

## 해양에서 분리한 *Exiguobacterium* sp. SC2-1의 항산화 활성 및 특성

김만철 · 박근태 · 손홍주<sup>1</sup> · 최우봉<sup>2</sup> · 허문수\*

제주대학교 해양과학대학 해양생물공학과, <sup>1</sup>밀양대학교 생물공학과, <sup>2</sup>동의대학교 생물공학과/바이오물질제약학과

제주도 연안의 해수로부터 항산화 물질을 생산하는 세균을 분리하였으며 항산화 물질의 특성을 조사하였다. 분리된 항산화 생성 균주는 그람양성의 통성혐기성균으로 운동성을 가진 단간균이었으며 생육시 NaCl를 필요로 하였다. 분리균주는 형태학적, 배양적, 생화학적 특성 및 16S rDNA 염기서열 분석결과 *Exiguobacterium* 속으로 동정되어 *Exiguobacterium* sp. SC2-1로 명명하였다. 항산화물질 생산균주 배양액의 radical 소거활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 법을 사용하였으며, 항산화 물질 생성 최적조건은 25°C, NaCl 4%, pH 6-8 이었으며, 최적 탄소원은 1% maltose였다. 배양액의 hydroxyl radical 소거활성은 73%였으며 superoxide radical 소거활성은 35%를 나타내었다.

**Key words** □ DPPH, *Exiguobacterium* sp., hydroxyl radical, SOD

해양은 지구상에 남아있는 마지막 자원의 보고로서, 해양에서 식하고 있는 동식물 등은 식량자원 뿐만 아니라 근래에는 의약 산업, 정밀화학소재, 신기능물질 등의 고부가가치 소재로서 이용되고 있다(36). 특히 해양은 지구 생물종의 약 80%가 존재한다는 것을 고려할 때, 잠재적 유전자원으로서의 그 중요성은 매우 크다.

경제성장의 발달로 식생활이 점차 서구화 되면서 우리나라도 고지방 식이 섭취등이 늘어나면서 패턴의 변화로 인해 뇌 혈관계 질환, 심장병, 고혈압 및 당뇨병 등의 순환기계 질환과 암으로 인한 사망률이 크게 높아져 건강에 대한 관심이 날로 고조되고 있다(2). 생체 내에서 산화 스트레스에 의한 free radical(유리기) 생성은 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 산화시키고, 이로 인해 생성된 과산화지질의 증가는 여러 조직을 손상시켜 대사 장애를 초래함으로써 생체기능의 저하나 노화 및 만성 퇴행성질환들의 유발과 밀접한 인과 관계를 가진 것으로 알려져 있다(12, 34). 과도하게 생성된 활성 산소를 제거하기 위하여 인체에서는 SOD를 비롯해 비타민 C, E 등의 방어기작들이 작용한다. 활성 산소는 대표적으로 superoxide, hydroxyl, peroxy, hydrogen peroxide 등이 있다. 따라서 생체 내에서 free radical 형성에 의한 체내의 산화적 손상을 억제 시킬수 있는 생리 활성 물질이 있다면 이는 순환기계 질환과 암 등 만성질환의 발병률을 낮추는데 크게 기여할 것이다(8, 9, 34).

항산화물질은 일반적으로 활성산소와 과산화지질의 제거 물질로서, 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene) 등이 널리 사용되어 왔으나 이 물질들의 안전성이 제검토 되면서 사용 규제가 강화 되고 있다(7). 반

면에 천연 항산화제로 이용되고 있는 비타민인  $\alpha$ -tocopherol 및 vitamin C 등은 항산화 효과가 낮고, 가격이 비싼 단점이 있다. 그러므로 항산화능이 우수 하고 인체에 무해하며 가격이 저렴한 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 따라서 천연 항산화 물질에 대한 개발의 필요성이 대두되면서, 최근에는 여러 종류의 육상 식물에서 항산화 물질 연구가 활발히 진행되고 있다(1, 4, 26). 그러나 식물의 연구에 비해 미생물에서는 비교적 연구가 미약하며 효모(31), 곰팡이(3, 16, 30), 세균(10, 11, 35)등에서 항산화 물질에 대한 약간의 보고가 있다. 또한 해양 자원인 경우에는 식용 해조류를 이용한 항산화제에 대한 연구가 있으나 해양 미생물에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다(9, 28).

