

GOVP1:199903729

664.024
2932

최 종
연구보고서

전통 장류에 존재하는 항돌연변이성
신 색소에 관한 연구

Study on Novel Antimutagenic Pigment in
Traditional Soy Sauce and Soybean Paste

영 남 대 학 교

유 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “전통 장류에 존재하는 항돌연변이성
신 색소에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다

1998. 11. 30.

주관연구기관명 : 영남대학교

총괄연구책임자 : 김 종 규

연 구 원 : 조 윤 래

연 구 원 : 최 명 락

연 구 원 : 이 은 주

연 구 원 : 신 옥 선

연 구 원 : 이 은 희

연 구 보 조 원 ; 김 정 득

연 구 보 조 원 ; 이 효 진

여 백

요 약 문

I. 제 목

전통 장류에 존재하는 항돌연변이성 신 색소에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가. 연구개발의 목적

- 전통 장류에 존재하는 신 항돌연변이성 물질의 구조, 기능성 및 세포에 대한 유해성 여부 등을 규명하여 여러 분야(의약품, 기능성 건강 식품)에서 이 물질을 이용하기 위한 과학적 연구를 하고자 한다.
- 기능성을 지닌 전통 장류를 제조 할 수 있는 발효균의 개발로 기능성 색소 물질이 포함된 전통 장류의 새로운 제법을 개발하는 자료로 사용하고자 한다.
- 새로운 생리 활성 물질인 색소를 생성하면서, 단일균 발효로 한국 전통 장류를 제조할 수 있는 *Bacillus species* SSA3의 분류학상 정확한 위치를 확인하고자 한다.

나. 연구개발의 중요성

1) 기술적 측면

- 항돌연변이성 신 색소는 우리 나라 전통 장류에만 존재하며, 이전에는 분석, 보고 된 바가 없는 새로운 물질로써 이 물질의 구조와 여

러 가지 약효의 규명이 필요하다.

Bacillus species SSA3이 생성하는 이 신 색소는 전통 장류에서의 기능적 역할뿐만 아니라 더 나아가서는 이 색소 자체를 항돌연변이성(항암성) 의약품, 기능성 식품과 식품 첨가물 등으로의 개발이 가능하다.

2) 경제. 산업적 측면

기능성을 지닌 전통 장류를 제조할 수 있는 발효균의 개발로 기능성 전통 장류의 대량 생산이 가능하다.

새로운 항돌연변이성 색소를 의약품 및 기능성 식품, 기능성 식품첨가물의 개발에 따른 상업화의 가능성이 크므로 경제적인 의의가 크다.

전통 간장, 된장의 제조 시 색의 자유로운 조정으로 소비자의 기호에 따라 다양한 제품의 전통 장류의 생산이 가능하다.

전통 장류의 우수성에 대한 입증으로 전통 장류의 수요를 증진시킨다.

안정적인 고기능성 식품을 요구하는 선진 국민들의 기호 충족으로 전통 장류의 세계 식품화가 가능하다.

3) 사회. 문화적 측면

전통 장류에 존재하는 물질이므로 이의 규명으로 전통 장류의 독특하고 우수한 품질이 입증된다.

전통 장류의 세계 식품화에 따라 우리 나라의 식문화를 널리 알릴 수 있다.

이 항돌연변이성 물질은 새로이 밝혀진 신 색소로써 색소 자체로서

의 의미도 매우 크다.

신 항돌연변이성 물질은 새로운 생리 활성 물질로 우리 나라 장류에서 처음 밝혀짐으로써 그 의의가 크다.

III. 연구개발 내용 및 범위

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
<ul style="list-style-type: none"> • 색소의 대량 생산 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus</i> sp. SSA3을 이용하여 색소의 대량 생산 및 최적 생산 조건 조사
<ul style="list-style-type: none"> • 색소의 정제 방법의 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 색소의 정제 방법의 확립 <ul style="list-style-type: none"> - Thin layer chromatography - Ion exchange chromatography - preparative HPLC
<ul style="list-style-type: none"> • 색소의 구조 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 색소의 구조 분석 <ul style="list-style-type: none"> - $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$-NMR spectroscopic analysis - Mass spectroscopic analysis - IR spectroscopic analysis - Atomic absorption analysis - Elementary analysis - Qualitative analysis - 구조 분석(해석)
<ul style="list-style-type: none"> • 색소의 기능성 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 정제 색소들의 항돌연변이성 및 항암성 <ul style="list-style-type: none"> - 항돌연변이성 - 세포증식활성 - 활성산소종 제거능 - 항암성 및 암세포 성장억제능 측정 <ul style="list-style-type: none"> : 정제 색소가 미치는 인터페론의 생산 효과 : Apoptosis 유도능의 평가
<ul style="list-style-type: none"> • 색소 생성 관여 gene 	<ul style="list-style-type: none"> • 색소 생성 관여 gene
<ul style="list-style-type: none"> • 색소 생성 균주의 동정 	<ul style="list-style-type: none"> • 색소 생성 균주의 동정

IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구 개발 결과

전통 장류에 존재하는 짙은 갈색 색소는 *Bacillus* species SSA3이 tyrosine으로부터 생성한다. 이 신 색소를 의약품 및 기능성 식품으로 개발하기 위해 인체에 대한 유해성 등을 규명하고자 하였다.

1. 색소의 대량생산

Bacillus sp. SSA3을 시험관에서 배양한 결과 최소 배지에서 배양 온도는 30℃, 배지의 초기 pH는 9, tyrosine농도는 0.1%에서 색소 생성이 최적이었다. 이 조건에서 jar fermentor에서 대량 생산을 시도한 결과 air flow는 배지 3ℓ에 5psi까지 초기 색소 생성이 증가하였고 14일 이후에는 air flow가 3psi 이상은 동일한 생산량을 나타내었다.

2. 색소의 정제

TLC로 색소를 정제하면 색소가 분해된다. 색소의 정제는 원심 분리, 강 이온 교환 수지, HPLC 및 methanol에 대한 용해성 등으로 정제를 할 수 있었으며, 원심 분리 액에서 methanol에 용해하는 색소들(TMS)은 배지 ml당 234~354 μ g, methanol에 용해되지 않는 색소들(TMI)은 배지 ml당 129~431 μ g까지 얻을 수 있었다. 최종 정제 과정에서 역상 column(Waters. Nova-Pak. C₁₈)을 이용한 HPLC를 2~3회 반복함으로써 거의 순수한(95%이상) 단일 peak의 색소들을 얻을 수 있었다.

3. 색소의 구조

정성 분석, ^1H , ^{13}C NMR, MASS, IR, 원소 분석을 이용하였다. 당과 지질은 없었으며, 구조 분석에서 3TMS-2는 분자량이 2355, 화학식은 $5\text{C}_4\text{H}_1\text{O}_{21}\text{N}_3\text{S}$, 분자 중에는 $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{R}$, $-\text{OCH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$, tyrosine 등이 존재한다.

2TMS-3은 분자량이 2046, 화학식이 $2\text{C}_{13}\text{H}_5\text{O}_{44}\text{N}_9\text{S}$, 분자 중에는 $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{R}$, $-\text{OCH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$ 및 tyrosine 등이 존재한다.

3TMI-2는 분자량이 2408, 화학식이 $4\text{C}_9\text{H}_2\text{O}_{27}\text{N}_2\text{S}$, 분자 중에는 $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{R}$, $-\text{OCH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$, $-\text{COOH}-$ 및 tyrosine이 존재한다.

2TMI-3은 분자량이 2205, 화학식이 $7\text{C}_5\text{H}\text{O}_{15}\text{N}$, 분자 중에는 $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$, $-\text{COOH}-$ 및 tyrosine이 존재한다.

4. 색소의 기능성

정제로 얻은 최종 색소획분 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및 2TMI-3은 aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이성이 우수하며, 특히 $200\mu\text{l}/2\text{ml}$ 의 2TMS-3은 $1\mu\text{g}/2\text{ml}$ 의 aflatoxin B₁에 대해 99.82%의 항돌연변이능을 갖고 있다. 색소는 SOD에 대한 활성은 거의 없으나 활성산소종 제거능은 78~99%까지를 갖고 있으며, $[P]=\kappa[X][Y][Z]$ (P =chemiluminescence, κ =photon constant, $[X]$ =active oxygen radical species ; oxidant, $[Y]$ =antioxidant, $[Z]$ =receptor; prooxidant)에서 Z로서 작용하고 있다.

항암성은 2TMI-3을 제외한 다른 획분들은 정상 세포 (CCL-13 ; Human normal liver cell)에는 거의 영향을 미치지 않으면서 암세포

(HepG₂ ; Human liver cancer cell)만을 37~48%를 죽이는 선택성을 가지며, 또 암세포의 증식 억제능을 가지고 있다. 그러나 apoptosis능은 없었다. Interferons 생산을 17~23% 증가시키는 아주 우수한 기능성을 지니고 있다.

5. 색소 생성 관련 유전자

항돌연변이성 색소 생성에 관여하는 유전자의 sequencing을 위해 *Bacillus* sp. SSA3의 chromosomal DNA를 *E. coli* DH5 α 에 형질 전환을 시도한 결과 어떠한 방법으로도 색소 유전자가 recombination 된 것을 확인 할 수 없는 점에서 색소 생성에 관여하는 유전자는 복수의 유전자로 사료된다.

6. *Bacillus* sp. SSA3의 동정

16S rRNA sequence를 비교하여 phylogenetic tree를 조사해 본 결과, 신 종균임을 확인 할 수 있었다.

본 신 색소는 우리 국민들이 오랫동안 장류를 통해 섭취해 오던 물질이며, 그 기능성이 우수하고 인체에 유해성이 거의 없으므로 의약품, 기능성 건강식품 및 기능성 식품첨가물로 이용 가능하리라 사료된다.

나. 연구 결과의 활용에 대한 건의

- 전통 간장 및 된장의 건강 식품화에 따른 세계 식품화
- 본 항돌연변이성 신 색소를 이용한 새로운 의약품 개발
- 이 신 색소를 이용한 새로운 건강식품 개발
- 의약품이나 건강식품 개발 연구 및 기업화
- 기능성 식품첨가물로 개발
- 항돌연변이성 신 색소의 연구 결과에 대한 세계 특허를 획득한다.
- 산업체와의 연계를 통해 신 색소를 함유한 장류 제조 및 건강 식품 제조를 위한 공장 생산화를 시도한다.
- 이 연구를 바탕으로 색소 생성 mechanism의 규명, 색소 생성 효소의 확인, 이들 효소의 고정화에 의한 색소 생성 등의 후속 연구를 시도한다.

Summary

I . Title of Research

Study on Novel Antimutagenic Pigment in Traditional Soy Sauce and Soybean Paste

II . The Objective and Importance of Research

1. The Objective of Research

- Dark brown pigments in traditional Korean soy sauce and soybean pastes are produced from tyrosine by *Bacillus* species SSA3. We have studied to develop pharmaceuticals and functional foods from the pigments.
- We hope use of this data for development of manufacturing method of traditional soy sauce and soybean paste contained the bioactive pigments.
- We will classify *Bacillus* species SSA3 which can produce traditional Korean soy sauce and soybean paste.

2. The Importance of Research

Traditional Korean soy sauce and soybean paste contain the pigments which are produced by *Bacillus* sp. SSA3. The pigments have bioactivity such as inhibition of activity of

aflatoxin B1.

So, it is very important that we investigate many kinds of bioactivities, mass producing conditions, and structure etc. of the pigments, because we can develop pharmaceuticals, and bioactive foods and food additives which have technical, economical and industrial, and social and cultural importance.

III. Research Contents and Scope

Contents	Scope
<ul style="list-style-type: none"> • Mass production of pigments 	<ul style="list-style-type: none"> • To survey of optimal mass production conditions of the pigments producing by <i>Bacillus</i> species SSA3.
<ul style="list-style-type: none"> • Purification of pigments 	<ul style="list-style-type: none"> • To develop new purifying protocol of the pigments. <ul style="list-style-type: none"> - Thin layer chromatography - Ion exchange chromatography - preparative HPLC
<ul style="list-style-type: none"> • Structures of pigments 	<ul style="list-style-type: none"> • Structures of pigments <ul style="list-style-type: none"> - ¹H, ¹³C-NMR spectroscopic analysis - Mass spectroscopic analysis - IR spectroscopic analysis - Atomic analysis - Elementary analysis - Qualitative analysis - interpretation of the data on the structure of pigments.
<ul style="list-style-type: none"> • Functional properties of the pigments 	<ul style="list-style-type: none"> • To survey bioactivity of the purified pigments <ul style="list-style-type: none"> - Antimutagenecity - Activity on cell growth - Removing ability of active oxygen radical species - Anticancer's properties and inhibiting activity on the growth of cancer cells <ul style="list-style-type: none"> : effect of the purified pigments on the production of interferons : Apoptosis
<ul style="list-style-type: none"> • The pigments genes 	<ul style="list-style-type: none"> • The pigments genes
<ul style="list-style-type: none"> • Identification of <i>Bacillus</i> species SSA3 	<ul style="list-style-type: none"> • Identification of <i>Bacillus</i> species SSA3

IV. Result of Study and Application Plan

1. Result of Study

1) Mass production of the pigments

During culture in test tube, *Bacillus* sp. SSA3 produced the most pigments, when the cells grew at 30°C, initial medium pH 9, and 0.1% tyrosine concentration in medium, Oxygen had to lead to produce the pigments.

2) Purification of the pigments

The pigments are modified according to acting of silica gel on TLC plate during TLC. The pigments are purified above 95% by means of centrifugation, ion exchange chromatography, HPLC, and methanol and water solubility. The methanol soluble pigments(TMS) were collected 234~354 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of medium and the methanol insolubles pigments (TMI) were collected 129~432 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of medium.

3) The structure of the pigments

The structures of the pigments were analyzed by qualitative analysis, ^1H and ^{13}C -NMR, Mass, IR and elementary analysis, The pigments did not contain glucides and lipids.

The structure of 3TMS-2 had $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{R}-$, $-\text{OCH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$, and one molecule of tyrosine. : molecular weight ; 2355 and formula ; $5\text{C}_4\text{H}_1\text{O}_{21}\text{N}_3\text{S}$. The structure

of 2TMS-3 had $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{R}-$, $-\text{OCH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$ and one molecule of tyrosine. : molecular weight ; 2046 and formula ; $2\text{C}_{13}\text{H}_5\text{O}_{44}\text{N}_9\text{S}$.

The structure of 3TMI-2 had $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{R}-$, $-\text{OCH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$, $-\text{COOH}-$ and one molecule of tyrosine. : molecular weight ; 2408 and formula ; $4\text{C}_9\text{H}_2\text{O}_{27}\text{N}_2\text{S}$.

The structure of 2TMI-3 had $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$, $-\text{COOH}-$ and one molecule of tyrosine. : molecular weight ; 2205 and formula ; $7\text{C}_5\text{HO}_{15}\text{N}$.

4) The bioactivity of the pigments

The pigments, 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 and 2TMI-3 had high antimutagenicity on aflatoxin B₁, especially antimutagenicity of 2TMS-3 was 99.82% on aflatoxin B₁. The pigments did not affect on SOD activity, but removed 78~99% of active oxygen radical species. The pigments were Z in $[\text{P}]=k[\text{X}][\text{Y}][\text{Z}]$ (P=chemiluminescence, k=photon constant, X=active oxygen radical species ; oxidant, Y=antioxidant, and Z=receptor ; prooxidant).

The pigments such as 3TMS-2, 3TMI-2 and 2TMI-3, killed 37~48% of human liver cancer cells(HepG2) but did not kill human normal liver cells(CCL-13).

The pigments promoted production of interferons.

The pigments did not have ability of apoptosis.

5) The pigments genes

We reasoned that many genes related to biosynthesis of the pigments.

6) Identification of *Bacillus* sp. SSA3

Bacillus sp. SSA3 was *novo* species.

2. Application Plan of Research Results

- Development of pharmaceuticals
- Developments of bioactive foods
- Developments of food additives
- Making public through technical journals and mass media
- Patent acquisition
- Patent transfer to use

CONTENTS

Presentation note -----	1
Abstract(in Korean) -----	3
Summary(in English) -----	11
Contents(in English) -----	17
Contents(in Korean) -----	19
Chapter 1. Introduction -----	21
Chapter 2. Status of Art in Domestic and Abroad --	26
1. Present status of domestic and foreign researches---	26
A. Foreign researches -----	26
B. Domestic researches -----	26
2. Present situation of our study on the domestic and foreign researches. -----	27
Chapter 3. Contents and Results of Research -----	28
1. Mass production of pigments -----	28
2. Purification of pigments -----	51
3. Functional properties of the pigments -----	76
4. Structures of pigments -----	128

5. The pigments genes -----	181
6. Identification of <i>Bacillus</i> species SSA3 -----	183
Chapter 4. Achievement of study and Contribution -	201
Chapter 5. Application Plan of Research Results ---	206
Chapter 6. Reference -----	207

목 차

제출문	1
요약문	3
Summary	11
Contents	17
목차	19
제 1 장 서 론	21
제 1 절 연구 개발의 목적과 범위	21
제 2 장 국내외 기술 현황	26
제 1 절 국내외의 기술개발 현황	26
제 2 절 연구 결과가 국, 내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치	27
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과	28
제 1 절 색소의 대량 생산	28
제 2 절 색소의 정제	51
제 3 절 색소의 기능성	76
제 4 절 색소의 구조	128
제 5 절 색소 생성 관련 유전자의 분리	181
제 6 절 전통 장류 중 갈색 색소 생성 미생물의 동정	183

제 4 장 연구 개발 목표 달성도 및 대외 기여도-----	201
제 1 절 연구 개발 목표 및 달성도-----	201
제 2 절 대외 기여도 -----	205
제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획-----	206
제 6 장 참고 문헌-----	207

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 목적과 범위

조미 식품으로써 일반 가정에서 널리 식용으로 이용되어 오고 있는 우리 고유의 전통 간장과 된장 중에는 항암성 물질과 항돌연변이성 물질이 존재하고 있어, 간혹 간암 유발 물질인 aflatoxin이 발견되어도 우리의 인체에는 별 영향 없이 우리들의 식단에 중요한 위치를 차지해 오고있다. 그러나 장류 중의 어떠한 물질이 강력한 간암 유발 물질인 aflatoxin의 활성을 억제하는 지, 또한 간암 유발 mechanism상에 어떻게 작용하는 지 등에 대한 연구는 전무한 상태이다. 이러한 상황에서 본인 등은 melanin이나 melanoidin이 아닌 신 색소를 전통 간장에서 발견하였으며, 특히 이 신 색소는 aflatoxin의 돌연변이성을 약 50% 정도 약화시킬 수 있는 강력한 항돌연변이성이 있음을 발견하였다. 또한 단일균 발효로 장류를 제조할 수 있는 *Bacillus* sp. SSA3에 의해 아미노산인 tyrosine으로부터 이 흑갈색의 신 색소가 생성된다는 사실도 밝혔다.^{1,2,25)}

미생물이 생성하는 색소에 관한 연구는 오랜 기간 동안 이루어져 왔다.³⁻⁸⁾ Gessard (1901), Munschel(1922) 및 Dawid(1973) 등은 *Bacillus* species의 변종(variety)에 따라서는 melanin을 형성한다고 하였고,³⁻⁵⁾ Schaeffer(1953)는 *Neurospora crassa*가 melanin(흑색소 성분)을 생성함을 보고하고 있다. 이와는 달리 Barnett(1982)에 의하면 melanin이 아닌 세포 밖에서 비효소적인 경로(nonenzymetic pathway)로 형성되는 수용성 색소를 보고하였고 특히, *Bacillus subtilis*는 갈색 색소(brown pigment)를 세포 밖에서 5종을 생성하고 이 중 1종류가 포자 형성과 관계가 있음을 입증하고 있다.^{8,9)}

또한, Barnett(1982)는 *Bacillus subtilis*가 성장 중에 색소 전구 물질

(pigment precursors) 을 세포 밖으로 분비하는데 이 precursors로부터의 색소 형성은 O_2 와 Mn^{2+} 을 요구하고 염기 의존성(base-dependent)이며, 비 효소적 경로(nonenzymetic pathway)로 합성됨과 tyrosine, histidine이 색소 형성을 촉진함을 밝히고 있다.⁸⁾

한편, 박 등(1986)은 한국 된장 중에 존재하는 *Bacillus subtilis* 중에서 어떤 균주는 tyrosine으로부터 흑갈색 색소(dark brown pigment)를 생성하며 이는 tyrosine에 의해 생성된다고 보고하고 있다.¹⁰⁾ 그러나 이는 Barnett(1982)의 보고와는 매우 상반되는 보고이다.⁸⁾

저자 등은 한국 재래식 간장과 된장에서 흑갈색 색소(dark brown pigment)를 생성하는 SSA3균을 분리 동정한 결과, *Bacillus licheniformis* 이었다.^{11,12)} 이 *B. licheniformis* SSA3은 tyrosine 첨가 배지에서 4종의 수용성 갈색 색소(brown pigment)를 생성하는데 이 4종의 색소를 혼합하면 한국 재래식 간장 중 짙은 흑갈색(dark brown color) 간장과 비슷한 색을 나타내며, thin layer chromatography(TLC)로 확인한 결과, 흑갈색인 재래식 간장의 색소 4 종류 중 3 종류와 Rf치가 동일함을 본 실험실에서 확인 하였다.

B. species SSA3은 또한 pH 5의 alanine 첨가 배지에서도 수용성 갈색 색소를 형성하였다. 그러나 *B. sp.* SSA3의 his-, met-, tyr⁺, ala⁺인 영양 요구성 돌연변이주는 tyrosine에서 색소를 형성치 않고, alanine에서는 색소를 형성하였으며 tyrosine에서 색소를 형성할 때는 O_2 요구성이었다. *B. sp.* SSA3이 생성하는 색소는 tyrosine에서 효소적으로 합성되는 양이온성 물질이며 H_2O 와 NH_4OH 에 용해되고 ethanol, acetone 및 chloroform 에는 불용성으로 *B. subtilis*가 생성하는 갈색 색소와는 전혀 다른 아직 보고되지 않은 새로운 색소(novel pigment)로 판명되었다. 한국 재래식 간장은 흑갈색과 갈색 2종류로 구분할 수 있는데 갈색인 간장에 O_2 를 공급함으로써 흑갈색으로 변화함이 보고되어 있고,¹³⁻¹⁶⁾

한편 일본 간장과 된장(미소) 제조 시 단백질과 전분의 가수분해 효소

의 생성원으로 사용하는 국균인 *Aspergillus oryzae*는 polyphenolase의 생성능이 약하기 때문에 변색을 적게 하며, 종국포자가 2×10^9 당 세균 수가 10^{3-4} 인 중국이 일본에서는 시판되고 있는데¹⁷⁾ 일본 장류 발효 시 색소 생성은 중국의 종류와 중국에 오염(contamination)되어 있는 세균의 종류에 따라 결정된다. 또한 비효소적 갈변 반응(maillard reaction)에 의해서도 색소가 형성되나 이는 일부에 지나지 않는다.¹⁸⁻²⁰⁾

한국 전통 장류는 우리 나라 국민에게는 없어서는 안될 조미 식품으로써 년 1조원 이상을 각 가정에서 생산 소비하고 있는 실정이다.²¹⁻²³⁾

현재 각 공장에서 생산하는 간장과 된장은 각 가정에서 생산하는 전통 재래식 간장 및 된장과는 풍미(맛과 향기)면에서 많은 차이가 있기 때문에 재래식 간장 및 된장과 비슷하거나 같은 풍미를 지닌 제품을 생산할 수 있는 기술 개발이 필요하다.²¹⁻²³⁾

한국 재래식 간장과 된장의 향과 맛을 생성하며 간장의 흑갈색의 색소도 생성할 수 있는^{11,24,25)} *B. sp. SSA3*을 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Torulopsis versatilis*의 세포 융합주인 Hybridoma ST723-F31과 함께 삶은 과쇄 대두에 배양함으로써 메주나 국의 제조 과정 없이 3주 이내에 한국 재래식 간장의 풍미를 지닌 제품을 제조할 수 있다.²⁶⁾ 한국 재래식 간장 및 된장 제조 시 색깔의 자유로운 조정(control)이 가능하도록, *B. sp. SSA3*에 의한 색소의 생성 요건과 이들 색소의 대량 생산, 색소의 정제 및 구조, 색소의 기능성(Function, Bioactivity), 색소 생성 유전자 및 색소 생성 균의 정확한 분류 등을 밝히고자 한다.

1. 기술적 측면

- 우리의 전통 장류는 혼합 균주에 의한 복합 발효로 제조되므로 유익한 물질과 유해한 물질이 함께 존재할 수 있다.
- 우리의 전통 장류는 코오지 균으로 제조하는 일본 미소 제조 방

- 식으로 만드는 공장산 된장과는 맛과 향 등의 품질이 매우 다르므로 현 공장산 된장만으로는 소비자의 기호를 충족시킬 수 없다.
- 전통 장류도 현대 제법으로 제조하기 위해서는 균을 선별하여 제조하여야 한다.
 - 균을 선별할 때 전통 장류 중 유익한 물질의 기능성을 부여할 필요가 있다.
 - 항돌연변이성 신 색소는 우리 나라의 전통 장류에만 존재하고 일본 장류에서는 물론 분석 보고된 바가 없으며 다른 어떠한 곳에서도 존재함이 보고된 바가 없다.
 - 신 색소는 새로운 물질이므로 이것의 구조, 생성 mechanism 및 항돌연변이성 기작의 규명에 대한 필요성이 요구되고, 특히 동물 세포에서 항돌연변이성의 기작을 규명함으로써 우리 나라의 첨단 기술을 한 단계 높일 수 있다고 사료된다.
 - 이 신 색소는 전통 장류에서의 역할뿐만이 아니고 더 나아가서는 이 색소 자체를 항돌연변이성(암발생 억제) 의약품으로 개발이 가능하고, 또한 다른 식품에도 이용하여 기능성 식품과 식품첨가물로 개발이 가능하다고 사료된다.

2. 경제 · 산업적인 측면

새로운 항돌연변이성 색소를 의약품으로 상업화가 가능하므로 경제적인 의의가 크다.

전통 간장, 된장의 제조 시 색의 자유로운 조정으로 다양한 제품의 전통 장류의 생산이 가능하다.

전통 장류의 우수성에 대한 입증으로 전통 장류의 수요를 증진시킬 수 있다.

안정적인 고기능성 식품을 요구하는 선진 국민들의 기호 충족으로

전통 장류의 세계 식품화가 가능하다.
기능성 식품 또는 기능성 식품첨가물로 개발이 가능하다.

3. 사회적인 측면

- 전통 장류에 존재하는 물질이므로 이의 규명으로 전통 장류의 독특하고 우수한 품질이 입증된다.
- 우리 나라 전통 장류의 우수 품질 입증으로 우리 나라의 식문화적 측면의 우수성을 입증하고 세계에 알릴 수 있다.
- 세계 식품화에 도움이 되므로 우리 나라의 식문화를 널리 알릴 수 있다.
- 새로운 항돌연변이성 물질은 새로이 밝혀진 색소로써 그 자체로서의 의미도 매우 크다.
- 이러한 색소가 우리 나라 장류에서 처음 밝혀짐으로써 그 의의가 크다.
- 신 항돌연변이성 물질은 새로운 생리 활성 물질이다.

제 2 장 국내외 기술 현황

제 1 절 국내외의 기술개발 현황

가. 국외의 경우

우리 나라의 전통 장류에서만 존재하기 때문에 이 신 색소에 관한 직접적인 연구보고는 없지만 연구해야 할 단계별로 비교하면 다음과 같다.

항 목	국 내	국 외
가) 신 물질 발견	비슷함	비슷함
나) 신 기능성 물질 발견	비슷함	비슷함
다) 신 물질 (분자량 3,000 이하)의 구조 결정	미 약	매우 발달됨
라) 신 물질이 동물이나 동물 세포에 미치는 영향	미 약	매우 발달됨

나. 국내의 경우

본 연구에 대해서는 저자들이 발표한 두 논문뿐이다. 한편은 Novel antimutagenic pigment produced by *Bacillus* species SSA3, J. of Microbiology & Biotechnology, 5(1), 48-50, 1995 이고 다른 한편은 Optimal conditions for pigmentation in *Bacillus* species SSA3 and cloning of a DNA fragment involved in pigment production, J. of Microbiology & Biotechnology, 5(1), 22-25, 1995이다.

제 2 절 연구 결과가 국, 내외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치

본 색소는 신 종균(새로 발견된 균)에 의해서 생성되는, Aflatoxin B₁에 대한 높은 항돌연변이성을 지닌 점, 인간의 암을 20%이상 발생시킨다는 활성산소종을 SOD와 관계없이 제거할 수 있는 점과 정상 세포에는 작용하지 않으면서 암세포만을 억제하는 선택성 등을 지닌 점이 주목할 만하다.

이와 같은 신 색소는 선진국이나 우리 나라 등에서 아직까지 발견된 예가 거의 없으리라 본다. 특히, 이 색소는 우리 나라 국민이 옛날부터 섭취해 오고 있는 장류에 들어 있는 물질이어서 매우 중요한 발견 및 개발이라 사료된다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 색소의 대량 생산

본 연구실에서 분리한 균주인 *Bacillus* sp. SSA3은 단일균 발효로 전통 된장 및 간장을 제조할 수 있으며^{27,28)}, 전통 된장 및 간장에 존재하는 흑갈색(dark brown)의 항돌연변이성 신 색소(novel pigments)를 생성한다. *Bacillus* sp. SSA3이 생성하는 항돌연변이성 신 색소의 구조 분석을 위해서는 대량 생산의 조건을 조사할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 각종 배지와 여러 가지 배양 조건에서의 색소 생성능을 측정하여 색소 생산의 향상성과 대량 생산의 최적 조건을 검토하고자 하며, 또한 유전 공학적 기법을 이용하여 색소의 생산능과 분비능이 향상된 균주(*E. coli* C600-T, *E. coli* C600-I)를 육종하여 색소 생성 최적 조건을 비교하고자 하였다.

1. 재료 및 방법

가. *Bacillus* sp. SSA3을 이용한 색소의 대량 생산 및 최적 생산 조건

1) 균주 육종

Bacillus sp. SSA3의 색소 생성에 관여하는 genes(pSJ15)가 chromosomal DNA에 삽입되어 있는 *E. coli* C600-T에서 chromosomal DNA를 추출한 후 *Hind* III로 digestion하여 pBR322에 cloning을 시도하였다^{29,30)}. Cloning된 DNA를 *E. coli* C600 wild type에 형질 전환하여 색

소 생산성을 나타내는 균주를 선별하고자 하였으며, 선별된 균주를 여러 종류의 배양 조건에서 배양하여 원균주 *Bacillus* sp. SSA3의 색소 생성능과 균체의 성장을 비교하여 살펴보고자 하였다.

2) 색소의 최적 생성 조건

육종된 *E. coli* C600-T와 원균주 *Bacillus* sp. SSA3에 의한 색소의 최적 생성 조건을 조사하였다. *Bacillus* sp. SSA3 균주의 배양은 색소 형성에 영향을 미치는 요인을 제거한 최소 배지(Table 1) 20ml이 첨가된 test-tube(2×20cm)에 균을 접종한 후 pH, 온도, tyrosine의 농도 등을 달리하는 다양한 배양 조건하에서 색소의 생성 조건을 조사하였다. *E. coli* C600-T 균주의 경우는 최소 액체 배지에서 생육이 되지 않기 때문에 복합 배지인 LB배지(Table. 2)에서 *Bacillus* sp. SSA3과 동일 조건으로 배양하여 색소 생성력과 균체 증식력을 조사하였다.

Table 1. Composition of the minimal medium used for the culture of *Bacillus* species SSA3.

Components	Grams per liter
Dextrose	1.0
Dipotassium phosphate	7.0
Monopotassium phosphate	2.0
Sodium citrate	0.5
Magnesium sulfate	0.1
Ammonium sulfate	1.0

Table 2. Composition of the LB medium(Luria-Bertani medium) used for the culture of *Escherichia coli* C600-T.

Components	Grams per liter
Bacto-tryptone	10
Bacto-yeast extract	5
NaCl	10

가) 배양 온도에 따른 색소 생성의 변화

배양 온도에 따른 생육 및 색소 생성의 변화를 조사하기 위하여 배양 온도를 25℃, 30℃, 35℃, 40℃로 달리하여 각각 배양하였다.

나) 초기 pH에 따른 색소 생성의 변화

색소 생성용 배지의 초기 pH를 4, 5, 6, 7, 8, 9로 각각 조정하여 35℃에서 150rpm으로 정치 및 진탕 배양하면서 이에 따른 색소 생성 및 균 생육의 변화를 살펴보았다.

다) Tyrosine 농도에 따른 색소 생성의 변화

Tyrosine 농도가 균증식과 색소 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 배지의 tyrosine 초기 농도를 0, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3%(W/V)으로 하여 35℃, pH 6.5에서 정치 및 진탕 배양을 하였다.

나. 발효조를 이용한 색소의 대량생산

앞의 실험 방법으로 조사된 색소 최적 생성 조건을 바탕으로 5ℓ 발효조(Jar fermenter, Marubishi HDF-300)에서 통기량 변화에 따른 *Bacillus* species SSA3의 색소 생성능을 조사하였다. 색소의 대량 생산을 위해 색소 형성에 영향을 미치는 요인을 제거한 최소 배지에 tyrosine을 0.1% (W/V)의 농도로 첨가하여, pH 9로 조정하여 사용하였으며, 1ℓ flask에 500ml 배지를 첨가하여 30℃, 200rpm으로 3일간 배양한 종균을 3ℓ의 배지를 함유한 5ℓ 발효조에 3% (v/v)으로 접종하여, 교반속도 200rpm으로 30℃에서 초기 통기량을 각각 1, 3, 5 PSI로 20일간 배양하였다.

2. 결과 및 고찰

가. *Bacillus* sp. SSA3을 이용한 색소의 최적 생산 조건

1) 균주 육종

Bacillus sp. SSA3의 색소 생성에 관여하는 genes(pSJ15)가 삽입된 육종균 *E. coli* C600-T는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 배지에 넓게 색소가 생성되어 있음을 알 수 있다. 또한 *Bacillus* sp. SSA3나 *E. coli* C600I보다 색소 생성 시기가 빠르고 다량의 색소를 생성하였다. *Bacillus* sp. SSA3 와 *E. coli* C600I는 색소 생성이 4~9일에 걸쳐 생성하나, *E. coli* C600-T는 배양 1~5일 사이에 색소를 생성함으로써 색소의 대량 생산에 이용 가능하리라 사료된다.

2) 색소의 최적 생성 조건

가) 배양 온도

(1) 액체 배양

Bacillus sp. SSA3을 tyrosine이 첨가된 최소 액체 배지에서 초기 pH를 6.5로 조절하고 배양 온도를 달리하여 7일간 배양 후 색소 생성력과 균체 증식력을 조사한 결과는 Fig. 2에서와 같다. 배양 온도 30°C에서 색소 생성량이 30.04mg/ml(OD₄₃₀=0.715)로 최대를 보였으며, 그 이후의 온도에서는 온도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 균체 증식력도 30°C에서 흡광도 0.542로 최대를 보였으며 온도가 증가할수록 감소하는 것으로 나타나 색소 생성력과 같은 경향임을 알 수 있었다. 형질육종 균주인 *E. coli* C600-T는 최소 액체 배지에서는 생육이 되지 않기 때문에 복합 배지인 LB배지에서 *Bacillus* sp. SSA3과 동일 조건으로 배양하여 색소 생성력과 균체 증식력을 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 *E. coli* C600-T는 35°C에서 색소 생성량이 39.50mg/ml(OD₄₃₀=0.94)으로 최대를 나타내었으며, 균체 증식력도 35°C에서 흡광도 1.201로 최대를 보였다. Table 3에서 보는 바와 같이 두 균주를 비교한 결과를 보면 육종균인 *E. coli* C600-T 균주가 *Bacillus* sp. SSA3 균주보다 색소 생성능과 균 증식력에서 우수함을 알 수 있다

(2) 고체 배양

Tyrosine을 첨가한 최소 고체 배지에서 액체 배양과 동일 조건에서 *Bacillus* sp. SSA3의 색소 생성능을 조사한 결과, Fig. 4에서와 같이 30°C에서 가장 먼저 색소를 생성하였으며, 35°C와 40°C의 넓은 범위에 걸쳐 색소를 생성하였다. Tyrosine을 첨가하지 않고 배양한 대조구에서는 전혀 색

소의 생성이 관찰되지 않았다.

나) 초기 pH에 따른 색소 생성

(1) 액체 배양

Bacillus sp. SSA3의 색소 생성에 있어서 초기 pH의 영향을 조사하기 위해 최소 액체 배지의 pH를 4~9까지 변화시킨 후, 35°C에서 7일간 배양하였다. Fig. 5에서와 같이 pH가 증가할수록 색소 생성능이 증가하였으며, 균중식도 pH가 증가할수록 증가하였으나, pH 9이상에서는 증가폭이 둔화되었다. pH 4에서는 거의 색소를 생산하지 않았고, 균의 성장도 아주 미약하였다.

E. coli C600-T 경우는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 pH 7에서 색소 생성능이 가장 좋았으며, pH 8이후로 pH의 증가에 따라 색소 생성능이 현저하게 감소하는 경향을 보였다. *Bacillus* sp. SSA3과 마찬가지로 pH 4에서는 거의 색소를 생산하지 않았으며 *Bacillus* sp. SSA3의 final pH는 배양 초기의 pH와 ± 0.5 정도의 차이를 보인 반면, *E. coli* C600-T는 pH 5이상에서 final pH가 모두 pH 8~9사이를 나타내었다.

(2) 고체 배양

Bacillus sp. SSA3의 색소 생성에 있어서 초기 pH의 영향을 조사한 결과 고체 배양의 경우는 Fig. 7에서와 같다. Tyrosine이 0.1% 첨가된 최소 배지에서는 넓은 범위의 pH에서 육안적으로 착색이 관찰되었고 특히, pH 7과 8에서 색소 생성능이 가장 우수하였다. 대조구로서 tyrosine이 첨가되지 않은 최소 배지에서는 육안적으로 착색이 관찰되지 않았다.

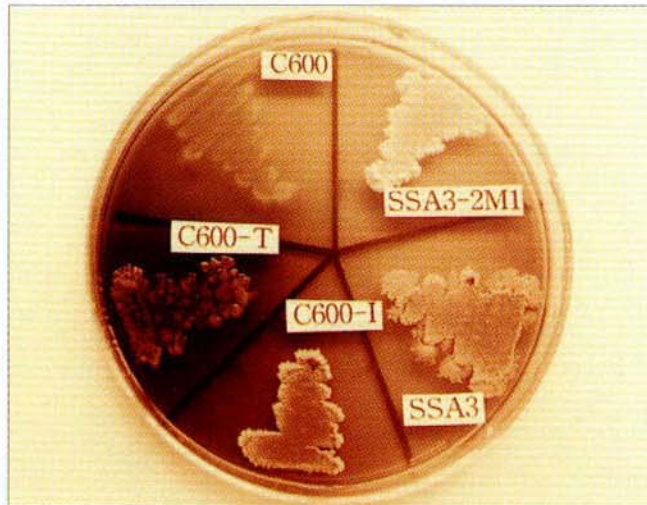


Fig. 1. Pigmentation of various strains.

Abbreviations : SSA3 ; wild type *Bacillus* species,
SSA3-2M1 ; unpigmentable mutant of *Bacillus* sp. SSA3,
C600 ; *Escherichia coli* C600, C600-T and C600-I ; *E. coli*
C600 containing pSJ15. pSJ15 is pigmentation genes.
Cells were cultured in the LB medium.

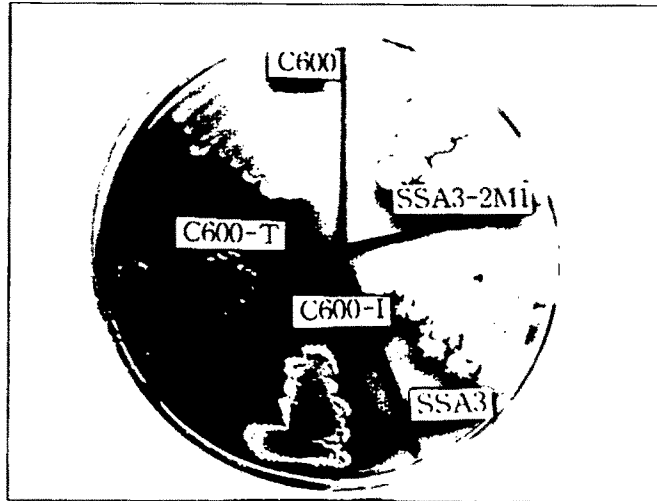


Fig. 1. Pigmentation of various strains.

Abbreviations : SSA3 ; wild type *Bacillus* species,
SSA3-2M1 ; unpigmentable mutant of *Bacillus* sp. SSA3,
C600 ; *Escherichia coli* C600, C600-T and C600-I ; *E. coli*
C600 containing pSJ15. pSJ15 is pigmentation genes.
Cells were cultured in the LB medium.

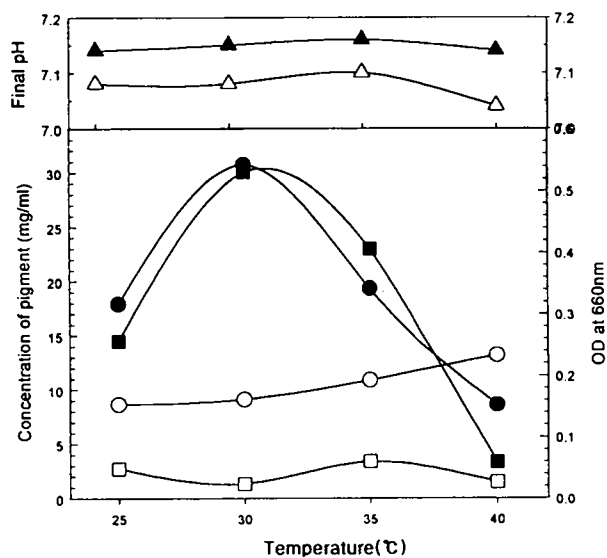


Fig. 2. The effect of temperature on the growth of *Bacillus* species SSA3 and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal liquid medium with 0.1% tyrosine.

- ; Pigment production (added tyrosine)
- ; Cell growth (added tyrosine, at OD₆₆₀ nm)
- ; Pigment production (not added tyrosine)
- ; Cell growth (not added tyrosine, at OD₆₆₀ nm)
- △ ; Initial pH
- ▲ ; Final pH

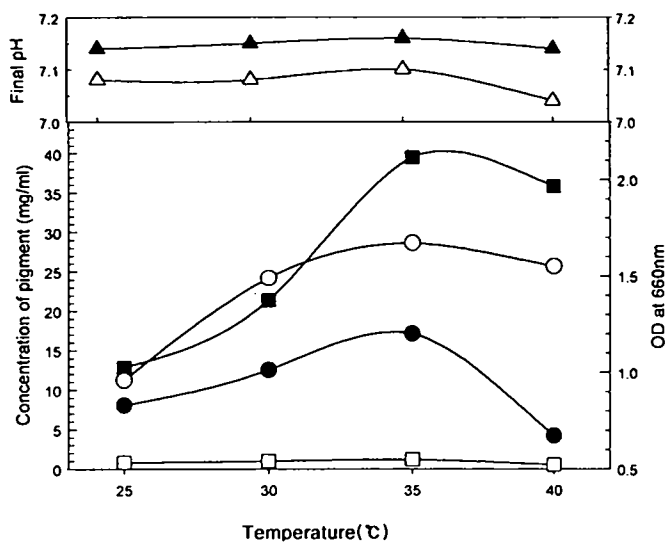


Fig. 3. The effect of temperature on the growth of *Escherichia coli* C600-T and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of LB broth with 0.1% tyrosine

- ; Pigment production (added tyrosine)
- ; Cell growth (added tyrosine, at OD₆₆₀ nm)
- ; Pigment production (not added tyrosine)
- ; Cell growth (not added tyrosine, at OD₆₆₀ nm)
- △ ; Initial pH
- ▲ ; Final pH

Table 3. The effect of temperature on growth and pigmentation between *Bacillus* species SSA3 and *Escherichia coli* C600-T after 7 days incubation.

Strains Temp (°C)	<i>Bacillus</i> sp. SSA3		<i>E. coli</i> C600-T	
	Pigmentation (O.D _{430nm})	Growth (O.D _{660nm})	Pigmentation (O.D _{430nm})	Growth (O.D _{660nm})
25	0.345	0.316	0.306	0.830
30	0.715	0.542	0.519	1.012
35	0.547	0.341	0.940	1.201
40	0.080	0.152	0.543	0.672

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal liquid medium or LB broth with 0.1% tyrosine, at 35°C.

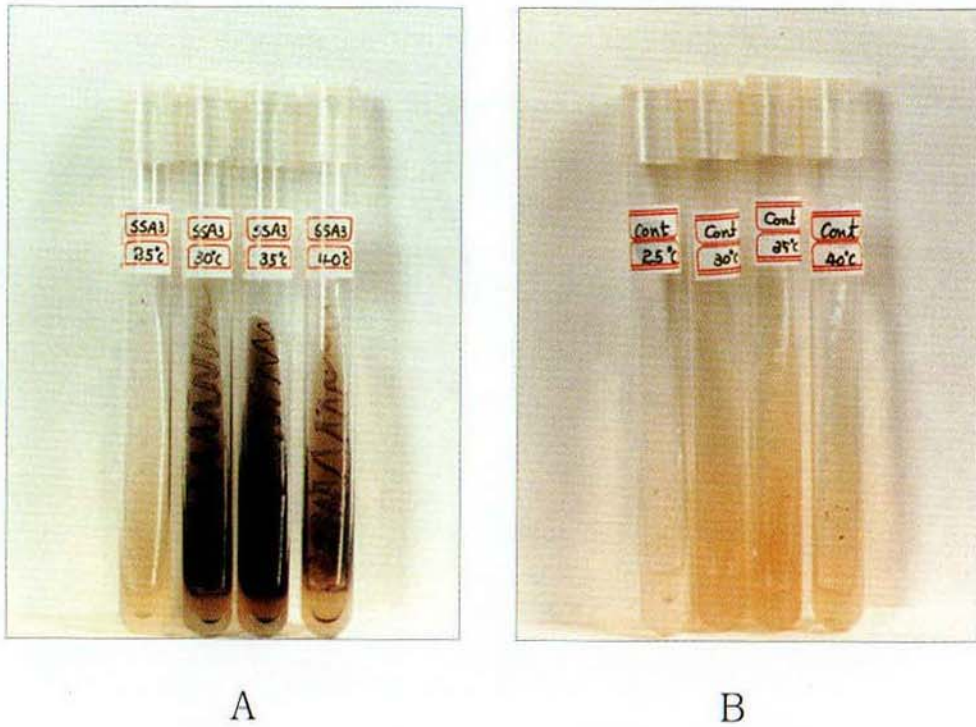


Fig. 4. The effect of temperature on growth of *Bacillus* species SSA3 and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal medium with 0.1% tyrosine at 25°C to 40°C. The initial pH of medium was adjusted to 6.5.

A ; added 0.1% tyrosine

B ; control (not added tyrosine)

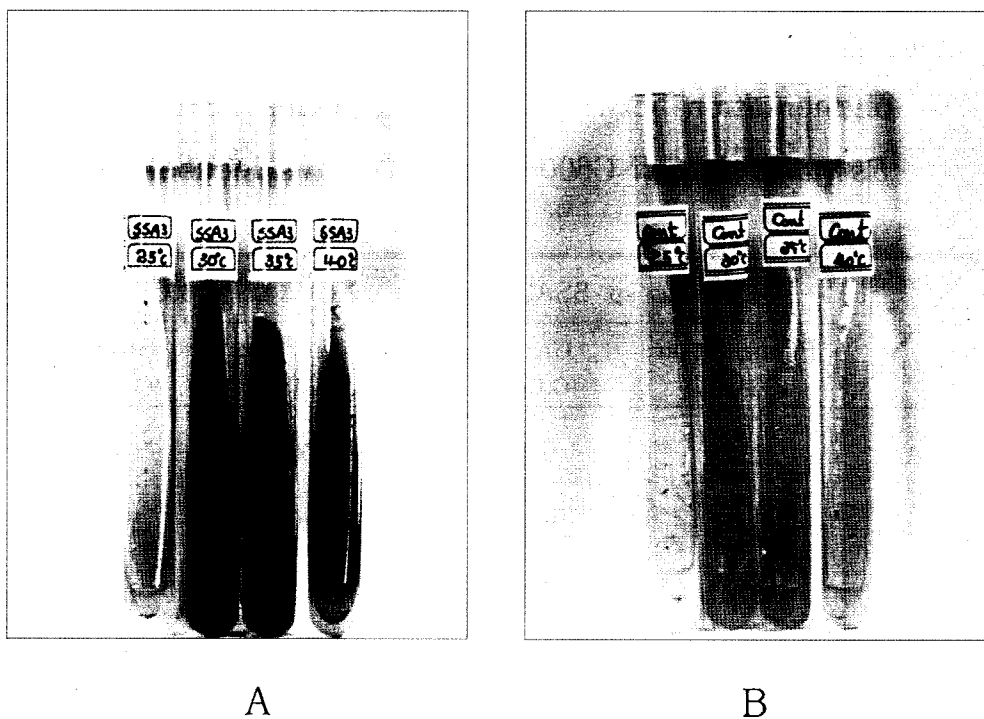


Fig. 4. The effect of temperature on growth of *Bacillus* species SSA3 and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal medium with 0.1% tyrosine at 25°C to 40°C. The initial pH of medium was adjusted to 6.5.

