키틴분해 박테리아 *Bacillus idriensis* (CGH18)의 항산화 활성

정명은¹, 홍주완¹, 이정임¹, 광명국¹, 김호준¹, 손재학³, 송영선⁴, 오광석⁵, 서영완^{1,2*}

Antioxidant Activity of a Chitin-degrading Bacterium *Bacillus idriensis* (CGH18)

Myoung Eun Jung¹, Joo Wan Hong¹, Hojun Kim¹, Myoung Kuk Kwak¹, Jae Hak Sohn³, Young-Sun Song⁴, Kwang-suk Oh⁵, and Youngwan Seo^{1,2*}

접수: 2013년 6월 18일 / 게재승인: 2013년 7월 18일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: A bacterium CGH18 exhibiting antioxidizing and chitin-degrading activities in the colloidal chitin culture medium was isolated from salt-fermented crab. This strain was identified as *Bacillus idriensis* based on 16S rDNA sequence homology search. Its crude extract was partitioned between *n*-BuOH and H₂O. The organic layer was further partitioned between CH₂Cl₂ and H₂O. Antioxidant activities of crude extract and its solvent fractions were evaluated using five different bioassay methods, including the degree of occurrence of intracellular reactive oxygen species (ROS), peroxynitrite scavenging (ONOO),

and oxidative damage of genomic DNA. All fractions exhibited significant antioxidant activity in bioassay systems used.

Keywords: *Bacillus idriensis*, 1,4-diketopiperazine, chitin, antioxidant activity

1. 서론

현대의학의 발달로 인간의 수명이 연장되면서, 단순히 오래 사는 것이 아니라 건강하고 행복한 삶을 살아가는 것에 대한 관심이 증가하고 있다. 따라서 인체의 노화와 관련된 세포기능 장애, 동맥경화 및 당뇨 등 성인병의 예방과 치료에 탁월한 효과를 나타내는 [1] 항산화제에 대한 관심이 증대되었다. 이러한 항산화제는 천연 항산화제와 합성 항산화제로 나눌 수 있으며, 현재 시중에 유통되는 것의 대부분은 합성 항산화제이다. 이는 천연 항산화제가 합성 항산화제에 비하여 안전하기는 하지만 가격이 비싸며, 단독으로는 산화 연쇄반응을 저지하는 능력이 낮기 때문이다. 이런 문제를 해결하기 위하여 항산화능이 우수하고 인체에 무해한 천연 항산화 물질을 찾기 위한 연구가 계속되어져 오고 있다 [2-7].

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, 단백질 소화효소와 지방분해효소를 다량 함유하고 있다. 젓갈은 항산화 활성을 비롯하여 [8] 다양한 생리활성 [9,10]을 가지며 이로부터 항암,

¹한국해양대학교 해양과학기술대학 해양환경 · 생명과학부

¹Division of Marine Environment & Bioscience, College of Ocean Science and Technology, Korea Marine University, Busan 606-791, Korea

Tel: +82-51-410-4328, Fax: +82-51-404-3538
e-mail: ywseo@hhu.ac.kr

²한국해양대학교 해양과학기술전문대학

²Science Science & Technology School, Korea Marine University, Busan 606-791, Korea

³신라대학교 의생명과학대학 바이오식품소재학과

³Department of Bio-food material, College of Medical & Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

⁴인제대학교 의생명공학대학 식의약생명공학과

⁴Center of Smart Foods and Drugs and Food Science Institute, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

⁵한국해양대학교 해양과학기술대학 해양공간건축학과

⁵Department of Architecture and Ocean Space, College of Ocean Science and Technology, Korea Marine University, Busan 606-791, Korea

항염증과 같은 여러 가지 생리활성을 보이는 미생물들도 분리되었다 [11-14]. 이와 같이 젓갈의 높은 저장성과 생리활성들은 염분에 의한 효과일 뿐만 아니라 젓갈 내 미생물의 항산화 효과에 의한 것으로 여겨졌으며 아울러 갑각류를 이용한 발효식품의 경우에 키틴을 분해하는 능력도 동시에 가지고 있을 가능성이 높을 것으로 사료되었다.

