

## 느릅나무로부터 분리된 *Enterobacter* sp. SSYL(KCTC 0687BP)이 생산하는 당화합물의 항암 면역활성 연구

양 영 렬 · \*김 영 주

삼성종합기술원

(접수 : 2001. 10. 25., 게재승인 : 2001. 12. 19.)

## Immunostimulating Exopolysaccharide with Anticancer Activity from *Enterobacter* sp. SSYL(KCTC 0687BP) Screened from *Ulmus parvifolia*

Young Lyeol Yang and Young Joo Kim†

Samsung Advanced Institute of Technology

(Received : 2001. 10. 25., Accepted : 2001. 12. 19.)

Immunostimulating exopolysaccharides with anticancer activity produced by *Enterobacter* sp. SSYL(KCTC 0687BP), isolated from Chinese elm(*Ulmus* sp.) were investigated. The exopolysaccharide contains molecular weight 100,000 to 1,000,000 Da and total carbohydrates 43.0 to 70.8% , total uronic acid 7.1 to 12.4%, and total proteins 15.4 to 20.6%. Compositions and contents of sugars in the exopolysaccharides are 10-30% glucose, less than 1% fructose, 10-15% galactose, 8-12% fucose, and 40-70% glucuronic acid. The anticancer immunostimulating activities were examined and proved with regard to both *in vitro* and *in vivo* bioassays. *In vivo* assay, the glycoprotein at the concentration of 0.3 mg/kg showed the best result that median survival time increased to ca. 138.1% in contrast to control groups.

**Key Words :** *Ulmus*, *Enterobacter* sp., exopolysaccharide, anticancer immunostimulating activity

### 서 론

종래 당화합물(polysaccharide)의 생산은 식물이나 해조류 등의 천연물 또는 다양한 미생물의 배양에 의해 생산되고 있다(1). 미생물에 의해 생산된 세포밖 당화합물(exopolysaccharide, EPS)로 상업화된 좋은 예들로는(Table 1) xanthan gum, pullulan, gellan gum, curdlan, hyaluronic acid 등이 있다(2). 이들 당화합물은 식품이나 화장품, 의약품 등에서 다양하게 이용되고 있으며, 당화합물이 갖는 다양한 용도로 인해 신규구조 및 조성을 갖는 당화합물의 생산 및 이의 용도개발에 많은 연구가 진행되고 있다(3-5). 특히 근래에 와서 세포벽의 바깥에 위치한 당화합물이 세포간 신호전달 매개체로 중요한 역할을 한다는 것이 알려지면서 당화합물에 대한 관심이 고조되고 있다(6-8).

느릅나무는 옛날 중국과 한국에서 약으로 써왔으며, 민방에서는 코니푸라고도 불리기도 하며 구황식물로 이용되기도 하였다. 유근피의 약성 (이수, 입질, 수종, 응중, 유선염, 위궤

양, 축농증, 등)은 본초강목, 의학입문, 향약집성방, 동의보감 등의 고전 의서들에서 언급되고 있다(9).

본 연구는 유근피(느릅나무 뿌리껍질)로부터 면역활성에 의한 항암효과를 갖는 당화합물 개발에 관한 연구를 수행해 가는 과정에서 살아있는 느릅나무 뿌리껍질로부터 EPS를 생산하는 신규미생물을 분리한 데서 기인한다. 본 연구실에서는 이미 유근피로부터 수용성 단백질당체를 분리하여, 이의 면역활성에 의한 항암효과를 검증한 바 있다(10). 본 연구실에서는 유근피와 살아있는 느릅나무 뿌리껍질 사이의 생리활성을 비교 연구하는 과정에서 살아있는 뿌리껍질로부터 면역활성을 나타내는 EPS를 생산하는 신규 미생물을 분리하였으며, 국제기탁기관인 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)을 통하여 동정한 결과 *Enterobacter*속의 속한 신규미생물로 검증되었다(특허균주 등록번호: KCTC 0687BP).

유근피가 느릅나무의 뿌리껍질을 사용하는만큼 민간인들에 의한 나무의 훼손 및 남벌이 심각한 문제로 지적이 되고 있는데, 뿌리껍질에서 분리된 미생물의 배양에 의한 항암효과를 갖는 면역활성 당화합물의 생산은 이런 문제에 대한 하나의 대안이 될 수 있을 것으로 생각한다. 또한, 생산 및 품질 관리면에서 미생물 배양에 의한 당화합물의 생산은 천연물 추출에 의한 당화합물의 생산에 비해 더욱 안정적인 장점을 갖고 있다고 할 수 있다. 본 논문에서는 이 신규 미생물을

†Corresponding Author : Samsung Advanced Institute of Technology, 103-6, Moonji-dong, Yusung-gu, Taejon 305-380, Korea  
Tel : +82-42-865-4784 Fax : +82-42-865-4789  
E-mail : yjkim@sait.samsung.co.kr

Table 1. Established applications of microbial exopolysaccharides(2)

