J. Fd Hyg. Safety 15(4), 282–286 (2000)

Bacillus cereus ASK 202의 β-Agarase가 생산한 한천올리고당의 항 돌연변이성 및 면역활성에 관한 연구

홍정화† · 윤호경 · 강민철* · 윤현주** · 변대석*** · 공재열***
*인제대학교 식품과학부, *식품의약품 안전청 부산지청*
***인제대학교 생명공학부, ***부경대학교 식품생명공학부**

Antimutagenic activity and Immunologic activity of Agarooligosaccharides Produced by β-Agarase from *Bacillus cereus* ASK 202

Jeong-Hwa Hong†, Ho-Kyoung Youn, Min-Chul Kang*, Hyun-Joo Youn, Dae-Seok Byun*** and Jai-Yul Kong*****
School of Food Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea
**Korea Food & Drug Administration, Pusan 608-080, Korea*
***School of Biotechnology& Biomedical Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea*
****Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea*

ABSTRACT – Agarooligosaccharides were produced by β-agarase from *Bacillus cereus* ASK 202. LD_{50} of Agarooligosaccharides was determined to be 1359 mg/kg which corresponded to GRAS material. Agarooligosaccharides at 5% level exhibited 88.3% inhibition on TA98 and 54% on TA100, indicating agarooligosaccharides to be potent antimutagenic substance. Immunologic activity of agarooligosaccharides was also confirmed by mouse spleen cell culture. Agarooligosaccharides addition of 200 μl/ml stabilized spleen cells (2.5×10^6 cells/ml) as compared to control (6.4×10^4 cells/ml).

Key words □ Agarooligosaccharides, antimutagenic substance, Immunologic activity

최근 해양생물에 대한 관심이 높아지면서 해양동물,[1-2] 해조류[3-5] 그리고 해양미생물[6-10]등의 생리활성물질에 관한 연구가 당단백질과 다당류를 중심으로 활발히 진행되고 있다.[11] 한천은 agarose와 agaropectin를 기본 구성 단위로, 70%가 agarose로서 3,6-anhydro-α-L-galactopyranosyl-(1,3)-D-galacto pyranose가 β-(1,4)결합한 hetero polymer 형태인 D, L-galactan이다. 한천올리고당은 한천을 효소로 분해하면 생성되는 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.[12,13]

천연물에서 유래된 다당류는 다양한 생물활성을 나타낸다. 특히 그 중에서 면역활성 작용을 갖는 다당류는 생체의 방어기전을 이용하여 항암효과가 있는 물질로 개발하려는 시도에서 매우 관심있게 연구되는 분야이다.[14] 한편 돌연변이가 암 유발의 초기 단계에서 매우 중요한 작용을 하며, 현재까지 밝혀진 대부분의 발암물질이 돌연변이원이라는 공통점은 돌연변이를 억제할 수 있는 물질은 항발암작용을 가질 수 있다는 것을 의미한다.[15]

본 연구에서는 항암효과와 같은 생리활성에 관한 연구가 거의 되고 있지 않은 한천올리고당의 면역활성 작용과 항돌연변이원성을 평가하여 항암 물질로서의 생리활성을 탐색하고자 한다. 또한 급성독성실험을 통하여 식품으로서의 안전성을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

한천올리고당 생산

Bacillus cereus ASK 202가 생산하는 β-Agarase 효소로 한천을 분해하여 한천올리고당을 생성하였다.[16]

†Author to whom correspondence should be addressed.

한천올리고당 조성

한천올리고당의 조성은 중합도가 2, 4, 6인 것이 각각 40%, 40%, 10%이고 나머지 10%는 중합도가 8이상인 것을 사용하였다.

LD_{50}추정 실험

실험동물의 준비와 실험동물처리

실험동물은 한국화학연구소에서 공급 받은 ICR계 마우스로 5주령의 20~25 g 체중의 수컷을 각 군당 10마리 선택하여 실험에 이용하였으며, 실험동물의 사육환경은 동일하게 하였다. 투여량은 Table 1과 같은 비율로 생리식염수에 녹여 개체당 0.5 ml씩 복강투여하였으며, 대조군은 생리식염수를 주었다. 경구 치사량을 측정하기 위해서 피검약을 생리식염수에 Table 2의 농도가 되도록 녹여 개체당 1 ml씩 경구투여하였다. 피검약을 투여 후 24시간 동안 2시간 주기로 관찰하여 생사여부와 중독증상 등을 관찰하였다.

