

항산화물질을 생산하는 해양방선균 *Streptomyces* sp. ACT-18의 동정 및 Electron Spin Resonance Spectrometry를 이용한 항산화활성

김만철 · 김주상 · Ramasamy Harikrishnan · 한용재 · 허문수*
제주대학교 수산생명의학과 해양과환경연구소

Identification and Antioxidant Activity using Electron Spin Resonance Spectrometry of Antioxidant Producing Marine Actinomycetes *Streptomyces* sp. ACT-18. Kim, Man-Chul, Ju-Sang Kim, Ramasamy Harikrishnan, Yong-Jae Han, and Moon-Soo Heo*. Department of Aquatic Life Medicine & Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea – For the research of the natural marine antioxidant, an antioxidant-producing marine actinomycetes was isolated from sea water in Jeju coastal area. The strain was identified based on 16S rDNA sequencing, the morphology by a method of scanning electron microscopy, physiological and biochemical characteristics and cellular fatty acid analysis. The isolated strain ACT-18 was gram positive, aerobic, non-motile spores. Substrate mycelia are dark green and yellow gray aerial mycelia. The cell size of the strain was 0.5~1.0 μ m. 16S rDNA sequence analysis showed that were Gram-positive bacteria grouped on *Streptomyces* sp. Results of cellular fatty acid analysis showed that major cellular fatty acids were C_{15:0} anteiso (39.33%), C_{16:1} cis 9 (11.96%), C_{16:0} (13.08%) and C_{17:0} anteiso (10.99%). The antioxidant activity of methanol extract from *Streptomyces* sp. ACT-18 was evaluated by measuring 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl, and alkyl radical scavenging activity using an electron spin resonance (ESR) spectrometer. DPPH radical scavenging activity of SBME (Streptomyces Broth Methanol Extract) A-18 was 46% at 0.1 mg/mL. Hydroxyl radical scavenging activity of SBME A-18 was 63% at 0.1 mg/mL. Alkyl radical scavenging activity of SBME A-18 was 39% at 0.1 mg/mL.

Key words: Identification, antioxidant activity, marine, *Streptomyces*, ESR

서 론

미생물로부터 항균항생제, 항암제, 효소저해제, 농업용 항생제, 면역조절제 등 다양한 생리활성물질을 탐색하기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다[19, 13, 21]. 방선균은 토양 속에 다양하게 존재하는 미생물의 일종으로 그람양성 진정세균에 속하며, 항생물질로 대표되는 이차대사산물, 생리활성물질, 비타민 등의 저분자물질을 생산하는 등 산업적인 응용범위가 매우 넓다[2, 15]. 최근 연구보고에 의하면 방선균주들이 생산하는 생리활성 물질의 다양성을 확인할 수가 있는데, 예를 들면 *Micromonospora* spp. 385종으로 가장 많은 생리활성 물질 생산균주로 확인이 되었으며, *S. griseus*가 187종, *S. lavendulae*가 129종, *S. antibioticus*가 95종, *S. hygrosopicus*가 286종의 각종 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려져 있으며, 생리활성 물질들은 대부분 peptide, macrolide, ansamycin, polyether 계열의 물질들의 구조적인 특징을 보이고 있다[5, 22].

항산화 물질은 일반적으로 활성산소와 과산화 지질의 제거물질로서 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[3]하고 있는 등 이물질에 대한 안정성에 대한 논란 뿐 아니라[12] 합성 항산화제에 대한 소비자의 기피성향과 합성 항산화제가 대량으로 투여된 동식물 실험에서 발암성이 보고되고[8] 합성 항산화제의 사용이 점점 제한되고 있다. 반면에 천연 항산화제로 이용되고 있는 비타민인 α -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. 미생물을 이용한 천연항산화 물질 연구에 있어서는 아직까지 미약하지만, 곰팡이[9], 효모[25], 세균[6], 방선균[4, 5] 등에서 항산화 물질에 대한 보고가 있으며, 또한 해양 유래 미생물에 대한 항산화 물질에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 또한 지금까지 생리활성물질 연구에 이용되어온 방선균종 대부분은 육상의 토양에서 분리된 것들이고, 해양의 방선균에 관하여서는 아직까지 거의 연구되지 않은 분야이다[1, 11].