A ; added 0.1% tyrosine

B ; control (not added tyrosine)

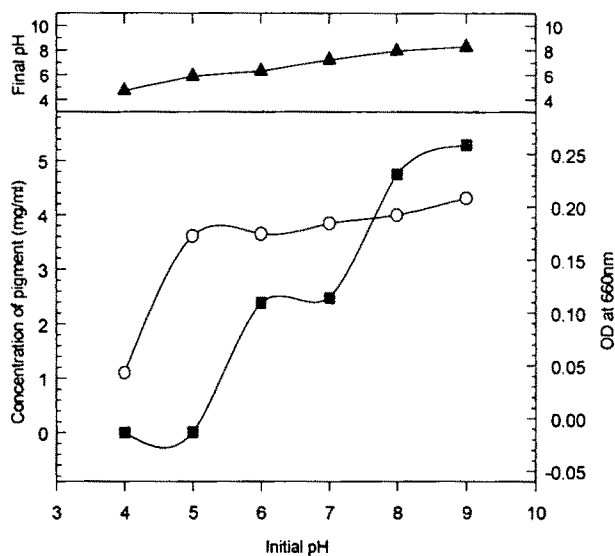


Fig. 5. The effect of initial pH on the growth of *Bacillus* species SSA3 and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal liquid medium with 0.1% tyrosine, at 35°C.

- ; Pigment production
- ; Cell growth
- ▲ ; Final pH

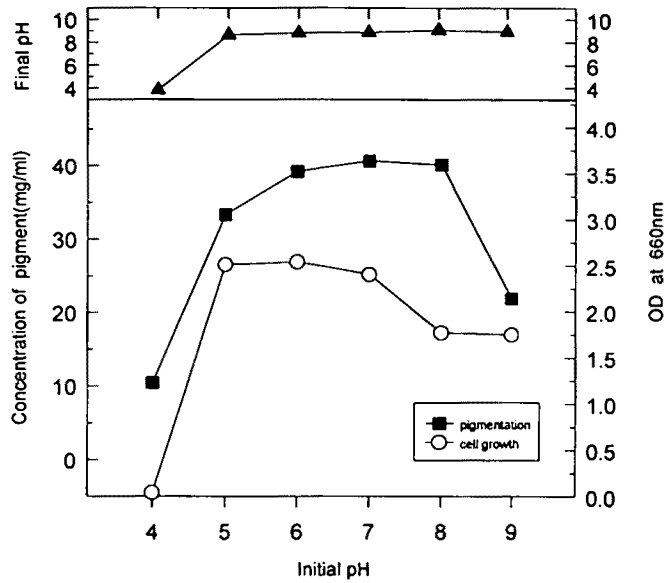


Fig. 6. The effect of initial pH on the growth of *Escherichia coli* C600-T and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of LB broth with 0.1% tyrosine, at 35°C.

- ; Pigment production
- ; Cell growth
- ▲ ; Final pH



A

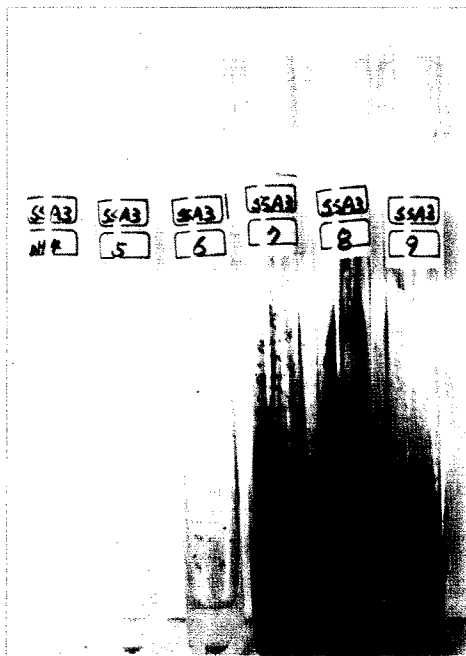
B

Fig. 7. The effect of initial pH on the growth of *Bacillus* species SSA3 and pigmentation by this strain.

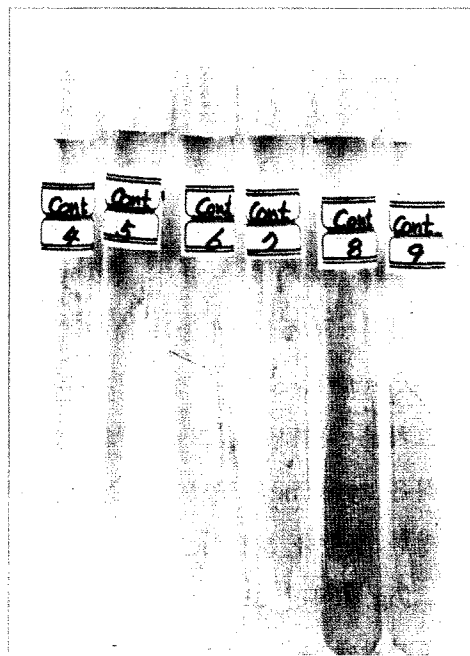
The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal medium with 0.1% tyrosine at 35°C.

A ; added 0.1% tyrosine

B ; control (not added tyrosine)



A



B

Fig. 7. The effect of initial pH on the growth of *Bacillus* species SSA3 and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal medium with 0.1% tyrosine at 35°C.

A ; added 0.1% tyrosine

B ; control (not added tyrosine)

다) Tyrosine 농도

(1) 액체 배양

Tyrosine을 농도별로 첨가한 최소 액체 배지에 *Bacillus* sp. SSA3을 배양하여 색소 생성능과 균체 증식력을 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. Tyrosine 농도가 증가함에 따라 색소 생성도 증가하여 0.1%의 농도에서 최고치를 나타냈고, 그 이상의 농도에서는 일정한 경향을 보였으며, 균의 증식은 tyrosine의 농도가 증가할수록 점차 증가하였으나 0.2% 이후에는 일정한 경향을 보였다.

Fig. 9에서 보는 바와 같이 *E. coli* C600-T의 경우는 tyrosine의 농도가 증가함에 따라 색소 생성능이 증가하여 0.15%의 농도에서 최고치를 나타내었으나 균 증식력은 tyrosine의 농도에 따라 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

(2) 고체 배양

Tyrosine을 농도별로 첨가한 최소 고체 배지에서 *Bacillus* sp. SSA3을 배양하여 색소 생성능을 관찰한 결과는 Fig. 10에서 보는 바와 같이 0.03% 이상의 농도로 첨가된 최소 배지에서 육안적으로 착색이 관찰되었으며 색소 생성능은 배지 전반에 걸쳐 확인되었다.

나. 발효조를 이용한 색소의 대량생산

Bacillus sp. SSA3 균주의 통기량에 따른 색소 생성능은 Fig. 11과 같이

초기 통기량이 많을수록 색소 생성이 빨라짐을 알 수 있다. 색소는 배양 2 일째부터 생성되기 시작하여 배양 10일째까지 증가하였으며 최고 색소 생성량이 31.83(mg/ml)으로 나타났다. 그 이후에는 초기 통기량이 3PSI와 5PSI에서는 비슷한 색소 생성능을 나타내었다. 용존 산소(DO)량의 경우도 배양 초기에는 차이가 나타났지만 일정 기간 이후에는 색소 생성 시와 마찬가지로 3PSI와 5PSI에서 비슷한 수치를 나타내었다.

초기 통기량 변화에 따른 균체 증식력을 조사한 결과는 Fig. 12에서 보는 바와 같이 초기 통기량이 많을수록 균의 증식도 높았는데, 배양 8일째까지 서서히 증가하다가 그 이후로는 일정한 경향을 보였다. Fig. 13에서는 배양 20일째 발효조에서의 색소 생성 정도를 나타낸 것이다.

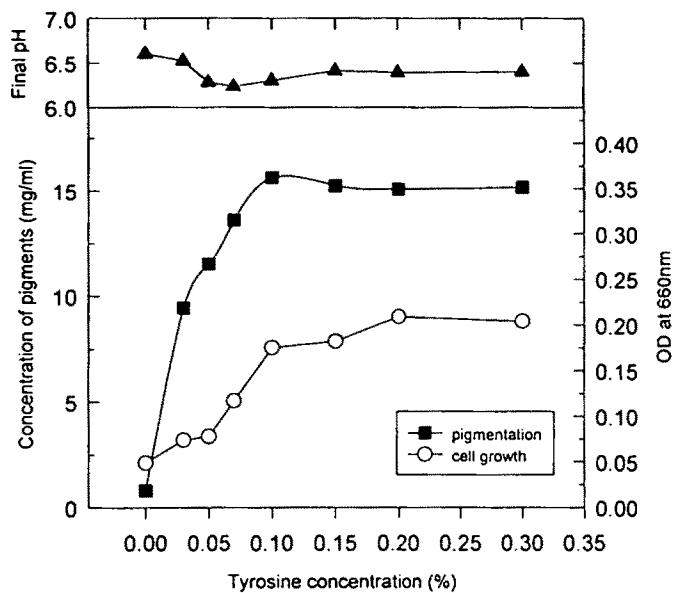


Fig. 8. The effect of tyrosine concentration on the growth of *Bacillus* species SSA3 and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal liquid medium at 35°C. The initial pH of medium was adjusted to 6.5.

■ ; Pigment production

○ ; Cell growth

▲ ; Final pH

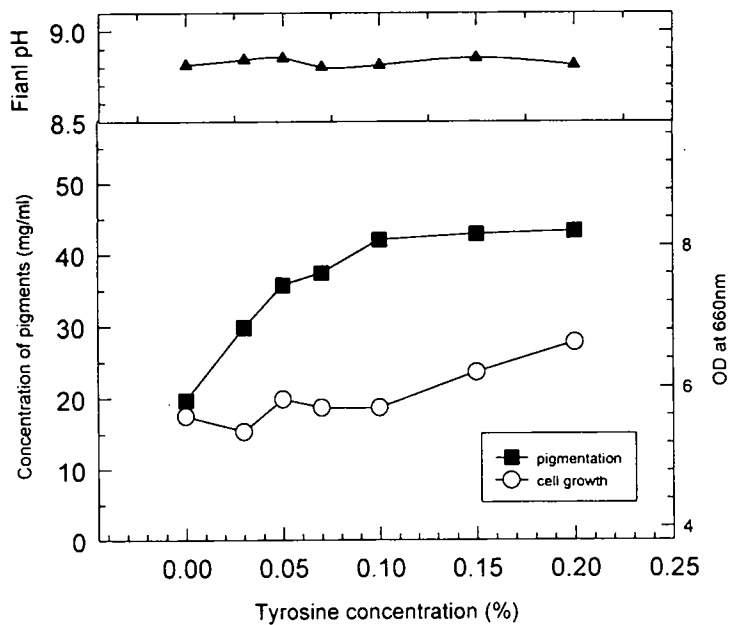


Fig. 9. The effect of tyrosine concentration on the growth of *Escherichia coli* C600-T and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20mℓ of LB broth at 35°C. The initial pH of medium was adjusted to 6.5.

■ ; Pigment production

○ ; Cell growth

▲ ; Final pH



Fig. 10. The effect of tyrosine concentration on the growth of *Bacillus* species SSA3 and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal medium at 35°C. The initial pH of medium was adjusted to 6.5.

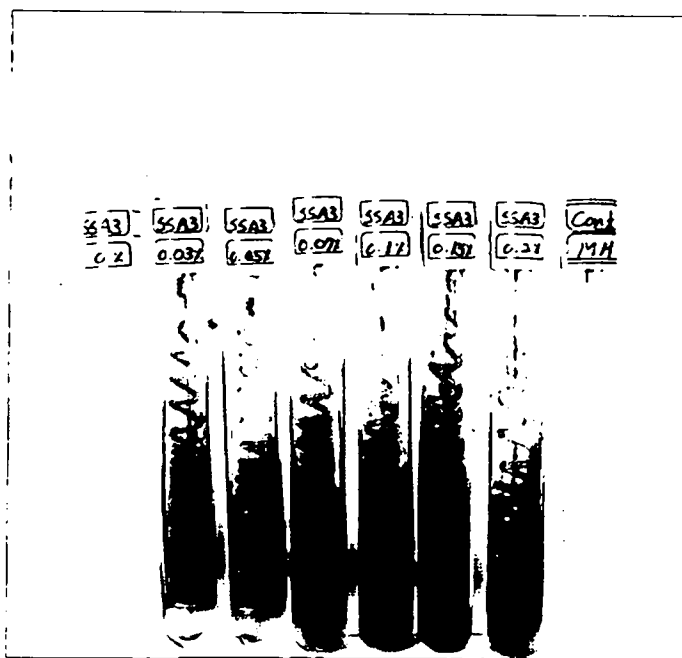


Fig. 10. The effect of tyrosine concentration on the growth of *Bacillus* species SSA3 and pigmentation by this strain.

The experiment was performed in test tube(2×20cm) contained 20ml of minimal medium at 35°C. The initial pH of medium was adjusted to 6.5.

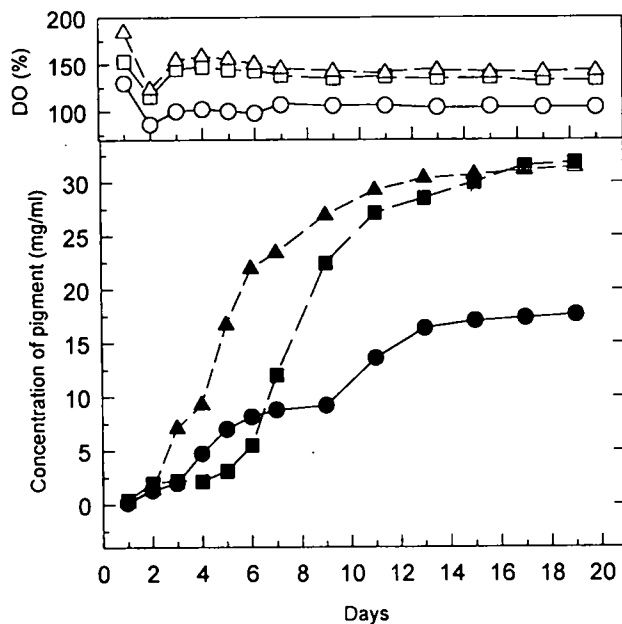


Fig. 11. The effect of initial air flow on pigmentation of *Bacillus* species SSA3 in jar fermenter.

Cultivation was carried out in 5 l jar fermenter containing the 3 l minimal liquid medium with 0.1% tyrosine, at 30°C. The initial pH of medium was adjusted to 9.

- ; initial air flow(AF)-1PSI.
- ; initial air flow(AF)-3PSI
- ▲ ; initial air flow(AF)-5PSI
- ; DO(AF 1PSI)
- ; DO(AF 3PSI)
- △ ; DO(AF 5PSI)

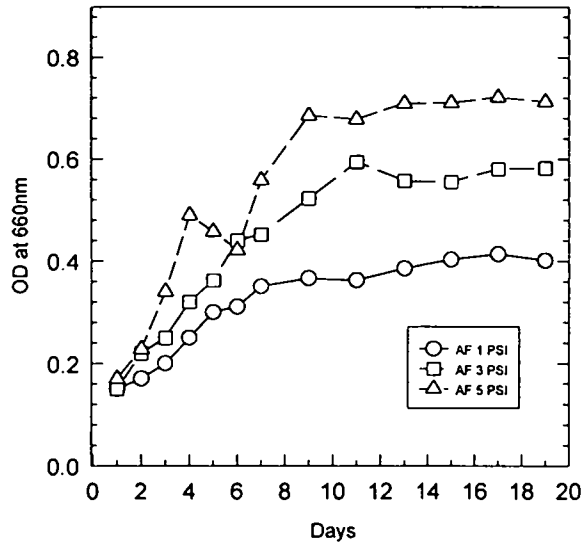


Fig. 12. The effect of initial air flow on growth of *Bacillus* species SSA3 in jar fermenter.

Cultivation was carried out in 5 l jar fermenter containing the 3 l minimal liquid medium with 0.1% tyrosine, at 30°C. The initial pH of medium was adjusted to 9.

- ; initial air flow(AF)-1PSI
- ; initial air flow(AF)-3PSI
- △ ; initial air flow(AF)-5PSI

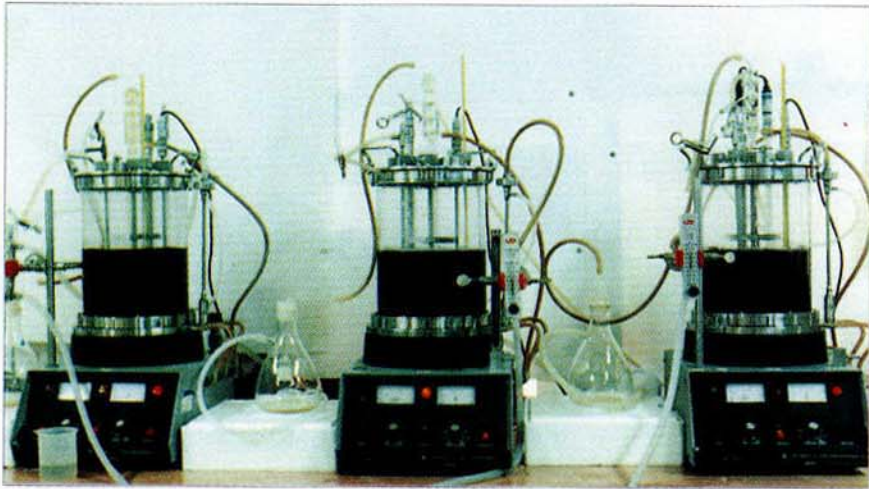


Fig. 13. Mass production of pigments produced by *Bacillus* species SSA3 in jar fermenter.

Cultivation was carried out in 5 l jar fermenter containing the 3 l minimal liquid medium with 0.1% tyrosine, at 30°C. The initial pH of medium was adjusted to 9.

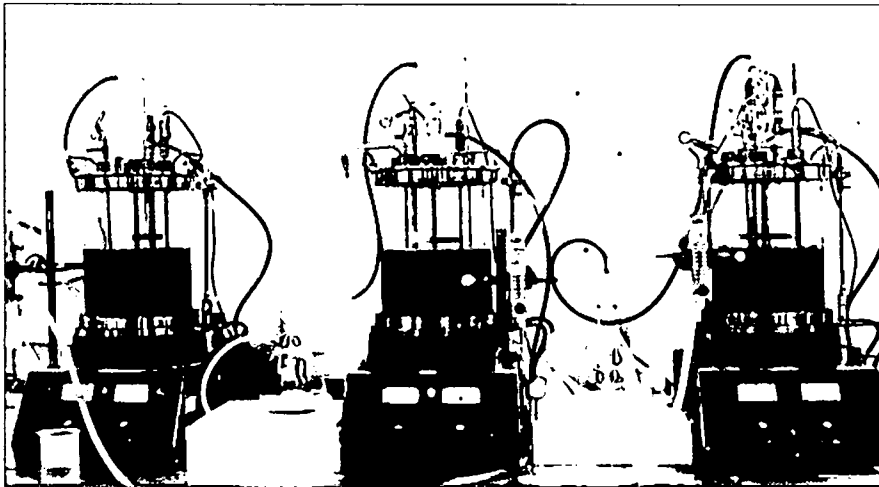


Fig. 13. Mass production of pigments produced by *Bacillus* species SSA3 in jar fermenter.

Cultivation was carried out in 5 l jar fermenter containing the 3 l minimal liquid medium with 0.1% tyrosine, at 30°C. The initial pH of medium was adjusted to 9.

3. 총결론

항들연변이성 신 색소의 생성 최적 조건을 조사한 결과 *Bacillus* sp. SSA3 균주인 경우 30℃, pH 9, 0.1 % 의 tyrosine 농도 하에서 최적의 상태로 나타났다. 색소의 생성능 및 분비능이 향상된 형질 육종 균주 *E. coli* C600-T는 배양 1~5일 사이에 색소를 생성하며, 35℃, pH 7, 0.1%의 tyrosine 농도 하에서 최적의 상태로 나타났다. 한편, 고체 배양과 액체 배양과의 비교에서는 두 균주 모두 비슷한 경향을 나타내었다.

이상의 실험에서 조사된 조건을 바탕으로 발효조를 이용한 색소의 대량 생산을 살펴 본 결과 통기량에 따른 색소 생성능은 초기 통기량이 많을수록 색소 생성이 빨라졌으며, 배양 2일째부터 생성되기 시작하여 배양 10일째까지 증가하여, 최고 생성량이 31.83(mg/ml)으로 나타났으며 그 이후에는 색소 생성이 일정한 경향을 나타내었다. 초기 통기량 변화에 따른 균체 증식력 조사에서도 색소 생성 변화와 일정한 경향을 보였다.

제 2 절 색소의 정제

색소의 정제 방법은 색소의 용해성, 이온성 등을 조사하여 ion exchange chromatography, thin layer chromatography(TLC), filtration 등³¹⁻³⁵⁾을 이용하여 색소의 구조 결정을 위한 정제 방법의 기반을 확립하고자 하였다.

1. 재료 및 방법

가. Ion exchange chromatography에 의한 색소 정제

Bacillus sp. SSA3이 생성하는 색소는 수용성이며, 이온성을 나타낸다. 이러한 성질을 이용하여, Amberlite(IR-120H, IRA-400), Dowex(50, 2-X 8), CM cellulose resins, Diaion HP20 등의 여러 가지 ion exchange resin을 이용하여 색소의 흡착 여부를 조사하였다.

나. Thin layer chromatography(TLC)에 의한 색소 정제

Ion exchange chromatography로 흡착 후 용출시킨 조색소 시료(TCP)를 TLC로 전개시킨 결과 3~4개의 band로 분리됨에 따라 TLC를 이용한 색소의 정제 방법을 강구하고자 하였다. 색소의 분리, 정제를 위해 thin layer chromatography(TLC, Merck., Kieselgel 60, 20 by 20cm)법을 사용하였으며, developing solvent의 조성은 n-butanol : ethanol : water(3 : 2 : 3)와 n-propanol : 25% NH₄OH : water(6 : 3 : 1)였다. 각각의 조색소 시료는 25% NH₄OH에 용해시켜 사용하였다.

다. High performance liquids chromatography(HPLC)에 의한 색소 정제

색소의 구조 분석을 위해서는 다량의 색소 시료가 요구됨에 따라 색소 물질을 대량으로 신속하게 분리, 분취할 수 있는 HPLC system을 이용하여 색소를 정제하고자 하였다. Semi-prep. HPLC system(Waters 600 pump)을 이용하였다. 조색소 시료(TCP)는 D.W(1% w/v)에 용해한 후 0.45 μ m filter로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였으며, 이동상은 n-propanol : 25% NH₄OH : water(6 : 3 : 1)를 사용하였으며, UV detector(Hitachi, L-4200 H)로 254nm의 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

Bacillus sp. SSA3 균주가 생성하는 색소의 구조 분석을 위해서는 색소의 대량 정제 방법의 확립이 필요하므로 ion exchange chromatography, thin layer chromatography(TLC), filtration 등을 이용하여 색소의 구조 결정을 위한 정제 방법의 기반을 확립하고자 하였다. 그러나 TLC에 의한 정제 방법은 정제 과정에서 계속해서 여러 개의 spot으로 분리되어 나타났으며, TLC 전개 시 발생하는 여러 spot들은 단일 물질이거나(예로서 monomer, dimer, trimer··등), 또는 TLC 전개 시 TLC plate의 silica gel과의 반응을 통해 색소 시료들의 분해가 일어나 여러 spot으로 나누어지는 것으로 사료 된다. 그래서 HPLC system을 이용한 정제 방법으로 대량의 색소를 신속하게 정제하여 구조 분석을 하였다.

가. Ion exchange chromatography에 의한 색소 정제

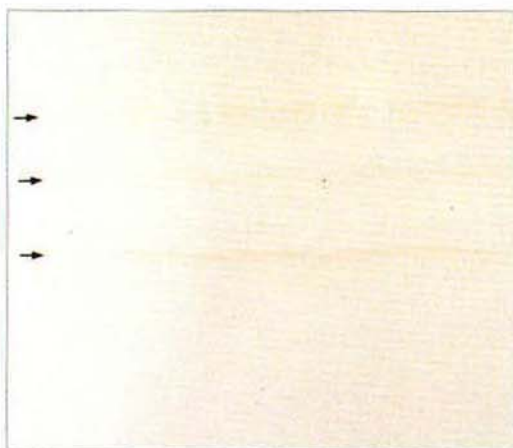
Bacillus sp. SSA3을 tyrosine이 첨가된 최소 배지에서 일정 기간 배양 후 균체를 제거시킨 상등액을 감압농축하여 색소를 얻었다. 이 색소는 수용성으로 NH_4OH 과 H_2O 에 용해되고, 양이온성 물질이므로, 이러한 성질을 이용하여 정제 방법을 강구하였다. 먼저 gel filtration(sephadex)을 이용한 방법은 색소의 분리가 일어나지 않았으며, 여러 가지 이온 교환 수지로 실험한 결과는 Table 4에서와 같이 강양이온 교환성인 Amberlite IR-120(H)와 Dowex 50 resins에는 흡착이 되었으나, CM-cellulose 및 음이온 교환성인 Amberlite IRA-400과 Dowex2-X8, DEAE cellulose에는 흡착이 되지 않았다. 이러한 성질에 따라 색소 시료를 물에 용해하여 Amberlite IRA-400 column을 통과시켜 색소 이외의 anion성 물질들을 제거하고, 이 여액을 다시 Amberlite IR-120(H) column을 통과시켜 색소 물질만 흡착시킨 후 2N NH_4OH 로 용출시켜 rotary vacuum evaporator로 감압농축하여 조색소 시료(TCP)를 얻었다.

나. Thin layer chromatography(TLC)에 의한 색소 정제

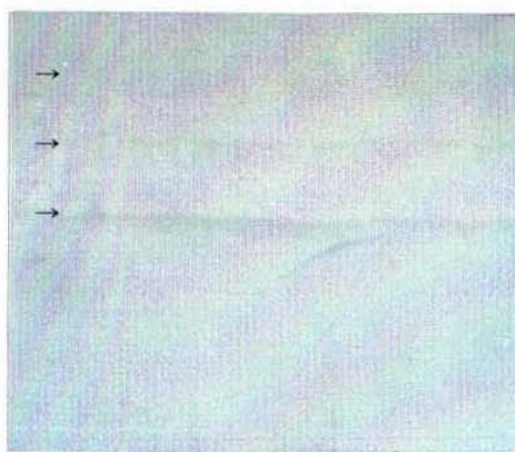
Ion exchange chromatography로 흡착 후 용출시킨 조색소 시료(TCP)를 TLC로 전개시킨 결과 3~4개의 band로 분리됨에 따라 TLC를 이용한 색소의 정제 방법을 강구하고자 하였다. 조색소 시료(TCP)를 NH_4OH 로 용출 후 silica gel thin layer chromatography(TLC)를 행하였다. 전개 용매 n-butanol : ethanol : water(3 : 2 : 3)로 전개한 결과, Fig. 14에서와 같이 3개의 band (위에서부터 P2-III1, II2, II3)가 얻어졌으며, 여기에 이물질이 혼입되었는지를 확인하기 위하여 sulphuric acid로 탄화할 시 색소 band 이외의 band는 나타나지 않았다.

Table 4. Adsorbent test of the pigments on various ion exchange chromatography resine.

Exchanger type	Functional group	Commercial designation	pKa	Exchange capacity (meq/g)	Adsorption
Cation	Sulfonic acid (-SO ₃ H)	Amberlite IR-120(H)	0-14	4.4	+
		Dowex 50.	0-14	4.5	+
	Carboxymethyl	CM cellulose	4.5-10	0.75	-
Anion	Quaternary-ammonium	Amberlite IRA-400	4-14	3.8	-
	Dimethyl-ethanol Benzyl-ammonium	Dowex 2-X8	0-14	3.5	-
	Diethylamino-ethyl	DEAE cellulose	2-9	1	-



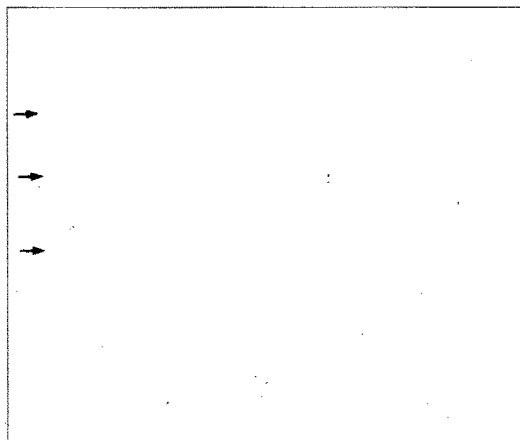
A



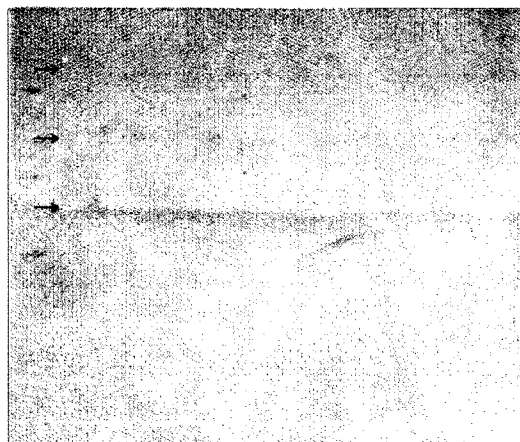
B

Fig. 14. First thin layer chromatogram of pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

A ; original chromatogram, B ; sprayed with sulphuric acid for detection of organic matter. A $70\mu\text{l}$ (5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates (Merck. Art 5721) and developed with n-butanol : ethanol : water (3 : 2 : 3) solvent.



A



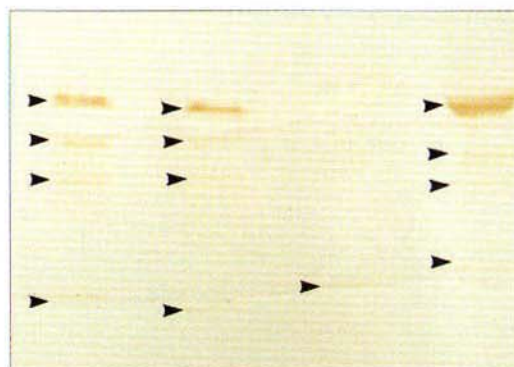
B

Fig. 14. First thin layer chromatogram of pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

A ; original chromatogram, B ; sprayed with sulphuric acid for detection of organic matter. A $70\mu\text{l}$ (5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates(Merck. Art 5721) and developed with n-buthanol : ethanol : water(3 : 2 : 3) solvent.

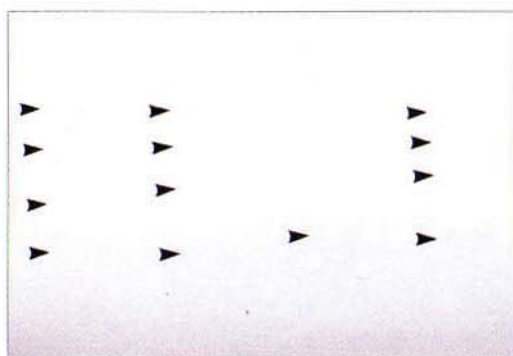
각각의 band를 fraction하여 NH_4OH 로 용출시켜 감압 농축 후, 전개 용매 n-propanol : NH_4OH : water(6 : 3 : 1)로 다시 전개시킨 결과, Fig. 15에서와 같이 P2-III은 4개의 band(P3-III1-I1, I2, I3, I4)로, P2-II2는 4개의 band(P3-II2-I1, I2, I3, I4)로, P2-II3이 1개의 band(P3-II3-I1)로 각각 분리되었다. 분리된 각각의 band 부위의 silica gel를 긁어모아 NH_4OH 로 색소를 용출시켰으며, 이 용출액에 남아 있는 silica gel 입자를 제거하기 위해 0.45, 0.22, 0.1 μm filter로 단계적으로 filtration한 후, cation Amberite로 색소만 흡착시켜 분리하였다. 이렇게 분리한 sample(P4-T-II)들을 Fig. 16에 나타내었다.

이상의 방법을 사용하여 Fig. 17에서와 같은 정제 방법을 구축하였다. 이렇게 정제된 색소 sample들이 단일 색소인 지를 확인하기 위해 전개용매 n-propanol : NH_4OH : water(6 : 3 : 1)로 다시 TLC를 하였다. Fig. 18에서와 같이 여러 개의 색소 spot이 나타났으며(A), 이를 50% H_2SO_4 로 탄화시 색소 spot 이외의 spot은 나타나지 않았다(B). 이러한 현상이 정제 과정에서 이온교환 수지와 TLC 상의 silica gel 내 유기 물질의 혼입때문인 지를 확인하기 위하여 이 두 가지에서 NH_4OH 로 추출한 각각의 추출물을 색소 sample과 함께 TLC를 하였다. Fig. 18의 IP(이온교환 수지 추출물) 및 TP(TLC의 silica gel 추출물)와 같이 A에서는 색소가 없었으나 50% H_2SO_4 를 분무하여 100 $^\circ\text{C}$ 에 태운 B에서는 각각 spot이 3개씩 나타났다. 그러나 R_f 치를 비교해 볼 때 이온교환 수지나 TLC를 구성하는 구성분의 오염 때문이라고는 볼 수 없었다. 그리고 Fig. 14와 15에서 색소 sample을 TLC한 결과와 이 TLC를 50% H_2SO_4 를 분무하여 100 $^\circ\text{C}$ 에서 탄화시킨 결과를 비교할 때 이물질의 spot를 발견할 수 없었다. 또한 Fig. 18에서 색소 자체의 spot(A)와 이를 탄화시킨 결과의 spot(B)는 동일하였다. 이러한 결과로 보아 각 색소 시료들의 TLC 상에서의 여러 spot들은 단일 물질일 가능성이 있으며(예로서 monomer, dimer, trimer··등), 또는 TLC 전개 시 TLC plate의 silica gel과의 반응을 통해 색소 시료들의 분해가 일어나 여



P2-II1 P2-II2 P2-II3 TCP

A

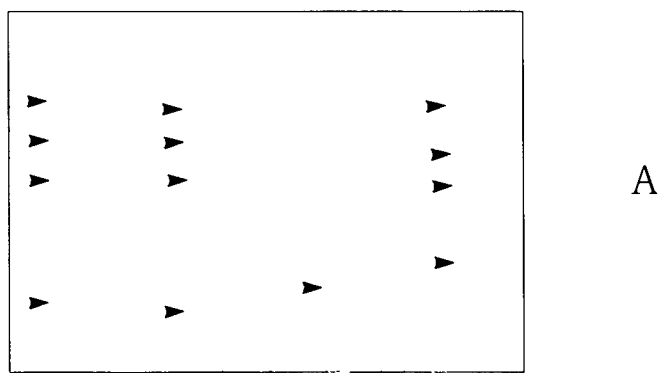


P2-II1 P2-II2 P2-II3 TCP

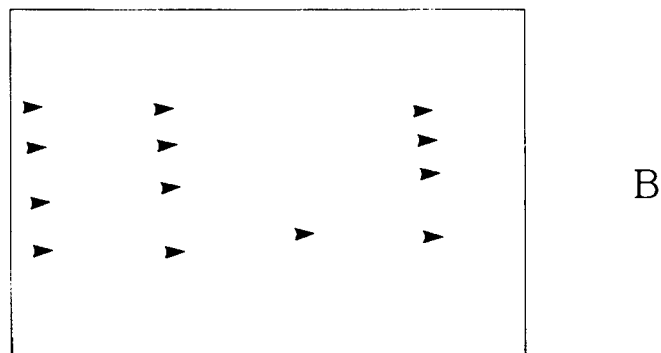
B

Fig. 15. Second thin layer chromatogram of pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

P2-II1, II2, II3 ; pigments fractionated from 1st TLC , TCP ; crude pigments, A ; original chromatogram, B ; sprayed with sulphuric acid for detection of organic matter. A $10\mu\text{l}$ (5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates(Merck. Art 5021) and developed with n-propanol : NH_4OH : water(6 : 3 : 1) solvent.



P2-II1 P2-II2 P2-II3 TCP



P2-II1 P2-II2 P2-II3 TCP

Fig. 15. Second thin layer chromatogram of pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

P2-II1, II2, II3 ; pigments fractionated from 1st TLC , TCP ; crude pigments, A ; original chromatogram, B ; sprayed with sulphuric acid for detection of organic matter. A 10 μ l(5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates(Merck. Art 5021) and developed with n-propanol : NH₄OH : water(6 : 3 : 1) solvent.

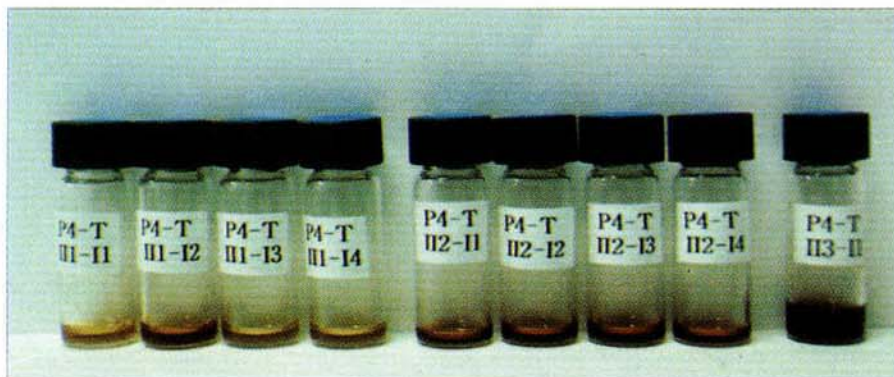


Fig. 16. Photogram of purified pigments.

Pigments fractionated from 2nd TLC by developing solvent
n-propanol : NH_4OH : water(6 : 3 : 1) solvent.

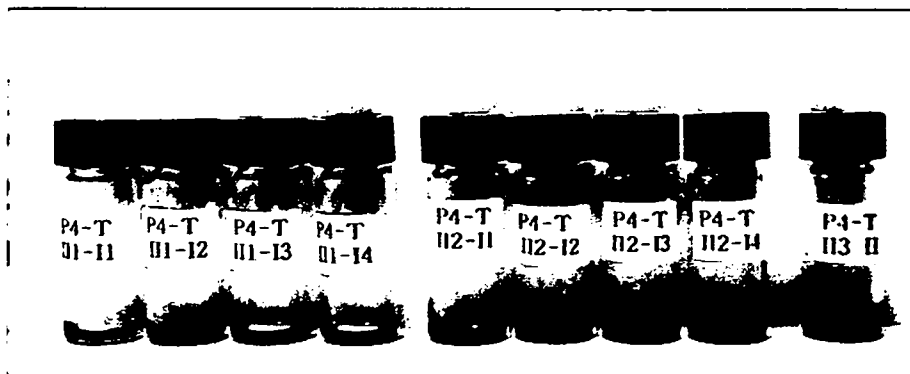


Fig. 16. Photogram of purified pigments.

Pigments fractionated from 2nd TLC by developing solvent
n-propanol : NH_4OH : water(6 : 3 : 1) solvent.

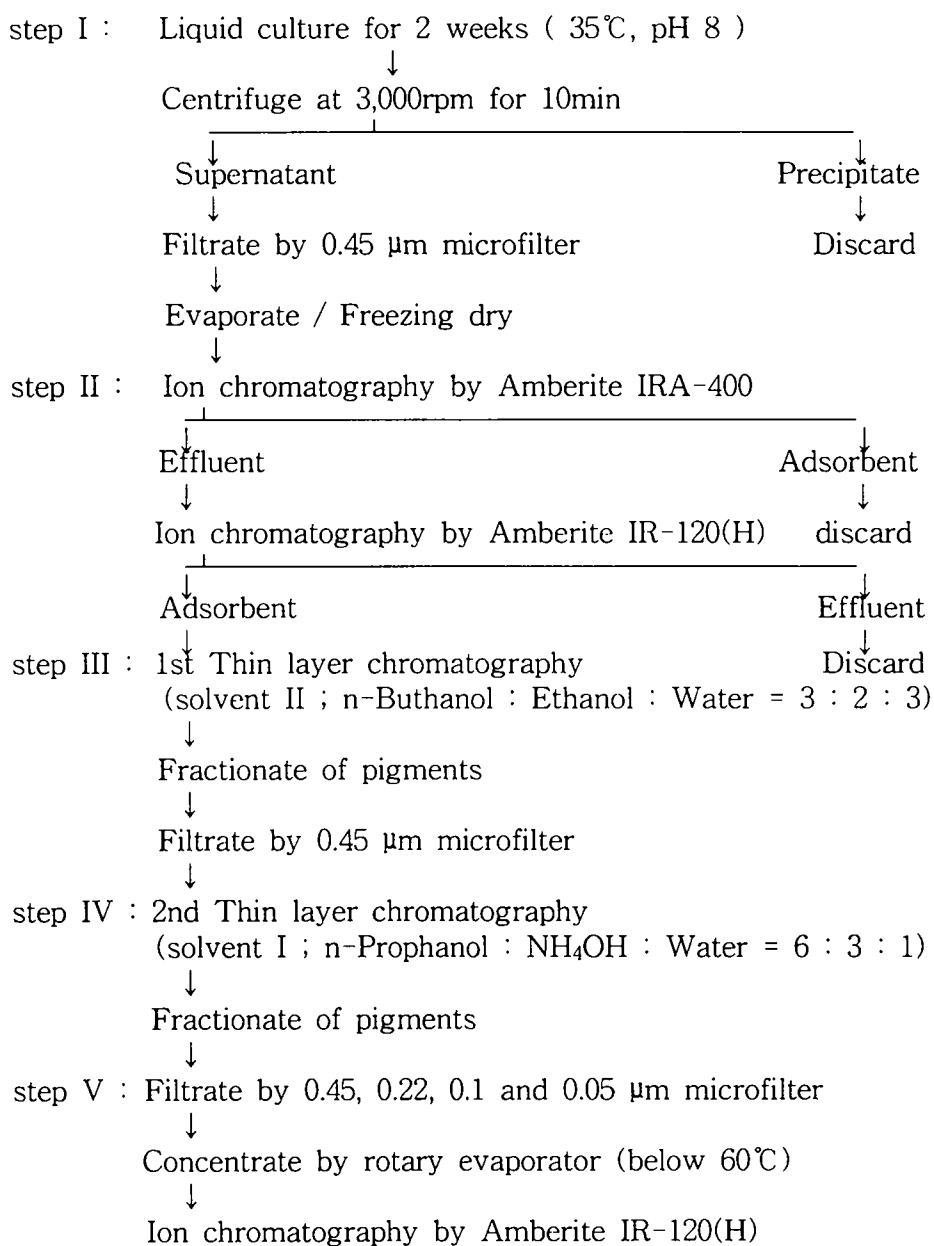
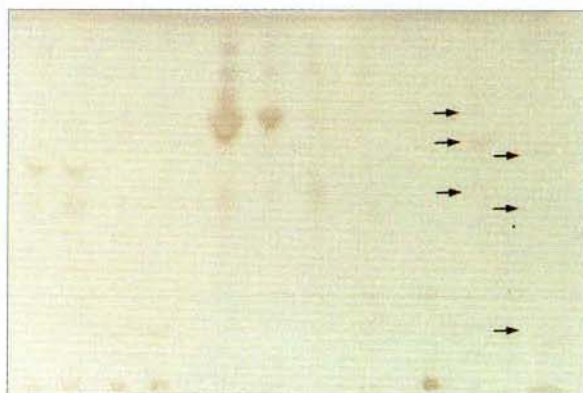


Fig. 17. Purification procedure of pigments produced by *Bacillus* species SSA3.



A

I₁, I₂, I₃, I₄ / I₁, I₂, I₃, I₄ / I₁ IP TP
 P3-II1 P3-II2 P3-II3

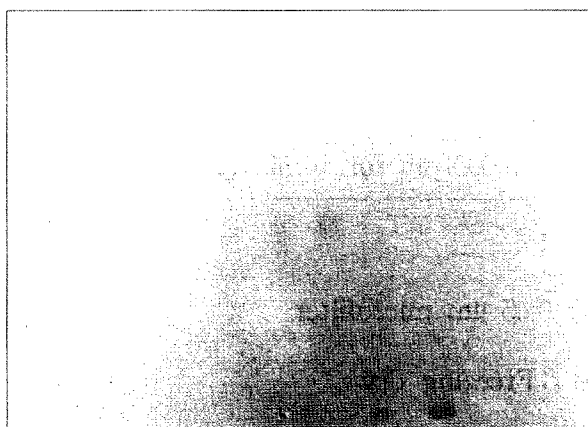


B

I₁, I₂, I₃, I₄ / I₁, I₂, I₃, I₄ / I₁ IP TP
 P3-II1 P3-II2 P3-II3

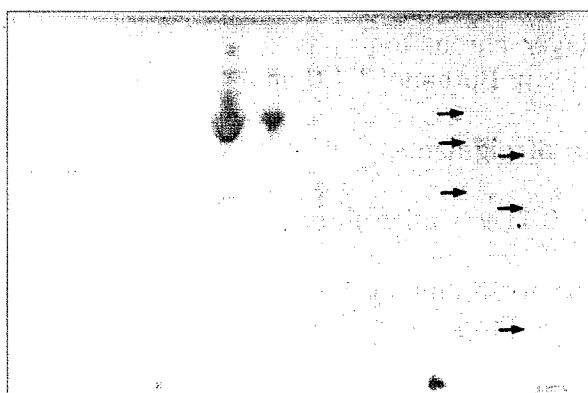
Fig. 18. Chromatogram of pigments purified by Amberlite IR-120(H).

A ; original chromatogram, B ; sprayed with 50% sulphuric acid, IP ; extract from cation Amberlite, TP ; extract from TLC. A 5 μ l (5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates and developed with n-propanol : NH₄OH : water (6 : 3 : 1)



A

I-1, I-2, I-3, I-4 / I-1, I-2, I-3, I-4 / I-1 IP TP
 P3-II1 P3-II2 P3-II3



B

I-1, I-2, I-3, I-4 / I-1, I-2, I-3, I-4 / I-1 IP TP
 P3-II1 P3-II2 P3-II3

Fig. 18. Chromatogram of pigments purified by Amberlite IR-120(H).

A ; original chromatogram, B ; sprayed with 50% sulphuric acid
 IP ; extract from cation Amberlite, TP ; extract from TLC. A 5 μ l
 (5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates
 and developed with n-propanol : NH₄OH : water (6 : 3 : 1)

러 spot으로 나누어지는 것으로 사료 된다. TLC에 의한 색소의 정제 방법은 정제 과정에서 TLC에서 색소와 TLC plate상의 물질의 분리가 완전히 되지 않는 여러 가지 문제점이 발생하므로 HPLC system을 이용한 정제 방법으로 대량의 색소를 신속하게 정제하여 구조 분석을 하고자 하였다. TLC의 각 정제 단계별 색소 생성량을 보면 step 1 과정에서 생성된 색소량을 100g로 했을 때, step 2 과정에서는 43.7g를, step 3 과정에서는 2.77g를, step 4 과정에서는 1.21g를, step 5 과정에서는 0.3g를 각각 얻을 수 있었다.

다. High performance liquids chromatography(HPLC)에 의한 색소 정제

Bacillus sp. SSA3을 tyrosine이 첨가된 최소 배지에서 일정 기간 배양 후, 균체를 제거시킨 상등액을 감압 농축하였다. 이를 ion exchange resin이 충전되어 있는 column에 흡착시킨 후 용출 하여 조색소(TCP)를 얻고, 메탄올에 용해시켜 상등액(TMS)과 침전물(TMI)로 분리하였다. 이렇게 분리된 메탄올 용해성 색소 시료(TMS) 및 메탄올 불용성 색소 시료(TMI)를 전개용매 n-propanol : 25 % NH₄OH : water(6 : 3 : 1)로 TLC 한 결과, Fig. 19에서와 같이 조색소(TCP)는 4개의 band(R_f 0.73, 0.55, 0.46, 0.23)가, TMS시료도 조색소와 같은 위치에 4개의 band가 나타났으며, TMI 시료의 경우는 TCP와 TMS와는 달리 2개의 band(R_f 0.73, 0.23)가 나타났다. 이를 iodine test 시(B) TMS시료의 경우는 몇 개의 band가 더 나타났지만 TCP와 TMI시료의 경우는 더 이상의 band는 나타나지 않았다. 이에 TMS, TMI 시료를 HPLC로 분획하여 그 구조 및 기능성 실험을 하고자 하였다.

TMS와 TMI 시료를 HPLC로 분석한 결과 Fig. 20와 같이 TMS 시료는 2개의 주 peak가 나타났는데 retention time 4분대에 1개의 peak와 6분대에 1개의 peak가 나타났다. 이를 semi-prep. HPLC(Waters 600 pump)를 이용

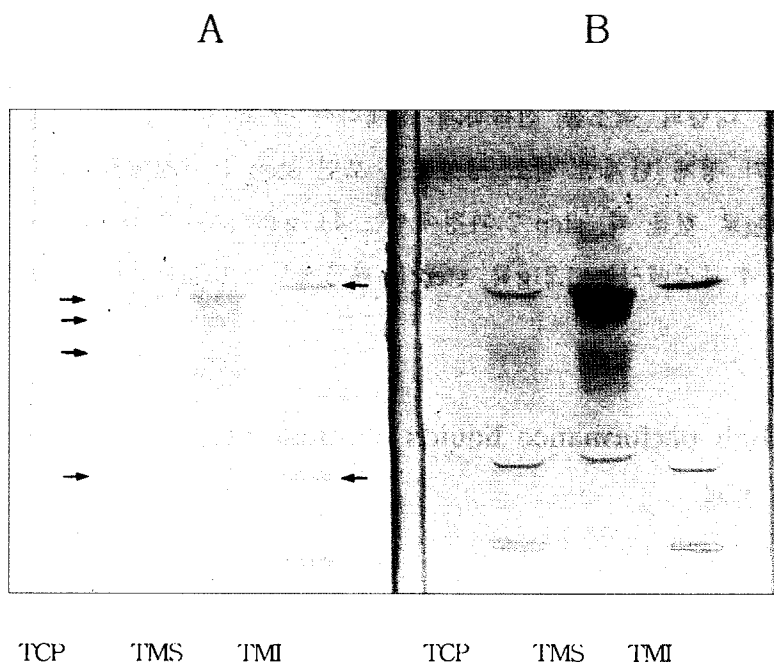
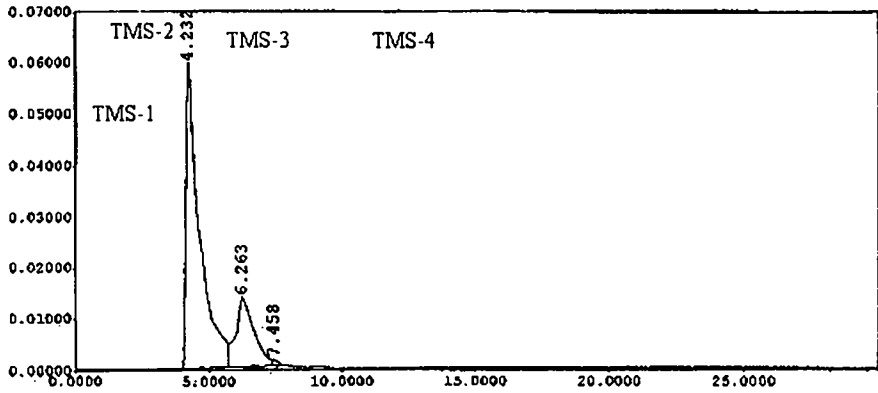


Fig. 19. Thin layer chromatogram of pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

TCP ; crude pigment. TMS ; soluble in MeOH, TMI ; insoluble in MeOH. A ; original chromatogram, B ; Iodine vapour test for detection of organic matter. A $70\mu\text{l}$ (5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates(Merck.Art 5721) and developed with n-propanol : NH_4OH : water(6 : 3 : 1)

Column	Waters Nova-Pak C ₁₈ , 3.9 × 300mm
Sample	TMS
Mobile Phase	n-propanol : NH ₄ OH : water(6 : 3 : 1)
Flow rate	0.35 ml/min
Detection	254 nm



Peak NO.	Retention time	Area(mV*sec)	Area(%)	Quantity (mg/ml)
1	4.232	2113.107	76.752	5.38
2	6.263	626.388	22.752	5.01
3	7.458	13.676	0.497	3.24
TOTAL		2753.171	100.0000	

Fig. 20. High performance liquid chromatogram of TMS pigments.