	Use	Polymer
<b>Biological properties:</b>	Antitumor agents	$\beta$ -D-glucans
	Eye and joint surgery	Hyaluronic acid( <i>Streptococcus</i> EPS)
	Heparin analogues	<i>Echerichia coli</i> K5 EPS
	Wound dressings	Bacterial cellulose
<b>Chemical properties:</b>	Enzyme substrates	<i>Echerichia coli</i> K4 and K5 EPS
	Oligosaccharide preparation	Curdlan, pullulan, scleroglucan
<b>Physical properties:</b>	Emulsion stabilization	Xanthan
	Fibre strength	Bacterial cellulose
	Film formation	Pullulan
	Flocculant	Various
	Foam stabilization	Xanthan
	Gelling agents	Gellan
		Curdlan, gellan
		Curdlan, xanthan
	Hydrating agent	Hyaluronic acid
	Inhibitor of crystal formation	Xanthan
	Shear thinning and viscosity control	Xanthan
	Suspending agent	Xanthan
		Various
	Viscosity control	Xanthan
	Jet printing	Xanthan

이용하여 면역활성에 의한 항암효과를 갖는 EPS를 생산 및 제조 방법 그리고 당화합물의 성분 및 물성, 면역활성에 의한 항암효과를 제시하고자 한다(11).

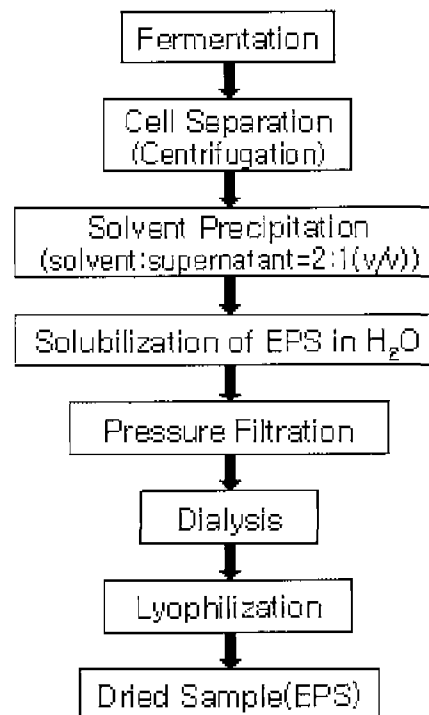
**재료 및 방법**

**균주분리 및 동정**

살아있는 느릅나무의 뿌리를 채취(부산 김해근처 야산)하여 뿌리에 있는 흙을 털어낸 후 뿌리껍질을 벗겨서 이것을 잘게 자른 후, 믹서기로 증류수를 붓고 분쇄하였다. 이 과정에서 뿌리껍질에 있는 수용성 당화합물이 추출되면서 수용액은 끈끈해지게 되는데 이 끈끈한 액을 MYGP(malt extract 3 g/L, yeast extract 3 g/L, glucose 10 g/L, bactopectone 5 g/L) 고체 한천배지에 조금 백금니로 도말(streaking)하였다. 이후 30℃ 배양기에서 배양(이틀 동안) 해가면서 고체 한천배지 상의 다양한 콜로니 중에서 세포막 다당류를 생산하는 콜로니(colony)들을 분리하였다. 고체 한천배지에서 세포막 다당류를 생산하는 콜로니는 MYGP배지를 포함하는 액체배지(100 mL)에서 30℃, 200 rpm의 조건으로 생산여부를 다시 확인하여 최종적으로 가장 높은 생산성을 보이는 균주를 분리하여, 동정에 들어갔다. 균주의 동정은 국제기탁기관인 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)을 통하여 동정하였으며, 동정을 위한 시료법으로는 균체지방산 분석(MIDI), API 20E 검정, BIOLOG 검정, 16S rRNA 서열분석 등이 이용되었다.

**세포막 다당류의 생산**

면역활성에 의한 항암효과를 보기 위한 샘플제조를 위해 2 L 발효조(Marubishi Co. Ltd, Model MDL 6C)를 사용하여



Scheme 1. Flow diagram for the preparation of dried EPS sample from fermentation culture broth.

다음 배지조성 및 배양조건에서 배양한 후 Scheme 1의 과정을 거쳐 세포막 다당류를 생산하였다. 배지조성은 30 g/L 탄소원, 3 g/L malt extract, 3 g/L yeast extract, 5 g/L bactopectone 이 사용되었다. 탄소원으로는 글루코스(glucose), 수크로스

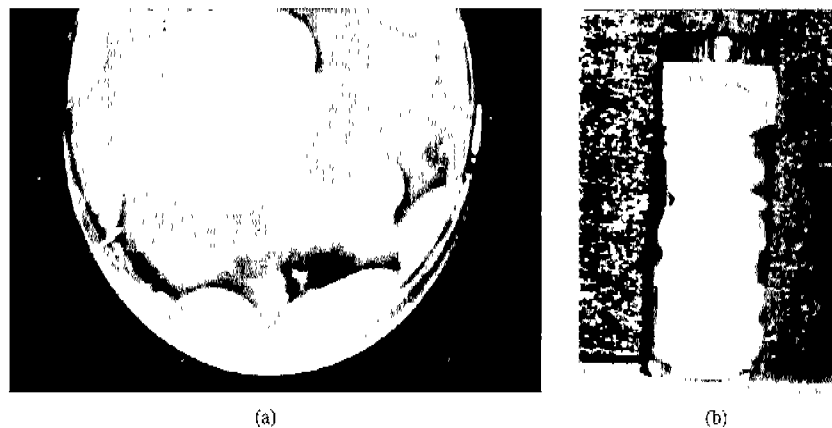


Figure 1. Photographs of microorganism(*Enterobacter* sp. SSYL(KCTC 0687BP)) producing exopolysaccharide on agar plate with MYGP media (a) and lyophilized sample of EPS (b).

