J. Fd Hyg. Safety 15(4), 277–281 (2000)

Bacillus cereus ASK 202의 β-Agarase가 생산한 한천올리고당의 항균 효과

홍정화† · 이재진 · 최희선* · 허성호 · 공재열*****

인제대학교 식품과학부, 유니푸드테크(주), 동의공업대 식품과학연구소**,*
*부경대학교 식품생명공학부****

Antibacterial Activity of Agarooligosaccharides Produced by β-Agarase from *Bacillus cereus* ASK 202

Jeong-Hwa Hong†, Jae-Jin Lee, Heesun Choi*, Sung-Ho Hur and Jai-Yul Kong*****

School of Food Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea
**Unifood Tech., Kimhae 621-010, Korea*
***Institute of Food Science, Dongeui Institute of Technology, Pusan 614-715, Korea*
****Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea*

ABSTRACT – Agar, one of the most abundant marine products has not been utilized extensively because of low level of processing technology in Korea. This research was carried out to improve the utilization of agar and consequent increase in profit. Antibacterial activity of agarooligosaccharides were evaluated against bacteria causing putrefaction and food poisoning. Addition of 0.4% agarooligosaccharides showed antibacterial activity toward *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7; furthermore, autoclave treatment of agarooligosaccharides solution enhanced the antibacterial activity. Agarooligosaccharides showed high stability against the pH change. Addition of amino acid(alanine, lysine, glycine, phenylalanine) in agarooligosaccharides solution enhanced antibacterial activity in *E. coli* O157:H7, *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*.

Key words □ Agarooligosaccharides, antibacterial activity

한천은 해양에 존재하는 대표적인 해조류로 국내 한천의 연간 생산량은 약 3,600톤이며, 오래 전부터 가축의 사료, 작물의 비료, 의약품, 화장품, 식품첨가물, 공업원료 등으로 널리 이용되어져 왔다[1]. 한천의 이용 현황은 전체 생산량의 약 6.5%에 불과하며, 특히 고가 제품인 시약용이나 의약품 등 한천가공품의 경우는 수입에 의존하고 있어 국내에서 대량 생산되고 있는 한천의 새로운 용도 개발에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

한천은 agarose와 agaropectin를 기본 구성단위로 하며, 70%가 agarose로서 3,6-anhydro-α-L-galactopyranosyl-(1, 3)-D-galacto pyranose가 β-(1,4)결합으로 되어 있는 hetero polymer 형태인 D, L-galactan이다. 한천올리고당은 한천을 효소로 분해하여 생성한 것으로 전분의 노화 억제 작용이 강하고, 항균 작용, 정균 작용, 정장 작용, 비피더스균 증식 인자, 항충치성 등의 기능성 효과가 매우 크다. 또한, 당뇨병, 난소화성, 비만, 변비 등의 예방과 치료에도 효과가 있다고 알려져 있다[2,3]. 그러나 현재까지 올리고당의 항균활성에 관한 연구는 보고된 바가 없으며, 특히 한천올리고당에 대한 연구는 더욱 그러하다.

천연물에 존재하는 항균성 물질을 식품 보존에 이용하고자 하는 연구는 오래 전부터 수행되었고, 현재 이에 대한 연구는 주로 향신료와 정유성분, 미생물이 생성한 항균 물질에 대해 이루어지고 있다. 특히 소비자들은 인공 합성보존제에 대해 부정적이므로 천연물로부터 항균성 물질을 개발하는 연구는 매우 시급하다[4-12].

본 연구는 한천올리고당을 이용하여 유해 식중독 미생물 및 식품 부패균에 대한 억제 효과 및 항균성을 평가함과 동시에 한천올리고당의 가공 공정 중 안전성을 평가하여 식품 첨가물로서의 가능성을 실험한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

한천올리고당(Agarooligosaccharides)의 생산

효소의 생산

†Author to whom correspondence should be addressed.

한천을 가수분해하는 효소 생산 균주로 *Bacillus cereus* ASK 202을 사용하였다. 균주는 인공해수에 bactopeptone 5 g, yeast extract 1 g, ferric citrate 0.1 g, ammonium nitrate 0.0016 g, disodium phosphate 0.008 g과 0.3%(W/V) agar를 첨가한 반고체배지를 이용하여 25°C, 150 rpm에서 36시간 배양하였다[13].