변이원성 실험

복귀돌연변이시험 균주 및 균주의 test

본 실험에 사용된 *Salmonella typhimurium* TA-98 (KCTC 2053)과 TA-100(KCTC 2054)은 KCTC에서 분양받았다. 실험에 사용하기 전 이 균주들은 Maron과 Ames[17-20]의 방법으로 genotype test, spontaneous reversion, ampicillin test, Rfa test 등을 거쳐 검정하였다.

항돌연변이원성 검사

Table 1. LD_{50} of agarooligosaccharide by intravenous injection.

Group	Dosage (mg/kg, i.p.)	Lethal rate (%)
1	1000	0
2	1125	25
3	1250	50
4	1375	50
5	1500	75
6	1750	75
7	2000	100

Table 2. LD_{50} of agarooligosaccharide by oral injestion.

Group	Dosage (mg/kg, i.p.)	Lethal rate (%)
1	1000	0
2	1125	25
3	1250	50
4	1375	50
5	1500	75

본 실험에 이용하였던 preincubation test는 S9 mixture 0.5 ml(간접돌연변이원인 경우), 12시간 배양된 균주($1\sim2\times10^9$ cells/ml) 0.1 ml, 희석된 시료 50 μl를 ice bath에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex한 후, 37°C에서 30분간 예비 배양 하였다. 45°C의 top agar(0.6% agar) 2 ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하였고, 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였고 돌연변이 억제효과 정도를 알아보았다. 돌연변이 억제 효과 정도(Inhibition rate)는 아래 식에 의해 계산하였다.[21]

$$\text{Inhibition rate } (\%) = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

a: 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이 수
b: 시료 처리하였을 때의 복귀돌연변이 수
c: 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수

비장세포의 배양

생후 8주된 BALB/C 생쥐 암놈의 비장을 분리하여 적혈구를 제거한 비장세포 현탁액을 배양하였다. 비장세포를 배양액 1 ml당 백만개가 되게 만든 후 24 well plate를 이용하여 각각 2 ml씩 분주하여 배양을 시작하였다. 3개의 well에 한천올리고당을 10 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 250 μg/ml씩 첨가하여 배양을 시작하였다. 매 3일마다 발전의 배양액을 제거한 후 같은 양의 한천올리고당이 첨가된 새로운 배양액을 보충하면서 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양을 하였다. 대조군은 시료가 첨가되지 않은 비장세포를 같은 조건에서 배양하였다.

결과 및 고찰

급성독성 시험

급성독성 실험결과는 Table 1, 2와 같다. 이의 결과로부터 Behrens-Kärbar법[22]에 의해 LD_{50}을 계산한 결과 한천올리고당의 LD_{50}은 1359 mg/kg이었다. 얻어진 갈락토올리고당의 LD_{50}치는 1500 mg/kg, 전이갈락토올리고당의 LD_{50}은 1500 mg/kg와 거의 유사하였다.[23] 이들에 관한 만성독성, 아급성독성시험에서 종양의 발생은 확인되지 않았으며, 4 g/kg을 35~180일간 연속투여에서도 안전성에 문제가 없는 것으로 보고되었다. 한천은 FAO/WHO 합동국제식품규격계획위원회의 식품첨가물 리스트에서 ADI(사람의 하루섭취 허용량 mg/kg)로 제한되지 않는 것으로 분류되어 있다.[24] 또한 키틴·키토산의 산분해물인 다당류에서도 급성독성은 보고되지 않고 있어서 대부분의 올리고당류들이 거의 무해한

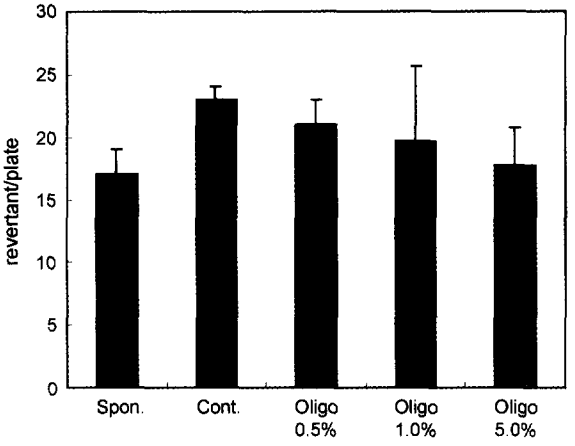

Fig. 1. Antimutagenecity effect of agarooligosaccharide on TA98.
Spon: spontaneous reversion
Cont: control
Oligo: agarooligosaccharides added at the indicated level

