

碩士學位論文

해양 기원의 *Streptomyces* sp. JR1의
색소 및 항균 특성 연구



濟州大學校 大學院

化學科

李 銀 叔

2005年 2月

碩士學位論文

해양 기원의 *Streptomyces* sp. JR1의
색소 및 항균 특성 연구



濟州大學校 大學院

化學科

李 銀 叔

2005年 2月

해양 기원의 *Streptomyces* sp. JR1의 색소 및 항균 특성 연구

指導教授 李 璿 柱

李 銀 叔

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



2005年 2月

李銀叔의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 鄭 憲 商 印

委 員 朴 根 兌 印

委 員 李 璿 柱 印

濟州大學校 大學院

2005年 2月

Characterization of Pigmentation and Bioactivities of *Streptomyces* sp. JR1

Eun-Suk Lee

(Supervised by Professor Sunjoo Lee)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
NATURAL SCIENCE

2005. 2.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT	i
List of Tables	ii
List of Schemes	ii
List of Figures	iii
I. 서 론	1
II. 실험과정	6
1. 기기 및 재료	6
2. Marin Broth상에서의 <i>Streptomyces</i> sp. JR1 배양	7
3. <i>Streptomyces</i> sp. JR1의 배양	7
1) Marin Broth 2216	7
2) \pm MgCl ₂ broth	8
4. MgCl ₂ 의 가감에 따른 <i>Streptomyces</i> sp. JR1의 생육능 검토	12
5. 초기 pH에 의한 red-brown pigmentation	12
6. 항균 활성	13
1) 사용 균주	13
2) 시료 처리	13
3) 항균 활성 실험	13
7. DPPH법에 의한 항산화 소거 활성	14
8. Melanin 함량 측정	14
9. 세포의 Viability 측정(MTT assay)	15
III. 실험결과 및 고찰	16
1. <i>Streptomyces</i> sp. JR1의 균사와 배지색 변화에 미치는 화합물의 영향	16
2. <i>Streptomyces</i> sp. JR1의 growth rate와 pigmentation의 경시적 변화	18
3. 배양액의 초기 pH에 의한 pigmentation의 변화	20
4. 항균 활성	21

1) Gram 양성 세균에 대한 항균 활성 검색	21
2) Gram 음성 세균에 대한 항균 활성 검색	22
5. DPPH 자유 radical 소거 활성	23
6. 배양 상등액 분획 시료의 melanin 함량	25
7. Cell viability 측정(MTT assay)	28
IV. 결 론	31
V. 참 고 문 헌	34

ABSTRACT

The Actinomycetes are members of the bacterial order Actinomycetales, bacteria which resemble fungi in their branching filamentous structure. However, They are true bacteria-prokaryotic cells-unlike eukaryotic fungal cells. As Actinomycetes grow, they form branching filaments of cells which become a network of strands called a mycelium, similar in appearance to the mycelium of some fungi.

Actinomycetes are the source of several useful antibiotics that used not only in the treatment of various human and animal diseases but also in agriculture as metabolic poisons. At least 70 of the approximately 100 marketed antibiotics used for the treatment of infections in human are derived from substances produces by *Streptomyces* sp..

A marin *Streptomyces* sp. JR1 which produced red-brown pigment was isolated from coastal area in Jeju.

We studied that red-brown pigmentation condition of *Streptomyces* sp. JR1 and antibacterial activities of organic extract of cultured cell and broth.

The optimal pH of medium and fermentation temperature were pH 7.0~7.5 and 27°C, respectively. The presence of magnesium chloride on Marin Broth improved the production of the pigment. The maximum absorption wavelength (λ_{\max})of red-brown pigment was 510 nm.

The organic extract of cultured cell and broth inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, but the inhibitory action was weak compared to the ampicillin. The organic extract of cultured cell and broth inhibited the melanin synthesis of B16F10 melanoma cell.

List of Tables

Table 1. Cell Wall Types of Actinomycetes	2
Table 2. Whole Cell Sugar Patterns of Actinomycete	2
Table 3. Antibiotics produced by <i>Streptomyces</i>	4
Table 4. Chemical dependence of medium color of <i>Streptomyces</i> sp. JR1. ..	16
Table 5. Results of test of antibacterial activity	22
Table 6. DPPH free radical scavenging effects of extracts of Marin Broth	23



Scheme 1. Flow chart for the extraction and separation of Marin Broth ..	8,9
Scheme 2. Flow chart for the extraction and separation of Marin Broth added MgCl ₂	10
Scheme 3. Flow chart for the extraction and separation of Marin Broth removed MgCl ₂	11

List of Figures

Figure 1. <i>Streptomyces</i> sp. JR1 on the agar plate added MgCl ₂ (left) or removed MgCl ₂ (right)	17
Figure 2. <i>Streptomyces</i> sp. JR1 on the added MgCl ₂ (left) or removed MgCl ₂ (right) Broth	17
Figure 3. <i>Streptomyces</i> sp. JR1 growth rate on ±MgCl ₂ broth	18
Figure 4. Time course of pigmentation produced by <i>Streptomyces</i> sp. JR1	19
Figure 5. Difference Visible Spectrum of pigmentation at ±MgCl ₂ broth ...	19
Figure 6. Effect of initial pH on the pigment production	20
Figure 7. Time dependence of pigmentation at different Initial pH of culture medium	21
Figure 8. DPPH free radical scavenging effects of Marin Broth extracts ...	24
Figure 9. Comparison of DPPH free radical scavenging effects between added and removed MgCl ₂ Broth extracts	24
Figure 10. Melanin contents Inhibition of Marin Broth extracts on B16F10 melanoma cell	26
Figure 11. Melanin contents Inhibition of added and removed MgCl ₂ Broth extracts on B16F10 melanoma cell	27
Figure 12. Cell viability Inhibition of Marin Broth extracts on B16F10 melanoma cell	29
Figure 13. Cell viability Inhibition of Marin Broth extracts on Detroit-551 fibroblast cell	30

I. 서론

자연은 임상에서 유용하게 이용되는 항생제, 항암제, 면역억제제 뿐만 아니라 가축용이나 농업에 이용되는 성장촉진제, 살충제, 제초제, 구충제 등을 포함하여, 경이로울 정도로 무수한 생물학적 활성을 지니는 화합물들을 제공한다.^{1),2),3)} 지금까지 밝혀진 바에 의하면 생리활성 물질을 생산하는 미생물 중 75%이상은 방선균에 의한 것이며, 따라서 방선균은 항생물질을 포함한 다양한 생리활성물질을 생산하는 천연유기화합물의 보고로서 신물질의 탐색 및 생합성 기작에 대해 깊이 연구되어 왔다. 최근 20년간 보고된 생리활성물질 중 방선균 유래는 64% 정도로, 곰팡이류 25.6% 기타 미생물 10%에 비해 높은 비율을 나타내고 있으며, 특히 항암제는 방선균 유래가 82%를 차지하고 있다.¹⁾

방선균은 Actinomycetales order에 속하는 원핵생물로 균사상으로 생육하는 특성을 지닌 gram 양성 세균으로 다양한 생리활성물질들을 생산하는 만큼 매우 다양한 형태적, 생리적 특성을 갖는다. 이는 방선균이 분류학적으로 bacteria와 fungi의 중간적 위치를 차지해 세균의 특성을 나타내기도 하며 경우에 따라서는 곰팡이와 유사한 특성을 갖는, 세균과 곰팡이의 경계미생물이 되기 때문이다.⁴⁾

방선균은 일반적으로, solid agar plate에서 자랄 때, 방선균에서 발생되어진 균사의 그물망은 agar plate의 표면쪽 뿐 아니라 안쪽까지 뻗쳐서 노카르디폼의 균사체처럼 기저균사체(substrate mycelium)를 형성하며, 균사들은 격막(septa)들에 의하여 여러 개의 핵 부위(nucleoid)들을 지닌 긴 세포로 나누어진다. 가끔 엽상체(thallus)라 부르는 조직과 같은 덩어리가 형성된다. 많은 방선균들은 plate의 위로 자라서 분생포자(condidia)를 형성하는 기중균사체(aerial mycelium)를 갖는다. 무성인 분생포자(condiospore)는 사상체의 끝에 달려 있으며, 만일 포자가 포자낭(sporangium)에 들어 있는 경우에는 이를 포자낭포자(sporangiospore)라 부른다. 방선균의 포자는 대개 영양분이 고갈되어 있을 때 사상체의 끝에 격막이 형성되어 발달한다.⁵⁾

방선균의 세포벽 조성형태는 분류상의 중요한 지표로서, tetrapeptide side chain 3의 위치에 있는 아미노산의 종류, interpeptide bridge에 glycine의 존재 유무 및 peptidoglycan 당 함량 등에 따라 4가지의 세포벽 형태로 구분할 수 있다 (Table 1).

또한 type II, III 및 IV에 속하는 방선균의 세포추출물에는 분류에 유용한 특징적 당이 함유되어 있다 (Table 2). 그 외 분류학적으로 중요한 특징들은 균사체와 색깔, 표면형태, 분생포자의 배열, DNA의 G+C함량, 세포막의 인지질 조성 및 포자의 내열성 등이 있다.⁵⁾

Table 1. Cell wall types of Actinomycetes

Cell wall type	Diaminopimelic acid isomer	Glycine in Interpeptide Bridge	Characteristic sugars	Representative Genera
I	L, L	+		<i>Streptomyces</i> , <i>Streptoverticilium</i>
II	<i>Meso</i>	+		<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> <i>Thermoactinomyces</i> ,
III	<i>Meso</i>	-		<i>Actinomadura</i> , <i>Frankia</i>
IV	<i>Meso</i>	-	Arabinose, glactose	<i>Saccharmonospora</i>



Table 2. Whole Cell Sugar Patterns of Actinomycetes

Sugar Pattern Types ^a	Characteristic Sugars	Representative Genera
A	Arabinose, glactose Madurose ^b	<i>Novcardia</i> , <i>Saccharomonospora</i> <i>Actionomadura</i> ,
B	None	<i>Streptosporangium</i> , <i>Dermatophilus</i> <i>Thermomonospora</i> ,
C		<i>Thermoactinomyces</i> , <i>Geodermatophilus</i> <i>Micromonospora</i> ,
D	arabinose, Xylose	<i>Actionplanes</i> , <i>Frankia</i>

^aCharacteristic sugar patterns are present only in wall types II-IV, those actinomycetes with *meso*-diaminopimelic acid

^bMadurose is 3-O-methyl-D-galactose.

방선균은 Berger's Manual of Determinative Bacteriology에 의해 8개의 group으로 분류 되어 있으며, 이는 ① Nocardioform ② Matilocular Sporangia ③ Actinoplatenes ④ Streptomyces ⑤ Maduromycetes ⑥ Thermomonospora ⑦ Thermoactinomycetes ⑧ Others 로 구분된다. 최근에는 16s rDNA/rRNA 염기서열 분석에 의한 새로운 분류체계가 제안되고 있다.

