



저작자표시-비영리 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시, 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리, 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

해조류 미역 가근에서 분리한
방선균 *Streptomyces praecox*
291-11의 항 염증 효과



2008년 2월

부경대학교 대학원

생물공학과

박 남 희

공학석사 학위논문

해조류 미역 가근에서 분리한 해양 방선균

Streptomyces praecox 291-11의

항 염증 효과

지도교수 홍 용 기

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2008년 2월

부경대학교 대학원

생물공학과

박 남 희

박남희의 공학석사 학위논문을 인준함.

2008년 2월 26일



주 심 공 학 박 사 김 중 균 (인)
위 원 이 학 박 사 박 남 규 (인)
위 원 농학·이학박사 홍 용 기 (인)

목 차

Abstract.....	iv
---------------	----

제 I 장. 해조류 및 해양저질로부터 항 염증작용을 가지는 방선균의 탐색

서론.....	1
재료 및 방법.....	2
1. 시료 채집	2
2. 배지 및 배양방법.....	3
3. 메탄올 추출물의 제조.....	4
4. 부종 억제효과.....	5
5. 충혈 억제효과.....	5
6. 16S rDNA에 의한 균 동정.....	6
결과 및 고찰.....	7
1. 해양 방선균 분리.....	7
2. 항 염증 효과.....	8
3. 16S rDNA에 의한 균 동정.....	9

제 II 장. *Streptomyces praecox* 291-11의 항 염증 효과

서론.....	17
재료 및 방법.....	18
1. 배지 종류에 따른 항 염증 효과.....	18
2. 배양 시간에 따른 항 염증 효과.....	20
3. 유기용매 종류별 추출물의 항 염증 효과.....	20
4. Active substance 분리.....	21
5. 농도별 실험.....	21
6. 동물실험.....	22
6-1. 부종 억제효과.....	22
6-2. 충혈 억제효과.....	22
6-3. 혈류 흐름효과.....	23
결과 및 고찰.....	24
1. 배지 종류에 따른 항 염증 효과 결과.....	24
2. 배양 시간에 따른 항 염증 효과 결과.....	24
3. 유기용매 추출물의 항 염증 효과 결과.....	25

4. Active substance 분리 결과.....	25
5. Active substance의 농도별 실험 결과.....	26
국문요지.....	39
참고문헌.....	41
감사의 글.....	44



**Anti-inflammatory activity of *Streptomyces praecox* 291-11 isolated from
rhizosphere of the seaweed *Undaria pinnatifida***

Nam-Hee Park

Department of Biotechnology, Pukyong National University

Abstract

Marine actinomycetes that showed anti-inflammatory activity have been surveyed. Total 363 strains have been isolated from marine sediment, seaweed tissue, and seaweed rhizosphere. Among them, two strains of 16 and 291-11 showed the most potent anti-inflammatory activity in a phorbol-ester-induced mouse ear edema and erythema assays. Strains 16 and 291-11 were isolated from the brown seaweed rhizosphere of *Sargassum thunbergii* and *Undaria pinnatifida*, respectively. The strains were identified as *Streptomyces macrosporeus* and *St. praecox* by 16S rDNA sequence analysis. Anti-inflammatory activity of *St. praecox* 291-11 was higher than *St. macrosporeus* 16. So *St. praecox* 291-11 have been surveyed by various type of the medium, cultivation time and extract solvent for the optimum conditions that has strong

anti-inflammatory activity.

St. praecox 291-11 was cultured in CF-4 medium for 6days and B medium for 4days. And *iso*-propanol extract of *St. praecox* was fractionated into several subfractions by using high performance liquid chromatography(HPLC) purification. Fraction 40min and 41min(designated BM31) isolated by using C₁₈ reversed-phase column HPLC purification showed good activity in phorbol-ester-induced mouse ear edema, erythema and bloodflow assays. Both of two fractions were same by GC-mass analysis. So, after collect of BM31, analyzed NMR and tested to anti-inflammatory activity for compare with indomethacin. IC₅₀ of indomethacin was 76.5 μ M. BM31 IC₅₀ of edema was 170 μ g/10 μ l, IC₅₀ of erythema was 260 μ g/10 μ l and IC₅₀ of bloodflow was not determined.

Key words: *Streptomyces praecox*, *Streptomyces macrosporeus*, actinomycetes, undaria pinnatifida rhizosphere, anti-inflammatory

제 1 장. 해조류 및 해양저질로부터 항 염증작용을 가지는 방선균의 탐색

서론

염증 (inflammation)은 다양한 물리적, 화학적 또는 생물학적인 원인, 즉 물리적 상해, 고온, 저온, 방사선, 자외선, 화학약품, 독물, 병원성 세균, 자가면역, allergy 등으로 야기될 수 있으며 그 발생 과정도 복잡하다 (Serhan, 2005). 염증반응으로서 나타나는 증상은 체액이 조직세포 사이에 증가하여 나타나는 부종, 혈관확장에 따른 충혈, 발열물질과 혈관확장에 의한 발열, 히스타민의 방출과 부종에 의한 통증현상 등으로 나타난다. 이러한 일련의 염증반응은 주로 지방산인 arachidonic acid가 phospholipase A₂ (PLA₂), cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 5-lipoxygenase 등에 의하여 prostaglandin, leukotriene 등으로 합성되어 염증반응과 퇴행성 질환의 발병에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Serhan, 2005). 이들의 효소작용을 억제시킴으로서 염증반응을 중단시킬 수 있으므로 이들의 효소억제물질 탐색이 해양생물을 대상으로 하여서도 많이 시도되었다 (Jacobson et al., 1990; Mayer et al., 1993). 특히 해양 방선균은 육상에서의 방선균들의 다양한 항생물질 생산 등의 유용성에

힘입어 각종 생리활성물질의 생산원으로서 많은 관심을 받고 있다 (Bull et al., 2000; Jensen and Fenical, 2000). 해양 방선균으로 부터의 항 염증물질의 생산은 해파리에서 분리한 *Streptomyces* sp. CNB-091 균주로 부터의 depsipeptide 화합물인 salinamide (Moore et al., 1999)가 알려져 있으며, 그 외 항생작용의 lajollamycin (Manam et al., 2005) 및 alkaloid 물질 (Charan et al., 2004), 세포독성의 lactam 화합물 (Mitchell et al., 2004), 항암작용의 thiocoraline (Erba et al., 1999), RNA polymerase 억제작용의 peptide (Miao et al., 1997) 등의 생산이 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서는 다양한 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려진 방선균들 중 해양 환경에 적응하여 서식하는 해양 방선균 특히 해조류 가근의 근권 방선균들을 포함하여 이들 모든 균주들로부터 염증반응의 억제효과를 측정하였다. 항 염증반응은 생쥐를 사용한 항 부종 (anti-edema) 및 항 충혈 (anti-erythema) 작용효과를 측정하였으며, 그 결과 두 종류의 해조류에서부터 항 염증작용을 가진 서로 다른 특징의 두 방선균을 분리하였다.

재료 및 방법

1. 시료채집

해양 방선균 분리를 위한 시료는 2004년 8월부터 2006년

3월까지 강릉, 포항, 울산, 부산, 통영, 완도 등지에서 수심 10 m 전후의 저질 및 해조류, 해조류 근권 (rhizosphere: 가근을 포함한 부착부위)을 채집하였다. 채집한 저질은 대략 2 g 에 멸균해수 4 mL 를 넣어 현탁한 후, 가급적 세균 등의 영양세포들의 수를 줄이기 위하여 55℃에서 6분간 열 처리하여 사멸시켰다. 여기에 14 mL의 멸균해수로 희석한 후 0.5 mL씩 각종 고체배지에 도말하였다. 해조류 및 해조류 가근 부착부위는 대략 2 g에 멸균해수 4 mL를 넣어 현탁한 후 55℃에서 6분간 열처리한 다음 바로 0.5 mL씩 각종 고체배지에 도말 배양하였다.

2. 배지 및 배양방법

해양 방선균의 분리에 사용한 배지는 5종류의 고체배지를 사용하였으며 그 조성은 다음과 같다; M1 배지 (Starch 10 g, yeast extract 4 g, peptone 2 g, agar 18 g, sea water 1 L, pH 7.8), M2 배지 (glycerol 6 mL, arginine 1 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, agar 18 g, seawater 1 L, pH 7.8), M3 배지 (glucose 6 g, chitin 2 g, agar 18 g, seawater 1 L, pH 7.8), M4 배지 (chitin 2 g, agar 18 g, seawater 1 L, pH 7.8), M 5 배지 (agar 18 g, seawater 1 L, pH 7.8). 모든 배지에는 멸균한 뒤 0.2 μ m로 여과된 cycloheximide (100 μ g/mL) 와 rifampin (5 μ g/mL)를 곰팡이 및 세균의 성장을 억제시키기 위하여 첨가하였다. 그리고 18℃에서 6 주일 동안

배양한 후 성장하는 방선균 집락 만을 분리하였다. 이들은 8 mL vial의 사면배지에 희선 배양하고 4도에서 보관하면서 3개월마다 계대 배양하였다.

3. 메탄올 추출물의 제조

분리된 모든 방선균들은 균 성장이 가장 좋은 M1 액체배지 5 mL에 접종하여 18℃에서 10일간 150 rpm으로 진탕 배양하였다. M4 배지에서 분리한 방선균 일지라도 M4 액체배지에서는 균이 잘 자라지 못하였으므로 액체배양은 모두 M1 액체배지를 사용하여 배양하였다. 균 생육 정도는 1500 G에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후의 생 균체 무게로 측정하였다. 메탄올 추출물은 균체를 포함한 배양액 전체를 40℃에서 진공 농축한 다음 5 mL의 메탄올을 첨가하여 1일 동안 실온에서 추출하였다. 1500 G에서 5분간 원심 분리하여 균체 및 침전물을 제거하고 상등액만 새로운 vial에 취하여 메탄올을 증발시켰다. 이때 메탄올 추출물에 락터 나온 소금 성분 등을 최대한 제거하기 위하여, 소금 성분이 눈에 보이지 않을 때까지 소량의 메탄올에 용해 및 농축을 수회 반복하였다. 그리고 최종적으로 추출물의 농도가 0.4mg/10 μ l로 되게 에탄올에 녹여 사용하였다.

