

## An Evaluation of the Anti-oxidant Activity of Fermented Defatted Sesame Seeds

Eun-Ji Kim<sup>1</sup>, Seung-Wha Jo<sup>1</sup>, Eun-jung Yim<sup>1</sup>, Kum-Suk Kim<sup>2</sup>, Beom-Seok Choi<sup>2</sup>, Nam-Rye Lee<sup>3</sup> and Do-Youn Jung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang, Jeonbuk 56048, Korea

<sup>2</sup>CHAMGOEUL. CO., LTD., Gimje-si, Jeonbuk 54368, Korea

<sup>3</sup>Defence Agency for Technology and Defense Research Center, Daejeon 34327, Korea

Received January 29, 2020 / Revised March 16, 2020 / Accepted April 29, 2020

This study was conducted to investigate the total lignin content and anti-oxidant activity in extracts of defatted sesame seeds (DSS) fermented with 15 strains of *Bacillus subtilis*. The anti-oxidant activities of DSS were analyzed both before and after fermentation. The total lignan content of the DSS extracts fermented with BCH3678 (1,613.8 mg/l) and BCH3572 (1,599.5 mg/l) were relatively high compared to other strains. Anti-oxidant activity was determined according to phenolic compound and flavonoid content and DPPH radical scavenging rate; the highest total phenolic compound content was provided by the DSS with SRCM103716 at 2,803.3 mg GAE/g which returned total flavonoid content of 1,553.1 mg/g as strong correlation of its anti-oxidant activity. The DSS extract fermented by SRCM103716 at 37°C for 24 hr showed the highest DPPH scavenging rate at 66.5%. The fermented DSS extracts, regardless of strain, demonstrated higher anti-oxidative activity than the unfermented control, and these results suggest that such extracts could be useful as a potential source of bioactive compounds.

**Key words** : Antioxidant activity, *Bacillus subtilis*, defatted sesame,  $\beta$ -glucosidase, lignan

### 서 론

약용식물로 잘 알려져 있는 참깨에 대한 기능성 연구는 오래전부터 진행되어 왔으며 특히 이들의 항산화 물질 탐색과 기능성 물질의 생리활성 등에 대한 관심은 더욱 고조되고 있다[14]. 특히 참깨 중에 함유되어 있는 sesamin, sesamol, sesaminol 등의 리그난 화합물의 간 해독작용과 생체내의 과산화지질 생성억제, 장내 콜레스테롤 흡수억제작용 등 체내생리활성조절 작용으로 인해 기능성 식품으로 보고되고 있다[1, 5, 19, 21]. 또한 참깨에는 tocopherol, flavonoids 등의 생리활성물질들이 유리형 또는 배당체 형태로 존재한다[8, 15, 17, 24]. 참기름 제조 과정에서 생산되는 부산물인 참깨탈지박은 50% 이상이 단백질 성분이며, 포도당과 결합된 수용성 배당체 형태로 존재하는 다양한 페놀성 화합물도 보유하고 있다[14, 23]. 이러한 참깨탈지박 내의 생리활성물질은 유리상태로도 존재하나, 대부분 당류와 결합한 배당체의 형태로 존재하고 있다. 그러나 배당체는 산, 효소 등에 의해 쉽게 가수분해되며, 유리상태가 배당체에 비해 생리활성이 더 높은 것으로 보고되

고 있다[11]. 이렇게 영양학적으로 우수한 참깨박은 재활용에 관한 기술개발이 많이 이루어지지 않아 전복 소재 기업체에서만 부산물로 연간 2,000톤이 생산되나, 일부는 가축사료로 이용되며, 대부분은 폐기되는 실정이다. 최근 이런 참깨탈지박의 유용성분 및 단백질을 토대로 기능성 식품을 개발하는 연구가 진행되고 있으나 이를 산업화하여 적용한 사례는 미비한 실정이다[11, 12]. 한편 콩 발효식품은 발효과정 중 미생물의  $\beta$ -glucosidase에 의해 isoflavone aglycone을 많이 생성하여 체내이용률을 높여 생리활성을 증가한다고 보고되어졌다[13]. 특히 장류 소재인 메주는 *Aspergillus* 속, *Mucor* 속, *Rhizopus* 속 등의 곰팡이류와 더불어 *Bacillus* 속이 중요한 역할을 하는데 이 메주가 장류의 발효원이 되어 장류의 풍미 및 기능성을 부여한다[25]. 따라서 본 연구에서는 단백질이 풍부한 참깨탈지박 및  $\beta$ -glucosidase 활성을 보유한 *Bacillus subtilis*를 이용하여 참깨탈지박을 발효하고 이의 기능성 성분 증가와 관련된 리그난 함량, 페놀 성분 그리고 항산화효능을 비교 평가하여 추후 장류의 소재로 이용하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리 및 $\beta$ -glucosidase 활성 유무 확인

본 연구에서 사용된 균주는 국내에 있는 전통식품에서 분리하였으며, 시료는 된장, 간장, 젓갈, 고추장 등의 100여종을 이용하였다. 각 시료 10 g을 멸균생리식염수 90 ml에 단계희석하여 Nutrient Agar (Difco, MI, USA) 배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양하였다. 이후 집락의 형태적 차이 및 배양 이후

