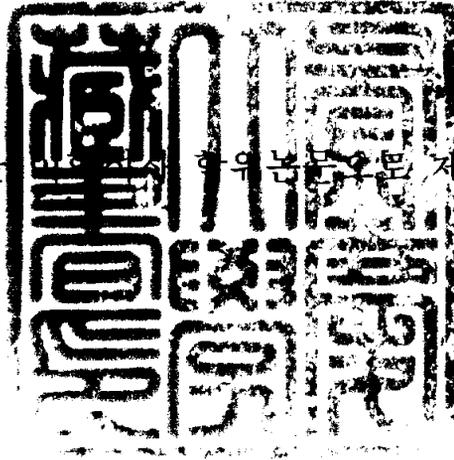


이학석사 학위논문

미생물 유래 천연유화제의
안전성과 기능성

지도교수 변 대 석

이 논문을 학위논문 제출함



2004년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

김 미 정

김미정의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월 12일

주 심 공학박사 류 홍 수



위 원 농학박사 남 택 정



위 원 의학박사 변 대 석



목 차

Abstract	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 천연유화제	5
1-1. 천연유화제 생산 균주	5
1-2. 천연유화제 성분	5
2. 방법	6
2-1. 항균활성	6
2-2. Microplate reader를 이용한 MIC TEST	7
2-3. 급성독성검사	7
2-3-1 동물실험	7
2-3-2 예비실험	8
2-3-3 본 실험	9
2-4 항돌연변이 효과	10
2-5 중금속 흡착능	11
2-6 항종양활성	12
2-6-1 In vivo test	12
2-6-2 In vitro test	13
2-7 항체 생성능	14
2-7-1 실험 동물의 면역화	14
2-7-2 세포배양	15
2-7-3 항체 Detection	15

III. 결과 및 고찰	17
1. 항균활성	17
2. Microplate reader를 이용한 MIC TEST	18
3. 급성독성검사	23
4. 항돌연변이 효과	25
5. 중금속 흡착능	29
6. 항종양활성	30
6-1 In vivo test	30
6-2 In vitro test	39
7. 항체 생성능	42
IV. 요약 및 결론	44
V. 참고문헌	46

The Functional Characteristics of Biosurfactants obtained from *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2

Mi Jeong Kim

Department of Food and life science, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Pseudomonas aeruginosa BYK-2 can produce the biosurfactant in largely by using wasted fish as carbon source. The anti-bacterial activity of biosurfactant is show excellent bacterial growth-control characteristics in above 1% concentrate level. In a toxic test, LD₅₀ level seems to be reached over 4000mg/100g body weight in ICR mouse and SD rat experiments. The biochemical analysis results of blood obtained from butchering animal

experiments seem to be no big different in figure when compared with control group in vitro. So we can judge the experiments materials will not cause any harmful side effects in vivo.

In experiments of biosurfactant's adsorption ability for heavy metals, 4 kinds of heavy metals (Fe, Cd, Pb and Zn) were removed to 40% within 5 minutes and almost removed after 15 minutes. This result thought to be very effective when applies biosurfactant in contaminated water purification process.

When apply natural biosurfactant in human breast cancer cell(MCF-7) and liver-cancer cell(SNU-386) by culture for 4 days to see the cell survival ratio, natural biosurfactant can restraint the growth of cancer cell to maximum 85% so we can assume that biosurfactant shows excellent anti-cancer activities. Biosurfactant is reported in several papers for their immuno-resistance activities in immunomodulating field. So we can expect more elevated effects when taking biosurfactant with existing anti-cancer medicine.

I. 서 론

유화제(계면활성제, **surfactants**)는 친수성 부분과 소수성 부분을 동시에 가지고 있는 양친매성(**amphipathic**)분자로, 계면의 표면장력을 감소시키는 성질을 가지고 있는 물질을 총칭한다. 이러한 구조적인 특징에 의해 기체, 액체, 고체와 같은 서로 성격이 다른 상 사이의 계면에 작용하여 흡착함으로써 계면의 물리적 현상 및 그 성질을 변화시킨다.

유화제(**surfactants**)는 1917년 독일에서 공업화된 후 2차 세계대전 이후 생산량과 소비량이 급증하였으나, 산업에서 사용되고 있는 거의 모든 유화제는 석유로부터 화학적으로 합성된 것들로서 대부분 독성이 강하고 쉽게 생분해되지 않기 때문에 1980년대부터 선진국에서는 많은 제품들에 대해 사용 및 생산금지 조치를 취하고 있는 실정이다. 최근 들어 환경문제에 대한 관심이 증대되어 비교적 큰 시장을 가지고 있는 세제부분에서 생 분해도가 높은 합성세제 및 다양한 생물들에서의 대체 물질 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 대체 물질 중에서도 특히 생물 또는 미생물 유래의 천연유화제(**biosurfactant**)는 여러 가지 장점을 가지고 있어 관심의 대상이 되고 있다. 즉 화학합성이 어려운 새로운 구조를 가지는 유화제를 쉽게 생산할 수 있으며, 비교적 간단한 배양과정과 간단한 원료들로부터 쉽게 대량 생산이 가능하며 무엇보다도 대부분이 쉽게 생분해되고, 독성이 적기 때문이다(Catherine N. M. et al., 2001).

천연유화제(천연유화물) 생산 미생물에 대해서는 이미 오래 전부터 토양과 해양 등을 대상으로 많은 연구가 수행되어 있으며, 최근에는 식품, 화장품, 세제, 제지, 농업 등 다양한 산업분야에서 이용되고 있어 점차 합성 계면활성제 시장을 대체해 가고 있는 실정이다. 그러나, 국내에서는 이와 관련된 연구가 미진하여 연구 개발된 제품이 거의 전무한 실정으로, 새로운 형태의 환경 친화적인 천연유화물을 개발하고 또한 그 응용 분야를 살펴보고자 한다.

최근 관심이 집중되고 있는 고기능 천연유화제는 기능성이 다양한 생물 유화제를 일컫는 말로 향균, 항산화성, 가열안정성, 콜레스테롤 저하, 풍미 안전성 등의 기능을 가지며, 주로 미생물에 의해 생산되며, 물리·화학적 특성으로는 유화, 보습, 결, 탄력, 조직 형성능 등과 보존성 우수한 식품 소재로서 새로운 각광을 받고 있다. 맛살류 등에 첨가하여 섭취할 경우 체내 환경호르몬과 같은 내분비계 교란물질과 납, 수은, 다이옥신과 같은 유해물질들과 결합하여 무독화 반응을 일으킨다고 알려져 있으며, 수산가공제품에 있어서 산패나 세균의 증식을 억제할 수 있어 식품의 유통기한을 연장시키는 장점뿐만 아니라 우수한 유화능, 보습능, 조직감등으로 품질향상을 꾀할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 천연유화제의 경우 건강 보조식품으로 이용가능성이 있기 때문에 고부가가치 산업이 될 수 있다. 현재 수산가공식품(어묵소시지, 어묵, 맛살류)에 사용되는 유화물의 경우 대부분 동·식물성 유지를 사용하여 과다 섭취시 심장질환, 비만과 암의 유발등 건강상 많은 문제를 일으키기 때문에 건강상 성인병의 문제점을 줄이는 한편, 유지의 기호성 즉, 풍미성과 입에서 느끼는 감촉 등을 유지하며 인체에 필요한 필수지방산을 섭취하는 방법을 모색하게 되었다. 그 외의 분야 중 의학계에서는 급성호흡기질환의 특효약으로 이용되는 등 고기능성 천연유화물의 개발필요성은 매우 크다고 사료된다(Gaynor C. D. et al., 1995, Hwang and Clements, 1990).

이러한 연유로 본 실험은, 미생물 유래 천연유화제의 안정성과 기능성 검토를 통해 새로운 천연유화제의 상품적 가치를 확보할 수 있을 것이라 여겨진다.

II. 재료 및 방법

1. 천연유화제

1-1 천연유화제 생산 균주

남해안의 유류 오염지역등 남해안 전지역에는 유류분해 세균들에 의해 자연 정화되는 것으로 나타났다. 자연 정화된 지역(경남 통영의 도남항, 거제도 장승포, 전남 여수 국동항)의 해수로부터 유류 분해능이 우수한 세균을 분리하였으며, 분리된 BYK-2 균주의 각종 형태, 생리·생화학적 특성을 조사한 결과, *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되어 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 180129)로 명명하였다.

각종 탄소원을 기질로 하여 균주를 배양한 후 분리, 추출하였다. 농축하여 얻어진 시료는 정제시켜 사용하였다.

본 실험에 사용된 천연유화제는, 부경대학교 생물공학과로부터 제공받아 사용하였다.

1-2 천연유화제의 성분

생물공학과로부터 제공받아 실험에 사용된 천연유화제는, fish oil을 기질로 배양되어 3종류의 glycolipid(α -Naphtoresorcinol, Rhodamine 6G, Ninhydrine)가 생산되었다.

정제된 천연유화제를 FT-IR 분석을 통해 동정해보면 hydroxyl group, long chain hydrocarbon, esters group, methyl group 등을 가지고 있는 것으로 나타났다.

