

면역증강물질을 생산하는 해양미생물의 분리 및 동정

최혜정 · 정명주 · 정영기*

동의대학교 미생물학과

Isolation and Identification of a Marine Bacterium Producing an Immunostimulant

Hye-Joung Choi, Myung-Ju Jung and Yong-Kee Jeong[†]

Dept. of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

A halophilic bacterium was isolated from domestic marine. The bacterium was identified as a 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 polyhydroxy butyrate (PHB) since they were positive on the Sudan black B staining. Their biochemical characters included the oxidation of glucose and maltose as a substrate and utilization of amino acids such as L-asparagine and L-glutamate for efficient growth. Of note, 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 morphological, physiological and biochemical characteristics of the isolated resembled those of the *Pseudomallei* group, therefore it was identified as *Burkholderia* sp. IS-203.

Key words: immunostimulant, *Burkholderia* sp., marine bacteria

서 론

천연물로부터 유래한 면역증강제는 면역반응을 강화 시키거나 저하된 면역능을 원상회복시킴으로써 암, 면역 결핍증, 그리고 만성감염 등의 치료를 위해 사용되고 있다(1-3). 면역조절제(immunomodulator)는 세균, 곰팡이, 합성물질, 식물, 동물 등으로부터 다양하게 보고되고 있으며 이들은 면역체계의 여러 단계에 작용하는 것으로 보고되고 있다(4,5). 최근에는 대식세포 등의 면역세포를 자극하여 면역 능력을 조절하는 면역조절제를 생약이나 균주로부터 찾아내는 연구들이 활발히 진행되고 있는데 lectin류나(6-8) 고분자 다당체에 의해 면역세포의 증식이 유도되면, thymidine의 세포내 DNA로의 도입이 현저히 증가되고 면역세포가 자극되며, 각종 면역세포의 기능과 세포의 분화증식을 조절하는 lymphokine과 cytokine의 생리활성물질의 분비가 많아진다. 일본에서는 Kumazawa 등(9)이 쥐의 spleen cell을 이용한 탐색으로부터 8개의 약용식물이 mitogenecity를 나타내고 그 중 7개는 interferon을 유도하는 것을 확인한 바 있다. Mitogen으로 작용하는 lectin은 암, 또는 면역기능의 저하로 고통받는 환자에게 적용될 수 있으나(10-12), 현재

사용되고 있는 대부분의 항암성 화학요법제나 항생물질들은 생체에 투여되면, 정상세포에 대한 독성, 암세포의 내성 획득, 인체내에서의 신속한 분해와 배설 등의 결점 뿐만 아니라, 숙주의 방어력에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 림프구 및 골수세포 등도 파괴하는 부작용을 가지고 있다(13,14) 또한 lectin은 이런 화학요법제에서 보여지는 해로운 작용은 제거하면서 체내의 면역작용을 활성화시킴으로서(15) 암의 진행을 억제시키거나, 감소된 면역기능을 정상적으로 회복시킬 수 있다(16). 지금까지 천연물로부터의 생리활성물질에 관한 연구는 주로 육상 자원을 대상으로 하여 왔지만(17-19), 육상생물로부터 새로운 활성도를 가진 물질을 개발하는 것이 투입된 연구비에 비해 경제성이 점차 떨어지므로 천진국 등에서는 이미 탐색 대상을 육상생태계가 아닌 해양이나 극한 생태계 같은 새로운 환경에 눈을 돌려 연구를 시작하고 있다. 해양은 특이한 생태계를 이루는 환경 때문에 해양생물이 만드는 대사산물은 육상생물에 비하여 특이한 골격의 화학구조를 가지게 되며 적자 생존의 경쟁속에서 살아남기 위하여 이들 생물은 다양한 생리활성을 나타내고 있다. 해양미생물에서 발견된 주목받는 생리활성물질로는 marnostatin, isatin, aplasmomycin, marinactam,

* To whom all correspondence should be addressed

istamycin 등 항생, 항암, 항바이러스 효과가 있는 물질들이며 열대의 산호에서 분리된 방선균 *Streptomyces* sp.가 생산하는 octalactin 등은 항암효과가 우수한 물질로 밝혀졌다(20).