#### \*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2000, Fax : +82-63-653-9590

E-mail : [jdy2534@korea.kr](mailto:jdy2534@korea.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

특성에 따라 균주를 1차 선별하여 분리하였다. 1차 선별 분리 균주 중에서  $\beta$ -glucosidase 활성이 있는 균주를 선별하기 위하여 [Luria-Bertani broth (Difco, Sparks, MD, USA), Agar (BD Difco, Sparks, Marrland, USA)], esculin hydrate (Sigma, MO, USA)를 50:50의 비율로 넣고 D.W.로 녹인 후 pH 7.5로 조정하여 만든 효소활성전용배지에 paper disc를 부착하고, 각 균주의 배양상등액 20  $\mu$ l를 분주하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 정지배양 후 투명한 크기를 측정하여 균집락의 직경에 대한 투명한 직경 비율이 1 이상 되는 경우의 균주를 선별하였다.

**유해 대사산물과 유해효소 생성능 분석**

Indole 생성여부를 확인하기 위하여 TSB (Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 각각의 균주를 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 진탕 배양한 다음 indole reagent dropper (Difco, Detroit, MI, USA)를 첨가하여 배지 표면의 색변화를 비교하여 indole 생성여부를 조사하였고, phenylalanine agar (Fluka, Buchs, Switzerland) 배지에 희선 도말한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하고 10% ferric-chloride (MBcell, Seoul, Korea)를 3-4방울 첨가한 다음 콜로니 주위의 색 변화를 관찰하여 phenyl-pyruvic acid의 생성 여부를 확인하였다.

Urease의 생성 여부를 확인하기 위하여 균주를 urea rapid test kit (MBcell, Seoul, Korea)에 접종한 후, Vaseline oil (MBcell, Seoul, Korea)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 24시간 혐기적 배양한 다음 색 변화를 확인하였다. 또한  $\beta$ -glucuronidase는 tryptone bile X-glucuronide (TBX, Oxoid, Hampshire, UK) 배지에 희선 도말 후, 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양한 다음 색 변화를 관찰하여 측정하였다.

**Biogenic amine 생성능 조사**

균주의 Biogenic amine의 생성능을 조사하기 위하여 0.25% (v/v) glycerol, 0.006% (w/v) bromocresol purple, 0.1% (w/v) histidine or tyrosine이 포함된 Nutrient agar (Difco, MI, USA)를 제조하여 각각의 균주를 희선 도말한 후, 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양한 다음 발색 정도를 비교하여 바이오제닉아민의 생성 여부를 확인하였다.

**참깨탈지박 발효**

본 연구에서 사용한 참깨탈지박은 ㈜참고을(전라북도 김제)로부터 공급받아 사용하였다. 참깨탈지박 발효를 위해 사용된 균주는 전통식품에서 분리한 *Bacillus subtilis* 15종을 이용하였다. *Bacillus subtilis*를 이용한 참깨탈지박의 발효를 위해, 참깨탈지박 무게의 1.5배에 해당하는 물을 첨가하여 121 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 증자하고, 최종 수분함량은 58-60%가 된 시료를 조제한 후, 각각의 균주 배양액을 10<sup>4</sup> CFU/ml가 되도록 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 발효하였다.

**참깨탈지박 발효물의  $\beta$ -glucosidase 활성 정량 측정**

$\beta$ -glucosidase 활성을 측정하기 위하여  $\beta$ -glucosidase activity assay kit (Sigma)를 이용하였다. 상기의 참깨탈지박 발효방법과 동일하게 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 발효하여 얻은 상등액을 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 적당량 희석한 후, 이를  $\beta$ -glucosidase 효소원으로 이용하였다. 대조구로는 증류수 (220  $\mu$ l)를 사용하였으며, Calibrator (200  $\mu$ l calibrator, 20  $\mu$ l water), 샘플(Assay buffer 200  $\mu$ l,  $\beta$ -NPG substrate 8  $\mu$ l, 배양상등액 12  $\mu$ l)구의 UV-Vis spectrophotometer (DU 800, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 하기의 식으로  $\beta$ -glucosidase activity를 확인하였다.

$$\beta\text{-glucosidase activity (Unit/l)} = \frac{(A_{405})_{\text{final}} - (A_{405})_{\text{initial}} * 250 \text{ units/l}}{(A_{405})_{\text{calibrator}} - (A_{405})_{\text{water}}}$$

**참깨탈지박 발효추출물**

각각의 시료 2.5 g에 50 ml 메탄올을 첨가하여 교반하였다. 교반한 다음 1시간 동안 sonicator (JAC Ultrasonic, KODO, Hwaseong, Korea)를 이용하여 추출하였고, 추출 후 원심분리기(416G, Gyrogen Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 사용하여 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리 하여 고형분을 제거한 것을 사용하였다.

**Total lignan 함량 분석 조건**

표준품으로 Sesamol, Sesaminol, Sesamin, Sesamol인을 이용하여 검량선을 작성하였다. 시료의 총 리그난 함량을 측정하기 위해 High performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1200, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)와 column으로서 Capcell PAK MGII C18 Column (4.6 $\times$ 150 mm ID, 3  $\mu$ m)을 기본 장비 구성으로 분석하였으며, 조건은 Table 1과 같다.

