

## Bacillus sp. FF-7에 의한 항산화물질 생산조건과 항산화 활성

차재영 · 김효정 · 전방실 · 박진철 · 옥민 · 조영수\*

동아대학교 응용생명공학부

(2003년 5월 16일 접수; 2003년 6월 24일 수리)

발효식품 시료로부터 분리된 세균을 DPPH( $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) 전자공여능으로 항산화 활성을 측정하여 가장 활성이 강한 균주를 선별하여 형태학적, 생화학적, 생리학적 특성 및 16S rRNA 염기서열을 조사한 결과 *Bacillus* sp. 으로 판명되어 FF-7로 명명하였다. DPPH 전자공여능법에 의한 *Bacillus* sp. FF-7이 생산하는 항산화물질의 최적 생산 배지조건은 탄소원 2% galactose와 질소원 1% tryptone 첨가였다. *Bacillus* sp. FF-7에 의해 생성된 항산화 물질의 활성을 DPPH 전자공여능, 흰쥐 각 조직 microsomal 실험계 및 linoleic acid 과산화지질 실험계에서 malondialdehyde를 thiobarbituric acid(TBA)방법으로 측정하였다. 흰쥐 각 조직 microsomal 실험계에서 지질과산화에 대한 항산화 효과는 뇌(97.50%) > 심장(79.95%) > 신장(77.84%) > 비장(77.47%) > 고환(69.96%) > 간장(62.45%) 순이었다. Linoleic acid의 과산화지질을 TBA법으로 측정한 결과 반응 4일째까지 억제 효과가 강하게 나타났으며, 동시에 대조구로 사용한 0.05% BHT 첨가구에서도 실험종료시까지 항산화 활성이 강하게 나타났다.

**Key words:** *Bacillus* sp. FF-7, DPPH ( $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl), lipid peroxidation, thiobarbituric acid (TBA), malondialdehyde

### 서론

경제성장의 발달로 풍족한 식생활과 고지방식이 섭취 등의 식생활 패턴의 변화로 인해 뇌 혈관계 질환, 심장병, 고혈압 및 당뇨병 등의 순환기계 질환과 암으로 인한 사망률이 크게 높아져 건강에 대한 관심이 날로 고조되고 있다.<sup>1)</sup> 생체 내에서 산화스트레스에 의한 free radical(유리기) 생성은 생체막의 구성 성분인 불포화지방산을 산화시키고, 이로 인해 생성된 과산화지질의 증가는 여러 조직을 손상시켜 대사 장애를 초래함으로써 생체기능의 저하나 노화 및 만성 퇴행성질환들의 유발과 밀접한 관련을 가진 것으로 알려지고 있다.<sup>2,3)</sup> 따라서 생체 내에서 free radical 형성에 의한 체내의 산화적 손상을 억제시킬 수 있는 생리활성 물질이 있다면 이는 순환기계 질환과 암 등 만성질환의 발병률을 낮추는 데에도 크게 기여할 것으로 생각된다.<sup>2,4,5)</sup>

최근, 건강 증진을 위한 생리활성 물질 탐색에 관한 연구가 여러 방향에서 활발하게 진행되고 있으며, 우리가 일상적으로 섭취하고 있는 발효식품 중에서도 항산화 효과가 있는 성분이 다수 보고 되고 있다.<sup>6,7)</sup> 발효식품에 존재하는 미생물중에서 극히 일부 균종만이 우리 식생활에 주로 이용되고 있을 뿐이다. 최근 항산화 효과가 뛰어난 미생물 유래 항산화 물질에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 곰팡이,<sup>8,9)</sup> 세균<sup>10)</sup> 유래의 배양액에서 항산화 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 한편, 어유를 사료화 시킬 목적으로 어유 산화를 억제시키는 항산화

작용을 가진 미생물을 탐색한 결과 *Aspergillus sojae*, *Aspergillus oryzae* 및 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 곰팡이와 효모에서 우수한 지질 산화억제 물질이 만들어지는 것으로 보고된 바 있다.<sup>11)</sup> 또한, *Streptococcus thermophilus* 및 *Lactobacillus bulgaricus* 세포 배양액에서도 항산화 효과가 있는 것으로 보고된 적이 있다.<sup>12)</sup> 그러나 우리나라 발효식품에 많이 관여하는 *Bacillus* sp. 세균 유래의 항산화 물질 생성에 관한 연구는 거의 없는 것으로 나타나 본 연구에서는 발효식품 유래 *Bacillus* sp. 균주의 배양액을 이용하여 *in vitro* 항산화 실험계를 이용하여 균주를 선별해내고 항산화 물질 생성 최적조건을 검토하여 미생물 유래 항산화제로서의 이용 가능성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

