

해양미생물로부터 면역증강물질 생산의 최적화

최혜절, 정명주, 정영기

동의대학교 미생물학과

전화 (051) 890-1534, FAX (051) 894-0840

Abstract

A halophilic bacterium was isolated from domestic marine. The bacterium was gram negative and motile. Transmission electron micrograph after cultivating for 6-, 20-, 72-, and 144 hrs showed that it was bacilli and contained intracellular granules, which were pleomorphic, larger in density by the time and considered to be PHB since they were positive on the sudan black B staining. The presence of sodium chloride was critical, because the isolated marine bacterium could not multiply and even produce any immunostimulant in the deficiency of sodium chloride. The strain produced an immunostimulant, which was investigated for the biological characteristics. The optimal conditions for the production of the immunostimulant were 1 % dextrose and 1 % yeast extract in artificial sea water for carbon and nitrogen sources, respectively. The initial pH and growth temperature for the production were 8.0 and 30°C under the presence of oxygen, respectively.

서론

해양미생물에서 발견된 주목받는 생리활성물질로는 marinostatin, isatin, aplasmomycin, marinactam, istamycin 등 항생, 항암, 항바이러스 효과가 있는 물질들이며 열대의 산호에서 분리된 방선균 *Streptomyces* sp.가 생산하는 octalactin 등은 항암효과가 우수한 물질로 밝혀졌다(1). 해양세균의 대사물질은 다수가 박테리아, 항진균, 세포독성, 항암, 항바이러스, 효소저해 등, 다양한 생리활성을 효과를 갖고 있다. 이러한 이유로 해양유래의 생물을 이용하여 신규 생리활성물질을 분리하여 개발하고자 하는 연구가 깊은 관심 속에서 진행되고 있다.

따라서 본 연구는 해양미생물로부터 생체방어 능력을 증강시킬 수 있는 면역증강물질 탐색의 일환으로 국내의 해양 일대의 해수를 채취하여 그로부터 면역증강물질 생산 균주를 분리하여 생산 균주의 특징을 조사하고 면역증강물질 생산을 위한 최적 배양 조건을 검토하였다. 나아가 물질의 기초적 성질과 특성 등을 파악하였기에 정리하고자 한다.

재료 및 방법

Burkholderia sp. IS-203의 면역증강물질 생산을 위한 배지 조성은 해수에 탄소원, 질소원, NaCl 등의 순서로 하였으며 배양 후 mitogenic activity와 생육도 및 pH를 검토하였다. mitogenic activity는 MTT법을 이용하여 mouse의 splenocytes에 대한 세포증식능을 multiscanner를 이용하여 540 nm에서 optical density를 측정하여 백분율로 나타내었고 면역증강물질을 생산하는 균의 생육도는 UV spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 optical density를 측정하였다. 탄소원은 MMM에 각종 탄소원을 1 % 첨가하여 배양한 후 mitogenic activity가 가장 높은 탄소원을 선택하였으며 결정된 탄소원은 농도별로 첨가하여 mitogenic activity를 검토하였다. 질소원은 결정된 탄소원을 넣은 다음 MMM에서 peptone을 제거하고 각종 유기 및 무기질소원을 1 %씩 첨가하여 배양한 후 탄소원과 같이 mitogenic activity를 검토하였다. 정해진 탄소원과 질소원을 넣은 후 해수의 NaCl 농도를 달리하여 배양한 후 위와 같은 방법으로 검토하였다. 초기 pH는 결정된 배지 조성에 1N-HCl과 1N-KOH로 3.0-10.0 까지 조절하여 초기 pH가 면역증강물질 생산에 미치는 영향을 검토하여 최적 pH를 결정하였다. 온도는 앞에서 정해진 배지 조건에 따라 20 °C-40 °C 까지 5 °C 간격으로 배양하여 면역증강물질 생산을 위한 최적 온도를 설정하였다. 통기량의 영향은 250 ml flask에 배지를 30-150 ml 씩 넣어 180 rpm으로 진탕배양 후 그 상등액으로 mitogen activity를 측정하여 결정하였다. 그리고 면역증강물질의 최대 생산시기는 정해진 최적 배양조건으로 배양하여 시간별로 활성을 측정함으로써 배양 최적시간을 결정하였다.

