Journal of the Korean Chemical Society
2015, *Vol. 59, No. 6*
Printed in the Republic of Korea
http://dx.doi.org/10.5012/jkcs.2015.59.6.545

단신 (Notes)

젓갈 미생물 *Bacillus idriensis*에서 분리된 Diketopiperazines 및 합성유도체들의 항산화 활성

곽명국[†] · 김호준[†] · 송영선[‡] · 공창숙[§] · 서영완[†,#,*]
[†]한국해양대학교 해양생명과학부
[‡]인제대학교 식품생명과학부
[§]신라대학교 식품영양학과
[#]한국해양대학교 해양과학기술전문대학원
(접수 2015. 9. 25; 게재확정 2015. 10. 12)

Antioxidant Activity of Diketopiperazines from *Bacillus idriensis*

Myoung Kuk Kwak[†], Hojun Kim[†], Young-Sun Song[‡], Chang-Suk Kong[§], and Youngwan Seo[†, #,*]
[†]*Division of Marine Bioscience, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea.*
[*]*E-mail: ywseo@kmou.ac.kr*
[‡]*Department of Food and Life Science, Inje University, Gimhae 50834, Korea*
[§]*Department of Food and Nutrition, College of Medical & Life Sciences, Silla University, Busan 46958, Korea*
[#]*Department of Convergence Study on the Ocean Science and Technology, Ocean Science & Technology School, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea*
(Received September 25, 2015; Accepted October 12, 2015)

주제어: *Bacillus idriensis*, 1,4-Diketopiperazine, 항산화 활성, 젓갈

Key words: *Bacillus idriensis*, 1,4-Diketopiperazine, Antioxidant activity, Fermented seafood

서 론

우리나라의 오랜 전통 식품인 젓갈은 어패류의 육, 내장, 생식소 등에 10~20%의 소금을 가하여 부패균의 번식을 억제하고, 자기소화 효소 및 미생물의 작용을 통하여 원료를 적당히 분해시키는 과정 중에 생성된 각종 방향성 성분에 의해 특유의 맛과 풍미를 지니고 있는 음식으로, 다양한 생리활성을 가지며[1-3] 이로부터 항암, 항염증과 같은 여러 가지 생리활성을 보이는 미생물들도 분리된 바 있다.[4-7] 이와 같이 젓갈의 높은 저장성과 생리활성들은 염분에 의한 효과일 뿐만 아니라 젓갈 내 미생물에 의한 항산화 효과도 기여하는 것으로 여겨졌지만 아직까지 젓갈미생물의 항산화물질에 대한 연구는 본 연구팀에 의해 발표된 선행연구를 제외하고는 아직까지 발표된 바가 없다.[8] 따라서 본 연구는 이미 뛰어난 항산화활성을 가지는 균주로 분리 보고된 바 있는 *Bacillus idriensis*를 대량 배양한 후 배양 추출액으로부터 항산화 활성성분을 분리하고자 하였으며 모두 5개의 diketopiperazine 유도체들을 분리하여 그 화학구조를 결정하였다(*Fig.* 2). 또한 분리된 화합물들 뿐만 아니라 그 유도체들을 합성하여 항산화 활성과 구조적인 관계를 파악하고자 하였다

실 험

시약 및 기기

화합물의 분리에 사용한 컬럼충전물질은 RP18(YMC-GEL ODS-A, 12 nm, S-75 μm)을 사용하였으며, TLC plate는 Silica F254s(Merck)를 사용하였다. 추출, 분획 및 컬럼 크로마토그래피에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 사용하였다. RI detector가 장착된 High performance liquid chromatography (HPLC, Dionex P580) system을 이용하여 화합물을 분리정제하였으며 화합물의 구조결정은 Varian NMR(300 MHz)을 사용하였다. 항산화 활성 및 MTT 등의 측정에 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT(Bio-TEK instruments, USA)를 사용하였다. DPPH radical, superoxide radical, hydroxy radical의 측정에는 Fourier transform electron spin resonance spectrometer JES PX2300(JEOL, Japan)을 사용하였다.

화합물의 추출 및 분리

Bacillus idriensis 균주를 Marine 배지를 사용하여 pH 7, 25 °C, 200 rpm에서 2일간 진탕 배양하여 얻어진 배양혼합액으로부터 다음과 같은 과정으로 활성물질을 정제하였다. 균체와 배양액의 혼합물에 동량의 EtOAc를 첨가하여 30분 동안 교반하고 세포내 함유된 물질의 효과적인 추출을 위해 추가적으로 1시간 동안 sonication 한 후에 이 용액의 유기층을 분리하여 EtOAc 추출액을 얻었다. 위의 과정을 3회 반복하여 얻어진 추출액을 원심분리하고 상층액만을 진공증발기(Eyela Japan, N-N series)로 농축하여 EtOAc 추출물을 얻었다(EtOAc ext : 30.32 g). 이렇게 얻어진 조추출물을 물층과 n-BuOH 층으로 분획한 후 각각의 분획층을 농축하였다. 용매를 제거하고 얻어진 n-BuOH 분획물(19.24 g)은 다시 CH_2Cl_2와 물층으로 재분획하여 각각 7.14 g과 11.52 g의 분획물을 얻었다.

