

Zooshikella sp. JE-34가 생산하는 Prodigiosin계 색소의 분리 및 최적 배양조건

김주상 · 김만철 · 이경준¹ · 허문수*

제주대학교 수산생명의학과 해양과환경연구소, ¹제주대학교 해양생명과학과

Isolation and Optimal Culture Conditions of Prodigiosin-like Pigment Produced by *Zooshikella* sp. JE-34. Kim, Ju-Sang, Man-Chul Kim, Kyeong-Jun Lee¹, and Moon-Soo, Heo*. Department of Aquatic Life Medicine & Marine and Environmental research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea, ¹Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea – A bacterial strain, JE-34, producing a high concentration of red pigment was isolated from a sediment in East China Sea. It was identified as *Zooshikella* sp. JE-34 based on the 16S rRNA gene sequence analysis. The red pigment was purified by solvent extraction and HPLC was identified as prodigiosin-like compound. Nutritional and cultural conditions were optimized for the production of prodigiosin-like pigment in the flask level. Optimal culture conditions were at initial medium pH 6.0~7.0, 30°C and 4 days incubation. For carbon and, nitrogen sources were soluble starch and malt extract.

Key words: Red pigment, *Zooshikella* sp. JE-34, prodigiosin-like compound, optimal conditions

서 론

천연색소는 오랜 기간 동안 사용되어 왔음에도 불구하고 합성색소와 같이 일정한 품질로 다량 공급되고 있는 종류가 많지 않으며 대부분 동물이나 식물에서 직접 추출하여 가격이 비싸고 생육 조건 및 자연환경에 따라 품질의 변화가 심한 단점을 지니고 있다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 식물의 조직배양을 통한 천연색소의 생산이 연구되어 일부 천연 색소가 상품화되기도 하였으나 식물의 조직배양 역시 시간이 오래 걸리고 생산성이 낮은 결점을 지니고 있다[11].

색소를 생산하는 미생물 중에서 *Serratia* sp.는 적색의 prodigiosin계열의 색소를 생산하며 많은 연구가 진행되었다[16, 24]. Prodigiosin (2-methyl-3-amyl-6-methoxyprodigiosene)은 기본골격인 prodigiosene에 각기 다른 alkyl 치환기를 가지는 그룹인 prodiginines (6-methoxyprodigiosenes)에 속한다. 이는 *Serratia marcescens*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* sp. 등에서 생산되는 특이적인 붉은 색소이며 비극성의 탄소수가 20개인 tripyrrole 구조로 Kraft가 *Bacillus prodigiosus*에서 처음으로 분리하였다[10].

이는 균의 성장과정 중 대수증식기에는 생성되지 않으나 정체기 즉 비증식세포에서 생산되는 특이적인 이차대사산물이며 환경적 요인, 배지조성, 온도, pH 등의 요인에 영향을 받는다[19, 20]. Prodigiosin의 생합성 과정은 복잡하며 마지막 단계에서 안정한 bipyrrrole인 4-methoxy-2,2'-bipyrrrole-

5-carboxaldehyde(MBC)와 휘발성의 monopyrrole인 2-methyl-3-amylpyrrole(MAP)이 각기 서로 분리된 경로에서 합성되어 효소학적으로 축합하여 선형의 tripyrrole을 형성한다[18].

Prodigiosin은 잠재적인 의약품으로서의 가능성을 가지고 있어 항진균, 항세균, 항원충, 항말라리아, 면역억제 및 항암활성에 관련한 연구가 활발히 진행되었으며[5, 14, 15], 색소생산과 연관된 미생물의 대사작용 혹은 prodigiosin 유사체들의 생합성 경로[13, 16] 및 구조분석[4, 6] 등이 연구되었다. 국내에서도 *Serratia* sp. KH-95가 생산하는 prodigiosin의 구조분석, 분리정제 및 배양특성의 연구가 수행된 바 있으며[2, 11, 21], *Hahella chejuensis*에서 생성되는 prodigiosin의 경우 구조분석, 생합성과정의 연구뿐만 아니라 발현유전자 분석, 면역억제제로서의 활성, 적조방제 활성 등의 연구를 통해 유용 천연물로서 가능성을 제시했다[7]. 또한 prodigiosin이 항진균과 관련하여 chitin synthase II의 저해제로서 작용한다는 연구 보고된 바 있다[8]. 이러한 활발한 연구에도 불구하고 산업적 응용 및 공업화에 대한 연구가 미비한 이유는 prodigiosin의 대표적인 생산자인 *Serratia* sp.의 경우 색소 생산량이 10-100 mg으로 매우 낮기 때문이다[23].

본 연구에서는 이전연구에서 해양으로부터 prodigiosin을 생산하는 *Zooshikella* sp. JE-34 (FJ595984)를 분리, 동정된 균주를 사용하였다. 이를 통해 prodigiosin의 생산자로서 응용가능성을 확인하기 위해 *Zooshikella* sp. JE-34의 배양특성을 확인하였으며 차후 미생물 유래의 prodigiosin의 산업화 및 관련분야에 기초적인 자료를 제공하고자 한다.

