

멸치액젓으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* JM-3의 생리활성기능에 관한 연구

이상수 · 김상무¹ · 신일식^{1,*}

한국화학시험연구원, ¹강릉대학교 해양생명공학부

Studies on Physiological Activity of *Bacillus subtilis* JM-3 Isolated from Anchovy Sauce

Sang-Soo Lee, Sang-Moo Kim¹ and Il-Shik Shin^{1,*}

Korea Testing and Research Institute for Chemical Industry

¹Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University

In previous paper, we isolated the bacteria, *Bacillus subtilis* JM-3, with proteolytic and fibrinolytic activity for candidate microorganisms that have rapid fermenting and physiological functions from anchovy sauce. This study was carried out to search physiological functions of *Bacillus subtilis* JM-3, such as antimicrobial, antioxidative, antimutagenic, angiotensin-converting enzyme inhibition, and anticarcinogenic activity *in vitro*. The cell free culture of *Bacillus subtilis* JM-3 showed strong antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*, antioxidative activity with 87% of inhibition rate against linoleic acid, 50% of antimutagenic activity against N-nitrosodimethylamine and N-nitrosomorpholine, and 88.9% of growth inhibition rate against SNU-1 cell line (stomach cancer cell of human). However, *Bacillus subtilis* JM-3 did not show angiotensin-converting enzyme inhibition activity.

Key words: *Bacillus subtilis* JM-3, antimicrobial activity, antioxidative activity, antimutagenic activity, anticarcinogenic activity

서 론

멸치액젓은 신선한 선어(鮮魚)를 염장하여 자가소화 효소 및 미생물의 작용에 의하여 원료가 분해·숙성된 액상의 전통 발효식품으로, 독특한 맛과 영양이 풍부하여 예로부터 간장 대용, 김치의 부재료나 조미료로 널리 사용되어져 왔다. 숙성기간 중 미생물 기원의 효소작용에 의하여 어육단백질이 여러 형태의 peptide로 분해되어 멸치액젓의 풍미를 향상시킬 뿐만 아니라 항암, 혈압강하, 혈청콜레스테롤 강하, 면역증강 그리고 칼슘 흡수의 촉진 등과 같은 광범위한 생리활성기능을 가지는 것으로 보고하고 있다. 이에 멸치액젓 숙성 중에 생성되는 peptide의 생리활성기능에 관한 많은 연구 결과들이 보고되고 있으며, Lee 등⁽¹⁾은 멸치액젓의 숙성에 관여하는 미생물의 특성에 대하여서도 보고한 바 있다. 이러한 일련의 연구들은 멸치액젓을 비롯한 전통발효식품 중에는 미지의 생리활성 기능을 가지는 물질들이 다량 존재한다는 것

을 보여주고 있으나, 멸치액젓 산업은 인스턴트 문화의 보급과 지속적인 화학조미료의 개발 등으로 인하여 그 규모가 작아지고 있는 추세⁽²⁾이며, 숙성기간의 장기화와 지속적인 저장·관리 또한 멸치액젓 제조산업의 경제성을 저하시키는 원인으로 작용하고 있어, 멸치액젓 제조산업의 획기적인 전환을 요구하고 있다. 이에 장기간을 요하는 멸치액젓의 숙성기간을 단축하기 위한 많은 연구가 진행되어져 왔다^(3,4). 단백질 분해 효소를 멸치액젓에 첨가하여 숙성기간을 단축하려는 노력들과 단백질 분해활성이 우수한 미생물을 직접 첨가하는 방법들이 여러 실험을 통하여 수행되었다^(3,5).

전보⁽⁶⁾에서 저자들은 멸치액젓의 속성발효 및 항혈전, 항고혈압 그리고 나아가서는 항암과 같은 생리활성기능을 부여한 신 개념의 멸치액젓을 제조할 목적으로 상업적으로 이용 가능한 기능성 멸치액젓 제조용 starter를 분리하고자 전통발효식품의 하나인 멸치액젓으로부터 단백질 분해활성이 뛰어난 균주의 선별과 아울러 혈전 용해활성이 우수한 *Bacillus subtilis* JM-3 균주를 분리하였으며, *B. subtilis* JM-3의 단백질분해활성과 혈전용해활성이 멸치액젓의 일반적인 염농도인 NaCl 20% 첨가구에서도 식염 무첨가구의 약 60%의 활성을 나타내어 *B. subtilis* JM-3의 멸치액젓의 starter로서의 충분한 이용 가능성에 대하여 보고한 바 있다.