좋은 항산화 활성을 보이는 CH_2Cl_2 분획물 1.85 g에 대하여 silica prep. TLC(20% MeOH in $CHCl_3$)를 실시하여 모두 5개의 분획들을 얻었으며, 각각의 분획들에 대한 reversed-phase HPLC(ODS-AM, 50% aq. MeOH)를 실시하여 순수한 화합물 **1-5**를 각각 33.5, 18.9, 5.4, 10.2, 9.3 mg 분리하였다.

화합물 **1** [cyclo(L-Pro-L-Tyr)]: 흰색의 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.04 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', -6'), 6.77 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3', -5'), 6.08 (1H, -OH), 5.77 (1H, NH), 4.20 (1H, dd, 10.3, 3.9 Hz, H-9), 4.08 (1H, t, 7.6, H-6), 3.58 (2H, m, H-3), 3.48 (1H, dd, J = 14.4, 11.0 Hz, H-10), 2.74 (1H, dd, J = 14.4, 10.3 Hz, H-10), 2.34 (1H, m, H-5), 1.97 (3H, m, H-4, -5); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.4 (C, C-7), 165.0 (C, C-1), 155.3 (C, C-4'), 130.2 (CH, C-2', -6'), 127.1 (C, C-1'), 116.1 (CH, C-3', -5'), 59.2 (CH, C-6), 56.3 (CH, C-9), 45.5 (CH_2, C-3), 36.0 (CH_2, C-10), 22.6 (CH_2, C-4), 28.4 (CH_2, C-5).

화합물 **2** [cyclo(L-Pro-L-Phe)]: 흰색의 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36–7.18 (5H, m, H-2'~6'), 3.60 (2H, m, H-2), 5.64 (1H, NH), 4.26 (1H, ddd, J = 10.7, 3.6, and 0.8 Hz, H-9), 4.07 (1H, dd, J = 8.4, 6.5 Hz, H-6), 3.60 (1H, m, H-10), 2.76 (1H, dd, J = 14.3, 10.7 Hz, H-10), 2.33 (1H, m, H-5), 2.05(1H, m, H-5), 1.91 (2H, m, H-4); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.2 (C, C-7), 164.9 (C, C-1), 135.8 (C, C-1'), 129.2 (CH, C-3', -5'), 129.0 (CH, C-2', -6'), 127.5 (CH, C-4'), 59.2 (CH, C-6), 56.2 (CH, C-9), 45.5 (CH_2, C-3), 36.8 (CH_2, C-10), 28.4 (CH_2, C-5), 22.6 (CH_2, C-4).

화합물 **3** [cyclo(L-Pro-L-Val)]: 흰색의 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.70 (1H, NH), 4.08 (1H, dd, J = 14.4, 7.2 Hz, H-6), 3.93 (1H, br s, H-9), 3.58 (2H, m, H-3), 2.63 (1H, m, H-10), 2.38 (1H, m, H-5), 2.05 (1H, m, H-5), 2.01 (1H, m, H-4), 1.91 (1H, m, H-4), 1.06 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-10Me), 0.91 (3H, d, 7.2, H-11); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.8 (C, C-1), 164.8 (C, C-7), 60.3 (CH, C-9), 58.8 (CH, C-6), 45.1 (CH_2, C-3), 28.5 (CH_2, C-5), 28.3 (CH, C-10), 22.3 (CH_2, C-4), 19.3 (CH_3, C-11), 16.0 (CH_3, C-10Me).

화합물 **4** [cyclo(L-Pro-L-Leu)]: 흰색의 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.18 (1H, NH), 4.10 (1H, t, 8.1, H-6), 4.00 (1H, dd, J = 9.6, 3.6 Hz, H-9), 3.55 (2H, m, H-3), 2.34 (1H, m, H-5), 2.13 (1H, m, H-5), 2.01 (2H, m, H-4, -10), 1.90 (1H, m, H-4), 1.75 (1H, m, H-11), 1.51 (1H, ddd, J = 14.3, 9.6, and 5.0 Hz, H-10), 0.99 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-11Me), 0.94 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-12); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.1 (C, C-1), 166.0 (C, C-7), 59.0 (CH, C-6), 53.4 (CH, C-9), 45.5 (CH_2, H-3), 38.6 (CH_2, C-10), 24.7 (CH, C-11), 28.2 (CH_2, C-5), 23.3 (CH_2, C-4), 22.8 (CH_3, C-12), 21.3 (CH_3, C-11Me).

