

GOVP1200621338

T0008805

최 종
연구보고서

면역증강물질 강화 전통발효식품 가공기술개발

Development of Korean Traditional
Fermentation Food Process strengthening
the Immuno-stimulators

연구기관
동아대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “면역증강물질 강화 전통발효식품 가공기술개발에 관한 연구” 과제 (제1세부과제 : 간기능 개선물질 생산 우수균주 개발 및 대량생산기술 개발, 제2세부과제 : 우수분리 균주를 이용한 키토올리고당 고함유 기능성 장류 가공기술개발, 제3세부과제 : 우수 분리 균주를 이용한 기능성 장류 가공기술 개발)의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 동아대학교
총괄연구책임자 : 조 영 수
세부연구책임자 : 최 용 락
세부연구책임자 : 이 영 춘
연 구 원 : 옥 민
연 구 원 : 김 정 욱
연 구 원 : 정 은 화
연 구 원 : 이 용 석
연 구 원 : 박 상 현
참 여 기 업 : (주)비오비

요 약 문

I. 제 목

면역증강물질 강화 전통발효식품 가공기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 경제성장과 더불어 풍족한 식생활을 영위하며 평균수명도 날로 증가하고 있으나, 식생활 패턴의 서구화로 인해 비만, 고지혈증, 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등의 만성퇴행성 질환(생활습관병)과 암으로 인한 사망률이 크게 높아져 건강에 대한 관심이 고조되고 있다. 이러한 질환은 식사 내용의 양적, 질적 변화를 기초로 한 에너지의 과잉 섭취와 알코올의 다량 섭취로 인하여 많이 발생함으로써 사회적 문제로 관심이 높아지고 있는 실정이다. 특히 이들 질환에서 공통적으로 나타나는 현상으로서 고지혈증이나 간장에서 지질축적에 의한 지방간이 유발되고 장기간 지속되면서 간경화 및 간암에 이르는 일련의 간장 질환으로 나타나고 있으나, 그 발생 기작에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다.

우리나라에서는 간염 및 간경화증을 비롯한 각종 간장 질환 발병율이 매우 높아 치료효과가 우수한 간장 질환 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 간장 질환 치료제의 개발은 여러 각도에서 시도할 수 있겠으나 천연물에서부터 간장 보호 작용을 가지는 물질을 찾는 방법이 지름길이라 생각된다. 따라서 간장 질환을 예방, 치료 개선시킬 수 있는 생리활성 성분의 탐색에 관한 연구는 대단히 중요하다. 최근 들어 유용미생물의 대사산물을 이용하여 각종 질환의 개선 또는 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있는 생리활성 물질의 탐색에 관한 연구가 활발히 전개되고 있다. 그 중 하나로 간장 질환 개선효과가 있는 것으로 알려진 glutathione 고함유 유용미생물 균종(효모)의 탐색과 대량 생산조건의 확립으로 glutathione 고함유 효모 균체 생산에 의한 건강보조식품 개발은 간장 질환의 개선과 예방 및 치료에 유용한 연구결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

Glutathione은 tripeptide(γ -L-glutamyl-cysteinyl-glycine)의 비단백질성 thiol 화합물로 세포 내에서 산화형(GSSG)과 환원형(GSH)으로 존재하면서 일부효소들의 보조효소, 단백질의 thiol기를 환원상태로 유지시켜 주는 기능, 세포벽의 보호, 세포의 증식, epoxide, methylglyoxal 및 acetaminophen 등과 같은 독성물질의 해독, 단백질과 DNA 합성, 방사선의 영향으로부터 세포보호 등 생체 내에서 중요한 생리활성을 나타내고 있다. 이와 같이 glutathione은 생체 내에서 여러 가지 생리 및 대사에 관여하고 있기 때문에 이것이 부족하게 되면 용혈작용, 중추신경 작용의 영향, 용혈성 빈혈 및 백내장 등의 증상을 나타내기도 한다. 현재는 의학 분야에서 간장 질환 치료제, 간장기능 회복 및 해독작용 등의 질병치료에 널리 사용되고 있으며, 독성물질의 해독작용에 의한 생체 내 산화를 억제시킴으로써 이와 관련한 각종 질환의 유발을 예방할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 전통 발효주로부터 생리활성 물질인 glutathione을 다량으로 함유하는 식용 가능한 효모 균주를 분리하여 glutathione 최적 생산조건을 확립하고, *in vitro* 실험 계에서의 항산화 효과를 이용하여 전통발효식품으로부터 면역증강물질인 「간 기능 개선물질 생산 우수균주 개발 및 대량생산기술 개발」 하고자 한다.

키틴은 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 β -1,4 결합한 다당류로서 개나 새우 등의 갑각류 껍질, 곤충의 외골격, 버섯이나 균류의 세포벽에 단백질과 복합체로서 함유되어 있으며, 식물계에서는 셀룰로오스와 같이 생물체의 지지나 보호의 역할을 담당하고 있다. 키틴은 지구상에서 연간 약 1,000 억톤 정도로 생산되고 있으며, 현존하는 최후의 생물자원 (Biomass)이라고 할 수 있다.

특히, 갑각류를 이용한 전통발효식품의 발효과정 중 면역증강물질 전환에 관여하는 미생물군의 탐색과 우수 재조합미생물의 개발을 통한 면역증강물질 강화 계장의 개발로 「우수분리 균주를 이용한 키토올리고당 고함유 기능성 장류 가공기술개발」 하고자 한다.

장류 시료로부터 높은 활성의 Fibrinolytic enzyme를 생산하는 미생물을 수십 종 분리하였다. 산업적으로 우수한 균종을 선별하기 위하여 분리된 미생물중 Fibrinolytic enzyme활성과 성장 속도면에서 가장 우수한 균주를 선별하여 FF-7로 명명 하였으며, 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 후 *Bacillus* sp.로 동정되었다.

FF-7 유래의 Fibrinolytic enzyme은 최적 pH 9.0, 최적온도가 45℃였고, pH 7.5~10일 때 상대 활성도는 70%이상을 나타내었다. Fibrinolytic enzyme생산

을 위한 최적 배양조건은 초기 pH 6~8일 때 상대 활성도가 80%이상을 나타내었고, 배양 12시간째에 가장 높은 활성도를 나타내었다. Fibrin plate를 이용한 혈전용해능을 확인한 결과 높은 혈전용해능을 가지고 있었다. 이상의 결과로 FF-7 유래의 Fibrinolytic enzyme는 pH 9.0, 온도 45℃로 대비하여 우수한 혈전용해제의 개발이 가능하리라 사료되어진다.

DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 전자공여능으로 항산화 활성을 측정에 의한 *Bacillus* sp. FF-7이 생산하는 항산화물질의 최적 생산 배지조건은 탄소원 2% galactose와 질소원 1% tryptone 첨가였다. *Bacillus* sp. FF-7에 의한 항산화 활성은 DPPH 전자공여능, 흰쥐 각 조직 microsomal 실험계 및 linoleic acid 과산화지질 실험계에서 malondialdehyde를 thiobarbituric acid (TBA)방법으로 항산화 활성을 측정하였다. 흰쥐 각 조직 microsomal 실험계에서 지질과산화에 대한 항산화 효과는 brain 97.50% > heart 79.95% > kidney 77.84% > spleen 77.47% > testis 69.96% > liver 62.45% 순이었다. Linoleic acid의 과산화지질을 TBA법으로 측정한 결과 반응 4일째까지 억제 효과가 강하게 나타났으며, 동시에 대조구로 사용한 0.05% BHT 첨가구에서도 실험종료시까지 항산화 활성이 강하게 나타났다. 따라서, DPPH 방법에 의한 *Bacillus* sp. FF-7 유래 항산화물질은 배양액 중 탄소원으로 2% galactose와 질소원으로 1% tryptone을 첨가 하였을 때 높은 항산화 활성이 나타났으며, 뇌 microsomal 실험계 및 linoleic acid 과산화지질 측정에서도 높은 항산화 활성을 나타내었다.

이러한 전통 장류의 발효 과정상 면역증강물질의 탐색과 발효에 관여하는 미생물의 탐색, 「우수 분리 균주를 이용한 기능성 장류 가공기술 개발」 하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 제1세부과제 : 간기능 개선물질 생산 우수균주 개발 및 대량생산기술 개발
 - (1) 전통발효식품으로부터 간기능개선물질 생산균주의 탐색
 - (2) 간기능개선 물질 생산균주의 분리 및 동정
 - (3) 분리미생물의 간기능강화 물질 생산 확인
 - (4) 분리미생물의 간기능개선물질 최적생산조건의 확립
 - (5) 간기능개선물질을 함유한 발효음료 시제품 개발

2. 제2세부과제 : 우수분리 균주를 이용한 키토올리고당 고함유 기능성 장류 가공기술개발

- (1) 갑각류 이용 젓갈의 수집
- (2) 갑각류 원료젓갈의 발효과정 중 chitooligosaccharide의 함량 조사
- (3) 키토올리고당 함유량이 높은 젓갈로부터 chitinase생산균주의 분리 및 동정
- (4) 분리 미생물이 생산하는 효소의 특성 및 최적생산조건의 확립
- (5) 분리 미생물을 이용한 계장 시제품 개발

3. 제3세부과제 : 우수 분리 균주를 이용한 기능성 장류 가공기술 개발

- (1) 전통발효식품인 전통 장류의 수집
- (2) 수집된 전통장류의 항산화능 확인
- (3) 전통장류로부터 항산화능이 우수한 유용미생물의 탐색 및 분리
- (4) 분리 미생물이 생산하는 항산화물질의 확인
- (5) 분리 미생물의 항산화물질의 최적생산조건 확립
- (6) 분리 미생물을 이용한 청국장 시제품 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

(1) 제1세부과제 : 간기능 개선물질 생산 우수균주 개발 및 대량생산기술 개발
○ 전통발효식품중 하나인 전통발효주로부터 유래 간기능개선물질인 glutathione 을 균체 내 다량으로 함유되어 있는 생산균을 수집 중 분리하여 그 중 가장 glutathione을 많이 함유하고 있는 균주를 분리하여 FF-8이라 명명하였다.

○ 간기능개선물질 생산균주의 분리 및 동정한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 확인되었다.

○ 분리미생물의 간 기능 개선물질 최적생산조건의 확립을 위해 탄소원, 질소원, 무기염류 및 배양온도, 교반속도 등 배양조건에 따른 glutathione최적 생산조건을 확립하고, 이 균주를 사용하여 발효음료 시제품을 만들었다.

(2) 제2세부과제 : 우수분리 균주를 이용한 키토올리고당 고 함유 기능성 장류 가공기술개발

○ 키토올리고당으로 분해시키는 균주를 이용하여 전통장류를 만들기 위하여 된장으로부터 우수균주를 분리하였다.

- 수집된 된장으로부터 키틴 키토산 분해 우수 균주를 분리 이를 바탕으로 우수 균주의 탐색을 실시하였다.
- 그 중 산업적 이용가능성이 우수한 미생물을 최종선정하고 분리 미생물이 생산하는 키틴아제 및 키토산나제, 관련효소의 최적생산조건을 확립 전통계장에 접목 시제품 만들었다.

(3) 제3세부과제 : 우수 분리 균주를 이용한 기능성 장류 가공기술 개발

- 전통 된장, 간장의 수렴을 위해 주로 된장에서 항산화활성이 높은 균주를 분리하였다.
- 수집 전통장류의 항산화활성검토하기 위해 각 지방 전통발효식품을 수집하여 항산화활성을 확인한 결과 가정별로 다양한 항산화 활성이 나타났다.
- 그 중 항산화능이 우수한 된장으로부터 항산화능이 우수한 유용미생물을 탐색하여 분리한 결과 *Bacillus subtilis*로 확인 확인하고 FF-7으로 명명하였다.
- 분리미생물의 항산화물질 최적생산조건 확립을 위해 각각 배양조건 및 배양 배지상에 따른 항산화활성을 조사하여 최적생산조건을 확립하고 청국장 시제품을 만들었다.

2. 연구개발 활용에 대한 건의

- 향후 분리균주의 특성 연구를 완료후 특허출원을 실시하여 기술이전을 위한 방안을 모색할 계획임.
- 분리균주의 새로운 생리활성물질의 탐색을 통하여 우수한 장류개발의 지표를 마련할 예정임.
- 분리균이 생산하는 생리활성물질은 식품 뿐 아니라 의약품의 원료로서의 가치를 위한 연구를 수행 예정임.
- 참여기업에 기술이전을 통하여 제품화 실시
- 논문발표 예정.

SUMMARY

Chap. 1. The screening of microorganism on Hepatic improvement and it's condition of pilot plant scale

Glutathione of reduced form is a tripeptide consisting of L-glutamate, L-cysteine and glycine. Intracellular glutathione widely affects oxidation and reduction. It is used as a medicine for liver and as a scavenger of toxigen. In this study, strain of high-producing intracellular glutathione was isolated from Korean Traditional Rice Wine. The isolated strain was identified as *Saccharomyces cerevisiae* based on the morphological, physiological and biochemical characteristics, and was designated as FF-8. The optimal condition for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 was obtained after cultivation with shaking for 72 hours in the YM(glucose 1.0%, acid peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%) medium. The optimal temperature, shaking rate and initial pH for the glutathione production were 30°C, 100 rpm, pH 6.0 respectively. The glutathione concentration produced by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 was 204 mg/l under the optimal medium condition ; 3% glucose as carbon source, 3% yeast extract as nitrogen source, 0.06% KH₂PO₄ as salt source, and 0.06% L-cysteine as precursor.

Antioxidative activities of the glutathione produced by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 were tested *in vitro* experimental models. In DPPH(α,α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) method, the electron donating activity of the glutathione produced by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in the optimal medium was as high as BHT(0.05%, w/v). The antioxidative activity was measured by inhibition against lipid peroxidation of rat tissues microsomes, and this activity of the glutathione produced by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in the optimal medium was shown in the following : liver 60.98% > kidney 56.43% > heart 52.91% > brain 52.13% > testis 45.57% > spleen 42.95%. In antioxidative activity determined by thiocyanate method against lipid peroxidation using linoleic acid, the antioxidative activity at the glutathione produced by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in the optimal medium was much higher than control

during 7 days. In TBA method, the antioxidative activity of the glutathione produced by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in the optimal medium was higher than YM basal medium.

Antioxidative activities of the cell free extracts containing a high-glutathione by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 were tested *in vitro* experimental models, by radical scavenging activity using DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) and lipid peroxidation inhibitions by both ferric TBA method and ferric thiocyanate method using linoleic acid and tissue microsomes. The concentration of intercellular glutathione by cultivating *S. cerevisiae* FF-8 in the YM optimal medium obtained 204 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was increased 2.76-fold by 74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the YM basal medium. In DPPH method, the electron donating activity of the glutathione produced by *S. cerevisiae* FF-8 cultured in the YM optimal medium was as high as BHT(0.05%, w/v). The antioxidative activity was measured by inhibition against lipid peroxidation of rat tissues microsomes and the results of antioxidant activity of the cell free extracts by *S. cerevisiae* FF-8 cultured in the YM optimal medium was shown in the following order : liver 60.98% > kidney 56.43% > heart 52.91% > brain 52.13% > testis 45.57% > spleen 42.95%. In antioxidative activities determined by ferric thiocyanate and TBA methods against lipid peroxidation using linoleic acid, the lipid peroxidation in the control mixture increased rapidly as typical peroxidation curve of linoleic acid from one day and the antioxidative activity of the cell free extracts by cultivating *S. cerevisiae* FF-8 in the YM optimal medium were higher than that of the YM basal medium. These data indicate that the cell free extracts containing a high intercellular glutathione of *S. cerevisiae* FF-8 cultured in YM optimal medium showed strong antioxidative capacities by DPPH radical scavenging activity and ferric thiocyanate and TBARS measurements.

The protective effect of glutathione-enriched *S. cerevisiae* FF-8 on CCl_4 induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats was investigated. The activities of liver markers (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase), lipid peroxidative index (thiobarbituric acid-reactive substances), the antioxidant status (reduced glutathione) were used as biomarkers to monitor the

protective role of glutathione-enriched *S. cerevisiae* FF-8. The liver marker enzymes in plasma and lipid peroxidative index in liver were increased in CCl₄-treated groups, but which were decreased significantly on treatment with glutathione-enriched *S. cerevisiae* FF-8. The hepatic glutathione concentration, which is closely associated with antioxidant system, was significantly depleted in carbon tetrachloride treated rats, but the carbon tetrachloride-related lowering of the hepatic glutathione concentrations were improved significantly by the treatment of glutathione-enriched *S. cerevisiae* FF-8. Administration of glutathione-enriched *S. cerevisiae* FF-8 to normal rats did not produce any harmful effects. These findings suggest that glutathione-enriched *S. cerevisiae* FF-8 is an effective antioxidant without any side-effects and might be useful in treating hepatotoxicity and oxidative stress by high protective effect in carbon tetrachloride (CCl₄)-treatment in rat.

The result of the present study demonstrate that the glutathione-enriched extracts produced by cultured *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in YM optimal medium is an effective antioxidant without any side-effects and might be useful in treating hepatotoxicity and oxidative stress by high protective effect in carbon tetrachloride -treatment in rats, as evidenced decreased serum ALT and AST activities and lipid peroxidation. These data indicate that the glutathione-enriched extracts produced by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 cultured in YM optimal medium has arrange of protective effects for hepatic injury or its therapy.

Chap. 2. Screening and isolation of chitooligosaccharide bacterium and processing of Korean traditional Soybean sauce

1) Screening and isolation of chitosanase and chitinase producing bacterium.

Bacillus sp. DAU101, producing of chitosanase and chitinase, was isolated from korean traditional food. This strain was identified on the basis of phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequence, *gyrA* gene, and phenotypic analysis. The 16S rDNA sequences of strain DAU101 showed high similarity, 99%, to that of *B. atrophaeus*, *B. subtilis* and then 98% for

B. amyloliquefaciens. The similarities of the *gyrA* nucleotide sequences were 98% for *B. atrophaeus*, and 83% for *B. amyloliquefaciens*, and 82% for *B. subtilis*. However, the black pigment producing characterization of this strain was different from that of *Bacillus atrophaeus*. *Bacillus* sp. DAU101 was inhibited hyphal growths of phytopathogenic fungi (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*). It was indicated that *Bacillus* sp. strain DAU101 should secrete antifungal agents.

2) Cloning and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101.

The gene encoding the chitosanase (*csn*) was cloned and sequenced. The *csn* gene was consisted of an open reading frame 837 nucleotides and encodes 279 amino acids with a deduced molecular weight of 31,420. The deduced amino acid sequence of the chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101 exhibits 88 and 30% similarities to those from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas* sp., respectively. The chitosanase was purified by using fusion vector, pGEX-6P-1, and GSTrap FF affinity column chromatography. The molecular weight of purified enzyme was about 27 kDa, which deleted signal peptide, by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The pH and temperature optima of the enzyme were 7.5 and 50°C, respectively. Result of thin-layer chromatography analysis that the enzyme was produced a chitosan dimer, chitosan trimer, and chitosan tetramer, as the major products. The enzyme activity was increased about 1.6-fold by the addition of 5, 10 mM Ca²⁺. However, Hg²⁺ and Ni⁺ ion was strongly inhibited the enzyme. The enzyme was reactive with soluble chitosan and glycol chitosan but not colloidal chitin, glycol chitin and CMC.

3) Cloning and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101.

A chitinase encoding gene from *Bacillus* sp. DAU101 was cloned in *Escherichia coli*. The nucleotide sequencing revealed a single open reading frame containing 1,781bp and encoding 597 amino acid with a 66kDa by SDS-PAGE and Zymogram. The chitinase was composed of three domains: a catalytic domain, a fibronectin III domain and a chitin binding domain.

The chitinase was purified by GST-fusion purification system. The pH and temperature optima of the enzyme were 7.5 and 60°C, respectively. The metal ions, Zn²⁺, Cu²⁺, and Hg²⁺, were strongly inhibited chitinase activity. However, chitinase activity was increased 1.4-fold by Co²⁺. Chisb could hydrolyze GlcNAc₂ to *N*-acetylglucosamine and was produced GlcNAc₂, when chitin derivatives are used as the substrate. This was indicated CHISB is a bifunctional enzyme, *N*-acetylglucosaminase and chitobiosidase. The enzyme could not hydrolyze glycol chitin, glycol chitosan, or CMC, but hydrolyzed colloidal chitin and soluble chitosan.

4) Soybean sauce crab

The soybean sauce crab was made by general method. Result of HPLC analysis that the soybean sauce crab was contained a chitosan dimer, chitosan trimer, and chitosan tetramer. This result was in accord with hydrolysis pattern of chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101.

Chap. 3 Development of Processing on Korean Traditional Chungkukjang using isolated microorganism

Bacillus sp. strain FF-7, which produces a strongly fibrinolytic enzyme, was screened from soil. The fibrinolytic enzyme was purified from supernatant of *Bacillus* sp. strain FF-7 culture broth and showed thermophilic, hydrophilic, and strong fibrinolytic activity. The optimum Temperature and pH were 45°C and 9, respectively, and molecular weight was 28,000 as determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The first 15 amino acids of N-terminal sequence is identical to that of subtilisin and different from that of nattokinase, but FF-7 showed a level of fibrinolytic activity that was about eight times higher than that of subtilisin.

The antioxidative activity of antioxidative substances produced from several bacterial strains isolated from fermented foods were tested by DPPH (α,α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) free radical scavenging activity. One of the strains showing the highest antioxidative activity was identified as *Bacillus* sp. based on the morphological, biochemical, physiological characteristics, and 16S

rRNA sequence, and named FF-7. The most optimal medium condition for the production of antioxidative substance from *Bacillus* sp. FF-7 was 2% galactose as carbon source and 1% tryptone as nitrogen source. The antioxidative substance produced from FF-7 in these cultural medium was also tested by *in vitro* experimental models, the peroxidation of linoleic acid and the peroxidation of rat tissues microsomes by using thiobarbituric acid (TBA) for assay of free malondialdehyde production. The antioxidative activity against lipid peroxidation of rat tissues microsomes was shown in the following order; brain 97.50% > heart 79.95% > kidney 77.84% > spleen 77.47% > testis 69.96% > liver 62.45%. The antioxidative substance produced from FF-7 on linoleic acid peroxidation by TBA method was effectively inhibited during four days, and 0.05% BHT (butylated hydroxytoluene) used comparative control was also effectively inhibited. Results showed that the highest antioxidative activity by DPPH method of antioxidative substance produced from *Bacillus* sp. FF-7 was obtained by supplementing 2% galactose as carbon source and 1% tryptone as nitrogen source in cultured medium, this substance effectively inhibited the formation of TBARS in brain microsome *in vitro* system and in linoleic acid peroxidation.

CONTENTS

Summary (Korean)	4
Summary (English)	7
Contents (English)	8
Contents (Korean)	10
Part 1. The Outline for Research & Development	17
Chapter 1. The purpose and need for research & development	17
Chapter 2. The contents and limit for research & development	22
Part 2. The Present States of Technology and Development at Home and Abroad	24
Part 3. The Results of Research & Development	26
Chapter 1. The screening of microorganism on Hepatic improvement and it's condition of pilot plant scale	26
1. Introduction	26
2. Materials and Method	27
3. Results & Discussion	35
4. Reference	74
Chapter 2. Screening and isolation of chitooligosaccharide bacterium and processing of Korean traditional Soybean sauce	82
1. Introduction	82
2. Materials and Method	84
3. Results & Discussion	89
4. Reference	118

Chapter 3. Development of Processing on Korean Traditional Chungkukjang using isolated microorganism	123
1. Introduction	123
2. Materials and Method	125
3. Results & Discussion	131
4. Reference	161
Part 4. Achievements of Purpose and Contribution for Relative Field	168
Chapter 1. Purpose of Research & Development and Achievement	168
Chapter 2. Contribution for Relative Field	169
Part 5. Results of Research & Development and Application Plan	171
Part 6. Collection of Technology information	172
Part 7. References	172

4. 참고문헌	162
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	169
제 1 절 목표달성도	169
제 2 절 관련분야에의 기여도	170
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	172
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	173
제 7 장 참고문헌	173

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

최근 경제성장과 더불어 풍족한 식생활을 영위하며 평균수명도 날로 증가하고 있으나, 식생활 패턴의 서구화로 인해 비만, 고지혈증, 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등의 만성퇴행성 질환(생활습관병)과 암으로 인한 사망률이 크게 높아져 건강에 대한 관심이 고조되고 있다. 이러한 질환은 식사 내용의 양적, 질적 변화를 기초로 한 에너지의 과잉 섭취와 알코올의 다량 섭취로 인하여 많이 발생함으로써 사회적 문제로 관심이 높아지고 있는 실정이다. 특히 이들 질환에서 공통적으로 나타나는 현상으로서 고지혈증이나 간장에서 지질축적에 의한 지방간이 유발되고 장기간 지속되면서 간경화 및 간암에 이르는 일련의 간장 질환으로 나타나고 있으나, 그 발생 기작에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다.

최근, 우리나라에서는 간염 및 간경화증을 비롯한 각종 간장 질환 발병율이 매우 높아 치료효과가 우수한 간장 질환 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 간장 질환 치료제의 개발은 여러 각도에서 시도할 수 있겠으나 천연물에서부터 간장 보호 작용을 가지는 물질을 찾는 방법이 지름길이라 생각된다. 따라서 간장 질환을 예방, 치료 개선시킬 수 있는 생리활성 성분의 탐색에 관한 연구는 대단히 중요하다. 최근 들어 유용미생물의 대사산물을 이용하여 각종 질환의 개선 또는 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있는 생리활성 물질의 탐색에 관한 연구가 활발히 전개되고 있다. 그 중 하나로 간장 질환 개선효과가 있는 것으로 알려진 glutathione 고 함유 유용미생물 균종(효모)의 탐색과 대량 생산조건의 확립으로 glutathione 고 함유 효모 균체 생산에 의한 건강보조식품 개발은 간장 질환의 개선과 예방 및 치료에 유용한 연구결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

그리고 glutathione은 생체 내에서 항산화와 관련된 물질로서 세포의 독성을 경감시켜 생체산화, 즉 세포노화를 억제시킴으로써 각종 질환의 유발을 예방할 것으로 생각된다. 노화과정에서 free radical이론을 포함하는 가장 중요한 요소는 정상적인 신체의 대사 과정에서 생기는 전자를 전자 수용체(e-acceptor)인 산소 분자 (O₂)에 주어 물을 생성하며 이 때 생성되는 에너지를 이용한다.

Glutathione은 tripeptide(γ -L-glutamyl-cysteinyl-glycine)의 비단백질성

thiol 화합물로 세포 내에서 산화형(GSSG)과 환원형(GSH)으로 존재하면서 일부 효소들의 보조효소, 단백질의 thiol기를 환원상태로 유지시켜 주는 기능, 세포벽의 보호, 세포의 증식, epoxide, methylglyoxal 및 acetaminophen 등과 같은 독성물질의 해독, 단백질과 DNA 합성, 방사선의 영향으로부터 세포보호 등 생체 내에서 중요한 생리활성을 나타내고 있다. 이와 같이 glutathione은 생체 내에서 여러 가지 생리 및 대사에 관여하고 있기 때문에 이것이 부족하게 되면 용혈작용, 중추신경 작용의 영향, 용혈성 빈혈 및 백내장 등의 증상을 나타내기도 한다. 현재는 의학 분야에서 간장 질환 치료제, 간장기능 회복 및 해독작용 등의 질병치료에 널리 사용되고 있으며, 독성물질의 해독작용에 의한 생체내 산화를 억제시킴으로써 이와 관련한 각종 질환의 유발을 예방할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 전통 발효주로부터 생리활성 물질인 glutathione을 다량으로 함유하는 식용 가능한 효모 균주를 분리하여 glutathione 최적 생산조건을 확립하고, *in vitro* 실험계에서의 항산화 효과를 이용하여 1. 전통발효식품으로부터 면역증강물질 전환 미생물의 탐색과 이를 이용하여 제조한 제품의 기능적 규명을 통한 고기능성 전통발효식품의 개발, 2. 감각류를 이용한 전통발효식품의 발효과정 중 면역증강물질 전환에 관여하는 미생물군의 탐색과 우수 재조합미생물의 개발을 통한 면역증강물질 강화 계장의 개발, 3. 전통 장류의 발효과정상 면역증강물질의 탐색과 발효에 관여하는 미생물의 탐색, 우수 재조합미생물의 개발을 통한 면역증강물질 강화 전통 장류의 개발하고자 한다.

국민의 소득 증대와 주거 생활여건의 변화로 식품의 소비구조가 변화되면서 국내 우수 전통발효식품은 기능성, 편의성, 건강지향성, 천연지향성 식품으로의 수요가 급격히 증가하고 있는 실정이다.

국내 전통발효식품은 선조들의 지혜, 경험과 체질에 맞는 음식에서 유래되어 개발, 발전되어 왔으며, 종류가 이용할 뿐 아니라 여러 가지 면역증강 물질을 함유하고 있어 우수한 전통발효식품의 과학적 근거 마련과 기능이 한층 강화된 고부가가치 전통발효식품의 개발이 이루어져야 한다.

면역증강 물질이 강화된 고부가가치 전통발효식품의 개발을 위해서는 전통 발효식품의 발효 과정상 미생물총의 변화 관찰과 미생물 중 면역증강 물질 전환 우수 미생물 탐색이 기본적으로 수행되어야 한다.

한국인의 건강발효식품에는 김치류, 장류, 젓갈류 및 전통주류 등으로 분류할 수 있지만, 그 중 채소발효식품인 김치에 대한 연구는 상당히 진전되어 있지만 감각류 첨가나 발효식품에 대한 체계적이고 조직적인 연구는 미비한 실정이다.

특히, 갑각류 발효식품 관련 미생물에 대한 고찰 및 기능성 증진에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이 중 젓갈류는 어패류를 재료로 한 다양한 종류의 미생물과 효소작용에 의해 만들어진 발효식품이며 특유의 맛과 우리아미노산 및 정미성분이 풍부하여 단백질공급원으로서 뿐 아니라 김치의 부원료나 조미료로서 우리의 식생활과 밀접한 관련을 가지고 있다.

어패류 중 새우, 게 등과 같은 갑각류는 상처의 치유성, 항종양활성 등의 면역증강물질인 Chitin이 약 10% 정도 함유되어 있다. chitin은 chitinase등에 의해 가수 분해되어 생리활성이 있는 물질로 전화되어 천연에는 존재하지 않는 면역증강물질인 chitin oligosaccharide가 생성되는 것으로 알려져 있다. 이런 관점에서 갑각류에 포함되어 있는 chitin이 발효과정 중 저분자 chitin oligosaccharides의 많은 생성이 예상되어 이를 첨가한 고기능성 전통발효식품의 개발이 가능하리라 사료된다.

전통발효식품 중 장류는 간장, 된장이 대표적이며, 식물성 단백질이 높은 염농도에서 미생물의 작용으로 분해되어 구수한 맛을 나타내므로 조미료가 되는 동시에 저장성이 우수한 발효식품이다.

전통장류의 발효에 관여하는 미생물에 의해 가수 분해되어 생성되는 기능성 물질 중 면역증강 물질에 대해서는 아직까지 정확한 역할에 대해서도 아직까지 자세한 규명이 이루어지지 않고 있다. 여기서, 전통장류의 면역증강물질 강화를 위하여 갑각류 첨가에 의해 상승효과를 가지는 고기능성 전통장류의 개발을 위해서는 조직적이고 체계적인 연구가 필요하다.

따라서, 본 연구는 복잡한 발효과정을 가지고 있는 국내 전통발효식품 중 젓갈류와 장류의 발효미생물 작용에 따른 면역증강물질의 탐색과 갑각류를 첨가한 면역증강물질이 강화된 전통발효식품을 개발함으로써 전통발효식품의 국내외에 우수한 고기능성 식품의 개발을 통한 부가가치 창출, 국민보건증진 및 의료비지출 절감에 이바지 할 수 있는 장을 마련한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

1) 전통발효식품은 우리나라 고유의 발효식품으로서 자연발효에 의해 제조되어 왔으나, 산업화의 계기로 인하여 전통발효식품의 표준화와 더불어 기능성 면역증진물질에 대한 관심이 대두되면서 발효를 위한 미생물의 과학화와 고기능성 발효식품의 개발이 절실히 요구하게 되었다.

2) 전통발효식품은 발효과정 중 미생물이나 효소의 기능에 의해 여러 가지 면역증강물질로 진화 생성되어 여러 가지 유용한 생리활성기능을 나타낸다. 따라서 발효에 관여하는 미생물의 자원을 탐색하고 특성을 조사하는 것은 고기능성 전통발효식품의 개발을 가능하게 한다.

3) 전통발효식품 유래 면역증강물질 생산 미생물의 탐색은 식품발효 뿐 아니라 식생활의 서구화나 여러 가지 환경 요인에 의해 발생하는 생활습관병에 대한 완화 또는 예방을 위한 정보를 제공할 수 있는 중요한 연구이다.

4) 면역증강물질은 주로 기능성 식품 제조의 첨가물로서의 활용으로 상승효과를 얻으려고 하는 것이 대다수이지만, 면역증강물질 생산 미생물의 탐색과 분리를 통하여 국내 전통발효식품 자체가 우수한 기능성 식품으로 각광 받을 수 있는 측면을 가지고 있다.

5) 특히, 키토올리고당은 복잡한 공정을 통하여 생산되어 고가로 판매되어지고 있어 이를 이용한 기능성 식품의 경우 가격이 비싼 단점을 가지고 있다. 하지만, 전통발효과정 중 chitinase 생산 균주의 탐색과 재조합을 통한 우수한 미생물의 개발은 갑각류를 이용한 개장, 젓갈 및 정류 제조 시 전통발효식품 자체에 높은 농도의 키토올리고당으로 전환 함유 할 수 있는 정점을 가지고 있어 널리 이용되고 있는 전통발효식품에 면역증강물질의 강화라는 우수한 결과를 가질 수 있다.

6) 전통장류의 발효에 관여하는 미생물의 정확한 역할에 대해 아직 연구가 미흡한 실정이다. 따라서, 발효에 관여하면서 면역증강물질을 생산하는 미생물의 탐색과 활용은 전통장류의 품질개선과 우수한 기능성 부여를 위한 기반을 조성할 수 있는 큰 장점을 가진다.

7) 또한, 전통장류의 제조 시 갑각류를 첨가하여 기능성 전통장류 제조기술 개발은 지금까지 이루어진 적은 없으며 기술적, 경제적으로 획기적으로 획기적인 기능성 전통장류의 개발이라 할 수 있다.

나. 경제·산업적 측면

1) 산업사회의 급격한 발전은 재래식 방법으로 제조 되어지던 전통발효식품의 상품화를 가능하게 하여 높은 매출실적을 가지고 있다. 하지만, 식생활이 서구화되어짐에 따라 간편한 식생활을 추구하고 있는 현대인들에게 전통발효식품의 기능적 강화를 통한 상품화는 소비자들의 구매 욕구 충족으로 높은 성장을 이루어 낼 수 있다.

2) 발효식품의 발효과정 중 면역증강물질 전환 미생물 탐색을 통한 전통발효식품 개발에의 활용은 생리활성부분의 우수성과 농어민의 소득증대에도 기여할 뿐 아니라, 소비자 측면에서는 저가의 고기능성 식품의 개발로 인하여 질병에 대한 면역력 증가로 의료비 지출이 줄어들 것으로 생각된다.

3) 최근 활발한 연구가 이루어지고 있는 생리활성물질의 탐색을 통한 고기능성 생리활성물질의 개발은 그 제조 공정의 복잡성과 함께 높은 가격을 형성하고 있어 경제적 부담을 안고 있다. 하지만, 전통발효식품 자체의 면역증강 기능의 상화를 통하여 항상 즐겨 섭취하는 저가의 고기능성 식품의 개발이 가능하게 된다. 이를 통해 면역증강물질이 강화된 전통발효식품의 개발은 상품화를 위한 식품산업의 발전과 더불어 고부가가치의 창출이 가능하게 된다.

4) 또한, 전통발효식품 발효과정 중 면역증강물질 전환 미생물의 탐색은 고부가가치 생물 산업의 자원보고로서의 가치를 가져 국내의 생물 산업으로의 미생물 수출을 통한 국가 산업의 우수성을 확보할 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

1) 농수산물이 주재료로 제조되는 전통발효식품은 그 우수성이 있는데도 불구하고 산업사회의 발달에 따른 편리성과 식생활의 서구화의 추구가 그 자체에 대한 인식이 떨어지고 있다. 따라서, 건강지향성, 기능성 추구성을 가지는 현대인에게 면역증강물질강화 전통발효식품의 개발은 전통발효식품에 대한 인식의 재고와 동시에 국가 주체성을 고취시킬 수 있다.

2) 최근 전통발효식품 중 하나인 김치의 여러 국가로의 수출이 이루어지고 있는 실정에서 다양한 국내 발효식품의 우수성을 전 세계에 알릴 수 있는 근

원을 제공함과 동시에 타 국가와의 전통발효식품과의 차별성을 부각시켜 민족의 자긍심을 고취시킨다.

3) 전통발효식품은 주원료가 국산 농산물이기 때문에 농수산물의 소비를 촉진하여 농어민의 소득증대에 기여할 것이다. 면역증강물질이 강화된 전통발효식품의 개발과 생산 공정을 간편화함으로써 고령화 인구가 증가되는 사회적 추세로 감안할 때, 노인의 복지건강을 위한 기능강화 식품이 절실한 실정이다. 즉, 국민보건증진과 식품의 서구화를 둔화시키고 수입식품의 소비를 억제시킬 뿐 아니라 수출을 촉진시킬 수 있다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

1. 제1세부과제 : 간 기능 개선물질 생산 우수균주 개발 및 대량생산기술 개발

가. 전통발효식품으로부터 간 기능개선물질 생산균주의 탐색
전통발효주, 전통장류에서 간 기능개선효과의 지표물질을 포함하고 있는 유용 가능성 미생물을 탐색함.

나. 간 기능개선 물질 생산균주의 분리 및 동정
glutathione 생성능이 우수한 균주를 분리하여 API kit 및 생리, 생화학적 특성과 16s rDNA sequence를 통한 균주의 동정

다. 분리미생물의 간 기능강화 물질 생산 확인
Spectrophotometer, TLC 등을 이용하여 물질의 순수분리 및 glutathione의 확인

라. 분리미생물의 간 기능개선물질 최적생산조건의 확립
온도, pH, 통기조건, 탄소원, 질소원, 미량원소별 글루타치온 최적 생산 조건의 확립

마. 분리 미생물의 발효 추출액 함유 음료 개발 및 면역증강 확인

2. 제2세부과제 : 우수분리 균주를 이용한 키토올리고당 고 함유 기능성 장류 가공기술개발

가. 갑각류 이용 것갈의 수집
전통발효장류를 이용 발효과정 중 미생물군의 조사

나. 갑각류이용하여 만든 계장의 발효 과정중 chitooligosaccharide의 함량 조사 계장 발효 중 생성된 키토올리고당의 함량을 조사하여 계장 키토올리고당 생성 타당성 검토

다. 키토올리고당 함유량이 높은 계장으로부터 chitinase 생산균주를 분리하기 위해 저염균배지(2.5% NaCl함유)배지와 고염균배지(15% NaCl함유)로 나누어 분리하고, 분리된 chitinase생산균은 지방산분석, 생화학적 특성조사, API kit와 16s rDNA sequence를 통한 동정을 실시한다.

라. 분리미생물이 생산하는 효소의 특성 및 최적생산조건의 확립
분리 미생물이 생산하는 chitinase의 온도, pH, 저해제에 따른 효소활성 비교. chitinase최적 생산조건의 확립 (배양배지별, 온도별, 통기조건별 등)

마. 분리 미생물을 이용한 계장 시제품 개발

3. 제3세부과제 : 우수 분리 균주를 이용한 기능성 장류 가공기술 개발

가. 전통발효식품인 전통 장류의 수집
전통발효식품인 된장과 간장을 지역별, 제조방법별로 구별하여 수집.

나. 수집된 전통장류의 항산화능 확인
수집된 된장과 간장은 DPPH법에 의거하여 파장 412nm에서 흡광도로 항산화능을 비교하여 유용 미생물의 분리원으로 선택한다.

다. 전통장류로부터 항산화능이 우수한 유용미생물의 탐색 및 분리
항산화능이 우수한 전통 된장 및 간장에서 항산화물질 생산 미생물의 분리. 분리된 미생물은 각각 10,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액의 항산화능과 침전된 균체를 sonication을 실시한 후 항산화능을 각각 확인한다.
그 중 우수한 유용미생물을 API kit, 지방산 분석, 생화학적 특성조사 및 16s rDNA sequence를 통한 동정을 실시한다.

라. 분리 미생물이 생산하는 항산화물질의 확인
유용미생물로부터 생산되는 항산화물질은 여러 가지 용매로 추출한 후 항산화 활성을 측정하고 Spectrophotometer를 이용하여 실험을 실시한다.

마. 분리 미생물의 항산화물질의 최적생산조건 확립
분리된 유용미생물은 배양배지별, 기질별, 통기조건별, 배양조건별 최적 생산조건을 확립한다.

바. 분리 미생물을 이용한 청국장 시제품 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황

1. 전통발효식품에 관한 연구는 많은 연구자들에 의해 발효 과정 중 미생물 변화와 성분분석에 의한 전통발효식품의 우수성을 보고하였고, 주 발효 미생물의 검토를 통해서 전통발효식품의 표준화에 관한 연구를 실시하였다.
2. 특히, 전통발효식품 중 가장 많은 연구결과를 가지고 있는 김치의 경우 발효 유산균에 의한 표준화를 통해 국내 여러 기업에서 제조 판매를 실시하고 있다.
3. 하지만, 전통발효식품 중 젓갈이나 장류는 지역적, 제조방법, 사용원료에 따라 맛, 향 그리고 기능성의 차이가 있기 때문에 이에 대한 체계적인 연구가 필요한 시점이다.
4. 특히, 전통발효식품은 기호적인 측면엔 관한 연구를 주로 수행하고 있는 실정이며, 기능성을 부각시키면서 우수한 전통발효식품의 제조기술개발에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있으며, 관습적 생산방법을 취하고 있는 현실이다.
5. 또한, 면역증강물질로 알려진 간 기능 개선물질, 키토올리고당 또는 항산화물질은 근래에 가장 활발한 연구가 이루어지고 있는 분야이며 이를 통하여 다양한 기능성 개발이 한창이다.
6. 이러한 면역증강물질을 전통발효식품에 첨가하려는 시도는 몇 차례 이루어지고 있지만 제조과정에 도입하여 발효식품 자체의 기능성을 부각시키는 연구는 없는 실정이다.
7. 이는 전통발효식품의 미생물학적 고찰과 유용미생물의 분리를 통하여 발효가 진행되면서 면역증강물질로 전화되어 식품자체에 이러한 물질이 강화될 수 있는 획기적인 연구로 사료된다.

제 2 절 앞으로의 전망

1. 산업사회의 급격한 발전은 가정에서 직접 제조한 전통발효식품의 섭취 보다는 상품화된 전통발효식품의 소비가 급격히 증가될 것이다. 이는 전통발효식품의 체계적인 연구를 통한 표준화가 선행되어야 할 것이다.
2. 따라서, 다양한 제품의 전통발효식품의 개발이 이루어질 것으로 예상되어지며, 기호적인 측면과 기능적인 측면을 동시에 만족시켜줄 갖추어진 제품의 개발이 되어야 할 것이다.
3. 이후 많은 연구자들에 의해 전통발효식품의 생리활성증강에 관한 다양한 시도가 일어날 것이며, 이에 따른 다양한 전통발효식품의 개발이 가능할 것이다.
4. 또한, 국내 우수한 전통발효식품이 기능성 식품으로서의 가치가 예상되며, 면역증강 물질이 강화된 전통식품의 개발은 소비지들에게 전통발효식품의 가치 부여과 동시에 소비시장의 확대, 기능적 우수성을 부각한 전통발효식품의 수출을 일익 할 수 있는 방안이 마련될 것이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 간기능 개선물질 생산 우수균주 개발 및 대량생산 기술 개발

1. 서론

최근, 우리나라에서는 간염 및 간경화증을 비롯한 각종 간장 질환 발병율이 매우 높아 치료효과가 우수한 간장 질환 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 간장 질환 치료제의 개발은 여러 각도에서 시도할 수 있겠으나 천연물에서부터 간장 보호 작용을 가지는 물질을 찾는 방법이 지름길이라 생각된다. 따라서 간장 질환을 예방, 치료 개선시킬 수 있는 생리활성 성분의 탐색에 관한 연구는 대단히 중요하다. 최근 들어 유용미생물의 대사산물을 이용하여 각종 질환의 개선 또는 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있는 생리활성 물질의 탐색에 관한 연구가 활발히 전개되고 있다. 그 중 하나로 간장 질환 개선효과가 있는 것으로 알려진 glutathione 고 함유 유용미생물 균종(효모)의 탐색과 대량 생산조건의 확립으로 glutathione 고 함유 효모 균체 생산에 의한 건강보조식품 개발은 간장 질환의 개선과 예방 및 치료에 유용한 연구결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

Glutathione은 tripeptide(γ -L-glutamyl-cysteinyl-glycine)의 비단백질성 thiol 화합물로 세포 내에서 산화형(GSSG)과 환원형(GSH)으로 존재하면서 일부효소들의 보조효소, 단백질의 thiol기를 환원상태로 유지시켜 주는 기능, 세포벽의 보호, 세포의 증식, epoxide, methylglyoxal 및 acetaminophen 등과 같은 독성물질의 해독, 단백질과 DNA 합성, 방사선의 영향으로부터 세포보호 등 생체 내에서 중요한 생리활성을 나타내고 있다. 이와 같이 glutathione은 생체 내에서 여러 가지 생리 및 대사에 관여하고 있기 때문에 이것이 부족하게 되면 용혈작용, 중추신경 작용의 영향, 용혈성 빈혈 및 백내장 등의 증상을 나타내기도 한다. 현재는 의학 분야에서 간장 질환 치료제, 간장기능 회복 및 해독작용 등의 질병치료에 널리 사용되고 있으며, 독성물질의 해독작용에 의한 생체 내 산화를 억제시킴으로써 이와 관련한 각종 질환의 유발을 예방할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 전통 발효주로부터 생리활성 물질인 glutathione을 다량으로 함유하는 식용 가능한 효모 균주를 분리하여 glutathione 최적 생산조건을 확립하고, *in vitro* 실험계에서의 항산화 효과에 대하여 그 결과를 보고하고자

한다.

