

Optimum Growth Conditions for λ -28 Bacterium Bearing Anti-Angiogenesis Effects

Jong-Kwon LIM, Se-Young LEE, In-Do .HEO, Min-Gyu SONG, Jin-Hyun SUN,
Eun-Ok KIM, Hyo-Jin SEO, Min-Yong KIM¹ and Jong-Deog Kim

Dept. of Biotechnology, ¹Dept. of Refrigeration Engineering, Yosu National
University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea, TEL&FAX:
+82-61-659-3305, pasteur@yosu.ac.kr

Abstract

Enterobacteria, named λ -bacteria isolated from fusiform fish bearing higher antioxidative capacity with ORP values, λ -28 strain bore higher anti-angiogenesis effect than other λ -species. Optimum growth condition of λ -28 bacterium was 25°C, neutral pH, Glc as a C-source, ammonium chloride as a N-source, and not effected with organic N-source.

서 론

혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 만들어지는 일련의 과정으로, 혈관을 구성하고 있는 내피세포의 이동(migration)과 세포간 장벽인 extracellular matrix(ECM)를 통과하는 침윤(invasion), 증식(proliferation), 혈관으로의 분화(tube-like structures), 새로운 ECM의 형성, 평활근세포의 관여 등 복잡하게 이루어지며, 이에 대한 유도물질과 억제 물질간의 균형에 의하여 정교하게 조절되는 것으로 알려져 있다(1).

혈관신생 저해를 위한 천연물이나 합성유기화합물을 국내외에서 많이 개발하고 있다. 해양생물은 육상과 전혀 다른 환경에서 자라나기 때문에 물질대사의 경로도 육상 생물과는 다르며 그 성분도 육상 생물과는 비교할 수 없을 만큼 새로운 구조를 갖는 화학물질을 생산한다. 그 중에서도 정어리, 고등어, 꽂치, 참치, 전갱이, 청어 등 등푸른 생선에 다량 함유되어 있는 불포화지방산인 EPA와 DHA가 여러 인체 암세포의 성장과 동맥경화를 억제한다고 보고된 바 있다(2-3). 하지만 이들 체내에 있는 불포화지방산은 쉽게 과산화지질로 변하면서 산화가 일어나는데, 산화가 일어나지 않고 자신의 체내에 가지고 있는 것은 어떠한 물질이 어류의 체내 그것도 장내세균에서 불포화지방산들을 산화되지 않게 하는 성분을 생산할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

사용균주

균주는 정어리의 내장에서 채취한 균을 분리하여 λ 균으로 명명하고 항산화 시험을 통하여 총 5개의 균주를 선발하여 angiogenesis 실험을 거쳐 λ -28균주를 선발하여 사용하였다.

시료의 제조

균주의 대량 배양을 위해서 5L jar fermentor를 이용하여 25°C, 250rpm, 5vvm, 호기 조건으로 45시간 배양하여 5000rpm, 15분간 원심분리하고 상등액을 취하여 80% 황산암모늄으로 염석한 후 15000rpm 원심분리하여 pellet을 MOPS buffer(pH 7.0) 및 phosphate buffer(pH 7.0)를 이용하여 투석하였다. 투석된 용액은 동결건조시켜 분말화 한 후 이를 phosphate buffer에 녹여 Size Exclusion Chromatography(SEC)를 실행하여 시료로써 사용 하였다.

세포배양 및 angiogenesis test

HUVECs은 2% FBS첨가 EBM-2배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂-incubator에서 배양하였다. Anti-angiogenesis test는 96well-plate에 30 μ l의 matrigel을 넣어 고체화 시킨 후 각 well당 5 \times 10³개의 세포를 넣어 총량이 200 μ l가 되게 한 후 세포 착상시 시료를 투여하고 3시간 후 tube가 형성되면 불규칙적으로 5면을 선택하여 촬영하고 NIH program을 이용하여 신생된 혈관의 길이를 측정하였다.

최적온도 영향

λ -28균주의 배양은 250 mL flask에 PYG배지를 이용하여 seed culture한 균주를 넣어 각각 25 °C, 30 °C, 37 °C의 incubator에서 배양하면서 측정하였다.