화합물 **5** [cyclo(L-Pro-L-Ile)]: 흰색의 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.75 (1H, NH), 4.07 (1H, t, J = 8.1 Hz, H-6), 3.96 (1H, br s, H-9), 3.55 (2H, m, H-3), 2.36 (1H, m, H-10), 2.30 (1H, m, H-5), 2.04 (1H, m, H-5), 2.02 (1H, m, H-4), 1.90 (1H, m, H-4), 1.43 (1H, m, H-11), 1.19 (1H, m, H-11), 1.05 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-10Me), 0.93 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-12); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.6 (C, C-1), 164.8 (C, C-7), 60.5 (CH, C-9), 58.5 (CH, C-6), 45.2 (CH_2, C-3), 35.3 (CH, C-10), 28.6 (CH_2, C-5), 24.1 (CH_2, C-11), 22.4 (CH_2, C-4), 16.1 (CH_3, C-10Me), 12.2 (CH_3, C-12).

2,5-Diketopiperizine 유도체들(6-8)의 합성

Glycine anhydride 1.0 g을 acetic anhydride 5 mL에 넣어 145 °C, 6시간 환류하여 diacetyl glycine anhydride 중간체를 얻었다. 이 중간체와 benzaldehyde를 1:1의 비율로 DMF 5 mL에 녹인 후에 과량의 triethylamine 0.5 mL를 넣고 160 °C에서 22시간 다시 환류하였으며 반응물을 냉각시켜 과량의 ethyl acetate를 첨가하면 고체가 석출되었다. 여과하여 얻어진 고체에 hydrazine을 넣어 실온에서 6시간 반응시킨 후 0.001 M HCl 용액을 첨가하고 chloroform을 이용하여 분획한 후에 얻어진 chloroform층을 농축하면 화합물 **6**이 얻어 졌다. Diacetyl glycine anhydride와 benzaldehyde 및 *p*-hydroxybenzaldehyde의 비를 두 배로 하면 화합물 **7**과 **8**이 얻어 진다.

화합물 **6** (3-benzylidene-2,5-piperazinedione): 흰색의 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.27 (1H, OH), 7.56–7.44 (2H, m, H-3'), 7.40–7.24 (3H, m, H-4', 5'), 6.66 (1H, C-1'), 3.99 (2H, d, J = 2.0 Hz, C-6); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.4 (C-5), 159.9 (C-2), 133.3 (C-3), 129.1, 128.6, 127.9, 126.9, 113.9 (C-1'), 44.8 (C-6).

화합물 **7** (3,6-dibenzylidene-2,5-piperazinedione): 흰색의 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.3 (2H, OH), 7.52

(4H, d, J = 7.4 Hz, C-3', C-3"), 7.40 (4H, t, J = 7.4 Hz, C-4', C-4"), 7.31 (2H, m, C-5', C-5"), 6.75 (1H, C-1', C-1"); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 158.0 (C-2, C-5), 133.1 (C-1', C-1"), 129.4 (CH x 4), 128.7 (CH x 4), 128.2 (C x 2), 126.4 (C x 2), 115.1 (C-3, C-6).

화합물 **8** [3,6-(di-4-hydroxybenzylidene)-2,5-piperazinedione]: 흰색의 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.92 (2H, OH), 7.39 (4H, d, J = 8.5 Hz, H-3', H-3"), 6.78 (4H, d, J = 8.5 Hz, H-4', H-4"), 6.66 (2H, C-1', C-1"); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 158.3 (C-2, C-5), 157.7 (C-5', C-5"), 131.1 (C-1', C-1"), 124.1, 124.0, 115.7* (C-3, C-6), 115.5* (C-4', C-4").

Electron spin resonance spectrometer를 이용한 항산화활성 측정

DPPH radical 소거능 측정: 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 전자 공여체와 반응하여 안정한 분자인 diphenylpicryl hydrazine이 된다. 이렇게 라디칼을 잃은 DPPH는 ESR을 이용하여 측정시 에너지 흡수가 일어나지 않게 되는 원리를 이용한다. 먼저 각 농도별 시료(2, 1, 0.5 mM)를 methanol에 녹여 준비하고, DPPH 시약을 methanol을 이용하여 60 μM로 만든다. 만든 두 용액을 60 μL씩 덜어서 섞고 2분 후 ESR 기기를 이용하여 측정하였다.[9]

Hydroxy radical 소거능 측정: Hydroxy radical 소거 측정 실험은 Fenton 반응을 이용한 실험으로 Fenton 반응에서 발생된 hydroxy radical이 DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) 와 반응하여 라디칼을 가진 DMPO-OH로 변하기 때문에 ESR을 이용하여 흡수되는 에너지를 측정 할 수 있게 된다. 실험방법은 각 농도별 시료 20 μL와 0.3 M DMPO 20 μL, 10 mM $FeSO_4$ 20 μL, 10 mM H_2O_2 20 μL를 넣고 2.5분 간 반응 시킨 후 ESR기기로 측정하였다.[10]