방선균류 중 *streptomyces* 속은 기균사에 연쇄상의 분생자를 형성하는 특징을 가지고 있으며, 토양방선균의 대표적인 속으로 항생물질을 생산하는 특색 있는 균종을 많이 포함하고 있는 것으로 알려져 있다. 직경이 0.5~0.1 μ m 정도지만, 길이는 무한대로 길다. Filament 끝에서 성장이 계속되는데 때로는 가지를 치기도 한다.^{5),6)7)}

*Streptomyces*의 포자는 conidia라고 하는데 이는 다른 박테리아의 endospore(아포)와는 전혀 성질이 다른 것이다. 절대 호기성인 *Streptomyces*는 담수나 해수에서 발견되기도 하나, 주로 토양에서 서식한다. 알칼리성이나 중성 토양이 산성 토양보다 *Streptomyces*의 서식에 적합하다. *Streptomyces*의 영양 요구성은 다양하나 생장소를 요구하는 경우는 매우 드물다. 당, 알코올, 유기산, 아미노산등을 탄소원으로 사용하여 탄수화물, 단백질, 지방 등은 체외 효소에 의해 작은 물질로 분해 된 후 이용한다. *Streptomyces*가 생산하는 항생제는 이루 헤아릴 수 없이 많다. 500종 이상이 발견되었으나, 50개 정도가 의약품, 수의용, 농업 및 산업에 쓰이고 있다(Table 3). 그러나 아직도 치료가 제대로 되지 않은 질환이 많고, 내성 균주의 발현으로 인하여 새로운 항생제의 연구는 계속적으로 이루어지고 있다.⁶⁾

*Streptomyces*속을 포함한 방선균은 육상의 토양에 풍부하게 존재하며 상업적으로 부가가치가 높은 생리활성 물질의 공급과 새로운 생리활성물질의 공급원으로서 검토되고 있다. 그러나 육상미생물에 관련된 방선균에 대한 연구는 많으나, 생리활성 물질을 생산하는 해양미생물에 대한 연구는 부족하다.⁸⁾ 해양미생물은 육상미생물과 여러 가지 면에서 생육환경이 다르며 이들이 가지고 있는 화학성분들도 특이한 구조와 독특한 생리활성을 나타내는 것이 많아 이들의 이용이 기대된다. 해양미생물은 육상 미생물과는 달리 해수중이라는 폐쇄계의 특이한 환경 즉, 높은 염의 농도, 수압 그리고 해수 중에 노출되어 있어 다른 미생물의 침입을 받기 쉬운 환경에서 서식하고 있어, 그 진화과정에 있어서 육상생물과는 극히 다른 대사계 혹은 생체 방어계를 확립하였을 것으로 추정되며, 따라서 육상미생물에서는 볼 수 없는 특이한 화학적 구조를 가진 다양

한 종류의 화합물을 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 국내에서는 생리활성물질을 생산하는 해양미생물의 연구가 미약하여 이에 대한 연구가 절실하다.^{8),9)}

Table 3. Antibiotics produced by *Streptomyces*

Chemical Classes	Common Name	Produced by	Active Against *
Aminoglycosides	Streptomycin	<i>S. griseus</i>	Most Gram negatives
	Spectinomycin	<i>Streptomyces spp.</i>	<i>M.tuberculosis</i> , penicillinase - Producing <i>N.gonorrhoeae</i>
	Neomycin	<i>S. fradiae</i>	Broad spectrum, usually used in topical applications due to toxicity
Tetracyclines	Tetracycline	<i>S.aureofaciens</i>	Broad spectrum, Gram positives, gram negatives, rickettsias and chlamydias, Mycoplasma
	Chlortetracycline	<i>S.aureofaciens</i>	AS for tetracycline
Macrolides	Erythromycin	<i>S.erytherus</i>	Most Gram positives, frequently used in place of penicilin, Legionella
	Clindamycin	<i>S.lincolnesis</i>	Effective against obligate anaerobes, especially <i>Bacteroides fragilis</i> .
Polyenes	Nystatin	<i>S.noursei</i>	Fungi, especially candida infections
	Amphocetin B	<i>S.nodosus</i>	Fungi
	Chloramphenicol	<i>S.venezylae</i>	Broad spectrum ; drug of choice for typhoid fever.

* Most antibiotics are effective against several different bacteria. The entries in this column refer to the most frequent clinical application of a given antibiotic.

본 연구에서는 제주 연안의 해수 및 해양 동물로부터 미생물을 분리·배양하여, 방선균의 성상을 가지고 항균활성을 보유한 균주를 분리하였으며 *Streptomyces* sp. JR1으로 명명되었다.

Streptomyces sp. JR1의 분리·배양·동정 과정에서 사용한 여러 종류의 미생물 배지 중에 유독 Marin Broth에서 배양한 경우에만 red-brown의 pigment를 생성하는 것을 확인하였으며, 본 연구는 이러한 pigmentation이 발현되는 조건의 확립과 항균성,

항산화제 및 미백효과 등 *Streptomyces sp.* JR1 으로부터 생리 활성 유용물질을 확보하기 위한 연구들을 수행하였다.



II. 실험과정

1. 기기 및 재료

Streptomyces sp. JR1의 분리용 배지는 Marin Broth 2216 (Difco co. USA)을 사용하였다. 또한 *Streptomyces* sp. JR1의 pigment에 관여하는 성분을 알아보기 위한 배지성분으로는 Bacto Agar, Bacto Peptone (BD, USA), Bacto Yeast Extract (Difco co. USA), Sodium Chloride, Potassium Chloride, Sodium phosphate, Dibasic (Sigma, USA), Strontium Chloride hexahydrate, Sodium metasilicate, Sodium Flouride (Sigma-Aldrich, USA), Magnesium Chloride hexahydrate, Boric Acid (Merck, Gemany) Sodium sulfate, Calcium Chloride, Potassium Bromide (Shinyo, Japan) Sodium Bicarbonate (Amresco. USA)를 사용하였다.

그리고 항균 시험용 배지로는 LB medium을 사용하였으며, 항균 시험용 균주로는 gram 음성균인 *Escherichia Coli* (KCTC 1682)와 gram 양성균인 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1621), *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Bacillus subtilis* (KCTC 1021), *Streptococcus pyogenes* (KCTC 3096)를 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받아서 보존해온 균주를 사용하였고, 배양기로는 (주)존샘의 Incubator(JS/IN/180)와 Shaking Incubator (JS-SKI-1000)를 사용하였다.

Melanin contents와 세포의 viability 측정에 사용된 B16F10 melanoma cell은 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양받았으며, 100 units/ml penicillin-streptomycin, 10% fetal bovine serum(FBS)가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 배지는 3일에 한 번 새 배지로 교환하였으며, 4~7일에 한번씩 세대 배양하였다. 합성 melanin과 3-(4,5-dimethylthiazol-2-gel)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma(USA)사의 것을 구입하여 사용하였다.

DPPH free radical 소거활성에 의한 항산화 효과 실험에 사용된 DPPH와 대조군으로 사용한 ascorbic acid, BHT(Butylated Hydroxytoluene)는 Sigma(USA)사의 것을 구입하여 사용하였다.

2. Marin Broth 상에서의 *Streptomyces* sp. JR1 배양

기존의 Marin Broth 2216 배지와, Difco manual의 조성을 따라 조합하여 만든 Marin Broth를 준비하였다. 그리고 Difco manual에 따른 각 성분들 중 하나씩을 제외시킨 배지들을 제조한 후 멸균시키고 각각의 배지에 *Streptomyces* sp. JR1 을 도말하여 28℃에서 일주일간 배양하였다.

3. *Streptomyces* sp. JR1의 배양

Streptomyces sp. JR1을 Marin Broth 2216와 실험실에서 조합한 $MgCl_2$ 를 제외한 배양액과 첨가한 배양액을 준비하여 각 배양액에서 27℃ 조건으로 일주일간 배양한 후 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 4℃, 30 min)와 filtering(감압여과)을 통하여 균사체와 배양액을 따로 분리하였다.



1) Marin Broth 2216

분리된 균사체는 acetone 추출을 행하였고 배양 상등액은 아래의 두 가지 방법으로 용매분획 후 농축과 동결건조를 거쳐 powder를 얻었다.

① 원심분리와 filtering을 거쳐 분리된 배양액은 pH paper를 이용하여 pH가 8.0 정도임을 확인한 후 Ethyl acetate(EtOAc), Chloroform($CHCl_3$), Buthanol(BuOH)의 순서로 용매 분획 후 농축과 동결건조를 거쳐 powder를 얻어냈으며, 남은 배양액은 다시 HCl을 가하여 pH 4.5 이하로 낮춰준 뒤, 다시 EtOAC, $CHCl_3$, BuOH의 순서로 용매 분획 후 농축과 동결건조를 거쳐 총 7개의 sample을 얻었다(Scheme 1-b).

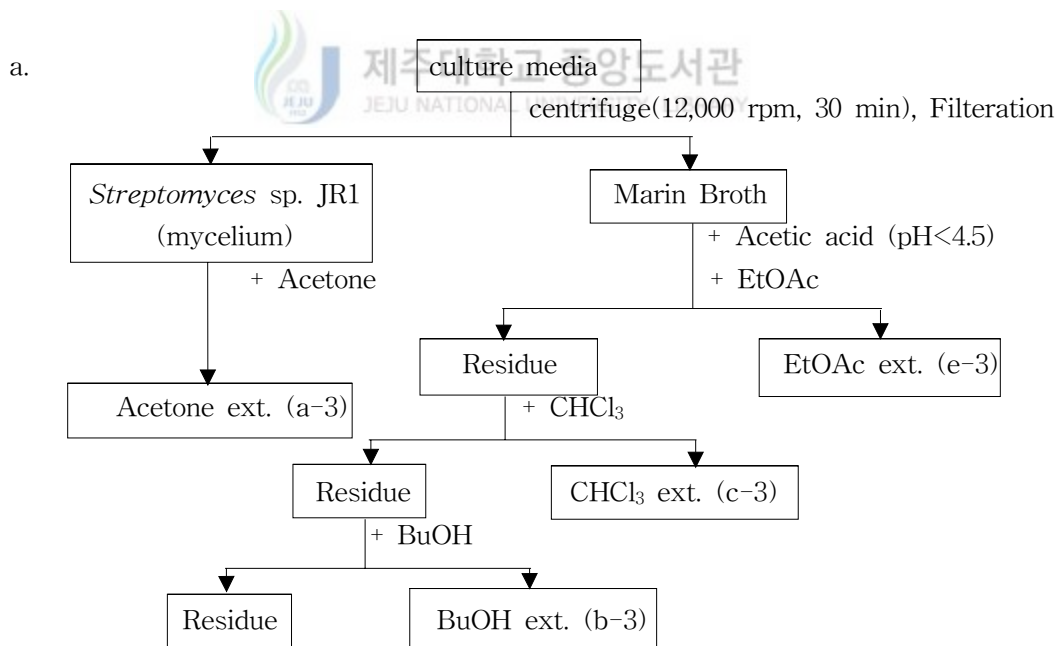
② 균사체는 acetone을 이용하여 추출하였으며, 배양 상등액은 acetic acid 와 EtOAC를 동량 넣고 용매 분획 후, $CHCl_3$, BuOH순으로 용매 분획 후 얻어진 추출물은 다시 농축과 동결건조를 거쳐, 총 4개의 sample을 얻었다(Scheme 1-a).

위의 두 가지 방법으로 용매 분획하여 얻어낸 11개의 sample은 항균 활성 test와 DPPH free radical 소거 활성 test에 사용되었으며, B16F10 melanoma cell에 적용하여 melanin contents 측정과 세포의 viability 측정 (MTT assay)에 사용되었다.