(sucrose), 프룩토스(fructose), 갈락토오스(galactose), 글루코네이트(gluconate), 자일로스(xylose), 아라비노오스(arabinose), 램노스(rhamnose) 등을 사용하였다. 발효조 배양조건은 온도 30℃, 250 rpm, 통기량 0.25~1.0 vvm이었으며, pH는 별도로 조절하지 않고 하루 정도(24시간 이내) 배양하였다. 배양과정중에서 글루코스를 기질로 사용한 경우 효소법(영동제약)에 의해 글루코스 농도 변화를 관찰하였으며, 시간에 따른 배양액의 산화환원전위(ORP) 변화도 관찰하였다. 배양후 초고속 원심분리기(Sorvall RC 26 Plus, Rotor SLA-1500)를 이용해 12,000 rpm, 20분 정도 조건에서 배양액으로부터 세포를 분리하였다. 이후 상등액을 분리하여 아세톤과 부피비 1:2의 비율로 상등액에 첨가하여 상등액으로부터 세포막 다당류를 분리하였다(4). 분리된 세포막 다당류는 다시 증류수(1.5~2 L)에 녹인 후 0.7~1.6  $\mu\text{m}$  범위의 여과지를 가압필터기에 넣어 필터링한 후 여과된 액을 투석막(dialysis membrane, cut off molecular weight 6,000~8,000)에 넣고 하루 정도 증류수에서 투석(dialysis) 시켰다. 투석된 액을 동결건조기를 이용해 건조시켜서 최종적으로 흰색 성상의 건조된 세포막 당화합물(EPS)을 얻었다(Figure 1(b)).

#### 세포막 다당류의 농도별, pH에 따른 점성변화 및 Xanthan gum과 비교한 유변학적 성질 조사

하케 점도계(Hakke viscometer)를 이용하여 슈크로스(sucrose)를 탄소원으로 했을 때 생산된 EPS의 농도별 점성을 측정하였다. 점도 측정을 위해 S51 스펀들을 사용하였으며, 측정온도는 25℃였다. 그리고 0.5%(w/v) EPS 용액을 제조한 다음 산/염기를 첨가하여 pH를 변화시킨 후(2.68~11.5), pH 변화에 따른 점도 변화를 관찰하였다. 또한, EPS의 유변학적 성질을 알아보기 위해 1% 세포막 다당류 용액과 1% xanthan gum 용액의 전단속도(shear rate)의 변화에 따른 점성변화 및 전단응력(shear stress)의 변화를 알아보았다. 본 실험을 위해서 Fluid Rheometer(ARES, Rheometric Scientific, Co.)를 사용하였다(12).

#### 세포막 다당류의 조성분석

EPS의 총당함량은 페놀-황산법(phenol-sulfuric method)을 사용하였으며, 산성당 함량은 카바졸법(carbazole method)을,

단백질 함량은 개선된 로우리법(modified Lowry method)을 사용하여 측정하였다. 그리고, 세포막 다당류의 당 구성 성분을 분석하기 위해서는 HPLC를 사용하였다(14).

#### 실험동물

EPS의 면역활성에 의한 항암효능을 검증하기 위하여 B16 흑색종 이식 쥐를 이용하여 실험하였다. 실험동물은 대한실험동물센터(주)로부터 공급 받아 유지 관리되고 있는 특정병 원체부재 쥐(암컷, 6주령, 18~22 g)를 사용하였다.

#### 생체의 면역활성 검정 및 생체내 항암활성, 독성 검정

EPS의 생체의 면역활성 검정을 위해 면역세포 증식시험(immune cell proliferation assay), 혼합림프액 반응(mixed lymphocyte reaction, MLR), 면역세포 분열촉진(direct mitogenicity) 시험, T-cell 의존형 항체생성(*in vitro* T-cell dependent antibody production) 능력측정을 실시하였으며, 생체내 면역활성에 의한 항암효과를 보기 위해 B16 흑색종 모델을 사용하였다. 그리고, 독성 검정을 위해서는 패혈성 쇼크 모델을 사용하여 확인하였다(14).

#### 결과 및 고찰

##### 신규 미생물의 분리 및 동정 결과

MYGP 배지의 고체 한천배지 상에 성장한 많은 콜로니 중에 세포막 당화합물(EPS)을 생산하는 균주를 중 액체 배양을 통해 당화합물을 가장 많이 생산하는 균주를 별도로 선별하여 동정을 실시하였다. Figure 1(a)는 최종적으로 선별된 균주를 다시 고체 한천 배지 상에 자라게 했을 때의 사진으로 EPS가 생성되어 petri dish 뚜껑까지 EPS가 떨어져 나가 있는 것을 볼 수 있다. 이 균주를 생명공학연구원 유전자은행에 균주동정을 의뢰한 결과 *Enterobacter*속에 속하는 신규 균주로 동정되었고, 이후 특허 균주로 등록하였다. 균주명은 *Enterobacter* sp. SSYL 이고, 유전자 은행에 특허균주로 기록된 균주번호는 KCTC 0687BP이다.

