

전통발효식품으로부터 Chitin 분해 미생물의 분리 및 특성 규명

고보경 · 최인순¹ · 이상현² · 임채오³ · 이성호³ · 갈상완⁴ · 최영주*

신라대학교 식품영양학과, ¹생물과학과, ²생명공학과, ³경상대학교 응용생명과학부, ⁴진주산업대학교 미생물공학과

Received April 2, 2004 / Accepted May 19, 2004

Isolation and Characterization of Chitinolytic Strain, *Bacillus atrophaeus* CJ-3. Bo Kyung Ko, In Soon Choi¹, Sang-Hyon Lee², Chae Ho Lim³, Sung-Ho Lee³, Sang Wan Gal⁴ and Young Ju Choi*. Department of Food and Nutrition, ¹Department of Life Science, ²Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, ³Division of Applied Life Science and Plant Molecular Biology & Biotechnology Center, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, ⁴Department of Microbiological Engineering, Chinju National University, Jinju 660-758, Korea – A bacterial strain CJ-3 which produced chitinase was isolated from Korean traditional soy sauce. Using 16S rDNA analysis, the strain CJ-3 was identified as *Bacillus atrophaeus*. The approximate molecular weight of the putative chitinase enzyme was 31.0 kDa and the enzyme activity was remarkably induced by addition of colloidal chitin (0.5, 1.0, 2.0%). The antioxidant activity was increased 53% by the browning reaction products of *B. atrophaeus* CJ-3. *Escherichia. coli* lipopolysaccharides (LPS)-induced production of nitric oxide(NO) was reduced up to 45% by the browning reaction product in RAW264.7 macrophage. Inhibition of cell viability in the presence of LPS was recovered to normal level by the browning reaction product. These results suggest that browning reaction of *B. atrophaeus* CJ-3 plays an important role for activation of immune system. *B. atrophaeus* CJ-3 exhibited optimum temperature and pH of 37°C and pH 7.0~8.0, respectively. The major intracellular free amino acid was determined to be glutamate.

Key words – chitinase, antioxidant activity, NO activity, MTT assay

풍족한 식생활로 인간의 수명이 길어지고 식생활 패턴의 변화로 순환기계 질환이나 암 등으로 인한 사망률이 크게 증가하면서 최근 이를 극복하기 위한 새로운 천연소재(natural compound)의 개발에 많은 관심을 가지게 되었다[1]. 특히 대두를 이용한 전통발효식품인 된장과 간장에는 각종 성인병 및 노화를 억제할 수 있는 phytochemical 성분들이 다양 존재하는 것으로 밝혀져 있다[2,3].

생체 내에서 산화 stress에 의한 free radical(자유기)생성은 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 산화시키며, 생성된 과산화 지질의 증가는 여러 조직을 손상시킨다. 즉 활성 산소의 증가는 생체기능의 저하나 노화 및 만성퇴행성 질환의 유발과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 생체내의 활성산소에 의한 노화방지를 억제하기 위한 항산화제의 개발은 순환기계 질환이나 면역기능 증진을 위해서 중요한 것으로 기대된다[4-6].

Nitric oxide (NO)는 다양한 생리적 및 병리학적인 과정에 관여하는 다기능 생체분자이다. 대식세포에서 NO는 병리적인 조건에서 항균 및 종양파괴(tumoricidal)활성에 작용한다. 세포보호와 항염증효과와는 반대로 NO의 대량생성은 산화적 stress와 관계 있으며 여러 질환의 병태생리, 관절염, 당

뇨, 폐혈증성 shock, 자동면역질환 및 만성염증과도 관계 있다[7]. 또한 NO는 단백질과 핵산의 작용을 조절하고 대식세포에서 apoptosis을 유발한다.

양조간장에서의 갈변반응은 주로 비효소적으로 일어나는 Maillard 반응이다. Maillard 반응 생성물은 주로 melanoidins으로 식품 또는 생체내에서 다양한 항산화성 및 항돌연변이성을 나타낸다는 많은 보고가 있다[8-10]. 발효식품에 존재하는 미생물 중에서 항산화 효과가 높은 미생물 유래 항산화물질에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다[11-14]. 이러한 발효식품에 대한 효소학적 연구는 protease 및 lipase를 중심으로 많이 진행되었지만[15], 특히 간장에서 chitinase 생성 균주에 관한 연구는 거의 없다.

Chitinase는 chitin의 β -1,4 결합을 가수분해하는 효소로서, 새우 등의 갑각류 폐기물을 분해하여 부가가치가 높은 oligo chitin이나 glucosamine를 생산한다. Chitin의 유도체인 chitosan이나, chitin 분해산물들은 식품산업이나, 제약산업, 농업 및 환경분야 등의 많은 분야에서 이용되고 있다[16-17].