**균주의 분리.** 높은 항산화 활성을 가지는 미생물 균종을 분리할 목적으로 된장, 간장 등의 발효식품으로부터 시료를 채취하였다. 채취된 시료를 멸균수로 적당히 희석한 후 순차적으로 skim milk agar 배지(skim milk 5 g/l, bacto-tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, bacto-agar 15 g/l)에 도말하고 항온배양기에서 37°C로 18시간 이상 배양하였다. 이때 배지상에서 단백질 분해환을 크게 나타낸 단일 균주를 각각 분리해내고, 다시 액체배지에서 배양한 균주의 배양액을 얻어 DPPH ( $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) 항산화 측정법<sup>13)</sup>으로 항산화 활성이 강한 단일 균주를 선별해 내어 FF-7로 명명하고 본 실험에 사용하였다.

**균주의 동정.** 항산화 활성이 강한 FF-7 균주를 형태학적으로 관찰한 결과 *Bacillus* sp.으로 판명되어 생명공학연구원 한

\*연락처

Phone: 82-51-200-7586; Fax: 82-51-200-7505  
E-mail: choys@mail.donga.ac.kr

국유전자원센터(대전)에 의뢰하여 AIP 50CHB kit 및 16S rRNA 염기서열로 동정한 결과 *Bacillus* sp.으로 판명되어 *Bacillus* sp. FF-7로 명명하였다.

**DPPH법에 의한 항산화 활성 측정.** DPPH 용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 whatman filter paper No. 2에 여과시켜 만들었다. 이 용액 5 ml에 균 배양액 1 ml 및 BHT 0.05%를 함유한 용액 1 ml를 각각 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은  $EDA(\%) = (\text{대조구흡광도} - \text{시료첨가구흡광도}) / \text{대조구흡광도} \times 100$  시료첨가구의 무첨가구의 흡광도 차를 측정하여 백분율로 표시하였다.<sup>13)</sup>

**탄소원 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성.** 탄소원의 종류에 따른 배양액의 항산화 활성 측정은 DPPH법에 의한 전자공여능으로 측정하였다. 균주 배양은 기본배지인 L-broth 배지에 glucose, sucrose, maltose, lactose, galactose를 각각 2% 농도로 첨가하고 초기 pH를 동일하게 6.8로 조정 한 후 전 배양된 FF-7을 각각 2%로 접종하여 30°C에서 18시간 배양한 후 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 항산화 측정에 이용하였다. 또한 FF-7 배양시 첨가한 탄소원 중에서 항산화 활성이 가장 우수한 galactose의 농도별 효과를 검토하기 위하여 L-broth에 1, 2, 3, 5 및 7% 농도로 각각 첨가하여 30°C에서 18시간 배양한 상등액을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다.

**질소원 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성.** 질소원의 종류에 따른 배양액의 항산화 활성 측정은 DPPH법에 의한 전자공여능으로 측정하였다. 균주 배양은 기본배지인 L-broth 배지에 tryptone, yeast extract, malt extract, beef extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 각각 1% 농도로 첨가하고 전배양된 FF-7을 각각 2%로 접종하여 초기 pH를 동일하게 6.8로 조정 한 후 30°C에서 18시간 배양한 후 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 항산화 측정용 물질로 이용하였다. 또한 FF-7 배양시 첨가한 질소원 중에서 항산화 활성이 가장 우수한 tryptone의 농도별 효과를 검토하기 위하여 L-broth에 1, 2, 3, 5 및 7% 농도로 각각 첨가하여 30°C에서 18시간 배양한 상등액을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 이때 L-broth 배지에 함유된 tryptone 및 yeast extract는 탄소원 및 다른 질소원과 동일한 실험조건을 만들어주기 위하여 첨가량을 고려하지 않고 실험을 진행하였다.