따라서 본 연구는 해양 유래의 미생물을 이용하여 *in vitro* 항산화 실험계를 이용하여 항산화능을 가진 균주를 선별해내고 항산화 물질 생성 최적 조건 및 균주 배양액에서의 항산화 활성을 조사하여 해양 미생물 유래 항산화제로서의 이용 가능성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 항산화 생성 균주의 분리 및 배양조건

항산화 활성을 나타내는 균주의 분리는 제주 연안 해수를 해양 미생물 분리용 평판배지 MA (Marine agar, Difco)에서 10<sup>1</sup>에서 10<sup>4</sup>배로 희석한 후 배지에 도말하여 25°C에서 3일간 배양하고, 멸균 filter paper를 배지에 부착시켜 균체 및 대사산물이 filter paper에 묻게 한 다음 떼어내었다(21).

0.183 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 용액을 균체 및 대사산물이 묻은 filter paper에 분사하여 색 변화로 항산화 활성 생성 균주를 1차적으로 분리하였다.

항산화 활성 측정 위한 균주의 배양은 25°C, 200 rpm에서

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: (064)754-3473, Fax: (064)756-3493  
E-mail: msheo@cheju.ac.kr

진탕 배양하였다. 상기의 방법으로 분리된 각 균주들은 MB (Marine broth, Difco)에 2%씩 첨가하여 배양한 후, 에탄올에 녹인  $4 \times 10^{-4}$  M DPPH 용액 2.9 ml에 균주 배양액 100  $\mu$ l를 혼합하여 30분간 반응 시켰다. 반응물을 4°C, 10,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후, 525 nm에서 흡광도 측정으로 활성이 가장 높은 균주를 선정하였다(18).

### 균주의 동정

선정된 분리균주의 동정을 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그 외 생화학적 성상 시험은 표준생화학 검사법(24, 32)에 따라 시험 하였고 균주의 생화학적 성상을 확인하기 위하여 Bergey's Manual (5)에 기재된 균주와 비교하여 나타내었다. 또한 16S rDNA 염기서열을 분석하기 위하여 2% NaCl이 첨가된 MB 10 ml에 분리균주를 접종하여 25°C에서 200 rpm으로 24시간 배양하였다. 배양액은 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상청액을 제거한 후 모아진 세균 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 정제하고 (주)마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 NCBI의 GenBank로부터 유사도를 조사하였으며 유사도가 높은 관련 균주들과의 유연관계를 살펴보기 위하여 Neighbor-joining method(14)에 의해 phylogenetic analysis를 수행하였다.

### DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

전자공여능은  $4.0 \times 10^{-4}$  M DPPH 용액 2 ml와 24시간 배양된 분리균주의 배양 상청액 1 ml를 혼합한 후, spectrophotometer (Hanson OPRON-3000, Korea)로 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로 사용된 합성 항산화제인 BHA와 BHT 및 천연항산화제인  $\alpha$ -tocopherol은 0.5% (w/v)의 농도로 제조한 후 제조된 DPPH용액 2 ml와 대조구역 1 ml씩을 혼합한 후 흡광도를 측정하였다. 전자 공여능(Electron donating ability, EDA)은 시료첨가구와 흡광도 차를 측정하여 백분율로 표시 하였다(6).

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

### Hydroxyl radical 소거활성

배양액의 hydroxyl radical (OH) 소거활성능을 조사하기 위해 2-deoxyribose oxidation method 방법(19, 23)을 변형하여 측정하였다. 시험관에 10 mM FeSO<sub>4</sub>/EDTA 용액 0.2 ml, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 ml, 배양액 0.2 ml와 0.1 mM phosphate buffer (pH 7.4) 1 ml, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 ml를 가하고 37°C에서 4시간 동안 반응 시킨 후, 2.8% TCA (trichloroacetic acid)용액 1 ml를 가하여 반응을 중지 시켰다. 그 후, 1.0% TBA (thiobarbituric acid)용액 1 ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시료에 대한 기준

시료는 균주가 접종되지 않은 배지를 가지고 측정하였다. ·OH 소거활성은 HSA (hydroxyl radical scavenging ability)로 표기 하였으며 다음과 같은 식으로 계산 하였다.

$$HSA(\%) = \{1 - [\text{absorbance of sample at 532 nm} / (\text{absorbance of control at 532 nm})]\} \times 100$$

### Superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 소거활성

Superoxide radical 소거활성능은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund의 방법에 따라 측정하였다(13, 33). 본 실험에서 사용된 시료는 50 ml MB에 배양된 균주의 배양액을 가지고 실험하였다. 50 mM phosphate buffer 2.61 ml, 3 mM pyrogallol 90  $\mu$ l를 첨가하여 30 초간격으로 6분간 측정하여, standard를 측정하였으며, 그 후의 시료는 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 2.61 ml와 시료 50  $\mu$ l, 3 mM pyrogallol 90  $\mu$ l를 첨가하여 325 nm에서 30초 간격으로 6분간 측정하였으며 superoxide radical 소거활성값은 다음과 같은 식에 의해서 나타내었다(20).

