

해양미생물로부터 면역증강물질의 생산 최적화

최혜정 · 정명주¹ · 정영기*

동의대학교 미생물학과
¹경성대학교 교양과정부

Optimization of the Production of an Immunostimulant from a Marine Bacterium

Hye-Joung Choi, Myung-Ju Jung¹ and Yong-Kee Jeong*

Dept. of Microbiology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea
¹School of Liberal Arts, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

Abstract

A halophilic bacterium for the production of the immunostimulant was isolated from domestic marine, it was identified as *Burkholderia* sp. IS-203. 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.

Key words – Immunostimulant, *Burkholderia* sp. Marin bacteria

서 론

천연물로부터 유래한 면역증강제는 면역반응을 강화시키거나 저하된 면역능을 원상회복시킴으로써 암, 면역결핍증, 그리고 만성감염 등의 치료를 위해 사용되고 있다 [1,7,9]. 면역조절제 (immunomodulator)는 세균, 곰팡이, 합성물질, 식물, 동물 등으로부터 다양하게 보고되고 있으며 이들은 면역체계의 여러 단계에 작용하는 것으로 보고되고 있다 [16,22]. 최근에는 대식세포 등의 면역세포를 자극하여 면역 능력을 조절하는 면역조절제를 생약이나 균주로부터 찾아내는 연구들이 활발히 진행되고 있다. lectin류 [4,8,21]나 고분자 다당체에 의해 면역세포의 증식이 유도

되면, thymidine이 세포내 DNA로의 도입이 현저히 증가되고 면역세포가 자극되며, 각종 면역세포의 기능과 세포의 분화증식을 조절하는 lymphokine과 cytokine의 생리활성물질의 분비가 많아진다. 일본에서는 Kojima 등 [11] 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 [5,6,17], 현재 사용되고 있는 대부분의 항암성 화학요법제나 항생물질들은 생체에 투여되면, 정상세포에 대한 독성, 암세포의 내성 획득, 인체내에서의 신속한 분해와 배설 등의 결점뿐만 아니라, 숙주의 방어력에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 림프구 및 골수세포 등도 파괴하는 부작용을 가지고 있다 [10,18]. 반면 lectin의 경우는 이런 화학요법제에서 보여지는 해로운 작용은 제거하면서 체내의

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-890-1534, Fax : 82-51-894-0840
E-mail: ykjeong@hyomin.dongueui.ac.kr

면역작용을 활성화시킴으로서[15] 암의 진행을 억제시키거나, 감소된 면역기능을 정상적으로 회복시킬 수 있다[20]. 지금까지 천연물로부터의 생리활성물질에 관한 연구는 주로 육상 자원을 대상으로 하여 왔지만[3,12,14], 육상생물로부터 새로운 활성도를 가진 물질을 개발하는 것이 투입된 연구비에 비해 경제성이 점차 떨어지므로 선진국 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. 해양 미생물에서 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[19].

따라서 본 연구는 해양미생물로부터 생체방어 능력을 증강시킬 수 있는 면역증강물질 탐색의 일환으로 국내의 해양 일대의 해수를 채취하여 분리한 면역증강물질 생산 균주인 *Burkholderia* sp. IS-203를 대량으로 생산하기 위한 배지의 최적조건을 검토하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

배지조성

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 1).

최적 배양 조건 검토

해수에서 분리한 *Burkholderia* sp. IS-203[2]의 면역증강물질 생산을 위한 최적 배양조건은 배지조성, NaCl 농도, 초기 pH, 온도, 통기량 순으로 행하였다. 배지 조성은 해수에 탄소원, 질소원, NaCl 등의 순서로 하였으며 배양 후 mitogenic activity와 생육도 및 pH를 검토하였다. mitogenic activity는 MTT법[13]을 이용하여 mouse의 splenocytes에 대한 세포증식능을 multiscanner를 이용하여 540 nm에서

Table 1. 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	

optical density를 측정하여 백분율로 나타내었고 면역증강 물질을 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℃~40℃ 까지 5℃ 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.