##### 발효에 의한 EPS의 생산

플라스크 상에서 *Enterobacter* sp. SSYL(KCTC 0687BP)

Table 2. Comparison of monosaccharide compositions produced by various kinds of *Enterobacter* microorganisms(13)

Microorganisms	Monosaccharides in Expolysaccharide
<i>E. sakazakii</i>	glucose, galactose, fructose, glucuronic acid, acetic acid
<i>E. agglomerans</i>	glucose, galactose
<i>E. cloacae</i>	glucose, galactose, fucose, glucuronic acid, pyruvic acid, acetic acid
<i>Enterobacter</i> sp.	glucose, fucose, glucuronic acid
<i>Enterobacter</i> sp. (KCTC 0687BP)	glucose, fructose, fucose, galactose, glucuronic acid

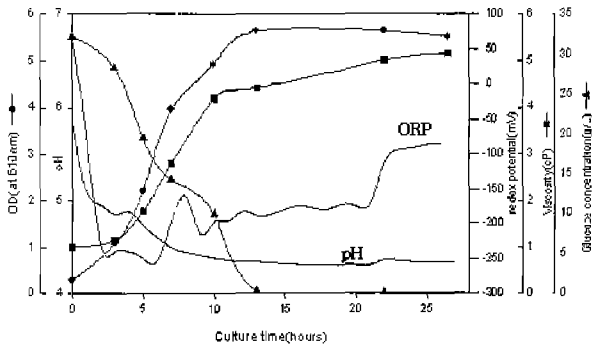
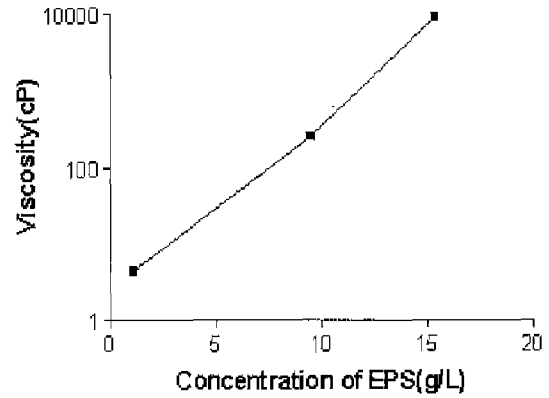


Figure 2. Time course of batch fermentation for the production of exopolysaccharide when using glucose as a carbon source.

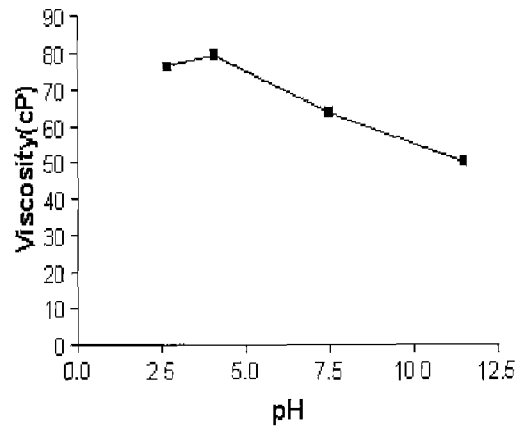
균주를 이용하여 12종의 탄소원에 대하여 EPS의 생산여부를 조사하였다. 이 중 galactose가 가장 높은 생산성을 나타내었으며(수율 38%), sucrose, glucose, xylose, gluconate 등에서도 생산이 높게 나타났다(수율 20% 내외). Glycerol 배지의 경우 생산이 매우 적었으며, sorbitol의 경우는 세포성장은 이루어졌지만 EPS는 전혀 생산이 되지 않았다(data not shown). 많은 탄소원 중에서 EPS 생산을 위해서 상대적으로 값이 싼 glucose와 sucrose를 최종적으로 선택하였으며, 두 탄소원의 경우 생산된 EPS의 생체의 면역세포 증식시험 결과를 보면 비슷한 면역세포 증식 결과를 보여주었다. 탄소원에 대한 최종 EPS의 수율은 10% 내외였다. 탄소원을 glucose로 했을 때 발효조의 거동을 Figure 2에 나타내었다. 그림을 보면 발효가 진행되어감에 따라 탄소원이 고갈되어가는 시점까지 발효액의 침도는 점진적으로 증가하지만, 탄소원이 고갈되어가는 시점에서 그 증가폭이 상당히 둔화되는 것을 볼 수 있다. 하지만 생성된 EPS는 분해되지 않고 시간이 지남에 따라 조금씩 점성이 증가되는 것으로 나타났다. 최종 발효가 끝났을 때 발효조 내부의 침도는 5.3 cP였다. 그리고, 발효 시간에 따른 pH와 ORP의 거동을 보면 glucose가 소모되는 시점 이후의 변화는 거의 비슷하게 나타나고 있음을 볼 수 있으나, 22시간 부근의 변화를 보면 ORP가 상당히 크게 변하는 것을 볼 수 있었다. 따라서, 발효조 내부의 상태변화와 관련하여 ORP를 측정변수 및 제어변수로 사용하는 것도 의미가 있다고 생각한다. 발효조를 통해 얻은 EPS의 최종 수율은 10% 내외로 플라스크 배양의 20% 내외의 수율에 비해서는 낮은 수율을 나타내었다.

