

Bacillus subtilis DC-2의 색소 생성 및 그 생성물에 대한 항산화성의 최적화

최응규 · 지원대 · 정현채 · 최동환 · 정영건[†]
영남대학교 식품가공학과

Optimization for Pigment Production and Antioxidative Activity of the Products by *Bacillus subtilis* DC-2

Ung-Kyu Choi, Won-Dae Ji, Hyun-Chae Chung, Dong-Hwan Choi and Yung-Gun Chung[†]

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 713-749, Korea

Abstract

Correlation among color intensity, electron donating ability to α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DP-PH) and cultivation conditions by *Bacillus subtilis* DC-2 were tested with response surface methodology. Both of pigment generation ability and DPPH were more affected by temperature than any other factor. The highest correlation was appeared between color intensity and DPPH as 0.8364 which is significant at 1% level. After fixing cultivation time which is not significant at 10% level to 84hrs as optical cultivation time, response surface methodology was conducted in regarding temperature and color intensity. As a result of overlapped contour map of color intensity and DPPH, when cultivation temperature was in the range of 38.9~41.1°C and pH was in the range of 8.34~9.12, optical density of color intensity was predicted higher than 0.374 at 390nm and DPPH was inferred higher than 1.310 at 528nm. In the range of optical culture condition, cultivation temperature, pH and cultivation time was fixed to 40°C, 8.5 and 84hrs, respectively. In resulting, observation value of color intensity and DPPH was in the range of anticipation value as 0.386 at 390nm and 1.332 at 528nm respectively.

Key words: *Bacillus subtilis* DC-2, color intensity, electron donating ability, response surface methodology, correlation

서 론

색소는 크게 천연색소와 합성색소로 나뉘어지며, 염색, 식품, 화장품 등에 많이 사용되고 있다. 이중 합성색소는 최근까지 광범위하게 사용되어 왔으나, 안전성 등의 문제가 있어 천연색소의 사용이 소비자들에 의해 선호되고 있다. 이러한 천연색소는 식물 또는 미생물 등에 의해서 생산될 수 있으며, 특히 자연환경과 병충해 등에 제약을 받지 않는 미생물에 의한 색소 생산에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 이러한 색소 생성물은 산화방지제, 향균제 등으로 이용되는 중요한 식품소재이다.

미생물이 생성하는 색소에 관한 연구는 오래 전부터 이루어져 왔으며(1-4), 특히 *Bacillus*속 균이 생성하는 색소에 관한 연구로, Dawid(3)는 *Bacillus* species의 변

종에 따라서는 melanin을 생성한다고 하였고, Clark와 Smith(4)는 *Bacillus niger*가 tyrosin에서 흑색소를 생성함을 보고하였다. Barnett 등(5,6)은 *Bacillus subtilis*에 의해 전구물질이 분비되어 비효소적으로 생성되는 흑색소의 종류 및 성질을 밝혔으며, 박과 경(7)은 대두 발효식품의 갈변과 관련된 tyrosin 산화 세균에 관해 보고하였다. 현재까지 장류에 관한 갈색물질의 항산화 효과에 대한 보고(8-12)들은 대부분이 멜라노이딘 관련 물질로 밝혀져 있을 뿐이며 한국 전통 장류의 주 발효균인 *Bacillus* sp 를 이용한 색소 생성과 그 생성물의 항산화성에 대한 연구는 전무하다.

장류산업과 같이 일반적으로 유용한 미생물을 산업적으로 이용하고자 할 때는 균주, 영양물질, 배양 조건에 대한 조절이 중요하며 이를 선정할 때는 균주의 증식, 유용 물질 회수의 편리성 및 경제성을 복합적으로

[†]To whom all correspondence should be addressed

고려하여야 한다. 미생물 배양의 경우 최적 조건을 설정할 때, 반응표면분석은 요인실험을 통하여 반응표면식을 구한 다음 최대 또는 최소 반응치를 보이는 처리 조합을 찾아내는 실험계획법의 한 분야로서 change-one-variable-at-a-time-method의 단점 즉, 각 요인들 사이에서 일어날 수 있는 교호작용이 무시될 수 있으므로 최고의 반응치를 찾을 수 없고, 두가지 이상의 결과를 동시에 예측할 수 없는 점 등을 극복하여 주된 요인을 찾아내고 각 요인들의 교호작용을 확인하면서 실험의 경비를 절약할 수 있는 장점을 가지고 있다(13).

