J. Fd Hyg. Safety 13(1), 6 - 13(1998)

해양에서 분리한 *Bacillus* sp. RH-5에 의한 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)산화에 대한 항산화 활성

류병호† · 정진웅 · 김동석 · 박종옥*

*경성대학교 식품공학과, *화학과*

Antioxidative Activity Against Oxidation of Human Low Density Lipoprotein (LDL) by *Bacillus* sp. RH-5 Isolated from Marine Origin

Beung Ho Ryu†, Jin Woong Jeung, Dong Suck Kim and Jong Ok Park*

Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

**Dept. of Chemistry, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea*

ABSTRACT—This study was carried out to investigate the antioxidative activity on oxidaton of human low density lipoprotein from marine microorganisms. *Bacillus* sp. RH-5 producing antioxidative activity have been isolated and identified from coast sea in Pusan. *Bacillus* sp. RH-5 produced at highest level of antioxidative activity in the medium of 1.0% glucose, 0.25% polypepton, 0.25% yeast extract, 0.01% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ and 50% sea water. The optimal medium pH, cultural temperature and shaking time for the highest production as the antioxidant were 7.0, 30°C and 48 hr, respectively. The culture broth inhibited the copper catalyzed oxidation of human low density lipoprotein (LDL) at the concentration of 500 and 1,000 μg/ml ethylacetate extracts in the presence of 5 μM $CuSO_4$. The electrophoretic mobility of the LDL oxidized in the presense of 5 μM $CuSO_4$ was higher than that of native LDL.

Key words □ Antioxidant, *Bacillus* sp., marine origin

우리가 생활하고 있는 지구는 지금으로부터 약 35억년전 최초로 탄생된 미분화된 원시 생명체가 해양의 환경 보호 속에 생명 활동을 하면서 오늘날 많은 종류의 해양 미생물에서부터 거대생물에 이르기까지 다종다양하게 분화된 생물로 살아가고 있다. 바다는 지구면적의 약 2/3로서 해양환경이 육상에 비하여 매우 광활하여 열대 및 아열대 해역 생물은 대단히 고밀도로 서식되어 있으며 그 생물자원이 다양하고 풍부하게 존재하고 있다.[1,2] 특히 해양생물들은 육상에 비하여 복잡한 생태계를 형성하고 있어 공생과 방어를 위한 유인 또는 기피물질등 새로운 구조를 가진 대사물질이나 화학물질등이 육상에 비하여 다양한 성분이 형성되기 때문에 신물질의 개발 가능성을 제시해 주고 있다.[3-5]

지금까지의 해양생물을 포함한 이 분야의 연구는 육상의 생물연구에 가리워져 어류나 조류에서 식량공급과 약간의 의약품 개발에 관한 부분적인 연구가 진행되었으나 최근 해양생물의 특이성에 착안하여 새로운 생리 활성물질을 탐색하기 위한 목적으로 활발한 연구를 수행하고 있는 추세이다. 해양생물에 관한 연구로서 해양생물로부터 항암작용[5-8] 및 항 virus성 작용[9]에 대한 연구가 있으며 특히 해양 미생물에서 2차대사 산물로 항생물질, 용균효소, oligo당, 항 혈액 응고작용 및 항산화작용 등이 있는 생리활성물질이 보고 되고 있다.[2,4,10]

한편 성인병의 하나인 동맥경화의 원인 중 하나는 Oxidized Low Density Lipoprotein(Oxid LDL)이 혈관벽에 쌓이므로써 발병한다고 규명되었다.[11] LDL은 혈장에 있는 cholesterol의 중요한 운반체로서 cholesterol 함량의 약 75%가 cholesteryl esters형태로 대사되고 LDL이 산화되어 Oxid LDL로 되어 동맥벽에 거품세포(foam cells)를 형성하며,[12] 이들 혈관에 cholesteryl esters를 운반하는 역할을 담당하게 된다.[13,14] Macrophage를 이용한 실험에서도 Oxid LDL은 monocytes와 macrophage의 소거수용체 경로(scavenger receptor pathway)를 통하여 cholesteryl esters로서 동맥벽에

†Author to whom correspondence should be addressed.

축적하게 된다.[14] LDL은 *in vitro*에서 macrophages,[15] 동물의 내피세포,[16] 평활근 세포[17] 및 금속이온[18]의 존재하에서도 Oxid LDL로 유도된다. Oxid LDL은 높은 세포 독성이 있는 aldehyde 등 지질의 과산화물을 함유하고 있고, 세포 조직에 확산되어 독성을 나타내며, 내피세포에 염증을 일으키고 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다.[12] 따라서 동맥경화의 원인을 예방하기 위해서는 LDL의 산화를 방지하는 항산화제를 섭취하지 않으면 안된다.