2) $\pm\text{MgCl}_2$ 배양액

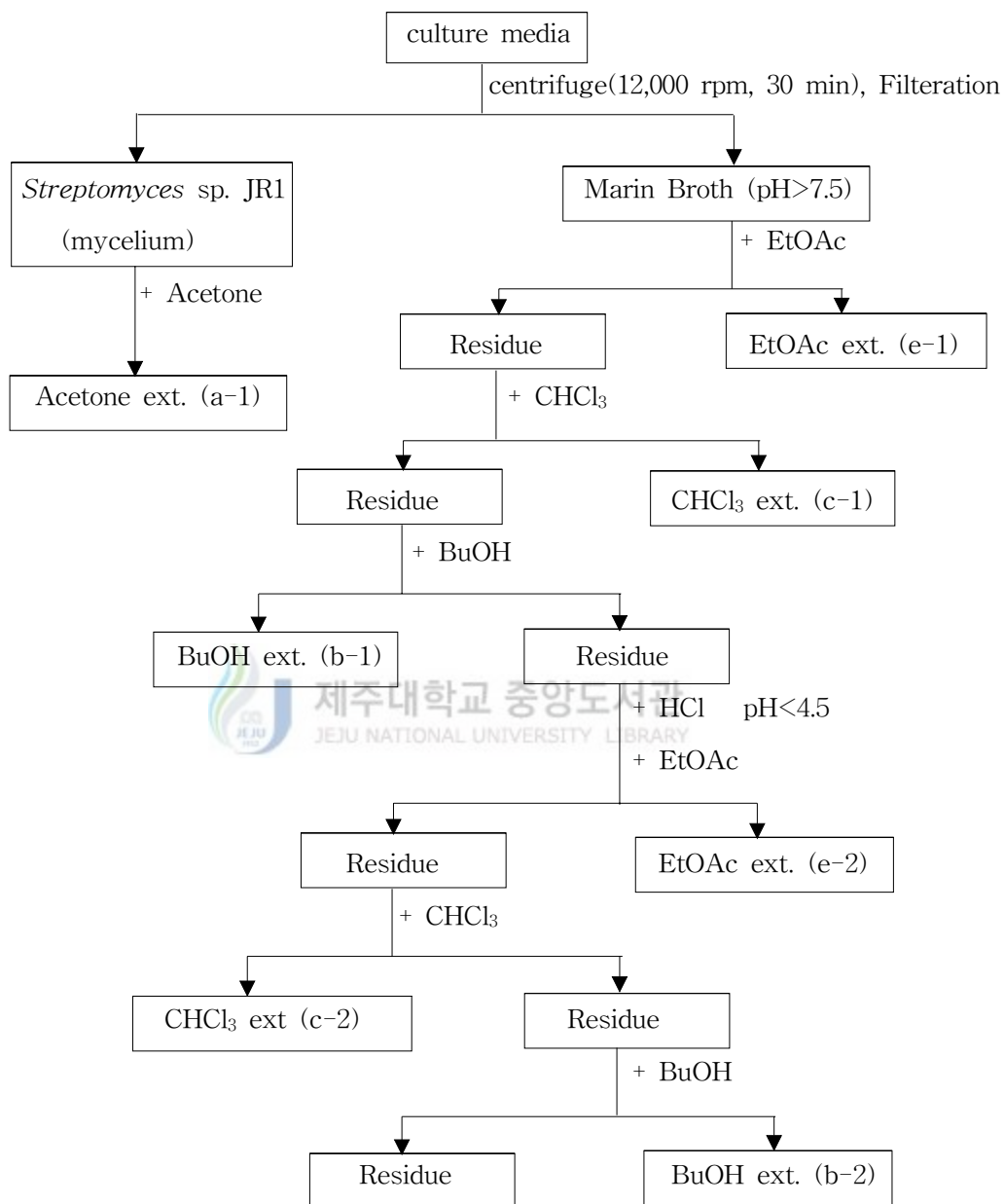
균사를 분리한 배양 상등액은 pH paper를 이용하여 pH가 8.0 정도임을 확인한 후 EtOAc, CHCl_3 , BuOH의 순서로 용매 분획 후 농축과 동결건조를 거쳐 powder를 얻어 냈으며, 남은 배양액은 다시 HCl을 가하여 pH 4.5 이하로 낮춰준 뒤, 다시 EtOAc, CHCl_3 , BuOH의 순서로 용매 분획 후 농축과 동결건조를 거쳐 6개씩 총 12개의 sample을 얻었다(Scheme 2, 3).

이렇게 얻어낸 12개의 sample은 항균 활성 test와 DPPH free radical 소거 활성 test에 사용되었으며, B16F10 melanoma cell에 적용하여 melanin contents 측정에 사용되었다.

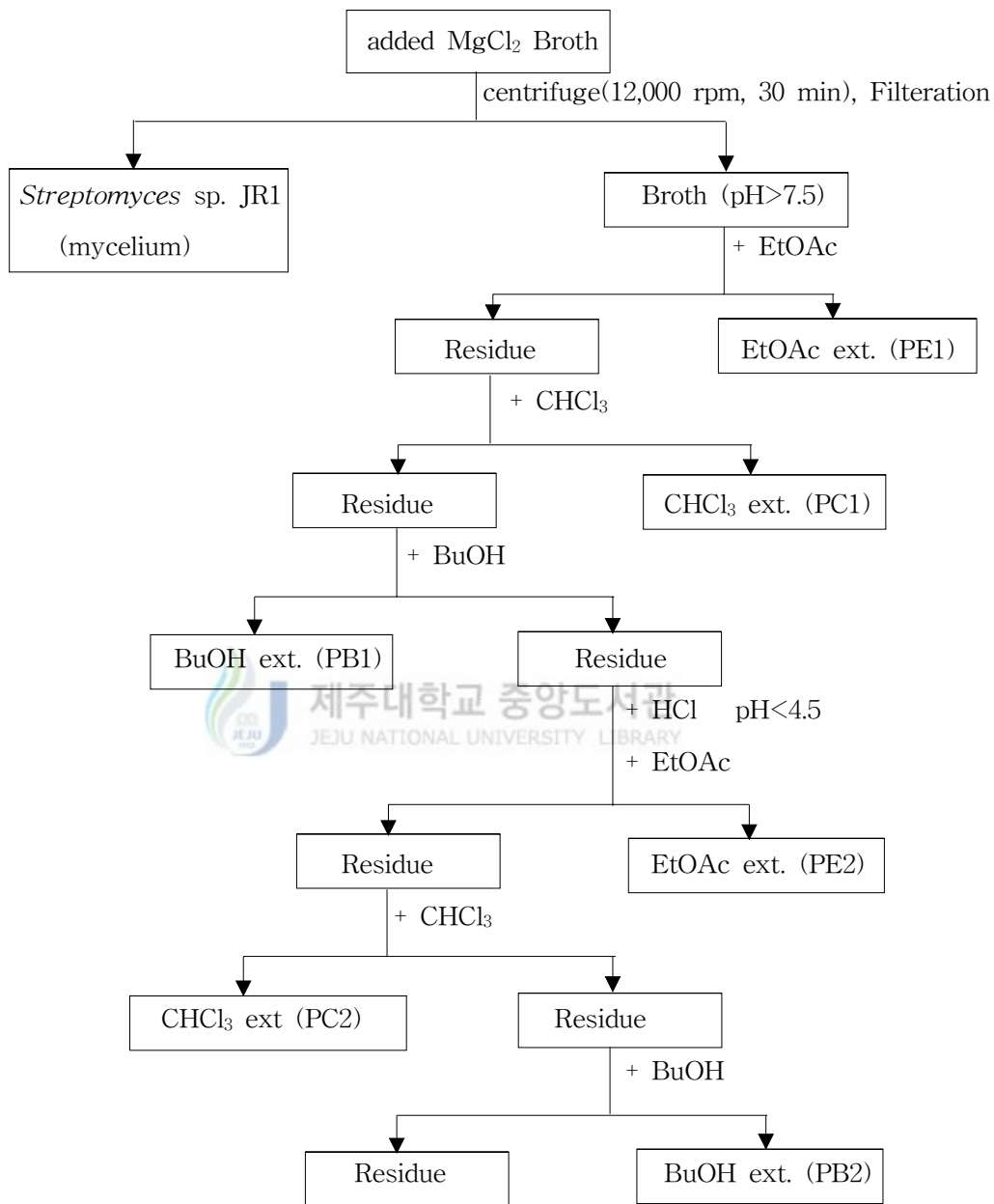


Scheme 1. Flow chart for the extraction and separation of Marin Broth.

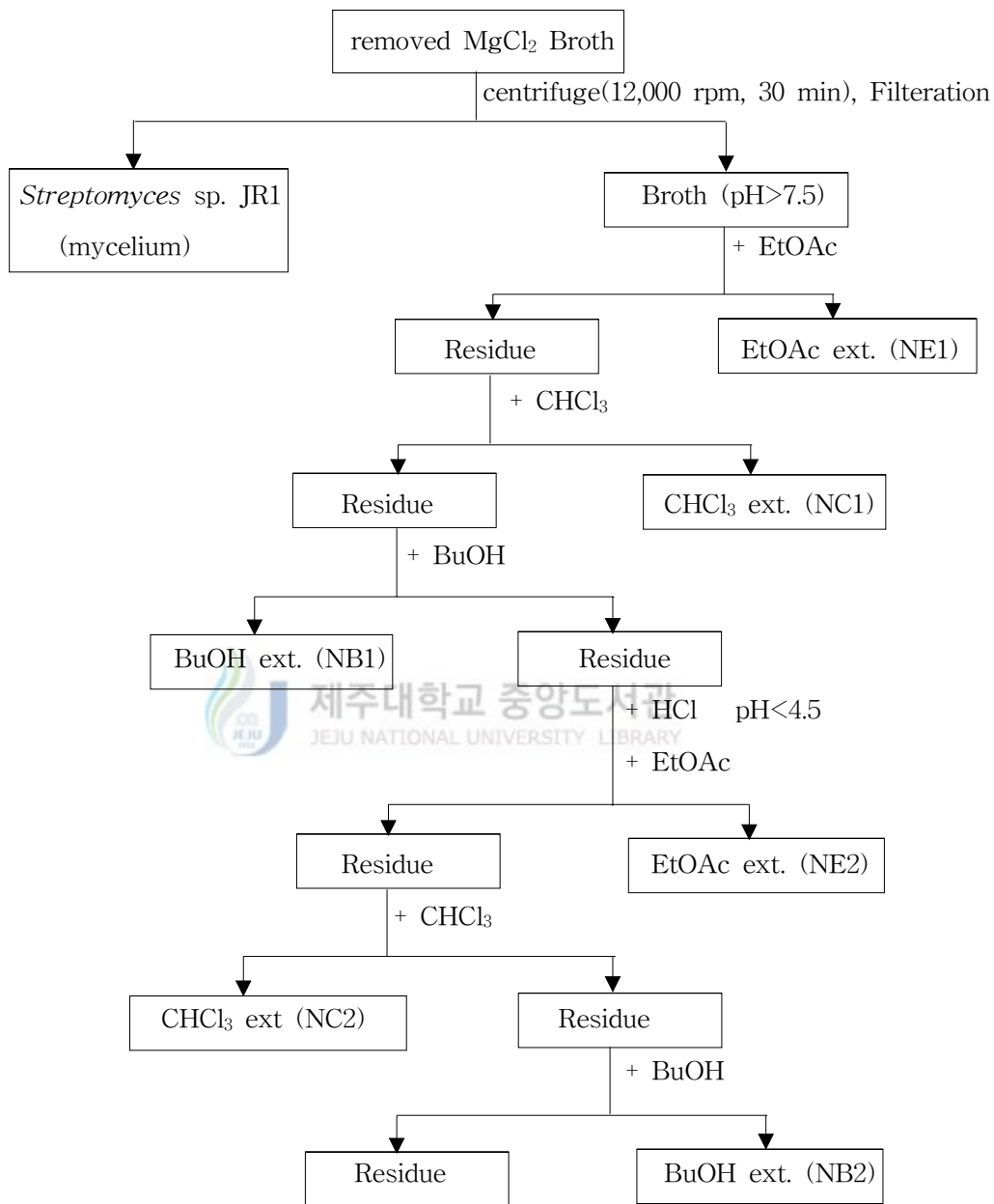
b.



