

## 수용성 적색 색소를 생산하는 *Serratia marcescens* US50-3 균주의 분리 및 동정

양인영 · 황순옥\*

유공(주) 대덕기술원 화학연구소 생물공학연구실

### Isolation and Identification of *Serratia marcescens* Strain US50-3 Producing Water-Soluble Red Pigment

In-Young Yang and Soon Ook Hwang\*

Biotechnology Laboratory, Taedok Institute of Technology, Yukong Ltd.,  
Taedok Science Town, 305-370, Taejon

**Abstract** — A strain US50-3 producing water-soluble red pigment was isolated from the pond separating oil from water near the oil storage tanks. The strain US50-3 was identified as a strain of *Serratia marcescens* considering its morphological and physiological characteristics, and DNA G+C contents. It showed a little difference comparing to the Type strain and was considered to be another biotype strain.

색소는 크게 천연물에서 추출한 천연색소와 화학적으로 합성된 합성색소로 나뉘어지는데 주로 염색이나 식품, 화장품등에 사용되고 있다. 합성색소는 19세기 이후 광범위하게 사용되어 왔으나 안전성등의 문제가 있어 식품이나 화장품등에 사용이 점차 금지되고 있고 따라서 천연색소의 사용이 소비자들에 의해 선호되고 있다. 천연색소는 식물 또는 미생물에서 생산될 수 있는데 주로 특정식물에서 추출등의 방법에 의해 생산되어 왔다. 그러나 이들 식물에 의한 생산은 자연환경과 병충해등에 의해 제약을 받으므로 이들에 의한 생산보다는 식물조직 배양이나(1, 2) 미생물에 의한 색소생산에 많은 연구가 이루어지고 있다(3-6). 그 결과 식물세포 배양에 의한 shikonin이나(7) *Monascus* sp.에서 생산되는 홍국색소가(8) 상품화되고 있다.

본 연구에서는 미생물에 의한 천연색소의 생산을 목적으로 울산과 대전지역의 토양 및 유류 저장지역의 미생물들을 분리하였는데, 그중 몇몇 균주가 색소들을 분비하였다. 따라서 본 실험에서는 울산에 위치한 유공(주)의 원유 저장탱크 부근의 유수 분리조로부터 수용성 적색 색소를 생성하는 균주를 분리하여 그 균주의 특성을 조사하고 동정하였다.

#### 균주의 분리, 선별 및 배양 방법

실험에 사용한 균주는 원유 저장탱크 부근의 유수 분리조내에서 채취한 내용물을 멸균 생리 식염수에 현탁한 후, LB 한천평판에 접종하여 30°C로 배양하여 생성된 균주들중에서 붉은색 균체를 선택하였다.

액체 배양은 1000 ml 삼각 플라스크에 100 ml의 LB agar 배지를 만든 후 균주를 접종한 300 ml의 LB 액체배지를 첨가하거나 2% glucose 액체배지(1.0% peptone, 1.0% meat extract, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, 0.01% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.0)를 첨가하여 30°C에서 submerged culture로 실시하였다.

#### 균주의 형태 및 생리학적 특성

분리 균주의 형태는 광학현미경으로 조사하였고, 생리·생화학적 특성으로는 catalase, oxidase, citrate utilization, hydrolysis of urea 그리고 lactose, arginine dehydrolase, H<sub>2</sub>S와 indole의 형성, sodium lactate에서 acetyl-methyl carbinol의 형성, nitrate 환원, gelatin 액화등을 실험하였으며 Grimont와 Grimont (9)의 방법에 따라 Table 1에 나타낸 것과 같은 탄소원 이용 실험을 수행하였다. 대조균으로는 *Serratia marcescens* ATCC 27117를 사용하였다.