우리나라에서 새우, 홍게, 꽃게 등을 식용으로 널리 이용함에 따라 폐기되는 부산물인 갑각류 껍질의 양도 증가하게 되었고 이것의 처리는 커다란 과제로 남게 되었다. 버려지는 껍질에는 고분자 다당류인 chitin이 포함되어 있기 때문에, 이를 분리하여 원료로 활용하면 높은 경제적 효과와 함께 환경보호에도 기여할 수 있을 것으로 생각되었다. 따라서 본 연구에서는 환경에 버려지던 게의 껍질을 산업적으로 이용할 수 있는 방법을 탐색하기 위해 갑각류 젓갈류로부터 항산화 활성이 높으며, 키틴 분해능을 가진 젓갈 유래 미생물 *Bacillus idriensis* (CGH18)을 분리 동정한 후 균주가 가진 생리활성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

시료로 사용된 젓갈은 2011년 시판용 새우젓과 게장을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용한 colloidal chitin은 2011년 동해안에서 폐기물로 나온 홍게 껍질로부터 만들어 사용하였다.

2.2. 사용시약

세포 배양에 필요한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 Hyclone사 (Logan, UT)에서 구입하였으며, Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin-Streptomycin과 phosphate buffered saline (PBS) 등은 GIBCO사 (Grand Island, NY)로부터 구입하여 사용하였다. MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, USA)에서 구입하였으며, ROS 측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다. 항산화 실험에 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)과 3-morpholinolinosydnonimine (SIN-1), dihydrorhodamine 123 (DHR 123)은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Peroxynitrite (ONOO⁻)는 Cayman (Ann Arbor, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.3. 균주의 분리 및 배양

젓갈을 10^{-2} ~ 10^{-5} 로 희석한 후 Marine agar (MA, Difco)에 도말하여 4~5일간 25°C에서 배양하였다. 형성된 미생물 집락 중 항산화 활성을 보이는 집락을 1차 선발하고, 선발된 미생물은 Marine broth (MB, Difco)에 접종한 다음 25°C, 200 rpm에서 48시간 배양하여 배양액을 얻었다. 배양액에 동량의 EtOAc를 넣어 추출한 농축액과 배양액을 사용하여 높은 항산화 활

성을 보이는 미생물을 선발하였고, 선발된 미생물을 colloidal chitin 고체 배지에 배양하여 가장 큰 clear zone을 형성하는 균을 최종적으로 선발하여 CGH18이라 명명하였다.

2.4. 껍질을 사용한 chitin 제조

껍질에 존재할 수 있는 오염물질을 제거하기 위하여 10% 소금물로 끓인 뒤 100°C에서 1시간 동안 건조하고 분쇄하였으며, 거기에 에탄올을 첨가하여 색소를 제거하였다. 탈색된 껍질에 원료중량의 15배에 달하는 10% 젖산 (lactic acid)을 첨가하고 24시간 교반하여 칼슘락테이트 (calcium lactate)의 형태로 칼슘을 제거한 후 그 잔류물을 물로 반복 수세하여 여과하였다. 계속해서 칼슘이 제거된 잔류물에 중량당 15배에 해당하는 1.25 N 탄산칼륨 (K₂CO₃)을 사용하여 70°C에서 6시간 동안 반응시켜 단백질을 분리하였으며 역시 그 잔류물을 물로 반복 수세하여 건조한 후 실험에 사용하였다.

2.5. Colloidal chitin의 제조와 배지 조성

상기의 방법으로 얻어진 chitin을 사용할 경우 미생물이 분해하는 속도가 느리기 때문에 colloidal 형태로 제조하여 배양에 사용하였다. Chitin 40 g을 400 mL의 진한 HCl에 풀어서 교반기에서 2시간 동안 교반하고, 교반되어진 chitin을 glass wool에 통과시켰으며, 통과되어진 chitin에 증류수 약 2 L를 첨가하여 약 24시간 정치시킨 후 상층액을 제거하였다. 증류수 첨가와 정치 및 상층액 제거 과정을 수차례 반복한 뒤 NaOH를 사용하여 pH를 중성으로 하고, 이 용액의 건조중량을 측정하여 Table 1에 제시된 성분 조성으로 배지를 만들어 실험에 사용하였다.

