

Bacillus sp. CS-17의 색소 생성조건 및 색소 농축액의 항균특성

손동화¹ · 권오진² · 최응규 · 정영건*

영남대학교 식품가공학과, ¹대구산업정보대학 조리과, ²대경대학 호텔조리과

초 록: 전통 대두발효식품으로부터 색소 생성능과 protease 활성이 가장 강한 균을 선별하여 *Bacillus* sp. CS-17로 동정하였다. CS-17 균의 균체증식은 배양 24시간, protease 활성은 배양 48시간, 그리고 색소 생성은 배양 72시간 후 최대에 달하였다. *Bacillus* sp. CS-17은 대두분말을 1.0% 첨가한 색소 생성용 기본배지에서 가장 높은 색소 생성능을 가지는 것으로 나타났다. 배양조건이 *Bacillus* sp. CS-17의 색소 생성에 미치는 효과를 조사한 결과, pH 8.5에서 37°C, 72시간 배양하였을 때 최적의 색소 생성을 보였다. NaCl의 첨가는 색소 생성능을 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 *Bacillus* sp. CS-17의 색소 생성 최적조건은 37°C, pH 8.5에서 72시간동안 배양하였을 때로 추정되었다. 그람 양성균 5주 및 그람 음성균 6주에 대하여 색소 농축액의 항균활성을 paper disc법으로 조사한 결과, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. aerogenes*, *B. cereus*, *A. hydrophila*의 성장에 대한 항균효과가 인정되었으나 그 활성은 전반적으로 미약하였다.

서 론

간장, 된장, 청국장 등 한국 전통적인 대두발효식품은 주요한 조미료로서 우리나라의 식문화에 기여하는 의의는 대단히 크며,¹⁾ 이들 장류식품의 주된 세균이 *Bacillus*속이라는 사실은 이미 널리 알려진 것으로서, 삶은 대두에 벗짚을 이용하여 재래식으로 발효시키거나, *Bacillus subtilis*, *B. natto* 등에 의하여 단기간 발효시켜 한국 전통 발효식품의 독특한 맛과 향 및 색을 생성하게 된다.^{2,3)}

전통 장류의 색소물질에 대한 연구로는 간장제품의 종류에 따른 항산화능의 비교,⁴⁾ 양조간장의 항산화성 물질에 관한 연구,^{5,6)} 지방산의 산화에 대한 양조간장의 항산화 특성,⁸⁾ 양조간장에서 멜라노이딘 관련물질의 분리 및 항산화성^{9,10)} 등 대부분이 멜라노이딘 관련물질로 밝혀져 있으며, *Bacillus*속 균이 생성하는 색소에 관한 연구로는 *Bacillus* sp.에 의한 melanin의 생성,¹¹⁾ tyrosin에서 *Bacillus niger*에 의한 흑색소의 생성,¹²⁾ *Bacillus subtilis*에 의해 전구 물질이 분비되어 비효소적으로 생성되는 흑색소의 종류 및 성질에 관한 연구,^{13,14)} 대두발효식품의 갈변과 관련된 tyrosine 산화 세균,¹⁵⁾ *Bacillus licheniformis* SSA3에 의한 색소의 생성조건과 새로운 색소¹⁶⁾에 관한 연구들이 단편적으로 보고되고 있을 뿐, 색소와 강력한 단백질 분해 효소를 동시에 생성하는 *Bacillus*속 균에 의한 대두분해산물 및 색소물질의 생리활성 작용에 관한 연구는 거의 연구가 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 전통 대두발효식품에서 색소를 생성하는 동시에 단백질 분해 효소의 활성이 강한 균주를 분리한 후 색소 생성능을 확인하여 장류를 기능성 식품으로 발전시키는 기초자료로 제시하고자 한다.