따라서 본 연구에서는 간장에서 chitinase 활성이 높으면서 갈변반응을 유발하는 균주를 분리하여 생화학적 특성을 조사하였으며. 또한 이러한 갈변반응 생성물이 bacterial lipopolysaccharides(LPS)에 의하여 유도된 NO 활성에 미치는 영향을 연구함으로서 면역기능, 세포활성 및 항산화력에 대한 갈변반응 효능을 연구하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-82-51-309-5459, Fax : +82-82-51-309-5687
E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

재료 및 방법

Chitinase 생산균주의 분리

전통 발효식품으로부터 chitinase를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 간장과 된장을 시료로 사용하였다. 생리식염수에 적당히 희석한 시료를 분리용 고체배지(LB medium + 1% colloidal chitin)에 plating한 후 37°C에서 2~3일간 배양한 다음 colloidal chitin을 분해하여 clear zone을 형성하는 colony를 순수 분리하였다. 1차 순수 분리된 colony 중에서 갈변 반응을 일으키는 균주를 선별하여 chitinase 활성 및 항산화력 측정을 위한 균주로 사용하였다. Colloidal chitin은 Roberts와 Selitrennikoff의 방법[18]에 따라 조제하였다.

DNA 추출

분리된 균주로부터 chromosomal DNA 분리는 G-spin™ genomic DNA extraction kit (iNtRON Biotechnol.)를 사용하여 분리하였으며 분리된 genomic DNA는 16S rDNA cloning을 위한 template로 사용하였다.

16S rDNA 증폭 및 염기서열 분석

Bacillus 속 균종의 분류가 가능한 부위 2곳을 대장균 염기서열 기준 forward primer로 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3'(대장균 기준 9~27 bp), reverse primer로 5'-AGGAAAG-GAGGTGATCCAGCC-3'(대장균 기준 1542~1525 bp)를 사용하여 16S rDNA 절편을 증폭하였다. PCR 반응은 5U의 Taq polymerase, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 1.5 mM MgCl₂를 포함하는 PCR 혼합물을 이용하였다. PCR은 first denature 95°C로 5분, 30 cycle로 denaturation 95°C 60초, annealing 55°C 45초, extension 72°C 5분으로 수행하였다(Model 9600 thermocycler, PE Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom). 증폭된 PCR 산물은 0.6% agarose gel에 전기영동한 후 DNA 단편을 회수하여 pGEM-T easy vector (Promega 사)에 cloning하여 DNA 염기서열 분석에 사용하였다. 염기서열분석은 자동염기서열 분석장치 Applied Biosystems 373A (PE Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다. 결정된 16S rDNA의 염기서열은 Genebank의 Blast program을 이용하여 이미 Genebank에 등록된 16S rDNA 염기서열과의 상동성을 비교하여 균주를 동정하였다[19,20].

균주의 생육조건 조사

균주의 최적 생육조건을 조사하기 위하여 배양온도, pH 및 염 농도에 대한 균주의 성장률을 420 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다.

효소액의 조제 및 Chitinase 활성 측정

Chitinase 활성 측정을 위해서 효소생산배지(1% colloidal

chitin, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.2% beef extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O)에서 37°C, 200 rpm, 48시간동안 진탕배양한 후에 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소반응은 colloidal chitin (1%)을 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 혼탁한 다음 조효소액 1 ml를 가하여 37°C에서 1시간동안 150 rpm으로 진탕하면서 효소반응을 시켰다. 반응이 끝난 다음 5분간 boiling하여 반응을 정지시킨 후 남아있는 colloidal chitin을 제거하기 위하여 원심분리(12,000 rpm, 10 min)를 하였다. 효소의 활성은 DNS (dinitrosalicylic acid)법으로 유리된 환원당을 정량하였다. 효소 1 unit는 1시간 동안 1 μM의 N-acetyl-D-glucosamine을 생산하는 효소의 양으로 정하였다. 단백질 정량은 Bradford의 방법[21]에 따라 측정하였으며, 이때 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하였으며 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH 법에 의한 항산화 활성측정

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)-용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 1.5×10^{-4} M을 녹인 후 중류수 100 ml 혼합하여 Whatman filter paper No. 2에 여과시켜 만들었다. Blois의 방법[22]에 따라 DPPH 용액 4 ml 균 배양액 1 ml 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 EDA (%) = (대조구흡광도-시료첨가구흡광도)/대조구흡광도 × 100으로 계산하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 프리라디칼의 제거활성을 백분율로 나타내었다.

