

Maillard 반응생성물이 *Bacillus* sp.의 생육특성에 미치는 영향

이기동 · 김정숙* · 권중호

경북대학교 식품공학과, *계명전문대학 식품영양학과

Effect of Maillard Reaction Products on Growth of *Bacillus* sp.

Gee-Dong Lee, Jeong-Sook Kim* and Joong-Ho Kwon

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

*Department of Food and Nutrition, Kyemyung Junior College

Abstract

Maillard reaction products (MRPs) added into a culture and the resultant bacterial growth were investigated using response surface methodology. The coefficients of determination (R^2) of response surface regression equations for bacteria were 0.9544 and 0.9578 in *Bacillus subtilis* and *Bacillus natto*, respectively. The MRPs produced at higher reaction temperature and for longer reaction time showed greater antimicrobial effect for *Bacillus subtilis*. Especially, the MRPs produced at temperature above 150°C for 8 to 12 hrs showed the strongest antimicrobial effect. The MRPs produced at lower reaction temperature and for shorter reaction time showed greater microbial growth effect for *Bacillus natto*, but those produced at the reaction temperature higher than 160°C showed the greatest antimicrobial effect. In the ridge analysis, the growth of *Bacillus subtilis* was the most significantly inhibited in the presence of MRPs prepared at 159.10°C and pH 12.21 for 9.67 hrs, and the growth of *Bacillus natto* was the most significantly inhibited in the presence of MRPs prepared at 169.94°C and pH 9.66 for 9.22 hrs.

Key words: microbial growth, MRPs, response surface methodology

서 론

식품의 갈변물질의 하나인 melanoidins은 다양한 반응물질로서 상이한 반응조건에서도 생성될 수 있으며, 관련 반응 mechanism도 계속 밝혀지고 있다. 또 식품의 Maillard 반응에 따른 영양순실, 갈색물질 및 항산화성 물질의 생성 등은 관련 분야 중에서도 많은 관심의 대상이 되고 있다⁽¹⁻⁴⁾. 비효소적으로 일어나는 Maillard 반응은 melanoidins 생성의 주된 반응이며, Maillard 반응 생성물 (MRPs)은 식품 또는 생체내에서 다양한 항산화성 및 항돌연변이원성을 나타낸다는 많은 연구결과가 있다^(1,5-8).

한편 미생물의 생육에 대한 melanoidins의 영향에 대해서도 많이 연구되어 왔다. Lewis⁽⁹⁾와 Finkelstein 등⁽¹⁰⁾은 MRPs가 미생물 생육을 억제한다고 하였다. Einarsson 등⁽¹¹⁾은 MRPs에 의한 미생물의 생육저해 효

과는 Maillard 반응 형태와 미생물의 종류에 따라 다르다고 했으며, MRPs의 농도가 증가함에 따라 미생물의 생육이 저연된다고 하였다. 그러나 五明 등⁽¹²⁾은 MRPs가 미생물의 생육을 촉진하였다는 연구결과를 보고한 바 있다.

본 연구에서는 MRPs가 미생물 생육에 미치는 영향을 알아보기자, 탈지대두박과 옥수수전분 가수분해물을 복합기질로 사용하여 Maillard 반응을 유도하면서 중심합성계획에 의해 설계된 반응조건별에 따라 melanoidins을 얻고 이들이 세균의 생육에 미치는 영향을 모니터링하기 위하여 SAS 및 mathematica program을 이용한 반응표면분석을 실시하였다.

재료 및 방법

반응기질의 제조

Maillard 반응기질의 제조는 이 등⁽¹³⁾의 방법에 따라 탈지대두박은 마쇄후 탈지하고 H_2SO_4 로 가수분해하여 동결건조하였으며, 옥수수 전분은 HCl로 가수분해

Corresponding author: Joong-Ho Kwon, Department Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

한 후 농축하고 동결건조하여 실험에 사용하였다.

Maillard 반응

Amino group과 carbonyl group의 비율이 2:1이 되도록 탈지대두박 가수분해물(7.75 g)과 옥수수 전분 가수분해물(2.00 g)을 20 ml 반응조에서 혼합하고 중심 합성계획⁽¹³⁾에 의해 요인변수인 반응온도(90-170°C), 반응시간(3-15 hrs) 및 용매 pH (5.5-13.5)를 변화시키면서 Maillard 반응을 진행시켰다. 반응이 끝난 반응조는 유수에서 냉각한 후 동결건조하고 여기에 질소가스를 충전하여 -18°C 이하의 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

갈색도의 측정

반응조건을 달리하여 얻은 MRPs의 갈색도는 용액을 일정비율로 희석하여 spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도로 측정하였다⁽¹⁴⁾.