재료 및 실험

색소 생성균의 분리 및 선별

균의 분리는 일반 가정에서 제조한 86종의 청국장 각 1.0 g을 멸균 생리식염수에 현탁시킨 후, 현탁액 1.0 ml를 색소 생성용 기본배지¹⁶⁾에 혼합 분주하고 30°C에서 배양하여 육안으로 색소 생성이 확인된 균을 1차로 분리하였다. 색소 생성이 확인된 분리균들은 색소 생성능과 protease 활성으로 1 균주를 선별하여 시험균으로 사용하였다. 색소 생성능의 측정에는 1% 대두분말이 첨가된 색소 생성용 기본배지에서 30°C, 48시간 배양하고 9,000 g에서 30분간 원심분리한 후, 그 상정액을 380 nm에서 흡광도값으로 표시하였다. 색소 생성용 기본배지는 dextrose 1.0 g, K₂HPO₄ 7.0 g, KH₂PO₄ 2.0 g, Na₂C₆H₅O₇·2H₂O 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, agar 15 g을 1 l의 증류수에 녹여 pH 7.0으로 조정하여 사용하였다. Protease 활성조사를 위하여는 Hagwara¹⁷⁾의 방법에 따라 효소액 0.5 ml에 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 9.0) 1.0 ml를 가하고 0.6% Harmarstein milk casein(pH 9.0) 기질 용액 2.5 ml를 넣고 40°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid 2.5 ml를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음, 여과한 여액 1.0 ml에 0.55 M Na₂CO₃용액 10 ml와 Folin-ciocalteu용액 1.0 ml를 넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소역가는 효소액 1.0 ml가 1분 동안 1 µg의 tyrosine을 생성할 수 있는 효소의 양을 1 unit로 계산하였다.

균주의 동정

분리균은 Bergey's manual of systematic bacteriology¹⁸⁾의

찾는말 : *Bacillus* sp. CS-17, 색소 생성, 색소 농축액, 항균활성
*연락처자

방법에 따라 형태학적, 생화학적 특성을 조사하고, 그 결과를 Analytical Services, Inc.에서 확인하여 동정하였다.

색소 생성용 기본배지의 선정

Protease 생성, 균체증식 최적배지, 색소 생성 기본배지와 1.0%의 대두분말이 첨가된 색소 생성 기본배지에서의 색소 생성능을 조사하여 최적배지를 선정하였다.

색소 생성조건

색소 생성 기본배지에 대두분말을 1.0% 첨가하여 배양 온도, pH, NaCl 및 배양시간에 따른 색소 생성능을 380 nm에서의 흡광도값으로 조사하였다.

색소 농축액의 항균활성 검정

검정균주 및 사용배지 : 검정균주는 한국 미생물보존센터 및 생명공학 연구소 유전자은행에서 11주 [*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis*(ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Vibrio parahaemolyticus*(ATCC 17802), *Clostridium perfringens*(ATCC 13124), *Enterobacter aerogenes*(ATCC 13048), *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923), *Bacillus cereus*(KCCM 40133), *Aeromonas hydrophila*(KCTC 2358), *Listeria monocytogenes*(KCTC 1014)]를 구입하여 사용하였다.

균주의 배양 및 현탁액의 조제 : 시험균주를 각각의 사면배지에 24시간 수 회 계대배양한 후 이것을 동일한 액체배지 100 ml에 1 백금이를 접종하여 최적온도에서 24시간 진탕배양(150 rpm)한 다음 현탁액 1 ml를 다시 새로운 액체배지 100 ml에 접종하고, 8시간동안 진탕배양시켜 정상기(stationary phase)의 세포를 얻었다. 이 세포 현탁액은 살균된 냉 0.1 M phosphate buffer(pH 7.1)로 희석하여 최종 세포의 농도가 $\approx 10^7$ cfu/ml가 되도록 조절하였다.

색소 농축액의 조제 : *Bacillus sp.* CS-17 균주를 보관용 배지에 24시간 수 회 계대배양한 후 이것을 색소 생성 최적배지 100 ml에 1백금이를 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양(150 rpm)한 다음 균 현탁액 1 ml를 다시 새로운 액체배지 100 ml에 접종하여 30시간 진탕배양시킨다. 배양액은 3회 원심분리(9,000 g, 30분)하여 그 상등액만을 여과, 70±0.5°C의 evaporator에서 농축시킨 다음, Membrane filter(φ: 0.45 μm, Millipore)로 제균한 것을 항균 시험액으로 사용하였다.