본 연구자들은 전보(14)에서 *Bacillus subtilis* DC-2(15)를 이용한 색소 생성과 DPPH에 의한 전자공여성을 통한 항산화성의 조건을 조사하여 보고한 바 있으며, 이 균을 상업적으로 이용하고자 할 경우, 색소의 생성과 항산화성을 동시에 최적의 조건으로 생성하는 작업은 경비의 최소화와 수율의 극대화의 측면에서 매우 중요한 일이다

따라서, 본 실험에서는 온도, pH, 배양시간 등의 배양 조건과 *Bacillus subtilis* DC-2가 생성하는 색소와 항산화성 간의 상관관계를 구하고 현장에서 이용이 가능한 최적의 범위를 제시하여 색소 생성능과 항산화성을 가진 균주를 이용하여 전통 장류를 제조하는 기초 자료로 제시하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주 및 배지는 전보(14)에서 사용한 것과 같다. 즉 경북지역에서 수집한 42종의 대두발효식품으로부터 분리된 색소 생성균 *Bacillus subtilis* DC-2를 시험균주로 사용하였으며, 색소 생성용 배지(0.1% dextrose, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 1.0% soybean, pH 7.0)에서 온도, pH 및 배양시간에 따른 색소생성을 측정하였다.

색소 생성능과 항산화성 측정

Bacillus subtilis DC-2를 각 조건별로 배양한 배양액을 12,000rpm에서 원심분리(Hitachi CR21E, Japan)한 후 상정액을 얻고, 이를 색소 생성능과 항산화성 측정의 시료로 사용하였다.

색소 생성능의 측정은 spectrophotometer(Shimatzu UV201, Japan)를 사용하여 390nm(15)에서 시료의 흡광도를 측정하였다. 항산화성의 측정은 α , α -diphenyl-

β -picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 전자공여성으로 시험하였다(14). 즉, DPPH 16mg을 100ml absolute ethanol에 용해한 후 증류수 100ml를 가하고 filter paper(Whatman No. 1)로 여과한 후 이 여액 5ml에, 배양액을 12,000rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상정액 1ml를 가하여 혼합한 후 spectrophotometer를 이용하여 528nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다.

통계분석

색소 생성과 항산화성에 대한 최적 배양조건을 구하기 위한 실험계획으로서 전보(14)에서와 같이 중심합성계획을 사용하였고, 반응표면 회귀분석을 위해 SAS (statistical analysis system) program을 사용하였으며, 배양 조건과 색소 생성능 및 항산화성을 각각 확률변수로 하여 각 변수간의 관련성을 알기 위하여 각 변수간의 상관분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

색소 생성과 항산화성에 대한 배양 조건의 영향

중심합성계획에 의하여 설계된 여러 배양조건에서 색소 생성 및 항산화성을 조사한 결과에 대한 단순 통계치는 Table 1에 나타내었다. 즉, 색소 생성능의 경우, 흡광도의 평균은 0.3026이었고 표준편차는 0.0863으로 나타났으며 최고치가 0.4210, 최소치가 0.1610이었고, DPPH의 경우, 평균이 1.0129, 표준편차가 0.2509, 최고치가 1.3540, 최소치가 0.4650으로 나타나 실험결과의 정밀도가 높음을 알 수 있었다.

배양 조건과 색소 생성능 및 항산화성 간의 상관관계

색도 및 항산화성과 배양조건과의 상관관계는 Table 2에 나타내었다.

