

반응표면 분석에 의한 *Bacillus subtilis* DC-2의 색소생성 및 그 생성물의 항산화성에 대한 최적조건

최응규 · 지원대 · 정현채 · 최동환 · 정영건[†]

영남대학교 식품가공학과

Optimum Condition for Pigment Production and Antioxidative Activity of the Products by *Bacillus subtilis* DC-2 with Response Surface Methodology

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 712-749, Korea

Abstract

The conditions for color intensity and electron donating ability to α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl (DPPH) of *Bacillus subtilis* DC-2 were investigated. Temperature, pH and cultivation time were chosen as three factors, and the optimal conditions of color intensity and DPPH was determined with response surface methodology. Color intensity was affected by cultivation temperature ($p < 0.1$). DPPH was influenced by cultivation temperature ($p < 0.05$) and pH ($p < 0.1$). But cultivation time was affected neither color intensity nor DPPH. Optimal conditions of color intensity with *Bacillus subtilis* DC-2 were appeared at cultivation temperature of 39.25°C, pH 8.83 and cultivation time of 84.41hrs. Optimal conditions of DPPH with *Bacillus subtilis* DC-2 were revealed at cultivation temperature of 39.19°C, pH 8.84 and cultivation time of 82.21hrs.

Key words: *Bacillus subtilis* DC-2, pigment generation, electron donating ability, DPPH, response surface methodology

서 론

한국 전통적인 대두 발효식품에 있어서 주된 세균이 *Bacillus*속이라는 사실은 이미 널리 알려진 사실로써, 이들 *Bacillus*속 균에 의해 발효기간 중 원료 대두로부터 한국 전통 발효식품의 독특한 맛, 향 및 색이 생성되게 된다(1-3).

전통 장류의 항산화 효과는 대부분이 멜라노이딘 관련물질에 기인한 것으로 밝혀져 있다. 문과 최(4) 및 최 등(5)은 양조간장의 저장 중 우육지방질에 대한 양조간장 및 된장의 항산화 효과를 살핀 결과 갈변반응물질이 가장 유력한 항산화 효과의 원인 물질로 추정하였다. 최 등(6)은 linoleic acid가 함유된 모델시스템에 있어서 지방산의 산화반응에 미치는 양조간장의 항산화 특성에 대한 연구를 통하여 양조간장이 산화반응 과정 중 과산화물을 억제시켰다고 보고하였다. 최 등(7,8)은 양조간

장에서 melanoidin related products(MRPs)를 분리하여 항산화 효과와 저장안정성을 규명하였으며, 문과 최(9)는 양조간장 중의 항산화 효력을 가진 물질을 분리하고 그 물질의 구조적인 특성을 알아본 결과 전형적인 멜라노이딘의 특성을 나타내었다고 보고하였다.

그러나, 한국 전통 대두 발효식품의 주된 발효균인 *Bacillus*속 균 중에서 protease 생성능이 뛰어난 항산화성을 가진 색소를 생성하는 균을 이용하여 전통 대두 발효식품의 생리적 기능성을 조사한 연구는 전무한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 전통 대두 발효식품으로 부터 색소 및 protease 생성능이 우수한 *Bacillus subtilis* DC-2 균주(10)를 분리하여 색소 생성과 그 배양액의 항산화성에 대한 최적 조건을 확인하여 전통 대두 발효식품의 기능성을 검토하는 기초자료로 제시하고자 한다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주 및 배지는 전보(10)에서 사용한 것과 같다.

색소 생성능 측정

색소 생성능은 배양온도, pH, NaCl 및 배양시간에 따라 조사하였다. 각각의 조건별로 배양한 배양액을 12,000 rpm에서 30분간 원심분리(HITACHI CR21E)한 후 상정액을 취하여 spectrophotometer(Shimadzu UV1201)를 사용하여 390nm(10)에서 흡광도를 조사하였다.

항산화성 측정

항산화성 시험은 α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl(DPPH)를 이용한 방법(11)으로 전자공여성을 측정하였다. 즉 DPPH 16mg을 100ml absolute ethanol에 용해한 후 증류수 100ml를 가하고 filter paper(Whatman No. 1)로 여과하였다. 이 여액 5ml에 배양액을 12,000rpm에서 30분간 원심분리(Hitachi CR21E)한 후 취한 상정액 1ml를 가하여 혼합한 후 spectrophotometer를 이용하여 528 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다.