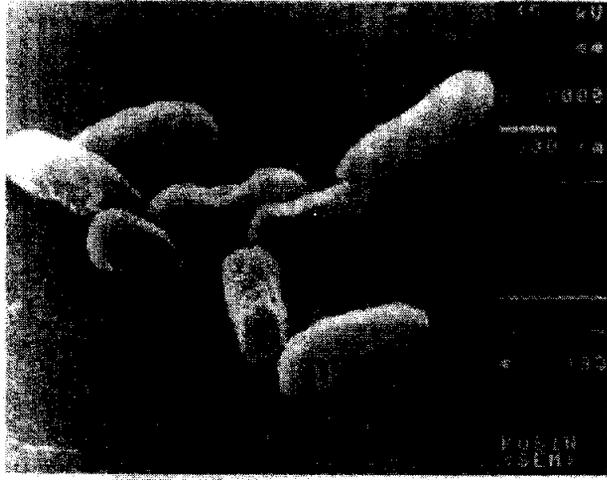


Fig. 1. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.
(original magnification approximately $\times 30,000$)

2. 방법

2-1 항균활성

KCTC(한국유전자원은행)에서 항균테스트용으로 시판되는 *E. coli*를 구입하여 천연유화제(biosurfactant)의 항균활성을 알아보기 위하여 실험에 사용하였다. 실험균은 LB배지에 접종하여 37℃에서 24시간동안 400rpm으로 진탕 배양한 후 UV-Spectrophotometer로 600nm에서 흡광도를 측정하여 O.D(optical density)가 1이 되게 조정하여 실험에 사용하였다. 천연유화제가 항균활성이 있는지 여부를 먼저 확인하기 위하여 다음과 같이 예비실험을 수행하였다. 세균배양액 100 μ l을 평판배지에 도말하고 시료를 농도별(10%, 5%, 2.5%)로 10 μ l씩 멸균된 DISC에 흡습시켜 세균 plate에 심은 후, 37℃의 배양기에서 24시간 배양한 다음 clear zone이 나타나는지 여부를 동량의 증류수를 DISC에 흡습시킨 대조군과 비교 관찰하였

다.

1. 천연유화제를 1%, 5%, 10%농도로 DISC에 흡습시켜 *E.coli*가 함유된 배지위에 올리고 37℃에서 24시간 배양한 다음 관찰하였다.
2. 천연유화제의 항균활성능력을 시판용 surfactant의 것과 비교·검토하기 위하여 *E.coli*가 함유된 평판배지에 Tween 20, Tween 80, Triton X-100, 천연유화제를 0.1%, 0.5%, 1%농도로 흡습시켜 37℃에서 24시간 배양하였다.

2-2 Microplate reader를 이용한 MIC TEST

96 well microplate의 각 well에 1.0×10^4 cells/ml의 *E.coli*를 함유하는 100 μ l의 tryptic soy broth를 가하고, well당 시료용액이 10%가 되도록 조제하여 100 μ l 첨가하고 이 농도로부터 단계적으로 두 배씩 희석되도록 하여 10%에서 0.0049%가 되도록 well에 준비하였다. Microplate Reader 내에서 37℃, 18시간 배양하면서 600nm에서 세균의 성장을 흡광도로 측정하여 MIC(minimum inhibition concentration)농도를 구하여 항균활성능력을 조사하였다.

2-3 급성독성검사

시험물질은 *pseudomonas aeruginosa* BYK-2에서 추출한 천연유화제로서, 갈색이고 기름과 비슷한 성상을 가진 것으로 실험을 시작하기 직전까지 냉장 보관하여 사용하였다.

2-3-1 동물실험

실험동물은 SD 계통의 수컷 랫트와 ICR 계통의 수컷 마우스로 특정병원균이 부재된 것으로, 한국화학연구소 안전성연구센터 실험동물 육종실에서 구입하여 실험에 사용하였다.

1. 동물입수 후 외관을 육안적으로 검사하고, 시험을 실시하는 동물사육실에서 7일간 순화시킨후 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.
2. 실험동물의 입수시 주령은 마우스와 랫트 모두 3주령이었다. 입수시 체중은 랫트의 경우는 평균 69.5 g이었고, 마우스는 평균 16.9~18.2 g이었고, 투여개시시 주령은 4주령이었다. 투여 개시시 체중은 랫트의 경우 119.3~136.1 g였고, 마우스의 경우는 21.2~22.4 g 였다.
3. 동물사육실의 환경조건은 다음과 같이 조성해 주었다.
 - 1) 실내온도 22±3℃, 상대습도 55±15%, 12시간(오전 8시~오후 8시) 주기로 명암을 조절하여 주었고, 고형사료와 수분을 충분히 공급하여 주었다.
 - 2) 실험기간중 사육실 온·습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 시간마다 측정되었으며, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동사항은 발견되지 않았다.

2-3-2 예비실험

1. 예비실험의 경우 투여 개시시 동물 수는 각각 10마리였고, 본 실험의 경우는 각각 25마리였다.
2. 우리나라 식품의약품 안전청에 의한 의약품 독성시험기준에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에 일본 후생성의 의약품 비임상시험 Guideline 해설(1997)을 참고로 용량을 정하여 실험하였다.
3. 본 실험에 들어가기에 앞서 예비실험으로 급성독성검사의 한계용량인 2000mg/100g body weight의 천연유화제를 실험동물인 SD계 Rat 10마리에 투여한 결과, 사망동물은 관찰되지 않았기 때문에 천연유화제의 LD₅₀값은 2000mg/100g body weight

를 상회할 것으로 판단하였다.

2-3-3 본 실험

시험물질은 천연유화제로서 예비시험 한계용량인 2000 mg/100g body weight를 기준으로 7000 mg/100g body weight까지 1000mg씩 늘려 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 mg/100g body weight를 투여하여 사망을 일으키는 용량수준을 확인하고자 하였으며, 시험물질을 투여하지 않고 생리식염수만 동량 투여한 대조군을 두었다.

1. 투여전날 하룻밤을 절식시킨 후 일회용 주사기를 이용하여 투여 당일 오전에 개체별로 1회 복강 투여하였다.
2. 복강 투여 후 투여당일은 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간마다, 투여익일부터 14일까지는 매일 1회 이상씩 일반증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.
3. 전 시험기간 종료 후 생존동물을 에테르로 마취시켜 개복하여 방혈치사시킨 후 육안으로 모든 내부장기를 관찰하였고, 채취한 혈액은 혈액분석기로써 대조군과 투여량에 따른 차이를 비교 분석하였다.
4. 혈액의 생화학적 검사는 BUN(Blood urine nitrogen), Blood glucose, Serum protein, serum albumin, total cholesterol, Triglyceride를 분석하였다.

랫트와 마우스를 선택한 이유는 독성시험에 적당한 실험동물로서 현재 급성독성시험에 널리 사용되고 있고, 종간의 특성차이를 보기 위해서 두 종류의 실험동물을 선택하였다.

2-4 항돌연변이 효과

항돌연변이 효과를 검색하는 방법에는 여러 가지가 있지만 본 연구에서는 1971년 Ames가 개발한 *Salmonella* 변이주 검출법을 이용하였다

(Maron and Ames, 1983). 균주에 돌연변이 물질을 노출시킨 다음 천연유화제가 첨가된 minimal glucose agar plate에 형성된 복귀돌연변이 균주의 수를 계수하여 돌연변이 및 항돌연변이성의 유무를 판정하는 것이다.

Salmonella typhimurium TA 100에 대해서 point mutation을 유발하는 유전독성을 가진 물질로 돌연변이를 유도한 후 천연유화제를 배지에 첨가하여 돌연변이가 회복되는지 여부를 확인해보고자 본 실험을 수행하였다. *Salmonella typhimurium* TA 100에 대한 대표적인 직접 돌연변이 유발원으로 사용된 MNNG (N-methyl-N'-Nitro -N- Nitrosoguanidine)은 발암성이 강하기 때문에 주로 위암연구에 많이 이용되고 있는 물질이다 (Mclean and Dutton, 1995).

직접 돌연변이 유발원으로 사용된 MNNG(N-methyl-N'-nitro- N-Nitrosoguanidine)은 미국 Sigma사로부터 구입하여 증류수에 2 μ mol의 농도가 되도록 녹여서 사용하였고, *Samonella typhimurium* LT-2의 Histidine영양요구성인 *Salmonella typhimurium* TA100은 인제대학교 식품영양학과 화학공학연구실로부터 분양 받아 실험에 사용하였다.

항돌연변이원성은 2 μ mol의 M'N'Nitrosoguanidine을 함유하는 500 μ l의 0.2 M 인산 완충액에 100 μ l의 전배양된 균주인 *Salmonella typhimurium* TA 100(2×10^9 cells/ml)와 100 μ l의 시료를 ice bath에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex 한 후 Minimal glucose agar plate에 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간배양한 후 복귀주의 수를 측정하여 아래의 식에 의해 돌연변이 억제효과의 정도(Inhibition rate)를 계산하였다.

$$\text{Inhibition Rate(\%)} = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

a : 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이의 수

b : 시료를 처리하였을때의 복귀돌연변이의 수

c : 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수

Pseudomonas aeruginosa BYK-2로부터 추출한 천연유화제를 MMNG에 의해

돌연변이를 일으킨 *Salmonella typhimurium* TA100이 첨가된 배지에 0.1, 0.5, 1, 5% 농도로 첨가하여 24시간 배양한 후 복귀 돌연변이 균주의 수를 측정하였다.

실험에 사용된 천연유화제의 농도와 돌연변이 유발 물질인 MNNG의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였다.

2-5 중금속 흡착능

천연유화제의 중금속 흡착능은, 실험동물의 혈액내에 존재하는 림프구들을 분리하여 중금속과 전배양하여 세포들을 중금속에 오염시킨 후, 천연유화제를 첨가하여 천연유화제가 세포내부와 배양액중의 중금속을 어느 정도 신속하게 제거하는지 여부를 살펴보려고 하였다. 그러나, 중금속 표준물질들 대부분이 물에는 불용이고, 3~5% 질산 용액에 녹아져 판매되고 있어서 이들을 배양액에 첨가하였을 경우, 세포의 정상적인 성장이 이루어지지 않았다. 따라서, 세포를 제외하고 천연유화제와 중금속을 시간대별로 반응시키면서 중금속 제거율을 살펴보았다.