2.6. 균주의 형태 및 생화학적 특성

Marine agar에서 성장된 colony로부터 그람염색을 통하여 Gram's type, cell 형태를 관찰하였다. 효소활성 및 기질이용성을 알아보기 위해 API 20NE strips (BioMerieux)을 이용하였다.

2.7. 분리균주의 동정 및 분류

분리균주는 Marine agar를 이용하여 2일간 배양한 후 성장된 colony로부터 Total DNA extraction kit를 이용하여 total DNA를 추출하였다. 16S rDNA는 16S rDNA primer, 27F (5'-AGA

Table 1. Selective medium for degrading chitin microorganisms

Ingredients	Weight
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g
K ₂ HPO ₄	0.7 g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg
MnSO ₄ · 5H ₂ O	1 mg
Colloidal chitin	3 g
Seawater	750 mL
DW	250 mL
Agar	15 g

Adjust to pH 7.0

GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; *Escherichia coli* nucleotide 8~27)와 1518R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3'; *Escherichia coli* nucleotide 1541~1522)을 사용하여 PCR에 의해 genomic DNA로부터 증폭하였다. PCR 산물은 전기영동 (0.8% agarose)에 의해 DNA가 증폭되었음을 확인하였다. 16S rDNA는 자동염기서열장치를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

16S rDNA염기서열의 분석은 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)로부터 얻어진 분류군의 염기서열을 이용하여 서열화하였으며 Phylogenetic Interference Package (PHYLP)가 서열 데이터를 분석하기 위해 사용되었다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining 방법을 이용하였으며, Evolutionary distances matrices는 Jukes & Cantor 모델에 따라 작성되었다. neighbour-joining tree topology는 1000 resampling에 기초한 bootstrap analysis에 의해 평가되었다.

2.8. 시료의 추출, 용매분획 및 화합물의 분리

균체와 배양액의 혼합물 67 L에 동량의 EtOAc를 첨가하여 25°C, 200 rpm에서 30분 동안 진탕하였다. 세포내 함유된 물질의 효과적인 추출을 위해 1시간 동안 sonication 한 후에 이 용액의 유기층을 분리하여 EtOAc 추출액을 얻었다. 위의 과정을 3회 반복하여 얻어진 추출액을 원심분리하고 상층액만을 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (EYELA JAPAN, N-N series)로 농축하여 EtOAc 추출물 (EtOAc 분획)을 얻었다 (EtOAc ext: 2.28 g). 이렇게 얻어진 조추출물을 H₂O-1 (0.16 g)와 *n*-BuOH (1.94 g)로 분획한 후 각각의 분획층을 농축하였다. 용매를 제거하고 얻어진 *n*-BuOH 분획물은 다시 CH₂Cl₂ (0.84 g)와 H₂O-2 (0.52 g)로 재분획하여 각각의 분획물을 얻었다.

좋은 항산화 활성을 보이는 CH₂Cl₂ 분획물 (0.114 g)에 대하여 silica prep. TLC (20% MeOH in CHCl₃)를 실시하여 여러 개의 분획들을 얻었으며, 얻어진 분획들 중 분획 17을 reversed-phase HPLC (ODS-AM, 50% aq. MeOH)로 분리하여 순수한 화합물인 cyclo-L-prolyl-L-tyrosine(1)을 3.1 mg 얻었다 (수율 1.0%).