활성 측정

마우스 비장세포에 대한 면역증강물질 활성은 3-(4,5-dimethyl-thazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay[13] 법을 이용하여 측정하였다. 결과는 대조군의 세포 생존율에 대한 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

Burkholderia sp. IS-203의 기본배지인 MMM 배지에 각종 탄소원을 1% (w/v)씩 첨가하여 30°C, 180 rpm에서 35시간 배양한 후 면역증강 활성과 생육 정도를 검토한 결과 dextrose가 기본배지보다 높은 면역증강 활성을 보였다. Fig. 1, 2와 같이 dextrose를 0.5~3%까지 농도별로 첨가하여 배양한 결과 1% dextrose를 첨가한 경우 가장 높은 면역활성을 나타냄으로써 최적 탄소원으로 1% dextrose로 결정하였다.

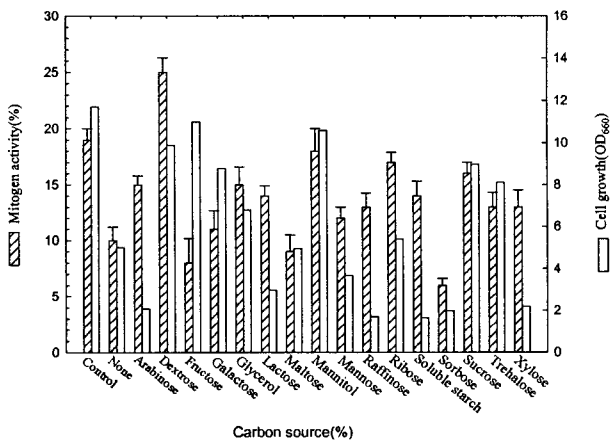


Fig. 1. Effect of carbon source on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.

□, cell growth; ▨, mitogenic activity.

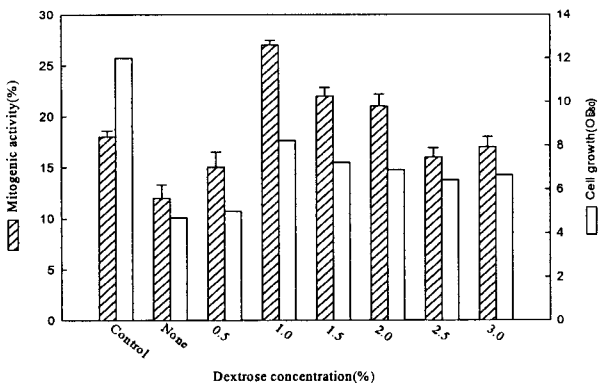


Fig. 2. Effect of dextrose concentration on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.

□, cell growth; ▨, mitogenic activity.

질소원의 영향

MMM 배지에서 결정된 탄소원인 dextrose를 1% 첨가하고 MMM 배지에 질소원인 peptone을 제거 한 후 여러 가지 유기, 무기 질소원을 1% 첨가하여 질소원의 영향을 검토하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 대부분의 균 생육 및 활성에 영향을 미치지 않았고 유기 질소원 중 yeast extract가 혼합된 대조구와 비교할 때 높은 면역활성을 나타내었다. yeast extract를 0.5~3.0%까지 농도로 첨가하여 배양한 결과 Fig. 4에서와 같이 1% yeast extract가 가장 높은 면역활성을 나타내어 질소원은 yeast extract의 1% 농도로 결정하였다.

NaCl 농도에 대한 영향

탄소원과 질소원이 결정된 해수 배지조성에 NaCl을 0~10%까지 첨가하여 균의 생육과 면역증강 활성을 검토한 결과 Fig. 5에서와 같이 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 기본배지와 같은 면역증강 활성을 보였고 균의 생육도 높았다. 그러므로 *Burkholderia* sp. IS-203은 NaCl 농도에 대해서 균의 증식과 면역증강 활성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 최적 NaCl 농도는 3%이고 자연해수 조건에서도 거의 같은 결과를 보였다.