$$\text{Superoxide radical scavenging activity}(\%) = (a-b)/a \times 100$$

a = standard의 반응전과 반응후의 흡광도 차이

b = sample의 반응전과 반응후의 흡광도 차이

### 탄소원의 종류 및 농도에 따른 배양액의 항산화 활성

탄소원의 종류에 따른 분리균주의 항산화능(antioxidant activity)은 DPPH법에 의한 전자공여능으로 측정하였다. 분리균주의 배양을 위하여 50 ml의 MB가 들어있는 250 ml의 삼각플라스크에 mannitol, sucrose, lactose, xylose, maltose, fructose, dextrose, glycerin이 각각 1% (w/v)의 농도가 되도록 첨가하였다. 초반 pH를 7.0으로 조정된 후 MB에 전배양된 분리균주를 각각 2%(v/v)로 접종하여 25°C에서 24, 30, 48시간 배양한 후 600 nm에서 생육도를 측정하고 각각의 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 항산화 활성 측정에 이용하였으며, 3번의 반복 실험을 통하여 얻은 결과를 평균수치로 계산한 후 나타내었다.

### 온도, 염, pH에 따른 영향

온도에 의한 배양액의 항산화 활성능에 대한 영향을 알아보기 위해 다양한 온도조건(0, 18, 25, 30, 35°C)하에서 50 ml MB가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 균주를 접종하여 24시간 동안 배양한 후 600 nm에서 생육도를 측정하였다. 항산화 활성은 배양액을 원심분리 하여 얻은 상청액 1 ml을 DPPH 용액 2 ml에 첨가하여 525 nm에서 나타내는 흡광도로 전자 공여능을 측정하였다. 염(NaCl) 농도에 의한 항산화 활성능에 대한 영향을 알아보기 위해 50 ml MB가 들어있는 250 ml 삼각플라스크의 NaCl을 각각 1~11%(w/v)로 첨가하여 염 농도를 조절하여 배양한 후, 생육도와 전자공여능을 측정하였다. 또한 pH에 의한 항산화 활성능을 검토하기 위해 250 ml 삼각플라스크에 들어있는 50 ml MB의 초반 pH를 4~10으로 조절하여 25 °C, 200 rpm으로 24시간 동안 배양한 후 생육도 및 전자공여능을 측정하였다. 염, pH,

온도에 의한 항산화능 실험에서 대조 시험구는 균을 접종하지 않은 MB를 같은 조건하에서 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균주의 분리 및 동정

제주 연안의 해수로부터 항산화 생성능이 있는 78개의 균주를 Takao 등의 방법(35)으로 분리한 후, DPPH법에 의하여 전자공여능 소거 활성능이 뛰어난 균주를 선별하였다. 그 중 항산화능이 가장 우수한 균주를 분리하여 SC2-1이라 명명하였다. 분리균주의 형태학적, 배양적, 생화학적 특성은 Table 1과 같다. 항산화능을 나타내는 SC2-1은 그람 양성균의 단간균으로 집락은 원형이었으며 오렌지색을 나타내었다. 또한 분리균주 SC2-1은 생육에 있어서 NaCl를 필요로 하였으며 운동성을 가졌다. 그리고 *Vibrio* 속의 선택배지인 TCBS 배지에서 생육하지 못하였으며 catalase 양성, oxidase 음성을 나타내었고, D-fructose, D-maltose를 이용하여 산을 생성하였다. 상기의 제 특성 결과를 Bergey's Manual 과 비교 검토한 결과 *Exiguobacterium oxidotolerans*와 매우 유사하였다. 또한 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 역시 *Exiguobacterium* 속으로 동정되어 *Exiguobacterium* sp. SC2-1로 명명하였다(Fig. 1).