*Corresponding author

Tel: 82-64-754-3473, Fax: 82-64-756-3493

Email: msheo@jejunu.ac.kr

재료 및 방법

균주의 선정 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 2005년 9월 동중국해에서 그래프를 이용하여 퇴적층으로부터 직접 분리하였으며, 채집된 퇴적물은 실험 전까지 멸균된 용기에 담아 4°C에서 보관하였고 채집된 퇴적물 약 1 g을 멸균된 인산완충식염수(PBS)에 단계회석법으로 회석한 후, 각 회석단을 MA (Marine Agar, Difco. Co. USA)에 100 mL를 접종, 도말 후 25°C에서 1~7일간 배양하였다. 분리균주 중에 적색색소를 다량 생산하는 균주 JE-34를 선발하여 사용하였다.

색소물질의 추출

분리균주 JE-34를 MB (marine broth, Difco. Co. USA) 50 mL에 30°C에서 24시간 동안 전배양한 후, 이를 200 mL MB에 재접종한 후, 30°C에서, 72시간 동안 배양하였다. 얻어진 배양액은 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액은 동량의 ethyl acetate를 가하여 색소를 추출하였고, 균체의 경우는 20 mL의 100% acetone을 가하여 추출하였다.

균체추출물은 10,000×g에서 20분간 원심분리 하여 탈색된 균체를 제거하고 상층액의 ethyl acetate 추출물과 혼합하였다. 이를 sodium sulfate를 가하여 탈수시킨 후, 회전감압 농축기로 농축하여 50% methanol로 1 mg/mL의 농도로 용해시켰다[12]. HPLC를 이용하여 색소물질을 동정하기 위해 prodigiosin을 생합성균으로 알려진 *Serratia marcescens* KCCM 21204 균주를 위와 동일한 방법으로 추출하여 분석에 사용하였다.

색소물질의 물성특성

추출한 색소의 색을 보다 객관적이고 측정 가능한 값으로 다루기 위해 색차계(JP 7100F, Color Techno System Japan)를 이용하여 분석하였다. C. I. E diagram은 색을 표현하는데 있어 색차계에서 얻어진 색의 정보를 X, Y, Z로 나타내며 다음의 공식에 의하여 계산하였다. 이때 표준백색판의 X, Y, Z 값은 각각 90.65, 95.66, 103.24이었다.

$$X = \frac{X}{X+Y+Z} \quad Y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

추출 색소의 광학특성을 알기위해 가시광선 영역(400~700 nm)의 흡수파장(λ_{max})을 측정하여 스펙트럼의 흡수대를 통하여 간접적으로 색소 추출물의 광학특성 및 물질을 추측하였다.

색소추출액의 HPLC 분석조건

분석에 사용한 HPLC(Waters Co. USA)는 Waters 2690이었으며 JE-34 및 *Serratia marcescens*의 색소추출액을 시료용액으로 사용하였다. 분석에 사용한 column은 XTerra

MS C₁₈ (5 μ m 2.1 mm×150 mm, Waters, USA)이었으며, 이동상의 유속을 0.3 mL/min으로 하고 100% methanol과 증류수를 이용하여 농도구배법(10~100% methanol 60 min)으로 두 시료의 peak를 비교분석하였다.

Prodigiosin-like pigment의 생성측정

Prodigiosin 생성은 Goldschmidt와 Williams의 방법[17]을 이용하여 측정하였다. 1 mL의 배양액에 2 mL의 acetone과 2 mL의 산성메탄(4 mL 1 M HCl과 96 mL methanol)을 가한 다음 10,000×g에서 20분 동안 원심분리한 후, 상층액을 취하여 534와 655 nm에서 흡광도를 측정하였다.

534와 655 nm에서의 두 흡광도 값의 차이 1을 19.3 μ g prodigiosin/mg protein으로 정의하였으며, bovine serum albumin(BSA)를 표준단백질로 이용하여 Bradford의 방법으로 정량하였다.

배양 특성

배양시간 및 배양온도에 따른 prodigiosin-like red pigment 생성균주인 JE-34의 배양 및 색소생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 액체배지에 전배양액을 1%(v/v)로 접종하여 4, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50°C에서 각각 배양하였으며, 초기 pH의 영향을 알아보기 위해 1M HCl 혹은 3M NaOH를 가하여 각각 pH 3~12로 조정된 배지에 동일비율로 접종하여 생육도와 prodigiosin 합성량을 측정하였다. 배지조성에 의한 균생육과 prodigiosin 합성량을 측정하기 위해 기본배지인 MB(marine broth, Difco. Co. USA)에 NaCl를 0~10%까지 첨가하여 배양하였고, 탄소원(chitosan, soluble starch, fructose, glucose, lactose, mannitol, sorbitol, sucrose, xylose)를 각각 1% 첨가하여 균성장 및 색소생산성을 관찰하였다. 질소원은 malt extract, peptone, yeast extract, NH₄NO₃, NaNO₃, (NH₄)₂HPO₄, KNO₃, (NH₄)₂SO₄들을 각각 0.5% 첨가하였고, 무기염류의 경우 BaCl₂, CaCl₂, CuSO₄, FeCl₂, HgCl₂, KCl, MgCl₂, NiCl₂, Na₂HPO₄, ZnCl₂를 각각 0.1% 첨가한 실험구에 동일조건으로 접종하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

색소물질의 특성 및 동정

본 실험에서 *Zooshikella* sp. JE-34와 *Serratia marcescens*의 적색색소를 추출하여 색소의 물성특성을 알아 본 결과 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 측정한 각각의 흡수 spectra는 가시광선영역에서 외견상 단일 peak를 나타냈으며, *Zooshikella* sp. JE-34의 최대흡수파장(λ_{max})은 528 nm, *Serratia marcescens*의 경우는 526 nm로 매우 유사한 분광학적 특성을 보였다(Fig. 1).