**Total polyphenol 함량 측정**

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법을 응용하여 추출된 시료를 농도별로 적절히 희석한 후 측정하였다[4]. 각 농도별 시료 200  $\mu$ l에 Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Darmstadt,

Table 1. HPLC analysis conditions for lignin contents

Conditions	
HPLC	Agilent 1200 series HPLC
Detection	Waters 996 Photodiode Array Detector UV 285 nm
Mobile phase	MeOH: Water (80:20)
Column	Capcell PAK MGII C18 Column (4.6 $\times$ 150 mm ID, 3 $\mu$ m)
Column temp.	40 $^{\circ}$ C
Flow rate	0.7 ml/min
Injection	10 $\mu$ l

Germeny) 12.5  $\mu$ l를 혼합하여 교반한 뒤, 120분 동안 상온에서 방치하여 반응시켰다. 반응액의 흡광도 값은 UV-Vis spectrophotometer (DU 800, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 750 nm에서 분석하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid (sigma)를 분석시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였다.

### Total flavonoid 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Davis 변법에 따라 추출된 시료를 농도별로 적절히 희석한 후 측정하였다. 각 농도별 시료 0.5 ml에 10% aluminum nitrate (Sigma) 0.1 ml, 1 M potassium acetate (Sigma) 0.1 ml 및 ethanol 4.3 ml를 차례로 가하여 혼합한 후 상온에서 40분간 방치하여 반응시켜 UV-Vis spectrophotometer (DU 800, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA) 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 rutin (Sigma)을 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

### DPPH radical 소거능 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 전자공여작용(electron donating abilities, EDA)에 대한 효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다[15]. 시료 50  $\mu$ l에 0.15 mM DPPH solution (99% MeOH에 용해) 150  $\mu$ l을 가한 후 30분간 상온에서 방치한 후 UV-Vis spectrophotometer (DU 800, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA) 흡광도 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 시료는 각각 methanol에 20배 희석하여 2시간 동안 추출하여 초음파처리 후 상등액을 사용하였다. 각 시료의 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 시료 첨가구 및 무첨가구 간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었으며, 양성 대조군으로는 ascorbic acid (Sigma)를 이용하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{(A_{405})_{\text{calibrator}} - (A_{405})_{\text{water}}}\right) \times 100$$

### 최종 선발 균주의 동정 및 계통도

선발된 균주 1종을 Luria-Bertani broth (Difco, Sparks, MD, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 다음 균체를 회수하여 genomic DNA를 추출하였고, 추출한 DNA는 universal primer인 27F와 1492R을 이용하여 증폭하였고 이후 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에 16S rRNA sequence 분석을 의뢰하였고, 분석된 염기서열은 NCBI의 data base와 비교하여 동정하였다. 계통도 분석은 Tamura-Neimodel에 기초한 Maximum Likelihood 방법[22]을 사용하여 작성하였으며, 산출한 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 bootstrap 분석으로 1,000회 실시하여 산출하였다.

### 통계 분석

모든 실험은 3회 이상 반복하여 결과를 도출했으며 통계 프로그램(SPSS ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균 $\pm$ 표준편차(Mean  $\pm$  S.D)로 계산하였다. 각 시험군 간의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 ANOVA (one-way analysis of variance test)를 실시한 후 유의성이 있는 경우,  $p < 0.05$  미만일 때 Ducan's multiple range test로 사후 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 고초균 분리 및 특성 확인

$\beta$ -glucosidase 활성을 갖는 고초균을 선별하기 위하여 국내의 된장, 간장, 젓갈, 고추장 등의 100여종을 시료로 이용하여 균주를 분리하였다. 이후 집락의 형태적 차이 및 배양 이후 특징에 따라 균주를 1차 선별하여 분리하였다. 1차 선별 분리 균주 200여종 중에서  $\beta$ -glucosidase 활성이 있는 고초균을 선별하여 -80°C에 보관하여 사용하였다. 참깨탈지박 발효 소재로 활용하기 위하여 선별균주가 tryptophanase에 의해 tryptophane을 분해하여 생성되는 발암 관련 물질인 indole과 phenyl-pyruvic acid, 발암 관련 효소인 urease와  $\beta$ -glucuronidase를 생성하는지를 확인하는 실험을 진행한 결과를 Table 2에 나타내었다. 15종 모두 유해 대사산물과 유해효소를 생성하지 않는 것으로 확인되어 안전성을 확보하였다. Biogenic amine은 미생물에 의하여 탈탄산효소활성에서 유리아미노산이 탈탄산 작용으로 생성되는 질소화합물로 히스타민과 티라민이 널리 알려져 있다. 이는 과량으로 섭취하게 되면 고혈압, 알레르기, 복통, 두통 등을 유발한다고 보고되어 있다[20]. 이는 식품의 안전성 측면에서 부작용이 알려지면서 특히 최근 국내 전통발효식품인 장류, 김치, 젓갈 등에서도 biogenic amine의 유해성이 중요한 문제가 되었다[4, 10]. 선별 균주의 biogenic amine의 생성에 대하여 확인한 결과, 15종 모두 biogenic amine의 유해성에 대하여 안전한 분리 균주임이 확인되었다.