#### 염색체 DNA G+C 함량 조사

세균 세포의 염색체 DNA분리는 Saito와 Miura(10)

Key words: *Serratia marcescens*, red pigment  
\*Corresponding author

**Table 1. Comparison of physiological and biochemical characteristics of US50-3 strain with *Serratia marcescens* type strain ATCC 27117**

Characteristics	US50-3	<i>S. marcescens</i> (ATCC 27117)	<i>S. marcescens</i> *
Gram stain	—	—	—
Morphology	straight rod	straight rod	straight rod
Motility	+	+	+
Catalase	+	+	+
Esculin	+	+	+
o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
Citrate utilization	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	—	—	—
Urea hydrolysis	—	—	—
VP test	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+
Indole production	+	—	—
Growth on Glucose	+	+	
Mannitol	+	+	
Inositol	+	+	
Sorbitol	+	+	+
Rhamnose	—	—	—
Raffinose	—	—	—
Cellobiose	—	—	—
Melibiose	—	—	—
Arabinose	—	—	—
Lactose	+	—	—
N-Acetylglucosamine	+	+	
D-Ribose	+	+	
Saccharose	+	+	
Maltose	+	+	
Itacomate	—	—	
Suberate	—	—	
Malonate	—	—	
Acetate	—	+	+
Lactate	+	+	+
Salicin	+	+	+
Melobiose	—	—	
Fructose	+	+	
Propionate	—	—	+
Caprate	+	+	+
L-Alanine	+	+	
L-Serine	+	+	
L-Proline	+	+	
Histidine	+	+	
5-Ketogluconate	+	+	
2-Ketogluconate	+	+	d
3-Hydroxy butyrate	—	—	d
4-Hydroxy benzoate	—	—	
3-Hydroxy benzoate	—	—	db

+, positive, —, negative, d; 11~89% of the strains are positive. db; test differentiates biovars. \*; data from Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (9).

의 방법을 변형하여 사용하였다.

염색체 DNA G+C 함량(mol%) 측정은 Tamaoka와 Komagata(11)의 방법을 사용하여 실시하였다. 잘 정제된 DNA 용액을 100°C에서 10분간 가열하여 변성시킨 후 nuclease P1 용액(0.1 mg/ml in 40 mM sodium acetate, 2 mM ZnSO<sub>4</sub> buffer)을 첨가한 다음 50°C에서 한시간 반응시켰다. 이 용액에 세균성 alkaline phosphatase를 첨가하고 37°C에서 한시간동안 반응시킨 후 그 반응물을 High Performance Liquid Chromatography(Hewlett Packard)로 분석하였다. Nucleotide는 0.2M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>과 acetonitrile의 혼합물(20 : 1, v/v)을 사용하여 실온에서 1 ml/min의 유속으로 흘러 HPLC의 UV 흡광도를 260 nm로 하여 분석하였다.

**형태학적 특징**

원유 저장탱크 부근의 유수 분리조로부터 분리한 적색 색소 생산균주의 형태학적 특징을 광학현미경으로 관찰한 결과 끝이 둥근 straight rod 임을 알 수 있었고 편모에 의한 운동성을 갖고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

**생리·생화학적 특성**

Strain US50-3의 생리·생화학적 특성을 실험한 결과 Table 1에 나타난 것과 같이 gram 음성균주이며 운동성을 갖는 통설형기성균이고, deoxyribonuclease와 gelatinase test에서 양성 반응을 나타내며 caprate를 단일 탄소원으로 이용하는 *Serratia* 속임을 알 수 있었다. 적색 색소를 생성하고 ornithine decarboxylase 실험에서는 양성, 탄소원 이용 실험들 중 cello-

