

海洋細菌을 이용한 EPA(eicosapentaenoic acid) 生成에 관한 研究

趙鏞桂 · 金成眞 · 金智修 · 李民京

東亞大學校 食品營養學科

Studies on the EPA(eicosapentaenoic acid) production by marine bacteria

Joh, Yong-Goe · Kim, Seong-Jin · Kim, Ji-Soo · Lee, Min-Kyeng

*Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University
840 Hadan 2-dong, Saha-gu, Pusan 604-714, Korea*

(Received Aug., 14, 1995)

ABSTRACTS

This project has been worked out for isolation of EPA-producing bacteria from marine source of sea water, sea sediment and intestinal contents eviscerated from some red-muscle fish such as mackerel, horse-mackerel and spike fish. The samples were precultured on the media of PPES-II glucose broth and then pure-cultured on Nutrient agar and P-Y-M glucose. Lipids extracted from those bacterial mass collected by centrifugation were analysed in terms of lipid class and fatty acid composition. The results are resumed as follows ;

1. 112 strains from sea water and 76 strains from sea sediment were tested for their EPA producing capability, but both strains of (SA-67 and SA-91) from the former and four strains(SS-35, 37, 51 and 71) from the latter have been proved to produce EPA above the level of 2% of total fatty acids. The strains such as GS-11, 29, 31, HM-9, 29, B-18, 33, 107, YL-129, 156, 203, 77, 104 and 256 which were isolated from fish intestinal contents, have also produced EPA at higher level than 2% of total fatty acids.

2. Contents of total lipids extracted from the cultures of these strains grown at 25°C, range from 2.8% to 6.9% (on dry weight %), and they are mainly composed of polar lipids(40.9~52.9%) such as phosphatidyl glycerol(+cardiolipin)(?) and phosphatidyl ethanolamine (33.8~40.0%), with smaller amount of free fatty acid (11.2~20.2%).

3. EPA was isolated from a mixture of fatty acid methyl esters obtained from the lipid of each strain by HPLC in silver-ion mode and was identified by GC-Mass spectrometry.

4. The strains of SW-91, GS-11, GS-29, HM-9, B-18 and YL-203 grown at 25°C have a level of 5% EPA in their total fatty acids, and the GS-11 and HM-9 strains show a tendency of increase in the EPA level with an increase of growth temperature.

I. 序 論

Eicosapentaenoic acid(cis-5, 8, 11, 14, 17-C_{20:5}, EPA)는 肝臟의 triacylglycerols(TG)와 poprotein 合成을 妨害함으로써 血中 TG를 낮추어 血漿脂質 含量을 減少시키고, cyclooxygenase와 lipoxigenase 活性을 阻害하여 platelet와 macrophage에 의한 thromboxane A₂와 leukotriene B₄ 등의 eicosanoid 合成을 低下시켜서 platelet의 凝固를 막아준다고 한다. 또 eicosanoid 代謝를 抑制시켜 줌으로써 動脈硬化의 發生을 遲延시키거나 進行을 抑制시켜 血栓症과 같은 血管室患을 最少化하는데 重要な 役割을 한다는 것이 많은 研究者들에 의해서 밝혀졌다.²⁵⁾

이런 生理的 機能에 의해 EPA가 最近들어 肉類攝取의 增加 등으로 인해 發病率과 死亡率이 顯著히 늘고 있는 成人病, 특히 高血壓, 心臟病, 動脈硬化 및 腦卒症 등의 循環器系 疾患의 豫防 및 治療에 뛰어난 效能을 가지고 있음이 밝혀져 많은 關心의 對象이 되고 있다.

이와같이 人體의 生理的 機能에 必需的인 EPA를 供給하는 方法으로는 魚貝類를 直接 攝取하거나, 魚油에서 精製하여 商品化한 EPA tablet를 利用하는 方法이 있을 수 있겠다. 그러나 前者의 方法은 魚貝類를 忌避하는 사람에게는 도움이 되지 못하며 後者의 경우에는 EPA의 複雜한 精製過程 중 製品의 安全性을 低下시키고 良質의 魚肉 蛋白質의 利用率을 떨어뜨릴 憂慮가 있다.

近年에 機能性 食品인 EPA의 給源을 魚類外에서 찾고자 하는 研究가 活潑히 進行되고 있다. 즉 Yamada等²⁾은 海水產 chlorella와 淡水產 chlorella를 細胞融合하여 EPA 含有率이 높은 變種을 얻었으며, Shimizu等¹⁵⁾은 γ -linolenic acid(γ -LA)을 生成하는 Mortierella屬의 絲狀菌을 低溫에서 培養할 때 γ -LA 代身에 EPA가 大量 生成됨을 確認한 바 있다.

EPA가 바다에 棲息하는 魚類에는 必需的으로 要求되고 있으며, 이는 食物連鎖로부터 由來되는 것 外에 消化管 內容物에 存在하는 微生物에 의하여 de nove의 所以로 相當量 만들어 진다는 事實이 알려졌으며,¹³⁾ Yazawa^{1, 3)}는 海水, 바닷빨(海水泥), 어류의 消化管 內容物에서 7,000種의 細菌을 檢索하여 EPA 生成하

는 數種의 細菌을 分離 報告한 바 있다.

저자¹⁴⁾는 EPA 生成 微生物檢索 計劃의 一環으로, 前報¹⁶⁾에 이어 海水, 바닷빨, 푸른 生鮮인 고등어, 전갱이, 魷치의 內臟物에서 EPA를 生成하는 細菌을 screening하여 그 結果의 一部을 여기에 報告한다.