하여 Fig. 21에서와 같이 각 부위별로 분취하였다. TMI 시료는 Fig. 22에서와 같이 3개의 주 peak가 나타났다. 이 peak들의 어떤 부위가 활성을 갖는지 확인하기 위해 각 peak 부위를 semi-prep. HPLC(Waters 600 pump)를 이용하여 분리 및 분취하여 8개의 분액(TMI-1, TMI-2, TMI-3, TMI-4, TMS-1, TMS-2, TMS-3, TMS-4)을 얻었다. 이때 사용한 이동상으로는 n-propanol : 25 % NH₄OH : water(6 : 3 : 1)를 사용하였다. 이러한 방법에 따라 분리한 색소 시료들에 대해 분석용 HPLC로 분석한 결과, 각각의 시료는 1개의 주 peak외에 몇 개의 peak가 나타났으며, 정제도 분석 결과 불순물의 혼입이 보였다. 따라서 이들 8개의 시료들을 좀 더 정제할 필요가 있으므로 이들 시료 중 그 생산량이 많고, 또한 세포 기능성 실험을 통해서 활성이 높게 나타난 시료부터 정제하여 그 구조 분석을 하고자 하였다. 색소의 기능성 실험 중 항산화성 효과 실험에서 활성이 크게 나타난 TMS-2, TMS-3, TMI-2, TMI-3 시료를 Fig. 23와 24에서 나타낸 방법에 따라 HPLC로 정제하여 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2, 2TMI-3 시료를 얻었다. 이상에서 얻은 각각의 색소 시료들을 HPLC로 분석한 결과 Fig. 25에서와 같이 3TMS-2시료는 retention time 6분대(6.032)에 1개의 peak가 나타났으며, 2TMS-3시료는 Fig. 26에서와 같이 retention time 6분대(6.513)에 1개의 peak가 나타났다. 3TMI-2시료는 Fig. 27에서와 같이 retention time 4분대(4.877)에 1개의 peak가 나타났으며, 2TMI-3시료는 Fig. 28에서와 같이 retention time 5분대(5.993)에 1개의 peak가 나타났다. HPLC 분석 결과 색소 시료들이 단일 peak로 나타남에 따라 이들이 단일 성분임을 재확인하기 위해 TLC를 행하였다. 그 결과, Fig. 29에서 보는 바와 같이 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및 2TMI-3 시료는 각각 3~4개의 peak를 나타내었다. 이러한 결과가 전개 시료 조제 시 25% NH₄OH에 용해시킴에 의해 시료가 분해되어 나타나는 결과인 지를 확인하기 위해, 색소 시료들을 D.W에 녹여 동일 조건하에서 다시 TLC를 행하였으나, Fig. 30에서와 같이 시료를 NH₄OH에 녹여서 TLC를 행한 결과와 별 차이를 나타내지 않았다.

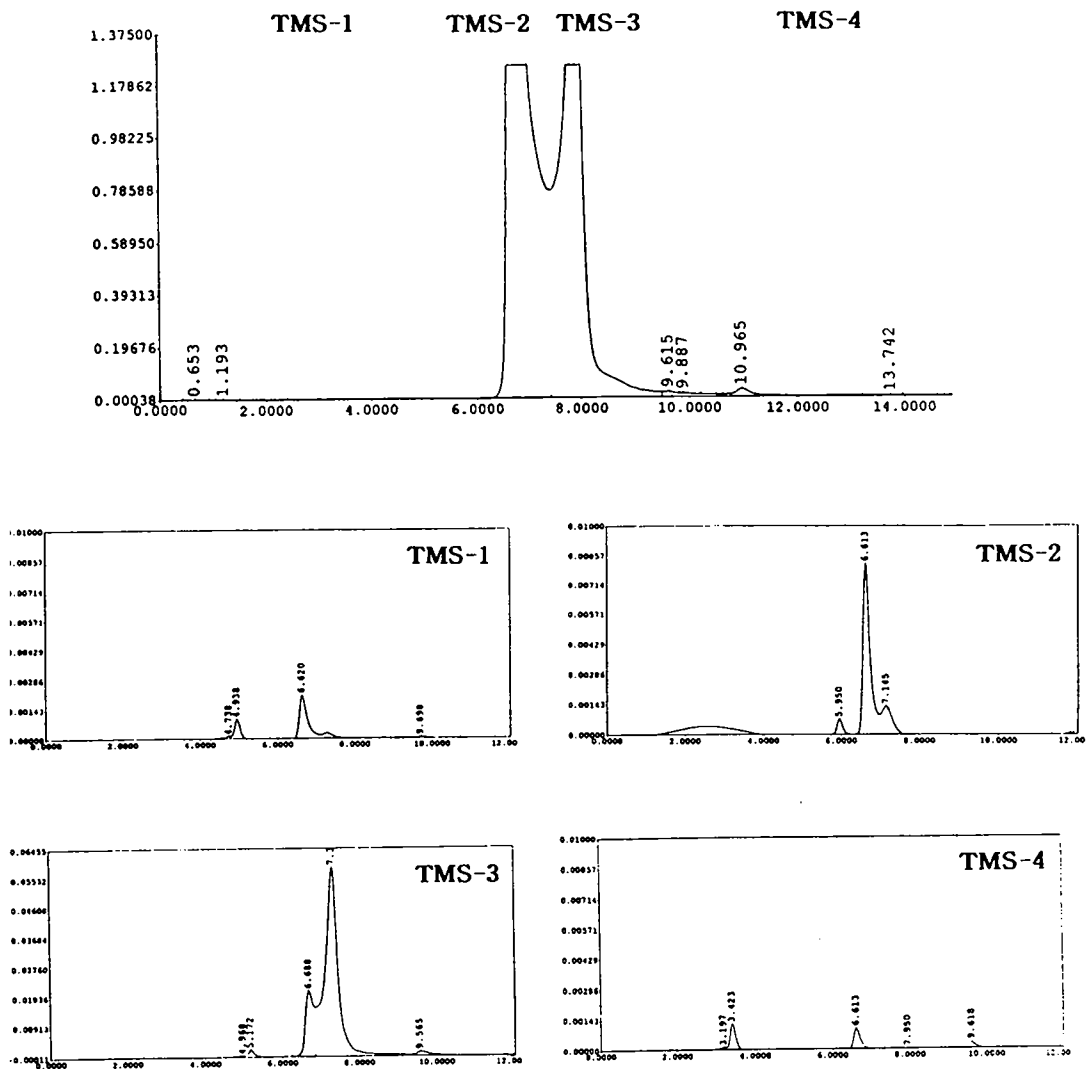
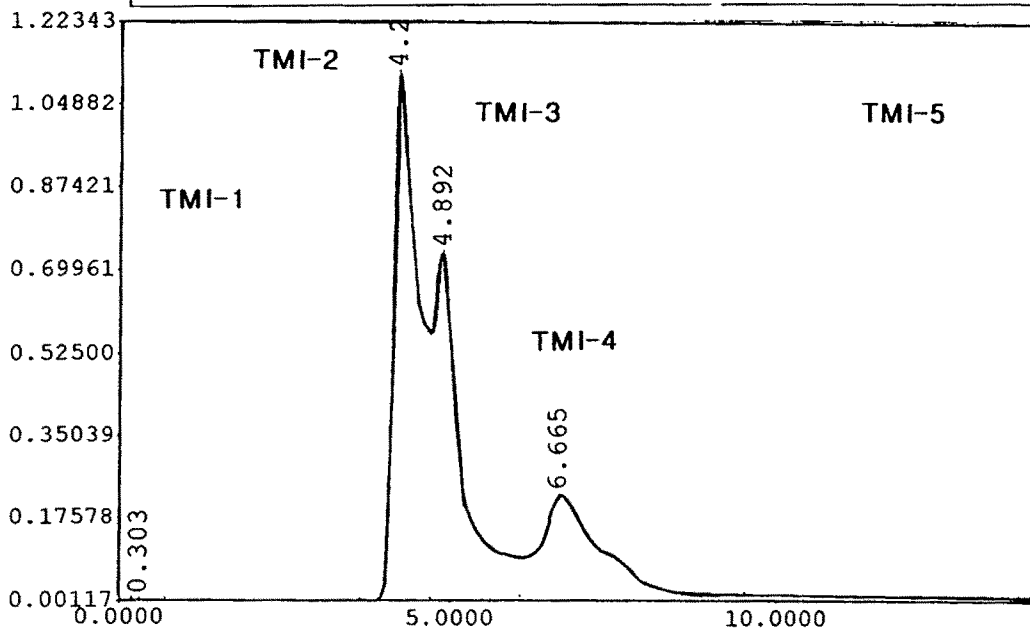


Fig. 21. Semi-preparative high performance liquid chromatogram of TMS pigments.

Column ; Waters Nova-Pak C18(19×300mm), Flow rate ; 5ml/min,
 Mobile phase, n-Propanol : NH₄OH : Water(6 : 3 : 1)

Column	Waters Nova-Pak C ₁₈ , 3.9 × 300mm
Sample	TMI
Mobile Phase	n-propanol : NH ₄ OH : water(6 : 3 : 1)
Flow rate	0.35 ml/min
Detection	254 nm



Peak NO.	Retention time	Area(mV*sec)	Area(%)	Quantity (mg/ml)
1	0.303	7.049	0.011	3.03
2	4.225	29322.793	45.401	5.41
3	4.892	21813.528	33.814	5.13
4	6.665	13443.098	20.814	3.45
TOTAL		64586.468	100.0000	

Fig. 22. High performance liquid chromatogram of TMI pigments.

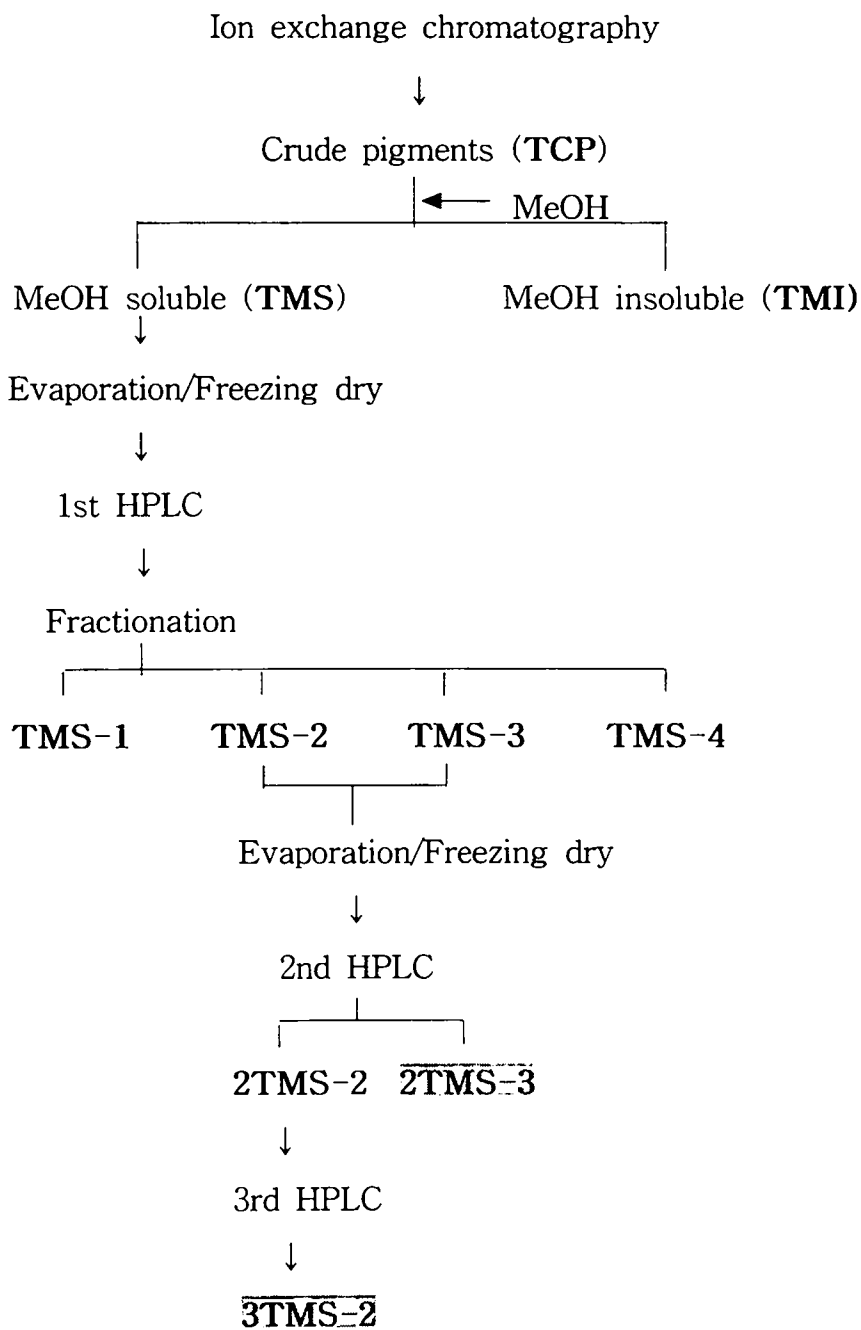


Fig. 23. Purification procedure of TMS pigments.

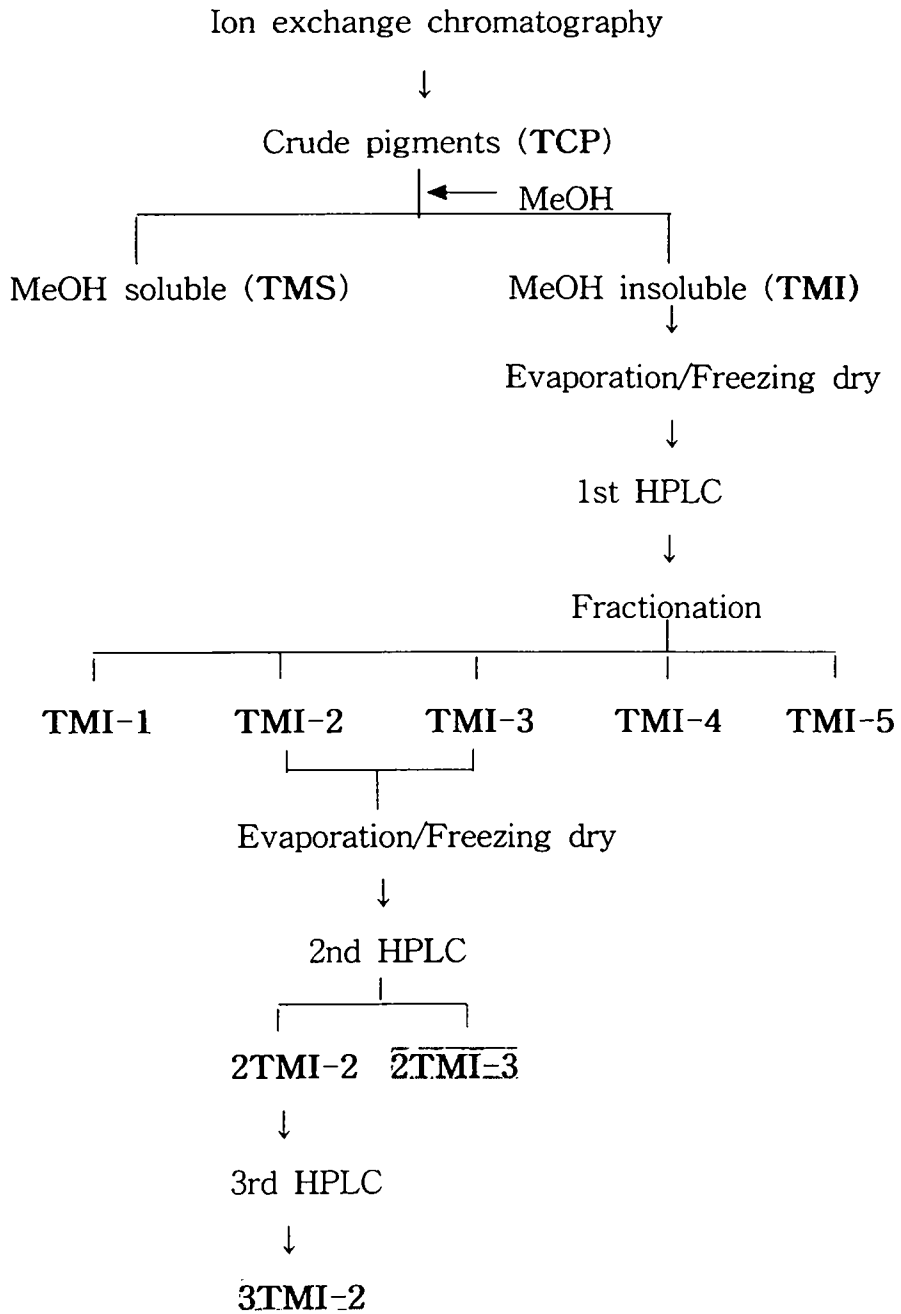
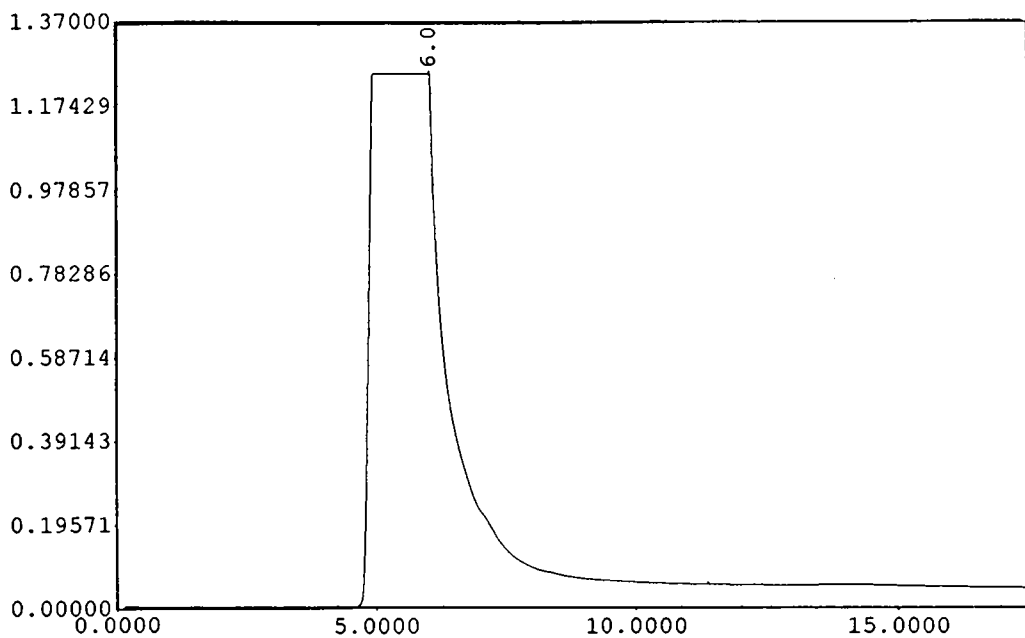


Fig. 24. Purification procedure of TMI pigments.

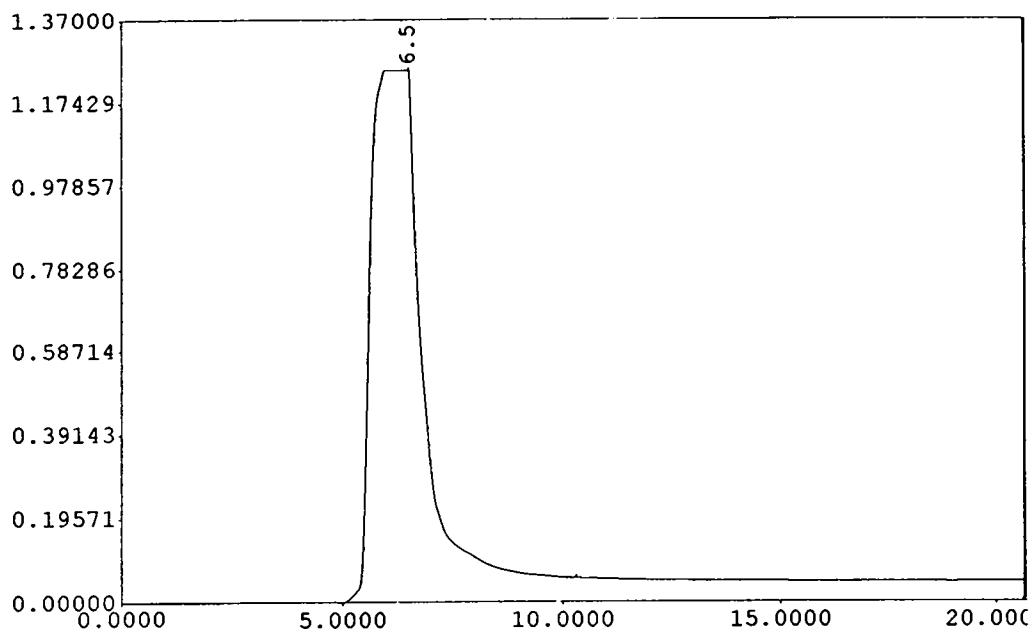
Column	Waters Nova-Pak C ₁₈ , 3.9 × 300mm
Sample	3TMS-2
Mobile Phase	n-propanol : NH ₄ OH : water (6 : 3 : 1)
Flow rate	0.35 ml/min
Detection	254 nm



Peak NO.	Retention time	Area(mV*sec)	Area(%)	Quantity (mg/ml)
1	6.032	128896.929	100.000	2.34
TOTAL			100.000	

Fig. 25. High performance liquid chromatogram of 3TMS-2 pigment.

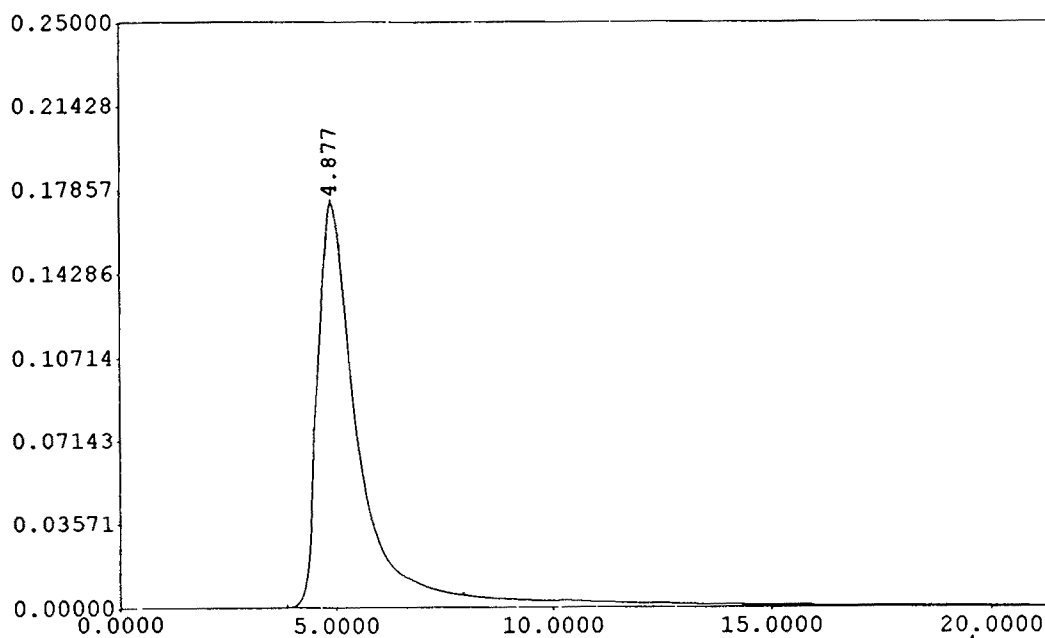
Column	Waters Nova-Pak C ₁₈ , 3.9 × 300mm
Sample	2TMS-3
Mobile Phase	n-propanol : NH ₄ OH : water (6 : 3 : 1)
Flow rate	0.35 ml/min
Detection	254 nm



Peak NO.	Retention time	Area(mV*sec)	Area(%)	Quantity (mg/ml)
1	6.513	99513.801	100.000	2.04
TOTAL			100.000	

Fig. 26. High performance liquid chromatogram of 2TMS-3 pigment.

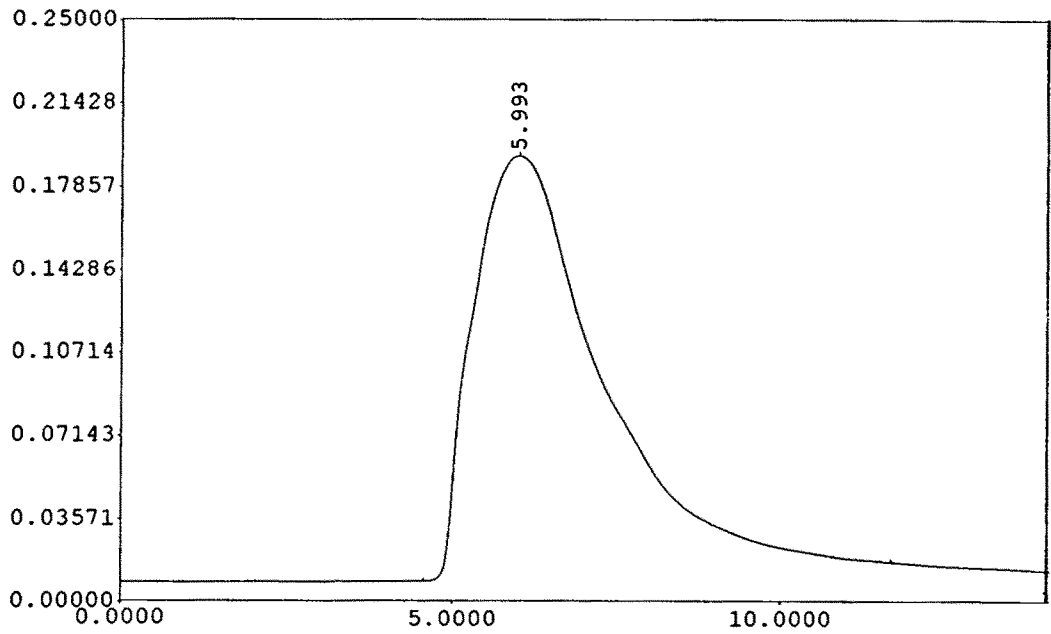
Column	Waters Nova-Pak C ₁₈ , 3.9 × 300mm
Sample	3TMI-2
Mobile Phase	n-propanol : NH ₄ OH : water (6 : 3 : 1)
Flow rate	0.35 ml/min
Detection	254 nm



Peak NO.	Retention time	Area(mV*sec)	Area(%)	Quantity (mg/ml)
1	4.877	10292.499	100.000	1.29
TOTAL			100.000	

Fig. 27. High performance liquid chromatogram of 3TMI-2 pigment.

Column	Waters Nova-Pak C ₁₈ , 3.9 × 300mm
Sample	2TMI-3
Mobile Phase	n-propanol : NH ₄ OH : water (6 : 3 : 1)
Flow rate	0.35 ml/min
Detection	254 nm



Peak NO.	Retention time	Area(mV*sec)	Area(%)	Quantity (mg/ml)
1	5.993	24461.253	100.000	2.16
TOTAL			100.000	

Fig. 28. High performance liquid chromatogram of 2TMI-3 pigment.

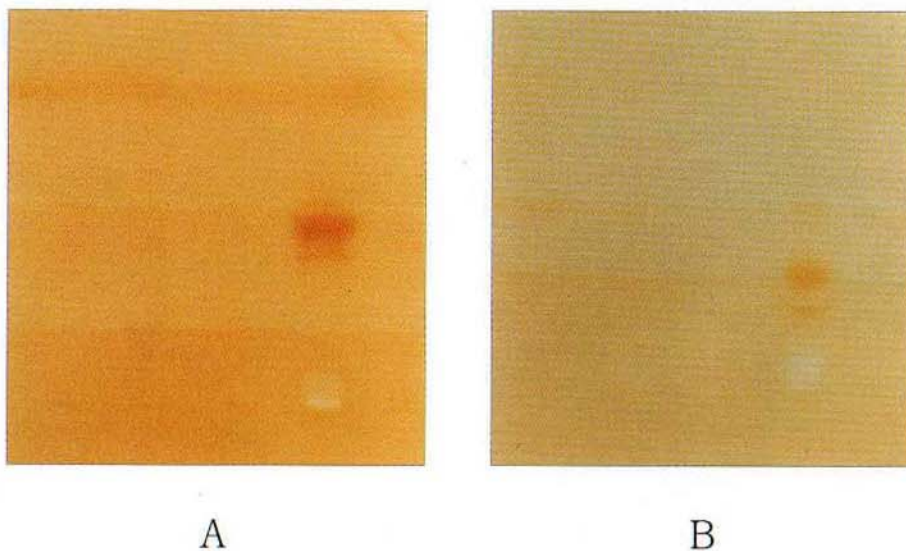
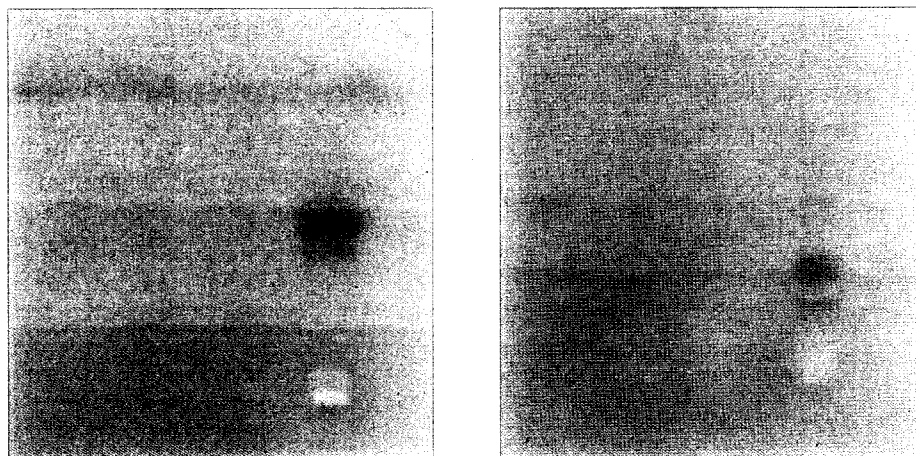


Fig. 29. Thin layer chromatogram of purified pigments.

A was developed with n-butanol : ethanol : water(3 : 2 : 3) solvent.
B was developed with n-propanol : NH_4OH : water(6 : 3 : 1) solvent.
Gel plates were sprayed with sulphuric acid for detection of organic matter. A $70\mu\text{l}$ (5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates (Merck. Art 5721)



A

B

Fig. 29. Thin layer chromatogram of purified pigments.

A was developed with n-butanol : ethanol : water(3 : 2 : 3) solvent.
B was developed with n-propanol : NH_4OH : water(6 : 3 : 1) solvent.
Gel plates were sprayed with sulphuric acid for detection of organic matter. A $70\mu\text{l}$ (5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates (Merck. Art 5721)

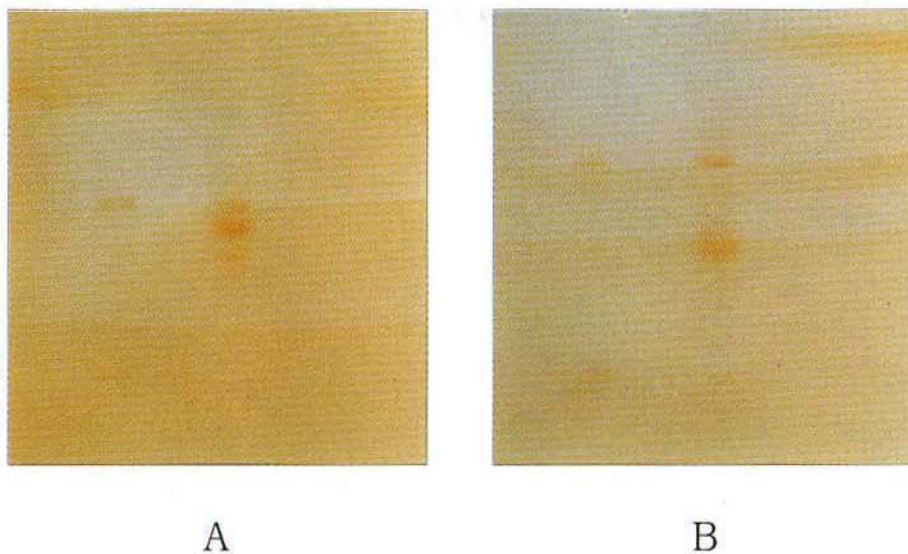


Fig. 30. Thin layer chromatogram of pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

A was developed with n-butanol : ethanol : water(3 : 2 : 3) solvent. B was developed with n-propanol : NH_4OH : water(6 : 3 : 1) solvent. Gel plates were sprayed with sulphuric acid for detection of organic matter. A $70\mu\text{l}$ (5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates (Merck. Art 5721).

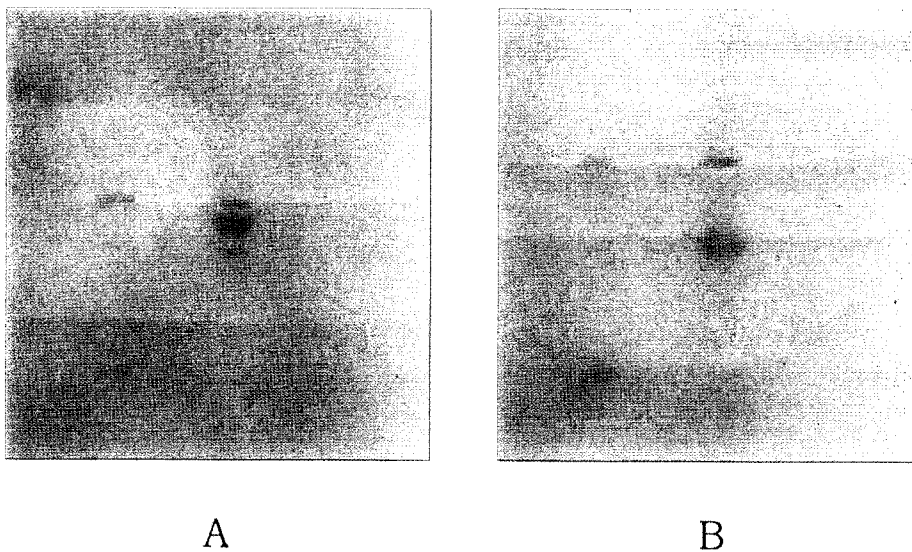


Fig. 30. Thin layer chromatogram of pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

A was developed with n-buthanol : ethanol : water(3 : 2 : 3) solvent.
B was developed with n-propanol : NH₄OH : water(6 : 3 : 1) solvent.
Gel plates were prayed with sulphuric acid for detection of organic matter. A 70 μ l(5% w/v) of sample was spotted on 0.25mm thick silica gel plates (Merck. Art 5721).

따라서 NH_4OH 에 의해 시료가 분해되지는 않는 것으로 보이며, 이들 색소들이 몇 가지의 복합물(dimer, polymer...)로 구성된 물질로 정제 과정 중에서 분리가 일어나는 것으로 사료된다.

3. 총결론

Bacillus sp. SSA3이 생성하는 색소를 Amberlite IRA-400 column, Amberlite IR-120(H) column을 통과시킨 후, TLC로 전개시킨 결과 3~4개의 band로 분리되며, 이를 다시 2차 전개시킨 결과 총 9개의 획분으로 분리되었다. 분리된 각각의 색소를 다시 TLC를 한 결과 계속적으로 분리된 spot들이 나타났다. 이러한 결과는 TLC 전개 시 시료가 TLC plate의 silica gel과의 반응을 통해 색소 시료들의 분해가 일어나 여러 spot으로 나누어지는 것으로 보인다. 따라서 색소의 정제는 원심분리, 강이온 교환수지, HPLC 및 methanol에 대한 용해성 등으로 정제를 하였다. 역상 column(Waters. Nova-Pak. R C_{18})을 이용한 HPLC에 의한 최종 정제 과정에서 3TMS-2($2.34\mu\text{g}/\text{ml}$), 2TMS-3($3.54\mu\text{g}/\text{ml}$), 3TMI-2($1.29\mu\text{g}/\text{ml}$), 2TMI-3($4.31\mu\text{g}/\text{ml}$)을 얻었으며, 각각의 시료들은 HPLC로 분석한 결과 거의 순수한 (95% 이상) 단일 peak로 나타났다.

제 3 절 색소의 기능성

Bacillus sp. SSA3이 생성하는 색소의 각 정제 단계별 항돌연변이성 및 세포 내에서의 항산화성 작용 기작을 규명하기 위하여 면역 비장 세포의 증식 활성, 항산화능, 항암성 및 암세포 성장 억제능 등을 조사하였다. 또한 본 색소를 의약품이나 (건강 보조)식품으로 사용 가능 여부를 규명하기 위하여 항돌연변이성 및 세포 내에서의 항산화성, 항암성 및 암세포 성장 억제능, interferons 생산 효과 등을 조사하였다.

1. 재료 및 방법

가. 항돌연변이성

Bacillus sp. SSA3의 조색소는 맹독성의 간암 유발 물질인 Aflatoxin B₁에 대해 50%정도의 항돌연변이성을 지니고 있다고 보고되어 있다. *Bacillus* sp. SSA3이 생성하는 색소의 항돌연변이원성을 확인하기 위해, histidine auxotrophs인 *Salmonella typhimurium*을 이용하여 Ames test를 하였다³⁶⁻⁴⁴. 색소 시료는 D.W(1 % w/v)에 용해한 후 0.45 μ m filter로 여과하여 사용하였으며, 돌연변이 원으로는 Aflatoxin B₁, IQ(2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline), PHIP(2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine)를 사용하였다.

나. 세포증식 활성

색소 시료에 대한 마우스 비장 세포의 호흡 연쇄를 이용한 세포 증식 활성을 확인하고, TNF- α (Tumor necrosis factor)를 낸다고 알려져 있는

Macrophage의 증식 효과에 대한 조사를 통해 TNF를 유도하는 암세포의 Cytotoxicity를 측정하고자 한다.

1) 마우스 비장 세포를 이용한 세포증식 활성 측정

마우스로는 C3H/HeN(male, 6 weeks old, Charles River)를 이용하여 비장을 추출한 후 세포를 여러 번 현탁하여, 세포 농도가 5×10^6 cell/ml 가 되도록 희석하였다. 여기에 색소 시료를 첨가하여 5 % CO₂ incubator, 37°C에서 배양하고 WST-법으로 측정하였다.

2) Macrophage의 증식 활성 측정

Macrophage(CRL-2019)를 RPMI phenol free 배지에 10% FBS를 첨가하여 6~7일 간격으로 계대 배양한 후, 색소 시료를 18 μ g/ml 농도로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 증식 활성을 측정하였다.

3) TNF- α 에 의한 항암 효과

색소 시료를 농도별로 Macrophage에 첨가하여 72시간 배양 후 이 배지를 L-929 cell line(암세포주)에 첨가하여 18시간 후 세포의 사멸 정도로부터 TNF- α (Mouse ; Recombinant, Sigma Co.)의 양을 평가하여 TNF- α 를 0.01~0.5 ng/ml 농도로 실험한 standard curve와 비교하였다.

다. 항산화성

산화 방지제는 식품의 자동 산화 방지와 인간의 노화 억제라는 측면에서 오래 전부터 연구가 진행되어 왔으며, 천연 항산화제와 합성 항산화제로 대별된다. 페놀류가 대부분을 차지하는 합성항산화제는 거의 모두가 인체 독성을 갖는다고 보고되고 있어 대부분 사용이 규제되고 있다. 따라서 항산화 효과가 확실하고, 무독성 및 안전성이 보장되는 천연 항산화제의 개발이 절

실히 요구된다. 따라서 본 연구에서는 색소 시료에 함유된 항산화성 물질과 그들의 제거 효소로서 SOD(super oxide dismutase)의 활성에 대해 검색해보고 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다. 세포주로는 Vero(African Green Monkey Kidney Cells)와 CCL13(Human liver cell)을 사용하여 색소 시료에 대한 항산화 효과를 조사하였다.

1) 활성 산소종(active oxygen radical species) 제거능

색소 시료를 세포주에 최종 농도 $18\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 첨가하여 18 시간 배양 후 전 처리하여 시료로 사용하였다. Hydroxyl radical의 측정 방법은 0.1M의 인산 완충 용액(pH 7.4), 10mM NaN_3 , 7mM deoxy-ribose, 5mM ferrous ammonium sulfate, 0.54M NaCl 시약을 각각 $33.3\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 검체군은 시료($15\mu\text{l}$)와 물($185\mu\text{l}$)을 합하여 $200\mu\text{l}$ 가 되게 하고, 대조군은 물 $200\mu\text{l}$ 만 넣어 이 혼합액을 37°C 항온 수조에서 15분간 가온한다. 반응 후 검체군의 시료 $30\mu\text{l}$ 를 취하여 8.1% SDS용액 $75\mu\text{l}$ 와 20% 용액 초산 $500\mu\text{l}$, 물 $25\mu\text{l}$ 를 추가하여 넣고 1.2 % TBA(thiobarbituric acid) 용액 $333\mu\text{l}$ 를 넣어 잘 섞은 다음 30분간 끓이고 실온에서 냉각한 후 $800\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 Spectrophotometer로 532nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량선에 의해 검체군과 대조군의 흡광도의 차를 이용하여 hydroxyl radical의 생성량을 계산하였다.

2) SOD(super oxide dismutase)의 활성

활성 산소종 radical의 제거 효소인 SOD 활성을 측정하기 위해 Oyanagui 등⁴⁵⁻⁴⁷⁾의 방법에 따라 최종 농도가 $18\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 각 색소 시료 0.1ml에 증류수 0.5ml, A시약(52.125mg of hydroxylamine+102.1mg of hypoxanthine/250ml D.W) 0.2ml, B시약(20ul of xanthine oxidase+

0.9939mg ethylenediamine-tetraacetic acid/26.7ml phosphate buffer, pH 8.2) 0.2ml를 첨가 혼합하여 37℃ 항온 수조에서 40분간 정치한 후 C 시약 (300mg of sulfanilic acid+N- 1-naphthylethylene diamine/500ml of 16.7% acetic acid) 2.0ml을 첨가 실온에서 20분간 정치한 후 spectrophotometer를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의거 SOD(super oxide dismutase)를 정량 하였다.

3) 색소 성분의 미약발광법(X,Y,Z)에 의한 활성 산소 제거능

자외선, alcohol 대사, 방사선 등에 의해 생성되는 활성산소종 라디칼은 DNA손상을 일으킬 만큼 반응성이 풍부하며, 식품 중에 이들 활성 산소종이 존재 시 라디칼 scavenger를 반응시키면 미약발광한다. 일반 식품 중 콩과식물을 소재로 한 식품인 된장, 간장에서 이러한 scavenger가 존재함이 관찰되었는데,⁴⁸⁾ 본 실험에는 색소 성분의 미약발광에 의한 활성산소종 제거능을 검토하므로써 생체 방어 기능을 밝히고자 하였다.

가) Spin trapping법에 의한 ESR 측정

Xanthine · hypoxanthine의 효소계에 의해 활성 산소를 발생시켜 DMPO (5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide, Labotec., Co. Ltd.)로서 활성산소를 보축하여 비교적 안정한 부가체(DMPO-O₂-adduct)를 ESR spin trapping법에 의한 SOD 활성을 측정하는 Kohon 등의 방법⁴⁹⁻⁵⁰⁾에 의해 측정하였다.

나) 미약발광의 측정

미약발광의 검출은 미약발광검출기(CLD-110, 東北電子(株))를 이용하여 350-600nm의 파장에서 발생하는 미약발광의 총량을 그 물질의 미약발광량

으로 하였다⁵¹⁾.

라. 항암성 및 암세포 성장 억제능

여러 가지 전통 발효 식품들은 좋은 영양원일뿐만 아니라 그들의 생리 활성 물질에 의한 항산화 및 항암 효과가 알려지면서 연구가 활발히 진행되고 있다⁵²⁻⁵⁷⁾. 그러나 국내에서는 아직 전통 발효 식품의 다양한 기능에 대한 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 색소 시료들의 항암성 측정 실험으로는 간암 세포주 및 간 정상 세포주에 대한 세포 독성 및 항암성 효과를 측정하였다.

1) 세포 독성의 평가

세포 독성 평가 실험은 세포주로 CCL-13(human normal cell)과 HepG2(human liver cancer cells)를 사용하였으며, 각 세포주를 DMEM (supplemented with 10% fetal calf serum)배지에 1×10^5 cells/ml이 되게 접종한 다음 4시간 후에 색소 시료를 농도별로 첨가하였다. 24시간 배양 후 세포를 배양 용기에서 탈착시켜 현미경으로 세포수를 측정하였다.

2) 암 세포 성장 억제능

세포 독성 평가 후 선택성이 미진한 것과 선택성이 우수한 색소 시료를 사용하여 암세포 및 정상 세포에 대한 성장 억제능으로 항암성을 평가하였다. 세포주를 $0.7 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/ml이 되게 접종한 후, 세포의 성장성은 매일 세포를 배양 용기에서 탈착시킨 후 현미경으로 세포수를 측정하였으며, 또한 시각적 평가를 위하여 성장 말기의 현미경 사진을 관찰하였다.

3) 정제 색소가 미치는 인터페론의 생산 효과 조사

Interferons 생산 평가에는 FS-4(human foreskin fibroblast)를 사용하였으며, 세포주를 10% FBS를 포함한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지를 넣고 색소 시료를 최종 농도가 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 첨가한 후, 37°C 의 5% CO_2 incubator에서 6~7일 간격으로 계대 배양하면서 실험에 임하였다. Virus는 interferons 정량을 위하여 VSV(vesicular stomatitis virus)를 사용하였다.

색소 시료 첨가에 따른 interferons 생산 방법은 다음과 같다.

가) Priming

FS-4(1×10^6 cells/ml)를 FBS 없는 DMEM로 2번 씻어준 다음 1% FBS가 포함된 DMEM에 다시 넣은 후 interferons 50U/ml를 첨가하여 37°C 에서 16시간 두었다.

나) Introduction

Cell을 serum없는 DME로 2번 씻어준 후, inducer로서 PolyI·PolyC($50\mu\text{g}/\text{ml}$), cycloheximide($10\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣어 34°C 에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 Actinomycine-D($1\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣어 34°C 에서 2시간 배양한 후, medium을 제거하고 cell을 serum 없는 DMEM로 씻어 주었다.

다) Production

37°C production medium(DMEM + 0.5% plasmanate)에 색소 시료들을 각각 첨가하고, 색소 시료를 넣지 않은 sample을 대조군(control)으로 하여 1시간 둔 다음 온도를 30°C 로 낮추고 24시간 후에 supernatant를 수집하였다. culture fluids는 1000g에서 10분간 centrifuge하고 -70°C 에서 실험을 행할 때까지 보관하였다.

라) Interferons assay

Interferons standard : FS-4를 5×10^4 cells가 되도록 96 well에 분주하고 Interferons standard를 1/2씩 연속적으로 희석한 후 plate에 $20 \mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고 나머지 $70 \mu\text{l}$ 를 2% FBS가 포함된 DME로 채워 37°C 에서 24시간 배양하였다. well당 VSV($10,000\text{PFU}$)를 $10 \mu\text{l}$ 를 접종하고 36시간 (interferons를 넣지 않은 sample이 모두 destruction된 시간) 후 50% destruction된 농도를 현미경으로 관찰하여 기준으로 하였다.

색소 시료 및 색소 시료를 첨가하지 않은 sample(대조군)를 첨가하여 얻은 interferons sample을 단계별로 희석하여 interferons standard와 마찬가지로 $20 \mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하였고 나머지 $70 \mu\text{l}$ 를 2% FBS가 포함된 DME로 채워 37°C 에서 24시간 배양한 후에 well당 VSV($10,000\text{PFU}$)를 $10 \mu\text{l}$ 를 접종하고 36시간 후 50% destruction된 농도를 기준으로 한 interferons 농도로 하고 희석 배수를 곱하여 interferons 생산량을 산출하고 대조군에 비교하였다.

바) 사진 촬영

Interferons 생산량을 산출한 후에 96 well에서 상층액을 제거하고 0.5% crystal violet, 40% ethanol in PBS 용액을 $50 \mu\text{l}$ 씩 넣어 세포를 10분간 고정 염색하고 염색액을 제거한 후 PBS용액으로 2번 닦은 후에 Olympus automatic photomicrographic system(PM20, USA)을 사용하여 사진을 촬영하였다.

마. 색소 시료의 apoptosis에 관한 연구

색소 시료가 특정 유전자의 지배에 의해 생체 내에서 생기는 불필요한 세포와 정상적이지 못한 세포를 적극적으로 제거하는 기구인 apoptosis에 대한 영향을 살펴보았다.