색소 농축액의 항균활성 : 색소 농축액(0.5 g/ml)의 항균활성은 paper disc agar diffusion법으로 조사하였다. 각 균주에 적합한 배지가 들어있는 petri dish에 균 현탁액 0.1 ml($\approx 10^6$ cfu/ml)를 접종, 도말하고 농축물을 멸균된 disc(8 mm, Toyo Seisakusho Co.)에 30, 50, 70 μl씩 흡수, 건조시켜 plate 표면위에 올려놓은 다음, 0.85% 식염수 75 μl로 확산시켰다. 그리고 24시간 배양하여 paper disc 주위에 생성된 저해환의 직경(mm)으로 항균활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

색소 생성균의 분리 및 선별

색소 생성 고체배지에서 육안으로 색소 생성능이 강한 20 여종의 균을 1차로 순수 분리한 후 이를 색소 생성용 액체배지에 접종하여 색소 생성능, protease 활성을 확인한 결과는 Table 1과 같으며, 색소 생성능과 protease 활성이 가장 강한 CS-17 균을 본 실험의 시험균으로 최종 선별하였다. Fig. 1은 선별된 균의 색소를 scanning한 결과로서 380 nm에서 최고의 흡광치를 나타내어 신¹⁰⁾이 *Bacillus licheniformis* SSA3가 생성하는 갈색색소가 430 nm에서 최고의 흡광도를 나타낸다는 보고와 달랐으며, 최 등¹⁹⁾이 청국장에서 분리한 *Bacillus sp.* DC-2가 생성하는 색소가 390 nm에서 최고의 흡광치를 나타낸다는 보고와 비슷한 결과를 보였다. 선별된 CS-17 균을 색소 생성 액체배지에서 72시간 동안 배양하면서 균체증식, protease 활성 및 색소 생성능을 조사한 결과, Fig. 2에서와 같이 균체증식은 배양 24시간, protease 활성은 배양 48시간, 그리고 색소 생성은 배양 72시간 후에 최대에 달하였다.

분리균의 동정

최종 선별된 색소 생성균 CS-17의 특성을 조사한 결과는

Table 1. Isolation and selection of pigment producing strains

Strains	Color intensity	Protease activity (unit)	Cell growth (CFU/ml)
CR-01	0.391	2.50	7.2×10^8
CR-09	0.402	2.64	7.3×10^8
CR-19	0.203	1.02	5.1×10^8
CR-30	0.137	0.91	4.3×10^8
CS-05	0.294	2.07	5.9×10^8
CS-07	0.334	2.19	6.4×10^8
CS-12	0.407	2.46	7.7×10^8
CS-14	0.231	2.04	5.3×10^8
CS-17	0.504	2.97	8.2×10^8
CS-26	0.454	2.54	7.4×10^8
CT-07	0.279	1.24	5.8×10^8
CT-11	0.312	1.95	5.9×10^8
CT-13	0.383	2.25	7.1×10^8
CT-20	0.209	1.37	5.6×10^8
CU-02	0.330	1.59	6.4×10^8
CU-06	0.317	1.32	6.1×10^8
CU-07	0.398	2.01	7.9×10^8
CU-12	0.361	1.43	6.9×10^8

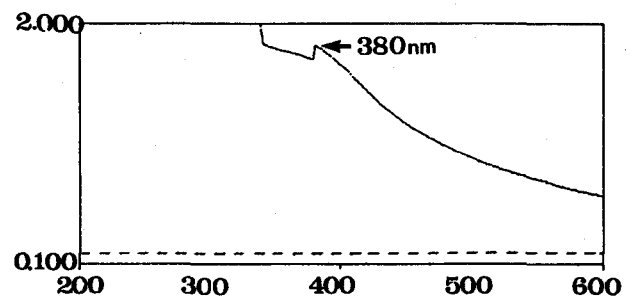


Fig. 1. Spectrum of pigment produced by the isolates.