*Serratia marcescens*가 생산하는 적색색소는 prodigiosin 계열의 색소라고 알려져 있으므로 HPLC를 통하여 분리된

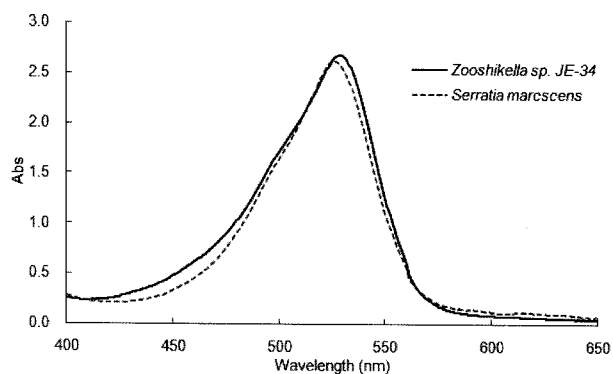


Fig. 1. UV spectrum of prodigiosin-like red pigments isolated from *Zooshikella* sp. JE-34 and *Serratia marcescens*.

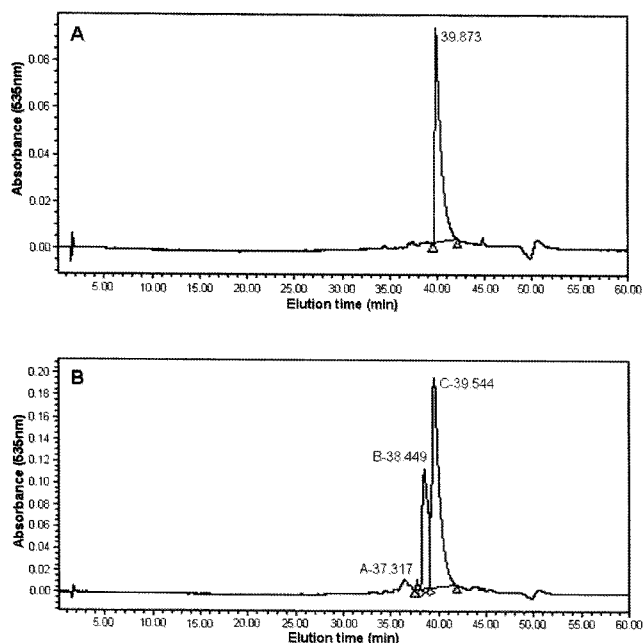


Fig. 2. HPLC profile of prodigiosin-like red pigment from *Zooshikella* sp. JE-34 (A) and *Serratia marcescens* (B).

peak를 분석하여 JE-34의 색소가 prodigiosin계열의 물질임을 확인하여 본 결과, Fig. 2A에서와 같이 *Serratia marcescens*가 생산하는 적색색소는 39.873 min에서 단일 peak로 검출되었으며, peak의 최대흡수파장(λ_{max})이 536.0 nm로 분석되어 prodigiosin의 기존연구[1]에서 보고된 λ_{max} 이 535-540 nm인 것과 유사한 결과를 보여 prodigiosin계열의 색소임을 확인하였다.

Zooshikella sp. JE-34의 경우는 Fig. 2의 B에서와 같이 37.713, 38.449, 39.544 min에서 3개의 peak가 검출되었고, 각 peak의 λ_{max} 은 536.0, 537.2, 536.0 nm로 유사하게 나타났으며 peak C의 경우 *Serratia marcescens*가 생산하는 적색색소의 검출시간과 거의 동일하였으므로 *Zooshikella* sp. JE-34가 생성하는 주요 적색색소는 prodigiosin 계열의 물질인 것으로 판단되었다. 보다 정확한 분자구조 및 분자량의 도

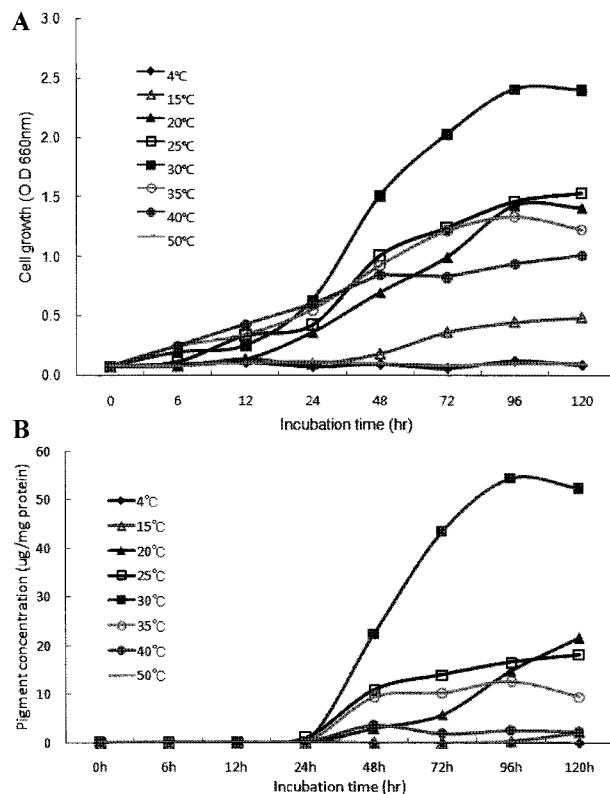


Fig. 3. Effect of temperature on the production of pigment in shake flask culture. A. Cell growth; B. Pigment.