Scheme 1. Flow chart for the extraction and separation of Marin Broth.



Scheme 2. Flow chart for the extraction and separation of Marin Broth added $MgCl_2$.



Scheme 3. Flow chart for the extraction and separation of Marin Broth removed MgCl₂ .

4. MgCl₂ 의 가감에 따른 *Streptomyces* sp. JR1의 생육능 검토

Marin broth에서 MgCl₂를 제거한 배양액(negative broth)과 첨가된 배양액(positive broth)을 각각 50ml씩 제조하였다.

Streptomyces sp. JR1의 single colony를 취해서 PBS (pH 7.4)에서 잘 현탁시킨 후 각 배지별로 200 μ l씩을 접종하여 27°C shaking incubator에 넣고 8일간 배양한다.

접종 후 하루가 지난 시점을 배양 1일째로 보고, 배양 8일째까지 매일 같은 시간에 각 배양액 6 ml씩을 취해서 5 ml은 filtering 한 후에 여과지 위에 남아있는 균사를 110°C dry oven에서 밤새 건조시킨 후 무게를 측정하였으며, 1 ml은 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다(여기서 450 nm는 보통 melanin양을 측정할 때 사용되는 파장임).

실험이 끝나고 남은 배양액은 원심분리를 통하여 균사와 배양액을 분리한 뒤, 각 배양액은 분광광도계를 이용하여 pigmentation에 따른 최대 흡수 파장을 찾아내었다.

5. 초기 pH에 의한 red-brown pigmentation

Streptomyces sp. JR1의 red-brown pigmentation에 대한 배양액의 초기 pH를 확인하기 위하여 pH 5.0에서 pH 9.0까지 0.5 단위로 pH를 달리하여 Marin Broth를 제조하였다. *Streptomyces* sp. JR1은 전배양 해둔 Marin Broth (pigment 생성 전)에 각 pH별로 2 ml씩 접종한 뒤, 27°C shaking incubator (200 rpm)에서 일주일간 배양하였다.

앞서 red-brown pigment 생성 시 최대 흡수파장인 510 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 pH별 배양액의 pigmentation 변화를 확인하였다.

배양이 끝난 용액은 Filtration을 통하여 균사와 배양액을 분리하였고, 분리한 균사는 110°C에서 건조 후 무게를 측정하였으며, 배양액은 510 nm에서 흡광도를 측정하고, 초기의 pH가 pigment 생성 후 어떻게 변화했는지를 확인하기 위하여 배양액의 최종 pH를 측정하였다.

6. 항균활성

1) 사용 균주

항균활성을 확인하기 위해 gram 양성균인 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* 와 gram 음성균인 *Escherichia coli* 를 준비하였다.

각 균주 별로 고체배지에 도말하여 하루 동안 37°C 에서 배양한 뒤, 단일 colony를 취해서 액체배지 3 ml에 접종하여 다시 하루 동안 37°C shaking incubator에서 배양하였다. 배양된 균들은 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 으로 희석하여 고체배지에 도말한 후, 다시 37°C 에서 하루 동안 배양하여, 균주별로 집락이 균일하게 분포하는 농도를 확인한다.

2) 시료의 처리

위에서 분획한 총 23개의 sample들 중 $\pm\text{MgCl}_2$ broth에서 분획한 BuOH층 sample 4개 (PB1, PB2, NB1, NB2) 를 제외한 나머지 sample들은 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 2 mg/ml, 1 mg/ml, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 4개의 농도범위로 희석하여 준비하였으며, 남은 4개의 sample은 증류수에 녹여 같은 농도 범위로 희석하여 준비하였다. 미리 멸균해 둔 disc 위에 준비한 sample을 30 μl 씩을 천천히 떨어뜨린 후 건조시켜둔다. 이때, 대조군으로는 DMSO 30 μl (BuOH층 4개의 sample의 경우는 증류수 30 μl)를 사용하였으며, 항균력을 비교하기 위한 비교군으로 Ampicilin을 sample과 같은 농도로 희석하여 사용하였다.

3) 항균활성 실험

농도가 결정된 균액 50 μl 를 top Agar 2 ml 과 섞어서 LB plate에 고르게 퍼지게 갈아준 뒤 그 위에 미리 sample을 30 μl 씩 처리하여 말려둔 disc를 올려놓고 37°C에서 배양하였다. 각 균주에 대한 항균 활성의 정도는 24~48시간 배양시킨 후에 sample을 처리한 disc 주위의 clear zone의 범위로써 측정한다.

7. DPPH법에 의한 항산화 소거활성

앞서 준비된 23개의 sample을 각각 2 mg/ml, 1 mg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml 의 6개의 농도로 준비하고, 비교군으로 사용한 ascorbic acid와 BHT 역시 같은 농도로 준비하였다.

515 nm에서의 흡광도가 8.9~1.1 사이가 되도록 희석한 DPPH solution 180 µl에 sample 20 µl를 가하고 10분간 반응시킨 후에 ELISA Reader를 이용하여 515nm에서의 흡광도를 측정하여, DPPH 자유라디칼 소거활성 정도를 측정하였다. 그리고, sample 자체의 흡광도를 고려하여, Ethanol(EtOH) 180 µl에 sample 20 µl의 sample을 섞어, 똑같이 ELISA Reader를 이용하여 515 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

$$\text{DPPH 흡광도} - \{(\text{DPPH} + \text{sample 흡광도}) - (\text{sample의 흡광도})\}$$

$$\text{Inhibition} = \frac{\text{DPPH 흡광도} - \{(\text{DPPH} + \text{sample 흡광도}) - (\text{sample의 흡광도})\}}{\text{DPPH 흡광도}} \times 100$$



8. Melanin 함량 측정

B16F10 melanoma cell을 2×10^5 cells/dish가 되도록 60mm culture dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 37°C, 10시간 정도 전배양을 하였다. 10시간 뒤 각 dish 별로 sample을 2 µg/ml 또는 20 µg/ml의 농도가 되도록 처리를 하고, CO₂ incubator에서 37°C, 3일간 배양하였다.

Sample 처리 마지막날 0.25% Trypsin-EDTA용액을 처리하여 세포를 수집하고, 각 처리군별로 200 µl의 1N NaOH용액을 넣고 세포를 녹였다(95°C, 5분간). 합성 멜라닌 (Sigma Chemical Co.) 10mg을 1N NaOH에 녹여 stock solution(1 mg/ml)을 제조한 뒤 700 µg/ml, 300 µg/ml, 100 µg/ml, 70 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml, 7 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0 µg/ml 농도로 희석하여 standard solution을 제조하였다. Sample과 standard solution을 96well plate에 넣고 450 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정한다.

후 측정된 흡광도 값은 합성 멜라닌으로 작성된 표준 직선에 적용하여 멜라닌 양으로 환산하였다.

9. 세포의 Viability 측정 (MTT assay)

B16F10 melanoma cell을 5×10^4 cells/well이 되도록 96 well-plate에 분주하여 CO₂ incubator에서 37°C, 10시간 정도 전배양을 하였다. 세포가 바닥에 부착이 되면, well 당 sample을 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 처리를 하고 CO₂ Incubator에서 37°C, 3일간 배양하였다.

3일 뒤 MTT solution (50mg/ml)을 well당 50 μl 씩 분주한 뒤, 4시간 동안 37°C에서 반응시킨 후, 얻어진 formazan을 DMSO로 녹인후 ELISA Reader를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

또한, 정상세포에서의 세포 독성을 비교해 보기 위하여 Detroit-551 fibroblast cell에 대해서도 2×10^4 cells/ml의 농도로 상기와 같은 방법으로 MTT assay를 수행하여 세포의 viability를 측정하였다.

III. 실험결과 및 고찰

1. *Streptomyces* sp. JR1의 균사와 배지색 변화에 미치는 화합물의 영향

Difco manual에 따라 Marin Broth의 성분 화합물들 중 탄소원을 제외한 나머지 성분들에서 각각 하나의 성분들을 제외한 배지를 제작하여 *Streptomyces* sp. JR1을 도말하여 27°C에서 일주일간 배양해본 결과, 다른 배지 성분들은 기존의 Marin Broth와 마찬가지로 균사와 배지 모두 적갈색을 띄면서 자란 반면, 배지 성분들 중 MgCl₂를 제외한 배지(negative)에서만 균사와 배지 색이 변하지 않음을 확인 할 수 있었다 (Table 4).

Table 4. Chemicals dependence of medium color of *streptomyces* sp. JR1

Removed chemicals	Color change	Removed chemicals	Color change
Ferric Citrate	+	Potassium Bromide	+
Sodium Chloride	+	Strontium Chloride	+
Magnesium Chloride	-	Boric Acid	+
Sodium Sulfate	+	Sodium silicate	+
Calcium Chloride	+	Sodium fluoride	+
Potassium chloride	+	Ammonium Nitrate	+
Sodium Bicarbonate	+	Disodium phosphate	+

* complete Marin Broth change to red-brown color

** + : color change - : no color change

상기 결과의 확인은 *Streptomyces* sp. JR1을 Marin Broth (positive broth)와 MgCl₂ 성분을 제거한 Marin Broth (negative broth)에서 27°C에서 일주일을 배양한 결과, MgCl₂성분이 함유되어있는 배지에서 자란 *Streptomyces* sp. JR1은 균사와 배지색이

모두 적갈색을 띄는 반면, MgCl₂ 성분을 제외시킨 negative broth에서는 균사와 배지 색에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1, 2).



Fig. 1. *Streptomyces* sp. JR1 on the agar plate added MgCl₂ (left) or removed MgCl₂ (right)



Fig. 2. *Streptomyces* sp. JR1 on the Marin broth added MgCl₂ (left) and removed MgCl₂ (right).

2. *Streptomyces* sp. JR1의 growth rate와 pigmentation의 경시적 변화

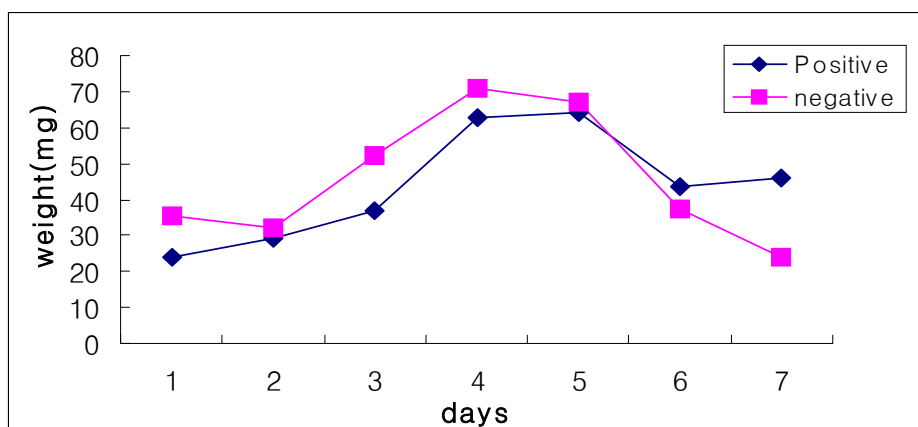
Streptomyces sp. JR1을 $MgCl_2$ positive와 negative 배양액에서 $27^\circ C$ 로 일주일간 배양하면서 24시간 단위로 5 ml씩을 취하여 균사의 건조 중량을 측정 한 결과, positive 나 negative 배양액 모두 균사의 무게는 차이가 없었다(Fig 3). 이는 $MgCl_2$ 가 균사의 성장 속도에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 보여진다.