이와 같이 동맥경화를 일으키는 Oxid LDL를 억제하는 천연 항산화제로는 α-tocopherol, β-carotene, lycopene, cryptoxanthin, phytofluene, retinoides 및 ubiquinol 등이 있으며, 또한 식물에 존재하는 flavonoid 및 그 유도체도 강한 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있다.[19-22]

수산물로부터의 항산화제에 대한 연구로는 일본의 경우 1980년대 해안에 생육하는 21종의 해조류등에서 항산화력이 있는 phospholipids를 분리하였고[23] 또 36종의 해조류중 *Rhodomela*속과 *Polysiphonia*속에서 5-bromo 3,4-hydroxybenzaldehyde라는 활성이 뛰어난 새로운 항산화제를 분리하였다.[23] 우리나라에서는 수산자원의 항산화제 연구는 동해안연안에서 생산되는 톳, 다시마, 미역 등 12종류의 해조류를 채취하여 항산화성 물질을 동정한 바 있고[24] 오징어먹즙, 불가사리, 성게 껍질, 우렁쉥이 껍질 및 비식용 해조류를 연구하였고, 또 파래, 고리메, 다시마, 넓미역, 방사무늬김 및 둥우리서실 등 12종의 식용해조류에서 천연 항산화제의 연구가 진행되어 왔다.[25] 그러나 해양미생물로부터 LDL의 수식에 대한 항산화 효과에 대한 연구는 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구는 부산 인근 연안에서 채취한 해수(海水)에서 분리한 세균으로부터 항산화활성이 우수한 균주를 검색한 다음 동맥경화의 원인이 되는 LDL의 산화를 억제하는 항산화활성이 우수한 균주를 선별하여 이를 분리 동정하고 생육조건 및 항산화 활성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 실험방법

재료

미생물—항산화 물질을 생산하는 균주를 분리하기 위하여 부산연안의 해수로부터 분리하였다.

배지 및 시약—본 실험에 사용한 배지는 Polypeptone 0.25 %, yeast extract 0.25%, glucose 5.0%, K_2HPO_4 0.1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02%, $MgSO_4$ 0.01 %, Sea water 50%(pH 7.0)을 사용하였다. 배지 시약은 Difco 제품을 구입하였으며, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), linoleic acid는 Sigma Co. 제품을, ammonium thiocyanate는 Junsei chemical Co. 제품을, 그 외는 특급시약을 사용하였다.

실험방법

항산화물질 생산균주의 분리 및 선정—해수 약 5~10 m*l*를 100 m*l*용 삼각플라스크에 넣고 현탁액을 10^{-4}~10^{-6} m*l*의 농도로 희석하여 평판배지에 도말한 후 30°C에서 24시간 배양한 다음 생성된 colonies상에 멸균이 된 여과지를 평판배지에 놓고 배지에 있는 균과 대사산물이 옮겨 지도록 24시간 방치하였다. 이때 여과지에 DPPH를 분무해 자주색에서 무색으로 탈색되는 균주 9여종을 1차 선별하였다.[26]

항산화 생산균주의 특성

형태학적 특성—선정된 균주의 세포형태와 집락의 특징은 *A Laboratory Manual*[27]과 *Mannal of Methods for General Bacteriology*[28]에 따라 면역혈청 한천배지와 Nutrient agar배지상에서 30°C에서 24시간 배양한 후 용혈성 유무와 colony의 형태 및 표면의 특징을 관찰하였다. 세포의 협막은 India ink[29]법으로 확인하였고, 편모의 염색을 Leifson변법[30]을 사용하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 transmission electron microscopy(TEM), JEOL 1200 EX-II(일본)를 이용하여 형태학적 특징을 검토하였다.

분리균의 동정 및 분류—생화학적 성질 및 자화성은 기존의 방법인 *Biochemical tests for identification of medical bacteria*[30] 및 *Manual for the identification of medical bacteria*[31]와 Sneath가 제시한 방법[32]으로 실시하였다. 또한 *Bacillus* sp.의 동정에 상품화된 kit인 ATB 50CHB와 API 20E (API Bio Merieux Co.)를 kit system에 따라 조작하여 판독하였다.

선정균주의 배양조건

항산화 물질의 생산성을 높이기 위하여 배양시간, 온도, pH, 탄소원 및 질소원 등의 영향을 조사하였다.

고체배지에 선별된 분리주를 30°C에서 24시간 진탕배양한 균액 1%(v/v)를 본 배양용 배지 100 m*l* 들어있는 300 m*l* 진탕 플라스크에 접종하여 30°C에서 5일 동안 진탕배양하면서 균의 증식과 항산화 활성을 측정하였다.

