

항산화 물질을 생산하는 해양 미생물의 분리 · 동정 및 배양 특성 조사

김현진 · 여수환 · 조성춘 · 배동원¹ · 윤정훈² · 황용일 · 이승철*
경남대학교 생명과학부, ¹경상대학교 공동실험실습관, ²한국생명공학연구원

Isolation and Identification of Antioxidant-producing Marine Bacteria and Medium Optimization. Kim, Hyun-Jin, Soo-Hwan Yeo, Sung-Choon Cho, Dong-Won Bae¹, Jung-Hoon Yoon², Yong-Il Hwang, and Seung-Cheol Lee*. Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea, ¹Central Laboratory, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea, ²KRIBB, P.O. Box 115, Yusong, Daejeon 305-600, Korea – For the research of the natural marine antioxidant, several bacteria were isolated from the coast of Jin-Hae in Korea. Among the marine bacteria studied, strain HJ-14, a gram-negative, motile, straight rod, aerobic, and Na⁺ required bacterium showed high activity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging. The morphological, physiological, and biochemical characteristics of the strain HJ-14 were similar to those of the *Alteromonas macleodii* ATCC 27126^T. Thus, it was tentatively identified as *Alteromonas* sp. HJ-14. The compositions of major fatty acids in cell membrane of *Alteromonas* sp. HJ-14 were C_{14:0}, C_{15:0}, C_{16:0} and C_{17:1 w8c}, which also suggest that it is affiliated with *Alteromonas* sp. The optimum culture conditions for production of antioxidant materials with *Alteromonas* sp. HJ-14 were at 25~37°C and pH 6~8. The optimum conditions for the production of antioxidant for carbon, inorganic nitrogen, and sodium chloride sources were 2.5%(w/v) dextrin, 0.5%(w/v) ammonium sulfate, and 2~6%(w/v) sodium chloride, respectively. The hydroxyl radical scavenging ability of *Alteromonas* sp. HJ-14 broth was 90.03%, which is higher than ascorbic acid(83.28%) and lower than butylated hydroxyanisole(95.46%) and α -tocopherol(97.17%).

Key words: Antioxidant, *Alteromonas* sp., identification, optimum culture condition

서 론

활성산소는 동물과 식물에 존재하며, 특히 외부로부터 미생물이 체내에 침투하면 반응성이 강한 활성산소가 세포막 주위에 만들어져 외래 미생물을 제거하는데 사용된다. 그러나, 이러한 활성 산소가 체내에서 너무 많이 생성되면 단백질, DNA, 효소 등에 피해를 주게 된다[7,13]. 과도하게 생성된 활성 산소를 제거하기 위하여 인체에서는 SOD를 비롯해 비타민 C, E 등의 방어기작들이 작용한다. 인체가 자외선, 방사선, 농약, 의약품, 중금속, 스트레스[10]에 의해 생성되는 xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase에 의해 활성 산소가 많이 생성되어 방어기작이 한계에 도달하면 암, 백혈병, 뇌졸중, 심근경색, 간염, 당뇨병 등의 질환이 발생하게 된다. 활성산소는 크게 라디칼과 비라디칼로 구분되며, 라디칼로는 superoxide, hydroxyl, peroxy, alkoxy, hydroperoxy 등이 있고, 비라디칼은 hydrogen peroxide, hypochlorous acid, ozone, singlet oxygen, hypobromous acid 등이 있다[11]. 한편, 과산화 지질 또한

인체에 여러 가지 질병을 유발하는데, 활성산소는 과산화 지질보다 훨씬 반응성이 큰 반면 체내에서 빨리 소멸되고, 과산화지질은 활성산소보다 반응성은 약하지만 체외로 배설되지 않고 서서히 조직을 파괴하는 성질이 있다. 과산화 지질은 주로 불포화지방산과 활성산소가 반응하여 생성하게 된다.

항산화 물질은 일반적으로 활성산소와 과산화 지질의 제거 물질로서, 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, t-butylhydroquinone 등이 널리 사용되어 왔으나, 이 물질들에 대한 안전성이 재검토되면서 사용 규제가 강화되고 있다[6]. 따라서 천연 항산화 물질에 대한 개발의 필요성이 대두되면서, 최근에는 여러 종류의 식물에서 항산화 물질 연구가 활발히 진행되고 있다[1,3,18]. 그러나, 식물에서의 연구에 비해 미생물에서는 비교적 연구가 미약하지만, 곰팡이[2,14,24], 효모[25], 세균[8,29] 등에서 항산화 물질에 대한 보고가 있다. 해양 유래 항산화 물질에 관해서는 세균[20,26,29]과 해조류[21]에서 보고된 바 있다.