II. 材料 및 實驗方法

1. 材 料

菌株 採取源으로 海水와 바닷빨은 慶南 海南岸 淸淨 海域에서 sampling하였고, 고등어, 전갱이와 魷치는 釜山 共同魚市場에서 購入하였다. 使用한 培地의 種類와 그 組成은 Table 1과 같으며, 培養方法은 Fig. 1에 表示한 바와 같다. 즉, 海水와 바닷빨은 生理食鹽水에

Table 1. The Composition of Media for Isolation of EPA-Producing Bacteria from Marine Sources

1) PPES-II medium	
Agar	15g
Tryptone	1g
Soytone	1g
Yeast extract	1g
Ferric citrate(1%)	100mL
Polypeptone	2g
Sea water	1L
pH	7.0 ± 0.1
2) Nutrient agar medium	
Beef extract	3g
Peptone	5g
Agar	15L
Sea water	1L
pH	6.8 ± 0.2
3) PYM-glucose agar	
Peptone	10g
Yeast extract	5g
Meat extract	2.5g
Glucose	20g
Sea water	1L
pH	7.0 ± 0.1

각각 1% 되게 稀釋하고, 魚類의 內臟과 內容物은 無菌函에서 막자사발로 磨碎하여 各各 0.1gr 程度를 取하여 3mL의 PPES-II broth를 分注한 試驗管에 接種한 後 4°C에서 10日間 preculture시켰다. 各 培養液을 白金耳로 PPES-II agar와 Nutrient agar plate에 inoculate하여 4°C와 25°C에서 10日 및 48時間 各 各 培養하였으며, 여기서 얻어진 獨立 colony를 釣菌하여 P-Y-M glucose 液體培地로 25°C에서 48時間 培養하였다. 이 培養液에서 釣菌하여 다시 한번 P-Y

-M glucose agar medium에 平板培養하여 (25°C, 48시간) colony를 純粹分離하였으며, 이 중 特徵적인 것을 골라 P-Y-M glucose 液體培地를 200mL 分注한 500mL容 shaking flask에 接種하였다. 各 培養 flask를 120 strokes/min의 速度로 shaking시키면서 25°C에서 2日間 培養하였다.

2. 集菌 및 總脂質의 油出·精製

培養液을 300rpm에서 10分間 遠心分離로 集菌한 後 -40°C에서 細胞壁을 破碎하여 freeze dry하였다. 이 dry cell에서 總脂質을 chloroform : methanol (2:1, V/V)로 抽出하여 室素 氣流下에서 溶媒를 除去시킨 後 總脂質의 무게를 測定하였다. 抽出된 總脂質의 一部를 10% KOH-ethanol 溶液으로 加水分解하여 遊離脂肪酸을 얻었다.

3. 脂質成分의 相互 分離⁵⁾

Thin-Layer Chromatography(TLC)로써 脂質成分을 相互 分離한다. 즉 試料의 總脂質을 TLC plate에 標準 脂質과 함께 spotting하여 n-hexane : diethyl ether : acetic acid(80:20:1, V/V/V)와 chloroform : methanol : acetic acid(65:24:4, V/V/V)의 展開溶媒로 展開시켜 脂質成分을 相互分離하고, 各 spot는 그 Rf值와 標準 脂質의 그것과 比較하여 暫定的으로 同定했다.

4. 脂肪酸 分析

加水分解하여 얻은 遊離脂肪酸을 sodium methoxide法으로 methylation한 後 n-hexane을 使用하여 脂肪酸 methyl ester를 回收한 後 Florisil column에서 hexane : acetone(99:1, V/V)溶媒로 精製하여 Carbowax 20M이 coating된 capillary column이 裝着된 gas-liquid chromatography (GLC)로 分析하였다. GLC 分析條件은 Table 2와 같다.

5. EPA의 同定

各 試料의 chromatogram中 EPA를 대구 肝油에서 얻은 標準品의 Rrt와 서로 比較하여 同定하거나, 또는 silver-ion chromatography로 EPA를 分割하여 GC-MS로 同定하였다.

