

Bacillus subtilis를 이용하여 발효시킨 감귤 가공부산물 추출물의 특성

문영건 · 이경준 · 허문수*
제주대학교 해양과학대학 해양과학부

Characteristics of Citrus By-Product Ferment Using *Bacillus subtilis* as Starter Extracts. Moon, Young Gun, Kyeong Jun Lee, and Moon-Soo Heo*. Faculty of Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea – In this study, we investigated the biological activity of antioxidant and antibacterial activity of citrus by-product ferment. Hot water extracts and 80% methanol extracts from citrus by-product of ferment were screened for antibacterial activity pathogenic bacteria by paper disc method. Among the various hot water extracts and 80% methanol extracts the *Bacillus subtilis* showed relatively strong antibacterial activities in the order. The reducing activity on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and ·OH radical scavenging potential were sequentially screened, in search for antioxidant activities of citrus by-product ferment.

Key words: Citrus by-product ferment, *Bacillus subtilis*, antioxidant activity, antibacterial activity, Hot water extracts, 80% methanol extracts

서 론

제주도는 아열대 기후대로 기후가 온난하여 한반도에 비하여 채소 및 과실류가 사시사철 생산되는 지역이다. 기후 및 문화적인 관제로 가공식품 보다는 자연 상태로 식품을 활용하는 지역이다. 감귤은 제주도에서만 생산할 수 있는 작물이기 때문에 오래 전부터 재래귤로 시작하여 오늘에 이르기까지 많은 종류가 생산되고 있다. 이러한 제주 감귤은 생과일로서의 식품적 가치뿐만 아니라 약용으로도 높은 가치를 가지고 있다. 제주도에 생산되는 감귤 총 생산량에서 80~85%는 생식용으로, 15~20%는 가공용으로 소비되고 있다[11]. 그러나 제주도에에서 가공용으로 소비되는 감귤은 대부분의 농축주스 및 썬 등 단순 가공품으로 생산되어지는 데 이때 막대한 양에 가공부산물이 발생하고 있다. 이렇게 생산되어지는 감귤 가공부산물등과 같은 식물소재 폐기물에는 높은 수준의 페놀 화합물을 함유하고 있어 환경에도 바람직하지 않은 영향을 주는 것이 사실이다. 그러나 이러한 천연 페놀화합물에는 항암, 항알러지, 항바이러스, 항염증 등 다양한 생리 기능들이 있는 것으로 밝혀지면서[3, 12, 18] 이에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히 감귤 과피에는 carotenoids, bioflavonoids, pectin 및 terpenes 등이 풍부하게 함유되어 있고[7, 8, 13], 심장 순환기계 질환 및 항암, 항산화, 항염증에 대한 개선 효과[2, 4-6] 등 다양한 생리적 작용이 보고되고 있다. 그러나 단순 감귤 가공공정에서 발생

하는 부산물 같은 경우는 효과적인 이용 방법이 없어 대부분이 방치되고 있다. 그러므로 이러한 감귤 가공부산물에 효과적인 처리방법을 찾는다면 폐자원의 재활용뿐만 아니라 식품, 동물사료 및 유용물질 생산에 기여할 수 있을 것으로 본다. 특히 감귤과즙 제조공정에서 생산되는 부산물은 sucrose, glucose와 같은 다량의 수용성 탄수화물과 조단백질 등을 함유하고 있어 미생물의 발효기질로서 적합하다고 볼 수 있다. Sakamoto 등[16]이 감귤 착즙액이나 과피 기수 분해물을 feed yeast, vinegar, butylene glycol, citric acid, lactic acid 등의 발효생산을 위한 탄소원으로 이용할 수 있음을 보여 주었다.

따라서 본 연구에서는 최근 들어 제주 환경에 있어 주요한 환경 오염원으로 부각되고 있는 감귤 가공부산물에 대해 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효를 실시하였고, 그 발효산물의 특성을 파악하여 감귤 가공부산물을 기능성 소재로서의 활용 가능성을 찾고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 감귤 가공부산물은 2005년 10월~2006년 2월에 제주도 전 지역에서 생산되어 가공공장인 (주)일해(제주도)에서 주스 착즙 후 배출되는 감귤 가공부산물을 제공받아 -20°C에서 보관하면서 실험 재료로 사용하였다.

감귤 가공부산물 발효에 이용되는 미생물

감귤 가공부산물을 발효시키기 위한 발효 미생물은 한국균협회(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)

*Corresponding author

Tel: 82-64-754-3473, Fax: 82-64-756-3493

E-mail: msheo@cheju.ac.kr

Table 1. List of bacteria used for fermentation.

Bacteria name	Stain No.
<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM ¹ 40820

¹KCCM: Korean Culture Center of Microorganism

에서 분양받아 실험에 이용하였다(Table 1).