*Corresponding author: Il-Shik Shin, Kangnung National University, 123, Jibyun-dong, Ganuneung-si, Gangwon-do 210-702, Korea
Tel: 82-33-640-2346
Fax: 82-33-640-2410
E-mail: shinis@kangnung.ac.kr

따라서 본 논문에서는 전보에 이어 생리활성기능을 부여한 신개념의 멸치액젓을 제조할 목적으로 전보에서 분리한 *B. subtilis* JM-3의 항균활성, 항산화활성, 항면이원활성, ACE 저해활성, 암세포 증식억제 효과 등을 조사하였다.

재료 및 방법

B. subtilis JM-3의 배양

전보⁽⁶⁾에서 분리한 *B. subtilis* JM-3를 DeMan, Rogosa, Sharpe(이하 MRS, Difco Lab., Detroit, USA) broth에서 24시간 이상 배양한 후에 배양액과 glycerol을 4:1이 되게 혼합하고 멸균된 2 mL vial tube에 분주하여 -85°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 생리활성 측정에는 *B. subtilis* JM-3을 brain heart infusion(BHI, Difco Lab., Detroit, USA) broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(5,000 ×g, 20 min) 하여 상청액을 분자량 3,000 dalton의 MWCO 3,000 Membrane filter(Amicon Co., Bedford, USA)로 한외 여과(Millipore Co., Bedford, USA)하여 분자량 3,000 dalton 이상의 용액을 0.45 μm의 Millix-GS filter(Millipore Co., Bedford, MA, USA)로 여과멸균 하여 시료로 사용하였다.

항균활성 측정

항균활성 측정용 균주 및 배양 배지: 항균활성 실험에 사용되어진 indicator microorganism들은 KCTC와 ATCC로부터 분양 받아 사용하였으며, *Vibrio* sp.는 3%의 NaCl이 첨가되어진 nutrient broth(Difco Lab., Detroit, USA), 이를 제외한 세균은 nutrient broth를 사용하여 37°C에서 24시간 전배양 하였다. 효모류의 경우는 30°C의 MRS broth에서 48시간 전배양하여 실험에 사용하였다.

실험 방법: 항균활성의 측정은 agar diffusion method로 mueller hinton(MH, Difco Lab., Detroit, USA) agar를 사용하여 투명한 크기를 측정하는 방법으로 실시하였다. 즉 건조되어진 MH agar plate에 전배양 되어진 indicator microorganism 100 μL를 도말평판법에 의하여 접종한 후 지름 5 mm의 구멍을 뚫어 여기에 시료 50 μL를 접종하여 전배양 조건과 동일한 조건으로 배양하였다. 양성 대조구로는 5 units의 penicillin-streptomycin을 사용하였고, 음성대조구로는 멸균 BHI(Difco Lab., Detroit, USA) broth를 시료와 동량 사용하였다.

항산화활성 측정

항산화 활성의 측정은 Hayase와 Kato⁽⁷⁾의 방법에 의하여 과산화물가를 측정하여 시료의 산화 억제율(%)로 나타내었다. 즉, 삼각플라스크에 linoleic acid 1.0 g을 칭량한 후 ethyl alcohol 20 mL를 가하여 완전히 녹이고 0.2 M 인산완충용액(pH 7.0) 25 mL를 가하여 혼합한 후, 시료 1 mL를 첨가하여 50°C에서 40 rpm/min의 조건으로 24시간 자동 산화시킨 다음 통상의 방법에 따라 과산화물가를 분석하였다. 음성 대조구는 BHI broth를 시료와 동량 첨가하여 실험하였다.

