

이학석사 학위논문

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

Antioxidant Activity of a Chitin-degrading Bacterium

Bacillus idriensis (CGH18)



2012년 2월

한국해양대학교대학원

해양생명환경학과

정명은

本 論文을 정명은의
理學碩士 學位論文으로 認准함.

위원장 임 선 영



위 원 이 범 중



위 원 서 영 완



2012년 2월

한국해양대학교 대학원

목 차

	Page
List of schemes -----	i
List of tables -----	ii
List of figures -----	iii
List of abbreviations -----	v
List of symbols -----	vi
 Abstract -----	 1
 1 서론 -----	 3
 2 재료 및 방법 -----	 6
2-1. 재료 -----	6
(1) 시료 -----	6
2-2. 시약 -----	6
(1) 배양 및 선발을 위한 배지 -----	6
(2) 추출, 분획 및 분리 -----	6
(3) 활성화 -----	7
2-3. 기기 -----	8
2-4. 배지 -----	9
(1) 균주의 분리 및 동정을 위한 고체 배지 -----	9
(2) 균주의 액체 배양 및 보관을 위한 배지 -----	9
(3) 선발을 위한 Colloidal chitin 배지 -----	9
(3-1) 수산가공부산물인 홍게 껍질을 사용한 Chitin 제조 -----	9
(3-2) Colloidal chitin의 제조 -----	10
(3-2) Colloidal chitin의 배지 제조 -----	10

2-5. 균주의 선발	12
(1) 젓갈 미생물 1차 선발	12
(2) 2차 선발	12
(3) 3차 선발	12
2-6. 선정 균주의 균학적 특성	13
(1) 형태 및 생화학적 특성	13
(2) 분리균의 동정 및 분류	13
(3) 선정 균주의 최적 배양 조건	14
2-7. 추출, 분획 및 분리	15
(1) 추출 및 분획	15
(2) 화학물의 분리	17
2-8. 항산화 활성 실험	19
(1) Peroxynitrite 소거 활성	19
2-9. 세포수준에서의 활성 실험	22
(1) 세포배양	22
(2) Cell viability의 측정	22
(3) ROS (total free radical 측정)	25
(4) TBARS법을 이용한 lipid peroxidation 측정	27
(5) Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA의 산화 생성물 측정	27
(6) GSH(Glutathione) 함량 측정	28
3 결과 및 고찰	29
3-1. 최종 선발 균주의 형태 및 생화학적 특성규명	29
(1) 형태 및 생화학적 특성규명	29

(2) 최적 배양 조건 -----	33
3-2. <i>B. idriensis</i> 에서 분리한 화합물들의 구조 결정 -----	37
3-3. 항산화 활성 실험 -----	47
(1) Peroxynitrite 소거 활성 -----	47
3-4. 세포 수준에서의 활성 실험 -----	50
(1) HT-1080 세포를 대한 MTT assay 효과 -----	50
(2) ROS (total free radical 측정) -----	52
(3) TBARS법을 이용한 lipid peroxidation 측정 -----	60
(4) Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA의 산화 생성물 측정 -----	62
(5) GSH(Glutathione) 함량 측정 -----	64
(6) 인체 유래 암세포에 대한 세포 독성 효과 -----	66
(6-1) HT-1080 세포 독성 효과 -----	66
(6-2) MCF-7 세포 독성 효과 -----	66
(6-3) HT-29 세포 독성 효과 -----	66
4 요약 및 결론 -----	70
5 참고문헌 -----	72
6 부록 -----	77

List of schemes

	Page
Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from <i>B. idriensis</i> (CGH18)	16
Scheme 2. Isolation of the compounds 1-2 from <i>B. idriensis</i> (CGH18)	18
Scheme 3. Measurement of the ONOO ⁻ scavenging effect	21



List of tables

	Page
Table 1. Selective medium for degrading chitin microorganism	11
Table 2. Result of biochemical test for isolate strains	32
Table 3. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 1	39
Table 4. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 2	40



List of figures

	Page
Fig. 1. Peroxynitrite (ONOO ⁻) mediated oxidation of DHR123.	20
Fig. 2. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.	24
Fig. 3. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.	26
Fig. 4. 16S rRNA gene sequence of strain CGH18	30
Fig. 5. Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequence analysis indicates that strain CGH18.	31
Fig. 6. Effect of Time(hrs) on the cell growth of <i>B. idriensis</i>	34
Fig. 7. Effect of temperature on the cell growth of <i>B. idriensis</i>	35
Fig. 8. Effect of pH on the cell growth of <i>B. idriensis</i>	36
Fig. 9. Chemical structure of compounds 1-2 from <i>B. idriensis</i>	41
Fig. 10. ¹ H NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	42
Fig. 11. ¹³ C NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	42
Fig. 12. TOCSY of compound 1 in CD ₃ OD	43
Fig. 13. COSY spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	43
Fig. 14. gHMQC of compound 1 in CD ₃ OD	44
Fig. 15. gHMBC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	44
Fig. 16. ¹ H NMR spectrum of compound 2 in CDCl ₃	45
Fig. 17. ¹³ C NMR spectrum of compound 2 in CDCl ₃	45
Fig. 18. TOCSY of compound 2 in CDCl ₃	46
Fig. 19. COSY spectrum of compound 2 in CDCl ₃	46
Fig. 20. Scavenging effect of crude extract and its solvent fractions of <i>Bacillus idriensis</i> on authentic ONOO ⁻ (% of control)	48
Fig. 21. Scavenging effect of crude extract and its solvent fractions of <i>Bacillus idriensis</i> on ONOO ⁻ from SIN-1 (% of control).	49
Fig. 22. Effects of crude extract and its solvent fractions of <i>Bacillus idriensis</i> on cell viability by MTT assay after 1 hr.	51

Inhibition effect of EtOAc extract from <i>Bacillus idriensis</i> on	
Fig. 23. intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells	53
Inhibition effect of BuOH solvent fractions from EtOAc extract	
Fig. 24. of <i>Bacillus idriensis</i> on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	54
Inhibition effect of H ₂ O-1 solvent fractions from EtOAc extract	
Fig. 25. of <i>Bacillus idriensis</i> on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	55
Inhibition effect of CH ₂ Cl ₂ solvent fractions from EtOAc extract	
Fig. 26. of <i>Bacillus idriensis</i> on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	56
Inhibition effect of H ₂ O-2 solvent fractions from EtOAc extract	
Fig. 27. of <i>Bacillus idriensis</i> on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	57
Inhibition effect of EtOAc extract from <i>Bacillus idriensis</i>	
Fig. 28. cultured with colloidal chitin on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	58
Inhibition effect of crude extract and its solvent fractions	
Fig. 29. from <i>Bacillus idriensis</i> on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. the cell were incubated with different concentration of the sample for 90 min.	59
Inhibition effects of crude extract and its solvent fractions of	
Fig. 30. <i>Bacillus idriensis</i> on membrane lipid peroxidation in HT-1080 cells	61
Antioxidant effect of crude extract and its solvent fractions	
Fig. 31. from <i>Bacillus idriensis</i> on genomic DNA in HT-1080 cells	63
Effects of crude extract and its solvent fractions of <i>Bacillus idriensis</i> on regulation of GSH level in HT-1080 cells.	65
Effects of crude extract and its solvent fractions of <i>Bacillus idriensis</i> on cell viability of HT-1080 cells.	67
Effects of crude extract and its solvent fractions of <i>Bacillus idriensis</i> on cell viability of MCF-7 cells.	68
Effects of crude extract and its solvent fractions of <i>Bacillus idriensis</i> on cell viability of HT-29 cells.	69
Fig. 36. Chemical structure of compounds 1-2 from <i>B. idriensis</i>	77

List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
c	: concentration
CD ₃ OD	: deuterium methanol
CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
¹³ C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
Fig.	: figure
H ₂ O	: water
¹ H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HRFAB	: high resolution fast atom bombardment
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
IR	: Infrared
LRFAB	: low resolution fast atom bombardment
MeOH	: methanol
MS	: mass spectroscopy
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO•	: nitric oxide radical
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
•O ₂ ⁻	: superoxide anion radical
•OH	: hydroxyl radical
ONOO ⁻	: peroxyxynitrite
RNS	: reactive nitrogen species
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reverse phase
S	: substrate
SiO ₂	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
<i>v</i> _{max}	: maximal velocity

List of symbols

J	Coupling constant (Hz)
M^+	Molecular ion
m/z	Mass to charge
R_f	Rate of flow
δ	Chemical shift



Antioxidant Activity of Chitin-degrading Bacteria

Bacillus idriensis (CGH18)

Abstract

Salt-fermented seafood sauce, called jeot-gal is one of the popular Korean traditional sauses and has been used to season other Korean food. It is made with various seafoods, such as shrimp, oyster, shellfish, fish, fish eggs, crab, and fish intestine. The seafood is salted and fermented for 2-3 months; then spices are added later to give its distinctive flavor. We considered that salt-fermented seafood's high storability would be greatly contributed by antioxidizing capacity of microorganism that inhabits oxidation in salt fermented-seafood. This capacity to avert spoilage would also be due to the antioxidant produced by the microorganism. Crab, one of people's favorite types of seafood, is one ingredient found in salt-fermented seafood sauces. Its shell contains a polysaccharide called as chitin which is slow to decompose. Therefore, the problem is that consumption of crab generates crab shell as a waste, and this waste pollutes the environment.

Therefore, salt-fermented food sauce made with crab will be a good source of a microorganism that may decompose chitin and prevent oxidation of seafood.

The research team tried to isolate microorganisms to show antioxidizing and chitin-decomposing activities in colloidal chitin culture medium. As a result, a bacterium CGH18 was isolated from crab marinated in Soy Sauce and identified as *Bacillus idriensis* by 16S rDNA sequence homology search. *B. idriensis* exhibited optimal growth condition of pH, temperature, and culture time at 7.0, 25°C and 48 h, respectively.

The culture broth was extracted repeatedly with EtOAc for 1 hour using sonication. Its crude extracts were 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 activity tests, including the degree of occurrence of intracellular reactive oxygen species (ROS), peroxynitrite (ONOO⁻), and lipid peroxidation, as well as the extent of GSH level, and oxidative damage of genomic DNA. All fractions exhibited significant antioxidant activity in bioassay systems used. In particular, the CH₂Cl₂ fraction showed the strongest antioxidant activity among the solvent fractions. Further purification of the CH₂Cl₂ fraction by various chromatographic methods resulted in the isolation of two diketopiperazine (compounds 1-2). Their chemical structures were determined by extensive 2D NMR experiments such as ¹H gDQCOSY, TOCSY, NOESY, gHMQC, and gHMBC, and by comparison with published spectral data.

1. 서론

인간의 오랜 소망인 생명연장이 의료기술의 발달로 이루어지면서, 이제는 그저 오래 사는 것만이 아닌 건강한 노년의 유지와 행복한 삶의 연장에 대한 관심이 증대 되고 있다. 이에 대한 부차적인 효과로 기능성 건강식품에 대한 관심도 증가하였으며 특히 다양한 항산화, 항노화 제품들이 각광을 받고 있다. 항산화제는 식품이나 유기물의 생체내 산화 및 인체의 노화 등과 관련하여 세포기능 장애, 동맥경화 및 당뇨 등 성인병 예방과 치료 효과에 탁월한 능력을 나타낸다 (Babizhayev et al., 1994). 이러한 항산화제는 천연 항산화제와 합성 항산화제로 나눌 수 있는데, 시중에 유통되어 상품으로 사용되는 항산화제는 대부분이 합성 항산화제로 이는 천연 항산화제가 합성 항산화제에 비하여 안전하기는 하지만 가격이 비싸며, 단독으로는 산화 연쇄반응 저지하는 능력이 낮기 때문이다.

이러한 문제를 해결하기 위하여 항산화능이 우수하고 인체에 무해한 천연 항산화 물질을 찾기 위한 노력이 여러 분야에서 계속되어져 오고 있다. 지금까지 보고된 연구로는 박하에 대한 천연 항산화제의 활성과 분리 (Pukalskas et al., 2012), 크렌베리 주스와 추출물의 항산화 능력 (Caillet et al., 2011), 동백나무와 녹차의 페놀릭 항산화제 (Liu et al., 2009) 등이 있다. 그리고 금양자의 색소 추출물과 그들의 항산화 활성 (Xiao et al., 2011), 양배추 추출물의 카로티노이드 색소의 구성과 항산화 활성 (Watanabe et al., 2011) 등 색소계의 항산화제에 대한 연구도 보고되어져 있다.

수산물로부터의 항산화제에 대한 연구는 성게 (Lee et al., 2010) 등의 항산화 활성 효과, 건조 고등어 추출물의 항산화 효과 (Jang et al., 2008)와 다시마 (Eom et al., 2010), 미역 (Kim et al., 2011) 같은 해조류에서도 연구되었으며, 우리나라의 경우에는 이 외에도 전통 발효 식품인 젓갈에 대한 항산화 연구 (김미정, 1998; 김동수 et al., 2003; 김현욱 et al., 2003)가 보고되어

져 있다.

젓갈은 어패류, 패류, 어류의 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 있으며 쌀밥을 주식으로 하는 우리나라의 식습관에 부족하기 쉬운 필수 아미노산을 보충해 주기 때문에 국민의 영양 공급에서 중요한 위치를 차지하고 있다 (Cho et al., 2009). 이러한 젓갈은 항산화 활성뿐만 아니라 콜레스테롤 저하 효과 (김현욱 등, 2003), 멸치 젓갈로부터의 새로운 혈전용해효소의 정제와 항암효과 (양용석 등, 2000), 명란젓으로부터의 비만 또는 고지혈증 및 동맥경화성 혈관계 질환의 예방 및 치료 효과 (강릉원주대학, 2011) 등이 알려져 있다.

이렇게 다양한 활성을 가진 젓갈로부터 여러 가지 생리활성을 가진 미생물들도 분류, 동정 되었다(차성광, 2008). 그중에서도 *Bacillus* sp.가 다량 분리 (Yoon et al., 2005a) 되었는데, 젓갈에서 분리된 *Bacillus* sp.들은 lipopeptide (Yoon et al., 2005b)와 protease (김은영 등, 2009)를 생산하고, 항암 (Park et al., 2004), 항염증 (Ko et al., 2011), 항균성 (전봉근, 2009) 등의 활성을 가지는 것으로 보고되었다.

이렇듯 젓갈은 그 자체가 다양한 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 젓갈이 가지는 미생물들도 다양한 활성을 나타낸다. 왜냐하면 젓갈이 가지는 대부분의 생리활성이 젓갈이 가지는 미생물들에서 유래되었을 것이기 때문이다. 본 논문에서는 젓갈의 높은 저장성 또한 염분에 의한 효과 뿐만 아니라 젓갈 내 미생물의 항산화 효과에 의한 것이라 사료되어 그에 대한 연구를 수행하였다.

홍게라고도 불리우는 붉은 대게는 단순 가공을 통해 대게살과 대게살을 이용한 가공품의 형태로 우리나라뿐만 아니라 다른 여러 나라에서도 소비되어지고 있으며, 그 소비량은 계속해서 증가하고 있다. 이에 따라, 부산물인 게의 껍질의 양도 증가하게 되었고 이것의 처리는 커다란 과제로 남게 되었다. 버려지는

게의 껍질에는 고분자 다당류인 chitin이 포함되어 있기 때문에, 버려지는 게의 껍질에서 chitin을 분리하여 원료로 활용하면 높은 경제적 효과와 함께 환경보호를 할 수 있을 것이라 생각된다.

그러나 게의 껍질에는 chitin 이외에도 회분, 색소 등의 여러 물질을 포함하고 있기 때문에 이들을 제거하기 위하여 공정을 거쳐야 하며, 기존의 방법들은 chitin의 분리를 위하여 강산과 강염기를 사용하여 왔다(Kim et al., 1994). 하지만 기존에 사용된 강산과 강염기를 사용하여 chitin을 분리하는 방법은 환경을 오염시킬 수 있기 때문에 여기서는 강산 대신에 lactic acid를 강염기 대신에 K_2CO_3 를 사용하여 chitin을 분리하여 사용하였다.

Chitin의 분해에 관한연구는 식품, 제약, 농업 등 다방면에서 이루어지고 있다(Wang et al., 2008). 특히 우리나라의 경우 농업분야에서 chitin 분해를 이용하여, 빈번한 화학 비료의 사용으로 저하된 토양의 질을 높이거나 (Lee et al., 2003), 과실의 품질 향상 및 농작물에 피해를 입히는 병충해 등을 방제 (최호성, 2009)하는 등 산업적으로 이용되고 있으며 chitin을 분해하는 몇몇 종류의 *Bacillus* sp.들이 보고되어져 있다(Wang et al., 2006; Wiwat et al., 1999).

본 연구에서는 지금까지 환경에 버려지던 게의 껍질로부터 chitin을 분리하고, 이를 사용하여 향산화 활성이 높으며, 키틴 분해능을 가진 젓갈 유래 미생물 *Bacillus idriensis* (CGH18)을 분리 및 동정한 후 균주가 가진 생리활성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 재료

(1) 시료

시료로 사용된 것같은 2010년 시판용 새우젓과 게장을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용한 colloidal chitin은 2010년 동해안에서 나온 게 폐기물을 구입하여 만들어 사용하였다.

2-2. 시약

(1) 배양 및 선발을 위한 배지

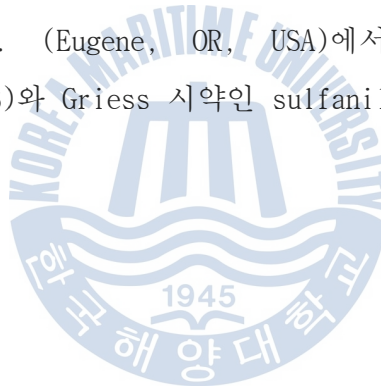
실험에 사용한 배지 중 배양을 위한 배지는 Marine Agar 2216 (Difco, USA)과 Marine Broth 2216 (Difco, USA)을 구입하여 사용하였으며, 배지 제작에 사용된 시약은 Duksan에서 구입하여 사용하였다.

(2) 추출, 분획 및 분리

Column packing materials은 RP 18(YMC-GEL ODS-AM, 12 nm, S-75 μ m)을 사용하였으며, TLC plate는 Silica gel 60 F254s (0.5mm, Merck)를 사용하였으며, spray reagent는 5% H_2SO_4 를 분사하여 발색되는 것을 관찰하였다. 추출 및 분획, column chromatography에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 구입하여 증류한 후 사용하였다. NMR 측정 시 용매는 CD_3OD (Merck, deuterium degree 99.95%), $CDCl_3$ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%)를 사용하였다.