본 연구에서는 해양 유래 항산화 물질을 생산하는 미생물을 탐색 · 동정하고, 배지 조성 최적화 및 온도, pH 등의 배양조건을 검토하여 항산화 물질 생성 특성을 보고하고자 한다.

*Corresponding author
Tel. 82-55-249-2684, Fax. 82-55-249-2995
E-mail: sclee@kyungnam.ac.kr

재료 및 방법

재료 및 시약

균주 배양에 사용된 기본배지는 Difco Co.(USA)의 Marine broth를 사용하였다. 균주 동정에서 사용된 시약에서 *Vibrio* 및 *Pseudomonas* 확인 실험은 각각 TCBS(Difco Co. USA), Pseudomonas Agar Base(Oxoid Ltd., England)를 사용하였다. 그람염색은 Difco Co.(USA)를 사용하였고, lipase, gelatinase, amylase 실험은 Sigma Co.(USA)의 tributyrin, gelatin, soluble starch를 사용하였다. 균주 동정에서 당 이용 및 기타 실험은 Sigma Co.(USA) 및 시중에 시판되는 특급품을 구입하여 사용하였으며, 배지 최적 성분에서 사용된 탄소원 및 무기질소원 또한 특급품 이상을 사용하였다. 항산화 활성 측정에 사용된 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 및 2-deoxyribose는 Sigma Co.(USA) 제품

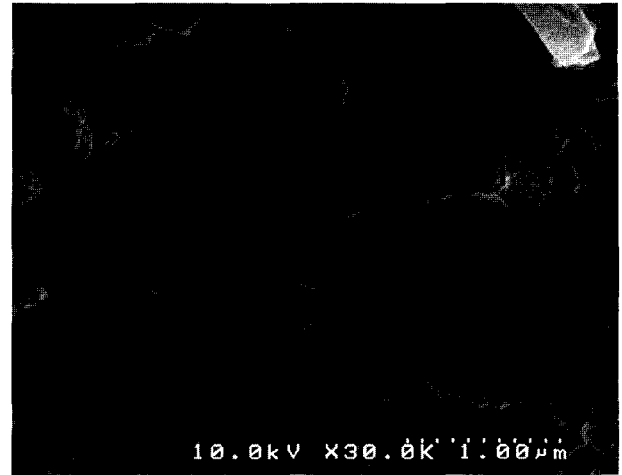


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the strain HJ-14. Bar indicates 1 μ m length.

Table 1. Differential phenotypic feature of isolate HJ-14 and *Ateromonas macleodii* ATCC 27126^T.

Characteristics	Strain HJ-14	<i>A. macleodii</i> ATCC 27126 ^T	Characteristics	Strain HJ-14	<i>A. macleodii</i> ATCC 27126 ^T
Gram reaction	-	-	Catalase	+	+
Cell shape	St	St	Oxidase	+	+
Growth at:			Urease	-	-
4°C	-	-	V · P	-	-
35°C	+	+	ONPG	+	+
40°C	+	d	KCN	-	-
Mobility	+	+	Hydrogen sulfide	-	-
Pigmentation	-	-	Casein hydrolysis	-	+
Cell size	0.5~0.6 0.9~1.9 μ m	0.7~1.0 2.0~3.0 μ m	Esculin hydrosis	-	-
Maximum NaCl concn tolerated (%, wt/vol)	1-12	1-6	Indole producton	+	+
Na ⁺ requirement for growth	+	+	Utiliaztion of:		
Reduction of NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	-	-	D-Galactose	+	+
Amylase(Starch hydrolysis)	+	+	Cellobiose	+	+
Gelatinase	+	+	Lactose	+	+
Lipase	+	+	Salicin	+	+
Utilization of:			D-Mannitol	-	d
D-Mannose	-	-	L-Tyrosine	+	+
D-Fructose	-	+	D-Xylose	-	d
Sucrose	+	+	L-Arabinose	-	-
Maltose	+	+	D-Glucose	+	+
N-Acetylglucosamine	-	d	Acetate	-	+
Succinate	-	-	Propionate	-	+
Citrate	-	-	L-Tartarate	-	-
Glycerol	+	+	Ethanol	+	d
D-Sorbitol	-	-	Butanol	-	-
DL-Malate	-	-	Glycine	-	d
m-hydroxybenzoate	-	-	L- α -Alanine	+	+
O/F test	Oxidation	Oxidation	L-Arginine	-	d
Growth on TCBS	-		L-Lysine	-	-
Growth on			L-Ornithine	-	-
Pseudomonas Agar Base	-		Dextrin	+	
			Starch	+	+
			Raffinose	+	+

+:positive, -:negative, St:straight rod, d:11-89% of strains are positive. T:type strain

을 사용하였고, 기타 시약은 특급품을 사용하였다.