출을 위한 NMR, LC-ms/ms 등의 구조분석이 진행 중이다.

Prodigiosin-like red pigment 생산을 위한 환경적 배양조건

분리균주 *Zooshikella* sp. JE-34의 최적배양온도를 확인하기 위해 균주의 생육도 및 pigment 생합성량에 미치는 배양온도의 영향을 조사하였으며, 4~50°C의 온도 범위에서 5일 동안 배양하여 측정하였다. 본 실험에 사용된 *Zooshikella* sp. JE-34의 경우 20~35°C에서 prodigiosin-like pigment 생육도는 10 µg/mg protein 이상으로 나타났다(Fig. 3). JE-34는 30°C에서 96시간 배양시에 가장 높은 성장을 보였고 pigment의 생합성량 또한 높았는데 이는 일반적으로 해양 세균은 저온미생물(psychrotroph)로서 보고된 것과 일치하였다. 균체의 성장과 pigment의 생합성량의 관계에서 균체의 성장은 24시간 이전부터 성장하는 것으로 나타났지만 pigment의 생합성은 24시간 이후에서 급격히 이루어졌는데 이는 prodigiosin의 생합성이 성장과정 중 비증식 세포에서 생산되는 특성과 관련이 있는 것으로 사료된다. Prodigiosin을 생합성하는 해양유래 미생물 중 *Zooshikella ganhwensis*, *Hahella chejuensis* 또한 저온성미생물로 30°C에서 성장 및 prodigiosin의 합성이 활발한 것으로 보고되어[9, 25] 본 균주와 유사한 특성을 보였다.

분리균주 *Zooshikella* sp. JE-34의 경우 초기 pH 6~7에서 가장 성장률이 높아 호중성 미생물(neutrophile)인 것으로 보

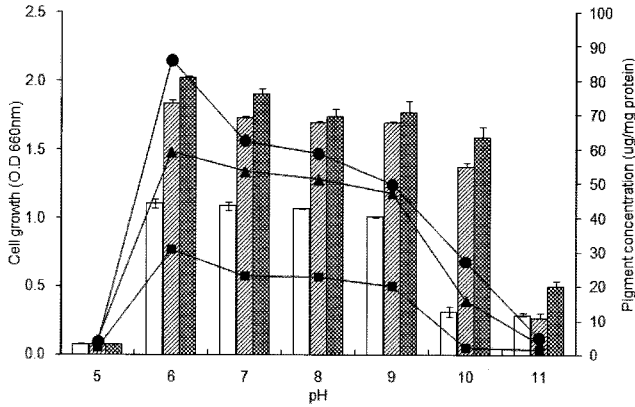


Fig. 4. Effect of pH on the production of pigment by *Zooshikella* sp. JE-34. Pigment production: ■-, 24 hr; ▲-, 48 hr; ●-, 72 hr; Cell growth: □, 24 hr; ▨, 48 hr; ▩, 72 hr.

이며 pH 8~10에서도 72시간에서 OD값 1.5이상의 성장을 보여 알칼리 환경에서도 안정하게 성장 하는 것으로 관찰되었다(Fig. 4). Pigment 생합성의 경우 또한 pH 6~7에서 높은 생합성량을 나타냈으나 pH가 높아짐에 따라 생합성량의 감소가 현저히 나타나는 것으로 나타났는데 이는 pH가 높아져도 균체의 성장은 하지만 효소와 막수송단백질의 활성이 억제되어 세포가 손상되기도 하며 영양물질분자의 이온화경향 변화에 의한 물질흡수능력이 떨어져 생합성 과정 중 효소축합과정에 필수적인 prodigiosin의 합성이 저해되는 것으로 사료된다. 한편 *S. marcescens*의 경우 prodigiosin의 생합성의 최적 pH는 8.0~8.5으로서 이러한 pH의 효과는 prodigiosin 생합성에 관여하는 프롤린의 양과 관련이 있는 것으로 보고 되었는데[13, 21] JE-34의 경우는 이와 대조적으로 최적 pH 6으로 관찰되어 균주의 차이에 따른 대사과정상의 차이에 의한 것으로 사료되어 차후 연구할 계획이다.

Prodigiosin-like red pigment 생산을 위한 배지조성의 영향

NaCl 농도의 영향: 일반적으로 해수에는 약 3.0% (w/v)의 NaCl이 함유되어 있으므로 NaCl에 따른 균체성장 및 이차대사산물의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 5). NaCl 농도를 0.0~9.0 (w/v)까지 조절한 배지에서 배양한 후 생육도 및 pigment 생합성량을 측정된 결과, 0.5%~6.0%까지의 농도범위에서 72시간에 OD 값이 1.0 이상의 생육도 및 35 µg/mg protein 이상의 pigment 생산량을 나타냈으며 생육도의 경우 2%에서 가장 높게 나타났다. Pigment 생합성량은 균체의 성장에 따라 증가하였으며 2%에서 역시 가장 높은 생합성량을 나타냈다.

