

ORIGINAL ARTICLE

한국 전통발효식품인 청국장에서 분리한 *Bacillus methylotrophicus*에 의한 항산화물질의 생산

이나리 · 우가영 · 장준혁 · 이상미 · 고태훈 · 이희섭¹⁾ · 황대연 · 손흥주*
부산대학교 생명자원과학대학, ¹⁾부산대학교 생활환경대학

Antioxidant Production by *Bacillus methylotrophicus* Isolated from Chungkookjang, Korean Traditional Fermented Food

Na-Ri Lee, Ga-Young Woo, Jun-Hyeok Jang, Sang-Mee Lee, Tae-Hun Go, Hee-Sup Lee¹⁾, Dae-Youn Hwang, Hong-Joo Son*

College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

¹⁾College of Human Ecology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Although antioxidant activities of Korean traditional fermented foods were reported by many researchers, study on antioxidant activity of microorganism originated from Korean traditional fermented foods was little. Therefore, we improved condition for antioxidant production by a bacterium isolated from home-made Chungkookjang. We selected a bacterial strain, which showed the highest antioxidative activity, from Chungkookjang and then named GJ. The selected GJ strain was identified as *Bacillus methylotrophicus* by alignment data of 16S rRNA gene nucleotide sequences. Improved medium compositions for DPPH radical scavenging activity were 0.25% sucrose, 1% peptone, 0.01% MgSO₄·7H₂O and initial pH 6.5, respectively. Optimal culture conditions were 30°C, 200 rpm and 4% inoculum volume, respectively. In improved conditions, DPPH radical scavenging activity of GJ reached to 91% in a short time. The strain GJ also possessed ACE inhibition and other antioxidative activities; ACE inhibition activity (49.4%), ABTS radical scavenging activity (99.8%), metal chelating activity (67.9%), SOD-like activity (36.5%) and reducing power ($A_{700} = 5.982$) were observed, respectively. Therefore, our results suggest that *B. methylotrophicus* GJ strain may be potential candidate for functional foods, cosmetic products for anti-aging and medicine for diseases caused by oxidative stress.

Key words : *Bacillus methylotrophicus*, Antioxidant activity, Chungkookjang

1. 서론

Hydroxyl 라디칼, peroxides 및 superoxide와 같은 활성산소종은 주위의 물질과 반응성이 아주 강해 세포 내 단백질, 지질분자, 유전정보를 함유한 DNA 등

에 산화적 손상을 입혀 노화, 당뇨병, 고혈압 및 각종 암 등의 여러 가지 질병을 유발하는 원인이 된다(Aruoma, 1994; Frlich와 Riedere, 1995, Lee 등, 2009b). 이것을 방지할 수 있는 것이 항산화물질과 항산화효소이다. 항산화물질은 이차적인 항산화제로서, 항산화 촉진제

Received 25 January, 2013; Revised 14 February, 2013;

Accepted 4 April, 2013

*Corresponding author : Hong-Joo Son, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea
Phone: +82-55-350-5544
E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

역할을 하지만 빠르게 흡수되어 소멸되는 단점이 있으며, 대표적인 예로 비타민 C, 글루타치온 등이 있다. 항산화효소는 신체내부에 존재하면서 신체의 방어시스템을 맡고 있는 효소로서, superoxide dismutase (SOD)와 catalase가 대표적이다.

지금까지 광범위하게 사용되어 온 butylhydroxyanisole(BHA) 및 butylhydroxytoluene (BHT)과 같은 합성 항산화제는 안전성에 대한 문제가 대두되면서 사용 규제가 강화되고 있다(Branen, 1975). 현재 천연 항산화제로 이용되고 있는 비타민 C, carotenoid 및 α -tocopherol 등은 항산화 효과가 낮고, 가격이 비싼 단점이 있다(Kim 등, 2005). 따라서 인체에 무해하면서 항산화능이 강한 천연 항산화제에 대한 개발이 요구되고 있다. 천연 항산화제 개발을 위해 미생물의 대사산물, 조류와 같은 해양생물, 동물 및 식물 등 매우 다양한 생물체들이 연구의 대상이 되고 있다. 이 중 유용 미생물이 생성하는 항산화물질은 촉매작용이 매우 강하고, 산화물의 제거 과정에서 쉽게 산화되지 않을 뿐만 아니라 인위적인 가열 등에 의해서도 쉽게 파괴되지 않은 특성이 있다.