**EPS의 화학적 성분분석**

발효조에 의해 생산된 세포밖 다당류의 분자량은 HPLC 분석결과 100,000~1,000,000 Da 사이의 분자량을 갖는 고분자 물질로 추정되었다. 그리고, IR과 <sup>1</sup>H-NMR을 사용하여 EPS를 분석해보면 산성당을 포함하는 당화합물의 전형적인



(a)



(b)

Figure 3. Viscosity variation with regard to concentration(a) and pH(b). EPS was produced by using sucrose as a carbon source. The initial concentration of EPS was 0.5% in (b) experiment.

피크들을 보여주었다(data not shown).

EPS의 총당함량은 43.0% 내지 70.8%였으며, 총산성당 함량은 7.1% 내지 11.4%, 총단백질 함량은 19.3% 내지 20.6%로, 느릅나무 뿌리껍질에서 분리된 신규미생물에 의해 생성된 EPS는 당단백질임을 알 수 있었다. EPS의 당 구성성분을 보면 glucuronic acid(46.7%), fucose(10.8%), fructose(0.2%), glucosc(29.9%), galactose(11.0%)이었고, 이외 미지의 성분이 1.3%정도였다. 기존의 문헌에 보고된 *Enterbacter*속에 속한 미생물들과 본 실험실에서 사용한 특허균주에 의해 생산된 EPS의 당성분을 비교해 보면(Table 2), 기존에 보고된 균주들의 경우(13)와 다름을 알 수 있었다.

**EPS의 농도별, pH에 따른 점성변화 및 유변학적 성질**

Figure 3(a)는 EPS의 농도를 변화시켰을 때 점도의 변화를, Figure 3(b)는 0.5%(w/v) 농도에서 pH 변화에 따른 점도 변

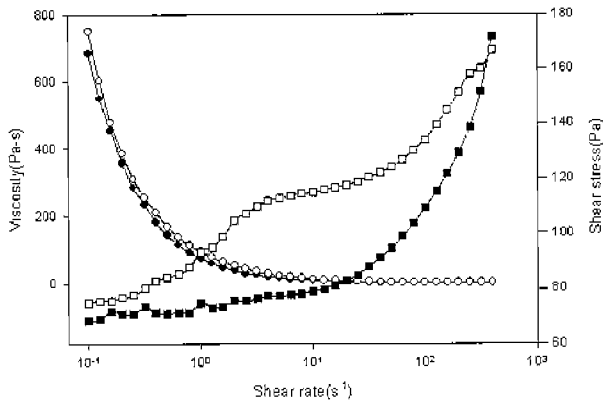


Figure 4. Rheological behaviors of both EPS and xanthan gum: ○ EPS viscosity; ● Xanthan gum viscosity; □ EPS shear stress; ■ Xanthan gum shear stress.

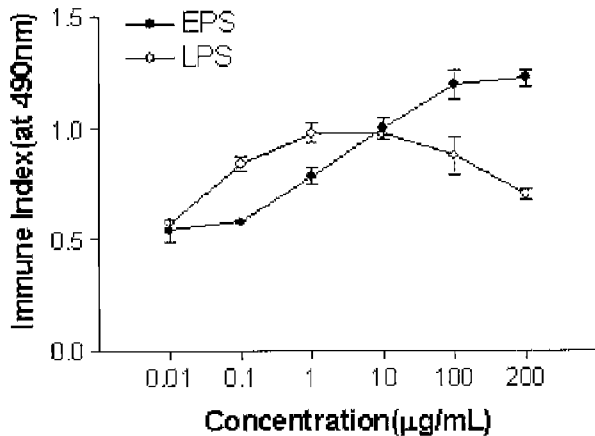
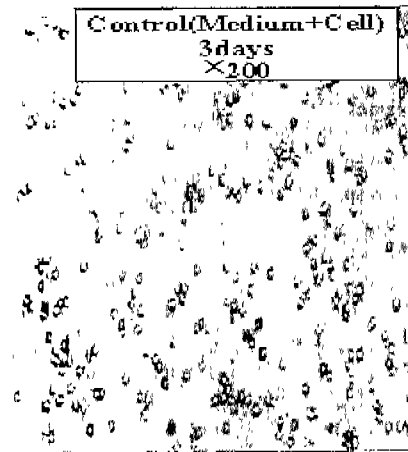


Figure 5. Result of immune cell proliferation assay. Immune index means absorbance at 490 nm in MTS assay.

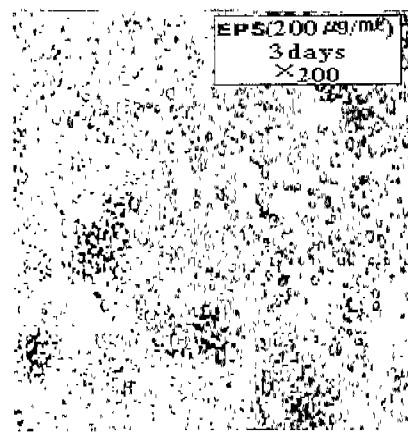
화를 보여주고 있다. 농도 증가에 따른 점도 증가는 지수적인 증가를 나타내었다. 그리고, 0.5% 용액의 초기 pH는 4.1 정도의 산성을 나타내었는데, 이 부근에서 최대 점성을 보였으며 pH가 증가함에 따라 점성은 감소하는 경향을 보였다. EPS의 유변학적 성질은 1% 농도에서 Xanthan gum 용액과 비교하여 살펴보았다. Figure 4는 전단속도의 변화에 따른 EPS와 xanthan gum의 점성변화, 전단응력의 변화를 보여주고 있다. 결과를 보면 세포막 다당류는 동일 농도에서 Xanthan gum과 비슷한 슈도플라스틱(Pseudoplastic) 유변학적 성질을 보여주고 있으며, 정상 점도(steady viscosity) 측면에서는 큰 차이를 나타내지 않았다.