*Corresponding author

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

E-mail: msheo@jejunu.ac.kr

미생물의 서식지로서 해양의 환경조건은 육상과 현저한 차이가 있기 때문에 해양에 있어서 방선균의 microflora는 육상과는 상당히 다를 것으로 사료되며, 또한 연안 해역에 존재하는 방선균 중에는 육상에서 유입된 담수 등으로 인하여 육상의 토양으로부터 유래된 방선균도 많은 것으로 알려지고 있다. 이들 중에는 해양이라고 하는 특이한 환경에 적응한 결과 대사체가 변화되어 새로운 2차 대사산물을 생산하는 균주도 있을 것으로 기대되며 해양은 새로운 생리활성물질 생산균주의 탐색원으로써 지극히 흥미로운 분야라고 말할 수 있다[20, 27].

따라서, 본 연구는 해양 유래의 새로운 천연 생리활성물질의 검색을 위한 기초적인 자료를 제공하고자 제주도 연안에서 분리된 해양방선균으로부터 항산화활성을 가지는 균주를 분리하였으며, 이 균주의 미생물학적인 동정과 배양액의 항산화 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

방선균주 분리 및 보관

균주의 샘플링을 위해서 제주도의 해수욕장을 중심으로 해수, 생물시료, 해조류를 각각 채취하여 방선균 분리용 시료로 사용하였다. 해양 방선균 분리용 배지로 Marine agar (MA, Difco, Co, USA), R2A agar(Difco, Co, USA), Yeast Mold agar(YM, Difco, Co, USA), Nutrient agar (NA, Difco, Co, USA)를 사용하였으며, 선별 분리주의 동정을 위해서는 ISP (International Streptomyces Project) 배지를 사용하였으며, 균주의 보존을 위해서 생장이 확인된 배지의 액체 배지를 이용하여 보관하였다.

방선균의 분리를 위해서 멸균 생리식염수에 해수는 10^{-2} ~ 10^{-3} 배로 희석하여 0.1 mL를 배지에 도말 한 후, 25~30°C에서 7~15일간 배양하여 나타나는 집락의 형태에 따라서 방선균을 분리하였으며, 생물시료나 해조류 같은 경우에는 갈아서 멸균 해수에 희석한 후, 배지에 도말하여 배양되었다.

분리방선균의 동정

분리 선발된 균의 1차 동정은 형태학적, 배양학적, 및 생화학적 특성을 Manual of method for general bacteriology와 Biochemical tests for identification of medial bacteria에 준하여 검토하고, Bergey's Manual에 의하여 제안된 방법에 의해 분석하였다. 분리균주 ACT-18의 형태학적 분석은 SEM(Scanning Electron Microphotography, JSM-6700F JEOL Ltd)을 통해 형태학적 특성을 관찰하였으며, 균주의 생화학적 성상 시험은 표준생화학 검사법에 따라 시험하였고 균주의 생화학적 성상을 확인하기 위하여 Bergey's Manual에 기재된 균주와 비교하여 나타내었다.

균주 ACT-18의 ISP(International Streptomyces Project) 배지에서의 배양특성을 확인하기 위해 기본적으로 Shirling

과 Gottlieb[26]에 의한 International Streptomyces Project (ISP)의 방법과 Bergey's Manual에 수록된 방법에 따라 배양학적 특성을 확인하였다.

16S rRNA 염기서열 및 Cellular Fatty Acid 분석

분리된 해양 유래 방선균의 16S rDNA 염기서열을 분석하기 위하여 250 mL flask에 MB 50 mL가 첨가된 배지에 분리균주를 접종하여 25°C에서 200 rpm으로 5일간 배양하였다. 배양액은 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 정제한 후, ABI 3730XL capillary DNA Sequencer를 이용하여 sequencing 분석을 하였으며, 염기조성, 상호비교(pairwise comparisons)를 위한 염기치환 양상, codon usage 및 각 개체 개체군의 유전자 차이는 MEGA 3.0 프로그램으로 계산되었으며, 미생물 군집 분석에 이용된 계통수는 distance 방법으로 MEGA 3.0(9) 프로그램의 Pair-distance를 이용하여 작성하였다. 결정된 염기서열을 NCBI BLAST를 이용하여 GenBank에 보고된 균주와의 상동성을 조사하였다.

그리고 균주의 세포 지방산 분석을 위해 25°C 일주일간 배양한 균체의 지방산을 Miller and Berger[17]의 방법에 준하여 Methyl ester화 시켰으며, 전 처리된 Fatty acid methyl esters(FAME) mixtures를 gas chromatograph(Hewlett Packed model 5898A GC)로 Microbial Identification software(MIDI)의 지침에 따라 분석하였다.