유리아미노산분석

유리아미노산의 분석은 Csonka [23]의 방법에 따라 균주를 LB medium (10 ml)에 하루 동안 배양한 후 membrane filter (0.45 μm)로 여과한다. Filter는 70% (v/v) 에탄올 10 ml를 첨가하여 20분 동안 실온에서 shaking한 후 원심분리 한다. 상등액을 60°C water bath에서 증발 건조시킨 후 0.2 M sodium citrate 용액에 녹인 후 Amino acid autoanalyzer (Biochrom 20 plus)로 분석하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 및 분자량 측정

균주의 단백질 분석은 Noel and Brill [24]의 방법에 따라 LB 배지에 colloidal chitin을 각각 0.5%, 1.0%, 20% 첨가한 후 균을 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 microcentrifuge tube로 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포는 10 mM Tris-HCl (pH7.6) 100 ml에 혼탁시킨 후 동량의 2x SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10.0% glycerol) 가하여 잘 혼합한 다음 3분 동안 끓인 후 얼음에 방치한다. 반응액은 vortex 후 단백질 전기영동을 위한 시료로 사용하였

다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)은 Laemmli 방법[25]에 따라 수행되었다. Stacking 젤과 running 젤의 acrylamide 농도는 12%와 3%을 각각 사용하였다. 단백질은 0.2% Coomassie brilliant blue R-250로 염색되었다. 표준단백질은 (NEB #P7702) MBP- β -galactosidase (175 kDa), MBP-paramyosin (83 kDa), Glutamic dehydrogenase (62 kDa), Aldolase (47.5 kDa), Triosephosphate isomerase (32.5 kDa), β -Lactoglobulin A (25 kDa), Lysozyme (16.5 kDa), Aprotinin (6.5 kDa)을 사용하였다.

NO Assay 방법

NO의 생성은 비색법으로 세포 상동액에 축적되는 nitrite 양을 측정하였다. 대식세포를 세포 배양판에 5×10^5 cells/ml의 세포가 되도록 재부유하여 LPS의 자극하에 24시간 배양하고 그 배양 상층액 내의 NO를 Griess 시약과 반응시켜 측정하였다[26]. 100 μ l의 세포배양 상층액을 취하여 동량의 Griess 시약[1% sulfanilamide (30% acetic acid)와 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (60% acetic acid) 혼합액]을 가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. NO의 활성 정도는 ELISA 판독기를 사용하여 800 μ g/ml 농도 범위에서 540 nm 흡광도를 측정하였다.

Cell viability 측정

세포활성은 MTT assay에 의하여 측정하였다[26]. 96-well microtiter plate (Nunc, Vangard, Neptune, NJ)에 RAW 264.7 macrophage를 1×10^5 cells/well의 농도로 분주하였다. 분주 24시간 후 각 추출물이 함유되어 있는 배지를 100 μ l씩 넣어 48시간 도안 배양하였다. Plate에 MTT 2 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl -tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 용액을 20 μ l 씩 첨가하여 4시간 동안 배양시

키고 formazan을 형성시키 후 조심스럽게 상동액을 제거하였다. DMSO (dimethyl sulfoxide) 150 μ l를 첨가하여 formazan을 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 농도는 10, 20, 50, 100, 200 μ l/well로 하였다.

결과 및 고찰

Chitinase 생산균주의 분리 및 동정

간장, 된장 등 발효식품으로부터 채취한 시료에서 분리된 균주를 colloidal chitin이 함유된 분리용 배지에 도말하여 clear zone 생성한 균주를 1차로 30여 균주를 분리하였다. 그 중에서 chitinase 활성이 높으면서 갈변반응을 일으키는 3번 균주를 2차로 선별하여 하여 CJ-3이라 명명하였다. Fig. 1A 와 같이 CJ-3 균주는 세포 외로 chitinase를 분비할 뿐만 아니라 3주 이상 냉장고에서 보관하면 갈변반응을 일으키는 것으로 관찰되었다(Fig. 1B). 식품에서의 갈변반응은 주로 비효소적으로 일어나는 Maillard 반응의 주된 생성물은 melanoidin이며 이러한 갈변반응은 영양 손실을 초래할 뿐만 아니라 갈색물질 및 항산화물질의 생성 등은 많은 관심의 대상이 되고 있다[8]. Maillard 반응생성물은 식품 또는 생체내에서 다양한 항산화성 및 항돌연변이성을 나타낸다는 많은 연구 결과가 있다[8-10]. 양조간장에서 갈변반응에 대한 대부분의 연구는 대두에 존재하는 아미노산, 페놀물질 및 melanoidin에 대한 것으로[6] chitinase 효소 생성 미생물에 의하여 일어난 갈변반응에 대한 연구는 거의 없다.

CJ-3 균주의 동정은 일차적으로 MIS system에 의하여 분석한 후 16S rDNA 염기서열을 결정하여 분석하였다(Fig. 2). 분리된 CJ-3 균주는 *Bacillus subtilis* 와 유사한 *B. atrophaeus*로 동정되었다. CJ-3 균주는 MIS system에 의한 분석에서는 *B. subtilis*와 높은 상동성을 나타내었다(data not shown).