따라서 본 연구는 해양미생물로부터 생체방어 능력을 증강시킬 수 있는 면역증강물질 탐색의 일환으로 국내의 해양 일대의 해수를 채취하여 그로부터 면역증강물질 생산 균주를 분리하여 동정하였다.

재료 및 방법

면역증강물질 생산균주의 분리

시료 수집

연구대상 균주 수집은 국내의 경남 통영 앞 바다와 남해안 일대, 동해안 일대에서 해수를 채취하여 Table 1에 나타난 바와 같이 인공해수(artificial sea water)(21)가 포함된 modified marine medium(MMM, Table 2)에 넣고 ice box에 보관한 상태로 실험실로 옮긴 후 진탕배양기를 이용하여 30°C, 180 rpm으로 배양하였다.

균주 분리

채취한 시료는 5일간 배양한 후 1.5%(w/v) 한천이 첨가된 marine medium에 도달하여 48시간 동안 정지배양하였다. 한천고체배양판에서 얻어진 각종 분리 균주에서 단일 집락을 분리하였다(Fig. 1). 분리된 집락은 10 mL 시험관의 MMM broth에 한 백급이를 접종하고, 30°C에서 18시간 진탕배양한 다음, 액체배지 150 mL을 함유한 500 mL 삼각 플라스크에 전배양액을 2% 접종한 후 진탕 배

Table 1. Composition of artificial sea water

Components ¹⁾	Proportion (% , w/v)
Calcium chloride dihydrate	0.147
Boric acid	0.0026
Potassium chloride	0.068
Magnesium chloride dihydrate	1.078
Sodium chloride	2.35
Ethylenediaminetetra-acetic acid tetrasodium salt	0.00003
Sodium hydrogen carbonate	0.0196
Sodium silicate	0.003
Sodium sulphate	0.4

¹⁾Used for cultivation of algae After kester et al. (1967).

Table 2. Composition of the modified marine medium for isolation of immunostimulant producing bacteria

Components	Concentration
Glucose	10.0 g
Peptone	5.0 g
NH ₄ NO ₃	0.0016 g
Na ₂ HPO ₄	0.008 g
Sea water	1.0 L
Experimental condition: pH 7.8	

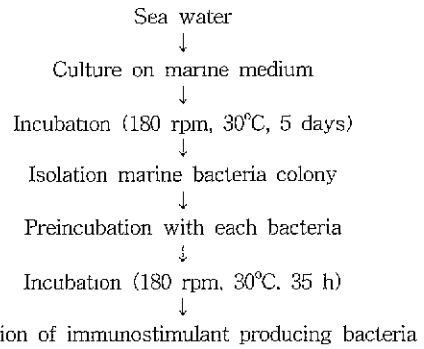


Fig. 1. Screening of immunostimulant producing bacteria.

양기를 이용하여 30°C, 180 rpm으로 35시간 동안 배양한 후 원심분리한 상등액을 마우스 비장세포에 적용하여 면역세포에서 가장 큰 활성을 나타내는 균주를 선정하였다(Fig. 2)

배지 조성

균주 배양을 위한 기본배지로서는 일본 Jarmarin Laboratory로부터 구입한 jamarin S 해수 1 L에 glucose 10 g, peptone 0.5 g, NH₄NO₃ 0.0016 g, Na₂HPO₄ 0.008 g을 첨가한 MMM(pH 7.8)을 사용하였다(Table 2) 균주는 기본 배지에 1.5%(w/v)의 한천을 첨가한 한천고체배양판배지에 접종시킨 후 30°C의 incubator에서 24시간 배양한 다음 4°C의 냉장고에 보관하였으며, 1주일마다 계대배양하였다.