항면이원 활성 측정

최소 glucose 한천평판배지: Vogel-Bonner 최소배지를 만든 후, agar 15 g을 700 mL 증류수에 녹인 것, glucose 20 g을

200 mL의 증류수에 녹인 것, Vogel-Bonner 최소배지 100 mL를 121°C, 15분간 각각 멸균한다. 멸균한 배지를 60°C까지 방냉한 후 세 용액을 무균적으로 혼합하여 평판배지를 만들고, 2일간 건조한 후 시험에 사용하였다.

Soft agar: 0.5 mM L-histidine과 0.5 mM D-biotin을 함유한 수용액을 만들어 10 mL씩 시험관에 분주하고 121°C, 15분간 멸균한 후, 방냉하여 냉장고에 보존하였다. Soft agar는 200 mL 용량의 삼각플라스크에 NaCl 0.6 g, agar 0.7 g, 증류수 100 mL를 넣고 121°C, 15분간 멸균하였다. 사용 직전에 멸균한 histidine-biotin 용액 10 mL를 37°C로 가온하여 soft agar 100 mL에 첨가하여 사용하였다.

변이원물질: 실험에 사용한 변이원 물질로는 식욕이나 어육을 가열 조리할 때 발생하는 3-Amino-1,4 -dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-1)과 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) (일본 岡山大學 藥學部 早津彦哉 교수로부터 분양)를 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 1.0 ppm과 0.5 ppm 용액을 각각 만든 후 사용직전 각 시험관에 0.1 mL씩 분주하였다. 그리고 N-nitrosoamine 중 변이원성이 높은 것으로 알려진 N-nitrosodimethylamine(NDMA)과 N-nitrosomorpholine(NMO) (일본 静岡縣立大學 木苗直秀 교수로부터 분양)은 증류수로 10 ppm과 20 ppm 용액을 각각 만들어 동일한 방법으로 시험하였다.

실험방법: *B. subtilis* JM-3 배양액의 항면이원활성은 preincubation method⁽⁸⁾로 측정하였다. 먼저 0.5 mL의 S9 mix와 0.1 mL의 *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100(일본 静岡縣立大學 木苗直秀 교수로부터 분양) 배양액을 시료와 변이원물질이 이미 들어 있는 시험관에 넣고 잘 섞은 후 37°C에서 20분간 진탕배양한다. 이 조작을 Table 1, 2, 3에 나타난 것처럼 각 실험구의 순서대로 실시하고 배양 후 2 mL의 soft agar를 첨가하여 최소 glucose 한천평판배지에 붓고 37°C에서 2일간 배양하여 형성된 복귀 colony 수를 측정하였다.

대조구: 음성대조구로서는 변이원물질 대신 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Co., Missouri, USA) 0.1 mL와 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하였으며, 양성대조구로서는 변이원물질 0.1 mL와 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 위와 같은 방법으로 측정하였다.

변이억제율의 계산: 변이억제율은 다음의 식에 의하여 구하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = \left(\frac{a-b}{a-c} \right) \times 100$$

a: 변이원물질에 의한 복귀 colony수

b: 변이원물질에 시료를 작용시킨 경우의 복귀 colony수

c: 자연복귀 colony수

ACE 저해효과 측정

Angiotensin-converting enzyme(ACE)의 조제: ACE(Sigma Co., Missouri, USA)는 다음과 같은 전처리 과정을 거친 것을 조효소로 사용하였다. 토끼의 허파로부터 얻은 아세톤 침전분말 1g에 붕산 완충용액(pH 8.3, 400 mM NaCl) 10 mL를 가하여 5°C에서 24시간 교반한 후 원심분리(6,000 ×g, 30 min)하여 얻은 상청액을 냉동 보관하여 사용하였다.

Table 1. Design of antimutagenic test for cell free culture of *B. subtilis* JM-3 against Trp-P-1 with *S. typhimurium* TA 98

Sample code	Concentration of sample and adding volume (S9 mix+)			
	<i>B. subtilis</i> JM-3 culture (mL)	D.W. ¹⁾ (mL)	1.0 ppm Trp-P-1 ²⁾	DMSO ³⁾ (mL)
Negative control	0.0	0.1	0.0	0.1
Positive control	0.0	0.0	0.1	0.1
A	0.0125	0.0	0.1	0.0
B	0.025	0.0	0.1	0.0
C	0.05	0.0	0.1	0.0
D	0.1	0.0	0.1	0.0
Trp-P-1 only	0.0	0.1	0.1	0.0

¹⁾Distilled water, ²⁾3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, ³⁾Dimethyl sulfoxide.