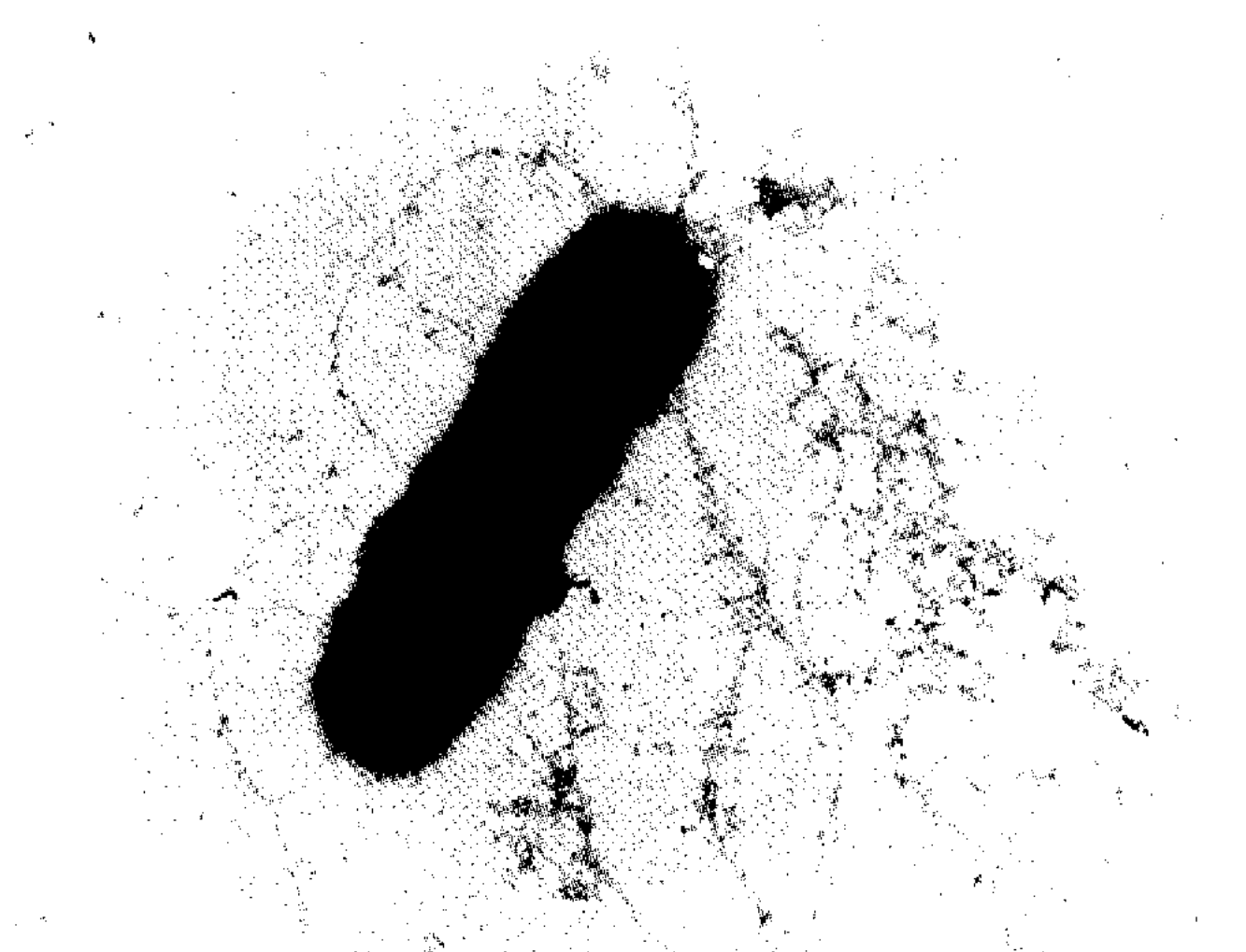


Fig. 1. Transmission electron micrograph of the strain US50-3 (20000×117)

biose와 raffinose에 대해 음성반응을, sorbitol에 대해서는 양성반응을 보여 *Serratia marcescens*로 동정하였다. *Serratia marcescens*는 18가지 biotype으로 나누어지는데 5개의 biotype에서만 색소를 생성한다고 보고된 바 있다(12). 다른 생리·생화학적 특성을 대조균주와 비교해 본 결과 단일 탄소원으로 lactose를 이용하고 acetate를 이용하지 못한다는 점에서 그리고 indole을 생성하는 점에서 대조균주인 ATCC 27117과 차이를 보였다.