한편, JE-34는 NaCl 0%에서 생육도 및 pigment 생합성을 하지 않는 것으로 관찰되어 해양유래 미생물로서 세포막의 안정성과 효소의 활성화를 위해 Na⁺이 필수적인 것으로 보이며 절대호염성균(obligate halophile)으로 사료된다.

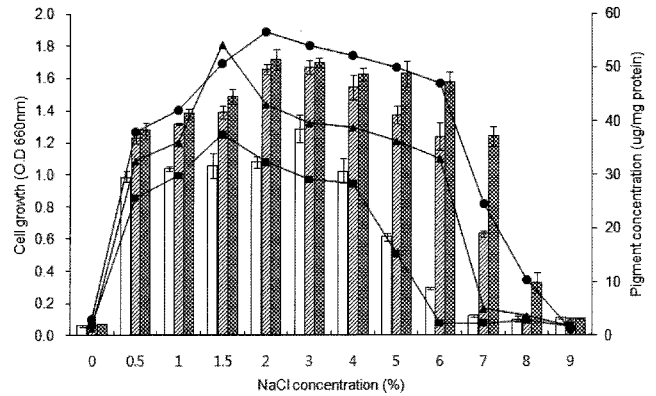


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the production of pigment by *Zooshikella* sp. JE-34. Pigment production: ■-, 24 hr; ▲-, 48 hr; ●-, 72 hr; Cell growth: □, 24 hr; ▨, 48 hr; ▩, 72 hr.

탄소원의 영향: JE-34의 성장 및 pigment 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위해 MB(marine broth, Difco. USA)를 기본배지로 하여 chitosan, fructose, glucose, lactose, mannitol, sorbitol, soluble starch, sucrose, xylose를 각각 1.0% (w/v)씩 첨가하여 균체성장 및 pigment 생산량을 측정하였다(Table 1). 균체의 성장은 fructose를 제외하고 모두 대조구보다 성장이 촉진된 것을 관찰할 수 있었고 다당류인 soluble starch에서 대조구 보다 약 156% 성장을 촉진시켰다. Pigment 생합성량은 chitosan, fructose, mannitol, sorbitol, soluble starch, sucrose의 첨가구에서 생합성량이 증가되었으며 균체의 성장과 마찬가지로 soluble starch에서 72시간 배양시에 약 229% 생합성을 증가시켰다. 단 Xylose의 첨가구의 경우는 실험균주가 성장 및 pigment 생합성이 이루어지지 않았는데 이는 xylose가 JE-34의 성장을 억제한 때문으로 사료된다(data not shown). 한편 glucose의 경우 실험결과 균체성장은 대조구에 비해 증가 되었지만 pigment 생합성량은 오히려 억제되었는데 이는 *S. marcescens*의 경우 glucose가 prodigiosin의 생성을 현저히 억제시킨다는 연구[3]와 유사한 결과로 보인다. 이는 일반적으로 glucose와 같이 쉽게 이용 가능한 기질은 그 자체가 이차대사산물의 생합성 관련 효소들을 저해할 뿐만 아니라 발효에서도 과량의 기질이 존재할 때 pyruvic acid 및 α-ketoglutaric acid 등의 축적으로 인한 간접적인 저해효과와 관련이 있는 것으로 생각된다[22]. 최적탄소원인 soluble starch를 0.0~5%(w/v)까지 첨가하여 농도에 따른 균체성장 및 pigment 생성능을 측정된 결과(Fig. 6A) 균체성장과 pigment 생합성량은 2.5% 가장 높았으며, 그 이상의 농도에서는 균체의 성장 및 pigment 생합성량이 감소하였는데 이는 위에서 언급한 과도한 기질 농도에 의한 저해효과로 사료된다.

질소원의 영향: 질소원은 미생물의 대사증식에 결정적인 영향을 미치는 성분으로, malt extract, peptone, yeast extract의 유기질소원과 NH₄NO₃, NaNO₃, (NH₄)₂HPO₄, KNO₃

(NH₄)₂SO₄의 무기질소원을 첨가하여 실험하였다(Table 1). 그 결과 모든 질소원이 대조구에 비하여 균체성장 및 pigment 생합성량이 증가함을 관찰할 수 있었고 유기질소원의 경우 malt extract, 무기 질소원의 경우 (NH₄)₂HPO₄ 각각 약 193% 및 177%의 생합성량을 증가시켰다. 특히 prodigiosin의 생합성은 여러 아미노산으로부터 합성된다고 보고된 바 있어[13] 질소원이 중요한 역할을 한다. Pigment 생합성량의 증가율이 가장 높은 malt extract에 대하여 농도 별로 실험한 결과(Fig. 6B) 최적농도는 1.5%로 나타났으며 pigment의 생합성량을 2배 이상 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 고농도일 경우 초기에는 성장 및 생합성량이 감소하였으나 시간이 경과함에 따라 균체성장 및 생합성량이 급격히 증가함을 보였다. 이는 malt extract가 고분자 물질이므로 이를 이용하는 과정에 있어 초기에는 고농도로 인한 catabolite repressor로 작용하지만 기질이 분해됨으로 인한 아미노산 등의 배지 내 농도 증가에 의해 생합성량이 급격히 증가한 것으로 사료된다.

