

## 제주 연안에서 분리한 항산화물질을 생산하는 균주의 동정 및 배양학적 특성

김만철 · 허문수\*

제주대학교 해양과학부

Received July 18, 2005 / Accepted October 4, 2005

**Identification and Cultural Characterization of Antioxidant Producing Bacteria Isolated from the Jeju Coasts.** Man-Chul Kim and Moon-Soo Heo\*. *Faculty of marine science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea* – An antioxidant-producing bacterium was isolated from sea water in Jeju island. The isolated strain, SC2-1 was gram-positive, catalase positive, facultatively anaerobic, oxidase negative, motile and small rods. The strain utilized sucrose, dextrose, fructose, mannitol and maltose as a sole carbon and energy source and sodium chloride was required for the bacteria growth. The radical scavenging activity of the culture supernatants was determined by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. This bacterium was identified based on cellular fatty acids analysis and 16S rDNA sequencing, and then named *Exiguobacterium* sp. SC2-1. The modified optimal medium compositions required the addition of maltose 2.5% (w/v), yeast extract 1.5% (w/v) and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05% (w/v) in marine broth (Difco. Co. USA). Antioxidant activity of under optimal culture conditions were 93%.

**Key words** – radical scavenging activity, DPPH, *Exiguobacterium* sp., 16S rDNA, antioxidant

활성산소는 유해산소라고도 하는데 우리가 호흡과정에서 몸속으로 들어간 산소가 산화과정에 이용되면서 여러 대사과정에서 생성되어 생체 조직을 공격하고 세포를 손상시키는 산화력이 강한 산소이다. 이러한 활성산소는 동물과 식물에 존재하며, 특히 외부로부터 미생물이 체내에 침투하면 반응성이 강한 활성산소가 세포막 주위에 만들어져 외래 미생물을 제거하는데 사용된다[7,15]. 산소를 이용하는 생물체는 정상적인 대사과정에서도 지속적으로 superoxide radical anion ( $\text{O}_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxyl radical ( $\text{OH}^\cdot$ ) 등과 같은 반응성이 큰 reactive oxygen species(ROS)를 생성하고, 이들은 자외선, 오존, 공기오염 등과 같은 외부 자극에 의해서도 생성된다. 이러한 활성산소가 체내에서 너무 많이 생성되면 단백질, DNA, 효소 등에 피해를 주게 된다. 경제 성장의 발달로 식생활이 점차 서구화 되면서 우리나라도 고지방식이 섭취 등이 늘어나면서 패턴의 변화로 인해 순환기계 질환과 암으로 인한 사망률이 크게 높아져 건강에 대한 관심이 날로 고조되고 있다. 최근 현대인의 질병 중 약 90%가 활성산소와 관련이 있다고 알려져 있으며, 구체적으로 그러한 질병에는 암, 동맥경화증, 당뇨병, 뇌졸중, 심근경색증, 간염, 신장염, 아토피, 파킨슨병, 자외선과 방사선에 의한 질병 등이 있다. 따라서 이러한 질병에 걸리지 않으려면 몸속의 활성산소를 없애주면 되는데 활성산소를 없애주는 물질인 항산화물에는 비타민 E, 비타민 C, 요산, 빌리루빈, 글루타티온, 카로틴 등이 포함된다. 항산화와 관련된 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX)와