청국장, 된장 및 김치 등과 같은 우리나라 전통 발효식품의 항산화능에 대한 연구는 많이 보고되어 있다(Ahn 등, 2012; Joo와 Park, 2010; Ku 등, 2007). 그러나 우리나라 발효식품 제조공정에 많이 관여하는 미생물을 순수분리한 후, 이 미생물이 생성하는 항산화물질에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다(Cha 등, 2003).

본 연구는 생약식물자원인 맥문동의 기능성 식품화, 즉 항산화 활성과 항고혈압 활성을 가진 맥문동 발효식품의 제조를 최종 목표로 설정되었으며, 이에 따라 먼저 항산화능을 보유한 미생물을 각종 시료로부터 순수분리한 후, 항산화 활성 생산을 위한 최적조건 및 항고혈압 활성을 조사함으로써 맥문동 발효를 위한 기초자료를 구축하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 분리 및 동정

항산화 물질을 생산하는 균주를 분리하기 위하여 사용한 시료는 각 가정에서 전통적인 방법에 의하여

제조한 청국장이었다. 시료는 멸균수를 이용하여 단계별로 희석하였다. 이때, *Bacillus* 균주만을 선별하기 위해 항온수조를 이용하여 90°C에서 15분정도 방치했다. 각 희석 시료 100 μ l를 skim milk 배지(3% skim milk, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.8% agar, pH 7.5)에 접종하여 30°C에서 1~2일 동안 배양하였다. Clear zone의 크기가 크고, 명확하며, 성장속도가 빠른 colony만을 순수분리하였다. 이들을 대상으로 DPPH 라디칼 소거능을 측정 한 후, 항산화능이 가장 우수한 GJ 균주를 공시균주로 선정하였다.

GJ 균주는 16S rRNA gene의 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. 16S rRNA gene을 증폭하는데 사용된 primer는 *E. coli* 16S rRNA gene의 보존염기순서에 근거하여 합성된 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') primer와 1492R(5'-TACGGYTACCTG TTACGACTT-3') primer였다. 분석된 염기서열을 NCBI GenBank에 있는 데이터베이스를 이용하여 유사균주와의 상동성을 비교하였다(Lane, 1961). 또한 염기서열을 Clustal X program을 이용하여 정렬한 후, Mega 5 프로그램을 이용하여 GJ 균주의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

2.2. DPPH 라디칼 소거활성 생산 최적조건 검토

전배양은 50 ml의 Tryptic Soy Broth(TSB)가 함유된 250 ml 용량의 Erlenmeyer flask에 균주 한 백입이를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24시간동안 왕복 진탕배양했다. 전배양액 1%(v/v)를 50 ml의 배지가 함유된 250 ml Erlenmeyer flask에 접종하여 30°C, 200 rpm에서 12시간동안 왕복 진탕배양했다. 이 조건에서 각종 탄소원, 질소원, 무기염 및 pH에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 이 때, DPPH 라디칼 소거능은 상대활성으로 나타내었다. TSB 조성은 1.7% tryptone, 0.3% soytone, 0.5% NaCl, 0.25% K₂HPO₄, 0.25% glucose(pH 6.8)이었다.