해양유래 방선균주 배양액 메탄올 추출물의 제조

분리균주 ACT-18의 배양액의 항산화 활성을 측정하기 위해 배양액의 추출물을 제조하였다. 삼각플라스크에 MB (Marine Broth, Difco. Co. USA)를 100 mL 분주한 후, 분리균주 ACT-18을 접종하여 Shaking incubator에서 25°C에서 120 rpm으로 2주간 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 균체 및 배양액을 분리하였으며, 배양액에 동량의 메탄올 용액을 첨가하여 over night 시킨 후, 감압 농축기를 이용하여 유기용매 성분들을 모두 날려버린 후, 배양액 추출물의 수율을 측정하였으며, 방선균주 배양액 메탄올 추출물은 항산화활성 평가를 위해서 실험에 이용되었다.

Electron Spin Resonance Spectrometer를 이용한 DPPH 라디칼 소거활성

각 sample의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical 소거활성은 Nanjo[18] 등의 방법에 의하여 측정하였

다. 60 μL 시료용액에 DPPH(60 μM) 용액을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 ESR(Electron Spin Resonance) Spectrometer로 측정하였다. ESR 측정에 대한 조건은 Table 1에 나타내었다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336±5 mT, time constant : 0.3s, power : 5 mW, amplitude : 1×500의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 DPPH radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium})] \times 100$$

Electron Spin Resonance Spectrometer를 이용한 Hydroxyl radical 소거활성

Sample의 hydroxyl radical 소거활성은 Rosen[24] 등의 방법에 의하여 측정하였다. 20 μL 시료용액에 0.3 M DMPO 20 μL, 10 mM FeSO₄ 20 μL, 10 mM H₂O₂ 20 μL을 혼합한 다음 quartz capillary tube에 옮긴 후 2.5분 후에 ESR spectrometer로 측정하였다. ESR 측정에 대한 조건은 Table 1에 나타내었다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3s, power : 1 mW, amplitude : 1×100의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 hydroxyl radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium})] \times 100$$

Electron Spin Resonance Spectrometer를 이용한 Alkyl radical 소거활성

각 추출물의 alkyl radical 소거활성은 Hiramoto[10] 등의 방법에 의하여 측정하였다. 20 μL의 시료용액에 D.W 20 μL, 40 mM AAPH 20 μL, 40 mM POBN 20 μL를 혼합한 다음 37°C에서 30분 방치한 후 quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR로 측정하였다. ESR 측정에 대한 조건은 Table 1에 나타내었다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3s, power : 7 mW, amplitude : 1×100의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 alkyl radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Alkyl radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium})] \times 100$$

결과 및 고찰

분리균주의 형태학적 및 생화학적 특성

분리균주 ACT-18은 전형적인 방선균주인 *Streptomyces* 종들과 유사한 형태학적 성상이 확인되었다. 기본적으로 포자는 원통형의 형태로 길이는 약 0.5~1.0 μm 폭은 약 0.4~0.5 μm였으며, 균사체들이 연쇄적으로 이어져 있는 모습을 하고 있었다(Fig. 1). 이러한 형태적인 특성은 방선균주들이 일반적으로 갖고 있는 형태적인 특징으로서 이러한 성상들을 기본적으로 방선균주임을 알 수 있는 단적인 결과로 사료된다.

일반적으로 세균을 동정함에 있어서 생리, 생화학적 특성 및 배양학적 특징을 조사한 후, 참고균주와의 특성을 비교 분석하게 된다. 또한 동정에만 한정되지 않고 그 균주의 기질분해나 성장조건 등의 특성을 파악할 수 있어 미지의 균주의 동정에 필수적이라고 할 수 있다. 그 결과 분리균주 ACT-18은 그람염색을 통하여 그람양성으로 판명되었으며, 해양유래미생물로서 성장을 위해서 NaCl을 필요로 하는 것으로 확인되었다. 또한 분리균주 ACT-18은 방선균주의 일반적인 생화학적 성상과 거의 일치하게 나타났으며, MA 배지상에서의 aerial mycelium 색소분석결과 균사체의 노란색의 회색을 확인할 수 있었으며, substrate mycelium은 짙은 초록색으로 최종 판명되었다. 분리균주 ACT-18은 *Streptomyces* 종들과 거의 유사한 생화학적 특성을 확인할 수 있으며, 비교균주와의 연관성을 찾을 수는 없었지만 전형적인 방선균주의 생화학적 특성을 확인할 수 있었다(Table 1) 그리고 분리 균주의 mycelia는 성장을 하면서 점차적으로 색이 짙해지는 양상을 보였으며, 균사체 바깥쪽으로 갈수록 어두워지는 특성을 보였다.