같은 항산화 효소들은 membrane의 lipid peroxidative damage, sulfhydryl-containing enzymes의 inactivation, integral protein의 cross linking 등을 일으키는 oxygen species를 불활성화시키거나 제거함으로써 항산화 작용을 하게 된다[19]. 항산화물질은 일반적으로 활성산소와 과산화 지질의 제거 물질로서, 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), t-butylhydroquinone 등이 널리 사용되어 왔으나, 일일 섭취량이 50 mg/kg/day 이상을 섭취할 경우 생체효소 및 지방의 변화로 병이나 암을 유발한다고 보고[5,14]하고 있는 등 이물질들에 대한 안정성에 대한 논란뿐만 아니라[17] 합성 항산화제에 대한 소비자의 기피성향과 합성 항산화제가 대량으로 투여된 동식물 실험에서 발암성이 보고되고[13] 있어 합성 항산화제의 사용이 점점 제한되고 있다. 반면에 천연 항산화제로 이용되고 있는 비타민인  $\alpha$ -tocopherol 및 vitamin C 등은 항산화 효과가 낮고, 가격이 비싼 단점이 있다. 그러므로 항산화능이 우수하고 인체에 무해하며 가격이 저렴한 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있다[5,10]. 이상적인 항산화제란 항산화효과가 요구되는 여러 가지 광범위한 제품이나 분야에서의 첨가효과와 아울러 무독성 및 안정성이 확실히 입증될 수 있어야 한다[9]. 그러므로 강력하면서도 인체에 해가되지 않는 천연 항산화제의 개발에 관한 연구가 매우 절실한 실정이다. 최근에는 여러 종류의 식물에서 항산화 물질 연구가 활발히 진행되고 있으며 육상식물[1,3]이나 해조류[21]에 대해서는 연구가 많이 이루어지고 있는 반면 미생물에서는 연구가 미약하지만, 곰팡이[2,16], 효모[22], 세균[10,24] 등에서 항산화 물질에 대한 보고가 있으며, 또한 해양 유래 미생물에 대한 항산화 관련 연구가 미흡한 실정이다. 미생물의 대사산물을 대상으로

\*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : msheo@cheju.ac.kr

한 생리 활성물질은 1940년 Chams 등이 penicillin을 실용화한 이래 미생물로부터 생리 활성물질에 대한 연구가 시작되었다[12]. 최근에는 미생물 유래 의약품, 식품 첨가물 및 생리 활성 물질을 분리 정제하고 그 구조를 분석하여 대량생산을 하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[23].

본 연구에서는 해양 유래 항산화 물질을 생산해내는 미생물을 탐색하고 동정하여 배지 상에서 영양성분의 최적화 조건 등의 배양조건을 검토하여 항산화 물질 생성 특성을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 항산화 활성 물질 생성 균주의 분리 및 선정

제주 연안 해수를 해양 미생물 분리용 평판배지 MA (Marine agar, Difco)에서  $10^1$ 에서  $10^4$ 배로 희석한 후 배지에 도말하여 25°C에서 3일간 배양하고, 생성된 균주를 tooth pick로 새로 만든 신선한 배지에 옮긴 후 다시 배양한 다음 생성된 colony에 멸균된 filter paper를 평판배지위의 colony상에 놓고 한천배지에 있는 colony의 대사산물 및 균체가 여지에 옮겨지도록 한 후 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 탄을 용액을 균체 및 대사산물이 묻은 filter paper에 분사하여 색이 소실되는 균주를 1차적으로 총 10여종을 선별하였다[24].

항산화 활성능 측정을 위한 균주를 배양하기 위해 25°C, 200 rpm에서 진탕 배양하였으며, 상기의 방법으로 분리된 각 균주들을 MB (Marine broth, Difco)에 2% (v/v)씩 첨가하여 24시간 배양한 후, 에탄올에 녹인  $3 \times 10^{-4}$ M DPPH (0.118 mg/ml) 용액 2.9 ml에 균주 배양액 100  $\mu$ l를 혼합하여 30분간 반응시켰다. 반응물을 4°C, 10,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후, 분비물을 제거하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성능이 가장 큰 균주를 선정하였다[18].