### 참깨탈지박 발효물의 $\beta$ -glucosidase 활성

참깨탈지박 소재의 발효 전과 후에 따른  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정한 결과(Table 3), 15종 모두 발효 전에 비하여 발효 후에  $\beta$ -glucosidase 활성이 높아지는 것을 확인하였다. 이 중 특히, SRCM103716 발효물에서 24시간 이후 16.88 unit/l의 가장 높은 활성을 보였다. 이는 발효에 의해 다량 분비되는  $\beta$ -glucosidase 효소가 참깨탈지박의 비배당체 성분을 배당체로 전환시켜 참깨탈지박에 적용 시 생리활성 물질이 증가할 것으로 판단된다.

### 참깨탈지박 발효 추출물의 total lignan 함량

참깨탈지박 소재의 발효 전과 후에 따른 추출물의 총 리그

Table 2. Comparison of  $\beta$ -glucosidase activities, harmful substances, harmful enzyme activities and biogenic amine for 15 strains

Strain	source	$\beta$ -glucosidase	Harmful substances		Harmful enzymes		Biogenic amines	
			Indole	Phenylpyruvic acid	$\beta$ -glucuronidase	Urease	histamine	tyramine
BCH3509	Ganjang	+ <sup>1)</sup>	- <sup>2)</sup>	-	-	-	-	-
BCH3520	Ganjang	+	-	-	-	-	-	-
BCH3558	Gochujang	+	-	-	-	-	-	-
BCH3572	Doenjang	+	-	-	-	-	-	-
BCH3623	Doenjang	+	-	-	-	-	-	-
BCH3637	Doenjang	+	-	-	-	-	-	-
BCH3678	Doenjang	+	-	-	-	-	-	-
BCH3700	Jeotgal	+	-	-	-	-	-	-
BCH3704	Jeotgal	+	-	-	-	-	-	-
BCH3711	Jeotgal	+	-	-	-	-	-	-
SRCM103716	Jeotgal	+	-	-	-	-	-	-
BCH3723	Cheonggukjang	+	-	-	-	-	-	-
BCH3751	Cheonggukjang	+	-	-	-	-	-	-
BCH3755	Cheonggukjang	+	-	-	-	-	-	-
BCH3765	Cheonggukjang	+	-	-	-	-	-	-

The experiments were carried out in triplicate ( $p < 0.05$ ).

<sup>1)</sup>+, positive.

<sup>2)</sup>-, no production.

난 함량의 변화를 관찰한 결과(Fig. 1), 15종 모두 발효 전에 비해 발효 후 전체 리그난 함량이 증가하였다. 발효 이후 BCH 3678, BCH3572 발효 추출물에서 총 리그난 함량이 각각 약 1,613.8 mg/l, 1,599.5 mg/l으로 가장 높았다. 다음으로는 BCH 3623, BCH3558 그리고 SRCM103716 발효 추출물에서 각각

1,534.9 mg/l, 1,528.2 mg/l, 1,521.8 mg/l로 두번째로 높게 나타났다. SRCM103716은  $\beta$ -glucosidase 활성은 높게 나타났지만 총리그난 함량은 상이한 결과를 보여 추후 생물전환된 구체적인 성분 및 메커니즘에 대한 연구는 필요할 것으로 사료된다. 그러나 발효전과 발효후의 리그난 성분의 증가는 리그난 성분이 발효과정 중 균주가 분비하는 효소에 의해 증가율을 높인 것으로 판단되었다. 또한 균주 및 효소를 이용한 생물전환을 통해 첨가가 가진 리그난 함량이 유의적으로 증가되는 것을 보고한 연구와 유사한 결과를 나타내었다[8].

Table 3. Comparison of  $\beta$ -glucosidase activities of the fermented defatted sesame seeds with *B. subtilis* 15 strains

Strain	$\beta$ -glucosidase activity (unit/l)	
	0 hr	24 hr
BCH3509	3.05±0.21 <sup>a</sup>	9.96±0.95 <sup>cde</sup>
BCH3520	3.05±0.21 <sup>a</sup>	9.66±0.59 <sup>def</sup>
BCH3558	3.05±0.21 <sup>a</sup>	10.59±0.64 <sup>c</sup>
BCH3572	3.05±0.21 <sup>a</sup>	7.97±0.87 <sup>hi</sup>
BCH3623	3.05±0.21 <sup>a</sup>	8.85±0.35 <sup>efgh</sup>
BCH3637	3.05±0.21 <sup>a</sup>	9.26±0.21 <sup>efg</sup>
BCH3678	3.05±0.21 <sup>a</sup>	9.32±0.15 <sup>defg</sup>
BCH3700	3.05±0.21 <sup>a</sup>	8.26±0.68 <sup>ghi</sup>
BCH3704	3.05±0.21 <sup>a</sup>	8.70±0.49 <sup>fgh</sup>
BCH3711	3.05±0.21 <sup>a</sup>	11.72±0.65 <sup>b</sup>
SRCM103716	3.05±0.21 <sup>a</sup>	16.88±0.26 <sup>a</sup>
BCH3723	3.05±0.21 <sup>a</sup>	9.35±0.54 <sup>defg</sup>
BCH3751	3.05±0.21 <sup>a</sup>	10.42±0.68 <sup>cd</sup>
BCH3755	3.05±0.21 <sup>a</sup>	7.42±0.61 <sup>i</sup>
BCH3765	3.05±0.21 <sup>a</sup>	8.85±0.84 <sup>efgh</sup>

Values represent the mean  $\pm$  SD (n=3).