Superoxide radical 소거능 측정: Superoxide radical 소거 측정 실험은 riboflavin에 UV를 조사하여 생긴 superoxide radical이 DMPO와 반응하여 DMPO-OH로 변하여 ESR로 측정할 수 있게 된다. 실험 방법은 각 농도별 시료 20 μL와 0.8 mM riboflavin 20 μL와 1.6 mM EDTA 20 μL, 0.8 mM DMPO(20μL)를 넣고 365 nm 자외선을 1분간 조사 한 후 ESR 기기로 측정하였다.[11]

Peroxynitrite 소거 활성 실험: $ONOO^-$ 소거 활성은 dihydrorhodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정하였다. DHR 123(5 mM)을 dimethylformamide로 녹여서 stock 용액은 질소로 purge하여 −80 °C에 보관하고, DHR 123 (f.c. 5 μM) 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서, 사용하기 전에 조제하였다. Buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)와 5 mM potassium chloride, DTPA (diethylentriaminepenta acetic acid) 100 μM (f.c.)을 혼합하여 조제하며 사용하기 전에 냉장 보관하였다. 이 buffer 용액에 DHR 123 용액을 혼합한 뒤 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 5분간 실온에 둔 후 Multi-detection microplate fluorescene spectrophotometer synergy HT로 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실온에서 1시간 후에 측정하였다. $ONOO^-$ (f.c. 10 μM)의 바탕용액은 0.3 N NaOH를 사용하였고, excitation 파장은 485 nm, emission 파장은 530 nm로 하였으며 실온에서 측정하였다. 그리고 실험은 triplicate 로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.[12]

세포내 활성산소종(ROS) 소거활성 측정: 세포의 활성산소종의 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다. DCFH-DA(fluorescence probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Sigma)는 세포내 활성산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포내의 활성 산소 농도를 측정할 수 있다.[13] HT-1080 세포를 96 well에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS 완충액으로 씻은 후 20 μM DCFH-DA을 각 well에 주입하여 37 °C 5% CO_2 incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 37 °C 5% CO_2 incubator에서 1시간 incubation한 후, DCFH-DA을 없애고 cell은 다시 PBS 완충액으로 씻은 후 500 μM H_2O_2 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 ex. 485 nm, em. 530 nm에서 형광 분석기로 측정하였다.

결과 및 고찰

*Bacillus idriensis*에서 분리된 3,5-Diketopiperazines의 구조결정

화합물 **1**은 흰색의 고체로 분리되었으며 ^{13}C NMR과 DEPT NMR 스펙트럼을 통하여 2개의 amide groups (-CONH-)를 포함하는 4개의 quaternary carbons (δ 169.4, 165.0, 155.3, 127.1), 4개의 methine carbons(δ 130.2, 116.1, 59.2, 56.3) 및 4 개의 methylene carbons(δ 45.5, 36.0, 22.6, 28.4) 신호들이 관측되었다. 또한 ^{1}H NMR 스펙트럼의 aromatic region인 δ 7.04 (2H, d, 8.5), δ 6.77 (2H, d, 8.5)에 나타난 두 개의 이중선은 전형적인 AB 형태의 신호로서 para위치가 치환된 방향족 고리 수소들로 예측되었다.

^{1}H COSY 실험을 통하여 지방족 수소들 사이의 correlation 관계가 관측되었다. δ 4.20 (1H, dd, J = 10.3, 3.9 Hz) 신호는 δ 3.48 (1H, dd, J = 14.4, 11.0 Hz)와 δ 2.74 (1H, dd, J = 14.4, 10.3 Hz)에 나타난 신호들과 서로 짝지음을 보여 주었으며 HMQC 및 TOCSY correlation들과 같이 고려할 때 δ 4.08 (1H, t, 7.6), 3.58 (2H, m), 2.34 (1H, m), 1.97(3H, m)의 신호들도

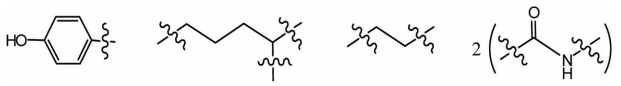

***Figure* 1.** Partial structure of compound 1.

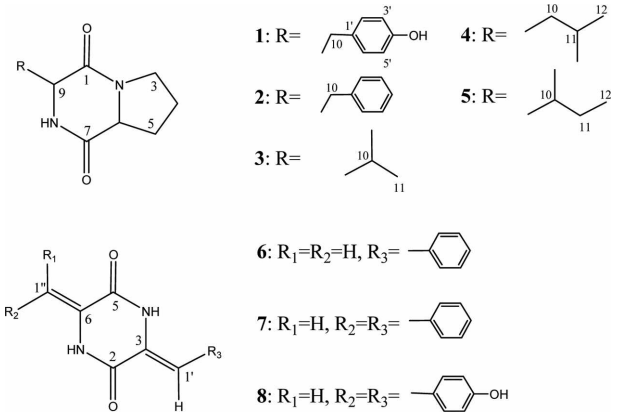

***Figure* 2.** Chemical structures of compounds **1**–**5** from *Bacillus idriensis* and their synthetic derivatives **6**–**8**.