항산화 활성 측정

미생물이 생산한 항산화 물질의 활성 측정은 thiocyanate method에 의해 측정하였다.[33] 농축한 항산화성 물질은 ethanol에 용해하여 두고 effendorf tube에 200 μ*l* 넣은 다음 이미 조제한 400 μ*l* phosphate buffer, 200 μ*l* distilled water, 200 μ*l* linoleic acid solution과 함께 넣어 섞은 다음 어두운 곳에 40°C를 유지하며 2시간 동안 반응시켰다. 반응액 100 μ*l*를 100 μ*l* NH_4SCN solution, 100 μ*l* ferrous chloride reagent와 함께 75% ethanol(3 m*l*)에 섞고 5분 뒤 490 nm에

서 흡광도를 읽어 활성을 측정하였다.

LDL의 Cu^{2+}에 의한 산화

Human LDL의 분리—건강한 남자의 혈액 50 m*l*을 1 mg/m*l* EDTA을 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4°C에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분 동안 원심분리(2000×g)한 다음 gentamycin sulfate(1 mg/25 m*l*)을 첨가하였다. LDL(d. 1.019~1.063 g/m*l*)은 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간 동안 분리하여 얻었다. 분리된 LDL은 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 로서 16~20시간 투석하였다.[34]

Copper mediated 산화—LDL(100 μg/m*l*)를 1~5 μM $CuSO_4$를 함유한 phosphate buffer saline(PBS)에 적당한 농도의 항산화 활성물질을 첨가하여 37°C에서 24시간 배양하여 LDL의 산화를 측정하였다.[19] 별도로 대조군은 이 배양액에 시료를 첨가하지 않은 조건에서 배양한 후 실험하였다.

Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정

LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. 100 μg protein/m*l* LDL이 함유된 배양 혼합액 0.5 m*l*에 20% TCA 1.5 m*l*를 가한 다음 여기에 0.05 M NaOH에 0.67% TBA 1.5 m*l*을 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90°C 수욕상에서 45분간 끓였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000×g)한 다음 상등액의 형광을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer(Model 650-10S)로서 510 및 553 nm에서 측정하였다.[35] 시료 중의 TBARS의 수는 malonaldehyde(MDA)로서 만들어진 MDA의 표준곡선으로 부터 MDA의 nmole로서 나타내었다.

LDL의 gel electrophoresis

LDL의 전기영동은 Nile red를 혼합한 LDL를 barbital buffer, pH 8.6으로 만든 agarose gel로써 75 V에서 20분 동안 전개하였다. 이를 UV lamp로서 확인하였다.[36]

단백질의 정량—LDL의 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[36]에 따라 측정하였다.[37]

결과 및 고찰

항산화 물질 생산 미생물의 분리 및 선정

해양 미생물로부터 항산화 물질을 생산하는 균주를 분리하기 위해 부산 연안의 해수를 분리용 고체배지에 도말한 후 수십종의 균주를 얻었다. 이들 균주를 액체배지로 배양한 다음 ethyl acetate로서 추출하여 얻은 농축물로서 DPPH 반응으로 확인하여 균주 9종을 1차 선별하고, thiocyanate test법[33]으로 가장 활성이 좋은 균주 1종을 최종 선발하였다. 선발된 균주를 RH-5로 잠정적으로 명명한 후 본 실험의 항산화제 생산균주로 선정하고 평판배지에 계대배양하면서 본 실험에 사용하였다.

선정균주의 균학적 특성

형태학적 특성—선별된 RH-5균주는 면역혈청 한천배지상에서의 용혈성은 인식되지 않았으며, nutrient agar plate상에서 배양하여 colony의 특성에 대하여 조사한 결과는 Table 1와 같다.

선별된 RH-5 균주를 Finley와 Fields 의 배지[38]상에서 접종하여 30°C에서 배양하면서 현미경으로 형태적 특성을 관찰한 결과 gram 양성의 내아포를 형성하는 간균으로 나타났으며, 편모염색 결과 주모성 편모를 가지고 있고 India ink법[29]으로 협막 염색을 한 결과 협막이 없는 것으로 나타났다. 한편 본 균주의 spore의 위치는 paracentral로 나타나, spore의 형태에 근거한 Gordon 등[39]의 morphological group에서 *Bacllus* sp.에 속함을 추측할 수 있다. 한편 항산화 활성 생산 분리 균주인 RH-5의 전자현미경 사진으로 cell wall의 두께가 2~3 nm로 나타나 gram 양성균임을 알 수 있었다.

