

碩士學位論文

Prodigiosin-like pigment를 생산하는
해양유래미생물 *Zooshikella* sp. JE-34의 분리
동정 및 이차대사산물의 생리활성 탐색



濟州大學校 大學院

水產生命醫學科

金 周 相

2008 年 2 月

Prodigiosin-like pigment를 생산하는
해양유래미생물 *Zooshikella* sp. JE-34의 분리
동정 및 이차대사산물의 생리활성 탐색

指導教授 許文洙

金周相

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2008 年 2 月

金周相의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長

이 제 희



委 員

허 문 수



委 員

전 유 진



濟州大學校 大學院

2008 年 2 月

Isolated and Identification of Prodigiosin-like Pigment
Produce Marine Bacteria *Zooshikella* sp. JE-34 and
Screening for Bioactive Substances from Bacterial
Secondary Metabolites

Ju-Sang Kim
(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Science

Department of Aquatic life medicine
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2008

목 차

목 차	I
Abstract	IV
List of Tables	VI
List of Figures	VII
I. 서 론	1
1. 해양유래천연물 탐색의 필요성	1
2. 천연색소 개발의 중요성	2
2-1. 미생물 유래 천연색소	2
2-2. Antibiotic Pigment Prodigiosin	4
II 재료 및 방법	6
1. 균주의 분리, 동정	6
1-1. 색소생산균주의 분리 및 보관	6
1-2. 분리균주의 동정	7
1) 형태학적 분석	7
2) 16S rRNA 염기서열 분석	7
3) 종속 계통적 분석	8
4) 생화학적 특성 분석	8
5) 세포 지방산 분석 (CFA)	8
1-3 색소물질의 분광학적 특성 및 동정	9
1) 색소물질의 추출	9
2) 색소물질의 물성특성	9
3) 색소추출액의 HPLC 분석조건	10

2. Prodigiosin-like pigment의 생산을 위한 배양조건 및 색소 안정성	10
2-1. Prodigiosin의 생성측정	10
2-2. 환경적 배양특성	11
2-3. 영양적 배양특성	12
2-4. 색소안정성	12
3. <i>Zooshikella</i> sp. JE-34가 생산하는 2차대사산물의 생리활성	13
3-1. 용매별 추출 및 분획물 제조	13
3-2. 이차대사산물의 라디칼 소거활성 측정	15
1) DPPH free radical scavenging activity	15
2) Hydroxyl radical scavenging activity	15
3) Alkyl radical scavenging activity	16
4) Hydrogen peroxide scavenging activity	16
3-3. 이차대사산물의 항균스펙트럼	17
III. 결과 및 고찰	19
1. 색소생산 균주의 분리 및 동정	19
1-1. 형태학적 특성	19
1-2. 16S rRNA 염기서열	23
1-3. 생화학적 분석	27
1-4. 색소물질의 분광학적 특성 및 동정	30
2. Prodigiosin-like pigment의 생산을 위한 배양조건 및 색소 안정성	33
2-1. 환경적 배양특성	33
1) 배양시간 및 배양온도에 따른 배양특성	33
2) pH의 영향	35
2-2. 영양적 배양특성	36
1) NaCl 농도의 영향	36
2) 탄소원의 영향	37
3) 질소원의 영향	38
4) 무기염류의 첨가 효과	39
5) 최적배양조건에 prodigiosin의 생산	42

2-3. <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 유래 적색색소의 색소안정성	44
1) pH의 영향	44
2) 광선 및 온도에 따른 영향	44
3. <i>Zooshikella</i> sp. JE-34가 생산하는 이차대사산물의 생리활성	47
3-1. 이차대사산물의 라디칼 소거활성	47
1) <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 supernatant의 라디칼 소거활성	48
2) 균체 및 배양액 추출 · 분획물의 DPPH radical 소거활성	50
3) 균체 및 배양액 추출 · 분획물의 Alkyl radical 소거활성	53
4) 균체 및 배양액 추출 · 분획물의 Hydroxyl radical 소거활성	56
5) 균체 및 배양액 추출 · 분획물의 Hydrogen peroxide 소거활성	59
3-2. 이차대사산물의 항균스펙트럼	61
1) <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 supernatant의 항균활성	62
2) 균체, 배양액의 추출물 및 분획물의 항균활성	66
3) <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 supernatant, 추출물 및 분획물의 최소억제농도	71
IV. 요약	74
V. 참고 문헌	76
감사의 글	86

Abstract

In last decades marine organisms caught great interest from pharmaceutical companies as sources for noble compounds. Despite its relatively short history, structures of over 5,500 novel secondary metabolites have been determined, of which ca 40 compounds revealed as agriculturally and pharmaceutically active compound.

A bacterial strain producing a high concentration of red pigment isolated from sediment that had been collected East China Sea, Which was recorded as JE-34. It was identified as *Zooshikella* sp. JE-34 as based on the biochemical properties, cellular fatty acids analysis and 16S rRNA gene sequence.

The strains were Gram-negative, chemo-organotrophic, aerobic and required NaCl (0.5-8 %) for growth. and major isoprenoid quinone was ubiquinone-9. The predominant cellular fatty acids were saturated and monounsaturated straight-chain fatty acids. The pigment showed characteristics similar to prodigiosin, as it is insoluble in water and has a red colour with a metallic green sheen. Prodigiosin has been reported to be deposited in the cell envelope and not released into the medium; in addition, in its amorphous state it has an appearance of red platelets with a green metallic sheen, and a maximum absorption of 535-540 nm. To date, prodigiosin and its analogues which have been shown to have anticancer, cytotoxic and immunosuppressive activities have been isolated from *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* species, and chemically synthesized. Nutritional and cultural conditions for the production of prodigiosin-like pigment by this organism under shake-flask conditions have optimized. Similarity initial medium pH 6.0, incubation time 4 days were found to be optimal. The optimal conditions for the production of prodigiosin-like

pigment for carbon, organic and inorganic nitrogen sources were soluble starch and malt extract.

The radical scavenging activities of the extracts from *Zooshikella* sp. JE-34 cell (ZC) and culture broth(ZB) according to extraction solvents and fractions on hydroxyl, alkyl and DPPH radical were investigated using a ESR spectrophotometer and compared with the ESR signal intensity. The extracts exhibited strong scavenging activity on hydroxyl, alkyl and DPPH radical, and the activity increased with increment of concentration of the extracts. The electron donating abilities (EDAs) of ZC acetone extract (ZCAE) and ZC ether soluble fraction (ZCfr.E) were 95.74% and 94.51% at 0.5mg/ml respectively. The hydroxyl radical scavenging ability of the ZC hot water extract (ZC70E) was highest (59.08% at 1mg/ml), and alkyl radical scavenging ability was highest in the ZC water extract (84.05% at 1mg/ml). From these results, ZC extracts and fractions had strong antioxidant activities.

This study was investigated the antimicrobial activity of the culture broth(ZB), and bacterial cell(ZC). ZC and ZB extracts according to extraction solvents and fractions. The antimicrobial activities of ZC and ZB extracts was tested against 18 microorganisms which were fish and human pathogens bacterial species. The extracts showed high activity against *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans* and had poor effect on *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*. Among the various solvent layers, the ZC methanol extraction (ZCME) and ZC diethyl ether soluble fraction (ZCfr.E) showed strong antimicrobial activities.

List of Tables

Table. 1.	List of strains and growth conditions used for antibacterial experiments.....	18
Table. 2.	Major characteristics that differentiate strain JE-34 from <i>Zooshikella ganghwensis</i> KCTC 12044, 12045 (Yi, 2003).....	28
Table. 3.	Physiological and biochemical features of strain JE-34 and KCTC 12044, 12045.....	29
Table. 4.	Cellular fatty acid composition (%) of strain JE-34 and KCTC 12044, 12045.....	29
Table. 5.	Effect of carbon, nitrogen, and mineral sources on the growth and producing prodigiosin pigment.....	40
Table. 6.	Antimicrobial activities of the supernatant of <i>Zooshikella</i> sp. JE-34.....	63
Table. 7.	Antibiotics resistance of human, fishes disease bacteria.....	64
Table. 8.	Inhibitory effect of strain JE-34 cell extracts(1mg) against the growth of various pathogenic bacteria.....	67
Table. 9.	Inhibitory effect of strain JE-34 cell fractions(100 μ g) against the growth of various pathogenic bacteria.....	68
Table. 10.	Minimal inhibitory concentration of <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 supernatant, methanol extract (ZCME) and diethyl ether fraction (ZCfrE) against various pathogenic bacteria.....	73

List of Figures

- Fig. 1. Structures of some members of the prodiginines and key prodigiosin biosynthesis intermediates.....4
- Fig. 2. Location in East China Sea for the collection of sediment.....6
- Fig. 3. Fractionation of bacterial cell and cultured broth of *Zooshikella* sp. JE-34.....14
- Fig. 4. Cultural characterization of Strain JE-34, and *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12044, 12045.....21
- Fig. 5. Scanning electron micrograph of Strain JE-34 (A, B, C) and, *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12044 (D).....22
- Fig. 6. Alignment of 16S rRNA sequence of the isolated Strain JE-34.24
- Fig. 7. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain JE-34 and member of the γ -*Proteobacteria*. Numbers at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1,000 resampled datasets.....26
- Fig. 8. The absorption spectra of prodigiosin-like pigments isolated from *Zooshikella* sp. JE-34 and *Serratia marcescens*.....31
- Fig. 9. HPLC profile of prodigiosin-like pigment from *Zooshikella* sp. JE-34 (A), *Serratia marcescens* (B).....31
- Fig. 10. The CIE chromaticity diagram showing the spectrum locus/red and the position of important illuminant.....32
- Fig. 11. Comparison of growth and prodigiosin pigment produce of *Zooshikella* sp. JE-34 in temperature.34

Fig. 12. Effect of pH on the producing prodigiosin pigment by <i>Zooshikella</i> sp. JE-34.....	35
Fig. 13. Effect of NaCl concentration on the producing prodigiosin pigment by <i>Zooshikella</i> sp. JE-34.....	36
Fig. 14. Effect of starch concentrations(A), malt extract concentrations(B), and Na ₂ HPO ₄ concentrations(C) on the growth and producing prodigiosin pigment.....	41
Fig. 15. Prodigiosin pigment from <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 during the shaking culture under optimal growth condition.....	43
Fig. 16. The absorption spectra of red pigment as function of pH from <i>Zooshikella</i> sp. JE-34.....	45
Fig. 17. Prodigiosin-like pigment from marine microorganism under pH conditions.....	45
Fig. 18. Effect of light on stability of <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 red pigment during storage at 25°C.....	46
Fig. 19. Effect of temperature on stability of <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 red pigment during storage in the dark.....	46
Fig. 20. Effect of temperature on the absorbance of <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 red pigment.....	46
Fig. 21. DPPH, alkyl, hydroxyl radical scavenging activities of culture supernatant of <i>Zooshikella</i> sp. JE-34.....	49
Fig. 22. Comparison of EDA (%) of <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 culture supernatant in other temperature conditions.....	49
Fig. 23. ESR spectrum obtained in an ethanol solution of 60 µmol/l DPPH at various concentrations of 25°C distilled water extracts from <i>Zooshikella</i> sp. JE-34.....	51

Fig. 24.	DPPH radical scavenging activity of the bacterial cell extracts and fractions from <i>Zooshikella</i> sp. CH-34.....	52
Fig. 25.	DPPH radical scavenging activity of the culture broth extracts and fractions from <i>Zooshikella</i> sp. CH-34.....	52
Fig. 26.	ESR spectrum observed during incubation of AAPH with 4-POBN at various concentrations of 25°C distilled water extracts from <i>Zooshikella</i> sp. JE-34.....	54
Fig. 27.	Alkyl radical scavenging activity of the bacterial cell extracts and fractions from <i>Zooshikella</i> sp. CH-34.....	55
Fig. 28.	Alkyl radical scavenging activity of the culture broth extracts and fractions from <i>Zooshikella</i> sp. CH-34.....	55
Fig. 29.	Hydroxyl radical scavenging activity of the bacterial cell extracts and fractions from <i>Zooshikella</i> sp. CH-34.....	57
Fig. 30.	Hydroxyl radical scavenging activity of the culture broth extracts and fractions from <i>Zooshikella</i> sp. CH-34.....	57
Fig. 31.	ESR spectrum obtained in Fenton reaction system at various concentrations of 25°C distilled water extracts from <i>Zooshikella</i> sp. JE-34.....	58
Fig. 32.	Hydrogen peroxide scavenging activity of the bacterial cell extracts and fractions from <i>Zooshikella</i> sp. CH-34.....	60
Fig. 33.	Hydrogen peroxide scavenging activity of the culture broth extracts and fractions from <i>Zooshikella</i> sp. CH-34.....	60
Fig. 34.	Antibacterial activity of the supernatant of <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 against various pathogenic Bacteria.....	65
Fig. 35.	Inhibitory effect of strain JE-34 cell methanol extract (A), chloroform extract (B), Diethyl ether fraction (C) against the growth of various pathogenic bacteria.....	69
Fig. 36.	Antibacterial activity of the extracts and fraction of <i>Zooshikella</i> sp. JE-34 against various pathogenic bacteria.....	70

I. 서론

1. 해양유래천연물 탐색의 필요성

지구상에 존재하는 생물들은 각각 적자생존의 경쟁 속에 살아남기 위하여 체내의 생화학적 반응의 결과 생성된 다양한 대사물질을 수없이 생산하고 있다. 인간은 이러한 대사물질들을 풍요로운 삶을 영위하기 위하여 이러한 천연물에 관련하여 고대에서부터 지금까지 꾸준히 연구하여 왔다.

현재 천연물 관련 연구는 화학분야와 생명공학에 중요한 부분을 차지하고 있으며 제약, 생물산업 등 고부가가치를 창출하는데 있어 필수적이라 할 수 있는 분야이며 이에 따른 경제적 파급효과 또한 매우 크다.

지금까지 천연물로부터 생리활성을 가진 천연물질의 연구는 주로 육상자원을 대상으로 하여 왔지만 다년간의 연구를 통하여 새로운 원천이 고갈되는 양상을 보여 경제성이 떨어지고 있는 추세이다. 이에 선진국들은 해양생물 유래 천연물에 집중적인 연구를 하고 있으며 그 결과 현재까지 해양생물에서 약 5500여종의 신물질이 개발되었다. 이들은 의약품, 건강보조제, 화장품등으로 경쟁적으로 개발되고 있으며 의약품 용도로 약 40여 물질이 특허를 내었으며 그 중 5종이 상품으로 개발 중이다(Faulkner, 1993). 해양생물 중 해양미생물은 거대해양생물에 비해 실험실내에 보전이 수월하고 분리된 균주의 대량배양이 가능하다는 장점이 있다. 또한 해양은 지구면적의 70%를 차지하고 있을 뿐 아니라 조간대에서 심해저까지 열대에서 극한지 까지 다양한 물리적 환경조건을 가지고 있으며, 육상과 다른 환경조건인 고염, 저온, Mg, K, Fe 등의 무기물이 풍부한 환경이며 물을 매질로 하는 환경이기에 육상생물과는 전혀 다른 생리적 대사과정, 적응기작 등의 특이성을 통해 유용한 천연물의 생산에 있어 유리하다 할 수 있다. 또한 이들도 육상 미생물과 마찬가지로 상호간에 격심한 생존경쟁을 하며 그 수단으로 생리활성 물질을 생산하는 것이 알려져 있으며(Fenical, 1993; Kobayashi 1993) 이들 중 다수는 고유한 해양 미생물(obligate marine microorganism)로서 오랜

기간 천연물 연구의 대상이 되어왔던 육상미생물과는 다른 종들로서 생리활성효과를 가진 신물질을 생산할 가능성이 매우 높으며(Fisher, 1983; Bonar, 1986; Okami, 1982; 1986), 해양환경에 능동적으로 적응한 육상 미생물(facultative marine microorganisms)도 다수 서식하고 있다. 이들의 천연물의 생성은 species-specific한 것이 아니라 strains-specific하며 동일 strain이라도 서식조건에 따라 다른 천연물을 합성하는 예가 많으므로 연구가치가 크다 하겠다(Stierle, 1992; Pathirana, 1992; Tapiolas, 1991; Nakamura, 1977; Sato, 1978). 특히 본 논문의 실험균주의 분리지인 동중국해의 경우 대륙붕은 천해대의 특성상 암반으로 되어있는 경우가 많지 않고 유동상태나 해중기후 등의 차이 때문에 생물상의 변화가 나타나므로 특이한 대사과정을 가지는 균주의 탐색이 가능할 것이라 보이며 비교적 샘플링등이 쉬워 접근성이 용이한 조건대에 비해 접근성이 용이하지 않기 때문에 연구가 미비한 특이성 있는 생물종의 탐색이 기대되는 지역이라 할 수 있다.

현재의 외국의 경쟁적으로 활발히 이루어지는 해양 천연물 연구 개발과는 대조적으로 3면이 바다인 유리한 환경에도 불구하고 국내의 연구는 미비한 실정이다. 현 상황이 지속될 경우 자본과 기술력, 그리고 자원의 증속 등 국가적으로 이 분야에 있어서 낙후 될 것으로 우려되며 이러한 상황을 타개하기 위하여 해양생물 자원의 탐색이 필수적이라고 할 수 있다.

2. 천연색소 개발의 중요성

2-1. 미생물 유래 천연색소

인류가 사용해 왔던 천연물질 중 밀접히 인류의 삶에 관여했던 물질을 꼽으라면 색소를 떠올릴 수 있을 것이다. 인류는 오래 전부터 자연물에서 추출한 천연 염료를 사용하면서 염료를 발달시켰다. 신석기시대 이후, 의복의 착색에 광물이 사용되었고, 5,000~6,000만년전에는 식물의 화분, 과일, 잎, 줄기 등의 즙이 사용되었던 것으로 추정된다. 우리나라의 경우 상고시대부터 식물로부터 사용해 왔으며 전 세계적으로 수천 종에 이르고 있다.

색소는 크게 천연색소와 합성색소가 있으며 합성색소의 생산의 용이성, 착색률,

생산단가 등의 장점들에 의해 광범위하게 사용되어 왔으나 발암성과 인체에 대한 유해성이 제기됨에 따라 그 사용이 엄격히 규제되고 있다. 최근 소비자들의 색소의 안전성에 대한 인식변화와 향상성유지, 생리조절기능이 중요시 되는 풍토가 합성색소를 대체할 천연색소의 수요를 급격히 증가시키게 되었다. 또한 많은 천연색소는 살균, 항염, 항산화 등 생리활성이 있으며 안전하여 화장품 및 기능성 식품, 의약품, 가축 및 양식어류의 사료첨가제 등의 잠재적 수요가 있다 (Francis, 1987; Lauro, 1991). 따라서 천연색소 시장이 크게 신장될 것으로 예상되고 있으나 기술 집약적인 산물이므로 현재도 선진국에서 주로 생산되고 있다. 천연색소의 세계적 시장은 대략 2억불에 달하며 일본의 경우 200억엔의 수요가 있었고 증대되는 추세이다. 천연색소의 연구는 유럽, 일본 등에서 다양하게 연구되었고 flavonoids, carotenoids, chlorophylls, anthocyanin, shikonin, carthamin, betacyanin 등이 연구되었다(Kim, 1988).

천연색소는 오랜 기간 동안 사용되어 왔음에도 불구하고 합성색소와 같이 산업적으로 요구하는 일정한 품질로 다량 공급할 수 있는 천연색소의 종류는 많지 않다. 지금까지 천연색소는 대부분 동물이나 식물에서 직접 추출하여 사용되어 가격이 비싸고 생육조건 및 자연환경에 따라 품질의 변화가 심한 단점을 지니고 있다(Fowler, 1983; Hannagata, 1992). 이에 비하여 미생물에 의해 생산되는 천연색소의 장점은 배양시간이 짧으며, 다른 천연색소보다 통일된 조건설정이 가능하여 균질성 높은 생산물을 얻을 수 있다는 점이다. 그리고 배지조성이 간단하여 배양에 따른 비용도 절감할 수 있다는 장점이 있다(Han, 1992; Natarajan, 1995; Yang, 1995; Yongsmith, 1994). 이들의 이용에 대하여 *Monascus*속을 이용한 색소에 관한 연구(Lee, 2003; Lee, 2002)를 비롯하여 *Rhodotorula*속의 carotenoid 생성에 관한 연구(Nam, 1991; Matelli, 1990; Costa, 1978) 그리고 *Claviceps*속의 적갈색 색소에 관한 연구(Cho, 1982) 등이 수행되었으며 특히 해양미생물의 경우 관련연구가 미비하며 무기질이 풍부한 환경에서 서식한 특성 때문에 생리활성이 있는 specific한 색소의 생산이 기대된다. 하지만 미생물유래 색소의 실제적인 이용에 접근한 경우는 극히 미미한 실정이며 이에 따라 천연색소의 단점인 낮은 생산성, 환경적 요인에 따른 안정성 등을 평가하여 산업적인 활용방안으로의 접근하고자 하였다.

2-2. Antibiotic Pigment Prodigiosin

색소를 생산하는 것으로 알려진 많은 미생물 중에서 *Serratia* 속은 적색의 Prodigiosin계열의 색소를 생산하는 것으로 많은 연구가 진행되어졌다(Castro, 1959; Deol, 1974; Lim, 1977; Natarajan, 1995; Yang, 1995). Prodigiosin (2-methyl-3-amyl-6-methoxyprodigosene)은 기본골격인 Prodigiosene에 각기 다른 alkyl 치환기를 가지는 그룹인 Prodiginines (6-methoxyprodigosenes)에 속한다. 이는 *Serratia marcescens*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*등에서 생산되는 특징적인 붉은 색소이며 비극성의 탄소수가 20개인 tripyrrole 구조로 Kraft가 *Bacillus prodigiosus*에서 처음으로 분리하였다(Kalesperis, 1975).

이는 균의 성장과정 중 대수증식기에는 생성되지 않으나 정체기 즉 비증식세포에서 생산되는 특징적인 이차대사산물이며 환경적 요인, 배지조성, 온도, pH등의 요인에 영향을 받는다(Williams, 1971; Williams and Quadri, 1980; Sole, 1994; Slater, 2003). Prodigiosin의 생합성 과정은 Fig. 1으로 나타내었으며 일련의 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 형성한다(Qadri, 1974).

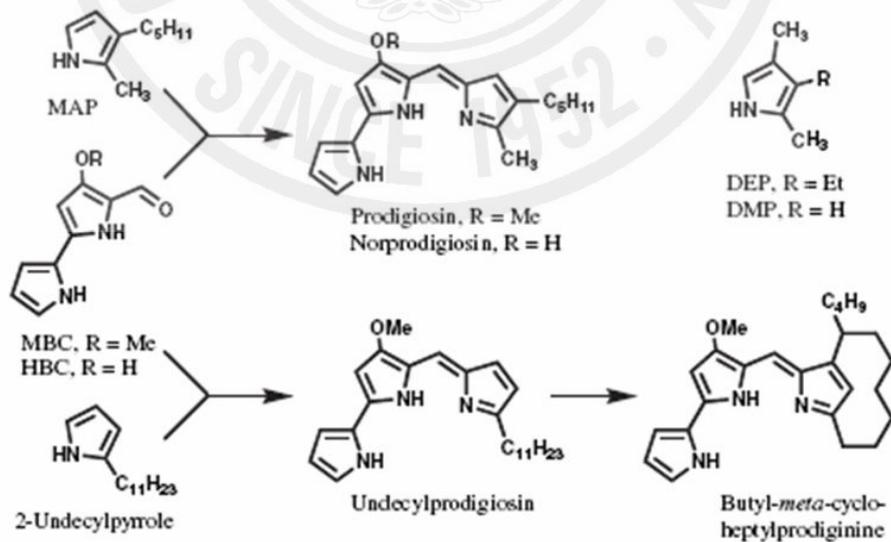


Fig. 1. Structures of some members of the prodiginines and key prodigiosin biosynthesis intermediates.

Prodigiosin은 잠재적인 의약제로서의 가능성을 가지고 있어 anti-fungal, anti-bacterial, anti-protozoal, anti-malarial, immunosuppressive and anti-cancer activities에 관련한 연구가 활발히 진행되었다(Williams and Quadri, 1980; Tsuji, 1990; 1992; Demain, 1995; Mortellaro, 1999; D'Alessio, 2000; Montaner, 2000). 이에 따라 색소생산과 연관된 미생물의 대사작용 혹은 Prodigiosin 유사체들의 생합성 경로(Lim, 1977; Natarajan, 1995; Qadi, 1973; Scott, 1976; Williams, 1971). 및 구조분석(Custro, 1959; Deol, 1974)등의 활발히 연구되었다. 국내에서도 *Serratia* sp. KH-95가 생산하는 prodigiosin의 구조분석, 분리정제, 배양특성의 연구가 수행된바 있으며 (Choi, 1997; Kim, 1998; Song, 2005) *Hahella chejuensis*에서 생성되는 prodigiosin의 경우 구조분석, 생합성과정의 연구뿐만 아니라 발현 유전자 분석, 면역억제제로서의 활성, 적조방제 활성등의 연구를 통해 그 잠재적인 유용 천연물로서 가능성을 제시했다(Kim, 2006; Huh, 2007). 또한 prodigiosin이 항진균과 관련하여 Chitin synthase II의 저해자로서 작용한다는 연구된 바 있다(Hwang, 1999).

이러한 활발한 연구에도 불구하고 공업화에 대한 연구가 미비한데 그 주된 이유는 Prodigiosin의 대표적인 생산자인 *Serratia*속의 경우 색소 생산량이 10-100mg으로 매우 낮기 때문이다(Natarajan, 1995; Williams, 1980). 이에 따라 prodigiosin을 다량 생산하는 균주를 개발 및 분리하거나 변이주등의 개발, 배양조건 탐색 등을 연구한다면 산업화로서의 가능성을 높일 수 있다고 사료된다.

본 논문은 동중국해의 퇴적층에서 분리한 균주 중 prodigiosin 유사 색소를 생산하는 균주를 분리하였고 이를 동정한 결과 *Zooshikella ganghwensis* 매우 유사하였으나 형태학적 특성, 생화학특성에서 다른 성상을 보여 *Zooshikella* sp. JE-34라고 명명하고 그 배양특성을 탐색하였다. 또한 이 Strain의 주요 대사산물인 색소물질의 물성특성, 안정성을 연구하였으며 분리균주의 이차대사산물의 생리활성을 탐색하기 위해 항균, 항산화 활성 측정을 통해 유용생물자원으로서의 잠재성을 알아보하고자 하였다.

II 재료 및 방법

1. 균주의 분리, 동정

1-1. 색소생산균주의 분리 및 보관

색소생산균주의 분리는 2005년 9월 동중국해에서 그랩을 이용하여 퇴적층의 세립질을 채취하였으며 실험균주인 JE-34는 Fig. 2의 정점에서 분리하였다. 채집된 퇴적물은 실험 전까지 멸균된 용기에 담아 4°C에서 보관하였고 채집된 퇴적물은 약 1g을 멸균된 PBS에 단계희석법을 통하여 희석한 후 각 희석단을 MA(Marine Agar, Difco. Co. USA)에 100 μ l 접종, 도말 후 25°C에서 1~7일간 배양하였다. 분리균주 중에 적색색소를 다량 생산하는 균주를 JE-34라고 명명하여 이를 실험에 사용하였으며 배양기간 동안 배양상태 균주의 보관은 멸균 glycerol을 활성화된 배양액에 1:4 v/v가 되도록 혼합하여 -70°C에서 보관하였다.



Fig. 2. Location in East China Sea for the collection of sediment

1-2. 분리균주의 동정

분리 선발한 균의 1차 동정은 형태학적, 배양학적 및 생화학 특성을 Manual of methods for general bacteriology(Gerhardt, 1981)와 Biochemical tests for identification of medical bacteria(Macfaddin, 1880)에 준하여 검토하고, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Kreig and Holt, 1989)에 의하여 제안된 방법에 의해 분석하였다. 수행한 분석결과를 BLAST의 Database와 비교하여 동정하였다.

1) 형태학적 분석

SEM(Scanning Electron Microphotography, JSM-6700F JEOL Ltd.)를 통해 형태학적 특성을 관찰하고자 했고 0.2 μ m filter를 멸균 후 배지에 올려 그 위에 균을 접종하였다. 균이 성장하면 filter를 차가운 2.4% glutaraldehyde에 담구어 고정시킨 후, 0.1 M phosphate buffer로 2회 이상 세척한다. 이를 ethylalcohol 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%로 각각 1hr 동안 탈수시킨다. 탈수시킨 filter를 isoamyl acetate에 담근 후, 액체 CO₂로 isoamyl acetate를 날리고, 금박을 입혀 전자현미경으로 관찰, 이미지화 시켰다.