서로 연결되어 있음이 확인되었다. 따라서 다음과 같은 부분구조가 제안되었으며 이러한 부분구조들은 (*Fig.* 2) HMBC 실험에 의해 서로 연결되어 화합물 **1**은 2,5-diketopiperazine 유도체인 cyclo(L-Pro-L-Tyr)로 결정되었다. 이 물질은 이전에 해면 *Jaspis digonoxea* 와 박테리아 *Pseudomonas aeruginosa*로부터 분리되어 보고되었다.[14,15]

밀접하게 관련된 화합물 **2**가 흰색의 고체로 분리되었다. 이 화합물의 ^{1}H과 ^{13}C NMR 스펙트럼은 방향족 영역을 제외하고는 화합물 **1**과 매우 유사하였다. 화합물 **1**에서는 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 4개의 신호가 관측된 반면에 화합물 **2**에는 5개의 방향족 신호가 관측되어 화합물 **1**의 para-hydroxyphenyl기가 hydroxy기가 제거된 phenyl 기로 존재함을 알 수 있었다. ^{1}H NMR에서도 유사한 변화가 관측되어 δ 7.04과 δ 6.77에 나타났던 두 개의 이중선이 사라지고 일치환된 benzene 패턴의 수소신호를 보여 주었다. 따라서 이 화합물의 화학구조는 cyclo(L-Pro-L-Phe)로 결정되었으며 NMR 스펙트럼 데이터는 문헌에 보고된 값과 잘 일치하였다.[16,17]

화합물 **3**은 흰색의 고체로 분리되었으며 ^{1}H과 ^{13}C NMR 스펙트럼은 화합물 **2**와 유사하였다. 다만 화합물 **3**의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 화합물 **2**의 aromatic region에 존재하던 신호들이 사라진 대신에 2개의 methyl peak(δ 19.3과 16.0)와 1개의 methine peak(δ 28.3)가 추가로 나타났으며 ^{1}H NMR 스펙트럼에서도 aromatic region에 나타났던 peak가 사라지고 δ 1.06(3H, d, J = 7.2 Hz)과 δ 0.91(3H, d, J = 7.2 Hz)에 두 개의 methyl 신호와 와 δ 2.63에 한 개의 methine peak가 나타났다. 이러한 결과는 화합물 **2**에 존재하던 benzyl group 대신에 isopropyl group이 존재한 경우에 잘 설명되었다. 따라서 화합물 **3**은 L-valine과 L-proline이 cyclization을 통하여 결합된 cyclo(L-Pro-L-Val)로 확인되었으며 NMR 데이터는 문헌치와 잘 일치하였다.[15,17,18]

화합물 **4**는 흰색의 고체로 분리되었으며 NMR 스펙트럼은 화합물 **3**과 매우 유사하였다. 하지만 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 하나의 methylene carbon(δ 38.6)이 발견되었으며 ^{1}H NMR 스펙트럼에서도 methylene proton(δ 2.01과 1.51)이 관측되어 **3**번 화합물의 isopropyl group이 isobutyl 기로 바뀌었음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 화합물 **4**는 cyclo(L-Pro-L-Leu)로 결정되었으며 문헌에 발표된 스펙트럼 데이터와 비교하였을 때 잘 일치하였다.[15,17,19]

마지막으로 화합물 **5** 또한 흰색의 고체로 분리되었으며 이 화합물의 ^{13}C NMR 스펙트럼은 화합물 **4**와 유사하였으며 DEPT 스펙트럼에서도 화합물 **4**와 동일하게 2개의 quaternary carbons, 3개의 methines, 4개의 methylenes, 2개의 methyls가 관측되었다. 하지만 ^{1}H NMR 스펙트럼에서 화합물 **4**와는 다르게 1개의 methyl기가 삼중선을 나타내어 화합물 **4**의 측쇄인 isobutyl기가 *sec*-butyl기로 치환되었을 것으로 추측되었다. 이러한 측쇄사슬의 구조는 ^{1}H COSY, HMQC 및 HMBC 실험에 의해서 확인되어 이 화합물의 구조는 cyclo(L-Pro-L-Ile)로 결정되었으며 NMR 데이터는 문헌치와 잘 일치하였다.[20]

ESR을 이용한 radical 소거 활성 실험: DPPH radical을 이용하여 화합물의 라디칼 소거 능력을 측정하였으며 시료를 첨가하지 않은 control과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. 분리한 5개의 화합물과 합성한 3개의 유도체를 각각 2, 1, 0.5 mM 농도에서 실험하였다. 분리된 물질들중에는 화합물 **2**번이 2 mM 농도에서 53%정도의 소거율을 보여 주었다. 합성유도체들인 **6** 과 **8** 의 경우에는 DPPH 라디칼 소거율이 상당히 높게 나타났다. 화합물 **6** 의 경우에 각 농도에서 75.2%, 41.1%, 30.0%의 소거율을 보였으며 화합물 **8** 의 경우에는 84.3%, 82.7%, 79.6%의 소거율을 보였다(*Fig.* 3(A)).