HepG2(human liver cancer cel)을 분주하고 24시간 후에 색소 시료 3-TMS-2, 2-TMI-3을 40 μ l/ml가 되게 첨가하여 72시간 배양 후 DNA 추출과 정제를 거쳐 electrophoresis를 행하였다.

2. 결과 및 고찰

Bacillus sp. SSA3이 생성하는 색소의 정제 단계별로 기능성 조사를 통해 여러 색소 시료 중 활성이 높은 시료부터 구조 분석을 하고자 한다. 또한 본 색소를 의약품이나 (건강 보조)식품으로 사용 가능한 지에 대해 규명하기 위하여 항돌연변이성 및 색소의 세포 내에서의 항산화성, 항암성, 암세포 성장 억제능 및 interferons 생산 효과 등을 조사하였다.

가. TLC에 의한 정제 과정별 기능성

1) 색소의 항돌연변이성 조사

전통 된장 및 간장의 색소를 생성하는 발효균인 *Bacillus* sp. SSA3의 조 색소는 맹독성의 간암 유발 물질인 Aflatoxin B₁(AFT B₁)에 대해 50%정도의 항돌연변이성을 지니고 있다. 정제된 색소의 항돌연변이원성을 확인하기 위해 histidine auxotrophs인 *Salmonella typhimurium*을 이용한 Ames test를 하였다. 1차 TLC로 분리한 색소들(P2-III1, II2, II3)에 대한 결과는 Table 5와 같이 mycotoxin의 일종인 Aflatoxin B₁(0.5 μ g/plate)에 대해서는 각각 88%, 62%, 85%정도 돌연변이성을 감소시켰으며, 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolinc(IQ)에 대해서는 각각 70%, 82%, 80% 정도 감소시켰으므로 이 두 물질에 대해서는 아주 강한 항돌연변이성을 나타내었다. 이들 색소를 2차 TLC로 전개 시 9개로 분리되었는데, 분리된 색소들(P2-III1-1,2,3,4, II2-1,2,3,4, II3-1)에 대한 항돌연변이성을 조사한 결과는 Table

Table 5. Inhibitory effects of the sample against various mutagens for *Salmonella Typhimurim* TA98¹⁾

Treatment($\mu\text{g}/\text{plate}$) ²⁾	Revertant/plate		Inhibition(%)
	Avg	\pm S.D. ³⁾	
Control(AFT B ₁ 0.5 μg)	170	\pm 38	
PS-III ⁴⁾	20	\pm 2	88
PS-II2	64	\pm 32	62
PS-II3	25	\pm 9	85
Control(IQ 0.02 μg)	343	\pm 166	
PS-III	104	\pm 36	70
PS-II2	62	\pm 15	82
PS-II3	79	\pm 9	80
Control(PHIP 0.2 μg)	521	\pm 133	
PS-III	375	\pm 228	28
PS-II2	418	\pm 231	20
PS-II3	539	\pm 81	-3

¹⁾ ; Antimutagenicity assay was based on the preincubation method described by maron and Ames. S9 fraction was prepared from the liver of Sprague-Dawley male rat injected with Arochor 1254(500mg/kg body weight).

²⁾ ; Control(Mutagen only)

Reactant(Mutagen + pigments ; 200 μg)

1. AFT B₁(Afatoxin B₁)

2. IQ(2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolinc : C₁₁H₁₀N₄=198.23)

3. PHIP(2-Amino-1-methly-6-phenylimidawo[4,5-b]pyridine M.W= 224.26)

³⁾ ; Mean \pm S.D. of triplication and mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants(11 \pm 3)

⁴⁾ ; Pigment samples fractionated from 1st TLC by developing solvent, n-Buthanol : ethanol : water=3 : 2 : 3

6에서와 같이 AFT B₁(1ug)에 대해서는 62.5~79.03% 정도 돌연변이성을 감소시켰으며, 0.05ug IQ에 대해서는 최고로 74.15%까지의 항돌연변이성을 나타내었다.

2) 세포 증식 활성

한국 전통 발효 식품들은 좋은 영양원일뿐만 아니라, 그들의 생리 활성 물질에 의한 항암 효과로 인해 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 국내에서는 아직 전통 발효 식품의 항암성에 대한 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 색소 시료를 이용하여 TNF(Tumor necrosis factor)를 낸다고 알려져 있는 Macrophage의 증식 효과에 대해서 알아보고 TNF를 유도하여 암세포의 Cytotoxicity를 측정하고자 하였다. 색소의 비장 임파구의 세포 증식 활성은 조추출물(TCP)에서는 현저한 증식 활성이 없었다. 그러나 Table 7에서 보는 바와 같이 정제한 시료 중에서 P1-2, 3, 4시료에서 대조구에 비해서 107~111%의 활성을 나타내었다. 이 결과는 색소 성분의 미지의 획득에 임파구 활성 인자의 존재를 시사하고 있다. 이들 인자가 항체 생산 세포인 B세포의 분열 촉진 반응을 자극하는 것인지, 또는 많은 임파구의 세포를 자극해서 cytokine을 분비하는 T세포의 분열 반응을 촉진하고 있는 것인지는 이 후 비장 임파세포를 nylon wool column법에 의해 B세포와 T세포로 분리한 후의 임파세포 증식 활성이 어떻게 변동할 것인지를 검토해야 할 것이다. 또한 경구 투여나 정맥주사와 같은 in vivo에 있어서의 복강 내 macrophage의 tumor necrosis factor- α 의 분비에 어떠한 영향을 미칠 지에 대한 생체 반응을 검토하고자 하였다.

Table 6. Inhibitory effects of the sample against various mutagens for *Salmonella Typhimurim* TA98.

Treatment($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant/plate		Inhibition(%)
	Avg	\pm S.D.	
Control(AFB ₁ 1 μg)	492	\pm 13	
PS-III-1 ¹⁾	140	\pm 26	71.77
PS-III-2	179	\pm 120	63.91
PS-III-3	151	\pm 30	69.56
PS-III-4	136	\pm 54	72.98
PS-II2-1	104	\pm 10	79.03
PS-II2-2	134	\pm 33	72.98
PS-II2-3	186	\pm 29	62.50
PS-II2-4	159	\pm 31	67.94
PS-II3-1	143	\pm 3	71.17
Control(IQ 0.05 μg)	1675	\pm 218	
PS-III-1	433	\pm 51	74.15
PS-III-2	1140	\pm 184	31.94
PS-III-3	1164	\pm 151	30.51
PS-III-4	891	\pm 60	46.81
PS-II2-1	888	\pm 74	46.99
PS-II2-2	654	\pm 52	60.96
PS-II2-3	995	\pm 100	40.50
PS-II2-4	642	\pm 149	61.67
PS-II3-1	580	\pm 55	65.37

¹⁾ ; pigment samples fractionated from 2nd TLC by developing solvent, n-propanol : NH₄OH : water (6 : 3 : 1)

Table 7. Effect of pigments on growth of C3H/HeN spleen cell.

Pigments ¹⁾	Ratio of cell growth (%)	Significant difference
PS-III-1	99	
PS-III-1	101	
PS-III-2	107	*
PS-III-3	109	*
PS-III-4	111	*
PS-II2-1	98	
PS-II2-2	99	
PS-II2-3	99	
PS-II2-4	99	
PS-II3-1	98	

¹⁾ ; pigment samples fractionated from 2nd TLC by developing solvent, n-propanol : NH₄OH : water(6 : 3 : 1)

* P<0.005

3) 색소의 활성 산소 제거능

자외선, alcohol 대사, 방사선 등에 의해 생성되는 활성산소종 라디칼은 DNA손상을 일으킬 만큼 반응성이 풍부하며, 실제 인간의 암 발생의 20% 정도가 이들 활성산소종 라디칼에 의해 일어난다고 한다. 식품 중에 이들 활성산소종이 존재 시 라디칼 scavenger를 반응시키면 미약 발광한다. 일반 식품 중 콩과식물을 소재로 한 식품인 된장, 간장에서 이러한 scavenger가 존재함이 관찰되었는데, 본 실험에는 색소 성분의 미약발광에 의한 활성산소종 제거능을 검토하므로 서 이들 색소의 생체 방어 기능을 밝히고자 하였다.

HOOH, HO·, LOOH·, LOO·, LO· 등 active oxygen radical species (X)는 인체 내에서 DNA와 단백질의 분자를 손상시켜 인간의 암 중 약 20%정도를 발생시키고 있다. 그러나 실제 인체 내에서는 식품 중 catalytic species(Y), 예로써 phenol류인 flavone, catechins, gallic acid 등 antioxygen에 의해 많은 활성산소종이 소거됨으로써 더 많은 암의 유발을 막고 있다. 또 최근에는 receptors ,Z, (예 DDMP, saponins, CH₃CHO) 등이 존재함으로써 Y의 성질을 바꾸어 줌이 알려져 있다. 즉 chemiiluminescence intensity인 $[P] = k[X][Y][Z]$ 임이 실험적으로 밝혀져 있다. 이는 인체 내에서 활성산소종의 제거는 catalytic species(Y)만이 아니라 receptors(Z)의 존재로 배가 될 수 있음을 뜻하기 때문에 이 색소 시료들의 활성 산소 제거능(Fig. 31)을 조사해 본 결과 모든 색소가 높은 활성 산소의 제거능을 나타냈으며, 그 중 PS-II2-II1은 control에 비해 약 400%나 높은 활성 산소 제거능이 있음을 확인하였다.

또한 색소 시료들의 receptors(Z)로써의 역할을 조사해 본 결과 Table 8에 서와 같이 이들 색소는 $O_2 \xrightarrow{SOD} HOOH \longrightarrow HO\cdot$ 의 반응 중 HOOH에 대해서는 Z(receptor)로써의 기능이 없으나 HO·에 대해서는 기능이 있는 특이한 성질을 갖고 있음이 밝혀졌다(이러한 현상은 새로운 사실임).

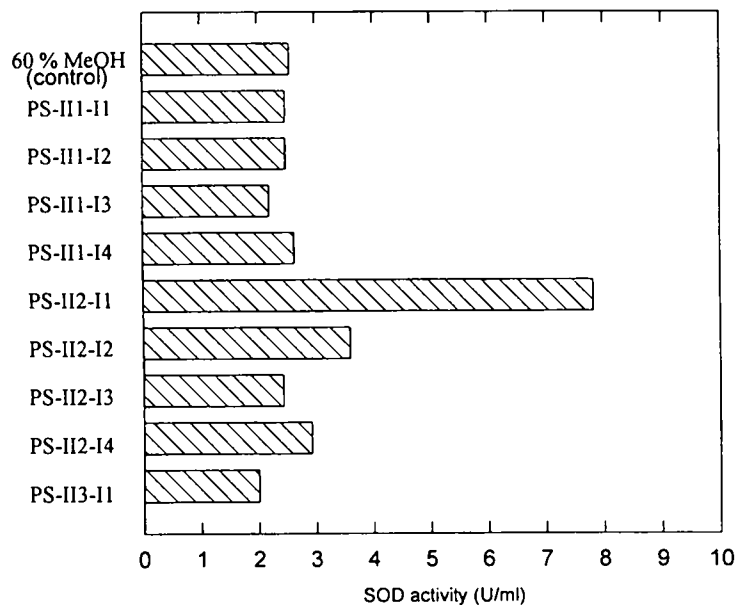


Fig. 31. Effect of pigments on super oxide dismutase (SOD) activity.

Table 8. Pigment samples as receptor(Z).

Pigments ¹⁾	H ₂ O ₂		OH·	
	Y	Z	Y	Z
Control ²⁾	100	100	100	100
PS-III-1	3.7	0	8.3	65.0
PS-III-2	7.4	0	5.8	83.3
PS-III-3	3.7	0	3.0	83.3
PS-III-4	3.7	0	5.0	83.3
PS-II2-1	11.1	0	8.3	76.7
PS-II2-2	-3.7	0	10.0	56.0
PS-II2-3	7.4	0	5.8	85.0
PS-II2-4	11.1	0	5.0	75.0
PS-II3-1	7.4	0	15.0	65.0

¹⁾ ; Pigment sample(1.0 mg/ml)

²⁾ ; Control(X ; active oxygen radical species ; oxidants)

Y(1.0 mg/ml gallic acid ; catalytic species ; antioxidant)

Z(2 % CH₃CHO ; receptor ; prooxidant)

HO· ; generated by Fenton reaction

이들 색소가 aflatoxin B₁에 대해 항돌연변이원성 효과, 항체 생산 세포의 증식 효과가 있으며, 활성 산소 제거능 및 활성산소종 제거능을 상승시키는 효과가 있음은, 인체 내에서 어떠한 큰 부작용이 없다면, 좋은 anticarcinogen으로써의 역할을 할 수 있으리라 사료된다(*Bacillus* sp. SSA3이 생성하는 이 색소는 옛날부터 우리 민족이 섭취해온 전통 간장과 된장 중의 한 색소 균이므로 인체에 부작용이 없을 가능성이 많음).

나. HPLC에 의한 정제 과정별 기능성

1) 항돌연변이성

정제한 색소의 항돌연변이원성을 확인하기 위해, HPLC로 분리 정제한 색소들(TMS-1, 2, 3, 4, TMI-1, 2, 3, 4, 5)에 대해 histidine auxotrophs인 *Salmonella typhimurium* 균주를 이용하여 Aflatoxin B₁, 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quino-linc(IQ)에 대한 Ames test를 행하였다. Table 9에서와 같이 AFT B₁의 농도별로 실험한 결과 *S. typhimurium* TA98 균주로 실험한 TCP(crude pigment) 경우 최고로 46%의 항돌연변이 효과를 나타내었으나, *S. typhimurium* TA100 균주로 실험한 경우 색소 시료 TMS, TMI들은 대체로 낮은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 이들 색소 시료의 항돌연변이 효과는 시료의 농도가 높을수록 항돌연변이 효과가 높아 졌으며, TMS-1시료가 53.67%로 가장 높은 효과를 나타내었다. Mutagen IQ에 대해서는 Table 10에서와 같이 대체로 50%이상의 항돌연변이 효과를 나타내었으며, 그 중 TMI-3 시료가 65.9%로 가장 높게 나타났다. 2차 HPLC로 정제한 색소 시료 2TMS-2, 2TMS-3, 2TMI-2 및 2TMI-3의 항돌연변이성 결과는 Table 11에서와 같이 2TMS-3 시료의 경우 균주에 따라 85.30~99.82% 정도의 높은 항돌연변이 효과가 나타났으며, Table 12에서와 같이 2TMS-2 시료가 86.58%, 2TMI-2 시료가 84.85%의 높은 항돌연변이 효과

Table 9. Inhibitory effects of the pigment samples against AFB₁ for *Salmonella typhimurium*¹⁾.

Treatment ($\mu\text{g}/\text{plate}$) ²⁾	Revertant/plate Avg \pm S.D. ³⁾		Inhibition(%)			Strains ⁵⁾
			50 ⁴⁾	100	200	
Control	1532	\pm 73				2
TCP	1336	\pm 188	46			1
TMS-1	1244	\pm 116	18.80	44.21	53.67	2
TMS-2	1148	\pm 114	25.07	35.24	38.66	2
TMS-3	1044	\pm 37	31.85	37.68	37.68	2
TMS-4	1070	\pm 24	30.16	23.49	29.69	2
TMI-1	1118	\pm 189	27.02	22.84	30.67	2
TMI-2	1046	\pm 44	31.72	9.30	35.56	2
TMI-3	1294	\pm 171	15.54	24.14	40.62	2
TMI-4	1149	\pm 173	25.00	28.22	38.01	2
TMI-5	1443	\pm 80	5.81	2.45	27.73	2

¹⁾ ; Antimutagenicity assay was based on the preincubation method described by Maron and Ames. S9 fraction was prepared from the liver of Sprague-Dawley male rat injected with Arochlor 1254(500mg/kg body weight).

²⁾ ; Control(Mutagen only ; AFB₁ 1 μg)
 Reactant(Mutagen + sample 50, 100, 200 μg)
 1. AFT B₁(Afatoxin B₁)

³⁾ ; Mean \pm S.D. of triplication and mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants(11 \pm 3).

⁴⁾ ; Concentration of pigment samples(μg)

⁵⁾ ; used strains(1 ; *S. typhimurium* TA98, 2 ; *S. typhimurium* TA100).

Table 10. Inhibitory effects of the pigment samples against IQ for *Salmonella typhimurium*.

Treatment($\mu\text{g}/\text{plate}$) ¹⁾	Revertant/plate ²⁾			Inhibition(%)	Strains
	Avg	\pm	S.D. ³⁾		
Control(IQ 0.3 μg)	745	\pm	71		<i>S. typhimurium</i>
TCP	1759	\pm	36	10	TA98
TMS-1	306	\pm	115	58.93	
TMS-2	394	\pm	20	47.11	
TMS-3	374	\pm	64	49.93	
TMS-4	437	\pm	52	41.34	<i>S. typhimurium</i> TA100
TMI-1	1118	\pm	189	2.68	
TMI-2	1046	\pm	44	52.62	
TMI-3	1294	\pm	171	65.90	
TMI-4	1149	\pm	173	60.54	
TMI-5	1443	\pm	80	64.83	

¹⁾ ; Antimutagenicity assay was based on the preincubation method described by Maron and Ames. S9 fraction was prepared from the liver of Sprague-Dawley male rat injected with Arochlor 1254(500mg/kg body weight).

²⁾ ; Control(Mutagen only ; IQ 0.3 μg)

Reactant(Mutagen + sample 200 μg)

1. IQ (2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolinc : $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4 = 198.23$)

³⁾ ; Mean \pm S.D. of triplication and mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants(TA98 : 119 ± 33 , TA100 : 105 ± 35)

Table 11. Inhibitory effects of the pigment sample 2TMS-3, against AFB₁ for *Salmonella typhimurium*¹⁾.

Treatment ($\mu\text{g}/\text{plate}$) ²⁾	Revertant/plate	Inhibition (%)	Strains
	Avg \pm S.D. ³⁾		
Control	413 \pm 110		<i>S. typhimurium</i>
2TMS-3	219 \pm 100	88.18	TA98
Control	452 \pm 113		<i>S. typhimurium</i>
2TMS-3	51.6 \pm 5.13	99.82	TA100

¹⁾ ; Antimutagenicity assay was based on the preincubation method described by Maron and Ames. S9 fraction was prepared from the liver of Sprague-Dawley male rat injected with Arochor 1254(500mg/kg body weight).

²⁾ ; Control(Mutagen only ; AFB₁ 0.5 μg)
Reactant(Mutagen + sample 200 μg)

1. AFT B₁(Afatoxin B₁)

³⁾ ; Mean \pm S.D. of triplication and mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants(TA98 : 103 \pm 13, TA100 : 150 \pm 25)

Table 12. Inhibitory effects of the pigment sample against AFB₁ for *Salmonella typhimurium* TA100¹⁾.

Treatment ($\mu\text{g}/\text{plate}$) ²⁾	Revertant/plate	Inhibition(%)
	Avg \pm S.D. ³⁾	
Control	365 \pm 32.63	
2TMS-2	165 \pm 21.04	86.58
2TMI-2	169 \pm 44.17	84.85
2TMI-3	172 \pm 48.79	49.78

¹⁾ ; Antimutagenicity assay was based on the preincubation method described by Maron and Ames. S9 fraction was prepared from the liver of Sprague-Dawley male rat injected with Arochor 1254(500mg/kg body weight).

²⁾ ; Control(Mutagen only ; AFB₁ 0.5 μg)
 Reactant(Mutagen + sample 200 μg)
 1. AFT B₁(Afatoxin B₁)

³⁾ ; Mean \pm S.D. of triplication and mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants.

를 나타내었으나, 2TMI-3 시료의 경우는 49.78%로 비교적 낮게 나타났다.

HPLC로 최종 정제한 색소 획분 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및 2TMI-3의 aflatoxin B₁에 대한 농도별 항돌연변이 효과에 대하여 조사한 결과는 Table. 13에서와 같이 2TMS-2 시료는 시료 농도가 증가 할수록 항돌연변이 효과가 높게 나타나 400 μ g 첨가 시 92.2%의 억제 효과를 보였다.

2TMS-3 시료는 시료 농도 50 μ g을 첨가하였을 때 96.08%의 항돌연변이 효과를 보였으며, 200 μ g 첨가 시에는 99.82%의 높은 억제 효과를 보였다.

3TMI-2 시료는 최고 86.85%(300 μ g)의 억제 효과를 나타내었으며, 2TMI-3 시료는 39.3~49.78%의 비교적 낮은 억제 효과를 나타내었다. Fig. 32에서와 같이 정제 색소 시료들의 농도별 항돌연변이 억제 경향을 보면 TMI 시료의 경우 300 μ g 첨가시 최고의 효과를 보였으나, 그 이후의 농도에서는 효과가 감소 하였다. TMS 시료의 경우, 3TMS-2 시료는 시료의 농도가 증가 할수록 억제 효과가 계속 증가 하였고, 2TMS-3 시료는 200 μ g에서 최대의 효과를 보였으며, 그 이후의 농도에서는 억제 효과가 감소 하였다.

Table 13. Dose inhibitory effects of the pigment sample against AFB₁ for *Salmonella typhimurium* TA100¹⁾.

Treatment ($\mu\text{g}/\text{plate}$) ²⁾	Inhibition(%)				
	50	100	200	300	400
3TMS-2	79.46	84.3	87	91.52	92.2
2TMS-3	96.08	96.10	99.82	95	94.83
3TMI-2	77.39	80.84	83.40	86.85	84.77
2TMI-3	41.7	43.78	46	49.78	39.3

¹⁾ ; Antimutagenicity assay was based on the preincubation method described by Maron and Ames. S9 fraction was prepared from the liver of Sprague-Dawley male rat injected with Arochor 1254(500mg/kg body weight).

²⁾ ; Control(Mutagen only ; AFB₁ 0.5 μg)
 Reactant(Mutagen + sample 50, 100, 200, 300, 400 μg)
 1. AFT B₁(Afatoxin B₁)

³⁾ ; Mean \pm S.D. of triplication and mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants.

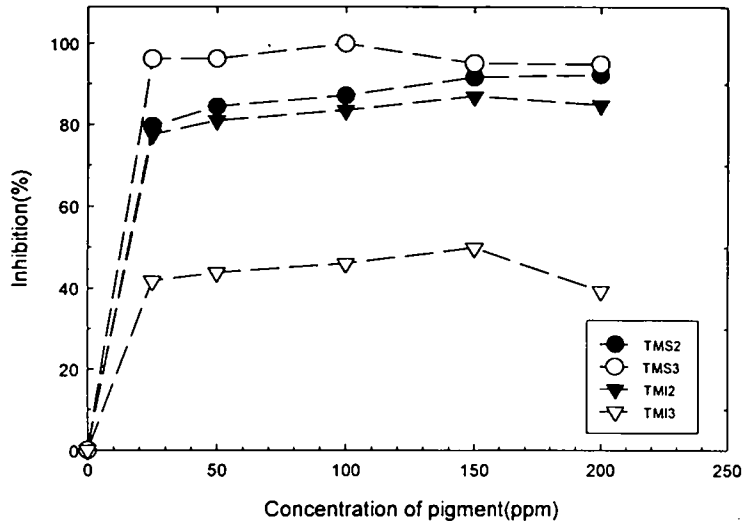


Fig. 32. Dose inhibitory effects of the pigment sample against AFB₁ for *Salmonella typhimurium* TA100.

2) 항산화 효과

가) Vero (African Green Monkey Kidney Cells) 세포주를 이용한 항산화 효과

(1) 활성 산소(active oxygen radical species) 제거능

Vero 세포주로 실험한 결과는 Fig. 33, 34에서와 같이 색소 시료들을 첨가한 배양액들 중에서 hydroxyl radical의 감소율이 가장 높은 것은 TMI-2이었으며 control에 비해서 대체로 hydroxyl radical의 감소율이 높았으나, TMI-5는 오히려 낮은 것으로 나타났다. TMS 시료에서도 control에 비해서 hydroxyl radical의 감소율이 높았으며, 그 중에서도 TMS-2, TMS-3이 감소율이 가장 높은 것으로 나타났다. 위의 결과를 토대로 색소의 항산화능은 TMS-2, TMS-3은 거의 완벽하게 라디칼의 생성을 억제하였고 TMI-2, TMI-1, TMI-3, TMI-4의 순으로 항산화능이 나타남을 알 수 있다.

(2) SOD(Super oxide dismutase)의 활성

SOD활성 증가 효과는 세포주 Vero로 실험한 결과 Fig. 35, 36에서와 같이 색소 시료들을 첨가한 sample들이 첨가하지 않은 control에 비해 activity가 높은 것은 TMI-1, TMI-2이었으며 TMI-3, TMI-4, TMI-5는 오히려 낮게 나타났다. 따라서 색소 시료가 Vero cell의 배양액에 첨가되었을 때 SOD activity를 크게 활성화하지는 않는 것으로 보인다. TMS의 시료의 경우에는 control에 비해 SOD activity가 높은 시료는 TMS-4뿐이고 나머지 시료들은 activity가 오히려 낮은 것으로 나타나서 SOD activity를 활성화하지 못하는 것으로 나타났다. 이는 SOD의 기질인 라디칼류를 색소가

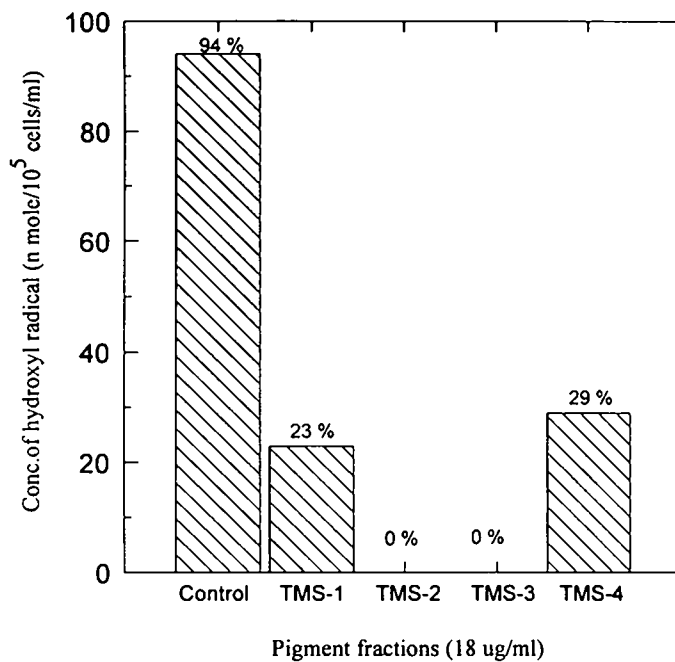


Fig. 33. The antioxidantal effect of TMS pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

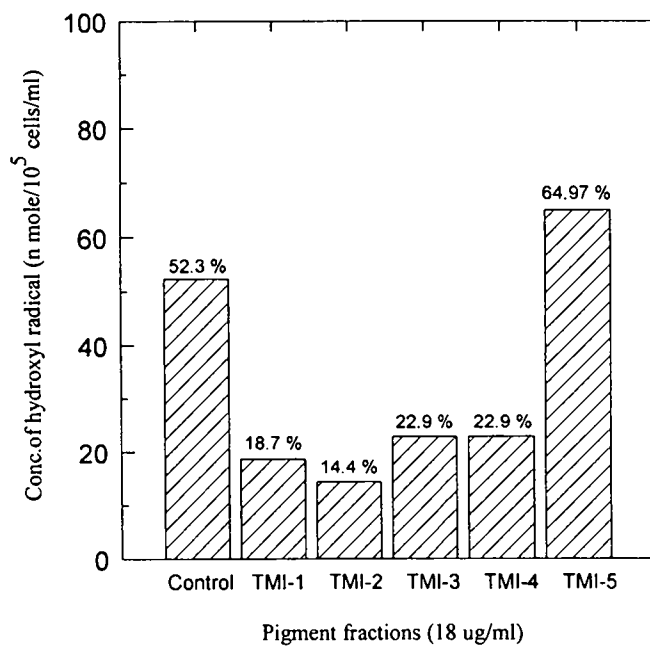


Fig. 34. The antioxidantal effect of TMI pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

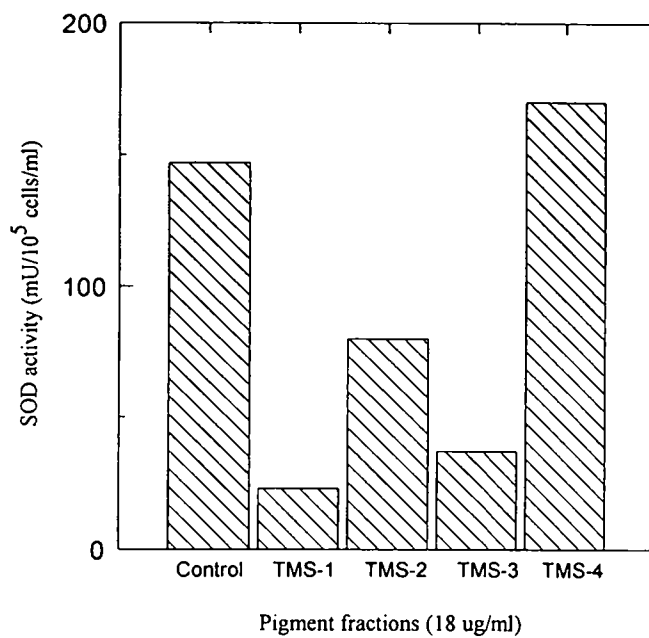


Fig. 35. Comparison of SOD activity by adding of TMS pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

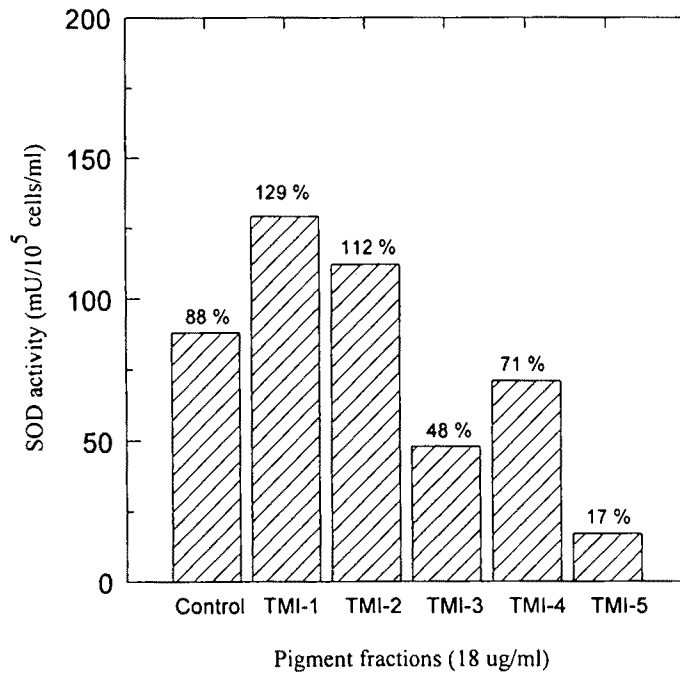


Fig. 36. Comparison of SOD activity by adding of TMI pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

직접 포획함으로써 세포의 SOD 생산 필요성이 감소되어 나타난 현상으로 해석되며, 결국 색소는 SOD와 같은 효소의 활성을 증가시킴으로써 라디칼의 제거를 나타내는 간접적인 항산화능보다는 직접적으로 hydroxyl radical을 포획함으로써 항산화능을 가지는 것으로 사료된다.

나) CCL13 (Human liver cell) 세포주를 이용한 항산화 효과

(1) 활성산소종(active oxygen radical species) 제거능

색소 시료에 의한 CCL13(Human liver cell) 세포주를 이용한 항산화 효과에서는 Table 14에서와 같이 hydroxyl radical의 감소율이 가장 높은 것은 TMS-4(69%)이었으며, 15~52% 정도의 hydroxyl radical의 감소를 보였으며, TMI-3은 오히려 낮은 것으로 나타났다.

HPLC로 최종 정제한 색소 시료 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및 2TMI-3에 대하여 활성산소종(active oxygen radical species)의 제거능 효과는 Table 15에서 보는 바와 같이 이들 시료들의 활성산소종 제거능은 78~99% 정도로 매우 높게 나타났으며, 시료 중 2TMS-2(99%)가 가장 높은 제거능을 보였으며, 2TMS-3(97%), 2TMI-3(85%), 2TMI-2(78%)의 순으로 제거능이 높은 것으로 나타나 이들 색소 시료들이 높은 항산화 효과를 가짐을 알 수 있다.

(2) SOD(Super oxide dismutase)의 활성

색소 시료에 대한 SOD 활성을 조사한 결과 Table 16에서와 같이 색소 시료를 첨가한 sample들이 첨가하지 않은 control에 비해 활성이 나타나지 않았다.

HPLC로 최종 정제한 색소 시료 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및

Table 14. The antioxidantal effect of pigment samples produced by *Bacillus* species SSA3.

Pigment samples	Concentration of hydroxyl radical (n mole/10 ⁴ cells/ml)	Reduction ratio of hydroxyl radical (%)
Control	118	
TMS-1	56	52
TMS-2	81	31
TMS-3	56	52
TMS-4	37	69
TMI-1	118	0
TMI-2	101	15
TMI-3	204	-73
TMI-4	79	33
TMI-5	-	-

*(-) ; below detection limit

Table 15. The antioxidantal effect of pigment samples purified from second HPLC.

Pigment samples	Concentration of hydroxyl radical (n mole/10 ⁵ cells/ml)	Reduction ratio of hydroxyl radical (%)
Control	738	
2TMS-2	10	99
2TMS-3	22	97
2TMI-2	165	78
2TMI-3	110	85

Table 16. Comparison of SOD activity by adding of pigment samples produced by *Bacillus* species SSA3.

Pigment samples	SOD activity (mU/10 ⁴ cells/ml)	Relative activity (%)
Control	0.76	
TMS-1	-	-
TMS-2	-	-
TMS-3	-	-
TMS-4	-	-
TMI-1	-	-
TMI-2	-	-
TMI-3	-	-
TMI-4	-	-
TMI-5	-	-

*(-) ; Below detection limit

2TMI-3의 SOD(Super oxide dismutase)에 대한 활성은 Table 17에서와 같이 3TMS-2 시료는 0.964(unit/ml), 2TMS-3 시료는 0.458, 3TMI-2 시료는 0.575, 그리고 2TMI-3 시료가 0.966으로 낮게 나타났다. 이는 Vero 세포주를 이용한 항산화 효과 조사의 경우와 경향이 일치함을 보였다.

3) 세포 증식 활성

가) Macrophage의 증식 활성 측정

색소 시료의 첨가에 따른 macrophage(CRL-2019)의 증식 효과는 Table 18에서 보는 바와 같이 TMS, TMI시료는 대체로 5~19%정도의 증식 효과를 나타내었으며, TMI-3, 4,5 시료의 경우는 오히려 감소하는 경향을 나타내어 이들 시료의 첨가에 따른 macrophage의 증식 효과는 없는 것으로 보인다.

나) TNF- α 에 의한 항암 효과

색소 시료를 macrophage 배양액에 농도별로 첨가하고 72시간 배양한 후 배양액을 L-929에 첨가하여 TNF- α 의 농도를 측정한 결과 Table 19에서와 같이 TNF- α 의 양은 극히 미량 검출되었는데 그 중에서 TMS-2 시료의 경우 0.1ng/ml, TMS-3 시료의 경우 0.13ng/ml의 생산 효과를 나타내었다.

HPLC로 최종 정제한 색소 시료 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및 2TMI-3에 대하여 macrophage의 증식 효과와 TNF- α 에 의한 항암 효과는 Table 20과 21에서 보는 바와 같이 활성이 비교적 낮게 나타나 세포 증식 효과는 극히 미미한 것으로 사료된다.

Tabel 17. Comparison of SOD activity by adding of pigment samples produced by *Bacillus* species SSA3.

Sample	Signal Peak Height (Mn)	Radical Amount	SOD (unit/ml)
3TMS-2 (5mg/ml)	15.80	54.40	0.964
2TMS-3 (5mg/ml)	11.20	60.40	0.458
3TMI-2 (5mg/ml)	15.60	74.40	0.575
2TMI-3 (5mg/ml)	13.20	45.40	0.966
Gallic acid (1mg/ml)	12.00	9.20	5.847
Gallic acid (5mg/ml)	15.40	5.80	12.353
blank	14.40	88.60	0.348

Table 18. The growth yield of macrophage¹⁾ by adding of pigment samples.

Pigment samples ²⁾	Growth yield (%)
TMS-1	16
TMS-2	7
TMS-3	5
TMS-4	19
TMI-1	10
TMI-2	12
TMI-3	-8
TMI-4	-8
TMI-5	-10

¹⁾ ; Macrophage(CRL-2019)

²⁾ ; Sample(18 ug/ml)

Table 19. The production of TNF- α ¹⁾ by adding of pigment samples.

Pigment samples	TNF- α Production (ng/ml)
TMS-1	0.09
TMS-2	0.10
TMS-3	0.13
TMS-4	0.08
TMI-1	0.08
TMI-2	0.09
TMI-3	0.003
TMI-4	0.003
TMI-5	0.001

¹⁾ ; TNF- α (Mouse ; Recombinant, Sigma Co.)

Cell line : L-929(Cancer cells)

Table 20. The growth yield of macrophage¹⁾ by adding of purified pigment samples.

Pigment samples ²⁾	Cell number (cells/ml)	Growth yield (%)
Control	1.3×10^6	*(-)
2TMS-2	9.6×10^5	(-)
2TMS-3	8.7×10^5	(-)
2TMI-2	6.5×10^5	(-)
2TMI-3	5.7×10^5	(-)

¹⁾ ; Macrophage(CRL-2019)

²⁾ ; Sample(18 ug/ml)

*(-) ; Below detection limit

Table 21. The production of TNF- α ¹⁾ by adding of pigment samples.

Pigment samples	TNF- α production (ng/ml)
2TMS-2	*(-)
2TMS-3	(-)
2TMI-2	0.02
2TMI-3	0.02

¹⁾ ; TNF- α (Mouse ; Recombinant, Sigma Co.)

Cell line : L-929(Cancer cells)

*(-) : Below detection limit

4) 항암성 및 암세포 성장 억제능 측정

HPLC로 최종 정제한 색소 시료의 간암 세포주(HepG2) 및 간 정상 세포주(CCL-13)에 대한 세포 독성 및 항암 효과를 측정하였다.

가) 세포 독성의 평가

간 정상 세포에 대한 시료들의 농도별 세포 독성을 살펴 본 결과 Table 22에서와 같이 2TMI-3 시료의 경우 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 17~34% 정도의 세포 독성을 보였으나, 그 외의 색소 시료들은 정상 세포에 대하여 세포 독성을 나타내지 않았다. 간암 세포인 HepG2에 대한 세포 독성을 살펴 본 결과는 Table 23에서와 같이 시료 농도 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 3TMS-2 시료가 48% 정도로 가장 높은 사멸 효과를 나타내었으며, 2TMS-3 시료는 39%($40\mu\text{g}/\text{ml}$), 2TMI-3이 45%($100\mu\text{g}/\text{ml}$), 3TMI-2 시료가 37%($100\mu\text{g}/\text{ml}$) 정도의 높은 효과를 나타내었으며, 시료 농도가 증가할수록 암세포주의 사멸 효과가 계속 증가하였다. 이상의 결과로 보아 2TMI-3 시료를 제외한 다른 획분들은 정상 세포(CCL-13)에는 영향을 미치지 않으면서 암세포(HepG2)에만 영향을 미치는 높은 특이성을 가지는 것으로 사료된다.

나) 암 세포 성장 억제능

색소 시료들에 대한 암세포 성장 억제능을 조사한 결과는 정상 세포와 암세포에 대해 높은 선택적 효과를 보이는 2TMS-3 시료의 경우 Fig. 37에서와 같이 암세포의 초기 성장은 저해하지만, 성장 속도에는 큰 영향이 없는 것으로 나타났다. 정상 세포에 대한 2TMS-3의 암세포 억제 효과는 Fig. 36에서와 같이 성장 저해 효과는 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 2TMS-3 시료의 암세포에 대한 항암 효과는 미미하며, 또한 정상

**Table 22. Cytotoxic effect of pigments on CCL-13
(Human normal liver).**

Sample conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0	20	40	60	100
Pigment samples					
3TMS-2	0	0	0	2	3
2TMS-3	0	0	1	0	3
3TMI-2	0	1	5	7	0
2TMI-3	0	0	17	32	34

**Table 23 Cytotoxic effect of pigments on HepG2
(human liver cancer cells).**

Sample conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0	20	40	60	100
Pigment samples					
3TMS-2	0	27	39	38	36
2TMS-3	0	24	39	38	36
3TMI-2	0	24	32	41	45
2TMI-3	0	15	14	32	37

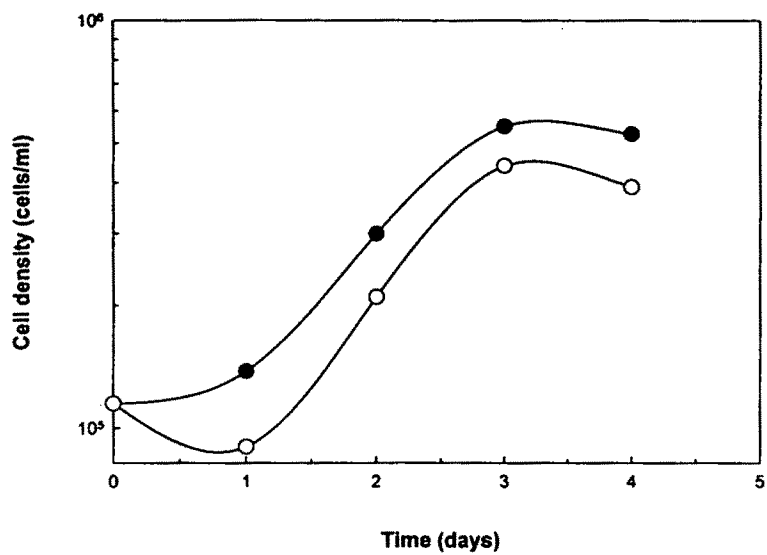


Fig. 37. The growth rate of HepG2(human liver cancer cells) cells according to adding 2TMS-3.

● ; HepG2(0 μg/ml)

○ ; HepG2(40 μg/ml)

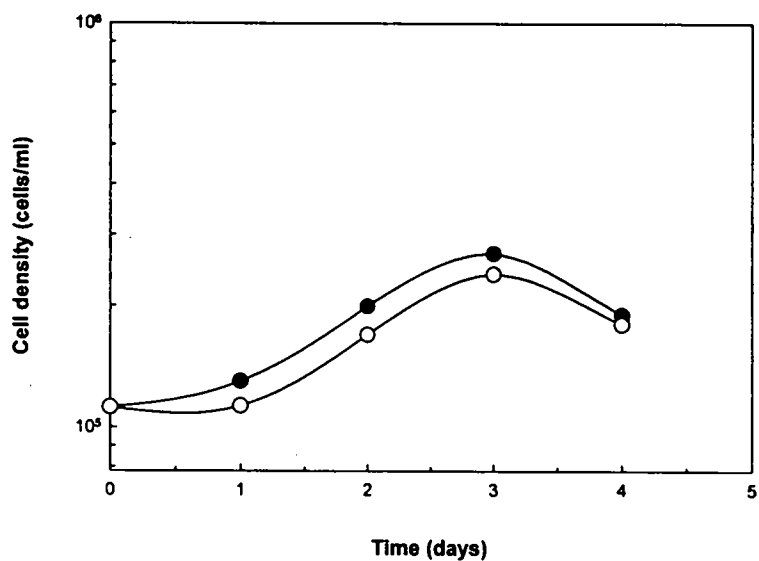


Fig. 38. The growth rate of CCL-13(human normal liver) cells according to adding 2TMS-3.

● ; CCL-13(0 μg/ml)

○ ; CCL-13(40 μg/ml)

세포에 대해서도 독성이 없는 것으로 사료된다. 그러나 3TMS-2 시료의 경우 Fig. 39에서와 같이 정상 세포의 성장은 시료의 첨가에 의해 영향을 받지 않으나, Fig. 40에서와 같이 암세포인 HepG2의 성장 속도를 약 50% 감소시키는 것으로 나타났다. 3TMS-2를 정상 세포(CCL-13)와 암세포(HepG2)주에 40 μ g/ml 농도로 첨가한 후 배양 4일째에 40배율 현미경 사진을 살펴보면 Fig. 41에서와 같이 암세포주(HepG2)의 경우 시료 첨가 시 세포의 밀집도가 상당히 감소하였음을 알 수 있으며, 정상 세포(CCL-13)의 경우는 시료 첨가군과 무첨가군에 대한 세포의 밀집도가 유사함을 알 수 있었다. 결론적으로 색소 시료 중 3TMS-2가 세포 독성 및 항암성이 가장 높으며, 또한 암세포에 대한 특이성을 가지고 있음이 판명되었다.

이러한 결과로 보아 항돌연변이성 및 선택적 항암성을 가진 이 색소 시료들은 기능성 식품으로서의 섭취 및 항돌연변이성 의약품으로서의 투여 시 인체에 무해함을 시사하여 식품 및 의약품으로의 사용이 용이하리라 사료된다.

다) 정제 색소가 미치는 인터페론의 생산 효과 조사

색소 시료의 첨가에 따른 interferons 생산에 관한 결과는 Table 24에서와 같이 3TMI-2, 2TMI-3의 시료의 경우 23%의 생성율을 나타내었고, 그에 비해 3TMS-2, 2TMS-3 시료의 경우 control에 비해 17%의 생성율이 증가한 것으로 나타났다. 또한 이들 시료에 대하여 VSV 감염 시 세포의 lysis를 관찰한 결과 Fig. 42에서 A는 VSV에 감염이 되지 않은 세포이고 B~G는 VSV에 감염된 세포이다. B~E는 색소를 첨가하여 interferons를 생성한 시료를 첨가한 세포군이고 F는 색소를 첨가하지 않고 interferons를 생산한 시료 첨가군, G는 interferons를 생산하지 않은 세포의 사진이다. 그 결과로서 A는 조직이 치밀하여 정상적 성장을 한 것을 볼 수 있고 G는

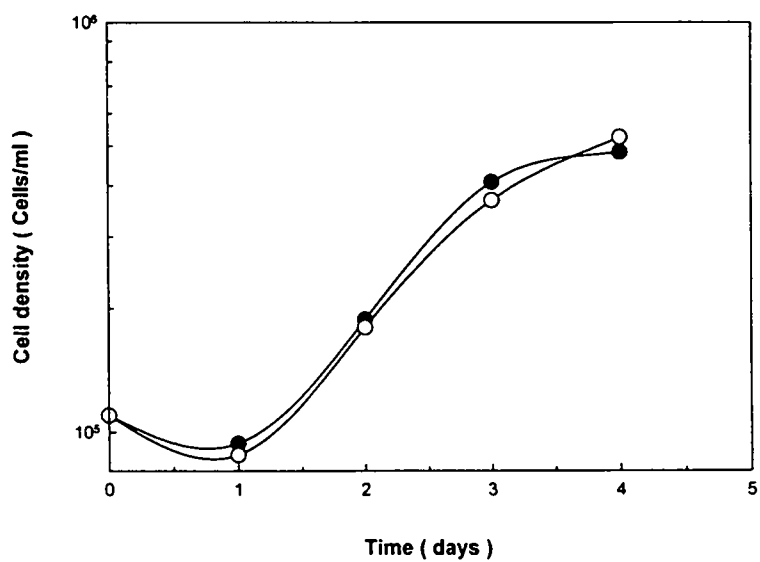


Fig. 39. The growth rate of CCL-13 cells according to adding 3TMS-2.

● ; CCL-13(0 $\mu\text{g/ml}$)

○ ; CCL-13(40 $\mu\text{g/ml}$)

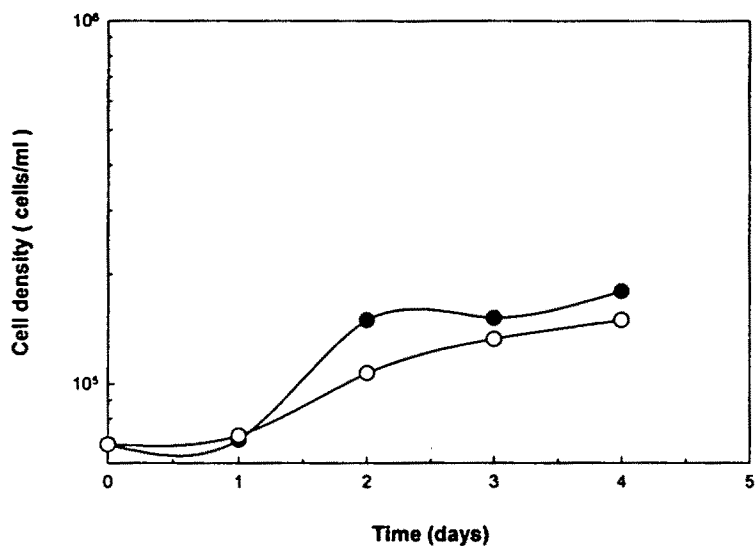
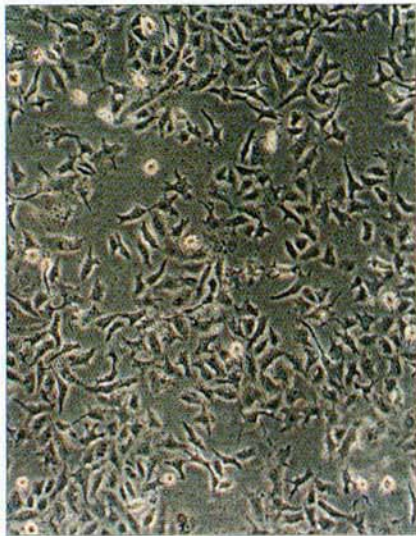


Fig. 40. The growth rate of HepG2 cells according to adding 3TMS-2.