2) 16S rRNA 염기서열 분석

16s rRNA 분석은 Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 Chromosomal DNA를 분리하였으며 Bacterial 16S rDNA universal primer를 이용하여 16s rDNA를 증폭시켰다. 합성된 oligonucleotides의 각각의 primer는 forward primer (27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' reverse primer (1492R): 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었다. 각각의 0.5 μ M primer, 200 μ M deoxynucleoside triphosphate, Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea) 3 μ l를 사용하여 PCR를 수행하였다. PCR 반응조건은 30cycle 동안 94 $^{\circ}$ C에서 45초 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 45초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 extention 하였으며 증폭된 PCR product는 1% agarose(Agarose LE, Promega CO.) gel을 0.5 μ g/ml ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 이를 ABI prismTM BigdyeTM terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer 를 사용하여 PCR product의 염기서열 분석을 수행하였다.

3) 종속 계통적 분석

분리균주의 16S rDNA 염기서열과 함께 BLAST 분석결과 염기서열과의 유사성이 높았던 *Zooshikella ganghwensis* 2 strain과 *Gammaproteobacteria* 와 Outgroup등의 분류군의 16S rDNA 유전자 염기서열과 함께 ClustalW software를 사용하여 배열하였다. 계통도는 distant에 근간을 둔 neighbor-joining 방법을 이용하여 계통수 및 유전적인 다형성을 조사하였다.

4) 생화학적 특성 분석

그람 염색법으로 JE-34의 세포벽 특성을 조사하였다. MA(Marine Agar, Difco. Co. USA)에 하루정도 배양하여 배지표면에 형성된 단일 colony를 멸균증류수에 한 방울로 현탁한 후 그람염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 동균에 대한 표준균주로는 그람 음성의 *E. coli*를 이용하였고, Safranin에 역염색 되는 경우 그람음성으로 그렇지 않으면 그람양성으로 판단하였다.

생화학적인 동정은 장내세균군인 Enterobacteriaceae에 속하지 않는 gram negative rods를 동정하는데 이용되는 전통적인 8가지 방법과 12개 종류의 탄수화물 동화시험법 등 모두 20가지 시험으로 구성되어있는 API 20NE (Bio Merieux SA, France)와 효소 활성을 통해 균을 동정하는 API ZYM을 통해 (Bio Merieux SA, France)를 사용하여 분석했다. 실험 균주는 일반적인 균주와 달리 JE-34는 해양성균주로서 일반배지에는 생육이 현저히 떨어지므로 전배양액을 Kit의 strip에 접종하기 전에 AUX medium에 Sea salt(sigma, USA)를 20%을 가하고 Bacterial suspension을 접종하여 사용했다.

5) 세포 지방산 분석 (CFA)

대부분의 지질성분은 고등생물의 경우에는 조성이 단순하고, 광범위하게 동일한 성분을 갖기 때문에 분류지표로 활용하기 어렵지만, 세균의 경우에는 다양성이 풍부하여 매우 유효한 지표로 이용되고 있다. 균주의 세포 지방산 분석을 위해 30°C 48시간 배양한 균체의 지방산을 Miller and Berger의 방법(1985)에 준하여 Methyl ester화 시켰다. 요약하면 1ml의 알칼리 감화액을 첨가한 후 100°C에서 30분간 반응시켜 saponified시킨다. 이를 냉각시키고 methylation reagent 2ml을

첨가하여 80℃에서 10분간 반응시킨 후 수층을 조심스럽게 제거하고 지질층에 추출용 용매 1.25ml을 첨가하여 10분간 천천히 저어 섞는다. 하층부의 물은 피펫으로 제거하고 남은 용매층에 세정액 약 3ml을 넣어 5분간 교반하여 이렇게 만들어진 용매층의 2/3을 덜어내어 gas chromatograph(GC)용 시료로 한다.

전처리된 Fatty acid methyl esters (FAME) mixtures를 gas chromatograph (Hewlett Packed model 5898A GC)로 Microbial Identification software (MIDI)의 지침에 따라 분석하였다.

1-3 색소물질의 분광학적 특성 및 동정

1) 색소물질의 추출

JE-34를 MB(marine broth, Difco. Co. USA.)에 50ml에 30℃ 24시간 전배양한 후 이를 200ml MB에 접종하고 30℃, 72시간동안 배양한다. 얻어진 배양액은 10,000g에서 20분간 원심분리 하여 상층액은 동량의 ethyl acetate를 가하여 추출하고, 균체의 경우는 20ml의 100% acetone을 가하여 색소를 추출한다.

균체추출물은 10,000g에서 20분간 원심분리 하여 탈색된 균체를 제거하고 상층액의 ethyl acetate 추출물과 혼합한다. 이를 sodium sulfate를 가하여 탈수시킨 후 회전감압농축기를 통해 농축하여 50% methanol으로 1mg/ml의 농도로 용해시켰다(Kim, 2007). HPLC를 이용하여 색소물질을 동정하기 위해 일반적으로 Prodigiosin을 생합성한다고 알려진 *Serratia marcescens* (KCCM 21204) 위와 동일한 방법으로 추출하여 분석에 사용했다.

2) 색소물질의 물성특성

색소의 추출액은 관찰하는 사람과 환경에 따라 서로 다르게 표현할 수 있기 때문에 색체의 정확한 측정 전달 및 재현을 위하여 과학적인 표색방법이 요구되어 추출한 색소의 색을 보다 객관적이고 측정 가능한 값으로 다루기 위해 색차계 (JP 7100F, Color Techno System Japan)를 이용하여 분석했다. C. I. E diagram은 색을 표현하는데 있어 색차계에서 얻어진 색의 정보는 X, Y, Z로 나

타내며 이는 다음의 공식에 의하여 계산했다. 이때 표준백색판의 X, Y, Z 값은 각각 90.65, 95.66, 103.24였다.

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

추출 색소의 광학특성을 알기위해 가시광선 영역의 spectrum을 측정을 통해 색소 추출물을 UV-visible spectrophotometer 를 사용하여 400~700nm 영역을 scanning하여 그들의 흡수과장(λ_{max})을 측정한다. 이에 스펙트럼의 흡수대를 통하여 간접적으로 색소 추출물의 광학특성 및 물질을 추측할 수 있다.

3) 색소추출액의 HPLC 분석조건

분석에 사용된 HPLC(Waters Co. USA.)는 Waters 2690을 사용하고 JE-34의 색소 추출액과 *Serratia marcescens*의 색소추출액을 HPLC에서의 시료용액으로 사용하였다. 분석에 사용된 column은 XTerra MS C₁₈(5 μ m 2.1mm×150mm, Waters, USA.)을 사용하였으며, 이동상의 유속은 0.3ml/min으로 하고 100% methanol과 distilled water를 이용하여 농도구배법(10~100% methanol 60min)의 분석조건으로 하여 두 sample의 peak를 비교분석하였다.

2. Prodigiosin-like pigment의 생산을 위한 배양조건 및 색소 안정성

각종 배지의 조성, 온도, pH 및 무기물 등의 배양조건은 2차대사 산물의 생성을 억제시키는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 prodigiosin의 경우 성장배지의 탄소와 질소의 비율에 따라 항박테리아 활성을 가진다고 보고된 바 있다(Alonzo, 1979). 또한 *S. marcescens*의 경우 Glucose, ATP, 무기인산, NaCl, pH등의 요인에 의해 prodigiosin의 생합성에 영향을 받는다고 알려져 본 실험에 사용된 *Zooshikella* sp. JE-34의 경우 또한 환경적요인, 배지조성에 따른 배양특성의 연구가 필요하다고 사료된다.

천연색소는 특유의 아름다운 색을 가지고 있으나 이들은 열, pH, 자외선, 산소 등에 약하여 식품의 가공 등에 의해 쉽게 탈색되어 합성색소를 부득이하게 사용하고 있다. 하지만 합성색소의 유해성 때문에 이를 대신하기 위한 노력은 계속되고 있으며 이에 따라 천연색소의 안정성에 대한 연구 또한 필수적이라고 하겠다.

2-1. Prodigiosin의 생성측정

Prodigiosin의 생성은 Goldschmidt와 Williams의 방법(Qadri, and Williams, 1973)을 이용하여 측정하였다. 1ml의 배양액에 2ml의 아세톤과 2ml의 산성메탄(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 정의 하였으며 protein 정량은 bovine serum albumin(BSA)를 표준단백질로 이용하여 Bradford의 방법(Bradford, 1976)을 사용하여 정량하였다.

2-2. 환경적 배양특성

배양시간 및 배양온도에 따른 prodigiosin-like pigment 생성균주인 JE-34의 배양, 색소생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 액체배지에 전배양액을 1%(v/v)로 접종하여 4, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50℃에 각각 배양하였으며, 초기 pH의 영향을 알아보기 위해 1N-HCl 혹은 3N-NaOH를 가하여 각각 pH 3~12로 조정 한 배지에 동일비율로 접종하여 균의 성장률과 prodigiosin 합성량을 측정한다.

2-3. 영양적 배양특성

배지조성에 의한 균의 생육도와 prodigiosin 합성량을 측정하기 위해 기본배지인 MB(marine broth, Difco. Co. USA)에 NaCl를 0~10%까지 첨가하여 배양하고, 탄소원(chitosan, soluble starch, fructose, glucose, lactose, mannitol, sorbitol, sucrose, xylose)를 각각 1%첨가하여 성장도 및 색소생산성을 관찰하였다. 질소원은 malt extract, peptone, yeast extract, NH_4NO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 들을 각각 0.5%첨가하고, 무기염류의 경우 BaCl_2 , CaCl_2 , CuSO_4 , FeCl_2 , HgCl_2 , KCl , MgCl_2 , NiCl_2 , Na_2HPO_4 , ZnCl_2 를 각각 0.1%첨가한 실험구에 동일조건으로 접종하여 관찰하였다. 염분농도의 경우 0~10%까지 실험하였다.

2-4. 색소안정성

JE-34가 생산하는 prodigiosin-like pigment의 색소 안정성을 보기위해 광선, pH, 온도에 따른 색소안정성을 측정하였다.

색소에 미치는 광선의 영향을 알아보기 위해 색소용액을 25℃의 암소와 백열등(110V, 30W)의 조건하에서 색소용액을 밀봉하여 6일 동안 535nm에서 흡광도를 측정하였다. 색소의 pH에 의한 영향을 검토하기 위해 색소용액에 동량의 각 pH별 완충용액(pH 1.0~2.0 : Clack-Lubs buffer, pH 3.0~8.0 : McIlvaine buffer, pH 9.0~12.0 : Sørensen buffer)를 가하여 25℃에서 3시간 방치 후 그들의 흡광도를 측정하였다.

가열온도에 따른 색소 안정성을 비교하고자 암소조건에서 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 121℃의 온도조건으로 1시간 정치한 후 측정하였으며 저장온도에 따른 안정성을 측정하기 위해 4, 25, 37℃의 암소조건으로 저장하여 6일간 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. *Zooshikella* sp. JE-34가 생산하는 2차대사산물의 생리활성

지금까지 *Zooshikella* sp. JE-34의 특성 및 주요대사산물인 prodigiosin의 생산성, 안정성등의 기본적인 연구를 하였고 본 장에서는 JE-34균주가 생산하는 이차대사산물의 이용가능성을 탐색하고자 하여 항산화 활성 및 항균활성을 측정하였다. 본 균주의 주요 대사산물인 prodigiosin은 앞서 말한바와 같이 anti-fungal, anti-bacterial, anti-protozoal, anti-malarial, immunosuppressive and anti-cancer activities에 관련한 연구(Williams and Quadri, 1980; Tsuji, 1990; 1992; Demain, 1995; Mortellaro, 1999; D'Alessio, 2000; Montaner, 2000)가 활발히 진행된 바 있어 그 생리적인 활성에 잠재성이 있으며 strain-specific한 물질로서의 가능성이 충분하다고 사료된다. 또한 JE-34가 생산하는 prodigiosin뿐만 아니라 EPS(exopolysaccharide), 유기산, 아미노산, 효소 등의 생리활성 물질을 탐색하는 것 또한 의의가 있다고 생각된다. 이에 따라 배양액, 용매별 추출물, 분획물에 대한 DPPH radical 소거능, Alkyl radical 소거능, Hydroxyl radical 소거능, Hydrogen peroxide 소거능의 항산화 활성과 천연 항생제로서의 가능성을 확인하기 위해 인체 혹은 어류질병 병원균에 대한 항균 활성을 측정을 하였다.

3-1. 용매별 추출 및 분획물 제조

Zooshikella sp. JE-34를 MB(marine broth, Difco. Co. USA.)에 접종하여 shaking incubator에서 30°C에서 120rpm 조건으로 전배양하고 1%(v/v) 비율로 접종하여 3L fermentor에 동일조건으로 120시간 배양하였다.

배양액은 균체와 배양액을 분리하기 위해 원심분리(8,000rpm, 15min, 4°C)한 후 균체는 증류수로 2회 씻어 낸 후 동결건조기를 이용하여 건조하고 배양액의 경우도 동결건조기를 이용하여 분말로 만들어 사용한다. 추출용매는 chloroform, 70% methanol, acetone, 25°C distilled water, 70°C distilled water를 사용하였고 각각의 용매 100ml에 건조된 균체 1g를 넣어 25°C(70°C distilled water는 제외) 48시간 추출하여 여과 후 이를 실험에 사용하였다.

분획물의 조제는 균체의 70% methanol 추출액을 감압 농축하고, 이것을 적정

량의 증류수로 분산시킨 후 Fig. 3과 같은 방법으로 순차 분획하였다. 즉, 분획 갈때기에서 3배량의 diethyl ether를 가한 후 2회씩 추출, 농축하여 분획을 얻었고, 계속해서 같은 방법으로 순차적으로 물층을 chloroform, ethyl acetate, n-butanol로 순차적으로 추출, 농축하여 각각의 분획 및 최종 물층을 농축한 분획을 동결건조하여 얻은 분말을 본 실험에 사용하였다. 또한 배양액의 분획은 배양액을 동량의 용매를 이용하여 같은 방법으로 실시하였다.

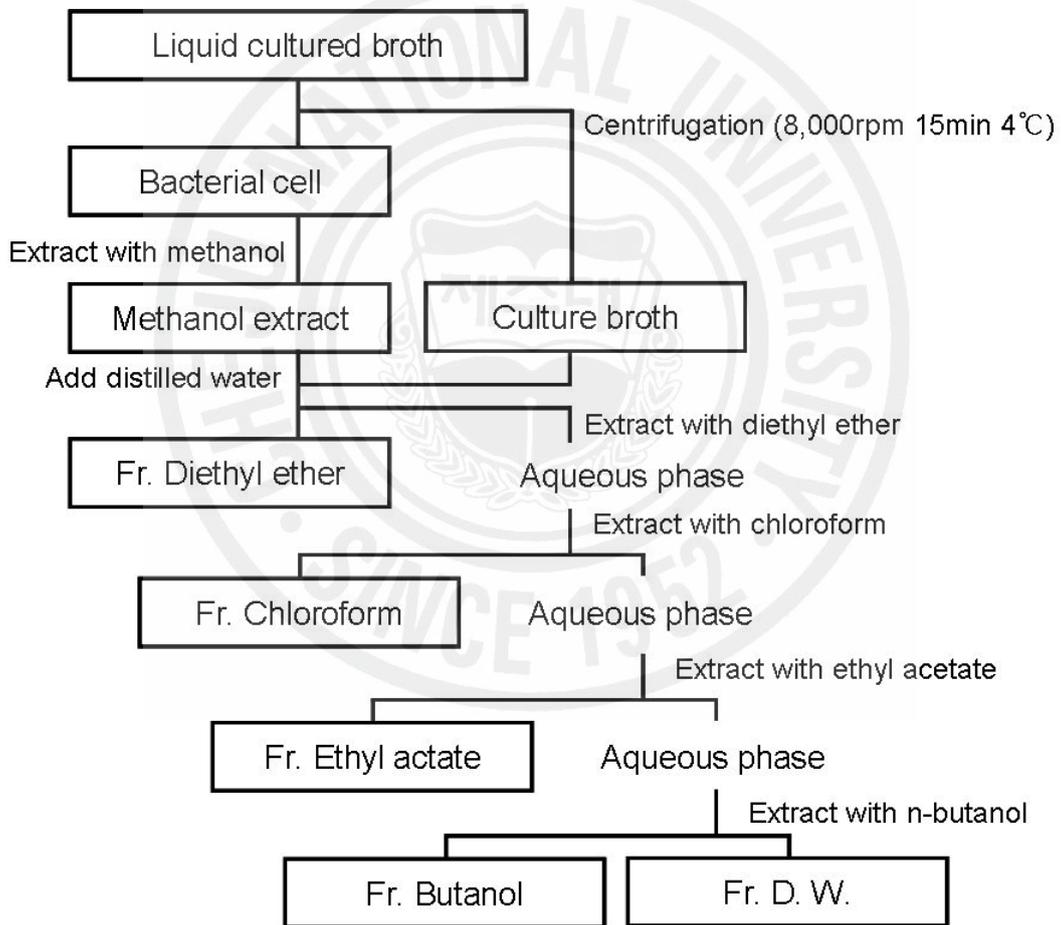


Fig. 3. Fractionation of bacterial cell and cultured broth of *Zooshikella* sp. JE-34

3-2. 이차대사산물의 라디칼 소거활성 측정

1) DPPH free radical scavenging activity

각 sample의 DPPH free radical 소거활성은 Nanjo 등의 방법에 의하여 측정하였다. 60 μ l 시료용액에 60 μ l DPPH (60 μ M) 용액을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 ESR로 측정하였다.

스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3s, power : 5 mW, amplitude : 1×500 의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 DPPH radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH free radical scavenging activity (%) =
(ESR signal intensity for medium containing the additives of concern/ESR signal intensity for the control medium) \times 100.

Measurement conditions: central field 3475 G, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 2 G, microwave power 5 mW, gain 6.3×10^5 , temperature 298 K.

2) Hydroxyl radical scavenging activity

Sample의 Hydroxyl radical 소거활성은 Rosen 등의 방법에 의하여 측정하였다. 20 μ l 시료용액에 0.3 M DMPO 20 μ l, 10 mM FeSO₄ 20 μ l, 10mM H₂O₂ 20 μ l을 혼합한 다음 quartz capillary tube에 옮긴 후 2.5분 후에 ESR로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3s, power : 1 mW, amplitude : 1×100 의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 Hydroxyl radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

Hydroxyl radical scavenging activity (%) =
(ESR signal intensity for medium containing the additives of concern/ESR signal intensity for the control medium) \times 100.

Measurement conditions: central field 3475 G, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 2 G, microwave power 1 mW, gain 6.3×10^5 , temperature 298 K.

3) Alkyl radical scavenging activity

각 추출물의 Alkyl radical 소거활성은 Hiramoto 등의 방법에 의하여 측정하였다. 20 μ l의 시료용액에 D.W 20 μ l, 40 mM AAPH 20 μ l, 40 mM POBN 20 μ l를 혼합한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 30분 방치 한 후 quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3s, power : 7 mW, amplitude : 1×500 의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 Hydroxyl radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

Alkyl radical scavenging activity (%) =

(ESR signal intensity for medium containing the additives of concern/ESR signal intensity for the control medium) \times 100.

Measurement conditions: central field 3475 G, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 2 G, microwave power 10 mW, gain 6.3×10^5 , temperature 298 K.

4) Hydrogen peroxide scavenging activity

각 추출물의 hydrogen peroxide 소거활성은 Müller의 방법에 따라 수행하였다. 0.1 M phosphate buffer(pH5.0)와 각 추출물 100 μ l을 각각 96 microwell plate에 넣어 혼합시킨다. 여기에 다시 20 μ l의 hydrogen peroxide을 첨가시키고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 1.25 mM ABTS와 peroxidase(1 unit/ml)를 각각 30 μ l 첨가하여 최종적으로 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydrogen peroxide 소거활성은 다음과 같이 계산하였다.

Hydrogen peroxide 소거활성(%) =

$[1 - (\text{대조구흡광도} - \text{시료흡광도}) / \text{대조구흡광도}] \times 100$

3-3. 이차대사산물의 항균스펙트럼

항균실험에 사용된 균주는 Table. 1과 같이 어류질병균 11종, 인체 유해균 7종을 생물자원센터 (KCTC) 혹은 한국미생물 보존센터(KCCM)에서 분양받아 사용하였으며, 균주의 생육을 위해 각각의 균주별로 Table. 1에 명시된 배지로 24~120시간 배양하여 사용하였다.

배양액, 용매별 추출액, 분획물의 항균활성 측정은 paper disk agar diffusion법에 따라 항균스펙트럼을 탐색하였으며 최소억제농도(minimum inhibition concentration, MIC)는 높은 활성을 보였던 추출액 및 분획물을 microtitre plate assay를 통하여 확인하였다.

paper disk agar diffusion법을 이용한 항균스펙트럼의 탐색은 시험균주를 전배양 하여 활성화 시킨 후, 멸균생리식염수를 이용하여 Macfaland No. 0.5농도로 균현탁액을 제조한 후 Muller Hinton agar plate (Difco, Co. USA)에 골고루 도말 한다. Sample disc의 제조는 배양액의 경우 filtration을 통해 제균 시킨 후 각각 100, 50, 20, 10%를 paper disc (ADVANTEC F0424695, 8mm)에 100 μ l 접종하여 건조하였고, 추출물의 경우 1,000 μ g씩, 분획물의 경우 100 μ g씩 되게 만들어 사용했으며, 항균활성이 높게 나타난 실험구는 농도별로 disc를 제조하였다. 제조된 disc를 균액이 도말 된 배지 위에 올려놓고 각각의 균주배양온도에 맞추어서 24시간 배양하여 disc 주위의 생육 저해환 유무를 확인하였다. 또한 시험균주의 항생제 감수성 시험을 통해 sample의 항균력을 비교, 가늠하였으며 사용된 항생제는 시판중인 5종에 대하여 실시했다.

최소억제농도(MIC)의 측정은 microtitre plate에 각각의 피검균에 따른 배지를 200 μ l씩 채운 후 제균된 배양액과, 활성이 높았던 추출액, 분획물을 2배 희석법으로 희석 혼합한 후 Macfaland No. 0.5농도의 피검균의 현탁액을 2 μ l씩 접종하여 24, 48시간 배양한다. 이에 660nm의 흡광도 값을 통해 최소억제농도(MIC) 및 억제정도를 가늠 하였으며, 각 희석단을 plate에 접종하여 피검균의 생육유무를 통해 최소억제농도(MIC)를 확정하였다.

Table 1. List of strains and growth conditions used for antibacterial experiments.

	Strain	Growth conditions
Gram negative bacteria	<i>Vibrio anguillarum</i> KCTC 2711	Marine Agar (Difco 0979), 25°C
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCCM 11965	Nutrient Agar (Difco 0001) with 3% NaCl, 37 °C
	<i>Vibrio alginolyticus</i> KCCM 40513	Marine Agar (Difco 0979), 37°C
	<i>Vibrio campbellii</i> KCCM 40864	Marine Agar (Difco 0979), 26°C
	<i>Vibrio harveyi</i> KCCM 40866	Photobacterium broth (Difco 0417), 26°C
	<i>Vibrio salmonicida</i> KCCM 41663	Trypticase Soy Agar with 1% NaCl, 26°C
	<i>Vibrio vulnificus</i> KCCM 41665	Trypticase Soy Agar with 1% NaCl, 30°C
	<i>Vibrio furnissii</i> KCCM 41679	Trypticase Soy Agar with 1% NaCl, 30°C
Gram positive bacteria	<i>Escherichia coli</i> KCCM 40880	Nutrient Agar (Difco 0001) 37°C
	<i>Edward tarda</i> KCTC 12267	Nutrient Agar (Difco 0001) 37°C
	<i>Propionibacterium acnes</i> KCCM 41747	Brain Heart Infusion Agar (Difco 0418), 37°C
	<i>Bacillus subtilis</i> KCCM 40820	Nutrient Agar (Difco 0001) 30°C
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	Trypticase soy broth (BBL 11768), 37°C
	<i>Streptococcus mutans</i> KCCM 40105	Brain Heart Infusion Agar (Difco 0418), 37°C
	<i>Streptococcus iniae</i> KCTC 3657	BHI (Medium 3) + 0.5 % Glucose Medium, 37°C
	<i>Streptococcus parauberis</i> KCTC 3651	Trypticase Soy Yeast Extract Medium, 37°C
Fungi	<i>Candida albicans</i> KCTC 7270	YM Agar, 24°C
	<i>Pityrosporum ovale</i> KCCM 11894	Pityrosporum Medium, 30°C

III. 결과 및 고찰

1. 색소생산 균주의 분리 및 동정

본 균주의 분리지의 좌표는 위도 30°57'6.22"N, 경도 122°32'9.30"E 이며 양쯔강 하류 근해로 수심은 약 15m로써 시료채취시의 수온은 26.1°C 염분농도는 25.3‰로 조사되었다. 실험방법에 명시된 방법에 의하여 실험한 결과 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Hahellaceae; *Zooshikella*로 확인되었고 좋은 DNA-DNA hybridization을 통해 DNA-DNA relatedness의 확인 등의 추가실험을 통해 차후에 명명할 것이다. 즉 JE-34의 동정결과 *Zooshikella* sp. JE-34라고 명명하였다. *Zooshikella*속은 현재 발표된 균주가 2개의 Strain만이 존재하는 속으로 희소균주로 사료되며 이에 본 연구에서 분리한 JE-34의 분류학적인 연구는 생물다양성 측면으로 가치가 있다고 생각된다. *Zooshikella* sp. JE-34가 신종균주로서의 가능성을 관찰하기 위해 *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12044, 12045 균주간의 비교를 중심으로 하였으며 결과는 다음과 같다.

1-1. 형태학적 특성

Strain JE-34의 고체배지에서 생육시의 colony의 특성을 관찰하였다. 그 결과 위에서 관찰시 파상이었고 유두상(unbonate)의 형태였으며, colony 가장자리가 불규칙하고 광택을 내며 불투명한 점성을 띄는 특성(fig. 4. A)을 보였다. 이는 *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12044, 12045 (Fig. 4. B, C)의 colony특성과 매우 흡사하나 2균주의 경우 원형의 돔형(convex)으로 JE-34와 다른 특성을 나타냈다. 3개 균주 모두 적색색소를 생성하였으며, 녹색의 metallic한 광택을 보였다. 이를 통해 3균주 모두 유사색소를 생성 할 것이라고 사료되며 Yi 등의 연구에서 *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12044, 12045이 생산하는 색소물질이 prodigiosin이라고 밝힌 바 있어 JE-34 또한 유사색소 물질이라 사료된다(Yi, 2003). 각각의 균주를 MA에 30°C에서 배양한 결과 12-18시간에 colony가 형

성되기 시작하였으며, 24시간 배양 후에는 적색색소를 생성하기 시작했다. 그리고 colony들이 모여 있는 부근을 중심으로 하여 색소의 강도가 높아지는 동시에 금속광택을 나타내기 시작하였다. 이는 기존의 연구(Margalith, 1992)에서 prodigiosin을 생산하는 균체 pellet의 특성이란 기술한 바 있어 생산되는 적색색소가 prodigiosin일 가능성을 뒷받침하는 결과라고 생각된다. 또한 JE-34는 액체배지에서도 높은 적색색소 생산성을 보였으며 균체가 응집되어 자라는 특성을 보였다.

균의 형태학적 특성은 30°C에서 하루 동안 배양한 후 SEM을 통해 관찰하였으며 JE-34는 간균의 형태를 보였으며 길이는 10~15 μm 폭은 0.6~0.9 μm 로 나타났으며 KCTC 12044, 12045의 경우 길이 1.5~2.5 μm 폭 0.7~0.9 μm 의 단간균으로(Yi, 2003) 형태적인 차이를 보였다. 하지만 이 결과는 SEM의 전처리 방법이 다름에 따른 결과 차이일 수 있을 것이라 생각되어 동일조건의 전처리를 하여 비교하였다. 그 결과 Fig. 5. D.에 보이는 바와 같이 폭은 유사하지만 길이는 1.5~7 μm 등 다양하게 관찰 되었다. 또한 3균주 모두 균체에 마디 같은 절이 있는 것이 부분적으로 관찰되어 Streptobacilli의 형태라고 추측되어 TEM(Transmission electron microscopy) 등의 추가 실험을 통해 확인해야 할 필요가 있다고 생각된다. 하지만 Streptobacilli형태이더라도 KCTC 12044, 12045 두 균주와 Strain JE-34는 형태학적 특성의 차이가 있다고 판단된다.