Means in each column with different subscripts letters are significantly different at Duncan's test ( $p < 0.05$ ).

**총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정**

참깨탈지박 소재의 발효 전과 발효 후에 따른 추출물의 총 폴리페놀 함량의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 발효 후 대조구를 제외한 모든 추출물에서 폴리페놀 함량이 증가하는 것을 확인하였으며, 이 중 SRCM103716 발효 추출물이 2,803.3 mg/l로 가장 높게 나타났다. 페놀성 화합물은 분자 내 Phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 수소를 공유하며 결합하는 성질이 있어 활성산소종을 효과적으로 제거해주면서 산화 및 노화 억제 기능을 하며, 플라보노이드는 폴리페놀계 화합물 중 하나로 역시 항산화 활성뿐만 아니라 다양한 생리활성 기능을 한다고 알려져 있다[2]. 참깨탈지박 소재의 발효 전과 후에 따른 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과(Fig. 3), 발효 후 대조구와 BCH3723, BCH3700 발효 추출물을 제외한 13종에서 총 플라보노이드 함량이 증가하는 것을 확인하였으며, 이 중에서 특히 SRCM103716, BCH3678의 2종은 각각 1,553.1 mg/l, 1,488.7 mg/l로 가장 높

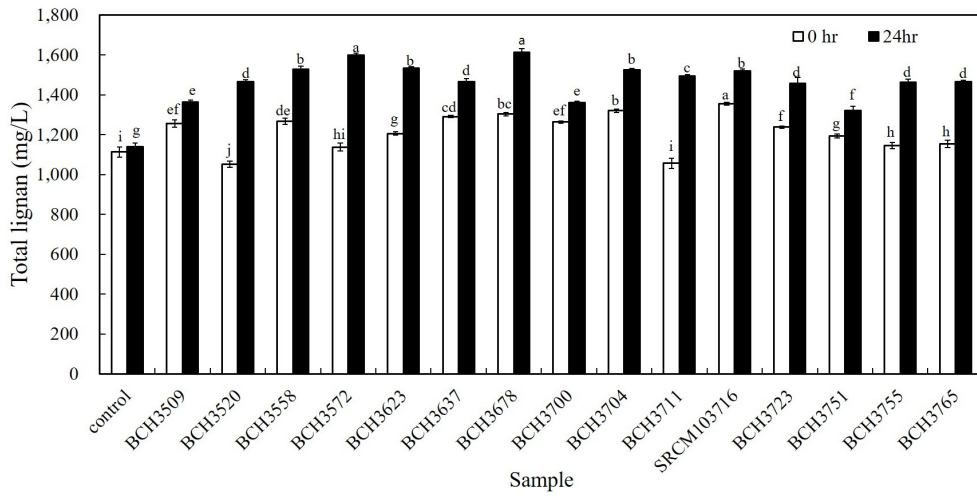


Fig. 1. Total lignan contents of extracts from the fermented defatted sesame seeds with *B. subtilis* 15 strains. Values represent the mean  $\pm$  SD (n=3). Means in each column with different subscripts letters are significantly different at Duncan's test ( $p < 0.05$ ).

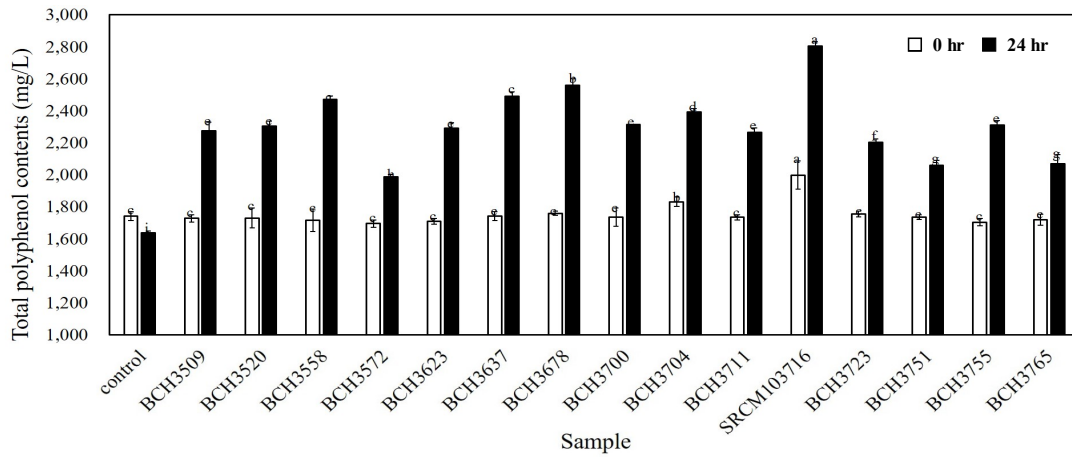


Fig. 2. Total polyphenol contents of extracts from the fermented defatted sesame seeds with *B. subtilis* 15 strains. Values represent the mean  $\pm$  SD (n=3). Means in each column with different subscripts letters are significantly different at Duncan's test ( $p < 0.05$ ).