균주의 분리 및 선정

항산화 활성 물질 생성 균주의 분리는 Takao 등의 방법 [29]에 이용된 해양 미생물 분리용 평판 배지(bacto peptone(0.25%), yeast extract(0.01%), agar(1.5%), FeSO₄ · 7H₂O, sea water(50%))에 10²에서 10⁴배로 희석한 해수를 도말하여 25°C에서 5일간 배양한 후, 멸균 filter paper를 배지에 부착시켜 균체 및 대사산물이 filter paper에 묻게 한 후 떼어내었다. 0.183 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 용액을 균체 및 대사산물이 묻은 filter paper에 분사하여 색 변화로 항산화 활성 생성 균주를 분리하였다. 상기의 방법으로 분리된 각 균주들을 Marine broth에 48시간 배양한 후, 에탄올에 녹인 0.041 mM DPPH 용액 1 ml에 배양액 200 µl를 혼합하여 10분간 반응시켰다. 반응물을 4°C, 12,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후, 525 nm에서 흡광도 측정으로 활성을 가장 크게 가지는 균주를 선정하였다[17]. 항산화 활성은 전자공여능(EDA, electron donating ability)으로 표기하였으며 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$EDA(\%) = \left[1 - \frac{(\text{absorbance of sample at 525 nm})}{(\text{absorbance of control at 525 nm})} \right] \times 100$$

균주의 동정

최종 분리 선정된 균주의 동정은 형태학적, 생화학적 특성을 조사하여[5,28,30,31] Bergey's Manual[4]의 방법에 따라 행하였다. 균주의 형태 관찰을 위해 Marine broth agar에 24시간 배양한 균체를 60, 70, 80, 90, 95, 100% ethanol로 단계적으로 수분을 제거한 후, 최종적으로 HMDS(hexamethyldisilazane)로 수분을 제거하여 SEM(scanning electron microscope, Hitachi S-4200, Japan)으로 관찰하였다.

지방산 분석

균주의 세포 지방산 분석을 위해 Marine broth agar에 30°C, 24시간 배양한 균체의 지방산을 Microbial Identification System (MIDI ; Microbial ID)의 지침에 의해 추출하여 분석하였다.

배양조건 및 배지성분의 최적화

배양 조건 및 배지성분의 최적화는 균주의 성장에 따라 항산화 활성(EDA)이 높게 나오는 것을 선택하여 생육에 영향을 주는 각각의 성분 및 조건을 조절하여 실시하였다. 배지조건의 최적화 과정에서 탄소원 최적화 실험은 Marine broth를 기본 배지로 하여 mannitol, sucrose, fructose, xylose, sorbitol, lactose, glucose, soluble starch, dextrin을

각각 1%(w/v)로 첨가하여 수행하였다. 최적 무기 질소원은 탄소원 최적화가 결정된 배지에 ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium sulfate, ammonium phosphate, potassium nitrate, sodium nitrate를 각각 0.5%(w/v)로 첨가하여 실시하였다. Sodium chloride농도는 2, 4, 6, 8, 10%(w/v)의 농도로 각각 첨가하였으며, 균주 배양 pH는 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 조절하고, 온도는 20, 25, 30, 37°C에서 배양 조건의 최적화를 실시하였다.

Hydroxyl radical 소거활성

배양액의 ·OH소거 활성능력을 조사하기 위해 2-deoxyribose oxidation method[9]를 변형하여 측정하였다. 시험관에 0.1 mM FeSO₄/EDTA 용액 0.2 ml, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 ml, 배양액 0.2 ml와 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 1.2 ml, 10 mM H₂O₂ 0.2 ml를 가하고, 100°C 수욕조에서 10분간 반응시킨 후, 2.8% TCA(trichloroacetic acid)용액 1 ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 그 후, 1.0% TBA(thiobarbituric acid)용액 1 ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. ·OH소거 활성은 HSA(hydroxyl radical scavenging ability)로 표기하였으며 다음과 같은 식

Table 2. Cellular fatty acids profile of the strain HJ-14.