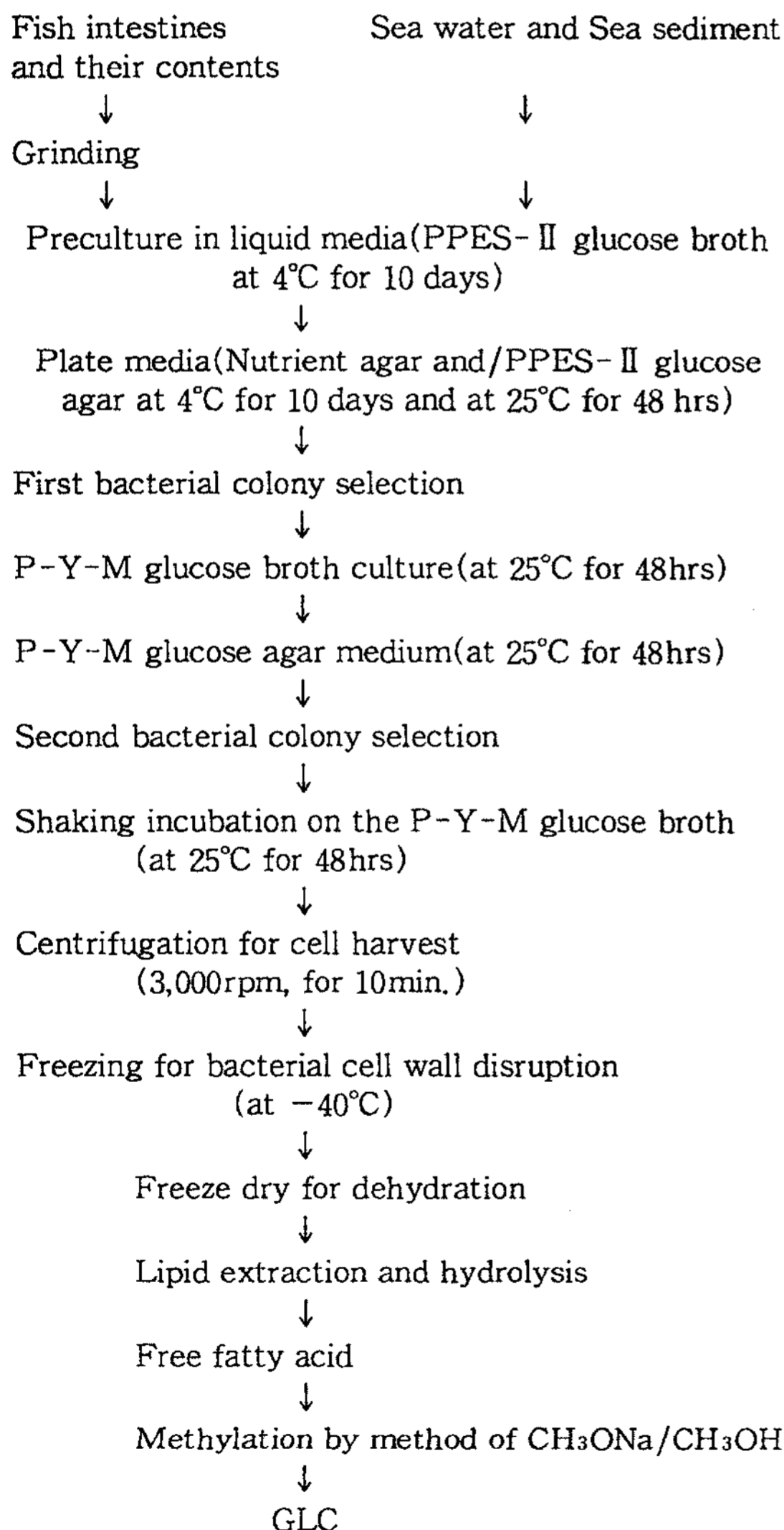


Fig. 1. A Procedure for Screening of Bacteria Producing EPA from Marine Objectives.

Table 2. GC condition for analysis of fatty acid methyl ester of total lipids from marine bacteria

Instrument	Hewlett Packard 5890 Capillary Gas Chromatograph
Column	A fused silica column(25m×0.32mm, I. D.) coated with Carbowax 20M (Hewlett Packard, Avondale, PA, USA)
Column temp.	Held at 175°C for 3min., then temperature programmed at 4°C/min to 205°C, and held at this point for further 30min
Carrier gas	H ₂ (25mL/min, split ratio 1:100)
Detector	FID.
Intergrator	Young-In D5208 Computing Intergrator(Young-In Scientific Co., LTD, Seoul, Korea)

6. Silver-ion-HPLC에 의한 EPA의 分劃

試料의 總脂肪酸 methyl ester를 silver-ion HPLC column(ChromSphere Lipids, 4.6×250mm, stainless steel, 5 μ m particle size, Chrompack International, Middelburg, The Netherland)이 裝着된 HPLC(Waters Model 440)로 分析하고 이 때 最終적으로 elute되는 EPA를 stream-splitter를 通하여 純粹하게 分劃하였다. 使用한 溶媒는 methanol-acetonitrile(9:1, by volume)로 0.75mL/min의 流速으로 흘렸으며, 檢出器는 light scattering detector(Sedex Model 55, Alfortville, France)였다.

7. GC-MS의 條件

EPA methyl ester를 加水分解하여 遊離된 脂肪酸을 picolinyl ester 誘導體로 만들어 Florisil column으로 精製·濃縮한 다음, cross-linked(5% phenyl-methyl) silicone으로 coating한 fused silica capillary column이 裝着된 Hewlett-Packard 5970 Mass Selective Detector에 injection하여 試料 脂肪酸의 splitting pattern에서 그 脂肪酸의 分子量과 2重結合의 位置를 찾아 試料 脂肪酸을 EPA로 同定하였다. 이 때 carrier gas로 He을 使用했으며, 60°C에서 220°C까지는 50°C/min로 乘溫하였고 여기서 250°C까지는 1°C/min로 乘溫하였다. 또 ionization chamber의 energy는 70eV이었다.

8. 菌株의 形態學的, 生化學的 特性檢査

EPA含量이 有意的으로 높은 菌株를 同定하기 위하여 Bergey's manual에 따라 形態學的, 生理學的 特性을 檢査하였다.

III. 結果와 考察

1. 細菌 培養

海水, 바다빨과 魚類인 고등어, 전갱이, 콩치의 腸內容物을 PPES-II glucose 液體培地에 1次 preculture한 後에, 그 培養液을 白金耳로 釣菌하여 PPES-II glucose agar 培地와 Nutrient agar培地에 streak culture하여 4°C와 25°C에서 10日 및 48時間 培養하였다. 이 때 海水를 4°C와 25°C에서 PPES-II glucose agar 培地로 培養했을 各各 130餘個의 colony가 檢出되었고, 바다빨에서도 培養溫度에 關係없이 80餘個의 colony를 檢出할 수 있었다. 그러나 魚類 腸內容物의 境遇를 보면 4°C보다 25°C에서 培養했을 때 檢出된 colony數가 倍 程度 많아, 고등어, 전갱이와 콩치에서는 그 數가 各各 310, 330 및 240餘種에 達했으며, 이는 魚類 腸內容物에는 低溫細菌 外에 中溫細菌이 많이 存在하고 있음을 말해주고 있다. 또 같은 培養溫度에서는 어느 試料에 關係없이 Nutrient agar보다 PPES-II培地上에 colony數가 훨씬 많은 것은 所謂 海洋性 細菌의 分離用으로 PPES-II培地가 보다 適合함을 알 수 있다(data 省略).

