

광합성세균 *Rhodobacter capsulatus* PS-2의 대량배양 최적화 및 대사산물 분석

봉기문¹, 김종민¹, 유재홍², 박인철², 이철원³, 김평일^{1*}

Mass Cultivation and Secondary Metabolite Analysis of *Rhodobacter capsulatus* PS-2

Ki Moon Bong¹, Jong Min Kim¹, Jae-Hong Yoo², In Chul Park², Chul Won Lee³, and Pyoung Il Kim^{1*}

Received: 8 August 2016 / Revised: 20 September 2016 / Accepted: 21 September 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Plant growth promoting (PGP) hormones, which are produced in a small quantity by bacteria, affect in plant growth and development. PGPs play an important role on the crop productivity in agricultural field. In this study, a photosynthetic bacterial strain producing the PGP was isolated from paddy soil. Bacterial isolate was gram negative, rod-shaped and motility positive. From the 16s rRNA gene sequence analysis, the isolate was identified as *Rhodobacter capsulatus* PS-2. The mass cultivation of *R. capsulatus* PS-2 was optimized by considering of the carbon, nitrogen and inorganic salt sources. Optimal medium composition was determined as Na-succinate 4.5 g, yeast extract 5 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 5 g, per liter. From the result of 500 L fermentation for 2 days using the optimal medium, the viable cells were 8.7×10⁹ cfu/mL. *R. capsulatus* PS-2 strain produced the carotenoid and indole-3-acetic acid (IAA). The carotenoid extraction and quantitative analysis were performed by HCl-assisting method. Total caro-

tenoid contents from *R. capsulatus* PS-2 culture broth were measured as 7.02±0.04 and 6.93±0.05 mg/L under photoheterotrophic and chemoheterotrophic conditions, respectively. To measure the productivity of IAA, colorimetric method was employed using Salkowski reagent at optical density 535 nm. The results showed that the highest content of IAA was 197.44 ±5.92 mg/L in the optimal medium supplemented with 0.3% tryptophan.

Keywords: *Rhodobacter capsulatus* PS-2, Carotenoid, Heterotrophic cultures, Plant growth promoting bacteria, Indole-3-acetic acid(IAA)

1. INTRODUCTION

최근 소득수준과 삶의 질 향상에 따라 소비자들은 화학비료와 화학합성농약을 사용하여 생산된 농산물보다 미생물, 천연식물추출물, 천적 등 생물학적 제제를 사용하여 재배한 친환경·유기 농산물을 선호하고 있다. 국내외적으로 친환경 농자재에 대한 관심과 수요가 증가되고 있는 가운데 농업용 미생물제제는 유기성분의 퇴비발효 촉진, 인산가용화, 영양성분의 전환 등 작물의 생장촉진과 식물병원균 방제를 위한 작물보호제로 사용되고 있다 [1]. 이 중 작물의 생장촉진에 관여하는 미생물제제는 주로 미생물 대량배양을 통한 액상 형태나 동결건조·분무건조에 의해 분말 제형화 공정을 거쳐 사용하는 것이 일반적이다. 이러한 미생물제제를 생산하기 위

¹전남생물산업진흥원 생물방제연구센터

¹Bio Control Research Institute, Jeonnam Bioindustry Foundation, Gokseong 57509, Korea

Tel: +82-61-363-8994, Fax: +82-61-363-9503

e-mail:pikim30@gmail.com

²국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과

²Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Korea

³전남대학교 자연과학대학 화학과

³Department of Chemistry, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

해서는 미생물의 대량배양이 필수적으로 이루어져야 한다. 그러나 일반적으로 미생물 배양에는 주로 고가의 상업용 배지를 사용하기 때문에 미생물 제품의 생산비를 낮춰 다수의 수요자에게 공급하는 것이 급선무이다. 또한 미생물 제품의 효과를 보증하기 위하여 배양물의 생균수를 기준치 이상으로 보증하여야 함에도 불구하고 현실적으로 그렇지 못하는 경우도 많이 있다.

농축산용 미생물제제로 활용되는 주요 미생물 종류는 고초균 (*Bacillus*), 효모 (*Yeast*), 유산균 (*Lactic acid bacteria*, LAB), 광합성세균 (*Photosynthetic bacteria*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 트리코더마 (*Trichoderma*), 아스퍼질러스 (*Aspergillus*)가 있다. 그 중 광합성세균은 논, 하천, 하수처리장 등 담수상태인 곳에 대부분 존재하고 있으며, 생균수는 다른 유기영양세균과 비교하였을 때 거의 유사한 것으로 알려져 있다 [2]. 광합성세균은 기본적으로 빛이 있는 혐기·광 (photoheterotrophic culture) 조건에서 광합성 작용에 의해 성장하지만, 이들 중 일부는 빛이 없는 호기·암 (chemoheterotrophic culture) 조건에서 다른 종속영양 미생물처럼 생육하기도 한다 [3]. 농축산용 미생물제제로 활용되는 광합성세균 중 홍색비유황세균 (purple nonsulfur bacteria, PSB)은 혐기·광 조건이나 호기·암 조건에서 생장이 가능하며 여러 유기물과 무기물을 이용하여 다양한 대사활동을 한다 [4]. 또한 균체 성분 중 비타민과 아미노산 함량이 높고 식물성장촉진 효과가 있는 것으로 알려져 있다 [5]. 그러나 광합성세균은 보존력이 낮고 유통이 까다로우며 제품 생산에 대한 체계적인 연구결과가 많지 않아 지속적인 연구가 필요한 실정이다.