**각 조직의 microsome 분획의 조제 및 항산화 활성 측정.** 정상 식이를 급여한 8주령의 흰쥐로부터 적출한 각 조직을 일정량 취해 1.15% KCl-10 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 homogenizer로 균질화 시킨 여액을 12,000 rpm 및 45,000 rpm으로 각각 원심분리 하여 얻어진 침전물에 상기 buffer를 일정량 가하여 microsome 분획으로 하였다.<sup>14)</sup> 항산화 활성은 Wong 등의 방법<sup>15)</sup>에 따라 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 1.5 ml에 배양액 0.2 ml, 각 조직의 microsome 분획 각각 0.1 ml, 0.1 mM ascorbate 0.1 ml 및 5 mM  $\text{FeSO}_4$  0.1 ml를 차례로 가하여 반응액을 잘 혼합하고 37°C의 shaking water bath에서 1시간 반응시켜 지질 과산화물을 유도시켰다. 이때 대조구는

**Table 1. Physiological characteristics of isolated microorganisms FF-7**

Gly	+	Cel	+
Ery	-	Mal	+
Dara	-	Lac	+
Lara	+	Mel	+
Rib	+	Sac	+
Dxyl	+	Tre	-
Lxyl	-	Inu	-
Ado	-	MLz	-
Mdx	-	Raf	+
Gal	-	Amd	+
Glu	+	Glyg	+
Fru	+	Xlt	-
Mnc	+	Gen	+
Sbc	-	Tur	-
Rha	-	Lyx	-
Dul	-	Tag	-
Ino	+	Dfuc	-
Man	+	Lfuc	-
Sor	+	Darl	-
Mdm	-	Larl	-
Mdg	+	Gnt	-
Nag	-	2KG	-
Amy	+	5KG	-
Arb	+		
Esc	+		
Sal	+		

<sup>1)</sup>used with API 50CHB kit

<sup>2)</sup>+: positive, -: negative

시료를 첨가하지 않았으며, 합성 항산화제인 BHT는 시료첨가량의 0.05%를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. 반응 후 3 M trichloroacetic acid와 2.5 N HCl의 혼합용액 0.5 ml를 가하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액 1 ml를 취하여 0.67% TBA 1 ml를 가하여 혼합하고 끓는 물 속에서 30분간 가열하여 발색시켰다. 냉각 후 3,000 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 지질 과산화의 억제율은 각각 대조구의 흡광도에 대한 저해율(%)로 비교하였다. 이때 균주 배양액은 DPPH법으로 측정된 항산화 활성의 최적 조건을 기초로 L-broth 배지에 탄소원 galactose 2% 및 질소원 tryptone 1% 첨가하고 초기를 pH 6.8로 조정하여 전배양된 FF-7를 2% 농도로 접종하여 30°C에서 18시간 배양한 후 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하였다.

**TBA(2-thiobarbituric acid)법에 의한 항산화 활성.** Linoleic acid(25 mg/ml in ethanol) 1 ml와 배양용액 1 ml를 시험관에 넣고 혼합한 후 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 2 ml와 증류수 1 ml를 가하여 40°C에서 보관하면서 일정간격으로 TBA법<sup>16)</sup>으로 측정하였다. 즉, 반응액 0.5 ml를 취하여 centrifuge tube에 넣고 35% trichloroacetic acid 0.25 ml와 0.75% aqueous TBA 0.5 ml를 가하여 혼합한 후 boiling water bath에서 가끔 흔들며 주면서 15분간 처리하여 냉각시킨 후 70% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가한 다음 20분 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하

1	CGGCG TGCCT AATAC ATGCA AGTCG AGCGG ACAGA TGGGA GCTTG CTCCC
51	TGATG TTAGC GCGCG ACGGG TGAGT AACAC GTGGG TAACC TGCCT GTAAG
101	ACTGG GATAA CTCGC GGAAG CCGGG GCTAA TACCG GATGG TTGTC TGAAC
151	CGCAT GGTTC AGACA TAAAA GGTGG CTTCG GCTAC CACTT ACAGA TGGAC
201	CCGCG GCGCA TTAGC TAGTT GGTGA GTTAA CGGCT CACCA AGGCG ACGAT
251	GCGTA GCCGA CCTGA GAGGG TGATC GGCCA CACTG GGACT GAGAC ACGGC
301	CCAGA CTCCT ACGGG AGGCA GCAGT AGGGA ATCTT CCGCA ATGGA CGAAA
351	GTCTG ACGGA GCAAC GCCGC GTGAG TGATG AAGGT TTTCG GATCG TAAAG
401	CTCTG TTGTT AGGGA AGAAC AAGTG CCGTT CAAAT AGGGC GGCAC CTTGA
451	CGGTA CCTAA CCAGA AAGCC ACGCG TAACT ACGTG CCAGC AGCCG CGGTA
501	ATACG TAGGT GGCAA GCGTT GTCGG GAATT ATTGG GCGTA AAGGG CTCGC
551	AGGCG GTTTC TTAAG TCTGA TGTGA AAGCC CCCGG CTCA

Fig. 1. Partial nucleotide sequence for 16S rRNA of *Bacillus* sp. FF-7.