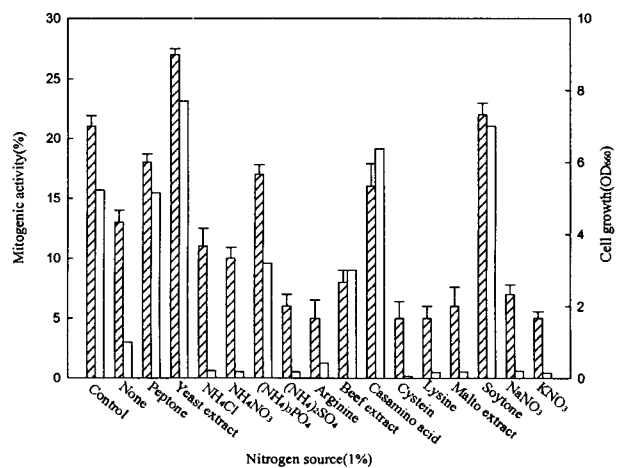


Fig. 3. Effect of nitrogen source on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.

□, cell growth; ▨, mitogenic activity.

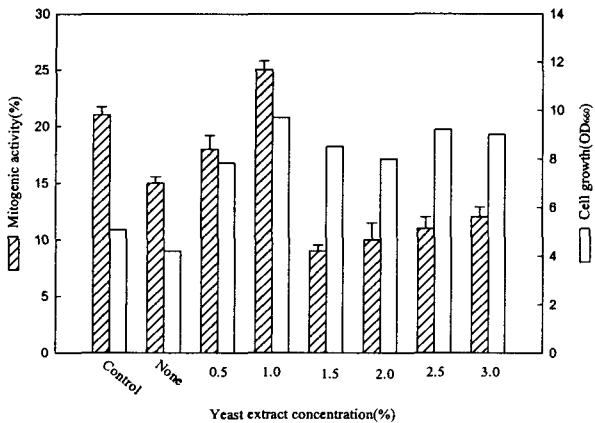


Fig. 4. Effect of yeast extract concentration on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.
□, cell growth; ▨, mitogenic activity.

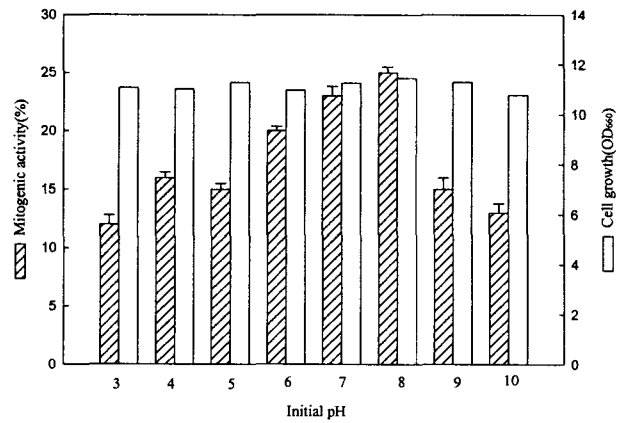


Fig. 6. Effect of initial pH on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.
□, cell growth; ▨, mitogenic activity.

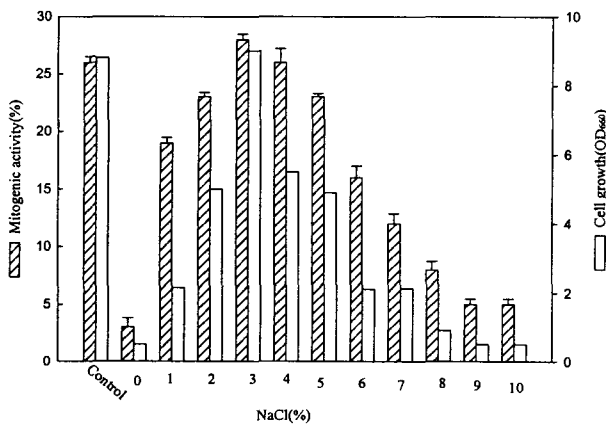


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.
□, cell growth; ▨, mitogenic activity.