Fenton 반응으로 발생한 hydroxy radical과 DMPO를 이용하여 hydroxy radical 소거율을 측정하였다. 2 mM 농도에서는 모든 화합물들이 60% 이상의 높은 소거율을 보였으며 화합물 **1**, **2**, **6**, **7**, **8** 의 경우에는 0.5 mM 농도에서도 75.2, 76.7, 79.7, 79.9, 84.6%의 높은 hydroxy radical 소거율을 나타내었다(*Fig.* 3(B)).

Superoxide radical 소거활성 실험은 riboflavin에 365 nm의 파장을 비춰주어서 발생하는 superoxide radical과 DMPO를 이용하여 측정하였다. 2 mM의 농도에서 화합물 **1**-**8**은 각각 80.3, 36.9, 45.7, 51.1, 40.3, 46.1, 36.6, 45.9%의 소거율을 보였으며 화합물 **1** 의 경우에는 0.5 mM 농도에

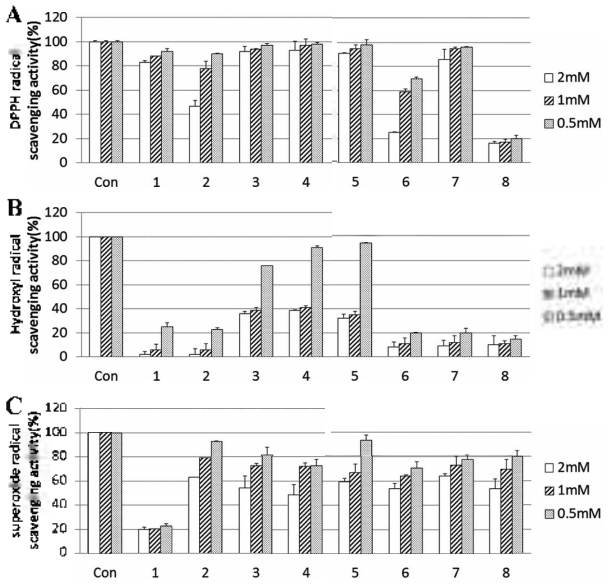

***Figure* 3.** Scavenging effects of compounds **1-8** measured with an ESR spectrometer on the DPPH radical (A), hydroxyl radical (B), and superoxide radical (C).

시도 77.2%의 소거율을 보였다(*Fig.* 3(C)).

Peroxynitrite 소거 활성 실험: 형광물질인 DHR 123을 이용하여 $ONOO^-$ 소거 활성을 검색하였으며, 시료를 첨가하지 않은 control과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. 분리한 5개의 화합물과 합성한 3개의 유도체를 각각 500, 250, 100, 50 μM의 농도에서 authentic peroxynitrite와 SIN-1에서 유도된 peroxynitrite의 소거율을 검색하였으며, 대조군으로는 500, 250, 100, 50 μM L-ascorbic acid와 penicillamine을 사용하였다.

먼저 authentic peroxynitrite에 대한 소거 활성을 측정한 결과 authentic peroxynitrite를 처리하지 않은 control과 비교하여 모든 시료에서 peroxynitrite 소거효과를 나타냈으며, 그 중에서 화합물 **8**이 가장 큰 소거효과를 보여 500, 250, 100, 50 μM의 농도에서 각각 92.2, 80.6, 77.3, 75.6%의 소거율을 보였다. **1**, **2**, **6**도 비교적 좋은 효과를 나타내어 500 μM의 농도에서 각각 62.8, 72.9, 68.7%의 소거율을 보였다(*Fig.* 4).