고, 그 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

**항산화 활성물질 생성 균주 분리 및 동정.** 간장, 된장 등 발효식품으로부터 채취한 시료에서 분리된 균주를 DPPH법에 의한 screening 과정을 통하여 항산화 활성이 가장 우수한 균주를 선별하여 생육특성과 안정성이 확보된 균주를 최종선별하여 본 실험에 사용 하였다. FF-7 균주는 생화학적 특성을 API 50CHB kit로 동정한 결과 *Bacillus* sp.로 밝혀졌으며 (Table 1), 16S rRNA 염기서열을 결정한 결과 *Bacillus* sp.로 아직까지 밝혀지지 않은 균주로 판명되어 본 연구자들에 의해 *Bacillus* sp. FF-7로 명명되었다(Fig. 1).

**탄소원 종류에 따른 FF-7 배양액의 항산화 활성.** DPPH법은 tocopherol, ascorbate, flavonoid 화합물, 방향족 아민류, maillard형 갈변 생성물질, peptide 등의 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로서 짙은 자색이 탈색되는 정도에 따라 항산화 효과를 전자공여능으로 측정하는 방법으로 항산화제 탐색에 일반적으로 이용되는 방법으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 본 실험계의 대조구로 자주 사용하는 합성 항산화제인 BHT는 항산화 작용으로 반응시간과 함께 528 nm에서 짙은 자색을 가지는 DPPH 용액의 흡광도가 점차적으로 감소하는 것으로 나타났다.<sup>17,18)</sup> 탄소원의 종류에 따른 FF-7 배양액의 항산화 활성을 DPPH법인 전자공여능으로 측정한 결과는 Fig. 2와 같이 47.5~74.0% 범위였으며, galactose > maltose > sucrose > glucose > lactose 순으로 나타났다. 대조구로 사용한 합성 항산화제 BHT 0.05%의 전자공여능 63.8%에 비해 galactose 첨가 배양액에서 74.0%로 비교적 높은 항산화 활성을 나타내었다.

또한 FF-7 배양시 첨가한 탄소원 중에서 항산화 활성이 가장 우수한 galactose의 농도별 효과를 검토한 결과는 Fig. 3과 같이 2% > 1% > 3% > 5% > 7% 순으로 나타났다. 따라서 *Bacillus* sp. FF-7 배양액의 탄소원 첨가에 의한 항산화 활성은 2% 첨가 농도에서 배양한 배양액에서 가장 높았다.

**질소원 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성.** *Bacillus* sp. FF-7 배양액의 질소원 종류에 따른 항산화 활성을 DPPH법

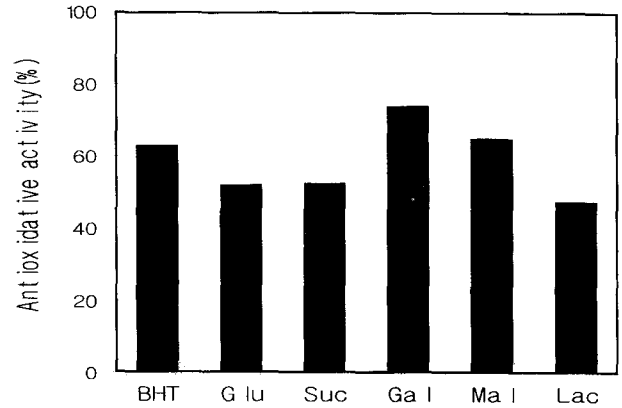


Fig. 2. Effect of carbon sources on the production of antioxidative substance by *Bacillus* sp. FF-7. The antioxidative activity was tested by DPPH method. BHT used as control at the level of 0.05%. BHT: Butylated hydroxytoluene, Glu: Glucose, Suc: Sucrose, Gal: Galactose, Mal: Maltose, Lac: Lactose