면역증강물질 생산 균주의 동정

마우스 비장세포에서 높은 활성을 보인 분리 균주의 동정은 형태학적 특성, 배양학적 특성 및 생화학적 특성을

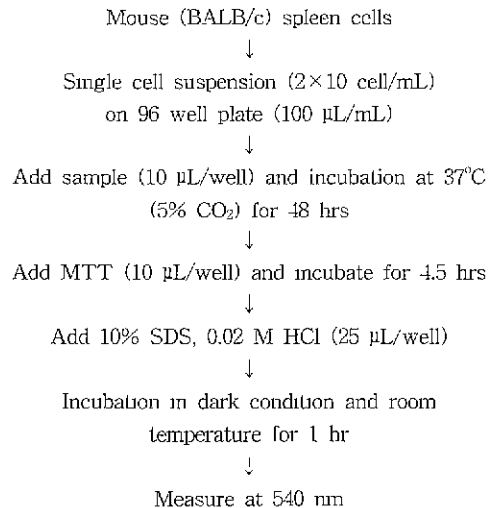


Fig. 2. Method for determination of immunostimulant activity.

조사함으로써 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 동정하였다. 형태학적 특성은 MMM 한천 평판배지에서 자란 집락의 모양과 색깔을 관찰하고 그람 염색을 통한 현미경상에서의 형태를 관찰하였다. 그리고 액체배지에서 6, 20, 72 및 144시간 배양하여 전자현미경(TEM, HITACHI H-600, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 배양학적 특성은 플라스크 배양을 통해 최적 생장 온도, 최적 생장 pH 및 산소 요구도를 조사하였고, 생화학적 특성은 Biology Microbial Identification System (Microstation 사, Korea)에 따라 당, 유기산 및 아미노산 이용능을 조사하였다.

활성 측정

마우스 비장세포에 대한 면역증강물질 활성은 3-(4,5-dimethyl-thazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay(22) 법을 이용하여 측정하였다. 결과는 대조군의 세포 생존율에 대한 백분율로 나타내었다

배지 및 시약

면역증강물질 활성을 알아보기 위한 동물세포 배양은 Roswell park memorial institutes 1640 medium(RPMI 1640, Gibco, Grand Island, NY., USA)과 fetal calf serum(FCS, Boehringer Mannheim, Germany), 100 unit/mL penicillin-streptomycin, sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine(Gibco, chemical Co., USA)을 사용하였고 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)과 24 well plate, 96 well plate(Coster, Cambridge, MA, USA)를 사용하였다. Trypan blue solution(0.4%), MTT, Lipopolysaccharide(LPS) 등은 Sigma chemical Co.(st. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

실험동물

본 실험에 사용된 동물은 암컷 BALB/c mouse로서 생후 6주 내외, 체중 30 g 내외의 것을 사용하였다. 실험에 사용하기 전까지의 온도는 22±2°C로 유지하였다. 사료는 표준 사료로 사용하였다

림프구 분리

실험동물(murine)의 림프구는 Wysocki and Sato (23)와 Mishell 등(24)의 방법에 따라 BALB/c mouse의 비장(spleen)을 분리하여 파쇄하고 탈지면으로 여과시킨 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전물에 Tris-buffered NH₄Cl soln(0.168 M NH₄Cl 0.17 M Tris-HCl, pH 7.65-9.1)을 가하여 적혈구를 반복하여 파괴시킨 후, 원심분리하여 백혈구단 남은 침전물에 FCS가 10% 함유된 RPMI 1640 medium을 가해 세포수가 2×10⁶ cell/mL 되도록 조정하여 이용하였다.