대부분의 세포벽 지질성분은 고등생물의 경우에 조성은 단순하고, 광범위하게 동일한 성분을 갖기 때문에 분류지표로 활용하기 어렵지만, 세균의 경우에는 다양성이 풍부하여 매우 유효한 지표로 이용되고 있다. 분리균주의 세포벽 지방산 조성은 Table 2에 나타내었으며, 이들의 주요한 지방산은

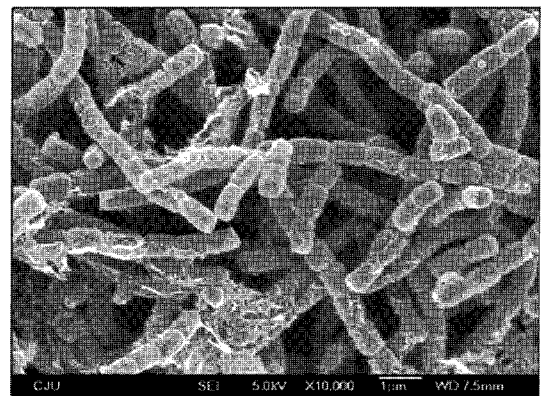


Fig. 1. Scanning electron micrograph of Strain ACT-18. Cell were grown on MA at 25°C for 10 days.

Table 1. Comparison of physiological and biochemical characteristics of the isolated *Streptomyces* sp. ACT-18.

Characterization	Species				
	Strain ACT-18	<i>Streptomyces champavatii</i>	<i>Streptomyces globosus</i>	<i>Streptomyces olivaceiscleroticus</i>	<i>Streptomyces albosporus</i>
Growth under anaerobic condition	-	-	-	-	-
Gram reaction	+	+	+	+	+
Motile spores	-	-	-	-	-
Color of aerial mycelium	Yellow Gray	Yellow	Gray	Gray	Red
Color of substrate mycelium	Dark Green	Dark Green	ND	Grayish yellow to olive brown	Yellow, Red, Violet
Optimum pH for growth	7.6	ND	8	ND	ND
Optimum NaCl for growth	2.5%	ND	ND	ND	ND
Growth on					
L-Arabinose	ND	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	ND	+
D-glucose	+	+	+	+	+
Sucrose	ND	°TM	+	+	ND
D-Xylose	+	+	+	+	+

+, positive; -, negative; ND, no data; V, variable results of test. ^aData compiled from references 10, 15, 17, and 26. Carbohydrate utilization was determined by growth on carbon utilization medium (ISP medium No. 9) supplemented with 1% carbon sources at 25°C. NaCl and pH range for growth was determined on inorganic salts starch agar medium (MA).

Table 2. Cellular fatty acid profile of the strain ACT-18.

Fatty acid	Composition (%)
12:0	0.27
13:0 ANTEISO	0.27
14:0 ISO	1.35
14:0	1.02
15:0 ISO	4.03
15:0 ANTEISO	39.33
15:1 B	0.29
15:0	2.34
16:1 ISO H	0.63
16:0 ISO	5.51
16:1 CIS 9	11.96
16:0	13.08
16:0 METHYL	1.12
17:1 ANTEISO C	3.03
17:0 ISO	1.12
17:0 ANTEISO	10.99
17:1 CIS 9	1.41
17:0 CYCLO	0.75
17:0	0.76
18:1 CIS 9	0.34
Total	99.79

C_{15:0} anteiso(39.33%), C_{16:1} cis 9(11.96%), C_{16:0}(13.08%), C_{17:0} anteiso(10.99%) 나타났으며, 이들 주요 지방산은 전체에 약 75% 이상 차지하며, 방선균주에 가장 많이 존재하는 지방산인 C_{15:0} anteiso의 비율이 가장 높게 나타나는 것으로 확인되었다.

또한 분리균주 ACT-18의 ISP(International Streptomyces

Project)배지 상에서의 배양학적 특성을 살펴보면 ISP NO.1, 2, 4, 7 및 Marine agar에서 양호한 성장을 보였으며, 각 배지 상에서의 균사체의 색의 다름을 확인할 수 있었다. Tryptone yeast agar에서는 vegetative mycelia의 색깔이 회색의 초록색을 띄었으며, aerial mycelia의 색은 베이지색을 나타냈다. Yeast malt배지에서는 vegetative mycelia에서는 짙은 초록색, aerial mycelia는 베이지색에 가까운 색을 보였으며, 무기염 한천배지상에서는 vegetative mycelia의 색이 하얀색에서 베이지에 가까웠다. 그리고 Pridoham-Gottlieb 배지상에서는 좋은 성장을 보이기도 않았으며, 균사체의 색 또한 뚜렷한 색을 보이지 않았다(Table 3)

16S rDNA 염기서열 및 종속 계통적 분석

분리균주 ACT-18의 계통학적 분석결과는 총 9개의 참고 균주와의 염기서열 분석 비교를 통하여 이루어 졌으며, *Streptomyces microflavus*, *Streptomyces griseorubiginosus*, *S. fulvotobius*, *S. globosus*, *S. albidus* 균주들과 가장 유사한 염기서열 상동성을 확인할 수 있었다. 비교균주들과 99% 이상의 상동성을 확인할 수 있었으며(Fig. 2), 최종적으로 분리균주 ACT-18을 *Streptomyces* sp. ACT-18로 명명되었다.