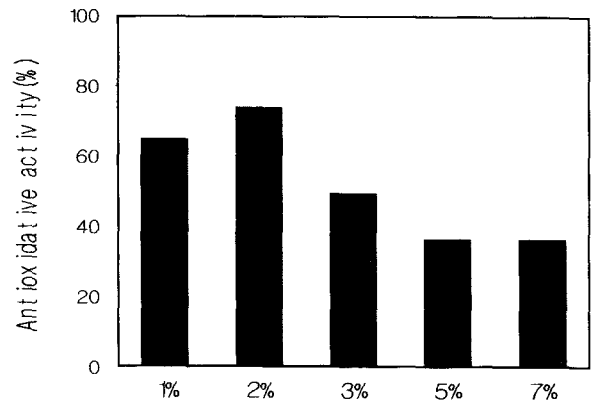


Fig. 3. Effect of galactose concentrations on the production of antioxidative substance by *Bacillus* sp. FF-7. The antioxidative activity was tested by DPPH method.

에 의한 전자공여능으로 측정된 결과는 Fig. 4와 같이 21.5~67.8% 범위였으며, tryptone > malt extract > beef extract > yeast extract > (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 순으로 나타났다. 대조구로 사용한 합성 항산화제 BHT 0.05%의 전자공여능 63.8%에 비해 tryptone 첨가 배양액에서 67.8%로 비교적 높은 항산화 활성을 나타내었다. 또한 FF-7 배양시 첨가한 질소원 중에서 항산화 활성이 가장 우수한 tryptone의 농도 변화에 따른 효과를 검토한 결과는 Fig. 5와 같이 1% > 2% > 3% > 5% > 7% 순으로 나타났다. 따라서 *Bacillus* sp. FF-7 배양액의 질소원 첨가에 의한 항산화 활성은 1% 첨가 농도에서 가장 높게 나왔다.

**각 조직의 microsome 과산화지질 억제 효과.** 동물 각 조직으로부터 조제한 microsome 분획은 free radical 반응에 의해 과산화 되기 쉬운 불포화 지방산을 많이 함유하고 있는 세포막으로 생체에서 일어나는 지질 과산화의 *in vivo* 실험계 뿐만 아니라 *in vitro* 실험계로도 널리 이용되어 오고 있다.<sup>19,21)</sup> 이러한 생체막의 불포화 지방산은 활성산소와 같은 free radical에 의하여 과산화 반응이 개시되면서 연쇄적으로 진행되므로 세포막의 투과성을 향진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래

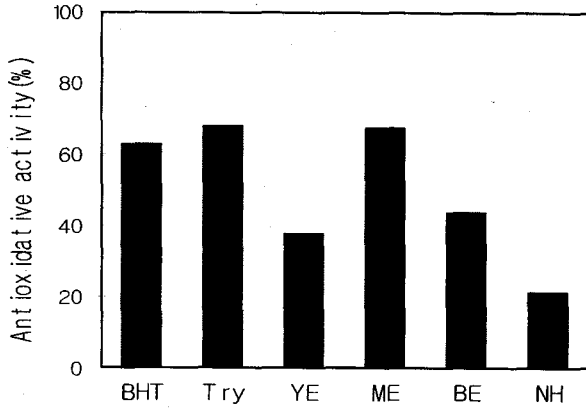


Fig. 4. Effect of nitrogen sources on the production of antioxidative substance by *Bacillus sp. FF-7*. The antioxidative activity was tested by DPPH method. BHT used as control at the level of 0.05%. Try: Tryptone, YE: Yeast extract, ME: Malt extract, BE: Beef extract, NH:  $(NH_4)_2SO_4$

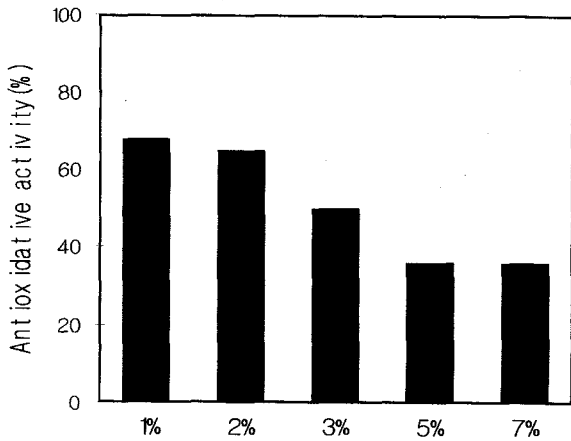


Fig. 5. Effect of tryptone concentrations on the production of antioxidative substance by *Bacillus sp. FF-7*. The antioxidative activity was tested by DPPH method.