미생물의 생육 측정

미생물의 생육시험에 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* (KCCM 12511)와 *Bacillus natto* (KCCM 11316)였으며, 균주 2 백그램을 취해 nutrient broth에 접종하여 24시간 배양한 후 이 종균 배양액 0.2 ml를 취하여 nutrient broth 4.8 ml와 MRPs (*Bacillus subtilis*; 0.2 mg/ml, *Bacillus natto*; 1 mg/ml)가 들어있는 시험관에 첨가하여 30°C의 진탕배양기에서 각각 24시간 배양시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽¹¹⁾.

실험계획

Maillard 반응생성물의 미생물 생육에 미치는 영향을 모니터링하고자 실험계획으로서 중심합성계획⁽¹³⁾을 사용하였으며, 반응표면 회귀분석을 위해 SAS (statistical analysis system) program을 사용하였다. Maillard 반응에 있어서 세 가지의 요인(독립)변수는 반응온도 (X_1), 반응시간 (X_2) 및 반응용매 pH (X_3)이며, 각 요인변수들은 -2, -1, 0, 1, 2의 네 단계로 부호

화하였고 실험조건들은 Table 1에 나타내었다. 또 반응변수로는 미생물의 생육 즉, *Bacillus subtilis* (Y_1)와 *Bacillus natto* (Y_2)의 변화와 갈색도(Y_3)로 하였다. 그리고 회귀분석 결과 임계점이 최대점과 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다.

결과 및 고찰

미생물 생육 특성

여러가지 반응조건에서 얻은 Maillard 반응생성물(MRPs)^o *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus natto*의 생육에 미치는 영향을 모니터링하고자 각 요인변수에 따른 반응변수의 값(Table 2)을 반응표면 분석하여 Fig. 1 및 2에 나타내었다. 세 가지 요인변수인 반응온도, 반응시간 및 용매 pH가 변화될 때 반응변수인 *Bacillus subtilis* (Y_1) 및 *Bacillus natto* (Y_2)의 생육에 대한 반응표면 회귀식은 Table 3과 같다. 이 때 R^2 는 각각 0.9544 및 0.9598로서 유의성이 인정되었다($P<0.01$).

$$\begin{aligned} Y_1 = & 1.2105 - 0.2108X_1 - 0.2601X_2 + 0.0121X_3 + 0.2635X_1^2 \\ X_2 = & 0.2075X_1X_3 + 0.0115X_2X_3 + 0.1305X_1^2 \\ & + 0.1745X_2^2 + 0.0115X_3^2 \end{aligned}$$

Table 2. Experimental data for pattern of the growth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus natto* under different conditions of reaction temperature, time and pH of solvent

No	Independent variables			Dependent variables		
	Temp. (°C)	Time (hr)	pH	<i>B. subtilis</i> ²⁾	<i>B. natto</i> ³⁾	Browning ³⁾ color
1	110(-1) ¹⁾	6(-1)	7.5(-1)	1.507	1.366	0.867
2	110(-1)	6(-1)	11.5(1)	1.681	1.366	0.879
3	110(-1)	12(1)	7.5(-1)	1.193	1.393	0.971
4	110(-1)	12(1)	11.5(1)	1.190	1.381	0.996
5	150(1)	6(-1)	7.5(-1)	1.388	1.317	1.097
6	150(1)	6(-1)	11.5(1)	1.166	1.306	1.104
7	150(1)	12(1)	7.5(-1)	1.149	1.306	1.031
8	150(1)	12(1)	11.5(1)	1.127	1.317	1.029
9	130(0)	9(0)	9.5(0)	1.198	1.364	1.047
10	130(0)	9(0)	9.5(0)	1.202	1.361	1.046
11	90(-2)	9(0)	9.5(0)	1.567	1.374	0.759
12	170(2)	9(0)	9.5(0)	1.094	1.232	0.951
13	130(0)	3(-2)	9.5(0)	1.624	1.371	1.129
14	130(0)	15(2)	9.5(0)	1.125	1.399	1.100
15	130(0)	9(0)	5.5(-2)	1.169	1.394	1.088
16	130(0)	9(0)	13.5(2)	1.254	1.343	1.126