4. 부종 억제효과

방선균 추출물에 대한 생체 내 (in vivo) 부종 (edema) 억제효과를 확인하기 위하여, 실험군당 최소 7마리 이상의 BALB/c 흰쥐 (약 8-10주령, 체중 25-30 g)를 사용하였다. 부종의 유발은 흰쥐 한쪽 귀의 안쪽 면에 acetone으로 용해한 PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate; $0.2 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$)를 $10 \mu\text{L}$ 씩 골고루 도포하여 10시간 후에 Spring-loaded micrometer (Mitutoyo Corp., Tokyo)로 부종 두께를 측정하였다. 이때 방선균 추출물은 $0.4\text{mg}/10\mu\text{L}$ 농도로서 $10 \mu\text{L}$ 씩 같은 방법으로 30분 먼저 도포하였다. 부종 값은 $(S_{10}-S_0)/S_0$ 로서 표시하며, 이때 S_{10} 은 PMA 도포 10시간 후의 귀 두께이며 S_0 는 0 시간 때의 귀 두께이다. 추출물이 없는 에탄올 자체만을 포함한 대조구의 PMA 경우는 약 0.81 ± 0.04 의 값을 보였다. 상대적 억제율 (%)은 $(1 - \text{추출물부종값}/\text{대조구부종값}) \times 100$ 으로 표시하였다.

5. 충혈 억제효과

방선균 추출물에 대한 생체 내 (in vivo) 충혈 (erythema) 억제효과를 확인하기 위하여는 상기의 부종억제효과 실험에서와 같이 PMA를 $10 \mu\text{L}$ 씩 도포하여 10시간 후에 귀의 충혈 정도를 디지털카메라로 촬영하여 이를 컴퓨터상에서 Adobe Photoshop 7.0 프로그램으로 충혈의 색상을 붉은 색상

(magenta) 값으로 측정하였다. 총혈값은 $(R_{10}-R_0)/R_0$ 로 표시하며, 이때 R_{10} 은 PMA 도포 10시간 후의 귀의 붉은 색상 값이며 R_0 는 0 시간 때의 귀의 붉은 색상 값이다. 추출물이 없는 에탄올 자체만을 포함한 대조구의 PMA 경우는 약 0.27 ± 0.01 의 값을 보였다. 상대적 억제율 (%)은 $(1 - \text{추출물총혈값}/\text{대조구총혈값}) \times 100$ 으로 표시하였다.

6. 16S rDNA에 의한 균 동정

분리 균주들의 동정을 위한 16S rDNA 염기서열은 우선 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 사용하여 분리한 후, 16S rDNA 염기서열 분석에 사용하는 universal primer인 27F (5' - AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')과 1492R (5' GGATACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 PCR 증폭하였다 (Yoon et al., 1996). 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV gel PCR clean-up system (Promega, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM 3700 DNA analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 염기서열과 비교하였으며, 상동성은 Clustal X와 Mega 2 프로그램을 이용하여 비교 분석하였다 (Thompson et al., 1994).

결과 및 고찰

1. 해양 방선균 분리

해양 방선균 분리를 위한 시료를 강릉, 포항, 울산, 부산, 통영, 완도 등지에서 수심 10 m 전후의 저질, 해조류 엽체 및 가근을 포함한 부착부위를 채집하여 각종 배지에서 도말 배양한 결과는 Table 1과 같다. 전반적으로 저질에서나 해조류에서 방선균의 분리가 쉽게 가능하였다. 그러나 저질의 경우 도말한 0.5 mL 당 시료가 0.05 g 에 상당하므로 해조류의 0.5 mL 당 0.25 g 에 비하여 1/5의 시료량으로서도 시료 1개당 평균 6.0 균주가 분리되었고, 해조류 시료 1개당 평균 1.5 균주가 분리되었다. 이를 동일 시료량으로 환산하면 해조류 보다 저질에서 30배정도 더 많은 방선균을 분리할 수 있었다. 이는 지역에 따른 방선균 수의 차이는 어느 정도 있는 것으로 보여지나, 일반적으로 방선균의 분리원으로서 잘 알려진 저질에서 방선균의 숫자가 많음을 볼 수 있다. 그러나 해조류 엽체 및 가근 부착부위에서도 많은 방선균을 분리할 수가 있었으므로 향후 해조류의 근권 미생물에 대한 분포 및 생태학적 연구도 필요할 것이다.

해양 방선균의 분리에 사용한 배지는 그 종류에 따라서 성장속도에는 차이가 있지만 3주 후에는 집락을 확인할 수가 있었으며 늦어도 6주 후에는 대부분의 집락들이 나타났다.

M2 배지, M3 배지, M5 배지에서는 41 종류의 시료에서 균이 거의 자라지 않았으므로 더 이상 분리배지로 사용하지 않았다. 전반적으로 영양분이 풍부한 M1 배지와 방선균 선택배지로 알려진 chitin만 함유된 M4 배지에서 상대적으로 많은 방선균들이 분리되었다 (Table 2). 이때 가급적 많은 해양 방선균들의 성장을 보기 위하여 18℃에서 6 주일 동안 배양한 후 성장하는 방선균 집락 만을 계산하였다. 많은 집락들에서 암갈색, 오렌지색, 분홍색 등의 수용성 색소를 생산하였다.

2. 항 염증 효과

분리된 전체 363 균주로부터의 메탄올 추출물을 사용하여 항 염증 (항 부종 및 항 충혈) 효과를 실험한 결과는, 부종값이 0.4 이하 (상대적 부종 억제율 50% 이상) 및 충혈값이 0.1 이하 (상대적 충혈 억제율 60% 이상)로 보인 것은 13균주였다. 이중 저질에서 분리된 것은 6균주, 해조류에서 분리된 것은 7균주였다. 이들은 저질에서 분리된 총 200균주에 비하면 3%, 해조류에서 분리된 총 163균주에 비하면 4% 정도가 항 염증효과를 나타내었다. 또한 해양환경에서의 생육 및 항 염증 효과를 확인하기 위하여 이들 13개 균주를 해수 및 증류수로 만든 M1 액체배지에 각각 배양하여 비교한 바는 해수 M1액체배지에서 균생육, 항부종, 항충혈이 더 높은 균주는 6개였다. 이 6균주들을 대상으로 M1 액체배양에서의 배양여액 및 균체, 추출물의 농도 별로 비교 실험한 결과는

부산 청사포의 갈조류 지충이 (*Sargassum thunbergii*) 가근 부착부위 및 강릉의 갈조류 미역 (*Undaria pinnatifida*) 가근 부착부위에서 각각 분리한 균주 16번 및 291-11번이 전반적으로 가장 우수하였다 (표 3 및 표 4). 균주 16번은 최적생육에 해수를 필요로 하며 균체에서 항 충혈효과가 더 강하였으며, 균주 291-11번은 해수가 없는 조건에서도 잘 생육하며 배양여액에서 항 부종효과가 더 강하였다.

3. 16S rDNA에 의한 균 동정

항 염증작용을 가지는 분리 균주 16번 및 291-11번을 동정하기 위하여 각각 16S rDNA 염기서열을 조사한 바는 Fig. 1 과 같다. 이들 염기서열들을 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 염기서열과 상동성을 비교하여 본 결과 방선균 중 *Streptomyces macrosporeus* 및 *St. praecox*와 각각 99%의 유사성을 나타내었다. 따라서 분리된 균주들을 *St. macrosporeus* 16 및 *St. praecox* 291-11로 명명하고자 한다.

일반적으로 방선균들은 포자를 형성할 수 있으므로 이들이 해양으로 유입되었을 경우에도 포자 상태로서 잔존할 수 있을 것으로 생각할 수 있으나 대다수의 해양 유래 방선균들은 생리적으로 해양환경에 적응되어져 육상 방선균들과는 다른 대사산물들을 많이 생산한다 (Moran et al., 1995; Mincer et al., 2002). 또한 방선균들은 항생물질, 항암물질, 색소생산,

유기물질의 분해 등 다양한 물질생산 및 자연계에서의 생태학적 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Lechevalier and Lechevalier, 1981). 따라서, 본 연구에서 분리된 균주들은 상대적으로 검색이 적게 이루어진 해양 방선균 중 특히 해조류 가근의 근권 방선균들로서 새로운 생리활성물질의 생산원으로서 기대되며 현재 이들 균주들로부터 항 염증물질의 정제실험이 진행중에 있다.



Table 1-1. Number of actinomycete colonies against sediment and seaweed samples including tissue and rhizosphere at various collection sites. ND, not determined.

Collection sites	Actinomycete colonies / Sediment samples	Actinomycete colonies / Seaweed samples
Kangnung	ND	71 / 17
Pohang	116 / 12	10 / 17
Ulsan	ND	4 / 3
Busan	48 / 14	35 / 24
Tongyoung	21 / 4	2 / 40
Wando	15 / 3	41 / 10
Total	200 / 33	163 / 111

Table 1-2. Number of actinomycete colonies isolated from various agar media.

Isolation media	Actinomycete colonies / Samples tested
M1 medium	235 / 144
M2 medium	3 / 41
M3 medium	0 / 41
M4 medium	125 / 144
M5 medium	0 / 41

Table 1-3. Cell growth and collection source of strains 16 and 291-11 isolated from seaweed rhizosphere. Each strain was cultured in 5 mL of M1 medium with 150 rpm at 18 °C for 10 d.