하여 노화현상 및 이에 따른 여러 가지 병리현상을 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>22,23)</sup> 본 실험에서  $Fe^{++}$ /ascorbate를 첨가하여 비효소적으로 과산화물을 유도한 각 조직 microsomes의 세포막 불포화지방산의 과산화지질 생성에 미치는 *Bacillus sp. FF-7* 배양액의 효과를 Fig. 6에 나타내었다. 이때 *Bacillus sp. FF-7* 배양액은 DPPH법으로 측정된 항산화 활성의 최적 조건을 기초로 한 탄소원 galactose 2% 및 질소원 tryptone 1%를 첨가한 조건에서 얻어진 것을 사용하였다.

*Bacillus sp. FF-7* 배양액의 각 조직 microsome 세포막 불포화지방산의 과산화지질 억제효과는 뇌 97.50%, 심장 79.95%, 신장 77.48%, 비장 77.47%, 고환 69.96% 및 간장 62.45% 순으로 나타나 대조구인 합성 항산화제 BHT와 거의 비슷한 억제효과가 있었다. 생체내의 뇌 조직은 다른 조직에 비해 인지질과 불포화지방산을 많이 함유하고 있어 과산화지질의 생성에 유리한 조건을 갖추고 있으며,<sup>24)</sup> 조직 특성상 산화 스트레스에 매우 민감한 조직으로 알려져 있다.<sup>25)</sup> 흰쥐 간장 및 신장 microsome 분획을 이용한 실험에서 꾸지뽕나무 추출물에서 각

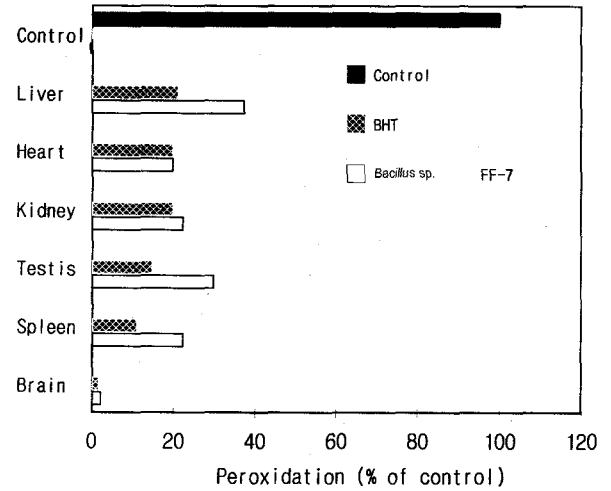


Fig. 6. Antioxidative activity of antioxidative substance produced from *Bacillus sp. FF-7* on tissues microsomal system as measured by the TBARS method. BHT used as control at the level of 0.05%.

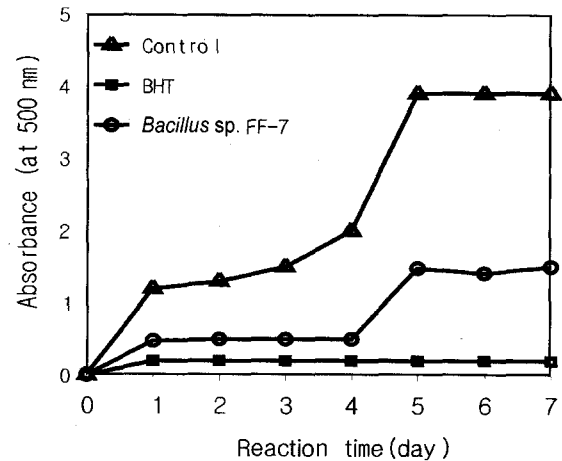


Fig. 7. Antioxidative activity of antioxidative substance produced from *Bacillus sp. FF-7* on linoleic acid system as measured by the TBA method. BHT used as control at the level of 0.05%.