λ -28균주의 영양원의 영향

탄소원의 영향과 질소원의 영향을 알아보기 위해 250 mL flask에 탄소원인 glucose, lactose, dextrose 및 fructose, 유기 질소원인 gelatin, casein, urea, 무기 질소원인 sodium azide, ammonium chloride 및 potassium nitrate를 각각 0.1 %씩 첨가하여 배지를 제조하였다. 각 균주를 접종하고 6시간 간격으로 시료를 채취하여 흡광도를 측정하였고, ORP meter를 이용하여 ORP를 측정하였다.

결과 및 고찰

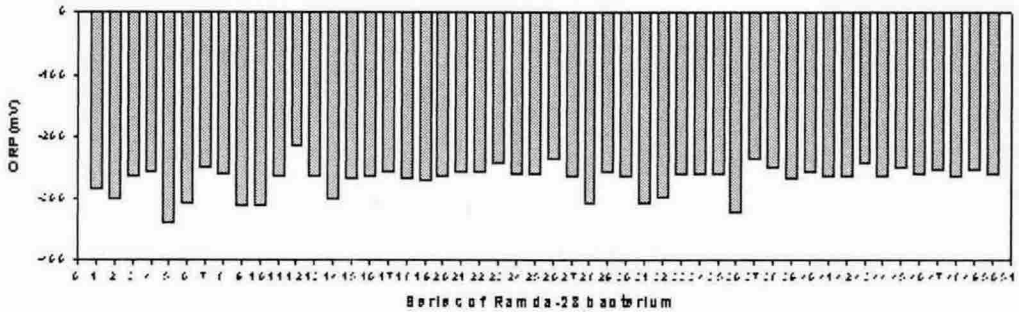


Fig. 1. ORP Value of λ bacteria series.

항산화력이 좋은 5개 균주의 선발

50개의 λ 균주로부터 ORP를 기준으로 5개의 λ 균주를 Fig. 1 과 같이 -0.3 V이하의 균주를 선발하였다.

Angiogenesis를 이용한 최종균주의 선발

각각의 균주의 angiogenesis 실험 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Anti-angiogenesis 실험 결과 λ -28균주의 효과가 control군에 비해 각각 73.3%, 34.7%의 저해율을 보였다. 따라서 이 후의 실험은 λ -28균주를 이용하였다.

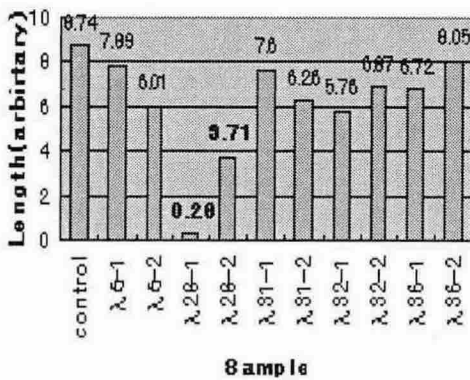


Fig. 2. Screening of λ -strains bearing antiangiogenesis effect from fusiform fish.

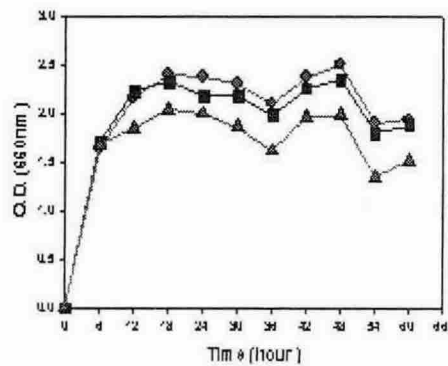


Fig. 3. Growth rate of λ -28 bacterium with a variety of temperature.
 ●: 25 °C ▲: 30 °C ■: 37 °C

최적온도

λ 균주의 최적 성장 온도를 탐색한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 25 °C에서 성장이 가장 좋았다.

최적 영양원

λ -28균주의 최적 영양원 실험은 아래의 그래프에서 보는 것과 같이 탄소원중에서는 glucose가 균주의 성장 면에서나 항산화 능력면에서 가장 좋은 수치를 보이는 것을 볼 수 있다. 무기 질소원에서는 ammonium chloride가 항산화력에서는 좋은 결과를 볼 수 있었으나 유기 질소원의 경우에는 항산화력이나 성장률에서 차이를 보이지 않았다.