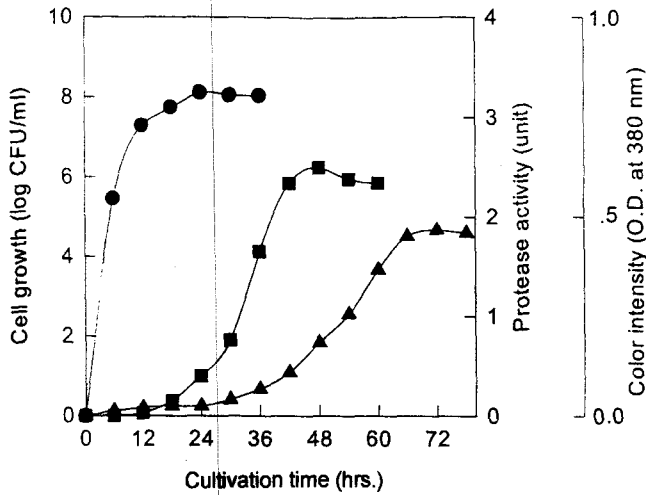


Fig. 2. Effect of culture time on the cell growth (●—●), protease activity (■—■) and pigment production (▲—▲) of selected strain. Medium (pH 7.0) was composed of 0.1% dextrose, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.05% Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.1% (NH₄)₂SO₄.

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the CS-17 isolates

Characteristics	CS-17
Shape	rod
Size	0.7~0.8 μm × 1.7~1.8 μm
Motility	+
Gram stain	+
Rods or filaments curved	-
Endospore produced	+
Filaments	-
Anaerobic growth	+
Growth in NaCl	
2%	+
5%	+
7%	+
10%	-
Oxidase	-
Catalase	+

Symbols: +, 90% or more of strains are positive; -, 90% or more of strains are negative.

Table 2에서 보는 바와 같다. CS-17 균은 아포를 형성하는 gram 양성, 간균으로 운동성이 있었으며, catalase 생성능이 양성이고 glucose로부터 산 생성능이 있었으며, 그 외의 생리적 특징들이 Bergey's manual of systematic bacteriology 상의 Bacillus sp.의 특징과 일치하였다. 또한 본 균주를 Analytical Services, Inc.(U.S.A.)에 의뢰한 결과, Bacillus coagulans의 변종으로 추정되나 신뢰도(SIM: 0.485)가 낮아 Bacillus sp. CS-17로 동정하였다.

색소 생성용 기본배지의 선정

Protease 활성, 균체중식 최적배지, 색소 생성 기본배지 및 1.0% 대두분말을 첨가한 색소 생성 기본배지를 사용하여 색소 생성능을 각각 조사한 결과, Fig. 3과 같이 protease 활성 및 균체중식 최적배지에서는 색소 생성능이 때

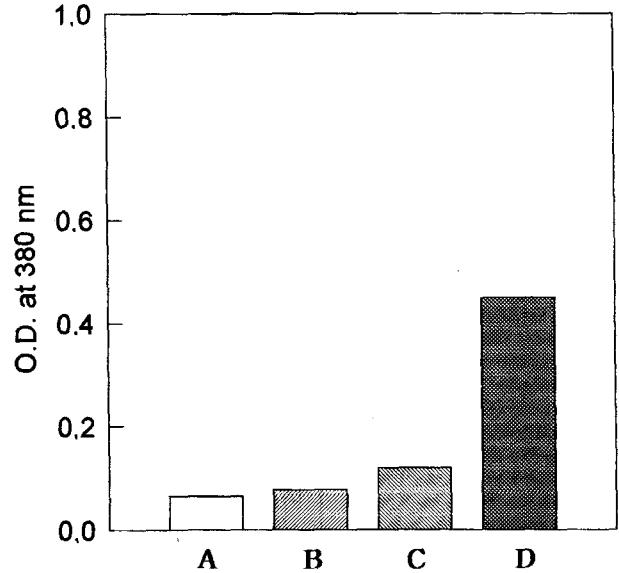


Fig. 3. Effect of different media on pigment production by Bacillus sp. CS-17. A: Optimal medium for cell growth (0.5% maltose, 5% (NH₄)₂SO₄, 0.5% yeast extract, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 1.0% NaCl, pH 7.5 and 37°C). B: Optimal medium for protease activity (0.5% maltose, 0.25% (NH₄)₂SO₄, 0.5% yeast extract, 0.3% K₂HPO₄, 0.01% MgSO₄·7H₂O, pH 7.75 and 37°C). C: The basal medium for pigment production (0.1% dextrose, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.05% Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.1% (NH₄)₂SO₄, pH 7.0 and 37°C). D: The basal medium for pigment production added 1.0% soybean (0.1% dextrose, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.05% Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 1.0% soybean, pH 7.0 and 37°C). The strain was cultivated for 72 hrs.