미생물제제로 활용되는 미생물은 다양한 대사산물을 생산하며 이를 통해 자연계의 순환에 영향을 미치고 있다. 미생물이 생산하는 대사산물 종류 중 식물성장호르몬은 농작물의 생육촉진 효과에 있어서 영양소가 아닌 유기물질로 특정 부위에서 생성되어 다른 부위로 이동하며 낮은 농도의 미량에서도 특정한 생리, 생화학적 또는 형태학적 반응을 일으키는 물질로 정의된다. 식물성장촉진 물질은 식물의 성장과 발달을 촉진하는 식물 호르몬의 일종으로 여겨지며 다양한 물질이 존재하는 것으로 알려져 있다. 현재 식물성장촉진 물질 중에서 상업적으로 이용되는 예는 auxin (indole-3-acetic acid, IAA), gibberellin (GA₃), abscisic acid (ABA), 에틸렌 등이 있다. 이 중 auxin의 대표적인 물질인 IAA는 줄기 절편의 길이 성장을 촉진하고 줄기와 뿌리의 발달, 꽃과 과실의 발생, 그리고 굴성 운동 등을 유도한다. 광합성세균은 IAA와 indole-3butyric acid (IBA)를 포함하는 auxin 계열의 식물성장 촉진 물질을 생산하며, 이들 대사산물은 식물 성장과 생리적 과정에 매우 광범위하고 다양하게 작용하는 것으로 보고되고 있다 [6,7]. 또한, 광합성세균 중에는 5-aminolevulinic acid (ALA), gibberellin을 생성하여 세포분열과 종자발아 촉진작용을 하는 것으로 알려져 있다 [8]. 이외에도 식물생장에 영향을 미치는 대사산물을 생산하는 미생물 종류는 *Pseudomonas fluorescens* sp., *Pseudomonas putida*, *Enterobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Bradyrhizobium japonicum*, *Azotobacter vinelan-*

dii, *Erwinia herbicola* 등이 있으며, 현재 활발한 연구가 진행되고 있다 [9].

본 연구에서는 농업에 활용하기 위해 논, 시설재배 밭 토양 및 호수의 퇴적 토양 등에서 분리한 광합성세균을 선별하여 대량생산 최적화를 통해 보존성을 높이고, 광합성세균이 생산하는 대사산물 탐색을 통해 미생물제제로의 가능성을 탐색하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 광합성세균의 분리 및 선별

광합성세균의 분리 및 선별을 위해 논, 시설재배 밭 토양, 쓰레기장, 하천 및 호수의 퇴적 토양 등 22개소에서 시료를 수집하였다. 수집된 시료는 각 종류별로 0.1 g 씩 150×20 mm의 culture tube에 30 mL Biebl & Pfennig's 배지 (KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.2 g, CaCl₂·2H₂O 1.2 g, yeast extract 0.05 g, malic acid 0.3 g, succinic acid 1 g, Na-acetate 1 g, 0.1% ferric citrate 5 mL, Trace Element Solution SL-7* 1 mL, per liter)를 혼합하여 액체파라핀으로 중층하였으며, 혐기상태로 3,000 lux 조도의 형광을 조사한 후 28°C 항온기에 정치 배양하였다 [10]. Tube 표면에 형성된 적색 또는 갈색의 균체를 백금선으로 채취하여 Biebl & Pfennig's 고체배지에 평판법으로 도말하여 순수 분리하였다. 광합성세균 중 호기·암배양이 가능한 균주를 선별하기 위해 각각의 균주를 Van Niel's yeast 배지 (K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, Yeast extract 10 g, per liter)에 호기·암 조건에서 30°C, 48시간 동안 배양하여 적색의 colony 형태를 나타내는 균주를 얻었다. 균주의 분류학적 동정을 위하여 다양한 생화학적 성장검사 및 전자주사현미경 (scanning electron microscope, SEM)으로 그 형태를 관찰하였다. 이를 바탕으로 Bergey's manual of systematic bacteriology의 색인에 따라 최종 분류 동정하였다 [11].

2.2. 광합성세균 배지 최적화 및 제형화

광합성세균의 배지 최적화를 위해 일반적으로 사용되는 Van Niel's yeast 배지에 탄소원, 유기산, 질소원, 무기염류를 첨가하여 최적배지를 선정하였다. 배지에 따른 광합성세균의 성장률을 측정하기 위해 탄소원 (glucose, soluble starch), 유기산 (sodium acetate, sodium succinate), 질소원 (yeast extract, soy peptone, MSG), 무기염류 (K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl, NH₄Cl, H₃BO₃, CaCO₃)를 농도별로 첨가하였으며, 흡광도 (600 nm) 및 생균수 측정을 통해 최적배지를 선정하였다. 배양 조건은 호기·암 상태에서 120 rpm, 30°C, 48시간 동안 진행하였다.