100ppm농도의 네 가지 중금속 납(Pb), 아연(Zn), 철(Fe), 카드뮴(Cd)이 2ml씩 가해진 24-well에 시료인 천연유화제를 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.3125%가 되도록 무첨가군을 대조군으로 한 후 37°C의 진탕 항온 수조(120rpm)에서 0, 5, 15, 30, 60분으로 각각 반응시킨 후, 14,000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상층액에 남아 있는 중금속을 ICP-AES(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer:Optima-3300XL, Perkin Elmer, USA)로 분석하였다.

2-6 항종양활성

2-6-1 In vivo test (Tetrazolium-based colorimetric Assay : MTT Assay)

항종양활성을 살펴보기 위해서 본래의 의도는 sarcoma 180세포를 한국 세포주은행으로부터 구입하여 실험동물에 접종하고 고형암을 유발, 시료인 천연유화제를 고형암에 주사하여 고형암의 성장이 저지되는지 여부를 조사하는 것이었다. 그러나, 최근의 연구동향이 sarcoma180의 사용을 지양하는 추세에 있어서 생체에서 주로 암을 일으키는 암세포를 분양 받아 천연유화제의 세포독성을 살펴보는 것으로 연구방향을 전환하였다.

사람의 유방암세포(MCF-7)와 간암세포(SNU 368)는 동아대학교 의과대학 생화학교실에서 분양 받아 계대 배양하여 실험에 이용하였다. 사람의 유방암세포(MCF-7)와 간암세포종(SNU 368)의 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 well당 0.1%, 1%, 5%, 10%농도가 되도록 천연유화제를 첨가하여 4일간 배양하면서 세포의 생존율을 살펴보았다.

부착성 세포인 MCF-7 과 SNU 368을 trypsin으로 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 RPMI-1640(Serum free)배양액으로 중화시키고, 5분간 1,500rpm 의 조건으로 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후 10ml의 RPMI-1640(with 10% Fetal bovine serum)을 가해 단일 세포 부유액을 조제하였다. 세포의 적정농도(2×10^4 개)를 예비실험을 통해 알아내었고, Multichannel pipette을 이용하여 각 well에 $180 \mu\text{l}$ 의 세포 부유액을 접종하였다. 시료인 천연유화제는 증류수에 0.001, 0.01, 0.1, 0.5%로 되도록 녹인 후 멸균 처리한 $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter를 통과시켰다. 시료를 농도별로 $20 \mu\text{l}$ 씩 세 개의 well에 첨가하여 triple test가 되도록 하였다. 대조군으로서 세포 부유액에 시료대신 PBS buffer만을 $20 \mu\text{l}$ 첨가하여 100%생존군으로 삼았다. 암세포와 시료가 접종된 well plate를 37°C , 5% CO_2 상태의 incubator에서 0, 1, 2, 3 일간 배양하였다. 지시한 시간대의 plate는 각각의 well에 0.1mg ($50 \mu\text{l}$ of 2mg/ml)의 MTT를 가해주고, 다시 37°C , 5% CO_2 하에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배지를 모두 제거하고 wellso에 생성된 불용성의 formazan결정을 용해시키기 위해서 DMSO를 $100 \mu\text{l}$ 씩 가한 후 약 15분간 가볍게 진탕한 뒤, 96-well plate용

광도계(ELISA reader)로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다.

시험군의 세포 생존율을 다음과 같이 계산하였다.

$$\frac{\text{mean optical density in test well}}{\text{mean optical density in control well}} \times 100$$

2-6-2 In vitro test (DNA/methyl green Assay)

DNA/methylgreen 복합체와 DNA active agent인 Distamycin A가 반응하여 DNA/Distamycin A복합체를 형성하고, methylgreen을 colorless carbinol이라는 물질로 전환시켜 630nm에서 흡광이 없어지도록 하는 것이 주된 원리이다. 이 분석법은 DNA와 강하게 결합하는 항암물질을 찾아내는데 목적이 있고, 최종목적은 보다 강한 항생제를 찾아내어 항암효과를 극대화하고자 하는데 있다. 최근에는 미생물 발효조에서 미생물들이 생산해 내는 물질들 중에서 항암효과를 가지는 물질들을 검색하는 방법으로 각광받고 있는 분석법중의 하나이고, 대표적인 것이 streptomyces insignis ATCC31913이 생산하는 Daunomycin이다(Neal S. et al, 1992).

표준물질 Distamycin A와 시료인 천연유화제간의 50% inhibition Concentration(IC50)값을 구함으로서 시료의 항암활성 정도를 DNA/Methyl green Assay에 의해 측정하였다.

표준물질 Distamycin A를 에탄올에 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 70, 100 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 조제하고 시료인 천연유화제도 같은 농도가 되도록 조제하였고, 대조군은 에탄올로 준비하였다.

DNA/methyl green(20mg)은 100ml의 0.05M Tris-HCl, pH7.5 buffer (containing 7.5mM MgSO₄) 녹여 24시간 동안 37°C에서 stirring시키면서 완전히 용해시켰다.

시료와 표준용액 각각을 농도별로 20 μ l씩 가하고 DNA/Methyl green 용액을 180 μ l가한 즉시 630nm에서 흡광도를 측정하고 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시킨 후 630nm로 흡광도를 측정하여 IC50값을 구하였다.

2-7 항체 생성능

천연유화제의 면역체계에 미치는 효과를 조사하기 위해서 항체 생성능을 살펴보았다.

2-7-1 실험 동물의 면역화

실험에 사용한 동물은 BalB/C Female로 생후 6주인 것을 사용하였고, 사육시 물과 사료는 충분한 양을 공급하였다. 항원인 carrier protein으로서는 KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin, Sigma H5654, 10mg)을 인산완충 용액 2ml에 녹여 사용하기 직전까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. Adjuvant는 Sigma사로부터 구입(Sigma F5881, Freund's Adjuvant, Complete)하여 carrier protein과 동량으로 섞어서 마우스당 400 μ l씩 투여하였다. 시료는 PBS를 사용하여 1%(10mg/ml)되게 조제한 뒤 5일간 마우스당 400 μ l씩 투여하였고, 대조군은 여과한 PBS를 동량으로 투여하였다. 투여 10일 후 실험동물을 희생시켜 비장을 적출한 후 세포를 분리하였다. 이때 비장세포는 대부분이 B세포로 이루어져 있다.

2-7-2 세포배양

DMEM with HEPES(Dullbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D5648)을 구입하여 3차 증류수 1L에 녹인 후 여기에 Sodium bicarbonate 3.7g을 넣고, HCl로 pH를 7.2로 맞추었다. 이것을 500ml씩 나누어 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후, sodium pyruvate(100X)5ml, Fetal calf serum 50ml, Non-essential amino acid 5ml, 2-mercaptoethanol(100X) 0.5ml,

Penicillin streptomycin(200X) 2.5ml, 열처리한 Fetal bovine serum 500ml을 무균적으로 첨가한 후 세포배양 배지로 사용하였다. 분리한 세포를 1×10^7 개가 되도록 배지에 부유시킨 후, 72시간동안 5% CO₂배양기로 배양하였다. 72시간 배양 후 세포배양액을 원심 분리하여 세포를 제거하고 상층액은 Mouse IgG antibody검출에 사용하였다.

2-7-3 항체 Detection

Mouse IgG를 검출하기 위해서 (주)네오딘으로부터 Anti-HBs EIA(Cat No. ND 1203)을 구입하여 ELISA Sandwich법으로 분석하였다. Mouse IgG에 대한 antigen이 흡착된 12-well plate에 음성 대조군, 양성 대조군, 시료를 각각 3개의 well에 50 μ l씩 가하고, 효소 표지액(Human HBs-Horse Radish Per-Oxidase)을 각 well에 50 μ l씩 가한 후 30 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝나기 5-10전에 기질액을 조제(H₂O₂ : 0.6mg/ml of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine= 1: 1, v/v)하여 암실에 둔다. 반응종료 후 각 well의 내용물을 흡입해내고, 세척액(400 μ l)으로 6회 세척하였다. 세척된 플레이트를 흡습지에 뒤집어 강하게 쳐서 남아있는 세척액을 완전히 제거한 다음, 암실에 둔 기질액을 각 well에 100 μ l씩 넣고 잘 혼합한 후 실온에서 빛이 들어가지 않도록 하여 30분간 반응시켰다. 반응 정지액을 100 μ l씩 각 well에 넣어 반응을 정지시켰다. 표준액과 검체의 흡광도를 450nm에서 10분 이내에 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 항균활성

분리된 천연유화제의 항균활성여부를 확인하기 위해 *E.coli* 가 함유된 평판배지 DISC법을 이용하여 살펴보았다. 천연유화제를 1%, 5%, 10% 농도로 DISC에 흡습시켜 *E.coli*가 함유된 배지 위에 올리고 37℃에서 24시간 배양한 결과, 1%이상의 농도에서 탁월한 세균 성장 저지능이 나타났고, 1%에서도 성장억제대의 크기가 1cm 정도 되는 것으로 보아 항균활성능력이 매우 큰 것으로 사료된다(그림 2).

천연유화제의 항균능력을 시판용 계면활성제와 비교하기 위해서 Tween 20, Tween 80, Triton X-100과 함께 0.1%, 0.5%, 1% 농도로 10 μ L씩 DISC에 흡습시켜 37℃에서 24시간 배양하였더니 Tween series 의 경우, 상기의 농도에서 항균활성을 보이지 않았으며 Triton X-100은 1%의 농도에서 항균활성을 나타내었고, 천연유화제는 합성계면활성제보다는 우수한 항균활성을 보였다(그림 3).