Strains	Cell mass in SW-based M1 medium (mg)	Cell mass in DW-based M1 medium (mg)	Seaweed source	Collection site
16	355	86	<i>Sargassum thunbergii</i>	Chungsapo, Busan
291-11	340	310	<i>Undaria pinnatifida</i>	Kangnung

Table 1-4. Anti-inflammatory activity of strains 16 and 291-11 isolated from seaweed rhizosphere. Reference with PMA showed edema value of 0.81 ± 0.04 and erythema value of 0.27 ± 0.01 . Mean $\pm$ S.E. (n $\geq$ 7); * P < 0.01

Strains	Cultivation	Edema value	Erythema value
16	Culture fluid	0.49 ± 0.12	0.30 ± 0.08
	Cell	0.58 ± 0.11	$0.15 \pm 0.07^*$
291-11	Culture fluid	$0.25 \pm 0.11^*$	0.18 ± 0.04
	Cell	0.63 ± 0.08	0.19 ± 0.07

(A)

5' TAACTGCAGTCGAAGATGAACACCTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT
GCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGAACCGCTTGGGCATCCAGGCGGT
TCGAAAGCTCCGGCGGTGACAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGA
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAATACGTGCCAG
CAGCCCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCA
CGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGAGGCTAGAGTTCCGTAGGGGAG
ATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGG
CCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTCGTAGTCCACGCGTAAAC
GGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCGCGCAGCTAACGCATTAAGTCCCCCGCTGGGGA
GTACGCCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCG
ACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCTG
GTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCGGGGTCAACTCGGAGGAA
GGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTATGTCTTGGGCTGCACAGTCTCAATGGCCGTTACAATGA
GCTGGATACCGAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCC
ATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCG
CCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTGGGAGGGAGCGTCAAGGG3'

(B)

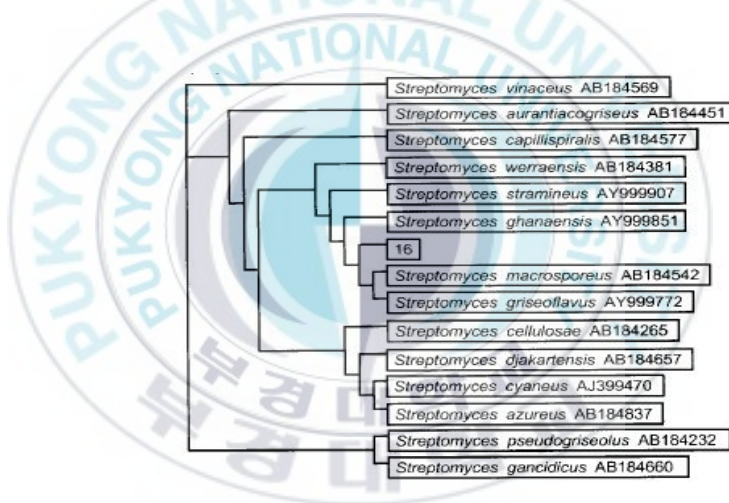


Figure 1-1. 16S rDNA sequence (A) and phylogenetic tree (B) of *Streptomyces macrosporeus* 16. The strain 16 was isolated from the brown seaweed *Sargassum thunbergii* rhizosphere at Chungsapo, Busan.

(A)

5' TCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCAC
TCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTAAAAGCTC
CGGGCGTGAAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAG
CCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCT
TTCAGCAGGGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGT
AATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTCGGATGT
GAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGA
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACT
AGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCGCCCGCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCACAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCG
AAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGT
GGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGT
GTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAC
GACGTCAAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGTACATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATG
CCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCG
GAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTTCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACG
TCACGAAAGTCGGTAACACCCGAGCCGGTGGCCCAACCCCTGTGGAGGAGCTTCAAGTGACGAG3'

(B)

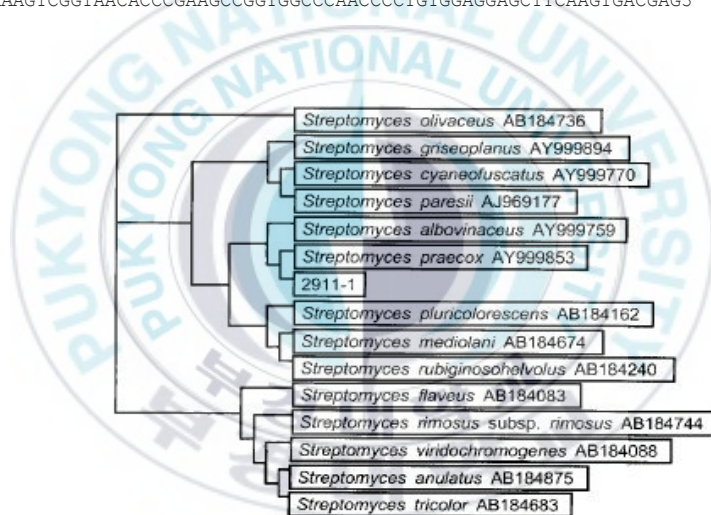


Figure 1-2. 16S rDNA sequence (A) and phylogenetic tree (B) of *Streptomyces praecox* 291-11. The strain 291-11 was isolated from the brown seaweed *Undaria pinnatifida* rhizosphere at Kangnung.

제 II 장. *Streptomyces praecox* 291-11의 항 염증 효과

서론

1장에서 부산 청사포의 갈조류 지충이 (*Sargassum thunbergii*) 가근 부착부위 및 강릉의 갈조류 미역 (*Undaria pinnatifida*) 가근 부착부위에서 각각 분리한 균주 16번 및 291-11번이 항 염증 효과가 있는 것으로 확인되었다. 균주 16번은 최적생육에 해수를 필요로 하며 균체에서 항 충혈효과가 더 강하였으며, 균주 291-11번은 해수가 없는 조건에서도 잘 생육하며 배양여액에서 항 부종효과가 더 강하였다. 그리고 균주 291-11의 특이한 점은 강릉의 수심 10m에 생육하는 미역의 가근에서 분리한 해양 방선균이라는 것이다. 이는 해안선 근처에서 자라는 미역의 생육 환경보다 수심이 깊은 해양 지대에서 자란 미역이 해양환경에 더 적응되어져 독특한 생리활성을 나타낼 수도 있다. 또한 균주 291-11의 배양 여액의 항 부종 효과가 균주 16번의 그것보다 약 2배 정도 뛰어남을 알 수 있었다. 따라서 항 염증 효과 중에서도 항 부종 효과에 초점을 맞추어 균주 291-11을 선택하였고 항 염증 물질을 찾는 실험을 진행하였다.

2장에서는 *Streptomyces praecox* 291-11의 항 염증 물질을 찾기 위한 최적 조건을 찾는 과정과 정제 실험이 진행되었다. 배지의 종류, 배양시간, 유기용매 추출법 등에 따른 항 염증 효과를 알아보고 가장 효과적인 조건을 찾아 추출물을 만들고 HPLC를 통해 정제하였다. 그리고 정제 후 구조분석을 하고 standard 물질과 Inhibition concentration 50, Limited concentration 50에 대해 비교, 조사할 계획이다.

재료 및 방법

1. 배지종류에 따른 항 염증 효과

항염증 활성이 가장 뛰어난 최적배지를 선택하기 위해 방선균 배양에 사용되는 대표적인 배지 9가지를 제조하였다. 9가지의 배지는 다음과 같다; CF-4배지(Glucose 4 g, Malt extract 10 g, Yeast extract 4 g, CaCO₃ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.8 g, seawater 1 L, pH 7.8), TCG 배지(Tryptone 3 g, Casitone 5 g, Glucose 4 g, seawater 1 L, pH 7.8), A1-C(=M1) 배지(Starch 10 g, Yeast extract 4 g, Peptone 2 g, seawater 1 L, pH 7.8), GAS(=M2) 배지(Glycerol(100%) 12.5 ml, Arginine 1 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, seawater 1 L, pH 7.8), GAC(=M3) 배지(Glucose 6g, Chitin(colloidal chitin) 2 g, seawater 1 L, pH 7.8), A 배지(NaCl 5 g,

Nutrient broth 8 g, seawater 1 L, pH 7.8), B 배지(Glucose 5 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, KH₂PO₄ 15 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, MnSO₄ · H₂O 0.0015 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.02 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.04 g, seawater 1 L, pH 7.8), C 배지(KNO₃ 3 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, Peptone 20 g, seawater 1 L, pH 7.8), D 배지(Glucose 1 g, Yeast extract 1 g, seawater 1 L, pH 7.8). Test tube에 15 mL씩 제조하고 멸균한 뒤 모든 배지에는 0.2 μm로 여과된 cycloheximide (100 μg/mL) 와 rifampin (5 μg/mL)를 곰팡이 및 세균의 성장을 억제시키기 위하여 첨가하였다. 그리고 18℃에서 10일간 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 균 생육 정도는 1500 G에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후의 생균체 무게로 측정하였다. 메탄올 추출물은 균체를 포함한 배양액 전체를 40℃에서 진공 농축한 다음 5 mL의 메탄올을 첨가하여 1일 동안 실온에서 추출하였다. 1500 G에서 5분간 원심 분리하여 균체 및 침전물을 제거하고 상등액만 새로운 vial에 취하여 메탄올을 증발시켰다. 이때 메탄올 추출물에 팔려 나온 소금 성분 등을 최대한 제거하기 위하여, 소금 성분이 눈에 보이지 않을 때까지 소량의 메탄올에 용해 및 농축을 수회 반복하였다. 그리고 최종적으로 추출물의 농도가 0.4mg/10μl로 되게 메탄올에 녹여 항 염증 효과(항 부종, 항 충혈, 혈류 흐름)를 실험하였다.