우 약하였으나 대두분말을 1.0% 첨가한 색소 생성 기본배지에서는 배양 48시간째에 0.47의 비교적 높은 흡광도치를 나타내었다. 본 결과로 볼 때 색소 생성에는 대두성분이 inducer로 작용함을 알 수 있었으며, 앞으로 청국장 제조시 색소 생성과 동시에 protease를 많이 분비할 수 있는 또 다른 방법이 모색되어야 함을 알 수 있었다. 따라서, 이후부터의 색소 생성 시험에는 대두가 1.0% 첨가된 배지를 사용하였다.

색소 생성 조건

배지의 pH, 배양시간, 배양온도 및 NaCl의 농도가 Bacillus sp. CS-17의 색소 생성에 미치는 효과를 조사하였다. pH가 CS-17 균주의 색소 생성에 미치는 영향을 pH 4.0~9.0의 범위에서 조사한 결과는 Fig. 4에서와 같이 약알카리(7.0~9.0)에서 색소가 비교적 잘 생성되었으며 pH 8.5에서 최대의 색소 생성을 보여 신¹⁰⁾이 보고한 pH 6.5보다 훨씬 알카리의 범위에서 색소 생성능이 강한 것으로 조사되었다. Bacillus sp. CS-17의 배양시간에 따른 색소 생성능을 96시간동안 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉 색소는 배양 24시간부터 서서히 생성되어 72시간에서 0.72의 흡광도치로 최대의 색소 생성을 보였으며 72시간 이후는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 최 등¹⁹⁾은 Bacillus subtilis DC-2를 96시간 동안 배양하면서 색소 생성능을 관찰한 결과, 배양

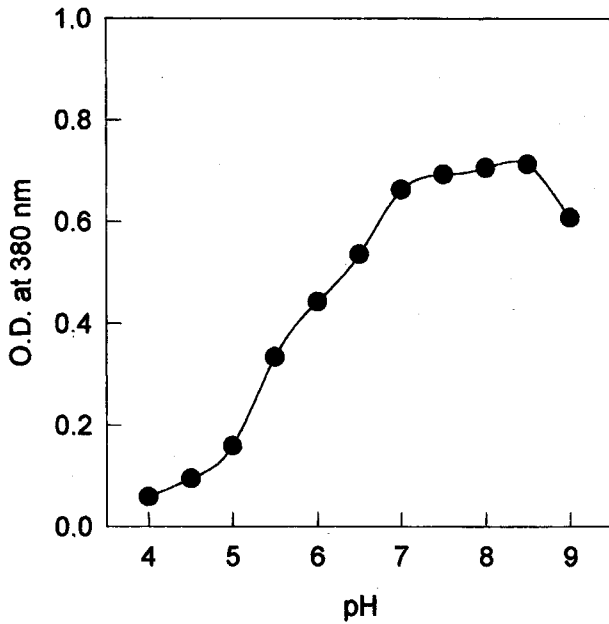


Fig. 4. Effect of pH on pigment production by *Bacillus* sp. CS-17. The medium was composed of 0.1% dextrose, 0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.05% $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.1% $(NH_4)_2SO_4$. The strain was cultivated for 48 hours at 37°C. ●—●: O.D. at 380 nm.

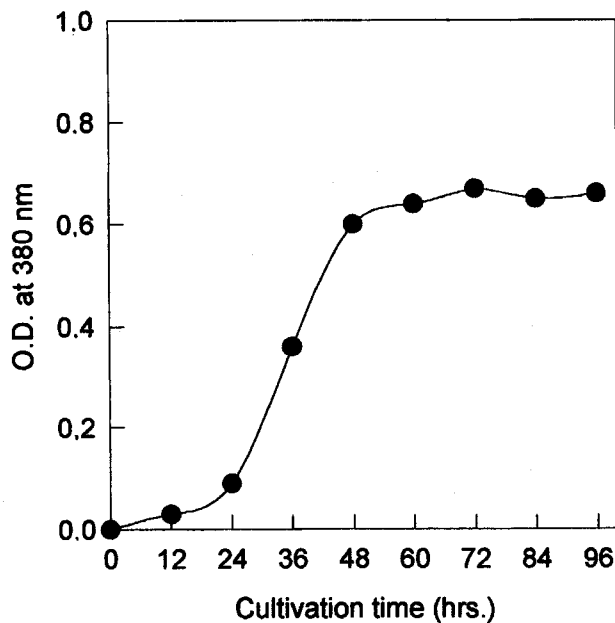


Fig. 5. Effect of cultivation time on pigment production by *Bacillus* sp. CS-17. The medium was composed of 0.1% dextrose, 0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.05% $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.1% $(NH_4)_2SO_4$. The strain was cultivated for 48 hours at 37°C and pH 8.5. ●—●: O.D. at 380 nm.

