

전복(*Haliotis discus*)에서 분리한 *Serratia marcescens*가 생산하는 적색 색소의 항균활성

신유진, 강창호, 소재성*

Red Pigment Producing *Serratia marcescens* Isolated from Abalone (*Haliotis discus*)

YuJin Shin, Chang-Ho Kang, and Jae-Seong So*

Received: 30 August 2016 / Revised: 31 October 2016 / Accepted: 9 November 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: *Serratia marcescens* characterized by the ability to produce red pigments inhabits various ecological niches. A strain *Serratia marcescens* PYU was isolated from abalone (*Haliotis discus*) collected at the West Sea in Korea. The isolated strain was gram-negative, motile, rods like coccus, oxidase-negative, and catalase-positive; and formed red pigment. *S. marcescens* PYU was grown in the presence of 0~10% (w/v) NaCl, at pH 4~9, and at 10~40°C. The strain PYU produced red pigment, and the extracted pigment showed antibacterial activity against *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garviae* which has been known as an important fish pathogens. Further studies are underway to elucidate the direct relationship between the red pigment and antibacterial activity.

Keywords: *Serratia marcescens*, Abalone (*Haliotis discus*), Red pigment, Anti-bacterial activity

1. INTRODUCTION

해양환경이 가지는 풍부한 생물학적 다양성은 해양 자원을 이용한 다양한 적용 가능성을 내포하고 있으며 큰 연구 가치를 지닌다 [1]. 특히 해양에서 서식하고 있는 다양한 해양 세

균은 특이적인 생물학적 특성을 지니는 이차대사산물들을 생산하며, 일부의 대사물질들은 색을 띠는 것으로 보고되고 있다 [2]. 세균이 생산하는 이차대사물질 중 일부는 생존을 위한 다른 미생물들에 대한 방어 기작으로 작용하며, 이러한 생리학적 특성은 다양한 유해 미생물의 억제 능력과 관련한 적용 가능성을 제시한다 [1].

Serratia 속은 그람음성의 세균으로 Enterobacteriaceae과에 속하며, 통성 혐기성의 특징을 가지는 짧은 간균이다 [3,4]. *Serratia* 속에서 가장 흔한 종은 *Serratia marcescens*로 알려져 있으며, 물, 토양, 대기, 식물과 동물을 포함한 다양한 환경에서 서식한다 [4]. *S. marcescens* 중 일부는 이차대사산물로서 prodigiosin속에 속하는 적색 색소 이외에도 분홍색 (pyrimine), 노랑색 (2-hydroxy-5-carboxymethyl muconic acid semi-aldehyde)의 색소나 색소 이외에 serrawettina, prodigiosan, serratine 등의 생리 활성 물질들을 생산한다 [5]. Prodigiosin 속의 적색 색소는 항균작용, 항진균작용, 면역억제 등의 다양한 생물학적 특성을 가지는 것으로 보고되었으며 [6,7], *S. marcescens* 이외에도 *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Pseudomonas* 등의 속에 속한 일부 해양 세균들도 prodigiosin이나 이와 관련된 물질들을 생산하는 것으로 보고된 바 있다 [2]. 미생물이 생산하는 색소의 정확한 생리학적 역할이 모두 밝혀지지 않았지만, 일반적으로 해양세균이 생산하는 색소는 주변환경의 적응과 포식자에 대한 방어작용을 하는 것으로 보고되고 있다 [1].

이에 본 연구에서는 서해연안에서 채취한 전복으로부터 적색 색소를 생산하는 미생물을 분리 동정하여 분리 균주의 생장특성을 파악하고, 분리 균주인 *S. marcescens* PYU가 생산

인하대학교 생물공학과
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel: +82-32-860-8666, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: sjaeseon@inha.ac.kr

하는 적색 색소의 특성을 분석하여 항균활성 능력을 확인하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 분리 시료 및 전처리

적색 색소를 생성하는 균주의 분리를 위한 해양 샘플로 2013년 6월부터 11월까지 서해안의 태안 소원면 (36°44'49.04"N, 126°10'43.51"E)에서 채취된 전복 (*Haliotis discus*)을 사용하였다. 채취된 전복은 멸균된 칼로 패각을 제거하였으며, 멸균된 분쇄기 (7011S, Waring, Torrington, CT, USA)를 이용하여 패육 (200 g)과 phosphate-buffered saline (PBS, 2.5 mM KH₂PO₄; pH 7.2) 200 mL를 넣어 분쇄하였다. 그 후 분쇄된 샘플을 PBS로 연속적으로 10배씩 희석하여 희석된 샘플을 각각 100 µL씩 Miller Luria-Bertani media (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)에 NaCl이 1% (w/v) 추가된 배지 (LB-N) 위에 도말한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 분리된 적색 색소 생성 균주는 25% (v/v) 글리세롤이 포함된 LB-N 액체배지에 접종하여 -70°C에서 보관하였다.