감귤 가공부산물 시료의 전처리

감귤 가공공장에서 실험 재료로 가져온 감귤 가공부산물을 실험에 필요한 양만을 습식 분쇄기를 사용하여 분쇄한 후 실험에 사용되었다. 먼저 분쇄된 감귤 가공부산물 시료 1 kg에 멸균증류수 1 L를 첨가한 후 당분(설탕 5%, w/w)을 첨가 혼합한다. 그 후 3 N NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조절한다. 그리고 난 후 고압 멸균기를 이용하여 121°C에서 25분간 멸균하여 감귤배지를 제조하였다.

그리고 대조구로 사용될 감귤 가공부산물은 감귤배지 제조과정에서 당분을 첨가하지 않은 것을 대조구로 사용하며, 제조된 감귤배지는 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효하기 전까지 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

감귤 가공부산물의 발효 및 추출

감귤 가공부산물을 발효하기 위하여 *B. subtilis*를 이용하였다. 감귤 가공부산물을 발효시키기 위하여 *B. subtilis* 균주를 전 배양하는데 Nutrient broth(NB, Difco, USA) 배지를 사용하여 30°C에서 2~3일간 호기적으로 교반 배양하였다. 전 배양된 *B. subtilis*은 다시 한번 NB에 1.0×10^3 cfu/ml 농도로 접종하여 동일한 조건에서 배양하였다. 이렇게 배양된 *B. subtilis*는 전처리 과정에서 제조되어진 감귤배지에 접종하는데 감귤배지에 접종하는 균 농도는 배양액을 1.0×10^3 cfu/ml이 되게 멸균 생리식염수를 이용하여 단계 희석하여 감귤배지에 2.5%가 되게 접종하여 *B. subtilis*의 최적 생육온도인 30°C에서 72시간동안 호기적 조건하에서 shaking incubator를 이용하여 100 rpm으로 교반하면서 발효과정을 거쳤다. 발효는 시중에 유통되고 있는 3 L 용량의 bottle를 이용하였으며 72시간 동안 발효 시켰다. 발효과정이 완료된 후 발효 산물의 pH는 3.5 부근까지 도달하였으며 *B. subtilis*의 균수는 2.5×10^9 cfu/ml로 증가하였다.

이렇게 발효된 시료는 -70°C 냉동고에서 24시간 냉동시킨 후 동결건조기를 이용하여 28시간 동안 동결건조 한다. 동결건조 된 시료는 GM-MM3900분쇄기(지엠 윌드텍, Korea)를 사용하여 분쇄하였다.

분쇄된 시료는 5 g씩 80% Methanol과 멸균 증류수 250 ml가 들어있는 1000 ml 삼각플라스크에 첨가하여 혼합한 후 추출 온도를 각각 25°C, 40°C, 60°C 조건하에서 3시간 동안 추출과정을 거친 후 여과지(Whatman No.1, England)를 이용하여 여과 시킨 후 Rotary Evaporator HS-2001N (Hahn Shin, Korea)을 사용하여 10배로 감압 농축하였다.

항균실험

항균실험에 사용된 균주는 생물자원센터 KCTC(Korean Collection For Type Culture)와 한국중균협회인 KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms)에서 12종을 분양받아(Table 2) 배양조건에 맞게 전 배양하여 실험에 사용하였다. 항균 활성 실험은 McFarland No 0.5로 희석된 각각의 세균 현탁액을 멸균된 면봉을 사용하여 준비되어진 Muller Hinton agar(MHA, BBL, USA) plate에 팔고루 도말하고, 건조 후 멸균된 paper disc(직경 6 mm, Advantec, Japan)에 *B. subtilis*에 의해 발효되어진 발효 산물을 증류수 및 80% methanol에 의해 온도별로 추출되어진 추출액을 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml의 농도로 조절하여 50 µL씩 적하하여 풍건 한 후 MHA plate에 얹어서 각 배양 온도에 맞춰 24시간 배양하여 clear zone을 caliper로 측정 하였다. Caliper로 측정된 clear zone은 paper disc의 직경도 포함 하였다.

전자공여능에 의한 항산화 활성 측정

전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 4.0×10^{-4} M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)용액 2 ml와 발효산물을 증류수와 80% 메탄올을 사용하여 25°C, 40°C, 60°C에서 추출하여 10배 농축한 농축액을 온도별로 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml로 희석한 희석액을 1 ml씩 혼합한 후, spectrophotometer Hanson OPRON-3000, Korea)로 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 천연 항산화제인 α -tocopherol과 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxytoluene), BHT(butylated hydroxytoluene)를 0.05% (w/v)의 농도로 제조한 후 제조된 DPPH용액 2 ml와 대조구액 1 ml를 혼합한 것과 *B. subtilis* 의해 발효되지 않은 감귤 가공부산물을 시험구와 같은 농도로 희석액을 제조한 후 제조된 DPPH용액 2 ml와 대조구액 1 ml씩을 혼합한 후 30분

Table 2. List of strains, media and optimum temperature used for antibacterial activity.