Tween series와 Triton X-100은 계면활성제로서 다양하게 이용되지만 유기합성 제품으로 자체의 독성 때문에 식품첨가물로서 사용을 꺼리고 있어 무독하면서 계면활성능력이 뛰어난 새로운 천연계면활성제의 개발이 시급한 실정이다.

천연유화제의 항균활성에 관한 보고는 다수의 문헌에서 찾아볼 수 있다. *Staphylococcus aureus*의 감염시 천연유화제가 체내의 식세포를 활성화시키는데 관여하여 식작용을 통해 세균을 사멸시키는 능력이 보고되고 있으며(Geertsma M.F. et al., 1993, 1994, Hayakawa, H. et al., 1989, Sherman M.P. et al., 1988), 사람을 비롯한 포유동물의 폐에 주로 감염되어 폐결핵을 유발하는 *Mycobacterium tuberculosis*군에 대해서 강한 항균활성을 보이는 것으로 보고되고 있다(Gaynor C.D. et al., 1995, Hwang and Clements, 1990).

Tween Series와 Triton X-100은 계면활성제로 다양하게 이용되고는 있지만 유기합성제품으로 그 독성 때문에 식품첨가물로 규제대상으로 되어 있기 때문에 천연계면활성제의 개발에 다양한 방법으로 접근중에 있다. 대표적인 천연계면활성제로서는 레시틴, 대두 단백질에서 분리한 레시틴 종류의 새로운 유화제, 오일류, 허브 성분등이 있지만 독성에 대한 안전성이 확보되고, 항균활성 가지면서 동시에, 유화능이 뛰어난 천연계면활성제는 거의 없다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서 분리된 천연유화제는 안전성여부만 확보된다면 위의 측면이 모두 수용되는 뛰어난 계면활성제로서 상품적 가치도 크리라 사료된다.

2. Microplate reader를 이용한 MIC TEST

그림 4, 5는 천연유화제와 Triton X-100의 MIC값(Minimum Inhibition Concentration)을 측정한 것이다. 세균배양액에서 세균의 증식이 천연유화물의 경우 0.0391%이상의 농도에서 거의 억제되었으며, Triton X-100의 경우에는 0.0781%이상의 농도에서 거의 억제되어 천연유화제가 Triton X-100보다 두 배 이상의 항균활성을 보이는 것으로 나타났다. 또한 Triton X-100과 천연유화물의 MIC값도 각각 0.0391%와 0.0195%로 두 배 이상의 차이가 나타났다. 따라서 천연유화물의 항균활성은 매우 뛰어난 것으로 나타났으며, 매우 낮은 농도에서도 안정된 효과를 나타내었다. Tween 20과 Tween 80도 같은 농도로 실험을 수행하였으나 거의 항균활성이 없는 것으로 나타났다.

천연유화제가 합성계면활성제보다 항균활성이 뛰어난 이유는 생물유화제의 구성성분이 인지질, 중성지질, 당질, 단백질 등으로 세균이나 세포의 막성질과 비슷하여 막구조를 변화시키거나 뚫고 들어가서 세균이나

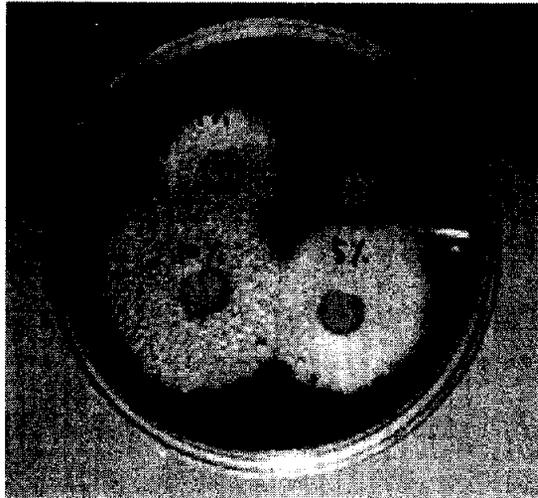


Fig. 2. Antibacterial activity of the biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.

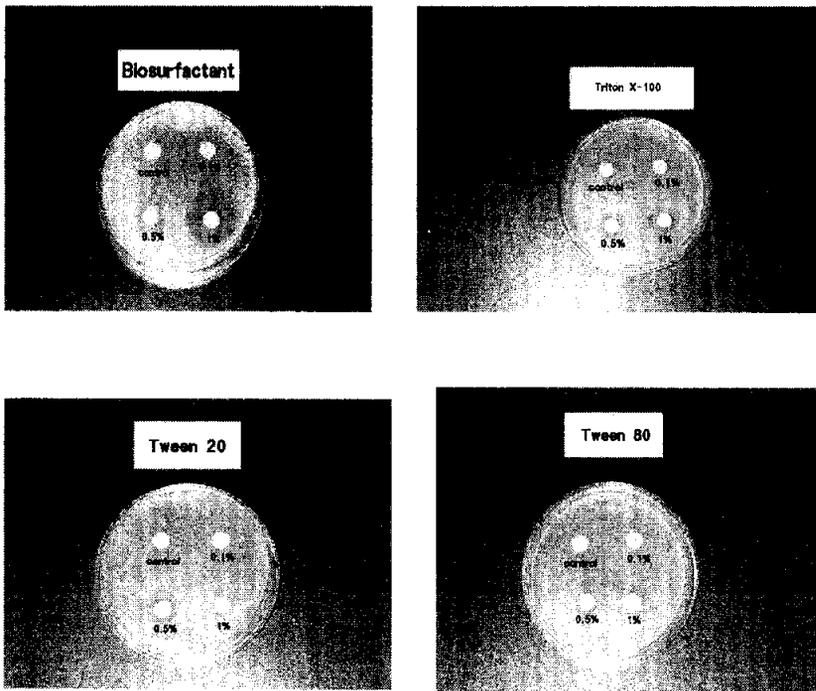


Fig. 3. Antibacterial activity of biosurfactant compared with commercial detergents.

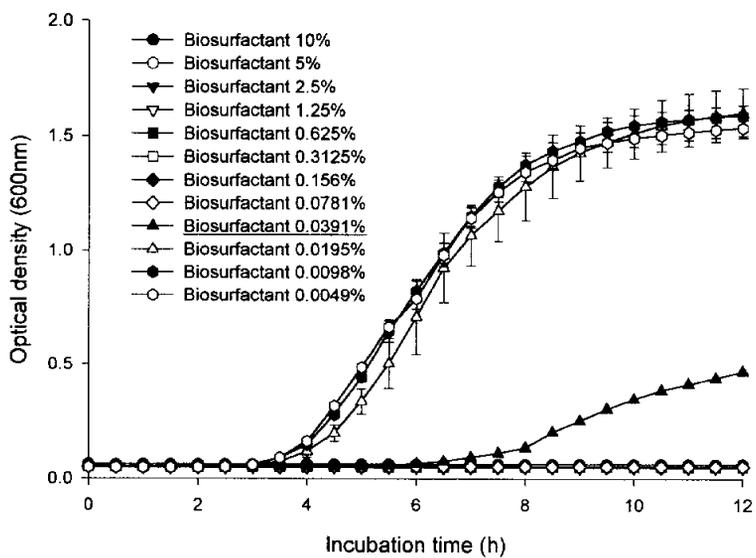


Fig. 4. *E.coli* growth curve treated with various concentration of biosurfactant

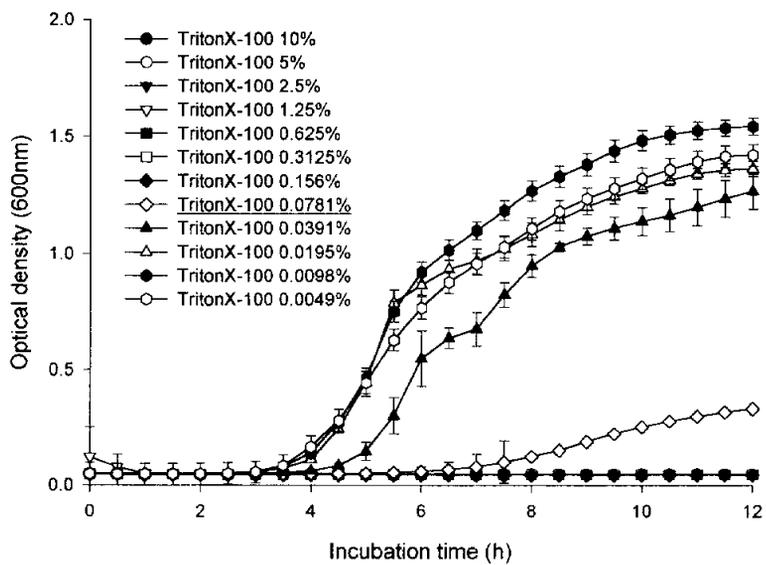


Fig. 5. *E. coli* growth curve treated with various concentration TritonX-100.

세포를 사멸시켜 항균활성을 나타내는 방법과, Lectin과 같이 세균에 대한 식작용 능력을 가지는 식세포나 면역세포를 자극한 후 활성화된 면역세포가 이차적으로 감염된 세균이나 세포를 사멸시키는 방법으로 체내에서 항균작용을 하고 있는 것으로 여겨진다(Borrón P.J. et al., 1998, Wilsher M. L. et al., 1988, Holmskov U. et al., 1994).