¹⁾ Parenthesises are the coded symbols of levels of independent variables

²⁾ Absorbance was determined at 620 nm

³⁾ Absorbance was determined at 420 nm

Table 1. Levels of independent variables in experimental design for Maillard reaction

Xi	Independent variables	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X ₁ : Temperature (°C)	90	110	130	150	170	
X ₂ : Time (hrs)	3	6	9	12	15	
X ₃ : pH of solvent	5.5	7.5	9.5	11.5	13.5	

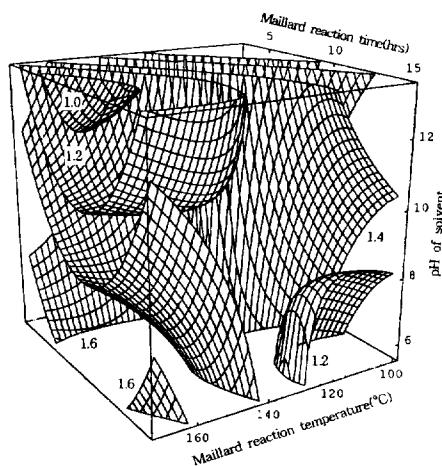


Fig. 1. Response surface for the growth of *Bacillus subtilis* at constant values (Abs. at 620 nm : 1.0, 1.2, 1.4 and 1.6) as a function of reaction temperature, reaction time and pH of solvent in Maillard reaction (control : 1.312)

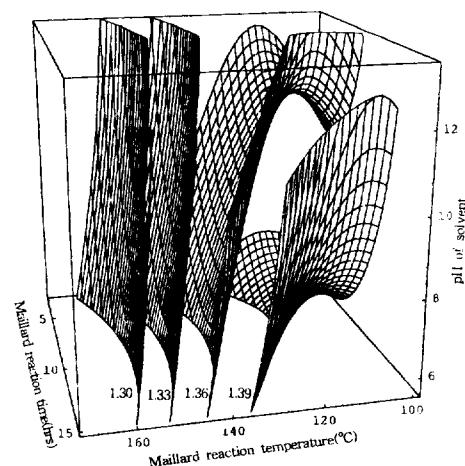


Fig. 2. Response surface for the growth of *Bacillus natto* at constant values (Abs. at 620 nm : 1.30, 1.33, 1.36 and 1.39) as a function of reaction temperature, reaction time and pH of solvent in Maillard reaction (control : 1.284)

$$\begin{aligned} Y_2 = & 1.3571 - 0.0680X_1 + 0.0122X_2 - 0.0142X_3 - 0.0210X_1X_2 \\ & + 0.0060X_1X_3 + 0.0050X_2X_3 - 0.0595X_1^2 + 0.0225X_2^2 \\ & + 0.0060X_3^2 \end{aligned}$$

먼저 MRP가 *Bacillus subtilis* 균의 생육에 미치는 영향을 보면 Fig. 1과 같이 Maillard 반응온도가 높고 반응시간이 길수록 생성된 MRP는 *Bacillus subtilis* 균의 생육을 억제하였으며, 특히 Maillard 반응시간이 8-12 hrs 범위에서 반응온도와 pH가 낮을수록 균의 생육이 억제됨을 알 수 있었다. 그러나 Maillard 반응에서 pH가 낮은 조건에서 온도가 150°C 이상이고 시간이 13시간 내외에서는 균의 생육이 다시 증가하는 경향을 보였다. 이는 melanoidins의 축합 및 중합에 의한 고분자화 및 비극성화로 MRP가 침전됨에 따라 미생물의 생육억제성이 줄어들기 때문으로 생각된다.

그러나 Fig. 2에 나타난 바와 같이 균의 *Bacillus natto* 생육에 대해서는 Maillard 반응시간의 변화에 따라 얻어진 MRP는 거의 영향을 미치지 않았으며 대체로 대조구보다 균의 성장이 다소 높게 나타났다.