한천 가수분해 반응

(1) 효소의 활성측정

조효소 용액은 액체 배지 배양액을 고속냉동원심분리기로 10,000 × g, 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 상층액을 사용하였다. 효소 활성은 Leon[14]의 방법에 따라 한천분해효소의 반응 산물인 환원당을 DNS법[15]에 의해 측정하였다. 한천분해효소의 활성은 1분당 1 μmol의 galactose를 생산하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

(2) 한천의 분해

Morrice[16]의 방법에 따라 agar 5g(dry weight, Difco)을 100°C의 0.01M Na-phosphate 완충용액(pH 6.8) 1 l에 용해한 후 40°C로 냉각시킨 다음 260 units의 agarase를 넣어 40°C 수욕조에서 80rpm으로 12시간 교반하면서 가수분해하였다.

한천올리고당의 회수 및 확인

한천의 효소분해물에 ethanol 200 ml를 넣고 rotary vacuum evaporator(80°C)로 약 30 ml가 되도록 농축한 다음 투석막에 넣고 탈이온수 1 l로 8시간 동안 15°C에서 3회 반복하여 투석하였다. 투과시킨 용액(약 3 l)은 rotary vacuum evaporator(80°C)에서 약 30 ml가 되도록 농축하고, 이 농축물의 환원당을 DNS법으로 측정하여 한천올리고당의 농도를 확인하였다. TLC(butanol:ethanol:water=2:1:1, Silica gel 60 glass plate)를 이용하여 올리고당의 존재를 확인하였고, 사용한 표준 물질은 neoagarobiose, neoagarotriose, neoagarotetraose, neoagarohexose였다. 주된 생산물은 D.P.(Degree of polymerization) 4였고, 부산물로 D.P. 2와 D.P. 6이 생성되었다.

한천올리고당의 항균활성

시험 균주

한천올리고당의 항균실험에 사용한 식중독 및 식품 변패 균주는 KCTC로부터 분양받았고, *E. coli* O157:H7은 부산보건환경연구원에서 분양 받아 사용하였다(Table 1).

시험균주 증균 배양

액체 배지 150 ml에 보존된 종균 1백금이를 취해 접종하고, shaking incubator에서 120rpm으로 24시간 배양 후 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 균액은 생리식염수로 희석하여 흡광도 0.1로 조정하여 사용하였다.

항균활성 측정

한천올리고당 용액을 각각 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%(w/v)의 농도로 액체배지를 제조한 후 생균수를 측정하여 항균활성을 시험하였다.

한천올리고당의 가공 적성

가열 처리에 따른 항균 효과

한천올리고당의 비가열 처리는 membrane filter(Φ0.2 μ)로 제균한 후 멸균한 배지에 첨가하였으며, 가열 처리한 한천올리고당은 배지에 한천올리고당을 첨가한 후 수행하였다. 실험 균주는 증균 배양하고 흡광도는 600 nm에서 0.1로 조정한 배양액을 각각의 배지에 0.1% 접종하고, 진탕배양을 하면서 일정시간별로 생균수를 측정하였다.

한천올리고당과 아미노산 혼합액의 가공 적성

항균 효과가 잘 나타나지 않는 0.2% 올리고당액에 13종류의 아미노산을 0.1M 농도로 가하여 항균 작용을 검토하였다. 아미노산 용액과 올리고당액을 혼합하여 121°C에서

Table 1. Strains for determination of antimicrobial activity.

Strains	Medium	Temperature (°C)
Salmonella typhimurium KCTC2541	Nutrient agar	37
Streptococcus mutans KCTC3065	Brain heart infusion agar	37
Bacillus cereus KCTC1012	Nutrient agar	30
Bacillus subtilis KCTC1022	Nutrient agar	30
Staphylococcus aureus KCTC1621	Nutrient agar	37
Lactobacillus plantarum KCTC3104	MRS + 0.5% Lactose medium	37
Pseudomonas fluorescens KCTC1645	Nutrient agar	26
E. coli O157:H7	Nutrient agar	37
Pichia membranaefaciens KCTC7006	Malt extract agar	25

15분간 가열 처리하여 냉각한 후 액체 배지에 가하였다. 액체 배지에 접종한 균은 최종 농도가 105cfu/ml가 되도록 조정하였으며, 37°C에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