Bacteria name	Media	Optimum temp(°C)
<i>Vibrio tubiashii</i> KCTC 2728	Marine Agar	30
<i>Vibrio harvey</i> KCTC 2717	Marine Agar	25
<i>Edwardsiella tarda</i> KCTC 12267	Nutrient Agar	25
<i>Vibrio anguillarum</i> KCTC 2711	Marine Agar	25
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	BHI Agar	37
<i>Vibrio alginolyticus</i> KCTC 2928	Marine Agar	28
<i>Vibrio cholerae</i> KCTC 2715	Marine Agar	25
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCTC 2471	Marine Agar	30
<i>Vibrio salmonicida</i> KCTC 2726	Trypticase Soy Agar with 1% NaCl	30
<i>Streptococcus parauberis</i> KCTC 3651	Marine Agar	25
<i>Streptococcus iniae</i> KCTC 3657	Marine Agar	25
<i>Vibrio ichthyoenteri</i> KCCM 40870	Marine Agar	25

간 상온에서 반응시킨 후 흡광도를 측정 하였다.

전자 공여능(Electron donating ability, EDA)은 *Bacillus subtilis* 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (1 - \text{Bacillus subtilis 첨가구의 흡광도} / \text{무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

Hydroxyl radical 소거활성(HSA) 측정

농도별로 희석된 농축액의 hydroxyl radical(OH) 소거활성능을 조사하기 위해 2-deoxyribose oxidation method 방법[9]을 변형하여 측정하였다.

시험관에 10 mM FeSO₄/EDTA 용액 0.2 ml, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 ml, 농축액 0.2 ml와 0.1 mM phosphate buffer(pH 7.4) 1 ml, 10 mM H₂O₂ 0.2 ml를 가하고 37 °C에서 4시간 동안 반응 시킨 후, 2.8% TCA (trichloroacetic acid)용액 1 ml를 가하여 반응을 중지 시켰다. 그 후, 1.0% TBA (thiobarbituric acid)용액 1 ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를

측정하였으며 시료에 대한 기준시료는 *Bacillus subtilis*에 의해 발효되지 않은 농축액을 가지고 측정하였다.

그리고 대조구로는 천연 항산화제인 α-tocopherol과 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxytoluene), BHT(butylated hydroxytoluene)를 사용하였다. ·OH 소거활성은 HSA (hydroxyl radical scavenging ability)로 표기 하였으며 다음과 같은 식으로 계산 하였다.

$$HSA(\%) = [1 - \{(\text{absorbance of sample at 532 nm}) / (\text{absorbance of control at 532 nm})\}] \times 100$$

결과 및 고찰

항균 실험

Bacillus subtilis 이용하여 발효된 감귤 가공부산물 추출액의 항균 실험에 대한 결과는 Table 3과 Table 4에 나타내었다. *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효시킨 감귤 가공부산물과 *Bacillus subtilis*를 이용하지 않고 발효시킨 감귤 가공부

Table 3. Antimicrobial activities of hot water extracts from citrus by-products and fermented products.

Sample name	Concentration (mg/ml)	Fish pathogenic bacteria(clear zone on plate(mm))											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
CBP ^a (25°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	6.5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	6.5	-	-	11	-	-	-	-
	20	-	-	7.5	11	10	11	-	11.5	-	-	-	-
CBP (40°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	7.5	-	7	13	8	8	-	-
	20	7.5	7.5	9	11.5	11	13	10.5	15	10	10.5	8	8
CBP (60°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	7	-	7	12.5	6.5	7	-	-
	20	6	6	9	11.5	11	12	10	14.5	9	10	7	7
CBP + <i>Bacillus subtilis</i> (25°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	6.5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	6.5	-	-	11	9	8.5	6	6
	20	8	8	8.5	11	10	12	9	12	10	10	9.5	9
CBP + <i>Bacillus subtilis</i> (40°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
	5	-	-	-	6	6	6.5	6.5	10.5	8.5	9	6	6
	10	7.5	7.5	9	10	9.5	10	9.5	13.5	8.5	9	7	7
	20	10	10.5	12	13.5	14	14.5	17	18	11.5	12	12.5	13
CBP + <i>Bacillus subtilis</i> (60°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
	5	6	6.5	7	7	7	8	8	11	6	7.5	6	6.5
	10	9	9	10	11	10.5	12	11	15.5	9	10	7.5	8
	20	11	11.5	13	14	15	14.5	17.5	17	12	13	12	13.5

^a: Citrus by-product, ^b: extraction temperature.

A. KCTC 2728 *Vibrio tubiashii*, B. KCTC 2711 *Vibrio harvey*, C. KCTC 12267 *Edwardsiella tarda*, D. KCTC 2711 *Vibrio anguillarum*, E. KCTC 1916 *Staphylococcus aureus*, F. KCTC 2928 *Vibrio alginolyticus*, G. KCTC 2715 *Vibrio cholerae*, H. KCTC 40870 *Vibrio ichthyenteri*, I. KCTC 2726 *Vibrio salmonicida*, J. KCTC 2471 *Vibrio parahaemolyticus*, K. KCTC 3657 *Streptococcus iniae*, L. KCTC 3651 *Streptococcus parauberis*.