(3) 활성

항산화 실험에 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)과 dihydrorhodamine 123 (DHR 123), penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methyl- butanoic acid) 은 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Peroxynitrite (ONOO^-)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 필요한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)과 RPMI-1640 은 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였다. FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin 그리고 100 units/mL Penicillin-Streptomycin은 GIBCO사 (USA) 로부터 구입하여 사용하였다. MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. ROS 측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다. Lipopolysaccharide (LPS)와 Griess 시약인 sulfanilamide, NED는 sigma 사에서 구입하였다.

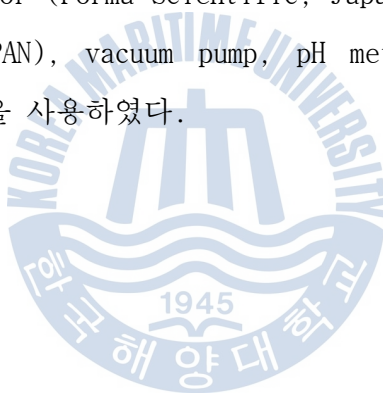


2-3. 기기

^1H -NMR 실험은 모두 Varian NMR 300 spectrometer (Varian Mercury 300, USA)를 사용하였다. Varian RI detector와 high performance liquid chromatography (HPLC, Dionex p580)를 사용하여 화합물을 정제·분리하였다.

미생물은 Shaking Incubator (HB-201SL, Hanbaek), B.O.D Incubator (BI-P-81, Lab house) 등을 사용하여 배양하였다.

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. 세포의 배양은 CO_2 incubator (Forma Scientific, Japan)를 사용하였고, rotary Evaporator (EYELA, JAPAN), vacuum pump, pH meter, water bath, pipet (JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다.



2-4. 배지

(1) 균주의 분리 및 동정을 위한 고체 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 Marine Agar 2216 55.1 g과 증류수 1 L를 넣고 stir에서 교반하여 용해시킨 후, autoclave에서 121℃, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후 충분히 식힌 뒤에 clean bench에서 petri-dish의 2/3 정도 분주 한 다음 건조 시켰다. 건조시킨 배지는 날짜와 이름을 적어 건조하고 서늘한 곳에 보관하였다가 사용하였다.

(2) 균주의 액체 배양 및 보관을 위한 배지

Plastic beaker에 Marine Broth 2216 55.1 g과 증류수 1 L를 넣고 입구를 실리스토퍼로 막은 뒤 완전히 용해시키고, autoclave에서 121℃, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후 충분히 식힌 뒤에 액체 배양에 사용하였다.

액체 배양을 위하여 만든 배지 800 μ L와 80% glycerol 200 μ L의 혼합액을 균주를 보관할 tube에 넣고, 배양된 균체를 백금으로 취하여 접종한 뒤 -80℃에서 보관하였다.

(3) 선발을 위한 Colloidal chitin 배지

(3-1) 수산가공부산물인 홍게 껍질을 사용한 Chitin 제조

(a) 세정

: 우선 껍질에 존재할 수 있는 미생물과 오염물질을 제거하기 위하여 10% 소금물로 끓인 뒤 100℃에서 1시간 동안 건조하고 분쇄하였다.

(b) 칼슘제거

: 환경오염을 야기할 수 있는 강산(HCl)을 사용하여 칼슘을 녹여 분리하는 대신에, 유기산인 젖산(lactic acid)를 사용하여 칼슘을 분리하였으며, 원료 중량의 15배에 달하는 10% lactic acid를 첨가하고 24시간 동안

교반하여 칼슘을 분리하였다.

(c) 단백질 제거

: 고농도의 강알칼리(NaOH)를 사용하는 종래의 방법은 환경오염을 야기시키는 문제가 있어 이를 피하려고 탄산칼륨(K_2CO_3)을 사용하여 단백질을 분리하였으며, 칼슘이 제거된 잔류물 중량의 15배에 해당하는 1.25 N K_2CO_3 을 첨가하여 70℃에서 6시간 동안 반응시켜 단백질을 분리하였다.

(3-2) Colloidal chitin의 제조

상기의 방법으로 얻어진 키틴을 사용할 경우 미생물이 chitin을 분해하는 속도가 느리기 때문에, colloidal 형태로 제조하여 미생물의 배양에 사용하였다. chitin 40 g을 400 mL의 진한 HCl에 풀어서 교반기에서 2시간 동안 교반하였다. 깔때기 위에 glass wool을 깔고 교반되어진 chitin을 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 중성에 가깝도록 하고, 이 용액의 건조중량을 측정하여 실험에 사용하였다.

(3-3) Colloidal chitin 배지의 제조

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수 1 L와 알맞은 조성 (Table 1.)의 시약을 순서대로 넣고 stir에서 교반하여 용해시킨 후, autoclave에서 121℃, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후 충분히 식힌 뒤에 clean bench에서 petri-dish의 2/3정도 분주 한 다음 건조 시켰다. 건조시킨 배지는 날짜와 이름을 적어 건조하고 서늘한 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 1. Selective medium for degrading chitin microorganisms.

Ingredients	Weight
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 g
K_2HPO_4	0.7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mg
Colloidal chitin	3 g
Seawater	750 ml
DW	250 ml
Agar	15 g
Adjust to pH 7.0	



2-5. 균주의 선발

(1) 젓갈 미생물 1차 선발

Petri dish에 marine agar 2216을 멸균 처리하여 접종할 수 있게 준비하고, 각각의 젓갈을 10^{-2} ~ 10^{-5} 로 희석한 후 각각 0.1 mL 씩 배지에 도말하여 4-5일간 25℃에서 배양하였다. 미생물 집락이 형성된 접시에 멸균여과지를 집락 위에 올려서 대사산물 및 균체가 여과지에 옮겨지도록 하루를 더 배양한 다음 여과지를 분리하여 Hume food에 정치하고, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 에탄올 용액을 균체 및 대사산물이 묻은 여과지에 분무하여 탈색시키는 미생물 집락을 확인한 후 항산화 활성을 보이는 집락을 tooth pick로 새로 만든 신선한 배지에 옮겨 1차 선발하였다.

(2) 2차 선발

1차 선발에 의해 선정된 미생물을 배양하기 위해 500 mL 삼각 플라스크에 100 mL 액체 배지를 멸균 처리하여 접종할 수 있게 준비하고, 고체 배지에 배양된 균주를 백금으로 액체 배지에 접종한 다음 25℃, 200 rpm에서 진탕 배양하였으며 다시 배양된 균주를 새로운 액체 배지에 2% (v/v)씩 첨가하여 48시간 배양한 배양액을 사용해 실험을 실행하였다.

(3) 3차 선발

고체 배지에 배양된 2차 선발 균주들을 백금으로 500 mL 삼각플라스크의 200 mL 액체 배지에 접종한 다음 25℃, 200 rpm에서 계대 배양하였으며, 얻어진 배양액에 동량의 EtOAc를 넣어 추출한 뒤 농축하여 사용하였다.

2-6. 선정 균주의 균학적 특성

(1) 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) 분리균의 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 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 (PHYLIP)로 서열 데이터를 분석하기 위해 사용되었다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining방법을 이용하였으며, Evolutionary distances matrices는 Jukes & Cantor 모델에 따라 작성되었다. neighbour-joining tree topology는 1000 resampling에 기초한 bootstrap analysis에 의해 평가되었다.

(3) 선정 균주의 최적 배양 조건

선정된 균주의 최적 배양 조건을 선정하기 위하여 배양시간, pH 등이 균주의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 고체 배지에 배양된 선정 균주를 백금이로 50 mL 액체 배지에 접종한 다음 25℃, 200 rpm에서 진탕 배양하였으며, 배양된 균주를 새로운 액체 배지에 4% (v/v)씩 첨가하여 진탕 배양하였다. 조건별로 얻어진 배양액은 15,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 한 후, 상층액을 취하여 UV-Vis spectrophotometer로 660nm에서 optical density (O.D)를 측정하였다.

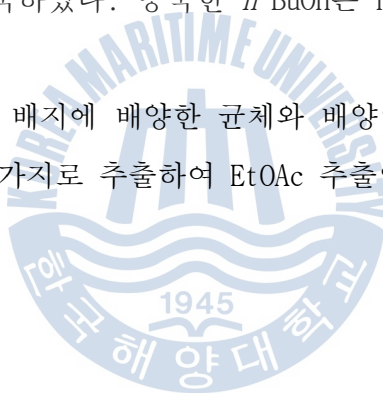


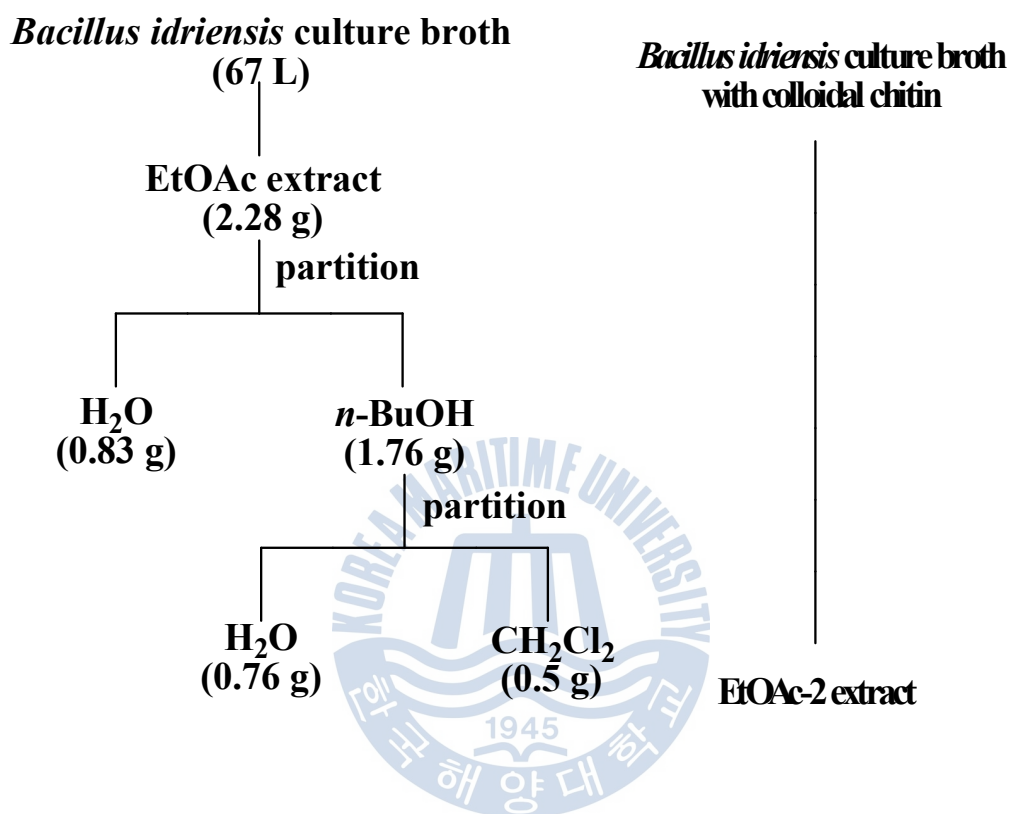
2-7. 추출, 분획 및 분리

(1) 추출 및 분획

균체와 배양액의 혼합물 67 L에 동량의 EtOAc를 첨가하여 25℃, 200 rpm에서 30분 동안 진탕 배양하였다. 세포내 함유된 물질의 효과적인 추출을 위해 1시간 동안 sonicate (JAC-ULTRASONIC 2010, KOREA)로 sonication 하였으며, 이 용액을 분별 깔대기를 이용한 분획을 실시하여 EtOAc 추출액을 얻었다. 위의 과정을 3회 반복하여 얻어진 추출액을 원심분리하고 상층액만을 40℃ 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (EYELA JAPAN, N-N series)로 농축하여 EtOAc 추출물을 얻었다 (EtOAc ext : 2.28 g). 조추출물을 H₂O와 *n*-BuOH로 분획한 뒤, 각각의 분획물을 농축하였다. 농축한 *n*-BuOH은 H₂O와 CH₂Cl₂로 재분획하여 각각의 분획물을 얻었다.

Colloidal chitin 액체 배지에 배양한 균체와 배양액에 동량의 EtOAc를 첨가하여 상기의 방법과 마찬가지로 추출하여 EtOAc 추출액을 얻었다 (Scheme 1).





Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from *B. idriensis* (CGH18)

(2) 화합물의 분리

CGH18 분획물의 ^1H NMR 분광분석 자료와 시료의 양을 고려하여 CH_2Cl_2 분획물에 대하여 silica prep. TLC (20% MeOH in CHCl_3)를 실시하여 fraction을 얻었고, 얻어진 시료 중 fraction 17 을 reversed-phase HPLC (ODS-AM, 50% aq. MeOH)하여 compound 1-2 를 분리하였다 (Scheme 2).



***Bacillus idriensis* culture broth**
(67 L)

EtOAc extract
(2.28 g)

partition

H₂O
(0.83 g)

***n*-BuOH**
(1.76 g)

partition

H₂O
(0.76 g)

CH₂Cl₂
(0.5 g)

prep.TLC
(Si, MeOH:CHCl₃=1:4)

Mix

HPLC
(C18, 50%aq. MeOH)

Compound 1-2

Scheme 2. Isolation of the compounds 1-2 from *B. idriensis* (CGH18)

2-8. 항산화 활성 실험

(1) Peroxynitrite 소거 활성

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다 (Fig. 1.). 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 (diethylenetriaminepenta acetic acid) 100 μM (f.c.)을 혼합하여 조제하며 사용하기 전에 냉장 보관하였다. 이 buffer 용액에 DHR 123 용액을 혼합한 뒤 시료와 peroxynitrite 를 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후 multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT로 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실시하면서 실온에서 방치하는 시간만 1시간으로 조절하여 측정하였다. SIN-1에 의한 DHR 123에 의한 산화는 점진적으로 일어나는 반면에 authentic peroxynitrite는 아주 급속히 산화를 시키기 때문이다. Excitation 파장은 485 nm, emission 파장은 530 nm로 하였으며 실온에서 측정하였다. 그리고 ONOO⁻ (f.c. 10 μM)의 바탕용액은 0.3N NaOH를 사용하였고, 실험은 triplicate 로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다 (Kooy et al., 1994). (Scheme 3).

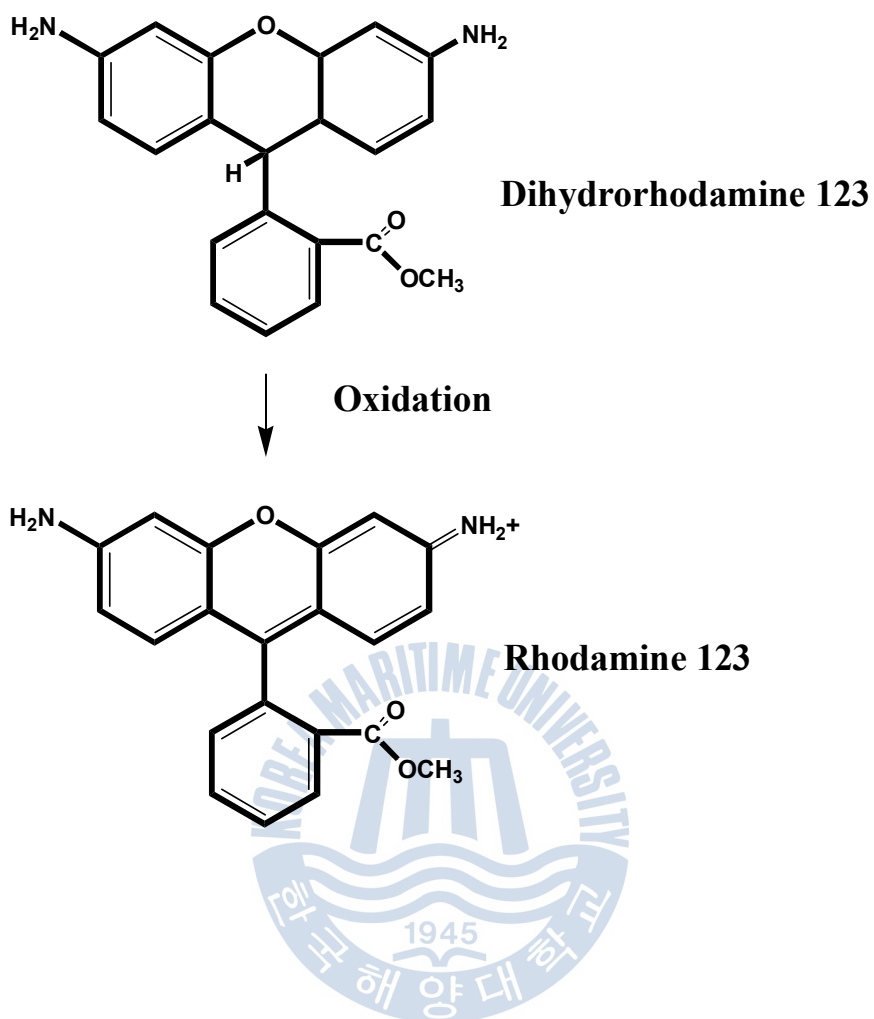


Fig. 1. Peroxynitrite (ONOO^-) mediated oolyxidation of DHR 123.

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μ M



Dihydrorhodamine 123 5 μ M



Incubation at 37 $^{\circ}$ C for 1 min



Sample



SIN-1 200 μ M or peroxynitrite 5 μ M



Measurement of fluorescence intensity

Excitation wavelength at 480 nm

Emission wavelength at 525 nm

Scheme 3. Measurement of the ONOO^- scavenging effect.

2-9. 세포 수준에서의 활성 실험

(1) 세포배양

인간 섬유육종세포주인 HT-1080 세포, 유방암 세포주인 MCF-7 그리고 인간 위암세포주인 AGS와 대장암 세포주인 HT-29는 각각 한국 세포 주 은행 (KCLB, Korean cell line Bank)에서 구입하였다. HT-1080, MCF-7은 100 unit/mL penicilin- streptomycin과 10% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 DMEM 배양액으로 배양하였고, AGS와 HT-29는 100 unit/mL penicilin- streptomycin과 10% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 RPMI 배양액으로 배양하였다. 모든 세포를 cell culture dish에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2-3회 배지를 교환하고 6-7일 만에 PBS로 세척한 후 HT-1080, MCF-7, AGS, HT-29는 0.05% Trypsin-0.02 % EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양 하였다.

