

Serratia marcescens 에서 글리옥실산이 Prodigiosin 생합성에 미치는 연구

최 병 범 · 방 선 권*

신흥전문대학 식품영양과

*호서대학교 자연과학대학 생명과학과

Studies on the Effect of Glyoxylate on the Biosynthesis of Prodigiosin in *Serratia marcescens*

Byung-Bum Choi and Son-Kwon Bang*

Dept. of Food and Nutrition, Shinheung Junior College, Euijeongbu 480-741

*Dept. of Life Science, College of Natural Science, Hoseo University, Asan 337-795

Abstract

The effects of amino acids and metabolites in growth media on the biosynthesis of prodigiosin from *Serratia marcescens* ATCC 25419 were examined. The prodigiosin synthesis was decreased approximately by 50 to 80% by several amino acids and metabolites tested. The prodigiosin synthesis was increased approximately by 20 to 40% by a low concentration of glyoxylate(1 to 3mM) and outstandingly increased by 122% at 5mM concentration under anaerobic condition. However, the prodigiosin synthesis was decreased approximately by 50 to 90% at a high concentration(20 to 30mM) under anaerobic condition. The prodigiosin was not synthesized by pyruvate and α -ketobutyrate under aerobic and anaerobic condition, with addition to glyoxylate under aerobic condition, among the range from 0.5 to 30mM, while the cell growth under anaerobic condition was decreased distinctly by a high concentration(20mM above) of glyoxylate. These data suggest that the growth and prodigiosin of *S. marcescens* is positively regulated by a low concentration of glyoxylate (1~5mM), but repressed by a high concentration of glyoxylate (20mM above) unlike pyruvate and α -ketobutyrate.

Key words : *Serratia marcescens*, prodigiosin, glyoxylate.

서 론

Prodigiosin(2-methyl-3-amyl-6-methoxyprodigiosene)은 enteric bacteria 중의 하나인 *Serratia marcescens*에 의해 생산되는 특징적인 붉은 색소이다. 이 화합물은 물에 잘 녹지 않고 탄소수가 20개인 tripyrrole 구조로 Kraft가 *Bacillus prodigiosus*에서 처음으로 분리하였다¹⁾. 2차 대사물질인 prodigiosin은 *S. marcescens*가 37°C 이하의 온도에서 성장할 때 생성되지만, 38°C 이상의 온도에서는 *S. marcescens*가 성장해도 prodigiosin은 생성되지 않는다고 보고되었다²⁾. Prodigiosin 생합성 과정은 복잡하며 마지막 단계는 안정한

bipyrrole인 4-methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carboxaldehyde(MBC)와 휘발성의 monopyrrole인 2-methyl-3-amylpyrrole(MAP)이 각기 서로 분리된 경로에서 합성되어 효소학적으로 축합하여 선형의 tripyrrole을 형성하는 과정으로 티아민은 간접적인 방식으로 MAP 생합성의 조절작용을 한다고 보고되었다³⁾. *S. marcescens*의 prodigiosin은 δ -aminolevulinic acid보다는 여러 아미노산으로부터 합성된다고 보고되었다⁴⁾. Qadri와 Williams은 알라닌, 히스티딘 그리고 프롤린은 주요 대사활동이 색소합성인 비중식 박테리아 세포에서 탄소와 질소원의 1차대사 물질의 역할을 하여 생체 고분자 합성을 증가시킨다고 보고하였다⁵⁾. 프롤린은 prodigio-