Table 4 Antimicrobial activities of 80% methanol extracts from citrus by-products and fermented products.

Sample name	Concentration (mg/ml)	Fish pathogenic bacteria(clear zone on plate(mm))											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
CBP ^a (25°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	7	6.5	6	7	-	-	-	-
	10	6	6.5	-	7.5	8	7	7.5	12	6	6.5	-	-
	20	8.5	9.5	9	12	12.5	12	10	13	9	9.5	-	-
CBP (40°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	7	6	6.5	8	-	-	-	-
	10	6.5	7	6.5	8	7.5	8	8	13	8	8	6	6
	20	9.5	11	11	12.5	13	13	11	15.5	11	11.5	9	9
CBP (60°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	7	6	6.5	8	-	-	-	-
	10	7	7	7	8.5	8	8.5	8	12.5	8.5	8	6.5	6
	20	10	11	11	12.5	13.5	13	11	16	10	10.5	8	8
CBP + <i>Bacillus subtilis</i> (25°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	7.5	-	-	-	-
	5	7	7.5	6.5	7	6.5	7.5	7	10	7.5	6.5	6	6
	10	9	9.5	9	9.5	10.5	11	11	14	9.5	9	9	9.5
	20	11.5	12	13	12	14.5	15	16.5	19	11	10.5	11.5	12
CBP + <i>Bacillus subtilis</i> (40°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
	5	6	6	6	6	6	6.5	6.5	10.5	8.5	9	6	6
	10	7.5	7.5	9	10	9.5	10	9.5	13.5	8.5	9	8	8
	20	10	10.5	12	13.5	14	14.5	17	18	11.5	12	11	12
CBP + <i>Bacillus subtilis</i> (60°C) ^b	1	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
	5	6	6.5	7	7	7	8	8	11	6	7.5	6	6.5
	10	9	9	10	11	10.5	12	11	14.5	9	10	7.5	8
	20	11	11.5	13	14	15	13.5	17.5	18	12	11	12	12.5

^a: Citrus by-product, ^b: extraction temperature.

A. KCTC 2728 *Vibrio tubiashii*, B. KCTC 2717 *Vibrio harvey*, C. KCTC 12267 *Edwardsiella tarda*, D. KCTC 2711 *Vibrio anguillarum*, E. KCTC 1916 *Staphylococcus aureus*, F. KCTC 2928 *Vibrio alginolyticus*, G. KCTC 2715 *Vibrio cholerae*, H. KCCM 40870 *Vibrio ichthyenteri*, I. KCTC 2726 *Vibrio salmonicida*, J. KCTC 2471 *Vibrio parahaemolyticus*, K. KCTC 3657 *Streptococcus iniae*, L. KCTC 3651 *Streptococcus parauberis*.

산물을 증류수와 80% methanol을 가지고 25°C, 40°C, 60°C에서 3시간 동안 추출단계를 거쳐서 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml에 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 그 결과 *Bacillus subtilis*를 이용하지 않고 발효시킨 감귤 착즙액 열수추출액(Table 3)에서는 추출온도에 따라 조금씩 차이를 나타내었고 또한 접종 농도에 따라서도 차이를 나타내었다. 특히 40°C와 60°C에서 추출한 시료 20 mg/ml 농도에서 KCTC 2711 *Vibrio anguillarum*, KCTC 1916 *Staphylococcus aureus*, KCTC 2928 *Vibrio alginolyticus*, KCTC 40870 *Vibrio ichthyenteri*에 대해 항균 활성을 나타내고 있다. 40°C에서 추출한 시료가 60°C에서 추출한 시료와 비교하였을 때 미미하지만 좀더 좋은 활성이 좋게 나타났다. *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효시킨 감귤 가공부산물 열수추출액에서는 평균적으로 감귤 가공부산물만을 발효시킨 것과 비교하여 보았을 때 5 mg/ml 농도에서부터 활성이 나타나기 시작하여 10 mg/ml과 20 mg/ml 농도에서는 모든 시험균에서 항균 활성을 나타내고 있다. 또한 80%

methanol를 사용하여 추출한 시료에서(Table 4)도 마찬가지로 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효시킨 감귤 가공부산물 추출 시료에서 높은 항균활성을 나타내고 있다. *Bacillus subtilis*를 이용하지 않고 발효시킨 감귤 가공부산물 80% methanol 25°C 추출시료에서는 20 mg/ml에서 40°C와 60°C 추출시료에서는 5 mg/ml 농도에서 KCTC 1916 *Staphylococcus aureus*, KCTC 2928 *Vibrio alginolyticus*, KCTC 2715 *Vibrio cholerae*, KCTC 40870 *Vibrio ichthyenteri*에 대하여 항균활성을 보이기 시작하여 20 mg/ml 농도에서는 모든 시험균에서 항균 활성이 나타났다. *Bacillus subtilis*를 이용하지 않고 발효시킨 감귤 가공부산물 열수추출액 결과와 비슷하게 40°C에서 추출한 시료에서 조금은 나은 활성이 나타났다. 반면 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효시킨 감귤 가공부산물 시료에서는 모든 시료에서 높은 항균 활성을 나타내었다. 특히 25°C에서 추출한 시료에서 가장 좋은 항균활성을 나타내었다. 항균 실험 결과에서도 나타났듯이 *Bacillus subtilis*를 첨가하여 감귤 가공부산물을 발효하였

을 때 감귤 가공부산물에 포함 되어 있는 유용성분들의 발효과정을 거치면서 그 기능성이 증가하여 *Bacillus subtilis*를 첨가하지 않은 시료보다 강한 저해 효과를 가져 온다는 것을 알 수가 있다.