선별된 배지를 대상으로 대량생산 최적화를 위해 500 L 발효기를 이용하여 광합성세균의 배양을 수행하였다. 100 mL 최적배지가 포함된 500 mL 삼각 플라스크에서 1차 종균 배양을 진행하였으며, 2차 종균의 경우 최적 배지 2 L를 포함한 5 L 삼각 플라스크에서 동일한 조건으로 배양한 후 500 L

발효기의 300 L 대량배양을 위한 접종원으로 사용하였다. 배양 조건은 동일하게 호기·암 조건으로 120 rpm, 30°C, 48시간 동안 배양하였다.

대량배양한 광합성세균의 분말 제형화를 위해 광합성세균 배양액을 15,000×g에서 15분 동안 관형원심분리기를 이용하여 균체를 회수하였다. 보존 첨가제에 따른 광합성세균의 생존율 비교를 위해 회수한 균체에 성분 조성이 다른 각각의 보존 첨가제 (#1; 0.2% SiO₂, 1% starch, #2; 0.2% SiO₂, 0.5% starch, 0.5% MSG)를 첨가하여 80시간 동안 동결건조 한 후 편밀 분쇄기를 이용하여 균질한 상태로 분말화하였다. 또한 분쇄된 광합성세균 제제를 이용하여 4°C (냉장), 25°C (실온), 40°C 조건에서 6주 동안 온도별 보존 안정성 실험을 수행한 후 분말 제형화에 따른 광합성세균의 보존성을 조사하였다.

2.3. Carotenoid 추출 및 분석

광합성세균이 생산하는 carotenoid의 추출과 배양조건에 따른 carotenoid 생산량을 비교하기 위해 최적배지에서 호기·암 조건으로 120 rpm, 30°C, 48시간 동안 100 mL (V₂)로 배양하였으며, 혐기·광 조건으로 3000 lux에 N₂ gas를 주입하여 120 rpm, 30°C, 48시간 동안 100 mL (V₂)에서 비교 배양하였다. Carotenoid 추출은 염산 추출법 (HCl-assisted extraction)으로 추출하였다. Carotenoid의 경우 균체 내부에서 합성되기 때문에 상등액이 제거된 광합성세균 균체를 사용하였으며, 3M HCl을 첨가하여 carotenoid가 추출될 수 있도록 균체를 분해하였다. 3M HCl에 의해 분해된 균체는 10,000×g에서 20분 동안 원심분리한 후 상등액은 제거하였다. 상등액이 제거된 시료에 acetone (V₁)을 첨가하여 28°C, 100 rpm, 30분 동안 교반하여 carotenoid를 추출하였다. 분리한 상등액의 480 nm에서 흡광도 값 (A), carotenoid 함량은 흡광도에 따라 산출식 (D: dilution ratio, 0.16: extinction coefficient of carotenoid)에 근거하여 정량 분석하였다 [12].

$$\text{Total pigment} = \frac{ADV_1}{0.16 V_2}$$

2.4. 식물생장촉진 물질 분석

2.4.1. 비색법 (colorimetric method)에 의한 IAA 함량 측정

광합성세균이 생산하는 식물생장촉진 물질 중 비색법을 통해 분석이 가능한 IAA 함량을 측정하였다. 광합성세균을 최적배지에 접종한 후 IAA의 전구물질인 L-tryptophan을 0.05, 0.1, 0.2, 0.3% 농도로 각각 첨가하여 호기·암 조건에서 48시간 배양하여 시간 변화에 따른 IAA의 생성량을 조사하였다. IAA 생성량 측정은 배양 후 배양액을 취하여 10,000×g로 20분 동안 원심분리한 상등액 1 mL에 salkowski 용액 (H₂SO₄ 150 mL, H₂O 250 mL, 1.5 M FeCl₃·6H₂O 7.5 mL) 2 mL을 혼합하여 상온에서 20분 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 535 nm에서 측정하였고, 표준 IAA (Sigma Co., USA)를 사용하여 얻어진 표준곡선에 따라 정량하였다 [13].

Table 1. Optimized LC-MS/MS parameters for the determination of IAA

MRM parameters	IAA
m/z	176 → 130
DP ^a , V	21
CE ^b , V	31
Mass spectra range	100~500 m/z
Ionization	ESI positive mode
Source temperature (°C)	500
Ionization voltage (V)	4500
Ion source (GS1) setting	30 Mpsi
Ion source (GS2) setting	30 Mpsi
Curtain gas setting	10 Mpsi

DP^a): declustering potential, CE^b): collision energy.