2.2. 분리 균주의 특성 확인 및 동정

분리 균주의 생화학적 특성확인을 위하여 LB-N 배지, 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 균은 그람 염색법 [8]을 실시하였으며, 균의 oxidase 활성과 catalase 활성은 각각 1% N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (BDH Limited, Poole, England)시약의 색변화와 3% H₂O₂ 시약의 기포 생성여부를 통하여 확인하였다. 균의 이동성은 soft LB-N 배지에 올린 멸균된 paper disc에 균을 10 µL를 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하여 확인하였다. 균의 생화학적 특성은 API 20E kit (BioMerirux, France)로 확인하였다.

분리 균주의 동정을 위하여 16S rRNA gene sequencing을 수행하였으며, 유전자의 증폭은 the universal rRNA gene pri-

mers (518F and 800R)를 사용하였고, 각 과정은 MacroGen Co. (Daejeon, Korea)을 통하여 진행하였다. 이후 분석된 16S rRNA sequencing 결과는 National Center for biotechnology Institute (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 통해 Genbank database와 비교하여 동정하였다. Sequence는 PHYDIT 3.1을 통하여 alignment를 진행하였고, 이후 MEGA 5.1 software를 이용하여 neighborjoining method로 계통수를 작성하였다 [9].

2.3. 분리 균주의 성장조건 확인

분리 균주의 성장조건을 확인하기 위하여, 각각 온도와 염 농도, pH 조건을 다르게 하여 배양하였다. 온도 조건의 확인을 위하여 분리 균주를 LB-N 액체배지에 접종하여 5°C부터 45°C 범위 (5°C 간격)의 온도에서 배양하였으며, 염 농도와 pH 조건의 확인은 각각 NaCl 농도를 0%에서 12% 범위 (1% 간격)로 조정된 배지와 pH를 4부터 10으로 조정된 배지에 분리 균주를 배양하여 확인하였다. 기본 배양 조건은 30°C, 200 rpm으로 24시간 배양 후 OD₆₀₀ 값의 변화로 균의 성장을 확인하였다.

2.4. 분리 균주가 생산하는 적색 색소의 추출

분리 균주를 LB-N 액체배지에 접종하여 각각 1일, 2일, 3일 배양한 후에 각 배양액을 16,180×g로 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 이후 95% ethanol을 넣어 세포를 재현탁한 후 2시간 동안 25°C에서 진탕시키고 다시 원심 분리하였다 [10]. 분리된 상등액을 병에 모아 filter paper (Whatman International Ltd, Maldstone, England)로 거르고 60°C에서 용매를 증발시킨 후, 1 mg/mL의 농도가 되도록 다시 ethanol로 용해하였다.

2.5. 적색 색소의 항균 활성 측정

추출한 적색 색소의 항균 활성을 확인하기 위하여 4종의 병원균 (*Bacillus cereus* KCCM40935, *Staphylococcus aureus* KCCM12214, *Salmonella typhimurium* KCCM41038, *Escheri-*

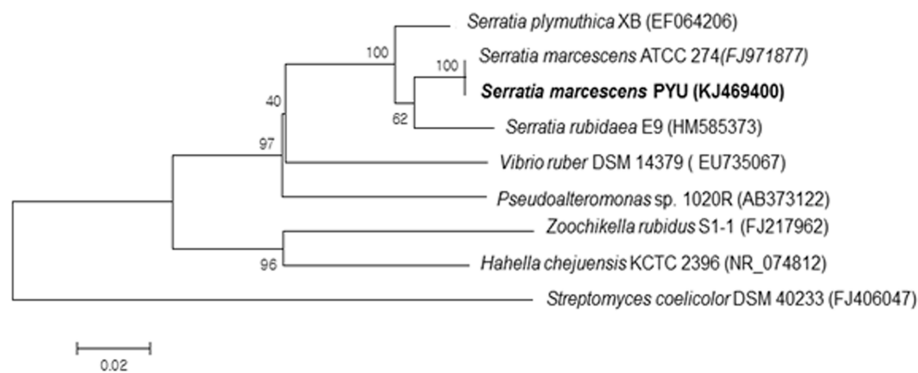


Fig. 1. Phylogenetic placement of *Serratia marcescens* PYU compared to red-pigment produced microorganisms. The tree was based on 16S rRNA gene sequences and constructed by using the neighbor-joining method. Numerical values indicate bootstrap percentile from 1,000 replicates.