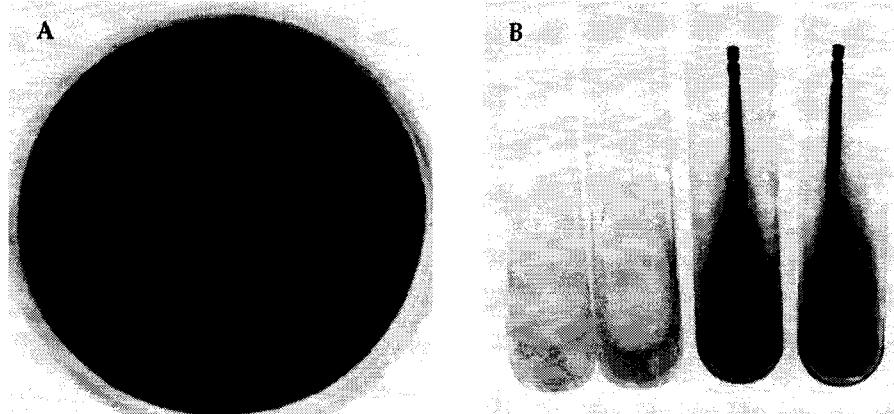


Fig. 1. Photograph of clear zone [A] and browning reaction [B].

[A]: *B. atrophaeus* CJ-3 was cultured in LB agar plate containing colloidal chitin (1.0%). [B]: The liquid cultures before and after the brown reaction of *B. atrophaeus* CJ-3.

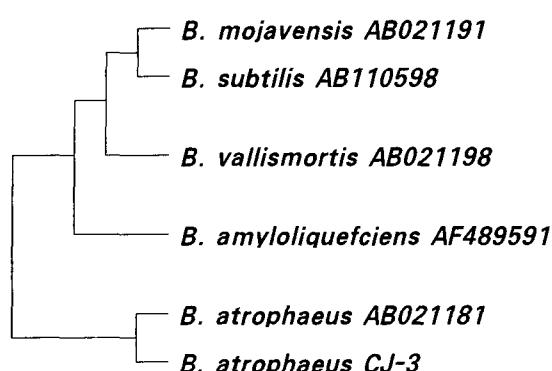


Fig. 2. The phylogenetic relationship between *B. atrophaeus* CJ-3 and other *Bacillus* sp. The tree was created using the MEGALIGN program. The analysis was performed based on the 16S rDNA sequence.

균주의 생육조건 측정

분리된 균주의 생육에 대한 온도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 3A에 나타난바와 같이 25~40°C 범위에서 잘 성장하였으며 37°C에서 최적온도를 나타내었다. pH에 대한 균주의 생육은 Fig. 3B에 나타난바와 같이 pH 4.0~pH 10까지의 생육을 조사하였는데 pH 중성(pH 7.0~pH 8.0) 부근에서 최적 생육조건을 나타내었다. 대부분의 전통발효식품은 염 농도가 높은 조건에서 잘 생육하는데 분리된 균주의 염에 대한 생육 조사는 Fig. 3C에 나타난바와 같이 3~9.0% NaCl 농도 하에서 비교적 잘 생육하였다. 그러나 12% 이상의 농도에서는 현저한 생육 저해를 보였다. CJ-3는 비교적 다양한 환경조건에서도 잘 생육할 수 있는 균주로 *Bacillus* 속의 특성과 유사하였다.

Chitinase 활성 측정

Chitinase 생산에 첨가된 colloidal chitin의 농도가 chitinase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소생산 기본배지(0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.2% beef extract,

0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O)에 colloidal chitin을 0.5, 1.0, 2.0%를 첨가하여 37°C, 200 rpm, 48시간동안 진탕 배양한 다음 chitinase 활성을 측정하였다. Fig. 4에 나타난바와 같이 colloidal chitin의 농도가 증가함에 따라 chitinase 활성이 증가하였다. 이러한 결과는 *Streptomyces lydicus* [27]와 유사한 결과로 *Serratia*의 경우[28] 0.15%에서 최적 활성을 나타난 것과는 달리 상당히 높은 2%의 colloidal chitin 농도에서도 높은 활성을 유지하였다.

DPPH 법에 의한 항산화 활성측정

간장, 된장 등 전통발효식품으로부터 분리된 *B. atrophaeus* CJ-3 균주를 DPPH 법에 따라 균주를 배양한 직후 항산화력을 측정하고 냉장보관 동안 갈변반응이 일어난 후의 항산화력을 측정하여 비교하였다. Fig. 5에 나타난바와 같이 분리된 균주의 항산화력이 9.2%에서 갈변반응에 의하여 63.0%로 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 갈변반응이 항산화력을 나타낸다는 보고[29,30]와 일치한다.

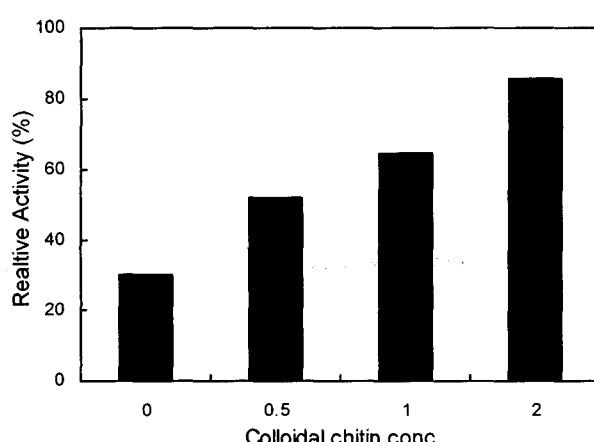


Fig. 4. Effect of colloidal chitin concentration on the chitinase activity from *Bacillus atrophaeus* CJ-3. Colloidal chitin was prepared from commercial chitin by the method of Roberts and Selitrennikoff.