Table 2. Design of antimutagenic test for cell free culture of *B. subtilis* JM-3 against MeIQx with *S. typhimurium* TA 98

Sample code	Concentration of sample and adding volume (S9 mix+)			
	<i>B. subtilis</i> JM-3 culture (mL)	D.W. ¹⁾ (mL)	0.1 ppm MeIQx ²⁾	DMSO ³⁾ (mL)
Negative control	0.0	0.1	0.0	0.1
Positive control	0.0	0.0	0.1	0.1
A	0.0125	0.0	0.1	0.0
B	0.025	0.0	0.1	0.0
C	0.05	0.0	0.1	0.0
D	0.1	0.0	0.1	0.0
MeIQx only	0.0	0.1	0.1	0.0

¹⁾Distilled water, ²⁾2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, ³⁾Dimethyl sulfoxide.

Table 3. Design of antimutagenic test for cell free culture of *B. subtilis* JM-3 against NDMA¹⁾ and NMO²⁾ with *S. typhimurium* TA 100 (S9 mix+)

Sample code	Concentration of sample and adding volume (S9 mix+)			
	<i>B. subtilis</i> JM-3 culture (mL)	D.W. ³⁾ (mL)	Mutagen	Medium (mL)
Negative control	0.0	0.1	0.0	0.1
Positive control	0.0	0.1	0.1	0.0
A	0.0125	0.0	0.1	0.0
B	0.025	0.0	0.1	0.0
C	0.05	0.0	0.1	0.0
D	0.1	0.0	0.1	0.0
MeIQx only	0.0	0.1	0.1	0.0

¹⁾N-Nitrosodimethylamine, ²⁾N-Nitrosomorpholine, ³⁾Distilled water.

실험 방법: *B. subtilis* JM-3 배양 농축액의 혈압강화 활성은 Cheung과 Chehman⁹⁾의 방법으로 ACE 활성 저해효과를 측정하여 나타내었다. 항균활성 실험에 사용되었던 동일 시료 100 μ L에 0.1 M 인산완충용액 200 μ L를 가한 후 20 μ L의 ACE 조효소액을 첨가하여 37°C에서 5분간 방치하였다. 이 용액에 기질(Hip-His-Leu, 2.14 mg/mL) 200 μ L를 가한 후 다시 37°C에서 30분간 반응 시키고, 1 N HCl 250 μ L를 가하여 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 2 mL를 가하여 15초간 균질화 하여 2,000 \times g의 조건으로 10분간 원심분리 한 후 상청액을 1 mL를 취하여 120°C에서 30분간 건조하였다. 완전히 건조되어진 상청액에 1 M NaCl 용액 1 mL를 가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항암활성

암세포 및 배양 조건: 본 연구에 사용되었던 암세포는 한국

세포주 은행으로부터 동결보존된 SNU-1(사람의 위암세포)을 분양 받아 10%의 fetal bovine serum(BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, USA)이 첨가되어진 RPMI 1640 medium(JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA)을 이용하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 일정한 세포농도가 될 때까지 배양하여 사용하였다.

실험 방법: *B. subtilis* JM-3 배양 농축액이 나타내는 암세포에 대한 세포독성을 항암 작용의 지표로 삼았으며, 세포독성의 측정은 MTT(3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay로 실시하였다. 96 well plate의 각 well 당 암세포 배양액 180 μ L(1.0 \times 10⁴ cell/mL)씩 분주하고 항균활성에 사용되었던 동일한 시료를 일정 농도로 희석하여 20 μ L씩 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 96시간 배양하였다. 인산생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT(Sigma, #M2128, Missouri, USA)용액 20 μ L를 첨가하고 동