2.4.2. LC-MS/MS를 이용한 IAA 정성분석

0.3% tryptophan이 첨가된 최적배지에서 배양한 광합성세균 배양액 100 mL을 10,000×g으로 원심분리한 후 0.2 μm filter로 제균한 상등액을 LC-MS/MS 분석용 시료로 사용하였다. Biosystems-Sciex API 2000 (Applied Biosystems, Concord, Ontario, Canada) 분석기기와 분석용 column으로 Sunfire (Ø 5 μm, 4.6×250 mm, Waters, USA)를 사용하였다. MS의 Ion source는 turbo spray 5500, capillary temperature는 500°C로 설정하였다. 분석시험에는 용매의 비율이 점진적으로 높아지는 gradient program (5-65%, 30 min)을 사용하였으며, 유속은 1 mL/min의 조건으로 하였다. 이동상 조건시험에서 A 용액은 100% H₂O에 0.05% Trifluoroacetic acid (TFA), B 용액은 100% acetonitrile (ACN)에 0.05% TFA를 사용하였다. 대사산물의 정성분석을 위한 LC-MS/MS의 ionization mode는 ESI positive mode와 MRM mode를 이용하여 분석하였다 (Table 1) [14].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 광합성세균 선발

논, 시설재배 밭 토양, 쓰레기장, 하천 및 호수의 퇴적 토양 등으로부터 광합성세균을 선발하기 위해 Biebl & Pfennig's 배지를 이용하여 tube 표면에 형성된 적색 또는 갈색의 균체 총 6종을 분리하였다. 그 중 호기·암 배양이 가능한 1종의 광합성세균을 선별하였다. 선별한 광합성세균의 유전학적 특징을 확인하기 위하여 각각의 genomic DNA를 template DNA로 사용하여 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하였다. 선별한 광합성세균의 16S rRNA 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 gene bank database 정보로부터 균주 염기서열의 상동성을 확인하였다. 수집된 염기서열들 간의 Multiple alignment는 DNASTar program을 이용하여 편집하였다. 그리고 MEGA 6.0 program의 neighbour-joining method (Fig. 1), Maximum Parsimony, Maximum Likelihood에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 확

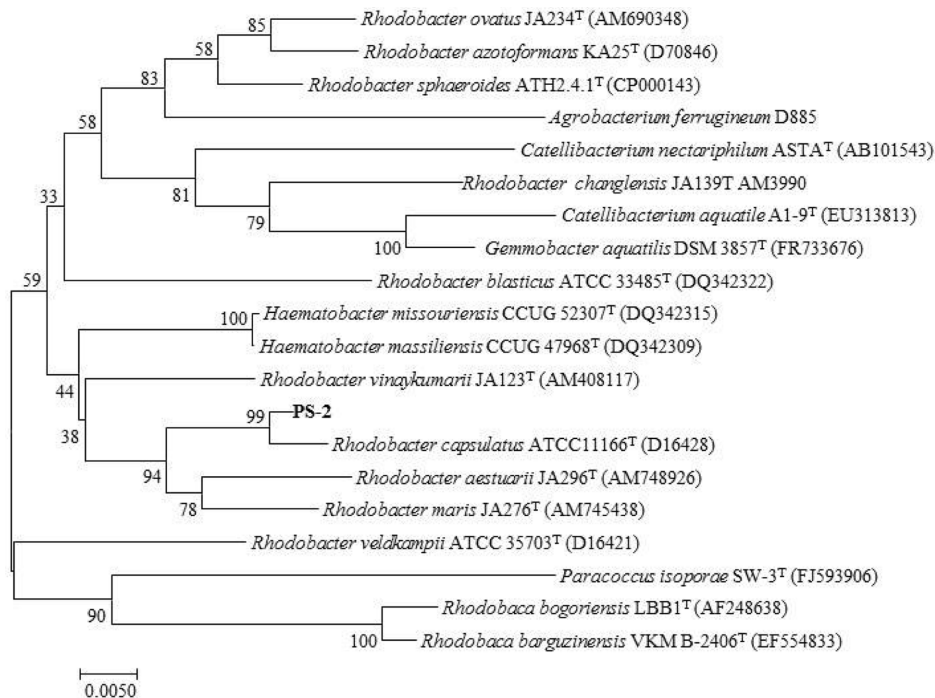


Fig. 1. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship of strain PS-2 with close relatives of the family Rhodobacteraceae.

인한 결과, *Rhodobacter capsulatus* ATCC 11166과 99%의 상동성을 나타내었다.

선별한 균주는 그람음성 세균으로 운동성을 나타내었다. 호기적 조건뿐 아니라 혐기적 환경에서 성장 가능한 통성 혐기성 균주였으며, amylase, cellulase, xylanase, protease 활성은 없었다 (data not shown). 이러한 각종 생리 생화학적 특징을 조사한 결과 *Rhodobacter capsulatus*와 가장 가까운 특성을 나타내었으며, 본 연구에서는 *Rhodobacter capsulatus* PS-2로 명명하였다 [15].