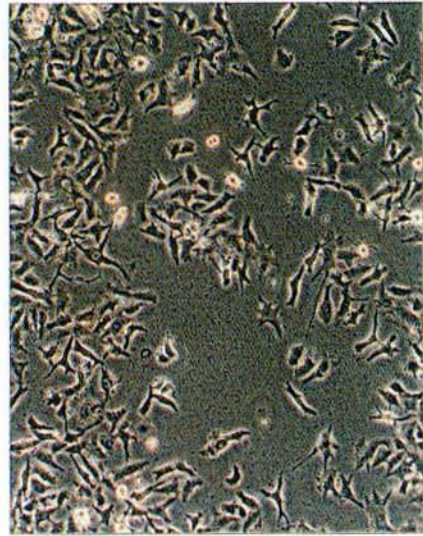
● ; HepG2(0 μg/ml)

○ ; HepG2(40 μg/ml)

A



B



C



D

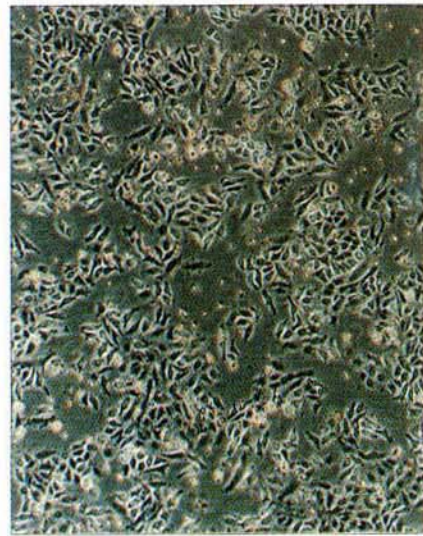


Fig. 41. 10× magnification of HepG2 and CCL-13 cells after 4 day culture.

A ; HepG2(0 μ g/ml of 3TMS-2) B ; HepG2(40 μ g/ml of 3TMS-2)

C ; CCL-13(0 μ g/ml of 3TMS-2) D ; CCL-13(40 μ g/ml of 3TMS-2)

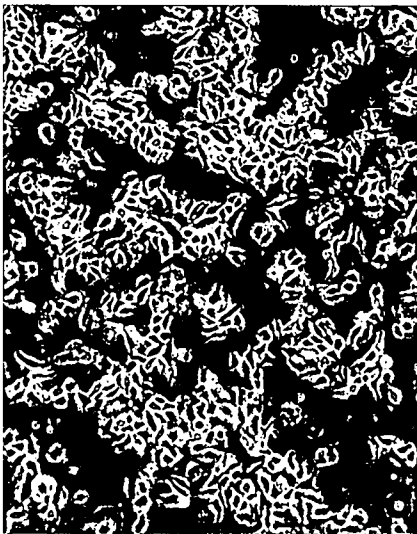
A



B



C



D

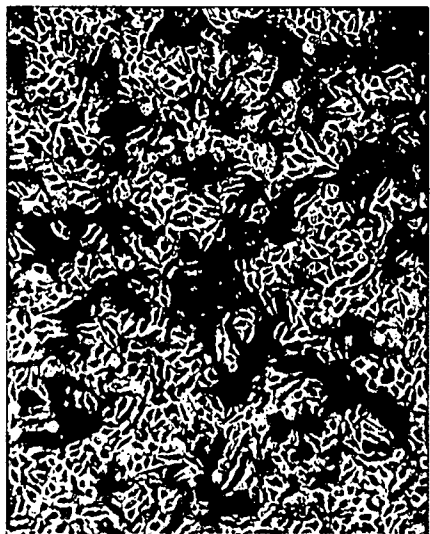


Fig. 41. 10× magnification of HepG2 and CCL-13 cells after 4 day culture.

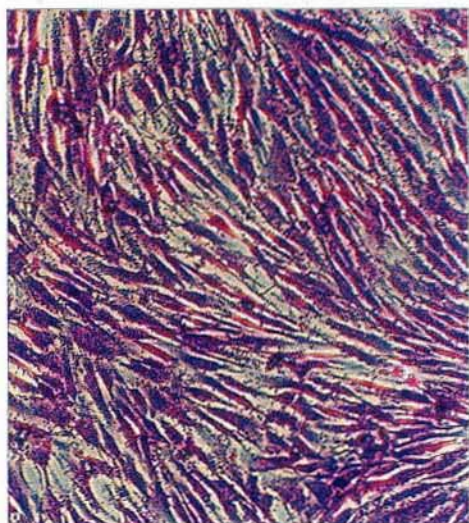
A ; HepG2(0 μ g/ml of 3TMS-2) B ; HepG2(40 μ g/ml of 3TMS-2)

C ; CCL-13(0 μ g/ml of 3TMS-2) D ; CCL-13(40 μ g/ml of 3TMS-2)

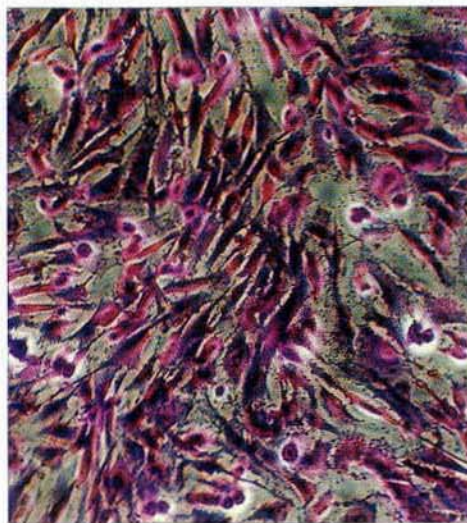
Table 24. The effect of pigment samples on interferons production of FS-4 cells.

Pigment samples	Interferons (U/ml)	Relative production ratio (%)
Control	10140	
3TMS-2	11700	17
2TMS-3	11700	17
3TMI-2	12480	23
2TMI-3	12480	23

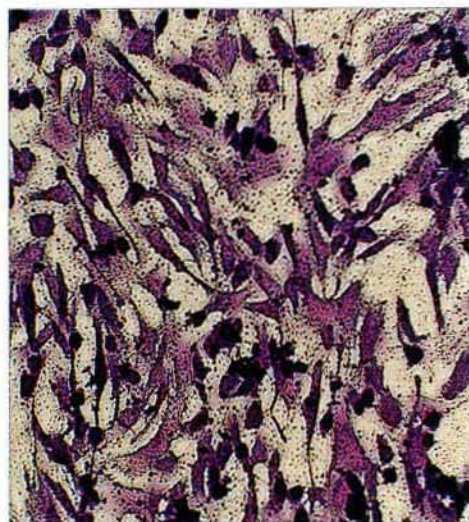
A



B



C



D

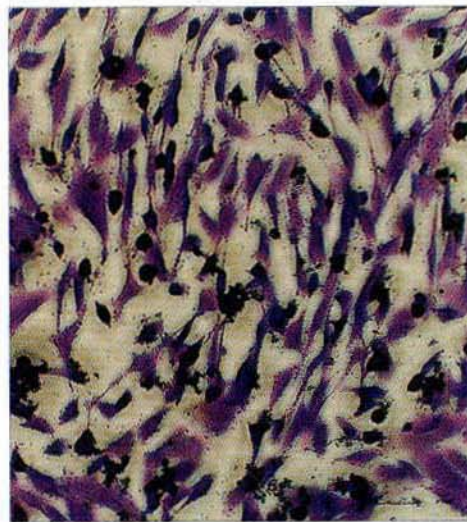


Fig. 42. Morphology changes of FS-4 cells after VSV infections.

A ; no VSV infection

B ; treated 3TMI-2

C ; treated 2TMI-3

D ; treated 3TMS-2

A



B



C



D



Fig. 42. Morphology changes of FS-4 cells after VSV infections.

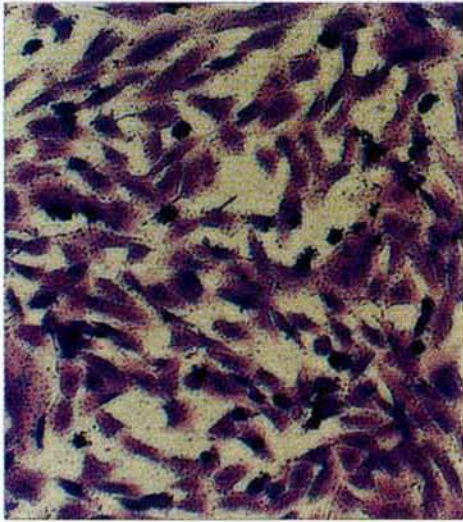
A ; no VSV infection

B ; treated 3TMI-2

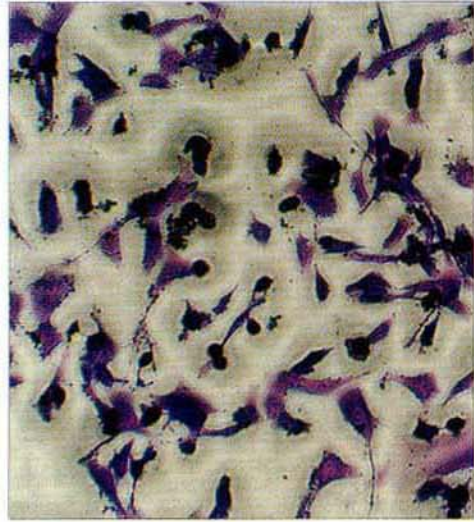
C ; treated 2TMI-3

D ; treated 3TMS-2

E



F



G



Fig. 42. Morphology changes of FS-4 cells after VSV infection.(continued)

E ; treated 2TMS-3, F ; control(sample without the addition of pigments)

G ; without interferons

E



F



G



Fig. 42. Morphology changes of FS-4 cells after VSV infection.(continued)

E ; treated 2TMS-3, F ; control(sample without the addition of pigments)

G ; without interferons

세포가 거의 사멸된 것을 알 수 있다. F는 control로서 interferons를 생산 하기는 하였지만 그 양이 미미하여 대부분의 세포가 사멸된 것으로 사료된다. 따라서 B~E군은 VSV에 의한 감염에 의한 세포의 손상이 상당히 경감 되었음을 알 수 있어서 색소 시료의 첨가가 interferons의 생산을 증가시킨 것으로 사료된다.

마. 정제 색소 시료의 Apoptosis 유도능

세포 내 apoptosis가 일어나면 endogenous endonuclease에 의해 chromosomal DNA가 절단되어 180-220bp fragment가 형성되게 되는데 전기영동한 결과 DNA단편이 관찰되지 않았다(data not shown). 이러한 결과로 보아 색소 시료는 apoptosis영향을 받지 않은 것으로 나타났다.

3. 총결론

TLC에 의해 정제된 색소 분획들은 aflatoxin B₁에 대해 65~88%의 항돌연변이성을 나타내며, IQ에 대해서는 70~82% 정도의 높은 항돌연변이성을 나타내었다. 세포 증식 활성 조사에서는 107~111%의 높은 활성을 나타내었으며, 활성산소종 제거능 조사에서도 모든 색소 분획들이 높은 제거능을 나타내어 이들 색소는 아주 우수한 기능성을 지닌 물질임을 알 수 있다.

HPLC에 의한 정제 과정별 기능성 조사에서 항돌연변이성의 경우 TCP 시료가 46% 정도의 효과를 보인 반면, TMS, TMI 분획들은 50~66%의 조금 증가된 효과를 보였으며, HPLC에 의해 최종 정제된 시료의 경우는 높은 항돌연변이 효과(86~99.82%)를 나타내었다. 특히, 2TMS-3 시료의 경우 200 μ g/2ml의 농도로 99.82%의 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 항산화 효과에서 hydroxyl radical 제거능은 78~99%까지의 효과를 나타내었으며, TMS-2, TMS-3 시료의 경우에는 거의 완벽하게 라디칼의 생성을 억제하였다. SOD에 대한 활성에서는 크게 활성화하지는 않는 것으로 나타났는데 이는 색소 시료가 SOD와 같은 효소의 활성을 증가시킴으로서 라디칼의 제거를 나타내는 간접적인 항산화능보다는 직접적으로 hydroxyl radical을 포획함으로써 항산화능을 가지는 것으로 보여진다.

Macrophage의 증식 활성 및 TNF- α 에 의한 항암 효과는 시료 모두 미비하게 나타났으나, 항암성 효과에서는 2TMI-3을 제외한 다른 획분들은 정상 세포(CCL-13)에는 거의 영향을 미치지 않으면서 암세포(HepG2)만을 37~48%정도나 제거하는 선택적 기능을 가지며 또한, 암세포의 증식 억제능을 가지는 것으로 판명되었다. 이러한 결과로 보아 항돌연변이성을 가진 이 색소 시료들은 기능성 식품으로서의 섭취 및 항돌연변이성 의약품으로서의 투여 시 인체에 무해함을 시사하여 식품 및 의약품으로의 사용이 용이하리라 사료된다.

interferons 생산에 관한 효과는 색소 시료의 첨가로 인해 17~23% 정도 interferons의 생산을 증가시키는 아주 우수한 기능성을 나타내었으며, apoptosis 효과는 없었다.

제 4 절 색소의 구조

Bacillus sp. SSA3이 생성하는 항돌연변이성 색소들을 기능성 식품 및 의약품으로 개발하기 위해서는 색소 물질의 정제와 그 구조의 규명이 필요하다. 정제 과정 단계별로 색소의 분석을 통해 시료의 정제도 및 그 구조를 분석^{58,59)}하고자 하였다.

1. 재료 및 방법

가. 정성 분석(Qualitative analysis)

Ion exchange chromatography로 조정제한 항돌연변이성 색소 물질의 구성 성분이 탄수화물 성인지, 단백질성인지, 지질성인지, 아니면 이러한 물질들이 혼합되어 있는 상태인지를 조사하기 위해 정성 실험 및 아미노산 분석을 행하였다. 정제된 색소에 대한 당정성 실험(Benedict, Fehling, Molisch, Iodine reaction), 아미노산과 단백질 정성 시험(Ninhydrin, Millon reaction) 및 지질 정성 분석(Saponification, glycerol 검출)을 행하였다.

나. Amino acid 분석

Amino acid분석에는 Pig-Tag method(Waters)에 따라 조정제한 색소 물질 2mg을 6 N-HCl(200 μ l)에 녹여 밀봉한 후, 110 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시켜 가수분해하였다. 반응액을 감압 건조하고, 200 μ l의 물에 녹여 여과한 후 분석에 사용하였다. 분석에는 Waters HPLC system(510 HPLC pump, 717 automatic sampler, 996 photodiode array detector, and Millennium 2010 chromatography manager)으로 Pico-Tag free amino acid analysis column(3.9 \times 300mm)을 사용하여 254nm에서 검출하였다.

다. 핵자기 공명 분광 분석(^1H 및 ^{13}C -NMR nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis)

색소의 구조 분석과 정제 정도를 알기 위해 색소 시료 각 5mg을 0.5ml D_2O 에 녹인 후, BRUKER ARX 300 NMR spectrometer를 이용하여 300MHz에서 ^1H , ^{13}C -NMR spectrum을 분석하였다

라. 질량 분석(Mass spectroscopic analysis)

색소 시료들의 분자량 및 정제 정도를 알기 위해 Mass spectrometer (Hewlett Packard HP-5971)를 사용하여 EI 및 FAB mass(fast atom bombardment, 고속원자충격법)법으로 분자량을 측정하였다.

마. 적외선 분광 광도 분석(IR spectroscopic analysis)

HPLC로 분리 정제한 색소 시료 각 3mg을 IR spectrophotometer(Perkin Elmer 1330)를 사용하여 분석하였다.

바. 원자 흡광 분광계(Atomic absorption analysis)

HPLC로 분리 정제한 색소 시료들을 Atomic absorption spectrophotometer(Shimazu, AA-680G)를 사용하여 분석하였다.

사. 원소 분석(Elementary analysis)

정제한 색소 시료 각 2mg을 Elemental analyzer(FISONs, EA1108

CHNSO)를 사용하여 분석하였다.

2. 결과 및 고찰

1) 정성 실험

색소 시료에 대한 정성 실험을 행한 결과, Table 25에서와 같이 탄수화물과 지질의 정성 실험에서는 반응이 나타나지 않았으며, 아미노산과 단백질의 정성 실험에서는 양성 반응을 나타내었다. 이러한 결과로부터 색소가 단백질성인 지 또는 색소 이외의 단백질성 물질이 혼입되었는지를 조사하기 위해 아미노산 분석을 시도 하였다.

Table 25. Chemical reaction of crude pigments.

Reaction	Detecting group	Result	Pigments
Benedict	Carbohydrate	Red pellet	-
Fehling	Carbohydrate	Red pellet	-
Molisch	Carbohydrate	Red-violet	-
Iodine	Polysaccharide	Dark-blue	-
Ninhydrin	Amino acid	Pink, Purple Orange	+
Millon	Protein	Reddish brown	+
Saponification	Lipid	Sediment	-
Glycerol-detection	Glycerol	Irritant odor-	

2) Amino acid 정량 분석

색소 시료에 대한 amino acid 정량 분석을 한 결과는 Table 26에서 보는 바와 같다. 분석에 사용한 시료 100mg 중 총 amino acid 함량이 7.838mg으로 나타났으며, 이는 색소 시료 중 10% 미만의 단백질성 물질이 혼입되어 있거나 또는 색소의 구조 중 일부분이라고 사료된다. 이는 색소의 구조가 아미노산만으로 이루어져 있다고 보기에는 색소 중의 아미노산 함량 수치가 너무 적게 나타났기 때문이다.

나. TLC에 의한 색소의 정제 과정별 구조

색소 배양액을 filtration과 ion exchange chromatography로 정제한 후, 전개 용매를 달리하여 1차, 2차 thin layer chromatography로 분리한 결과, 9개의 분획을 얻었다. 이 색소 분획들이 단일 물질인 지, 또는 다른 구조를 가진 물질들인 지를 확인 및 정제도를 조사하기 위하여 Mass spectrometer와 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 행하였다. 색소 시료 TCP의 Mass-spectrum을 분석한 결과, Fig. 43에서 보는 바와 같이 분자량이 1000이상의 물질로 확인되었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과 PS-Ⅱ1-1시료는 Fig. 44에서, PS-Ⅱ1-2시료는 Fig. 45에서, PS-Ⅱ1-3시료는 Fig. 46에서, PS-Ⅱ1-4시료는 Fig. 47에서, PS-Ⅱ2-1시료는 Fig. 48에서, PS-Ⅱ2-2시료는 Fig. 49에서, PS-Ⅱ2-3시료는 Fig. 50에서 PS-Ⅱ3-1시료는 Fig. 51과 52에서와 같다. 색소 분획들은 공통적으로 내부에 aromatic ring 기를 함유한 것으로 나타났으며, 혼입물의 유입이 보였다. 이 혼입물은 TLC plate 상의 silica gel에서 유래된 것으로 이러한 혼입물로 인해 TLC로 정제한 색소는 구조 결정에 사용하기가 매우 어렵기 때문에 HPLC로 다시 정제를 시도하였다.

Table 26. The amino acid components of pigments produced by *Bacillus* species SSA3.

Amino acid	Ret. time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount (pmol)	Amount* (mg)
Cystein	3.365	783306	108663	1049.694	0.102
Aspartate	3.732	4017931	643840	5723.285	0.605
Glutamate	4.198	4286568	625101	6535.976	0.764
Serine	7.015	2317771	315018	3055.915	0.257
Glycine	7.332	4980208	761104	5874.828	0.353
Histidine	7.648	840108	123680	1077.282	0.134
Arginine	8.198	2041634	279061	2585.852	0.360
Threonine	8.465	2404971	356593	3341.939	0.318
Alanine	8.715	3629235	719925	5104.258	0.364
Proline	8.848	3258742	447054	3612.898	0.333
Tyrosine	11.382	9016851	1394933	11534.494	1.672
Valine	12.282	3273989	439852	4717.682	0.442
Methionine	13.032	1084498	109588	1356.783	0.162
Cystein2	14.332	351688	32479	309.397	0.030
Isoleucine	14.965	2383937	290394	3237.052	0.340
Leucine	15.282	3033104	416734	3843.005	0.403
Phenylalanine	17.082	1452174	196786	2015.282	0.265
Tryptophan	17.998	3347580	291618	3376.088	0.552
Lysine	19.232	3930046	495797	3273.840	0.383
Total					7.838

The amino acids were applied to a 30 cm Pico-Tag free amino acid analysis column(3.9×300mm) equilibrated with buffer A equipped with a Waters HPLC system and eluted with a linear gradient composed by buffer B at a flow rate of 1 ml/min at 40°C.

Absorbance at 254nm was measured. Buffer A is 140mM sodium acetate (6% acetonitrile), and buffer B is 60% acetonitrile.

* ; The amount of amino acids per sample 100mg.

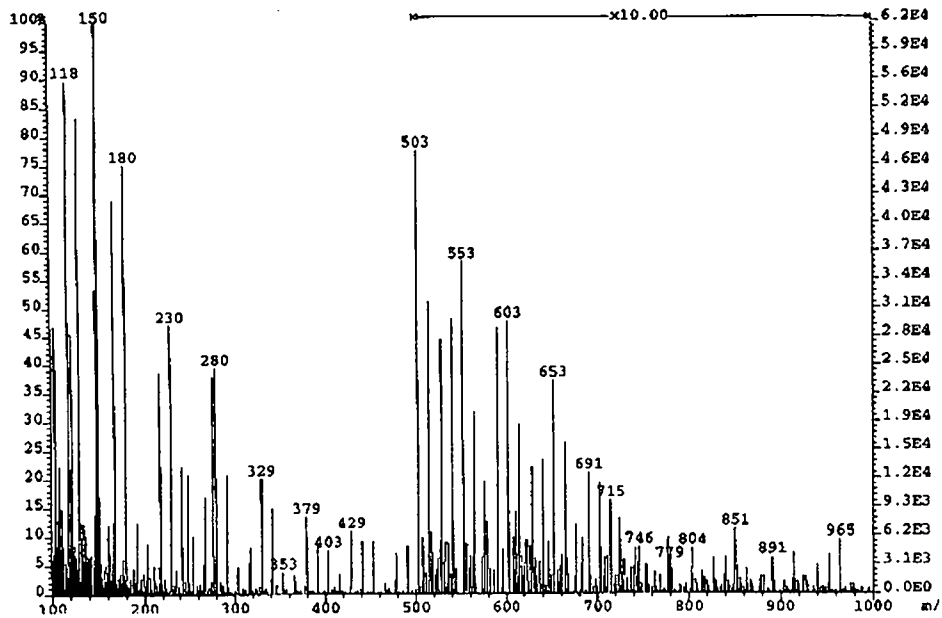


Fig. 43. FAB-Mass spectrum of TCP pigment.

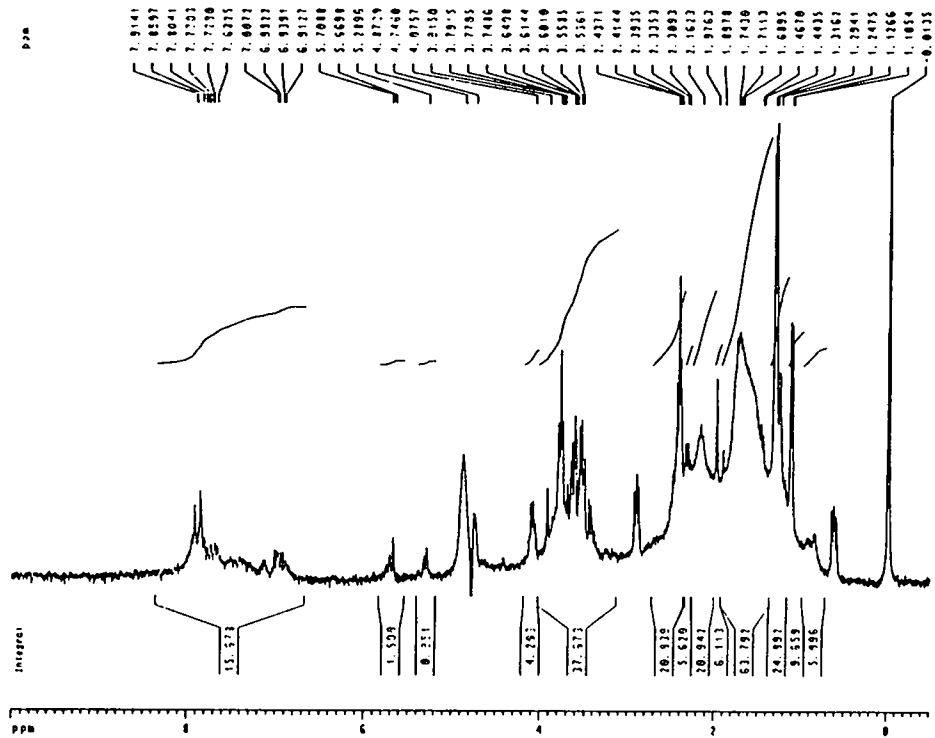


Fig. 44. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of PS-III-1 pigment(300MHz, D_2O).

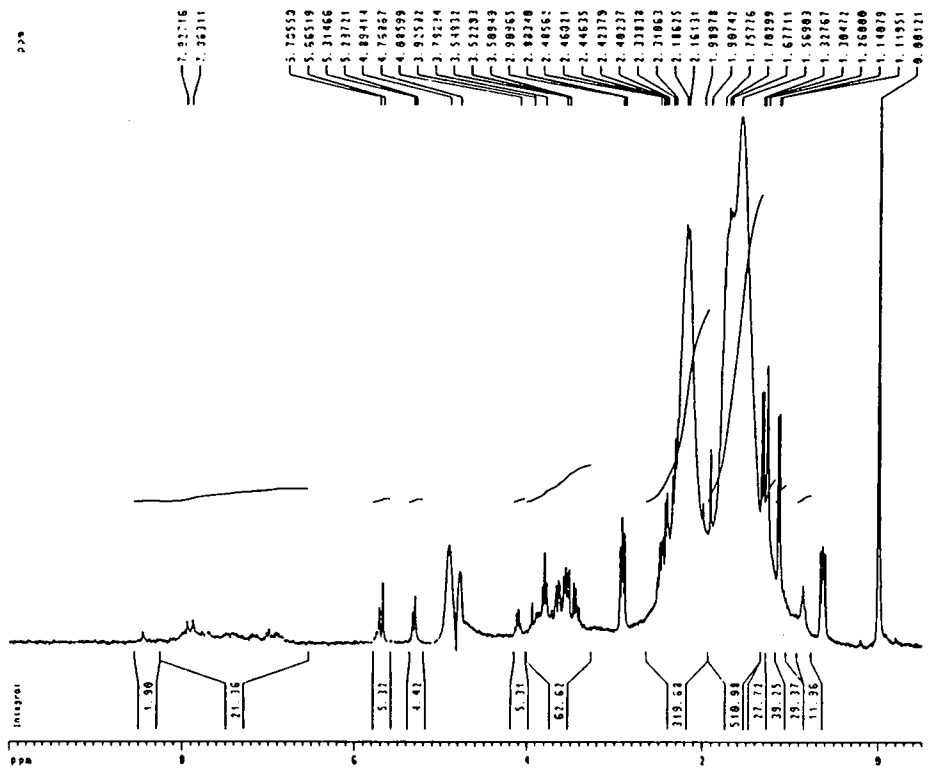


Fig. 45. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of PS-III-2 pigment(300MHz, D_2O).

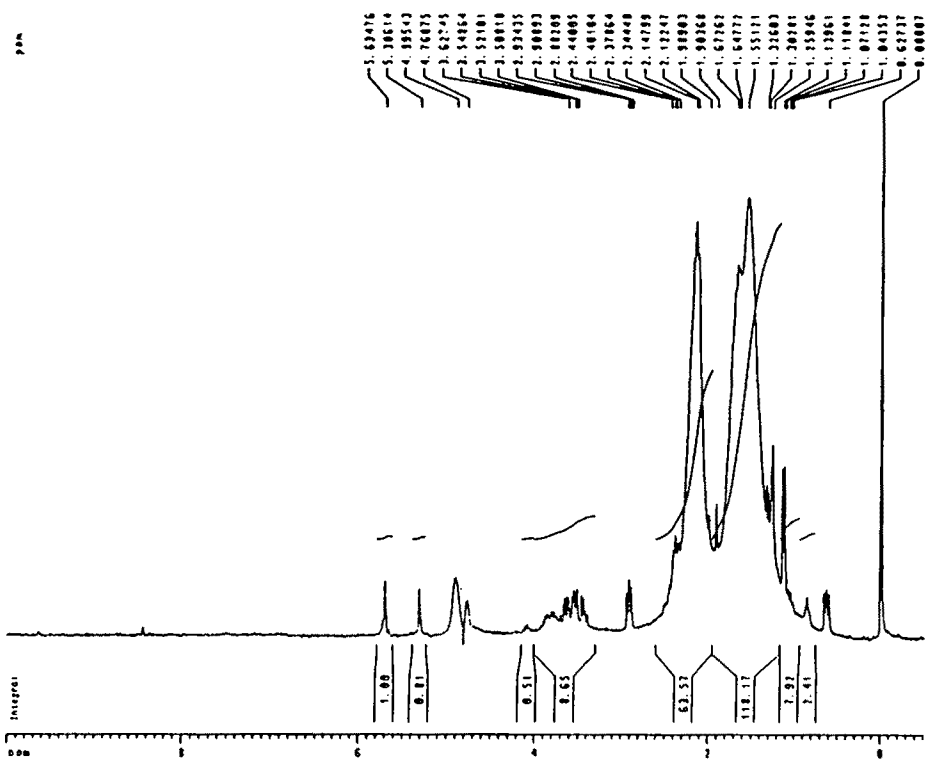


Fig. 46. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of PS-III-3 pigment (300MHz, D_2O).

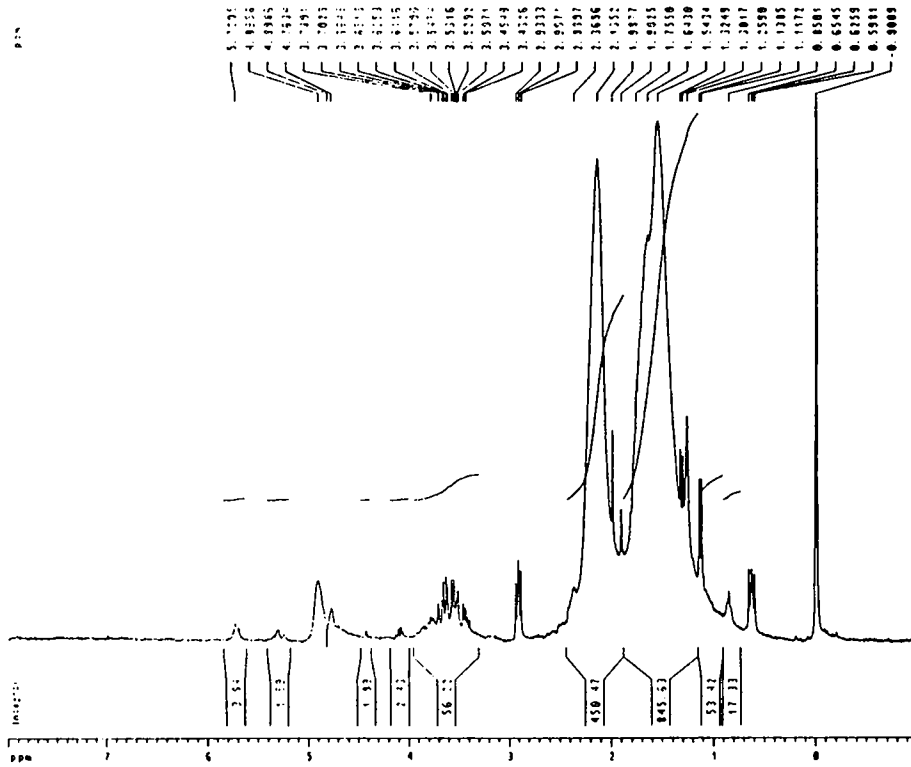


Fig. 47. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of PS-III-4 pigment (300MHz, D_2O).

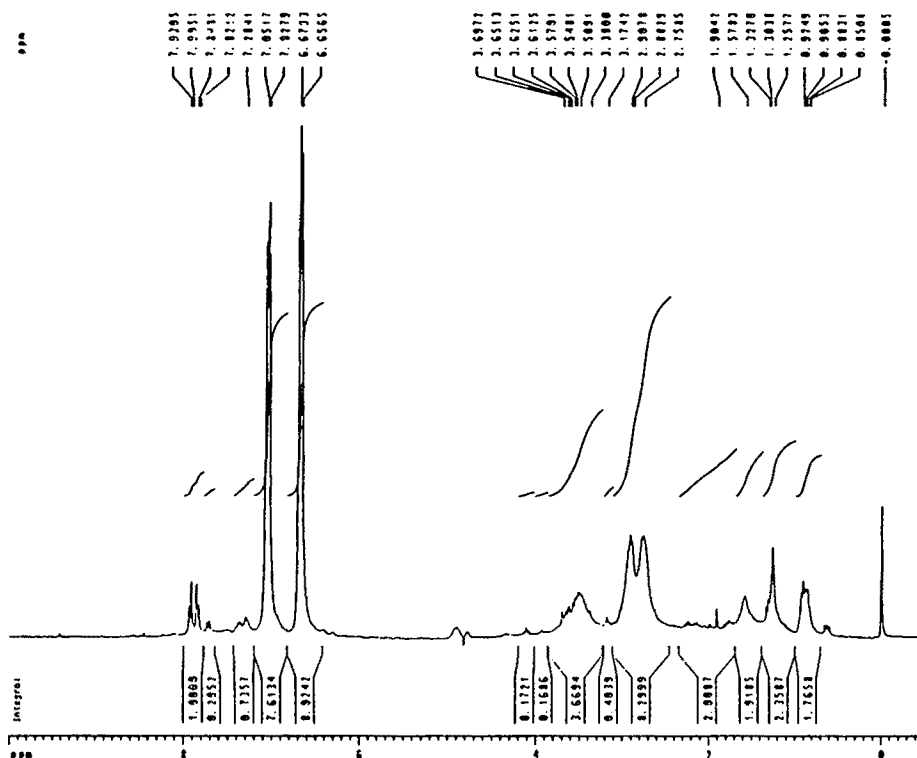


Fig. 48. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of PS-II2-1 pigment (300 MHz, D_2O).

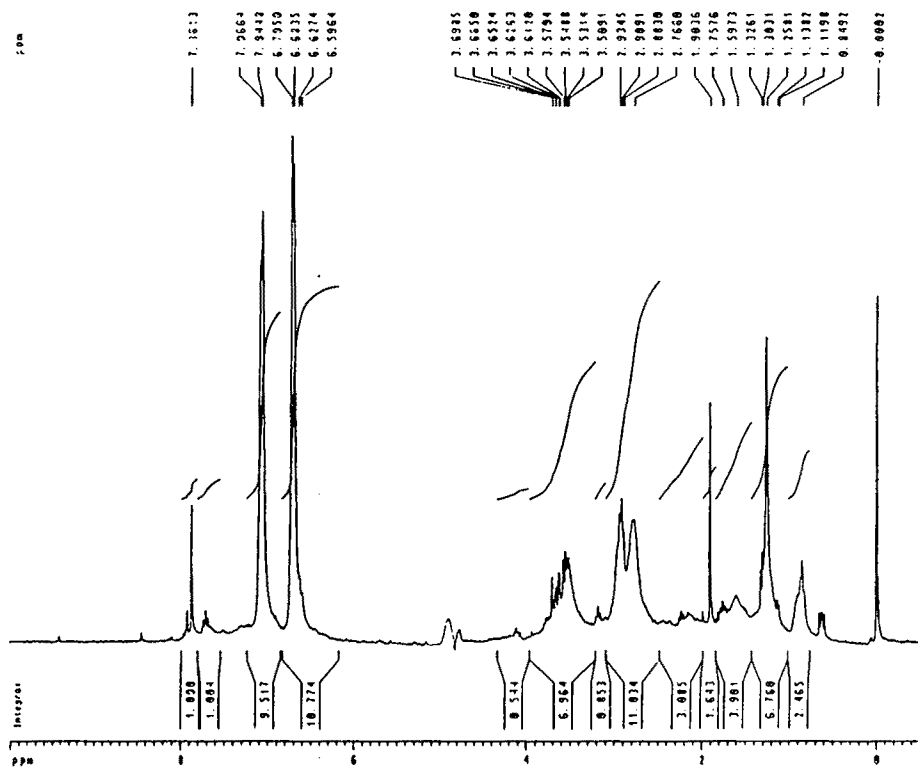


Fig. 49. ¹H-Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of PS-II2-2 pigment (300 MHz, D₂O).

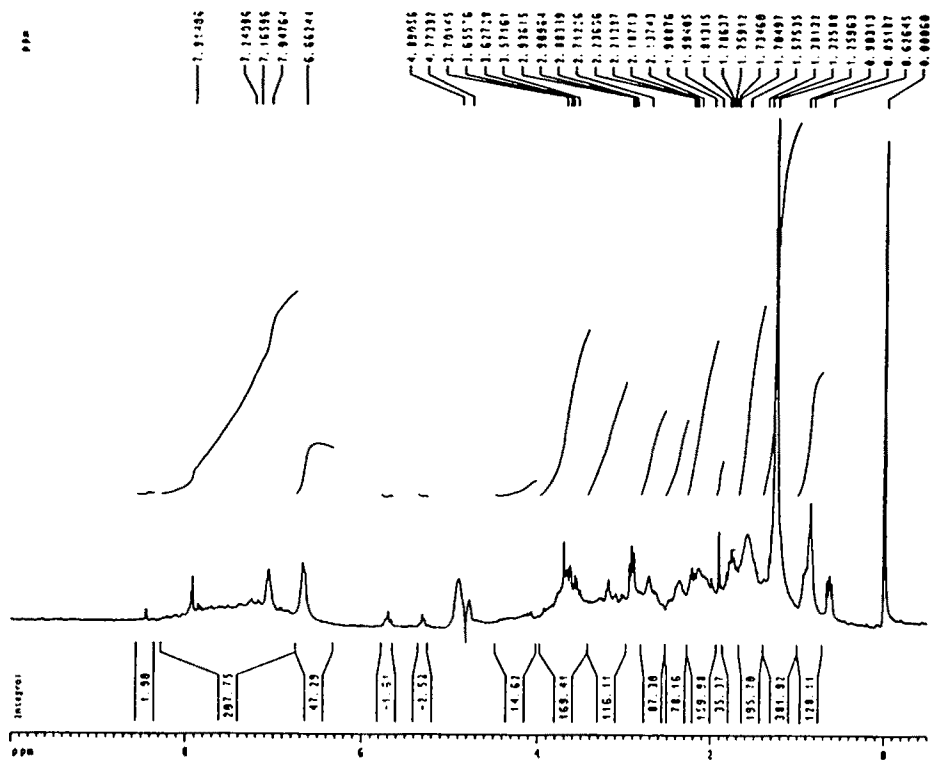


Fig. 50. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of PS-II2-3 pigment (300MHz, D_2O).

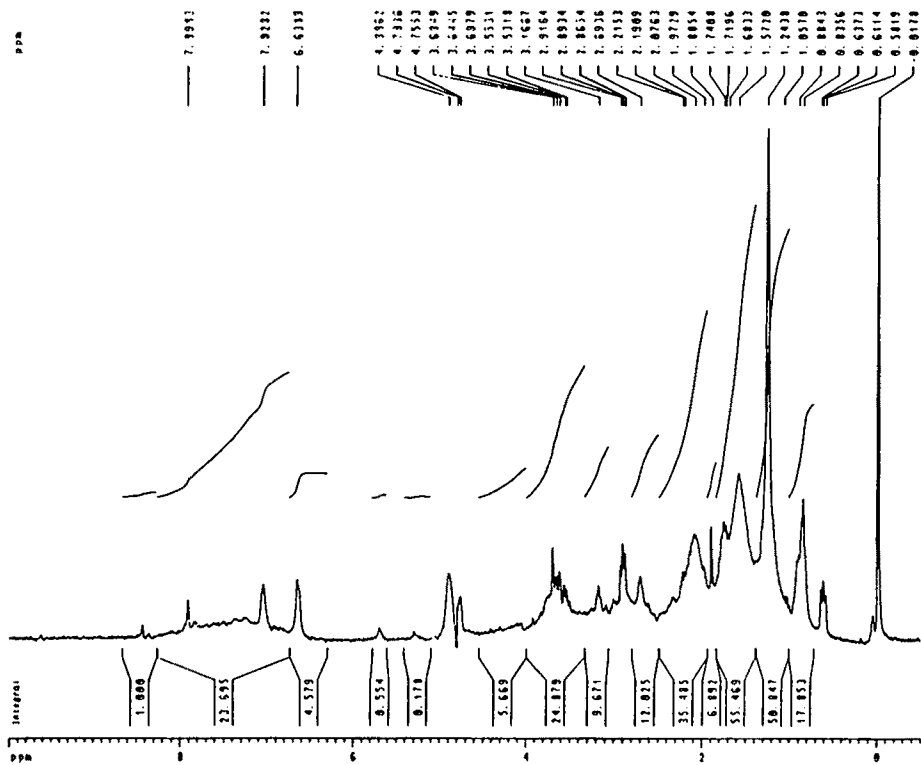


Fig. 51. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of PS-II2-4 pigment(300MHz, D_2O).

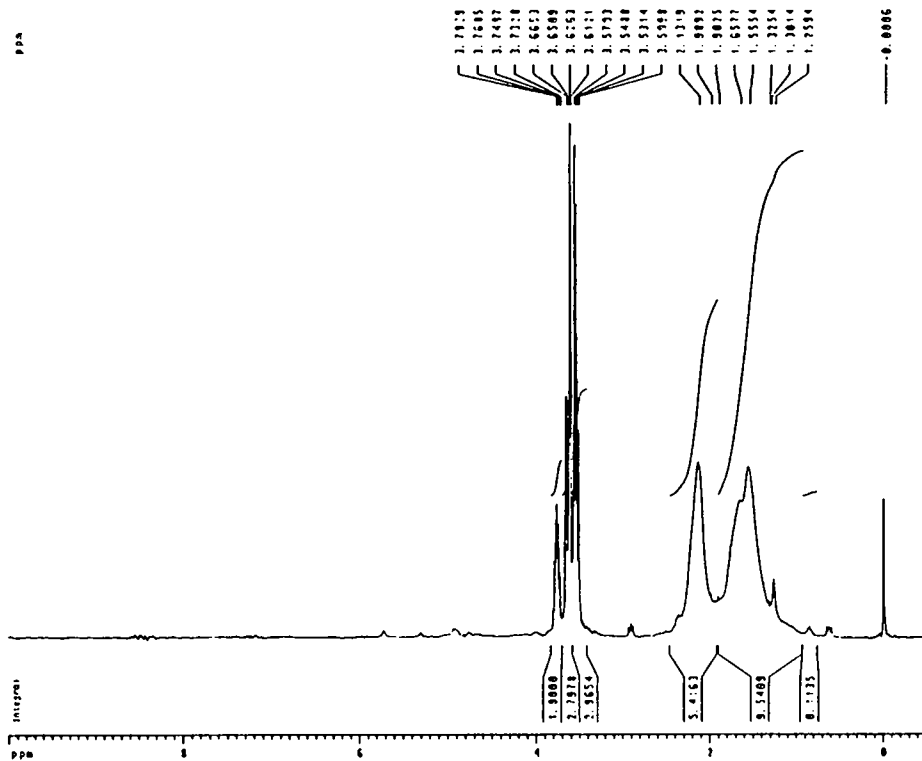


Fig. 52. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of PS-II3-1 pigment (300 MHz, D_2O).

다. HPLC에 의한 색소의 정제 과정별 구조

HPLC로 정제한 2TMS-2, 2TMS-3, 2TMI-2 및 2TMI-3의 구조 분석 및 정제 정도(혼입물의 유무)를 조사하기 위해, 질량 분석(Mass spectroscopic analysis)과 ^1H 및 ^{13}C -NMR spectroscopic analysis, 적외선 분광광도분석(IR spectroscopic analysis), 원자 흡광 분광계(Atomic absorption analysis) 및 원소 분석(Elementary analysis)을 행하였다

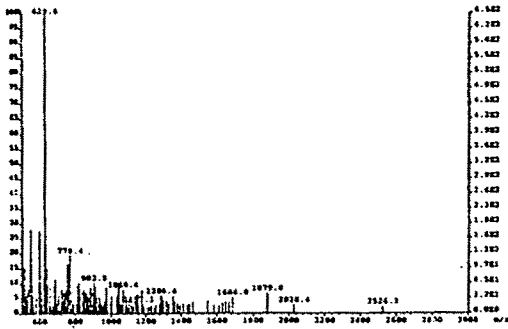
1) 질량 분석(Mass spectroscopic analysis)

색소 시료의 분자량 및 정제 정도(혼입물의 유무)를 알기 위한 Mass-spectrometer 분석 결과는 Fig. 53에 TMS-1, 2, 3, 4시료, Fig. 54에 는 TMI-1, 2, 3, 4, 5시료의 mass-spectrum이다. 이들 결과로 보아 색소 시료들의 분자량이 2000이상으로 추정 된다.

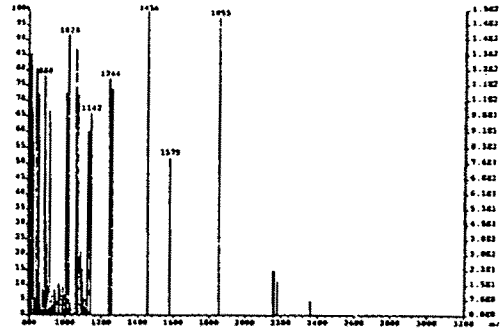
색소 시료 2TMS-2, 2TMS-3, 2TMI-2 및 2TMI-3의 분자량 1000이하의 분자 상태를 확인하기 위해 EI-spectrum을 분석하였다. 그 결과는 각각 Fig. 55, 56, 57 및 58과 같다. HPLC로 최종 정제한 색소 시료들의 FAB-spectrum 분석 결과는 Fig. 59에 3TMS-2시료, Fig. 60에서 2TMS-3 시료, Fig. 61에서 3TMI-2시료, 2TMI-3시료의 spectrum은 Fig. 62에서와 같이 분자량 2000부위에서 peak가 나타난 것으로 보아 분자량이 큰 물질로 추정된다.

2) ^1H 및 ^{13}C -NMR spectroscopic analysis

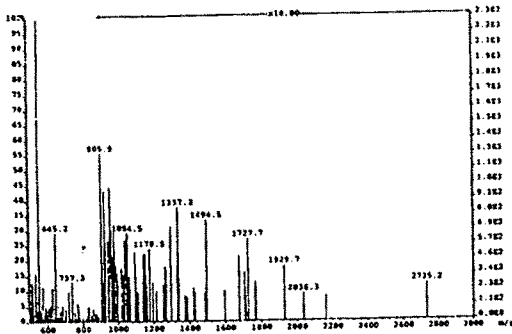
색소분획 물질의 ^1H -NMR 분석 결과는 TMS 시료들은 Fig. 63에서, TMI 시료들은 Fig. 64에서와 같다. 이들 시료 모두 saturated alkane(CH_3CH_2)을 함유한 구조로 나타났으며, TMS-2, 3 및 TMI-2, 3, 4시료의 경우는 aromatic ring을 함유한 구조로 나타났다.



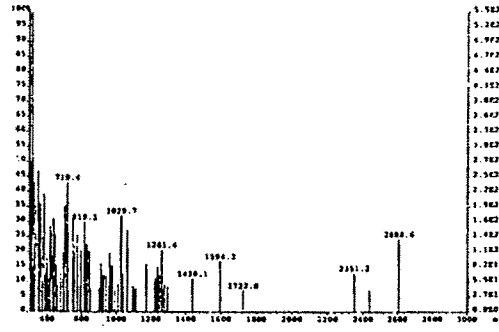
TMS-1



TMS-2

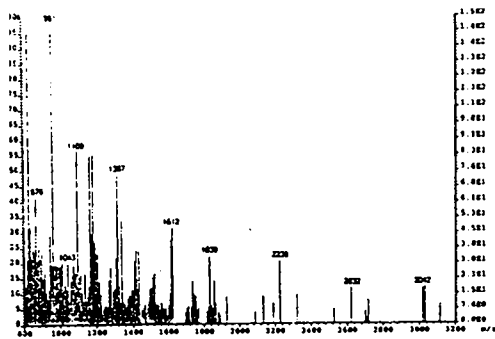


TMS-3

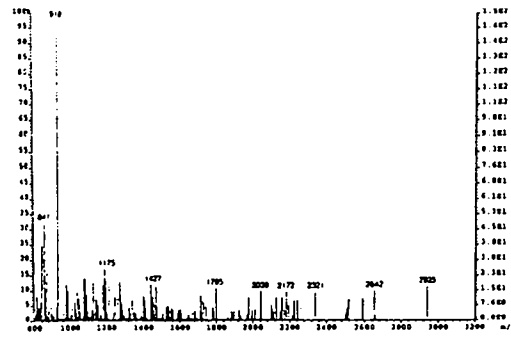


TMS-4

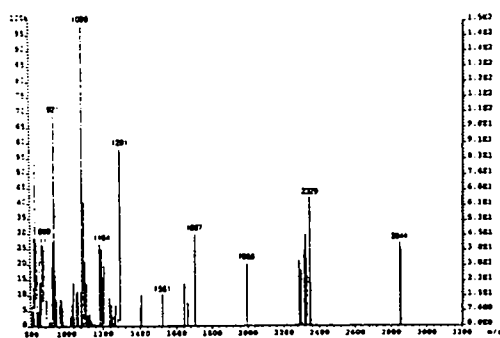
Fig. 53. FAB-Mass spectra of TMS pigments.



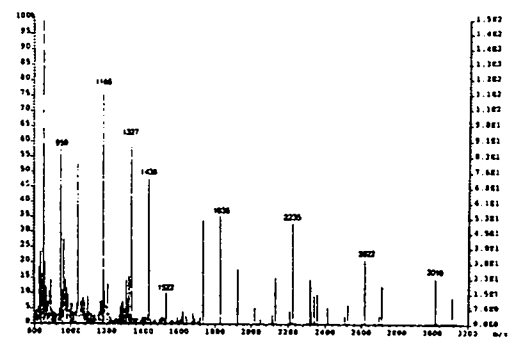
TMI-1



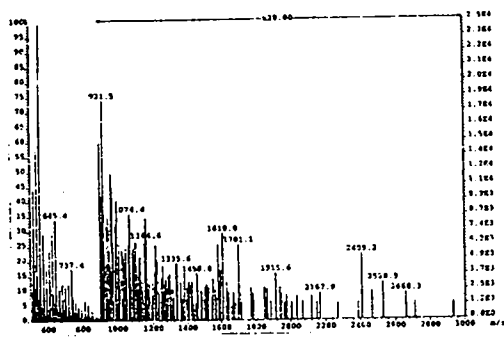
TMI-2



TMI-3



TMI-4



TMI-5

Fig. 54. FAB-Mass spectra of TMI pigments.