(2) Cell viability의 측정

MTT assay를 이용하여 CGH18의 이차대사산물이 cell viability에 미치는 영향을 확인할 수 있다. MTT assay는 세포의 증식과 세포의 살아있는 정도를 간접적으로 측정하는 것으로써 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용된다. 대사과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl-tetrazolium bromide] crystal로 환원시킨다. 생성된 MTT formazan의 흡광도는 540 nm 의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아 있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

Raw 264.7, HT-1080, MCF-7, AGS, HT-29 세포 각각을 cell counting 하여 96 well micro-plate에 1×10^5 cells/mL 로 100 μ L 씩 분주하여 37°C, CO₂

incubator 에서 24시간 배양하였다. 준비 된 농도별 시료를 각 well에 처리하고 24시간 37℃, CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고 MTT 시약 5 mg을 1 mL PBS로 녹인 후, 10% FBS가 함유된 DMEM (AGS ; RPMI)배지 9 mL와 희석하여 각 well에 100 μL 씩 처리하고 3~4시간 동안 incubation하여 formazan 형성을 관찰하였다. Formazan이 형성되면 MTT 시약처리 배지를 제거하고 DMSO 100 μL를 넣어서 10분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Fig. 2.).

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



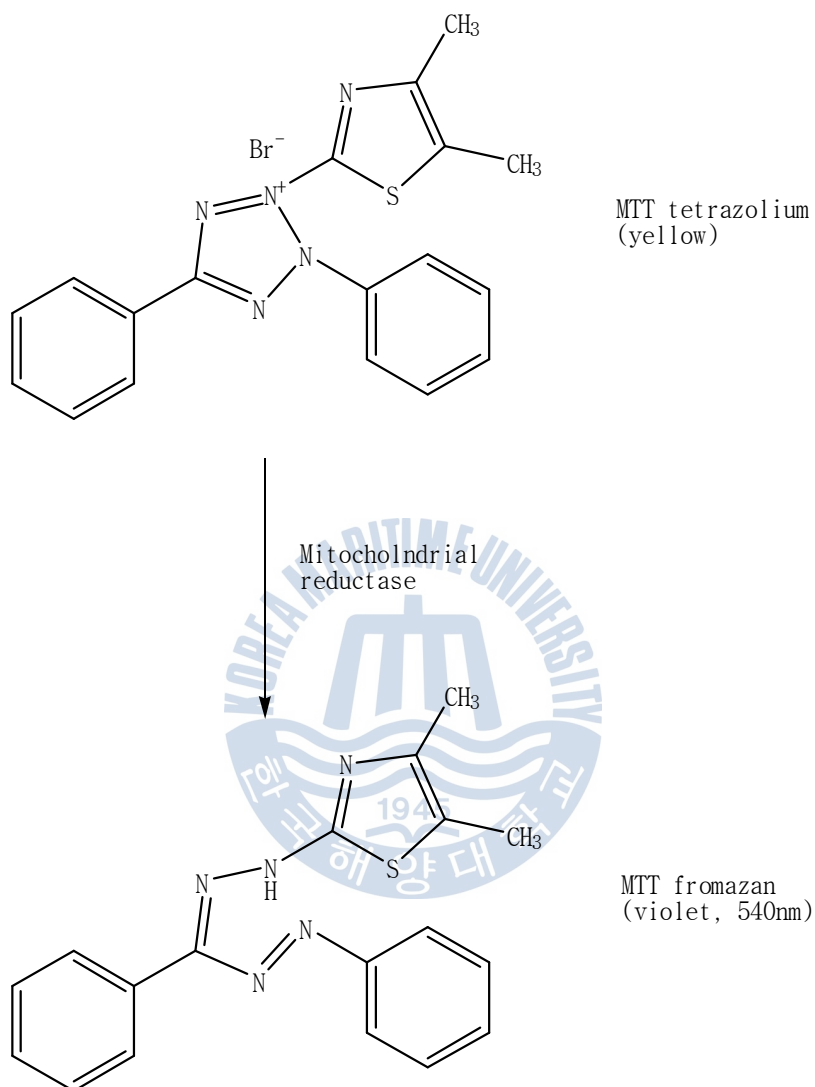


Fig. 2. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.

(3) ROS (total free radical 측정)

세포의 free radical의 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다 (Okimotoa., 2000). 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 활성산소 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 incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 1시간 incubation한 후, DCFH-DA를 없애고 cell은 다시 PBS 완충액으로 씻은 후 500 μ M H₂O₂ 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 ex. 485 nm, em. 530 nm에서 형광 분석기로 측정하였다 (Fig. 3.).



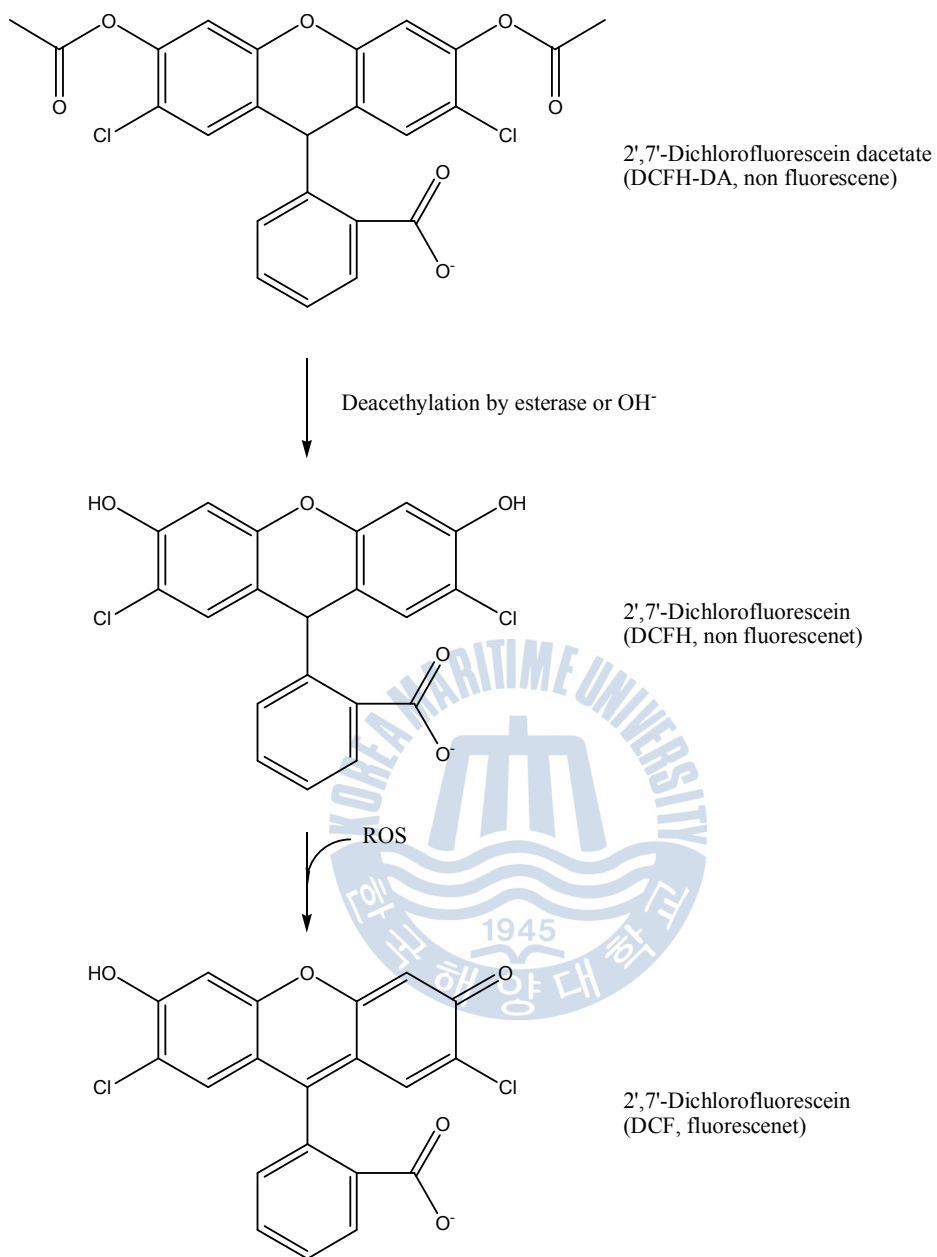


Fig. 3. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.

(4) TBARS법을 이용한 lipid peroxidation 측정

Lipid peroxidation의 생성정도는 thiobarbituric acidreactive substances(TBARS) 방법으로 측정하였다 (Heath and Packer, 1968). 200 μ L의 PBS-suspended HT-1080 세포를 일정한 농도의 시료로 각각 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10분간 배양하였다. 세포내 산화를 유도하기 위하여 2 mM H₂O₂와 0.1 M FeSO₄로 처리한 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, trichloroacetic acid(TCA, 10% w/v)를 처리하여 산화를 중지시키고, 동량의 TBA(1% w/v)를 첨가하여 90°C에서 30분 동안 반응시켰다. 실온에서 냉각시킨 혼합액을 원심분리 후 상등액의 흡광도를 528 nm에서 측정하였다.

(5) Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA의 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(Milne et al., 1993)의 방법을 이용하여 측정하였다. 어떤 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.

(6) GSH(Glutathione) 함량 측정

세포내에 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent dls mBBBr(monobromobiman)을 이용하여 측정하였다 (Poot et al., 1986). 세포는 fluorescence microtiter 96-well plates에 well 당 1×10^7 cells/mL가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37℃ 5% CO₂ incubator에서 30분간 배양하였다. 다시 각 well은 PBS 완충액으로 씻은 후 40M mBBBr(monobromobiman)를 처리하여 37℃ 5% CO₂ incubator에서 30분간 반응시킨 후 시료처리에 의한 GSH 함량 변화를 시간별로 ex. 360nm, em. 465 nm에서 형광 분석기로 측정하였다.



3. 결과 및 고찰

3-1 최종 선발 균주의 형태 및 생화학적 특성규명

(1) 형태 및 생화학적 특성규명

최종적으로 황산화능이 좋고 chitin 분해 속도가 빠른 CGH18을 선정하여 동정하였다. CGH18의 염기서열은 Fig. 4.과 같이 결정되었으며 총 1,322염기를 대상으로 similarity 분석을 수행한 결과 *Bacillus idriensis* (AY904033)와 100%를 나타내었으며 계통도에서도 동일한 clade에 위치하였다 (Fig. 5.). 따라서 CGH18균주는 *Bacillus idriensis* 로 판정하였다.



1 CCAAGGCGGG CCAGCCTATA ATGCAGTCGA GCGGACTTGC TGGAGCTTGC TCCAGCAGGT
 61 TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGC AACCTGCCTG TAAGACTGGG ATAACCTCGG
 121 GAAACCGGAG CTAATACCGG ATAGTATCTT GAACCGCATG GTTCAAGTTG GAAAGACGGT
 181 TTCGGCTGTC ACTTACAGAT GGGCCCGCGG CGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAATGGCTC
 241 ACCAAGGCAA CGATGCGTAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG GACTGAGACA
 301 CGGCCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC CGCAATGGAC GAAAGTCTGA
 361 CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGTT TTCGGATCGT AAAACTCTGT TGTTAGGGAA
 421 GAACAAGTGC GAGAGTAACT GCTCGCACCT TGACGGTACC TAACCAGAAA GCCACGGCTA
 481 ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA ATTATTGGGC
 541 GTAAAGCGCG CGCAGGCGGT TTCTTAAGTC TGATGTGAAA GCGCCCGGCT CAACCGGGGA
 601 GGGTCATTGG AAAGTGGGAA ACTTGAGTGC AGAAGAGGAG AGTGGAATTC CACGTGTAGC
 661 GGTGAAATGC GTAGAGATGT GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGACTCTC TGGTCTGTAA
 721 CTGACGCTGA GCGCGGAAAG CGTGGGGAGC GAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG
 781 CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGAGG GTTCCGCCC TTAGTGCTG CAGCTAACGC
 841 ATTAAGCACT CCGCTGGGG AGTACGGTCG CAAGACTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG
 900 GCGCGACAA GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTGGAAGCA ACGCGAAGAA CCTTACCAGG
 961 TCTTGACATC CTTTGCCACT TCTAGAGATA GAAGGTTCCC CTTCGGGGGA CAAAGTGACA
 1021 GGTGGTGCAT GGTGTGCTC AGCTCGTGTG GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG
 1081 CGCAACCCTT GATCTTAGTT GCCAGCATTG AGTTGGGCAC TCTAAGGTGA CTGCCGGTGA
 1141 CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAC CTGGGCTACA
 1201 CACGTGCTAC AATGGATGGT ACAAAGGGCT GCGAGACCGC GAGGTTTAGC CAATCCCATA
 1261 AAACCATCTT CAGTTCGGAT TGCAGGCTGC AACTCGCCTG CATGAAGCTG GAATCGTAGT
 1321 TAATCGCGGA TCAGCATGCC GCGGTGAATA CGTTCCCGGG CCTTGATACAC ACCGCCCCTC
 1381 ACACCACGAG AGTTTGCAAC ACCCGAAGTC GGTGGGGTAA CCGCAAGGAG CCAGCCGCAT
 1441 ATAGGGGGTT CGGT

Fig. 4. 16S rRNA gene sequence of strain CGH18.

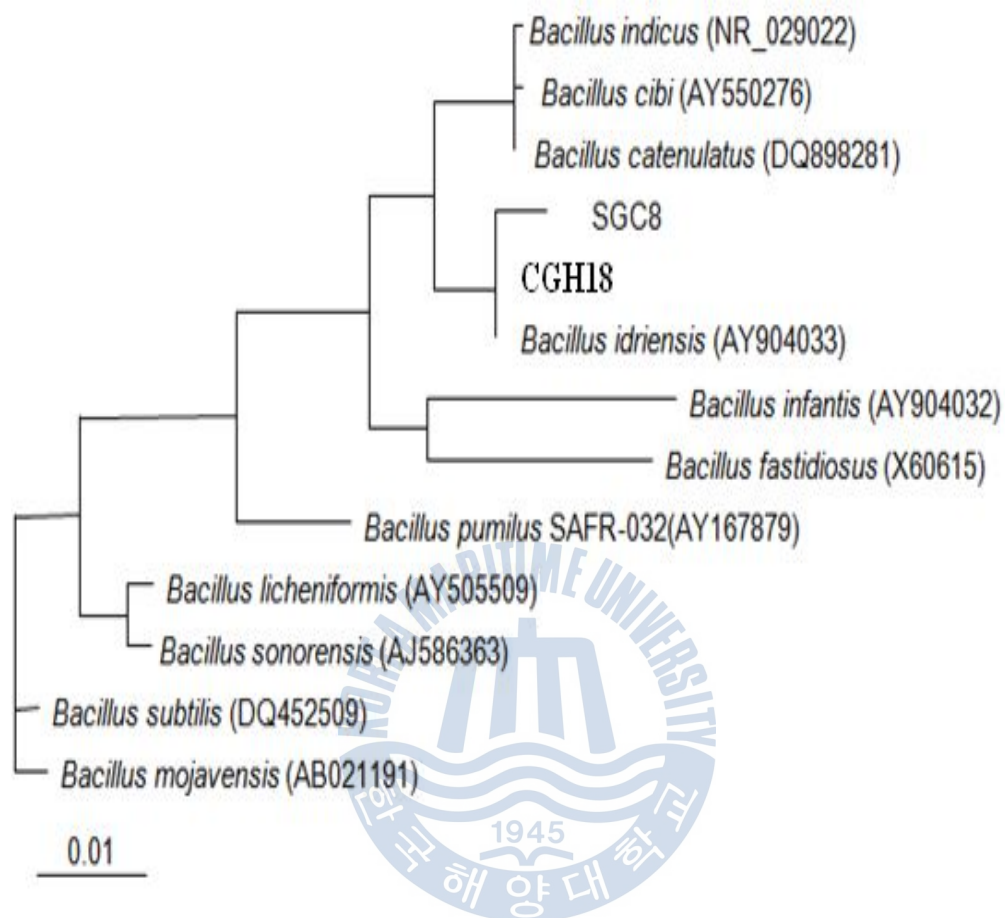


Fig. 5. Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequence analysis indicates that strain CGH18.

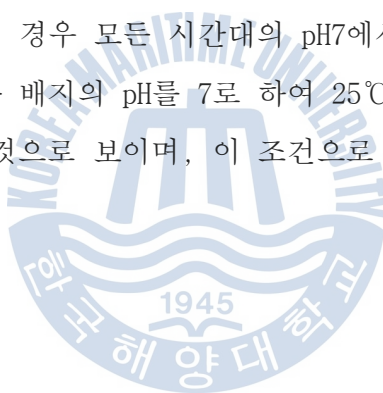
<i>B. idriensis</i> (CGH18)	
Gram's type	G+
Cell form	rod
Enzyme activity	
Reduction of nitrate to nitrite	-
Indol production	-
Fermentation (glucose)	-
Arginin dihydrolase	-
Urease	-
β -glucosidase(Esculin hydrolysis)	-
Protease(gelatin hydrolysis)	+
β -galactosidase	+
Assimilation of	
D-glucose	+
L-arabinose	-
D-mannose	-
D-mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
D-maltose	+
Potassium gluconate	+
Capric acid	-
Adipic acid	-
Malate	+
Trisodium citrate	-
Phenylacetic acid	-

Table 2. Result of biochemical test for isolate strains

(2) 최적 배양 조건

CGH18의 최적 배양 조건을 선정하기 위하여 배양시간과 온도, 그리고 pH가 균주의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 고체 배지에 배양된 선정 균주를 백금이로 50 mL 액체 배지에 접종한 다음 25℃, 200 rpm에서 진탕 배양하였으며, 배양된 균주를 새로운 액체 배지에 4% (v/v)씩 첨가하여 진탕 배양하였다. 조건별로 얻어진 배양액은 15,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 한 후, 상층액을 취하여 배양시간과 온도, pH에 따른 탁도를 660 nm에서 측정하였다.

처음 접종 후 24시간 뒤부터 12시간 간격으로 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간의 탁도를 측정하였으며, 그 결과 모든 pH에서 처음 24시간에서 48시간까지는 균이 성장하였으며, 그 이후부터는 성장이 되지 않고 오히려 균의 감소가 일어났다 (Fig. 6.). 온도의 경우 25℃에서 가장 높은 성장을 나타내었으며 (Fig. 7.), pH의 경우 모든 시간대의 pH7에서 가장 높은 성장을 보였다 (Fig. 8.). 이로부터 배지의 pH를 7로 하여 25℃에서 48시간 배양했을 때 균이 가장 잘 성장하는 것으로 보이며, 이 조건으로 *B. idriensis*를 배양하였다.