2. 배양 시간에 따른 항 염증 효과

9가지 배지 중 항 염증 효과가 뛰어난 배지를 선택하여 배양시간에 따른 항 염증효과를 측정하였다. 10개의 동일 배지를 만들어 1일자부터 10일자까지 배양하였고 배양된 균체와 배양액을 각각 나누어 메탄올 추출물을 만든 후 항 염증 효과(항 부종, 항 충혈, 혈류 흐름)를 측정 하였다.

3. 유기용매 종류별 추출물의 항 염증 효과

항 염증 물질을 가장 잘 분리해 낼 수 있는 최적의 유기용매를 찾기 위해 극성 차이에 따른 16가지 종류의 유기용매를 사용하여 배양균을 추출한 후 항 염증 효과를 측정하였다. 선택된 배지를 Test tube에 15 mL씩 넣고 균을 배양한 후 균체를 포함한 배양액 전체를 40℃에서 진공 농축한 다음 5 mL의 유기용매를 첨가하여 1일 동안 실온에서 추출하였다. 1500 G에서 5분간 원심 분리하여 균체 및 침전물을 제거하고 상등액만 새로운 vial에 취하여 유기용매를 증발시켰다. 이때 추출물에 딸려 나온 소금 성분 등을 최대한 제거하기 위하여, 소금 성분이 눈에 보이지 않을 때까지 소량의 유기용매에 용해 및 농축을 수회 반복하였다. 그리고 최종적으로 추출물의 농도가 0.4mg/10 μ l로 되게 에탄올에 녹여 항 염증 효과(항 부종, 항 충혈, 혈류 흐름)를 실험하였다.

4. Active substance 분리

항 염증 효과가 있는 추출물을 농축하여 HPLC에 적용하였다. 그 전에 배양하지 않은 상태의 배지만을 농축시킨 후 HPLC 정제를 하여 데이터를 얻었다. 또한 B배지에서 배양된 균체와 배양액을 각각 농축시킨 후 정제하여 데이터를 얻은 후 각 peak를 비교하였다. 배지에서 나온 peak는 활성 실험에서 제외하였다. 정제는 HPLC C₁₈ reversed-phase column (Alltima, 10×250mm)에 적용하여 linear gradient로 0-100% acetonitrile (0.1% TFA)을 60분 동안 205 nm에서 유속은 2mL min⁻¹으로 용출하였다. 각 peak마다 항 염증 효과를 측정하였고 활성이 있는 peak를 선택하여 isocratic하에서 단일 peak로 정제를 한 후 GC-mass, NMR(proton, carbon, 2D)등의 분석을 통해 구조를 결정할 계획이다. 또한 농도별로 활성을 측정하여 IC₅₀을 측정한 후 기준물질인 indomethacin과의 효능을 비교할 계획이다.

5. Active substance의 농도별 실험

항 염증 활성을 보이는 분획을 모아 농도별로 실험하였다. 농도는 10μg /10μl, 50μg /10μl, 150μg /10μl, 200μg /10μl, 300μg/10μl, 400μg/10μl 별로 실험하였고 개체군은 쥐 5마리 이상을 실험하였다.

6. 동물실험

6-1. 부종 억제효과

방선균 추출물에 대한 생체 내 (in vivo) 부종 (edema) 억제효과를 확인하기 위하여, 실험군당 최소 7마리 이상의 BALB/c 흰쥐 (약 8-10주령, 체중 25-30 g)를 사용하였다. 부종의 유발은 흰쥐 한쪽 귀의 안쪽 면에 acetone으로 용해한 PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate; 0.2 μ g/10 μ L)를 10 μ L 씩 골고루 도포하여 10시간 후에 Spring-loaded micrometer (Mitutoyo Corp., Tokyo)로 부종 두께를 측정하였다. 이때 방선균 추출물은 0.4 mg/10 μ L 농도로서 10 μ L씩 같은 방법으로 30분 먼저 도포하였다. 부종 값은 $(S_{10}-S_0)/S_0$ 로서 표시하며, 이때 S_{10} 은 PMA 도포 10시간 후의 귀 두께이며 S_0 는 0 시간 때의 귀 두께이다. 추출물이 없는 에탄올 자체만을 포함한 대조구의 PMA 경우는 약 0.81 ± 0.04 의 값을 보였다. 상대적 억제율 (%)은 $(1 - \text{추출물부종값}/\text{대조구부종값}) \times 100$ 으로 표시하였다.

6-2. 충혈 억제효과

방선균 추출물에 대한 생체 내 (in vivo) 충혈 (erythema) 억제효과를 확인하기 위하여는 상기의 부종억제효과 실험에서와 같이 PMA를 10 μ L씩 도포하여 10시간 후에 귀의

충혈 정도를 디지털카메라로 촬영하여 이를 컴퓨터상에서 Adobe Photoshop 7.0 프로그램으로 충혈의 색상을 붉은 색상(magenta)값으로 측정하였다. 충혈값은 $(R_{10}-R_0)/R_0$ 로서 표시하며, 이때 R_{10} 은 PMA 도포 10시간 후의 귀의 붉은 색상값이며 R_0 는 0 시간 때의 귀의 붉은 색상값이다. 추출물이 없는 에탄올 자체만을 포함한 대조구의 PMA 경우는 약 0.27 ± 0.01 의 값을 보였다. 상대적 억제율(%)은 $(1 - \text{추출물충혈값}/\text{대조구충혈값}) \times 100$ 으로 표시하였다.

6-3. 혈류 흐름효과

방선균 추출물에 대한 생체 내 (in vivo) 혈류 흐름(bloodstream) 억제효과를 확인하기 위하여는 상기의 부종억제효과 실험에서와 같이 PMA를 $10 \mu\text{L}$ 씩 도포하여 10시간 후에 귀의 혈류 흐름 정도를 laser speckle flowgraphy(Inflameter LFG-1; SoftCare, Fukuoka, Japan)를 사용하여 측정하였다. 움직이는 laser beam에 의해 귀의 피부가 스캔이 되어 피부 내의 혈류 정도를 측정하였다. 스캐너와 귀 표면의 거리는 0.5 cm였고 귀 표면의 직경 5 mm의 혈류값을 컴퓨터 상에서 분석하였다(Lee et al., 2003). 혈류값은 $(R_{10}-R_0)/R_0$ 로서 표시하며, 이때 R_{10} 은 PMA 도포 10시간 후의 귀의 혈류 값이며 R_0 는 0 시간 때의 귀의 혈류 값이다. 추출물이 없는 에탄올 자체만을 포함한 대조구의 PMA 경우는 약 0.33 ± 0.01 의 값을 보였다. 상대적 억제율(%)은

(1-추출물혈류값/대조구혈류값) x 100으로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 배지종류에 따른 항 염증 효과 결과

9가지의 대표적인 배지 중 CF-4배지에서 *St. praecox* 291-11의 Cell mass가 가장 높았다(Table 1). 그리고 PMA assay에서 항 혈류 값이 9개의 배지 중 가장 좋았다. Cell mass는 많지 않지만 항 부종과 항 충혈 효과는 B 배지에서 가장 좋았다. 따라서 CF-4 배지와 C 배지를 선택배지로 사용하였다.

2. 배양 시간에 따른 항 염증 효과 결과

CF-4 배지의 배양 시간에 따른 PMA assay 결과 6일자까지 배양한 균체의 메탄올 추출물을 사용했을 경우 항 부종 효과가 좋았다. 그리고 4일자까지 배양한 배양액의 메탄올 추출물을 사용했을 경우 항 충혈 효과와 혈류 흐름효과가 좋았다(Table 2).

B 배지의 배양 시간에 따른 PMA assay 결과 4일자까지 배양한 균체의 메탄올 추출물을 사용했을 경우 항 부종과 항 충혈 효과가 좋았다. 그리고 1일자까지 배양한 균체의 메탄올 추

출물에서는 혈류 흐름효과가 좋았다(Tabel 3).

따라서 *St. praecox* 291-11의 항 염증 효과를 극대화시키기 위해 CF-4에서 6일 동안 배양한 후 균체만 걸러서 다시 B 배지에서 4일 동안 배양한 후 추출을 하였다.

3. 유기용매 종류별 추출물의 항 염증 효과 결과

극성 차이에 따른 유기용매 16가지를 사용하여 추출물을 제조하고 항 염증 효과를 측정한 결과 iso-propanol 추출물에서 항 부종 효과가 가장 뛰어났다. 항 충혈 효과는 Acetic acid에서 가장 뛰어났고 혈류 흐름효과는 Tetrahydrofuran에서 가장 뛰어났다(Table 4).

4. Active substance 분리 결과

배양되지 않은 B배지를 정제한 결과(Fig. 2-1)와 B배지에서 배양 후 배양액만을 정제한 결과(Fig. 2-2), 균체만을 정제한 결과(Fig. 2-3)를 비교하였다. 무배양 배지에서는 나타나지 않지만 배양액과 균체에서 나타나는 분획을 대상으로 단일 분획으로 분리한 후 활성 실험을 하였다. 그 중 2개의 분획에서 강한 항 충혈, 항 혈류 효과가 나타났다. 먼저 40분에 용출된 분획은 acetonitrile이 67% 일때 용출되었고 항 혈류효과가 약 80.6%를 나타내었다. 또한 41분에 나타난 분획은 acetonitrile이 69% 일때 용출되었고

항 충혈효과가 78.6%를 나타내었다. 이 때 사용된 농도는 $10\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 였다.

GC-mass를 분석한 결과 두 분획의 스펙트럼이 같음을 알 수 있었다. 따라서 두 분획을 한데 모아 농도별 실험을 진행하였고 구조분석을 하였다.