배양 조건에서 3시간 더 배양한 후에 이를 2,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상정액을 제거하였다. Formazan이 형성되어진 각 well에 DMSO 300 µL를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA micro plate reader (Power wave 340, Bio-Tek Instrument Inc., Vermont, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 적정 희석 농도의 Adriamycin(Sigma Co., Missouri, USA)을 양성의 대조구로 사용하였으며, 음성대조구로는 멸균 BHI broth를 사용하였다. 대조 균주로는 *B. subtilis* ATCC 6633 균주를 사용하였으며 시료와 동일한 방법에 의하여 제조되어진 배양 농축액을 사용하였다. 암세포에 대한 *B. subtilis* JM-3의 성장억제 효과(%)는 아래의 계산식에 의하여 구하였다.

$$\text{성장억제효과 (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

결과 및 고찰

항균활성

분리균주 *B. subtilis* JM-3의 항균활성을 측정된 결과를 Table 4에 나타내었다. 그램양성세균의 경우, *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes* 그리고 *Micrococcus lutes* 등에 항균활성을 나타냈으며, 그램음성세균은 *Enterobacter aerogenes*에 대해서만 항균활성 보였다. 그리고 본 실험에 사용되어진 2종의 효모에 대하여서는 항균활성은 없었다. 항균활성을 나타낸 균주 중에서 저온성 병원성 세균인 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성이 가장 강하였다. 이러한 결과는 대부분의 bacteriocin의 항균활성은 그램음성균의 독특한 세포 구조 때문에 그램양성균에 국한되어져 왔으며, 최근 Lactic acid bacteria가 생산하는 일부 bacteriocin이 제한적으로 그램음성세균인 *Listeria monocytogenes*에 성장을 억제한다는 보고^(10,11)들과 비교하여 매우 유사한 결과로 볼 수 있을 것이다. *B. subtilis*가 생산하는 subtilicin의 항균활성에 관한 연구는 그동안 활발히 진행되어져 왔으며, 최근 Mah 등⁽¹¹⁾에 의한 김치로부터 분리한 *B. subtilis*-430의 항균활성에 관한 연구에서는 그램양성균을 비롯한 그램음성, 효모에도 광범위한 항균활성을 보였다는 것은 매우 특이적인 경우라 할 수 있을 것이다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, *B. subtilis* JM-3가 생산하는 항균물질은 항균활성 영역이 광범위하지는 않았지만 여간장의 숙성 중 미생물 상의 조절 능력을 가질 것으로 여겨지며, *Listeria monocytogenes*와 같은 저온성 병원미생물의 성장을 효과적으로 억제할 것으로 여겨진다.

항산화활성

Linoleic acid mixture에 *B. subtilis* JM-3의 배양 농축액(이하 시료) 1 mL를 첨가하여 50°C에서 산화반응 시켰을 때의 결과를 Table 5에 나타내었다.

중류수 1 mL를 첨가한 대조구의 경우는 24시간 자동산화 시켰을 때의 peroxide value(POV)가 770 mL/g로 현저하게 증가하였는데, 이는 유사한 조건인 50°C에 정치하여 48시간 동안 ethyl linoleic acid를 자동산화 시켰을 때의 값과 유사한 과

Table 4. Antimicrobial activity of cell free culture of *B. subtilis* JM-3

Indicator microorganisms	Clear zone (mm)
Gram-positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-25923	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633	14
<i>Bacillus cereus</i> KCTC-1012	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC-3140	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	20
<i>Micrococcus lutes</i> ATCC-9341	16
Gram-negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i> ATCC-25922	0
<i>Escherichia coli</i> O157; H7 ATCC-43889	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC-13048	16
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC-2058	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	0
<i>Vibrio cholerae</i> KCTC-0139	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC-2210001	0
<i>Vibrio vulnificus</i> KCTC-2987	0
Yeasts	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS-1200	0
<i>Candida albican</i> 17PL76	0

Table 5. Antioxidative activity of cell free culture of *B. subtilis* JM-3 on oxidation of linoleic acid by oxygen method (50°C, 24 hr)

Additive	Na ₂ S ₂ O ₃	POV ¹⁾ (mL/g)	Index (%)
Control (D.W. ²⁾)	38.5	770	100.0
Negative control (BHI broth)	36.0	720	93.5
<i>B. subtilis</i> JM-3 cell free culture	5.0	100	13.0

¹⁾Peroxide value, ²⁾Distilled water.