초기 pH의 영향

면역증강물질 생산을 위한 최적 배지의 초기 pH를 3.0~10.0까지 조절하여 초기 pH가 면역증강물질 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 6과 같다. *Burkholderia* sp. IS-203은 pH 3.0~10.0 범위에서 높은 생육도를 나타냈으며 최적 pH는 8.0으로 생육도와 면역증강물질 생산이 높았다.

배양 온도의 영향

최적 pH를 8.0으로 한 최적 배지에 배양온도를 20℃에서 40℃까지 범위에서 배양하여 면역증강물질 생산성을 조

사한 결과 Fig. 7에서와 같이 30℃에서 가장 높은 생육과 면역증강 활성을 보였다.

통기량의 영향

통기량에 따른 균의 생육과 면역증강물질 생산성을 검토하기 위해 앞서 결정된 최적조건 생산 배지를 250 ml 플라스크에 30~150 ml씩 넣어 진탕배양기에서 30℃, 180 rpm으로 35 시간 배양한 후 균의 생육 및 면역증강 활성을 측정된 결과 Fig. 8과 같이 50 ml의 배지를 첨가한 플라스크에서 큰 활성을 나타내었으나 30 ml의 배지를 첨가한 플라스크에서 균의 생육이 가장 높았다.

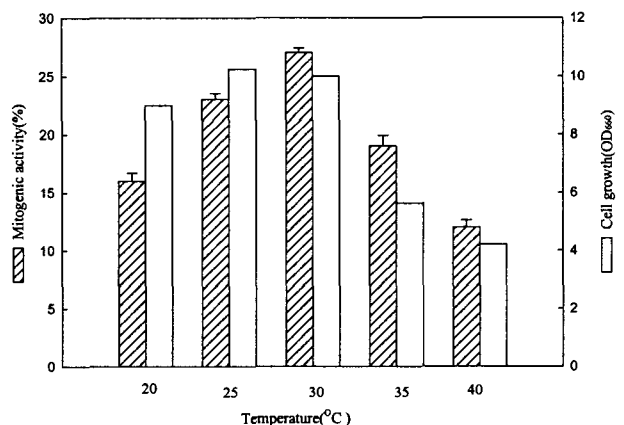


Fig. 7. Effect of temperature on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203.
□, cell growth; ▨, mitogenic activity.

해양미생물로부터 면역증강물질의 생산 최적화

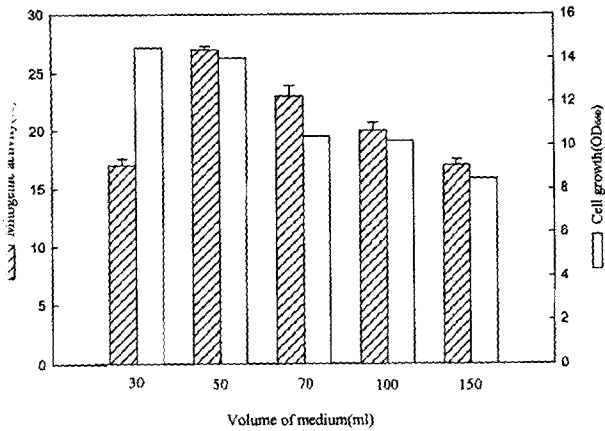


Fig. 8. Effect of aeration on the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203. □, cell growth; ▨, mitogenic activity.

면역증강물질 생산을 위한 배양의 경시 효과

면역증강물질 생산을 위한 최적 배양 조건으로 *Burkholderia* sp. IS-203을 배양하여 시간에 따른 면역증강 활성과 생육 및 배양여액의 pH를 조사하였다. Fig. 9에 나타난 바와 같이 면역증강물질은 정지기부터 생산되었으며 최고 생산량은 36시간째로 나타났다. 이상과 같이 *Burkholderia* sp. IS-203에 의한 면역증강물질 생산을 위한 최적 조건은 Table 2와 같다.