전자공여능에 의한 항산화 활성 측정

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중에서 DPPH radical 소거활성법은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 방법으로 흔히 이용되고 있다. 항산화 물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하여 복합체를 만들고, DPPH는 항산화 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여, 전자공여능(EDA)으로부터 항산화 활성을 측정할 수가 있다. 전자공여 작용은 활성 radical에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제 시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 활성 radical에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로도 이용되고 있다. DPPH법은 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질의 의해 환원됨으로서 짙은 자색이 탈색되는 정도에 따라 항산화 효과를 전자공여능으로 측정하는 방법이다. *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효되어진 감귤 가공부산물과 *Bacillus subtilis*를 첨가하지 않고 감귤 부산물만을 발효시킨 산물을 열수추출법과 80% methanol을 사용하여 각 온도 별로 추출을 하여 감압농축한 후 농축액을 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml로 희석하여 DPPH에 의한 항산화 활성을 측정하였다(Fig. 2, 3). 그리고 대조구로는 천연 항산화제인 α -tocopherol과 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxytoluene), BHT(butylated hydroxytoluene)의 DPPH에 의한 항산화 활성을 측정하였다(Fig. 1).

열수추출법으로 추출한 시료에서는 *Bacillus subtilis* 첨가한 시료와 첨가하지 않은 시료 모두 40°C에서 추출 하였을 때 가장 높은 radical 소거활성을 나타내었다. 그 중에서도 *Bacillus subtilis* 이용하여 발효시킨 시료를 40°C에서 추출 하였을 경우 10 mg/ml 농도에서 합성항산화제인 BHT와 유사한 항산화 활성(73%)을 나타내었으며, 20 mg/ml 농도에서는 BHT보다 높은 활성(78%)을 나타내었다. 반면 80%

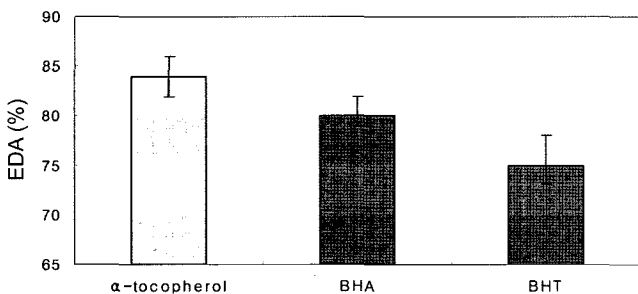


Fig. 1. Radical scavenging activity. The antioxidative activity was tested by DPPH method. The concentration of BHA, BHT and α -tocopherol added in reaction mixture were 5 mg/ml. BHA: butylated hydroxyanisole, BHT: butylated hydroxytoluene.

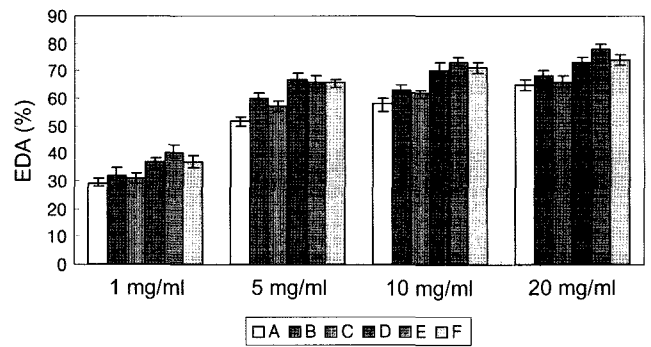


Fig. 2. Radical scavenging activity of the hot water extracts obtained Citrus by-product (CBP) ferment. A: CBP-25°C extracts, B: CBP-40°C extracts, C: CBP-60°C extracts, D: *Bacillus subtilis* ferment-25°C extracts, E: *Bacillus subtilis* ferment-40°C extracts, F: *Bacillus subtilis* ferment-60°C extracts.