메탄올 추출물의 농도별 항산화활성 비교

분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-18의 배양액 메탄올 추출물의 수율을 조사한 결과 141 mg/mL의 농도를 확인할 수 있었으며, 농도별 항산화 활성을 DPPH radical, hydroxyl radical, alkyl radical 소거활성을 ESR spectroscopy 측정방

Table 3. Cultural characteristics of the isolated *Streptomyces* sp. ACT-18 cultured in International Streptomyces Project medium.

Medium	Characteristics		
	<i>Streptomyces</i> sp. ACT-18		
	Growth	Vegetative mycelia	Aerial mycelia
Tryptone yeast agar (ISP NO. 1)	G	Gray to Green	White to beige
Yeast malt agar (ISP NO. 2)	G	Dark Green	Beige
Inorganic salt-Starch agar (ISP NO. 4)	G	White to beige	White to Beige
Tyrosine agar (ISP NO. 7)	G	Dark Gray	Dark, Beige
Pridoham-Gottlieb agar (ISP NO. 9)	M	White	Beige
Marine Agar	G	Dark Green	Whiteto Beige

G, growth; M, Moderate

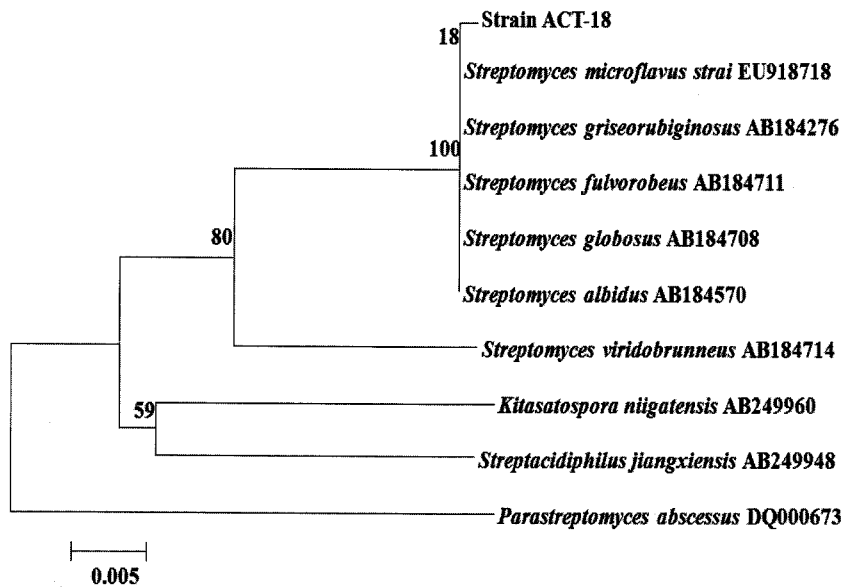


Fig. 2. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain ACT-18 and member of the *Streptomyces* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database. *Kitasatospora niigatensis*, *Streptomyces jiangxiensis*, *Parastreptomyces abscessus* was used as an outgroup. Bar, 0.005 nucleotide substitution per position.

법을 이용하여 평가하였다.

DPPH는 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로서 짙은 자색이 탈색되는 정도에 따라 항산화 효과를 전자공여능으로 측정하는 방법으로 항산화제 탐색에 일반적으로 이용되는 방법이다. 기존에는 분광학적으로 측정하였으나 본 실험에서는 ESR(Electron Spin Resonance) spectroscopy를 이용하여 더욱 정밀도를 높였으며 색소에 의한 오차를 줄일 수 있는 방법이라 할 수 있겠다. ESR spectroscopy에 의한 측정방법은 가장 유망한 방법 중의 하나로써, 방사선 조사시 입사된 에너지의 일부가 분자결합을 붕괴시켜 방출된 자유 라디칼이나 이온들을 측정할 수 있는 것으로 시료준비가 간편하고 신속하며 시료에 손상을 주지 않는 검지기술로 알려져 있다[14, 16].

