

담수산 미세조류로부터 생리활성물질의 탐색

이완석 · 최애란 · 안치용 · 오현철¹ · 안종석¹ · 오희목*

(한국생명공학연구원 환경생명공학연구소, ¹세포신호조절연구소)

Screening of Bioactive Materials from Freshwater Microalgae

Wan-Seok Lee, Aeran Choi, Chi-Yong Ahn, Hyuncheol Oh¹,
Jong Seog Ahn¹ and Hee-Mock Oh*

Environmental Biotechnology Laboratory and

¹Laboratory of Cellular Signalling Modulator,

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

One hundred and fifty four microalgal strains, newly isolated from nationwide freshwaters in Korea, were screened for their anticancer, antidiabetic, and antibiotic activities. The microalgal strains were cultured with different nutritional conditions that were divided into 4 groups as follows; a normal Allen medium, nitrogen (N)-limited medium, phosphorus (P)-limited medium, and N and P-limited medium. Algal biomass was extracted with a mixture of acetone:H₂O (1:1, v:v) and the extracts were used for the screening of bioactive materials. Anticancer, antidiabetic, and antibiotic materials were screened by the methods of vaccinia H1-related protein tyrosine phosphatase (VHR DS-PTPase) inhibition, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibition, and paper disk. The inhibition activity of VHR DS-PTPase was observed in 18 strains, having a maximum 79% inhibition from *Anabaena affinis* and the inhibition activity of PTP1B was observed in 9 strains, having a maximum 97% from *Sphaerocystis schroeteri*. *Microcystis aeruginosa* incubated in an N and P-limited medium showed antibiotic activity in 8 species out of 13 pathogenic bacteria. As a whole, it seemed that the stressed condition such as N and/or P limitation increased the production of bioactive materials in microalgae.

Key Words: bioactive materials, microalgae, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), vaccinia H1-related protein tyrosine phosphatase (VHR DS-PTPase)

서 론

담수산 미세조류의 일부 종은 호소 또는 하천에서 수화(bloom)를 형성하여 독소를 생산하고, 이취미(taste and odor)를 발생시키는 등 수질을 악화시키기 때문에 이들 미세조류의 발생억제와 제거에 대해서 많은 연구가 수행되었다(Ahn *et al.* 2003; Kang *et al.* 2003). 한편 미세조류가 생산하는 2차 대사산물은 독소에 대한 연구가 주를 이루었다(Dittmann *et al.* 1997, Fairey and Ramsdell 1999). 그러나 최근 *Spirulina*와 같은 남조류에서 다양한 생리활성물질이 발견되었으며, 이를 자원으로 이용하려는 연구가 활발히 진행되

면서 담수의 미세조류가 생산하는 고부가가치 생리활성물질에 관심이 증대되고 있다(Costa *et al.* 2004; Danesi *et al.* 2004).

미세조류 중에서 남조류는 발생의 기원은 오래되었으나 그 역사에 비해 많은 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다(Rantala *et al.* 2004). 남조류가 생산하는 2차 대사산물은 현재까지 밝혀지지 않은 새로운 화합물이 대부분이며, 독특한 구조를 형성하며, 생리·생화학적인 특성이 규명되지 않는 화합물들이 많은 부분을 차지하고 있다(Shimizu 2003).

미생물로부터 유용물질의 생산은 대부분 세균, 곰팡이, 방선균 등을 대상으로 수행되었으며, 이들은 종속영양생물로서 생태계에서 대부분 분해자의 역할을 수행하고 있다. 그러나 미세조류는 광합성에 의해 탄소원을 공급 받는 독립영양생물이며, 수중생태계에서 1차 생산자로서 매우 중요한 구성

*Corresponding author (heemock@kribb.re.kr)