Strain RH-5의 동정

본 분리균주는 앞에서 전술한 바와 같이 gram양성의 내아포를 형성하는 호기성 간균으로 편모염색 결과 주모성 편모를 가지고 있었으며 또한 spore의 모양은 ellipsoidal로 나타났다. 이와 같은 성상을 나타내는 균종은 Cowan & Steel[31]에 의하여 검색한 바 *Bacillus* sp.에 속하는 것으로 동정할 수 있었으며 Gordon 등[39]에 의한 morphological group I(*B. megaterium, B. cereus group, B. licheniformis, B. subtilis, B. pumilus, B. firmus, B. coagulans*)에 속함을 추측할 수 있다. 또 분리균주와 대조균주에 대한 API system의 항목과 convertional 방법에서의 생화학적 특성을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. 본 분리균주는 12% NaCl이 함유된 배지에서도 생육하였으며 생육온도는 50°C까지 생육하는 호기성 균주였으며 가수분해활성에 있어서는 starch, glycogen, casein 등을 분해하였고 catalase, oxidase 등을 생산하였으나 urease, indole, gelatinase 등은 negative의 특성을 나타내었다.

한편 type strain인 *Bacillus subtilis*와는 달리 D-xylose, sorbitol 및 D-turanose분해능이 없었으며 acetate이용능 등이 없어 다소의 상반되는 결과를 보여주고 있었다. 이상과 같이 *Bacillus* sp.에 대한 공통적인 생화학적 검사결과는 본

Table 1. Morphological and Biochemical, Chararcteristics of strain RH-5 isolated from sea water

Test	RH-5	Test	RH-5
Morphological charateristics		L-Xylose	−
Gram stain	Positive	Adonitol (ADO)	−
Shape of cell	Rod	β-Methylxyloside (MDX)	−
Width of cell (mm)	0.8	Galactose (GAL)	−
Length of cell (μm)	2.8	D-Glucose (GLU)	+
Spore shape	Ellipsoidal	D-Fructose (FRU)	+
Spore position	Paracentral	D-Mannose (MNE)	−
Motility	Motile	L-Sorbose (SBE)	−
Anaerobic growth		Rhamnose (RHA)	−
Gas from glucose	−	Dulcitol (DUL)	−
Catalase	+	Inositol (INO)	−
Oxidase	+	Sorbitol (SOR)	−
Egg-yolk lecithinase	−	Cellobiose (CEL)	−
Hydrolysis of starch	+	Maltose (MAL)	+
Hydrolysis of glycogen	+	Lactose (LAC)	−
Hydrolysis of casein	+	Melibiose (MEL)	−
Growth at pH 6.8, nutrient broth	+	Sucrose (SAC)	−
Inulin (INU)	−	Trehalose (TRE)	+
Indole	−	Urease	−
Gelatinase	−	Melezitose (MLZ)	−
Growth in NaCl 2%	+	D-Raffinose (RAF)	−
Growth in NaCl 8%	+	Starch (AMD)	+
Growth in NaCl 10%	+	Xylitol (XLT)	−
Growth in NaCl 12%	+	D-Turanose (TUR)	−
Biochemical properties		D-Xyxose (LYX)	−
Glycerol (GLY)	−	D-Tagatose (TAG)	−
Erythritol (ERY)	−	D-Fucose (DFUC)	−
D-Arabinose (DARA)		D-Turanose (TUR)	−
L-Arabinose		D-Fucose (LFUC)	−
Ribose (RIB)		D-Arabitol (DARL)	−
D-Xylose		L-Arabitol (LARL)	−

실험에서 분리 동정한 균주인 RH-5를 편의상 *Bacillus* sp. RH-5로 잠정적으로 명명하였다.

항산화물질 생산을 위한 배양조건

각종 배지의 성분, 금속이온, pH 및 온도 등의 배양 조건은 2차대사 산물의 생산에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 각 조건 하나 하나에 대한 종류별 또는 농도별로 모두 조사한다는 것이 어렵기 때문에 이미 보고되어진 *Bacillus* sp.의 생육에 필요한 공통적인 배지조성(polypeptone 5.0 g, yeast extract 5.0 g, glucose 5.0 g, K_2HPO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 g, NaCl 0.02 g, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g/*l*, pH 7.0)을 선정한 후 *Bacillus* sp.에 의한 항산화 물질의 생산을 위한 배양조건을 검토하였다.

배양시간의 영향

배양시간이 *Bacillus* sp. RH-5이 생육도와 항산화 물질의 생산을 검토하기 위하여 액체배지에 종배양액을 1%(v/v)로 접종하여 30°C에서 5일간 진탕배양하면서 균의 생육도와 항산화 활성을 측정한 결과 Fig. 1와 같이 균의 생육도는 48시간에서 높게 나타났으며 항산화 활성은 배양 48시간에서 최고인 것으로 나타났다.