색소 생성과 항산화성의 최적조건을 위한 실험계획

색소 생성과 항산화성에 대한 최적 배양조건을 구하기 위한 실험계획으로서 중심합성계획을 사용하였으며, 반응표면 회귀분석을 위해 SAS(Statistical Analysis System) program을 사용하였다. 중심합성계획(12-14)에서 세개의 배양조건은 온도(X_1), pH(X_2), 배양시간(X_3)이었으며, 각 배양조건들은 -2, -1, 0, 1, 2로서 다섯 단계로 부호화하였고 실험값은 Table 1에 나타내었다. 중심합성계획에서 중심점의 수는 제한없이 하나 이상이므로 여기에서는 한개의 중심점을 (0,0,0)으로 설정하였다. 그리고 축점의 수는 배양조건이 세개이므로 여섯개의 축점으로 하였으며, 축점에서 α 및 $-\alpha$ 값은 각각 2 및 -2로 하고 축점으로 $(-\alpha, 0, 0)$, $(\alpha, 0, 0)$, $(0, -\alpha, 0)$, $(0, \alpha, 0)$, $(0, 0, -\alpha)$, $(0, 0, \alpha)$ 으로 설정하였다. 그리고 요인 실험점은

Table 1. Levels of cultivation conditions in experimental design

X_i	Cultivation conditions	Level				
		-2	-1	0	1	2
X_1	Temperature(°C)	27	32	37	42	47
X_2	pH	6.5	7.5	8.5	9.5	10.5
X_3	Time(hrs.)	24	48	72	96	120

로는 2^3 즉, 여덟개의 요인 실험점으로 하였으며, 각각의 요인 실험점은 (-1,-1,-1), (-1,-1,1), (-1,1,-1), (1,-1,-1), (-1,1,1), (1,-1,1), (1,1,-1), (1,1,1)로 설정하였다. 각각의 실험은 5반복으로 행하였으며, 세가지 배양조건에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

여기서 Y는 색도와 항산화성, X_1 , X_2 , X_3 은 배양조건, b_0 는 절편, b_n 은 회귀계수이다.

결과 및 고찰

배양조건에 따른 색소 생성

색소 생성균 *Bacillus subtilis* DC-2의 색소 생성에 영향을 미치는 각각의 배양조건을 조사하였다. 배양온도가 색소 생성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같이 35°C 이상의 비교적 높은 온도에서 색소 생성능이 강한 것으로 나타났으며 37°C에서 0.7 이상의 최대의 색소 생성능을 보였다. pH의 경우 Fig. 2에서와 같이 pH 7.0~9.0 사이의 약알칼리 범위에서 색소가 비교적 잘 생성되었으며, 특히 pH 8.5에서 최대의 색소 생성능을 보였다. 배양시간의 경우 Fig. 3에서 보는 바와 같이 배양 36시간 부터 색소가 서서히 생성되어 72시간에서 최적의 색소 생성능을 보였다. NaCl을 0~6%까지 첨가하여 37°C에서 48시간 진탕배양한 후 색소 생성을 관찰한 결과는 Fig. 4와 같이 NaCl이 3% 첨가되었을 때부터

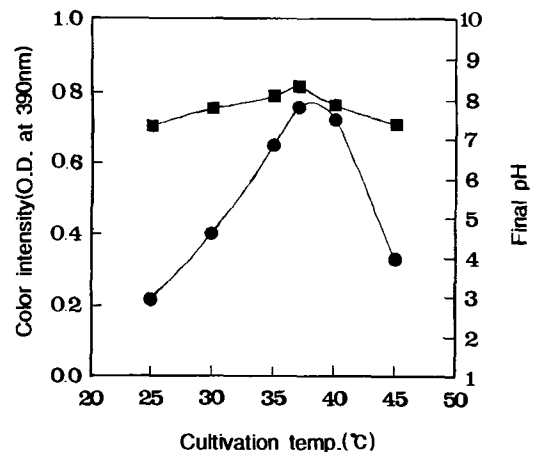


Fig. 1. Effect of cultivation temperature on color intensity by *Bacillus subtilis* DC-2.

The medium was composed of 0.1% dextrose, 0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.05% sodium citrate, 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.