산화물이 생성량이다. 반면, 시료 1 mL 첨가한 실험구에서는 POV가 100 mL/g로 linoleic acid의 자동산화를 80%이상 억제하는 효과를 가지는 것으로 나타났다. 이는 매우 높은 산화억제 효과로 Choi 등⁽¹²⁾의 실험에서 대표적 항산화물질인 BHA 0.05%의 농도와 유사한 결과를 보여주는 것이다. *B. subtilis*가 항산화 물질을 생산한다는 것은 Choi 등⁽¹³⁾의하여 전통 대두 발효식품으로부터 갈색색소를 생산하는 *B. subtilis* DC-2를 분리하였는데 이들이 생산하는 갈색색소가 항산화능을 가진다고 보고하였다. 또한 전통 간장이나 된장 중의 갈색색소(멜라노이드 관련물질)들이 항산화능을 가진다는 여러 보고들을 종합하여 볼 때, *B. subtilis* JM-3 또한 배양 중 생성되는 대사산물이 대단히 높은 항산화능을 가지는 것으로 추측할 수 있으며, 앞으로 더 많은 연구가 진행된다면 천연 항산화제로서의 산업적 이용 또한 가능할 것으로 기대된다.

항변이활성

분리균주 *B. subtilis* JM-3의 항변이활성을 조사한 결과는 Table 6 및 7과 같다. 항돌연변이원성 실험 전에 돌연변이원

Table 6. Antimutagenic specificity of cell free culture of *B. subtilis* JM-3 against Trp-P-1 and MeIQx with *S. typhimurium* TA 100 (S9 mix +)

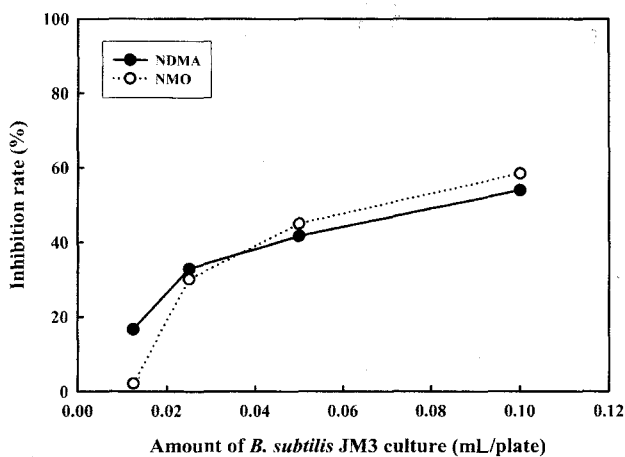
Amount of <i>B. subtilis</i> culture (mL/plate)	His+ revertant ¹⁾ CFU/plate					
	Trp-P-1 ²⁾			MeIQx ³⁾		
	Trp-P-1 only	Sample+Trp-P-1	Negative control	MeIQx only	Sample+MeIQx	Negative control
0.0125	501	454	40	242	235	28
0.025	501	497	40	242	251	28
0.05	501	489	40	242	227	28
0.1	501	504	40	242	239	28

¹⁾Colonies not required histidine, ²⁾3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, ³⁾2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline

Table 7. Antimutagenic specificity of cell free culture of *B. subtilis* JM-3 against NDMA and NMO with *S. typhimurium* TA 100 (S9 mix +)

Amount of <i>B. subtilis</i> culture (mL/plate)	His+ revertant ¹⁾ CFU/plate					
	NDMA ²⁾			NMO ³⁾		
	NDMA only	Sample+NDMA	Negative control	NMO only	Sample+NMO	Negative control
0.0125	476	401	23	563	552	32
0.025	476	327	23	563	403	32
0.05	476	287	23	563	324	32
0.1	476	232	23	563	253	32

¹⁾Colonies not required histidine, ²⁾N-Nitrosodimethylamine, ³⁾N-Nitrosomorpholine.