그리고 임상학적으로는 glutathione을 다량으로 함유하는 효모 균주를 우리나라 전통 식품으로부터 분리하여 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성에서 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었으며, YM 최소배지와 최적배지 조건에서 각각 생산된 glutathione 고함유 균체를 사용하여 항산화 효과 및 사염화탄소 간독성 억제효과를 검토하였다.

또한 본 실험에서 분리, 동정, 최적생산조건 확립, 사염화탄소에 의한 간독성 유발 억제효과가 입증된 글루타치온 고함유 효모인 *Saccharomyces* sp. FF-8의 면역증강 작용을 알아보기 위하여 대식세포(macrophage)의 활성화에 대하여 검토하였다. 대식세포는 면역기능의 조절에 중요한 역할을 하고 있으므로 면역요법제 개발 시 중심으로 생각할 수 있는 물질이다.

2. 재료 및 방법

가. Glutathione 고함유 균주의 분리 및 생산조건

1) 균주의 분리

Glutathione 고 함유 효모 균종을 분리할 목적으로 부산광역시 금정구 금정산성 일대에서 전통 쌀 막걸리를 수집하여 YM(glucose 1.0%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%) 고체배지에 도말한 다음 30℃에서 2~3일간 배양한 후 생성된 단일 colony로부터 효모로 추정되는 균주를 1차 분리하였다. 1차 분리된 균주를 YM 액체배지에 각각 접종한 후 30℃에서 2일간 진탕 배양하였다. 배양액을 7,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 회수된 균체에 동일량의 증류수를 가하여 Sonicator(F60, Fisher Scientific, USA)로 세포벽을 파괴시킨 것을 시료로 하여 Owens와 Belcher의 방법으로 각 균주의 세포내 glutathione 생산능을 측정하였다. 분리한 균주 중에서 glutathione생산능이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하여 본 실험에 사용하였다. 균주의 일반적인 계대 배양은 YM 배지를 사용하였다.

2) 균주의 동정

Glutathione 생산균주의 동정은 서울대학교 유전공학특화 창업보육센터에 입주하고 있는 Micro ID Co., Ltd.에 의뢰하여 AIP 20C AUX kit 및 균체 지방산 분석(MIDI, Hewlett-Packard Model 6890A gas chromatography)으로 동정

하였다. 그리고 이 균주를 2% glutaraldehyde(0.1% MgSO₄ 함유 0.1 M Cacodylate buffer, pH 7.2)로 24시간 동안 실온에서 전 고정된 다음 0.1 M Cacodylate buffer(pH 7.2)로 2시간 동안 세척하고, 0.2 M Cacodylate buffer(pH 7.4)에 1% 농도가 되게 녹인 osmic acid(OsO₄) 용액으로 4℃에서 24시간 동안 처리하여 고정시켰다. 고정된 sample에서 용액을 제거한 뒤에 50, 70, 80, 90 및 95% 에탄올에서 각각 10분간 2회씩 탈수시켰다. 탈수한 뒤에 sample을 임계점 건조기에서 건조하고 platinum coating 한 다음 주사 전자 현미경(SEM, JSM-6700F, JEOL, Tokyo, JAPAN)으로 형태를 관찰하였다.

3) 건조 균체량의 측정

사면 배양한 분리균주를 YM 액체배지에 백금이로 1회 접종하고 30℃에서 72시간 진탕 배양한 후 배양액을 7,000×g에서 15분간 원심분리 하였다. 분리된 균체를 증류수로 1회 세척하고 80℃에서 24시간동안 향량이 될 때까지 건조시킨 후 각각 균체의 무게를 달리하여 취하고 증류수에 현탁시킨 후 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, JAPAN)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정한 표준곡선으로부터 배양액의 건조 균체량을 측정하였다.

4) Glutathione의 정량

Owens와 Belcher의 방법에 따라 0.2 M Phosphate buffer(pH 7.1) 2.5 ml, 1.0 mM EDTA 0.8 ml, 0.6 mM DTNB 0.03 ml, glutathione reductase(5 unit)와 시료 0.2 ml를 혼합한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하고 0.2 mM NADPH 용액 0.1 ml를 첨가하여 30℃에서 5분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. NADPH용액 첨가 전후의 흡광도 차이를 구하여 작성된 표준곡선으로부터 glutathione 함량을 정량하였다.

5) Glutathione 생산조건

배양시간에 따른 균체의 생육과 glutathione 생산량을 검토하기 위하여 YM 액체배지에 백금이로 1회 접종하고, 30℃에서 24시간 배양한 전배양액을 동일한 배지에 2% 접종하여 30℃에서 진탕배양하면서 12시간 간격으로 배양액을 취해 균체의 생육과 glutathione 생산량을 측정하였다. 그리고 YM 배지를 사용하여 온도, 교반조건 및 pH를 검토하였으며, glutathione 생산을 위한 최적 배지조성 검토는 YM 배지를 기본으로 하여 각종 영양원의 종류와 농도를 구하였다.

나. Glutathione 고함유 균주의 항산화 활성

1) DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

DPPH(α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 Whatman filter paper No. 2에 여과시켜 만들었다. 이 용액 5 ml에 시료용액 1 ml를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 이때 대조구인 BHT는 0.05% 농도로 첨가하여 위와 동일하게 방법으로 흡광도 감소를 측정하였다. DPPH를 이용한 전자 공여능(electron donating ability; EDA)은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{EDA (\%)} = \{1 - (\text{Abs} / \text{Abc})\} \times 100 \dots$$

Abc : Absorbance of control treatment at 528 nm

Abs : Absorbance of sample treatment at 528 nm

2) 각 조직 microsomal 분획의 조제

성장기의 정상 흰쥐로부터 적출한 각 조직을 냉각된 생리식염수로 즉시 씻고 여과지로 물기를 제거한 후 일정량을 취해 1.15% KCl-10 mM phosphate buffer(pH 7.4) 4 ml를 넣고 homogenizer(DIAX 900, Heidolph, Germany)로 균질화시켰다. 이 용액을 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상층액을 4 겹의 가아제로 여과하고, 여액을 4°C로 설정된 초원심분리기(Hitachi 55p-72, Tokyo, Japan)에서 45,000 rpm으로 45분간 원심분리 하여 얻어진 침전물에 1.15% KCl-10 mM phosphate buffer(pH 7.4) 10 ml를 넣은 후 microsomal 분획으로 하였다.

3) 각 조직 microsomal 분획을 이용한 항산화 활성 측정

항산화 활성은 Wong 등의 방법에 따라 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 1.5 ml에 시료용액 0.2 ml, 각 조직의 microsomal 분획(1 ml중 1 mg의 단백질 함유) 0.1 ml, 0.1 mM ascorbate 0.1 ml 및 5 mM FeSO₄ 0.1 ml를 차례로 가하여 반응액을 잘 혼합한 후 37°C의 shaking water bath에서 1시간 incubation 시켜 과산화물을 유도시켰다. 이때 대조구는 시료를 첨가시키지 않고 위와 동일하게 방법으로 실시하였다. Incubation이 끝나면 Esterbauer 등의 방법에 준하여 3 M trichloroacetic acid와 2.5 N HCl의 혼합용액 0.5 ml를 가하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액 1 ml를 취하여 0.67% TBA 1 ml를 가하여 혼합하고 끓는 물 속에서 30분간 가열하여 발색시켰다. 냉각 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 지질 과산화의 억제율은 대조구의 흡광도에 대한

저해율(%)로 비교하였다.

4) Thiocyanate에 의한 항산화 활성 측정

Osawa의 방법에 따라 먼저 linoleic acid (25 mg/ml in EtOH), ferrous chloride(2.45 mg/ml in 3.5% hydrochloric acid), ammonium thiocyanate(0.3 g/ml in H₂O), 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)를 조제하여 이것을 stock solution으로 사용하였다. 혼합용액은 시료용액 0.2 ml, linoleic acid 0.2 ml을 시험관에 넣고 혼합한 후 phosphate buffer 0.4 ml와 증류수 0.2 ml를 가하여 40℃에서 은박 포장 후 incubation하면서 일정기간의 간격으로 측정하였다. 측정방법은 혼합용액에서 0.1 ml를 취하여 test tube에 넣고 70% ethanol 3 ml과 ammonium thiocyanate 용액 0.1 ml, ferrous chloride 용액 0.1 ml를 혼합한 후 정확히 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성의 비교를 위하여 BHT를 0.05% 농도로 사용하여 BHT 첨가구로 하였다.

5) TBA(2-thiobarbituric acid)에 의한 항산화 활성 측정

시료용액 1 ml, linoleic acid (25 mg/ml in EtOH) 1 ml을 시험관에 넣고 혼합한 후 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 2 ml와 증류수 1 ml를 가하여 40℃에서 incubation 하면서 일정간격으로 측정하였다. 측정방법(49)은 시료액 0.5 ml를 centrifuge tube에 넣고 35% trichloroacetic acid 0.25 ml와 0.75% aqueous TBA 0.5 ml를 가하여 혼합한 후 boiling water bath에서 가끔 흔들면서 15분간 처리하였다. 이것을 흐르는 물에 냉각시킨 후 70% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가한 다음 20분 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하고, 그 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 사염화탄소 간 독성 유발 실험

1) 실험동물 사육 조건

실험동물은 8주령의 흰쥐를 구입하여 일주일간 시판 고형사료를 급여하면서 환경에 적응시킨 후 군당 6마리씩 난괴법(randomized complete block design)으로 분류하여 사육실 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 12시간(명주기: 07:00~19:00)이 자동 설정된 동물 사육실에서 사육하였다. 실험군은 반합성 식이를 6주간 투여한 후 올리브유만을 복강주사한 정상군(Normal group), 반합성 식이에 5% 수준으로 glutathione 고함유 효모 *S. cerevisiae* FF-8 균체 분말을 6주간 투여한 후 올리브유만을 복강주사한 FF-8군(FF-8 group), 반합성 식이를 6주간 투여한 후 올리브유에 사염화탄소를 용해

(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight)시켜 실험 최종 2일간 2회 복강주사 하여 급성 간 독성을 유발시킨 사염화탄소 군(CCl_4 group) 및 반합성 식이에 5% 수준으로 glutathione 고함유 효모 *S. cerevisiae* FF-8 균체 분말을 6주간 투여한 후 올리브유에 용해시킨 사염화탄소를 복강주사 한 사염화탄소+FF-8군(FF-8+ CCl_4 group)으로 나누었다. 본 실험에 사용한 식이조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of experimental diet(%)

Ingredients	Normal	FF-8 ¹⁾	CCl_4 ²⁾	CCl_4 plus FF-8
Casein	20	15	20	15
α -Corn starch	15	15	15	15
Corn oil	10	10	10	10
Cellulose	5	5	5	5
AIN-93 mimeral mixture	4	4	4	4
AIN-93 vitamin mixture	1	1	1	1
L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Sucrose	44.5	44.5	44.5	44.5
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
FF-8 powder	0	5.0	0	5.0

1) FF-8 : glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 strain

2) CCl_4 : Carbon tetrachloride

2) 분석시료의 조제

실험 최종일 흰쥐에 사염화탄소를 최종 주사 한 후 12시간 후 에테르로 가볍게 마취시켜 복부 대동맥으로부터 채혈하여 얻어진 혈액은 약 30분간 실온에서 방치시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중의 지질농도 및 간 기능 지표 효소 활성을 측정 하였다. 간 조직은 적출한 후 냉각된 생리식염수로 충분히 세척하고 물기를 제거한 다음 장기 무게를 측정하고, -80°C 에서 보존하면서 실험분석에 제공하였다.

3) 혈청 지질농도 및 생화학적 지표분석

사염화탄소에 의한 간 독성 억제 효과를 검토하기 위하여 Total lipid, triglyceride, total-cholesterol, HDL-cholesterol, nonesterified fatty acid (NEFA), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP) 활성은 의료전문수탁검사기관인 네오딘 의학연구소에 의뢰하여 분석하였다. 간장 총 지질은 Folch 등의 방법에 준하여 간장 1g을 chloroform: methanol 의 2:1 혼합액으로서 지질을 추출하여 -40℃의 냉동고에서 보관하면서 지질분석에 이용하였다. 간 조직의 중성 지질 농도는 추출 순화한 지질의 일정량을 농축하여 석유에테르에 용해시켜 시판효소법 (Triglyceride-E test wako; Wako Junyaku, Osaka, Japan)으로 측정 하였다.

4) Glutathione의 정량

간 조직 중의 glutathione 함량 측정은 Beutler 및 Kelly (17)의 방법에 따라 0.2 M Phosphate buffer(pH 7.1) 2.5 ml, 1.0 mM EDTA 0.8 ml, 0.6 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 0.03 ml, glutathione reductase(5 unit)와 시료 0.2 ml를 혼합한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하고 0.2 mM NADPH 용액 0.1 ml를 첨가하여 30℃에서 5분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. NADPH용액 첨가 전후의 흡광도 차이를 구하여 작성된 표준곡선으로부터 glutathione 함량을 청량하였다.

5) 간조직의 병리조직학적 관찰

동물해부 직후 적출한 간을 냉각 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거시킨 상태에서 조직의 일정한 부위의 일부를 취하여 10% 중성포르말린 용액에 고정하여 통상적인 조직처리인 파라핀 포매 과정을 거쳐 3~4 μ m 두께로 절편하여 hematoxylin 및 eosin (H&E) 염색 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

6) 간장 microsome 획분의 조제 및 항산화 활성 조사

정상식을 급여한 흰쥐를 디에틸에테르로 가볍게 마취시켜 개복하여 적출한 간장을 냉각된 생리식염수로 즉시 씻고 여과지로 물기를 흡수시킨 다음 일정량 취해 1.15% KCl-10 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 homogenizer로 균질화 시켰다. 이 용액을 4℃로 설정된 냉각원심분리기로 12,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 4겹의 거즈로 여과하고, 여액을 4℃로 설정된 초원심분리기(Hitachi 55p-72, Tokyo, Japan)에서 45,000 rpm으로 45분간 원심분리하여 침전된 획분에 1.15% KCl-10 mM phosphate

buffer (pH 7.4)을 일정량 가하여 microsome 획분으로 하였다. 항산화 활성은 Wong 등의 방법에 따라 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 1.5 mL에 각 시료 용액 0.2 mL (6 mg/mL), 간 microsome 분획(1 mL중 1 mg의 단백질 함유) 0.1 mL, 0.1 mM ascorbate 0.1 mL 및 5 mM FeSO₄ 0.1 mL를 차례로 가하여 반응액을 잘 혼합한 후 37°C의 shaking water bath에서 1시간 incubation 시켜 과산화물을 유도시켰다. 이때 대조구는 시료를 첨가시키지 않고 위에서와 동일한 방법으로 행하였다. 반응후 3M trichloroacetic acid와 2.5N HCl의 혼합용액 0.5 mL를 가하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액 1 mL를 취하여 0.67% TBA 1 mL를 가하여 혼합하고 끓는 물 속에서 30분간 가열하여 발색시켰다. 냉각 후 533 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 지질과산화의 억제율은 대조군의 흡광도에 대한 저해율(%)로 비교하였다.

7) 통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean±S.E.)로 표시하였으며, 각 실험군간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

라. *Saccharomyces cereviciae* FF-8 발효액과 시판 제품의 면역증강 비교실험

1) 실험동물

실험에 사용한 Rat는 SD계 수컷으로 효창사이언스(대구)에서 구입하여 사용하였다. 각군 6마리씩 스테인레스 케이지에 랜덤으로 배분하였다. 사육실 온도는 22±2°C, 습도는 55~60%로 유지되며 명암 순환이 12시간 단위로 조절되는 환경에서 키우고 분말사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

2) 시료제조

본 실험에서 분리한 균주인 *Saccharomyces cereviciae* FF-8로 발효시킨 발효액 및 시판하고 있는 칸네주스(밀 효모발효추출액, 독일산)를 시료로 사용하여 대식세포 활성능을 비교, 측정하였다.(Fig. 1)

3) 세포배양배지

실험에 사용한 세포 배양액은 RPMI1640(Rosewell Park Memorial Institute; GIBCO)에 2mg/ml sodium bicarbonate(GIBCO), 2×10⁻²M HEPES

buffer(GIBCO), $5 \times 10^{-3}N$ HCl (GIBCO), 10% 우태아혈청 (Fetal bovine serum, FBS; GIBCO), 100 U/mL penicillin(GIBCO), 100 ug/mL streptomycin(GIBCO), $5 \times 10^{-5}M$ 2-mercaptoethanol(Sigma)를 첨가하여 완전 배지로 사용하였다.

4) 면역세포(비장림프구, 복강대식세포)분리

생쥐를 경추 탈골시킨 다음 70% ethanol로 복부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하여 멸균된 Hank's balanced salt solution(HBSS; GIBCO)이 담긴 petri-dish로 옮겨, 멸균된 수술용 칼로 칼집을 낸 뒤 핀셋으로 지분거려 세포를 부유시킨 후 약 1분간 정치시켜 조직 파편을 제거한 후 500g에서 10분간 원심침전시켰다. 혼입된 적혈구를 제거하기 위하여 cell pellet을 ACK buffer(Tris-NH₄Cl)에 현탁하여 1분간 정치한 뒤 FBS 10mL을 첨가하였다. 그리고 FBS로 2회 세척하고 tripan blue 염색법으로 살아있는 세포수를 계수한 후 완전배지에 적정농도로 조정하였다. 복강세포는 thioglycollate 1.5mL을 생쥐의 복강에 주사한 후 4일 후 경추 탈골로 희생시킨 다음 pasteur pipet을 이용하여 FBS로 복상을 잘 세척하여 복강세포를 수거하였다.

5) 복강 대식세포의 탐식능 측정

대식세포의 탐식능 측정은 Iwao Suzuki의 방법을 변형하여 수행하였다. 생쥐의 복강에서 세포를 수거하여 계수 후 dish에서 2일 동안 배양하였다. 그 후 dish에 부착하지 않은 세포는 PBS로 2번 세척하여 버리고 5×10^7 fluorescent microbeads (1um, Polysciences)/ 1×10^6 cell를 넣고 45분간 배양하였다. 배양 후 비탐식 부유입자(microbeads)를 FBS로 3번 세척하여 제거하고 세포 표면에 붙은 비탐식 부유입자를 제거하기 위해 trypsin을 1분간 처리하고 3번을 세척하였다. 그 후 부착되어 있는 세포를 떼어서 tube에 옮긴 다음 현광 현미경을 통하여 세포 안에 탐식된 microbeads를 세었으며, 각 시험군당 총 300개의 세포를 관찰하였다.

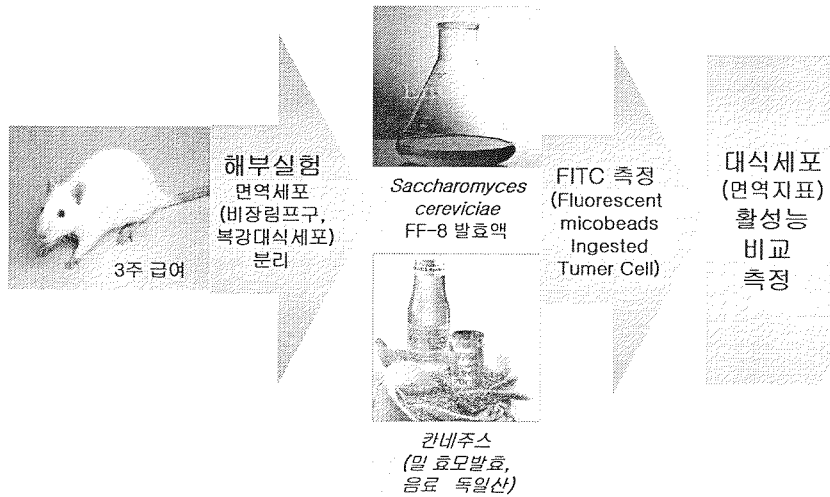


Fig. 1. *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 발효액 및 칸네주스(밀 효모발효음료)를 시료로 사용하여 대식세포 활성능을 비교, 측정

3. 실험결과

가. Glutathione 고함유 균주의 분리 및 생산조건

1) 균주의 분리 및 동정

부산광역시 금정구 금정산성 일대에서 수집한 전통 쌀 막걸리로부터 1차적으로 분리한 균주 중에서 효모로 추정되며 생육이 비교적 우수한 균주 5주를 선별하여 그 중 glutathione 생산능이 우수한 균주를 최종적으로 선별하여 본 실험에 사용하였다(Table 1). 최종 선별한 glutathione 생산 균주를 동정하고자 전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과(Fig. 2), 분리된 균주는 타원형으로 크기는 $4.5 \times 3.4 \mu\text{m}$ (장축×단축)로 비교적 일반적 크기의 효모이었으며, 출아흔을 발견할 수 있어 출아법으로 증식함을 알 수 있었다. 한편 분리균의 생리화학적 특성을 API 20C AUX kit로 동정한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었으며(Table 2), 균체 지방산 분석으로 세포막의 지방산 조성을 분석한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 재확인되어 본 연구자들에 의해 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8로 명명되었다(Table 3).

Table 2. Measure of glutathione production and dry cell weight on yeasts isolated from Korean traditional rice wine

Yeast	Glutathione (mg/l)	Dry Cell Weight (g/l)
FF8-1	49.2	4.05
FF8-2	74.1	4.68
FF8-3	39.8	2.62
FF8-4	38.9	4.02
FF8-5	35.2	4.63

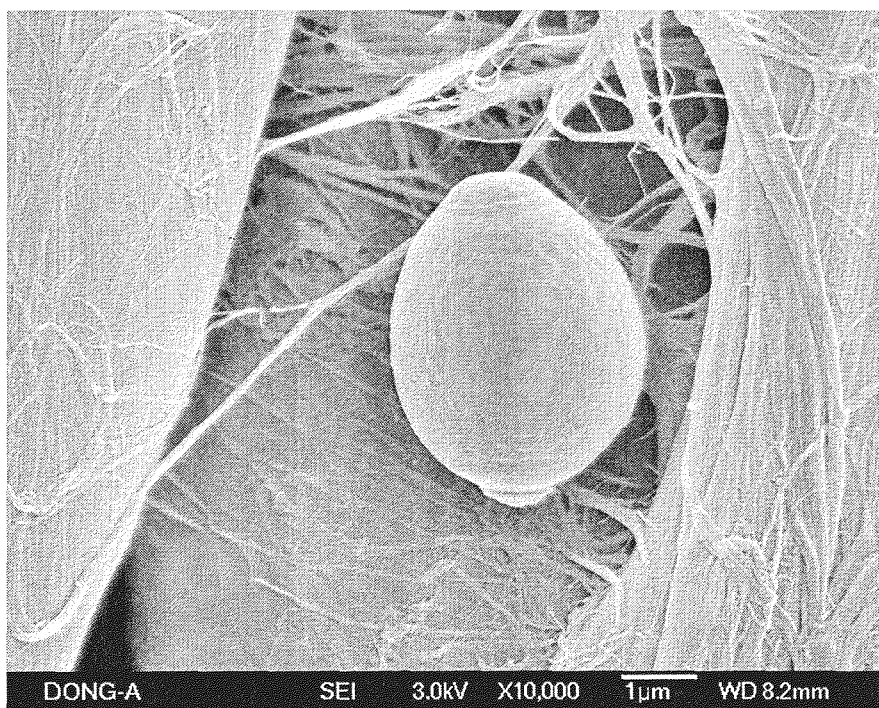


Fig. 2. Scanning electron micrograph of the isolated *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 ($\times 10,000$).

Table 3. Physiological characteristics of the isolated *Saccharomyces cerevisiae* FF-8¹⁾

Carbon source	Assimilation
Control	- ²⁾
Glucose	+
Glycerol	-
2-Keto-gluconate	-
L-Arabinose	-
D-Xylose	-
Adonitol	-
Xylitol	-
Galactose	+
Inositol	-
D-Sorbitol	-
α-Methyl-D-glucoside	-
N-Acetyl-glucosamine	-
Cellobiose	-
Lactose	-
Maltose	+
Sucrose	+
Trehalose	-
Melezitose	-
Raffinose	+
Hyphae/Pseudohyphae	-

¹⁾ used with API 20C AUX kit

²⁾ +: positive, -: negative

Table 4. Composition of cellular fatty acid of the isolated *Saccharomyces cerevisiae* FF-8

Fatty acid composition	FF-8
C ₁₄ : 0	1.5
C ₁₆ : 1 cis9(w7)	53.3
C ₁₆ : 0	14.5
C ₁₈ : 1 cis9(w9)	28.0
C ₁₈ : 0	2.7
ID	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (0.423)

2) Glutathione의 생산조건

가) 배양시간에 따른 균체 생육 및 glutathione 생산

YM 배지에서 배양시간에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주의 생육과 glutathione 생산량을 검토한 결과, Fig. 3에서와 같이 균체의 생육은 배양초기부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 72시간에서 최대를 나타내었으며 그 이후부터 점차적으로 감소하는 경향이였다. 이 때 glutathione 생산량은 배양 24시간까지는 균체 생육과 차이를 나타내 보였으나, 36시간부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 72시간째에 최대량을 나타내어 균체의 생육과 동일한 양상을 나타내었다. 이는 Shin 등이 분리한 *Candida* sp.에 의한 glutathione 생산에서 배양 36시간에 최대량을 나타내었다는 보고와는 시간적으로는 차이가 있었으나, 균주의 대수성장기가 지난 후 glutathione 생산량이 최대가 되었다는 보고와는 유사한 결과를 나타내었다.

나) 배양온도에 따른 glutathione의 생산조건

Saccharomyces cerevisiae FF-8의 온도 변화에 의한 균체의 생육 및 glutathione 생산량을 검토하기 위해 YM 배지를 20, 25, 30, 35 및 40℃에서 72시간 진탕 배양한 결과는 Fig. 4과 같다. 균체의 생육과 glutathione 생산량은 30℃에서 최대 함량을 나타내었으며 30℃ 이상의 온도에서는 glutathione 생산량이 급격하게 감소하였다. Shinichiro 등은 *Saccharomyces cerevisiae*의 경우 20~40℃의 배양온도에서 glutathione 생산량이 높다고 보고하였고,

Tadayuki 등은 *Candida utilis*의 경우 24℃에서 glutathione 생산량이 높다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 분리된 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*의 최적 생산온도와 유사한 결과를 나타내었다.

다) 교반속도에 따른 glutathione의 생산조건

Saccharomyces cerevisiae FF-8의 교반속도에 따른 균체의 생육 및 glutathione 생산량을 검토하기 위해 YM 배지를 사용하여 30℃에서 0, 50, 100, 150 및 200 rpm으로 72시간 배양한 결과는 Fig. 5와 같다. 균체의 생육은 shaking rate가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였지만, glutathione 생산량은 교반속도 100 rpm에서 최대량을 나타내었으며 그 이상의 교반속도에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 진탕함으로써 균체가 응집되지 않고 분산되어 기질과 작용하는 반응면적이 넓어지고 호기성균주로서 산소의 이용성 증대로 균체의 생육은 증가되지만, 과도한 진탕은 오히려 glutathione 생산을 저해하는 것으로 생각되어진다.

라) 초기 pH에 따른 glutathione의 생산조건

Saccharomyces cerevisiae FF-8의 초기 pH에 의한 균체의 생육 및 glutathione 생산량을 검토하기 위해 YM 배지의 pH를 4~10으로 조정하여 30℃에서 100 rpm으로 72시간 배양한 결과는 Fig. 6와 같다. 균체의 생육은 초기 pH가 5에서 최대값을 나타내었고, glutathione 생산량은 초기 pH가 6에서 최대량을 나타내었다. Kenzo 등은 *Candida krusei*의 경우 pH 6에서 glutathione 생산량이 높다고 보고하였으며, Tadayuki 등도 pH 6에서 glutathione 생산량이 높다고 보고하여 본 연구에서 분리하여 사용한 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주와 유사한 결과를 나타내었다.

마) 탄소원에 따른 영향

탄소원의 종류에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 생육과 glutathione 생산량을 검토하기 위해 YM 배지의 탄소원으로 glucose, galactose, fructose 등의 단당류와 lactose, maltose, sucrose 등의 이당류, 그리고 soluble starch와 같은 다당류를 각각 1%가 되도록 첨가하여 배양한 결과는 Table 4와 같다. 이당류인 lactose를 첨가한 경우에는 균체의 생육 및 glutathione 생산이 강력히 억제되었지만 그 외의 탄소원에서는 비교적 안정된 균체의 생육 및 glutathione 생산량을 나타내었다. 균체의 생육은 sucrose에서 가장 높게 나타났으며 glutathione 생산량은 glucose에서 가장 높게 나타내어 glucose의 농도를 무첨가, 1, 2, 3, 4 및 5%로 첨가하여 배양한 후 균체의 생육

과 glutathione 생산량을 측정하였다(Fig. 7). 균체의 생육은 glucose의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였지만, glutathione 생산량은 3%로 첨가하였을 때 최대량을 나타내었으며 그 이상의 경우에는 감소하는 경향을 보였다. Shimizu 등은 균체의 생육에서는 sucrose와 fructose가 우수하였고 glutathione 생산에는 glucose가 가장 높은 생산효과를 나타내었다고 보고하였으며, Liu 등도 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 glutathione 생산에서 탄소원으로 glucose가 가장 우수한 생산효과를 나타내었다고 보고하여 본 연구에서 분리된 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주와 유사한 결과를 나타내었다.

바) 질소원에 따른 영향

질소원의 종류에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 생육과 glutathione 생산량을 검토하기 위해 YM 배지의 질소원으로 peptone, tryptone, yeast extract, malt extract, beef extract, casein, soybean meal 등의 유기 질소원과 NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 등의 무기 질소원을 각각 1%가 되도록 첨가하여 배양한 결과는 Table 5와 같다. 균체의 생육은 유기 질소원인 tryptone에서 가장 높게 나타났으며 무기 질소원인 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에서는 가장 낮았다. Glutathione 생산량도 대체적으로 유기 질소원이 무기 질소원 보다 높게 나타내었으며, 특히 yeast extract에서 가장 높게 나타내어 yeast extract의 농도를 무첨가, 1, 2, 3, 4 및 5%로 첨가하여 배양한 후 균체의 생육과 glutathione 생산량을 측정하였다(Fig. 8). 균체의 생육은 yeast extract의 농도가 증가함에 따라 증가하여 4%에서 가장 높게 나타났지만, glutathione 생산량은 3%에서 최대량을 나타내었으며 그 이상의 경우에는 감소하는 경향을 보였다. 이렇게 glutathione 생산에 있어서 가장 큰 영향을 미치는 질소원으로 Shin 등은 yeast extract가 우수하였다고 보고하였으며, Liu 등도 질소원으로 yeast extract와 peptone이 가장 높은 glutathione 생산 효과를 나타내었다고 보고하여 본 연구에서 분리된 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주와 유사한 결과를 나타내었다.

사) 무기질원에 따른 영향

미량성분으로서 무기질원의 종류에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 생육과 glutathione 생산량을 검토하기 위해 최적 생산조건의 탄소원과 질소원을 함유한 배지에 무기질원으로 MgSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , CaCl_2 , FeSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 등의 무기질원을 각각 0.05%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 6과 같다. 균체의 생육은 NaCl , CaCl_2 , MnSO_4 등에서 가장 높게 나타났지만, glutathione 생산량은 KH_2PO_4 에서 가장 높게 나타내어 KH_2PO_4 의

농도를 무첨가, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 및 0.10%로 첨가하여 배양한 후 균체의 생육과 glutathione 생산량을 측정하였다(Fig. 9). 균체의 생육과 glutathione 생산량은 KH_2PO_4 의 농도가 증가함에 따라 증가하여 0.06%에서 최대량을 나타내었으며 그 이상의 경우에는 감소하는 경향을 보였다. Gamarallage 등은 효모를 배양하는데 있어 다양한 무기질원이 영향을 주는데, 특히 K^+ , Mg^{+2} 그리고 Ca^{+2} 이 효모내 대사과정에 직접적인 영향을 준다고 보고하였으며, Kim 등은 *Candida* sp. 변이주를 이용한 glutathione 생산에서 무기질원으로 KH_2PO_4 가 가장 좋았다고 보고하여 본 연구에서 분리된 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주와 유사한 결과를 나타내었다.

아) 아미노산에 따른 영향

Glutathione의 전구체로 다양한 아미노산의 영향에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 생육과 glutathione 생산량을 검토하기 위해 최적 생산조건의 탄소원과 질소원, 그리고 무기질원을 함유한 배지에 L-glutamic acid, L-cysteine, glycine, L-methionine, L-cystine, taurin 등의 아미노산을 각각 0.05%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 7과 같다. 균체의 생육은 L-cystine에서 가장 높게 나타났으나 glutathione 생산량은 L-cysteine에서 가장 높게 나타내어 L-cysteine의 농도를 무첨가, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 및 0.10%로 첨가하여 배양한 후 균체의 생육과 glutathione 생산량을 측정한 결과, Fig. 10에서와 같이 0.06%에서 최대를 나타내어 Murata 등의 glutathione 생산 실험에서 L-cysteine이 glutathione 생산에 절대적으로 필요하다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

자) Glutathione 생산의 최적 조건

지금까지의 연구결과로 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 glutathione 생산량에 영향을 미치는 최적 배지조성을 검토한 결과는 Table 8과 같다. 이렇게 최적배지를 사용하여 배지 초기 pH를 6으로 조정하고 30℃에서 100 rpm으로 배양시간에 따른 균체의 생육 및 glutathione 생산량을 YM 액체배지와 비교 검토한 결과, Fig. 11에서와 같이 72시간에서 균체의 생육 및 glutathione 생산량이 최대 함량을 나타내어 YM 배지에서의 배양시간에 따른 결과와 유사한 경향을 나타내었지만, glutathione 생산은 90 mg/l에서 204 mg/l로 약 2.3배, 건조균체 중의 glutathione은 15.6 mg/g에서 21.5 mg/g으로 약 1.4배 정도 증가하였다.

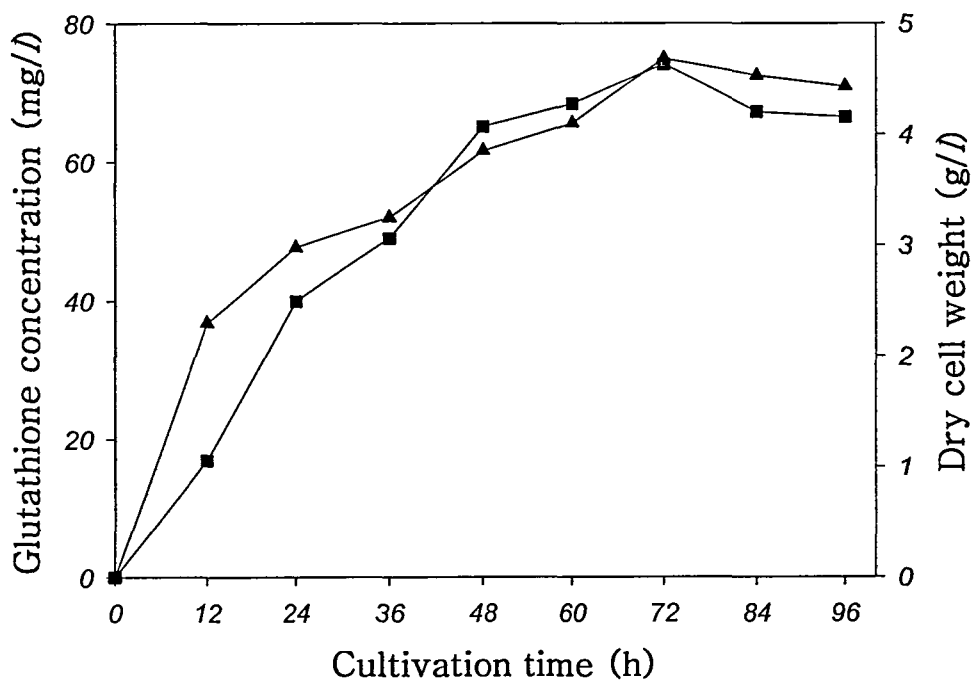


Fig. 3. Profiles of glutathione production and dry cell weight by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 during cultivation.

(-■- : Glutathione, -▲- : Dry cell Weight)

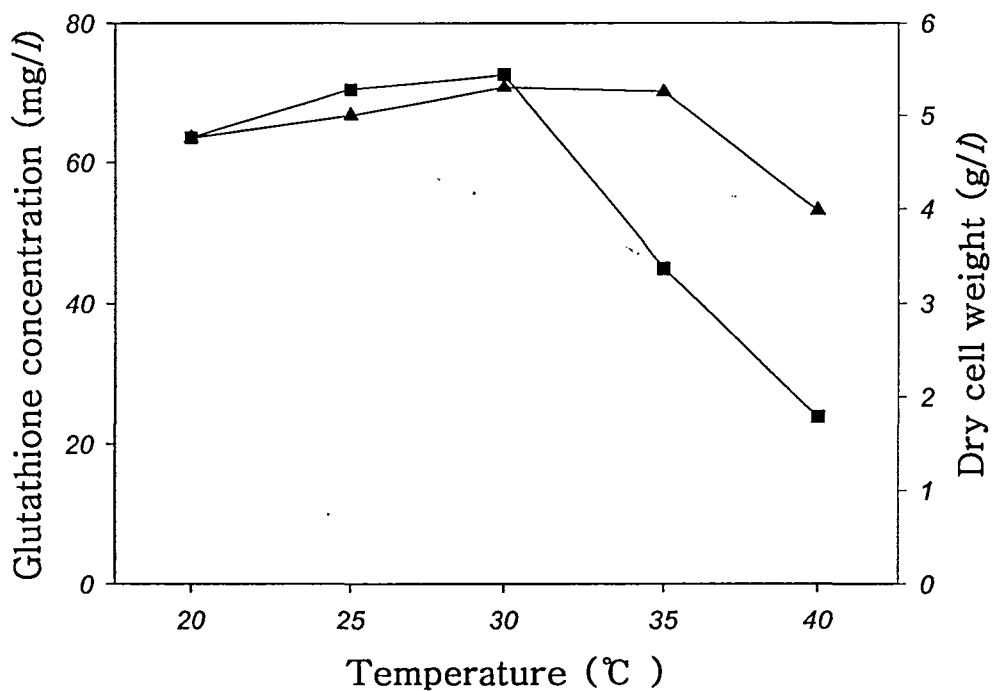


Fig. 4. Effect of temperature on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture.

(-■- : Glutathione, -▲- : Dry cell Weight)

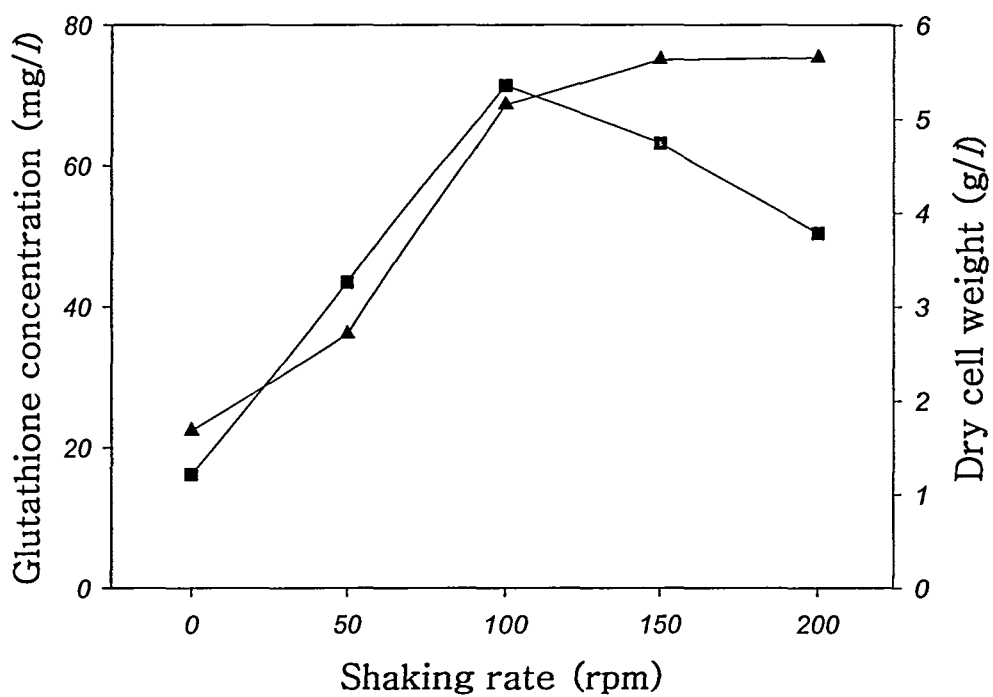


Fig. 5. Effect of shaking rates on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture.

(-■- : Glutathione, -▲- : Dry cell Weight)

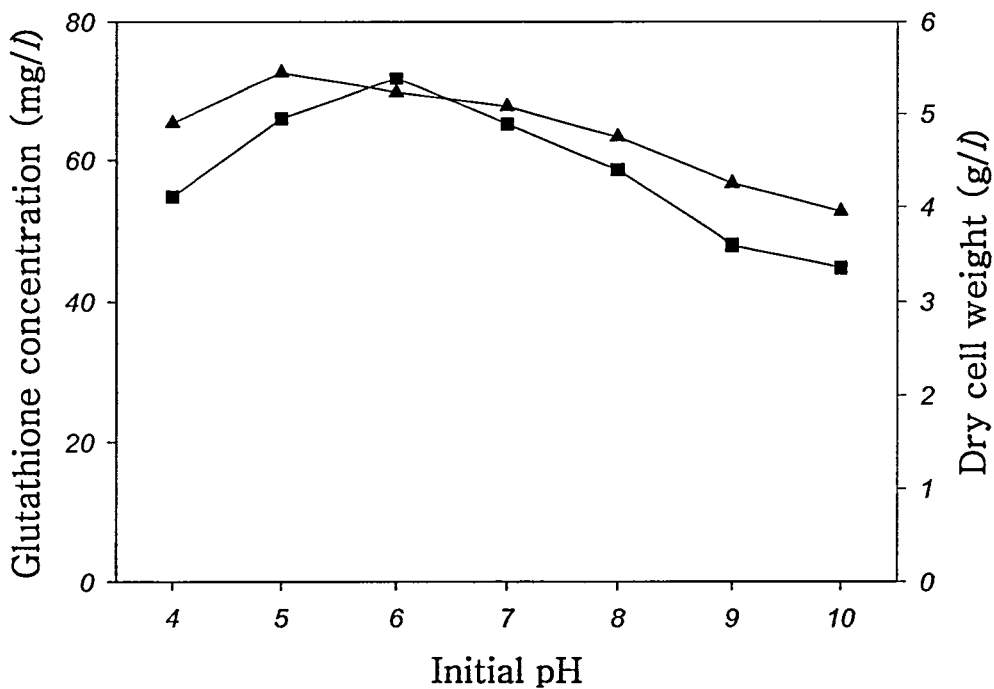


Fig. 6. Effect of initial pH on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture.
 (-■- : Glutathione, -▲- : Dry cell Weight)

Table 5. Effect of various carbon sources on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture

Carbon source	Glutathione		Dry Cell Weight	
	(mg/l)	(%)	(g/l)	(%)
Glucose	57.6	100.0	4.15	100.0
Galactose	54.6	94.8	4.05	97.6
Fructose	52.4	91.0	4.13	97.6
Lactose	18.8	32.6	2.10	50.0
Maltose	56.6	98.3	4.00	95.2
Sucrose	53.8	93.4	4.23	100.0
Soluble starch	2.4	4.2	2.38	57.3

The medium contained 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, and the carbon sources were added at a concentration of 1.0% (w/v).