sin의 pyrrole 구조와 유사하여 세포 성장과 prodigiosin 합성이 분리된 비증식 세포계에 가하면 색소화를 유발시킨다고 보고되었다⁶⁾. 알라닌은 1차 대사물질과 prodigiosin 전구체의 두 가지 역할을 하나, 히스티딘은 1차 대사물질 역할만을 한다고 보고되었다⁷⁾. Casein hydrolysate에 들어있는 알라닌, 아스파르산, 글루탐산, 히스티딘, 프롤린 그리고 세린을 비증식 세포의 성장 배지에 첨가하면, prodigiosin 합성을 유발시킨다고 보고되었다⁸⁾. 메티오닌은 S-adenosyl methionine (SAM)으로 전환하여 색소의 메틸화 단계에서 메틸기 공여체 역할을 한다고 보고되었다⁹⁾. 27°C에서 배양시킨 비증식 박테리아의 성장 배지에 55~95mM 농도의 알라닌, 아스파르산, 글루탐산, 히스티딘, 히드록시프롤린, 오르니틴, 프롤린 그리고 세린을 첨가하면 prodigiosin 합성이 최대가 된다고 보고되었다¹⁰⁾. 한편, 글루코오스는 *S. marcescens*의 prodigiosin 생성을 현저하게 억제시키며 cAMP 억제 인자인 theophylline은 세포내 cAMP의 농도를 증가시켜 글루코오스에 의한 유도 억제를 감소시킨다고 보고되었다¹¹⁾. 또한, ATP, 무기인산 그리고 리보오스는 *S. marcescens*의 prodigiosin 생성을 억제시키나, 아데닌은 영향을 주지 못한다고 보고되었다¹²⁾. *S. marcescens*의 비증식 세포에서 무기 인산은 0.3mM이내에서 prodigiosin 생성을 급격하게 증가시키지만 10~250mM의 농도 범위에서는 감소시키는 경향을 나타낸다고 보고되었다¹³⁾. *S. marcescens*의 prodigiosin 생합성은 NaCl의 농도에 영향을 받으며 생합성의 최적 pH는 8.0~8.5이고 이러한 pH 효과는 prodigiosin 생합성에 참여하는 프롤린의 양과 관련있다고 보고되었다^{14,15)}. 한편, prodigiosin은 *S. marcescens* 성장 배지의 탄소와 질소의 비율에 따라 항박테리아 활성을 가지며 성장 배지를 이용하여 수질의 오염 정도를 결정할 수 있다고 보고되었다^{16,17)}. 또한, prodigiosin은 T-림파구의 특이한 면역 억제 인자 역할을 하여 cytotoxic T-세포의 유도를 억제시킨다고 보고되었다¹⁸⁾.

본 연구에서는 *S. marcescens*의 ATCC 25419의 성장 배지에 대해 여러 아미노산과 대사물질에 의한 prodigiosin의 생합성에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

실험 방법

1. 실험 균주

Serratia marcescens ATCC 25419는 Louisiana State University의 Braymer 교수로부터 분양받아 BHI (brain heart infusion) 사면 배지에 옮긴 다음 배

양하였다.

2. 시 약

Potassium phosphate, glucose, magnesium sulfate, ammonium sulfate, acetone, methanol, dithiothreitol (DTT), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), proline, histidine, methionine, lysine, aspartate, thiamine, glyoxylate, pyruvate, α -ketobutyrate, α -aminobutyrate, α -hydroxybutyrate, α -ketoglutarate, fumarate, bovine serum albumin (BSA) 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. BHI, agarose는 Difco사, 그 밖에 사용한 시약은 일급 내지 특급 제품을 사용하였다.

3. *Serratia marcescens* ATCC 25419의 배양

사면 배지에 보존된 균주의 종균은 121°C, 15 lb에서 15분 동안 멸균한 BHI 배지 10ml에 소량 집중한 다음 하룻밤 동안 배양하였다. 이 종균 모액을 최소 배지 4ml이 들어있는 10ml 배양관에 0.1ml씩 넣어 30°C에서 12시간 동안 진탕 배양하였다. 최소 배지는 시트르산을 빼고 0.5% (W/V) 글루코오스를 가해서 변형된 Davis-Mingioli 최소 배지를 사용하였다¹⁹⁾. 배지의 구성 성분은 0.5% glucose, 51mM K₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄ (pH 7.0), 8mM (NH₄)₂SO₄, 0.4mM MgSO₄ · 7H₂O 이었다.

4. Prodigiosin의 생성 측정

Prodigiosin의 생성은 Goldschmidt와 Williams의 방법⁸⁾을 이용하여 측정하였다. 1ml 배양액에 2ml 아세트산과 2ml 산성메탄올(4ml 1N HCl과 96ml methanol)을 가한 다음 10,000×g에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 취하여 534와 655nm에서 O.D.를 측정하였다. 534와 655nm에서의 O.D.차 1을 19.3μg prodigiosin /mg protein으로 정의하였다⁸⁾.

5. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준단백질로 이용하여 Lowry 방법²⁰⁾을 사용했다.

6. 여러 아미노산과 대사산물이 prodigiosin 생합성에 미치는 영향

최소 배지에 각각 5mM의 프롤린, 히스티딘, 메티오닌, 리신 그리고 아스파르산을 가한 다음, 혐기성 조건 하에서 30°C에서 12시간 동안 배양시킨 후 prodigiosin 생합성을 측정하였다. 또한, 최소배지에 각각 5mM의

글리옥실산, 피루브산, α -케토부티르산, α -아미노부티르산, α -히드록시부티르산, α -케토글루타르산, 푸마르산 그리고 티아민을 가한 다음, 혐기성 조건하에서 30℃에서 12시간 동안 배양시킨 후 prodigiosin 생합성을 측정하였다.

7. 여러 농도의 글리옥실산, 피루브산 그리고 α -케토부티르산이 prodigiosin 생합성에 미치는 영향

Prodigiosin 생합성에 대한 글리옥실산, 피루브산 그리고 α -케토부티르산의 영향을 좀 더 자세히 살펴보기 위한 실험에서 최소 배지에 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30mM로 세분해서 글리옥실산, 피루브산 그리고 α -케토부티르산을 각각 가한 다음, 호기성과 혐기성 조건하에서 30℃에서 12시간 동안 배양시킨 후 prodigiosin 생합성을 측정하였다.

8. 여러 농도의 글리옥실산이 세포 성장에 미치는 영향

1%(W/V) 아가로오스가 들어있는 최소 배지 plate 에 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30mM로 세분해서 글리옥실산을 각각 가한 다음, 혐기성 조건하에서 30℃에서 12시간 동안 배양시킨 후 세포 성장을 조사하였다. 또한, 최소 배지에 1, 5, 10, 15, 20, 30mM로 세분해서 글리옥실산을 가한 다음, 혐기성 조건하에서 30℃에서 배양시킨 후 3시간마다 세포의 성장도를 660nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 여러 아미노산과 대사산물이 prodigiosin 생합성에 미치는 영향

*Serratia marcescens*의 prodigiosin 생합성에 대한 아미노산의 영향을 알아보고자 프롤린, 히스티딘, 메티오닌, 리신 그리고 아스파르산을 사용하였다. 최소 배지에 5mM의 여러 아미노산을 첨가시킨 후 혐기성 조건하에서 세포 배양액의 prodigiosin 생성도를 조사한 결과는 Table 1에서 나타난 바와 같이 프롤린, 히스티딘, 메티오닌, 리신 그리고 아스파르산은 대조군보다 prodigiosin 생합성을 각각 53, 78, 53, 51 그리고 56% 감소시켰다. 한편, 조사한 대사산물들 중에서 피루브산, α -케토부티르산, α -케토글루타르산 그리고 푸마르산은 각각 알라닌, 트레오닌, 프롤린과 히스티딘 그리고 메티오닌의 분해 대사산물이며 α -아미노부티르산, α -히드록시부티르산 그리고 티아민은 각각 α -케토부티르산과 pyrrole의 유사체이다. Table 1에서 나타난 것처럼 글리옥실

Table 1. The effects of various amino acids and metabolites in growth media on the prodigiosin synthesis in *Serratia marcescens* ATCC 25419.

Experiments were carried out in modified Davis-Mingoli medium supplemented with each of metabolites.

Addition to minimal medium (mM)	Prodigiosin (g/mg protein)	Relative activity (%)
None	7.4±0.004	100
Proline (5)	3.4±0.004	47
Histidine (5)	1.6±0.002	22
Methionine (5)	3.4±0.002	47
Lysine (5)	3.6±0.003	49
Aspartate (5)	3.2±0.003	44
Glyoxylate (5)	16.2±0.002	222
Pyruvate (5)	2.9±0.002	40
α -Ketobutyrate (5)	2.6±0.001	36
α -Aminobutyrate (5)	1.5±0.001	21
α -Hydroxybutyrate (5)	2.0±0.001	27
α -Ketoglutarate (5)	1.5±0.003	21
Fumarate (5)	2.9±0.002	40
Thiamine (5)	2.1±0.003	27

The concentration of each metabolite added to the medium was 5mM.