림프구의 mitogenic activity

면역세포에 대한 mitogenic activity는 96 well plate에

2×10⁶ cell/mL의 마우스 비장세포를 100 μL씩 분주하고 10% FCS가 포함된 RPMI 1640 medium에 50배 희석된 분리 균주의 배양상등액을 100 μL씩 triplicate로 넣은 후 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣어 48시간 동안 배양하였다. 배양한 각 well에 10 μL의 MTT(5 mg/mL in PBS) 시약을 가해서 45시간 동안 추가 배양하여 formazan crystal 형성을 유도하였다. 시간이 경과된 후 formazan crystal을 용해하기 위해 10% SDS-0.02 M HCl액 25 μL씩을 떨어뜨리고 알루미늄 호일로 밀폐하여 실온의 암실조건에서 1시간 동안 방치한 다음 multiscanner(Ti-tertek Multiscan MCC/340, Flow Laboratories, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 하여 얻어진 흡광도의 상대적인 값을 비교하여 면역활성능을 측정하였다.

결과 및 고찰

면역증강물질 생산균주의 분리

우리나라 해안의 여러 장소에서 해수를 채취하여 면역증강물질 생산 균주 분리 시료로 사용하였다. 채취한 시료들을 기본배지인 MMM를 이용하여 진탕배양기에서 30°C, 180 rpm으로 5일간 배양한 후 배양여액이 마우스 비장세포를 증가시키는 균주를 분리한 결과, 약 80여 균주를 1차 분리하였으며 이들 중 마우스 비장세포를 15% 이상 증가시키는 20균주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 20균주를 1.5%(w/v) 한천을 포함한 한천평판배지에서 30°C, 48시간 동안 점치배양 후 단일 집락을 분리하여 MMM broth에 각각 30°C, 180 rpm, 35시간 동안 진탕배양 후 배양여액을 MTT assay 방법을 이용하여 마우스 비장세포 증가를 측정하였으며, 측정 결과 마우스 비장세포를 가장 월등히 증가시키는 균주를 선별하여 면역증강물질 생산 균주로 선택하였다.

면역증강물질 생산균주의 동정

해수로부터 분리한 면역증강물질 생산균주의 동정을 위해 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하였다. 형태학적 특성으로 분리균주의 MMM 한천 평판배지상에서 집락은 크림색의 둥근 점질성이었으며 Gram 염색 결과 G 음성으로, 미약한 운동성을 가지며 catalase 양성과 oxidase 음성 반응을 보였다(Table 3). 균주를 6시간, 20시간, 72시간 및 144시간 배양한 전자 현미경상에서의 특징은 Fig. 3에 나타난 바와 같이 20시간 배양한 영양세포는 1.25~0.6×0.6 μm 크기의 간균 형태를 갖추었으며 시간이 흐를수록 세포내 과립의 밀도가 증가하면서 세포 형태가 다형태성으로 변하였다. 세포내 과립의 존재를 확인하기 위해 sudan black B로 염색한 결과 양성으로서 polyhydroxy butyrate(PHB)로 예상되었다.

Table 3. Morphological characteristics of the isolated strain

Formation	Characteristics
Gram stain	Negative
Colony shape	Round
Colony opacity	Opaque
Colony pigment	Cream
Capsule stain	Negative
Sudan black B stain	Positive
Cell shape	Rod
Cell size	1.25~0.6 μm×0.6 μm

생육에 산소를 요구하는 호기성균이었다. 생화학적 특성으로 Table 4에서 나타난 바와 같이 D-glucose, D-mannose, D-mannitol, inositol, maltose 등의 당과 L-asparagine, L-glutamate 등의 아미노산을 이용하였고 특히, O/F test에서는 glucose와 maltose를 산화하였다 이상과 같은 결과로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 따라 확인, 동정한 결과 해양세균 유래인 *Pseudomonallei* group의 *Burkholderia* 속으로 확인되었으므로 본 균주를 *Burkholderia* sp. IS-203으로 명명하였다.