같은 시간 단위로, 배양액 색의 변화를 분광광도계를 통하여 450 nm에서의 흡광도로 확인한 결과를 보면, positive 배양액의 경우, 2일째에 흡광도가 급격히 증가하며, negative의 경우는 4일 째에 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 4).

이는 배양액의 $MgCl_2$ 성분이 균의 성장 속도에는 크게 영향을 미치지 않으면서, red-brown pigment 생성에는 더욱 용이한 조건을 만들어주는 것으로 보여진다.

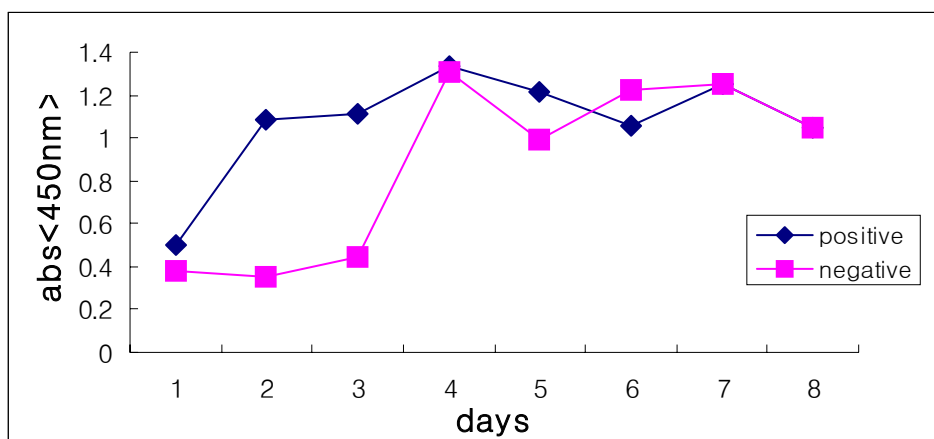
배양 7일째의 positive와 negative 배양액의 최대 흡수파장을 확인해본 결과, 적갈색의 pigmentation이 나타나는 positive의 경우, 510 nm, pigmentation이 나타나지 않는 negative의 경우 420 nm에서 최대 흡수 파장을 나타냄을 확인해 볼 수 있었다(Fig 5).

Fig. 3. *Streptomyces* sp. JR1 growth rate on $\pm MgCl_2$ broth



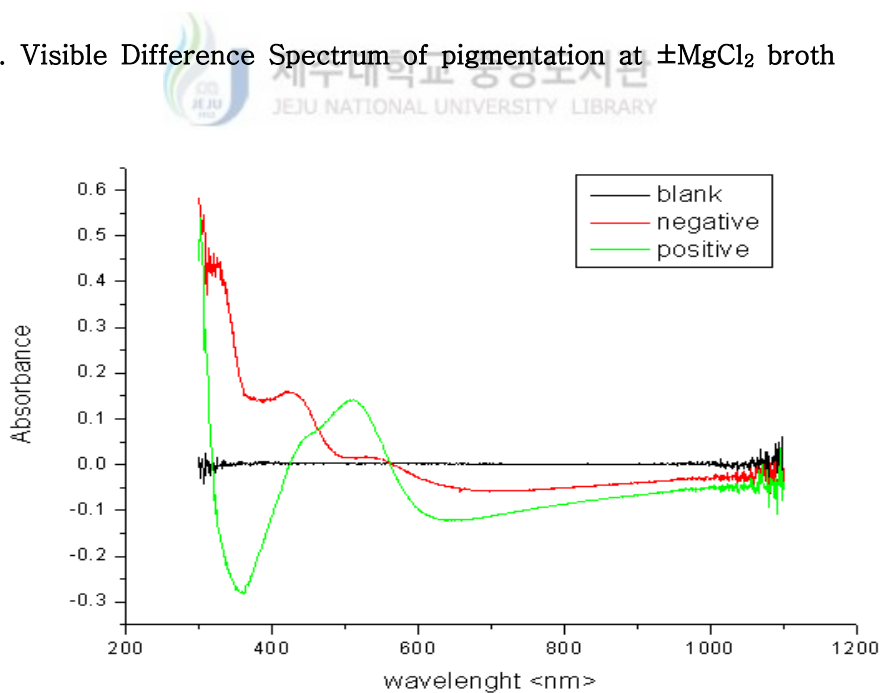
* Growth rate of *Streptomyces* sp. JR1 was determined at positive or negative broth everyday. Amount of bacteria was measured after drying precipitated 5ml cells at $110^\circ C$.

Fig. 4. Time course of Pigmentation produced by *Streptomyces* sp. JR1



* Pigmentation of *Streptomyces* sp. JR1 was measured at positive or negative broth everyday. Pigment was determined with UV/VIS spectrophotometer at 450nm.

Fig. 5. Visible Difference Spectrum of pigmentation at \pm MgCl₂ broth



*Visible difference spectrum of pigments produced by *Streptomyces* sp. JR1 against marine broth after 7 days culture. λ_{\max} of pigment at negative broth was 420 nm, while that at positive broth was 510 nm.

3. 배양액의 초기 pH에 의한 pigmentation의 변화

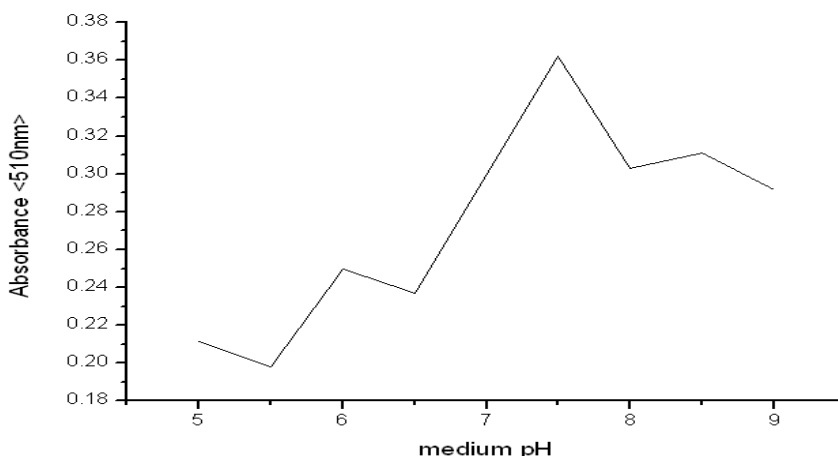
Red-brown pigmentation이 나타나는 Marin Broth를 pH 5.0에서 pH 9.0까지 0.5 간격으로 제조하여 각 배지별로 *Streptomyces* sp. JR1을 동일량 접종하여 27°C에서 일주일간을 배양하면서 pigmentation을 변화를 관찰해 본 결과 배지 조건이 중성 및 약 염기성인 경우에 red-brown pigmentation이 더 잘 나타났다(Fig 6).

배지의 초기 pH별로 경시적인 pigmentation의 변화율을 확인해 본 결과 조금씩 차이는 있지만, 대체적으로 시간이 지남에 따라, 5일째까지는 흡광도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 7).

또한, 7일 경과후의 각 pH별 배양액의 최종 pH를 확인해 본 결과, 대체적으로 pH가 7.8~8.2 정도의 염기성을 띄는 것을 확인할 수 있었다. 이는 본래 방선균이 유래한 해수의 pH가 8.0 정도 이므로 최적의 서식 조건을 위한 방선균 자체 pH 조절의 영향으로 보여지며, pH 8.0 정도에서 pigmentation이 잘 생성되는 것으로 보여 진다.

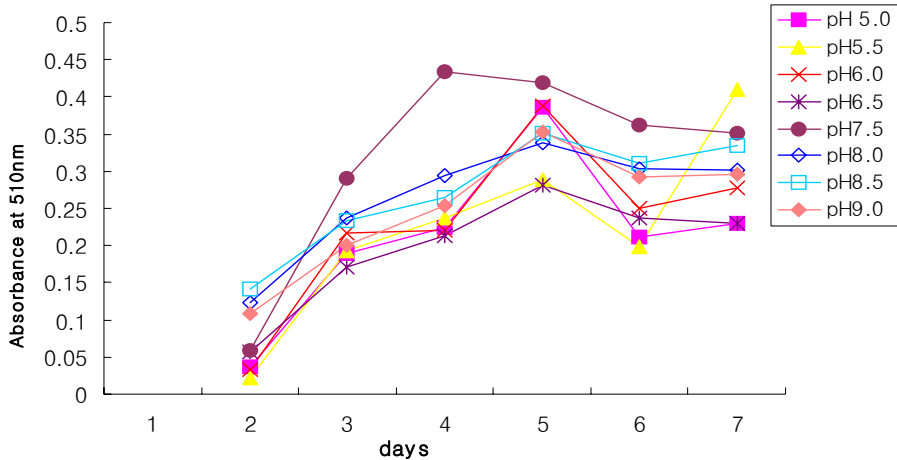


Fig. 6. Effect of initial pH on the pigment production



* *Streptomyces* sp. JR1 was cultured at different initial pH for 6 days at 27°C.

Fig. 7. Time dependence of pigmentation at different Initial pH of culture medium



**Streptomyces* sp. JR1 was cultured at different initial pH for 7 days at 27°C. Five milliliter of broth was taken and amount of pigment produced at each pH was measured at 510 nm.



4. 항균 활성

1) Gram 양성세균에 대한 항균 활성 검색

실험에 사용된 *Streptomyces* sp. JR1의 acetone 추출물과 Marin Broth의 각 분획물들을 Gram 양성균인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* 들에 대한 항균활성을 검색한 결과를 Table 5 에 나타내었다. $MgCl_2$ 의 가감여부에 따른 배양액의 분획물들의 항균활성 결과는 data를 넣지는 않았지만, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* 균주들에 대해서 EtOAc층과 $CHCl_3$ 층에서 미미한 항균력을 나타내는 것을 확인 하였다.

2) Gram 음성세균에 대한 항균 활성 검색

실험에 사용된 *Streptomyces* sp. JR1의 acetone 추출물과 Marin Broth의 각 분획물들을 Gram 음성균인 *Escherichia coli* 에 대해 항균활성을 검색한 결과 전혀 항균력을 나타내지 않았다.

Table 5. Results of tests of antibacterial activity (units : mm)

sample (2mg/ml)	gram positive			gram negative	
	<i>S.aures</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>St.pyogenes</i>	<i>E.coli</i>
Amp ^r	16~20	7~8	2~4	16~20	
a-1	-	-	-	-	-
b-1	-	-	0.5~1	-	-
b-2	-	-	-	-	-
c-1	-	2	(0.1)	-	-
c-2	-	(2)	-	-	-
e-1	-	0.5(3)	(0.1)	-	-
e-2	-	0.5(2)	(0.1)	-	-
a-3	-	-	-	-	-
b-3	-	-	-	-	-
c-3	-	(2)	-	-	-
e-3	(0.1)		-	(2)	-

a: acetone ext., b: BuOH ext., c: CHCl₃ ext., e: EtOAc ext.