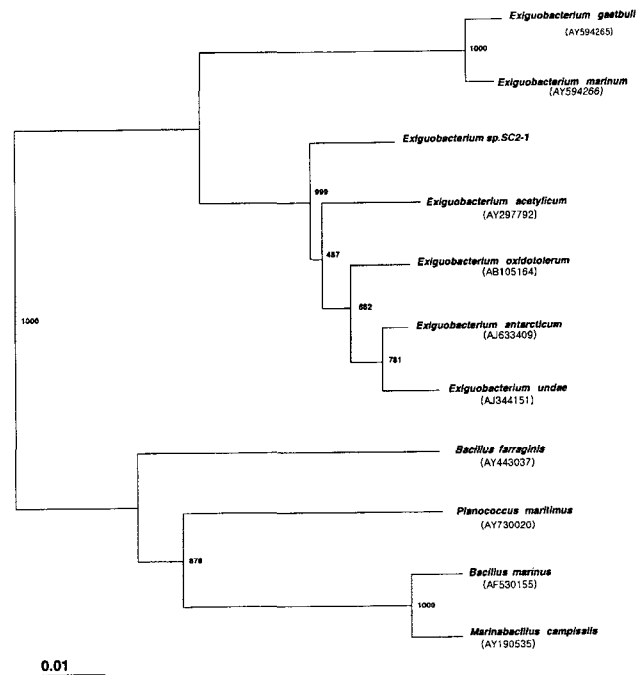
#### DPPH법에 의한 항산화 활성

항산화 물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하여 복합체

**Table 1.** phenotypic characteristics of isolated SC2-1 and *Exiguobacterium oxidotolerans* T-2-2<sup>T</sup>

Characteristics	Strain SC2-1	<i>E. oxidotolerans</i> T-2-2 <sup>T</sup>
Gram reaction	+	+
Cell shape	Rod	Rod
Growth at:		
4°C	+	+
35°C	+	+
40°C	+	+
Mobility	+	+
Pigmentation	Orange	Orange
Maximum NaCl concn tolerated	0~11%	ND
Na <sup>+</sup> requirement for growth	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
Methyl red	+	+
Acid produced from:		
D-Fructose	+	+
D-Maltose	+	+
Mannitol	+	+
L-Arabibose	-	-
D-Xylose	-	-
Sorbitol	-	-
D-Galactose	-	-

Symbols: +, positive; -, negative; ND, no data

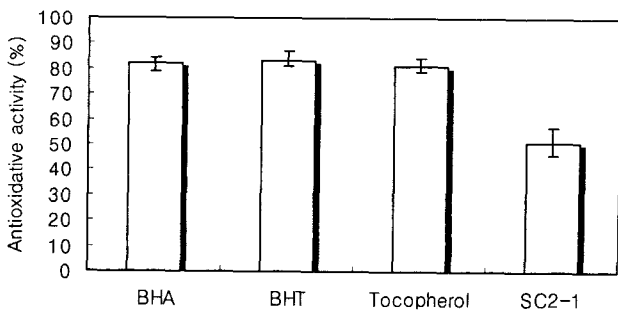


**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences comparing isolated strain with members of *Exiguobacterium* and related genera. DNA distance were established by using the neighbor-joining method. The scale bar indicates 0.01 substitution per nucleotide position. The numbers at the branch nodes are bootstrap values from 1000 bootstrap trails.

를 만들고, DPPH는 항산화성 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로, 전자공여능(electron donating ability)으로부터 항산화 활성을 추정할 수있다.

DPPH법은 α-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. 본 실험계에서 대조구로 자주 사용된 합성 항산화제인 BHT는 항산화 작용으로 반응시간과 함께 525 nm에서 짙은 자색을 가지는 DPPH 용액의 흡광도가 점차적으로 감소하는 것으로 나타났다.

DPPH법에 의한 전자공여능을 측정한 결과는 BHT>BHA>α-tocopherol>SC2-1 순으로 나타났다(Fig. 2). 대조구로 사용한 합성 항산화제인 BHA, BHT와 천연 항산화제인 α-tocopherol의 농도는 0.5%(w/v)였으며 SC2-1의 항산화 활성능은 다른 합성 항산화제나 천연 항산화제에 비해 낮게 나타났지만 일반적으로 실험에 사용되는 합성 항산화제의 농도(0.05%, w/v)에 비교해 보았을 때 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 사료된다. 또한 배양 상등액상의 정제되지 않은 상태로서 50% 이상의 뚜렷한 활성을 나타내었기 때문에 천연 항산화제로서의 가능성을 보여주고 있다. 상기의 결과는 분리균주의 배양 조건에 따라 달라질 수 있으며 환경적인 요인을 최적화하여 항산화능을 높인다면 산업



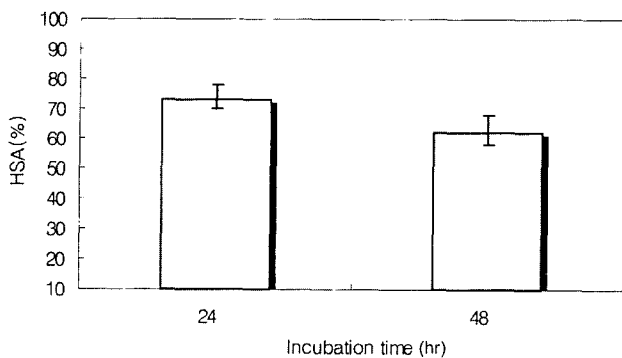
**Fig. 2.** Radical scavenging activity of culture supernatant of strain SC2-1. The antioxidative activity was tested by DPPH method. The concentration of BHA, BHT, and  $\alpha$ -tocopherol added in reaction mixture were 5 mg/ml. BHA: butylated hydroxyanisole, BHT: butylated hydroxytoluene.