MTT 법에 의한 활성 측정

면역활성을 알아보기 위하여 *in vitro* 실험으로 마우스 비장세포를 적출하여 2×10^6 cell/mL 준비한 후, 해수에서 분리한 균주의 배양액을 첨가하여 세포 증식률을 측정하였다. 그 결과 분리균주 *Burkholderia* sp. IS-203의 배양 상등액을 첨가하지 않은 control에 대하여 약 23%의 면역활성을 나타내어(Fig. 4, 5), 마우스 비장세포 내의 면역세포가 왕성하게 증식하였음을 알 수 있었다. 이처럼 해수에서 분리한 면역증강물질 생산 균주가 마우스 비장세포의 림프구의 분열을 유도하여 면역세포의 활성을 증진시키면서 정상세포에 대해서는 전혀 세포독성을 나타내지 않기 때문에 암세포에 대해서 선택적인 세포독성의 효과를 보였다. 따라서 치료에 존재하는 면역

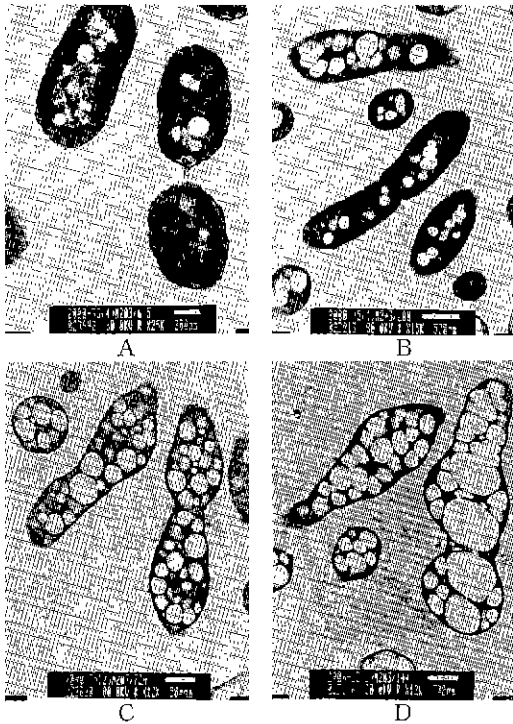


Fig. 3. Transmission electron micrograph of immunostimulant producing bacteria.

A. Culture time 6.5 hr, B. 20 hr, C. 72 hr, D. 144 hr

분리 균주의 배양 · 생화학적 특성을 확인한 결과 최적 성장 온도는 30°C였으며 20°C에서부터 40°C까지도 생육을 보였으며 pH는 3.0에서 10.0까지 높은 생육을 보였고

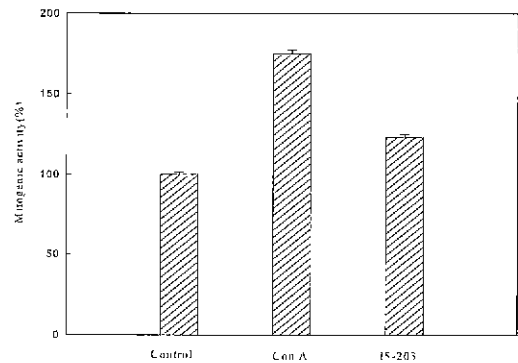


Fig. 5. Mitogenic activity of immunostimulant producing bacteria on the mouse splenocyte.

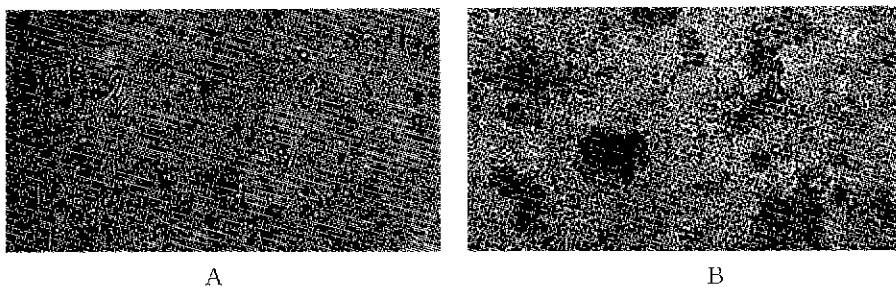


Fig. 4. Mitogenic activity of immunostimulant producing bacteria on the mouse splenocyte culture.