온도와 색도의 경우 0.5821로 5% 유의수준에서 정(+)의 상관관계를 나타내었고, 온도와 항산화성의 경우 0.5319로 5% 유의수준에서 유의성이 인정되었다. pH의 경우 색도는 0.4722로 10% 유의수준에서 정(+)의 상관관계가 인정되었으나, 항산화성은 0.3143으로 유의성이 인정되지 않았다. 배양시간과 색도 및 항산화성과의 상관관계는 각각 0.2462와 0.3795로 유의성이 인정되지 않았다. 따라서, 색소 생성능과 항산화성 모두에 온도가 가장 많은 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

한편, 색도와 항산화성과의 상관관계는 0.8364로 1%의 유의수준에서 유의성이 인정되어 색소물질과 항산화성 사이에는 매우 높은 정(+)의 상관관계를 가지는

Table 1. Simple statistics of color intensity and electron donating ability under different conditions of cultivation temperature, time and pH

Variable	N.	Mean	S.D.	Sum	Minimum	Maximum
Temp.	15	37	5.3452	555	27	47
pH	15	8.5	1.0690	127.5	6.5	10.5
Time	15	72	25 6571	1080	24	120
Color	15	0.3026	0.0863	4,539	0.161	0.421
DPPH	15	1.0129	0.2509	15 1930	0.465	1.354

S.D: Standard Deviation

Table 2. Correlation coefficients among cultivation conditions, color intensity and electron donating ability

	Temp.	pH	Time	Color
Color	0.5821**	0.4722*	0.2462	
DPPH	0.5319**	0.3143	0.3795	0.8364***

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

것을 알 수 있었다.

간장 및 된장 발효과정 중에 생성된 갈변물질은 주로 amino-carbonyl반응에 의해서 생성되는 melanoidin에 기인하는 것(16)으로 알려져 있으며, 신(17)은 *Bacillus licheniformis* SSA3에 의해 생성된 색소가 tyrosinase에 의한 것이라고 보고한 바 있다. 並本과 松下(18)는 어류를 건조할 때의 갈변은 당류와 아미노산 및 지질이 공존하는 환경하에 일어나지만, amino-carbonyl반응이 주반응이고 산화된 지방이 amino-carbonyl반응을 촉진하는 것으로 인정된다고 보고하였다. 하지만 본 실험에서 생성된 색소물질은 *Bacillus subtilis* DC-2가 생성하는 물질로 여겨지므로 앞으로, 이 물질의 검색이 필요하다고 사료된다.

색소 생성과 항산화성의 최적화

전보(14)에서 배양온도, 배양시간 및 배양액의 pH를 색도와 항산화성에 대하여 분산분석한 결과, F-ratio가 가장 낮아 유의성이 인정되지 않은 배양시간을 최적 시간인 84시간으로 고정하고 온도와 시간에 대한 반응 표면분석을 함으로써 배양 조건에 대한 색도 및 항산화성의 contour map을 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다.

색도의 경우 37.2~41.3°C와 pH 8.34~9.41의 범위에서 0.374이상의 흡광도를 기록하는 것으로 예상되었고, DPPH에 의한 전자공여성의 경우 38.9~41.7°C의 범위에서 1.310이상의 흡광도 감소치를 나타내는 것으로 예상되었다. 색도 및 항산화성에 대한 contour map을 겹쳐서 그려본 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 빗금친 부분은 색도 및 항산화성 둘다 최대인 조건 범위를 나타낸

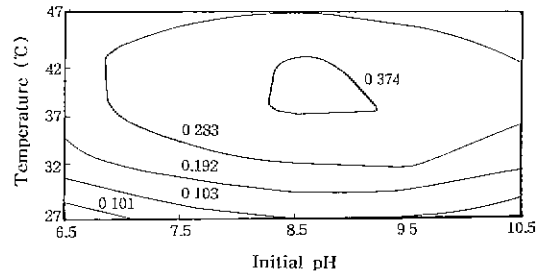


Fig. 1. Contour map of color intensity by *Bacillus subtilis* DC-2.

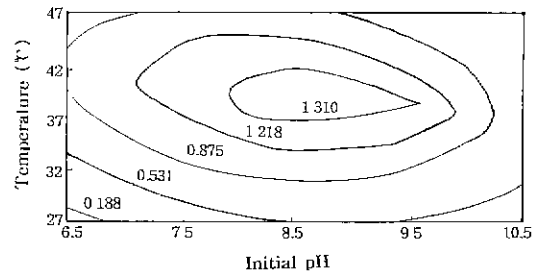


Fig. 2. Contour map of electron donating ability to α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl at 528nm by *Bacillus subtilis* DC-2.