2.9. Cyclo-L-prolyl-L-tyrosine(Cyclo-Pro-Tyr)

colorless gum; [α]_D²⁰ -48.75° (c 0.27, MeOH); LREIMS m/z 261 [M]⁺; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.05 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6'), 7.05 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-2'), 6.71 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.71 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-3'), 4.37 (1H, td, J = 2.0, 5.0 Hz, H-9), 4.06 (1H, ddd, J = 2.0, 6.0, 11.5 Hz, H-6), 3.56 (1H, m, H-3-b), 3.35 (1H, m, H-3-a), 3.04 (2H, m, H-10), 2.10 (1H, m, H-5-b), 1.82 (2H, m, H-4), 1.23 (1H, m, H-5-a); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 170.55 (C-7), 166.75 (C-1), 157.50 (C-4'), 131.97 (C-2'), 131.97 (C-6'), 127.48 (C-1'), 116.07 (C-3'), 116.07 (C-5'), 60.05 (C-6), 57.90 (C-9), 45.93 (C-3-a), 45.93 (C-3-b), 37.71 (C-10), 29.45 (C-5-a), 29.45 (C-5-b), 22.78 (C-4)

2.10. Peroxynitrite 소거 활성

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정하여 분석하였다. DHR 123을 dimethyl-formamide로 녹여서 5 mM stock 용액을 만들고, 질소로 purge 하여 -80°C에 보관하였다. 50 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합한 pH 7.4의 buffer와 100 μ M DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid)를 혼합하여 DHR 123을 5 μ M로 희석하여 사용하였다. 이 buffer 용액에 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후 multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT를 사용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 SIN-1에 의한 산화가 DHR 123에 의한 산화와는 달리 점진적으로 일어나기 때문에 동일한 방법으로 실시하되 실온에서 방치하는 시간만 1시간으로 조절하여 측정하였다. 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다 [15].

2.11. 세포배양

인간 섬유육종세포주인 HT-1080 세포는 한국 세포주 은행 (KCLB, Korean cell line Bank)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 (Forma scientific, Japan)에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3회 배지를 교환하고 6~7일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

2.12. Cell viability의 측정

배양된 HT-1080 세포를 well 당 1×10⁵ cells/mL가 되도록 96 well plate에 분주하여 37°C, CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 준비된 농도별 시료를 각 well에 처리하고 1시간 동안 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거하고 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 시약을 처리하고 3~4시간 동안 incubation하여 formazan형성을 관찰하였다. Formazan이 형성되면 MTT 시약처리 배지를 제거하고 DMSO로 녹여서 ELISA reader (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.13. Intracellular ROS 측정

세포의 free radical의 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다 [16]. DCFH-DA (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. HT-1080 세포를 96 well에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS 완충액으로 씻은 후 20 μ M DCFH-DA를 각 well에 주입하여 37°C, 5%

CO₂ 배양기에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 농도 별로 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA를 없애고 cell은 다시 PBS 완충액으로 씻은 후 500 μ M H₂O₂ 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광 분석기로 측정하였다.

2.14. Genomic DNA 추출 및 산화 생성물 측정

HT-1080 세포로부터의 genomic DNA의 추출은 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit (USA Bioneer, Inc.)를 이용하여 순차적인 방법에 따라 추출하였다. 추출되어진 genomic DNA의 산화정도는 Milne 등 [17]의 방법을 이용하여 측정하였다. 일정농도의 시료, genomic DNA, FeSO₄ 및 H₂O₂를 물에 녹여 100 μ L의 혼합물을 만들고 각각의 최종농도가 genomic DNA, FeSO₄ 및 H₂O₂의 최종농도가 50 μ g/mL, 200 μ M, 그리고 0.1 mM이 되도록 준비하였다. 이 혼합물을 30 분간 실온에서 반응시키고 10 mM의 EDTA를 첨가하여 반응을 중지시켰으며 반응물은 1% agarose gel을 이용하여 100 V에서 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 1 mg/mL ethidium bromide로 염색하고 AlphaEase gel image analysis software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 이용하여 UV로 관찰하였다.