A. Control, B. *Burkholderia* sp. IS-203

Table 4. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain

Properties	Results	Properties	Results
Aerobic growth	+	Trehalose	-
Gram stain	G(-)rod	D-Gluconic acid	-
Hemolysis on human blood	-	Tryptophan	-
Oxidase	-	Acetamide	-
Motility	+	Esculin	-
Catalase	+	Indoxyl- β -D-glucoside	-
OF glucose	A	Urea	-
OF maltose	A	Citrate	-
OF trehalose	-	Malonate	-
OF lactose	-	Polymyxin	R
OF mannitol	-	Arginine	-
OF xylose	-	Lysine	-
Tween 40	-	Ornithin	-
Tween 80	-	Pyruvate	+
Glycogen	-/-	Succinate	+
Dextrin	-/-	L-Asparagine	+
Maltose	+	L-Glutamate	+
Sucrose	-	L-Serine	-
Xylose	-	ONPG	+
Raffinose	-	NO ₃ reduction	+
Inositol	+	DNase	-
Adonitol	-	TSI	NA
D-Glucose	+	Growth in NaCl (pH 7.8)	
D-Mannose	+	0%	-
D-Fructose	-	2%	+
D-Mannitol	+	5%	+
D-Sorbitol	-	7%	W
L-Rhamnose	-	10%	-
L-Arabinose	-		

+, 90% or more strains positive; -, 90% or more strains negative; V, 11~89% of strains positive; R, resistant; A, acid reaction; W, weak; NA, results not available.

세포 활성 증진 물질을 순수 분리하여 계속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 더 나아가 *in vivo* 실험을 통하여 체내에서의 면역 증진능을 검토할 필요가 있다고 사료된다.

요 약

면역증강물질을 생산하는 균주를 해수로부터 분리하여 동정한 결과 크림색의 둥근 점질성의 집락을 나타내었으며, Gram 음성의 간상형이고, 미약한 운동성을 가지며 catalase 양성과 oxidase 음성 반응을 보였다. 균주를 6시간, 20시간, 72시간 및 144시간 배양하여 전자 현미경 상에서 관찰한 결과 20시간 배양한 영양세포는 1.25~0.6 \times 0.6 μ m 크기의 간균 형태를 갖추었으며 시간이 흐를수록 세포내 과립의 밀도가 증가하면서 세포 형태가 다형태성으로 변하였다. 세포내 과립의 존재를 확인하기 위해 sudan black B로 염색한 결과 양성으로서 polyhydroxy butyrate로 예상되었다. 생육을 위한 최적 온도는 30°C, pH는 3.0~10.0이었으며 호기성균이었다. D-Glucose, D-mannose, D-mannitol, inositol, maltose 등의 당과 L-asparagine, L-glutamate 등의 아미노산을 이용

하였고 특히, O/F test에서는 glucose와 maltose를 산화하였다. 이상과 같은 결과로 해양세균 유래인 *Pseudomallei* group의 *Burkholderia* 속으로 확인되었으므로 본 균주를 *Burkholderia* sp IS-203으로 명명하였다

문 헌

- Itoh, A., Izuka, K. and Natori, S. : Antitumor effects of Sarcophage lectin on murine transplanted tumors. *J. Cancer Res.*, **76**, 1027-1033 (1985)
- Agarwal, B.B., Traquina, P.R. and Eessalu, T.E. : Modulation of receptor and cytotoxic response of tumor necrosis factor-L by various lectins. *J. Biol. Chem.*, **261**, 13652-13656 (1986)
- Hara, C., Kumazawa, Y., Inagaki, K., Kaneko, M., Kiho, T. and Ukai, S. : Mitogenic and colony-stimulating factor inducing activity of polysaccharide fractions from the fruit bodies of *Dictyohora indusiata* *Fisc. Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1615-1616 (1991)
- Severinson, E. and Larsson, E.L. : *Handbook of Experimental Immunology*. Weir, D.M., (ed), Blackwell Scientific Publications, Vol 2, p 63 (1986)
- Yongwen, Z., Hiroaki, K., Tsukasa, M. and Haruki, Y. : Fractionation and chemical properties of immunomodulating polysaccharides from roots of *Dipsacus asper-*