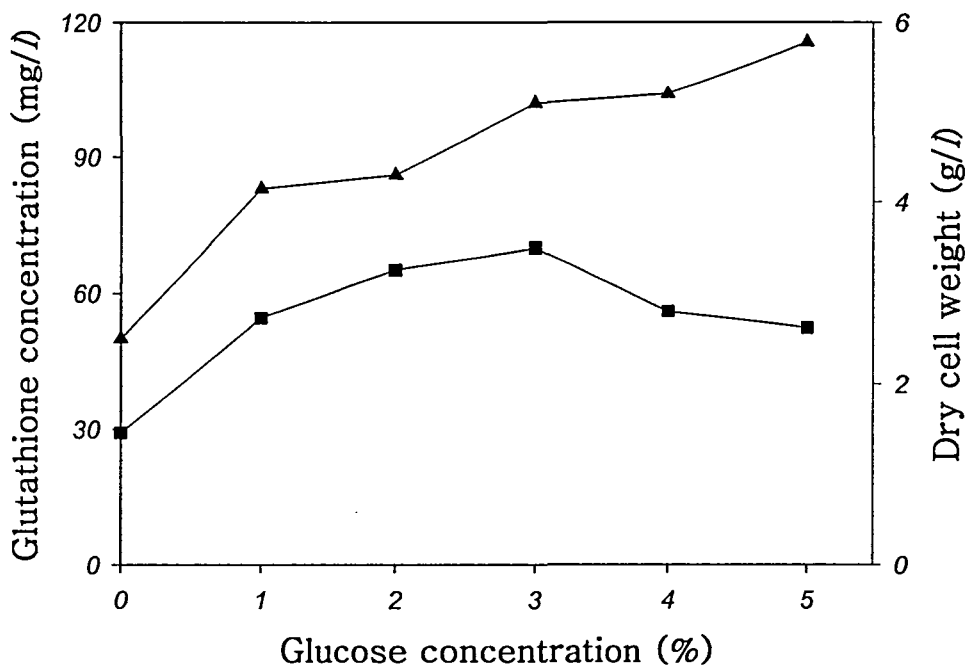


Fig. 7. Effect of glucose concentration on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture. (-■- : Glutathione, -▲- : Dry cell Weight)

Table 6. Effect of various nitrogen sources on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture

Nitrogen source	Glutathione		Dry Cell Weight	
	(mg/l)	(%)	(g/l)	(%)
Peptone	66.4	100.0	4.60	100.0
Tryptone	67.4	101.5	5.80	126.1
Yeast extract	88.4	133.1	5.63	121.7
Malt extract	46.2	69.6	4.85	106.5
Beef extract	44.4	66.9	3.77	82.6
Casein	36.0	54.2	3.94	84.8
Soybean meal	64.2	96.7	4.53	97.8
NaNO ₃	41.2	62.0	4.28	93.5
NH ₄ Cl	37.2	56.0	3.83	82.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	26.2	39.5	2.91	63.0

The medium contained 3.0% glucose, and the nitrogen sources were added at a concentration of 1.0% (w/v).

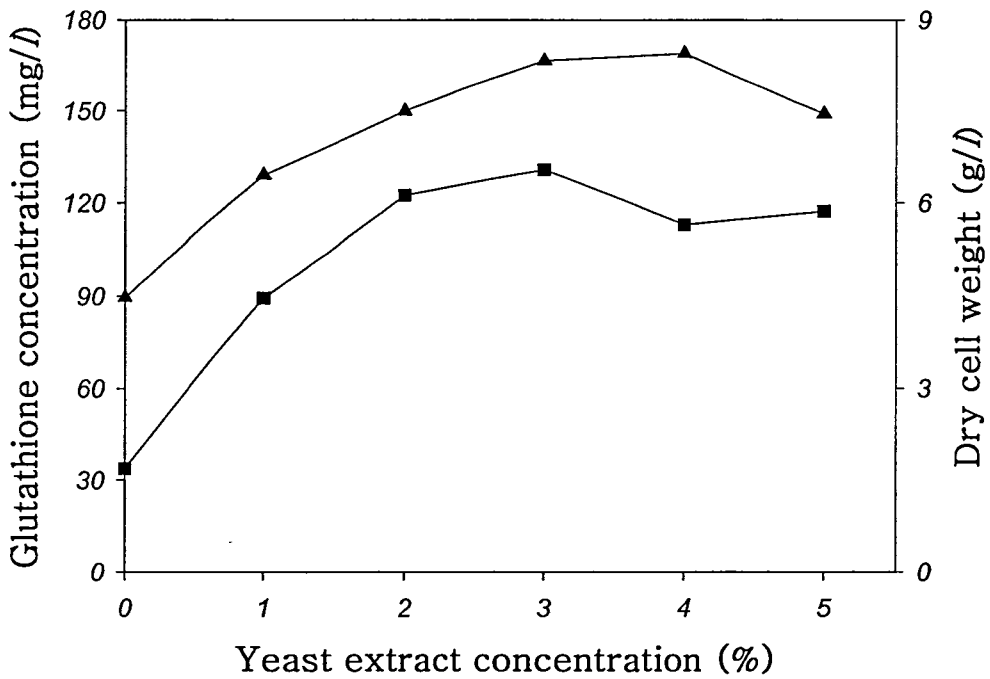


Fig. 8. Effect of yeast extract concentration on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture.

(-■- : Glutathione, -▲- : Dry cell Weight)

Table 7. Effect of various salt sources on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture

Salt source	Glutathione		Dry Cell Weight	
	(mg/l)	(%)	(g/l)	(%)
Control ^a	127.0	100.0	8.30	100.0
MgSO ₄	135.8	106.9	8.30	100.0
K ₂ HPO ₄	140.0	110.2	8.60	103.6
KH ₂ PO ₄	144.8	114.0	8.68	104.8
NaCl	130.2	102.5	8.73	104.8
CaCl ₂	128.6	101.3	8.73	104.8
FeSO ₄	126.4	99.5	8.53	102.4
ZnSO ₄	143.2	112.8	8.85	107.2
MnSO ₄	140.0	110.2	8.73	104.8

^a The control medium contained 3.0% glucose, 3.0% yeast extract, and the salt sources were added at a concentration of 0.05% (w/v).

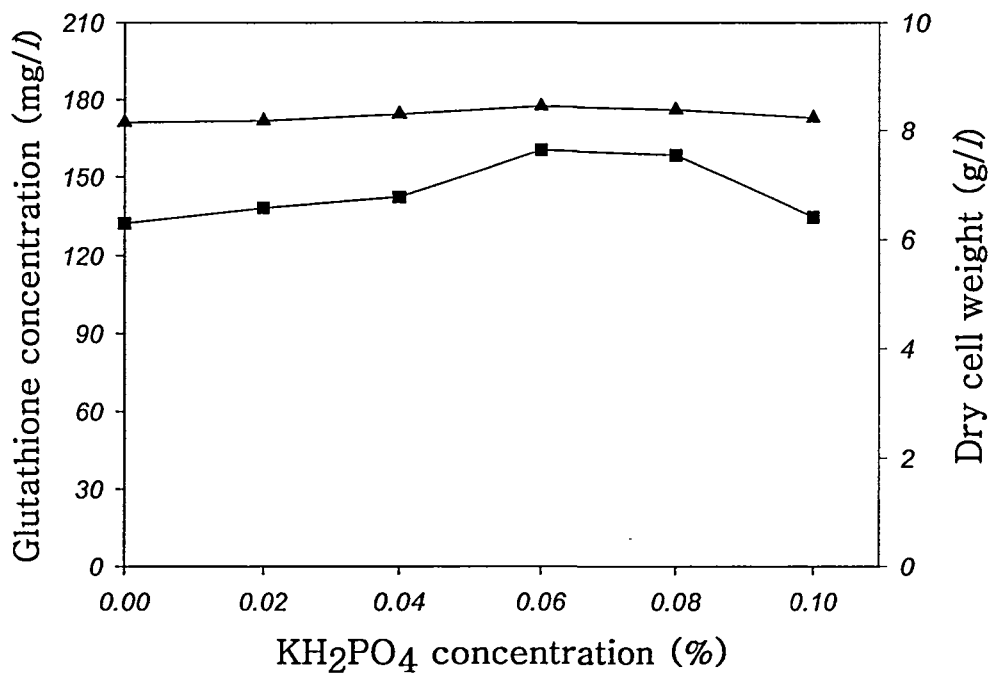


Fig. 9. Effect of KH₂PO₄ concentration on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture. (-■- : Glutathione, -▲- : Dry cell Weight)

Table 8. Effect of various amino acid sources on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture

Amino acid source	Glutathione		Dry Cell Weight	
	(mg/l)	(%)	(g/l)	(%)
Control ^a	158.0	100.0	8.40	100.0
L-Glutamic acid	139.0	88.0	8.15	97.6
L-Cysteine	200.4	126.8	8.28	98.8
Glycine	132.8	84.1	7.43	88.1
L-Methionine	150.0	94.9	7.98	92.9
L-Cystine	140.6	88.9	8.40	100.0
Taurin	134.0	84.8	7.90	94.0

^a The control medium contained 3.0% glucose, 3.0% yeast extract, KH₂PO₄ 0.06%, and the amino acid sources were added at a concentration of 0.05% (w/v).

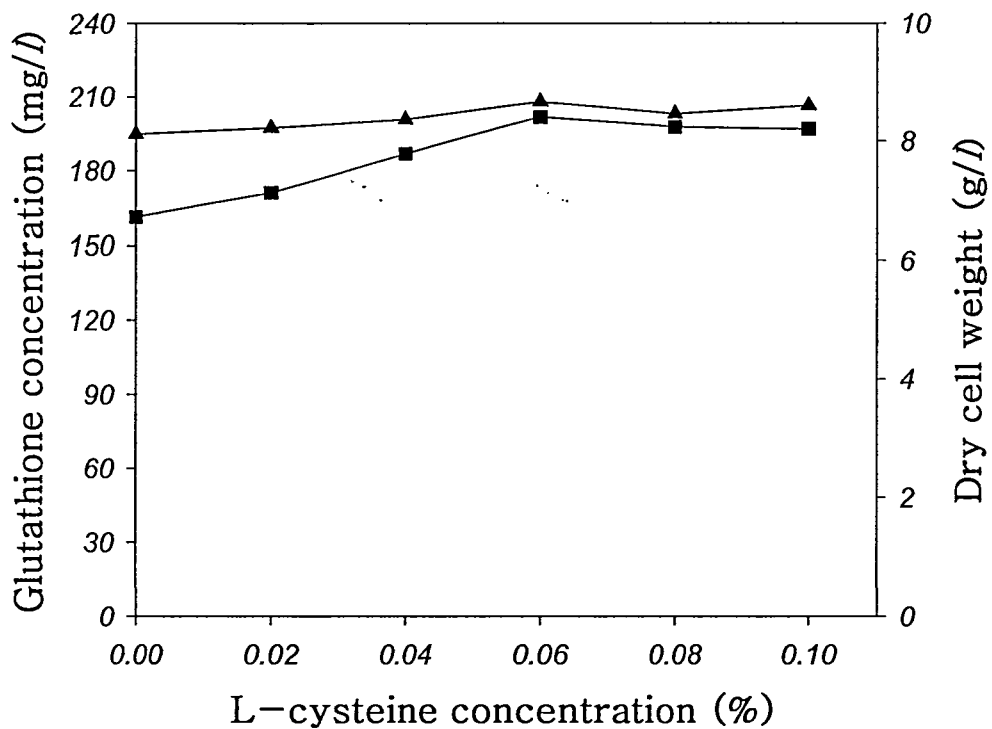


Fig. 10. Effect of L-cysteine concentration on glutathione production and dry cell weight in *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 culture. (■ : Glutathione, ▲ : Dry cell Weight)

Table 9. Optimal medium composition for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8

Medium component	Concentration (w/v)
Glucose	3.0%
Yeast extract	3.0%
KH ₂ PO ₄	0.06%
L-Cysteine	0.06%

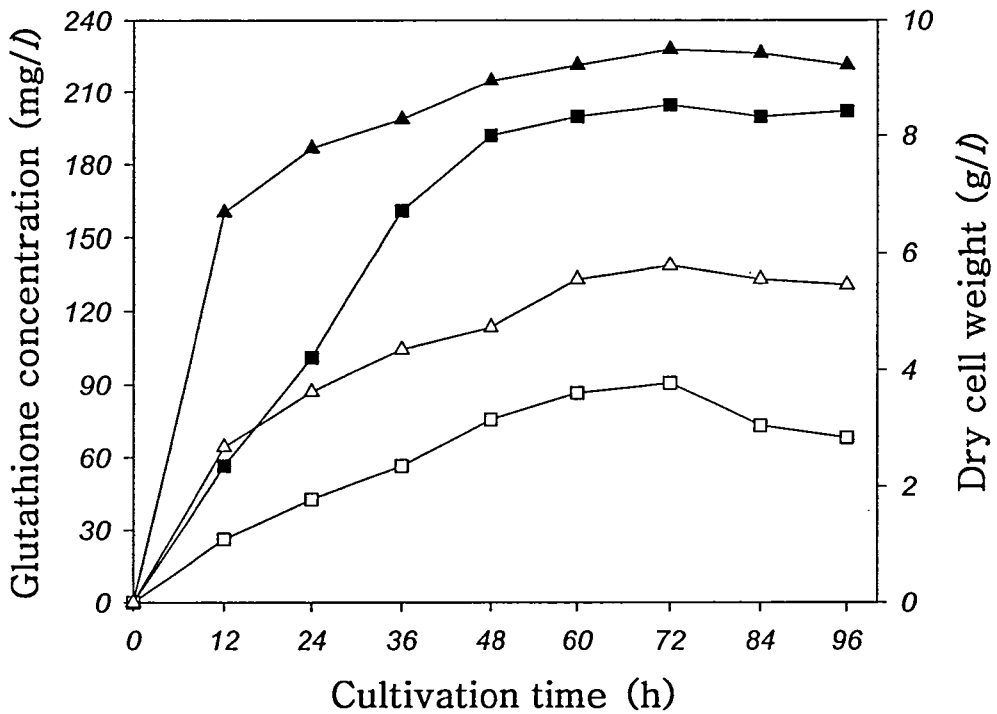


Fig. 11. Time courses of glutathione production and dry cell weight by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in the optimal medium and the YM medium.

Optimal medium(-■-: Glutathione, -▲-: Dry Cell Weight), YM medium(-□-: Glutathione, -△-: Dry Cell Weight)

나. Glutathione 고함유 균주의 항산화 활성

1) DPPH법에 의한 전자 공여능

DPPH는 비교적 안정한 free radical로써, ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는데, 이러한 DPPH법은 시료 용액의 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 실제 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되는 방법이다. *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 YM 배지와 최적 생산배지에서 생산된 glutathione의 항산화 효과를 DPPH radical 제거정도를 측정하여 전자 공여능으로 비교한 결과, YM 배지에서 55.49%, 최적 생산배지에서 67.26%로 나타나 glutathione 생산량이 증가함에 따라 항산화 활성도 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 12). 특히 glutathione 함량이 높은 최적 생산배지의 경우 대조구인 0.05% BHT와 비슷한 수준으로 높은 항산화 활성이 나타났다.

2) 각 조직 microsome의 지질 과산화 억제활성

동물 각 조직으로부터 조제한 microsome 분획은 free radical 반응에 의해 과산화 되기 쉬운 불포화지방산을 많이 함유하고 있는 세포막으로 생체에서 일어나는 지질 과산화의 *in vivo* 실험계 뿐만 아니라 *in vitro* 실험계로도 널리 이용되어 오고 있다. 이러한 지질 과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 또는 당뇨병 등 생체 이상에 의해 각 세포에 중대한 손상을 입히는 것으로 알려져 있다. 작용 기전은 조직 내 세포의 산화적 스트레스의 증가, 즉 free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인해 일어나게 된다. 이러한 지질 과산화 반응으로 형성된 지질 과산화물은 생체 내에서 퇴행성 과정을 유발하고, 압, 노화, 생체막의 변화 및 파괴 등 생체기능에 좋지 못한 효과를 나타내므로 생체 내에서 지질 과산화물의 제어는 매우 중요하다. 동물 체내에서 생체막 지질의 과산화물 생성 정도를 나타내는 TBARS 함량은 각 조직세포의 microsome에 Fe^{2+} /ascorbate을 첨가하여 비효소적으로 유도하는데, *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 YM 배지와 최적 생산배지에서 생산된 glutathione이 각 조직세포의 TBARS 함량에 미치는 영향을 Fig. 13에 나타내었다. 각 조직세포 microsome 세포막 불포화지방산의 과산화지질 억제효과는 glutathione 함량이 높은 최적 생산배지가 YM 배지보다 전체적으로 높게 나타났다. 간장 60.98%, 신장 56.43%, 심장 52.91%, 뇌 52.13%, 고환 45.57% 및 비장 42.95% 순으로 나타나 대조구인 0.05% BHT와 비교적 비슷한 억제효과를 나타내었다. 특히 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8이 생산한 glutathione은

다른 조직에서 보다 간장에서 지질과산화 억제 효과가 더욱 높게 나타나 동물을 이용한 *in vivo* 실험계에서 항산화 활성 뿐만 아니라 간장질환 억제효과를 동시에 확인해볼 필요성이 제기되었다.

3) Linoleic acid 산화 실험계를 이용한 항산화 활성

Saccharomyces cerevisiae FF-8의 YM 배지와 최적 생산배지에서 생산된 glutathione을 불포화지방산인 linoleic acid를 이용한 thiocyanate 방법으로 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 14과 같다. Glutathione 함량이 높은 최적 생산배지가 YM 배지보다 높은 항산화 활성을 나타내었다. 그리고 반응 7일째까지 대조구에 비해 매우 강한 항산화 활성이 유지되었으며, 0.05% BHT와도 비교적 비슷한 수준으로 높은 항산화 활성을 나타내었다. 또한 TBA법을 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 15와 같다. 본 실험계에서는 반응 5일째까지 최적 생산배지가 YM 배지보다 항산화 활성이 높게 나타났으나, 반응 6일째부터는 항산화 활성의 차이를 볼 수 없었다. 이들에 비해 대조구로 사용된 0.05% BHT는 매우 강한 항산화 작용을 나타내었다.

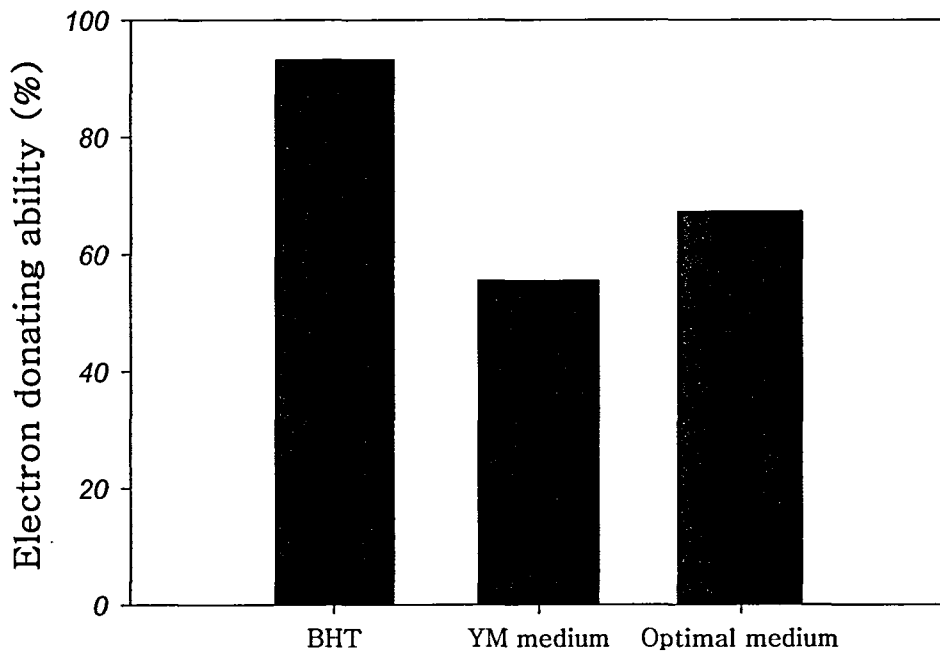


Fig. 12. DPPH electron donating ability of glutathione produced by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8.
BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%)

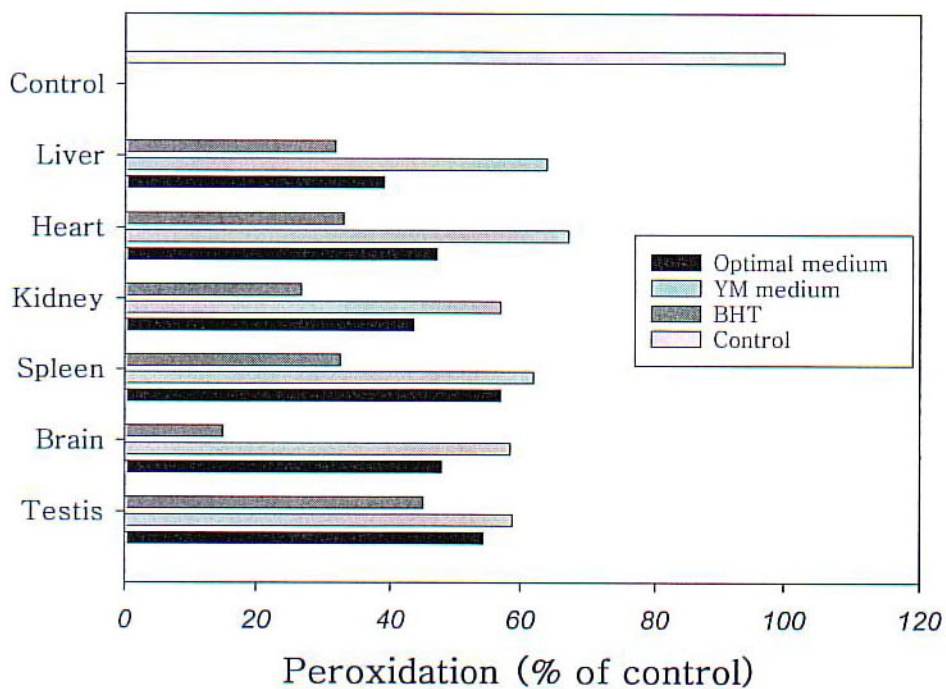


Fig. 13. Antioxidative activity of glutathione produced from *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in organic microsomal system as measured by the TBARS method.

BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%)

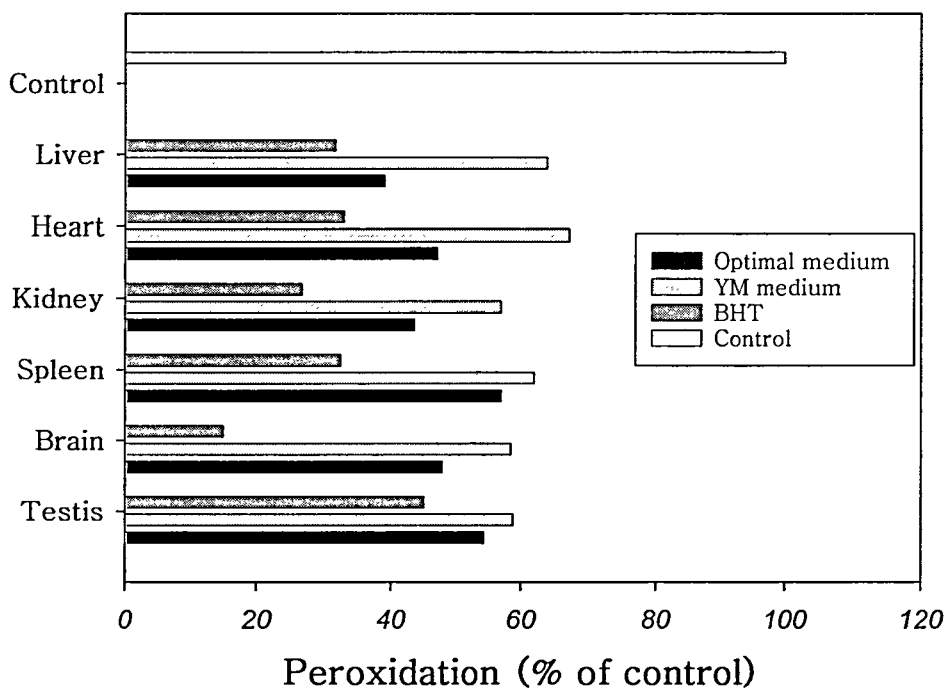


Fig. 13. Antioxidative activity of glutathione produced from *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in organic microsomal system as measured by the TBARS method.

BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%)

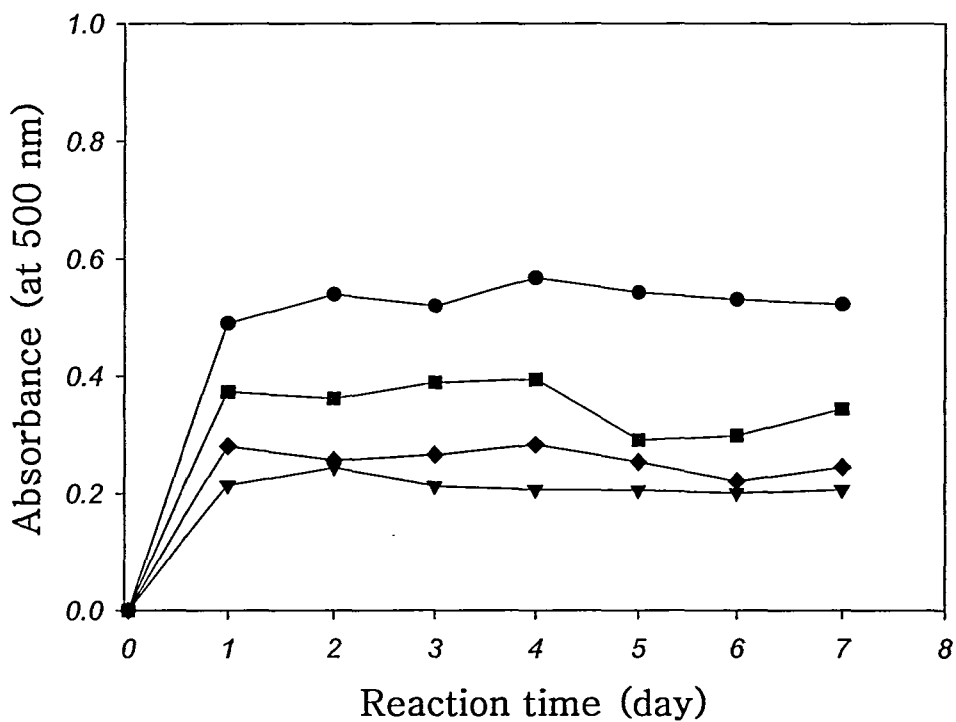


Fig. 14. Antioxidative activity of glutathione produced from *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in the linoleic acid system that is measured by the thiocyanate method.

(-●- : Control, -▼- : BHT, -■- : YM medium,
 -◆- : Optimal medium) BHT : butylated hydroxytoluene
 (0.05%)

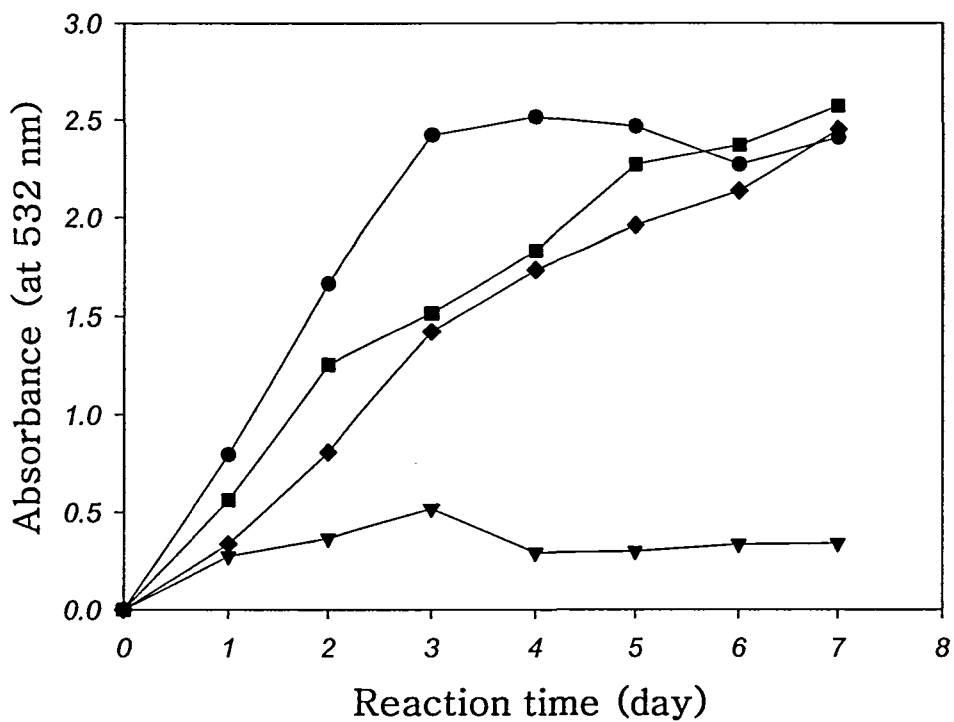


Fig. 15. Antioxidative activity of glutathione produced from *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in the linoleic acid system that is measured by the TBA method.
 (-●- : Control, -▼- : BHT, -■- : YM medium,
 -◆- : Optimal medium) BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%)

다. 사염화탄소 유발 간독성 억제 효과

1) 체중에 미치는 영향

최적배지에서 생산된 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체를 5% 수준으로 식이 중에 첨가하여 섭취시킨 FF-8군에서는 정상군 보다 체중이 약간 감소하였으나, 사염화탄소 처리에 의한 CCl₄군에서의 체중 감소는 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체 급여로 상쇄되었다(Table 10). 이러한 결과는 glutathione 고함유 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체가 정상상태에서는 체중을 감소시키고 간 기능 저하에 관련된 상태에서는 체중 감소를 완화시키는 양반된 결과를 보이는 것으로 사료되어진다. 그러나 이러한 각 실험군간의 체중 변화는 통계상의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 10. Body weight changes of CCl₄ treated rats.

Group	Body weight (g)		
	Initial	Final	Changes (6 weeks)
Normal	381.8±9.3	436.4±21.8	54.6±14.40
FF-8 ¹⁾	381.5±11.8	426.8±13.9	45.4±6.22
CCl ₄ ²⁾	388.6±7.4	428.0±7.8	39.4±3.02
CCl ₄ plus FF-8	389.9±13.1	432.8±15.9	42.8±4.41

¹⁾ FF-8 : glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 strain

²⁾ CCl₄ : Carbon tetrachloride

2) 간 조직 중량에 미치는 영향

정상군에 비해 CCl₄군에서 전체 간 중량(g) 및 상대적 간 중량(% , g/100 body weight)이 현저히 증가하였다(Table 11). 이러한 사염화탄소 처리 동물에서 간 무게의 현저한 증가는 사염화탄소 간 독성 모델에서 나타나는 전형적인 결과로서 사염화탄소 독성으로 간 세포막 손상으로 투과성이 증가하여 부종이 일어나고, 간세포에서 주로 중성지방의 축적으로 인해 간장이 비대해 지는 것으로 보고 되고 있다. 그러나 사염화탄소군에서 나타난 이러한 간 조직 중량의 증가는 FF-8 균주의 전처리로 정상군 수준으로 현저히 감소되었다.

Table 11. Liverweights of CCl₄ treated rats.

Group	Absolute weight (g)	Relative weight (g/100 body weight)
Normal	10.58±0.26	2.45±0.11 ^a
FF-8 ¹⁾	10.65±0.46	2.49±0.07 ^a
CCl ₄ ²⁾	13.40±0.34	3.15±0.07 ^b
CCl ₄ plus FF-8	12.77±0.81	2.94±0.10 ^b

¹⁾ FF-8 : glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 strain

²⁾ CCl₄ : Carbon tetrachloride

3) 총 지질 농도에 미치는 영향

혈청 총 지질 농도는 사염화탄소를 투여하지 않은 정상군에 비해 FF-8군에서 감소경향을 보였고, 또한 사염화탄소를 투여한 CCl₄군에 비해 CCl₄+FF-8군에서도 감소경향을 보여 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체는 정상상태 또는 간 기능 장애와 같은 병적 상태에서도 혈청 총 지질 농도 저하작용이 있는 것으로 사료되어 진다(Fig. 16). 이러한 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체 투여군에서 총 지질 농도의 감소는 이들 실험군에서 총 콜레스테롤 및 중성지질, 유리지방산의 농도 감소에 기인하는 것으로 보여 진다.

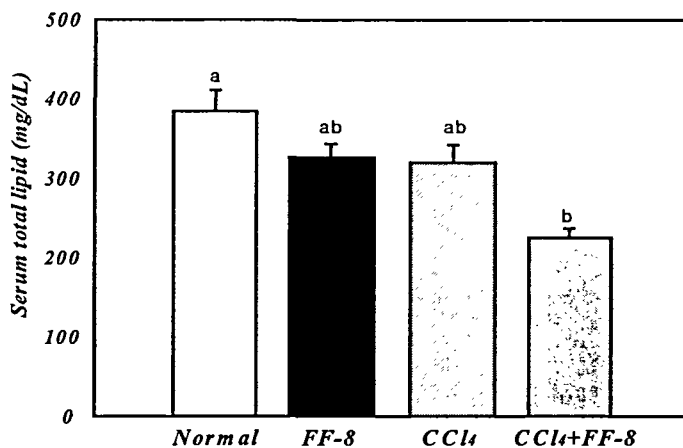


Fig. 16. Concentrations of total lipids of serum in CCl₄ treated rats.

4) 혈청 및 간 조직의 중성지질 농도에 미치는 영향

간 조직의 중성지질 농도는 정상군에 비해 사염화탄소 처리군에서만 현저히 증가하였는데(Fig. 17), 이는 사염화탄소 처리에 의해 전형적으로 나타나는 간 조직의 중성지질 축적(34,35)에 의해 지방간이 유발된 것을 나타내어 준다. 그러나 사염화탄소 처리에 의한 중성지질의 이러한 증가는 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체의 전처리로 정상군 수준까지 감소하여 지방간을 개선시키는 것으로 나타났다. 사염화탄소 처리에 의해 간 중성지질의 증가는 주로 지방산 합성의 증가와 간에서 혈중으로 분비되는 lipoprotein의 분비 저해에 기인하는 것으로 보고되고 있다.

혈중의 중성지질 농도는 사염화탄소 처리에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 이전에 보고된 결과와 일치하고 있다. 그러나 사염화탄소 단독 처리한 CCl₄군에 비해 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체 투여 CCl₄+FF-8군에서 현저히 감소하였다. 이상의 결과를 보면 사염화탄소 단독 처리에 의한 혈중 및 간 조직의 중성지질 증가는 glutathione을 고함유한 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체 급여로 현저히 감소함으로써 중성지질 증가와 관련한 질환의 개선에 유용할 것으로 사료되어 진다.

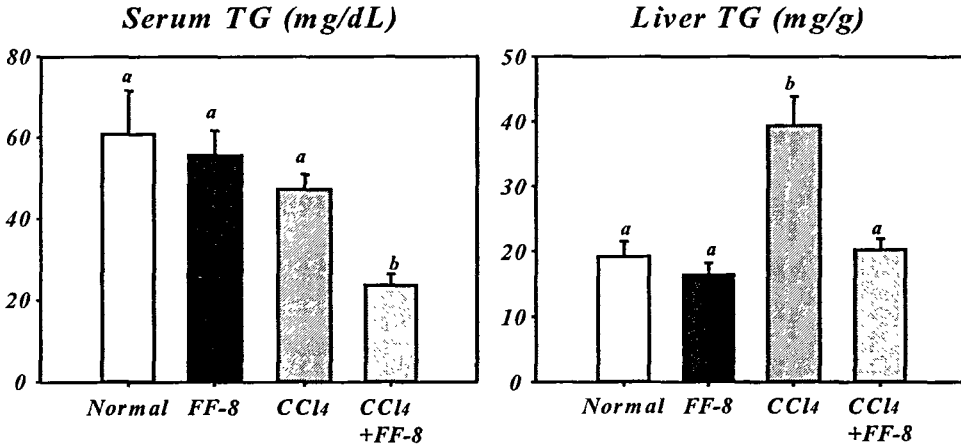


Fig. 17. Concentrations of triglyceride of serum and liver in CCl₄ treated rats.

5) 혈청 콜레스테롤 및 유리지방산 농도에 미치는 영향

혈청 총 콜레스테롤 농도는 정상군에 비해 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주 단독 투여 FF-8군에서 통계상의 유의적인 차이 없이 약간 낮았으며, 사염화탄소 처리 CCl₄군에 비해 CCl₄+FF-8군에서 현저히 감소하였다(Table 12).

혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 정상군에 비해 FF-8군에서 증가경향을 보였고, CCl₄군 및 CCl₄+FF-8군에서는 정상군 보다는 감소경향을 FF-8군 보다는 유의적인 감소를 나타내었다.

Table 12. Concentrations of total cholesterol, HDL-cholesterol and free fatty acid of serum in CCl₄ treated rats.

Group	Total cholesterol	HDL-cholesterol	Free fatty acid
Normal	99.83±4.22 ^a	24.83±1.17 ^{ab}	591.00±43.65 ^a
FF-8 ¹⁾	85.83±4.77 ^a	28.67±1.41 ^a	366.17±14.83 ^b
CCl ₄ ²⁾	87.00±4.95 ^a	20.50±1.69 ^b	761.00±29.51 ^c
CCl ₄ plus FF-8	61.50±7.37 ^b	20.67±2.54 ^b	530.20±23.13 ^a

1) FF-8 : glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 strain

2) CCl₄ : Carbon tetrachloride

혈청 유리지방산 농도는 정상군에 비해 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주 단독 투여군(FF-8군)에서 유의적으로 감소하였고, CCl₄군에서는 유의적으로 증가한 반면 CCl₄+FF-8군에서는 오히려 정상군 수준 이하로 현저히 감소하였다. CCl₄ 처리에 의한 혈중 유리지방산의 현저한 증가는 간 조직에서 유리지방산 합성의 증가로 인해 혈중으로 유리되어 높은 것으로 생각된다.

6) 간 기능 지표 효소 ALT 및 AST 활성에 미치는 영향

간 손상 임상지표의 하나인 혈청 중 AST 및 ALT 활성은 사염화탄소 처리로 인해 유의적으로 증가되어 전형적인 사염화탄소 유발 간독성을 나타내었다(Fig. 18). 그러나 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주의 전처리로 ALT 활성은 현저히 감소한 반면 AST 활성은 통계상의 유

의적인 차이 없이 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 혈청 LDH 활성도 ALT 활성과 동일한 경향으로 감소하였으나, ALP 활성은 각 실험군간에 현저한 차이는 없었다(Fig. 19). 사염화탄소 처리로 간 손상 임상지표로 사용되는 혈중 ALT, AST, ALP 및 LDH 활성이 농도 및 처리 시간 의존적으로 증가되는 것으로 알려져 있다. Sugimura와 Yamamoto는 acetaminophen-유발 간 독성에서 glutathione 고함유 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8추출물을 투여하였을 때 투여농도 의존적으로 혈중 AST 및 ALT 활성 저하로 간 독성이 억제된 것으로 보고한 바 있다.

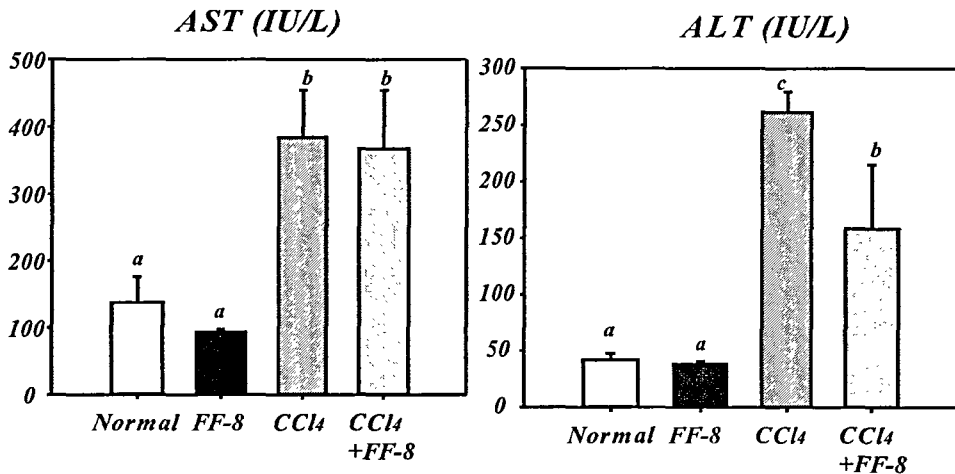


Fig. 18. Activities of serum AST and ALT in CCl₄ treated rats.

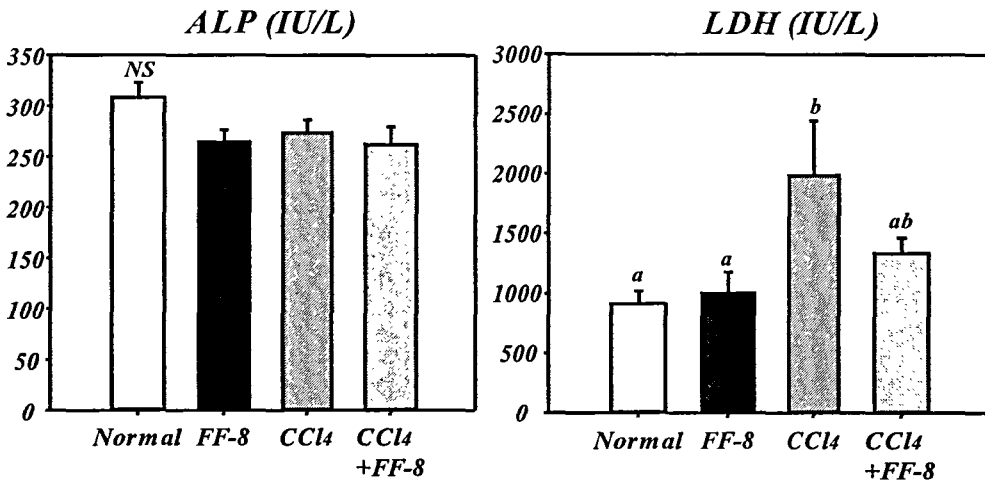


Fig. 19. Activities of serum ALP and LDH in CCl₄ treated rats.

7) 간 지질과산화물 농도 및 glutathione 농도에 미치는 영향

지질 과산화 반응은 carbon tetrachloride, acraminophen 및 alcohol과 같은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 또는 질병 등에 의한 병태 생리학적 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 가장 중요한 기전으로 인정되고 있다. 이러한 기전은 조직내 세포의 산화적 스트레스의 증가, 즉 free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인해 야기되며, 동물 체내에서 생체막 지질의 과산화물 생성 정도의 지표로 알려져 있는 TBARS를 간 조직과 microsome 분획에서 측정된 결과는 Fig. 20과 같다. 사염화탄소와 같은 간 독소는 간 조직내 과산화지질을 유도하여 지방산 조성을 변화시켜 궁극적으로는 세포독성을 유발시키게 된다. 간이 유해물질로부터 손상을 입을 경우 간 세포막의 지질이 과산화되며 내부의 효소계가 파괴됨으로써 혈액 및 조직 내 과산화지질 함량이 증가하게 된다.

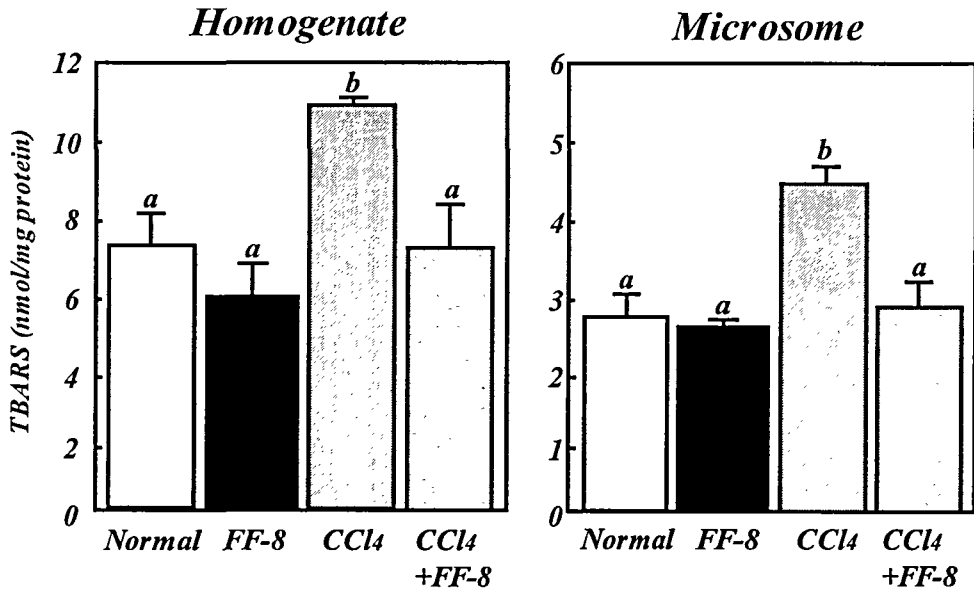


Fig. 20. Concentrations of TBARS of liver homogenate and microsomal fractions in CCl₄ treated rats.

간 조직의 지질과산화물 생성량을 나타내는 TBARS 농도는 정상군에 비해 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주 투여군에서 통계상의 유의적인 차이는 없었으나 약간 감소하였고, 특히 사염화탄소 처리로 TBARS 농도가 현저히 증가하여 간 조직이 손상된 것을 나타내어 주고 있다. 그러나 이러한 TBARS 농도의 현저한 증가는 비효소적 항산화제 역할을 하는 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체 투여로 간 세포 분획에서 정상군 수준으로 현저히 감소하여 사염화탄소에 의한 산화스트레스를 어느 정도 완화시키는 효과를 보여주었다.