84시간째에 최대의 색소 생성능을 보였다고 보고한 바 있다. 색소 생성에 복합적으로 영향을 미칠 수 있는 peptone 과 yeast extract를 제거한 후 대두를 1.0% 첨가한 배지에 25~45°C의 배양온도에서 *Bacillus* sp. CS-17의 색소 생성을 조사한 결과는 Fig. 6에서와 같이 35~40°C의 비교적 고

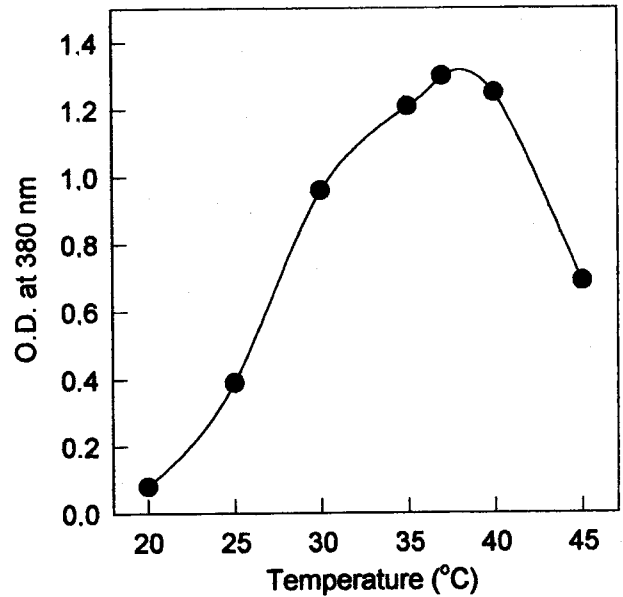


Fig. 6. Effect of temperature on pigment production by *Bacillus* sp. CS-17. The medium was composed of 0.1% dextrose, 0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.05% $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.1% $(NH_4)_2SO_4$. The strain was cultivated for 48 hours at pH 7.0. ●—●: O.D. at 380 nm.

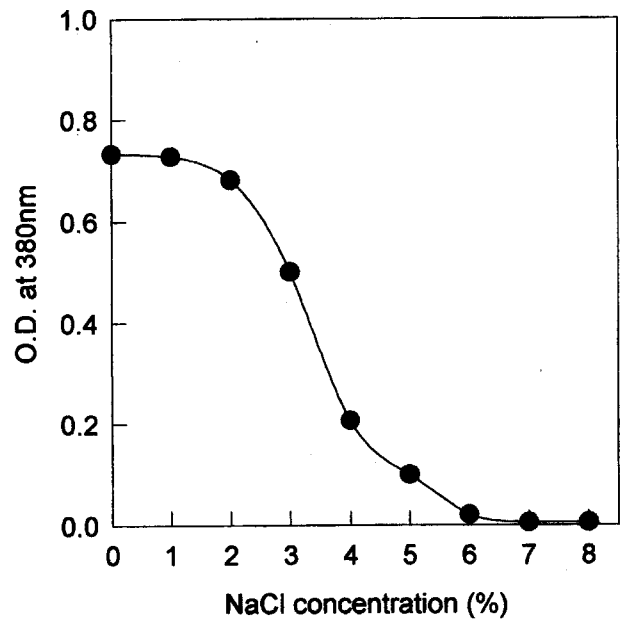


Fig. 7. Effect of NaCl concentration on pigment production by *Bacillus* sp. CS-17. The medium was composed of 0.1% dextrose, 0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.05% $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.1% $(NH_4)_2SO_4$. The strain was cultivated for 72 hours at 37°C, pH 8.5. ●—●: O.D. at 380 nm.