■ : pH

● : O.D. at 390nm

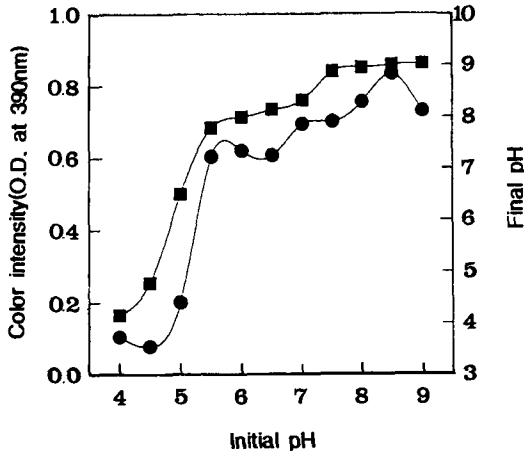


Fig. 2. Effect of cultivation pH on color intensity by *Bacillus subtilis* DC-2.
 The medium was composed of 0.1% dextrose, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O and 0.1%(NH₄)₂SO₄.
 The strain was cultivated for 48 hours at 37°C.
 ■ : pH
 ● : O.D. at 390nm

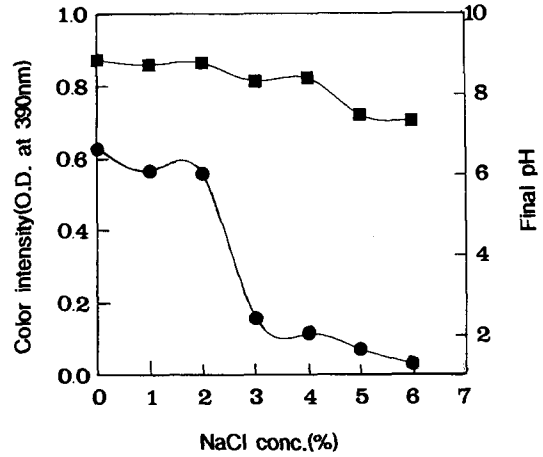


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on color intensity by *Bacillus subtilis* DC-2.
 The medium was composed of 0.1% dextrose, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O and 0.1% (NH₄)₂SO₄.
 The strain was cultivated for 72 hours at 37°C, pH 7.0.
 ■ : pH
 ● : O.D. at 390nm

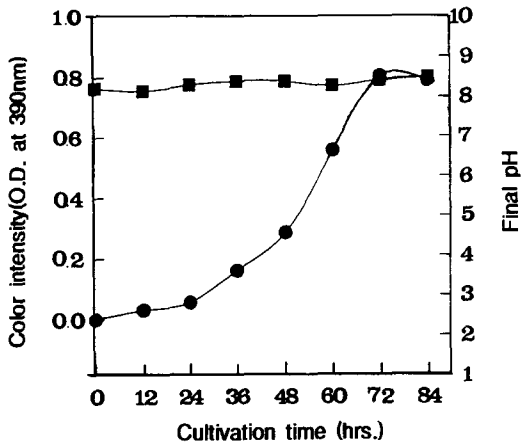


Fig. 3. Effect of cultivation time on color intensity by *Bacillus subtilis* DC-2.
 The medium was composed of 0.1% dextrose, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O and 0.1%(NH₄)₂SO₄.
 The strain was cultivated for 48 hours at 37°C and pH 8.5.
 ■ : pH
 ● : O.D. at 390nm

색소 생성능이 급격히 감소되었고 6% 이상의 첨가시 색소 생성능이 거의 사라지는 것을 알 수 있었다.

신 등(15)은 *Bacillus licheniformis* SSA3를 이용하여 색소 생성 조건을 조사한 결과 pH 6.5에서 색소가 가장 많이 생성되었으며 배양 7일째 색소가 생성되기 시작하였다고 보고하여 본 균주가 내는 색소의 생성조건

과는 상이하였으며, NaCl이 색소 생성을 저해한다는 결과는 본 실험과 동일하였다. 한편, 배양 후 pH의 변화는 미생물이 생육함에 따른 배지성분의 이용과 기타 여러 가지 분비물로 인한 것으로 보고되어 있다(16-18).

색소 생성과 항산화성의 최적조건

이상의 실험에서 *Bacillus subtilis* DC-2균의 색소 생성에 영향을 미치는 인자를 온도, pH, 배양시간의 3요인으로 정하고 반응표면분석을 통하여 색소 생성 및 항산화성의 최적 조건을 조사하였다.