5. DPPH 자유 radical 소거 활성

각 분획층 별로 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH free radical 소거 활성 정도를 비교해 본 결과, 대조군으로 쓰인 ascorbic acid과 비교시 항산화 효과는 거의 나타나지 않았다. 대조군 중에서도 활성이 낮은 편에 속하는 BHT와 비교해 보아도 e-3 sample을 제외하고는 활성이 그다지 높지 않음을 확인할 수 있었다. (Table 6, Fig 8)

또한, MgCl₂의 가감 여부에 따라서 배양한 배양액에서의 분획물인 경우, MgCl₂의 가감 여부, 즉 pigment의 생성여부와는 상관없이 비슷한 활성을 나타내었고, 대조군으로 쓰인 ascorbic acid 와 BHT와 비교시 전체적으로 항산화 효과는 거의 나타나지 않았다(Fig 9).

Table 6. DPPH free radical scavenging effects of extracts of Marin Broth

(units : %)

sample	Inhibition of sample concentration					
	200 μ g/ml	100 μ g/ml	50 μ g/ml	25 μ g/ml	12.5 μ g/ml	6.25 μ g/ml
ascorbic acid	95.89	95.31	94.63	93.30	90.67	61.55
BHT	45.89	30.73	24.21	18.29	15.11	12.43
a-1	31.85	20.28	17.09	13.68	12.72	13.10
b-1	18.76	16.23	13.44	12.86	11.37	11.50
b-2	16.73	13.79	11.54	11.39	11.99	12.55
c-1	16.78	15.22	13.29	11.25	9.62	10.49
c-2	19.40	14.11	11.55	11.42	10.16	10.53
e-1	16.00	11.64	10.97	10.45	9.99	9.21
e-2	16.77	11.98	11.75	10.79	9.66	10.52
a-3	17.15	16.28	14.77	13.00	11.53	12.21
b-3	12.27	13.23	11.77	10.46	11.27	10.72
c-3	14.04	12.29	11.04	10.30	10.80	10.25
e-3	43.09	47.37	30.26	20.16	15.05	13.77

a : acetone ext., b : BuOH ext., c : CHCl₃ ext., e : EtOAc ext.

Fig. 8. DPPH free radical scavenging effects of Marin Broth extracts.

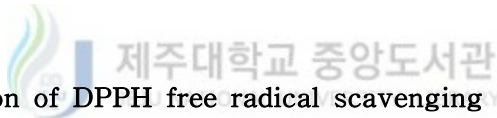
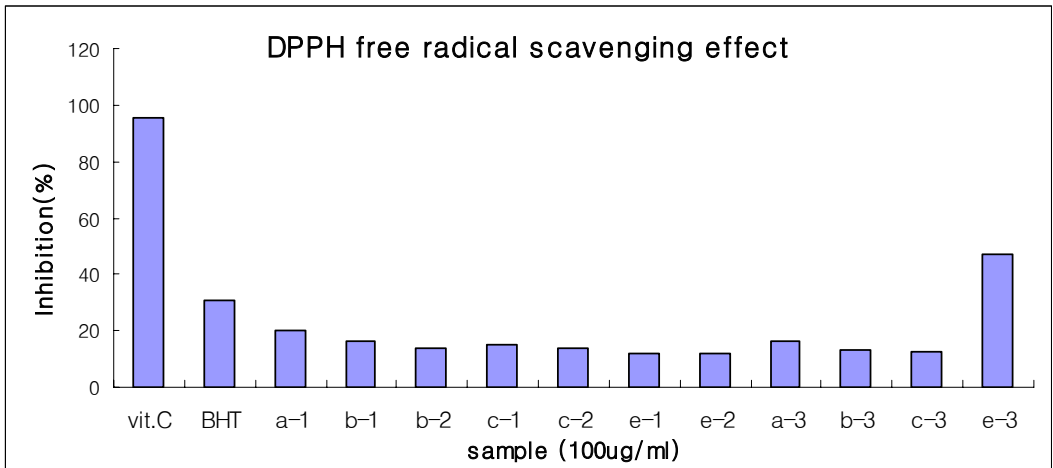
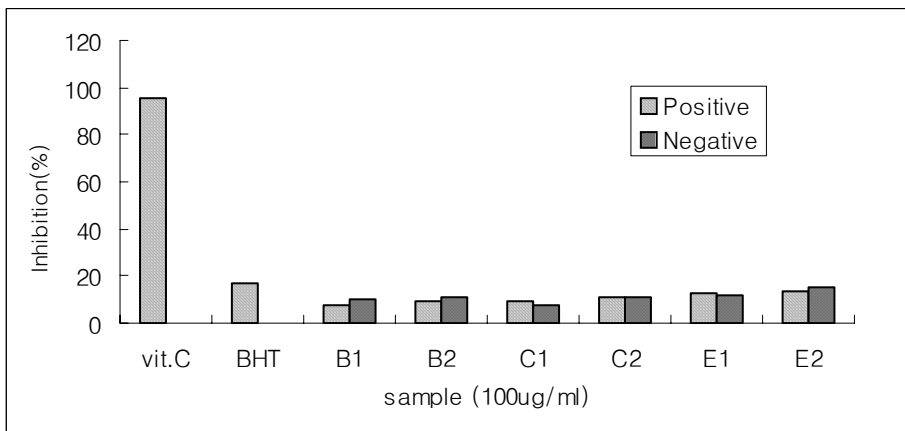


Fig. 9. Comparison of DPPH free radical scavenging effects between added and removed MgCl₂ Broth extracts.



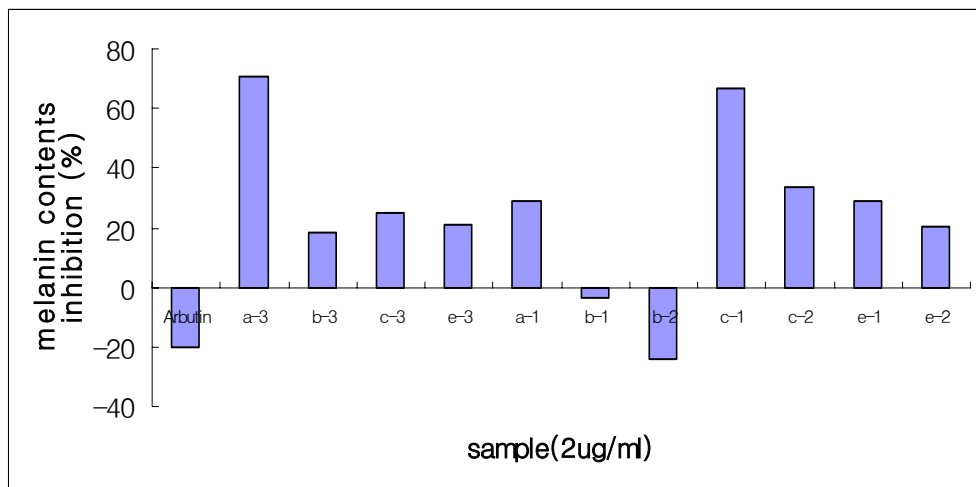
6. 배양 상등액 분획 시료의 melanin 함량

배양 상등액 분획 sample들의 melanin 억제 효과(미백 효과)를 확인하기 위하여 B16F10 melanoma cell을 이용하여 melanin contents를 조사한 결과는 control에 대한 상대적인 값으로 Fig 10, 11에 나타내었다. 세포에 적은 양($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)의 sample을 처리하였을 때는 a-3과 c-1의 melanin 생성 저해 효과가 좋게 나타나는 것을 확인 하였으며, 오히려 흑화작용을 보였던 Arbutin과 비교를 하자면, 흑화 작용을 보였던 b-1과 b-2를 제외한 나머지 sample 모두 melanin 생성 저해 효과가 좋음을 확인하였다 (Fig. 10-a.).

또한, 세포에 많은 양 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$)의 sample을 처리하였을 때는 Arbutin과 비교하여 c-1의 melanin 생성 저해 효과가 높게 나타남을 확인하였으며, b-1, b-2의 melanin 생성 저해 효과는 Arbutin과 비슷한 수준임을 확인하였다(Fig. 10-b.).

그리고 MgCl_2 의 가감 여부에 따라서 배양한 배양액에서의 분획물인 경우, MgCl_2 가 첨가된 배양액에서의 분획물들이 MgCl_2 가 제거된 배양액에서의 분획물들보다 melanin 저해활성이 높게 나타남을 확인하였으며, 특히, CHCl_3 와 EtOAc 분획층에서 melanin 저해 효과가 높게 나타남을 확인하였다(Fig. 11.).

a.



b.

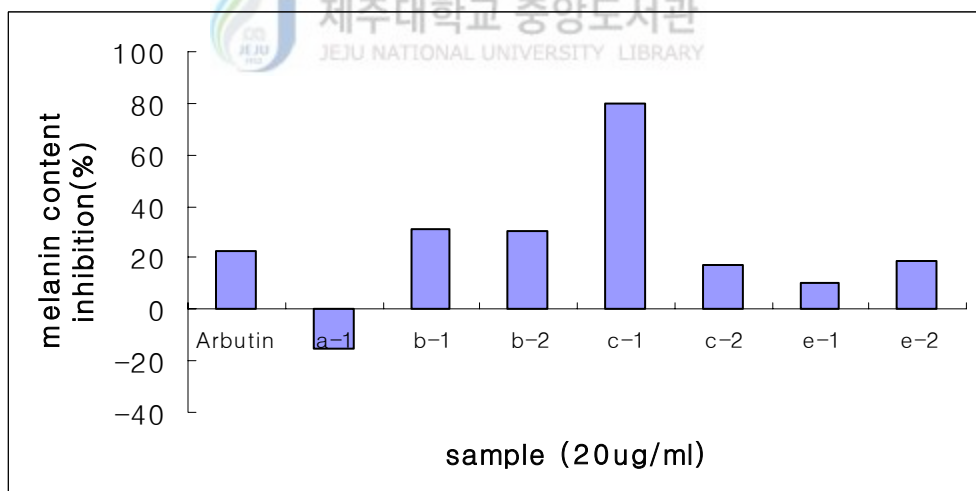
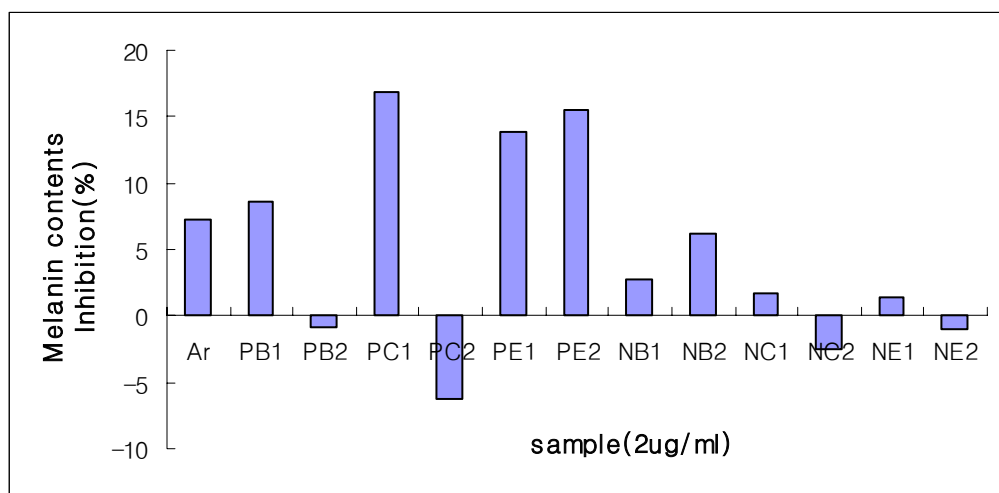


Fig. 10. Melanin contents Inhibition of Marin Broth extracts on B16F10 melanoma cell (a : 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, b : 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

a.



b.