chia coli O157:H7 KCCM40406)과 4종의 어병세균 (*Edwardsiella tarda* FP5060, *Streptococcus iniae* FP5228, *Vibrio ichthyocyteri* FP4004, *Lactococcus garviae* FP5245)을 사용하였다. 4종의 병원균은 LB 배지에 접종하여 35°C, 200 rpm 조건에서 배양하였으며, 4종의 어병세균의 경우 2% NaCl이 포함된 Brain-Heart Infusion medium (Bacto, Spark, USA)에 접종하여 30°C, 200 rpm 조건으로 배양하였다.

항균활성 측정은 병원균과 어병세균 희석액 100 µL을 Müller-Hinton Agar (MHA, BBL, Spark, USA)와 2% NaCl이 포함된 MHA에 각각 도말한 후, 멸균된 paper disc에 각각 1일, 2일, 3일 동안 배양하여 추출한 적색 색소와 대조군으로 95% ethanol을 50 µL씩 흡수시켜 균이 도말된 배지에 올리고 18시간 동안 각각 35°C와 30°C에서 배양하였다. 배양 후 paper disc 주변에 생성되는 저해환의 크기를 측정하여 적색 색소의 항균활성을 측정하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 분리 균주의 특성 및 동정

7월 태안 소원면에서 채취된 전복 샘플로부터 붉은색의 col-

Table 1. Comparison of biochemical characteristic with *Serratia marcescens*; +, positive, -, negative

Characteristic	PYU	<i>Serratia marcescens</i> ^a
β-galactosidase	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Citrate utilization	+	+
H ₂ S production	-	-
Urease	-	-
Tryptophane deaminase	-	-
Indole production	-	-
Gelatinase	+	+
D-glucose fermentation	+	+
D-mannitol fermentation	+	+
inositol fermentation	+	+
D-sorbitol fermentation	+	+
L-rhamnose fermentation	-	-
D-sucrose fermentation	+	+
D-melibiose fermentation	-	-
Voges-Proskauer	+	+
L-arabinose fermentation	-	-

^aCharacteristics were compiled from several references (*serratia* infection, genus *serratia*).