적으로 유용한 천연 항산화 물질을 확보할 수 있을 것이다.

**Hydroxyl radical 소거활성**

Hydroxyl radical ( $\cdot$ OH)은 산소종 중 반응성이 매우 강하며 지질 산화를 개시하고 DNA 손상 및 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있다. Hydroxyl radical ( $\cdot$ OH)은 생체의 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나  $H_2O_2$ 가  $Fe^{2+}$ 나  $Cu^{2+}$  이온의 존재 하에서 생산되며 가장 독성이 강한 free radical이므로 이 라디칼을 소거하는 정도를 측정하였다. 본 실험에서는 *in vitro*상에서  $Fe^{2+}$  존재 시 발생하는  $\cdot$ OH에 의해 2-deoxyribose를 손상여부를 조사한 결과 *Exiguobacterium* sp. SC2-1 배양 상등액의  $\cdot$ OH 소거능은 24시간 배양조건시 약 73.3%, 48시간 배양에서는 62% 정도의 활성을 나타내었다(Fig. 3).

이러한 소거활성은 배양 상등액 중의 물질이 2-deoxyribose와 hydroxyl radical과의 반응보다 더 빨리 일어나 2-deoxyribose의 변성을 억제하는 것으로 사료된다(29). 또한,  $\cdot$ OH 소거능은 antioxidant 특성뿐만 아니라 pro-oxidant 특성을 조사하는 방법(27)으로도 널리 사용되고 있다. 아직까지 본 연구에서는 항산화 작용을 하는 물질들을 정확하게 규명한 것은 아니지만 높은 항산화능을 나타내는 것으로 보아 충분한 이용가능성이 있다고 사



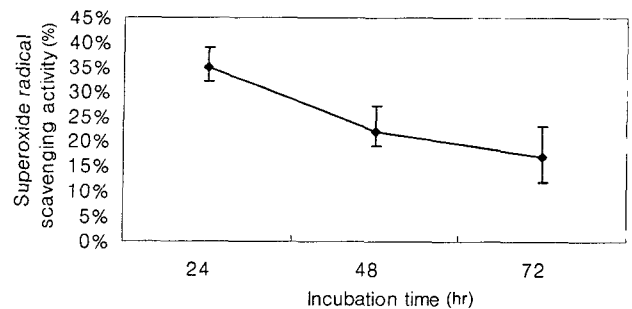
**Fig. 3.** Hydroxyl radical scavenging activities of culture supernatant of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 by 2-deoxyribose oxidation method.

료되며 좀 더 지속적인 연구가 필요할 것이다.

**Superoxide radical 소거활성**

생체내의 항산화 방어기구 중 효소적 방어계의 하나로서 superoxide radical을 환원시켜서 산소독으로부터 생체를 보호하는 superoxide radical 소거활성을 pyrogallol 자동산화로 생성되는 superoxide anion radical을 소거 여부로 확인하였으며 Fig. 4와 같다. *Exiguobacterium* sp. SC2-1은 24시간 배양에서 35%, 48시간에서는 22%, 72hr에서는 15% 정도의 항산화능을 나타내었다. 배양시간의 경과에 따른 생육도 감소와 함께 superoxide radical 소거능도 감소하였다.

Superoxide radical은 호기적 대사기관에서 여러 가지 생화학적 반응으로 생성되며, 주로 세포막 지질의 불포화 지방산과 반응하여 지질 과산화물을 생성하므로 세포손상을 초래한다고 알려져 있다. 생체는 이러한 지질 과산화에 대한 반응체계로서 SOD에 의하여 superoxide radical을  $H_2O_2$ 로 바꾸며, 다시  $H_2O_2$ 는 catalase와 glutathion peroxidase의 작용에 의해  $H_2O$ 로 환원되므로 이들 효소계의 반응에 의해서 자유 라디칼로부터 생체를 보호할수 있다(22). 실제로 일본의 Niwa 등은 새로운 산화 방지제를 발굴하고 임상실험을 통하여 효능을 평가하고 식품을 개발하여 상품화 하였고, 이들의 활성산소의 시발물질이라고 할수 있는 superoxide anion을 scavenging 함으로써 생체에 실질적으로 상해를 유발하는 hydroxyl radical과 과산화수소의 생성을 억제하여 유용한 생리활성을 나타낸다고 보고하였다(25). 이는 산화 방지제의 일종으로 SOD와 작용 기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성 물질이라고 불린다. 이와는 별도로 식물체를 대상으로 SOD 유사활성 물질을 탐색하고 효능을 평가하는 연구가 보고된 바 있다(15). 본 실험에서는 *Exiguobacterium* sp. SC2-1의 배양액에서 35% 정도의 superoxide radical 소거활성을 나타내었다. 이상의 실험결과를 통하여 *Exiguobacterium* sp. SC2-1은 DPPH radical에 대한 전자공여능, hydroxyl radical 소거능과 superoxide radical 소거능을 가진 것으로 판명되었다. 특히 활성산소 radical에 대한 소거활성에 있어 독성이 보다 큰 hydroxyl radical 소거 활성이 superoxide radical 소거활성 보다 매우 높아 유용한 항산화제의 개발 가능성을 보여주고 있다(17). 차후의 연구진행을 통하여 항산화능을 보여주