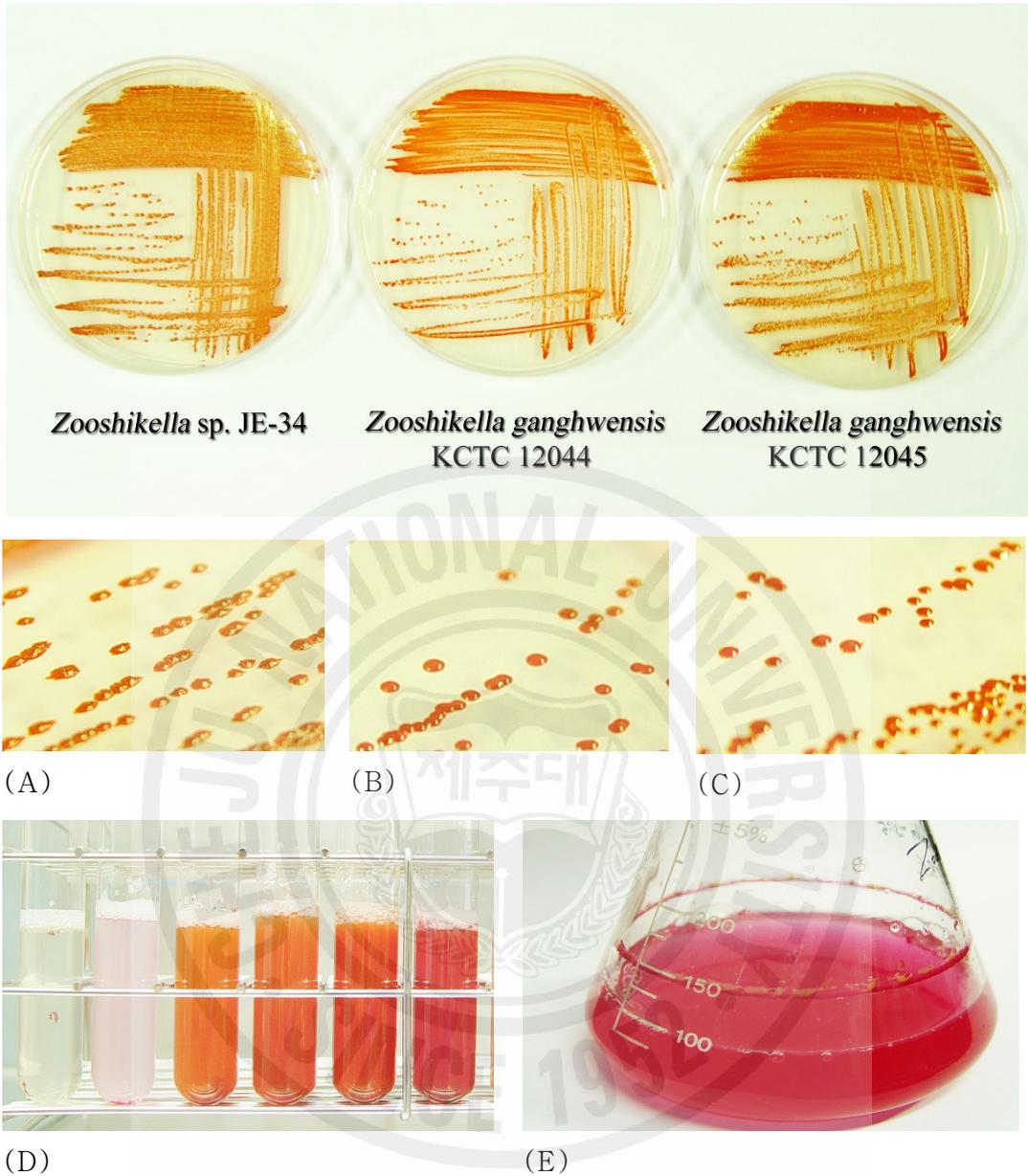


Fig. 4. Cultural characterization of Strain JE-34, and *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12044, 12045.

(A) Colony shape of Strain JE-34 (B) Colony shape of *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12044

(C) Colony shape of *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12045

(D) Red pigment from Strain JE-34 under culture times (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72hr)

(E) Cultural characterization of Strain JE-34 under broth media condition

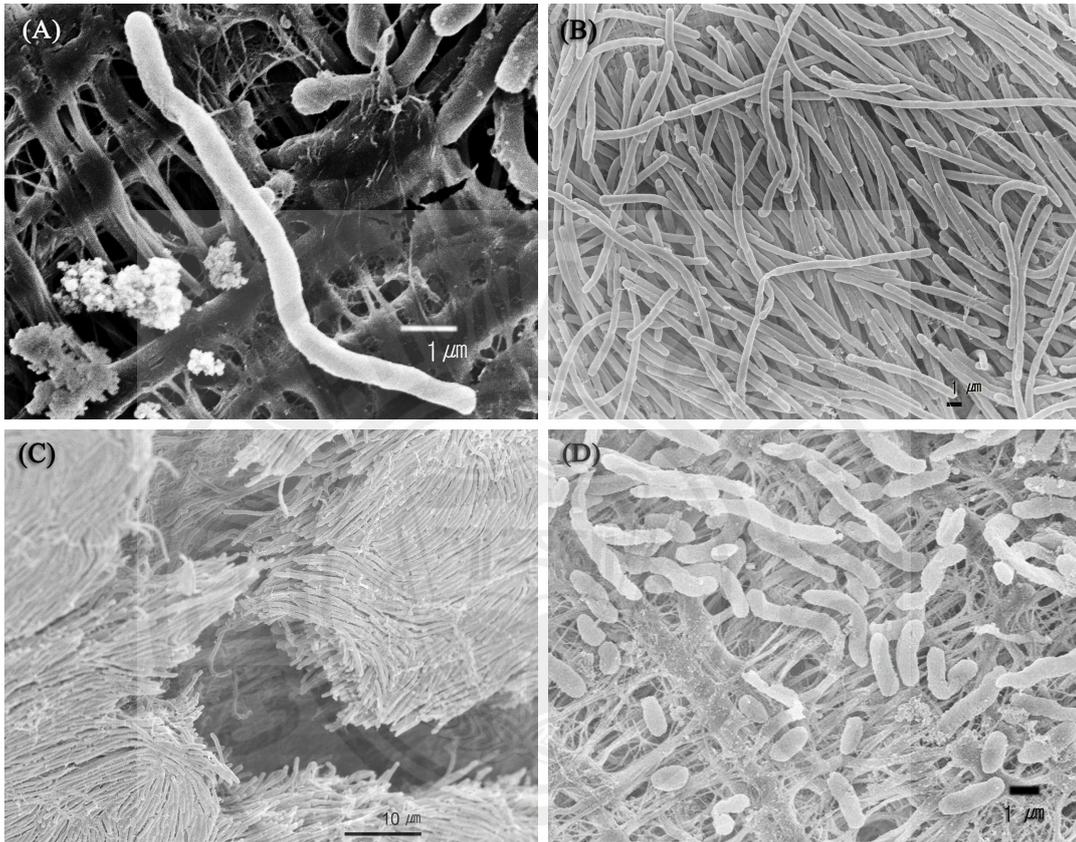


Fig. 5. Scanning electron micrograph of Strain JE-34 (A, B, C) and, *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12044 (D). Cells were grown on MA at 30°C for 1days

1-2. 16S rRNA 염기서열

리보솜 RNA(rRNA)는 전 생물에 보편적으로 존재하는 보존성이 높은 핵산분자이며, 미생물의 진화계통의 연구에 가장 유용한 분자마커로 이용되고 있다. 특히 범용성이 높은 분자는 small subunit rRNA(SSU rRNA)로서 분류에 이용되는 16S 및 16S유사(18S) rRNA가 이에 속한다. 현재 미생물의 분류체계는 SSU rRNA의 정보를 근거로 재구축되어 있으며, 이 방법은 미생물 분류학에 필수적인 것으로 인식되기에 이르렀다. 특히 미지의 분리균주의 계통학적 위치를 알기위한 최초의 실험단계에서 SSU rRNA분석은 필수적이다.

Strain JE-34의 16S rRNA PCR증폭을 통해 얻은 1470bp를 National Center Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 수행한 결과 *Zooshikella ganghwensis* JC2045, *Zooshikella ganghwensis* JC2044, Uncultured marine bacterium partial 16S rRNA gene, isolate LQ-2001와 각각 99%의 상동성을 보였으며 이들을 alignment 한 결과를 Fig. 6으로 나타냈다. 상동성이 높았던 균주들의 분리지가 각각 대한민국의 강화도 갯벌과 홍콩부근의 Dayawan 만에서 분리되어 *Zooshikella*속의 경우 동중국해의 퇴적층 및 해수 중에 존재하는 균종이라 생각된다. Database내의 다른 균주들과는 최대 92%의 상동성을 띄는 것으로 분석되어 각각 *Marinobacter lutaensis* (92%), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* isolate MARC4F (91%), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (91%), *Hahella chejuensis* KCTC 2396 (91%)로 조사되었다.

계통수(phylogenetic tree)는 거리(distance)에 근거한 방법으로 작성하였으며 Fig. 7은 JE-34에서 얻은 16S rRNA 서열과 γ -*Proteobacteria* 15종의 유전자 data를 이용하여 Neighbor-Joining 방법에 의해 계통수를 나타내었다(Fig. 7). 계통수 분석결과 *Hahellaceae*의 경우 진화적 관계에 있어 *Oceanospirillum*, *Alteromonadaceae*와 가깝게 묶였으며 *Hahellaceae*에 속하는 것으로 보고된 *Hahella*, *Zooshikella*속의 균주들 또한 각각의 그룹을 나타냈다. 본 실험의 균주인 JE-34는 계통수의 진화적 관계를 분석한 결과 *Zooshikella*속에 포함되는 것으로 보이며 *Zooshikella*속의 타 균주와 매우 가까운 진화적 거리를 나타내어 동일종일 가능성이 높다고 보인다. 하지만 *Zooshikella*속에 포함되는 균주가 1종 2strain만이 보고되어 희소균주로서 연구가치가 높다고 사료된다.

```

JE-34          -----CTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGGGC
AJ315452      AGACTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGGGC
AY 130995     -----TTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGGGC
AY 130994     -----ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGGGC
                *****

JE-34          GGTAACAGGAGAGCTTGCTCTTGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAAT
AJ315452      GGTAACAGGAGAGCTTGCTCTTGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAAT
AY 130995     GGTAACAGGAGAGCTTGCTCTTGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAYGCATAGGAAT
AY 130994     GGTAACAGAAGAGCTTGCTCTTGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAAT
                *****

JE-34          CTGCCCATGGGTGGGGGATAGCCCGGAGAAATCCGGATTAATACCGCATATGCCCTGAGG
AJ315452      CTGCCCATGGGTGGGGGATAGCCCGGAGAAATCCGGATTAATACCGCATATGCCCTGAGG
AY 130995     CTGCCCATGGGTGGGGGATAGCCCGGAGAAATCCGGATTAATACCGCATATGCCCTGAGG
AY 130994     CTGCCCGTGGGTGGGGGATAGCCCGGAGAAATCCGGATTAATACCGCATATGCCCTGAGG
                *****

JE-34          GGTAAGCAGGGGATCTTAGGACCTTGCGCCGATGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAG
AJ315452      GGTAAGCAGGGGATCTTAGGACCTTGCGCCGATGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAG
AY 130995     GGTAAGCAGGGGATCTTAGGACCTTGCGCCGATGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAG
AY 130994     GGTAAGCAGGGGATCTTAGGACCTTGCGCCGATGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAG
                *****

JE-34          TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
AJ315452      TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
AY 130995     TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
AY 130994     TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
                *****

JE-34          CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
AJ315452      CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
AY 130995     CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
AY 130994     CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
                *****

JE-34          CAATGGGGCAACCCGTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAA
AJ315452      CAATGGGGCAACCCGTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAA
AY 130995     CAATGGGGCAACCCGTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAA
AY 130994     CAATGGGGCAACCCGTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAA
                *****

JE-34          AGCACTTTCAGCAGGGAGGAAAGGTTGCGGGCTAATACCTCGTAGCTGTGACGTTACCTG
AJ315452      AGCACTTTCAGCAGGGAGGAAAGGTTGCGGGCTAATACCTCGTAGCTGTGACGTTACCTG
AY 130995     AGCACTTTCAGCAGGGAGGAAAGGTTGCGGGCTAATACCTCGTAGCTGTGACGTTACCTG
AY 130994     AGCACTTTCAGCAGGGAGGAAAGGTTGCGGGCTAATACCTCGTAGCTGTGACGTTACCTG
                *****

JE-34          CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGGAGGGTGCAAGCGT
AJ315452      CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGGAGGGTGCAAGCGT
AY 130995     CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGGAGGGTGCAAGCGT
AY 130994     CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGGAGGGTGCAAGCGT
                *****

JE-34          TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTTACTAAGCTGGATGTGAAATC
AJ315452      TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTTACTAAGCTGGATGTGAAATC
AY 130995     TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTTACTAAGCTGGATGTGAAATC
AY 130994     TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTTACTAAGCTGGATGTGAAATC
                *****

JE-34          CCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTATAACTGGTAGGCTAGAGTATGGCAGAGGCGAG
AJ315452      CCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTATAACTGGTAGGCTAGAGTATGGCAGAGGCGAG
AY 130995     CCCGGGCTTAACCTGGGAGTGCATTATAACTGGTAGGCTAGAGTATGGCAGAGGCGAG
AY 130994     CCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTATAACTGGTAGGCTAGAGTATGGCAGAGGCGAG
                *****

JE-34          TGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGG
AJ315452      TGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGG
AY 130995     TGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGG
AY 130994     TGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGG
                *****

```

Fig. 6. Alignment of 16S rRNA sequence of the isolated Strain JE-34.

AJ315452 : Uncultured marine bacterium, AY130995 : *Zooshikella ganhwensis* JC2045,
AY130994 : *Zooshikella ganhwensis* JC2044

JE-34 CGACTCGCTGGGTCAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAG
 AJ315452 CGACTCGCTGGGTCAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAG
 AY130995 CGACTCGCTGGGTCAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAG
 AY130994 CGACTCGCTGGGTCAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAG

JE-34 ATACCCTGGTAGTCCAGCCGTAACCGATGAGAAGTACCCGTTGGGATCCATGTAGGTCT
 AJ315452 ATACCCTGGTAGTCCAGCCGTAACCGATGAGAAGTACCCGTTGGGATCCATGTAGGTCT
 AY130995 ATACCCTGGTAGTCCAGCCGTAACCGATGAGAAGTACCCGTTGGGATCCATGTAGGTCT
 AY130994 ATACCCTGGTAGTCCAGCCGTAACCGATGAGAAGTACCCGTTGGGATCCATGTAGGTCT

JE-34 TGGTGGCGCAGCTAACGCCTAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAC
 AJ315452 TGGTGGCGCAGCTAACGCCTAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAC
 AY130995 TGGTGGCGCAGCTAACGCCTAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAC
 AY130994 TGGTGGCGCAGCTAACGCCTAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAC

JE-34 TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC
 AJ315452 TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC
 AY130995 TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC
 AY130994 TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC

JE-34 GCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATCCTGCGAACACTTTAGAGATAGAGTGGTGCCCT
 AJ315452 GCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATCCTGCGAACACTTTAGAGATAGAGTGGTGCCCT
 AY130995 GCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATCCTGCGAACACTTTAGAGATAGAGTGGTGCCCT
 AY130994 GCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATCCTGCGAACACTTTAGAGATAGAGTGGTGCCCT

JE-34 CGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
 AJ315452 CGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
 AY130995 CGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
 AY130994 CGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT

JE-34 TAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCATGTAATGGTGGGGACTC
 AJ315452 TAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCATGTAATGGTGGGGACTC
 AY130995 TAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCATGTAATGGTGGGGACTC
 AY130994 TAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCATGTAATGGTGGGGACTC

JE-34 TAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCC
 AJ315452 TAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCC
 AY130995 TAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCC
 AY130994 TAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCC

JE-34 CTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGGCGAACAGAGGGTTGCCAAGCTGCGA
 AJ315452 CTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGGCGAACAGAGGGTTGCCAAGCTGCGA
 AY130995 CTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGGCGAACAGAGGGTTGCCAAGCTGCGA
 AY130994 CTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGGCGAACAGAGGGTTGCCAAGCTGCGA

JE-34 AGTGGAGCTAATCTCTTAAAACGTCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
 AJ315452 AGTGGAGCTAATCTCTTAAAACGTCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
 AY130995 AGTGGAGCTAATCTCTTAAAACGTCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
 AY130994 AGTGGAGCTAATCTCTTAAAACGTCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA

JE-34 TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
 AJ315452 TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
 AY130995 TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
 AY130994 TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC

JE-34 TTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCC
 AJ315452 TTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCC
 AY130995 TTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCC
 AY130994 TTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCC

JE-34 TTCCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA-----
 AJ315452 TTCCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAAGGTAGC
 AY130995 TTCCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAAGGTAGC
 AY130994 TTCCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAAGGTAGC

Fig. 6. Continued

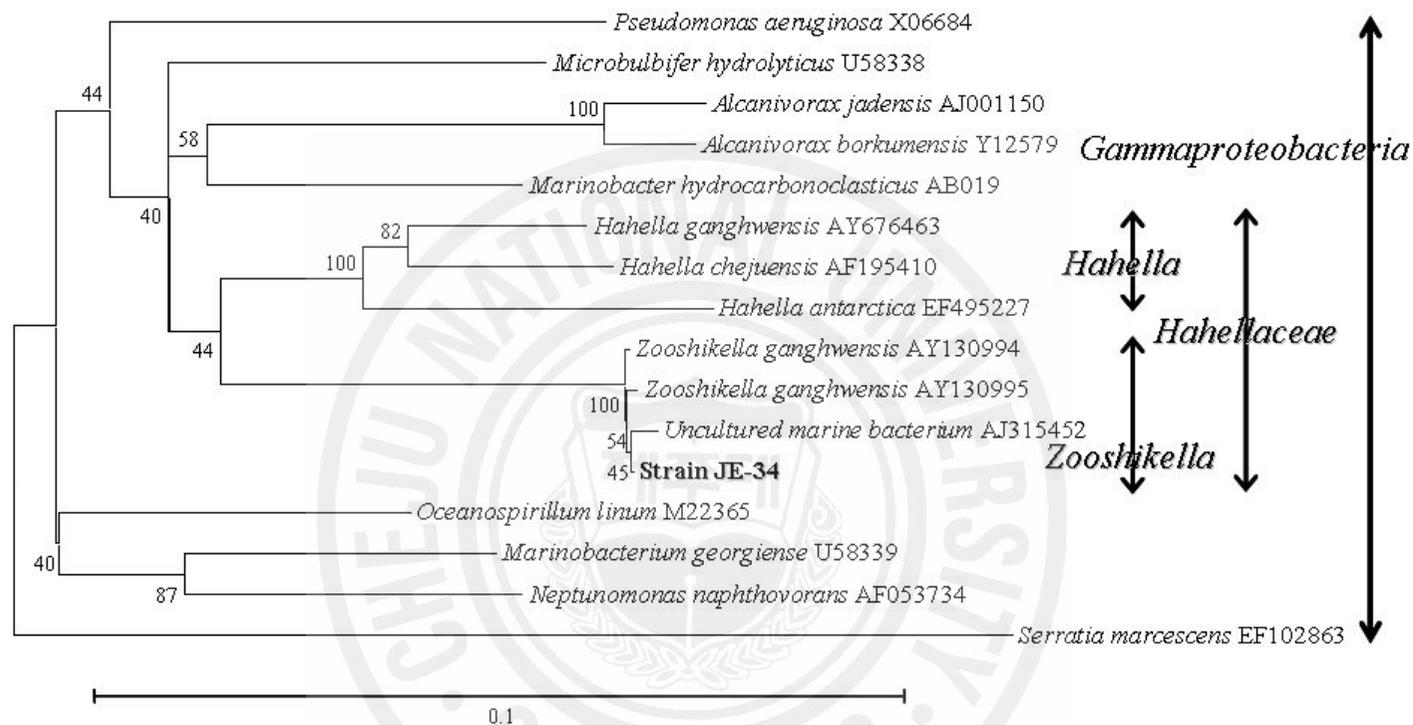


Fig. 7. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain JE-34 and member of the γ -Proteobacteria. Numbers at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1,000 resampled datasets. *Serratia marcescens* (EF102863) was used as an outgroup. Bar, 0.1 nucleotide substitutions per position.

1-3. 생화학적 분석

세균 및 효모를 동정함에 있어서 생리·생화학적 특성, 및 배양학적 특징을 조사해야 한다. 또한 동정에만 한정되지 않고 그 균주의 기질분해나 성장조건 등의 특성을 파악할 수 있어 미지의 균주의 동정에 필수적이라고 할 수 있다.

JE-34는 그람염색을 통해 그람음성이었으며 Nitrate reduction, Citrate, D-Glucose, D-Mannitol, D-Mannose, D-Sorbitol, Inositol, L-Ornithine, Malate, Maltose, N-Acetylglucosamine, Sucrose를 이용 가능한 특성을 나타냈다(Table. 2). 또한 Alkaline phosphate, Leucine arylamidase, Acid phosphate, N-acetyl- β -glucosamidase의 경우 양성으로 나타났으며 Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Valine arylamidase, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase의 경우 약한 효소활성을 보였다(Table. 3). JE-34와 Zooshikella ganghwensis KCTC 12044, 12045의 생화학적 특성을 비교한 결과 유사한 부분이 많았지만 Arginine dihydrolase, ornithine decarboxylase, glucose fermentation, gelatin hydrolysis, cystine arylamidase α -glucosidase와 citrate, D-mannitol, D-mannose, D-sorbitol, L-arginine, sucrose 이용능의 차이를 보였다.

세포 지방산 분석의 결과 지방산의 전체적인 비율은 유사하게 나타났으며 주요지방산은 C_{16:0}(palmitic acid), C_{16:1 ω 7c}(palmitoleic acid), C_{18:1 ω 7c}들이 주요지방산 성분임을 알 수 있었다(Table. 4). 이와 같이 생화학 특성은 일정 부분 다른 특성을 나타냈으나 세포벽의 지방산 조성이 유사한 것으로 미루어 서로 매우 가까운 종이라 생각된다.

Table. 2. Major characteristics that differentiate strain JE-34 from *Zooshikella ganghwensis* KCTC 12044, 12045 (Yi, 2003).

Characteristic	Strain JE-34	KCTC 12044, 12045
Pigmentation	Red	Yellowish-red or red
Relation to oxygen	Aerobe	Aerobe
Temperature range for growth (°C)	15-40	15-45
pH range for growth	6-10	5-8
Na ⁺ requirement	0.5-8%	1-7%
Arginine dihydrolase	-	+
Ornithine decarboxylase	-	+
Nitrate reduction	+	+
Acid production from glucose	-	+
Urease	-	-
Gelatin hydrolysis	-	+
Utilization of:		
Citrate	+	-
D-Glucose	+	+
D-Mannitol	+	-
D-Mannose	+	-
D-Sorbitol	+	-
D-Xylose	-	-
Inositol	+	-
L-Arginine	-	+
L-Ornithine	+	+
Malate	+	+
Maltose	+	+
N-Acetylglucosamine	+	+
Sucrose	+	-

Table. 3. Physiological and biochemical features of strain JE-34 and KCTC 12044, 12045
 +: positive, -: negative, w: weak positive

Characteristic	Strain JE-34	KCTC 12044	KCTC 12045
Alkaline phosphate	+	+	+
Esterase (C 4)	w	+	+
Esterase Lipase (C 8)	w	+	+
Lipase (C 14)	-	-	+
Leucine arylamidase	+	+	+
Valine arylamidase	w	+	+
Cystine arylamidase	-	w	w
Trypsin	-	-	-
α -chymotrypsin	-	-	-
Acid phosphate	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	w	w	w
α -galactosidase	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	-
α -glucosidase	-	+	w
β -glucosidase	-	-	-
N-acetyl- β -glucosamidase	+	-	+
α -mannosidase	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-

Table. 4. Cellular fatty acid composition (%) of strain JE-34 and KCTC 12044, 12045.
 Values are percentages of total fatty acids. Tr, <0.5%

Fatty acid	Strain JE-34	KCTC 12044	KCTC 12045
C _{10:0}	3.37	2.6	3.1
C _{10:0} 3-OH	4.11	2.1	3.2
C _{12:0}	1.07	Tr	1.7
C _{12:1} 3-OH	0.75	Tr	0.8
C _{12:0} 3-OH	6.03	5.1	5.5
C _{14:0}	4.97	6.0	5.4
C _{16:0}	25.78	31.9	29.5
C _{16:1} ω 7c	36.48	37.1	36.1
C _{18:1} ω 7c	15.55	14.5	13.2
C _{18:0}	0.60	0.7	0.5

1-4. 색소물질의 분광학적 특성 및 동정

본 실험에서 *Zooshikella* sp. JE-34와 *Serratia marcscens*의 적색색소를 추출하여 색소의 물성특성을 알아보았다. UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 측정한 각각의 흡수 spectra는 가시광선영역에서 외견상 단일 peak를 나타냈으며, *Zooshikella* sp. JE-34의 최대흡수파장(λ_{max})은 528nm에서 *Serratia marcscens*의 경우는 526nm으로 나타났으며 각각의 색소는 매우 유사한 spectrum을 나타내어 유사한 분광학적 특성을 보였다(Fig. 8).

*Serratia marcscens*가 생산하는 적색색소는 기존연구(Song, 2005)에 의해 prodigiosin계열의 색소라고 알려져 있으며 이에 HPLC를 통한 분리된 peak를 분석하여 JE-34의 색소가 prodigiosin계열의 물질임을 확인하여 보았다.

그 결과 Fig. 9의 A의 경우 *Serratia marcscens*가 생산하는 적색색소로서 단일 peak를 나타냈으며 이는 39.873min에서 검출되었다. peak의 spectrum의 최대흡수파장(λ_{max})이 536.0nm로 분석되어 prodigiosin의 기존연구(Allen, 1967)에서 보고된 λ_{max} 이 535-540nm인 것과 유사한 결과를 보여 prodigiosin계열의 색소라고 사료된다. Fig 9의 B는 *Zooshikella* sp. JE-34에서 추출한 색소의 분석결과이며 이는 3개의 peak를 나타내었고 37.713, 38.449, 39.544min에서 검출되었다. 각 peak의 spectrum의 λ_{max} 은 536.0, 537.2, 536.0nm로 유사하게 나타났으며 peak C의 경우 *Serratia marcscens*가 생산하는 적색색소의 검출시간과 거의 동일하였다. 이러한 분석결과 *Zooshikella* sp. JE-34가 생성하는 주요 적색색소는 prodigiosin 계열의 물질일 것이라고 사료된다. 하지만 본 연구만으로는 확실한 분자구조 및 분자량의 도출이 불가능 하므로 차 후 NMR, LC-ms/ms등의 구조분석이 요구된다.

색소의 추출액은 관찰하는 사람과 환경에 따라 서로 다르게 표현할 수 있기 때문에 색체의 정확한 측정 전달 및 재현을 위하여 과학적인 표색방법이 요구되어 추출한 색소의 색을 보다 객관적이고 측정 가능한 값으로 다루기 위해 CIE 표색법을 사용하였으며 그 결과 JE-34가 생산하는 색소는 X: 33.74 Y: 19.68 Z: 18.63로 측정되었으며 Fig. 10에 나타냈다.

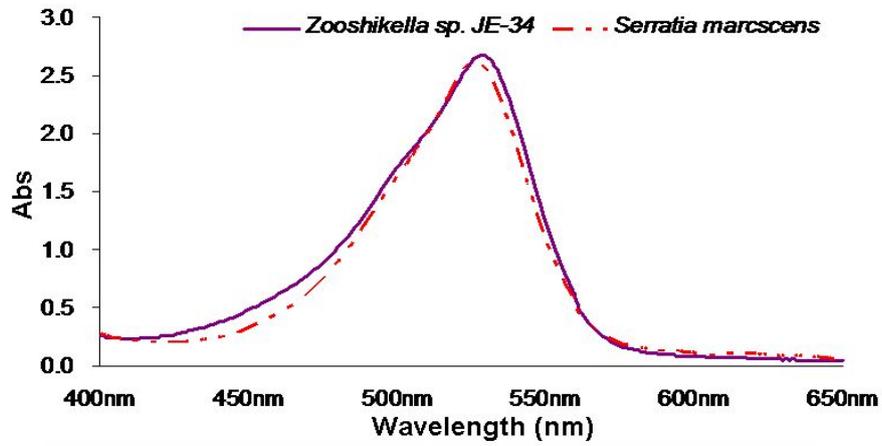


Fig. 8. The absorption spectra of prodigiosin-like pigments isolated from *Zooshikella sp. JE-34* and *Serratia marcescens*.