**Fig. 1. Inhibition rate of cell free culture of *B. subtilis* JM-3 against mutagenicity of N-nitrosodimethylamine (NDMA) and N-nitrosomorpholine (NMO).**

성 실험을 먼저 행하여 본 결과 모든 시료에서 자연복귀 영역에서 벗어나지 않는 것으로 나타나 돌연변이원성은 없는 것으로 판단되었다.

이를 기초로 하여 식육이나 어육을 가열 조리할 때 발생하는 Trp-P-1과 MeIQx, 그리고 N-nitrosoamine 중 변이원성이 높은 것으로 알려진 NDMA 및 NMO를 돌연변이원으로 사용한 항돌연변이원성 시험에서, *B. subtilis* JM-3의 배양액은 Trp-P-1과 MeIQx에 대하여는 항변이활성이 없었으나 (Table 6), N-nitroso compound인 NDMA 및 NMO에 대하여서는 약 50%의 변이억제 활성을 나타내었으며, 변이억제 활성은 농도에 비례하는 것으로 나타났다 (Table 7, Fig. 1).

Table 8. ACE inhibition effect of produced enzyme solution by cell free culture of *B. subtilis* JM-3

Sample	ACE inhibition rate (%)
<i>B. subtilis</i> JM-3 culture	90
Negative control (BHI broth)	90

ACE 저해활성

분리균주 *B. subtilis* JM-3의 혈압강화 활성을 측정한 결과는 Table 8과 같다.

B. subtilis JM-3의 배양농축액 100 μ L를 첨가하여 ACE 조효소의 활성 저해 효과를 조사한 결과 90%의 저해효과를 나타내었으나, 음성 대조구로 사용한 멸균 BHI broth를 첨가한 실험구에서도 90%의 저해율을 나타내어 시료의 ACE 활성 억제 효과는 없는 것으로 나타났다. 즉, 분리균주 *B. subtilis* JM-3가 배양 중 생산하는 대사산물에 의한 ACE 억제 효과를 갖는 것이 아니라 BHI 배지에 존재하는 여러 물질들의 작용인 것으로 생각할 수 있을 것이다. 또한 ACE는 불활성형인 angiotensin-I의 C말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin-II로 전환시켜 혈압을 상승시킴과 동시에 생체내에서 혈압강화작용을 갖는 bradykinin을 분해하여 불활성화 시킴으로서 고혈압의 원인으로 여겨지고 있으며, 이러한 ACE 활성 저해제로는 casein 가수분해물, 인공 합성 peptide, 어육단백질로부터 분획되어진 peptide 또는 근육단백질의 가수분해물들이 알려져 있다. 이와 같이 대부분의 ACE 억제작용을 가지는 물질들이 단백질의 가수분해물로서 본 실험의 결과 또한 BHI medium 속에 상당 부분 존재하는 가수분해 단백질이나 peptide들의 작용에 의하여 ACE 활성이 강력히 저해된 것으로 추측된다.

Table 9. Inhibitory effect of produced enzyme solution by cell free culture of *B. subtilis* JM-3 on the growth of SNU-1 cell using MTT assay

Samples	Growth inhibition rate (%)
<i>B. subtilis</i> JM-3	
1/16 dilution	42.6
1/8 dilution	41.9
1/4 dilution	43.4
1/2 dilution	57.3
Not dilution	88.9
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
Adriamycin	
0.005 mg/mL	93.0
0.001 mg/mL	79.9
0.5 µg/mL	73.1
0.1 µg/m	34.3
0.05 µg/m	26.9
0.01 µg/m	18.2

암세포 증식억제 효과

분리균주 *B. subtilis* JM-3의 암세포 증식 억제 활성을 측정 한 결과는 Table 9와 같다. *B. subtilis* JM-3의 배양농축액을 2배 희석법에 의하여 암세포 성장억제 효과를 측정 한 결과 원액 20L를 첨가한 경우 88.9%의 높은 성장 억제율을 나타내었으며, 1/2희석 농도에서는 성장 억제율이 농도의 희석비율에 비하여 매우 크게 저하되었으나, 성장 억제율 57.3%로 IC₅₀이상의 농도를 유지하는 것으로 나타났다. 1/4 이상의 희석단계에서는 성장 억제율이 40%의 수준을 유지하며 크게 저하되지 않는 것을 알 수 있었다. 시료 원액의 암세포 성장억제효과(88.9%)는 양성 대조구로 사용되어진 대표적 항암물질인 adriamycin의 1 mg/mL의 농도의 성장억제효과(80%)보다도 높은 것으로 나타났다. 본 균주는 지속적인 실험을 통하여 어간장 starter로 개발뿐만 아니라 저비용의 항암물질 생산 균주로 산업에 직접 적용할 수 있기를 기대한다.