배양온도의 영향

Bacillus sp. RH-5균주의 배양온도에 따른 생육도와 항산화 생산의 영향을 검토하기 위하여 액체배지에 종배양액을 1%(v/v) 접종하여 25°C～35°C로 배양온도를 변화시키면서 48시간 동안 진탕배양한 후 항산화 활성을 측정해 본 결과 Fig. 2에 나타내었다. 생육온도 범위는 25°C～35°C의 범위에서 생육하였으나 30°C 부근에서 균의 생육도 및 항산화 활성도가 높게 나타났다.

Initial pH의 영향

Bacillus sp. RH-5의 생육도와 항산화물질 생산에 적합한

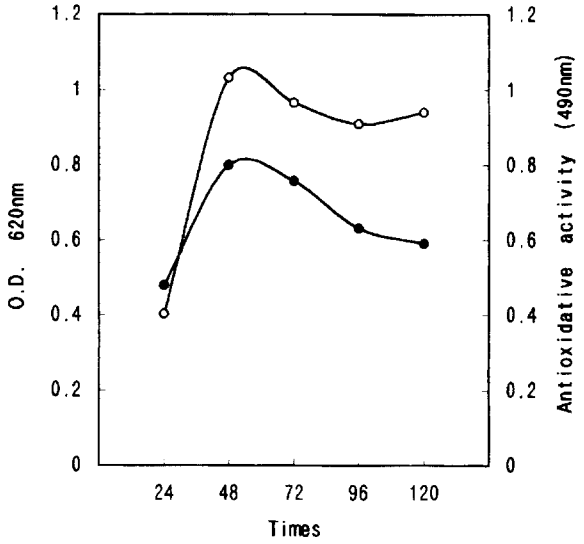

Fig. 1. Effect of cultivation times on the growth and antioxideative effect of strain RS-5 cultured in liquid medium at 30°C for 5 days.
●-●: cell growth, ○-○: Antioxidative activity.

initial pH의 영향을 검토하기 위하여 액체배지를 0.5 M NaOH 또는 0.5 M HCl로 pH를 조정하고 종배양액을 각각 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 균의 생육도와 활성을 측정한 결과 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 이 균은 pH 7.0~8.0의 영역에서 높은 생육도를 나타내었으며 pH 7.0에서 가장 높은 생육도와 항산화 활성을 나타내었다.

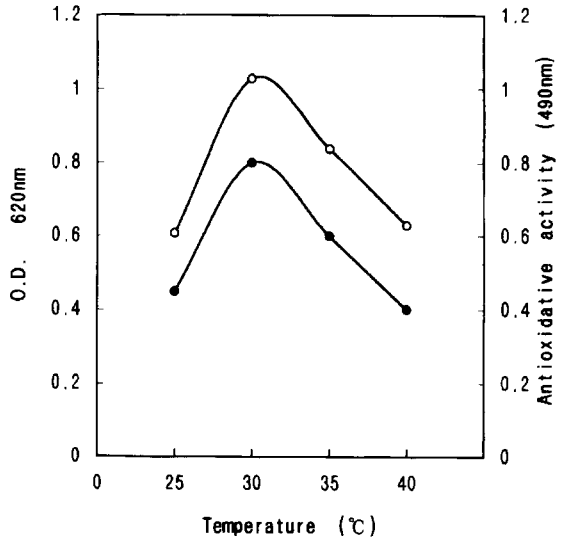

Fig. 2. Effect of temperatures on the growth and antioxidative effect of strain Rs-5 cultured in liquid medium at 30°C for 48 hours.
●-●: cell growth, ○-○: Antioxidative activity (%).

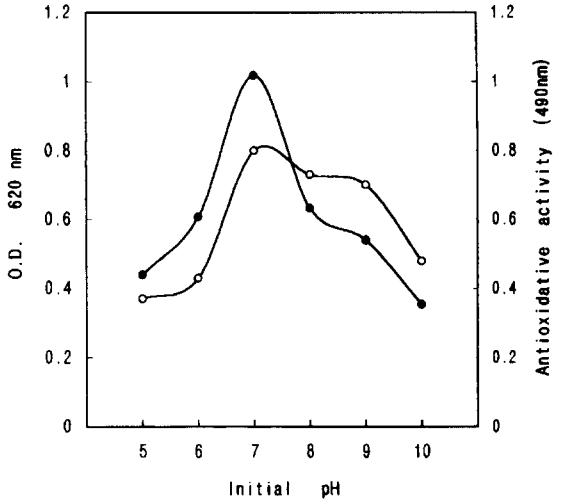

Fig. 3. Effect of initial pH on the growth and antioxidative effect of strain RH-5 cultured in liquid medium at 30°C for 48 hours.
●-●: cell growth, ○-○: Antioxidative activity.