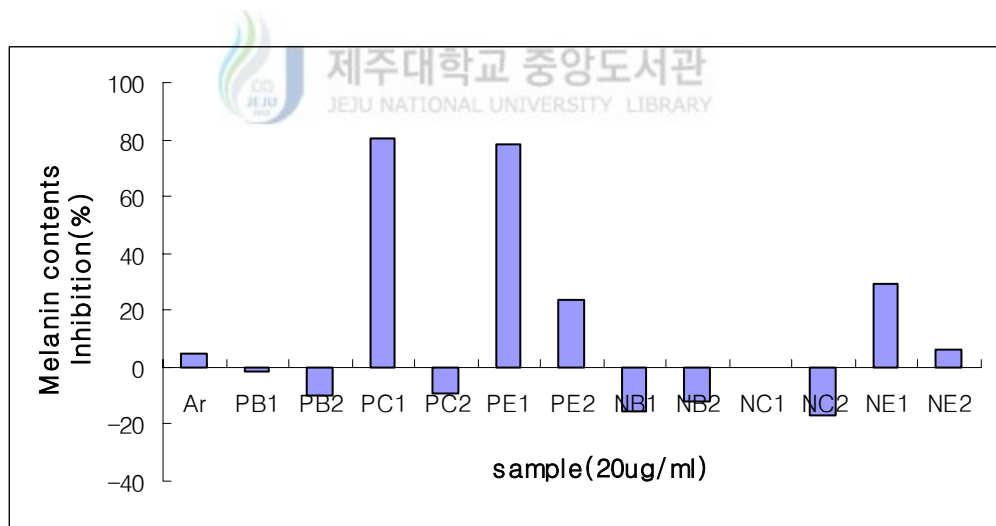


Fig. 11. Melanin contents Inhibition of add and removed $MgCl_2$ Broth extracts on B16F10 melanoma cell (a : $2 \mu g/ml$, b : $20 \mu g/ml$).

7. Cell viability (MTT assay)

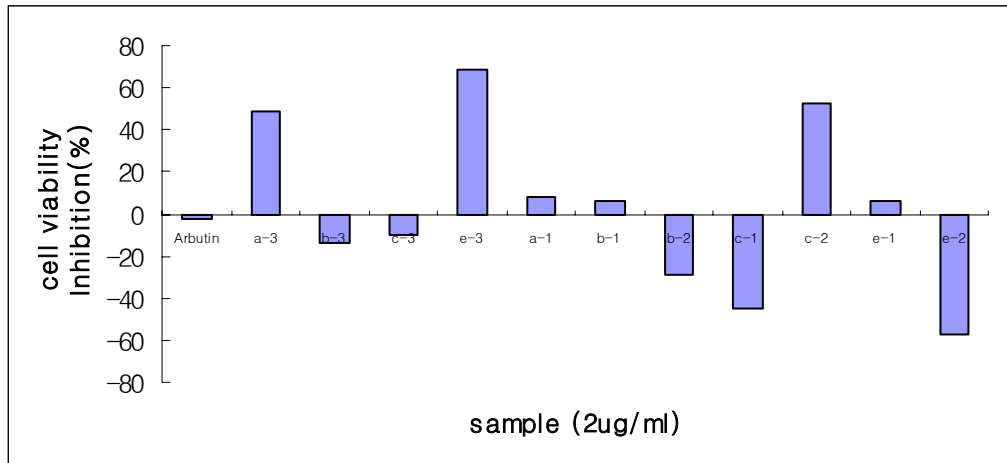
B16F10 melanoma cell에 대한 각 분획 sample별 melanin 생성 저해 효과에 따른 세포독성을 보기 위한 MTT assay는, melanin contents 측정 결과와 마찬가지로, control을 기준으로 한 상대적인 값으로 Fig. 12에 나타내었다.

세포에 적은 양($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)의 sample을 처리하였을 때는 a-3, e-3, c-2의 세포독성이 높게 나타났으며, a-1, b-1, e-1도 어느 정도의 세포독성을 보이고 b-3, c-3, b-2, c-1의 경우, 세포독성이 없고, 오히려 세포를 증식시키는 것을 확인하였다(Fig. 12-a). 반면, 세포에 많은 양($20 \mu\text{g}/\text{ml}$)의 sample을 처리하였을 때는 a-1, b-1, c-2에서 약간의 세포독성을 보였으나, Arbutin에 비해서는 적었다. e-2의 경우는 세포독성이 없고, 오히려 cell을 증식시키는 것을 확인할 수가 있었다(Fig. 12-b).

그리고 암세포인 B16F10 melanoma cell 외에 정상 세포인 Detroit-551 fibroblast cell line에 대한 각 분획 sample별 세포 독성을 MTT assay를 통하여 확인해 본 결과를 control을 기준으로 한 상대적인 값으로 Fig. 13에 나타내었다.

c-1, e-1, e-3의 경우, 세포독성이 있긴 하였으나, 50% 미만이었으며, 전반적으로 정상세포에 대한 세포독성은 크지 않은 편이었다.

a.



b.

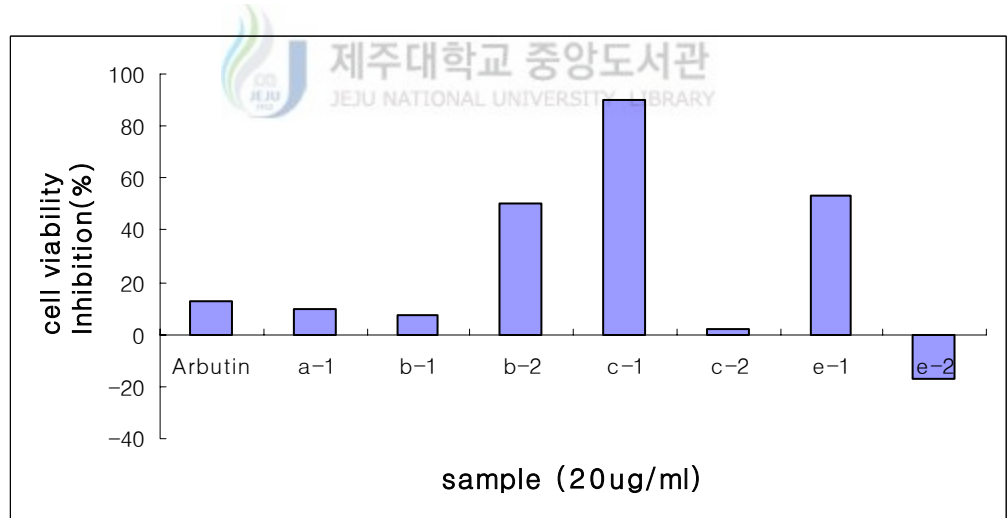
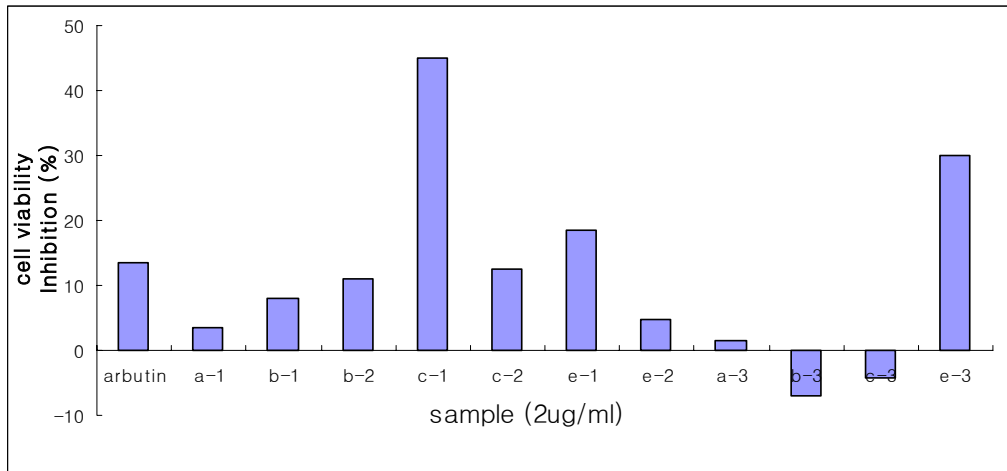


Fig. 12. Cell viability Inhibition of Marin Broth extracts on B16F10 melanoma cell (a : 2 µg/ml , b : 20 µg/ml).

a.



b.

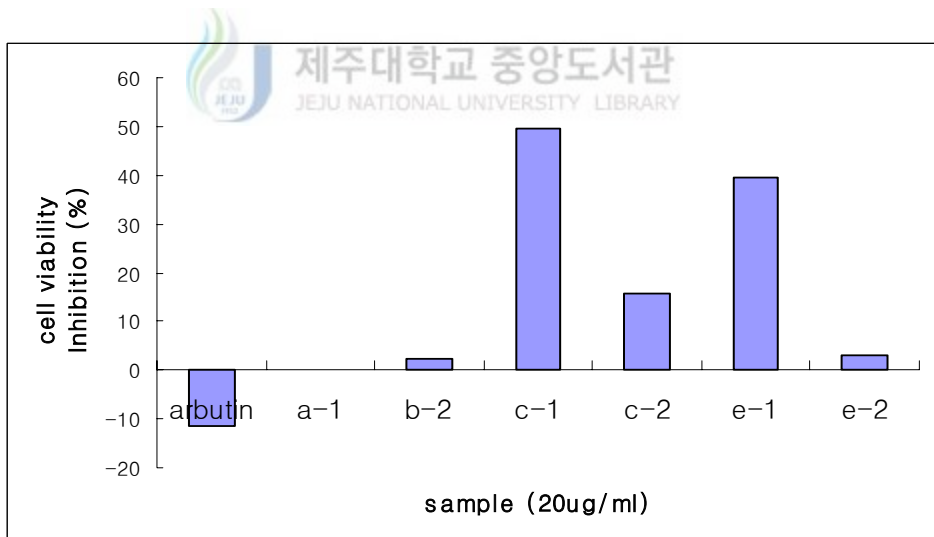


Fig. 13. Cell viability Inhibition of Marin Broth extracts on Detroit-551 fibroblast cell (a : 2 µg/ml, b : 20 µg/ml).

IV. 결론

본 연구는 제주연안의 해수 및 해양동물로부터 방선균류를 분리하였으며 그 중 *Streptomyces* 속에 속하는 *Streptomyces* sp. JR1을 분리 동정하였고, 이 균주의 pigmentation과 항균활성을 중심으로 실험을 진행하였다.