**생체의 면역활성 검정 및 생체내 항암활성, 독성 검정 결과**

Figure 5는 면역세포 증식시험결과를 나타내었다. EPS의 경우 유근피 추출 물의 경우(14)와 마찬가지로 농도가 증가할수록 높은 면역세포 증식을 보였으며, 이는 positive control로 사용한 LPS(lipopolysaccharide)와 비교해 볼 때 다른 경향성을 보여주는 것이다. Figure 6은 EPS를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우 면역세포 증식시험에 따른 면역세포의 증식정도를 현미경상에서 관찰한 것으로 EPS를 처리할 경우(Figure 6(b)) 뚜렷한 세포 증식을 볼 수 있다. 이런 결과는



(a)



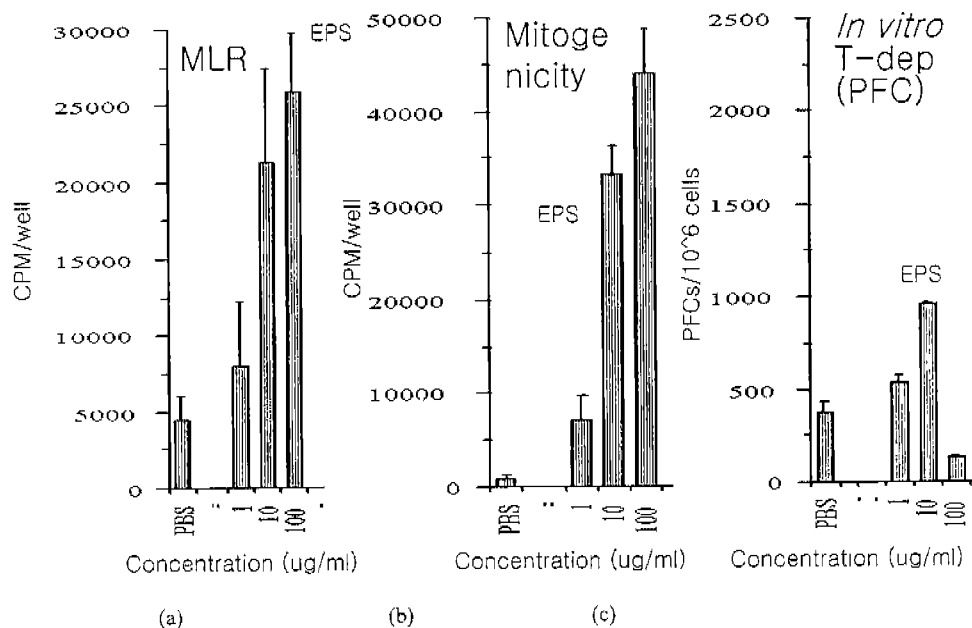
(b)

Figure 6. Microscopic photographs(magnification:200) of immune cell proliferation assay after 3 days culture. [(a) control: medium+cell, (b) sample treatment(200 µg/mL)].

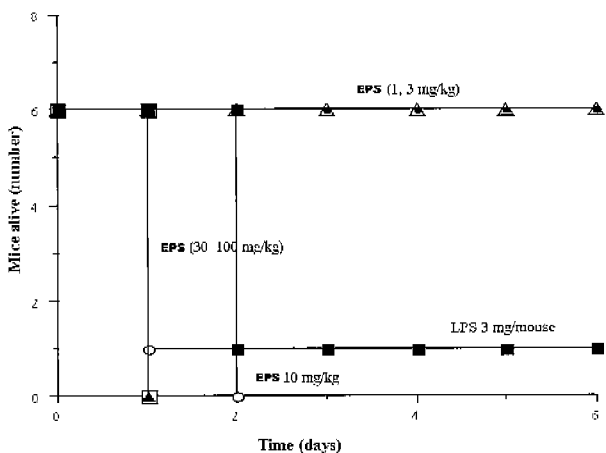
Figure 7(b)의 면역세포 분열촉진시험(*in vitro* mitogenicity test)에서도 EPS의 농도가 증가할수록 세포분열이 촉진되는 동일한 결과를 볼 수 있다. 따라서, 느릅나무로부터 분리된 미생물에 의해 생산된 EPS는 면역세포의 증식을 유도하는 기능을 갖고 있음을 알 수 있다.

Figure 7(a)는 혼합림프액 반응(MLR) 결과를 나타내는 것으로 이 경우도 EPS의 처리농도가 증가할수록 높은 면역반응을 보여주고 있다. Control로 사용된 PBS에 비해 높은 면역반응을 보여주고 있는데, 유근피로부터 추출한 단백질다당체와 마찬가지로 EPS도 면역세포 중 T세포의 활성화를 촉진하는 기능을 갖고 있음을 알 수 있다. Figure 7(c)는 EPS의 *in vitro* T-dependent 항체 형성능력에 대한 실험결과로 MLR이나 direct mitogenicity 실험결과에 비해 낮은 활성을 보여주었다. 이상과 같은 세포의 면역실험결과를 토대로 볼 때 느릅나무로부터 분리된 미생물에 의해 생산된 EPS는 면역세포의 증식을 유도하는 mitogen.으로서의 기능을 갖고 있으며, 면역세포 중 B세포에 대한 면역반응보다는 T세포에 대한 면역반응을 더 강하게 유도하는 것으로 판단되며, 이러한 면역반응이 결국 항암효과를 유발한다고 추정한다.