2.3. DPPH 라디칼 소거능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능은 Blois(1958) 방법으로 측정하였다. 배양액을 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후, 상등액 500 μ l에 200 μ M DPPH 용액 500 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 소거능은 시료 대신 증류수를 첨

가한 대조군과 시료간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

2.4. ACE 저해능 및 기타 항산화능 측정

항고혈압 활성은 angiotensin-converting enzyme (ACE) 저해능을 측정함으로써 조사하였다. ACE 저해능은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 시료 50 μ l에 기질용액 100 μ l를 첨가하여 37°C에서 5분간 반응을 시켰다. ACE 용액 100 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1 N HCl을 첨가하여 반응을 중지시켰다. Hippuric acid를 추출하기 위해 반응중지액에 ethyl acetate 1.5 ml를 첨가하여 혼합한 후, 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상등액 500 μ l를 90°C에 1시간동안 건조시킨 후, 추출된 hippuric acid에 증류수 1.5 ml를 첨가하여 1시간동안 방치하여 UV/Vis spectrophotometer로 229 nm에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해율은 시료 대신 증류수를 첨가한 대조군과 시료간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법으로 측정하였다. ABTS 라디칼을 생성하기 위해 14.8 mM ABTS 용액과 4.9 mM potassium persulfate을 1:1(v/v)로 혼합하여 12-16시간동안 방치하였다. 적당히 희석된 ABTS 라디칼 용액 1.0 ml에 시료 100 μ l를 첨가하여 30°C에서 정확히 1분동안 방치한 후, 5분 내에 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 시료 대신 증류수를 첨가한 대조군과 시료간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

Metal chelating 활성은 Dinis 등(1994)의 방법으로 측정하였다. 시료 1 ml에 2 mM ferrous chloride 100 μ l와 5 mM ferrozine 200 μ l를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Metal chelating 활성은 시료 대신 증류수를 첨가한 대조군과 시료간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

SOD 유사 활성은 Marklund와 Marklund(1974)의 방법으로 측정하였다. 시료 200 μ l에 50 mM Tris-HCl 3 ml 및 7.2 mM pyrogallol 200 μ l를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시켰다. 1 N HCl 1 ml를 첨가하여 반응

을 중지시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 대신 증류수를 첨가한 대조군과 시료간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

Nitric oxide 소거능은 다음과 같이 측정하였다. 10 mM sodium nitroprusside 500 μ l에 시료 500 μ l를 첨가하여 25°C에서 150분간 반응시켰다. 여기에 sulfanilamide 용액 500 μ l를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후, N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 용액 500 μ l를 첨가하여 25°C에서 10분간 다시 반응시키고 546 nm에서 흡광도를 측정하였다(Marcocci 등, 1994). Nitric oxide 소거능은 시료 대신 증류수를 첨가한 대조군과 시료간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

Hydroxyl 라디칼 소거능은 Halliwell 등(1987)의 방법을 사용하여 측정하였다. 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4) 1.2 ml에 10 mM 2-deoxyribose 200 μ l, 10 mM FeSO₄ · 7H₂O 200 μ l, 10 mM Na₂-EDTA 200 μ l, 10 mM H₂O₂ 200 μ l 및 시료 200 μ l를 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 2.8% trichloroacetic acid 1 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고, 100°C에서 10분간 가열 및 냉각한 후, 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl 라디칼 소거능은 시료 대신 증류수를 첨가한 대조군과 시료간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

환원력은 Oyaizu(1986)의 방법으로 측정하였다. 시료 250 μ l에 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 250 μ l 및 1% potassium ferricyanide 250 μ l를 첨가하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후, 원심분리하였다. 상등액 250 μ l에 증류수 250 μ l 및 0.1% ferric chloride 50 μ l를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 생육도 및 pH 측정

세포의 생육도는 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 배양액의 pH는 pH meter를 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주 분리 및 동정

DPPH 라디칼 소거능을 갖는 *Bacillus* 속 균주를 분

리하기 위해 가정에서 만든 된장 및 청국장으로부터 skim milk 평판배지에서 clear zone의 크기가 크고, 성장속도가 빠른 단일 colony를 순수분리한 후, 각 균주의 DPPH 소거능을 측정하였다. 분리된 균주 중 DPPH 라디칼 소거능이 우수한 GJ 균주를 선발하였고, 이를 실험균주로 선정하였다.