**Fig. 4.** Superoxide radical scavenging activity of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 by pyrogallol auto-oxidation colorimetric method.

**Table 2.** Effect of carbon sources on the production of antioxidant activity

Source	Compounds	Cell growth (OD 600 nm)			EDA (%) <sup>a)</sup>		
		24 hr	30 hr	48 hr	24 hr	30 hr	48 hr
Carbon <sup>b)</sup> (1%W/V)	Mannitol	0.873	0.848	0.772	22	15	18
	Sucrose	0.796	0.791	0.699	17	11	8
	Lactose	0.835	0.941	0.857	24	17	13
	Xylose	0.797	0.745	0.789	18	12	3
	Maltose	0.970	0.925	0.865	41	34	28
	Fructose	0.573	0.550	0.510	33	18	14
	Dextrose	0.604	0.587	0.603	24	21	14
	Glycerine	0.877	0.844	0.763	28	25	14

<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.

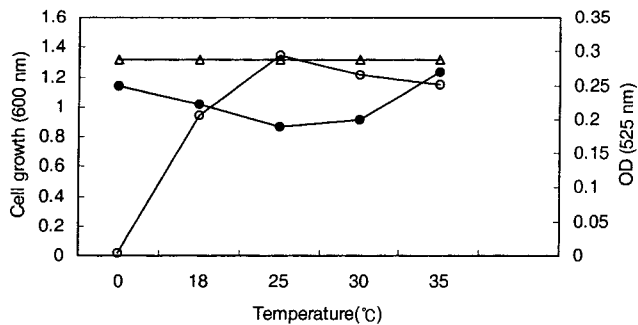
는 물질에 대한 구체적인 검토가 필요할 것으로 사료된다.

**탄소원의 영향**

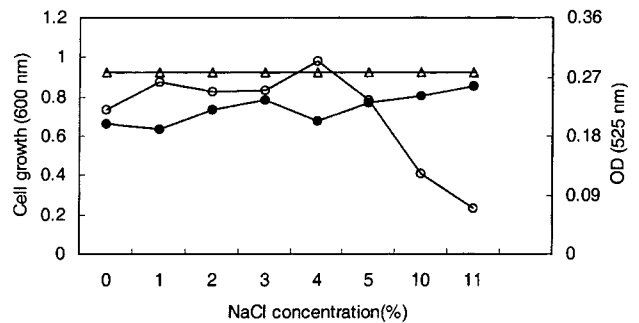
*Exiguobacterium* sp. SC2-1의 생육도와 전자공여능에 대한 탄소원의 영향을 조사하기 위해서 MB에 mannitol, sucrose, lactose, xylose, maltose, fructose, dextrose, glycerine을 각각 1% (w/v)씩 첨가하여 조사한 결과, Table 2에서와 같이 다른 탄소원들에 비해 maltose가 생육도와 전자공여능이 가장 높게 관찰되었다. 그러나 24시간 배양시에 전자공여능이 높게 나왔으나, 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 볼수가 있었다. 이는 배양 중 maltose가 고갈 되어 영양원으로 사용을 못해 항산화능이 떨어지는 것으로 사료된다. 또한 균주에 대한 질소원의 영향을 밝혀내게 된다면 좀더 높은 활성을 기대할 수가 있을 것이며 *Exiguobacterium* sp. SC2-1의 생육도 및 전자공여능이 지금 보다 더 높은 항산화 활성을 나타낼 것으로 사료된다.