2. EPA生産 菌株의 確認

各 試料의 P-Y-M glucose agar 培地에서 純粹 分離한 colony에서 形態學的으로 相異한 것을 選擇하여 各各 P-Y-M glucose 液體 培地에 接種하여 25°C에서 48時間 培養하여 集菌한 다음, 前節에서 言及한 方法으로 脂肪酸 組成을 分析하여 EPA 含量이 2.0% 以上이면 純粹 分離한 各 菌株가 EPA 生成能力을 가졌다고 看做하였다. 이와 같이하여 海水에서 分離한 112個의 菌株中 SW-67과 SW-91의 2菌株만 EPA를 生産하였으나, 바다빨에서 分離한 76種의 菌株에서는 SS-35, 37 및 SS-70 菌株에서만 EPA 生成을 보였다. 한편 고등어, 전갱이 및 콩치의 腸內容物에서 分離한 菌株 中 200~201種을 選擇하여 그 EPA 生成能力

Table 3. Lipid Class Composition of the Total Lipid from Marine Bacteria Grown on P-Y-M Glucose Broth at 25°C

Lipid Class	Fish Intestines																				
	Sea Water					Sea Sediment															
	Bacteria																				
	SW-	SS-	GS-	HM-	B-	YL-	256	104	77	203	156	129	107	33	129	156	203	77	104	256	
Lipid content (% dry weight)	5.8	4.7	3.5	4.9	3.1	4.9	4.7	2.8	5.6	3.3	5.0	6.1	6.9	5.0	6.1	5.2	4.3	5.4	5.9	5.0	
Lipid composition (% total lipid)																					
Neutral lipid																					
free fatty acid	15.3	20.2	19.5	17.1	14.6	15.1	16.0	11.2	13.7	14.9	17.1	14.9	12.3	17.1	14.9	18.1	15.2	14.8	13.9	17.2	
Polar lipids																					
phosphatidyl glycerol(PG)	49.5	40.9	43.8	45.8	51.5	48.8	45.9	52.9	49.1	50.1	49.1	49.1	50.8	49.1	49.1	46.7	47.6	45.2	51.5	46.1	
+ cardiolipin(?)																					
phosphatidyl ethanolamine (PE) (?)	35.2	38.9	36.7	37.1	34.3	36.1	38.1	35.9	37.2	35.0	33.8	36.0	36.9	33.8	36.0	35.1	37.2	40.0	34.6	36.7	

與否를 調査한 結果, 고등어, 전갱이와 쏜치에서 6種 (GS-11, 29, 31와 YL-129, 156, 203), 4種(HM-9, 29, YL-77, 104) 및 4種(B-18, 33, 107 및 YL-256)의 菌株가 EPA 生成能力이 있음을 確認하였다 (Table 3).

3. 總脂質의 含量 및 脂質組成의 同定과 定量

25°C에서 P-Y-M培로 培養한 각 菌株의 總脂質 含量은 2.8~6.9%로 菌株에 따라 매우 相異하였으나, YL-129, 156, 203, 77, 104, 256과 같은 黃色 色素를 띄고 있는 菌株의 境遇는 그 含量이 大略 4.3~6.1%로 比較的 一定하였다.

脂質 組成을 알고자 總脂質을 TLC에 spot하여 hexane-diethyl ether(80:20, V/V) 溶媒로 展開하였더니 中性脂質과 原點에 머문 極性脂質로 分離되었으며, 이 極性脂質을 chloroform-acetic acid(65:24:4, V/V/V)로 다시 展開하였더니 phosphatidyl glycerol(PG) 또는 cardiolipin으로 여겨지는 spot와 phosphatidyl ethanolamine(PE)의 spot가 나타났으며, Watanabe等⁴⁾은 EPA生成 bacteria의 PE fraction에 N-mono methyl PE도 混在해 있다고 하였으나 本 實驗에서는 이의 存在를 確認하지 못하였다. 磷脂質은 TLC spot에 Dittmer 試藥으로 確認하고, PE의 amino基는 Ninhydrin 試藥을 反應시켜 그 存在를 確認하였다.

各 脂質 成分을 定量하기 위하여 silica gel이 coating 되어 있는 가늘고 긴 quartz bar의 一端에 試料脂質을 少量의 chloroform-methanol(2:1, V/V)에 녹여 spot하였다. 이 quartz bar를 1次 chloroform-methanol-acetic acid(65:24:4, V/V) 溶媒로 bar 길이의 折半 가량 展開하여 極性脂質을 相互 分離하고, bar를 展開槽로부터 끄집어 내어 殘存 溶媒를 完全히 除去한 다음에 hexane-diethyl ether(80:20, V/V)로 같은 方向으로 再次 展開하여 中性脂質을 極性脂質로부터 分離하였다. TLC上에 分離된 각 spot를 FID-TLC Analyser인 Isatron MK-5로 定量하였다.

Table 2에서 나타낸 바와 같이 中性脂質을 大部分 遊離脂肪酸 그 含量이 11.2~20.2%로 菌株에 따라 매우 相異하며 磷脂質의 1/4~1/8 程度에 지나지 않았다. 磷脂質 중 phosphatidyl glycerol 또는 card-

iolipin으로 여겨지는 分割이 總脂質이 61.1~66.2%로 PE의 33.8~38.9%에 比하여 훨씬 많았다. Table 4에 表示된 바와 같이 PG 또는 cardiolipin은 그 含量이 培養溫度에 따라 큰 差異가 없고 培養溫度에 따라 PE含量에 큰 差異를 보이는 것은 膜의 流動性에 PE가 PG 또는 cardiolipin보다 깊이 關與하고 있기 때문이라고 思料된다.