결과 및 고찰

1) 탄소원의 영향

Burkholderia sp. IS-203의 기본배지인 MMM 배지에 각종 탄소원을 1 % (w/v) 씩 첨가하여 30 °C, 180 rpm에서 35 시간 배양한 후 면역증강 활성과 생육 정도를 검토한 결과 dextrose가 control 보다 높은 면역증강 활성을 보였다. 따라서 dextrose를 0.5-3 %까지 농도별로 첨가하여 배양한 결과 1.0 % dextrose를 첨가한 경우 가장 높은 면역활성을 나타냄으로써 최적 탄소원으로 1 % dextrose로 결정하였다.(Fig. 1.)

2) 질소원의 영향

MMM 배지에서 결정된 탄소원인 dextrose를 1.0 % 첨가하고 MMM 배지에 질소원인 peptone을 제거 한 후 여러 가지 유기, 무기 질소원을 1 % 첨가하여 질소원의 영향을 검토하였다. 그 결과 대부분의 무기질소원과 유기질소원인 아미노산 첨가는 대부분 균의 생육 및 활성에 영향을 미치지 않았고 유기 질소원 중 yeast extract가 혼합된 대조구와 비교할 때 높은 면역활성을 나타냄으로써(Fig. 2.) yeast extract를 0.5-3.0 %까지 농도로 첨가하여 배양한 결과, 1 % yeast extract가 가장 높은 면역활성을 나타내어 질소원은 yeast extract의 1 % 농도로 결정하였다.

3) NaCl 농도에 대한 영향

탄소원과 질소원이 결정된 해수 배지조성에 NaCl을 0-10 %까지 첨가하여 균의 생육과 면역증강 활성을 검토한 결과 NaCl 1-6 %까지는 균의 생육과 활성을 보였지만 NaCl을 첨가하지 않은 0 %와 7-10 %까지는 균의 생육이 저지되었고 면역증강 활성도 저하되었다. 특히, NaCl 3 %를 첨가한 배지는 Control과 같은 면역증강 활성을 보였고 균의 생육도 높았다. 그러므로 *Burkholderia* sp. IS-203은 NaCl 농도에 대해서 균의 증식과 면역증강 활성에 영향을 미침을 알 수 있다. 최적 NaCl 농도는 3 %이고 자연해수 조건에서도 거의 같은 결과를 보였다.(Fig. 3.)

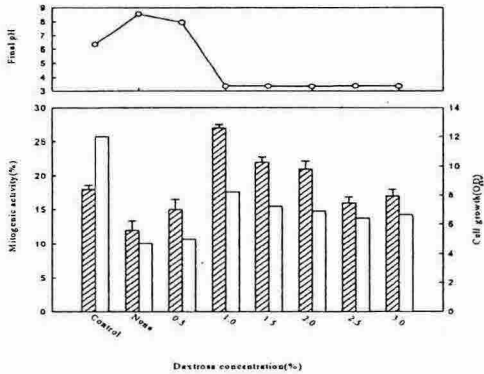


Fig. 1. Effect of dextrose concentration on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.

Symbol : —○—, final pH; —□—, cell growth; —▨—, mitogenic activity

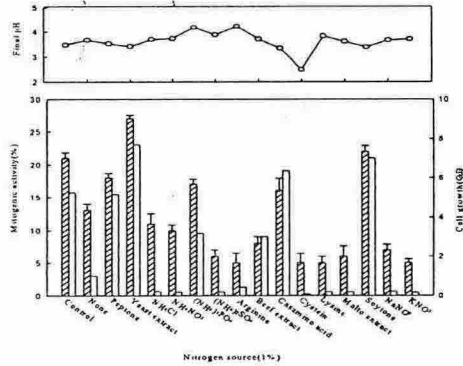


Fig. 2. Effect of nitrogen source on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.

Symbol : —○—, final pH; —□—, cell growth; —▨—, mitogenic activity

4) 초기 pH의 영향

면역증강물질 생산을 위한 최적 배지의 초기 pH를 3.0-10.0까지 조절하여 초기 pH가 면역증강물질 생산에 미치는 영향을 검토한 결과, *Burkholderia* sp. IS-203은 pH 3.0-10.0 범위에서 높은 생육도를 나타냈으며 최적 pH는 8.0으로 생육도와 면역증강물질 생산이 높았다.(Fig. 4.)

5) 배양 온도의 영향

최적 pH를 8.0으로 한 최적 해수 배지에 배양온도를 20 °C에서 40 °C 까지 범위에서 배양하여 면역증강물질 생산성을 조사한 결과에서와 같이 30 °C에서 가장 높은 생육과 면역증강 활성을 보였다.(Fig. 5.)