Table 1. Number of microalgal strains tested in this experiment

Class	Genus	No. of strains	Genus	No. of strains
Cyanophyceae	<i>Microcystis</i>	11	<i>Synechocystis</i>	2
	<i>Anabaena</i>	17	<i>Nostoc</i>	1
	<i>Merismopedia</i>	1	<i>Spirulina</i>	3
	<i>Aphanothece</i>	9	<i>Nodularia</i>	2
	<i>Aphanocapsa</i>	1	<i>Phormidium</i>	6
	<i>Chroococcus</i>	2	<i>Lyngbya</i>	3
	<i>Oscillatoria</i>	30		
Chlorophyceae	<i>Ankistrodesmus</i>	3	<i>Hydrodictyon</i>	1
	<i>Chlorella</i>	11	<i>Spirogyra</i>	1
	<i>Scenedesmus</i>	2	<i>Closterium</i>	1
	<i>Sphaerocystis</i>	1	<i>Roya</i>	1
	<i>Selenastrum</i>	3	<i>Staurastrum</i>	1
	<i>Eudorina</i>	4	<i>Penium</i>	2
	<i>Botryococcus</i>	4	<i>Micrasterias</i>	1
	<i>Palmella</i>	1	<i>Hyalotheca</i>	1
	<i>Chlorococcum</i>	2	<i>Chlorokybus</i>	1
	<i>Chlamydomonas</i>	4	<i>Mougeotia</i>	2
	<i>Radiofilum</i>	2	<i>Bambusina</i>	1
	<i>Dictyosphaerium</i>	1	<i>Zygnemopsis</i>	1
	<i>Oocystis</i>	2	<i>Phymatodocis</i>	1
	<i>Tetraspora</i>	3	<i>Gloeocystis</i>	1
	<i>Mesothaenium</i>	3	<i>Protodema</i>	1
	<i>Chlorococcum</i>	2	<i>Haematococcus</i>	1
	Total		154	

원이다. 따라서 미세조류는 세균, 곰팡이, 방선균 등과는 다른 종류 또는 기능을 갖는 각종 대사산물을 생산하는 것으로 추정된다. 그럼에도 불구하고 미세조류에서 고부가가치 생리활성물질인 항암, 항당뇨 또는 항생물질의 탐색과 개발에 관한 연구는 많지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내에 분포하고 있는 담수산 미세조류를 분리하고, 고부가가치의 생리활성물질인 항암, 항당뇨 또는 항생물질을 생산하는 미세조류를 탐색하였다. 또한 미세조류가 생리활성물질을 생산하기 위한 최적 조건을 조사하기 위하여 조류생장에 필수적인 질소와 인의 농도를 조절한 4가지 배양조건에서 실험하였다.

재료와 방법

대상조류와 배양

실험에 사용된 남조류와 녹조류는 전국의 하천과 호수에서 채취한 물시료로부터 분리 배양한 조류와 한국유전자은행(KCTC)에 보존되고 있는 조류 중 154 strains로 남조류 속에 속하는 88 strains, 녹조류 속에 속하는 66 strains를 대상으로 하였다(Table 1). 대상 조류의 배양은 Allen medium(Allen 1968) 100 ml을 250-ml flask에 넣고 멸균한

후 대상 조류를 접종하여 $130-150 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광조건에서 배양하였으며, 온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 배양 시 공기는 air-pump를 이용하여 공급하였다(80 ml/min). Allen medium은 4가지 group으로 일반 Allen medium, N-limited Allen medium, P-limited Allen medium 그리고 NP-limited Allen medium으로 나누어 실험하였다. N 또는 P-limited medium은 일반 Allen medium에 비해 질소 또는 인 농도가 각각 1/10씩 되도록 첨가하였다.

생리활성물질 추출

배양된 조류를 50-ml cornical tube로 옮겨 3,500 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상정액을 제거하고 pellet과 1:1 (v:v) 비율로 acetone을 첨가하여 초음파분쇄기(Vibra cell, Sonic & Materials Inc.)로 10분간 조류 세포를 파쇄하였다. Acetone 추출액을 다시 원심분리하여 조체를 제거하고 정량된 e-tube에 옮겨 Speed-vac(SC100, Savant)을 사용하여 용매를 휘발시켰다. 용매가 휘발된 e-tube를 재 정량하여 그 중량의 차이로 생리활성물질을 정량하고 최종 농도가 $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 이 되도록 methanol에 용해시켰다.