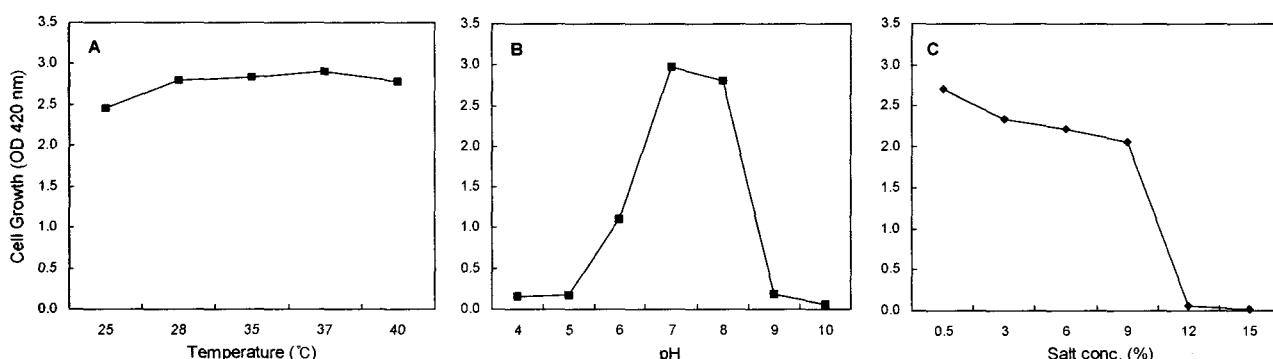


Fig. 3. The effect of temperature [A], pH [B] and sodium chloride concentration [C] on the growth of *B. atrophaeus* CJ-3. Optical density is plotted as a function incubation time.

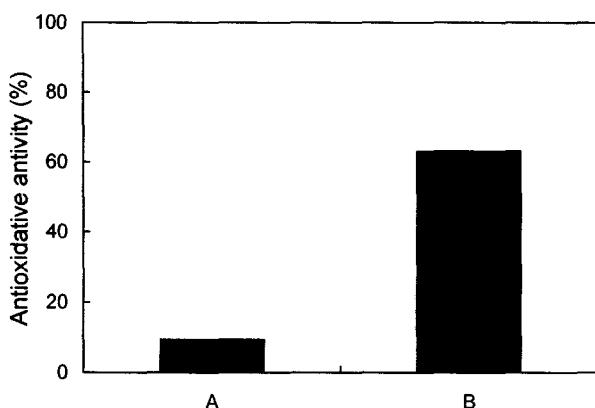


Fig. 5. Effect of browning reaction on the antioxidative activity of *Bacillus atrophaeus* CJ-3.
The antioxidative activities before [A] and after [B] of the browning reaction were tested by DPPH method.

미생물에 의한 갈변반응이 대부분의 식품에서 일어나는 비효소적 갈변반응인 Maillard 반응과의 차이점을 규명하고 미생물에 의하여 일어나는 갈변반응 기작을 연구하는 것은 매우 흥미로울 것으로 생각된다.

유리아미노산분석

유리아미노산의 분석은 Table 1에 나타난바와 같이 *B. atrophaeus* CJ-3의 주요 intracellular 유리 아미노산은 glutamate 18.3% 가장 많이 함유하였으며 histidine 12.9%, tyrosine 10.8% 및 proline 8.5%로 존재하였다. Glutamate는 나트륨과 결합하여 글루타민산나트륨(MSG)을 형성함으로서 조미료의 주요성분으로 이용되고 있다. 또한 glutamate나 proline 등은 osmoprotectant로서 높은 염 농도 하에서도 생육할 수 있는 중요한 유리 아미노산으로 알려져 있다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 분자량 측정