5. Active substance의 농도별 실험 결과

농도별 실험에 사용된 분획은 40분과 41분에 용출된 것으로 GC-mass결과 이 두 분획의 스펙트럼이 같음을 알 수 있었다(후에 이 분획을 BM31이라고 명명하였다). 따라서 두 분획을 한데 모아 농도 실험을 진행하였다(Table. 2-5, Fig. 2-6). 농도는 $10\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 부터 $50\mu\text{g}/10\mu\text{l}$, $150\mu\text{g}/10\mu\text{l}$, $200\mu\text{g}/10\mu\text{l}$, $300\mu\text{g}/10\mu\text{l}$, $400\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 으로 나누어 실험하였으며 그 결과 부종의 IC_{50} 은 $170\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 이었고, 충혈의 IC_{50} 은 $260\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 이었으며 혈류의 IC_{50} 은 측정할 수 없었다. 이는 (+)control인 indomethacin의 IC_{50} 이 $76.5\mu\text{M}$ 이라고 했을 때 부종은 2.2배, 충혈은 3.4배 낮은 효능을 나타내었다. 그러나 활성 물질을 indomethacin과 같은 농도인 $300\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 에서 활성을 측정한 결과 (-)control에 대한 상대적 억제 농도가 부종은 1.4배 낮은 효능을 보였고 충혈은 1.1배, 혈류는 2배 높은 효능을 나타내었다.

Table 2-1. Bioactivity assay result of methanol extract of *St. praecox* 291-11 cultured from 9 kind of medium. Applied concentration was 0.4mg/10 μ l dissolved in ethanol.

Medium	Cell mass(mg)	Edema value	R.I (%)	Erythema value	R.I (%)	Bloodflow value	R.I (%)
M1	522.5	0.549 $\pm$ 0.08	32	0.139 $\pm$ 0.03	49	0.128 $\pm$ 0.03	61
M2	681.7	0.458 $\pm$ 0.07	43	0.145 $\pm$ 0.03	46	0.063 $\pm$ 0.03	81
M4	259.5	0.484 $\pm$ 0.09	40	0.148 $\pm$ 0.02	45	0.051 $\pm$ 0.01	85
TCG	428.6	0.476 $\pm$ 0.08	41	0.171 $\pm$ 0.02	37	0.051 $\pm$ 0.02	85
CF-4	*833.4	0.532 $\pm$ 0.04	34	0.163 $\pm$ 0.02	40	*0.023 $\pm$ 0.02 ^c	93
A	349.5	0.592 $\pm$ 0.06	27	0.146 $\pm$ 0.01	46	0.080 $\pm$ 0.02	76
B	353.9	*0.456 $\pm$ 0.05 ^a	44	*0.122 $\pm$ 0.02 ^b	55	0.064 $\pm$ 0.03	81
C	104.7	0.618 $\pm$ 0.03	24	0.134 $\pm$ 0.02	50	0.087 $\pm$ 0.02	74
D	172.2	0.676 $\pm$ 0.05	17	0.201 $\pm$ 0.03	26	0.069 $\pm$ 0.05	79
(+)control		0.130 $\pm$ 0.01	84	0.140 $\pm$ 0.03	48	0.284 $\pm$ 0.01	15
(-)control		0.810 $\pm$ 0.04		0.270 $\pm$ 0.01		0.330 $\pm$ 0.01	

Positive control was used Indomethacin. Applied concentration was 0.3mg/10 μ l. And negative control was used PMA. Applied concentration was 0.2mg/10 μ l. Mean $\pm$ S.E. (n=7); P^a < 0.04, P^b < 0.01, P^c < 0.13

★ R.I(%) : relative inhibition

**Table 2-2. . Bioactivity assay result of methanol extract of *St. praecox* 291-11
cultured in CF-4 medium by different time of cultivation.
Applied concentration was 0.4mg/10 μ l dissolved in ethanol.**

	Cell mass(mg)	Edema value	R.I (%)	Erythema value	R.I (%)	Bloodflow value	R.I (%)
3day cell	163	0.351 $\pm$ 0.09	57	0.206 $\pm$ 0.02	24	0.074 $\pm$ 0.01	78
4day cell	1228.4	0.558 $\pm$ 0.03	31	0.175 $\pm$ 0.02	35	0.086 $\pm$ 0.03	74
5 day cell	1128	0.786 $\pm$ 0.06	3	0.202 $\pm$ 0.02	25	0.103 $\pm$ 0.01	69
6 day cell	2003.4	*0.350 $\pm$ 0.09 ^a	57	0.202 $\pm$ 0.03	25	0.032 $\pm$ 0.03	90
7 day cell	5113.9	0.414 $\pm$ 0.04	49	0.151 $\pm$ 0.05	44	0.093 $\pm$ 0.03	72
8 day cell	3358.5	0.401 $\pm$ 0.04	50	0.147 $\pm$ 0.02	46	0.127 $\pm$ 0.05	62
9 day cell	3069.3	1.002 $\pm$ 0.08	-24	0.228 $\pm$ 0.03	16	0.161 $\pm$ 0.04	51
10 day cell	3459.5	0.981 $\pm$ 0.03	-21	0.183 $\pm$ 0.04	32	0.105 $\pm$ 0.03	68
3 day culture fluid		0.645 $\pm$ 0.05	20	0.147 $\pm$ 0.02	46	0.049 $\pm$ 0.01	85
4 day culture fluid		0.701 $\pm$ 0.01	13	*0.106 $\pm$ 0.01 ^b	61	*0.001 $\pm$ 0.01 ^c	99
5 day culture fluid		0.616 $\pm$ 0.07	24	0.139 $\pm$ 0.02	49	0.077 $\pm$ 0.03	77
6 day culture fluid		0.752 $\pm$ 0.06	7	0.177 $\pm$ 0.02	34	0.101 $\pm$ 0.04	69
7 day culture fluid		0.674 $\pm$ 0.14	17	0.170 $\pm$ 0.02	37	0.085 $\pm$ 0.02	74
8 day culture fluid		0.434 $\pm$ 0.09	46	0.139 $\pm$ 0.04	49	0.106 $\pm$ 0.03	68
9 day culture fluid		0.601 $\pm$ 0.04	26	0.140 $\pm$ 0.02	48	0.022 $\pm$ 0.01	93
10 day culture fluid		0.560 $\pm$ 0.11	31	0.190 $\pm$ 0.03	30	0.072 $\pm$ 0.01	78
(+)control		0.130 $\pm$ 0.01	84	0.140 $\pm$ 0.03	48	0.284 $\pm$ 0.01	15
(-)control		0.810 $\pm$ 0.04		0.270 $\pm$ 0.01		0.330 $\pm$ 0.01	

Positive control was used Indomethacin. Applied concentration was 0.3mg/10 μ l. And negative control was used PMA. Applied concentration was 0.2mg/10 μ l. Mean $\pm$ S.E. (n=7); P^a < 0.04, P^b < 0.01, P^c < 0.13

★ R.I(%) : relative inhibition

Table 2-3. Bioactivity assay result of methanol extract of *St. praecox* 291-11 cultured in B medium by different time of cultivation. Applied concentration was 0.4mg/10 μ l dissolved in ethanol.

Time(day)	Cell mass(mg)	Edema Value	R.I (%)	Erythema value	R.I (%)	Bloodflow value	R.I (%)
1day cell	810.6	0.537 $\pm$ 0.02	34	0.249 $\pm$ 0.01	8	*0.007 $\pm$ 0.02 ^c	98
2day cell	739.8	0.658 $\pm$ 0.04	19	0.162 $\pm$ 0.01	40	0.053 $\pm$ 0.04	84
3day cell	628.3	0.492 $\pm$ 0.10	39	0.199 $\pm$ 0.02	26	0.047 $\pm$ 0.01	86
4day cell	868.6	*0.087 $\pm$ 0.09 ^a	89	*0.095 $\pm$ 0.04 ^b	65	0.158 $\pm$ 0.09	52
5day cell	655.1	0.198 $\pm$ 0.08	76	0.118 $\pm$ 0.01	56	0.075 $\pm$ 0.02	77
6day cell	1104.2	0.528 $\pm$ 0.06	35	0.155 $\pm$ 0.01	43	0.068 $\pm$ 0.01	79
7day cell	336.6	0.440 $\pm$ 0.04	46	0.121 $\pm$ 0.05	55	0.057 $\pm$ 0.01	83
9day cell	669.2	0.282 $\pm$ 0.02	65	0.117 $\pm$ 0.01	57	0.071 $\pm$ 0.03	78
10day cell	533	0.367 $\pm$ 0.08	55	0.118 $\pm$ 0.03	56	0.065 $\pm$ 0.02	80
1day culture fluid		0.584 $\pm$ 0.07	28	0.195 $\pm$ 0.02	28	0.008 $\pm$ 0.01	98
2day culture fluid		0.732 $\pm$ 0.04	10	0.197 $\pm$ 0.01	27	0.030 $\pm$ 0.01	91
3day culture fluid		0.634 $\pm$ 0.05	22	0.180 $\pm$ 0.02	33	0.039 $\pm$ 0.01	88
4day culture fluid		0.094 $\pm$ 0.12	88	0.098 $\pm$ 0.04	64	0.125 $\pm$ 0.02	62
5day culture fluid		0.088 $\pm$ 0.01	89	0.156 $\pm$ 0.03	42	0.065 $\pm$ 0.02	80
6day culture fluid		0.548 $\pm$ 0.03	32	0.179 $\pm$ 0.01	34	0.088 $\pm$ 0.03	73
7day culture fluid		0.423 $\pm$ 0.02	48	0.124 $\pm$ 0.02	54	0.045 $\pm$ 0.01	86
9day culture fluid		0.387 $\pm$ 0.03	52	0.124 $\pm$ 0.03	54	0.086 $\pm$ 0.04	74
10day culture fluid		0.197 $\pm$ 0.06	76	0.134 $\pm$ 0.03	50	0.096 $\pm$ 0.04	71
(+)control		0.130 $\pm$ 0.01	84	0.140 $\pm$ 0.03	48	0.284 $\pm$ 0.01	15
(-)control		0.810 $\pm$ 0.04		0.270 $\pm$ 0.01		0.330 $\pm$ 0.01	

Positive control was used Indomethacin. Applied concentration was 0.3mg/10 μ l. And negative control was used PMA. Applied concentration was 0.2mg/10 μ l. Mean $\pm$ S.E. (n=7); P^a < 0.01, P^b < 0.13, P^c < 0.02

★ R.I(%) : relative inhibition

Table 2-4. Bioactivity assay result of *St. praecox* 291-11 cultured in CF-4 and B medium. 16 kind of solvent extract concentration was 0.4mg/10 μ l dissolved in ethanol.