SIN-1으로부터 유도된 $ONOO^-$ 소거활성 검색에서도

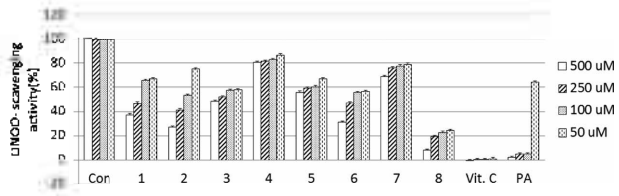

***Figure* 4.** Scavenging effect of compounds **1–8** on authentic $ONOO^-$.

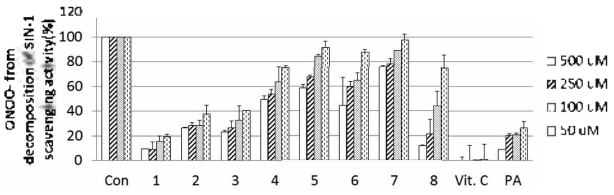

***Figure* 5.** Scavenging effect of isolated compounds **1–8** on $ONOO^-$ from SIN-1.

500, 250, 100, 50 μM의 농도에서 모든 시료가 SIN-1을 처리하지 않은 control보다 높은 소거 활성을 나타내었다. 가장 큰 소거 효과를 보인 시료는 화합물 **1**이며 각각의 농도에서 90.4, 90.9, 84.5, 80.5%의 소거율을 보였다. 다음으로 화합물 **3** 이 효과가 좋았으며 역시 각각의 농도에서 76.7, 73.5, 67.3, 59.5%의 소거율을 보였다. 이 외에도 화합물 **2**의 비교적 좋은 소거 활성을 보였으며 500 μM 농도에서 74%의 소거율을 보였다. 합성 유도체인 경우에 화합물 **8**이 좋은 효과를 나타내어 500, 250 100 μM의 농도에서 각각 88.3, 78.5, 56.3%의 소거율을 보였다(*Fig.* 5).

세포내 ROS 측정: 세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 DCFH-DA를 사용해 세포내 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. HT 1080 세포를 500 μM의 H_2O_2로 처리한 후 0, 30, 60, 90, 120분마다 활성을 측정하였다. 모든 화합물들은 각각 500, 250, 100, 50 μM의 농도로 측정하였으며, 대조군으로는 시료를 넣지 않고 H_2O_2를 처리한 control과 시료와 H_2O_2를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하여 비교하였다. H_2O_2를 처리한 well에서는 시간에 따라 DCF flourescence 값이 급격히 증가하였으며, H_2O_2를 처리하지 않은 blank는 시간에 따른 DCF flourescence 값의 변화가 거의 없었다. 화합물 **2**, **5** 의 경우에 좋은 ROS 소거활성이 나타났으며 농도에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다. 이 화합물들은 50 μM의 농도에서도 각각 69.3과 73.9%의 소거율을 나타낸 반면에 화합물 **1**, **3**, **4**는 500 μM 농도에서도 낮은 ROS 소거 능력을 나타내었다. 합성유도체인 **6-8**의 경우에 ROS 소거활성이 비교적 좋게 나타났으며 120분 500 μM 농도에서 각각 89.8, 81.5, 72.1%의 ROS 소거율을 보여주었으며 이 화합물들도 농도에 따른 소거효과의 차이는 크지 않았다(*Fig.* 6).

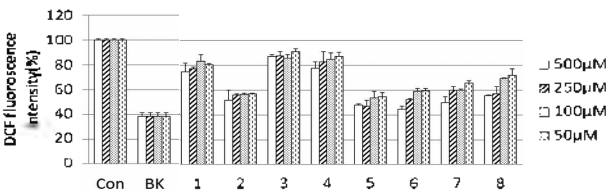

***Figure* 6.** Inhibition effect of compounds **1–8** on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

결 론

*Bacillus idriensis*를 대량 배양한 후에 여러 가지 크로마토그래피 기법으로 배양액의 EtOAc 추출액으로부터 5개의 2,5-diketopiperazine 유도체들(**1–5**)을 분리하였다. 이렇게 분리된 화합물들에 대해 여러 가지 항산화 활성검색을 실시하였다. 전체적인 항산화 활성 검색결과를 보면 분리한 물질들중에서는 화합물 **1**과 **2**의 결과가 좋았기 때문에 이 화합물들의 골격 즉 9번과 10번 탄소 사이에 이중결합을 도입하면 conjugation이 증가되어 항산화과정에서 형성되는 라디칼이 더 안정화되기 때문에 라디칼 소거활성도 증가될 것으로 예상되었다. 또한 문헌조사에서도 이와 유사한 conjugation 구조를 가진 천연물 golmaenone이 좋은 항산화 활성을 보였다.[21] 따라서 보다 많은 conjugation을 가진 유도체들이 더 좋은 항산화 효과를 가질 것으로 예측되어 2,5-diketopiperazine의 3번과 6번 위치에 이중결합을 가진 화합물 **6–8**을 합성하여 이들의 활성을 검색하였다. 2,5-Diketopiperazine의 ESR을 이용한 DPPH radical 소거활성 실험에서는 화합물 **6**과 **8** 이 각각 2 mM 농도에서 75%, 84%의 소거율을 보였으며 hydroxy radical 소거 활성 실험에서는 화합물 **6–8** 모두가 매우 뛰어난 활성을 나타내어 0.05 mM 농도에서도 80% 이상의 소거율을 보였다. Authentic peroxynitrite 활성검색의 경우 화합물 **8**이 매우 좋은 소거효과를 나타내었으며 50 μM에서도 약 80%의 소거율을 보였다. 또한 SIN-1에서 유도된 peroxynitrite 소거활성 검색에서도 500 μM의 농도에서 화합물 **8**이 88%의 소거율을 보였다. HT 1080 세포내에서 ROS 소거활성을 검색했을 경우 화합물 **6–8**이 500 μM에서 모두 70% 이상의 좋은 소거효과를 나타내었다. 이상과 같이 3,5-diketopiperazine의 화학구조를 변화시켰을 때 괄목한 만한 항산화활성의 증가가 확인되었다.