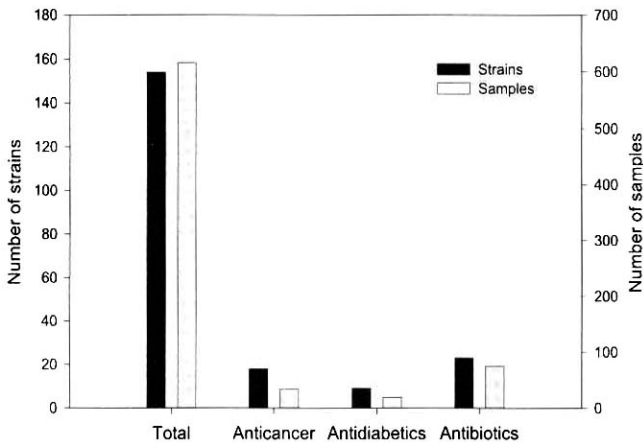


Fig. 1. Number of microalgal strains and samples containing bioactive materials.

생리활성 측정

항암 또는 항당뇨 활성의 측정은 Tonks et al.(1988)의 방법에 따라 para-nitrophenyl phosphate(p-NPP)를 기질로 이용하여 탈인산화 정도를 측정하여 vaccinia H1-related phosphatase (VHR)와 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)에 대한 저해활성을 조사하였다. 효소활성은 96-well plate에 VHR과 PTP1B(25 μ l/5 ml) 50 μ l, 조류 추출물(500 μ g/ml) 3 μ l, 그리고 p-NPP(2 mM) 50 μ l를 연속적으로 첨가한 후 30°C에서 반응시켰다. 반응 1시간 후 10 M의 NaOH 50 μ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Spectrophotometer(UV 160-A, Shimadzu)를 사용하여 405 nm에서 실험구의 흡광도를 측정하여 VHR과 PTP1B를 첨가하지 않은 대조구와 흡광도의 차이를 시료의 항암 또는 항당뇨 활성으로 나타내었다.

항생 활성은 13종의 병원균 (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, *Escherichia coli* KCTC 2441, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Shigella flexneri* KCTC 2008, *Enterobacter cloacae* KCTC 2361, *Citrobacter freundii* KCTC 2006, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Bacillus megaterium* KCTC 1096, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Lactococcus garvieae*)을 대상으로 paper disk법을 수행한 후, 생성되는 환의 지름을 측정하여 항생 활성으로 나타내었다.

결과와 고찰

담수산 미세조류 154 strains의 배양액 추출물을 대상으로 각각 항암, 항당뇨, 항생 활성을 측정하여 생리활성물질 생산하는 미세조류를 탐색한 결과 항암 18(12%), 항당뇨 9(6%), 항생 23(15%) strains에서 각각 활성을 나타내었다 (Fig. 1). 배지 중 질소와 인의 조성을 달리하여 배양한 총

Table 2. Primary screening of cyanobacteria against VHR DS-PTPase and PTP1B inhibition activity

Microalgal strains	Incubation*	Inhibition (%)	
		VHR	PTP1B
<i>Anabaena affinis</i>	P-limited	79	92
<i>Anabaena sp.</i>	Normal	-**	91
<i>Chlorella kessleri</i>	NP-limited	54	89
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Normal	-	89
<i>Microcystis aeruginosa</i>	P-limited	51	76
<i>Oscillatoria subbrevis</i>	NP-limited	68	81
<i>Sphaerocystis Schroeteri</i>	Normal	-	97
<i>Sphaerocystis Schroeteri</i>	N-limited	62	86
<i>Synechocystis sp.</i>	Normal	-	84

* Normal, Allen medium; N-limited, nitrogen-limited Allen medium; P-limited, phosphorus-limited Allen medium; NP-limited, nitrogen and phosphorus-limited Allen medium.

** Less than 40% inhibition.

616 시료 중에서 항암은 34(6%), 항당뇨는 19(3%), 항생 75(12%) 시료에서 각각 활성을 나타내었다. 따라서 배지 조성에 따라 각 생리활성물질의 활성이 다르게 나타나는 것을 알 수 있으며, 항암 또는 항당뇨 활성이 배지 조건에 따른 영향을 많이 받는 것으로 조사되었다. 항생 활성은 조사된 strains 중 15%, 배지별로 조사된 총 시료의 12%에서 활성을 나타내어 그 차이가 적었으며, 이는 한 strain이 4가지 배지 조건에서 동시에 활성을 보이는 경우가 많다는 것을 의미한다.