탄소원의 영향

탄소원의 종류에 따라 항산화물질 생산량에 미치는 영향을 검토하였다. 액체배지에 각종 탄소원 1%(v/v)를 첨가하여 30°C에서 48시간 진탕배양한 다음 균의 생육도와 항산화 활성도를 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 glucose, fructose, saccharose 등은 항산화 생산에 비교적 양호한 탄소원으로 나타났다.

질소원의 영향

항산화 생산에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위해 액체배지에 각종 유기 및 무기 질소원을 1%(w/v)씩을 첨가

Table 2. Effect of various carbon sources on the production of antioxidative substances by *Baillus* sp. RH-5 cultured in liquid medium at 30°C for 48 hrs

Carbon sources (1.0%, w/v)	Cell growth (OD, 620 nm)	Relative activity (%)
None	0.920	71.7
L-Arabinose	0.982	77.4
Dextrine	0.94	76.1
Xylose	0.824	72.4
Rhanmose	0.901	73.0
D-Mannose	0.913	70.1
Galactose	0.924	66.2
D-Fructose	1.005	94.0
Saccharose	1.036	94.5
Glucose	1.074	100
Maltose	0.963	80.1
Lactose	0.914	72.3

하여 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 균의 생육도와 항산화 활성을 측정한 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 무기질 소원을 첨가한 배지에서는 균의 생육도가 낮았으며 항산화 활성도 낮았으나 $(NH_4)_2HPO_4$를 첨가한 배지에서는 항산화의 활성이 다소 높게 나타났다.

Table 3. Effect of various nitrogen sources on the antioxidative activity by strain RH-5 cultured in liquid medium at 30°C for 48 hours

Nitrogen sources (1.0%, w/v)	Cell growth (OD, 620 nm)	Relative activity (%)
None	0.099	23.6
Organic nitrogen sources		
Malt extract	0.565	43.3
Peptone	0.891	83.2
Polypeptone	0.985	100
Tryptone	0.975	92.5
Yeast extract	0.951	97.3
Inorganic nitrogen sources		
$NaNO_2$	0.020	7.3
$(NH_4)_2NO_3$	0.172	10.1
$(NH_4)_2HPO_4$	0.879	73.7
KNO_3	0.548	45.5

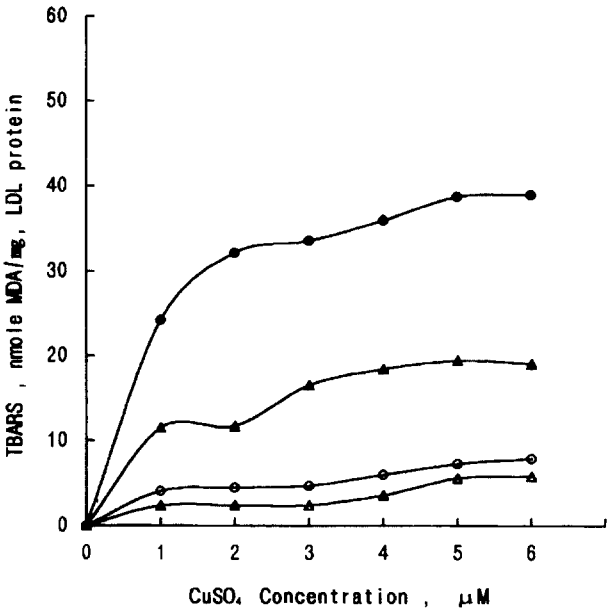

Fig. 4. Effects of ethylacetate extracts of *Bacillus* sp. RH-5 cultivation on the oxidation of LDL by cupric sulfate ●-●: LDL+$CuSO_4$, ▲-▲: LDL+$CuSO_4$+250 μg/m*l* ethylacetate extracts, ○-○: LDL+$CuSO_4$+500 μg/m*l* ethylacetate extracts, △-△: LDL+$CuSO_4$+1000 μg/m*l* ethylacetate extracts, LDL (100 μg protein/m*l*) was incubated for 18h at 37°C in the presence or absence of ethylacetate extracts. Oxidation was initiated by the addition of 1~6 μM $CuSO_4$: The lipoperoxide content was measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and was expressed as nmol malondialdehyde equivalents/mg; Data are the mean of three separate experiments.

Bacillus sp. RH-5 배양액의 추출물의 사람 LDL에 대한 항산화 효과

Bacillus sp. RH-5를 배양 최적 조건에서 48시간 배양한 후 배양액을 여과한 후 여액을 사람 LDL에 대한 항산화 활성을 측정하였다. *Bacillus* sp. RH-5의 배양액을 ethyl acetate로 추출한 후 추출물을 1~6 μM $CuSO_4$의 존재하에서 250, 500 및 1,000 μg/m*l*로 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 항산화 활성을 측정하기 위하여 LDL의 혼합배양액을 37°C에서 18시간 배양한 후 LDL의 산화억제효과는 $CuSO_4$를 1, 2, 3, 4, 5 및 6 μM을 첨가하여 실험한 결과 $CuSO_4$ 함량이 증가할수록 TBARS의 값은 증가하였으며, $CuSO_4$의 농도가 5 및 6 μM일 때 TBARS의 값은 거의 비슷하였다.