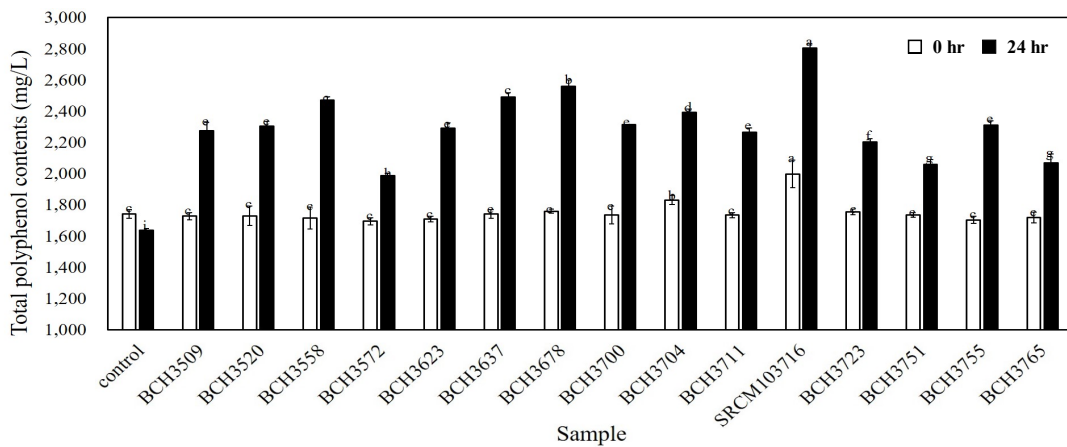


Fig. 3. Total flavonoids contents of extracts from the fermented defatted sesame seeds with *B. subtilis* 15 strains. Values represent the mean  $\pm$  SD (n=3). Means in each column with different subscripts letters are significantly different at Duncan's test ( $p < 0.05$ ).

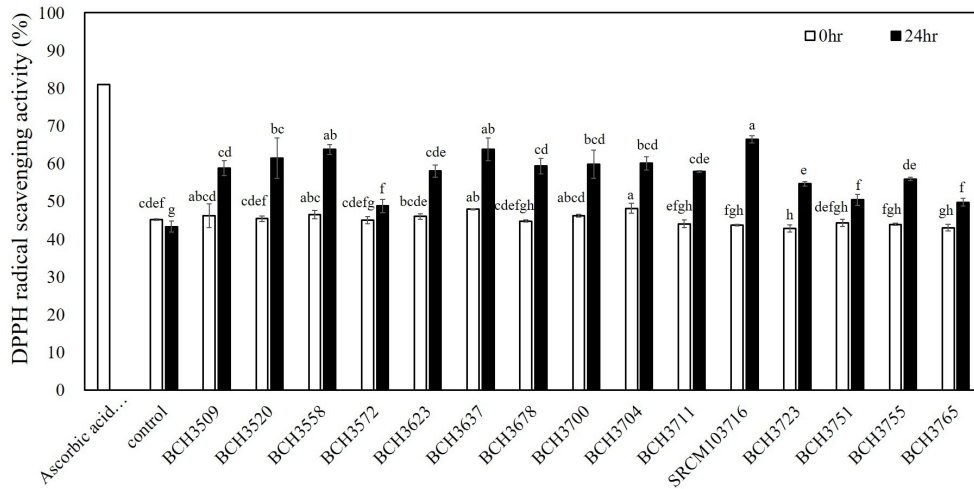


Fig. 4. DPPH radical scavenging activities of extracts from the fermented defatted sesame seeds with *B. subtilis* 15 strains. Values represent the mean  $\pm$  SD (n=3). Means in each column with different subscript letters are significantly different at Duncan's test ( $p < 0.05$ ).