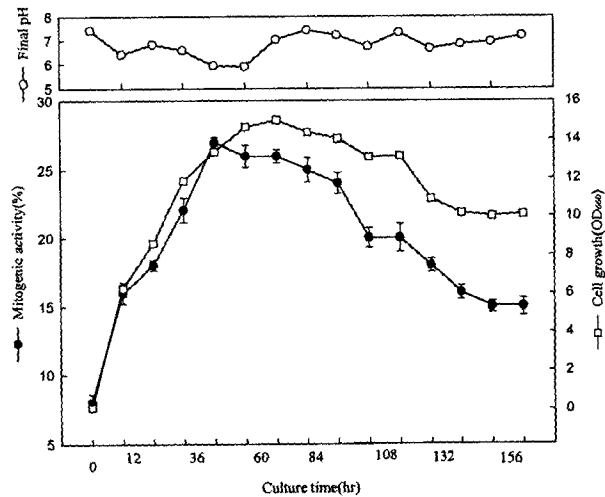


Fig. 9. Time profiles of cell growth and production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203 under optimal condition.

-○-, final pH; -□-, cell growth; -●-, mitogenic activity.

Table 2. The optimal culture conditions for the production of immunostimulant from *Burkholderia* sp. IS-203

Medium condition	Dextrose	1.0%
	Yeast extract	1.0%
	Sea water	
Physical condition	pH	8.0
	Temperature	30°C
	Aeration	50ml medium/250ml flask

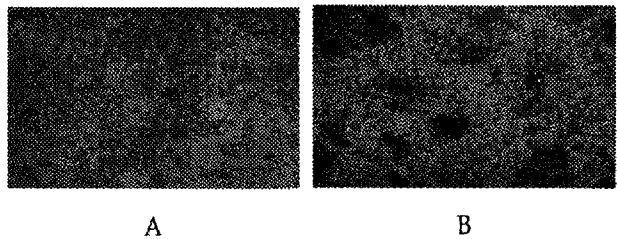


Fig. 10. Mitogenic activity of immunostimulant producing bacteria on the mouse splenocyte culture. A : Control, B : IS-203.

MTT 법에 의한 활성 측정

면역활성을 알아보기 위하여 *in vitro* 실험으로 마우스 비장세포를 적출하여 2×10^6 cell/ml 준비한 후, 해수에서 분리한 균주의 배양 여과액을 첨가하여 세포 증식률을 측정하였다. 그 결과 분리균주의 *Burkholderia* sp. IS-203 배양 여과액을 첨가하지 않은 마우스 비장세포에 대하여 약 23%의 면역활성을 나타내어(Fig. 10), 마우스 비장세포내의 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 시료에 존재하는 면역세포 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

해수에서 분리한 *Burkholderia* sp. IS-203으로부터 면역

증강물질을 생산하기 위한 최적조건을 검토한 결과는 다음과 같다. 면역증강물질을 생산하는 최적 배양조건은 인공 해수에 1% glucose와 1% yeast extract 였으며, 최적 NaCl 요구성은 3%로 전형적인 해양세균의 특징을 보여주는 것으로 생각되어진다. 그리고 최적 배양조건으로 최적 초기 pH는 8.0, 최적 온도는 30℃였으며, 산소를 요구하는 호기성균이었다. 면역증강물질을 생산하기 위한 배양조건은 35℃, pH 6.0이었으며, 최적생육 배지는 1.5% soluble starch, 1% tryptone, 0.5% yeast extract로 조성하여 500 ml의 삼각플라스크에 50 ml씩 분주하여 진탕배양하였다. 이와 같은 최적조건에서 항생물질은 정지기부터 생산되는 비증식연관형으로서 포자형성이후부터 생산되었다.