Fatty acid	Composition (%)
C _{11:0}	0.33
unknown 11.798	0.43
C _{12:0}	3.88
unknown 12.112	0.44
C _{11:0} 3OH	2.36
C _{13:0}	1.80
C _{12:0} 3OH	1.12
C _{14:0}	5.26
Sum in feature 2	1.13
iso C _{15:0}	0.32
C _{15:1} w8c	3.30
C _{15:1} w6c	1.57
C _{15:0}	8.02
Sum in feature 3	4.32
C _{16:0} N alcohol	0.43
iso C _{16:0}	0.54
Sum in feature 4	36.41
C _{16:0}	13.36
anteiso C _{17:1} w9c	0.39
C _{17:1} w8c	5.77
C _{17:1} w6c	0.37
C _{17:0}	1.72
Sum in feature 6	0.26
C _{18:1} w9c	0.48
Sum in feature 7	4.83
C _{18:0}	0.94
Sum in feature 9	0.21
C _{20:3} w6, 9, 12c	0.00
Total	99.99

으로 계산하였다.

$$\text{HSA}(\%) = \left[\frac{(\text{absorbance of sample at 532 nm})}{(\text{absorbance of control at 532 nm})} \right] \times 100$$

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

해수로부터 일차적으로 Takao 등의 방법[29]으로 항산화 물질 생성능이 있는 60개의 균주를 분리한 후, 최종적으로 Kang 등의 방법[17]을 변형하여 항산화 물질 생성능이 가장 우수한 균주를 분리하여 HJ-14라고 명명하였다. 항산화 물질을 생성하는 HJ-14는 그람 음성 간균으로 표면에 파흔 모양의 돌기가 형성되어져 있고(Fig. 1), 크기는 0.5~0.9 × 0.9~1.9 μm였다. 평판배지에 배양 시 균주의 colony는 원형으로 자라고, 배양 초기에는 표면이 불룩하다가 시간이 지나면서 오목해지는 것이 관찰되었다. 생리학적 특성은 Table 1과 같이 생육에 Na⁺가 필요하고, 운동성을 가지고 있으며, amylase, gelatinase, lipase, catalase, oxidase를 분비하였다. 한편 oxidation/fermentation 시험에서 oxidation으로 나타났고, *Vibrio* sp. 선택배지인 TCBS 배지 및 *Pseudomonas* sp. 선택배지인 *Pseudomonas* Agar Base에서도 생육하지 못했다. 이와 같은 특성은 해수 미생물 중 호기성인 *Alteromonas* sp.가 갖는 특성과 유사하였으며, 4°C에서의 성장, D-mannose,

D-fructose, sucrose, maltose, N-acetylglucosamine, succinate, glycerol, D-sorbitol, DL-malate, α-ketoglutarate, m-hydroxybenzoate의 이용 및 pigment 생성 유무를 실험한 결과, *Alteromonas macleodii*와 가장 유사함을 보였다. 또한, HJ-14 균주의 세포벽 지방산 조성은 Table 2에 나타내었으며, 이들의 주요한 지방산은 C_{14:0}, C_{15:0}, C_{16:0}, C_{17:1 w8c} 및 Sum in feature 4로 분석되어 본 균주는 *Alteromonas* 종에 속하는 것으로 밝혀졌으며, 이에 *Alteromonas* sp. HJ-14로 명명하였다.

Alteromonas sp.에 대한 최근의 계통도 연구에서 기존에 알려졌던 *A. aurantia*, *A. citrea*, *A. rubra* 등을 포함한 14 종들은 *Pseudoalteromonas* sp.로 새롭게 분류되었다[12]. *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*에서 해독제와 폐수 정화에 이용될 수 있는 exopolysaccharide의 생산이 발견되었고[23], 혈액응고를 방지하는 heparin과 비슷한 특성을 가지는 저분자 anticoagulant과[16] alginate lyase를 생산하는 경우[27]가 보고되었다.

탄소원의 영향

Alteromonas sp. HJ-14의 생육도와 전자공여능에 대한 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 기본배지(Marine broth)에 mannitol, sucrose, lactose, fructose, glucose, xylose, soluble starch, sorbitol, dextrin을 각각 1%(w/v)씩 첨가하여 조사한 결과, Table 3에서와 같이 dextrin의 경우에서 가장

Table 3. Effects of carbon, nitrogen sources, and sodium chloride concentrations on the production of antioxidant materials.