GJ 균주의 동정은 16S rRNA gene의 염기서열 분석을 통하여 실시하였다. 16S rRNA 부분 염기서열을 NCBI GenBank에 등록된 유사 균주와 비교분석하여 유전자간 상관성을 알아본 결과, GJ 균주는 *Bacillus methylotrophicus*와 99%의 상동성을 가지고 있었다. 또한 Mega 5 프로그램을 이용하여 계통도를 그려본 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 GJ 균주는 *Bacillus methylotrophicus*와 동일 클러스터를 형성하였다. 따라서 본 균주를 *B. methylotrophicus* GJ이라고 명명하였다.

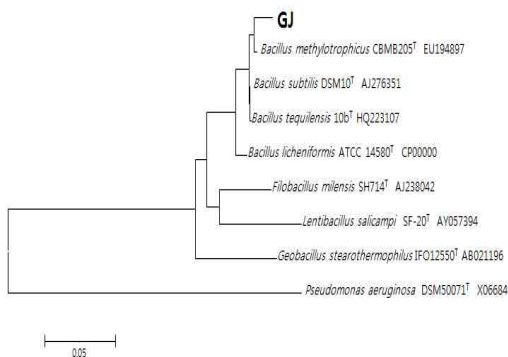


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed using 16s rRNA gene sequences, available in the GenBank database, employing the Neighbour-joining method. The bar indicates a Jukes-Cantor distance of 0.05.

지금까지 보고된 전통 청국장으로부터 분리된 균주는 *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* 및 *B. cereus* 등(Lee 등, 2008)이 있는 반면, *B. methylotrophicus*의 분리에 관한 보고는 본 논문이 최초이다.

3.2. DPPH 라디칼 소거활성 생산 최적조건

DPPH 라디칼 소거활성 생산을 위한 최적조건 검토를 위해 먼저 기본배지를 선정하고자 Luria-Bertani (LB), TSB, nutrient broth(NB), potato dextrose

broth(PDB) 배지에서 DPPH 라디칼 소거능을 조사하였다. 그 결과 TSB 배지에서 12시간 배양하였을 때, 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능이 나타났다(미제시). 따라서 이후 실험은 TSB를 기본배지로 하여 실시하였다.

탄소원의 종류가 DPPH 라디칼 소거능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 탄소원을 0.25%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. Sucrose, maltose, glycerol 및 sorbitol 순으로 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 그 중 sucrose에서 가장 높은 소거능을 나타내었다. 반면, soluble starch에서는 가장 낮은 소거능을 나타내었다. Cha 등(2003)은 *Bacillus* sp. FF-7의 경우, galactose를 첨가한 배지에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다고 보고하였으며, Lee 등(2009a)은 *Bacillus polyfermenticus*는 fructose를 첨가한 배지에서 가장 높은 소거능을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 사용균주에 따라 DPPH 라디칼 소거능에 영향을 미치는 탄소원은 다를 수 있었다. 최적 탄소원인 sucrose의 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 조사한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.25%와 0.5% sucrose에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 0.5% 이상의 농도에서는 소거능이 감소하였다.

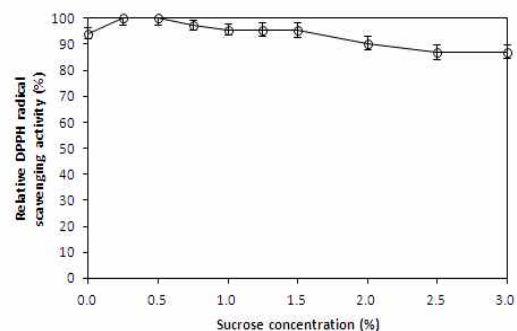


Fig. 2. Effect of sucrose concentration on relative DPPH radical scavenging activity of strain GJ. Values are expressed as average±standard deviation of three independent experiments.