요 약

속성 발효 및 기능성 멸치액젓의 제조에 사용할 수 있는 미생물 starter의 개발을 목적으로 전보에서 분리한 단백질 분해활성 및 혈전용해활성이 가장 우수했던 *B. subtilis* JM-3는 저온성 병원성 세균인 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성이 가장 강하였으며, linoleic acid의 자동산화율 80%이상 억제하는 항산화활성을 나타내었다. 그리고 N-nitroso compound인 NDMA 및 NMO에 대하여서는 약 50%의 변이억제 활성을 나타내었으며, SNU-1(사람의 위암세포)에 대하여 배양 원액 20 µL를 첨가한 경우 88.9%의 높은 성장 억제율을 나타내어 기능성 멸치액젓 제조용 starter로서의 기능성이 확인되었으며, 앞으로 본 균주의 기능성 멸치액젓 starter로서의

이용을 극대화하기 위하여서는 돌연변이에 의한 호염성 변이주의 유전적 육종⁽⁴⁾이나 형질 전환 방법 등을 응용한 호염성 미생물과의 접목을 통한 내염성 균주의 개발도 필요할 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 수산특정연구개발사업의 수행에 의한 연구결과이며, 연구비를 지원해준 해양수산부에 감사드립니다.

문 헌

- Lee, Y.J., Cho, Y.J., Son, K.M. and Choi, C. Characterization of alkaline protease produced by *Bacillus* sp. CW-1121. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 24: 537-542 (1991)
- KNSO. A Study of Cause of Death for 1999. Korean National Statistical Office, Seoul, Korea (2000)
- Kim, T.H., Park, S.H., Lee, D.S., Kwon, T.K., Kim, J.K. and Hong, S.D. Properties of alkaline protease produced by an alkalophilic *Bacillus* sp. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18: 159-164 (1990)
- Kim, J.K. and Kim, S.D. Genetic breeding of Korean soybean paste-fermenting *Bacillus* sp. by UV mutation. J. Korean Agric. Chem. Soc. 32: 148-153 (1999)
- Kim, Z.U. and Cho, S.H. A study on the manufacturing of soy-sauce by the combined use of *Aspergillus sojae* and *Bacillus subtilis*. J. Korean Agric. Chem. 18: 1-9 (1975)
- Lee, S.S., Kim, S.M., Park, W.Y., Kim, H.Y. and Shin, I.S. Studies on proteolytic and fibronolytic activity of *Bacillus subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 283-289 (2002)
- Hayase, F. and Kato, H. Antioxidative components of sweet potam. Nutr. Sci. 30: 37-41 (1984)
- Hayatsu, H. A Manual for Antimutagenic Test, p. 15. Gwangcheon Pub. Co., Tokyo, Japan (1990)
- Cheung, H.S. and Chehman, D.W. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol. 20: 1637-1647 (1971)
- Daeschel, M.A. Applications and Interactions of Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria in Foods and Beverages. Elsevier, New York, USA (1993)
- Mah, J.H., Kim, K.S., Park, J.H., Byun, M.W., Kim, Y.B. and Hwang, H.J. Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from kimchi. J. Microbiol. Biotechnol. 11: 577-584 (2001)
- Choi, H.S., Lee, J.S., Moon, G.S. and Park, K.Y. Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 22: 565-569 (1993)
- Choi, U.K., Ji, W.D., Chung, H.C., Choi, D.H. and Chung, Y.G. Optimum condition for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2 with response surface methodology. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26: 620-624 (1997)

(2003년 2월 5일 접수; 2003년 6월 10일 채택)