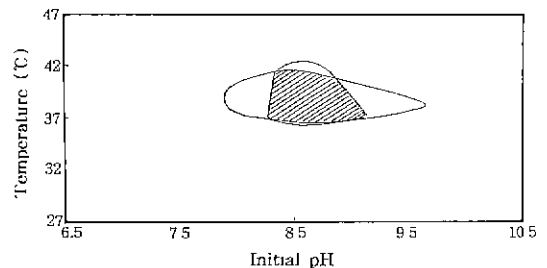


Fig. 3. Superimposed contour map for optimization of color intensity and electron donating ability in cultivating conditions.

Color: Color intensity at 390nm
DPPH: Electron donating ability to α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl at 528nm

것으로써 Table 3에서의 같이 배양온도가 38.9~41.3°C의 범위에 있었고 pH는 8.34~9.12의 범위에 있었으

Table 3. The range of optimum conditions of response variables¹⁾ yielding optimum response by superimposing of contour map

Cultivation conditions	Range of optimum conditions
Temp.	38.9~41.3
pH	8.34~9.12
Time	84

¹⁾Color: Color intensity at 390nm

DPPH: Electron donating ability to α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl at 528nm

Table 4. Predicted and experimented values of response variables at the given conditions¹⁾ within the range of optimum conditions

Response variables ²⁾	Predicted values	Experimented values
Color	>0.374	0.386
DPPH	>1.310	1.332

¹⁾Temperature: 40°C, pH: 8.5, Time: 84hrs

²⁾Color: Color intensity at 390nm

DPPH: Electron donating ability to α , α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl at 528nm

며, 색도의 경우 0.374이상의 흡광도와 DPPH에 의한 전자공여성의 경우 1.310이상의 흡광도 감소치를 나타내는 것으로 예상되었다.

반응표면을 겹쳐 그려서 얻은 최적 배양조건의 범위에서 임의의 조건을 배양온도 40°C, 배지의 pH 8.5 및 배양시간을 84시간으로 정한 후, 색도 및 항산화성에 대하여 최적 조건을 확인해 본 결과, 예측치와 동일한 조건에서의 실측치와의 관계를 Table 4에 나타내었다. 색도에 대한 실측치가 0.386, DPPH에 의한 전자공여성에 대한 실측치가 1.332로 나타나 모두 예측치의 범위에 속함을 알 수 있었다.

신(17)은 *Bacillus licheniformis* SSA3가 생성하는 색소는 배양 7일째부터 생성되기 시작하였다고 보고하였는데, 본 실험의 결과와 비교할 때 본 실험에 사용한 *Bacillus subtilis* DC-2의 색소 생성은 기간면에서 최소한 3일이상을 절약할 수 있는 결과이었다.

본 연구자들은 전보(14)에서 색도의 경우 39.25°C, pH 8.83에서 84.41시간 동안 배양시 최적의 색도를 나타내었고 항산화성의 경우 39.19°C, pH 8.84 에서 82.21시간 동안 배양시 최고의 항산화성을 나타내는 것으로 보고하였는데, 반응표면분석을 이용한 본 실험의 결과 *Bacillus subtilis* DC-2의 색소 생성 및 항산화성의 최적 범위는 38.9~41.3°C, pH 8.34~9.12에서 84시간 동안 배양하였을 때인 것으로 나타나 전보의 결과를 뒷받침한 것이었다 따라서, *Bacillus subtilis* DC-2의 색소

생성 및 그 생성물의 항산화성을 실제 현장에서 산업적으로 이용하기 위해서는 이 범위내의 임의의 조건에서 배양하는 것이 가장 유리할 것으로 사료된다.