**온도, 염, pH에 따른 영향**

배양 온도에 의한 *Exiguobacterium* sp. SC2-1의 항산화 활성도에 대한 영향을 알아보기 위하여 다양한 온도조건(0, 18, 25, 30, 35°C)에서 실험한 결과는 Fig. 5와 같다. *Exiguobacterium* sp. SC2-1의 최적 배양온도는 25~30°C였으며 전자 공여능 또한



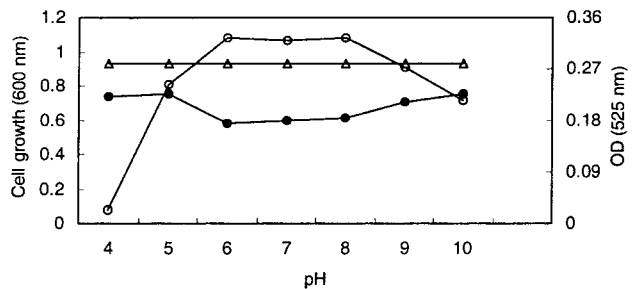
**Fig. 5.** Effect of temperature on the producing antioxidative activity by *Exiguobacterium* sp. SC2-1. The antioxidative activity was tested by DPPH method. - ○ -, cell growth in broth; - ● -, activity of SC2-1 in broth; - △ -, control in broth.



**Fig. 6.** Effect of NaCl on the producing antioxidative activity by *Exiguobacterium* sp. SC2-1. The antioxidative activity was tested by DPPH method. - ○ -, cell growth in broth; - ● -, activity of SC2-1 in broth; - △ -, control in broth.

생육도에 비례하여 나타났다.

염(NaCl)농도에 의한 *Exiguobacterium* sp. SC2-1의 항산화 활성도에 대한 영향을 검토하기 위해 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11% (w/v)에서 전자공여능 및 균생육도를 측정된 결과 11%의 염 농도에서도 생육이 가능했으며 4%에서 가장 높은 생육도 및 전자공여능을 보였다(Fig. 6). 해양유래 세균의 특성상 생육도에 크게 반응하지 않지만 염농도에 따른 생육환경 조건이 전자공여능의 활성에는 많은 작용을 하고 있는 것을 확인 할 수가



**Fig. 7.** Effect of pH on the producing antioxidative activity by *Exiguobacterium* sp. SC2-1. The antioxidative activity was tested by DPPH method. - ○ -, cell growth in broth; - ● -, activity of SC2-1 in broth; - △ -, control in broth.

있어서 항산화능이 염농도에 의하여 영향을 미치는 것으로 사료된다.

pH에 의한 *Exiguobacterium* sp. SC2-1의 항산화 활성능에 대한 영향을 알아보기 위해 MB의 pH를 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 조정하였다. 그 결과, pH 6~8사이에서 균주 *Exiguobacterium* sp. SC2-1의 생육도 및 전자공여능이 거의 비슷하였으나, pH 5 및 9에서는 전자공여능이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7). 그러나, pH 10인 경우에는 중성 및 약알칼리성의 결과와는 대조적으로 균의 생육이 늦어질 뿐만 아니라, 전자공여능도 감소하는 것으로 나타났다. 이 결과 전자공여능에 관여하는 항산화능은 pH에 민감하다는 것을 알수가 있었으며 pH가 중성에서 전자 공여능이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수가 있었다.

### 감사의글

본 논문은 제주대학교 해양과학대학 Brain Korea 21 사업에 의해 지원되었음.