**색소 생성을 위한 배양상의 특징**

US 50-3균주는 균주 보존을 위한 계대 배양을 실시하는 과정에서 액체 배양을 실시할 경우 그들의 색소 생성능을 잃고 말았다. 이는 Bae 등의 결과와 유사하였다(13). 따라서 일반적인 액체배양을 통해서 이 균주로부터 색소를 얻을 수 없고 submerged culture를 통해서만 색소를 얻을 수 있었다. 또한 37°C에서는 색소를 생성하지 않았는데 이는 Lee 등의 결과와 잘 일치하였다(14). 또한 색소는 균배양시 2차 대사물로 생성되어 기존 보고들과 잘 일치하였다. 또한 이 균주로부터 생성되는 색소는 물에 잘 용해되는 특성을 보였다. 대조균주인 ATCC 27117이 생성하는 색소와의 차이가 Fig. 2에 잘 나타나 있다. 48

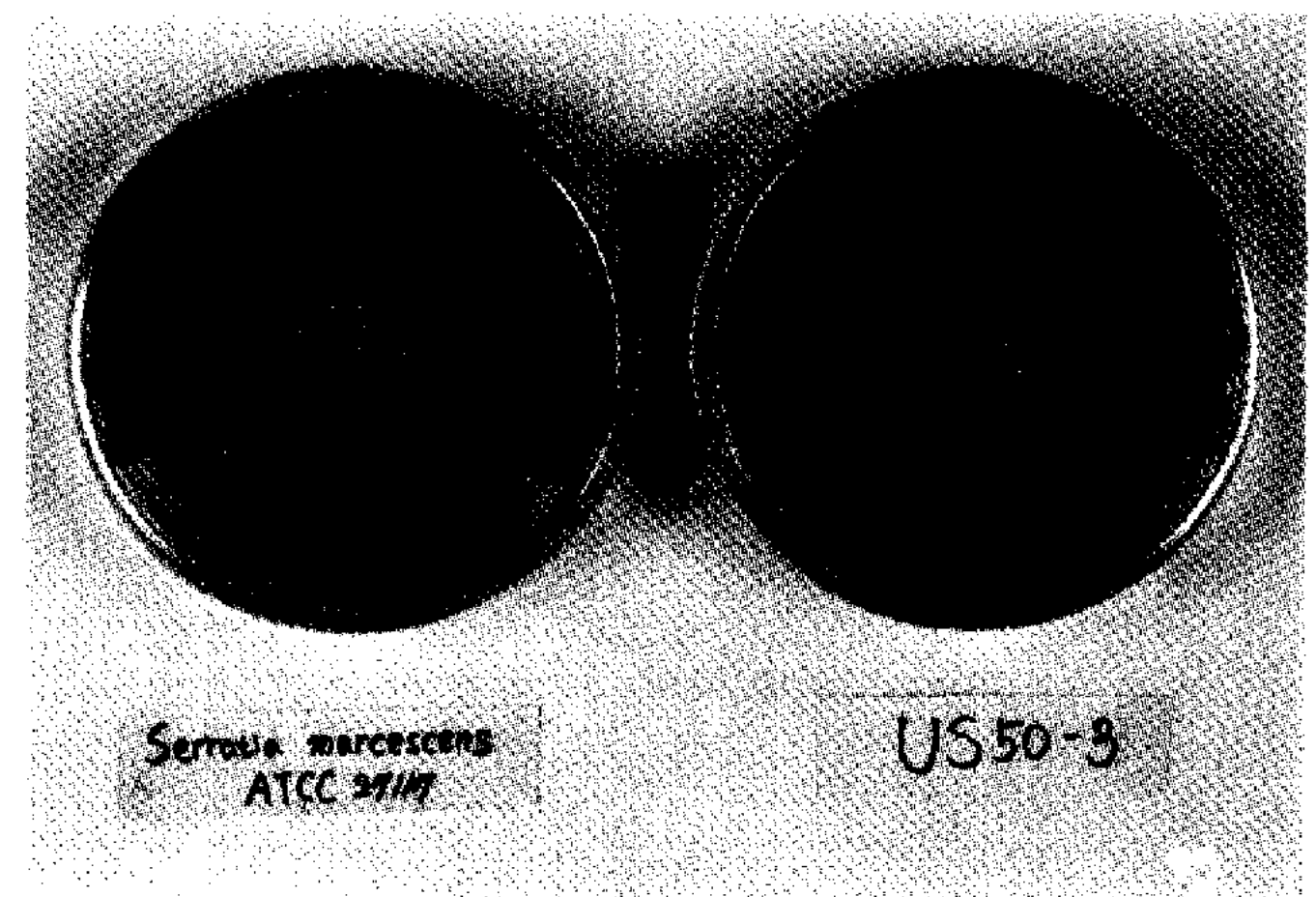


Fig. 2. Photographs of *Serratia marcescens* ATCC 27117 and US50-3 grown on LB agar.