결 과

항균 작용의 검정

한천올리고당의 식중독균(*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7), 전분질 식품 부패균(*Bacillus subtilis*), 냉장저장 육류부패균(*Pseudomonas fluoresens*), 김치발효균(*L. plantarum*) 등에 대한 항균 효과 검증 결과는 Fig. 1과 같다. 한천올리고당의 첨가 시 *S. typhimurium*, *B. cereus*와 *L. plantarum*, *P. fluoresens*에는 항균 효과가 없었으나, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus mutans*에 대해

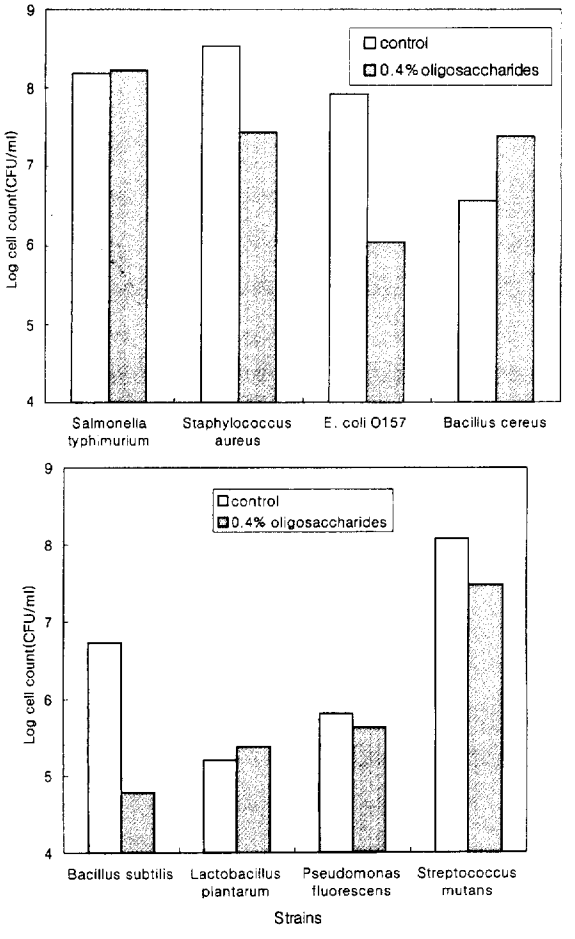

Fig. 1. Antibacterial activity of agarooligosaccharides toward various bacteria

항균성을 나타내었으나 그 효과는 크지 않았다. 전분 식품 부패균인 *Bacillus subtilis*는 생균이 검출되지 않는 높은 항균성을 보였다. 따라서 한천올리고당의 항균활성 연구는 항균효과가 나타난 네 가지 균주를 중심으로 진행하였다.

올리고당의 pH 안전성을 결정하기 위하여 0.4% 한천올리고당액에 HCl 또는 NaOH를 가하여 pH를 2~8로 맞춘 후 10°C에서 24시간 방치하였다. 이를 다시 pH 6~8로 조절한 후 0.1 ml를 액체 배지에 첨가하였다. 선택된 균주를 각각 1백금이 접종하고, 48시간 배양한 후 생균수를 측정하였다. 그 결과는 Table 2와 같으며, 한천올리고당액의 pH는 항균효과에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 따라서 한천올리고당은 pH의 변화에 안정하다고 판단되며, *E. coli*에 대한 한천올리고당의 항균 활성으로 pH 6.0에서 유의적으로 크게 나타났다.

한천올리고당의 가공 적성

올리고당 자체에 항균활성이 있는지, 아니면 불순물로 존재하는 어떤 물질과의 반응에 의하여 항균작용이 나타나는지를 살펴보았다. 이를 위하여 실제로 가열과 여과 등의 공정을 거치는 인위적인 반응을 유도하거나 제거하였을 때 발생하는 현상을 조사하였다. 이를 위하여 불순물을 함유한 것으로 추정되는 올리고당액과 올리고당액을 autoclave한 것 그리고 순수한 neoagarotetraose를 동일 농도로 균액 배지에 가하여 48시간 배양한 후 생균수 변화를 측정하였다. 배지에 올리고당을 첨가하지 않은 것을 대조구로 하였으며, 그 결과는 Table 3과 같다.