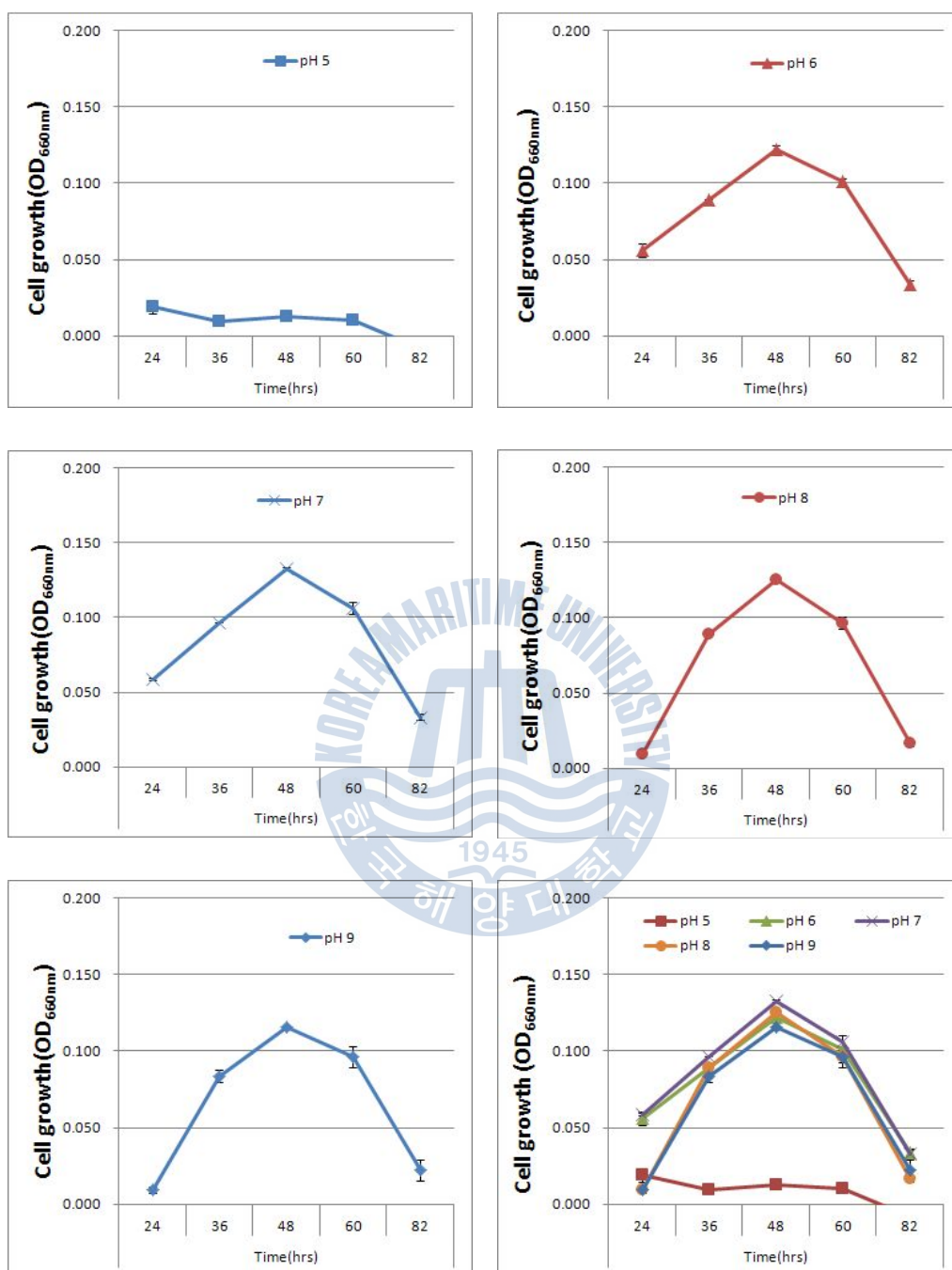


Fig. 6. Effect of Time(hrs) on the cell growth of *B. idriensis*.

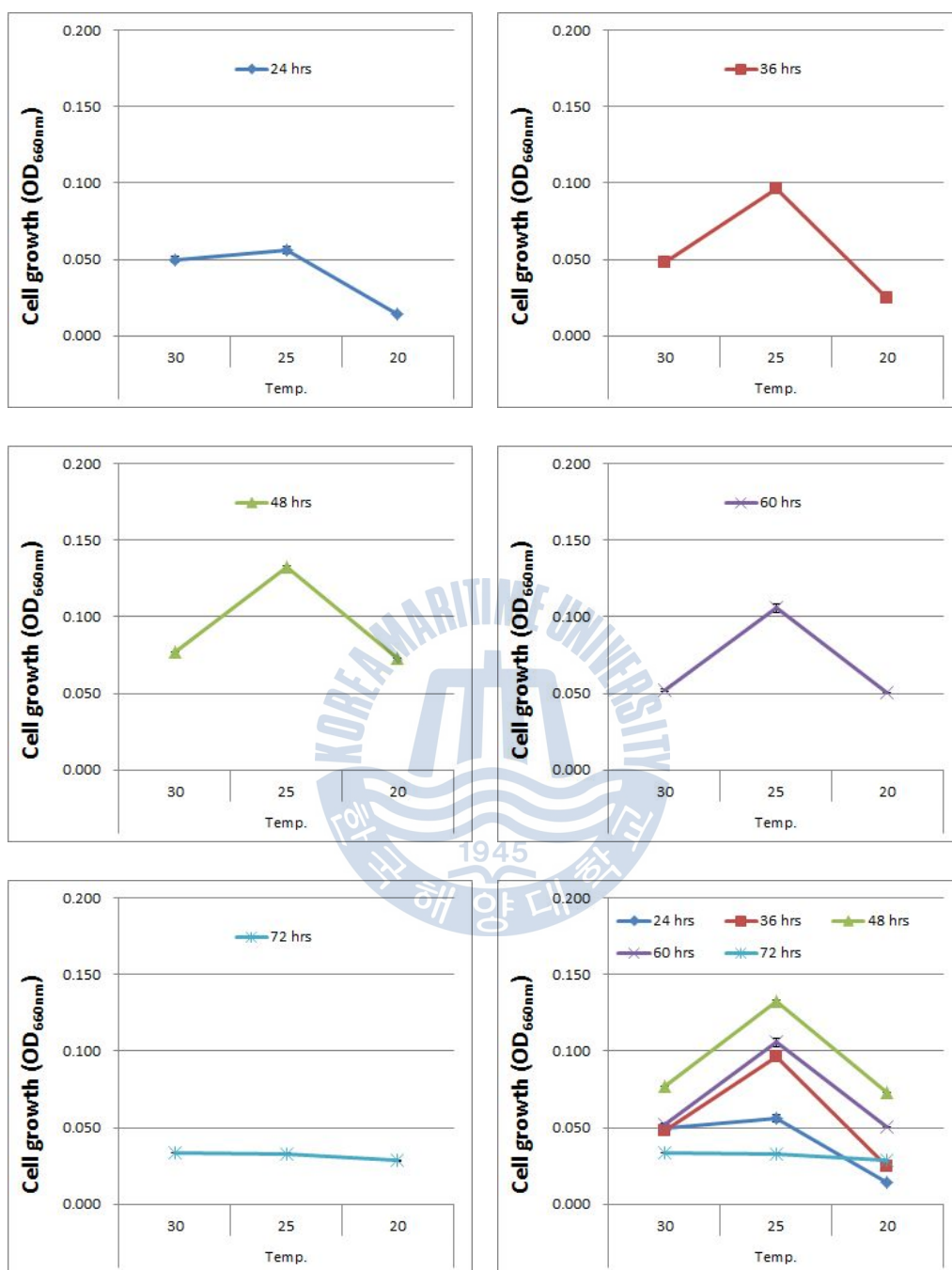


Fig. 7. Effect of temperature on the cell growth of *B. idriensis*.

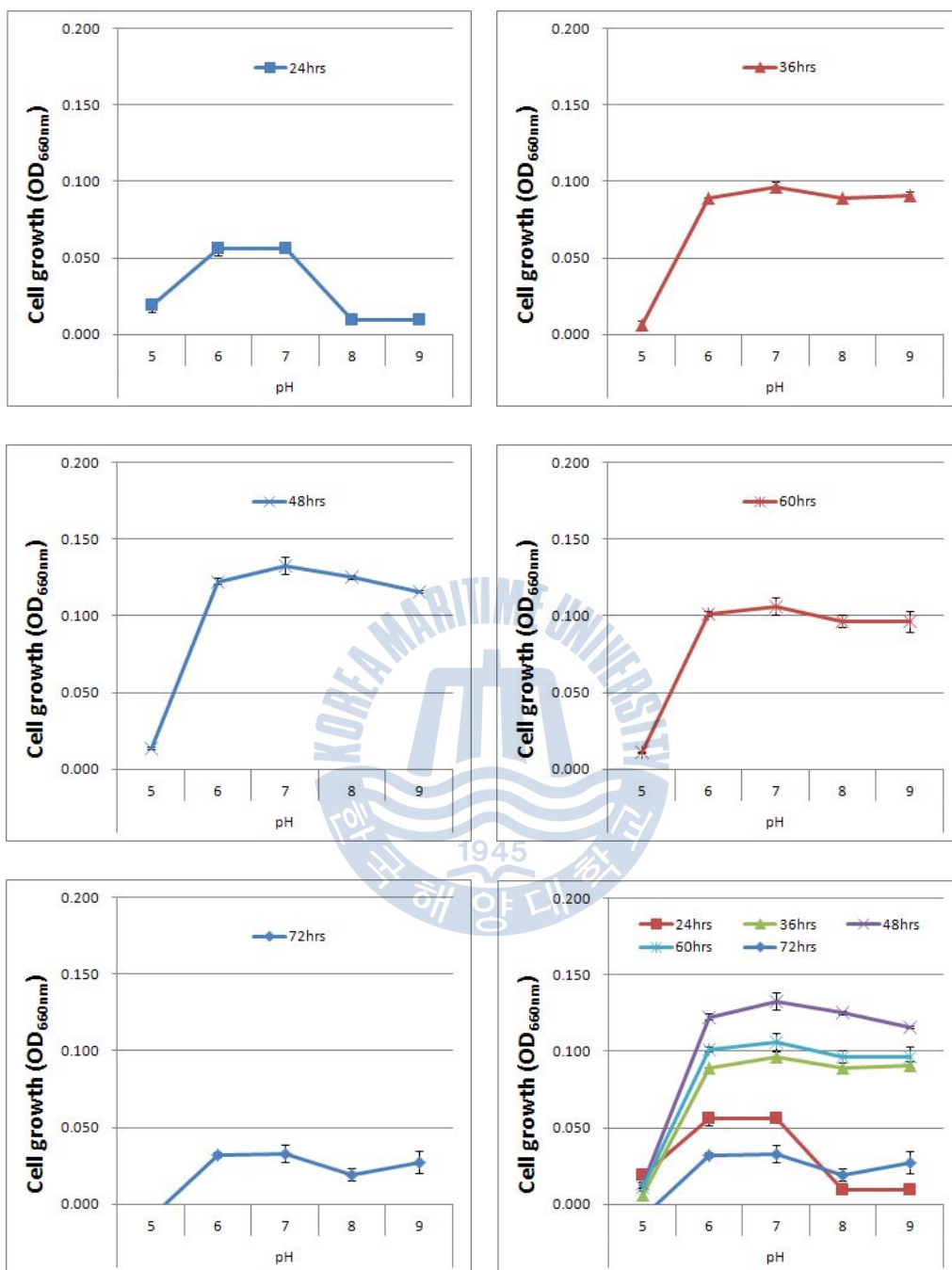


Fig. 8. Effect of pH on the cell growth of *B. idriensis*.

3-2. *B. idriensis* 에서 분리된 화합물들의 구조 결정

Compound 1은 무색의 비결정성 고체로 분리되었으며, LREIMS m/z 261 $[M]^+$ 와 ^{13}C NMR 자료에 의해서 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ 으로 결정되었다. ^1H NMR 스펙트럼에서 δ 3.9 - 4.3 사이의 두 개의 α -methine 잔기 신호와 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 나타난 δ 165 - 170 사이의 신호로 두 개의 CONH group을 확인할 수 있었으며, 이것은 diketopiperazine ring system의 특징적인 신호이며 따라서 compound 1은 DKP ring system을 가지고 있다고 생각하였다. 또한, ^1H NMR 스펙트럼에서 δ 6.73과 δ 6.97의 신호로 aromatic ring이 존재하고 있음을 알 수 있었다. Compound 1의 정확한 구조는 COSY, TOCSY, gHMQC, gHMBC 등의 2D 실험을 통하여 결정하였다. ^1H - ^1H COSY correlation으로 δ 3.04 (1H, dd, 14.0, 4.5)와 δ 4.37 (1H, td, 5.0, 2.0)이 직접적으로 coupling 되어 $-\text{CH}_2(\text{C}-10)=\text{CH}(\text{C}-9)-$ 로 연결되어 있음을 알 수 있었다, 마찬가지로 δ 1.0 - 4.0 사이의 broad한 multiplet이 서로 연결되어 있어 최종적으로 $-\text{CH}_2(\text{C}-3)-\text{CH}_2(\text{C}-4)-\text{CH}_2(\text{C}-5)-\text{CH}(\text{C}-6)-$ 의 부분구조가 있음을 알 수 있었다. 또한 δ 1.0 - 4.0 사이의 broad한 multiplet (H-3a, H-3b, H-4, H-5a, H-5b)들도 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다. Aromatic moiety는 ^1H NMR 스펙트럼에서 전형적인 para-치환형태의 패턴을 보이는 2개의 신호(δ 7.05, 1H, d, 8.5 Hz; δ 6.71, 1H, d, 8.5 Hz)를 보여 주었으며 정확한 방향족 고리의 구조는 aromatic proton들(7.05와 6.71)과 연관된 gHMBC 실험 데이터 분석을 통하여 결정되었으며 hydroxy기는 C-4'에 연결된 것으로 확인되었다. 또한, δ 7.05(H-2'와 H-6')의 신호와 C-10(δ 37.71)의 신호 사이의 long-ranged correlation을 통하여 앞서 COSY에 의해 밝혀진 부분구조가 aromatic ring의 C-1'와 연결되어 있는 것을 알 수 있었다. 알려진 부분구조와 chemical shift 값을 문헌값과 비교하여 Compound 1은 cyclo-(L-prolyl-L-tyrosine)으로 결정되었다 (Jayatilake et al., 1996).

Compound 2는 무색의 비결정성 고체로 분리되었으며, LREIMS m/z 244 $[M]^+$ 와 ^{13}C NMR 자료에 의해서 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ 으로 결정되었다. Compound 2는 NMR 스펙트럼 분석 결과, compound 1과 매우 유사한 화합물임을 알수 있었으며, 두 화합물의 NMR 스펙트럼 비교 분석 결과, compound 1의 ^{13}C NMR 에서 나타난 aromatic ring의 신호인 δ 110 - 160 사이의 신호가 hydroxyl기가 붙어있던 C-4'의 신호가 사라진 것으로 보아 hydroxyl기가 붙어 있지 않은 aromatic ring이 있을 것이라 생각되었으며, chemical shift 값을 문헌값과 비교한 결과 compound 2는 cyclo-(L-prolyl-L-phenylalanine)으로 결정되었다 (Jayatilake et al., 1996).



Table 3. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound **1**.

position	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}
1		166.75
2		
3-a	3.35 (1H, m)	45.93
3-b	3.56 (1H, m)	45.93
4	1.82 (2H, m)	22.78
5-a	1.23 (1H, m)	29.45
5-b	2.10 (1H, m)	29.45
6	4.06 (1H, ddd, 11.5, 6.0, 2.0)	60.05
7		170.55
8		
9	4.37 (1H, td, 5.0, 2.0)	57.90
10	3.04 (2H, m)	37.71
1'		127.48
2'	7.05 (1H, d, 8.5)	131.97
3'	6.71 (1H, d, 8.5)	116.07
4'		157.50
5'	6.71 (1H, d, 8.5)	116.07
6'	7.05 (1H, d, 8.5)	131.97

Measured in CD_3OD at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table 4. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound **2**.

position	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}
1		164.91
2		
3-a	3.56 (1H, m)	45.53
3-b	3.65 (1H, m)	45.53
4	1.87 (2H, m)	22.66
5-a	2.05 (1H, m)	28.45
5-b	2.33 (1H, m)	28.45
6	4.08 (1H, t, 7.1)	59.18
7		169.21
8	5.62 (1H, s)	
9	4.27 (1H, dd, 10.3, 3.2)	56.23
10-a	3.52 (1H, m)	36.88
10-b	2.77 (1H, dd, 15.1, 10.3)	36.88
1'		135.83
2'	7.3 (5H, m)	129.00
3'	7.3 (5H, m)	129.20
4'	7.3 (5H, m)	127.48
5'	7.3 (5H, m)	129.20
6'	7.3 (5H, m)	129.00

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, gHMQC, and gHMBC experiments.

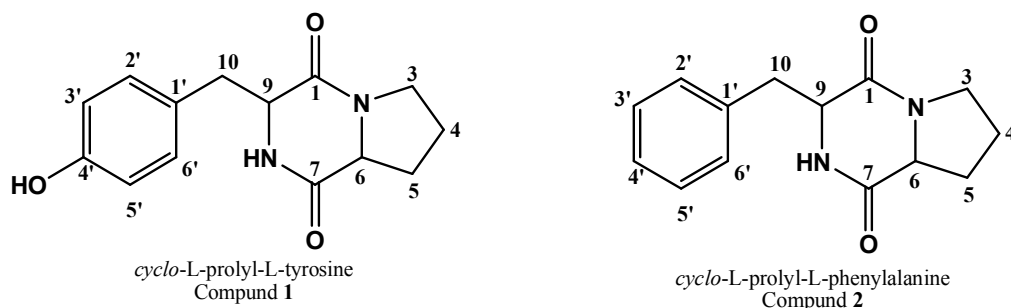


Fig. 9. Chemical structure of compounds 1–2 from *B.idriensis*

Compound **1** : colorless gum; LREIMS m/z 261 $[M]^+$, $C_{18}H_{14}O_9$, $[\alpha]_D^{20}$: -48.75° (c 0.27, MeOH) ; IR (NaCl) $\nu_{\max}$ cm^{-1} ; 3590, 3380, 1670 cm^{-1} , UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm ; 234 nm ; 1H and ^{13}C NMR, see **Table 3**.