3. 급성독성검사

우리나라 식품의약품 안전청에 의한 의약품 독성시험기준에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에 일본 후생성의 의약품 비임상시험 Guideline 해설(1997)을 참고로 용량을 정하여 실험하였다. 본 실험에 들어가기에 앞서 예비실험으로 급성독성검사의 한계용량인 2000mg /100g body weight의 천연유화제를 실험동물인 SD계 Rat 10마리에 투여한 결과, 사망동물은 관찰되지 않았기 때문에 천연유화제의 LD₅₀값은 2000mg/100g body weight를 상회할 것으로 판단하였다. 본 실험에 들어가서 SD계 Rat와 ICR mouse를 각각 5군으로 나누어 4000mg/100g body weight, 5000mg/100g body weight, 6000mg/100g body weight, 7000mg/100g body weight, 무처리군으로 나누어 1회 복강 투여 후 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였으며 그 결과는 다음과 같이 간략하게 표현할 수 있다.

① 천연 유화제에 의한 사망률은 ICR mouse에서는 6000mg/100g body weight에서 한 마리의 사망이 나타났고, 7000mg/100g body weight에서는 전체 사망을 나타내었다. SD Rat군에서는 4000mg/100g body weight에서 2마리의 사망이 나타났고, 그 이상의 용량 투여군에서는 전체 사망을 나타내었다.

따라서, ICR mouse군에서 천연유화물의 LD₅₀치는 6000mg/100g body weight와 7000mg/100g body weight 사이에 존재할 것으로 사료

된다. 따라서 두 종류의 실험동물에서 천연유화제의 LD₅₀치는 4000mg/100g body weight를 상회할 것으로 여겨진다. 현재 식품첨가물로 사용되고 있는 유화제 중 프로필렌글리콜지방산 에스테르의 경우 LD₅₀가 1350mg/100g body weight 로 본 천연유화제가 식품첨가물로서 안전성이 더 높은 것으로 나타났다.

- ② 일반증상의 경우 생존한 모든 시험군에서 관찰기간동안 시험물질의 투여와 관련된 어떠한 증상도 관찰되지 않았다.
- ③ 체중변화의 경우 생존한 모든 시험군에서 정상적인 체중증가를 나타내었다.
- ④ 사망직후 복강개복과 내장기간의 부검소견의 경우 사망한 실험동물에서 육안으로는 이상소견이 관찰되지 않았다.
- ⑤ 실험 종료 후 계획도살 부검소견의 경우는 생존한 실험동물의 전부에서 육안으로는 이상소견이 발견되지 않았다.
- ⑥ 계획도살 후 채취한 혈액을 자동혈액분석기로 혈청 총단백질, albumin, BUN(Blood Urine Nitrogen), Glucose, cholesterol, Triglyceride 를 분석한 결과를 표 1과 2에 나타내었다. 대조군과 비교하였을때 수치상의 큰 차이는 찾아볼 수 없었다.

시험물질로서 사용된 천연유화제의 주요성분이 지질성분이기 때문에 다소 혈청 속에 지질성분인 콜레스테롤이나 중성지질의 양이 증가할 것으로 예상하였으나 rat의 경우는 오히려 감소하는 경향도 보여서 정상적으로 대사 되었음을 알 수 있었다. 또한 BUN이나 총단백질, albumin의 경우 대조군과 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보아 신장이나 간 대사에 영향을 미치지 않았음을 나타내는 결과로 시험기간에 우려할 부작용은 일으키지 않는 것으로 사료된다.

4. 항돌연변이 효과

본 연구에서는 1971년 Ames가 개발한 *Salmonella* 변이주 검출법을 이용하였다(Maron and Ames, 1983).

MMNG는 *Samonella typhimurium* TA100에 대한 대표적인 직접 돌연변이 원으로서 발암성이 강하기 때문에 주로 위암 연구에 많이 이용되며, 핵산의 알킬화와 같은 DNA염기배열에 이상을 일으키는 유전적인 작용과 아미노산의 니트로아미노화등의 DNA 유전정보 발현에 이상을 일으키는 등의 기전에 관여하여 암을 유발시킨다고 한다(Mclean and dutton, 1995).

천연유화제의 직접 돌연변이원에 의한 항돌연변이원성 효과를 Table 3에 나타내었다.

천연유화제를 MMNG에 의해 돌연변이를 일으킨 *Samonella typhimurium* TA100이 첨가된 배지에 0.1%, 0.5%, 1%, 5%농도로 첨가하여 24시간 배양한 후 복귀 돌연변이 균주의 수를 측정한 결과 1%와 5%에서 각각 50.4%와 62.5%로 관찰되었다. 이는 천연유화제 첨가농도가 1%이상에서 50% 이상의 돌연변이를 저해효과가 매우 높음을 시사하는 것이다. 저농도에서는 효과가 미미한 것으로 나타났으나 좀 더 천연유화제를 정제한 다면 그 효과가 커지리라 예상된다.

항돌연변이 물질이란 발암과정을 중지시키거나 지연시키는 역할을 하는 물질이라는 의미로, 전구체로부터 발암물질생성을 저해하는 물질균인 chemopreventive agent, 발암물질과 세포성 분자들과의 반응을 저해하는 blocking agent, 발암물질과 세포성분과 결합한 후 신생물의 변화를 저해하는 suppresssing agent의 3가지 범주로 나눌 수 있다. (Wattenberg, 1985, Hocman, 1989, Flora and Ramel, 1988, Flora 1988)

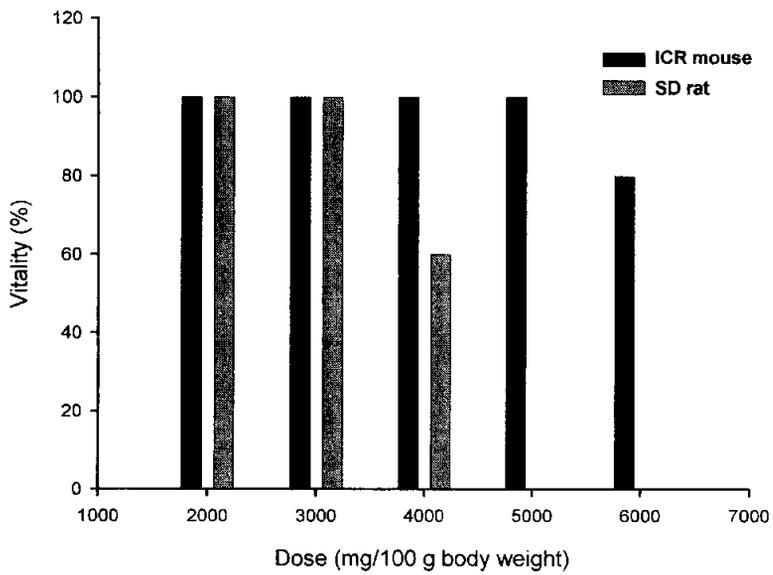


Fig. 6. Vitality of ICR mouse and SD rat injected with various dose biosulfactant.

Table 1. Blood analysis results of ICR mouse injected with biosurfactant

Items	Control	Biosurfactant	
	not treated (n=5)	2000mg/100g body weight (n=5)	4000mg/100g body weight (n=5)
BUN(mg/dL)*	21.0±0.7	24.6±0.9	28.7±1.2
Glucose(mg/dL)	176.0±21.0	141.0±14.5	193.0±15.6
Total Protein (g/dL)	6.0±0.8	5.4±0.8	5.4±1.2
Albumin(g/dL)	4.1±0.6	3.0±0.4	3.1±0.2
Cholesterol (mg/dL)	104.0±10.2	126.0±8.8	121.0±10.3
Triglycerides (mg/dL)	65±5.7	75.3±6.4	86.0±4.6

* BUN:Blood urine nitrogen

Table 2. Blood analysis results of SD-Rat injected with biosurfactant

Items	Control	Biosurfactant	
	not treated (n=5)	2000mg/100g body weight (n=5)	4000mg/100g body weight (n=3)
BUN(mg/dL)*	27.8±2.3	20.6±1.2	22.3±2.3
Glucose(mg/dL)	128.0±10.2	127.0±9.6	137.0±13.6
Total Protein (g/dL)	6.2±0.3	5.8±0.8	5.7±0.5
Albumin(g/dL)	4.4±0.8	3.9±0.1	3.8±0.1
Cholesterol (mg/dL)	121.0±6.3	98.0±5.4	94.0±12.3
Triglycerides (mg/dL)	61.0±4.2	64.5±3.6	57.0±4.5

*BUN:Blood urine nitrogen

다수의 연구자들에 의해서 항돌연변이 효과가 있는 물질을 개발하고자 하는 이유는 최종적으로 안전하고, 효율적인 항암물질로서의 응용에 있다. 암세포라고 하는 것은 체세포가 일종의 돌연변이가 일어난 것으로서 하나의 지표가 될 수 있기 때문이다. 천연유화제가 항균활성뿐만 아니라 항암활성을 가진다는 것을 의미하는 결과라고 하겠다.

5. 중금속 흡착능

그림 7-10는 천연유화제의 중금속 흡착능을 살펴본 것이다. 천연유화제가 체내 또는 세포 내에서 유입된 중금속을 신속하게 배출 또는 결합하여 배설하는지 여부를 확인하기 위해서 마크로파지를 분리하여 세포 배양액 중에 천연유화제와 중금속 표준물질을 첨가하였다. 100ppm 농도의 네 가지 금속, Fe, Cd, Pb, Zn이 함유된 용액에 천연유화제를 0%, 0.3125%, 0.6215%, 1.25%, 2.5%, 5%농도가 되도록 첨가하여 진탕 항온수조에서 120rpm, 37℃에서 반응시키면서 0, 5, 15, 30, 60분 각각의 시간대에서 일부를 취하여 원심 분리한 후 상층액에 남아있는 중금속의 양을 ICP-AED로 측정하였다. 네 종류의 중금속은 그림에서 보면 알 수 있듯이 5분 이내에 40%이상이 제거되었고, 15분 이후에는 거의 100% 가까운 중금속 제거율을 보였다. 이 결과는 비록 생세포를 이용한 실험은 아니었지만, 산업적으로나 환경적으로 신속한 중금속의 제거방법을 제시하는 것으로, 본 실험에 사용한 천연유화제는 거의 무독하기 때문에 중금속이 오염된 수질정화에 매우 효과적이라고 사료된다.