간 조직 내 지질과산화물 생성은 비효소적 항산화제 역할을 하는 내인성 항산화 물질인 glutathione 농도와 밀접한 관련성을 가지고 있다. 간 조직 내 환원형 glutathione 농도는 정상군에 비해 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체 투여 FF-8군에서 현저히 증가하였으나, 사염화탄소 처리에 의해서는 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체 투여로 통계상의 차이 없이 약간 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 21). 따라서 본 실험에서도 간 조직 내 지질과산화물 생성이 내인성 항산화 물질인 glutathione 농도와 밀접한 관련성을 가지는 것으로 시사되었다.

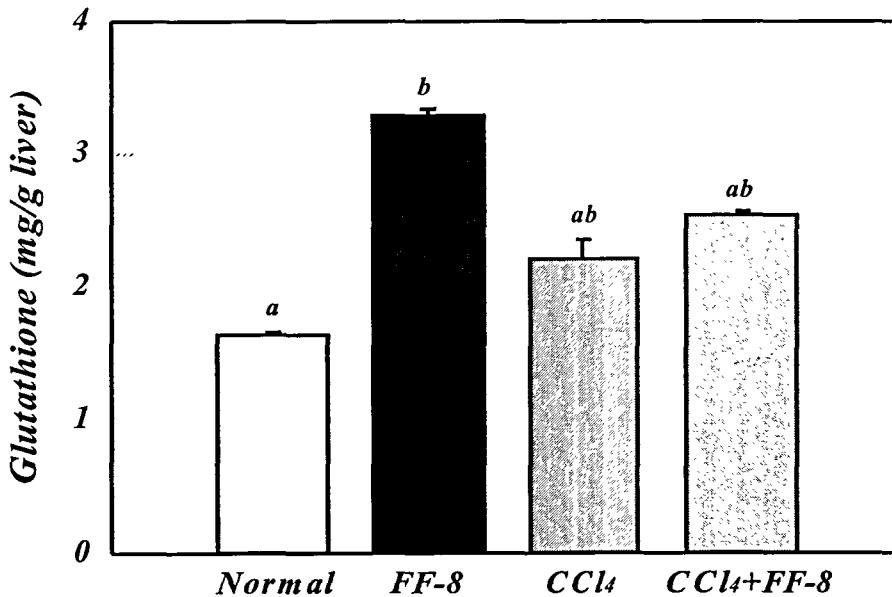


Fig. 21. Concentrations of liver glutathione in CCl₄ treated rats.

사염화탄소와 같은 독성물질에 의해 유발되는 간 독성 모델동물에서 일부 아미노산 성분에 의해 간 해독 작용과 더불어 과산화지질 농도가 감소하는 효과가 시사된바 있어 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주의 구성 아미노산 조성을 분석한 결과 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주의 구성 아미노산 함량 범위는 11.51~1.51%였다(Table 13). 구성 아미노산에 가장 많이 함유된 성분은 glutamate 11.51% (g/100g dry weight) 였고, 다음 순으로 valine 5.95%, aspartate 5.46%, lysine 4.56% 함유되어 있었다. 특히 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주에 많이 함유된 glutathione의 주요 구성 아미노산인 glutamate (11.51%)가 제일 많이 함유되어 있어 과산화지질 농도와 간 해독 작용에 영향을 미칠 가능성이 시사되었다.

Table 13. Concentrations of compositional amino acid of *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 strain.

Compositional amino acid	% in sample
Aspartic acid	5.46
Threonine	2.32
Serine	2.46
Glutamic acid	11.52
Proline	1.86
Glycine	2.93
Alanine	3.59
Cystine	-
Valine	5.95
Methionine	-
Isoleucine	3.02
Leucine	4.09
Tyrosine	1.92
Phenylalanine	2.42
Histidine	1.51
Lysine	4.58
Arginine	3.29

8) 간 조직의 형태학적 관찰

간조직의 형태학적 관찰 결과, 정상군에서는 간 소엽 구조가 잘 유지되었으며, 간세포들은 풍부한 호산성 세포질과 둥근 핵을 가지고 있었고 간세포판은 대부분 한 층으로 잘 유지되어 있었다. 이와 유사하게 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체 투여 FF-8군에서는 간 소엽을 구성하고 있는 간세포들이 전반적으로 균일하게 배열되어 있어 정상적인 대조군의 간소견과 비슷한 양상을 보였다. 사염화탄소 처리군에서는 중심정맥을 중심으로 심한 세포성 괴사가 초래되었으며, 간조직의 염증 및 크고 많은 지방세포들의 배열에 의한 지방변성(fatty changes)이 나타났다(Fig. 22). 그러나 사염화탄소+FF-8군의 간 조직에서는 염증 및 괴사가 현저히 줄어들 뿐 아니라 소포성 지방세포들의 크기와 숫자가 현저히 줄어들어 형태학적 관찰에서 간독성 및 지방간의 개선효과가 있었다. 한편 간 조직 내 지방세포는 사염화탄소 처리로 크기와 숫자가 현저히 증가해 있는 것에 비해 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균체의 전처리에 의해 현저히 줄어들어 지방증 억제 효과가 확인되었다(Fig. 23).

따라서 사염화탄소-유발 급성 간독성 및 지방간에 대한 glutathione 고함유 효모 *S. cerevisiae* FF-8 균주의 전처리에 의해 간조직의 염증, 괴사, 지방증 및 지질과산화물의 현저한 감소로 간 보호 및 지방간 개선 작용과 산화스트레스 억제 작용이 있는 것으로 판단되었다.

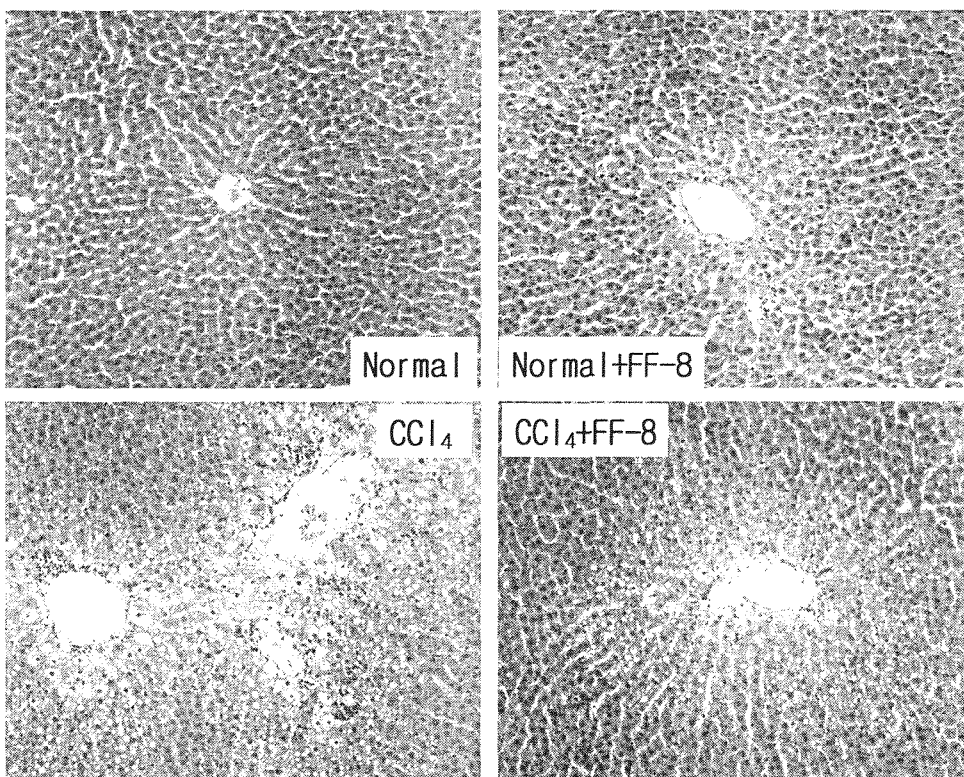


Fig. 22. Hepatic histopathologic changes in the rats treated carbon tetrachloride . The liver sections (right 200 and left 400 X final magnification, n=2) were stained with hematoxylin and eosin (H&E). CV: central vein, arrow: Kupffer cells in sinusoids.

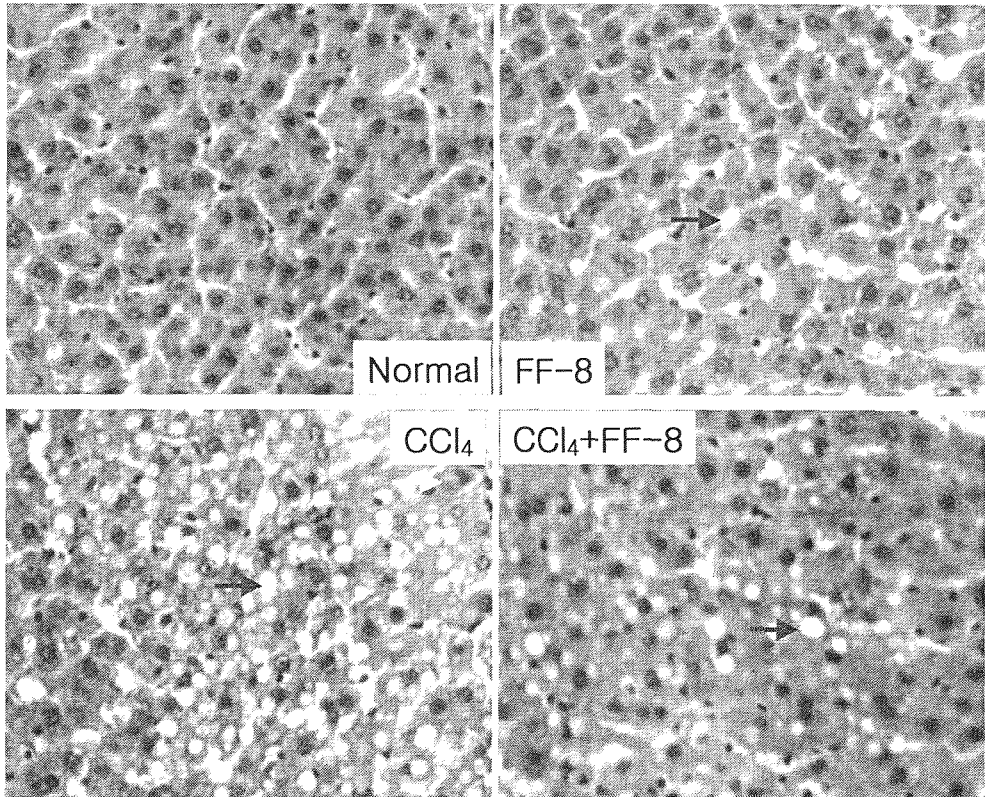


Fig. 23. Effect of glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 strain on hepatic fatty changes in carbon tetrachloride treatment rats (hematoxylin and eosin stain, right 200 and left 400 X). FF-8; glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 strain, CCl₄; carbon tetrachloride, CCl₄+FF-8; carbon tetrachloride+glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 strain. Arrow: fatty drops.

이상의 결과에서 우리나라 전통발효주에서 분리된 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주 유래의 내인성 항산화물질 glutathione은 본 연구에서 확립된 최적생산 배지 조건하에서 미생물의 생육 특성상 단시간 내에 대량생산이 가능하며, 실험적 간 질환 유발 동물모델에서 glutathione 고함유 효모 섭취에 의해 간 독성 억제와 산화스트레스 억제 효과로 각종 질환유발 및 노화 억제 효과를 동시에 만족시킬 수 있는 건강보조식품과 기초의약품 개발 원료로 사용될 가능성이 높은 것으로 사료되었다.

라. *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 발효액과 시판 제품의 면역증강 비교실험 결과

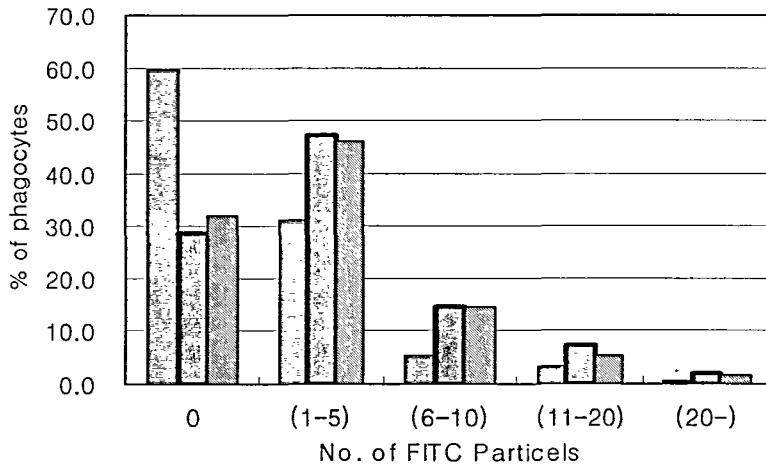


Fig. 24. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 Fermented Solution on phagocytic activities of peritoneal macrophages. (☐:Control, ☒:Kanne Juice, ☓:*Saccharomyces cerevisiae* FF-8 Fermented Solution, FITC ; Fluorescent micobeads Ingested Tumer Cell)

Fig. 24는 본 연구에서 면역증강물질을 확인하기 위하여 칸네주스 및 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 발효액의 대식세포의 탐식능에 미치는 영향을 알아본 결과이다. *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 발효액에서 대식세포 활성능은 대조군에서는 microbead를 하나도 탐식하지 않은 세포가 약 59.5%이었으며, 1-5개, 6-10개, 11-20개, 20개 이상을 탐식한 세포가 각각 31.1%, 5.4%, 3.4%, 0.6%이었다. 이에 비하여 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 발효액이 대식세포 중에서는 microbead를 하나도 탐식하지 않은 세포 비율이 28.7%로 대조군의 59.5%에 비해 낮아지고, 1개 이상을 탐식한 세포가 71.3%로 대조군의 40.5%에 비해 현저하게 증가하였다. 이 결과로 보아 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 발효액은 대식세포 탐식능을 향상시켰음을 확인할 수 있다.

4. 참고문헌

- "Annual report on the cause of death statistics," National Statistical Office, Republic of Korea. 2001.
- E. Mezey, "Alcoholic liver disease: Roles of alcohol and malnutrition," *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, pp. 2709-2714 (1980).
- J. Y. Cha, Y. Mameda, K. Oogami, K. Yamamoto and T. Yanagita, "Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, pp. 508-513. (1998).
- J. Y. Cha, Y. S. Cho, I. Kim, T. Anno, S. M. Rahman and T. Yanagita, "Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rat," *Plant Foods Hum. Nutr.*, 56, pp. 349-358 (2001).
- B. S. Reddy and A. Rivenson, "Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline, a food mutagen," *Cancer Res.*, 53, pp. 3914-3918 (1993).
- T. Hino, Y. Kobayashi, M. Nishida and Y. Senoo, "Purification of glutathione and γ -glutamylcysteine from cultured microorganisms," Japan Patent, 61-282397, 1986.
- K. Yokozeki, H. Takeuchi and Y. Hirose, "Glutathione," Japan patent, 60-160894, 1985.
- C. M. Grant, F. H. MacIver and I. W. Dawes, "Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Curr Genet*, 29, pp. 511-515 (1996).
- Y. Sugimura and K. Yamamoto, "The protective effect of glutathione - enriched yeast extract on acetaminophen-induced liver damage in rats," *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 51, pp. 189-193 (1998).
- J. K. Shin, "Effect of bromobenzene pretreatment on the hepatic glutathione content and glutathione S-transferase activity in bromobenzene treated rats," *Kor. J. Env. Hlth. Soc.*, 23, pp. 83-88 (1997).
- R. F. Del maestro, "An approach to free radicals in medicine and biology," *Acta Physiol. scand.*, 492, pp. 153-160 (1980).
- K. T. Oldham, K. S. Guice, P. A. Ward and K. J. Johnson, "The role

- of oxygen radicals in immune complex injury," *J. Free Rad. Biol. Med.*, 4, pp. 387-392 (1988).
- B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, "Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease," *Biochem. J.*, 219, pp. 1-6 (1984)
- D. Harman, "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry," *J. Gerontol.*, 11, pp. 289-293 (1956).
- E. A. Porta, "Role of oxidative damage in the aging process, in Cellular Antioxidant Defense Mechanism," Vol. 3, C. K. Chow, Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1988.
- J. M. McCord and I. Fridovich, "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin," *J. Biol. Chem.*, 244, 6094-6102 (1969).
- B. Chance, H. Sies and A. Boveris, "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs," *Physiol. Rev.*, 59, pp. 527-532 (1979).
- A. Meister and M. E. Anderson, "Glutathione," *Annu. Rev. Biochem.*, 52, pp. 711-717 (1983).
- L. Flohe, W. A. Guntler and H. H. Shock, "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme," *FEBS Lett.*, 32, pp. 132-136 (1973).
- H. Z. Chae, S. J. Chung and S. G. Rhee, "Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast," *J. Biol. Chem.*, 269, pp. 27670-27676 (1994)
- S. J. Kim, J. W. Park, W. K. Choi, I. H. Kim and K. Kim, "Inhibition of metal-catalyzed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201, pp. 8-12 (1994).
- S. Gelfant and J. G. Smith, "Aging - Noncycling cells an explanation," *Science*, 178, pp. 357-361 (1972).
- S. T. Omaye, K. A. Reddy and C. E. Cross, "Effect of butylated hydroxytoluene and other antioxidants on mouse lung metabolism," *J. Toxicol. Environ. Health*, 3, pp. 829-836 (1977).
- D. K. Lim, U. Choi and D. H. Shin, "Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants," *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, pp. 83-89 (1996).
- S. Suzuki, Y. Hinokio, K. Komatsu, M. Ohtomo, M. Onoda, S. Hirai, M. Hirai, A. Hirai, M. Chiba, S. Kasuga, H. Akai and T. Toyota, "Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 45, pp. 161-168

- (1999).
- G. De Mattia, O. Laurenti and D. Fava, "Diabetic endothelial dysfunction. Effect of free radical scavenging in Type 2 diabetic patients," *J. Diabetes Res. Complications*, 17, pp. 30-35 (2003).
- J. Y. Cha, H. J. Kim, B. S. Jun, J. C. Park, M. Ok and Y. S. Cho, "Antioxidative activity and produced condition of antioxidative substance by *Bacillus* sp. FF-7," *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 46, pp. 165-170 (2003)
- J. Y. Cha and Y. S. Cho, "Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats," *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28, pp. 1131-1136 (1999).
- K. Murata and A. Kimura, "Relationship between glutathione contents and generation times in *Saccaromyces cerevisiae*," *Agric. Biol. Chem.*, 50, pp. 1055-1056 (1986).
- W. G. Kim and Y. M. Koo, "Production of γ -glutamylcysteine by immobilized mixed microbial system of recombinant *E. coli* and Yeast," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 10, pp. 249-256 (1995).
- R. C. Fahey, S. Brody and D. Mikolajczyk, "Changes in the glutathione thiol-disulfide status of *Neurospora crassa* conidia during germination and aging," *J. Bacteriol.*, 121, pp. 144-151 (1975).
- K. Murata and A. Kimura, "Some properties of glutathione biosynthesis - deficient mutants of *Escherichia coli*," *B. J. Gen. Microbiol.*, 128, pp. 1047-1052 (1982).
- R. C. Fahey and G. I. Newton, "*Eutamoeba historlytica*: A Eukaryote without glutathione metabolism," *Science*, 224, pp. 70-72 (1983).
- W. B. Jakoby, "Metabolic Basis of Detoxification," Academic press, 1982.
- H. I. Rhee, K. Murata and A. Kimura, "Molecular cloning of the *Pseudomonas putida* glyoxylase I gene in *Escherichia coli*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, pp. 831-836 (1987).
- A. Meister and M. E. Anderson, "Glutathione," *Ann. Rev. Biochem.*, 52, pp. 711-760 (1983).
- Y. Yamada, Y. Tani and T. Kamihara, "Production of extracellular glutathione by *Candida tropicalis* PK 233," *J. Gen. Microbiol.*, 130, pp. 3275-3278 (1984).
- J. K. Shin, "Effect of bromobenzene pretreatment on the hepatic glutathione

- content and glutathione S-transferase activity in bromobenzene treated rats," *Kor. J. Env. Hlth. Soc.*, 23, pp. 83-88 (1997).
- Y. Kenzo, T. Hirashi and H. Yoshiteru, "Glutathione no seizouho," Japan patent, 60-160894, 1985.
- C. W. I. Owens and R. V. Belcher, "A colorimetric micro-method for the determination of glutathione," *Biochem. J.*, 94, pp. 705-711 (1965).
- Y. S. Lee, J. S. Yoo, S. Y. Chung, C. S. Park and Y. L. Choi, "Microbial immobilization, characterization and isolation of nitrogen oxidizing bacteria," *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 46, pp. 7-11 (2003).
- APHA, AWWA, WEF, "In standard methods for the examination of water and wastewater," 18th ed, Washington D.C., 1992.
- W. C. Shin, D. S. Kim, J. H. Yu and J. H. Yu, "Isolation, identification and culture condition of microorganism producing glutathione," *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, pp. 1-5 (1993).
- J. T. Hwang, H. C. Kang, T. S. Kim and W. J. Prak, "Lipid component and properties of grape seed oils," *Korean J. Food. Nutr.*, 12, pp. 150-155 (1999).
- J. Y. Cha and Y. S. Cho, "Effect of stem bark extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentrations of lipid and tissue lipid peroxidation in the cholesterol-fed rats," *Korean J. Food Sci. Technol.*, 33, pp. 128-134 (2001).
- S. F. Wong, B. Holliwel, R. Richmond and W. R. Skowronek, "The role of superoxide and hydroxyl radical in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid," *J. Inorganic Biochem.*, 14, pp. 127-134 (1981).
- H. Esterbauer, J. Lang, S. Zadavec and T. F. Slater, "Methods in Enzymology," Vol. 152, Academic Press Inc., New York, 1987.
- T. Osawa, "A novel type of antioxidant isolated from leaf was of *Eucalyptus* leaves," *Agric. Biol. Chem.*, 45, pp. 735-739 (1981).
- A. Ottolenghi, "Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids," *Arch. Biochem. Biophys.*, 79, pp. 355-461 (1959).
- J. W. Kim, I. Jin and J. W. Seu, "Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* F38-1, a thermotolerant yeast for fuel alcohol production at higher temperature," *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, pp. 617-623 (1995).

- H. Shinichiro, T. Hisao and S. Kuniaki, "Process for producing glutathione," Eur. Patent Application, 0079241, 1982.
- M. Tadayuki, M. Hirokazu, I. Junick and H. Mokichi, "變異株," Japan Patent, 61-31081, 1986.
- H. Shimizu, K. Araki, S. Shioya and K. Suga, "Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture," Biotechnol. Bioeng., 38, pp. 196-205 (1991).
- C. H. Liu, C. F. Hwang and C. C. Liao, "Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*," Process Biochemistry, 34, pp. 17-23 (1999).
- C. Gamarallage, G. M. Walker and H. J. Staines, "Use of response surfaces to investigate metal ion interactions in yeast fermentations," J. Am. Soc. Brewing Chemists, 55, pp. 24-29 (1997).
- D. S. Kim, J. H. Yu, S. S. Yoon and W. C. Shin, "Production of glutathione by *Candida* sp. mutant," Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, pp. 435-439 (1993).
- K. Murata and K. Tani, "Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells containing an ATP regeneration system," Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 11, pp. 72-77 (1981).
- Li Y, Chen J, Zhou N, Fu W, Ruan W, Lun S. 1998. Effects of amino acids and yeast extract on glutathione production. Chin J Pharm 29, 537 - 542.
- Murata, K. and A. Kimura. 1986. Relationship between glutathione contents and generation times in *Saccaromyces cerevisiae*. Agric. Biol. Chem. 50: 1055-1056.
- Kim WG, Koo YM. 1995. Production of γ -Glutamylcysteine by immobilized mixed microbial system of recombinant *E. coli* and Yeast. Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 10: 249-256.
- Murata K, Kimura A. 1982. Some properties of glutathione biosynthesis-deficient mutants of *Escherichia coli* B. J. Gen. Microbiol. 128: 1047-1052.
- Fahey RC, Newton GI. 1983. *Eutamoeba historlytica*: A Eukaryote without glutathione metabolism. Science 224: 70-72.
- 6=11. Sugiyama Y, Yamamoto K. 1998. The protective effect of glutathione-enriched yeast extract on acetaminophen-induced liver

- damage in rats. *J Jpan Soc Nutr Food* 51, 189-193.
- Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- 8=12. Shin JK. 1997. Effect of bromobenzene pretreatment on the hepatic glutathione content and glutathione S-transferase activity in bromobenzene treated rats, *Korean J Env Hlth Soc.* 23, 83-88.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 17, 24-38.
- Shin H, Hudson LG, Liu KJ. 2004. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 37, 582-593.
- Owens CWI, Belcher. RV. 1965. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione, *Biochem J.* 94, 705-711.
- Mitsuda H, Yasumoto K. Iwami K. 1966. Antioxidative action of indol compounds during the antioxidation of linoleic acid. *Eiyo Shokuro*, 19, 210-214.
- Osawa T. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf of Eucalyptus leaves. *Agric Biol Chem.* 45, 735-739.
- Ottolenghi A. 1959. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch Biochem Biophys.* 79, 355-461.
- Esterbauer H, Lang J, Zdravec S, Slater TF. 1987. "Methods in Enzymology," Vol. 152, Academic Press Inc., New York.
- Folch J, Lees M, Sloane-Starley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226, 497-509.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61, 882-888.
- Wong SF, Holliwell B, Richmond R, Skowroneck WR. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radical in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *J Inorganic Biochem.* 14, 127-134.
- Duncan DB. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 1, 1-42.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26, 1199-1204.
- Seto H, Shin-ya K. 1993. Antioxidative agents produced by microorganisms. *Tranpakushitsu Kakusan Koso.* 38, 1778-1790.

- Abe N, Murata T, Hirota A. 1998. Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 661-666.
- Kim WG, Kim JP, Yoo ID. 1996. Benzastatins A, B, C, and D: new free radical scavengers from *Streptomyces nitrosporeus* 30643. II. Structural determination. *J Antibiotics* 49, 26-30.
- Rashid MH, Kato F, Murata A. 1992. Effect of microorganism on the peroxidation of lipid and fatty acid composition of fermented fish meal. *Biosci Biotechnol Biochem* 56, 1058-1061.
- Kato F, Nakazato I, Murata A, Okamoto S, Yone Y. 1986. Utilization of waste fish treatment with microorganisms. Part II. Use of waste fish from large scale production of fermented fish meal and its feed efficiency. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 60, 287-293.
- Cha JY, Kim HJ, Jun BS, Park JC, Ok M, Cho YS. 2003. Antioxidative activities and produced condition of antioxidative substance by *Bacillus* sp. FF-7. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46, 165-170
- Jamieson DJ. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527.
- Stephen DW, Jamieson DJ. 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FMES Microbiol Lett* 141, 207-212.
- Kato F, Nakazato I, Shiraishi T, Hayashi K, Murata A, Yone Y. 1986. Screening for antioxidative activity in microorganisms (Utilization of waster fish treated with microorganisms. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 59, 901-907.
- Wong SF, Holliwel B, Richimond R, Skowroneck WR. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radical in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *J Inorganic Biochem*, 14, 127-134.
- Pierce RA, Glaug MR, Greco RS, Mackenzie JW, Boyd CD, Deak SB. 1987. Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Biol Chem* 26, 1652-1658.
- Jeon JR, Park JR. 2005. Effects of *Chrysanthemum boreale* M. water extract on serum liver enzyme activities and Kupffer cells of carbon tetrachloride induced rats. *Food Sci Biotechnol* 14, 290-296.

- Amdur MO, Doull J, Klassen CD. 1991. Toxicology 4th ed., Pergamon Press, New York, USA.
- Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL. 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43, 139-154.
- Torres-Duran PV, Miranda-Zamora R, Paredes-Carcajal MC, Mascher D, Ble-Castillo J, Diaz-Zagoya JC, Juarez-Oropeza MA. 1998. *Spirulina maxima* prevents induction of fatty liver by carbon tetrachloride in the rats. *Biochem Molecular Biol Int* 44, 787-793.
- Pencil SD, Brattin EA, Glender EAJ, Recknagel RO. 1984. Carbon tetrachloride-dependent inhibition of isolated hepatocytes: Characterization and Requirement for Bioactivation *Biochem Pharmacol* 33, 2419-2423.
- Maling HM, Frank A, Horning MG. 1962. Effect of carbon tetrachloride on hepatic synthesis and release of triglyceride. *Biochem Biophys Acta* 65, 540-545.
- Recknagel R, Lombardi B. 1961. Studies of biochemical changes in subcellular particles of rat liver and their relationship to a new hypothesis regarding the pathogenesis of carbon tetrachloride fat accumulation. *J Biol Chem* 236, 564-569.
- Yasuda S, Watanabe S, Kobayashi T, Okuyama H. 1997. Docosahexaenoic acid-rich fish oil dose not enhance the elevation of serum transaminase and liver triacylglycerol induced by carbon tetrachloride in mice. *Lipid* 32, 1249-1255.
- Kien CL, Ganther HE. 1983. Manifestations of chronic selenium deficiency in a child receiving total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 37, 319-328.
- Naziroglu M, Cay M, Ustundag B, Aksakal M, Yekeller H. 1999. Protective effects of vitamin E on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Cell Biochem Funct* 17, 253-259.
- Plaa GL, Witschi H. 1976. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol*, 16, 125-131.
- Recknagel RO. 1983. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sci* 33, 401-408.
- Chance B, Seis H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527, 1979.

제 2 절 우수분리 균주를 이용한 키토올리고당 고함유 기능성 장류 가공기술개발

1. 서론

키틴은 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 β -1,4 결합한 다당류로서 게나 새우 등의 갑각류 껍질, 곤충의 외골격, 버섯이나 균류의 세포벽에 단백질과 복합체로서 함유되어 있으며, 식물계에서는 셀룰로오스와 같이 생물체의 지지나 보호의 역할을 담당하고 있다 [1]. 키틴은 지구상에서 연간 약 1,000 억톤 정도로 생산되고 있으며, 현존하는 최후의 생물자원 (Biomass)이라고 할 수 있다 [2]. 키토산은 키틴을 강알칼리로 탈아세틸화 (deacetylation)시켜 얻을 수 있으며, D-글루코사민 (GlcN)이 β -1,4 결합한 구조를 가지고 있다 [3,4]. 키틴·키토산의 이용은 해양 생물자원의 유효 이용이 주목을 받은 이후 급속히 발전하였으나, 그 응용분야로는 공업용 재료로서 폐수처리제 혹은 중금속 흡착제, 생물공학적 재료로서 효소 고정화담체, 크로마토그래피용 수지 및 기능성 막, 농업용 재료로서 병충해 예방제, 의료용 재료로서 인공피부 등 대부분 고분자 물질로서 이용되어 왔다. 그러나 최근 10여년전부터 키틴·키토산 및 그 유도체가 면역증강 및 부활 작용에 의한 항암활성, 항균활성, 체내 콜레스테롤 개선작용 및 고혈압 억제 작용 등 여러 가지 생리 활성을 가지고 있다는 사실이 밝혀짐으로써 현재 생리기능성 신소재로서 연구 개발이 활발히 진행되고 있다 [5,6,7,8,9,10]. 그런데, 키틴·키토산은 자체로서 대단히 고분자 물질이고, 또한 셀룰로오스나 카라기난과 같이 사람의 위장관에서 소화 흡수 되지 못한다. 즉 사람의 위장관에서는 β -1,4 글리코시드 결합을 분해 할 수 있는 효소가 존재하지 않는다. 따라서 키틴·키토산의 생체내 활성물질로서 효율적으로 이용하기 위해서는 그들의 올리고당을 생산할 필요가 있다 [11].

Chitin을 분해하는 효소는 키틴을 분해하는 방법에 따라 크게 3가지의 그룹 (endochitinases, exochitinase[EC.3.2.1.14]과 N-acetylglucosaminases)으로 나눌 수 있다. Endochitinase는 키틴 내부를 무작위로 가수 분해 하는 효소이고, exochitinase는 환원성을 가지는 GlcNAc의 이당체 형태인 GlcNAc₂ 단위로 키틴의 말단에서부터 분해한다. N-acetylglucosaminases는 endochitinase에 의해서 생성된 GlcNAc의 올리고당이나 exochitinase에 의해서 생성된 GlcNAc₂를 가수분해하여 키틴 구성의 기본 단위인 GlcNAc을 생산한다 [12]. 이러한 키틴 분해 효소들은 *Bacillus circurans* [13], *Serratia marcescens* [14], *Aeromonas* sp. [15], *Altermonas* sp. [16]와 *Janthiobacterium lividum* [17]과 같은 다양한 호기성 미생물에 보고되어졌다.

Chitinase (EC 3.2.1.1.32)는 미생물뿐만 아니라, 몇몇의 식물에서도 관찰되어졌다 [18,19,20,21]. Chitinase는 키틴 분자속의 β -glycoside 결합의 가수분해하는 패턴에 따라서 크게 3 분류로 나눌 수 있다. Class I chitinase[22,23]는 GlcNAc-GlcN과 GlcN-GlcN 결합 사이를 분해하며, class II chitinase[24]는 GlcN-GlcN 결합 사이를 분해하며, class III chitinase[25,26]는 GlcN-GlcNAc와 GlcN-GlcN 결합사이를 분해하는 특성을 가진다.

기존에 알려진 키틴의 분해 과정을 Fig. 1에서 요약하였다. 반응 1, chitin deacetylase에 의해서 키틴에 존재하는 아세틸기가 제거된 형태인 키틴산이 생성된다. 반응 2, 키틴의 탈아세틸화의 산물인 키틴산은 내부 가수 분해 효소인 chitinase에 의해서 올리고 형태의 글루코사민 (GlcN)_n 단위로 분해되고, 이와 협동적으로 외부 가수 분해 효소인 *exo*- β -D-glucosaminase는 단당류 형태인 글루코사민을 생산 한다 (반응 3). 키틴 분해의 또 다른 과정은 내부와 외부 두 종류 타입의 chitinase에 의해서 다당류인 키틴이 이당류의 형태인 GlcNAc인 (GlcNAc)₂로 분해하는 과정이다 (반응 4, 5). β -N-Acetylglucosaminase는 이당류인 (GlcNAc)₂를 단당류의 형태인 GlcNAc로 분해하거나 올리고당 형태인 (GlcNAc)_n에서 단당류인 GlcNAc로 분해 한다 (반응 6). 어떤 미생물은 (GlcNAc)₂를 GlcNAc로 분해하거나 (GlcNAc)₂ phosphorylase에 의해서 GlcNAc-1-phosphate를 생산 한다 (반응 7) 또는 (GlcNAc)₂ phosphotransferase system에 의해서를 GlcNAc-6-phosphate-GlcNAc로 변형 시킨다 (반응 8). 이어진 반응으로 6-phospho- β -glucosaminidase에 의해서 GlcNAc와 GlcNAc-6-phosphate로 분해한다 (반응 9) [27,28,29].

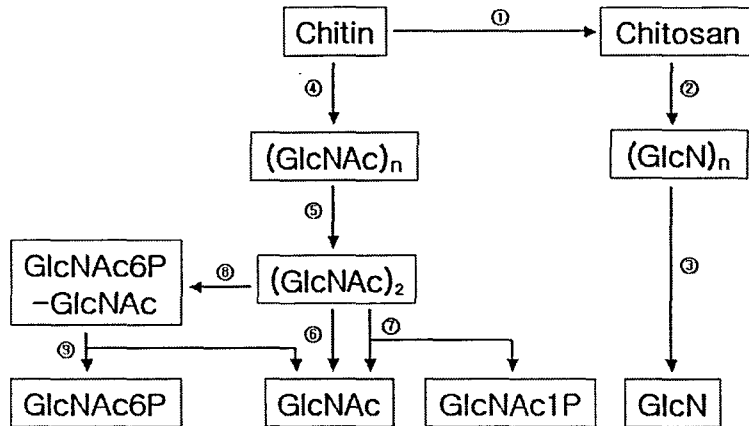


Fig. 1. Previously known chitin catabolic pathways from chitin to monosaccharide. Enzymes are displayed as 1, chitin deacetylase; 2, chitosanase; 3, GlcNase; 4, endochitinase; 5, exochitinase; 6, GlcNAcase; 7, ClcNAc₂ phosphorylase; 8, GlcNAc₂ phophoryltransferase system; and 9, 6-phospho-β-D-glucosaminidase.

2. 재료 및 방법

1) 재료

키토산, 글라이콜 키토산, 키토닌은 시그마-알드리치사로부터 구매하였다. 키토산 올리고당 (GlcN)_n과 키토닌 올리고당 (GlcNAc)_n들은 셰이카가쿠사로부터 구매 하였으며, 다른 모든 시약들은 특급 시약을 사용하였다.

2) Chitosanase 및 chitinase 생산 균주의 분리

본 연구에 사용된 균주는 한국의 전통 식품인 된장으로부터 분리하였다. 샘플 1g에 멸균수 10ml에 넣고 vortexing mixer를 이용 강하게 교반한 후 6단계 희석 평판 법으로 LB agar 배지(polypeptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, agar 15g /1L)에 도말하여 생성된 colony를 0.1% colloidal chitin-LB agar 배지 (1% colloidal chitin 10ml, poly peptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, agar 15g /1L)와 1% soluble chitosan-LB agar 배지 (1% soluble chitosan 10ml, poly peptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, agar 15g /1L)에 희석 도 말하여 37°C에서 일주일가량 배양 후, 0.5% congo red로 염색하여 NaCl로 탈

색하였을 때 colloidal chitin이나 soluble chitosan이 분해되어 clear zone이 형성되는 균주를 1차 선발하였다. 1차 분리된 균주를 액체 LB 배지에 접종하여 37°C에 O/N 배양하여 다시 분리용 LB agar 배지에 획선 도말하여 37°C에서 1주일 배양하며 콜로니 주변에 colloidal chitin과 soluble chitosan을 분해하여 clear zone이 가장 선명하면서도 크게 나타나는 균주를 chitosanase 및 chitinase 생산 균주로 최종 선발하였다 (Fig. 2).

3) 수용성 키토산 기질의 준비

1% 수용성 키토산은 증류수 900ml에 키토산 분말을 10g 녹여 준비하였다. 녹이는 중 1M의 Acetic acid을 90ml 첨가 하였으며, 최종 볼륨을 증류수를 이용하여 1 liter로 맞추었으며, 1M Sodium Acetate를 이용하여 pH5.0으로 보정하였다 [30].

4) Colloidal chitin 제조

Colloidal chitin은 Roberts와 Selitrennikoff의 방법을 변형하여 chitin(Sigma사, C9213)을 이용하여 제조하였다. Chitin 분말 20g에 진한 염산 350ml을 천천히 첨가한 후, 4°C에서 강하게 stirring하며 O/N하였다. Chitin-염산 용액에 차가운 95% 에탄올을 2L 첨가한 후, -35°C에서 강하게 stirring하며 O/N하였다. 침전물을 원심 분리 (5,000g, 2분, 4°C)를 통하여 수집하였다. 수집된 침전물은 증류수를 이용하여서 pH7.0이 될 때 까지 washing하였다 [31].

5) Glycol chitin 제조

Glycol chitin은 Molano등의 방법을 변형하여 glycol chitosan의 아세틸레이션을 통하여 얻었다. 5g의 glycol chitosan을 10% acetic acid 100ml에 mortar에서 갈면서 녹였다. 끈득끈득한 액체를 22°C에 over night 방치하였다. Me-OH(450ml)을 천천히 첨가하며 그 액체를 Whatman paper No.4에 통과시키며 여과하였다. 이 여과된 것을 비이커로 옮기고 acetic anhydrate 7.5ml을 첨가하고 stirring 하였다. 그 결과 형성된 gel을 실온에 30분 동안 방치하고 작은 조각으로 잘랐다. Gel로부터 방출된 물기를 제거 하였다. Gel 조각을 Waring Blendor로 옮겨 약간의 Me-OH을 덮을 정도로 첨가하여 homogenized 하였다. 이를 4°C 10,000rpm 15분간 원심분리 하였다. Gel로 된 pellet에 1vol의 Me-OH을 첨가 하여 다시 homogenized하고 원심 분리하였다. Pellet을 0.02%(W/V) sodium azide가 포함된 증류수 (500ml)에 녹이고 4분 동안 homogenized 하였다 [32].

6) 균주의 염색체 DNA의 분리

선별 균주의 동정을 위하여 DAU101의 염색체 DNA를 다음과 같이 분리하였다. 염색체 DNA를 얻기 위하여 pre-culture한 균주를 LB배지 3ml에 접종하여 37°C shaking incubator에서 4~6시간 동안 배양하였다. 배양된 균주를 집균하여 1X TEN buffer(Tris-HCl, EDTA, NaCl)로 washing하였다. 500ul SET buffer (20% sucrose, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl[pH7.6], 1mg/ml lysozyme)로 suspension하고, 37°C에서 10분 동안 incubation 후에 proteaseK(20mg/ml)를 소량 첨가한다. 동시에 SDS를 최종 1%되도록 첨가하여 37°C에서 30분간 세포를 lysis하고, 6M NaCl을 첨가한 후 phenol 정제하였다. Phenol 정제한 sample은 99% Et-OH로 침전시켜(-70°C, 10분), chromosomal DNA를 회수하였다.

7) 주사 전자 현미경 관찰을 위한 샘플의 준비

분리한 균주를 2% Glutaraldehyde (0.1M sodium phosphate buffer[pH7.2], 0.1% MgCl 포함)로 2시간 동안 4°C에서 전 고정한다. 고정액을 제거하고 0.1M Sodium Phosphate Buffer pH7.2로 1시간씩 2회 세척하고, 0.2M Sodium Phosphate Buffer pH7.4에 1%가 되게 녹인 오스미움산 용액으로 4°C에서 24시간 동안 2차 고정시킨다. 고정된 샘플에서 용액을 제거한 뒤에 탈수를 한다. 탈수 과정은 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% Et-OH에 담아 10분간 방치한 후 원심 분리하여 용액 제거하는 단계를 각각 2회씩 반복하였다. 50~90% 단계는 4°C에서 실행하였으며, 95~100% 단계는 실온에서 실행하였다. 다음으로 hexadimethyl -disilazane을 첨가하여 4°C에서 1시간 방치한 후 원심 분리하여 액을 제거하였다.

8) 검은 색소 생성능의 테스트

Bacillus sp. DAU101의 검은 색소 생성능의 실험을 위하여 TGY배지 (tryptone 5g, yeast extract 2.5g, glucose 1g, agar 15g per liter)와 glycerol-glutamate agar배지 (glycerol 10g, monosodium glutamate 25g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, CaCl₂·2H₂O 0.011g, FeSO₄·7H₂O 0.015g, ZnSO₄·7H₂O 0.013g, CuSO₄·5H₂O 0.005g, agar 15g per liter)에서 관찰하였다 [32,33].

9) 16S rDNA와 *gyrA* 유전자를 이용한 계통도 분석

16S rDNA와 *gyrA* 유전자는 PCR법을 통해서 획득하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위해서 두 개의 프라이머 (5' -GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

[position 9 to 27 *E.coli* 16S rDNA]와 5' -AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' [position 1,525 to 15,42 *E.coli* 16S rDNA)]를 사용하였으며, *gyrA* 유전자의 증폭을 위해서 두 개의 프라이머 (5' -CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3' 와 5' -CAAGGTAATGCTC CAGGCATTGCT-3')를 사용 하였다[35]. PCR법은 다음과 같은 절차에 따라서 수행하였다: pre-denaturation 95°C 60초를 수행 후, denaturation 95°C 60 초, annealing 60°C 60초, extension 72°C 90초씩 30 사이클 수행하였으며, 마지막으로 final extension 72°C 10분을 수행하여 PCR반응을 마무리 하였다. PCR법에 의해서 생성된 PCR 산물은 pGEM T-easy 벡터(Promega사)에 재조합하였다.

10) *Bacillus* sp. DAU101의 키토산아제 유전자의 분자적 클로닝

Bacillus sp. DAU101의 genome library를 구축하였다. 먼저, *Bacillus* sp. DAU101의 싱글 콜로니를 LB배지 10ml에 접종하여 37°C, 180rpm에서 하룻밤 동안 배양하였다. 세포를 집균하여 Sambrook[36] 등이 기술한 방법에 의해서 genomic DNA를 준비하였다. 준비된 DNA를 제한 효소 *EcoRI*을 이용하여 부분 절단을 한 후, 0.6% 아가로스 겔에 전기 영동하여 대략 1~2 kb 정도의 단편들을 회수 하였다. 회수한 DNA 단편들은 제한효소 *EcoRI*과 calf intestinal alkaline phosphatase 처리된 pUC18 플라스미드에 재조합되어졌다. 재조합된 플라스미드는 다시 *E.coli* JM109에 transformation (형질전환) 하였다. 형질 전환 된 균주는 37°C에서 암피실린(50µg/ml)이 함유된 0.5% glycol chitosan-0.1% congo red agar 배지에서 배양하였다. 붉은 색의 배지에서 콜로니 주위에 투명한 오렌지색 환을 나타내는 균주를 키토산아제를 생산하는 재조합 균주로 선별하였으며 염기서열을 분석하였다. 염기 서열의 분석 및 유사성의 조사는 NCBI의 BLAST(N)을 사용하였다. 상동성 얼라이먼트는 MacVector 6.5의 CLUSTAL W 프로그램을 이용하였다.