總脂質을 TLC에 展開하여 얻은 chromatogram에 anthrone試藥⁵⁾을 反應시켰을 때 紫色으로 呈色되지 않았으므로, 糖脂質은 細胞壁에서 잘 抽出되지 않은 것 같다.

4. Silver-ion HPLC에 의한 EPA^{17~20)}

Fig. 2에서 보는 바와 같이 saturated, monoenoic 와 dienoic acid(+branched fatty acid)가 2重結合數의 順으로 溶出되고, 2重結合數가 5個인 EPA는 29分에 溶出되기 始作하였다.

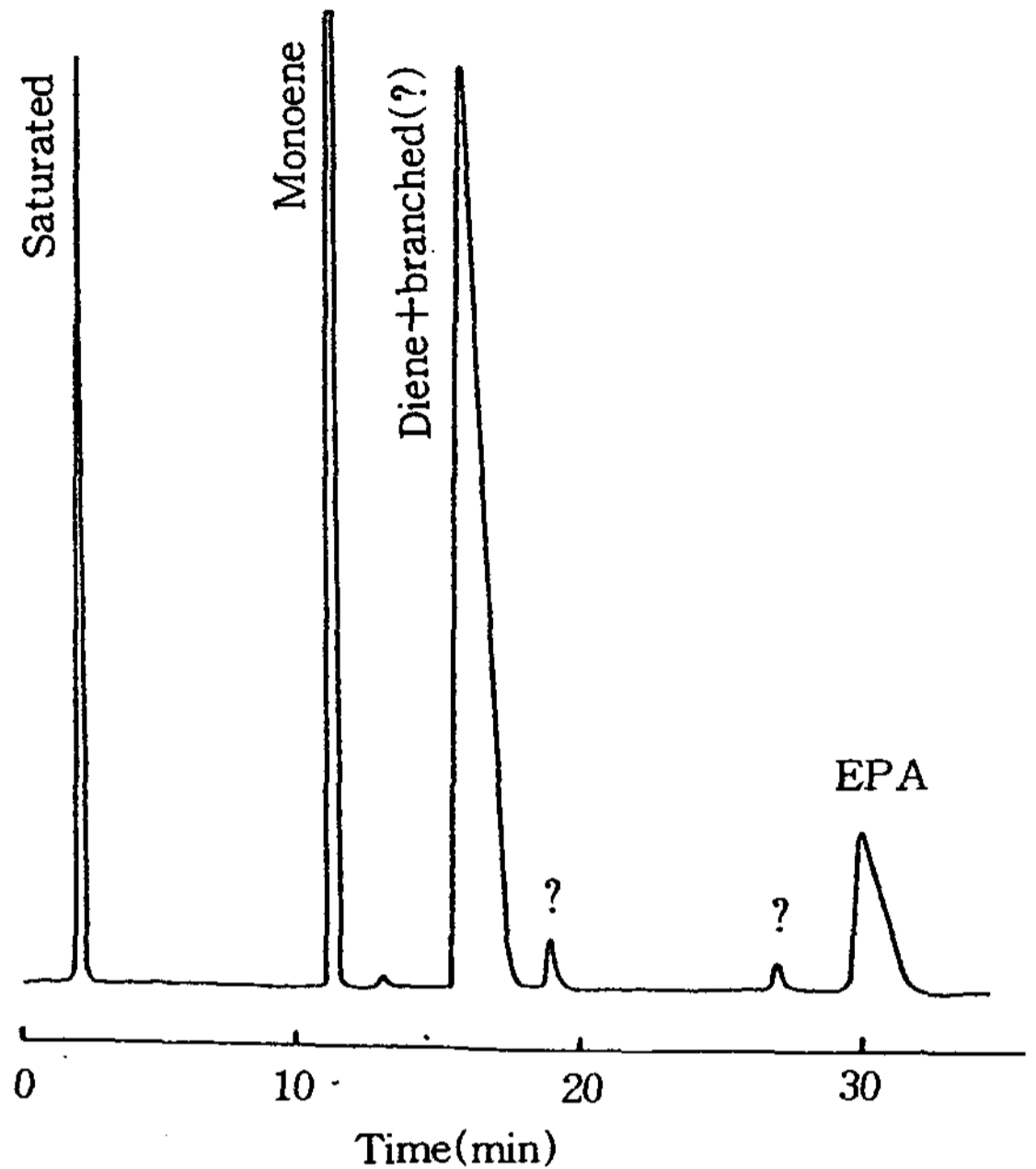


Fig. 2. Silver-ion HPLC Chromatogram of 5, 8, 11, 14, 17-C20:5(EPA) Methyl Ester Isolated from Marine Bacteria.