3.2. 배지조성 최적화 및 대량배양 조건 확립

선별한 광합성세균 *R. capsulatus* PS-2의 최적배양 조건을 확립하였다. Van Niel's yeast 배지에 유기산, 질소원, 무기염류를 농도별로 첨가하여 선별한 최적배지 (4.5 g Na-succinate, 5 g yeast extract, 1 g K₂HPO₄, 5 g MgSO₄, per liter)의 경우 흡광도 2.12, 생균수 1.2×10⁹ cfu/mL으로 최고의 배양효율을 나타내었으며, 상업용 배지를 사용한 결과와 유사한 배양효율을 나타내었다 [16]. 대량배양의 최적화를 위해 최적배지를 대상으로 5, 50, 500 L 발효기를 이용하여 *R. capsulatus* PS-2를 호기암 조건에서 pilot-scale 대량배양을 수행하였다. 배양 조건은 30°C, 120 rpm에서 배양액의 1%를 접종하여 48시간 배양하였다. 또한 산소 공급량은 0.3 vvm으로 설정하였으며, 초기 pH 6.5-7.0에서 최종 pH 8.49-8.55로 배양이 종료되었다. 5 L jar-fermenter에서 최적배양한 결과 최종 생균수는 2.7×10⁹ cfu/mL, 50 L 발효기에서 최적배양한 최종 생균수는 5.8×

10⁹ cfu/mL, 500 L 대용량 발효기를 이용하여 호기·암 배양한 결과 최종 생균수는 8.7×10⁹ cfu/mL로 측정되었다 (Fig. 2). 대량배양 scale-up 결과 500 L 대용량 발효기에서 가장 높은 생균수가 조사되었으며, 이는 500 L 발효기의 통기량 및 온도 조절 기능이 5 L 및 50 L보다 안정하기 때문에 가장 높은 효율을 나타낸 것으로 판단된다. 동결건조기를 이용해 분말 제형화된 초기 생균수는 각각 2.3×10⁹ cfu/g (제형화 조건 #1; 0.2% SiO₂, 1% starch), 2.1×10⁹ cfu/g (제형화 조건 #2; 0.2%

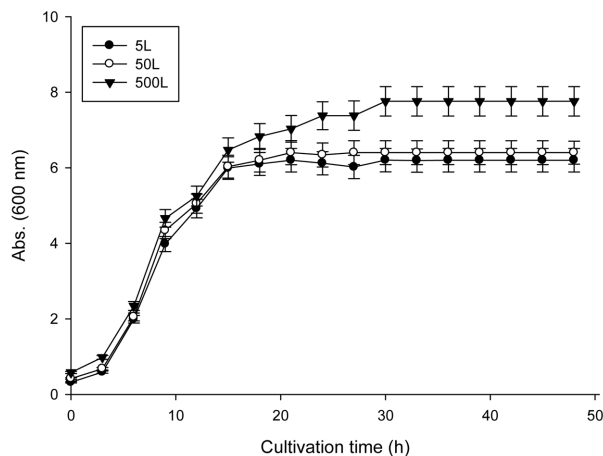


Fig. 2. Scale-up and culture profile of *Rhodobacter capsulatus* PS-2 using 5, 50 and 500 L fermenters.

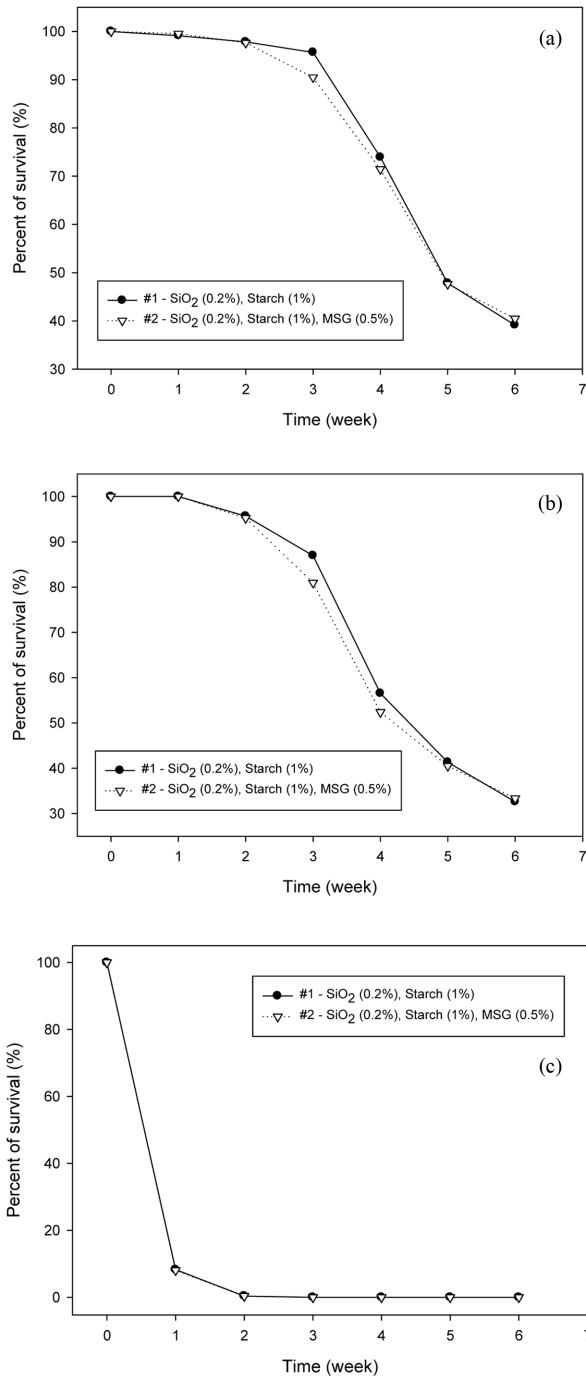


Fig. 3. Stability and conservativeness of *Rhodobacter capsulatus* PS-2 under different storage conditions. A, 4°C; B, 25°C; C, 40°C.