2.15. DPPH radical 소거 활성 측정

15 mL의 ethanol에 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 시약 2 mg을 녹인 DPPH 원액 1.2 mL에 3 mL ethanol과 0.5 mL DMSO를 동일 비율로 혼합하여 DPPH radical solution을 준비하였다. 준비된 900 μ L의 DPPH radical solution에 100 μ L의 시료를 혼합하고 상온에서 10분간 반응시킨 후 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 사용하여 518 nm에서 흡광도를 측정하였다 [18]. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며, 대조군의 UV-Vis 흡광도는 0.94~0.97이 되도록 조정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 형태 및 생화학적 특성규명

젓갈로부터 분리한 미생물들을 검색한 결과 그 중에서 항산화능이 좋고 chitin 분해 속도가 빠른 CGH18을 선정하여 동정하였다. 미생물 중 세균 (bacteria)와 고세균 (archaea)의 계통분류는 2000년 이후 16S ribosomal RNA 염기서열을 결정하고 그것의 type strain과 sequence similarity 분석한 후에 기준에 알려진 종들과 97% 이상의 similarity를 보이면 동일종으로 분류하며 그 이하일 경우에는 신종으로 분류하고 있다. 따라서 CGH18의 염기서열을 대상으로 similarity 분석을 수행한 결과 *Bacillus idriensis* (AY904033)와 100% 일치하였으며 계통도에서도 동일한 clade에 위치하였다 (Fig. 1). 따라서 CGH18균주는 *Bacillus idriensis*로 판정하였다.

Fig. 1. Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequence analysis indicates that strain CGH18.

Fig. 2. Scavenging effect of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on authentic ONOO⁻.

3.2. ONOO⁻ 소거 활성

*Bacillus idriensis*의 EtOAc 추출물과 그것을 용매분획하여 얻어진 *n*-BuOH, H₂O-1, CH₂Cl₂, H₂O-2 분획물에 대한 authentic ONOO⁻의 소거 효과는 Fig. 2에 나타난 바와 같으며, 모든 시료에서 authentic ONOO⁻가 유의적으로 소거되는 것이 보여졌다. EtOAc 추출물이 가장 높은 소거율을 보였으며, 그 다음으로는 H₂O-1, *n*-BuOH, H₂O-2, CH₂Cl₂ 분획물 순으로 나타났다. 그중에서 EtOAc-1 추출물과 H₂O-1 분획물은 100 μ g/mL에서 각각 70.7%와 67.0%라는 높은 ONOO⁻ 소거율을 보였으며, 50 μ g/mL에서도 거의 50%에 가까운 ONOO⁻ 소거 효과가 나타났다. SIN-1을 처리한 결과는 Fig. 3에서 보여지는 것처럼 100, 50, 25 μ g/mL 모든 농도의 시료에서 SIN-1을 처리하지 않은 control보다 높은 소거 활성이 나타났다. 모든 시료가 100 μ g/mL의 농도에서 50%가 넘는 소거 활성을 나타냈으며, CH₂Cl₂ 분획의 경우에는 100, 50, 25 μ g/mL에서 약 83%, 80%, 68%로 높은 소거 효과가 관찰되었다.

3.3. HT-1080 cell에 대한 MTT assay 효과

세포내 항산화 활성 측정을 하기 전에 MTT assay를 이용하여 시료가 HT-1080 cell의 생존에 영향을 미치는 범위를 측정하였다. 시료는 1시간 동안 각각 200, 100, 50 μ g/mL의 농도

로 처리하였다 (Fig. 4). 그 결과 대부분의 시료에서 80%가 넘는 생존율을 보였으나 CH_2Cl_2 분획물이 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 70%의 생존율을 나타내었기 때문에 세포 수준의 항산화 실험을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 수행하였다.

3.4. Intracellular ROS 소거 활성

세포내 활성 산소와 반응해 형광물질을 만들어 내는 DCFH-DA를 사용하여 세포내에 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다 (Fig. 5). 500 μM 의 H_2O_2 로 처리한 후 각각 0, 30, 60, 90, 120분 뒤에 측정하여 활성을 검색하였으며, 모든 시료는 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험하였다. 대조군은 시료를 제외하고 500 μM H_2O_2 만 처리한 control과 시료와 H_2O_2 모두로 처리하지 않은 blank를 사용하였다. control은 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 급격히 증가하는 반면에, blank의 경우 시간에 따른 DCF fluorescence 값의 변화가 거의 없었다. 모든 시료에서 시간과 농도에 의존적인 결과가 나타났으며, control과 비교하였을 때 생성된 유리 라디칼을 현저하게 소거시키는 것이 확인되었다. 심지어 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 낮은 농도에서도 효과가 보이는 것이 관찰되었다. H_2O -1 분획물의 경우 다른 시료들에 비하여 높은 효과를 나타내지는 못했지만 control과 비교했을 때 활성을 보였다. 효과를 보인 대부분의 시료들은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 blank에 가까운 정도의 소거를 보였다. 이것으로 보아 측정한 모든 농도에서 *B. idriensis*의 추출물과 분획물이 세포내 ROS 소거 활성에 매우 뛰어난 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. Fig. 5(f)는 시