분리된 균주의 단백질 pattern은 Fig. 6에 나타난바와 같이

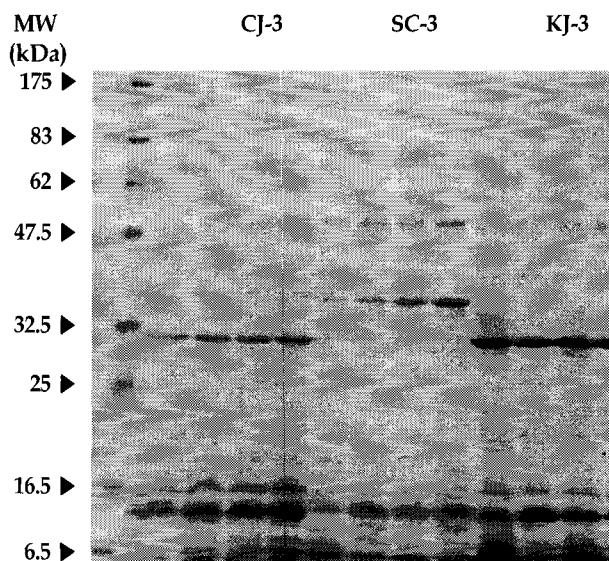


Fig. 6. SDS-PAGE of the putative chitinase from *Bacillus atrophaeus* CJ-3. The three strains were cultured in LB medium containing colloidal chitin (0.5, 1.0, 2.0%). The CJ-3 and SC-3 strains were contain chitinase activity whereas strain KJ-3 was contain protease activity. Lane 1 : Molecular weight marker, (175kDa; MBP-β-galactosidase, 83kDa; MBP-paramyosin, 62kDa; Glutamic dehydrogenase, 47.5kDa; Aldolase, 32.5kDa; Triosephosphate isomerase, 25kDa; β-Lactoglobulin A, 16.5kDa; Lysozyme, 6.5kDa; Aprotinin). Lane 2~5: CJ-3, Lane 6~9 : SC-3, Lane 10~13 : KJ-3.

배지에 colloidal chitin을 첨가함으로서 chitinase 효소 생성량이 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다. 그에 비해서 protease 활성과 약한 chitinase 활성을 가진 KJ-3의 경우는 colloidal chitin의 존재에 의해서 CJ-3나 SC-3의 경우와 달리 그렇게 유도되지 않았다. 일반적으로 colloidal chitin의 농도가 증가하면 chitinase 활성이 증가하는 경향을 보이고 있는데 본 연구의 결과에서도 colloidal chitin의 첨가에 의하여

Table 1. Composition of intracellular free amino acid of *Bacillus atrophaeus* CJ-3

Free Amino Acid	(%)	Free Amino Acid	(%)
L-Glutamic Acid	18.318	β-Alanine	1.841
L-Histidine	12.876	L-Alanine	1.834
L-tyrosine	10.799	L-Aspartic acid	1.748
L-proline	8.541	1-Methyl-L-histidine	1.699
L-Valine	6.270	O-phospho-L-serine	1.671
L-citulline	5.538	L-Arginine	1.515
L-Threonine	5.439	Glycine	1.443
D,L-β-Aminoisobutyric Acid	5.319	L-α -Aminoadipic Acid	0.686
δ-Hydroxy lysine	3.685	L-Serine	0.534
L-Leucine	3.226	O-Phosphoethanolamine	0.396
L-Anserine	2.404	Urea	0.383
L-Methionine	1.973	Ammonium Chloride	0.383

chitinase 활성이 현저히 증가하는 것으로 나타났다. SDS-PAGE를 이용하여 표준단백질로부터 구한 *B. atrophaeus* CJ-3에 의하여 생성되는 chitinase 효소의 분자량은 31.0 kDa이었다. 현재까지 보고된 미생물이 생산하는 chitinase의 분자량은 *Aeromonas* 속들의 105~110 kDa, *Vibrio* 속들의 60~63 kDa, *Serratia* 속들의 50~58 kDa, *Streptomyces*와 *Mucor* 속들의 30~38 kDa, *Bacillus licheniformis* X-7u의 chitinase I 89 kDa, II 76 kDa, III 66kDa, IV 59kDa 등이 밝혀져 있으며 subunit의 구조는 식물과 미생물 기원의 모든 효소가 monomer로 보고되어 있다[31]. *B. subtilis*에서 Kim 등이 56 kDa [32], *Bacillus circulans* No 4.1에서 45 kDa [33]크기의 chitinase를 보고하였다.

NO Assay 및 cell viability

Bacterial lipopolysaccharide (LPS)를 대식세포에 처리하여 NO를 유도시킨 다음 갈변반응을 일으킨 *B. atrophaeus* CJ-3 배양액을 대식세포에 처리하여 NO 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 7A에 나타난바와 같이 LPS에 의하여 유도된 NO 활성은 갈변반응 생성물을 첨가함으로서 NO 활성이 약 45% 정도 감소하였다. 이러한 결과는 갈변반응 생성물이 면역기능과 관계가 있음을 나타내는 것이다. 일반적으로