Source	Component	Cell growth (OD _{660nm})			EDA (%) ^{a)}		
		12 hrs	24 hrs	48 hrs	12 hrs	24 hrs	48 hrs
Carbon ^{b)} (1%, w/v)	Control	3.62	4.46	2.80	47.64	28.17	22.20
	Mannitol	2.83	4.52	2.48	47.95	29.94	21.14
	Sucrose	3.71	7.40	5.47	53.04	52.04	42.36
	Lactose	3.94	6.63	4.40	51.14	35.14	43.52
	Fructose	2.73	4.63	3.78	43.02	19.87	19.47
	Glucose	3.23	6.06	4.63	48.94	44.92	43.67
	Xylose	2.42	4.40	1.92	48.47	34.58	32.44
	Soluble starch	3.39	5.40	4.04	51.71	41.38	42.09
	Sorbitol	2.32	4.46	2.09	46.74	33.05	27.25
	Dextrin	4.19	8.72	4.61	56.09	54.94	45.50
Inorganic nitrogen ^{c)} (0.5%, w/v)	Control	6.05	10.04	12.04	76.02	79.01	79.67
	NH ₄ Cl	4.68	9.65	10.02	89.31	90.15	90.34
	NH ₄ NO ₃	5.02	8.45	12.35	84.34	83.15	84.16
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.12	9.45	13.15	91.05	91.35	92.10
	KNO ₃	4.68	8.12	12.98	81.06	80.68	82.47
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	7.09	7.95	13.28	89.01	82.16	82.01
	NaNO ₃	7.02	10.42	12.27	76.05	75.12	79.23
Sodium chloride concentrations ^{d)} (%, w/v)	2	5.08	8.75	12.35	88.33	87.61	89.64
	4	3.65	7.27	9.28	85.34	86.31	86.34
	6	3.42	6.14	7.99	83.64	82.12	79.69
	8	2.60	5.28	7.95	74.35	82.14	80.79
	10	1.26	4.16	7.78	44.27	72.35	74.15

^{a)}EDA (%) = [1 - (absorbance of sample at 525 nm)/(absorbance of control at 525 nm)]100. Each basal medium is ^{b)} Marine broth (Difco Co., USA), ^{c)} Marine broth/2.5% dextrin, and ^{d)} Marine broth/2.5% dextrin/(NH₄)₂SO₄. All cultures were carried out at 25, pH 7.

Table 4. Effect of dextrin concentration on the production of antioxidant materials.

Concentration (%)	Cell growth (OD _{660nm})			EDA (%)		
	12 hrs	24 hrs	48 hrs	12 hrs	24 hrs	48 hrs
0.0	3.62	4.46	2.80	47.64	28.17	22.20
0.5	4.51	6.48	4.02	50.04	48.02	42.12
1.0	4.19	8.72	4.61	56.09	54.94	45.50
1.5	6.24	8.98	8.24	62.05	63.82	60.08
2.0	6.48	8.56	10.04	70.82	72.34	68.46
2.5	6.08	8.37	9.79	73.05	77.04	72.68
3.0	5.89	9.24	9.57	70.56	79.45	73.04
4.0	6.12	7.87	8.64	72.44	72.05	71.88
5.0	5.97	7.95	8.46	71.16	73.08	74.21

Table 5. Effect of initial pH on the production of antioxidant materials.

Initial pH	Cell growth (OD _{660nm})			EDA (%)		
	12 hrs	24 hrs	48 hrs	12 hrs	24 hrs	48 hrs
5	0.34	0.26	5.69	0.84	0.68	89.96
6	6.62	8.65	11.68	90.12	89.67	90.34
7	6.15	8.45	11.87	90.84	90.13	91.02
8	8.12	11.35	11.98	90.34	88.78	90.04
9	5.12	8.71	11.81	8.05	85.01	89.34
10	3.22	5.21	5.04	0.08	0.04	0.16

전자공여능이 높게 관찰되었다. 또한, dextrin 농도의 영향을 조사하기 위해, dextrin 농도를 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5%(w/v)로 첨가한 결과는 Table 4에 나타냈다. 그 결과, 탄소원의 농도가 2%이하에서 전자공여능이 배양 초기에 높게 나타났으나, 시간이 경과함에 따라 점차 감소되는 경향을 볼 수가 있었다. 그러나, 2.5%의 dextrin에서는 전자공여능이 일정하게 유지되었는데, 이는 배양 중 dextrin이 고갈되지 않고, 영양원으로서 지속적으로 이용되어 항산화 물질을 계속 생산하는 것으로 사료된다. 한편, Table 3에서 나타낸바와 같이 mannitol, fructose, xylose, sorbitol 등의 당은 대조군과 비교해 볼 때 전자공여능 및 균주의 생육도에는 거의 영향을 미치지 않았다.