Fig. 3. Scavenging effect of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on ONOO^- from SIN-1.

Fig. 4. Effects of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on cell viability by MTT assay after 1 hr.

료와 농도에 따른 각각의 활성 산소종 소거효과를 90분 후에 측정하여 나타낸 그래프로, 모든 시료의 농도에서 높은 활성이 나타났으며 특히, CH_2Cl_2 추출물이 다른 시료들보다 높은 소거 효과를 나타냈다.

3.5. Genomic DNA 추출 및 genomic DNA의 산화 생성물 측정

HT-1080 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 0.1 mM H_2O_2 와 0.1 M FeSO_4 를 이용하여 10분간 Fenton 반응을 시켰을 때

Fig. 5. Inhibition effect of crude extract and its solvent fractions from *Bacillus idriensis* on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells: (a) EtOAc extract; (b) *n*-BuOH fraction; (c) H_2O -1 fraction; (d) CH_2Cl_2 fraction.

Fig. 5. Inhibition effect of crude extract and its solvent fractions from *Bacillus idriensis* on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells: (e) H₂O-2 fraction; (f) at 90 min.

Fig. 6. Antioxidant effect of crude extract and its solvent fractions from *Bacillus idriensis* on genomic DNA in HT-1080 cells.

시료가 DNA 산화를 억제시키는 정도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않고 H₂O₂와 황산철을 첨가한 대조군을 기준 (100%)으로 산화 정도를 비교하여 백분율 (%)로 나타내었다. 모든 시료에서 농도의존적인 산화 억제가 나타났다. 100 µg/mL에서 EtOAc 추출물과 n-BuOH 분획물을 제외한 모든 시료들에

Cyclo-L-prolyl-L-tyrosine

Fig. 7. Chemical structure of compounds 1 from *B. idriensis*.

Fig. 8. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 1 from *B. idriensis*.

서 50%가 넘는 산화 억제 효과가 보여졌다 (Fig. 6).

3.6. Diketopiperazine 유도체 (1)의 분리와 구조결정

CGH18 균주 배양액 추출물의 용매 분획 중에서 가장 항산화 활성이 우수한 CH₂Cl₂ 분획으로부터 여러 종류의 크로마토그래피를 이용하여 diketopiperazine 유도체를 분리하였다. 분리된 화합물은 NMR 스펙트럼 분석 (Varian NMR 300 spectrometer, USA)을 통해 이미 보고된 바 있는 cyclo-(L-prolyl-L-tyrosine)으로 확인되었으며 분광학적인 데이터가 문헌에 보고된 값과 잘 일치하였다 [19].

3.7. Diketopiperazine 유도체 (1)의 DPPH radical 소거 활성

시료의 농도를 2, 1, 0.5 mM로 하여 라디칼 소거 활성을 확인하였다. 그 결과, Fig. 8에서 나타난 것처럼 2 mM의 농도에서 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비교하여 30% 이상 DPPH radical을 소거하는 것으로 나타났다 (Fig. 8).

3.8. Diketopiperazine 유도체 (1)의 ONOO⁻ 소거 활성

분리된 화합물의 authentic ONOO⁻의 소거 효과는 추출물 및 분획물의 실험 방법과 동일한 방법으로 실행하였으며, 화합물의 농도는 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.01, 0.001 mM에서 실행하였다. 소거 효과는, Fig. 9에서 볼 수 있듯이 compound 1번이 positive control로 사용된 Vit. C와 penicillamine (PA)보다 낮은 활성을 보였지만 0.5 mM에서 peroxynitrite를 42% 이상 감소시키는 결과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 38%, 37%, 36%, 23%, 7%으로 생성된 peroxynitrite를 감소시키는 것으로 나타났다 (Fig. 9).