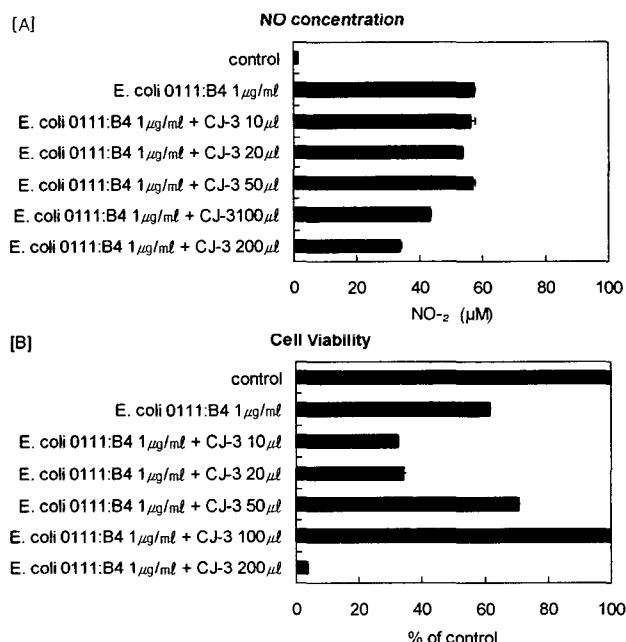


Fig. 7. Effects of the browning reaction product on NO synthesis [A] and cell viability [B] in RAW264.7 cells stimulated with LPS [A].

RAW264.7 cells were cultured for 24 h with various concentration of browning reaction product in the presence of LPS (1μg/ml). NO release was measured using the method of Griess (nitrite). Cell viability was determined by MTT assay. Results are expressed as means±S.E. of three independent experiments.

암에 걸린 세포는 NO 활성이 증가하는데 항암제 등을 투여하면 NO 활성이 감소하는 것으로 나타난다.

세포활성은 MTT 분석을 통해서 측정하였다. LPS로 처리된 대식세포는 약 50%정도의 세포감소를 보였는데 갈변반응을 일으킨 *B. atrophaeus* CJ-3 배양액을 첨가하면 정상수준으로 회복되는 것이 관찰되었다(Fig. 7B).

NO는 면역학적 방어에서 중요한 역할을 수행하고, 분비 조직과 세포의 기능에 영향을 미치며, 세포성 면역계의 주된 역할의 하나로 NO는 세포 독성이나 성장 억제 활성을 나타낸다. NO는 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 생성된다. NO는 대부분의 포유류 동물의 세포내에서 생성되고 신경계에서는 화학적 신호 전달 물질로서, 혈관계에서는 혈압 조절과 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합 작용을, 골격근에서는 대사와 근 수축 조절 등 생리학적 전달자로서 뿐만 아니라, 염증 반응, 면역계 및 세포 독성 외에도 세포의 분화나 세포내 신호 전달 등의 중요한 조절 물질로 알려지고 있다. 또한 면역 세포에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 다량으로 외부의 자극에 의해 유전자 수준에서 발현되고 주로 침입한 미생물이나 종양 세포에 대해 독성을 갖는 방어 물질로서 작용하는 것으로 알려져 있다[34-36]. 최근에 NO가 세포 활성화 물질 및 reactive oxygen intermediates(ROI)에 의해 유발된 세포 독성을 최소화시키는 역할이 밝혀짐으로 이 분야에 대해서 활발히 연구되고 있다.