무기염류의 첨가 효과: 미생물이 생산하는 이차대사산물의 생산에 있어 금속염은 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 특히 해양미생물의 경우 해수에 무기염류가 풍부함에 따라 금속염의 영향이 더욱 중요할 것으로 사료된 바 기본배지에

무기염류 BaCl₂, CaCl₂, KCl, MgCl₂ Na₂HPO₄를 0.1% (w/v) 농도로 첨가하여 균체성장 및 pigment 생합성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 1). 예비실험을 통해 CuSO₄, FeCl₂, HgCl₂, NiCl₂, ZnCl₂에서 72시간 동안 배양한 결과 균성장이 이루어 지지 않아 중금속염의 첨가는 균체성장 및 pigment 생합성의 저해요인으로 작용하는 것으로 사료되었다(Data not shown). 이는 중금속이 -SH 작용기를 가진 단백질과 결합하면 단백질을 비활성화 시키는 것과 연관된 결과라 생각된다. 실험결과 BaCl₂, Na₂HPO₄의 경우 대조구에 비해 균체의 성장 및 pigment 생합성이 증대됨이 관찰되었으며, MgCl₂의 경우는 균체의 성장은 대조구와 유사하였으나 pigment 생합성은 증대되는 양상을 보여 Mg⁺가 생합성 과정에 영향을 미치는 것으로 생각되며 Na₂HPO₄의 경우 가장 높은 생육도 및 생합성량의 증가를 나타냈다.

이에 따라 Na₂HPO₄를 0~3.0%(w/v)로 각각 첨가하여 배양한 결과(Fig. 6C) 1.0%에서 생육도 및 생합성능이 높게 나타났으며 그 이상의 농도에서는 저해되는 양상을 보였다. *S. marcescens*의 비증식 세포에서 무기인산은 0.3 mM 이내에서 prodigiosin 생성을 급격히 증가시키지만 10~250 mM의 농도 범위에서는 감소시키는 경향을 나타낸다는 보고[24]와는 다르게 나타났다. 하지만 이는 균 특이성이 크기 때문

Table 1. Effect of carbon, nitrogen, and mineral sources on the cell growth and production of pigment.

Source	Component	Cell growth (OD _{660nm})			Pigment concentration (µg/mg protein)		
		24 hrs	48 hrs	72 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
Carbon (1%, w/v)	Control	1.081	1.656	1.712	28.5	38.7	53.1
	Fructose	0.088	0.681	1.559	3.1	22.0	45.0
	Glucose	0.802	1.815	2.080	16.9	40.1	48.8
	Lactose	0.933	1.771	1.800	32.8	76.3	68.7
	Mannitol	0.960	1.723	1.755	33.8	46.4	56.1
	Sorbitol	1.084	1.787	1.829	46.9	85.4	59.5
	Starch	1.457	2.608	2.675	91.8	91.1	121.5
	Sucrose	1.293	2.031	2.054	39.7	73.4	52.9
	Chitosan	1.085	1.619	1.664	22.1	45.0	37.8
Nitrogen (0.5%, w/v)	Control	1.081	1.656	1.712	28.5	38.7	53.1
	Malt extract	1.017	2.208	2.447	20.2	92.8	102.5
	Peptone	1.350	1.800	2.003	34.8	54.5	61.0
	Yeast extract	1.185	1.382	2.145	27.7	52.7	85.2
	NH ₄ NO ₃	0.938	1.618	1.773	38.6	50.3	43.2
	NaNO ₃	1.078	1.716	1.708	42.7	58.2	63.3
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.217	2.564	3.345	66.7	84.9	94.3
	KNO ₃	1.128	1.688	1.696	61.6	55.6	38.3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.011	1.706	1.799	66.1	64.9	67.6
Mineral sources (0.1% w/v)	Control	1.081	1.656	1.712	28.5	38.7	53.1
	BaCl ₂	1.450	1.959	1.975	34.4	54.7	70.3
	CaCl ₂	1.133	1.696	1.676	38.4	40.2	54.7
	KCl	1.078	1.749	1.758	38.0	38.3	65.2
	MgCl ₂	1.061	1.747	1.745	62.9	70.7	90.2
	Na ₂ HPO ₄	1.094	1.960	1.996	66.4	63.1	90.2