무기 질소원 및 염(NaCl) 농도의 영향

Alteromonas sp. HJ-14에 대한 무기 질소원의 영향을 조사하기 위해 ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium phosphate, ammonium sulfate, potassium nitrate, sodium nitrate를 2.5% dextrin이 함유된 기본배지에 각각 0.5%(w/v)로 첨가한 결과, ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium phosphate를 첨가한 배지에서 전자공여능이 나타났으며(Table 3), ammonium sulfate를 첨가한 배지에서 가장 우수하였다. 염(NaCl) 농도의 영향을 알아보기 위해 2, 4, 6, 8, 10%에서 전자공여능 및 균 생육도를 측정된 결과, 2%의 염 농도에서 전자공여능 및 균 생

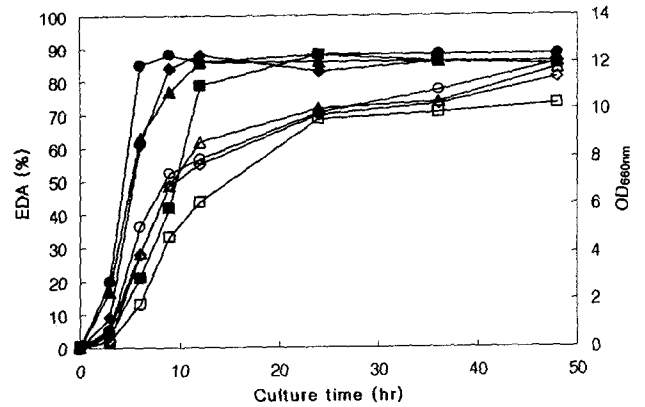


Fig. 2. Effects of culture temperature on the production of antioxidant materials. - ■-, EDA at 20°C; - ◆-, EDA at 25°C; - ▲-, EDA at 30°C; - ●-, EDA at 37°C; - □-, cell growth at 20°C; - ◇-, cell growth at 25°C; - △-, cell growth at 30°C; - ○-, cell growth at 37°C.

육도가 가장 우수하였고, 10% 염 농도에서는 12시간 배양 때에는 균주의 생육이 억제되고 전자공여능도 낮았으나 24시간 이후부터 균 성장 및 전자공여능이 증가하여 높은 염에 대한 내성이 생기는 것을 관찰할 수 있었다. 연안 해수의 염 농도(NaCl)는 1~3%(w/v)이며, *A. macleodii*는 1-6%의 염 농도에서 내성이 있다고 보고되었으나[15], *Alteromonas* sp. HJ-14는 12% 염 농도에서도 내성을 가지는 것이 관찰되었다.

초기 pH 및 배양 온도의 영향

초기 pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 기본배지의 pH를 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 조정하였다. 그 결과, pH 6~8사이에서는 전자공여능이 거의 비슷하였으나, pH 5 및 9에서는 배양 초기에 전자공여능이 억제되었다가 시간이 경과함에 따라 점차 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Table 5). 그러나, pH 10의 경우에는 중성 및 약알칼리성의 결과와는 대조적으로 균의 생육이 늦어질 뿐만 아니라, 전자공여능도 거의 나타나지 않았다. 따라서, 전자공여능에 관여하는 항산화 물질의 생산은 pH에 민감하며, 중성 부근에서 잘 생산되는 것을 알 수 있었다.

배양 온도의 영향을 알아보기 위해, 다양한 온도조건(20, 25, 30, 37°C)하에서 각각 실험한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 20°C를 제외한 온도에서는 전자공여능 및 균 생육도가 거의 비슷하였다. 그러나, 20°C에서는 균의 생육 초기에 다른 대조군들보다 생육이 늦게 이루어짐으로써 전자공여능 또한 낮지만, 균 생육이 점차 진행되면서부터 다른 대조군들과 비슷한 활성을 가지는 것이 관찰되었다. 본 연구에서 조사된 항산화 물질 생산 최적 배지와 기본배지인 Marine broth에서의 균주 생육과 전자공여능 비교를 Fig. 3에 나타내었다. Marine broth 및 최적 배지에서 배양 6시간만에 각각 59.60%, 81.02%로 전자공여능이 최고점에 도달하였고,

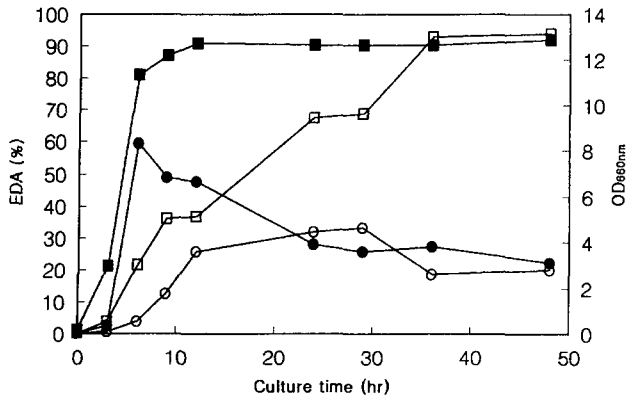


Fig. 3. Comparison of growth and EDA (%) of the strain HJ-14 in Marine broth and optimized broth. -■-, EDA in optimized broth; -●-, EDA in Marine broth; -□-, cell growth in optimized broth; -○-, cell growth in Marine broth.