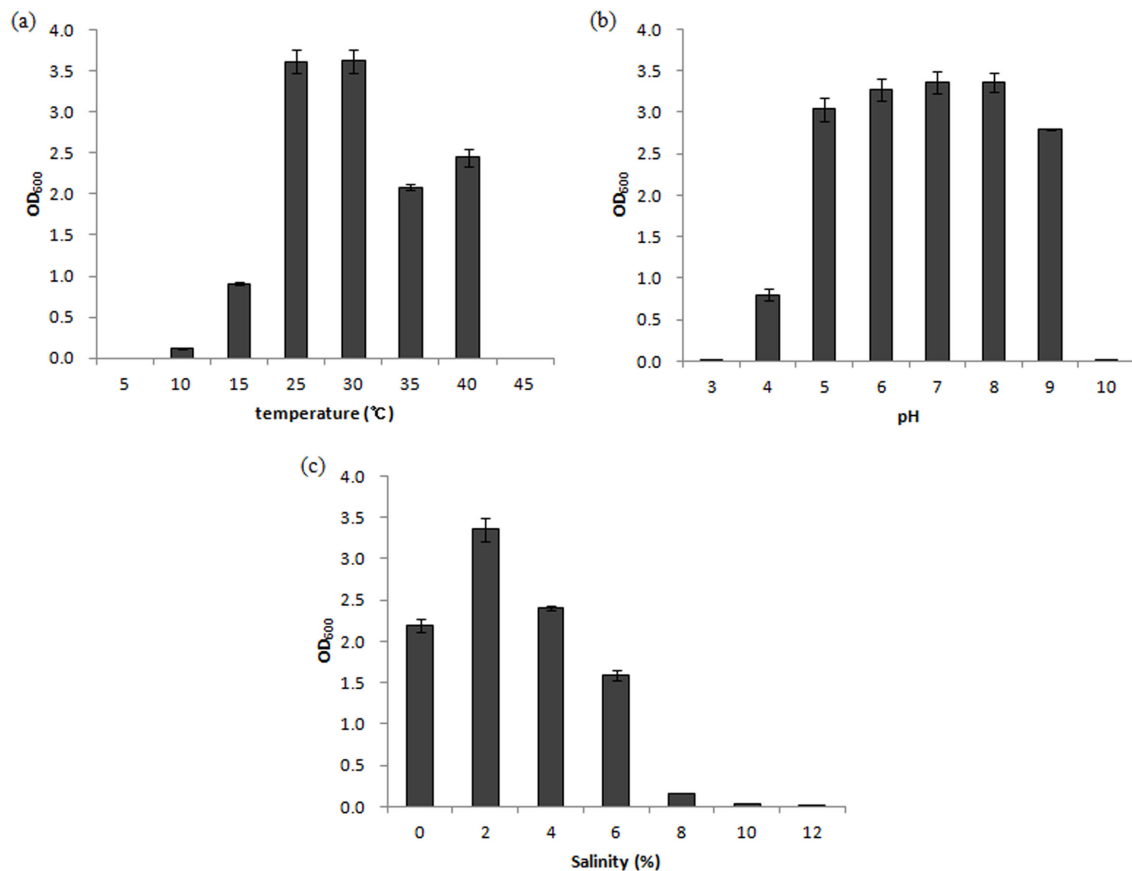


Fig. 2. Growth condition of isolated strain *Serratia marcescens* PYU. (a) at various temperature, 5–45°C; (b) at various pH, pH 3–10; (c) at various salt (NaCl) concentrations, 0–12%.

ony를 생성하는 균주를 분리하였고 PYU로 명명하였다. PYU 균주의 생화학적 특성확인을 통해 그람 음성이며 rod-shape의 구균으로 catalase-positive, oxidase-negative이고 운동성을 가지는 것을 확인하였다. LB-N 배지에서 PYU 균주는 둥글고 매끄러운 표면에 우유빛을 띠는 colony를 형성하며, 붉은색의 색소를 생산한다. 최근 국내 해안에서 적색 색소를 생산하는 분리 균주들로 *Hahella chejuensis* [11]와 *Zooshikella rubidus* [12]가 보고되었다. 기존의 연구를 통해 각 분리 균주가 생산하는 적색 색소의 생리학적 특성에 대하여 prodiginines (*H. chejuensis*)은 항균 작용과 조류를 고사시키는 작용을 하며 [11], prodigiosin과 cycloprodigiosin (*Z. rubidus*)은 항균 작용을 가지는 것으로 확인되었다 [12].

PYU의 16S rRNA gene sequence와 계통수 분석결과, *S. marcescens*와 99%의 유사성을 가지는 것을 확인하였으며 (Fig. 1), 본 연구를 통해 새롭게 분리한 *S. marcescens* PYU (PYU)의 16S rRNA gene sequence을 GenBank에 등록하였다 (acces-

sion number KJ469400). 또한 PYU의 생화학적 특성도 일반적으로 알려진 *S. marcescens*의 생화학적 특성과 비교하였을 때 [3,4], 매우 유사함을 확인하였다 (Table 1).

3.2. Determination of range of growth condition

PYU는 통성 혐기성으로, 호기적 조건에서 상대적으로 더 빠른 속도로 높은 농도까지 성장하는 것을 확인하였다 (data not shown). 이에 PYU의 생육 조건을 확인하는 실험은 호기적 조건에서 실시하였다. 실험 결과 PYU는 10~40°C (최적 온도 25~30°C), pH 4~9 (최적 pH 6~8), NaCl 농도 0~10% (최적 농도 2%)의 조건에서 성장하는 것이 확인되었다 (Fig. 2). 해양 세균은 압력, 온도, 염, 등의 다양한 스트레스 환경에 노출되며 [13], 본 연구의 PYU는 7월 연안에서 채취된 전복으로부터 분리된 균주로 PYU의 최적 성장조건은 일반적으로 알려진 여름철 표층해수의 온도, pH, 염도와 유사함을 확인하였다. 특히 PYU가 최대 10%의 NaCl이 포함된 배지에서도