- oides*. *Planta Medica*, **63**, 393-399 (1997)
6. Green, E.D. and Baenziger, J.U. : Characterization of oligosaccharides by lectin affinity highperformance liquid chromatography *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 168-172 (1989)
 7. Yeaton, R.W. : Invertebrate lectin. I. Occurrence *Dev Comp. Immunol.*, **5**, 391-402 (1981)
 8. Harada, A.K., Yokosawa, H. and Ishii, S.I. : N-acetyl-galactosamine-specific lectin, a novel lectin in the hemolymph of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Isolation, characterization and comparison with galactose-specific lectin. *Comp. Biochem. Physiol.*, **88B**, 375-381 (1987)
 9. Kumazawa, T., Imai, J. and Tamakuma, S. : Clinical and immunological separated from hot water extract of *Angelica acutiloba* Kitagawa (Yamato Tohku). *Immunol.*, **47**, 75-83 (1982)
 10. Shohat, B., Joshna, H., Kott, I. and Irea, I. : Cellular immune competence in patient with tumors of the gastrointestinal tract. *Isr. J. Med. Sci.*, **12**, 1462-1466 (1976)
 11. Hadden, J.W. : Immunopharmacology of mice and men. *Int. J. Immunopharmac.*, **1**, 5-8 (1979)
 12. Hadden, J.W., Lopez, C., O'Reilly, R.I. and Hadden, E.M. : Levanisole and mosiplex: Antiviral agent with immunopotentiating action. *N.Y. Acad. Sci.*, **284**, 139-152 (1976)
 13. Kato, I., Kobayashi, S., Yokokura, T. and Muta, M. : Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann.*, **72**, 517-523 (1981)
 14. Tsuru, T., Yusa, K., Sudo, Y., Takamori, R. and Sugimoto, Y. : A fluorene-containing anthracycline (ME 2302) as a new antitumor agent against murine and human tumors and their multidrug resistant sublines. *Cancer Res.*, **49**, 5537-5542 (1989)
 15. Parent, M., Parent, F. and Chedid, L. : Enhancement of the neonate's nonspecific immunity to *Klebsiella* infection by muramyl dipeptide, a synthetic immunoadjuvant. *Immunology*, **75**, 3395-3399 (1978)
 16. Wybran, J., Govaerts, A. and Appelboom, T. : Inosiplex, a stimulating agent for normal human T cell and human leucocytes. *J. Immunol.*, **121**, 1184-1187 (1989)
 17. Food, K.A. : Biological response modifiers, The new immunotherapy. *Cancer Res.*, **49**, 1621-1639 (1978)
 18. Oldham, R.K. : Biological response modifiers. *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 789-796 (1983)
 19. Lafreniere, R. and Rosenberg, S.A. : Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Cancer Res.*, **45**, 3735-3741 (1985)
 20. Watanabe, I. : *Current Topics in Marine Biotechnology*. Fungi Tech. Press Ltd, p 11-14 (1990)
 21. Lasen, H. : the family halobacteriaceae. *The Prokaryote*, **1**, 976-978 (1981)
 22. Mosmann, T. : MTT assay. *J. Immunol. Method.*, **65**, 55-64 (1983)
 23. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : Panning for lymphocyte, a method for cell selection. *Pro Natl Acad Sci*, **75**, 2844-2848 (1978)
 24. Mishell, B.B., Shugi, S.M., Henry, C., Chan, E.L., Norht, J., Gallily, R., Slomich, M., Miller, K., Marbrook, J., Park, D. and Good, A.H. : Preparation of mouse cell suspension in selected methods. In *Cellular Immunology*, Mishell and Shugi (ed.), Freeman Co., San Francisco, p.3-27 (1980)

(2000년 10월 27일 접수)