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$

Compound **2** : colorless powder; FAB-MS m/z 240 $[M]^+$, $C_{18}H_{12}O_9$, $[\alpha]_D^{20}$: -16.36° (c 0.18, MeOH) ; IR (NaCl) $\nu_{\max}$ cm^{-1} ; 3590, 3380, 1670 cm^{-1} , UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm ; 220 nm ; 1H and ^{13}C NMR, see **Table 4**.

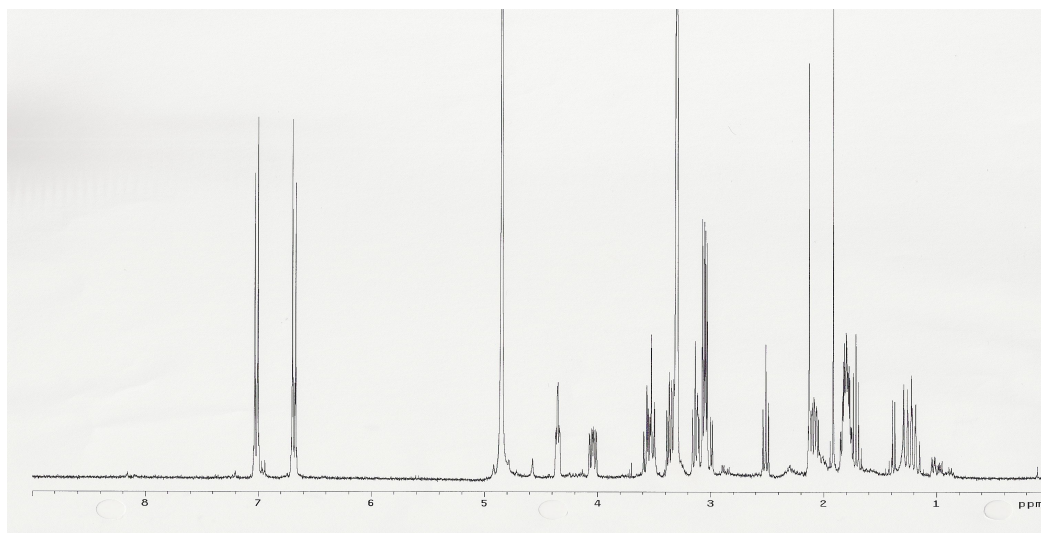


Fig. 10. ^1H NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

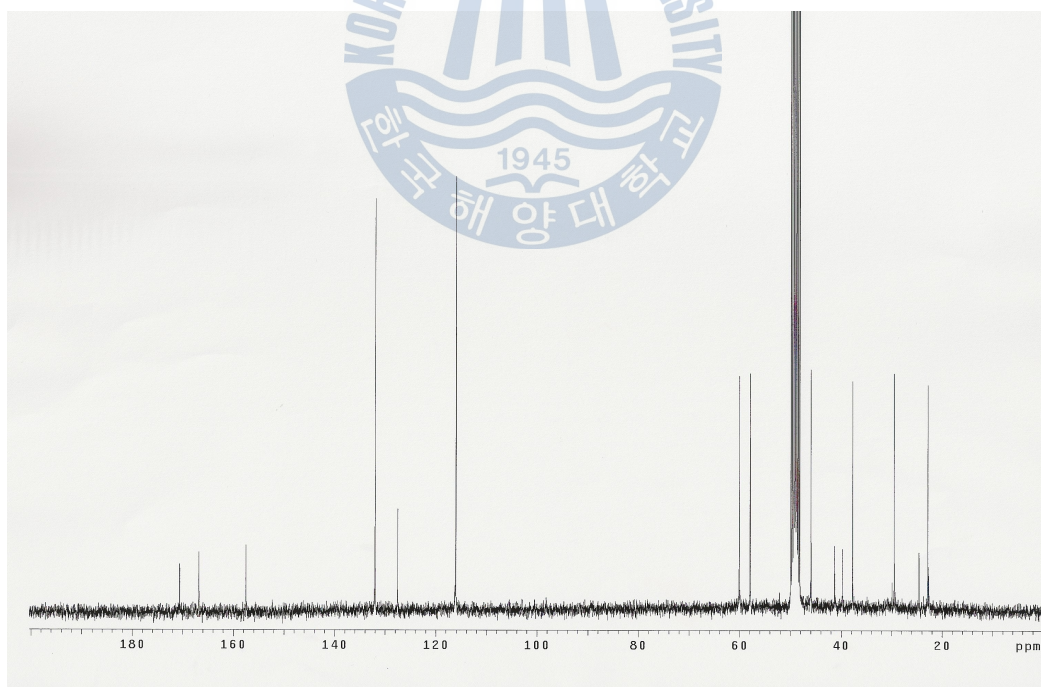


Fig. 11. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

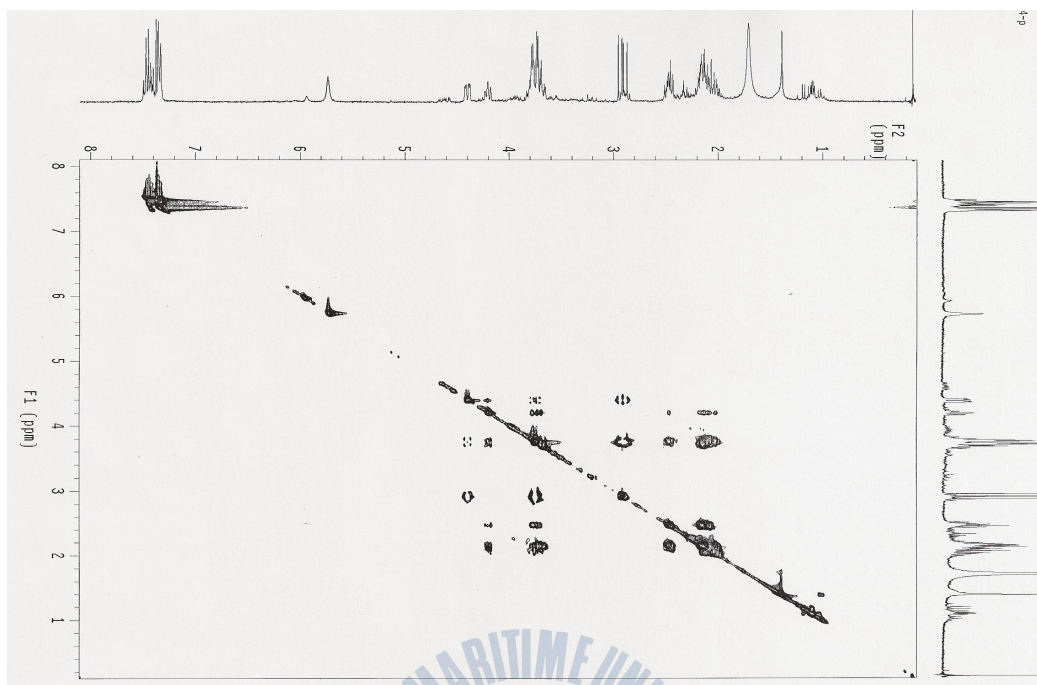


Fig. 12. TOCSY of compound 1 in CD_3OD .

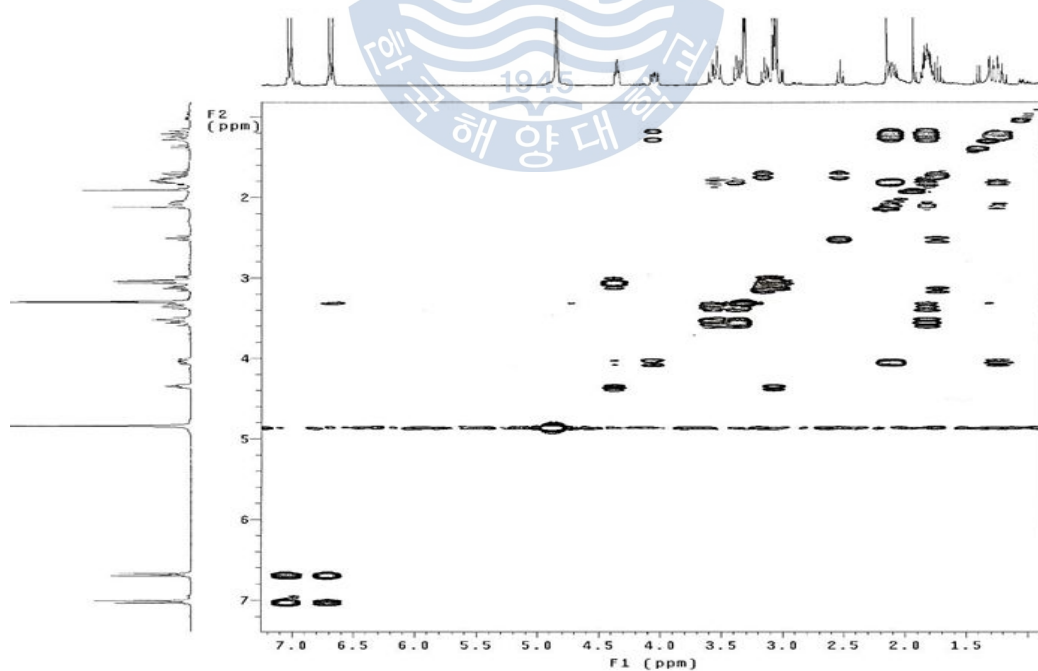


Fig. 13. COSY spectrum of compound 1 in CD_3OD .

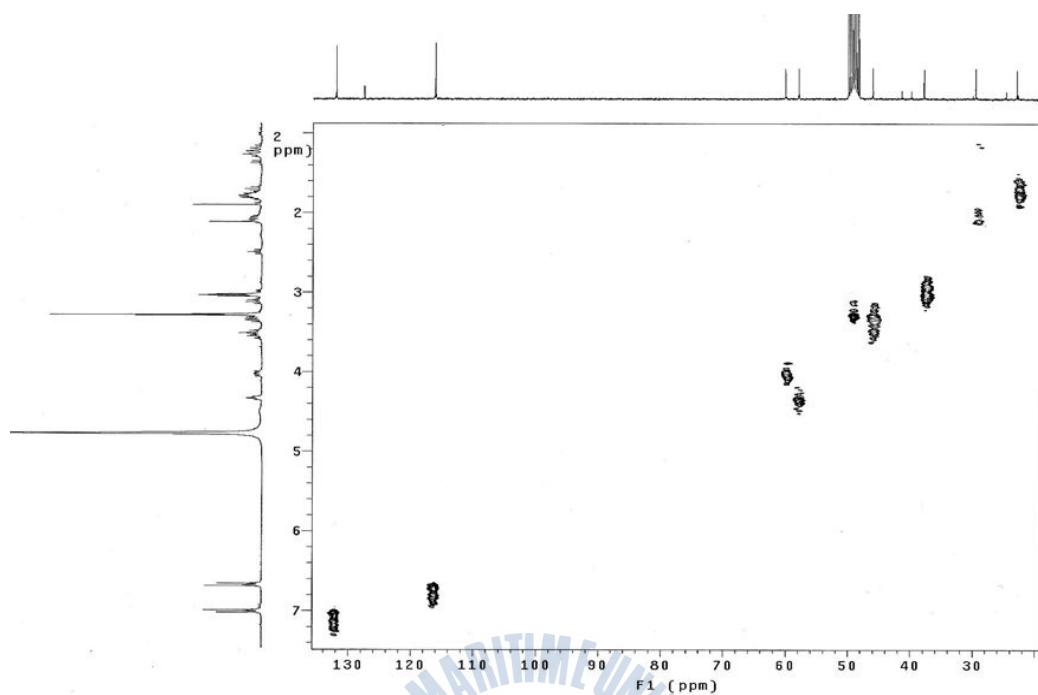


Fig. 14. gHMQC of compound 1 in CD_3OD .

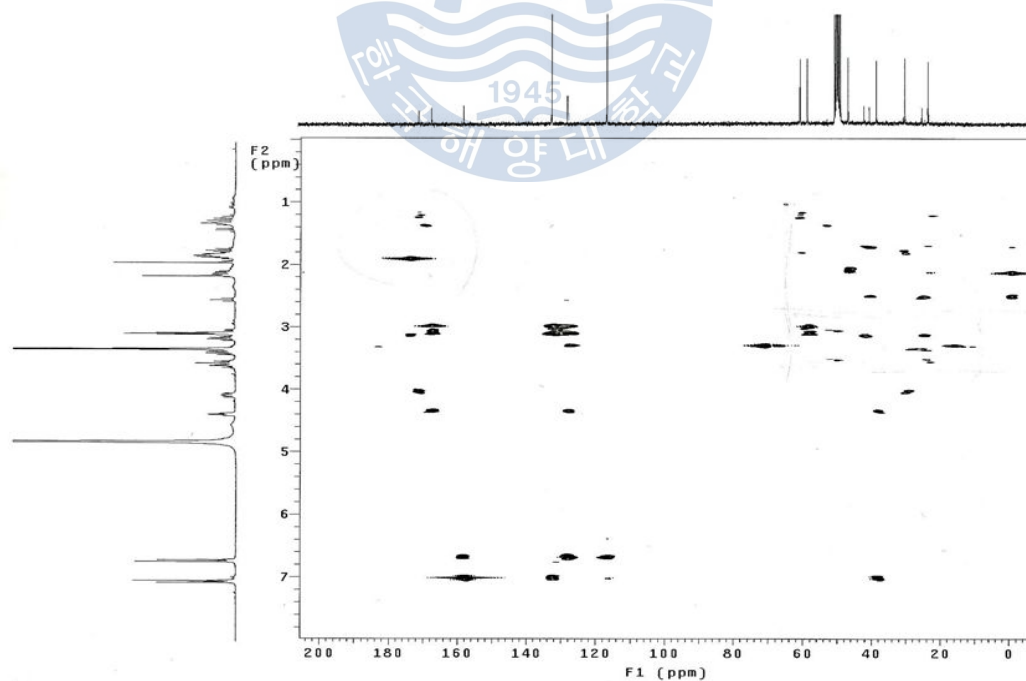


Fig. 15. gHMBC spectrum of compound 1 in CD_3OD .



Fig. 16. ^1H NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3 .



Fig. 17. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

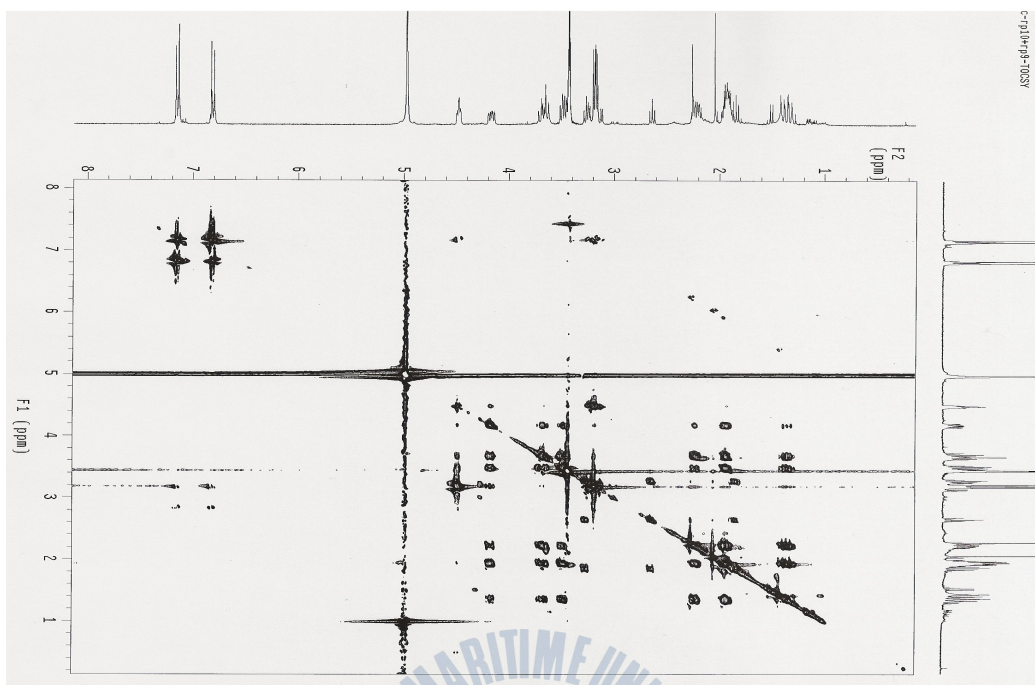


Fig. 18. TOCSY of compound 2 in CDCl_3 .



Fig. 19. COSY spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

3-3 항산화 활성 실험

(1) peroxyntirite 소거 활성

형광물질인 DHR 123을 이용하여 ONOO^- 소거 활성을 검색하였으며, 시료를 첨가하지 않은 control과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. EtOAc 추출물과 그것을 용매분획하여 얻어진 4개의 분획물인 *n*-BuOH, H₂O-1, CH₂Cl₂, H₂O-2 분획물과 colloidal chitin을 넣어 배양한 배양액의 EtOAc 추출물인 EtOAc-2 추출물에 대하여 각각 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 SIN-1과 authentic peroxyntirite의 소거율을 검색하였으며, 대조군으로는 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ L-ascorbic acid 와 penicillamine을 사용하였다.

먼저 authentic peroxyntirite에 대한 소거 활성을 측정한 결과 authentic peroxyntirite를 처리하지 않은 control과 비교하여 모든 sample에서 peroxyntirite 소거효과를 나타냈으며, 그 중에서도 EtOAc-1 추출물, H₂O-1 분획물 및 EtOAc-2 추출물은 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 70.7%, 50.8%, 32.5%와 67.0%, 50.1%, 31.2% 그리고 97.6%, 93.4%, 83.6%의 활성을 나타내었으며, 특히 EtOAc-2 추출물의 경우에는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군으로 사용된 25 $\mu\text{g/mL}$ penicillamine과 비슷한 정도의 높은 소거 활성이 관찰되었다 (Fig. 20.).

SIN-1을 처리한 결과에서도 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ 모든 농도의 sample에서 SIN-1을 처리하지 않은 control보다 높은 소거 활성이 나타났으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 모든 sample은 50%가 넘는 소거 활성을 나타냈다. 특히 EtOAc-2 추출물의 경우에는 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 83%, 80%, 68%로 매우 높은 소거 효과가 관찰되었다 (Fig. 21.).