2,5-Diketopiperazine은 현재 알려진 가장 작은 고리형 다이펩타이드 구조 화합물로써 두 개의 아미노산이 이중 펩타이드 결합으로 연결되어 있다. 이 화합물은 포유류를 포함하여 해양 미생물 등 많은 생명체에서 이차 대사산물로 분리되며 자연계에 광범위하게 존재한다.[22] 이전에는 다이펩타이드들이 단지 폴리펩타이드들을 생성하는 과정에 만들어 지는 부산물로 생각되었으나 그 이후 주목할 만한 생리활성을 가진 유도체들이 계속적으로 발견되었다.[22,23] 따라서 2,5-diketopiperazine이 젓갈 미생물에서 발견된 것은 매우 흥미있는 결과라고 할 수 있으며 이러한 측면에서 젓갈 미생물에 대한 계속적인 연구가 진행된다면 항산화 기능을 포함한 여러 가지 생리활성을 가지는 물질을 개발하는 좋은 소재가 될 수 있을 것이다.

Acknowledgments. 본 연구는 2010년 농림수산식품부 수산기술개발사업 (No. 20100293) 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Kim, J. S.; Moon, G. S.; Lee, K. H.; Lee, Y. S. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutrition* **2006**, *35*, 171.
2. Lee, N. K.; Kim, H. W.; Choi, S. Y.; Park, H. D. Kor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *31*, 297.
3. Yang, W. S.; Lim, H. S.; Chung, K. T.; Kim, Y. H.; Hur, M. K.; Choi, B. T.; Choi, Y. H.; Jeong, Y. K. *J. Life Sci.* **2000**, *15*, 434.
4. Ko, Y. J.; Kim, H. H.; Kim, E. J.; Kim, J. Y.; Kang, S. D.; Son, Y. H; Choi, S. Y.; Cha, S. K.; Kim, J. W.; Lee, J. O.; Ryu, C. H. *J. Life Sci.* **2011**, *21*, 393.
5. Park, J. K.; Cho, Y. U.; Choi, Y. J.; Jeong, Y. K.; Gal, A. W. *J. Life Sci.*, **2004**, *14*, 815.
6. Yoon, J. H.; Lee, C. H.; Oh, T. K. *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiol.* **2005**, *557*, 733.
7. Yoon, S. H.; Kim, J. B.; Lim, Y. H.; Hong, S. R.; Song, J. K.; Kim, S. S.; Kwon, S. W.; Park, I. C.; Kim, S. J.; Yeo, Y. S.; Ko, B. S. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *33*, 295.
8. Jung, M. E.; Hong, J. W.; Kim, H.; Kwak, M. K.; Sohn, J. H.; Song, Y.-S.; Oh, K.; Seo, Y. *KSBB Journal* **2013**, *28*, 217.
9. Nanjo, F.; Goto, K.; Seto, R.; Suzuki, M.; Sakai, M.; Hara, Y. *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *21*, 895.
10. Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. In *Methods in Enzymology*; Packer, L., Ed.; Academic Press: Orlando, U.S.A., 1984, 198.
11. Guo, Q.; Zhao, B.; Shen, S.; Hou, J.; Hu, J.; Xin, W. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1427*, 13.
12. Kooy, N. W.; Royall, J. A.; Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. *Free Radical Biol. Med.* **1994**, *16*, 149.
13. Okimotoa, Y.; Watanabe, A.; Nikia, E.; Yamashitab, T.; Noguchia, N. *FEBS Lett.* **2000**, *474*, 13.
14. Rudi, A.; Kashman,Y.; Enayahu, Y.; Chley, M. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 829.
15. Jayatilake, G. S.; Thornton, M. P.; Leonard, A. C.; Grimwade, J. E.; Baker, B. J. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 293.
16. Ström, K.; Sjögren, J.; Broberg, A.; Schnürer, *J. Appl. Environ. Microb.* **2002**, *68*, 4322.
17. Li, X.; Bobretsov, S.; Xu, Y.; Xiao, X.; Hung, O. S.; Qian, P. Y. *Biofouling* **2006**, *22*, 201.
18. Schmitz, F. J.; Vanderah, D. J.; Hollenbeak, K. H.; Enwall, C. E. L.; Gopichand, Y.; SenGupta, P. K., Hossain, M. B.; Helm, D. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3941.
19. Yan, P. S.; Song, Y.; Sakuno, E.; Nakajima, H.; Nakagawa, H.; Kimiko, Y. *Appl. Environ. Microb.* **2004**, *70*, 7466.
20. Adamczeski, M.; Reed, A. R.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 201.
21. Li, Y.; Li, X.; Kim, S.-K.; Kang, J. S.; Choi, H. D.; Rho, J. R.; Son, B. W. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 375.
22. Martins, M. B.; Carvalho, I. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 9923.
23. Sylvie Lautru, S.; Gondry, M.; Genet, R.; Pernodet, J.-L. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1355.