본 실험에 이용한 중심합성계획은 Table 2에서 보는 바와 같이 표준화된 값을 사용하였다. 표준화된 값은 측정단위가 다른 변수들과 동등한 비교가 가능하도록 해주며, 다중공선성을 제거하고자 사용하였다.

색도에 대한 반응표면은 Fig. 5에서와 같이 maximum point를 가지고 있는 것으로 나타났으며, 이에 대한 회귀분석 결과는 Table 3에 나타내었다. 세가지 배양조건인 온도(27~47°C), pH(6.5~10.5) 및 배양시간(24~120hrs.)이 변할 때 색도에 대한 반응표면 회귀식은 다음과 같았다.

$$Y_1 = 0.3979 + 0.0940X_1 + 0.0508X_2 + 0.0398X_3 - 0.0260X_1X_2 - 0.0070X_1X_3 - 0.0250X_2X_3 - 0.1939X_1^2 - 0.1104X_2^2 - 0.0529X_3^2 \quad (1)$$

색도에 대한 회귀식의 R²는 linear에서 0.4982로 10% 유의수준에서 유의성이 인정되었으나 quadratic과 in-

Table 2. Experimental data for color intensity and electron donating ability under different conditions of cultivation temperature, time and pH

Exp. No.	Cultivation conditions			Color	DPPH
	Temp.(°C)	pH	Time(hr.)		
1	-1(32)	-1(7.5)	-1(48)	0.161	0.465
2	1(42)	-1(7.5)	-1(48)	0.329	1.088
3	-1(32)	1(9.5)	-1(48)	0.260	1.082
4	1(42)	1(9.5)	-1(48)	0.400	1.108
5	-1(32)	-1(7.5)	1(96)	0.197	0.961
6	1(42)	-1(7.5)	1(96)	0.356	1.137
7	-1(32)	1(9.5)	1(96)	0.269	0.939
8	1(42)	1(9.5)	1(96)	0.404	1.311
9	0(37)	0(8.5)	0(72)	0.421	1.354
10	-2(27)	0(8.5)	0(72)	0.178	0.668
11	2(47)	0(8.5)	0(72)	0.253	1.068
12	0(37)	-2(6.5)	0(72)	0.270	0.721
13	0(37)	2(10.5)	0(72)	0.328	1.213
14	0(37)	0(8.5)	-2(24)	0.296	0.834
15	0(37)	0(8.5)	2(120)	0.417	1.244

Numbers in parentheses are the coded symbols of levels of cultivation conditions for central composite design
 Color: Color intensity at 390nm
 DPPH: Electron donating ability to α,α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl at 528nm

Table 3. Regression coefficients of the second order polynomials for color intensity and antioxidative activity

Coefficients	Color	DPPH
	Y ₁	Y ₂
b ₀	0.3979*	1.3144**
Liner	R ² =0.4982*	R ² =0.6499**
b ₁	0.0940*	0.2496**
b ₂	0.0508	0.2216**
b ₃	0.0398	0.1781
Interaction	R ² =0.0065	R ² =0.0576
b ₁₂	-0.0260	-0.2005
b ₁₃	-0.0070	-0.0505
b ₂₃	-0.0250	-0.2425
Quadratic	R ² =0.3152	R ² =0.1777
b ₁₁	-0.1939**	-0.4657**
b ₂₂	-0.1104	-0.3667*
b ₃₃	-0.0529	-0.2947
R ²	0.8199	0.8852*
Pro>F	0.1598	0.0618

*Significant at 10% level; **Significant at 5% level
 Model on which X₁=cultivation temperature, X₂=pH, X₃=Cultivation time is $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_{12}X_1X_2+b_{13}X_1X_3+b_{23}X_2X_3+b_{11}X_1^2+b_{22}X_2^2+b_{33}X_3^2$ (Y: Color intensity and antioxidative activity, b₀: Intercept, b_n=regression coefficients)
 Color: Color intensity at 390nm
 DPPH: Electron donating ability to α,α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl at 528nm

teraction에서는 0.3152와 0.0065로 유의성이 인정되지 않았으며, 전체의 R²는 0.8199였고 유의성은 0.1598로 10% 유의수준에서 인정되지 않았다.