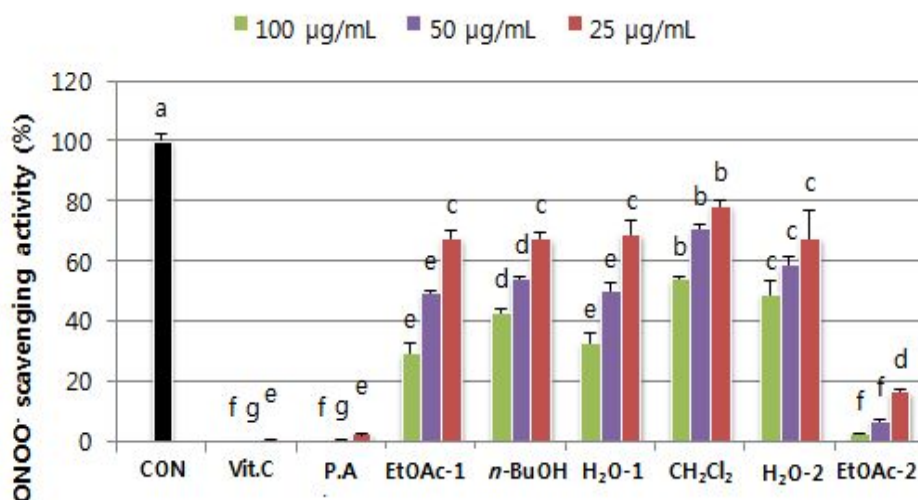
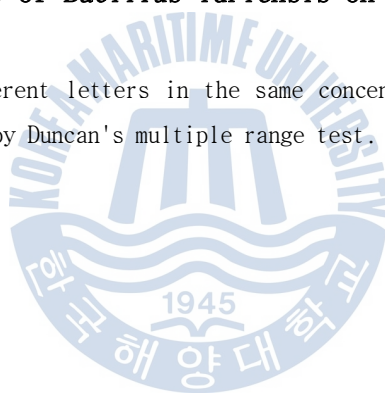


Fig. 20. Scavenging effect of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on authentic ONOO⁻ (% of control).

^{a-g} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



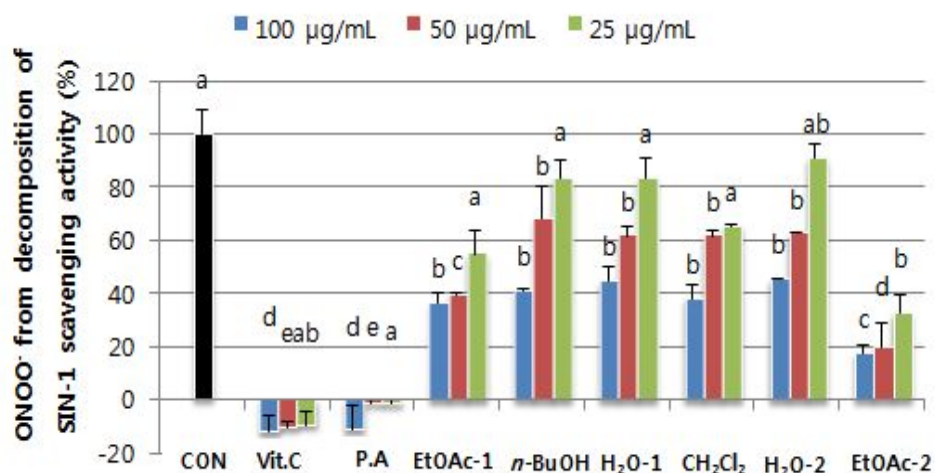
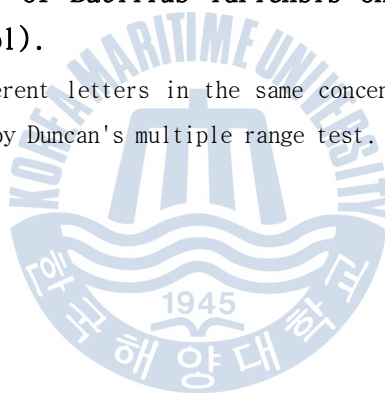


Fig. 21. Scavenging effect of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on ONOO⁻ from SIN-1 (% of control).

^{a-e} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

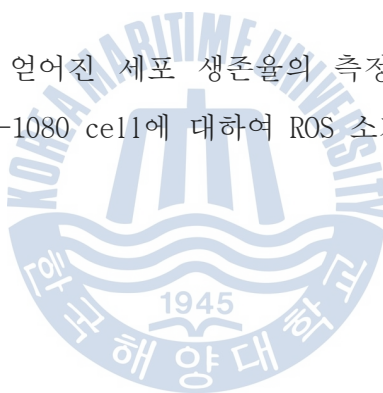


3-4 세포 수준에서의 활성 실험

(1) HT-1080 cell에 대한 MTT assay 효과

항산화 활성 측정을 위해서 MTT assay를 이용하여 sample이 HT-1080 cell 생존에 영향을 미치는 범위를 측정하였다. 사용된 sample의 농도는 200, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ 으로 1시간 동안 처리하였으며, sample을 처리하지 않은 control을 기준으로 세포 생존율을 백분율(%)로 나타내었다. 그 결과 Colloidal Chitin을 넣어 배양한 배양액의 EtOAc 추출물인 EtOAc-2 추출물이 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 50%의 생존을 보였고, CH_2Cl_2 분획물이 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 70%의 생존율을 나타냈다. 이 둘을 제외한 나머지의 추출물과 분획물들은 모두 80%가 넘는 생존율을 보였다 (Fig. 22.).

MTT assay를 측정하여 얻어진 세포 생존율의 측정결과를 바탕으로 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 HT-1080 cell에 대하여 ROS 소거 활성을 확인하였다.



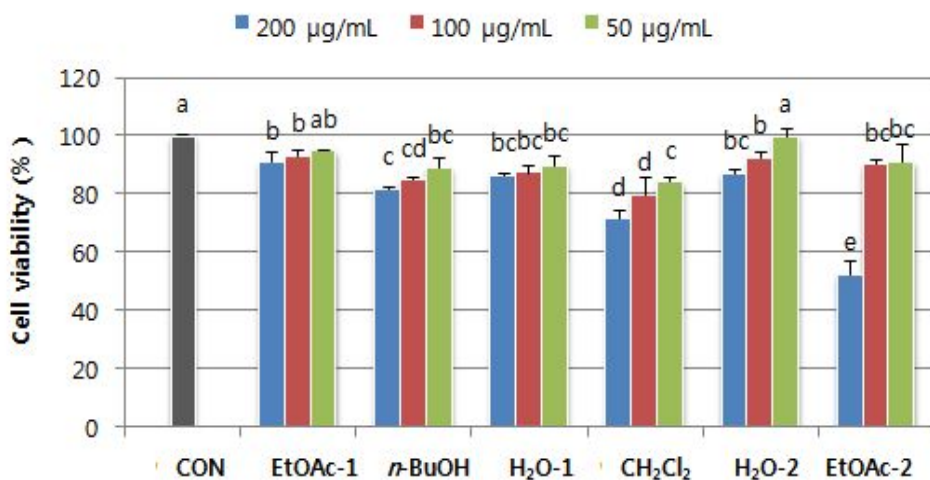
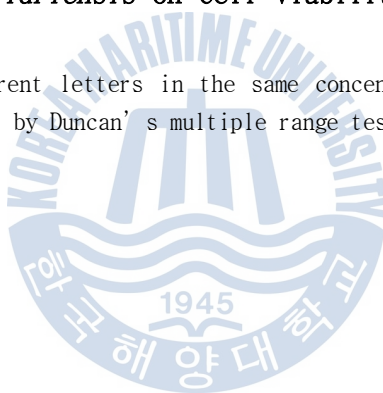


Fig. 22. Effects of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on cell viability by MTT assay after 1 hr.

^{a-e} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



(2) ROS (total radical 측정)

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 DCFH-DA를 사용해 세포내 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. 500 μM 의 H_2O_2 로 처리한 후 0, 30, 60, 90, 120분 뒤에 측정하여 활성을 검색하였다. 모든 sample은 각각 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 측정하였으며, 대조군으로는 sample을 넣지 않고 500 μM H_2O_2 로 처리한 control과 sample과 500 μM H_2O_2 를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 500 μM H_2O_2 를 처리한 control은 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 급격히 증가하였으며, 500 μM H_2O_2 를 처리하지 않은 blank는 시간에 따른 DCF fluorescence 값의 변화가 거의 없었다. H_2O -1 분획물을 제외한 모든 sample이 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 blank와 비슷한 정도의 세포내 활성 산소종 소거 효과를 나타냈으며, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 control에 비교하였을 때 생성된 유리라디칼을 현저하게 소거하였다. H_2O -1 분획물도 다른 sample들 높은 활성을 보이지는 않았지만 control과 비교했을 때 높은 활성을 나타냈다. 모든 sample에서 농도 의존적인 효과가 나타났다. 이것으로 보아 측정한 모든 농도에서 *B. idriensis*의 추출물과 분획물이 세포내 ROS 소거 활성에 매우 뛰어난 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 23-29.).

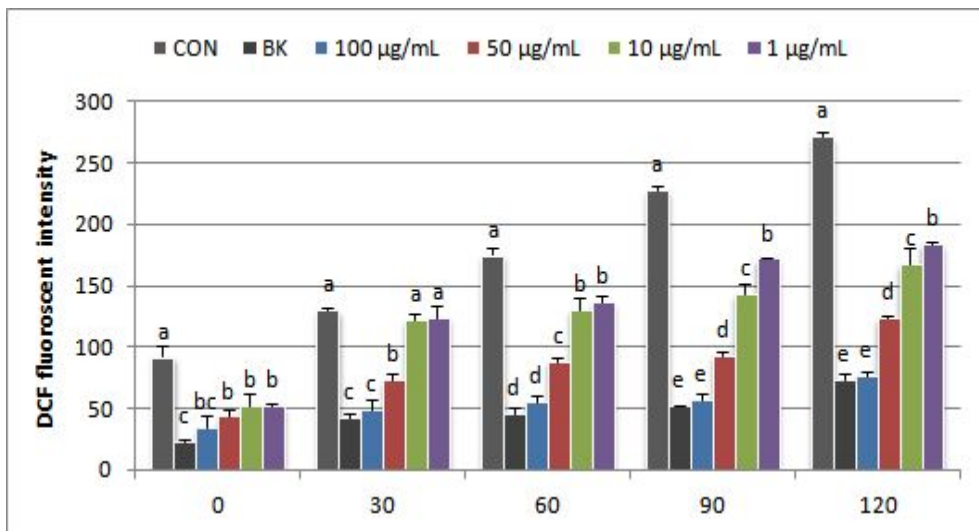
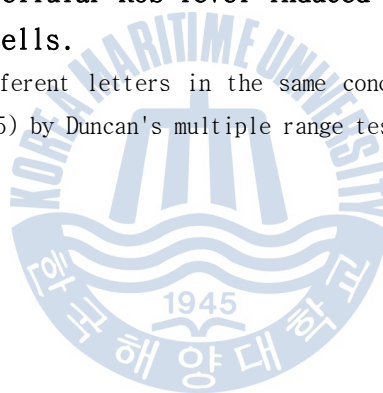


Fig. 23. Inhibition effect of EtOAc extract from *Bacillus idriensis* on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

^{a-e} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



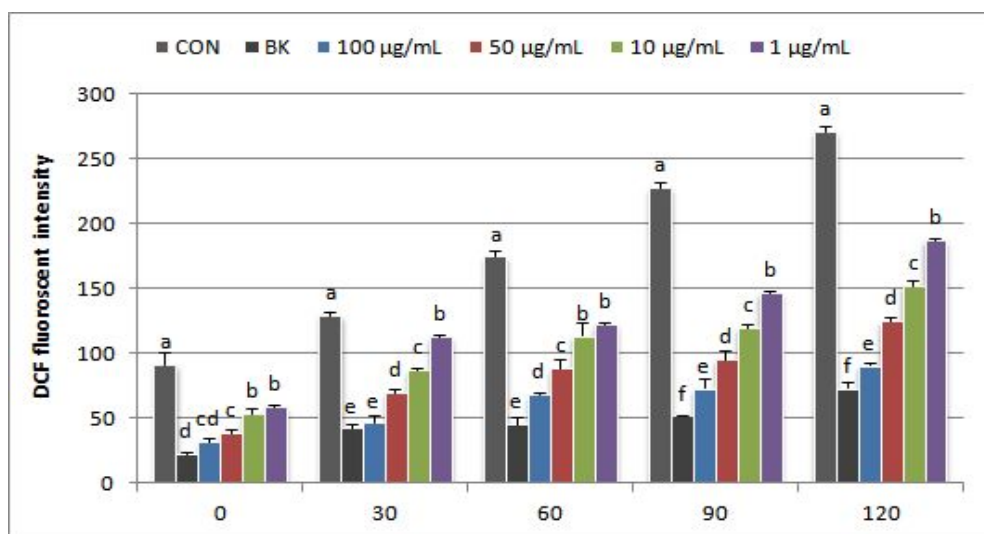
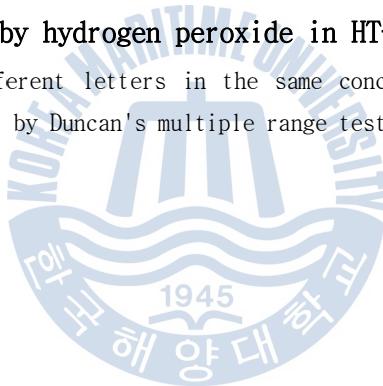


Fig. 24. Inhibition effect of BuOH solvent fractions from EtOAc extract of *Bacillus idriensis* on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

^{a-f} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



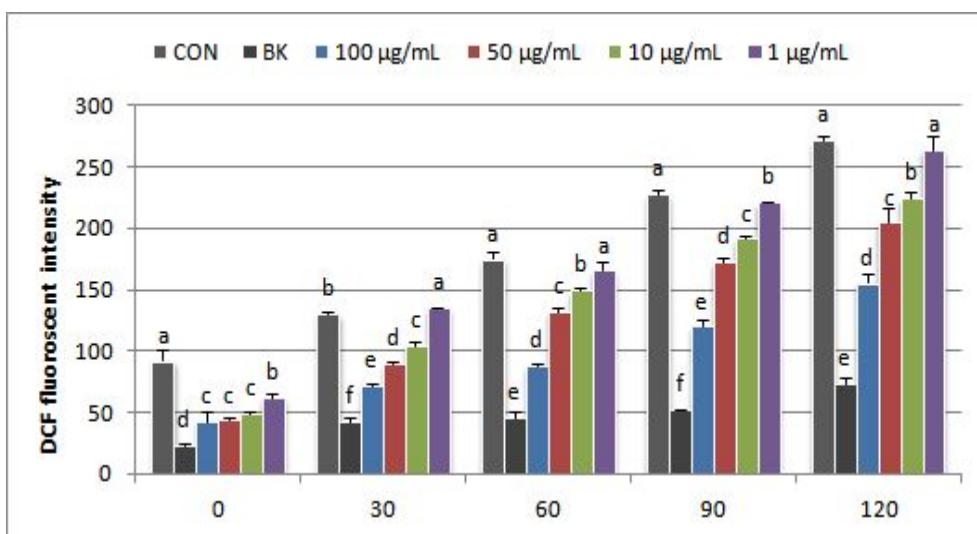


Fig. 25. Inhibition effect of H₂O-1 solvent fractions from EtOAc extract of *Bacillus idriensis* on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

^{a-f} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



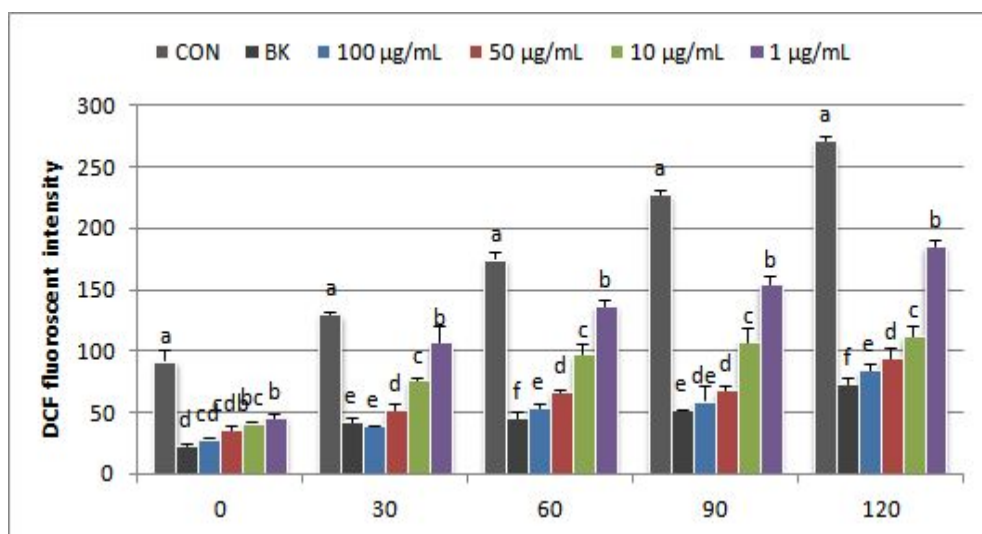
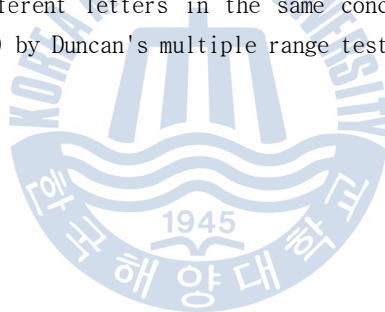


Fig. 26. Inhibition effect of CH_2Cl_2 solvent fractions from EtOAc extract of *Bacillus idriensis* on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

^{a-f} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



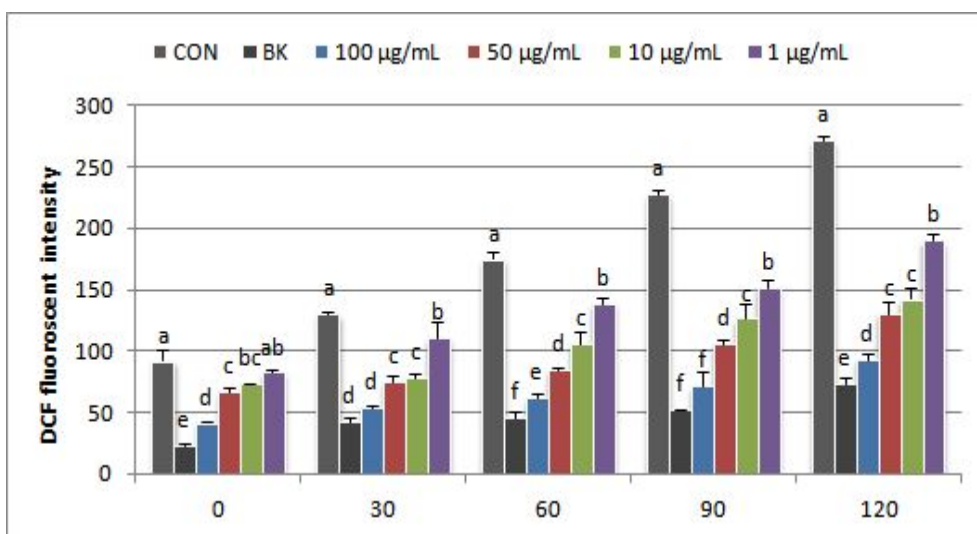
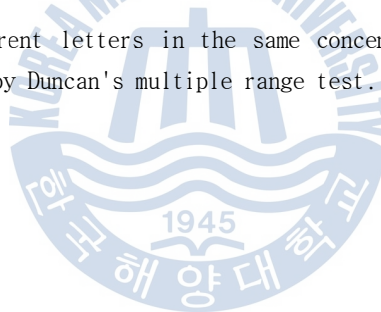