또 반응온도에 따른 영향에서 150°C 이하의 낮은 Maillard 반응온도에서 생성된 MRP는 반응온도가 낮아지고 용매 pH가 낮아질수록 *Bacillus natto* 균의 생육을 증가하게 하였으나, 130°C 이상에서는 반응 pH의 영향을 받지 않았다. 그리고 Maillard 반응온도가

150°C 이상으로 증가할수록 생성된 MRP는 *Bacillus natto* 균의 생육을 저해시켰다.

이상의 결과에서 볼 때 미생물의 생육에 대한 MRP의 작용에서 Maillard 반응 중 온도가 가장 큰 영향을 미치며, 다음으로 Maillard 반응시간이 영향을 미치고 있음을 볼 수 있었다. 박⁽¹⁵⁾, Lewis⁽¹⁶⁾, Finkelstein 및 Lankford⁽¹⁷⁾ 등은 MRP가 미생물 성장을 억제한다고 하였으나, 五明 등⁽¹⁸⁾은 MRP가 미생물의 생육을 촉진한다고 하였다. Einarsson 등⁽¹⁹⁾은 MRP에 의한 미생물의 성장저해 효과는 Maillard 반응형태와 미생물의 종류에 따라 다르다고 하였으며, MRP의 농도가 증가함에 따라 생육이 억제된다고 하였다. 이와 같은 많은 보고에서 MRP는 미생물의 생육을 저해하기도 하며, 때로는 미생물의 생육을 촉진하기도 한다고 보고되어 있다.

본 연구결과에서도 MRP는 *Bacillus* 속 미생물의 생육을 억제하거나 촉진하는 것으로 확인되었지만 MRP의 생성조건에 따라 영향이 다르게 나타남을 알 수 있었다. 그리하여 4차원 반응표면분석법을 적용함으로써 Maillard 반응온도, 반응시간 및 용매 pH에 따라 얻어진 MRP의 미생물 생육에 대한 영향을 그래프상에서 모니터링할 수 있었다.

갈색도

MRP의 갈색도에 대한 반응표면은 Fig. 3에 나타나 있으며, Maillard 반응조건인 온도, 시간 및 용매의

pH에 따른 반응표면 회귀식(Table 3)의 R^2 는 0.9544로서 유의성이 인정되었다($p<0.01$). MRPs의 갈변 정도는 낮은 반응온도에서는 온도가 증가할수록 증가하나 145°C 내외에서 최대값을 보였으며, 이보다 높은 반응온도 범위에서는 반응시간이 짧고 온도가 높을수록

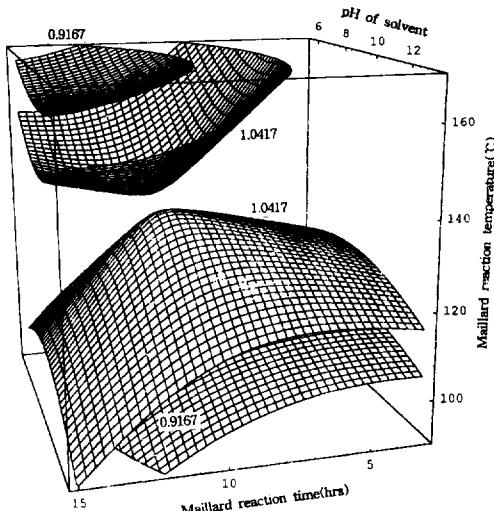


Fig. 3. Response surface for the browning color (Abs. at 620 nm : 0.9167 and 1.0417) as a function of reaction temperature, reaction time and pH of solvent in Maillard reaction

Table 3. Regression coefficients of the second order polynomials¹⁾ for three response variables

Coefficient	<i>B. subtilis</i> Y ₁	<i>B. natto</i> Y ₂	Browning color Y ₃
b ₀	1.2105***	1.3571***	1.0295*
Linear			
b ₁	-0.2108 ²⁾	-0.0680 ^{**2)}	0.1165*** ²⁾
b ₂	-0.2601***	0.0122	0.0027
b ₃	0.0121	-0.0142	0.0147
Interactions			
b ₁₂	0.2635**	-0.0210	-0.1810**
b ₁₃	-0.2075*	0.0060	-0.0160
b ₂₃	0.0115	0.0050	-0.0020
Quadratic			
b ₁₁	-0.1305*	-0.0595***	-0.1915***
b ₂₂	0.1745**	0.0225	0.0680
b ₃₃	0.0115	0.0060	0.0695
% Variability explained (R^2)	0.9544	0.9598	0.9544
Probability of F	0.0023	0.0016	0.0023