### 16S rDNA 및 지방산 분석에 의한 균주의 동정

분리 균주의 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열 분석과 균주의 세포벽 지방산 조성을 분석하였다. 염기서열을 분석하기 위하여 MB에서 24시간 동안 배양된 균주를 사용하여 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상청액을 제거한 후 모아진 bacteria pellet을 수집하였다. Accuprep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 분리하고 Bioneer사에서 제조한 eubacteria의 Universal Primer 27F forward primer와 1522R reverse primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 Accuprep PCR Purification Kit를 이용하여 정제하였으며, 최종적으로 염기서열을 분석하였다. 세포 지방산 분석을 위해 Marine broth에 25°C, 24시간 배양한 균체의 지방산을 Microbial Identification System (MIDI ; Microbial ID, Sherlock System)의 지침에 의해 지방산을 추출하여 분석하였다.

### 분리 균주의 항산화 활성 측정

시료에 대한 전자공여능은 DPPH의 환원성을 이용하여 525 nm에서 흡광도로 측정하였다. 즉, 시료용액 1 ml를 시험관에 넣고 DPPH 2 ml 가하고 10초동안 vortex mixer로 섞은 후, 상온에서 30분간 반응시킨 후, 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로서 전자 공여능을 나타내었다[4]. 대조구는 균주가 접종되지 않은 Marine broth를 사용하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \frac{(\text{대조구흡광도} - \text{시료첨가구흡광도})}{\text{대조구흡광도}} \times 100$$

### 균주의 배양조건

이전 연구[20]에서 균주는 해수에서 분리되어 Marine broth에서 가장 높은 생육도를 보였으며, 분리균주의 최적생장에 따른 온도, 염, pH에 대한 영향을 조사해 본 결과 최적온도 25°C, NaCl 농도 4.0%, pH 범위는 7~8로 나타났으며, 이 조건에 맞게 균주를 배양하였다.

### 탄소원 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성

배지조건의 최적화 과정에서 탄소원의 종류에 따른 배양액의 항산화 활성 측정은 DPPH법에 의한 전자공여능으로 측정하였다. 균주 배양은 기본배지인 Marine broth를 기본배지로 하여 mannitol, sucrose, lactose, xylose, maltose, fructose, dextrose, glycerin을 각각 1% (w/v)로 첨가하여 초기 pH를 7.8로 동일하게 조정된 후, 전 배양된 분리균주를 각각 2% (v/v)로 접종하여 25°C에서 24시간 배양한 후, 600 nm 흡광도로 생육도를 측정하였으며, 8,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻은 상등액을 가지고 항산화 활성을 측정하였으며, 이에 나타난 maltose의 농도별 효과를 검토하기 위하여 Marine broth에 탄소원을 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0% 각각의 농도별로 첨가하여 25°C, 24시간 배양한 상등액을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다[6].

### 질소원 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성

질소원의 종류에 따른 배양액의 항산화 활성 측정은 DPPH법에 의한 전자공여능으로 측정하였다. 균주 배양은 기본배지인 Marine broth 배지에 최적탄소원인 maltose를 2.5% 농도로 첨가한 후, peptone, yeast extract, tryptone, NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, malt extract, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>를 각각 0.5% (w/v)의 농도로 각각 첨가하였으며, 전 배양된 분리균주를 각각 2% (v/v)로 접종하여 초기 pH를 동일하게 7.8로 조정된 후, 25°C에서 24시간 배양한 후, 600 nm에서 흡광도로 생육도를 측정하고, 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 또한 선별된 최적 질소원 농도를 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0% (w/v)로 달리하여 질소원 선별 실험 조건과 같은 방법으로 수행하였다. 이때

Marine broth에 함유된 peptone과 yeast extract는 탄소원 및 다른 질소원과 동일한 실험조건을 만들어주기 위하여 첨가량을 고려하지 않고 실험을 진행하였다.