Fig. 27. Inhibition effect of H₂O-2 solvent fractions from EtOAc extract of *Bacillus idriensis* on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

^{a-f} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



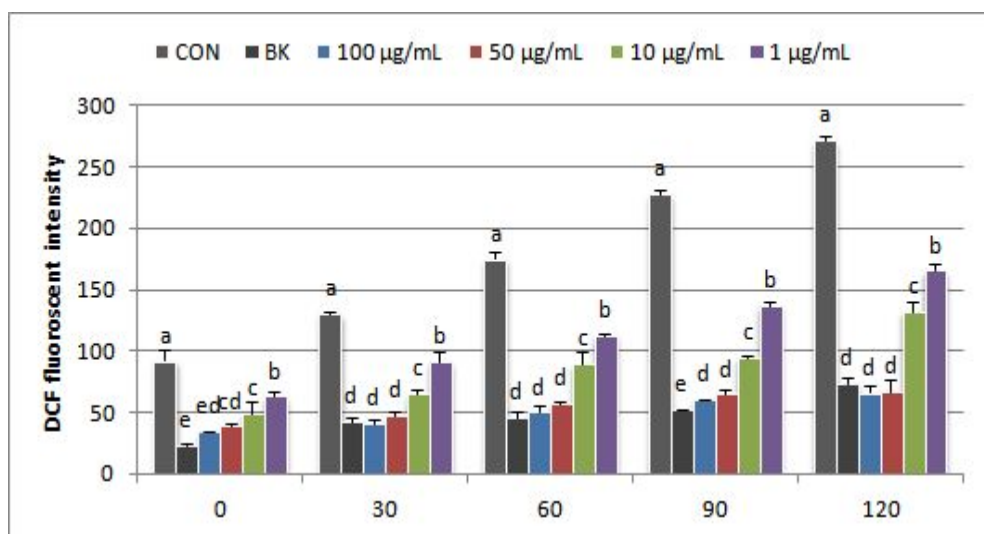


Fig. 28. Inhibition effect of EtOAc extract from *Bacillus idriensis* cultured with colloidal chitin on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

^{a-c} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Fig. 29.은 90분에 측정한 sample과 각각의 농도에 따른 활성 산소종 소거효과를 나타낸 그래프로, 모든 sample에서 높은 활성이 나타났으며 특히, CH_2Cl_2 추출물과 colloidal chitin을 넣어 배양한 배양액의 EtOAc 추출물인 EtOAc-2 추출물이 다른 sample 보다 높은 소거 효과를 나타냈다.

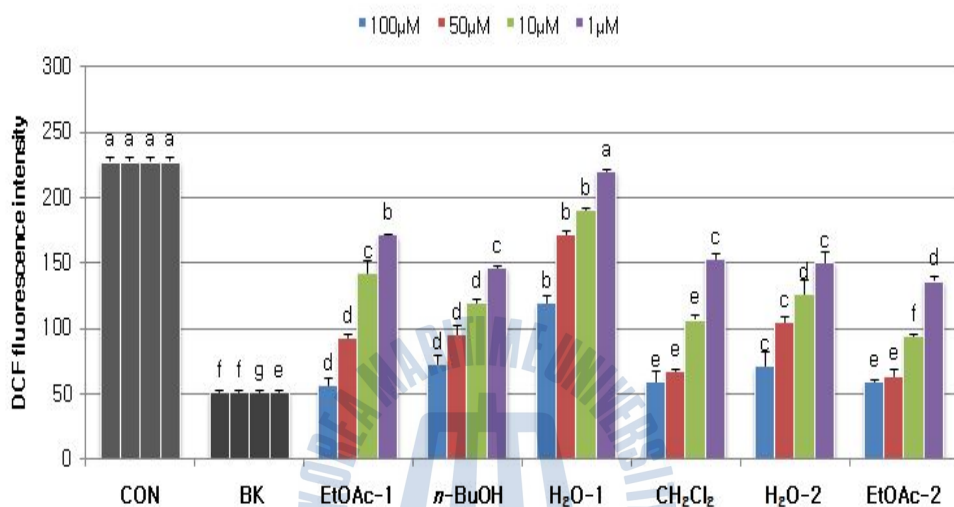


Fig. 29. Inhibition effect of crude extract and its solvent fractions from *Bacillus idriensis* on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. the cell were incubated with different concentration of the sample for 90 min.

^{a-g} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(3) TBARS법을 이용한 lipid peroxidation 측정

HT-1080 세포를 이용한 지질 과산화 측정은 TBARS assay를 이용하여 측정하였다. 시료를 첨가하지 않고 H_2O_2 와 황산철을 첨가한 대조군과 비교하여 산화 억제효과를 백분율(%)로 나타내었다. 대조군과 비교시 모든 샘플에서 10 mg/mL의 농도일 때 지질 산화를 10% 가량 억제하는 것으로 나타났으며, sample들간의 큰 억제능 차이는 보이지 않았다. (Fig. 30.).



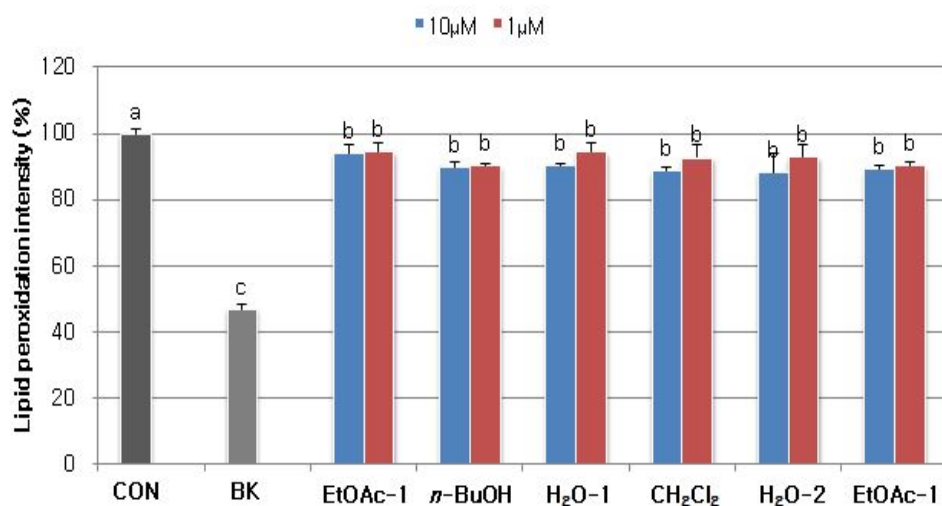
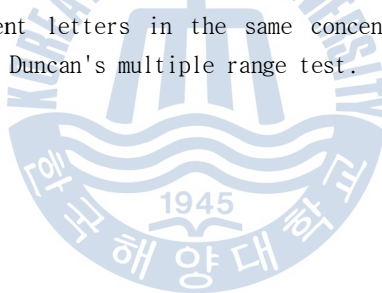


Fig. 30. Inhibition effects of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on membrane lipid peroxidation in HT-1080 cells.

^{a-c} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



(4) 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 때의 추출물이 DNA 산화를 억제시키는 정도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않고 H_2O_2 와 황산철을 첨가한 대조군을 100%로 비교하여 산화 정도를 백분율(%)로 나타내었다.

EtOAc-1 추출물을 제외한 모든 sample 에서 높은 항산화 효과가 나타났으며, 특히 EtOAc-2 추출물은 100 mg/mL의 농도에서 blank보다 높은 항산화 효과를 나타내었다 (Fig. 31.).



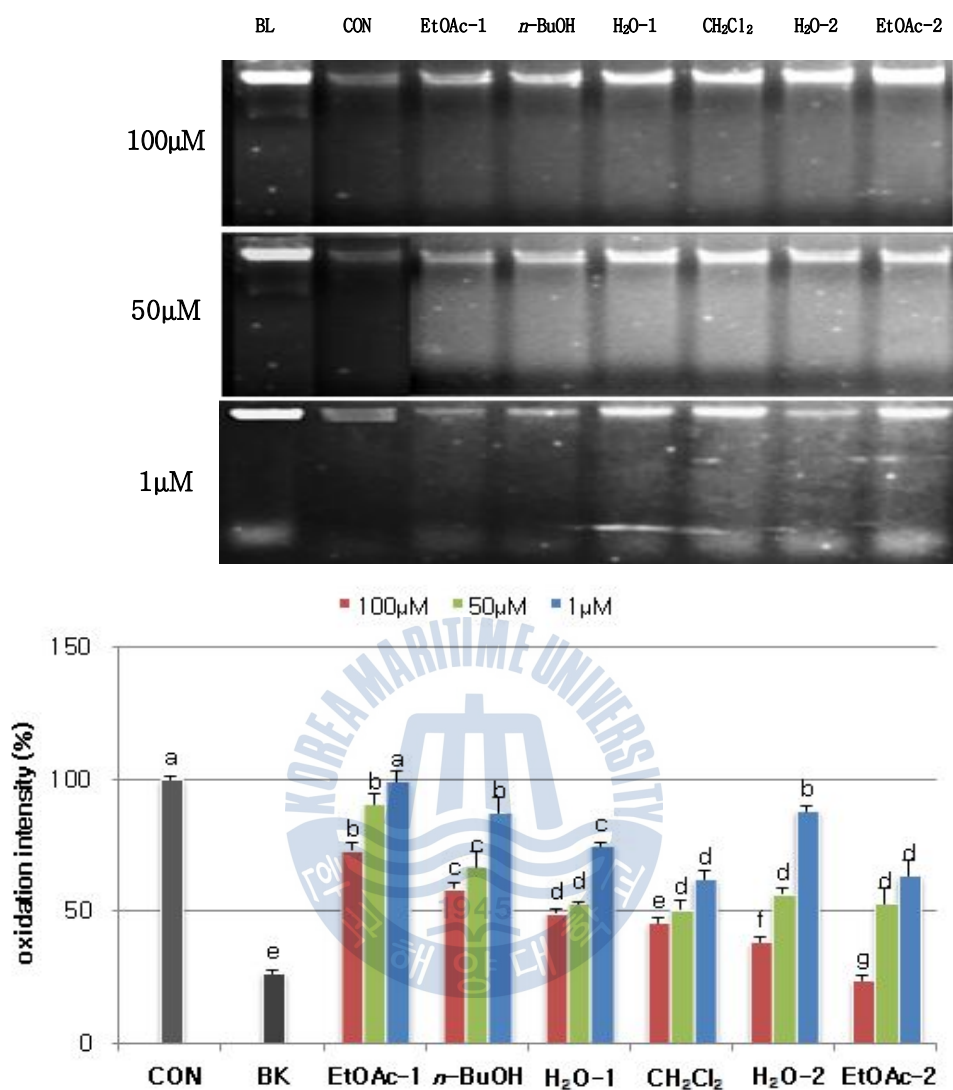


Fig. 31. Antioxidant effect of crude extract and its solvent fractions from *Bacillus idriensis* on genomic DNA in HT-1080 cells.

^{a-g} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(5) GSH(Glutathione) 함량 측정

세포내에 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBBr (monobromobimane)을 이용하여 40 μ M mBBBr 처리 후 시료처리에 대한 GSH 함량의 변화를 120분 뒤에 측정하였다. GSH는 세 개의 아미노산으로 이루어진 tripeptide (cystein, glutamic acid, glycine)로써, sulfhydryl radical을 가지고 있어, 세포내 산화생성물을 제거 하는 역할을 한다). 따라서 비형광성 물질인 mBBBr과 이들이 세포내에서 결합하여 형광을 나타내므로, 그 정도를 측정하여 세포내 GSH 함량을 나타내었다. 모든 sample은 각각 100, 50, 10 μ g/mL의 농도로 측정하였으며, 대조군으로는 시료를 처리하지 않은 control을 사용하였으며, 결과 값은 control과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다 (Fig. 32.).

대부분의 sample에서 GSH 함량이 많이 증가하지 않았지만, 대조군으로 사용된 Vitamin C와 비교했을 때 비슷한 함량을 나타냈습니다.



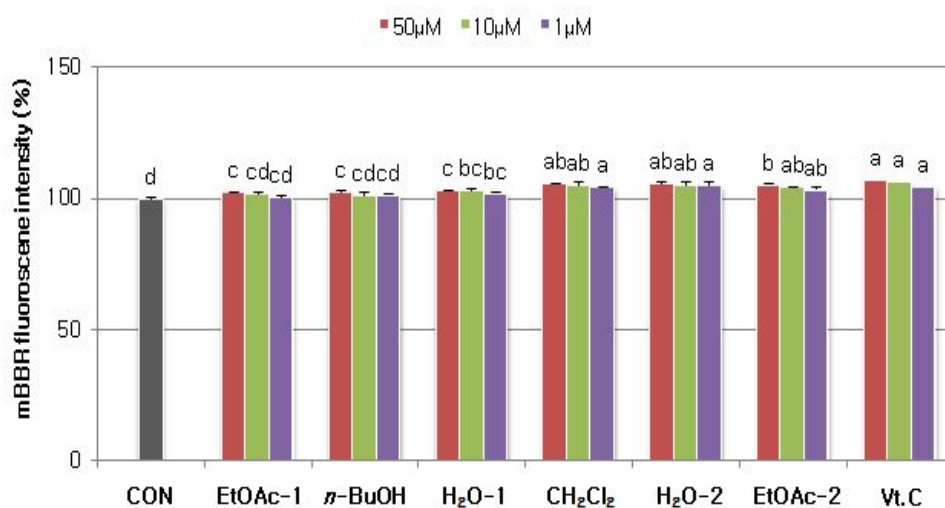
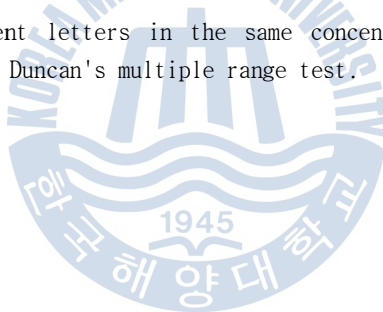


Fig. 32. Effects of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on regulation of GSH level in HT-1080 cells.

^{a-d} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



(6) 인체 유래 암세포에 대한 세포 독성 효과

항암 생리활성 물질탐색을 위한 기초 연구로서 추출물 및 용매 분획물을 이용하여 HT-1080, HT-29, MCF-7 세포성장에 미치는 영향을 관찰 하였다

(6-1) HT-1080 세포 독성 효과

인간 섬유 육종 세포인 HT-1080 cell에 대하여 추출물 및 분획물의 세포 증식 억제정도 측정하였다. 사용한 농도는 100, 50, 10, 1 mg/mL 이며, CH₂Cl₂ 분획물이 100 mg/mL에서 50%정도의 세포 증식 억제효과를 나타냈으며, *n*-BuOH 분획물, H₂O-1 분획물 그리고 EtOAc-2 추출물도 100 mg/mL에서 30%가 넘는 세포 증식 억제효과가 나타났다 (Fig. 33.).

(6-2) MCF-7 세포 독성 효과

인간 유방암 세포인 MCF-7 cell에 대한 세포 증식 억제정도를 100, 50, 10, 1 mg/mL의 농도에서 확인한 결과, 모든 sample에서 농도 의존적인 세포 증식 억제정도가 관찰되었으며, 특히 CH₂Cl₂ 분획물과 EtOAc-2 추출물에서 높은 억제효과가 나타났다 (Fig. 34.).

(6-3) HT-29 세포 독성 효과

대장암 세포인 HT-29 cell에 대한 세포 증식 억제정도를 확인한 결과, 100, 50, 10, 1 mg/mL의 농도에서 농도 의존적인 세포 증식 억제정도가 관찰되었으며, MCF-7의 경우와 마찬가지로 CH₂Cl₂ 분획물과 EtOAc-2 추출물에서 높은 억제효과가 나타났다 (Fig. 35.).

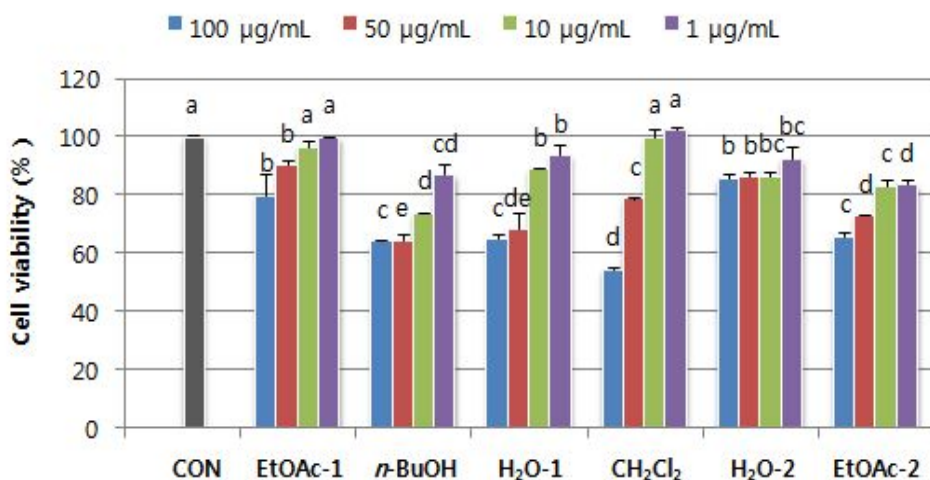
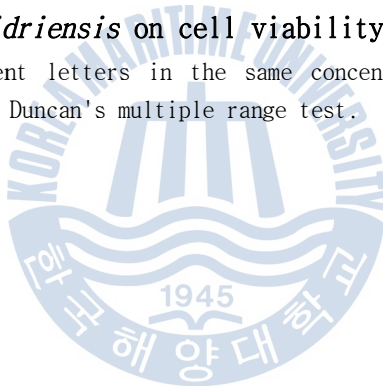


Fig. 33. Effects of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on cell viability of HT-1080 cells.