5. GC-Mass spectrometry에 의한 EPA^{22~24)}

Fig. 3은 本 實驗에서 分離한 EPA의 picolinyl es-

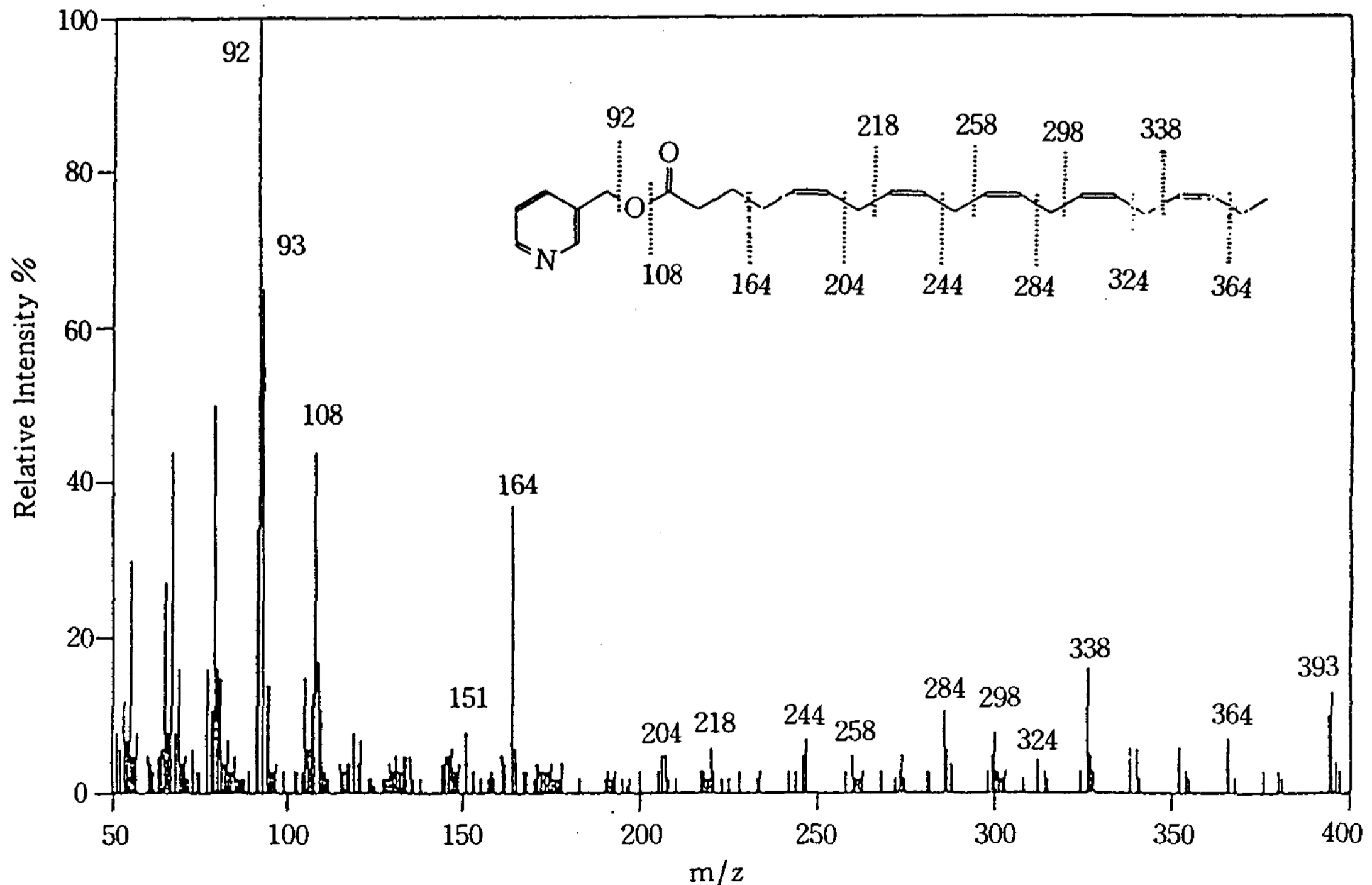


Fig. 3. Mass Spectrum of 5, 8, 11, 14, 17-C20:5(EPA) Picolinyl Ester Isolated from Marine Bacteria.

Table 4. Fatty Acid Composition of Total Lipids Extracted from the Marine Bacteria Isolated from Sea Water, Sea Sediment and Fish Intestines, Cultured at 25°C(Area % as Methyl Ester)

Fatty Acid	SW-		SS-		GS-		HM-		B-		YL-								
	67	91	35	37	70	11	29	31	9	29	18	33	107	129	156	203	77	104	256
C12:0		1.0	0.3	1.5	0.1	4.0	3.0	1.9	3.1	1.2	0.6	0.1	0.2	0.9	3.9	3.2	1.5	2.0	1.8
C12:1					0.6	0.1						0.4			0.4	0.1	0.1	0.1	
C14:0	0.5	2.3	0.5	2.7	0.9	3.1	4.3	3.0	4.2	6.3	1.2	0.4	0.9	2.5	2.8	3.0	4.2	3.1	3.5
C14:1	0.1	0.1			0.9	0.1	0.1	0.5	0.5	0.3	0.4	0.1	0.1	0.4	0.5	0.2	0.1	0.1	0.1
C15:0			0.1	0.3		1.0	0.8	0.7	0.1		0.2			0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
C16:0	6.9	4.8	4.3	8.1	5.1	13.4	14.1	8.4	12.5	15.1	5.8	10.0	12.4	12.8	15.3	16.1	18.5	17.0	14.1
C16:1(n-7)	18.5	16.0	17.9	27.8	20.5	36.3	39.1	25.9	32.7	36.7	18.1	20.0	15.9	36.9	34.1	35.0	34.2	36.0	37.8
C17:0	0.1	0.1	0.3	0.2	0.8	0.5	0.7	0.3	0.1	0.2	0.1			0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C18:0	4.8	7.9	3.5	8.8	5.3	1.6	2.5	9.9	1.4	10.2	4.0	6.3	10.5	4.1	5.7	4.0	4.3	5.2	4.8
C18:1(n-9)	51.0	46.5	53.4	39.7	49.1	12.5	17.7	38.5	20.5	19.1	47.7	38.4	39.6	14.6	13.0	18.2	19.2	20.1	22.3
C18:1(n-7)	1.0	0.7	1.1	0.4	1.3	1.2	0.9	0.3			0.5	0.6	0.1	1.2	1.0	0.9	0.4	0.5	0.6
C18:2(n-6)					0.1									0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C20:1(n-9)	1.9	1.9	1.1	1.4	2.6	0.2	1.5	1.3	1.0	1.4	2.0	2.8	1.0	3.9	2.8	3.4	2.5	1.9	2.1
C20:4(n-6)	0.8	0.4	0.3	0.7	0.5		0.1				0.5	1.1	0.1	1.2	1.0	0.9	1.3	1.1	1.4
C20:5(n-3)	4.1	5.6	1.3	3.4	2.7	13.0	5.2	3.0	12.7	3.9	5.0	4.4	4.2	3.2	4.1	5.1	3.0	3.9	4.7
unknown	10.3	12.7	15.9	5.0	11.0	11.7	10.0	6.7	11.2	5.6	13.9	15.7	15.0	17.6	15.1	9.6	10.4	8.8	6.6