Table 2. Comparison of DNA G+C content between US50-3 strain with *Serratia marcescens* type strain ATCC 27117

US50-3	<i>S. marcescens</i> (ATCC 27117)	<i>S. marcescens</i> *
59.2	58.2	57.5~60

\*; data from Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (9).

시간 배양후 US50-3 균주는 NCC(national color code)가 1401이었고 ATCC 27117 균주는 1261로 차이가 있어 서로 다른 색소를 생산하는 것이 판명되었다.

이 균주는 기존의 18가지 biotype과는 다르며 수용성 적색 색소를 생산하므로 다른 biotype의 균주로 생각되며 현재 수용성 적색 색소의 정제 및 물질 확인 중에 있다.

#### 염색체 DNA의 G+C 함량

분리 균주의 DNA 염기 조성을 분석한 결과 DNA의 G+C 함량이 59.2 mol%인 것으로 확인하였는데, 이는 *Serratia marcescens* Type 균주의 DNA G+C 함량인 57.5~60 mol%의 범위에 속하는 값이었다. 따라서 분리된 균주가 *Serratia marcescens* 임이 재차 확인되었다(Table 2).

#### 참고문헌

- Kim, C.H., S.W. Lee, B. Whang, and I.S. Chung. 1994. Improved anthocyanin production in hairy root culture of *Daucus carota* by fungal elicitor. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 395-400.
- Taya, M., K. Mine, M. Kino-Oka, S. Tone, and T. Ichi. 1992. Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *J. Ferment. Bioeng.* **73**: 31-36.
- Ohshima, M., N. Ishizaki, and Y. Tonooka. 1985. Production of neopurpuratin, a purplish-red pigment, by pure culture of *Streptomyces propurpuratus*. *J. Ferment. Technol.* **63**: 79-83.
- Trias, J., M. Vinas, J. Guinea, and J.G. Loren. 1988. Induction of yellow pigmentation in *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 3138-3141.
- Yongsmith, B., S. Krairak, and R. Bavavoda. 1994. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. *J. Ferment. Bioeng.* **78**: 223-228.
- Ju, J.Y., H.W. Nam, J.C. Yoon, and C.S. Shin. 1994. Extractive fermentation of red pigment using *Monascus* sp. J101. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 85-91.
- Fowler, M.W. 1983. Production of commercially useful compounds by plant cell culture. Pp. 3-38. In S.H. Mantell and H. Smith (eds.), *Plant Biotechnology*, Cambridge University Press, London.
- Hiroi, T., T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukiaka, and N. Ogasawara. 1979. Hyper pigment-productive mutant of *Monascus anka* for solid culture. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 1975-1976.
- Grimont, P.A.D. and F. Grimont. 1984. Genus VIII. *Serratia* Bizio 1823, 288<sup>AL</sup>. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, The Williams & Willkins, Baltimore.
- Saito, H. and V. Miura. 1963. Preparation of transforming DNA by phenol treatment. *Biophys. Acta.* **72**: 619-629.
- Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS. Microbiol. Lett.* **25**: 125-128.
- Grimont, F. and P.A.D. Grimont. 1992. The Genus *Serratia*, Pp. 2822-2828. In A. Balows et al (eds.), 2nd ed. The prokaryotes, vol. 3. Springer-Verlag, New York.
- Bae, S.J., K.H. Kim, B.W. Kim, and Y.H. Kim. 1995. Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* strain A80 producing water-soluble blue pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 43-46.
- Lee, S.Y., Y.C. Shin, E.K. Kang, H.Y. Kwon, and M.J. Cho. 1990. Changes of cell surface hydrophobicity of a *Serratia marcescens* with cultivation time and temperatures. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 227-232.

(Received 10 June 1995)