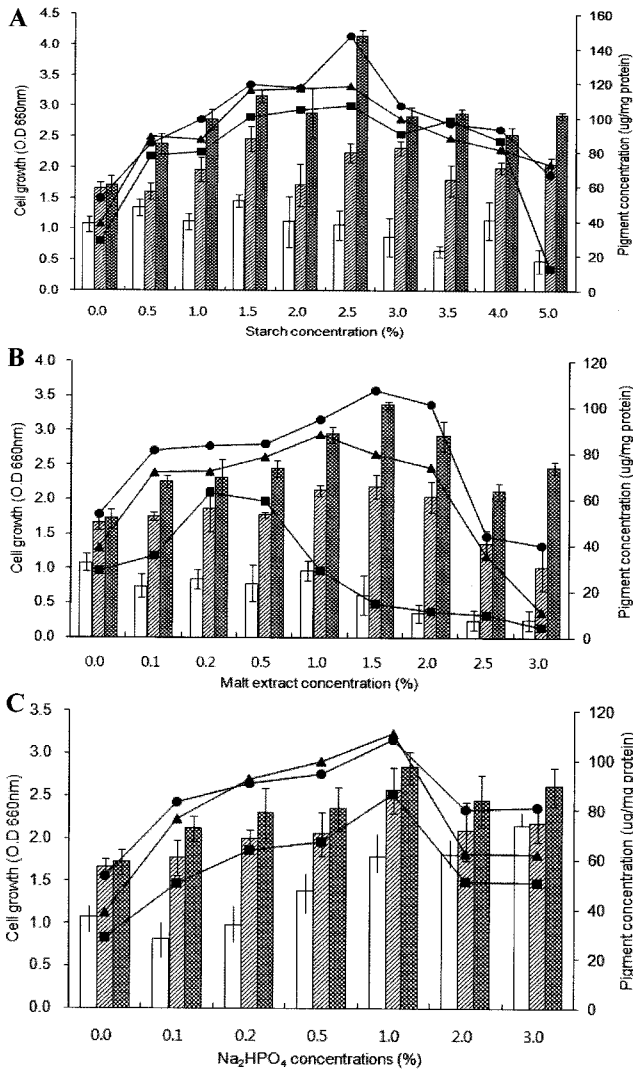


Fig. 6. Effect of starch concentrations (A), malt extract concentrations (B), and Na₂HPO₄ concentrations (C) on growth and producing pigment. Prodigiosin production: -■-, 24 hr; -▲-, 48 hr; -●-, 72 hr; Cell growth: □, 24 hr; ▨, 48 hr; ▩, 72 hr.

에 충분히 가능하다 생각되며 일정농도를 기준으로 양상자체는 유사하게 나타나 pigment 생합성은 무기인산의 농도와 관련이 있는 것으로 사료된다.

최적배지조성에 따른 pigment 생산에 대한 고찰

지금까지의 결과를 토대로 본 균주는 다량의 Prodigiosin 계열의 색소를 생합성 하는 것을 확인하였고 배지 및 배양조건을 조절하여 균체성장과 Prodigiosin 계열 색소의 생합성량을 증가시킬 수 있어 여러 생리활성이 알려진 Prodigiosin의 생산효율을 증가시킬 수 있는 기초자료로서 이용가치가 있을 것이라 사료되며 추가적인 연구가 필요하다고 보인다. 특히 본 연구에서 탐색하지 못한 아미노산 조성이 prodigiosin의 생합성에 미치는 영향을 연구할 필요성이 있다고 생각되며 이는 *Serratia marcescens*의 prodigiosin 생합

성에 알라닌, 히스티딘, 프롤린 등의 아미노산이 생합성을 유발한다는 연구된 바 있기 때문이다[23]. 미생물의 이차대사산물생산 및 균의 성장촉진을 위한 최적배양조건의 탐색은 매우 광범위한 물질에 의해 쉽게 결정할 수 없는 분야이다. 이에 따라 본 균주의 경우에도 차 후 균주의 배양특성의 대한 심도 있는 연구가 요구되며 특히 prodigiosin의 대표적인 생산자인 *Serratia marcescens*의 경우 우수한 균주개발이 활발히 연구되고 있어 본 연구의 균주 또한 다양한 연구를 통해 최적 색소 생합성 조건을 확립한다면 새로운 해양생물 자원의 확보차원으로 가치가 있을 것이라고 사료된다.

요 약

본 연구는 해양유래의 특이색소미생물을 선발하여 미생물의 특성 및 이차대사산물의 생리활성 탐색을 통해 새로운 생물자원개발을 위해 수행되었다. 본 연구에 사용된 prodigiosin 유사 색소를 생산하는 균주 JE-34는 동중국해 퇴적층으로부터 분리되었으며 *Zooshikella* sp. JE-34으로 명명하였다. *Zooshikella* sp. JE-34는 적색색소를 다량 생산하였으며 대표적인 prodigiosin 생산균주인 *Serratia marcescens*의 색소추출액과 분광학적 특성 및 HPLC 분석을 통해 JE-34가 생산하는 색소가 prodigiosin 유사색소로 판단되었다. JE-34 균주의 배지조성에 따른 생육도 및 pigment 생합성의 변화를 알아보기 위해 탄소원, 질소원, 무기염류를 첨가하여 배양한 결과 탄소원으로는 soluble starch, 질소원으로는 malt extract, 무기염류로는 Na₂HPO₄에서 최적의 pigment를 생산하였다. *Zooshikella* sp. JE-34는 prodigiosin의 생합성에 있어 대표적인 생산자인 *Serratia marcescens*와 마찬가지로 우수한 pigment 생합성량을 보여 prodigiosin의 생합성의 생물자원으로서 의의가 있다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 해양수산부 해양과학기술 연구개발사업의 연구비 지원을 받아 수행된 연구로서 호남지역 Sea Grant 사업단의 연구비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Allen, E. G 1967. Conditions of the colour change of prodigiosin. *Nature* **216**: 929-931.
- Choi, B. B. and S. K. Bang. 1997. Studies on the effect of glyoxylate on the biosynthesis of prodigiosin in *Serratia marcescens*. *Kor. J. Food Nutr.* **10**: 475-479.
- Clements-Jewery, S. 1976. 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.