Solvent	Polarity	Edema value	R.I (%)	Erythema value	R.I (%)	Bloodflow value	R.I (%)
Hexane	0.0	0.286 $\pm$ 0.07	65	0.180 $\pm$ 0.03	33	0.076 $\pm$ 0.02	77
Cyclohexane	0.2	0.392 $\pm$ 0.11	52	0.149 $\pm$ 0.02	45	0.080 $\pm$ 0.06	76
Carbon tetrachloride	1.6	0.523 $\pm$ 0.16	35	0.163 $\pm$ 0.02	40	0.072 $\pm$ 0.01	78
Diethyl ether	2.8	0.422 $\pm$ 0.01	48	0.164 $\pm$ 0.01	39	0.178 $\pm$ 0.02	46
Benzene	3.0	0.490 $\pm$ 0.09	40	0.234 $\pm$ 0.01	13	0.136 $\pm$ 0.01	59
Methylene chloride	3.1	0.390 $\pm$ 0.09	52	0.231 $\pm$ 0.03	14	0.077 $\pm$ 0.04	77
iso-Propanol	3.9	*0.285 $\pm$ 0.09 ^a	65	0.153 $\pm$ 0.03	43	0.057 $\pm$ 0.03	83
Tetrahydrofuran	4.0	0.507 $\pm$ 0.07	37	0.240 $\pm$ 0.01	11	*0.042 $\pm$ 0.01 ^c	87
Chloroform	4.1	0.491 $\pm$ 0.24	39	0.156 $\pm$ 0.05	42	0.075 $\pm$ 0.01	77
Ethylacetate	4.4	0.583 $\pm$ 0.02	28	0.216 $\pm$ 0.02	20	0.069 $\pm$ 0.05	79
Acetone	5.1	0.448 $\pm$ 0.03	45	0.158 $\pm$ 0.02	41	0.174 $\pm$ 0.03	47
Ethanol	5.2	0.330 $\pm$ 0.14	59	0.169 $\pm$ 0.04	37	0.049 $\pm$ 0.02	85
Acetonitrile	6.2	0.314 $\pm$ 0.04	61	0.203 $\pm$ 0.03	25	0.086 $\pm$ 0.01	74
Acetic acid	6.2	0.303 $\pm$ 0.01	63	*0.126 $\pm$ 0.04 ^b	53	0.094 $\pm$ 0.03	72
Methanol	6.6	0.450 $\pm$ 0.12	44	0.185 $\pm$ 0.02	31	0.045 $\pm$ 0.01	86
Water	9.0	0.324 $\pm$ 0.06	60	0.153 $\pm$ 0.02	43	0.094 $\pm$ 0.02	72
(+)control		0.130 $\pm$ 0.01	84	0.140 $\pm$ 0.03	48	0.284 $\pm$ 0.01	15
(-)control		0.810 $\pm$ 0.04		0.270 $\pm$ 0.01		0.330 $\pm$ 0.01	

Positive control was used Indomethacin. Applied concentration was 0.3mg/10 μ l. And negative control was used PMA. Applied concentration was 0.2mg/10 μ l. Mean $\pm$ S.E. (n=7); P^a < 0.04, P^b < 0.07, P^c < 0.02

★ R.I(%) : relative inhibition

Table 2-5. Bioactivity assay result of 4 kind of active substance concentration.

Concentration ($\mu\text{g}/10\mu\ell$)	Edema value	R.I (%)	Erythema value	R.I (%)	Bloodflow value	R.I (%)
10	0.638 $\pm$ 0.09	21	0.182 $\pm$ 0.03	33	0.151 $\pm$ 0.04	55
50	0.596 $\pm$ 0.07	26	0.156 $\pm$ 0.04	41	0.153 $\pm$ 0.03	55
150	0.487 $\pm$ 0.06	40	0.141 $\pm$ 0.02	48	0.045 $\pm$ 0.01	85
200	0.279 $\pm$ 0.06	65	0.155 $\pm$ 0.01	41	0.093 $\pm$ 0.05	73
300	^a 0.180 $\pm$ 0.02	78	^b 0.129 $\pm$ 0.01	52	^c 0.141 $\pm$ 0.03	58
400	0.291 $\pm$ 0.01	64	0.076 $\pm$ 0.03	70	0.112 $\pm$ 0.05	67
(+)control 300	0.130 $\pm$ 0.13	84	0.140 $\pm$ 0.03	48	0.284 $\pm$ 0.01	15
(-)control 400	0.810 $\pm$ 0.04		0.270 $\pm$ 0.01		0.330 $\pm$ 0.01	

Positive control was used Indomethacin. Applied concentration was 0.3mg/10 $\mu\ell$. And negative control was used PMA. Applied concentration was 0.2mg/10 $\mu\ell$. Mean $\pm$ S.E. (n $\geq$ 5); P^a < 0.01, P^b < 0.01, P^c < 0.02

★ R.I(%) : relative inhibition

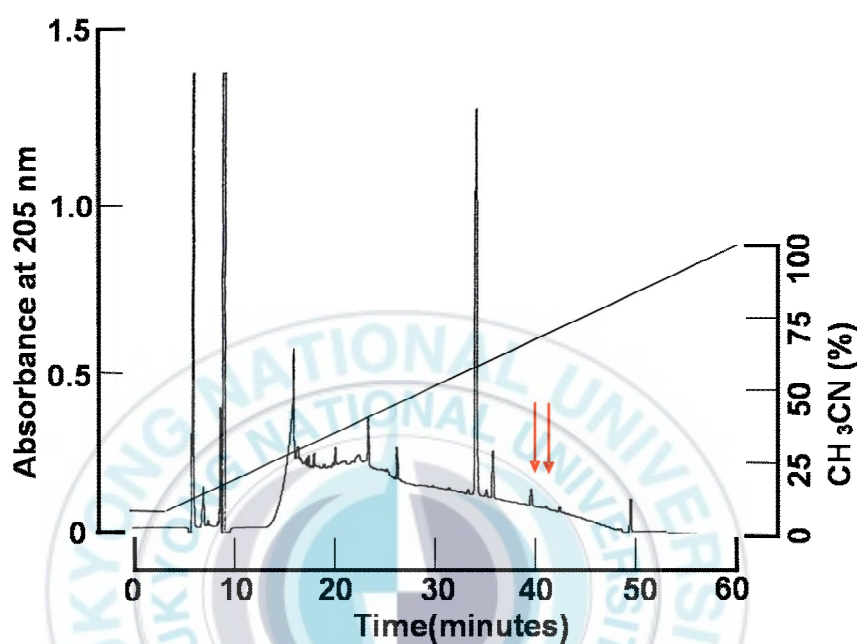


Fig. 2-1. HPLC purification result of the isopropanol extract of *Streptomyces praecox* 291-11 from B medium without cultivation. The fraction collected from HPLC alltima C₁₈ reversed-phase column (10×25 cm). It was eluted with a linear gradient of 0-100% acetonitrile over 60min at a flow rate 2 mL min⁻¹. The absorbance monitored at 205 nm.

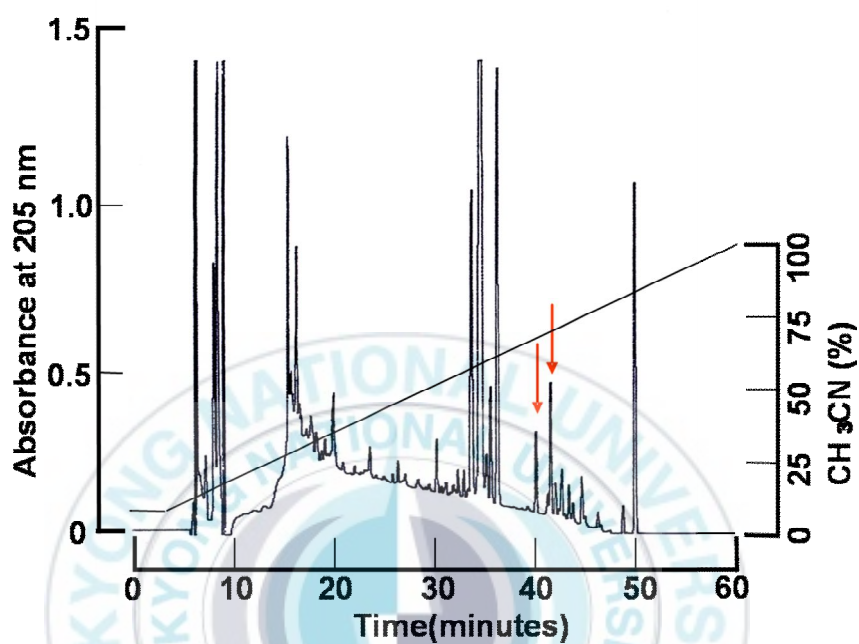


Fig. 2-2. HPLC purification result of the isopropanol extract of *Streptomyces praecox* 291-11 of culture fluid cultured in B medium. The fraction collected from HPLC alltima C₁₈ reversed-phase column (10×25 cm). It was eluted with a linear gradient of 0-100% acetonitrile over 60min at a flow rate 2 mL min⁻¹. The absorbance monitored at 205 nm.