11) GST-chitosanase fusion 플라스미드의 구축

Glutathione S-transferase (GST)-chitosanase fusion 단백질을 구축하기 위하여 바이오니아사에서 합성한 두개의 oligonucleotides 프라이머(5' -TACGAATTC GCGGCCGGGCTGAATAAGGAT-3', 5' -TTCCTCGAGTTTATTGAATAGTGAAA TTTCCGT-3')를 사용하였다. 이 프라이머들은 GST fusion 단백질의 발현 벡터인 pGEX-6P-1에 쉽게 클로닝하기 위해서 프라이머 내부에 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*의 자리를 삽입하였다. PCR 반응액 50ul 속에는 100pmol의 프라이머, 200ng의 주형 DNA, 20mM의

각각의 dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)와 1.0U의 Taq DNA Polymerase 를 함유하였다. 증폭 과정은 다음 단계를 30회 반복 하였다: pre-denaturation 95°C에서 60초를 실시한 후, denaturation 95°C에서 60초, annealing 55°C에서 60초, extension 72°C에서 90초를 30회 반복하였으며, 이후 마지막 extension 반응으로 72°C에서 10분간 실시하였다. 증폭된 DNA 단편은 제한효소 *EcoRI* 과 *XhoI*으로 처리한 후, *EcoRI*과 *XhoI* 처리를 하고 인산기가 제거된 pGEX-6P-1 벡터에 클로닝하였다. 그 결과, GST-chitosanase 융합 플라스미드 인pGECSN-SP를 구축 하였다.

12) 재조합 단백질 CSN-SP의 정제

GST-chitosanase fusion 플라스미드를 가진 *E.coli* BL21 (DE3)는 지수 성장기에 0.1mM의 IPTG에 의해서 과발현 시켰으며, 이후 37°C에서 3시간정도 더 배양하였다. 세포는 4°C, 6,000rpm에서 15분간 원심분리를 통해서 집균 하였으며, 1X PBS 버퍼 (10X PBS를 희석사용: 1.4M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na₂HPO₄, 18mM KH₂PO₄ [pH 7.3])를 이용하여 Washing하였으며, 1X PBS를 이용하여 재현탁하였다. 세포는 sonication을 통하여 파쇄 하였으며, 그 상등액은 4°C, 13,000 rpm에서 30 분간 원심 분리하여 수집하였다. 상등액은 1X PBS로 평형화 되어있는 GSTrap FF column에 통과 시킨 후, 10mM reduced glutathione을 이용해서 용출하였다. 용출 속도는 분당 1ml의 속도를 유지 하였다. 용출된 fraction은 PreScission cleavage 버퍼 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT [pH7.0])로 투석하고 Amicon Ultra-4를 이용하여 농축하였다. 농축된 GST-chitosanase 융합 단백질은 PreScission protease를 이용하여 5°C에서 12 시간동안 반응시켜 GST 영역을 제거 하였다. 이 분리된 단백질들은 다시 GSTrap FF column에 다시 통과시켜 컬럼에 결합하지 않은 unbounded 단백질을 회수하여 정제한 단백질로 사용하였다.

13) Enzyme assay and protein determination

Chitosanase의 효소 활성의 수용성 키토산으로부터 생성되는 환원당을 측정하여 결정하였다. 반응액 속에는 50ul의 1.0% 수용성 키토산, 100ul 1X PBS와 enzyme을 첨가하여 최종 부피를 250ul로 혼합한 후, 50°C에서 30분간 반응 시켰다. 효소 반응은 100°C에서 10분간 끓임으로써 정지시켰다. 이후 원심분리를 통하여 상등액을 취한 후, 변형된 DNS법에 의해서 환원당량[37]을 측정하였다. 1U는 분당 1 umol의 환원당을 생성하기 위해 필요한 효소의 양으로 정의 하였다. Glucosamine을 스탠다드 물질로 사용하였다. 효소의 단백질 농도는 브래드포드법[38]에 의해서 결정되었으며, 스탠다드 물질로는 BSA를 사용하였다

(0.2~1mg/ml). SDS-PAGE는 Laemmli법[38]에 의해서 전개하였으며, Coomassie 염색법에 의해서 단백질을 염색하였다.

14) 가수분해 산물의 분석

키토산 올리고당과 키토산으로부터의 가수 분해 산물의 분석을 위해서 Thin-layer chromatography (TLC)를 통하여 분석 하였다. 반응액 1ul를 실리카겔 플레이트에 점적한 후, n-butanol-methanol-25% ammonia solution-water (5:4:2:1 [vol:vol:vol:vol]) 혼합액을 이용하여 전개 시키고 마지막으로 aniline-diphenylamine reagent (4ml의 aniline, 4g의 diphenylamine, 200ml의 acetone, 30ml의 85% phosphoric acid)를 분사하여 180℃에서 10분간 구워서 반응 산물을 분석하였다.

15) 항진균 활성 시험

분리 균주의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 작용의 존재를 확인하기 위해서 PDA 배지(DIFCO, USA)에 포도에서 잣빛 곰팡이병을 유발하는 *Botrytis cinerea*, 시들음병을 유발하고 박과작물에서 덩굴 쪼김병을 유발하는 *Fusarium oxysporum*, 뿌리 썩음병과 가지 갈록병을 유발하는 *Rhizoctonia solani*, 균핵병을 유발하는 *Sclerotinia sclerotiorum*, 사과, 파과 식물의 검은 곰팡이병을 유발하는 *Aspergillus niger*를 PDA배지에서 분리 균주와 함께 접종하여 30℃ 저온에서 생육시키며 분리 균주에 의해 식물 병원성 곰팡이 생육이 저해되는 지를 관찰하였다.

16) Nucleotide sequence accession number

이 보고서에 기재된 *Bacillus* sp. DAU101의 16S rDNA, *gyrA*, *csn* gene들은 GenBank에 DQ316093, DQ316094, DQ316095로 등록 하였다.

3. 실험결과

가. Chitosanase와 chitinase를 생산하는 균주의 선별 및 동정

1) Chitosanase 및 chitinase를 생산하는 균주의 선별

한국의 전통 식품인 된장에서 chitinase와 chitosanase 생산능이 우수한 미생물을 분리하기 위하여 샘플을 채취하여 6단계 희석하여 single colony를 형성시켰다. 형성된 colony 중에서 0.1% colloidal chitin, 0.01% glycol chitin 또는

soluble chitosan이 함유된 LB agar plate에서 각각 7일 동안 배양하였을 경우 아래와 같이 강한 활성(투명환)을 나타내는 균주를 분리하여 DAU101이라고 명명하였다 (Fig. 1).

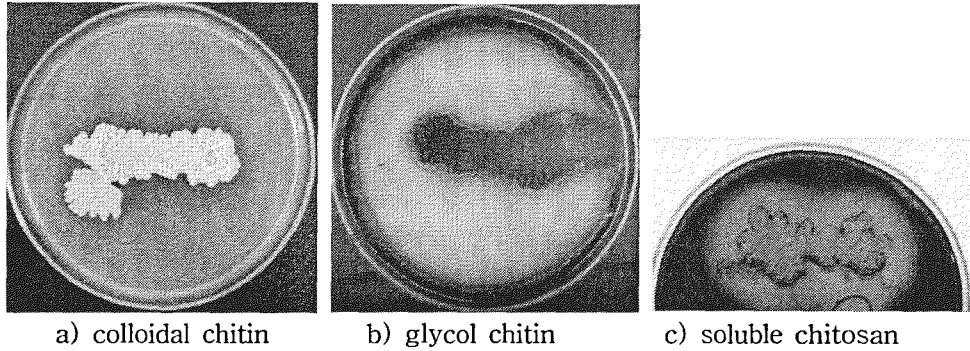


Fig. 2. Degradation pattern of colloidal chitin, glycol chitin, and soluble chitosan by *Bacillus* sp. DAU101.

2) 선별 균주의 동정 및 특성

DAU101은 그람 염색법에 의해서 그람 양성균으로 확인 되었으며, 전계방사형 주사 전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, JSM-6700F, Jeol, Japan) 관찰에 의해서 rod type의 형태가 관찰되어 간균임을 확인하였다 (Fig. 3). 그리고 유기질소를 에너지원으로 제공할 때 검은색을 색소를 생산하는 특성을 나타내었다. 갈색의 색소는 TGY배지에서 14일 정도 배양한 결과 생산되었으며, 검은색의 색소는 glycol-glutamate agar 배지에서 1-2정도 배양 하였을 때 생산되었다 (Fig. 4). 이러한 결과는 기존에 밝혀진 색소를 생산하는 것으로 알려진 *Bacillus atrophaeus* 균주와 차이를 나타내는 것으로 관찰된다. 또, 우리는 유전적 진화를 분석하기 위해서 16S rDNA와 *gyrA* 유전자를 결정하였다. 16S rDNA의 경우 그의 상동성이 *B. atrophaeus*, *B. subtilis*[39,40] 그리고 *B. vallismortis*와는 99%, *B. mojavensis*, *B. amyloliquefaciens* 그리고 *B. licheniformis*와는 98%를 나타내었다. 하지만, *gyrA*의 상동성의 경우 *B. atrophaeus*와 98%, *B. mojavensis*와 96%, *B. amyloliquefaciens*와 83%, *B. subtilis*와 82%, *B. vallismortis*와 81%를 나타내었다 (Fig. 5, Fig. 6).

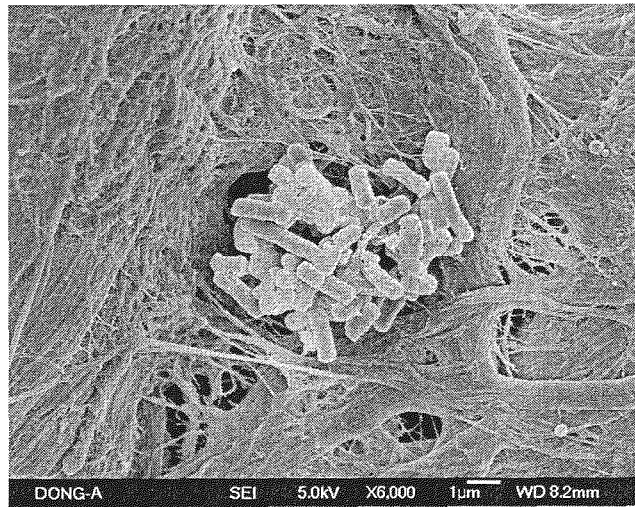


Fig. 3. Scanning Electron Microscopic (SEM) photograph of *Bacillus* sp. DAU101.

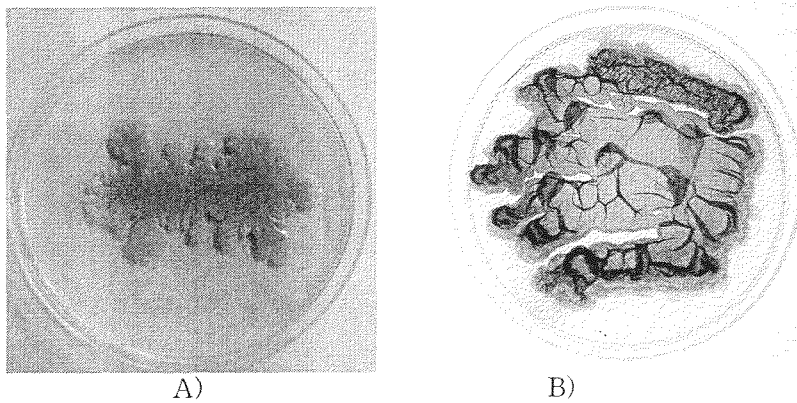


Fig. 4. Ability of pigmentation by *Bacillus* sp. DAU101. A, brown pigmentation was observed after 14 days in TGY medium; B, black pigmentation was observed after 1-2 days in glycerol-glutamate medium.

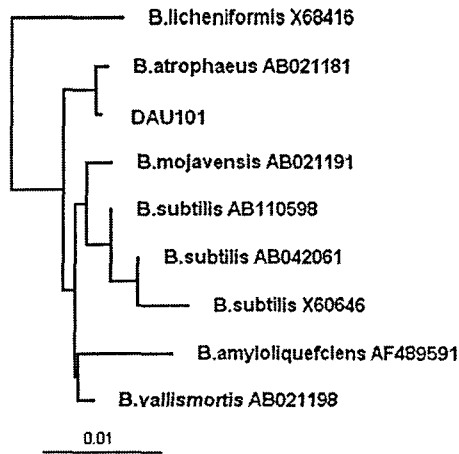


Fig. 5. Unrooted phylogenetic tree constructed from analysis of the 16S rDNA sequence of isolated *Bacillus* sp. DAU101. 16S rDNA of *B. thuringiensis*(D16281, AY138290), *B. anthracis*(X55059) *B. cereus*(D16266) was used as an out group.

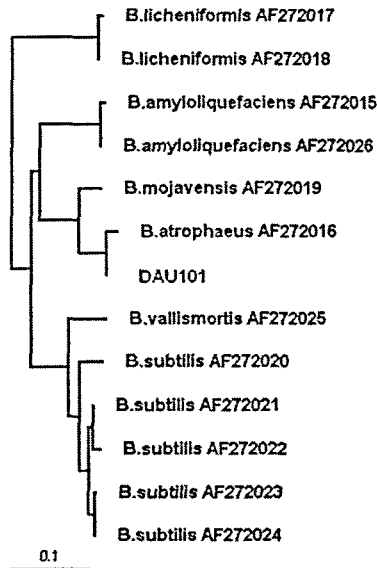


Fig. 6. Unrooted phylogenetic tree constructed from analysis of the *gyrA* sequence of isolated *Bacillus* sp. DAU101. 16S rDNA of *B. weihenstephanensis* (AB021199) was used as an out group.

3) 식물 병원성 곰팡이 생육 억제 작용

분리 균주인 DAU101의 식물 병원성 곰팡이에 대한 생육 억제 작용의 존재를 확인하기 위해서 PDA 배지에 식물 병원성 곰팡이인 *Botrytis cinerea* (젓빛곰팡이병), *Fusarium oxysporum* (덩굴쪼김병), *Rhizoctonia solani* (뿌리썩음병, 가지잘록병), *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병), *Aspergillus niger* (검은곰팡이병)와 함께 접종 하여 1주일 정도 30°C에서 배양하며 관찰하였다. *Bacillus* sp. DAU101 균주에서 생성된 chitosanase와 chitinase에 의해 *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*의 식물 병원성 곰팡이들의 세포벽을 구성하는 chitin과 chitosan을 분해하여 생육을 저해에 따른 일정한 크기의 zone을 형성하게 된다. 그 결과 *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*와 같은 식물 병원성 곰팡이의 생육을 저해하는 일정한 zone을 확인할 수 있었으며 분리 균주 *Bacillus* sp. DAU101은 식물 병원성 곰팡이의 생육을 저해하는 활성을 가진 균주임을 확인 할 수 있었다 (Fig. 7).

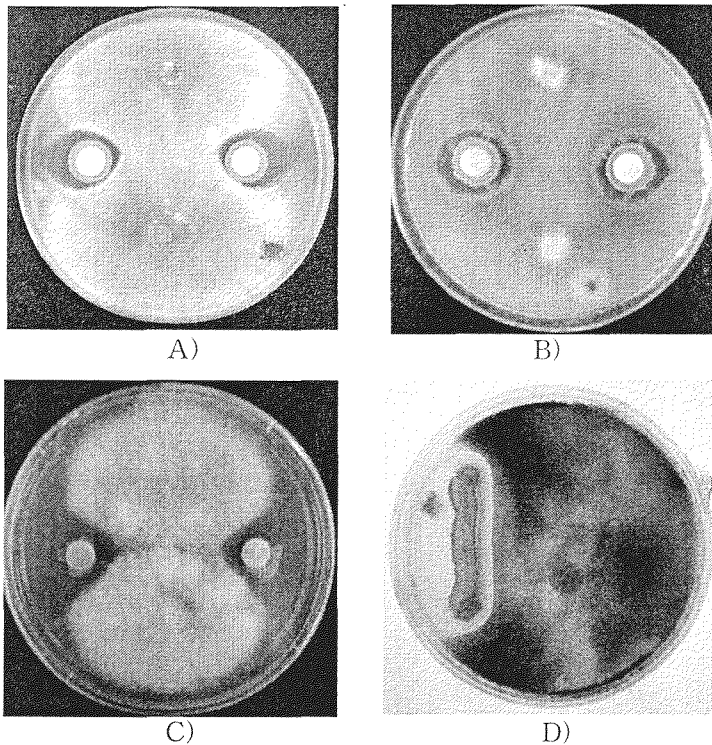


Fig. 7. Inhibition of the growth of pytopathogenic fungi from *Bacillus* sp. DAU101 by pairing culture on the PDA medium. A, *Botrytis cinerea*; B, *Rhizoctonia solani*; C, *Fusarium oxysporum*; D, *Sclerotinia sclerotiorum*.

나. *Bacillus* sp. DAU101의 chitosanase 생산 유전자 분석 및 효소 특성

1) Cloning, sequencing and analysis of chitosanase gene

Bacillus sp. DAU101의 게놈 라이브러리는 pUC18을 이용하여 구축하였다 (Fig. 8). DAU101의 chromosomal DNA로부터 chitosanase 유전자를 가진 형질 전환된 *E. coli* JM109는 glycol chitosan-congo red agar 배지에서 콜로니 주변으로 오렌지색 투명존을 형성하였다. 대략 20,000개의 ampicillin 저항성 콜로니들 중에서 오직 하나의 콜로니만이 오렌지색 투명환을 나타내었다.

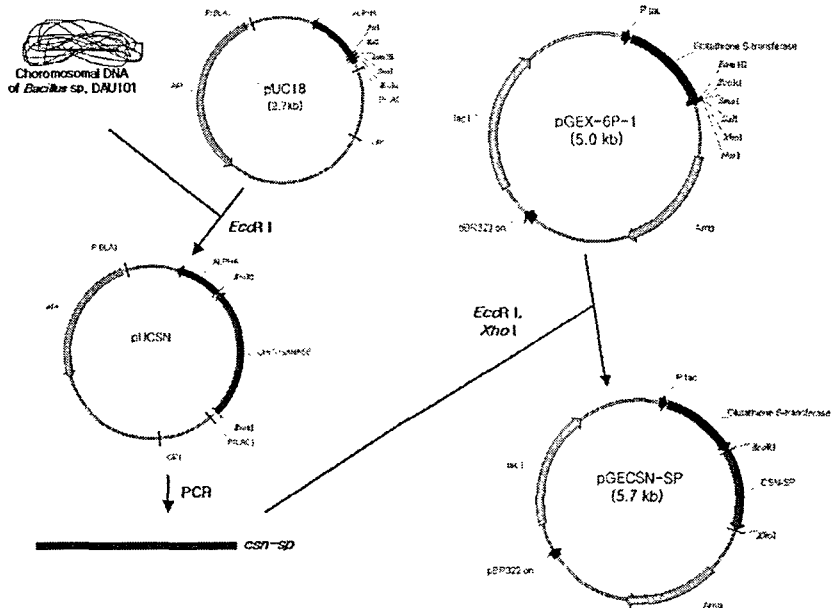


Fig. 8. Construction of recombinant plasmids, pUCSN, and pGEXSN-SP, with chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101.

Chitosanase 유전자 염기서열을 분석한 결과, chitosanase 유전자의 분자량 31,420 Da를 가지는 279개의 아미노산을 암호화하는 837개의 뉴클레오티드로 구성되어 있었다. 리보솜 결합 자리 (AAGGGG)는 시작 코돈의 upstream 영역에서 찾을 수 있었으며, 종결 코돈 (TAA)의 아래쪽에서는 Hair pin 루프 구조를 찾을 수 있었다. Chitosanase의 N-터미널 영역은 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) [41,42] 사이트를 통해서 예측하였다. 분석한 결과, 시그널 펩타이드의 절단 부위는 Ala-36과 Ala-37번 사이인 것으로 나타났다 (Fig. 9). 균주 DAU101의 추정된 아미노산 서열을 다른 9개의 박

테리아성 chitosanase와 비교하였다. 9개의 아미노산 서열을 CLUSTALW 방법을 통하여 일라이먼트 하였다. 단백질은 당 가수분해 효소 family 46에 속하는 것으로 동정되었으며, *Bacillus subtilis* (88% identity), *B. sp* thermostable chitosanase (66% identity), *Pseudomonas sp.* (30% identity), *Amycolatopsis sp.* (28% identity), *Streptomyces sp.* (19% identity), *B. ehimensis* (19% identity), *B. circurans* (17% identity) 그리고 *Burkholderia gladioli* (14% identity)와 상동성을 나타내었다. *Bacillus sp.* DAU101의 chitosanase의 Glu-19와 Asp-35는 *Streptomyces sp.* N174의 chitosanase [43]의 촉매 활성에 필수적인 것으로 제안된 Glu-22와 Asp-40의 아미노산 서열들과 일치하였다 (Fig. 10).

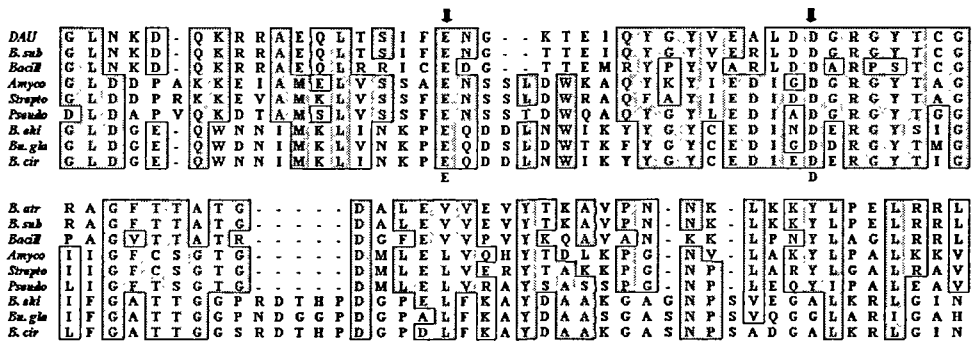


Fig. 9. Nucleotide sequence of the *csn* gene and deduced amino acid sequence of the gene product from *Bacillus sp.* DAU101. The putative Shine-Dalgarno (SD) sequence for ribosome binding side is underline. The N-terminal amino acids predicted from the signalP site is indicated arrow. The amino acid residues that seems to be essential for chitosanase activity are marked by circled.

```

CGCTTAGCATTCAAATATTGACAAATTCGTGTGTTTTCAACAAAAAATCACTCCCTCAGTATACTCAGTCCGTAACITTTACATATGAAACGGGTATGG 100
CAATGAAAATCAGTTTGAAGAAAAAGCAGGTTTTGGAAGAAGACGGCGTTTCATCTTATTTTCACCATGTTTTTACCCGTGATGAGCGGTAC 200
M K I S L K K K A G F W K K T A V S S L I F T M F F T L M M S G T 33
CGTTTTTCGGCCGGCTCAATAAGGATCAGAACCCCGCCCGAAGCCTGACCAGCATCTTTGAAAACGGAAAGACGGAAATCCAATACGGATATCTT 300
Y F A A G L N K D Q K R R A E Q L T S I F ⊕ N G K T E I Q Y G Y Y 68
↑
GAACCGTTGGATGACGGAAGCGTTACAGTTGCCGGCCGGCCGGCTTTACGACGGCTACCGGAGATCGCGTGGAAAGTAGTCGAAGTCTACACGAAACCGG 400
E A L D ⊕ G R G Y T C G R A G F T T A T G D A L E Y V E Y T K A 99
TGCCGAATAACAAATGAAAAAGTATTTGCCCTCAATTCGCTCGTCTTGCAGACGAAACCGGATGACATCAGCAATCTCAAAGGATCGCTTTCGCTG 500
Y P N N K L K K Y L P E L R R L A K D E S D D I S N L K G F A S A W 132
CGCGTCACTTCCCAATGATAAAGCCTTCCCGCTGCCAAGATAAGCTAAATCACAGCTTGATTATCAGCCGGCGATGAAACGTTACGAAATGCCCGA 600
R S L G N D K A F R A A Q D K Y N D S L Y Y Q P A M K R S E N A G 168
CTGAAAACGGCCTTCCCAAAACAGTGTGATGACGATACGGTGATTGACGATGCGGACGGCGATGATCGGACTCCTTTTATGCCCTGATTAACCGCACGA 700
L K T A L A K A V M Y D T Y I Q H G D G D D P D S F Y A L I K R T 199
ACAAAAAATGGCCCGCTCACCGAAAGACGCAACTCAGGAGAAGAAATGCTCAATAAATTCTCGATGTCCGCTATGACGATCTCAATCCGTCAGA 800
N K K M G G S P K D G T D E K K W L N K F L D V R Y D D L M N P S D 233
TGACCACACTCAGCATGATGAGAGAAATCGGTTGCCCGTTCGACGTTTTCCCGATATTGTCAAACAGAACTACAATTTAAACGGCCGATTTCAT 900
E D T Q D E W R E S V A R Y D V F R D I V K E K N Y N L N G P I H 268
GTCCGGTCAAGCGAATACGAAATTTCACTATTCAATAAACAAAAAACCCCGCCATATGCCGGTTTTACTATTAACCGATGGAGCCTTCCATTTCGA 1000
Y R S S E Y G N F T I Q * ←—————→ 279
ACTTGATCAAACCGTTCATTTCAACTCGGATTCATCCGAAAGTCTTTTGTCAATCGGTCGATCAACCCCATAACCGATCATTTCTGTGCTTCTCTTC 1100
AGAAATACCGGGCTCATCAAGTAGAAAAGCTGTTCTTCAGAAACTTTTGATACTTTCCGCTCGTGCTCCAATGAAAT 1179

```

Fig. 10. Amino acid alignment of other bacterial chitosanases. Arrows indicate two conserved carboxylic amino acid residues. *DAU*, *Bacillus* sp. DAU101 (DQ316095); *B. sub*, *Bacillus subtilis* (X92868); *Bacill*, *Bacillus* sp. KFB-CO4 (AF160195); *Amyco*, *Amycolatopsis* sp. CsO-2 (BAA94840); *Strepto*, *Streptomyces* sp. AM-7161 (BAC79047); *Pseudo*, *Pseudomonas* sp. A-01 (BAC06189); *B. ehi*, *Bacillus ehimensis* EAG1 (BAA23489); *Bu. gla*, *Burkholderia gladioli* (BAA82154); *B. cir*, *Bacillus circulans* MH-K1 (P33673).

3) GST 융합 단백질을 이용한 chitosanase의 정제

Chitosanase는 글루타치온을 이용한 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. chitosanase 유전자는 pGEX-6P-1 벡터를 이용하여 발현 시켰으며, 대장균 *E. coli*의 세포질에 존재하였다. 그리하여 chitosanase 단백질의 시그널 펩타이드 영역은 제거 하였다. 재조합 융합 플라스미드인 pGECSN-SP를 가진 대장균의 확실한 chitosanase 활성을 확인하였다. 대장균 세포는 소니케이션을 통해서 파쇄하였으며, 정제는 GSTrap FF 컬럼과 PreScission protease를 이용

하여 실행하였다. 단백질의 분자량은 스탠다드 단백질과 비교하여 그 이동성을 비교 하였을 때, 대략 27 kDa 정도 되는 것으로 관찰 되어졌다. 이는 SDS-PAGE를 통해서 확인할 수 있었다(Fig. 11). 이 정제된 단백질을 이용하여 여러 가지 효소 활성 측정에 이용하였다.

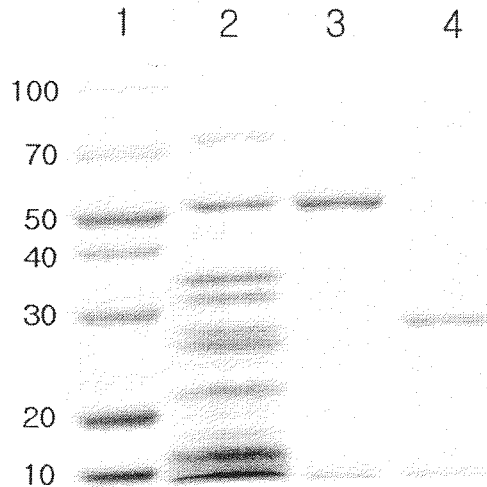


Fig. 11. Purification of chitosanase from the GST-chitosanase fusion protein. Lane 1, marker protein; 2, soluble fraction after 6h of induction at 37°C; 3, GST-chitosanase following fusion protein adsorption; 4, purified protein digested by PreScission Protease.

4) pH, 온도 및 금속이온들이 효소 활성에 미치는 영향

Chitosanase의 최적 활성은 soluble chitosan을 기질로 사용하며 반응 버퍼의 pH 7.5 일 때 최고를 나타내었다. 여러 온도 중에서는 50°C에서 단백질이 최고의 활성을 나타내었다 (Fig. 12). 금속 이온의 효과는 다음 금속 이온들 (Co^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Cs^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Na^+ , EDTA, Li^+)을 최종 농도 1, 5 또는 10 mM 정도로 반응액에 첨가 하여 효소의 활성을 체크하였다. Ni^+ 와 Hg^{2+} 의 금속 이온들을 첨가하였을 때, 모든 농도대에서 효소의 활성을 대략 97-99% 저해하였다. 그리고 Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cs^{2+} 이온들은 첨가하였을 때, 각각 (55, 80, 97%), (83, 71, 71%), (54, 56, 28%), (15, 11, 40%) 정도

의 효소 활성을 저해하는 것으로 관찰되었다. Hg^{2+} 에 의한 chitosanase의 활성 저해는 다른 chitosanase 그룹에서 알려진 일반적인 특성인 반면에 다른 금속 이온에 의한 효소 활성의 저해는 고유의 특성이다. 이와는 반대로 5, 10mM의 Ca^{2+} 이온을 첨가하였을 때는 soluble chitosan의 분해 활성이 대략 1.6배 정도 증가하였으며, 10 mM Mg^{2+} 이온의 경우 1.5배, 1, 5mM의 Na^+ 는 대략 1.4배 정도로 효소의 활성을 증가시켰다. 다른 금속 이온(K^+ , Li^+)들은 약간 효소 활성을 증가시키는 것으로 나타났다 (Table 1).

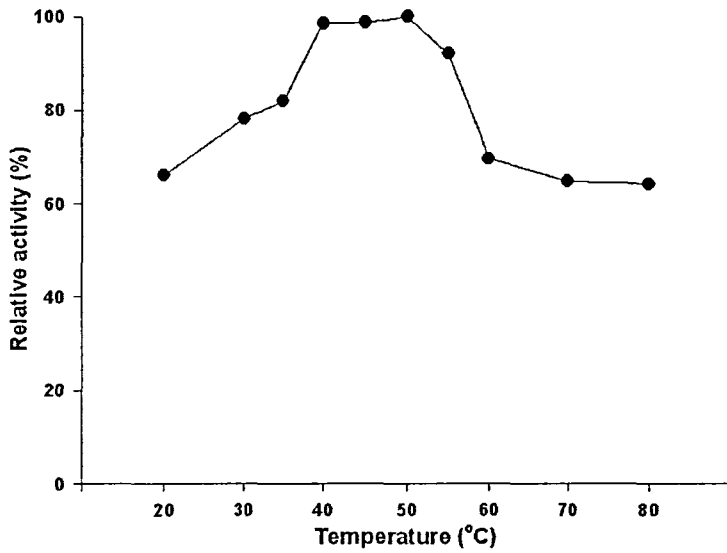


Fig. 12 Effect of temperature on the activity of purified chitosanase.

Table 1. Effect of metal ions on the activity of purified chitosanase.

Reagent	Relative activity (%) ^a		
	1 mM	5 mM	10 mM
Control	100	100	100
Co ²⁺	47	45	73
K ⁺	113	113	115
Mg ²⁺	103	125	147
Ca ²⁺	131	165	163
Li ⁺	115	119	124
Ba ²⁺	66	98	125
Ni ²⁺	3	2	0
Cs ⁺	85	89	61
Zn ²⁺	46	21	3
Cu ²⁺	17	29	24
Hg ²⁺	0.5	8	3
Na ²⁺	142	146	128
EDTA	97	110	82

5) 기질 특이성

정제한 chitosanase의 soluble chitosan, glycol chitosan, 다른 다당류에 대한 효소의 활성을 Table 2에 나타내었다. chitosanase는 soluble chitosan과 glycol chitosan은 특이성을 가졌지만, 다른 기질들 (colloidal chitin, glycol chitin, CMC)에 대해서는 특이성을 가지지 못하였다. 그리고 soluble chitosan을 glycol chitosan에 비해서 더 빨리 가수 분해하였다 (Table 2).

Table 2. Substrate specificity of chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101.

Substrate ^a (1 %)	Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$ per mg of enzyme)	Relative activity ^b (%)
Soluble chitosan	112.3	100
Glycol chitosan	2.55	2.27
Colloidal chitin	N.D. ^c	N.D.
Glycol chitin	N.D.	N.D.
Carboxymethyl cellulose	N.D.	N.D.

^aEach reaction mixture contained substrate at a concentration of 0.25%.

^bRelative activity was expressed as rates relative to the activity of enzyme on soluble chitosan. ^cN.D., not detect.

6) 가수분해 산물의 분석

chitosanase의 가수분해 성향은 기질로 soluble chitosan 과 그의 올리고당 (GlcN₁-GlcN₆)들을 이용하여 실험하였다. soluble chitosan과 그의 올리고당을 이용한 가수 분해 산물의 성향 분석 실험을 위해서 정제 단백질을 50°C에서 180분간 반응 시켰다. TLC 분석을 통해서 chitosanase는 soluble chitosan을 기질로 이용하여서 주로 GlcN₂, GlcN₃, GlcN₄ 형태의 올리고당을 생산하는 것으로 관찰 되어졌다. 이는 chitosanase가 기질의 내부를 절단하는 endo-type의 분해 특성을 가지는 것을 의미한다. 키토산 사당체(GlcN₄)를 기질로 이용하였을 때, 그 산물은 키토산 이당체 (GlcN₂)였다. 키토산 오당체(GlcN₅)를 기질로 이용하였을 때, 그 산물은 키토산 이당체 (GlcN₂)와 삼당체 (GlcN₃)였으며, 키토산 육당체(GlcN₆)를 기질로 이용하였을 때, 그 산물은 키토산 이당체 (GlcN₂), 키토산 삼당체(GlcN₃)와 키토산 사당체(GlcN₄)였다 (Fig. 13, Fig. 14). 하지만, chitosanase는 키토산 단당류(GlcN)과 키토산 이당체(GlcN₂)를 기질로 이용하지는 못하였다. 이러한 키토산 올리고당의 가수 분해 산물의 성향을 토대로 분석한 결과, 정제한 chitosanase는 기질로 적어도 사당체 이상의 GlcN이 결합된 올리고당을 결합시킨 후 그의 내부를 절단하는 것으로 생각되어진다. Soluble chitosan을 기질로 반응 시켰을 때도 키토산 삼당체(GlcN₃)를 주산물로 생산 하였으며 이와 동시에 다량의 키토산 이당체(GlcN₂)와 키토산 사당체 (GlcN₄)가 생산 되었으며, 미량의 키토산 오당체(GlcN₅)와 키토산 육당체 (GlcN₆)가 생산되었다. 하지만 단당류는 확인 되지 않았다 (Fig. 15). 이를 통하여 정제한 chitosanase가 endo-type의 가수분해 특성을 가짐을 다시 한번 확인 할 수 있었다.

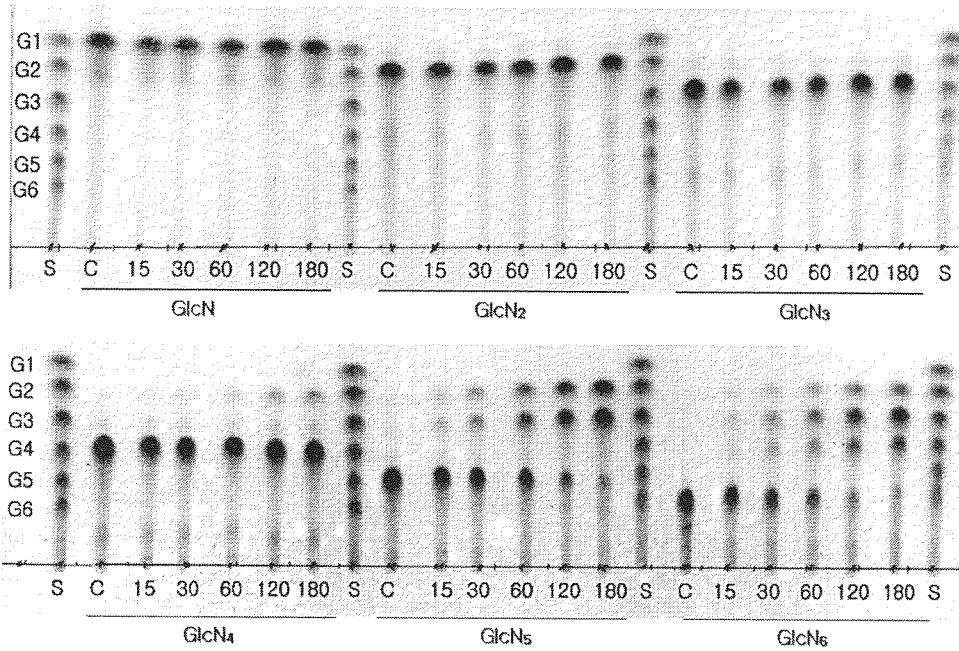


Fig. 13. TLC of hydrolysis products by chitosanase from various chitosan oligo saccharides. The reaction mixture (50ul) containing 0.5ug of substrate in 1X PBS was incubated with purified enzyme (0.75ug) at 50°C. The reaction mixture were analyzed at the indicated times. Lane S, standard chitosan oligosaccharides from GlcN(G1) to GlcN₆(G6). Lane C, negative control.

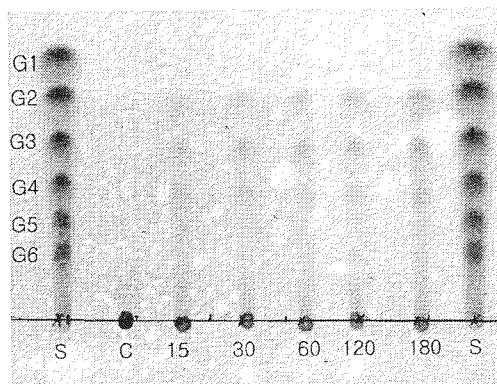


Fig. 14. TLC of hydrolysis products by chitosanase from soluble chitosan. The reaction mixture (50ul) containing 0.5ug of substrate in 1X PBS was incubated with purified enzyme (0.75ug) at 50°C. The reaction mixture were analyzed at the indicated times. Lane S, standard chitosan oligosaccharides from GlcN(G1) to GlcN₆(G6). Lane C, negative control.

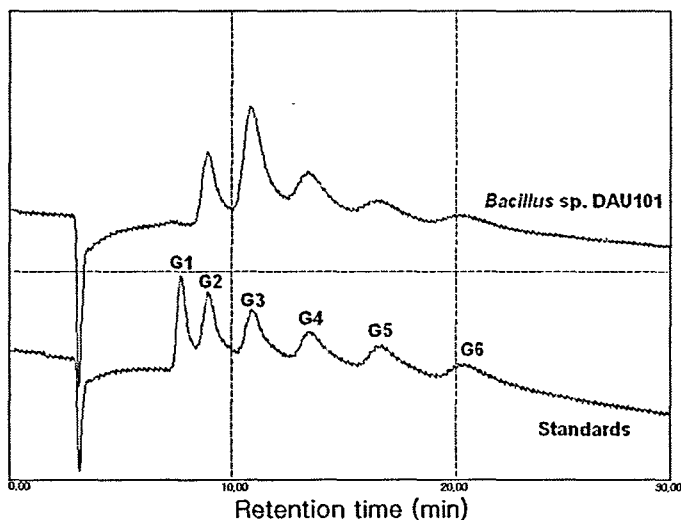


Fig. 15. Hydrolysate profiles of chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101. Sample were incubated at 50°C for 12h and analyzed on a TSK-Gel NH₂-60 column for the chitosan oligosaccharides. Standards G1 through G6 indicate standard GlcN_n where n is 1 through 6, respectively.

다. *Bacillus* sp. DAU101의 chitinase 생산 유전자의 분석 및 효소 특성

1) Cloning and sequence analysis of the chitinase gene

DAU101의 chromosomal DNA로부터 chitinase 유전자를 가진 형질 전환된 *E. coli* JM109는 LB-colloidal chitin agar 배지에서 콜로니 주변으로 투명존을 형성것으로 선별하였다. 대략 10,000개의 ampicillin 저항성 콜로니들 중에서 오직 하나의 콜로니만이 colloidal chitin을 분해하는 활성을 나타내었다. 이 플라스미드를 pUCHISB라고 명명하였다 (Fig. 16).