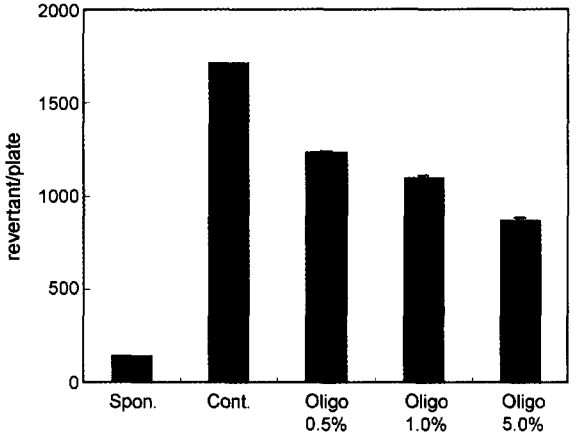

Fig. 2. Antimutagenecity effect of agarooligosaccharide on TA 100.
Spon: spontaneous reversion
Cont: control
Oligo: agarooligosaccharides added at the indicated level

것으로 보고[25]된다. 본 연구에 사용된 마우스에서도 급성독성시험 결과 종양이나 다른 독성 증상은 관찰되지 않았다. 따라서 한천올리고당은 GRAS(Generally Recognized As Safe) 등급에 해당하는 무해첨가물로 판단된다.

항돌연변이효과

가. 한천 올리고당 농도에 따른 TA98 및 TA100의 항돌연변이 효과

Fig. 1은 직접돌연변이원인 MNNG의 농도를 0.30 μg/μl으로 TA98 균주에 한천올리고당의 농도를 달리하여 Ames test를 한 결과이다. Spontaneous는 17, control은 23revertant/plate을 보임으로써 대조군에 비해 자연복구돌연변이의 수치가 감소함을 알 수 있었다. 또한 한천올리고당 첨가군에서 0.5% 첨가군은 21 revertant/plate인 반면, 5.0% 첨가군은 17.7revertant/plate를 나타내어 한천올리고당을 첨가하는 것이 균주의 돌연변이를 저해하는 것으로 나타났다.

Fig. 2는 직접돌연변이원인 MNNG의 농도를 0.35 μg/μl으로 TA100 균주에 한천올리고당의 농도를 달리하여 Ames test한 결과이다. 실험에 사용된 Spontaneous는 136, control은 1709 revertant/plate을 보임으로써 대조군에 비해 자연복귀 돌연변이의 수치가 감소하였고, 한천올리고당 0.5% 첨가군은 1230 revertant/plate를 보였다. 반면 5.0% 첨가군은 863 revertant/plate를 나타내어 한천올리고당을 첨가한 군이 대조군보다 균주의 돌연변이를 저해하는 효과가 큼을 알 수 있었다.

Fig. 1과 2의 한천올리고당 농도에 따른 균주의 항돌연변이 효과를 inhibition rate(%)로 Fig. 3에 나타내었다. 한천

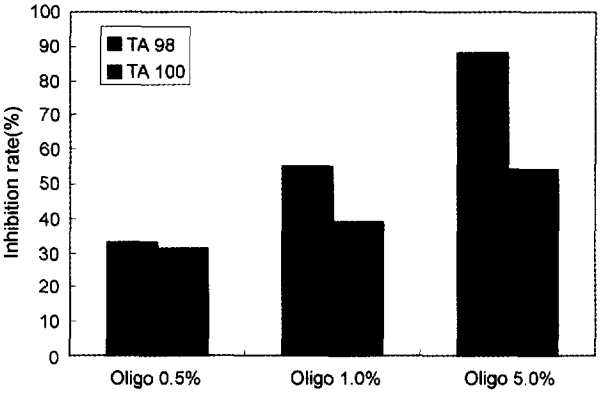

Fig. 3. Effect of agarooligosaccharide concentration on the mutagenecity of TA100 (2054).
Oligo: agarooligosaccharides added at the indicated level

올리고당 5% 농도에서, TA98 균주에 있어 88.3%의 저해효과를 나타내었고, TA100 균주는 54%의 항돌연변이 효과를 보였다. 이와 같이 TA98이 TA100보다 수치상으로 그 저해율이 높아 한천올리고당이 항돌연변이 생리활성이 있음을 입증할 수 있었다.