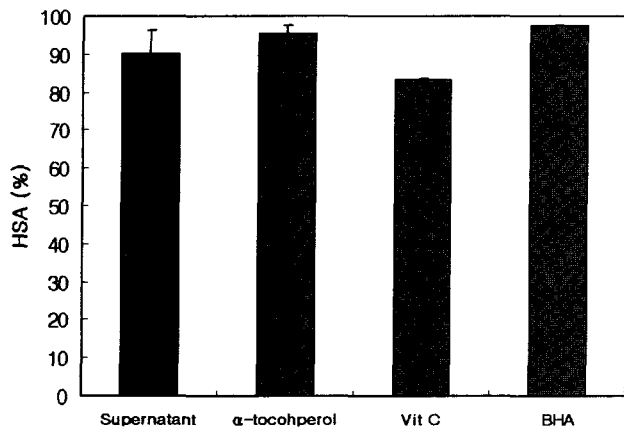


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activities of culture supernatant of strain HJ-14. The concentration of α-tocopherol, Vitamin C, and BHA added in reaction mixture were 10 mg/ml.

시간이 경과함에 따라 Marine broth에서는 전자공여능이 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었으나 최적화된 배지에서 는 지속되었다.

Hydroxyl radical 소거활성

Hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)은 산소종 중 반응성이 매우 강하며 지질 산화를 개시하고 DNA 손상 및 돌연변이를 유발하는 물질로 널리 알려져 있다[11]. 본 실험에서는 *in vitro*에서 Fe^{2+} 존재 시 발생하는 $\cdot\text{OH}$ 에 의해 2-deoxyribose를 손상 여부를 조사한 결과 *Alteromonas* sp. HJ-14 배양 상등액의 $\cdot\text{OH}$ 소거능은 90.03%로, BHA(95.46%), L-ascorbic acid(83.28%), α-tocopherol(97.17%)과 유사한 활성을 나타내었다. 이러한 소거활성은 배양 상등액 중의 물질이 2-deoxyribose와 hydroxyl radical과의 반응보다 더 빨리 일어나 2-deoxyribose의 변성을 억제하는 것으로 사료된다[22]. 또한, $\cdot\text{OH}$ 소거능은 antioxidant 특성뿐만 아니라 pro-oxidant특성을 조사하는 방법[19]으로도 널리 사용되고 있

며, 본 실험에서는 hydroxyl radical소거 활성이 높게 나타나는 것으로 보아 pro-oxidant특성은 없는 것으로 나타났다.

요 약

전자 공여능으로 항산화 물질 생산 능력이 우수한 해양 미생물을 분리하여 HJ-14라고 명명하였다. HJ-14는 형태적, 생리적, 생화학적 특성이 *Alteromonas macleodii* ATCC 27126T와 가장 유사하였으며, 주요 세포 지방산이 $\text{C}_{14:0}$, $\text{C}_{15:0}$, $\text{C}_{16:0}$ 및 $\text{C}_{17:1}$ w8c로 분석됨으로서 *Alteromonas* sp. HJ-14로 동정하였다. *Alteromonas* sp. HJ-14의 항산화 물질 생산에 대한 배양 특성을 조사하기 위해, 탄소원, 무기질소원, sodium chloride 농도, 초기 pH 및 배양온도의 영향을 관찰하였다. 탄소원으로는 2.5% dextrin, 무기 질소원으로는 ammonium sulfate, sodium chloride는 2~6%, pH와 온도는 각각 pH 6~8, 25~37°C에서 전자공여능이 높게 나타났으며, 최적 조건일 때에 전자공여능은 90~92%로 나타났다. 또한, $\cdot\text{OH}$ 소거능도 90.03%로 관찰되어 항산화활성이 높은 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 경남대학교 학술연구구성비의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Amarowicz, R., M. Naczki, and F. Shahidi. 2000. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hull. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 2755-2759.
- Aoyama, T., Y. Nakakita, M. Nakagawa, and H. Sakai. 1992. Screening for antioxidants of microbial origin. *Agric. Bio. Chem.* **46**: 2369-2371.
- Bae, S. M., J. H. Kim, C. W. Cho, T. J. Jeong, H. S. Yook, M. W. Byun, and S. C. Lee. 2002. Effect of γ -irradiation on the antioxidant activity of rice hull, rice bran and barley bran. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 246-250.
- Baumann, P., A. L. Furniss, and J. V. Lee. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 343-352. Williams Wilkins, Baltimore.
- Benson, H. J. 1998. *Microbiology Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. pp. 58-204. 7th ed. WCB/McGraw-Hill, New York.
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**: 59-63.
- Chance, B., H. Sies, and A. Boveris. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527-605.
- Choi, U. K., W. D. Ji, H. C. Chung, D. H. Choi, and Y. G.