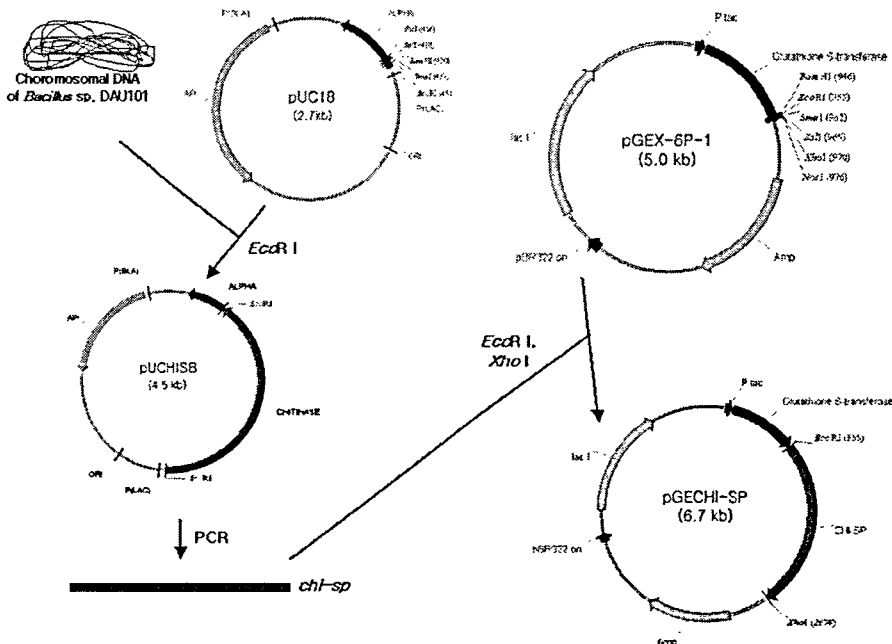


Fig. 16. Construction of recombinant plasmids, pUCHISB and pGEXHI-SP, with chitinase from *Bacillus* sp. DAU101.

pUCHISB는 여러 개의 작은 DNA 단편을 가지는 subclon들로 나누어서 염기서열을 결정하였다. 전체 ORF는 65,919 Da의 분자량을 가지는 597개의 아미노산을 암호화하는 1,781개의 뉴클레오티드로 구성된 것으로 밝혀졌다. 개시 코돈은 ATG를 사용하여 ORF를 시작하였다. 추정된 아미노산 서열의 N-말단으로부터 33번째 아미노산에 전형적인 시그널 펩타이드 절단 부위가 존재하는 것으로 보여 졌다. CHISB의 시그널 펩타이드는 SignalP 사이트 (

http://www.cbs.dtu/services/SignalP/)를 통해서 그람 양성 세균의 경우를 적용하여 분석하였다. 최적의 절단 부위는 A-33과 S-34 사이인 것으로 예측되어졌다 (Fig. 17).

```

TTG AAA ANG GGG TGA ACA AAA TAN AGT TTC ATT GAT GAA CAG CCA AAA AAA TTG
→ chisb
1  ATG AAA AAA GTG TTT TCA AAC AAA AAG TTT CTC GTT TTT TCT TTC ATT TTT GCG
  M K K V F S N K K F L V F S F I F A
55  ATG ATT TTA AGT CTG TCT TTT TTT AAT GGG GAA AGC GCA AAA GCC AGT TCT GAC
  M I L S L S F F N G E S A K A S S D
110 AAA AGT TAT AAA ATC ATC GGC TAC TAT CCG TCC TGG GGC GCT TAT GGA AGG GAT
  K S Y K I I G Y Y P S W G A Y G R D
165 TTT CAA GTA TGG GAT ATG GAT GCT TCT AAA GTC AGC CAT ATT AAT TAT GCA TTT
  F Q V W D M D A S K V S H I N Y A F
220 GCT GAT ATT TGC TGG GAG GGG AGG CAT GGA AAC CCT GAT CCG ACA GGC CCG AAT
  A D I C W E G R H G N P D P T G P N
275 CCC CAA AAA TGG TCT TGC CAG GAT GAA AAC GGA GTG ATT GAT GTT CCA AAT GGA
  P Q K W S C Q D E N G V I D V P N G
330 TCA ATC GTT ATG GGG GAC CCA TGG ATC GAT GTG CAA AAG TCA AAT GCC GGA GAT
  S I V M G D P W I D V Q K S N A G D
385 ACT TGG GAT GAG CCG ATT CGG GGC AAC TTT AAA CAA CTA TTG AAG CTG AAA AAG
  T W D E P I R G N F K Q L L K L K K
440 AAC CAT CCT CAT TTG AAA ACA TTC ATA TCA GTT GGC GGA TGG TCA AAT
  N H P H L K T F I S V G G W S W S N
495 CGC TTT TCA GAT GTT CCG GCA GAT CCT CCG GCA AGA GAG AAT TTT GCT GCT TCA
  R F S D V A A D P A A R E N F A A S
550 GCA GTA GAT TTT TTA AGA AAA TAT GGG TTT GAT GGG GTC GAC CTT GAC TGG GAA
  A V D F L R K Y G F D G V D L D W E
605 TAC CCG GTT AGT GGA GGG CTG CCG GGA AAC AGC ACC CGT CCG GAG GAT AAG AGA
  Y P V S G G L P G N S T R P E D K R
660 AAC TAC ACG CTA CTC TTG CAG GAT GTG CGA GAA AAG CTT GAC GCC GCA GAA GCG
  N Y T L L Q D V R E K L D A A E A
715 AAG GAT GGC AAG AAA TAC TTG CTG ACG ATC GCC TCC GGC GCC AGT CCT GAA TAT
  K D G K K Y L L T I A S G A S P E Y
770 GTA AGC AAC ACT GAA TTA GAT AAG ATT GCT GAA ACC GTT GAT TGG ATT AAC ATT
  V S N T E L D K I A E T V D W I N I
825 ATG ACC TAT GAC TTT AAT GGC GGA TGG CAA AGT ATA AGC GCT CAT AAT GCC CCA
  M T Y D F N G G W Q S I S A H N A P
880 TTA TTC TAT GAT CCA AAA GCG AAA GAA GCC GGC GTT CCA AAC GCT GAG ACA TTT
  L F Y D P K A K E A G V P N A E T F
935 AAC ATT GAA AGC ACC GTG AAG CGC TAC AAG GAA GCC GGT GTC AAA GCG GAC AAA
  N I E S T V K R Y K E A G V K A D K
990 TTA GTG CTT GGC ACA CCG TTC TAT GGC AGA GGC TGG AGC AAT TGT GAG CCT GCA
  L V L G T P F Y G R G W S N C E P A
1045 GAC AAC GGA GAA TAT CAA AAA TGC GGA CCG GTT AAA GAA GGG ACG TGG GAA AAG
  D N G E Y Q K C G P V K E G T W E K
1100 GGG GTA TTT GAT TTT TCA GAT CTT GAA AAG AAC TAC ATC AAT AAA AAC GGA TAT
  G V F D F S D L E K N Y I N K N G Y
1155 AAA AGA TAT TGG AAT GAT CGA GCA AAA GTG CCG TTT TTG TAT AAT GCG GAG AAT
  K R Y W N D R A K V P F L Y N A E N
1210 GGA AAC TTC ATT ACC TAC GAT GAT GAA GAA TCA TAT GGA TAC AAA ACC GAT TTA
  G N F I T Y D D E E S Y G Y K T D L
1265 ATT CAA TCA AAC GGA TTA AGC GGG GCT ATG TTT TGG GAT TTC AGC GGT GAT TCA
  I Q S N G L S G A M F W D F S G D S
1320 AAT CAG ACT TTG CTC AAC AAA TTA GCA GCC GAT TTA GGG TTC GCT CCG GGT GGG
  N Q T L L N K L A A D L G F A P G G

```

```

1375 GGT AAT CCA GAG CCG CCT GCA TCT GCA CCG GGT AAT TTG CGT GTG ACC GAA AAA
    G N P E P P A S A P G N L R V T E K
1430 ACC GCA ACC AGT ATC AGT CTG GTG TGG GAT GCA CCG AGC GAC GGA GCA AAC ATC
    N I T A T S I S L V W D A P S D G A
1485 GCA GAG TAT GTG CTG TCA TAT GAA GGC GGG GCC GTA TCG GTC AAG GAT ACA TCG
    A E Y V L S Y E G G A V S V K D T S
1540 GCG ACA ATC GGG CAA TTA AAG CCG AAT ACG ACA TAC TCA TTT ACA GTA TCG GCA
    A T I G Q L K P N T T Y S F T V S A
1595 AAG GAT GCG GAC GGA AAG CTC CAT ACC GGG CCA ACG ATA GAA GCA ACA ACA AAC
    K D A D G K L H T G P T I E A T T N
1650 TCT GAT CAA ACA TGT GGG TAT AAC GAA TGG AAA GAT ACA GCC GTC TAC ACA GGC
    S D Q T C G Y N E W K D T A V Y T G
1705 GGA GAC CGA GTC GTC TTT AAC GGC AAA GTG TAT GAA GCG AAA TGG TGG ACG AAA
    G D R V V F N G K V Y E A K W W T K
1760 GGA GAG CAG CCG GAT CAG GCT GGT GAG TCG GGT GTA TGG AAA TTA ATT GGT GAT
    G E Q P D Q A G E S G V W K L I G D
1815 TGC AAA TAA ATC AGT TTG ATA GAA AAC GAT AAA GAG AGA G 3'
    C K *

```

Fig. 17. Nucleotide sequence of the chitinase gene and deduced amino acid sequence of the gene product from *Bacillus* sp. DAU101. The N-terminal amino acids predicted from the SignalP site is indicated arrow.

2) Functional domains of chitinase

CHISB의 추정된 아미노산 서열을 분석한 결과, DAU101이 생산하는 chitinase는 다음의 도메인 순서로 구성 된 것으로 밝혀졌다: N-말단 시그널 펩타이드, glycosyl hydrolase family 18, fibronectin 3 (Fn3) domain, 그리고 chitin-binding domain (CBD) (Fig. 18). *Streptomyces griseus* ChiC를 제외한 대부분의 세균성 chitinase는 glycosyl hydrolase family 18에 속하는 것으로 알려져 있다 [44]. Family 18 세균성 chitinase의 보존된 아미노산 서열을 Fig. 19에 나타내었다. 보존된 아미노산 서열 중에는 촉매 반응에서 전자 공여체로 작용하는 글루탐산도 존재하였다[45,46]. Fn3 domain은 catalytic domain과 chitin binding domain 사이에 존재하였으며 Fig. 20에 다른 유사 아미노산 서열들과 얼라이언트 결과를 나타내었다. 세균성 Fn3 domain은 많은 세균의 chitinase, cellulase, amylase poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase[47]와 같은 세균성 효소에 존재하는 것으로 알려졌다. Fibronectin은 다양한 기능을 가진 세포외 매트릭스로서 세포 집합에 관여한다[48,49]. Chitinase에서 이 도메인의 존재는 비수용성 또는 크리스탈 형태의 키틴을 분해를 하는 과정에 있어서 중요한 역할을 한다. 많은 프롤린과 하이드록시아미노산 (Ser과 Thr)은 도메인을 서로 연결하여주는 domain linker로서 작용하는 것으로 알려져 있다

[50]. CHISB의 Fn3 domain도 catalytic domain과 chitin binding domain을 서로 연결하여 주는 기능을 하는 것으로 생각 되어진다. Fig. 21은 다른 세균성 chitin binding domain과의 유사성을 비교한 것을 나타내었다. Cellulose binding domain은 아미노산 서열을 기준으로 하여 10개의 패밀리로 그룹화 할 수 있다[51]. CHISB를 비롯하여 대부분의 세균성 chitinase의 CBD 안에는 chitin을 구성하는 *N*-acetylglucosamine의 pyranose 링을 공격하는 것으로 생각되어지는 Tyr과 Trp가 아주 잘 보존 되어져 있다.

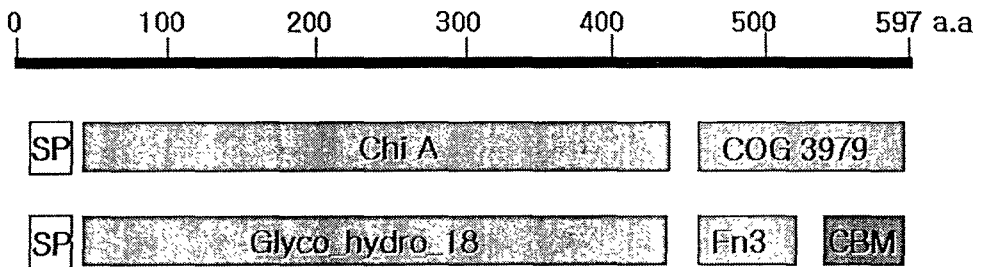


Fig. 18. Functional domain searching of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101.

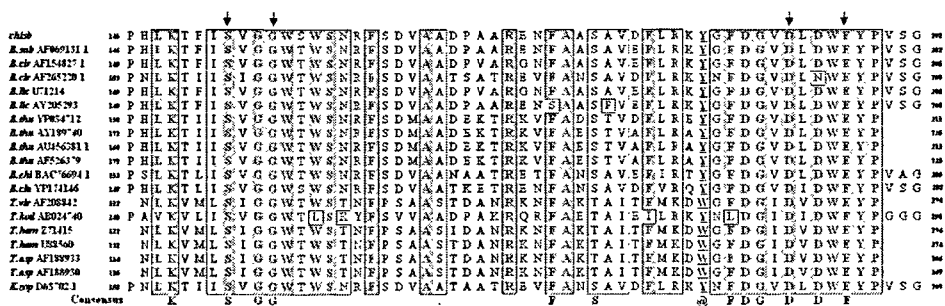


Fig. 19. Alignment of putative catalytic domain in chitinase of *Bacillus* sp. DAU101. The putative catalytic domain of *Bacillus* sp. DAU101 was compared with those of *B. subtilis* AF069131.1, *B. circulans* AF154827.1, *B. circulans* AF265220.1, *B. licheniformis* U71214, *B. licheniformis* AY205293, *B. thuringiensis* YP_034712.1, *B. thuringiensis* AY189740, *B. thuringiensis* AY456381.1, *B. thuringiensis* AF526379, *B. ehimensis* BAC76694.1, *B. clausii* YP_174146, *Trichoderma viride* AF20884.1, *Thermococcus kodakarensis* AB024740, *Trichoderma hamatum* Z71415, *T. hamatum* U88560, *T. asperellum* AF188933, *T. asperellum* AF188930 and *Kurthia zopfii* D63702.1. Arrows indicates the four residues identified as being conserved among bacterial and fungal chitinases. Symbol @ indicates conserved aromatic residues. Identity are dark background and similarity are light background.

```

chit3  454 E P P A S A P G N L R V T E K T A T S T S L V W D A P S D G A N I A E Y V L S Y E G G A V S V 588
B.sub AF069131.1 454 E P P S S A P D N L R V T E K T A T S I S L A W D A P S D G A N I A E Y V L S Y E G G A V S V 590
B.lg U71214 454 E P P S S A P V N V R V T G K T A T S V S L A W D A A S S G T N I A E Y V V S F E S R S I S V 592
B.lg AY205293 454 E P P S S A P V N V R V T G K T A T S V S L A W D A P S S G A N I A E Y V V S F E S R S I S V 594
B.hal D83764 454 E E P S S A P T N I Q A T E V T S T T V T L T W Q A P T E E P - T Q Y S V A Y D 604
P.syr ZP00127547 521 A P - P G N L R Q T G A T P T S V S L A W D A P T O G T A V D V Y H I Y S F D A P T V T V 644
P.syr AA053944.1 549 D Q P P S A P T D L K A T D I T A Y S V S L E W T A P S G P H R I K Q Y I V 693
S.coel T35719 744 P P P T A P G N F R A I G R T A T T V G L A W D R S I D N V A V A A Y 772
C.fim P26225 777 E P P S A P S N L R V S K S E S S I T E L T W D K S I D N V K V A G Y K I Y R D G 817
T.fus ZP00294422 784 E T P P S K P G N L K A S D I T A T S A T L T W D A S T D N V G V V G Y K V S 804

```

Fig. 19. Alignment of the Fibronectin 3 (Fn3) domain of chitinase with those of other bacterial chitinases. The putative fibronectin 3 domain of *Bacillus* sp. DAU101 was compared with those of *B. subtilis* AF069131.1, *B. licheniformis* U71214, *B. licheniformis* AY205293, *B. halodurans* D83764, *Pseudomonas syringae* ZP_00127547, *P. syringae* AA053944.1, *Streptomyces coelicolor* T35719. *Cellulomonas fimi* P26225 and *Thermobifida fusca* ZP_00294422.

```

chit3  547 Y N E W K D T A V Y T G G D R V V F N G K V Y E A K W W T K G E Q P D Q A G E S G V W 589
B.sub AF069131.1 547 Y N E W K D T A V Y T G G D R V V F N G K V Y E A K W W T K G E Q P D Q A G E S G V W 589
B.lg YP077581.1 546 Y D E W K E T S A Y T G G E R V A F N G K V Y E A K W W T K G D R P D Q S G E W G V W 592
B.lg AY205293 546 Y D E W K E T S A Y T G G E R V A F N G K V Y E A K W W T K G D R 594
B.lg U71214.1 546 Y D E W K E T N A Y T G G E R V A F N G K V Y E A K W W T K G D R 604
B.hal D83764 559 W Q A N N V Y T G G D Q V Q H G G K L Y E A K W W T T G E E P G I T T G E W G V W 692
B.ehi AB110080 67 W D S T K V Y T G G Q K V S Y N G K V E A K W W T Q G E T P S Q T N T W G S W 94
B.cla YP174146 672 W E Q T A V Y T G G D Q V Q H K G H L Y E A K W W T T G E E P G T T T G E W G V W 698
A.sp AB063629 756 Y P T W D R S T V Y V G G D R V I H N S N V F E A K W W T Q G E E P G I A D V W 916
C.pac AF120157.1 1009 Y D A W V A T Q V Y V A G D R V E V D G R V F E A K W W T Q G Q H P L V S G P W G S W 1112
V.par NP799565 798 N A W D A S A V Y T G G N Q V T H A G K T W E A K W W T Q G D D P S K S G E W G V W 830
V.fis YP204981 798 N A W D A S T V Y T G G D Q V S Q A G K W E A K W W T K G D E P S K S G E W G V W 836
V.alg AB055155 798 N A W D A S A V Y T G G N V T H A G K T W E A K W W T Q G D D P S K S G E W G V W 839
S.coel AJ276990 734 W T A T K E Y T G G S V V S H K K G H T F L A R W W T K G E E P G T T G E W G V W 778
S.coel NP631281.1 104 W S A G S V Y S G G D T V S F G G H T V R A K W W T T G E E P G I T T G E W G V W 116
P.sp AF007896.1 712 W N A D A I Y T G G D T W L Y N G V E Y E A K W W T T Q G D R P D L G G 826
L.lac ZP00381935 446 N I W Q K D K I Y V Q G D R V T F N G V D Y E A K W W N T G Q Q P D Q S G D F G P W 889
Consensus W T Y G V S G @ A W @ T G P I G W

```

Fig. 20. Alignment of the chitin binding domain of chitinase with those of other bacterial chitinases. The putative chitin binding domain of *Bacillus* sp. DAU101 was compared with those of *B. subtilis* AF069131.1, *B. licheniformis* , YP_077581.1, *B. licheniformis* AY205293, *B. licheniformis* U71214, *B. halodurans* D83764, *B. ehimensis* AB110080, *B. clausii* YP_174146.1, *Alteromonas* sp. AB063629, *Cellulomonas pachnodae* AF120157.1, *Vibrio parahaemolyticus* NP_799565, *V. alginolyticus* AB055155, *Streptomyces olivaceoviridis* AJ276990, *S. coelicolor* NP_631281.1 *Pseudoaltermonas* sp. AF007896.1 and *Lactococcus lactis* ZP_00381935.

3) GST 융합 단백질을 이용한 chitinase의 정제

Chitinase는 글루타치온을 이용한 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다[52]. Chitosanase 유전자는 pGEX-6P-1 벡터를 이용하여 glutathione-S-transferase와 융합시켜서 발현 발현하였으며, 융합 단백질은 대장균 *E. coli* BL21 (DE3)의 세포질에 존재하였다. 그리하여 chitinase 단백질의 시그널 펩타이드 영역은 제거 하였다. 재조합 융합 플라스미드인 pGECHI-SP를 가진 대장균의 확실한 chitinase 활성을 확인하였으며, IPTG를 이용하여 발현을 유도 하였다. 대장균 세포는 소니케이션을 통해서 파쇄 하였으며, 정제는 GSTrap FF 컬럼과 PreScission protease를 이용하여 실행하였다. 단백질의 분자량은 스탠다드 단백질과 비교하여 그 이동성을 비교 하였을 때, 대략 62 kDa 정도 되는 것으로 관찰 되어졌다. 이는 SDS-PAGE를 통해서 확인할 수 있었다 (Fig. 21). 이 정제된 단백질을 이용하여서 여러 가지 효소 활성 측정에 이용하였다.

4) pH, 온도 및 금속 이온의 효소활성에 대한 영향

효소의 최대 활성은 기질로 콜로이드 키틴을 사용할 때, 60°C와 pH7.5를 나타내었다 (Fig. 22). 금속 이온의 영향은 다음의 금속 이온들을 최종 농도 1, 5 또는 10mM이 되도록 첨가하여 분석하였다: Co^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Cs^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Na^+ , EDTA 또는 Li^+ . 금속 이온 (Zn^{2+} , Cu^{2+} 과 Hg^{2+})는 chitinase 활성을 완전히 저해하였다. 그리고 Ni^+ 과 EDTA도 효소의 활성을 대략 20~40% 정도 저해하는 효과를 나타내었다. 하지만, 5 mM Co^{2+} 를 효소 반응액에 첨가 하였을 때는 효소의 활성이 1.4배 증가 하였다. 그리고 역시 Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} 또는 Ba^{2+} 을 첨가하였을때도 효소의 활성이 증가 하였다. 그 밖의 다른 금속 이온들 (K^+ , Li^+)에서는 효소 활성에 미치는 영향이 미미하였다. (Table 3).

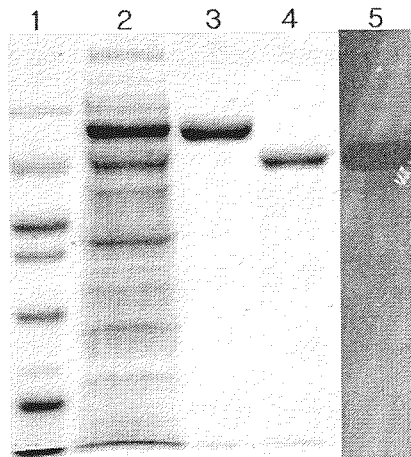


Fig. 21. Purification of chitinase from the GST-chitosanase fusion protein. Lane 1, marker proteins; 2, soluble fraction after 6h of induction at 37°C; 3, GST-chitosanase following fusion protein adsorption; 4, purified protein digested by PreScission Protease; 5, chitinase activity after SDS-PAGE in a gel containing 0.01% (w/v) glycol chitin as substrate.

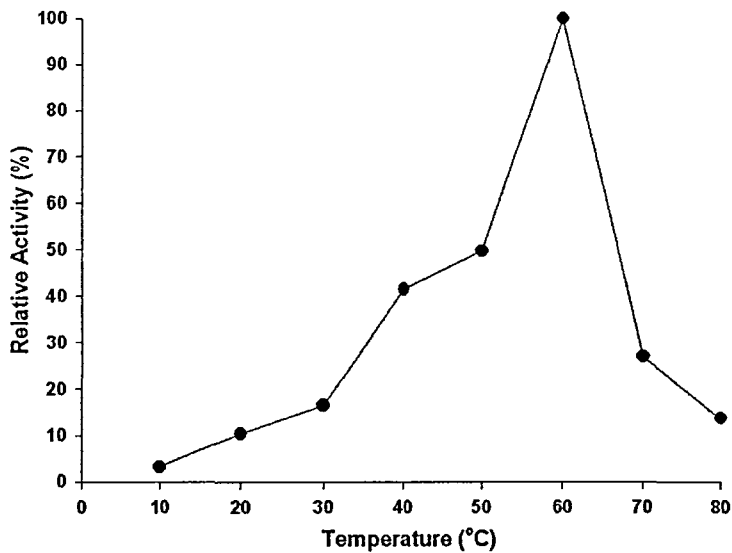


Fig. 22. Effect of temperature on the activity of purified chitinase.

Table 3. Effect of metal ions on the activity of purified chitinase.

Reagent	Relative activity (%)		
	1 mM	5 mM	10 mM
Control	100	100	100
Co ²⁺	118	143	135
K ⁺	100	103	112
Mg ²⁺	97	124	94
Ca ²⁺	117	125	109
Li ⁺	86	119	117
Ba ²⁺	96	136	134
Ni ²⁺	82	63	80
Cs ⁺	117	107	98
Zn ²⁺	20	0	0
Cu ²⁺	0	5	14
Hg ²⁺	0	0	0
Na ²⁺	99	96	104
EDTA	93	89	85

5) 기질 특이성

Bacillus sp. DAU101이 생산하는 chitinase는 정제 키틴을 비롯하여 여러 키틴 파생물 (콜로이달 키틴, 글라이콜 키틴, 수용성 키토산, 글라이콜 키토산, carboxymethyl cellulose)들 중에서 정제 키틴을 반응 기질로 가장 잘 이용하였다 (Table. 4). 효소는 글라이콜 키틴, 글라이콜 키토산과 CMC는 반응 기질로 이용하지 못하였으나, 콜로이달 키틴과 수용성 키토산은 정제 키틴을 기질로 사용할 때와 비교 하여 각각 28%와 19% 정도의 활성을 나타내었다.

Table 4. Substrate specificity of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101.

^aEach reaction mixture contained substrate at a concentration of 0.25%. ^bRelative activity was expressed as rates relative to the activity of enzyme on soluble chitosan. ^cN.D., not detect.

Substrate ^a (1 %)	Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$ per mg of enzyme)	Relative activity ^b (%)
Colloidal chitin	0.73	28.02
Glycol chitin	N.D.	N.D.
Purified chitin	2.59	100
Soluble chitosan	0.51	19.70
Glycol chitosan	N.D.	N.D.
Carboxymethyl cellulose	N.D.	N.D.

6) Chitinase 반응 산물의 분석

chitinase의 반응 산물 분석 실험은 콜로이달 키틴과 몇몇의 키틴 올리고당들을 기질로 이용하여 수행하였다. 일반적인 세균성 chitinase는 크게 2개의 메이저 군으로 나눌수 있다: endochitinase (EC 3.2.1.14)와 exochitinase (EC 3.2.1.29). Endochitinase는 키틴을 내부를 무작위적으로 절단하여 chitotetraose (GlcNAc₄), chitotriose (GlcNAc₃)와 chiobiose (GlcNAc₂) 같은 NAG의 수용성 올리고머들을 생산한다. Exochitinase는 다시 작은 두 개의 군으로 나눌 수 있다. 키틴의 말단으로부터 환원당 형태인 chitobiose를 생산하는 chitobiosidase와 endochitinase와 chitobiosidase의 산물을 분해해서 단당의 형태인 *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)을 생산하는 *N*-acetylglucosaminase로 분류할 수 있다[53]. 우리는 CHISB가 다음에 서술된 이유에 의해서 chitobiosidase와 *N*-acetylglucosaminase의 효소 활성을 가지는 bifunctional protein이라고 추측한다: (a) CHISB는 GlcNAc₂를 분해해서 GlcNAc를 생산한다. 이는 CHISB가 *N*-acetylglucosaminase이지만 endo- chitinase는 아니라는 것을 나타낸다; (b) 콜로이달 키틴을 비롯하여 GlcNAc₃ ~GlcNAc₆을 기질로 이용할 때, 주요 산물로 GlcNAc₂를 생산한다. 이것은 CHISB가 chitobiosidase라는 것을 나타낸다 (Fig. 23, Fig. 24). 이러한 반응 패턴은 *Clostridium parapurtificum* [54]의 chitinase의 반응 패턴과 유사하였다. *C. parapurtificum*의 ChiB는 GlcNAc₂와 GlcNAc₂를 주요 산물로 생산하였다. DAU101의 GlcNAc₂와 GlcNAc₂를 주요 산물로 생산하는 것은 문헌에 보고된 2번째의 실험이다 (Fig. 25). 그러므로 *Bacillus* sp. DAU101의 *chisb* 유전자는 GlcNAc₂와 GlcNAc₂를 생산하는 유용한 방법이 될 수 있을 것이다.

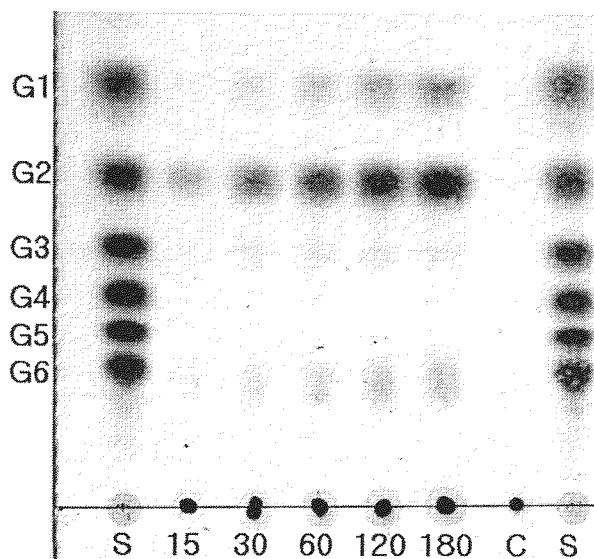


Fig. 23. TLC of hydrolysis products by chitinase from colloidal chitin. The reaction mixture (50ul) containing 0.5ug of substrate in 1X PBS was incubated with purified enzyme (0.75ug) at 60°C. The reaction mixture were analyzed at the indicated times. Lane S, standard chitin oligosaccharides from GlcNAc (G1) to GlcNAc₆ (G6). Lane C, negative control.

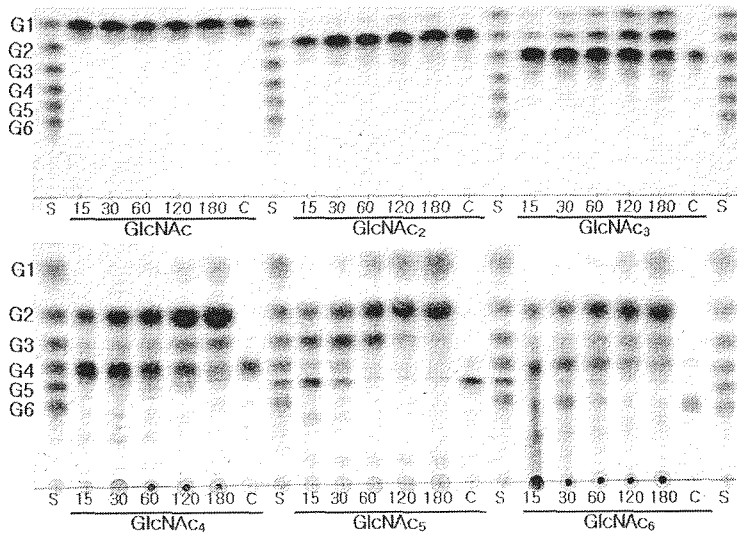


Fig. 24. TLC of hydrolysis products by chitinase from various chitin oligosaccharides for 3H. The reaction mixture (50ul) containing 0.5ug of substrate in 1X PBS was incubated with purified enzyme (0.75ug) at 60°C. The reaction mixture were analyzed at the indicated times. Lane S, standard chitin oligosaccharides from GlcNAc (G1) to GlcNAc₆ (G6). Lane C, negative control.

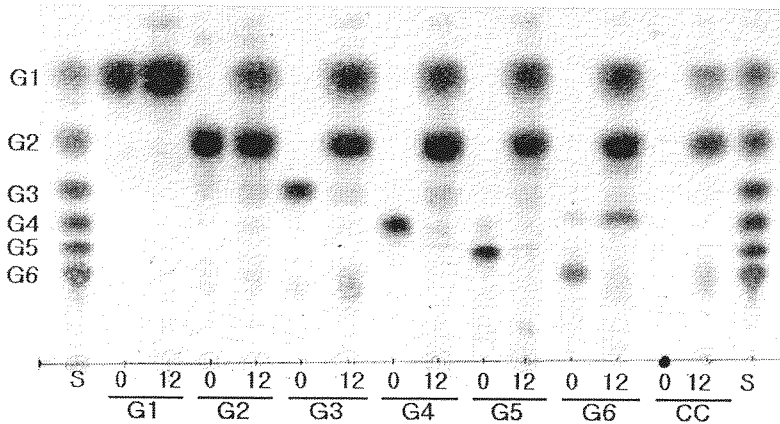


Fig. 25. TLC of hydrolysis products by chitinase from colloidal chitin and various chitin oligosaccharides for 12H. The reaction were conducted at 60°C for 12H by using N-acetylglucosamine (G1), chitobiose (G2), chitotriose (G3), chitotetraose (G4), chitopentaose (G5), chitohexaose (G6), and colloidal chitin (CC), as the substrates. Lane S, standard chitin oligosaccharides from N-acetylglucosamine (G1) to chitohenaose (G6); 0, not treated with chitinase; 12, treated with chitinase for 12H.

라. 기능성 계장 만들기

1) 계장 담그기

- ① 황태포나 멸치, 다시마를 넣고 다식물을 만들어 식힌다.
- ② 향신재(통마늘, 생강, 양파, 대파, 홍고추)를 넣고 끓인 후 식힌다.
- ③ 향신재를 제거한다.
- ④ 한약재(계피, 둥글레, 감초, 당귀, 황귀)를 넣고 끓인 후 식힌다.
- ⑤ 한약재를 제거한다.
- ⑥ 간장과 다식물의 비율이 1:1로 섞은 후 다시 끓인 후 식힌다.
- ⑦ 손질한 계를 *Bacillus* sp. DAU101의 배양 상등액에 넣어 키틴과 키토산의 분해 반응을 유도한다.
- ⑧ 계장 단지에 전처리한 계를 넣고 간장 다식물을 잠길 정도로 붓는다.
- ⑨ 마른 붉은 고추와 숯을 넣는다.

- ⑩ 사흘 후, 게를 제거하고 간장 다싯물을 끓인 후 식힌다. 이때, 너무 짜지 않게 하기 위해서 물을 한 컵 정도 첨가한다.
- ⑪ 다시 게를 게장 단지에 넣고 식힌 간장 다싯물을 붓는다.
- ⑫ ⑩~⑪의 과정을 3회 반복한다.

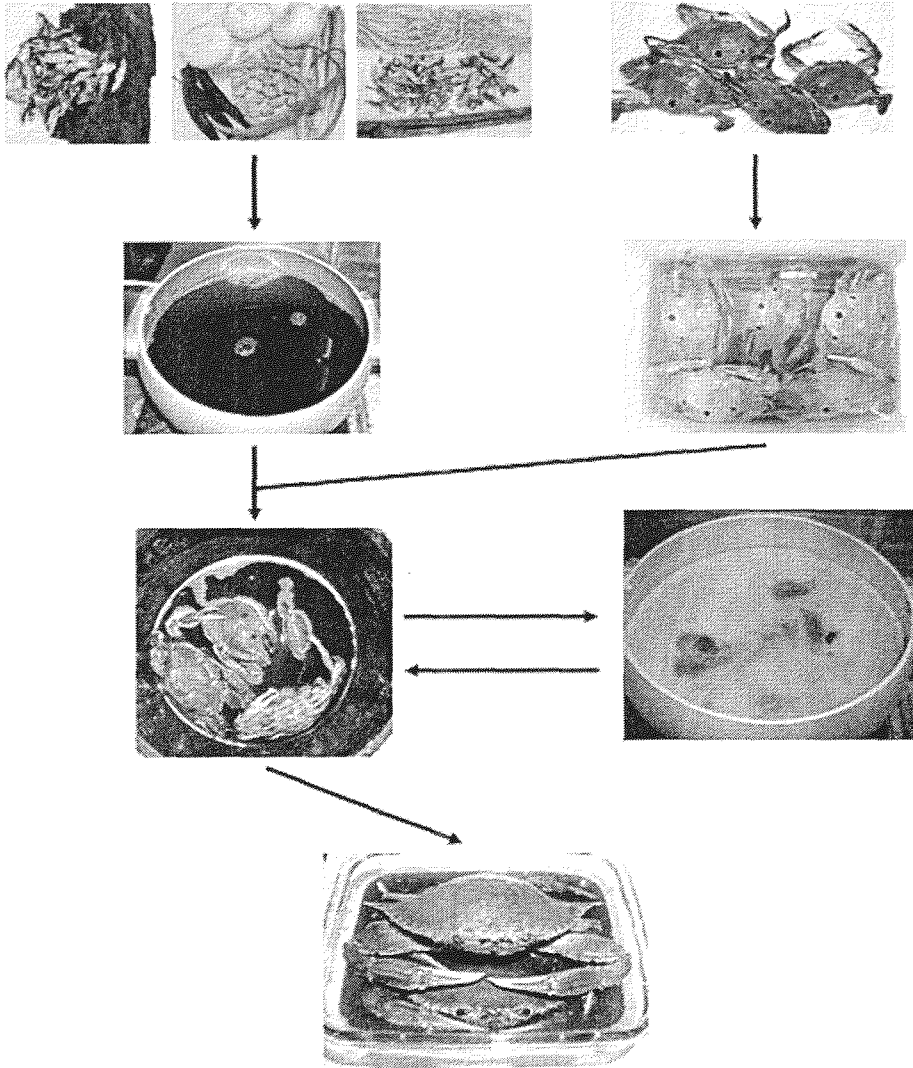


Fig.26. 게장 담그기의 개략도

2) 게장 시료의 HPLC 분석

완성된 게장 시료에서 HPLC를 통해서 생성된 올리고당을 분석하였다. 간장의 높은 염분을 제거하기 위해서 투석과정을 우선적으로 실시하였다. HPLC 분석 결과, 균주의 chitosanase 효소에 의해 생성된 올리고당 패턴과 유사하게, GlcN₂, GlcN₃과 GlcN₄의 생성을 확인 할 수 있었다 (Fig. 27). 이는 면역 증강, 항균 활성, 항생활성 등과 같은 여러 가지 생물학적 작용을 형성하는 올리고당의 생성이 게장을 통해서도 가능하다는 것을 나타낸다.

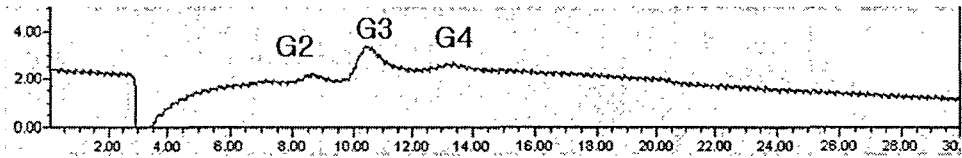


Fig. 27. HPLC를 통한 게장 속의 올리고당 패턴의 분석.

4. 참고문헌

1. Gooday G. W. (1994) Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. p279-312. In C. Ratledge (ed.) Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
2. Allan G. G., Fox J. R. and Kong N. (1978) In R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser (ed.), Proceedings of the first international conference on chitin and chitosan. 63-78. MIT Press, Cambridge, Mass.
3. Fenton D. M. and Eveleigh D. E. (1981) Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*. *J. Gen Microbiol.* 126:151-165.
4. Pelletier A. and Sygusch J. (1990) Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* P1. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:844-848.
5. Suzuki K., Mikami T., Okawa Y., Tokoro A. Suzuki S. and Suzuki M. (1986). Antitumor effect of hexa-*N*-acetylchitogexaose and chitohexose. *Carbohydr. Re.* 151:403-408.
6. Tsukada K., Matsumoto T., Aizawa K., Tokoro A., Naruse R., Suzuki S. and Suzuki M. (1990) Antimetastatic and growth-inhibitory effects of *N*-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Japanese J. Cancer Research.* 81:259-265.
7. Suzuki S. (1996) Studies on biological effects of water soluble lower homologous oligosaccharides of chitin and chitosan. *Fragrance J.* 15:61-68
8. Tokoro A., Kobayashi M., Tatekawa N. Suzuki S. and Suzuki M. (1989) Protective effect of *N*-acetylchitohexaose of *Listeria monocytogens* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 33:357-367.
9. Hirano S. and Nagao N. (1989) Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.* 53:3065-3066.
10. Kendra D. F. and Hadwiger L. A. (1984) Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology.* 8:276-281.
11. Seng J. M. (1998) Chitine, chitosane et derives: de nouvelles

- perspectives pour l'industrie. *Biofutur*. 71:40-44.
12. Tanaka T., Fukui T. and Imanaka T. (2001) Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase form the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Biol. Chem.* 276:35629-35635.
 13. Alam M. M., Nikaido N., Tanaka H. and Watanabe T. (1995) Cloning and sequencing of *chiC* gene of *Bacillus circulans* WL-12 and relationship of its product to some other chitinases and chitinase-like proteins. *J. Ferment. Bioeng.* 80:454-461.
 14. Burberg M. B., Nes I. F. and Eijsink V. G. (1996) Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 142:1581-1589.
 15. Shiro M., Ueda M., Kawaguchi T. and Arai M. (1996) Cloning of a cluster of chitinase genes from *Aeromonas* sp. no. 10S-24. *Biochim. Biophys. Acta.* 1305:44-48.
 16. Tsujibo H., Yoshida Y., Miyamoto K., Imada C., Lkami Y. and Inamori Y. (1992) Purification, properties, and partial amino acid sequence of chitinase from a marine *Alteromonas* sp. strain O-7. *Can J. Microbiol.* 38:891-897.
 17. Gleave A. P., Taylor R. K., Morris B. A. and Greenwood D. R. (1995) Cloning and sequencing of gene encoding the 69-kDa extracellular chitinase of *Janthinobacterium lividum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:279-288.
 18. Ouakfaoui S. E. and Asselin A. (1992) Multiple forms of chitosanase activities. *Phytochem.* 31:1513-1518.
 19. Ouakfaoui S. E. and Asselin A. (1992) Diversity of chitosanase activity in cucumber. *Plant Sci.* 85:33-41.
 20. Sharma P., Borja D., Stougaard P. and Lonneborg A. (1993) PR-proteins accumulating in spruce roots infected with a pathogenic *Pythium* sp. isolate include chitinases, chitosanases and β -1,3-glucanases. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 43:57-67.
 21. Osswald W. F., Shapiro J. P., Doostdar H., McDonald R. E., Niedz R. P., Nairn C. J. and Mayer R. T. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35:811-820.
 22. Fukamizo T., Honda Y., Goto S., Boucher I. and Brzezinski R. (1995) Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174.

- Biochim J.* 311:377-383.
23. Fukamizo T., Ohkawa T., Ikeda Y. and Goto S. (1994) Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. *Biochim. Piophys. Acta* 1205:183-188.
 24. Izume M., Nagae S., Kawagishi H., Mitsutomi M. and Ohtakara A. (1992) Action pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M chitosanase on partially *N*-acetylated chitosan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56:448-453.
 25. Mitsutomi M., and Ohtakara A. (1992) Difference between microbial chitinase and chitosanase in the mode of action on partially *N*-acetylated chitosan. In "Advances in chitin and chitosan", eds. Brine, C. J., Sanford, R.A., and Zikakis, J. P., Elsevier, London, pp.304-313.
 26. Tanabe T., Morinaga K., Fukamizo T., and Mitsutomi M. (2003) Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with trans-glycosylation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:354-364.
 27. Park J. K., Keyhani N. O. and Roseman S. (2000) Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification, molecular cloning, and characterization of a *N,N'*-diacetylchitobiose phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 275:33077- 33083.
 28. Keyhani N. O. and Roseman S. (1997) Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, *N,N'*-diacetylchitobiose, by expressing the *cel* operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14367-14371.
 29. Keyhani N. O., Wang L. X., Lee Y. C. and Roseman S. (2000) The chitin disaccharide, *N,N'*-diacetylchitobiose, is catabolized by *Escherichia coli* and is transported/phosphorylated by the phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* 275:33084-33090.
 30. Choi Y. J., Kim E. J., Piao Z., Yun Y. C. and Shin Y. C. (2004) Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4522-4531.
 31. Roberts W. K. and Selitrennikoff C. P. (1988) Plant and bacterial chitinase differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* 134:169-176.
 32. Trudel J. and Asselin A. (1989) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178:362-366.

33. Nakamura L. K. (1989) Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:295-300.
34. Arai T. and Mikami Y. (1972) Chromogenicity of *Streptomyces*. *Appl. Microbiol.* 23:402-406.
35. Chun J. S. and Bae K. S. (2000) Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Anton Leeuw* 78:123-12.
36. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Pres.
37. Miller L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:208-218.
38. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-25.
39. David J. L. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. 114-147 John Wiley & Sons Ltd. New York. N.Y.
40. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M. G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S. C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C. V., Caldwell B., Capuano V., Carter N. M., Choi S. K., Codani J. J., Connerton I. F., Canchin A. *et al* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 390:249-256.
41. Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. and von Heijne G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *protein engineering* 10:1-6.
42. Bendtsen J. D., Nielsen H., von Heijne G. and Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:784-795.
43. Boucher I., Fukamizo T., Honda Y., Willick G. E., Neugebauer W. A. and Brzezinski R. (1995) Site-directed mutagenesis of evolutionary conserved carboxylic amino acids in the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 reveals two residues essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* 270:31077-31082.

44. Herissat B. and Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**:781-788.
45. Perrakis A., Tews I., Dauter Z., Oppenheim A. B., Chet I., Wilson K. S. and Vorgisa C. E. (1994) Crystal structures of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* **2**:1169-1180.
46. Watanabe T., Kobori K., Miyashita K., Fujii T., Sakai H., Uchida M. and Tanaka H. (1993) Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J. Biol. Chem.* **268**:18567-18572.
47. Little E., Bork P. and Doolittle R. F. (1994) Tracing the spread of fibronectin type III domains in bacterial glycohydrolases. *J. Mol. Evol.* **39**:631-643.
48. Bork P. and Doolittle R. F. (1992) Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8990-8994.
49. Doolittle R. F. and Bork P. (1993) Evolutionarily mobile modules in proteins. *Sci. Am.* **269**:50-56.
50. Tomme P., Warren R. A. J. and Gilkes N. R. (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37**:1-81.
51. Tomme P., Warren R. A. J., Miller R. C., Kilburn Jr. D. G. and Gilkes N. R. (1995) Cellulose-binding domains—classification and properties, p141-161. In J. M. Saddler and M. Penner (ed.), *The enzymatic degradation of insoluble polysaccharides*. American Chemical Society, Washington, D. C.
52. Yoon H. G., Kim H. Y., Lim Y. H., Kim H. K., Shin D. H., Hong B. S. and Cho H. Y. (2000) Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3727-3734.
53. Cohen-Kupiec R., and Chet I. (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Genet.* **219**:270-277.
54. Morimoto K., Karita S., Kimura T., Sakka K. and Ohmiya K. (1997) Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase ChiB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain. *J. Bacteriol.* **179**:7306-7314.

제 3 절 우수 분리 균주를 이용한 기능성 장류 가공기술 개발

1. 서론

최근 생활수준의 향상과 더불어 건강에 대한 관심이 급속히 높아져가고 있는 추세이며, 이에 따른 여러 가지 성인병에 대한 예방과 치료에 관심이 높아져가고 있다.

최근 선진국의 통계에 의하면 혈관 순환기계 질환이 현대인 사망원인 1위를 차지하고 있으며, 우리나라 통계보고(NSO)에서도 선진국에서와 마찬가지로 사망자수 및 원인에 있어 1위는 악성종양으로서 21%, 2위는 순환계 질환으로서 약 17%, 3위는 심장질환으로서 9%이다.

그런데 2위 및 3위의 질환은 모두 혈관 내 장애에 의해 일어나며 그 사망율의 합계는 약 26%로서 악성종양보다 훨씬 상화하고 있는 추세이다.

이러한 혈관계 질환 중 특히 혈전에 의한 질환의 경우, 현재 의학적으로 많은 관심과 함께 활발한 연구가 진행되고 있다.

생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 균형을 이루고 있으며 정상적으로 순환하고 있는 동안 생성된 혈전은 즉시 분해 되어 인체에 영향을 주지 않는다.

그러나 여러 가지 원인으로 균형이 깨지면 생성되는 혈전이 분해 되는 혈전보다 많아지고 분해 되지 않는 혈전은 혈관을 막게 되므로 혈액의 순환이 방해되어 조직으로의 영양분 및 산소공급이 중단되게 되며 뇌졸중 및 심장질환의 원인이 되기도 한다.

이러한 혈전증의 시작은 혈관 벽에서 발생하는 노화에 따라 진행되어지지만, 혈관 중의 혈소판 응집력의 향진에 의한 혈전의 형성이 직접적인 원인이 되기도 한다.

이러한 경우 혈전형성을 방지하기 위해 항 혈전제가 필요하고, 이미 생성된 혈전의 경우에는 혈전을 용해하여 혈전을 치료하는 혈전용해제가 필요하다.

혈액의 응고는 혈액의 상태를 액상에서 겔상으로 전환하는 현상으로 지혈작용의 일부이다. 생체 내에서 지혈현상은 반드시 손상된 혈관주변에서만 일어나게 되며, 여러 가지 응고인자들의 선택적인 결합과 혈장 내에 존재하는 여러 가지 단백질 가수분해 억제인자들과 길항적인 작용을 하는 일련의 효소반응에 의하여 정교하게 조절되고 있다. 이처럼 정교한 조절에도 불구하고 다양한 병적 또는 외부적 원인에 의하여 생체 내 혈액응고와 용해의 균형이 깨지게 되면 과도한 혈전이 형성되어 뇌혈전증이나 심장마비를 유발하게 된다. 따라서

혈전의 형성을 방지하고 혈전을 용해하는 치료제를 개발하기 위한 연구가 범세계적으로 활발히 진행되고 있다.