Catherine 등(2001)은 천연유화제를 이용한 토양이나 수질중의 중금속 제거능을 살펴본 결과 매우 탁월한 효과가 있었다고 보고하고 있으며, Li(1995)등은 카드뮴, 구리, 납, 수은, 니켈, 아연 등은 세계 환경 기구(Environmental Protection Agency)에서 정하는 가장 유해한 중금속으로 고려되어 있고, 토양 중에 이들 중금속의 오염은 관심이 집중되어 있다고

하였다. 따라서, 이들의 제거방법을 강구하여 토양 중에 포함된 중금속이 지하수를 통해서 강이나 호수, 바다로 도달하지 못하도록 토양중의 중금속 제거방법을 신속히 강구할 것을 요구하면서, 중금속의 효과적인 제거방법의 하나로 천연유화제의 사용을 권장하고 있다. 천연유화제의 경우 독성에 대한 우려 없이 토양중의 중금속을 재빨리 제거한다는 논문도 다수 보고되고 있다.

6. 항종양활성

6-1 In vivo test (Tetrazolium-based colorimetric Assay ; MTT Assay)

현재 많이 사용되고 있는 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) 검색법은 96 well plate를 사용하고 검사결과를 ELISA reader (multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 높게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 널리 사용되고 있다 (Carmichael, J. et al., 1987, Mosmann, T., 1983, Shoemaker R. H. et al., 1985).

대사과정이 온전한 암세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT는 phenol red가 결여된 배지 또는 염용액에서 조제될 경우 황색을 띠게 되는 수용성 tetrazolium salt이다. 용해된 MTT는 dehydrogenase enzyme에 의해서 tetrazolium ring이 끊어져서 불용성의 purple formazan으로 환원된다. 이 불용성 formazan은 isopropanol 또는 DMSO등의 용매를 이용하여 용해되어 환원되어진 dye의 농도가 540nm의 파장에서 최대가 되면, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있으며, 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례한다. 즉, 죽은 세포에서는 이 전환이 이루어지지 않기 때문에 흡광도는

MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례하는 것이다. 항 종양 활성 등에서 암세포 생존율을 구할 때 용이하게 사용되는 방법 중의 하나이다.

사람의 유방암 세포종(MCF-7)과 간암 세포종(SNU-386)의 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 well당 0.1%, 1%, 5%, 10% 농도가 되도록 천연유화제를 첨가하여 4일간 배양하면서 세포의 생존율을 살펴보았다. 천연유화제를 첨가하지 않은 대조군에 비교한 시료군의 생존율은 매우 낮은 편이었다. 천연유화제는 암세포의 성장률을 최대 85%정도까지 억제하였으며, 강한 항암활성을 보인다고 여겨지는 결과이다(그림 11, 12). 천연유화제가 항암활성을 보인다는 문헌상의 보고는 입증된 바를 찾지 못하였으나 최근의 항암제 실험에서 주로 논의되고 있는 것이 리포솜을 이용한 항암제 투여이다. 플라티늄 항암제 이외에도 Doxorubicin, Camptothecin, Taxol등에 지질이나 계면활성제를 이용하여 리포솜을 형성하여 이들 약물을 세포내로 운반시킨다면 독성이 없고, naked 약물에 비해 세포내로의 약물운반능력과 체내 순환율이 높아 항암효과가 증가된다는 것이다. 리포솜은 친수성, 소수성 그리고 양쪽성 분자까지도 높은 함유율로 제제할 수 있어 운반매개체로는 매우 강점이 있고, 리포솜 자체의 독특한 구조 때문에 약물이나 유전자 운반뿐만 아니라 초음파나 MRI의 조영제로도 각광을 받고 있다는 것이다(Khokhar, A. R., 1989, 1991). 천연유화제 자체도 면역학적으로 면역억제의 성향을 띤다는 사실을 다수의 논문에서 보고된 바가 있다.

Table 3. Influence of biosurfactant on the mutagenicity induced by MNNG in *Salmonella typhimurium* TA 100

Treatment	Concentration(%)	Revertant/plate	Inhibition Rate(%)
Control(MNNG) Spontaneous		986±62	
MNNG + Biosurfactant	0.1	936±32	5.7
	0.5	845±25	15.0
	1	541±12	50.4
	5	434±11	62.5