SIN-1의 점진적 산화에 의해 생성된 ONOO⁻ 소거능 측정

Fig. 9. Scavenging effect of isolated compounds 1 from *B. idriensis* on authentic ONOO⁻ (concentration: mM/ml).

Fig. 10. Scavenging effect of isolated compounds 1 from *B. idriensis* on ONOO⁻ from SIN-1 (concentration: mM/ml).

결과는 Fig. 10에서 볼 수 있듯이 compound 1을 positive control과 비교했을 때는 낮은 소거능을 보였지만 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 생성된 ONOO⁻를 훨씬 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 특히, 0.5 mM의 농도에서는 85% 가량 ONOO⁻를 소거하였으며, 그 외 0.25, 0.1, 0.05 mM 농도에서도 각각 65, 59, 54%로 생성된 ONOO⁻를 절반 이상 소거하였다.

4. 결론

본 연구는 시중에 유통 중인 젓갈로부터 키틴을 분해하면서 동시에 높은 항산화 활성을 가지는 미생물을 선별하였으며 이 균주를 동정한 결과 *Bacillus idriensis*로 판명되었다. *B. idriensis*를 pH 7의 액체배지에서 25°C로 48시간 동안 배양한 후에 EtOAc로 추출하고 용매를 제거한 후에 조추출물을 얻었으며 이를 다시 용매의 극성에 따라 분획하여 *n*-BuOH, H₂O-1, CH₂Cl₂, H₂O-2 분획을 얻었다. 이들 분획에 대한 여러 가지 항산화 활성 결과 CH₂Cl₂ 용매 분획층이 가장 좋은 활성을 보여 주었다.

따라서 항산화 활성이 가장 좋은 CH₂Cl₂ 분획으로부터 활성성분들의 분리를 시도하였으며 하나의 Cyclic dipeptide인 2,5-diketopiperazine 유도체 (1, cyclo-Pro-Tyr)가 얻어졌다. 2,5-Diketopiperazine은 자연계에서 두루 발견되어지며 여러 미생물로부터 분리되었다 [20]. 또한 2,5-diketopiperazine 유도체들이 정족수 인식 신호물질들 중에 하나라는 것이 이미 보고되었으며 masculosin으로 알려진 cyclo-Pro-Tyr(1)도 그러

한 물질들 중에 하나이다 [21]. 젓갈 미생물에서 이러한 물질이 분리된 것은 매우 흥미있는 현상이며 앞으로 젓갈내 호염성균의 군집형성에 대한 연구에도 이용될 수 있을 것이다. 이 화합물에 대한 항산화 활성 측정결과 유의적인 활성을 나타내었다. 이 화합물은 아직까지 젓갈 균주인 *Bacillus idriensis*에서 분리된 적이 없으며 항산화 활성도 여기에서 처음으로 보고되어진다. 현재 CH₂Cl₂ 분획으로부터 추가적인 항산화 활성성분을 분리하기 위한 연구가 계속해서 진행중에 있다.

사사

본 연구는 2010년 농림수산식품부 수산기술개발사업 (No. 20100293) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 해양수산부의 지원으로 수행한 해양에너지 전문인력 양성사업의 연구결과입니다.