6) 통기량의 영향

통기량에 따른 균의 생육과 면역증강물질 생산성을 검토하기 위해 앞서 결정된 최적조건 생산 배지를 250ml flask에 30-150ml씩 넣어 진탕배양기에서 30 °C, 180 rpm으로 35 시간 배양한 후 균의 생육 및 면역증강 활성을 측정된 결과 50ml의 배지를 첨가한 flask에서 큰 활성을 나타냈으나 30ml의 배지를 첨가한 flask에서 균의 생육이 가장 높았다.

7) 면역증강물질 생산을 위한 배양의 경시 효과

면역증강물질 생산을 위한 최적 배양 조건으로 *Burkholderia* sp. IS-203을 배양하

여 시간에 따른 면역증강 활성과 생육 및 배양여액의 pH를 조사하였다.(Fig. 7.) 면역증강물질은 대수증식기부터 생산되었으며 최고 생산량은 정지기인 36 시간째로 나타났다.

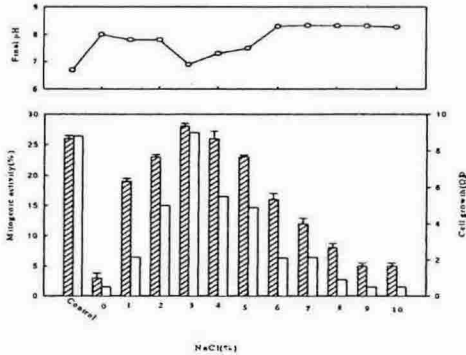


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.

Symbol : —○—, final pH; □, cell growth; ▨, mitogenic activity

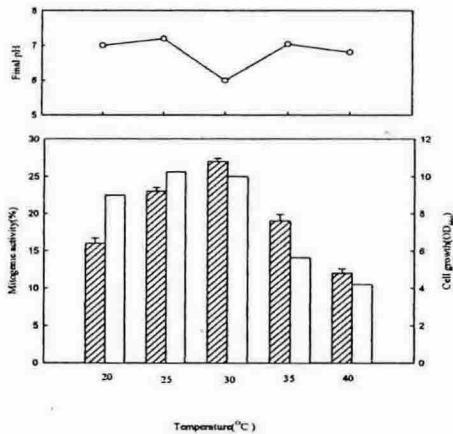


Fig. 5. Effect of temperature on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.

Symbol : —○—, final pH; □, cell growth; ▨, mitogenic activity

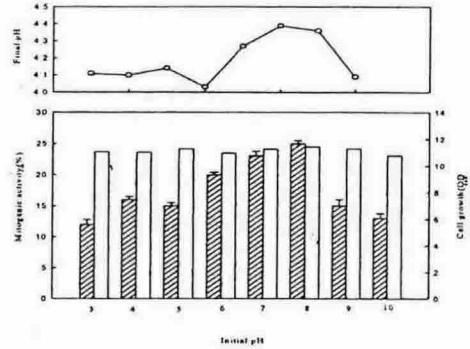


Fig. 4. Effect of initial pH on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.

Symbol : —○—, final pH; □, cell growth; ▨, mitogenic activity

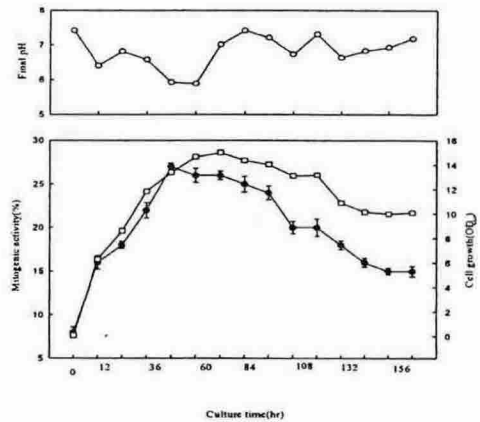


Fig. 6. Time profiles of cell growth and production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203 under optimal condition.

Symbol : —○—, final pH; —□—, cell growth; —●—, mitogenic activity

참고문헌

1. K. Okutani, Nippon Suisan Gakkaishi, 50:1035, 1984.
2. Koji., Purusotan B., Shigetoshi K., and Tsuneo N. Immunostimulating activity of Celosian, an Antiepatotoxic Polysaccharide Isolation from *Celosia argenta*, *Planta Medica*. 63:216-219, 1997.
3. Ohkuma, T., Otagiri, K., Ikekawa, T., and Tanka, S. Augmentation of antitumor activity by combined cryodestruction of sarcoma 180 and protein-bound polysaccharide. EA, isolated from *Flammulina velutipes*(curt, ex fr.) sing in ICR mice. *J. Pharm. Dyn.* 5:4439-4444, 1982.