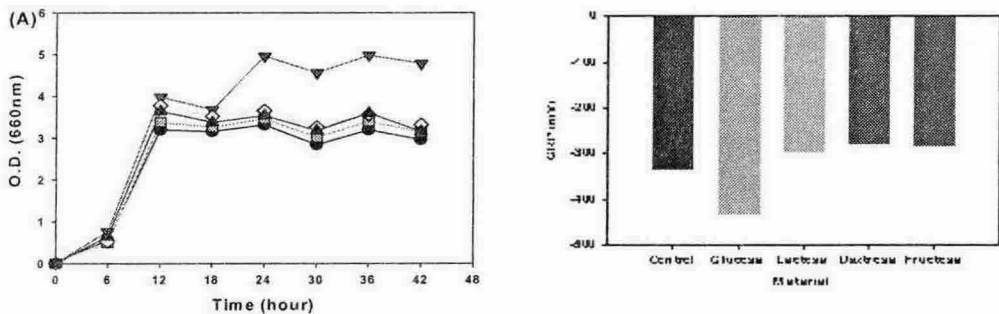


Fig. 4. (A) Influence of carbon sources on the growth of λ -28 bacterium.

(B) ORP of λ -28 bacterium with various carbon sources.

●: control, ▼: glucose, ■: lactose, ◆: dextrose, ▲: fructose

요약

정어리에서 분리한 균주 중 가장 항산화력이 강한 균주를 5개를 선발하여 이를 antiangiogenesis test를 통하여 효과가 가장 뛰어난 균주인 λ -28번 균주를 선발 하였다. 균주의 최적 배지를 제조하기 각기 다른 온도, 영양성분등을 투여하여 최적의 조건을 알아보았다. 온도에 있어서는 균주의 특성상 바다온도와 가장 비슷한 25°C에서 가장 좋은 성장률을 보였고 영양적인 측면에서 보면 탄소원에서는 glucose가 균주 성장률이나 항산화력에서 다른 첨가물에 비해 유효한 효과를 보였고, 무기 탄소원에서는 ammonium chloride가 좋은 항산화력을 보였다. 유기 탄소원을 첨가한 실험에서는 유효한 효과가 나타나지 않았다.

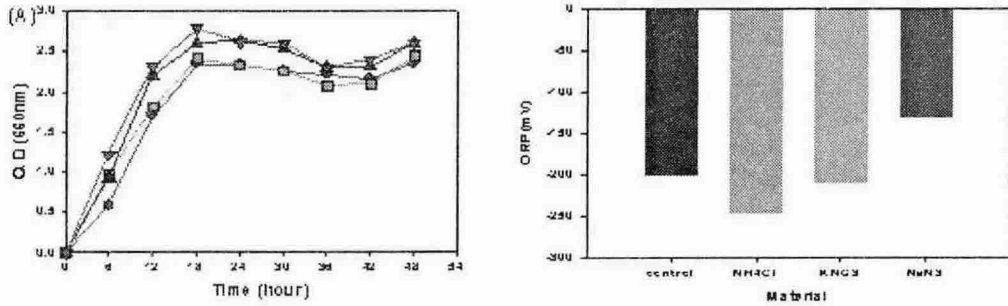


Fig. 5. (A) Influence of inorganic nitrogen sources on the growth of λ -28 bacterium. (B) ORP of λ -28 bacterium with various inorganic nitrogen sources.
 ●: control, ■: ammonium chloride, ▲: potassium nitrate ▼: sodium azide

감 사

학술진흥재단의 기초과학지원사업(KRF-2004-015-C00484)의 일부이며 이에 감사합니다.

References

1. Folkman J and Shing Y. Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(16):10931-10934.
2. Beck SA, Smith KL and Tisdale MJ. Anticachetic and antitumor effect of EPA and its effect on protein turnover. *Cancer Research* 51(15) : 6089, 1991.
3. Phillipson BE, Rothrock DW, Conner WE, Harris W, Ellingworth R. Reduction of plasma lipoprotein and apoprotein by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. *New Engl J* 312(19) : 1210.