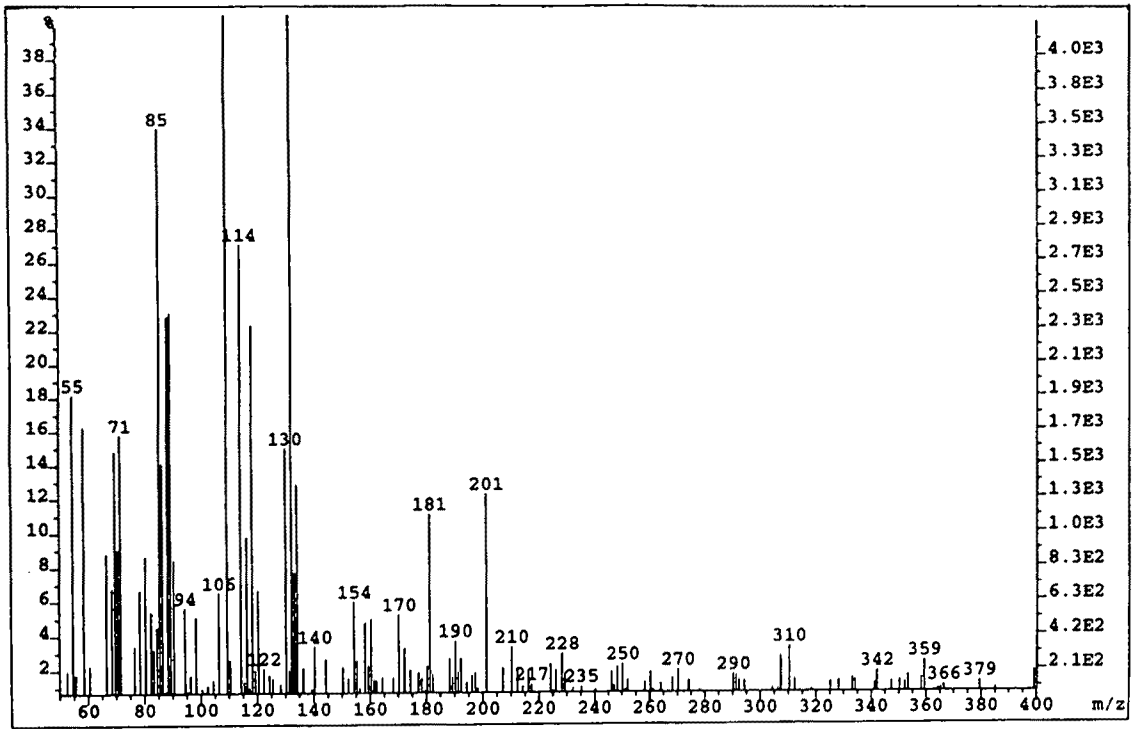


Fig. 55. EI-Mass spectrum of 3TMS-2 pigment.

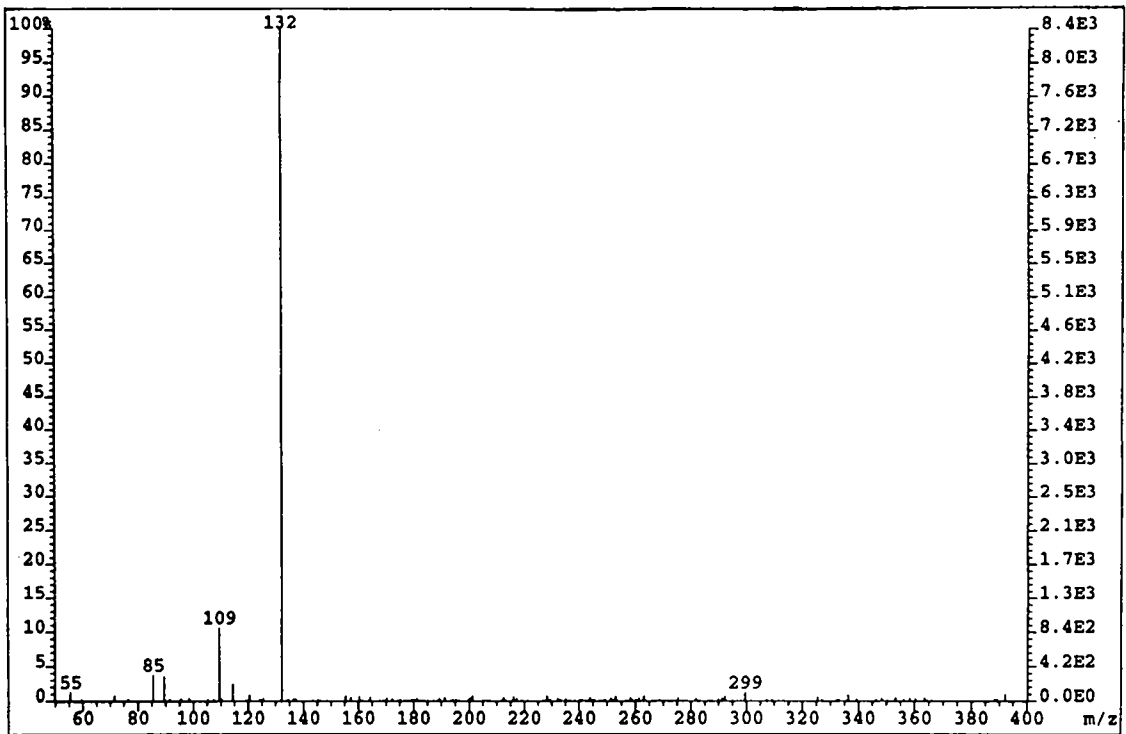


Fig. 56. EI-Mass spectrum of 2TMS-3 pigment.

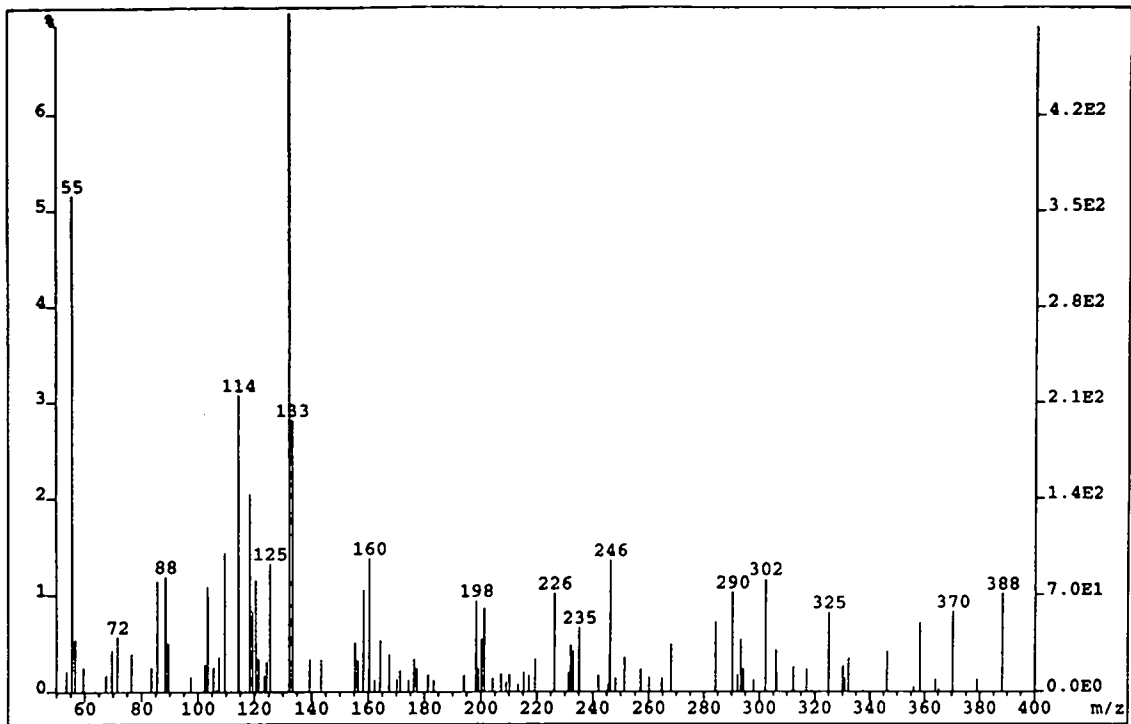


Fig. 57. EI-Mass spectrum of 3TMI-2 pigment.

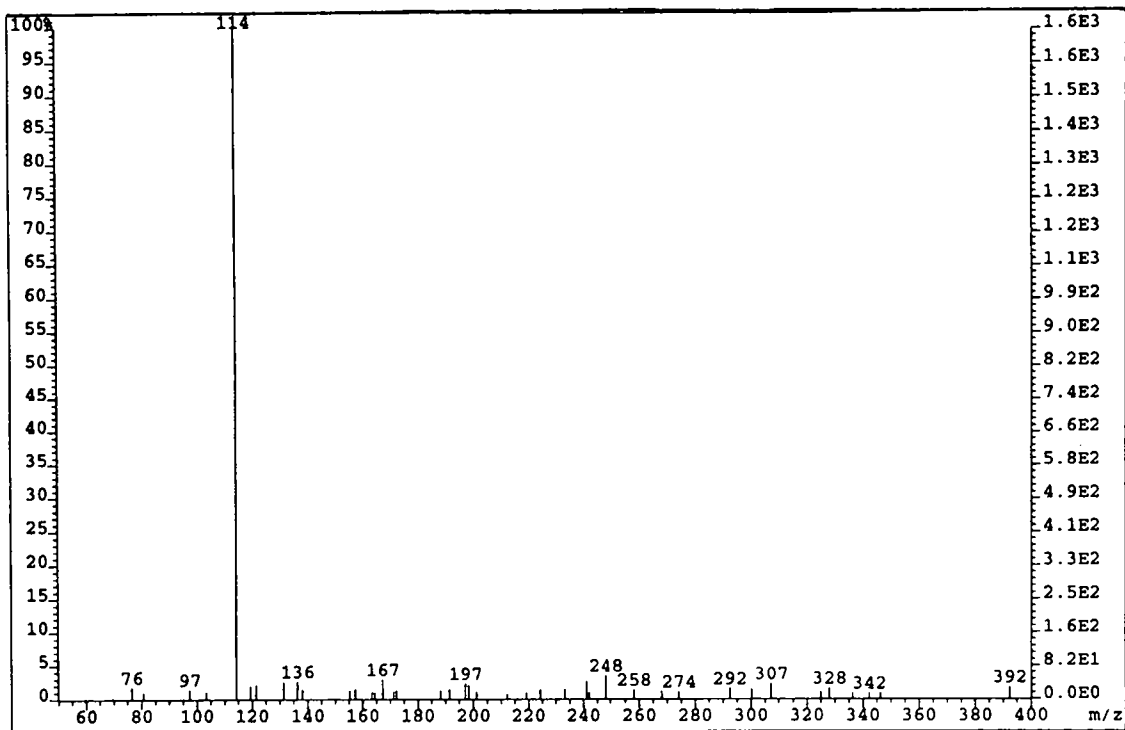


Fig. 58. EI-Mass spectrum of 2TMI-3 pigment.

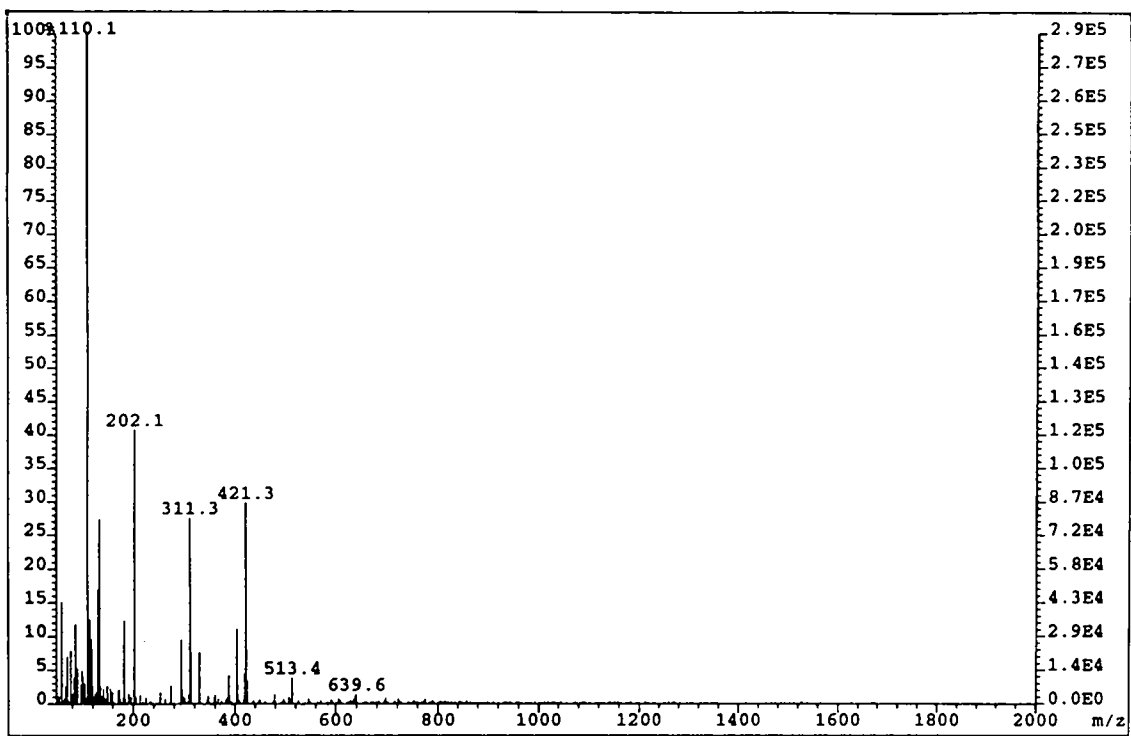


Fig. 59. FAB-Mass spectrum of 3TMS-2 pigment.

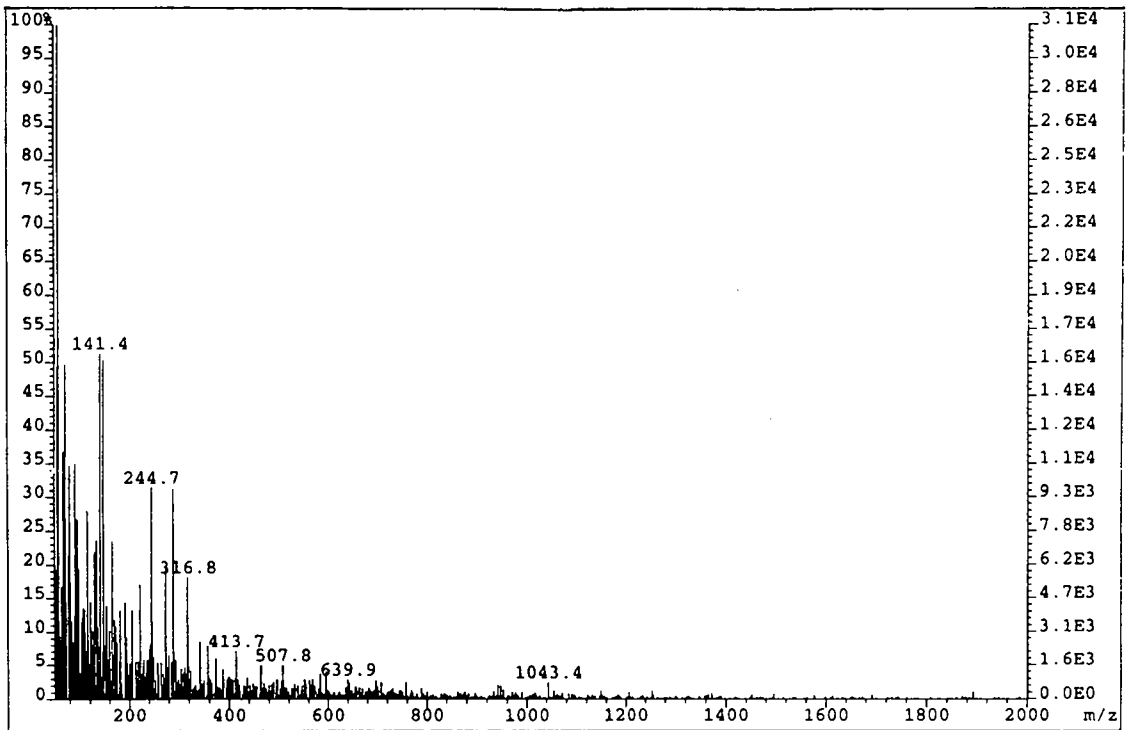


Fig. 60. FAB-Mass spectrum of 2TMS-3 pigment.

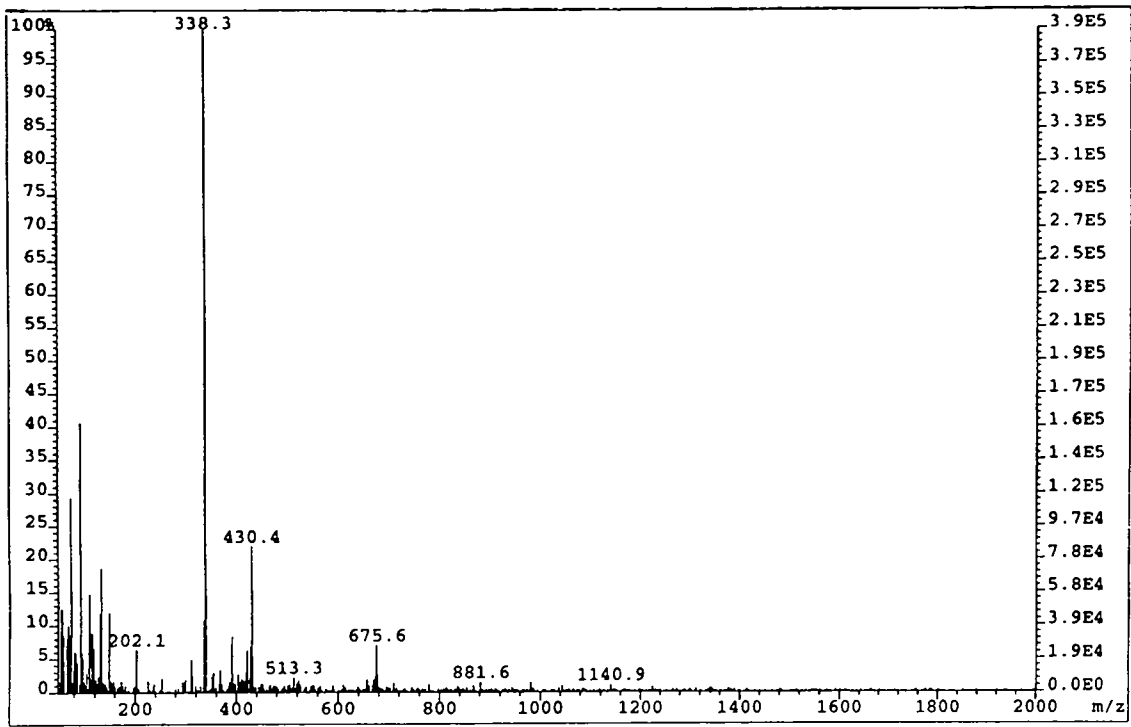


Fig. 61. FAB-Mass spectrum of 3TMI-2 pigment.

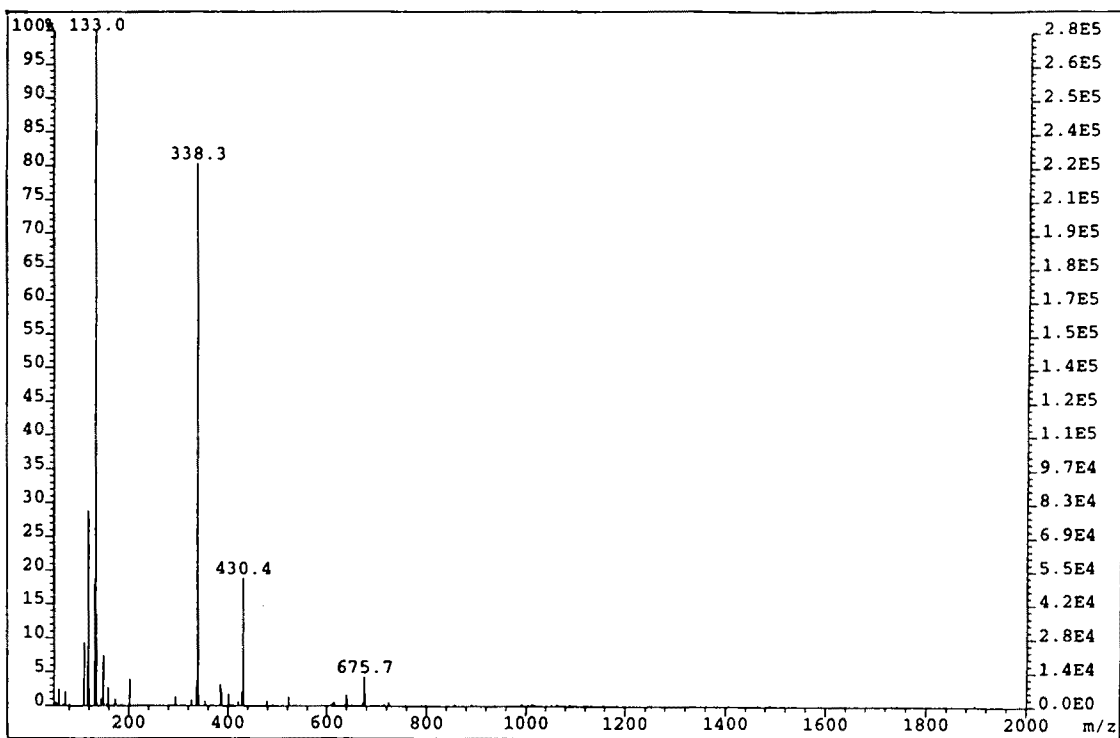


Fig. 62. FAB-Mass spectrum of 2TMI-3 pigment.

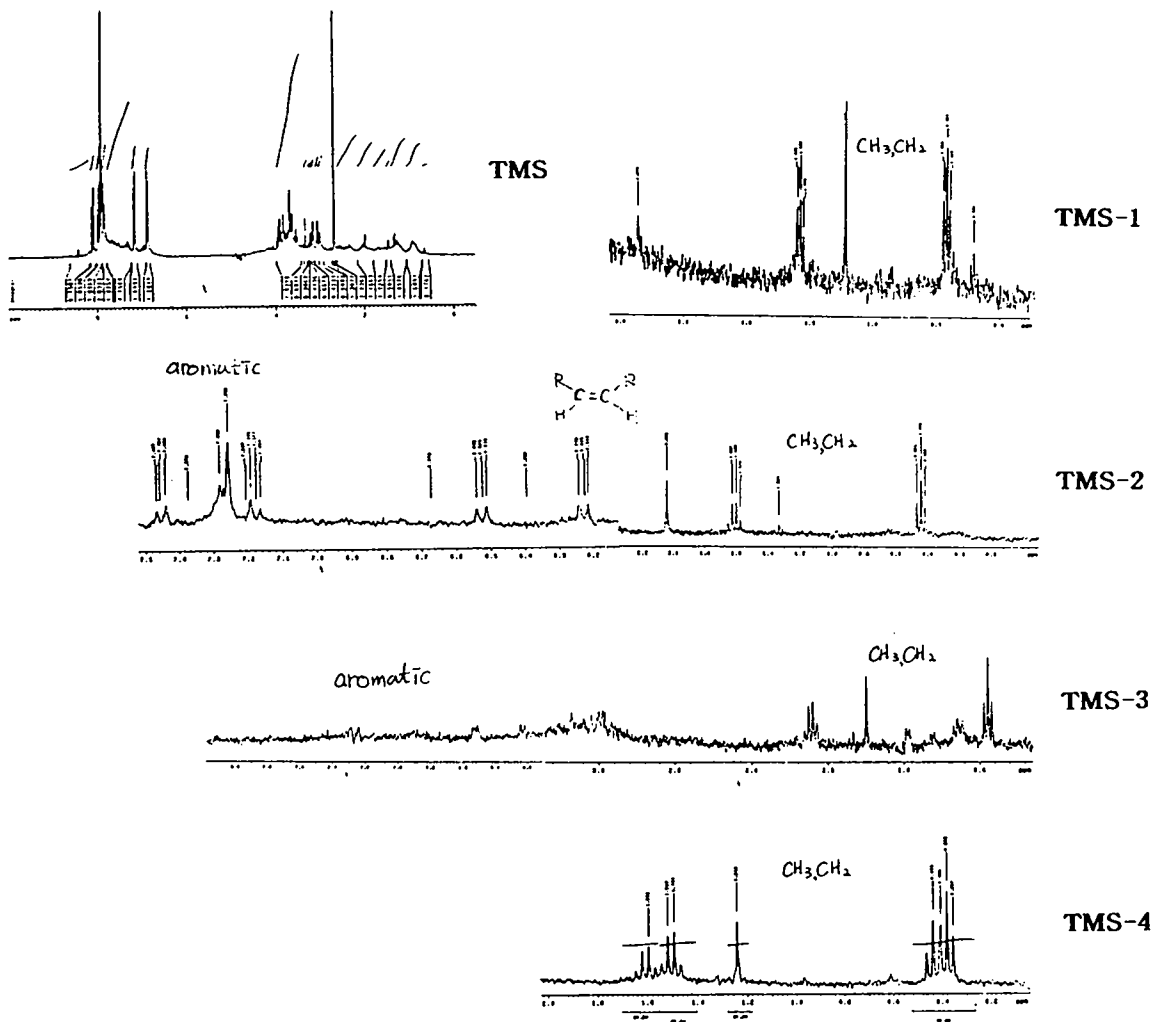


Fig. 63. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectra of TMS pigments(300MHz, D_2O).

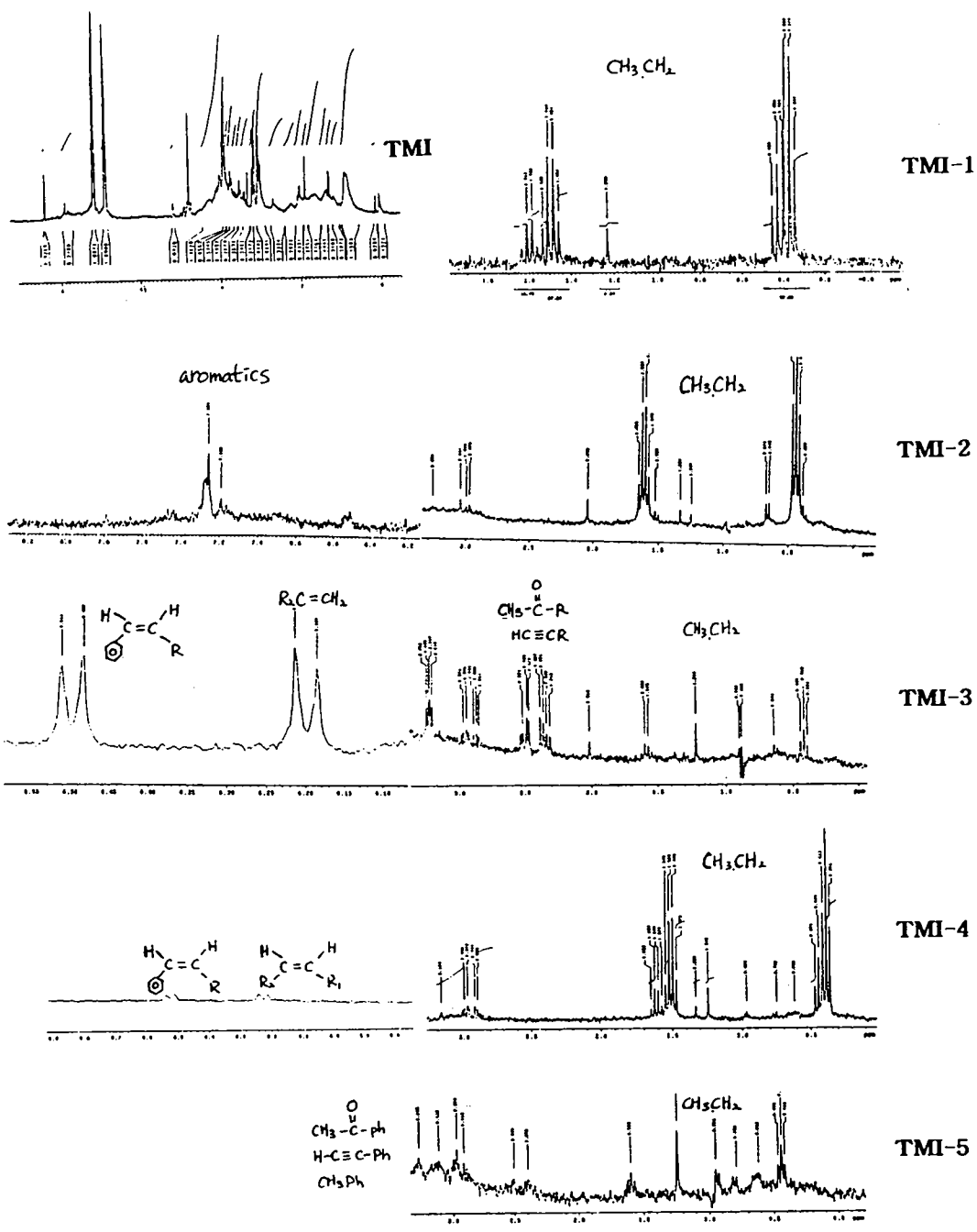


Fig. 64. $^1\text{H-Nuclear}$ magnetic resonance spectroscopy spectra of TMI pigments(300MHz, D_2O).

2차 HPLC로 정제한 색소 시료 2TMS-2, 2TMS-3, 2TMI-2 및 2TMI-3의 분석 결과는 Fig. 65, 66, 67과 68과 같다. 2TMS-3을 제외한 색소 시료들은 1.2~1.45ppm 부위에서 alkyl기(-CH₃-CH₂-), 3.4~3.7ppm 부위에서 S-CH₂- R, -OCH- 기의 존재를 나타내고 있으며, 이는 원소 분석의 sulphur의 존재와 일치하며, methionine과 cystein 잔기의 존재를 나타내는 것이라 추정된다. 6~7ppm 부위에서 나타난 두 개의 peak는 aromatic ring을 함유한 구조로, 이는 tyrosine을 precursor로 하여 색소가 생성되는 것과도 일치하며 색소 분자 내에 tyrosine을 함유하는 것을 나타낸다.

3차 HPLC로 최종 정제된 색소 시료들의 spectrum과 two dimensional NMR spectrum 분석 결과, 2TMS-2의 ¹H-NMR spectrum은 Fig. 69와 Fig. 70과 같으며, 2TMS-3의 ¹H-NMR spectrum은 Fig. 71과 Fig. 72과 같으며, 3TMI-2의 ¹H-NMR spectrum은 Fig. 73과 Fig. 74과 같으며, 2TMI-3의 ¹H-NMR spectrum은 Fig. 75와 Fig. 76과 같다. 이들 spectrum을 보면 2.8~3.0ppm과 3.7ppm부위, 6.6~7ppm 부위에서 tyrosine 1 분자의 존재를 확인할 수 있었다. 3.1~3.6ppm부위에 나타난 peak는 불순물의 peak로써 이러한 peak는 tyrosine 분자 내의 1개의 -H 잔기의 peak보다도 작은 양으로 나타나 색소 시료들이 거의 정제 되었음을 알 수 있다. 전체 색소 시료의 ¹³C-NMR 분석 결과는 Fig. 77, 78, 79 및 80에서와 같이 R-CH₃ (18.844ppm), R-CH₂-R (53.207ppm), -O-CH₂-CH₂-O- (65~76ppm), aromatic ring의 C (118~133ppm) 및 -O-C=O (178ppm)를 함유한 구조로 나타났으며, 이는 tyrosine 잔기의 존재와 일치한다. 100ppm 부근에서 나타나는 환상 당의 amino 탄소 원자의 존재는 보이지 않았다.

3) 적외선 분광 광도 분석(IR spectroscopic analysis)

정제 색소들의 내부에 존재하는 관능기(functional group)를 확인하기 위해 적외선 분광 광도 분석을 행한 결과, 3TMS-2는 Fig. 81과 같으며,

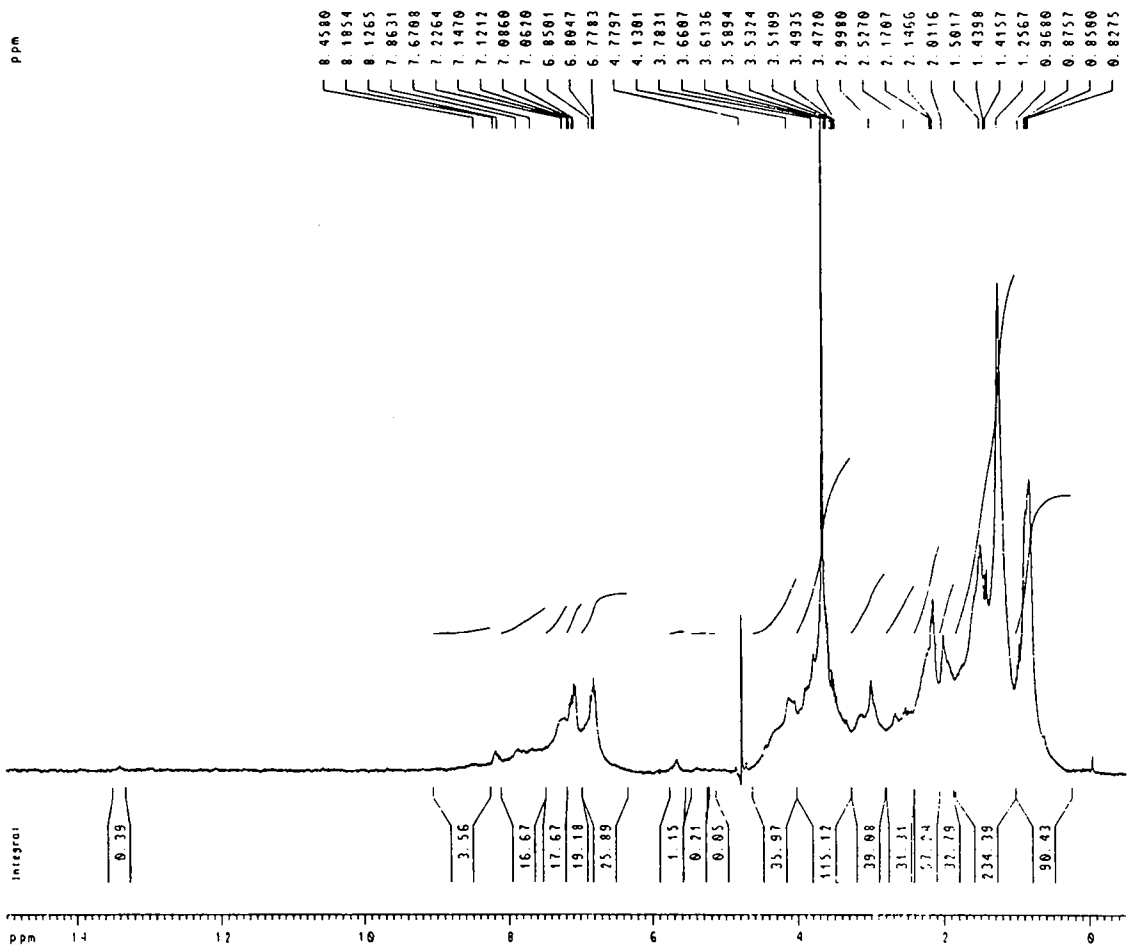


Fig. 65. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 3TMS-2 pigment(300MHz, D_2O).

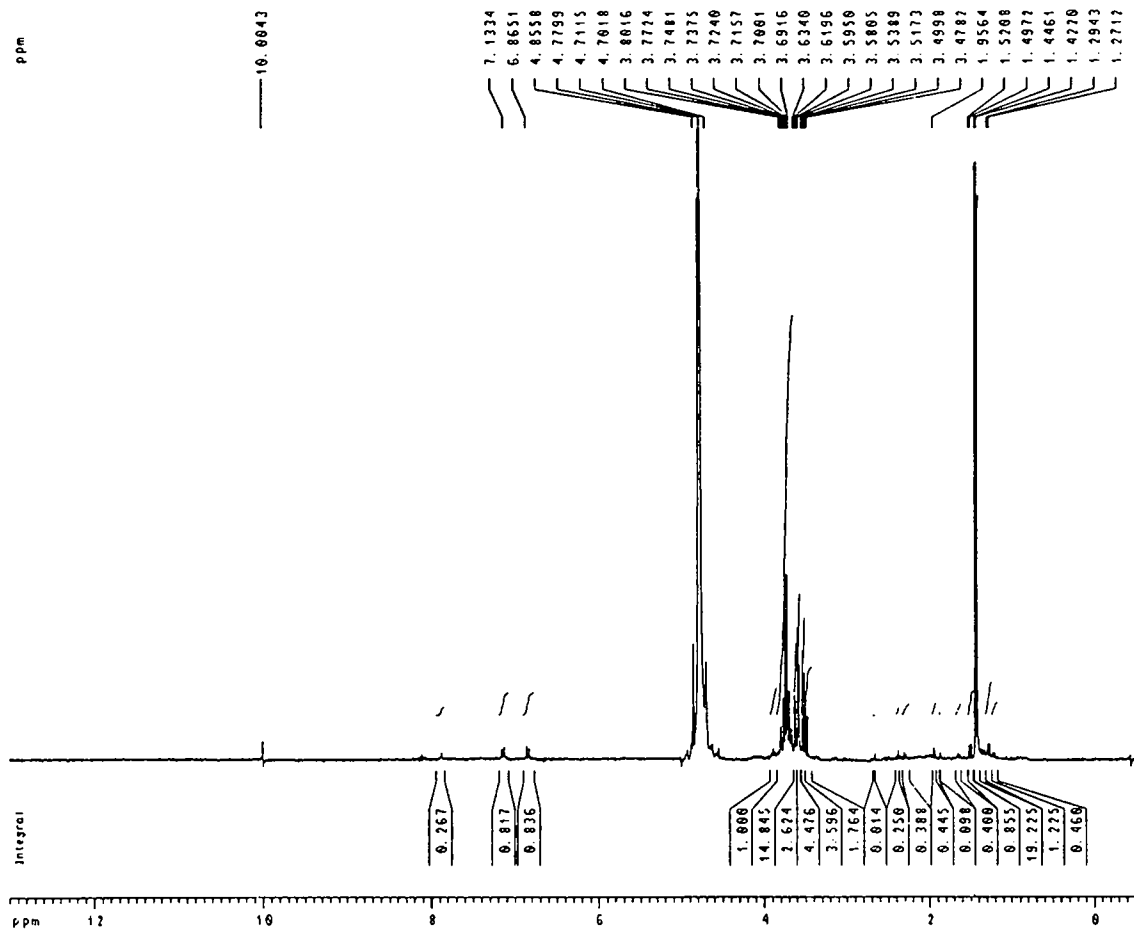


Fig. 66. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 2TMS-3 pigment(300MHz, D_2O).

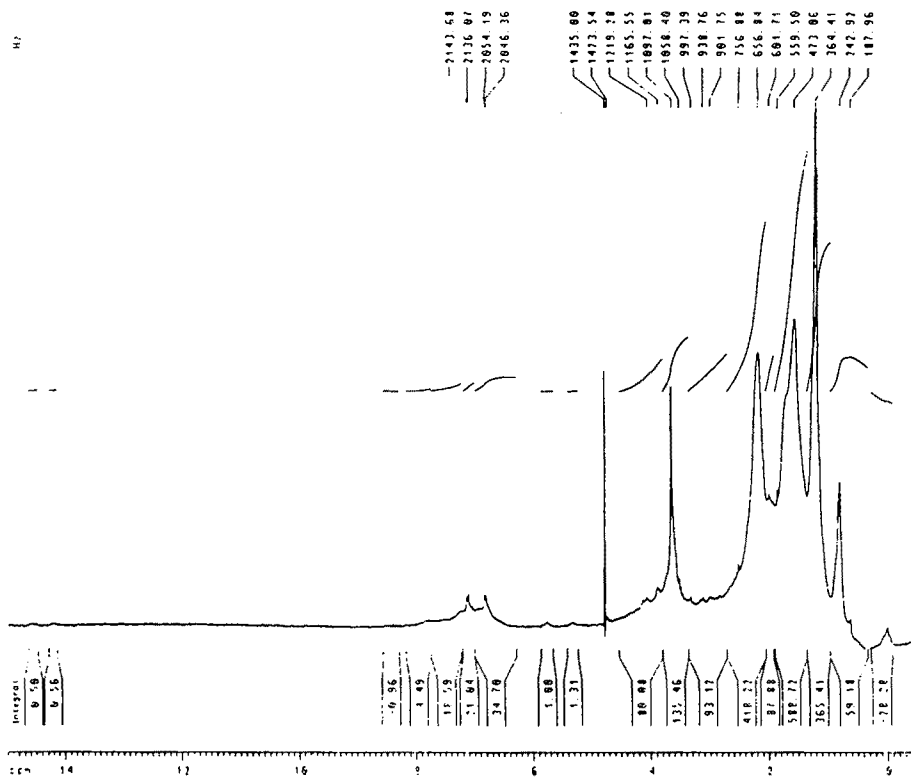


Fig. 67. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 3TMI-2 pigment(300MHz, D_2O).

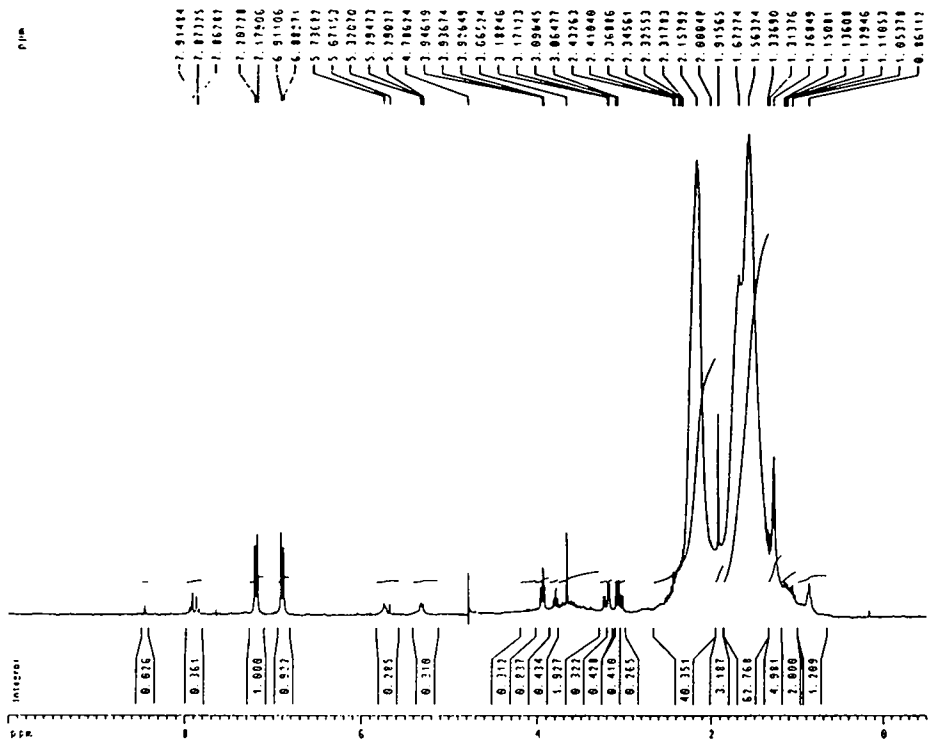


Fig. 68. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 2TMI-3 pigment(300MHz, D_2O).

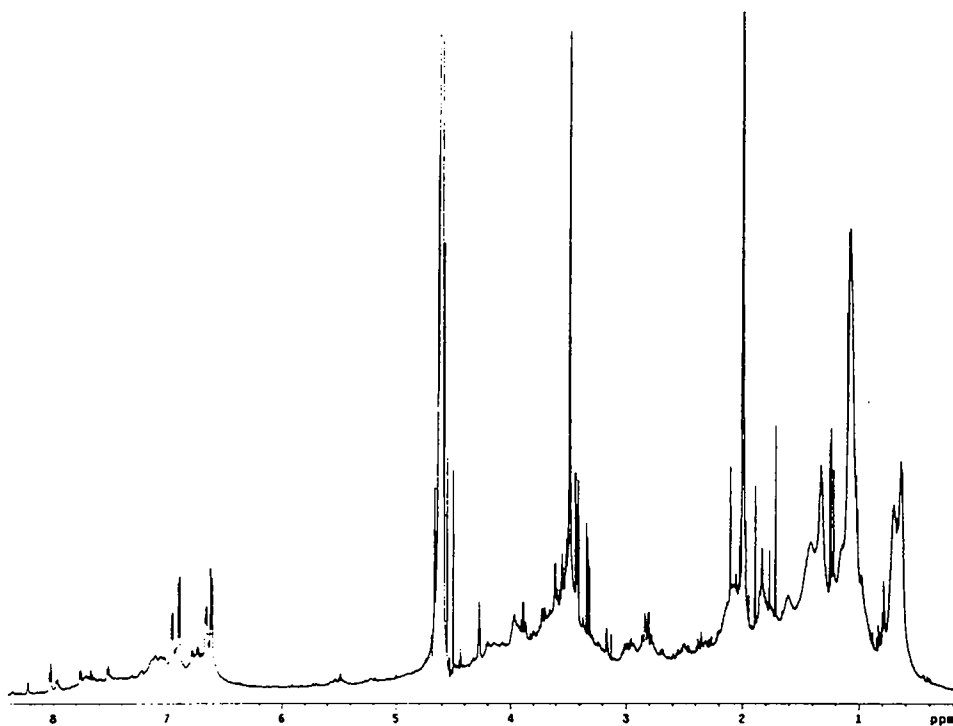


Fig. 69. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 3TMS-2 pigment(600MHz, D_2O).

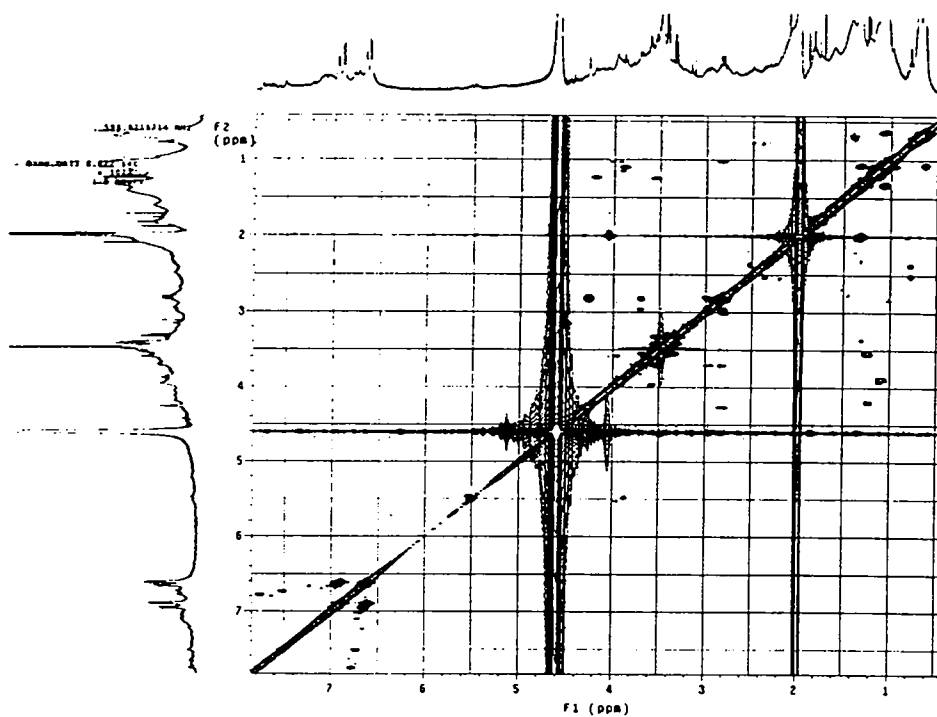


Fig. 70. Two-dimensional ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 3TMS-2 pigment(600MHz, D_2O).

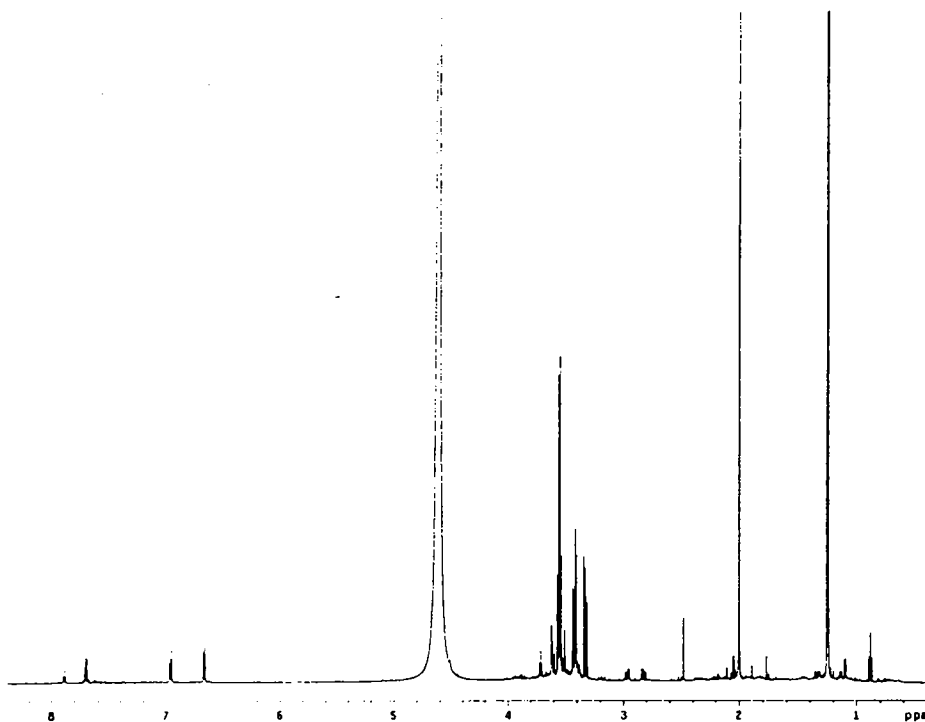


Fig. 71. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 2TMS-3 pigment(600MHz, D_2O).