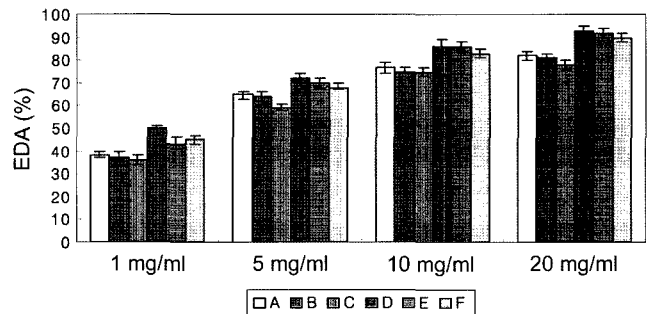


Fig. 3. Radical scavenging activity of the 80% methanol extracts obtained Citrus by-product (CBP) ferment. A: CBP-25°C extracts, B: CBP-40°C extracts, C: CBP-60°C extracts, D: *Bacillus subtilis* ferment-25°C extracts, E: *Bacillus subtilis* ferment-40°C extracts, F: *Bacillus subtilis* ferment-60°C extracts.

methanol을 이용하여 추출한 시료에서는 *Bacillus subtilis* 첨가한 시료와 첨가하지 않은 시료 모두 25°C에서 추출 하였을 때 가장 높은 radical 소거활성을 나타내었다. *Bacillus subtilis*를 첨가하지 않고 발효한 시료에서는 10 mg/ml, 20 mg/ml 농도에서 합성항산화제인 BHT와 유사한 radical 소거활성을 나타내었다. 그리고 *Bacillus subtilis*를 첨가하여 발효시킨 시료를 25°C에서 추출 할 경우 5 mg/ml 농도에서부터 합성 항산화제인 BHT와 유사한 활성(72%)을 나타내며, 10 mg/ml에서는 BHA 보다 높은 radical 소거활성(86%)을 나타내었다. 특히 20 mg/ml에서는 천연 항산화제인 α -tocopherol 보다 훨씬 높은 radical 소거활성(93%)을 나타내었다. 또한 *Bacillus subtilis*를 첨가하여 발효시킨 시료를 40°C에서 추출 할 경우에도 25°C에서 추출한 것 보다는 조금 약하지만 유사한 radical 소거활성을 나타내었다.

Hydroxyl radical 소거활성(HSA) 측정

Free radical 중에 생체 내에서 가장 빈번히 출현하고 따라서 중요하게 취급되는 것이 산소radical이다. 주요 산소 radical로는 superoxide(O₂⁻), hydroxyl(OH[·]), perhydroxyl

(HO₂·), alkoxy(RO·), peroxy(ROO·) radical 등이 있다. 그 외 radical은 아니지만 반응성이 강한 산소 종으로 과산화수소(H₂O₂)와 singlet oxygen이 있다. Singlet oxygen은 분자 산소와는 달리 외각의 전자 2개의 spin방향이 서로 반대로 되어 있어 불안정하다. 이상에서 열거한 여러 형태의 산소를 가리켜 흔히 reactive oxygen species(활성 산소)라 부르는데 그 중에서도 hydroxyl radical과 singlet oxygen이 수용액 중에서 가장 강한 반응성을 나타내어 지질산화를 개시하고 DNA에 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있고, 생체의 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 과산화수소(H₂O₂)가 Fe²⁺나 Cu²⁺ 이온의 존재 하에서 생산되며 가장 독성이 강한 free radical이므로 이 라디칼을 소거하는 정도를 측정 한다[9, 15].

*Bacillus subtilis*를 이용하여 발효되어진 감귤 가공부산물과 *Bacillus subtilis*를 첨가하지 않고 감귤 가공부산물만을 발효시킨 것을 열수추출법과 80% methanol을 사용하여 각 온도별로 추출을 하여 감압농축한 후 농축액을 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml로 희석하여 hydroxyl radical 소거활성을 측정하였다(Fig. 5-6). 대조구로 사용된 천연 항산화제인 α-tocopherol은 78%, 합성항산화제인 BHA는 72%, BHT는 65%에 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다(Fig. 4).

열수추출법으로 추출한 시료에서는 *Bacillus subtilis* 첨가하여 발효시킨 시료와 첨가하지 않고 발효시킨 시료 모두 40°C에서 추출하였을 때 다른 온도에서 추출한 시료보다 높은 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다. 열수추출법으로 추출한 시료의 hydroxyl radical 소거활성 실험에서는 천연 항산화제와 합성 항산화제보다 높은 소거활성을 보이는 시료는 나타나지 않았으나 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효시킨 감귤 가공부산물을 40°C에서 추출하여 20 mg/ml 농도로 실험 하였을 때 합성 항산화제인 BHT와 유사한 활성을 나타내었고, *Bacillus subtilis*로 발효시키지 않은 감귤 가공부산물 보다는 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다. 반면 80% methanol을 이용하여 추출한 시료에서는 *Bacillus subtilis* 첨가한 시료와 첨가하지 않은 시료 모두

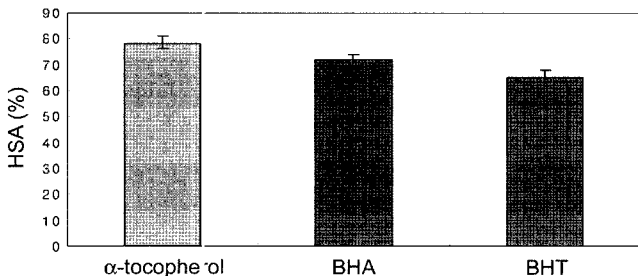


Fig. 4. Radical scavenging activities by 2-deoxyribose oxidation method. The concentration of BHA, BHT and α-tocopherol added in reaction mixture were 5 mg/ml. BHA: butylated hydroxyanisole, BHT: butylated hydroxytoluene.