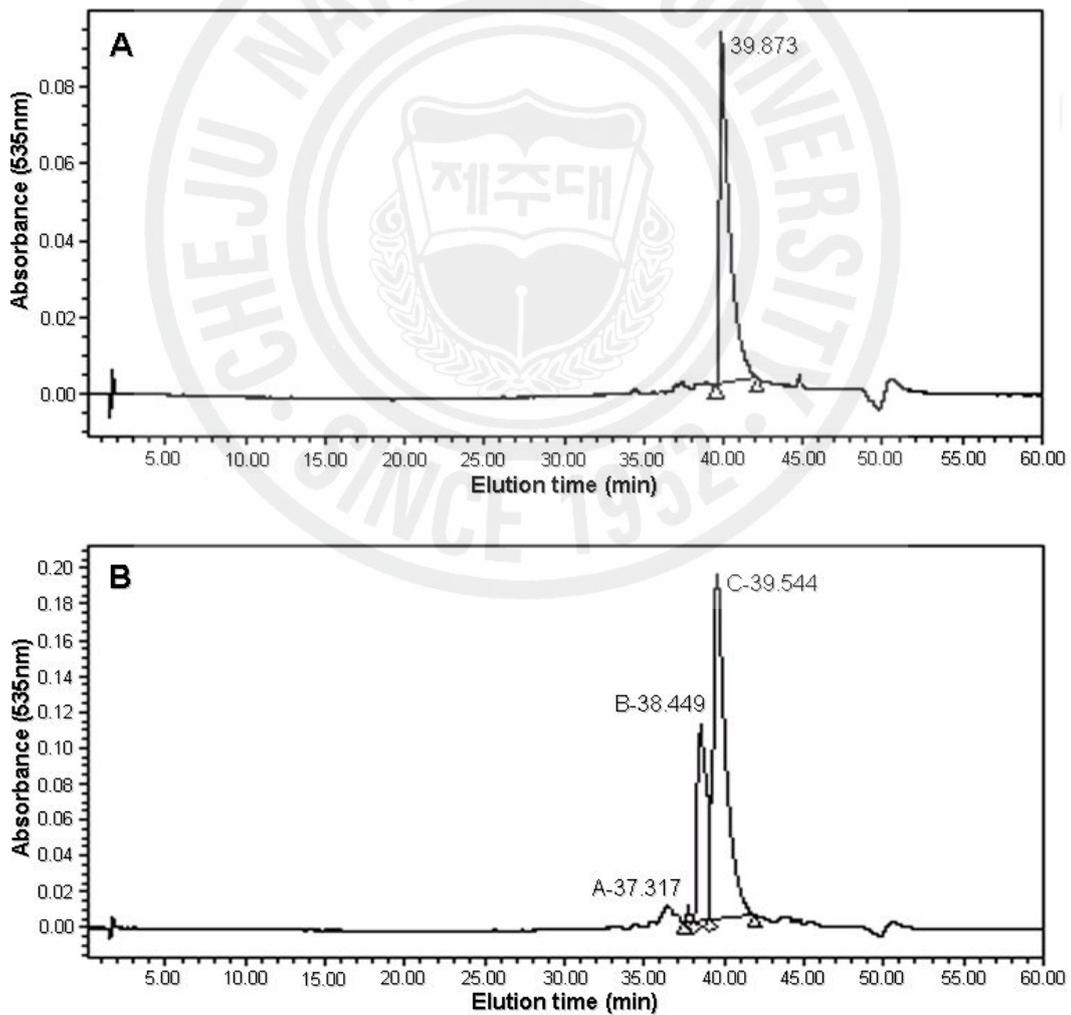


Fig. 9. HPLC profile of prodigiosin-like pigment from *Zooshikella sp. JE-34* (A), *Serratia marcescens* (B).

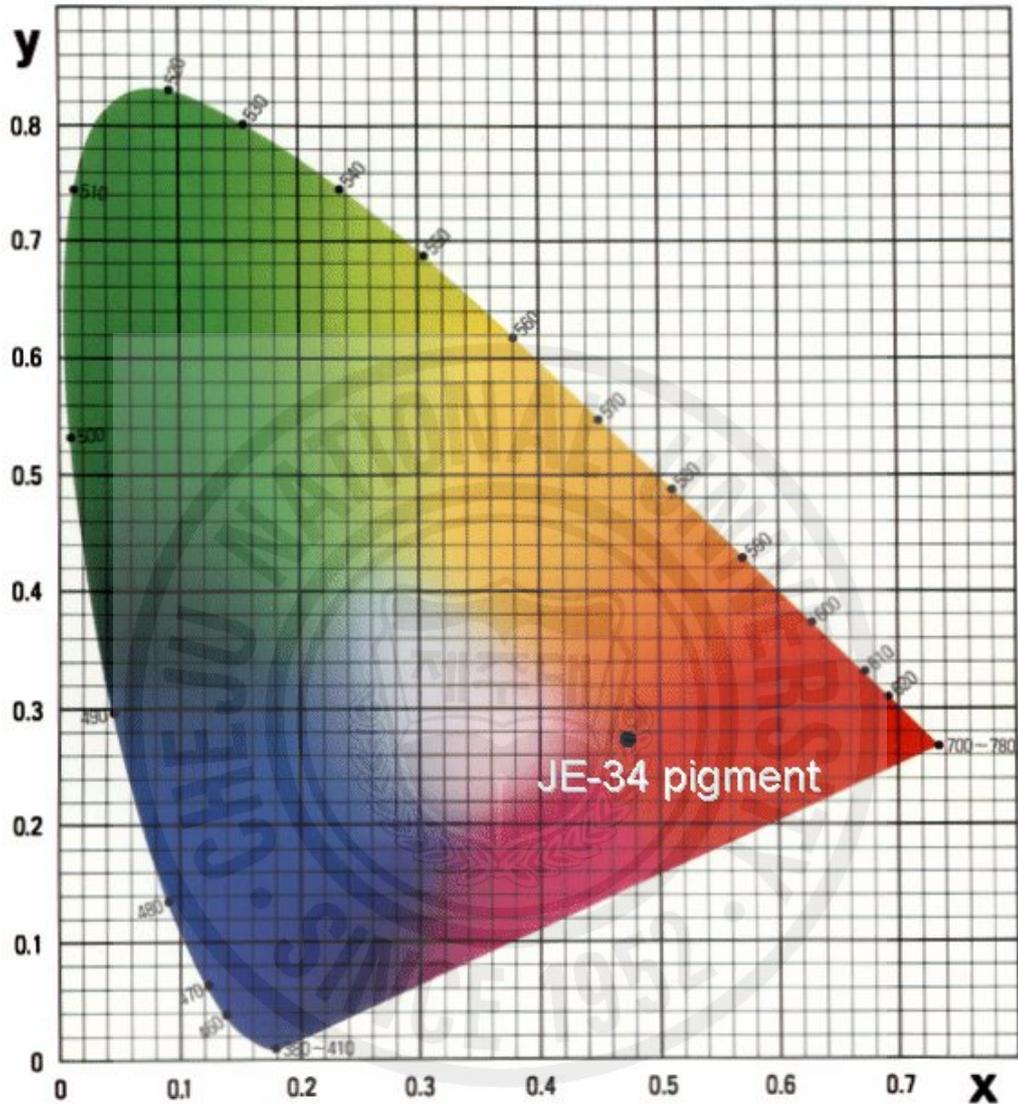


Fig. 10. The CIE chromaticity diagram showing the spectrum locus/red and the position of important illuminant.

2. Prodigiosin-like pigment의 생산을 위한 배양조건 및 색소 안정성

2-1. 환경적 배양특성

1) 배양시간 및 배양온도에 따른 배양특성

배양온도는 균주의 생육 및 이차대사산물의 생성에 있어 중요한 요인 중의 하나이다. 특히 미생물은 보통 단세포이므로 외부온도에 따라 세포온도가 그대로 변하므로 온도에 특히 민감하다. 일반적으로 온도가 상승하면 효소촉매반응의 속도가 높아져서 생장률이 증가하며 이에 따라 생화학반응속도가 증가되어 전체적인 대사활동이 활발히 일어나 일반적인 미생물은 높은 온도에서 빨리 자란다. 하지만 특정온도를 넘어서면 성장속도가 저해되고 아주 높은 고온에서는 일반적으로 세포의 구조와 기능에 손상을 입히며, 저온에서는 화학적 조성 및 구조에는 영향을 끼치지 않지만 세포의 기능이 떨어짐에 기인한다. 따라서 균주의 성장도 및 prodigiosin 생합성량에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 4~50°C의 온도 범위에서 5일 동안 배양하여 측정하였다. 본 실험에 사용된 *Zooshikella* sp. JE-34의 경우 15~40°C에서 prodigiosin 생합성량 및 균체성장이 일정수준 나타났다(Fig. 11). JE-34는 30°C에서 96시간 배양시에 가장 높은 성장을 보였고 prodigiosin의 생합성량 또한 높았으며 이는 일반적으로 해양 세균은 저온미생물(psycrotroph)로서 20~30°C 부근에서 잘 성장하는 것으로 보고된 것과 일맥상통한다(Kang, 2004; Choi, 2002). 성장과 prodigiosin의 생합성량의 관계를 살펴보면 균체의 성장은 24시간 이전부터 성장하는 것으로 나타났지만 prodigiosin의 생합성량은 24시간 이후에서야 급격히 이루어졌다. 이는 prodigiosin의 생합성은 성장과정 중 비증식 세포에서 생산되는 특성과 관련이 있다고 사료된다. prodigiosin을 생합성한다고 알려진 해양유래 미생물중 *Zooshikella ganghwensis*, *Hahella chejuensis* 또한 저온성미생물로 이들도 30°C에 성장 및 prodigiosin의 합성이 활발하다고 보고되어(Yi, 2003, Jeong, 2005) 본 균주와 유사한 특성을 보였다.

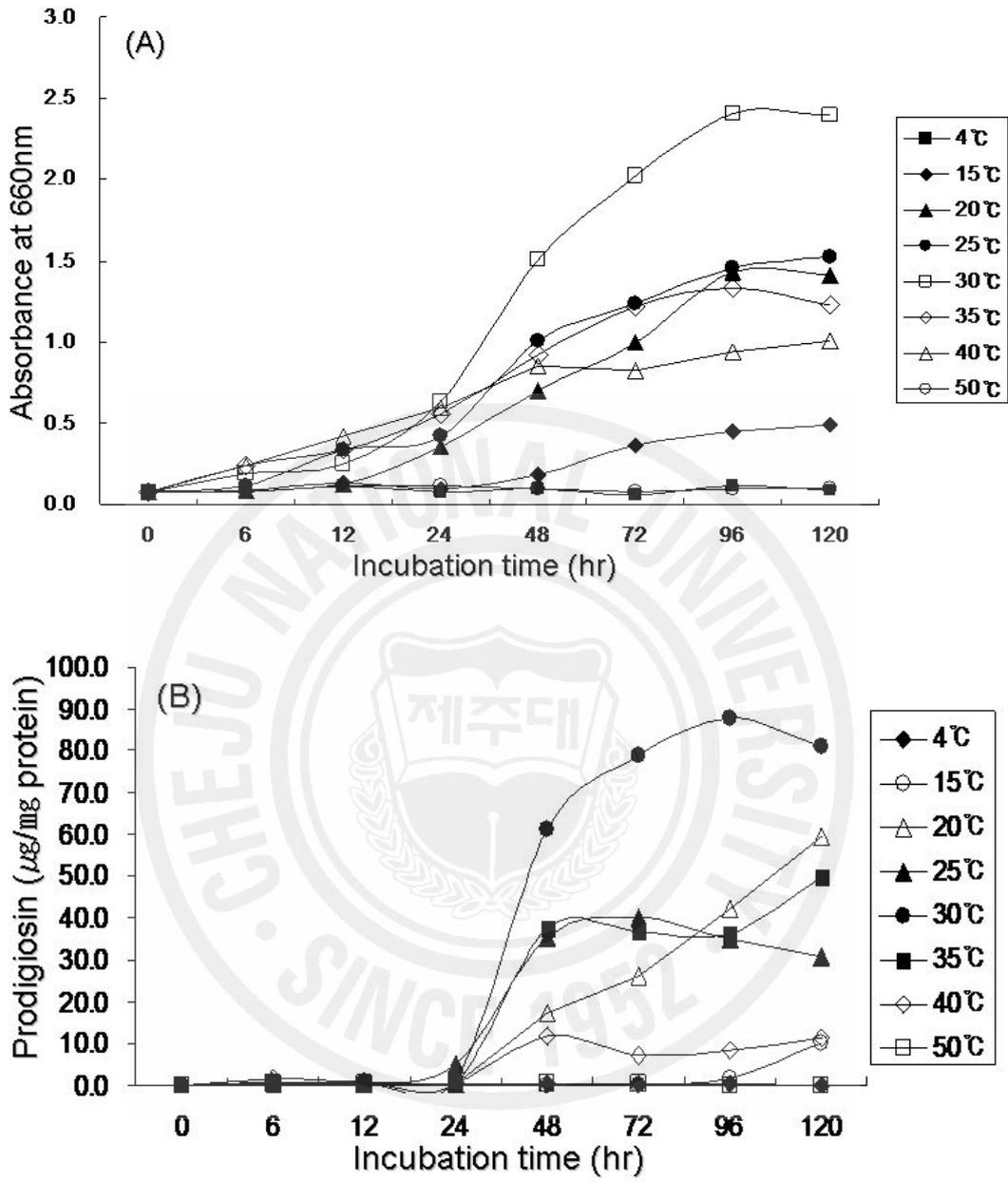


Fig. 11. Comparison of growth and prodigiosin pigment produce of *Zooshikella* sp. JE-34 in temperature.

(A): Cell growth curve (B): Producing prodigiosin

2) pH의 영향

배양액의 pH는 다양한 영양분, 성장인자 등의 세포막 이동속도에 영향을 미치며 외부의 pH가 변하면 영양물질분자의 이온화 경향이 달라져 물질흡수능력이 감소하므로 미생물의 성장과 이차대사산물의 생산에 중요한 역할을 한다. JE-34의 경우 초기 pH 6~7에서 가장 성장률이 높아 호중성 미생물(neutrophile)인 것으로 보이며 pH 8~10에서도 일정수준이상의 성장을 하여 알칼리 환경에서도 안정성 있는 성장을 하는 것으로 관찰되었다(Fig. 12). prodigiosin의 생합성의 경우 또한 pH 6~7에서 높은 생합성량을 나타냈으나 pH가 높아짐에 따라 생합성량의 감소가 현저히 나타나는 것으로 나타났다. 이는 pH가 높아져도 균체의 성장은 하지만 효소와 막수송단백질이 활성이 억제되어 세포가 손상되기도 하며 영양물질분자의 이온화경향변화에 의한 물질흡수능력이 떨어져 생합성 과정 중 효소 축합과정이 필수적인 prodigiosin 합성이 저해되는 것이라 사료된다. 한편 *S. marcescens*의 prodigiosin의 생합성의 최적 pH는 8.0~8.5이고 이러한 pH의 효과는 prodigiosin 생합성에 관여하는 프롤린의 양과 관련이 있다는 연구(Lim, 1977; Solie, 1994)와 대조적으로 최적 pH 6으로 관찰되어 strain의 차이에 따른 대사과정의 차이가 있을 것이라고 생각되어 차 후 연구할 계획이다.

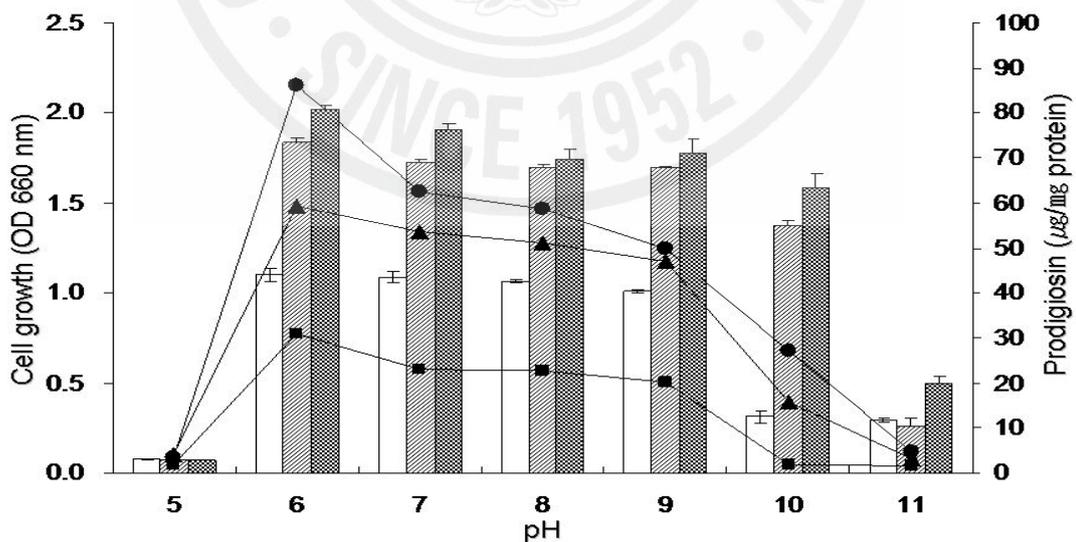


Fig. 12. Effect of pH on the producing prodigiosin pigment by *Zooshikella* sp. JE-34. Prodigiosin production : -■-, 24hr; -▲-, 48hr; -●-, 72hr; Cell growth: □, 24hr; ▨, 48hr; ▩, 72hr

2-2. 영양적 배양특성

1) NaCl 농도의 영향

일반적으로 해수에는 약 3.0% (w/v)의 NaCl이 함유되어 있으므로 NaCl에 따른 균체성장 및 이차대사산물의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다(fig. 13). NaCl 농도를 0.0~9.0(w/v)까지 조절한 배지에서 배양한 후 성장도 및 prodigiosin의 생합성량을 측정한 결과, 0.5%~6.0%까지의 농도범위에서 일정 수준 이상의 성장도 및 prodigiosin의 성장도를 나타냈으며 성장도의 경우 2%에서 가장 높은 성장도를 나타내었다. prodigiosin의 생합성량은 균체의 성장에 기인하여 증가하는 추이를 보였으며 2% 실험구가 역시 가장 높은 생합성량을 보였다.

JE-34는 NaCl 0.0%에서 성장 및 prodigiosin을 생합성 하지 않는 것으로 관찰되어 이는 해양유래 미생물로서 세포막의 안정성과 효소의 활성화를 위해 Na⁺의 배지내의 존재가 필수적인 것으로 보여 절대호염성균(obligate halophile)으로 사료된다.

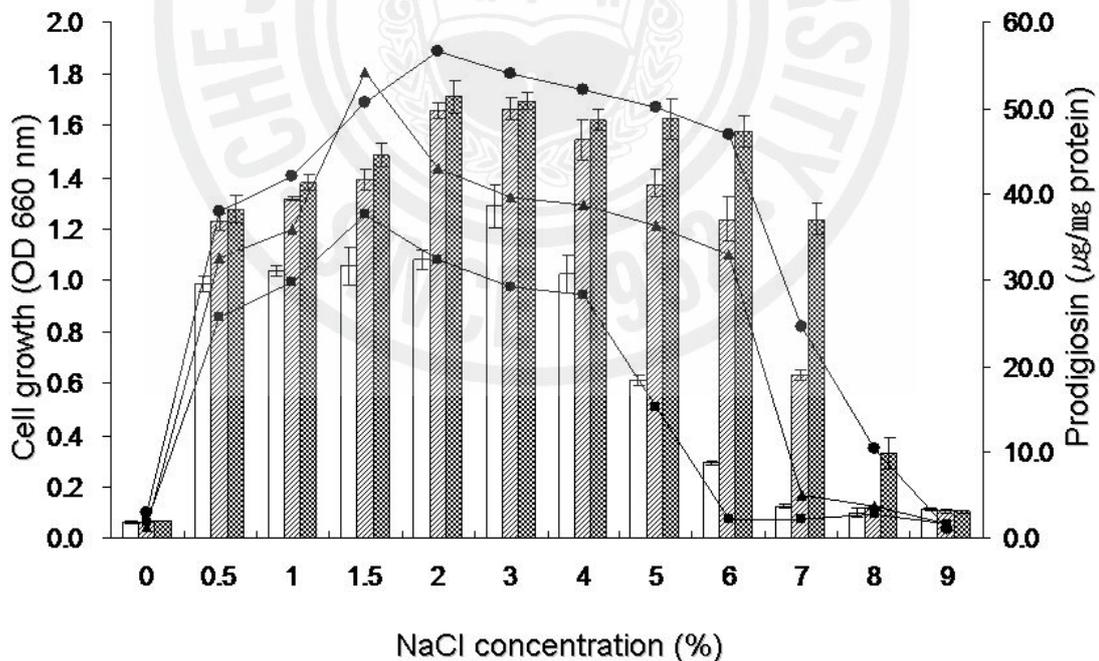


Fig. 13. Effect of NaCl concentration on the producing prodigiosin pigment by *Zooshikella* sp. JE-34.

Prodigiosin production : -■-, 24hr; -▲-, 48hr; -●-, 72hr; Cell growth: □, 24hr; ▨, 48hr; ▩, 72hr

2) 탄소원의 영향

JE-34의 성장 및 prodigiosin의 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%씩 첨가하여 균체성장 및 prodigiosin 생산량을 측정하였다(Table. 5). 균체의 성장은 fructose를 제외하고 모두 대조구보다 성장이 촉진된 것을 관찰할 수 있었고 다당류인 soluble starch의 첨가구에서 가장 성장이 촉진된 것으로 대조구 보다 약 156% 성장을 촉진시켰다. prodigiosin의 생합성량은 chitosan, fructose, mannitol, sorbitol, soluble starch, sucrose의 첨가구에서 생합성량이 증가되었으며 균체의 성장과 마찬가지로 soluble starch에서 가장 생합성을 증진시켰으며 72시간 배양시에 약 229% 생합성을 증가시켰다. 단 Xylose의 첨가구의 경우는 실험균주가 성장 및 prodigiosin을 생합성이 이루어지지 않는 것이 확인되었으며 xylose가 JE-34의 성장을 억제한다고 사료된다(data not shown). 한편 glucose의 경우 실험결과 균체성장은 대조구에 비해 증가 되었지만 prodigiosin의 생합성량은 미미하게나마 억제되었다. 이는 *S. marcscens*의 경우 glucose에 의해 prodigiosin의 생성을 현저히 억제시킨다는 연구(Clement, 1976)와 유사한 결과로 보인다. 이는 일반적으로 glucose와 같이 쉽게 이용 가능한 기질은 그 자체가 이차 사산물의 생합성 관련 효소들을 저해할 뿐만 아니라 발효에서도 과량의 기질이 존재할 때 pyruvic acid 및 α -ketoglutaric acid 등의 축적으로 이들에 의한 간접적인 저해효과도 초래할 수 있는 것과 관련이 있다고 생각된다(Aoyagi, 1990; Tanaka, 1992). 최적의 탄소원으로 선정된 soluble starch를 0.0~5%(w/v)까지 농도별로 첨가하여 균체성장 및 저해활성을 측정하였다(fig. 14. A). 그 결과 균체성장과 prodigiosin 생합성량은 2.5% 첨가구에서 가장 높았으며 이 이상의 농도에서는 균체의 성장 및 prodigiosin 생합성량이 감소하는 추세를 보였다. 이는 위에서 언급한 과도한 기질에 의한 저해 효과라 사료되며 *Zooshikella* sp. JE-34의 발효과정에서 생산하는 주요이차대사산물인 prodigiosin의 생합성을 저해하는 catabolite repressor로 작용한 것으로 사료된다.

3) 질소원의 영향

질소원은 미생물의 대사증식에 결정적인 영향을 미치는 성분으로 알려져 있 malt extract, peptone, yeast extract의 유기 질소원과 NH_4NO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 의 무기 질소원을 첨가하여 실험하였다(Table. 5). 그 결과 모든 질소원 첨가구에서 Control에 비하여 균체성장 및 prodigiosin의 생합성량이 증가함을 관찰할 수 있었고 유기질소원의 경우 malt extract, 무기 질소원의 경우 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 의 실험구에서 가장 증가되는 결과를 얻었고 이는 각각 약 193%, 177%의 prodigiosin 생합성량의 증가시켰다. 이는 미생물이 효소를 이용하여 각각의 질소원을 기질로 이용하여 분해과정을 통해 아미노산들을 생산하게 되는 것과 관련이 있다. 배지내의 풍부한 아미노산의 조성은 생물체의 단백질합성 및 효소활성의 증대를 야기할 수 있어 균체성장을 촉진시킨다. 특히 prodigiosin의 생합성은 여러 아미노산으로부터 합성된다고 보고되어(Lim, 1977) 질소원의 첨가가 중요한 역할을 한다고 사료된다. 이중 prodigiosin 생합성량의 증가율이 높은 malt extract를 최적 질소원으로 선택하여 농도별로 첨가하여 실험하였다(Fig. 14. B). 실험결과 성장도 및 prodigiosin 생합성량의 최적 농도는 1.5%로 나타났으며 prodigiosin의 생합성량을 2배 이상 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 농도가 고농도일 경우 초기에는 성장 및 생합성량이 감소하였으나 시간이 경과함에 따라 균체성장 및 생합성량이 급격한 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 생합성량의 급격한 증가가 나타난 것이라 사료된다.

4) 무기염류의 첨가 효과

미생물이 생산하는 이차대사산물의 생산에 있어 금속염은 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 특히 해양미생물의 경우 해수의 무기염류가 풍부한 특성에 의해 금속염의 영향이 더욱 중요할 것이라 사료된다.

이에 따라 기본배지에 무기염류 BaCl_2 , CaCl_2 , KCl , MgCl_2 , Na_2HPO_4 를 0.1% (w/v)농도로 첨가하여 균체 성장 및 prodigiosin 생합성에 미치는 영향을 알아보았다(Table. 5). 예비 실험을 통해 CuSO_4 , FeCl_2 , HgCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 에서는 72 시간동안 배양한 결과 성장이 이루어 지지 않아 중금속염의 첨가는 균체성장 및 생합성의 저해요인으로 작용함으로 사료된다(Data not shown). 이는 중금속의 경우 -SH 작용기를 가진 단백질과 결합하면 단백질을 비활성화 시키는 것과 연관된 결과라 생각된다. 실험결과 BaCl_2 , Na_2HPO_4 의 경우 대조구에 비해 균체의 성장 및 prodigiosin 생합성이 증대됨이 관찰되었으며, MgCl_2 의 경우는 균체의 성장은 대조구와 유사하였으나 prodigiosin의 생합성은 증대되는 양상을 보여 Mg^+ 가 생합성 과정에 영향을 미친다고 생각된다. 이 중에 Na_2HPO_4 의 경우 가장 높은 성장도 및 생합성량의 증가를 나타냈다.

이에 따라 Na_2HPO_4 를 0.0~3.0% (w/v)로 각각 첨가하여 배양 관찰하였다(Fig. 14. C). 그 결과 1.0% 첨가구에서 가장 성장도 및 생합성능이 높게 나타났으며 농도가 더욱 높아짐에 따라 저해되는 양상을 보였다. *S. marcscens*의 비증식 세포에서 무기인산은 0.3mM이내에서 prodigiosin 생성을 급격히 증가시키지만 10~250mM의 농도 범위에서는 감소시키는 경향을 나타낸다는 보고(Witney, 1977)와 다르게 나타났다. 하지만 이는 균 특이성이 크기 때문에 충분히 가능하다 생각되며 일정농도를 기준으로 양상자체는 유사하게 나타나 prodigiosin의 생합성은 무기인산의 농도와 관련이 있다고 사료된다.

Table. 5. Effect of carbon, nitrogen, and mineral sources on the growth and producing prodigiosin pigment.