Streptomyces sp. JR1을 분리. 동정하는데 이용한 Marin Broth에서 이 방선균의 적갈색 pigment를 확인하고, 배지조성 중 탄소원을 제외한 나머지 화합물들을 제거하면서 실험을 진행한 결과, $MgCl_2$ 성분이 이 방선균의 pigmentation에 관여함을 알아낼 수 있었다. 또한 $MgCl_2$ 를 제외한 배양액과 그렇지 않은 배양액에 각각 *Streptomyces* sp. JR1을 접종하여 일주일간 배양하면서, 그들의 균 성장속도와 pigmentation의 변화를 건조중량법을 이용한 균사 무게 측정과 분광광도계를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 확인해본 결과, 배양액속의 $MgCl_2$ 의 존재는 균의 성장속도에는 그다지 큰 영향을 미치지 않으면서, pigmentation의 변화는 빠르게 일으키는 것을 확인해 볼 수가 있었다. 일주일간 배양한 후에 pigmentation이 일어나지 않은 $MgCl_2$ 를 제거한 배양액과, 적갈색의 pigmentation이 확연히 나타난 $MgCl_2$ 가 첨가된 배양액의 최대 흡광도를 확인해본 결과, 적갈색의 pigment가 생성된 경우에는 붉은색 계열이 흡광되는 510 nm에서, 그렇지 않은 경우에는 본래의 배양액 색인 노란색 계열이 흡광되는 420 nm에서 최대 흡수 파장을 나타내었다.

또한 본래 적갈색의 pigment를 생성하는 Marin Broth를 pH5.0에서 pH9.0까지 0.5간격으로 제조하여 각각에 대해서 배양액의 초기 pH가 *Streptomyces* sp. JR1의 pigmentation에 주는 영향을 앞서 확인한 510 nm에서의 흡광도로 확인한 결과, 초기의 배양액 조건이 중성 및 약염기성인 경우에 pigmentation이 잘 일어남을 확인하였으며, 대체로 5일째까지는 흡광도가 꾸준히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 실험이 끝난 후 남은 배양액들의 pH를 다시 측정한 결과, 최종 pH가 7.8~8.2 정도로 거의 일정하게 약염기성을 띄는 것을 확인할 수가 있었는데, 이는 본래 방선균이 유래한 해수의 pH가 8.0 정도임을 감안했을 때, 최적의 서식 조건을 위해 방선균 자체가 염기 또는 산을 내 놓아서 pH를 조절했을 것으로 보여지며, 적갈색의 pigmentation 역시, pH가 7.0~8.0 정도의 중성 및 약염기성 조건에서 잘 일어나는 것으로 보여진다.

즉, *Streptomyces* sp. JR1의 적갈색의 pigment 생성은 Marin Broth의 $MgCl_2$ 성분이 있을 때와, 배양액의 초기 pH가 중성 및 약염기성일 때 pigment가 잘 생성되는 것으로 확인할 수 있다.

이렇게 적갈색의 pigment를 나타냈을 때의 *Streptomyces* sp. JR1의 이차대사물질들이 항생제 또는 항산화제, 그리고 미백제로의 사용가능 여부를 확인하기 위하여 pigment가 생성됐을 때의 배양액을 균사와 배양액을 분리하여, 균사에서는 acetone 추출물을, 배양액에서는 $CHCl_3$, EtOAc, BuOH의 분획층을 얻어내었다.

이렇게 얻어진 acetone 추출물과 $CHCl_3$, EtOAc, BuOH의 분획층을 가지고 gram 음성균인 *Escherichia coli* 와 gram 양성균인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* 균주들에 대한 항균활성 test를 해본 결과, gram 음성균에서는 거의 항균력을 보이지 않았으며, gram 양성 균주들에서는 EtOAc와 $CHCl_3$ 분획층에서 약간의 항균작용을 확인하였다.

Sample 100 $\mu g/ml$ 을 기준으로 DPPH free radical 소거 활성을 비교해 본 결과 ascorbic acid에 비해서는 항산화능력이 거의 없으나, 합성 항산화제인 BHT와 비교해 보았을 때는 e-3 (EtOAc 분획층)에서 좋은 활성을 나타내었다. e-3 sample에 대해서는 차후에 *in vivo* 실험을 통하여 항산화제로의 사용가능성에 대한 연구들이 더욱 필요할 것으로 보여진다.

그리고 적갈색의 pigment와 관련하여 B16F10 melanoma cell에 대하여 앞서 분리한 sample들을 적용하여 melanin 생성 저해 효과와 MTT를 통한 세포독성 여부를 확인해 보았다. 그 결과, 우선 melanin 생성 저해 효과를 보았을 때, 적은 양(2 $\mu g/ml$)의 sample을 처리하였을 때는 a-3과 c-1의 melanin 생성 저해 효과가 좋게 나타나는 것을 확인해 볼 수 있으며, 오히려 흑화작용을 보였던 Arbutin과 비교를 하자면, 흑화작용을 보였던 b-1과 b-2를 제외한 나머지 sample 모두 melanin 생성 저해 효과가 좋을 수 있었다. 이들 sample에 대해서 MTT assay를 통한 세포 독성 여부를 함께 보았을 때, b-3, c-3, c-1의 경우는 세포 독성이 없고, 오히려 cell을 증식시키는 것을 확인하였다.

또한, 많은 양 (20 $\mu g/ml$)의 sample을 처리하였을 때는 Arbutin과 비교하여 c-1의 melanin 생성 저해 효과가 높게 나타남을 확인해 볼 수 있었는데, 이 sample의 경우는 MTT assay 결과 세포 독성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

이들 sample들이 정상세포에 미치는 영향을 보기 위하여 Detroit-551 cell에 대해서도 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 눈에 띄게 높은 값을 보이는 c-1, e-1의 경우도 50% 미만의 수준으로 대체적으로 세포독성은 높지 않았다.

이상의 결과들로 봤을 때, 적은 양으로도 melanin 생성 저해 효과가 높고, 세포독성도 적은 b-3, c-3, c-1 sample에 대해서는 미백제로의 개발 가능성에 대하여 차후 *in vivo* 실험등을 통한 미백효과에 대한 검증이 더 필요할 것으로 보여진다.

이상의 결과들로서, *Streptomyces* sp. JR1의 이차대사물질들에서 항생제, 항산화제, 미백제로의 유용성분의 연구 및 개발 가능성을 보여주는 기초 자료로 이용될 수 있다고 사료된다.



V. 참고문헌

1. 특별논단 : 방선균 유래 항생·항암 물질 생합성 연구의 최근 연구동향 - 명지대학교 생명과학부, 현창구·홍순광((주)아트만바이오사이언스). Life Science & Biotechnology.
2. Moustafa Y. El-Naggar Maha A. Hassan and Wafa Y. Said. **2001.**, Isolation and characterisation of an antimicrobial substance produced by *Streptomyces violatus.*, *Egyptial Journal of Biology.* vol. 3. p11-21.
3. Maha A. Hassan Moustafa Y. El-Naggar and Wafa Y. Said. **2001.**, Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures., *Egyptial Journal of Biology.* vol. 3. p 1-10.
4. 아끼라 시마즈·김창진·유익동, **1993**, 방선균의 다양성-종류, 형태 및 생활환., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol.21, No.1 ; 88-94
5. 김관수·류천인·이기성·이상선·이용보·이지열·전순배·조덕현 공저., 미생물학., 대광문화사., **1997.** : p100-107
6. 민경희·김치경·조민기., 대학미생물학., 탐구당., **1994.**,
7. Dong-A Encyclopedia (동아세계대백과사전), 동아출판사, **1992** : vol.13 : p444, vol.18 : p387
8. 최종덕·박옥연., **1993.**, 생리활성물질을 생성하는 해양미생물의 동정 - I. 항미생물 물질을 생산하는 해양방선균 분리균주 No. 101의 분리 및 배양 조건., *Bull. Korean Fish Soc.*, 26(4) : 305~311
9. Yong Li, Xifeng Li, 손병화. 최홍대., **2003.**, 해양균류의 항균활성 검색 (Screening of Antimicrobial Activity from the Marin-Derived Fungus), *Kor. J. pharmacogn.*, 34(2) : 142~144
10. 김창진. **1997.**, 특집 : 산업적 유용미생물(IV) - 산업적 유용 방선균의 분리 및 분류., *생물산업* vol. 10, No.2 : 34-43
11. 김기은 · 조문구, **1994**, 한국 근해 연안저토에서 분리한 해양 방선균이 생성하는

색소의 분리., *Kor. J. Biotechnol. Bioeng. Vol.9.* No.5 : 464-468

12. 문성훈 · 하상철 · 이동선 · 김종국 · 홍순덕., 1995. Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해제를 생성하는 방선균 분리주의 동정 및 최적 발효조건., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol.23.* No.4 : 439-445

13. 김창진 · 이강현 · 아끼라 시마즈 · 유익동., 1994., 다수 배지의 사용에 따른 방선균의 증복 분리빈도., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol.22,* No.3 : 329-331

14. 신진이 · 박재홍 · 배동훈 · 유주현., 1995., 항암성 항생물질을 생산하는 토양 방선균 YBE-316의 분리 및 동정., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. vol.23.* No.3 : 297-303



감사의 글

대학원에 입학한지도 벌써 2년이 지나고 어느새 졸업을 할 시기가 되었습니다. 논문을 준비하면서, 많이 배우고 노력했지만, 2년이란 시간은 저의 부족함을 메우기에는 너무 짧은 시간이 아닌가 싶습니다. 앞으로도 더 많은 경험과 배움의 기회를 갖기를 바래보며, 2년여의 대학원 생활동안 부족한 저를 이끌어주시고 격려해주신 모든 분들께 지면을 빌어 감사의 말씀을 드리고 싶습니다.

우선 너무나 어리고 부족한 저에게 많은 조언과 관심을 아끼지 않고 여기까지 이끌어주신 이선주 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 그리고, 바쁘신 와중에도 논문이 완성되기까지 논문 심사를 해주신 정덕상 교수님과 실험에 사용한 군주 제공에서부터 실험에 대한 많은 조언과 관심을 아끼지 않으신 해양대학의 박근태 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 학부과정부터 대학원 생활까지 많은 조언을 해주시고, 학문의 길로 이끌어주신 한성빈 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 김원형 교수님, 이남호 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 항상 건강하시고, 올 2005년에는 좋은 일만 함께 하시길 기원합니다.

그리고, 학부 4학년 때부터 항상 함께하고 있는 화학과 생화학 실험실 식구들. 바쁜 와중에도 항상 내 논문을 걱정해주시고 실험 아이디어를 내주신 부희정 선생님, 든든하게 옆에서 지켜주는 경범오빠, 그리고, 가끔 짜증을 부려도 웃으면 넘기면서 실험실을 지키는 상훈이, 얼마 전부터 실험실 식구가 된 승우와 민영이. 너무 너무 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 본 논문을 쓰기까지 관심을 갖고 조언해 주신 생물학과 이동현 선생님과, 실험기자재의 사용을 웃으며 허용해준 생물학과 현경만. 또한, 학부와는 사뭇 다른 느낌으로 낯설었던 대학원 생활동안 많은 힘이 되어 주셨던 화학과 선배님, 후배님들께도 깊은 감사를 드립니다.

옆에서 그리고 멀리서 항상 나를 지켜보면서, 믿고 격려해주는 친구들이 있어 항상 행복합니다. 이름을 일일이 거론할 수는 없지만, 내가 항상 그들을 사랑하고 있다는 사실을 그들이 알아줬으면 좋겠네요. 항상 힘이 되는 친구들과 바쁘다는 핑계로 신경 써주지 못했던 여과지 식구들께, 미안한 마음과 항상 이해해줘서 감사하다는 말을 함께 전하고 싶습니다.

마지막으로 연세가 많으심에도 불구하고, 아직도 학교에 남아있는 철부지 막내딸 걱정에 맘 놓고 늙지도 못하고 계시는 저의 부모님. 항상 저의 선택을 존중하고 믿어 주시며 격려해주시는 부모님께 정말 감사하다는 말씀을 드리고 싶습니다.

그리고 정말 많이 사랑합니다. 아무쪼록 건강하시길 바랍니다.