조사한 미세조류 중 항암과 항당뇨 활성의 대표적 결과는 Table 2에 요약하였다. 항암 활성은 *Anabaena affinis*가 79%의 VHR 저해 활성을 보여 가장 우수한 것으로 나타났으며, 항당뇨 활성은 *Sphaerocystis Schroeteri*가 97%의 PTP1B 저해 활성을 나타내어 가장 활성이 우수하였다. 특히 *Anabaena affinis*는 항당뇨 활성이 92%로 높아 항암과 항당뇨 모두에 우수한 활성을 갖는 것으로 조사되었다.

미세조류의 항생 활성을 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다. *Microcystis aeruginosa* A, *Synechocystis sp.*와 *Anabaena sp.*는 조사된 총 13종의 병원균 중에서 8종의 병원균에 항생 활성을 나타내어 비교적 항생 활성이 우수한 strain으로 조사되었다. 미세조류 추출물은 시험에 사용된 대부분의 병원균 성장에 억제 활성을 보였으나 *Edwardsiella tarda*와 *Lactococcus garvieae*의 생장억제 활성을 갖는 미세조류 추출물은 없었다.

항암 활성을 나타내는 미세조류 18 strains가 4가지 배지에서 배양되었을 때 나타내는 항암 활성을 box-plot으로 나타내었다(Fig. 2A). 인-제한과 질소인-제한 배지의 median(중간값)이 각각 36%과 45%로 정상(27%)과 질소-제한 배지(33%) 보다 높게 나타났다. 또한 box의 분포는 질소인-제한 배지에서 26%부터 62%까지로 나타나 질소 또는 인을 제한

Table 3. Clear zone test of microalgal extracts for screening antibiotic materials (Clear zone: mm)

Microalgal strains	Incubation**	P1*	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
<i>Anabaena</i> sp.	Normal	10	-	9	-	-	9	9	-	-	9	-	9	-
<i>Anabaena</i> sp.	N-limited	10	-	9	9	-	9	10	9	10	-	-	9	-
<i>Anabaena</i> sp.	NP-limited	9	-	11	-	9	9	10	-	-	-	-	10	-
<i>Aphanothece</i> sp.	Normal	10	9	9	-	10	11	10	-	-	9	-	-	-
<i>Chlorella kessleri</i>	Normal	9	-	10	-	-	-	-	-	10	-	-	11	-
<i>Chlorella regularis</i> var. <i>minima</i>	Normal	-	9	10	-	-	-	10	9	11	-	-	10	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> A	P-limited	10	10	9	-	-	10	10	9	-	11	-	9	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> A	NP-limited	9	11	12	9	-	9	10	9	-	-	-	9	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> B	Normal	10	-	-	-	9	9	10	-	-	-	-	9	-
<i>Oscillatoria</i> sp.	P-limited	11	-	-	10	-	-	-	-	-	9	-	10	-
<i>Synechocystis</i> sp.	N-limited	10	10	9	-	10	11	10	-	11	-	-	9	-

* Pathogen strains: P1, *Salmonella typhimurium*; P2, *Salmonella gallinarum*; P3, *Escherichia coli* KCTC 2441; P4, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621; P5, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917; P6, *Shigella flexneri* KCTC 2008; P7, *Enterobacter cloacae* KCTC 2361; P8, *Citrobacter freundii* KCTC 2006; P9, *Klebsiella pneumonia* KCTC 2208; P10, *Bacillus megaterium* KCTC 1096; P11, *Edwardsiella tarda*; P12, *Escherichia coli*; P13, *Lactococcus garvieae*.

** Normal, Allen medium; N-limited, nitrogen-limited Allen medium; P-limited, phosphorus-limited Allen medium; NP-limited, nitrogen and phosphorus-limited Allen medium.