SiO₂, 0.5% starch, 0.5% MSG)로 조사되었다. 분말 제형화된 광합성세균의 보존성(안정성)을 조사하기 위하여 4°C(냉장), 25°C(실온), 40°C(가혹 조건)에서 1주일 간격으로 6주 동안 생균수를 측정하였다. 4°C에서 6주 후 생균수를 측정할 결과, 제형화 조건 #1의 경우 9×10^8 cfu/g, 제형화 조건 #2의 경우 8.5×10^8 cfu/g로 확인되었다(Fig. 3(a)). 25°C에서 6주 후 생균

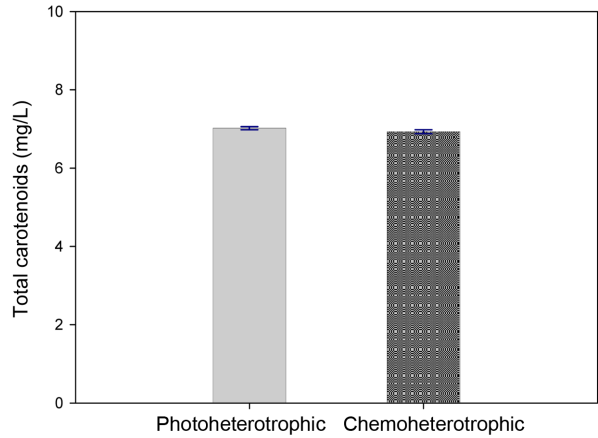


Fig. 4. Carotenoid production of *Rhodobacter capsulatus* PS-2 from the chemoheterotrophic and photoheterotrophic culture conditions.

수는 제형화 조건 #1의 경우 7.5×10^8 cfu/g, 제형화 조건 #2의 경우 7×10^8 cfu/g로 최종 확인되었다(Fig. 3(b)). 40°C에서 온도별 보존 안정성 실험 결과 1주일 경과 후 생균수는 제형화 조건 #1의 경우 9.5×10^6 cfu/g, 제형화 조건 #2의 경우 8.0×10^6 cfu/g로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 제형화 조건 #1이 #2에 비하여 온도에 대한 안정성이 높은 것으로 판단되며, 이후 모든 실험은 제형화 조건 #1번(0.2% SiO₂, 1% starch)으로 선정하여 모든 실험을 수행하였다. 광합성세균 분말 제형화 후 온도별 보존 안정성 실험 결과, 40°C 조건에서 보존성은 1주일 경과 후부터 생균수가 급격하게 감소됨을 확인하였으며, 2주 후부터 생균수는 전혀 확인할 수 없었다(Fig. 3(c)). 결론적으로, 각각의 조건에서 분말 제형화된 광합성세균의 보존성을 조사한 결과 4°C(냉장), 25°C(실온)에서 6주 이후에도 1×10^8 cfu/g 이상의 생균수를 확인할 수 있었다.

따라서, 본 연구를 바탕으로 제품을 개발할 경우 생산된 제품은 4-25°C 조건에서 보관하는 것을 보관온도로 선정하고 6주 이상 보관하지 않는 것을 권장해야 할 것으로 판단된다.

3.3. Carotenoid 추출 및 정량분석

최적배지에서 100 mL volume으로 배양한 *R. capsulatus* PS-2가 생산하는 carotenoid의 정량분석을 위해 염산(HCl-assisted extraction)을 이용한 추출법을 수행하였다. 추출용매는 acetone을 이용하였으며, 추출물은 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도에 따라 산출식에 대입하여 정량분석한 결과, 7.18 ± 0.15 mg/L의 함량이 측정되었다. 배양 조건에 따른 carotenoid 생산 차이를 조사하기 위해 혐기·광 조건과 호기·암 조건에서 각각 배양한 *R. capsulatus* PS-2의 carotenoid 생산량을 비교하였다. 분석한 결과, 혐기·광배양의 경우 7.02 ± 0.04 mg/L, 호기·암배양의 경우 6.93 ± 0.05 mg/L의 총 carotenoid 함량이 측정되었다(Fig. 4). 배양 조건에 따른 *R. capsulatus* PS-2의 색소 생산은 커다란 차이가 없음을 확인하였다.