**무기염류 종류에 따른 배양액의 항산화 활성**

최적 무기염류를 선발하기 위하여 Marine broth를 기본 배지로 하여 최적 탄소원과 질소원 실험 결과로 선발된 maltose 2.5% (w/v), yeast extract 1.5% (w/v)를 각각 첨가한 후, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 농도를 각각 0.05% (w/v)가 되도록 첨가하고 pH를 7.8로 조절하였으며, 접종원을 2% (v/v)로 접종하여 25℃, 24시간동안 배양한 후, 600 nm에서 생육도를 측정하였으며 배양액을 다시 원심 분리하여 얻은 상등액을 가지고 항산화 활성을 측정하였다.

**최적배지에서의 항산화 활성 비교**

최적 배양 조건 및 영양성분 선발 시험 결과로부터 얻어진 2.5% (w/v) maltose, 1.5% (w/v) yeast extract, 0.05% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 50 ml Marine broth가 첨가된 250 ml 삼각 플라스크에 첨가한 후, pH를 7.8로 조절한 다음, 121℃, 15분간 고압 멸균하였다. 그 후, 2% (v/v)정도의 농도로 균을 최적 배지 접종한 다음, 25℃, 24시간 동안 200 rpm에서 배양한 후, 최종적으로 항산화 활성을 측정하였다. 또한 천연 항산화제인 α-tocopherol, 합성 항산화제인 BHA, BHT의 농도를 0.05% (w/v)로 조절한 후 DPPH법에 의한 방법으로 항산화 활성을 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**항산화 활성물질 생성 균주의 분리 및 동정**

제주 연안의 해수로부터 항산화 생성능이 있는 균주를 1차적으로 분리 한 후, DPPH법에 의하여 라디칼 소거능이 가장 높은 균주를 선발하여 SC2-1이라 명명하였다. 항산화능을 나타내는 분리균주 SC2-1의 생화학적 특성[20]은 이전 보고에 의해서 나타내었으며, 분리 균주는 그람 양성, 단간균으로 집락은 원형이며 오렌지색을 나타내었으며, 해양 세균으로 생육에 있어서 sodium chloride를 필요로 했으며 catalase 양성, oxidase 음성을 나타내었으며, D-fructose, D-maltose, D-mannitol를 이용하여 산을 생성하였다. 이와 같은 특성은 *Exiguobacterium* sp.가 갖는 특성과 유사하였으며, SC2-1 균주의 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 *Exiguobacterium oxidotolerans*와 98% 일치하는 것으로 분석되었다. 균주의 세포벽 지방산 조성은 Table 1에 나타내었으며, 이들의 주요한 지방산은 C<sub>13:0 iso</sub>, C<sub>13:0 anteiso</sub>, C<sub>15:0 iso</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:0 w11c</sub>, C<sub>17:0 iso</sub> 및 Sum in feature 4로 분석되어 본 균주는 *Exiguobacterium* 종과 98%이상 일치하는 것으로 밝혀졌으며, 이에 최종적으로 *Exiguobacterium* sp. SC2-1로 명명하였다.

Table 1. Cellular fatty acid profile of the strain SC2-1

Fatty acid	Composition (%)
isoC <sub>11:0</sub>	0.35
isoC <sub>12:0</sub>	1.25
C <sub>12:0</sub>	0.52
isoC <sub>13:0</sub>	12.84
anteisoC <sub>13:0</sub>	12.22
isoC <sub>14:0</sub>	0.86
C <sub>14:0</sub>	1.31
Sum in feature 1	1.38
isoC <sub>15:0</sub>	15.22
anteisoC <sub>15:0</sub>	3.21
C <sub>15:0</sub>	0.21
C <sub>16:1 w7c alcohol</sub>	0.59
isoC <sub>16:1 H</sub>	0.45
isoC <sub>16:0</sub>	1.23
C <sub>16:1 w11c</sub>	5.70
Sum in feature 3	3.56
C <sub>16:1 w5c</sub>	0.25
C <sub>16:0</sub>	12.93
isoC <sub>17:1 w10c</sub>	5.16
Sum in feature 4	1.45
isoC <sub>17:0</sub>	8.83
anteisoC <sub>17:0</sub>	2.36
C <sub>17:0</sub>	0.65
C <sub>18:3 w6c</sub>	3.52
C <sub>18:1 w7c</sub>	1.29
C <sub>18:0</sub>	2.66
Total	99.99

**탄소원 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성**

항산화성 물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하여 복합체를 만들고, DPPH는 항산화성 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로, 전자공여능 (electron donating ability; EDA)으로부터 항산화 활성을 추정할 수 있다. 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[4].