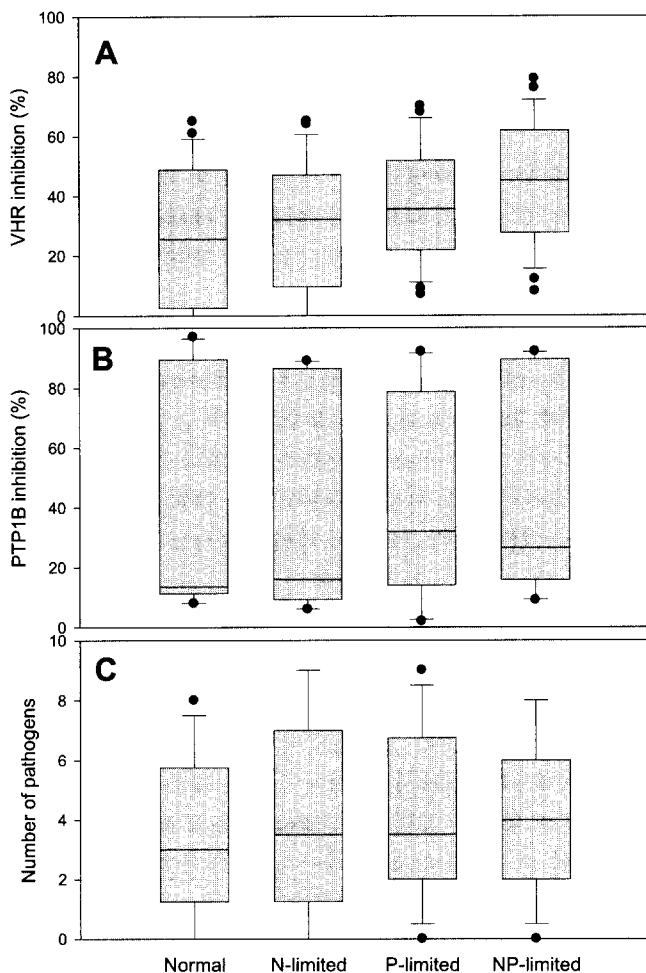


Fig. 2. Comparison of anticancer, antidiabetic and antibiotic activities of microalgae cultured in different media condition. A, anticancer activity; B, antidiabetic activity; C, antibiotic activity.

하여 배양한 배지에서 항암 활성이 높음을 알 수 있었다. 배지 조건에 따른 미세조류의 항당뇨 활성은 Fig. 2B에 나타내었다. 항당뇨 활성은 항암 활성의 결과에 비해 box의 범위가 넓게 나타나 시료에 따른 항당뇨 활성의 차이가 크음을 알 수 있었다. 정상과 질소-제한 배지에서 median이 각각 14%와 17%로서 낮게 나타났으나, 인-제한 배지에서 37%로 비교적 높게 조사되었다. 미세조류 추출물이 항생 활성을 나타내는 대상 병원균의 수를 배지 조성 별로 조사하였다(Fig. 2C). 항생 활성은 배지 조건에 따른 box plot의 median 값이 정상, 질소-제한, 인-제한 또는 질소인-제한 배지에서 각각 3.1, 3.6, 3.6과 4.0으로 나타나 실험구 간에 저해 병원균 수에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다.

본 연구의 결과를 배양 조건과 남조류와 녹조류로 세분화하여 살펴보면 총 88 strains의 남조류 중 정상 배지에서 항암, 항당뇨와 항생 물질을 생산하는 남조류 strains가 각각 5%, 3%, 15%였으며 질소와 인-제한 배지에서의 결과는 각각 18%, 7%, 18%로 나타나 제한 조건에서 생리활성물질을 생산하는 strains가 많은 것으로 조사되었다(Table 4). 실험한 총 66 strains의 녹조류 중 정상 배지에서 항암, 항당뇨 또는 항생 물질을 생산하는 녹조류 strains가 각각 2%, 2%, 5%였으며 질소와 인-제한 배지에서의 결과는 각각 3%, 3%, 5%로 나타나 녹조류에서는 일반 배지와 제한 배지의 차이가 크지 않았다. 그러나 생리활성물질을 생산하는 strains의 비율은 녹조류에 비해 남조류가 높았다.

Oh et al.(2000)은 남조류의 chemostat 배양 연구를 통하여 *Microcystis*가 생산하는 대표적 독소이며 생리활성물질로 알려진 microcystin은 인-제한 조건에서 단위생체량당 함량이 증가하는 것을 보고하였다. 뿐만 아니라 질소와 인을 제한하

Table 4. Percentage of microalgal strains containing bioactive materials

Class	Anticancer (%)		Antidiabetic (%)		Antibiotic (%)	
	Normal*	Limited**	Normal	Limited	Normal	Limited
Cyanophyceae	5	18	3	7	15	18
Chlorophyceae	2	3	2	3	5	5

* Normal, activity in normal medium.