EPS의 생체내 독성 실험결과를 보면(Figure 8), EPS의 경

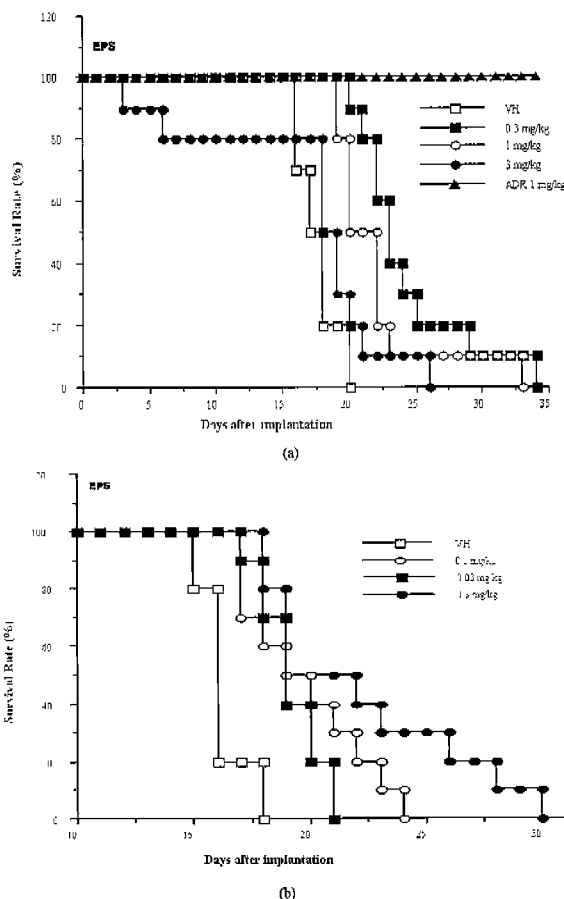


**Figure 7.** *In vitro* bioassays for measuring immunostimulating activities(PBS:phosphate-buffered saline, PFC:plaque forming cell) [(a):mixed lymphocyte reaction(MLR), (b) direct mitogenicity test, (c)*in vitro* T-dependent antibody production test].



**Figure 8.** The number of live mice after treatment of exopolysaccharide(EPS). The mice was treated at the concentration of 1,3,10,30,100 mg/kg. 3 mg of lipopolysaccharide(LPS) was injected to each mouse.

우 10 mg/kg까지 폐혈증(septic shock)과 유사한 독성 증상이 나타났지만, 그 이하의 농도에서는 뚜렷한 독성이 나타나지 않았다. 이 결과로부터 생체 내 항암효과를 보기 위한 EPS의 처리농도는 3 mg/kg 이하로 하였다. Figure 9(a)는 0.3, 1, 3 mg/kg의 시료처리시 B16 흑색종 모델을 이용한 면역에 의한 항암효과를 측정된 것으로 주어진 농도에서 낮은 농도일수록 항암효과가 크게 나타났다. 이에 따라 Figure 9(b)와 같이 농도를 더 낮추어 0.03, 0.1, 0.3 mg/kg에 대해서 조사한 결과 0.3 mg/kg일 때 가장 강한 항암효과를 나타내었으며, 이 농도에서 약 138.1% 정도의 생존연장효과를 나타내었다. 이때 양성대조 물질인 아드리아마이신(adriamycin)의 경우 177.2% 이상의 높은 생존연장 효과를 나타내었다. 또한, 투여 다음 날부터 14일간 체중의 변화를 2일 간격으로 관찰한



**Figure 9.** *In vivo* immunostimulating anticancer activities of exopolysaccharide. The mice implanted with B16F10 melanoma was treated with each sample. BDF1 mice were inoculated i.p. on Day 0 with 10<sup>5</sup> B16F10 melanoma cells. Drugs were administered by the i.p. at days 0-15. ADR means adriamycin.

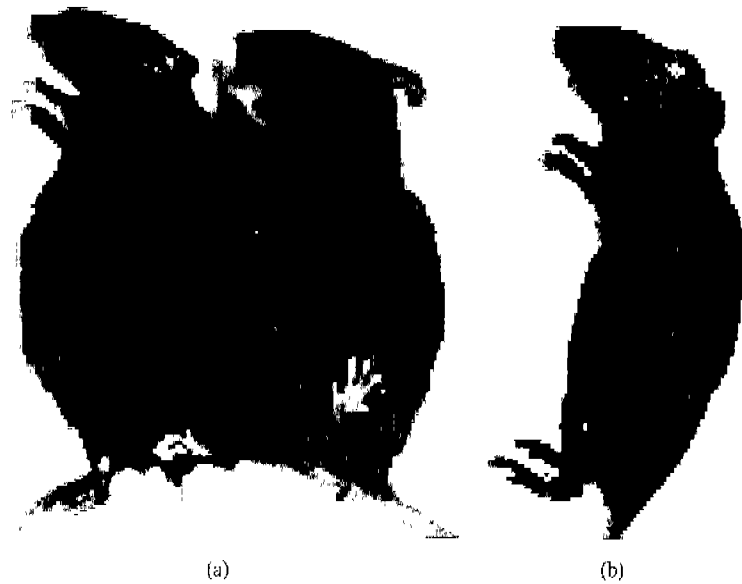


Figure 10. Photographs of B16 melanoma transplanted mice[(a) control(no treatment), (b) 0.3 mg/kg sample treatment].