본 실험계에서 대조구로 자주 사용하는 합성 항산화제인 BHT, BHA는 항산화 작용으로 반응시간과 함께 525 nm에서 짙은 자색을 가지는 DPPH 용액의 흡광도가 점차적으로 감소하는 것으로 나타났다[11].

탄소원의 종류에 따른 분리균주 *Exiguobacterium* sp. SC2-1 배양액의 생육도 및 DPPH법에 의한 항산화 활성을 측정된 결과는 Fig. 1와 같이 17%~41% 범위였으며, maltose > fructose > glycerine > lactose > dextrose > mannitol > xylose > sucrose 순으로 나타났다.

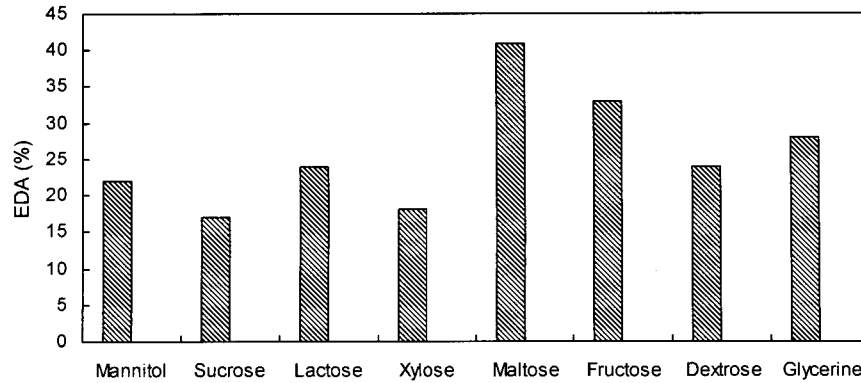


Fig. 1. Effect of various carbon sources on the antioxidant activity of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 supernatant.

또한 *Exiguobacterium* sp. SC2-1의 배양시 첨가한 탄소원 중에서 항산화 활성이 가장 우수한 maltose의 농도별 효과를 검토한 결과는 Table 2와 같이 나타났으며, 2.5% (w/v) 첨가 농도에서 배양한 배양액에서 60% 정도의 항산화 활성으로 가장 높게 나타났다.

**질소원 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성**

질소원이 *Exiguobacterium* sp. SC2-1 배양에 미치는 영향을 알아보기 위하여 최적 탄소원인 maltose 2.5% (w/v) 농도가 첨가된 MB배지에서 유기태 질소원 및 무기태 질소원 등 총 9종을 각각 0.5% (w/v)씩 첨가하여 조사한 결과는 Table 3에

Table 2. Effect of maltose concentration on the growth and antioxidant activity of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 supernatant

Concentration	Cell growth (OD <sub>600nm</sub> )			EDA(%) <sup>a)</sup>		
	24hrs	30hrs	48hrs	24hrs	30hrs	48hrs
None	0.830	0.820	0.840	30	22	14
0.5	0.897	0.912	0.912	38	30	20
1.0	0.970	0.865	0.865	41	34	28
1.5	1.254	1.223	1.322	48	50	52
2.0	1.093	1.134	0.877	50	52	54
2.5	1.127	1.176	0.988	60	62	56
3.0	1.092	1.107	0.885	60	51	52
4.0	0.052	1.076	0.819	53	54	54

<sup>a)</sup>EDA (Electron donating ability)  
 Each basal medium is Marine broth (Difco Co., USA).  
 Each value represents the average of three independent experiments.