혈전은 혈류중의 피브리노겐이 활성화된 트롬빈에 의해서 피브린으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성된다. 피브리노겐은 수용성 혈장단백질의 일종으로 분자량이 340 kDa이며 체내에는 약 2.5 mg/ml의 농도로 존재하는 hexaprotein으로 트롬빈에 의해 피브린이 된다. 이렇게 형성된 피브린은 혈액응고에 있어 중요한 역할을 하며 혈전의 기본물질이기도 하다.

혈전분해효소는 작용기전에 따라 혈전에 직접 작용하여 용해시키는 단백질 분해효소제와 인체의 혈액 분해계를 활성화시키는 효소제로 크게 분류된다. 단백질 분해효소제로서는 brinase, ochrase, trypsin, plasmin 등이 알려져 있는데 plasmin은 보통 plasminogen이라는 zymogen의 형태로 존재하며 plasminogen activator에 의해 분해 되었을 경우 활성형으로 변하여 피브린 분해활성을 나타낸다. 이러한 피브린 분해시스템은 혈관 내 피브린의 침착에 대한 일종의 방어적 기능이며 이러한 기능에 의해 혈전으로부터 생체를 보호하는 기능을 한다.

현재 사용되고 있는 혈전용해제로는 streptokinase(SK), urokinase(UK), tissue plasminogen activator(tPA), single chain urokinase type plasminogen activator(SCUPA)라 불리는 prourokinase(pro-UK), anisylated plasminogen streptokinase activator complex(APSAC)등이 있다.

미국의 Sobel등이 사람 또는 동물의 뇨 중에서 정제한 urokinase는 현재까지 장맥 주사용으로 시판, 사용되고 있다. 그러나 urokinase는 가격이 고가이고 정맥 주사제로만 사용되며, 급한 환자에게만 사용이 한정되고 있다.

Fletcher등은 용혈성 연쇄상 구균(*Streptococcus haemolyticus*)에 의하여 생산되는 물질 중에서 혈전용해효과가 있는 streptokinase를 정제하였는데, streptokinase는 urokinase보다 혈중 반감기는 길고 진신에 고루 작용하는 잇점이 있으나 출혈 등의 부작용이 큰 문제로 알려져 있다. 사람의 악성 종양인 melanoma유래의 tissue plasminogen activator가 현재 혈전용해제로서 임상에 사용되고 있다.

tPA는 혈전과 친화력이 강하며 fibrin분해력이 큰 것이 특징이나 혈중 반감기가 짧고 가격이 고가이기 때문에 경제성이 있어야 문제가 된다. 이를 해결하기 위하여 여러 기업에서 가격이 저렴하고 안정성이 증대된 tPA유도체의 개발을 시도하고 있으며 최근 상당한 진전이 있는 것으로 알려져 있다.

일본의 Mihara등이 지렁이의 체단백질로부터 혈전용해작용이 강한 효소를 분리 정제하여 보고한 바 있다. Lumbrokinase(LK)라고 명명한 이 효소는 혈전용해작용도 가능하지만 일반 단백질의 분해 작용이 그 이상 강한 것으로 보고

되고 있다.

그러므로 일본에서는 판매가 허가되고 있지 않으나 우리나라에서는 생약성분으로 판매가 허가되고 있다. 현재 국내의 2개 제약회사 제품으로 고가로 시판 중에 있다.

그 이외에도 *Fusarium pallidorozeum*, *Katsuwonus pelamis*와 *Staphylococcus aureus* 등의 여러 미생물로부터 혈전용해효소를 분리한 바 있으나 이들은 부작용을 일으키는 단점이 있다고 알려져 있다.

Bacillus 속에 속하는 균주들은 많은 종류의 protease를 균체 외로 분비하고 이러한 효소는 다양한 기질에 반응하는 성질을 가지고 있다. 이 중 일부 alkaline protease는 피브린을 강력히 분해하는 성질을 가지고 있다. 그동안 많은 연구자들에 의해 *Bacillus*가 생산하는 protease가 확인된 바 있고 최근 일본의 전통식품인 natto에서 분리된 *B. subtilis var natto* (*B. natto*)가 강력한 피브린 분해활성을 갖는 alkaline serine protease를 분비하는 것으로 보고된 바 있다. 국내에서는 전통적인 콩 발효식품인 청국장에서 natto균과 유사한 성질을 갖는 *Bacillus* 균주가 분리되고 있으며 분리균에서 피브린 분해활성을 갖는 alkaline serine protease가 보고된 바 있다.

따라서 본 연구는 혈전용해활성이 우수한 균주를 분리하고, 분리, 동정한 강력한 피브린 분해활성을 나타내는 *Bacillus* sp. FF-7 균주로부터 혈전용해효소 배양 조건을 확립하여 산업적 혈전용해효소 생산의 바탕을 마련하고자 한다.

그리고 본 연구에서 우수한 균주로 확인된 *Bacillus* sp. FF-7을 사용하여 시제품을 개발하였다. 청국장은 콩 발효식품 중에서 가장 짧은 기간(2~3일)에 발효가 완성되며, 이때 특이한 풍미와 우수한 영양성분을 포함하여 가장 효과적으로 콩을 먹을 수 있는 고유한 전통 발효식품이다. 일본의 기록을 보면 절 아래 주민들이 승려들을 위하여 부식으로 납품하였다 하여 납두라는 말이 사용되었는데 이는 일본이 육식을 피해야 하는 승려들의 단백질 공급원으로써 청국장을 상용한 것 같다. 원료 콩은 벧집에 부착된 야생 고초균에 의하여 발효가 이루어지는데 이 균의 단백질 분해효소의 역할이 매우 중요한 작용을 한다.

2. 재료 및 방법

가. 혈전용해효소를 생산하는 미생물의 분리, 동정 및 배양학적 특성

1) 균주의 분리

혈전용해효소를 분비하는 미생물을 분리하기 위하여 경남 김해시 일대의 일

반가정의 장류로부터 시료를 채취하고, 시료 1g을 100ml의 멸균증류수에 현탁한 후 NB(Beef extract 3.0g, Pepton 5.0g (g/l)) agar plate에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 이때 형성된 단일 균락을 선택하여 fibrin plate에 계대하였으며 37°C에서 24시간동안 배양한 후 균락 주변에 투명환을 생성하는 미생물 중 투명환의 크기로 미생물을 분리하였다. 선발된 균주를 TSB(pancreatic digest of casein 17.0g, Enzymatic digest of soybean meal 3.09g, dextrose 2.5g, Dipotassium phosphate 2.5g, Sodium chloride 5.0g (g/l)) broth에서 액체배양한 후 fibrin plate에 30 μ l를 점적하여 fibrinolytic activity를 측정하여 최종 선발 하였다.

균주의 보관을 위해서는 멸균된 glycerol stock solution (1.5% glycerol)을 사용하여 동결건조 시킨 후 ample 형태로 보관하였다.

2) 균주의 동정

선발된 균주는 NB agar에서 37°C에서 24시간 동안 배양 한 후 동정에 사용하였다. 1차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 후, API 50CHB kit(bioMerieux Co, France)를 이용하여 탄소원에 대한 이용성을 조사하고 간이 동정을 실시하였다. 16s rDNA를 이용한 동정은 (주)Micro ID사에서 실시하였으며, Promega에서 판매하는 Wizard genomic DNA purification kit를 사용하여 total DNA를 추출하였다. 추출된 total DNA는 primer를 이용하여 PCR product를 얻었다. PCR product의 sequencing을 통해 얻어진 염기서열은 Blast program(National Center for Biotechnology Information, USA)을 사용하여 유전자 Database와 비교 분석하였다.

그리고 이 균주를 2% glutaraldehyde (0.1% MgSO₄ 함유 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2)로 24시간 동안 실온에서 전 고정한 다음 0.1M cacodylate buffer(pH 7.2)로 2시간 세척하고, 0.2M cacodylate buffer (pH 7.4)에 1% 농도가 되게 녹인 osmic acid(OsO₄) 용액으로 4°C에서 24시간 동안 처리하여 고정시켰다. 고정된 sample에서 용액을 제거한 뒤에 50, 70, 80, 90 및 95% 에탄올에서 각각 10분간 2회씩 탈수시켰다. 탈수한 뒤에 sample을 임계점 건조기에서 건조하고 platinum coating한 다음 주사 전자 현미경(SEM, JSM-6700F, JEOL, Tokyo, JAPAN) 으로 형태를 관찰하였다.

3) 배양 조건 및 생육측정

고체 평판 배지에 보존된 균을 백금이로 300ml 삼각플라스크내 100ml의 L-broth medium (Bactotryptone 10g/l, yeast extract 5g/l, NaCl 5g/l, pH 6.8)에 접종하였다. 이 삼각플라스크는 37°C, 180rpm에서 8시간 동안 배양하였다.

그런 다음 배양액을 다시 500ml 삼각 플라스크의 100ml L-broth에 접종하여 동일한 조건에서 12시간 배양하였다. 지수성장기 말기에 분광광도계 (Spectrophotometer, HP 8452A)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도(660nm)가 1.8에 이르렀을 때 이 후 실험을 위한 전배양액으로 사용하였다.

4) 조효소액의 준비

조효소액을 준비하기 위하여 여러 가지 복합배지를 이용하여 균의 성장 및 protease활성이 가장 우수한 배지를 선택하기 위해 MHB, BHI, LB, TSB, NB 배지를 각각 Difco. 사제(USA)에서 구입하여 각 배지에 표기된 함량으로 각각 500ml 삼각플라스크에 100ml의 부피가 되게 조제 후 전배양액을 각각 2%씩 접종하였다.

접종된 삼각 플라스크는 37°C, 180rpm으로 Shaking incubator에서 18시간 배양하여 protease활성 및 균의 성장정도를 확인하였다.

protease활성 및 균의 생장이 우수한 TSB배지를 500ml의 삼각 플라스크에 100ml이 되도록 조제하여 동일한 조건에서 18시간 배양 후 10,000×g로 20분동안 원심분리를 실시하고 상등액을 취하여 조효소액으로 하였다. 단백질 정량은 Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법에 따라 측정하였고, 준비된 조효소액은 -20°C에서 냉동보관하면서 사용하였다.

5) 피브린분해활성

효소활성 측정을 위하여 배양액을 원심분리하여 Tris buffer(pH7.2, 20mM)로 7:3의 비로 희석하였다. 이 효소 희석액 50 μ l를 미리 준비한 fibrin plate에 떨어뜨린 후 37°C 항온기에서 일정시간 반응 시키고, 분해환의 지름으로부터 분해면적을 구하였다. Fibrin plate위에 효소액을 떨어뜨릴 때 지름 8mm의 paper disk를 이용하여 그 위에 효소액을 떨어뜨렸다.

Fibrin plate는 fibrinogen에 thrombin을 투여하여 만들었다. 즉, Fibrinogen 0.06g을 0.1M borate buffer(pH7.5) 10ml에 넣어 37°C로 맞춘 항온기에서 2시간 동안 두어 완전히 녹였다. 녹은 fibrinogen을 petri dish에 10ml씩 분주하고 fibrinogen 10ml당 thrombin(5,000unit, Sigma Co. St.Louis, USA) 40unit를 petri dish전면에 골고루 갈 수 있도록 유의하면서 넣고 상하좌우로 적당하게 흔들어 주면서 투여하였다.

6) 조효소액의 최적 pH 및 최적 온도

조효소액의 pH 변화 따른 효소활성 변화를 알아보기 위하여 pH 4.0 ~ 7.0

범위는 0.02 M citric acid-sodium phosphate dibasic buffer, pH 7.0 ~ 8.0 범위는 0.02 M sodium phosphate mono basic sodium phosphate dibasic buffer, pH 8.0 ~ 9.0 범위는 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 9.0-11.0은 0.02M glycine-NaOH buffer로 조정하였다. 각각 pH 농도별로 0.6% fibrin(w/v) 기질 용액에 0.5ml를 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 온도변화에 따른 효소활성의 변화는 FF-7 조효소액의 protease 최적활성을 갖는 pH 9.0으로 조정하고, 이 조효소 용액과 0.6% fibrin(w/v) 기질용액과 혼합한 후 10, 20, 30, 40, 50, 60 및 70°C에서 반응시켜 효소 활성을 측정하였다.

7) 배양배지에 따른 균체의 성장 및 fibrinolytic enzyme activity.

가) 탄소원의 종류 및 농도에 따른 균체생육 및 효소활성 측정

탄소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성을 측정하기 위하여 기본배지인 L-broth배지에 glucose, maltose, sucrose, lactose, galactose를 각각 2%농도로 첨가하고 배양액의 pH를 6.8로 조정하였다. 그리고, 전배양된 *Bacillus* sp. FF-7배양액을 각각 3%농도로 접종하여 30°C에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

또한, *Bacillus* sp. FF-7 배양시 가장 우수한 protease활성을 나타낸 galactose를 각각 L-broth에 무첨가, 1%, 2%, 3%, 4%농도가 함유되도록 하여 30°C에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

나) 질소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성 측정

질소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성을 측정하기 위해 L-broth에 함유되어지는 1%의 tryptone을 동일농도의 peptone, yeast extract, malt extract, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, casein, soybean으로 대체하고 배양초기 pH를 동일하게 6.8로 조정한 후 30°C에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

측정된 질소원 중에서 가장 우수한 protease활성을 가지는 질소원을 이용하여 무첨가, 2%, 4%, 6%, 8%농도별로 하여 질소원 농도에 의한 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

8) 효소의 fibrin 분해양상에 따른 분류

Fibrin plate를 80°C에서 30분간 열처리하여 plasminogen을 제거한 plate(Plasminogen-free fibrin plate)와 열처리하지 않은 fibrin plate(plasminogen-rich fibrin plate)에 조효소액의 반응을 비교하였다.

9) Urokinase(녹십자)와 조효소액의 활성 비교

Urokinase는 녹십자에서 시중에 시판하고 있는 제품을(녹십자) 0.1M Borate Buffer를 이용하여 7,000IU로 맞춘 후 Fibrin Plate상에서 FF-7의 조효소액과 비교 검토하였다.

나. *Bacillus sp.* FF-7 배양액의 항산화활성 (*In vitro*, *In vivo*)

1) DPPH법에 의한 항산화 활성 측정.

DPPH 용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 whatman filter paper No. 2에 여과시켜 만들었다. 이 용액 5 ml에 균 배양액 1 ml 및 BHT 0.05%을 함유한 용액 1 ml를 각각 혼합하여 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능 (Electron donating ability, EDA) 은 $EDA (\%) = \frac{\text{대조구흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구흡광도}} \times 100$ 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차를 측정하여 백분율로 표시하였다.

2) 탄소원 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성.

탄소원의 종류에 따른 배양액의 항산화 활성 측정은 DPPH법에 의한 전자공여능으로 측정하였다. 균주 배양은 기본배지인 L-broth 배지에 glucose, sucrose, maltose, lactose, galactose를 각각 2% 농도로 첨가하고 초기 pH를 동일하게 6.8로 조정 한 후 전배양된 FF-7을 각각 2%로 접종하여 30°C에서 18시간 배양한 후 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 항산화 측정에 이용하였다. 또한 FF-7 배양시 첨가한 탄소원 중에서 항산화 활성이 가장 우수한 galactose의 농도별 효과를 검토하기 위하여 L-broth에 1, 2, 3, 5 및 7% 농도로 각각 첨가하여 30°C에서 18시간 배양한 상등액을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다.

3) 질소원 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성

질소원의 종류에 따른 배양액의 항산화 활성 측정은 DPPH법에 의한 전자공여능으로 측정하였다. 균주 배양은 기본배지인 L-broth 배지에 tryptone, yeast extract, malt extract, beef extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 각각 1% 농도로 첨가하고 전배양된 FF-7을 각각 2%로 접종하여 초기 pH를 동일하게 6.8로 조정 한 후 30°C에서 18시간 배양한 후 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 항산화 측정용 물질로 이용하였다. 또한 FF-7 배양시 첨가한 질소원

중에서 항산화 활성이 가장 우수한 tryptone의 농도별 효과를 검토하기 위하여 L-broth에 1, 2, 3, 5 및 7% 농도로 각각 첨가하여 30°C에서 18시간 배양한 상등액을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다.

4) 각 조직의 microsome 분획의 조제 및 항산화 활성 측정.

정상 식이를 급여한 8주령의 흰쥐로부터 적출한 각 조직을 일정량 취해 1.15% KCl-10 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 homogenizer로 균질화시킨 여액을 12,000 rpm 및 45,000 rpm으로 각각 원심분리하여 얻어진 침전물에 상기 buffer를 일정량 가하여 microsome 분획으로 하였다. 항산화 활성은 Wong 등의 방법에 따라 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 1.5 ml에 배양액 0.2 ml, 각 조직의 microsome 분획 각각 0.1 ml, 0.1 mM ascorbate 0.1 ml 및 5 mM FeSO₄ 0.1 ml를 차례로 가하여 반응액을 잘 혼합하고 37°C의 shaking water bath에서 1시간 반응시켜 지질 과산화를 유도시켰다. 이때 대조구는 시료를 첨가하지 않았으며, 합성 항산화제인 BHT는 시료첨가량의 0.05%를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. 반응 후 3 M trichloroacetic acid와 2.5 N HCl의 혼합용액 0.5 ml를 가하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액 1 ml를 취하여 0.67% TBA 1 ml를 가하여 혼합하고 끓는 물속에서 30분간 가열하여 발색시켰다. 냉각 후 3,000 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 지질 과산화의 억제율은 각각 대조구의 흡광도에 대한 저해율(%)로 비교하였다. 이때 균주 배양액은 DPPH법으로 측정된 항산화 활성의 최적 조건을 기초로 L-broth 배지에 탄소원 galactose 2% 및 질소원 tryptone 1% 첨가하고 초기를 pH 6.8로 조정하여 전배양된 FF-7를 2% 농도로 접종하여 30°C에서 18시간 배양한 후 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하였다.

5) Fe²⁺/ascorbate에 의해 유도된 항산화활성 조사

항산화 활성은 Wong 등의 방법에 따라 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 1.5ml에 각 시료 용액 0.2ml (6.0 mg/ml), 간 microsome 분획(1ml 중 1mg 단백질 함유) 0.1ml, 0.1 mM ascorbate 0.1ml 및 5mM FeSO₄ 0.1ml를 차례로 가하여 반응액을 잘 혼합한 후 37°C의 shaking water bath에서 1시간 incubation시켜 과산화를 유도시켰다. 이때 대조구는 시료를 첨가시키지 않고 위의 방법과 동일하게 수행하였다.

Incubation이 끝나면 Esterbauer 등의 방법에 준하여 3M trichloroacetic acid와 2.5N HCl의 혼합용액 0.5ml를 가하고 3,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액 1ml를 취하여 0.67% TBA 1ml를 가하여 혼합하고 끓는 물속에서 30

분간 가열하여 발색시켰다. 냉각 후 535nm에서 흡광도를 측정하였으며, 지질 과산화의 억제율은 대조군의 흡광도에 대한 저해율(%)로 비교하였다.

6) Linoleic acid 실험계의 항산화 활성 조사

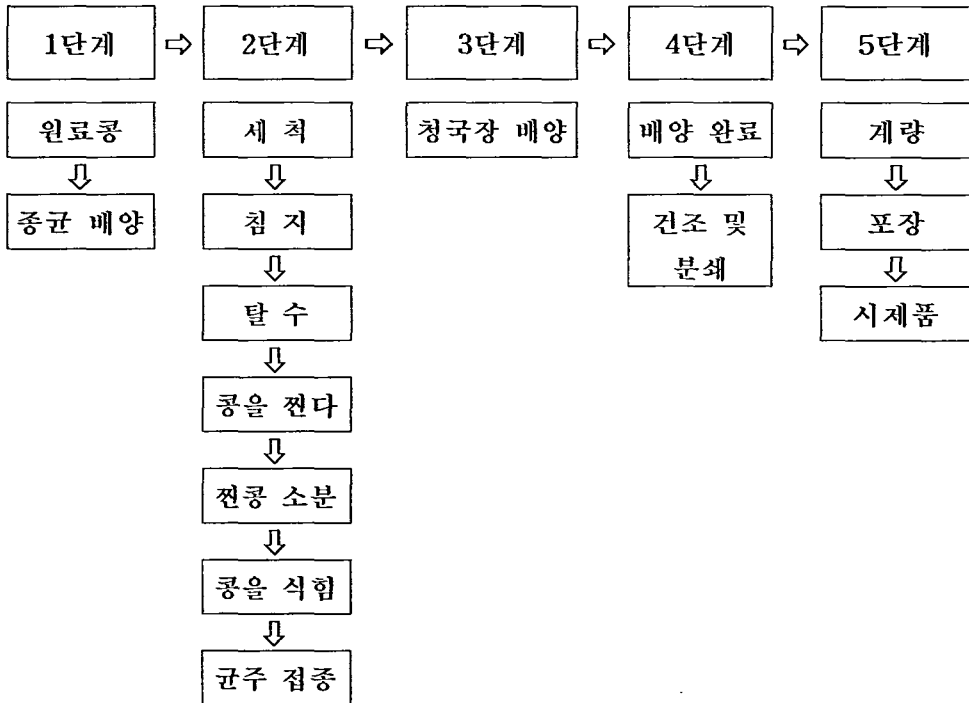
Osawa의 방법에 따라 먼저 linoleic acid(25mg/ml in EtOH), ferrous chloride (2.45 mg/ml in 3.5% hydrochloric acid), ammonium thiocyanate(0.3g/ml in H₂O), 0.2M phosphate buffer (pH 7.0)를 조제하여 이들을 stock solution으로 사용하였다. 혼합용액은 각 시료용액 0.2ml (6.0mg/ml 또는 0.6 mg/ml), linoleic acid 0.2ml을 시험관에 넣고 혼합한 후 phosphate buffer 0.4ml와 증류수 0.2ml를 가하여 40°C에서 은박 포장 한 후 incubation하면서 일정기간의 간격으로 측정하였다. 측정방법은 혼합용액에서 0.1ml를 취하여 test tube에 넣고 70% ethanol 3ml과 ammonium thiocyanate용액 0.1ml, ferrous chloride 용액 0.1ml를 혼합한 후 정확히 3분 후에 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성의 비교를 위하여 합성 항산화제인 BHT를 시료첨가량의 1/10량을 사용하여 BHT 첨가구로 하였다.

7) TBA(2-thiobarbituric acid)법에 의한 항산화 활성.

Linoleic acid (25 mg/ml in ethanol) 1 ml와 배양용액 1 ml를 시험관에 넣고 혼합한 후 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml와 증류수 1 ml를 가하여 40°C에서 보관하면서 일정간격으로 TBA법으로 측정하였다. 즉, 반응액 0.5 ml를 취하여 centrifuge tube에 넣고 35% trichloroacetic acid 0.25 ml와 0.75% aqueous TBA 0.5 ml를 가하여 혼합한 후 boiling water bath에서 가끔 흔들며 주면서 15분간 처리하여 냉각시킨 후 70% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가한 다음 20분 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하고, 그 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. *Bacillus* sp. FF-7 균주를 이용한 청국장 개발

1) 청국장 생산 공정도



3. 실험결과

가. 혈전용해효소를 생산하는 미생물의 분리, 동정 및 배양학적 특성

1) 균주의 분리

경남 김해시 일대의 일반가정으로부터 장류시료를 채취하여 멸균수로 희석한 후 순차적으로 fibin plate 배지에 도말한 뒤 37℃에서 18시간 이상 배양하여 생성된 균주들 중 상대적으로 투명환이 가장 큰 균주를 선별하여 FF-7로 명명하였다.

분리균주인 FF-7은 gram staining에서 결과 양성을 나타내었으며, spore staining에서는 spore가 존재하였고 원형의 colony 형태를 가지고 있었다. (Fig. 1.)

2) 균주의 동정

토양으로부터 Fibrinolytic enzyme 활성이 우수한 FF-7은 형태학적, 생리학적 특성상 *Bacillus* sp.임을 확인하고 API 50CHB kit를 이용하여 *Bacillus* sp.임을 확인하였다. (Table 1) 전자현미경(SEM)으로 관찰결과 분리된 균주는 간균으로 *Bacillus* sp.으로 관찰되었다.(Fig. 1)

이와 같은 결과로 (주)Micro ID사에 의뢰하여 16s rDNA sequence를 실시하여 동정한 결과 *Bacillus* sp.로서 아직까지 밝혀지지 않은 균주로 판정되어져 본 연구자에 의해 *Bacillus* sp. FF-7으로 명명하였다. (Table 2)

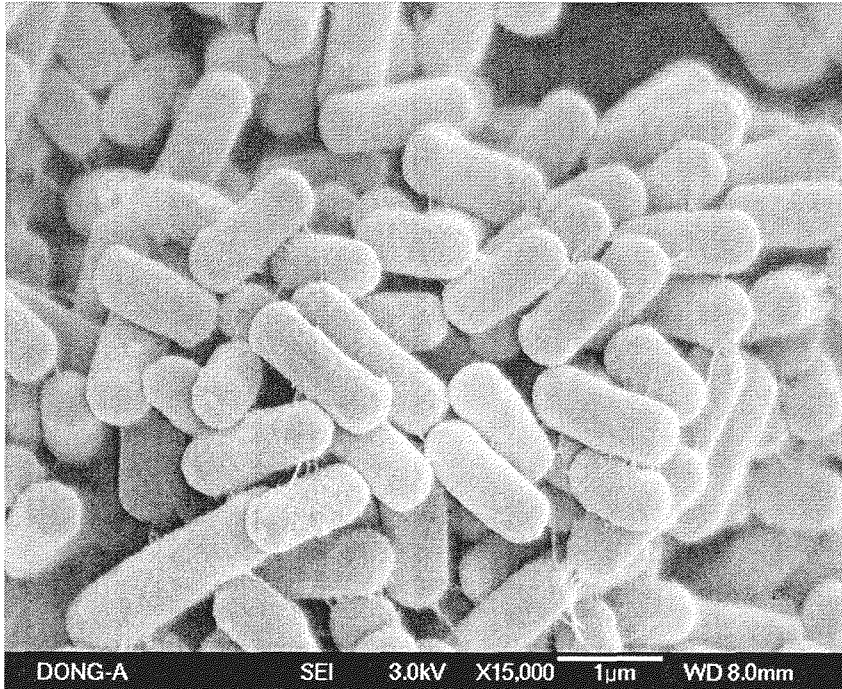


Fig. 1. Scanning electron micograph of the isolated *Bacillus* sp. FF-7($\times 15,000$)

Table 1. Physiological characteristics of isolated microorganisms FF-7

Gly	+	Cel	+
Ery	-	Mal	+
Dara	-	Lac	+
Lara	+	Mel	+
Rib	+	Sac	+
Dxyl	+	Tre	-
Lxyl	-	Inu	-
Ado	-	Mlz	-
Mdx	-	Raf	+
Gal	-	Amd	+
Glu	+	Glyg	+
Fru	+	Xlt	-
Mne	+	Gen	+
Sbe	-	Tur	-
Rha	-	Lyx	-
Dul	-	Tag	-
Ino	+	Dfuc	-
Man	+	Lfuc	-
Sor	+	Darl	-
Mdm	-	Larl	-
Mdg	+	Gnt	-
Nag	-	2KG	-
Amy	+	5KG	-
Arb	+		
Esc	+		
Sal	+		

1) used with API 50CHB kit

2) + : positive, - : negative

Table 2. 16S rDNA partial sequencing patten of *Bacillus* sp. FF-7.

1	CGGCG	TGCCT	AATAC	ATGCA	AGTCG	AGCGG	ACAGA	TGGGA	GCTTG	CTCCC
51	TGATG	TTAGC	GGCGG	ACGGG	TGAGT	AACAC	GTGGG	TAACC	TGCCT	GTAAG
101	ACTGG	GATAA	CTCCG	GGAAA	CCGGG	GCTAA	TACCG	GATGG	TTGTC	TGAAC
151	CGCAT	GGTTC	AGACA	TAAAA	GGTGG	CTTCG	GCTAC	CACTT	ACAGA	TGGAC
201	CCGCG	GCGCA	TTAGC	TAGTT	GGTGA	GGTAA	CGGCT	CACCA	AGGCG	ACGAT
251	GCGTA	GCCGA	CCTGA	GAGGG	TGATC	GGCCA	CACTG	GGACT	GAGAC	ACGGC
301	CCAGA	CTCCT	ACGGG	AGGCA	GCAGT	AGGGA	ATCTT	CCGCA	ATGGA	CGAAA
351	GTCTG	ACGGA	GCAAC	GCCGC	GTGAG	TGATG	AAGGT	TTTCG	GATCG	TAAAG
401	CTCTG	TTGTT	AGGGA	AGAAC	AAGTG	CCGTT	CAAAT	AGGGC	GGCAC	CTTGA
451	CGGTA	CCTAA	CCAGA	AAGCC	ACGGC	TAACT	ACGTG	CCAGC	AGCCG	CGGTA
501	ATACG	TAGGT	GGCAA	GCGTT	GTCCG	GAATT	ATTGG	GCGTA	AAGGG	CTCGC
551	AGGCG	GTTTC	TTAAG	TCTGA	TGTGA	AAGCC	CCCGG	CTCA		

3) 혈전용해효소활성

토양으로부터 분리된 *Bacillus* sp. FF-7 조효소액의 혈전용해활성을 fibrin plate를 이용하여 각각 50 μ l와 100 μ l를 8mm paper disk 위에 분무하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간이 지난 후 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. 타 *Bacillus* sp. 에서는 혈전용해활성을 확인할 수 없었으며, FF-7에서는 우수한 혈전용해활성을 확인할 수 있었다.

Fibrin plate를 이용한 FF-7의 혈전용해 활성은 8시간까지 2시간 간격으로 형성되는 투명환의 면적이 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었으며. 이는 이등과 길 등에 의해 보고 된 결과와 일치하였다.(Fig. 3)

국내 발효식품으로부터 분리되어진 미생물의 혈전 용해능은 국내에서는 많이 보고된 바 있으며, 이미 보고 되어진 된장 및 청국장으로부터 분리된 *Bacillus* sp. 보다 생육과 혈전용해능이 우수한 혈전용해 활성을 나타내어지는 것으로 사료되어진다.

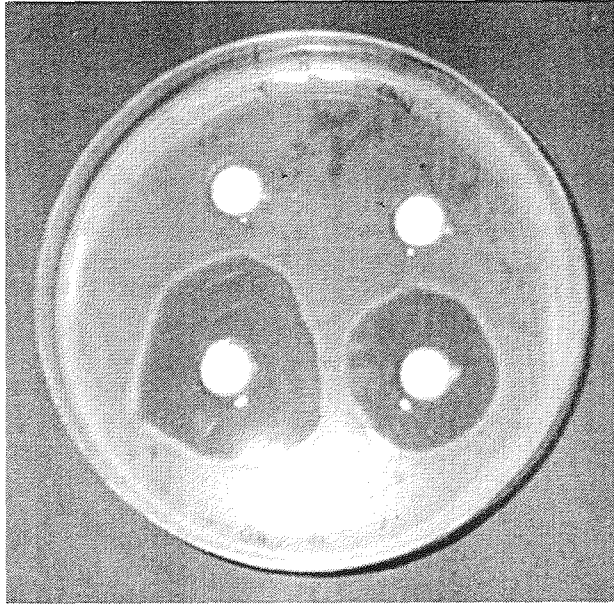


Fig. 2. Clear zone indicates the fibrinolytic enzyme activity of *Bacillus* sp. FF-7

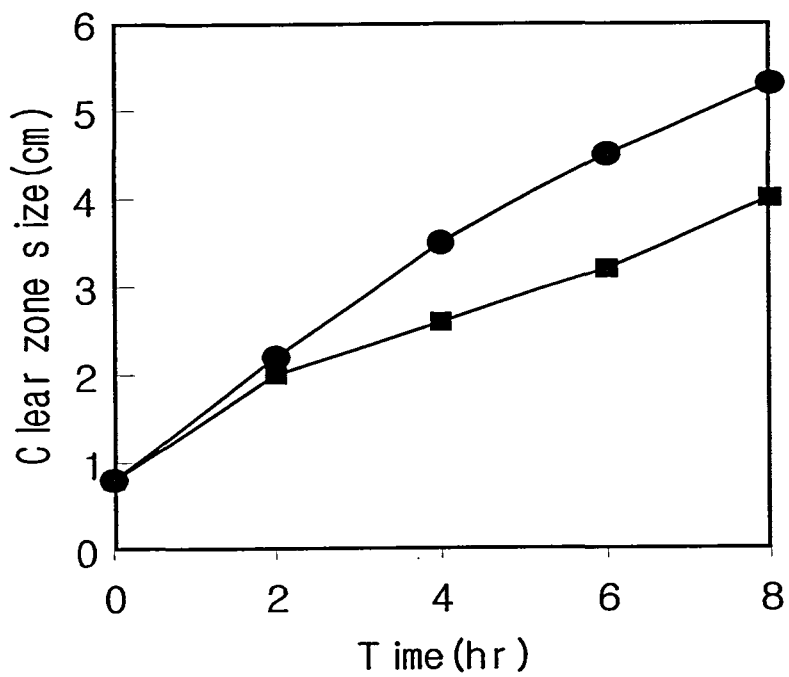


Fig. 3. Calibration curve for determination of fibrinolytic activity
(-●-: 30 μl, -■-: 50 μl)

4) 배양시간에 따른 균체의 생육 및 효소활성의 변화

FF-7균주의 배양시간별 균체 생육과 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 균체의 생육은 배양 6시간부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 15시간 이후에 최대성장을 나타내었고 그 이후로 감소하는 경향을 나타내었다. 혈전용해 효소의 활성은 균체 성장과 동일한 형태로 활성을 나타내기 시작 하였으며, 이는 이미 보고 되어진 *Bacillus* sp.의 세포외 protease의 활성과 동일한 결과를 나타내었다.

5) 초기 pH 변화에 의한 균체 생육 및 효소 활성의 변화

FF-7균주의 초기 pH변화에 따른 균의 생육과 효소 활성의 변화를 알아보기 위해 배양배지의 초기 pH를 4 ~ 10으로 조절한 후 전 배양액을 3%씩 접종하고 30℃에서 24시간 배양한 후 균체생육과 효소활성도는 Fig. 5 와 같다. 배양 배지의 초기 pH 5 ~ 10까지 균체생육은 전체적으로 양호하였지만, 효소 활성도는 pH 4부터 증가하기 시작하여 pH 6에서 가장 높게 나타났고 초기 pH가 6 ~ 8로 조정 후 배양한 결과 혈전용해활성이 우수하였다. 그러나, 배양 후의 배양액의 pH는 전체적으로 8.6 ~ 8.8로 유사하였다.

6) 조효소액의 효소활성에 미치는 pH 및 온도 영향

Bacillus sp. FF-7 유래 조효소액의 효소활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 기질용액의 pH를 5에서 11까지 변화시켜 조효소용액과 반응시킨 뒤 활성을 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. pH 6에서부터 9까지 비교적 넓은 pH 범위에서 혈전용해활성이 70%이상의 활성도를 나타내었으며, 이 조효소액의 반응 최적 pH는 6로 나타나 중성 protease임을 알 수 있었다.

또한, FF-7 조효소액의 혈전용해효소의 최적온도를 검토하기 위해 온도를 10℃ 부터 70℃로 변화시키면서 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. 효소 반응액은 20 ~ 60℃에서 80% 이상의 높은 효소활성을 나타내었으며, 이 효소의 최적 반응온도는 40℃를 나타내었다. 따라서, 본 실험에 사용된 *Bacillus* sp. FF-7은 20~40℃에서 90%이상의 높은 활성을 가지는 혈전용해효소를 생성함으로써 산업적으로 이용성이 우수하다고 판단되어진다. 또한, 중성 pH인 6 ~ 7에서 혈전용해능이 우수하여 혈전용해제로서 혈전증 관련 기능성식품이나 의약품 등에 널리 이용되어질 것이라 사료되어진다.

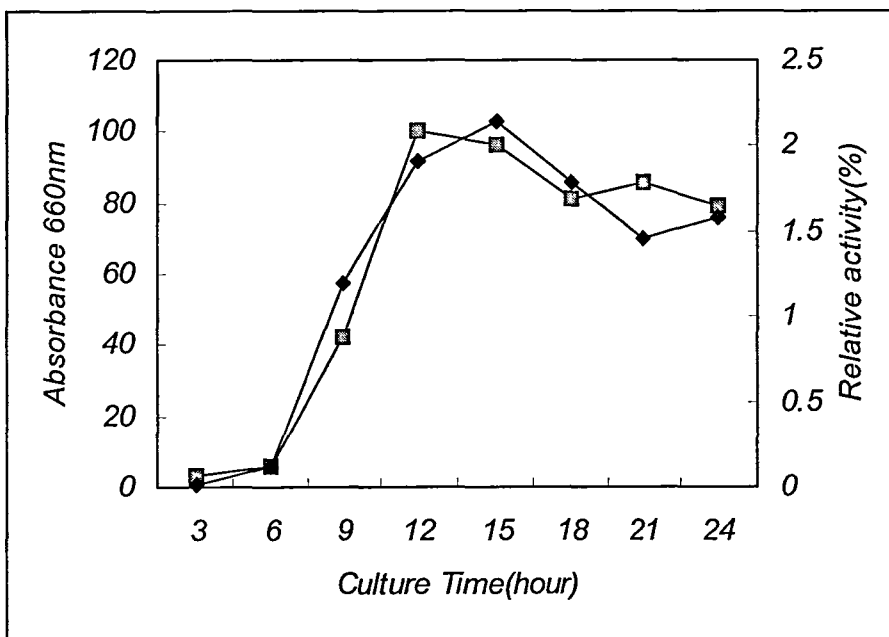


Fig. 4. Time course of fibrinolytic enzyme activity in *Bacillus* sp. FF-7. (—■—■—:Relative activity , —◆—◆—:Cell growth)

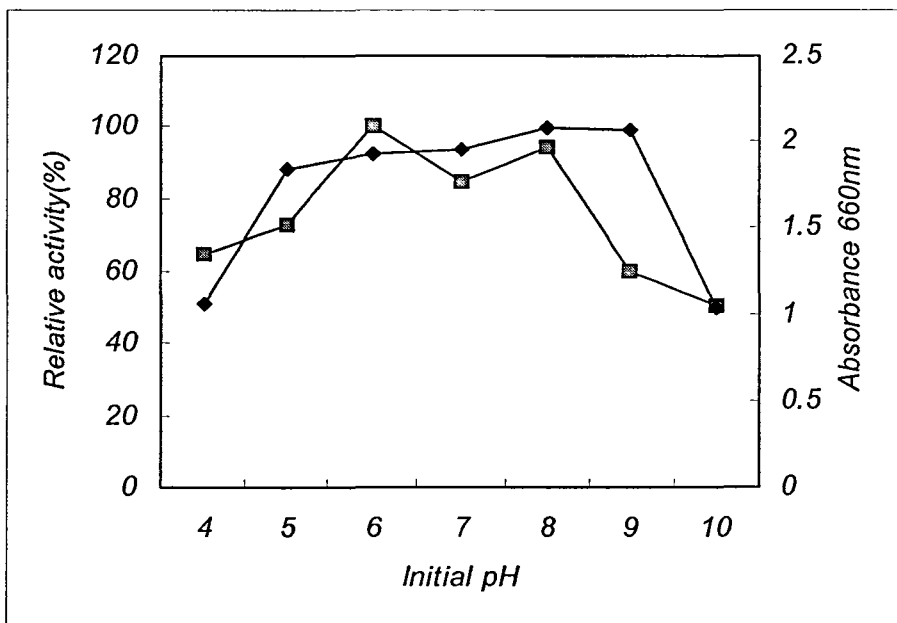


Fig. 5. Initial pH for cell growth and fibrinolytic enzyme activity of *Bacillus* sp. FF-7

(—■—■—: Relative activity , —◆—◆—: Cell growth)

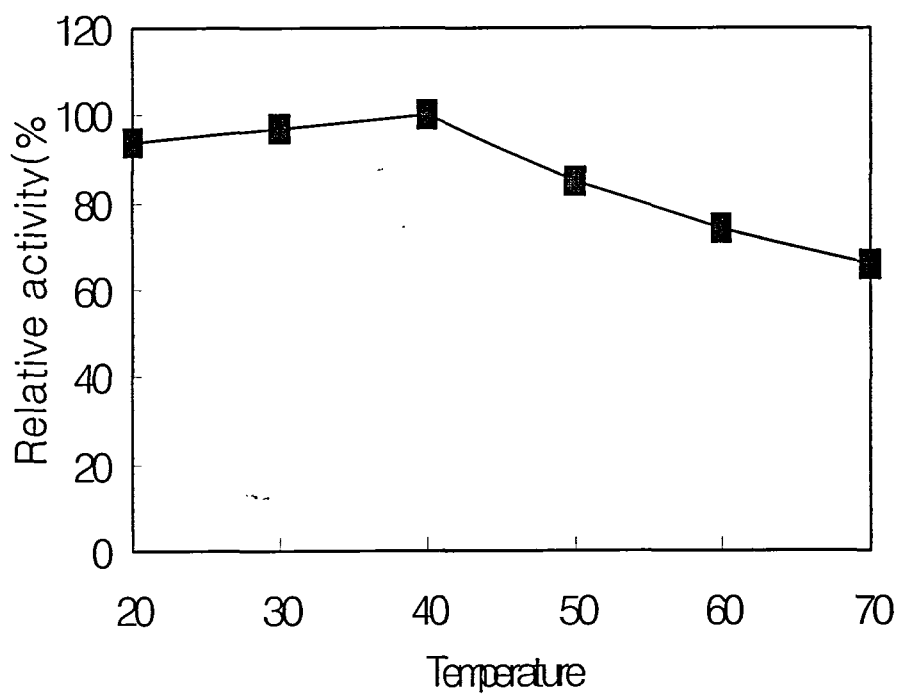


Fig. 6. Optimal temperature for fibrinolytic enzyme activity of *Bacillus* sp. FF-7

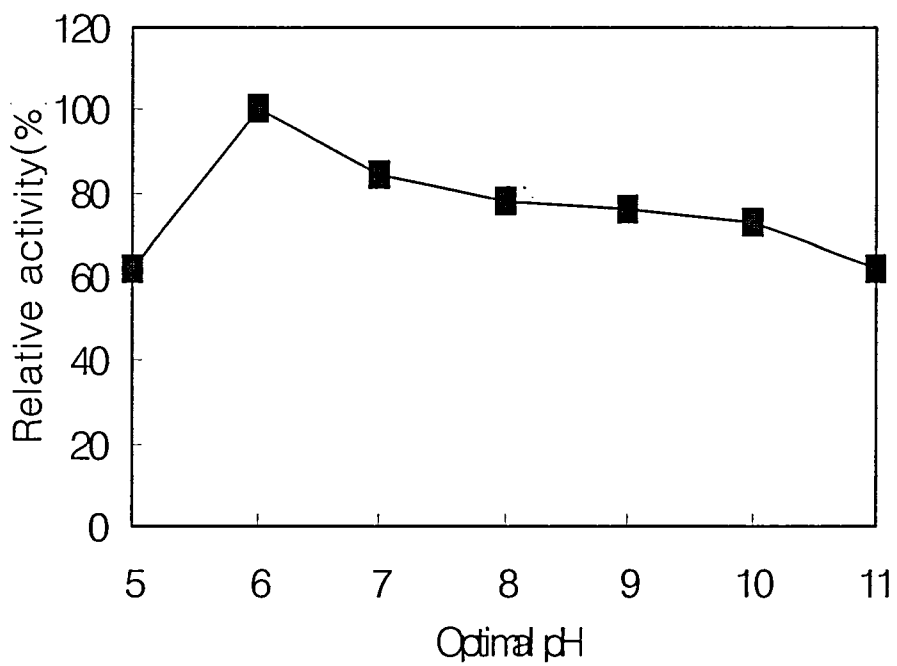


Fig. 7. Optimal pH for fibrinolytic enzyme activity of *Bacillus* sp. FF-7

7) 배양배지에 따른 균체의 성장 및 fibrinolytic enzyme activity.