DPPH에 의한 전자공여성에 대한 반응표면은 Fig. 6에서와 같이 maximum point를 가지고 있는 것으로

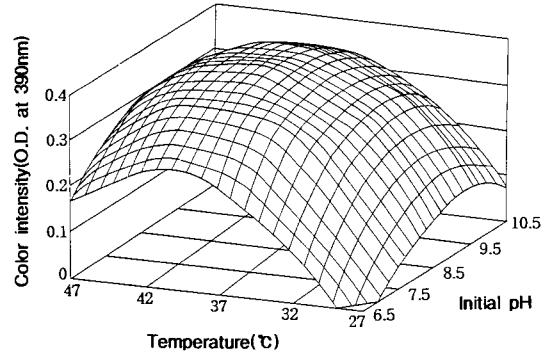


Fig. 5. Response surface for the color formation by *Bacillus subtilis* DC-2.

나타났으며, 이에 대한 회귀분석 결과는 Table 3에 나타내었다. 세가지 배양조건인 배양온도(27~47°C), pH(6.5~10.5) 및 배양시간(24~120hrs.)이 변할 때 DPPH에 의한 전자공여성에 대한 반응표면 회귀식은 다음과 같았다.

$$Y_2=1.3134+0.2496X_1+0.2216X_2+0.1781X_3-0.2005X_1X_2-0.0505X_1X_3-0.2425X_2X_3-0.4657X_1^2-0.3667X_2^2-0.2947X_3^2 \quad (2)$$

전자공여성에 대한 회귀식의 R²는 linear에서 0.6499로 5% 유의수준에서 유의성이 인정되었으며, quadratic과 interaction에서는 0.1777과 0.0576으로 유의성이 인정되지 않았고, 전체의 R²는 0.8852로 10% 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 따라서, *Bacillus subtilis* DC-2가 생성하는 색소는 배양온도, 배양시간 및 배양액의 pH변화와 비례관계에 있음을 알 수 있었다.

배양온도, 배양시간 및 배양액의 pH를 색도와 전자

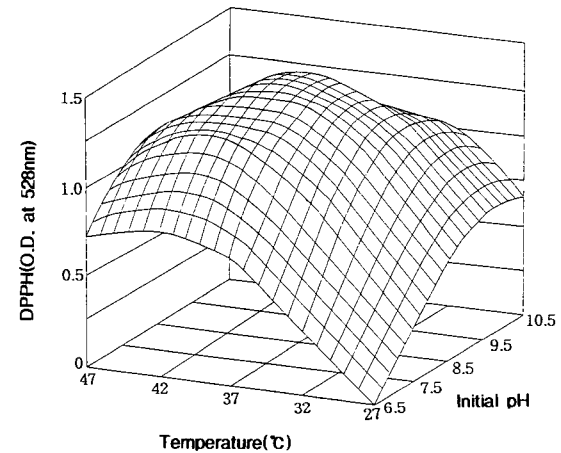


Fig. 6. Response surface for the electron donating ability of cultivation with *Bacillus subtilis* DC-2.

Table 4. Analysis of variance for regression model of color intensity and antioxidative activity on cultivation conditions

Cultivation conditions	F-Ratio	
	Color	DPPH
Temp.	4.108*	5.201**
pH	1.290	4.191*
Time	0.572	2.691

*Significant at 10% level; **Significant at 5% level
Color: Color intensity at 390nm
DPPH: Electron donating ability to α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl at 528nm

Table 5. Predicted levels of color intensity and antioxidative activities yielding optimum responses by analysis of ridge

Cultivation conditions	Levels for optimum responses	
	Color	DPPH
Temperature(°C)	39.2536	39.1947
pH	8.8338	8.8437
Time(hrs.)	84.4125	82.2090
Morphology	Maximum	Maximum

Color: Color intensity at 390nm, DPPH: Electron donating ability to α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl at 528nm
Maximum: Maximum point

공여성에 대하여 분산분석한 결과는 Table 4와 같다. 즉, 색도에 대한 분산분석에서는 F-ratio의 값이 배양 온도에서 가장 높게 나왔으며 10% 유의수준에서 유의성이 인정되어 색소 생성 여부는 배양온도에 의해 가장 많은 영향을 받음을 알 수 있었다. 전자공여성에 대한 분산분석에서 F-ratio의 값은 배양온도에서 5.201로 가장 높게 나왔으며 5% 유의수준에서 유의성이 인정되었고, pH에서 4.191로 10% 유의수준에서 유의성이 인정되어 전자공여성은 온도에 의해 가장 크게 영향을 받고 그 다음으로 pH에 의해 영향을 받음을 알 수 있었다.