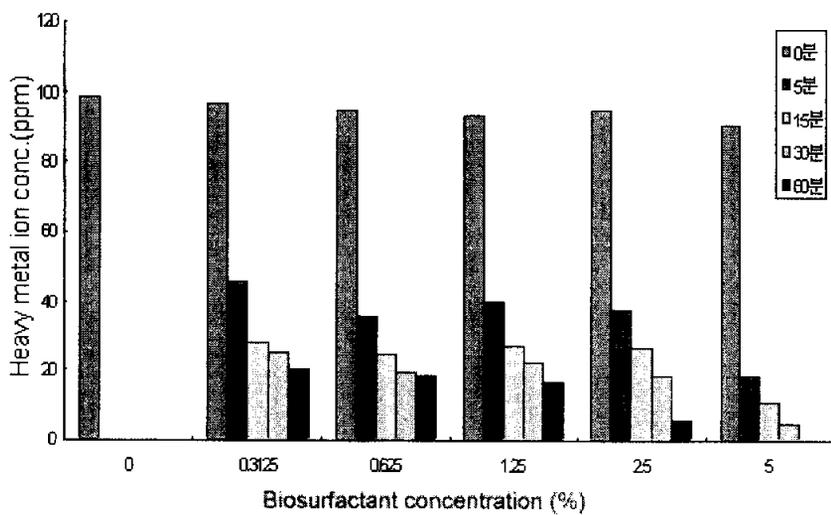


Fig. 7. Effect of biosurfactant on the removal of Cadmium

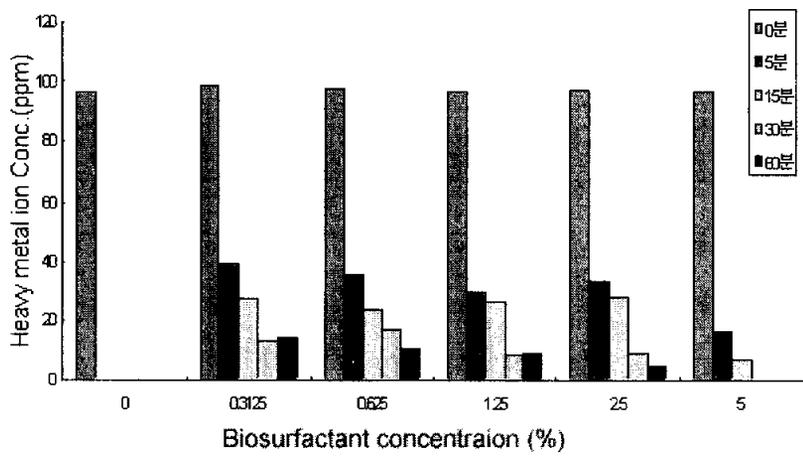


Fig 8. Effect of biosurfactant on the removal of Zinc

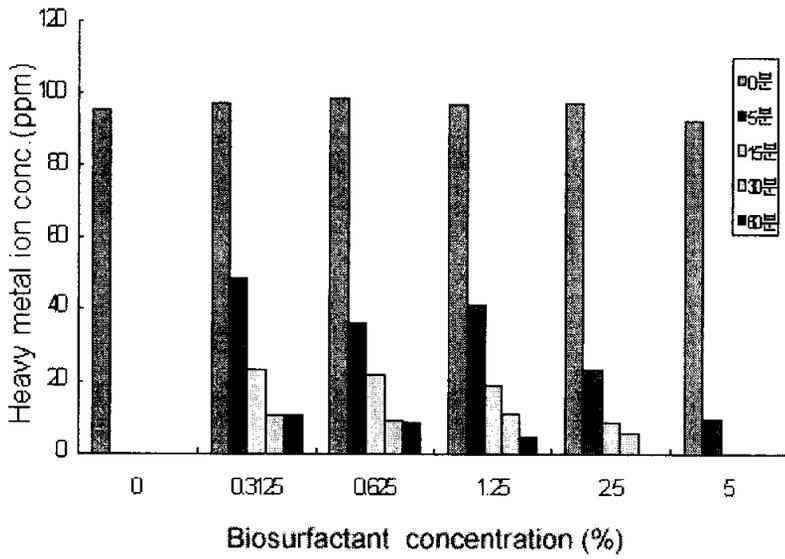


Fig. 9. Effect of biosurfactant on the removal of Iron

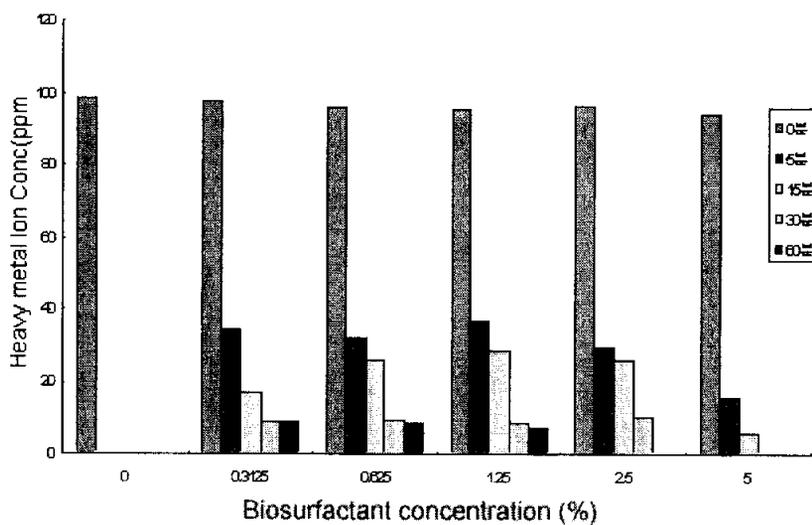


Fig. 10. Effect of biosurfactant on the removal of Lead

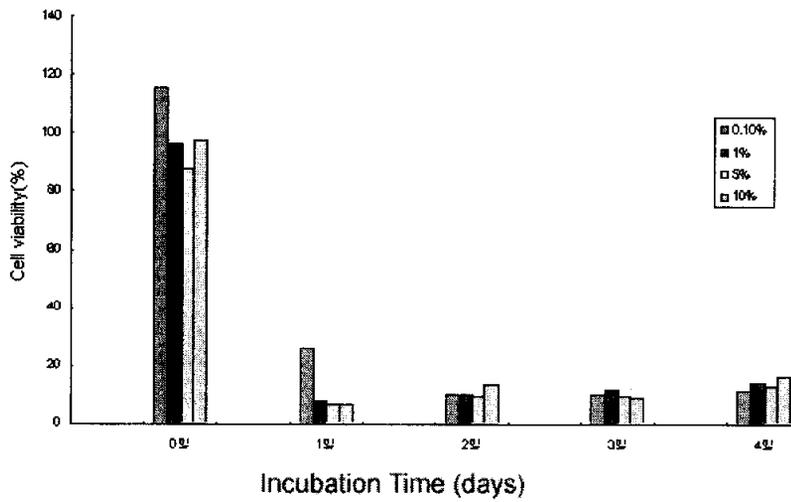


Fig. 11. Cytotoxic effect of surfactant for MCF-7 cell line

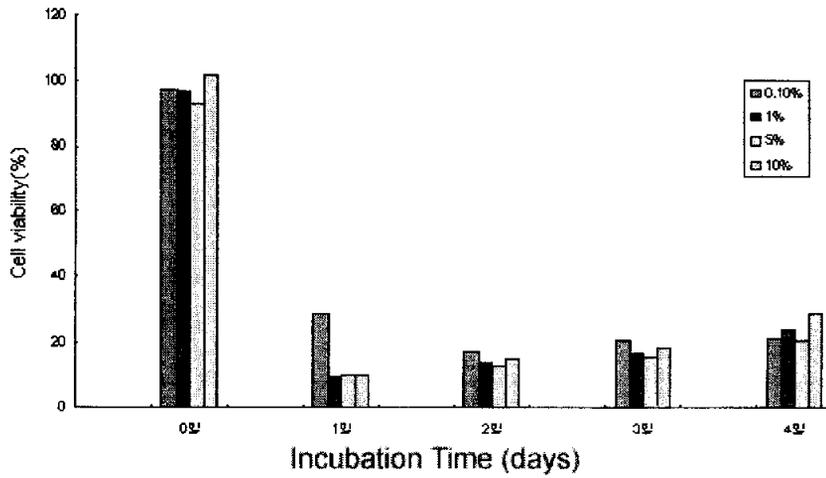


Fig. 12. Cytotoxic effect of surfactant for SNU 368 cell line

6-2 In vitro test

그림 11, 12에서 살펴본 바와 같이 천연유화제는 *in vivo*에서 항종양 활성이 매우 뛰어났다. 따라서 *in vitro* 적인 실험에서도 항종양 활성이 뛰어난지 여부를 DNA/Methyl green Assay법으로 알아보았다. Methyl green이라는 물질은 DNA와 가역적으로 결합 또는 분리되어질 수 있는 물질이다. Distamycin A와 DNA/methyl green이 반응하면 DNA/Distamycin A와 methyl green이라는 새로운 생성물이 생성되는데 이를 억제하는 것이 항암제의 역할이다. Distamycin A는 항생 효과가 매우 강한 약품으로 알려져 있고 DNA와 강하게 결합하는 성질을 가지고 있어서 항암제로도 널리 사용되고 있다.

천연유화제와 Distamycin A와의 항암 활성를 비교한 결과가 그림 13,14이다. 그림에서 알 수 있듯이 천연유화제는 Distamycin A와 비슷하거나 약간 낮은 정도의 효과를 보이는 것을 알 수 있다.

또한 IC 50값도 distamycin 값이 11.29($\mu\text{g}/\text{mL}$)이고, 천연유화제는 13.52($\mu\text{g}/\text{mL}$)로 합성품이 아닌 천연의 항생물질 개발가능성을 제시하는 결과라고 할 수 있을 것이다.

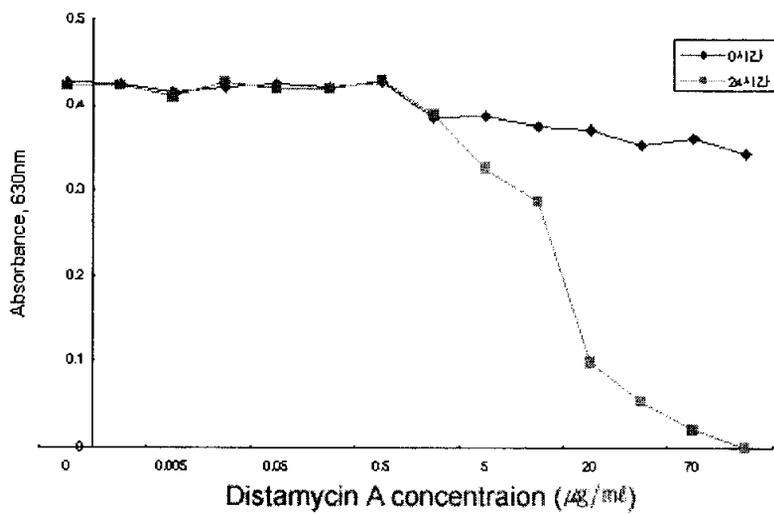


Fig. 13. Displacement of methyl green in DNA by distamycin A

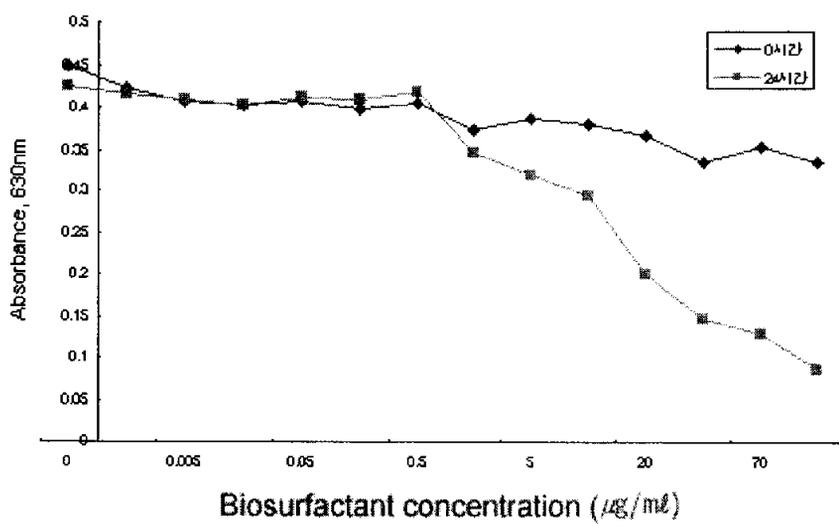


Fig. 14. Displacement of methyl green in DNA by biosurfactant

7. 항체생성능

천연유화제의 면역체계에 미치는 효과를 살펴보기 위해서 항체 생성능을 실험하였다. 단백질과 지질로서 구성된 계면활성제, 지질로만 구성된 계면활성제, 합성계면활성제를 포함한 모든 계면활성제는 어떤 방법으로든지 면역기능에 다양한 효과를 나타낸다고 보고하고 있다. 사람, 돼지, 토끼 등에서 추출된 계면활성제는 mitogen에 의해서 자극 받은 림프구의 성장을 억제하고, Natural killer cell에 의한 target cell의 lysis를 저해, 마크로파지의 표면 Fc Receptor와 보체의 발현감소 등 면역기능억제의 효과가 두드러지게 보고되고 있다(Ansfield and Benson, 1980, Wisher et al., 1988, Catanzaro et al., 1988, Coonrod and Yoneda, 1983).

본 실험에서도 비슷한 경향을 발견할 수 있었다. 마우스를 Hapten으로 면역화시킨 후 10mg/ml의 천연유화제를 400 μ l씩 5일 동안 복강 투여한 후 마우스의 비장을 적출하여 B 림프구를 분리하여 72시간 배양한 후 배양액중의 IgG만을 검출하였다. 대조군으로서는 천연유화제 대신 PBS만을 투여한 것으로 하였다. 우선 IgG가 대조군에 비해서 많이 발현되었는지를 조사하기 위해서 (주)네오턴으로부터 Anti-HBs라는 ELISA kit를 구입하여 분석한 결과 시료의 흡광도가 대조군과 거의 차이가 없었다. 그림 15에서 보면 알 수 있듯이 천연유화제에 의한 IgG의 발현은 비교군과 차이가 없었으며 더욱이 양성 대조군보다 더 낮은 흡광도를 보임으로서 복강투여는 항체생산에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보여진다. 또한, 분리된 B 림프구를 72시간 배양하면서, 대조군과 세포 성장율을 비교한 결과 세포 성장율도 거의 차이가 없거나 오히려 성장이 느린 경향을 나타내 일련의 참고문헌과 유사한 결과인 면역억제효과를 살펴볼 수 있었다. 따라서 천연유화제가 면역기능을 나타내는 것을 항체생산을 매개하지 않는 세포성 면역에 관여하는 것으로 사료된다.