¹⁾Model on which X₁=temperature of reaction, X₂=time of reaction, X₃=pH of solvent is : Y=b₀+b₁X₁+b₂X₂+b₃X₃+b₁₂X₁X₂+b₁₃X₁X₃+b₂₃X₂X₃+b₁₁X₁²+b₂₂X₂²+b₃₃X₃² (Y : dependent variables, b₀ : intercept, b_n : regression coefficients)

²⁾*Significant at 10% level; **significant at 5% level; ***significant at 1% level

다시 갈색도가 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 MRPs의 갈색도가 미생물의 생육패턴과 일치하지 않는다는 것을 알 수 있었으며, 미생물의 종류에 따라 갈색도와의 관계가 다르게 나타남을 알 수 있었다.

변수 상호간의 상관관계

복합기질계 Maillard 반응에 있어서 반응온도, 반응시간 등의 요인변수와 미생물 생육특성을 나타내는 반응변수들의 각각의 상관계수를 구해 본 결과는 Table 4와 같다. *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus natto* 균은 Maillard 반응온도와 상관계수 -0.55528 ($P<0.05$) 및 -0.79849 ($P<0.01$)로서 높은 부(負)의 상관관계를 나타내었다. 또 반응온도는 갈색도와 정(正)의 상관을 보여 주었다($r=0.57258$). Maillard 반응시간과는 *Bacillus subtilis*균이 -0.68497의 상관계수로서 비교적 높은 부의 상관관계를 나타내면서 1% 수준에서 유의성이 인정되었다.

이와 같은 상관관계에서 볼 때 Maillard 반응에서 반응온도 및 시간에 따라 생성되는 MRPs는 미생물의 생육에 유의적인 영향을 미치게 됨을 알 수 있었고, Maillard 반응 중 갈색도의 생성은 요인변수 중 반응온도와 가장 큰 상관이 있음을 보여주고 있었다.

세균의 최대 생육억제

각 반응변수에 대한 회귀분석을 실시하여 본 결과(Table 5) 모두 안정점을 나타내고 있었으므로, 다시 능선분석을 하여 반응변수의 최대값을 나타내는 요인 변수 값을 예측하였다. 능선분석결과 Table 5에 나타낸 바와 같이 *Bacillus subtilis*의 최대 생육억제를 나타내는 Maillard 반응조건은 159.10°C, 9.69 시간 및 용매 pH 12.21이었으며, *Bacillus natto* 균에 대해서는 반응 조건 169.94°C, 9.22 시간 및 용매 pH 9.66에서 가장 생육억제능이 강한 MRPs가 생성될 수 있음을 나타내었다.

Stecchini 등⁽¹⁶⁾은 glucose-glycine 용액에서 열처리 시간이 경과함에 따라 생성된 MRPs의 미생물 생육억제능은 증가되었다고 하였다. 그러나 세균의 생육 최

Table 4. Correlation matrix among variables

Variables	Temp.	Time	pH	<i>B. subtilis</i>	<i>B. natto</i>
<i>B. subtilis</i>	-0.55528*** ¹⁾	-0.68497***	0.03193		
<i>B. natto</i>	-0.79849***	0.14384	-0.16733	0.29092	
Browning color	0.57258**	0.02285	0.06733	-0.45615*	-0.05312

¹⁾*Significant at 10% level; **significant at 5% level; ***significant at 1% level

Table 5. Predicted levels of process variables yielding optimum responses for inhibition of bacterial growth by ridge analysis

Independant variables	Levels for optimum responses		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. natto</i>	Browning color
Temp. (°C)	159.10	169.94	148.10
Time (hr)	9.69	9.22	3.67
pH	12.21	9.66	9.80
Morphology	S.P. ¹⁾	S.P.	S.P.

¹⁾saddle point : pattern of response surface obtained by response surface methodology

대역제 조건에서 나타난 바와 같이 160°C 부근에서 10시간 이상 Maillard 반응을 유도했을 경우에는 MRPs의 생육억제제능이 다시 감소된다는 사실을 반응표면분석(Fig. 1,2)에 의해 모니터링 할 수 있었다.