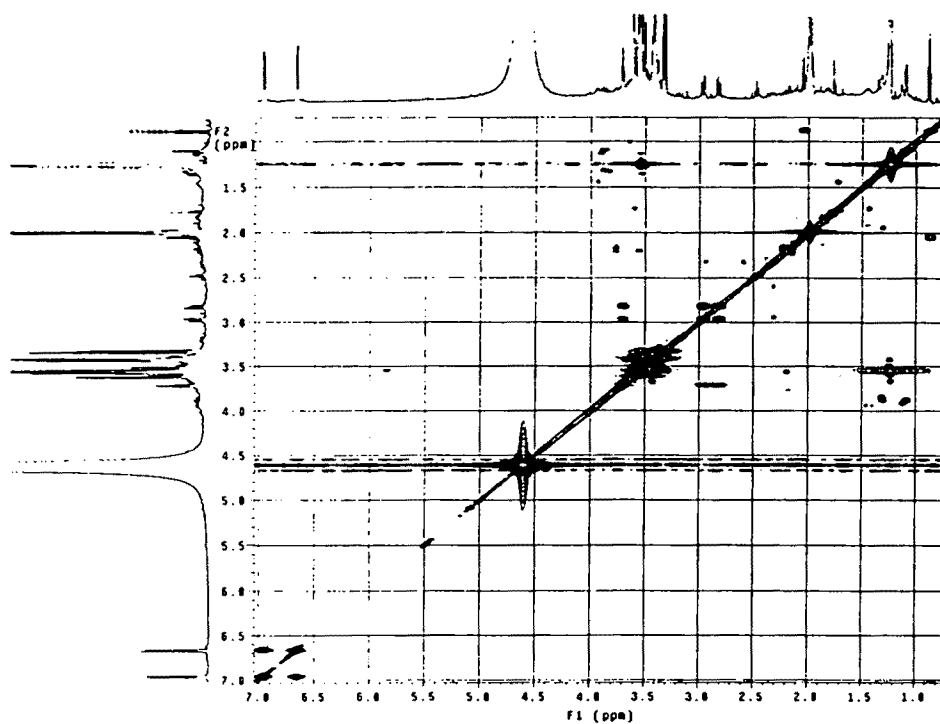


Fig. 72. Two-dimensional ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 3TMS-2 pigment (600MHz, D_2O).

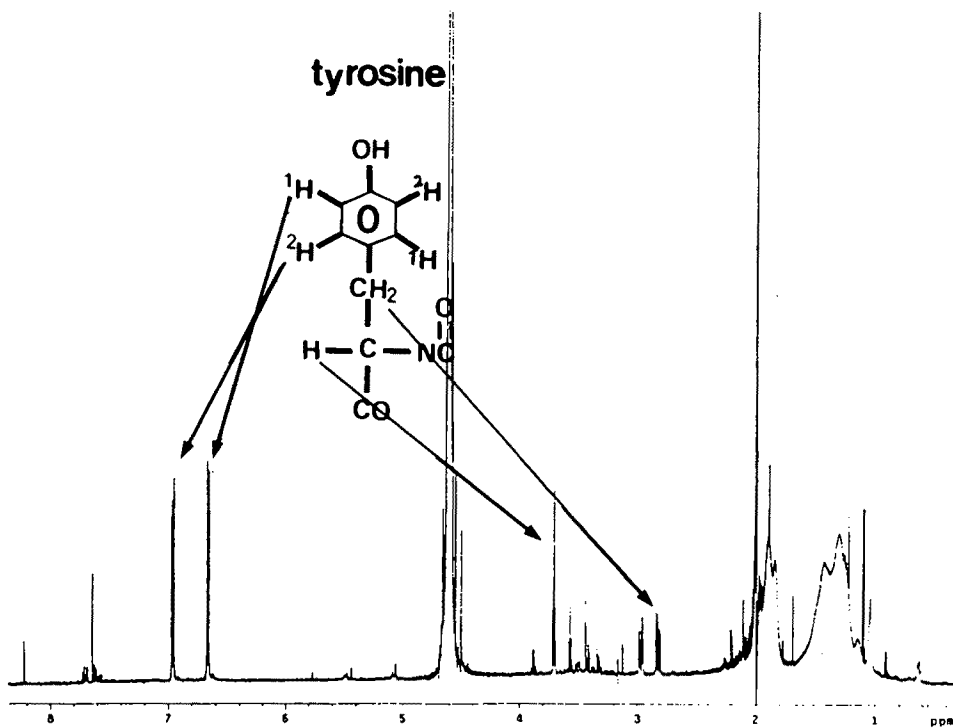


Fig. 73. ¹H-Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 3TMI-2 pigment(600MHz, D₂O).

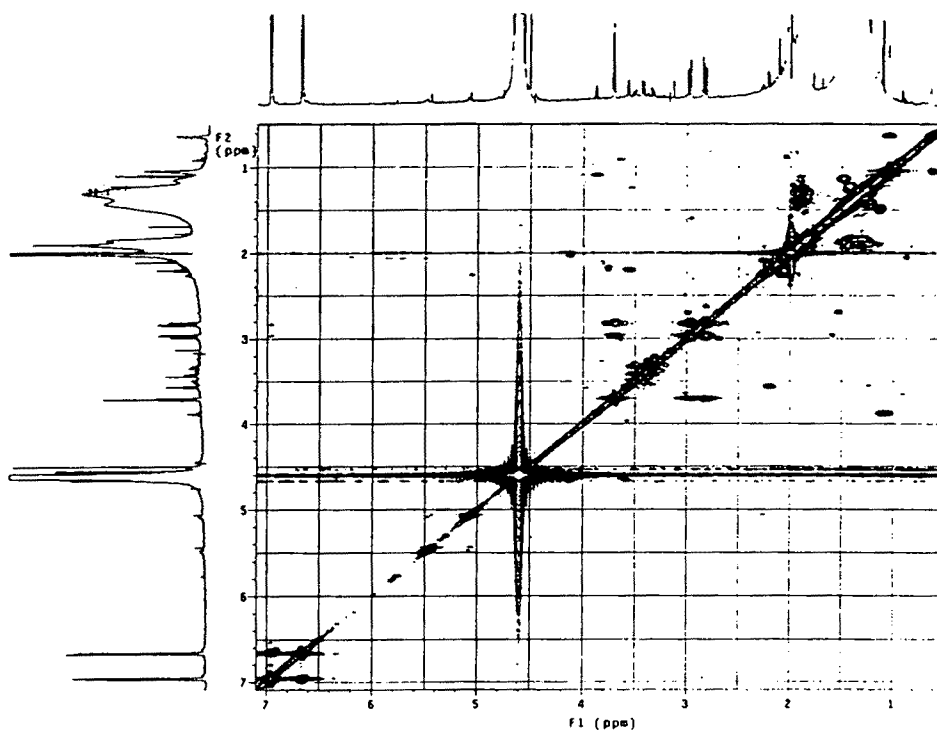


Fig. 74. Two-dimensional ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 2TMI-3 pigment(600MHz, D_2O).

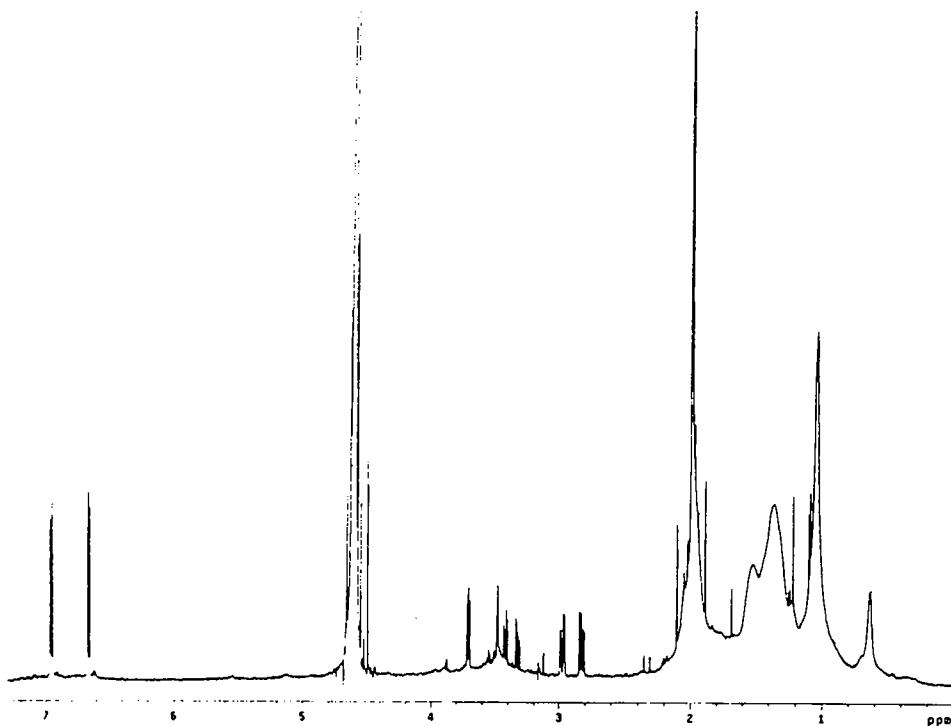


Fig. 75. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 3TMI-2 pigment(600MHz, D_2O).

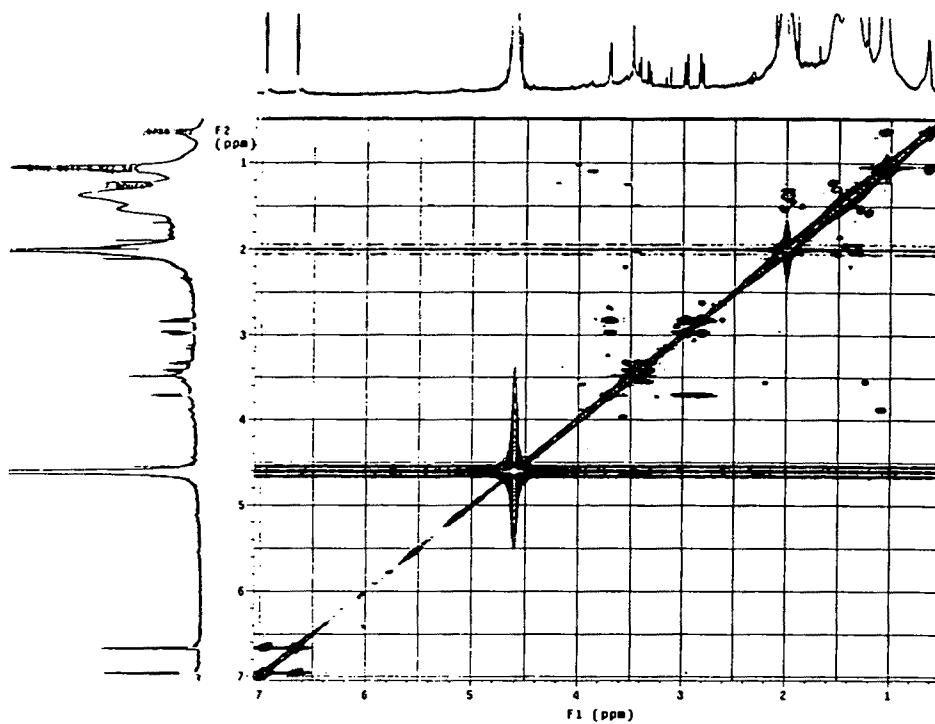


Fig. 76. Two-dimensional ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 2TMI-3 pigment(600MHz, D_2O).

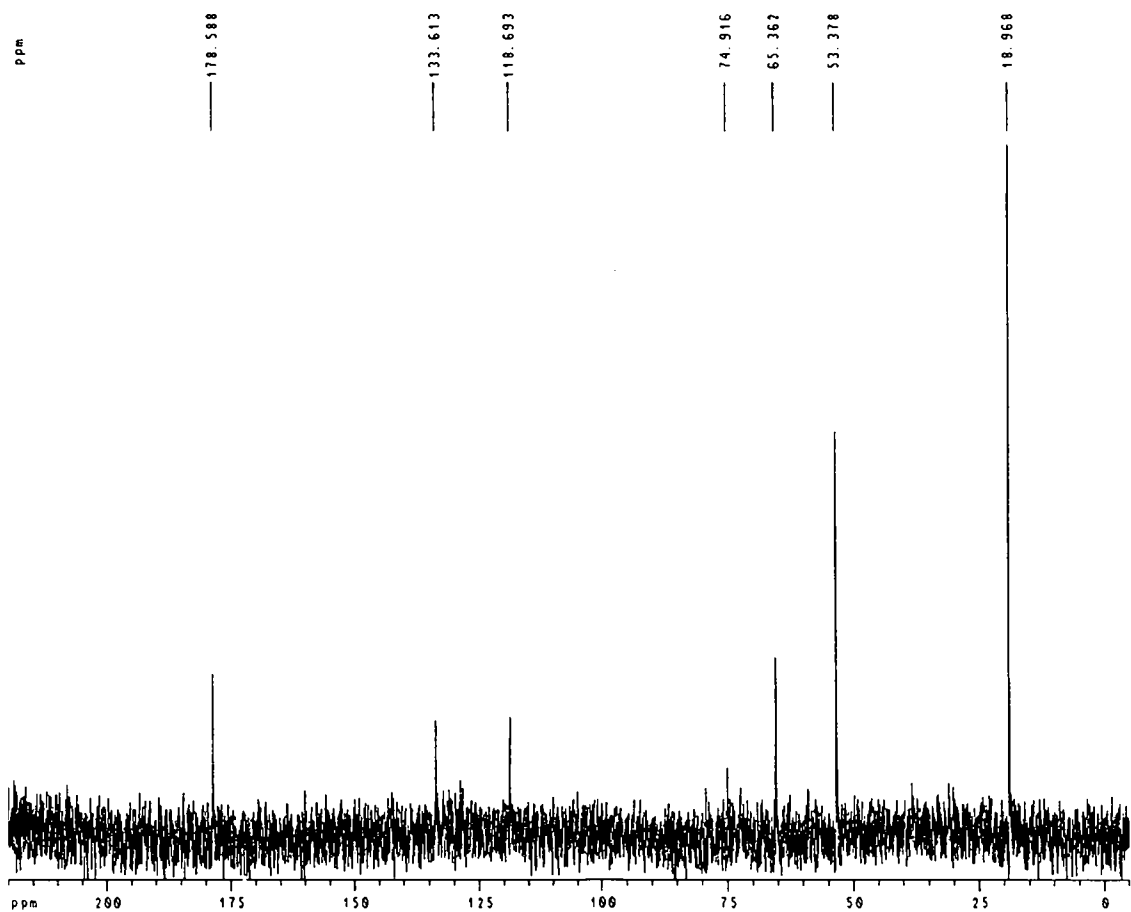


Fig. 77. ^{13}C -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 3TMS-2 pigment(300MHz, D_2O).

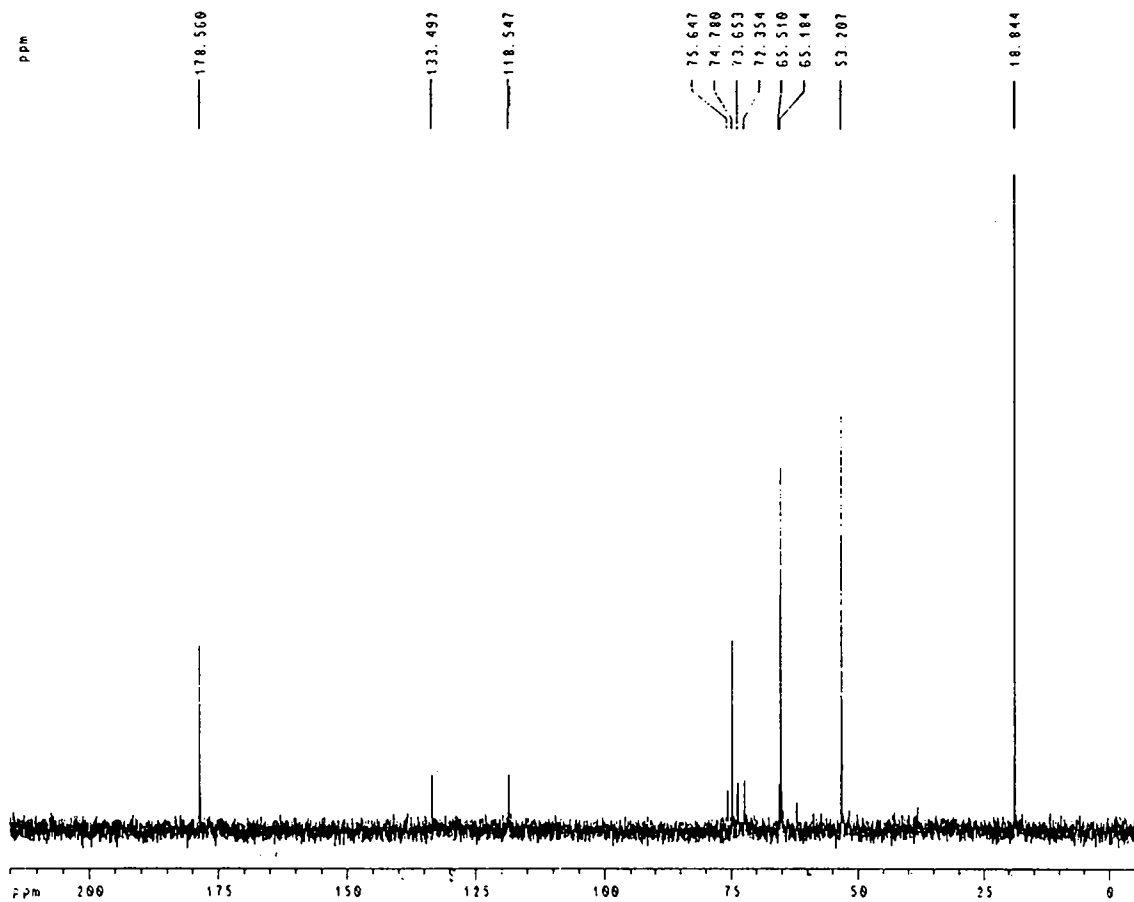


Fig. 78. ^{13}C -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 2TMS-3 pigment(300MHz, D_2O).

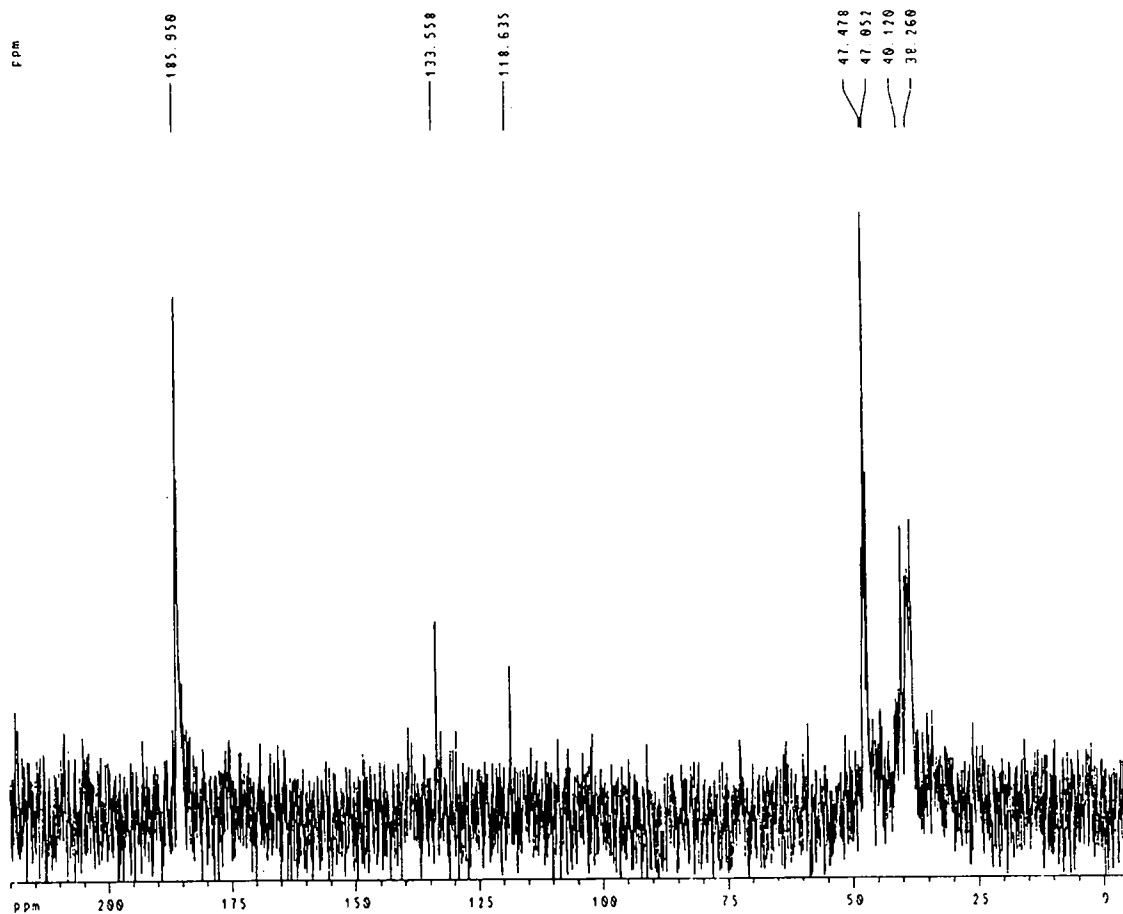


Fig. 79. ^{13}C -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 3TMI-2 pigment(300MHz, D_2O).

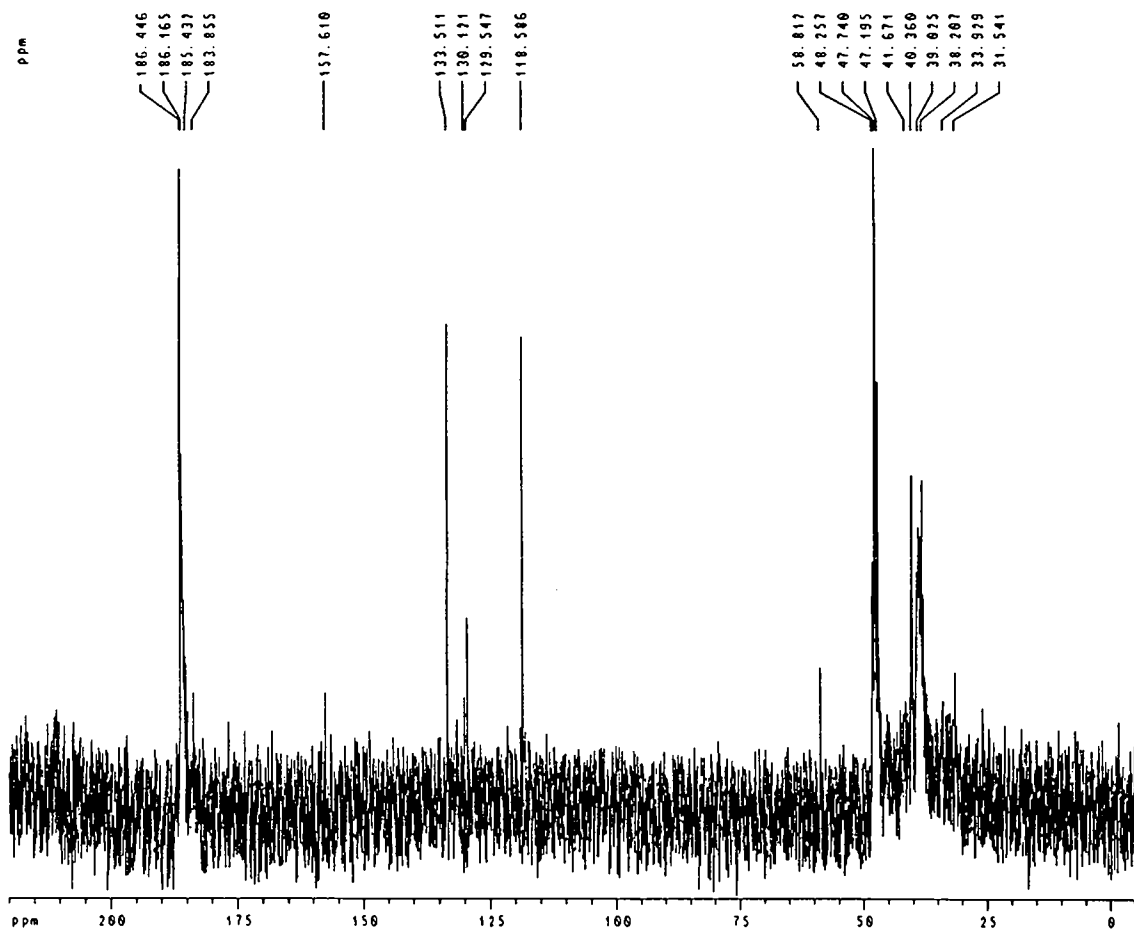


Fig. 80. ^{13}C -Nuclear magnetic resonance spectroscopy spectrum of 2TMI-3 pigment(300MHz, D_2O).

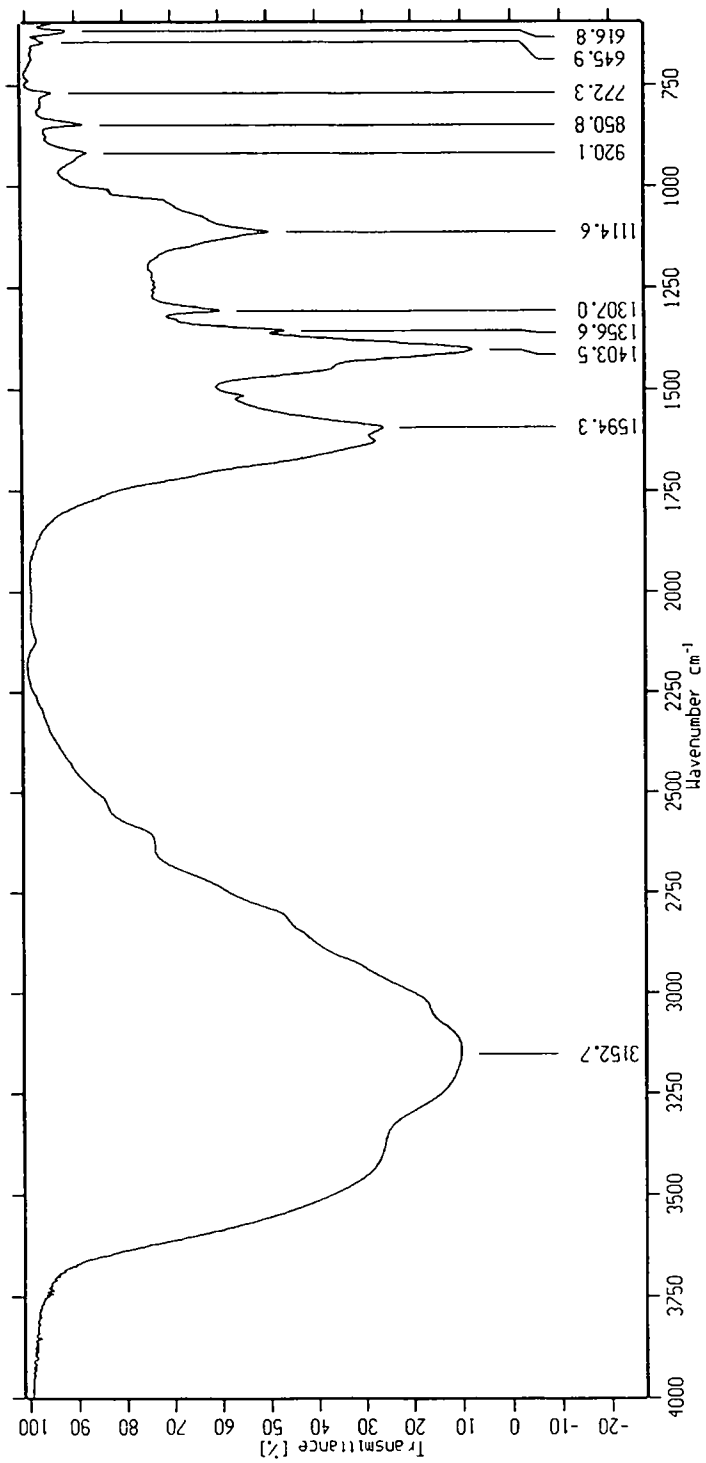


Fig. 81. IR-Spectroscopy spectrum of 3TMS-2 pigment

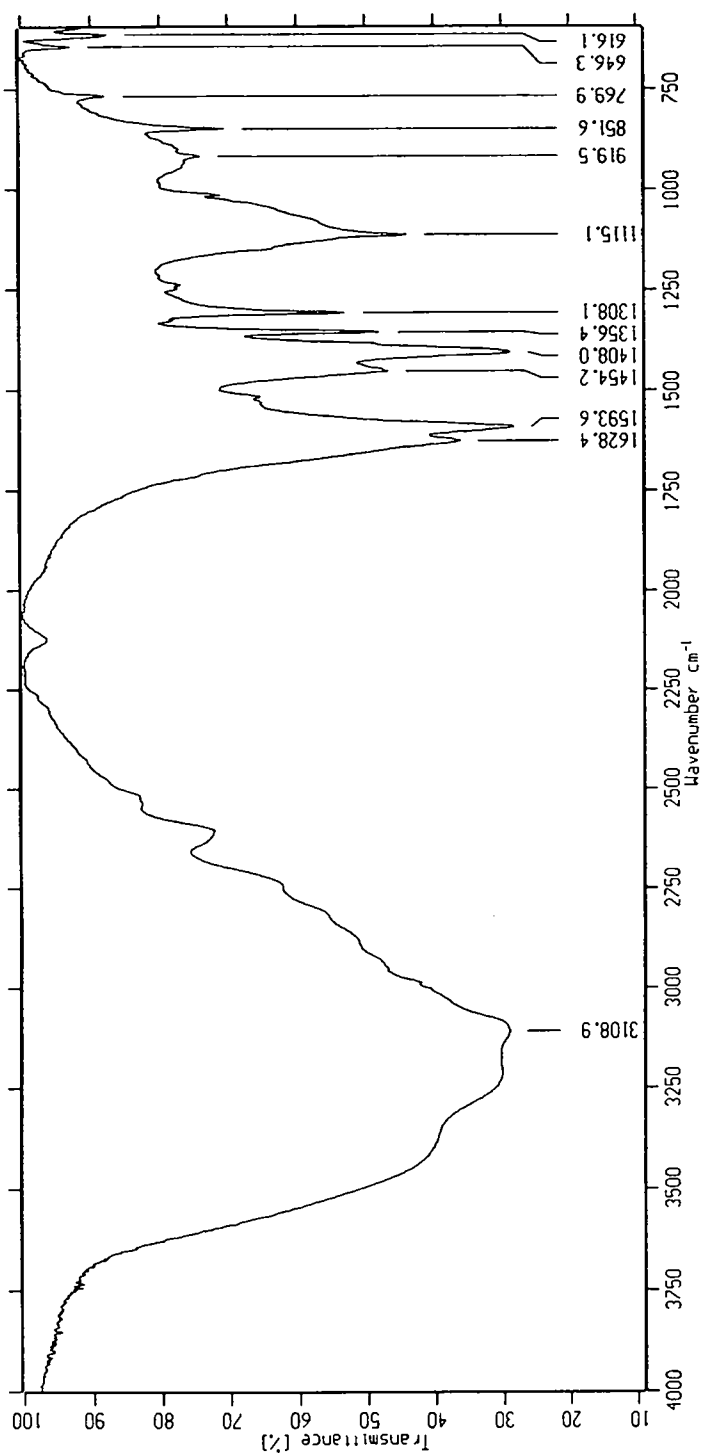


Fig. 82. IR-Spectroscopy spectrum of 2TMS-3 pigment

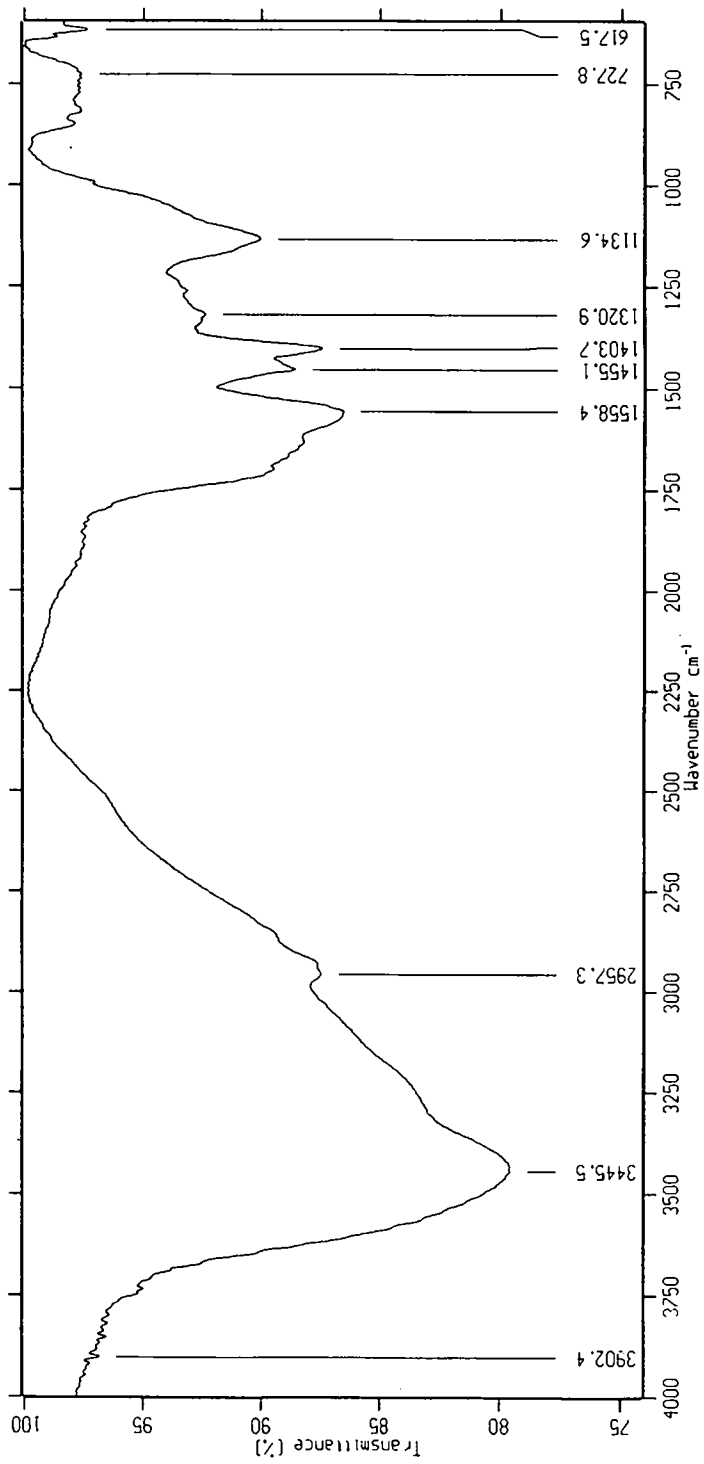


Fig. 83. IR-Spectroscopy spectrum of 3TMI-2 pigment

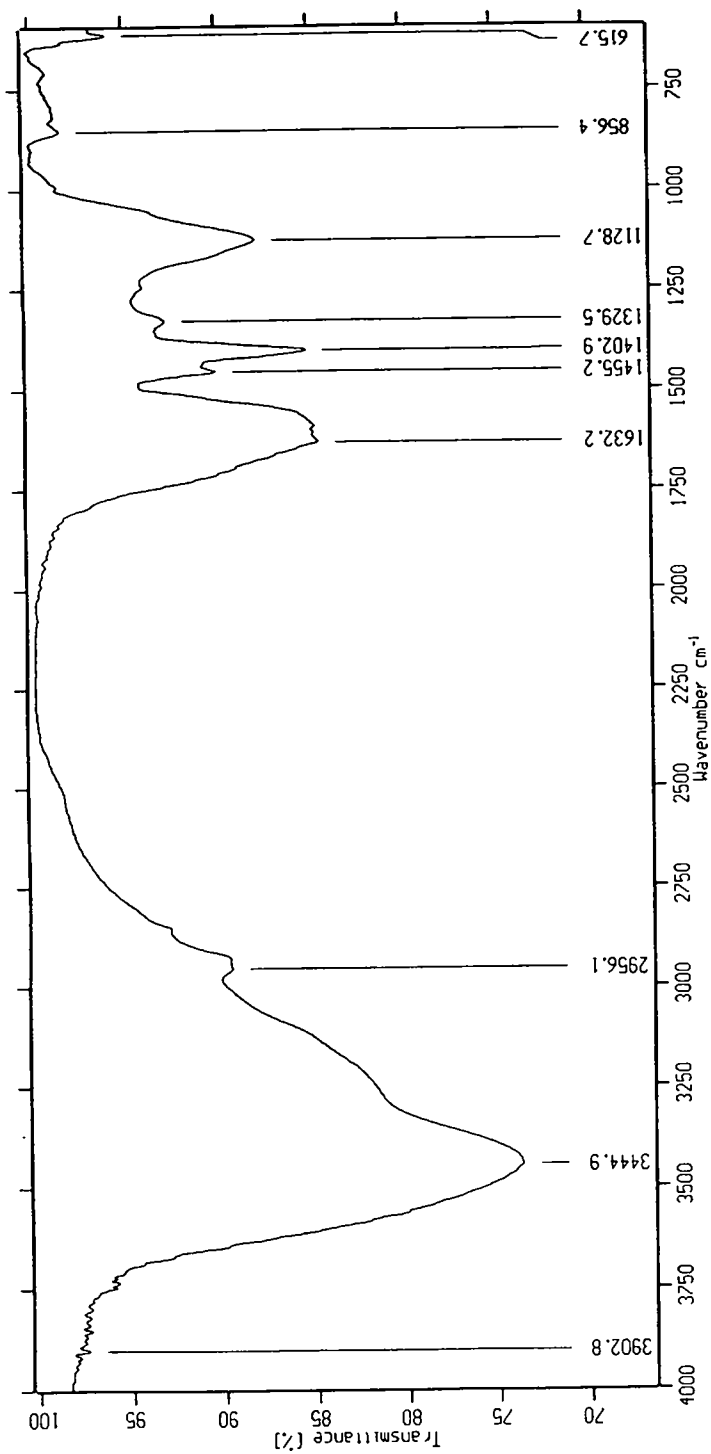


Fig. 84. IR-Spectroscopy spectrum of 2TMI-3 pigment

2TMS-3은 Fig. 82과 같으며, 3TMI-2는 Fig. 83과 같으며, 2TMI-3은 Fig. 84과 같다. IR-spectrum분석 결과, wave number 3200cm^{-1} 부근에서 강한 수소 결합 -OH기 또는 -COOH기의 peak가 관찰되었으며, 2900cm^{-1} 부근에서 -CH기의 존재가 관찰되었으며, 1600cm^{-1} 부근에서 acid 결합의 존재가 관찰되며, 1100cm^{-1} 부근에서는 C-O기의 peak가 각각 관찰되어 색소간에 서로 비슷한 구조를 나타내었다.

4) 원자 흡광 분광계(Atomic absorption analysis)

무기 원소의 정성 및 정량 분석에 이용되는 원자 흡광 분광계로 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및 2TMI-3을 분석한 결과, 이들 시료 모두에 무기 원소는 나타나지 않았다. 따라서 이 결과를 기초로 원소 분석(Elementary analysis)을 수행하였다.

5) 원소 분석(Elementary analysis)

정제 색소 시료 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및 2TMI-3에 함유한 원소 C, H, N, S의 성분을 확인하기 위하여 원소 분석기(Elementary analyzer)를 이용하여 분석하였다. 각각의 시료에 대한 원소 분석한 결과는 Table 27에 서와 같다. 색소 시료 3TMS-2의 원소 구성 비율은 9.458%의 nitrogen, 16.740%의 carbon, 4.572%의 hydrogen, 3.096%의 sulphur로, 2TMS-3은 12.990%의 nitrogen, 17.257%의 carbon, 6.942%의 hydrogen, 1.385%의 sulphur로, 3TMI-2는 4.817%의 nitrogen, 21.202%의 carbon, 4.912%의 hydrogen, 2.448%의 sulphur로 구성되어 있으며, 2TMI-3의 경우는 5.155%의 nitrogen, 22.259%의 carbon, 4.504%의 hydrogen으로 구성된 물질로 확인되었다. 색소 시료의 구성 성분 중 nitrogen의 함량이 높은 것으로 보아 아미노산 잔기의 존재를 추정할 수 있으며, 3.5%미만의 sulphur가 검출됨에

따라 sulphur를 함유한 아미노산 잔기의 존재를 나타내고 있다. 또한 oxygen의 함량이 높은 점으로 보아 COO-잔기가 많은 구조로 사료된다.

Table 27. The results of elemental analysis(E.A) of the pigment

Element	Pigments (% of composition)			
	3TMS-2	2TMS-3	3TMI-2	2TMI-3
Carbon	9.458	12.990	4.817	5.155
Hydrogen	16.740	17.257	21.202	22.259
Nitrogen	4.572	6.942	4.912	4.504
Sulfur	3.096	1.385	2.448	0

3. 총결론

HPLC로 정제한 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및 2TMI-3시료의 분자량 및 정제 정도(혼입물의 유무)를 분석하기 위하여 정성 분석, ^1H , ^{13}C NMR, MASS, IR, 원소 분석을 이용하였다. 당과 지질은 없었으며 구조 분석에서 3TMS-2는 분자량이 2355, 화학식은 $5\text{C}_4\text{H}_1\text{O}_{21}\text{N}_3\text{S}$, 분자 중에는 $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{R}-$, $-\text{OCH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$, tyrosine 등이 존재한다. 2TMS-3은 분자량이 2046, 화학식이 $2\text{C}_{13}\text{H}_5\text{O}_{44}\text{N}_9\text{S}$, 분자 중에는 $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{R}-$, $-\text{OCH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$ 및 tyrosine 등이 존재한다. 3TMI-2는 분자량이 2408, 화학식이 $4\text{C}_9\text{H}_2\text{O}_{27}\text{N}_2\text{S}$

분자 중에는 $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{R}-$, $-\text{OCH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$, $-\text{COOH}-$ 및 tyrosine이 존재한다. 2TMI-3은 분자량이 2205, 화학식이 $7\text{C}_5\text{HO}_{15}\text{N}$, 분자 중에는 $-\text{CH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{OH}-$, $-\text{COOH}-$ 및 tyrosine이 존재한다. 원소 분석한 결과는 색소 시료의 구성 성분 중 nitrogen의 함량이 높은 것으로 보아 아미노산 잔기의 존재 및 COO^- 잔기가 많은 구조로 확인되었다. 이상의 결과로 보아 이런 복잡하고 분자량이 큰 구조의 완전한 구조 결정에는 일본에서의 경우 3~4년이 더 걸린다고 한다. 또한 이러한 구조는 세계적으로 밝혀진 바가 없으며, 본 색소 물질의 생물 활성이 특징적이고 또 식품 중에 함유되어 있는 것을 추출시키면 기능성 식품으로써도 기대가 되며, 그 구조의 해명이 크게 기대된다고 한다(日本 東北大學의 應用生物化學科 生體分子分析實, 大類洋 教授). 따라서 앞으로의 연구 과정에서는 색소의 정제와 동시에 정제된 색소 물질의 아미노산 조성 분석, 2차원적 $^1\text{H-NMR}$ 분석 및 IO_4^- 에 의한 색소의 분해 반응과 acetyl화에 의한 유도화를 포함한 분석을 비교해 볼 필요가 있다.

제 5 절 색소 생성 관련 유전자의 분리

항돌연변이성 색소 생성에 관여하는 유전자의 sequencing을 통해 관련 효소 및 색소 생성 mechanism을 규명하고, 색소의 대량 생산의 필요에 따라, 색소 생성에 관여하는 유전자의 sequencing 확인을 통해 번역 (translation) 단계별 생성 물질들을 조합, 분석하여 색소의 구조를 결정하고자 유전자의 cloning을 시도하였다²⁹⁾.

1. 재료 및 방법

항돌연변이성 색소 생성에 관여하는 유전자의 sequencing을 위해 *Bacillus* sp. SSA3의 chromosomal DNA를 *Hind* III로 partial digestion 하여, pBluescript SK(+/-)의 *lacZ* 부위를 *Hind* III로 digestion 후 이 두 부위를 ligation 시켰으며 *E. coli* DH 5 α 에 형질 전환을 시도하였다.. pBluescript SK(+/-)의 *lac Z* 유전자 부위에 색소 생성에 관여하는 gene(pigmentation gene)을 삽입 후 tyrosine이 첨가된 X-gal 배지에서 배양시켜 유전자 유입 여부를 확인하고자 하였다.

가. 색소 생성 유전자의 cloning 및 transformation의 시도

pBluescript SK(+/-)는 크기가 2.96 kb이며, 내부의 *lac Z* gene에 의해 β -galactosidase를 분비하여, 배지 내의 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, 20mg/ml in dimeethylformamide) 및 IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside, 200mg/ml)와 반응하여 푸른색의 colony를 형성한다. 이 plasmid 내의 *lac Z* 유전자 부위에 외부 유전자가 유입되면 흰색의 집락을 형성하게 되는데 이러한 특성을 이용하여, 이 *lac Z* 유전자 부위에 색소 생성에 관여하는 gene(pigmentation gene)을 삽입한

후, tyrosine이 첨가된 X-gal 배지에서 배양시키면 흑갈색의 집락을 형성하게 된다.

2. 결과 및 고찰

Bacillus sp. SSA3의 색소 생성에 관여하는 유전자를 여러 가지 방법으로 cloning 및 transformation을 시도하였으나, 색소 생성 유전자가 recombination 된 것을 확인할 수 없었다. 이러한 결과를 미루어 보아 *Bacillus* sp. SSA3의 색소 생성에 관여하는 유전자는 단일 유전자가 아니라 chromosomal DNA의 여러 부분에 분산되어 있는 복수 유전자 군으로 추정된다.

색소 생성에 관여하는 gene에 대한 실험은 농림수산특정연구과제에서 제외되어 더 이상의 연구는 수행할 수 없었다.

제 6 절 전통 장류 중 갈색 색소 생성 미생물의 동정

한국 재래식 장류에서 분리 선별된 균주들은 균주 자체로서의 중요성뿐만 아니라, 이 균주들에 의해 생성되는 여러 생리 활성 물질들로 인하여 식품 및 의약품 등에 중요한 역할을 담당하고 있어 많은 주목을 받고 있다. 특히 본 연구실에서 재래식 간장으로 부터 분리한 *Bacillus* sp. SSA3 균주는 단일균 발효로 재래식 장류의 제조가 가능하며, 또한 전통 간장과 된장 중에서 흑갈색의 항돌연변이성 신 색소를 생성하는 점에서 볼 때 한국 재래식 장류의 대량으로의 산업화는 물론 기능성 식품 및 의약품으로써의 이용이 가능하다는데 매우 중요한 의미를 지닌다. 그러나 이 균주에 대한 상세한 분류나 동정에 관한 연구는 거의 없기 때문에 *Bacillus* sp. SSA3 균주의 분류학상 정확한 위치 확인과 보고의 필요가 있다.

1. 재료 및 방법

Bacillus sp. SSA3 균주의 형태학적, 배양학적, 물리학적, 생리학적 및 영양학적 여러 특성들을 조사하여 Bergey's manual of systematic bacteriology등을 참고로 동정하였고^{60~65)}, genomic DNA digestion and electrophoresis, cellular fatty acid, comparative protein electrophoresis, ribotyping pattern set 비교 분석 및 16s rRNA sequence analysis 등의 방법들을 사용하여 동정하였다.

2. 결과 및 고찰

한국 재래식 장류에서 분리 선별된 균주인 *Bacillus* species SSA3 균주는 단일균 발효로 재래식 장류의 제조가 가능하며, 또한 전통 간장과 된장 중에서 흑갈색의 항돌연변이성 신 색소를 생성하는 점에서 볼 때

한국 재래식 장류의 산업화는 물론 기능성 식품 및 의약품으로써의 이용이 가능하다는데 매우 중요한 의미를 지닌다. 이러한 중요한 발효균주의 분류학상 정확한 위치의 확인 및 보고될 필요성에 따라 이 균주의 형태학적, 배양학적, 물리학적, 생리학적 및 영양학적 여러 특성들을 조사하여 Bergey's Manual Systematic Bacteriology를 참고로 동정한 결과 신종 균으로 판명되었다. 80년대에는 이 균이 *Bacillus licheniformis*로 동정되었으나 90년대에 *Bacillus* 속균들이 유전자 분석에 의해 분류학상으로 많은 변화가 있었다. 그래서 본 균은 이전의 동정 방법들과 최근의 방법들에 의해 새로이 동정하고자 하였다.

가. 생리학적 및 생화학적 특성

시험 균주의 생리학적 특성을 조사하기 위해 세포의 형태와 Gram 염색, 운동성, 포자 형성능 등의 cell morphology와 집락의 형태, 생육 과정에서의 색소 생성능 등 colonial morphology를 조사하였다. 생화학적 특성으로는 catalase와 oxidase의 생성능, 여러 기질의 이용능, 여러 가지 당을 이용한 대사 과정에서의 산과 gas의 생성능 등을 조사하였다. 한편, 동정균의 영양과 생육 조건은 생육 온도와 염농도에 따른 생육능 그리고 산소에 의한 영향과 배지 성분의 이용능 등을 조사하였다. 이러한 특성들을 조사함에 있어서 Bergey's Manual, the Journal of Clinical Microbiology, the International Journal of Systematic Bacteriology, the USDA Handbook on the Genus *Bacillus* 등의 protocols^{63~66}를 이용하였다.