ter²¹⁾의 mass spectrum이다. 分子量에 該當하는 m/z 393가 觀察되었으며, 여기서 picolinyl residue의 分子量 108를 뺀 285는 脂肪酸 C_{20:5}의 殘基를 나타낸다. 또 m/z 164와 204(amu 40, -CH₂CH=CH-), m/z 218과 244(amu 26, -CH=CH-), m/z 258과 284(amu 26), m/z 298과 324(amu 26), m/z 338과 364(amu 26)가 主된 peak이므로, 5個의 2重結合이 Δ^{5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 19} 位置에 存在함을 알 수 있었다.

6. 總脂質의 脂肪酸 組成

EPA生成 菌株의 總脂質의 脂肪酸 組成을 보면 總生成菌株 19株 중 高等어와 전갱이 腸 內容物에서 分離한 GS-11과 HM-9 菌株는 그 EPA 含量이 各各 13.0%와 12.7%로 (25°C 培養) check한 colony中 第一 含量이 높았다. GS-11과 HM-9 菌株는 培養溫度가 낮아짐에 따라 그 總脂質 含量과 더불어 EPA 生成 能力도 減少하였으나, 反面에 이 菌株들을 25°C에 培養했을 때 C_{16:1(n-7)}, C_{18:1(n-9)}의 含量이 36.3%, 12.5%(GS-11)와 32.7%, 20.5%(HM-9)였으나, 培養溫度가 내려감에 따라 그 含量이 45.7%, 38.2%와 43.7%, 35.8%로 그 含量이 急激히 增加하여 monoenoic acid의 大部分을 차지하였다.

이와는 相異하게 SW-91 菌株는 培養溫度의 低下

에 따라 monoenoic acid의 含量이 增加하여 25°C에 서 培養하였을 때는 C_{18:1(n-9)}와 C_{16:1(n-7)}이 46.5%와 16.0%였으나, 4°C에서는 그 含量이 急激히 增加하여 57.5%와 21.3%에 達했다. 그러나 培養溫度의 低下에 따라 그 EPA 含量은 5.6%에서 9.3%로 總脂質과 더 불어 增加하였다(Table 4, 5).

Watanabe等⁴⁾은 EPA 生産性이 높은 SCRC-2738 菌株의 溫度에 따른 EPA 生産性を 調査하였더니, 20°C 以下の 培養 條件에서는 EPA 含量이 거의 一定하였으나, 25°C로 變化시키면 減少하기 始作하여 27°C에서는 그 含量이 半減하고 30°C에서는 EPA가 거의 檢出되지 않았다고 하였다. 本 實驗의 SW-91 菌株도 이와 비슷한 傾向을 보였다. 反面에 Henderson 등⁶⁾과 Okuyama^{7, 8)}는 海水에서 分離한 Gram-negative 인 *Vibro* sp.에 EPA 生産性이 있음을 確認하였으며, 5°C에서 20°C로 培養條件을 바꾸면 EPA 含量이 激減한다고 報告하여 本 實驗에서 얻은 GS-11과 HM-9의 結果도 이와 비슷한 性向을 보였다. 一般的으로 生物은 環境의 溫度 變化에 適應하기 위하여 生體膜을 構成하는 磷脂質의 構成 脂肪酸 acyl基를 elongation, unsaturation 또는 branching하여 膜流動性이나, 膜에 結合한 酵素의 活性을 調節하고 있는데,⁹⁾ bacteria에서는 環境 條件의 變化에 適應하기 위해서는 acyl基

Table 5. Changes of Lipid Class Composition of Total Lipid Extracted from Marine Bacteria Grown on P-Y-M Glucose Broth at Various Temperatures

Lipid Class	Bacteria								
	SW-91			GS-11			HM-9		
	4°C	10°C	* 25°C	4°C	10°C	25°C	4°C	10°C	25°C
Lipid content (% dry weight)	6.0	5.2	4.7	2.2	1.9	3.1	1.4	2.0	2.8
Lipid composition (% total lipid)									
Neutral lipid free fatty acid	7.3	10.5	20.1	5.1	8.3	14.6	9.5	9.9	11.2
Polar lipids phosphatidyl glycerol(PG) + cardiolipin(?)	36.8	38.1	40.9	47.2	48.9	51.1	46.2	50.0	52.9
phosphatidyl ethanolamine (PE) (?)	55.9	51.4	38.9	47.7	42.8	34.3	44.3	40.1	35.9

* Grown for 4 day

Table 6. Changes of Fatty Acid Composition of Total Lipid Extracted from Marine Bacteria Grown on P-Y-M Glucose Broth at Various Temperatures