4. Custro, A. J., A. H. Corwin, F. J. Waxham, and A. L. Beilby. 1959. Products from *Serratia marcescens*. *J. Org. Chem.* **24**: 455-459.
5. D'Alessio, R., A. Bargiotti, O. Carlini, F. Colotta, M. Ferrari, P. Gnocchi *et al.* 2000. Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. *J. Med. Chem.* **43**: 2557-2565.
6. Deol, B. S., J. R. Alben, J. L. Still, A. V. Robertson, and J. Winkler. 1974. Isolation and structure confirmation of norprodigiosin from a *Serratia marcescens* mutant. *Aus. J. Chem.* **27**: 2657-2662.
7. Huh, J. E., J. H. Yim, H. K. Lee, E. Y. Moon, D. K. Rhee, and S. Pyo. 2007. Prodigiosin isolated from *Hahella chejuensis* suppresses lipopolysaccharide-induced NO production by inhibiting p38 MARK, JNK and NK- κ B activation in murine peritoneal macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **7**: 1825-1833.
8. Hwang, E. I., Y. K. Kim, H. B. Lee, H. G. Kim, and S. U. Kim. 2000. Screening system for chitin synthase II inhibitors from natural resources and its inhibitor prodigiosin. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 251-257.
9. Jeong, H. Y., J. H. Yim, C. H. Lee, S. H. Choi, Y. K. Park, S. H. Yoon, C. G. Hur, H. Y. Kang, D. K. Kim, H. H. Lee, K. H. Park, S. H. Park, H. S. Park, H. K. Lee, T. K. Oh, and J. H. Kim. 2005. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucl. Acids Res.* **33**: 7066-7073.
10. Kalesperis, G. S., K. V. Praflad, and D. L. Lynch. 1975. Toxicogenic studies with the antibiotic pigment from *Serratia marcescans*. *Can. J. Microbiol.* **21**: 213-220.
11. Kim, C. H., S. H. Kim, and S. I. Hong. 1998. Isolation and characteristics of prodigiosin-like red pigment produced by *Serratia* sp. KH-95. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 283-289.
12. Kim, D., J. S. Lee, Y. K. Park, J. F. Kim, H. Jeong, T. K. Oh, B. S. Kim, and C. H. Lee. 2007. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 937-944.
13. Lim, D. V., S. M. H. Qadri, C. Nichols, and R. P. Williams. 1977. Biosynthesis of prodigiosin by non-proliferating wild-type *Serratia marcescens* and mutant deficient in catabolism of alanine, histidine and proline. *J. Bacteriol.* **129**: 124-129.
14. Montaner, B., S. Navarro, M. Pique, M. Vilaseca, M. Martinell, E. Giralt, E. Gil, and P. T. Ricardo. 2000. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J. Pharmacol.* **131**: 585-593.
15. Mortellaro, A., S. Songia, P. Gnocchi, M. Ferrari, C. Fornasiero, R. D'Alessio, A. Isetta, F. Colotta, and J. Golay. 1999. New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF- κ B and AP-1 activation. *J. Immunol.* **162**: 7102-7109.
16. Natarajan, V. and P. K. Kamath. 1995. Biosynthesis UV stable pigment prodigiosin. *Paintindia* **45**: 23-33.
17. Qadri, S. M. H. and R. P. Williams. 1973. Role of methionine in biosynthesis of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **116**: 1191-1198.
18. Qadri, S. M. H. and R. P. Williams. 1974. Incorporation of amino acid carbon into prodigiosin synthesized by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* **20**: 461-468.
19. Slater, H., M. Crow, L. Everson, and G. P. Salmond. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol. Microbiol.* **47**: 303-320.
20. Sole, M., N. Rius, A. Francia, and J. G. Loren. 1994. The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 341-344.
21. Song, M. J., J. D. Bae, D. S. Lee, C. H. Kim, J. S. Kim, S. W. Kim, and S. I. Hong. 2006. Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *J. Biosci. Bioeng.* **101**: 157-161.
22. Tanaka, S. 1992. Fermentation processes in screening for new bioactive substances. p. 303-326. In S. Omura (ed.). The search for bioactive compound from microorganism. Springer-Verlag, New York.
23. Wasserman, H. H., R. J. Sykes, P. P. Peverada, C. K. Shaw, R. J. Cushley, and S. R. Lipsky. 1973. Biosynthesis of prodigiosin Incorporation patterns of 13-carbon-labeled alanine, proline, glycine, and serine elucidated by Fourier transform nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **95**: 6874-6875.
24. Witney, F. R., M. L. Failla, and E. D. Weinberg. 1977. Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1042-1046.
25. Yi, H., Y. H. Chang, H. W. Oh, K. S. Bae, and J. Chun. 2003. *Zooshikella ganghwensis* gen. nov., sp. nov., isolated from tidal flat sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1013-1018.

(Received May 15, 2009/Accepted Aug. 28, 2009)