Table 3. Effect of various nitrogen sources on the growth and antioxidant activity of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 supernatant

Source	Compounds	Cell growth (OD <sub>600nm</sub> )			EDA(%) <sup>a)</sup>		
		24hrs	30hrs	48hrs	24hrs	30hrs	48hrs
Nitrogen <sup>b)</sup> (0.5% w/v)	None	1.067	1.180	1.174	60	54.5	52
	Peptone	1.191	1.283	1.253	62.3	58.2	61
	Yeast extract	1.328	1.394	1.371	79.2	74	77
	Tryptone	1.398	1.439	1.519	76.6	67.6	51.3
	NaNO <sub>3</sub>	1.022	1.113	1.023	49	53.1	44.9
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.036	1.133	1.156	44.5	53	42.1
	(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	1.242	1.277	1.212	59.8	58.5	72
	Malt extract	1.058	1.174	1.253	61.3	59.5	59.4
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.080	1.161	1.156	45.8	53	51.3
	KNO <sub>3</sub>	0.976	1.096	1.093	52.2	52.3	49.7

<sup>a)</sup>EDA (Electron donating ability)  
<sup>b)</sup>Each basal medium is Marine broth (Difco Co., USA).  
 Each value represents the average of three independent experiments.

서와 같이 유기태 질소원인 yeast extract를 첨가한 배지에서 균 생육도 및 항산화활성이 가장 높게 나타났으며, 모든 실험구의 전자공여능은 42.1~77%의 범위였으며, tryptone을 첨가한 배지에서도 균 생육도 및 항산화 활성이 양호하였으며, 다른 유기태 질소원의 경우에도 대조구와 비교해 보았을 때 양호한 활성을 나타냈다. 그리고 NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 등 무기태 질소원을 첨가한 배지에서는 항산화 활성이 비교적 낮게 나타나는 것을 확인할 수가 있었다.

그리고 선발된 최적 질소원인 yeast extract 농도의 생육도 및 항산화 활성을 조사한 결과는 Fig. 2에서와 같이 질소원이 1%이상 첨가된 배지에서의 항산화 활성이 90%이상 나타났으며, yeast extract 1.5% (w/v)가 첨가된 배지에서 균 생육도 및 항산화 활성이 가장 높게 나타났다. 영양원에 대한 항산화 활성의 증가가 확연히 나타나는데, 어떠한 작용에 의해서 대사산물이 생성되는 지는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. Table 2,3에서와 같이 시간경과에 따라서도 항산화능이 감소하지 않는 것은 탄소원이나 질소원이 영양원으로 충분히 작용하여 균주가 2차 대사산물을 생산하는데 있어서 계속적으로 에너지원으로서 공급되어서 나타나는 결과라고 사료된다.

**무기염류 종류에 따른 배양액의 항산화 활성**

최적 무기염류의 선발 및 농도를 조사하기 위하여 maltose 2.5% (w/v)와 yeast extract 1.5% (w/v)가 첨가된 배지에 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 각각 0.05% (w/v) 첨가하여 균의 생육도 및 항산화 활성을 조사한 결과는 Table 4와 같이 5종의 무기염류는 균주의 성장에는 그다지 효과적으로 나타나지 않았지만 그 중에서도 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 첨가구에서 균 생육도 및 항산화 활성이 증가하는 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 buffering reagent로 작용하는 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 세포 구조를 형성하는 K<sup>+</sup>의 효과에 기인한다는 보고가 있다[8].