본 항산화 실험에서 *Streptomyces* sp. ACT-18 배양액 메탄올 추출물의 시료 농도를 각각 0.1, 0.5, 1 mg/mL로 제조

한 후 실험에 사용하였으며, DPPH 소거활성에 대한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

DPPH radical 소거활성 결과 농도 의존적 라디칼 소거활성 특성을 보였으며, 0.1 mg/mL 농도에서는 DMSO 10% 실험구와 거의 유사한 활성을 보였으며, 0.5 mg/mL 농도에서는 DMSO 1% 실험구와 비교해보았을 때 약 2 배정도의 활성의 차이를 확인할 수 있었다.

Hydroxyl radical(OH)은 산소종 중 반응성이 매우 강하며 지질 산화를 개시하고 DNA 손상 및 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있다. 또한 hydroxyl radical은 생체의 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 H₂O₂가 Fe²⁺나 Cu²⁺ 이온의 존재하에서 생성되며 가장 독성이 강한 free radical[7, 23]이므로 이 라디칼을 소거하는 정도를 측정하였다. *Streptomyces* sp. ACT-18 메탄올 추출물의 hydroxyl radical 소거활성에 대한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 그 결

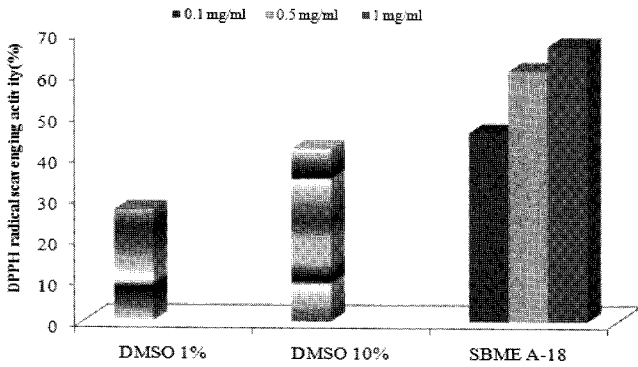


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of strain ACT-18 methanol extract by ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy. NC, negative control (water).

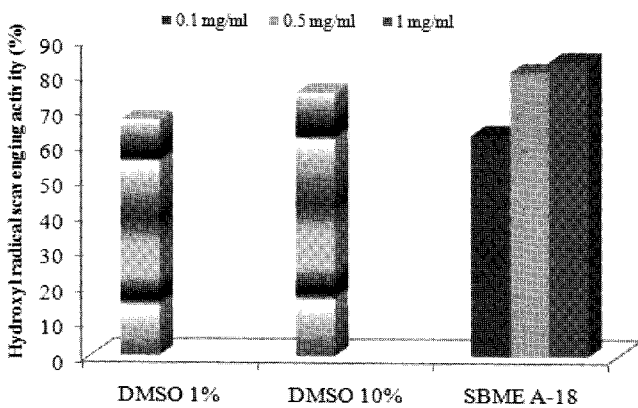


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of strain ACT-18 methanol extract by ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy. NC, negative control (water).

과 0.1 mg/mL 농도 처리구에서는 DMSO 처리구보다 낮은 라디칼 소거활성을 보였지만 그 이상의 농도에서는 농도의존적 특성을 보이면서 활성이 점차적으로 증가하는 양상을 보였다. 또한 0.5 mg/mL 이상 처리구에서는 모두 DMSO 처리구보다 높은 활성을 보였으며, 모든 실험구에서 높은 hydroxyl radical 소거활성을 보였다.

Alkyl radical은 hydrocarbon reaction에서 초기 반응 생성물로 많이 형성된다. 이는 불포화지방산이 산소에 노출되면 지질과산화이 일어나면 이는 free radical에 의해 불포화지방산의 methylene(-CH₂)기로부터 수소원자(H)가 탈취함에 따라 개시(initiation)된다. 이를 흔히 일으키는 radical로는 ·OH, RO·, ROO·, HO₂· 등이 있고 O₂과 H₂O₂는 그 자체로는 그런 능력이 없다. 수소탈취에 의해 생긴 alkyl radical(R·)은 분자재구성을 통해 diene형태로 바뀌고 이것이 다시 산소와 결합하여 peroxy radical을 형성한다. Peroxyl radical은 다시 다른 불포화지방산으로부터 수소를 탈취함으로써 일종의 연쇄반응이 진행될 수 있다. Peroxyl radical은 또한 분자재구성을 통해 여러 형태의 과산화물로 전환된다. 지질과산화물은 그 자체로는 상당히 안정되나 전이금속의 존재 하에서는 분해가 촉진된다. 지질과산화물의 분해산물은 다양하며 많