참고문헌

- Babizhayev, M. A. and C. E. Bozzo (1994) Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens. *Biochimica et Biophysica Acta* 1225: 326-337.
- Kim, Y. S., H. G. Nam, H. J. Shin, M. S. Na, M. H. Kim, C. W. Lee, J. S. Kim, Y. L. Piao, and W. S. Cha (2011) Effect of hot water extract of *Undaria pinnatifida* on the activities of antioxidant and nitrite scavenging. *KSBB* 28: 151-158.
- Caillet, S., J. Cote, G. Doyon, J. F. Sylvain, and M. Lacroix (2011)

- Antioxidant and antiradical properties of cranberry juice and extracts. *Food Res. Int.* 44: 1408-1413.
4. Eom, S. H., B. J. Lee, and Y. M. Kim (2010) Effect of yeast fermentation on the antioxidant and anti-inflammatory activity of sea tangle water extract. *Korean J. Fisheries and Aquatic Sci.* 43: 117-124.
 5. Lee, S. J., W. H. Ha, H. J. Choi, S. Y. Cho, and J. W. Choi (2010) Hepatic detoxification and antioxidant activity in Sea-urchin roe and ethanol extract of roe. *Korean J. Fisheries and Aquatic Sci.* 43: 428-436.
 6. Liu, Q., Y. J. Zhang, and C. R. Yang (2009) Phenolic antioxidants from green tea produced from *Camellia crassicolumna* Var. multiplex. *J. Agricultural and Food Chem.* 57: 589-590.
 7. Pukalskas, A., P. R. Venskutonis, and S. Salido (2012) Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chem.* 130: 695-701.
 8. Kim, J. S., G. S. Moon, K. H. Lee, and Y. S. Lee (2006) Studies on quality changes and antioxidant activity during the fermentation of the alt fermented Whangseoke. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutrition* 35: 171-176.
 9. Lee, N. K., H. W. Kim, S. Y. Choi, and H. D. Paik (2003) Some probiotic properties of some lactic acid bacteria and yeasts isolated from Jeot-gal. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 297-300.
 10. Yang, W. S., H. S. Lim, K. T. Chung, Y. H. Kim, M. K. Huh, B. T. Choi, Y. H. Choi, and Y. K. Jeong (2000) Characterization of a fibrinolytic enzyme from pickled anchovy. *Journal of Life Science* 15: 434-438.
 11. Ko, Y. J., H. H. Kim, E. J. Kim, J. Y. Kim, S. D. Kang, Y. H. Son, S. Y. Choi, S. K. Cha, J. W. Kim, J. O. Lee, and C. H. Ryu (2011) Anti-allergic inflammatory effect of bacteria isolated from fermented soybean and Jeotgal on human mast cell line (HMC-1). *J. Life Sci.* 21: 393-399.
 12. Park, J. K., Y. U. Cho, Y. J. Choi, Y. K. Jeoung, and A. W. Gal (2004) Antitumor activity of *Bacillus subtilis* SW-1 isolated from Jeotgal. *J. Life Sci.* 14: 815-820.
 13. Yoon, J. H., C. H. Lee, and T. K. Oh (2005) *Bacillus cibi* sp. nov., isolated from Jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiol.* 557: 733-736.
 14. Yoon, S. H., J. B. Kim, Y. H. Lim, S. R. Hong, J. K. Song, S. S. Kim, S. W. Kwon, I. C. Park, S. J. Kim, Y. S. Yeo, and B. S. Ko (2005b) Isolation and characterization of three kinds of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* JKK238 from Jeot-Kal of Korean traditional fermented fishes. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 295-301.
 15. Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biol. Med.* 16: 149-156.
 16. Okimotoa, Y., A. Watanabe, E. Nikia, T. Yamashitab, N. Noguchia (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* 474: 13-14.
 17. Milne, L., P. Nicotera, S. Orrenius, and M. Burkitt (1993) Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Archives of Biochem. Biophys.* 304: 102-109.
 18. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 26: 1199-1200.
 19. Jayatilake, G. S., M. P. Thornton, A. C. Leonard, J. E. Grimwade, and B. J. Baker (1996) Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Natural Products* 59: 293-296.
 20. Prasad, C. (1995) Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides* 16: 151-164.
 21. Holden, M. T., S. R. Chhabra, R. D. Nys, P. Stead, N. J. Bainton, P. J. Hill, M. Manefield, N. Kumar, M. Labatte, D. England, S. Rice, M. Givskov, G. P. Salmond, G. S. Stewart, B. W. Bycroft, S. Kjelleberg, and P. Williams (1999) Quorum-sensing cross talk: Isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Molecular Microbiol.* 33: 1254-1266.