^{a-e} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



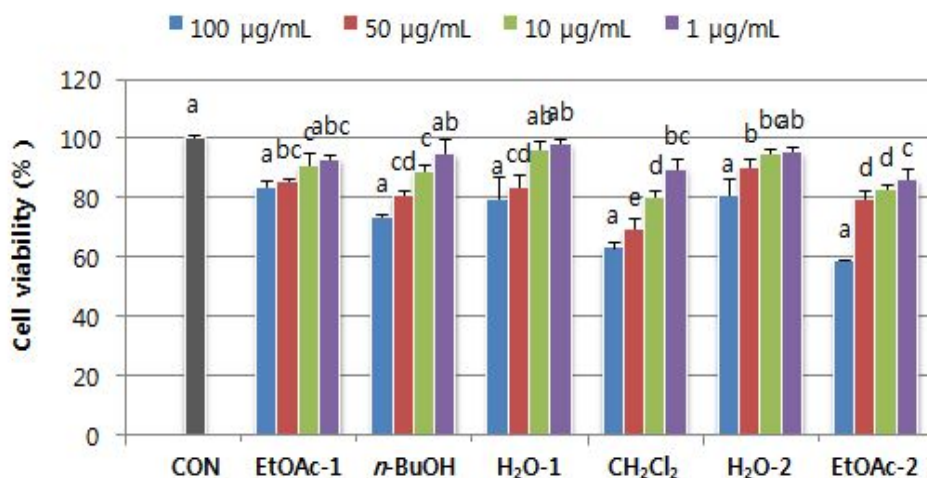
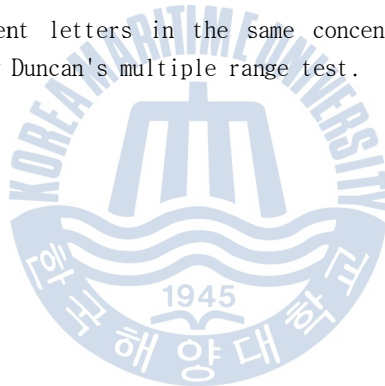


Fig. 34. Effects of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on cell viability of MCF-7 cells.

^{a-e} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



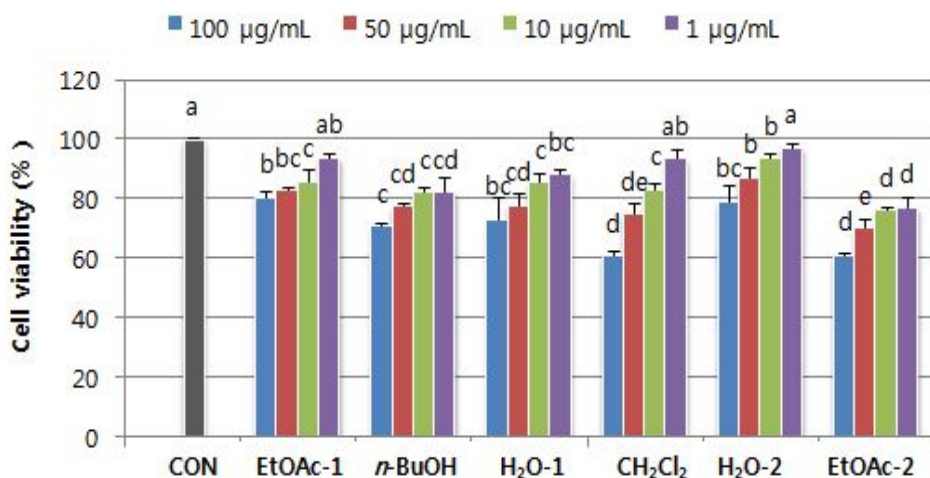


Fig. 35. Effects of crude extract and its solvent fractions of *Bacillus idriensis* on cell viability of HT-29 cells.

^{a-e} Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



4. 요약 및 결론

홍게로도 불리는 붉은 대게는 단순 가공을 통해 대게살과 대게살을 이용한 가공품의 형태로 우리나라를 뿐만 아니라 다른 여러 나라에서 소비되어지고 있으며, 그 소비량은 계속해서 증가하고 있다. 이에 따라, 부산물인 게껍질의 양도 증가하게 되었고 이것의 처리는 커다란 과제로 남게 되었다. 버려지는 게의 껍질에는 고분자 다당류인 chitin이 다량 포함되어 있기 때문에, 게껍질에서 chitin을 분리하여 원료로 활용하면 높은 경제적 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서는 chitin을 분해하여 성장 할 수 있는 미생물을 전통수산물효식품인 젓갈에서 분리하여 그들의 생리활성을 검색하고 미생물이 생산하는 이차대사산물을 분리하여 활용 가능성을 검토하였다.

시중에 유통중인 젓갈을 구입하고 회석하여 도말하여 성장을 확인 한 뒤, EtOH에 녹인 DPPH 용액을 탈색시키는 미생물의 집락을 1차 선별하였다. 1차 선별한 미생물들을 액체배양하여 그 배양액으로 향산화 활성을 측정하여 2차로 44종의 미생물을 선별하였고, 44종의 선별 미생물의 액체 배양액을 EtOAc로 추출하여 그 농축액을 사용하여 생리활성을 검색하였다. 또한, 수산가공폐기물인 홍게의 껍질을 구입하여 환경오염을 야기시키는 강산과 강알칼리는 사용하는 종래의 방법을 대신하여 약산인 젓산 등을 사용하여 chitin을 제조하였고, 이를 colloidal 형태로 만들어 키틴분해 미생물 선별 배지에 사용하였다. colloidal chitin 고체 배지에서 clear zone을 형성하고, 자라는 속도가 빠르며 높은 향산화 능을 가지는 균주인 CGH18을 선별하였으며 동정한 결과 CGH18은 *Bacillus idriensis*로 판명되었다.

*Bacillus idriensis*의 최적 배양 조건인 pH7의 액체배지에서 25℃로 48시간 동안 배양한 배양액에 동량의 EtOAc를 넣어 조추출물을 얻었으며, 이를 분획하여 총 4개의 *n*-BuOH, H₂O-1, CH₂Cl₂, H₂O-2 fraction을 얻었다. 또한, colloidal chitin을 넣어 배양한 배양액에 동량의 EtOAc를 넣어 EtOAc-2 조추

출물을 얻었다. 이들에 대한 ROS 소거 활성을 측정한 결과 CH_2Cl_2 분획물과 EtOAc-2 추출물이 가장 높은 소거 활성을 보였기에 높은 항산화 능을 보이는 물질이 있을것이라 사료되었다. 하지만 EtOAc-2 추출물은 미생물의 성장 속도가 다소 느려서 Marine agar를 이용하여 배양한 추출액으로부터 물질분리를 시도하였다. 이미 앞에서 언급한 것처럼 균체와 배양액의 EtOAc 추출물을 H_2O 와 $n\text{-BuOH}$ 로 분획한 뒤, 각각의 분획물을 농축하였다. 이렇게 농축한 $n\text{-BuOH}$ 은 H_2O 와 CH_2Cl_2 로 재분획하여 각각의 분획물을 얻었다. 이렇게 얻어진 CH_2Cl_2 분획물을 silica prep. TLC를 통해 여러 개의 subfraction을 얻었으며, 그 중 하나를 reverse-phased HPLC 실시하여 compound 1-2를 분리하였다.

세포수준의 항산화 활성을 통하여 조추출물과 대부분의 분획물들이 ROS와 다른 항산화 활성 실험에 대하여 높은 소거 활성을 나타내었기에 *Bacillus idrensis*의 추출물과 분획물을 이용하여 우수한 항산화제를 개발 할 수 있을 것으로 보이며, 또한 CH_2Cl_2 분획물에서 분리한 compounds 1-2는 추출물과 분획물보다 더 높은 항산화 활성을 가질 것으로 기대 된다.

또한, 대부분의 활성 실험에서 가장 높은 활성을 나타낸 EtOAc-2 추출물은 추후에 colloidal chitin의 배지 함유량과 배지 조성에 따른 균의 성장 속도를 규명하여 그들의 최적 배양 조건을 탐색하고, 그를 이용하여 대량 배양 후 이차대사산물을 분리, 구조 결정을 함으로써 colloidal chitin의 유무에 따른 이차대사산물의 차이와 활성의 차이에 대하여 규명해 보는 추가 연구가 필요할 것으로 여겨 진다.

5. 참고문헌

- 강릉원주대학교산학협력단. 명란젓을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 고지혈증 및 동맥경화성 혈관계 질환의 예방 및 치료용 조성물. KO. 101027586 (2011).
- 김동수, 김영명, 조진호. 전통젓갈 유래 저분자 peptide의 항산화 작용화 항혈액응고 작용. *한국어업기술학회지*, 119-120 (2003).
- 김미정. Antioxidative effect by *bacillus* sp. MJ-149 isolated from fermented anchovy 경성대 대학원 석사학위논문 (1998).
- 김은영, 김동균, 김유리, 최선영, 공인수. 세포외 Protease를 생산하는 내염성 *Bacillus* sp. SJ-10 균주의 분리 동정 및 효소 특성 *The Korean journal of microbiology* 45, 193-199 (2009).
- 김현욱, 이나경, 최신양. 젓갈 유래 프로바이오틱스의 항산화 및 콜레스테롤 저하 효과. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 생물공학의 동향(XII), 697-700 (2003).
- 양웅석, 김광혁, 정영기. 전통발효 식품 멸치 젓갈로부터 새로운 혈전용해효소의 정제와 항암효과. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 29 (2000).
- 전봉근. Characterization of Antibacterial and Biosurfactant Substance Produced by *Bacillus vallismortis* BK6 Isolated from Jeot-kal 제주대학교 석사논문 (2009).
- 차성광, 김주령, 박선정, 한국식품연구원. 장류와 젓갈류로부터 건강 기능활성 미생물의 분리. *The Korean Society of Food Science and Nutrition* 10, 277-277 (2008).
- 최호성. (A)functional roles of a Chitinase to Control Phytopathogenic

- Fungi by Soil-borne Bacterium that Produces a Chitin Degradation Enzyme 전남대학교 대학원 석사학위논문 (2009).
- 하나코스, 주. Method of extracting and refining an anti-oxidizing agent from the *Solanum nigrum* L and method of producing cosmetics using the same. KO. 1020050078136 (2007).
- Beda N., Nedospasov A. A. spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide* **13**, 93-97 (2005).
- Blois M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **25**, (1958).
- Caillet S., Cote J., Doyon G., Sylvain J. F., Lacroix M. Antioxidant and antiradical properties of cranberry juice and extracts. *Food research international* **44**, 1408-1413 (2011).
- Cho H. J., Hwang S. K., Lee K. C., Lee H. S., Kim P. G. Preparation and characterizations of various chitosan from chitin. *Journal of Food Hygiene and Safety* **13**, 34-40 (1998).
- Eom S. H. , Lee B. J., Kim Y. M. Effect of Yeast Fermentation on the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Sea Tangle Water Extract. *Korean journal of fisheries and aquatic sciences* **43**, 117-124 (2010).
- Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts:: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189-198 (1968).
- Herron G. S., Banda M.J., Clark E.J., Gavrilovic J., Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 2814 (1986).

- Jang J. R., Choi. H. J., Kim K. K., Lim S. Y. Effect of Extracts from Dried Mackerel on Antioxidant Activity and Inhibition of Growth of Human Cancer Cell Line. *Journal of life science* **18**, 680-685 (2008).
- Kim Y. S., Nam H. G., Shin H. J., Na M. S., Kim M. H., Lee C. W., Kim J. S., Piao Y. L., Cha W. S. Effect of Hot Water Extract of *Undaria pinnatifida* on the Activities of Antioxidant and Nitrite Scavenging. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* **28**, 151-158 (2011).
- 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. Anti-Allergic Inflammatory Effect of Bacteria Isolated from Fermented Soybean and Jeotgal on Human Mast Cell Line (HMC-1). *Journal of Life Science* **21**, 393-399 (2011).
- Kooy N. W., Royall J. A., Ischiropoulos H., Beckman J. S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine* **16**, 149-156 (1994).
- Lee S. H., Kim W. S., Kim K. Y., Kim T. H., Whangbo H., Jung W. J., Chung S. J. Effect of Chitin Compost Incorporated with Chitinolytic Bacteria and Rice Bran on Chemical Properties and Microbial Community in Pear Orchard Soil. *JOURNAL OF THE KOREAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE* **44**, 133-270 (2003).
- Lee S. J. , Ha W. H., Choi H. J. , Cho S. Y., Choi J. W. Hepatic Detoxification and Antioxidant Activity in Sea-urchin Roe and Ethanol Extract of Roe. *Korean journal of fisheries and aquatic sciences* **43**, 428-436 (2010).
- Liu Q., Zhang Y. J., Yang C. R. Phenolic antioxidants from green tea

- produced from *Camellia crassicolumna* Var. multiplex. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**, 589–590 (2009).
- Milne L., Nicotera P., Orrenius S., Burkitt M. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **304**, 102–109 (1993).
- Okimotoa Y., Watanabae A., Nikia E, Yamashitab T., Noguchia N. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* **474**, 13–14 (2000).
- Park J. K., Cho Y. U., Choi Y. J., Jeoung Y. K., Gal A. W. Antitumor activity of *Bacillus subtilis* SW-1 isolated from Jeotgal. *Journal of life science* **14**, 815–820 (2004).
- Poot M., Verkerk A., Koster J. F., Jongkind J. F. De novo synthesis of glutathione in human fibroblasts during in vitro ageing and in some metabolic diseases as measured by a flow cytometric method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects* **883**, 580–584 (1986).
- Pukalskas A., Venskutonis P. R., Salido S. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania *Food chemistry* **130**, 695–701 (2012).
- Kim S. B., Park T. K. Isolation and characterization of chitin from crab shell. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering (Korea Republic)* **9**, 174–179 (1994).
- Wang S. L., Lin H. T., Liang T. W., Chen Y. J., Yen Y. H., Guo S. P. Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *Bioresource technology* **99**, 4386–4393 (2008).

- Wang, S. L., Lin T. Y., Yen Y. H., Liao H. F., Chen Y. J. Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate research* **341**, 2507-2515 (2006).
- Watanabe M., Musumib K., Ayugasea J. Carotenoid pigment composition, polyphenol content, and antioxidant activities of extracts from orange-colored Chinese cabbage. *LWT - Food Science and Technology* **44**, 1971-1975 (2011).
- Wiwat C., Siwayaprahm P., Bhumiratana A. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1. *Current microbiology* **39**, 134-140 (1999).
- Xiao K. J., Zhong. X. K., Wang J. Extraction of brown pigment from *Rosa laevigata* and its antioxidant activities *Pharmaceutical biology* **49**, 734-740 (2011).
- Yoon J. H. , Lee C. H., Oh T. K. *Bacillus cibi* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 733-736 (2005a).
- Yoon S. H., Kin 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. Isolation and Characterization of Three Kinds of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* JKK238 from Jeot-Kal of Korean Traditional Fermented Fishes. *Korean journal of microbiology and biotechnology* **33**, 295-301 (2005b).

6. 부록

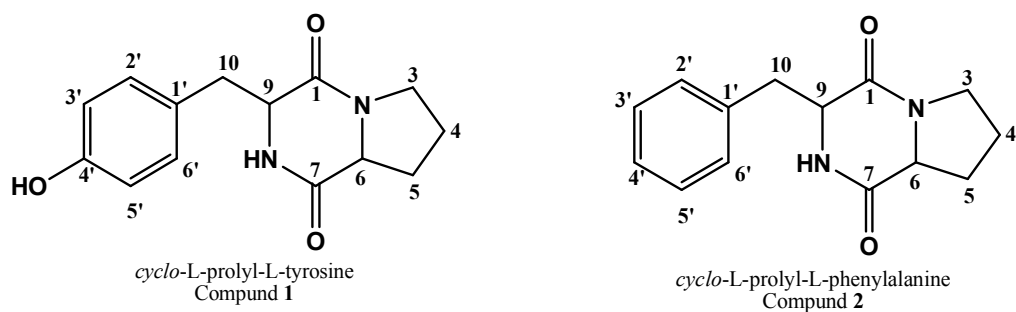


Fig. 36. Chemical structure of compounds 1-2 from *B.idriensis*



< 감사의 글 >

저라는 사람의 잔 속에 지식이라는 물을 채우기 위하여 대학원에 진학한지 벌써 2년이란 시간이 지났습니다. 누군가에겐 긴 시간이었을 지난 2년이 저에게 있어서는 매우 짧고 금방 지나간 시간 같기에 아쉬움이 많이 남습니다.

제일 먼저 이 논문이 나올 수 있도록 저를 지도해주신 서영완 교수님께 감사를 드립니다. 교수님의 가르침이 있었기에 부족하나마 이정도의 논문이 나올 수 있었습니다. 그리고 논문 심사를 해 주신 임선영 교수님과 이범중 교수님도 감사드립니다.

실험실에서 사랑과 마음을 담아 저를 보듬어 주시고 자신의 논문을 작성하느라 바쁠때에도 친절하게 모르는 것을 알려주신 정임언니, 제가 하지 못한 작은 부분을 챙겨주던 주완이, 실험실의 마스코트 호준이, 듄직한 명국이 모두모두 감사드립니다.

그리고 매번 찾아가서 귀찮게 하고 뜯금없이 부탁 드려도 흔쾌히 받아주시는 유아언니, 형설수설 정리되지 못한 제 고민을 말해도 알아듣고 조언해주시는 진혁오빠, 항상 밝은 모습을 보여주시며 제 걱정을 많이 해주시는 해진언니, 언제나 제게 많은 도움을 주시는 영란언니, 유쾌하고 밝은 웃음을 보여주시는 주리언니, 제가 챙기지 못하는 학교의 일들을 챙겨주시는 형주언니 이 모든 분들에게 감사를 드립니다.

학교를 같이 다니면서 저의 하소연을 들어주고 위로해주던 성혜, 지금은 다른 곳에 떨어져 있지만 마음만은 가까운 필애, 화선이 모두모두 고맙습니다. 무엇보다도 항상 저를 믿고 든든한 버팀목이 되어주시는 우리 가족들 너무너무 사랑합니다.

이제 사회인이 되어가는 저와 제가 감사의 마음을 드리는 모든 분들의 앞날에 항상 기쁘고 좋은 일만 가득하기를 빌겠습니다.