은 종류의 carbonyl 화합물을 포함한다. 생체막에는 다량의 불포화지방산을 포함하고 있다. 따라서 지질과산화로 인해 지질분자의 구조적 변화가 넓은 범위에 걸쳐 일어나면 생체막 fluidity의 감소, membrane potential의 감소, 이온투과성의 증가, 세포소기관 내용물의 누출 등이 예상되고 결국은 세포기능의 저하와 세포의 죽음을 초래할 수 있다. 지질과산화물과 그것의 분해산물 중에는 생체에 유해한 성분들이 있으며 대식세포기능의 억제, 단백질합성 억제, 효소의 실패, thrombin 과다생산 등과 같은 유해 작용들이 보고되고 있다. 따라서 본 실험에서는 실험군주가 지질과산화의 시발점이라 할 수 있는 alkyl radical의 소거활성을 통해 그 생리활성물질로서 가능성을 확인하고자 하였다.

Fig. 5는 추출물의 농도별 alkyl radical에 대한 항산화활성 결과를 나타낸 그래프로서 추출물 농도별 투여 모든 실험구에서 대조구인 DMSO 보다 높은 alkyl radical 소거활성을 확인할 수 있었다. 또한 0.1 mg/mL의 농도에서도 DMSO 10%처리구보다 높은 활성을 나타내어 본 추출물이 alkyl radical에 대해서는 좋은 항산화활성을 보이는 것으로 확인되었다. 각각의 농도별 투여구에서는 농도에 의존적으로 활성이 높아지며, 1 mg/mL의 농도에서는 control과 비교해 보았을 때 3배 이상의 항산화활성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 Ryu[25] 등이 보고한 방선균주 배양액 ethylether 추출물의 항산화활성결과와 평가방법에서는 차이가 있었지만, 방선균 배양액의 항산화활성에 있어서는 좋은 결과를 나타낸 것과 일치하는 결과였으며, Chang[3]이 보고한 DPPH 라디칼 소거활성에 있어서는 일치하는 결과로 최종 분석되었다. 차후 항산화 물질 분리, 정제 및 구조적인 분석을 통한 물질동정을 통한 항산화 작용 기작에 관한 연구가 수행되어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 제주 연안 해수로부터 분리된 항산화물질을 생

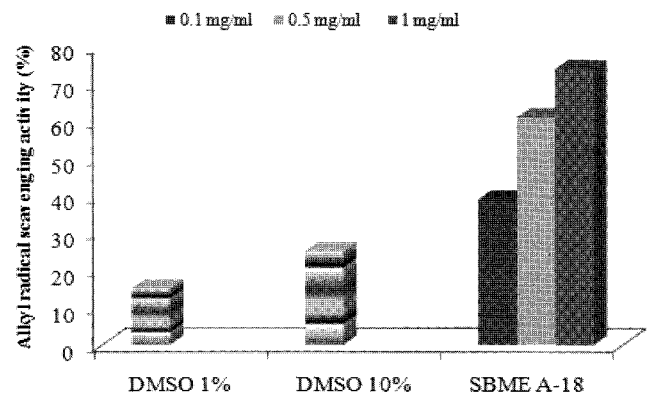


Fig. 5. Alkyl radical scavenging activity of strain ACT-18 methanol extract by ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy. NC, negative control (water).