Source	component	Cell growth (OD _{660nm})			Prodigiosin ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)		
		24hrs	48hrs	72hrs	24hrs	48hrs	72hrs
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)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
	Na₂HPO₄	1.094	1.960	1.996	66.4	63.1	90.2

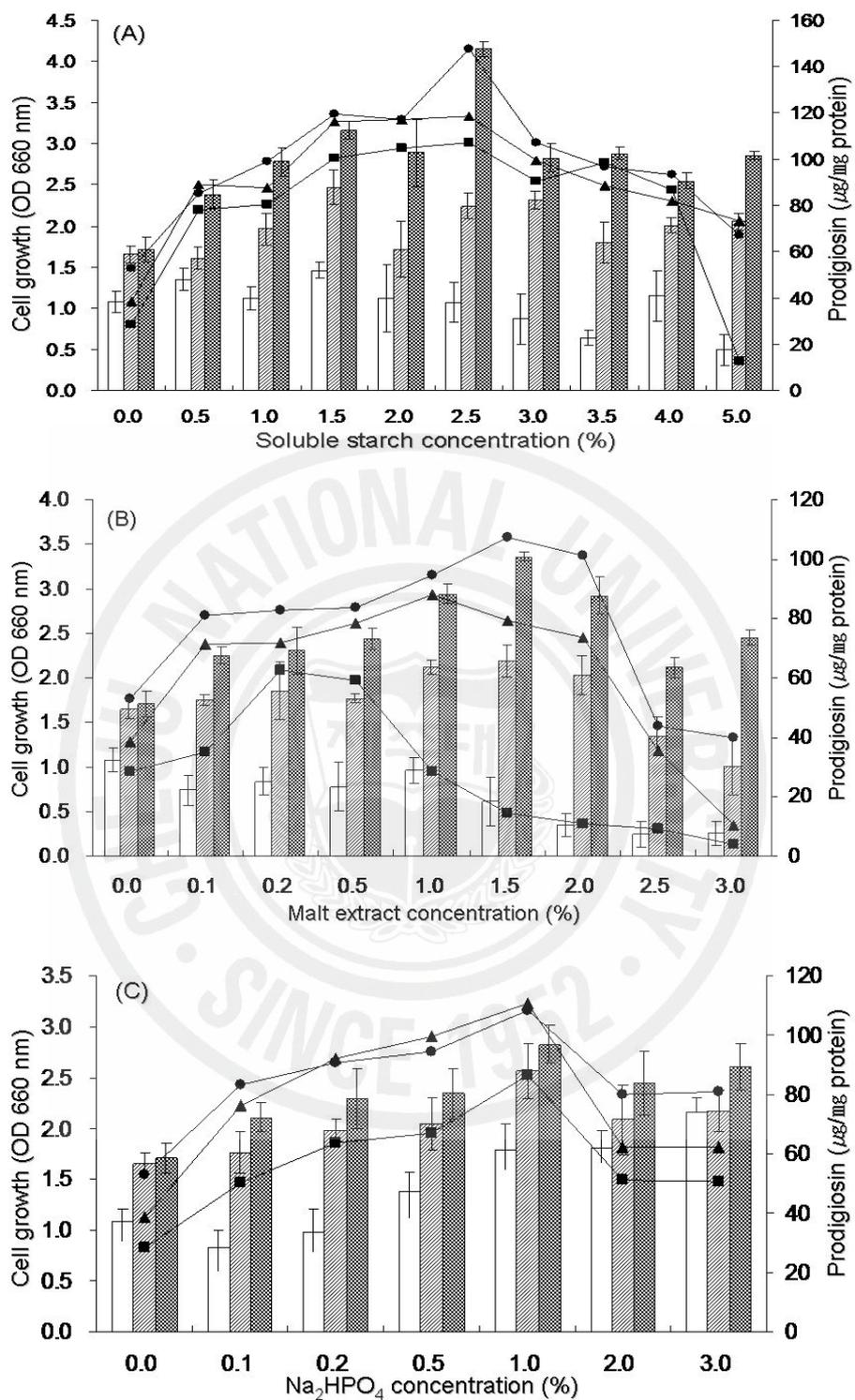


Fig. 14. Effect of starch concentrations(A), malt extract concentrations(B), and Na₂HPO₄ concentrations(C) on the growth and producing prodigiosin pigment. Prodigiosin production : -■-, 24hr; -▲-, 48hr; -●-, 72hr; Cell growth: □, 24hr; ▨, 48hr; ▩, 72hr

5) 최적배양조건에 prodigiosin의 생산

앞의 결과를 토대로 배지 및 배양조건을 조절하여 균체성장과 prodigiosin의 생합성의 증가시키고자 하였다. 하지만 앞의 결과에 의거하여 조성한 배지의 경우 첨가된 탄소원, 질소원, 무기염류가 interaction을 통해 균의 성장을 저해함에 따라 각각의 배지조성들을 비교해 보았다(Fig. 15). 균체의 성장은 starch 첨가구에서 가장 높은 성장을 보였으나 malt extract, Na_2HPO_4 의 경우는 성장이 서서히 지속적인 성장을 보였다(Fig. 15. A). prodigiosin의 생합성은 Starch, malt extract의 첨가구가 120시간에 높은 생합성량을 보였으며, 위의 성장패턴과 비슷한 양상을 보였다. Na_2HPO_4 의 첨가구의 경우는 기본배지보다 48시간 이후부터 96시간까지는 생합성량이 높게 나타났으나 120시간에는 기본배지구와 유사한 생합성량을 보였다.

한편 앞에서 언급한 대로 여러 생리활성이 알려진 Prodigiosin의 대표적인 생산자로 널리 알려진 *Serratia marcescens*를 이용하고자 세계적으로 생산성이 우수한 균주개발의 연구가 활발히 이루어 졌다. 이러한 맥락에서 본 실험에서는 *Serratia marcescens*와 *Zooshikella* sp. JE-34의 prodigiosin의 생합성량을 비교하여 보았다(Fig. 15. B). *Serratia marcescens*의 경우 prodigiosin의 생합성을 위해 조성된 The caseinen riched medium (casein 20g, K_2HPO_4 1.7g, MgSO_4 1g.7H₂O, NaCl 1 g +1L D.W)에 30°C의 동일조건에서 배양하였다. 배양한 결과 *Zooshikella* sp. JE-34의 기본배지의 최대생합성량에 비해 약 20배의 차이를 보이며 Starch 첨가배지의 경우는 약 30배의 차이를 보인다. 이에 따라 *Zooshikella* sp. JE-34는 prodigiosin 생합성의 bioreactor로서의 매우 긍정적인 의의가 있다고 생각된다.

또한 본 연구에서 탐색하지 못한 아미노산 조성이 prodigiosin의 생합성에 미치는 영향을 연구할 필요성이 있다고 사료된다. 이는 *Serratia marcescens*의 prodigiosin 생합성에 알라닌, 히스티딘, 프롤린등의 아미노산이 생합성을 유발한다는 연구된 바 있기 때문이다.(Wasserman, 1973).

미생물의 이차대사산물생산 및 균의 성장촉진을 위한 최적배양조건 탐색은 매우 광범위한 물질에 의해 쉽게 결정할 수 없는 분야이다. 이에 따라 본 균주의 경우에도 차 후 균주의 배양특성의 대한 심도 있는 연구가 요구된다.

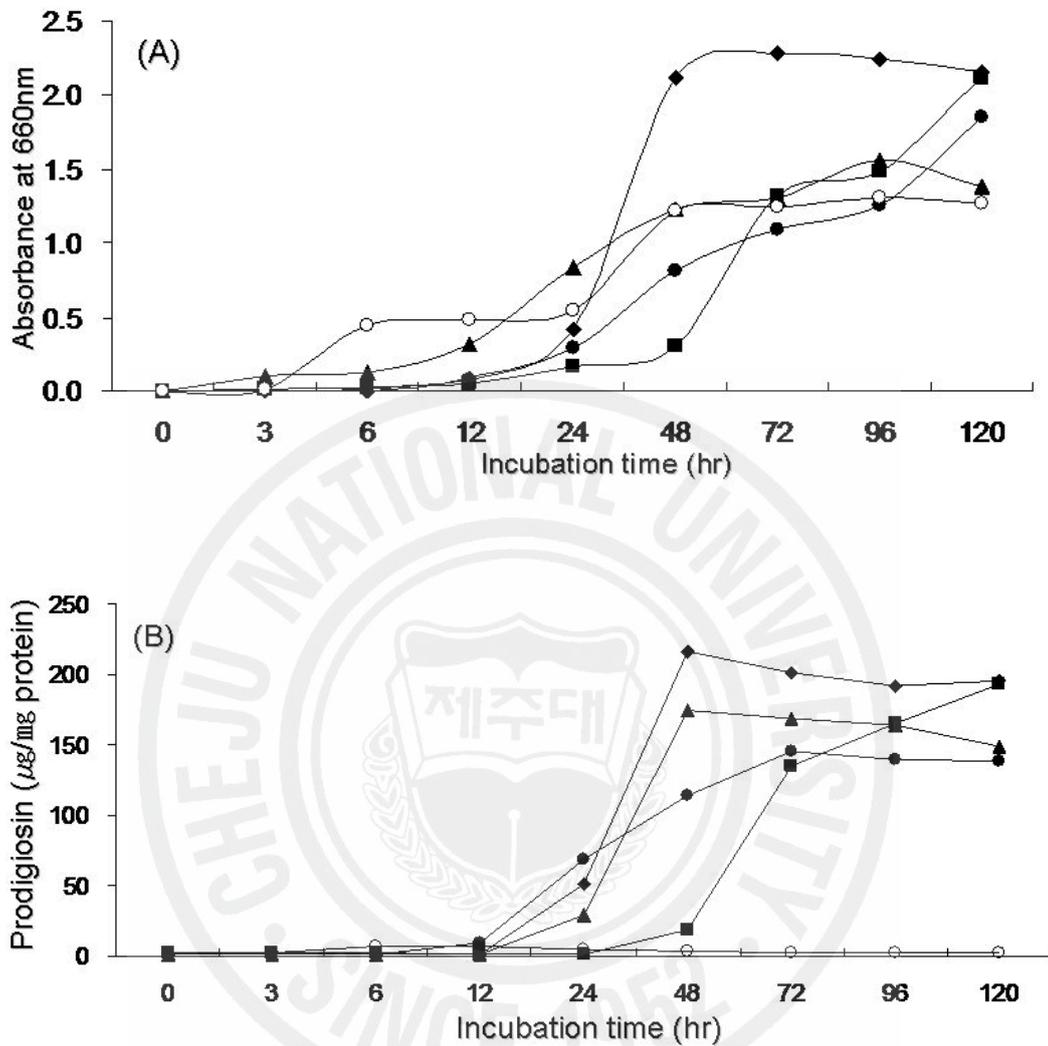


Fig. 15. Prodigiosin pigment from *Zooshikella* sp. JE-34 during the shaking culture under optimal growth condition.

Optimal growth condition was as follows: ● Basal medium, ◆ MB+Strach 2.5%, ■ MB+Malt extract 1.5%, ▲ MB+Na₂HPO₄, ○ *Serratia marcescens* (The caseinen riched medium)

2-3. Zooshikella sp. JE-34 유래 적색색소의 색소안정성

1) pH의 영향

Zooshikella sp. JE-34의 색소용액은 pH 7.0의 상태에서 최대흡수파장이 530nm으로 나타났으며 pH 3.0~10.0의 조건하에서 색소용액의 spectrum의 변화 및 색의 변화를 나타내었다 (Fig. 16, 17).

실험결과 산성조건에서는 적색을 유지했지만 염기성 조건으로 바뀔수록 주황색으로 변해되었으며 pH 8.0에서는 spectrum의 변화가 급격히 나타나 최대흡수파장이 470nm부근으로 점차적으로 전환되는 양상을 보였다. 이는 Song의 연구에서 *Serratia* sp. KH-95의 prodigiosin이 pH 7.3에서 pH 9.0으로 염기성의 조건일수록 470nm로 최대흡수파장이 전환되는 것과 매우 유사한 결과를 보여 이 실험의 색소물질이 prodigiosin 유사색소라는 반증이라고 생각된다(Song, 2005).

2) 광선 및 온도에 따른 영향

광선이 색소물질에 미치는 영향은 Fig. 18에서와 같이 암소에서 저장한 경우 6일 동안 약 95%이상의 안정성을 보였으며 광조사의 경우 3일간은 95%이상의 안정성을 유지하였지만 4일 이후에는 안정성이 감소함을 나타냈으며 6일 후에는 약 55%정도의 퇴색현상을 나타내었다. 이는 일반적으로 천연색소가 광선에 의해 색소물질이 분해되는 것과 유사한 양상을 나타내어 광선의 접촉 차단이 색소의 안정화에 기여할 수 있다고 보인다. 따라서 이 색소물질의 활용시에 광선 차단을 염두에 두어야 할 것이라고 사료된다.

온도에 대한 색소의 안정성은 4, 25, 37°C에서 저장하여 비교하였으며 결과는 Fig. 19과 같았다. 그 결과 4°C에서 저장한 경우 6일간 저장했음에도 불구하고 98%이상의 안정성을 보였으며 25°C에서는 96%이상, 37°C에서는 95%이상의 안정성을 보여 색조의 변화에 영향을 거의 받지 않았다. 이에 따라 저온에서 보관시에 높은 안정성을 기대할 수 있다고 생각된다. 보다 넓은 범위의 온도에서의 안정성을 알기위해 4~121°C의 범위의 온도로 처리한 결과 Fig. 20와 같았다. 실험결과 4~50°C 범위에서는 95%이상의 높은 안정성을 보였으며 60°C에서부터 서서히 안정성이 저하됨을 관찰할 수 있었다. 하지만 121°C에서 처리한 실험구도 80%이상의 일정수준 이상의 높은 안정성을 보여 활용 가능성이 높다 사료된다.

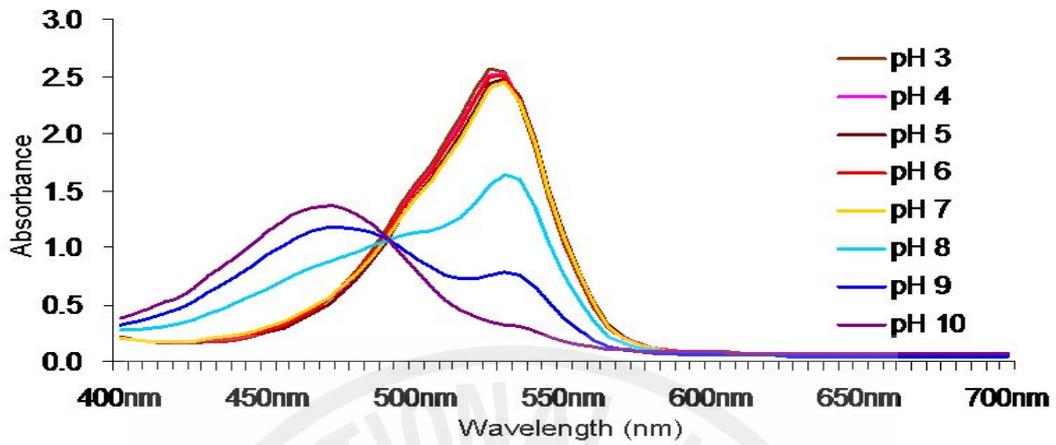


Fig. 16. The absorption spectra of red pigment as function of pH from *Zooshikella* sp. JE-34.



Fig. 17. Prodigiosin-like pigment from marine microorganism under pH conditions.

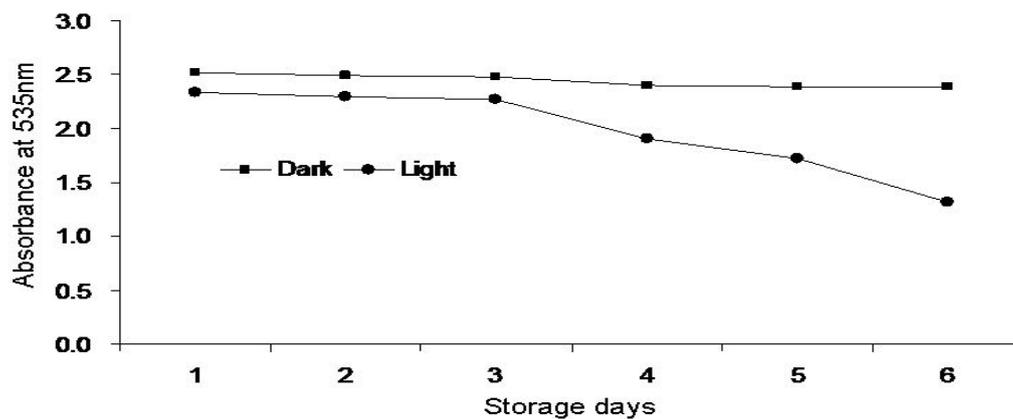


Fig. 18. Effect of light on stability of *Zooshikella* sp. JE-34 red pigment during storage at 25°C

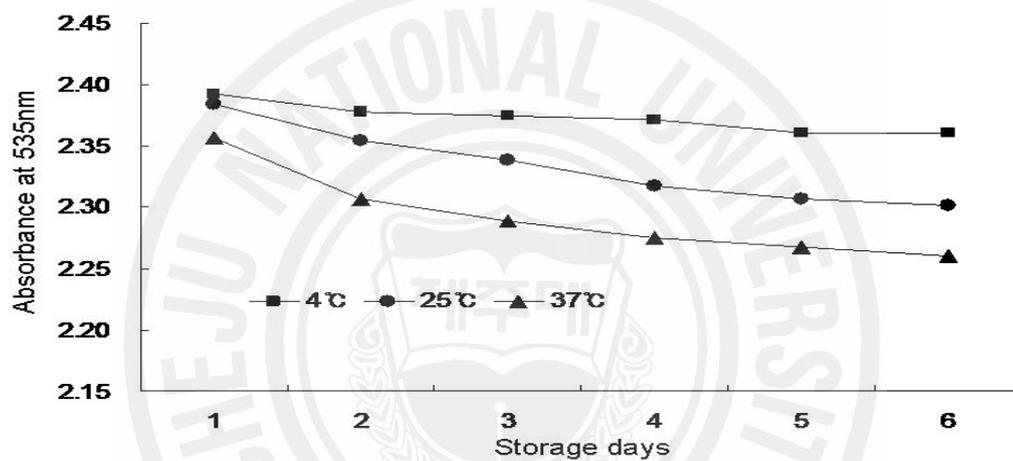


Fig. 19. Effect of temperature on stability of *Zooshikella* sp. JE-34 red pigment during storage in the dark.

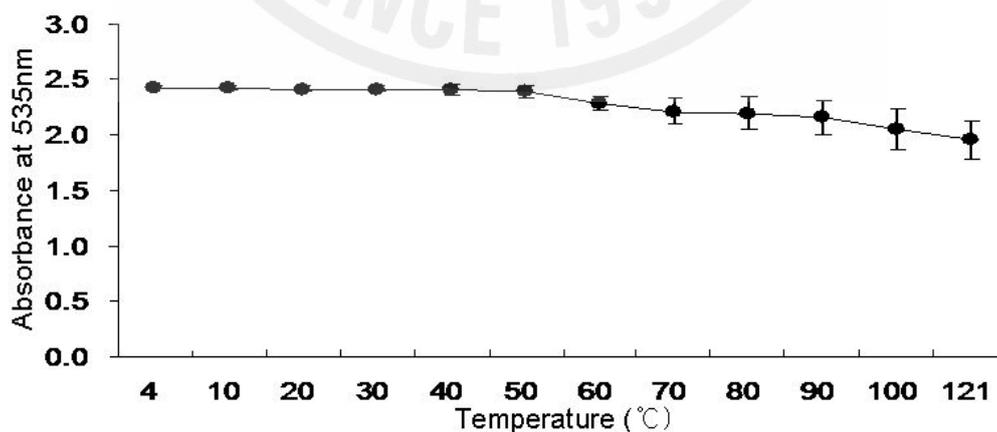


Fig. 20. Effect of temperature on the absorbance of *Zooshikella* sp. JE-34 red pigment.

3. *Zooshikella* sp. JE-34가 생산하는 이차대사산물의 생리활성

3-1. 이차대사산물의 라디칼 소거활성

산소는 지구상에서 가장 많은 원소로서 호기성 생물은 환경중의 풍부한 산소를 전자수용체로 하는 호흡을 통해 에너지를 획득한다. 그러나 이와 같이 생명유지에 절대적으로 필요한 산소이지만 안정한 분자상태인 기저삼중항산소 (ground state triplet oxygen)가 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적 화학적 요인 등에 의하여 superoxide, hydroxyl, peroxy radical, alkoxy, hydroperoxy radical 등의 라디칼과 hydrogen peroxide, singlet oxygen, ozone 등의 비라디칼 같은 반응성이 매우 큰 활성산소(active oxygen)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 가지고 있다. 이들이 체내에서 과도하게 생성되면 세포구성성분인 단백질, DNA, 효소, 지질 등에 비선택, 비가역적인 파괴작용을 함으로서(McBride, 1991; Orrenius, 1993) 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병등, 동맥경화, 염증, 류마티스, 간염, 당뇨병 등의 각종질병 및 노화를 일으키는 것으로 알려져 있다(Cross, 1987). 또한 이들 활성산소에 의한 지질과산화물 등이 생성되어 이들 또한 질병에 원인이 되기도 한다. 이렇게 과다하게 생성된 활성산소를 제거하기 위해 생체에서는 SOD를 비롯해 비타민 C, E등의 방어기작이 존재하지만 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산소독성에 의한 세포파괴가 일어난다. 이에 따라 활성산소와 과산화 지질의 제거물질로서 항산화물질의 탐색이 활발히 이루어지고 있으며 합성항산화제의 안전성이 재검토 되면서 천연항산화제의 개발이 요구되고 있다. 이는 주로 식품소재에서 항산화물질 연구가 활발히 연구 되고 있으나 미생물에서 생산하는 항산화 물질 특히 해양성 미생물의 경우는 더욱 연구가 미약하다.

근래에 들어 미생물 대사산물에서 신규 항산화물질을 탐색하는 연구가 진행되고 있으며 국내에서는 방선균 대사산물로부터 thiazin계의 gerithiazine, benzamide계의 benzastatin A, B, C, D, E, F(Kim, 1996)등의 연구가 이루어 졌고, 해외의 경우 더욱 활발히 연구되었으며 pyrrostatin, pyridoxatin, carquinostatin, Neocarazostatin B, 특히 antiostatins류 화합물의 경우 vitamin E에 비해 약 50배의 강한항산화 활성을 나타내었다(Mo, C.-J., 1990). 이러한 동향과 일반적인 색소의 경우 항산화능이 높다고 알려져 있는 점과 관련하여 *Zooshikella* sp. JE-34의 이차대사산물의 항산화 활성을 알아보았다.

1) *Zooshikella* sp. JE-34 supernatant의 라디칼 소거활성

실험균주인 *Zooshikella* sp. JE-34의 이차대사산물이 항산화 활성이 있는지 확인하기 위해 균체를 제거한 supernatant의 항산화 활성을 측정하였다.

Supernatant는 1, 10, 50, 100%의 농도별로 실험에 이용하였으며 DPPH radical 저해활성은 Nanjo의 방법(Nanjo, 1996), Alkyl radical 저해활성은 Hiramoto의 방법(Hiramoto, 1993), Hydroxyl radical 저해활성은 Rosen의 방법(Rosen, 1984)을 이용하여 ESR (electron spin resonance spectrometry)을 통해 측정하였다(Fig. 21). DPPH radical 저해활성은 1%, 10%에서는 50%에 못미치는 활성을 보였지만 50%에서 92.67%를 저해하였고, 100%에서는 96.02%의 저해활성을 나타냈다. Alkyl radical 저해활성은 1%에서의 저농도에서도 약 50%에 이르는 활성을 보였으며 100%실험구의 경우 86.6%의 저해활성을 나타냈다.

Hydroxyl radical 저해활성은 50%에서는 39.18%, 100%에서는 48.30%로 나타났다. 균 배양액의 항산화력을 가진 이차대사산물의 생산조건을 탐색하기 위해 배양온도 및 배양시간에 따른 DPPH radical 소거활성의 변화를 알아보았다(Fig. 22). 이전의 배양특성에 관련한 실험에서의 균체의 성장곡선과 유사한 결과를 보였으며 이는 항산화력을 띄는 이차대사산물은 균의 성장에 의존적으로 증가하는 것으로 보이며 고온이 아닌 전제하에 온도에 크게 영향을 받지 않는다고 사료된다. 배양온도 중 30°C에서 전반적으로 높은 소거활성을 보였으며 96시간 배양시에 95%를 저해하여 최대소거활성을 나타냈다.

이러한 결과를 통해 *Zooshikella* sp. JE-34 배양액 중에는 긍정적인 항산화 활성을 띄는 이차대사산물이 존재할 것이라 사료되어 이를 용매별 추출 및 분획을 통해 항산화력을 다음의 실험에서 확인하였다. 또한 배양액으로 용리되는 이차대사산물 뿐 아니라 균체내의 이차대사산물 및 균체성분이 활성물질일 가능성에 의해 동일하게 추출 및 분획하여 항산화력을 측정하였다.

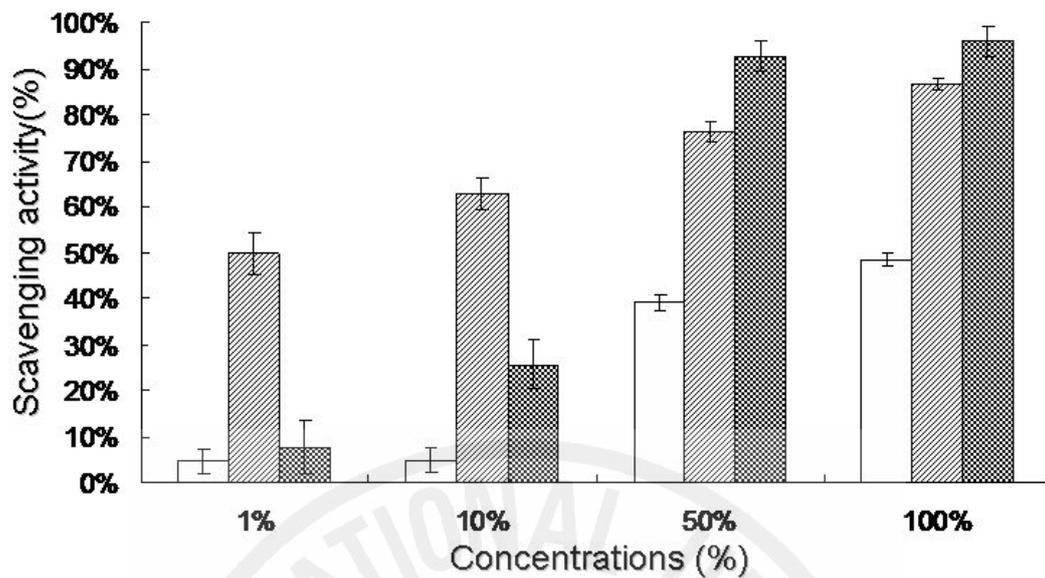


Fig. 21. DPPH, alkyl, hydroxyl radical scavenging activities of culture supernatant of *Zooshikella* sp. JE-34.

□ , Hydroxyl radical scavenging activity; ▨ , Alkyl radical scavenging activity; ▩ , DPPH radical scavenging activity.

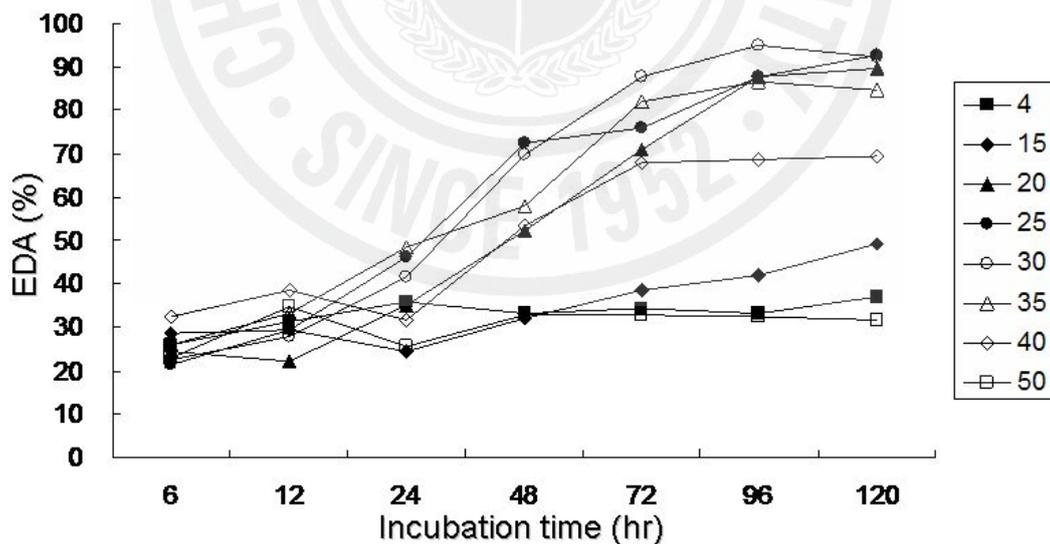


Fig. 22. Comparison of EDA (%) of *Zooshikella* sp. JE-34 culture supernatant in other temperature conditions.

2) 균체 및 배양액 추출 · 분획물의 DPPH radical 소거활성

일반적으로 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그중에 DPPH radical 소거 활성법은 비교적 간단하고 널리 사용되는 방법이다. 이는 시료중의 항산화 물질이 전자적으로 불안정한 상태인 DPPH와 전자를 공여하여 안정한 상태를 만들 수 있는 능력을 측정하는 방법으로 기존에는 분광학적으로 측정하였으나 본 실험에서는 ESR (electron spin resonance spectrometry)를 이용하여 더욱 정밀도를 높였으며 색소에 의한 오차를 줄일 수 있는 방법이라 할 수 있겠다. ESR spectroscopy에 의한 측정방법은 가장 유망한 방법 중의 하나로써, 방사선 조사시 입사된 에너지의 일부가 분자결합을 붕괴시켜 방출된 자유 라디칼이나 이온들을 측정할 수 있는 것으로 시료준비가 간편하고 신속하며 시료준비가 간편하고 신속하며 시료에 손상을 주지 않는 검지기술로 알려져 있다(Janzen, 1987; Kadiiska, 2002). 하지만 이러한 장점에 불구하고 국내에서는 유해산소의 검지방법으로 이용한 경우가 드물다.

30°C에서 120시간 배양된 *Zooshikella* sp. JE-34를 균체와 배양액으로 나누어 각각 5가지의 용매조건(25°C distilled water, 70°C distilled water, Acetone, 70% methanol, chloroform)의 추출물로 DPPH radical 소거활성을 측정하였다(Fig. 24, 25).