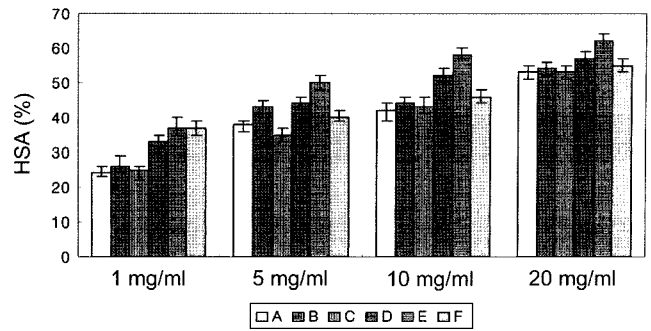


Fig. 5. Hydroxyl radical scavenging activity of the hot water extracts obtained Citrus by-product (CBP) ferment. A: CBP-25°C extracts, B: CBP-40°C extracts, C: CBP-60°C extracts, D: *Bacillus subtilis* ferment-25°C extracts, E: *Bacillus subtilis* ferment-40°C extracts, F: *Bacillus subtilis* ferment-60°C extracts.

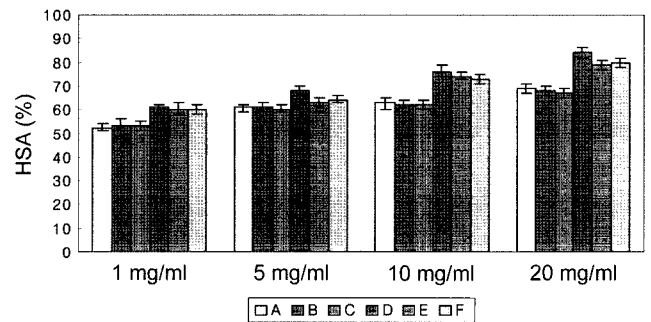


Fig. 6. Hydroxyl radical scavenging activity of the 80% methanol extracts obtained Citrus by-product (CBP) ferment. A: CBP-25°C extracts, B: CBP-40°C extracts, C: CBP-60°C extracts, D: *Bacillus subtilis* ferment-25°C extracts, E: *Bacillus subtilis* ferment-40°C extracts, F: *Bacillus subtilis* ferment-60°C extracts.

25°C에서 추출 하였을 때가 40°C나 60°C에서 추출하였을 때 보다 높은 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다. *Bacillus subtilis*를 첨가하지 않고 발효한 시료에서는 10 mg/ml에 농도에서는 합성 항산화제인 BHT와 유사한 값(63%)을 나타내기 시작하여 20 mg/ml 농도에서 합성 항산화제인 BHT 보다 높은 hydroxyl radical 소거활성(69%)을 나타내었다. 그리고 *Bacillus subtilis*를 첨가하여 발효시킨 시료를 25°C에서 추출 할 경우 5 mg/ml 농도에서 합성 항산화제인 BHT 보다 높은 활성(68%)을 나타내었으며, 10 mg/ml의 농도에서는 BHA 보다 높고 천연 항산화제인 α-tocopherol과 유사한 hydroxyl radical 소거활성(76%)을 나타내었다. 특히 20 mg/ml에서는 천연 항산화제인 α-tocopherol 보다 훨씬 높은 hydroxyl radical 소거활성(84%)을 나타내었다. 또한 *Bacillus subtilis*를 첨가하여 발효시킨 시료를 40°C에서 추출 할 경우에도 25°C에서 추출한 것 보다는 조금 약하지만 유사한 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 *Bacillus subtilis*를 첨가하여 발효시킨 감귤 가공부산물물의 열수 추출액과 80% 메탄올 추출액을 가지고 항균활성과 항산화활성을 측정하였는데, 그 결과(Table 3)를 살펴보면 우선 열수추출법으로 추출한 시료에서는 추출온도를 40 °C하여 추출한 실험구(*Bacillus subtilis* 첨가구)와 비교 실험구(*Bacillus subtilis* 미 첨가구) 20 mg/ml 농도에서 항균활성이 높게 나타났다. 그리고 80% 메탄올을 사용하여 추출한 시료에 결과(Table 4)를 보면 열수추출법에 의해 추출한 실험 결과보다 전반적으로 높은 항균활성을 나타내는 것을 볼 수가 있다. 특히 25°C에서 추출한 실험구에서 항균실험에 이용된 12종의 미생물 모두에서 높은 항균활성을 나타내고 있다.