질소원의 종류가 DPPH 라디칼 소거능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 질소원을 2%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 무기질

Table 1. Effect of carbon source and nitrogen source on relative DPPH radical scavenging activity of strain GJ

Carbon source (0.25%)	Relative DPPH radical scavenging activity (%)	Nitrogen source (2%)	Relative DPPH radical scavenging activity (%)
None	92.1 ± 2.1	None	47.1 ± 3.0
Glucose	95.2 ± 2.6	Tryptone +soytone	100.0 ± 2.2
Galactose	91.5 ± 2.5	Polypeptone	95.9 ± 2.0
Fructose	94.4 ± 1.9	Bacto peptone	99.8 ± 1.9
Sucrose	100.0 ± 2.0	Soytone	79.7 ± 2.5
Maltose	99.2 ± 2.4	Tryptone	98.0 ± 2.7
Lactose	92.1 ± 2.9	Casein	34.1 ± 3.2
Mannitol	93.1 ± 1.6	Skim milk	88.7 ± 2.8
Sorbitol	98.0 ± 2.4	Beef extract	62.5 ± 1.7
Glycerol	98.2 ± 3.0	Corn steep liquor	66.4 ± 2.9
Soluble starch	55.3 ± 2.4	Casamino acid	99.0 ± 1.4
		Malt extract	89.5 ± 2.4
		Gelatin	84.1 ± 2.6
		Yeast extract	40.5 ± 2.0
		NH ₄ NO ₃	38.8 ± 1.9
		(NH ₄) ₂ SO ₄	38.8 ± 2.7
		NH ₄ Cl	31.0 ± 2.5

Values are expressed as average±standard deviation of three independent experiments

소원을 첨가한 배지, casein 또는 yeast extract를 첨가한 배지는 질소원을 첨가하지 않은 배지보다 DPPH 라디칼 소거능이 낮았다. Tryptone+soytone, bacto peptone, casamino acid, tryptone 순으로 DPPH 라디칼 소거능이 높았으며, 특히 tryptone+soytone이 첨가된 배지에서 가장 높은 소거능을 보였다. Cha 등 (2003)과 Lee 등(2009a)은 tryptone을 첨가한 배지에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다고 보고하여 본 실험결과와 비슷하였다.

DPPH 라디칼 소거능이 대체로 높았던 bacto peptone, tryptone, casamino acid를 대상으로 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 조사한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 tryptone의 경우 농도가 증가할수록 소거능이 감소하였고, casamino acid의 경우 1.5%에서 높은 소거능을 보였지만, 1.0% bacto peptone을 첨가했을 때 가장 높은 소거능을 나타내었다.

0~1% NaCl 및 0~0.7% K₂HPO₄ 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 조사하였다. NaCl과 K₂HPO₄을 배지에 첨가하였을 때, DPPH 라디칼 소거능이 감소하여 NaCl과 K₂HPO₄은 DPPH 라디칼 소거능에 부정적인 영향을 미침을 알 수 있었다(미제시).

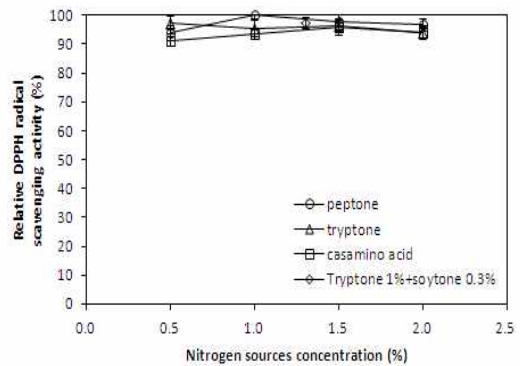


Fig. 3. Effect of nitrogen source concentration on relative DPPH radical scavenging activity of strain GJ. Values are expressed as average±standard deviation of three independent experiments.