실험 결과 균체의 용매별 추출물의 경우 1mg/ml에서는 모든 용매에서 90%이상의 매우 높은 DPPH radical 소거활성을 보였으며 Acetone 추출물의 경우 0.5mg/ml에서 약 95%, 0.1mg/ml의 농도에서 73%의 활성을 보여 가장 높은 활성을 보였다. 단 균체의 추출 시 수율이 너무 낮아 이용가능성에 있어서는 불리한 면이 있을 것이라 사료된다(Data not shown). 그 외의 용매별 추출물에서도 0.5mg/ml에서도 50%이상의 소거활성을 보여 균체에 다량의 전자공여능을 띠는 물질이 존재할 것이라 생각된다. 균체의 추출물을 용매별(diethyl ether, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, distilled water) 분획을 통해 항산화 활성을 띠는 물질의 극성 및 비극성계열의 화합물인지 확인해 보았다(Fig. 24). 그 결과 비극성용매인 diethyl ether 분획물에서 0.5 mg/ml 에서도 약 95%의 높은 활성을 나타내었으며 극성용매로 갈수록 활성이 낮아지는 추이를 보였다. 단 n-butanol의 경우 0.5 mg/ml 70%의 순수한 소거활성을 나타내었다. 이를 종합하여 볼 때 균체의 성분에서는 비극성 물질 중에 높은 전자공여

능을 가진 물질이 존재할 것이라 사료된다.

이에 HPLC를 통한 diethyl ether의 분석결과 prodigiosin과 유사한 peak를 관찰할 수 있었으며(Data not shown) 이에 본 균주가 생성하는 prodigiosin 유사색소가 긍정적인 전자공여능을 가지고 있다고 추측 가능하여 차후 물질의 구조분석 및 정제물의 전자공여능을 측정할 필요가 있다고 사료된다.

배양액의 용매별 추출물의 경우 균체에 비하여 전체적으로 낮은 전자공여능을 보였다(Fig. 25). 실험구 중 Acetone 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었다.

배양액의 추출물의 경우 많은 부분이 배지성분이 차지하고 있으며 비극성 물질의 경우 배양액에 용리되기 어렵기 때문에 전자공여능이 비교적 낮게 나타났다고 사료된다. 배양액의 용매별 분획물의 전자공여능을 측정한 결과 균체분획물과 유사하게 비극성용매에서 높은 전자공여능이 나타났다. 이중 chloroform 분획물 1mg/ml에서 84%의 소거활성을 보여 가장 높았고 diethyl ether의 분획물도 1mg/ml농도에서 77%정도로 우수한 소거활성을 보였다.

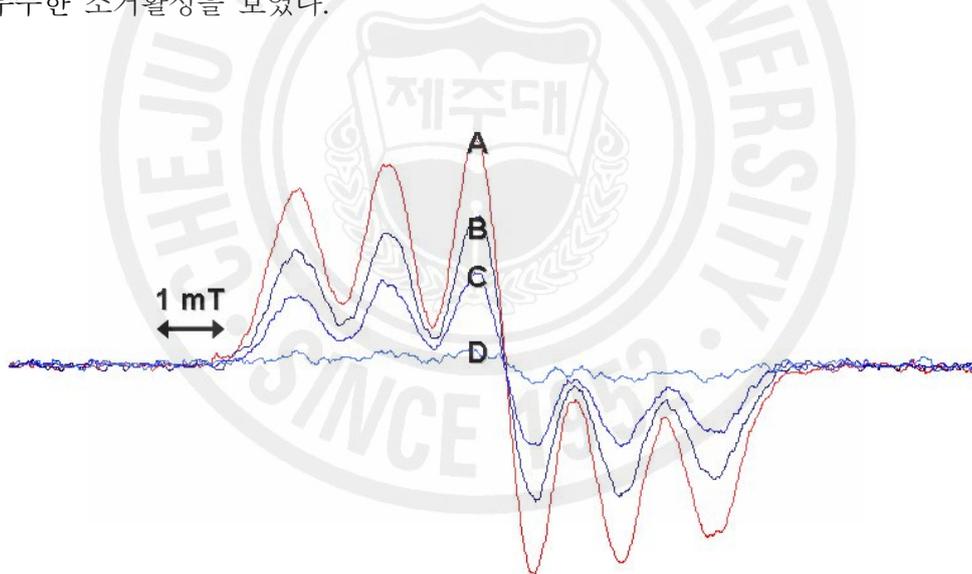


Fig. 23. ESR spectrum obtained in an ethanol solution of 60 $\mu\text{mol/l}$ DPPH at various concentrations of 25 $^{\circ}\text{C}$ distilled water extracts from *Zooshikella* sp. JE-34.

(A) control; (B) 0.1 mg/ml; (C) 0.5 mg/ml; (D) 1.0 mg/ml.

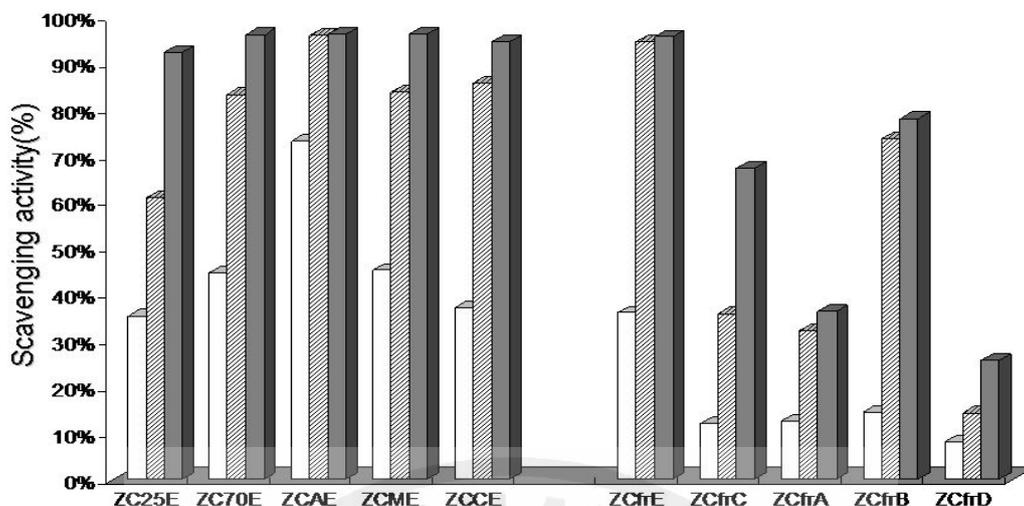


Fig. 24. DPPH radical scavenging activity of the bacterial cell extracts and fractions from *Zooshikella* sp. CH-34.

□, 0.1mg/ml ▨, 0.5 mg/ml ■ 1.0 mg/ml ; ZC25E: Distilled water extract at 25°C, ZC70E: Distilled water extract at 70°C, ZCAE: Acetone extract, ZCME: 70% methanol extract, ZCCE: chloroform extract. ZCfrE: Diethyl ether extract, ZCfrC: Chloroform extract, ZCfrA: Ethyl acetate extract, ZCfrB: n-butanol extract, ZCfrD: Distilled water extract.

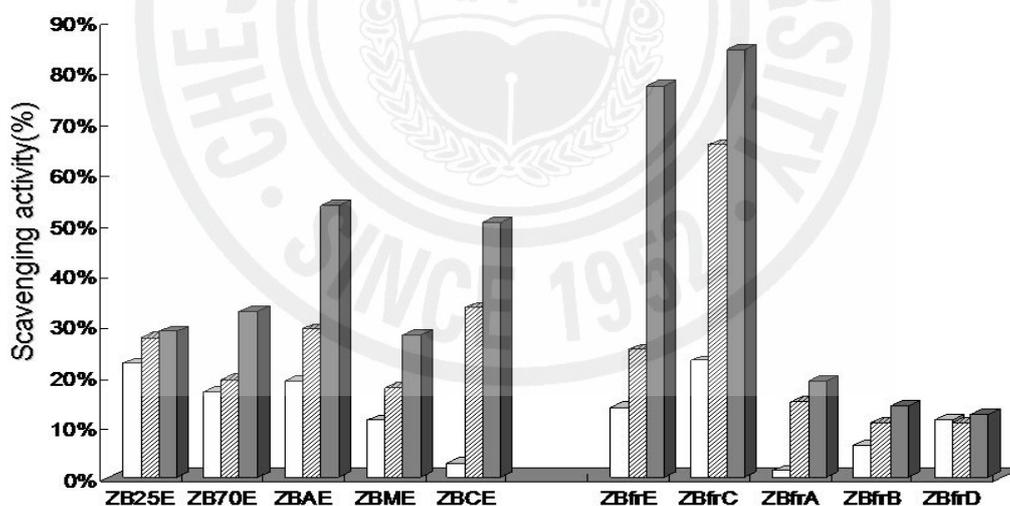


Fig. 25. DPPH radical scavenging activity of the culture broth extracts and fractions from *Zooshikella* sp. CH-34.

□, 0.1mg/ml ▨, 0.5 mg/ml ■ 1.0 mg/ml ; ZB25E: Distilled water extract at 25°C, ZB70E: Distilled water extract at 70°C, ZBAE: Acetone extract, ZBME: 70% methanol extract, ZBCE: chloroform extract. ZBfrE: Diethyl ether extract, ZBfrC: Chloroform extract, ZBfrA: Ethyl acetate extract, ZBfrB: n-butanol extract, ZBfrD: Distilled water extract.

3) 균체 및 배양액 추출 · 분획물의 Alkyl radical 소거활성

Alkyl radical은 hydrocarbon reaction에서 초기 반응 생성물로 많이 형성된다. 이는 불포화지방산이 산소에 노출되면 지질과산화이 일어나며 이는 free radical에 의해 불포화지방산의 methylene(-CH₂-)기로부터 수소원자(H·)가 탈취함에 따라 개시(initiation)된다. 이를 흔히 일으키는 radical로는 ·OH, RO·, ROO·, HO₂· 등이 있고 O₂-과 H₂O₂는 그 자체로는 그런 능력이 없다. 수소탈취에 의해 생긴 alkyl radical (R·)은 분자재구성을 통해 diene형태로 바뀌고 이것이 다시 산소와 결합하여 peroxy radical을 형성한다. Peroxy radical은 다시 다른 불포화지방산으로부터 수소를 탈취하므로써 일종의 연쇄반응(chain reaction)이 진행될 수 있다. Peroxy radical은 또한 분자재구성을 통해 여러 형태의 과산화물로 전환된다. 지질과산화물은 그 자체로는 상당히 안정되나 전이금속의 존재 하에서는 분해가 촉진된다. 지질과산화물의 분해산물은 다양하며 많은 종류의 carbonyl 화합물을 포함한다. 생체막에는 다량의 불포화지방산을 포함하고 있다. 따라서 지질과산화로 인해 지질분자의 구조적 변화가 넓은 범위에 걸쳐 일어나면 생체막 fluidity의 감소, membrane potential의 감소, 이온투과성의 증가, 세포소기관 내용물의 누출 등이 예상되고 결국은 세포기능의 저하와 세포의 죽음을 초래할 수 있다. 지질과산화물과 그것의 분해산물중에는 생체에 유해한 성분들이 있으며 대식세포기능의 억제, 단백질 합성 억제, 효소의 실활, thrombin 과다생산등과 같은 유해작용들이 보고되어 왔다. 이에 따라 본 실험군주가 지질과산화의 시발점이라 할 수 있는 alkyl radical의 소거활성을 통해 그 생리활성물질로서 가능성을 확인하고자 하였다.

실험 결과 균체의 용매별 추출물의 경우 25°C의 D.W.의 추출물이 Alkyl radical 소거활성이 가장 높았으며 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml에서 각각 23.39, 75.36, 84.05%으로 나타났다(Fig. 27). 70°C의 조건하의 열수추출물의 결과로 보아 Alkyl radical 소거활성을 가지는 물질이 열에 일정수준 영향을 받는 것이라고 사료되며 DPPH radical 소거능과는 대조적으로 극성용매추출물이 비교적 강한 소거활성을 보였다. 균체의 용매별 분획물의 결과를 살펴보면 diethyl ether, butanol의 분획물의 농도가 1.0 mg/ml에서 각각 81.54, 71.80%의 가장 높은 소

거활성이 나타났으며 전반적으로 1.0 mg/ml의 농도에서는 50%이상의 소거활성을 보였다(Fig. 27). 이는 소거활성물질의 중간정도의 극성을 가지고 있다고 생각되며 균체의 대사산물 및 구성성분은 매우 긍정적인 Alkyl radical 소거활성물질이라 생각된다.

배양액의 용매별 추출물의 경우 전반적으로 균체의 추출물에 비해 낮은 활성을 나타냈으나 acetone의 추출물의 경우 1.0 mg/ml의 농도에서 86.13%의 높은 활성을 나타냈다(Fig. 28). acetone의 경우 색소물질의 추출에 널리 이용되는 추출용매로서 본 실험에서도 배양액내의 soluble하거나 미립자상태의 색소물질의 영향이 클 것으로 생각된다. 추출액의 경우도 선명한 적색을 띄어 본 균주가 생성하는 적색색소 즉 prodigiosin 유사색소가 긍정적인 alkyl radical 소거활성을 지닐 것이라 추측되며 차 후 연구를 통해 밝혀낼 것이다. 배양액의 용매별 분획물은 전반적으로 높은 소거활성을 나타냈으며 diethyl ether, ethyl acetate에서 가장 높은 활성을 보였으며 다른 분획물도 1.0 mg/ml에서 모두 50%이상의 활성을 보였다.

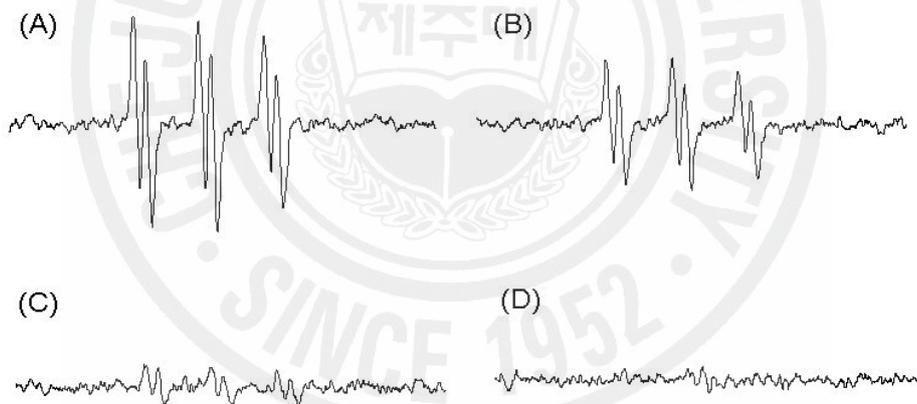


Fig. 26. ESR spectrum observed during incubation of AAPH with 4-POBN at various concentrations of 25°C distilled water extracts from *Zooshikella* sp. JE-34.

(a) control; (b) 0.1 mg/ml; (c) 0.5 mg/ml; (d) 1.0 mg/ml.

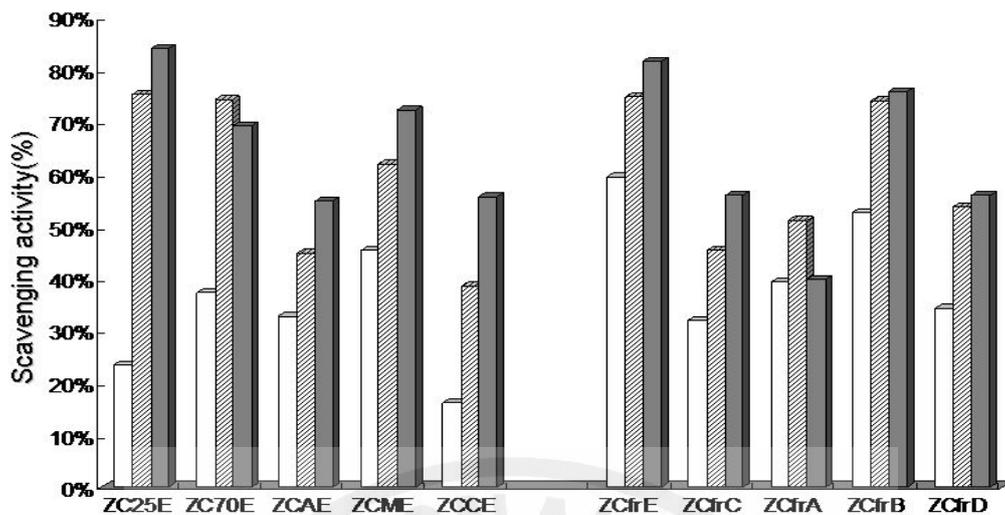


Fig. 27. Alkyl radical scavenging activity of the bacterial cell extracts and fractions from *Zooshikella* sp. CH-34.

□, 0.1mg/ml ▨, 0.5 mg/ml ■ 1.0 mg/ml ; ZC25E: Distilled water extract at 25°C, ZC70E: Distilled water extract at 70°C, ZCAE: Acetone extract, ZCME: 70% methanol extract, ZCCE: chloroform extract. ZCfrE: Diethyl ether extract, ZCfrC: Chloroform extract, ZCfrA: Ethyl acetate extract, ZCfrB: n-butanol extract, ZCfrD: Distilled water extract.

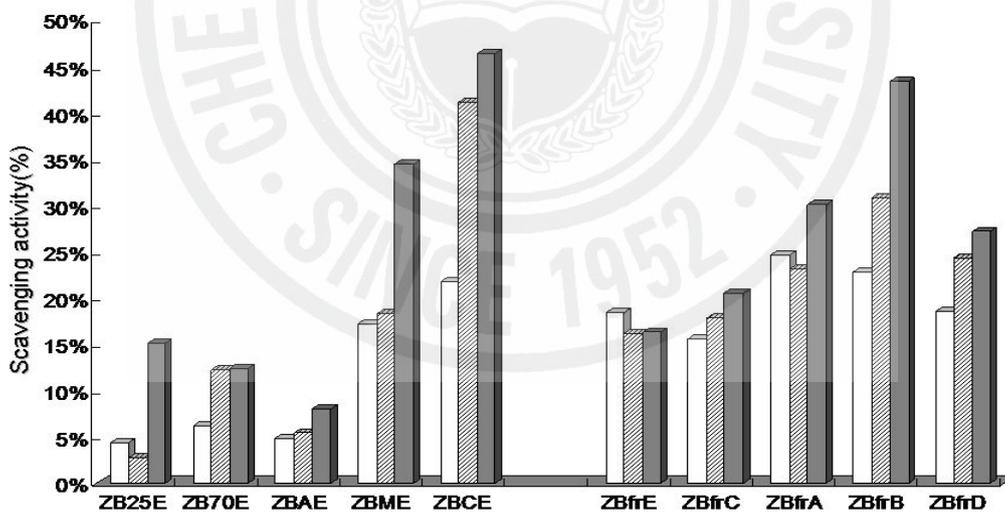


Fig. 28. Alkyl radical scavenging activity of the culture broth extracts and fractions from *Zooshikella* sp. CH-34.

□, 0.1mg/ml ▨, 0.5 mg/ml ■ 1.0 mg/ml ; ZB25E: Distilled water extract at 25°C, ZB70E: Distilled water extract at 70°C, ZBAE: Acetone extract, ZBME: 70% methanol extract, ZBCE: chloroform extract. ZBfrE: Diethyl ether extract, ZBfrC: Chloroform extract, ZBfrA: Ethyl acetate extract, ZBfrB: n-butanol extract, ZBfrD: Distilled water extract.

4) 균체 및 배양액 추출 · 분획물의 Hydroxyl radical 소거활성

Hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)은 활성산소종 중 가장 반응성이 매우 강하며 지질 산화를 개시하고 DNA 손상 및 돌연변이를 유발하는 물질로 널리 알려져 있다 (Evans, 2001). 이는 생체 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 과산화수소(H_2O_2)가 Fe_2^+ 나 Cu_2^+ 이온이 존재 하에서 생산되며 가장 독성이 강한 free radical이므로 이를 소거하는 정도를 측정하여 보았다.

균체의 용매별 추출물의 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과 25°C, 70°C의 distilled water 추출물이 가장 높은 활성을 보였으며 25°C distilled water 추출물의 경우 1.0, 0.5 mg/ml의 농도에서 53.88, 53.38% 저해하는 것으로 나타났다 (Fig. 29). 열수 추출인 70°C distilled water 추출물의 경우 1.0mg/ml의 농도에서 59.08%로 나타난 것으로 보아 hydroxyl radical의 소거활성에는 열의 영향이 미비하다고 사료된다. 이외의 추출용매에서는 낮은 저해활성을 보여 지금까지와는 다른 결과를 보였다. 이는 hydroxyl radical 소거활성이 비극성의 색소물질인 prodigiosin 유사물질의 영향에 아닐 수 있다고 사료된다. 물을 용매로한 추출물은 육안으로 보아도 다른 추출물에 비해 색소량이 적었으며 균체의 구성성분 및 대사산물중 물에 용리될 수 있는 물질이 작용했다고 생각된다. 균체의 용매별 분획물의 경우는 전반적으로 준수한 소거활성을 보였으며 chloroform, n-butanol의 분획물에서 활성이 비교적 높았다. 배양액의 용매별 추출액의 경우는 chloroform이 가장 활성이 높았으며 0.5mg/ml에서 40%이상의 소거활성을 나타냈다(Fig. 30). 이는 균체의 추출물과 대조되는 결과였으며 배양액내의 미립자의 물질이 존재하여 비극성용매인 chloroform에 용리되었을 것으로 생각되며 이 물질이 hydroxyl radical 소거활성에 긍정적인 역할을 한 것이라 추측된다. 배양액의 분획물은 n-butanol에서 가장 활성이 높았으며 43%의 소거활성을 나타내었다.

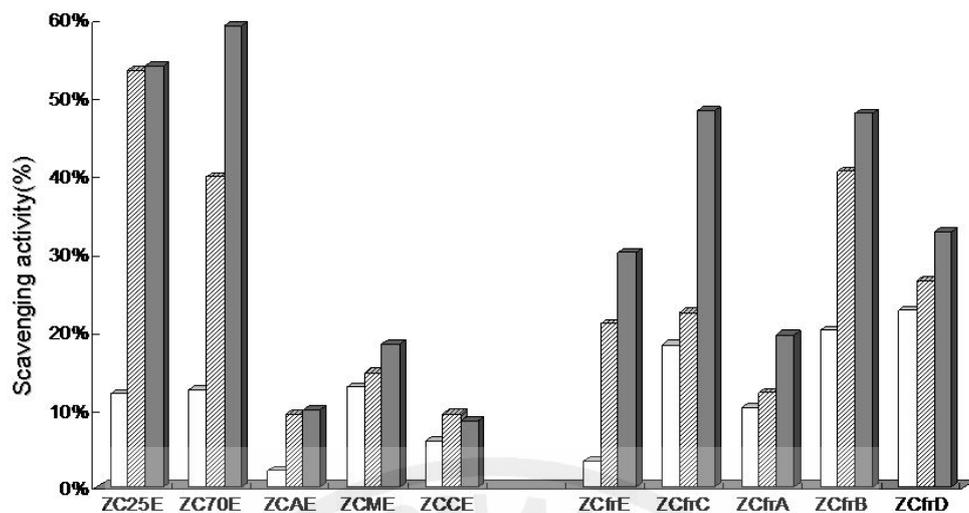


Fig. 29. Hydroxyl radical scavenging activity of the bacterial cell extracts and fractions from *Zooshikella* sp. CH-34.

□, 0.1mg/ml ▨, 0.5 mg/ml ■, 1.0 mg/ml ; ZC25E: Distilled water extract at 25°C, ZC70E: Distilled water extract at 70°C, ZCAE: Acetone extract, ZCME: 70% methanol extract, ZCCE: chloroform extract. ZCfrE: Diethyl ether extract, ZCfrC: Chloroform extract, ZCfrA: Ethyl acetate extract, ZCfrB: n-butanol extract, ZCfrD: Distilled water extract.

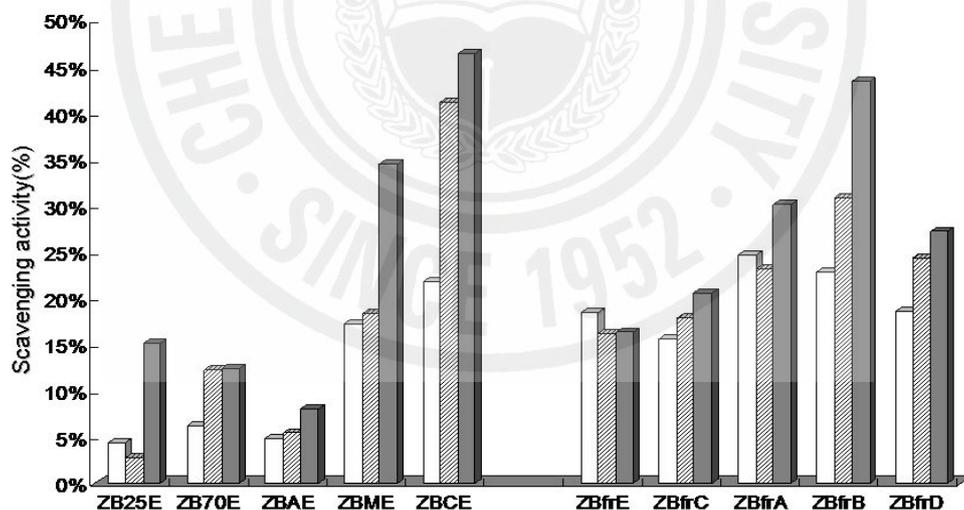


Fig. 30. Hydroxyl radical scavenging activity of the culture broth extracts and fractions from *Zooshikella* sp. CH-34.

□, 0.1mg/ml ▨, 0.5 mg/ml ■, 1.0 mg/ml ; ZB25E: Distilled water extract at 25°C, ZB70E: Distilled water extract at 70°C, ZBAE: Acetone extract, ZBME: 70% methanol extract, ZBCE: chloroform extract. ZBfrE: Diethyl ether extract, ZBfrC: Chloroform extract, ZBfrA: Ethyl acetate extract, ZBfrB: n-butanol extract, ZBfrD: Distilled water extract.

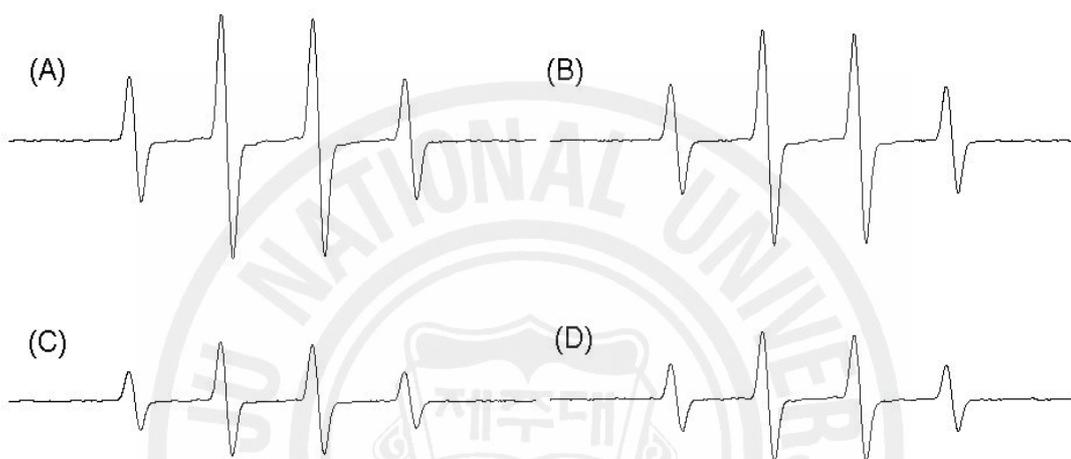


Fig. 31. ESR spectrum obtained in Fenton reaction system at various concentrations of 25°C distilled water extracts from *Zooshikella* sp. JE-34. (a) control; (b) 0.1 mg/ml; (c) 0.5 mg/ml; (d) 1.0 mg/ml.

5) 균체 및 배양액 추출 · 분획물의 Hydrogen peroxide 소거활성

Hydrogen peroxide는 과산화지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 과산화지질은 동맥경화, 뇌졸중 등의 성인병의 원인이 되고, 간장의 세포막에 과산화지질이 증가하면 세포의 기능이 저하되어 염증이 유발되며, 그 결과 간경화, 간염 등을 초래한다고 보고되었다. Prapar 등(Prapar, 1984)의 연구결과에 의하면 유해산소들은 DNA에도 손상을 주어 돌연변이를 일으킬 수 있고 나아가서는 종양이나 암의 원인이 될수 있다는 사실이 밝혀졌다. 즉 DNA를 직접 공격하거나 이를 공격하는 2차적인 다른 radical인 lipid peroxide radical등을 생성한다.