Cell morphology는 Table 28에서 보는 바와 같이 motility를 가지고 있다. 세포 형태로는 rod형, Gram 양성으로 subterminal region에 endospore를 형성하고 있으며 단일 혹은 작은 chain의 형태로 존재한다.

Colonial morphology는 집락들이 불투명하고 도드라졌거나 평평한

elevation을 가지고 있으며, 또한 세포 표면은 주름지고 가장 자리가 알게 패인 형태로 매우 불규칙한 형태를 나타내었다.

Biochemical test의 결과는 Table 29에서와 같다. Catalase와 oxidase의 생성 반응에서는 양성을 나타내었으며 Voges-Proskauer test에서도 양성을 나타내었다.

균의 생육 조건 조사의 결과는 동정균은 호기성 균으로 최고 생육 온도는 45℃이고, 최저 생육 온도는 20℃이었으며 10%의 NaCl 농도 하에서도 생육이 가능하였다.

생리학적 및 생화학적 특성들을 종합해 보면 분리균들은 내성 포자를 가진 Gram 양성 간균이며 catalase 양성, Voges-Proskauer test 양성, 혐기 상태에서 균의 생육이 이루어지지 않으며 starch 가수 분해능이 있는 균으로 나타났다. 동정균과 *Bacillus subtilis*의 주요 특성들은 Table 30에서와 같이 voges-proskauer test에서 pH의 범위와 최고 생육 온도, arabinose와 xylose 및 mannitol에서 산 생성능 등에 다소 상이함을 나타내고 있다.

나. Genomic DNA digest와 전기영동에 의한 비교 분석

시험 균주의 genomic DNA를 추출, 정제하여 제한효소 *NOT I* 절단한 후, 기존의 동정된 균주의 절단된 genomic DNA와 함께 1.5% agarose gel 상에서 전기영동 하여 digestion pattern들과 비교 분석하였다^{64,65}.

이때 사용한 제한효소 *NOT I*은 GC/GGCCGC의 8 base pair를 인

CGCCGG/CG

식하여 절단한다.

분리균의 digested genomic DNA를 *Bacillus* sp. 여러 균종들과 비교해 본 결과는 Fig. 85과 같으며, 분리균이 *Bacillus coagulans*와 유사한

pattern을 나타내었으나, 이 결과로는 정확한 판정이 이루어지지 않았다

다. 지방산 methyl ester(FAME)에 의한 동정

Bacillus species SSA3 균의 total fatty acid analysis^{66,67)}를 위해 nutrient agar plate 상에서 회수된 균주들로부터 추출한 세포성 지방산을 methyl ester화 시킨 후 gas-chromatography based microbial identification system(MIS)으로 각각의 지방산 성분을 분석하여 ATCC의 database 상에서 타 균주와 비교 분석하였다.

이때 사용한 database는 MIDI/MIS의 database이며, 이는 300개 이상의 지방산 methyl ester를 분석할 수 있는 것으로 yeasts, anaerobic bacteria, aerobic bacteria, mycobacteria에 대해 방대한 database를 구축⁶¹⁾하고 있어 타 균주와의 지방산 비교 분석에 많이 사용되고 있다.

세포성 지방산을 gas chromatography based microbial identification system으로 분석하여 library search(TSBA [Rev 3.90])한 결과 세포성 지방산 methyl ester 분석에 의한 Identification coefficient가 0.6 이상일 경우 database속의 *Bacillus* 균종과 good match를 이루어 매우 유용한 자료로써의 가치가 있으나 0.300보다 낮을 경우에는 정확한 동정을 위한 data로써 사용하기가 어렵다. *Bacillus* sp. SSA3균은 identification coefficient가 0.48의 *Bacillus licheniformis*로 나타나 정확한 동정이 되지 않았으나, *Bacillus* 속의 균종임은 확인할 수 있었다.

라. Comparative proteins 전기영동에 의한 비교 분석

동정균들의 세포성 protein을 추출, 정제하여 15%의 poly-acrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE analysis를 행하고, 그 결과를 기존의 동정된 균주들(ATCC strains)의 protein electrophoresis

Table 28. Physiological and biochemical Characteristics of the isolated strain *Bacillus* species SSA3.

Characteristics	<i>B. sp.</i> SSA3	Characteristics	<i>B. sp.</i> SSA3
Rods	+	Growth at 37°C	+
Rods straight	+	Growth at 45°C	+
Rods curved	-	Growth at 50°C	-
Cells single	+	Growth at 55°C	-
Cells chained	+	Growth at 60°C	-
Ends tapered	-	Growth at 65°C	-
Ends rounded	+	Catalase	+
Ends squared	-	Oxidase	+
Endospore formed	+	Casein hydrolysis	+
Sporangium swollen	-	Esculin hydrolysis	+
One spore/cell	+	Gelatin liquification	+
Spore round	-	Hippurate hydrolysis	-
Spore cylindrical	+	Lecithinase degradation directly underneath	W
Spore oval	+	Starch hydrolysis	+
Spore central	+	Tween 80 hydrolysis *	+
Spore terminal	-	Tyrosine decomposition *	-
Spore subterminal	+	Urea decomposition	-
Gram stained	+	Growth in 2% NaCl	+
Gram positive	+	Growth in 5% NaCl	+
Gram negative	-	Growth in 7% NaCl	+
Gram variable	-	Growth in 10% NaCl	+
Vacuoles present	-	Growth in 0.2% azide	V
Colony translucent	+	Growth at pH 4.5	-
Colony transparent	-	Growth at pH 6.0	+
Colony opaque	+	Acid from arabinose	-
Colony entire	-	Gas from arabinose	-
Colony erose	+	Acid from cellobiose	-
Colony lobate	-	Gas from cellobiose	-
Colony circular	-	Acid from fructose	+
Colony irregular	+	Gas from fructose	-
Colony rhizoid	-		

W ; weak, V ; variable, * ; soluble and insoluble black pigment formed

Table 28. (Continued)

Characteristics	<i>B. sp. SSA3</i>	Characteristics	<i>B. sp. SSA3</i>
Colony low convex	+	Acid from glucose	+
Colony high convex	-	Gas from glucose	-
Colony flate	-	Acid from lactose	-
Colony raised	+	Gas from lactose	-
Colony glistening	+	Acid from mannitol	+
Colony dull	+	Acid delayed > 14 days	+
Colony dry	-	Gas from mannitol	-
Colony smooth	+	Acid from mannose	-
Colony rough	+	Gas from mannose	-
Sol. brown pigment	-	Acid from sucrose	+
Sol. black pigment	+	Gas from sucrose	-
Sol. yellow pigment	-	Acid from trehalose	-
Insol. brown pigment	-	Gas from trehalose	-
Insol. black pigment	+	Acid from xlose	-
Insol. yellow pigment	-	Gas from xlose	-
Insol. orange pigment	-	Aerobe	+
Insol. red pigment	-	Facultative	-
Cells motile	+	Microaerophile	-
Growth at 15°C	+	Anaerobe	-
Growth at 20°C	+	Gas from sealed nitrate	-
Growth at 26°C	+	Gas from sealed glucose	-
Growth at 30°C	+	Dihydroxyacetone	-
Indole	-	Litmus reduced	+
Nitrate to nitrite	+	VP(5198) positive	+
Nitrate to gas	-	VP(5331) positive	+
Methylene blue reduction	+	pH VP 5198 6.0 or less	-
Mehtylene blue reoxidation	+	pH VP 5198 6.5 - 7.5	+
Litmus milk acid	-	pH VP 5198 8.0 or more	-
Litmus milk coagulated	-	Citrate utilization	+
Litmus milk alkaline	+	Propionate utilization	+
Litmus milk peptonized	+	Phenylalanine deamination	-

Table 29. Biological metabolic Characteristics of the isolated strain *Bacillus* species SSA3.

Characteristics	<i>B. sp.</i> SSA3	Characteristics	<i>B. sp.</i> SSA3	Characteristics	<i>B. sp.</i> SSA3
water	-	α -methyl D-galactoside	-	L-malic acid	+
α -cyclodextrin	-	β -methyl D-galactoside	-	methyl pyruvate	+
β -cyclodextrin	+	3-methyl glucose	+	methyl succinate	-
dextrin	+	α -methyl D-glucoside	-	propionic acid	V
glycogen	+	β -methyl D-glucoside	+	pyruvic acid	+
inulin	-	α -methyl D-mannoside	-	succinamic acid	-
mannan	-	palatinose	+	succinic acid	-
tween 40	+	psicose	+	N-acetylL-glutamate	+
tween 80	+	raffinose	-	alaninamide	-
N-acetyl glucosamin	-	rhamnose	-	D-alanine	-
N-acetyl mannosamin	-	ribose	-	L-alanine	-
amydalin	-	salicin	-	L-alanyl-glycine	-
L-arabinose	-	sedoheptulosan	-	L-asparagine	+
D-arabitol	-	sorbitol	-	L-glutamic acid	+
arbutin	-	stachyose	-	glycyl-L-glutamate	-
cellobiose	+	sucrose	+	L-pyroglutamin acid	-
D-fructose	+	D-tagatose	-	L-serine	-
L-fructose	-	D-trehalose	-	putrescine	-
D-galactose	-	turanose	+	butanediol	-
D-galacturonic acid	-	xylitol	-	glycerol	+
gentiobiose	V	D-xylose	+	adenosine	+
D-gluconic acid	-	acetic acid	-	2'-deoxy adenosine	-
α -D-glucose	+	α -hydroxybutyrate	-	inosine	-
m-inositol	-	β -hydroxybutyrate	-	thymidine	+
α -D-lactose	-	γ -hydroxybutyrate	-	uridine	-
lactulose	-	ρ -hydroxybutyric acid	-	adenosine-5'- monophosphate	-
maltose	+	α -ketoglutaric acid	-	thymidine-5'- monophosphate	-
maltotriose	+	α -ketovaleric acid	-	uridine-5'- monophosphate	-
D-mannitol	-	lactamide	-	fructose-6-phosphate	+
D-mannose	-	lactic acid methylester	-	glucose-1-phosphate	-
D-melezitose	-	L-lactic acid	+	glucose-6-phosphate	+
D-melibiose	-	D-malic acid	-	D-L- α -glycerol phosphate	+

+ ; positive - ; negative V ; varable

**Table 30. Characterization between *Bacillus* species
SSA3 and *Bacillus* species.**

Characteristics	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. sp. SSA3</i>
Growth temp.(°C)			
maximum.	45 - 55	45	45
minimum	5 - 20		15
10 % NaCl	-	+	+
Egg yolk reaction	-		weak
Pigment on potato	pink	brown	
Acid production:			
L-Arabinose	+		-
Lactose	-	+	-
D-Xylose	+	-	-
utilization of citrate	+ (87%)	- (22%)	+
Phenylalanine deamination	-	+ (89%)	-
Tween 80 hydrolysis	+ (87%)	- (0)	+

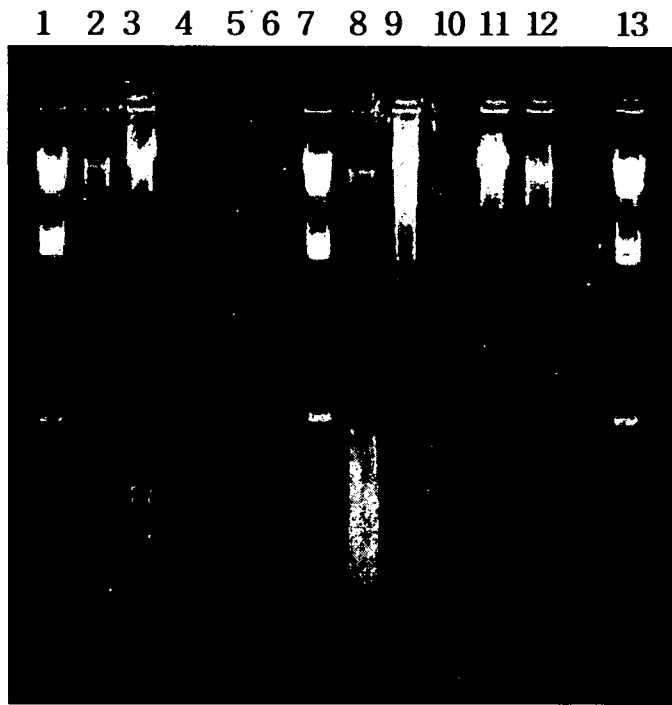


Fig. 87. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA digest of *Bacillus* species SSA3.

lane 1 ; λ -DNA digested with *Hind* III

lane 2 ; *Bacillus* species SSA3

lane 3 ; *Bacillus circulans*(ATCC 23861)

lane 4~6 ; Other strains

lane 7 ; λ -DNA digested with *Hind* III

lane 8 ; *Bacillus coagulans* (ATCC 7050)

lane 9 ; *Bacillus macerans* (ATCC 8244)

lane 10 ; Negative control

lane 11 ; *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580)

lane 12 ; Blank

lane 13 ; λ -DNA digested with *Hind* III

pattern들과 비교 분석하였다^{29, 68-72}).

여러 *Bacillus* spp. 균들의 세포성 단백질을 15%의 polyacrylamide gel 을 사용하여 SDS-protein 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 86에서 보는 바와 같다. *Bacillus* sp. SSA3의 protein 전기영동 pattern과 유사한 균을 찾을 수 없었다.

마. Ribotyping pattern set 비교 분석

E. coli DNA probe를 이용하여 ribosomal DNA operon들을 분석하는 ribotyping test를 Dupont Riboprinter^R로 분석하여 기존의 동정된 균들의 RiboGroup pattern set을 database 상에서 서로 비교 분석하였다. Ribosomal DNA operon을 분석하는 ribotyping test를 하여 riboprint patterns를 비교해 본 결과는 Table 31에서 보는 바와 같이 SSA3은 여러 균들 중에서 *Bacillus amyloliquefaciens*와 가장 가까운 match를 나타내고 있으나, 분리균과 일치하는 *Bacillus* 속의 균종은 없었다.

바. 16S rRNA gene sequencing 에 의한 비교 분석

16S rRNA gene sequence analysis에 의한 동정은 PCR-amplified 16S rRNA의 direct sequencing⁷³에 의한 방법을 사용하였다. 우선 분리 균주의 genomic DNA extraction, 16S rRNA의 PCR amplication, PCR products의 purification⁷⁴을 통해 정제된 PCR products의 sequencing은 ABI PRISMTM의 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems Germany)의 manufacturer's protocol을 사용하였으며 sequence reactions는 Applied Biosystems 373A DNA Sequencer를 사용한 electrophoresis를 행하였다.

이상의 16S rRNA의 sequencing 결과들을 종합하여 similarity matrix와

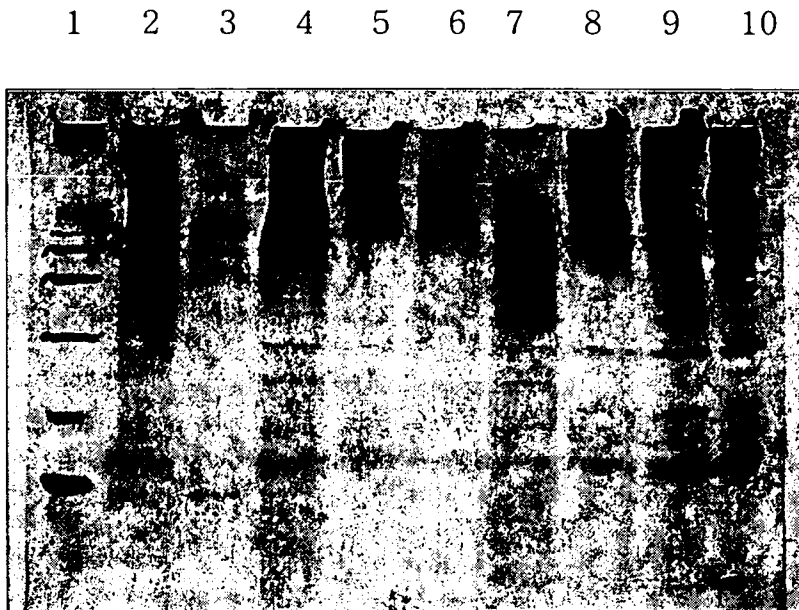


Fig. 88. SDS - PAGE analysis of *Bacillus* species SSA3.

lane 1 ; Protein Standard

lane 2~3 ; Other strains

lane 4 ; *Bacillus* species SSA3

lane 5 ; *Bacillus subtilis* (ATCC 6051)

lane 6 ; Other strain

lane 7 ; *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580)

lane 8 ; *Bacillus coagulans* (ATCC 7050)

lane 9 ; *Bacillus macerans* (ATCC 8244)

lane 10 ; *Bacillus cirulans* ss. *rotans* (ATCC 23861)

Table 31. Characterization and identification by RiboGroup pattern set of *Bacillus* sp. SSA3.

RiboPrint λ pattern	RiboGroup Pattern Set
	<i>Bacillus</i> spp(Variant)
	<i>Bacillus</i> sp(Variant)
	<i>Bacillus</i> sp. SSA3
	<i>Bacillus</i> spp(Variant)
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus macerans</i>
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus coagulans</i>

phylogenetic tree로 나타내었는데 이때 16S rRNA gene similarity value는 alignments의 sequence를 pairwise comparison에 의한 계산에 근거하여 그 수치를 백분율로 나타내었다.

PHYLIP package⁷⁵⁾의 phylogenetic tree(dendrogram) operation의 구성을 위해서 pairwise evolutionary distance는 Jukes와 Cantor⁷⁶⁾에 의해 교정된 percent similarity로부터 computer 상에서 계산된 결과들을 사용하였다.

Phylogenetic tree상에서 나타나는 유전적 상관 관계의 distance는 neighbor-joining method⁷⁷⁾를 기본으로 하여 작성하였다.

Bacillus sp. SSA3의 16S rRNA의 sequence는 Fig. 87에서와 같으며, 16S rRNA의 sequencing 결과들을 종합하여 *Bacillus subtilis*와 비교한 결과는 Fig. 88에서와 같이 alignment score가 76%로 나타났다. *Bacillus* sp. SSA3의 similarity matrix value는 Table 32에서와 같으며, Fig. 89에서 phylogenetic tree로 나타낸 결과로 보아 신 종균(new species)로 사료된다.

CCUGGCUCAG GACGAACGCU GCGGCGUGC CUAUACAUG CAAGUCGAGC 50
 GGACAGAUGG GAGCUUGCUC CCUGAUGUUA GCGGCGGACG GGUGAGUAAC 100
 ACGUGGGUAA CCUGCCUGUA AGACUGGGAU AACUCCGGGA AACCGGGGCU 150
 AAUACCGGAU GCUUGUUUGA ACCGCAUGGU UCAAACAUA AAGGUGGCUU 200
 CGGCUACCAC UJACAGAUGG ACCGCGGGG CAUJAGCUAG UUGGUGAGGU 250
 AAUGGCUCAC CAAGGCAACG AUGCGUAGCC GACCUAGAGG GGUGAUCGGC 300
 CACACUGGGA CUGAGACACG GCCAGACUC CUACGGGAGG CAGCAGUAGG 350
 GAAUCUCCG CAUUGGACGA AAGUCUGACG GAGCAACGC GCGUGAGUGA 400
 UGAAGGUUUU CGGAUCGUAA AGCUCUGUUG UUAAGGAAGA ACAAGUGCCG 450
 UUCAAAUAGG GCGGCACCUU GACGGUACCU AACCAGAAAG CCACGGCUAA 500
 CUACGUGCCA GCAGCCGGG UAAUACGUAG GUGGCAAGCG UUGUCCGGAA 550
 UUAUUGGGCG UAAAGGGCUC GCAGGCGGUU UCUAAGUCU GAUGUGAAAAG 600
 CCCCCGGCUC AACCGGGGAG GGUCAUUGGA AACUGGGGAA CUUGAGUGCA 650
 GAAGAGGAGA GUGGAAUUC ACGUGUAGCG GUGAAAUCG UAGAGAUGUG 700
 GAGGAACACC AGUGGCGAAG GCGACUCUCU GGUCUGUAAC UGACGCUGAG 750
 GAGCGAAAGC GUGGGGAGCG AACAGGAUUA GAUACCCUGG UAGUCCAGC 800
 CGUAAACGAU GAGUGCUAAG UGUUAGGGGG UJUCGCCCC UJAGUGCUGC 850
 AGCUAACGCA UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGACUGAAA 900
 CUCAAAGGAA UUGACGGGG CCCGCACAAG CGGUGGAGCA UGUGGUUUA 950
 UUCGAAGCAA CGCGAAGAAC CUJACCAGGU CUUGACAUCU UCUGACACCC 1000
 CUAGAGAUAG GGCUUCCCCU UCGGGGGCAG AGUGACAGGU GGUGCAUGGU 1050
 UGUCGUCAGC UCGUGUCGUG AGAUGUUGGG UUAAGUCCCG CAACGAGCGC 1100
 AACCCUUGAU CUUAGUUGCC AGCAUUCAGU UGGGCACUCU AAGGUGACUG 1150
 CCGGUGACAA ACCGGAGGAA GGUGGGGAUG ACGUCAAAUC AUCAUGCCCC 1200
 UUAUGACCCUG GGCUACACAC GUGCUACAAU GGACAGAACA AAGGGCAGCG 1250
 AGACCGGAG GUUAAGCAA UCCACAAAU CUGUUCUCAG UUCGGAUCGC 1300
 AGUCUGCAAC UCGACUGCGU GAAGCUGGAA UCGCUAGUAA UCGCGGAUCA 1350
 GCAUGCCGCG GUGAAUACGU UCCCGGGCCU UGUACACACC GCCCGUCACA 1400
 CCACGAGAGU UUGUAAACACC CGAAGUCGGU GAGGUAACCU UUAUGGAGCC 1450
 AGCCGCCGAA GGUGGGACAG AUGAUUGGGG UGAAGUCGUA ACAAGGUAGC 1500
 CGUAUCGGAA GGUGCGCUGG A

Fig. 87. 16S rRNA sequence of the *Bacillus* sp. SSA3

(DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases with the accession number(s) AB017587.)

```

B._sub      GAGAGTTTGATCCCTGGCTCAGGACGAAACGCTGGCGCGGTGCCTAATACAT
165         -----CCTGGCTCAGGACGAAACGCTGGCGCGGTGCCTAATACAT
          .....

B._sub      GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCCTCCCTGATGTTAGCGCGCGAC
165         GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCCTCCCTGATGTTAGCGCGCGAC
          .....

B._sub      GGGTGAGTAACACGTTGGTAACTCCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
165         GGGTGAGTAACACGTTGGTAACTCCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
          .....

B._sub      AAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCCGATGGTTCAAACATA
165         AAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCCGATGGTTCAAACATA
          .....

B._sub      AAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTA
165         AAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTA
          .....

B._sub      GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
165         GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
          .....

B._sub      GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
165         GGGTGATCGGCC-----
          .....

B._sub      GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
165         -----GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
          .....

B._sub      CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTGTTAGGGAAG
165         CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTGTTAGGGAAG
          .....

B._sub      AACAAAGTACCGTTCGAAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAA
165         AACAAAGTACCGTTCGAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAA
          .....

B._sub      GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGC
165         GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGC
          .....

B._sub      GTTNTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAGTC
165         GTTNTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAGTC
          .....

B._sub      TGA'TGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGAAGTGGGGA
165         TGATGTGAAAGCGAA-GCCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGACGA
          .....

B._sub      ACTTTCAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTC-TNCGGTCGAAATG
165         GCCAAAGCCTGG--GGAGCGAACAGGATTAGATACCTCGTAGTCCACGC
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

B._sub      CGTAGA-GATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
165         CGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGTTTCGCGCCCTTAGTGTCTG
          **** * **** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

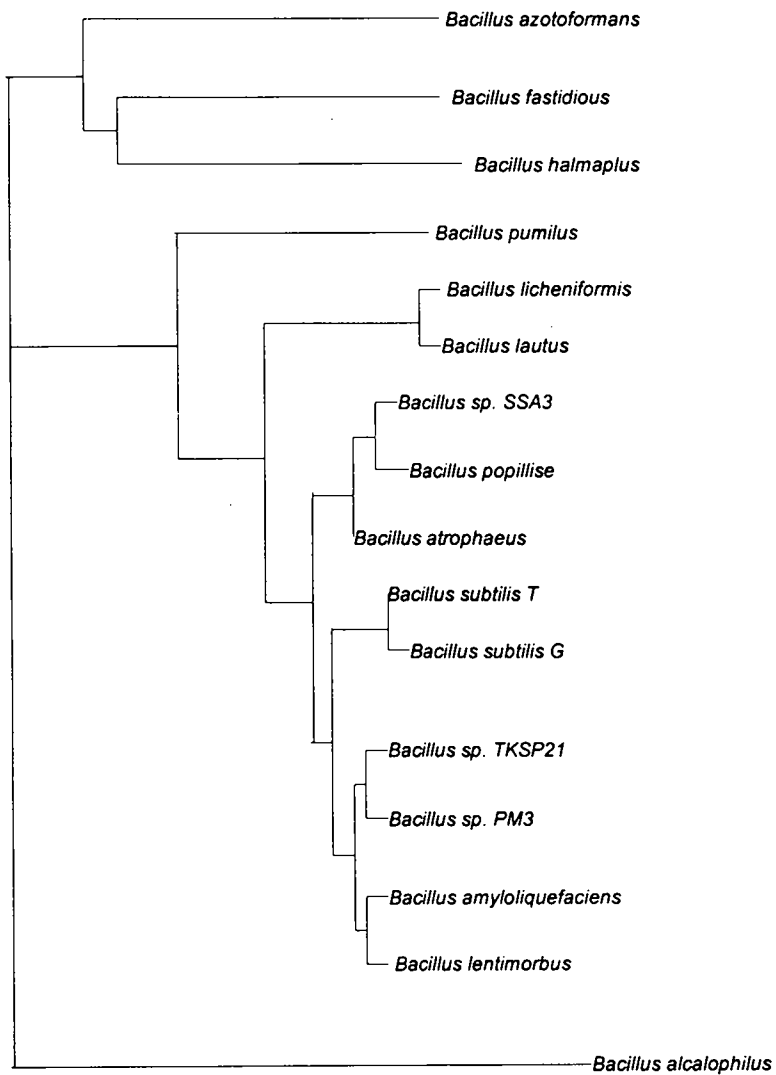
B._sub      AACTGACCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCEAA----CAGGATTCAGT
165         AGCTAACGCATTAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Fig. 88. The pairwise alignment of each base pair between *Bacillus* sp. SSA3 and *Bacillus subtilis*. (alignment score : 76 %)

Table 32. 16S rRNA gene similarity values for strain *Bacillus* sp. SSA3 and related taxa.

Strains	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
1. <i>Bacillus</i> sp. SSA3	-													
2. <i>Bacillus subtilis</i> T	99.3	-												
3. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.5	99.7	-											
4. <i>Bacillus subtilis</i> G	99.3	99.9	99.6	-										
5. <i>Bacillus lentimorbus</i> ATCC14707	99.4	99.6	99.9	99.5	-									
6. <i>Bacillus popilliae</i>	99.8	99.3	99.4	99.2	99.3	-								
7. <i>Bacillus atrophaeus</i>	99.8	99.3	99.5	99.3	99.4	99.8	-							
8. <i>Bacillus lautus</i> NCIMB 12780	99.8	98.9	98.9	98.8	99.0	98.7	98.8	-						
9. <i>Bacillus licheniformis</i> NCDO1772	98.6	98.8	98.8	98.7	98.8	98.5	98.6	99.7	-					
10. <i>Bacillus pumilus</i>	98.0	97.8	97.7	97.7	97.6	97.9	97.9	97.3	97.1	-				
11. <i>Bacillus fastidiosus</i>	95.6	95.6	95.5	95.6	95.6	95.6	95.5	95.5	95.4	95.4	-			
12. <i>Bacillus azotoformans</i>	95.5	95.5	95.3	95.5	95.4	95.1	95.2	95.2	95.2	95.0	95.2	-		
13. <i>Bacillus halmaplus</i> DSM 8723	94.7	94.7	94.7	94.6	94.8	94.6	94.6	95.1	95.2	95.2	95.7	95.1	-	
14. <i>Bacillus alcalophilus</i> DSM 485	93.8	93.8	93.7	93.7	93.7	93.7	93.7	94.0	94.1	93.7	93.2	93.6	93.7	-



.10

Scale bar = 10 nucleotide substitutions per 100 nucleotides

Fig. 89. Phylogenetic tree showing the position of *Bacillus sp. SSA3*.

3. 총결론

세포성 지방산 methyl ester 분석, genomic DNA digest와 전기 영동에 의한 분석, comparative protein 전기영동에 의한 분석, ribotyping pattern set 분석과 Biological metabolic test, 생리학적 및 생화학적 특성 분석, 16S rRNA sequencing 등을 통해 분석한 결과, 일치하는 균을 찾을 수 없었으나, 생리학적 및 생화학적 특성의 비교 분석으로는 여러 균종 중에서 *Bacillus subtilis*와 제일 유사한 균으로 나타났다. 그러나 16s rRNA의 sequence를 비교한 결과 *Bacillus subtilis*의 경우와 매우 다르며 phylogenetic tree로 분류한 결과 신종균으로 판명 되었다.

제 4 장 연구 개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구 개발 목표 달성도

1. 색소의 대량 생산

Bacillus sp. SSA3에 의해 생성되는 항돌연변이성 신 색소의 최적 생성 조건을 조사한 결과, 균주 배양 온도 30℃, 배양 pH 9, tyrosine 농도 0.1 % 에서 최적의 생성 상태로 나타났으며, 색소의 생성능 및 분비능이 향상된 육종 균주 *Escherichia coli* C600-T 균주인 경우는 *Bacillus* sp. SSA3보다 빠른 색소 생성을 나타내어 배양 1~2일만에 색소를 생성하였으며, 배양 온도 35℃, 배양 pH 7, tyrosine 농도 0.1 % 에서 최적의 상태로 나타났으며, 고체 배양과 액체 배양과의 비교에서는 두 균주 모두 비슷한 조건을 나타내고 있음을 조사하여 색소 생성 최적 조건의 실험을 완료하였다. 이 조건들을 바탕으로 한 발효조에서의 색소의 대량 생산에서 통기량에 따른 색소 생성능은 초기 통기량이 많을수록 색소 생성이 빨라짐을 알 수 있었다. 색소는 배양 2일째부터 생성되기 시작하여 배양 10일째까지 증가하였으며 그 이후에는 색소 생성이 일정한 경향을 나타내었다. 초기 통기량 변화에 따른 균체 증식력 조사에서도 색소 생성 변화와 일정한 경향을 보임을 확인하였으며, 이로써 색소의 최적 조건 실험 및 대량 생산 조건 실험을 완료하였다.

2. 색소의 정제

TLC로 색소를 정제하면 색소가 분해된다. 색소의 정제는 원심 분리, 강이온 교환수지, HPLC 및 methanol에 대한 용해성 등으로 정제를 할

수 있었으며, 원심 분리 액에서 methanol에 용해하는 색소들(TMS)은 배지 ml당 234~354 μ g, methanol에 용해되지 않는 색소들(TMI)은 배지 ml당 129~431 μ g까지 얻을 수 있었다. 최종 정제 과정에서 역상 column(Waters. Nova-Pak. C₁₈)을 이용한 HPLC를 2~3회 반복함으로써 거의 순수한(95%이상) 단일 peak의 색소들을 얻을 수 있었다.

3. 색소의 기능성

정제로 얻은 최종 색소 획분 3TMS-2, 2TMS-3, 3TMI-2 및 2TMI-3은 aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이성이 우수하며, 특히 200 μ l/2ml의 2TMS-3은 1 μ g/2ml의 aflatoxin B₁에 대해 99.82%의 항돌연변이능을 갖고 있다. 색소는 SOD에 대한 활성은 거의 없으나 활성산소종 제거능은 78~99% 까지를 갖고 있으며, $[P]=k[X][Y][Z]$ (P=chemiluminescence, k=photon constant, [X]=active oxygen radical species ; oxidant, [Y]=antioxidant, [Z]=receptor; prooxidant)에서 Z로서 작용하고 있다.

항암성은 2TMI-3을 제외한 다른 획분들은 정상 세포 (CCL-13 ; Human normal liver cell)에는 거의 영향을 미치지 않으면서 암세포 (HepG₂ ; Human liver cancer cell)만을 37~48%를 죽이는 선택성을 가지며, 또 암세포의 증식 억제능을 가지고 있다. 그러나 apoptosis능은 없었다. Interferons생산을 17~23% 증가시키는 아주 우수한 기능성을 지니고 있다. 이로써 색소의 기능성 실험을 완료하였다.

4. 색소의 구조

정성 분석, ¹H, ¹³C NMR, MASS, IR, 원소 분석을 이용하였다. 당과 지질은 없었으며, 구조 분석에서 3TMS-2는 분자량이 2355, 화학식은 5C₄H₁O₂₁N₃S, 분자 중에는 -CH₃-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-R-,

-CHO-, -O-C=O-, -OH-, tyrosine등이 존재한다.

2TMS-3은 분자량이 2046, 화학식이 $2C_{13}H_5O_{44}N_9S$, 분자 중에는 -CH₃-CH₂-, -S-CH₂-R-, -CHO-, -O-C=O-, -OH- 및 tyrosine 등이 존재한다.

3TMI-2는 분자량이 2408, 화학식이 $4C_9H_2O_{27}N_2S$, 분자 중에는 -CH₃-CH₂-, -S-CH₂-R-, -CHO-, -O-C=O-, -OH-, -COOH- 및 tyrosine이 존재한다.

2TMI-3은 분자량이 2205, 화학식이 $7C_5HO_{15}N$, 분자 중에는 -CH₃-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-, -O-C=O-, -OH-, -COOH- 및 tyrosine이 존재함을 확인하였다.

5. 색소 생성 관련 유전자의 분리

Bacillus sp. SSA3의 색소 생성에 관여하는 유전자를 여러 가지 방법으로 cloning 및 transformation을 시도하였으나, 색소 생성 유전자가 recombination된 것을 확인할 수 없는 점으로 보아 *Bacillus* sp. SSA3의 색소 생성에 관여하는 유전자는 단일 유전자가 아니라 chromosomal DNA의 여러 부분에 분산되어 있는 복수 유전자 군으로 추정된다.

색소 생성에 관여하는 gene의 sequencing을 위한 이후의 실험은 농림수산특정연구과제의 연구비 지원 중단으로 인해 더 이상 수행할 수 없었다.

6. 전통 장류 중 갈색 색소 생성 미생물의 동정

색소 생성 균주의 동정 연구에서 세포성 지방산 methyl ester 분석, genomic DNA digest와 전기 영동에 의한 분석, comparative protein

전기영동에 의한 분석, ribotyping pattern set 분석과 Biological metabolic test, 생리학적 및 생화학적 특성 분석, 16S rRNA sequencing 등을 통해 분석한 결과들을 종합하여 볼 때 *Bacillus* sp. SSA3은 *Bacillus* spp.의 어느 종과도 일치하는 균을 찾을 수가 없었으며, *B. subtilis* 뿐만 아니라 *B. licheniformis* 와도 다른 새로운 균종임을 확인하였다.

제 2 절 대의 기여도

본 색소는

1. 간암을 일으키는 Aflatoxin B₁의 활성을 거의 100% 저해할 수 있으며
2. 인간의 암 중 20% 이상을 일으킨다고 보고된 활성산소종을 SOD와 관계없이 제거할 수 있으며
3. 정상 세포에는 영향이 없이 암세포만을 선택적으로 저해하며
4. 우리 나라 전통 장류에 존재하는 점과
5. 신 종균이 tyrosine에서 생성한다는 점 등에서 이 물질을 의약품, 신 기능성 식품 및 식품 첨가물로의 개발이 가능하며, 이는 국제적으로나 국내적으로 매우 기여도가 크리라 사료된다.

제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획

전통 장류 중에 존재하는 신 항돌연변이성 색소의 구조와 동물 세포나 조직에 미치는 영향 등이 규명되므로 씨 장류가 건강식품으로 용도가 확대 될 수 있으며, 이 신 항돌연변이성 색소의 구조가 규명되면 의약품으로도 개발이 가능

신 항돌연변이성 색소는 인체에 대해 무해하며, 오랫동안 우리 나라 국민들이 섭취해 오고 있기 때문에 이 색소를 이용하여 새로운 건강식품이나 건강 보조 식품, 기능성 식품첨가물 등으로의 개발 가능

이 색소의 생산량을 자유로이 조정하므로 씨 다양한 제품의 전통 장류의 생산이 가능하며, 이 신 색소를 이용하여 상품 생산을 상업화할 때 산업체와 연계하여 기술 전수 가능

지금까지의 연구 결과를 국내에서는 한국식품과학회지 등 식품 관련 학회에 학술 논문으로 투고 및 기타 학술발표회 등에 연구 결과 발표 및 게재 예정이며, 또한 국외 학술지에도 게재 예정

신 항돌연변이성 색소를 생성하는 균주의 특허 신청 및 연구 결과에 대한 특허 신청

제 6 장 참고 문헌

1. 김종규, 새로운 색소를 생성하는 미생물 및 그의 한국 재래식 간장의 제조에의 이용, 한국, 한국특허번호 : 055543 (1992)
2. Jong Kyu Kim et 2 : Novel antimutagenic pigment produced by *Bacillus* sp. SSA3, J. of Microbiology and Biotechnology, Vol 5, No. 1, 48-50(1995)(Note)
3. Gessard, C. : Variete melanogene du *bacille* pyocyanique, Ann. Inst. Pasteur, Paris, 15, 817-831(1901)
4. Muschel, A. : Zur chemi der schwarzfarburg kohlenhydrathaltiger nahrboden durch den *Bacillus mesentericus* var. niger, Biochem. Z., 131, 570-640(1992)
5. Dawid, W. : Farbstoffbildinde bakterien. Pigmentibildung und isolierung der bakterien, Mikrokosmos, 62, 78-82(1973)
6. Clark, F. E. and N. R. Smith : Cultural requirements for the production of black pigments by *Bacilli*, J. Bacteriol., 37, 277-284(1938)
7. P. Schaeffer : A black mutant of *Neurospora crasa*. mode of action of the mutant allele and action of light on melanogenesis, Arch. Biochem. Biophy., 47, 359-375(1953)
8. T. A. Barnett, D. Valenzuela, S. Riner and J. H. Hageman : Production by *Bacillus subtilis* of brown sporulation-associated pigments, Can. J. Microl., 29, 96-101(1982)
9. T. A. Barnett and J. H. Hageman : Characterization of a brown pigment from *Bacillus subtilis* Cultures, Can. J. Microl., 29, 309-315(1983)
10. 박 승규, 경 규향 : 대두 발효 식품의 갈변과 관련된 티로신 산화 세균

- 에 관한 연구 한국 식품과학회지, 18(5), 376-381(1986)
11. 박 선미, 김 종규 : *Bacillus licheniformis*가 생성하는 색소, 한국산업 미생물학회 제 34 차 추계학술 발표 (1989)
 12. 김 종규 : 새로운 색소를 생산하는 미생물 및 그의 한국 재래식 간장의 제조에의 이용, 한국특허 출원 제 7678호 (1990)
 13. 정 구민, 조 성환, 김 제욱 : 장류의 색변화에 관한 연구, 한국농화학회지, 24(3) 200-205(1981)
 14. 박 승규, 한 창근, 경 규항, 유 양자 : 간장의 저장 중 갈색화 반응에 대한 산소의 영향, 한국식품과학회지, 22(3), 307-311(1990)
 15. 박 승규, 경 규항 : 간장 Model system에서 산소 갈변 촉진 효과, 한국식품과학회지, 23(4), 523-525(1991)
 16. 박 건영, 이 은숙, 문 숙희, 최 홍식 : 간장 및 모델 시스템에서 간장 갈색 물질과 슛이 Aflatoxin B1의 파괴에 미치는 영향, 한국식품과학회지, 21(3), 419-424(1989)
 17. 樓井芳人, 劑藤道雄, 東 秀雄, 鈴木明治 : 總合食料工業, p522-523, p551(1945)
 18. 橋場弘長, 越山育則, 坂口健二, 井口信義 : 醬油の 褐變と 鐵をよびその他微量金屬 イオンの 影響, 日本農藝化學會誌, 5(1), 29-35(1971)
 19. 橋場弘長 : 醬類の 褐變物質に ついて, 日本農藝化學會誌, 45(1), 29-35(1971)
 20. 茂田井安, 井上 進, 西尺嘉顔 ; 醬類の 色の 性質と 色素成分の 分離, 日本農藝化學會誌, 46(12), 631-637(1972)
 21. 이 한창 : 한국 간장 공업의 현실과 미래. 한국 간장에 관한 심포지움 중, 한국농화학회 영남지부, 별권. 1-11(1988)
 22. 조선일보 제 21157호. 9면 : 의식주 1990년 1월 6일
 23. 이 한창 : 심포지움 한국 전통 발효 식품연구의 현황과 전망 논문집 중 장류, 한국산업 미생물학회, 한국식문화학회, 한국식품과학회,

29-52(1998)

24. 김 종규 : 간장의 발효와 미생물. 한국 간장에 관한 심포지움 중, 한국 농화학회 영남지 부, 21-27(1998)
25. 김 종규 : 한국 간장, 된장 제조용 *Bacillus* SSA3의 육종과 이용에 관한 연구, 1989년 한국학술진흥 재단 자유 공모과제 최종 보고서 (1991)
26. 김 종규 : 세포융합에 의한 간장발효균의 육종, 식품개발연구원, 식품 기술, 3(1), 34-45(1990)
27. 김 종규 외 2명 ; 한국 재래식 간장 및 된장에서 분리한 세균의 특성, 한국농화학회지, 29(4), 422-428(1986)
28. 김 종규 외 3명 ; 한국재래식 간장 및 된장 제조를 위한 우량변이주 개발, 산업미생물학회지,
29. J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis, ; Molecular cloning, a laboratory manual 2nd ed.,(1989)
30. P.Greharct, R.G.E.Murray, R.Costilow, ; Manual of Methods for General Bacteriology(1981)
31. Erich Heftmann ; Chromatography : A laboratory handbook of chromatographic and electrophoretic methods, van nostrand reinhold ltd. 3rd ed. 1975.
32. J. J. Kirkland ; modern practice of liquid chromatography, Wiley & Sons, Inc., N.Y., 1971.
33. Gunter zweig and Joseph Sherma ; Handbook of chromatography, CRC press, 1972.
34. Egon Stahl ; Thin-layer chromatography : A laboratory handbook, 2nd ed. Geroge Allen & Unwin Ltd London, 1973.
35. H. N. M. STEWART, R. AMOS AND S. G. PERRY ; Liquid Adsorption Chromatography in Columns and on Thin Layrers, J.

- Chromatog., 38, 209-223(1968)
36. Maron, D.M. and Ames, B. N. ; Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Muta. Res., 113, 173(1983)
 37. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. ; Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutat. Res., 31, 347(1975)
 38. Ames, B. N., Kammen, H. O. and Yamasaki, E. ; Hairdyes are mutagenic : Identification of variety of mutagenic ingredients, proc. Natl. Acad. Sci(USA), 72(6), 2423(1975).
 39. Ames, B. N., Durstan, W. E., Yamasaki, E and Lee, F. D. ; Carcinogens are mutagenic : A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Natl. Acad. Sci(USA), 70(8), 2281(1973).
 40. Ames, B. N., Lee, F. D. and Durstan, W. E. ; An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci(USA), 70(3), 782(1973)
 41. Heung-Seok Oh and Seung-Si Ham ; Antimutagenic Effects of Enzymatic Browning Reaction products of polyphenol Compounds by polyphenoloxidase derived from Mushroom (*Agaricus bisporus*), KOREAN J.FOOD SCI.TECHNOL., 24(4), 341-346(1992)
 42. 박건영, 문숙희, 백형석 : 된장의 Aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이 효과, 한국영양식량학회지, 19(2), 156, (1990)
 43. Eun-Ju Cho, Sook-Hee Rhee, Kun-Young Park : Antimutagenic and Anticarcinogenic Effects of Alginic acid Extracted from Sporophyll of Sea Mustard, J. Food Sci. Nut., 3(2), 169 (1998)
 44. 이동녕, 문진영, 오규석, 이태균, 최미정, 이동목, 남경수 : 안태음의 변

- 이원성 및 간독성에 관한 연구, 생약학회지, 28(3), 149 (1997)
45. Oyanagui, Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, 42, 290 (1984)
 46. Liochev, S.I. : Lucigenin luminescence as a measure of intracellular superoxide dismutase activity in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94(7), 2891 (1997)
 47. Yoshiki, Y., Kim, J.H., Okubo, K., Nagoya, I., Sakabe, T. and Tamura, T. ; Saponin conjugated with-2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one from dolichos lab and the SOD-like activity, *Phytochem.*, 38(1), 229-231(1995)
 48. Yoshiki, Y. and Okubo, K. ; Oxygen radical scavenging activity of DDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) conjugated saponin in soybean seed, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(8), 1556-1557(1995)
 49. Mitsuta, K., Mizuta, Y., Kohon, M., Hiramatsu, M. and Mori, A. ; The Application of ESR Spin-Trapping Technique to the Evaluation of SOD-like Activity of Biological Substances, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 63, 187-191(1990)
 50. Midori, H. and Masahiro, K. ; Determination of superoxide dismutase activity by electron spin resonance spectrometry using the spin trap method, *JEOL NEWS*, 23(1), 7-9(1987)
 51. Yoshiki, Y., Kahara, T. and Okubo, K. ; Mechanism of Catechin Chemiluminescence in the Presence of Active Oxygen, *J. BIOLUMIN. CHEMILUMIN.*, 11, 131-136(1996)
 52. 이종호, 김미혜, 임상선 : 재래식 메주 및 된장중의 항산화성 물질에 관한 연구 - 1. 메주 발효 및 된장숙성중의 지질산화와 갈변, *한국영양식량학회지*, 20(2), 147 (1991)

53. 김미혜, 임상선, 김성희, 김경업, 이종호 : 재래식 메주 및 된장중의 항산화성 물질에 관한 연구 - 2. 지용성 갈변물질의 분리와 항산화력, 한국영양식량학회지, 23(2), 251 (1994)
54. 김미혜, 임상선, 김성희, 김경업, 이종호 : 재래식 메주 및 된장중의 항산화성 물질에 관한 연구 - 3. 수용성 갈변물질의 항산화력, 한국영양식량학회지, 23(4), 604 (1994)
55. 김미혜, 임상선, 유영법, 김경업, 이종호 : 재래식 메주 및 된장중의 항산화성 물질에 관한 연구 - 4. 페놀화합물의 항산화력, 한국영양식량학회지, 23(5), 792 (1994)
56. 김선봉, 염동민, 여생규, 지청일, 이용우, 박영호 : 효소에 의한 단백질 가수분해물의 항산화 작용. 한국식품과학회지 21. 492 (1989)
57. 최홍수, 이정수, 문갑순, 박건영 : 지방산의 산화에 의한 양조간장의 항산화 특성. 한국식품과학회지, 22, 332 (1990)
58. HARI SINGH NALWA ; Structural determination of a semiconductive tetramer of aniline by IR, tV-visible, ESR, XPS and mass spectroscopy techniques, J.Material.Sci., 26, 1683-1690(1991)
59. Jeremy N. S. Evans ; Biomolecular NMR-spectroscopy, Oxford Univ. Press, 1995
60. J. G. Holt. N. R. Krieg, P. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams ; Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams & Wilkins Company, Ninth ed. 1994.
61. Priest, F. TG., Alberto Ramos-Cormenzana, B. J. Tindal : Bacterial Diversity and Systematics, FEMS Symposium No. 75. Plenum Press, New York. 1994.
62. Fergus, G.P., M. Goodfellow and C. Todd. ; A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*, J. General Microbiol., 143, 1847-1882(1988)

63. Gordon, R. E., W. C. Haynes and C. H. Pang : "The Genus *Bacillus*". Agricultural Handbook No. 427. Department of Agriculture, Washington, D. C. 1973.
64. Slepecky, RR. A., H. Ernest Hemphill : The Genus *Bacillus Nonmedica*, in " The Prokaryotes" 2nd Ed., (Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H., Eds.), 1663-1696. Springer-Verlag New York. 1992.
65. Peter, H. A. S., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and whole-cell protein patterns, in "Methods in Microbiology" (Colwell, Wilkins Batimore) 1104-1207. 1986.
66. Bligh, E. G. and W. J. Dyer : A rapid methods of total lipids extraction and puropication *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37. 911, 1959.
67. Metcalfe, L. D. and A. A. Schmits : The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, 33(3), 363, 1961.
68. Fredrick, M. A. : Short protocols in molecular biology. Harvard Medical School, 1989.
69. Jakman, P.J.H. : Bacterial taxonomy based on eletrophoretic whole-cell protein patterns, in "Chemical Methods in Bacterial Systematics" (Goodfellow, M. and Minnikin, D. E., Eds.), 115-128. Academic Press, London.1985.
70. Jakman, P.J.H. : Microbial systematics based on eletrophoretic (R.R. and Grigorova, R., Eds.), Vol. 19, 209-225. Academic Press, London. 1987.
71. Raspoet, D., B. Pot, De Deyn., P. De Vos, K. Kersters and J.De Ley

- : Differentiation between 2,3-butanediol producing *Bacillus licheniformis* and *B. polymyxa* strains by fermentation product profiles and whole-cell protein electrophoretic patterns. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 1-7. 1991.
72. Pot, B., P. Vandamme and K. Kersters: Analysis of electrophoretic whole-organism fingerprints, in "Chemical Methods in Bacterial Systematics" (Goodfellow, M. and O'Donnell, A. G., Eds.). J. Wiley & Sons, Chichester(in press), 1994.
73. Church, G. M. and W. Gilbert : Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81. 5294, 1984.
74. Rainey, F. A., N. Ward-Rainey, R. M. Kroppenstedt & E. Stackebrandt : The genus *Nocardopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage : proposal of Nocardopsaceae fam. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 46, 1088-1092. 1996.
75. Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5.1. Seattle : Department of Genetics, University of Washington, 1993.
76. Jukes, T. H. & C. R. Cantor: Evolution of protein molecules In Mammalian protein metabolism, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro, New York : Academic press. 1969.
77. Saitou, N. & M. Nei : The neighbor-joining method "a new method for reconstructing phylogenetic trees". *Mol. Biol.* 4, 406-425(1987)