온에서 많은 색소가 생성되는 것으로 나타났으며, 37°C에서 최적의 생성을 보여 protease 활성이 높을 때 색소 생성이 높음을 알 수 있었다. 이는 신¹⁶⁾이 보고한 *Bacillus licheniformis* SSA3와 최 등¹⁹⁾이 보고한 *Bacillus subtilis* DC-2 균주의 최적 색소 생성온도와 비슷한 결과이다. NaCl이 함유된 최소배지에서 염농도가 *Bacillus* sp. CS-17의 색소

Table 3. Antibacterial effect of culture broth concentrates of Bacillus sp. CS-17 zone diameter (mm)

Strains	concentration (mg/disk)		
	15	25	35
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	8.5	8.5	9.0
<i>P. aeruginosa</i>	-	8.5	8.5
<i>S. typhimurium</i>	-	w ²	8.5
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>C. perfringenes</i>	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	-	w	8.5
<i>S. aureus</i>	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	8.5
<i>A. hydrophila</i>	-	w ²	8.5
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-

¹No and ²week inhibition zone were formed.

Cultivation time: 24 hrs.

생성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 NaCl을 0~6%의 농도범위로 첨가하여 37°C에서 48시간동안 진탕배양한 후 색소 생성을 관찰한 결과는 Fig. 7에서와 같이 NaCl의 첨가는 색소 생성능을 억제하는 것으로 나타나 효소활성 및 균체 증식에서의 NaCl 요구성과는 차이가 있음을 알 수 있었다. 즉, 1%의 NaCl 첨가의 경우에도 색소 생성능이 조금 감소하였으며, 2% 이상 첨가되었을 때는 첨가농도가 증가함에 따라 색소 생성능이 급격히 감소되었고, 6% 이상 첨가시 색소 생성능이 거의 사라지는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로 *Bacillus sp. CS-17*의 색소 생성 최적조건은 37°C, pH 8.5에서 72시간동안 배양하였을 때로 사료된다.

색소 농축액의 항균활성

색소 농축액의 항균활성을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 즉, *B. subtilis*가 15 mg/disk에서도 항균활성이 나타나 그 효과가 가장 좋았으며 *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. aerogenes*, *B. cereus*, *A. hydrophila*가 35 mg/disk의 색소 농축액의 첨가시 8.5 mm의 저해환을 나타내었다. 이상의 결과로서 *Bacillus sp. CS-17*에 의해 생성된 색소 농축액은 일부균주에 대해 항균효과가 인정되었으나 그 활성은 전반적으로 미약하였다. 류 등²²⁾은 *Monasus* 균주의 액체배양 농축액은 *E. aerogenes*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* 등에 항균효과가 있었다고 보고하였으며 마와 황²³⁾은 영양원과 배양조건에 따른 항균활성을 보고하였다. 천연 색소는 착색효과가 좋고 생산 및 정제기술이 합성착색료에 비해 간단하고 착색원료의 제한성과 종류에 따라 가격이 비싸며 또한 쉽게 구할 수가 없는 단점을 가지고 있으나 새로운 생물학적 기술로 보다 기능성이 뛰어난 색소를 개발한다면 이를 해결할 수 있을 것으로 생각된다.²⁴⁾

참고문헌

1. Rhee, S. H., S. K. Kim and H. S. Cheigh (1983) Studies on the Lipid in Korean Fermented Foods. *Korean J. Food Sci.*

Technol. **15**, 399-403.

2. Suh, J. S., S. G. Lee and M. K. Ryu (1982) Effect of *Bacillus* strains on the *Chungkook-jang* processing. *Korean J. Food Sci. Technol.* **14**, 309-314.

3. Kim, J. K. and C. S. Kim (1980) The taste components of ordinary Korean soy sauce. *J. Korean Agricultural Chemical Society.* **23**, 89-94.

4. Kim, J. K., Y. G. Chung and S. H. Yang (1985) Effective components on the taste of ordinary Korean soy sauce. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 285-287.

5. Moon, G. S. (1991) Comparison of various kinds of soybean sauces on their antioxidative activities. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **20**, 582-589.

6. Moon, G. S. and H. S. Cheigh (1990) Separation and characteristics of antioxidative substances in fermented soybean sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**, 461-465.

7. Moon, G. S. and H. S. Cheigh (1987) Antioxidative characteristics of soybean sauce in lipid oxidation process. *Korean J. Food Sci. Technol.* **19**, 537-541.