Fatty Acid	Bacteria								
	SW-91			GS-11			HM-9		
	4°C	10°C*	25°C	4°C	10°C	25°C	4°C	10°C	25°C
C12:0		0.1	1.0		1.2	4.0		1.8	3.1
C12:1						0.6			
C14:0		0.8	2.3	0.9	1.0	3.1	0.7	3.5	4.2
C14:1			0.1			0.9		0.1	0.5
C15:0						1.0			0.1
C16:0	1.5	3.4	4.8	4.0	8.2	13.4	5.2	6.7	12.5
C16:1(n-7)	21.3	19.2	16.0	45.7	39.9	36.3	43.7	38.2	32.7
C17:0			0.1			0.5			0.1
C18:0	3.7	5.1	7.9	0.7	0.9	1.6	0.1	0.5	1.4
C18:1(n-9)	57.5	55.4	46.5	38.2	30.7	12.5	35.9	30.3	20.5
C18:1(n-7)			0.7		0.5	1.2			
C18:2(n-6)									
C20:1(n-9)			1.9	0.1	0.1	0.2	0.1	0.6	1.0
C20:4(n-6)			0.4						
C20:5(n-3)	9.3	6.5	5.6	6.2	10.9	13.0	7.3	11.2	12.7
Unknown	6.7	9.5	12.7	4.2	6.6	11.7	7.0	7.1	11.2

* Grown for 4 days

의 불포화가 가장 效果的이라고 한다.¹⁰⁾ 여러가지 acyl基로 構成된 phosphatidyl choline으로 人造膜을 model로 相轉移 溫度에 관한 實驗^{11, 12)}에서 monoenoic acid가 가장 重要的 役割을 하며, polyenoic acid는 膜流動性에 크게 關與하지 않는다고 한다.

本 實驗의 結果만으로는 polyenic acid(EPA)가 海洋性 細菌의 溫度變化에 미치는 生理的 役割은 明確히 糾明할 수는 없었으나, 膜의 生理的 役割에 어떤 形態로든 關聯되어 있을 可能性이 높으므로, 앞으로 繼續하여 海洋性 細菌에서 EPA의 生理的 機能에 關하여 보다 깊이 研究하여야 하겠다.

謝 辭

이 研究는 1992年度 '92 科學技術處 特定研究 開發 事業'의 研究結果의 一部이며, 著者는 本 研究遂行을 위해 도와주신 科學技術處 여러분과 韓一食品 金斗庫 社長님께 感謝를 드리는 바입니다.

문 헌

- 1) K. Yazawa, K. Araki, K. Watanabe, C. Ishikawa, A. Inoue, K. Kondo, S. Watabe and K. Hashimoto, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1835(1988).
- 2) H. Yamada, K. Araki, N. Okazaki, K. Watanabe, C. Ishikawa, A. Inoue, N. Numao and K. Kondo, *J. Biochem.*, **103**, 5(1988).
- 3) 矢澤一良, *化學と工業*, **41**, 1137(1988).
- 4) K. Watanabe and K. Yazawa, *Yukagaku*, **42**, 278(1993).
- 5) *生化學實驗講座 3, 脂質의 化學(日本生化學篇)*, 東京化學同人, 東京, p. 41(1974).
- 6) R. J. Henderson, R. M. Millar, J. R. Sargent and J. P. Jostensen, *Lipids*, **28**, 389(1993).
- 7) H. Okuyama, S. Sasaki, S. Higashi and N.

- Murata, *J. Bacteriol.*, **172**, 3515(1990).
- 8) H. Okuyama, N. Okajima, S. Sasaki, S. Higashi and N. Murate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1084**, 13(1991).
- 9) 野澤義則, 生化學, **51**, 314(1979).
- 10) O. N. J. Russell, *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 108 (1984).
- 11) P. G. Barton and F. D. Gunstone, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4470(1975).
- 12) G. Cevc, *Biochemistry*, **30**, 7186(1991).
- 13) T. Yasumoto, D. Yasumura, M. Yotsu, T. Michshita, A. Endo and Y. Kotaki, *Toxicol.*, **50**, 793(1986).
- 14) 趙鏞桂, 東北大學 博士學位 請求 論文(1976).
- 15) S. Shimizu, Y. Shimen, H. Kawashima, K. Akimoto and H. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **150**(1), 335(1988).
- 16) 趙鏞桂, '92 特定課題 開發事業 1次年 報告書(科學技術處), pp. 9~17, 1994.
- 17) W. W. Christie, E. Y. Brechany and K. Stefanov, *Chem. Phys. Lipids*, **46**, 127(1988).
- 18) K. Stefanov, M. Konaklieva, E. Y. Brechany and W. W. Christie, *Phytochem.*, **27**, 3495 (1988).
- 19) W. W. Christie, E. Y. Brechany and V. K. S. Shukula, *Lipids*, **24**, 116(1989).
- 20) W. W. Christie, and G. H. M. Breckenridge, *J. Chromatogr.*, **469**, 261(1989).
- 21) W. W. Christie, In *Gas Chromatography and Lipids*, The Oily Press, Ayr, Scotland, 74 (1989).
- 22) W. W. Christie, E. Y. Brechany, K. Stefanov and S. Popov, *Lipids*, **27**, 640(1986).
- 23) W. W. Christie, E. Y. Brechany, S. B. Johnson and R. T. Holman, *Lipids*, **21**, 657 (1986).
- 24) D. J. Harvey, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **11**, 340(1982).
- 25) 葛谷恒彦, 大森正晴, 多田道彦, プロスタグランジンと病態(室田誠逸 編), 東京化學同人, 東京, pp. 121~126(1986).