결과 약물처리 후 14일째까지 특별한 체중감소는 관찰되지 않았다(data not shown). Figure 10은 용매대조군에 대한 EPS를 처리한 마우스의 사진을 보여주는 것으로 용매대조군의 경우 암세포 증식이 과도하게 이루어진 것을 볼 수 있지만 단백당체의 경우 이러한 암세포증식이 상당히 억제되었음을 알 수 있다. 전체적인 결과를 보면 EPS의 경우 천연물인 유근피 추출 단백당체의 경우와 비슷한 면역활성능을 보여주었다(14). 유근피 추출 단백당체의 경우 3 mg/kg에서, EPS의 경우는 0.3 mg/kg에서 면역활성에 의한 항암효과에 의해 약 140% 정도의 비슷한 생존 연장효과를 나타내었다.

유근피 추출물의 경우 서론에서 언급했듯이 삼림을 훼손시키는 문제가 있으며, 천연물 추출인만큼 생산에 시간적/공간적 제약이 따를 수 있지만, 미생물에 의한 EPS의 경우 이런 문제를 쉽게 극복할 수 있다. 단 유근피 추출물인 경우 세포독성이나 안정성면에서 EPS보다 더 뛰어나다고 볼 수 있으며, 이 경우 EPS는 좀더 안정성에 대한 검증이 요구된다고 할 수 있다.

## 요 약

본 연구에서는 느릅나무 뿌리껍질에서 분리한 신규 균주인 *Enterobacter* sp. SSYL(KCTC 0687BP)을 사용하여 세포벽 당화합물(exopolysaccharide, EPS)을 생산하여, EPS의 면역활성에 의한 항암효과를 실험적으로 제시하였다. EPS는 총당함량이 43.0% 내지 70.8%였으며, 총산성당 함량은 7.1% 내지 11.4%, 총단백질 함량은 19.3% 내지 20.6%로, 분자량은 100,000에서 1,000,000 Da의 당단백질을 알 수 있었다. EPS의 당구성성분을 보면 glucuronic acid(46.7%), fucose(10.8%), fructose(0.2%), glucose(29.9%), galactose(11.0%)이었고, 이외 미지의 성분이 1.3% 정도였다. EPS의 면역활성 검정에 따르면 EPS는 면역세포의 증식을 자극하는 mitogen 역할을 하며, 특히 T 세포에 의한 면역증강효과를 나타내었다. B16 흑색종 이식

마우스를 이용한 생체내 면역활성에 의한 항암효과를 관찰한 결과 유의성 있는 항암효과를 나타내었으며, 천연물인 유근피 추출 단백당체의 결과(3 mg/kg에서 약 140%의 생존 연장효과를 보임)와 비교해 볼 때 1/10의 농도인 0.3 mg/kg에서 약 138.1%의 비슷한 항암효과를 나타내었다.

## REFERENCES

1. Roller, S. and I. C. M. Dea (1992), Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods, *Critical Reviews in Biotechnology*, **12**(3), 261-277
2. Sutherland, I. W. (1998), Novel and established applications of microbial polysaccharides, *TIBTECH*, **16**, 41-46
3. Yalpani, M. (1987), Industrial polysaccharides: Genetic engineering, structure/property relations and applications, pp 311-335, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam
4. Sutherland, I. W. (1990), Biotechnology of microbial exopolysaccharides, Cambridge University Press
5. Miguel, Y. R. (1998), Polysaccharide biotechnology- a Cinderella project, *TIBTECH*, **16**, 50-52
6. Hodgson, J. (1991), Carbohydrate-based therapeutics, *Biotechnology*, **9**, 609-612
7. Karlsson, K. A. (1991), Glycobiology: a growing field for drug design, *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 265-272
8. Lee, Y. C. (1992), Perspective of glycotechnology: Carbohydrate recognition for better or worse, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **4**(17), 251-261
9. 최진규 (1997), 토종약초장수법, pp 414-417, 태일출판사
10. Yang, Y. L., Y. J. Kim, K. H. Kim and E. Oh (2000), Peptido-glyco compounds separated from slippery Elm for anticancer immunoreactive material and the processes for the preparation of the material, Korean Patent (2000-00636)
11. Yang, Y. L., and Y. J. Kim (2000), Immunostimulating exopolysaccharide with anticancer activity obtained from the new screened microorganism *Enterobacter* sp. SSYL(KCTC 0687BP) and its preparation of the material, Korean Patent (2000-43675)

12. Werner, F. and A. Mersmann (1998), About the rheology of polymer solutions, *Chem. Eng. Technol.*, **21**, 559-562
13. Shimada, A., H. Nakata, and I. Nakamura (1997), Acidic exopolysaccharide produced by *Enterobacter* sp., *J. Ferment. Bioeng.*, **84**(2), 113-118
14. Yang, Y. L., Y. J. Kim, K. H. Kim and Eugene Oh (2001), Separation of glycoprotein and its anticancer immunostimulating activity from dried barks of slippery Elm (*Ulmus parvifolia*), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, submitted