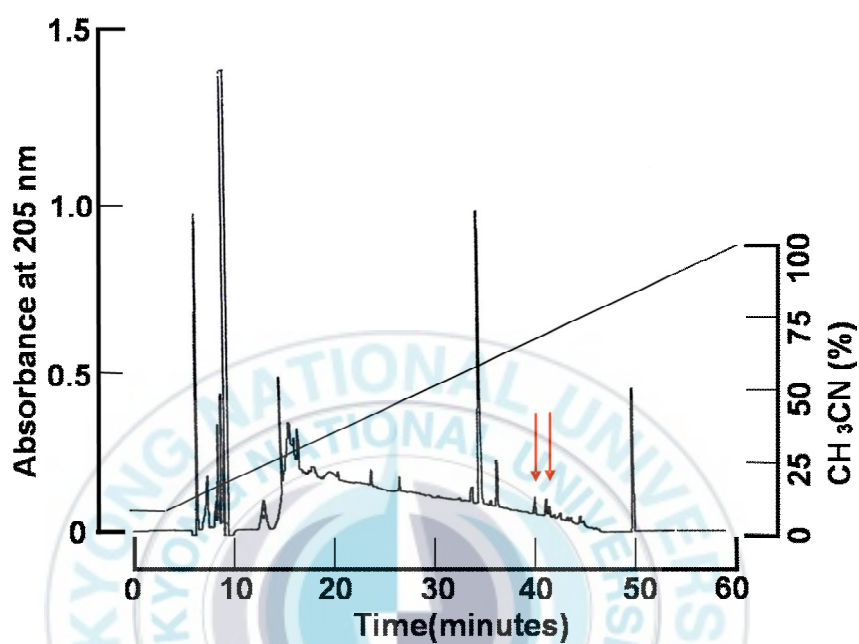


Fig. 2-3. HPLC purification result of the isopropanol extract of *Streptomyces praecox* 291-11 of cell cultured in B medium. Same fractions collected from HPLC alltima C₁₈ reversed-phase column (10×25 cm). It was eluted with a linear gradient of 0-100% acetonitrile over 60min at a flow rate 2 mL min⁻¹. The absorbance monitored at 205 nm. Arrow 40min and 41min indicate the fractions that have anti-inflammatory activity.

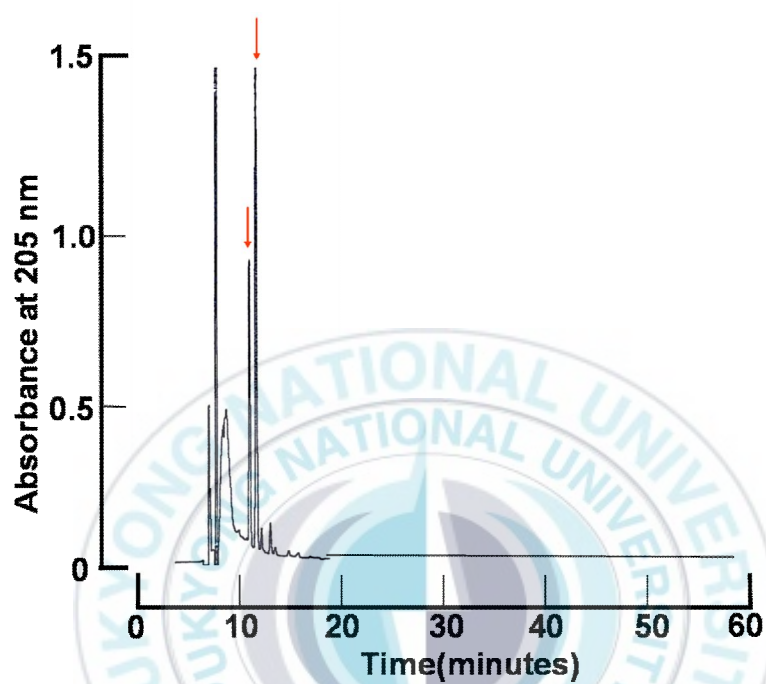


Fig. 2-4. HPLC purification result of 40min(D:A=33:67) isolated by isocratic(DW : ACN = 41 : 59). The fraction collected from HPLC alltima C₁₈ reversed-phase column (10×25 cm). It was eluted DW : ACN = 41 : 59 over 60min at a flow rate 2 mL min⁻¹. The absorbance monitored at 205 nm.

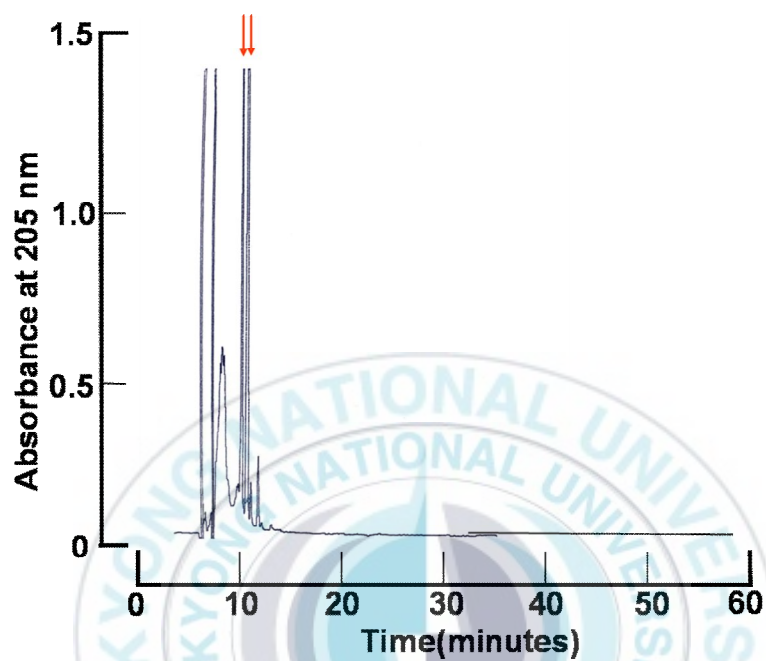


Fig. 2-5. HPLC purification result of 40min(D:A=31:69) isolated by isocratic(DW : ACN = 39 : 61). The fraction collected from HPLC alltima C₁₈ reversed-phase column (10×25 cm). It was eluted DW : ACN = 41 : 59 over 60min at a flow rate 2 mL min⁻¹. The absorbance monitored at 205 nm.

BM31

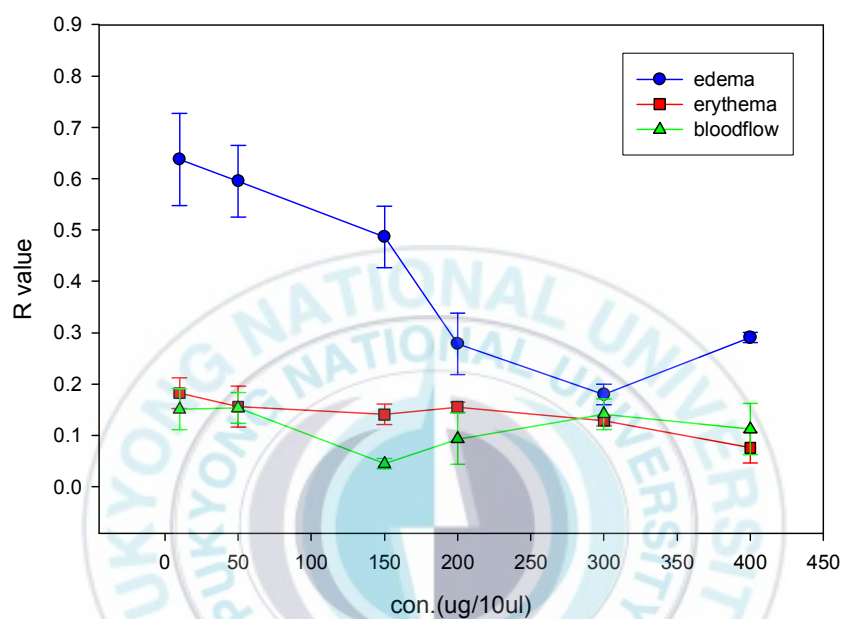


Fig. 2-6. Anti-inflammatory activity of active substance BM31 by variation concentration. IC_{50} of edema was $170\mu\text{g}/10\mu\text{l}$, IC_{50} of erythema was $260\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ and IC_{50} of bloodflow was not determined.