균체의 용매별 추출물의 실험결과 25°C의 D.W.의 추출물이 가장 높은 소거활성을 나타냈으며 0.5, 1.0 mg/ml의 농도에서 각각 81.34%와 98.51%의 높은 소거활성을 나타냈으며 75°C의 열수추출물을 제외하고 0.5 mg/ml의 농도에서 50%이상의 소거활성을 보였다(Fig. 32). 이의 결과를 통해 Hydrogen peroxide의 소거활성에 관련하는 균체의 대사산물 및 균체성분은 열에 약하다고 사료된다. 분획물의 경우 Diethyl ether의 분획물이 활성이 제일 높았으며 0.1 mg/ml의 저농도에서 71.57%의 높은 활성을 보였다. 이에 Diethyl ether에 포함된 prodigiosin 유사색소가 소거활성이 있을 것이라 추측된다.

배양액의 추출용매에 따른 소거활성을 확인한 결과 acetone, chloroform에서 높은 활성을 보였고 나머지 용매의 추출물은 저조한 소거활성을 나타내었다(Fig. 33). acetone, chloroform의 추출물은 각각 0.5 mg/ml의 농도에서 소거활성이 50%이상을 나타냈으며 chloroform의 추출물의 경우 1.0 mg/ml의 농도에서 92.47%의 높은 활성을 나타내었다. 배양액의 분획물의 소거활성은 비극성 용매층에서 비교적 높은 활성을 보였다(Fig. 33). Diehtyl ether, Chloroform의 비극성용매의 분획물은 0.5 mg/ml의 농도에서 소거활성이 50%이상을 나타냈으며 1.0 mg/ml의 농도에서는 각각 75.33, 79.66%의 비교적 높은 활성을 나타냈다.

이를 종합하여 볼 때 Hydrogen peroxide 소거활성을 지닌 물질은 비극성의 물질일 가능성이 높으며 매우 긍정적인 활성을 나타냈다.

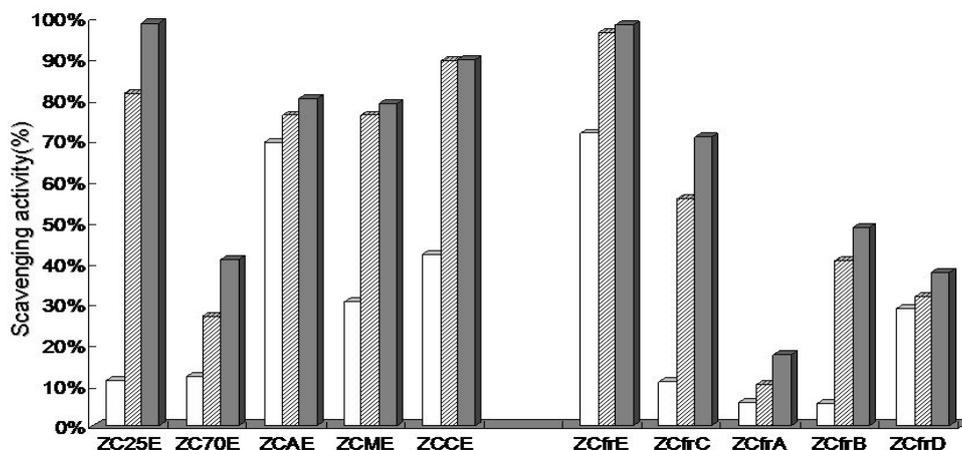


Fig. 32. Hydrogen peroxide scavenging activity of the bacterial cell extracts and fractions from *Zooshikella* sp. CH-34.

□, 0.1mg/ml ▨, 0.5 mg/ml ■, 1.0 mg/ml ; ZC25E: Distilled water extract at 25°C, ZC70E: Distilled water extract at 70°C, ZCAE: Acetone extract, ZCME: 70% methanol extract, ZCCE: chloroform extract. ZCfrE: Diethyl ether extract, ZCfrC: Chloroform extract, ZCfrA: Ethyl acetate extract, ZCfrB: n-butanol extract, ZCfrD: Distilled water extract.

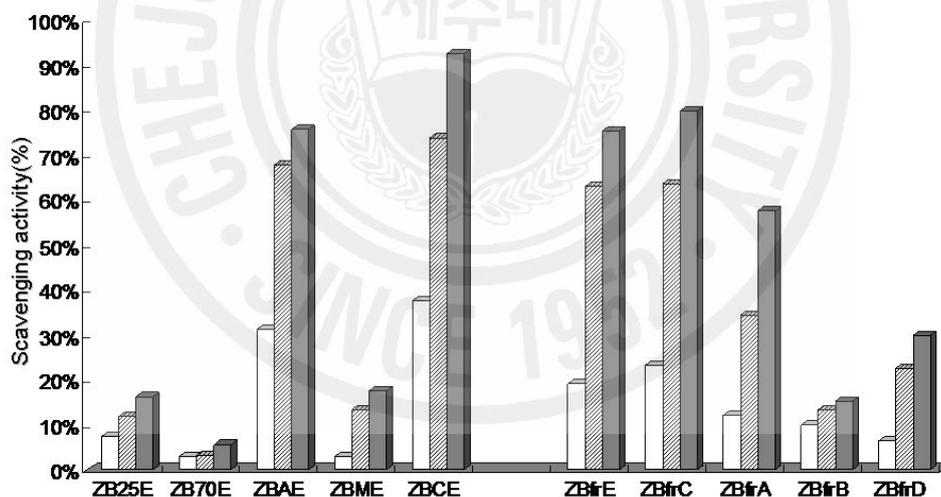


Fig. 33. Hydrogen peroxide scavenging activity of the culture broth extracts and fractions from *Zooshikella* sp. CH-34.

□, 0.1mg/ml ▨, 0.5 mg/ml ■, 1.0 mg/ml ; ZB25E: Distilled water extract at 25°C, ZB70E: Distilled water extract at 70°C, ZBAE: Acetone extract, ZBME: 70% methanol extract, ZBCE: chloroform extract. ZBfrE: Diethyl ether extract, ZBfrC: Chloroform extract, ZBfrA: Ethyl acetate extract, ZBfrB: n-butanol extract, ZBfrD: Distilled water extract.

3-2. 이차대사산물의 항균스펙트럼

항생물질이란 용어는 1945년 Waksman이 “미생물에 의하여 생산되는 화학물질로서, 저농도에서 다른 미생물의 증식을 억제하거나 죽이는 능력을 가진 화학물질” 이라고 최초로 정의를 내린 바에서 그 의미를 찾을 수 있다. 그 후에 다양한 생합성, 반합성 또는 합성물질들이 다양한 생물체에 항생효과를 나타냄이 보고되어 미생물에 국한하여 항생물질을 정의하기가 어렵게 되었다. 일례로, 1972년 Zahner는 항생물질을 생성하는 주체의 면에서는 미생물에서 고등생물까지의 생명체(living organism)로, 항생물질이 작용하는 대상의 관점에서는 미생물뿐만 아니라 기생충, 곤충, 식물, 동물세포, 암세포까지 그 범위를 확대하였다. 광의의 의미에서 항생물질을 정의한다면, ‘항생물질은 미생물이나 다른 생물(조류, 지의류, 녹색식물, 동물세포 등)에서 생산되는 천연의 저분자 물질 또는 이러한 물질의 반합성(semisynthetic) 물질로서 1 mg/ml 이하의 저 농도에서 미생물 등 생장을 억제하거나 사멸시키는 물질“이라 할 수 있을 것이다. 항생물질을 화학적인 특성에서 살펴본다면, 분자량은 150-5,000dalton의 저분자량 유기화합물로 주로 탄소, 수소, 질소, 산소 원자로 구성되어 있으며, 물질에 따라서는 S, P, F, Cl원자를 화학구조 중에 포함하기도 한다. 이들은 분자구조 내에 hydroxyl, carbonyl, amine기 등 특성의 관능기(functional group)를 지니고 있기 때문에 세포의 특정 성분을 이루는 분자와 상호작용을 함으로써 항생(antibiogenesis)효과를 나타낸다.

항생물질은 세계적으로 연간 10만톤 이상이 생산되며, 230억 달러이상의 거래 규모를 이루고 있다. 미국에서만 연간 80억 달러 이상의 시장이 형성되며, cephalosporin(45%), penicillins(15%), quinolones(11%), tetracyclines(6%), macrolide(5%) 등의 항생물질이 생산의 대부분을 차지한다. 이러한 항생물질은 꾸준히 많은 연구자에 의해 발견, 개발되고 있으나 평균적으로 엄청난 개발비용과 시간이 소모되어 감소추이를 보이고 있다. 하지만 내성균주의 생성, 항생제의 비다양성, 효능향상, 부작용감소, 넓은 항생작용의 범위 등의 필요성에 의해 항생제의 개발은 지속적인 연구가 필요하다. 따라서 항생물질로 알려진 prodigiosin을 다량 생산하는 *Zooshikella* sp. JE-34의 이차대사산물의 항균 스펙트럼을 통해 그의 항균특성을 알아보려고 하였다.

1) *Zooshikella* sp. JE-34 supernatant의 항균활성

실험균주인 *Zooshikella* sp. JE-34가 생성하는 이차대사산물의 항균활성을 확인하여 보았다. 그 결과 그람음성, 양성, 진균류에 걸쳐 폭넓은 항균활성을 나타냈으며 결과는 Table. 6과 같다. Supernatant는 *Vibrio*속인 8개의 균주 중 7개의 균주에 대한 항균력이 확인되었다. 그 중 *Vibrio vulnificus*에서 저해환이 크게 나타났으며 *Vibrio harveyi*에 있어서는 항균활성이 나타나지 않았다. 다른 그람음성균인 *Escherichia coli*, *Edward tarda*의 경우 항균력이 미치지 않았다. 항균활성이 나타나지 않은 균주의 경우는 Supernatant의 농도가 낮음에 기인하는 것으로 보이며 disc에 많은 양을 로딩할 경우 저해환이 나타남을 확인하였다(Data not shown).

JE-34의 Supernatant는 그람양성세균 6종에 대하여 강한 항균활성을 보였으며 특히 구균에 강한 활성을 보였다. 이는 prodigiosin이 항구균활성을 가진다는 보고와 일치하는 부분으로 보인다. 특히 *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus iniae*에서는 전혀리 없이 제균만을 한 Supernatant 10 μ l 처리구의 경우 극히 적은 량의 처리만으로도 일정수준의 저해환을 관찰할 수 있어 항생제로서의 이용가능성이 있다고 사료된다. 본 균주들은 각각 여드름 유발균, 치아우식증 유발균, 어류질병 중 널리 알려진 연쇄구균증의 원인균이므로 연구가치가 있다고 생각된다. 또한 진균 2종의 경우 100 μ l 처리구에서 저해환을 형성하여 항진균제로서의 가능성도 가늠할 수 있었다.

본 실험균주들의 항생제의 감수성은 Table 7에 나타내었으며 사용된 항생제는 5종으로 ampicillin, neomycin, penicillin, tetracycline, erythromycin을 사용하였다. *Streptococcus iniae*의 경우 항생제에 견주어도 손색이 없을 정도의 저해환이 관찰되어 본 균주의 supernatant의 경우 특별한 가공과정 없이도 항생물질로 이용가능성이 있다고 사료된다.

Table. 6. Antimicrobial activities of the supernatant of *Zooshikella* sp. JE-34.

Strain	Inhibition zone (mm)			
	100µl	50µl	20µl	10µl
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10	10	9	9
<i>Vibrio alginolyticus</i>	9	9	9	9
<i>Vibrio campbellii</i>	14	10	9	9
<i>Vibrio harveyi</i>	0	0	0	0
Gram negative bacteria <i>Vibrio salmonicida</i>	9	0	0	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	24	22	16	10
<i>Vibrio furnissii</i>	9	9	9	9
<i>Vibrio anguillarum</i>	10	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
<i>Edward tarda</i>	0	0	0	0
Gram positive bacteria <i>Propionibacterium acnes</i>	34	30	25	24
<i>Bacillus subtilis</i>	20	16	10	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	20	16	12
<i>Streptococcus mutans</i>	34	28	24	22
<i>Streptococcus iniae</i>	44	35	27	19
<i>Streptococcus parauberis</i>	24	17	12	9
Fungi <i>Candida albicans</i>	10	0	0	0
<i>Pityrosporum ovale</i>	12	9	0	0

Table. 7. Antibiotics resistance of human, fishes disease bacteria

Strain	Inhibition zone (mm)				
	Am	Ery	Neo	Pe	Tet
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	28	24	0	42
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	23	21	0	32
<i>Vibrio campbellii</i>	0	18	20	0	33
<i>Vibrio harveyi</i>	0	14	21	0	33
Gram negative bacteria <i>Vibrio salmonicida</i>	14	18	32	26	43
<i>Vibrio vulnificus</i>	20	36	35	21	47
<i>Vibrio furnissii</i>	0	18	20	0	19
<i>Vibrio anguillarum</i>	0	19	21	0	31
<i>Escherichia coli</i>	0	14	20	0	26
<i>Edward tarda</i>	0	0	19	0	21
Gram positive bacteria <i>Propionibacterium acnes</i>	39	36	28	45	18
<i>Bacillus subtilis</i>	32	34	27	32	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	32	23	34	34
<i>Streptococcus mutans</i>	38	36	21	43	22
<i>Streptococcus iniae</i>	39	39	0	29	26
<i>Streptococcus parauberis</i>	38	28	8	38	28
Fungi <i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0
<i>Pityrosporum ovale</i>	25	29	23	29	31

Am: ampicillin, Ery: erythromycin, Neo: neomycin, Pe: penicillin, Tet: tetracycline

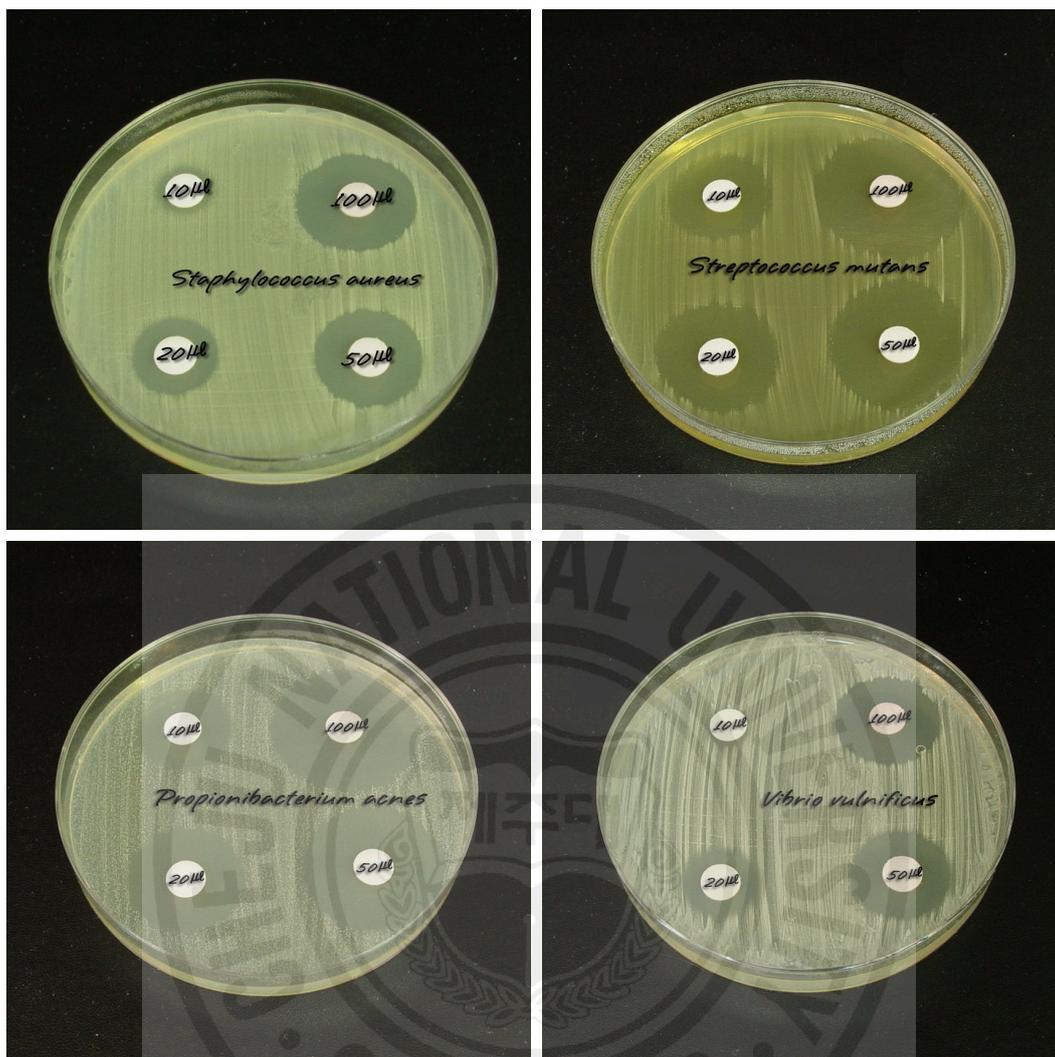


Fig. 34. Antibacterial activity of the supernatant of *Zooshikella* sp. JE-34 against various pathogenic Bacteria.

2) 균체, 배양액의 추출물 및 분획물의 항균활성

Zooshikella sp. JE-34가 생산하는 이차대사산물을 용매별 추출하여 항균활성을 확인하여 Table. 8 에 나타내었다. disc에 loading한 추출물의 양은 건조량이 1mg이 되도록 하였으며 그 결과 폭넓은 항균활성을 보였다. 용매별 추출물의 성향을 살펴 보면 극성인 물을 용매로한 실험구들의 경우 항균활성이 미비한 결과를 보였으나 acetone, methanol, chloroform의 용매에서는 대부분의 균주에서 항균활성을 보였다. 특히 methanol, chloroform의 경우는 강한 항균활성을 보였으며 항생제에 비해 높은 항균활성을 보이는 결과가 다수 관찰되었다.

이는 JE-34가 생성하는 비극성을 띠는 prodigiosin 유사색소에 의한 것이라 생각되며 prodigiosin 계열의 물질이 넓은범위의 항균 스펙트럼을 갖는다는 보고와 상응하는 결과로 보인다. 특히 저해환이 40~60mm로 관찰되었던 균은 *Vibrio campbellii*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Candida albicans*, *Pityrosporum ovale* 이었으며 그람음성, 양성, 진균에 다양하게 강한 항균활성을 나타냈다. 특히 그람양성에 강한 항균활성을 보였다.

이에 따라 분획을 통해 항균활성물질의 일차적인 정제를 하여 항균실험을 실시하였는데 disc에 loading하는 양을 100 μ g으로 하여 항균력을 측정 하였다.

그 결과 대부분의 분획에서는 항균활성이 미비하였지만 Diethyl ether 분획물에서 활성이 나타났다. 이는 역시 광범위한 항균활성을 나타냈으며 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, *Propionibacterium arcnes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Candida albicans*, *Pityrosporum ovale* 에서 강한 항균활성을 나타냈다. 이 분획물은 앞서 HPLC분석을 통해 prodigiosin 유사물질이라 간이 동정한 바 있어 prodigiosin 유사색소의 활성이라 생각된다. 배양액의 추출물과 분획물의 경우도 실험하였으나 비교적 미비한 항균활성을 보였다(Data not shown). 이는 항균활성을 띠는 prodigiosin이 비극성 물질임에 기인한다. 추가적으로 이번과정에서 높은 활성을 보인 methanol, chloroform 추출물과 Diethyl ether분획물의 농도별 항균활성을 측정하여 농도에 따른 저해정도를 가늠하였고 fig. 35로 나타내었다.

Table. 8. Inhibitory effect of strain JE-34 cell extracts(1mg) against the growth of various pathogenic bacteria.

S train	Inhibition zone (mm)				
	ZC25E	ZC70E	ZCAE	ZCME	ZCCE
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9	0	21	48	53
<i>Vibrio alginolyticus</i>	9	9	14	26	24
<i>Vibrio campbellii</i>	0	0	12	42	48
<i>Vibrio harveyi</i>	0	0	10	9	11
Gram negative bacteria <i>Vibrio salmonicida</i>	9	9	11	27	42
<i>Vibrio vulnificus</i>	0	0	12	28	43
<i>Vibrio furnissii</i>	0	0	10	19	22
<i>Vibrio anguillarum</i>	0	0	13	24	51
<i>Escherichia coli</i>	0	0	10	14	10
<i>Edward tarda</i>	0	0	11	13	0
Gram positive bacteria <i>Propionibacterium acnes</i>	0	0	15	20	34
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	11	30	41
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	12	33	48
<i>Streptococcus mutans</i>	10	9	12	38	47
<i>Streptococcus iniae</i>	14	10	24	45	65
<i>Streptococcus parauberis</i>	12	9	19	46	55
Fungi <i>Candida albicans</i>	0	0	12	25	48
<i>Pityrosporum ovale</i>	9	9	11	36	52

ZC25E: Distilled water extract at 25°C, ZC70E: Distilled water extract at 70°C,
ZCAE: Acetone extract, ZCME: 70% methanol extract, ZCCE: chloroform extract.

Table. 9. Inhibitory effect of strain JE-34 cell fractions(100 μ g) against the growth of various pathogenic bacteria.

Strain	Inhibition zone (mm)				
	ZCfrE	ZCfrC	ZCfrA	ZCfrB	ZCfrD
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	41	20	13	0	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	16	9	9	9	9
<i>Vibrio campbellii</i>	27	0	0	0	0
<i>Vibrio harveyi</i>	9	0	0	0	0
Gram negative bacteria <i>Vibrio salmonicida</i>	33	9	0	0	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	34	0	0	0	0
<i>Vibrio furnissii</i>	16	0	0	0	0
<i>Vibrio anguillarum</i>	18	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0
<i>Edward tarda</i>	11	0	0	0	0
Gram positive bacteria <i>Propionibacterium acnes</i>	44	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	47	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	44	9	0	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	43	0	0	0	0
<i>Streptococcus iniae</i>	32	21	14	11	0
<i>Streptococcus parauberis</i>	32	17	9	9	0
Fungi <i>Candida albicans</i>	31	14	0	0	0
<i>Pityrosporum ovale</i>	42	0	0	0	0

ZCfrE: Diethyl ether fraction, ZCfrC: Chloroform fraction,
 ZCfrA: Ethyl acetate fraction, ZCfrB: n-butanol fraction,
 ZCfrD: Distilled water fraction.

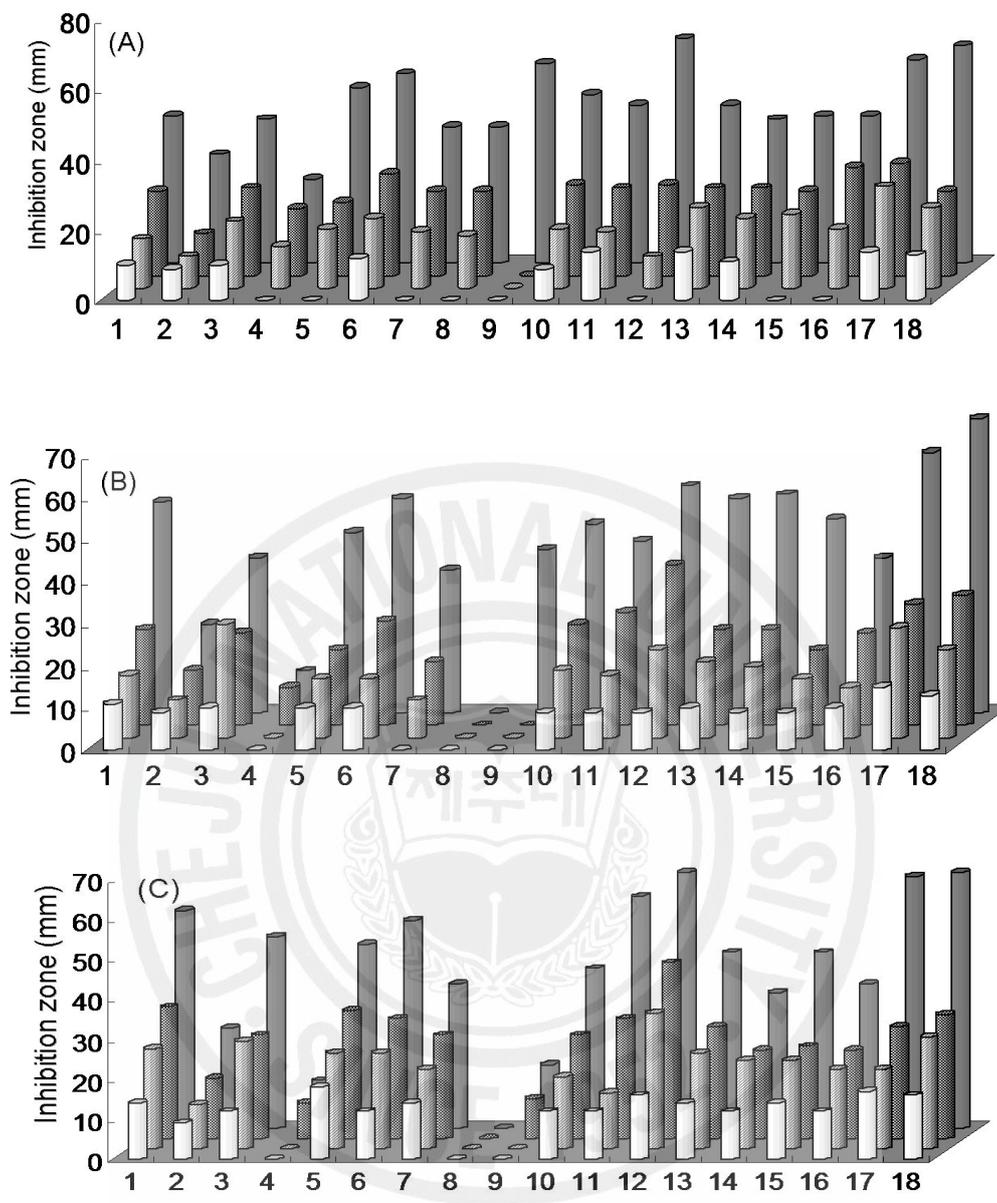


Fig. 35. Inhibitory effect of strain JE-34 cell methanol extract (A), chloroform extract (B), Diethyl ether fraction (C) against the growth of various pathogenic bacteria.

□: 10µg ▨: 50µg ▩: 100µg ■: 1mg

Taxa: 1: *Vibrio parahaemolyticus*, 2: *Vibrio alginolyticus*, 3: *Vibrio campbellii*, 4: *Vibrio harveyi*, 5: *Vibrio salmonicida*, 6: *Vibrio vulnificus*, 7: *Vibrio furnissii*, 8: *Escherichia coli*, 9: *Streptococcus mutans*, 10: *Propionibacterium acnes*, 11: *Bacillus subtilis*, 12: *Pityrosporum ovale*, 13: *Candida albicans*, 14: *Staphylococcus aureus*, 15: *Vibrio anguillarum*, 16: *Edward tarda*, 17: *Streptococcus iniae*, 18: *Streptococcus parauberis*

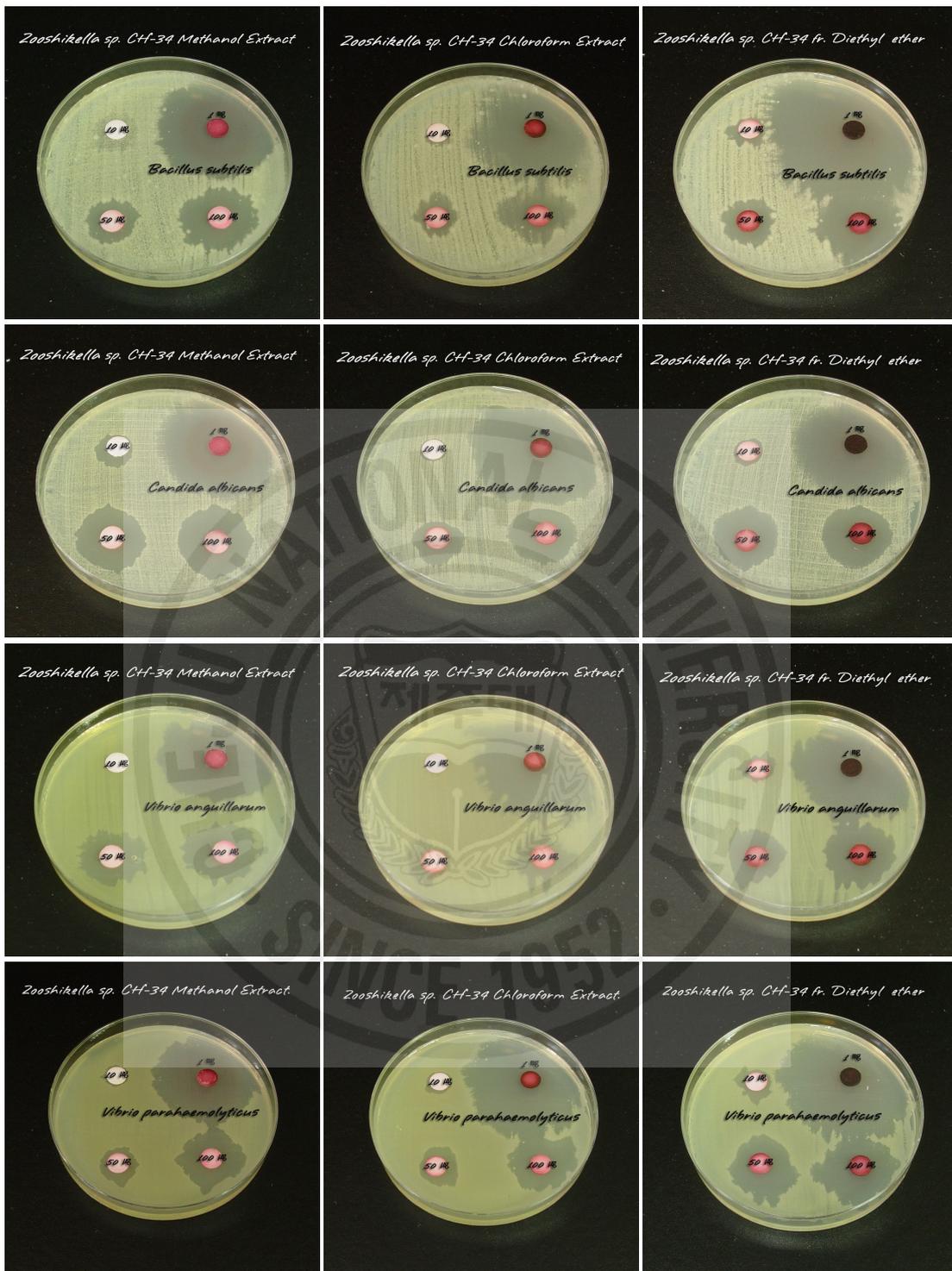


Fig. 36. Antibacterial activity of the extracts and fraction of *Zooshikella* sp. JE-34 against various pathogenic bacteria.