NaCl과 K₂HPO₄을 제외한 무기염을 0.005% 및 0.01%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. CaCl₂·2H₂O, CuSO₄·5H₂O 및 MgSO₄·7H₂O를 첨가한 배지에서 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었으며, 그 중 0.01% MgSO₄·7H₂O를 첨가하였을 때 소거능이 가장 높았다. Lee 등(2009a)은 MgSO₄·7H₂O를 첨가하였을 때, 항산화능이 가장 높

있다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다. 또한, Mg 부족은 산화적 스트레스를 유발한다는 보고가 있다(Tewari 등, 2006).

Table 2. Effect of inorganic salt on relative DPPH radical scavenging activity of strain GJ

Inorganic salt	Relative DPPH radical scavenging activity (%)	
None	89.6 ± 2.5	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.005%	95.4 ± 2.6
	0.01%	91.5 ± 1.9
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005%	86.0 ± 3.0
	0.01%	87.2 ± 2.8
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.005%	70.1 ± 2.9
	0.01%	72.5 ± 3.1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.005%	87.3 ± 2.5
	0.01%	86.0 ± 2.0
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.005%	89.9 ± 2.3
	0.01%	81.5 ± 1.6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005%	96.9 ± 2.4
	0.01%	92.5 ± 2.9
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.005%	90.6 ± 2.7
	0.01%	100.0 ± 1.7
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.005%	79.4 ± 2.3
	0.01%	78.3 ± 2.1
KCl	0.005%	87.3 ± 3.1
	0.01%	89.9 ± 2.4

Values are expressed as average±standard deviation of three independent experiments

배지의 초기 pH에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 조사한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 5-8의 범위에서 소거활성이 대체로 높게 나타났고, pH 9 이상의 범위에서는 소거능이 급격하게 감소하였다. 특히 pH 6-6.8의 범위에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 이후 실험은 초기 pH인 6.5을 선정하여 실시하였다.

온도(25~40°C), 진탕속도(100~250 rpm) 및 접종량(1~5, v/v%)에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 조사한 결과, 30°C에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었으며, 온도가 높을수록 소거능은 감소하였다. 진탕속도는 DPPH 라디칼 소거능에 별다른 영향을 미치지 않았다. 종균 접종량은 많을수록 소거능이

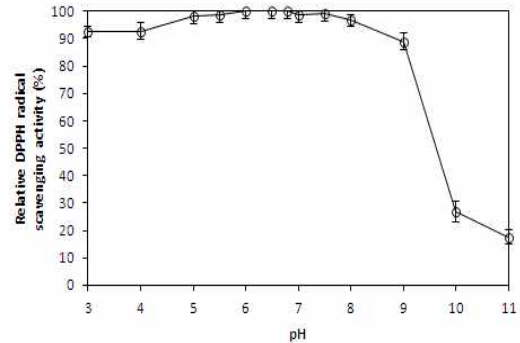


Fig. 4. Effect of initial pH on relative DPPH radical scavenging activity of strain GJ. Values are expressed as average±standard deviation of three independent experiments.

높았으며, 4% 종균을 접종하였을 때, 가장 높은 소거능을 보였다(미제시).

상기에서 확립된 최적 배양조건에서 DPPH 라디칼 소거능, 생육도 및 pH를 조사하였다 (Fig. 5). DPPH 라디칼 소거능은 배양 6~12시간에 가장 높았으며, 그 이후에는 감소하였다. pH는 배양시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었고, 이는 질소원인 peptone이 대사과정 중에 분해되어 생성되는 암모니아 때문으로 사료된다. 생육도는 배양 18시간까지 증가하였고, 배양 18-30시간에서는 완만하게 증가하였으며 그 이후에는 감소하였다. Lee 등(2009a)은 최적 배양조건에서 배양시간이 경과함에 따라 DPPH 라디

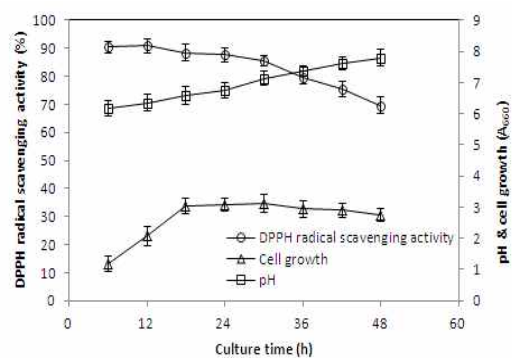


Fig. 5. Time courses of DPPH radical scavenging activity, cell growth and pH in an optimal medium by strain GJ. Values are expressed as average±standard deviation of three independent experiments.