** Limited, activity in N and/or P-limited medium.

여 배양한 후 조류의 생화학적 조성을 살펴본 Kilham *et al.* (1997)의 연구 결과에 의하면 *Ankistrodesmus falcatus*는 질소와 인을 제한하여 배양한 결과 성장률은 최대 15%의 차이를 보였으며 단백질 구성에 차이를 나타내는 것으로 보고되었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때, 본 실험에서 항암, 항당뇨와 항생 활성이 배양 조건에 따라 다른 것은 질소와 인을 제한하여 배양함으로써 미세조류의 단백질 구성이 변하여 2차 대사산물의 생산에 영향을 준 것으로 사료된다.

Skulberg (2000)는 남조류로부터 생산되며 생리 활성을 갖는 2차 대사산물을 종합하였는데, 주로 plasmin, thrombin, elastase, papain, trypsin 저해 또는 성장 저해 활성물질, 항바이러스, 항균 활성물질 그리고 몇 가지 독소 등이 현재까지 알려진 남조류에서 생성되는 2차 대사산물이라고 보고하였다. 현재까지 알려진 남조류 유래 항암물질은 *Microcystis*가 생산하는 독소인 microcystin으로서 protein phosphatase 저해 활성을 갖는 것으로 알려져 있다 (MacKintosh *et al.* 1990). 그러나 미세조류 유래 항암 또는 항당뇨 물질로서 구조가 명확히 밝혀진 물질은 극히 일부에 그치고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 국내에서 채취한 담수산 미세조류로부터 항암, 항당뇨와 항생물질을 탐색한 결과로서 담수산 미세조류 유래의 고부가가치 생리활성물질 탐색과 연구의 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다. 결론적으로 녹조류 보다 남조류가 생리활성물질 생산 가능성이 높으며, 인 또는 질소 인-제한 배지와 같은 stress 조건이 좀더 유리한 것으로 판단된다. 앞으로 *Anabaena affinis* 등의 남조류를 대량 배양하여 생리활성물질의 구조를 동정한 후 생리·생화학적 특성에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 지원으로 수행하는 21세기 프런티어사업(이산화탄소 저감 및 처리기술)의 일환으로 수행되었음.

참고문헌

- Ahn C.-Y., Park M.-H., Joung S.-H., Kim H.-S., Jang K.-Y. and Oh H.-M. 2003. Growth inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: laboratory and enclosure studies. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 3031-3037.
- Allen M.M. 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plate. *J. Phycol.* **4**: 1-4.
- Costa J.A.V., Colla L.M. and Filho P.F.D. 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technol.* **92**: 237-241.
- Danesi E.D.G., Rangel-Yagui C.O., Carvalho J.C.M. and Sato S. 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg.* **26**: 329-335.
- Dittmann E., Neilan B.A., Erhard M., Dohren H. and Borner T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.* **26**: 779-787.
- Fairey E.R. and Ramsdell J.S. 1999. Reporter gene assay for algal-derived toxin. *Nat. Toxins* **7**: 415-421.
- Kang H, Na E.G., Sin G.S. and Jang J.H. 2003. Feasibility test for control of algae by electron beam irradiation in eutrophic lake and coastal water. *J. KSEE* **25**: 1368-1374.
- Kilham S.S., Kreeger D.A., Goulden C.E. and Lynn S.G. 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constitution of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biol.* **38**: 591-596.
- MacKintosh C., Beattie K.A., Klumpp S., Cohen P. and Codd G.A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plant. *FEBS Lett.* **264**: 187-192.
- Oh H.-M., Lee S.J., Jang M.-H. and Yoon B.-D. 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 176-179.
- Rantala A., Fewer D.P., Hisbergues M., Rouhiainen L., Vaitoomaa J. and Borner T. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 568-573.
- Shimizu Y. 2003. Microalgal metabolite. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 236-243.
- Skulberg O.M. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules-experience from cyanophyte research. *J. Appl. Phycol.* **12**: 341-348.

Tonks N.K., Diltz C.D. and Fischer E.H. 1988. Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* **263**: 6731-6737.

Received 28 August 2004

Accepted 4 October 2004