본 실험에서 LDL을 $CuSO_4$로 산화 시킨 후 *Bacillus* sp. RH-5의 배양액의 ethylacetate 추출물을 500~1,000 μg/m*l* 첨가하였을 때 항산화 효과가 좋은 것으로 나타나 LDL에 대한 산화 억제 효과가 우수한 것으로 판단되었다.

사람 LDL 및 Oxid LDL의 gel electrophoresis

사람의 혈액중에서 분리한 native LDL, $CuSO_4$ 및 *Bacillus* sp. RH-5의 추출물을 일정 조건하에서 혼합하여

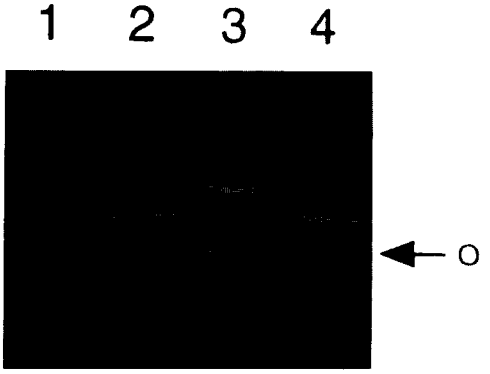

Fig. 5. Agarose gel electerophoresis of native LDL (lane 1), LDL incubated with 5 μM cupper and 500 μg/m*l* ethylacetate extracts of *Bacillus* sp. RH-5 (land 2) . LDL incubated with 5 μM copper(lane 3) and LDL incubated with 5 μM copper and 1,000 μg/m*l* ethylacetate extracts of *Bacillus* sp. RH-5 (land 4). After incubation period, lipoproteins were stained with Nile red (50 μ*l* of LDL added to 4 μg Nile red) and electrophorsed. The lipoproteins were viewed under a UV transilluminator and photographed.

agarose gel electrophoresis를 실시하여 LDL의 이동거리를 비교하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 native LDL를 대조구로 하고 LDL에 5 μM $CuSO_4$의와 배양액 추출물을 첨가하여 전기영동 이동상을 조사한 결과 native LDL과 배양액 추출물을 첨가한 경우에는 이동상이 낮았다. 이와 같이 *Bacillus* sp. RH-5의 배양액의 추출물을 첨가한 경우에는 Oxid LDL보다 이동거리가 낮았으므로 항산화 효과가 있는 것으로 판단된다.

감사의 말씀

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 연구비 지원에 의한 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

국문요약

해양 미생물로부터 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)에 대한 항산화 활성 균주를 검색 하였든 바 부산 인근 연안에서 항산화 활성이 높은 *Bacillus* sp. RH-5를 분리 동정하였다. *Bacillus* sp. RH-5의 항산화 활성물질의 생산 최적 배지는 1.0% glucose, 0.25% polypeptone, 0.25% yeast extract, 0.01% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 50% sea water이였다. 이때 최적 조건은 pH 7.0, 배양 온도는 30°C 및 배양 시간은 48시간에서 항산화 활성이 가장 높았다. 사람 LDL을 1~5 μM $CuSO_4$ 존재하에서 산화 시킨 결과 *Bacillus* sp. RH-5 배양액의 ethyl acetate 추출물의 500 및 1,000 μg/ml에서 산화가 억제되었으며 또 5 μM $CuSO_4$ 존재하에서 산화시킨 LDL의 전기영동거리는 native LDL보다 다소 높았으나 LDL에 ethyl acetate추출물을 첨가한 경우 그 이동거리는 native LDL과 거의 비슷하였다.