칼 소거능이 증가하여 최고 80.5%의 소거능을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 본 실험균주의 DPPH 라디칼 소거능(91%)이 더 우수함을 알 수 있었다.

3.3. ACE 저해능 및 기타 항산화능

상기에서 확립된 최적조건에서 ACE 저해능 및 다양한 항산화능에 대해 조사하였다. ACE 저해능은 배양 42시간까지 49.4%로 증가하다가 그 이후 약간 감소하였다(Fig. 6A). Metal chelating 활성은 배양시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 배양 48시간에 67.9%로 최고 활성을 나타내었다(Fig. 6A). ABTS 라디칼 소거능은 배양 24-30시간에 급격하게 증가하였고, 배양 42~48시간에 99.8%로 최대 활성을 나타내었다(Fig. 6A). SOD 유사활성은 배양시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 배양 48시간에 36.5%로 최고 활성을 나타내었다(Fig. 6B). 환원력은 배양 12시간이후에 급격하게 증가하여 배양 30시간에 5.982로 가장 높게 나타났고, 그 이후에는 급격하게 감소하였다(Fig. 6B). 반면 nitric oxide 소거능 및 hydroxyl radical 소거능은 5%미만으로 활성이 미약하였다(Fig. 6B).

4. 결론

우리나라의 전통 발효식품 자체의 항산화능에 관한 연구는 많지만, 우리나라의 전통 발효식품으로부터 유래한 미생물의 항산화능에 대한 연구는 거의 이

루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 한국 전통발효식품인 청국장으로부터 항산화능이 있는 균주를 순수분리한 후, 이 균주의 항산화능을 자세하게 조사하였다. 청국장으로부터 높은 항산화능을 가진 세균을 분리하였고, 이를 GJ라고 명명하였다. 균주 GJ는 16S rRNA gene 염기서열 분석에 의하여 *B. methylotrophicus*와 99%의 상동성을 가지고 있었으므로 *B. methylotrophicus* GJ로 동정하였다. DPPH 라디칼 소거능을 위한 최적 배지 조건은 0.25% sucrose, 1% peptone, 0.01% MgSO₄·7H₂O이었으며, 최적 배양조건은 초기 pH 6.5, 30℃, 200 rpm 및 4% 접종량이였다. 최적 배양조건에서 DPPH 라디칼 소거능은 91%이었다. 또한, ACE 저해능은 49.4%, ABTS 라디칼 소거능은 99.8%, chelating 활성은 67.9%, SOD 유사활성은 36.5%, 환원력은 5.982이었다. 따라서 균주 GJ는 기능성 식품, 노화 방지를 위한 화장품 및 산화적 스트레스에 의해 유발되는 질병을 위한 의약품 등 다양한 용도 개발에 응용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 농림수산식품부 연구개발사업(식품기술개발사업)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다(과제번호 110119-3).