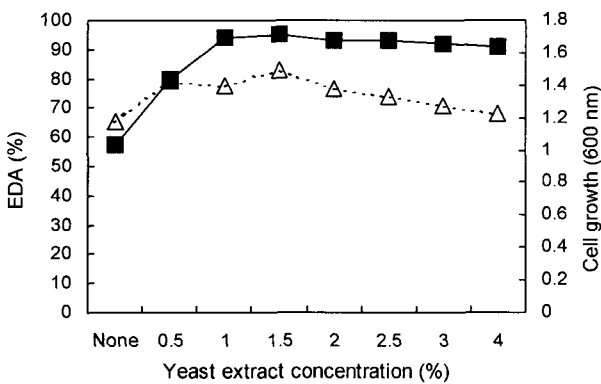


Fig. 2. Effect of yeast extract concentration on the growth and radical scavenging activity of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 supernatant. -Δ-, cell growth ; -■-, EDA.

Table 4. Effect of various mineral sources on the growth and antioxidant activity of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 supernatant

Mineral sources (0.05%, w/v)	Cell growth (OD <sub>600nm</sub> )	EDA(%) <sup>a)</sup>
None	1.322	93
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.340	94
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.221	93.6
MgCl <sub>2</sub>	1.252	93.8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.359	93
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.351	95

<sup>a)</sup>EDA (Electron donating ability)  
Each basal medium is Marine broth (Difco Co., USA).  
Each value represents the average of three independent experiments.

**최적 배지에서의 항산화 활성 비교**

*Exiguobacterium* sp. SC2-1을 최적배지에 배양한 후, 배양 상등액의 항산화 활성을 다른 항산화제와 비교한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 배양 상등액의 전자공여능(EDA)은 94~95%로 천연 항산화제인 α-Tocopherol (94%)과 합성 항산화제인 BHT (94%), BHA (95%)와 유사한 활성을 나타내었다. 이는 *Exiguobacterium* sp. SC2-1 배양액의 우수한 항산화 활성을 나타내는 것으로써 천연 항산화제로서 가능성을 보여주고 있는 것이며 인체에 유해한 합성 항산화제의 대체제로서의 가능성을 보여주는 것이다.

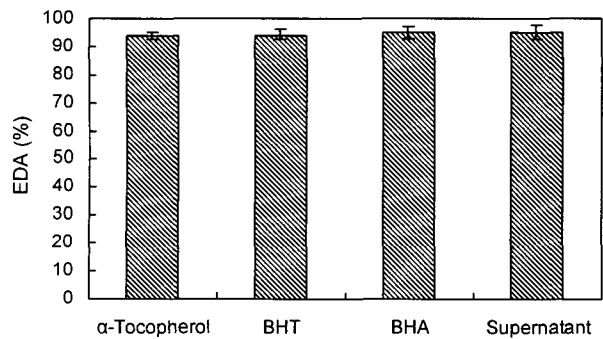


Fig. 3. Antioxidant activity of culture supernatant of strain *Exiguobacterium* sp. SC2-1. The concentration of α-tocopherol, BHT, and BHA added in reaction mixture were 0.5 mg/ml, respectively. BHT: butylated hydroxytoluene, BHA: butylated hydroxyanisole.

**요 약**

합성 항산화제에 대응할 수 있는 천연 항산화제의 개발에 대한 기초적인 자료를 제공하고자 해양 미생물을 이용한 연구를 하였으며, 전자공여능으로 항산화 물질 생산 능력이 우수한 해양 미생물을 분리하여 SC2-1라고 명명하였다. 분리