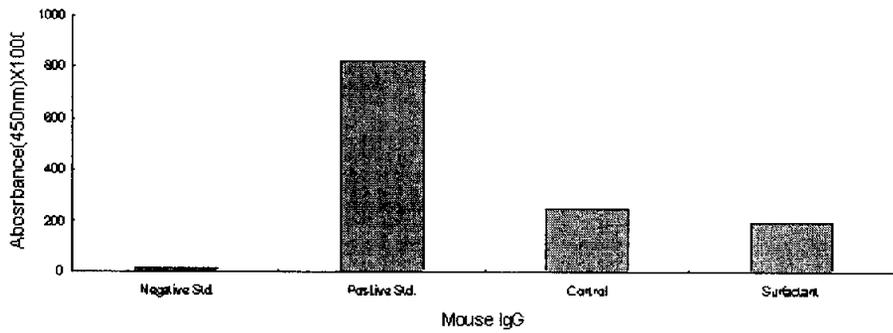


Fig. 15. Specific reactivity of ELISAs(sandwich method) against anti-mouse IgG antigen for detection of mouse IgG

IV. 요약 및 결론

천연유화물의 항균활성 및 독성 검사, 항돌연변이 효과와 중금속 흡착능, 항종양활성 등의 기능성을 조사한 결과, 다양한 기능성을 가지고 있음을 확인하였다.

항균활성능력은 매우 큰 것으로 나타났으며, 천연유화제가 체내 식세포 활성화에 관여하여 식작용을 통해 세균 사멸 능력이 보고되고 있어 무독한 천연계면활성제의 개발이 시급한 실정이며, 급성독성검사에서도 식품첨가물로서는 안전성이 높은 것으로 나타나 항균활성뿐만 아니라, 항암활성도 가지고 있어 효율적으로 항암물질 응용에 이용할 수 있을 것이라 기대된다. 토양이나 수질의 중금속 제거능이 탁월하여 환경오염 개선에 이용될 수 있으며 천연유화제의 사용이 권장되고 있다. 천연유화제는 림프구의 성장을 억제하고, Natural killer cell에 의한 Target cell의 lysis를 저해, 마크로파지의 표면 Fc Receptor와 보체의 발현 감소 등 면역 기능 억제 효과가 두드러지게 보고되고 있으며, 실험을 통해 천연유화제는 항체생산을 매개하지 않는 세포성 면역에 관여하는 것으로 사료되어진다.

본 연구에 사용된 해양미생물 유래 천연유화제와 시판중인 유화제를 기능면에서 비교하면, 화학유화제에 비해 천연유화제는 우수한 특성을 많이 가지고 있는 것으로 나타났다.

이러한 결과를 이용하여 식품산업에서 수산가공제품과 고기능성 식품에 첨가하거나, 무해한 천연유화물의 첨가로 화장품의 보관기간을 연장시켜 사용할 수 있다. 제약분야에서는 여러 가지 기능성을 가지는 약품으로서 사용이 가능하고, 약물 운반 시스템으로서 liposome으로 사용할 수 있다. 오염된 토양의 정화나 석유 산업 등에도 이용이 가능하며, 펄프나 제지산업, 중금속 회수 및 금속 공정, 농업분야 등 여러 분야에서 사용이 기대되고 있으므로 앞으로 좀 더 활발한 연구를 통해 이용방안이

증대되고 실용화될 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

Anderson, W.(1961) The antipeptic activity of sulfated polysaccharides, *J.Parm. Pharmacol.*, **13**, 139

Abe, S. and T. Kaneda(1975) Studies on the effect of marine products on cholesterol metabolism in rats--XI: Isolation of a new betaine, ulvaline, from a green laver *Monostroma nitidum* and its depressing effect on plasma cholesterol levels. *Bull. Jap. Fish Soc.*, **41**, 567-571

Ansfield, M. J. and B. J. Benson(1980) Identification of the immunosuppressive components of canine pulmonary surface active material, *J. Immunol.* **125**, 1093-1098

Borron, P. J., E. C. Crouch, J. F. Lewis, J. R. Wright, F. P. Possmayor, and L. J. Fraher(1998) Recombinant Rat surfactant-associated protein D inhibits human T lymphocyte proliferation and IL-2 production, *J. Immunol.*, **161**, 4599

Catanzaro, A., P. Richman, S. Batchner, and M. Hallman(1988) Immunomodulation by pulmonary surfactant, *J. Lab. Clin. Med.*, **112**, 727-734

Catherine N. M., N. Y. Raymond, and F. G. Bernard(2001) Heavy metal removal from sediments by biosurfactants, *J. Hazardous Materials*, **85**, 111-125

Cecilia D. G., X. M. Francis, R. V. Dennis, E. M. Stephen, and S. S. Larry(1995), Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages, *The Journal of Immunology*, **155**, 5343-5351

Coonrod, J. D. and K. Yoneda K. (1983) Effect of rat alveola lining matrial on macrophage receptors, *J. Immunol.*, 130-2589-2596

Cooper, D. G., J. E. Zajic and D. F. Gerson(1979), Production of surface active lipids by *Corynebacterium lepus*, *Appl. Environ. Microbial.*, **37**(1), 4-10

Flora, S. D.(1988) Problems and prospects in antimutagenesis and anticarcinogenesis, *Mutat. Res.*, **202**, 279-283

Geertsma, M. F., H. R. Broos, M. T. van den Barselaar, P. H. Nibbering, and R. van Furth(1993), Lung surfactant suppresses oxygen-dependent bactericidal functions of human blood monocytes by inhibiting the assembly of the NADPH oxidase, *J. Immunol.*, **150**, 2931

Geertsma, Minke F., P. H. Nibbering, H. P. Haagsman, M. R. Daha, and Ralph van Furth(1994), Binding of surfactant protein A to Clq receptors mediates phagocytosis of *stapylococcus aureus* by monocytes, *Am. J. Physiol.* **267**, L578

Hawgood, S. and J. A. Clements(1990) Pulmonary surfactant and its apoproteins, *J. Clin. Invest.*, **86**, 1

Khokhar, A. R., S. Al-Baker, I. H. Krakoff, and R. Perez-Soler(1989) Toxicity and antitumor activity of cis-bis- carboxylato (trns -R,R -1,2-di-aminocyclohexane) platinum(II) complexes entrapped in liposomes, a new series of lipid-soluble drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*, **23**,219-224

Maron, D. M. and B. N. Ames(1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215

Mclean, M and M. Dutton(1995) Cellular interactions and metabolism

of aflatoxin ; An Updata. *Pharmac. Ther.*, **65**, 163-192

Minke F. G., H. N. Peter, P. H. Henk, R. D. Mohamed, and V. F. Ralph(1994), Binding of surfactant protein A to Clq receptors mediators phagocytosis of *staphylococcus aureus* by monocytes, *Am. J. physiol.*, **267**, 578-584

Mosmann, T.(1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55

Santos, L. G., O. Kappeli, and A. Fiechter(1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 301-305

Siemann, M. and F. Wagner(1993) in Biosurfactant : production, properties., Application, Surfactant series. Marcell Dekker Inc. New York., **48**(N. Kosaric), 99-133

일본후생성(1997), 의약품 비임상시험 guideline 해설, 東京

坂上良男(1983), 海藻の生化学と利用; 抗潰瘍性成分. 恒星社厚生閣, pp.90-100, 東京

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 부족한 저를 올바른 학문의 길로 이끌어 주시고 아낌없는 지도와 격려로 보살펴 주신 변대석 교수님께 진심으로 존경과 감사를 드립니다. 바쁘신 와중에서도 깊은 사랑과 관심으로 논문을 교람하여 주신 류홍수 교수님, 남택정 교수님께 깊은 감사의 말씀을 올립니다. 또한 학문적·인격적으로 큰 가르침을 베풀어 주신 김형락 교수님, 최진호 교수님, 최재수 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

힘들 때 따뜻한 격려와 관심을 가져주신 선배님들과 동기들에게 고맙다는 말을 하고 싶으며, 특히 바쁜 일정에도 큰 도움을 준 선배같은 후배 정용실과 동기 행선에게 진심으로 감사하며, 그 외에도 크고 작은 일에 힘이 되어준 실험실 후배들과 힘들 때 가장 큰 위로가 되어준 박대숙 선생님과 도움주신 모든 분들께 감사의 말씀을 전합니다. 직장의 바쁜 일정 중에서도 공부할 수 있게 배려해 주신 영양과장 수녀님과 메리놀병원 영양사들에게도 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 딸을 항상 걱정하시어 헌신적인 사랑과 믿음으로 지켜봐 주신 아버지와 늘 넉넉한 마음과 늦은 시간 차량 봉사로 도움 준 사랑하는 남편, 공부하느라 많은 시간 함께 있어 주지 못한 사랑하는 나의 두 보물 정한이와 호영이, 멀리서나마 많은 도움 준 경석이와 항상 곁에서 의지가 되어준 가족들과 시댁 식구들에게 고마움을 전하며, 대학원 공부를 무사히 마칠 수 있도록 가장 큰 힘이 되어주신 사랑하는 나의 어머니에게 이 기쁨을 바치며 감사와 사랑을 드립니다.