

멸치액젓으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* JM-3의 혈전용해효소 최적 생산 조건과 생리활성기능

이상수, 이건욱, 최윤미, 장태은, 김상무, 신일식

강릉대학교 해양생명공학부

서론

우리 인체는 생체 내에서 일어나는 크고 작은 상처들에 의한 혈액의 손실을 방지하기 위한 방어 수단으로 혈전(Fibrin)을 생성하게 되는데 이렇게 생성된 혈전의 일부가 상처복구 후에도 분해 되지 않고 혈관을 순환하게 된다. 혈관내의 잉여(剩餘) 혈전들은 뇌혈관과 같은 아주 작은 모세혈관 벽에 침착하여 혈액의 흐름을 방해함으로써 뇌졸중에 의한 반신불수 또는 직접적인 사망의 원인으로 작용하게 된다. 최근 전통발효식품과 같은 새로운 분리원으로부터 혈전의 억제·용해물질들의 분리에 관한 연구(Sumi et al., 1987, 1995)가 활발하게 진행되고 있으며, 그 중 액젓은 고래로부터 오늘날까지 우리의 식생활문화의 한 부분을 차지하면서 경험적으로 인체에 대한 부작용이 없다는 것이 증명되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 멸치액젓에서 분리한 *Bacillus subtilis* JM-3의 혈전용해효소의 활성 및 최적 생산 조건과 항산화 활성, 항균활성, ACE 활성 억제 효과, 암세포 증식 억제 효과 등의 생리활성기능을 조사하였다.

재료 및 방법

시료 : 본 실험에 사용되어진 어간장은 강원도 속초시에 위치한 품미(株)의 숙성탱크에서 1, 3, 5년 숙성되어진 멸치 어간장을 냉장 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

균주의 분리, 배양 : 2%의 skim milk를 첨가한 MRS agar 평판에 어간장 100 μ l을 도말평판법에 의하여 27.5 $^{\circ}$ C에서 48hr 배양 후 투명한이 생긴 colony를 선별하여 MRS agar slant에 계대 보관하면서 실험균으로 사용하였다.

Fibrin 분해 활성 실험 : Astrup등의 방법을 일부 수정한 Fibrin plate method에 의하여 투명한의 크기를 측정하였고, 대조구로는 Plasmin(Sigma. Co.)를 사용하였다.

B. subtilis JM-3의 배양 및 시료 조제: 분리균주 중 혈전 용해활성이 가장 강하였던 *B. subtilis* JM-3를 BHI broth에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 3,000 \times g, 20분간 원심분리 하였다. 원심분리한 배양 상청액을 한외여과방법으로 분자량 3,000Da. 이상의 물질만을 10배 농축하여, 0.45 μ m의 membrane filter로 여과 멸균 하여 시료로 하였다.

Fibrin 분해 효소 최적 생산조건: 온도(15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50℃) , pH(4, 5, 6, 7, 8, 9), 식염농도(0, 3, 6, 9, 12, 15, 20%)에 있어서 *B. subtilis* JM-3의 Fibrin 분해 효소 최적 생산조건을 조사하였다.

B. subtilis JM-3의 항산화 활성측정: Hayase and Kato (1984)의 방법에 따라 과산화 물가를 측정하여 시료의 억제율(%)로 나타내었다.

*B. subtilis*의 항균 활성측정: Agar diffusion method로 Mueller hinton agar를 사용하여 투명한 크기를 측정하는 방법으로 실시하였다. 대상 균주로는 그람양성균 6종과, 그람 음성균 8종 그리고 효모 2종을 실험하였다.

ACE 활성 저해율 측정: Cheung (1971) 등의 방법으로 행하였다.

B. subtilis JM-3 암세포 증식 억제 활성: 한국세포주 은행으로부터 분양받은 SNU-1 (사람의 위암세포)에 대한 *B. subtilis* JM-3의 증식 억제 활성의 측정은 MTT assay로 실시하였다.

결과 및 요약

멸치액젓으로부터 분리한 *B. subtilis* JM-3의 Fibrin 분해 효소의 최적 생산 조건은 40℃, pH 5.0, NaCl 0%이었으며, 멸치액젓의 일반적인 염농도인 NaCl 20% 첨가구에서도 식염 무첨가구의 약 60%의 활성을 나타내어 *B. subtilis* JM-3의 멸치액젓의 starter로서의 충분한 이용 가능성을 나타내었다. 또한 *B. subtilis* JM-3 배양 상청액의 ACE 활성 저해 효과는 없었으며, 83%의 높은 항산화 활성을 나타내었고, 항균효과로는 *Listeria monocytogenes*의 성장을 강력히 억제하였으며, 암세포 증식 억제율은 88.9%이었다.

참고문헌

- Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1730-1734 (1993)
- Sumi, H., Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, H. and Muraki, H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. Experimentia. 43: 1110-1111 (1987)
- Sumi, H., Nakajima, N. and Yatagai, C. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "Shiokara," a Japanese traditional fermented food. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 112B 3: 543-547 (1995)
- Hayase, F. and Kato, H. Antioxidative components of sweet potam. Nutr. Sci. 30: 37. (1973)
- Cheung, H. S. and D. W. Chshman. Sepctrometric assay and proterties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Phamacol. 20: 1637~1647 (1971)