Values are mean \pm range of variation for three experiments.

산은 대조군보다 prodigiosin 생합성을 122% 증가시켰으나, 피루브산, α -케토부티르산, α -아미노부티르산, α -히드록시부티르산, α -케토글루타르산, 푸마르산 그리고 티아민은 대조군보다 prodigiosin 생합성을 각각 60, 64, 79, 73, 79, 60 그리고 71% 감소시켰다.

2. 여러 농도의 글리옥실산, 피루브산 그리고 α -케토부티르산이 prodigiosin 생합성에 미치는 영향

글리옥실산이 prodigiosin의 생합성에 미치는 영향을 혐기성 조건하에서 여러 농도에서 조사한 결과 글리옥실산은 1~3mM에서 대조군보다 prodigiosin 생합성을 20~40% 정도 증가시킨 반면 20~30mM에서 prodigiosin 생합성을 50~90% 정도 감소시켰다(Fig. 1). 특히 5mM에서 prodigiosin 생합성을 122% 증가시키는 효과를 보여주었다. 한편, 혐기성 조건하에서 피루브산과 α -케토부티르산을 여러 농도로 세분해서 첨가했을 경우 글리옥실산과는 다르게 조사한 모든 농도에서 prodigiosin이 생성되지 않았다. 호기성 조건의 동일한 실험에서도 글리옥실산, 피루브산 그리고 α -케토부티르산은 모두 조사한 모든 농도에서 prodigiosin 생성되지 않았으며 특히, 글리옥실산은 혐기성 조건하에서 농도에 따라 prodigiosin 생성 정도가 현저하게 구별되었으나, 호기성 조건에서는 조사한 모든 농도에서 prodigiosin이 생성되지 않았다(data not shown).

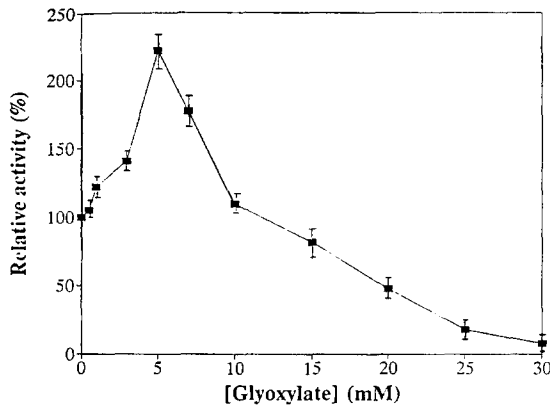


Fig. 1. Effect of varying concentrations of glyoxylate in growth media on the prodigiosin synthesis. Cells were grown anaerobically for 12h at 30°C in modified Davis-Mingioli medium. Values are mean \pm range of variation for three experiments.

1%(W/V) 아가로오스를 첨가한 최소 배지에서 글리옥실산 농도에 따른 prodigiosin 생성과 세포 성장 조사 실험에서 1~15mM까지는 prodigiosin 생성과 세포 성장이 관찰되었고 특히, 5mM 부근의 농도에서 prodigiosin이 최대로 조사되었다(Fig. 2, A~G). 그러나, 25mM 농도 이상에서는 prodigiosin이 거의 생성되지 않았고 세포도 성장되지 않았다(Fig. 2, I~J). 또한 글리옥실산을 혐기성 조건하에서 여러 농도로 세분해서 최소 배지에 첨가하여 660nm에서 세포 성장도를 측정 한 실험에서도 20mM 이상의 농도에서는 세포 성장이 현저히 감소되었다(Fig. 3, D~E).