산하는 해양 방선균의 천연해양항산화물질에 관한 연구이다. 균주 ACT-18은 16S rDNA 염기서열, 전자현미경을 이용한 형태학적 분석, 생리학적, 생화학적 특성 및 세포 지방산분석을 통하여 동정되었다. 분리균주 ACT-18은 Gram 양성, 호기성, 비운동성 포자, 배지상에서 substrate mycelia의 색이 어두운 초록색, aerial mycelia는 노란색의 회색을 나타내었다. 세포사이즈는 약 0.5~1.0 μm 였다. 16S rDNA 염기서열 분석결과 Gram 양성박테리아인 *Streptomyces* 종들과 그룹을 형성하였다. 지방산분석결과 주요 지방산은 C_{15:0} anteiso(39.33%), C_{16:1} cis 9(11.96%), C_{16:0}(13.08%)과 C_{17:0} anteiso(10.99%)로 분석되었다. *Streptomyces* sp. ACT-18의 배양액 메탄올 추출물의 항산화 활성은 electron spin resonance (ESR) spectrometer에 의한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl, alkyl 라디칼 소거활성을 측정하여 나타내었다. 그 결과 배양액 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 0.1 mg/mL의 농도에서 46%의 라디칼 소거활성을 보였으며, Hydroxyl 라디칼 소거활성은 0.1 mg/mL에서 63%, alkyl 라디칼 소거활성은 0.1 mg/mL에서 39%의 소거활성을 보였다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2006-F00051)로서 연구비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Alderson, G., D. A. Ritchie, C. Cappellano, R. H. Cool, N. M. Ivanova, A. S. Huddleston, C. S. Flaxman, V. Kristufek, and A. Lounes. 1993. Physiology and genetics of antibiotic production and resistance. *Res. Microbiol.* **144**: 665-672.
- Beppu, T. and S. Horinouchi. 1991. Molecular mechanisms of the A-factor-dependent control of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Planta Medica.* **57**: 44-47.
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**: 59-63.
- Chang, H. B. and J. H. Kim. 2007. Antioxidant properties of dihydroherbimycin A from a newly isolated *Streptomyces* sp. *Biotechnol Lett.* **29**: 599-603.
- Chang, H. B., S. C. Kim, and J. H. Kim. 2006. Chemical characteristics and biological activities of herbimycin A and dihydroherbimycin A produced by soil isolate *Streptomyces* sp. AO-0511. *The Korean Journal of Microbiology.* **42**: 47-53.
- 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.
- Evans, P. and B. Halliwell. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British J. Nutr.* **85**: S67-S74.
- Frankel, E. N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their on food quality. *Food Chemistry.* **57**: 51-54.
- 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.
- Hiramoto, K., H. Johkoh, K. I. Sako, and K. Kikugawa. 1993. DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radical Res.* **19**: 323-332.
- Hopwood, D. A. 1987. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis: of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. Lond. Series B.* **23**: 2257-2269.
- Ito, N. S., A. Fukushima, A. Hasegawa, M. Shibata, and O. T. Ogis. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in F344 rats. *J. Nat. Cancer Inst.* **70**: 343-347.
- Iwai, Y. and Y. Takahashi. 1992. Selection of microbial sources of bioactive compounds. pp. 281-302. In S. Omura (ed.), *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*. Springer-Verlag, New York.
- Janzen, E. G., D. L., Towner, and D. L. Haire. 1987. Detection of free radical generated from the *in vitro* metabolism of carbon tetrachloride using improved ESR spin trapping techniques. *Free Radical Res.* **3**: 357-364.
- Jones, G. H. 1985. Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces* antibiotics. *J. Bacteriol.* **163**: 1215-1221.
- Kadiiska, M. B. and R. P. Masom. 2002. *In vivo* copper-mediated free radical production: an ESR spin-trapping study. *Spectrochim Acta A* **58**: 1227-1239.
- Miller, L. and T. Berger. 1985. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett-Packard Application Note 228-241. Hewlett-Packard Co., Avondale, Pa.
- Nanjo, F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, and Y. Hara. 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Bio. Med.* **21**: 895-902.
- Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics. pp. 33-67. In M. Goodfellow (ed.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press. London.
- Okami, Y., T. Okazaki, T. Kitahara, and H. Umezawa. 1976. Studies on marine microorganisms. A. new antibiotic, aplasmomycin, produced by a *Streptomyces* isolated shallow sea mud. *J. Antibiotics.* **29**: 1019-1025.
- Okazaki, T. 1987. Rare actinomycetes, new breed of actinomycetes. *J. Microorganismsm.* **3**: 453-461.
- Omura, S., A. Nakagawa, and N. Sadakane. 1979. Structure of herbimycin, a new ansamycin antibiotic. *Tetrahedron Lett.* **44**: 4323-4326.
- Roberfroid, M. and P. B. Calderon. 1995. In free radicals and oxidation phenomena in biological systems. University

- of Catholique de Louvain Brussels, New York, pp. 11-32.
24. Rosen, G. M. and E. J. Rauckman. 1984. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. In L. Packer (Ed.) *Methods in enzymology*, vol105. Academic Press, Orlando, FL. pp. 198-209.
25. Ryu, B. H., H. S. Kim, J. S. Jung, S. H. Lee, and Y. A. Ji. 1987. Screening for antioxidant compounds from edible marine algae. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**: 256-261.
26. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
27. Tsukamoto, M., S. Nakajima, H. Arakawa, Y. Sugiura, H. Suzuki, M. Hirayama, S. Kamiya, Y. Teshima, H. Kondo, K. Kojiri, and H. Suda. 1998. A new antitumor antibiotics, BE-19412A, produced by a *Streptomyces*. *J. Antibiotics.* **51**: 908-914.

(Received Sep. 18, 2009/Accepted Feb. 12, 2010)