3) *Zooshikella* sp. JE-34 supernatant, 추출물 및 분획물의 최소억제농도

최소억제농도(minimal inhibitory concentration: MIC)는 in vitro상의 실험인 만큼 in vivo상에서 동일조건으로 처리시에 동일한 결과를 도출하기 어렵지만 생물접촉실험의 기반으로 가치가 있다고 사료되어 실시하였다. *Zooshikella* sp. JE-34의 supernatant 및 항균활성이 비교적 우수하였던 methanol 추출물과 Diethyl ether 분획물의 최소성장억제농도의 측정을 통하여 항생제의 대체자로서 가능성을 가늠하고자 측정하였으며 Table. 10으로 나타냈다. 실험 결과 supernatant의 경우 그람양성균에서 1% 미만에서도 90%이상 성장을 억제하는 것으로 나타나 매우 우수한 항균력을 가짐을 알 수 있었고 특히 구강질환의 원인균인 *Streptococcus mutans*에서 0.05%이하에서도 성장을 억제하는 등 구균에서 높은 항균력을 가지는 것으로 나타났다. 진균류, 그람음성균에서도 폭 넓은 항균활성을 보였지만 비교적 고농도에서 억제됨을 확인할 수 있었다. Supernatant의 경우 실험균주의 배양 후 특별한 처리과정 없이 제균만을 통해 얻을 수 있으므로 활용방안 또한 넓고 경제적으로 유리하다고 생각된다.

Methanol 추출물의 경우 과반수이상의 균주에서 항생제의 정의에 입각한 저농도인 1mg/ml 이하의 농도에서 90%이상 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 또한 그람양성균, 진균류에서 비교적 높은 항균력을 보였으며 특히 그람양성균에서 매우 우수한 활성을 나타냈다. 그 중 양식넙치 연쇄구균증의 원인균인 *Streptococcus iniae*에 대하여 미량의 농도인 0.97ug/ml에서도 생육을 저해하는 것으로 나타나 양식넙치의 질병방제에 이용가능성이 높다고 사료된다. Diethyl ether 분획물의 경우 methanol 추출물에 비해 전반적으로 높은 항균력을 보였으며 그람양성균, 진균류에서 비교적 항균활성이 높은 유사한 양상을 보였다.

최근에 천연물을 이용한 미생물 억제 연구는 활발히 이루어지고 있으며 본 실험보다 저농도에서 유해미생물을 저해하는 물질이 다수 밝혀졌다. 하지만 이들의 대부분은 순수물질을 분리하여 측정한 결과로 실험에 사용된 경우로 본 실험의 경우 supernatant 및 추출, 분획물의 경우 순수물질이 아님에도 상당히 높은 항균력을 띄는 것으로 나타나 의의가 있다고 생각된다. 또한 이를 정제과정을 통해 순수물질을 얻는다면 MIC가 더 낮아질 것이라고 사료된다. 따라서 이 실험을 통

해 *Zooshikella* sp. JE-34가 생산하는 주요 대사산물인 prodigiosin-like pigment가 광범위한 천연항균제로서 이용 가능성이 높다고 생각된다.

한편 식용식물이나 동물에서 유래한 천연물에 비하여 미생물유래 천연물의 경우 다양한 활성물질이 발견되었음에도 불구하고 안전성의 원인으로 산업화에는 상당한 시간이 요구된다고 알려져 있다. 이에 본 실험 이외에 zebrafish (*Danio rerio*)의 수정란을 통해 독성평가를 하였으며 그 결과 supernatant의 경우 5% 처리구 이하의 농도에서는 부화 및 생존에 영향을 주지 않았으며 diethyl ether 분획물의 경우 100ppm 이하에서는 영향을 주지 않았다(data not shown). 그 이상의 농도의 처리구의 경우 또한 접종 직후 사망한 개체는 발견되지 않았으며 3일후부터 점차적으로 사망한 개체가 발견되었다. 또한 *Zooshikella* sp. JE-34의 주요대사산물이라 생각되는 prodigiosin의 경우 여러 연구를 통해 임상에 적용가능성을 인정받아 면역억제제, 항암제등의 특허 출원된 바 있어 본 물질의 활용에 있어 가능성이 높다 생각된다. 하지만 strain-specific한 미생물 대사산물의 특성을 고려하여 차 후 생물접촉 실험을 통해 독성평가를 할 예정이다.

Table. 10. Minimal inhibitory concentration of Zooshikella sp. JE-34 supernatant, methanol extract (ZCME) and diethyl ether fraction (ZCfrE) against various pathogenic bacteria.

Strain	MIC (minimal inhibitory concentration)			
	supernatant	ZCME	ZCfrE	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	50%	500ug/ml	250ug/ml	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	25%	500ug/ml	250ug/ml	
<i>Vibrio campbellii</i>	25%	500ug/ml	500ug/ml	
<i>Vibrio harveyi</i>	50%	>1mg	>1mg	
Gram negative bacteria	<i>Vibrio salmonicida</i>	12.5%	500ug/ml	125ug/ml
	<i>Vibrio vulnificus</i>	3.125%	250ug/ml	250ug/ml
	<i>Vibrio furnissii</i>	50%	>1mg	>1mg
	<i>Vibrio anguillarum</i>	6.25%	250ug/ml	62.5ug/ml
	<i>Escherichia coli</i>	>50%	>1mg	>1mg
	<i>Edward tarda</i>	50%	>1mg	>1mg
	Gram positive bacteria	<i>Propionibacterium acnes</i>	0.2%	62.5ug/ml
<i>Bacillus subtilis</i>		0.78%	125ug/ml	31.25ug/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>		0.2%	500ug/ml	125ug/ml
<i>Streptococcus mutans</i>		<0.05%	62.5ug/ml	62.5ug/ml
<i>Streptococcus iniae</i>		0.2%	0.97ug/ml	7.81ug/ml
<i>Streptococcus parauberis</i>		0.1%	31.25ug/ml	15.63ug/ml
Fungi	<i>Candida albicans</i>	12.5%	31.25ug/ml	62.5ug/ml
	<i>Pityrosporum ovale</i>	1.56%	7.81ug/ml	1.95ug/ml

IV. 요약

이 실험은 해양유래의 특이색소미생물을 선별하여 미생물의 특성 및 이차대사산물의 생리활성 탐색을 통해 새로운 생물자원개발에 목표를 가지고 진행하였다.

실험에 사용된 해양유래미생물의 분리지는 동중국해의 양쯔강 하류 근해였으며 그곳의 해양 퇴적층에서 미생물을 분리한 후 특이적으로 적색색소를 생성하는 균주를 발견하였다. 이를 형태학적인 관찰, 16S rDNA 염기서열 분석, 세포지방산 분석, 생화학특성을 탐색하여 동정하였으며 그 결과 특이색소생성 균주는 2003년도에 강화도 갯벌에 분리한 *Zooshikella ganhwensis*와 매우 유사한 특성을 나타내어 *Zooshikella* sp. JE-34라고 명명하였다. 하지만 *Zooshikella*속의 경우 2 strain만이 존재하는 희소균주로서 JE-34의 경우 심도 있는 연구가 요구된다고 사료되어 차 후에 종까지 확실히 명명하도록 하겠다.

JE-34는 특징적으로 적색색소를 다량 생산하는데 이를 분광학적 특성을 통해 prodigiosin 유사색소라고 추측 하였으며 이를 확인하기 위해 prodigiosin의 대표적인 생산자인 *Serratia marcescens*의 색소추출액을 동일조건외의 HPLC 분석을 통해 JE-34가 생산하는 색소가 비슷한 양상을 나타내어 prodigiosin 유사색소라고 사료된다.

prodigiosin의 경우 anti-fungal, anti-bacterial, anti-protozoal, anti-malarial, immunosuppressive and anti-cancer activities 등의 활성을 가지고 있다는 보고에 따라 잠재적인 의약재제로서 가치가 알려져 있어 이를 다량생산하기 위해 배양특성을 탐색하였으며 그 결과 JE-34는 30℃에서 성장이 가장 높았고 pH는 6, NaCl의 경우는 2%의 조건에서 성장이 잘 되었다.

배지 구성에 따른 성장 과 prodigiosin의 생합성의 변화를 알아보기 위해 탄소원, 질소원, 무기염류를 첨가하여 배양한 결과 탄소원으로는 soluble starch, 질소원으로는 malt extract, 무기염류로는 Na₂HPO₄에서 기본배지 조성에서 배양시 보다 확연히 증가되는 추이를 보였다. *Zooshikella* sp. JE-34와 prodigiosin의 생합성에 있어 대표적인 생산자인 *Serratia marcescens*의 생합성량을 비교 하였을 때 기본배지에서는 약 20배 최적배지에서는 30배 가량의 생합성량을 보여 prodigiosin의 생합성의 bioreactor로서 의의가 있다고 사료된다.

추가적으로 JE-34가 생성하는 이차대사산물의 생리활성을 탐색하였으며 항산화활성의 경우 균의 배양액 및 추출물, 분획물에서 DPPH, Alkyl, hydroxyl radical등의 강한 소거활성을 나타내어 prodigiosin 유사색소 혹은 기타 이차대사산물의 항산화제제로서 가능성이 있다고 사료된다. 또한 prodigiosin은 항생제제로서 알려진 바 있어 확인뿐만 아니라 같은 물질이라도 균주마다 다른 물질이 생합성 될 수 있어 18가지의 균주에 대한 항균력을 측정하였다. 그 결과 균체에서 추출된 비극성 물질이 항균작용에 탁월했다고 보인다. 특히 그람양성균에 강한 항균활성을 보였으며 매우 저농도에서도 인체 및 어류질병원인균의 성장을 억제하는 것으로 관찰되어 천연항생물질로서의 이용가능성이 있다고 사료된다.

이러한 결과를 미루어 볼 때 기능성 천연색소제제 혹은 의약제제 등으로 개발이 가능할 것이라 사료되고 차 후 물질 규명, 생합성과정의 연구, 정제, in vivo, 대량 배양실험, 독성평가 등을 통해 좀 더 심도 있는 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 어류질병 원인균에 탁월한 것으로 조사되어 어류질병에 방제 차원으로의 접근 또한 필요하다고 생각된다.

V. 참고 문헌

- Allen, E. G. 1967 Conditions of the colour change of prodigiosin. *Nature* 216: 929-931
- Alonzo, V., Scoglio, M. E. and Mangione, L. 1979 Effect of the carbon/nitrogen ratio on the antibiotic activity of prodigiosin. *G. Bacteriol. Virol. Immun.* 71: 3-15
- Aoyagi, T., M. Ishizuka, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1977 Enzyme inhibitors in relation to cancer therapy. *J. Antibiot.* 30: 121-132.
- Bonar, D. B., R. M. Weiner, and R. R. Colwell. 1986. Microbial-invertebrate interactions and potential for biotechnology. *Microb. Ecol.* 12: 101-110.
- Cho, S. H. and Anderson, J. A. 1982 Pigmentation of *Claviceps* species after on tryptophan media. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 25(3): 155
- 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(4): 475-479.
- Choi, H. J., M. J. Jung and Y. K. Jeong. 2002 Optimization of the production of an immunostimulant from a marine bacterium. *Kor. J. Life Sci.* 12: 759-764.
- Clements, Jewery, S. 1976 The reversal of glucose repressed prodigiosin production in *serratia marcsens* by the cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate inhibitor theophylline. *Biochem. Biophys. Acta.* 15: 421-422.
- Costa, I., Martelli, H. L., da Silva, I. M. and Pomeroy, D. 1978 Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain. *Biotechnol. Lett.* 9(5): 373

- Cross, E. E., B. Halliwell B., E. T. Borish, W. A. Pryor, B. N. Ames, R. L. Saul and J. M. McCord. 1987. Oxygen radicals and human disease (clinical conference). *Ann. Intern. Med.* 107: 526–545.
- Custro, A. J., A. H. Corwin, F. J. Waxham, and A. L. Beilby. 1959 Products from *Serratia marcescens*. *J. Org. Chem.* 24: 455–459.
- D'Alessio, R., Bargiotti, A., Carlini, O., Colotta, F., Ferrari, M., Gnocchi, P., et al. 2000 Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. *J Med Chem* 43: 2557--2565.
- Demain, A.L. 1995 Why do microorganisms produce antimicrobials? In *Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends*. Hunter, P.A., Darby, G.K., and Russell, N.J. (eds). Cambridge: Society for General Microbiology, Symposium 53, pp. 205–228.
- 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.
- Evans, P. and B. Halliwell. 2001 Micronutrients : oxidant/antioxidant status. *British J. Nutr.* 85: S67–S74.
- Faulkner, D.J. 1993. Marine natural product. *Nat. Prod. Rep.* 10: 497–539.
- Fenical, W., 1993. Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource. *Chem. Rev.* 93: 1673–1683.
- Fisher, W. S. 1983. Eggs of *palaemon macrodactylus*: II. Association with aquatic bacteria. *Biol Bull.* 164: 201–213.
- Fowler, M. W. 1983. Production of commercially useful compounds by plant cell culture, pp. 3–38. In S. H. Mantell and H. Smith (eds), *Plant Biotechnology*, Cambridge University Press, London.

- Francis, F. J. 1987. Lesser-known food colorants. *Food technol.* 41(4): 62-68
- Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Han, O. and R. E. Mudgett. 1992. Effect of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentation. *Biotechnol. Prog.* 8: 5-10.
- Hannagata, N., A. Ito, Y. Fukuju, and K. Murata. 1992. Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus Tinctorius* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 44-47
- Hiramoto K, Johkoh H, Sako KI, Kikugawa K. 1993. DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radical Res. Com.* 19: 323-332.
- 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.*
- 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(2): 251-257
- Janzen, E. G., Towner, D. L., Haire, D. L. 1987. Detection of free radical generated from the *in vitro* metabolism of carbon tetrachloride using improved ESR spin trapping techniques. *Free Radical Res Commun.* 3: 357-364.

- 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. *Nucleic Acids Research*, 33(22) : 7066-707
- Kadiiska, M. B., Masom, R. P. 2002. *In vivo* copper-mediate free radical production: an ESR spin-trapping study. *Spectrochim Acta A* 58: 1227-1239.
- Kalesperis G. S., Praflad, K. V. and Lynch, D. L. 1975 Toxigenic studies with the antibiotic pigment from *Serratia marcescans*. *Can. J. Microbiol.* 21: 213-220.
- Kang, S. I., Y. M. Kim, Y. B. Jang, D. J. Lim and J. Y. Kong. 2004 The optimal culture condition for the collagenolytic protease production from *Vibrio vulnificus* CYK279H. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 295-300.
- 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(4): 283-289.
- Kim, D. H. 1988. Food Chemisry, pp. 39-102. Tamgudang, Seoul
- Kim, D. K., Y. K. Park, J. S. Lee, J. H. F. Kim, H. Y. Jeong, B. S. Kim, and C. H. Lee 2006 Analysis of a prodigiosin biosynthetic gene cluster from the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16(12): 1912-1918.
- 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.

- Kim, W. G., J. P. Kim, and I. D. Yoo. 1996. Benzastatin A, B, C and D: New free radical scavengers from *Streptomyces nitrosoreus* 30643. (II) Structure determination. *J. Antibiotics* 49: 26–30.
- Kobayashi, J. and M. Ishibashi. 1993. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem. Rev.* 93: 1753–1771.
- Kreig, N. R. and J. G. Holt. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. ?, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Lauro, G. J. 1991. A primer on natural colors. *Cereal Foods World* 36: 949–953.
- Lee, H. J. and H. J. Lee. 2002 Isolation and characteristics of yellow – pigment producing mutants of *Monascus anka*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30(2): 111–115
- Lee, S. M., H. S. Kim, and T. S. Yu. 2003 The Optimal Condition for Production of Red Pigment by *Monascus anka* on Solid Culture. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32(2): 155–160.
- Lim, D. V., S. M. H. Qadri, C Nichols, and R. P. Willams 1977 Biosynthesis of prodigiosin by nonproliferating wild-type *Serratia marcescens* and mutant deficient in catabolism of alanine, histidine and proline. *J. Bacteriol.* 129: 124–129
- Macfaddin, J. F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Margalith, P. Z. 1992 *Pigment Microbiology*. London: Chapman & Hall.
- Marion M. Bradford 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding *Anal. Biochem.* 72: 248–254

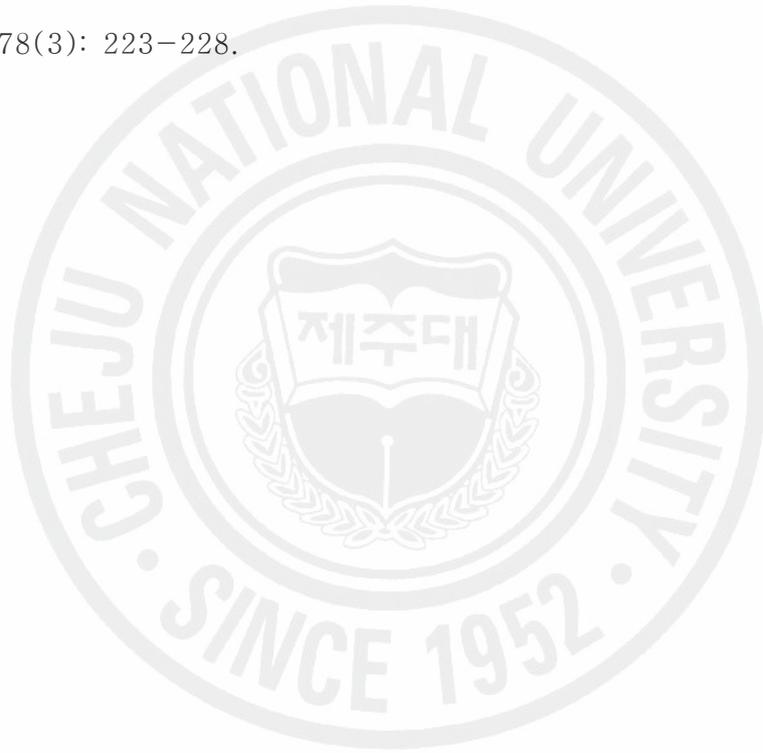
- Matelli, H. L., da Silva, I. M., Souza, N. O. and Pomeory, D. 1990
Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar cane
juice. *Biotechnol. Lett.* 12(3): 207
- McBride, T. J., B. D. Preston and L. A. Loeb. 1991 Mutagenic spectrum
resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry* 30:
207-213.
- Miller, L., and T. Berger. 1985. Bacterial identification by gas
chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett-Packard Application Note
228-241. Hewlett-Packard Co., Avondale, Pa.
- Mo, C. J., K. Shin ya, K. Furihata, A. Shimazu, Y. Hayakawa and H. Seto.
1990. Isolation and structural elucidation of antioxidative agent,
antioestrogens A₁ to A₄ and B₂ to B₅. *J. Antibiotics* 43: 1337-1340.
- Montaner, B., Navarro, S., Pique, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, E.,
et al. 2000 Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens*
induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 131:
585-593.
- Mortellaro, A., Songia, S., Gnocchi, P., Ferrari, M., Fornasiero, C., D'Alessio, R.,
et al. 1999 New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent
proliferation and NF- κ B and AP-1 activation. *J Immunol* 162: 7102-
7109.
- Muller HE. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by
Microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol. Mikrobio.*
Hyg. 259: 151-158.
- Nakamura, H., Y. Iitaka, T. Kitahara, T. Okazaki, and Y. Okami. 1977.
Structure of aplasmomycin. *J. antibiot.* 30: 714-719.

- Nam, H. S. and Rhee, J. S. 1991 Effect of carbon source and carbon to nitrogen ratio on carotenogenesis of *Rhodotorula glutinis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1(1): 75
- Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Bio. Med.* 21:895-902.
- Natarajan, V. and P. K. Kamath. 1995. UV stable pigment: prodigiosin. *Paintindia* 45: 23-33
- Okami, Y. 1982. Potential use of marine microorganisms for antibiotics and enzyme production. *Pure Appl. Chem.* 54: 1951-1962.
- Okami, Y. 1986. Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microb. Ecol.* 12: 65-78.
- Orrenius, S. 1993. Mechanisms of oxidative cell damage, Pp. 47-64. In Poli, G., E. Albano and M. U. Dianzani(ed.), *Free radicals: From basic science to medicine*, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Pathirana, C., P. R. Jensen, and W. Fenical. 1992. Marinone and debromomarinone: antibiotic sesquiterpenoid naphthoquinones of a new structure class from a marine bacterium. *Tetrahedron Lett.* 33: 7663-7666.
- Prapar, H. D. and Bird, R. P. 1984. *J. Agric. food Chem.* 32: 433
- Qadri, S. M. H. and R. P. Williams. 1973 Role of methionine in biosynthesis of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 116: 1191-1198.
- Qadri, S. M. H. and Williams, R. P. 1974 Incorporation of amino acid carbon into prodigiosin synthesized by nonproliferating cells of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 20: 461-468.

- Rosen GM, Rauckman EJ. 1984. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. In L. Packer (Ed.) *Methods in enzymology*, vol105. Academic Press, Orlando, FL. pp 198–209.
- Sato, K., T. Okazaki, K. Maeda, and Y. Okami. 1978. New antibiotics, aplasmomycins B and C. *J. Antibiot.* 31: 632–635.
- Scott, R. H., S. M. H. Qadi, and R. P. Williams. 1976 Role of L-proline in the biosynthesis of prodigiosin. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 561–566.
- Slater, H., Crow, M., Everson, L., and Salmond, G.P. 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.
- Sole, M., Rius, N., Francia, A., and Loren, J.G. 1994 The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Lett Appl Microbiol* 19: 341–344.
- Solie, M., Rius, N., Francia, A. and Loren, J. G. 1994 The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Lett. in Appl. Microbiol.* 19: 341–344.
- 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(2):157–161.
- Stierle, D. B. and A. A. Stierle. 1992. Pseudomonic acid derivatives from a marine bacterium *Experientia* 48: 1165–1169.
- 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.

- Tapiolas, D. M., M. Roman, W. Fenical, T. J. Stout, and J. Clardy. 1991. Octalactins A and B: cytotoxic eight-membered ring lactones from a marine bacterium *Streptomyces* sp. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 4682–4683
- Tsuji, R.F., Magae, J., Yamashita, M., Nagai, K., and Yamasaki, M. 1992 Immunomodulating properties of prodigiosin 25-C, an antibiotic which preferentially suppresses induction of cytotoxic T cells. *J Antibiot (Tokyo)* 45: 1295–1302.
- Tsuji, R.F., Yamamoto, M., Nakamura, A., Kataoka, T., Magae, J., Nagai, K., and Yamasaki, M. 1990 Selective immunosuppression of prodigiosin 25-C and FK506 in the murine immune system. *J Antibiot (Tokyo)* 43: 1293–1301.
- Wasserman, H. H., Sykes, R. J., Peverada, P. P., Shaw, C. K., Cushley, R. J. and Lipsky, S. R. 1973 Biosynthesis of prodigiosin Incorporation patterns of ¹³C-labeled alanine, proline, glycine, and serine elucidated by Fourier transform nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* 95: 6874–6875.
- Williams, R. P., Gott, C. I., Qadri, S. M., and Scott, R. H. 1971 Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 106: 438–443.
- Williams, R.P., and Quadri, S.M. 1980 The pigments of *Serratia*. In *The Genus Serratia*. Von Graevenitz, A., and Rubin, S.J. (eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 31–75.
- Williams, R.P., and Quadri, S.M. 1980 The pigments of *Serratia*. In *The Genus Serratia*. Von Graevenitz, A., and Rubin, S.J. (eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 31–75.
- Witney, F. R., Failla, M. L. and Weinberg, E. D. 1977 Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1042–1046.

- Yang, I. Y. and S. O. Hwang. 1995 Isolation and identification of *Serratia marcescens* strain US50-3 producing water soluble red pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 777-780.
- Yi H, Chang YH, Oh HW, Bae KS, Chun J. 2003 *Zooshikella ganghwensis* gen. nov., sp. nov., isolated from tidal flat sediments. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53(4) : 1013-1018.
- Yongsmith, B., S. Krairak, and R. Bavavoda. 1994. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* sp. *J. Ferment Bioeng.* 78(3): 223-228.



감사의 글

구체적인 목표가 있는 사람은, 조금 돌아가더라도 확고한 신념과 목표가 있다면 그 꿈을 이룰 수 있지만 그 꿈을 이루기 위해서는 그 길을 올바르게 갈 수 있도록 인도해 주는 안내자와 나침반이 필요하다고 생각합니다. 제가 해양미생물 실험실에 들어와서 지금까지 힘들어하고 방황할 때 마다 항상 주변에서 충고와 격려해 주신 모든 분들 덕에 미약하나마 학위논문을 마칠 수 있었던 것 같습니다. 석사과정 2년 동안, 너무나도 부족한 저를 언제나 믿어주시고 기회를 주신 허문수 교수님께 먼저 머리 숙여 마음깊이 감사의 인사를 드리고 싶습니다. 가는 길이 힘들어 포기하고 싶을 때도, 저를 감싸주시고 제게 올바른 길로 갈 수 있도록 지도해 주신 교수님께 더 좋은 결과를 보여 드리지 못한 것 같아 너무나 송구스럽습니다.

그리고 학부과정 부터 흥미를 이끌어 주시고 바쁘신 가운데도 논문을 검토해 주신 이재희 교수님, 전유진 교수님 많은 가르침과 관심을 주신 송춘복 교수님, 여인규 교수님께 깊은 감사드립니다.

대학원생 생활을 하면서 많은 관심과 격려를 아끼지 않으신 진창남 소장님, 고대희 계장님, 실험에 있어 어려워하는 저를 바쁘신 와중에도 관심을 가져 주시며 많은 가르침을 주셨던 강봉조 연구사님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

졸업 후에도 항상 마음 써주시고 격려해 주신 병규형님, 영환이형, 철영이형, 민주, 선경 대학원생활 동안 항상 친동생처럼 아껴주신 영건이형, 만철이형 그리고 항상 고생하는 실험실 후배들 현식, 윤범, 봉근, 민욱, 용재, 동민, 익수, 창현 우리실험실 가족 모두에게 고맙다는 말을 전합니다.

그리고 항상 의지할 수 있어 제일 큰 힘이 되어주고 실험에 관해서도 항상 자기 일처럼 도와주고 고민해 주었던 동기 태원, 경주, 승홍, 송헌, 혜영 그리고 대학 생활동안 함께한 해양자원공학 실험실, 어류분자생리학 실험실, 분자유전학 실험실, 어류유전육종 실험실 선배님, 후배님들과 외국인 유학생들에게도 감사의 마음을 전합니다. 항상 친구 중에 석사하나 생긴다고 농담하며 걱정, 격려, 응원해준 내 친구들에게도 감사드립니다. 마지막으로 항상 철없는 둘째아들을 걱정하시며 저희 형제 뒷바라지 하시느라 고생하시는 아버지, 어머니 그리고 우리 형, 동관이에게 평소에는 말하지 못했지만 항상 감사하다고 말씀드리고 싶습니다.