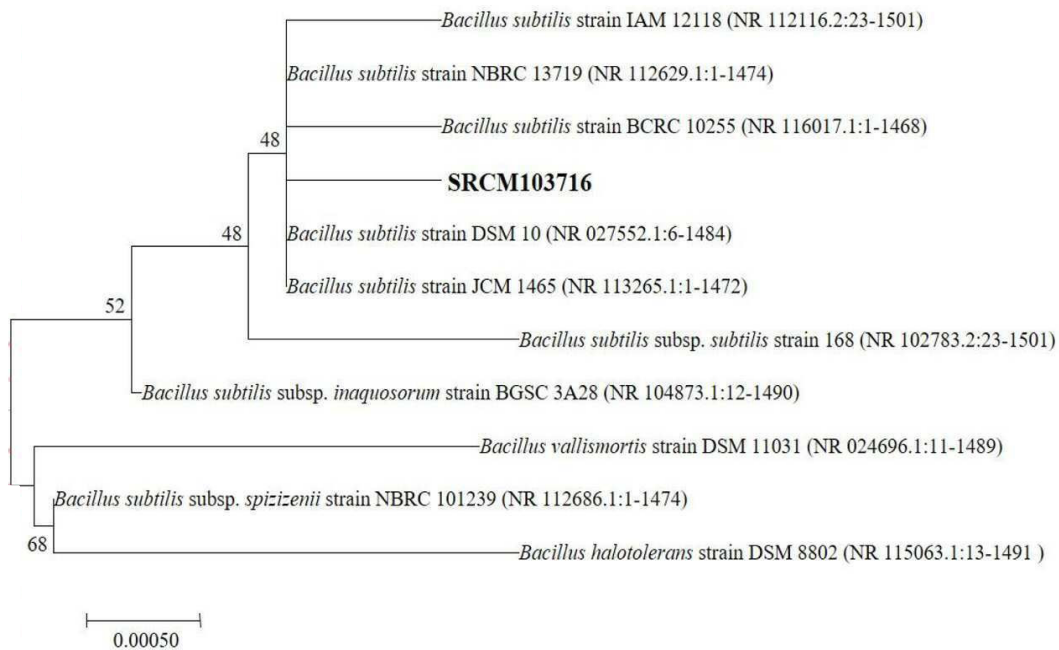


Fig. 5. Molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood method.

게 증가되었다.

상기의 결과를 통하여 참깨탈지박 발효물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 발효 군주에 따라 차이가 있으며, 발효 전에 비해 발효 후에 대부분 항산화 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 군주가 참깨탈지박의 발효에 관여하여 효소를 생산하고 생리활성 물질의 증대에 영향을 미친 것으로 판단된다. 15종 군주 중 SRCM103716, BCH3678의 2종은 가장 높은 증가율을 보여주었으며, 이는 총 리그난 함량이 발효 후에 증가하는 경향과 유사하게 나타났다.

**참깨탈지박 발효 추출물의 DPPH radical 소거 활성능 측정**

참깨탈지박 소재의 발효 전과 후에 따른 DPPH radical 소거 활성능 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 발효 전에는 43.24~45.34%의 소거능을 보였으나, 발효 후, 모든 추출물에서 소거능이 증가하는 경향을 보였다. 이 중 발효 24시간 이후 SRCM103716 발효 추출물에서 약 66.5%로 가장 높게 나타났다. 이러한 연구결과는 SRCM103716 군주의 발효 과정을 통해 DPPH 활성 라디칼을 저해시켜 산화적 스트레스의 방어기작으로 작용한 것으로 판단된다.

또한 전자공여능은 phenolic acid와 flavonoids 및 기타

phenol성 물질에 대한 항산화의 지표라 하여 환원력이 큰 물질일수록 전자공여능이 높다고 보고되어[8] 참깨탈지박 발효 추출물의 총폴리페놀 및 총플라보이드 함량의 결과와 유사하였다.

따라서 본 연구에서 장류소재로 이용가능한 참깨탈지박 발효물 제조용 균주는 항산화활성과 총 리그난 함량이 높은 *B. subtilis* SRCM103716을 최종 선발하였다.

### 최종 선발 균주의 동정 및 계통도

참깨탈지박 소재의 발효 균주로 최종 선발된 SRCM103716의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과를 이용하여 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLAST 결과, *Bacillus* 속에 속하며, *B. halotolerans*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. vallismortis*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* 등의 species 수준에서 구별되는 것을 확인하였다. *Bacillus subtilis*와 99%의 상동성을 보여 *Bacillus subtilis*로 동정되었다(Fig. 5). Sequence alignment 분석 결과, SRCM103716은 최종적으로 *B. subtilis* SRCM103716로 명명하였으며, 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 *B. subtilis* KFCC11832P로 기탁하였다.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### References