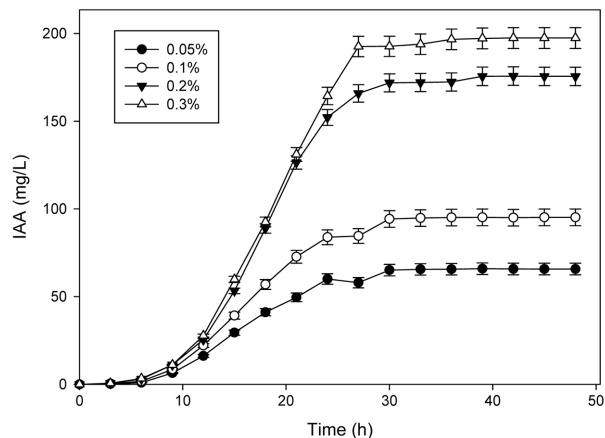


Fig. 5. Quantitative analysis of IAA produced by *Rhodobacter capsulatus* PS-2 with the tryptophan concentration gradient.

3.4. IAA 분석

R. capsulatus PS-2 균주를 tryptophan이 첨가된 최적배지에서 배양하며 시간 변화에 따른 IAA 생성량을 조사하였다 [17]. IAA 전구물질로 알려진 tryptophan 0.05, 0.1, 0.2, 0.3%을 최적배지에 각각 첨가하여 호기-암 조건에서 배양한 후 IAA 생산 농도를 측정한 결과 tryptophan 0.05%에서 65.73 mg/L, 0.1%에서 95.18 mg/L, 0.2%에서 175.58 mg/L, 0.3%에서 197.44±5.92 mg/L가 각각 조사되었다 (Fig. 5). IAA 전구물질인 tryptophan 농도 증가에 따라 IAA 생산량도 증가하였으며, 41 mg/L의 IAA를 생성하는 *Azotobacterium vinelandii*와 비교하였을 때 약 1.6~4.8배의 높은 IAA 생산량을 확인할 수 있었다 [18].

R. capsulatus PS-2의 시간 변화에 따른 생산량은 42시간에서 최대 결과를 나타내었으며, 본 연구에서 분리한 광합성세균은 tryptophan을 IAA의 전구물질로 활용하여 IAA에 의한 성장촉진 효과를 충분히 나타낼 수 있는 것으로 판단된다.

Tryptophan을 전구물질로 활용하는 IAA의 정성분석을 위하여 LC-MS/MS에서 MRM 조건을 176.1 → 130.1 m/z로 설정하여 최적 탐색하였다. 전처리 시료를 분석한 결과 머무름 시간 (retention time) 21 min에서 표준물질 (Fig. 6(a))과 동일한 시간의 머무름 시간을 나타내었으며 (Fig. 6(b)), 본 연구에서 분리한 광합성세균 *R. capsulatus* PS-2의 경우 식물생장 촉진물질 중 auxin의 대표 물질인 IAA를 생산하는 것을 확인할 수 있었다.

4. CONCLUSION

본 연구를 통해 논, 시설재배 발 토양, 쓰레기장, 하천 및 호수의 퇴적 토양 등 22개소에서 분리한 총 6종의 광합성세균 중 호기-암 배양이 가능한 *R. capsulatus* PS-2를 분리하였다. 형태학적 특징으로는 그람음성의 막대모양으로, 운동성이 있

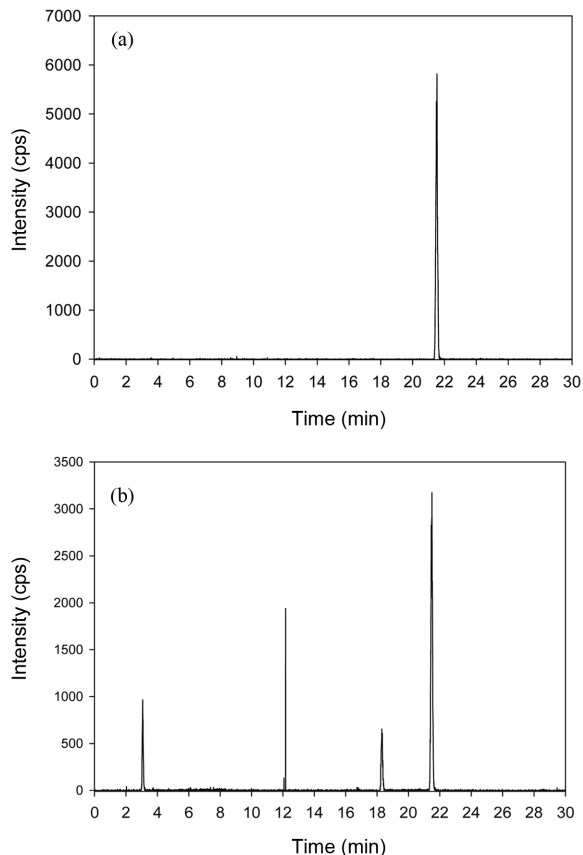


Fig. 6. Qualitative analysis of IAA using LC-MS/MS mass spectra from *Rhodobacter capsulatus*. Retention time 21 min, IAA. (a) standard IAA, (b) IAA extracted from *R. capsulatus* PS-2 culture broth.