비중식 세포에서 prodigiosin 생합성을 유발시키는 아미노산은 먼저 대사되어 생체 고분자와 중간체 합성의 탄소와 질소원 역할의 1차 대사 활동후 prodigiosin

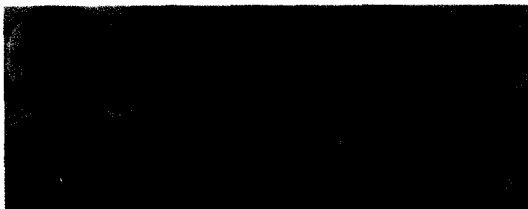


Fig. 2. Effect of varying concentrations of glyoxylate in 1% (W/V) agarose media on the prodigiosin synthesis. The concentration of glyoxylate added to the agarose medium : A: None, B: 1 mM, C: 3 mM, D: 5 mM, E: 7 mM, F: 10 mM, G: 15 mM, H: 20 mM, I: 25 mM, J: 30 mM. Cells were grown anaerobically for 12 h at 30°C in modified Davis-Mingioli medium supplemented with 1% (W/V) agarose.

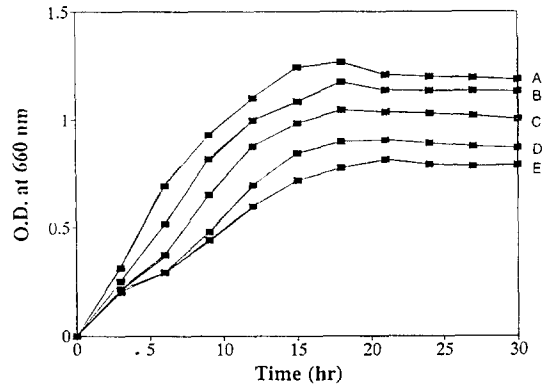


Fig. 3. Effect of varying concentrations of glyoxylate on the growth of *S. marcescens*. The concentration of glyoxylate added to the modified Davis-Mingioli medium : A: None, B: 5 mM, C: 10 mM, D: 20 mM, E: 30 mM. Cells were grown anaerobically at 30°C in modified Davis-Mingioli medium supplemented with varying glyoxylate.

을 2차적으로 합성한다고 보고되었다⁸⁾. 본 실험에서 *S. marcescens*의 성장 배지에 첨가한 아미노산과 대사물질은 두 가지 역할을 하는데 세포 성장에 필요한 탄소와 질소원의 1차 대사물질과 prodigiosin 생합성의 2차 대사물질로 작용한다고 생각된다. 이러한 결과들로부터 글리옥실산의 농도에 의해 *S. marcescens*의 prodigiosin 생합성이 조절되며 글리옥실산은 낮은 농도에서는 *S. marcescens*의 1, 2차 대사물질로 작용하여 prodigiosin 생합성에 관여하지만, 높은 농도에서는 *S. marcescens*의 성장을 억제시켜 2차 대사물질인 prodigiosin의 생합성도 억제된다고 사료된다.

요 약

최소 배지에 여러 아미노산과 대사 산물을 첨가하여 혐기성 조건하에서 배양시킨 *Serratia marcescens* ATCC 25419 세포 추출물에서 prodigiosin의 생합성을 조사한 결과 아미노산과 대사 산물들은 prodigiosin 생합성을 대조군보다 50~80% 정도 감소시켰다. 글리옥실산은 1~3mM에서 prodigiosin의 생합성을 대조군보다 20~40% 정도 증가시켰고, 특히 5mM의 농도에서는 최대 122% 증가시켰으나, 20~30mM에서 prodigiosin의 생합성을 50~90% 정도 감소시켰다. 한편, 혐기성과 호기성 조건의 피루브산과 α -케토부티르산은 호기성 조건의 글리옥실산과 함께 조사한 모든 농도(0.5~30mM)에서 prodigiosin이 생성되지 않았으