색소 생성과 항산화성에 대한 최적 배양조건의 예측치는 Table 5에 나타내었다. 색도와 전자공여성 모두 maximum point를 나타내었으며 색도에 대한 배양조건은 배양온도 39.25°C, pH 8.83 및 84.41시간에서 가장 높은 색도를 나타내었으며 DPPH에 의한 전자공여성은 배양온도 39.19°C, pH 8.84 및 82.21시간에서 가장 높은 것으로 나타났다.

요 약

온도, pH, 배양시간을 세가지 인자로 하고 반응표면 분석을 통하여 *Bacillus subtilis* DC-2균에 의한 색소 생성 및 DPPH(α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl)에 의

한 전자공여성의 최적 조건을 조사하였다. 색소생성능에는 배양온도가 10% 유의수준에서 영향을 미치는 것으로 나타났으며, DPPH에 의한 전자공여성의 경우 배양온도가 5% 유의수준, pH가 10% 유의수준에서 영향을 미치며, 배양시간은 10% 유의수준에서 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. *Bacillus subtilis* DC-2의 색소생성 최적 조건은 배양온도 39.25°C, pH 8.83 및 84.41시간으로 나타났으며 DPPH에 의한 전자공여성은 배양온도 39.19°C, pH 8.84 및 82.21시간에서 가장 높은 것으로 나타났다.

문 헌

1. 박계임, 김기주: 한국 간장제조에 관한 연구(제1보). 중양공업연구소연구보고, **20**, 89(1970)
2. 김종규, 김창식: 한국 재래식 간장의 맛 성분과 관련된 연구. 한국농화학회지, **23**, 89(1980)
3. 김종규, 정영진, 양성호: 한국 재래식 간장의 맛에 영향을 미치는 성분. 한국산업미생물학회지, **13**, 285(1985)
4. 문갑순, 최홍식: 양조간장의 항산화 작용 및 항산화성 물질에 관한 연구. 한국식품과학회지, **19**, 537(1987)
5. 최홍식, 박정숙, 문갑순, 박진영: 지방질의 산화에 대한 된장 및 그 추출물의 항산화 특성. 한국영양식량학회지, **19**, 2(1990)
6. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박진영: 지방질의 산화에 대한 양조간장의 항산화 특성. 한국식품과학회지, **22**, 332(1990)
7. 최홍식, 이정수, 이창용: 양조간장에서 분리한 멜라노이딘 관련물질의 항산화 작용특성. 한국식품과학회지, **22**, 570(1993)
8. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박진영: 양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성. 한국식품과학회지, **22**, 565(1993)
9. 문갑순, 최홍식: 양조간장으로부터 항산화성 물질의 분리 및 그 특성. 한국식품과학회지, **22**, 461(1990)
10. 최용규, 손동화, 지원대, 정영진: 색소 생성균 *Bacillus* sp. DC-2를 이용한 protease생성. 한국위생과학회지, **2**, 1(1996)
11. 김상달, 도재호, 오훈일: 고려인삼 갈변물질의 항산화 효과. 한국농화학회지, **24**, 161(1981)
12. 박성현: 현대실험계획법. 민영사, p.607(1990)
13. Myers, R. H.: Response surface methodology. Black-sburg, VA.(1976)
14. Montgomery, D. C.: *Design and analysis of experiments*. Wiley, New York(1991)
15. 신옥선: *Bacillus licheniformis* SSA3에 의한 색소의 생성조건과 새로운 색소. 영남대학교 대학원 석사학위논문(1992)
16. 박선미, 김종규: *Bacillus licheniformis*가 생성하는 색소. 한국산업미생물학회 제34차 추계학술발표(1989)
17. 김종규: 새로운 색소를 생산하는 미생물 및 그의 한국 재래식 간장의 제조에의 이용. 한국특허출원 제768호(1990)
18. Deutscher, M. P. and Kornberg, A.: Biochemical studies of sporulation and germination. *J. Biol. Chem.*, **243**, 4653(1968)

(1997년 6월 7일 접수)