그 결과 neoagarotetraose 단독 사용과 한천올리고당액을 0.2 μm filter로 여과시킨 것에는 항균 효과가 전혀 나타나지 않아 항균 효과는 순수 한천올리고당만으로 이루어지는 것은 아닌 것으로 판단된다. 즉, 다른 성분과의 상승 작용이 항균 효과에 영향을 미치는 것으로 추정된다. 또한 가열 공정 처리한 것은 시험 균주가 1/100으로 감소하여 항균성이 증가함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 통하여 항균성은 올리고당액 중 아미노산 또는 펩타이드와 올리고당의 maillard 반응에 인하여 생성된 화합물에 의해 생성되는 것

Table 2. pH stability of agarooligosaccharides for antibacterial activity toward the various bacteria.

Microorganism \ pH	Log cell count(cfu/) 2	4	6	8
Sterptococcus mutans	1.4×10^7	4.2×10^7	6.1×10^7	7.8×10^7
Bacillus subtilis	6.9×10^4	7.0×10^4	7.2×10^4	7.4×10^4
Staphylococcus aureus	5.4×10^7	4.3×10^7	3.2×10^7	3.4×10^7
E. coli O157:H7	9.4×10^6	5.8×10^6	1.3×10^6	5.4×10^6

Table 3. Effect of processing conditions on the antibacterial activity toward various bacteria.

Microorganism \ Processing conditions	Log cell count (cfu/ml)			
	control	autoclave	filter	neoagarotetraose
Sterptococcus mutans	4.0×10^8	7.0×10^6	6.0×10^8	8.0×10^7
Bacillus subtilis	8.0×10^6	2.5×10^4	4.0×10^6	6.5×10^6
Staphylococcus aureus	7.0×10^8	1.0×10^7	9.5×10^8	4.5×10^8
E. coli O157:H7	9.0×10^7	6.0×10^4	3.0×10^7	2.0×10^8

으로 판단된다.

한천올리고당과 아미노산 혼합액의 가공 적성

항균 효과가 잘 나타나지 않는 0.2% 올리고당액에 13종류의 아미노산을 0.1M 농도로 가하여 항균 작용을 살펴본 결과는 Table 4와 같다. *Streptococcus mutans*의 경우 alanine, lysine, phenylalanine의 아미노산이 항균 활성에 상승 작용을 나타내었으며, glycine의 항균 활성은 다소 떨어졌으나 비슷한 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 E. coli O157:H7에서도 유사하였으나, cysteine과 proline을 첨가한 경우 항균 활성이 상승하는 특이성을 보이기도 했다. *Staphylococcus aureus*는 cysteine이 항균 효과를 나타내었고 다른 아미노산의 첨가는 항균 효과에 별다른 영향을 미치지 않았다.

Table 4. Effect of amino acid addition on the antibacterial activity of agarooligosaccharides

(unit:cfu/ml)

Amino acid	*Streptococcus mutans*	*Staphylococcus aureus*	*E. coli* O157:H7
Ala	1.2×10^4	6.2×10^7	3.2×10^4
Val	3.5×10^7	3.7×10^8	6.4×10^8
Leu	4.9×10^8	5.2×10^8	5.5×10^8
Ser	2.7×10^8	3.1×10^7	6.1×10^8
Cys	1.2×10^7	1.4×10^6	3.4×10^5
Met	3.7×10^8	6.1×10^7	2.5×10^8
Asp	5.1×10^7	5.5×10^8	5.8×10^7
Arg	3.6×10^7	1.7×10^8	2.9×10^8
Lys	2.5×10^4	2.3×10^5	4.2×10^4
Trp	1.9×10^8	7.4×10^7	1.7×10^8
Gly	4.3×10^5	3.5×10^6	3.1×10^4
Phe	2.5×10^4	8.1×10^7	5.2×10^4
Pro	7.2×10^8	4.9×10^8	2.8×10^5
Control	4.5×10^7	3.9×10^8	6.7×10^6

고 찰

본 연구를 통하여 한천올리고당은 비교적 낮은 농도로도 *B. subtilis*에 강한 항균 활성을 보였으며, 가열 과정이 항균 활성에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 따라서 최근 소개되고 있는 무균화포장법에 이용되는 산미료 대체용으로 사용이 가능할 것으로 생각된다. 특히 산미료의 신맛에 대한 소비자의 불만을 잠재울 수 있을 뿐만 아니라 생리활성물질인 올리고당의 첨가라는 특수성을 부각시킬 수 있을 것으로 판단된다.