참고문헌

1. 內藤敦: 海洋生物, 資源の探索と利用. CMC, シエシ (1986).
2. 官地 遠, 松永是: マリンハイオテクノロシの 展望. 化學と工業, 604-86 (1988).
3. 北天勳編: 海洋天然物化學. 化學 No.111 同人, p. 53 (1988).
4. 西澤一俊: 海藻多糖の 生理作用. 生化學, **61**(7), 605-612 (1989).
5. 西澤一俊: 藻類の 酸性多糖類と その 生理活性. 食品開發, **8**(11), 28-35 (1979).
6. Scheuer, P.J.: Marine natural products. Academic Press (1978).
7. 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호: 파래와 곰피에서 추출한 당단백질의 Sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성. 한국영양식량학회지, **21**(5), 544-559 (1992).
8. 조경자, 이영숙, 류병호: 청각과 김에서 추출한 당 단백질의 Sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역활성. 한국수산학회지, **23**(5), 345-352 (1990).
9 Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushal, M. and Yamamoto, N.: Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor sulfated polysaccharide extracted from sea algae. *Antimicrob. agents and chemeother.*, **31**(10), 1524-1538 (1987).
10. 岡見吉郎: 海洋生物から, 醫藥品ベツセ-シ". 化學と工業, 620-102 (1988).
11. Ross, R.: The Pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990'S. *Nature.*, **362**, 801-809 (1993).
12. Jessup, W., Dean, R.T. and de Whalpt, C.V.: The role of oxidative modification and antioxidants in LDL metabolism and atherosclerosis. in Emerit, I., Parker, L., Auclair, C., eds.. Antioxidant in therapy and preventive medicine, Y. Newyork, plenum, 139 (1990).
13. Roma P., Catapano A.L., Bertulli, S.M., Varesi L., Fumagalli R. and Bernini F.: Oxidized LDL increase free cholesterol and fail to stimulate cholesterol esterification in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res.* **171**, 123-131 (1990).
14. Henriksen, T., Mahoney, E. and Steinberg, D.: Enhanced macrophage degradation of low density lipoportein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* **78**, 6499-6503 (1981).
15. Henriksen, T., Mafoney, E.M., and Steinberg, D.: Enhnced macrophage degradation of biological modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis,* **3**, 149-159 (1983).
16. Morel, D.W., Docorleto, P.E. and Chisolm, G.M.: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Atherosclerosis,* **4**, 357-364 (1984).

17. Steinbrecher U., Parthasarathy, S., Leake D.S., Witztum J.L. and Steinberg D.: Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* **83**, 3883-3887 (1984).
18. Heinecke, J.W., Rosen, H. and Chait, A.: Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J. Clin. Invest.,* **74**, 1890-1894 (1984).
19. Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G. and Rabl, H.: Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann. Med.,* **23**, 573-581 (1991).
20. Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G. and Waeg, G.: Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.,* **53**, 314S-321S (1991).
21. Mao, S.J.T. and Yates, M.T.: Antioxidant activity of probucol and vitamin E(α-tocopherol) in plasma. *Artheriosclerosis* 9, 751 a, 1989(abstract).
22. Kaneda, T. and Ande, H.: Component lipids of purple laver and their antioxygenic activity. *Proc. Int. Seaweed Symp.,* **7**, 553 (1971).
23. Fujimoto, K. and Kaneda, T.: Separation of antioxidant compounds from marine algea. Hydrobiologia, 116(1984).
24. 박재한, 강규찬, 백상봉, 이윤형, 이규순: 식용 해조류에서 항산화물질의 분리. 한국식품과학회지, **23**(3), 261(1994).
25. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이응호: 수산 미이용 자원중에 존재하는 항산화 물질의 검색. 한국식품과학회지, **26**(4), 417-421 (1994).
26. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature,* **4617**, 1198-1221(1958).
27. Laboratory Manual: 2nd ed, the Benjamin/cummings Publishing Company, New York (1987).
28. Gerhardt, Murray, Costilow and Wester: *Manual of Methods for General Bacteriology.* American Societ for Microbiology. New York (1981).
29. Avakyan, A.A., Levina, L.N. and Pavlova, I.B.: Structure and composition of *Bacillus anthracis capsule. J. Bacteriol.,* **90**(4), 1082-1095 (1965).
30. MacFaddin, J.F.: *Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria.* 2nd ed. Baltimore, Williams and Wilkins (1980).
31. Cowan, S.T. and Steel, K.J.: *Manual for the identification of medical bacteria.* 2nd ed., Cambridge University Press (1974).
32. Sneath, P.H.: *Bergey's manual of systeratic bacteriology.* Vol. 2. Baltimore, Williams and Willkins Co., 1104-1138 (1986).
33. Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Iwami, K.: Antioxidative action of indole compounds during the antioxidation of linoleic acid. *Nutrition and Food* (Japan), **19**(3), 60-65 (1966).
34. Havel R.J., Eder, H.A. and Bragdon, J.H: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in guman serum. *J. Clin. Invest.,* **34**, 1345-1353 (1985).
35. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M.: Continous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.* **6**, 67-75 (1989).
36. Greenspan, P. and Gutman, R.L.: Detection by nile red of agarose gel electrophoresed native and modified low density lipoprotein. *Electrophoresis* **14**, 65-68(1993).
37. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* **193**, 265-275 (1951).
38. Finley, N. and Fields, M.L., Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Microbiol.* **10**, 231-236 (1962).
39. Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Pang, C.H.N.: The genus Bacillus Hand book NO. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C (1973).