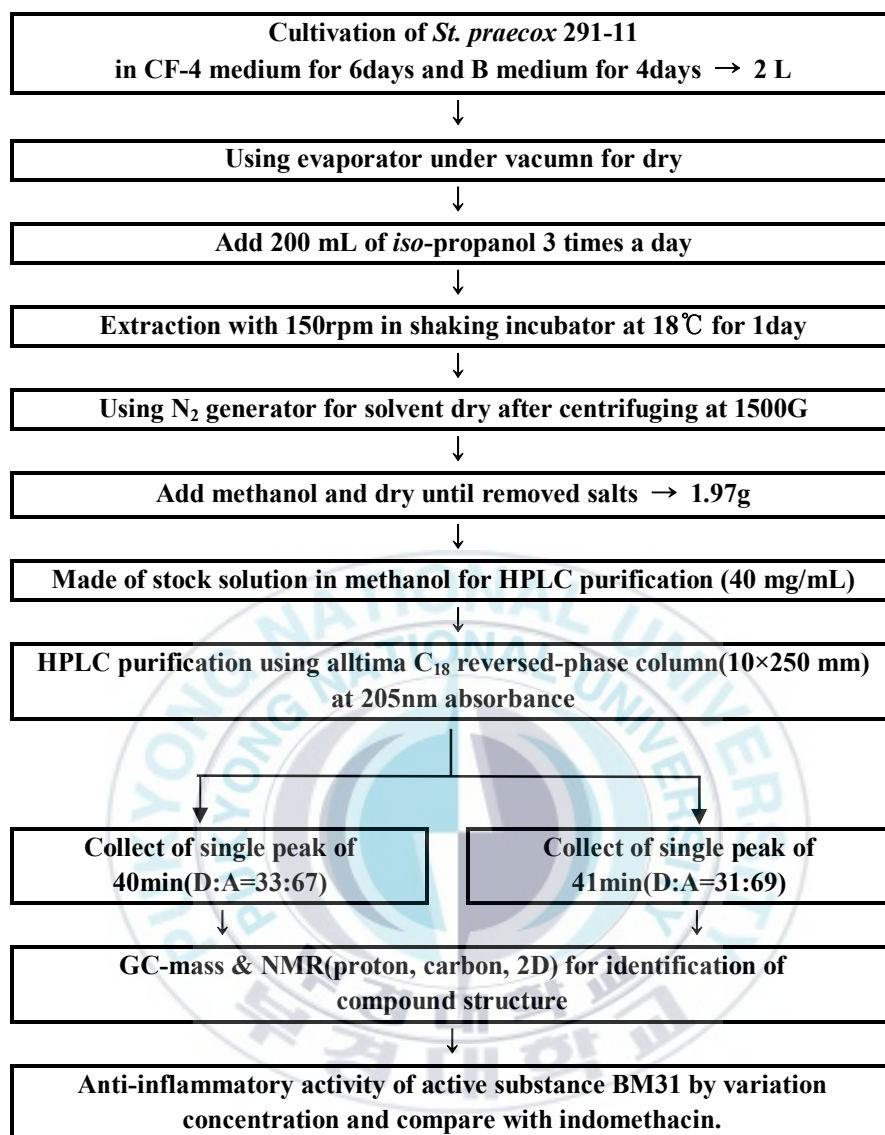


Fig. 2-7. Purification procedure of anti-inflammatory substance from *iso*-propanol extract of *St. praecox*.

국문요지

염증 (inflammation)은 다양한 물리적, 화학적 또는 생물학적인 원인, 즉 물리적 상해, 고온, 저온, 방사선, 자외선, 화학약품, 독물, 병원성 세균, 자가면역, allergy 등으로 야기될 수 있으며 그 발생 과정도 복잡하다 (Serhan, 2005). 염증반응으로서 나타나는 증상은 체액이 조직세포 사이에 증가하여 나타나는 부종, 혈관확장에 따른 충혈, 발열물질과 혈관확장에 의한 발열, 히스타민의 방출과 부종에 의한 통증현상 등으로 나타난다. 특히 해양 방선균은 육상에서의 방선균들의 다양한 항생물질 생산 등의 유용성에 힘입어 각종 생리활성물질의 생산원으로서 많은 관심을 받고 있다 (Bull et al., 2000; Jensen and Fenical, 2000). 따라서, 본 연구에서는 다양한 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려진 방선균들 중 해양 환경에 적응하여 서식하는 해양 방선균 특히 해조류 가근의 근권 방선균들을 포함하여 이들 모든 균주들로부터 염증반응의 억제효과를 측정하였다. 항 염증반응은 생쥐를 사용한 항 부종 (anti-edema) 및 항 충혈 (anti-erythema), 혈류 흐름 (bloodstream) 에 대한 작용효과를 측정하였으며, 그 결과 두 종류의 해조류에서부터 항 염증작용을 가진 서로 다른 특징의 두 방선균을 분리하였다. 부산 청사포의 갈조류 지충이 (*Sargassum thunbergii*) 가근 부착부위에서 분리한 균주 16번은 *Streptomyces macrosporeus*로 동정되었고

강릉의 갈조류 미역 (*Undaria pinnatifida*) 가근 부착부위에서 분리한 균주 291-11번은 *Streptomyces praecox*로 동정되었다. 항 염증 효과를 가진 물질을 얻을 수 있는 최적 조건을 찾기 위해 배지별, 배양 시간별, 유기용매별 추출에 따른 실험을 하였고 CF-4 배지와 B 배지에서 각각 6일, 4일간 배양한 후 *iso*-propanol로 추출하였을 때 활성이 뛰어났다. 그리고 무배양 배지, 배양액, 균체를 각각 HPLC를 통해 정제하였고 2개의 분획에서 활성을 확인하였다. 이를 GC-mass로 분석한 결과 같은 스펙트럼이 나타났으므로 같은 물질이라 판단하여 NMR 분석을 통해 구조 결정을 하였다. 또한 농도별 실험 결과 IC_{50} 은 $170\mu g/10\mu l$ (부중), $260\mu g/10\mu l$ (충혈)으로 나타났다. 이는 (+)control인 indomethacin의 IC_{50} 이 $76.5\mu M$ 이라고 했을 때 부중은 2.2배, 충혈은 3.4배 낮은 효능을 나타내었다. 그러나 활성 물질을 indomethacin과 같은 농도인 $300\mu g/10\mu l$ 에서 활성을 측정한 결과 (-)control에 대한 상대적 억제 농도가 부중은 1.4배 낮은 효능을 보였고 충혈은 1.1배, 혈류는 2배 높은 효능을 나타내었다. 앞으로는 약물 기전을 밝히는 실험이 수행되어야 할 것이다. 이처럼 해양 유래 방선균으로부터 새로운 생리활성 물질의 발견을 확인하였고 앞으로도 천연물질의 발견을 기대할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 많은 시간과 정성을 들였습니다. 학부생활부터 석사과정까지 3년 가까운 시간 동안 실험실에서 많은 것을 보고 느끼고 깨달으며 정말 값진 시간을 보냈습니다. 제가 3년 동안 아무 탈없이 학교 생활을 할 수 있게 도와주시고 많은 가르침과 인생의 본보기가 되어주신 홍용기 교수님께 진심으로 감사 드리며 존경한다는 말씀 드리고 싶습니다. 또한 격려와 조언을 아끼지 않으셨던 김중균 교수님과 박남규 교수님, 공인수 교수님, 이형호 교수님, 김성구 교수님께도 감사 드립니다. 실험실의 고참이셨던 최박사님과 박선미 교수님께도 감사의 말씀 드리며 졸업하신 지영선배님과 세은이 언니께도 감사의 말씀 전합니다. 그리고 선배로써 친한 언니로써 저를 예쁘게 봐주신 아름다우신 저희 언니들, 혜진이 언니, 희영이 언니, 상현이 언니, 경주언니, 경숙이 언니, 유미언니, 윤임이 언니에게도 감사 드립니다. 베트남 청년 Hai와 이쁜 Maria, 실험실의 기쁨조 선영, 지숙, 래현에게 감사 드리며, 2년을 동고동락하면서 옆에서 든든한 힘이 되어준 우리 동기 지영이와 수경이, 수정이, 동균 선배에게도 감사 드리며 멋진 사회인이 되길 바랍니다. 많이 부족하고 서투른 제가 무사히 석사과정을 마칠 수 있도록 도와주신 모든 분들께 다시 한번 감사드리며 이 학위논문을 사랑하는 저희 가족에게 바칩니다.

참고문헌

- Bull, A.T., A.C. Ward and M. Goodfellow. 2000. Search and discovery strategic for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 573-606.
- Charan, R.D., G. Schlingmann, J. Janso, V. Bernan, X. Feng and G.T. Carter. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.*, 67, 1431-1433.
- Erba, E., D. Bergamaschi, S. Ronzoni, M. Faretta, S. Taverna, M. Bonfanti, C.V. Catapano, G. Faircloth, J. Jimeno, M. D'Incalci. 1999. Mode of action of thiocoraline, a natural marine compound with anti-tumour activity. *Br. J. Cancer*, 80, 971-980.
- Jacobson, P.B., L.A. Marshall, A. Sung, R.S. Jacobs. 1990. Inactivation of human synovial fluid phospholipase A₂ by the marine natural product, manoalide. *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1557-1564.
- Jensen, P.R. and W. Fenical. 2000. Marine microorganisms and drug discovery: Current status and future potential. In: *Drugs from the Sea*, Fusetani, N., ed. Karger, Basel, Swiss, pp. 6-29.
- Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier. 1981. Isolation to the order Actinomycetales. In: *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, Starr, M.P. et al., eds. Springer-Verlag, New York, pp. 1915-1922.
- Manam, R.R., S. Teisan, D.J. White, B. Nicholson, J. Grodberg, S.T.C. Neuteboom, K.S. Lam, D.A. Mosca, G.K. Lloyd and B.C.M. Potts. 2005. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro- β -lactone- β -lactam antibiotic from the marine actinomycete *Streptomyces nodosus*. *J.*

- Nat. Prod., 68, 240-243.
- Mayer, A.M.S., V.J. Paul, W. Fenical, J.N. Norris, M.S. de Carvalho and R.S. Jacobs. 1993. Phospholipase A₂ inhibitors from marine algae. *Hydrobiologia*, 260/261, 521-529.
- Miao, S., M.R. Anstee, K. LaMarco, J. Matthew, L.H.T. Huang and M.M. Brasseur. 1997. Inhibition of bacterial RNA polymerases. Peptide metabolites from the cultures of *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.*, 60, 858-861.
- Mincer, T.J., P.R. Jensen, C.A. Kauffman and W. Fenical. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine Actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5005-5011.
- Mitchell, S.S., B. Nicholson, S. Teisan, K.S. Lam and B.C.M. Potts. 2004. Aureoverticillactam, a novel 22-atom macrocyclic lactam from the marine actinomycete *Streptomyces aureoverticillatus*. *J. Nat. Prod.*, 67, 1400-1402.
- Moore, B.S., J.A. Trischman, D. Seng, D. Kho, P.R. Jensen and W. Fenical. 1999. Salinamides, anti-inflammatory depsipeptides from a marine Streptomycete. *J. Org. Chem.*, 64, 1145-1150.
- Moran, M.A., L.T. Rutherford and R.E. Hosson. 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3695-3700.
- Serhan, C.N. 2005. Novel w-3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. *Pharmacol. Ther.*, 105, 7-21.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence

alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.

Yoon, J.H., S.T. Lee and Y.H. Park. 1996. Inter- and intra-specific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 187-194.