참 고 문 헌

1. Agarwal, B. B., P. R. Traquna and T. E. Eessalu. 1986. Modulation of receptor and cytotoxic response of tumor necrosis factor-L by various lectins. *J. Biol. Chem.* **261**, 13652-13656.
2. Choi, H. J., M. J. Jung and Y. K. Jeong. 2000. Isolation and Identification of a Marine Bacterium Production an Immunostimulant. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 1145-1150.
3. Food, K. A. 1978. Biological response modifiers: The new immunotherapy. *Cancer Res.* **49**, 1621-1639.
4. Green, E. D. and J. U. Baenziiger. 1989. Characterization of oligosaccharides by lectin affinity high-performance liquid chromatography. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 168-172.
5. Hadden, J. W., C. Lopez, R. I. O'Rerlly and E. M. Hadden. 1976. Levanisole and inosiplex: Antivial agent with immunopotentiating action. *N. Y. Acad. Sci.* **284**, 139-152.
6. Hadden, J. W. Immunopharmacology of mice and men. *Int. J. Immunopharmac.* **1**, 5-8.
7. Hara, C., Y. Kumazawa, K. Inagki, M. Kaneko, T. Kiho and S. Ukai. 1991. mitogenic and Colony-stimulating factor inducing activity of polysaccharide fractions from the fruit bodies of *Dictyohora indusiata* Fisc. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1615-1616.
8. Harada, A. K., H. Yokosawa and S. I. Ishii. 1987. N-acethylgalactosamine-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.
9. Itoh, A., K. Iizuka and S. Natori. 1985. Antitumor effects of Sarcophage lectin on murine transplanted tumors. *J. cancer Res.* **76**, 1027-1033.
10. Kato, I., S. Kobayashi, T. Yokokura and M. Mutai. 1981. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann.* **72**, 517-523.
11. Kumazwa, T., J. Imai and S. Tamakuma. 1982. Clinical and immunologican separated from hot water extract of *Angelica acutiloba* Kitagawa (Yamato Tohki). *Immunol.* **47**, 75-83.
12. Lafreniere, R. and S. A. Rosenberg. 1985. Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Cancer res.* **45**, 3735-3741.
13. Mosmann, T. 1983. MTT assay. *J. Immunol. method* **65**, 55-64.
14. Oldham, R. K. 1983. Biological response modifiers. *J. Natl. Cancer Inst.* **70**, 789-796.
15. Parent, M., F. Parent and L. Chedid. 1978. Enhancement of the neonate's nonspecific immunity to Klebsiella infection by muramyl dipeptide, a synthetic immunoadjuvant. *Immunology* **75**, 3395-3399.
16. Severinson E. and E.L. Larsson. 1986. pp. 63, *In* Weir D. M. (ed.), Handbook of Experimental Immunology, Vol. 2, Blackwell Scientific Publications.
17. Shohat, B., H. Joshna, I. Kott and I. Irea. 1976. Cellular immune competence in patient with tumors of the gastrontestinal tract. *Isr. J. Med. Sci.* **12**, 1462-1466.
18. Tsuru, T., K. Yusa, Y. Sudo, R. Takamori and Y. Sugimoto. 1989. A fluorine-containing anthracycline (ME 2302) as a new antitumor agent against murine and human tumors and their multidrug resistant sublines. *Cancer Res.* **49**, 5537-5542.
19. Watanabe, I. 1990. Current Topics in Marine Biotechnology, pp. 11-14, Fungi Tech. Press Ltd.
20. Wybran, J., A. Govaerts and T. Appelboom. 1989. Inosiplex: A stimulating agent for normal human T cell and human leucocytes. *J. Immunol.* **121**, 1184-1187.
21. Yeaton, R. W. 1981. Invertebrate lectin: I. Occurrence. *Dev. Comp. Immunol.* **5**, 391-402.
22. Yongwen Z., K. Hiroaki, M. Tsukasa and Y. Haruki. 1997. Fractionation and dhemical properties of immunomodulating polysaccharides from roots of *Dipsacus asperoides*. *Planta Medica.* **63**, 393-399.

(Received November 18, 2002; Accepted December 21, 2002)