요 약

Maillard 반응 중 생성된 Maillard 반응생성물(MRPs)에 대한 세균의 생육 패턴을 조사하고자 반응표면분석을 적용하였으며, 세균의 생육배지에 MRPs를 첨가시켜 생육에 대한 반응표면회귀식의 R^2 는 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus natto* 균에서 각각 0.9544 및 0.9598였다 ($p<0.01$). *Bacillus subtilis*의 생육에 관한 MRPs의 영향에서 Maillard 반응온도가 높고 반응시간이 긴 MRPs 첨가군은 생육이 감소하다가 반응시간이 8~12 hrs 범위 및 반응온도가 150°C 이상의 생성조건에서 크게 감소하였다. *Bacillus natto* 균에 대한 생육에서는 Maillard 반응시간의 영향을 거의 받지 않았고, 150°C보다 낮은 반응온도에서는 온도가 낮고 용매 pH가 낮아질수록 생성된 MRPs에 대한 균의 생육이 증가하였으나 150°C 이상에서는 pH의 영향을 받지 않고 온도가 증가 할수록 생성된 MRPs에 대한 균의 생육이 감소하였다. 능선분석에서 *Bacillus subtilis* 균에 대한 생육은 159.10°C, 9.69시간 및 용매 pH 12.21에서 생성된 MRPs가 가장 생육억제 효과가 컸으며, *Bacillus natto* 균의 생육은 169.94°C, 9.22시간 및 용매 pH 9.66에서 생성된 MRPs에 의해 가장 크게 억제되었다.

문 헌

- Namiki, M.: Chemistry of Maillard reactions : recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food Res.*, **32**, 115 (1988)
- Mathew, A.G. and Parpia, H.A.B.: Food browning as polyphenol reaction. *Adv. Food Res.*, **19**, 75 (1971)
- Lee, C.Y.: Browning Reaction, Enzymatic. In *Enzymatic Encyclopedia of Food Sci. Technol.*, Hui, Y. H. (ed.), John Sons, Inc., p.223 (1982)
- Oimomi, M. and Hayase, F.: Topics of Maillard reaction *in vivo*. *Nippon Nogeikaku Kaishi*, **61**, 987 (1987)
- Ham, S.S.: Desmutagenicity of the enzymatic browning reaction products which obtained from *Prunus salicina* (yellow) enzyme and polyphenol compounds. *J. Korea Agric. Chem. Soc.*, **31**, 38 (1987)
- 최홍식, 이정수, 문갑순, 박진우 : 지방산의 산화에 대한 양조간장의 항산화성. *한국식품과학회지*, **22**, 332 (1990)
- 문갑순, 최홍식 : 양조간장의 항산화 작용 및 항산화성 물질에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **19**, 537 (1987)
- Eichner, K.: Antioxidative effect of Maillard reaction intermediates. *Prog. Food Nutrition Sci.*, **5**, 441 (1981)
- Lewis, I.M.: The inhibition of *Phytomonas malvaceara* in culture media containing sugars. *J. Bacteriol.*, **19**, 423 (1930)
- Finkelstein, R.A. and Lankford, C.E.: A bacterotoxic substance in autoclaved culture media containing glucose and phosphate. *Appl. Microbiol.*, **5**, 74 (1957)
- Einarsson, H., Snygg, B.G. and Eriksson, C.: Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 1043 (1983)
- 五明紀春, 三浦理代 : Melanoindinの食品營養學的研究. 日本營養食糧學會, **36**, 331 (1983)
- 이기동, 김정숙, 권중호 : 반응표면분석에 의한 Maillard 반응 중 기질의 동적변화. *한국식품과학회지*, **28**, 212 (1995)
- 문갑순, 최홍식 : 양조간장으로부터 항산화성 물질의 분리 및 그 특성. *한국식품과학회지*, **22**, 461 (1990)
- 박진우 : Glucose-amino산계 Maillard 반응 생성물의 생물작용. 부산수산대학교 박사학위논문 (1987)
- Stecchini, M.L., Giavedoni, P., Sarais, I. and Lerici, C.R. T.I.: Antimicrobial activity of Maillard reaction products against *Aeromonas hydrophila*. *Italian J. Food Sci.*, **5**, 147 (1993)

(1995년 8월 7일 접수)