비장세포의 배양

비장은 생체내에서 혈액을 통하여 침투한 항원이 대식세포와 B 임프구 그리고 T 임프구 등과 상호작용하여 면역반응이 일어나는 장소로 잘 알려져 있다.[26-27]

비장세포 현탁액의 배양에 한천올리고당을 첨가하여 배양한 결과, 배양을 시작한지 10일째부터 대조군과 시료를 첨가한 배양군간에 차이가 나타나기 시작하였다. 한천올리

Table 3. The effects of agarooligosaccharide on the mouse spleen cell culture.

Agarooligosaccharide (μl/ml)	cells/ml(at 37°C incubation)	
	10 day	20 day
control	1.6×10^5	6.0×10^4
10 μg/ml	2.0×10^5	8.0×10^4
25 μg/ml	3.6×10^5	2.4×10^5
50 μg/ml	3.4×10^5	1.0×10^5
100 μg/ml	3.6×10^5	1.4×10^5
200 μg/ml	2.0×10^6	2.5×10^6

고당을 첨가하지 않은 대조군과 200 μg/ml 이하의 한천올리고당을 첨가한 배양군에서는 비장세포의 수가 줄어들었으나, 한천올리고당 200 μg/ml를 첨가한 배양군에서는 세포의 수가 줄어들지 않고 성장함을 관찰할 수 있었다. 배양 20일이 지난 후 대조군에서는 비장세포의 수가 급격히 감소하였으나 한천올리고당 200 μg/ml를 첨가한 배양에서는 세포수가 전혀 줄어들지 않고 잘 자라고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 200 μg/ml 이하의 한천올리고당을 첨가한 배양에서는 세포수가 더 이상 줄어들지 않고 자라고 있음이 관찰되었다.

Table 3은 한천올리고당 농도에 따른 비장세포수의 변화 결과이다. 이를 통하여 면역반응에 관여하는 비장 세포들은 한천올리고당의 첨가로 인하여 장기간 생존함을 알 수 있었으며, 한천올리고당은 비장세포의 성장에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이러한 사실은 한천올리고당이 생체내에서 면역반응에 영향을 미칠 수도 있음을 간접적으로 제시해 주는 것이다.

감사의 글

본 연구는 1997년 해양 수산부의 수산특정연구개발사업의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

한천올리고당을 식품으로 활용하기 위한 전제 조건인 안전성 실험결과, 한천올리고당의 LD_{50}은 1359 mg/kg으로 GRAS(Generally Recognized As Safe)등급에 해당하는 무해첨가물에 해당되었다. 또한 5% 한천올리고당의 항돌연변이 효과는 TA 98균주에 88.3%, TA 100균주에 54%의 저해효과를 나타내어 강력한 항돌연변원성 물질임을 알 수 있었다. 한천올리고당의 면역활성을 평가하기 위하여 비장세포에 한천올리고당을 200 μl/ml 첨가하여 배양한 결과, 대조군과 비교시 배양 20일 이후에도 비장세포수가 감소하지 않아 한천올리고당의 면역증진 효과를 알 수 있었다.