한천올리고당의 항균 활성과 가공 적성에 대한 연구를 통하여 한천올리고당에 아미노산 중 alanine, lysine, glycine, phenylalanine을 혼합 사용한다면 비교적 높은 항균 활성을 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 이와 같이 한천올리고당에 아미노산을 첨가함으로써 최종 제품의 정미효과와 일부 필수아미노산의 첨가로 인한 제품의 영양적인 측면이 강조되어 상품성 부각에도 효과를 거둘 수 있으리라 본다. 또한 *Streptococcus mutans*은 치아에 플라그를 형성하여 충치발생과 염증 등을 유발하므로 한천올리고당에 alanine, lysine, phenylalanine 등을 혼합하여 검이나 치약에 사용한다면 항균 효과를 볼 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1997년 해양 수산부의 수산특정연구개발사업의 일환으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

국문요약

한천은 비교적 풍부한 수산자원의 하나이나 그 가공 수준은 매우 미약하여 상당수가 폐기되고 있다. 한천의 이용률과 부가가치를 높이기 위하여 한천올리고당의 미생물학적 활성에 관한 연구를 수행하였다. 식품 부패 및 식중독균에 대한 억제 효과는 0.4% 한천올리고당을 첨가한 경우 포도상구균과 대장균 O157:H7에 대하여 항균활성을 나타내었다. 한천올리고당은 pH의 변화에 매우 안정하여 pH는 항균활성에 영향을 주지 않았다. 또한 가압멸균할 경우 항균효과가 현저히 증가함을 보였다. 한천올리고당의 가공 적성을 알아본 결과 아미노산 중 alanine, lysine, glycine, phenylalanine을 혼합하면 항균 활성이 증가함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 농수축산신문: 한국식품연감. 서울 (1995).
2. 河野每明, 德永降久, 日高秀昌, 三好照三, 北川廣進, 平賀哲男, 片所 功: 新規有用 heterooligoの研究-neoagarooligo糖の性質. 日本農藝化學會大會講演要旨集, p.777, Tokyo (1987).
3. 河野每明, 日高秀昌: Neoagarooligo糖の特性と生產技術, Nippon Nogeikagaku Kaishi, **63**(6), 1126 (1989)
4. Bass, G.K. : Methods of testing disinfectants, In disinfection & Sterilization" 2nd(ed.), Block, S.S., ed., Lead and Febiger, Philadelphia p.49 (1977).
5. Beuchat, L.R. and Golden, D.A.: Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol., **43**, 134 (1989).
6. Davidson, P.M. and Post, D.s.: Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In Antimicrobials in Foods. Branen, All and Division, P.M., (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, p. 371 (1983).
7. 정병선, 이병구, 심선택, 허정근 : 쑥씨 중의 정유성분이 미생물의 생육에 미치는 영향, 한국식문화학회지, **4**, 417 (1989).
8. Conner, D.E. and Beuchat, L.R. : Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. J. Food Sci., **49**, 429 (1984).
9. Shelef, L.A. Nagilk, O.A. and Bogen, D.W.: Sensitivity of some common food borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. J. Food Sci., **45**, 1042 (1980).
10. Branen, A.L., Go, H.C. and Genske, R.P.: Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptoccus diacetiliactis* and *Luconostoc citrovorum*. J. Food Sci., **40**, 446 (1975).
11. Pulusani, S.R., Rao, D.R. and Sunki, G.R.: Antimicrobial activity of lactic cultures-Partial purification and characterization of antimicrobial compouds produced by *Streptococcus thermopnilus*. J. Food Sci., **44**, 575 (1979).
12. Abdel-Bar N., Harris, N.D. and Rill, R.L.: Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. J. Food Sci., **52**, 411 (1987).
13. Kong, J.Y., Bae, S.K., Hwang, S.H., Ha, S.D., Kim, H.T., Kim, S.K. and Kim, B.J.: Purification of extracellular agarase from marine bacterium(*Pseudomonas* sp. W7) and molecular cloning of the agarase gene, Kor. J. Biotechnol. Bioeng., **11**(1), 37 (1996).
14. Leon, O., Quitana, L., Peruzzo, G. and Slebe, J.C.: Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain C-1, Appl. Environ. Microbiol., 58 (12), 4060-4063 (1992).
15. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem., **31**(3), 426 (1959).
16. Morrice, L., McLean, M., Long, W. and Williamson, F. : -Agarases I and from *Pseudomonas atlantica*, Eur. J. Biochem., **137**, 149 (1983).