었다. 분리균주는 호기 및 혐기조건에서 배양이 가능한 통성 혐기성으로 확인되었으며, amylase, cellulase, xylanase, protease 활성을 나타내지 못하였다. 분리균주의 16S rRNA 염기 서열을 분석한 결과 *Rhodobacter capsulatus* ATCC 11166과 99%의 상동성을 나타내었으며, 본 연구에서 *Rhodobacter capsulatus* PS-2로 명명하여 연구를 수행하였다. 선별균주의 최적배양조건으로는 30°C, pH 7.0이었고, 유기산, 질소원, 무기염류 첨가를 통해 산출한 최적배지의 조성은 4.5 g Na-succinate, 5 g yeast extract, 1 g K₂HPO₄, 5 g MgSO₄, per liter로 조사되었다. 대량배양의 최적화를 위해 최적배지를 대상으로 5, 50, 500 L 발효기를 이용하여 scale-up을 수행한 결과, 최종적으로 8.7×10⁹ cfu/mL의 생균수로 배양할 수 있었다. 제형화한 분리균주의 온도 보존성 (안정성)은 4°C (냉장), 25°C (실온)에서 6주 동안 1×10⁸ cfu/mL의 보존성을 나타내었으며, 40°C에서는 불안정한 것으로 조사되었다. 최적배지에서 배양한 광합성세균 *R. capsulatus* PS-2는 carotenoid를 합성하였으며, 식물생장촉진 물질 indole-3-acetic acid (IAA)를 전구물질인 tryptophan 첨가에 의해 높은 수준으로 생산하였다. IAA는 tryptophan 농도에 따라 증가하였으며, tryptophan 0.3%를 첨가한 최적배지에서 42시간 배양 시 가장 높은 197.44±5.92

mg/L의 생성량을 확인할 수 있었다. LC-MS/MS 분석을 통해 이온화된 IAA의 모분자는 176.1 Da, 세분화 이온은 130.1 Da 이었으며, 머무름 시간 21 min에서 식물생장촉진물질인 IAA가 검출되는 것을 확인할 수 있었다.

Acknowledgements

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호 PJ101513)의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Nam, H. S. (2011). Environmentally-friendly agriculture & biotic pesticide. *KIC News* 14: 12-18.
- Van Niel, C. B. (1944) The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriological Reviews* 8: 1.
- Zeilstra-Ryalls, J., M. Gomelsky, J. M. Eraso, A. Yeliseev, J. O'Gara, and S. Kaplan (1998) Control of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 180: 2801-2809.
- Sasikala, C. R. C. V. and C. V. Ramana. (1995) Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria. I. Production of single cell protein, vitamins, ubiquinones, hormones, and enzymes and use in waste treatment. *Advances in Applied Microbiology* 41: 173-226.
- Sunayana, M. R., Ch. Sasikala, and Ch. V. Ramana (2005) Rhodestrin: A novel indole terpenoid phytohormone from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol. Lett.* 27: 1897-1900.
- Costacurta, A., P. Mazzafera, and Y. Rosato (1998) Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is increased in the presence of plant leaf extracts. *FEMS Microbiol. Lett.* 159: 215-220.
- Kende, H. and J. Zeevaart (1997) The five "classical" plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197-1210.
- Chon, S. U. (2003) Herbicidal activity of δ -aminolevulinic acid on several plants as affected by application methods. *Kor. J. Crop Sci.* 48: 50-58.
- Beyeler, M., C. Keel, P. Michaux, and D. Haas (1999) Enhanced production of indole-3-acetic acid by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 affects root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against *Pythium* root rot. *FEMS Microbiol. Lett.* 28: 225-233.
- Biebl, H. and N. P. Pfennig (1978) Growth yields of green sulfur bacteria in mixed culture with sulfur and sulfate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 117: 9-16.
- Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, W. Rainey & Whitman (Eds.) (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media, USA.
- Chen, D., Y. Han, and Z. Gu (2006) Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Process Biochemistry* 41: 1773-1778.
- Glickmann, E. and Y. Dessaux (1995) A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 793-796.
- Kim, J. H., J. M. Park, G. H. Choi, Y. K. Park, G. J. Im, D. H. Kim, and O. K. Kwon (2013) Comparison of liquid chromatography-mass/mass spectrometry (MS) and gas chromatography-MS for quantitative analysis of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid from the concentrated liquid fertilizer. *Journal of Applied Biological Chemistry* 56: 53-57.
- Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, G. Bourg, M. Ramuz, and A. Allardet-Servent (1998) Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *Journal of Bacteriology* 180: 2749-2755.
- Lee, S. S., T. J. Oh, J. Kim, J. B. Kim, and H. S. Lee (2009) Bacteriocin from purple nonsulfur phototrophic bacteria, *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology and Virology* 39: 269-276.
- Normanly, J., J. D. Cohen, and G. R. Fink (1993) Arabidopsis thaliana auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 10355-10359.
- Jeon, J. S., T. S. Ahn, and H. K. Song (2003) Indoleacetic acid producing ability of soil bacteria that promote plant growth and phosphate solubilizing capability. *Institute of Basic Sciences* 14: 171-180.