요 약

반응표면분석을 통하여 *Bacillus subtilis* DC-2에 의한 색도 및 DPPH에 의한 전자공여성과 배양 조건과의 상관관계를 조사한 결과 온도가 색도와 전자공여성 모두에 5% 유의수준에서 정(+)의 상관관계가 있는 것으로 나타나 온도에 의해 가장 많은 영향을 받는 것으로 나타났으며 색도와 전자공여성 간의 상관관계는 0.8364로 1% 유의수준에서 매우 상관관계가 높은 것으로 나타났다. 분산분석에서 유의성이 인정되지 않은 배양시간을 최적 시간인 84시간으로 고정하고 온도와 시간에 대한 반응표면분석을 실시하여 색도 및 전자공여성에 대한 contour map을 겹쳐서 그려본 결과, 배양 온도는 38.9~41.3°C의 범위에서, pH는 8.34~9.12의 범위에서 색도의 경우 0.374이상의 흡광도와 DPPH에 의한 전자공여성의 경우 1.310이상의 흡광도 감소치를 나타내는 것으로 예상되었다. 반응표면을 겹쳐 그려서 얻은 최적 배양조건의 범위에서 임의의 조건을 배양온도 40°C, 배지의 pH 8.5 및 배양시간을 84시간으로 정한 후 색도 및 전자공여성에 대하여 최적 조건을 확인해 본 결과 색도에 대한 실측치가 0.386, DPPH에 의한 전자공여성에 대한 실측치가 1.332로 나타나 모두 예측치의 범위에 속함을 알 수 있었다.

문 헌

- Gessard, C.: Variete melanogene du bacille Pyocyanique. *Ann. Inst. Paris*, **15**, 817(1901)
- Muschel, A.: Zur chemi der schwarzfärbung kohlenhydrathaltiger nährboden durch de *Bacollus mesentericus* var. *niger*. *Biochem. Z.*, **131**, 570(1922)
- Dawid, W.: Farbstoffbildnde bakterien. Pigmentbildung und isolierung der bakterien, *Mikrokosmos*, **62**, 78(1973)
- Clark, F. E. and Smith, N. R.: Cultural requirements for the production of black pigment by *Bacilli*. *J. Bacteriol.*, **37**, 277(1938)
- Barnett, T. A., Valenzuela, D., Riner, S. and Hageman, J. H.: Production by *Bacillan subtilis* of brown sporulation-associated pigments. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 96(1982)
- Barnett, T. A. and Hageman, J. H.: Characterization of brown pigment from *Bacillus subtilis* cultural. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 309(1983)
- 박승규, 경규향. 대두 발효식품의 갈변과 관련된 티로신 산화 세균에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **18**, 376

- (1986)
8. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박진영: 양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성. 한국영양식량학회지, **22**, 565(1993)
 9. 최홍식, 이정수, 이창용: 양조간장에서 분리한 멜라노이딘 관련 물질의 항산화작용 특성. 한국영양식량학회지, **22**, 570(1993)
 10. 문갑순, 최홍식: 양조간장으로부터 항산화성물질의 분리 및 그 특성. 한국식품과학회지, **22**, 461(1990)
 11. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박진영: 지방산 산화에 대한 양조간장의 항산화 특성. 한국식품과학회지, **22**, 332(1990)
 12. 문갑순, 최홍식: 양조간장의 항산화작용 및 항산화성 물질에 관한 연구. 한국식품과학회지, **19**, 537(1987)
 13. 김상교, 오세종, 이상준, 백영진, 박연희: 반응표면 분석에 의한 *Lactococcus* sp HY 449의 성장 및 bacteriocin 생산의 최적화 산업미생물학회지, **22**, 522(1994)
 14. 최응규, 지원대, 정현채, 최동환, 정영진: 반응표면분석에 의한 *Bacillus subtilis* DC-2의 색소생성 및 그 생성물의 항산화성에 대한 최적조건. 한국식품영양과학회지, **26**, 620(1997)
 15. 최응규, 손동희, 지원대, 정영진: 색소 생성균 *Bacillus* sp. DC-2를 이용한 protease 생성. 한국위생과학회지, **2**, 49(1996)
 16. Toyomizu, M. and Chung, C. Y.: Studies on discolorization of fish products. V. Mechanism of rusting in amino acid-reducing sugar-lipid system. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish*, **24**, 857(1986)
 17. 신옥선: *Bacillus licheniformis* SSA3에 의한 색소의 생성조건과 새로운 색소. 영남대학교 대학원 석사학위논문(1992)
 18. 竝本滿走, 松下雪郎: 食品成分の相互作用 譜琰社(1980)

(1997년 7월 21일 접수)