참고문헌

1. Kamiya, H., Muramoto., Goto, R. and Yamazaki, M.: Characterization of the antibacterial and antineoplastic glycoprotein in a sea hare aplysia juliana. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 773-777 (1998).
2. Cho, K. J., Lee, Y. S. and Ryu, B. H.: Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma 180. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **23**, 345-352 (1990).
3. Konishi, F., Mitsuyama, M., Okuda, M., Kuniaki, T., Hasegawa, T. and Nomoto, K.: Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of Chlorella vulgaris against myelosuppression by 5-fluorouracil. Cancer *Immunol. Immunother.*, **42**, 268-274 (1996).
4. Ryu, H. S., Moon, J. H. and Suh, J. S.: Chemical compositions of glycoprotein and chondrotin sulfates from sea cucumber (Stichopus japonicus). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 72-80 (1997).
5. Moon, J. H., Ryu, H. S., Yang, H. S. and Shu, J. S.: Antimutagenic and anticancer effects of glycoprotein and chondroitin sulfate from sea cucmber (Stichopus japonicus). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 350-358 (1998).
6. Okai, Y., Okai, K. H. and Nakamura, S.: Identification of heterogenous antimutagenic activities in the extract of edible brown seaweeds, Laminaria japonica and Undaria pinnatifida by the umu gene expression system in Salmonella typhimurium (TA1535/pSK1002). *Mutation Research*, **303**, 63-70 (1993).
7. Okutani, K. and Kobayashi, H.: Isolation and fractionation of extracellular polysaccharide from marine vibrio. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 493-496 (1985).
8. Okutani, K.: The structure of an extracellular polysaccharide from a marine strain of enterobacter. *Nippon Suisan Gakkaish*, **57**, 1949-1956 (1991).
9. Okutani, K.: A viscous antitumor substance obtained from a marine bacterium No. 9-12. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 323-326 (1977).
10. Tandavanitj, S., Ishida, S. and Okutani, K.: Isolation and characterization of extracellular mucopoly-saccharide produced by a marine strain of pseudomonas. *Nippon Suisan*

Gkakaishi, **55**, 2015-2019 (1989).
11. 이종열, 류홍수, 문정혜, 서재수: 개불에서 추출한 당단백질의 항암효과 및 면역활성, **28**(4), 917~923 (1999).
12. 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).
13. 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).
14. 이강노, 지옥표, 곽종환, 김영식, 박호군, 구경아, 윤현주: Artemisia속 생약의 다당류 분획 연구 (I), 생약학회지, **24** (4), 1993.
15. 최영현, 김은영, 박건영, 이숙희, 이원호: 어성초즙 및 추출물의 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회지, **23**(6), 916-921 (1994).
16. 홍정화, 이재진, 최희선, 허성호, 공재열: *Bacillus cereus* Ask 202가 생산한 한천올리고당의 항균효과, 식품안전성학회, **15**(4), (2000).
17. 전유진, 김세권, 키틴·키토산 및 그 올리고당의 면역작용에 의한 항종양활성, Vol. 7, No. 2, 1997, 생명과학회지
18. 윤택구: 암의 원인과 환경. 한국환경성돌연변이 발암원 학회지, **1**, 39 (1981).
19. 류태형: 식품, 영양과 암의 관계. 한국영양식량학회지, **14** (3), 305 (1985).
20. 한국과학재단: 녹황색 채소 및 민간 항암 약재로 부터의 항돌연변이 및 항암물질의 분리, 동정과 이들의 생화학적 항암 기작에 관한 연구 (1993).
21. 김민선, 배재민, 박희준, 정해영, 양한석, 최재수, 박건영: 개오동나무 수피로 부터 항돌연변이 물질의 분리. 한국 환경성 돌연변이발암원 학회지, **12**(2) 147 (1992).
22. 박희준, 문숙희, 박건영, 최재수, 정해영, 양한석, 서석수: 와송의 항돌연변이효과. 약학회지, **35**(4) 253 (1991).
23. Cran, P.S., Rhee, S.V. and Steel, D.F.: Experiednce with 1079 case of cancer of the stomach seen in Korea from 1962 to 1968. *Amer. J. Surgery*, **120**, 747 (1970).
24. 박건영, 문숙희, 백형석, 최홍식: 된장의 Aflatoxine B_1에 대한 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회지, **19**(2), 156 (1990).
25. 박건영, 이규복: 재래식 된장, 간장 제조중 Aflatoxine B_1의 파괴에 관한 연구. 부산대학교 가정대학 연구보고서, **13**, 49 (1987).
26. 박건영, 문숙희, 이숙희: 된장의 항돌연변이 효과 - 된장찌게 및 된장국의 Aflatoxine B_1에 대한 돌연변이유발 억제 효과. 한국환경성돌연변이, 발암원학회지, **14**(2), 145 (1994).
27. 粟飯原景昭 內山 充 編著, 食品의 安全性 評價, 한림원, 133-163 (1993).