- Akimoto, K., Kitagawa, Y., Akamatsu, T., Hirose, N., Sugano, M., Shimizu, S. and Yamada, H. 1993. Protective effects of sesamin against liver damage caused by alcohol or carbon tetrachloride in rodents. *Ann. Nutr. Metab.* **37**, 218-224.
- Choi, S. Y., Cho, H. S. and Sung, N. J. 2006. The antioxidative and nitrite scavenging ability of solvent extracts from wild grape (*Vitis Coignetia*) skin. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 961-966.
- Folin, O. and Denis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-243.
- Halász, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* **5**, 42-49.
- Hirata, F. 1996. Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. *Atheroscler.* **122**, 135-136.
- Jung, T. D., Shin, G. H., Kim, J. M., Oh, J. W., Choi, S. I., Lee, J. H. and Jung, C. S. 2016. Changes of lignan content and antioxidant activity of fermented sesame (sesame indicum L.) by cultivars. *FASEB J.* **30**, 1174-1183.
- Kang, N. S. and Lee, J. H. 2011. Characterisation of phenolic phytochemicals and quality changes related to the harvest times from the leaves of Korean purple perilla (*Perilla frutescens*). *Food Chem.* **124**, 556-562.
- Kang, Y. H., Park, Y. K., Oh, S. R. and Moon, K. D. 1995. Studies on the physiological functionality of ine needle and mugwort extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 978-984.
- Kim, D. H., Lee, G. Y., Kim, N. M. and Lee, J. S. 2003. Physiological functionality of various extracts from danmemil and legumes. *Kor. J. Food Nutr.* **16**, 347-352.
- Kim, J. H., Ryu, S. J., Lee, J. W., Kim, Y. W., Hwang, H. J. and Kwon, O. K. 2013. Investigation on biogenic amines in plant-based minor Korean fermented foods. *J. Appl. Biol. Chem.* **56**, 113-117.
- Kumamoto, H., Matsubara, Y., Iizuka, Y., Okamoto, K. and Yokoi, K. 1985. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in kinkan (*Fortunella japonica*) peelings. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2613-2618.
- Kurowska, E. M., Dresser, G. K., Deutsch, L., Vachon, D. and Khalil, W. 2003. Bioavailability of omega-3 essential fatty acids from perilla seed oil. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**, 207-212.
- Lee, K. H., Choi, H. S., Choi, Y. H., Park, S. Y. and Song, J. 2014. Changes in isoflavone content and quality characteristics of *Cheonggukjang* prepared with *Bacillus subtilis* HJ18-3 and KACC 15935. *Kor. J. Food Preserv.* **21**, 121-128.
- Mohdaly, A. A., Sarhan, M. A., Smetanska, I. and Mahmoud, A. 2010. Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *J. Sci. Food Agric.* **90**, 218-226.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
- Nakazawa, T. and Ohsawa, K. 2000. Metabolites of orally administered *Perilla frutescens* extract in rats and humans. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 122-127.
- Nam, M. J. and Chung, H. Y. 2008. Oxidative stability of sesame oil prepared from black sesame flour. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **40**, 141-145.
- Park, S. J. and Kang, M. H. 2004. Functional properties of sesame seed. *Food Industry Nutr.* **9**, 31-40.
- Ryu, S. N., Kim, K. S. and Lee, E. J. 2002. Current status and prospects of quality evaluation in sesame. *Kor. J. Crop. Sci.* **47**, 140-149.
- Seo, J. W., Yang, H. J., Jeong, S. J., Ryu, M. S., Ha, G., Jeong, S. Y. and Jeong, D. Y. 2018. Characterization of *Lactobacillus brevis* SCML 432 isolated from *Meju* in *Sunchang* and optimization of its culture conditions by statistical methods. *Kor. J. Food Preserv.* **25**, 397-410.
- Sugano, M., Inoue, T., Koba, K., Yoshida, K., Hirose, N., Shinmen, Y., Akimoto, K. and Amachi, T. 1990. Influence of sesame lignans on various lipid parameters in rats. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2669-2673.
- Tamura, K. and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512-526.
- Yamamoto, H. and Ogawa, T. 2002. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria.

- Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 921-924.
24. Yang, S. Y., Hong, C. O., Lee, H., Park, S. Y., Park, B. G. and Lee, K. W. 2012. Protective effect of extracts of *Perilla frutescens* treated with sucrose on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem.* **133**, 337-343.
25. Yoo, S. K., Cho, W. H., Kang, S. M. and Lee, S. H. 1999. Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybena paste and soybean sauce. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 113-117.

### 초록 : 참깨탈지박 발효 추출물의 항산화 활성 평가

김은지<sup>1</sup> · 조승화<sup>1</sup> · 임은정<sup>1</sup> · 김금숙<sup>2</sup> · 최범석<sup>2</sup> · 이남례<sup>3</sup> · 정도연<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>재단법인 발효미생물산업진흥원, <sup>2</sup>(주)참고을, <sup>3</sup>국방기술품질원 국방신뢰성연구센터)

본 연구에서는 참기름 제조과정의 부산물인 참깨탈지박을 고초균으로 발효하여 이를 총 리그난 함량 및 항산화 활성을 평가한 후 최종 균주를 선발하였고, 참깨탈지박 발효 추출물의 기능성을 확보하고자 하였다. 국내의 전통발효식품으로부터 분리 균주 중  $\beta$ -glucosidase 활성을 보유한 고초균 15종을 이용하여 참깨탈지박에 37°C에서 24시간 발효하였다. 참깨탈지박 발효 전과 발효 후의  $\beta$ -glucosidase 정량, 총 리그난 함량, 총폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 그리고 DPPH 라디칼 소거능을 분석하였다.  $\beta$ -glucosidase 활성 측정 결과, SRCM103716 발효 추출물에서 16.88 unit/l의 높은 활성을 보였다. 총 리그난 함량은 BCH3678, BCH3572 발효 추출물에서 각각 약 1613.8 mg/l, 1599.5 mg/l로 가장 높았다. BCH3623, BCH3558, SRCM103716 발효 추출물에서 각각 1534.9 mg/l, 1528.2 mg/l, 1521.8 mg/l로 두번째로 높게 나타났다. 총 폴리페놀 함량은 SRCM103716 발효 추출물이 2803.3 mg/l로 가장 높게 나타났고, 총 플라보노이드 함량은 SRCM103716, BCH3678의 2종이 각각 1553.1 mg/l, 1488.7 mg/l로 가장 높게 증가되었다. DPPH 라디칼 소거능을 확인 한 결과, SRCM103716 발효 추출물에서 약 66.5%로 가장 높게 증가하였다. 이에 최종적으로 *B. subtilis* SRCM103716를 참깨탈지박 발효균주로 선발하였다. 이들 결과를 바탕으로 리그난 및 각종 항산화 성분 등의 기능성 성분을 함유하는 발효 참깨탈지박을 확보하여 추후 장류 소재로 이용하고자 하였다.