- Chung. 1997. Optimization for pigment production and anti-oxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **26**: 1039-1043.
9. Chung, S. K. 1997. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 118-123.
10. Datta, K., S. Sinha, and P. Chattopadhyay. 2000. Reactive oxygen species in health and disease. *Natl. Med. J. India* **13**: 304-310.
11. Evans, P. and B. Halliwell. 2001. Micronutrients : oxidant/antioxidant status. *British J. Nutr.* **85**: S67-S74.
12. Gauthier, G., M. Gauthier, and R. Christen. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 755-761.
13. Halliwell, B. and J. M. Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.
14. Hayashi, K., K. Suzuki, M. Kawaguchi, T. Nakajima, T. Suzuki, M. Numata, and T. Nakamura. 1995. Isolation of antioxidant from *Penicillium roquefortii* IFO 5956. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 312-320.
15. Ivanova, E. P., L. A. Romanenko, J. Chun, M. H. Matte, G. R. Matte, V. V. Mikhailov, V. I. Svetashev, A. Huq, T. Mauge, and R. R. Colwell. 2000. *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the pacific ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 901-907.
16. Jouault, S. C., L. Chevolut, D. Helley, J. Ratiskol, A. Bros, C. Simquin, O. Roger, and A. M. Fischer. 2001. Characterization, chemical modifications and *in vitro* anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1528**: 141-151.
17. Kang, Y. H., Y. K. Park, and G. D. Lee. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.* **48**: 232-239.
18. Medina, I., M. T. Satue-Gracia, J. B. German, and E. N. Frankel. 1999. Comparison of natural polyphenol antioxidants from extra virgin olive oil with synthetic antioxidants in tuna lipids during thermal oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4873-4879.
19. Navarro, M. C., M. P. Montilla, A. Martin, J. Jimenez, M. P. Utrilla. 1992. Free radicals and antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus*. *Plan to Med.* **59**: 312-314.
20. Park, B. K. 1983. Studies on antioxidants of microbial origin. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**: 201-204.
21. Park, J. H., K. C. Kang, S. B. Baek, Y. H. Chang, E. H. Lee, and K. S. Rhee. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**: 256-261.
22. Racchi, M., M. Daglia, C. Lanni, A. Papetti, S. Govoni, and G. Gazzani. 2002. Antiradical activity of water soluble components in common diet vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1272-1277.
23. Racuenes, G., P. Pignet, G. Gauthier, A. Peres, R. Christen, H. Rougeaux, G. Barbier, and J. Guezennec. 1996. Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 67-73.
24. Rashid, H., F. Kato, A. Murata, and M. Kando. 1993. Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae* K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 935-939.
25. Ryu, B. H., H. S. Kim, J. S. Jung, S. H. Lee, and Y. A. Ji. 1987. Screening for antioxidative activities of yeasts on fish oil. *Kor. J. Food Hygiene.* **2**: 15-20.
26. Ryu, B. H., Y. S. Lee, and S. T. Yang. 2000. Antioxidative effects of cultivation *Streptomyces* sp. BH-405 isolated from marine origin. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**: 150-155.
27. Sawabe, T., M. Ohtsuka, Y. Ezura. 1997. Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4. *Carbohydrate Res.* **304**: 69-76.
28. Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
29. Takao, T., F. Kitatani, N. Watanade, A. Yagi, and K. Sakata. 1994. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 1780-1783.
30. Vera, J., R. Alvarez, E. Murano, J. C. Slebe, and O. Leon. 1998. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4378-4383.
31. Yumoto, I., K. Kawasaki, H. Iwata, H. Matsuyama, and H. Okuyama. 1998. Assignment of *Vibrio* sp. strain ABE-1 to *Colwellia maris* sp. nov., a new psychrophilic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1357-1362.

(Received May 10, 2002/Accepted Aug. 30, 2002)