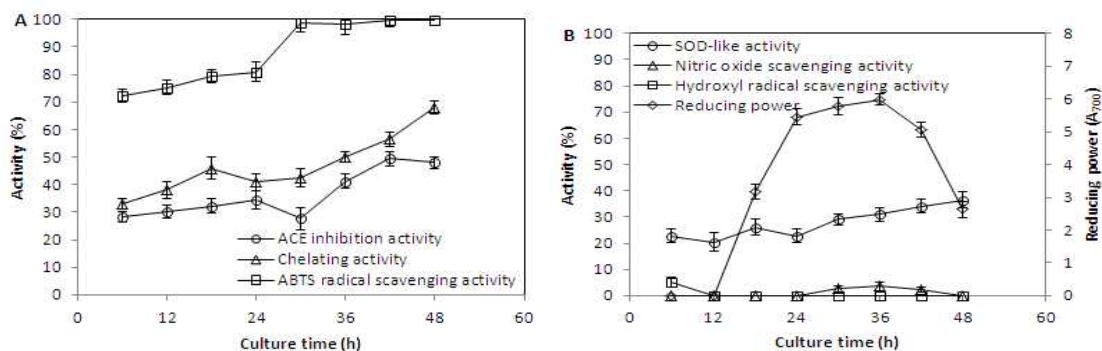


Fig. 6. ACE inhibition activity and various antioxidant activities of strain GJ. (A) ACE inhibition activity, chelating activity and ABTS radical scavenging activity; (B) nitric oxide scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, SOD-like activity and reducing power. Values are expressed as average±standard deviation of three independent experiments.

참고 문헌

- Ahn, J. B., Park, J. A., Jo, H., Woo, I., Lee, S. H., Jang, K. I., 2012, Quality characteristics and antioxidant activity of commercial Doenjang and traditional Doenjang in Korea, *Kor. J. Food Nutr.*, 25, 142-148.
- Aruoma, O. I., 1994, Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, *Food Chem. Toxicol.*, 32, 671-754.
- Branen, A. L., 1975, Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59-63.
- Blois, M. S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
- Cha, J. Y., Kim, H. J., Jun, B. S., Park, J. C., Ok, M., Cho, Y. S., 2003, Antioxidative activity and produced condition of antioxidative substance by *Bacillus* sp. FF-7, *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 46, 165-170.
- Cushman, D. W., Cheung, H. S., 1971, Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung, *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637-1648.
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., Almeida, L. M., 1994, Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers, *Arch. Biochem. Biophys.*, 315, 161-169.
- Frllich, I., Riederer, P., 1995, Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidant treatment, *Drug Res.*, 45, 443-449.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Aruoma, O. I., 1987, The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals, *Anal. Biochem.*, 165, 215-219.
- Joo, E. Y., Park, C. S., 2010, Antioxidative and fibrinolytic activity of extracts from soybean and Chungkukjang(fermented soybeans) prepared from black soybean cultivar, *Kor. J. Food. Preserv.*, 17, 874-880.
- Kim, M. C., Park, G. T., Son, H. J., Choi, W. B., Heo, M. S., 2005, Antioxidant activity and characterization of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 isolated from sea water, *Kor. J. Microbiol.*, 41, 74-80.
- Ku, H. S., Noh, J. S., Kim, H. J., Cheigh, H. S., Song, Y. O., 2007, Antioxidant effects of sea tangle added Korean cabbage Kimchi *in vitro* and *in vivo*, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 36, 1497-1502.
- Lane, D. J., 1991, 16S/23S rRNA sequencing, in: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
- Lee, N. K., Park, J. W., Cho, J. I., Kim, B. Y., Kwon, K. O., Hahm, Y. T., 2008, Isolation of *Bacillus* spp. from Cheonggukjang and its antagonistic effect against *Bacillus cereus*, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 40, 669-673.
- Lee, J. H., Chae, M. S., Choi, G. H., Lee, N. K., Paik, H. D., 2009a, Optimization of medium composition for production of the antioxidant substances by *Bacillus polyfermenticus* SCD using response surface methodology, *Food Sci. Biotechnol.*, 13, 959-964.
- Lee, S. G., Kim, H. J., Lee, S. P., Lee, I. S., 2009b, Antioxidant and anticancer activities of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUC1, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 38, 657-662.
- Marcocci, L., Maguire, J. J., Droylefaix, M. T., Packer, L., 1994, The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201, 748-755.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974, Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, 47, 469-474.
- Oyaizu, M., 1986, Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine, *Jpn. J. Nutr.*, 44, 307-315.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biol. Med.*, 26, 1231-1237.
- Tewari, R. K., Kumar, P., Sharma, P. N., 2006, Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants, *Sci. Hortic.-England*, 108, 7-14.