### 참고문헌

- Amarowicz, R., M. Naczka, and F. Shahidi. 2000. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hull. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2755-2759.
- Annual report on the cause of death statistics. 2001. National Statistical Office, Republic of Korea.
- 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. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 31, 246-250.
- Bauman, P., A. L. Furniss, and J. V. Lee. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 577-586. Williams Wilkins, Baltimore.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26, 1199-1204
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 59-63
- Cha, J. Y., and Cho, Y. S. 2001. Effect of steam bark extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentration and tissue lipid peroxidation in the cholesterol-fed rats. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 33, 128-134.
- Cha, J. Y., and Cho, Y. S. 1999. Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28, 1131-1136.
- Cho, S. Y., You, B. H., Chang, M. H., and Lee, E. H., 1994. Screening of the antioxidants in unused marine resources by the polarographic method. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 26(4), 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. Kor. Soc. Food Nutr.* 26, 1039-1043.
- De Mattia, G., Laurenti, O., and Fava, D. 2003. Diabetic endothelial dysfunction: effect of free radical scavenging in type 2 diabetic patients. *J. Diabetes Complications* 17, 30-35.
- Eugene F., Roth, Jr., and Harriet S. Gilbert. 1983. The pyrogallol assay for superoxide dismutase : absence in glutathione artifact. *Anal. Biochem.* 137, 50-53.
- Fengrong, R., Soichi, O., and Hiroshi, T. 2003. Longitudinal phylogenetic tree of within-host viral evolution from noncontemporaneous samples: a distance-based sequential-linking method. *An Int. J. on genes and genomes.* 317, 89-95
- Han, D. S., J. H. Kwak, S. H. Kim, and S. J. Kim. 1996. Effect of plant extracts with superoxide dismutase-like activity on survival of fruit flies under oxidative stress, *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28, 865-869
- Hayashi, K., K. Suzuki, M. Kawaguchi, T. Nakajima, T. Suzuki, M. Numata, and T. Nakamura. 1995. Isolation of antioxidant from *Penicillium roquefortii* IFO-5956. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 312-320.
- Kang, M. Y., Lee, Y. R., Koh, H. J., and Nam, S. H. 2004. Antioxidative and antimutagenic activity of ethanolic extracts from giant embryonic rices. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 47(1), 61-66.
- 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.
- Kawagan, S. 1996. Protocol for control of body functional material in food, pp. 8-15, *Kakuen press center*, Japan.
- Kim, A. K., and Kim, J. H. 2001. Alterations of antioxidant enzymes in response to oxidative stress and antioxidants. *J. Appl. Pharmacol.* 9, 249-257
- Kim, H. S., Yeo, S. H., Cho, S. C., Bae, D. W., Yoon, J. H., Hwang, Y. I., and Lee, S. C. 2002. Isolation and identification of antioxidant producing marine bacteria and medium optimization. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 223-229.
- Kim, S. W., S. O. Lee, and T. H. Lee. 1991. Purification and characterization of superoxide dismutase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.* 55, 101-108.
- Kogukuchi, N. 1999. Protocol for free radical experiments, pp. 40-45. Suiyoonsa, Ja.
- MacFaddin J.F. 2000. Individual biochemical tests. In: *Biochemical Tests for Identification of medical Bacteria*, 3rd edn, pp. 1-456.
- Masayuki, N., H. Koichi, K. Yutaka, K. Masako, and H. Masao. 2004. p38 MapK associated with stereoselective priming by grepafloxacin on  $O_2^-$  production in neutrophils. *Free radical Biol. Medicine.* 36, 1259-1269.
- Medina, I., M. T. Satue-Gracia, J. B. German, and E. N. Frankel. 1999. Comparison of natural polyphenol antioxidants in extra virgin olive oil with synthetic antioxidants in tuna lipids during thermal oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4873-4879.
- Navarro, M. C., M. P. Montilla, A. Martin, J. Jimenez, M. P. Utrilla. 1992. Free radicals and antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus*. *Plan to Med.* 59, 312-314.
- Park, J. H., Kang, K. C., Baek, S. B., Lee, Y. H. and Rhee, K. S. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 23(3), 256-261.
- Racchi, M., Daglia, C., Lanni, A., Papetti, S., Govoni, and G. Gazzani. 2002. Antiradical activity of water soluble components in common diet vegetable. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1272-1277.
- Rashid, H., F. Kato, A. Murata, and M. Kando. 1993. Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae* K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 935-939.
- 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.
32. Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43, 159-271.
33. Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474.
34. Suzuki, S., Y. Hinokio, K. Komatsu, S. Kasuga, H. Akai, and T. Toyota. 1999 Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complication. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45, 161-168.
35. Takao, T., F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi, and K. Sakata. 1994. A simple screening method for antioxidant and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1780-1783.
36. Feng, Xi., L.Y. Li, K.W. Nam, D. S. Kim, H. D. Choi, and B. W. Son. 2002. Screening of radical scavenging activity from the marine derived fungus. *Kor. J. Pharmacogn.* 33(3), 219-223.

(Received November 22, 2004/Accepted January 24, 2005)

---

**ABSTRACT : Antioxidant Activity and Characterization of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 Isolated from Sea Water**

**Man-Chul Kim, Guen-Tae Park, Hong-Joo Son<sup>1</sup>, WooBong Choi<sup>2</sup>, and Moon-Soo Heo\***  
(Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea, <sup>1</sup>Dept. of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea, <sup>2</sup>Dept. of Biotechnology & Bioengineering, Dongeui University, Busan 614-714, Korea)

For the research of the natural marine antioxidant, an antioxidant-producing bacterium was isolated from seawater in Jeju coastal area. The isolated strain SC2-1 was Gram-positive, catalase positive, oxidase negative, motile and small rods. The strain utilized sucrose, dextrose, fructose, mannitol and maltose as a sole carbon and energy source and NaCl required for growth. The radical scavenging activity of the culture supernatant was determined by DPPH method. This bacterium was identified based on morphological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis, and then was named *Exiguobacterium* sp. SC2-1. The optimum conditions of culture for production antioxidant were 25°C, pH 6-8 and 4% NaCl. The strain showed the highest activity and growth cultured in medium which added 1% maltose. Hydroxyl radical activity of the supernatant of *Exiguobacterium* sp. SC2-1 was 73%. The SOD activity of the culture supernatant was estimated about 35%.