DPPH method에 의한 radical 소거활성을 보면 열수추출법(Fig. 2)에서는 *Bacillus subtilis* 이용하여 발효시킨 시료를 40°C에서 추출하였을 경우 10 mg/ml 농도에서 합성 항산화제인 BHT보다 높고 BHA와 유사한 항산화 활성을 나타내었으며, 20 mg/ml 농도에서는 BHA보다 높은 활성을 나타내었다. 반면 80% methanol(Fig. 3)을 이용하여 *Bacillus subtilis*를 첨가하여 발효시킨 시료를 25°C에서 추출 할 경우 5 mg/ml 농도에서는 BHT와 유사한 활성을 나타내며, 10 mg/ml에서는 BHA보다 높은 radical 소거활성을 나타내었으며, 20 mg/ml에서는 천연 항산화제인 α -tocopherol 보다 훨씬 높은 radical 소거활성을 나타내는 것을 알 수가 있다. 2-deoxyribose oxidation method에 의한 hydroxyl radical 소거활성을 보면 열수추출법으로 추출한 시료(Fig. 5)에서는 모든 시료에서 천연 항산화제와 합성 항산화제보다 높은 hydroxyl radical 소거활성을 보이는 시료는 나타나지 않았으나 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효시킨 시료를 40°C에서 추출하여 20 mg/ml 농도로 실험 하였을 때 합성 항산화제인 BHT와 유사한 활성을 나타내었고, *Bacillus subtilis*로 발효시키지 않은 시료 보다는 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다. 반면 80% methanol을 이용하여 추출한 시료(Fig. 6)에서는 *Bacillus subtilis*를 첨가하여 발효시킨 시료를 25°C에서 추출 할 경우 5 mg/ml 농도에서 BHT 보다 높은 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었으며, 10 mg/ml의 농도에서는 BHA 보다 높고 천연항산화제인 α -tocopherol과 유사한 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다. 특히 20 mg/ml에서는 천연 항산화제인 α -tocopherol 보다 훨씬 높은 hydroxyl radical 소거활성을 나타내는 것을 볼 수가 있었다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 제주지역환경기술센터 산학협력연구사업비에 의해 수행 되었습니다.

REFERENCES

1. Aruoma, O. I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **32**: 671-683.
2. Bok, S. H., S. H. Lee, Y. B. Park, K. H. Bae, T. S. Jeong, and M. S. Choi. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr.* **29**: 1182-1185.
3. Carrol, K. K., F. M. Kurowska, and N. Guthrie. 1999. Use of citrus limonoids and flavonoids as well as tocotrienols for the treatment of cancer. International patent WO 9916167.
4. Chen, Y. T., R. L. Zheng, Z. J. Jia, and Y. Ju. 1990. Flavonoids as superoxide scavenger and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* **9**: 19-21.
5. Cook, N. C. and S. Samman. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* **7**: 66-76.
6. Damon, P., O. Flandre, F. Michel, L. Perdrix, C. Lavrid, and A. Crastes de Paulet. 1987. Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. *Arzneimittel Forschung.* **37**: 1449-1453.
7. Kim, Y. D., Y. J. Kim, S. W. Oh, Y. J. Kang, and Y. C. Lee. 1999. Antimicrobial activity of solvent extracts from *Citrus sudachi* juice and peel. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**: 1613-1618.
8. Kamiya, S. and S. Esaki. 1971. Recent advances in the chemistry of the citrus flavonoids. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **18**: 38-48.
9. Kawagan, S. 1996. Protocol for control of body functional material in food, pp. 8-15. *Kakuen press center*, Japan.
10. KoguKuchi, N. 1999. *Protocol for free radical experimant*, pp. 40-45. *suiyoonsa*, Japan.
11. Lee, H. Y., H. M. Seog, Y. J. Nam, and D. H. Chung. 1987. Physico-chemical properties of Korean mandarin(*Citrus reticula*) orange juice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **19**: 338-345.
12. Mayer, A., O. Yi, D. Pearson, A. L. Waterhouse, and E. Frankel. 1997. Inhibition of human low-density lipoproteins oxidation in relation to phenolic antioxidants in grapes. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1838-1843.
13. Moresi, M., F. Clementi, J. Rossi, R. Medici, and L. Vinti. 1987. Production of biomass from untreated orange peel by *Fusarium avenaceum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 37-45.
14. Marklud, S. and G. Marklud. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 469-474.
15. Miquel, J., A. T. Quintanilha. and H. Weber. 1989. In *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. CRC press, I pp. 223.
16. Sakamoto, S., I. Shooro, and M. Arai. 1982. Reduced cellulose as a substrate of cellulases. *J. Ferment. Technol.* **60**:

- 327.
17. Trush, M. A., E. G. Mimnaugh, and T. E. Gram, 1982. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **31**: 3335-3346.
18. Williams, R. L. and M. S. Elliot. 1997. Antioxidants in

grapes and wines: Chemistry and health effects. In Shahidi F., *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Application*, Illinois, AOCS Press. 150-173.

(Received Mar. 12, 2007/Accepted Apr. 26, 2007)