, *Yeast spp.(Candida spp.)*와 *Lactobacillus spp.*는 찰쌀의 수침액을 산성화시키면서 향미와 유과의 질감에 큰 영향을 준 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 이효지, 전희정, 매갯과의 재료배합에 따른 texture 특성의 비교 연구. 대한가정학회지, 16(3): 43 (1978).
2. 장기숙, 약과의 조리 특성에 관한 연구, 성신여대 대학원 (1977).
3. 이혜수, 우경자, 이효은, 약과에 관한 연구. 대한가정학회지, 9(1): 23 (1971)
4. 강인희, 한국의 맛. 금광사, p. 319 (1988).
5. 방신영, 우리나라 음식 만드는법. 장충도서 출판사 (1955).
6. 신용철, 김태운, 이상열, 변시명, 알카리성 아밀라제를 생산하는 *Bacillus*속 미생물 분리와 그 조효소의 특성. 한국식품과학회지, 23(3): 349 (1991).
7. Shoichi, T., Production of Raw Starch Saccharifying Enzyme by *Corticium Rolfsii*. *Agr. Biol. Chem.*, 50(8): 1979 (1986).
8. Kazuhiro, H., Repeated Batch Conversion of Raw Starch to Ethanol Using Amylase. *Agr. Biol. Chem.*, 53(7): 1961 (1989).
9. 박동찬, Glucoamylase 및 α -amylase의 분쇄 마찰 매체 효소 반응계에서의 생전분 효소 분해 Mechanism. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 18(3): 260 (1990).
10. 최성현, *Streptomyces* Sp. SM-2가 생성하는 생전분 가수분해 효소의 특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 17(2): 136 (1989).
11. Bernfeld, P., Enzymes of Starch Degradation and Synthesis in Adances in Enzymology. Vol. XII, (Nord, F.F. Ed) p. 379, Interscience Publishers, New York (1951).
12. Bernfeld, P., Amylase, a and b in Method in Enzymology. Vol. I, (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Eds) p. 149, Academic Press, New York (1955).
13. Fennema, O.R., Food Chemistry, 2nd Edition, p. 112 (1984).
14. 정만재, *Bacillus Circulance* F-2가 생산하는 α -amylase에 대한 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 9(4): 185 (1981).