각 66% 및 44% 과산화지질 억제 효과가 있었다.<sup>26)</sup> 특히 *Bacillus sp. FF-7* 배양액은 다른 조직에서 보다 불포화지방산을 많이 함유하고 있는 뇌의 microsome 분획을 이용한 실험계에서 지질과산화 억제 효과가 더욱 높게 나타나 동물을 이용한 *in vivo* 실험계에서 확인해볼 필요성이 제기된다. 따라서 *Bacillus sp. FF-7* 배양액이 각 조직의 지질 과산화물 생성을 억제시키는 것은 산화적 손상을 일으키는 원인 물질인 free radical 생성을 억제시킬 수 있는 가능성이 있기 때문에 이들과 밀접하게 관련되어있는 질환의 발병을 예방 또는 치료할 수 있는 생리활성 물질로서 작용할 가능성이 있다.

**Linoleic acid 산화 실험계를 이용한 항산화 활성.** *Bacillus sp. FF-7* 배양액에 의한 linoleic acid를 이용한 TBA법으로 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 본 실험계에서 *Bacillus sp. FF-7* 배양액의 항산화 효과가 반응 4일째까지는 합성 항산화제 BHT와 비슷한 수준으로 나타났다. 그러나 무첨가의 대조구에서는 반응 1일째부터 산화가 활발하게 일어나 5일

째까지 급속히 증가하였다. 항산화 작용을 가진 균주를 탐색하기 위하여 균배양액에 산화 기질로 fish oil를 첨가하여 배양시킨 후 그 상등액을 TBA법으로 측정 한 결과에서 *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium stationis* ATCC 14403, *Arthrobacter citreus* ATCC 11624 등의 일부 세균에서는 항산화 효과가 없는 것으로 보고 되었다.<sup>11)</sup>

그러나, 본 실험에서 선별된 *Bacillus* sp. FF-7 배양액을 이 중결합 2개인 단일 지방산인 linoleic acid를 이용하여 TBA법으로 항산화 활성을 측정하였기 때문에 실험설계가 약간 다르다고는 할 수 있으나 *Bacillus subtilis*와는 전혀 다른 결과를 보여 매우 흥미로운 결과로 사료되어진다. 한편, *Streptococcus thermophilus* 및 *Lactobacillus bulgaricus*의 유산균 세포 추출액은 linoleic acid peroxidation을 현저히 저하시켰는데, 이는 시판 항산화제 BHT 25~96 ppm에 상당하는 농도로 항산화 활성을 나타낸 것으로 보고된 바 있다.<sup>12)</sup>

본 실험의 결과, DPPH 방법에 의한 *Bacillus* sp. FF-7 유래 항산화물질은 배양액중 탄소원으로 2% galactose와 질소원으로 1% tryptone을 첨가 하였을 때 높은 항산화 활성을 나타내었으며, 뇌 microsomal 실험계 및 linoleic acid 과산화지질 측정에서도 높은 항산화 활성을 나타내어 단시간 내에 대량생산이 가능한 미생물 유래 항산화제 개발 가능성을 시사하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2002학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제)지원에 의하여 연구 되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Annual report on the cause of death statistics (2001) National Statistical Office, Republic of Korea.
- Suzuki, S., Hinokio, Y., Komatu, K., Ohtomo, M., Onoda, M., Hirai, S., Hirai, M., Hirai, A., Chiba, M., Kasuga, S., Akai, H. and Toyota, T. (1999) Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **45**, 161-168.
- De Mattia, G., Laurenti, O. and Fava, D. (2003) Diabetic endothelial dysfunction. Effect of free radical scavenging in Type 2 diabetic patients. *J. Diabetes Complications* **17**, 30-35.
- Cha, J. Y. and Cho, Y. S. (2001) Effect of stem bark extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentrations and tissue lipid peroxidation in the cholesterol-fed rats. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**, 128-134.
- Cha, J. Y. and Cho, Y. S. (1999) Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1131-1136.
- Iwai, K., Nakaya, N., Kawasaki, Y. and Matsue, H. (2002) Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: Effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3597-3601.
- Iwai, K., Nakaya, N., Kawasaki, Y. and Matsue, H. (2002) Inhibitory effect of natto, a kind of fermented soybeans, on LDL oxidation *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3592-3596.
- Rashid, M. H. O., Kato, F., Murata, A. and Kondo, M. (1993) Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 45-53.
- Rashid, M. H. O., Kato, F., Murata, A. and Kondo, M. (1993) Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus oryzae*. *Bull. Fac. Agr. Saga University* **75**, 45-53.
- Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F. and Chou, S. T. (2002) Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Agric. Food Chem.* **50**, 2454-2458.
- Kato, F., Nakazato, I., Shiraishi, T., Hayashi, K., Murata, A. and Yone, Y. (1985) Screening for antioxidative activity in microorganisms (Utilization of waster fish treated with microorganisms). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **59**, 901-907.
- Lin, M. Y. and Yen, C. L. (1999) Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms. *J. Dairy Sci.* **82**, 1629-1634.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
- Schnaitman, C., Erwin, V. G. and Greenwalt, J. W. (1967) The submitochondrial localization of monoamine oxidase: An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **32**, 719-723.
- Duncan, D. B. (1959) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* **1**, 1-42.
- Wong, S. F., Holliwell, B., Richmond, R. and Skowronek, W. R. (1981) The role of superoxide and hydroxyl radical in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *J. Inorganic Biochem.* **14**, 127-134.
- Ottolenghi, A. (1959) Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **79**, 355-461.
- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. and Manley, M. (2003) Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 902-909.
- Cha, J. Y., Kim, H. J., Chung, C. H. and Cho, Y. S. (1999) Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1310-1315.
- Park, J. C., Choi, J. S. and Choi, J. W. (1995) Effects of the fraction from the leaves, fruits, stems and roots of *Cudrania tricuspidata* and flavonoids on lipid peroxidation. *Korea J. Pharmacogn.* **26**, 377-384.
- Cha, J. Y., Kim, H. J. and Cho, Y. S. (2000) Effect of water-soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in tissues of rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 531-536.
- Kim, H. J., Cha, J. Y., Choi, M. R. and Cho, Y. S. (2000) Antioxidative activities by water-soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Agric. Chem.* **43**, 148-152.
- Johnson, J. E., Walford, R., Harma, D. and Miquel, J. (1986) *In Free radicals, aging and degenerative disease*, Alen R. Liss, N.Y.
- Plaa, G. L. and Witschi, H. (1976) Chemicals, drugs and lipid

- peroxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **16**, 125-131.
24. Cha, J. Y. and Cho, Y. S. (1999) Effects of  $\alpha$ -linolenic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on the content and fatty acid composition of brain phospholipid in rats. *Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 75-80.
25. Choi, J. H., Kim, D. I., Park, S. H., Baek, Y. H., Lee, H. S. and Ryu, K. S. (2000) Effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaf extract on oxidative stress and membrane fluidity in brain of SD rats. *Korean J. Life Sci.* **10**, 354-361.
26. Cha, J. Y. and Cho, Y. S. (2001) Antioxidant activity of extracts from fruit of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 547-551.

---

#### Antioxidative Activity and Produced Condition of Antioxidative Substance by *Bacillus* sp. FF-7

Jae-Young Cha, Hyo-Jung Kim, Bang-Sil Jun, Jin-Chul Park, Min Ok and Young-Su Cho\* (*Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea*)

**Abstract:** The antioxidative activity of antioxidative substances produced from several bacterial strains isolated from fermented foods were tested by DPPH ( $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) free radical scavenging activity. One of the strains showing the highest antioxidative activity was identified as *Bacillus* sp. based on the morphological, biochemical, physiological characteristics, and 16S rRNA sequence, and named FF-7. The most optimal medium condition for the production of antioxidative substance from *Bacillus* sp. FF-7 was 2% galactose as carbon source and 1% tryptone as nitrogen source. The antioxidative substance produced from FF-7 in these cultural medium was also tested by *in vitro* experimental models, the peroxidation of linoleic acid and the peroxidation of rat tissues microsomes by using thiobarbituric acid (TBA) for assay of free malondialdehyde production. The antioxidative activity against lipid peroxidation of rat tissues microsomes was shown in the following order; brain 97.50% > heart 79.95% > kidney 77.84% > spleen 77.47% > testis 69.96% > liver 62.45%. The antioxidative substance produced from FF-7 on linoleic acid peroxidation by TBA method was effectively inhibited during four days, and 0.05% BHT (butylated hydroxytoluene) used comparative control was also effectively inhibited. Results showed that the highest antioxidative activity by DPPH method of antioxidative substance produced from *Bacillus* sp. FF-7 was obtained by supplementing 2% galactose as carbon source and 1% tryptone as nitrogen source in cultured medium, this substance effectively inhibited the formation of TBARS in brain microsome *in vitro* system and in linoleic acid peroxidation.

Key words: *Bacillus* sp. FF-7, DPPH ( $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl), lipid peroxidation, thiobarbituric acid (TBA), malondialdehyde

\*Corresponding author