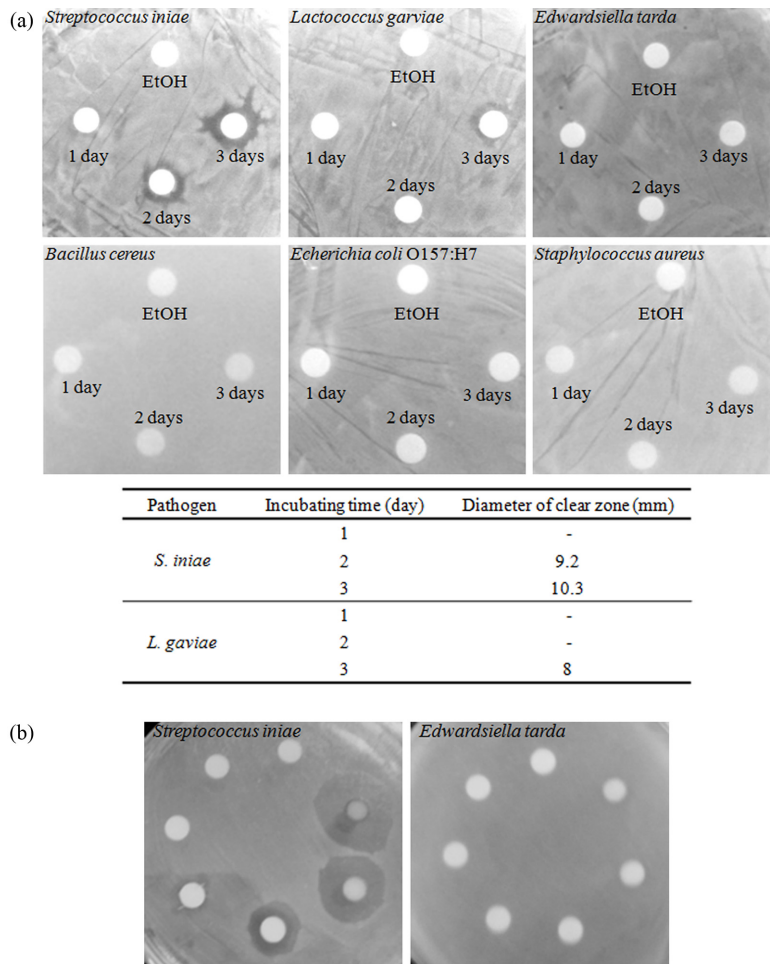


Fig. 3. Anti-bacterial activity of crude red pigment produced by *Serratia marcescens* PYU. (a) clear zone of crude red pigment by incubating duration of *Serratia marcescens* PYU against *S. iniae*, *L. garviae*, *E. tarda*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, and *S. aureus*; the paper disc at the top is 95% ethanol and 3 other paper discs are the crude red pigment incubated for each 1, 2, and 3 day, clockwise. (b) clear zone of crude red pigment by concentration against *S. iniae* and *E. tarda*; the paper disc at the top is 0 ppm and 6 other paper discs are each 1, 10, 100, 1000, 5000, and 10000 mg/L clockwise.

생장하며 최적의 배양을 위하여 배지 내 NaCl의 농도가 2%라는 특징은 대부분의 해양세균들이 상대적으로 높은 Na⁺ 농도인 바닷물의 영향으로 Na⁺를 필요로 한다는 사실 [13]에 부합한다.

3.3. 적색 색소의 항균작용

이전 연구에 따르면 [2], *S. marcescens*가 생산하는 적색 색소인 prodigiosin은 항균, 항진균, 면역 억제 등의 다양한 생리학적 특성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서는 총 8종의 병원균 중 어병세균인 *S. iniae*와 *L. garviae*만이 PYU가 생산하는 적색 색소에 의한 저해를 보였으며 (Fig. 3(a)), 배양한 시간이 길수록 저해 정도가 강해지는 것을 확인할 수 있는데, 이는 배양시간에서 따라 적색 색소의 생산이 증가하는 것과 같은 양상을 보였다. 또한 *S. iniae*와 *E. tarda*에 대한 적색 색소의 농도에 따른 저해 여부를 확인하는 실험에서 *E. tarda*는 저해를 보이지 않았으나 *S. iniae*는 100 mg/L의 농도부터 저해가 되는 것을 확인하였다(Fig. 3(b)). *S. iniae*와 *L. garviae*는 중증의 어병 세균으로 담수와 해양 환경에 서식하는 어류에 streptococcosis (lactococcosis 포함)를 유발한다 [14]. 중동 지역과 캐나다, 미국, 호주, 일본, 싱가포르 등 아시아-태평양 지역의 담수와 해양 환경에서 양식되는 어류 중 최소 27종에 대하여 streptococcosis에 의한 감염이 보고되었으며, streptococcosis 감염 시 3~7일 이내 50% 이상의 폐사율을 보여 심각한 경제적 손실을 야기한다 [15]. 국내에서도 *S. iniae*나 *L. garviae*에 의한 streptococcosis은 여름철 해수 온도가 16°C 이상이 되는 시기의 어류 양식에서 많이 발생하며, 높은 폐사율로 인하여 경제적 손실을 야기하는 것으로 조사되었다 [16,17]. 본 연구를 통해 새롭게 분리한 *S. marcescens* PYU 균주가 생산하는 적색 색소는 *S. iniae*와 *L. garviae*에 대한 항균 효과를 가지고 있으며, 이를 통하여 여름철 어류의 높은 폐사율을 야기하는 streptococcosis의 발생을 줄일 대안방안으로 적색 색소에 대한 다양한 적용 가능성을 확인할 수 있었다.