8. Cheigh, H. S., J. S. Lee, G. S. Moon and G. Y. Park (1993) Antioxidative characteristics of fermented soybean sauce on the oxidation of fatty acid mixture. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **22**, 332-336.

9. Cheigh, H. S., J. S. Lee and C. Y. Lee (1993) Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **22**, 570-575.

10. Cheigh, H. S., J. S. Lee, G. S. Moon and G. Y. Park (1993) Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **22**, 565-569.

11. Dawid, W. (1973) Farbstoffbildende bakterien. Pigmentbildung und isolierung der bakterien. *Mikrokosmos.* **62**, 78-84.

12. Clark, F. E. and Smith, N. R. (1938) Cultural requirements for the production of black pigment by *Bacilli*. *J. Bacteriol.* **37**, 277-282.

13. Barnett, T. A., Valenzuela, D., Riner, S. and Hageman, J. H. (1982) Production by *Bacillus subtilis* of brown sporulation-associated pigments. *Can. J. Microbiol.* **29**, 96-101.

14. Barnett, T. A. and Hageman, J. H. (1983) Characterization of brown pigment from *Bacillus subtilis* cultural. *Can. J. Microbiol.* **29**, 309-315.

15. Park, S. K. and K. H. Kyung (1986) Pigment-forming bacteria in the presence of L-tyrosin and their possible role in the browning of fermented soybean products. *Korean J. Food Sci. Technol.* **18**, 376-381.

16. Sin, O. S. (1992) Producing condition of pigments by *Bacillus licheniformis* SSA3., M.S. Thesis, Yeungnam University, Kyungsan.

17. Hagwara, S. (1956) Method of enzymatic analysis vol. 2, 237-246 Tokyo, Japan.

18. Buchanan, R. E. and Gibbons, M. E. (1974) "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th. ed.", The williams & Wilkins Co., Baltimore.

19. Choi, U. K., W. D. Ji, D. H. Son and Y. G. Chung (1996) Protease production by Pigment-producing Bacterium *Ba-*

- cillus* sp. DC-2. *J. Korean Soc. Hygienic Sciences*. **2**, 49-57.
20. Choi, U. K., W. D. Ji, H. C. Chung, D. H. Son and Y. G. Chung (1997) Optimum condition for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2 with response surface methodology. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 620-624.
21. Choi, U. K., W. D. Ji, H. C. Chung, D. H. Son and Y. G. Chung (1997) Optimization for pigment production and antioxidative activity of products by *Bacillus subtilis* DC-2, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 1039-1043.
22. Ryu, D. S., Y. B. Kim and H. J. Hwang (1995) Antibacterial effects of *Monascus* strain isolated from Koji, *J. Korean Soc. Hygienic Sciences*. **10**, 271-276.
23. Mah, J. H and H. J. Hwang (1996) Screening of *Monascus* strain for antimicrobial activity and effect of change of nutrients and incubation conditions on antimicrobial activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 1080-1086.
24. Kim, S. E. and J. G. Kim (1997) Edible pigment produced by microorganism. *Food Technic.* **10**, 81-88.

Conditions for the Pigment Production by *Bacillus* sp. CS-17 and Antibacterial Activity of Pigment Concentrated Extracts

Dong-Hwa Son¹, Oh-Jin Kwon², Ung-Kyu Choi, Yung-Gun Chung* (*Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749; ¹Dept. of Food Preparation, Taegu Polytechnic College, Taegu 706-020; ²Dept. of Hotel Culinary Art, Taekyeung C&D College, Kyongsan 712-850, Korea*)

Abstract : A bacterium with potent activity of pigment production and protease was isolated and identified as being *Bacillus* sp. CS-17. Cell growth, protease activity and pigment production of the strain reached to its maximum point after 24 hrs, 48 hrs, 72 hrs, respectively. The best pigment producing ability of *Bacillus* sp. CS-17 was shown on basal medium for pigment production added 1.0% soybean. The high efficient conditions for pigment production was obtained at culture of pH 8.5, 37°C and 72 hours. Among the tested 5 gram positive strains and 6 gram negative strains, weak antibacterial activity of pigment concentrated extracts was appeared against growth of *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. aerogenes*, *B. cereus*, *A. hydrophila*.

Key words : *Bacillus* sp. CS-17, pigment production, pigment concentrated extracts, antibacterial activity

*Corresponding author