요약

전통발효 식품인 간장으로부터 chitinase 활성이 높으면서 갈변반응을 일으키는 균주인 CJ-3를 분리하여 갈변반응생성물이 면역기능, 항산화력 및 세포활성에 미치는 영향과 생화학적 특성을 규명하였다. 분리된 CJ-3 균주는 16S rDNA 염기서열분석에 의하여 *Bacillus atrophaeus*로 동정되었으며 분리된 균주의 분자량은 대략 31.0 kDa으로 colloidal chitin (0.5, 1.0, 2.0%)의 첨가에 의하여 chitinase 활성이 현저히 증가되었다. *B. atrophaeus* CJ-3에 의해서 유도되는 갈변반응물 200 μl 첨가로 LPS에 의하여 유도되는 nitric oxide (NO) 활성을 45%까지 감소시켰다. MTT 분석을 통한 세포활성에서도 갈변반응물은 LPS에 의하여 세포활성을 정상수준으로 회복하였다. *B. atrophaeus* CJ-3 균주의 DPPH 전자공여능법에 의한 항산화력은 갈변반응에 의하여 약 55% 증가하였다. 이러한 결과들은 갈변반응생성물은 면역기능 및 세포활성을 증가시키는 것으로 추정된다. 분리된 균주의 최적 생육조건은 최적온도 37°C, 최적 pH 7.0 및 염 농도는 9% NaCl농도까지는 잘 생육하는 것으로 나타났으며 분리된 균주의 주요 intracellular 유리아미노산은 glutamate로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 2002년도 신라대학교 교내학술연구비로 수행되었음을 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Annual report on the cause of death statistics. 2001. National Statistical Office, Republic of Korea.
2. Kim, J.-S. and S. Yoon, 1999. Isoflavone contents and β -glucosidase activities of soybeans, Meju and Doenjang. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 1405-1409.
3. Song, T. T., S. Hendrich and P. A. Murphy. 1999. Estrogenic activity of glycetein, a soy isoflavone. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1607-1610.
4. Lee, S. E., H. J. Hwang, J.-S. Ha, H.-S. Jeong and J. H. Kim 2003. Screening of medicinal extracts for antioxidant activity. *Life Sci.* **73**, 167-179.
5. Lee, K. G. and T. Sjibamoto. 2000. Antioxidant properties of aroma compounds isolated from soybeans and mung beans. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4290-4293.
6. Cheigh, H.-S., J.-S. Lee, G.-S. Moon and K.-Y. Park. 1990. Antioxidative characteristics of fermented soybean sauce on the oxidation of fatty acid mixture. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**, 332-336.
7. Yoo, Y. H., Y. J. Lim, S. E. Park, J. M. Kim and Y. C. Park. 2004. Overexpression of redox factor-1 negatively regulates NO synthesis and apoptosis in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *FEBS Letters* **556**, 39-42.
8. Namiki, M. 1988. Chemistry of Maillard reactions : recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food Res.* **32**, 115-122.
9. Ham, S. S. 1987. Desmutagenicity of the enzymatic browning reaction products which obtained from *Prunus salicina* (yellow) enzyme and polyphenol compounds. *J. Korea Agric. Chem. Soc.* **31**, 38-45.
10. Eichner, K. 1981. Antioxidative effect of Maillard reaction intermediates. *Prog. Food Nutrition Sci.* **5**, 441-448.
11. Iwai, K., N. Nakaya, Y. Kawasaki and H. Matsue. 2002. Inhibitory effect of natto, a kind of fermented soybeans, on the LDL oxidation *in vitro*. *J. Agric. Food. Chem.* **50**, 3592-3596.
12. Rashid, M. H. O., F. Kato, A. Murata and M. Kondo. 1993. Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 45-53.
13. Chung, Y. C., C. T. Chang, W. W. Chao, C. F. Lin and S. T. Chou. 2002. Antioxidative activity and safety of the 50 ethanol extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NKI. *Agric. Food Chem.* **50**, 2454-2458.
14. Cha, J.-Y., H.-J. Kim, B.-S. Jun, J.-C. Park, M. Ok and Y.-S. Cho. 2003. Antioxidative and produced condition of antioxidative substance by *Bacillus* sp. FF-7. *Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 165-170.
15. Choi, C., K.-S. Choi, Y.-J. Cho, S.-I. Lim, S. Kim, J.-H. Son, H.-D. Lee and Y.-H. Kim. 1996. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111 in Korean traditional soy sauce. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **25**, 915-921.
16. Jeon, Y. J., E. H. Lee and S. K. Kim. 1996. Bioactivities of chitin and chitinsan (I). *Kor. J. Chitin and Chitin-san* **1**, 4-13.
17. Kim, S. K. 1996. Synthetic techniques of chitin and chitinsan derivatives and their analytical methods. *Kor. J. Chitin and Chitin-san* **1**, 20-47.
18. Roberts, W. K. and C. P. Selitrennikoff. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 169-176.
19. Altschul, S. F., W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
20. Larsen, N., G. J. Olsen, B. L. Maidak, M. J. McCaughey, R. Overbeek, T. Macke, T. L. Marsh and C. Woese. 1993. The ribosomal database project. *Nucleic. Acids Res.* **21**, 3021-3023.
21. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
22. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
23. Csonka, L. N. 1981. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **182**, 82-86.
24. Noel, K. D. and W. J. Brill. 1980. Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum* population. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 931-938..
25. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
26. Lin, H.Y., S.-H. Juan, S.-C. Shen, F.-L. Hsu and Y.-C. Chen. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1821-1832.
27. Lee, S. M. 1993. Identification and cultural characterization of *Streptomyces lydicus* G-23 for producing chitinase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 6-12.
28. Lee, E.-T. and S.-D. Kim. 1999. Isolation and antifungal activity of the chitinase producing bacterium *Serratia* sp 3095 as antagonistic bacterium against *Fusarium* sp. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 181-187.
29. Lee, D.-I., T.-R. Heo and D. H. Kim. 1975. Comparison of the antioxidant effects of ethyl alcohol extracts of a maillard-type and a caramelization-type browning reaction mixtures. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **7**, 43-50.
30. Lee, G.-D., J.-S. Kim and J.-H. Kwon. 1997. Effect of maillard reaction products on growth of *Bacillus* sp. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 309-313.
31. Hong, B.-S., H.-G. Yoon, D.-H. Shin and H.-Y. Cho. 1996. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* KFB-V14. *Kor. J. Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.* **24**, 567-573.
32. Kim, N.-W., Y. K. Jeong and H.-K. Jun. 2002. Purification and characterization of the chitinase from *Bacillus subtilis* JK-56. *Kor. J. Life Sci.* **12**, 77-86.
33. Wiwat, C., P. Siwayaprahm and A. Bhumiratana. 1999. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1. *Current Microbiol.* **39**, 134-140.
34. Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 12231-12234.
35. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretary product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
36. Ji, Y., T. P. Akerboom, H. Sies and J. A. Thomas. S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulphhydryls by S-nitroso glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 67-78