4. CONCLUSION

서해안에서 채취한 전복으로부터 *Serratia marcescens* PYU를 최초로 분리하였다. 균주 PYU는 그람 음성의 통성 혐기성 구균으로 적색 색소를 생산하며, 10~40°C, pH 4~9, NaCl 농도 0~10% 조건에서 생육이 가능하다. 균주 PYU가 생산하는 적색 색소를 에탄올로 추출하여, 여름철 양식어류의 높은 폐사율을 야기하는 어병 세균인 *S. iniae*와 *L. garviae*에 대한 항균효과를 확인하였다.

REFERENCES

1. Bhatnagar, I. and S. K. Kim (2010) Immense essence of excellence:

- Marine microbial bioactive compounds. *Mar. Drugs* 8: 2673-2701.
2. Soliev, A. B., K. Hosokawa, and K. Enomoto (2011) Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evid.-based Complement Altern. Med.* 2011: 17. doi:10.1155/2011/670349
 3. Mahlen, S. D. (2011) *Serratia* infections: From military experiments to current practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 24: 755-791.
 4. Grimont, F. and P. A. D. Grimont (2006) The genus *Serratia*. pp. 799-811. In: D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (eds.), *The Proteobacteria*. Springer, NY, US.
 5. Luna, M., S. García, O. García, and Á. Trigos (2013) Serratatin a new metabolite obtained from *Serratia marcescens*, a bacterium isolated from the microflora associated with banana plantations. *Nat. Prod. Res.* 27: 49-53.
 6. Khanafari, A., M. M. Assadi, and F. A. Fakhr (2006). Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *J. Biol. Sci.* 6: 1-13.
 7. Williams, R. P. and S. M. H. Qadri (1980) The pigment of *Serratia*. pp. 31-75. In: A. von Graevenitz, and S. J. Rubin (Eds.), *The genus Serratia*. CRC Press, Boca Raton, FL, US.
 8. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (1994) *Methods for general and Molecular Bacteriology*. pp. 31-32. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
 9. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
 10. Park, H., S. G. Lee, T. K. Kim, S. J. Han, and J. H. Yim (2012) Selection of extraction solvent and temperature effect on stability of the algicidal agent prodigiosin. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17: 1232-1237.
 11. Lee, H. K., J. Chun, E. Y. Moon, S. H. Ko, D. S. Lee, H. S. Lee, and K. S. Bae (2001) *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 661-666.
 12. Yi, H., Y. 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.
 13. Macleod, R. A. (1965) Question of existence of specific marine bacteria. *Bacteriol. Rev.* 29: 9-23.
 14. Vendrell, D., J. I. Balcazar, I. Ruiz-Zaruela, I. de Blas, O. Girones, and J. L. Muzquiz (2006) *Lactococcus garviae* in fish: A review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29:177-198.
 15. Agnew, W. and A. C. Barnes (2007) *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol.* 122: 1-15.
 16. Moon, J. S., H. Jang, J. Y. Kim, S. J. Joh, M. J. Kim, and S. W. Son (2007) Evaluation on efficacy of β -hemolytic *Streptococcus iniae* vaccine on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Vet. Sci.* 47: 291-298.
 17. Cho, M. Y., M. S. Kim, H. S. Choi, G. H. Park, J. W. Kim, M. S. Park, and M. A. Park (2008) A statistical study on infectious disease of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J. Fish Pathol.* 21: 271-278.