균주 SC2-1은 제주 연안 해수로부터 분리하였으며, 생화학 적, 유전학적, 세포벽의 지방산 조성을 토대로 최종적으로 *Exiguobacterium* sp. SC2-1로 동정하였다. 항산화물질을 생산을 위한 최적 배양조건 및 영양원을 조사한 결과는 다음과 같다. 항산화물질 생성 최적 온도는 25°C이고, 최적 pH는 7.8이며 최적 배양시간은 24시간이었다. 항산화물질 생산 최적 배지조성은 기본배지로 Marine broth에 탄소원으로는 maltose였으며, 적정농도는 2.5% (w/v)였다. 질소원에서는 유기태 질소원인 yeast extract이었고, yeast extract 최적농도는 1.5% (w/v)였으며, 최적 무기염류는 0.05% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가했을 때 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 최적배지 조건에서의 *Exiguobacterium* sp. SC2-1 배양액의 항산화 활성과 합성 항산화제, 천연 항산화제와의 비교실험 결과는 균주의 전자 공여능은 93~95%, 합성 항산화제인 BHT와 BHA는 94~95%, 천연 항산화제 α-Tocopherol은 94%로 거의 유사한 항산화 활성을 확인 할 수 있었다.

### 감사의 글

본 논문은 2005년도 제주대학교 해양과학대학 Brain Korea 21 사업에 지원을 받아 연구되었으며, 이에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

- Amarowicz, R., M. Naczek 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 irradiation on the antioxidant activity of rice hull, rice bran and barley bran. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 246-250.
- Bios, M. S. 1958. Antioxidant determination by the used of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-63.
- Cha, J. Y., H. J. Kim, B. S. Jun, J. C. Park, M. Ok and Y. S. Cho. 2003. Antioxidative activity and production condition of antioxidative substance by *Bacillus* sp. FF-7. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**(3), 165-170.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.
- Cha, W. S., M. Y. Lee, B. S. Cho, S. Y. Park and D. G. Oh. 2004. A study on the mycelial growth of *Agroclybe aegerita* in flask culture. *Kor. J. Life Sci.* **14**(4), 560-566.
- Cho, S. Y., B. J. You, M. H. Chang, S. J. Lee, N. J. Sung and E. H. Lee. 1994. Screening for the antioxidants in unused marine resources by the polarographic method. *Kor. J. Food. Sci. Tech.* **26**, 417-421.
- Choi, U. K., W. D. Ji, H. C. Chung, D. H. Choi and Y. G. Chung. 1997. Optimization for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **26**, 1039-1043.
- De Beer, D., E. Joubert, W. C. Gelderblom and M. Manley. 2003. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 902-909.
- E. Chain., H. W. Florey, M. B. Adelaide, A. D. Gardner, D. M. Oxford, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing and A. G. Sanders. 1940. Penicillin as chemotherapeutic agent. *The lancet.* **236**, 226-228.
- Frankel, E. N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their on food quality. *Food Chemistry.* **57**, 51-54.
- Fujimoto, K and T. Kaneda. 1980. Screening test for anti-oxidogenic compounds from marine algae and fractionation from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **46**, 1125.
- Halliwell, B and J. M. Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-14.
- Hayashi, K., K. Suzuki, M. Kawaguchi, T. Nakagima, T. Suzuki, M. Numata and T. Nakamura. 1995. Isolation of antioxidant from *Penicillium roquefortii* IFO 5956. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 312-320.
- Ito, N., S. A. Fukushima, M. Hasegawa, Shibata and O. T. Ogis. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in F344 rats. *J. Nat. Cancer Inst.* **70**, 343-347.
- Kang, Y. H., Y. K. Park and G. D. Lee. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **48**, 4873-4879.
- Kim, A. K and J. H. Kim. 2001. Alterations of antioxidant enzymes in response to oxidative stress and antioxidants. *J. Applied Pharmacology* **9**, 249-257.
- Kim, M. C., G. T. Park, H. J. Son, W. B. Choi and M. S. Heo. 2005. Antioxidant activity and characterization of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 isolated from sea water. *The Korean. J. Microbiology.* **41**(1), 74-80.
- 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.
- 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.
- Ryu, B. H., J. O. Park, H. S. Kim and M. J. Kim. 2000. Antioxidative activity of culture of *Streptomyces* sp. BH-405 on macrophage mediated modification of human low density lipoprotein[LDL]. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(2), 156-161.
- Takao, T., F. Kitatani, N. Watanabe, 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.