며 또한, 혐기성 조건하에서 높은 농도(20mM 이상)의 글리옥실산은 *S. marcescens*의 성장을 현저하게 억제시켰다. 이러한 결과들로부터 글리옥실산은 피루브산과 α -케토부티르산과는 다르게 낮은 농도(1~5mM)에서는 *S. marcescens*의 1, 2차 대사물질로 작용하여 prodigiosin 생합성을 증가시키지만, 높은 농도(20mM 이상)에서는 *S. marcescens*의 성장을 억제시켜 2차 대사물질인 prodigiosin의 생합성도 억제된다고 사료된다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 호서대학교 부설 기초과학 연구소의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kalesperis, G. S., Praflad, K. V. and Lynch, D. L. : Toxigenic studies with the antibiotic pigments from *Serratia marcescens*, *Can. J. Microbiol.*, **21**, 213~220 (1975).
2. Williams, R. P. : Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*, *Appl. Microbiol.*, **25**, 396~402 (1973).
3. Qadri, S. M. H. and Williams, R. P. : Incorporation of amino acid carbon into prodigiosin synthesized by nonproliferating cells of *Serratia marcescens*, *Can. J. Microbiol.*, **20**, 461~468 (1974).
4. Lim, D. V., Qadri, S. M. H., Nichols, C. and Williams, R. P. : Biosynthesis of prodigiosin by non-proliferating wild-type *Serratia marcescens* and mutants deficient in catabolism of alanine, histidine, and proline, *J. Bacteriol.*, **129**, 124~130 (1977).
5. Wasserman, H. H., Sykes, R. J., Peverada, P. P., Shaw, C. K., Cushley, R. J. and Lipsky, S. R. : Biosynthesis of prodigiosin. Incorporation patterns of ^{13}C -labeled alanine, proline, glycine, and serine elucidated by Fourier transform nuclear magnetic resonance, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6874~6875 (1973).
6. Lim, D. V., Qadri, S. M. H. and Williams, R. P. : Incorporation of proline into prodigiosin by a put mutant of *Serratia marcescens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 738~742 (1976).
7. Scott, R. H., Qadri, S. M. H. and Williams, R. P. : Role of L-proline in the biosynthesis of prodigiosin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 561~566 (1976).
8. Qadri, S. M. H. and Williams, R. P. : Role of methionine in biosynthesis of prodigiosin by *Serratia marcescens*, *J. Bacteriol.*, **116**, 1191~1198 (1973).
9. Goldschmidt, M. C. and Williams, R. P. : Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin, *J. Bacteriol.*, **96**, 609~616 (1968).
10. Williams, R. P., Scott, R. H., Lim, D. V. and Qadri, S. M. H. : Macromolecular syntheses during biosynthesis of prodigiosin by *Serratia marcescens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 70~77 (1976).
11. Clements-Jewery, S. : The reversal of glucose repressed prodigiosin production in *Serratia marcescens* by the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate inhibitor theophylline, *Biochem. Biophys. Acta*, **15**, 421~422 (1976).
12. Lawanson, A. O. and Sholeye, F. O. : Inhibition of prodigiosin formation in *Serratia marcescens* by adenosine triphosphate, *Biochem. Biophys. Acta*, **15**, 439~440 (1976).
13. Witney, F. R., Failla, M. L. and Weinberg, E. D. : Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Serratia marcescens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1042~1046 (1977).
14. Rjzantseva, I. N., Andreeva, I. N. and Ogorodnikova, T. L. : Effect of various growth conditions on pigmentation of *Serratia marcescens*, *Microbios.*, **79**, 155~161 (1994).
15. Solie, M., Rius, N., Francia, A. and Loren, J. G. : The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*, *Lett. in Appl. Microbiol.*, **19**, 341~344 (1994).
16. Alonzo, V., Scoglio, M. E. and Mangione, L. : Effect of the carbon/nitrogen ratio on the antibiotic activity of prodigiosin, *G. Bacteriol. Virol. Immun.*, **71**, 3~15 (1979).
17. Potravnova, R. S. and Feobilova E. P. : Modified method for determining water pollution by using a *Serratia marcescens* culture, *Microbiol.*, **48**, 363~365 (1979).
18. Nakamura, A., Magae, J., Tsuji, R. F., Yamasaki, M. and Nagai, K. : Suppression of cytotoxic T cell induction *in vivo* by prodigiosin 25-C, *Transplantation*, **47**, 1013~1016 (1989).
19. Davis, B. D. and Mingioli, E. S. : Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B₁₂, *J. Bacteriol.*, **60**, 17~28 (1950).
20. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275 (1951).

(1997년 9월 30일 접수)