가) 탄소원의 종류 및 농도에 미치는 혈전용해능의 비교

FF-7균주의 탄소원 종류에 따른 혈전용해 효소 활성을 비교하기 위해 LB 배지에 glucose, starch, sucrose, lactose, galactose를 각각 2%농도로 첨가하여 30°C에서 18시간 배양한 후 8,000×g에서 20분간 원심분리하여 조제되어진 조효소액을 fibrin plate에 30μl를 paper disk에 가하여 37°C에서 4시간 후 형성되어진 분해환의 크기를 이용한 혈전용해활성도는 Fig.8과 같다. 사용되어진 탄소원에 대한 혈전용해활성도는 galactose를 사용하였을 때 가장 높았으며, galactose농도에 따른 혈전용해활성은 농도에 비례하여 증가하는 경향을 나타내었으며 4%에서 가장 우수하였다. (Fig. 9)

나) 질소원의 종류 및 농도에 미치는 혈전용해능의 비교

질소원의 종류에 따른 혈전용해 활성을 비교하기 위하여 LB배지에서 질소원인 1% tryptone 대신에 soybean, yeast extract, malt extract, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl을 동일한 농도로 대체하여 30°C에서 18시간 배양한 후 원심분리한 상등액을 이용하여 혈전용해 활성을 비교하였다. (Fig.10) 혈전용해 효소 활성은 malt extract를 사용하였을 때 가장 높았으며, 탄소원의 결과에서와 같이 농도에서는 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 4%의 농도에서 가장 우수하였다.(Fig.11)

다) 미량원소 종류별 혈전용해능의 비교

미량원소의 종류에 따른 혈전용해활성을 비교하기 위해 LB배지에서 NaCl을 대신에 yeast extract, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MnSO₄, MgSO₄, ZnSO₄, CaCl₂, FeSO₄를 0.15%수준으로 대체하여 30°C에서 18시간 배양한 후 원심분리한 상등액을 이용하여 혈전용해활성을 비교하였다. 혈전용해활성은 K₂HPO₄를 사용했을 때 가장 활성이 높았다. (Fig.12)

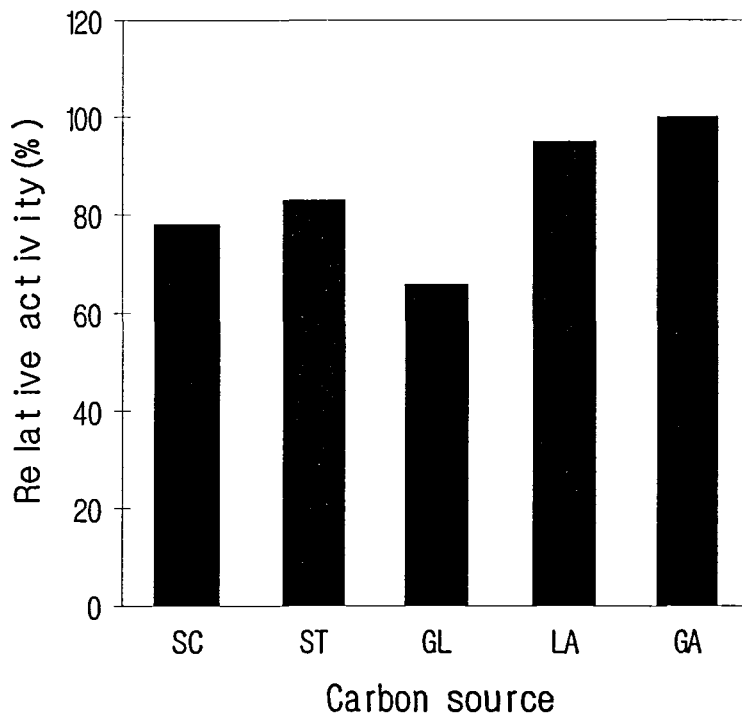


Fig. 8. Effect of carbon source on activity of fibrinolytic enzyme
(SC: Sucrose, ST: Starch, GL: Glucose, LA: Lactose,
GA: Galactose)

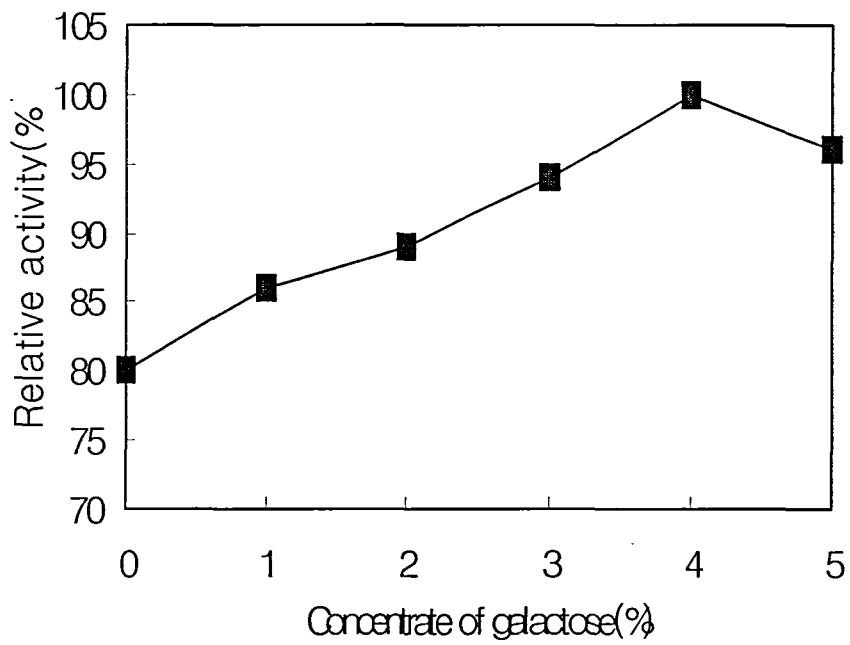


Fig. 9. Effect of galactose concentration on activity of fibrinolytic enzyme.

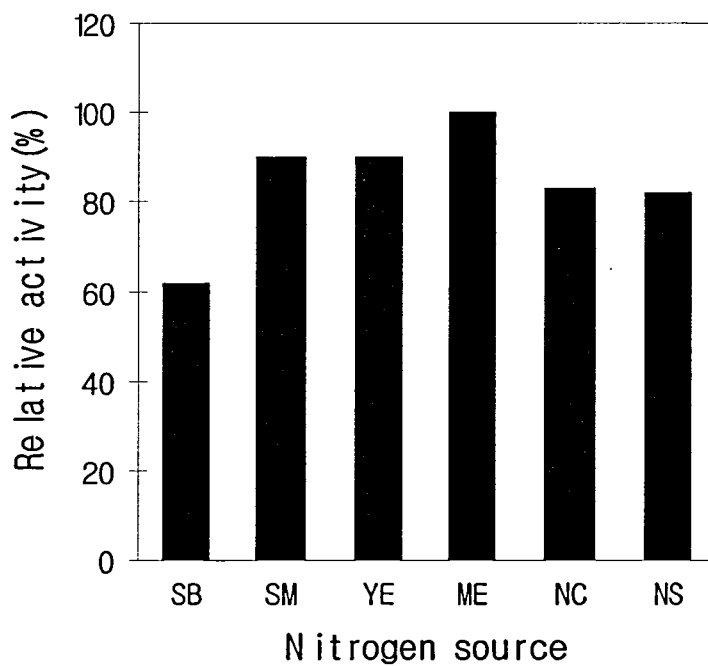


Fig. 10. Effect of nitrogen source on activity of fibrinolytic enzyme.

(SB: Soybean powder, SM: Skim milk, YE: Yeast extract, ME: Malt extract, NC: NH_4Cl , NS: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

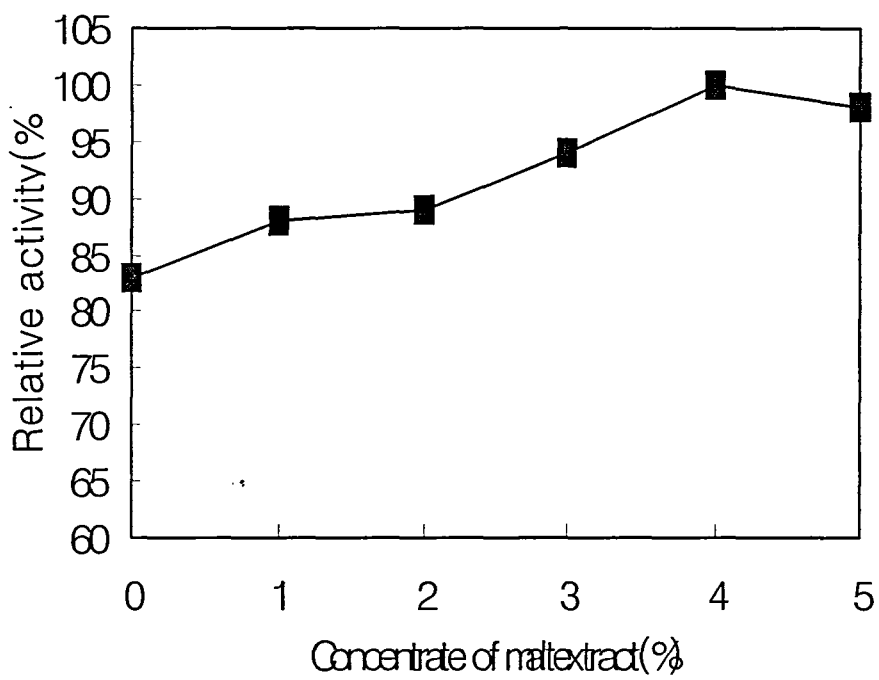


Fig. 11. Effect of malt extract concentration on activity of fibrinolytic enzyme.

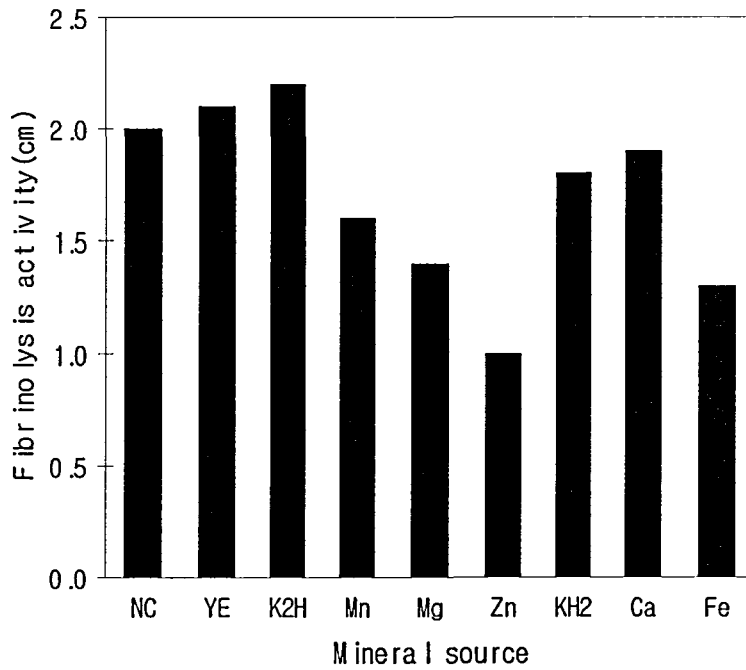


Fig. 12. Effect of mineral source on activity of fibrinolytic enzyme.

(NC: NaCl, YE: Yeast extract, K2H: K_2HPO_4 , Mn: $MnSO_4$,
Mg: $MgSO_4$, Zn: $ZnSO_4$, KH2: KH_2PO_4 , Ca: $CaCl_2$, Fe: $FeSO_4$)

8) 효소의 Fibrin 분해양상에 따른 분류

혈전용해효소는 fibrin을 분해하는 양상에 따라 두 가지 형태로 나눌 수 있다. 그 하나는 혈액 중 plasminogen을 active type인 plasmin으로 변화시켜 plasmin으로 하여금 fibrin을 분해하도록 하는 plasminogen activator type과 이와 무관하게 효소자체가 직접 혈전을 분해하는 direct active type이 있다.

이에 본 효소의 분해기작을 확인하기 위해 plasminogen-rich fibrin plate와 plasminogen-free plate를 사용하였다. Fig.13 에서 보는 바와 같이 본 혈전용해효소는 plasminogen을 제거한 plasminogen-free plate에서도 plasminogen-rich fibrin plate와 마찬가지로 활성을 발현하는 결과를 보였다. 그러므로 본 효소는 fibrin을 직접 분해하는 direct active type으로 판단되었다. Urokinase 와 *Bacillus* sp. FF-7의 피브린 분해능을 비교 한 그림을 Fig.14에 나타내었다. 그 결과 같은 농도에서 *Bacillus* sp. FF-7의 피브린 분해능이 Urokinase보다는 약간 낮았으나 *Bacillus* sp. FF-7의 피브린 분해능도 우수한 것으로 확인 되었다.

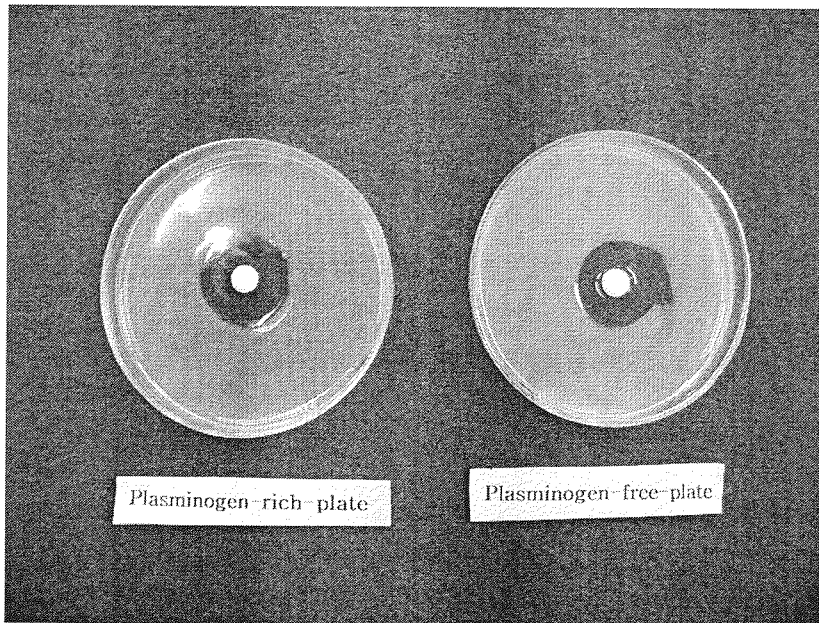


Fig. 13. Fibrinolytic activity of FF-7 in plasminogen-free and plasminogen-rich fibrin plates. plasminogen-rich fibrin plate contained 5U(0.5U/ml) of plasminogen per plate

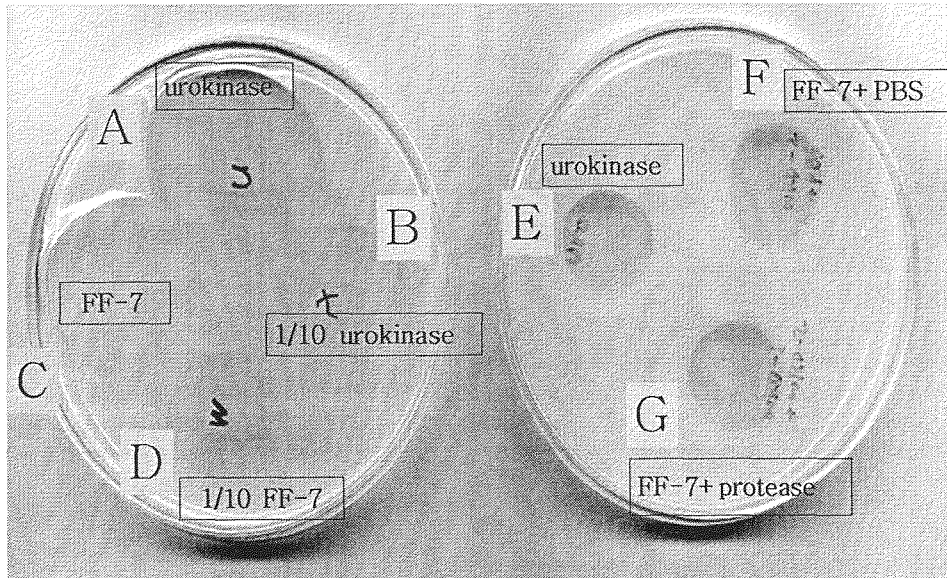


Fig. 14. Comparison of the fibrinolytic activity with urokinase.

나. *Bacillus* sp. FF-7 배양액의 항산화활성 (*In vitro*, *In vivo*)

1) 체중, 식이 섭취량 및 식이 효율에 미치는 영향

Bacillus sp. FF-7을 식이 중에 10%와 20% 수준으로 첨가하여 3주일간 섭취시킨 흰쥐의 체중 및 식이 섭취량은 실험군 간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다. (Table 2)

그러나 BF-10, BF-20은 control군보다 체중 증가량에서 유의적인 차이는 없었으나 약간 감소하는 결과를 보였다. 이러한 결과는 시판 식이 대신에 첨가한 균체가 영양적인 측면에서 대조군보다 떨어지기 때문인 것으로 첨가 균체량이 많을 수록 차이가 있었다.

체중에 대한 각 장기의 상대적 중량비 (g/kg body weight) 변화는 Table 3

과 같다.

신장의 상대적 중량비는 control군에 비하여 실험군 BF-10군과 BF-20군에서 감소하였으며, control군과 비교하여 BF-10군간에서 5% 수준에서 유의적으로 감소하는 경향이며 BF-20군에서는 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

그 외 다른 장기인 뇌, 간, 심장, 비장, 고환 등의 상대적 중량비는 각 실험군 간의 유의적 차이는 인정되지 않았다. 따라서, 기본 식이를 투여한 대조군에 비해서 *Bacillus* sp. FF-7을 투여한 실험군에서 각 장기의 중량비가 약간씩 변화를 보임으로서 생체내 대사계에도 어떤 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 사료된다.

Table 2. Effect of *Bacillus* sp. FF-7 on the body weight and body weight gain in rats.

Group	Body weight			Food intake	FER
	initial	Final	Gain		
	g/rat			g/day	
control	93.489±4.99	210.15±8.22	116.67±3.78	18.64±0.40	0.29±0.34
BF-10	94.64±3.53	193.29±6.68	98.65±8.84	17.23±0.98	0.27±0.51
BF-20	95.02±1.75	188.20±11.71	93.17±9.96	19.17±0.02	0.23±0.52

1) FER (Food efficiency ratio) = Body weight gain / Food intake

Values are mean±SE of six rats per group. Between the groups, values with different letter are significantly different at $p < 0.05$

Table 3. Effect of *Bacillus* sp. FF-7 on the tissue weight in rats.

Ingredients	Control	BF-10	BF-20
	Tissue weight (g/100g body weight)		
Brain	0.75±0.05	0.81±0.04	0.87±0.07
Liver	3.82±0.15	3.38±0.10	3.79±0.08
Kidney	1.84±0.13 ^a	1.15±0.08 ^b	1.49±0.11 ^{ab}
Heart	0.93±0.04	0.91±0.03	0.94±0.02
Spleen	0.56±0.02	0.50±0.03	0.52±0.06
Testis	3.08±0.06	2.73±0.10	2.83±0.13

Values are means±SE of six rats per group. Between the groups, value letter are significantly different at $p < 0.05$

2) 각 조직의 지질과산화물 함량에 미치는 영향

지질과산화반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 등에 의한 병태 생리학적 현상이나 조직의 손상정도를 나타내는 가장 중요한 기전으로 인정되고 있다. 이러한 기전은 조직내 세포의 산화적 스트레스의 증가, 즉 free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인해 야기된다. 동물 체내에서 생체막 지질의 과산화물 생성정도의 지표로 알려져 있는 TBARS를 측정된 결과 Table 4, Table 5와 같다. 각 조직에 있어서 지질과산화물의 상대적 함량은 조직의 homogenate에서는 신장, 뇌, 고환, 비장, 심장, 간장의 순이고, 각 조직의 microsome에서는 간, 뇌, 신장, 심장, 고환, 비장 순으로 나타났다.

본 실험에 있어 microsome에서 고환의 지질과산화물함량은 대조군에 비교해서 BF-10군에서는 유의적으로 감소하였고, BF-20군에서는 감소의 경향을 나타내었다,

또한, 비장과 심장의 지질과산화물 함량은 대조군에 비해 BF-10군, BF-20군에서 유의적으로 감소하였다. microsome에서는 homogenate와는 달리 모든 장기에서 감소의 경향을 나타내었다.

그리고, homogenate에서 신장의 지질과산화물 함량은 대조군에 비교해서 BF-10에서는 유의적으로 감소하였고, BF-20에서는 감소의 경향을 나타내었으나 BF-10에 비해 오히려 증가의 경향이 있기에 통계상의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

신장은 생체의 대사과정에서 생성된 노폐물을 체외로 배설시키며, 체액의 항상성 유지와 항이뇨 호르몬 생성에도 중요한 역할을 담당하는 내분비기능도 가지고 있다. 또한, 신장은 혈류량이 많고 노폐물을 여과시키는 과정에서 혈액 속에 들어 있는 독성물질에 노출될 기회가 많기 때문에 체내에서 이들의 주된 축적 부위로 알려져 있으며, 이 때문에 항산화계가 저하되어 지질과산화물을 생성하는데 좋은 환경을 제공함으로써 조직의 손상을 초래할 수도 있다. 당뇨 및 만성신부전 실험 모델에서 세포내 산화스트레스 증가에 의한 신장, 간장 및 혈액에서 지질과산화물 증가, 특히 뇨 중의 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 생성의 증가는 신장에서 기능장애가 일어난 것을 암시해 준다. 본 실험 결과에서 *Bacillus* sp. FF-7이 신장의 과산화물 생성을 억제시키는 것은 산화적 손상을 일으키는 원인물질인 free radical생성과 밀접하게 관련되어 있는 질환의 발병을 예방 또는 치료할 수 있는 생리활성물질로서 작용할 가능성이 있다.

또한, 뇌의 지질과산화물 함량은 대조군에 비교해서 BF-10에서 유의적으로 감소하였고, BF-20에서는 감소의 경향을 나타내었으나 BF-10의 감소량에 비해 오히려 증가의 경향을 나타내어 통계상 유의적인 차이는 없었다.

고환의 경우 지질과산화물 함량은 대조군에 비해 다소 감소하였으나 개체 차이가 커서 유의성은 나타나지 않았다. 비장의 경우에는 BF-10에서 다소 증가하였으나 통계상으로 유의적인 차이가 없었다.

또한, 간장, 심장의 경우 지질과산화물 함량은 대조군에 비교해서 실험군에서 약간의 증가 경향을 보였으나 통계상의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

Table 4. Effect of *Bacillus* sp. FF-7 on the TBARS concentration of tissue homogenates in rats

Ingredients	Control	BF-10	BF-20
Kidney	207.07±25.93 ^a	138.68±4.02 ^b	181.08±15.49 ^{ab}
Brain	190.10±26.70 ^a	127.13±11.34 ^b	130.82±14.17 ^{ab}
Testis	169.75±30.42	132.37±5.02	139.02±12.38
Spleen	141.33±15.32	151.79±13.93	114.75±9.43
Heart	119.27±6.18	136.21±16.39	124.15±7.78
Liver	97.71±11.44	109.21±5.16	112.69±5.20

TBARS(nmol/g tissue)

Values are means±SE of six rats per group.

Between the groups, values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the tissues homogenates were measured as described in the materials and methods section.

Table 5. Effect of *Bacillus* sp. FF-7 on the TBARS concentration of tissue microsomes in rats.

Ingredients	Control	BF-10	BF-20
Liver	205.84±43.97	140.44±8.29	136.02±3.55
Brain	169.75±30.42	132.37±5.02	139.02±12.30
Heart	118.94±3.48 ^a	94.35±4.08 ^b	99.12±1.20 ^b
Kidney	113.34±11.14	111.46±6.87	113.47±10.62
Testis	111.98±7.46 ^a	85.86±1.25 ^b	83.22±3.48 ^b
Spleen	110.72±9.22 ^a	87.27±2.04 ^b	87.69±5.36 ^b

Values are means±SE of six rats per group.

Between the groups, values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the tissues homogenates were measured as described in the materials and methods section.

3) 비헴철 및 아연 함량 측정

필수 미량 원소인 철은 두 가지로 분류하고 있다. 하나는 몸 안에 저장 되어 있는 철로 단백질과 99%의 복합체로 되어 있다. 나머지 1%의 유리철분이 노화에 영향을 준다.

즉, 단백질과 99%의 복합체로 된 철은 체내 H₂O₂를 제거하는 Catalase의 구성성분이며, 체내의 Vit C의 함량과 H₂O₂의 농도차에 의해서 지질 과산화 반응이 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있어 생체내 지질과산화반응을 조사하는데 있어서 비헴철 함량 측정은 중요하다. 간장의 비헴철 함량은 대조군에서 161.09ppm, BF-10에서 180.07 ppm으로 나타났다. (Table 6) 간장 중의 지질과산화물 함량은 철분함량에 의해 영향을 받는다는 결과가 보고된 바 있다.

비헴철 함량과 *in vivo*계의 지질과산화물 함량이 증가하여 이전의 결과와 유사하였으며 본 실험에서도 대조군에 비해 *Bacillus* sp. FF-7 투여군에서 간장 중의 비헴철 함량과 *in vivo*계의 지질과산화물 함량이 증가하여 이전의 결과와 일치하였다.

Table 6. Effect of *Bacillus* sp. FF-7 on the nonheme iron and zinc contents of liver in rats.

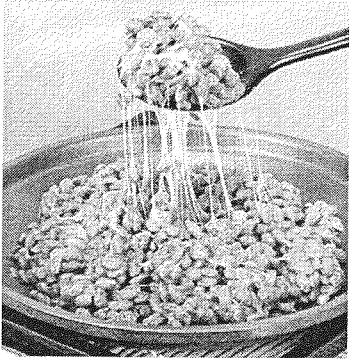
Ingredients	Control	BF-10	BF-20
	ppm		
Fe	161.09±6.11 ^a	182.07±07 ^b	162.82±0.86 ^a
Zn	29.70±0.98 ^a	32.87±0.27 ^a	38.37±2.54 ^b

Values are means±SE of rats per group.

Between the groups, values with different letters are significantly different at p<0.05

다. *Bacillus* sp. FF-7 균주를 이용한 청국장 개발 결과

본 실험에서 향산화능 및 혈전분해능이 높은 균주를 사용하여 청국장 생산 공정도에 따라 아래의 시제품을 개발하였다.



4. 참고문헌

- Ward. O. P. Proteolytic Enzymes, in *Comprehensive Biotechnology* 1st ed. by M. Y. Murray, Pergamon press, 789 - 792 (1985)
- Peckman. E.V. *Aspergillus* proteinase. *Biochemistry*. 5 : 321 - 325 (1951)
- Crewth. W. C. The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin. *Aus. J. Biol.* 6 : 597 - 601 (1963)
- Masaaki. Y. S., Kazuo and M., Mitsuo. Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No.3405. *Agric. Biol. Chem.* 48 : 1637 - 1645 (1984)
- Kageyama. K. Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing. *J. Ferment. Technol.* 33 : 53 - 57 (1955) Nunokawa. Y., Y. Namba and S. Watanabe. A study of the rice Koji protease. *J. Soc. Brew.* 53 : 930 - 933 (1961)
- Horikoshi, K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. part 1. alkaline protease produced by *Bacillus* No.221. *Agr. Biol. Chem.* 35 : 1407 - 1414. (1966)
- Manachini, P. L., M. G. Fortima, and C. Parini. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 : 409 - 413 (1988)
- Tsuru. D., H. Kira, T. Yamamoto, and J. Fukumoto. Studies on bacterial protease. Part 16. purification crystallization and some enzymic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *Agr. Biol. Chem.* 30 : 1261 - 1268. (1966)
- Roh Jong soo, Chung Young Chul, Park Seok Kyu and Nack-kie Sung. Isolation of Alkalopsychrotrophic Protease-Producing *Pseudomonas* sp. RP-222 and properties of Its Crude Enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19 : 383 - 389 (1992)
- Guntelber, A.V. and M. Ottesen. Preparation of crystals containing the plakalbumin forming enzyme from *Bacillus subtilis*. *Nature(London)* 170 : 802 (1952)
- Smith, E. L., R. J. Delange, W. H. Evans, M. Landon, and F. S. Markland. *Subtilism* Calsberg. V. The complete sequence: comparison with subtilisin BPN: evolutionary relationship. *J. Biol. Chem.* 243 : 2184 - 2191 (1968)

- Ottesen, M. and A. Spector. A comparison of two proteinases from *Bacillus subtilis*. C.R. Trav. Lab. Calsberg. 32 : 63 - 74 (1960)
- 정동효 . 효소학, 제 3장: 촉매로서의 효소, 제7장 : 효소의 이용, 선진문화사, 서울 (1992)
- 인구분석과 . 96년 사망원인 통계 결과. 통계청. 한국 (1997)
- Collen, D., H. R. Lijnen and H. K. Gold. Towards Better Thrombolytic Therapy, Progress in Cardiovascular Diseases 34 : 101 - 112 (1991)
- Verstranete, M., H.R. Lijnen and D. Collen. Thrombolytic Agents in Development, Drugs 50 : 29 - 42 (1995)
- White, W. F., G. H. Barlow, and M. M. Mozen. The Isolation and Characterization of Plasminogen Activator (Urokinase) from Human Urine, Biochemistry, 5 : 2160 - 2169 (1996)
- Sumi, H., N. Toki, K. Sasáki, and K. C. Robbins. Oral Administration of Urokinase, Thromb. Res., 20 : 711 - 714 (1980)
- Wun, T. C., W. D. Schleuning, and E. Reich . Isolation and Characterization of Urokinase from Human Plasma, J. Biol. Chem, 257 : 3276 - 3283 (1982)
- Sumi, H., M. Maruyama, O. Matsuo, H. Mihara, and N. Toki. Higher Fibrin-binding and Trombolytic Properties of Single Polypeptide Cha in High Molecular Weight Urokinase, Thromb. Haemostas, 47 : 267 (1982)
- Abe, T., M. Kazama, T. Kinoshita, I. Naito, T. Ogushi, Y. Yoshimura, J. Teruya, and N. Shimizu. Shift of Fibrinolysis System at Oral Administration of Urokinase in Human Subjects; Double Blind Cross over study, Blood and Vessels(in Japanese), 13: 472-479 (1982)
- Sumi, H., M. Maruyama, T. Yoneta, and H. Mihara. Activation of plasma Fibrinolysis after Intrarectal Administration of High molecular Weight Urokinase and Its Derivative, Acta Haematol., 70 : 289 - 295 (1983)
- Sasaki, K., S. Moriyama, H. Sumi, N. Toki, and K.C. Robbins. The Transport of ¹²⁵I-labeled Human High Molecular Weight Urokinase across the Intestinal Tract in a Dog Model with Stimulation of Synthesis and/or Release of Plasminogen Activators, Blood, 66 : 67 - 75 (1985)
- Sumi, H., M. Seiki, N. Morimoto, H. Tsushima, M. Maruyama, and H. Mihara. Plasma Fibrinolysis after Intraduodenal Administration of Urokinase in Rats, Enzyme, 33 : 121 - 127 (1985)

- Toki, N., H. Sumi, K. Sasaki, I. Boreish, and K. C. Robbins. Transport of Urokinase across the Intestinal Tract of Normal Human Subjects with Stimulation of Synthesis and/or Release of Urokinase-type Proteins, *J. Clin. Invest.*, 75 : 1212 - 1222 (1985)
- Fletcher, A. P. and A. J. Johnson . Methods Employed for Purification of Streptokinase, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 94, 233(1995)
- Pennica, D., W. E. Holmes, W. J. Kohr, R. N. Harkins, G. A. Vehar, C. A. Ward, W. F. Bennett, E. Yelverton, P. H. Seeburg, H. L. Heyneker, D. V. Goeddel, and D. Collen. Cloning and Expression of Human Tissue-type Plasminogen Activator cDNA in *Escherichia coli*, *Nature*, 301 : 214 - 221. (1983)
- Voet, D. and J. G. Voet . *Biochemistry*, 2nd ed., pp 1196 - 1207, John Willy Press, U.S.A.(1995)
- Mihara, H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki, and M. Maruyama. A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted from the Earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jap. J. Physiol.*, 41 : 461 - 472 (1991)
- Nakajima, N., H. Mihara, and H. Sumi . Characterization of potent Fibrinolytic Enzyme in Earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 : 1726 - 1730. (1993)
- Sumi, H., N. Nakajima, and H. Mihara . A Very Stable and Potent Fibrinolytic Enzyme Found in Earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol.* (1993)
- Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki. A Novel Fibrinolytic Enzyme(Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto; a Typical and Popular Soybean Food in the Japanese Diet, *Experientia*, 43, 1110 - 1111. (1987)
- Samy, A. EI-Aassar. Production and Properties of Fibrinolytic Enzyme in Solid State Cultures of *Fusarium pallidroseum*, *Biotech. Lett.*, 17 : 943-948 (1995)
- Nakajima, N., N. Taya, and H. Sumi. Potent Fibrinolytic Enzyme from the Lysate of *Katsuwonus pelamis* Digestive Tract(Shiokara) : Purification and Characterization, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(9) : 1604 - 1605. (1993)
- Lijnen, H. R., B. Van Hoef, F. De Cock, K.Okada, S. Ueshima, O. Matsuo,

- and D. Collen . On the Mechanism of Fibrin-specific Plasminogen Activation by Staphylokinase, *J. Biol. Chem*, 266 : 11826 - 11832 (1991)
- Arai, K, J. Mimuro, S. Madoiwa, M. Matsuda, T. Sako, and Y. Sakata. Effect of Staphylokinase Concentration of Plasminogen Activation, *Biochimicaet Biophysica Acta.*, 1245 : 69 - 75. (1995)
- Lack, C. H . Staphylokinase : an Activator of Plasma Protease, *Nature*, 161 : 673 - 682 (1948)
- Kim, W. K., K. H. Choi, Y. T. Kim, H. H. Park, J. Y. Choi, Y. S. Lee, H. I. Oh, I. B. Kwon, and S. Y. Lee. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from Chungkook-jang, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2482 - 2488 (1996)
- Kim, H. K., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong, and I. S. Kong . Purification and Charaterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. KA38 Originated from Fermented Fish. *J. Ferment. Bioeng.*, 84 : 307 - 312 (1997)
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. A. Farr and R. J. Randal. Protein Measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265 - 275 (1951)
- Hagihara, B., H. Matrubaraa, M. Nakai, and K. Okunuki. Crystalline bacterial proteinase. 1. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* 45 : 185 - 194 (1958)
- Hwang Se Young. Purification and Characterization of An Extracellular Serine Protease from *Bacillus* sp. strain KUN-17. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23 : 53 - 59 (1995)
- Kim Sung Jo, Yoon Joo Hee, Lee Myoung Sook, Kim Han Bok. Isolation and Charaterization of *Bacillus cereus* Secreting Protease from Korean Soybean Paste. *Kor. J. Microbiol.* 33 : 136 - 141 (1997)
- Koo Ja-Hyup, Choi In-Jae and Nam Hee-sop. Medium Optimization for Production of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* NS70. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25 : 207 - 211 (1997)
- Himelbloom, B. H. and H. M. Hassen. Effect of cysteine on growth, protease production, and catalase activity of *Pseudomonase fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 418 - 421 (1986)

- Lee Si Kyung, Heo Seok, Bae Dong Ho and Choi Kee Hyun. Medium Optimization for Fibrinolytic Enzyme Production by *Bacillus subtilis* KCK-7 Isolated from Korean Traditional Chungkookjang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 : 226 - 231(1998)
- Kil Ji Oeun, Kim Gi Nam and Park In Shik. Production and Characterization of Fibrinolytic enzyme : Optimal Condition for Production of the Enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 Isolated from Chungkook-jang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27 : 51 - 56 (1998)
- Annual report on the cause of death statistics. National Statistical Office, Republic of Korea. (2001)
- Suzuki, S., Hinokio, Y., Komatu, K., Ohtomo, M., Onoda, M., Hirai, S., Hirai, M., Hirai, A., Chiba, M., Kasuga, S., Akai, H. and Toyota, T. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45, 161-168.(1999)
- De Mattia, G., Laurenti, O. and Fava, D. Diabetic endothelial dysfunction. Effect of free radical scavenging in Type 2 diabetic patients. *J. Diabetes Complications* 17, 30-35. (2003)
- Cha, J. Y. and Cho, Y. S. Effect of stem bark extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentrations and tissue lipid peroxidation in the cholesterol-fed rats. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33, 128-134. (2001)
- Cha, J. Y. and Cho, Y. S. Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28, 1131-1136. (1999)
- Iwai, K., Nakaya, N., Kawasaki, Y. and Matsue, H. Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3597-3601. (2002)
- Iwai, K., Nakaya, N., Kawasaki, Y. and Matsue, H. Inhibitory effect of natto, a kind of fermented soybeans, on LDL oxidation in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3592-3596. (2002)
- Rashid, M. H. O., Kato, F., Murata, A. and Kondo, M. Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 45-53. (1993)
- Rashid, M. H. O, Kato, F., Murata, A. and Kondo, M. Purification and

- characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus oryzae*. Bull. Fac. Agr. Saga Univ. 75, 45-53.(1993)
- Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F. and Chou, S. T. Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. Agric. Food Chem. 50, 2454-2458. (2002)
- Kato, F., Nakazato, I., Shiraishi, T., Hayashi, K., Murata, A. and Yone, Y. Screeninig for antioxidative activity in microorganisms (Utilization of waster fish treated with microoganisms. Part 1). Nippon Nogeikagaku Kaishi 59, 901-907.(1985)
- Lin, M. Y. and Yen, C. L. Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms. J. Dairy Sci. 82, 1629-1634. (1999)
- Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 26, 1199-1204. (1958)
- Schnaitman, C., Erwin, V. G. and Greenwalt, J. W. The submitochondrial localization of monoamine oxidase; An enzymatic marker for the outer membraine of rat liver mitochondria. J. Cell Biol. 32, 719-723. (1967)
- Duncan, D. B. Multiple range and multiple F tests. Biometrics 1, 1-42. (1959)
- Wong, S. F., Holliwell, B., Richimond, R. and Skowroneck, W. R. The role of superoxide and hydroxyl radical in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. J. Inorganic Biochem. 14, 127-134. (1981)
- 65) Ottolenghi, A. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. Arch Biochem. Biophys. 79, 355-461. (1959)
- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. and Manley, M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. J. Agric. Food Chem. 51, 902-909. (2003)
- Cha, J. Y., Kim, H. J., Chung, C. H. and Cho, Y. S. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28, 1310-1315. (1999)
- Park, J. C., Choi, J. S. and Choi, J. W. Effects of the fraction from the leaves, fruits, stems and roots of *Cudrania tricuspidata* and flavonoids on lipid peroxidation. Korea J. Pharmacogn. 26, 377-384. (1995)

- Cha, J. Y., Kim, H. J. and Cho, Y. S. Effect of water-soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in tissues of rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29, 531-536. (2000)
- Kim, H. J., Cha, J. Y., Choi, M. R. and Cho, Y. S. Antioxidative activities by water-soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Agric. Chem.* 43, 148-152. (2000)
- Johnson, J. E., Walford, R., Harma, D. and Miquel, J. In 'Free radicals, aging and degenerative disease', Alen R. Liss, N.Y.(1986)
- Plaa, G. L. and Witschi, H. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 16, 125-131. (1976)
- Cha, J. Y. and Cho, Y. S. Effects of α -linolenic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on the content and fatty acid composition of brain phospholipid in rats. *Agric. Chem. Biotechnol.* 42, 75-80. (1999)
- Choi, J. H., Kim, D. I., Park, S. H., Baek, Y. H., Lee, H. S. and Ryu, K. S. Effects of mulberry(*Morus alba* L.) leaf extract on oxidative stress and membrane fluidity in brain of SD rats. *Korean J. Life Sci.* 10, 354-361. (2000)
- Cha, J. Y. and Cho, Y. S. Antioxidant activity of extracts from fruit of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30, 547-551. (2001)
- Lee, Y. S., Yoo, J. S., Chung, S. Y., Park, C. S. and Choi, Y. L Microbial immobilization, characterization and isolation of nitrogen oxidizing bacteria. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 46, 7 - 11 (2003)
- APHA, AWWA, WEF. In standard Methods for the Examination of Water Wastewater (18th ed) Washington D. C. (1992)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 1차년도 (2004년)

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도(점수)
1차년도 (2004년)	•면역강화물질 함유 전통발효식품의 탐색 및 수집	25
	•전통발효식품으로부터 면역증강물질 생산 균주의 분리 및 최적조건확립	25
	•전통장류에서 면역증강 물질 생산 균주 분리 동정 및 최적생산조건의 확립과 효소의 특성조사	25
	•전통장류에서 항산화물질 생산 균주 분리 동정 및 최적생산조건 확립	25

1. 2차년도 (2005년)

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도(점수)
2차년도 (2005년)	• 분리 미생물 유래 간기능개선물질 대량생산 기술개발	10
	• 면역증강물질이 강화된 발효식품의 개발	20
	• 분리 chitinase, chitosanase 생산 미생물 유전자의 탐색	15
	• 분리 우수 미생물을 이용한 키토올리고당 함유 계장 제조기술 개발	20
	• 분리 항산화물질생산 미생물 유전자의 탐색	15
	• 분리 우수 미생물을 이용한 항산화능 및 혈전분해능이 우수한 청국장 제조기술 개발	20

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 산업화의 계기로 인하여 전통발효식품의 표준화와 더불어 기능성 면역증진 물질에 대한 관심이 대두되면서 발효를 위한 미생물의 과학화와 고기능성 발효식품의 개발이 절실히 요구하게 되었다.
2. 전통발효식품은 발효과정 중 미생물이나 효소의 기능에 의해 여러 가지 면역증강물질이 전환 생성되어 여러 가지 유용한 생리활성기능을 나타낸다. 따라서, 이러한 미생물의 자원을 탐색하고 특성을 조사하는 것은 고기능성 전통발효식품의 개발을 가능하게 한다.
3. 전통발효식품 유래 면역증강물질 전환에 관여하는 미생물의 탐색은 식품발

효 뿐 아니라 식생활의 서구화나 여러 가지 환경 요인에 의해 발생하는 생활 습관병에 대한 완화 또는 예방을 위한 정보를 제공할 수 있는 중요한 연구이다.

4. 면역증강물질은 주로 기능성 식품 제조의 첨가물로서의 활용으로 상승효과를 얻으려고 하는것이 대다수이지만, 면역증강물질 생산 미생물의 탐색과 분리를 통하여 국내 전통발효식품 자체가 우수한 기능성 식품으로 각광 받을 수 있는 측면을 가지고 있다.

5. 특히, 키토올리고당은 복잡한 공정을 통하여 생산되어 고가로 판매되어지고 있어 이를 이용한 기능성 식품의 경우 가격이 비싼 단점을 가지고 있다. 하지만, 전통발효과정 중에 chitinase 및 chitosanase 생산 균주의 탐색과 재조합을 통한 우수한 미생물의 개발은 갑각류를 이용한 계장이나 젓갈 제조시 전통발효식품 자체에 높은 농도의 키토올리고당으로 전환 시킬 수 있는 장점을 가지고 있어 널리 이용되고 있는 전통발효식품에 면역증강물질의 강화라는 우수한 결과를 가질 수 있다.

6. 전통장류의 발효에 관여하는 미생물의 정확한 역할에 대해 아직 연구가 미흡한 실정이다. 따라서, 발효에 관여하면서 면역증강물질로 전환 생성하는 미생물의 탐색과 활용은 전통장류의 품질개선과 우수한 기능성 신제품개발을 위한 기반을 조성할 수 있는 큰 장점을 가진다.

7. 또한, 전통장류의 제조시 게나 새우 부산물을 이용하여 기능성 전통 장류 제조기술 개발은 지금까지 이루어진 적은 없으며 기술적, 경제적으로 획기적인 기능성 전통장류의 개발이라 할 수 있다.

8. 산업사회의 급격한 발전은 재래식 방법으로 제조 되던 전통발효식품의 상품화를 가능하게 하여 높은 매출을 가지고 있다. 하지만, 식생활이 서구화에 따라 간편한 식생활을 추구하고 있는 현대인들에게 전통발효식품의 기능적 강화를 통한 상품화는 소비시장의 높은 성장을 이루어 낼 수 있는 장점을 가진다.

9. 최근 활발한 연구가 이루어지고 있는 생리활성물질의 탐색을 통한 고기능성 생리활성물질의 개발은 그 제조 공정의 복잡성과 함께 높은 가격을 형성하고 있어 경제적 부담을 안고 있다. 하지만, 전통발효식품 자체의 면역증강 기능의 강화를 이루어 저가의 고기능성 식품의 개발이 가능하게 된다. 이를 통해 면역증강물질이 강화된 전통발효식품의 개발은 상품화를 위한 식품 산업의 발전과 더불어 고수의 산업의 창출이 가능하게 된다.

10. 또한, 전통발효식품 발효과정상 면역증강물질 생산 미생물의 탐색은 고부가가치 생물 산업의 자원보고로서의 가치를 가져 국외 생물 산업으로의 미생물 수출을 통한 국가 산업의 우수성을 확보할 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 결과의 활용

1. 특허출원 및 상품화

- 가. 전통발효식품 유래 유용미생물에 대한 기능적 고찰을 통한 특허출원
- 나. 가능성이 높은 전통발효식품의 개발은 관련업체를 통한 시제품

2. 논문발표

- 가. *Bacillus* sp. FF-7에 의한 향산화물질 생산과 향산화활성
- 나. 전통발효주로부터 glutathione 고함유효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 분리, 동정 최적 생산조건

3. 논문 투고준비 중

- 가. *Bacillus* sp. FF-7이 생산하는 혈전용해효소의 특성
- 나. 된장으로부터 chitinase생산균주의 분리 및 특성

제 2 절 활용 계획

- 1. 향후 분리균주의 특성 연구를 완료 후 특허출원을 실시하여 기술이전을 위한 방안을 모색할 계획임.
- 2. 분리균주의 새로운 생리활성물질의 탐색을 통하여 우수한 장류개발의 지표를 마련할 예정임.
- 3. 분리균이 생산하는 생리활성물질은 식품 뿐 아니라 의약품의 원료로서의 가치를 위한 연구를 수행 예정임.
- 4. 참여기업에 기술이전을 통하여 시제품 실시

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음.

제 7 장 참고문헌

각 절에 삽입되었음.